



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112759650 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 01

(21) 申请号 202110059477.7

(22) 申请日 2015.04.02

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112759650 A

(43) 申请公布日 2021.05.07

(30) 优先权数据
61/974,738 2014.04.03 US

(62) 分案原申请数据
201580018643.1 2015.04.02

(73) 专利权人 IGM生物科学股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 B·基特 L·G·普莱斯塔 F·张
R·巴利加

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

专利代理师 陶家蓉 余颖

(51) Int.Cl.
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 103570821 A, 2014.02.12

审查员 陈茹

权利要求书1页 说明书28页
序列表45页 附图16页

(54) 发明名称
修饰的J链

(57) 摘要
本发明涉及修饰的重组J链多肽、结合分子，
如包含其的抗体；及其用途。

1. 一种二聚IgA抗体,该二聚IgA抗体包含两个IgA单体和修饰的J链,其中所述修饰的J链在C或N末端处包含引入J链序列中的外来结合部分,且其中每个IgA单体包含两条IgA重链,外来结合部分是 scFv。

2. 如权利要求1所述的二聚IgA抗体,其中所述J链是SEQ ID NO:1的天然人J链序列。

3. 如权利要求1所述的二聚IgA抗体,其中所述外来结合部分通过肽接头直接融合被引入J链序列中。

4. 如权利要求3所述的二聚IgA抗体,其中所述肽接头为10至20个氨基酸长。

5. 如权利要求4所述的二聚IgA抗体,其中所述肽接头为15个氨基酸长。

6. 如权利要求1所述的二聚IgA抗体,其中所述scFv结合至效应细胞,所述效应细胞选自以下组成的组:T细胞、天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞及嗜中性粒细胞。

7. 如权利要求6所述的二聚IgA抗体,其中所述效应细胞是T细胞。

8. 如权利要求7所述的二聚IgA抗体,其中所述scFv结合至所述T细胞上的CD3 ϵ 。

9. 如权利要求6所述的二聚IgA抗体,其中所述效应细胞是NK细胞。

10. 如权利要求9所述的二聚IgA抗体,其中所述scFv结合至所述NK细胞上的CD16、CD64或NKG2D。

11. 如权利要求6所述的二聚IgA抗体,其中所述效应细胞是巨噬细胞。

12. 如权利要求11所述的二聚IgA抗体,其中所述scFv结合至巨噬细胞上的CD14。

13. 如权利要求6所述的二聚IgA抗体,其中所述效应细胞是嗜中性粒细胞。

14. 如权利要求13所述的二聚IgA抗体,其中所述scFv结合至嗜中性粒细胞上的CD16b或CD177。

15. 如权利要求1所述的二聚IgA抗体,其中每个IgA重链恒定区包括Ca1结构域、Ca2结构域和Ca3结构域。

16. 如权利要求1所述的二聚IgA抗体,其中每个IgA单体还包含两条轻链,所述轻链其与两条IgA重链结合,每条轻链包含一个轻链可变域及一个轻链恒定区。

17. 一种组合物,其包含如权利要求1至16中任一项所述的二聚IgA抗体。

18. 如权利要求17所述的组合物,其为药物组合物,另外包含药学上可接受的载体。

修饰的J链

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年4月3日提交的美国临时申请序列号 61/974,738的优先权和权益,其内容以引用的方式整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及修饰的重组J链多肽与结合分子,如包含其的抗体。

发明背景

[0004] J链是酸性15-kDa多肽,其经由二硫键与五聚IgM和二聚IgA 相连,所述二硫键包括在IgM μ 或IgA α 重链的C末端处18-氨基酸分泌尾段(tp)中的倒数第二个半胱氨酸残基。在Cys 12与100、Cys 71 与91、和Cys 108与133之间分别形成三个二硫桥。参见,例如Frutiger 等人1992,Biochemistry 31,12643-12647。用于将J链并入到人类IgM 和IgA中且用于聚合免疫球蛋白组装并与J链相连的结构要求分别由 Sorensen等人2000, Int.Immunol.12(1):19-27和Yoo等人1999,J. Biol.Chem.274(47):33771-33777报道。可溶性J链在大肠杆菌中的重组产生是由Redwan等人2006,Human Antibodies 15:95-102报道。

[0005] 用于制造杂合IgA/IgG和IgM/IgG抗体的方法在本领域中是已知的。因此,杂合IgA2/IgG1抗体的重组产生在Chintalacharuvu等人 2001,Clin Immunol 101(1):21-31中报道。据报道, α tp或 μ tp在IgG γ 重链的末端处的加入促进聚合并提高效应子功能,如补体激活(Smith 等人,J Immunol 1995,154:2226-2236)。IgA/IgG杂合抗体具有IgA和 IgG两者的特性。

[0006] 尽管在抗体的设计中取得了进步,但仍然需要具有改进特性如改进的亲合力、特异性和/或亲合力的修饰抗体。

[0007] 随着本领域的进展,抗体功能已通过蛋白质工程的创造性手段得到提高,从而提供更高的亲合力、更长的半衰期和/或更佳的组织分布,并且通过小分子和大分子技术的组合经由毒性有效负载递送(例如抗体-药物缀合物)增强细胞破坏的集中。改善抗体功能的另一种方法利用免疫球蛋白(IgG)结构的二价结合,这允许一个IgG分子结合两种抗原。实际上,在某些应用中,不对称抗体存在良好的潜力来通过同时结合两种不同的靶抗原发挥有效功能。为了解决这个需要,已制造多种构建体来产生可结合两种不同抗原的单分子,从而允许在自然界中从未见过的功能。此双特异性方法的一个实例是“blinatumomab”(MT103或AMG103),其分别结合T细胞和B细胞上的CD3和CD19受体。细胞毒性T细胞与癌性B细胞的此连接允许对B细胞白血病的有效治疗。

[0008] 然而,在双特异性抗体的构建、表达和产生中仍存在相当大的技术难度。尽管双特异性抗体由于其同时结合两种不同抗原的能力而被认为是有前景的治疗剂,但其功用因稳定性和制造复杂性的问题而受到限制。

[0009] 各种形式的蛋白质工程已被用于匹配异源重链,加上重链和轻链的适当成对匹配

以有效地产生双特异性IgG。另外,各种双特异性抗体形式,包括四源杂交瘤、化学异缀合物、使用所选异源二聚化结构域的重组构建体以及由两个最小抗原结合位点组成的最小尺寸的重组构建体。

[0010] 然而,所有这些努力都充满着困难。

[0011] 因此,尽管致力于开发工程化的、如双特异性抗体,但仍然非常需要开发更有效的平台。这在治疗性抗体的情况下尤其正确,其中具有多重特异性的新型修饰的抗体和抗体样分子的设计和产生可缩短所述治疗剂的发现与临床引入之间的时间线。

发明内容

[0012] 本发明至少部分是基于以下认识: IgM或IgA抗体的J链可通过将一个或多个结合部分引入天然的J链序列中来修饰,并且修饰的J链可被引入IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体中,而不会损害受体抗体的功能性或修饰的J链与其靶标的结合。这允许具有结合部分的修饰的J链与一组靶抗原相互作用,而IgA、IgM、IgG/IgM或 IgG/IgA抗体可与不同的靶抗原组反应。

[0013] 本发明进一步基于以下认识:通过将修饰的J链导向效应细胞,如T细胞、NK细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞,身体的免疫应答可被激活,并且抗体依赖性细胞毒性(ADCC)应答可得以提高。

[0014] 一方面,本发明涉及一种修饰的J链,其包含引入天然序列J链中的外来结合部分。

[0015] 在一个实施方案中,天然序列J链是SEQ ID NO:1的天然人J链序列或其功能片段。

[0016] 在另一实施方案中,外来结合部分通过直接或间接融合被引入 SEQ ID NO:1的天然人J链序列中。

[0017] 在又一实施方案中,结合部分通过经由肽接头的间接融合被引入。

[0018] 在一个实施方案中,间接融合是经由在结合部分的C和/或N末端处或附近的肽接头完成。

[0019] 在另一实施方案中,外来结合部分被引入C末端和/或N末端处或附近的SEQ ID NO:1的天然人J链序列中,如距离C末端和/或N末端大约10个残基内。

[0020] 在又一实施方案中,外来结合部分被引入SEQ ID NO:1的天然人J链序列中的半胱氨酸残基92与101之间。

[0021] 在又一实施方案中,外来结合部分在糖基化位点处或附近被引入 SEQ ID NO:1的天然人J链序列中。

[0022] 肽接头如果存在的话,其长度可为例如约10至20个氨基酸、或约15至20个氨基酸、或15个氨基酸。

[0023] 在又一实施方案中,外来结合部分通过化学或化学酶促衍生化被引入SEQ ID NO:1的天然人J链序列中。化学接头可以是可裂解的或非可裂解的接头,其中可裂解的接头可为例如化学上不稳定接头或酶不稳定接头。

[0024] 在又一实施方案中,所述接头选自自由以下组成的组: N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(SPP)、亚氨基四氢噻吩(IT)、亚氨酸酯

的双官能衍生物、活性酯、醛、双叠氮基化合物、双重氮衍生物、二异氰酸酯、以及双活性氟化合物。

[0025] 在一个不同的实施方案中,J链是通过插入酶识别位点并且通过将外来结合部分经由肽或非肽接头翻译后连接于酶识别位点来修饰。

[0026] 在所有实施方案中,外来结合部分可例如选自由以下组成的组:抗体、抗体的抗原结合片段、抗体-药物缀合物、抗体样分子、抗体样分子的抗原结合片段、可溶性和膜结合蛋白、配体、受体、病毒样颗粒、蛋白毒素、酶、以及替代支架。替代支架的实例包括darpin、纤连蛋白结构域、adnectin及knottin。典型的抗原结合片段包括 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 $scFv$ 及单结构域抗体。在一个优选实施方案中,抗原结合片段是 $scFv$ 。

[0027] 在一个实施方案中,修饰的J链的外来结合部分结合至效应细胞,其中所述效应细胞可例如选自由以下组成的组:T细胞、天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞及嗜中性粒细胞。

[0028] 在一个实施方案中,效应细胞是T细胞,其中外来结合部分可例如结合至T细胞上的 $CD3\epsilon$ 。

[0029] 在另一实施方案中,效应细胞是NK细胞,其中修饰的J链的外来结合部分的靶标可例如选自由以下组成的组:NK细胞上的 $CD16$ 、 $CD64$ 及 $NKG2D$ 。

[0030] 在又一实施方案中,效应细胞是巨噬细胞,其中修饰的J链的外来结合部分可例如结合至巨噬细胞上的 $CD14$ 。

[0031] 在又一实施方案中,效应细胞是嗜中性粒细胞,其中修饰的J链的外来结合部分可例如结合至嗜中性粒细胞上的 $CD16b$ 或 $CD177$ 。

[0032] 另一方面,本发明涉及一种包含如上所述的修饰的J链的抗体、或所述抗体的抗原结合片段。所述抗体可为IgM、IgA、IgG/IgM或 IgG/IgA抗体,并且包括多特异性,例如双特异性抗体。

[0033] 在一个实施方案中,所述抗体是包含尾段的IgM抗体、IgA抗体或IgG抗体、或其抗原结合片段。

[0034] 在另一实施方案中,抗体具有对选自由以下组成的组的一个或多个结合靶标的结合特异性:靶细胞、可溶性结合靶标、细胞表面受体、基质蛋白、转运受体。

[0035] 在又一实施方案中,抗体结合至肿瘤细胞。

[0036] 在又一实施方案中,抗体结合至图19中所列的肿瘤靶标相关抗原,其中J链可例如被修饰以结合图19中所列的任何效应细胞靶标。

[0037] 在又一些实施方案中,修饰的J链以V-接头-J取向或J-接头-V取向存在于抗体中。

[0038] 在一个实施方案中,所述肿瘤是血液癌症或实体肿瘤,其中血液癌症可为例如白血病、淋巴瘤、骨髓瘤及骨髓增生异常综合征,尤其包括急性骨髓性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、慢性髓性白血病或慢性淋巴细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤及非何杰金氏淋巴瘤。在这类实施方案中,所述抗体可例如结合至以下中的一个或多个: $CD11c$ 、 $CD19$ 、 $CD20$ 、 $CD22$ 、 $CD33$ 、 $CD70$ 、 $CD56$ 、 $CD138$,并且修饰的J链可结合至 $CD3\epsilon$ 。

[0039] 在另一实施方案中,肿瘤是上皮肿瘤。

[0040] 在又一实施方案中,抗体结合至肿瘤上的基于碳水化合物的靶标。

[0041] 在又一实施方案中,抗体结合至病毒抗原,如HBV抗原或HIV 抗原,例如PreS1或

GP120。

[0042] 又一方面,本发明涉及一种组合物,其包含含有如所述的修饰的 J链的IgM、IgA、IgG/IgM、IgG/IgA抗体。所述组合物可为例如药物组合物或诊断组合物。

[0043] 又一方面,本发明涉及一种治疗肿瘤或病毒性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的具有如本文所述的修饰的J链的 IgM、IgA、IgG/IgM、IgG/IgA抗体。

[0044] 另一方面,本发明涉及具有如本文所述的修饰的J链的IgM、IgA、IgG/IgM、IgG/IgA抗体在制备供治疗肿瘤或病毒性疾病用的药剂中的用途。

[0045] 又一方面,本发明涉及具有如本文所述的修饰的J链的IgM、IgA、IgG/IgM、IgG/IgA抗体在治疗肿瘤或病毒性疾病中的用途。

附图简述

[0046] 图1示出了包含J链的IgM五聚物的结构,其中链A和B在天然的IgM中是相同的。

[0047] 图2示出了IgA、二聚IgA及分泌型IgA(sIgA)的示意性结构。

[0048] 图3示出了成熟的人J链(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列。

[0049] 图4示出了成熟的人J链(SEQ ID NO:1)与来自各种动物物种的 J链(SEQ ID No:1至44)的比对。

[0050] Hum=人类NP_653247 23-159(SEQ ID NO:1)

[0051] Chm=黑猩猩XP_001160135 39-175(SEQ ID NO:2)

[0052] Gor=大猩猩XP_004038830 23-159(SEQ ID NO:3)

[0053] Ora=猩猩NP_001125381 23-159(SEQ ID NO:4)

[0054] Gib=长臂猿XP_003265761 39-175(SEQ ID NO:5)

[0055] Mar=狨猴XP_003732538 32-168(SEQ ID NO:6)

[0056] Cyn=食蟹猴NP_001247815 23-159(SEQ ID NO:7)

[0057] Bab=狒狒XP_003898844 23-159(SEQ ID NO:8)

[0058] Squ=松鼠猴XP_003931978 23-159(SEQ ID NO:9)

[0059] Shr=树鼩XP_006142955 25-160(SEQ ID NO:10)

[0060] Dol=海豚XP_004328961 25-158(SEQ ID NO:11)

[0061] Kil=虎鲸XP_004283629 25-158(SEQ ID NO:12)

[0062] Ele=大象XP_003414110 25-158(SEQ ID NO:13)

[0063] Sea=海豹XP_006729388 25-158(SEQ ID NO:14)

[0064] Rhi=犀牛XP_004419202 25-157(SEQ ID NO:15)

[0065] Cat=屋猫XP_003985350 25-158(SEQ ID NO:16)

[0066] Wol=狼XP_532398 26-159(SEQ ID NO:17)

[0067] Pan=大熊猫EFB23253 1-134(SEQ ID NO:18)

[0068] Fer=雪貂XP_004766376 26-158(SEQ ID NO:19)

[0069] Hor=马NP_001271464 25-158(SEQ ID NO:20)

[0070] Gui=豚鼠NP_001265705 25-160(SEQ ID NO:21)

[0071] Cam=骆驼XP_006188738 25-158(SEQ ID NO:22)

[0072] Goa=山羊XP_005681786 25-158(SEQ ID NO:23)

- [0073] Chn=灰鼠XP_005392838 94-229(SEQ ID NO:24)
- [0074] Ham=仓鼠XP_005068228 24-160(SEQ ID NO:25)
- [0075] She=绵羊XP_004009937 25-158(SEQ ID NO:26)
- [0076] BBa=棕蝠XP_006094475 25-158(SEQ ID NO:27)
- [0077] Ant=羚羊XP_005983836 25-158(SEQ ID NO:28)
- [0078] Cow=母牛NP_786967 25-157(SEQ ID NO:29)
- [0079] Mou=小鼠NP_690052 23-159(SEQ ID NO:30)
- [0080] Rat=大鼠EDL88516 23-159(SEQ ID NO:31)
- [0081] Hed=刺猬XP_004703237 25-157(SEQ ID NO:32)
- [0082] Rab=兔P23108 1-136(SEQ ID NO:33)
- [0083] Opo=负鼠XP_003341415 29-162(SEQ ID NO:34)
- [0084] All=短吻鳄XP_006270094 26-159(SEQ ID NO:35)
- [0085] Tur=龟XP_005304167 26-159(SEQ ID NO:36)
- [0086] Tas=塔斯马尼亚恶魔XP_003772863 27-160(SEQ ID NO:37)
- [0087] Pla=鸭嘴兽XP_003430954 36-160(SEQ ID NO:38)
- [0088] Par=长尾小鹦鹉XP_005142787 28-160(SEQ ID NO:39)
- [0089] Duc=鸭XP_005031370 28-160(SEQ ID NO:40)
- [0090] Chi=鸡NP_989594 26-158(SEQ ID NO:41)
- [0091] Tur=火鸡XP_003205717 27-159(SEQ ID NO:42)
- [0092] Fal=猎鹰XP_005243236 29-160(SEQ ID NO:43)
- [0093] Spa=麻雀XP_005492217 29-158(SEQ ID NO:44)
- [0094] 图5示出了人类和蝙蝠(黑狐蝠, *Pteropus alecto*) J链氨基酸序列 (分别是SEQ ID NO:1和45)的氨基酸序列的比对。
- [0095] 图6:缺乏其J链的IgM抗体(阴性对照)和包含J链的IgM是在还原SDS PAGE上分离并通过蛋白质印迹使用抗J链抗体来检测。抗 J链抗体仅与包含J链的IgM反应。
- [0096] 图7:从转染的CHO细胞收获的上清液被均分来用抗mu或抗 myc亲和力基质进行免疫沉淀。这些CHO细胞表达具有抗B细胞特异性的IgM,被称为CDIM(是指细胞死亡诱导分子)。此IgM抗体被称为IGM-55.5。将免疫沉淀的蛋白在还原SDS PAGE上分离并通过蛋白质印迹使用抗J或抗myc抗体来检测。N末端标记的抗CD3scFvJ 和C末端标记的J抗CD3scFv转染的细胞呈现大约51kD的阳性条带,其对抗J和抗myc两种抗体有反应。
- [0097] 图8示出了包含具有对T细胞(T细胞抗原CD3)的结合特异性的修饰的J链的双特异性IgM五聚物的两种不同取向。
- [0098] 图9:在C末端包含J链的抗CD3单链Fv(抗CD3scFv-J)的序列 (SEQ ID NO:46)和结构。SP=信号肽。
- [0099] 图10:在N末端包含J链的抗CD3单链Fv(J-抗CD3scFv)的序列 (SEQ ID NO:47)和结构。SP=信号肽。
- [0100] 图11是对靶抗原具有结合特异性的不对称双特异性IgM五聚物的示意图,其包含共价地连接于对效应细胞具有结合特异性的J链的结合结构域。
- [0101] 图12示出了具有用CD3 scFv结合结构域共价修饰的J链的抗 CD20 IgM五聚物的

蛋白质印迹。用考马斯蓝染色的非还原PAGE观察IgM的全尺寸:大约1百万道尔顿MW。修饰的J链以如下两种取向并入IgM五聚物中:CD3-J和J-CD3。

[0102] 图13示出了具有提供对CD3的结合特异性的修饰的J链(CD3_J) 的双特异性抗CD20 IgM(CD20_{IgM}) 的重链(HC)、轻链(LC) 及修饰的J链的瞬时共转染的结果。

[0103] 图14显示修饰的J链向抗CD20 IgM中的并入对CDC活性没有负面影响。另外,数据显示以任一种取向(V15J或J15V,其中“15”表示接头的长度) 包含修饰的J链的IgM分子比抗CD20 IgG抗体明显更有效。

[0104] 图15显示双特异性CD20_{IgM} x CD3_{J-链}分子在B细胞消耗方面高度有效,这是由于因修饰的J链的CD3特异性所致的B细胞的活化的T细胞杀伤。将Raji,即CD19+CD20+B细胞系,与具有CD20 IgM x J野生型或CD20 IgM x CD3-J链的T-ALL(CD8+溶细胞T细胞系) 在37度、5%CO2下共培养24小时。收获细胞并用对CD3和CD19 的荧光抗体染色并且通过流式细胞术分析以评价存活的B细胞。

[0105] 图16显示含有提供对CD3的结合特异性的修饰的J链的双特异性抗CD20 IgM分子具有明显优于含有野生型J链的抗CD20 IgM五聚物的改善的细胞毒性。T细胞结合的双特异性IgM五聚物在1ng/ml 的浓度下是有效的,并且是含有野生型J链的抗CD20 IgM有效性的300倍。

[0106] 图17示出了在抗CD20 IgG、IgM及双特异性IgM下的体内B 细胞消耗。购买用人CD34+干细胞重建的人源化NSG小鼠(Jackson Laboratory;库存号:007799) 并且分析全血中的CD19+B细胞的给药前水平。制备CD20 IgM x CD3-J链用于以0.5mg/kg静脉内给予动物。在给药后6小时之后,从动物获得全血并且通过流式细胞术使用荧光标记的CD19+抗体分析人B细胞的循环水平。

[0107] 图18是CD16特异性Vhh骆驼科J链的蛋白质印迹。

[0108] 图19列出了修饰的J链的IgM抗体靶标和效应细胞靶标。在表的左列中列出的任何IgM抗体靶标可与右列中列出的任何修饰的J链靶标组合。

发明详述

[0109] I. 定义

[0110] 在更详细地描述本发明前,应理解本发明不限于所描述的具体实施方案,因为这些实施方案当然可以变化。还应该理解,本文所用的术语仅仅是为了描述具体的实施方案,并不意味着限制,因为本发明的范围只受所附权利要求书的限制。

[0111] 当提供一个数值范围时,应该理解的是介于该范围的上下限间的每一个中间值(除非文中另外清楚地指出,否则所述中间值是下限单位的十分之一) 和任何其他所说明的或者在所说明的范围中的中间值都被包括在本发明内。这些较小范围的上下限可独立地被包括在该较小的范围中,且在所说明范围内明确地排除极限值的条件下也被包括在本发明内。

[0112] 除非另外定义,否则本文所用的技术和科学术语都具有本发明相关领域的普通技术人员通常理解的含义。Singleton等人, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology第2版, J.Wiley&Sons (New York, NY 1994), 为本领域技术人员提供在本申请中使用的许多术语的一般指导。

[0113] 本文所提及的全部出版物以引用的方式清楚地并入本文,从而公开和描述了与出版物所引用的内容相关的方法和/或材料。

[0114] 术语“抗体”包括单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、单链分子以及抗体片段(例如Fab、F(ab')₂及Fv)。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中与“抗体”可互换使用。基本4链抗体单位是由两个相同轻(L)链和两个相同重(H)链构成的杂四聚糖蛋白。除非另外指示,术语“抗体”在本文中以广义使用并且具体地包括抗体的所有同种型、亚类及形式,包括IgG、IgM、IgA、IgD、及IgE和其片段,优选是抗原结合片段。本文优选的抗体包括IgM和IgA抗体及其抗原结合片段,其可被修饰以包括来自其他同种型如IgG的序列,以便产生嵌合抗体。

[0115] 在IgG的情况下,4-链单位通常是约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键与H链连接,而两条H链通过一个或多个二硫键(取决于H链同种型)彼此连接。每条H和L链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条H链在N末端处具有可变结构域(V_H),对于每条α和γ链继之以三个恒定结构域(C_H)且对于μ和ε同种型继之以四个C_H结构域。每条L链在N末端处具有可变结构域(V_L),在其另一端处继之以恒定结构域。V_L与V_H对齐且C_L与重链(C_H)的首个恒定结构域对齐。据信特定的氨基酸残基在轻链与重链可变结构域之间形成界面。成对的V_H与V_L一起形成单个抗原结合位点。

[0116] IgM是形成聚合物的糖蛋白,其中多重免疫球蛋白连同二硫键一起共价连接。IgM大多数作为五聚物存在,但也可作为六聚物存在,且因此含有10或12个抗原结合位点。五聚形式通常含有一个另外的多肽,称为J链,但也可在J链不存在下制得。五聚IgM分子具有大约970kDa的分子量。由于其聚合性质,IgM具有高亲合力且在补体激活中尤其有效。不同于在IgG中,IgM单体中的重链由一个可变结构域和四个恒定结构域构成。IgM恒定结构域在本文中表示为CM1或Cμ1、CM2或Cμ2、CM3或Cμ3、以及CM4或Cμ4,其中“CM”和“Cμ”名称可互换使用。IgM五聚物的结构示于图1中。

[0117] 术语“IgM”在本文中以广义使用且具体地包括单和多特异性(包括双特异性)IgM分子,例如像PCT申请号PCT/US2014/054079中公开的多特异性IgM结合分子,其全部公开内容以引用的方式清楚地并入本文。

[0118] 术语“IgM结合单位”或“IgM抗体结合单位”是以广义使用且具体地包括IgM抗体重链恒定区多肽,其包含至少一个CM4恒定结构域,融合至与靶标(例如抗原)结合的可变结构域序列(V_H),有或没有相关抗体轻链可变结构域(V_L)序列。

