



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104684928 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 03

(21) 申请号 201380041074. 3

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司
44202

(22) 申请日 2013. 07. 31

代理人 郝传鑫

(30) 优先权数据

61/679, 045 2012. 08. 02 US

61/767, 724 2013. 02. 21 US

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006. 01)

C07K 16/46(2006. 01)

C07K 19/00(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2015. 02. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/053086 2013. 07. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/022592 EN 2014. 02. 06

(71) 申请人 JN 生物科学有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州山景城罗格大街
320

(72) 发明人 鹤下直哉 J. · 云 · 曹

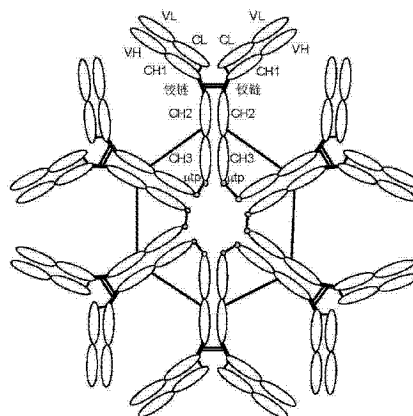
权利要求书3页 说明书45页
序列表44页 附图10页

(54) 发明名称

通过半胱氨酸突变和 μ 尾端多聚化的抗体或融合蛋白

(57) 摘要

本发明提供了引入半胱氨酸突变并与 μ 尾端连接的恒定区和包含所述恒定区的抗体或融合蛋白。所述恒定区包括至少 IgG 重链恒定区的 CH2 和 CH3 区, 其包含半胱氨酸突变和 μ 尾端。包含所述恒定区的抗体或融合蛋白获得了形成例如五聚体或六聚体的多价复合体的能力。包含所述恒定区的抗体或融合蛋白还保留了 IgG 的性能, 包括特异性地结合蛋白 G, 这有利于其纯化, 并且表现出 pH- 依赖性的 FcRn 结合性能, 这与其相对长的体内半衰期相关。取决于同种型和亚型、抗原的特性和额外的 IgG 铰链结构域的存在, 这样的抗体或融合蛋白可能还具有特异性地结合蛋白 A 的性能和效应功能, 如 ADCC、CDC 和调理素作用。



1. 一种包含 IgG CH2 区和 CH3 区的抗体或融合蛋白,其中通过 EU 编码的 Fc 区的位点 279、285 或 287 为半胱氨酸。
2. 根据权利要求 1 所述的抗体或融合蛋白,其中所述 CH3 区在其 C 末端与人 μ 尾端连接,其中所述抗体或融合蛋白的单元可通过不同单元中位于所述位点上的半胱氨酸之间的二硫键和不同单元中尾端之间的二硫键形成多聚体。
3. 根据权利要求 1 所述的抗体或融合蛋白,其中所述 IgG CH2 区和 CH3 区是人 IgG。
4. 根据权利要求 1 所述的抗体或融合蛋白,其进一步包含人 IgG CH1 区和铰链区。
5. 根据权利要求 4 所述的抗体或融合蛋白,其中所述人 IgG CH1 区、铰链区、CH2 区和 CH3 区是人 IgG1。
6. 根据权利要求 4 所述的抗体或融合蛋白,其中所述人 IgG CH1 区、铰链区、CH2 区和 CH3 区是人 IgG2。
7. 根据权利要求 4 所述的抗体或融合蛋白,其中所述人 IgG CH1 区、铰链区、CH2 区和 CH3 区是人 IgG3。
8. 根据权利要求 4 所述的抗体或融合蛋白,其中所述人 IgG CH1 区、铰链区、CH2 区和 CH3 区是人 IgG4。
9. 根据权利要求 1 所述的抗体或融合蛋白,其为多聚体形式,其中抗体或融合蛋白单元通过不同单元中位于所述位点上的半胱氨酸之间的二硫键和不同单元中尾端之间的二硫键而结合在一起。
10. 一种包含 IgG 铰链区、CH2 区和 CH3 区的抗体或融合蛋白,其中所述 CH2 区或 CH3 区的一个位点突变为半胱氨酸残基并且所述 CH3 区在其 C- 末端连接到 μ 尾端,其中所述抗体或融合蛋白的单元可通过不同单元中位于所述突变位点上的半胱氨酸之间的二硫键和不同单元中尾端之间的二硫键而多聚化。
11. 根据权利要求 10 所述的抗体或融合蛋白,所述抗体或融合蛋白进一步包含 IgG CH1 区。
12. 根据权利要求 10 所述的抗体或融合蛋白,其特异性地结合死亡受体家族蛋白并诱导携带所述蛋白的细胞凋亡。
13. 根据权利要求 10 所述的抗体或融合蛋白,其中所述死亡受体家族蛋白是 DR4。
14. 根据权利要求 10 所述的抗体或融合蛋白,其进一步包含人 IgG CH1 区。
15. 根据权利要求 10 所述的抗体或融合蛋白,其特异性地结合 TNF 受体家族蛋白并诱导携带所述蛋白的细胞凋亡或细胞郁滞。
16. 一种包含人 IgG1、IgG2 或 IgG4CH2 区和 CH3 区的抗体或融合蛋白,其中所述 CH2 区或 CH3 区的一个位点突变为半胱氨酸残基并且所述 CH3 区在其 C 末端与 μ 尾端连接,其中所述抗体或融合蛋白的单元可通过不同单元中位于所述突变位点上的半胱氨酸之间的二硫键和不同单元中尾端之间的二硫键而多聚化。
17. 一种抗体蛋白,其包含成熟重链可变区和成熟轻链可变区,所述成熟重链可变区包含 SEQ ID NO:23 的 CDRs,所述成熟轻链可变区包含 SEQ ID NO:27 的 CDRs。
18. 根据权利要求 17 所述的抗体,其中所述成熟重链可变区与 SEQ ID NO:31(不含信号肽)具有至少 90%的一致性,并且所述成熟轻链可变区与 SEQ ID NO:32(不含信号肽)具有至少 90%的一致性。

19. 一种抗体,其包含成熟重链可变区和成熟轻链可变区,所述成熟重链可变区与 SEQ ID NO:31(不含信号肽)具有至少 90%的一致性,并且所述成熟轻链可变区与 SEQ ID NO:32(不含信号肽)具有至少 90%的一致性。

20. 根据权利要求 1、10、16、17 和 19 中任一所述的抗体或融合蛋白,其是包含与重链恒定区连接的单链 Fv 的单链抗体。

21. 根据权利要求 20 所述的抗体,其是多特异性抗体的组分,所述多特异性抗体包含多种由权利要求 20 定义的单链抗体,其中所述多种单链抗体的所述单链 Fv 具有不同的 VH 区,并且所述多种单链抗体通过不同单元中位于所述突变位点上的半胱氨酸之间的二硫键和不同单元中尾端之间的二硫键而复合在所述多特异性抗体中。

22. 根据权利要求 21 所述的抗体,其中所单链 Fv 具有相同的 VL 区。

23. 根据权利要求 1、10、16、17 和 19 中任一所述的抗体或融合蛋白,其特异性地结合蛋白 G,特异性地结合蛋白 A,表现出 ADCC、CDC 和 / 或调理素作用。

24. 根据权利要求 23 所述的抗体或融合蛋白,其中若存在 CH1 区,所述 CH1 区、铰链区、CH2 区和 CH3 区是人 IgG1 区,并且所述抗体特异性地结合蛋白 G 及特异性地结合蛋白 A。

25. 根据权利要求 24 所述的抗体,其表现出 ADCC、CDC 和 / 或调理素作用。

26. 根据权利要求 1、10、16、17 和 19 中任一所述的抗体或融合蛋白,其中若存在 CH1 区,所述 CH1 区、铰链区、CH2 区和 CH3 区是人 IgG2 区或 IgG4 区,并且所述抗体或融合蛋白特异性地结合蛋白 G 及特异性地结合蛋白 A。

27. 根据权利要求 1、10 和 16 中任一所述的抗体或融合蛋白,其是包含与异源多肽连接的免疫球蛋白重链的融合蛋白。

28. 根据权利要求 27 所述的融合蛋白,其中所述异源蛋白通过例如 Gly-Gly-Ala-Ala 的柔性连接器与恒定区的铰链连接。

29. 根据权利要求 27 所述的融合蛋白,其中所述异源多肽是受体胞外域或特异性地结合受体胞外域的蛋白。

30. 根据权利要求 27 所述的融合蛋白,其作为多特异性复合体的组分,所述多特异性复合体包含多种融合蛋白,所述融合蛋白包括不同的异源多肽。

31. 根据权利要求 1、10、16、17 和 19 中任一所述的抗体或融合蛋白,其是多特异性复合体,所述多特异性复合体包含通过不同单元中位于所述位点上的半胱氨酸之间的二硫键和不同单元中 μ 尾端之间的二硫键而复合的抗体和融合蛋白。

32. 根据权利要求 1、10、16、17 和 19 中任一所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体、嵌合抗体、饰面抗体或人抗体。

33. 根据权利要求 1、10、16、17 或 19 中任一所述的抗体或融合蛋白,其特异性地结合受体的胞外域。

34. 根据权利要求 33 所述的抗体或融合蛋白,其是特异性地结合 CD79a、CD30、DR5 或 DR4 的抗体。

35. 根据权利要求 1、10、16 中任一所述的抗体或融合蛋白,其是包含 TNF- α 受体、LFA-3 或 IL-1 受体的胞外域的融合蛋白。

36. 根据权利要求 35 所述的抗体或融合蛋白,其是包含 TRAIL 蛋白的融合蛋白。

37. 根据权利要求 1、10、16、17 和 19 中任一所述的抗体或融合蛋白,其与毒性部分共

轭。

38. 根据权利要求 37 所述的抗体或融合蛋白,其中所述毒性部分是细胞毒性的。

39. 根据权利要求 33 所述的抗体或融合蛋白,其是特异性地结合 CD40、OX40、4-1BB、GITR 或 CD27 的抗体。

40. 一种包含由任一前述权利要求定义的抗体或融合蛋白的药物组合物。

41. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括向患有癌症或有患癌症风险的病患施用由任一前述权利要求定义的抗体或融合蛋白的有效方案。

42. 一种治疗免疫失调的方法,所述方法包括向患有免疫失调或有患免疫失调风险的病患施用由任一前述权利要求定义的抗体或融合蛋白的有效方案。

43. 一种生产抗体和 / 或融合蛋白的多特异性复合体的方法,所述方法包括:

a. 用编码多种由权利要求 1、10、16、17 和 19 中任一项定义的抗体和 / 或融合蛋白的一种或多种载体转染细胞,所述抗体和 / 或融合蛋白具有不同的特异性;其中所述抗体和 / 或融合蛋白被表达并通过位于所述位点上的半胱氨酸之间的二硫键和 μ 尾端之间的二硫键而被组装在多特异性复合体中;和

b. 从细胞培养物中分离所述多特异性复合体。

44. 根据权利要求 43 所述的方法,其中所述多种抗体或多种融合蛋白中的每一种抗体或每一种融合蛋白由不同的载体编码。

45. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体包含成熟轻链可变区和成熟重链可变区,所述成熟轻链可变区包含具有分别由 SEQ ID NO. 39、40 和 41 指定的氨基酸序列的 CDRs,所述成熟重链可变区包含具有分别由 SEQ ID NO. 43、44 和 45 指定的氨基酸序列的 CDRs。

46. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体包含成熟轻链可变区和成熟重链可变区,所述成熟轻链可变区与 SEQ ID NO. 38 的成熟可变区具有至少 90% 的序列一致性,所述成熟重链可变区与 SEQ ID NO. 42 的成熟可变区具有至少 90% 的序列一致性。

通过半胱氨酸突变和 μ 尾端多聚化的抗体或融合蛋白

[0001] 相关申请的交互参照

[0002] 本申请是递交于 2012 年 8 月 2 日的 61/679,045 和递交于 2013 年 2 月 21 日的 61/767,724 的非临时申请,这两项专利申请均以参考方式整体纳入以符合所有目的。

[0003] 以参考的方式并入序列表

[0004] 本申请所公开的序列包含在以 txt 递交的指定的 90 千字节的 436134seqlist.txt 中,其创建于 2013 年的 7 月 26 日,此序列表以参考的方式并入本申请中。

背景技术

[0005] 抗体是由在免疫系统中发挥重要作用的 B 细胞产生的糖蛋白(可参见:Schroeder et al., J. Allergy Clin. Immunol. 125:S41-S52, 2010)。哺乳动物可产生五类抗体,即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。人类可产生 IgG 的四个亚类(IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4)以及 IgA 的两个亚类(IgA1 和 IgA2)。每种抗体是由以单体形式存在的两个相同的轻链和两个相同的重链构成的。这四条链通过共价键和非共价键的组合而彼此连接,并形成 Y 形分子。在哺乳动物中有两种类型的轻链, κ 和 λ 。重链存在几种不同的类型,由此定义了抗体的类。在人类中, μ 重链被并入到 IgM 中, δ 重链被并入到 IgD 中, $\gamma-1$ 重链被并入到 IgG1 中, $\gamma-2$ 重链被并入到 IgG2 中, $\gamma-3$ 重链被并入到 IgG3 中, $\gamma-4$ 重链被并入到 IgG4 中, $\alpha-1$ 重链被并入到 IgA1 中, $\alpha-2$ 重链被并入到 IgA2 中, ϵ 重链被并入到 IgE 中。这些抗体的单体形式具有两个抗原结合位点,并且因此所述抗体对于抗原结合是二价的(divalent)。虽然 IgG、IgD 和 IgE 仅仅以单体产生,然而在缺少 J 链时,IgM 以六聚体产生并因此对于抗原结合是十二价(dodecavalent)的,而当 J 链存在时,IgM 形成十价的(decavalent)五聚体(可参见:Gilmour et al., Trans. Med. 18:167-174, 2008)。IgA 通过 J 链形成四价的(tetravalent)二聚体,而当缺少 J 链时 IgA 是单体,但是已有报道称不存在 J 链时可自发形成二聚体 IgA(可参见:Johansen et al., Scand. J. Immunol. 52:240-248, 2000)。

[0006] 截止 2011 年底,美国食品和药品管理局已批准 31 种单克隆抗体作为人类治疗剂。所有这些治疗抗体为 IgG 抗体或其衍生物。除了特异性抗原结合,IgG 抗体还引发由 Fc 区介导的各种生物学功能(可参见:Schroeder et al. supra; Desjarlais et al., Exp. Cell Res. 317:1278-1285, 2011)。在人类中,细胞结合 IgG1 和 IgG3 抗体通过将所述 Fc 区结合至 NK 细胞表达的 Fc γ 受体 III 型(CD16)(可参见:Hulett et al., Adv. Immunol. 57:1-127, 1994)上来介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(抗体-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)。类似地,细胞结合 IgG1 和 IgG3 抗体通过所述 Fc 区和补体成分(complement components)的相互作用能够有效地触发补体依赖性细胞毒性作用(complement-dependent cytotoxicity, CDC)(可参见:Bindon et al., J. Exp. Med. 168:127-142, 1988)。

[0007] 人类 IgG 抗体的所有四个亚类的 Fc 区与新生的 Fc 受体(FcRn)结合,所述 FcRn 是由跨膜 α 链和 $\beta-2$ 微球蛋白构成的异源二聚体,所述结合是 pH 依赖性的,所述结合导致:将通过胞饮作用内在化的 IgG 抗体从溶菌酶的分解代谢降解中抢救,并使它们回收

循环中(可参见:Ghetie et al., *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766, 2000)。因此 IgG 抗体表现出从循环中缓慢清除,这导致了其在人类中长的血清半衰期,通常是 23 天(可参见:Kindt et al., Chapter 4, *Kuby Immunology*, Sixth Edition, W. H. Freeman&Co., 2006)。此外,所述 IgG 抗体的 Fc 区结合到蛋白 A(除 IgG3)和蛋白 G,由此通过蛋白 A 和蛋白 G 的亲合层析来纯化 IgG 抗体是可能的(可参见:Andrew et al., Unit 2.7, Chapter III, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley&Sons, Inc. 1997)。

[0008] 在细胞表面的特定分子的二聚化通常可引发一个或多个生物反应。单克隆 IgG 抗体与位于细胞表面的 PSMA(前列腺特异性膜抗原)蛋白的结合提高了 PSMA 内在化(internalization)速率(可参见:Liu et al., *Cancer Res.* 58:4055-4060, 1998)。I 型跨膜蛋白 MUC1 的内在化和下调(down-regulation)通过结合到 IgG1 抗体引发(可参见:Hisatsune et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388:677-382, 2009)。抗 c-Met 的单克隆抗体使细胞表面的 c-Met 蛋白二聚化,并启动细胞内信号而导致细胞增殖(可参见:Prat et al., *J. Cell Sci.* 111:237-247, 1998)。类似地,单克隆抗-EPO 受体抗体通过使表面的 EPO 受体同源二聚化(homodimerization)而用作细胞生长激动剂(可参见:Schneider et al., *Blood* 89:473-482, 1997)。死亡受体 5(DR5)是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的成员,然而,在细胞表面上的死亡受体 5(DR5)的抗体介导的二聚化并不总是触发信号转导,而通过小鼠单克隆抗-DR5IgG 抗体和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的混合物介导的死亡受体 5(DR5),例如,会引发在细胞质中的信号转导并触发细胞凋亡(可参考:Griffith et al., *J. Immunol.* 162:2597-2605, 1999)。

[0009] J 链存在时, IgM 抗体为五聚体, J 链不存在时, IgM 抗体为六聚体(可参见:Gilmour et al., 同上)。IgG 抗体仅能够二聚化抗原,与 IgG 抗体相反,由于 IgM 抗体的十价或十二价的抗原结合能力, IgM 抗体可使细胞表面蛋白多聚化。Fas 是所述 TNFR 超家族的成员(可参见:Cosman, *Stem Cells* 12:440-455, 1994),对 Fas 具有特异性的单克隆 IgM 抗体可有效地诱导表达 Fas 的细胞凋亡,这是由于表面的 Fas 蛋白的多聚化(可参见:Yonehara et al., *J. Exp. Med.* 169:1747-1756, 1989),而抗-Fas IgG 抗体不能进行所述诱导,除非它们是交联的(可参见:Matsuno et al., *J. Rheumatol.* 29:1609-1614, 2002)。相较于 IgG, IgM 表现出更短的循环半衰期,在人类中通常为 5 天,因为它无法与 FcRn 结合(可参考:Kindt et al., 同上)。由于不与 CD16 结合, IgM 抗体也不能介导 ADCC。此外,由于 IgM 不与蛋白 A 和蛋白 G 结合,因此 IgM 不可能通过蛋白 A 和蛋白 G 亲和层析分别来纯化(可参见:Gautam et al., *Biotechnol. Adv.* 29:84-849, 2011)。

[0010] 多种结构式(structural formats)已被利用于尝试产生多价抗体的新形式。Cuesta 等的综述文章(可参见:*Trends Biotech.*, 28:355-362, 2010)上总结了多价抗体工程化的最近进展。优选的多价 IgG 抗体能够有效地在细胞表面上使抗原多聚化。同样重要的是,通过 γ 重链的 Fc 区介导的性能,如 ADCC, CDC, 调理素作用, PH 依赖性的 FcRn 结合以及和蛋白 A 和蛋白 G 的结合能力,仍旧保持在这些多价 IgG 抗体中。

[0011] 为了产生多价 IgG 抗体, Caron 等(可参见:*J. Exp. Med.*, 176:1191-1195, 1992)在人源化抗-CD33IgG1/ κ 抗体(HuG1-M195)中的人 γ -1 重链的羧基末端起第四个位点引入丝氨酸-至-半胱氨酸替换。这种修饰的 HuG1-M195, 称为 Hd-IgG 抗体, 被纯化并经 Ellman 氏试剂处理以使之交联, 然后阻断多余的巯基位点。单体 HuG1-M195 通过苯基琼脂糖凝胶

柱层析法从 Hd-IgG 中消除。由此产生的 Hd-IgG 显示出显著改进的使 CD33 分子内在化的能力,并且比 HuG1-M195 在 ADCC 和 CDC 上更有效。

[0012] Miller 等(可参见:J. Immunol., 170:4854-4861, 2003)通过复制人源化抗-HER2 的 IgG1 单克隆抗体(hu4D5)的重链的 VH-CH1 区构建了一个四价的 IgG 抗体。所述被修饰的 γ 重链,从 N-末端至 C-末端,由以下组成:VH、CH1、VH、CH1、铰链、CH2 和 CH3 区。一个轻链结合到所述修饰的 IgG 中的所有四个 VH-CH1 区,形成了一个四价的 hu4D5 抗体(TA-HER2)。相比于在 HER2-表达细胞的亲源(parental)二价的 hu4D5,TA-HER2 可被更迅速的内在化。Miller 等(同上)也构建了一个四价的抗-DR5IgG 抗体,称为 TA-DR5 抗体,具有与 TA-HER2 相同的重链形式。TA-DR5 触发细胞凋亡的浓度比亲源(parental)二价的抗-DR5IgG 单克隆抗体低 100 倍。

[0013] Rossi 等(可参见:Cancer Res., 68:8384-8392, 2008)报道了使用对接和锁定(Dock-and-Lock)方法构建六价抗-CD20IgG 抗体,被认定为 Hex-hA20。Hex-hA20 由六个 Fab 区和两个 Fc 区组成,为了产生 Hex-hA20,两种组分被构建并且分别在哺乳动物细胞中生产。首先,A-激酶锚定蛋白(AD)的锚定域被基因地(genetically)融合至人源化抗-CD20IgG1 抗体(hA20)重链的羧基末端。这种构建体被命名为 CH3-AD2-IgG-hA20。第二,环 AMP 依赖性蛋白激酶(DDD)的对接结构域被基因地(genetically)融合至 h20 的 Fab 片段的羧基末端。这种构建体被命名为 CH1-DDD2-Fab-hA20。CH3-AD2-IgG-hA20 和 CH1-DDD2-Fab-hA20 分别通过蛋白 A 和蛋白 L 亲和层析纯化。Hex-hA20 通过以下方法得到:在氧化还原条件下混合纯化的 CH3-AD2-IgG-hA20 和 CH1-DDD2-Fab-hA20,随后用蛋白 A 纯化。Hex-h20 抑制 CD20-表达 B 淋巴瘤细胞系的增殖而不需要交联抗体。Hex-h20 保留了 hA20 的 ADCC 活性,但失去了 CDC 活性。

[0014] Yoo 等(可参见:J. Biol. Chem., 47:33771-33777, 1999)构建了变体的(variant)人抗-DNS IgG2 抗体,其中 γ -2 重链的部分替换为人 α -1 重链的相应部分。在被称为 $\gamma\gamma\gamma$ - α tp 的所述构建体中,存在于人 α -1 重链的 C 末端的 18-氨基酸多肽,称为 α tp(也称为 α 尾端(tailpiece)),被连接至人 γ -2 重链的 C 末端。所述 $\gamma\gamma\gamma$ - α tp 构建体被进一步修饰以产生如下三种变体的 IgG2 抗体。在 $\alpha\gamma\gamma$ - α tp 中,所述 γ -2 重链的 CH1 区被替换为人 α -1 重链的对应部分。在 $\alpha\alpha\gamma$ - α tp 中,CH1、铰链和 CH2 区被替换为人 α -1 重链的对应部分。在 $\gamma\alpha\gamma$ - α tp 中,铰链和 CH2 区被替换为人 α -1 重链的对应部分。这些构建体在产生 J 链的小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0 中稳定地表达。每种纯化的 $\gamma\gamma\gamma$ - α tp、 $\alpha\gamma\gamma$ - α tp、 $\alpha\alpha\gamma$ - α tp 和 $\gamma\alpha\gamma$ - α tp 抗体均为单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体和六聚体的混合物。所述混合物中五聚体和六聚体的组合百分比分别为:对于 $\gamma\gamma\gamma$ - α tp 为 20%,对于 $\alpha\gamma\gamma$ - α tp 为 25%,对于 $\alpha\alpha\gamma$ - α tp 为 45%,对于 $\gamma\alpha\gamma$ - α tp 为 32%。

[0015] Sorensen 等(可参见:J. Immunol. 156:2858-2865, 1996)基于人单克隆抗-NIP(3-硝基-4-羟基-5-iodophenylacetic 酸)IgG3 抗体变体产生了多价的抗体,其中,第一、第二和第三铰链区被清除。所述变体 IgG3 抗体的 γ -3 重链两个位置被改造。首先,人 μ 重链的 C-末端中存在的 18 氨基酸多肽,称为 μ tp(也称为 μ 尾端(tailpiece)),被连接到重链的 C-末端。第二,CH2 区中第 309 位的一个亮氨酸残基变成了一个半胱氨酸残基。这种被改造的单克隆 IgG3 抗体,被称为 IgGL309C μ tp,在产生 J 链的小鼠骨髓瘤细胞系

J558L 中表达,并使用 NIP- 琼脂糖凝胶柱纯化。据报道,相比亲源 IgG3 抗体, IgGL309C μ tp 具有相对差的分泌水平,并且很大一部分 IgGL309C μ tp 被保留在细胞内。分析表明,五聚体和六聚体构成所述纯化的 IgGL309C μ tp 的 81%。

[0016] Sorensen 等(可参见: Int. Immunol., 12:19-27, 2000) 也改造了与上述相同的人抗-NIP IgG3 抗体变体,通过取代 γ -3 重链的 CH2 和 CH3 区为人 μ 重链的包括 μ tp 的 CH3 和 CH4 区。这种改造的 IgG3/IgM 杂交分子的重链,称为 IgG-C μ 3-C μ 4,自 N- 末端开始,由抗-NIP VH 区、人 γ -3 重链的 CH1 和第四铰链区和人 μ 重链的包含 μ tp 的 CH3 和 CH4 区。IgG-C μ 3-C μ 4 在产生 J 链的 J558L 细胞中表达并用 NIP- 琼脂糖凝胶柱纯化。在纯化的 IgG-C μ 3-C μ 4 中,六聚体和五聚体分别构成了 14.0% 和 66.7%。因为 IgG-C μ 3-C μ 4 没有人 γ -3 重链的 CH2 和 CH3 区,它将缺乏 Fc γ - 介导的性能,例如 ADCC、pH 依赖性的 FcRn 结合和结合到蛋白 A 和蛋白 G 的能力。

