



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113271956 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 29

(21) 申请号 201980088092.4

(22) 申请日 2019.12.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113271956 A

(43) 申请公布日 2021.08.17

(30) 优先权数据
62/776,409 2018.12.06 US
62/778,062 2018.12.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.07.06

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/064779 2019.12.05

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/118109 EN 2020.06.11

(73) 专利权人 西托姆克斯治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 O·瓦西尔杰瓦 M·B·温特

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

专利代理师 王丹丹 王云红

(51) Int.Cl.
A61K 38/05 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 106163556 A,2016.11.23
CN 106459153 A,2017.02.22

审查员 邱丹腾

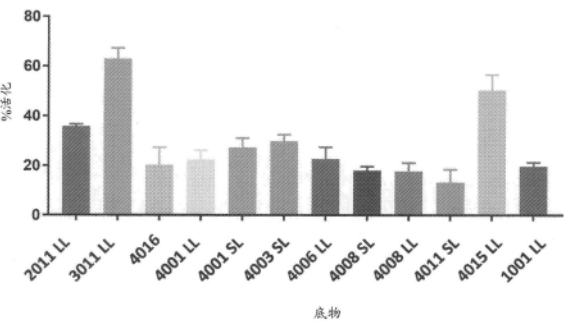
权利要求书5页 说明书113页
序列表112页 附图9页

(54) 发明名称

基质金属蛋白酶可裂解的和丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶可裂解的底物及其使用方法

(57) 摘要

本发明大体上涉及多肽,其包含作为至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的至少第一可裂解部分(CM1)以及作为至少一种丝氨酸蛋白酶(SP)或至少一种半胱氨酸蛋白酶(CP)的底物的至少第二可裂解部分(CM2);涉及包含这些多肽的可活化抗体和其他较大分子,所述多肽包含作为至少一种MMP蛋白酶的底物的至少CM1以及作为至少一种SP蛋白酶或至少一种半胱氨酸蛋白酶(CP)的底物的至少CM2;并且涉及制备这些多肽并在多种治疗性、诊断性和预防性适应症中使用这些多肽的方法,所述多肽包含作为至少一种MMP蛋白酶的底物的至少CM1以及作为至少一种SP蛋白酶或至少一种半胱氨酸蛋白酶(CP)的底物的至少CM2。



1. 一种包含串联底物的分离的多肽,其中所述串联底物包含作为至少一种基质金属蛋白酶MMP的底物的至少第一可裂解部分CM1以及作为至少一种丝氨酸蛋白酶SP的底物的至少第二可裂解部分CM2,

其中CM1包含如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列ALAHGLF以及CM2包含如SEQ ID NO:131所示的氨基酸序列APRS,并且

其中所述串联底物的N端至C端排列为CM1-CM2或CM2-CM1;

其中CM1和CM2彼此直接连接使得所述串联底物包含选自SEQ ID NO:31和32组成的组的氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的分离的多肽,其中所述CM2包含选自以下组成的组的SP酶的底物:尿激酶、蛋白裂解酶和中性粒细胞弹性蛋白酶。

3. 如权利要求1所述的分离的多肽,其中所述MMP为MMP2、MMP9或MMP14。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的分离的多肽,其中所述串联底物包含如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列。

5. 如权利要求1至3中任一项所述的分离的多肽,其中所述串联底物包含如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列。

6. 一种分离的多肽,其包含:

抗体或其抗原结合片段AB;

串联底物,其包括作为至少一种基质金属蛋白酶MMP的底物的至少第一可裂解部分CM1,以及

作为至少一种丝氨酸蛋白酶SP的底物的至少第二可裂解部分CM2,

其中CM1包含如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列ALAHGLF以及CM2包含如SEQ ID NO:131所示的氨基酸序列APRS,并且

其中所述串联底物的N端至C端排列为CM1-CM2或CM2-CM1;

其中CM1和CM2彼此直接连接使得所述串联底物包含选自SEQ ID NO:31和32组成的组的氨基酸序列。

7. 如权利要求6所述的分离的多肽,其中所述CM2包含选自以下组成的组的SP酶的底物:尿激酶、蛋白裂解酶和中性粒细胞弹性蛋白酶。

8. 如权利要求6所述的分离的多肽,其中所述MMP为MMP2、MMP9或MMP14。

9. 如权利要求6至8中任一项所述的分离的多肽,其中所述串联底物包含如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列。

10. 如权利要求6至8中任一项所述的分离的多肽,其中所述串联底物包含如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列。

11. 如权利要求6至8中任一项所述的分离的多肽,其中所述MMP和SP中的至少一种与靶标共定位在组织中。

12. 如权利要求6至8中任一项所述的分离的多肽,其中所述抗原结合片段选自以下组成的组:Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。

13. 如权利要求6至8中任一项所述的分离的多肽,其中所述AB连接至所述CM1。

14. 如权利要求13所述的分离的多肽,其中所述AB直接连接至所述CM1。

15. 如权利要求13所述的分离的多肽,其中所述AB通过连接肽连接至所述CM1。
16. 如权利要求6至8中任一项所述的分离的多肽,其中所述AB连接至CM2。
17. 如权利要求16所述的分离的多肽,其中所述AB直接连接至CM2。
18. 如权利要求16所述的分离的多肽,其中所述AB通过连接肽连接至所述CM2。
19. 如权利要求6至8中任一项所述的分离的多肽,
其中所述AB包含抗体或其抗原结合片段的轻链可变区,并且
其中所述CM1或所述CM2连接至所述AB的所述轻链可变区的N端。
20. 如权利要求6至8中任一项所述的分离的多肽,
其中所述AB包含抗体或其抗原结合片段的轻链可变区,并且
其中所述CM1或所述CM2连接至所述AB的所述轻链可变区的N端。
21. 如权利要求6至8中任一项所述的分离的多肽,其中所述分离的多肽包含掩蔽部分MM。
22. 如权利要求21所述的分离的多肽,其中所述MM与所述AB结合的解离常数大于所述AB与靶标结合的解离常数。
23. 如权利要求21所述的分离的多肽,其中所述MM是长度不超过40个氨基酸的多肽。
24. 如权利要求21所述的分离的多肽,其中所述MM与所述CM1连接,使得所述分离的多肽在未裂解状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2-AB或AB-CM2-CM1-MM。
25. 如权利要求24所述的分离的多肽,其中所述分离的多肽包含所述MM与所述CM1之间的连接肽。
26. 如权利要求24所述的分离的多肽,其中所述分离的多肽包含CM2与所述AB之间的连接肽。
27. 如权利要求24所述的分离的多肽,其中所述分离的多肽包含
所述MM与所述CM1之间的连接肽;和
所述CM2与所述AB之间的连接肽。
28. 如权利要求21所述的分离的多肽,其中所述MM与CM2连接,使得所述分离的多肽在未裂解状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM2-CM1-AB或AB-CM1-CM2-MM。
29. 如权利要求28所述的分离的多肽,其中所述分离的多肽包含所述MM与所述CM2之间的连接肽。
30. 如权利要求28所述的分离的多肽,其中所述分离的多肽包含CM1与所述AB之间的连接肽。
31. 如权利要求28所述的分离的多肽,其中所述分离的多肽包含
所述MM与所述CM2之间的连接肽;和
所述CM1与所述AB之间的连接肽。
32. 如权利要求21所述的分离的多肽,
其中所述AB包含抗体或其抗原结合片段的轻链可变区,并且
其中所述CM1或所述CM2连接至所述AB的所述轻链可变区的N端。
33. 如权利要求21所述的分离的多肽,
其中所述AB包含抗体或其抗原结合片段的轻链可变区,并且
其中所述CM1或所述CM2连接至所述AB的所述轻链可变区的N端。

34. 如权利要求21所述的分离的多肽,其中所述分离的多肽包含第一连接肽LP1和第二连接肽LP2,并且其中所述分离的多肽在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:MM-LP1-CM1-CM2-LP2-AB、AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM、MM-LP1-CM2-CM1-LP2-A B或AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM。

35. 如权利要求34所述的分离的多肽,其中所述两个连接肽彼此不相同。

36. 如权利要求34或35所述的分离的多肽,其中LP1和LP2中的每一个是长度为1至20个氨基酸的肽。

37. 如权利要求34或35所述的分离的多肽,其中所述分离的多肽包含CM1与CM2之间的第三连接肽LP'。

38. 如权利要求34或35所述的分离的多肽,其中LP1或LP2包含以下氨基酸序列:如SEQ ID NO:202所示的GGSG、如SEQ ID NO:203所示的GGSGG、如SEQ ID NO:204所示的GSGSG、如SEQ ID NO:205所示的GSGGG、如SEQ ID NO:206所示的GGGSG或如SEQ ID NO:207所示的GSSSG。

39. 如权利要求34或35所述的分离的多肽,其中LP1包含以下氨基酸序列:如SEQ ID NO:208所示的GSSGGSGSGSGSG、如SEQ ID NO:209所示的GSSGGSGSGSGG、如SEQ ID NO:210所示的GSSGGSGSGSGGS、如SEQ ID NO:211所示的GSSGGSGSGSGSGSGGS、如SEQ ID NO:212所示的GSSGGSGSGSG或如SEQ ID NO:213所示的GSSGGSGSGSGS、如SEQ ID NO:214所示的GGGSSSGGS或如SEQ ID NO:215所示的GGGS。

40. 如权利要求34或35所述的分离的多肽,其中LP2包含以下氨基酸序列:GSS、GGS、如SEQ ID NO:215所示的GGGS、如SEQ ID NO:216所示的GSSGT或如SEQ ID NO:217所示的GSSG。

41. 如权利要求34或35所述的分离的多肽,其中LP1包含以下氨基酸序列:如SEQ ID NO:208所示的GSSGGSGSGSGSG或如SEQ ID NO:214所示的GGGSSSGGS,并且其中LP2包含以下氨基酸序列:GGS或如SEQ ID NO:215所示的GGGS。

42. 如权利要求34或35所述的分离的多肽,

其中所述AB包含抗体或其抗原结合片段的轻链可变区,并且其中所述LP2连接至所述AB的所述轻链可变区的N端。

43. 如权利要求34所述的分离的多肽,

其中所述AB包含抗体或其抗原结合片段的重链可变区,并且其中所述LP2连接至所述AB的所述重链可变区的N端。

44. 如权利要求22所述的分离的多肽,其中所述MM的氨基酸序列与所述靶标的氨基酸序列不同,并且与所述AB的天然结合配偶体的氨基酸序列不超过10%相同。

45. 如权利要求22所述的分离的多肽,其中所述MM在裂解状态下不干扰或竞争所述AB与所述靶标的结合。

46. 如权利要求1至3和6至8中任一项所述的分离的多肽,其中MMP9和MMP14对所述第一可裂解部分CM1的可裂解性各自为至少80%。

47. 如权利要求1至3和6至8中任一项所述的分离的多肽,其中MMP9和MMP14对所述第一可裂解部分CM1的可裂解性各自为至少85%。

48. 如权利要求1至3和6至8中任一项所述的分离的多肽,其中MMP9和MMP14对所述第一

可裂解部分CM1的可裂解性各自为至少90%。

49. 如权利要求1至3和6至8中任一项所述的分离的多肽,其中所述第一可裂解部分CM1的体内稳定性小于25%活化。

50. 如权利要求1至3和6至8中任一项所述的分离的多肽,其中MMP9和MMP14对所述串联底物的可裂解性各自为至少30%。

51. 如权利要求1至3和6至8中任一项所述的分离的多肽,其中MMP9和MMP14对所述串联底物的可裂解性各自为至少50%。

52. 如权利要求1至3和6至8中任一项所述的分离的多肽,其中MMP9和MMP14对所述串联底物的可裂解性各自为至少70%。

53. 如权利要求1至3和6至8中任一项所述的分离的多肽,其中MMP9和MMP14对所述串联底物的可裂解性各自为至少50%,并且中性粒细胞弹性蛋白酶对所述串联底物的可裂解性为至少50%。

54. 如权利要求1至3和6至8中任一项所述的分离的多肽,其中MMP9和MMP14对所述串联底物的可裂解性各自为至少70%,并且中性粒细胞弹性蛋白酶对所述串联底物的可裂解性为至少70%。

55. 如权利要求1至3和6至8中任一项所述的分离的多肽,其中所述第一可裂解部分CM1的体内稳定性小于40%活化。

56. 如权利要求1至3和6至8中任一项所述的分离的多肽,其中所述第一可裂解部分CM1的体内稳定性小于30%活化。

57. 一种缀合的多肽,其包含与剂缀合的如权利要求6至56中任一项所述的分离的多肽,其中所述剂选自由以下组成的组:

- a) 毒素或其片段;
- b) 微管抑制剂;
- c) 核酸损伤剂;
- d) 多拉司他汀或其衍生物;
- e) 瑞奥西汀或其衍生物;
- f) 美登木素生物碱或其衍生物;
- g) 倍癌霉素或其衍生物;
- h) 卡奇霉素或其衍生物;
- i) 吡咯并苯并二氮杂草或其衍生物;
- j) 瑞奥西汀E或其衍生物;
- k) 单甲基瑞奥西汀E (MMAE);
- l) 单甲基瑞奥西汀D (MMAD);
- m) 美登木素生物碱DM1;
- n) 美登木素生物碱DM4; 以及
- o) 可检测部分。

58. 如权利要求57所述的缀合的多肽,其中所述可检测部分为诊断剂。

59. 一种药物组合物,其包含:

如权利要求6至56中任一项所述的分离的多肽; 以及

载剂。

60. 如权利要求59所述的药物组合物,其包含另外的剂。

61. 如权利要求60所述的药物组合物,其中所述另外的剂为治疗剂。

62. 一种分离的核酸分子,其编码如权利要求6至56中任一项所述的分离的多肽。

63. 一种载体,其包含如权利要求62所述的分离的核酸分子。

64. 一种产生抗体或可活化抗体的方法,其通过在导致如权利要求6至56中任一项所述的分离的多肽表达的条件下培养细胞来进行,其中所述细胞包含如权利要求62所述的分离的核酸分子。

65. 如权利要求6至56中任一项所述的分离的多肽或如权利要求59至61中任一项所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗病症或疾病、缓解所述病症或疾病的症状或延迟所述病症或疾病的进展,其中所述药物包括治疗有效量的如权利要求6至56中任一项所述的分离的多肽或如权利要求59至61中任一项所述的药物组合物;其中所述病症或疾病为癌症。

66. 如权利要求65所述的用途,其中所述药物包括另外的剂。

67. 如权利要求66所述的用途,其中所述另外的剂为治疗剂。

基质金属蛋白酶可裂解的和丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶可裂解的底物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年12月6日提交的美国临时申请号62/776,409和2018年12月11日提交的美国临时申请号62/778,062的权益,所述临时申请的内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明大体上涉及多肽,其包含作为至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的至少第一可裂解部分(CM1)以及作为至少一种丝氨酸蛋白酶(SP)和/或至少一种半胱氨酸蛋白酶(CP)的底物的至少第二可裂解部分(CM2);涉及包含这些多肽的可活化抗体和其他较大分子,所述多肽包含作为至少一种MMP蛋白酶的底物的至少CM1以及作为至少一种SP蛋白酶和/或至少一种CP蛋白酶的底物的至少CM2;并且涉及制备这些多肽并在多种治疗性、诊断性和预防性适应症中使用这些多肽的方法,所述多肽包含作为至少一种MMP蛋白酶的底物的至少CM1以及作为至少一种SP蛋白酶和/或至少一种CP蛋白酶的底物的至少CM2。

[0004] 对序列表的引用

[0005] 依据美国联邦法规(C.F.R.)第37章第1.821条,以计算机可读形式(CFR)通过EFS-Web作为文件名“CYTX-058-PCT_ST25”以电子方式随函提交的“序列表”以引用的方式并入本文。序列表的电子副本创建于2019年11月26日,并且磁盘容量为159千字节。

背景技术

[0006] 蛋白酶是通过裂解氨基酸残基之间的肽键来降解蛋白质的酶。蛋白酶天然存在于所有生物体中,并参与从简单降解到高度调控途径的多种生理反应。已知一些蛋白酶基于蛋白质中特定氨基酸序列的存在而破坏特定的肽键。

[0007] 因此,需要鉴别蛋白酶的新底物并在多种治疗性、诊断性和预防性适应症中使用这些底物。

发明内容

[0008] 在本发明的一个方面,本文提供了一种包含串联底物的分离的多肽,其中串联底物包含作为至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的至少第一可裂解部分(CM1)以及作为至少一种丝氨酸蛋白酶(SP)或半胱氨酸蛋白酶(CP)的底物的至少第二可裂解部分(CM2),其中CM1包含氨基酸序列AHGL或PRQV,并且其中串联底物的N端至C端排列为CM1-CM2或CM2-CM1。在一些实施方案中,分离的多肽的CM1包含选自以下组成的组的氨基酸序列:ALAHGLF(SEQ ID NO:1)、ALAHGL(SEQ ID NO:52)、LAHGLF(SEQ ID NO:50)、LAHGL(SEQ ID NO:53)和AHGLF(SEQ ID NO:51)。在一些实施方案中,分离的多肽的CM1包含选自HVPRQV(SEQ ID NO:8)和VPRQV(SEQ ID NO:60)组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含通过连接肽连接的CM1和CM2。在一些实施方案中,分离的多肽的CM1和

CM2彼此直接连接。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含含有CP酶的底物的CM2,并且其中CP酶为豆荚蛋白酶(legumain)。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含CM2,其包含选自由以下组成的组的SP酶的底物:尿激酶、蛋白裂解酶(matrilysin)和中性粒细胞弹性蛋白酶。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含CM2,其包含选自由以下组成的组的SP酶的底物:尿激酶、蛋白裂解酶和中性粒细胞弹性蛋白酶;以及CP酶的底物,并且其中CP酶为豆荚蛋白酶。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含CM1,其包含选自由以下组成的组的MMP酶的底物:MMP2、MMP9或MMP14。

[0009] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含CM2,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SGR、LSGR (SEQ ID NO:73)、ARG、PRS、TFVH (SEQ ID NO:141)、AAN、SAN和GPTN (SEQ ID NO:152)。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含CM2,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SGR、LSGR (SEQ ID NO:73)、LSGRS (SEQ ID NO:72)、LSGRSD (SEQ ID NO:71)、LSGRSA (SEQ ID NO:110)、LSGRSDN (SEQ ID NO:70)、LSGRSAN (SEQ ID NO:109)、LSGRSDNH (SEQ ID NO:20)、LSGRSGNH (SEQ ID NO:78)、LSGRSDNP (SEQ ID NO:90)、LSGRSDNI (SEQ ID NO:84)、LSGRSANI (SEQ ID NO:108)、LSGRSANP (SEQ ID NO:114)、LSGRSDYH (SEQ ID NO:86)、LSGRSDTH (SEQ ID NO:92)、LSGRSDQH (SEQ ID NO:96)、LSGRSDIH (SEQ ID NO:100)和LSGRSDDH (SEQ ID NO:104)。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含CM2,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:ARGP (SEQ ID NO:128)、TARG (SEQ ID NO:125)和TARGP (SEQ ID NO:124)。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含CM2,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:APRS (SEQ ID NO:131)、APRSF (SEQ ID NO:130)和PRSF (SEQ ID NO:132)。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含CM2,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:GLPTFVHL (SEQ ID NO:135)、GLPTFVH (SEQ ID NO:136)、GLPTFV (SEQ ID NO:137)、LPTFVHL (SEQ ID NO:138)、LPTFVH (SEQ ID NO:139)和LPTFV (SEQ ID NO:140)。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含CM2,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:AAN、SAN和GPTN (SEQ ID NO:152)。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含CM2,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:AAN、SAN和GPTN (SEQ ID NO:152);和选自由以下组成的组的氨基酸序列:SGR、LSGR (SEQ ID NO:73)、LSGRS (SEQ ID NO:72)、LSGRSD (SEQ ID NO:71)、LSGRSA (SEQ ID NO:110)、LSGRSDN (SEQ ID NO:70)、LSGRSAN (SEQ ID NO:109)、LSGRSDNH (SEQ ID NO:20)、LSGRSGNH (SEQ ID NO:78)、LSGRSDNP (SEQ ID NO:90)、LSGRSDNI (SEQ ID NO:84)、LSGRSANI (SEQ ID NO:108)、LSGRSANP (SEQ ID NO:114)、LSGRSDYH (SEQ ID NO:86)、LSGRSDTH (SEQ ID NO:92)、LSGRSDQH (SEQ ID NO:96)、LSGRSDIH (SEQ ID NO:100)和LSGRSDDH (SEQ ID NO:104)。

[0010] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的串联底物的N端至C端排列为CM1-CM2。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的串联底物的N端至C端排列为CM2-CM1。

[0011] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的MMP9和MMP14对CM1第一可裂解部分的可裂解性各自为至少80%。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的MMP9和MMP14对CM1第一可裂解部分的可裂解性各自为至少85%。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的MMP9和MMP14对CM1第一可裂解部分的可裂解性各自为至少90%。

[0012] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的CM1第一可裂解部分的体内稳定性小于30%活化。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的CM1第一可裂解部分的体内稳定性

小于25%活化。

[0013] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的MMP9和MMP14对串联底物的可裂解性各自为至少30%。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的MMP9和MMP14对串联底物的可裂解性各自为至少50%。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的MMP9和MMP14对串联底物的可裂解性各自为至少70%。

[0014] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的MMP9和MMP14对串联底物的可裂解性各自为至少15%,并且蛋白裂解酶对串联底物的可裂解性为至少30%。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的MMP9和MMP14对串联底物的可裂解性各自为至少30%,并且蛋白裂解酶对串联底物的可裂解性为至少30%。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的MMP9和MMP14对串联底物的可裂解性各自为至少50%,并且蛋白裂解酶对串联底物的可裂解性为至少50%。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽的MMP9和MMP14对串联底物的可裂解性各自为至少70%,并且蛋白裂解酶对串联底物的可裂解性为至少70%。

[0015] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽具有串联底物,其体内稳定性低于40%活化。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽具有串联底物,其体内稳定性低于30%活化。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽具有串联底物,其体内稳定性低于25%活化。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽具有串联底物,其体内稳定性低于20%活化。

[0016] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含串联底物,其包含选自SEQ ID NO:25-43组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含串联底物,其包含选自SEQ ID NO:25、26、29、31、32、34、36和37组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含串联底物,其包含选自SEQ ID NO:27、28、30、33和35组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含串联底物,其包含选自SEQ ID NO:25、29、31、36和37组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含串联底物,其包含选自SEQ ID NO:26、32和34组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含串联底物,其包含选自SEQ ID NO:27、28和33组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含串联底物,其包含选自SEQ ID NO:30和35组成的组的氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方案中,本文提供了一种本公开的分离的多肽,其包含特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB);作为至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的至少第一可裂解部分(CM1);以及作为至少一种丝氨酸蛋白酶(SP)或半胱氨酸蛋白酶(CP)的底物的至少第二可裂解部分(CM2),其中CM1包含氨基酸序列AHGL或PRQV,并且其中串联底物的N端至C端排列为CM1-CM2或CM2-CM1。在一些实施方案中,MMP、CP和SP中的至少一种与靶标共定位在组织中。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含其选自以下组成的组的抗原结合片段:Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含与CM1连接的AB。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含与CM1直接连接的AB。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含通过连接肽与CM1连接的AB。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含与CM2连接的AB。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含与CM2直接连接的AB。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含通过连接肽与CM2连接的AB。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含AB,其包含抗体或其抗原结合片段的轻链可变区,并且其中CM1或CM2连接至AB的轻链

可变区的N端。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含AB,其包含抗体或其抗原结合片段的重链可变区,并且其中CM1或CM2连接至AB的重链可变区的N端。

[0018] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含掩蔽部分(MM)。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含MM,其与AB结合的解离常数大于AB与靶标结合的解离常数。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含MM,其为长度不超过40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含MM,其与CM1连接,使得分离的多肽在未裂解状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2-AB或AB-CM2-CM1-MM。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含MM与CM1之间的连接肽。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含CM2与AB之间的连接肽。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含MM与CM1之间的连接肽和CM2与AB之间的连接肽。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含MM,其与CM1连接,使得分离的多肽在未裂解状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM2-CM1-AB或AB-CM1-CM2-MM。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含MM与CM2之间的连接肽。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含CM1与AB之间的连接肽。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含MM与CM2之间的连接肽和CM1与AB之间的连接肽。

[0019] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),并且其中分离的多肽在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:MM-LP1-CM1-CM2-LP2-AB、AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM、MM-LP1-CM2-CM1-LP2-AB或AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM。在一些实施方案中,两个连接肽彼此不相同。在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度为约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,分离的多肽在CM1与CM2之间包含第三连接肽(LP')。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含AB,其包含抗体或其抗原结合片段的轻链可变区,并且其中LP2连接至AB的轻链可变区的N端。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含AB,其包含抗体或其抗原结合片段的重链可变区,并且其中LP2连接至AB的重链可变区的N端。

[0020] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含MM,其中MM的氨基酸序列与靶标的氨基酸序列不同,并且与AB的天然结合配偶体的氨基酸序列不超过10%相同。在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含在裂解状态下不干扰或竞争AB与靶标的结合的MM。

[0021] 在一些实施方案中,分离的多肽包含选自由SEQ ID NO:450-462组成的组的轻链氨基酸序列。在一些实施方案中,分离的多肽包含选自由SEQ ID NO:450-462组成的组的轻链氨基酸序列和包含SEQ ID NO:400的重链氨基酸序列。

[0022] 在本发明的另一方面,本文提供了一种在活化状态下特异性结合靶标的可活化抗体,所述可活化抗体包含特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB);与AB偶合的掩蔽部分(MM),其中当可活化抗体处于未裂解状态时,MM抑制AB与靶标的结合;以及可裂解部分(CM),其包含根据本文提供的串联底物中的任一种的串联底物。在一些实施方案中,可活化抗体包含MM,其与AB结合的解离常数大于AB与靶标结合的解离常数。在一些实施方案中,可活化抗体包含MM,其为长度不超过40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,可活化抗体包含其选自由以下组成的组的抗原结合片段:Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,可活化抗体包含MM,其与AB结合的解离常数大于AB与靶标结合的解离常数。

[0023] 在一些实施方案中,可活化抗体包含MM,其与CM1连接,使得可活化抗体在未裂解

状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2-AB或AB-CM2-CM1-MM。在一些实施方案中,可活化抗体包含MM与CM1之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包含CM2与AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包含MM与CM1之间的连接肽和CM2与AB之间的连接肽。

[0024] 在一些实施方案中,可活化抗体包含MM,其与CM1连接,使得可活化抗体在未裂解状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM2-CM1-AB或AB-CM1-CM2-MM。在一些实施方案中,可活化抗体包含MM与CM2之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包含CM1与AB之间的连接肽。在一些实施方案中,可活化抗体包含MM与CM2之间的连接肽和CM1与AB之间的连接肽。

[0025] 在一些实施方案中,可活化抗体包含AB,其包含抗体或其抗原结合片段的轻链可变区,并且其中CM1或CM2连接至AB的轻链可变区的N端。在一些实施方案中,可活化抗体包含AB,其包含抗体或其抗原结合片段的轻链可变区,并且其中CM1或CM2连接至AB的重链可变区的N端。

[0026] 在一些实施方案中,可活化抗体包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),并且其中可活化抗体在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:MM-LP1-CM1-CM2-LP2-AB、AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM、MM-LP1-CM2-CM1-LP2-AB或AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM。在一些实施方案中,两个连接肽彼此不相同。在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度为约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,可活化抗体在CM1与CM2之间包含第三连接肽(LP')。在一些实施方案中,可活化抗体包含AB,其包含抗体或其抗原结合片段的轻链可变区,并且其中LP2连接至AB的轻链可变区的N端。在一些实施方案中,可活化抗体包含AB,其包含抗体或其抗原结合片段的轻链可变区,并且其中LP2连接至AB的重链可变区的N端。

[0027] 在一些实施方案中,可活化抗体包含选自由SEQ ID NO:450-462组成的组的轻链氨基酸序列。在一些实施方案中,可活化抗体包含选自由SEQ ID NO:450-462组成的组的轻链氨基酸序列和包含SEQ ID NO:400的重链氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,可活化抗体包含与靶标不同的MM,并且与AB的天然结合配偶体的氨基酸序列不超过10%相同。在一些实施方案中,可活化抗体包含在裂解状态下不干扰或竞争AB与靶标的结合的MM。

[0029] 在本发明的另一方面,本文提供了一种缀合的可活化抗体,其包含缀合至剂的可活化抗体。在一些实施方案中,剂通过接头缀合至AB。在一些实施方案中,剂通过可裂解的接头缀合至AB。在一些实施方案中,剂通过不可裂解的接头缀合至AB。

[0030] 在一些实施方案中,缀合的可活化抗体包含作为毒素或其片段的剂。在一些实施方案中,缀合的可活化抗体包含作为微管抑制剂的剂。在一些实施方案中,缀合的可活化抗体包含作为核酸损伤剂的剂。在一些实施方案中,缀合的可活化抗体包含这样的剂,所述剂为多拉司他汀(dolastatin)或其衍生物、瑞奥西汀(auristatin)或其衍生物、美登木素生物碱(maytansinoid)或其衍生物、倍癌霉素(duocarmycin)或其衍生物、卡奇霉素(calicheamicin)或其衍生物、瑞奥西汀E或其衍生物、单甲基瑞奥西汀E(MMAE)、单甲基瑞奥西汀D(MMAD)或选自由DM1和DM4组成的组的美登木素生物碱。在一些实施方案中,缀合的可活化抗体包含作为可检测部分或诊断剂的剂。

[0031] 在本发明的另一方面,本文提供了一种药物组合物,其包含本公开的分离的多肽

或本公开的可活化抗体或本公开的缀合的可活化抗体以及载剂。在一些实施方案中,药物组合物包含另外的剂。在一些实施方案中,药物组合物包含作为治疗剂的另外的剂。

[0032] 在本发明的另一方面,本文提供了一种分离的核酸分子,其编码本公开的分离的多肽或本公开的可活化抗体。在一些实施方案中,载体包含本公开的分离的核酸分子。

[0033] 在本发明的另一方面,本文提供了一种产生抗体或可活化抗体的方法,其通过在导致本公开的分离的多肽或本公开的可活化抗体表达的条件下培养细胞来进行。在本发明的另一方面,本文提供了一种制造在活化状态下结合靶标的可活化抗体的方法,所述方法包括:培养包含编码本公开的可活化抗体的核酸构建体的细胞,以及回收可活化抗体。

[0034] 在本发明的另一方面,本文提供了一种治疗病症或疾病、缓解所述病症或疾病的症状或延迟所述病症或疾病的进展的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开的分离的多肽或本公开的可活化抗体或本公开的缀合的可活化抗体或本公开的药物组合物。在一些实施方案中,所述病症或疾病为癌症。在一些实施方案中,所述方法包括向受试者施用另外的剂。在一些实施方案中,所述方法包括向受试者施用另外的治疗剂。

附图说明

[0035] 图1是示出本公开的指示的可活化抗EGFR抗体在施用于nu/nu小鼠后观察到在体内裂解的百分比的示例性结果的图。这些示例性结果表明,几种测试的可活化抗体显示出比可被多种酶裂解的其他底物高的稳定性程度。

[0036] 图2A和图2B是示出本公开的指示的抗EGFR可活化抗体与EGFR的体外结合的示例性结果的图。这些示例性结果表明,MMP底物影响了可活化抗体的前结构域的掩蔽效率。

[0037] 图3A和图3B是示出使用小鼠H292异种移植模型获得的本公开的指示的可活化抗EGFR抗体的体内功效的示例性结果的图。这些示例性结果表明,本公开的具有某些MMP底物的可活化抗体在此异种移植模型中显示出与无掩蔽的抗EGFR西妥昔单抗(cetuximab)相当的功效。

[0038] 图4是示出本公开的指示的可活化抗EGFR抗体在施用于小鼠H292异种移植模型后在肿瘤内组织内被活化的百分比的示例性结果的图。

[0039] 图5是示出本公开的具有单个MMP或串联底物的指示的可活化抗EGFR抗体在施用于nu/nu小鼠后观察到在体内裂解的百分比的示例性结果的图。这些示例性结果表明,具有串联底物的几种测试的可活化抗体显示出比可被多种酶裂解的其他底物高的体内稳定性程度。

[0040] 图6是示出使用小鼠H292异种移植模型获得的本公开的指示的可活化抗EGFR抗体的体内功效的示例性结果的图。这些示例性结果表明,本公开的具有某些MMP底物的可活化抗体在此异种移植模型中显示出与无掩蔽的抗EGFR西妥昔单抗抗体相当的功效。

[0041] 图7是示出本公开的指示的可活化抗EGFR抗体在施用于小鼠H292异种移植模型后在肿瘤内组织内被活化的百分比的示例性结果的图。

[0042] 图8是示出由本公开的指示的抗EGFR可活化抗体与EGFR的体外结合计算出的计算的掩蔽效率的示例性结果的图。这些示例性结果表明,串联底物影响了可活化抗体的前结构域的掩蔽效率。

[0043] 图9是示出本公开的指示的可活化抗EGFR抗体在与人肿瘤组织一起孵育后被活化

的百分比的示例性结果的图。

具体实施方式

[0044] 本公开提供了氨基酸序列,其包含作为至少一种基质金属蛋白酶 (MMP) 的底物的至少第一可裂解部分 (CM1) 以及作为至少一种丝氨酸蛋白酶 (SP) 和/或至少一种半胱氨酸蛋白酶 (CP) 的底物的至少第二可裂解部分 (CM2)。这些氨基酸序列在本文中统称为“串联底物”。此术语并不旨在传达关于作为至少一种基质金属蛋白酶 (MMP) 的底物的第一可裂解部分 (CM1) 以及作为至少一种丝氨酸蛋白酶 (SP) 和/或至少一种半胱氨酸蛋白酶 (CP) 的底物的至少第二可裂解部分 (CM2) 的取向或其他结构排列的任何要求。因此,术语“串联底物”涵盖具有如下从N端到C端的结构排列的CM1-CM2底物:CM1-CM2或CM2-CM1。术语“串联底物”还涵盖CM1序列的至少一部分与CM2序列的至少一部分重叠的底物。

[0045] 在一些实施方案中,CM2包含至少两个底物。在一些实施方案中,CM2包含第一丝氨酸蛋白酶的底物和第二丝氨酸蛋白酶的底物。在一些实施方案中,CM2包含丝氨酸蛋白酶的底物和半胱氨酸蛋白酶的底物。

[0046] 本文所述的CM1-CM2底物可用于多种治疗性、诊断性和预防性适应症中。例如,这些CM1-CM2底物可用于可活化抗体,其包含含有前结构域的抗体或其抗原结合片段 (AB)。前结构域包含与AB的至少一个抗原或表位结合结构域连接,使得MM的偶合降低了AB结合其靶标的能力的至少一个掩蔽部分 (MM)。

[0047] 在一些实施方案中,可活化抗体包含至少第一CM (CM1) 和至少第二CM (CM2)。在一些实施方案中,CM1底物序列的至少一部分与CM2序列的至少一部分重叠。在一些实施方案中,CM1底物序列和CM2底物序列共享至少一个共有的氨基酸残基。在一些实施方案中,CM1底物序列和CM2底物序列共享至少两个共有的氨基酸残基。在一些实施方案中,CM1底物序列和CM2底物序列共享至少三个共有的氨基酸残基。在一些实施方案中,CM1底物序列和CM2底物序列共享三个或更多个共有的氨基酸残基。

[0048] 在一些实施方案中,CM1和CM2是可操作地连接在一起的多肽。

[0049] 在一些实施方案中,CM1和CM2是直接连接在一起的多肽,即一个底物的N端直接连接到另一个底物多肽的C端。在一些实施方案中,CM1的N端直接连接到CM2的C端。在一些实施方案中,CM2的N端直接连接到CM1的C端。

[0050] 在一些实施方案中,CM1和CM2是通过至少一个连接部分可操作地连接在一起的多肽。

[0051] 在一些实施方案中,可活化抗体中的第一可裂解部分CM1和第二可裂解部分CM2在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2-AB、AB-CM2-CM1-MM、MM-CM2-CM1-AB或AB-CM1-CM2-MM。

[0052] 在一些实施方案中,可活化抗体包含CM1与CM2之间的连接肽 (LP')。在一些实施方案中,可活化抗体包含掩蔽部分 (MM) 与CM1之间的连接肽 (LP'')。在一些实施方案中,可活化抗体包含CM2与AB之间的连接肽 (LP''')。在一些实施方案中,可活化抗体包含MM与CM1之间的连接肽 (LP'') 和CM2与AB之间的连接肽 (LP''')。在一些实施方案中,可活化抗体包含MM与CM1之间的连接肽 (LP'') 和CM1与CM2之间的连接肽 (LP')。在一些实施方案中,可活化抗体包含CM1与CM2之间的连接肽 (LP') 和CM2与AB之间的连接肽 (LP''')。在一些实施方案中,可活

化抗体包含MM与CM1之间的连接肽(LP'')、CM1与CM2之间的连接肽(LP')和CM2与AB之间的连接肽(LP'')。

[0053] 在一些实施方案中,可活化抗体包含CM1与CM2之间的连接肽(LP')。在一些实施方案中,可活化抗体包含AB与CM1之间的连接肽(LP'')。在一些实施方案中,可活化抗体包含CM2与掩蔽部分(MM)之间的连接肽(LP'')。在一些实施方案中,可活化抗体包含AB与CM1之间的连接肽(LP'')和CM2与MM之间的连接肽(LP'')。在一些实施方案中,可活化抗体包含AB与CM1之间的连接肽(LP'')和CM1与CM2之间的连接肽(LP')。在一些实施方案中,可活化抗体包含CM1与CM2之间的连接肽(LP')和CM2与MM之间的连接肽(LP'')。在一些实施方案中,可活化抗体包含AB与CM1之间的连接肽(LP'')、CM1与CM2之间的连接肽(LP')和CM2与MM之间的连接肽(LP'')。

[0054] 在一些实施方案中,LP'为GG。在一些实施方案中,LP'为GGSGGS(SEQ ID NO:218)。

[0055] 在一些实施方案中,CM1为至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物。MMP的实例包括MMP1;MMP2;MMP3;MMP7;MMP8;MMP9;MMP10;MMP11;MMP12;MMP13;MMP14;MMP15;MMP16;MMP17;MMP19;MMP20;MMP23;MMP24;MMP26;和MMP27。

[0056] 在一些实施方案中,CM1为MMP2、MMP9、MMP14、MMP1、MMP3、MMP13、MMP17、MMP11和/或MMP19的底物。在一些实施方案中,CM1为MMP2的底物。在一些实施方案中,CM1为MMP9的底物。在一些实施方案中,CM1为MMP14的底物。在一些实施方案中,CM1为两个或更多个MMP的底物。在一些实施方案中,CM1为至少MMP9和MMP14的底物。在一些实施方案中,CM1为至少MMP2和MMP9的底物。在一些实施方案中,CM1为至少MMP2和MMP14的底物。在一些实施方案中,CM1为三个或更多个MMP的底物。在一些实施方案中,CM1为至少MMP2、MMP9和MMP14的底物。在一些实施方案中,CM1包含同一种MMP的两个或更多个底物。在一些实施方案中,CM1包含至少两个或更多个MMP2底物。在一些实施方案中,CM1包含至少两个或更多个MMP9底物。在一些实施方案中,CM1包含至少两个或更多个MMP14底物。

[0057] 在一些实施方案中,CM1为MMP的底物,并且至少包含序列ALAHGLF(SEQ ID NO:1);DLAHPLL(SEQ ID NO:2);AFRHLR(SEQ ID NO:3);PHGFFQ(SEQ ID NO:4);SVHHLI(SEQ ID NO:5);RGPPLYW(SEQ ID NO:6);RFPYGVW(SEQ ID NO:7);HVPRQV(SEQ ID NO:8);SNPFKY(SEQ ID NO:9);RFPLKV(SEQ ID NO:10);PFHLSR(SEQ ID NO:11);STVFHM(SEQ ID NO:12);MGPWFM(SEQ ID NO:13);RHLAKL(SEQ ID NO:14);PLGVRGK(SEQ ID NO:15)和QNQALRIA(SEQ ID NO:16)。

[0058] 在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列ALAHGLF(SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列DLAHPLL(SEQ ID NO:2)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列AFRHLR(SEQ ID NO:3)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列PHGFFQ(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列SVHHLI(SEQ ID NO:5)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列RGPPLYW(SEQ ID NO:6)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列RFPYGVW(SEQ ID NO:7)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列HVPRQV(SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列SNPFKY(SEQ ID NO:9)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列RFPLKV(SEQ ID NO:10)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列PFHLSR(SEQ ID NO:11)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列STVFHM(SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列MGPWFM(SEQ ID NO:13)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列RHLAKL(SEQ

ID NO:14)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列PLGVRGK(SEQ ID NO:15)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列QNQALRIA(SEQ ID NO:16)。

[0059] 在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列LAHGLF(SEQ ID NO:50)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列AHGLF(SEQ ID NO:51)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列ALAHGL(SEQ ID NO:52)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列LAHGL(SEQ ID NO:53)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列AHGL(SEQ ID NO:54)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列ALAHG(SEQ ID NO:55)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列LAHG(SEQ ID NO:56)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列AHG。

[0060] 在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列VPRQV(SEQ ID NO:60)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列PRQV(SEQ ID NO:61)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列HVPRQ(SEQ ID NO:62)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列VPRQ(SEQ ID NO:63)。在一些实施方案中,CM1包含氨基酸序列PRQ。

[0061] 在一些实施方案中,CM2为至少一种丝氨酸蛋白酶(SP)的底物。在一些实施方案中,SP选自u型纤溶酶原活化物(uPA,也称为尿激酶)、蛋白裂解酶(在本文中也称为MT-SP1或MTSP1)、中性粒细胞弹性蛋白酶(例如人中性粒细胞弹性蛋白酶)及其组合。以非限制性实例的方式,裂解本文所述的CM2的其他SP的实例包括活化蛋白C;组织蛋白酶A;组织蛋白酶G;糜蛋白酶;凝血因子蛋白酶,例如像FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa;弹性蛋白酶;颗粒酶B;胍基苯甲酰胺酶(Guanidinobenzoatase);HtrA1;乳铁蛋白;Marapsin;NS3/4A;PACE4;纤溶酶;PSA;tPA;凝血酶;类胰蛋白酶;II型跨膜丝氨酸蛋白酶(TTSP),例如像DESC1、DPP-4、FAP、Hepsin、蛋白裂解酶-2、TMPRSS2、TMPRSS3和/或TMPRSS4。

[0062] 例如,合适的CM2被至少一种丝氨酸蛋白酶裂解,并且可包含选自以下氨基酸序列的至少一种序列:LSGRSDNH(SEQ ID NO:20)、LSGRSDN(SEQ ID NO:70)、LSGRSD(SEQ ID NO:71)、LSGRS(SEQ ID NO:72)、LSGR(SEQ ID NO:73)、SGRSDN(SEQ ID NO:74)、SGRSD(SEQ ID NO:75)、SGRS(SEQ ID NO:76)、SGR、LSGRSGNH(SEQ ID NO:78)、LSGRSGN(SEQ ID NO:79)、LSGRSG(SEQ ID NO:80)、SGRSGNH(SEQ ID NO:81)、SGRSGN(SEQ ID NO:82)、SGRSG(SEQ ID NO:83)、LSGRSDNI(SEQ ID NO:84)、SGRSDNI(SEQ ID NO:85)、LSGRSDYH(SEQ ID NO:86)、LSGRSDY(SEQ ID NO:87)、SGRSDYH(SEQ ID NO:88)、SGRSDY(SEQ ID NO:89)、LSGRSDNP(SEQ ID NO:90)、SGRSDNP(SEQ ID NO:91)、LSGRSDTH(SEQ ID NO:92)、LSGRSDT(SEQ ID NO:93)、SGRSDTH(SEQ ID NO:94)、SGRSDT(SEQ ID NO:95)、LSGRSDQH(SEQ ID NO:96)、LSGRSDQ(SEQ ID NO:97)、SGRSDQH(SEQ ID NO:98)、SGRSDQ(SEQ ID NO:99)、LSGRSDIH(SEQ ID NO:100)、LSGRSDI(SEQ ID NO:101)、SGRSDIH(SEQ ID NO:102)、SGRSDI(SEQ ID NO:103)、LSGRSDDH(SEQ ID NO:104)、LSGRSDD(SEQ ID NO:105)、SGRSDDH(SEQ ID NO:106)、SGRSDD(SEQ ID NO:107)、LSGRSANI(SEQ ID NO:108)、LSGRSAN(SEQ ID NO:109)、LSGRSA(SEQ ID NO:110)、SGRSANI(SEQ ID NO:111)、SGRSAN(SEQ ID NO:112)、SGRSA(SEQ ID NO:113)、LSGRSANP(SEQ ID NO:114)和SGRSANP(SEQ ID NO:115)。

[0063] 在一些实施方案中,合适的CM2被至少一种丝氨酸蛋白酶裂解,并且可包含选自以下氨基酸序列的至少一种序列:TARGPSFK(SEQ ID NO:120)、ARGPSFK(SEQ ID NO:121)、TARGPSF(SEQ ID NO:122)、TARGPS(SEQ ID NO:123)、TARGP(SEQ ID NO:124)、TARG(SEQ ID NO:125)、ARGPSF(SEQ ID NO:126)、ARGPS(SEQ ID NO:127)、ARGP(SEQ ID NO:128)和ARG。

[0064] 在一些实施方案中,合适的CM2被至少一种丝氨酸蛋白酶裂解,并且可包含选自以下氨基酸序列的至少一种序列:APRSF (SEQ ID NO:130)、APRS (SEQ ID NO:131)和PRSF (SEQ ID NO:132)。

[0065] 在一些实施方案中,合适的CM2被至少一种丝氨酸蛋白酶裂解,并且可包含选自以下氨基酸序列的至少一种序列:GLPTFVHL (SEQ ID NO:135)、GLPTFVH (SEQ ID NO:136)、GLPTFV (SEQ ID NO:137)、LPTFVHL (SEQ ID NO:138)、LPTFVH (SEQ ID NO:139)和LPTFV (SEQ ID NO:140)。

[0066] 在一些实施方案中,CM2为至少一种半胱氨酸蛋白酶 (CP) 的底物。在一些实施方案中,CP为豆荚蛋白酶。在一些实施方案中,合适的CM2被至少一种半胱氨酸蛋白酶裂解,并且可包含选自以下氨基酸序列的至少一种序列:AAN、SAN和GPTN (SEQ ID NO:152)。