[0119] 术语“双特异性IgM结合单位”或“双特异性IgM抗体结合单位”是以广义使用且具体地包括一对IgM抗体重链恒定区多肽,其包含至少一个融合至可变结构域序列(V_H)的CM4恒定结构域,每个可变结构域序列结合至不同靶标,有或没有相关抗体轻链可变结构域(V_L)序列。在一个实施方案中,双特异性IgM抗体包含两个V_HV_L抗原结合区,每个能够结合至一个抗原上的不同表位或两个不同抗原上的表位。双特异性IgM抗体结合单位可为来自单个物种的全长,或为嵌合的或人源化的。本发明的双特异性IgM抗体具有五聚或六聚环结构,其包含五个或六个双特异性IgM结合单位。

[0120] 术语“多特异性IgM”在本文中以广义使用,指的是具有两种或更多种结合特异性的IgM抗体。因此,术语“多特异性”包括“双特异性”,例如双特异性抗体或双特异性结合单位,包括包含至少两个单特异性亚单位的IgM五聚物,每个亚单位结合至不同抗原(AA、BB),

或者包含五个或六个双特异性亚单位的IgM五聚物,每个亚单位结合至两种不同抗原(AB、AB)。因此,双特异性和多特异性IgM五聚物可包括五个相同的双特异性结合单位、单特异性IgM结合单位(其中至少两个具有不同的结合特异性)、或其任何组合。

[0121] “全长IgM抗体重链”是在N末端至C末端方向上由抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定重链恒定结构域1(CM1或C μ 1)、抗体重链恒定结构域2(CM2或C μ 2)、抗体重链恒定结构域3(CM3或C μ 3)、及抗体重链恒定结构域4(CM4或C μ 4)组成的多肽。如本文所定义的双特异性全长IgM抗体包含五个或六个单体(结合单位),每个具有两个抗原结合位点,其特异性地结合至两种不同结合靶标(表位)。全长抗体的重链或轻链的C末端表示在重链或轻链的C末端处的最后一个氨基酸。全长抗体的重链或轻链的N末端表示在重链或轻链的N末端处的首个氨基酸。

[0122] 天然IgA是包含两条相同轻链(κ 或 λ)和两条相同重链(α)的四聚蛋白。在人中,存在两种IgA同种型:IgA1和IgA2。IgA,类似于IgG,含有三个恒定结构域(CA1-CA3或C α 1-C α 3),在C α 1与C α 2结构域之间有一个铰链区,其中“CA”与“C α ”名称可互换使用。所有IgA同种型都具有一个18个氨基酸的“尾段(tailpiece)”,其位于C α 3结构域的C末端,这使得能够形成聚合Ig(参见,例如Garcia-Pardo等人,1981,J.Biol.Chem.256,11734-11738和Davis等人,1988,Eur.J.Immunol.18,1001-1008)。血清IgA是单体但也可聚合。在其分泌形式中,IgA包含2-5个通过J链连接的基本4链单位,其可包括尾段,并且可通过分泌组分相连。尾段、二聚IgA及分泌型IgA与分泌组分(sIgA)相连的结构示于图2中。IgA抗体可进一步被分成IgA1和IgA2亚类。术语“IgA”抗体在本文中使用以具体地包括所有亚类,即IgA1和IgA2抗体,包括二聚和多聚形式,有和没有分泌组分、以及所述抗体的片段,优选是抗原结合片段。出于本发明的目的,IgA抗体优选地是二聚物,其中两个尾段通过J链连接(参见图2)。

[0123] 术语“IgA”在本文中以广义使用并且具体地包括单和多特异性IgA分子,例如像PCT申请号PCT/US2015/015268中所公开的多特异性IgA结合分子,其全部公开内容以引用的方式清楚地并入本文。

[0124] 术语“多特异性IgA”在本文中以广义使用,指的是具有两种或更多种结合特异性的IgA抗体。因此,术语“多特异性”包括“双特异性”,例如双特异性抗体或双特异性结合单位,包括包含两个单特异性亚单位的IgA二聚物,每个亚单位结合至不同抗原(AA、BB),或者包含两个双特异性亚单位的IgA二聚物,每个亚单位结合至两种不同抗原(AB、AB)。

[0125] 在一个实施方案中,二聚多特异性IgA分子是由两个单特异性结合单位组成,每个结合单位具有针对不同结合靶标(AA、BB)的结合特异性。在另一实施方案中,在二聚IgA分子中,两个结合单位中的至少一个具有两种不同的结合特异性(即为双特异性的,例如AA、A,B或AA、BC)。在另一实施方案中,两个结合单位中的每一个都具有两种特异性,其可为相同(AB、AB)或不同的(例如AC、CD或AB、AC)。

[0126] 术语“双特异性IgA抗体结合单位”是以广义使用且具体地包括一对IgA抗体重链恒定区多肽,其包含至少一个融合至可变结构域序列(V_H)的CA3恒定结构域,每个可变结构域序列结合至不同靶标,有或没有相关抗体轻链可变结构域(V_L)序列。在一个实施方案中,双特异性IgA抗体包含两个V_HV_L抗原结合区,每个能够结合至一个抗原上的不同表位或两个不同抗原上的表位。双特异性IgA抗体结合单位可为来自单个物种的全长,或为嵌合的或人源化的。

[0127] “全长IgA抗体重链”是在N末端至C末端方向上由抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定重链恒定结构域1(CA1或Ca1)、抗体重链恒定结构域2(CA2或Ca2)、及抗体重链恒定结构域3(CA3或Ca3)组成的多肽。根据本发明的双或多特异性全长IgA抗体包含两个单体(结合单位),其各自可为单或双特异性的,有或没有分泌组分。因此,本发明的多特异性IgA抗体可包括单特异性和双特异性结合单位,只要生成的IgA抗体具有至少两种结合特异性。全长抗体的重链或轻链的C末端表示在重链或轻链的C末端处的最后一个氨基酸。全长抗体的重链或轻链的N末端表示在重链或轻链的N末端处的首个氨基酸。

[0128] 关于不同类别抗体的结构和特性的其他细节,参见,例如Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Stites,Abba I.Terr和Tristram G.Parslow(编著),Appleton&Lange,Norwalk,Conn.,1994,第71页和第6章。

[0129] 如本文所用的术语“界面”用于指代在第一IgM重链恒定区中包含那些“接触”氨基酸残基(或其他非氨基酸组,例如像碳水化合物组)的一个区,所述残基与第二IgM重链恒定区中的一个或多个“接触”氨基酸残基(或其他非氨基酸组)相互作用。

[0130] 术语“不对称界面”用于指代在两个抗体链如第一与第二IgM重链恒定区之间和/或在IgM重链恒定区与其匹配轻链之间形成的界面(如上所定义),其中在第一与第二链中的接触残基通过设计是不同的,包含互补接触残基。不对称界面通过球形突起/孔相互作用和/或盐桥偶联(电荷交换)和/或本领域中已知的其他技术产生,例如通过 CrossMab方法将 μ 重链与其匹配轻链偶联。

[0131] “空腔”或“孔”是指从第二多肽的界面凹进的至少一个氨基酸侧链且因此容纳第一多肽的邻近界面上的相应突起(“球形突起”)。空腔(孔)可存在于原始界面中或可被合成地引入(例如通过更改编码界面的核酸)。通常,编码第二多肽的界面的核酸被更改以编码空腔。为了实现此举,编码第二多肽的界面中的至少一个“原始”氨基酸残基的核酸被取代为编码至少一个“输入”氨基酸残基的DNA,所述输入氨基酸残基具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积。应当理解,可存在一个以上原始及相应的输入残基。被取代的原始残基的数量上限是第二多肽的界面中的残基总数。用于形成空腔的优选输入残基是通常天然存在的氨基酸残基并且优选地选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、缬氨酸(V)及甘氨酸(G)。最优选的氨基酸残基是丝氨酸、丙氨酸或苏氨酸,最优选的是丙氨酸。在优选实施方案中,用于形成突起的原始残基具有较大的侧链体积,如酪氨酸(Y)、精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)或色氨酸(W)。

[0132] “原始”氨基酸残基是被“输入”残基取代的残基,输入残基可具有比原始残基更小或更大的侧链体积。输入氨基酸残基可为天然存在的或非天然存在的氨基酸残基,但优选是前者。

[0133] “非天然存在的”氨基酸残基意指不是由遗传密码编码但能够共价地结合多肽链中的邻近氨基酸残基的残基。非天然存在的氨基酸残基的实例是正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸及其他氨基酸残基类似物,例如像Ellman等人,Meth.Enzym.202:301-336(1991)中所描述的那些。为了生成所述非天然存在的氨基酸残基,可使用Noren 等人Science 244:182(1989)和Ellman等人,同上的工序。简单说来,这包括用非天然存在的氨基酸残基化学上激活抑制型tRNA,然后进行RNA的体外转录和翻译。在某些实施方案中,本发明的方法包括取代IgM重链中的至少一个原始氨基酸残基,但可取代一个以上原始残基。

通常,在第一或第二多肽的界面中的不超过总残基将包含取代的原始氨基酸残基。取代所优选的原始残基是“掩埋的(buried)”。“掩埋”意指基本上难以接近溶剂的残基。优选的输入残基不是半胱氨酸以便防止二硫键的可能氧化或错配。

[0134] 突起“可定位”在空腔中,这意味着分别在第一多肽和第二多肽的界面上的突起与空腔的空间位置以及突起和空腔的尺寸是如此以使得突起可位于空腔中,而不会明显地干扰界面处的第一与第二多肽的正常联合。由于突起如Tyr、Phe及Trp通常不从界面的轴线垂直延伸并且具有优选构象,所以突起与相应空腔的对准依赖于突起/空腔对基于如通过X-射线晶体衍射或核磁共振(NMR)获得的三维结构的建模。这可使用本领域中广泛接受的技术实现,包括分子建模技术。

[0135] “原始核酸”意指编码目标多肽的核酸,其可被“更改”(即基因工程化或突变)以编码突起或空腔。原始或初始核酸可为天然存在的核酸或可包含已经受先前更改的核酸(例如人源化抗体片段)。“更改”核酸意味着原始核酸通过插入、缺失或取代至少一个编码目标氨基酸残基的密码子而突变。通常,编码原始残基的密码子被编码输入残基的密码子取代。以此方式遗传修饰DNA的技术已在以下文献中评述: *Mutagenesis: a Practical Approach*, M.J. McPherson 编著, (IRL Press, Oxford, UK. (1991), 并且包括例如定点诱变、盒式诱变及聚合酶链反应(PCR) 诱变。

[0136] 突起或空腔可通过合成手段,例如通过重组技术、体外肽合成、用于引入先前所述的非天然存在的氨基酸残基的那些技术、通过肽的酶促或化学偶联或这些技术的一些组合被“引入”到第一或第二多肽的界面中。因此,被“引入”的突起或空腔是“非天然存在的”或“非天然的”,这意味着其不存在于自然界中或原始多肽(例如人源化单克隆抗体)中。

[0137] 优选地,用于形成突起的输入氨基酸残基具有相对较少数目的“旋转异构体”(例如约3-6个)。“旋转异构体”是氨基酸侧链在能量上有利的构象。各种氨基酸残基的旋转异构体的数量评述于Ponders和 Richards, *J. Mol. Biol.* 193:775-791(1987)中。

[0138] 除非另有说明,术语“抗体”具体地包括天然的人和/或非人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgA、IgD及IgM抗体,包括天然存在的变体。因此,例如,人类IgM序列可以从GenBank入藏登记号X14940.1 获得,而变体已报道为GenBank CAB37838.1、CAC20458.1、AFM37312.1、X57331.1及J00260.1。

[0139] 关于多肽(例如抗体或J链)的术语“天然”是指具有在自然界中出现的序列的多肽,而不管其制备模式。因此,术语“天然”和“天然序列”在本文中可互换使用,并且清楚地包括具有在自然界中发现的序列的重组多肽。

[0140] 如本文所用的术语“天然序列J链”或“天然J链”是指任何动物物种的天然序列IgM或IgA抗体的J链,包括成熟的人J链,其氨基酸序列示于图3(SEQ ID NO:1)中;和非人动物物种的J链,包括但不限于图4中示出的SEQ ID NO:2至44的天然序列J链多肽或图5中示出的蝙蝠J链多肽(SEQ ID NO:45)。

[0141] 术语“修饰的J链”在本文中用于指代包含引入天然序列中的外来结合部分的天然序列J链多肽的变体。引入可通过任何手段实现,包括外来结合部分的直接或间接融合或通过经由化学接头的连接。术语“修饰的人J链”具体地包括但不限于通过引入结合部分修饰的SEQ ID NO:1的氨基酸序列的天然序列人J链。该术语具体地包括但不限于通过引入外来结合部分修饰的SEQ ID NO:1的氨基酸序列的天然序列人J链,所述外来结合部分不会干扰

IgM或IgA的有效聚合(二聚化)和所述聚合物(二聚物)与靶标的结合。

[0142] 术语“结合部分”在本文中以广义使用以包括能够特异性结合至靶标如抗原的任何化学实体。结合部分的实例包括但不限于抗体、抗体的抗原结合片段、抗体药物缀合物、抗体样分子、抗体样分子的抗原结合片段、可溶性和膜结合蛋白、配体、受体、病毒样颗粒、蛋白毒素、酶、以及替代支架。优选结合部分是优选具有生物功能的多肽(包括肽)。示例性生物功能是结合部分结合至并活化效应细胞如B细胞、T细胞、或天然杀伤(NK)细胞的能力。

[0143] 术语“多肽”在本文中以广义使用并且包括肽序列。术语“肽”通常描述含有高达约60个、优选高达约30个通过肽键共价连接的氨基酸的氨基酸线型分子链。

[0144] 关于“结合部分”的术语“外来”在本文中用于指代不存在于参照天然多肽序列中的相同位置处的结合部分。因此,外来多肽序列(包括肽序列)可能包含在相应的天然序列内,但在不同位置处。在一个优选实施方案中,“外来”序列不存在于相应的天然序列中的任何位置处。

[0145] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质抗体群中获得的抗体,即构成该群体的每个抗体除了可能的很小量天然存在的突变外都相同。单克隆抗体针对单个抗原性位点具有高度特异性。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂形成对比,每个单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”表明该抗体的特点,即其来自基本上同质的抗体群,不解释为需通过任何特殊方法产生该抗体。举例来说,根据本发明使用的单克隆抗体可通过首次由Kohler等人(1975)Nature 256:495描述的杂交瘤方法制得,或可通过重组DNA方法(参见,例如美国专利号4,816,567)制得。“单克隆抗体”还可使用例如以下文献中所述的技术从噬菌体抗体文库中分离:Clackson等人(1991)Nature 352:624-628及Marks等人(1991)J.Mol.Biol.222:581-597。

[0146] 本文中单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与源自具体物种的抗体中的相应序列相同或同源,而所述链的其余部分与源自另一物种的抗体以及所述抗体的片段(只要它们显示所需的生物学活性)中的相应序列相同或同源(美国专利号4,816,567;及Morrison等人(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855)。

[0147] “人源化”形式的非人(例如鼠科)抗体是含有来源于非人免疫球蛋白的最少序列的抗体。就大部分序列而言,人源化抗体指其中受体的超变区残基被非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的超变区残基取代的,具有所需特异性、亲和力及能力的人免疫球蛋白(受体抗体)。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基也被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可包含未在受体抗体或供体抗体中发现的残基。为了进一步精修抗体的性能进行这些修饰。一般说来,人源化抗体基本上包括至少一个,且通常两个可变结构域的全部,其中高变环的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的相应部分,而FR区的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的相应部分。人源化抗体还任选包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。关于进一步的细节,参见Jones等人(1986)Nature 321:522-525;Riechmann等人(1988)Nature 332:323-329;及Presta(1992)Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596。

[0148] “分离的”抗体在本文中是已经鉴别并且从重组宿主细胞中的自然环境组分中分离和/或回收的抗体。对于抗体而言,其自然环境的污染物组分是干扰诊断或治疗用途的物

质,且可包括酶、激素、及其他蛋白质或非蛋白质溶质,以及不希望产生的副产物。在一个优选实施方案中,本文中的分离抗体将被纯化(1)至大于95重量%、或大于98重量%、或大于99重量%,如通过SDS-PAGE或SEC-HPLC方法所测定,(2)至足以通过利用氨基酸测序仪获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)至通过还原或非还原条件下的SDS-PAGE以及考马斯蓝染色或优选银染所证实的均质性。通常,分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0149] 术语“特异性结合”或“特异性地结合至”或“特异于”是指结合部分与结合靶标的结合,如抗体与靶标抗原的结合,所述靶标抗原例如特定多肽、肽上的表位或其他靶标(例如糖蛋白靶标)且意指可测量地不同于非特异性相互作用(例如,非特异性相互作用可结合至牛血清白蛋白或酪蛋白)的结合。特异性结合可例如通过测定结合部分或抗体或通过引入结合部分而修饰的抗体与靶分子相比于结合至对照分子的结合来测量。例如,特异性结合可通过与类似于靶标的对照分子(例如,过量的非标记的靶标)的竞争来测定。在这种情况下,如果标记的靶标与探针的结合竞争性地通过过量的未标记的靶标进行抑制,那么表示特异性结合。术语“特异性结合”或“特异性地结合至”或“特异于”特定多肽或如本文所用的特定多肽靶标上的表位可例如通过对靶标具有以下Kd的分子来展现:至少约200nM、或至少约150nM、或至少约100nM、或至少约60nM、或至少约50nM、或至少约40nM、或至少约30nM、或至少约20nM、或至少约10nM、或至少约8nM、或至少约6nM、或至少约4nM、或至少约2nM、或至少约1nM或更大。在某些情况下,术语“特异性结合”是指以下结合:其中分子结合至特定多肽或特定多肽上的表位,而基本上不结合至任何其他多肽或多肽表位。

[0150] “结合亲和力”是指在分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总强度。除非另外指示,如本文所用的“结合亲和力”是指内在结合亲和力,其反映了结合对的成员(例如抗体与抗原)之间的1:1相互作用。分子X对于其配偶体Y的亲和力一般可通过解离常数(Kd)表示。例如,Kd可为约200nM、150 nM、100nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、8nM、6nM、4nM、2nM、1nM或更强。亲和力可通过本领域中已知的常见方法(包括本文所述的那些)来测量。低亲和力抗体一般缓慢地结合抗原且倾向于容易离解,而高亲和力抗体一般更快地结合抗原且倾向于更久地保持结合。测量结合亲和力的多种方法在本领域中是已知的。

[0151] 如本文所用,“Kd”或“Kd值”是指通过适用于抗体和靶标对的技术测量的解离常数,例如,使用表面等离子体共振测定,例如在25℃下使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.),采用约10个反应单位(RU)的固定抗原CM5晶片。

[0152] 术语“缀合物”、“缀合的”及“缀合”是指任何及所有形式的共价或非共价键联,并且包括但不限于直接基因或化学融合、经由接头或交联剂的偶联、以及非共价联合。

[0153] 本文所用的术语“融合”是指在一条多肽链中不同来源的氨基酸序列通过其编码核苷酸序列的同框组合的组合。除与其一个末端的融合之外,术语“融合”还明确地包括内部融合,即多肽链内不同来源的序列的插入。在本文中使用的术语“融合”是指不同来源的氨基酸序列的组合。

[0154] 如本文所用的术语“化合价”表示抗体中的特定数目的结合位点的存在。因此,术语“二价”、“四价”及“六价”分别表示两个结合位点、四个结合位点及六个结合位点的存在。因此,如果在根据本发明的双特异性IgA抗体中每个结合单位是二价的,那么该双特异性

IgA抗体将具有4个化合价。

[0155] 术语“表位”包括能够特异性结合至抗体的任何分子决定簇。在某些实施方案中，表位决定簇包括分子的化学活性表面基团，如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基，且在某些实施方案中，可具有特定的三维结构特征和或比电荷特征。表位是由抗体结合的抗原的一个区。“结合区”是由结合分子结合的结合靶标上的一个区。

[0156] “多表位特异性”是指特异性地结合至相同或不同靶标上的两个或更多个不同表位的能力。“单特异性”是指仅结合一个表位的能力。根据一个实施方案，双特异性IgM抗体以至少 10^{-7} M、或 10^{-8} M或更佳的亲和力结合至每个表位。

[0157] 术语“靶标”或“结合靶标”是以广义使用并且具体地包括但不限于多肽、核酸、糖类、脂质、细胞及其他分子，有或没有当它们在自然界中存在时的生物功能。

[0158] 术语“抗原”是指可结合至抗体或触发细胞免疫应答的实体或其片段。免疫原是指抗原，其可引发生物体、具体来说动物、更具体地说哺乳动物（包括人）中的免疫应答。术语抗原包括被称为如上所定义的抗原决定簇或表位的区。

[0159] 如本文所用，术语“免疫原性的”是指引发抗体产生和/或活化针对免疫原的抗原的T细胞和/或其他反应性免疫细胞的物质。

[0160] 本发明抗体的“抗原结合位点”或“抗原结合区”通常含有六个互补决定区（CDR），其以不同程度促成结合位点对抗原的亲和力。存在三个重链可变结构域CDR（CDRH1、CDRH2及CDRH3）和三个轻链可变结构域CDR（CDRL1、CDRL2及CDRL3）。CDR和框架区（FR）的延伸程度通过对比氨基酸序列的编译数据库来测定，在编译数据库中那些区已根据序列之中的变异性、和/或来自抗体/抗原复合物的结构信息进行定义。包含较少CDR（即，其中结合特异性是由三个、四个或五个CDR决定）的功能性抗原结合位点也包括在本发明范围内。小于整组的6个CDR对于结合至一些结合靶标已足够。因此，在一些情况下，仅VH或VL结构域的CDR将足以。此外，某些抗体可能具有针对抗原的非CDR相关结合位点。所述结合位点特别地包括在本发明的定义内。

[0161] 在本申请中使用的术语“宿主细胞”表示任何种类的细胞系统，其可被工程化以生成根据本发明的抗体。在一个实施方案中，中国仓鼠卵巢（CHO）细胞被用作宿主细胞。

[0162] 如本文所用，表达“细胞”、“细胞系”及“细胞培养物”可互换使用并且所有这类名称都包括子代。因此，词语“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由此衍生的培养物，而不考虑传代的次数。还应理解由于故意的或无意的突变，所有子代的DNA内容可能不完全相同。包括对初始转化的细胞作筛选具有相同功能或生物活性的突变体子代。

[0163] 当将核酸置于与另一核酸序列的功能关系中时，所述核酸被“可操作地连接”。例如，如果要将前序列或分泌前导序列被表达为参与多肽分泌的前蛋白，前序列或分泌前导序列的DNA可操作地连接于该多肽的DNA；如果要使启动子或增强子影响编码序列的转录，该启动子或增强子可操作地连接于该序列；或如果要使核糖体结合位点的位置有利于翻译，该核糖体结合位点可操作地连接于编码序列。一般来说，“可操作地连接”意指连接的DNA序列是连续的，并且在分泌型前导序列的情况下，是连续的且处于阅读框中。然而，增强子不必是连续的。连接是通过在方便的限制性位点处的连接实现。如果这种位点不存在，那么按照常规操作使用合成的寡核苷酸接合物或接头。

[0164] 详细描述

[0165] 具有修饰的J链的抗体的设计和产生

[0166] IgM是由B细胞响应于抗原刺激产生的首个免疫球蛋白,并且在血清中以约1.5mg/ml存在,半衰期为5天。IgM是五聚或六聚分子。如同IgG一样,IgM单体由两条轻链和两条重链组成。然而,虽然IgG 含有三个重链恒定结构域(CH1、CH2及CH3),但IgM的重(μ)链另外含有第四恒定结构域(CH4),类似于IgE中的 ϵ 重链。此额外恒定结构域位于IgG和IgA的富脯氨酸铰链区的位置处,铰链区负责抗原结合Fab结构域相对于IgG和IgA抗体的Fc结构域的旋转灵活性。

[0167] 五个IgM单体形成具有另外的小多肽链(J链)的复合物以形成天然的IgM分子。在IgM从产抗体细胞中分泌之前,J链被认为促进 μ 链的聚合。虽然IgM的结晶被证明很有挑战性,但Czajkowsky和Shao (PNAS 106(35):14960-14965,2009)最近公布了IgM的基于同源性的结构模型,这是基于IgE Fc结构域的结构和已知的二硫化物配对。作者报道了人IgM五聚物是具有弯曲偏差的蘑菇形分子。IgM重(μ)链含有五个N连接的糖基化位点:Asn-171、Asn-332、Asn-395、Asn-402及Asn-563。

[0168] 免疫球蛋白A(IgA)作为在大多数哺乳动物的粘膜分泌物中存在的主要抗体类别,通过吸入和摄取病原体代表了针对入侵的第一道关键防线。IgA还以显著浓度见于许多物种的血清中,在血清中其用作介导已突破粘膜表面的病原体的消除的第二道防线。特异于IgA的Fc区的受体Fc α R是IgA效应功能的介体。人IgA可具有两个不同的IgA重链恒定区(C α)基因,其产生两个亚类IgA1和IgA2。IgA1与IgA2之间的主要区别存在于铰链区中,铰链区位于两个Fab臂与Fc区之间。IgA1由于氨基酸的重复延伸段的插入而具有延长的铰链区,其不存在于IgA2中。IgA具有形成二聚物的能力,其中两个单体单位(每个包含两条重链和轻链)假定是以端到端构型排列,所述构型通过二硫桥及J链的并入来稳定。在粘膜部位处局部产生的二聚IgA转运穿过上皮细胞边界并且通过与聚合免疫球蛋白受体(pIgR)的相互作用向外进入分泌物中。在此过程期间,pIgR分解并且被称为分泌组分(SC)的主要片段变得共价连接到IgA二聚物上。