[0017] 人们对通过与细胞表面蛋白(如 TNF 受体家族成员(可参见: Hehlhans and Pfeffer, Immunol. 115:1-20, 2005; Mahmood and Shukla, Exp. Cell Res. 316:887-899, 2010)) 有效的交联能够诱导细胞凋亡、细胞郁滞和 / 或细胞内的信号转导,而不会失去 Fc γ - 介导功能,如 ADCC、CDC、调理素作用和长的血清半衰期的多聚化 IgG 抗体有强烈的需求。这种多聚化 IgG 抗体被期望通过它们独特的作用机制能够有效治疗癌症和其他疾病。

发明内容

[0018] 本发明提供了包含 IgG 的 CH2 和 CH3 区的抗体或融合蛋白,其中通过 EU 编号的 Fc 区的位点 279、285 或 287 是半胱氨酸。任选地,所述 CH3 区在其 C 末端与人 μ 尾端连接(μ tailpiece, 又称 μ 尾片),其中所述抗体或融合蛋白的单元(units) 可通过不同单元中位于所述位点上的半胱氨酸之间的二硫键和不同单元中尾端之间的二硫键形成多聚体。任选地,所述 IgG CH2 区和 CH3 区是人 IgG。一些抗体或融合蛋白进一步包含人 IgG CH1 区和铰链区。任选地,所述人 IgG CH1 区、铰链区、CH2 区和 CH3 区是人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4。所述抗体或融合蛋白的单元可通过不同单元中所述位点上的半胱氨酸之间的二硫键和不同单元中尾端之间的二硫键被连接(hold) 在一起。

[0019] 本发明进一步提供了包含 IgG 铰链区、CH2 区和 CH3 区的抗体或融合蛋白,其中所述 CH2 区或 CH3 区的一个位点突变为半胱氨酸残基并且所述 CH3 区在其 C 末端与 μ 尾端连接,其中所述抗体或融合蛋白的单元可通过不同单元中所述突变位点上的半胱氨酸之间的二硫键和不同单元中尾端之间的二硫键而多聚化。一些抗体或融合蛋白进一步包含一个 IgG CH1 区,优选为人 IgG CH1 区。任选地,所述抗体或融合蛋白特异性地与死亡受体家族蛋白(Death Receptor family protein) 结合并且诱导携带所述蛋白(如 DR4) 的细胞凋亡。一些抗体或融合蛋白特异性地与 TNF 受体家族蛋白结合并且诱导携带所述蛋白的细胞凋亡或细胞郁滞。

[0020] 本发明进一步提供了包含人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的 CH2 区和 CH3 区的抗体或融合蛋白,其中所述 CH2 区或 CH3 区的一个位点突变为半胱氨酸残基并且所述 CH3 区在其 C 末端与 μ 尾端连接,其中所述抗体或融合蛋白的单元可通过不同单元中所述突变位点上的半胱氨酸之间的二硫键和不同单元中尾端之间的二硫键而多聚化。

[0021] 本发明进一步提供了一种抗体,其包含成熟重链可变区和成熟轻链可变区,所述成熟重链可变区包含 SEQ ID NO:23 的 CDRs,所述成熟轻链可变区包含 SEQ ID NO:27 的 CDRs。任选地,所述成熟重链可变区具有与 SEQ ID NO:31(不含信号肽)至少 90%的一致性并且所述成熟轻链可变区具有与 SEQ ID NO:32(不含信号肽)至少 90%的一致性。

[0022] 本发明进一步提供了一种抗体,其包含成熟重链可变区和成熟轻链可变区,所述成熟重链可变区具有与 SEQ ID NO:31(不含信号肽)至少 90%的一致性并且所述成熟轻链可变区具有与 SEQ ID NO:32(不含信号肽)至少 90%的一致性。

[0023] 任意上述的抗体或融合蛋白均可作为单链抗体,其包含与重链恒定区连接的单链 Fv。任选地,所述抗体是多特异性 (multi-specific) 抗体的组分,所述多特异性抗体包含多种单链抗体,其中所述多种单链抗体的 scFvs(单链 Fv)具有不同的 VH 区并且所述多种单链抗体在所述多特异性抗体中通过不同单元中所述突变位点上的半胱氨酸之间的二硫键和不同单元中尾端之间的二硫键被复合 (complexed)。任选地,所述 scFvs(单链 Fv)具有相同的 VL 区。

[0024] 任意上述的抗体或融合蛋白均可特异性地结合蛋白 G,特异性地结合蛋白 A,表现出 ADCC、CDC 和 / 或调理素作用。任选地,若存在 CH1 区,所述 CH1 区、铰链区、CH2 区和 CH3 区是人 IgG1 区,并且所述抗体特异性地结合蛋白 G 以及特异性地结合蛋白 A。任选地,所述抗体表现出 ADCC、CDC 和调理素作用。

[0025] 在某些上述的抗体或融合蛋白中,若存在 CH1 区,所述 CH1 区、铰链区、CH2 区和 CH3 区是人 IgG2 或人 IgG4 同种型,并且所述抗体或融合蛋白特异性地结合蛋白 G,且特异性地结合蛋白 A。任选地,所述抗体或融合蛋白是包含免疫球蛋白重链的融合蛋白,所述免疫球蛋白重链与异源多肽连接。任选地,所述异源蛋白通过例如 Gly-Gly-Ala-Ala 的柔性连接器与恒定区的铰链连接。任选地,所述异源多肽是受体胞外域或特异性地与受体胞外域连接的蛋白质。任选地,所述融合蛋白是包含多种融合蛋白的多特异性复合体 (complex) 的成分,所述融合蛋白包括不同的异源多肽。

[0026] 任意上述的抗体或融合蛋白可以以多特异性复合体的形式存在,所述多特异性复合体包含通过不同单元中所述位点上的半胱氨酸之间的二硫键和不同单元中 μ 尾端之间的二硫键复合的抗体和融合蛋白。

[0027] 任意上述的抗体可以是人源化抗体、嵌合抗体、饰面抗体或人抗体。

[0028] 任意上述的抗体或融合蛋白可与受体的胞外域特异性地结合。

[0029] 某些上述的抗体或融合蛋白特异性地与 CD79a、CD30、DR5、DR4、CD40、OX40、4-1BB、GIT 或 CD27 结合。

[0030] 某些融合蛋白包含 TNF- α 受体、LFA-3 或 IL-1 受体的胞外结构域。某些融合蛋白包含 TRAIL 蛋白。

[0031] 任意上述的抗体或融合蛋白可与毒性部分共轭,任选地细胞毒性的。

[0032] 本发明进一步提供了一种包含以上定义的抗体或融合蛋白的药物组合物。

[0033] 本发明进一步提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向患有癌症或有患癌症风险的病患施用以上定义的抗体或融合蛋白的有效方案。

[0034] 本发明进一步提供了一种治疗免疫失调的方法,所述方法包括向患有免疫失调或有患免疫失调风险的病患施用以上定义的抗体或融合蛋白的有效方案。

[0035] 本发明进一步提供了一种生产抗体和 / 或融合蛋白的多特异性复合物的方法, 所述方法包括 :a. 用编码多种以上定义的抗体和 / 或融合蛋白的一种或多种载体转染细胞, 所述抗体和 / 或融合蛋白具有不同的特异性 ; 其中所述抗体和 / 或融合蛋白被表达并通过位于所述位点上的半胱氨酸之间的二硫键和 μ 尾端之间的二硫键组装于多特异性复合体中 ; 和 b. 从细胞培养物中分离所述多特异性复合体。任选地, 所述多种抗体或融合蛋白由不同的载体编码。

[0036] 本发明进一步提供了一种单克隆抗体, 所述单克隆抗体包含成熟轻链可变区和成熟重链可变区, 所述成熟轻链可变区包含具有分别由 SEQ ID NO. 39、40 和 41 指定的氨基酸序列的 CDRs, 所述成熟重链可变区包含具有分别由 SEQ ID NO. 43、44 和 45 指定的氨基酸序列的 CDRs。

[0037] 本发明进一步提供了一种单克隆抗体, 所述单克隆抗体包含成熟轻链可变区和成熟重链可变区, 所述成熟轻链可变区具有与 SEQ ID NO. 38 的成熟可变区至少 90% 的序列一致性, 所述成熟重链可变区具有与 SEQ ID NO. 42 的成熟可变区至少 90% 的序列一致性。

附图说明

[0038] 图 1 : San11 抗体表达载体的结构示意图。

[0039] 图 2 : YON007 抗体表达载体的结构示意图。

[0040] 图 3A-F : 来自 Superose 6 凝胶过滤柱的抗 -DR5IgG1 抗体的洗脱图谱。

[0041] 图 4A-H : 来自 Superose 6 凝胶过滤柱的单体的或多聚体的抗 -DR5IgG1 抗体的洗脱图谱。

[0042] 图 5A-D : 由多价抗 -DR5IgG1 抗体诱导的 Ramos 细胞凋亡。

[0043] 图 6A-D : 由多价抗 -DR5IgG1 抗体诱导的 Colo-205 细胞凋亡。

[0044] 图 7 : 一个示例性的 IgG 抗体, 其在 Fc 区具有一个氨基酸取代成半胱氨酸且在所述 Fc 区的末端携带 μ tp 序列, 所述 IgG 抗体是六聚体构象。链间二硫键以直线示出。每个单体单元具有两个结合位点, 每个结合位点形成自一条重链和一条轻链的可变区。六个单体单元通过二硫键彼此结合, 一个二硫键在 Fc 区之间且另一个二硫键在不同单体单元的 μ tp 序列之间。显示的包括价态和二硫键形态的所述抗体仅为本发明提供的用于说明的一个实施方案。

[0045] 图 8A、B、C : IgG 和 IgM 组分的序列。

[0046] 图 9 : HuYON007. V279C. μ tp 多聚体或 HuYON007IgG1 处理的 Ramos- 携带 CB17SCID 小鼠的存活数据。

[0047] 图 10 : 单链 Fv 形式的 HuYON007. V279C. μ tp 的表达载体的原理图。

[0048] 定义

[0049] 抗体或融合蛋白通常以分离的形式提供。这意味着抗体或融合蛋白通常具有至少 50% w/w 的纯度, 其不含源自其制备或纯化过程中的干扰蛋白质及其它污染物, 但不排除该单克隆抗体与额外的制药上可接受的载体 (carrier) 或其他媒介 (vehicle) 组合以利于其使用的可能性。有时抗体或融合蛋白具有至少 60%、70%、80%、90%、95 或 99% w/w 不含源自其制备或纯化过程中的干扰蛋白质及其它污染物的纯度。通常, 抗体或融合蛋白是其纯化后剩余的主要大分子种类。抗体或融合蛋白与其靶标抗原的特异性结合是指至少

10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10} M⁻¹的亲合性。相比于与至少一种不相关靶标的非特异性结合,特异性结合可在一个更高的数量级上被检测出,并且可与所述的非特异性结合区分。特异性结合可以是特定官能团之间形成键或特定空间契合(例如锁和钥匙类型)的结果,然而非特异性结合是范德华力(van der Waals forces)的结果。特异性结合并不必然意味着抗体或融合蛋白只结合一个且只有一个靶标。

[0050] 基本的抗体单位是亚基的四聚体。每个四聚体包括两对相同的多肽链,每一对多肽链具有一条“轻链”(约25千道尔顿)及一条“重链”(约50至70千道尔顿)。每条链的末端包括约100-110个或更多氨基酸的可变区,该可变区主要负责识别抗原。此可变区在刚被表达时与一个可切割的信号肽(cleavable signal peptide)连接。不具有该信号肽的可变区有时被称为成熟可变区。因此,举例来说,轻链成熟可变区是指不具有轻链信号肽的轻链可变区。然而,提及可变区并不意味着信号序列必然存在;实际上,本发明的抗体或融合蛋白一旦表达和分泌,信号序列就被切割。一对重链和轻链可变区定义了抗体的结合区。轻链和重链的羧基端部分别定义了轻链恒定区和重链恒定区。每所述重链恒定区主要负责效应功能。在IgG抗体中,所述重链恒定区被分成CH1区、铰链区、CH2区和CH3区。在IgA中,所述重链恒定区被分成CH1、CH2和CH3。CH1区通过二硫键和非共价键结合到轻链恒定区。铰链区提供了抗体的结合区和效应器区之间的灵活性,并且还提供了一个四聚体亚基中两个重链恒定区之间分子间二硫键结合位点。所述CH2和CH3区是效应功能和FcRn结合的主要位点。在IgM抗体中, μ 重链恒定区(C μ)被细分为四个区域C μ 1, C μ 2, C μ 3和C μ 4。所述C μ 3和C μ 4区,有时与一个或多个J链组合,在天然IgM抗体中提供了多聚化的功能。 μ 尾端(tailpiece)是一个位于IgM重链恒定区C-末端的18个氨基酸长的多肽。J链存在时,IgM多聚化形成一个五聚体结构,J链不存在时,IgM多聚化形成一个六聚体结构。

[0051] 轻链被分类为 κ 或 λ 。重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ ,并定义对应抗体的同种型(isotype)分别为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过一个约12或12个以上的氨基酸的“J”区连接,同时重链也包括一个约10个或更多个氨基酸“D”区(一般见Fundamental Immunology(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y., 1989, Ch. 7, 以参考方式整体纳入以符合所有目的)。

[0052] 每个轻/重链对的成熟可变区可形成抗体的结合位点。因此,一个完整的抗体具有2个结合位点,即为二价的。在天然抗体中,所述结合位点是一样的。然而,双特异抗体可以被制备,其中,两个结合位点是不同的(参见例如Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321(1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53(1992))。可变区全表现出相对保守的骨架区(FR)的相同的通用结构,所述骨架区通过3个高变区连接,所述的高变区也叫互补决定区或CDRs。源自每个轻/重链对的两条链的CDRs是由框架区对准,以结合到特定的抗原表位。从N-末端至C-末端,轻链和重链均包括结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。每个结构域的氨基酸分配与Kabat《免疫学重要的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest)(国立卫生研究院, Bethesda, MD, 1987和1991)中的定义或Chothia&Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987); Chothia等, Nature 342:878-883(1989)的定义是一致的。Kabat还提供了一种广泛使用的编号惯例(Kabat编号),其中,不同重链可变区或不同轻链

可变区之间的相应残基被分配了相同的编号。尽管 Kabat 编号可用于抗体恒定区,但如本发明的情况,EU 索引 (EU index) 被更普遍地使用。

[0053] 抗体或融合蛋白单元,也称为多聚化单元 (multimerization unit) 是指并入了半胱氨酸突变和 μ 尾端的抗体或融合蛋白的单体单元 (monomeric unit) 通过不同单元中突变的半胱氨酸之间形成的二硫键和不同单元的尾端之间形成的二硫键经受多聚化。所述多聚化单元本身可以是一或二价的。在单特异性 (mono-specific) 二价抗体单元中,两条重链和两条轻链是相同的。在双特异性 (bispecific) 二价抗体单元中,具有两个不同的重链和轻链对,所述两个重链和轻链对具有不同结合特异性。抗体单元也可以是含有单一重链和轻链组合的一价抗体,如单链抗体的情况,其中,重链和轻链可变区分子内配对。融合蛋白单元可以是单体的 (monomeric)、包含一种融合蛋白的两个拷贝的同型二聚体 (homodimeric)、包含不同融合蛋白异源二聚体 (heterodimeric)。

[0054] 多聚化指至少两个多聚化单元的联合,更通常 5 或 6 个这样的单元通过突变半胱氨酸之间的二硫键联合 (即一个单元的突变半胱氨酸与另一个单元的突变半胱氨酸结合) 和 μ 尾端之间的二硫键联合 (即连接到一个 IgG 上的一个单元的 μ 尾端与另一个单元的 μ 尾端结合)。具有并入半胱氨酸突变和在 C 端与 μ 尾端连接的 IgG 重链恒定区的抗体或融合蛋白的多聚化有时会形成比普通 IgM 的五聚体或六聚体结构更高过更低序 (order) 结构。有时,这类多聚化的特征在于通过多聚化形成一个具有至少约五或六个单元的复合体。

[0055] 化合价 (valency) 是指结合区的数量或者换言之,能被抗体或融合蛋白结合的靶抗原分子的最大数目。一个标准的同型二聚体 IgG 抗体有两个化合价。一个标准的 IgM 抗体具有 10 或 12 化合价,取决于是形成五聚体还是六聚体结构 (即五或六个 IgM 的单元,每个单元均是含有两个结合位点的四聚体)。本发明的抗体或融合蛋白 (其中的单体单元是二价的) 可以有 10 个或 12 个化合价,然而抗体或融合蛋白 (其中单体单元是一价) 可具有 5 或 6 个化合价。化合价可以在这些值中变化,这是因为具有 cys- μ 重链恒定区的抗体或融合蛋白有时会形成比常规的 IgM 的五聚体或六聚体结构更高序或更低序的结构。这些化合价是理论最大值。在实践中,由于空间位阻的限制,结合的抗原的拷贝数可能小于理论上的最大值。

[0056] 如果所有其抗原 (或配体) 结合区具有相同的特异性,本发明的抗体或融合蛋白是单特异性的抗体。如果它的抗原结合区包括至少两种不同的特异性,该抗体或融合蛋白是多特异性的。多特异性的抗体或融合蛋白中的不同特异性的数量可以为 2 至多达所述抗体或融合蛋白的最大价数 (例如,10 或 12)。在由通过相同细胞培养的抗体或融合蛋白群体中,不同特异性的数目在不同的所述群体中是变化的。

[0057] 术语“抗体”包括任何形式的具有至少一个结合区 (包含单价片段) 抗体、两条重链和两条轻链的二价四聚体单元、以及更高序的复合体,特别是一价或二价单元的五聚体和六聚体。所述抗体可以是单特异性的,在这种情况下,所有结合区具有相同特异性,或者所述抗体可以是多特异性,在这种情况下,所述结合位点具有至少两种特异性。抗体片段通常包括一个重链可变区和 cys- μ 重链恒定区,也可以包括一个轻链可变区。例如,抗体片段可以包括从 N-末端到 C 末端的轻链可变区,肽间隔区,重链可变区和本发明的 cys- μ 重链恒定区。另一个片段包含重链可变区 (结合区) 和 cys- μ 重链恒定区和无轻链 (即,

Dab 或纳米抗体)。同样地,融合蛋白包括单体或二聚的融合蛋白单元,或更高序的复合体,特别是五聚体和六聚体。

[0058] 术语“表位”是指位于抗原上的能与抗体或融合蛋白结合的位点。抗原表位可由一个或多个蛋白三级折叠的并列的连续的氨基酸或不连续的氨基酸形成。由连续氨基酸形成的抗原表位(也称为线性表位)通常暴露于变性剂后保留,而由三级折叠形成的抗原表位(也称为构象表位)通常经变性剂处理后通常消失。一些抗体结合到终端-特异性表位,意味着:相比与其他多肽融合的相同的多肽(这导致失去自由终端),抗体优先结合到具有自由终端的多肽。抗原表位的独特空间构象中通常包括至少为 3 个,更通常为 5 个或 8-10 个氨基酸。抗原表位独特空间构象的测定方法包括,例如,x-射线结晶学和二维核磁共振,见,例如 Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)。

[0059] 术语“抗原”或“靶抗原”是指通过抗体或融合蛋白结合的靶标分子。抗原可以是任何长度的(天然的、合成的或重组表达)蛋白质、核酸或其他分子中的碳水化合物。抗原包括受体、配体(ligands)、反受体(counter receptors)和外壳蛋白。

[0060] 在一个融合蛋白中的异源多肽是不天然地连接至免疫球蛋白恒定区的多肽。这样的多肽可以是全长的蛋白质或其任何片段,该片段有足够的长度以保持其可以与所述全长蛋白质结合的抗原特异性地结合。例如,异源多肽可以是受体胞外结构域或其配体。

[0061] 识别相同或重叠抗原表位的抗体可被简单的免疫分析法检定,该免疫分析法显示一个抗体相对于另一个抗体竞争结合靶抗原的能力。抗体的对应抗原表位也可以通过结合于抗原的抗体的 X-射线晶体学来确定,以鉴定接触残基。或者,如果可减少或消除一种抗体结合的抗原所有氨基酸突变类型也可减少或消除另一种抗体的结合,则这两种抗体具有相同的抗原表位。如果可减少或消除一种抗体结合的抗原某些氨基酸突变类型也可减少或消除另一种抗体的结合,则这两种抗体具有重叠的抗原表位。

[0062] 抗体间的竞争由试验分析来确定,其中被测的抗体抑制参照抗体(reference antibody)与共有抗原的特异结合(见,如 Junghans 等, Cancer Res. 50:1495, 1990)。在竞争性结合试验分析中,若过量的被测试抗体(例如,至少 2x、5x、10x、20x 或 100x)抑制至少 50%,但优选为 75%、90%或 99%参照抗体的结合,则被测试抗体与参照抗体竞争。由竞争法确定的抗体(竞争性抗体)包括与参照抗体具有相同结合抗原表位的抗体,及与一个毗邻抗原表位(由于空间位阻发生,该毗邻抗原表位充分接近与参照抗体结合的抗原表位)结合的抗体。

[0063] 术语“患者”包括接受预防或治疗处理的人类和其他哺乳动物受试者。

[0064] 为了对氨基酸替换的保守性和非保守性进行分类,氨基酸分组如下:组 I(疏水性侧链):甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸亮氨酸、氨酸、异亮氨酸;组 II(中性亲水性侧链):半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸;组 III(酸性侧链):天冬氨酸、谷氨酸;组 IV(基本侧链):天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、精氨酸;组 V(影响链定位的残基):甘氨酸、脯氨酸;组 VI(芳香侧链):色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸。保守的替换涉及同一类氨基酸之间的替换,非保守替换构成一类氨基酸的成员被另一类氨基酸的成员替换。

[0065] 序列一致性百分率根据 Kabat 编号法则(对可变区)或 EU 编号法则(对恒定区)对抗体序列进行最大比对。如果受试抗体区域(如一条轻链或一条重链的完整的成熟可变

区)与一个参照抗体的相同序列比对,比对后,受试抗体与参照抗体区域相同序列百分率为受试抗体与参照抗体中被相同的氨基酸占据的位点数量除以两个区域的比对位置的总数,缺口不算在内,乘以 100 以转换成百分率。

[0066] “包括”的一个或多个例举元素的组合物或方法还囊括其它没有特别例举的元素。例如,一个包括抗体的组合物,该组合物可以仅含有该抗体,也可与其它成分相结合。

[0067] 术语“抗体依赖性细胞的细胞毒性”,或 ADCC,是一种用于诱导细胞死亡机制,所述机制取决于抗体包被的靶细胞(即结合抗体的细胞)与具有细胞溶解活性的免疫细胞(也称为效应细胞)之间的相互作用。这样的效应细胞包括自然杀伤细胞,单核细胞/巨噬细胞和嗜中性粒细胞。ADCC 是由结合到细胞的抗体的 Fc 区与 Fc γ 受体之间的相互作用触发,所述 Fc γ 受体尤其是 Fc γ RI 和 Fc γ RIII,位于如嗜中性粒细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞的免疫效应细胞上。靶细胞通过吞噬作用或细胞溶解除去,这取决于介导的效应细胞的类型。经抗体包被的靶细胞的死亡的发生是效应细胞活性的结果。

[0068] 术语调理素作用(opsonization)也被称为“抗体依赖性细胞吞噬作用”,或 ADCP,是指经由全部或部分吞噬性免疫细胞(如巨噬细胞,嗜中性粒细胞和树突状细胞)将被抗体包被的细胞的内在化(internalized)过程,其中所述吞噬性免疫细胞结合到免疫球蛋白 Fc 区。

[0069] 术语“补体依赖性细胞毒性”或 CDC 是指一种诱导细胞死亡机制,其中与标靶结合的抗体的 Fc 效应器结构域激活一系列最终在标靶细胞膜上形成孔洞的酶反应。典型地,抗原-抗体复合体(如被抗体包被的靶细胞)结合并激活补体成分 C1q,从而激活导致靶细胞死亡的补体级联反应。补体的活化还可能导致补体成分沉积在所述靶细胞表面,通过结合白细胞上的补体受体(例如,CR3)而促进 ADCC。

[0070] pH 依赖性的抗体与 FcRn 受体的结合是指,相比在 pH7.5 时,pH 6.0 使抗体更强烈地结合于受体。在通过胞饮作用内在化后,在核内体(endosomes)中低 pH 值环境下的 FcRn 结合可以将 IgG 抗体从溶酶体中分解代谢降解中解救出来。被解救的 IgG 抗体然后在中性 pH 中从 FcRn 释放出,并被回收到循环里。这样的 pH 依赖性 FcRn 结合是 IgG 抗体(也包括本发明的含有 cys- μ 重链恒定区的抗体和融合蛋白)血清半衰期长的基础(可参见:Ghetie et al.,Annu. Rev. Immunol. 18:739-766, 2000)。例如,人 IgG 抗体在 pH 6.0 时结合到人类新生 Fc 受体(FcRn),然而它们在 pH 为 7.5 时的结合十分弱。IgG 抗体中的 FcRn 结合位点位于在 CH2 和 CH3 结构域的连接处。由于在 pH6.0 或 7.5 时, μ 重链不与 FcRn 结合,所以天然 IgM 抗体不能利用 FcRn 介导途径将抗体从溶酶体的降解中解救出来,因此,IgM 抗体一般比天然 IgG 抗体具有更短的半衰期。