[0067] 在一些实施方案中,CM1-CM2底物包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO:25)、ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO:26)、HVPRQVLSGRS (SEQ ID NO:27)、HVPRQVLSGRSAN (SEQ ID NO:28)、TARGPALAHGLF (SEQ ID NO:29)、TARGPVPRQV (SEQ ID NO:30)、APRSALAHGLF (SEQ ID NO:31)、ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO:32)、HVPRQVAPRSF (SEQ ID NO:33)、ALAHGLPTFVHL (SEQ ID NO:34)、GLPTFVHLPRQV (SEQ ID NO:35)、AANALAHGLF (SEQ ID NO:36)、GPTNALAHGLF (SEQ ID NO:37)、ISSGLLSGRSNI (SEQ ID NO:38)、AVGLLAPPGGLSGRSNI (SEQ ID NO:39)、ISSGLLSGRSNIGS (SEQ ID NO:40)、AVGLLAPPGGLSGRSNIGS (SEQ ID NO:41)、ISSGLLSGRSNIG (SEQ ID NO:42)和AVGLLAPPGGLSGRSNIG (SEQ ID NO:43)。

[0068] 在一些实施方案中,可活化抗体在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2-AB、AB-CM2-CM1-MM、MM-CM2-CM1-AB或AB-CM1-CM2-MM。

[0069] 在一些实施方案中,可活化抗体包含第一连接肽 (LP1) 和第二连接肽 (LP2),并且抗体在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:MM1-LP1-CM1-CM2-LP2-AB、AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM、MM1-LP1-CM2-CM1-LP2-AB或AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM。在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度为约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,两个连接肽不需要彼此相同。

[0070] 在一些实施方案中,可活化抗体包含CM1与CM2之间的连接肽 (LP')。在一些实施方案中,可活化抗体包含掩蔽部分 (MM) 与CM1之间的连接肽 (LP1)。在一些实施方案中,可活化抗体包含CM2与AB之间的连接肽 (LP2)。在一些实施方案中,可活化抗体包含MM与CM1之间的连接肽 (LP1) 和CM2与AB之间的连接肽 (LP2)。在一些实施方案中,可活化抗体包含MM与CM1之间的连接肽 (LP1) 和CM1与CM2之间的连接肽 (LP')。在一些实施方案中,可活化抗体包含CM1与CM2之间的连接肽 (LP') 和CM2与AB之间的连接肽 (LP2)。在一些实施方案中,可活化抗体包含MM与CM1之间的连接肽 (LP1)、CM1与CM2之间的连接肽 (LP') 和CM2与AB之间的连接肽 (LP2)。

[0071] 在一些实施方案中,可活化抗体包含CM1与CM2之间的连接肽 (LP')。在一些实施方案中,可活化抗体包含AB与CM1之间的连接肽 (LP1)。在一些实施方案中,可活化抗体包含CM2与掩蔽部分 (MM) 之间的连接肽 (LP2)。在一些实施方案中,可活化抗体包含AB与CM1之间的连接肽 (LP1) 和CM2与MM之间的连接肽 (LP2)。在一些实施方案中,可活化抗体包含AB与CM1之间的连接肽 (LP1) 和CM1与CM2之间的连接肽 (LP')。在一些实施方案中,可活化抗体包

含CM1与CM2之间的连接肽(LP')和CM2与MM之间的连接肽(LP2)。在一些实施方案中,可活化抗体包含AB与CM1之间的连接肽(LP1)、CM1与CM2之间的连接肽(LP')和CM2与MM之间的连接肽(LP2)。

[0072] 在一些实施方案中,LP'为GG。在一些实施方案中,LP'为GGSGGS (SEQ ID NO:218)。

[0073] 在一些实施方案中,LP1或LP2中的至少一个包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO:200)和(GGGS)_n (SEQ ID NO:201),其中n为至少1的整数。

[0074] 在一些实施方案中,LP1或LP2中的至少一个包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:GGSG (SEQ ID NO:202)、GGSGG (SEQ ID NO:203)、GSGSG (SEQ ID NO:204)、GSGGG (SEQ ID NO:205)、GGGSG (SEQ ID NO:206)和GSSSG (SEQ ID NO:207)。

[0075] 在一些实施方案中,LP1包含氨基酸序列GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO:208)、GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO:209)、GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:210)、GSSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:211)、GSSGGSGGSG (SEQ ID NO:212)或GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO:213)、GGGSSGS (SEQ ID NO:214)和GGGS (SEQ ID NO:215)。

[0076] 在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS (SEQ ID NO:215)、GSSGT (SEQ ID NO:216)或GSSG (SEQ ID NO:217)。在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GGS。在一些实施方案中,LP2包含氨基酸序列GGGS (SEQ ID NO:215)。

[0077] 在一些实施方案中,CM1为MMP的底物,并且至少包含序列ALAHGLF (SEQ ID NO:1);DLAHPLL (SEQ ID NO:2);AFRHLR (SEQ ID NO:3);PHGFFQ (SEQ ID NO:4);SVHHLI (SEQ ID NO:5);RGPKLYW (SEQ ID NO:6);RFPYGVW (SEQ ID NO:7);HVPRQV (SEQ ID NO:8);SNPFKY (SEQ ID NO:9);RFPLKV (SEQ ID NO:10);PFHLR (SEQ ID NO:11);STVFHM (SEQ ID NO:12);MGPWFM (SEQ ID NO:13);RHLAKL (SEQ ID NO:14);PLGVRGK (SEQ ID NO:15)和QNQALRIA (SEQ ID NO:16)。

[0078] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽或本公开的可活化抗体包含CM1-CM2底物和LP2接头,其中CM1-CM2包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO:25)、ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO:26)、HVPRQVLSGRS (SEQ ID NO:27)、HVPRQVLSGRSAN (SEQ ID NO:28)、TARGPALAHGLF (SEQ ID NO:29)、TARGPVPRQV (SEQ ID NO:30)、APRSALAHGLF (SEQ ID NO:31)、ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO:32)、HVPRQVAPRSF (SEQ ID NO:33)、ALAHGLPTFVHL (SEQ ID NO:34)、GLPTFVHLPRQV (SEQ ID NO:35)、AANALAHGLF (SEQ ID NO:36)、GPTNALAHGLF (SEQ ID NO:37)、ISSGLLSGRSNI (SEQ ID NO:38)和AVGLLAPPGGLSGRSNI (SEQ ID NO:39),并且LP2接头包含GGGS (SEQ ID NO:215)。

[0079] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽或本公开的可活化抗体包含CM1-CM2底物和LP2接头,其中CM1-CM2包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO:25)、ALAHGLFSGRSAN (SEQ ID NO:26)、HVPRQVLSGRS (SEQ ID NO:27)、HVPRQVLSGRSAN (SEQ ID NO:28)、TARGPALAHGLF (SEQ ID NO:29)、TARGPVPRQV (SEQ ID NO:30)、APRSALAHGLF (SEQ ID NO:31)、ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO:32)、HVPRQVAPRSF (SEQ ID NO:33)、ALAHGLPTFVHL (SEQ ID NO:34)、GLPTFVHLPRQV (SEQ ID NO:35)、AANALAHGLF (SEQ ID NO:36)、GPTNALAHGLF (SEQ ID NO:37)、ISSGLLSGRSNI (SEQ ID NO:38)和AVGLLAPPGGLSGRSNI (SEQ ID NO:39),并且LP2接头包含GGS。

[0080] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽或本公开的可活化抗体包含CM1-CM2底物和LP2接头,其中CM1-CM2和LP2包含选自以下组成的组的氨基酸序列:LSGRSALAHGLFGGGS (SEQ ID NO:226)、ALAHGLFSGRSANGGGS (SEQ ID NO:227)、HVPRQVLSGRSGGGS (SEQ ID NO:228)、HVPRQVLSGRSANGGGS (SEQ ID NO:229)、TARGPALAHGLFGGGS (SEQ ID NO:230)、TARGPVPRQVGGGS (SEQ ID NO:231)、APRSALAHGLFGGGS (SEQ ID NO:232)、ALAHGLFAPRSFGGGS (SEQ ID NO:233)、HVPRQVAPRSFGGGS (SEQ ID NO:234)、ALAHGLPTFVHLGGGS (SEQ ID NO:235)、GLPTFVHLPRQVGGGS (SEQ ID NO:236)、AANALAHGLFGGGS (SEQ ID NO:237)、GPTNALAHGLFGGGS (SEQ ID NO:238)、ISSGLLSGRSNIGGGS (SEQ ID NO:239)和AVGLLAPPGGLSGRSNIGGGS (SEQ ID NO:240)。

[0081] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽或本公开的可活化抗体包含CM1-CM2底物和LP2接头,其中CM1-CM2和LP2包含选自以下组成的组的氨基酸序列:LSGRSALAHGLFGGGS (SEQ ID NO:241)、ALAHGLFSGRSANGGGS (SEQ ID NO:242)、HVPRQVLSGRSGGGS (SEQ ID NO:243)、HVPRQVLSGRSANGGGS (SEQ ID NO:244)、TARGPALAHGLFGGGS (SEQ ID NO:245)、TARGPVPRQVGGGS (SEQ ID NO:246)、APRSALAHGLFGGGS (SEQ ID NO:247)、ALAHGLFAPRSFGGGS (SEQ ID NO:248)、HVPRQVAPRSFGGGS (SEQ ID NO:249)、ALAHGLPTFVHLGGGS (SEQ ID NO:250)、GLPTFVHLPRQVGGGS (SEQ ID NO:251)、AANALAHGLFGGGS (SEQ ID NO:252)、GPTNALAHGLFGGGS (SEQ ID NO:253)、ISSGLLSGRSNIGGGS (SEQ ID NO:254)和AVGLLAPPGGLSGRSNIGGGS (SEQ ID NO:255)。

[0082] 在一些实施方案中,AB与靶标结合的解离常数为约100nM或更低。

[0083] 在一些实施方案中,可活化抗体包含特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)。在一些实施方案中,AB为全长抗体。在一些实施方案中,AB为免疫活性片段。在一些实施方案中,AB为抗原结合片段。在一些实施方案中,AB为单克隆抗体、结构域抗体、单链、Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scab、dAb、单结构域重链抗体或单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,此种AB为小鼠抗体、其他啮齿动物抗体、嵌合抗体、人源化抗体或完全人单克隆抗体。

[0084] 在一些实施方案中,MMP蛋白酶与靶标共定位在组织中,并且当抗体暴露于所述蛋白酶时,MMP蛋白酶裂解抗体中的CM1。在一些实施方案中,SP蛋白酶与靶标共定位在组织中,并且当抗体暴露于所述蛋白酶时,SP蛋白酶裂解抗体中的CM2底物。在一些实施方案中,CP蛋白酶与靶标共定位在组织中,并且当抗体暴露于所述蛋白酶时,CP蛋白酶裂解抗体中的CM2底物。在一些实施方案中,MMP蛋白酶和/或SP蛋白酶与靶标共定位在组织中,并且当抗体暴露于所述蛋白酶时,MMP蛋白酶和/或SP蛋白酶裂解抗体中的CM1-CM2底物。在一些实施方案中,MMP蛋白酶和SP蛋白酶与靶标共定位在组织中,并且当抗体暴露于所述蛋白酶时,MMP蛋白酶和SP蛋白酶中的至少一个裂解抗体中的CM1-CM2底物。在一些实施方案中,MMP蛋白酶和CP蛋白酶与靶标共定位在组织中,并且当抗体暴露于所述蛋白酶时,MMP蛋白酶和CP蛋白酶中的至少一个裂解抗体中的CM1-CM2底物。在一些实施方案中,MMP蛋白酶和/或CP蛋白酶和/或SP蛋白酶与靶标共定位在组织中,并且当抗体暴露于所述蛋白酶时,MMP蛋白酶和/或CP蛋白酶和/或SP蛋白酶裂解抗体中的CM1-CM2底物。在一些实施方案中,MMP蛋白酶和CP蛋白酶和SP

蛋白酶与靶标共定位在组织中,并且当抗体暴露于所述蛋白酶时,MMP蛋白酶、SP蛋白酶和CP蛋白酶中的至少一个裂解抗体中的CM1-CM2底物。

[0085] 在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM1底物序列和CM2底物序列中的每一个独立地为长度至多15个氨基酸的多肽。

[0086] 在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM1底物序列为至少一种MMP的底物,并且包含与被同一种MMP蛋白酶天然裂解的任何多肽序列(例如,任何动物多肽序列)基本不相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM1底物序列为至少一种MMP的底物,并且包含与被同一种MMP蛋白酶天然裂解的任何哺乳动物多肽序列基本不相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM1底物序列为至少一种MMP的底物,并且包含与被同一种MMP蛋白酶天然裂解的任何人多肽序列基本不相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM1底物序列为至少一种MMP的底物,并且包含与被同一种MMP蛋白酶天然裂解的任何多肽序列(例如,任何动物多肽序列)不超过90%或更多相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM1底物序列为至少一种MMP的底物,并且包含与被同一种MMP蛋白酶天然裂解的任何哺乳动物多肽序列不超过90%或更多相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM1底物序列为至少一种MMP的底物,并且包含与被同一种MMP蛋白酶天然裂解的任何人多肽序列不超过90%或更多相同的多肽序列。

[0087] 在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM2底物序列为至少一种SP和/或至少一种CP的底物,并且包含与被同一种SP蛋白酶天然裂解的任何多肽序列(例如,任何动物多肽序列)基本不相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM2底物序列为至少一种SP和/或至少一种CP的底物,并且包含与被同一种SP和/或CP蛋白酶天然裂解的任何哺乳动物多肽序列基本不相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM2底物序列为至少一种SP和/或至少一种CP的底物,并且包含与被同一种SP和/或CP蛋白酶天然裂解的任何人多肽序列基本不相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM2底物序列为至少一种SP和/或至少一种CP的底物,并且包含与被同一种SP和/或CP蛋白酶天然裂解的任何多肽序列(例如,任何动物多肽序列)不超过90%或更多相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM2底物序列为至少一种SP和/或至少一种CP的底物,并且包含与被同一种SP和/或CP蛋白酶天然裂解的任何哺乳动物多肽序列不超过90%或更多相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM2底物序列为至少一种SP和/或至少一种CP的底物,并且包含与被同一种SP和/或CP蛋白酶天然裂解的任何人多肽序列不超过90%或更多相同的多肽序列。

[0088] 在一些实施方案中,本公开的CM1-CM2底物包含选自由SEQ ID NO:25-43组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的CM1-CM2底物包含选自由SEQ ID NO:25、26、29、31、32、34、36和37组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的CM1-CM2底物包含选自由SEQ ID NO:27、28、30、33和35组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的CM1-CM2底物包含选自由SEQ ID NO:25、29、31、36和37组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的CM1-CM2底物包含选自由SEQ ID NO:26、32和34组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的CM1-CM2底物包含选自由SEQ ID NO:27、28和33组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的CM1-CM2底物包含选自由SEQ ID NO:30和35组成的组的氨基酸序列。

[0089] 在一些实施方案中,本公开的可活化抗体包含CM1-CM2底物,其包含选自SEQ ID NO:25-43组成的组的氨基酸序列;以及结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)和降低AB的抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)。在一些实施方案中,本公开的可活化抗体包含CM1-CM2底物,其包含选自SEQ ID NO:25、26、29、31、32、34、36和37组成的组的氨基酸序列;以及结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)和降低AB的抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)。在一些实施方案中,本公开的可活化抗体包含CM1-CM2底物,其包含选自SEQ ID NO:27、28、30、33和35组成的组的氨基酸序列;以及结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)和降低AB的抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)。在一些实施方案中,本公开的可活化抗体包含CM1-CM2底物,其包含选自SEQ ID NO:25、29、31、36和37组成的组的氨基酸序列;以及结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)和降低AB的抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)。在一些实施方案中,本公开的可活化抗体包含CM1-CM2底物,其包含选自SEQ ID NO:26、32和34组成的组的氨基酸序列;以及结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)和降低AB的抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)。在一些实施方案中,本公开的可活化抗体包含CM1-CM2底物,其包含选自SEQ ID NO:27、28和33组成的组的氨基酸序列;以及结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)和降低AB的抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)。在一些实施方案中,本公开的可活化抗体包含CM1-CM2底物,其包含选自SEQ ID NO:30和35组成的组的氨基酸序列;以及结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)和降低AB的抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)。

[0090] 在一些实施方案中,可活化抗体包含CM1-CM2底物,其包含选自SEQ ID NO:25-43组成的组的氨基酸序列;和包含本文公开的抗EGFR抗体的氨基酸序列的抗EGFR抗体。在一些实施方案中,可活化抗体包含CM1-CM2底物,其包含选自SEQ ID NO:25-43组成的组的氨基酸序列;以及具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:401的轻链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:400的重链的抗体。

[0091] 在一些实施方案中,CM1-CM2包含在具有选自SEQ ID NO:450-462组成的组的轻链氨基酸序列和SEQ ID NO:400的重链氨基酸序列的可活化抗体中。

[0092] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含作为至少一种MMP的底物的CM1底物,并且包含与被同一种MMP蛋白酶天然裂解的任何多肽序列(例如,任何动物多肽序列)基本不相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1底物序列为至少一种MMP的底物,并且包含与被同一种MMP蛋白酶天然裂解的任何哺乳动物多肽序列基本不相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1底物序列为至少一种MMP的底物,并且包含与被同一种MMP蛋白酶天然裂解的任何人多肽序列基本不相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1底物序列为至少一种MMP的底物,并且包含与被同一种MMP蛋白酶天然裂解的任何多肽序列(例如,任何动物多肽序列)不超过90%或更多相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1底物序列为至少一种MMP的底物,并且包含与被同一种MMP蛋白酶天然裂解的任何哺乳动物多肽序列不超过90%或更多相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1底物序列为至少一种MMP的底物,并且包含与被同一种MMP蛋白酶天然裂解的任何人多肽序列不超过90%或更多相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM1底物序列为至少一种MMP的底物,并且包含选自以下组成的组的多肽序列:ALAHGLF(SEQ ID NO:1)、DLAHPLL(SEQ ID NO:2)、RGPKLYW(SEQ ID NO:6)、RFPYGVW(SEQ

ID NO:7)和QNQALRIA (SEQ ID NO:16)。

[0093] 在一些实施方案中,本公开的可活化抗体包含CM1底物,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:ALAHGLF (SEQ ID NO:1)、DLAHPLL (SEQ ID NO:2)、RGPPLYW (SEQ ID NO:6)、RFPYGVW (SEQ ID NO:7)和QNQALRIA (SEQ ID NO:16);以及结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)和降低AB的抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)。

[0094] 在一些实施方案中,本公开的分离的多肽包含作为至少一种SP蛋白酶的底物的CM2底物,并且包含与被同一种SP蛋白酶天然裂解的任何多肽序列(例如,任何动物多肽序列)基本不相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM2底物序列为至少一种SP的底物,并且包含与被同一种SP蛋白酶天然裂解的任何哺乳动物多肽序列基本不相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM2底物序列为至少一种SP的底物,并且包含与被同一种SP蛋白酶天然裂解的任何人多肽序列基本不相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM2底物序列为至少一种SP的底物,并且包含与被同一种SP蛋白酶天然裂解的任何多肽序列(例如,任何动物多肽序列)不超过90%或更多相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM2底物序列为至少一种SP的底物,并且包含与被同一种SP蛋白酶天然裂解的任何哺乳动物多肽序列不超过90%或更多相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM2底物序列为至少一种SP的底物,并且包含与被同一种SP蛋白酶天然裂解的任何人多肽序列不超过90%或更多相同的多肽序列。在一些实施方案中,CM2底物序列为至少一种SP的底物,并且包含选自由以下组成的组的多肽序列:APRSF (SEQ ID NO:130)和GLPTFVHL (SEQ ID NO:135)。

[0095] 在一些实施方案中,本公开的可活化抗体包含CM2底物,其包含选自由APRSF (SEQ ID NO:130)和GLPTFVHL (SEQ ID NO:135)组成的组的氨基酸序列;以及结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)和降低AB的抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)。

[0096] 在一些实施方案中,本公开的可活化抗体包含底物,其包含选自由SEQ ID NO:1-16组成的组的氨基酸序列;以及结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)和降低AB的抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)。

[0097] 在一些实施方案中,CM1-CM2、CM1或CM2底物也是至少一种另外的蛋白酶的底物。

[0098] 在一些实施方案中,所述至少一种另外的蛋白酶是与裂解CM1的MMP蛋白酶不同的MMP蛋白酶。在一些实施方案中,所述至少一种另外的蛋白酶是选自由以下组成的组的MMP蛋白酶:MMP1;MMP2;MMP3;MMP7;MMP8;MMP9;MMP10;MMP11;MMP12;MMP13;MMP14;MMP15;MMP16;MMP17;MMP19;MMP20;MMP23;MMP24;MMP26;和MMP27。

[0099] 在一些实施方案中,所述至少一种另外的蛋白酶是与裂解CM2的SP蛋白酶不同的SP蛋白酶。在一些实施方案中,所述至少一种另外的SP蛋白酶选自由以下组成的组:uPA;蛋白裂解酶;活化蛋白C;组织蛋白酶A;组织蛋白酶G;糜蛋白酶;凝血因子蛋白酶,例如像FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa;弹性蛋白酶;颗粒酶B;胰基苯甲酰酶;HtrA1;人中性粒细胞弹性蛋白酶;乳铁蛋白;Marapsin;NS3/4A;PACE4;纤溶酶;PSA;tPA;凝血酶;类胰蛋白酶;II型跨膜丝氨酸蛋白酶(TTSP),例如像DESC1、DPP-4、FAP、Hepsin、蛋白裂解酶-2、TMPRSS2、TMPRSS3和TMPRSS4。

[0100] 在一些实施方案中,所述至少一种另外的蛋白酶选自由表1所示的那些蛋白酶组成的组。

[0101] 表1: 示例性蛋白酶和/或酶

[0102]	ADAMS, ADAMTS, 例如 ADAM8	半胱天冬酶, 例如, 半胱天冬酶 1	半胱氨酸蛋白酶, 例如, 克鲁兹蛋白酶 (Cruzipain) 豆荚蛋白酶 Otubain-2
	ADAM9	半胱天冬酶 2	
	ADAM10	半胱天冬酶 3	
	ADAM12	半胱天冬酶 4	
	ADAM15	半胱天冬酶 5	KLK, 例如, KLK4
	ADAM17/TACE	半胱天冬酶 6	KLK5
	ADAMDEC1	半胱天冬酶 7	KLK6
	ADAMTS1	半胱天冬酶 8	KLK7
	ADAMTS4	半胱天冬酶 9	KLK8
	ADAMTS5	半胱天冬酶 10	KLK10
[0103]		半胱天冬酶 14	KLK11
	天冬氨酸蛋白酶, 例如, BACE		KLK13
	肾素	半胱氨酸组织蛋白酶, 例如, 组织蛋白酶 B	KLK14
		组织蛋白酶 C	
	天冬氨酸组织蛋白酶, 例如, 组织蛋白酶 D	组织蛋白酶 K	金属蛋白酶, 例如, 穿膜肽酶(Meprin) 中性内肽酶(Neprilysin)
	组织蛋白酶 E	组织蛋白酶 L	PSMA
		组织蛋白酶 S	BMP-1
		组织蛋白酶 V/L2	
		组织蛋白酶 X/Z/P	

[0104] 本公开还提供了一种抗体,其包含至少第一CM1和至少第二CM2,并且与剂缀合。在一些实施方案中,第一CM1和第二CM2各自是长度不超过15个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,可活化抗体是在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列的缀合的可活化抗体:MM-CM1-CM2-AB-剂、剂-AB-CM2-CM1-MM、MM-CM2-CM1-AB-剂或剂-AB-CM1-CM2-MM。在一些实施方案中,可活化抗体是在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列的缀合的可活化抗体:剂-MM-CM1-CM2-AB、AB-CM2-CM1-MM-剂、剂-MM-CM2-CM1-AB或AB-CM1-CM2-MM-剂。在一些实施方案中,可活化抗体是在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列的缀合的可活化抗体:剂-MM-CM1-CM2-AB-剂、剂-AB-CM2-CM1-MM-剂、剂-MM-CM2-CM1-AB-剂或剂-AB-CM1-CM2-MM-剂。

[0105] 在一些实施方案中,可活化抗体是包含掩蔽部分(MM)、第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2)的缀合的可活化抗体,并且抗体在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:MM1-LP1-CM1-CM2-LP2-AB-剂、剂-AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM、MM1-LP1-CM2-CM1-LP2-AB-剂或剂-AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM。在一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度为约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中,两个连接肽不需要彼此相同。

[0106] 在一些实施方案中,可活化抗体是包含掩蔽部分(MM)、第一连接肽(LP1)和第二连

接肽 (LP2) 的缀合的可活化抗体, 并且抗体在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列: 剂-MM1-LP1-CM1-CM2-LP2-AB、AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM-剂、剂-MM1-LP1-CM2-CM1-LP2-AB或AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM-剂。在一些实施方案中, LP1和LP2中的每一个是长度为约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中, 两个连接肽不需要彼此相同。

[0107] 在一些实施方案中, 可活化抗体是包含掩蔽部分 (MM)、第一连接肽 (LP1) 和第二连接肽 (LP2) 的缀合的可活化抗体, 并且抗体在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列: 剂-MM1-LP1-CM1-CM2-LP2-AB-剂、剂-AB-LP2-CM2-CM1-LP1-MM-剂、剂-MM1-LP1-CM2-CM1-LP2-AB-剂或剂-AB-LP2-CM1-CM2-LP1-MM-剂。在一些实施方案中, LP1和LP2中的每一个是长度为约1至20个氨基酸的肽。在一些实施方案中, 两个连接肽不需要彼此相同。

[0108] 在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含CM1与CM2之间的连接肽 (LP')。在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含掩蔽部分 (MM) 与CM1之间的连接肽 (LP1)。在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含CM2与AB之间的连接肽 (LP2)。在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含MM与CM1之间的连接肽 (LP1) 和CM2与AB之间的连接肽 (LP2)。在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含MM与CM1之间的连接肽 (LP1) 和CM1与CM2之间的连接肽 (LP')。在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含CM1与CM2之间的连接肽 (LP') 和CM2与AB之间的连接肽 (LP2)。在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含MM与CM1之间的连接肽 (LP1)、CM1与CM2之间的连接肽 (LP') 和CM2与AB之间的连接肽 (LP2)。

[0109] 在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含CM1与CM2之间的连接肽 (LP')。在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含AB与CM1之间的连接肽 (LP1)。在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含CM2与掩蔽部分 (MM) 之间的连接肽 (LP2)。在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含AB与CM1之间的连接肽 (LP1) 和CM2与MM之间的连接肽 (LP2)。在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含AB与CM1之间的连接肽 (LP1) 和CM1与CM2之间的连接肽 (LP')。在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含CM1与CM2之间的连接肽 (LP') 和CM2与MM之间的连接肽 (LP2)。在一些实施方案中, 缀合的可活化抗体包含AB与CM1之间的连接肽 (LP1)、CM1与CM2之间的连接肽 (LP') 和CM2与MM之间的连接肽 (LP2)。

[0110] 在一些实施方案中, LP' 为GG。在一些实施方案中, LP' 为GGSGGS (SEQ ID NO:218)。

[0111] 在一些实施方案中, LP1或LP2中的至少一个包含选自以下组成的组的氨基酸序列: (GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (SEQ ID NO:381) 和 (GGGS)_n (SEQ ID NO:382), 其中n为至少1的整数。

[0112] 在一些实施方案中, LP1或LP2中的至少一个包含选自以下组成的组的氨基酸序列: GGSG (SEQ ID NO:202)、GGSGG (SEQ ID NO:203)、GSGSG (SEQ ID NO:204)、GSGGG (SEQ ID NO:205)、GGGSG (SEQ ID NO:206) 和GSSSG (SEQ ID NO:207)。

[0113] 在一些实施方案中, LP1包含氨基酸序列GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO:208)、GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO:209)、GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:210)、GSSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:211)、GSSGGSGGSG (SEQ ID NO:212) 或GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO:213) 和GGGSSGGS (SEQ ID NO:214)。

[0114] 在一些实施方案中, LP2包含氨基酸序列GSS、GGS、GGGS (SEQ ID NO:215)、GSSGT (SEQ ID NO:216) 或GSSG (SEQ ID NO:217)。

[0115] 在一些实施方案中, CM1-CM2底物连接到或以其他方式附接到抗体。例如, CM1-CM2

用于将一种或多种剂连接到与给定靶标结合的抗体或其抗原结合片段(AB),使得CM1-CM2在暴露于MMP和/或SP和/或CP时被裂解,并且剂从AB中释放。示例性靶标包括但不限于表2所示的靶标。示例性AB包括但不限于表3所示的抗体。

[0116] 在一些实施方案中,AB与靶标结合的解离常数为约100nM或更低。

[0117] 在一些实施方案中,抗体包括特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,结合靶标的抗体或其免疫活性片段为单克隆抗体、结构域抗体、单链、Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scab、dAb、单结构域重链抗体或单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,此种结合靶标的抗体或其免疫活性片段为小鼠抗体、其他啮齿动物抗体、嵌合抗体、人源化抗体或完全人单克隆抗体。

[0118] 在一些实施方案中,MM与AB结合的解离常数不超过AB与靶标的解离常数。

[0119] 在一些实施方案中,MM在裂解状态下不干扰或竞争AB与靶标的结合。

[0120] 在一些实施方案中,MM是长度为约2至40个氨基酸的多肽。例如,MM是长度至多约40个氨基酸的多肽。

[0121] 在一些实施方案中,MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体的序列不同。在一些实施方案中,MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体不超过50%相同。在一些实施方案中,MM多肽序列与AB的任何天然结合配偶体不超过40%、30%、25%、20%、15%或10%相同。

[0122] 在一些实施方案中,缀合至AB或可活化抗体的AB的剂为治疗剂。在一些实施方案中,剂为抗肿瘤剂。在一些实施方案中,剂为毒素或其片段。如本文所用,毒素的片段为保留毒素活性的片段。在一些实施方案中,剂通过可裂解的接头缀合至AB。在一些实施方案中,剂通过包含至少一个CM1-CM2底物序列的接头缀合至AB。在一些实施方案中,剂通过不可裂解的接头缀合至AB。在一些实施方案中,剂为微管抑制剂。在一些实施方案中,剂为核酸损伤剂,诸如DNA烷基化剂或DNA嵌入剂,或其他DNA损伤剂。在一些实施方案中,剂为选自表4中列出的组的剂。在一些实施方案中,剂为多拉司他汀。在一些实施方案中,剂为瑞奥西汀或其衍生物。在一些实施方案中,剂为瑞奥西汀E或其衍生物。在一些实施方案中,剂为单甲基瑞奥西汀E(MMAE)。在一些实施方案中,剂为单甲基瑞奥西汀D(MMAD)。在一些实施方案中,剂为美登木素生物碱或美登木素生物碱衍生物。在一些实施方案中,剂为DM1或DM4。在一些实施方案中,剂为倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,剂为卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,剂为吡咯并苯并二氮杂草(pyrrolobenzodiazepine)。在一些实施方案中,剂为吡咯并苯并二氮杂草二聚体。

[0123] 在一些实施方案中,剂为抗炎剂。

[0124] 在一些实施方案中,抗体和/或可活化抗体还包含可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分为诊断剂。

[0125] 在一些实施方案中,缀合的抗体和/或缀合的可活化抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记包括显像剂、造影剂、酶、荧光标记、发色团、染料、一种或多种金属离子或基于配体的标记。在一些实施方案中,显像剂包括放射性同位素。在一些实施方案中,放射性同位素为铟或镓。在一些实施方案中,造影剂包括碘、钆或铁氧化物。在一些实施方案中,酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或 β -半乳糖苷酶。在一些实施方案中,荧光标记包括黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、修饰的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2(RFP tdimer2)、HCRED或铈衍生物。在一些实施方案中,发

光标记包括N-甲基吡啶(N-methylacrydinium)衍生物。在一些实施方案中,标记包括Alexa Fluor®标记,诸如Alex Fluor® 680或Alexa Fluor® 750。在一些实施方案中,基于配体的标记包括生物素、亲和素、链霉亲和素或一种或多种半抗原。

[0126] 在一些实施方案中,抗体和/或可活化抗体的AB天然含有一个或多个二硫键。在一些实施方案中,AB可被工程化为包含一个或多个二硫键。

[0127] 在一些实施方案中,抗体和/或缀合的抗体为单特异性的。在一些实施方案中,抗体和/或缀合的抗体为多特异性的,在本文中称为多特异性抗体和/或缀合的多特异性抗体。在一些实施方案中,多特异性抗体和/或缀合的多特异性抗体为双特异性或三功能的。在一些实施方案中,抗体和/或缀合的抗体被配制为pro-双特异性T细胞衔接蛋白(pro-BITE)分子的一部分。在一些实施方案中,抗体和/或缀合的抗体被配制为pro-嵌合抗原受体(pro-CAR)修饰的T细胞或其他工程化的受体或其他免疫效应细胞(诸如CAR修饰的NK细胞)的一部分。在一些实施方案中,可活化抗体和/或缀合的可活化抗体被配制为pro-嵌合抗原受体(CAR)修饰的T细胞的一部分。在一些实施方案中,可活化抗体和/或缀合的可活化抗体被配制为pro-嵌合抗原受体(CAR)修饰的NK细胞的一部分。

[0128] 在一些实施方案中,可活化抗体和/或缀合的可活化抗体为单特异性的。在一些实施方案中,可活化抗体和/或缀合的可活化抗体为多特异性的,在本文中称为多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体。除非另外指出,否则如本文所用,术语诸如“可活化抗体”及其所有语法变形均旨在涵盖但不限于其中可活化抗体是本公开的多特异性可活化抗体的实施方案。除非另外指出,否则如本文所用,术语诸如“缀合的可活化抗体”及其所有语法变形均旨在涵盖但不限于其中缀合的可活化抗体是本公开的缀合的多特异性可活化抗体的实施方案。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体为双特异性或三功能的。在一些实施方案中,可活化抗体和/或缀合的可活化抗体被配制为pro-双特异性T细胞衔接蛋白(pro-BITE)分子的一部分。在一些实施方案中,可活化抗体和/或缀合的可活化抗体被配制为pro-嵌合抗原受体(pro-CAR)修饰的T细胞或其他工程化受体的一部分。

[0129] 在一些实施方案中,本文所述的抗体、抗体缀合物、可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体与一种或多种另外的剂或另外的剂的组合结合使用。合适的另外的剂包括用于预期应用诸如像癌症的当前药物和/或外科治疗。例如,可活化抗体、缀合的可活化抗体、多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体可与另外的化学治疗剂或抗肿瘤剂结合使用。

[0130] 在一些实施方案中,可活化抗体为多特异性可活化抗体。本文提供的多特异性可活化抗体为多特异性抗体,其识别两种或更多种不同抗原或表位,并且包含至少一个掩蔽部分(MM),其与多特异性抗体的至少一个抗原或表位结合结构域连接,使得MM的偶合降低抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力。在一些实施方案中,MM通过充当至少一种MMP蛋白酶和至少一种SP蛋白酶的底物的CM1-CM2底物偶合至多特异性抗体的抗原或表位结合结构域。本文提供的可活化多特异性抗体在循环中稳定,在预期的治疗和/或诊断位点活化,但在正常组织(即健康组织)中不活化,并且在活化时表现出与相应的未修饰的多特异性抗体至少相当的与靶标的结合。

[0131] 在一些实施方案中,本文提供的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体(包括但不限

于本公开的多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体)至少包含第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其特异性结合表皮生长因子受体(EGFR),并且含有VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列的组合,其中VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列中的至少一个选自至少包含氨基酸序列NYGVH(SEQ ID NO:220)的VH CDR1序列;至少包含氨基酸序列VIWSGGNTDYNTPFSTS(SEQ ID NO:221)的VH CDR2序列;至少包含氨基酸序列ALTYDYEFAY(SEQ ID NO:222)的VH CDR3序列;及其组合。

[0132] 在一些实施方案中,本文提供的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体(包括但不限于本公开的多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体)至少包含第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其特异性结合EGFR,并且含有VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的组合,其中VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列中的至少一个选自至少包含氨基酸序列RASQSIGTNIH(SEQ ID NO:223)的VL CDR1序列;至少包含氨基酸序列KYASESIS(SEQ ID NO:224)的VL CDR2序列;和至少包含氨基酸序列QQNNNWPTT(SEQ ID NO:225)的VL CDR3序列;及其组合。

[0133] 在一些实施方案中,本文提供的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体(包括但不限于本公开的多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体)至少包含第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其特异性结合EGFR,并且含有VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列的组合,其中VH CDR1序列、VH CDR2序列和VH CDR3序列中的至少一个选自包含与氨基酸序列NYGVH(SEQ ID NO:220)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列的VH CDR1序列;包含与氨基酸序列VIWSGGNTDYNTPFSTS(SEQ ID NO:221)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列的VH CDR2序列;包含与氨基酸序列ALTYDYEFAY(SEQ ID NO:222)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列的VH CDR3序列;及其组合。

[0134] 在一些实施方案中,本文提供的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体(包括但不限于本公开的多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体)至少包含第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其特异性结合EGFR,并且含有VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列的组合,其中VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列中的至少一个选自包含与氨基酸序列RASQSIGTNIH(SEQ ID NO:223)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列的VL CDR1序列;包含与氨基酸序列KYASESIS(SEQ ID NO:224)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列的VL CDR2序列;和包含与氨基酸序列QQNNNWPTT(SEQ ID NO:225)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列的VL CDR3序列;及其组合。

[0135] 在一些实施方案中,本文提供的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体(包括但不限于本公开的多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体)至少包含第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其特异性结合EGFR,并且含有VH CDR1序列、VH CDR2序列、VH CDR3序列、VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列,其中VH CDR1序列至少包含氨基酸序列NYGVH(SEQ ID NO:220);VH CDR2序列至少包含氨基酸序列VIWSGGNTDYNTPFSTS(SEQ ID NO:221);VH CDR3序列至少包含氨基酸序列ALTYDYEFAY(SEQ ID NO:222);VL CDR1序列至少包含氨基酸序列RASQSIGTNIH(SEQ ID NO:223);VL CDR2序列至少包含氨基酸序列KYASESIS(SEQ ID NO:224);并且VL CDR3序列至少包含氨基酸序列QQNNNWPTT(SEQ ID NO:

225)。

[0136] 在一些实施方案中,本文提供的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体(包括但不限于本公开的多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体)至少包含第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其特异性结合EGFR,并且含有VH CDR1序列、VH CDR2序列、VH CDR3序列、VL CDR1序列、VL CDR2序列和VL CDR3序列,其中VH CDR1序列包含与氨基酸序列NYGVH(SEQ ID NO:220)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列;VH CDR2序列包含与氨基酸序列VIWSGGNTDYNTPFST(SEQ ID NO:221)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列;VH CDR3序列包含与氨基酸序列ALTYDYEFAY(SEQ ID NO:222)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列;VL CDR1序列包含与氨基酸序列RASQSIGTNIH(SEQ ID NO:223)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列;VL CDR2序列包含与氨基酸序列KYASESIS(SEQ ID NO:224)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列;并且VL CDR3序列包含与氨基酸序列QQNNNWPTT(SEQ ID NO:225)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的序列。

[0137] 在一些实施方案中,本文提供的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体(包括但不限于本公开的多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体)包含CM1-CM2底物,其包含选自由SEQ ID NO:25-43组成的组的氨基酸序列;以及抗Jagged抗体,其包含本文公开的抗Jagged抗体的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文提供的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体(包括但不限于本公开的多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体)包含CM1-CM2底物,其包含选自由SEQ ID NO:25-43组成的组的氨基酸序列;以及具有包含氨基酸序列SEQ ID NO:401的轻链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:400的重链的抗体。

[0138] 在一些实施方案中,本文提供的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体(包括但不限于本公开的多特异性可活化抗体和/或缀合的多特异性可活化抗体)至少包含SEQ ID NO:400的重链氨基酸序列和选自由SEQ ID NO:403-423和450-462组成的组的轻链氨基酸序列。

[0139] 在一些实施方案中,可活化抗体还包含缀合至AB的剂。在一些实施方案中,剂为治疗剂。在一些实施方案中,剂为抗肿瘤剂。在一些实施方案中,剂为毒素或其片段。在一些实施方案中,剂通过接头缀合至AB。在一些实施方案中,接头为可裂解的接头。在一些实施方案中,剂为微管抑制剂。在一些实施方案中,剂为核酸损伤剂,诸如DNA烷基化剂或DNA嵌入剂,或其他DNA损伤剂。在一些实施方案中,接头为可裂解的接头。在一些实施方案中,剂通过包含至少一个CM1-CM2底物序列的接头缀合至AB。在一些实施方案中,剂为选自表4中列出的组的剂。在一些实施方案中,剂为多拉司他汀。在一些实施方案中,剂为瑞奥西汀或其衍生物。在一些实施方案中,剂为瑞奥西汀E或其衍生物。在一些实施方案中,剂为单甲基瑞奥西汀E(MMAE)。在一些实施方案中,剂为单甲基瑞奥西汀D(MMAD)。在一些实施方案中,剂为美登木素生物碱或美登木素生物碱衍生物。在一些实施方案中,剂为DM1或DM4。在一些实施方案中,剂为倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,剂为卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,剂为吡咯并苯并二氮杂草。在一些实施方案中,剂为吡咯并苯并二氮杂草二聚体。

[0140] 在一些实施方案中,剂为抗炎剂。

[0141] 在一些实施方案中,可活化抗体还包含可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分为诊断剂。

[0142] 在一些实施方案中,缀合的抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记包括显像剂、造影剂、酶、荧光标记、发色团、染料、一种或多种金属离子或基于配体的标记。在一些实施方案中,显像剂包括放射性同位素。在一些实施方案中,放射性同位素为铟或钆。在一些实施方案中,造影剂包括碘、钆或铁氧化物。在一些实施方案中,酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或 β -半乳糖苷酶。在一些实施方案中,荧光标记包括黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、修饰的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2(RFP tdimer2)、HCRED或钼衍生物。在一些实施方案中,发光标记包括N-甲基吡啶衍生物。在一些实施方案中,标记包括Alexa Fluor[®]标记,诸如Alex Fluor[®]680或Alexa Fluor[®]750。在一些实施方案中,基于配体的标记包括生物素、亲和素、链霉亲和素或一种或多种半抗原。

[0143] 在一些实施方案中,可活化抗体还包含信号肽。在一些实施方案中,信号肽通过间隔区缀合至可活化抗体。在一些实施方案中,间隔区在不存在信号肽的情况下缀合至可活化抗体。在一些实施方案中,间隔区直接连接到可活化抗体的MM。在一些实施方案中,间隔区以从N端到C端的结构排列间隔区-MM-CM1-CM2底物-AB直接连接到可活化抗体的MM。直接连接到可活化抗体的MM的N端的间隔区的实例为选自以下组成的组的氨基酸序列:QQQSGQ(SEQ ID NO:153)、GQSGQ(SEQ ID NO:154)、QSGQ(SEQ ID NO:155)、SGQ、GQ和Q。在一些实施方案中,间隔区至少包含氨基酸序列QQQSGQ(SEQ ID NO:153)。在一些实施方案中,间隔区至少包含氨基酸序列GQSGQ(SEQ ID NO:154)。在一些实施方案中,间隔区至少包含氨基酸序列QSGQ(SEQ ID NO:155)。在一些实施方案中,间隔区至少包含氨基酸序列SGQ。在一些实施方案中,间隔区至少包含氨基酸序列GQ。在一些实施方案中,间隔区至少包含氨基酸序列Q。

[0144] 在一些实施方案中,可活化抗体的AB天然含有一个或多个二硫键。在一些实施方案中,AB可被工程化为包含一个或多个二硫键。

[0145] 在一些实施方案中,可活化抗体的血清半衰期长于相应抗体的血清半衰期;例如,可活化抗体的pK长于相应抗体的pK。在一些实施方案中,可活化抗体的血清半衰期与相应抗体的血清半衰期类似。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少15天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少12天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少11天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少10天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少9天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少8天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少7天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少6天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少5天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少4天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少3天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少2天。在一些实施方案中,当施

用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少24小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少20小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少18小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少16小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少14小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少12小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少10小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少8小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少6小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少4小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少3小时。

[0146] 本公开还提供了包含可活化抗体的组合物和方法,所述可活化抗体包含特异性结合给定靶标的抗体或抗体片段(AB),其中AB与降低AB结合其靶标的能力的掩蔽部分(MM)偶合。在一些实施方案中,可活化抗体还包含作为至少一种MMP和至少一种SP的底物的CM1-CM2底物。本文提供的组合物和方法使得能够将一种或多种剂附接到AB中的一个或多个半胱氨酸残基,而不损害可活化抗体的活性(例如,掩蔽、活化或结合活性)。在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法使得能够将一种或多种剂附接到AB中的一个或多个半胱氨酸残基,而不减少或以其他方式干扰MM中的一个或多个二硫键。本文提供的组合物和方法产生与一种或多种剂(例如,多种治疗剂、诊断剂和/或预防剂中的任一种)缀合的可活化抗体,例如,在一些实施方案中,没有任何一种或多种剂与可活化抗体的MM缀合。本文提供的组合物和方法产生缀合的可活化抗体,其中MM保留有效且高效地掩蔽未裂解状态的可活化抗体的AB的能力。本文提供的组合物和方法产生缀合的可活化抗体,其中可活化抗体在可裂解CM1-CM2底物的MMP存在下仍被活化,即被裂解。

[0147] 可活化抗体具有针对剂的至少一个缀合点,但是在本文提供的方法和组合物中,少于所有可能的缀合点可用于与剂缀合。在一些实施方案中,一个或多个缀合点是涉及二硫键的硫原子。在一些实施方案中,一个或多个缀合点是涉及链间二硫键的硫原子。在一些实施方案中,一个或多个缀合点是涉及链间硫键的硫原子,而不是涉及链间二硫键的硫原子。在一些实施方案中,一个或多个缀合点是半胱氨酸或含有硫原子的其他氨基酸残基的硫原子。此类残基可天然存在于抗体结构中,或可通过定点诱变、化学转化或错误掺入非天然氨基酸而掺入抗体中。

[0148] 还提供了制备在AB中具有一个或多个链间二硫键且在MM中具有一个或多个链内二硫键的可活化抗体的缀合物的方法,并且提供了一种与游离硫醇反应的药物。所述方法通常包括用还原剂例如像TCEP部分还原可活化抗体中的链间二硫键;以及使与游离硫醇反应的药物缀合至部分还原的可活化抗体。如本文所用,术语部分还原是指其中可活化抗体与还原剂接触并且少于所有二硫键(例如,少于所有可能的缀合位点)被还原的情况。在一些实施方案中,少于99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或少于5%的所有可能的缀合位点被还原。

[0149] 在一些实施方案中,提供了一种将剂(例如药物)还原并缀合至可活化抗体从而导致剂具有布置的选择性的方法。所述方法通常包括用还原剂部分还原可活化抗体,使得可