[0169] IgA和IgM都具有在C末端中的一个18氨基酸延伸,被称为“尾段”(tp)。IgM(μ tp)和IgA(α tp)尾段在七个氨基酸位置处不同。IgM和IgA尾段在各种动物物种之中高度保守。IgA和IgM尾段中的保守的倒数第二个半胱氨酸残基已经证明参与了聚合。两个尾段都含有N连接的糖类添加位点,该位点的存在是IgA中的二聚物形成和J链并入及IgM中的五聚物形成所需的。然而,在尾段中的N连接的糖类的结构和组成不同,提示聚糖通过糖基转移酶进行加工的利用度的差异。

[0170] 已经报道了人及各种脊椎动物物种如母牛、小鼠、鸟类、两栖动物及兔的J链的核苷酸和/或蛋白质序列。人J链含有八个半胱氨酸残基,两个(Cys13和Cys69)与 α 或 μ 链(分别在IgA和IgM中)一起参与了二硫桥,并且六个参与了链内二硫桥(Cys13:Cys101、Cys72:Cys92、Cys109:Cys134)。J链的三维晶体结构尚未见报道。

[0171] 本发明至少部分基于以下认识:IgM和IgA抗体的J链可通过引入结合特异性(结合部分)来修饰,而不会干扰IgM或IgA抗体结合至其结合靶标的能力。因此,本发明涉及修饰的J链,其包含引入天然序列J链(如SEQ ID NO:1的天然序列人J链)中的结合部分。本发明还涉及包含修饰的J链的结合分子。结合分子可为例如IgM抗体、IgA抗体或IgG/IgM或IgG/IgA杂合抗体,其可在IgG重链处含有IgM或IgA尾段且因此合并IgG和IgA或IgA的特性,包

括并入和形成具有本发明的修饰的J链的聚合物的能力。关于IgG/IgM和IgG/IgA杂合抗体的其他细节,参见,例如Koteswara等人,Clinical Immunology 2001,101(1):21-31。

[0172] 修饰的J链包含外来结合部分,其包括但不限于能够特异性地结合至结合靶标的多肽(包括肽)或催化组分,如酶样蛋白酶。如早先所论述,结合部分包括但不限于抗体、抗体的抗原结合片段、抗体-药物缀合物、抗体-药物缀合物的抗原结合片段、抗体样分子、抗体样分子的抗原结合片段、可溶性和膜结合蛋白、配体、受体、病毒样颗粒、蛋白毒素、催化组分如酶和酶样蛋白酶、以及替代支架。应强调的是,任何类型的结合部分都可根据本公开的教导通过适当地选择位置、添加类型(例如,直接或间接融合、化学连接等)引入J链中。

[0173] 在一个优选实施方案中,结合部分是抗体或抗体的抗原结合片段(也被称为“抗体片段”),包括单特异性、双特异性及多特异性抗体和抗体片段。术语“抗体片段”是以广义使用并且包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv和(scFv)₂片段、互补决定区(CDR)片段、直链抗体、单链抗体分子、微型抗体、以及由抗体片段形成的多特异性抗体。在一个优选实施方案中,抗体片段是scFv。

[0174] 在另一优选实施方案中,结合部分是抗体样分子,例如像人结构域抗体(dAb)、双重亲和力和重新靶向(DART)分子、双抗体、二-双抗体、双重可变结构域抗体、堆叠可变结构域抗体、小模块免疫药物(SMIP)、替代抗体、链交换工程化结构域(SEED)体或TandAb。

[0175] 结合部分可为配体,如神经营养蛋白、白介素、可溶性分子因子或生长因子。

[0176] 作为结合分子的受体包括离子-通道-连接的、G-蛋白-连接的、以及酶-连接的细胞表面受体。具体的实例包括但不限于ErbB1、ErbB2、ErbB3、ErbB4、TNFR、PDL1及CTLA-4。

[0177] 在又一优选实施方案中,结合部分是替代支架。在本上下文中,术语“支架”意在描述可携带更改的氨基酸或序列插入物的蛋白质框架,所述插入物赋予蛋白质变体以结合特定靶标的能力。蛋白质替代支架包括但不限于CTLA-4、淀粉酶抑肽、纤连蛋白、脂质运载蛋白、T细胞受体、CBM4-2、蛋白A结构域、Im9、设计的AR蛋白、设计的TPR蛋白、锌指、pVIII、鸟胰多肽、GCN4、WW结构域、SRC同源性结构域2和3、PDZ结构域、TEM-1、 β -内酰胺酶、GFP、硫氧还蛋白、葡萄糖球菌核酸酶、PHD-指、c1-2、BPTI、APPI、HPSTI、大肠杆菌素、LACI-D1、LDTI、MTI-II、蝎毒素、knottin、昆虫防御素A肽、EETI-II、Min-23、CBD、PBP、细胞色素b₅₆₂、LDL受体结构域A、 γ 晶体蛋白、泛素、转铁蛋白、C型凝集素样结构域。优选的替代支架是darpin、纤连蛋白结构域及adnectin。关于进一步的细节,参见Binz HK等人,2005Nature Biotechnology 23(10):1257-1268。

[0178] 结合部分可引入天然的J链序列中的任何位置处,从而允许结合部分与其结合靶标的结合,而不会干扰受体IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA分子与其一个或多个结合靶标的结合。优选位置包括在C末端处或附近、在N末端处或附近或在内部位置处,基于J链的三维结构是可达的。在优选实施方案中,结合部分被引入天然序列J链中,在距C末端约10个残基之外或距N末端约10个氨基酸残基之外,其中天然序列J链优选地是SEQ ID NO:1的人J链。在另一实施方案中,结合部分被引入SEQ ID NO:1的天然序列人J链中介于SEQ ID NO:1的半胱氨酸残基92与101之间,或在另一天然序列J链的等效位置处。在又一实施方案中,结合部分在糖基化位点处或附近被引入天然序列J链中,如SEQ ID NO:1的J链。最优选地,结合部分被引入SEQ ID NO:1的天然序列人J链中,距C末端约10个氨基酸残基内。

[0179] 引入可通过以下操作完成,通过直接或间接融合,即通过J链与结合部分氨基酸序

列在一条多肽链中的组合,通过其编码核苷酸序列的同框组合,有或没有肽接头。肽接头(间接融合)如果使用的话,可例如为约1至50、或约1至40、或约1至30、或约1至20、或约1至10、或约10至20个氨基酸残基,并且可存在于有待引入J链序列中的结合部分的一端或两端处。在一个优选实施方案中,肽接头为约10至20、或10至15个氨基酸长。在另一优选实施方案中,肽接头为15个氨基酸长。

[0180] 结合部分还可通过化学键使用含有两种不同官能团(其具有它们自身的反应性和选择性)的异双官能蛋白质交联剂附接至天然J链序列。这些交联剂可在一个步骤过程中使用或可用于生成活化的蛋白质,这些蛋白质通常可保留并在分离步骤中与第二生物分子反应。因此,举例来说,异双官能交联试剂可用于在J链与结合部分之间形成缀合物。反应性基团包括但不限于亚胺反应性基团(如NHS或硫代 NHS)、马来酰亚胺基团等等。举例来说,已经在半抗原载体蛋白的形成和酶-抗体缀合物的制备中使用这类交联剂,其为可裂解的或非可裂解的。在化学上,可裂解的交联剂具体地包括但不限于基于二硫化物的、脲、及肽接头。公知的并且大量研究的酶不稳定的接头为缬氨酸-瓜氨酸接头,但其他肽接头也是已知的并且合适的。非可裂解的接头的典型代表物为硫醚,如SMCC(N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸酯)。关于进一步的细节,参见,例如Ducry L和Stump B, *Bioconjugate Chem.* 2010, 21:5-13,其整个公开内容以引用的方式清楚地并入本文。关于其他合适接头的清单,参见,例如 Klein等人, *Protein Engineering, Design&Selection*; 2014, 27(10): 325-330,其整个公开内容以引用的方式清楚地并入本文。

[0181] 虽然修饰的J链通常含有一个外来结合部分,但也可能将一个以上结合部分引入J链中。

[0182] 修饰的J链可通过重组DNA技术的公知技术产生,即通过在合适的原核细胞或真核生物的宿主生物体如CHO细胞或大肠杆菌中表达编码修饰的J链的核酸。因此,修饰的J链可例如在大肠杆菌中表达,如由Symersky等人, *Mol Immunol* 2000, 37:133-140所述。

[0183] 在一个实施方案中,J链最初可通过酶识别位点的插入来修饰,并且通过肽或非肽接头进行翻译后修饰,所述接头可将任何外来结合部分连接至J链,例如像细胞毒性小分子,以便制造抗体-药物缀合物(ADC)。

[0184] 修饰的J链也可与受体IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体的重链和轻链共表达。虽然由于其复杂的结构,重组IgM的大规模生产较为困难,但是已报道使用非淋巴样细胞的IgM的若干重组生产系统,包括IgM重链(H)和轻链(L)在C6神经胶质瘤细胞、CHO细胞及HeLa细胞中的共表达(对于在CHO细胞中的表达参见,例如 W089/01975和Wood等人, *J. Immunol.* 145, 3011-3016(1990))。在有或没有J链下IgM单克隆抗体在大肠杆菌中的表达描述于例如Azuma 等人, *Clin Cancer Res* 2007, 13(9):2745-2750中。IgM在表达腺病毒的E1A和E1B蛋白的无限增殖的人视网膜细胞系中的产生描述于美国申请公开号20060063234中。

[0185] 受体抗体可为单特异性、双特异性或多特异性的。双特异性和多特异性IgM和IgA结合分子(包括抗体)描述于例如美国申请序列号 61/874,277和61/937,984中,其整个内容据此以引用的方式清楚地并入。

[0186] 具有修饰的J链的抗体的应用

[0187] 包含本发明的修饰的J链的抗体具有广泛的治疗和诊断应用。

[0188] 在一个实施方案中,包含修饰的J链的抗体结合至同一可溶性靶标(例如像VEGF、TNF α 或IL6)上的两个或更多个位点。该目的可例如为拮抗蛋白质上的多重位点和/或提高对给定靶标的亲合力。

[0189] 在另一实施方案中,包含本文修饰的J链的抗体结合同一细胞表面(受体)靶标如EGFR或HER2(ErbB2)上的两个或更多个位点。因此,例如,这类抗体可靶向HER2分子上的4D5和2C4表位。此方法可提高生物效力和/或对给定靶标的亲合力。

[0190] 在又一实施方案中,包含本发明的修饰的J链的抗体结合两种或更多种不同的可溶性靶标(球状蛋白质或肽),例如TNF α 和IL6、VEGF α 和Ang2、或两个细胞因子。此方法可能造成更完全地阻断特定途径;阻断所谓的“细胞因子风暴”,即由某些多价双特异性抗体(如针对CD3抗原的双特异性抗体)引起的不希望有的T细胞活化;或协调酶和其底物,例如因子IXa和因子X。特定的实例包括但不限于具有修饰的J链的双特异性抗体,其中第一特异性涉及VEGF且第二特异性涉及Ang2或DLL4(抗血管生成),或者第一特异性涉及TNF且第二特异性涉及Ang2或IL-17(抗炎特性),其中任一特异性都可被引入IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体或其抗原结合片段的J链中。

[0191] 在又一实施方案中,包含修饰的J链的抗体可结合一种或多种可溶性靶标及一种或多种细胞表面受体靶标,如血管生成因子和新血管特异性受体。此方法的目的也可为增强在特定位点或组织处的递送和阻断。

[0192] 在更进一步的实施方案中,包含修饰的J链的抗体被设计来结合两种或更多种不同的细胞表面受体靶标,例如像HER1、HER2(ErbB2)及HER3(ErbB3),从而经由相同的或不同的途径抑制多重靶标。这可造成提高的特异性和选择性和/或给定途径的更完全阻断。这类抗体的特定实例包括但不限于具有修饰的J链的双特异性抗体,其中一种特异性涉及HER2且另一种特异性涉及HER3;或一种特异性涉及EGFR(HER1)且另一种特异性涉及HER2。具有修饰的J链的其他双特异性IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体可例如结合至EGFR和HER3、IL-1 α 和IL-1 β 、IL-4和IL-13、Ang-2和VEGF-A、因子IXA和因子X、或IL-17A和IL-17F。

[0193] 包含本发明的修饰的J链的抗体也可被设计来结合一种或多种可溶性靶标或细胞表面受体靶标以及一种或多种长停留时间靶标,例如像TNF α 和/或VEGF及血清白蛋白。这些分子预期比没有白蛋白特异性的结合分子具有更长的循环半衰期。

[0194] 在又一实施方案中,包含本文中的修饰的J链的抗体可结合一种或多种可溶性靶标及一种或多种基质蛋白和/或底物,例如像VEGF α 和透明质酸。所生成的多特异性结合分子可因其在眼内空间中增加的停留时间而在例如以下抗血管生成治疗中具有效用:眼部病状,如年龄相关黄斑变性(AMD)。

[0195] 包含修饰的J链并且结合一种或多种可溶性或受体靶标加上一种或多种转运子受体(即转铁蛋白受体)(例如,抗EGFRvIII(缺失外显子 III的突变形式),发现成胶质细胞瘤与抗转铁蛋白特异性组合)的抗体可在抗体横穿血脑屏障的递送中具有效用。

[0196] 在一个优选实施方案中,本文中的IgM、IgA、IgG/IgM和IgG/IgA抗体包含对以下免疫细胞具有结合特异性的修饰的J链并且结合至疾病细胞或病原体上表达的抗原:如T细胞、NK细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞。由于IgM分子包含5个结合单位,且IgA分子是包含两个结合单位的二聚物,所以这类分子因其更大的亲合力而比双特异性IgG抗体明显更有效。另外,通过活化并针对靶疾病细胞、组织或病原体重取向效应细胞(例如效应T细胞),本文

中的IgM、IgA、IgG/IgM和IgG/IgA抗体诱导针对该靶标的免疫应答,由此进一步增强效力和功效。由于这些有益的特性,包含修饰的J链的本文的IgM、IgA、IgG/IgM和IgG/IgA抗体在其中IgG抗体以低亲和力结合至其靶标的情况中尤其有利。因此,在一个实施方案中,本文的IgM、IgA、IgG/IgM和IgG/IgA抗体可包含治疗性IgG抗体的结合结构域。

[0197] 在某些实施方案中,包含修饰的J链的本文中的IgM、IgA、IgG/IgM和IgG/IgA抗体可用于治疗癌症。可以预料,任何类型的肿瘤和任何类型的肿瘤相关抗原都可被靶向。癌症的示例性类型包括但不限于急性淋巴母细胞性白血病、急性髓性白血病、胆癌、乳腺癌、子宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、头颈癌、何杰金氏淋巴瘤、肺癌、甲状腺髓样癌、非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肾癌、卵巢癌、胰腺癌、神经胶质瘤、黑色素瘤、肝癌、前列腺癌、以及膀胱癌。然而,熟练的技术人员将认识到对于实际上任何类型的癌症来说,肿瘤相关抗原在本领域中是已知的。

[0198] 可由本发明的IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体靶向的肿瘤相关抗原包括但不限于甲胎蛋白(AFP)、相关抗原、Ba 733、BAGE、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、碳酸酐酶IX、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA-4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1a、结肠特异性抗原-p(CSAp)、CEA(CEACAM5)、CEACAM6、c-Met、DAM、EGFR(HER1、ErbB1)、ErbB2(HER2)、ErbB4(HER3)、EGFRvIII、EGP-1(TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、成纤维细胞生长因子(FGF)、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- β 、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)及其亚单位、HER2/neu、HMGB-1、低氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、PAM4抗原、胰腺癌粘蛋白、PD-1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PlGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、生存素、生存素-2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、TNF- α 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标记、bcl-2、bcl-6、Kras。

[0199] 如以上所论述,对于肿瘤学应用,包含修饰的J链的抗体可被设计来触发免疫细胞针对靶癌细胞的杀灭功能。因此,举例来说,IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体或其抗原结合片段的J链可通过将针对免疫细胞如T细胞或天然杀伤(NK)细胞的结合特异性引入天然的J链中来修饰,而IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体提供针对靶细胞的结合特异性,例如在肿瘤细胞表面上的肿瘤标记物,如致癌基因,包括例如任何或更多的以上所列的肿瘤相关抗原。

[0200] 在T细胞的情况下,分化簇3(CD3)是多聚蛋白质复合物,历史上称为T3复合物,并且是由四条不同的多肽链(ϵ 、 γ 、 δ 、 ζ)构成,这些多肽链组装并用作三对二聚物($\epsilon\gamma$ 、 $\epsilon\delta$ 、 $\zeta\zeta$)。

CD3复合物充当T细胞共受体,该共受体与T细胞受体(TCR)非共价地结合。此CD3复合物的组分,尤其是CD3 ϵ ,靶向特异性地结合至肿瘤相关抗原的IgM 抗体的修饰的J链。虽然特异于效应T细胞的修饰的J链优选结合至 CD3 (CD3 ϵ) 抗原,但在效应T细胞上表达的其他抗原也是已知的并且可由修饰的J链靶向。示例性T细胞抗原包括但不限于CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD69以及CD90。

[0201] 包括具有CD3结合特异性的修饰的J链的示例性IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体可包括已知的IgG抗体与肿瘤相关抗原的结合区,例如像blinatumomab(也称为MT103)(抗CD19)、CD19hA19(抗CD19,美国专利号7,109,304)、hPAM4(抗粘蛋白,美国专利号7,282,567)、hA20(抗CD20,美国专利号7,251,164)、hIMMU31(抗AFP,美国专利号7,300,655)、hLL1(抗CD74,美国专利号7,312,318)、hLL2(抗CD22,美国专利号7,074,403)、hMu-9(抗CSAp,美国专利号7,387,773)、hL243(抗HLA-DR,美国专利号7,612,180)、hMN-14(抗CEACAM5,美国专利号6,676,924)、hMN-15(抗CEACAM6,美国专利号7,541,440)、hRS7(抗EGP-1,美国专利号7,238,785)、hMN-3(抗CEACAM6,美国专利号7,541,440)、Ab124以及Ab125(抗CXCR4,美国专利号7,138,496),其公开内容以引用的方式清楚地并入本文。

[0202] 在一个具体的实施方案中,包含blinatumomab的CD19结合区的IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体包含具有blinatumomab的CD3 结合区的修饰的J链。此抗体可用于例如治疗非何杰金氏淋巴瘤或B 细胞系列的急性淋巴细胞白血病(B-ALL)。

[0203] 在另一具体实施方案中,包含利妥昔单抗的CD20结合区的IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体包含具有CD3特异性的修饰的J链,如包含blinatumomab的CD3结合区的修饰的J链。

[0204] 在又一具体实施方案中,包含MT110的EpCAM结合区的IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体包含具有CD3特异性的修饰的J链,如包含MT110的CD3结合区的修饰的J链。这类双特异性抗体可用于治疗胃肠癌症。

[0205] 可提供用于与具有CD3结合特异性的修饰的J链组合的结合区的替代抗体包括例如阿昔单抗(抗糖蛋白IIb/IIIa)、阿来组单抗(抗CD52)、贝伐单抗(抗VEGF)、西妥昔单抗(抗EGFR)、吉妥单抗(抗CD33)、替伊莫单抗(抗CD20)、帕尼单抗(抗EGFR)、托西莫单抗(抗CD20)、曲妥单抗(抗ErbB2)、lambrolizumab(抗PD-1受体)、尼沃单抗(抗PD-1受体)、易普利单抗(抗CTLA-4)、阿巴伏单抗(抗CA-125)、阿德木单抗(抗EpCAM)、阿特利珠单抗(抗IL-6受体)、本然力单抗(抗CD125)、奥比妥珠单抗(GA101,抗CD20)、CC49(抗TAG-72)、AB-PG1-XG1-026(抗PSMA,美国专利申请序列号11/983,372,保藏为ATCC PTA-4405和PTA-4406)、D2/B(抗PSMA,WO 2009/130575)、托珠单抗(抗IL-6受体)、巴利昔单抗(抗CD25)、达珠单抗(抗CD25)、依法珠单抗(抗CD11a)、GA101(抗CD20;Glycart Roche)、阿塔利珠单抗(抗 α .4整联蛋白)、奥马佐单抗(抗IgE);抗TNF- α .抗体,如CDP571(Ofei等人,2011,Diabetes 45:881-85)、MTNFAI、M2TNFAI、M3TNFAI、M3TNFABI、M302B、M303(Thermo Scientific, Rockford, Ill.)、英利昔单抗(Centocor, Malvern, Pa.)、塞妥珠单抗(UCB, Brussels, Belgium)、抗CD40L(UCB, Brussels, Belgium)、阿达木单抗(Abbott, Abbott Park, Ill.)、BENLYSTA.RTM.(Human Genome Sciences);用于治疗阿尔默茨氏病的抗体,如Alz 50(Ksiezak-Reding等人,1987,J Biol Chem 263:7943-47)、甘特那单抗(gantenerumab)、索兰珠单抗(solanezumab)及英夫利昔单抗;抗纤维蛋白抗体,像59D8、T2G1s、MH1;抗CD38

抗体,如MOR03087 (MorphoSys AG)、MOR202 (Celgene)、HuMax-CD38 (Genmab) 或达若图单抗 (Johnson&Johnson);抗HIV抗体,如P4/D10 (美国专利号8,333,971)、Ab 75、Ab 76、Ab 77 (Paulik等人,1999,Biochem Pharmacol 58:1781-90)、以及在美国专利号5,831,034、美国专利号5,911,989及Vcelar等人,AIDS 2007;21(16):2161-2170和Joos等人,Antimicrob.Agents Chemother. 2006;50(5):1773-9中所述的抗HIV抗体。

[0206] 图19列出了用于治疗血液癌症、上皮细胞瘤及富糖基肿瘤的示例性靶抗原,以及在T细胞、NK细胞、巨噬细胞及嗜中性粒细胞上的示例性抗原以用修饰的J链来靶向。应理解的是,结合至所列肿瘤抗原中的任一者的IgM分子可与具有任何所列结合特异性的修饰的J链组合。因此,在表的左列中列出的任何抗体靶标可与右列中列出的任何修饰的J链靶标组合。

[0207] 在一个优选实施方案中,IgM五聚物提供对靶细胞如B细胞的结合特异性,而与效应细胞例如T细胞的结合结构域可共价地连接至 IgM抗体的J链上。因此,J链可通过CD3 (CD3 ϵ) 结合结构域的共价连接来修饰。以此构型,IgM五聚物(包含10个拷贝的重链和10个拷贝的轻链)提供对靶B细胞的结合特异性,而J链的T细胞连接递送细胞毒性效力。换言之,结合至肿瘤靶标的IgM抗体另外获得T 细胞结合功能。共价地连接到天然J链或天然J链的变体上的CD3 结合结构域可例如为抗CD3抗体的单链Fv(scFv);或仅有天然存在的重链的抗体,例如骆驼科(骆驼、美洲驼、羊驼)或软骨鱼(鲨鱼、鳐形目鱼)的单链抗体;具有CD3结合特异性的支架,例如纤连蛋白(例如纤连蛋白III)。虽然在本文中特别地提及某些优选实施方案,但应理解的是具有对任何靶标如任何肿瘤抗原的结合特异性并且包含结合至任何T细胞标记物的修饰的J链的IgM、IgA、IgG/IgM和IgG/IgA 抗体也被虑及并在本发明的范围内。

[0208] 在一个实施方案中,多特异性IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA 抗体结合至以上所列的一种或多种肿瘤靶标,而J链被修饰以结合至 CD3 ϵ 。在一个优选实施方案中,多特异性IgM、IgA、IgG/IgM或 IgG/IgA抗体结合至图19中所列的一种或多种肿瘤靶标,而J链被修饰以结合至CD3 ϵ 。

[0209] 天然杀伤(NK)细胞是先天免疫的重要组分并且在宿主防御中借助于其释放细胞因子及介导针对肿瘤细胞和病毒感染细胞的溶细胞活性的能力发挥关键作用。NK细胞抗原包括但不限于CD16、CD32a、CD56、CD57、CD64、CD117(或c-kit),粘附分子,包括淋巴细胞相关分子-2(LFA-2或CD2)、LFA-3(CD58)、以及LFA-1(CD11a/CD18)。

[0210] 将双特异性抗体与修饰的J链结合的NK细胞的实例包括具有对以上所列的任何肿瘤抗原的结合特异性的IgM、IgA、IgG/IgM和 IgG/IgA抗体,其包含结合至NK细胞的修饰的J链。在一个具体的实施方案中,具有HER2结合特异性的双特异性IgM、IgA、IgG/IgM 和IgG/IgA抗体包含被修饰以结合CD16、CD32a、CD56或CD64的 J链。在另一优选实施方案中,多特异性IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA 抗体结合至图19中表左列中所列的任何肿瘤靶标,并且J链被修饰以结合NK细胞上的CD16、CD64或NKG2D。

[0211] 可例如通过将CD14特异性引入J链中提供本发明的J链修饰抗体中的巨噬细胞结合。

[0212] 在一个实施方案中,多特异性IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA 抗体结合至以上所列的一种或多种肿瘤靶标,而J链被修饰以结合至 CD14。在一个优选实施方案中,多特异性