[0071] 人源化抗体是经基因工程改造过的抗体,其中源自非人“供体”抗体的 CDRs 被嫁接于(grafted into)人“受体”抗体序列(见例如 Queen,US 5,530,101 及 5,585,089; Winter,US 5,225,539;Carter,US 6,407,213;Adair,US 5,859,205; 及 Foote,US 6,881,557)。所述受体抗体序列可为例如成熟人抗体序列、所述序列的组合物、人抗体序列的共有序列(consensus sequence)或种系区域序列(germline region sequence)。因此,人源化抗体是这样一种抗体,其具有完全或实质上源自供体抗体的部分或全部 CDRs,和完全或实质上源自人抗体序列的可变区框架序列及恒定区(若存在的话)。类似地,人源化重链具有至少一、二及通常所有三个完全或实质上源自供体抗体重链的 CDRs,及实质上源自

人重链可变区框架及恒定区序列的重链可变区框架序列及重链恒定区（若存在的话）。类似地，人源化轻链具有至少一、二及通常所有三个完全或实质上源自供体抗体轻链的 CDRs，及实质上源自人轻链可变区框架及恒定区序列的轻链可变区框架序列及轻链恒定区（若存在的话）。不同于纳米抗体（nanobodies）及 dAb，人源化抗体包含人源化重链及人源化轻链。当人源化抗体中的 CDR 与非人抗体中的对应 CDR 之间的对应残基（如 Kabat 定义）具有至少 85%、90%、95% 或 100% 的一致性时，该人源化抗体中的 CDR 则实质上源自该非人抗体中的对应 CDR。当抗体链的可变区框架序列或抗体链的恒定区与由 Kabat 定义的对应该残基具有至少 85%、90%、95% 或 100% 的一致性时，则抗体链的可变区框架序列或抗体链的恒定区其实质上源自人的可变区框架序列或人的恒定区。

[0072] 虽然人源化抗体通常纳入所有六个来自小鼠抗体的 CDRs（优选地，由 Kabat 定义），其也可以由少于所有源自小鼠抗体的 CDRs（例如至少 3、4 或 5 个源自小鼠抗体的 CDRs）制备（例如 Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002；Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320:415-428, 2002；Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999；Tamura et al., Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000）。

[0073] 嵌合抗体（chimeric antibody）是这样的抗体，其中非人抗体（例如小鼠）的轻链及重链的成熟可变区与人轻链及重链恒定区组合（combined）。该抗体实质上或完全保留该小鼠抗体的结合特异性，且具有大约三分之二的人序列。

[0074] 饰面抗体（veneered antibody）是一种人源化抗体的类型，其保留非人抗体的一些及通常所有的 CDRs 及一些非人可变区框架残基，但用源自人抗体序列对应位置的残基来取代其他可能贡献 B- 或 T- 细胞表位（例如暴露的残基）的可变区框架残基（Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991）。结果是这样一种抗体，其 CDRs 完全或实质上源自非人抗体，而该非人抗体的可变区框架由于所述取代而更似人。

[0075] 人抗体（human antibodies）可以分离自人，或来自人免疫球蛋白基因的表达（如，在基因小鼠中、体外试验或噬菌体展示）。用于制备人抗体的方法包括三源杂交瘤方法（Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367(1983)、Oestberg 的美国专利第 4,634,664 号、及 Engleman 等人之美国专利第 4,634,666 号）、使用转基因小鼠（该小鼠含有人免疫球蛋白基因）（见例如 Lonberg et al., W093/12227(1993)；US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, Nature 148,1547-1553(1994), Nature Biotechnology 14,826(1996), Kucherlapati, W0 91/10741(1991)）及噬菌体展示方法（见例如 Dower et al., W0 91/17271and McCafferty et al., W0 92/01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743and US 5,565,332）。

[0076] 蛋白 A 最初是在细菌 *Staphylococcus aureus* 细胞壁中发现的 40-60kDa 的表面蛋白。蛋白 A 高亲和力地特异性结合至人类 IgG1、IgG2 和 IgG4 的以及小鼠 IgG2a 和 IgG2b。蛋白 A 不与人 IgG3 或 IgA 或 IgM 结合。蛋白 A 可用于抗体的亲和纯化。

[0077] 蛋白 G 是 65kDa 的（G148 蛋白 G）和 58kDa 的（C40 蛋白 G）链球菌细胞表面蛋白。它包含一个对于 IgG 结合不需要的血清白蛋白结合结构域，它往往被删除。蛋白 G 特异性结合所有人类 IgG 同种型，但非 IgA 或 IgM。G 蛋白对于抗体纯化也是有用的。

[0078] 当提及本发明的抗体（目前的抗体）保留其源自的亲本抗体（即，无突变的半胱氨酸和 μ 尾端）的性能时，保留可以是部分保留或全部保留。本发明目前的抗体与其源自的亲本抗体之间的活性的全部保留是指目前的抗体的活性在试验误差范围内与其亲本抗体相同或更高。活性的部分保留是指目前抗体的活性显著高于阴性对照的背景水平（即超出实验误差），并且优选是其亲本抗体的相应活性的至少 50%。

[0079] 详细说明

[0080] I. 通则

[0081] 本发明提供了重链 IgG 恒定区和抗体或融合蛋白，所述重链 IgG 恒定区并入了半胱氨酸突变并且在 C-末端与 μ 尾端连接（cys- μ 重链恒定区），所述抗体或融合蛋白含有所述重链 IgG 恒定区。所述重链至少包括 CH2 和 CH3 区。所述抗体和融合蛋白可通过突变的半胱氨酸之间形成的二硫键和 μ 尾端之间形成的二硫键形成多价复合体（complexes），例如，五聚体或六聚体结构。所述抗体和融合蛋白也特异性地结合蛋白 G，这有利于纯化。所述抗体和融合蛋白任选地保留全部或部分地 IgG 性能，包括 pH-依赖性的 FcRn 结合，这与 IgG 在体内相对长的半衰期相关。取决于同种型或亚型、抗原的性质和额外的 IgG CH1 和铰链结构域，IgG cys- μ 重链恒定区也可以全部或部分保留以下性能：特异性地结合蛋白 A 和效应功能 ADCC、CDC 和调理素作用。图 7 显示了一种示例性抗体。

[0082] IgG 效应功能、相对长的半衰期和易于纯化与多聚化能力的结合致使抗体或融合蛋白具有这些性能的新颖的组合。例如，一些这样的抗体或融合蛋白可有效地使细胞表面的受体或结合配体多聚，同时保持全部的或部分的或相对于具有未改造的 IgG 同种型的抗体保持甚至提高的 Fc γ -介导的性能，如 ADCC、CDC、调理素作用、pH-依赖性的 FcRn 结合以及结合蛋白 A 和蛋白 G 的性能。相比于传统的 IgG、IgM 或 IgA 抗体，不同同种型的性能的组合对于治疗癌症和其他疾病提供了更大效力的可能性。

[0083] 所述抗体或融合蛋白的多聚化能力还提供了用于制备抗体和融合蛋白的多特异性复合体的形式，其中，具有不同特异性的单元（units）通过突变的半胱氨酸之间的二硫键和 μ 尾端之间的二硫键结合在一起。

[0084] 以上的优点可以不通过体外操作而实现，这不同于涉及制备核酸构建体来表达并入 cys- μ 重链恒定区的所述抗体或融合蛋白。

[0085] II. 恒定区的成分

[0086] 所述恒定区包括 IgG 部分和位于 C 末端的 μ 尾端。所述 IgG 部分至少包括 IgG CH2 区和 CH3 区。所述 CH2 区和 / 或 CH3 区的至少一个位点突变为半胱氨酸残基。所述位点应支持抗体或融合蛋白单元之间的分子间二硫键，优选对期望的效应功能没有实质损害的位点。在位点 279、285、287 和 309 中的一个或多个上的半胱氨酸残基是合适的。优选仅一个位点突变为半胱氨酸，以减少链内的二硫键形成的可能性。但是，每抗体重链恒定区的 2、3 或 4 个残基可任选地修饰为半胱氨酸。所述 CH2 区和 CH3 区至少部分地负责 FcRn 结合、蛋白 A 和 G 结合、ADCC、CDC 和调理素作用。优选地，所述 IgG 部分还包括铰链区和 / 或 CH1 区。所述铰链区提供了抗体或融合蛋白的结合区和效应区（effector region）之间的灵活性且有助于有效的效应功能如 ADCC、调理素作用和 CDC。所述铰链区也是将一对 IgG 重链连接在一起的二硫键的位点。所述 CH1 区与轻链恒定区结合并且通常包含多种形式（formats），其中，具有轻链恒定区的轻链是存在的，但可以在融合蛋白或单链抗体形式

(无轻链恒定区)中被省略。

[0087] 所述 μ 尾端和突变为半胱氨酸的所述位点一起贡献于将多个一价或二价结合单元多聚化形成一个多价复合体。虽然对于本发明的实施不需要理解机制,但我们认为,抗体或融合蛋白的多聚化与天然 IgM 抗体具有类似的方式,即通过不同单体的 μ 尾端之间的二硫键而多聚化。一些 IgM 的多聚体还包含与所述 μ 尾端结合的一条或多条 J 链。在一条或多条 J 链存在时,IgM 可形成五聚体结构,且缺少 J 链时,IgM 可形成六聚体结构。相对于五聚体的 IgM,六聚体的 IgM 被报道具有更强的 CDC。如同对于 IgM,虽然本发明的抗体和融合蛋白被认为形成五聚体或六聚体的复合体,但其他非五聚体或六聚体形式的更大或更小的多聚体也可以形成。

[0088] 以上提到的成分从 N 末端到 C 末端的顺序为:IgG CH1 区(若存在)、IgG 铰链区(若存在)、IgG CH2 区、IgG CH3 区、 μ 尾端。

[0089] 通常,所有的所述 IgG 区是相同的同种型(isotype)和亚型(subtype)。例如,所有 IgG 区来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

[0090] 优选地,所述 IgG 区是人 IgG。图 8A、B、C 显示了人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 重链的示例性的序列,成分被描述为 CH1 区、铰链区、CH2 区、CH3 区、 μ 尾端和 J 链。但是,来自其他物种的区也可以被使用,包括非人灵长类、骆驼科、软骨鱼、小鼠或大鼠。

[0091] 提及人 IgG、IgA 和 IgM 区(即,CH1 区、铰链区、CH2 区、CH3 区、 μ 尾端或 J-链)是指所述示例性序列、它们的同种异型(allotypes)或同族同种异性(isoallotypes)、或其他与示例性序列具有 90、95、98 或 99% 序列一致性的变体序列,和/或与所述示例性序列不同,不同之处在于:对于 CH1 区、CH2 区、CH3 区和 J-链具有至多 1、2、3、4、5、10 或 15 个氨基酸缺失、取代或内部插入,对于 IgG1、2 或 4 铰链区,具有 1、2 或 3 个氨基酸缺失、取代或内部取代(internal substitutions),对于 IgG3 铰链区,具有至多 1、2、3、4、5 或 6 个氨基酸缺失、取代或内部取代,对于 μ 尾端,具有至多 1 或 2 个氨基酸缺失、取代或内部取代。取代若存在的话,最好是保守的。人类恒定区显示了不同个体之间同种异型变异(allotypic variation)和同族同种异型变异(isoallotypic variation),即,在一个或多个多态性位点,恒定区可以在不同个体中不同。同族同种异型与同种异型的区别在于,识别一种同种异型的血清可以结合到一个或多个其它同种型(isotype)的非多态性区域。提及人恒定区,其包括具有任何天然同种异型(包括同族同种异型)的恒定区,或包括具有占据天然同种异型中的多态位点的残基的任何排列的恒定区。非人类的恒定区序列由例如 Swiss-Prot 或 Genbank databases 提供。提及非人恒定区,其同样包括同种异型或同族同种异型变异体,和它们的排列(permutations),或不同于天然序列的其它变异体序列。变异的范围是由序列一致性和/或关于非人恒定区的天然序列的取代数目来定义,这类似于上述关于人恒定区的变异体。Eu 编号法则用于定义同种异型间的或不同物种间的对应位置,或用于定义突变的位置。

[0092] 轻和/或重链的氨基或羧基末端的一个或几个氨基酸,如重链的 C-末端赖氨酸,可能丢失或部分或全部其分子被衍生化。取代可以在恒定区进行,以减少或增加效应器功能,例如补体介导的细胞毒性或 ADCC(参见,例如 Winter et al.,US Patent No. 5,624,821;Tso et al.,US Patent No. 5,834,597;and Lazar et al.,Proc.Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006)或以延长在人类中的半衰期(见,例如,Hinton et al.,J.

Biol. Chem. 279:6213, 2004)。示例性的取代包括在 250 位的 Gln 和 / 或在 428 位的 Leu (EU 编号), 用以增加抗体的半衰期。234、235、236 和 / 或 237 任何位置的取代会降低对于 Fc γ 受体的亲和力, 尤其是 Fc γ RI 受体 (参见, 例如美国专利 6624821)。任选地, 人 IgG 的 234、236 和 / 或 237 位由丙氨酸取代, 及 235 位由谷氨酰胺取代 (参见, 例如, 美国专利 5, 624, 821)。

[0093] 如果使用铰链区, 所述铰链的一部分可以被合成的连接器分子取代。这在融合蛋白中是经常的, 其中融合蛋白的结合区通过一个铰链区连接到 CH2 和 CH3 IgG 或 IgA 恒定区, 在所述铰链区中, 例如高达 10 个 N- 末端残基被合成的柔性的连接器取代。Gly-Gly-Ala-Ala、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser、Leu-Ala-Ala-Ala-Ala 和它们的多聚体是这样的连接器的例子。所述铰链区也可以通过合成的连接器被整个取代或整个被删除而无取代。

[0094] 一些可能的例外是: 合成的连接器取代了部分或全部铰链区、一个或一些氨基酸取代用以增强或抑制效应器功能或 FcRn 结合 (下面进一步讨论的)、一个或多个半胱氨酸突变和在 C 末端的与 μ 尾端连接以及 N- 末端被附加上结合区, 而优选的是, 杂交恒定区仅包含上面提及的 CH1 区、铰链区、CH2 区、CH3 区, 而不含其他序列。然而, 其他的序列, 如六组氨酸标签 (hexa-histidine tag), 可以被添加, 但不是必要的。

[0095] 在天然抗体恒定区序列 (例如, 如 8A、B、C 中示出的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链) 中, 半胱氨酸突变是指半胱氨酸残基占据了一个被非半胱氨酸的氨基酸所占据的位点。V279C、H285C、A287C 和 L309C 是优选的半胱氨酸突变。野生型残基 (即 V、H、A 或 L) 在四个人类同种型的每一个中都是相同的。如同实施例, 用于半胱氨酸突变的其他位点可以通过经验确定。选择用于半胱氨酸突变的其他位点的标准包括: (i) 在所述 CH2 或 CH3 区的特定区域, (ii) 其侧链暴露于溶剂中, 和 / 或 (iii) 不是位于所述 IgG 结构的两个 Fc 区的界面上, 这样的位点可以选择取代成半胱氨酸。简而言之, 编码抗体的构建体被修饰或否则被合成以在用于半胱氨酸残基测试的所述位点引入一个密码子并且在 C 末端引入 μ 尾端。所述构建随后转染至合适的宿主细胞。这种细胞的上清随后被测试以得到产生的抗体的水平和分子量。一个完整抗体 (异质二聚体的) 的分子量通常约 150-160kDa。因此, 这种分子量的多聚体并且尤其是具有约 750 至 1100 分子量的复合体表明半胱氨酸残基可有效用于表达和多聚化。这样的位点优选在 IgG 抗体的 Fc 区或更具体地为 CH2 区或 CH3 区。

[0096] III. 并入 Cys- μ 尾端的抗体和融合蛋白的性质

[0097] 上述含有重链恒定区的抗体或融合蛋白的性能取部分决于同种型、CH1 和铰链 (如果存在) 及 CH2 和 CH3 区的亚型、是否存在 CH1 和 / 或铰链区及所述抗体或融合蛋白结合的抗原的性质。

[0098] 含有本发明所述恒定区的抗体和融合蛋白保留了至少使单价或二价单元多聚以形成更高的价的能力, 和保留了 IgG 抗体的至少一种性能。当 CH1、铰链 (如果存在)、CH2 和 CH3 是 IgG 来源的, 那么所述抗体完全或部分地保留至少 IgG 样的蛋白 G 结合及特异性结合靶抗原的能力。pH 依赖性 FcRn 结合性能也可以部分或完全地保留。

[0099] 同种型或亚型的选择取决于所需的性能。对于无 cys- μ 重链恒定区的抗体, 如果需要强效应功能 (通常是针对癌细胞、病原体), 那么 IgG1 或 IgG3 被选择, 如果需要弱的或不需要 CDC、ADCC 和调理素作用 (这种情况可能是抑制受体-配体相互作用), 那么选择 IgG2 或 IgG4。

[0100] 当 CH1 和铰链区（如果存在的话）、CH2 和 CH3 区是人类 IgG1，那么含有本发明恒定区的抗体或融合蛋白具有特异性结合到蛋白 A 和蛋白 G 的性能，并且可能具有 pH 依赖性 FcRn 结合和效应功能，诸如取决于结合的抗原的 ADCC、CDC、调理素作用。如果结合的抗原是表面受体（例如，在细胞或病毒上），所述效应功能通常存在。如果所述抗原通常是可溶形式，则效应功能通常不针对可溶性抗原表达，但是可以通过将所述抗原以结合形式（例如，细胞表面上）表达来证明。

[0101] 当所述 CH1 和铰链区（如果存在的话）、CH2 和 CH3 区是人类 IgG2、IgG4 的，那么含有 cys- μ 重链恒定区的抗体或融合蛋白至少表现出并且可能具有 pH 依赖性 FcRn 结合。人 IgG2 和 IgG4 同种型普遍缺乏 CDC。IgG4 针对结合的抗原具有一定的 ADCC 和调理作用，但是弱于人 IgG1 或 IgG3。

[0102] 当所述 CH1 和铰链区（如果存在的话）、CH2 和 CH3 区是人类 IgG3，那么含有本发明重链恒定区的抗体或融合蛋白显示出至少特异性结合到蛋白 G 的性能，并且可能具有 pH 依赖性 FcRn 结合。该抗体或融合蛋白还可能显示效应功能，如 ADCC、CDC、调理素作用，这取决于结合的抗原表面抗原还是可溶的，正如 IgG1 的情况。

[0103] 含有本发明恒定区的抗体或融合蛋白如果存在 CDC、ADCC 或调理素作用，那么相比于可供比较的含有常规 IgG 恒定区的抗体或融合蛋白，所述 CDC、ADCC 或调理素作用的水平有时相同（在实验误差范围内）或有时更高。

[0104] VI. 抗体和融合蛋白形式 (formats)

[0105] 本发明的恒定区（cys- μ 重链恒定区）可以被并入单特异性抗体、融合蛋白、以及多特异性复合体。对于单特异性抗体的表达，cys- μ 重链恒定区可以连接到重链可变区，并且与包含可变区和恒定区的轻链一起表达。所述重链和轻链通过重链 CH1 区和轻链恒定区彼此结合以形成异源二聚体。二个异源二聚体然后通过铰链、重链的 IgG 部分的 CH2 和 CH3 区联合，以形成四聚体单元，正如常规抗体的情况。四聚体单元可以通过不同链的突变的半胱氨酸之间的二硫键和不同链的 μ 尾端之间的二硫键进一步多聚化。

[0106] 对于单特异性单链抗体，重链和轻链可变区被表达为通常通过肽间隔区隔开的相同链的部分（参见，例如 US 5,260,203, US 5,869,203, US 6,291,159）。肽间隔的长度决定了重链和轻链可变区是否分子内（intramolecularly）联合形成一种单元（该单元含有一条轻链可变区，其与一条重链可变区分子内配对）或分子间（intermolecularly）联合形成四聚体单元（该四聚体单元有两个轻链可变区和两个重链可变区，每个轻链可变区分子间地结合到重链可变区）。在两种情况下，所述单元可以通过突变的半胱氨酸的二硫键和尾端之间的二硫键多聚化。

[0107] 所述 cys- μ 重链恒定区可以用于任何类型的工程抗体（engineered antibody），包括嵌合的、人源化的、饰面的或人抗体。所述抗体可以是单克隆抗体、或基因工程化的多克隆抗体制备物（参见 US 6,986,986）。

[0108] 对于融合蛋白，cys- μ 重链恒定区被表达为连接至异源多肽。所述异源多肽提供了一个在恒定区的 N-末端的结合区，有时也简称为结合区。IgG CH1 区通常不包括在融合蛋白的恒定区内。IgG 铰链区可以包括在内或不包括在内。在一些融合蛋白中，部分或全部铰链区被合成的连接器肽（linker peptide）替换，所述连接器肽赋予了融合蛋白的结合部与所述 cys- μ 重链恒定区之间的灵活性。

[0109] 融合蛋白的结合区 (binding region) 可以是任何迄今为止生产的用于其它融合蛋白中的结合部 (binding portion) 的类型。结合区的实例是细胞受体的胞外结构域, 或它们的配体或反受体 (例如, TNF- α 受体、死亡家族受体、LFA3 或 IL-1 受体或 Trail)。

[0110] 抗体和融合蛋白均可以以多特异性形式表达, 即作为一个复合体, 该复合体含有不同靶特异性的抗体或融合蛋白单元。个体的特异性通过 cys- μ 重链恒定区的多聚化而相联合。在一个复合体中的不同特异性的数目可以是, 例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12。不同特异性的单元的组合可以发生在两个水平。在第一个水平, 二价多聚化单元可以像双特异性抗体或异源二聚体融合蛋白那样包含两个结合特异性。在组合的第二个水平, 不同特异性的多聚化单元可以通过 cys- μ 重链恒定区的多聚化彼此结合。这种多聚化生成至少约五个或六个单元的复合体。

[0111] 当结合特异性的上述两个水平聚合, 本发明的方法使得至少约 10 个 (五聚体) 或 12 (六聚体) 的特异性结合在一个相同复合体中。虽然在许多应用中, 这个特异性的数量多于需要, 但本发明的方法在特异性需求较少的应用中提供了优势 (例如, 仅有 2)。因为在第二个水平中特异性被组合, 统计学上更可能是所形成的任何复合体包括每个所需特异性的至少一个单元。相反, 当通过常规方法表达双特异性抗体时, 多特异性单元的形成会与单特异性单元的形成相竞争, 这导致抗体异质群体, 其中有些是双特异性的, 但其中有相当多的是单特异性。

[0112] 在抗体的多特异性形式中, 所述单元通常包含不同的重链可变区。轻链可变区也可以是不同的。然而, 也可以选择 (例如, 使用噬菌体展示) 含有相同轻链可变区的具有不同结合特异性的抗体。此类抗体可以以多特异性形式组合, 其中, 所述单元具有不同的重链可变区, 但相同的轻链可变区。

[0113] 多特异性抗体或融合蛋白可包括对于在靶标 (例如, 癌细胞或病原体) 上的抗原的结合特异性, 也包括对于在效应细胞 (例如, T-细胞上的 CD3) 上的抗原的结合特异性。这样的多特异性复合体在靶细胞和效应细胞之间形成一座桥, 并促进效应细胞的细胞毒作用或调理素作用活性。多特异性抗体或融合蛋白可另外或可选地包括对于在同一靶标 (例如, 肿瘤细胞或病原体) 上的两个不同抗原的结合特异性。相比仅对单一抗原具有特异性的抗体或融合蛋白, 这些抗体或融合蛋白对靶细胞具有更强的选择性毒性。其它的多特异性抗体或融合蛋白包括对于受体和其配体或反受体的结合区。相比仅能单独结合受体或配体 / 反受体的抗体或融合蛋白, 这些抗体或融合蛋白可发挥更大的抑制作用。这些特异性中的任何一个和其他特异性均可组合在一个相同的多特异性复合体中。

[0114] VII. 示例性抗体

[0115] 实施例 6 中描述的本发明的一种示例性抗体是抵抗死亡受体 4 的鼠抗体。所述抗体的重链可变区具有 SEQ ID NO:23 (信号肽残基 1-19 可以被省略) 所示的氨基酸序列, 并且轻链可变区具有 SEQ ID NO:27 (信号肽残基 1-19 可以被省略) 所示的氨基酸序列。本发明还包括与所述示例性抗体具有相同的三个重链 CDRs 和相同的三个轻链 CDRs (例如, 如由 Kabat、Chothia 或其组合所定义的) 的其他抗体, 包括其人源化、嵌合或饰面形式。根据 Kabat, 所述三个重链 CDRs 和所述三个轻链的 CDRs 分别是 SEQ ID NOS:24-26 和 SEQ ID NOS:28-30。优选的人源化抗体具有重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区具有 SEQ ID NO:31 (信号肽残基 1-19 可以被省略) 的氨基酸序列, 所述轻链可变区具有 SEQ

ID NO:32(信号肽残基 1-19 可以被省略)的氨基酸序列。本发明还包括具有重链可变区和轻链可变区的人源化抗体,所述重链可变区具有与 SEQ ID NO:31(省略信号肽)至少 90、95、98 或 99% 的序列一致性的氨基酸序列,所述轻链可变区具有与 SEQ ID NO:32(省略信号肽)至少 90、95、98 或 99% 的序列一致性的氨基酸序列。自示例性序列的变化优选在与 CDRs 不相邻的可变区框架残基上,与 CDRs 相互作用或直接结合在抗原上(参见 Queen et al., US 5,530,101 和 5,585,089;同上),并且优选保守取代。本发明还提供了具有编码上述氨基酸序列的 DNA 序列的核酸。优选的编码人源化抗体重链或轻链序列的 DNA 序列通过 SEQ ID NOS. 33 和 34 提供,且核酸随其具有至少 95% 序列一致性。