活化抗体的掩蔽部分或其他非AB部分中的任何缀合位点不被还原,以及将所述剂缀合至AB中的链间硫醇。选择一个或多个缀合位点以允许所需剂布置,以允许在所需位点发生缀合。还原剂例如TCEP。还原反应条件(例如像还原剂与可活化抗体的比率、孵育时间、在孵育期间的温度、还原反应溶液的pH等)通过鉴别产生缀合的可活化抗体的条件来确定,其中MM保留有效且高效地掩蔽未裂解状态的可活化抗体的AB的能力。还原剂与可活化抗体的比率将根据可活化抗体而变化。在一些实施方案中,还原剂与可活化抗体的比率的范围将为约20:1至1:1、约10:1至1:1、约9:1至1:1、约8:1至1:1、约7:1至1:1、约6:1至1:1、约5:1至1:1、约4:1至1:1、约3:1至1:1、约2:1至1:1、约20:1至1:1.5、约10:1至1:1.5、约9:1至1:1.5、约8:1至1:1.5、约7:1至1:1.5、约6:1至1:1.5、约5:1至1:1.5、约4:1至1:1.5、约3:1至1:1.5、约2:1至1:1.5、约1.5:1至1:1.5或约1:1至1:1.5。在一些实施方案中,比率的范围为约5:1至1:1。在一些实施方案中,比率的范围为约5:1至1.5:1。在一些实施方案中,比率的范围为约4:1至1:1。在一些实施方案中,比率的范围为约4:1至1.5:1。在一些实施方案中,比率的范围为约8:1至约1:1。在一些实施方案中,比率的范围为约2.5:1至1:1。

[0150] 在一些实施方案中,提供了一种还原可活化抗体的AB中的链间二硫键并使剂(例如,含有硫醇的剂诸如药物)缀合至所得链间硫醇以选择性地将一种或多种剂定位在AB上的方法。所述方法通常包括用还原剂部分还原AB以形成至少两种链间硫醇而不在可活化抗体中形成所有可能的链间硫醇;以及使所述剂与部分还原的AB的链间硫醇缀合。例如,将可活化抗体的AB在约37°C下以所需的还原剂:可活化抗体比率部分还原约1小时。在一些实施方案中,还原剂与可活化抗体的比率的范围将为约20:1至1:1、约10:1至1:1、约9:1至1:1、约8:1至1:1、约7:1至1:1、约6:1至1:1、约5:1至1:1、约4:1至1:1、约3:1至1:1、约2:1至1:1、约20:1至1:1.5、约10:1至1:1.5、约9:1至1:1.5、约8:1至1:1.5、约7:1至1:1.5、约6:1至1:1.5、约5:1至1:1.5、约4:1至1:1.5、约3:1至1:1.5、约2:1至1:1.5、约1.5:1至1:1.5或约1:1至1:1.5。在一些实施方案中,比率的范围为约5:1至1:1。在一些实施方案中,比率的范围为约5:1至1.5:1。在一些实施方案中,比率的范围为约4:1至1:1。在一些实施方案中,比率的范围为约4:1至1.5:1。在一些实施方案中,比率的范围为约8:1至约1:1。在一些实施方案中,比率的范围为约2.5:1至1:1。

[0151] 含有硫醇的试剂可为例如半胱氨酸或N-乙酰基半胱氨酸。还原剂可为例如TCEP。在一些实施方案中,可在缀合之前使用例如柱色谱法、透析或透滤来纯化还原的可活化抗体。在一些实施方案中,在部分还原之后且在缀合之前不对还原的抗体进行纯化。

[0152] 本公开还提供了部分还原的可活化抗体,其中在不干扰可活化抗体中的任何链内二硫键的情况下,已用还原剂还原可活化抗体中的至少一个链间二硫键,其中可活化抗体包含特异性结合至靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制未裂解状态的可活化抗体的AB与靶标的结合的掩蔽部分(MM)以及偶合至AB的CM1-CM2底物,其中CM1-CM2底物为充当至少一种MMP和至少一种SP的底物的多肽。在一些实施方案中,MM通过CM1-CM2底物偶合至AB。在一些实施方案中,可活化抗体的一个或多个链内二硫键不被还原剂干扰。在一些实施方案中,可活化抗体内的MM的一个或多个链内二硫键不被还原剂干扰。在一些实施方案中,可活化抗体在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2底物-AB或AB-CM1-CM2底物-MM。在一些实施方案中,还原剂为TCEP。

[0153] 本公开还提供了部分还原的可活化抗体,包括但不限于本公开的多特异性可活化

抗体,其中在不干扰或以其他方式损害可活化抗体的活性和/或功效的情况下,已用还原剂还原可活化抗体中的至少一个链间二硫键,其中可活化抗体包含特异性结合至靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制未裂解状态的可活化抗体的AB与靶标的结合的掩蔽部分(MM)以及偶合至AB的CM1-CM2底物,并且CM1-CM2底物为充当蛋白酶的底物的多肽。以非限制性实例的方式,可活化抗体的活性和/或功效为掩蔽活性、可活化抗体的活化和/或活化的可活化抗体的结合活性。在一些实施方案中,可活化抗体的一个或多个链内二硫键不被还原剂干扰。在一些实施方案中,可活化抗体内的MM的一个或多个链内二硫键不被还原剂干扰。在一些实施方案中,可活化抗体在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2底物-AB或AB-CM1-CM2底物-MM。在一些实施方案中,还原剂为TCEP。

[0154] 本公开还提供了缀合的可活化抗体,其包含连接到单甲基瑞奥西汀D(MMAD)有效载荷的可活化抗体,其中可活化抗体包含特异性结合至靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)、抑制未裂解状态的可活化抗体的AB与靶标的结合的掩蔽部分(MM)以及偶合至AB的CM1-CM2底物,并且CM1-CM2底物为充当至少一种MMP蛋白酶和至少一种SP蛋白酶的底物的多肽。

[0155] 在一些实施方案中,MMAD缀合的可活化抗体可使用以下几种用于将剂附接到AB的方法中的任一种进行缀合:(a)附接到AB的碳水化合物部分,或(b)附接到AB的巯基,或(c)附接到AB的氨基,或(d)附接到AB的羧基。

[0156] 在一些实施方案中,MMAD有效载荷通过接头缀合至AB。在一些实施方案中,MMAD有效载荷通过接头缀合至AB中的半胱氨酸。在一些实施方案中,MMAD有效载荷通过接头缀合至AB中的赖氨酸。在一些实施方案中,MMAD有效载荷通过接头缀合至AB的另一个残基,诸如本文公开的那些残基。在一些实施方案中,接头为含有硫醇的接头。在一些实施方案中,接头为可裂解的接头。在一些实施方案中,接头为不可裂解的接头。在一些实施方案中,接头选自自由表5和表6中示出的接头组成的组。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效载荷通过马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸接头连接。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效载荷通过马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头连接。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效载荷通过马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基接头连接。在一些实施方案中,可活化抗体和MMAD有效载荷通过马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基接头连接。在一些实施方案中,使用本文公开的部分还原和缀合技术将MMAD有效载荷缀合至AB。

[0157] 本公开还提供了多肽和其他较大分子,其包含本文提出的一个或多个CM1-CM2底物序列。以非限制性实例的方式,本文提出的CM1-CM2底物序列可用于前药组合物及其使用方法。本文提出的这些CM1-CM2底物序列也可用于探针和其他检测剂及其使用方法。例如,本文提出的CM1-CM2底物序列可与fluor和其他淬灭剂结合使用以产生检测剂,诸如显像剂和其他诊断剂。本领域普通技术人员将理解,本文提出的CM1-CM2底物序列在本领域中可用于使用可被至少一种MMP和至少一种SP裂解的底物的任何组合物和/或方法中。

[0158] 本公开还提供了一种编码本文所述的抗体和/或可活化抗体的分离的核酸分子,以及包含这些分离的核酸序列的载体。本公开提供了产生抗体和/或可活化抗体的方法,其通过在导致抗体和/或可活化抗体表达的条件下培养细胞来进行,其中细胞包含此种载体。

[0159] 本公开提供了一种制造本公开的结合给定靶标的缀合的抗体的方法,所述方法通

过 (a) 在导致抗体表达的条件下培养包含编码抗体的核酸构建体的细胞, (i) 其中抗体包含 CM1-CM2 底物, 并且 (ii) 其中 CM1-CM2 底物为充当基质金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶的底物的多肽; (b) 回收抗体; 以及 (c) 使回收的抗体与一种或多种另外的剂缀合。

[0160] 本公开还提供了一种制造本公开的在活化状态下结合给定靶标的可活化抗体的方法, 所述方法通过以下进行: (a) 在导致可活化抗体表达的条件下培养包含编码可活化抗体的核酸构建体的细胞, 其中可活化抗体包含掩蔽部分 (MM)、CM1-CM2 底物和特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段 (AB), (i) 其中 CM1-CM2 底物为充当 MMP 和 SP 的底物的多肽; 并且 (ii) 其中 CM1-CM2 底物定位在可活化抗体中, 使得在未裂解状态下, MM 干扰 AB 与靶标的特异性结合, 并且在裂解状态下, MM 不干扰或竞争 AB 与靶标的特异性结合; 以及 (b) 回收可活化抗体。

[0161] 本公开还提供了一种制造本公开的在活化状态下结合给定靶标的缀合的可活化抗体的方法, 所述方法通过以下进行: (a) 在导致可活化抗体表达的条件下培养包含编码可活化抗体的核酸构建体的细胞, 其中可活化抗体包含掩蔽部分 (MM)、CM1-CM2 底物和特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段 (AB), (i) 其中 CM1-CM2 底物为充当 MMP 和 SP 和/或 CP 的底物的多肽; 并且 (ii) 其中 CM1-CM2 底物定位在可活化抗体中, 使得在未裂解状态下, MM 干扰 AB 与靶标的特异性结合, 并且在裂解状态下, MM 不干扰或竞争 AB 与靶标的特异性结合; (b) 回收可活化抗体; 以及 (c) 使回收的抗体与一种或多种另外的剂缀合。

[0162] 本公开提供了预防受试者的靶标相关疾病、延迟所述疾病的进展、治疗所述疾病、缓解所述疾病的症状或以其他方式改善所述疾病的方法, 所述方法通过向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体来进行。

[0163] 本公开提供了预防受试者的炎症和/或炎性病症、延迟所述病症的进展、治疗所述病症、缓解所述病症的症状或以其他方式改善所述病症的方法, 所述方法通过向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体来进行。本公开还提供了预防受试者的癌症、延迟所述癌症的进展、治疗所述癌症、缓解所述癌症的症状或以其他方式改善所述癌症的方法, 所述方法通过向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体来进行。本公开还提供了预防受试者的自身免疫疾病、延迟所述疾病的进展、治疗所述疾病、缓解所述疾病的症状或以其他方式改善所述疾病的方法, 所述方法通过向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体来进行。

[0164] 在这些方法和用途的任何实施方案中使用的缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体可在疾病的任何阶段施用。例如, 可将此种缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体施用于患有从早期到转移的任何阶段的癌症的患者。术语受试者和患者在本文可互换使用。

[0165] 在一些实施方案中, 受试者为哺乳动物, 诸如人、非人灵长类动物、伴侣动物 (例如, 猫、狗、马)、农场动物、工作动物或动物园动物。在一些实施方案中, 受试者为啮齿动物。在一些实施方案中, 受试者为人。在一些实施方案中, 受试者为伴侣动物。在一些实施方案中, 受试者为兽医护理的动物。

[0166] 将缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体及其治疗制剂施用于患有或易患与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的受试者。使用本领域已知的多种方法

中的任一种来鉴别患有或易患与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的受试者。例如,使用多种临床和/或实验室测试(诸如身体检查和血液、尿液和/或粪便分析)中的任一种来鉴别患有癌症或其他肿瘤病状的受试者,以评估健康状况。例如,使用多种临床和/或实验室测试(诸如身体检查和/或体液分析,例如血液、尿液和/或粪便分析)中的任一种来鉴别患有炎症和/或炎性病症的受试者,以评估健康状况。

[0167] 如果实现了多种实验室或临床目标中任一种,则认为将缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体施用于患有与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的患者是成功的。例如,如果与疾病或病症相关的一种或多种症状得到缓解、减轻、抑制或不进展到进一步(即,更糟)状态,则认为将缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体施用于患有与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的患者是成功的。如果疾病或病症进入缓解期或不进展到进一步(即,更糟)状态,则认为将缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体施用于患有与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症的患者是成功的。

[0168] 在一些实施方案中,本文所述的抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体与一种或多种另外的剂或另外的剂的组合结合使用。合适的另外的剂包括用于预期应用诸如像癌症的当前药物和/或外科治疗。例如,抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体可与另外的化学治疗剂或抗肿瘤剂结合使用。

[0169] 在一些实施方案中,一种或多种另外的剂为化学治疗剂,诸如选自以下组成的组的化学治疗剂:多西他赛(docetaxel)、紫杉醇(paclitaxel)、abraxane(即,白蛋白缀合的紫杉醇)、多柔比星(doxorubicin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、卡铂、顺铂、伊立替康(irinotecan)和吉西他滨(gemcitabine)。

[0170] 在一些实施方案中,一种或多种另外的剂为检查点抑制剂、激酶抑制剂、靶向肿瘤微环境中的抑制剂的剂和/或T细胞或NK激动剂。在一些实施方案中,一种或多种另外的剂为单独的或与另外一种或多种另外的剂诸如化学治疗剂或抗肿瘤剂组合的放射疗法。在一些实施方案中,一种或多种另外的剂为疫苗、肿瘤病毒和/或DC活化剂,以非限制性实例的方式,诸如toll样受体(TLR)激动剂和/或 α -CD40。在一些实施方案中,一种或多种另外的剂为被设计成通过ADCC或通过毒素直接缀合(例如,抗体-药物缀合物(ADC))来杀死肿瘤的肿瘤靶向抗体。

[0171] 在一些实施方案中,检查点抑制剂为选自以下组成的组的靶标的抑制剂:CTLA-4、LAG-3、PD-1、PD-1、TIGIT、TIM-3、B7H4、BTLA和Vista。在一些实施方案中,激酶抑制剂选自自由B-RAFi、MEKi和Btk抑制剂(诸如依鲁替尼(ibrutinib))组成的组。在一些实施方案中,激酶抑制剂为克唑替尼(crizotinib)。在一些实施方案中,肿瘤微环境抑制剂选自自由以下组成的组:IDO抑制剂、 α -CSF1R抑制剂、 α -CCR4抑制剂、TGF- β 、髓源性抑制细胞或T调节细胞。在一些实施方案中,激动剂选自自由以下组成的组:OX40、GITR、CD137、ICOS、CD27和HVEM。

[0172] 在一些实施方案中,抑制剂为CTLA-4抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为LAG-3抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为PD-1抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为PD-1抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为TIGIT抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为TIM-3抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为B7H4抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为Vista抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为B-RAFi抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为MEKi抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为Btk抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为依鲁替尼。在一些实施方案

中,抑制剂为克唑替尼。在一些实施方案中,抑制剂为IDO抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为 α -CSF1R抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为 α -CCR4抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂为TGF- β 。在一些实施方案中,抑制剂为髓源性抑制细胞。在一些实施方案中,抑制剂为T调节细胞。

[0173] 在一些实施方案中,激动剂为OX40。在一些实施方案中,激动剂为GITR。在一些实施方案中,激动剂为CD137。在一些实施方案中,激动剂为ICOS。在一些实施方案中,激动剂为CD27。在一些实施方案中,激动剂为HVEM。

[0174] 在一些实施方案中,将抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体在治疗期间和/或治疗后与一种或多种另外的剂(例如像化学治疗剂、抗炎剂和/或免疫抑制剂)组合施用。在一些实施方案中,抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及另外的剂被配制成单一治疗组合物,并且同时施用抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及另外的剂。或者,抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及另外的剂彼此分开,例如,将它们各自配制成单独的治疗组合物,并且同时施用抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及另外的剂,或者在治疗方案中的不同时间施用抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及另外的剂。例如,在施用另外的剂之前施用抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体,在施用另外的剂之后施用抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体,或以交替方式施用抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及另外的剂。如本文所述,以单剂量或多剂量施用抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及另外的剂。

[0175] 在一些实施方案中,同时施用抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及一种或多种另外的剂。例如,抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及一种或多种另外的剂可被配制成单一组合物或作为两种或更多种单独的组合物施用。在一些实施方案中,依次施用抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及一种或多种另外的剂,或在治疗方案中的不同时间施用抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及另外的剂。

[0176] 在一些实施方案中,将缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体在治疗期间和/或治疗后与一种或多种另外的剂组合施用,所述一种或多种另外的剂以非限制性实例的方式诸如抗炎剂、免疫抑制剂、化学治疗剂(诸如烷基化剂)、抗代谢物、抗微管剂、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒性抗生素和/或任何其他核酸损伤剂。在一些实施方案中,另外的剂为紫杉烷,诸如紫杉醇(例如**Abraxane®**)。在一些实施方案中,另外的剂为抗代谢物,诸如吉西他滨。在一些实施方案中,另外的剂为烷基化剂,诸如基于铂的化学治疗剂,诸如卡铂或顺铂。在一些实施方案中,另外的剂为靶向剂,诸如激酶抑制剂,例如索拉非尼(sorafenib)或埃罗替尼(erlotinib)。在一些实施方案中,另外的剂为靶向剂,诸如另一种抗体,例如单克隆抗体(例如贝伐单抗(bevacizumab))、双特异性抗体或多特异性抗体。在一些实施方案中,另外的剂为蛋白酶体抑制剂,诸如硼替佐米(bortezomib)或卡非佐米(carfilzomib)。在一些实施方案中,另外的剂为免疫调节剂,诸如来那度胺(lenalidomide)或IL-2。在一些实施方案中,另外的剂为放射。在一些实施方案中,另外的剂为被本领域技术人员视为标准护理的剂。在一些实施方案中,另外的剂为本领域技术人

员众所周知的化学治疗剂。

[0177] 在一些实施方案中,另外的剂为抗体、另一种缀合的抗体、另一种可活化抗体和/或另一种缀合的可活化抗体。在一些实施方案中,另外的剂为针对与第一缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体相同的靶标的抗体、另一种缀合的抗体、另一种可活化抗体和/或另一种缀合的可活化抗体。在一些实施方案中,另外的剂为针对与第一缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体的靶标不同的靶标的抗体、另一种缀合的抗体、另一种可活化抗体和/或另一种缀合的可活化抗体。

[0178] 在一些实施方案中,同时施用缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及一种或多种另外的剂。例如,缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及一种或多种另外的剂可被配制成单一组合物或作为两种或更多种单独的组合物施用。在一些实施方案中,依次施用缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及一种或多种另外的剂,或在治疗方案中的不同时间施用抗体和/或缀合的抗体以及另外的剂。例如,在施用另外的剂之前施用抗体和/或缀合的抗体,在施用另外的剂之后施用抗体和/或缀合的抗体,或以交替方式施用抗体和/或缀合的抗体以及另外的剂。如本文所述,抗体和/或缀合的抗体以及另外的剂为单剂量或多剂量。

[0179] 本公开还提供了用于在多种诊断性和/或预防性适应症中使用缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体的方法和试剂盒。

[0180] 根据本公开的药物组合物可包含本公开的抗体、缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及载剂。这些药物组合物可包括在试剂盒中,例如像诊断试剂盒。

[0181] 缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体包含特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段(AB)。AB的靶标的示例性类别包括但不限于细胞表面受体和分泌的结合蛋白(例如,生长因子)、可溶性酶、结构蛋白(例如,胶原、纤连蛋白)等。在一些实施方案中,缀合的抗体和/或可活化抗体具有结合细胞外靶标(通常为细胞外蛋白靶标)的AB。在一些实施方案中,缀合的抗体和/或可活化抗体被设计用于细胞摄取,并且可在细胞内转换。

[0182] 作为非限制性实例,AB为表2中列出的任何靶标的结合配偶体。

[0183] 表2:示例性靶标

[0184]

1-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LIF-R	STEAP1
α -4 整联蛋白	CD56	DLK1	透明质酸酶	Lewis X	STEAP2
α -V 整联蛋白	CD64	DLL4	ICOS	LIGHT	TAG-72
α 4 β 1 整联蛋白	CD70	DPP-4	IFN α	LRP4	TAPA1
α 4 β 7 整联蛋白	CD71	DSG1	IFN β	LRRC26	TGF β
AGR2	CD74	EGFR	IFN γ	MCSP	TIGIT
抗 Lewis-Y		EGFRviii	IgE	间皮素	TIM-3
Apelin J 受体	CD80	内皮素 B 受体 (ETBR)	IgE 受体 (Fc ϵ RI)	MRP4	TLR2
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MUC1	TLR4
B7-H4	CD86	EpCAM	IGF1R	粘蛋白 -16 (MUC16、CA-125)	TLR6
BAFF	CD95	EPHA2	IL1B	Na/K ATP 酶	TLR7
BTLA	CD117	EPHB2	IL1R	中性粒细胞弹性蛋白酶	TLR8
C5 补体	CD125	ERBB3	IL2	NGF	TLR9

[0185]

C-242	CD132 (IL-2RG)	RSV 的 F 蛋白	IL11	Nicestrin	TMEM31
CA9	CD133	FAP	IL12	Notch 受体	TNF α
CA19-9 (Lewis a)	CD137	FGF-2	IL12p40	Notch 1	TNFR
碳酸酐酶 9	CD138	FGF8	IL-12R、 IL-12R β 1	Notch 2	TNFRS1 2A
CD2	CD166	FGFR1	IL13	Notch 3	TRAIL-R 1
CD3	CD172A	FGFR2	IL13R	Notch 4	TRAIL-R 2
CD6	CD248	FGFR3	IL15	NOV	转铁蛋白
CD9	CDH6	FGFR4	IL17	OSM-R	转铁蛋白 受体
CD11a	CEACAM 5 (CEA)	叶酸受体	IL18	OX-40	TRK-A
CD19	CEACAM 6 (NCA-90)	GAL3ST1	IL21	PAR2	TRK-B
CD20	CLAUDIN -3	G-CSF	IL23	PDGF-AA	uPAR
CD22	CLAUDIN -4	G-CSFR	IL23R	PDGF-BB	VAP1
CD24	cMet	GD2	IL27/IL27R (wsx1)	PDGFR α	VCAM-1
CD25	胶原	GITR	IL29	PDGFR β	VEGF
CD27	Cripto	GLUT1	IL-31R	PD-1	VEGF-A
CD28	CSFR	GLUT4	IL31/IL31R	PD-L1	VEGF-B
CD30	CSFR-1	GM-CSF	IL2R	PD-L2	VEGF-C
CD33	CTLA-4	GM-CSFR	IL4	磷脂酰-丝 氨酸	VEGF-D
CD38	CTGF	GP IIb/IIIa 受体	IL4R	P1GF	VEGFR1
CD40	CXCL10	Gp130	IL6、IL6R	PSCA	VEGFR2
CD40L	CXCL13	GPIIB/IIIA	胰岛素受体	PSMA	VEGFR3
CD41	CXCR1	GPMB	Jagged 配体	RAAG12	VISTA
CD44	CXCR2	GRP78	Jagged 1	RAGE	WISP-1
CD44v6		HER2/neu	Jagged 2	SLC44A4	WISP-2
CD47	CXCR4	HGF	LAG-3	磷酸鞘氨醇 1	WISP-3
CD51	CYR61	hGH			

[0186] 作为非限制性实例,AB是或源自表3中列出的抗体。

[0187] 表3:Ab的示例性来源

[0188]

抗体商品名(抗体名称)	靶标
Avastin™(贝伐单抗)	VEGF
Lucentis™(兰尼单抗(ranibizumab))	VEGF
Erbix™(西妥昔单抗)	EGFR
Vectibix™(帕尼单抗(panitumumab))	EGFR
Remicade™(英利昔单抗(infliximab))	TNF α
Humira™(阿达木单抗(adalimumab))	TNF α
Tysabri™(那他珠单抗(natalizumab))	整联蛋白 $\alpha 4$
Simulect™(巴利昔单抗(basiliximab))	IL2R
Soliris™(依库丽单抗(eculizumab))	补体 C5
Raptiva™(依法珠单抗(efalizumab))	CD11a
Bexxar™(托西莫单抗(tositumomab))	CD20
Zevalin™(替伊莫单抗(ibrutinomab tiuxetan))	CD20
Rituxan™(利妥昔单抗(rituximab))	CD20
奥美珠单抗(ocrelizumab)	CD20
Arzerra™(奥法木单抗(Ofatumumab))	CD20
Gazyva™(奥比妥珠单抗(obinutuzumab))	CD20
Zenapax™(达克珠单抗(daclizumab))	CD25
Adcetris™(本妥昔单抗(brentuximab vedotin))	CD30
Mylotarg™(吉妥珠单抗(gemtuzumab))	CD33
Mylotarg™(吉妥珠单抗奥佐米星(gemtuzumab ozogamicin))	CD33
Campath™(阿仑单抗(alemtuzumab))	CD52
ReoPro™(阿昔单抗(abciximab))	糖蛋白受体 IIb/IIIa
Xolair™(奥马珠单抗(omalizumab))	IgE
Herceptin™(曲妥珠单抗(trastuzumab))	Her2
Kadcyla™(恩美曲妥珠单抗(trastuzumab emtansine))	Her2
Synagis™(帕利珠单抗(palivizumab))	RSV 的 F 蛋白
(伊匹单抗(ipilimumab))	CTLA-4
(曲美母单抗(tremelimumab))	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(帕妥珠单抗(pertuzumab))	Her2-neu
(尔妥马单抗(ertumaxomab))	CD3/Her2-neu
Orencia™(阿巴西普(abatacept))	CTLA-4
(他尼珠单抗(tanezumab))	NGF
(巴维昔单抗(bavituximab))	磷脂酰丝氨酸
(扎鲁木单抗(zalutumumab))	EGFR
(马帕木单抗(mapatumumab))	EGFR
(马妥珠单抗(matuzumab))	EGFR
(尼妥珠单抗(nimotuzumab))	EGFR

[0189]	ICR62	EGFR
	mAb 528	EGFR
	CH806	EGFR
	MDX-447	EGFR/CD64
	(依决洛单抗(edrecolomab))	EpCAM
	RAV12	RAAG12
	huJ591	PSMA
	Enbrel™(依那西普(etanercept))	TNF-R
	Amevive™(阿法西普(alefacept))	1-92-LFA-3
	Antril™、Kineret™(阿那白滞素(ankinra))	IL-1Ra
	GC1008	TGFβ
		Notch, 例如 Notch 1
		Jagged 1 或 Jagged 2
	(阿德木单抗(adecatumumab))	EpCAM
	(芬妥木单抗(figitumumab))	IGF1R
	(托珠单抗(tocilizumab))	IL-6 受体
	Stelara™(优特克单抗(ustekinumab))	IL-12/IL-23
	Prolia™(地诺单抗(denosumab))	RANKL

[0190] 本文提供的可活化抗体和可活化抗体组合物至少含有特异性结合靶标例如人靶标的抗体或其抗体片段(贯穿本公开统称为AB),其中AB被掩蔽部分(MM)修饰。

[0191] 在一些实施方案中,选择掩蔽部分以与特异性抗体或抗体片段一起使用。例如,用于与结合EGFR的抗体一起使用的合适的掩蔽部分包括包含序列CISPRG(SEQ ID NO:165)的MM。以非限制性实例的方式,MM可包含诸如以下的序列:CISPRGC(SEQ ID NO:166); CISPRGCG(SEQ ID NO:167);CISPRGCPDGPYVMY(SEQ ID NO:168);CISPRGCPDGPYVM(SEQ ID NO:169);CISPRGCEPGTYVPT(SEQ ID NO:170)和CISPRGCPGQIWHPP(SEQ ID NO:171)。其他合适的掩蔽部分包括PCT公布号W0 2010/081173中所公开的EGFR特异性掩蔽中的任一种,以非限制性实例的方式,诸如GSHCLIPINMGAPSC(SEQ ID NO:172);CISPRGCGSSASQSGQSHCLIPINMGAPSC(SEQ ID NO:173);CNHHYFYTCGCISPRGCPG(SEQ ID NO:174);ADHVFWSYGCISPRGCPG(SEQ ID NO:175);CHHVYWGHCISPRGCPG(SEQ ID NO:176);CPHFSTTTSCGCISPRGCPG(SEQ ID NO:177);CNHHYHYCGCISPRGCPG(SEQ ID NO:178);CPHVSFGSCGCISPRGCPG(SEQ ID NO:179);CPYYTLSYCGCISPRGCPG(SEQ ID NO:180);CNHVYFGTCGCISPRGCPG(SEQ ID NO:181);CNHFTLTTCGCISPRGCPG(SEQ ID NO:182);CHHFTLTTCGCISPRGCPG(SEQ ID NO:183);YNPCATPMCCISPRGCPG(SEQ ID NO:184);CNHHYFYTCGCISPRGCG(SEQ ID NO:185);CNHHYHYCGCISPRGCG(SEQ ID NO:186);CNHVYFGTCGCISPRGCG(SEQ ID NO:187);CHHVYWGHCISPRGCG(SEQ ID NO:188);CPHFSTTTSCGCISPRGCG(SEQ ID NO:189);CNHFTLTTCGCISPRGCG(SEQ ID NO:190);CHHFTLTTCGCISPRGCG(SEQ ID NO:191);CPYYTLSYCGCISPRGCG(SEQ ID NO:192);CPHVSFGSCGCISPRGCG(SEQ ID NO:193);ADHVFWSYGCISPRGCG(SEQ ID NO:194);YNPCATPMCCISPRGCG(SEQ ID NO:195);CHHVYWGHCISPRGCG(SEQ ID NO:196);C(N/P)H(H/V/F)(Y/T)(F/W/T/L)(Y/G/T/S)(T/S/Y/H)CGCISPRGCG(SEQ ID NO:197);CISPRGCGQPIPSVK

(SEQ ID NO:198); CISPRGCTQPYHVS (SEQ ID NO:199); 和/或 CISPRGCNAVSGGLS (SEQ ID NO:164)。

[0192] 与未用MM修饰的AB的特异性结合或亲本AB与靶标的特异性结合相比,当用MM修饰AB且在存在靶标时,AB与其靶标的特异性结合降低或受到抑制。

[0193] 用MM修饰的AB针对靶标的 K_d 比未用MM修饰的AB或亲本AB针对靶标的 K_d 大至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更多倍,或在5-10倍、10-100倍、10-1,000倍、10-10,000倍、10-100,000倍、10-1,000,000倍、10-10,000,000倍、100-1,000倍、100-10,000倍、100-100,000倍、100-1,000,000倍、100-10,000,000倍、1,000-10,000倍、1,000-100,000倍、1,000-1,000,000倍、1,000-10,000,000倍、1000-10,000,000倍、10,000-100,000倍、10,000-1,000,000倍、10,000-10,000,000倍、100,000-1,000,000倍或100,000-10,000,000倍之间。相反,用MM修饰的AB针对靶标的结合亲和力比未用MM修饰的AB或亲本AB针对靶标的结合亲和力低至少2、3、4、5、10、20、25、40、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更多倍,或在5-10倍、10-100倍、10-1,000倍、10-10,000倍、10-100,000倍、10-1,000,000倍、10-10,000,000倍、100-1,000倍、100-10,000倍、100-100,000倍、100-1,000,000倍、100-10,000,000倍、1,000-10,000倍、1,000-100,000倍、1,000-1,000,000倍、1,000-10,000,000倍、1000-10,000,000倍、10,000-100,000倍、10,000-1,000,000倍、10,000-10,000,000倍、100,000-1,000,000倍或100,000-10,000,000倍之间。

[0194] MM针对AB的解离常数(K_d)通常大于AB针对靶标的 K_d 。MM针对AB的 K_d 可比AB针对靶标的 K_d 大至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000或甚至10,000,000倍。相反,MM针对AB的结合亲和力通常低于AB针对靶标的结合亲和力。MM针对AB的结合亲和力可比AB针对靶标的结合亲和力低至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000或甚至10,000,000倍。

[0195] 与未用MM修饰的AB的特异性结合或亲本AB与靶标的特异性结合相比,当用MM修饰AB且在存在靶标时,AB与其靶标的特异性结合降低或受到抑制。当在体内或体外测定中测量时,与未用MM修饰的AB与靶标的结合或亲本AB与靶标的结合相比,当用MM修饰时,AB结合靶标的能力可降低至少50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和甚至100%,持续至少2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84或96小时或5、10、15、30、45、60、90、120、150或180天或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更长时间。

[0196] MM抑制AB与靶标的结合。MM结合AB的抗原结合结构域并抑制AB与靶标的结合。MM可在空间上抑制AB与靶标的结合。MM可变构地抑制AB与其靶标的结合。在这些实施方案中,当在体内或体外测定中测量时,与未用MM修饰的AB、亲本AB或未偶合至MM的AB与靶标的结合相比,当AB被修饰或偶合至MM且在存在靶标时,AB与靶标不结合或基本上不结合,或AB与靶标的结合不超过0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%或50%,持续至少2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84或96小时或5、10、15、30、45、60、90、120、150或180天或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更长时间。

[0197] 当AB偶合至MM或被MM修饰时,MM“掩蔽”或减少或以其他方式抑制AB与靶标的特异

性结合。当AB偶合至MM或被MM修饰时,此种偶合或修饰可引起降低或抑制AB特异性结合其靶标的能力的结构变化。

[0198] 偶合至MM或用MM修饰的AB可由下式(以从氨基(N)端区域到羧基(C)端区域的顺序)表示:

[0199] (MM) - (AB)

[0200] (AB) - (MM)

[0201] (MM) - L - (AB)

[0202] (AB) - L - (MM)

[0203] 其中MM为掩蔽部分,AB为抗体或其抗体片段,并且L为接头。在许多实施方案中,可能期望将一个或多个接头(例如柔性接头)插入到组合物中以提供柔性。

[0204] 在某些实施方案中,MM不是AB的天然结合配偶体。在一些实施方案中,MM不含或基本上不含与AB的任何天然结合配偶体的同源性。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%相似。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%相同。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体不超过25%相同。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体不超过50%相同。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体不超过20%相同。在一些实施方案中,MM与AB的任何天然结合配偶体不超过10%相同。

[0205] 在一些实施方案中,可活化抗体包含被MM修饰的AB,并且还包含作为至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的至少一个可裂解部分(CM1)以及作为至少一种丝氨酸蛋白酶(SP)的底物的至少第二可裂解部分(CM2)。此类可活化抗体表现出与AB的靶标的可活化/可转换结合。可活化抗体通常包含被掩蔽部分(MM)和CM1-CM2底物修饰或与其偶合的抗体或抗体片段(AB)。

[0206] 排列可活化抗体的元件,使得MM和CM1-CM2底物定位成使得在裂解(或相对活性)状态下且在存在靶标的情况下,AB结合靶标,而在未裂解(或相对无活性)状态下在存在靶标的情况下,AB与其靶标的特异性结合降低或受到抑制。由于MM对AB特异性结合其靶标的能力的抑制或掩蔽,AB与其靶标的特异性结合可减少。

[0207] 用MM和CM1-CM2底物修饰的AB针对靶标的 K_d 比未用MM和CM1-CM2底物修饰的AB或亲本AB针对靶标的 K_d 大至少5、10、20、25、40、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更多倍,或在5-10倍、10-100倍、10-1,000倍、10-10,000倍、10-100,000倍、10-1,000,000倍、10-10,000,000倍、100-1,000倍、100-10,000倍、100-100,000倍、100-1,000,000倍、100-10,000,000倍、1,000-10,000倍、1,000-100,000倍、1,000-1,000,000倍、1000-10,000,000倍、10,000-100,000倍、10,000-1,000,000倍、10,000-10,000,000倍、100,000-1,000,000倍或100,000-10,000,000倍之间。相反,用MM和CM1-CM2底物修饰的AB针对靶标的结合亲和力比未用MM和CM1-CM2底物修饰的AB或亲本AB针对靶标的结合亲和力低至少2、3、4、5、10、20、25、40、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更多倍,或在5-10倍、10-100倍、10-1,000倍、

10-10,000倍、10-100,000倍、10-1,000,000倍、10-10,000,000倍、100-1,000倍、100-10,000倍、100-100,000倍、100-1,000,000倍、100-10,000,000倍、1,000-10,000倍、1,000-100,000倍、1,000-1,000,000倍、1000-10,000,000倍、10,000-100,000倍、10,000-1,000,000倍、10,000-10,000,000倍、100,000-1,000,000倍或100,000-10,000,000倍之间。

[0208] 与未用MM和CM1-CM2底物修饰的AB或亲本AB与靶标的特异性结合相比,当用MM和CM1-CM2底物修饰AB且在存在靶标但不存在修饰剂(例如MMP和SP)时,AB与其靶标的特异性结合降低或受到抑制。当在体内或体外测定中测量时,与亲本AB与其靶标的结合或未用MM和CM1-CM2底物修饰的AB与其靶标的结合相比,当用MM和CM1-CM2底物修饰时,AB结合靶标的能力可降低至少50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和甚至100%,持续2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84或96小时或5、10、15、30、45、60、90、120、150或180天或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更长时间。

[0209] 如本文所用,术语裂解状态是指可活化抗体在CM1-CM2底物被至少一种基质金属蛋白酶和/或至少一种丝氨酸蛋白酶修饰(即裂解)之后的状况。如本文所用,术语未裂解状态或完全未裂解是指可活化抗体在不存在CM1-CM2底物被MMP和/或SP裂解的情况下的状况。如上所述,术语“可活化抗体”在本文中用于指在其未裂解(天然)状态下以及在其裂解状态下的可活化抗体。在其裂解状态下的可活化抗体在本文中也称为活化抗体和/或活化的可活化抗体。对于普通技术人员清楚的是,在一些实施方案中,由于CM1-CM2底物被蛋白酶裂解,从而导致至少MM的释放,裂解的可活化抗体可能缺乏MM。

[0210] 可活化的或可转换的意指当处于受抑制、掩蔽或未裂解状态(即第一构象)时,可活化抗体表现出与靶标的第一结合水平,并且当处于未受抑制、无掩蔽和/或裂解状态(即第二构象)时,可活化抗体表现出与靶标的第二结合水平,其中第二靶标结合水平大于第一结合水平。一般来说,靶标对可活化抗体的AB的接近在存在能够裂解CM1-CM2底物的裂解剂的情况下比在不存在这种裂解剂的情况下更大。因此,当可活化抗体处于未裂解状态时,AB与靶标的结合受到抑制并且其靶标结合可受到掩蔽(即,第一构象使得AB不能结合靶标),并且在裂解状态下,AB不受抑制或对靶标结合无掩蔽。

[0211] 选择可活化抗体的CM1-CM2底物和AB,使得AB代表给定靶标的结合部分,并且CM1-CM2底物代表MMP和SP的底物,其中MMP和/或SP与靶标共定位在受试者的治疗位点或诊断位点。发现本文公开的可活化抗体的特定用途,其中例如各自能够裂解CM1-CM2底物中的位点的MMP和SP在治疗位点或诊断位点的含靶标组织中存在的水平相对高于在非治疗位点的组织中(例如在健康组织中)。

[0212] 在一些实施方案中,如果AB与靶标的结合未被掩蔽或以其他方式抑制,则可活化抗体提供降低的另外可由AB在非治疗位点的结合引起的毒性和/或不良副作用。

[0213] 一般来说,可通过选择感兴趣的AB并构建可活化抗体的剩余部分来设计可活化抗体,以便在构象受限时,MM提供AB的掩蔽或AB与其靶标的结合的减少。可考虑结构设计标准以提供此功能特征。

[0214] 提供了在受抑制的构象对比未受抑制的构象中表现出靶标结合的所需动态范围的可转换表型的可活化抗体。动态范围通常是指(a)在第一组条件下参数的最大检测水平与(b)在第二组条件下参数的最小检测值的比率。例如,在可活化抗体的背景下,动态范围是指(a)在存在能够裂解可活化抗体的CM1-CM2底物的MMP和SP的情况下与可活化抗体结合

的靶蛋白的最大检测水平与 (b) 在不存在蛋白酶的情况下与可活化抗体结合的靶蛋白的最小检测水平的比率。可活化抗体的动态范围可计算为可活化抗体裂解剂 (例如, 酶) 处理的解离常数与可活化抗体裂解剂处理的解离常数的比率。可活化抗体的动态范围越大, 可活化抗体的可转换表型就越好。具有相对较高的动态范围值 (例如, 大于1) 的可活化抗体表现出更期望的转换表型, 使得在存在能够裂解可活化抗体的CM1-CM2底物的裂解剂 (例如, 酶) 的情况下与不存在裂解剂的情况相比, 由可活化抗体进行的靶蛋白结合发生的程度更大 (例如, 主要发生)。

[0215] 可以提供多种结构构型的可活化抗体。下文提供了可活化抗体的示例性式。特别设想的是, AB、MM和CM1-CM2底物的N端到C端顺序可在可活化抗体中颠倒。还特别设想的是, CM和MM可在氨基酸序列中重叠, 例如, 使得CM1-CM2底物至少部分地包含在MM内。

[0216] 例如, 可活化抗体可由下式 (以从氨基 (N) 端区域到羧基 (C) 端区域的顺序) 表示:

[0217] (MM) - (CM1-CM2底物) - (AB)

[0218] (AB) - (CM1-CM2底物) - (MM)

[0219] 其中MM为掩蔽部分, CM1-CM2底物为可裂解部分, 并且AB为抗体或其片段。如上文所述, 术语“CM1-CM2底物”并不旨在传达关于作为至少一种基质金属蛋白酶 (MMP) 的底物的第一可裂解部分 (CM1) 以及作为至少一种丝氨酸蛋白酶 (SP) 的底物的至少第二可裂解部分 (CM2) 的取向或其他结构排列的任何要求。因此, 术语“CM1-CM2底物”涵盖具有如下从N端到C端的结构排列的CM1-CM2底物: CM1-CM2或CM2-CM1。术语“CM1-CM2底物”还涵盖其中CM1序列的至少一部分与CM2序列的至少一部分重叠的底物。还应注意, 尽管在上式中将MM和CM1-CM2底物指示为不同的组分, 但在本文公开的所有示例性实施方案 (包括式) 中, 设想的是, MM和CM1-CM2底物的氨基酸序列可重叠, 例如, 使得CM1-CM2底物完全或部分地包含在MM内。另外, 上式提供了可定位在可活化抗体元件的N端或C端的另外的氨基酸序列。

[0220] 在某些实施方案中, MM不是AB的天然结合配偶体。在一些实施方案中, MM不含或基本上不含与AB的任何天然结合配偶体的同源性。在一些实施方案中, MM与AB的任何天然结合配偶体不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%相似。在一些实施方案中, MM与AB的任何天然结合配偶体不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%相同。在一些实施方案中, MM与AB的任何天然结合配偶体不超过50%相同。在一些实施方案中, MM与AB的任何天然结合配偶体不超过25%相同。在一些实施方案中, MM与AB的任何天然结合配偶体不超过20%相同。在一些实施方案中, MM与AB的任何天然结合配偶体不超过10%相同。

[0221] 在许多实施方案中, 可能期望将一个或多个接头 (例如柔性接头) 插入到可活化抗体构建体中, 以在MM-CM1-CM2底物连接部、CM1-CM2底物-AB连接部或两者中的一个或多个处提供柔性。例如, AB、MM和/或CM1-CM2底物可能不含足以提供所需柔性的数量的残基 (例如, Gly、Ser、Asp、Asn, 尤其是Gly和Ser, 特别是Gly)。因此, 此类可活化抗体构建体的可转换表型可受益于一种或多种氨基酸的引入以提供柔性接头。另外, 如下文所述, 当可活化抗体以构象受限的构建体提供时, 可以可操作地插入柔性接头以促进未裂解的可活化抗体中环状结构的形成和维持。

[0222] 例如, 在某些实施方案中, 可活化抗体包含下式中的一个 (其中下式表示在N端到C

端方向或C端到N端方向的氨基酸序列)：

[0223] (MM) -LP1- (CM1-CM2底物) - (AB)

[0224] (MM) - (CM1-CM2底物) -LP2- (AB)

[0225] (MM) -LP1- (CM1-CM2底物) -LP2- (AB)

[0226] 其中MM、CM1-CM2底物和AB如上所定义；其中LP1和LP2中的每一个独立地且任选地存在或不存在，是包含至少1种柔性氨基酸(例如，Gly)的相同或不同的柔性接头。另外，上式提供了可定位在可活化抗体元件的N端或C端的另外的氨基酸序列。实例包括但不限于靶向部分(例如，存在于靶组织中的细胞受体的配体)和血清半衰期延长部分(例如，结合血清蛋白的多肽，诸如免疫球蛋白(例如，IgG)或血清白蛋白(例如，人血清白蛋白(HAS)))。

[0227] CM1-CM2底物被至少一种MMP特异性裂解的速率为约 $0.001-1500 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 或至少 $0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250$ 或 $1500 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ，并且被至少一种SP特异性裂解的速率为约 $0.001-1500 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 或至少 $0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250$ 或 $1500 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 。

[0228] 为了通过酶特异性裂解，使酶与CM1-CM2底物之间进行接触。当包含偶合到MM的AB和CM1-CM2底物的可活化抗体是在存在靶标和足够的酶活性的情况下时，CM1-CM2底物可被裂解。足够的酶活性可以是指所述酶与CM1-CM2底物接触并实现裂解的能力。可容易地设想，酶可能在CM1-CM2底物附近，但是由于其他细胞因子或酶的蛋白质修饰而不能裂解。

[0229] 适用于在本文所述的组合物中使用的接头通常是提供修饰的AB或可活化抗体的柔性以促进抑制AB与靶标的结合的接头。此类接头通常被称为柔性接头。合适的接头可容易地选择并且可具有任何合适的不同长度，诸如1个氨基酸(例如，Gly)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸，包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸，并且长度可为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。

[0230] 示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:381)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:382)，其中n为至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对无结构的，并且因此可能能够充当组件之间的中性系链。甘氨酸比甚至丙氨酸接近显著更大的phi-psi空间，并且受到的限制远小于具有较长侧链的残基(参见Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992))。示例性柔性接头包括但不限于Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:202)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(SEQ ID NO:203)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:204)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:205)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:206)、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(SEQ ID NO:207)等。普通技术人员将认识到，可活化抗体的设计可包括全部或部分柔性的接头，以使得接头可包括柔性接头以及赋予较少柔性结构以提供所需的可活化抗体结构的一个或多个部分。

[0231] 在一些实施方案中，本文所述的可活化抗体还包含与可活化抗体缀合的剂。在一些实施方案中，缀合的剂为治疗剂，诸如抗炎剂和/或抗肿瘤剂。在此类实施方案中，剂与可活化抗体的碳水化合物部分缀合，例如，在一些实施方案中，其中碳水化合物部分位于可活化抗体的抗体或抗原结合片段的抗原结合区域之外。在一些实施方案中，剂与可活化抗体

中抗体或抗原结合片段的巯基缀合。

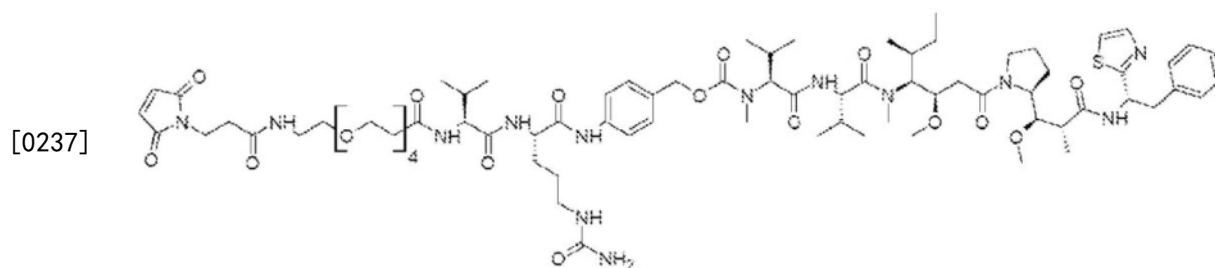
[0232] 在一些实施方案中,剂为细胞毒性剂(诸如毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段))或放射性同位素(即放射性缀合物)。