IgM、IgA、IgG/IgM或 IgG/IgA抗体结合至图19中所列的一种或多种肿瘤靶标,而J链被修饰以结合至CD14。

[0213] 具有修饰的J链的IgM、IgA、IgG/IgM和IgG/IgA抗体可靶向基于糖类的抗原,参见,例如Cazet等人,Breast Cancer Research;2010, 12:204的综述文章。基于糖类的肿瘤抗原已显示具有良好的肿瘤关联,其具有替代型糖基化,从而允许产生结合至这类抗原且具有适当的特异性而不一定是高亲和力的IgG抗体。使用具有针对此类抗原的相关增强亲和力的IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体,代表了对于新型治疗抗体的极大机会,尤其是联合通过J链修饰实现的效应细胞动员。在一个优选实施方案中,IgM、IgA、IgG/IgM和IgG/IgA抗体结合至一种或多种基于碳水化合物的肿瘤抗原,而J链被修饰以结合图19中所列的任何效应细胞。

[0214] 在另一优选实施方案中,可使用具有修饰的J链的IgM、IgA、IgG/IgM及IgG/IgA抗体作为针对病原体的IgM、IgA、IgG/IgM或IgG/IgA抗体的一部分。在一个优选实施方案中,病原体选自自由以下组成的组:HIV病毒、结核分枝杆菌、无乳链球菌、甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌、嗜肺性军团病菌、酿脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟氏菌、脑膜炎奈瑟氏菌、肺炎球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、B型流感嗜血杆菌、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、绿脓假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、I型单纯疱疹病毒、II型单纯疱疹病毒、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘-带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人T细胞白血病病毒、埃-巴二氏病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水疱性口腔炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒40、小鼠乳腺肿瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、西尼罗病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、鼠弓形体、让氏锥虫、克氏锥虫、罗德西亚锥虫、布氏锥虫、曼氏血吸虫、日本裂体吸虫、牛皮蝇巴贝西虫、柔嫩艾美球虫、盘尾丝虫、热带利什曼原虫、旋毛线虫、小泰累尔梨浆虫、泡状带绦虫、绵羊绦虫、牛肉绦虫、细粒棘球绦虫、科特氏中孔绦虫、关节炎支原体、猪鼻支原体、口腔支原体、精氨酸支原体、莱氏无胆甾原体、唾液支原体及肺炎支原体,如美国专利号6,440,416中所公开。

[0215] 在此实施方案中,免疫效应细胞可例如为嗜中性粒细胞。

[0216] 图19具体地列出作为本文中的IgM、IgA、IgG/IgM和IgG/IgA 抗体的靶标的病毒抗原,与可由所述抗体的修饰的J链靶向的嗜中性粒细胞标记物组合。

[0217] 注意到本文中的IgM、IgA、IgG/IgM和IgG/IgA抗体还可靶向富含碳水化合物的癌症上的碳水化合物抗原。这类抗原包括例如 CEA、CA-125、TADG78、唾液酸化Lewis-X (CD15)。

[0218] 在所有实施方案中,用于修饰天然J链的结合部分(结合单位)可在J链之前或之后引入。因此,具有CD3结合特异性的修饰的J链可具有抗CD3_{scFv}-J或J-抗CD3_{scFv}构型。在C末端包含J链的抗CD3 单链Fv(抗CD3_{scFv}-J)的序列(SEQ ID NO:46)和结构示于图8中。在N 末端包含J链的抗CD3单链Fv(J-抗CD3_{scFv})的序列(SEQ ID NO:47) 和结构示于图9中。所述抗体由于其提高的亲合力而优于双特异性 IgG抗体。因此,举例来说,它们适于靶向低拷贝数目的靶标,如美罗华耐药的伯基特淋巴瘤细胞,其特征为低水平的CD20表达。另外,包含修饰的J链的本文中的IgM、IgA、IgG/IgM和IgG/IgA抗体相对于双特异性IgG抗体具有大大增强

的效力。

[0219] 具有修饰的J链的抗体的药物组合物

[0220] 对于治疗用途,包含修饰的J链的抗体可配制成药物组合物。本发明的药物组合物可通过本领域中已知的多种方法施用。熟练技术人员将理解,施用的途径和/或模式将随靶疾病或病状和所需结果而变化。为了通过某些施用途径施用本发明的化合物,可能需要用材料包衣化合物或将化合物与所述材料共同施用以防止其失活。例如,所述化合物可在适当的载体(例如脂质体)或稀释剂中向受试者施用。药学上可接受的稀释剂包括盐水和缓冲水溶液。药物载体包括无菌水溶液或分散体以及为了无菌可注射溶液或分散体的临时制备的无菌粉末。所述介质和试剂用于药学上活性物质的用途在本领域中是已知的。

[0221] 所述组合物还可含有佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和/或分散剂。微生物存在的预防可通过消毒操作并通过纳入各种以下抗菌剂和抗真菌剂得以确保:例如对羟苯甲酸、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等等。还可能需要将等渗剂,如糖、氯化钠等纳入组合物中。另外,可注射药物形式的延长吸收可通过纳入延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶而产生。

[0222] 活性成分在本发明的药物组合物中的实际剂量水平可以变化以便获得对于具体的患者、组合物及施用模式有效实现所需治疗反应而不会对患者有毒性的活性成分的量。所选的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括所采用的本发明的具体组合物的活性、施用途、施用时间、采用的具体化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与所采用的具体组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、所治疗患者的年龄、性别、体重、条件、一般健康状况及先前病史、以及医学领域中公知的类似因素。

[0223] 所述组合物必须是无菌和液态的以致组合物可通过注射器递送。除水之外,载体优选为等渗缓冲盐水溶液。

[0224] 提供以下示例性序列列表及附图以有助于理解本发明,其真正范围在所附权利要求书中叙述。应当理解,可在不背离本发明的精神的情况下对所阐明的工序进行修改。

[0225] 本发明的更多细节通过以下非限制性实施例示出。

[0226] 实施例1

[0227] 制备包含结合CD3的修饰的J链的双特异性抗CDIM IgM抗体

[0228] 1. 具有设计的突变的DNA构建体的生成

[0229] a. DNA构建体合成。具有设计的突变的所有DNA构建体都是由商业销售商(Genescript)合成,其中相容的限制性位点位于两端以便亚克隆到各自的表达载体中。

[0230] b. 构建表达载体。合成的DNA构建体以1 μ g/ml重悬于 Tris-EDTA缓冲液中。DNA(1 μ g)经受酶解作用并且通过电泳将合成的基因从载体质粒DNA中分离。通过标准分子生物学技术将消化的 DNA接合到消化前的质粒DNA上(对于J链为pCAGGS, Gene 108 (1991) 193-200)。接合的DNA被转化成感受态细菌并且铺于具有多重选择性抗生素的LB板上。挑出若干菌落并且通过标准分子生物学技术制得DNA制剂。通过测序证实所制备的DNA。只有具有与设计的DNA序列100%DNA序列匹配的细菌克隆才可用于质粒DNA制备且随后用于细胞转染。

[0231] c. 不同的J链。为了证明J链变体能与IgM结合,构建两个不同的J链变体,它们具有并入抗CD3抗体(OKT3 scFv)的不同融合位点。

[0232] i. 此构建体是由与人J链的N末端融合的OKT3(抗CD3)的scFv 构成(CD3scFv-15aa 接头-J):

[0233]

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSR
GYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWG
QGTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSY
MNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLGSGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYY
CQQWSSNPFTFGSGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQEDERIVLVDNKCKCARITS
RIIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSLCKKCDPT
EVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALT
PDACYPDGGGSEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH-

(SEQ ID NO: 46)

[0234] 此构建体具有约45kD的分子量并能结合至CD3(Sino Biological)的可溶性 ϵ 链,或T细胞;并且能够结合至抗myc单克隆抗体4A6或其他抗myc抗体。

[0235] ii.此构建体是由与人J链的C末端融合的0KT3(抗CD3)的scFv 构成(J-15aa接头-CD3scFv):

[0236]

QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTS
PLRTRFVYHLSLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCY
TAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPDGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELAR
PGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA
TLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTTLTVSSGGGG
SGGGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPK
RWIYDTSKLGSGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGS
GTKLEIKEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH-

(SEQ ID NO: 47)

[0237] 此J-CD3scFv构建体具有约45kD的分子量并能结合至CD3(Sino Biological)的可溶性 ϵ 链,或T细胞;并且能够结合至抗myc单克隆抗体4A6或其他抗myc抗体。

[0238] d.IgM重链:此重链构建体具有IGM-55.5的全长 μ 链,其结合 B细胞表面上的CDIM:

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSG
STNYPNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGRMAWGASVNFY
WGQGTLLTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKY
KNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCVKVQHPNGNKEK
NVPLPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQ
VGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQN

[0239]

ASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTITYDSVTISWTRQNG
EAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSEGERFTCTVTHTDLPSPKQTIS
RPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVVFVQWMQRGQPLSP
EKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTV
DKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

(SEQ ID NO: 3)

[0240] 此重链构建体具有约64kD的分子量,并且当与轻链共表达时,所生成的IgM能够结合至CDIM阳性B细胞。

[0241] e. IGM-55.5的轻链被称为IGM-55.5,其结合B细胞表面上的CDIM(细胞死亡诱导分子):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGTRLEIKRTV

[0242]

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 5)

[0243] 该轻链构建体具有约24kD的分子量,并且当与适当的重链(SEQ ID NO 3)共表达时,能够结合至CDIM阳性B细胞。

[0244] 2. 蛋白质表达、纯化及表征

[0245] a. 转染。重链、轻链及修饰的J链DNA被转染到CHO细胞中。表达载体的DNA通常以1:1:1的比率与PEI混合,然后添加到CHO-S细胞中。根据确定的技术(参见“Biotechnology and Bioengineering,第87卷,553-545”)用CHO-S细胞进行PEI转染。

[0246] b. 免疫沉淀

[0247] i. 捕获选择的IgM(BAC, Thermo Fisher)。根据制造商方案(GE Life Sciences),通过用捕获选择的IgM亲和基质的免疫沉淀来部分纯化来自转染的CHO细胞上清液的IgM蛋白。在室温下培养2小时后,通过离心将亲和基质从上清液中分离。在小心地除去PBS之前,用PBS进一步洗涤基质3次。通过用NuPage LDS蛋白缓冲液(Life Technology)培养5分钟从基质中洗脱捕获的蛋白质。

[0248] ii. 抗myc琼脂糖亲和基质(Sigma)。根据制造商方案,通过用抗myc亲和基质的免疫沉淀来部分纯化来自转染的CHO细胞上清液的IgM蛋白。在室温下培养2小时后,通过离心将亲和基质从上清液中分离。在最后一次洗涤之后小心地除去PBS之前,用PBS进一步洗

涤基质3次。通过用NuPage LDS蛋白缓冲液(Life Technology)培养5 分钟从基质中洗脱捕获的蛋白质。

[0249] c.凝胶电泳

[0250] i.非还原SDS PAGE

[0251] ii.非还原SDS PAGE根据尺寸分离天然IgM及其突变形式。由同二聚体重链和轻链构成的五聚IgM产生大约1,000,000分子量的蛋白质条带。在加样到凝胶上之前,在25C下将NuPage LDS样品缓冲液(Life Technologies)添加到IgM蛋白样品中持续30分钟。NativePage Novex 3-12%Bis-Tris凝胶(Life Technologies)是与Novex Tris-乙酸酯SDS运行缓冲液(Life Technologies)一起使用。跑胶直到染料前沿到达凝胶的底部。

[0252] iii.还原SDS-PAGE。将NuPage LDS样品缓冲液(Life Technologies)和NuPage还原剂二硫苏糖醇(Life Technologies)添加到 IgM蛋白样品中并加热至80℃持续10分钟,之后加样到NuPage Novex 4-12%Bis-Tris凝胶(Life Technologies)上。将NuPage MES SDS 运行缓冲液(Life Technologies)用于凝胶电泳。跑胶直到染料前沿到达凝胶的底部。在电泳完成之后,从装置中除去凝胶并使用胶态蓝染色(Life Technologies)对凝胶进行染色。

[0253] iv.蛋白质印迹。在电泳完成之后,从XCell SureLock Mini-Cell 中除去凝胶。在30伏下转移到PVDF膜上并持续1小时(参考Life Technologies手册)。在25C下用20ml在PBST中的3%BSA阻断1 小时。

[0254] 对于抗J链蛋白质印迹,在4C下将在3%BSA中的抗J(SP105, Thermo Fisher)以1:500添加到PBST中过夜。在室温下用PBST洗涤四次。在室温下将在3%BSA中的HRP-山羊抗兔IgG(Jackson Immunology)以1:5,000添加到PBST中持续1小时。在室温下用PBST 洗涤4次。在将印迹暴露于薄膜之前,添加10ml HRP化学发光底物(Thermo Fisher)持续10分钟。抗J链抗体仅与IgM反应,IgM与未修饰的J链(图6)或修饰的J链(图7)共表达。

[0255] 对于抗myc蛋白质印迹,在4C下将在3%BSA中的抗myc(4A6, Millipore)以1:200添加到PBST中过夜。在室温下用PBST洗涤四次。在室温下将在3%BSA中的HRP-山羊抗小鼠IgG(Jackson Immunology)以1:5,000添加到PBST中持续1小时。在室温下用PBST 洗涤4次。在将印迹暴露于薄膜之前,添加10ml HRP化学发光底物(Thermo Fisher)持续10分钟。抗myc抗体仅与具有myc标记的修饰的J链反应(图2)。

[0256] 3.双特异性功能分析

[0257] a.靶标结合的FACS分析

[0258] 通过抗体与T细胞系(Jurkat,CD3阳性细胞系)和B细胞系(Nalm6,阴性对照细胞系)的结合证实了结合至T细胞的具有 CD3scFv-J的IGM-55.5或具有J-CD3scFv的IGM-55.5。在洗涤之后,将若丹明标记的4A6添加到细胞悬液中。通过有或没有CD3抗原的阳性和阴性对照细胞的MFI检测细胞靶标结合。

[0259] 通过抗体与阳性细胞系(Daudi,阳性细胞系)和阴性细胞系(Peer) 的结合证实了结合至CDIM表达细胞的具有CD3scFv-J的IGM-55.5 或具有J-CD3scFv的IGM-55.5。在洗涤之后,将若丹明标记的4A6 添加到细胞悬液中。通过有或没有CDIM抗原的阳性和阴性对照细胞的MFI检测细胞靶标结合。

[0260] b.在共培养中T细胞介导的B细胞杀伤的FACS分析

[0261] 将Raji,即CD19+CD20+B细胞系与具有CD20 IgM x J野生型或CD20 IgM x CD3-J链的T-ALL (CD8+溶细胞T细胞系) 在37度、5%CO₂下共培养24小时。收获细胞并用针对CD3 (552852/BD Biosciences) 和CD19 (555413/BD Biosciences) 的荧光抗体染色并且通过流式细胞术进行分析以评价存活的B细胞。

[0262] c.B细胞的补体依赖性细胞毒性

[0263] 将Ramos (即CD20+细胞系) 以25,000个细胞/孔接种于96孔半区域白板中。添加抗体和人补体 (5%最终,Quidel) 以起始补体依赖性细胞毒性并且使用Cell Titer Glo和制造商方案测量存活细胞的数量。使用每孔0.1s积分时间,在Envision多模式读取器 (Perkin Elmer) 上检测发光。通过对比没有添加药物的孔归一化发光值 (相对发光单位 -RLU) 来计算存活细胞的百分比。使用GraphPad Prism和四参数拟合来分析数据,其中顶值和底值分别固定在100和0%存活力。

[0264] 可使用本领域中已知的技术 (如以上所述的那些) 以类似方式进行多特异性结合和多特异性功能分析。

[0265] 实施例2:

[0266] 具有携带抗CD3结合scFv的修饰的J链的双特异性抗CD20IgM抗体的分子克隆、表达和纯化

[0267] 此实施例描述靶向不同B细胞抗原 (CD20) 的另一IgM抗体及结合至CD3的修饰的J链的分子克隆的制备、表达及纯化。使用实施例1中所述的方法制备对应于以下重链和轻链序列的DNA。

[0268] SEQ ID NO:48:抗CD20抗体 (利妥昔单抗) 的IgM轻链序列

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQIVLSQSPAILSPGKEKVTMTCRASSSVSYIHWFQKPGSSPKPWYATSNL
ASGVVPRVFRSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
[0269] ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

[0270] SEQ ID NO:49:抗CD20抗体 (利妥昔单抗) 的IgM重链序列

MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLQPGAEVLKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNG
DTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSSGSASAPTLFP
LVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMOGTDEH
VVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVSGSVT
[0271] TDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPDQDTAIRVFAIPPSFASIF
LTKSTKLTLCLVTDLTITYDSVTISWTRQNGEAVKTHNTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDL
PSPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPE
PQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

[0272] 将对应于这些重链和轻链以及对应于实施例1中所述的野生型 (wt) J链、015J或J150 J链序列的DNA共同转染到HEK293细胞中并且使用先前所述的骆驼科树脂表达和纯化蛋白质。如图13中所示,所有四种蛋白质都良好地表达。将不含J链的抗CD20 IgM六聚物清楚地与含有J链的五聚物 (对于具有野生型J链的IgM五聚物以及其中抗CD3 scFv与J链以任何取向 (015J或J150) 连接的双特异性IgM) 分辨开。

[0273] 实施例3:

[0274] 包含携带不同的抗CD3结合scFv的修饰的J链的双特异性抗CD20 IgM抗体的分子克隆、表达和纯化

[0275] 为了确定双特异性IgM与携带与实施例1和2中所用不同序列的抗CD3 scFv的修饰的J链的组装是可行的,进行携带来自抗体维西珠单抗(Nuvion)的可变区的J链的组装。具有对应于维西珠单抗(V)的scFv的两条J链的序列显示如下,所述scFv经由含有15aa的接头以两种不同取向-V15J和J15V融合至J链。

[0276] SEQ ID NO:50:V15J的J链序列

MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSG
YTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDAVYYCARSAYDYDGFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSG
GGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFT
[0277] LTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGQEDERIVLDNKCKCARITSRIIRS
SEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATET
CYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMKVETALTPDACYPD

[0278] SEQ ID NO:51:J15V的J链序列

MKNHLLFWGVLAFFIKAVHVKAQEDERIVLDNKCKCARITSRIIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDP
TSPLRTRFVYHLSLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMKVETA
LTPDACYPDGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYI
[0279] NPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDAVYYCARSAYDYDGFAYWGQGLTVTVSSGGGGSG
GGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK

[0280] 如实施例1中所述,合成对应于这些序列的DNA并且将其连同抗CD20 IgM的重链和轻链一起转染到HEK293细胞中以产生蛋白质,然后使用对IgM有特异性的骆驼科抗体亲和基质纯化该蛋白质。如图13所示,用15aa接头融合至新型抗CD3 scFv的J链能够并入IgM中并且可将具有相应J链的双特异性IgM的五聚形式与没有J链的六聚形式清楚地区分开。

[0281] 实施例4:

[0282] 包含第二效应细胞结合结构域的抗CD16骆驼科修饰的J链形式的IgM的分子克隆、表达和纯化-抗CD16骆驼科

[0283] 此实施例证明有可能将不同于scFv的结合部分连接至J链,其涉及不同效应细胞群上的不同靶标。使用如下所示的骆驼科Vhh序列,选出所述序列以结合至天然杀伤细胞(NK细胞)上的CD16抗原。同样,使用柔性15aa接头将此序列与J链连接以产生C15J。如实施例1中所述表达和纯化双特异性IgM并且在杂化凝胶上进行分析。清楚地看见形成五聚物质。此外,使用蛋白质印迹确定C15J J链向五聚IgM中的并入(图18)。

[0284] SEQ ID NO:52:C15J的J链序列

MGWSYIILFLVATATGVHSEVQLVESGGELVQAGGSLRLSCAASGLTFSSYNMGWFRAPGKEREFVASITWSGR
DTFYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMSSSLKPEDTAVYYCAANPWPVAAAPRSGTYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGG
[0285] SGGGGQEDERIVLDNKCKCARITSRIIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSLCK
KKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMKVETALTPDACYPD

[0286] 实施例5:

[0287] 有和没有并入的J链的IgM家族的补体依赖性细胞毒性的分析

[0288] 补体依赖性细胞毒性是通过抗体进行细胞杀伤的关键机制。已知IgM抗体由于其多聚形式而增强补体依赖性细胞杀伤(CDC)。本发明的一个关键方面是测试在其C或N末端并入携带效应细胞的scFv或骆驼科Vhh结合分子的修饰的J链是否会干扰C1q-补体途径的关键组分的结合,且因此可抑制CDC。我们测量了IgM和双特异性IgM构建体每一者的CDC活

性。如图14所示,我们发现并入修饰的J链出人意料地对我们的双特异性IgM的CDC活性没有不利影响。此外,在我们所测试的接头长度下,我们发现双特异性IgM在摩尔基础上具有比相应的IgG高60-100倍的CDC活性(图14)。

[0289] 实施例6:

[0290] 通过双特异性IgM体外共培养物的T细胞依赖性B细胞杀伤的分析

[0291] 效应T细胞与具有修饰的J链的双特异性IgM抗体的结合预期与不携带J链或野生型J链的IgM相比大大地增强靶B细胞群的杀伤。为了测试在共培养中的细胞杀伤,进行如实施例1中所述的细胞杀伤测定。将抗体以单个高浓度(100ng/mL)与CD20+Raji细胞和CD3+效应T-ALL细胞一起培养。如图15所示,在其J链上携带CD3结合scFv的双特异性IgM能够引起B细胞的完全杀伤。与剂量反应同样完成的实验显示与不载有能够结合T细胞的scFv的IgM相比在B细胞杀伤上存在大于300倍的增强。在低至10ng/mL的浓度下观察到双特异性IgM对B细胞的完全杀伤。

[0292] 实施例7:

[0293] 在NSG小鼠模型中T细胞依赖性B细胞体内杀伤的证明

[0294] 为了测试在体内环境中制造的双特异性IgM,用人源化非肥胖的重度糖尿病合并免疫缺陷 γ 空(NSG)小鼠进行实验。这些小鼠具有严重受损的免疫功能并且缺乏小鼠T-和B-淋巴细胞。用人CD34+干细胞对其进行重建以产生具有基本上人淋巴细胞群的小鼠。当在这些动物中以0.5mg/kg静脉内给予CD20 IgM x CD3-J链并且获得全血并通过流式细胞术对人B细胞的循环水平进行分析时,观察到即使短至6小时的治疗也可实现B细胞群的完全消耗(图17)。

[0295] 虽然若干实施方案已提供于本公开中,应理解在不背离本公开的精神或范围的情况下,所公开的系统和方法可以许多其他具体的形式实现。本发明的实施例被认为是说明性且非限制性的,且并非意在限制于本文所给出的细节。在不背离本文所公开的精神和范围的情况下,本领域的技术人员可作出变化、替代和变更的各种示例。

[0001] 序列表
 [0002] <110> IGM生物科学股份有限公司(IGM BIOSCIENCES, INC.)
 [0003] <120> 修饰的J链
 [0004] <130> IGM-0004-WO
 [0005] <140> PCT/US2015/024149
 [0006] <141> 2015-04-02
 [0007] <150> 61/974,738
 [0008] <151> 2014-04-03
 [0009] <160> 57
 [0010] <170> PatentIn version 3.5
 [0011] <210> 1
 [0012] <211> 137
 [0013] <212> PRT
 [0014] <213> 人(Homo sapiens)
 [0015] <400> 1
 [0016] Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala
 [0017] 1 5 10 15
 [0018] Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp
 [0019] 20 25 30
 [0020] Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu
 [0021] 35 40 45
 [0022] Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His
 [0023] 50 55 60
 [0024] Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp
 [0025] 65 70 75 80
 [0026] Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser
 [0027] 85 90 95
 [0028] Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala
 [0029] 100 105 110
 [0030] Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala
 [0031] 115 120 125
 [0032] Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp
 [0033] 130 135
 [0034] <210> 2
 [0035] <211> 137
 [0036] <212> PRT
 [0037] <213> 黑猩猩(Pan troglodytes)
 [0038] <400> 2

[0039]	Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala
[0040]	1 5 10 15
[0041]	Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp
[0042]	20 25 30
[0043]	Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu
[0044]	35 40 45
[0045]	Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His
[0046]	50 55 60
[0047]	Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp
[0048]	65 70 75 80
[0049]	Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser
[0050]	85 90 95
[0051]	Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Arg Ala
[0052]	100 105 110
[0053]	Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala
[0054]	115 120 125
[0055]	Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp
[0056]	130 135
[0057]	<210> 3
[0058]	<211> 574
[0059]	<212> PRT
[0060]	<213> 人工序列
[0061]	<220>
[0062]	<221> 来源
[0063]	<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic
[0064]	polypeptide"
[0065]	<400> 3
[0066]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
[0067]	1 5 10 15
[0068]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
[0069]	20 25 30
[0070]	Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[0071]	35 40 45
[0072]	Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
[0073]	50 55 60
[0074]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
[0075]	65 70 75 80
[0076]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0077]	85 90 95