[0116] 实施例 14 中描述了另一种对抗人死亡细胞受体 5 的示例性抗体。本发明进一步提供了单克隆抗体,其包括成熟轻链可变区,所述成熟轻链可变区包含具有分别指定为 SEQ ID NO. 39、40 和 41 的氨基酸序列的 CDRs,且所述单克隆抗体还包括成熟重链可变区,所述成熟重链可变区具有分别指定为 SEQ ID NO. 43、44 和 45 的氨基酸序列的 CDRs。本发明进一步提供了单克隆抗体,其包括成熟轻链可变区和成熟重链可变区,所述成熟轻链可变区与 SEQ ID NO. 38 的成熟可变区(即在残基 21 和 C 末端之间)具有至少 90、95、96、97、98 或 99% 的序列一致性,所述成熟重链可变区与 SEQ ID NO. 42 的成熟可变区(即在残基 20 和 C 末端之间)具有至少 90、95、96、97、98 或 99% 的序列一致性。优选地,与 SEQ ID NO. 38 或 42 的任何偏离是在可变区框架。优选地,这样的偏离是保守取代。本发明还包括编码以上任何抗体的核酸。

[0117] V. 基因工程和表达

[0118] 含有 cys- μ 重链恒定区链的抗体或融合蛋白通过重组表达产生。cys- μ 重链恒定区是通过将编码 IgG 重链部分的 DNA 片段与编码 μ 尾端的 DNA 片段框内(in-frame)融合来实现。所述 IgG 部分包括一个或多个位点的半胱氨酸突变。所述半胱氨酸突变可通过存在的 DNA 分子(例如位点专一性(site specific)突变或盒式(cassette)突变)的突变或通过 DNA 分子的从头合成引入。优选地,IgG 部分的 CH3 外显子的最后一个氨基酸被框内融合到(fused in frame to) μ 尾端的第一个氨基酸。编码 cys- μ 重链恒定区的片段的 N-末端可以被融合到编码结合区(binding region)的 DNA 片段,当是抗体的情况下,所述结合区是重链可变区,当是融合蛋白的情况下,所述结合区是其他结合区(例如,一个细胞表面受体的细胞外区域)。在单链抗体中,编码至少轻链可变区的 DNA 构建体可以框内融合编码重链的片段。可选地,所述轻链可分别表达,既可作为与重链相同的载体中的不同表达单元,也可作为单独载体上的表达单元。如在常规抗体的产生中,编码抗体链或融合蛋白的 DNA 片段通常可操作地在 N-末端被连接到编码信号肽的 DNA 片段,以使之分泌。

[0119] 对于构建一个编码多种成分的构建体,其所融合的遗传元件的顺序并不重要。例如,编码重链可变区的 DNA 片段可以连接到编码 IgG 重链恒定区的 DNA,也可以连接到编码 μ 尾端 IgM 部分的 DNA,或编码 cys- μ 重链恒定区的片段可以首先被彼此连接。所述片段还可以在重叠 PCR 类型反应(overlapping PCR-type reaction)中,通过加入编码各个片段的重叠寡核苷酸被同时连接。在实践中,一旦编码 cys- μ 重链恒定区的表达载体被制备,所述同一载体可用于插入任何重链可变区或在融合蛋白情况下(有时是轻链可变区)的其他结合区,而不需要再创建编码 cys- μ 重链恒定区的 DNA 片段。

[0120] 哺乳动物细胞是用于表达编码本发明的抗体或融合蛋白的核苷酸片段的优

选宿主（见 Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987)）。许多能够分泌完整异源蛋白质的合适的宿主细胞系如今已被开发, 并包括 CHO 细胞系, 各种 COS 细胞系, HeLa 细胞, HEK293 细胞, L 细胞和包括 SP2/0 和 NS0 的非抗体产生 (non-antibody-producing) 骨髓瘤。优选地, 所述细胞是非人的。用于产生抗体的细胞可以是或不是内源性表达 J 链。如果内源 J 链不被表达或表达水平不足, 宿主细胞可以被遗传修饰以表达 J 链（即, 通过引入一个构建体编码它）。然而, 也可以使用不表达 J 链的宿主细胞。带或不带 J 链的细胞选择影响着所产生的抗体或融合蛋白的化合价（例如, 带 J 链的为五聚体, 不带 J 链的为六聚体）。优选地, 本发明的抗体或融合蛋白从单克隆细胞系中表达。

[0121] 这些细胞的表达载体可以包括: 表达控制序列, 如复制起点, 启动子, 增强子 (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), 和必要的加工信息位点, 如核糖体结合位点, RNA 剪接位点, 聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。优选的表达控制序列是来自内源基因、巨细胞病毒、SV40, 腺病毒、牛乳头瘤病毒等的启动子。见 Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992)。

[0122] 细胞转染了编码所述要被表达的抗体或融合蛋白的一个或多个载体。对于多链抗体, 重链和轻链可以表达在相同或不同的载体上。为表达多特异性复合体, 编码该复合体（即, 不同的抗体或融合蛋白）成分的 DNA 可以在相同或不同的载体上。

[0123] 抗体或融合蛋白链被表达, 加工以去除信号肽, 组装和从宿主细胞分泌。据认为, 多聚化和与 J 链联合至少主要发生在细胞内, 由此, 分泌的抗体或融合蛋白主要是多聚体, 尤其是通过 cys- μ 重链恒定区将 5 个或 6 个单元联合的多聚体。

[0124] 抗体或融合蛋白可通过常规的抗体纯化方法从细胞培养上清液中进行纯化。如果 cys- μ 重链恒定区包括 IgG 部分, 则该纯化可以包括使用蛋白 A 或蛋白 G 作为亲和试剂的层析步骤。常规抗体纯化方法, 如离子交换, 羟磷灰石色谱法或高效液相色谱法也可用（一般参见, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)）。

[0125] VI. 靶标

[0126] 含有 cys- μ 重链恒定区的抗体或融合蛋白可以被定向于任何靶分子。所述抗体或融合蛋白尤其适用于表面结合的靶蛋白 (surface-bound target proteins)（例如, 在细胞或病毒上）, 其中, 所述靶蛋白的团聚 (aggregation) 诱导所需的反应。所希望的反应可以是, 例如, 清除具有靶标的细胞或病毒、通过受体的信号转导, 例如, 诱导细胞凋亡或细胞郁滞, 抑制受体结合于配体或反受体, 或内在化结合有毒剂的抗体或融合蛋白。抗体或融合蛋白可以被制备成具有与现有的商业抗体或融合蛋白相同的靶标, 或所述抗体或融合蛋白可以是商业抗体或融合蛋白的衍生版本, 其中现有的恒定区已被本发明的 cys- μ 重链恒定区取代。通过与目标配体（该目标配体与表面结合的抗原结合）结合, 所述抗体或融合蛋白还可以直接团聚表面结合的抗原。

[0127] 为了说明作用的一种可能的机制, 本发明的对肿瘤坏死因子受体超家族的成员具有特异性的、包含本发明 cys- μ 重链恒定区的抗体或融合蛋白被制备。这种受体需要三聚化来进行信号转导。由于所述抗体是多价的（例如, 五聚体或六聚体）, 它可以使肿瘤细胞的表面上的抗原多聚化, 并诱导肿瘤细胞凋亡和 / 或生长停滞。这样的多价抗体用于治疗癌症的功效可以通过小鼠异种移植模型 (mouse xenograft models) 或其他合适的癌症的

动物模型来研究。

[0128] 为了说明另一种机制,本发明的包含 cys- μ 重链恒定区的抗体或融合蛋白被制备,其对于免疫细胞表面上表达的抗原具有特异性,所述免疫细胞例如 B 细胞、T 细胞、单核细胞,嗜中性粒细胞或树突状细胞。这样的抗体可以使免疫细胞表面上的抗原多聚化,并触发正常或异常的信号转导。可替换地,这样的抗体可以触发细胞表面抗原的内在化。这样的免疫细胞的功能得到增强或抑制,这取决于抗原、细胞类型和结合的表位,从而导致免疫系统的调节。这样的抗体用于治疗免疫系统疾病的功效可以在适当的体外系统中进行研究,或在免疫失调的动物模型中进行研究。

[0129] 为了说明另一种机制,包含 cys- μ 重链恒定区的抗体或融合蛋白被制备,其对于由病原体表达的抗原具有特异性,所述病原体如传染性细菌、酵母、真菌或病毒。所述抗体使传染性微生物或病毒无效(例如,通过 ADCC, CDC, 调理素作用,或通过抑制病原体和细胞受体之间的相互作用,或者通过连接到抗体的毒性部分(toxic moiety)的作用)。这样的抗体用于治疗传染性疾病的功效可以在适当的体外系统中进行研究,或在传染的动物模型中进行研究。

[0130] 感兴趣的靶标包括:肿瘤细胞上的受体和它们的配体或反受体(例如 CD3、CD20、CD22、CD30、CD34、CD40、CD44、CD52、CD70、CD79a、DR4、DR5、EGFR、CA-125/Muc-16、MC1 受体、PEM 抗原、gp72、EpCAM、Her-2、VEGF 或 VEGFR、神经节苷脂 GD3、CEA、AFP、CTLA-4、 α v β 3、HLA-DR 10 β 、SK-1)。其它感兴趣的靶标是自身抗体或介导自身免疫性疾病的 T-细胞亚群。其他感兴趣的靶标是生长因子受体(例如,FGFR、HGFR、PDGFR、EFGF, NGFR 和 VEGFR)及其配体。其它靶标是 G-蛋白受体并包括物质 K 受体(substance K receptor)、血管紧张素受体、 α 和 β 肾上腺素受体、血清素受体,和 PAF 受体。参见,例如, Gilman, Ann. Rev. Biochem. 56:625-649(1987)。其他靶标包括离子通道(例如,钙,钠,钾通道)、毒蕈碱受体、乙酰胆碱受体、GABA 受体、谷氨酸盐受体和多巴胺受体(见 Harpold, U. S. Pat. No. 5, 401, 629 和 U. S. Pat. No. 5, 436, 128)。其它靶标是粘附蛋白(adhesion proteins)如整合素、选择素、和免疫球蛋白超家族成员(见 Springer, Nature 346:425-433(1990). Osborn, Cell 62:3(1990); Hynes, Cell 69:11(1992))。其它靶标是细胞因子,如白介素 IL-1 贯穿至最新的 IL-37、肿瘤坏死因子、干扰素、和肿瘤生长因子 β 、集落刺激因子(CSF)和粒细胞单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)和细胞死亡受体家族成员,尤其是 DR4 或 DR5。见人细胞因子:Handbook for Basic&Clinical Research(Aggarwal et al. eds., Blackwell Scientific, Boston, Mass. 1991)。其它靶标是淀粉样肽(amyloidogenic peptides),如 A β , α -突触核蛋白或朊病毒肽。其它靶标是激素、酶、细胞内和细胞间信使,例如,腺苷酸环化酶(adenyl cyclase)、鸟苷环化酶(guanyl cyclase)和磷脂酶 C。靶标分子可以是人类的,哺乳动物的或细菌的。其它靶标是抗原,如来自病毒和细菌的微生物病原体的和肿瘤的蛋白质、糖蛋白和碳水化合物。其它靶标是共刺激分子(co-stimulatory molecules),如 OX40、4-1BB、GITR 和 CD27。

[0131] 一些商业抗体和它们的靶标的例子包括:alemtuzumab、CD52、rituximab、CD20、trastuzumab Her/neu、nimotuzumab、cetuximab、EGFR、bevacizumab、VEGF、palivizumab、RSV、abciximab、GpIIb/IIIa、infliximab、adalimumab、certolizumab、golimumab TNF- α 、baciliximab、daclizumab、IL-2、omalizumab、IgE、gemtuzumab、

CD33、natalizumab、VLA-4、vedolizumab alpha4beta7、belimumab、BAFF、otelixizumab、teplizumab CD3、ofatumumab、ocrelizumab CD20、epratuzumab CD22、alemtuzumab CD52、eculizumab C5、canakimumab IL-1beta、mepolizumab IL-5、reslizumab、tocilizumab IL-6R、ustekinumab、briakinumab IL-12, 23。商业融合蛋白的实例包括：结合 TNF- α 的依那西普 (etanercept)、alefacept (LFA3-Fc 融合体, 其结合 CD2)、TACI-Fc 融合体 (其结合 BAFF 和 APRIL)、abatacept (CTLA-4-Fc, 其结合 CD80 and CD86)、romiplostim (与 Fc 融合的血小板生成素的肽类似物)。所述任何商用的抗体或融合蛋白可被修改, 将现有的重链恒定区替换为本发明的 cys- μ 重链恒定区。另外, cys- μ 重链恒定区可以被连接到与上述任何商业抗体或融合蛋白有相同靶特异性 (例如, 如通过竞争测定法测定) 的其它抗体。

[0132] VII. 免疫偶联物

[0133] 抗体或融合蛋白可以偶联于毒性剂。毒性剂可以是细胞毒性的 (cytotoxic) 或抑制细胞生长的 (cystostatic)。毒性剂一些例子包括：抗微管蛋白剂、auristatin 类、DNA 小沟结合剂、DNA 复制抑制剂、烷基化剂 (例如, 铂络合物, 如顺铂, 单 (铂), 双 (铂) 和三核铂络合物和卡铂 (carboplatin))、蒽环类、抗生素、抗叶酸剂、抗代谢药、化疗增敏剂、duocarmycins、喜树碱、依托泊苷、氟化嘧啶、离子载体、lexitropsins、亚硝基脒、platinols、预成形的化合物、嘌呤抗代谢物、嘌呤霉素、放射增敏剂、类固醇、紫杉烷类、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱, 或类似物。多种放射性核素可用于生成放射偶联性抗体 (radioconjugated antibodies)。例子包括： ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。所述抗体与毒性剂的偶联物可以使用很多多种双功能蛋白偶联剂制备, 如 N-琥珀酰亚胺 3-2-吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP)、亚氨基噻吩 (iminothiolane, IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物 (诸如 dimethyl adipimidate HCl)、活性酯类 (如, 双琥珀酰亚胺辛二酸酯 (disuccinimidyl suberate))、醛类 (诸如戊二醛)、双叠氮化合物 (如, 对 (p-叠氮苯甲酰基) 己二胺, bis(p-azidobenzoyl)hexanediamine)、双-重氮衍生物 (如双 (对-重氮苯甲酰基-乙二胺, bis-(p-diazonium benzoyl)-ethylenediamine)、二异氰酸酯 (如甲苯 2,6-二异氰酸酯) 和双活性氟化合物 (如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。毒性剂也可以通过连接器 (linker) 连接到抗体, 所述连接器可以在细胞内的条件下被切割 (US 2003-0083263, 2005-0238649 和 2005-0009751)。对于上述毒性剂, 它们在细胞中内在化 (internalized) 是唯一有效的或最有效的。本发明的抗体或融合蛋白可通过结合到细胞受体而被内在化, 例如, 细胞受体的交联可促进内在化。

[0134] VIII. 治疗方法和药物组合物

[0135] 本发明的抗体或融合蛋白可用于治疗癌症, 这些癌症包括上述商业抗体已被用来治疗的那些。所述方法可用于治疗实体瘤 (solid tumors), 尤其是血液恶性肿瘤, 例如白血病 (例如 T 细胞大颗粒淋巴细胞性白血病), 淋巴瘤 (Hodgkin's 或 Non-Hodgkin's), 或多发性骨髓瘤。实体瘤包括皮肤的 (例如黑素瘤), 卵巢的, 子宫内膜的, 膀胱的, 乳腺的, 直肠的, 结肠的, 胃的, 胰腺的, 肺的, 胸腺的, 肾的和脑的。

[0136] 本发明的抗体和融合蛋白也可用于抑制各种不希望的免疫应答, 包括那些在上文中提到的已经用商业抗体抑制的。

[0137] 一类可由本发明的抗体或融合蛋白治疗的免疫失调是移植排斥。当同种异体细胞

或器官（例如，皮肤，肾，肝，心脏，肺，胰腺和骨髓）移植到宿主（即供体和受者是来自相同物种的不同的个体），宿主的免疫系统可能针对移植体中外源抗原（宿主抗移植体疾病，host-versus-graft disease）装载免疫应答，这导致移植组织的破坏。本发明的抗体对于在受体中阻断异体抗原诱导的免疫应答是特别有用的。

[0138] 本发明的抗体或融合蛋白的一个相关的用途是调节涉及“移植体抗宿主 (graft versus host)”病 (GVHD) 的免疫应答。GVHD 是潜在的致命疾病，它发生于免疫活性细胞 (immunologically competent cells) 被转移到同种异体接受者时。在这种情况下，供体的免疫活性细胞可能攻击受体中的组织。皮肤、肠上皮细胞和肝组织是频繁的目标，在 GVHD 过程中可能被破坏。当免疫组织被移植时，例如骨髓移植，该疾病产生了一个特别严重的问题；但在其他情况下，包括心脏和肝脏移植，GVHD 也被报道不太严重。

[0139] 另一种需要免疫抑制的情况是治疗自身免疫性疾病如 1 型糖尿病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、multiple 硬化症 (multiple sclerosis)、僵人综合征 (stiff man syndrome)、类风湿性关节炎、重症肌无力和系统性红斑狼疮。在这些疾病中，身体产生细胞和 / 或体液免疫应答来抵抗其自身抗原，这导致抗原的破坏和潜在的后果严重和 / 或致命的结果。自身免疫性疾病通过施用本发明的抗体或融合蛋白中的一种来治疗。

[0140] 其他可被本发明的抗体或融合蛋白治疗的免疫失调包括：哮喘、过敏症、腹腔疾病 (celiac disease)、牛皮癣和眼色素层炎。腹腔疾病，牛皮癣和眼色素层炎是自身免疫性疾病。

[0141] 所述抗体或融合蛋白还可以用于治疗病原性感染，如病毒、细菌、原生动物或真菌感染。病毒性感染的一些实例包括 HIV、肝炎 (A、B 或 C)、疱疹病毒（例如，VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II、CMV 和 Epstein Barr 病毒）、腺病毒、XMRV 病毒、流感病毒、虫媒病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、coronavirus、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV 病毒、登革热病毒、MLV- 相关病毒、乳头状瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、JC 病毒和虫媒病毒性脑炎病毒 (arboviral encephalitis virus)。细菌性感染的一些实例包括衣原体、立克次体细菌、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、pneumococci、脑膜炎球菌和 conococci、克雷伯氏菌属、变形杆菌、沙雷氏菌属、假单胞菌属、军团菌、白喉杆菌、沙门氏菌、杆菌、霍乱、破伤风、肉毒杆菌、炭疽菌、瘟疫、钩端螺旋体、Lymes 疾病细菌、链球菌或奈瑟氏球菌。致病性真菌的一些实例包括念珠菌、曲霉属、隐球菌菌、组织胞浆菌、肺孢子菌和穗霉菌。原生动物的例子包括隐孢子虫、贾第鞭毛虫和疟原虫。

[0142] 抗体或融合蛋白以有效的方案施用意味着施用的剂量和路径，它们可以延迟发作、降低严重程度、抑制进一步恶化，和 / 或改善至少一种迹象或失调的症状。如果患者已经经受失调，方案 (regime) 可以被称为治疗上的有效方案。如果患者相对于一般群体具有提高的失调 (disorder) 的风险但又尚未经历症状，所述可以被称为预防上的有效方案。在一些实例中，治疗上的或预防上的功效可以相比于同一病人的历史对照或过去经历而在个体患者中被观察。在其他实例中，治疗上的或预防上的功效可以相比于未经治疗的对照群体患者而在一个群体中的临床前或临床试验中证明。

[0143] 示例性的抗体或融合蛋白的剂量是 0.01-20，或者 0.5-5，或者 0.01-1，或者 0.01-0.5，或 0.05-0.5mg/kg 体重（例如，0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 或 5mg/kg）或 10-1500 毫克作

为固定剂量。剂量取决于患者状况和对先前治疗的反应,如果有的话,治疗是预防性的还是治疗性的,所述失调是否为急性或慢性,及其他因素。

[0144] 施用可以是肠胃外,静脉内,口服,皮下,动脉内,颅内,鞘内,腹膜内,外用,鼻内或肌内。通过静脉内或皮下给药而施用到体循环是优选的。静脉内给药可以是,例如,通过输注一段时间如 30-90 分钟。

[0145] 给药频率依赖于抗体或融合蛋白在循环中的半衰期、患者情况、给药途径等因素。该频率可以是每天,每周,每月,每季度,或以不规则的间隔,这响应于患者情况和治疗的失调的进展的变化。示例的用于静脉内给药的频率是介于每周和每季度之间经历一个连续的治疗,尽管更多或更少的给药频率也是可能的。对于皮下给药,示例性的给药频率为每天至每月,尽管更多或更少的给药频率也是可能的。

[0146] 给药剂量的数目取决于所述失调是急性或慢性的、和对于治疗的失调的应答。对于急性失调或慢性失调的急性发作,1 和 10 之间的剂量通常是足够的。对于急性失调或慢性失调的急性发作,有时单次推注剂量,任选地以分开形式,是足够的。对于急性失调或急性发作的复发,可重复治疗。对于慢性失调,抗体可以定期施用,如至少 1,5 年或 10 年内的每周、每两周、每月、每季、每 6 个月,或患者的一生。

[0147] 对于胃肠外给药的药物组合物优选是无菌的,基本上等渗,并在 GMP 条件下生产。药物组合物可以以单位剂量形式 (unit dosage form) 来提供 (即,单次给药的剂量)。药物组合物可以使用一种或多种生理上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或辅料进行配制。剂型 (formulation) 取决于所选择的给药途径。对于注射,抗体可在水溶液中配制,优选在生理相容的缓冲液如 Hank 氏溶液,林格氏溶液或生理盐水或乙酸盐缓冲液 (以减少注射部位的不适感)。该溶液可以含有配制剂 (formulatory agents) 如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。作为一种选择,抗体可以是冻干形式,在使用前与合适的载体构造,例如,无菌无热原水。

[0148] 本发明的抗体可以与有效针对所治疗的失调的其他治疗方法结合起来治疗。对于治疗免疫失调,常规治疗包括:肥大细胞脱颗粒抑制剂、皮质类固醇、非类固醇消炎药,以及更强的抗炎药物,如咪唑硫嘌呤、环磷酰胺、瘤可宁、FK506 和环孢菌素。生物抗炎剂,如 **Tysabri®** (那他珠单抗) 或 **Humira®** (阿达木单抗),也可以被使用。当治疗癌症时,本发明的抗体可与化疗、放疗、干细胞治疗、外科手术或用其它生物制剂一起使用,所述生物制剂例如针对 HER2 抗原的 **Herceptin®** (曲妥珠单抗)、针对 VEGF 的 **Avastin®** (贝伐单抗)、对 EGF 受体的抗体如 **Erbix®** (西妥昔单抗) 和 **Vectibix®** (帕尼单抗)。化疗剂包括:苯丁酸氮芥、环磷酰胺或苯丙氨酸氮芥、卡铂、道诺霉素,多柔比星,伊达比星,和米托蒽醌,氨甲喋呤,氟达拉滨和阿糖胞苷,依托泊苷或拓扑替康,长春新碱和长春碱。对于感染,治疗可与抗生素、抗病毒剂、抗真菌或抗原生动物剂或类似物一起使用。

[0149] XI. 其他应用

[0150] 在临床诊断或治疗或研究的情况下,所述抗体或融合蛋白可用于检测靶分子。例如,所述抗体可用于检测癌症相关的抗原,用于作为患者正经受免疫介导的并需要治疗的失调的指示。该抗体也可以作为实验室研究试剂而出售,用于检测靶标和对各种刺激的响应。在这些用途中,抗体或融合蛋白可以用荧光分子、自旋标记分子、酶或 radioisotopes 标记,并且可以跟与执行测定必要的试剂一起以试剂盒的形式提供。所述抗体或融合蛋白还可以用于纯化它们的靶抗原,例如,通过亲和层析。

[0151] 出于所有目的,所有以上和以下引用的专利申请、网站、其出版物、注册号等以全文引用的方式并入,其引用程度就如同将每一项特定且个别地以全文引用的方式并入。如果不同版本的序列在不同时期结合了不同注册号,则所述版本及其注册号以本申请的有效申请日为准。如果适用,关于所述的注册号,有效申请日意味着比实际申请日更早或优先申请的申请日。同样,如果不同版本的公开文本、网站等公开于不同时间,则以最接近本申请有效申请时间的版本为准,除非另有说明。本发明的任何功能,步骤,元件,实施例可以结合任何其他使用,除非另有说明。虽然本发明已经通过图示和实施例描述了本发明的一些细节,以便于清楚和理解,很明显某些实施某些变化和修改也是在权利要求保护范围内的。

实施例

[0152] 实施例 1:用于嵌合抗人 CD30 单克隆 IgG 抗体的表达载体

[0153] 在这项工作中的基因克隆、形成突变和质粒构建使用标准的分子生物学技术进行,如在 Sambrook 和 Russel (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), Kostelny et al. (Int. J. Cancer 93:556-565, 2001), 和 Cole et al. (J. Immunol. 159:3613-3621, 1997) 中描述的那些技术。