[0233] 在一些实施方案中,剂为可检测的部分,例如像标记或其他标志物。例如,剂是或包括放射性标记的氨基酸、可通过标志亲和素(例如,含有可通过光学或量热法检测的荧光标志物或酶活性的链霉亲和素)检测的一个或多个生物素部分、一种或多种放射性同位素或放射性核素、一种或多种荧光标记、一种或多种酶标记和/或一种或多种化学发光剂。在一些实施方案中,可检测的部分通过间隔区分子附接。

[0234] 本公开还涉及包含缀合至细胞毒性剂(诸如毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段))或放射性同位素(即放射性缀合物)的抗体的免疫缀合物。合适的细胞毒性剂包括例如多拉司他汀及其衍生物(例如,瑞奥西汀E、AFP、MMAF、MMAE、MMAD、DMAF、DMAE)。例如,剂为单甲基瑞奥西汀E(MMAE)或单甲基瑞奥西汀D(MMAD)。在一些实施方案中,剂为选自表4中列出的组的剂。在一些实施方案中,剂为多拉司他汀。在一些实施方案中,剂为瑞奥西汀或其衍生物。在一些实施方案中,剂为瑞奥西汀E或其衍生物。在一些实施方案中,剂为单甲基瑞奥西汀E(MMAE)。在一些实施方案中,剂为单甲基瑞奥西汀D(MMAD)。在一些实施方案中,剂为美登木素生物碱或美登木素生物碱衍生物。在一些实施方案中,剂为DM1或DM4。在一些实施方案中,剂为倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,剂为卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,剂为吡咯并苯并二氮杂草。在一些实施方案中,剂为吡咯并苯并二氮杂草二聚体。

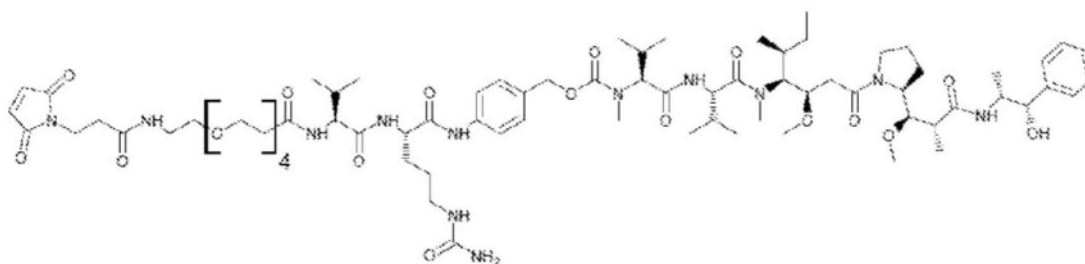
[0235] 在一些实施方案中,使用马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸接头或马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头将剂连接到AB。在一些实施方案中,使用马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸接头将剂连接到AB。在一些实施方案中,使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸接头将剂连接到AB。在一些实施方案中,所述剂是使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基接头连接到AB的单甲基瑞奥西汀D(MMAD),并且此接头有效载荷构建体在本文中称为“vc-MMAD”。在一些实施方案中,所述剂是使用马来酰亚胺PEG-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基接头连接到AB的单甲基瑞奥西汀E(MMAE),并且此接头有效载荷构建体在本文中称为“vc-MMAE”。vc-MMAD和vc-MMAE的结构如下所示:

[0236] vc-MMAD:



[0238] vc-MMAE:

[0239]



[0240] 可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素(ricin)A链、相思豆毒素(abrin)A链、蒴莲根毒素(modeccin)A链、 α -八叠球菌素(α -sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、香石竹毒(dianthin)蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻风树毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、肥皂草(*Saponaria officinalis*)抑制剂、白树毒素(gelonin)、米托菌素(mitogellin)、局限曲霉素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯族毒素(tricothecene)。多种放射性核素可用于产生放射性缀合的抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0241] 抗体和细胞毒性剂的缀合物使用多种双功能蛋白偶合剂制成,所述偶合剂诸如3-(2-吡啶基二巯基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)、亚氨基硫烷(iminothiolane, IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(诸如己二酸二甲酯HCL)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(诸如戊二醛)、双叠氮基化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人, *Science* 238: 1098 (1987) 中所述来制备。碳-14标记的1-异硫氰酸苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸缀合至抗体的示例性螯合剂。(参见W094/11026)。

[0242] 表4列出了可在本文描述的公开中采用的一些示例性药剂,但绝不意味着是详尽的列表。

[0243] 表4:用于缀合的示例性药剂

[0244]

细胞毒性剂	
瑞奥西汀	涡轮他汀(Turbostatin)
瑞奥西汀 E	苯他汀(Phenstatin)
单甲基瑞奥西汀 D (MMAD)	羟基苯他汀
单甲基瑞奥西汀 E (MMAE)	海绵抑素 5 (Spongistatin 5)
去甲基瑞奥西汀 E (DMAE)	海绵抑素 7
瑞奥西汀 F	Halistatin 1
单甲基瑞奥西汀 F (MMAF)	Halistatin 2
去甲基瑞奥西汀 F (DMAF)	Halistatin 3
瑞奥西汀衍生物, 例如其酰胺	修饰的苔藓抑素(Bryostatin)
瑞奥西汀酪胺	Halocomstatin
瑞奥西汀喹啉	吡咯并苯并咪唑(PBI)
多拉司他汀	西布司他汀 6 (Cibrostatin6)
多拉司他汀衍生物	Doxaliform
多拉司他汀 16 DmJ	蒽环类似物
多拉司他汀 16 Dpv	
美登木素生物碱, 例如 DM-1; DM-4	

[0245]

美登木素生物碱衍生物	西马多丁 (Cemadotin) 类似物 (CemCH ₂ -SH)
倍癌霉素	假单胞菌毒素 A (PE38) 变体
倍癌霉素衍生物	假单胞菌毒素 A (ZZ-PE38) 变体
α -鹅膏蕈碱(α -amanitin)	ZJ-101
蒽环类	OSW-1
多柔比星	O6-苄基鸟嘌呤的 4-硝基苄氧羰基衍生物
柔红霉素(Daunorubicin)	拓扑异构酶抑制剂
苔癬抑素	哈密特林(Hemiasterlin)
喜树碱	三尖杉碱(Cephalotaxine)
喜树碱衍生物	高三尖杉酯碱(Homoharringtonine)
7-取代的喜树碱	吡咯并苯并二氮杂革(PBD)
10, 11-二氟亚甲基二氧基喜树碱	吡咯并苯并二氮杂革(PBD)二聚体
康普瑞汀(Combretastatin)	功能化的吡咯并苯并二氮杂革
脱溴海兔毒素(Debromoaplysiatoxin)	功能化的吡咯并苯并二氮杂革二聚体
Kahalalide-F	卡奇霉素
圆皮海绵内酯(Discodermolide)	鬼臼毒素(Podophyllotoxin)
海鞘素(Ecteinascidin)	紫杉烷
	长春花生物碱
抗病毒药	
阿昔洛韦(Acyclovir)	可缀合的检测剂
阿糖腺苷(Vira A)	荧光素及其衍生物
金刚烷胺(Symmetrel)	异硫氰酸荧光素(FITC)
抗真菌药	放射性药物
制霉菌素(Nystatin)	¹²⁵ I
	¹³¹ I
另外的抗肿瘤药物	⁸⁹ Zr
阿霉素(Adriamycin)	¹¹¹ In
佐柔比星(Cerubidine)	¹²³ I
博来霉素(Bleomycin)	¹³¹ In
马法兰(Alkeran)	^{99m} Tc
长春碱(Velban)	²⁰¹ Tl
长春新碱(Oncovin)	¹³³ Xe
氟尿嘧啶	¹¹ C
甲氨蝶呤	⁶² Cu
塞替派(Thiotepa)	¹⁸ F
比生群(Bisantrene)	⁶⁸ Ga
米托蒽醌(Novantrone)	¹³ N
硫鸟嘌呤	¹⁵ O
甲基苄肼(Procarbazine)	³⁸ K
阿糖胞苷(Cytarabine)	⁸² Rb

[0246]		^{99m}Tc (锝)
	抗细菌药	
	氨基糖苷类	重金属
	链霉素	钡
	新霉素(Neomycin)	金
	卡那霉素(Kanamycin)	铂
	阿米卡星(Amikacin)	
	庆大霉素	抗支原体药
	妥布霉素(Tobramycin)	泰乐菌素(Tylosin)
	链霉素 B	大观霉素
	大观霉素	
	氨苄西林(Ampicillin)	
	磺胺	
	多粘菌素	
	氯霉素(Chloramphenicol)	

[0247] 本领域普通技术人员将认识到,可将多种可能的部分与本公开的所得抗体偶合。(参见例如“Conjugate Vaccines”, Contributions to Microbiology and Immunology, J.M.Cruse和R.E.Lewis, Jr (编), Carger Press, New York, (1989), 其全部内容以引用的方式并入本文)。

[0248] 只要抗体和其他部分保持它们各自的活性,就可通过使两个分子结合的任何化学反应来完成偶合。此键联可包括许多化学机制,例如共价结合、亲和力结合、插层、配位结合和络合。然而,在一些实施方案中,结合为共价结合。共价结合可通过现有侧链的直接缩合或通过外部桥联分子的并入来实现。许多二价或多价连接剂可用于将蛋白质分子(诸如本公开的抗体)偶合至其他分子。例如,代表性偶合剂可包括有机化合物,诸如硫酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和己二胺。此列表并不旨在详尽说明本领域中已知的各类偶合剂,而是示例性说明更常见的偶合剂。(参见Killen和Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen等人, Immunological Reviews 62:185-216 (1982); 和Vitetta等人, Science 238:1098 (1987))。

[0249] 在一些实施方案中,除了本文提供的组合物和方法之外,还可通过插入或以其他方式包含在可活化抗体序列中的修饰的氨基酸序列来修饰缀合的可活化抗体以进行位点特异性缀合。这些修饰的氨基酸序列被设计成允许在缀合的可活化抗体内控制缀合剂的布置和/或剂量。例如,可使可活化抗体工程化以包含在轻链和重链上的位置处的半胱氨酸取代,其提供反应性硫醇基团并且不会不利地影响蛋白质折叠和组装、也不改变抗原结合。在一些实施方案中,可使可活化抗体工程化以在可活化抗体内包含或以其他方式引入一个或多个非天然氨基酸残基以提供合适的缀合位点。在一些实施方案中,可使可活化抗体工程化以在可活化抗体序列内包含或以其他方式引入酶可活化肽序列。

[0250] 在文献中描述了合适的接头。(参见例如Ramakrishnan, S. 等人, Cancer Res. 44: 201-208 (1984), 其描述MBS (M-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯) 的使用。也参见美国专利号5,030,719,其描述通过寡肽接头与抗体偶合的卤代乙酰肼衍生物的使用。在一些实施方案中,合适的接头包括:(i) EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基-丙基) 碳二亚胺盐酸

盐; (ii) SMPT (4-琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)-甲苯) (Pierce Chem.Co., 目录 (21558G)); (iii) SPDP (琥珀酰亚胺-6[3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸酯) (Pierce Chem.Co., 目录号21651G); (iv) 磺基-LC-SPDP (磺基琥珀酰亚胺基6[3-(2-吡啶基二硫代)-丙酰胺基]己酸酯) (Pierce Chem.Co. 目录号2165-G); 和(v) 缀合至EDC的磺基-NHS (N-羟基磺基-琥珀酰亚胺; Pierce Chem.Co., 目录号24510)。另外的接头包括但不限于SMCC、磺基SMCC、SPDB或磺基SPDB。

[0251] 上文所述接头含有具有不同属性的组分, 因此导致具有不同物理化学性质的缀合物。例如, 羧酸烷基酯的磺基-NHS酯比羧酸芳基酯的磺基-NHS酯更稳定。含有NHS酯的接头的溶解度低于磺基-NHS酯。此外, 接头SMPT含有空间位阻二硫键, 并且可形成具有增加的稳定性的缀合物。一般来说, 二硫键联的稳定性低于其他键联, 因为二硫键联在体外被裂解, 从而导致可用的缀合物较少。特别地, 磺基-NHS可增强碳二亚胺偶合的稳定性。当与磺基-NHS结合使用时碳二亚胺偶合 (诸如EDC) 形成的酯对水解的抵抗力大于单独的碳二亚胺偶合反应形成的酯对水解的抵抗力。

[0252] 在一些实施方案中, 接头可裂解。在一些实施方案中, 接头不可裂解。在一些实施方案中, 存在两个或更多个接头。所述两个或更多个接头都是相同的, 即, 可裂解或不可裂解的, 或者所述两个或更多个接头是不同的, 即, 至少一个可裂解和至少一个不可裂解。

[0253] 本公开利用以下几种用于将剂附接到AB的方法: (a) 附接到AB的碳水化合物部分, 或(b) 附接到AB的巯基, 或(c) 附接到AB的氨基, 或(d) 附接到AB的羧基。根据本公开, AB可通过具有至少两个反应性基团的中间接头共价附接到剂, 所述反应性基团中一个接头与AB反应并且一个接头与剂反应。可选择可包括任何相容有机化合物的接头, 以使得与AB (或剂) 的反应不会不利地影响AB反应性和选择性。此外, 接头与剂的附接可能不会破坏剂的活性。用于与氧化的抗体或氧化的抗体片段反应的合适的接头包括含有选自以下组成的组的胺的那些接头: 伯胺、仲胺、胍、酰胍、羟胺、苯胍、氨基脒和氨基硫脒基团。此类反应性官能团可作为接头结构的一部分存在, 或可通过对不含此类基团的接头进行合适的化学修饰来引入。

[0254] 根据本公开, 用于附接至还原的AB的合适的接头包括具有能够与还原的抗体或片段的巯基反应的某些反应性基团的那些接头。此类反应性基团包括但不限于: 反应性卤代烷基 (包括例如卤代乙酰基)、对汞基苯甲酸酯基团和能够进行迈克尔型 (Michael-type) 加成反应的基团 (包括例如马来酰亚胺以及由Mitra和Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110所描述类型的基团)。

[0255] 根据本公开, 用于附接至既不氧化也不还原的Ab的合适的接头包括具有能够与Ab中未修饰的赖氨酸残基中存在的伯氨基反应的某些官能团的那些接头。此类反应性基团包括但不限于NHS羧酸酯或碳酸酯、磺基-NHS羧酸酯或碳酸酯、4-硝基苯基羧酸酯或碳酸酯、五氟苯基羧酸酯或碳酸酯、酰基咪唑、异氰酸酯和异硫氰酸酯。

[0256] 根据本公开, 用于附接至既不氧化也不还原的Ab的合适的接头包括具有能够与Ab中天冬氨酸残基或谷氨酸残基中存在的羧酸基团反应的某些官能团的那些接头, 所述官能团已被合适的试剂活化。合适的活化试剂包括具有或不具有添加的NHS或磺基-NHS的EDC, 以及用于羧酰胺形成的其他脱水剂。在这些情况下, 存在于合适的接头中的官能团将包含伯胺和仲胺、胍、羟胺和酰胍。

[0257] 可在将接头附接至AB之前或之后将剂附接至接头。在某些应用中,可能期望首先制备AB-接头中间体,其中所述接头不含缔合剂。根据特定应用,然后可将特定的剂共价附接至接头。在一些实施方案中,出于缀合目的,首先将AB附接至MM、CM1-CM2底物和缔合的接头,并且然后将其附接至接头。

[0258] 支链接头:在特定的实施方案中,利用具有用于附接剂的多个位点的支链接头。对于多位点接头,与AB的单共价附接将产生能够在许多位点处结合剂的AB接头中间体。所述位点可为可与醛或巯基或剂附接的任何化学位点。

[0259] 在一些实施方案中,可通过在AB上的多个位点处附接单个位点接头来实现更高的比活度(或更高的剂与AB的比率)。可通过两种方法中的任一种将所述多个位点引入AB中。第一,可在同一AB中产生多个醛基和/或巯基。第二,可将具有用于随后附接至接头的多个功能位点的“支链接头”附接至AB的醛或巯基。支链接头或多位点接头的功能位点可为醛或巯基,或可为可与接头附接的任何化学位点。可通过将这两种方法组合(即在AB上的多个位点处附接多位点接头)来获得更高的比活度。

[0260] 可裂解接头:易于被补体系统的酶裂解的肽接头可用于本公开的一个实施方案中,所述酶诸如但不限于尿激酶、组织纤溶酶原活化物、胰蛋白酶、纤溶酶或具有蛋白水解活性的另一种酶。根据本公开的一种方法,剂通过易于被补体裂解的接头附接。抗体选自可活化补体的类别。因此,抗体-剂缀合物活化补体级联并在靶位点释放剂。根据本公开的另一方法,剂通过易于被具有蛋白水解活性的酶裂解的接头附接,所述酶诸如尿激酶、组织纤溶酶原活化物、纤溶酶或胰蛋白酶。这些可裂解接头可用于包括细胞外毒素的缀合的可活化抗体中,所述细胞外毒素以非限制性实例的方式例如表4中所示的任何细胞外毒素。

[0261] 表5提供可裂解接头序列的非限制性实例。

[0262] 表5:用于缀合的示例性接头序列

可裂解序列的类型	氨基酸序列
<u>纤溶酶可裂解序列</u>	
尿激酶原	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 319)
	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 320)
TGFβ	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 321)
纤溶酶原	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 322)
葡激酶	SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 323)
	SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 324)
<u>因子 Xa 可裂解序列</u>	IEGR (SEQ ID NO: 325)
	IDGR (SEQ ID NO: 326)
	GGSIDGR (SEQ ID NO: 327)
<u>MMP 可裂解序列</u>	
明胶酶 A	PLGLWA (SEQ ID NO: 328)
[0263] <u>胶原酶可裂解序列</u>	
小牛皮肤胶原蛋白(α1(I)链)	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 329)
小牛皮肤胶原蛋白(α2(I)链)	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 330)
牛软骨胶原蛋白(α1(II)链)	GIAGQ (SEQ ID NO: 331)
人肝脏胶原蛋白(α1(III)链)	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 332)
人 α ₂ M	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 333)
人 PZP	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 334)
	AGLGVVER (SEQ ID NO: 335)
	AGLGISST (SEQ ID NO: 336)
大鼠 α ₁ M	EPQALAMS (SEQ ID NO: 337)
	QALAMSAI (SEQ ID NO: 338)
大鼠 α ₂ M	AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 339)
	MDAFLESS (SEQ ID NO: 340)
大鼠 α ₁ I ₃ (2J)	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 341)
大鼠 α ₁ I ₃ (27J)	SAPAVESE (SEQ ID NO: 342)
人成纤维细胞胶原酶	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 343)
[0264] <u>(自溶裂解)</u>	VAQFVLTE (SEQ ID NO: 344)
	AQFVLTEG (SEQ ID NO: 345)
	PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 346)

[0265] 另外,剂可通过二硫键(例如,半胱氨酸分子上的二硫键)附接至AB。由于许多肿瘤自然释放高水平的谷胱甘肽(一种还原剂),因此其可还原二硫键,随后在递送位点释放所述剂。在某些特定实施方案中,将修饰CM1-CM2底物的还原剂还将修饰缀合的可活化抗体的接头。

[0266] 间隔区和可裂解元件:在一些实施方案中,可能有必要以优化所述剂与可活化抗体的AB之间的间隔的方式构建接头。这可通过使用具有以下通用结构的接头来完成:

[0267] W-(CH₂)_n-Q

[0268] 其中

[0269] W为--NH--CH₂--或--CH₂--;

[0270] Q为氨基酸、肽;并且

[0271] n为0至20的整数。

[0272] 在一些实施方案中,接头可包含间隔区元件和可裂解元件。间隔区元件用于将可裂解元件定位成远离AB的核心,以使得可裂解元件更易于接近负责裂解的酶。上文所述的某些支链接头可充当间隔区元件。

[0273] 在整个讨论中,应当理解,接头与剂的附接(或间隔区元件与可裂解元件的附接,或可裂解元件与剂的附接)不需要是特定的附接或反应模式。提供具有适当稳定性和生物相容性的产物的任何反应都是可接受的。

[0274] 血清补体以及接头的选择:根据本公开的一种方法,当需要释放剂时,使用作为可活化补体的一类抗体的AB。所得缀合物保留结合抗原补并活化补体级联两者的能力。因此,根据本公开的这一实施方案,剂连接至可裂解接头或可裂解元件的一端,并且接头基团的另一端附接至AB上的特异性位点。例如,如果剂具有羟基或氨基,则可分别通过酯或酰胺键将其附接至肽、氨基酸或其他合适选择的接头的羧基端。例如,此类剂可通过碳二亚胺反应附接至接头肽。如果剂含有将干扰与接头的附接的官能团,则这些干扰官能团可在附接之前封闭,并且在制备产物缀合物或中间体后就解封闭。然后直接或在进一步修饰后使用接头的相反端或氨基端,以结合至能够活化补体的AB。

[0275] 接头(或接头的间隔区元件)可具有任何所需的长度,其一端可共价附接到可活化抗体的AB上的特异性位点。接头或间隔区元件的另一端可附接至氨基酸或肽接头。

[0276] 因此,当这些缀合物在补体存在下结合至抗原时,使剂附接至接头的酰胺或酯键将被裂解,从而导致所述剂以其活性形式释放。当施用于受试者时,这些缀合物将完成所述剂在靶位点处的递送和释放,并且特别有效于在体内递送如呈现于但不限于表4中的那些的药剂、抗生素、抗代谢物、抗增殖剂等。

[0277] 在无补体活化情况下释放的接头:在靶向递送的又一应用中,由于补体级联的活化将最终溶解靶细胞,因此需要在无补体活化的情况下释放所述剂。因此,当应在不杀死靶细胞的情况下完成剂的递送和释放时,此方法有用。当需要将细胞介体(诸如激素、酶、皮质类固醇、神经递质、基因或酶)递送至靶细胞时,这就是目标。这些缀合物可通过经由适度易于被血清蛋白酶裂解的接头将剂附接到不能活化补体的AB而制备。当将这种缀合物施用于个体时,抗原-抗体复合物将快速形成,而剂的裂解将缓慢发生,从而导致化合物在靶位点处释放。

[0278] 生物化学交联剂:在一些实施方案中,可使用某些生物化学交联剂将可活化抗体缀合至一种或多种治疗剂。交联试剂形成将两个不同分子的官能团连结在一起的分子桥。为了以逐步方式连接两种不同的蛋白质,可使用消除不想要的均聚物形成的异双官能交联剂。

[0279] 可通过溶酶体蛋白酶裂解的肽基接头也是有用的,例如Val-Cit、Val-Ala或其他二肽。另外,可使用在溶酶体的低pH环境中可裂解的酸不稳定的接头,例如:双唾液酸醚。其他合适的接头包括组织蛋白酶不稳定的底物,特别是在酸性pH下显示最佳功能的那些底物。

[0280] 表6中引用了示例性异双官能交联剂。

[0281] 表6:示例性异双官能交联剂

异双官能交联剂				交联后的间隔臂长度(埃)
接头	针对以下的反应	优点和应用		
[0282]	SMPT	伯胺	更大的稳定性	11.2 Å
		巯基		
	SPDP	伯胺	硫醇化	6.8 Å
		巯基	可裂解交联	
	LC-SPDP	伯胺	延长的间隔臂	15.6 Å
		巯基		
	磺基-LC-SPDP	伯胺	延长的间隔臂	15.6 Å
		巯基	水溶性	
	SMCC	伯胺	稳定的马来酰亚胺反应性基团	11.6 Å
		巯基	酶-抗体缀合	
			半抗原-载体蛋白缀合	
	磺基-SMCC	伯胺	稳定的马来酰亚胺反应性基团	11.6 Å
		巯基	水溶性	
			酶-抗体缀合	
[0283]	MBS	伯胺	酶-抗体缀合	9.9 Å
		巯基	半抗原-载体蛋白缀合	
	磺基-MBS	伯胺	水溶性	9.9 Å
		巯基		
	SIAB	伯胺	酶-抗体缀合	10.6 Å
		巯基		
	磺基-SIAB	伯胺	水溶性	10.6 Å
		巯基		
	SMPB	伯胺	延长的间隔臂	14.5 Å
		巯基	酶-抗体缀合	
[0283]	磺基-SMPB	伯胺	延长的间隔臂	14.5 Å
		巯基	水溶性	
	EDE/磺基-NHS	伯胺	半抗原-载体缀合	0
		羧基		
	ABH	碳水化合物	与糖基反应	11.9 Å
		非选择性		

[0284] 不可裂解的接头或直接附接:在本公开的一些实施方案中,缀合物可被设计成使得剂被递送至靶标但未释放。这可通过将剂直接或经由不可裂解的接头附接至AB来完成。

[0285] 这些不可裂解的接头可包括氨基酸、肽、D-氨基酸或可被修饰以包含随后可通过本文所述的方法用于附接至AB的官能团的其他有机化合物。此种有机接头的通式可为

[0286] $W-(CH_2)_n-Q$

[0287] 其中

[0288] W为--NH--CH₂--或--CH₂--;

[0289] Q为氨基酸、肽;并且

[0290] n为0至20的整数。

[0291] 不可裂解的缀合物:在一些实施方案中,化合物可附接至不活化补体的AB。当使用不能进行补体活化的AB时,可使用易于被活化的补体裂解的接头或使用不易于被活化的补体裂解的接头来完成这种附接。

[0292] 本文公开的抗体也可配制为免疫脂质体。含有抗体的脂质体通过本领域已知的方法制备,诸如以下所述的方法:Epstein等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:3688(1985); Hwang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4030(1980);以及美国专利号4,485,045和4,544,545。循环时间增加的脂质体公开于美国专利号5,013,556中。

[0293] 特别有用的脂质体可通过反相蒸发法使用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物产生。通过具有限定的孔径的过滤器挤出脂质体,以产生具有所需直径的脂质体。本公开的抗体的Fab'片段可通过二硫化物交换反应缀合至脂质体,如Martin等人,J.Biol.Chem.,257:286-288(1982)中所述。

[0294] 定义:

[0295] 除非另外定义,否则结合本公开使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。术语“一个/种(a/an)”实体是指一个/种或多个/种所述实体。例如,一种化合物是指一种或多种化合物。因此,术语“一个/种(a/an)”、“一个/种或多个/种”和“至少一个/种”在本文中可互换使用。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。一般来说,与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学以及蛋白质和寡核苷酸或多核苷酸化学及杂交结合使用的命名法和它们的技术是本领域中众所周知且常用的那些。标准技术用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂转染)。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书或如本领域中通常所完成或如本文所述来进行。前述技术和程序通常根据本领域中众所周知的常规方法和如在整个本说明书中所引用且论述的各种一般和更具体的参考文献中所述来进行。参见例如Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989))。结合本文所述的分析化学、合成有机化学和医药化学所使用的命名法和这些化学领域的实验室程序和技术是本领域中众所周知且常用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及受试者的治疗。

[0296] 如根据本公开所用,除非另外指出,否则以下术语应理解为具有以下含义:

[0297] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分,其含有特异性结合抗原(与抗原免疫反应)的抗原结合位点的分子。“特异性结合”或“与.....免疫反应”或“免疫特异性结合”意指抗体与所需抗原的一个或多个抗原决定簇反应,并且不与其他多肽反应或以低得多的亲和力结合($K_d > 10^{-6}$)。抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、结构域抗体、单链抗体、Fab和F(ab')₂片段、scFv以及Fab表达文库。

[0298] 已知基础抗体结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每一对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基端部分包含主要负责抗原识别的约100至110或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基端部分限定了主要负

责效应子功能的恒定区。一般来说,从人获得的抗体分子与类别IgG、IgM、IgA、IgE和IgD中的任一种有关,它们因所述分子中存在的重链的性质而彼此不同。某些类别还具有亚类,诸如IgG₁、IgG₂等。此外,在人中,轻链可为 κ 链或 λ 链。

[0299] 如本文所用,术语“单克隆抗体”(mAb)或“单克隆抗体组合物”是指仅含有由独特轻链基因产物和独特重链基因产物组成的抗体分子的一个分子种类的抗体分子的群体。特别地,单克隆抗体的互补决定区(CDR)在群体的所有分子中是相同的。MAb含有能够与抗原的特定表位免疫反应的抗原结合位点,所述表位的特征在于针对所述抗原结合位点的独特结合亲和力。

[0300] 术语“抗原结合位点”或“结合部分”是指免疫球蛋白分子的参与抗原结合的部分。抗原结合位点由重链(“H”)和轻链(“L”)的N端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。在重链和轻链的V区内三个高度相异的链段(称为“高变区”)插在称为“框架区”或“FR”的更为保守的侧翼链段之间。因此,术语“FR”是指天然存在于免疫球蛋白中的高变区之间并且与高变区相邻的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中相对于彼此设置,以形成抗原结合表面。抗原结合表面与结合的抗原的三维表面互补,并且每条重链和轻链的三个高变区称为“互补决定区”或“CDR”。每个结构域的氨基酸分配是根据免疫学感兴趣的蛋白质的Kabat序列的定义进行的(National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987和1991)),或Chothia和Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia等人Nature 342:878-883 (1989)。

[0301] 如本文所用,术语“表位”包括能够特异性结合至免疫球蛋白、scFv或T细胞受体的任何蛋白质决定簇。术语“表位”包括能够特异性结合至免疫球蛋白或T细胞受体的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团(诸如氨基酸或糖侧链)组成,并且通常具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。例如,可产生针对多肽的N端或C端肽的抗体。当解离常数 $\leq 1\mu\text{M}$;在一些实施方案中 $\leq 100\text{nM}$ 并且在一些实施方案中 $\leq 10\text{nM}$ 时,认为抗体特异性结合抗原。

[0302] 如本文所用,术语“特异性结合”、“免疫结合”和“免疫结合性质”是指在免疫球蛋白分子与所述免疫球蛋白对其具有特异性的抗原之间发生的类型的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力可根据相互作用的解离常数(K_d)来表示,其中较小的 K_d 表示较大的亲和力。可使用本领域中众所周知的方法来定量所选择的多肽的免疫结合性质。一种此类方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率的速率,其中那些速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力以及在两个方向上同等地影响速率的几何参数。因此,可通过计算浓度以及缔合和解离的实际速率来确定“缔合速率常数”(K_{on})和“解离速率常数”(K_{off})。(参见Nature 361:186-87 (1993))。 K_{off}/K_{on} 的比率能够删去与亲和力无关的所有参数,并且等于解离常数 K_d 。(通常参见Davies等人(1990) Annual Rev Biochem 59:439-473)。如通过诸如放射性配体结合测定或本领域技术人员已知的类似测定的测定所测量的,当结合常数(K_d)为 $\leq 1\mu\text{M}$,在一些实施方案中 $\leq 100\text{nM}$,在一些实施方案中 $\leq 10\text{nM}$,并且在一些实施方案中 $\leq 100\text{pM}$ 至约 1pM 时,认为本公开的抗体特异性结合至靶标。

[0303] 如本文所用,术语“分离的多核苷酸”应意指基因组、cDNA或合成来源或其某种组合的多核苷酸,所述“分离的多核苷酸”根据其来源(1)不与多核苷酸的全部或一部分缔合(其中“分离的多核苷酸”见于自然界中), (2)可操作地连接至其在自然界中不连接的多核

苷酸,或(3)不作为较大序列的一部分存在于自然界中。根据本公开的多核苷酸包含编码本文所示的重链免疫球蛋白分子的核酸分子以及编码本文所示的轻链免疫球蛋白分子的核酸分子。

[0304] 本文提及的术语“分离的蛋白质”意指cDNA、重组RNA或合成来源或其某种组合的蛋白质;所述“分离的蛋白质”根据其来源或衍生来源(1)不与自然界中所见的蛋白质缔合,(2)不含来自相同来源的其他蛋白质,例如不含鼠蛋白质,(3)由来自不同物种的细胞表达,或(4)不存在于自然界中。

[0305] 术语“多肽”在本文中用作通用术语,是指具有多肽序列的天然蛋白质、片段或类似物。因此,天然蛋白质片段和类似物是多肽属的种类。根据本公开的多肽包含本文所示的重链免疫球蛋白分子和本文所示的轻链免疫球蛋白分子,以及通过包含重链免疫球蛋白分子与轻链免疫球蛋白分子的组合形成的抗体分子(诸如 κ 轻链免疫球蛋白分子,并且反之亦然),以及其片段和类似物。

[0306] 如本文所用,术语“天然存在的”当应用于对象时是指对象可见于自然界中的事实。例如,可从自然界中的来源分离并且不通过人在实验室中有意修饰的存在于生物(包括病毒)中或以其他方式天然存在的多肽或多核苷酸序列为天然存在的。

[0307] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指所描述的组分处于容许其以预期的方式起作用的关系中。“可操作地连接”至编码序列的控制序列是以使得在与控制序列相容的条件下实现编码序列的表达的方式连接。

[0308] 如本文所用,术语“控制序列”是指实现与它们连接的编码序列的表达和加工所必需的多核苷酸序列。此类控制序列的性质根据宿主生物体而不同;在原核生物中,此类控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列;在真核生物中,此类控制序列通常包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”旨在至少包括其存在为表达和加工所必需的所有组件,并且还可包括其存在为有利的另外组件,例如前导序列和融合配偶体序列。如本文提及的术语“多核苷酸”意指长度为至少10个碱基的核苷酸,是核糖核苷酸或脱氧核苷酸或者是任一类型的核苷酸的修饰形式。所述术语包括DNA的单链和双链形式。

[0309] 本文提及的术语寡核苷酸包括通过天然存在的和非天然存在的寡核苷酸键联连接在一起的天然存在的和修饰的核苷酸。寡核苷酸是通常包含200个碱基或更少碱基的长度的多核苷酸亚群。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为10至60个碱基,并且在一些实施方案中,长度为12、13、14、15、16、17、18、19或20至40个碱基。寡核苷酸通常为单链的,例如用于探针,但是寡核苷酸可为双链的,例如用于构建基因突变体。本公开的寡核苷酸为有义或反义寡核苷酸。

[0310] 本文提及的术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。本文提及的术语“修饰的核苷酸”包括具有修饰的或取代的糖基的核苷酸等。本文提及的术语“寡核苷酸键联”包括诸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺磷酸酯(phosphoranilate)、氨基磷酸酯等的寡核苷酸键联。参见例如LaPlanche等人Nucl. Acids Res. 14:9081(1986);Stec等人J. Am. Chem. Soc. 106:6077(1984),Stein等人Nucl. Acids Res. 16:3209(1988),Zon等人Anti Cancer Drug Design 6:539(1991);Zon等人Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach,第87-108页(F. Eckstein,编,Oxford University Press,Oxford

England (1991)); Stec 等人美国专利号 5,151,510; Uhlmann 和 Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990)。如果需要,寡核苷酸可包括用于检测的标记。

[0311] 如本文所用,二十种常规氨基酸及其缩写遵循常规用法。参见 Immunology-A Synthesis (第2版, E.S. Golub 和 D.R. Gren 编, Sinauer Associates, Sunderland 7 Mass. (1991))。二十种常规氨基酸的立体异构体(例如 D-氨基酸)、非天然氨基酸(诸如 α -、 α -二取代的氨基酸)、N-烷基氨基酸、乳酸以及其他非常规氨基酸也可为本公开的多肽的合适的组分。非常规氨基酸的实例包括: 4-羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 σ -N-甲基精氨酸以及其他类似氨基酸和亚氨基酸(例如 4-羟基脯氨酸)。在本文所用的多肽表示法中,根据标准用法和惯例,左手方向为氨基端方向,并且右手方向为羧基端方向。

[0312] 类似地,除非另外说明,否则单链多核苷酸序列的左手端为 5' 端,双链多核苷酸序列的左手方向称为 5' 方向。初生 RNA 转录物的 5' 至 3' 添加方向被称为转录方向,在具有与 RNA 相同的序列的 DNA 链上并且是 5' 至 RNA 转录物的 5' 端的序列区域被称为“上游序列”,在具有与 RNA 相同的序列的 DNA 链上并且是 3' 至 RNA 转录物的 3' 端的序列区域被称为“下游序列”。

[0313] 当应用于多肽时,术语“实质同一性”意指当诸如通过使用默认空位权重的程序 GAP 或 BESTFIT 进行最佳比对时,两个肽序列共享至少 80% 序列同一性,在一些实施方案中共享至少 90% 序列同一性,在一些实施方案中共享至少 95% 序列同一性并且在一些实施方案中共享至少 99% 序列同一性。

[0314] 在一些实施方案中,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。

[0315] 如本文所论述,设想的是本公开涵盖抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列中的微小变化,条件是氨基酸序列中的变化保持至少 75%, 在一些实施方案中保持至少 80%、90%、95%, 并且在一些实施方案中保持 99%。特别地,设想保守性氨基酸置换。保守性置换是在氨基酸家族内发生的在其侧链中相关的那些置换。遗传编码的氨基酸通常分成以下家族: (1) 酸性氨基酸为天冬氨酸、谷氨酸; (2) 碱性氨基酸为赖氨酸、精氨酸、组氨酸; (3) 非极性氨基酸为丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸; 以及 (4) 不带电荷的极性氨基酸为甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。亲水性氨基酸包括精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸。疏水性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。其他氨基酸家族包括 (i) 丝氨酸和苏氨酸,它们是脂族-羟基家族; (ii) 天冬酰胺和谷氨酰胺,它们是含有酰胺的家族; (iii) 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,它们是脂族家族; 和 (iv) 苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸,它们是芳族家族。例如,合理地预期用异亮氨酸或缬氨酸分离置换亮氨酸、用谷氨酸分离置换天冬氨酸、用丝氨酸分离置换苏氨酸或用结构上相关的氨基酸类似地置换氨基酸将不会对所得分子的结合或性质具有重大影响,尤其是在置换不涉及框架位点内的氨基酸的情况下。氨基酸改变是否产生功能性肽可通过测定多肽衍生物的特异性活性容易地确定。测定在本文中详细描述。抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物可由本领域普通技术人员容易地制备。片段或类似物的合适的氨基端和羧基端出现在功能结构域的边界附近。可通过将核苷酸和/或氨

氨基酸序列数据与公开或专有序列数据库进行比较来鉴别结构和功能结构域。在一些实施方案中,计算机化的比较方法用于鉴别在具有已知结构和/或功能的其他蛋白质中出现的序列基序或预测的蛋白质构象结构域。鉴别折叠成已知三维结构的蛋白质序列的方法是已知的。Bowie等人Science 253:164(1991)。因此,前述实例证明,根据本公开,本领域技术人员可识别可用于定义结构和功能结构域的序列基序和结构构象。

[0316] 合适的氨基酸取代是以下的那些:(1)降低对蛋白水解的易感性,(2)降低对氧化的易感性,(3)改变用于形成蛋白质复合物的结合亲和力,(4)改变结合亲和力,以及(5)赋予或修饰此类类似物的其他物理化学或功能性质。类似物可包括具有除了天然存在的肽序列以外的序列的各种突变蛋白。例如,单个或多个氨基酸取代(例如保守性氨基酸取代)可在天然存在的序列中(例如,在形成分子间接触的一个或多个结构域外部的多肽部分中)进行。保守性氨基酸取代不应实质上改变亲本序列的结构特征(例如,氨基酸置换不应倾向于破坏亲本序列中存在的螺旋,或破坏表征亲本序列的其他类型的二级结构)。本领域公认的多肽二级结构和三级结构的实例描述于Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton编, W.H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden和J. Tooze编, Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); 以及Thornton等人Nature 354:105(1991)。

[0317] 如本文所用,术语“多肽片段”是指如下多肽,其具有氨基端和/或羧基端缺失和/或一个或多个内部缺失,但是其中剩余的氨基酸序列与例如从全长cDNA序列推导的天然存在的序列中的相应位置相同。片段长度通常为至少5、6、8或10个氨基酸,在一些实施方案中长度至少14个氨基酸,在一些实施方案中长度至少20个氨基酸,通常长度至少50个氨基酸,并且在一些实施方案中长度至少70个氨基酸。如本文所用,术语“类似物”是指由至少25个氨基酸的区段组成的多肽,所述区段与推导的氨基酸序列的一部分具有实质同一性并且在合适的结合条件下与靶标具有特异性结合。通常,多肽类似物相对于天然存在的序列包含保守性氨基酸取代(或添加或缺失)。类似物长度通常为至少20个氨基酸,在一些实施方案中长度至少50个氨基酸或更长,并且经常可与全长天然存在的多肽一样长。

[0318] 术语“剂”在本文中用于表示化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子或由生物材料制成的提取物。

[0319] 如本文所用,术语“标记”或“标记的”是指并入可检测的标志物,例如通过并入放射性标记的氨基酸或附接至具有可通过标记的亲合素(例如,含有可通过光学方法或比色方法检测的荧光标志物或酶促活性的链霉亲和素)检测的生物素基部分的多肽。在某些情况下,标记或标志物也可用于治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域中已知的并且可使用。用于多肽的标记的实例包括但不限于以下:放射性同位素或放射性核素(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、荧光标记(例如,FITC、罗丹明、镧系元素磷光体)、酶标记(例如,辣根过氧化物酶、p-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光、生物素基团、由二级报告分子识别的预定多肽表位(例如,亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)。在一些实施方案中,标记通过具有各种长度的间隔臂附接以降低潜在的空间位阻。如本文所用,术语“药剂或药物”是指当适当施用于患者时能够诱导所需治疗作用的化合物或组合物。

[0320] 本文中的其他化学术语根据本领域中的常规用法使用,如由The McGraw-Hill

Dictionary of Chemical Terms(Parker,S.编,McGraw-Hill,San Francisco(1985))所例示。

[0321] 如本文所用,“基本上纯的”意指目标种类是存在的主要种类(即,在摩尔基础上它比组合物中的任何其他单独种类更丰富),并且在一些实施方案中,基本上纯化的级分是其中目标种类占存在的所有大分子种类的至少约50%(在摩尔基础上)的组合物。

[0322] 一般来说,基本上纯的组合物将占组合物中存在的所有大分子种类的大于约80%,在一些实施方案中大于约85%、90%、95%和99%。在一些实施方案中,目标种类被纯化至必要的均质性(通过常规的检测方法不能检测到组合物中的污染物种类),其中组合物基本上由单一大分子种类组成。

[0323] 术语患者包括人和兽医受试者。

[0324] 本公开的可活化抗体特异性结合给定靶标,例如人靶蛋白。本公开中还包括结合至与本文所述的可活化抗体相同的表位的可活化抗体。

[0325] 本领域技术人员将认识到,可以在无需过度实验的情况下,通过确定单克隆抗体(例如,鼠单克隆抗体或人源化抗体)是否阻止本文所述的方法中使用的单克隆抗体与靶标结合来确定前者是否具有与后者相同的特异性。如果正在测试的单克隆抗体与本公开的单克隆抗体竞争,如本公开的单克隆抗体的结合降低所示,则两种单克隆抗体结合至相同或密切相关的表位。一种用于确定单克隆抗体是否具有本公开的单克隆抗体的特异性的方法是将本公开的单克隆抗体与靶标预孵育并且然后添加正测试的单克隆抗体以确定正测试的单克隆抗体结合靶标的能力是否受到抑制。如果正测试的单克隆抗体受到抑制,则其极有可能具有与本公开的单克隆抗体相同或在功能上等效的表位特异性。

[0326] 多特异性可活化抗体

[0327] 本公开还提供了多特异性可活化抗体。本文提供的多特异性可活化抗体为多特异性抗体,其识别两种或更多种不同抗原或表位,并且包含至少一个掩蔽部分(MM),其与多特异性抗体的至少一个抗原或表位结合结构域连接,使得MM的偶合降低抗原或表位结合结构域结合其靶标的能力。在一些实施方案中,MM通过充当至少一种MMP蛋白酶和至少一种SP的底物的CM1-CM2底物偶合至多特异性抗体的抗原或表位结合结构域。本文提供的可活化多特异性抗体在循环中稳定,在预期的治疗和/或诊断位点活化,但在正常组织(即健康组织)中不活化,并且在活化时表现出与相应的未修饰的多特异性抗体至少相当的与靶标的结合。

[0328] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体被设计成衔接免疫效应细胞,在本文中也称为免疫效应细胞衔接性多特异性可活化抗体。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体被设计成衔接白细胞,在本文中也称为白细胞衔接性多特异性可活化抗体。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体被设计成衔接T细胞,在本文中也称为T细胞衔接性多特异性可活化抗体。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体衔接白细胞上的表面抗原,诸如T细胞、自然杀伤(NK)细胞、髓样单核细胞、巨噬细胞和/或在另一种免疫效应细胞上的表面抗原。在一些实施方案中,免疫效应细胞为白细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞为T细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞为NK细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞为单核细胞,诸如髓样单核细胞。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体被设计成与多于一个靶标和/或多于一个表位结合或以其他方式相互作用,在本文中也称为多抗原靶向可活化抗

体。如本文所用,术语“靶标”和“抗原”可互换使用。

[0329] 在一些实施方案中,本公开的免疫效应细胞衔接的多特异性可活化抗体包含靶向抗体或其抗原结合片段和免疫效应细胞衔接性抗体或其抗原结合部分,其中靶向抗体或其抗原结合片段和/或免疫效应细胞衔接性抗体或其抗原结合部分中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,免疫效应细胞衔接性抗体或其抗原结合片段包含结合第一免疫效应细胞衔接性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合第一靶标的能力。在一些实施方案中,靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,接合免疫效应细胞的抗体或其抗原结合片段包含结合第一免疫效应细胞衔接性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合第一靶标的能力,并且靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,非免疫效应细胞衔接性抗体为靶向癌症的抗体。在一些实施方案中,非免疫细胞效应抗体为IgG。在一些实施方案中,免疫效应细胞衔接性抗体为scFv。在一些实施方案中,靶向抗体(例如,非免疫细胞效应抗体)为IgG,并且免疫效应细胞衔接性抗体为scFv。在一些实施方案中,免疫效应细胞为白细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞为T细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞为NK细胞。在一些实施方案中,免疫效应细胞为髓样单核细胞。

[0330] 在一些实施方案中,本公开的T细胞衔接性多特异性可活化抗体包含靶向抗体或其抗原结合片段和T细胞衔接性抗体或其抗原结合部分,其中靶向抗体或其抗原结合片段和/或T细胞衔接性抗体或其抗原结合部分中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,T细胞衔接性抗体或其抗原结合片段包含结合第一T细胞衔接性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合第一靶标的能力。在一些实施方案中,靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,T细胞衔接性抗体或其抗原结合片段包含结合第一T细胞衔接性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合第一靶标的能力,并且靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二靶标的能力。

[0331] 在一些实施方案中,T细胞衔接性多特异性可活化抗体包含靶向癌症的抗体或其抗原结合片段和T细胞衔接性抗体或其抗原结合部分,其中靶向癌症的抗体或其抗原结合片段和/或T细胞衔接性抗体或其抗原结合部分中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,T细胞衔接性抗体或其抗原结合片段包含结合第一T细胞衔接性靶标的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合第一靶标的能力。在一些实施方案中,靶向癌症的抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2