[0078]	Arg Gly Arg Met Ala Trp Gly Ala Ser Val Asn Phe Asp Tyr Trp Gly
[0079]	100 105 110
[0080]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr
[0081]	115 120 125
[0082]	Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser
[0083]	130 135 140
[0084]	Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr
[0085]	145 150 155 160
[0086]	Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly
[0087]	165 170 175
[0088]	Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val
[0089]	180 185 190
[0090]	Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val
[0091]	195 200 205
[0092]	Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu
[0093]	210 215 220
[0094]	Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro
[0095]	225 230 235 240
[0096]	Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln
[0097]	245 250 255
[0098]	Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu
[0099]	260 265 270
[0100]	Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu
[0101]	275 280 285
[0102]	Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr
[0103]	290 295 300
[0104]	Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val
[0105]	305 310 315 320
[0106]	Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val
[0107]	325 330 335
[0108]	Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe
[0109]	340 345 350
[0110]	Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr
[0111]	355 360 365
[0112]	Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn
[0113]	370 375 380
[0114]	Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn
[0115]	385 390 395 400
[0116]	Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp

[0117]		405		410		415
[0118]	Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro					
[0119]		420		425		430
[0120]	Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His					
[0121]		435		440		445
[0122]	Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu					
[0123]		450		455		460
[0124]	Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala					
[0125]	465		470		475	480
[0126]	Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu					
[0127]		485		490		495
[0128]	Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg					
[0129]		500		505		510
[0130]	Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr					
[0131]		515		520		525
[0132]	Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg					
[0133]		530		535		540
[0134]	Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr					
[0135]	545		550		555	560
[0136]	Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr					
[0137]		565		570		
[0138]	<210> 4					
[0139]	<211> 137					
[0140]	<212> PRT					
[0141]	<213> 猩猩(Pongo abelii)					
[0142]	<400> 4					
[0143]	Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala					
[0144]	1	5		10		15
[0145]	Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp					
[0146]		20		25		30
[0147]	Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu					
[0148]		35		40		45
[0149]	Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His					
[0150]		50		55		60
[0151]	Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp					
[0152]	65		70		75	80
[0153]	Asn Gln Ile Val Ile Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser					
[0154]		85		90		95
[0155]	Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala					

[0156]	100	105	110
[0157]	Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Ala Ala		
[0158]	115	120	125
[0159]	Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp		
[0160]	130	135	
[0161]	<210> 5		
[0162]	<211> 214		
[0163]	<212> PRT		
[0164]	<213> 人工序列		
[0165]	<220>		
[0166]	<221> 来源		
[0167]	<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic		
[0168]	polypeptide"		
[0169]	<400> 5		
[0170]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0171]	1 5 10 15		
[0172]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr		
[0173]	20 25 30		
[0174]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[0175]	35 40 45		
[0176]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0177]	50 55 60		
[0178]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0179]	65 70 75 80		
[0180]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile		
[0181]	85 90 95		
[0182]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
[0183]	100 105 110		
[0184]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
[0185]	115 120 125		
[0186]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
[0187]	130 135 140		
[0188]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
[0189]	145 150 155 160		
[0190]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
[0191]	165 170 175		
[0192]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
[0193]	180 185 190		
[0194]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		

[0195]	195	200	205
[0196]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0197]	210		
[0198]	<210> 6		
[0199]	<211> 137		
[0200]	<212> PRT		
[0201]	<213> 狢猴(Callithrix jacchus)		
[0202]	<400> 6		
[0203]	Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala		
[0204]	1	5	10 15
[0205]	Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Asn Asp Pro Asn Glu Asp		
[0206]	20	25	30
[0207]	Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu		
[0208]	35	40	45
[0209]	Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His		
[0210]	50	55	60
[0211]	Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp		
[0212]	65	70	75 80
[0213]	Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser		
[0214]	85	90	95
[0215]	Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala		
[0216]	100	105	110
[0217]	Val Val Pro Leu Val Phe Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Ser Ala		
[0218]	115	120	125
[0219]	Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp		
[0220]	130	135	
[0221]	<210> 7		
[0222]	<211> 137		
[0223]	<212> PRT		
[0224]	<213> 食蟹猴(Macaca mulatta)		
[0225]	<400> 7		
[0226]	Gln Glu Gly Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala		
[0227]	1	5	10 15
[0228]	Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp		
[0229]	20	25	30
[0230]	Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu		
[0231]	35	40	45
[0232]	Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His		
[0233]	50	55	60

[0234]	Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp
[0235]	65 70 75 80
[0236]	Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser
[0237]	85 90 95
[0238]	Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala
[0239]	100 105 110
[0240]	Val Val Pro Leu Thr Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Gln Thr Ala
[0241]	115 120 125
[0242]	Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
[0243]	130 135
[0244]	<210> 8
[0245]	<211> 137
[0246]	<212> PRT
[0247]	<213> 狒狒(Papio anubis)
[0248]	<400> 8
[0249]	Gln Glu Gly Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala
[0250]	1 5 10 15
[0251]	Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp
[0252]	20 25 30
[0253]	Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu
[0254]	35 40 45
[0255]	Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His
[0256]	50 55 60
[0257]	Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp
[0258]	65 70 75 80
[0259]	Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Leu Cys Asp Glu Asp Ser
[0260]	85 90 95
[0261]	Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala
[0262]	100 105 110
[0263]	Val Val Pro Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Thr Lys Met Val Gln Thr Ala
[0264]	115 120 125
[0265]	Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
[0266]	130 135
[0267]	<210> 9
[0268]	<211> 137
[0269]	<212> PRT
[0270]	<213> 松鼠猴(Saimiri boliviensis)
[0271]	<400> 9
[0272]	Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Ala Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

[0273]	1	5	10	15
[0274]	Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Asn Asn Pro Asn Glu Asp			
[0275]	20	25	30	
[0276]	Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Val Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu			
[0277]	35	40	45	
[0278]	Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His			
[0279]	50	55	60	
[0280]	Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp			
[0281]	65	70	75	80
[0282]	Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser			
[0283]	85	90	95	
[0284]	Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Thr			
[0285]	100	105	110	
[0286]	Val Val Pro Leu Val Phe Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Lys Ala Thr			
[0287]	115	120	125	
[0288]	Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp			
[0289]	130	135		
[0290]	<210> 10			
[0291]	<211> 136			
[0292]	<212> PRT			
[0293]	<213> 树鼩(<i>Tupaia chinensis</i>)			
[0294]	<400> 10			
[0295]	Glu Asp Lys Gly Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Gln			
[0296]	1	5	10	15
[0297]	Val Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Asn Gln Asp Ile			
[0298]	20	25	30	
[0299]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Gly Asn Arg Glu Asn			
[0300]	35	40	45	
[0301]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu			
[0302]	50	55	60	
[0303]	Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Leu Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn			
[0304]	65	70	75	80
[0305]	Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala			
[0306]	85	90	95	
[0307]	Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Thr Met			
[0308]	100	105	110	
[0309]	Val Pro Leu Ile Phe Gly Gly Lys Thr Lys Met Val Gln Thr Ala Leu			
[0310]	115	120	125	
[0311]	Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp			

[0312]	130	135
[0313]	<210> 11	
[0314]	<211> 134	
[0315]	<212> PRT	
[0316]	<213> 海豚(Tursiops truncatus)	
[0317]	<400> 11	
[0318]	Glu Asp Glu Arg Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg	
[0319]	1 5 10 15	
[0320]	Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Ala Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile	
[0321]	20 25 30	
[0322]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Ser Arg Glu Asn	
[0323]	35 40 45	
[0324]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu	
[0325]	50 55 60	
[0326]	Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Leu Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn	
[0327]	65 70 75 80	
[0328]	Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ile Glu	
[0329]	85 90 95	
[0330]	Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Pro	
[0331]	100 105 110	
[0332]	Leu Thr Tyr Gly Gly Lys Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro	
[0333]	115 120 125	
[0334]	Asp Ser Cys Tyr Pro Asp	
[0335]	130	
[0336]	<210> 12	
[0337]	<211> 134	
[0338]	<212> PRT	
[0339]	<213> 虎鲸(Orcinus orca)	
[0340]	<400> 12	
[0341]	Glu Asp Glu Arg Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg	
[0342]	1 5 10 15	
[0343]	Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Ala Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile	
[0344]	20 25 30	
[0345]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Ser Arg Glu Asn	
[0346]	35 40 45	
[0347]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu	
[0348]	50 55 60	
[0349]	Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Leu Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn	
[0350]	65 70 75 80	

[0351]	Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ile Glu
[0352]	85 90 95
[0353]	Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Pro
[0354]	100 105 110
[0355]	Leu Thr Tyr Gly Gly Lys Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
[0356]	115 120 125
[0357]	Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
[0358]	130
[0359]	<210> 13
[0360]	<211> 134
[0361]	<212> PRT
[0362]	<213> 大象(<i>Loxodonta africana</i>)
[0363]	<400> 13
[0364]	Lys Asp Glu Arg Thr Leu Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Val Arg
[0365]	1 5 10 15
[0366]	Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Lys Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile
[0367]	20 25 30
[0368]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn
[0369]	35 40 45
[0370]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu
[0371]	50 55 60
[0372]	Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asp Asn
[0373]	65 70 75 80
[0374]	Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser Glu
[0375]	85 90 95
[0376]	Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Thr Val Pro
[0377]	100 105 110
[0378]	Leu Ile Tyr Gly Gly Lys Thr Lys Met Val Thr Thr Ala Leu Thr Pro
[0379]	115 120 125
[0380]	Asp Ser Cys Tyr Arg Asp
[0381]	130
[0382]	<210> 14
[0383]	<211> 134
[0384]	<212> PRT
[0385]	<213> 海豹(<i>Leptonychotes weddellii</i>)
[0386]	<400> 14
[0387]	Glu Asp Gly Arg Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Gln Cys Ala Arg
[0388]	1 5 10 15
[0389]	Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asn Pro Asn Glu Asp Ile

[0390]	20	25	30
[0391]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn		
[0392]	35	40	45
[0393]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu		
[0394]	50	55	60
[0395]	Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asp Asn		
[0396]	65	70	75
[0397]	Gln Val Val Ile Ala Ser Gln Ser Asn Leu Cys Asp Glu Asp Ser Glu		
[0398]	85	90	95
[0399]	Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Trp Val Pro		
[0400]	100	105	110
[0401]	Phe Thr Tyr Gly Gly Gln Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro		
[0402]	115	120	125
[0403]	Asp Ser Cys Tyr Pro Asp		
[0404]	130		
[0405]	<210> 15		
[0406]	<211> 133		
[0407]	<212> PRT		
[0408]	<213> 犀牛(Ceratotherium simum)		
[0409]	<400> 15		
[0410]	Glu Asp Glu Arg Ile Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Val Arg Ile		
[0411]	1	5	10
[0412]	Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val		
[0413]	20	25	30
[0414]	Glu Arg His Ile Arg Ile Val Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile		
[0415]	35	40	45
[0416]	Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Gln Phe Val Tyr His Leu Ser		
[0417]	50	55	60
[0418]	Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln		
[0419]	65	70	75
[0420]	Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser Glu Ile		
[0421]	85	90	95
[0422]	Cys Tyr Ala Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Pro Leu		
[0423]	100	105	110
[0424]	Thr Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Val Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp		
[0425]	115	120	125
[0426]	Ser Cys Tyr Pro Asp		
[0427]	130		
[0428]	<210> 16		

42

[0468]	Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Pro
[0469]	100 105 110
[0470]	Ile Met Tyr Gly Gly Gln Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
[0471]	115 120 125
[0472]	Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
[0473]	130
[0474]	<210> 18
[0475]	<211> 134
[0476]	<212> PRT
[0477]	<213> 大熊猫(Ailuropoda melanoleuca)
[0478]	<400> 18
[0479]	Glu Asp Gly Arg Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Gln Cys Ala Arg
[0480]	1 5 10 15
[0481]	Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile
[0482]	20 25 30
[0483]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn
[0484]	35 40 45
[0485]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu
[0486]	50 55 60
[0487]	Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Gly Asn
[0488]	65 70 75 80
[0489]	Gln Ile Val Ile Ala Ser Gln Ser Asn Leu Cys Asp Glu Asp Ser Glu
[0490]	85 90 95
[0491]	Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Pro
[0492]	100 105 110
[0493]	Phe Thr Tyr Gly Gly Gln Thr Arg Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
[0494]	115 120 125
[0495]	Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
[0496]	130
[0497]	<210> 19
[0498]	<211> 133
[0499]	<212> PRT
[0500]	<213> 雪貂(Mustela furo)
[0501]	<400> 19
[0502]	Asp Gly Met Thr Val Leu Ala Asp Asn Lys Cys Gln Cys Val Arg Ile
[0503]	1 5 10 15
[0504]	Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Ile
[0505]	20 25 30
[0506]	Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile

[0507]	35	40	45
[0508]	Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Asn Phe Val Tyr His Leu Ser		
[0509]	50	55	60
[0510]	Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln		
[0511]	65	70	75
[0512]	Ile Val Ile Ala Ser Gln Ser Asn Leu Cys Asp Glu Asp Ser Glu Thr		
[0513]	85	90	95
[0514]	Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Trp Val Pro Phe		
[0515]	100	105	110
[0516]	Thr Tyr Gly Gly Gln Thr Lys Met Val Gln Thr Ala Leu Thr Pro Asp		
[0517]	115	120	125
[0518]	Ser Cys Tyr Pro Asp		
[0519]	130		
[0520]	<210> 20		
[0521]	<211> 134		
[0522]	<212> PRT		
[0523]	<213> 马 (Equus caballus)		
[0524]	<400> 20		
[0525]	Glu Gly Glu Arg Ile Val Leu Ala Asp Asn Lys Cys Lys Cys Val Arg		
[0526]	1	5	10
[0527]	Val Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asn Pro Asn Glu Asp Ile		
[0528]	20	25	30
[0529]	Leu Glu Arg His Ile Arg Ile Ile Ile Pro Val Asn Ser Arg Glu Asn		
[0530]	35	40	45
[0531]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu		
[0532]	50	55	60
[0533]	Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asp Asn		
[0534]	65	70	75
[0535]	Gln Val Val Thr Ala Ser Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Glu Ser Glu		
[0536]	85	90	95
[0537]	Thr Cys Tyr Ala Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Pro		
[0538]	100	105	110
[0539]	Leu Thr Tyr Gly Gly Gln Thr Lys Ile Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro		
[0540]	115	120	125
[0541]	Asp Ser Cys Tyr Pro Asp		
[0542]	130		
[0543]	<210> 21		
[0544]	<211> 136		
[0545]	<212> PRT		

[0546]	<213> 豚鼠 (Cavia porcellus)															
[0547]	<400> 21															
[0548]	Glu	Glu	Glu	Arg	Thr	Val	Leu	Ala	Asp	Asn	Lys	Cys	Gln	Cys	Ala	Arg
[0549]	1				5					10					15	
[0550]	Val	Thr	Ser	Arg	Val	Ile	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Pro	Val	Glu	Asp	Ile
[0551]				20					25					30		
[0552]	Val	Glu	Arg	His	Ile	Arg	Ile	Ile	Val	Pro	Leu	Asn	Ser	Arg	Glu	Asn
[0553]				35					40					45		
[0554]	Ile	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Arg	Thr	Lys	Phe	Val	Tyr	His	Leu
[0555]		50						55				60				
[0556]	Ser	Asp	Leu	Cys	Lys	Lys	Cys	Asp	Pro	Val	Glu	Val	Glu	Leu	Asp	Asp
[0557]	65					70					75				80	
[0558]	Gln	Val	Val	Thr	Ala	Thr	Gln	Ser	Asn	Leu	Cys	Glu	Asp	Asp	Arg	Glu
[0559]					85					90					95	
[0560]	Pro	Glu	Thr	Cys	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Arg	Asn	Lys	Cys	Tyr	Thr	Asn	Val
[0561]				100					105					110		
[0562]	Val	Pro	Leu	Ser	Tyr	Gly	Gly	Lys	Thr	Lys	Leu	Val	Thr	Ala	Ala	Leu
[0563]				115					120					125		
[0564]	Thr	Pro	Asp	Ser	Cys	Tyr	Pro	Asp								
[0565]		130							135							
[0566]	<210> 22															
[0567]	<211> 134															
[0568]	<212> PRT															
[0569]	<213> 骆驼 (Camelus ferus)															
[0570]	<400> 22															
[0571]	Glu	Asp	Glu	Ser	Thr	Val	Leu	Val	Asp	Asn	Lys	Cys	Lys	Cys	Ala	Arg
[0572]	1				5					10					15	
[0573]	Ile	Thr	Ser	Arg	Ile	Ile	Pro	Ser	Pro	Glu	Asp	Pro	Ser	Gln	Asp	Ile
[0574]				20						25				30		
[0575]	Val	Glu	Arg	Asn	Ile	Arg	Ile	Ile	Val	Pro	Leu	Asn	Asn	Arg	Glu	Asn
[0576]				35						40				45		
[0577]	Ile	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Arg	Thr	Lys	Phe	Glu	Tyr	His	Leu
[0578]		50						55				60				
[0579]	Ser	Asp	Leu	Cys	Lys	Lys	Cys	Asp	Leu	Thr	Glu	Val	Glu	Leu	Gly	Asn
[0580]	65					70					75				80	
[0581]	Arg	Val	Val	Thr	Ala	Thr	Gln	Ser	Asn	Leu	Cys	Asp	Asp	Asp	Ile	Glu
[0582]					85					90					95	
[0583]	Thr	Cys	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Arg	Asn	Lys	Cys	Tyr	Thr	Asn	Lys	Val	Pro
[0584]				100					105					110		

[0585]	Phe Thr Tyr Asp Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
[0586]	115 120 125
[0587]	Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
[0588]	130
[0589]	<210> 23
[0590]	<211> 134
[0591]	<212> PRT
[0592]	<213> 山羊(Capra hircus)
[0593]	<400> 23
[0594]	Glu Asn Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg
[0595]	1 5 10 15
[0596]	Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Ala Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile
[0597]	20 25 30
[0598]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Ser Arg Glu Asn
[0599]	35 40 45
[0600]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Met Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu
[0601]	50 55 60
[0602]	Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Thr Arg Glu Val Glu Leu Glu Asp
[0603]	65 70 75 80
[0604]	Gln Val Val Thr Ala Ser Gln Ser Asn Ile Cys Asp Arg Asp Thr Glu
[0605]	85 90 95
[0606]	Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Lys
[0607]	100 105 110
[0608]	Leu Asn Tyr Arg Gly Gln Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
[0609]	115 120 125
[0610]	Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
[0611]	130
[0612]	<210> 24
[0613]	<211> 136
[0614]	<212> PRT
[0615]	<213> 灰鼠(Chinchilla lanigera)
[0616]	<400> 24
[0617]	Glu Glu Lys Lys Thr Ile Leu Ala Asp Asn Lys Cys Gln Cys Ala Arg
[0618]	1 5 10 15
[0619]	Val Ser Ser Arg Val Ile Arg Ser Pro Glu Asn Pro Asn Glu Asp Ile
[0620]	20 25 30
[0621]	Val Glu Arg Tyr Ile Arg Ile Ile Val Pro Val Asn Asn Arg Glu Asn
[0622]	35 40 45
[0623]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Arg Arg Thr Gln Phe Val Tyr His Leu

[0624]	50	55	60
[0625]	Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asn Asn		
[0626]	65	70	75 80
[0627]	Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Leu Cys Glu Glu Asp Gly Glu		
[0628]	85	90	95
[0629]	Pro Glu Thr Cys Tyr Ala Tyr Asn Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val		
[0630]	100	105	110
[0631]	Val Pro Leu Thr Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Pro Val Lys Val Ala Leu		
[0632]	115	120	125
[0633]	Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Ala Asp		
[0634]	130	135	
[0635]	<210> 25		
[0636]	<211> 137		
[0637]	<212> PRT		
[0638]	<213> 仓鼠 (<i>Mesocricetus auratus</i>)		
[0639]	<400> 25		
[0640]	Asp Asn Glu Lys Thr Ile Leu Ala Asp Asn Lys Cys Met Cys Thr Arg		
[0641]	1	5	10 15
[0642]	Val Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Thr Glu Asn Pro Asn Glu Asp Ile		
[0643]	20	25	30
[0644]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Val Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn		
[0645]	35	40	45
[0646]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu		
[0647]	50	55	60
[0648]	Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asp Asp		
[0649]	65	70	75 80
[0650]	His Ile Val Thr Ala Ser Gln Ser Thr Ile Cys Ser Glu Asp Ser Val		
[0651]	85	90	95
[0652]	Val Pro Glu Thr Cys Tyr Met Tyr Asn Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala		
[0653]	100	105	110
[0654]	Met Val Pro Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Thr Lys Met Val Pro Ser Ala		
[0655]	115	120	125
[0656]	Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp		
[0657]	130	135	
[0658]	<210> 26		
[0659]	<211> 134		
[0660]	<212> PRT		
[0661]	<213> 绵羊 (<i>Ovis aries</i>)		
[0662]	<400> 26		

[0663]	Glu Asn Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg
[0664]	1 5 10 15
[0665]	Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Ala Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile
[0666]	20 25 30
[0667]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Ser Arg Glu Asn
[0668]	35 40 45
[0669]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Met Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu
[0670]	50 55 60
[0671]	Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Thr Arg Glu Val Glu Leu Glu Asp
[0672]	65 70 75 80
[0673]	Gln Val Val Thr Ala Ser Gln Ser Asn Ile Cys Asp Arg Asp Thr Glu
[0674]	85 90 95
[0675]	Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Lys
[0676]	100 105 110
[0677]	Leu Asn Tyr Arg Gly Gln Thr Lys Leu Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
[0678]	115 120 125
[0679]	Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
[0680]	130
[0681]	<210> 27
[0682]	<211> 134
[0683]	<212> PRT
[0684]	<213> 棕蝠(Myotis lucifugus)
[0685]	<400> 27
[0686]	Glu Asp Glu Arg Thr Val Leu Ala Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg
[0687]	1 5 10 15
[0688]	Val Thr Ser Arg Val Ile Pro Ser Pro Asp Asp Pro Thr Gln Glu Ile
[0689]	20 25 30
[0690]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Val Asn Asn Arg Glu Asn
[0691]	35 40 45
[0692]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu
[0693]	50 55 60
[0694]	Ser Glu Met Cys Lys Lys Cys Asp Thr Thr Gln Val Glu Leu Glu Asn
[0695]	65 70 75 80
[0696]	Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Asn Glu
[0697]	85 90 95
[0698]	Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Lys Val Pro
[0699]	100 105 110
[0700]	Phe Ser Tyr Gly Gly Lys Thr Val Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
[0701]	115 120 125

[0702]	Glu Ser Cys Tyr Pro Asp
[0703]	130
[0704]	<210> 28
[0705]	<211> 134
[0706]	<212> PRT
[0707]	<213> 羚羊(Pantholops hodgsonii)
[0708]	<400> 28
[0709]	Glu Asn Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg
[0710]	1 5 10 15
[0711]	Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Ala Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile
[0712]	20 25 30
[0713]	Val Glu Arg Asn Val Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Ser Arg Glu Asn
[0714]	35 40 45
[0715]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Met Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu
[0716]	50 55 60
[0717]	Ser Asp Leu Cys Lys Arg Cys Asp Thr Arg Glu Val Glu Leu Glu Asp
[0718]	65 70 75 80
[0719]	Gln Val Val Thr Ala Ser Gln Ser Asn Ile Cys Asp Arg Asp Thr Glu
[0720]	85 90 95
[0721]	Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Lys
[0722]	100 105 110
[0723]	Leu Asn Tyr Arg Gly Gln Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
[0724]	115 120 125
[0725]	Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
[0726]	130
[0727]	<210> 29
[0728]	<211> 133
[0729]	<212> PRT
[0730]	<213> 母牛(Bos taurus)
[0731]	<400> 29
[0732]	Glu Asn Glu Arg Ile Val Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile
[0733]	1 5 10 15
[0734]	Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Ala Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile Val
[0735]	20 25 30
[0736]	Glu Arg Asn Val Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Ser Arg Glu Asn Ile
[0737]	35 40 45
[0738]	Ser Asp Pro Thr Ser Pro Met Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu Ser
[0739]	50 55 60
[0740]	Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Thr Thr Glu Val Glu Leu Glu Asp Gln

[0741]	65	70	75	80
[0742]	Val Val Thr Ala Ser Gln Ser Asn Ile Cys Asp Ser Asp Ala Glu Thr			
[0743]	85	90	95	
[0744]	Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Lys Leu			
[0745]	100	105	110	
[0746]	Ser Tyr Arg Gly Gln Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp			
[0747]	115	120	125	
[0748]	Ser Cys Tyr Pro Asp			
[0749]	130			
[0750]	<210> 30			
[0751]	<211> 137			
[0752]	<212> PRT			
[0753]	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
[0754]	<400> 30			
[0755]	Asp Asp Glu Ala Thr Ile Leu Ala Asp Asn Lys Cys Met Cys Thr Arg			
[0756]	1	5	10	15
[0757]	Val Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Thr Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile			
[0758]	20	25	30	
[0759]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Val Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn			
[0760]	35	40	45	
[0761]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Arg Asn Phe Val Tyr His Leu			
[0762]	50	55	60	
[0763]	Ser Asp Val Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Glu Asp			
[0764]	65	70	75	80
[0765]	Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asn Glu Asp Asp Gly			
[0766]	85	90	95	
[0767]	Val Pro Glu Thr Cys Tyr Met Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Thr			
[0768]	100	105	110	
[0769]	Met Val Pro Leu Arg Tyr His Gly Glu Thr Lys Met Val Gln Ala Ala			
[0770]	115	120	125	
[0771]	Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp			
[0772]	130	135		
[0773]	<210> 31			
[0774]	<211> 137			
[0775]	<212> PRT			
[0776]	<213> 大鼠 (Rattus norvegicus)			
[0777]	<400> 31			
[0778]	Asp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Ala Asp Asn Lys Cys Met Cys Thr Arg			
[0779]	1	5	10	15