[0154] 为了制备鼠抗-人 CD30 单克隆抗体 San11 (ChSan11) 的鼠-人嵌合 IgG1/ κ 形式,哺乳动物表达载体 pChSan11 (图 1) 被构建成包含下列基因成分。在图 1 中,从 pChSan11 的 SalI 位点顺时针转动,质粒包含重链转录单元,所述重链转录单元起始自人巨细胞病毒 (CMV) 主要立即早期启动子和增强子 (图中的 CMV-P),以启动该抗体重链基因的转录。CMV 启动子之后是:编码小鼠抗-人 CD30 单克隆抗体 San11 的重链可变区的外显子 (San11VH) (其侧翼为 SpeI 位和 HindIII 位点),含有人 γ -1 重链恒定区的基因组序列,它包括 CH1、铰链、CH 2 和 CH 3 外显子与插入的内含子,和人 γ -1 重链基因的多聚腺苷酸化位点。在重链基因序列之后,轻链转录单元自 CMV 启动子和增强子 (CMV-P) 起始,其次是编码鼠抗-人 CD30 单克隆抗体 San11 的轻链可变区的外显子 (San11VL) (其侧翼为 NheI 和 EcoRI 位点),含有人 κ 链的恒定区外显子 (C κ) (它前面有一部分内含子) 的基因序列,在 C κ 外显子后是人 κ 链基因的多聚腺苷酸化位点。所述轻链基因之后是 SV40 早期启动子 (SV40-P)、用于对抗嘌呤霉素的嘌呤霉素 N-乙酰基转移酶基因 (puro) 和含有 SV40 聚腺苷酸化位点的片段 (SV40-A)。最后,pChSan11 包含质粒 pUC19 的一部分,它包括细菌复制起点 (pUC ori) 和 β 内酰胺酶基因 (β 内酰胺酶)。图中的箭头表示转录方向。

[0155] 产生抗-人 CD30 单克隆抗体 San11 的小鼠杂交瘤在 JN Biosciences 公司 (Mountain View, CA) 制备,使用重组人 CD30 蛋白作为免疫原,并按照标准杂交瘤技术制备,例如 GenomONE CF EX 细胞融合试剂 (Cosmo Bio, Carlsbad, CA)。San11 的 VH 和 VL 序列通过标准实验程序测定,如 Tsurushita 等人描述的方法 (同上)。

[0156] pChSan11 中位于的 SpeI 和 HindIII 位点之间的 San11VH 基因被设计为一个外显子,该外显子包括位于编码区 3' 端的剪接供体信号 (splice donor signal)。pChSan11 中编码的 San11VH 的氨基酸序列 (包括信号肽) 为:

[0157] MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANGDTIYDPNFQGKATITAYTSSNTAYLQLSSLTSEDTAIVYYCARGYYGSSYWFVDVWGAGTTVTVSS (SEQ

ID NO:1)。成熟 San11VH 序列开始于 SEQ ID NO:1 中的第 20 位。

[0158] pChSan11 中位于 NheI 和 EcoRI 位点之间的 San11VL 基因被设计为一个外显子,该外显子包括位于编码区 3' 端的剪接供体信号。pChSan11 中编码的 San11VL 的氨基酸序列(包括信号肽)为:

[0159] MESDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTGLMQWYQQKPGQPPKLLIYSASNVESGVPARFTGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMFYFCQQSRKVPWTFGGGTKLEIKR(SEQ ID NO:2)。成熟 San11VH 序列开始于 SEQ ID NO:2 中的位点 21。

[0160] 实施例 2:形成多聚化 IgG 抗体的 Fc 突变

[0161] 为了产生形成多聚化 IgG 抗体的 Fc 突变,在 n pChSan11 中,首先将编码人 μ 重链的 18 个氨基酸长度(18-amino-acid-long)的尾端(μ tp;也被成为 μ 尾端)的 DNA 片段融合至 γ -1 重链编码区的 3' 末端,以产生 pChSan11. μ tp。 μ tp 的氨基酸序列是 PTLYNVSLVMSDTAGTCY(SEQ ID NO:3)。在 pChSan11. μ tp 编码的重链恒定区的氨基酸序列是:

[0162] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY(SEQ ID NO:4)。

[0163] pChSan11. μ tp 中,氨基酸取代成半胱氨酸随后通过人 γ -1 重链基因的位点 256、279、283、284、285、286、287、288、290、305、307、309、311、312、433、434 和 440 中的任一位点直接突变被引入。Kabat 等的 Eu 编号(Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991) 被用于指定(assigning)人 γ 重链的氨基酸的位点。携带这样的半胱氨酸取代突变的 pChSan11. μ tp 中,被编码的人 γ -1 重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NOs:5 至 21 所示。

[0164] 携带每个半胱氨酸取代突变的 pChSan11. μ tp 表达载体分别使用脂质体 2000 试剂(Invitrogen 公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)根据制造者协议被转染至人胚胎肾细胞系 HEK293。HEK293 细胞在 37°C 下,在 7.5% CO₂ 培养箱中,生长于含 10%胎牛血清的 DME 培养基(FBS;HyClone, Logan, UT)。包含瞬时表达的 ChSan11-IgG1/ κ 抗体的培养上清通过凝胶过滤分馏,凝胶过滤使用具有 Superose 610/300GL 柱的 AKTA Basic FPLC 系统(GE Healthcare, Indianapolis, IN),其分离 5 至 5,000 千道尔顿(kDa)范围的球蛋白。PBS 用作洗脱缓冲液。

[0165] 在每个馏分中存在的 IgG1/ κ 抗体通过夹心酶联免疫分析法(sandwich ELISA)进行分析。在典型的试验中,ELISA 板被 PBS(磷酸盐缓冲盐水, pH 7.4)中的羊抗-人 γ 重链多克隆抗体包被,用冲洗缓冲液(包含 0.05%吐温 20 的 PBS)洗涤,并用封闭缓冲液(Blocking Buffer)(包含 2%脱脂牛奶和 0.05%吐温 20 的 PBS)封闭。用冲洗缓冲液洗涤之后,在 ELISA 缓冲液(包含 1%脱脂牛奶和 0.025%吐温 20 的 PBS)中适当地稀释的测试样品涂于 ELISA 板上。合适的人或人源化的 IgG/ κ 抗体被用作标准品。于室温下孵育 ELISA 板 1 小时并用冲洗缓冲液洗涤之后,结合抗体使用 HRP-共轭羊抗-人 κ 链多克隆抗体进行检测。孵育和洗涤之后,显色通过加入 ABTS 底物引发并且使用 2%的草酸终止。吸光度在 405nm 下读取。

[0166] 强 ELISA 信号表明在 Superose 6 馏分（大致对应 1,000kDa 蛋白质）中观测到 IgG1/ κ 抗体的存在,并且因此表明多聚体的形成,所述多聚体具有人 γ -1 链的 Fc 区的 17 个半胱氨酸取代突变中的四个突变:位点 279 由缬氨酸突变为半胱氨酸 (V279C;SEQ ID NO:6),位点 285 由组氨酸突变为半胱氨酸 (H285C;SEQ ID NO:9),位点 287 由丙氨酸突变为半胱氨酸 (A287C;SEQ ID NO:11),或位点 309 由亮氨酸突变为半胱氨酸 (L309C;SEQ ID NO:16)。强 ELISA 信号也可以在具有这四个半胱氨酸取代突变、大致对应 150kDa 的蛋白质的馏分中观测到。ChSan11 仅在对应约 150kDa 的蛋白质的馏分中显示出强 ELISA 信号。

[0167] 这四个半胱氨酸取代突变 (V279C、H285C、A287C 和 L309C) 用于生产多聚化 IgG 抗体的能力被进一步研究。携带在位点 279 (V279C;SEQ ID NO:6)、位点 285 (H285C;SEQ ID NO:9)、位点 287 (A287C;SEQ ID NO:11) 和位点 309 (L309C;SEQ ID NO:16) 取代成半胱氨酸的氨基酸的 pChSan11. μ tp 表达载体,分别被指定为 pChSan11. V279C. μ tp、pChSan11. H285C. μ tp、pChSan11. A287C. μ tp 和 pChSan11. L309C. μ tp。

[0168] 实施例 3:抗-30IgG 抗体的表达和纯化

[0169] 表达载体 pChSan11 被引入小鼠骨髓瘤细胞系 NS0 (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK) 的染色体中,以获得分别稳定生产 ChSan11IgG1/ κ 抗体的细胞系。NS0 细胞在 37°C 下,在 7.5% CO₂ 培养箱中,生长于含 10% 胎牛血清的 DME 培养基。通过电穿孔稳定转染 NS0,如 Bebbington et al. 的描述 (Bio/Technology 10:169-175, 1992)。转染前,各表达载体用 FspI 线性化 (linearized)。在一个典型的实验中,用 20 μ g 线性化的质粒转染约 10⁷ 细胞,将细胞悬浮于含 10% FBS 的 DME 培养基中,并接种 (plate) 到几个 96 孔板中。48 小时后,使用选择培养基 (DME 培养基,含 10% FBS, HT 媒介补充物 (Sigma, St. Louis, MO), 0.25mg/ml 黄嘌呤和 1 μ g/ml 麦可酚酸)。选择启动大约 10 天后,转染子的培养上清被用来测定抗体 (通过如上描述的 ELISA 法测定抗体)。NS0 稳定转染生产的 ChSan11 适合在无血清培养基 (使用杂交瘤 SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA)) 中生长并在滚瓶中培养直至细胞活力变为少于 50%。离心、过滤之后,培养上清被保存于 4°C。

[0170] 表达载体 pChSan11. V279C. μ tp、pChSan11. H285C. μ tp、pChSan11. A287C. μ tp 和 pChSan11. L309C. μ tp 被分别引入到中国仓鼠卵巢细胞系 CHO-S (Invitrogen) 染色体中,其不表达 J 链,以获得分别稳定生产 IgG1/ κ 抗体 ChSan11. V279C. μ tp、ChSan11. H285C. μ tp、ChSan11. A287C. μ tp 和 ChSan11. L309C. μ tp 的细胞系。CHO-S 细胞在 37°C 下,在 7.5% CO₂ 培养箱中,生长于 SFM4CHO 介质中 (HyClone)。通过电穿孔,稳定转染进 CHO-S 中。转染前,各表达载体用 FspI 线性化。在一个典型的实验中,用 20 μ g 经线性化的质粒转染约 10⁷ 个细胞,将细胞悬浮在 SFM4CHO 中,适当稀释细胞后,接种到多个 96 孔板中。48 小时后,加入嘌呤霉素溶液,用于选择稳定的转染。选择启动大约两个星期后,转染子的培养上清用于测定抗体的产生。通过夹心 ELISA (如上所述) 测定抗体的表达。生产 ChSan11. V279C. μ tp、ChSan11. H285C. μ tp、ChSan11. A287C. μ tp 和 ChSan11. L309C. μ tp 中每个的 CHO-S 稳定的转染子用 SFM4CHO 扩展,直至细胞活性变得小于 50%。离心、过滤之后,培养上清被保存于 4°C。

[0171] 对于抗体的纯化,培养上清上样到蛋白 A 柱 (HiTrap MABSelect SuRe, GE Healthcare, Piscataway, NJ)。在用 0.1M 甘氨酸-盐酸 (pH 值 3.0) 洗脱抗体之前,所述柱

用 PBS 洗涤。所有洗脱的抗体的缓冲液用 1M 的 Tris-HCl (pH 值为 8) 中和,然后通过渗析变为 PBS。通过测定 280nm 下的吸光度得到抗体的浓度 ($1\text{mg/ml} = 1.40\text{D}$)。

[0172] 实施例 4:多聚化抗-CD30 抗体的表征

[0173] 纯化的 ChSan11、ChSan11.V279C. μtp 、ChSan11.H285C. μtp 、ChSan11.A287C. μtp 和 ChSan11.L309C. μtp IgG1/ κ 抗体根据标准方法,通过 SDS-PAGE 表征。在还原条件下的分析表明,每种抗体是由重链和轻链组成的,重链的分子量约为 53kDa (对于 ChSan11) 或 56kDa (对于 ChSan11.V279C. μtp 、ChSan11.H285C. μtp 、ChSan11.A287C. μtp 和 ChSan11.L309C. μtp),轻链的分子量约为 27kDa。当与 ChSan11 的重链相比时,ChSan11.V279C. μtp 、ChSan11.H285C. μtp 、ChSan11.A287C. μtp 和 ChSan11.L309C. μtp 的重链的分子量的增加是由于 18 个氨基酸长度的 μtp 的加入以及在 μtp 序列中碳水化合物结合位点的存在。

[0174] 天然形式的纯化的 ChSan11、ChSan11.V279C. μtp 、ChSan11.H285C. μtp 、ChSan11.A287C. μtp 和 ChSan11.L309C. μtp 抗体的分子大小是通过使用 Superose610/300GL 柱的凝胶过滤来分析的。对于 ChSan11,在 15.4ml 洗脱时,观察到一个主峰。当与分子大小标记的洗脱形式比较时,天然形式的 ChSan11 的大小被估计为约 150kDa,这与由两条重链和两个轻链组成的单体的人 IgG1 抗体的大小是一致的。ChSan11.V279C. μtp 、ChSan11.H285C. μtp 、ChSan11.A287C. μtp 和 ChSan11.L309C. μtp 抗体中的每个在洗脱图谱中均显示出两个主峰,一个主峰对应具有估计约为 170kDa 分子量的单体 IgG 抗体,另一个主峰对应具有约为 1,000kD 分子量的多聚体 IgG 抗体。

[0175] 在 Superose 6 凝胶过滤馏分中对应的分子量约为 1,000kDa 的 ChSan11.V279C. μtp 、ChSan11.H285C. μtp 、ChSan11.A287C. μtp 和 ChSan11.L309C. μtp 抗体的多聚体形式 (分别为 ChSan11.V279C. μtp 多聚体、ChSan11.H285C. μtp 多聚体、ChSan11.A287C. μtp 多聚体和 ChSan11.L309C. μtp 多聚体) 诱导人 T 细胞淋巴瘤细胞系 Karpas 299 的生长停滞的能力被测试。通过用鼠单克隆抗-CD30IgG 抗体和多克隆抗-鼠 IgG 抗体的混合物处理的细胞表面的 CD30 蛋白的交联导致了 Karpas 299 的细胞郁滞 (可参见:Wahl et al., Cancer Res. 62:3736-3742, 2002)。为了研究多聚体的抗-CD30IgG 抗体对 CD30 蛋白交联的能力,在 ChSan11-IgG1、ChSan11.V279C. μtp 多聚体、ChSan11.H285C. μtp 多聚体、ChSan11.A287C. μtp 多聚体和 ChSan11.L309C. μtp 多聚体中的每个以 $2\mu\text{g/ml}$ 存在的条件下, 2×10^5 Karpas 299 细胞在 96 孔板中的、含有 10% FBS 的 0.2mL RPMI-1640 介质中被孵育。5 天孵育之后, Karpas 299 细胞用四氮唑盐 WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD) 孵育并测定在 450nm 下的吸光度,其是脱氢酶活性水平的指示物并因此直接与活性细胞数目相关。细胞生长百分比 (Percent cell growth) 通过将测试抗体存在时的吸光度值相对于无抗体存在时的吸光度值进行归一化 (normalizing) 被计算。无细胞存在时的吸光度值作为背景值。Karpas 299 细胞的生长水平如下: ChSan11 存在时是 106%, ChSan11.V279C. μtp 多聚体存在时是 41%, ChSan11.H285C. μtp 多聚体存在时是 39%, ChSan11.A287C. μtp 多聚体存在时是 43%, ChSan11.L309C. μtp 多聚体存在时是 38%。因此, ChSan11.V279C. μtp 多聚体、ChSan11.H285C. μtp 多聚体、ChSan11.A287C. μtp 多聚体和 ChSan11.L309C. μtp 多聚体中的每个均显示出作为多价抗体的功能,即可在细胞表面交联 CD30 分子并诱导 Karpas 299 细胞的生长停滞。

[0176] 实施例 5:鼠抗-CD30 单克隆抗体 San11 的人源化

[0177] San11VH 和 VL 的人源化通过 Tsurushita 等(同上)描述的方法进行。编码人源化 San11VH 的基因作为外显子被合成,其包括位于编码区 3' 端的剪接供体信号、片段 5' 端的 SpeI 位点和片段 3' 端的 HindIII 位点。编码人源化 San11VL 的基因作为外显子被合成,其包括位于编码区 3' 端的剪接供体信号、片段 5' 端的 NheI 位点和片段 3' 端的 EcoRI 位点。用于人源化抗-人 CD30 单克隆 IgG1/ κ 抗体生产的哺乳动物表达载体通过如下 pChSan1 修饰方式被构建:(1) 用介于 SpeI 和 HindIII 位点之间的人源化 VH 基因替代 San11VH 基因;和 (2) 用介于 NheI 和 EcoRI 位点之间的人源化 San11VL 基因替代 San11VL 基因。为了表达多聚体的人源化 San11 抗体,在 pChSan11.V279C. μ tp、pChSan11.H285C. μ tp、pChSan11.A287C. μ tp 或 pChSan11.L309C. μ tp 相应的位点,人源化的 San11VH 和 VL 基因分别取代 ChSan11VH 和 VL 基因。得到的表达载体分别被引入真核细胞的染色体。稳定的转染在合适的培养基中被扩展。多聚体的人源化抗-CD30IgG 抗体被纯化,如实施例 3 所描述。

[0178] 实施例 6:多聚体的抗-DR4 抗体的表达载体

[0179] 产生抗-人死亡受体 4(DR4;也称为 Apo2, TRAIL 受体 1 和 TNFRSF10A) 单克隆 IgG1/ λ 抗体 YON007 的鼠杂交瘤在 JN Biosciences 公司(Mountain View,CA) 分离,使用与人 γ -1 重链(DR4-Fc)(SEQ ID NO:22) 的 Fc 区融合的人 DR4 的胞外域作为免疫原,并按照标准杂交瘤技术。

[0180] YON007VH 的氨基酸序列通过标准试验步骤(如 Tsurushita 等(同上)描述的方法)进行测定。包括信号肽序列的 YON007VH 的氨基酸序列是:

[0181] MNRLTSSLLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGL EWLAIHYWDDDKRYNPSLKSRLKISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCTRRGEYGNFDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO:23)。成熟 YON007VH 开始于 SEQ ID NO:23 的第 20 位。基于 Kabat 等(同上)定义的、YON007VH 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别是 TSGMG(SEQ ID NO:24)、HIYWDDDKRYNPSLK(SEQ ID NO:25) 和 RGEYGNFDY(SEQ ID NO:26)。

[0182] 类似地,YON007VL 的氨基酸序列被测定。包括信号肽序列的、YON007VL 的氨基酸序列是:

[0183] MAWISLILSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSSGAVTTSNFANWVQEKPDHLFTGLI GGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL(SEQ ID NO:27)。成熟 YON007VL 开始于 SEQ ID NO:27 的第 20 位。基于 Kabat 等(同上)定义的、YON007VL 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别是 RSSSGAVTTSNFAN(SEQ ID NO:28)、GTNNRAP(SEQ ID NO:29) 和 ALWYSNHWV(SEQ ID NO:30)。

[0184] YON007VH 和 VL 的人源化通过 Tsurushita 等(同上)描述的步骤进行。包括信号肽序列的、人源化 YON007(HuYON007) VH 的氨基酸序列是:

[0185] MNRLTSSLLLLIVPAYVLSQVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWL AHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCTRRGEYGNFDYWGQGTTLTVSS(SEQ ID NO:31)。成熟 HuYON007VH 序列开始于 SEQ ID NO:31 的第 20 位。HuYON007VL 的氨基酸序列是:

[0186] MAWISLILSLLALSSGAISQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSSGAVTTSNFANWVQQTPGQAPRGLI GGTNNRAPGVPDFSGSLLGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL(SEQ ID NO:32)。成

熟的 HuYON007VL 序列开始于 SEQ ID NO:32 的第 20 位。

[0187] 编码 HuYON007VH(SEQ ID NO:33) 的基因作为外显子被合成,其包括位于编码区 3' 端的剪接供体信号、片段 5' 端的 SpeI 位点和片段 3' 端的 HindIII 位点。编码 HuYON007VL(SEQ ID NO:34) 的基因作为外显子被合成,其包括位于编码区 3' 端的剪接供体信号、片段 5' 端的 NheI 位点和片段 3' 端的 EcoRI 位点。

[0188] 用于生产人源化抗 - 人 DR4 单克隆 IgG1/ λ 抗体 HuYON007 的哺乳动物表达载体 pHuYON007(图 2) 通过如下 pChSan11 修饰方式被构建:(1) 用介于 SpeI 和 HindIII 位点之间的 HuYON007VH 基因(SEQ ID NO:33;图 2 中显示为“VH-007”)替代 San11VH 基因;(2) 用介于 NheI 和 EcoRI 位点之间的 HuYON007VL 基因(SEQ ID NO:34;图 2 中显示为“VL-007”)替代 San11VL 基因;和(3) 用编码人 λ -2 恒定区(C λ) 的外显子替换 C κ -编码外显子。pHuYON007 的示意结构如图 2 所示。图中的箭头表明转录的方向。

[0189] pHuYON007 中编码的成熟重链的氨基酸序列是:

[0190] QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSRL
TISKDTSKNQVVL TMTNMDPVD TATYYCTRRGEYGNFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ
ID NO:35)。

[0191] pHuYON007 中编码的成熟轻链的氨基酸序列是:

[0192] QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSGAVTTSNFANWVQQTPGQAPRGLIGGTNNRAPGVDPDRFSGSIL
GNKAALTITGAQADDES DYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS(SEQ ID
NO:36)。

[0193] 对于多聚体的 HuYON007IgG 抗体的表达,编码人 μ 重链(μ tp)(SEQ ID NO:3) 的 18 个氨基酸长度尾端的 DNA 片段被与 pHuYON007 中的 γ -1 重链的 3' 末端融合以产生 pHuYON007. μ tp。pHuYON007. μ tp 中编码的重链恒定区的氨基酸序列与 pChSan11. μ tp(SEQ ID NO:4) 中编码的重链恒定区的氨基酸序列相同。

[0194] 通过重链基因的位点 279、285、287 和 309 上的氨基酸分别被半胱氨酸取代,表达载体 pHuYON007. μ tp 被进一步修饰以产生 pHuYON007. V279C. μ tp、pHuYON007. H285C. μ tp、pHuYON007. A287C. μ tp 和 pHuYON007. L309C. μ tp。在 pHuYON007. V279C. μ tp 中,Fc 区位点 279 上的缬氨酸被取代为半胱氨酸。

[0195] pHuYON007. V279C. μ tp 中编码的重链恒定区的氨基酸序列与

[0196] pChSan11. V279C. μ tp(SEQ ID NO:6) 中编码的重链恒定区的氨基酸序列相同。

[0197] 在 pHuYON007. H285C. μ tp 中,位点 285 上的组氨酸取代为半胱氨酸。

[0198] pHuYON007. H285C. μ tp 中编码的重链恒定区的氨基酸序列与

[0199] pChSan11. H285C. μ tp(SEQ ID NO:9) 中编码的重链恒定区的氨基酸序列相同。

[0200] 在 pHuYON007. A287C. μ tp 中,位点 287 上的丙氨酸被取代为半胱氨酸。

[0201] pHuYON007. A287C. μ tp 中编码的重链恒定区的氨基酸序列与

- [0202] pChSan11. A287C. μ tp (SEQ ID NO:11) 编码的重链恒定区的氨基酸序列相同。
- [0203] 在 pHuYON007. L309C. μ tp 中, 位点 309 上的亮氨酸被取代为半胱氨酸。
- [0204] pHuYON007. L309C. μ tp 中编码的重链恒定区的氨基酸序列与
- [0205] pChSan11. L309C. μ tp (SEQ ID NO:16) 编码的重链恒定区的氨基酸序列相同。
- [0206] pHuYON007、pHuYON007. μ tp、pHuYON007. V279C. μ tp、pHuYON007. H285C. μ tp、pHuYON007. A287C. μ tp 和 pHuYON007. L309C. μ tp 中的每个的轻链基因编码相同的氨基酸序列。
- [0207] pHuYON007. μ tp、pHuYON007. V279C. μ tp、pHuYON007. H285C. μ tp、pHuYON007. A287C. μ tp 和 pHuYON007. L309C. μ tp 表达载体的示意结构如图 2 所示。
- [0208] 实施例 7 : 抗 -DR4IgG1 抗体的表达和纯化
- [0209] 表达载体 pHuYON007、pHuYON007. V279C. μ tp、pHuYON007. H285C. μ tp、pHuYON007. A287C. μ tp 和 pHuYON007. L309C. μ tp 分别被引入到中国仓鼠卵巢细胞系 CHO-S (Invitrogen) 染色体中, 以获得分别稳定生产人源化 IgG1/ λ 抗体 HuYON007、HuYON007. V279C. μ tp、HuYON007. H285C. μ tp、HuYON007. A287C. μ tp 和 HuYON007. L309C. μ tp 的细胞系。稳定转染进 CHO-S 中, CHO-S 稳定转染子的选择和扩展以及抗体纯化按照以上描述的方法进行。
- [0210] 纯化的 HuYON007、HuYON007. V279C. μ tp、YON007. H285C. μ tp、HuYON007. A287C. μ tp 和 HuYON007. L309C. μ tp IgG1/ λ 抗体根据标准步骤通过 SDS-PAGE 表征。在还原条件下的分析表明这些抗体的每个均由重链和轻链组成, 重链的分子量约 51kDa (对于 HuYON007) 或 54kDa (对于 HuYON007. V279C. μ tp、HuYON007. H285C. μ tp、HuYON007. A287C. μ tp 和 HuYON007. L309C. μ tp), 轻链的分子量约 27kDa。当与 HuYON007 的重链比较时, HuYON007. V279C. μ tp、HuYON007. H285C. μ tp、HuYON007. A287C. μ tp 和 HuYON007. L309C. μ tp 重链的分子量的增加是由于 18 个氨基酸长度的 μ tp 的加入以及 μ tp 中存在的碳水化合物结合位点。
- [0211] 以天然形式存在的纯化的 HuYON007、HuYON007. V279C. μ tp、HuYON007. H285C. μ tp、HuYON007. A287C. μ tp 和 HuYON007. L309C. μ tp IgG1/ λ 抗体的分子大小是通过如上描述的使用 Superose 610/300GL 柱的凝胶过滤来分析的。对于 HuYON007, 在 15.4ml 洗脱时, 观察到一个主峰 (图 3B)。当与分子大小标记的洗脱图谱比较时 (图 3A), 天然形式的 HuYON007 的大小被估计为约 150kDa, 这与由两条重链和两个轻链组成的单体的人 IgG1 抗体的大小是一致的。HuYON007. V279C. μ tp (图 3C)、HuYON007. H285C. μ tp (图 3D)、HuYON007. A287C. μ tp (图 3E) 和 HuYON007. L309C. μ tp (图 3F) 中的每个在洗脱图谱中均显示出两个主峰。在 ~ 15 ml 洗脱的馏分对应于单体的 IgG 抗体, 具有估计约 180kDa 的分子量, 而在 ~ 11 ml 洗脱的馏分对应于多聚体的 IgG 抗体, 具有估计约 1,000kDa 的分子量, 其对应 IgG 抗体的五聚体或六聚体。
- [0212] 对于 HuYON007. V279C. μ tp、HuYON007. H285C. μ tp、HuYON007. A287C. μ tp 和 HuYON007. L309C. μ tp, 多聚化的抗体通过使用 Superose 6 柱的凝胶过滤与单体的抗体分离。对于 HuYON007. V279C. μ tp (HuYON007. V279C. μ tp 多聚体), 分离的多聚化抗体的凝胶过滤图谱如图 4A 所示, 对于 HuYON007. H285C. μ tp (HuYON007. H285C. μ tp 多聚体) 如图 4C 所示, 对于 HuYON007. A287C. μ tp (HuYON007. A287C. μ tp 多聚体) 如图 4E 所示,