附接至掩蔽部分 (MM2), 使得MM2的偶合降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。在一些实施方案中, T细胞衔接性抗体或其抗原结合片段包含结合第一T细胞衔接性靶标的第一抗体或其抗原结合片段 (AB1), 其中AB1附接至掩蔽部分 (MM1), 使得MM1的偶合降低AB1结合第一靶标的能力, 并且靶向癌症的抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段, 所述第二抗体或其片段包含结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段 (AB2), 其中AB2附接至掩蔽部分 (MM2), 使得MM2的偶合降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。

[0332] 在一些实施方案中, T细胞衔接性多特异性可活化抗体包含靶向癌症的IgG抗体或其抗原结合片段和T细胞衔接scFv, 其中靶向癌症的IgG抗体或其抗原结合片段和/或T细胞衔接性抗体或其抗原结合部分中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中, T细胞衔接性抗体或其抗原结合片段包含结合第一T细胞衔接性靶标的第一抗体或其抗原结合片段 (AB1), 其中AB1附接至掩蔽部分 (MM1), 使得MM1的偶合降低AB1结合第一靶标的能力。在一些实施方案中, 靶向癌症的IgG抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段, 所述第二抗体或其片段包含结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段 (AB2), 其中AB2附接至掩蔽部分 (MM2), 使得MM2的偶合降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。在一些实施方案中, T细胞衔接性抗体或其抗原结合片段包含结合第一T细胞衔接性靶标的第一抗体或其抗原结合片段 (AB1), 其中AB1附接至掩蔽部分 (MM1), 使得MM1的偶合降低AB1结合第一靶标的能力, 并且靶向癌症的IgG抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段, 所述第二抗体或其片段包含结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段 (AB2), 其中AB2附接至掩蔽部分 (MM2), 使得MM2的偶合降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。

[0333] 在免疫效应细胞衔接性多特异性可活化抗体的一些实施方案中, 一种抗原通常是肿瘤细胞或与疾病相关的其他细胞类型上存在的抗原, 诸如但不限于表2中列出的任何靶标, 诸如但不限于EGFR、erbB2、EpCAM、Jagged、PD-L1、B7H3或CD71 (转铁蛋白受体), 并且另一种抗原通常是T细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、髓样单核细胞、巨噬细胞和/或其他免疫效应细胞表面上存在的刺激性或抑制性受体, 诸如但不限于B7-H4、BTLA、CD3、CD4、CD8、CD16a、CD25、CD27、CD28、CD32、CD56、CD137、CTLA-4、GITR、HVEM、ICOS、LAG3、NKG2D、OX40、PD-1、TIGIT、TIM3或VISTA。在一些实施方案中, 抗原是T细胞或NK细胞表面上存在的刺激性受体; 此类刺激性受体的实例包括但不限于CD3、CD27、CD28、CD137 (也称为4-1BB)、GITR、HVEM、ICOS、NKG2D和OX40。在一些实施方案中, 抗原是T细胞表面上存在的抑制性受体; 此类抑制性受体的实例包括但不限于BTLA、CTLA-4、LAG3、PD-1、TIGIT、TIM3和NK表达的KIR。赋予T细胞表面抗原特异性的抗体结构域也可被结合至T细胞受体、NK细胞受体、巨噬细胞受体和/或其他免疫效应细胞受体 (诸如但不限于B7-1、B7-2、B7H3、PD-L1、PD-L2或TNFSF9) 的配体或配体结构域取代。

[0334] 本公开的一个实施方案是多特异性可活化抗体, 其在癌症微环境中可活化, 并且包括针对肿瘤靶标的抗体 (例如IgG或scFv) 和针对在活化的T细胞或NK细胞表面上表达的共刺激受体的激动剂抗体 (例如IgG或scFv), 其中癌症靶抗体和/或激动剂抗体中的至少一种被掩蔽。共刺激受体的实例包括但不限于CD27、CD137、GITR、HVEM、NKG2D和OX40。在此实施方案中, 一旦被肿瘤相关蛋白酶活化, 多特异性可活化抗体将以肿瘤依赖性方式有效交联并活化T细胞或NK细胞表达的共刺激受体, 以增强通过其内源性T细胞抗原或NK活化受体对任何肿瘤抗原作出反应的T细胞的活性。这些T细胞或NK细胞共刺激受体的活化依赖性

质将使活化的多特异性可活化抗体的活性集中于肿瘤特异性T细胞,而不活化不依赖于其抗原特异性的所有T细胞。在一个实施方案中,至少掩蔽多特异性可活化抗体的共刺激受体抗体以防止可能存在于组织中的自身反应性T细胞的活化,所述组织也表达由多特异性可活化抗体中针对肿瘤靶标的抗体识别的抗原,但其活性因缺乏共受体参与而受到限制。

[0335] 本公开的一个实施方案是在以T细胞过度刺激为特征的疾病(诸如但不限于自身免疫疾病或炎性疾病微环境)中可活化的多特异性可活化抗体。此种多特异性可活化抗体包含针对包含自身免疫或炎性疾病中由T细胞靶向的组织中表达的表面抗原的靶标的抗体,例如IgG或scFv;以及针对在T细胞或NK细胞表面上表达的抑制性受体的抗体,例如IgG或scFv,其中疾病组织靶抗体和/或T细胞抑制性受体抗体中的至少一种被掩蔽。抑制性受体的实例包括但不限于BTLA、CTLA-4、LAG3、PD-1、TIGIT、TIM3和NK表达的KIR。自身免疫疾病中由T细胞靶向的组织抗原的实例包括但不限于多发性硬化症中在髓鞘或神经细胞上表达的表面抗原或1型糖尿病中在胰岛细胞上表达的表面抗原。在此实施方案中,当定位在处于自身免疫攻击或炎症下的组织中时,多特异性可活化抗体被活化并与T细胞或NK细胞抑制性受体共衔接,以抑制通过其内源性TCR或活化受体对任何疾病组织靶向抗原作出反应的自身反应性T细胞的活性。在一个实施方案中,掩蔽至少一种或多种抗体以防止在也可表达靶抗原的非疾病组织中抑制T细胞反应。

[0336] 在一些实施方案中,T细胞衔接性多特异性可活化抗体包含抗CD3 ϵ (CD3 ϵ ,在本文中也称为CD3e和CD3) scFv和靶向抗体或其抗原结合片段,其中抗CD3 ϵ scFv和/或靶向抗体或其抗原结合部分中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包含结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中,靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包含结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CD3 ϵ 的能力,并且靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二靶标的能力。

[0337] 在一些实施方案中,T细胞衔接性多特异性可活化抗体包含抗CD3 ϵ scFv和靶向癌症的抗体或其抗原结合片段,其中抗CD3 ϵ scFv和/或靶向癌症的抗体或其抗原结合部分中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包含结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中,靶向癌症的抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包含结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CD3 ϵ 的能力,并且靶向癌症的抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。

[0338] 在一些实施方案中,T细胞衔接性多特异性可活化抗体包含抗CD3 ϵ scFv和靶向癌症的IgG抗体或其抗原结合片段,其中抗CD3 ϵ scFv和/或靶向癌症的IgG抗体或其抗原结合部分中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包含结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中,靶向癌症的IgG抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。在一些实施方案中,CD3 ϵ scFv包含结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CD3 ϵ 的能力,并且靶向癌症的抗体IgG或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。

[0339] 在一些实施方案中,T细胞衔接性多特异性可活化抗体包含源自OKT3的抗CD3 ϵ (CD3 ϵ)scFv,其中靶向抗体或其抗原结合片段和/或OKT3 scFv或OKT3来源的scFv中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,OKT3 scFv或OKT3来源的scFv包含结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中,靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,OKT3 scFv或OKT3来源的scFv包含结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CD3 ϵ 的能力,并且靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二靶标的能力。

[0340] 在一些实施方案中,T细胞衔接性多特异性可活化抗体包含OKT3 scFv或OKT3来源的scFv和靶向癌症的抗体或其抗原结合片段,其中OKT3 scFv或OKT3来源的scFv和/或靶向癌症的抗体或其抗原结合部分中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,OKT3 scFv或OKT3来源的scFv包含结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中,靶向癌症的抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。在一些实施方案中,OKT3 scFv或OKT3来源的scFv包含结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CD3 ϵ 的能力,并且靶向癌症的抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。

[0341] 在一些实施方案中,T细胞衔接性多特异性可活化抗体包含OKT3 scFv或OKT3来源的scFv和靶向癌症的IgG抗体或其抗原结合片段,其中OKT3 scFv或OKT3来源的scFv和/或靶向癌症的IgG抗体或其抗原结合部分中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,OKT3

scFv或OKT3来源的scFv包含结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CD3 ϵ 的能力。在一些实施方案中,靶向癌症的IgG抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。在一些实施方案中,OKT3 scFv或OKT3来源的scFv包含结合CD3 ϵ 的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CD3 ϵ 的能力,并且靶向癌症的抗体IgG或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二癌症相关靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二癌症相关靶标的能力。

[0342] 在一些实施方案中,T细胞衔接性多特异性可活化抗体包含抗CTLA-4scFv,其中靶向抗体或其抗原结合片段和/或抗CTLA-4scFv中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,抗CTLA-4scFv包含结合CTLA-4的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CTLA-4的能力。在一些实施方案中,靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,抗CTLA-4scFv包含结合CTLA-4的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CTLA-4的能力,并且靶向抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二靶标的能力。

[0343] 在一些实施方案中,T细胞衔接性多特异性可活化抗体包含抗CTLA-4scFv和靶向IgG抗体或其抗原结合片段,其中抗CTLA-4scFv和/或靶向IgG抗体或其抗原结合部分中的至少一种被掩蔽。在一些实施方案中,抗CTLA-4scFv包含结合CTLA-4的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CTLA-4的能力。在一些实施方案中,靶向IgG抗体或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二靶标的能力。在一些实施方案中,抗CTLA-4scFv包含结合CTLA-4的第一抗体或其抗原结合片段(AB1),其中AB1附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合CTLA-4的能力,并且靶向抗体IgG或其抗原结合片段包含第二抗体或其片段,所述第二抗体或其片段包含结合第二靶标的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中AB2附接至掩蔽部分(MM2),使得MM2的偶合降低AB2结合第二靶标的能力。

[0344] 在一些实施方案中,多抗原靶向抗体和/或多抗原靶向可活化抗体至少包含结合第一靶标和/或第一表位的第一抗体或其抗原结合片段以及结合第二靶标和/或第二表位的第二抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,多抗原靶向抗体和/或多抗原靶向可活化抗体结合两个或更多个不同的靶标。在一些实施方案中,多抗原靶向抗体和/或多抗原靶向可活化抗体结合同一靶标上的两个或更多个不同表位。在一些实施方案中,多抗原靶向抗体和/或多抗原靶向可活化抗体结合两个或更多个不同的靶标与同一靶标上的两个或更多个不同表位的组合。

[0345] 在一些实施方案中,包含IgG的多特异性可活化抗体具有被掩蔽的IgG可变结构域。在一些实施方案中,包含scFv的多特异性可活化抗体具有被掩蔽的scFv结构域。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体具有IgG可变结构域和scFv结构域,其中IgG可变结构域中的至少一个偶合至掩蔽部分。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体具有IgG可变结构域和scFv结构域,其中scFv结构域中的至少一个偶合至掩蔽部分。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体具有IgG可变结构域和scFv结构域,其中IgG可变结构域中的至少一个偶合至掩蔽部分,并且scFv结构域中的至少一个偶合至掩蔽部分。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体具有IgG可变结构域和scFv结构域,其中IgG可变结构域和scFv结构域中的每一个偶合至其自身的掩蔽部分。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体的一个抗体结构域对靶抗原具有特异性,并且另一个抗体结构域对T细胞表面抗原具有特异性。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体的一个抗体结构域对靶抗原具有特异性,并且另一个抗体结构域对另一个靶抗原具有特异性。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体的一个抗体结构域对靶抗原的表位具有特异性,并且另一个抗体结构域对靶抗原的另一个表位具有特异性。

[0346] 在多特异性可活化抗体中, scFv可融合至IgG可活化抗体的重链的羧基端、IgG可活化抗体的轻链的羧基端或IgG可活化抗体的重链和轻链的羧基端。在多特异性可活化抗体中, scFv可融合至IgG可活化抗体的重链的氨基端、IgG可活化抗体的轻链的氨基端或IgG可活化抗体的重链和轻链的氨基端。在多特异性可活化抗体中, scFv可融合至IgG可活化抗体的一个或多个羧基端和一个或多个氨基端的任何组合。在一些实施方案中, 与CM1-CM2底物连接的掩蔽部分(MM) 附接至IgG的抗原结合结构域并将其掩蔽。在一些实施方案中, 与CM1-CM2底物连接的掩蔽部分(MM) 附接至至少一个scFv的抗原结合结构域并将其掩蔽。在一些实施方案中, 与CM1-CM2底物连接的掩蔽部分(MM) 附接至IgG的抗原结合结构域并将其掩蔽, 并且与CM1-CM2底物连接的掩蔽部分(MM) 附接至至少一个scFv的抗原结合结构域并将其掩蔽。

[illegible]

L3-VH*-LP2-CM1-CM2底物-LP1-MM)₂: (MM-LP1-CM1-CM2底物-LP2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂: (MM-LP1-CM1-CM2底物-LP2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂: (MM-LP1-CM1-CM2底物-LP2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)₂: (MM-LP1-CM1-CM2底物-LP2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)₂: (MM-LP1-CM1-CM2底物-LP2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-LP2-CM1-CM2底物-LP1-MM)₂: (VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-LP2-CM1-CM2底物-LP1-MM)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-LP2-CM1-CM2底物-LP1-MM)₂: (VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; or (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-LP2-CM1-CM2底物-LP1-MM)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂, 其中: VL和VH代表IgG中包含的具有第一特异性的轻和重可变结构域; VL*和VH*代表scFv中包含的具有第二特异性的可变结构域; LP1为连接掩蔽部分(MM)和CM1-CM2底物的接头肽; LP2为连接CM1-CM2底物和抗体的连接肽; L3为连接scFv的可变结构域的接头肽; L4为将具有第一特异性的抗体连接至具有第二特异性的抗体的连接肽; CL为轻链恒定结构域; 并且CH1、CH2、CH3为重链恒定结构域。所述第一特异性和第二特异性可针对任何抗原或表位。

[0348] 在T细胞衔接性多特异性可活化抗体的一些实施方案中, 一种抗原通常是肿瘤细胞或与疾病相关的其他细胞类型表面上存在的抗原, 诸如但不限于表2中列出的任何靶标, 诸如但不限于EGFR、erbB2、EpCAM、Jagged、PD-L1、B7H3或CD71(转铁蛋白受体), 并且另一种抗原通常是T细胞、自然杀伤(NK)细胞、髓样单核细胞、巨噬细胞和/或其他免疫效应细胞表面上存在的刺激性(在本文中也称为活化)或抑制性受体, 诸如但不限于B7-H4、BTLA、CD3、CD4、CD8、CD16a、CD25、CD27、CD28、CD32、CD56、CD137(也称为TNFRSF9)、CTLA-4、GITR、HVEM、ICOS、LAG3、NKG2D、OX40、PD-1、TIGIT、TIM3或VISTA。赋予T细胞表面抗原特异性的抗体结构域也可被结合至T细胞受体、NK细胞受体、巨噬细胞受体和/或其他免疫效应细胞受体(诸如但不限于B7-1、B7-2、B7H3、PD-L1、PD-L2或TNFSF9)的配体或配体结构域取代。在多抗原靶向可活化抗体的一些实施方案中, 一种抗原选自表2中列出的靶标的组, 并且另一种抗原选自表2中列出的靶标的组。

[0349] 在一些实施方案中, 靶向抗体为抗EGFR抗体。在一些实施方案中, 靶向抗体为C225v5, 其对结合EGFR具有特异性。在一些实施方案中, 靶向抗体为C225, 其对结合EGFR具有特异性。在一些实施方案中, 靶向抗体为C225v4, 其对结合EGFR具有特异性。在一些实施方案中, 靶向抗体为C225v6, 其对结合EGFR具有特异性。在一些实施方案中, 靶向抗体为抗Jagged抗体。在一些实施方案中, 靶向抗体为4D11, 其对结合人和小鼠Jagged1和Jagged2具有特异性。在一些实施方案中, 靶向抗体为4D11v2, 其对结合人和小鼠Jagged1和Jagged2具有特异性。

[0350] 在一些实施方案中, 靶向抗体可以是呈可活化抗体的形式。在一些实施方案中, 一个或多个scFv可以是呈Pro-scFv的形式(参见例如WO 2009/025846、WO 2010/081173)。

[0351] 在一些实施方案中, scFv对结合CD3ε具有特异性, 并且是或源自结合CD3ε的抗体或其片段, 例如CH2527、FN18、H2C、OKT3、2C11、UCHT1或V9。在一些实施方案中, scFv对结合CTLA-4(在本文中也称为CTLA和CTLA4)具有特异性。

[0352] 在一些实施方案中, 抗CTLA-4scFv包含以下氨基酸序列:

GGGSGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSSLSPGERA
TLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG
SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGGTKVEIKRSG
[0353] GSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQTGGGVVQPGRSLRLSCAASG
STFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLV
TVSSAS (SEQ ID NO: 347)

[0354] 在一些实施方案中,抗CTLA-4scFv包含与氨基酸序列SEQ ID NO:347至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列。

[0355] 在一些实施方案中,抗CD3 ϵ scFv包含以下氨基酸序列:

GGGSGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGAS
VKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNV
NQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHY
[0356] CLDYWGQGTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGQIVLTQSPAISASP
GEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPA
HFRGSGSGTSSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI
NR (SEQ ID NO: 349)

[0357] 在一些实施方案中,抗CD3 ϵ scFv包含与氨基酸序列SEQ ID NO:349至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列。

[0358] 在一些实施方案中,scFv对结合一种或多种T细胞、一种或多种NK细胞和/或一种或多种巨噬细胞具有特异性。在一些实施方案中,scFv对结合选自以下组成的组的靶标具有特异性:B7-H4、BTLA、CD3、CD4、CD8、CD16a、CD25、CD27、CD28、CD32、CD56、CD137、CTLA-4、GITR、HVEM、ICOS、LAG3、NKG2D、OX40、PD-1、TIGIT、TIM3或VISTA。

[0359] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体还包含缀合至AB的剂。在一些实施方案中,剂为治疗剂。在一些实施方案中,剂为抗肿瘤剂。在一些实施方案中,剂为毒素或其片段。在一些实施方案中,剂通过接头缀合至多特异性可活化抗体。在一些实施方案中,剂通过可裂解的接头缀合至AB。在一些实施方案中,剂通过包含至少一个CM1-CM2底物序列的接头缀合至AB。在一些实施方案中,接头为不可裂解的接头。在一些实施方案中,剂为微管抑制剂。在一些实施方案中,剂为核酸损伤剂,诸如DNA烷基化剂或DNA嵌入剂,或其他DNA损伤剂。在一些实施方案中,接头为可裂解的接头。在一些实施方案中,剂为选自表4中列出的组的剂。在一些实施方案中,剂为多拉司他汀。在一些实施方案中,剂为瑞奥西汀或其衍生物。在一些实施方案中,剂为瑞奥西汀E或其衍生物。在一些实施方案中,剂为单甲基瑞奥西汀E(MMAE)。在一些实施方案中,剂为单甲基瑞奥西汀D(MMAD)。在一些实施方案中,剂为美登木素生物碱或美登木素生物碱衍生物。在一些实施方案中,剂为DM1或DM4。在一些实施方案中,剂为倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,剂为卡奇霉素或其衍生物。在一些实施

方案中,剂为吡咯并苯并二氮杂草。在一些实施方案中,剂为吡咯并苯并二氮杂草二聚体。

[0360] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体还包含可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分为诊断剂。

[0361] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体天然含有一个或多个二硫键。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体可被工程化为包含一个或多个二硫键。

[0362] 本公开还提供了一种编码本文所述的多特异性可活化抗体的分离的核酸分子,以及包含这些分离的核酸序列的载体。本公开提供了产生多特异性可活化抗体的方法,其通过在导致所述可活化抗体表达的条件下培养细胞来进行,其中所述细胞包含此种核酸分子。在一些实施方案中,细胞包含此种载体。

[0363] 本公开还提供了一种制造本公开的多特异性可活化抗体的方法,其通过以下步骤进行:(a)在导致多特异性可活化抗体表达的条件下培养包含编码多特异性可活化抗体的核酸构建体的细胞,以及(b)回收多特异性可活化抗体。

[0364] 本公开还提供了多特异性可活化抗体和/或多特异性可活化抗体组合物,其至少包含特异性结合第一靶标或第一表位的第一抗体或其抗原结合片段(AB1)和结合第二靶标或第二表位的第二抗体或其抗原结合片段(AB2),其中至少AB1偶合至或以其他方式附接至掩蔽部分(MM1),使得MM1的偶合降低AB1结合其靶标的能力。在一些实施方案中,MM1通过MMP和SP的CM1-CM2底物偶合至AB1,其中MMP和SP中的至少一个与AB1的靶标共定位在受试者的治疗位点或诊断位点。本文提供的多特异性可活化抗体在循环中稳定,在预期的治疗和/或诊断位点活化,但在正常组织(即健康组织)中不活化,并且在活化时表现出与相应的未修饰的多特异性抗体至少相当的与AB1的靶标结合。

[0365] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体包含MM1与CM1-CM2底物之间的连接肽。

[0366] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体包含CM1-CM2底物与AB1之间的连接肽。

[0367] 在一些实施方案中,可活化抗体包含第一连接肽(LP1)和第二连接肽(LP2),并且多特异性可活化抗体的至少一部分在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:MM1-LP1-CM1-CM2底物-LP2-AB1或AB1-LP2-CM1-CM2底物-LP1-MM1。在一些实施方案中,两个连接肽不需要彼此相同。

[0368] 在一些实施方案中,LP1或LP2中的至少一个包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:381)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:382),其中n为至少1的整数。在一些实施方案中,LP1或LP2中的至少一个包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:GGSG(SEQ ID NO:383)、GGSGG(SEQ ID NO:384)、GSGSG(SEQ ID NO:385)、GSGGG(SEQ ID NO:386)、GGGSG(SEQ ID NO:387)和GSSSG(SEQ ID NO:388)。

[0369] 在一些实施方案中,可活化抗体包含CM1与CM2之间的连接肽(LP')。

[0370] 在一些实施方案中,可活化抗体包含第一连接肽(LP1)、第二连接肽(LP2)和在CM1与CM2之间的连接肽(LP'),并且多特异性可活化抗体的至少一部分在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:MM1-LP1-CM1-CM2底物-LP2-AB1或AB1-LP2-CM1-CM2底物-LP1-MM1。在一些实施方案中,连接肽不需要彼此相同。

[0371] 在一些实施方案中,LP'为GG。在一些实施方案中,LP'为GGSGGS(SEQ ID NO:218)。

[0372] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体至少包含特异性结合第一靶标或第一表位的第一抗体或其抗原结合片段(AB1)以及特异性结合第二靶标或第二表位的第二抗体或

其抗原结合片段(AB2)。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体中AB各自独立地选自以下组成的组:单克隆抗体、结构域抗体、单链、Fab片段、 $F(ab')_2$ 片段、scFv、scAb、dAb、单结构域重链抗体和单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体中AB各自为啮齿动物(例如,小鼠或大鼠)抗体、嵌合抗体、人源化抗体或完全人单克隆抗体。

[0373] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体中AB各自与其相应的靶标或表位结合的解离常数为约100nM或更小。

[0374] 在一些实施方案中,MM1与其相应的AB结合的解离常数大于AB与其相应的靶标或表位的解离常数。

[0375] 在一些实施方案中,MM1与其相应的AB结合的解离常数不超过AB与其相应的靶标或表位的解离常数。

[0376] 在一些实施方案中,当多特异性可活化抗体处于裂解状态时,MM1不干扰或竞争其相应的AB与相应的靶标或表位的结合。

[0377] 在一些实施方案中,MM1是长度为约2至40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体中MM各自是长度不超过40个氨基酸的多肽。

[0378] 在一些实施方案中,MM1的多肽序列与相应AB的靶标的序列不同。

[0379] 在一些实施方案中,MM1的多肽序列与相应AB的任何天然结合配偶体不超过50%相同。在一些实施方案中,MM1的多肽序列与相应AB的任何天然结合配偶体不超过25%相同。在一些实施方案中,MM1的多肽序列与相应AB的任何天然结合配偶体不超过10%相同。

[0380] 在一些实施方案中,MM1的偶合降低相应AB结合其靶标或表位的能力,使得与MM1偶合的AB针对其相应靶标或表位的解离常数(K_d)比未与MM1偶合的AB针对其相应靶标或表位的 K_d 大至少20倍。

[0381] 在一些实施方案中,MM1的偶合降低相应AB结合其靶标或表位的能力,使得与MM1偶合的AB针对其相应靶标或表位的解离常数(K_d)比未与MM1偶合的AB针对其相应靶标或表位的 K_d 大至少40倍。

[0382] 在一些实施方案中,MM1的偶合降低相应AB结合其靶标或表位的能力,使得与MM1偶合的AB针对其相应靶标或表位的解离常数(K_d)比未与MM1偶合的AB针对其相应靶标或表位的 K_d 大至少100倍。

[0383] 在一些实施方案中,MM1的偶合降低相应AB结合其靶标或表位的能力,使得与MM1偶合的AB针对其相应靶标或表位的解离常数(K_d)比未与MM1偶合的AB针对其相应靶标或表位的 K_d 大至少1000倍。

[0384] 在一些实施方案中,MM1的偶合降低相应AB结合其靶标或表位的能力,使得与MM1偶合的AB针对其相应靶标或表位的解离常数(K_d)比未与MM1偶合的AB针对其相应靶标或表位的 K_d 大至少10,000倍。

[0385] 在一些实施方案中,MM1为选自本文公开的MM的氨基酸序列。

[0386] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体至少包含当多特异性可活化抗体处于未裂解状态时抑制AB2与其靶标的结合的第二掩蔽部分(MM2)以及偶合至AB2的另外的可裂解部分(CM'),其中CM'为CM1-CM2底物或充当第二蛋白酶的底物的多肽。在一些实施方案中,CM'为长度不超过15个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,CM'为CM1-CM2底物,其中CM1-CM2底物中CM1和CM2各自的长度独立地不超过15个氨基酸。

[0387] 在一些实施方案中,MMP蛋白酶、SP蛋白酶和/或第二蛋白酶与第二靶标或表位共定位在组织中,并且其中当多特异性可活化抗体暴露于MMP蛋白酶、SP蛋白酶和/或第二蛋白酶时,MMP蛋白酶、SP蛋白酶和/或第二蛋白酶裂解多特异性可活化抗体中的CM。'在一些实施方案中,MMP蛋白酶、SP蛋白酶和/或第二蛋白酶与第一靶标或表位和第二靶标或表位共定位在组织中。在一些实施方案中,MMP蛋白酶、SP蛋白酶和/或第二蛋白酶为相同的MMP蛋白酶和相同的SP蛋白酶。在一些实施方案中,MMP蛋白酶、SP蛋白酶和/或第二蛋白酶不是相同的MMP蛋白酶并且不是相同的SP蛋白酶。在一些实施方案中,CM1-CM2底物和CM'是相同的MMP蛋白酶和相同的SP蛋白酶的不同底物。在一些实施方案中,裂解CM'的蛋白酶选自由表1所示的那些组成的组。

[0388] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体中MM(例如,MM1和至少MM2)各自与其相应的AB结合的解离常数大于AB与其相应的靶标或表位的解离常数。

[0389] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体中MM各自与其相应的AB结合的解离常数不超过AB与其相应的靶标或表位的解离常数。

[0390] 在一些实施方案中,当多特异性可活化抗体处于裂解状态时,多特异性可活化抗体中MM各自不干扰或竞争其相应的AB与相应的靶标或表位的结合。

[0391] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体中MM各自是长度为约2至40个氨基酸的多肽。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体中MM各自是长度不超过40个氨基酸的多肽。

[0392] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体中MM各自的多肽序列与相应AB的靶标的序列不同。

[0393] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体中MM各自的多肽序列与相应AB的任何天然结合配偶体不超过50%相同。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体中MM各自的多肽序列与相应AB的任何天然结合配偶体不超过25%相同。在一些实施方案中,多特异性可活化抗体中MM各自的多肽序列与相应AB的任何天然结合配偶体不超过10%相同。

[0394] 在一些实施方案中,MM各自的偶合降低相应AB结合其靶标或表位的能力,使得与MM偶合的AB针对其相应靶标或表位的解离常数(K_d)比未与MM偶合的AB针对其相应靶标或表位的 K_d 大至少20倍。

[0395] 在一些实施方案中,MM各自的偶合降低相应AB结合其靶标或表位的能力,使得与MM偶合的AB针对其相应靶标或表位的解离常数(K_d)比未与MM偶合的AB针对其相应靶标或表位的 K_d 大至少40倍。

[0396] 在一些实施方案中,MM各自的偶合降低相应AB结合其靶标或表位的能力,使得与MM偶合的AB针对其相应靶标或表位的解离常数(K_d)比未与MM偶合的AB针对其相应靶标或表位的 K_d 大至少100倍。

[0397] 在一些实施方案中,MM各自的偶合降低相应AB结合其靶标或表位的能力,使得与MM偶合的AB针对其相应靶标或表位的解离常数(K_d)比未与MM偶合的AB针对其相应靶标或表位的 K_d 大至少1000倍。

[0398] 在一些实施方案中,MM各自的偶合降低相应AB结合其靶标或表位的能力,使得与MM偶合的AB针对其相应靶标或表位的解离常数(K_d)比未与MM偶合的AB针对其相应靶标或表位的 K_d 大至少10,000倍。

[0399] 在一些实施方案中,MM各自为选自本文公开的MM的氨基酸序列。

[0400] 在一些实施方案中,裂解CM1-CM2底物序列的蛋白酶与多特异性可活化抗体中AB1的靶标共定位在组织中,并且当多特异性可活化抗体暴露于蛋白酶时,MMP蛋白酶和/或SP蛋白酶(即MMP蛋白酶和SP蛋白酶中的至少一种)裂解多特异性可活化抗体中的CM1-CM2底物。

[0401] 在一些实施方案中,多特异性可活化抗体包含多于一个CM1-CM2底物序列,并且裂解至少一个CM1-CM2底物序列的MMP蛋白酶和/或SP蛋白酶与多特异性可活化抗体中至少一个AB区域的靶标共定位在组织中,并且当多特异性可活化抗体暴露于蛋白酶时,MMP蛋白酶和/或SP蛋白酶裂解多特异性可活化抗体中的CM1-CM2底物。

[0402] 在一些实施方案中,将每个CM1-CM2底物定位在多特异性可活化抗体中,使得在未裂解状态下,多特异性可活化抗体与一个AB区域的靶标的结合的发生减少,其中解离常数比未修饰的AB与其靶标结合的解离常数大至少两倍,而在裂解状态下,AB结合至其靶标。

[0403] 在一些实施方案中,将每个CM1-CM2底物定位在多特异性可活化抗体中,使得在未裂解状态下,多特异性可活化抗体与一个AB区域的靶标的结合的发生减少,其中解离常数比未修饰的AB与其靶标结合的解离常数大至少三倍,而在裂解状态下,AB结合至其靶标。

[0404] 在一些实施方案中,将每个CM1-CM2底物定位在多特异性可活化抗体中,使得在未裂解状态下,多特异性可活化抗体与一个AB区域的靶标的结合的发生减少,其中解离常数比未修饰的AB与其靶标结合的解离常数大至少四倍,而在裂解状态下,AB结合至其靶标。

[0405] 在一些实施方案中,将每个CM1-CM2底物定位在多特异性可活化抗体中,使得在未裂解状态下,多特异性可活化抗体与一个AB区域的靶标的结合的发生减少,其中解离常数比未修饰的AB与其靶标结合的解离常数大至少五倍,而在裂解状态下,AB结合至其靶标。

[0406] 在一些实施方案中,将每个CM1-CM2底物定位在多特异性可活化抗体中,使得在未裂解状态下,多特异性可活化抗体与一个AB区域的靶标的结合的发生减少,其中解离常数比未修饰的AB与其靶标结合的解离常数大至少十倍,而在裂解状态下,AB结合至其靶标。

[0407] 在一些实施方案中,将每个CM1-CM2底物定位在多特异性可活化抗体中,使得在未裂解状态下,多特异性可活化抗体与一个AB区域的靶标的结合的发生减少,其中解离常数比未修饰的AB与其靶标结合的解离常数大至少20倍,而在裂解状态下,AB结合至其靶标。

[0408] 在一些实施方案中,将每个CM1-CM2底物定位在多特异性可活化抗体中,使得在未裂解状态下,多特异性可活化抗体与一个AB区域的靶标的结合的发生减少,其中解离常数比未修饰的AB与其靶标结合的解离常数大至少40倍,而在裂解状态下,AB结合至其靶标。

[0409] 在一些实施方案中,将每个CM1-CM2底物定位在多特异性可活化抗体中,使得在未裂解状态下,多特异性可活化抗体与一个AB区域的靶标的结合的发生减少,其中解离常数比未修饰的AB与其靶标结合的解离常数大至少50倍,而在裂解状态下,AB结合至其靶标。

[0410] 在一些实施方案中,将每个CM1-CM2底物定位在多特异性可活化抗体中,使得在未裂解状态下,多特异性可活化抗体与一个AB区域的靶标的结合的发生减少,其中解离常数比未修饰的AB与其靶标结合的解离常数大至少100倍,而在裂解状态下,AB结合至其靶标。

[0411] 在一些实施方案中,将每个CM1-CM2底物定位在多特异性可活化抗体中,使得在未裂解状态下,多特异性可活化抗体与一个AB区域的靶标的结合的发生减少,其中解离常数比未修饰的AB与其靶标结合的解离常数大至少200倍,而在裂解状态下,AB结合至其靶标。

[0412] 本公开还提供了包含多特异性可活化抗体的组合物和方法,所述多特异性可活化

抗体至少包含特异性结合靶标的第一抗体或抗体片段 (AB1) 以及第二抗体或抗体片段 (AB2), 其中多特异性可活化抗体中的至少第一AB偶合至降低AB1结合其靶标的能力的掩蔽部分 (MM1)。在一些实施方案中, 每个AB偶合至MM, 所述MM降低其相应的AB对每个靶标的能力。例如, 在双特异性可活化抗体的实施方案中, AB1偶合至降低AB1结合其靶标的能力的第一掩蔽部分 (MM1), 并且AB2偶合至降低AB2结合其靶标的能力的第二掩蔽部分 (MM2)。在一些实施方案中, 多特异性可活化抗体包含多于两个AB区域; 在此类实施方案中, AB1偶合至降低AB1结合其靶标的能力的第一掩蔽部分 (MM1), AB2偶合至降低AB2结合其靶标的能力的第二掩蔽部分 (MM2), AB3偶合至降低AB3结合其靶标的能力的第三掩蔽部分 (MM3), 对于多特异性可活化抗体中的每个AB, 依此类推。

[0413] 在一些实施方案中, 多特异性可活化抗体还包含作为MMP蛋白酶和SP蛋白酶的底物的CM1-CM2底物, 其中CM1-CM2底物将MM连接至AB。例如, 在一些实施方案中, 多特异性可活化抗体至少包含特异性结合靶标的第一抗体或抗体片段 (AB1) 以及第二抗体或抗体片段 (AB2), 其中多特异性可活化抗体中的至少第一AB通过第一CM1-CM2底物偶合至降低AB1结合其靶标的能力的掩蔽部分 (MM1)。在一些双特异性可活化抗体的实施方案中, AB1通过第一CM1-CM2底物偶合至MM1, 并且AB2通过第二CM1-CM2底物偶合至降低AB2结合其靶标的能力的第二掩蔽部分 (MM2)。在一些实施方案中, 多特异性可活化抗体包含多于两个AB区域; 在这些实施方案的一些中, AB1通过第一CM1-CM2底物偶合至MM1, AB2通过第二CM1-CM2底物偶合至MM2, 并且AB3通过第三CM1-CM2底物偶合至降低AB3结合其靶标的能力的第三掩蔽部分 (MM3), 对于多特异性可活化抗体中的每个AB, 依此类推。

[0414] 具有非结合空间部分或非结合空间部分的结合配偶体的可活化抗体

[0415] 本公开还提供了可活化抗体, 其包含非结合空间部分 (NB) 或非结合空间部分的结合配偶体 (BP), 其中BP募集或以其他方式将NB吸引至可活化抗体。本文提供的可活化抗体包括例如包含非结合空间部分 (NB)、CM1-CM2底物和结合靶标的抗体或抗体片段 (AB) 的可活化抗体; 包含非结合空间部分的结合配偶体 (NB)、CM1-CM2底物和AB的可活化抗体; 以及包含已募集NB的BP、CM1-CM2底物 and 与靶标结合的AB的可活化抗体。其中NB共价连接至可活化抗体的CM1-CM2底物和AB或通过与共价连接至可活化抗体的CM1-CM2底物和AB的BP相互作用而缔合的可活化抗体在本文中称为“含有NB的可活化抗体”。可活化的或可转换的意指当可活化抗体处于受抑制、掩蔽或未裂解状态 (即第一构象) 时, 可活化抗体表现出与靶标的第一结合水平, 并且当可活化抗体处于未受抑制、无掩蔽和/或裂解状态 (即第二构象, 即活化的抗体) 时, 可活化抗体表现出与靶标的第二结合水平, 其中第二靶标结合水平大于第一靶标结合水平。与常规抗体治疗相比, 可活化抗体组合物可表现出增加的生物利用度和更有利的生物分布。

[0416] 在一些实施方案中, 如果AB未被掩蔽或以其他方式被抑制免于结合至非治疗位点和/或非诊断位点, 则可活化抗体提供降低的另外可由这种位点的结合引起的毒性和/或不良副作用。

[0417] 在一个实施方案中, 可活化抗体包含非结合空间部分 (NB); CM1-CM2底物; 和特异性结合至靶标的抗体或抗体片段 (AB), 其中NB是不特异性结合至AB的多肽; CM1-CM2底物是包含酶的底物 (S) 的多肽; CM1-CM2底物定位成使得在未裂解状态下, NB干扰AB与靶标的结合, 并且在裂解状态下, NB不干扰AB与靶标的结合; 并且NB不抑制酶对CM1-CM2底物的裂解。

如本文以及全文中所使用,术语多肽是指包含至少两个氨基酸残基的任何多肽,包括较大的多肽、全长蛋白质及其片段,并且术语多肽不限于单链多肽并且可包括多单元(例如,多链)多肽。在多肽的长度较短(例如,总共少于50个氨基酸)的情况下,术语肽和多肽在本文中可互换使用,并且在多肽的长度较长(例如50个氨基酸或更大)的情况下,术语多肽和蛋白质在本文中可互换使用。

[0418] 在一个实施方案中,可活化抗体包含非结合空间部分(NB);CM1-CM2底物;和特异性结合至靶标的抗体或抗体片段(AB),其中(i)NB包含不特异性结合至AB的多肽;(ii)CM1-CM2底物是包含酶的底物(S)的长度至多50个氨基酸的多肽;(iii)CM1-CM2底物定位成使得在未裂解状态下,NB干扰AB与靶标的结合,并且在裂解状态下,NB不干扰AB与靶标的结合;并且(iv)NB不抑制酶对CM1-CM2底物的裂解。例如,CM1-CM2底物的CM1底物序列和CM2底物序列各自独立地具有至多15个氨基酸的长度。

[0419] 在一个实施方案中,可活化抗体包含非结合空间部分(NB);CM1-CM2底物;和特异性结合至靶标的抗体或抗体片段(AB),其中(i)NB包含不特异性结合至AB的多肽;(ii)CM1-CM2底物是包含酶的底物(S)的多肽;(iii)CM1-CM2底物定位成使得在未裂解状态下,NB干扰AB与靶标的结合,并且在裂解状态下,NB不干扰AB与靶标的结合;(iv)NB不抑制酶对CM1-CM2底物的裂解;并且(v)可活化抗体在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:NB-CM1-CM2底物-AB或AB-CM1-CM2底物-NB。

[0420] 在一个实施方案中,可活化抗体包含非结合空间部分(NB);CM1-CM2底物;和特异性结合至靶标的抗体或抗体片段(AB),其中(i)NB包含不特异性结合至AB的多肽;(ii)CM1-CM2底物是包含酶的底物(S)的多肽;(iii)CM1-CM2底物定位成使得在未裂解状态下,NB干扰AB与靶标的结合,并且在裂解状态下,NB不干扰AB与靶标的结合,并且其中与裂解的AB结合靶标的能力相比,未裂解的可活化抗体中NB使AB结合靶标的能力降低至少50%,例如至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少100%;并且(iv)NB不抑制酶对CM1-CM2底物的裂解。例如,使用如本文所述的测定法或体外靶标置换测定法(例如像PCT公布号WO 2009/025846和WO 2010/081173中描述的测定法)来确定AB结合靶标的能力的降低。

[0421] 在一个实施方案中,可活化抗体包含非结合空间部分(NB)的结合配偶体(BP);CM1-CM2底物;和特异性结合至靶标的抗体或抗体片段(AB),其中BP是在暴露于NB时与其结合的多肽;NB不特异性结合至AB;CM1-CM2底物是包含酶的底物(S)的多肽;CM1-CM2底物定位成使得在存在NB的未裂解状态下,NB干扰AB与靶标的结合,并且在裂解状态下,NB不干扰AB与靶标的结合并且BP不干扰AB与靶标的结合;并且NB和BP不抑制酶对CM1-CM2底物的裂解。在此实施方案的一些实例中,可活化抗体的BP任选地结合至NB。在一个实施方案中,在体内通过可活化抗体的BP来募集NB。

[0422] 在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,可活化抗体被配制为组合物。在这些实施方案的一些实施方案中,组合物还包含NB,其中NB与包含BP、CM1-CM2底物和AB的可活化抗体共配制。在此实施方案的一些实例中,BP选自由以下组成的组:白蛋白结合肽、纤维蛋白原结合肽、纤连蛋白结合肽、血红蛋白结合肽、转铁蛋白结合肽、免疫球蛋白结构域结合肽和其他血清蛋白结合肽。

[0423] 在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,NB为可溶性球状蛋白。在这

些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,NB为在血流中循环的蛋白质。在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,NB选自由以下组成的组:白蛋白、纤维蛋白原、纤连蛋白、血红蛋白、转铁蛋白、免疫球蛋白结构域和其他血清蛋白。

[0424] 在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,CM1-CM2底物为包含蛋白酶的底物(S)的多肽。在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,蛋白酶与组织共定位,并且当可活化抗体暴露于蛋白酶时,蛋白酶裂解可活化抗体中的CM1-CM2底物。在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,CM1-CM2底物是长度至多50个氨基酸的多肽。在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,CM1-CM2底物是包含长度至多15个氨基酸(例如长3个氨基酸、长4个氨基酸、长5个氨基酸、长6个氨基酸、长7个氨基酸、长8个氨基酸、长9个氨基酸、长10个氨基酸、长11个氨基酸、长12个氨基酸、长13个氨基酸、长14个氨基酸或长15个氨基酸)的底物(S)的多肽。

[0425] 在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,可活化抗体在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:NB-CM1-CM2底物-AB、AB-CM1-CM2底物-NB、BP-CM1-CM2底物-AB或AB-CM1-CM2底物-BP。在可活化抗体包含BP且可活化抗体存在相应NB的实施方案中,可活化抗体在未裂解状态下具有如下从N端到C端的结构排列:NB:BP-CM1-CM2-AB、NB:BP-CM2-CM1-AB、AB-CM1-CM2-BP:NB或AB-CM2-CM1-BP:NB,其中“:”表示NB与BP之间的相互作用,例如结合。

[0426] 在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,可活化抗体包含特异性结合给定靶标的抗体或其抗原结合片段,并且为单克隆抗体、结构域抗体、单链、Fab片段、F(ab')₂片段、scFv、scab、dAb、单结构域重链抗体或单结构域轻链抗体。在一些实施方案中,此种结合靶标的抗体或其免疫活性片段为小鼠抗体、其他啮齿动物抗体、嵌合抗体、人源化抗体或完全人单克隆抗体。

[0427] 在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,可活化抗体包含含有本文给出的氨基酸序列的可变重链区和含有本文给出的氨基酸序列的可变轻链区的组合。在一些实施方案中,可活化抗体包含含有与本文给出的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的可变重链区以及含有与本文给出的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列的轻链可变区的组合。

[0428] 在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,可活化抗体还包含缀合至AB的剂。在一些实施方案中,剂为治疗剂。在一些实施方案中,剂为抗肿瘤剂。在一些实施方案中,剂为毒素或其片段。在一些实施方案中,剂通过接头缀合至AB。在一些实施方案中,接头为可裂解的接头。在一些实施方案中,剂通过不可裂解的接头缀合至AB。在一些实施方案中,剂为选自表4中列出的组的剂。在一些实施方案中,剂为微管抑制剂。在一些实施方案中,剂为核酸损伤剂,诸如DNA烷基化剂或DNA嵌入剂,或其他DNA损伤剂。在一些实施方案中,剂为多拉司他汀。在一些实施方案中,剂为瑞奥西汀或其衍生物。在一些实施方案中,剂为瑞奥西汀E或其衍生物。在一些实施方案中,剂为单甲基瑞奥西汀E(MMAE)。在一些实施方案中,剂为单甲基瑞奥西汀D(MMAD)。在一些实施方案中,剂为美登木素生物碱或美登木素生物碱衍生物。在一些实施方案中,剂为DM1或DM4。在一些实施方案中,剂为倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,剂为卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,剂为吡咯并苯

并二氮杂草。在一些实施方案中,剂为吡咯并苯并二氮杂草二聚体。

[0429] 在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,可活化抗体还包含可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分为诊断剂。

[0430] 在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,可活化抗体还包含间隔区。在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,可活化抗体还包含信号肽。在一些实施方案中,信号肽通过间隔区缀合至可活化抗体。在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,间隔区直接连接到可活化抗体的MM。

[0431] 在一些实施方案中,可活化抗体的血清半衰期长于相应抗体的血清半衰期;例如,可活化抗体的 pK 长于相应抗体的 pK 。在一些实施方案中,可活化抗体的血清半衰期与相应抗体的血清半衰期类似。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少15天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少12天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少11天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少10天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少9天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少8天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少7天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少6天。在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少5天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少4天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少3天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少2天。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少24小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少20小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少18小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少16小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少14小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少12小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少10小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少8小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少6小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少4小时。在一些实施方案中,当施用于生物体时,可活化抗体的血清半衰期为至少3小时。

[0432] 本公开还提供了一种编码这些可活化抗体中的任一种的分离的核酸分子,以及包含这些分离的核酸序列的载体。本公开提供了产生可活化抗体的方法,其通过在导致所述可活化抗体表达的条件下培养细胞来进行,其中细胞包含此种核酸序列。在一些实施方案中,细胞包含此种载体。