[0780]	Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile
[0781]	20 25 30
[0782]	Val Glu Arg Ser Ile Arg Ile Val Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn
[0783]	35 40 45
[0784]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Asn Phe Val Tyr His Leu
[0785]	50 55 60
[0786]	Ser Asp Val Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Glu Asp
[0787]	65 70 75 80
[0788]	Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Ser Gly Asp Ser Gly
[0789]	85 90 95
[0790]	Val Pro Glu Thr Cys Tyr Met Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala
[0791]	100 105 110
[0792]	Met Val Pro Leu Arg Tyr His Gly Glu Thr Lys Met Val Gln Thr Ala
[0793]	115 120 125
[0794]	Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
[0795]	130 135
[0796]	<210> 32
[0797]	<211> 133
[0798]	<212> PRT
[0799]	<213> 刺猬(Echinops telfairi)
[0800]	<400> 32
[0801]	Lys Asp Glu Gly Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Val Arg
[0802]	1 5 10 15
[0803]	Val Thr Ala Arg Ser Ile Pro Ser Thr Glu Asp Pro Asn Glu Glu Ile
[0804]	20 25 30
[0805]	Leu Glu Lys Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Gly Ser Arg Glu Asn
[0806]	35 40 45
[0807]	Ile Ser Asp Pro Asn Ser Pro Val Arg Thr Thr Phe Val Tyr His Met
[0808]	50 55 60
[0809]	Thr Asp Leu Tyr Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asp Asn
[0810]	65 70 75 80
[0811]	Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Gly Cys Asp Glu Asp Glu Thr
[0812]	85 90 95
[0813]	Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Val Val Pro Leu
[0814]	100 105 110
[0815]	Thr Tyr Gly Gly Lys Thr Tyr Met Val Arg Thr Ala Leu Thr Pro Asp
[0816]	115 120 125
[0817]	Ser Cys Tyr Pro Asp
[0818]	130

[0819]	<210>	33
[0820]	<211>	136
[0821]	<212>	PRT
[0822]	<213>	兔 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)
[0823]	<400>	33
[0824]	Glu Asp Glu Ser Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Gln Cys Val Arg	
[0825]	1	5 10 15
[0826]	Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Asp Pro Asp Asn Pro Ser Glu Asp Ile	
[0827]	20	25 30
[0828]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Thr Arg Glu Asn	
[0829]	35	40 45
[0830]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Leu	
[0831]	50	55 60
[0832]	Ala Asn Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Ile Glu Leu Asp Asn	
[0833]	65	70 75 80
[0834]	Gln Val Phe Thr Ala Ser Gln Ser Asn Ile Cys Pro Asp Asp Asp Tyr	
[0835]	85	90 95
[0836]	Ser Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Thr Leu	
[0837]	100	105 110
[0838]	Val Pro Ile Thr His Arg Gly Gly Thr Arg Met Val Lys Ala Thr Leu	
[0839]	115	120 125
[0840]	Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp	
[0841]	130	135
[0842]	<210>	34
[0843]	<211>	134
[0844]	<212>	PRT
[0845]	<213>	负鼠 (<i>Monodelphis domestica</i>)
[0846]	<400>	34
[0847]	Glu Asp Glu Gly Arg Ile Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Val Arg	
[0848]	1	5 10 15
[0849]	Val Thr Ser Arg Leu Val Pro Ser Lys Asp Asn Pro Glu Glu Lys Val	
[0850]	20	25 30
[0851]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Leu Ile Val Pro Leu Arg Asn Arg Glu Asn	
[0852]	35	40 45
[0853]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Arg Phe Val Tyr Arg Leu	
[0854]	50	55 60
[0855]	Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Leu Glu Leu Asn Asn	
[0856]	65	70 75 80
[0857]	Glu Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Asn Cys Asp Asp Thr Ser Glu	

[0858]	85																90				95			
[0859]	Thr	Cys	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Arg	Asn	Lys	Cys	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Ala								
[0860]	100								105				110											
[0861]	Leu	Tyr	Leu	Glu	Gly	Glu	Thr	Arg	Leu	Val	Thr	Thr	Ala	Leu	Thr	Pro								
[0862]	115						120				125													
[0863]	Glu	Ser	Cys	Tyr	Asn	Asp																		
[0864]	130																							
[0865]	<210> 35																							
[0866]	<211> 134																							
[0867]	<212> PRT																							
[0868]	<213> 短吻鳄(Alligator mississippiensis)																							
[0869]	<400> 35																							
[0870]	Glu	Glu	Trp	Glu	Glu	His	Val	Leu	Val	Asp	Asn	Lys	Cys	Gln	Cys	Val								
[0871]	1	5				10				15														
[0872]	Arg	Val	Thr	Ser	Lys	Phe	Val	Pro	Ser	Lys	Asp	Asn	Pro	Gln	Glu	Glu								
[0873]	20						25				30													
[0874]	Ile	Leu	Glu	Arg	Asn	Ile	Arg	Val	Ile	Val	Pro	Leu	Lys	Ser	Arg	Met								
[0875]	35						40				45													
[0876]	Asn	Ile	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Arg	Thr	Thr	Phe	Val	Tyr	Arg								
[0877]	50				55				60															
[0878]	Leu	Ser	Glu	Leu	Cys	Lys	Lys	Cys	Asp	Pro	Thr	Glu	Ile	Glu	Leu	Gly								
[0879]	65	70						75				80												
[0880]	Gly	Gln	Ile	Val	Thr	Ala	Gln	Gln	Ser	Thr	Asp	Cys	Ser	Lys	Ser	Asp								
[0881]	85						90				95													
[0882]	Thr	Cys	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Arg	Asn	Lys	Cys	Tyr	Thr	Thr	Thr	Phe	Pro								
[0883]	100						105				110													
[0884]	Phe	Ala	Tyr	Gly	Gly	Gln	Thr	Lys	Asn	Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Thr	Pro								
[0885]	115						120				125													
[0886]	Ala	Ser	Cys	Tyr	Ala	Asp																		
[0887]	130																							
[0888]	<210> 36																							
[0889]	<211> 134																							
[0890]	<212> PRT																							
[0891]	<213> 龟(Chrysemys picta)																							
[0892]	<400> 36																							
[0893]	Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	His	Val	Leu	Val	Asp	Asn	Lys	Cys	Lys	Cys	Ala								
[0894]	1	5				10				15														
[0895]	Arg	Val	Thr	Ser	Lys	Phe	Val	Pro	Ser	Lys	Asp	Asn	Pro	Gln	Glu	Glu								
[0896]	20						25				30													

[0897]	Val	Leu	Val	Arg	Asn	Ile	Arg	Val	Ile	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Arg	Lys
[0898]			35						40					45		
[0899]	Asn	Ile	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Pro	Val	Arg	Thr	Thr	Phe	Val	Tyr	Arg
[0900]			50						55					60		
[0901]	Leu	Ser	Glu	Leu	Cys	Lys	Lys	Cys	Asp	Pro	Thr	Glu	Val	Glu	Leu	Gly
[0902]	65					70					75					80
[0903]	Asp	Arg	Val	Val	Thr	Ala	Glu	Gln	Ser	Asn	Asn	Cys	Ser	Ser	Ser	Asp
[0904]					85					90						95
[0905]	Thr	Cys	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Arg	Asn	Lys	Cys	Tyr	Thr	Thr	Thr	Phe	Pro
[0906]					100					105					110	
[0907]	Phe	Phe	Tyr	Gly	Gly	Lys	Ile	Asn	Thr	Val	Gln	Ala	Ala	Leu	Thr	Pro
[0908]					115					120					125	
[0909]	Glu	Ser	Cys	Tyr	Ala	Asp										
[0910]					130											
[0911]	<210> 37															
[0912]	<211> 132															
[0913]	<212> PRT															
[0914]	<213> 塔斯马尼亚恶魔(Sarcophilus harrisii)															
[0915]	<400> 37															
[0916]	Glu	Asp	Glu	Gly	Arg	Ile	Leu	Val	Asp	Asn	Lys	Cys	Gln	Cys	Val	Arg
[0917]	1				5					10					15	
[0918]	Val	Thr	Ser	Arg	Leu	Val	Pro	Ser	Lys	Asp	Asn	Pro	Glu	Val	Glu	Val
[0919]					20					25					30	
[0920]	Val	Glu	Arg	Asn	Ile	Arg	Leu	Ile	Val	Pro	Leu	Lys	Asn	Arg	Glu	Asn
[0921]					35					40					45	
[0922]	Ile	Ser	Asp	Pro	Asn	Ser	Pro	Val	Arg	Thr	Asn	Phe	Val	Tyr	Arg	Leu
[0923]			50						55					60		
[0924]	Ser	Asn	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Asp	Pro	Ile	Glu	Leu	Glu	Leu	Gly	Asn
[0925]	65					70					75					80
[0926]	Glu	Ile	Val	Thr	Ala	Thr	Gln	Ser	Asn	Asn	Trp	Ser	Cys	Gly	Thr	Cys
[0927]					85					90						95
[0928]	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Arg	Asn	Lys	Cys	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Leu	Asp
[0929]					100					105					110	
[0930]	Leu	Gly	Gly	Lys	Ser	Thr	Met	Val	Thr	Thr	Ala	Leu	Thr	Pro	Glu	Ser
[0931]					115					120					125	
[0932]	Cys	Tyr	Ser	Asp												
[0933]					130											
[0934]	<210> 38															
[0935]	<211> 125															

[0936]	<212>	PRT
[0937]	<213>	鸭嘴兽(Ornithorhynchus anatinus)
[0938]	<400>	38
[0939]	Asn Lys Cys Lys Cys Thr Arg Val Thr Ser Lys Phe Val Pro Ser Lys	
[0940]	1 5 10 15	
[0941]	Glu Asp Pro Ser Val Lys Val Leu Glu Arg Asn Ile Arg Val Ile Ile	
[0942]	20 25 30	
[0943]	Pro Leu Lys Ala Arg Gln Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Pro Arg	
[0944]	35 40 45	
[0945]	Thr Arg Phe Val Tyr Glu Leu Ser Lys Leu Cys Gln Lys Cys Asp Gln	
[0946]	50 55 60	
[0947]	Thr Glu Val Glu Leu Asp His Glu Val Val Thr Ala Thr Arg Gly Asn	
[0948]	65 70 75 80	
[0949]	Ser Cys Asp Arg Pro Gly Asp Asp Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys	
[0950]	85 90 95	
[0951]	Cys Tyr Met Ser Thr Ile Pro Phe Thr Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Val	
[0952]	100 105 110	
[0953]	Val Asn Thr Val Leu Thr Pro Glu Ser Cys Tyr Pro Asp	
[0954]	115 120 125	
[0955]	<210>	39
[0956]	<211>	133
[0957]	<212>	PRT
[0958]	<213>	长尾小鹦鹉(Melopsittacus undulatus)
[0959]	<400>	39
[0960]	Glu Asp Met Glu Arg Val Leu Val Asn Asn Lys Cys Gln Cys Val Thr	
[0961]	1 5 10 15	
[0962]	Val Thr Ser Lys Leu Val Arg Ser Lys Glu Asn Pro Asn Glu Glu Ile	
[0963]	20 25 30	
[0964]	Leu Gln Arg Asn Ile Arg Ile Leu Val Pro Leu Lys Ala Arg Glu Asn	
[0965]	35 40 45	
[0966]	Ile Ser Asp Pro Leu Ser Pro Leu Arg Thr Thr Phe Val Tyr Arg Met	
[0967]	50 55 60	
[0968]	Thr Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Phe Glu Leu Gly Gly	
[0969]	65 70 75 80	
[0970]	Glu Ile Tyr Lys Ala Gln Gln Ser Asn Ser Cys Asp Glu Pro Glu Thr	
[0971]	85 90 95	
[0972]	Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asp Lys Cys Tyr Thr Thr Asn Phe Pro Phe	
[0973]	100 105 110	
[0974]	Leu Tyr His Gly Glu Thr Lys Asn Leu Gln Ala Val Leu Thr Pro Ala	

[0975]	115	120	125
[0976]	Ser Cys Tyr Ala Asp		
[0977]	130		
[0978]	<210> 40		
[0979]	<211> 133		
[0980]	<212> PRT		
[0981]	<213> 鸭(Anas platyrhynchos)		
[0982]	<400> 40		
[0983]	Asp Gly Glu Glu Arg Val Leu Val Asn Asn Lys Cys Lys Cys Thr Thr		
[0984]	1 5 10 15		
[0985]	Val Thr Ser Arg Leu Val Pro Ser Lys Glu Asn Pro Asp Glu Glu Ile		
[0986]	20 25 30		
[0987]	Leu Glu Arg Asn Ile Arg Ile Thr Val Pro Leu Arg Ser Arg Gln Asn		
[0988]	35 40 45		
[0989]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Thr Phe Val Tyr Arg Met		
[0990]	50 55 60		
[0991]	Ala Glu Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Gly Gly		
[0992]	65 70 75 80		
[0993]	Glu Ile Tyr Glu Ala Gln Gln Ser Thr Ser Cys Asn Glu Pro Glu Thr		
[0994]	85 90 95		
[0995]	Cys Tyr Thr Tyr Asn Arg Asp Lys Cys Tyr Thr Thr Thr Phe Pro Phe		
[0996]	100 105 110		
[0997]	Ile Tyr His Gly Glu Thr Lys His Ile Gln Ala Ala Leu Thr Pro Ala		
[0998]	115 120 125		
[0999]	Ser Cys Tyr Ala Asp		
[1000]	130		
[1001]	<210> 41		
[1002]	<211> 133		
[1003]	<212> PRT		
[1004]	<213> 鸡(Gallus gallus)		
[1005]	<400> 41		
[1006]	Asp Gly Glu Glu Arg Val Leu Val Asn Asn Lys Cys Lys Cys Val Thr		
[1007]	1 5 10 15		
[1008]	Val Thr Ser Lys Phe Val Pro Ser Lys Asp Asn Pro Glu Glu Glu Val		
[1009]	20 25 30		
[1010]	Leu Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Lys Ser Arg Glu Asn		
[1011]	35 40 45		
[1012]	Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Thr Phe Val Tyr Arg Met		
[1013]	50 55 60		

[1014]	Thr	Glu	Leu	Cys	Lys	Lys	Cys	Asp	Pro	Val	Glu	Ile	Glu	Leu	Gly	Gly
[1015]	65					70					75					80
[1016]	Glu	Thr	Tyr	Gln	Ala	Gln	Gln	Ser	Asn	Ser	Cys	Asn	Glu	Pro	Glu	Thr
[1017]					85					90						95
[1018]	Cys	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Arg	Asp	Lys	Cys	Tyr	Thr	Thr	Thr	Phe	Pro	Phe
[1019]					100					105					110	
[1020]	Val	Tyr	His	Gly	Glu	Thr	Lys	His	Ile	Gln	Ala	Ala	Leu	Thr	Pro	Thr
[1021]					115					120					125	
[1022]	Ser	Cys	Tyr	Ala	Glu											
[1023]					130											
[1024]	<210>	42														
[1025]	<211>	133														
[1026]	<212>	PRT														
[1027]	<213>	火鸡(Meleagris gallopavo)														
[1028]	<400>	42														
[1029]	Asp	Gly	Glu	Glu	Arg	Val	Leu	Val	Asn	Asn	Lys	Cys	Lys	Cys	Val	Thr
[1030]	1				5					10					15	
[1031]	Val	Thr	Ser	Lys	Phe	Val	Pro	Ser	Lys	Asp	Asn	Pro	Glu	Glu	Glu	Val
[1032]					20					25					30	
[1033]	Leu	Glu	Arg	Asn	Ile	Arg	Ile	Ile	Val	Pro	Leu	Lys	Ser	Arg	Gln	Asn
[1034]					35					40					45	
[1035]	Ile	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Arg	Thr	Asn	Phe	Val	Tyr	Arg	Met
[1036]					50					55					60	
[1037]	Thr	Glu	Leu	Cys	Lys	Lys	Cys	Asp	Pro	Val	Glu	Ile	Glu	Leu	Gly	Gly
[1038]	65					70					75					80
[1039]	Glu	Thr	Tyr	Gln	Ala	Gln	Gln	Ser	Thr	Ser	Cys	Asn	Glu	Pro	Glu	Thr
[1040]					85					90						95
[1041]	Cys	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Arg	Asp	Lys	Cys	Tyr	Thr	Thr	Thr	Ile	Pro	Phe
[1042]					100					105					110	
[1043]	Val	Tyr	Gln	Gly	Glu	Thr	Lys	Gln	Ile	Gln	Ala	Ala	Leu	Thr	Pro	Ala
[1044]					115					120					125	
[1045]	Ser	Cys	Tyr	Ala	Asp											
[1046]					130											
[1047]	<210>	43														
[1048]	<211>	132														
[1049]	<212>	PRT														
[1050]	<213>	猎鹰(Falco peregrinus)														
[1051]	<400>	43														
[1052]	Asp	Asp	Glu	His	Val	Leu	Val	Asn	Asn	Lys	Cys	Gln	Cys	Val	Thr	Val

[1053]	1	5	10	15
[1054]	Thr Ser Lys Phe Val Pro Ser Lys Glu Asp Pro Gly Glu Glu Val Leu			
[1055]	20	25	30	
[1056]	Glu Arg Asn Ile Arg Ile Leu Val Pro Leu Arg Ala Arg Glu Asn Ile			
[1057]	35	40	45	
[1058]	Ser Asp Pro Met Ser Pro Leu Arg Thr Thr Phe Val Tyr Arg Met Thr			
[1059]	50	55	60	
[1060]	Glu Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Gly Gly Glu			
[1061]	65	70	75	80
[1062]	Ile Tyr Lys Ala Gln Gln Ser Thr Ser Cys Asn Glu Pro Glu Thr Cys			
[1063]	85	90	95	
[1064]	Tyr Thr Tyr Asn Arg Asp Lys Cys Tyr Thr Thr Thr Phe Pro Phe Ser			
[1065]	100	105	110	
[1066]	Tyr His Gly Glu Val Lys Lys Val Gln Ala Val Leu Thr Pro Ala Ser			
[1067]	115	120	125	
[1068]	Cys Tyr Ala Asp			
[1069]	130			
[1070]	<210> 44			
[1071]	<211> 130			
[1072]	<212> PRT			
[1073]	<213> 麻雀 (Zonotrichia albicollis)			
[1074]	<400> 44			
[1075]	Asp Glu Glu Tyr Val Leu Val Asn Asn Lys Cys Gln Cys Val Thr Val			
[1076]	1	5	10	15
[1077]	Thr Ser Lys Phe Val Pro Ser Gln Glu Asn Pro Gln Glu Glu Val Leu			
[1078]	20	25	30	
[1079]	Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Lys Ala Arg Glu Asn Ile			
[1080]	35	40	45	
[1081]	Ser Asp Pro Leu Ser Pro Leu Arg Thr Thr Phe Val Tyr Arg Leu Ser			
[1082]	50	55	60	
[1083]	Glu Leu Cys Lys Asn Cys Glu Pro Ile Glu Ile Asp Leu Gly Gly Ala			
[1084]	65	70	75	80
[1085]	Ile His Gln Ala Gln Gln Gly Asn Ser Cys Glu Glu Pro Gln Thr Cys			
[1086]	85	90	95	
[1087]	Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Glu Cys Tyr Ser Ser Pro Val Pro Leu Leu			
[1088]	100	105	110	
[1089]	His His Gly Glu Val Met Gln Val Pro Ala Ala Leu Thr Pro Asp Ser			
[1090]	115	120	125	
[1091]	Cys Phe			

[1092]	130
[1093]	<210> 45
[1094]	<211> 169
[1095]	<212> PRT
[1096]	<213> 黑狐蝠(Pteropus alecto)
[1097]	<400> 45
[1098]	Glu Asp Glu Arg Ile Leu Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg
[1099]	1 5 10 15
[1100]	Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile
[1101]	20 25 30
[1102]	Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Lys Leu Gly Asp Glu Lys Ser Met Val
[1103]	35 40 45
[1104]	Asn Leu Trp Asn Cys Lys Leu Leu Cys Thr Ala Gly Leu Gln Ser Lys
[1105]	50 55 60
[1106]	Glu Gly Gly Met Val Ala Asp Thr Ala Gly Lys Val Pro Leu Asn Asn
[1107]	65 70 75 80
[1108]	Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Arg Arg Thr Asn Phe Val
[1109]	85 90 95
[1110]	Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Asn Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu
[1111]	100 105 110
[1112]	Leu Asp Asn Gln Val Val Thr Val Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu
[1113]	115 120 125
[1114]	Asp Asn Glu Thr Cys Tyr Ala Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn
[1115]	130 135 140
[1116]	Arg Val Pro Leu Leu Tyr Gly Gly Lys Thr Ile Met Val Glu Thr Ala
[1117]	145 150 155 160
[1118]	Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
[1119]	165
[1120]	<210> 46
[1121]	<211> 436
[1122]	<212> PRT
[1123]	<213> 人工序列
[1124]	<220>
[1125]	<221> 来源
[1126]	<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic
[1127]	polypeptide"
[1128]	<400> 46
[1129]	Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[1130]	1 5 10 15

[1131]	Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg
[1132]				20					25					30		
[1133]	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
[1134]			35					40					45			
[1135]	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
[1136]		50					55					60				
[1137]	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn
[1138]	65					70					75				80	
[1139]	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser
[1140]					85					90					95	
[1141]	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
[1142]				100					105					110		
[1143]	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp
[1144]			115					120					125			
[1145]	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
[1146]		130					135					140				
[1147]	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser
[1148]	145					150					155				160	
[1149]	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys
[1150]				165					170					175		
[1151]	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser
[1152]				180					185					190		
[1153]	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser
[1154]			195					200					205			
[1155]	Gly	Val	Pro	Ala	His	Phe	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser
[1156]		210					215					220				
[1157]	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
[1158]	225					230				235					240	
[1159]	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu
[1160]				245					250				255			
[1161]	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
[1162]				260					265				270			
[1163]	Gly	Ser	Gln	Glu	Asp	Glu	Arg	Ile	Val	Leu	Val	Asp	Asn	Lys	Cys	Lys
[1164]			275					280					285			
[1165]	Cys	Ala	Arg	Ile	Thr	Ser	Arg	Ile	Ile	Arg	Ser	Ser	Glu	Asp	Pro	Asn
[1166]		290					295					300				
[1167]	Glu	Asp	Ile	Val	Glu	Arg	Asn	Ile	Arg	Ile	Ile	Val	Pro	Leu	Asn	Asn
[1168]	305					310				315				320		
[1169]	Arg	Glu	Asn	Ile	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Val

[1170]		325		330		335
[1171]	Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu					
[1172]		340		345		350
[1173]	Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu					
[1174]		355		360		365
[1175]	Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr					
[1176]		370		375		380
[1177]	Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu					
[1178]	385		390		395	400
[1179]	Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp Gly Gly Gly Ser Glu					
[1180]		405		410		415
[1181]	Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His					
[1182]		420		425		430
[1183]	His His His His					
[1184]		435				
[1185]	<210> 47					
[1186]	<211> 439					
[1187]	<212> PRT					
[1188]	<213> 人工序列					
[1189]	<220>					
[1190]	<221> 来源					
[1191]	<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic					
[1192]	polypeptide"					
[1193]	<400> 47					
[1194]	Met Lys Asn His Leu Leu Phe Trp Gly Val Leu Ala Val Phe Ile Lys					
[1195]	1	5		10		15
[1196]	Ala Val His Val Lys Ala Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp					
[1197]		20		25		30
[1198]	Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser					
[1199]		35		40		45
[1200]	Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val					
[1201]	50		55		60	
[1202]	Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg					
[1203]	65		70		75	80
[1204]	Thr Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro					
[1205]		85		90		95
[1206]	Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn					
[1207]		100		105		110
[1208]	Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg					

[1209]	115	120	125
[1210]	Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr		
[1211]	130	135	140
[1212]	Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp Gly		
[1213]	145	150	155
[1214]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val		
[1215]	165	170	175
[1216]	Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val		
[1217]	180	185	190
[1218]	Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met		
[1219]	195	200	205
[1220]	His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr		
[1221]	210	215	220
[1222]	Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp		
[1223]	225	230	235
[1224]	Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln		
[1225]	245	250	255
[1226]	Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg		
[1227]	260	265	270
[1228]	Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
[1229]	275	280	285
[1230]	Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
[1231]	290	295	300
[1232]	Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser		
[1233]	305	310	315
[1234]	Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser		
[1235]	325	330	335
[1236]	Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys		
[1237]	340	345	350
[1238]	Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His		
[1239]	355	360	365
[1240]	Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly		
[1241]	370	375	380
[1242]	Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser		
[1243]	385	390	395
[1244]	Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly		
[1245]	405	410	415
[1246]	Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val		
[1247]	420	425	430

[1248] Asp His His His His His His
 [1249] 435
 [1250] <210> 48
 [1251] <211> 235
 [1252] <212> PRT
 [1253] <213> 人工序列
 [1254] <220>
 [1255] <221> 来源
 [1256] <223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic
 [1257] polypeptide"
 [1258] <400> 48
 [1259] Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 [1260] 1 5 10 15
 [1261] Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 [1262] 20 25 30
 [1263] Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 [1264] 35 40 45
 [1265] Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 [1266] 50 55 60
 [1267] Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 [1268] 65 70 75 80
 [1269] Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 [1270] 85 90 95
 [1271] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 [1272] 100 105 110
 [1273] Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [1274] 115 120 125
 [1275] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 [1276] 130 135 140
 [1277] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 [1278] 145 150 155 160
 [1279] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 [1280] 165 170 175
 [1281] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 [1282] 180 185 190
 [1283] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 [1284] 195 200 205
 [1285] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 [1286] 210 215 220