对于 HuYON007.L309C. μ tp (HuYON007.L309C. μ tp 多聚体) 如图 4G 所示。HuYON007.V279C. μ tp、HuYON007.H285C. μ tp、HuYON007.A287C. μ tp 和 HuYON007.L309C. μ tp 多聚体中的每个在 ~ 11 ml 洗脱时显示出一个主峰,其对应于 $\sim 1,000$ kDa 的分子。对于 HuYON007.V279C. μ tp (HuYON007.V279C. μ tp 单体),分离的单聚化抗体的凝胶过滤图谱如图 4B 所示,对于 HuYON007.H285C. μ tp (HuYON007.H285C. μ tp 单体) 如图 4D 所示,对于 HuYON007.A287C. μ tp (HuYON007.A287C. μ tp 单体) 如图 4F 所示,对于 HuYON007.L309C. μ tp (HuYON007.L309C. μ tp 单体) 如图 4H 所示。这四种单体中的每种在 ~ 15 ml 洗脱时显示出一个主峰,其对应 ~ 180 kDa 分子。

[0213] 实施例 8 :HuYON007 抗体介导的 Ramos 细胞凋亡

[0214] 人 Burkitt 淋巴瘤细胞系 Ramos 在细胞表面表达 DR4 (可参见 :Daniel et al. Blood:110:4037-4046, 2007)。通过交联而使 DR4 多聚化已知可以诱导细胞凋亡 (可参见 :Griffith et al. J. Immunol. 162:2597-2605, 1999)。

[0215] Ramos 细胞 (CRL-1596 ;ATCC, Manassas, VA) 生长于含 10 % FBS 的 DME 介质中。为评估 HuYON007.V279C. μ tp、HuYON007.H285C. μ tp、HuYON007.A287C. μ tp 和 HuYON007.L309C. μ tp IgG1 抗体通过表面上 DR4 的交联诱导 Ramos 细胞凋亡的能力,纯化的 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体、HuYON007.H285C. μ tp 多聚体、HuYON007.A287C. μ tp 多聚体和 HuYON007.L309C. μ tp 多聚体中的每个在重复的孔中、以 100ng/ml、20ng/ml、4ng/ml、0.8ng/ml、0.16ng/ml 或 0.032ng/ml 的终浓度用 Ramos 细胞孵育。纯化的 HuYON007.V279C. μ tp 单体、HuYON007.H285C. μ tp 单体、HuYON007.A287C. μ tp 单体和 HuYON007.L309C. μ tp 单体中的每个也以 100ng/ml、20ng/ml、4ng/ml、0.8ng/ml、0.16ng/ml 或 0.032ng/ml 的终浓度用 Ramos 细胞孵育。在 37℃、在 7.5 % CO₂ 培养箱中培养过夜之后,根据生产商的说明书,用 alamarBlue (Invitrogen) 测量细胞活力 (cell viability)。细胞活力百分比通过将测试抗体存在时的吸光度值相对于无测试抗体存在时的吸光度值进行归一化被计算。无细胞时的吸光度值被作为背景值。

[0216] HuYON007.V279C. μ tp 多聚体、HuYON007.H285C. μ tp 多聚体、HuYON007.A287C. μ tp 多聚体和 HuYON007.L309C. μ tp 多聚体中的每个均可有效诱导 Ramos 细胞凋亡 (分别如图 5A、5B、5C 和 5D 所示)。在 100ng/ml 的抗体浓度时,这四种多聚体中每个均可实现近 100 % 的细胞死亡。相反, HuYON007.V279C. μ tp 单体、HuYON007.H285C. μ tp 单体、HuYON007.A287C. μ tp 单体和 HuYON007.L309C. μ tp 单体中的每个均不能有效诱导 Ramos 细胞凋亡 (分别如图 5A、5B、5C 和 5D 所示)。在 100ng/ml 抗体存在时,对于 HuYON007.V279C. μ tp 单体细胞活性为 80 %,对于 HuYON007.H285C. μ tp 单体活性为 91 %,对于 HuYON007.A287C. μ tp 单体活性为 83 %,对于 HuYON007.L309C. μ tp 单体活性为 92 %。

[0217] 实施例 9 :HuYON007 介导的 Colo-205 细胞凋亡

[0218] 通过交联而使细胞表面的 DR4 多聚化已知可以诱导人结肠癌细胞系 Colo1-205 凋亡 (可参见 :Chuntharapai et al., J. Immunol. 166:4891-4898, 2001)。为评估 HuYON007.V279C. μ tp、HuYON007.H285C. μ tp、HuYON007.A287C. μ tp 和 HuYON007.L309C. μ tp IgG1 抗体通过表面上 DR4 的交联诱导 Colo-205 细胞凋亡的能力,纯化的 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体、HuYON007.H285C. μ tp 多聚体、HuYON007.A287C. μ tp 多聚体和 HuYON007.L309C. μ tp 多聚体中的每个在重复的孔中、以 100ng/ml、20ng/ml、4ng/ml、0.8ng/ml、0.16ng/ml

ml 或 0.032ng/ml 的终浓度用 Colo-205 细胞孵育。纯化的 HuYON007.V279C. μ tp 单体、HuYON007.H285C. μ tp 单体、HuYON007.A287C. μ tp 单体和 HuYON007.L309C. μ tp 单体中的每个也以 100ng/ml、20ng/ml、4ng/ml、0.8ng/ml、0.16ng/ml 或 0.032ng/ml 的终浓度用 Colo-205 细胞孵育。在 37℃、在 7.5% CO₂ 培养箱中培养过夜之后,根据生产商的说明书,用 alamarBlue(Invitrogen) 测量细胞活力 (cell viability)。细胞活力百分比通过将测试抗体存在时的吸光度值相对于无测试抗体存在时的吸光度值进行归一化被计算。无细胞时的吸光度值被作为背景值。

[0219] HuYON007.V279C. μ tp 多聚体、HuYON007.H285C. μ tp 多聚体、HuYON007.A287C. μ tp 多聚体和 HuYON007.L309C. μ tp 多聚体中的每个均可有效诱导 Colo-205 细胞凋亡(分别如图 6A、6B、6C 和 6D 所示)。在 100ng/ml 的抗体浓度时,这四种多聚体中每个均可使得 Colo-205 细胞的活性小于 35%。相反,用 HuYON007.V279C. μ tp 单体、HuYON007.H285C. μ tp 单体、HuYON007.A287C. μ tp 单体和 HuYON007.L309C. μ tp 单体时,未观察到活性的降低,即使实在最高的抗体测定浓度时(100ng/ml)(分别如图 6A、6B、6C 和 6D 所示)。

[0220] 实施例 10:用于治疗癌细胞的多聚体的 IgG 抗体和化疗剂的组合物

[0221] 在细胞表面上表达 DR4 的人骨髓瘤细胞系 RPMI 8226 的凋亡可以通过激动剂抗-DR4 抗体诱导(可参见:Locklin et al., Leukemia 21:805-812, 2007)。为评估 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体通过表面上的 DR4 的交联诱导 RPMI 8226 细胞凋亡的能力,在 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体不存在或存在的条件下培养 RPMI 8226 细胞(CCL-155, ATCC)。此外, HuYON007.V279C. μ tp 多聚体与硼替佐米(bortezomib)(一种适用于多发性骨髓瘤的化疗剂)的协合作用,用于杀死 RPMI 8226 细胞的能力被测试。

[0222] RPMI 8226 在含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中生长 24 小时,在以下物质存在的条件下:(i)4.1ng/ml HuYON007.V279C. μ tp 多聚体, (ii)2.5ng/ml 的硼替佐米, (iii)4.1ng/ml 的 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体和 2.5ng/ml 的硼替佐米,或 (iv)无添加物作为 100% 活性对照。使用 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI) 测定的 RPMI 8226 细胞的活性如下:仅用 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体时为 43%,仅用硼替佐米时为 49%,使用 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体和硼替佐米的混合物时为 9.5%。虽然 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体和硼替佐米中的每个均可诱导 RPMI 8226 细胞的细胞死亡,但当 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体和硼替佐米同时使用时,致死活性更高。

[0223] 实施例 11:Ramos 细胞鼠系统性异种移植模型

[0224] HuYON007.V279C. μ tp 多聚体的功效使用 Ramos 细胞鼠系统性异种移植模型来评估。为了形成肿瘤,在第 0 天时向 CB17SCID 母鼠静脉注射 5×10^6 Ramos 细胞至其尾静脉中。在第 7、10、14、17、21、24、28 和 31 天时向携带肿瘤的小鼠静脉注射 HuYON007IgG1 (0.5mg/kg)、HuYON007.V279C. μ tp 多聚体 (0.5mg/kg) 或 PBS。小鼠每天被监测发病率和死亡率。当观察到后肢麻痹或体重减少多于 20% 时,小鼠被安乐死。试验在第 45 天时终止。

[0225] 小鼠的存活期使用 Kaplan-Meier 方法绘制(图 9)并使用 Mantel-Cox 测试分析显著性。对于 PBS 处理的组,小鼠平均存活时间是 27.5 天,对于 HuYON007IgG1 处理的组为 31.5 天,对于 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体处理的组为 45 天。PBS 处理的组与 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体处理的组之间的 P 值小于 0.0001。HuYON007IgG1 处理的组与 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体处理的组之间的 P 值小于 0.0001。

V279C. μ tp 多聚体处理的组之间的 P 值小于 0.0001。在 Ramos 细胞鼠系统性异种移植模型中作为治疗剂,相比于 HuYON007IgG1, HuYON007. V279C. μ tp 多聚体显著地更有效。

[0226] 实施例 12:多聚体的抗-CD40 激动剂抗体

[0227] CD40, TNF 受体超家族成员,在各种类型的细胞(包括抗原呈递细胞)的表面表达并在免疫系统中作为共刺激分子。CD40 配体,也称为 CD40L 和 CD154,是 TNF 超家族的成员。CD154 主要表达于活性的 T 细胞表面且也以可溶性的三聚体存在。在抗原呈递细胞上的 CD40 通过与 CD154 相互作用的联合(Ligation)引发免疫应答,如抗体产生、肿瘤致死和病毒感染细胞的清除(供审查,参见 Grewal and Flavell, Annu. Rev. Immunol. 16:111-135, 1998)。

[0228] 人 Burkitt's B 淋巴瘤细胞系 Ramos 在表面上表达 CD40(可参见:Henriquez et al., J. Immunol. 162:3298-3307, 1999)。Ramos 细胞表面上的 CD40 与可溶三聚体 CD154 的联合(Ligation)已知可诱导 NF- κ B 的活性并提高 CD54 和 CD95 的表达(可参见:Henriquez et al. 同上)

[0229] 为了测试单体的和多聚体的抗-CD40IgG 抗体对 Ramos 细胞活性的影响,重组的嵌合抗-CD40IgG 抗体的表达载体被产生。鼠抗人 CD40 单克隆抗体的 VH 基因的编码区被转化为外显子,其包括信号肽编码序列、剪接供体信号和侧翼的 SpeI 和 HindIII 位点。类似地,同样的鼠抗人 CD40 单克隆抗体的 VL 基因被转化为外显子,其包括信号肽编码序列、剪接供体信号和侧翼的 NheI 和 EcoRI 位点。携带 VH 外显子的 SpeI-HindIII 片段和携带 VL 外显子的 NheI-EcoRI 片段,源自鼠抗人 CD40 单克隆抗体,被引入 p ChSan11 的相应位点(图 1)。得到的表达载体被称为 pChACD40。类似地,相同的 VH 和 VL 片段被引入 pChSan11. V279C. μ tp(图 1)以产生 pChACD40. V279C. μ tp。pChACD40 和 pChACD40. V279C. μ tp 的总体结构分别与 pChSan11 和 pChSan11. V279C. μ tp 的总体结构基本一致,除了 VH 和 VL 基因不同。pChACD40 和 pChACD40. V279C. μ tp 中的每个表达的鼠-人嵌合抗体特异性地结合人 CD40。

[0230] 使用 pChACD40. V279C. μ tp 和 pChACD40 的 CHO-S 稳定转染的产生以分别生产 ChACD40. V279C. μ tp 多聚体和 ChACD40IgG1 按照如实施例 7 中的描述进行。ChACD40. V279C. μ tp 多聚体和 ChACD40IgG1 抗体中的每个均从对应的 CHO-S 稳定转染子(如实施例 7 中的描述的)的培养上清中被纯化。ChACD40. V279C. μ tp 多聚体和 ChACD40IgG1 的分子大小通过如上所述的使用 Superose 610/300GL 的凝胶过滤进行分析。对于 ChACD40. V279C. μ tp 多聚体,一个对应约 1,000kDa 分子量的主峰被观测到。对于 ChACD40IgG1,显示出一个对应约 150kDa 的主峰。

[0231] 在 1 μ g/ml 的 ChSan11IgG1、ChACD40IgG1 或 ChACD40. V279C. μ tp 多聚体存在的条件下,Ramos 细胞在 37°C、在 7.5% CO₂ 培养箱中,生长于含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中。48 小时孵育之后,细胞用 PE 标记的鼠抗-CD95 单克隆抗体着色并通过流式细胞仪分析。用 ChSan11IgG1 时,其不与 Ramos 细胞结合,Ramos 细胞生长的平均通道荧光(MCF)值是 9.2。用 ChACD40IgG1 和 ChACD40. V279C. μ tp 多聚体时,细胞生长的 MCF 值分别是 19.8 和 180.7。相比于 ChACD40IgG1, ChACD40. V279C. μ tp 多聚体更有效地诱导了 Ramos 细胞中的 CD95 的上升调节(up-regulation)。因此,相比于 ChACD40IgG1,所述 ChACD40. V279C. μ tp 多聚体是种更有效的激动剂。

[0232] 抗-CD40 抗体以本发明多聚体的 IgG 的形式 (例如 ChACD40.V279C. μ tp) 施用,将是活化免疫系统以治疗癌症和传染性疾病的有效途径 (可参见:Li and Ravetch, Science 333:1030-1034, 2011;Antunes et al., J. Biomed. Biotechnol. 2012:464532, 2012;Capece et al., J. Biomed. Biotechnol. 2012:926321, 2012)。

[0233] 实施例 13:多聚体的 IgG 抗体与共刺激分子的结合活化免疫系统

[0234] T 细胞在合适的免疫应答中的活化需要两个独特的信号事件。第一个信号是通过 T 细胞受体与抗原呈递细胞上的 MHC 分子以抗原依赖性的方式结合 (engagement) 来提供。第二个信号是通过共刺激分子与位于 T 细胞和抗原呈递细胞之间的它们的配体的相互作用来提供。通过共刺激分子 (如 OX40、4-1BB、GITR 和 CD27) 与它们的配体或激动剂抗体的交联诱导的细胞内信号转导 (intracellular signaling) 已显示可有效地触发免疫应答 (供审查,参见:McNamara et al., J. Clin. Invest. 118:376-386, 2008;Sharpe, Immunol. Rev. 229:5-11, 2009;Capece et al., 同上;Antunes et al., 同上;Gao et al., Trends Immunol. 34:90-98, 2013)。共刺激分子与本发明的多聚体 IgG 抗体的交联将为免疫系统的活化提供有效的机制。

[0235] 对抗共刺激分子 (如 OX40、4-1BB、GITR 和 CD27) 的非人、人源化的或人单克隆抗体的 VH 和 VL 基因,被克隆至合适的载体,例如 pChSan11.H285C. μ tp 或 pHuYON007.V279C. μ tp,用于以本发明多聚体的 IgG 形式表达。作为结果的多聚体的 IgG 抗体表达于合适的细胞中并通过如以上所述的亲和层析纯化。由这样的多聚体的 IgG 抗体引起的免疫系统激活在合适的基于细胞的测定中或动物 (例如,具有人免疫细胞植入的免疫缺陷小鼠) 中被测试 (可参见:(humanized mice;Schultz et al., Nat. Rev. Immunol. 12:786-798, 2012)。这样的多聚体的 IgG 抗体的治疗活性在合适的动物疾病模型 (如有癌症或病原体的人源化的小鼠) 中被测试 (可参见:Brehm et al., Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 17:120-125, 2010;Dranoff et al., Nat. Rev. Immunol. 12:61-66, 2012;Strowig et al., Drug Discovery Today:Disease Models 9:e11-e16, 2012;Akkina, Virology 435:14-28, 2013)。

[0236] 实施例 14:双特异性多聚体的 IgG 抗体

[0237] 载体 pCh9G6-MVIG1 和 pChSan11-MVIG1,其表达分别结合人 CD79a 和 CD30 的多价 IgG1 抗体,使用供应商的方案、采用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen),被分别或一起转染到 HEK293 细胞。培养上清中的瞬时表达的抗体的抗原结合,用以下两种形式的 ELISA 检测。

[0238] 为了以单链 Fv (scFv) 形式表达 HuYON007.V279C. μ tp 多聚体 (可参见:Ahmad et al. Clin. Dev. Immunol. 2012:980250, 2012),表达载体 pHuYON007.V279C. μ tp 通过以下方式被修饰:首先移除轻链基因,然后用合成的外显子 (从 5' 到 3',其编码包括其信号肽的 HuYON007VL、灵活的多肽连接器、成熟 HuYON007VH、灵活的多肽连接器和接着的人 γ -1 重链铰链区) 替换 VH、CH1 和铰链外显子。得到的表达载体 pScFv. HuYON007.V279C. μ tp 的示意结构如图 10 所示。由 pScFv. HuYON007.V279C. μ tp (SEQ ID NO:37) 表达的单链 Fv 抗体与人 DR4 特异性地结合。

[0239] 人源化抗-人死亡受体 5 (DR5;也称为 TRAIL 受体 2, TNFRSF10B, CD262) 单克隆抗体 HuG0H729S 的 VL 和 VH 区,其根据标准杂交瘤和人源化技术由 JN Biosciences 公司生成,

被克隆至如上描述的 pScFv. HuYON007. V279C. μ tp 的对应位点,以产生另一个 scFv 表达载体 pScFv. HuGOH729S. V279C. μ tp。包含信号肽序列的 HuGOH729S VL 的氨基酸序列是:

[0240] MESQIQAFVFLWLSGVDGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVNTAAAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPYTFGGQGTKLEIK (SEQ ID NO:38)。成熟 HuGOH729S VL 开始于 SEQ ID NO:38 的第 21 位。基于 Kabat 等(同上)定义的 HuGOH729S VL 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别是 KASQDVNTAAA (SEQ ID NO:39)、WASTRHT (SEQ ID NO:40) 和 QQHYSTPYT (SEQ ID NO:41)。包括信号肽序列的 HuGOH729S VH 的氨基酸序列是:

[0241] MEWCWVFLFLSVTAGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIIHWVRQAPGQGLEWIGWFYPGNNNIKSNEKFKDRVTLTADTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARNEDNYGNFFGYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:42)。

[0242] 成熟 HuGOH729S VH 开始于 SEQ ID NO:42 的第 20 位。基于 Kabat 等(同上)定义的 HuGOH729S VH 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别是 DYIIH (SEQ ID NO:43)、WFYPGNNNIKSNEKFKD (SEQ ID NO:44) 和 NEDNYGNFFGY (SEQ ID NO:45)。由 pScFv. HuGOH729S. V279C. μ tp (SEQ ID NO:46) 表达的单链 Fv 抗体与人 DR5 特异性地结合。

[0243] pScFv. HuYON007. V279C. μ tp 和 pScFv. HuGOH729S. V279C. μ tp 的表达载体单独地或共同地转染至 HEK293 细胞以进行如上面所述的抗体表达。HEK293 细胞培养上清中短暂表达的抗体通过 ELISA 测试其与 DR4 和 DR5 的同时结合。

[0244] 微量滴定板的孔用与人 γ 1 链的 Fc 区在 C 末端融合的重组的人 DR4 胞外域 (DR4-Fc; SEQ ID NO:22) 包被。用封闭缓冲液封孔之后,HEK293 细胞的适当稀释的培养上清加至孔内,并于室温下孵育 1 小时。用冲洗缓冲液冲洗孔之后,在 ELISA 缓冲液中的、与人 λ 2 恒定区在 C 末端融合的重组的人 DR5 胞外域 (DR5-C λ ; SEQ ID NO:47) 被加至孔内。从人 λ 2 恒定区羧基末端起第二个位置上的半胱氨酸在 DR5-C λ 中被改变为丝氨酸残基。于室温下孵育 ELISA 板 30 分钟并用冲洗缓冲液冲洗孔之后,结合的 DR5-C λ 通过 HRP- 共轭羊抗-人 λ 链多克隆抗体被检测。添加 ABTS 底物启动显色并用 2% 草酸终止显色。在 405nm 下读取吸光度。

[0245] 当与未转染的 HEK293 细胞的培养上清相比时,用 pScFv. HuYON007. V279C. μ tp 或 pScFv. HuGOH729S. V279C. μ tp 转染的 HEK293 细胞的培养上清未显示出信号。当 pScFv. HuYON007. V279C. μ tp 和 pScFv. HuGOH729S. V279C. μ tp 共转染至 HEK293 细胞中时,培养上清在这种 ELISA 形式下显示出强信号,表明双特异性多聚体抗体的存在可以同时结合包被在 ELISA 板上的 DR4-Fc 和溶液中的 DR5-C λ 。

[0246] 抗细胞表面抗原的各种双抗体以如上示出的双特异性多聚体的 IgG 形式表达。这样的双特异性多聚体的 IgG 抗体可用正常的、恶性的或感染病原体的细胞孵育。抗体处理的细胞的变化,如细胞凋亡、细胞郁滞、促进生长、分化、形态变化、蛋白表达的变化和细胞内信号转导的调整,被分析以识别可用作试剂、诊断剂和治疗剂的双特异性多聚体的 IgG 抗体。

[0247] 实施例 15:功能性多聚体抗体的筛选

[0248] 抗体显示库,如单链 Fv 噬菌体显示库,使用源自天然或免疫动物的 VH 和 VL 基因生成或使用合成的 VH 和 VL 基因生成,然后按照标准步骤承受与正常的、恶性的或感染病原体

的细胞结合的抗体的丰度 (enrichment) (可参见 :Kretzschmar et al., Current Opinion Biotechnol. 13:598-602, 2002 ;Dufner et al., Trends Biotechnol. 24:523-529, 2006 ; Shibasaki et al., Recent Patents Biotechnol. 3:19-37, 2009 ;Mannocci et al., Chem. Commun. 47:12747-12753, 2011 ;Geyer et al., Antibody Methods and Protocols, Methods Mol. Biol. Vol. 901, Chapter 2, 2012)。为了表达本发明的多聚体的 IgG 抗体, 富集文库中的 VH-VL 基因对的混合物被转移至载体 (例如, pScFv. HuYON007. V279C. μ tp 或 pHuYON007. V279C. μ tp) 中, 以产生第二个抗体库。

[0249] 第二个抗体库中的每个载体被转移至细胞中, 以表达与细胞表面抗原结合的单特异性多聚体的 IgG 抗体。可选地, 第二个抗体库中的每个载体与编码多聚体的 IgG 抗体 (与已知的细胞表面抗原结合) 的另一个载体共转染至细胞中, 以产生与两个不同的细胞表面抗原结合的双特异性多聚体的 IgG 抗体。这样表达的单特异性和双特异性多聚体的抗体用正常的、恶性的或感染病原体的细胞单独地孵育。抗体处理的细胞的变化, 如细胞凋亡、细胞郁滞、促进生长、分化、形态变化、蛋白表达的变化和细胞内信号转导的调整被监测。这样的单特异性和双特异性多聚体的 IgG 抗体 (与细胞表面抗原结合) 的治疗功效在如以上描述的合适的动物模型中被进一步测试。

[0250]

序列表

SEQ ID NO:1

鼠单克隆抗体 San11 的重链可变区 (VH) 的氨基酸序列

MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEW
IGRIDPANGDTIYDPNFQ GKATTTAYTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCARGYYGSSYWFYFDVWGA
GTTVTVSS

SEQ ID NO:2

鼠单克隆抗体 San11 的轻链可变区 (VL) 的氨基酸序列

MESDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTGLMQWYQOKPGQ
PPKLLIYSASNVESGVPARFTGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQQSRKVPWTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO:3

人 μ 重链的 18 个氨基酸长度的尾端的氨基酸序列 (μ tp)

PTLYNVSLVMSDTAGTCY

SEQ ID NO:4

pChSan11. μ tp 中编码的重链恒定区的氨基酸序列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
PTLYNVSLVMSDTAGTCY