[0433] 含有NB的可活化抗体针对靶标的解离常数(K_d)大于不与NB或NB:BP缔合的AB针对靶标的 K_d 。含有NB的可活化抗体针对靶标的解离常数(K_d)大于亲本AB针对靶标的 K_d 。例如,含有NB的可活化抗体针对靶标的 K_d 比不与NB或NB:BP缔合的AB针对靶标的 K_d 或亲本AB针对靶标的 K_d 大至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更多倍,或在5-10倍、10-100

倍、10-1,000倍、10-10,000倍、10-100,000倍、10-1,000,000倍、10-10,000,000倍、100-1,000倍、100-10,000倍、100-100,000倍、100-1,000,000倍、100-10,000,000倍、1,000-10,000倍、1,000-100,000倍、1,000-1,000,000倍、1000-10,000,000倍、10,000-100,000倍、10,000-1,000,000倍、10,000-10,000,000倍、100,000-1,000,000倍或100,000-10,000,000倍之间。相反,含有NB的可活化抗体针对靶标的结合亲和力低于不与NB或NB:BP缔合的AB针对靶标的结合亲和力或低于亲本AB针对靶标的结合亲和力。例如,含有NB的可活化抗体针对靶标的结合亲和力比不与NB或NB:BP缔合的AB针对靶标的结合亲和力低或比亲本AB针对靶标的结合亲和力低至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更多倍,或在5-10倍、10-100倍、10-1,000倍、10-10,000倍、10-100,000倍、10-1,000,000倍、10-10,000,000倍、100-1,000倍、100-10,000倍、100-100,000倍、100-1,000,000倍、100-10,000,000倍、1,000-10,000倍、1,000-100,000倍、1,000-1,000,000倍、1000-10,000,000倍、10,000-100,000倍、10,000-1,000,000倍、10,000-10,000,000倍、100,000-1,000,000倍或100,000-10,000,000倍之间。

[0434] 与不与NB或NB:BP缔合的AB的特异性结合相比,当含有NB的可活化抗体是在存在靶标时,AB与靶标的特异性结合降低或受到抑制。与亲本AB与靶标的特异性结合相比,当含有NB的可活化抗体是在存在靶标时,AB与靶标的特异性结合降低或受到抑制。当在体外和/或体内测量时,与不与NB或NB:BP缔合的AB与靶标的结合或亲本AB与靶标的结合相比,含有NB的可活化抗体结合靶标的能力降低例如至少50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%,持续至少2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84或96小时或5、10、15、30、45、60、90、120、150或180天或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更长时间。

[0435] 与不与NB或NB:BP缔合的AB的特异性结合相比,当含有NB的可活化抗体是在存在靶标但不存在修饰剂(例如蛋白酶或其他酶)时,AB与靶标的特异性结合降低或受到抑制。与亲本AB与靶标的特异性结合相比,当含有NB的可活化抗体是在存在靶标但不存在修饰剂(例如蛋白酶、其他酶、还原剂或光)时,AB与靶标的特异性结合降低或受到抑制。当在体外和/或体内测量时,与不与NB或NB:BP缔合的AB与靶标的结合或亲本AB与靶标的结合相比,含有NB的可活化抗体结合靶标的能力降低例如至少50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%,持续至少2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84或96小时或5、10、15、30、45、60、90、120、150或180天或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更长时间。

[0436] 在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,可活化抗体包含缀合至AB以产生可活化抗体缀合物的剂。在可活化抗体缀合物的一些实施方案中,剂为治疗剂。在一些实施方案中,剂为诊断剂。在一些实施方案中,剂为可检测的标志物。在可活化抗体缀合物的一些实施方案中,剂为抗肿瘤剂。在可活化抗体缀合物的一些实施方案中,剂为毒素或其片段。在可活化抗体缀合物的一些实施方案中,剂通过接头缀合至AB。在可活化抗体缀合物的一些实施方案中,接头为可裂解的接头。在一些实施方案中,剂通过不可裂解的接头缀合至AB。在一些实施方案中,剂为微管抑制剂。在一些实施方案中,剂为核酸损伤剂,诸如DNA烷基化剂或DNA嵌入剂,或其他DNA损伤剂。在一些实施方案中,剂为选自表4中列出的组的

剂。在一些实施方案中,剂为多拉司他汀。在一些实施方案中,剂为瑞奥西汀或其衍生物。在一些实施方案中,剂为瑞奥西汀E或其衍生物。在一些实施方案中,剂为单甲基瑞奥西汀E(MMAE)。在一些实施方案中,剂为单甲基瑞奥西汀D(MMAD)。在一些实施方案中,剂为美登木素生物碱或美登木素生物碱衍生物。在一些实施方案中,剂为DM1或DM4。在一些实施方案中,剂为倍癌霉素或其衍生物。在一些实施方案中,剂为卡奇霉素或其衍生物。在一些实施方案中,剂为吡咯并苯并二氮杂草。在一些实施方案中,剂为吡咯并苯并二氮杂草二聚体。

[0437] 在这些可活化抗体实施方案中任一种的一些实例中,可活化抗体为双靶标结合可活化抗体。此类双靶标结合可活化抗体含有可结合相同或不同靶标的两个Ab。在特定实施方案中,双靶标可活化抗体含有双特异性抗体或抗体片段。

[0438] 设计双靶标结合可活化抗体,使得其具有可被裂解剂裂解的CM1-CM2底物,所述裂解剂与能够结合至可活化抗体的AB的一个或两个靶标共定位在靶组织中。可设计具有多于一个针对相同或不同靶标的AB的双靶标结合可活化抗体,以使其具有多于一个CM1-CM2底物,其中第一CM1-CM2底物可被第一靶组织中的裂解剂裂解,并且其中第二CM1-CM2底物可被第二靶组织中的裂解剂裂解,其中一个或多个靶标结合至可活化抗体的AB。在一个实施方案中,第一靶组织和第二靶组织在空间上分开,例如在生物体中的不同位置处。在一个实施方案中,第一靶组织和第二靶组织是在时间上分开的同一组织,例如在两个不同时间点的同一组织,例如第一时间点是当组织是早期肿瘤时且第二时间点是当组织是晚期肿瘤时。

[0439] 本公开还提供了编码本文所述的可活化抗体的核酸分子。本公开还提供了包含这些核酸的载体。本文所述的可活化抗体是通过在导致可活化抗体表达的条件下培养细胞而产生的,其中细胞包含这些核酸分子或载体。

[0440] 本公开还提供了制造可活化抗体的方法。在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)在导致可活化抗体表达的条件下培养包含编码可活化抗体的核酸构建体的细胞,其中可活化抗体包含(i)非结合空间部分(NB);(ii)CM1-CM2底物;和(iii)特异性结合至靶标的抗体或其抗原结合片段(AB),其中(1)NB不特异性结合至AB;(2)CM1-CM2底物是包含酶的底物(S)的多肽;(3)CM1-CM2底物定位成使得在未裂解状态下,NB干扰AB与靶标的结合,并且在裂解状态下,NB不干扰AB与靶标的结合;并且(4)NB不抑制酶对CM1-CM2底物的裂解;以及(b)回收可活化抗体。

[0441] 在一些实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)在导致可活化抗体表达的条件下培养包含编码可活化抗体的核酸构建体的细胞,其中可活化抗体包含(i)非结合空间部分(NB)的结合配偶体(BP);(ii)CM1-CM2底物;和(iii)特异性结合至靶标的抗体或其抗原结合片段(AB),其中(1)NB不特异性结合至AB;(2)CM1-CM2底物是包含酶的底物(S)的多肽;(3)CM1-CM2底物定位成使得在存在NB的未裂解状态下,NB干扰AB与靶标的结合,并且在裂解状态下,NB不干扰AB与靶标的结合并且BP不干扰AB与靶标的结合;并且(4)NB和BP不抑制酶对CM1-CM2底物的裂解;以及(b)回收可活化抗体。在此实施方案的一些实例中,可活化抗体的BP结合至NB。

[0442] 可活化抗体和缀合的可活化抗体的用途

[0443] 应当理解,根据本公开的治疗实体的施用将与并入制剂中以提供改善的转移、递送、耐受性等的合适的载剂、赋形剂和其他剂一起施用。许多适当的制剂可见于所有药物化

学家已知的处方集中:Remington's Pharmaceutical Sciences(第15版,Mack Publishing Company,Easton,PA(1975)),特别是其中Blaug,Seymour的第87章。这些制剂包括例如粉剂、糊剂、软膏剂、凝胶剂、蜡、油、脂质、含有脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(诸如LipofectinTM)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳剂、乳剂卡波蜡(carbowax)(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有卡波蜡的半固体混合物。任一种上述混合物可适于根据本公开的治疗和疗法,条件是制剂中的活性成分不被制剂灭活,并且制剂在生理上相容且可耐受施用途。也参见Baldrick P.“Pharmaceutical excipient development:the need for preclinical guidance.”Regul.Toxicol Pharmacol.32(2):210-8(2000);Wang W.“Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals.”Int.J.Pharm.203(1-2):1-60(2000);Charman WN“Lipids,lipophilic drugs,and oral drug delivery-some emerging concepts.”J Pharm Sci.89(8):967-78(2000);Powell等人“Compendium of excipients for parenteral formulations”PDA J Pharm Sci Technol.52:238-311(1998)以及其中关于与药物化学家熟知的制剂、赋形剂和载剂有关的另外的信息的引用。

[0444] 本公开的治疗制剂(其包含缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体)用于预防、治疗或以其他方式改善与异常靶标表达和/或活性相关的疾病或病症。例如,本公开的治疗制剂(其包含缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体)用于治疗或以其他方式改善炎症、炎性病症、自身免疫疾病和/或癌症或其他肿瘤病状。在一些实施方案中,癌症是其中表达靶标的实体瘤或血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是其中表达靶标的实体瘤。在一些实施方案中,癌症是其中表达靶标的血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,靶标在实质(例如,在癌症中,经常执行器官或组织功能的器官或组织的部分)上表达。在一些实施方案中,靶标在细胞、组织或器官上表达。在一些实施方案中,靶标在基质(即,细胞、组织或器官的结缔支持框架)上表达。在一些实施方案中,靶标在成骨细胞上表达。在一些实施方案中,靶标在内皮(脉管系统)上表达。在一些实施方案中,靶标在癌症干细胞上表达。在一些实施方案中,与可活化抗体缀合的剂为微管抑制剂。在一些实施方案中,与可活化抗体缀合的剂为核酸损伤剂。

[0445] 结合任何已知用于诊断或治疗与靶标表达和/或活性(例如像异常靶标表达和/或活性)相关的疾病或病症的方法来确定预防、改善或治疗的有效性。延长受试者的存活或以其他方式延迟受试者中与靶标表达和/或活性(例如异常靶标表达和/或活性)相关的疾病或病症的进展表明,缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体赋予临床益处。

[0446] 缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体可以药物组合物的形式施用。涉及制备此类组合物的原理和考虑因素以及组分选择的指导提供于例如Remington:The Science And Practice Of Pharmacy第19版(Alfonso R.Gennaro等人,编者)Mack Pub.Co.,Easton,Pa.:1995;Drug Absorption Enhancement:Concepts,Possibilities,Limitations,And Trends,Harwood Academic Publishers,Langhorne,Pa.,1994;和Peptide And Protein Drug Delivery(Advances In Parenteral Sciences,第4卷),1991,M.Dekker,New York中。

[0447] 在使用抗体片段的一些实施方案中,选择特异性结合至靶蛋白的结合结构域的最小片段。例如,基于抗体的可变区序列,肽分子可被设计成保留结合靶蛋白序列的能力。此

类肽可化学合成和/或通过重组DNA技术产生。(参见例如Marasco等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:7889-7893(1993))。制剂还可含有正在治疗的特定适用症所必需的多于一种活性化合物,例如在一些实施方案中具有不会不利地互相影响的互补活性的那些化合物。在一些实施方案中,或另外,组合物可包含增强其功能的剂,例如像细胞毒性剂、细胞因子、化学治疗剂或生长抑制剂。此类分子以对于预期目的有效的量合适地组合存在。

[0448] 活性成分也可包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中、包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)中或包埋在粗乳剂中。

[0449] 将用于体内施用的制剂必须是无菌的。这易于通过经由无菌过滤膜过滤来实现。

[0450] 可制备持续释放制剂。持续释放制备物的合适实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半渗透性基质,所述基质呈成形物品,例如膜或微胶囊的形式。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(甲基丙烯酸-2-羟乙酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和L-谷氨酸 γ 乙酯的共聚物、不可降解乙烯-乙酸乙烯酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚物(诸如LUPRON DEPOTTM(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球))和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物能够释放分子超过100天,但某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。

[0451] 在一些实施方案中,缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体含有可检测标记。使用完整的抗体或其片段(例如Fab、scFv或F(ab)₂)。关于探针或抗体的术语“标记的”旨在涵盖通过将可检测物质偶合(即物理连接)到探针或抗体来直接标记探针或抗体,以及通过与直接标记的另一种试剂反应来间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括使用荧光标记的二次抗体检测一次抗体,并用生物素末端标记DNA探针,以使得可用荧光标记的链霉亲和素对其进行检测。术语“生物样品”旨在包括从受试者分离的组织、细胞和生物流体,以及存在于受试者体内的组织、细胞和流体。因此,在术语“生物样品”的用法中包括血液以及血液的一部分或组分,包括血清、血浆或淋巴液。也就是说,本公开的检测方法可用于在体外以及体内检测生物样品中的分析物mRNA、蛋白质或基因组DNA。例如,用于检测分析物mRNA的体外技术包括RNA印迹杂交和原位杂交。用于检测分析物蛋白质的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀、免疫化学染色和免疫荧光。用于检测分析物基因组DNA的体外技术包括RNA印迹杂交。用于进行免疫测定的程序描述于例如“ELISA:Theory and Practice:Methods in Molecular Biology”,第42卷,J.R.Crowther(编)Human Press,Totowa,NJ,1995;“Immunoassay”,E.Diamandis和T.Christopoulos, Academic Press,Inc.,San Diego,CA,1996;和“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”,P.Tijssen,Elsevier Science Publishers,Amsterdam,1985中。此外,用于检测分析物蛋白质的体内技术包括将标记的抗分析物蛋白质抗体引入到受试者中。例如,抗体可用放射性标志物标记,所述放射性标志物在受试者中的存在和位置可通过标准成像技术检测。

[0452] 本公开的缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体也可用于多种诊断和预防制剂。在一个实施方案中,将缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体施用于处于发展一种或多种上述病症的风险下的患者。可使用基因型、血清学或生化标志物确定

患者或器官对一种或多种上述病症的易感性。

[0453] 在一些实施方案中,将缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体施用于被诊断为患有与一种或多种上述病症相关的临床适应症的人个体。诊断后,施用缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以减轻或逆转临床适应症的影响。

[0454] 本公开的缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体也可用于检测患者样品中的靶标,并因此可用作诊断剂。例如,本公开的抗体和/或可活化抗体及其缀合形式用于体外测定(例如ELISA),以检测患者样品中的靶标水平。

[0455] 在一个实施方案中,将本公开的缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体固定在固体支持物(例如,微量滴定板的一个或多个孔)上。固定的缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体用作可存在于测试样品中的任何靶标的捕获抗体。在使固定的抗体与患者样品接触之前,冲洗固体支持物并用封闭剂(诸如乳蛋白或白蛋白)处理以防止分析物的非特异性吸附。

[0456] 随后,用疑似含有抗原的测试样品或用含有标准量抗原的溶液处理孔。例如,此种样品是来自疑似具有被认为是对病理的诊断的循环抗原水平的受试者的血清样品。在冲洗掉测试样品或标准品后,用可检测标记的第二抗体处理固体支持物。标记的第二抗体用作检测抗体。测量可检测标记的水平,并通过与由标准样品形成的标准曲线进行比较来确定测试样品中靶抗原的浓度。

[0457] 应当理解,基于使用本公开的抗体及其缀合形式获得的结果,在体外诊断测定中,可以基于靶抗原的表达水平对受试者的疾病进行分期。对于给定的疾病,从被诊断为处于疾病进展的不同阶段和/或处于疾病治疗性治疗的不同时间点的受试者中抽取血液样品。使用为进展或治疗的每个阶段提供统计学上显著的结果的样品群体,指定了可被认为是每个阶段的特征的抗原浓度范围。

[0458] 缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体也可用于诊断和/或成像方法。在一些实施方案中,此类方法为体外方法。在一些实施方案中,此类方法为体内方法。在一些实施方案中,此类方法为原位方法。在一些实施方案中,此类方法为离体方法。例如,具有可酶裂解的CM1-CM2底物的可活化抗体可用于检测能够裂解CM1-CM2底物的酶的存在或不存在。此类可活化抗体可用于诊断中,其可包括通过在给定宿主生物体的给定细胞或组织中活化的抗体(即,由可活化抗体的裂解而产生的抗体)的测量的积累来在体内检测(例如,定性或定量)酶活性(或在一些实施方案中,具有增加的还原电位的环境,诸如可提供二硫键还原的环境)。活化的抗体的这种积累不仅表明组织表达酶活性(或根据CM1-CM2底物的性质而增加的还原电位),而且还表明组织表达活化的抗体结合的靶标。

[0459] 例如,可选择CM1-CM2底物作为在肿瘤位点、生物限制位点的病毒或细菌感染位点(例如像脓肿、器官等)等处发现的基质金属蛋白酶(MMP)和丝氨酸蛋白酶(SP)的底物。AB可为结合靶抗原的AB。使用如本文所公开的方法,或在适当时使用本领域技术人员熟悉的方法,可将可检测标记(例如,荧光标记或放射性标记或放射性示踪剂)缀合至抗体和/或可活化抗体的AB或其他区域。在上述筛选方法的背景下讨论合适的可检测标记,并且下文提供了另外的具体实例。使用对疾病状态的蛋白质或肽具有特异性的AB以及在感兴趣的疾病组织中活性升高的MMP,相对于其中CM1-CM2底物特异性酶在可检测水平上不存在或以低于疾病组织中的水平存在或无活性(例如,呈酶原形式或呈与抑制剂的复合物)的组织,可活化

抗体将表现出增加的与疾病组织的结合率。由于肾脏过滤系统迅速清除血液中的小蛋白质和多肽,并且由于对CM1-CM2底物具有特异性的酶在可检测水平上不存在(或以较低水平存在于非疾病组织中或以无活性构象存在),相对于非疾病组织,活化的抗体在疾病组织中的积累增加。

[0460] 在另一个实例中,可活化抗体可用于检测样品中裂解剂的存在或不存在。例如,在可活化抗体含有易于被酶裂解的CM1-CM2底物的情况下,可活化抗体可用于检测(定性或定量)样品中酶的存在。在另一个实例中,在可活化抗体含有易于被还原剂裂解的CM1-CM2底物的情况下,可活化抗体可用于检测(定性或定量)样品中还原条件的存在。为了促进这些方法中的分析,可以可检测地标记可活化抗体,并且可将其结合至支持物(例如,固体支持物,诸如载玻片或珠)。可检测标记可定位在可活化抗体在裂解后不释放的一部分上,例如,可检测标记可为淬灭的荧光标记或在发生裂解前不可检测的其他标记。例如,可通过使固定的、可检测地标记的可活化抗体与疑似含有酶和/或还原剂的样品接触足以发生裂解的时间,然后洗涤以去除过量的样品和污染物来进行测定。然后通过在与样品接触之前可活化抗体的可检测信号的变化来评估样品中裂解剂(例如,酶或还原剂)的存在或不存在,例如,由于样品中的裂解剂裂解可活化抗体而导致可检测信号的存在和/或增加。

[0461] 此类检测方法可适于也提供对在裂解时能够结合可活化抗体的AB的靶标的存在或不存在的检测。因此,测定可适于评估裂解剂的存在或不存在以及感兴趣的靶标的存在或不存在。如上文所述,裂解剂的存在或不存在可通过可活化抗体的可检测标记的存在和/或增加来检测,并且靶标的存在或不存在可通过检测靶标-AB复合物(例如通过使用可检测地标记的抗靶抗体)来检测。

[0462] 可活化抗体也可用于原位成像,以验证例如通过蛋白酶裂解进行的可活化抗体活化和与特定靶标的结合。原位成像是能够在生物样品(诸如细胞培养物或组织切片)中定位蛋白水解活性和靶标的技术。使用此技术,可以基于可检测标记(例如,荧光标记)的存在来确认与给定靶标的结合和蛋白水解活性。

[0463] 这些技术可用于来源于疾病位点(例如肿瘤组织)或健康组织的任何冷冻细胞或组织。这些技术也可用于新鲜的细胞或组织样品。

[0464] 在这些技术中,可活化抗体用可检测标记进行标记。可检测标记可为荧光染料(例如,荧光团、异硫氰酸荧光素(FITC)、异硫氰酸罗丹明(TRITC)、Alexa Fluor®标记)、近红外(NIR)染料(例如,Qdot®纳米晶体)、胶体金属、半抗原、放射性标志物、生物素和扩增试剂(诸如链霉亲和素)或酶(例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)。

[0465] 在已与标记的可活化抗体一起孵育的样品中检测到标记表明,样品含有靶标并且含有对可活化抗体的CM1-CM2底物具有特异性的基质金属蛋白酶(MMP)和一种丝氨酸蛋白酶(SP)。在一些实施方案中,可使用诸如本文所述的那些广谱蛋白酶抑制剂和/或通过使用对蛋白酶具有特异性的剂(例如,对蛋白酶蛋白裂解酶(MT-SP1)具有特异性并抑制蛋白裂解酶的蛋白水解活性的抗体,诸如A11)来确认MMP的存在;参见例如2010年11月11日公布的国际公布号W0 2010/129609。使用诸如本文所述的那些广谱蛋白酶抑制剂和/或通过使用更具选择性的抑制剂的相同方法可用于鉴别对可活化抗体的CM1-CM2底物具有特异性的MMP和SP。在一些实施方案中,可使用对靶标具有特异性的剂(例如另一种抗体)来确认靶标的存在,或可检测标记可与未标记的靶标竞争。在一些实施方案中,可使用未标记的可活化

抗体,其中通过标记的二级抗体或更复杂的检测系统进行检测。

[0466] 类似的技术也可用于体内成像,其中在受试者(例如,哺乳动物,包括人)中检测到荧光信号表明,疾病位点含有靶标并且含有对可活化抗体的CM1-CM2底物具有特异性的MMP和SP。

[0467] 这些技术也可用于试剂盒中和/或用作试剂,以用于基于可活化抗体中的蛋白酶特异性CM1-CM2底物来检测、鉴别或表征多种细胞、组织和生物体中的蛋白酶活性。

[0468] 本公开提供了在多种诊断性和/或预防性适应症中使用抗体和/或可活化抗体的方法。例如,本公开提供了检测受试者或样品中裂解剂和感兴趣的靶标的存在或不存在的方法,其通过以下步骤来进行:(i)使受试者或样品与可活化抗体接触,其中可活化抗体包含掩蔽部分(MM)、被裂解剂裂解的CM1-CM2底物以及特异性结合感兴趣的靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中可活化抗体在未裂解的非活化状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2底物-AB或AB-CM1-CM2底物-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标结合的肽,并且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列并且不是AB的天然结合配偶体的修饰形式;并且(b)其中在未裂解的非活化状态下,MM干扰AB与靶标的特异性结合,并且在裂解的活化状态下,MM不干扰或竞争AB与靶标的特异性结合;以及(ii)测量受试者或样品中活化的可活化抗体的水平,其中受试者或样品中可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或样品中存在裂解剂和靶标,并且其中受试者或样品中没有可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或样品中不存在和/或不充分存在裂解剂、靶标或裂解剂和靶标两者。在一些实施方案中,可活化抗体为与治疗剂缀合的可活化抗体。在一些实施方案中,可活化抗体不缀合至剂。在一些实施方案中,可活化抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记定位在AB上。在一些实施方案中,使用特异性结合至活化的抗体的二级试剂来完成测量受试者或样品中可活化抗体的水平,其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,二级试剂为包含可检测标记的抗体。

[0469] 本公开还提供了检测受试者或样品中裂解剂的存在或不存在的方法,其通过以下步骤来进行:(i)在感兴趣的靶标(例如靶标)存在下,使受试者或样品与可活化抗体接触,其中可活化抗体包含掩蔽部分(MM)、被裂解剂裂解的CM1-CM2底物以及特异性结合感兴趣的靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中可活化抗体在未裂解的非活化状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2底物-AB或AB-CM1-CM2底物-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标结合的肽,并且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列并且不是AB的天然结合配偶体的修饰形式;并且(b)其中在未裂解的非活化状态下,MM干扰AB与靶标的特异性结合,并且在裂解的活化状态下,MM不干扰或竞争AB与靶标的特异性结合;以及(ii)测量受试者或样品中活化的可活化抗体的水平,其中受试者或样品中可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或样品中存在裂解剂,并且其中受试者或样品中没有可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或样品中不存在和/或不充分存在裂解剂。在一些实施方案中,可活化抗体为与治疗剂缀合的可活化抗体。在一些实施方案中,可活化抗体不缀合至剂。在一些实施方案中,可活化抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记定位在AB上。在一些实施方案中,使用特异性结合至活化的抗体的二级试剂来完成测量受试者或样品中可活化抗体的水平,其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,二级试剂为包含可检测标记的抗体。

[0470] 本公开还提供了用于在检测受试者或样品中裂解剂和靶标的存在或不存在的方法中使用的试剂盒,其中所述裂解剂包括至少一种可活化抗体,其包含掩蔽部分(MM)、被裂解剂裂解的CM1-CM2底物以及特异性结合感兴趣的靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中可活化抗体在未裂解的非活化状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2底物-AB或AB-CM1-CM2底物-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标结合的肽,并且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列并且不是AB的天然结合配偶体的修饰形式;并且(b)其中在未裂解的非活化状态下,MM干扰AB与靶标的特异性结合,并且在裂解的活化状态下,MM不干扰或竞争AB与靶标的特异性结合;以及(ii)测量受试者或样品中活化的可活化抗体的水平,其中受试者或样品中可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或样品中存在裂解剂,并且其中受试者或样品中没有可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或样品中不存在和/或不充分存在裂解剂。在一些实施方案中,可活化抗体为与治疗剂缀合的可活化抗体。在一些实施方案中,可活化抗体不缀合至剂。在一些实施方案中,可活化抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记定位在AB上。在一些实施方案中,使用特异性结合至活化的抗体的二级试剂来完成测量受试者或样品中可活化抗体的水平,其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,二级试剂为包含可检测标记的抗体。

[0471] 本公开还提供了检测受试者或样品中裂解剂的存在或不存在的方法,其通过以下步骤来进行:(i)使受试者或样品与可活化抗体接触,其中可活化抗体包含掩蔽部分(MM)、被裂解剂裂解的CM1-CM2底物、特异性结合靶标的抗原结合结构域(AB)以及可检测标记,其中可活化抗体在未裂解的非活化状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2底物-AB或AB-CM1-CM2底物-MM;其中MM是抑制AB与靶标的结合的肽,并且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列并且不是AB的天然结合配偶体的修饰形式;其中在未裂解的非活化状态下,MM干扰AB与靶标的特异性结合,并且在裂解的活化状态下,MM不干扰或竞争AB与靶标的特异性结合;并且其中可检测标记定位在可活化抗体的在CM1-CM2底物裂解后释放的一部分上;以及(ii)测量受试者或样品中可检测标记的水平,其中受试者或样品中可检测水平的可检测标记指示受试者或样品中不存在和/或不充分存在裂解剂,并且其中受试者或样品中没有可检测水平的可检测标记指示受试者或样品中存在裂解剂。在一些实施方案中,可活化抗体为与治疗剂缀合的可活化抗体。在一些实施方案中,可活化抗体不缀合至剂。在一些实施方案中,可活化抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记定位在AB上。在一些实施方案中,使用特异性结合至活化的抗体的二级试剂来完成测量受试者或样品中可活化抗体的水平,其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,二级试剂为包含可检测标记的抗体。

[0472] 本公开还提供了用于在检测受试者或样品中裂解剂和靶标的存在或不存在的方法中使用的试剂盒,其中试剂盒至少包括本文所述的用于接触受试者或生物样品的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体(例如,与治疗剂缀合的可活化抗体)以及用于检测受试者或生物样品中活化的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体的水平的装置,其中受试者或生物样品中可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或生物样品中存在裂解剂和靶标,并且其中受试者或生物样品中没有可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或生物样品中不存在和/或不充分存在裂解剂、靶标或裂解剂和靶标两者,使得在受试者或生物样品中不能检测到可活化抗体的靶标结合和/或蛋白酶裂解。

[0473] 本公开还提供了检测受试者或样品中裂解剂的存在或不存在的方法,其通过以下步骤来进行:(i)在靶标存在下使受试者或生物样品与可活化抗体接触;以及(ii)测量受试者或生物样品中活化的可活化抗体的水平,其中受试者或生物样品中可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或生物样品中存在裂解剂,并且其中受试者或生物样品中没有可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或生物样品中不存在和/或不充分存在可检测水平的裂解剂,使得在受试者或生物样品中不能检测到可活化抗体的蛋白酶裂解。此种可活化抗体包含掩蔽部分(MM)、被裂解剂裂解的CM1-CM2底物以及特异性结合靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中可活化抗体在未裂解(即非活化)状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2底物-AB或AB-CM1-CM2底物-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标的结合的肽,并且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列;并且(b)其中未裂解状态的可活化抗体的MM干扰AB与靶标的特异性结合,并且其中裂解(即活化)状态的可活化抗体的MM不干扰或竞争AB与靶标的特异性结合。在一些实施方案中,可活化抗体为与治疗剂缀合的可活化抗体。在一些实施方案中,可活化抗体不缀合至剂。在一些实施方案中,可检测标记附接到掩蔽部分。在一些实施方案中,可检测标记附接到蛋白酶裂解位点N端的可裂解部分。在一些实施方案中,AB的单个抗原结合位点被掩蔽。在其中本公开的抗体具有至少两个抗原结合位点的一些实施方案中,至少一个抗原结合位点被掩蔽并且至少一个抗原结合位点不被掩蔽。在一些实施方案中,所有抗原结合位点均被掩蔽。在一些实施方案中,测量步骤包括使用包含可检测标记的二级试剂。

[0474] 本公开还提供了用于在检测受试者或样品中裂解剂和靶标的存在或不存在的方法中使用的试剂盒,其中试剂盒至少包括本文所述的用于在靶标存在下使受试者或生物样品与可活化抗体接触的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体;以及测量受试者或生物样品中活化的可活化抗体的水平,其中受试者或生物样品中可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或生物样品中存在裂解剂,并且其中受试者或生物样品中没有可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或生物样品中不存在和/或不充分存在可检测水平的裂解剂,使得在受试者或生物样品中不能检测到可活化抗体的蛋白酶裂解。此种可活化抗体包含掩蔽部分(MM)、被裂解剂裂解的CM1-CM2底物以及特异性结合靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中可活化抗体在未裂解(即非活化)状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2底物-AB或AB-CM1-CM2底物-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标的结合的肽,并且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列;并且(b)其中未裂解状态的可活化抗体的MM干扰AB与靶标的特异性结合,并且其中裂解(即活化)状态的可活化抗体的MM不干扰或竞争AB与靶标的特异性结合。在一些实施方案中,可活化抗体为与治疗剂缀合的可活化抗体。在一些实施方案中,可活化抗体不缀合至剂。在一些实施方案中,可检测标记附接到掩蔽部分。在一些实施方案中,可检测标记附接到蛋白酶裂解位点N端的可裂解部分。在一些实施方案中,AB的单个抗原结合位点被掩蔽。在其中本公开的抗体具有至少两个抗原结合位点的一些实施方案中,至少一个抗原结合位点被掩蔽并且至少一个抗原结合位点不被掩蔽。在一些实施方案中,所有抗原结合位点均被掩蔽。在一些实施方案中,测量步骤包括使用包含可检测标记的二级试剂。

[0475] 本公开还提供了用于在检测受试者或样品中裂解剂的存在或不存在的方法中使用的试剂盒,其中试剂盒至少包括本文所述的用于接触受试者或生物样品的可活化抗体

和/或缀合的可活化抗体以及用于检测受试者或生物样品中活化的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体的水平的装置,其中可活化抗体包含定位在可活化抗体的在CM1-CM2底物裂解后释放的一部分上的可检测标记,其中受试者或生物样品中可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或生物样品中不存在和/或不充分存在裂解剂,使得在受试者或生物样品中不能检测到可活化抗体的靶标结合和/或蛋白酶裂解,并且其中受试者或生物样品中没有可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或生物样品中存在可检测水平的裂解剂。

[0476] 本公开提供了检测受试者或样品中裂解剂和靶标的存在或不存在的方法,其通过以下步骤来进行:(i)使受试者或生物样品与可活化抗体接触,其中可活化抗体包含定位在可活化抗体的在CM1-CM2底物裂解后释放的一部分上的可检测标记;以及(ii)测量受试者或生物样品中活化的可活化抗体的水平,其中受试者或生物样品中可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或生物样品中不存在和/或不充分存在裂解剂、靶标或裂解剂和靶标两者,使得在受试者或生物样品中不能检测到可活化抗体的靶标结合和/或蛋白酶裂解,并且其中受试者或生物样品中降低的可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或生物样品中存在裂解剂和靶标。降低水平的可检测标记为例如降低约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%和/或约100%。此种可活化抗体包含掩蔽部分(MM)、被裂解剂裂解的CM1-CM2底物以及特异性结合靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中可活化抗体在未裂解(即非活化)状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2底物-AB或AB-CM1-CM2底物-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标的结合的肽,并且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列;并且(b)其中未裂解状态的可活化抗体的MM干扰AB与靶标的特异性结合,并且其中裂解(即活化)状态的可活化抗体的MM不干扰或竞争AB与靶标的特异性结合。在一些实施方案中,可活化抗体为与治疗剂缀合的可活化抗体。在一些实施方案中,可活化抗体不缀合至剂。在一些实施方案中,可活化抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记定位在AB上。在一些实施方案中,使用特异性结合至活化的抗体的二级试剂来完成测量受试者或样品中可活化抗体的水平,其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,二级试剂为包含可检测标记的抗体。

[0477] 本公开还提供了用于在检测受试者或样品中裂解剂和靶标的存在或不存在的方法中使用的试剂盒,其中试剂盒至少包括本文所述的用于接触受试者或生物样品的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及用于检测受试者或生物样品中活化的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体的水平的装置,其中受试者或生物样品中可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或生物样品中不存在和/或不充分存在裂解剂、靶标或裂解剂和靶标两者,使得在受试者或生物样品中不能检测到可活化抗体的靶标结合和/或蛋白酶裂解,并且其中受试者或生物样品中降低的可检测水平的活化的可活化抗体指示受试者或生物样品中存在裂解剂和靶标。降低水平的可检测标记为例如降低约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%和/或约100%。

[0478] 本公开还提供了检测受试者或样品中裂解剂的存在或不存在的方法,其通过以下步骤来进行:(i)使受试者或生物样品与可活化抗体接触,其中可活化抗体包含定位在可活化抗体的在CM1-CM2底物裂解后释放的一部分上的可检测标记;以及(ii)测量受试者或生

物样品中可检测标记的水平,其中受试者或生物样品中可检测水平的可检测标记指示受试者或生物样品中不存在和/或不充分存在可检测水平的裂解剂,使得在受试者或生物样品中不能检测到可活化抗体的蛋白酶裂解,并且其中受试者或生物样品中降低的可检测水平的可检测标记指示受试者或生物样品中存在裂解剂。降低水平的可检测标记例如降低约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%和/或约100%。此种可活化抗体包含掩蔽部分(MM)、被裂解剂裂解的CM1-CM2底物以及特异性结合靶标的抗原结合结构域或其片段(AB),其中可活化抗体在未裂解(即非活化)状态下包含如下从N端到C端的结构排列:MM-CM1-CM2底物-AB或AB-CM1-CM2底物-MM;(a)其中MM是抑制AB与靶标的结合的肽,并且其中MM不具有AB的天然存在的结合配偶体的氨基酸序列;并且(b)其中未裂解状态的可活化抗体的MM干扰AB与靶标的特异性结合,并且其中裂解(即活化)状态的可活化抗体的MM不干扰或竞争AB与靶标的特异性结合。在一些实施方案中,可活化抗体为与治疗剂缀合的可活化抗体。在一些实施方案中,可活化抗体不缀合至剂。在一些实施方案中,可活化抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记定位在AB上。在一些实施方案中,使用特异性结合至活化的抗体的二级试剂来完成测量受试者或样品中可活化抗体的水平,其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,二级试剂为包含可检测标记的抗体。

[0479] 本公开还提供了用于在检测受试者或样品中感兴趣的裂解剂的存在或不存在的方法中使用的试剂盒,其中试剂盒至少包括本文所述的用于接触受试者或生物样品的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及用于检测受试者或生物样品中活化的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体的水平的装置,其中可活化抗体包含定位在可活化抗体的在CM1-CM2底物裂解后释放的一部分上的可检测标记,其中受试者或生物样品中可检测水平的可检测标记指示受试者或生物样品中不存在和/或不充分存在裂解剂、靶标或裂解剂和靶标两者,使得在受试者或生物样品中不能检测到可活化抗体的靶标结合和/或蛋白酶裂解,并且其中受试者或生物样品中降低的可检测水平的可检测标记指示受试者或生物样品中存在裂解剂和靶标。降低水平的可检测标记例如降低约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%和/或约100%。

[0480] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,可活化抗体包含可检测标记。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,可检测标记包括显像剂、造影剂、酶、荧光标记、发色团、染料、一种或多种金属离子或基于配体的标记。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,显像剂包括放射性同位素。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,放射性同位素为铟或钨。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,造影剂包括碘、钆或铁氧化物。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或 β -半乳糖苷酶。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,荧光标记包括黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、修饰的红色荧光蛋白(mRFP)、红色荧光蛋白tdimer2(RFP tdimer2)、HCRED或钨衍生物。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,发光标记包括N-甲基吡啶衍生物。在这些方法的一些实施方案中,标记包括Alexa Fluor[®]标记,诸如Alex Fluor[®] 680或Alexa Fluor[®] 750。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,基于配体的标记包括生物素、亲和素、链霉亲和素或一种或多种半抗原。

[0481] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,受试者为哺乳动物。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,受试者为人。在一些实施方案中,受试者为非人哺乳动物,诸如非人灵长类动物、伴侣动物(例如,猫、狗、马)、农场动物、工作动物或动物园动物。在一些实施方案中,受试者为啮齿动物。

[0482] 在这些方法的一些实施方案中,方法为体内方法。在这些方法的一些实施方案中,方法为原位方法。在这些方法的一些实施方案中,方法为离体方法。在这些方法的一些实施方案中,方法为体外方法。

[0483] 在一些实施方案中,原位成像和/或体内成像可用于鉴别要治疗的患者的方法。例如,在原位成像中,可活化抗体用于筛选患者样品,以鉴别在适当位置例如肿瘤位点具有适当的一种或多种蛋白酶和一种或多种靶标的那些患者。

[0484] 在一些实施方案中,原位成像用于鉴别或以其他方式细化适用于用本公开的可活化抗体治疗的患者群体。例如,对于靶标(例如靶标)和裂解正测试(例如,在疾病位点积累活化的抗体)的可活化抗体的CM1-CM2底物中的底物的蛋白酶均测试为阳性的患者被鉴定为用包含此种CM1-CM2底物的此种可活化抗体治疗的合适候选者。同样,对于靶标(例如靶标)以及裂解正使用这些方法测试的可活化抗体的CM1-CM2底物中的底物的蛋白酶中的一者或两者测试为阴性的患者可被鉴定为另一种治疗形式的合适候选者。在一些实施方案中,可用包含不同CM1-CM2底物的其他可活化抗体测试对于第一可活化抗体测试为阴性的此类患者,直到鉴别出用于治疗的合适的可活化抗体(例如,包含在疾病位点被患者裂解的CM1-CM2底物的可活化抗体)。在一些实施方案中,然后向患者施用治疗有效量的对于患者测试为阳性的缀合的可活化抗体。

[0485] 在一些实施方案中,体内成像用于鉴别或以其他方式细化适用于用本公开的可活化抗体治疗的患者群体。例如,对于靶标(例如靶标)和裂解正测试(例如,在疾病位点积累活化的抗体)的可活化抗体的CM1-CM2底物中的底物的蛋白酶均测试为阳性的患者被鉴定为用包含此种CM1-CM2底物的此种可活化抗体治疗的合适候选者。同样,测试为阴性的患者可被鉴定为另一种治疗形式的合适候选者。在一些实施方案中,可用包含不同CM1-CM2底物的其他可活化抗体测试对于第一可活化抗体测试为阴性的此类患者,直到鉴别出用于治疗的合适的可活化抗体(例如,包含在疾病位点被患者裂解的CM1-CM2底物的可活化抗体)。在一些实施方案中,然后向患者施用治疗有效量的对于患者测试为阳性的缀合的可活化抗体。

[0486] 在方法和试剂盒的一些实施方案中,所述方法或试剂盒用于鉴别或以其他方式细化适用于用本公开的可活化抗体治疗的患者群体。例如,对于靶标(例如靶标)和裂解正在这些方法中测试的可活化抗体的CM1-CM2底物中的底物的蛋白酶均测试为阳性的患者被鉴定为用包含此种CM1-CM2底物的此种可活化抗体治疗的合适候选者。同样,对于靶标(例如靶标)和裂解正使用这些方法测试的可活化抗体的CM1-CM2底物中的底物的蛋白酶均测试为阴性的患者可能被鉴定为另一种治疗形式的合适候选者。在一些实施方案中,可用其他可活化抗体测试此类患者,直到鉴别出用于治疗的合适的可活化抗体(例如,包含在疾病位点被患者裂解的CM1-CM2底物的可活化抗体)。在一些实施方案中,对于任一靶标(例如,靶标)测试为阴性的患者被鉴定为用包含此种CM1-CM2底物的此种可活化抗体治疗的合适候选者。在一些实施方案中,对于任一靶标(例如,靶标)测试为阴性的患者被鉴定为不是用包

含此种CM1-CM2底物的此种可活化抗体治疗的合适候选者。在一些实施方案中,可用其他可活化抗体测试此类患者,直到鉴别出用于治疗的合适的可活化抗体(例如,包含在疾病位点被患者裂解的CM1-CM2底物的可活化抗体)。在一些实施方案中,可活化抗体为与治疗剂缀合的可活化抗体。在一些实施方案中,可活化抗体不缀合至剂。在一些实施方案中,可活化抗体包含可检测标记。在一些实施方案中,可检测标记定位在AB上。在一些实施方案中,使用特异性结合至活化的抗体的二级试剂来完成测量受试者或样品中可活化抗体的水平,其中所述试剂包含可检测标记。在一些实施方案中,二级试剂为包含可检测标记的抗体。

[0487] 在一些实施方案中,方法或试剂盒用于鉴别或以其他方式细化适用于用本公开的抗靶可活化抗体和/或缀合的可活化抗体(例如,与治疗剂缀合的可活化抗体)治疗的患者群体,随后通过向有需要的受试者施用此可活化抗体和/或缀合的可活化抗体来进行治疗。例如,对于靶标(例如靶标)和裂解正在这些方法中测试的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体的CM1-CM2底物的蛋白酶均测试为阳性的患者被鉴定为用包含此种CM1-CM2底物的此种抗体和/或此种缀合的可活化抗体治疗的合适候选者,并且然后向患者施用治疗有效量的经测试的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体。同样,对于靶标(例如靶标)以及裂解正使用这些方法测试的可活化抗体的CM1-CM2底物中的底物的蛋白酶中的一者或两者测试为阴性的患者可被鉴定为另一种治疗形式的合适候选者。在一些实施方案中,可用其他抗体和/或缀合的可活化抗体测试此类患者,直到鉴别出用于治疗的合适的抗体和/或缀合的可活化抗体(例如,包含在疾病位点被患者裂解的CM1-CM2底物的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体)。在一些实施方案中,然后向患者施用治疗有效量的对于患者测试为阳性的可活化抗体和/或缀合的。

[0488] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,MM是长度为约4至40个氨基酸的肽。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,可活化抗体包含接头肽,其中接头肽定位在MM与CM1-CM2底物之间。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,可活化抗体包含接头肽,其中接头肽定位在AB与CM1-CM2底物之间。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,可活化抗体包含第一接头肽(LP1)和第二接头肽(LP2),其中第一接头肽定位在MM与CM1-CM2底物之间,并且第二接头肽定位在AB与CM1-CM2底物之间。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,LP1和LP2中的每一个是长度为约1至20个氨基酸的肽,并且其中LP1和LP2中的每一个不需要相同的接头。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,LP1和LP2中的一个或两个包含甘氨酸-丝氨酸聚合物。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,LP1和LP2中的至少一个包含选自以下组成的组的氨基酸序列:(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:381)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:382),其中n为至少1的整数。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,LP1和LP2中的至少一个包含具有式(GGS)_n的氨基酸序列,其中n为至少1的整数。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,LP1和LP2中的至少一个包含选自以下组成的组的氨基酸序列:Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:383)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(SEQ ID NO:384)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:385)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:386)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly(SEQ ID NO:387)和Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(SEQ ID NO:388)。

[0489] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,AB包含选自本文提出的交叉反应性抗体序列的抗体或抗体片段序列。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,AB包含Fab片段、scFv或单链抗体(scAb)。

[0490] 在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,裂解剂是与靶标共定位在受试者或样品中的蛋白酶,并且CM1-CM2底物是用作蛋白酶的底物的多肽,其中当可活化抗体暴露于蛋白酶时,蛋白酶裂解可活化抗体中的CM1-CM2底物。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,CM1-CM2底物中CM1底物序列和CM2底物序列中的每一个独立地为长度至多15个氨基酸的多肽。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,CM1-CM2底物偶合至AB的N端。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,CM1-CM2底物偶合至AB的C端。在这些方法和试剂盒的一些实施方案中,CM1-CM2底物偶合至AB的VL链的N端。

[0491] 本公开的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体用于诊断和预防制剂中。在一个实施方案中,将可活化抗体施用于处于发展上述炎症、炎性病症、癌症或其他病症中的一种或多种的风险下的患者。

[0492] 可使用基因型、血清学或生化标志物确定患者或器官对一种或多种上述病症的易感性。

[0493] 在一些实施方案中,将可活化抗体和/或缀合的可活化抗体施用于被诊断为患有与一种或多种上述病症相关的临床适应症的人个体。诊断后,施用可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以减轻或逆转临床适应症的影响。

[0494] 本公开的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体也可用于检测患者样品中的靶标,并因此可用作诊断剂。例如,本公开的可活化抗体和/或缀合的可活化抗体用于体外测定(例如ELISA),以检测患者样品中的靶标水平。

[0495] 在一个实施方案中,将本公开的可活化抗体固定在固体支持物(例如,微量滴定板的一个或多个孔)上。固定的可活化抗体用作可存在于测试样品中的任何靶标的捕获抗体。在使固定的抗体与患者样品接触之前,冲洗固体支持物并用封闭剂(诸如乳蛋白或白蛋白)处理以防止分析物的非特异性吸附。