[1287]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1288]	225 230 235
[1289]	<210> 49
[1290]	<211> 593
[1291]	<212> PRT
[1292]	<213> 人工序列
[1293]	<220>
[1294]	<221> 来源
[1295]	<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic
[1296]	polypeptide"
[1297]	<400> 49
[1298]	Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[1299]	1 5 10 15
[1300]	Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
[1301]	20 25 30
[1302]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[1303]	35 40 45
[1304]	Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
[1305]	50 55 60
[1306]	Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
[1307]	65 70 75 80
[1308]	Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
[1309]	85 90 95
[1310]	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
[1311]	100 105 110
[1312]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
[1313]	115 120 125
[1314]	Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
[1315]	130 135 140
[1316]	Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp
[1317]	145 150 155 160
[1318]	Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp
[1319]	165 170 175
[1320]	Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser
[1321]	180 185 190
[1322]	Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr
[1323]	195 200 205
[1324]	Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu
[1325]	210 215 220

[1326]	His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn
[1327]	225 230 235 240
[1328]	Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe
[1329]	245 250 255
[1330]	Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu
[1331]	260 265 270
[1332]	Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp
[1333]	275 280 285
[1334]	Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val
[1335]	290 295 300
[1336]	Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser
[1337]	305 310 315 320
[1338]	Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr
[1339]	325 330 335
[1340]	Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser
[1341]	340 345 350
[1342]	Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro
[1343]	355 360 365
[1344]	Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys
[1345]	370 375 380
[1346]	Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr
[1347]	385 390 395 400
[1348]	Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser
[1349]	405 410 415
[1350]	His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu
[1351]	420 425 430
[1352]	Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr
[1353]	435 440 445
[1354]	Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val
[1355]	450 455 460
[1356]	Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln
[1357]	465 470 475 480
[1358]	Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe
[1359]	485 490 495
[1360]	Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu
[1361]	500 505 510
[1362]	Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala
[1363]	515 520 525
[1364]	Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu

[1365]	530	535	540
[1366]	Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu		
[1367]	545	550	555
[1368]	Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro		
[1369]	565	570	575
[1370]	Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys		
[1371]	580	585	590
[1372]	Tyr		
[1373]	<210> 50		
[1374]	<211> 412		
[1375]	<212> PRT		
[1376]	<213> 人工序列		
[1377]	<220>		
[1378]	<221> 来源		
[1379]	<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic		
[1380]	polypeptide"		
[1381]	<400> 50		
[1382]	Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		
[1383]	1	5	10
[1384]	Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys		
[1385]	20	25	30
[1386]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
[1387]	35	40	45
[1388]	Ile Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu		
[1389]	50	55	60
[1390]	Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn		
[1391]	65	70	75
[1392]	Gln Lys Leu Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser		
[1393]	85	90	95
[1394]	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val		
[1395]	100	105	110
[1396]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr		
[1397]	115	120	125
[1398]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
[1399]	130	135	140
[1400]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln		
[1401]	145	150	155
[1402]	Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr		
[1403]	165	170	175

[1404]	Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys		
[1405]		180	185
[1406]	Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala		190
[1407]		195	200
[1408]	Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		205
[1409]		210	215
[1410]	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr		220
[1411]	225	230	235
[1412]	Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys		240
[1413]		245	250
[1414]	Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		255
[1415]		260	265
[1416]	Gly Gly Ser Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys		270
[1417]		275	280
[1418]	Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro		285
[1419]		290	295
[1420]	Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn		300
[1421]	305	310	315
[1422]	Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe		320
[1423]		325	330
[1424]	Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val		335
[1425]		340	345
[1426]	Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp		350
[1427]		355	360
[1428]	Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys		365
[1429]		370	375
[1430]	Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val		380
[1431]	385	390	395
[1432]	Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp		400
[1433]		405	410
[1434]	<210> 51		
[1435]	<211> 415		
[1436]	<212> PRT		
[1437]	<213> 人工序列		
[1438]	<220>		
[1439]	<221> 来源		
[1440]	<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic		
[1441]	polypeptide"		
[1442]	<400> 51		

[1443]	Met	Lys	Asn	His	Leu	Leu	Phe	Trp	Gly	Val	Leu	Ala	Val	Phe	Ile	Lys
[1444]	1				5					10					15	
[1445]	Ala	Val	His	Val	Lys	Ala	Gln	Glu	Asp	Glu	Arg	Ile	Val	Leu	Val	Asp
[1446]					20					25					30	
[1447]	Asn	Lys	Cys	Lys	Cys	Ala	Arg	Ile	Thr	Ser	Arg	Ile	Ile	Arg	Ser	Ser
[1448]					35					40					45	
[1449]	Glu	Asp	Pro	Asn	Glu	Asp	Ile	Val	Glu	Arg	Asn	Ile	Arg	Ile	Ile	Val
[1450]					50					55					60	
[1451]	Pro	Leu	Asn	Asn	Arg	Glu	Asn	Ile	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Arg
[1452]	65						70					75				80
[1453]	Thr	Arg	Phe	Val	Tyr	His	Leu	Ser	Asp	Leu	Cys	Lys	Lys	Cys	Asp	Pro
[1454]							85					90				95
[1455]	Thr	Glu	Val	Glu	Leu	Asp	Asn	Gln	Ile	Val	Thr	Ala	Thr	Gln	Ser	Asn
[1456]							100					105				110
[1457]	Ile	Cys	Asp	Glu	Asp	Ser	Ala	Thr	Glu	Thr	Cys	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Arg
[1458]							115								125	
[1459]	Asn	Lys	Cys	Tyr	Thr	Ala	Val	Val	Pro	Leu	Val	Tyr	Gly	Gly	Glu	Thr
[1460]							130								140	
[1461]	Lys	Met	Val	Glu	Thr	Ala	Leu	Thr	Pro	Asp	Ala	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gly
[1462]	145						150					155				160
[1463]	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val
[1464]							165					170				175
[1465]	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val
[1466]							180					185				190
[1467]	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ile	Ser	Tyr	Thr	Met
[1468]							195					200				205
[1469]	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Tyr
[1470]							210					215				220
[1471]	Ile	Asn	Pro	Arg	Ser	Gly	Tyr	Thr	His	Tyr	Asn	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp
[1472]	225						230					235				240
[1473]	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
[1474]							245					250				255
[1475]	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
[1476]							260					265				270
[1477]	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
[1478]							275					280				285
[1479]	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
[1480]							290					295				300
[1481]	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu

[1482]	305	310	315	320
[1483]	Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser			
[1484]		325	330	335
[1485]	Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
[1486]		340	345	350
[1487]	Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser			
[1488]		355	360	365
[1489]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
[1490]		370	375	380
[1491]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser			
[1492]	385	390	395	400
[1493]	Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[1494]		405	410	415
[1495]	<210> 52			
[1496]	<211> 293			
[1497]	<212> PRT			
[1498]	<213> 人工序列			
[1499]	<220>			
[1500]	<221> 来源			
[1501]	<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic			
[1502]	polypeptide"			
[1503]	<400> 52			
[1504]	Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly			
[1505]	1	5	10	15
[1506]	Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln			
[1507]		20	25	30
[1508]	Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe			
[1509]		35	40	45
[1510]	Ser Ser Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg			
[1511]		50	55	60
[1512]	Glu Phe Val Ala Ser Ile Thr Trp Ser Gly Arg Asp Thr Phe Tyr Ala			
[1513]	65	70	75	80
[1514]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn			
[1515]		85	90	95
[1516]	Thr Val Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val			
[1517]		100	105	110
[1518]	Tyr Tyr Cys Ala Ala Asn Pro Trp Pro Val Ala Ala Pro Arg Ser Gly			
[1519]		115	120	125
[1520]	Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly			

[1521]	130	135	140
[1522]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Glu Asp Glu		
[1523]	145	150	155
[1524]	Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser		
[1525]	165	170	175
[1526]	Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg		
[1527]	180	185	190
[1528]	Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp		
[1529]	195	200	205
[1530]	Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu		
[1531]	210	215	220
[1532]	Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val		
[1533]	225	230	235
[1534]	Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr		
[1535]	245	250	255
[1536]	Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu		
[1537]	260	265	270
[1538]	Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp		
[1539]	275	280	285
[1540]	Ala Cys Tyr Pro Asp		
[1541]	290		
[1542]	<210> 53		
[1543]	<211> 137		
[1544]	<212> PRT		
[1545]	<213> 大猩猩 (Gorilla gorilla)		
[1546]	<400> 53		
[1547]	Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala		
[1548]	1	5	10
[1549]	Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp		
[1550]	20	25	30
[1551]	Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu		
[1552]	35	40	45
[1553]	Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His		
[1554]	50	55	60
[1555]	Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp		
[1556]	65	70	75
[1557]	Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser		
[1558]	85	90	95
[1559]	Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala		

[1560]	100	105	110
[1561]	Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Lys Thr Ala		
[1562]	115	120	125
[1563]	Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp		
[1564]	130	135	
[1565]	<210> 54		
[1566]	<211> 137		
[1567]	<212> PRT		
[1568]	<213> 白颊长臂猿(Nomascus leucogenys)		
[1569]	<400> 54		
[1570]	Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala		
[1571]	1 5 10 15		
[1572]	Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile His Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp		
[1573]	20 25 30		
[1574]	Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu		
[1575]	35 40 45		
[1576]	Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His		
[1577]	50 55 60		
[1578]	Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp		
[1579]	65 70 75 80		
[1580]	Asn Gln Ile Val Ile Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser		
[1581]	85 90 95		
[1582]	Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala		
[1583]	100 105 110		
[1584]	Val Val Pro Leu Leu Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala		
[1585]	115 120 125		
[1586]	Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp		
[1587]	130 135		
[1588]	<210> 55		
[1589]	<211> 417		
[1590]	<212> PRT		
[1591]	<213> 人工序列		
[1592]	<220>		
[1593]	<221> 来源		
[1594]	<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic		
[1595]	polypeptide"		
[1596]	<400> 55		
[1597]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala		
[1598]	1 5 10 15		

[1599]	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr
[1600]				20					25					30		
[1601]	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[1602]			35					40					45			
[1603]	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
[1604]		50					55				60					
[1605]	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
[1606]	65					70					75					80
[1607]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[1608]					85					90					95	
[1609]	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
[1610]				100					105					110		
[1611]	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
[1612]			115					120					125			
[1613]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile
[1614]		130					135					140				
[1615]	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser
[1616]	145					150					155					160
[1617]	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser
[1618]					165					170					175	
[1619]	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
[1620]				180						185				190		
[1621]	Ala	His	Phe	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile
[1622]			195				200					205				
[1623]	Ser	Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
[1624]		210					215					220				
[1625]	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
[1626]	225					230					235					240
[1627]	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln
[1628]					245					250				255		
[1629]	Glu	Asp	Glu	Arg	Ile	Val	Leu	Val	Asp	Asn	Lys	Cys	Lys	Cys	Ala	Arg
[1630]				260					265					270		
[1631]	Ile	Thr	Ser	Arg	Ile	Ile	Arg	Ser	Ser	Glu	Asp	Pro	Asn	Glu	Asp	Ile
[1632]			275						280					285		
[1633]	Val	Glu	Arg	Asn	Ile	Arg	Ile	Ile	Val	Pro	Leu	Asn	Asn	Arg	Glu	Asn
[1634]		290					295					300				
[1635]	Ile	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Val	Tyr	His	Leu
[1636]	305					310					315					320
[1637]	Ser	Asp	Leu	Cys	Lys	Lys	Cys	Asp	Pro	Thr	Glu	Val	Glu	Leu	Asp	Asn

[1638]		325		330		335
[1639]	Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala					
[1640]		340		345		350
[1641]	Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val					
[1642]		355		360		365
[1643]	Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu					
[1644]		370		375		380
[1645]	Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp Gly Gly Gly Ser Glu Gln Lys Leu					
[1646]	385		390		395	400
[1647]	Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His					
[1648]		405		410		415
[1649]	His					
[1650]	<210> 56					
[1651]	<211> 413					
[1652]	<212> PRT					
[1653]	<213> 人工序列					
[1654]	<220>					
[1655]	<221> 来源					
[1656]	<223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic					
[1657]	polypeptide"					
[1658]	<400> 56					
[1659]	Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala					
[1660]	1	5		10		15
[1661]	Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp					
[1662]		20		25		30
[1663]	Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu					
[1664]		35		40		45
[1665]	Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His					
[1666]	50		55		60	
[1667]	Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp					
[1668]	65		70		75	80
[1669]	Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser					
[1670]		85		90		95
[1671]	Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala					
[1672]		100		105		110
[1673]	Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala					
[1674]		115		120		125
[1675]	Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly					
[1676]		130		135		140

[1677]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly	
[1678]	145	150 155 160
[1679]	Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala	
[1680]		165 170 175
[1681]	Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg	
[1682]		180 185 190
[1683]	Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly	
[1684]		195 200 205
[1685]	Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr	
[1686]		210 215 220
[1687]	Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser	
[1688]		225 230 235 240
[1689]	Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr	
[1690]		245 250 255
[1691]	Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly	
[1692]		260 265 270
[1693]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile	
[1694]		275 280 285
[1695]	Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys	
[1696]		290 295 300
[1697]	Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp	
[1698]		305 310 315 320
[1699]	Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr	
[1700]		325 330 335
[1701]	Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser	
[1702]		340 345 350
[1703]	Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala	
[1704]		355 360 365
[1705]	Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly	
[1706]		370 375 380
[1707]	Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu	
[1708]		385 390 395 400
[1709]	Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His	
[1710]		405 410
[1711]	<210>	57
[1712]	<211>	6
[1713]	<212>	PRT
[1714]	<213>	人工序列
[1715]	<220>	

-
- [1716] <221> 来源
- [1717] <223> /note="Description of artificial sequence: Synthetic
- [1718] 6His tag"
- [1719] <400> 57
- [1720] His His His His His His
- [1721] 1 5

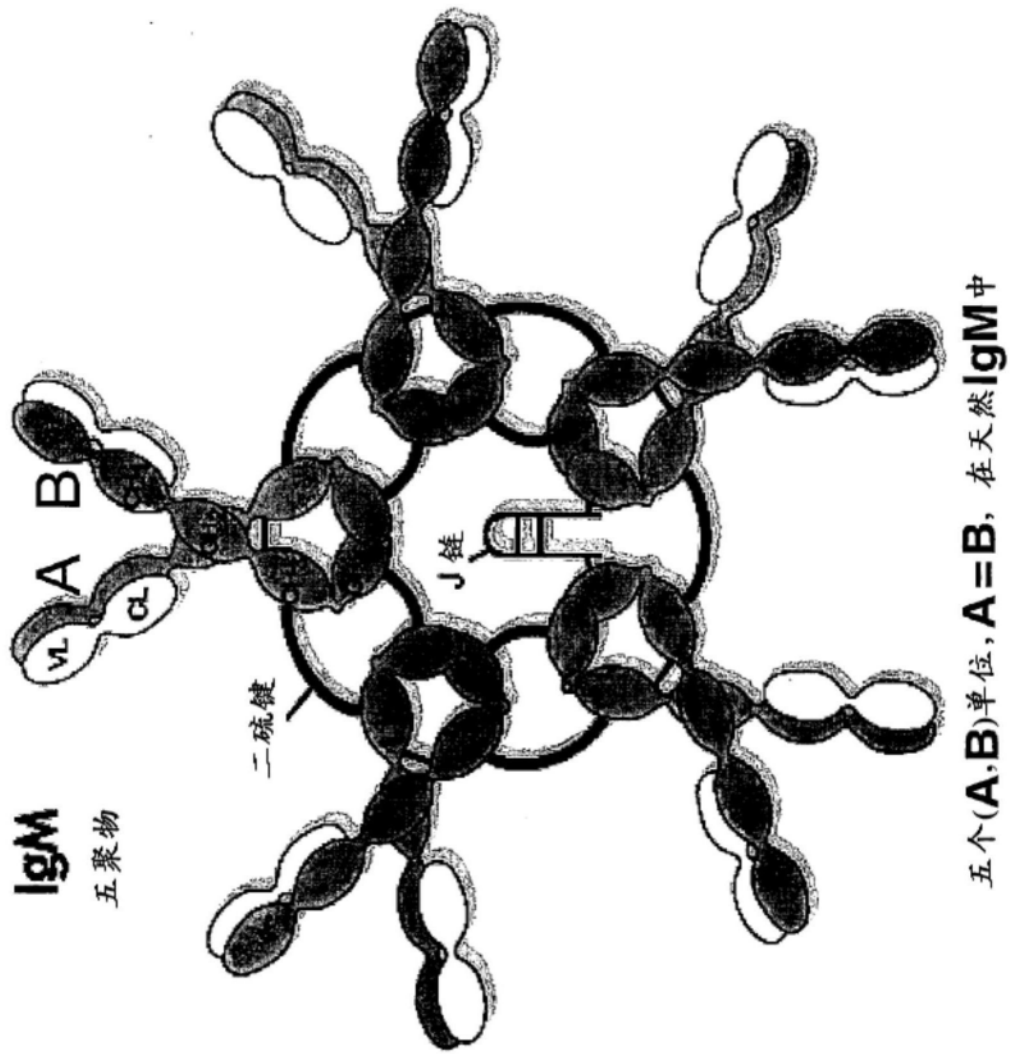


图1

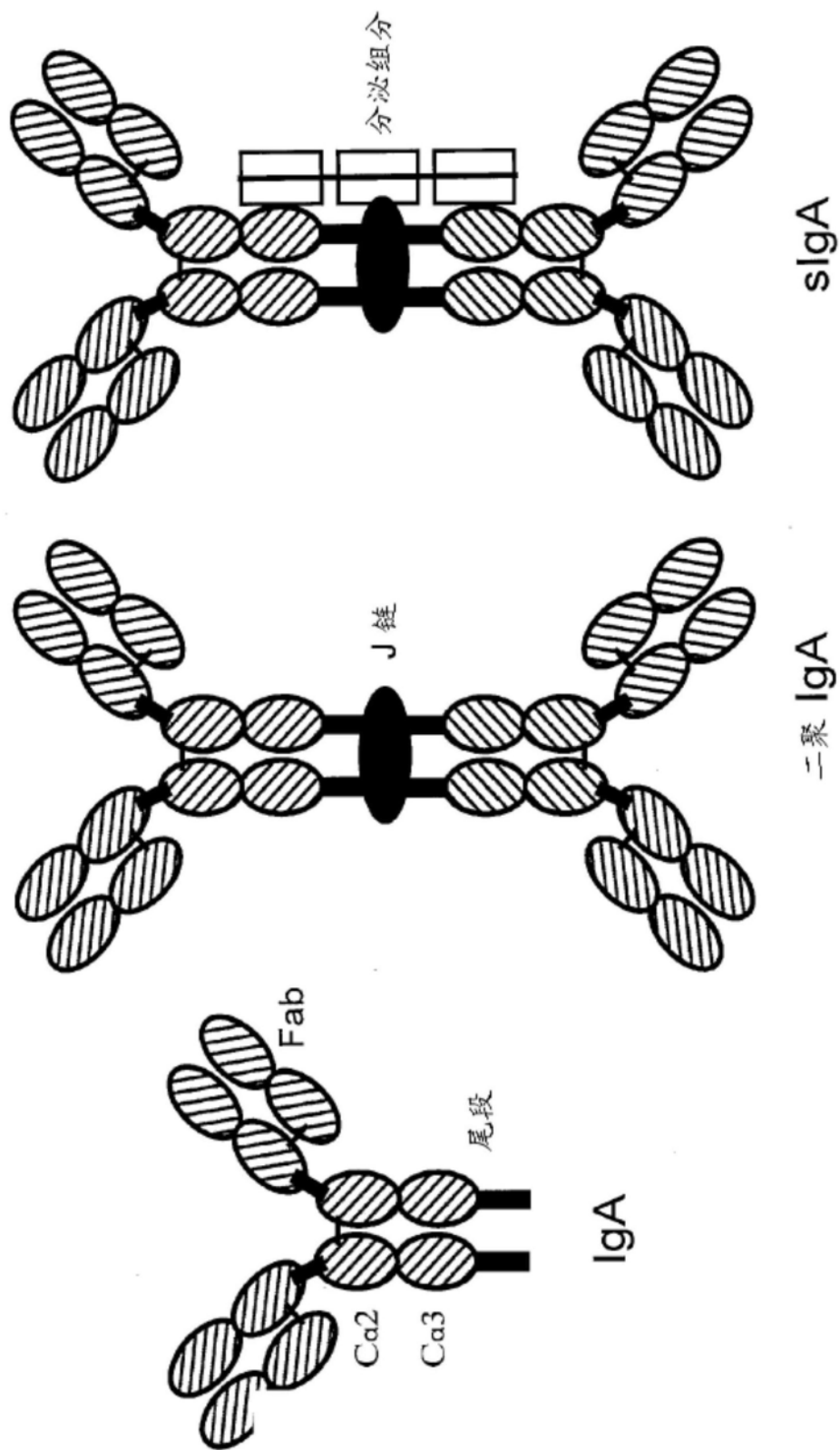


图2

成熟人J链

- QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSSEDPNEDIVERNI
RIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPT
EVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYT
AVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD (SEQ ID NO:
1)
- 氨基酸数量: 137
- 分子量: 15594.4
- 理论 pI: 4.59

图3

Hum = 人类 NP_653247 23-159
 Chm = 黑猩猩 XP_001160135 39-175
 Gor = 大猩猩 XP_004038830 23-159
 Ora = 猩猩 NP_001125381 23-159
 Gib = 长臂猿 XP_003265761 39-175
 Mar = 狨猴 XP_003732538 32-168
 Cyn = 食蟹猴 NP_001247815 23-159
 Bab = 狒狒 XP_003898844 23-159
 Squ = 松鼠猴 XP_003931978 23-159
 Shr = 树鼩 XP_006142955 25-160
 Dol = 海豚 XP_004328961 25-158
 Kil = 虎鲸 XP_004283629 25-158
 Ele = 大象 XP_003414110 25-158
 Sea = 海豹 XP_006729388 25-158
 Rhi = 犀牛 XP_004419202 25-157
 Cat = 屋猫 XP_003985350 25-158
 Wol = 狼 XP_532398 26-159
 Pan = 大熊猫 EFB23253 1-134
 Fer = 雪貂 XP_004766376 26-158
 Hor = 马 NP_001271464 25-158
 Gui = 豚鼠 NP_001265705 25-160
 Cam = 骆驼 XP_006188738 25-158
 Goa = 山羊 XP_005681786 25-158
 Chn = 灰鼠 XP_005392838 94-229
 Ham = 仓鼠 XP_005068228 24-160
 She = 绵羊 XP_004009937 25-158
 BBa = 棕蝠 XP_006094475 25-158
 Ant = 羚羊 XP_005983836 25-158
 Cow = 母牛 NP_786967 25-157
 Mou = 小鼠 NP_690052 23-159
 Rat = 大鼠 EDL88516 23-159
 Hed = 刺猬 XP_004703237 25-157
 Rab = 兔 P23108 1-136
 Opo = 负鼠 XP_003341415 29-162
 All = 短吻鳄 XP_006270094 26-159
 Tur = 龟 XP_005304167 26-159
 Tas = 塔斯马尼亚恶魔 XP_003772863 27-160
 Pla = 鸭嘴兽 XP_003430954 36-160
 Par = 长尾小鹦鹉 XP_005142787 28-160
 Duc = 鸭 XP_005031370 28-160
 Chi = 鸡 NP_989594 26-158
 Tur = 火鸡 XP_003205717 27-159
 Fal = 猎鹰 XP_005243236 29-160
 Spa = 麻雀 XP_005492217 29-158

图4

图4(续)