SEQ ID NO:5

携带位点 256(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11. μ tp 中编码的人 γ -1 重链的氨基酸序列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRCPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
PTLYNVSLVMSDTAGTCY

SEQ ID NO:6

[0251]

携带位点 279(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ-1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS  
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYCDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
PTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:7

携带位点 283(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ-1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS  
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVCVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
PTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:8

携带位点 284(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ-1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS  
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVECHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
PTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:9

携带位点 285(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ-1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS  
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVCNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
PTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:10

[0252]

携带位点 286(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ -1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHCAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:11

携带位点 287(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ -1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNCKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:12

携带位点 288(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ -1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNACTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:13

携带位点 290(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ -1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTCPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:14

[0253]

携带位点 305(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ-1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVCLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:15

携带位点 307(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ-1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLCVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:16

携带位点 309(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ-1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVCHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:17

携带位点 311(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ-1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHCDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:18

[0254]

携带位点 312(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ-1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:19

携带位点 389(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ-1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPECNKYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:20

携带位点 390(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ-1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNCYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:21

携带位点 440(带下划线的)上的氨基酸取代为半胱氨酸的 pChSan11.µtp 中编码的人 γ-1 重链的氨基酸序列

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKCLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
```

SEQ ID NO:22

[0255]

与人 γ -1 重链的 Fc 区融合的人 DR4 的胞外域的氨基酸序列 (DR4-Fc)

ASGTEAAAATPSKVWGSSAGRIEPRGGGRGALPTSMGQHGPSARARAGRAPGPRPAREASPRLRVH
KTFKFVVVGVLQVVPSSAATIKLHDQSIGTQQWEHSPLGELCPPGSHRSEHPGACNRCTEGVGYT
NASNNLFACLPCTACKSDEEERSPCTTTTRNTACQCKPGTFRNDNSAEMCRKCSTGCPRGMVKVKDC
TPWSDIECVHKESGNGHNTGGGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:23

鼠单克隆抗体 YON007 VH 的氨基酸序列

MNRLTSSLLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGL
EWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLKISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCTRRGEYGNFDYWGQGT
TLTVSS

SEQ ID NO:24

YON007 VH 的 CDR1 的氨基酸序列

TSGMG

SEQ ID NO:25

YON007 VH 的 CDR2 的氨基酸序列

HIYWDDDKRYNPSLKS

SEQ ID NO:26

YON007 VH 的 CDR2 的氨基酸序列

RGEYGNFDY

SEQ ID NO:27

鼠单克隆抗体 YON007 VL 的氨基酸序列

MAWISLILSLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSSGAVTTSNFANWVQEKPDHLETT
GLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEALYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO:28

[0256]

YON007 VL 的 CDR1 的氨基酸序列

RSSSGAVTTSNFAN

SEQ ID NO:29

YON007 VL 的 CDR2 的氨基酸序列

GTNNRAP

SEQ ID NO:30

YON007 VL 的 CDR3 的氨基酸序列

ALWYSNHWV

SEQ ID NO:31

人源化的 YON007 VH 的氨基酸序列

MNRLTSSLLLLLIVPAYVLSQVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKAL
EWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCTRGEYGNFDYWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO:32

人源化的 YON007 VL 的氨基酸序列

MAWISLILSLLLALSSGAISQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSSGAVTTSNFANWVQQTTPGQAPR
GLIGGTNNRAPGVPDRFSGSLLGNKAALTITGAQADDES DY CALWYSNHWVFEGGGTKLTVL

SEQ ID NO:33

编码 HuYON007 VH 的外显子核苷酸序列

ACTAGTACCACCATGAACAGGCTTACTTCCTCATTTGCTGCTGCTGATTGTCCCTGCATATGTCCTG
TCCCAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCTGCCCTGGTGAAACCCACACAGACCTCACACTGACC
TGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATCAGACAGCCCCA
GGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAACCCATCCCTG
AAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAACCAAGTGCTCCTTACAATGACCAACATG
GACCTGTGACACAGCCACCTATTACTGTACTCGGAGAGGGGAGTATGGTAACTTCGACTACTGG
GGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTCTGCTGTACTGAAGCTT

SEQ ID NO:34

编码 HuYON007 VL 的外显子核苷酸序列

[0257]

GCTAGCACCAACCATGGCCTGGATTTCACCTTATCCTCTCTCCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATT
TCCCAGACTGTCGTGACCCAGGAGCCATCCTTCTCAGTGTCCCCTGGAGGGACAGTCACACTCACT
TGTCGCTCAAGTTCTGGGGCTGTTACAACCAGTAACTTTGCCAACTGGGTCCAGCAGACCCCAGGC
CAGGCTCCACGCGGCCTCATCGGCGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCT
GGCTCCATCCTTGGGAACAAAGCTGCCCTCACCATCACCGGGGCCAGGCAGATGATGAATCTGAT
TATTACTGTGCTCTATGGTACAGCAACCACTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
GGTGAGTCTCTTCTCCCCGAATTC

SEQ ID NO:35

pHuYON007 中编码的成熟免疫球蛋白重链的氨基酸序列

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNP
SLK SRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCTRGEYGNFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP
FLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
PKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:36

pHuYON007 中编码的成熟免疫球蛋白轻链的氨基酸序列

QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSSGAVTTSNFANWVQQTTPGQAPRGLIGGTNNRAPG
VPDRFSG SILGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL
FPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY
LSLTPEQWKSHRYSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO:37

pScFv.HuYON007.V279C.μtp. 中编码的成熟单链抗-DR4 抗体的氨基酸序列

QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSSGAVTTSNFANWVQQTTPGQAPRGLIGGTNNRAPG
VPDRFSG SLGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGG
SQVTLRESG PALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDK
RYNP SLK SRLTISKD TSKNQVVLMTNMDPVDATYYCTRGEYGNFDYWGQGLVTVSSSTG
GGEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYCDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKPTLYN
VSLVMSDTAGTCY

SEQ ID NO:38

HuGOH729S VL 的氨基酸序列

MESQIQAFVFVFLWLSGVDGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVNTAAAWYQQK
PGKAPKL LIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQHYSTPYT
FGQGTKLEIK

[0258]

SEQ ID NO:39

HuGOH729S VL 的 CDR1 的氨基酸序列

KASQDVNTAAA

SEQ ID NO:40

HuGOH729S VL 的 CDR2 的氨基酸序列

WASTRHT

SEQ ID NO:41

HuGOH729S VL 的 CDR3 的氨基酸序列

QQHYSTPYT

SEQ ID NO:42

HuGOH729S VH 的氨基酸序列

MEWCWVFLFLLSVTAGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIIHWVRQAPGQGLEW
IGWFYPGNNNIKSNEKFKDRVTLTADTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARNEDNYGNFFGYWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO:43

HuGOH729S VL 的 CDR1 的氨基酸序列

DYIIH

SEQ ID NO:44

HuGOH729S VL 的 CDR2 的氨基酸序列

WFYPGNNNIKSNEKFKD

SEQ ID NO:45

HuGOH729S VL 的 CDR3 的氨基酸序列

NEDNYGNFFGY

SEQ ID NO:46

[0259]

pScFv.HuGOH729S.V279C.µtp.中编码的成熟单链抗-DR5 抗体的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVNTAAAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSG
SGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQHYSTPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAE
VKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIIHWVRQAPGQGLEWIGWFYPGNNNIKSNEKFKDRVTLTADTST
STVYMELSSLRSEDTAVYYCARNEDNYGNFFGYWGQGLVTVSSTGGGEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYCDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

SEQ ID NO:47

在 C 末端与人 λ2 恒定区融合的重组人 DR5 胞外域的氨基酸序列 (DR5-CA)

ALITQQDLAPQQRAAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISEDGRDCISCKYGQDYSTHWNDLLFCLRCTRC
DSGEVELSPCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPEMCRKCRTGCPRGMVKVGDCTPWSDIECVHKESGT
KHSGEAPAVEETVTSSPGTPASPCSTGGGGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT
ESS

[0001]

<110> 鹤下直哉

J. · 云 · 曹

<120> 通过半胱氨酸突变和 μ 尾端多聚化的抗体或融合蛋白

<130> 057761/436134

<150> 61/679, 045

<151> 2012-08-02

<150> 61/767, 724

<151> 2013-02-21

<160> 47

<170> 对 Windows4.0 版本的 FastSEQ

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

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

[0002]

	115	120	125
Val	Trp Gly Ala Gly Thr	Thr Val Thr Val	Ser Ser
130		135	140

<210> 2
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 2
 Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 35 40 45
 Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Gly Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
 85 90 95
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg
 130

<210> 3
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 3
 Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr

[0003]

1	5	10	15
Cys Tyr			
<210> 4			
<211> 348			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 4			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1 5 10 15			
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
20 25 30			
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
35 40 45			
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50 55 60			
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65 70 75 80			
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85 90 95			
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
100 105 110			
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
115 120 125			
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
130 135 140			
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145 150 155 160			
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
165 170 175			
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
180 185 190			
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
195 200 205			
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
210 215 220			
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225 230 235 240			

[0004]

```

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245                      250                      255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260                      265                      270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275                      280                      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290                      295                      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305                      310                      315                      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val
      325                      330                      335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
      340                      345

```

<210> 5
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 5

```

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

```

[0005]

145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
	290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val			
	325	330	335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr			
	340	345	

<210> 6

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 6

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

[0006]

```

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

```

<210> 7

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0007]

<223> 合成

<400> 7

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
  1           5           10           15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      50           55           60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
      65           70           75           80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85           90           95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
      100          105          110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      115          120          125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      130          135          140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      145          150          155          160
Tyr Val Asp Gly Val Cys Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      165          170          175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
      225          230          235          240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val

```

[0008]

	325	330	335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr			
	340	345	
<210> 8 <211> 348 <212> PRT <213> 人工序列			
<220> <223> 合成			
<400> 8			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Cys His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240

[0009]

```

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245                      250                      255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260                      265                      270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275                      280                      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290                      295                      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305                      310                      315                      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val
      325                      330                      335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
      340                      345

```

<210> 9
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 9

```

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

```

[0010]

145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val Cys Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
	290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val			
	325	330	335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr			
	340	345	

<210> 10

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 10

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

[0011]

```

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

```

<210> II

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0012]

<223> 合成

<400> 11

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
  1           5           10           15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      50           55           60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
      65           70           75           80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85           90           95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
      100          105          110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      115          120          125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      130          135          140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      145          150          155          160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Cys Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      165          170          175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
      225          230          235          240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val

```

[0013]

	325	330	335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr			
	340	345	
<210> 12			
<211> 348			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 12			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Cys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240

[0014]

```

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245                      250                      255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260                      265                      270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275                      280                      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290                      295                      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305                      310                      315                      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val
      325                      330                      335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
      340                      345

```

<210> 13

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 13

```

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

```

[0015]

145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Cys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val			
	325	330	335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr			
	340	345	

<210> 14

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 14

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

[0016]

```

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

```

<210> 15

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0017]

<223> 合成

<400> 15

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1           5           10           15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50           55           60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65           70           75           80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85           90           95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
          100          105          110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
          115          120          125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
          130          135          140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
          145          150          155          160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
          165          170          175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Cys Val Leu
          180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
          195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
          210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
          225          230          235          240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
          245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
          260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
          275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
          290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
          305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val

```

[0018]

	325	330	335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr			
	340	345	
<210> 16			
<211> 348			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 16			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Cys			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240

[0019]

```

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245                      250                      255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260                      265                      270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275                      280                      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290                      295                      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305                      310                      315                      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val
      325                      330                      335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
      340                      345

```

<210> 17

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 17

```

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

```

[0020]

145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Cys Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
	225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
	290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
	305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val			
	325	330	335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr			
	340	345	

<210> 18

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 18

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

[0021]

```

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

```

<210> 19

<211> 348

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0022]

<223> 合成

<400> 19

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
  1           5           10           15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      50           55           60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
      65           70           75           80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85           90           95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
      100          105          110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      115          120          125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      130          135          140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      145          150          155          160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      165          170          175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
      225          230          235          240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Cys
      260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val

```

[0023]

	325	330	335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr			
	340	345	
<210> 20			
<211> 348			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 20			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240

[0024]

```

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245                      250                      255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260                      265                      270
Cys Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275                      280                      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290                      295                      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305                      310                      315                      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val
      325                      330                      335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
      340                      345

```

<210> 21
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 21

```

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

```

[0025]

145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Cys Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val			
	325	330	335
Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr			
	340	345	

<210> 22

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 22

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

[0026]

Val	His	Lys	Thr	Phe	Lys	Phe	Val	Val	Val	Gly	Val	Leu	Leu	Gln	Val
65					70					75				80	
Val	Pro	Ser	Ser	Ala	Ala	Thr	Ile	Lys	Leu	His	Asp	Gln	Ser	Ile	Gly
				85					90					95	
Thr	Gln	Gln	Trp	Glu	His	Ser	Pro	Leu	Gly	Glu	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly
				100				105					110		
Ser	His	Arg	Ser	Glu	His	Pro	Gly	Ala	Cys	Asn	Arg	Cys	Thr	Glu	Gly
				115			120						125		
Val	Gly	Tyr	Thr	Asn	Ala	Ser	Asn	Asn	Leu	Phe	Ala	Cys	Leu	Pro	Cys
				130			135					140			
Thr	Ala	Cys	Lys	Ser	Asp	Glu	Glu	Glu	Arg	Ser	Pro	Cys	Thr	Thr	Thr
145					150					155					160
Arg	Asn	Thr	Ala	Cys	Gln	Cys	Lys	Pro	Gly	Thr	Phe	Arg	Asn	Asp	Asn
				165					170					175	
Ser	Ala	Glu	Met	Cys	Arg	Lys	Cys	Ser	Thr	Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Met
				180				185					190		
Val	Lys	Val	Lys	Asp	Cys	Thr	Pro	Trp	Ser	Asp	Ile	Glu	Cys	Val	His
				195				200					205		
Lys	Glu	Ser	Gly	Asn	Gly	His	Asn	Thr	Gly	Gly	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser
				210			215					220			
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
				260				265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
				275				280					285		
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
				290				295					300		
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310					315					320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
				325					330					335	
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
				340					345					350	
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
				355				360					365		
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
				370				375					380		
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
385					390					395					400
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
				405					410					415	

[0027]

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 23
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 23
 Met Asn Arg Leu Thr Ser Ser Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
 20 25 30
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45
 Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Lys Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser
 85 90 95
 Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

[0028]

<400> 24

Thr Ser Gly Met Gly

1 5

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 25

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 26

Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Phe Asp Tyr

1 5

<210> 27

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 27

Met Ala Trp Ile Ser Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ser Gly

1 5 10 15

Ala Ile Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser

[0029]

78

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 30

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
1 5

<210> 31

<211> 138

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 31

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

<210> 32

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

[0031]

<220>

<223> 合成

<400> 32

```

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

```

<210> 33

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 33

```

Ala Cys Thr Ala Gly Thr Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Ala
 1           5           10           15
Ala Cys Ala Gly Gly Cys Thr Thr Ala Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys
          20           25           30
Ala Thr Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Thr Thr
          35           40           45
Gly Thr Cys Cys Cys Thr Gly Cys Ala Thr Ala Thr Gly Thr Cys Cys
          50           55           60
Thr Gly Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Thr Thr
          65           70           75           80
Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Thr Cys Cys Thr
          85           90           95
Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Cys Cys Ala

```

[0032]

100						105						110							
Cys	Ala	Cys	Ala	Gly	Ala	Cys	Cys	Cys	Thr	Cys	Ala	Cys	Ala	Cys	Thr				
115						120						125							
Gly	Ala	Cys	Cys	Thr	Gly	Cys	Ala	Cys	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Cys	Thr				
130						135						140							
Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Cys	Thr	Cys	Ala	Cys	Thr	Cys	Ala	Gly	Cys	Ala				
145						150						155						160	
Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Thr				
165						170						175							
Gly	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Cys	Ala	Gly	Ala	Cys	Ala	Gly				
180						185						190							
Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Cys	Cys	Cys				
195						200						205							
Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Cys	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Cys	Ala				
210						215						220							
Cys	Ala	Thr	Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Gly	Ala	Thr				
225						230						235						240	
Gly	Ala	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Gly	Cys	Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	Cys	Cys				
245						250						255							
Cys	Ala	Thr	Cys	Cys	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Cys	Ala	Gly				
260						265						270							
Gly	Cys	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Thr	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Ala	Gly				
275						280						285							
Gly	Ala	Cys	Ala	Cys	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Cys	Cys				
290						295						300							
Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys	Cys	Thr	Thr	Ala	Cys	Ala	Ala	Thr				
305						310						315						320	
Gly	Ala	Cys	Cys	Ala	Ala	Cys	Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Cys	Cys	Cys	Thr				
325						330						335							
Gly	Thr	Cys	Gly	Ala	Cys	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys	Ala	Cys	Cys	Thr				
340						345						350							
Ala	Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Thr	Ala	Cys	Thr	Cys	Gly	Gly	Ala	Gly				
355						360						365							
Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Cys				
370						375						380							
Thr	Thr	Cys	Gly	Ala	Cys	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys				
385						390						395						400	
Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Cys	Cys	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Cys				
405						410						415							
Cys	Gly	Thr	Cys	Thr	Cys	Cys	Thr	Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Gly				
420						425						430							
Thr	Cys	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly	Thr	Ala	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Cys				
435						440						445							
Thr	Thr																		

[0033]

450

<210> 34

<211> 420

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 34

```

Gly Cys Thr Ala Gly Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly
 1           5           10           15
Cys Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr Ala Thr
      20           25           30
Cys Cys Thr Cys Thr Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Cys Thr
      35           40           45
Cys Thr Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala
      50           55           60
Thr Thr Thr Cys Cys Cys Ala Gly Ala Cys Thr Gly Thr Cys Gly Thr
65           70           75           80
Gly Ala Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly Cys Cys Ala Thr Cys Cys
      85           90           95
Thr Thr Cys Thr Cys Ala Gly Thr Gly Thr Cys Cys Cys Cys Thr Gly
      100          105          110
Gly Ala Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Ala Cys Thr
      115          120          125
Cys Ala Cys Thr Thr Gly Thr Cys Gly Cys Thr Cys Ala Ala Gly Thr
      130          135          140
Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Ala Cys Ala Ala
145          150          155          160
Cys Cys Ala Gly Thr Ala Ala Cys Thr Thr Thr Gly Cys Cys Ala Ala
      165          170          175
Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Cys Cys
      180          185          190
Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Ala Cys
      195          200          205
Gly Cys Gly Gly Cys Cys Thr Cys Ala Thr Cys Gly Gly Cys Gly Gly
      210          215          220
Thr Ala Cys Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Cys Gly Ala Gly Cys Thr
225          230          235          240
Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Thr Cys
      245          250          255

```

[0034]

Gly Cys Thr Thr Cys Thr Cys Thr Gly Gly Cys Thr Cys Cys Ala Thr
 260 265 270
 Cys Cys Thr Thr Gly Gly Gly Ala Ala Cys Ala Ala Ala Gly Cys Thr
 275 280 285
 Gly Cys Cys Cys Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Gly
 290 295 300
 Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala Gly Gly Cys Ala Gly Ala Thr Gly Ala
 305 310 315 320
 Thr Gly Ala Ala Thr Cys Thr Gly Ala Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys
 325 330 335
 Thr Gly Thr Gly Cys Thr Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Ala Cys Ala
 340 345 350
 Gly Cys Ala Ala Cys Cys Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Thr Thr
 355 360 365
 Cys Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Gly
 370 375 380
 Cys Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr Cys Cys Thr Ala Gly Gly Thr Gly
 385 390 395 400
 Ala Gly Thr Cys Thr Cys Thr Thr Cys Thr Cys Cys Cys Cys Gly Ala
 405 410 415
 Ala Thr Thr Cys
 420

<210> 35

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 35

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

[0035]

85																90						95					
Cys	Thr	Arg	Arg	Gly	Glu	Tyr	Gly	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly												
100								105				110															
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe												
115								120				125															
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu												
130								135				140															
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp												
145								150				155				160											
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu												
165								170				175															
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser												
180								185				190															
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro												
195								200				205															
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys												
210								215				220															
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro												
225								230				235				240											
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser												
245								250				255															
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp												
260								265				270															
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn												
275								280				285															
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val												
290								295				300															
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu												
305								310				315				320											
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys												
325								330				335															
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr												
340								345				350															
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr												
355								360				365															
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu												
370								375				380															
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu												
385								390				395				400											
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys												
405								410				415															
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu												
420								425				430															
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu												

[0036]

435	440	445
Lys		
<210> 36		
<211> 215		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成		
<400> 36		
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Ser Gly Ala Val Thr Thr Ser		
20 25 30		
Asn Phe Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly		
35 40 45		
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe		
50 55 60		
Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala		
65 70 75 80		
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn		
85 90 95		
His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro		
100 105 110		
Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu		
115 120 125		
Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro		
130 135 140		
Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala		
145 150 155 160		
Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala		
165 170 175		
Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg		
180 185 190		
Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr		
195 200 205		
Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
210 215		

[0037]

<210> 37
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 37

```

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

```

[0038]

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

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 39

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 40

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0040]

<220>

<223> 合成

<400> 41

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 42

<211> 139

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 42

Met Glu Trp Cys Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35

40

45

Thr Asp Tyr Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Asn Asn Asn Ile Lys Ser Asn

65

70

75

80

Glu Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser

85

90

95

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

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Glu Asp Asn Tyr Gly Asn Phe Phe Gly Tyr

115

120

125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130

135

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0041]

<223> 合成

<400> 43

Asp Tyr Ile Ile His

1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 44

Trp Phe Tyr Pro Gly Asn Asn Asn Ile Lys Ser Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 45

Asn Glu Asp Asn Tyr Gly Asn Phe Phe Gly Tyr

1 5 10

<210> 46

<211> 496

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 46

[0042]

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Thr	Ala
			20					25					30		
Ala	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50			55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Thr	Pro	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
			100					105					110		
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln
			115				120					125			
Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys
			130				135				140				
Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ile	Ile	His	Trp	Val	Arg
145					150					155				160	
Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Trp	Phe	Tyr	Pro	Gly
				165					170					175	
Asn	Asn	Asn	Ile	Lys	Ser	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Leu
			180					185					190		
Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu
			195				200					205			
Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Glu	Asp	Asn
			210				215					220			
Tyr	Gly	Asn	Phe	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
225					230					235				240	
Ser	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
			245						250				255		
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
			260					265					270		
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
			275				280					285			
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
			290				295					300			
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Cys	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
305					310					315				320	
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
			325						330					335	
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
			340					345					350		

[0043]

```

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
      355                360                365
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
      370                375                380
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
385                390                395                400
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
      405                410                415
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
      420                425                430
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
      435                440                445
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
      450                455                460
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Pro Thr
465                470                475                480
Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
      485                490                495

```

<210> 47

<211> 267

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 47