[0496] 随后,用疑似含有抗原的测试样品或用含有标准量抗原的溶液处理孔。例如,此种样品是来自疑似具有被认为是对病理的诊断的循环抗原水平的受试者的血清样品。在冲洗掉测试样品或标准品后,用可检测标记的第二抗体处理固体支持物。标记的第二抗体用作检测抗体。测量可检测标记的水平,并通过与由标准样品形成的标准曲线进行比较来确定测试样品中靶抗原的浓度。

[0497] 应当理解,基于使用本公开的抗体获得的结果,在体外诊断测定中,可以基于靶抗原的表达水平对受试者的疾病进行分期。对于给定的疾病,从被诊断为处于疾病进展的不同阶段和/或处于疾病治疗性治疗的不同时间点的受试者中抽取血液样品。使用为进展或治疗的每个阶段提供统计学上显著的结果的样品群体,指定了可被认为是每个阶段的特征的抗原浓度范围。

[0498] 可活化抗体和/或缀合的可活化抗体也可用于诊断和/或成像方法。在一些实施方案中,此类方法为体外方法。在一些实施方案中,此类方法为体内方法。在一些实施方案中,此类方法为原位方法。在一些实施方案中,此类方法为离体方法。例如,具有可酶裂解的CM1-CM2底物的可活化抗体可用于检测能够裂解CM1-CM2底物的酶的存在或不存在。此类可活化抗体可用于诊断中,其可包括通过在给定宿主生物体的给定细胞或组织中活化的抗体(即,由可活化抗体的裂解而产生的抗体)的测量的积累来在体内检测(例如,定性或定量)酶活性(或在一些实施方案中,具有增加的还原电位的环境,诸如可提供二硫键还原的环

境)。活化的抗体的这种积累不仅表明组织表达酶活性(或根据CM1-CM2底物的性质而增加的还原电位),而且还表明组织表达活化的抗体结合的靶标。

[0499] 例如,可选择CM1-CM2底物作为在肿瘤位点、生物限制位点的病毒或细菌感染位点(例如像脓肿、器官等)等处发现的蛋白酶的蛋白酶底物。AB可为结合靶抗原的AB。使用本领域技术人员熟悉的方法,可将可检测标记(例如,荧光标记或放射性标记或放射性示踪剂)缀合至可活化抗体的AB或其他区域。在上述筛选方法的背景下讨论合适的可检测标记,并且下文提供了另外的具体实例。使用对疾病状态的蛋白质或肽具有特异性的AB以及在感兴趣的疾病组织中活性升高的蛋白酶,相对于其中CM1-CM2底物特异性酶在可检测水平上不存在或以低于疾病组织中的水平存在或无活性(例如,呈酶原形式或呈与抑制剂的复合物)的组织,可活化抗体将表现出增加的与疾病组织的结合率。由于肾脏过滤系统迅速清除血液中的小蛋白质和多肽,并且由于对CM1-CM2底物具有特异性的酶在可检测水平上不存在(或以较低水平存在于非疾病组织中或以无活性构象存在),相对于非疾病组织,活化的抗体在疾病组织中的积累增加。

[0500] 在另一个实例中,可活化抗体可用于检测样品中裂解剂的存在或不存在。例如,在可活化抗体含有易于被酶裂解的CM1-CM2底物的情况下,可活化抗体可用于检测(定性或定量)样品中酶的存在。在另一个实例中,在可活化抗体含有易于被还原剂裂解的CM1-CM2底物的情况下,可活化抗体可用于检测(定性或定量)样品中还原条件的存在。为了促进这些方法中的分析,可以可检测地标记可活化抗体,并且可将其结合至支持物(例如,固体支持物,诸如载玻片或珠)。可检测标记可定位在可活化抗体在裂解后不释放的一部分上,例如,可检测标记可为淬灭的荧光标记或在发生裂解前不可检测的其他标记。例如,可通过使固定的、可检测地标记的可活化抗体与疑似含有酶和/或还原剂的样品接触足以发生裂解的时间,然后洗涤以去除过量的样品和污染物来进行测定。然后通过在与样品接触之前可活化抗体的可检测信号的变化来评估样品中裂解剂(例如,酶或还原剂)的存在或不存在,例如,由于样品中的裂解剂裂解可活化抗体而导致可检测信号的存在和/或增加。

[0501] 此类检测方法可适于也提供对在裂解时能够结合可活化抗体的AB的靶标的存在或不存在的检测。因此,测定可适于评估裂解剂的存在或不存在以及感兴趣的靶标的存在或不存在。如上文所述,裂解剂的存在或不存在可通过可活化抗体的可检测标记的存在和/或增加来检测,并且靶标的存在或不存在可通过检测靶标-AB复合物(例如通过使用可检测地标记的抗靶抗体)来检测。

[0502] 可活化抗体也可用于原位成像,以验证例如通过蛋白酶裂解进行的可活化抗体活化和与特定靶标的结合。原位成像是能够在生物样品(诸如细胞培养物或组织切片)中定位蛋白水解活性和靶标的技术。使用此技术,可以基于可检测标记(例如,荧光标记)的存在来确认与给定靶标的结合和蛋白水解活性。

[0503] 这些技术可用于来源于疾病位点(例如肿瘤组织)或健康组织的任何冷冻细胞或组织。这些技术也可用于新鲜的细胞或组织样品。

[0504] 在这些技术中,可活化抗体用可检测标记进行标记。可检测标记可为荧光染料(例如,异硫氰酸荧光素(FITC)、异硫氰酸罗丹明(TRITC))、近红外(NIR)染料(例如,Qdot®纳米晶体)、胶体金属、半抗原、放射性标志物、生物素和扩增剂(诸如链霉亲和素)或酶(例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)。

[0505] 在已与标记的可活化抗体一起孵育的样品中检测到标记表明,样品含有靶标并且含有对可活化抗体的CM1-CM2底物具有特异性的蛋白酶。在一些实施方案中,可使用诸如本文所述的那些广谱蛋白酶抑制剂和/或通过使用对蛋白酶具有特异性的剂(例如,对蛋白酶蛋白裂解酶(MT-SP1)具有特异性并抑制蛋白裂解酶的蛋白水解活性的抗体,诸如A11)来确认蛋白酶的存在;参见例如2010年11月11日公布的国际公布号W0 2010/129609。使用诸如本文所述的那些广谱蛋白酶抑制剂和/或通过使用更具选择性的抑制剂的相同方法可用于鉴别对可活化抗体的CM1-CM2底物具有特异性的一种蛋白酶或一类蛋白酶。在一些实施方案中,可使用对靶标具有特异性的剂(例如另一种抗体)来确认靶标的存在,或可检测标记可与未标记的靶标竞争。在一些实施方案中,可使用未标记的可活化抗体,其中通过标记的二级抗体或更复杂的检测系统进行检测。

[0506] 类似技术也可用于体内成像,其中在受试者(例如,哺乳动物,包括人)中检测到荧光信号指示疾病位点含有靶标并且含有对可活化抗体的CM1-CM2底物具有特异性的蛋白酶。

[0507] 这些技术也可用于试剂盒中和/或用作试剂,以用于基于可活化抗体中的蛋白酶特异性CM1-CM2底物来检测、鉴别或表征多种细胞、组织和生物体中的蛋白酶活性。

[0508] 在一些实施方案中,原位成像和/或体内成像可用于鉴别要治疗的患者的方法。例如,在原位成像中,可活化抗体用于筛选患者样品,以鉴别在适当位置例如肿瘤位点具有适当的一种或多种蛋白酶和一种或多种靶标的那些患者。

[0509] 在一些实施方案中,原位成像用于鉴别或以其他方式细化适用于用本公开的可活化抗体治疗的患者群体。例如,对于靶标和裂解正测试(例如,在疾病位点积聚活化的抗体)的可活化抗体的裂解部分(CM1-CM2底物)中的底物的蛋白酶均测试为阳性的患者被鉴定为用包含此种CM1-CM2底物的此种可活化抗体治疗的合适候选者。同样,对于靶标和裂解正使用这些方法测试的可活化抗体的CM1-CM2底物中的底物的蛋白酶中的一者或两者测试为阴性的患者被鉴定为另一种治疗形式的合适候选者(即不适用于用所测试的可活化抗体进行治疗)。在一些实施方案中,可用包含不同CM的其他可活化抗体测试对于第一可活化抗体测试为阴性的此类患者,直到鉴别出用于治疗的合适的可活化抗体(例如,包含在疾病位点被患者裂解的CM1-CM2底物的可活化抗体)。

[0510] 在一些实施方案中,体内成像用于鉴别或以其他方式细化适用于用本公开的可活化抗体治疗的患者群体。例如,对于靶标和裂解正测试(例如,在疾病位点积聚活化的抗体)的可活化抗体的裂解部分(CM1-CM2底物)中的底物的蛋白酶均测试为阳性的患者被鉴定为用包含此种CM1-CM2底物的此种可活化抗体治疗的合适候选者。同样,测试为阴性的患者被鉴定为另一种治疗形式的合适候选者(即不适用于用所测试的可活化抗体进行治疗)。在一些实施方案中,可用包含不同CM的其他可活化抗体测试对于第一可活化抗体测试为阴性的此类患者,直到鉴别出用于治疗的合适的可活化抗体(例如,包含在疾病位点被患者裂解的CM1-CM2底物的可活化抗体)。

[0511] 药物组合物

[0512] 可将本公开的缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体(在本文中也称为“活性化合物”)及其衍生物、片段、类似物和同源物并入适用于施用的药物组合物中。此类组合物通常包含缀合的抗体、可活化抗体和/或缀合的可活化抗体以及药学上可接受的载

剂。如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”旨在包括可与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。在本领域的标准参考文献最新版的Remington's Pharmaceutical Sciences中对合适的载剂进行了描述。此类载剂或稀释剂的合适实例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液(ringer's solution)、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。也可使用脂质体和非水性媒介物,诸如不挥发性油。用于药学活性物质的此类介质和剂的用途是本领域中众所周知的。除非任何常规介质或剂与活性化合物不相容,否则设想将其用于所述组合物中。补充性活性化合物也可并入组合物中。

[0513] 将本公开的药物组合物配制成与其预期的施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入)、透皮(即局部)、透粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包含以下组分:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲液,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的剂,诸如氯化钠或葡萄糖。可用酸或碱(诸如盐酸或氢氧化钠)调节pH。肠胃外制剂可封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0514] 适用于可注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(其中可溶于水的)或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载剂包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须为无菌的且应当为易于注射的流体。所述组合物在制造和储存的条件下必须是稳定的并且必须针对诸如细菌和真菌的微生物污染作用而防腐。载剂可为溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如,可通过使用诸如卵磷脂的包衣、在分散体的情况下通过保持所需的颗粒大小、以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。对微生物作用的预防可通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现。在一些实施方案中,将期望在组合物中包含等渗剂,例如糖类、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇)、氯化钠。可通过在组合物中包含延迟吸收的剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0515] 可通过根据需要将所需量的活性化合物与一种上文列举的成分或其组合并入适当的溶剂中,随后进行过滤灭菌来制备无菌注射溶液。通常,通过将活性化合物并入无菌媒介物中来制备分散体,所述媒介物含有碱性分散介质和上文列举的所需要的其他成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉剂的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,所述冷冻干燥从其先前无菌过滤溶液中得到活性成分和任何另外所需成分的粉末。

[0516] 口服组合物通常包含惰性稀释剂或可食用载剂。可将它们封装在明胶胶囊中或压成片剂。为了口服治疗施用的目的,可将活性化合物与赋形剂合并,并且以片剂、含片或胶囊的形式使用。口服组合物也可使用流体载剂制备以用作漱口水,其中口服应用流体载剂中的化合物并漱口并咳出或吞咽。可包含药物相容性结合剂和/或佐剂材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊剂、含片等可含有以下成分中的任一种或具有类似性质的化合物:粘合剂,诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂诸如淀粉或乳糖,崩解剂诸如海藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂,诸如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,诸如胶体二氧化硅;甜味

剂,诸如蔗糖或糖精;或调味剂,诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙子调味剂。

[0517] 对于通过吸入施用,将化合物以气溶胶喷雾的形式从含有合适的推进剂(例如,气体,诸如二氧化碳)的压力容器或分配器或者喷雾器中递送。

[0518] 全身施用也可通过透粘膜或透皮方式进行。对于透粘膜或透皮施用,在制剂中使用适于待渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域已知的,并且包括例如用于透粘膜施用的洗涤剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。透粘膜施用可通过使用鼻喷雾剂或栓剂来完成。对于透皮施用,将活性化合物配制成软膏、药膏、凝胶或乳膏,如本领域通常已知的。

[0519] 化合物还可被制备为栓剂(例如,具有常规栓剂基质诸如可可脂和其他甘油酯)或保留灌肠剂的形式,以用于直肠递送。

[0520] 在一个实施方案中,活性化合物与将保护化合物使其免于从体内快速消除的载剂一起制备,诸如受控释放制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可使用生物可降解的、生物相容的聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的方法对于本领域技术人员将是清楚的。材料也可从Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals, Inc商购获得。脂质体悬浮液(包含用针对病毒抗原的单克隆抗体靶向受感染细胞的脂质体)也可用作药学上可接受的载剂。这些悬浮液可根据本领域技术人员已知的方法来制备,例如,如美国专利号4,522,811中所述。

[0521] 特别有利的是,将口服或肠胃外组合物配制成为易于施用和均匀剂量的剂量单位形式。如本文所用,剂量单位形式指适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量的物理离散单位;每个单位含有计算为与需要的药物载剂结合以产生所需治疗效果的预定量的活性化合物。本公开的剂量单位形式的规格由以下规定并且直接取决于以下情况:活性化合物的独特特征和待实现的特定治疗效果,以及合成此类用于治疗个体的活性化合物的领域内的固有限制。

[0522] 药物组合物可与施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。

[0523] 本发明将在以下实施例中进一步描述,这些实施例不限制权利要求中所述的本发明的范围。

[0524] 实施例

[0525] 实施例1:可活化抗体和基质金属蛋白酶(MMP)可裂解底物

[0526] 本文提供的研究描述了本公开的示例性基质金属蛋白酶(MMP)底物和包含本公开的MMP底物的示例性可活化抗体。

[0527] 构建示例性可活化抗体,使得每个可活化抗体都包含表7中列出的MMP底物中的一种。本公开的示例性可活化抗体的序列在表8中列出,包含基于特异性结合到表皮生长因子受体(EGFR)的小鼠/人嵌合单克隆抗体的抗体或其抗原结合片段(AB)。示例性可活化抗体还包含偶合到AB的轻链的N端的前结构域。每个前结构域包含掩蔽部分(MM)和可裂解部分(CM),并且CM包含表7的至少一种MMP底物序列。

[0528] 表7:基质金属蛋白酶(MMP)底物

[0529]

名称	序列	SEQ ID NO:
4001	ALAHGLF	1
4002	DLAHPLL	2
4003	AFRHLR	3

4004	PHGFFQ	4
4005	SVHHLI	5
4006	RGPKLYW	6
4007	RFPYGVW	7
4008	HVPRQV	8
4009	SNPFKY	9
4010	RFPLKV	10
4011	PFHLSR	11
4012	STVFHM	12
4013	MGPWFM	13
4014	RHLAKL	14
4015	PLGVRGK	15
4016	QNQALRIA	16

[0530] 表8:可活化抗体序列

[0531]

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5)重链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 400)

QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGL
 EWLGVIWSSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDT
 AIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD

ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

抗 EGFR 可活化抗体轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO:399)

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRL L
IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVESEDIADYYCQQNNNW
PTTFGAGTKLELKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体轻链(氨基酸序列)(SEO ID NO: 401)

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRL
IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNW
PTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-NSUB)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 402)

QGGSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGGGSGGGSGGS
DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRL
IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNW
PTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLKA
DYEKHKVYACEVTHOGLSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4001SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 403)

QGGSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSALAHGLFGGGSQILLT
QSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYAS
ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFG
AGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH

[0532]

[0533]

KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
<u>抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4001LL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 404)</u>
QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGALAHGLFGGG SQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRL LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
<u>抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4002SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 405)</u>
QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSDLAHPLLGGGSQILLT QSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFG AGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
<u>抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4003SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 406)</u>
QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSAFRHLRGGGSQILLTQ SPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASE SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGA GTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
<u>抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4004LL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 407)</u>
QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGPHGFFQGGGS QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRL IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNW

[0534]

PTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
 PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA
 DYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4005SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
 NO: 408)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSVHHLIGGGSQILLTQ
 SPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRL LIKYASE
 SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGA
 GTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4006SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
 NO: 409)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSRGPKLYWGGGSQILL
 TQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRL LIKYA
 SESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF
 GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4006LL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
 NO: 410)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGSSGGSGGSGGSGRGPKLYWGGG
 SQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRL
 LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN
 WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
 YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK
 ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4007SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
 NO: 411)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSRFPYGVWGGGSQILL

[0535]

TQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYA
 SESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF
 GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4008SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
 NO: 412)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSHVPRQVGGGSQILLT
 QSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYAS
 ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFG
 AGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKH
 KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4008LL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
 NO: 413)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSGGSGGHVPRQVGGGS
 QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLL
 IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNW
 PTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
 PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKA
 DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4009SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
 NO: 414)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSNPFKYGGGSQILLTQ
 SPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASE
 SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGA
 GTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4010SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID

[0536]

NO: 415)
QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSRFPLKVGGGSQILLTQ SPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASE SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGA GTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4011SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 416)
QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSPFHLSRGGGSQILLTQ SPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASE SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGA GTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4012SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 417)
QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSTVFHMGGGSQILLTQ SPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASE SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGA GTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4013SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 418)
QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSMGPWFMGGGSQILLT QSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFG AGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKH

[0537]

KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4013LL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 419)
QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGMGPWFMGGG SQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRL LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL SSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4014SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 420)
QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGRHLAKLGGGSQILLTQ SPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRL LIKYASE SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGA GTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL SSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4015SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 421)
QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGSPLGVRGKGGGSQILLT QSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRL LIKYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFG AGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL SSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4015LL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 422)
QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGPLGVRGKGGG SQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRL LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN

[0538]

WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-4016)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 423)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGQNQALRIAGG
GSQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPR
LLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN
WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-2011LL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 480)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGISSGLLSGRSD
NPGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRN
GSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQ
QNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-3011LL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 481)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGGSGAVGLLAPPGG
LSGRSDNPGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW
YQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDI
ADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
YSLSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-1001SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 482)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSISSGLLSSGGGSQILLT

[0539]

QSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKAYAS
ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFG
AGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-1001LL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 483)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGSSGGSGGSGGSGISSGLLSSGGG
SQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRL
LIKAYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNN
WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-1004SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 484)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSAVGLLAPPGGGSQILL
TQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKAYA
ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF
GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-1004LL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 485)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGSSGGSGGSGGSGPAVGLLAPPG
GGSQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSP
RLLIKAYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNN
NWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-1005SL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID

	NO: 486)
	QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSGPSHLVLTGGGSQILL TQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYA SESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0540]	抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-1005LL)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 487)
	QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGSSGGSGGSGGSGGPSHLVLTGG GSQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPR LLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0541] 实施例2:具有MMP可裂解底物的可活化抗体的体外稳定性

[0542] 本文提供的研究评估了含有本公开的基质金属蛋白酶 (MMP) 底物的可活化抗体的体外稳定性。

[0543] 通过在重组MMP9或重组MMP14基质金属蛋白酶的存在下测量本公开的可活化抗体的稳定性。将每种可活化抗体 (100 μ g/mL) 与50mM所示重组蛋白酶在37 $^{\circ}$ C下孵育24小时,并且通过毛细管电泳测量每种蛋白酶裂解的可活化抗体的分数。表9总结了此体外研究的示例性结果。

[0544] 这些示例性结果表明,本公开的底物显示出MMP9或MMP14酶的一定范围的可裂解性。这些示例性结果还显示了一组底物,其中MMP9和MMP14的可裂解性均为至少85%。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列ALAHGLF (SEQ ID NO:1)、DLAHPLL (SEQ ID NO:2) 或RGPKLYW (SEQ ID NO:6)。

[0545] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中MMP9和MMP14的可裂解性均为至少90%。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列ALAHGLF (SEQ ID NO:1)。

[0546] 表9:MMP可裂解的可活化抗体的体外活化

可活化抗体中的底物	底物	底物 SEQ ID NO.	MMP14 可 裂解性(%)	MMP9 可 裂解性(%)
c225v5-3954-4001-SL	ALAHGLF	1	96.5	94.5
c225v5-3954-4001-LL	ALAHGLF	1	100	100.0
c225v5-3954-4002-SL	DLAHPLL	2	85.9	87.5
c225v5-3954-4003-SL	AFRHLR	3	53.1	6.0
c225v5-3954-4004-LL	PHGFFQ	4	46.2	29.8
c225v5-3954-4005-SL	SVHHLI	5	24.4	70.5
c225v5-3954-4006-LL	RGPKLYW	6	84.2	90.8
c225v5-3954-4006-SL	RGPKLYW	6	85.7	92.9
c225v5-3954-4007-SL	RFPYGVW	7	0.0	69.5
c225v5-3954-4008-LL	HVPRQV	8	0.0	55.2
c225v5-3954-4009-SL	SNPFKY	9	0.0	22.1
c225v5-3954-4010-SL	RFPLKV	10	0.0	18.0
c225v5-3954-4011-SL	PFHLSR	11	9.9	78.8
c225v5-3954-4012-SL	STVFHM	12	0.0	56.5
c225v5-3954-4014-SL	RHLAKL	14	30.5	0.0
c225v5-3954-4015-LL	PLGVRGK	15	0.0	90.0

[0548] 实施例3:具有MMP可裂解底物的可活化抗体的体内稳定性

[0549] 本文提供的研究评估了含有本公开的基质金属蛋白酶 (MMP) 底物的可活化抗体的体内稳定性。

[0550] 这些示例性研究通过向小鼠施用一定剂量的可活化抗体并且然后通过蛋白质印迹法测量观察到的可活化抗体在血浆中被裂解的分数来测量本公开的含有MMP底物的可活化抗体的稳定性。将稳定性与其他已知的可活化抗体进行比较,所述其他可活化抗体具有底物例如2011 (ISSGLLSGRSDNP, SEQ ID NO:21) 和3011 (AVGLLAPPGGLSGRSDNP, SEQ ID NO:22),其包含至少一种MMP底物和至少丝氨酸蛋白酶底物;或底物1001 (ISSGLLSS, SEQ ID NO:17),其包含至少一种MMP底物。

[0551] 在此研究中,以12.5mg/kg的剂量向约7-8周龄的nu/nu小鼠腹膜内施用所示测试物品。施用后7天后,通过心脏穿刺采集末梢血,并在采集后1小时内处理成血浆。将收集的样品在磷酸盐缓冲盐溶液中以1:100稀释,并使用A110UK山羊抗人IgG抗体(American Qualex)和抗山羊二级抗体(Jackson ImmunoResearch),使用WES蛋白质印迹方案(Protein Simple)进行变性和分析。通过定量与裂解的可活化抗体相对应的较高迁移率多肽的分数来确定裂解的可活化抗体的分数。表10和图1中总结了这些示例性测定的结果。

[0552] 表10. 可活化抗体的体内稳定性

测试物品	7天后的%活化
C225v5-3954-2011LL	35.80
C225v5-3954-3011LL	62.85
C225v5-3954-4016	20.30
C225v5-3954-4001LL	22.37
C225v5-3954-4001SL	27.23
C225v5-3954-4003SL	29.70

C225v5-3954-4006LL	22.70
C225v5-3954-4008SL	17.93
C225v5-3954-4008LL	17.77
C225v5-3954-4012SL	13.20
C225v5-3954-4015LL	50.43
C225v5-3954-1001LL	19.77

[0554] 这些示例性结果表明,包含本公开的MMP底物的某些可活化抗体显示出比具有丝氨酸蛋白酶和MMP底物的可活化抗体高的体内稳定性。

[0555] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中体内稳定性小于30%活化。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列ALAHGLF (SEQ ID NO:1) 或RGPKLYW (SEQ ID NO:6)。

[0556] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中体内稳定性小于25%活化。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列ALAHGLF (SEQ ID NO:1) 或RGPKLYW (SEQ ID NO:6)。

[0557] 实施例4:具有MMP可裂解底物的可活化抗体的掩蔽效率

[0558] 本文提供的研究评估了包含本公开的基质金属蛋白酶 (MMP) 底物的可活化抗体的体外掩蔽效率。

[0559] 在这些研究中,使用固相结合测定法 (ELISA) 来证明包含本公开的MMP底物的抗EGFR可活化抗体与重组EGFR的结合亲和力。如图2A和图2B所示,测量了本公开的具有所示底物的可活化抗体与EGFR的结合亲和力,并将其与c225v5亲本抗体进行比较。将掩蔽效率与其他可活化抗体进行比较,所述其他可活化抗体具有已知底物例如2001 (ISSGLLSGRSDNH, SEQ ID NO:23),其包含至少一种MMP底物和至少丝氨酸蛋白酶底物;或底物1001 (ISSGLLSS, SEQ ID NO:17)、1004 (AVGLLAPP, SEQ ID NO:18) 和1005 (GPSHLVLT, SEQ ID NO:19),其包含至少一种MMP底物。这些示例性结果的总结显示在表11以及图2A和图2B中。

[0560] 这些示例性结果表明,MMP底物对可活化抗体中掩蔽部分的掩蔽效率有影响,在一些情况下增加了可活化抗体的前结构域中掩蔽部分的表现掩蔽效率。

[0561] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中掩蔽效率大于70。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列ALAHGLF (SEQ ID NO:1)、RGPKLYW (SEQ ID NO:6) 或RFPYGVW (SEQ ID NO:7)。

[0562] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中掩蔽效率大于160。这些示例性结果还显示了一组底物,其中掩蔽效率为160至350。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列ALAHGLF (SEQ ID NO:1) 或RFPYGVW (SEQ ID NO:7)。

[0563] 表11. 可活化抗体的体外结合活性和掩蔽效率

测试物品	K _{Da} (nM)	掩蔽效率
C225v5亲本抗体 (图2A)	0.094	1
C225v5-3954-2001 (图2A)	3.71	39.5
C225v5-3954-1004-LL	1.51	16.1
C225v5-3954-1001-LL	3.83	40.7

C225v5-3954-4001-LL	15.8	168
C225v5-3954-4001-SL	32.9	350
C225v5亲本抗体(图2B)	0.082	1
C225v5-3954-2001(图2B)	3.23	39.4
C225v5-3954-4006-LL	6.12	74.6
C225v5-3954-4008-SL	22.2	271
C225v5-3954-4007-SL	22.6	276
C225v5-3954-1005-LL	36.6	446

[0565] 实施例5:抗EGFR可活化抗体的体内功效

[0566] 本文提供的研究使用小鼠H292(人肺癌细胞系)异种移植模型评估了包含本公开的基质金属蛋白酶(MMP)底物的可活化抗体的体内功效。

[0567] 在这些研究中,6-8周龄雌性nu/nu小鼠中H292(人肺癌衍生性细胞系)皮下异种移植肿瘤生长到180-260mm³的平均体积。H292细胞系对抗EGFR抗体西妥昔单抗有反应。然后将小鼠随机分为多个组,每组7只小鼠,并且在第1天向每组腹膜内给药10mg/kg的所示测试物品。如图3A所示,对在施用测试物品后每个时间点的平均肿瘤体积±SEM作图。图3B示出了用具有所示底物的活化的抗体或用西妥昔单抗或免疫球蛋白(IVIG)对照处理的每只小鼠在第28天的绝对肿瘤体积分布。用可活化抗体或不可裂解的甘氨酸-丝氨酸接头(NSUB)来确定功效,所述可活化抗体具有已知底物例如1001(ISSGLLSS)、1004(AVGLLAPP)和1005(GPSHLVLT),其包含至少一种MMP底物。

[0568] 如图3A和图3B所示,本公开的具有MMP底物的某些可活化抗体显示出与缺乏前结构域的西妥昔单抗相当的体内功效。

[0569] 实施例6:抗EGFR可活化抗体的体内肿瘤内活化

[0570] 本文提供的研究评估了包含本公开的基质金属蛋白酶(MMP)底物的可活化抗体在施用于小鼠H292(人肺癌细胞系)异种移植模型后的体内肿瘤内活化。

[0571] 在这些研究中,6-8周龄雌性nu/nu小鼠中H292(人肺癌衍生性细胞系)皮下异种移植肿瘤生长到180-260mm³的平均体积。H292细胞系对抗EGFR抗体西妥昔单抗有反应。然后将小鼠随机分为多个组,每组7只小鼠,并且在第1天向每组腹膜内给药10mg/kg的所示测试物品。用具有所示底物的活化的抗体或用西妥昔单抗或免疫球蛋白(IVIG)对照处理每只小鼠。用可活化抗体或不可裂解的甘氨酸-丝氨酸接头(NSUB)来确定功效,所述可活化抗体具有已知底物例如1001(ISSGLLSS,SEQ ID NO:17)、1004(AVGLLAPP,SEQ ID NO:18)和1005(GPSHLVLT,SEQ ID NO:19),其包含至少一种MMP底物。

[0572] 给药后4天从小鼠收集肿瘤和血浆。将肿瘤组织用含有HALT蛋白酶抑制剂混合物(Thermo Fisher)和EDTA的免疫沉淀缓冲液(Pierce)裂解,并使用Barocycler(Pressure Bioscience)裂解。使用A110UK山羊抗人IgG抗体(American Qualex)和抗山羊二级抗体(Jackson ImmunoResearch),使用WES蛋白质印迹方案(Protein Simple)分析样品。通过定量与裂解的可活化抗体相对应的较高迁移率多肽的分数来确定裂解的可活化抗体的分数。表12和图4中总结了这些示例性测定的结果。

[0573] 表12中示出了本公开的具有MMP底物的某些可活化抗体的性质的总结。比较了实

施例3的表10给出的所示测试物品的体内稳定性。这些示例性结果表明,MMP底物4001表现出所需性质,包括MMP9和MMP14的可裂解性。一些底物还显示出比其他参考MMP底物(1001和1004)高的相对稳定性。

[0574] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中体内非肿瘤和/或肿瘤内稳定性小于30%活化。这些示例性结果还显示了一组底物,其中体内非肿瘤和/或肿瘤内稳定性在20%与30%活化之间。这些示例性结果还显示了一组底物,其中体内非肿瘤和/或肿瘤内稳定性在22%与27%活化之间。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列ALAHGLF(SEQ ID NO:1)、RGPKLYW(SEQ ID NO:6)或RFPYGVW(SEQ ID NO:7)。

[0575] 表12.MMP底物特征的总结

[0576]	底物	底物序列	底物 SEQ ID NO	体内稳定性 (非肿瘤)	体内稳定性 (肿瘤内)
	2001	ISSGLLSGRSDNH	23	30%	未测试
	4001-LL	ALAHGLF	1	22%	27%
	4001-SL	ALAHGLF	1	27%	25%
	4007-SL	RFPYGVW	7	N/A	22%
	4006-LL	RGPKLYW	6	23%	26%
	4008-SL	HVPRQV	8	18%	14%
	1005-LL	GPSHLVLT	19	11%	16%
	1001-LL	ISSGLLSS	17	20%	20%
	1004-LL	AVGLLAPP	18	未测定	37%

[0577] 实施例7:可活化抗体和串联可裂解底物

[0578] 本文提供的研究描述了本公开的示例性串联底物,其包含至少一种可被本公开的基质金属蛋白酶(MMP)底物裂解的底物和至少一种可被丝氨酸蛋白酶裂解的底物。

[0579] 构建示例性可活化抗体,使得每个可活化抗体都包含表13中列出的串联底物中的一种。本公开的示例性可活化抗体的序列在表14中列出,包含基于特异性结合到表皮生长因子受体(EGFR)的小鼠/人嵌合单克隆抗体的抗体或其抗原结合片段(AB)。示例性可活化抗体还包含偶合到AB的轻链的N端的前结构域。每个前结构域包含掩蔽部分(MM)和可裂解部分(CM),并且CM包含表13的至少一个串联底物序列。

[0580] 表13:串联MMP/丝氨酸蛋白酶底物

名称	序列	SEQ ID NO:
5001	LSGRSALAHGLF	25
5002	ALAHGLFSGRSAN	26
5003	HVPRQVLSGRS	27
5004	HVPRQVLSGRSAN	28
5005	TARGPALAHGLF	29
5006	TARGPVPRQV	30
5007	APRSALAHGLF	31
5008	ALAHGLFAPRSF	32
5009	HVPRQVAPRSF	33
5010	ALAHGLPTFVHL	34
5011	GLPTFVHLPRQV	35
5012	AANALAHGLF	36
5013	GPTNALAHGLF	37
5014	ISSGLLSGRSNI	38
5015	AVGLLAPPGGLSGRSNI	39
5016	ISSGLLSGRSNIGS	40
5017	AVGLLAPPGGLSGRSNIGS	41
5018	ISSGLLSGRSNIG	42
5019	AVGLLAPPGGLSGRSNIG	43

[0582] 表14:可活化抗体序列

[0583]	抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5001)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 450)
	QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSLSGRSALAHGLFGGG SQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRL LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNN WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0584]

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5002)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 451)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSALAHGLFSGRSANGG
GSQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPR
LLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN
WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5003)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 452)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSHVPRQVLSSGRSGGGS
QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLL
IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNW
PTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5004)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 453)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSHVPRQVLSSGRSANGG
GSQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPR
LLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN
WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5005)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 454)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSTARGPALAHGLFGGG
SQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRL
LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN
WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF

[0585]

YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5006)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 455)
QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSTARGPVPRQVGGGSQ ILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLI KYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWP TTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5007)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 456)
QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSAPRSALAHGLFGGGS QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLI IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNW PTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5008)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 457)
QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSALAHGLFAPRSFGGG SQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRL LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5009)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID NO: 458)
QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSHVPRQVAPRSFGGGGS QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLI

[0586]

IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNW
PTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5010)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 459)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSALAHGLPTFVHLGGG
SQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRL
LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN
WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5011)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 460)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSGLPTFVHLPRQVGGG
SQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRL
LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN
WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5012)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 461)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSAANALAHGLFGGGSQ
ILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLI
KYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWP
TTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-5013)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
NO: 462)

[0587]

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSGPTNALAHGLFGGGS
 QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLL
 IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNW
 PTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
 PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
 DYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-2001)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
 NO: 488)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNHGSS
 GTQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPR
 LLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN
 WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
 YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
 ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-2001TT)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
 NO: 489)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNHGGG
 SQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRL
 LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN
 WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
 YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
 ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 EGFR 可活化抗体(c225v5-3954-3001)轻链(氨基酸序列)(SEQ ID
 NO: 490)

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRS
 DNHGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR
 TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYY
 CQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0588] 实施例8:具有串联底物的可活化抗体的体外稳定性

[0589] 本文提供的研究评估了本公开的含有示例性串联底物的可活化抗体的体外稳定

性,所述串联底物包含至少一种可被基质金属蛋白酶(MMP)底物裂解的底物和至少一种可被丝氨酸蛋白酶裂解的底物。

[0590] 本公开的可活化抗体的稳定性通过所示重组蛋白酶(蛋白裂解酶、豆荚蛋白酶、中性粒细胞弹性蛋白酶、MMP2、MMP9和MMP14)的存在下进行测量。将每种可活化抗体(250nM/38.5μg/mL)与10mM所示蛋白酶在37°C下孵育24小时,并且通过毛细管电泳测量每种蛋白酶裂解的可活化抗体的分数。使用A110UK山羊抗人IgG抗体(American Qualex)和抗山羊二级抗体(Jackson ImmunoResearch),使用WES蛋白质印迹方案(Protein Simple)分析样品。通过定量与裂解的可活化抗体相对应的较高迁移率多肽的分数来确定裂解的可活化抗体的分数。表15A中总结了此体外研究的示例性结果。

[0591] 另外,进行示例性研究以确定所示蛋白酶对本公开的所示底物的可裂解性动力学(即 $K_{cat}/K_m(M^{-1}s^{-1})$)。表15A中总结了此体外研究的示例性结果。

[0592] 这些示例性结果表明,本公开的底物显示出所示蛋白酶的一定范围的可裂解性。

[0593] 这些示例性结果表明,本公开的串联底物显示出蛋白裂解酶、MMP9、MMP14、豆荚蛋白酶和/或中性粒细胞弹性蛋白酶的一定范围的可裂解性。这些示例性结果还显示了一组底物,其中MMP9和MMP14的可裂解性均为至少30%。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列LSGRSALAHGLF(SEQ ID NO:25)、ALAHGLFSGRSAN(SEQ ID NO:26)、TARGPALAHGLF(SEQ ID NO:29)、APRSALAHGLF(SEQ ID NO:31)、ALAHGLFAPRSF(SEQ ID NO:32)、AANALAHGLF(SEQ ID NO:36)或GPTNALAHGLF(SEQ ID NO:37)。

[0594] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中MMP9和MMP14的可裂解性均为至少50%。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列LSGRSALAHGLF(SEQ ID NO:25)、APRSALAHGLF(SEQ ID NO:31)、ALAHGLFAPRSF(SEQ ID NO:32)、AANALAHGLF(SEQ ID NO:36)或GPTNALAHGLF(SEQ ID NO:37)。

[0595] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中MMP9和MMP14的可裂解性均为至少70%。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列LSGRSALAHGLF(SEQ ID NO:25)或APRSALAHGLF(SEQ ID NO:31)。

[0596] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中MMP9和MMP14的可裂解性均为至少15%,并且蛋白裂解酶的可裂解性为至少50%。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列LSGRSALAHGLF(SEQ ID NO:25)、ALAHGLFSGRSAN(SEQ ID NO:26)、HVPRQVLSGRS(SEQ ID NO:27)、HVPRQVLSGRSAN(SEQ ID NO:28)、APRSALAHGLF(SEQ ID NO:31)或ALAHGLFAPRSF(SEQ ID NO:32)。

[0597] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中MMP9和MMP14的可裂解性均为至少15%,并且蛋白裂解酶的可裂解性为至少30%。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列LSGRSALAHGLF(SEQ ID NO:25)、ALAHGLFSGRSAN(SEQ ID NO:26)、HVPRQVLSGRS(SEQ ID NO:27)、HVPRQVLSGRSAN(SEQ ID NO:28)、TARGPALAHGLF(SEQ ID NO:29)、APRSALAHGLF(SEQ ID NO:31)、ALAHGLFAPRSF(SEQ ID NO:32)、AANALAHGLF(SEQ ID NO:36)或GPTNALAHGLF(SEQ ID NO:37)。

[0598] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中MMP9和MMP14的可裂解性均为至少30%,并且蛋白裂解酶的可裂解性为至少30%。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列LSGRSALAHGLF(SEQ ID NO:25)、ALAHGLFSGRSAN(SEQ ID NO:26)、

TARGPALAHGLF (SEQ ID NO:29)、APRSALAHGLF (SEQ ID NO:31)、ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO:32)、AANALAHGLF (SEQ ID NO:36) 或GPTNALAHGLF (SEQ ID NO:37)。

[0599] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中MMP9和MMP14的可裂解性均为至少50%,并且蛋白裂解酶的可裂解性为至少50%。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO:25)、APRSALAHGLF (SEQ ID NO:31)、ALAHGLFAPRSF (SEQ ID NO:32)、AANALAHGLF (SEQ ID NO:36) 或GPTNALAHGLF (SEQ ID NO:37)。

[0600] 这些示例性结果还显示了一组底物,其中MMP9和MMP14的可裂解性均为至少70%,并且蛋白裂解酶的可裂解性为至少70%。在一些实施方案中,此类底物可包括分离的多肽,其包含氨基酸序列LSGRSALAHGLF (SEQ ID NO:25) 或APRSALAHGLF (SEQ ID NO:31)。

[0601] 表15A:具有串联底物的可活化抗体的体外活化

可活化抗体的底物	底物 (SEQ ID NO)	可裂解性(%)				
		蛋白裂解酶	MMP 14	MM P9	豆荚蛋白酶	中性粒细胞弹性蛋白酶
[0602]	2001 ISSGLLSGRSDN H (23)	53	58	22	5	18
	3001 AVGLLAPPGGLS GRSDNH (24)	NT	NT	NT	0	52
	4001 ALAHGLF (1)	0	77	100	0	37
	4008 HVPRQV (8)	40	6	100	0	28

[0603]

5001	LSGRSALAHGLF (25)	100	76	76	0	88
5002	ALAHGLFSGRSA N (26)	100	58	37	21	67
5003	HVPRQVLSGRS (27)	99	20	100	0	77
5004	HVPRQVLSGRSA N (28)	75	19	86	27	84
5005	TARGPALAHGLF (29)	6	34	72	0	81
5006	TARGPVPRQV (30)	100	6	81	0	30
5007	APRSALAHGLF (31)	100	90	77	0	74
5008	ALAHGLFAPRSF (32)	98	55	100	0	66
5009	HVPRQVAPRSF (33)	100	9	78	0	31
5010	ALAHGLPTFVHL (34)	0	11	0	0	100
5011	GLPTFVHLPRQV (35)	80	7	55	0	100
5012	AANALAHGLF (36)	0	72	52	7	55
5013	GPTNALAHGLF (37)	0	78	62	9	56

[0604] NT=未测试

[0605] 表15B:具有串联底物的可活化抗体的体外活化

[0606]

可活化抗体的底物	底物 (SEQ ID NO)	Kcat / Km ($M^{-1} s^{-1}$)				
		蛋白裂解酶	MMP 14	MM P9	MMP2	中性粒细胞弹性蛋白酶
2001	ISSGLLSGRSDN H (23)	2.55 E+03	6.33 E+03	3.94 E+02	1.32 E+04	3.17 E+03
3001	AVGLLAPPGGLS GRSDNH (24)	5.35 E+03	1.70 E+04	5.05 E+04	3.10 E+05	1.91 E+04
4001	ALAHGLF (1)	0.00 E+00	6.01 E+03	8.84 E+03	5.76 E+04	N/D

[0607]	5007	APRSALAHGLF (31)	2.72 E+04	9.25 E+03	2.53 E+04	9.83 E+04	2.42 E+04
	5013	GPTNALAHGLF (37)	0.00	7.77 E+03	1.04 E+04	7.65 E+04	N/D
	4008	HVPRQV (8)	4.76 E+02	2.30 E+02	1.87 E+04	1.30 E+04	N/D
	5006	TARGPVPRQV (30)	5.37 E+03	5.64 E+02	3.39 E+04	3.69 E+04	N/D
	5011	GLPTFVHLPRQV (35)	1.43 E+03	4.44 E+02	4.18 E+03	3.38 E+03	6.65 E+05

[0608] N/D=未测定

[0609] 实施例9:具有串联底物的抗EGFR可活化抗体的体内功效

[0610] 本文提供的研究使用小鼠H292(人肺癌细胞系)异种移植模型评估了包含基质金属蛋白酶(MMP)底物和至少一种丝氨酸蛋白酶底物的本公开的可活化抗体的体内功效。

[0611] 在这些研究中,6-8周龄雌性nu/nu小鼠中H292(人肺癌衍生性细胞系)皮下异种移植肿瘤生长到180-260mm³的平均体积。H292细胞系对抗EGFR抗体西妥昔单抗有反应。然后将小鼠随机分为多个组,每组7只小鼠,并且在第1天向每组腹膜内给药12.5mg/kg的所示测试物品。如图6所示,对在施用测试物品后每个时间点的平均肿瘤体积±SEM作图。用具有所示底物的活化的抗体或用西妥昔单抗或免疫球蛋白(IVIG)对照处理每只小鼠。用具有已知底物(例如2001(ISSGLLSGRSDNH)和3001(AVGLLAPPGLSGRSDNH))的可活化抗体确定功效。

[0612] 除体内稳定性测定外,还使用如图7所示的所示可活化抗体进行肿瘤内测定。给药后4天从小鼠收集肿瘤和血浆。将肿瘤组织用含有HALT蛋白酶抑制剂混合物(Thermo Fisher)和EDTA的免疫沉淀缓冲液(Pierce)裂解,并使用Barocycler(Pressure Bioscience)裂解。使用A110UK山羊抗人IgG抗体(American Qualex)和抗山羊二级抗体(Jackson ImmunoResearch),使用WES蛋白质印迹方案(Protein Simple)分析样品。通过定量与裂解的可活化抗体相对应的较高迁移率多肽的分数来确定裂解的可活化抗体的分数。图7中总结了这些示例性测定的结果。

[0613] 如图6所示,本公开的具有串联MMP和丝氨酸蛋白酶底物的某些可活化抗体显示出与缺乏前结构域的西妥昔单抗相当的体内功效。

[0614] 实施例10:具有串联底物的可活化抗体的掩蔽效率

[0615] 本文提供的研究评估了包含串联基质金属蛋白酶(MMP)和丝氨酸蛋白酶底物的本公开的可活化抗体的体外掩蔽效率。

[0616] 在这些研究中,使用固相结合测定法(ELISA)来证明包含本公开的MMP底物的抗EGFR可活化抗体与重组EGFR的结合亲和力。测量了本公开的具有所示底物的可活化抗体与EGFR的结合亲和力,并将其与c225v5亲本抗体进行比较。这些示例性结果的总结显示在表16和图8中。

[0617] 这些示例性结果表明,串联底物通过增加可活化抗体中掩蔽部分的表现掩蔽效率而起作用。

[0618] 表16.可活化抗体的体外结合活性和掩蔽效率

[0619]	测试物品	K _{Da} ,nM(标准误差)	掩蔽效率
--------	------	---------------------------	------

C225v5亲本抗体	0.1585 (0.01978)	1
C225v5-3954-2001	5.062 (0.8141)	32
C225v5-3954-3001	9.095 (1.598)	57
C225v5-3954-4008	32.11 (6.39)	203
C225v5-3954-5007	26.61 (3.946)	168
C225v5-3954-5006	19.08 (3.15)	120
C225v5-3954-5013	29.85 (4.287)	188
C225v5-3954-5010	34.26 (4.212)	216
C225v5-3954-5011	29.03 (2.524)	183
C225v5-3954-5001	17.13 (2.538)	108

[0620] 实施例11:具有串联底物的可活化抗体的体内稳定性

[0621] 本文提供的研究评估了本公开的含有示例性串联底物的可活化抗体的体内稳定性,所述串联底物包含至少一种可被基质金属蛋白酶(MMP)裂解的底物和至少一种可被丝氨酸和/或半胱氨酸蛋白酶裂解的底物。

[0622] 这些示例性研究通过向小鼠施用一定剂量的可活化抗体并且然后通过蛋白质印迹法测量观察到的可活化抗体在血浆中被裂解的分数来测量本公开的含有MMP底物的可活化抗体的稳定性。将稳定性与其他已知的可活化抗体进行比较,所述其他可活化抗体具有底物例如2001 (ISSGLLSGRSDNH) 和3001 (AVGLLAPPGGLSGRSDNH),其包含至少一种MMP底物和至少丝氨酸蛋白酶底物。