	70	80	90	100	110	120	130
		100	110	120	130	140	150
Hum	KKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSAT-ETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMKVETALTPDACYPD						
Chm				-	R.....		
Gor				-	K.....		
Ora		I.....		-	A.....		
Gib		I.....		-	L.....		
Mar				-	F.....S.....S.....		
Cyn				-	T.....Q.....S.....		
Bab		L.....		-	T.R.....Q.....S.....		
Squ				-	T.....F.....KAT.....S.....		
Shr	L.....			-	TM.....IF.....K.....Q.....S.....		
Dol	L.....V.....		I---		NR.....T.....K.....S.....		
Kil	L.....V.....		I---		NR.....T.....K.....S.....		
Ele	V.....V.....		---		NT.....I.....K.....T.....S.....R.....		
Sea	V.....V.I.S.....L.....		---		NW.....FT.....Q.....S.....		
Rhi	V.....V.....		---I.A.....		NR.....T.....V.....S.....		
Cat	V.....M.S.....E.---	V.....			NR.....FT.....V.R.....S.....		
Wol	LV.....V.I.S.....L.....T---				NR.....IM.....Q.....S.....		
Pan	V.....G.....I.S.....L.....		---		NR.....FT.....Q.R.....S.....		
Fer	V.....I.S.....L.....		---		NW.....FT.....Q.....Q.....S.....		
Hor	V.....V.....S.....E.---	A.....			NR.....T.....Q.....I.....S.....		
Gui	V.....D.V.....L.ED.REP-				N.....S.....K.L.TA.....S.....		
Cam	L.....G.RV.....L.D.I---				NK.....FT.D.....S.....		
Goa	TR.....ED.V.....S.....R.T---				NR.K.N.R.Q.....S.....		
Chn	V.....N.....V.....L.E.....GEP-	A.N.....			T.....P.KV.....S.....A.....		
Ham	V.....DH.....S.....T.....S.....VVP.....M.N.....				M.....T.R.....PS.....S.....		
She	TR.....ED.V.....S.....R.T---				NR.K.N.R.Q.....L.....S.....		
BBa	T.Q.....E.....V.....		N---		NK.....FS.....K.V.....ES.....		
Ant	R.....TR.....ED.V.....S.....R.T---				NR.K.N.R.Q.....S.....		
Cow	T.....ED.V.....S.....S.A---				NR.K.S.R.Q.....S.....		
Mou	V.....ED.V.....	N.....DGVP.....M.....			TM.....R.H.....QA.....S.....		
Rat	V.....ED.V.....	SG.GVP.....M.....			M.....R.H.....Q.....S.....		
Hed	V.....V.....G.....	---			N.....T.....K.Y.....R.....S.....		
Rab	I.....VF.....S.....PD.DYS-				TL.....ITHR.G.R.....KAT.....S.....		
Opo	L.....N.EV.....N.....DT.---				STAA.YLE.....RL.T.....ES.....N.....		
All	I.....GG.....Q.....TD.SKS----	D.....			TTF.FA.....Q.....NI.A.....AS.....A.....		
Tur	GDRV.....E.....N.SSS----	D.....			TTF.FF.....KINT.QA.....ES.....A.....		
Tas	R.....I.L.G.E.....NWSCG----				STAL.DL.....KST.....T.....ES.....S.....		
Pla	Q...Q.....HEV.....RG.S.....RPG---DD.....				MSTI.FT.....V.N.V.....ES.....		
Par	V.F.....GGE.YK.Q.....S.....P----				D.....TNF.FL.H.....NLQAV.....AS.....A.....		
Duc	V.....GGE.YE.Q.....TS.N.P----				N.D.....TTF.FI.H.....HIQA.....AS.....A.....		
Chi	V.I.....GGETYQ.Q.....S.N.P----				N.D.....TTF.F.H.....HIQA.....TS.....AE.....		
Tur	V.I.....GGETYQ.Q.....TS.N.P----				N.D.....TTI.F.Q.....QIQA.....AS.....A.....		
Fal	V.....GGE.YK.Q.....TS.N.P----				N.D.....TTF.FS.H.....V.K.QAV.....AS.....A.....		
Spa	N.E.I.ID.GGA.HQ.Q.G.S.E.P---Q.....				E.SSP.LHH.VMQ.PA.....S.F		

图4(续)

人对蝙蝠J链

查询	2	EDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRII-----	41
		EDERI+LVDNKCKCARITSRII S EDP++DIVERNIRI	
本发明	25	EDERILLVDNKCKCARITSRIIPSPEDPSQDIVERNIRIKLGDEKSMVNLWCKLLCTAG	84
查询	40	-----VPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTA	86
		VPLNNRENISDPTSP RT FVYHLSDLCK CDPTEVELDNQ+VT	
本发明	85	LQSKEGGMVADTAGKVPLNNRENISDPTSPRRTNFVYHLSDLCKNCDPTEVELDNQVVTV	144
查询	87	TQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD	137
		TQSNICDED+ETCY YDRNKCYT VPL+YGG+T MVETALTPD+CYPD	
本发明	145	TQSNICDEDN--ETCYAYDRNKCYTNRVPLLYGGKTIMVETALTPDSCYPD	193

图5

考马斯染色 抗J蛋白质印迹

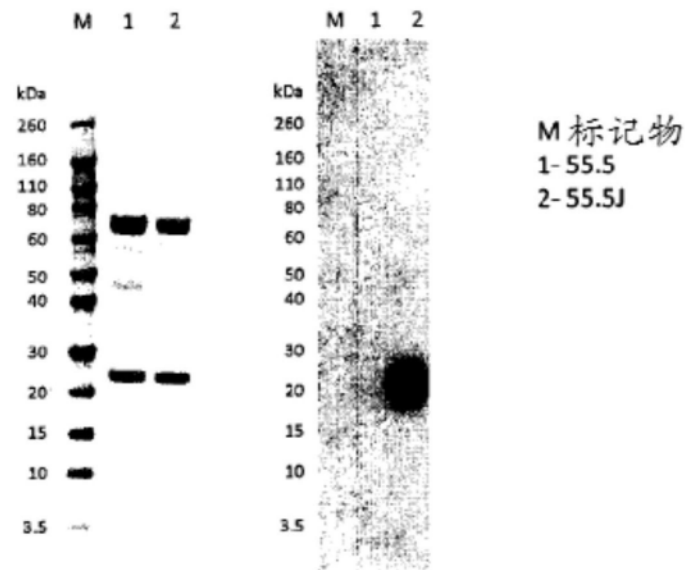


图6

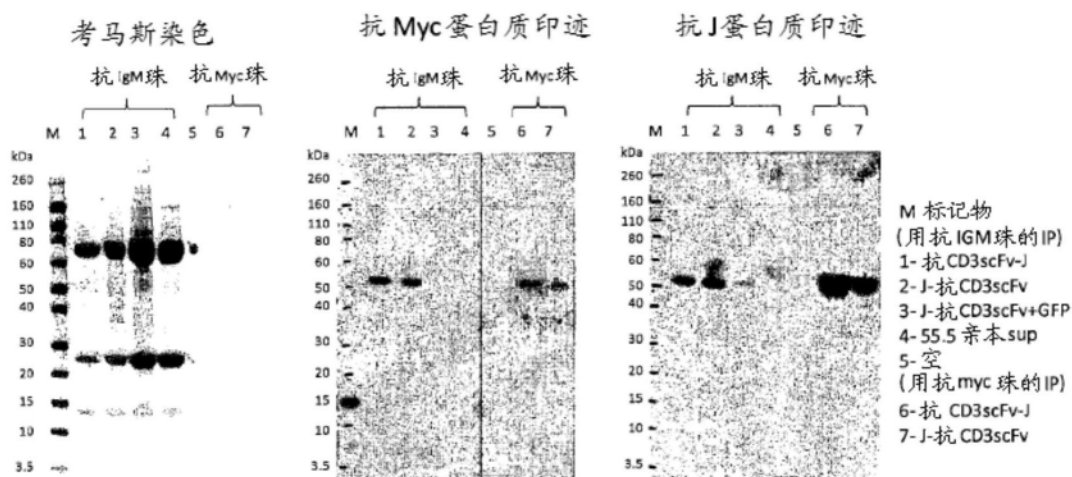


图7

J链构建体的定向

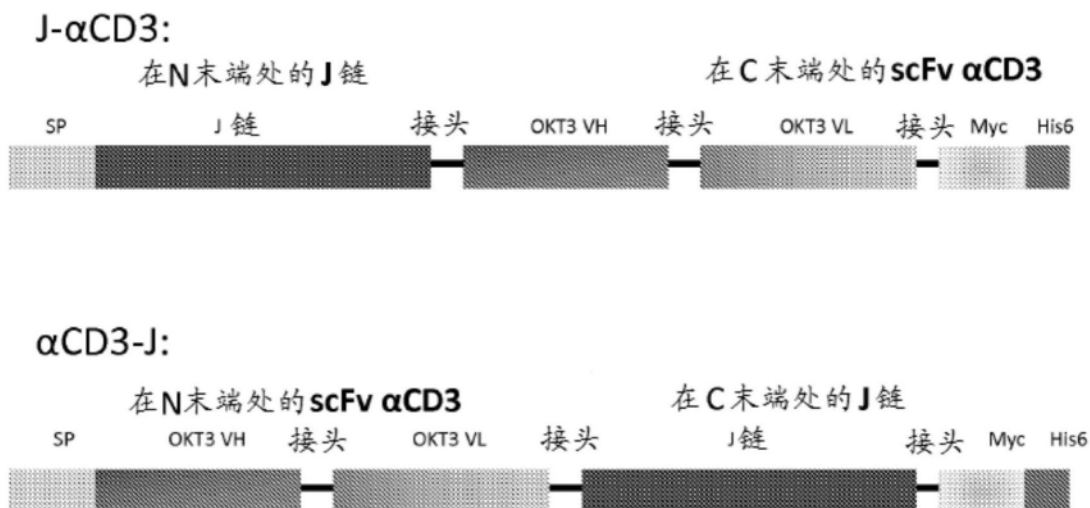


图8

抗CD3scFv-J

- MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTR
YTMHWVKQRPQGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYM
QLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGG
GGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWI
YDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTF
GSGTKLEIKGGGSGGGSGGGSGGGSQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSS
EDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTE
VELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVE
TALTPDACYPDGGGSEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH-

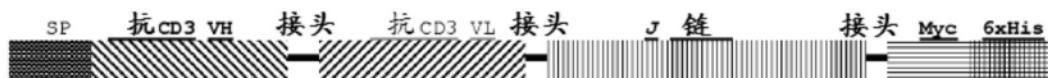


图9

J-抗CD3scFv

- MKNHLLFWGVLA VFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSED
PNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVE
LDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETA
LTPDACYPDGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASG
YTFTRYTMHWVKQRPQGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSS
STAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGG
GGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTS
PKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSSLTISGMEAEDAATYYCQQWSS
NPFTFGSGTKLEIKGGGSEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH-



图10

具有修饰的J链的不对称IgM五聚物

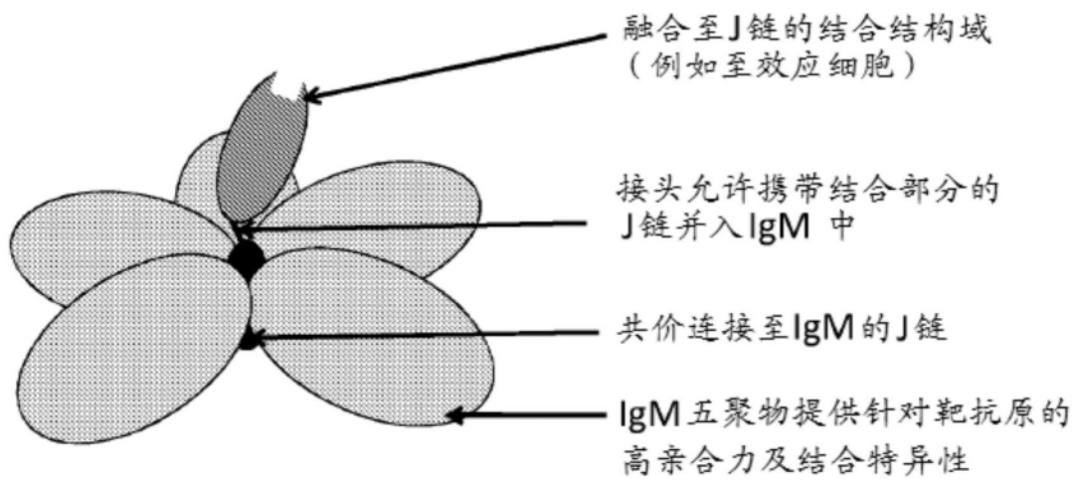
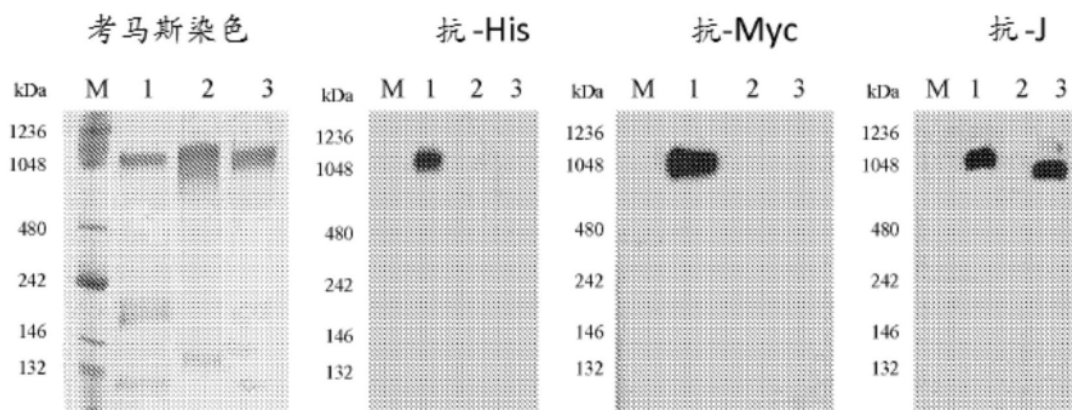


图11

并入 α CD20 IgM五聚物中的
具有 α CD3 scFv的修饰的J链

M标记物

1) IgM + α CD3-J 链

2) 55.5 IgM

3) 55.5 IgM + wt J

图12

所表达的 $\alpha\text{CD20}_{\text{IgM}} \times \alpha\text{CD3}_{\text{J}}$ 双特异性 IgM

- 瞬时共转染：
HC、LC 及 JC

- 所有 5 个 J 变体
都是五聚物

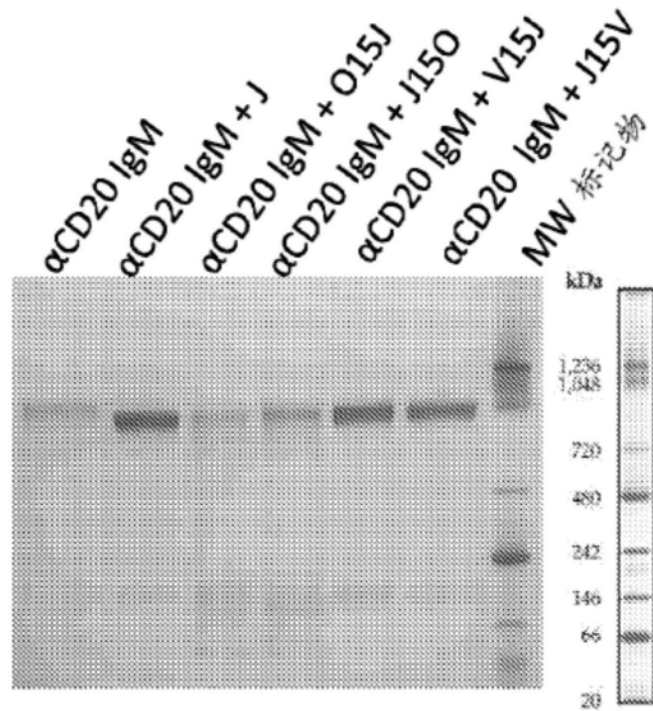
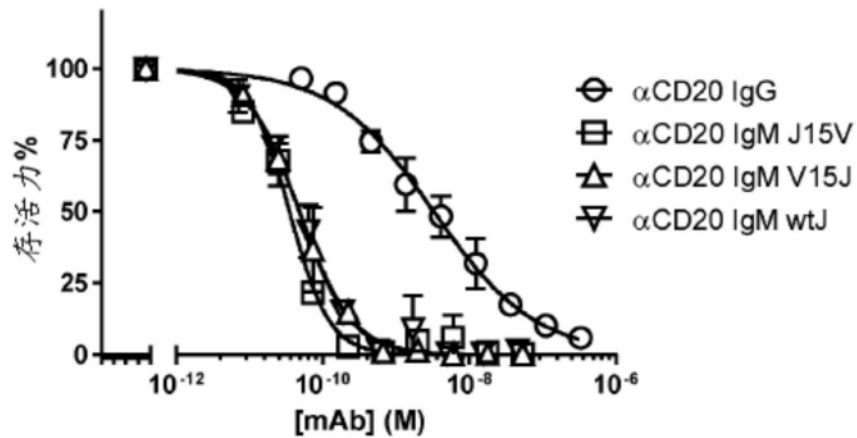


图13

V15J/J15V 变体保留 CDC 活性



EC50(pM)			
αCD20 IgG	αCD20 IgM wt J	αCD20 IgM V15J	αCD20 IgM J15V
3292	48.4	47.9	35.2

图14

双特异性 IgM: B 细胞的活性 T 细胞杀伤
 $\alpha\text{CD20}_{\text{IgM}} \times \alpha\text{CD3}_{\text{J链}}$ 在 B 细胞消耗中非常有效

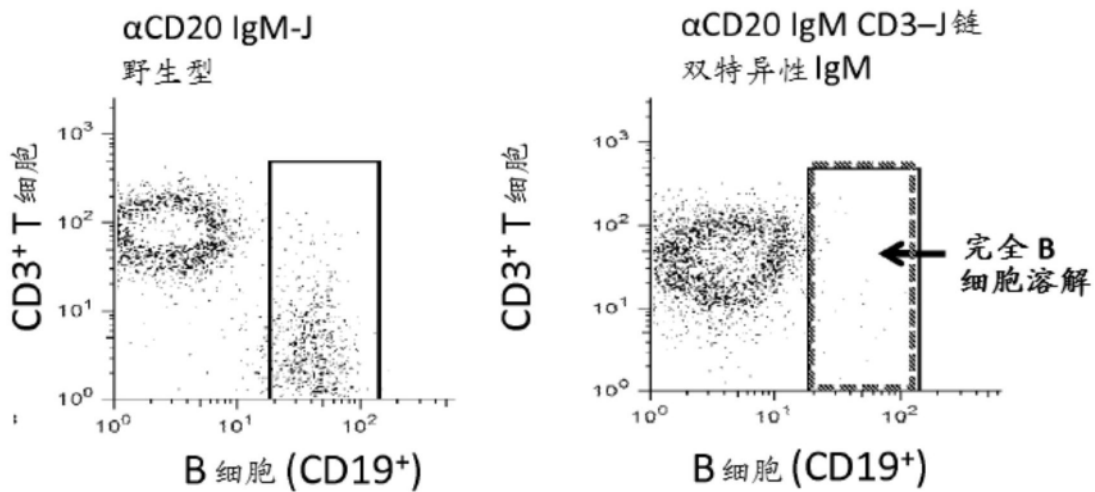


图15

双特异性IgM: α CD20 活性很高
在 α CD20 x α CD3 IgM 下的T细胞的
Raji细胞 (B 细胞) 杀伤

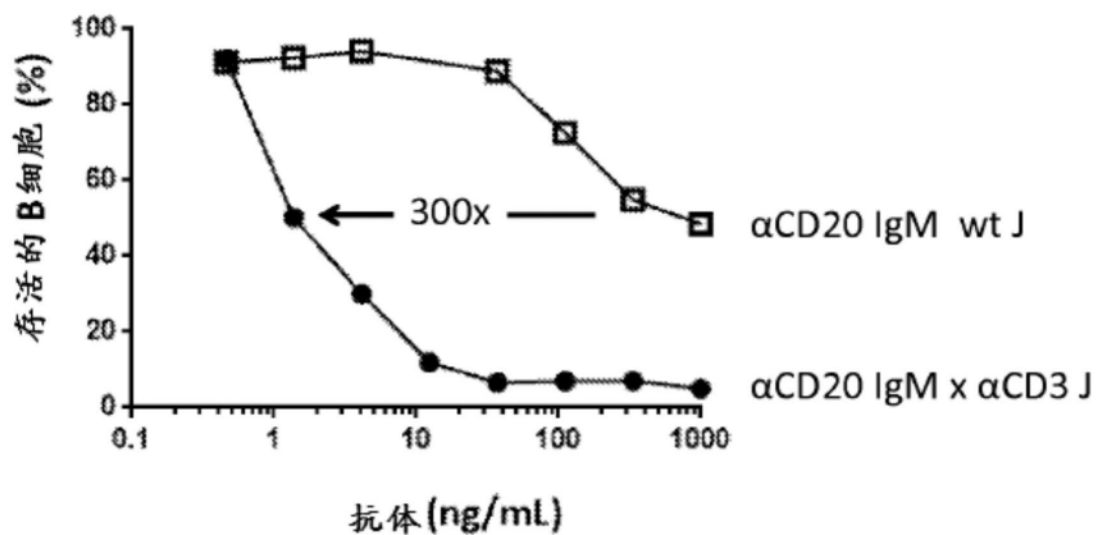


图16

在抗CD20 IgG、IgM和双特异性 IgM 下的
体内 B 细胞消耗是非常活跃的

非 GLP NSG 人源化小鼠
在 CD45+ 细胞中的人 CD19+ 细胞百分比
外周血

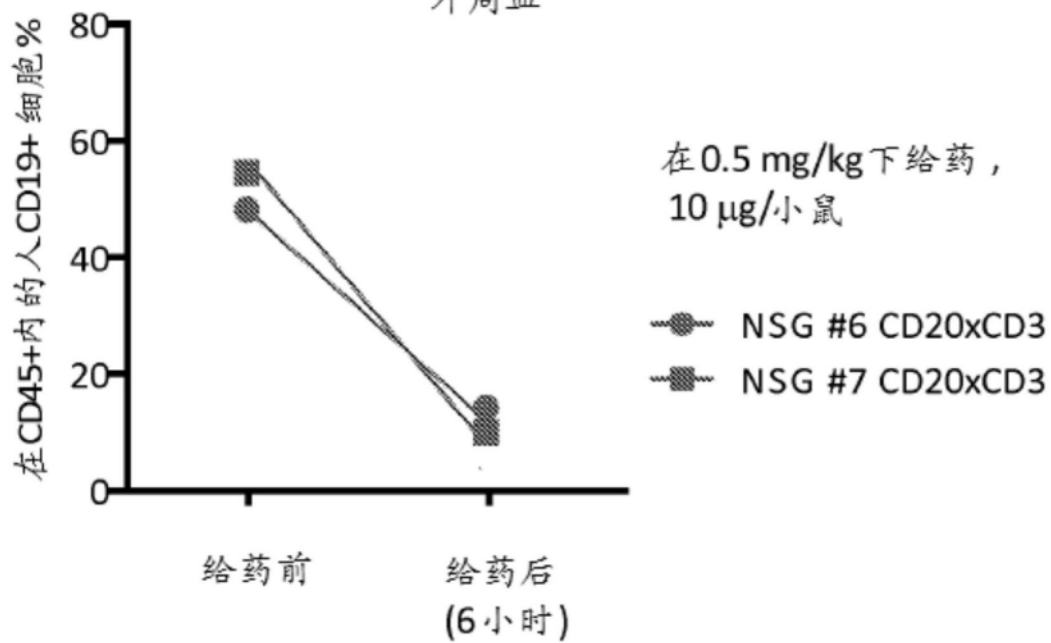


图17

CD16特异性Vh骆驼科-J链

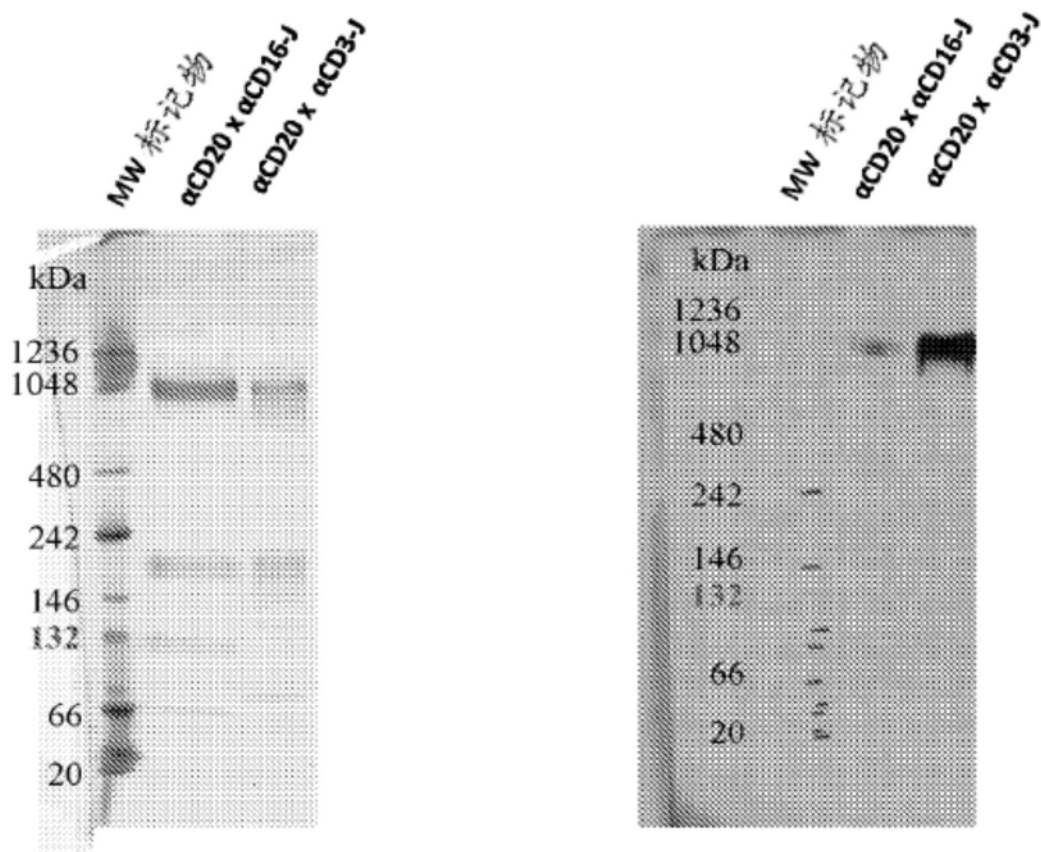


图18

双特异性抗体靶细胞×效应细胞的
菜单驱动方法：对于肿瘤学应用

靶标相关抗原	免疫效应细胞
血液癌症 CDIM, CD19, CD20, CD22, CD33, CD70, CD56, CD138 上皮肿瘤 EpCAM, Her2, Eph-A2 PSMA, MCSP, AGS-5 GPNMB 糖类抗原 CEA, CA-125, TADG78 唾液酸化 Lewis-X (CD15) 病毒抗原 PreS1 (HBV), GP120 (HIV)	T 细胞: CD3 ϵ NK 细胞, CD16, CD64 NKG2D 巨噬细胞 CD14 嗜中性白细胞 CD16b, CD177

图19