```

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

```

[0044]

115	120	125
Glu Ser Gly Thr Lys His Ser Gly Glu Ala Pro Ala Val Glu Glu Thr		
130	135	140
Val Thr Ser Ser Pro Gly Thr Pro Ala Ser Pro Cys Ser Thr Gly Gly		
145	150	155
Gly Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser		
165	170	175
Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser		
180	185	190
Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser		
195	200	205
Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn		
210	215	220
Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp		
225	230	235
Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr		
245	250	255
Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Ser Ser		
260	265	

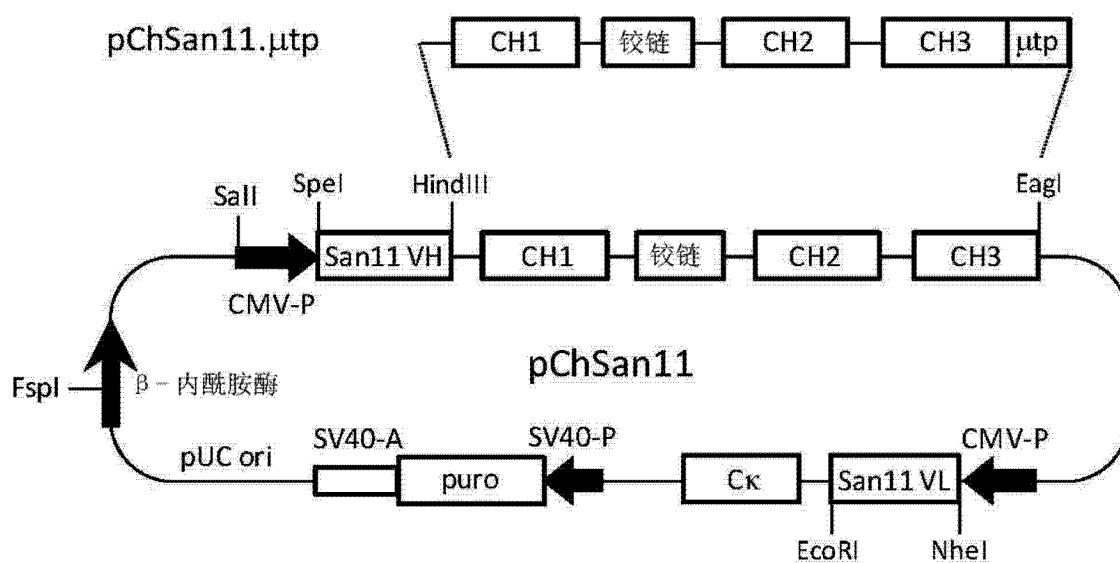


图 1

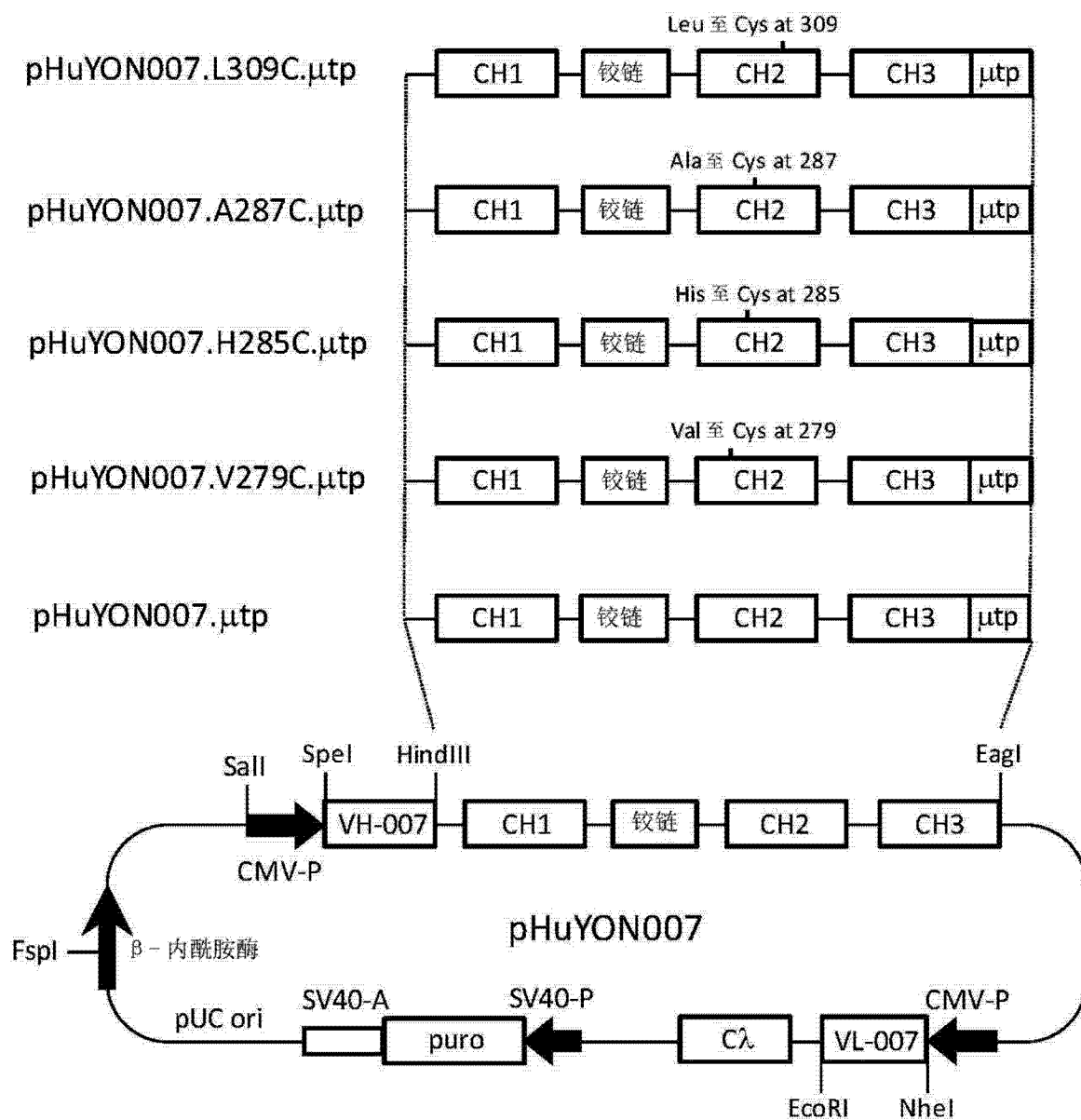


图 2

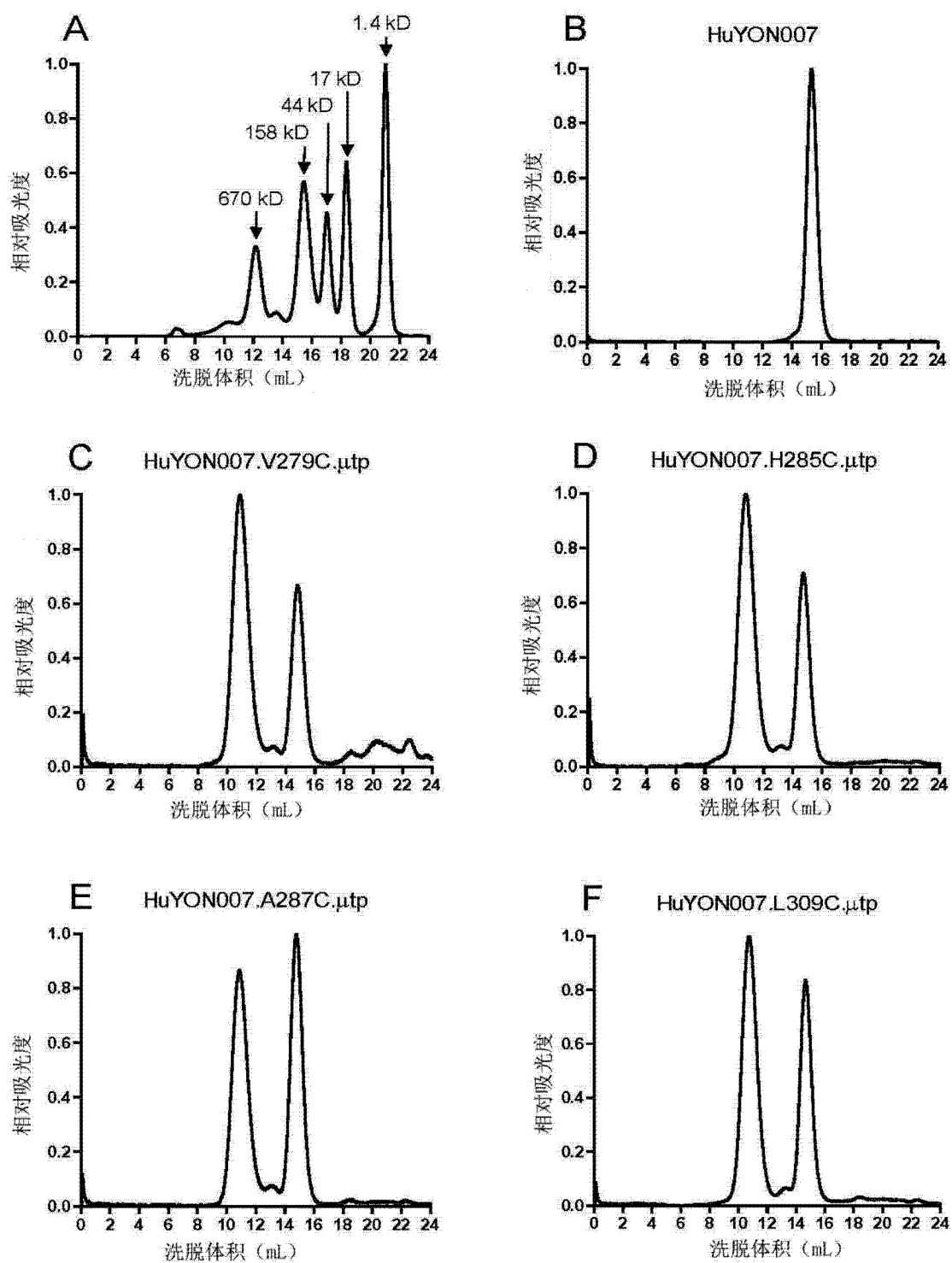


图 3A-F

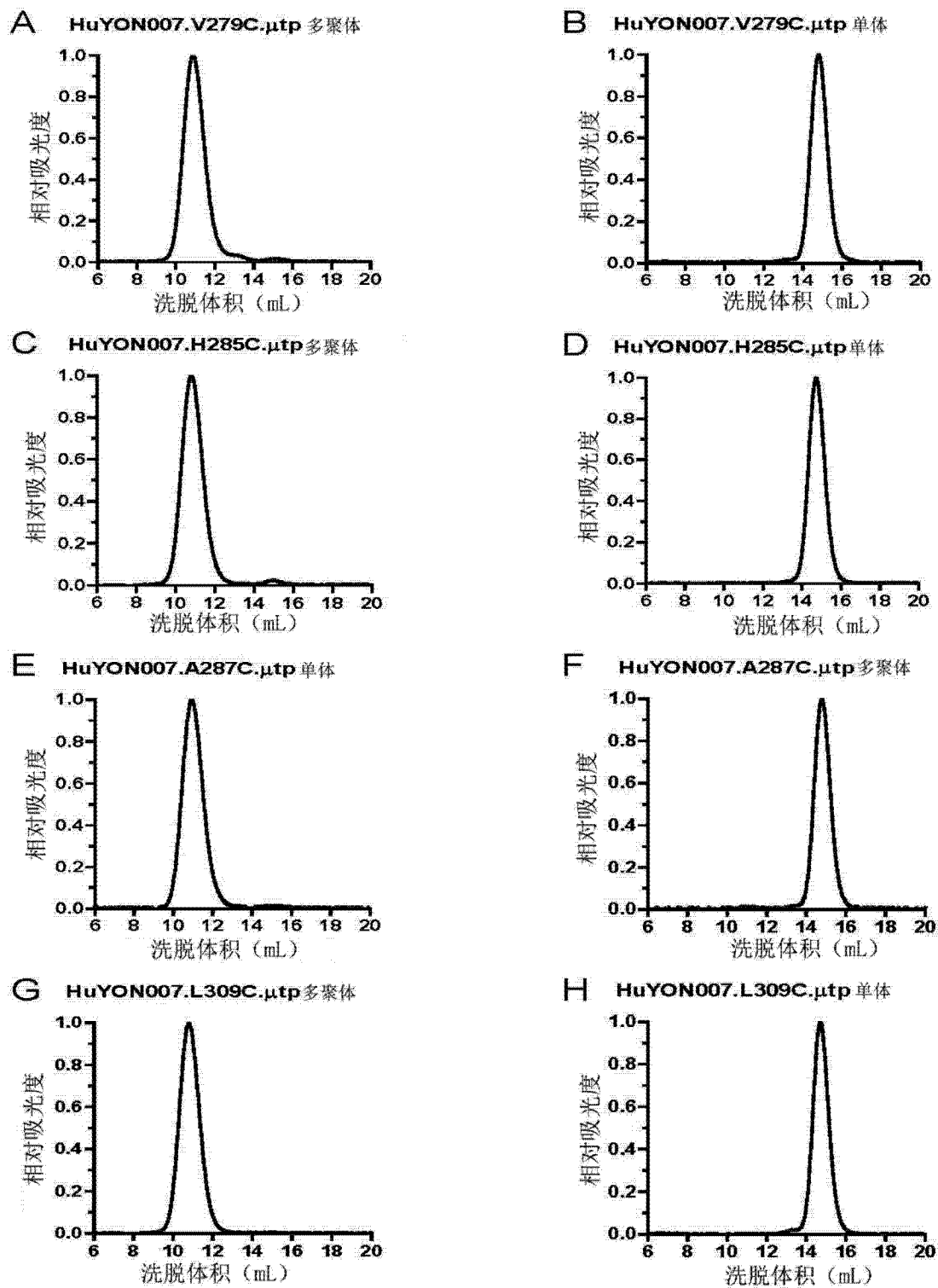


图 4A-H

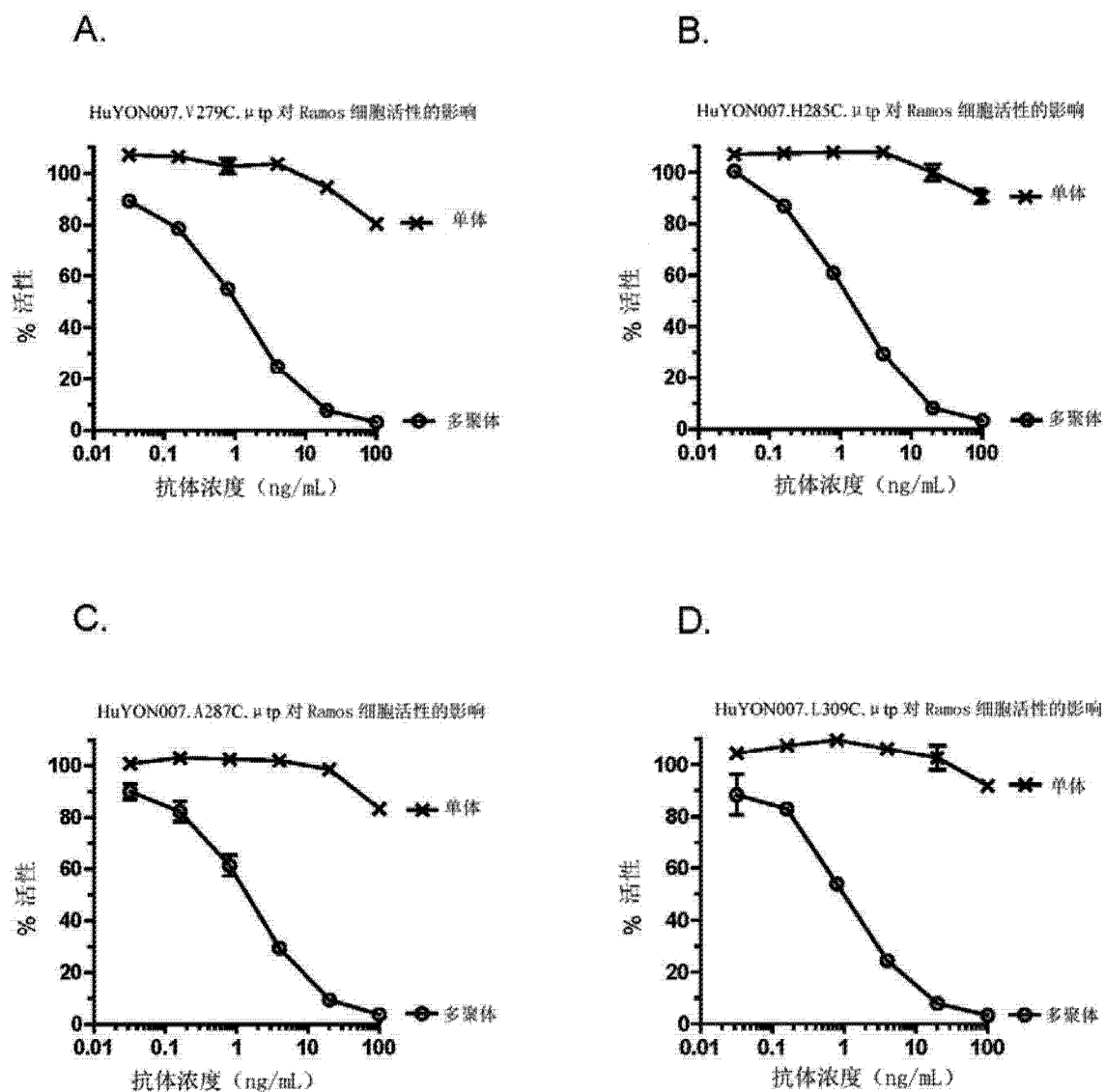


图 5A-D

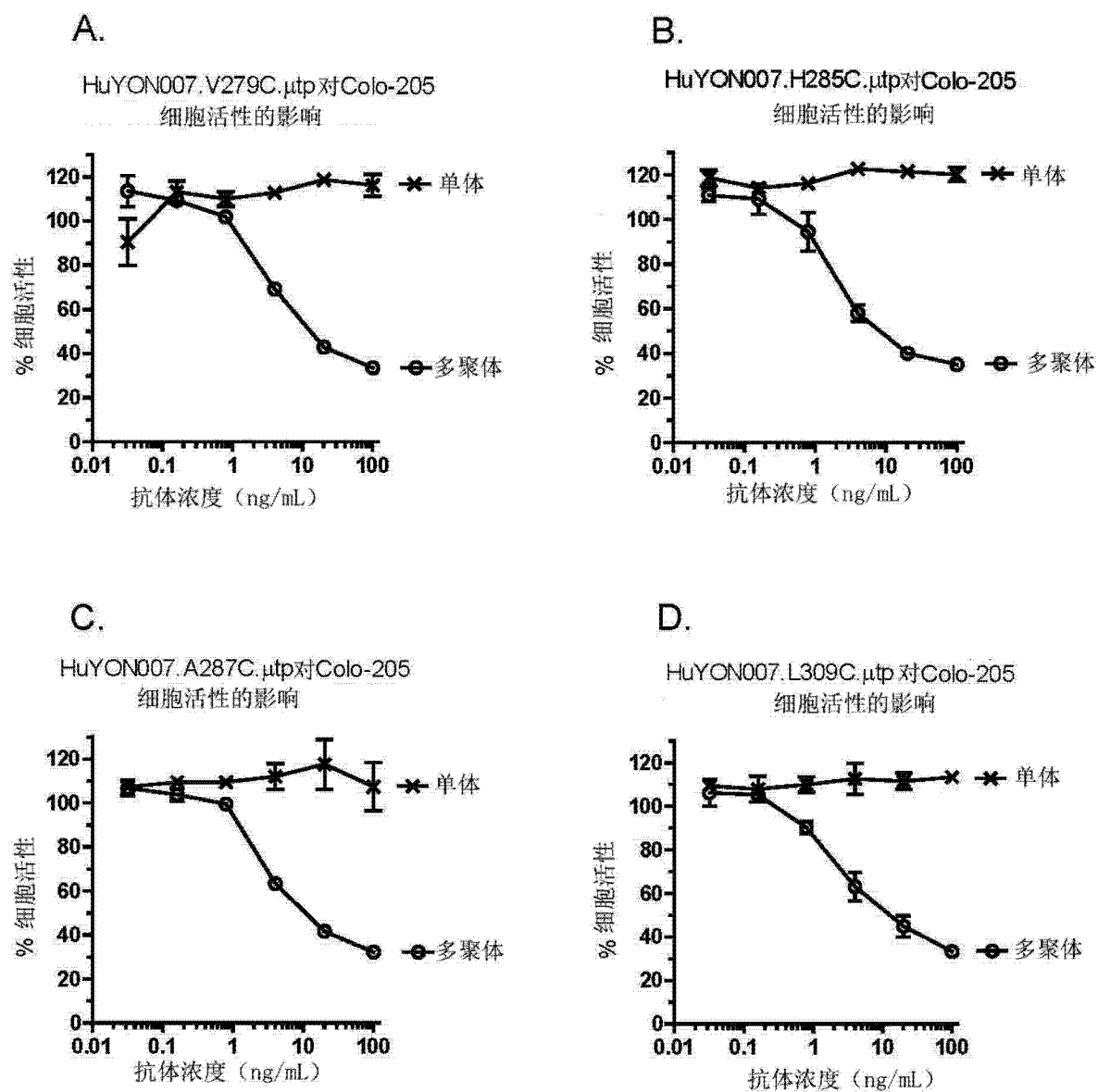


图 6A-D

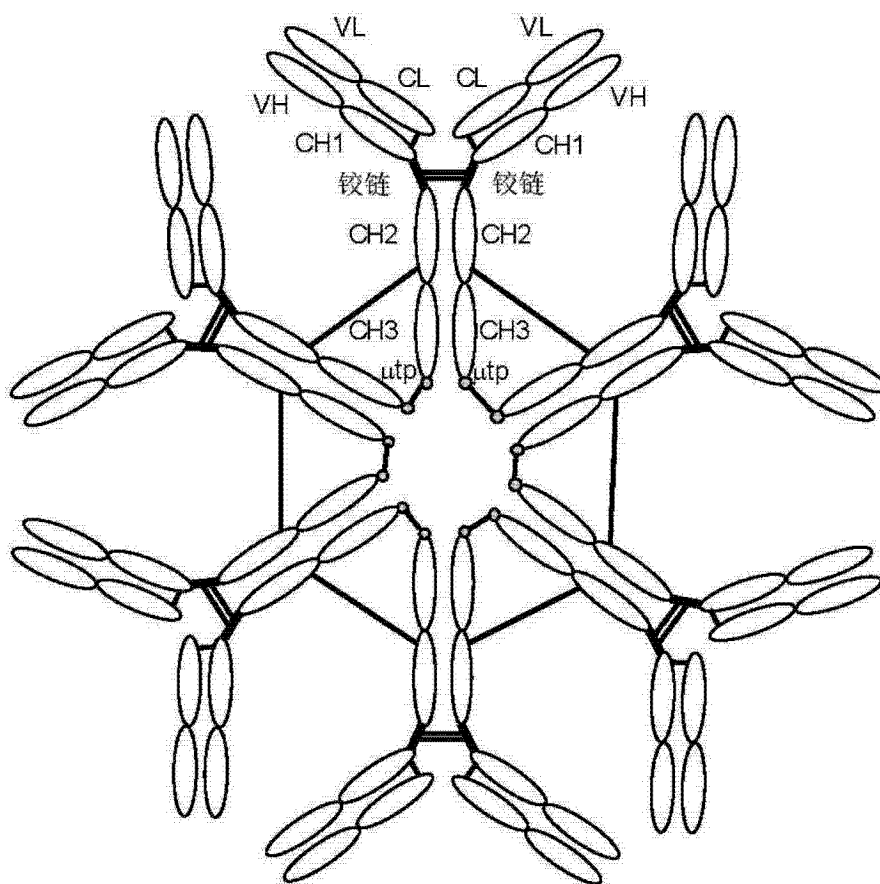


图 7

人 γ -1 重链恒定区

CH1:ASTKGPSVF~~FLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~VS~~WNSGALTSGVHTFPAVLQSS~~
GLYSLSSV~~TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV~~

铰链:EPKSCDKTHTCPPCP

CH2:APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

CH3:GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~FSCSV~~MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

人 γ -1 重链恒定区

CH1:ASTKGPSVF~~FLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT~~VS~~WNSGALTSGVHTFPAVLQSS~~
GLYSLSSV~~TVPSNFGTQTYTCNV~~DHKPSNTKVDKTV

铰链:ERKCCVECPPCP

CH2:APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTFRVVS~~VLT~~VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK

CH3:GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~FSCSV~~MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

人 γ -3 重链恒定区

CH1:ASTKGPSVF~~FLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~VS~~WNSGALTSGVHTFPAVLQSS~~
GLYSLSSV~~TVPSSSLGTQTYTCNV~~NHKPSNTKVDKRV

铰链:ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
RCP

CH2:APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTFRVVS~~VLT~~VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK

CH3:GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIF~~SCSV~~MHEALHNRFTQKSLSLSPGK

图 8A

人 γ -4 重链恒定区

CH1:ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRV

铰链:ESKYGPPCPSCP

CH2:APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

CH3:GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

图 8B

人 μ 尾端

PTLYNVSLVMSDTAGTCY

J-链 (aa1-22=信号肽)

MKNHLLFWGVLAVFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSEDPNEDIVERNI
RIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSAT
ETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPD

图 8C

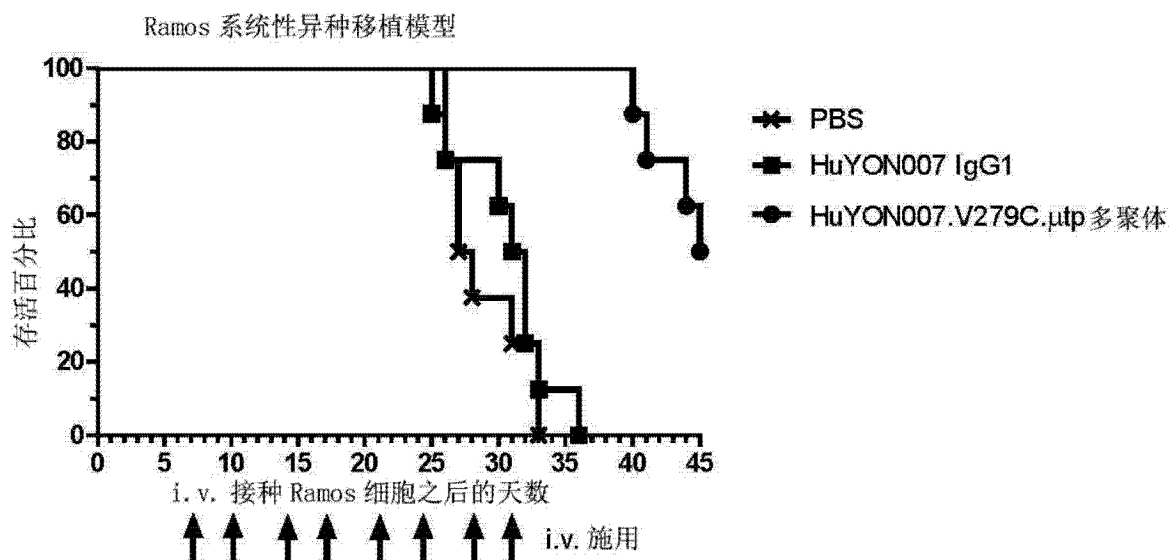


图 9

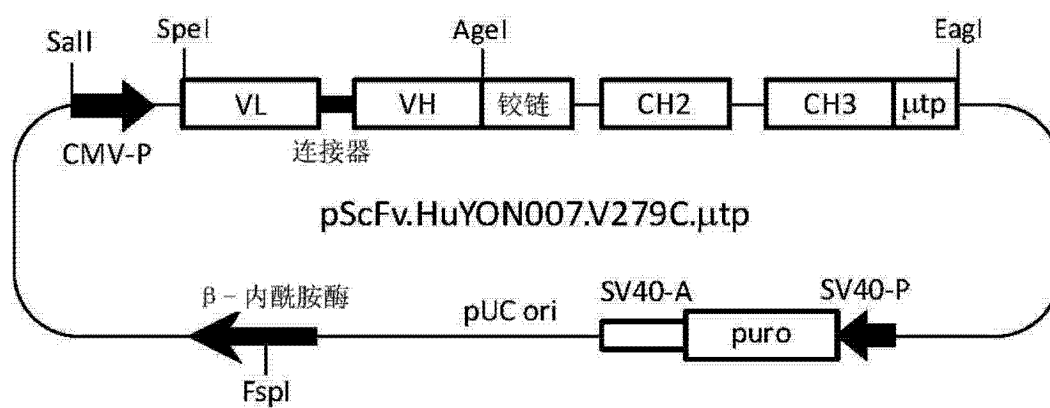


图 10