[0623] 在此研究中,以12.5mg/kg的剂量I' m向约7-8周龄的nu/nu小鼠腹膜内施用所示测试物品。施用后7天后,通过心脏穿刺采集末梢血,并在采集后1小时内处理成血浆。将收集的样品在磷酸盐缓冲盐溶液中以1:100稀释,并使用A110UK山羊抗人IgG抗体(American Qualex)和抗山羊二级抗体(Jackson ImmunoResearch),使用WES蛋白质印迹方案(Protein Simple)进行变性和分析。通过定量与裂解的可活化抗体相对应的较高迁移率多肽的分数来确定裂解的可活化抗体的分数。表17中总结了这些示例性测定的结果。

[0624] 这些示例性结果表明,本公开的包含串联底物的某些可活化抗体显示出比具有丝氨酸蛋白酶和MMP底物的可活化抗体高的体内稳定性。

[0625] 表17:具有串联底物的可活化抗体的体内稳定性

可活化抗体	底物	底物 SEQ ID NO	%裂解
c225v5-3954-2001	ISSGLLSGRSDNH	23	36% (DNP)
c225v5-3954-4001	ALAHGLF	1	27%
c225v5-3954-4008	HVPRQV	8	18%
c225v5-3954-5001	LSGRSALAHGLF	25	54%
c225v5-3954-5002	ALAHGLFSGRSAN	26	70%
c225v5-3954-5003	HVPRQVLSGRS	27	55%
c225v5-3954-5004	HVPRQVLSGRSAN	28	65%
c225v5-3954-5005	TARGPALAHGLF	29	40%

[0627]

c225v5-3954-5006	TARGPVPRQV	30	36%
c225v5-3954-5007	APRSALAHGLF	31	37%
c225v5-3954-5008	ALAHGLFAPRSF	32	70%
c225v5-3954-5009	HVPRQVAPRSF	33	55%
c225v5-3954-5010	ALAHGLPTFVHL	34	12%
c225v5-3954-5011	GLPTFVHLPRQV	35	21%
c225v5-3954-5012	AANALAHGLF	36	24%
c225v5-3954-5013	GPTNALAHGLF	37	21%

[0628] 实施例12:抗EGFR可活化抗体的体内肿瘤组织活化

[0629] 本文提供的研究评估了人肿瘤裂解物对本公开的包含串联底物的可活化抗体的体外活化。

[0630] 在这些研究中,将人肿瘤组织(头颈癌或胰腺癌)与具有图9所示的底物的抗EGFR可活化抗体一起孵育。示例性结果显示,与具有串联底物2001(ISSGLLSGRSDNH;SEQ ID NO:23)或3001(AVGLLAPPGGLSGRSDNH;SEQ ID NO:24)的可活化抗体相比,具有5007底物(APRSALAHGLF;SEQ ID NO:31)的可活化抗体显示出更高水平的活化。

[0631] 在进一步的研究中,使用选自加拉丁(galardin)、EDTA、抑肽酶或西维来司(sivelestat)的类特异性蛋白酶抑制剂对头颈部肿瘤组织或胰腺肿瘤组织的具有本发明的5007串联底物(APRSALAHGLF;SEQ ID NO:31)的可活化抗体进行类似的活化研究。研究表明,广谱丝氨酸蛋白酶抑制剂抑肽酶将活化量降低至 $\leq 5\%$ 。相比之下,用其他三种抑制剂的治疗显示出与非抑制剂对照研究相当的活化水平。这些示例性结果表明,此活化不受MMP(加拉丁,EDTA)或中性粒细胞弹性蛋白酶(西维来司钠)抑制剂的抑制。

[0632] 其他实施方案

[0633] 虽然已结合本发明的详细描述描述了本发明,但是前述描述旨在说明而非限制由所附权利要求书的范围限定的本发明的范围。其他方面、优点和修改在以下的范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 西托姆克斯治疗公司(CYTOMX THERAPEUTICS, INC.)
- [0003] <120> 基质金属蛋白酶可裂解的和丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶可裂解的底物及其使用方法
- [0004] <130> CYTX-058-PCT
- [0005] <150> 62/776,409
- [0006] <151> 2018-12-06
- [0007] <150> 62/778,062
- [0008] <151> 2018-12-11
- [0009] <160> 490
- [0010] <170> PatentIn version 3.5
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 7
- [0013] <212> PRT
- [0014] <213> 合成(Synthetic)
- [0015] <400> 1
- [0016] Ala Leu Ala His Gly Leu Phe
- [0017] 1 5
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 7
- [0020] <212> PRT
- [0021] <213> 合成(Synthetic)
- [0022] <400> 2
- [0023] Asp Leu Ala His Pro Leu Leu
- [0024] 1 5
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 6
- [0027] <212> PRT
- [0028] <213> 合成(Synthetic)
- [0029] <400> 3
- [0030] Ala Phe Arg His Leu Arg
- [0031] 1 5
- [0032] <210> 4
- [0033] <211> 6
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> 合成(Synthetic)
- [0036] <400> 4
- [0037] Pro His Gly Phe Phe Gln

[0038]	1	5
[0039]	<210>	5
[0040]	<211>	6
[0041]	<212>	PRT
[0042]	<213>	合成 (Synthetic)
[0043]	<400>	5
[0044]	Ser Val His His Leu Ile	
[0045]	1	5
[0046]	<210>	6
[0047]	<211>	7
[0048]	<212>	PRT
[0049]	<213>	合成 (Synthetic)
[0050]	<400>	6
[0051]	Arg Gly Pro Lys Leu Tyr Trp	
[0052]	1	5
[0053]	<210>	7
[0054]	<211>	7
[0055]	<212>	PRT
[0056]	<213>	合成 (Synthetic)
[0057]	<400>	7
[0058]	Arg Phe Pro Tyr Gly Val Trp	
[0059]	1	5
[0060]	<210>	8
[0061]	<211>	6
[0062]	<212>	PRT
[0063]	<213>	合成 (Synthetic)
[0064]	<400>	8
[0065]	His Val Pro Arg Gln Val	
[0066]	1	5
[0067]	<210>	9
[0068]	<211>	6
[0069]	<212>	PRT
[0070]	<213>	合成 (Synthetic)
[0071]	<400>	9
[0072]	Ser Asn Pro Phe Lys Tyr	
[0073]	1	5
[0074]	<210>	10
[0075]	<211>	6
[0076]	<212>	PRT

[0077] <213> 合成 (Synthetic)
[0078] <400> 10
[0079] Arg Phe Pro Leu Lys Val
[0080] 1 5
[0081] <210> 11
[0082] <211> 6
[0083] <212> PRT
[0084] <213> 合成 (Synthetic)
[0085] <400> 11
[0086] Pro Phe His Leu Ser Arg
[0087] 1 5
[0088] <210> 12
[0089] <211> 6
[0090] <212> PRT
[0091] <213> 合成 (Synthetic)
[0092] <400> 12
[0093] Ser Thr Val Phe His Met
[0094] 1 5
[0095] <210> 13
[0096] <211> 6
[0097] <212> PRT
[0098] <213> 合成 (Synthetic)
[0099] <400> 13
[0100] Met Gly Pro Trp Phe Met
[0101] 1 5
[0102] <210> 14
[0103] <211> 6
[0104] <212> PRT
[0105] <213> 合成 (Synthetic)
[0106] <400> 14
[0107] Arg His Leu Ala Lys Leu
[0108] 1 5
[0109] <210> 15
[0110] <211> 7
[0111] <212> PRT
[0112] <213> 合成 (Synthetic)
[0113] <400> 15
[0114] Pro Leu Gly Val Arg Gly Lys
[0115] 1 5

[0116] <210> 16
[0117] <211> 8
[0118] <212> PRT
[0119] <213> 合成 (Synthetic)
[0120] <400> 16
[0121] Gln Asn Gln Ala Leu Arg Ile Ala
[0122] 1 5
[0123] <210> 17
[0124] <211> 8
[0125] <212> PRT
[0126] <213> 合成 (Synthetic)
[0127] <400> 17
[0128] Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Ser
[0129] 1 5
[0130] <210> 18
[0131] <211> 8
[0132] <212> PRT
[0133] <213> 合成 (Synthetic)
[0134] <400> 18
[0135] Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro
[0136] 1 5
[0137] <210> 19
[0138] <211> 8
[0139] <212> PRT
[0140] <213> 合成 (Synthetic)
[0141] <400> 19
[0142] Gly Pro Ser His Leu Val Leu Thr
[0143] 1 5
[0144] <210> 20
[0145] <211> 8
[0146] <212> PRT
[0147] <213> 合成 (Synthetic)
[0148] <400> 20
[0149] Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His
[0150] 1 5
[0151] <210> 21
[0152] <211> 13
[0153] <212> PRT
[0154] <213> 合成 (Synthetic)

[0155]	<400> 21
[0156]	Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro
[0157]	1 5 10
[0158]	<210> 22
[0159]	<211> 18
[0160]	<212> PRT
[0161]	<213> 合成(Synthetic)
[0162]	<400> 22
[0163]	Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp
[0164]	1 5 10 15
[0165]	Asn Pro
[0166]	<210> 23
[0167]	<211> 13
[0168]	<212> PRT
[0169]	<213> 合成(Synthetic)
[0170]	<400> 23
[0171]	Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His
[0172]	1 5 10
[0173]	<210> 24
[0174]	<211> 18
[0175]	<212> PRT
[0176]	<213> 合成(Synthetic)
[0177]	<400> 24
[0178]	Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp
[0179]	1 5 10 15
[0180]	Asn His
[0181]	<210> 25
[0182]	<211> 12
[0183]	<212> PRT
[0184]	<213> 合成(Synthetic)
[0185]	<400> 25
[0186]	Leu Ser Gly Arg Ser Ala Leu Ala His Gly Leu Phe
[0187]	1 5 10
[0188]	<210> 26
[0189]	<211> 13
[0190]	<212> PRT
[0191]	<213> 合成(Synthetic)
[0192]	<400> 26
[0193]	Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Ser Gly Arg Ser Ala Asn

[0194]	1	5	10
[0195]	<210> 27		
[0196]	<211> 11		
[0197]	<212> PRT		
[0198]	<213> 合成 (Synthetic)		
[0199]	<400> 27		
[0200]	His Val Pro Arg Gln Val Leu Ser Gly Arg Ser		
[0201]	1	5	10
[0202]	<210> 28		
[0203]	<211> 13		
[0204]	<212> PRT		
[0205]	<213> 合成 (Synthetic)		
[0206]	<400> 28		
[0207]	His Val Pro Arg Gln Val Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn		
[0208]	1	5	10
[0209]	<210> 29		
[0210]	<211> 12		
[0211]	<212> PRT		
[0212]	<213> 合成 (Synthetic)		
[0213]	<400> 29		
[0214]	Thr Ala Arg Gly Pro Ala Leu Ala His Gly Leu Phe		
[0215]	1	5	10
[0216]	<210> 30		
[0217]	<211> 10		
[0218]	<212> PRT		
[0219]	<213> 合成 (Synthetic)		
[0220]	<400> 30		
[0221]	Thr Ala Arg Gly Pro Val Pro Arg Gln Val		
[0222]	1	5	10
[0223]	<210> 31		
[0224]	<211> 11		
[0225]	<212> PRT		
[0226]	<213> 合成 (Synthetic)		
[0227]	<400> 31		
[0228]	Ala Pro Arg Ser Ala Leu Ala His Gly Leu Phe		
[0229]	1	5	10
[0230]	<210> 32		
[0231]	<211> 12		
[0232]	<212> PRT		

[0233]	<213>	合成 (Synthetic)
[0234]	<400>	32
[0235]	Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Ala Pro Arg Ser Phe	
[0236]	1	5 10
[0237]	<210>	33
[0238]	<211>	11
[0239]	<212>	PRT
[0240]	<213>	合成 (Synthetic)
[0241]	<400>	33
[0242]	His Val Pro Arg Gln Val Ala Pro Arg Ser Phe	
[0243]	1	5 10
[0244]	<210>	34
[0245]	<211>	12
[0246]	<212>	PRT
[0247]	<213>	合成 (Synthetic)
[0248]	<400>	34
[0249]	Ala Leu Ala His Gly Leu Pro Thr Phe Val His Leu	
[0250]	1	5 10
[0251]	<210>	35
[0252]	<211>	12
[0253]	<212>	PRT
[0254]	<213>	合成 (Synthetic)
[0255]	<400>	35
[0256]	Gly Leu Pro Thr Phe Val His Leu Pro Arg Gln Val	
[0257]	1	5 10
[0258]	<210>	36
[0259]	<211>	10
[0260]	<212>	PRT
[0261]	<213>	合成 (Synthetic)
[0262]	<400>	36
[0263]	Ala Ala Asn Ala Leu Ala His Gly Leu Phe	
[0264]	1	5 10
[0265]	<210>	37
[0266]	<211>	11
[0267]	<212>	PRT
[0268]	<213>	合成 (Synthetic)
[0269]	<400>	37
[0270]	Gly Pro Thr Asn Ala Leu Ala His Gly Leu Phe	
[0271]	1	5 10

[0272]	<210>	38
[0273]	<211>	12
[0274]	<212>	PRT
[0275]	<213>	合成(Synthetic)
[0276]	<400>	38
[0277]	Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asn Ile	
[0278]	1	5 10
[0279]	<210>	39
[0280]	<211>	17
[0281]	<212>	PRT
[0282]	<213>	合成(Synthetic)
[0283]	<400>	39
[0284]	Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asn	
[0285]	1	5 10 15
[0286]	Ile	
[0287]	<210>	40
[0288]	<211>	14
[0289]	<212>	PRT
[0290]	<213>	合成(Synthetic)
[0291]	<400>	40
[0292]	Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asn Ile Gly Ser	
[0293]	1	5 10
[0294]	<210>	41
[0295]	<211>	19
[0296]	<212>	PRT
[0297]	<213>	合成(Synthetic)
[0298]	<400>	41
[0299]	Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asn	
[0300]	1	5 10 15
[0301]	Ile Gly Ser	
[0302]	<210>	42
[0303]	<211>	13
[0304]	<212>	PRT
[0305]	<213>	合成(Synthetic)
[0306]	<400>	42
[0307]	Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asn Ile Gly	
[0308]	1	5 10
[0309]	<210>	43
[0310]	<211>	18

[0311]	<212>	PRT
[0312]	<213>	合成 (Synthetic)
[0313]	<400>	43
[0314]	Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asn	
[0315]	1	5 10 15
[0316]	Ile Gly	
[0317]	<210>	44
[0318]	<400>	44
[0319]	000	
[0320]	<210>	45
[0321]	<400>	45
[0322]	000	
[0323]	<210>	46
[0324]	<400>	46
[0325]	000	
[0326]	<210>	47
[0327]	<400>	47
[0328]	000	
[0329]	<210>	48
[0330]	<400>	48
[0331]	000	
[0332]	<210>	49
[0333]	<400>	49
[0334]	000	
[0335]	<210>	50
[0336]	<211>	6
[0337]	<212>	PRT
[0338]	<213>	合成 (Synthetic)
[0339]	<400>	50
[0340]	Leu Ala His Gly Leu Phe	
[0341]	1	5
[0342]	<210>	51
[0343]	<211>	5
[0344]	<212>	PRT
[0345]	<213>	合成 (Synthetic)
[0346]	<400>	51
[0347]	Ala His Gly Leu Phe	
[0348]	1	5
[0349]	<210>	52

[0350] <211> 6
[0351] <212> PRT
[0352] <213> 合成 (Synthetic)
[0353] <400> 52
[0354] Ala Leu Ala His Gly Leu
[0355] 1 5
[0356] <210> 53
[0357] <211> 5
[0358] <212> PRT
[0359] <213> 合成 (Synthetic)
[0360] <400> 53
[0361] Leu Ala His Gly Leu
[0362] 1 5
[0363] <210> 54
[0364] <211> 4
[0365] <212> PRT
[0366] <213> 合成 (Synthetic)
[0367] <400> 54
[0368] Ala His Gly Leu
[0369] 1
[0370] <210> 55
[0371] <211> 5
[0372] <212> PRT
[0373] <213> 合成 (Synthetic)
[0374] <400> 55
[0375] Ala Leu Ala His Gly
[0376] 1 5
[0377] <210> 56
[0378] <211> 4
[0379] <212> PRT
[0380] <213> 合成 (Synthetic)
[0381] <400> 56
[0382] Leu Ala His Gly
[0383] 1
[0384] <210> 57
[0385] <400> 57
[0386] 000
[0387] <210> 58
[0388] <400> 58

[0389]	000
[0390]	<210> 59
[0391]	<400> 59
[0392]	000
[0393]	<210> 60
[0394]	<211> 5
[0395]	<212> PRT
[0396]	<213> 合成 (Synthetic)
[0397]	<400> 60
[0398]	Val Pro Arg Gln Val
[0399]	1 5
[0400]	<210> 61
[0401]	<211> 4
[0402]	<212> PRT
[0403]	<213> 合成 (Synthetic)
[0404]	<400> 61
[0405]	Pro Arg Gln Val
[0406]	1
[0407]	<210> 62
[0408]	<211> 5
[0409]	<212> PRT
[0410]	<213> 合成 (Synthetic)
[0411]	<400> 62
[0412]	His Val Pro Arg Gln
[0413]	1 5
[0414]	<210> 63
[0415]	<211> 4
[0416]	<212> PRT
[0417]	<213> 合成 (Synthetic)
[0418]	<400> 63
[0419]	Val Pro Arg Gln
[0420]	1
[0421]	<210> 64
[0422]	<400> 64
[0423]	000
[0424]	<210> 65
[0425]	<400> 65
[0426]	000
[0427]	<210> 66

[0428] <400> 66
[0429] 000
[0430] <210> 67
[0431] <400> 67
[0432] 000
[0433] <210> 68
[0434] <400> 68
[0435] 000
[0436] <210> 69
[0437] <400> 69
[0438] 000
[0439] <210> 70
[0440] <211> 7
[0441] <212> PRT
[0442] <213> 合成 (Synthetic)
[0443] <400> 70
[0444] Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn
[0445] 1 5
[0446] <210> 71
[0447] <211> 6
[0448] <212> PRT
[0449] <213> 合成 (Synthetic)
[0450] <400> 71
[0451] Leu Ser Gly Arg Ser Asp
[0452] 1 5
[0453] <210> 72
[0454] <211> 5
[0455] <212> PRT
[0456] <213> 合成 (Synthetic)
[0457] <400> 72
[0458] Leu Ser Gly Arg Ser
[0459] 1 5
[0460] <210> 73
[0461] <211> 4
[0462] <212> PRT
[0463] <213> 合成 (Synthetic)
[0464] <400> 73
[0465] Leu Ser Gly Arg
[0466] 1

[0467] <210> 74
[0468] <211> 6
[0469] <212> PRT
[0470] <213> 合成 (Synthetic)
[0471] <400> 74
[0472] Ser Gly Arg Ser Asp Asn
[0473] 1 5
[0474] <210> 75
[0475] <211> 5
[0476] <212> PRT
[0477] <213> 合成 (Synthetic)
[0478] <400> 75
[0479] Ser Gly Arg Ser Asp
[0480] 1 5
[0481] <210> 76
[0482] <211> 4
[0483] <212> PRT
[0484] <213> 合成 (Synthetic)
[0485] <400> 76
[0486] Ser Gly Arg Ser
[0487] 1
[0488] <210> 77
[0489] <400> 77
[0490] 000
[0491] <210> 78
[0492] <211> 8
[0493] <212> PRT
[0494] <213> 合成 (Synthetic)
[0495] <400> 78
[0496] Leu Ser Gly Arg Ser Gly Asn His
[0497] 1 5
[0498] <210> 79
[0499] <211> 7
[0500] <212> PRT
[0501] <213> 合成 (Synthetic)
[0502] <400> 79
[0503] Leu Ser Gly Arg Ser Gly Asn
[0504] 1 5
[0505] <210> 80

[0506] <211> 6
[0507] <212> PRT
[0508] <213> 合成 (Synthetic)
[0509] <400> 80
[0510] Leu Ser Gly Arg Ser Gly
[0511] 1 5
[0512] <210> 81
[0513] <211> 7
[0514] <212> PRT
[0515] <213> 合成 (Synthetic)
[0516] <400> 81
[0517] Ser Gly Arg Ser Gly Asn His
[0518] 1 5
[0519] <210> 82
[0520] <211> 6
[0521] <212> PRT
[0522] <213> 合成 (Synthetic)
[0523] <400> 82
[0524] Ser Gly Arg Ser Gly Asn
[0525] 1 5
[0526] <210> 83
[0527] <211> 5
[0528] <212> PRT
[0529] <213> 合成 (Synthetic)
[0530] <400> 83
[0531] Ser Gly Arg Ser Gly
[0532] 1 5
[0533] <210> 84
[0534] <211> 8
[0535] <212> PRT
[0536] <213> 合成 (Synthetic)
[0537] <400> 84
[0538] Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Ile
[0539] 1 5
[0540] <210> 85
[0541] <211> 7
[0542] <212> PRT
[0543] <213> 合成 (Synthetic)
[0544] <400> 85

[0545] Ser Gly Arg Ser Asp Asn Ile
[0546] 1 5
[0547] <210> 86
[0548] <211> 8
[0549] <212> PRT
[0550] <213> 合成 (Synthetic)
[0551] <400> 86
[0552] Leu Ser Gly Arg Ser Asp Tyr His
[0553] 1 5
[0554] <210> 87
[0555] <211> 7
[0556] <212> PRT
[0557] <213> 合成 (Synthetic)
[0558] <400> 87
[0559] Leu Ser Gly Arg Ser Asp Tyr
[0560] 1 5
[0561] <210> 88
[0562] <211> 7
[0563] <212> PRT
[0564] <213> 合成 (Synthetic)
[0565] <400> 88
[0566] Ser Gly Arg Ser Asp Tyr His
[0567] 1 5
[0568] <210> 89
[0569] <211> 6
[0570] <212> PRT
[0571] <213> 合成 (Synthetic)
[0572] <400> 89
[0573] Ser Gly Arg Ser Asp Tyr
[0574] 1 5
[0575] <210> 90
[0576] <211> 8
[0577] <212> PRT
[0578] <213> 合成 (Synthetic)
[0579] <400> 90
[0580] Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro
[0581] 1 5
[0582] <210> 91
[0583] <211> 7

[0584] <212> PRT
[0585] <213> 合成 (Synthetic)
[0586] <400> 91
[0587] Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro
[0588] 1 5
[0589] <210> 92
[0590] <211> 8
[0591] <212> PRT
[0592] <213> 合成 (Synthetic)
[0593] <400> 92
[0594] Leu Ser Gly Arg Ser Asp Thr His
[0595] 1 5
[0596] <210> 93
[0597] <211> 7
[0598] <212> PRT
[0599] <213> 合成 (Synthetic)
[0600] <400> 93
[0601] Leu Ser Gly Arg Ser Asp Thr
[0602] 1 5
[0603] <210> 94
[0604] <211> 7
[0605] <212> PRT
[0606] <213> 合成 (Synthetic)
[0607] <400> 94
[0608] Ser Gly Arg Ser Asp Thr His
[0609] 1 5
[0610] <210> 95
[0611] <211> 6
[0612] <212> PRT
[0613] <213> 合成 (Synthetic)
[0614] <400> 95
[0615] Ser Gly Arg Ser Asp Thr
[0616] 1 5
[0617] <210> 96
[0618] <211> 8
[0619] <212> PRT
[0620] <213> 合成 (Synthetic)
[0621] <400> 96
[0622] Leu Ser Gly Arg Ser Asp Gln His

[0623]	1	5
[0624]	<210>	97
[0625]	<211>	7
[0626]	<212>	PRT
[0627]	<213>	合成 (Synthetic)
[0628]	<400>	97
[0629]	Leu Ser Gly Arg Ser Asp Gln	
[0630]	1	5
[0631]	<210>	98
[0632]	<211>	7
[0633]	<212>	PRT
[0634]	<213>	合成 (Synthetic)
[0635]	<400>	98
[0636]	Ser Gly Arg Ser Asp Gln His	
[0637]	1	5
[0638]	<210>	99
[0639]	<211>	6
[0640]	<212>	PRT
[0641]	<213>	合成 (Synthetic)
[0642]	<400>	99
[0643]	Ser Gly Arg Ser Asp Gln	
[0644]	1	5
[0645]	<210>	100
[0646]	<211>	8
[0647]	<212>	PRT
[0648]	<213>	合成 (Synthetic)
[0649]	<400>	100
[0650]	Leu Ser Gly Arg Ser Asp Ile His	
[0651]	1	5
[0652]	<210>	101
[0653]	<211>	7
[0654]	<212>	PRT
[0655]	<213>	合成 (Synthetic)
[0656]	<400>	101
[0657]	Leu Ser Gly Arg Ser Asp Ile	
[0658]	1	5
[0659]	<210>	102
[0660]	<211>	7
[0661]	<212>	PRT

[0662] <213> 合成 (Synthetic)
[0663] <400> 102
[0664] Ser Gly Arg Ser Asp Ile His
[0665] 1 5
[0666] <210> 103
[0667] <211> 6
[0668] <212> PRT
[0669] <213> 合成 (Synthetic)
[0670] <400> 103
[0671] Ser Gly Arg Ser Asp Ile
[0672] 1 5
[0673] <210> 104
[0674] <211> 8
[0675] <212> PRT
[0676] <213> 合成 (Synthetic)
[0677] <400> 104
[0678] Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asp His
[0679] 1 5
[0680] <210> 105
[0681] <211> 7
[0682] <212> PRT
[0683] <213> 合成 (Synthetic)
[0684] <400> 105
[0685] Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asp
[0686] 1 5
[0687] <210> 106
[0688] <211> 7
[0689] <212> PRT
[0690] <213> 合成 (Synthetic)
[0691] <400> 106
[0692] Ser Gly Arg Ser Asp Asp His
[0693] 1 5
[0694] <210> 107
[0695] <211> 6
[0696] <212> PRT
[0697] <213> 合成 (Synthetic)
[0698] <400> 107
[0699] Ser Gly Arg Ser Asp Asp
[0700] 1 5

[0701] <210> 108
[0702] <211> 8
[0703] <212> PRT
[0704] <213> 合成 (Synthetic)
[0705] <400> 108
[0706] Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Ile
[0707] 1 5
[0708] <210> 109
[0709] <211> 7
[0710] <212> PRT
[0711] <213> 合成 (Synthetic)
[0712] <400> 109
[0713] Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn
[0714] 1 5
[0715] <210> 110
[0716] <211> 6
[0717] <212> PRT
[0718] <213> 合成 (Synthetic)
[0719] <400> 110
[0720] Leu Ser Gly Arg Ser Ala
[0721] 1 5
[0722] <210> 111
[0723] <211> 7
[0724] <212> PRT
[0725] <213> 合成 (Synthetic)
[0726] <400> 111
[0727] Ser Gly Arg Ser Ala Asn Ile
[0728] 1 5
[0729] <210> 112
[0730] <211> 6
[0731] <212> PRT
[0732] <213> 合成 (Synthetic)
[0733] <400> 112
[0734] Ser Gly Arg Ser Ala Asn
[0735] 1 5
[0736] <210> 113
[0737] <211> 5
[0738] <212> PRT
[0739] <213> 合成 (Synthetic)

[0740] <400> 113
[0741] Ser Gly Arg Ser Ala
[0742] 1 5
[0743] <210> 114
[0744] <211> 8
[0745] <212> PRT
[0746] <213> 合成 (Synthetic)
[0747] <400> 114
[0748] Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro
[0749] 1 5
[0750] <210> 115
[0751] <211> 7
[0752] <212> PRT
[0753] <213> 合成 (Synthetic)
[0754] <400> 115
[0755] Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro
[0756] 1 5
[0757] <210> 116
[0758] <400> 116
[0759] 000
[0760] <210> 117
[0761] <400> 117
[0762] 000
[0763] <210> 118
[0764] <400> 118
[0765] 000
[0766] <210> 119
[0767] <400> 119
[0768] 000
[0769] <210> 120
[0770] <211> 8
[0771] <212> PRT
[0772] <213> 合成 (Synthetic)
[0773] <400> 120
[0774] Thr Ala Arg Gly Pro Ser Phe Lys
[0775] 1 5
[0776] <210> 121
[0777] <211> 7
[0778] <212> PRT

[0779] <213> 合成 (Synthetic)
[0780] <400> 121
[0781] Ala Arg Gly Pro Ser Phe Lys
[0782] 1 5
[0783] <210> 122
[0784] <211> 7
[0785] <212> PRT
[0786] <213> 合成 (Synthetic)
[0787] <400> 122
[0788] Thr Ala Arg Gly Pro Ser Phe
[0789] 1 5
[0790] <210> 123
[0791] <211> 6
[0792] <212> PRT
[0793] <213> 合成 (Synthetic)
[0794] <400> 123
[0795] Thr Ala Arg Gly Pro Ser
[0796] 1 5
[0797] <210> 124
[0798] <211> 5
[0799] <212> PRT
[0800] <213> 合成 (Synthetic)
[0801] <400> 124
[0802] Thr Ala Arg Gly Pro
[0803] 1 5
[0804] <210> 125
[0805] <211> 4
[0806] <212> PRT
[0807] <213> 合成 (Synthetic)
[0808] <400> 125
[0809] Thr Ala Arg Gly
[0810] 1
[0811] <210> 126
[0812] <211> 6
[0813] <212> PRT
[0814] <213> 合成 (Synthetic)
[0815] <400> 126
[0816] Ala Arg Gly Pro Ser Phe
[0817] 1 5

[0818] <210> 127
[0819] <211> 5
[0820] <212> PRT
[0821] <213> 合成 (Synthetic)
[0822] <400> 127
[0823] Ala Arg Gly Pro Ser
[0824] 1 5
[0825] <210> 128
[0826] <211> 4
[0827] <212> PRT
[0828] <213> 合成 (Synthetic)
[0829] <400> 128
[0830] Ala Arg Gly Pro
[0831] 1
[0832] <210> 129
[0833] <400> 129
[0834] 000
[0835] <210> 130
[0836] <211> 5
[0837] <212> PRT
[0838] <213> 合成 (Synthetic)
[0839] <400> 130
[0840] Ala Pro Arg Ser Phe
[0841] 1 5
[0842] <210> 131
[0843] <211> 4
[0844] <212> PRT
[0845] <213> 合成 (Synthetic)
[0846] <400> 131
[0847] Ala Pro Arg Ser
[0848] 1
[0849] <210> 132
[0850] <211> 4
[0851] <212> PRT
[0852] <213> 合成 (Synthetic)
[0853] <400> 132
[0854] Pro Arg Ser Phe
[0855] 1
[0856] <210> 133

[0857] <400> 133
[0858] 000
[0859] <210> 134
[0860] <400> 134
[0861] 000
[0862] <210> 135
[0863] <211> 8
[0864] <212> PRT
[0865] <213> 合成 (Synthetic)
[0866] <400> 135
[0867] Gly Leu Pro Thr Phe Val His Leu
[0868] 1 5
[0869] <210> 136
[0870] <211> 7
[0871] <212> PRT
[0872] <213> 合成 (Synthetic)
[0873] <400> 136
[0874] Gly Leu Pro Thr Phe Val His
[0875] 1 5
[0876] <210> 137
[0877] <211> 6
[0878] <212> PRT
[0879] <213> 合成 (Synthetic)
[0880] <400> 137
[0881] Gly Leu Pro Thr Phe Val
[0882] 1 5
[0883] <210> 138
[0884] <211> 7
[0885] <212> PRT
[0886] <213> 合成 (Synthetic)
[0887] <400> 138
[0888] Leu Pro Thr Phe Val His Leu
[0889] 1 5
[0890] <210> 139
[0891] <211> 6
[0892] <212> PRT
[0893] <213> 合成 (Synthetic)
[0894] <400> 139
[0895] Leu Pro Thr Phe Val His

[0896]	1	5
[0897]	<210>	140
[0898]	<211>	5
[0899]	<212>	PRT
[0900]	<213>	合成 (Synthetic)
[0901]	<400>	140
[0902]	Leu Pro Thr Phe Val	
[0903]	1	5
[0904]	<210>	141
[0905]	<211>	4
[0906]	<212>	PRT
[0907]	<213>	合成 (Synthetic)
[0908]	<400>	141
[0909]	Thr Phe Val His	
[0910]	1	
[0911]	<210>	142
[0912]	<400>	142
[0913]	000	
[0914]	<210>	143
[0915]	<400>	143
[0916]	000	
[0917]	<210>	144
[0918]	<400>	144
[0919]	000	
[0920]	<210>	145
[0921]	<400>	145
[0922]	000	
[0923]	<210>	146
[0924]	<400>	146
[0925]	000	
[0926]	<210>	147
[0927]	<400>	147
[0928]	000	
[0929]	<210>	148
[0930]	<400>	148
[0931]	000	
[0932]	<210>	149
[0933]	<400>	149
[0934]	000	

[0935]	<210>	150
[0936]	<400>	150
[0937]	000	
[0938]	<210>	151
[0939]	<400>	151
[0940]	000	
[0941]	<210>	152
[0942]	<211>	4
[0943]	<212>	PRT
[0944]	<213>	合成 (Synthetic)
[0945]	<400>	152
[0946]	Gly Pro Thr Asn	
[0947]	1	
[0948]	<210>	153
[0949]	<211>	6
[0950]	<212>	PRT
[0951]	<213>	合成 (Synthetic)
[0952]	<400>	153
[0953]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln	
[0954]	1	5
[0955]	<210>	154
[0956]	<211>	5
[0957]	<212>	PRT
[0958]	<213>	合成 (Synthetic)
[0959]	<400>	154
[0960]	Gly Gln Ser Gly Gln	
[0961]	1	5
[0962]	<210>	155
[0963]	<211>	4
[0964]	<212>	PRT
[0965]	<213>	合成 (Synthetic)
[0966]	<400>	155
[0967]	Gln Ser Gly Gln	
[0968]	1	
[0969]	<210>	156
[0970]	<400>	156
[0971]	000	
[0972]	<210>	157
[0973]	<400>	157

[0974]	000
[0975]	<210> 158
[0976]	<400> 158
[0977]	000
[0978]	<210> 159
[0979]	<400> 159
[0980]	000
[0981]	<210> 160
[0982]	<400> 160
[0983]	000
[0984]	<210> 161
[0985]	<400> 161
[0986]	000
[0987]	<210> 162
[0988]	<400> 162
[0989]	000
[0990]	<210> 163
[0991]	<400> 163
[0992]	000
[0993]	<210> 164
[0994]	<211> 15
[0995]	<212> PRT
[0996]	<213> 合成 (Synthetic)
[0997]	<400> 164
[0998]	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Asn Ala Val Ser Gly Leu Gly Ser
[0999]	1 5 10 15
[1000]	<210> 165
[1001]	<211> 6
[1002]	<212> PRT
[1003]	<213> 合成 (Synthetic)
[1004]	<400> 165
[1005]	Cys Ile Ser Pro Arg Gly
[1006]	1 5
[1007]	<210> 166
[1008]	<211> 7
[1009]	<212> PRT
[1010]	<213> 合成 (Synthetic)
[1011]	<400> 166
[1012]	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys

[1013]	1	5		
[1014]	<210>	167		
[1015]	<211>	8		
[1016]	<212>	PRT		
[1017]	<213>	合成 (Synthetic)		
[1018]	<400>	167		
[1019]	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Gly			
[1020]	1	5		
[1021]	<210>	168		
[1022]	<211>	15		
[1023]	<212>	PRT		
[1024]	<213>	合成 (Synthetic)		
[1025]	<400>	168		
[1026]	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly Pro Tyr Val Met Tyr			
[1027]	1	5	10	15
[1028]	<210>	169		
[1029]	<211>	14		
[1030]	<212>	PRT		
[1031]	<213>	合成 (Synthetic)		
[1032]	<400>	169		
[1033]	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly Pro Tyr Val Met			
[1034]	1	5	10	
[1035]	<210>	170		
[1036]	<211>	15		
[1037]	<212>	PRT		
[1038]	<213>	合成 (Synthetic)		
[1039]	<400>	170		
[1040]	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Glu Pro Gly Thr Tyr Val Pro Thr			
[1041]	1	5	10	15
[1042]	<210>	171		
[1043]	<211>	15		
[1044]	<212>	PRT		
[1045]	<213>	合成 (Synthetic)		
[1046]	<400>	171		
[1047]	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Gly Gln Ile Trp His Pro Pro			
[1048]	1	5	10	15
[1049]	<210>	172		
[1050]	<211>	15		
[1051]	<212>	PRT		

[1052]	<213> 合成 (Synthetic)
[1053]	<400> 172
[1054]	Gly Ser His Cys Leu Ile Pro Ile Asn Met Gly Ala Pro Ser Cys
[1055]	1 5 10 15
[1056]	<210> 173
[1057]	<211> 32
[1058]	<212> PRT
[1059]	<213> 合成 (Synthetic)
[1060]	<400> 173
[1061]	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Gly Gly Ser Ser Ala Ser Gln Ser Gly
[1062]	1 5 10 15
[1063]	Gln Gly Ser His Cys Leu Ile Pro Ile Asn Met Gly Ala Pro Ser Cys
[1064]	20 25 30
[1065]	<210> 174
[1066]	<211> 19
[1067]	<212> PRT
[1068]	<213> 合成 (Synthetic)
[1069]	<400> 174
[1070]	Cys Asn His His Tyr Phe Tyr Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
[1071]	1 5 10 15
[1072]	Cys Pro Gly
[1073]	<210> 175
[1074]	<211> 19
[1075]	<212> PRT
[1076]	<213> 合成 (Synthetic)
[1077]	<400> 175
[1078]	Ala Asp His Val Phe Trp Gly Ser Tyr Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
[1079]	1 5 10 15
[1080]	Cys Pro Gly
[1081]	<210> 176
[1082]	<211> 19
[1083]	<212> PRT
[1084]	<213> 合成 (Synthetic)
[1085]	<400> 176
[1086]	Cys His His Val Tyr Trp Gly His Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
[1087]	1 5 10 15
[1088]	Cys Pro Gly
[1089]	<210> 177
[1090]	<211> 19

[1091]	<212>	PRT																	
[1092]	<213>	合成 (Synthetic)																	
[1093]	<400>	177																	
[1094]	Cys	Pro	His	Phe	Thr	Thr	Thr	Ser	Cys	Gly	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly			
[1095]	1				5					10						15			
[1096]	Cys	Pro	Gly																
[1097]	<210>	178																	
[1098]	<211>	19																	
[1099]	<212>	PRT																	
[1100]	<213>	合成 (Synthetic)																	
[1101]	<400>	178																	
[1102]	Cys	Asn	His	His	Tyr	His	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly			
[1103]	1				5					10						15			
[1104]	Cys	Pro	Gly																
[1105]	<210>	179																	
[1106]	<211>	19																	
[1107]	<212>	PRT																	
[1108]	<213>	合成 (Synthetic)																	
[1109]	<400>	179																	
[1110]	Cys	Pro	His	Val	Ser	Phe	Gly	Ser	Cys	Gly	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly			
[1111]	1				5					10						15			
[1112]	Cys	Pro	Gly																
[1113]	<210>	180																	
[1114]	<211>	19																	
[1115]	<212>	PRT																	
[1116]	<213>	合成 (Synthetic)																	
[1117]	<400>	180																	
[1118]	Cys	Pro	Tyr	Tyr	Thr	Leu	Ser	Tyr	Cys	Gly	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly			
[1119]	1				5					10						15			
[1120]	Cys	Pro	Gly																
[1121]	<210>	181																	
[1122]	<211>	19																	
[1123]	<212>	PRT																	
[1124]	<213>	合成 (Synthetic)																	
[1125]	<400>	181																	
[1126]	Cys	Asn	His	Val	Tyr	Phe	Gly	Thr	Cys	Gly	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly			
[1127]	1				5					10						15			
[1128]	Cys	Pro	Gly																
[1129]	<210>	182																	

[1130]	<211>	19
[1131]	<212>	PRT
[1132]	<213>	合成(Synthetic)
[1133]	<400>	182
[1134]	Cys Asn His Phe Thr Leu Thr Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly	
[1135]	1	51015
[1136]	Cys Pro Gly	
[1137]	<210>	183
[1138]	<211>	19
[1139]	<212>	PRT
[1140]	<213>	合成(Synthetic)
[1141]	<400>	183
[1142]	Cys His His Phe Thr Leu Thr Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly	
[1143]	1	51015
[1144]	Cys Pro Gly	
[1145]	<210>	184
[1146]	<211>	18
[1147]	<212>	PRT
[1148]	<213>	合成(Synthetic)
[1149]	<400>	184
[1150]	Tyr Asn Pro Cys Ala Thr Pro Met Cys Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys	
[1151]	1	51015
[1152]	Pro Gly	
[1153]	<210>	185
[1154]	<211>	18
[1155]	<212>	PRT
[1156]	<213>	合成(Synthetic)
[1157]	<400>	185
[1158]	Cys Asn His His Tyr Phe Tyr Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly	
[1159]	1	51015
[1160]	Cys Gly	
[1161]	<210>	186
[1162]	<211>	18
[1163]	<212>	PRT
[1164]	<213>	合成(Synthetic)
[1165]	<400>	186
[1166]	Cys Asn His His Tyr His Tyr Tyr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly	
[1167]	1	51015
[1168]	Cys Gly	

[1169]	<210>	187																	
[1170]	<211>	18																	
[1171]	<212>	PRT																	
[1172]	<213>	合成 (Synthetic)																	
[1173]	<400>	187																	
[1174]	Cys Asn His Val Tyr Phe Gly Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly																		
[1175]	1	5	10	15															
[1176]	Cys Gly																		
[1177]	<210>	188																	
[1178]	<211>	18																	
[1179]	<212>	PRT																	
[1180]	<213>	合成 (Synthetic)																	
[1181]	<400>	188																	
[1182]	Cys His His Val Tyr Trp Gly His Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly																		
[1183]	1	5	10	15															
[1184]	Cys Gly																		
[1185]	<210>	189																	
[1186]	<211>	18																	
[1187]	<212>	PRT																	
[1188]	<213>	合成 (Synthetic)																	
[1189]	<400>	189																	
[1190]	Cys Pro His Phe Thr Thr Thr Ser Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly																		
[1191]	1	5	10	15															
[1192]	Cys Gly																		
[1193]	<210>	190																	
[1194]	<211>	18																	
[1195]	<212>	PRT																	
[1196]	<213>	合成 (Synthetic)																	
[1197]	<400>	190																	
[1198]	Cys Asn His Phe Thr Leu Thr Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly																		
[1199]	1	5	10	15															
[1200]	Cys Gly																		
[1201]	<210>	191																	
[1202]	<211>	18																	
[1203]	<212>	PRT																	
[1204]	<213>	合成 (Synthetic)																	
[1205]	<400>	191																	
[1206]	Cys His His Phe Thr Leu Thr Thr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly																		
[1207]	1	5	10	15															

[1208]	Cys Gly
[1209]	<210> 192
[1210]	<211> 18
[1211]	<212> PRT
[1212]	<213> 合成 (Synthetic)
[1213]	<400> 192
[1214]	Cys Pro Tyr Tyr Thr Leu Ser Tyr Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
[1215]	1 5 10 15
[1216]	Cys Gly
[1217]	<210> 193
[1218]	<211> 18
[1219]	<212> PRT
[1220]	<213> 合成 (Synthetic)
[1221]	<400> 193
[1222]	Cys Pro His Val Ser Phe Gly Ser Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
[1223]	1 5 10 15
[1224]	Cys Gly
[1225]	<210> 194
[1226]	<211> 18
[1227]	<212> PRT
[1228]	<213> 合成 (Synthetic)
[1229]	<400> 194
[1230]	Ala Asp His Val Phe Trp Gly Ser Tyr Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly
[1231]	1 5 10 15
[1232]	Cys Gly
[1233]	<210> 195
[1234]	<211> 17
[1235]	<212> PRT
[1236]	<213> 合成 (Synthetic)
[1237]	<400> 195
[1238]	Tyr Asn Pro Cys Ala Thr Pro Met Cys Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys
[1239]	1 5 10 15
[1240]	Gly
[1241]	<210> 196
[1242]	<211> 18
[1243]	<212> PRT
[1244]	<213> 合成 (Synthetic)
[1245]	<400> 196
[1246]	Cys His His Val Tyr Trp Gly His Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly

[1247]	1	5	10	15
[1248]	Cys Gly			
[1249]	<210> 197			
[1250]	<211> 18			
[1251]	<212> PRT			
[1252]	<213> 合成 (Synthetic)			
[1253]	<220>			
[1254]	<221> MISC_FEATURE			
[1255]	<222> (2) .. (2)			
[1256]	<223> Xaa=Asn或Pro			
[1257]	<220>			
[1258]	<221> MISC_FEATURE			
[1259]	<222> (4) .. (4)			
[1260]	<223> Xaa=His或Val或Phe			
[1261]	<220>			
[1262]	<221> MISC_FEATURE			
[1263]	<222> (5) .. (5)			
[1264]	<223> Xaa=Tyr或Thr			
[1265]	<220>			
[1266]	<221> MISC_FEATURE			
[1267]	<222> (6) .. (6)			
[1268]	<223> Xaa=Phe或Trp或Thr或Leu			
[1269]	<220>			
[1270]	<221> MISC_FEATURE			
[1271]	<222> (7) .. (7)			
[1272]	<223> Xaa=Tyr或Gly或Thr或Ser			
[1273]	<220>			
[1274]	<221> MISC_FEATURE			
[1275]	<222> (8) .. (8)			
[1276]	<223> Xaa=Thr或Ser或Tyr或His			
[1277]	<400> 197			
[1278]	Cys Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Gly Cys Ile Ser Pro Arg Gly			
[1279]	1	5	10	15
[1280]	Cys Gly			
[1281]	<210> 198			
[1282]	<211> 15			
[1283]	<212> PRT			
[1284]	<213> 合成 (Synthetic)			
[1285]	<400> 198			

[1286]	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Gly Gln Pro Ile Pro Ser Val Lys
[1287]	1 5 10 15
[1288]	<210> 199
[1289]	<211> 15
[1290]	<212> PRT
[1291]	<213> 合成(Synthetic)
[1292]	<400> 199
[1293]	Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Thr Gln Pro Tyr His Val Ser Arg
[1294]	1 5 10 15
[1295]	<210> 200
[1296]	<211> 5
[1297]	<212> PRT
[1298]	<213> 合成(Synthetic)
[1299]	<400> 200
[1300]	Gly Ser Gly Gly Ser
[1301]	1 5
[1302]	<210> 201
[1303]	<211> 4
[1304]	<212> PRT
[1305]	<213> 合成(Synthetic)
[1306]	<400> 201
[1307]	Gly Gly Gly Ser
[1308]	1
[1309]	<210> 202
[1310]	<211> 4
[1311]	<212> PRT
[1312]	<213> 合成(Synthetic)
[1313]	<400> 202
[1314]	Gly Gly Ser Gly
[1315]	1
[1316]	<210> 203
[1317]	<211> 5
[1318]	<212> PRT
[1319]	<213> 合成(Synthetic)
[1320]	<400> 203
[1321]	Gly Gly Ser Gly Gly
[1322]	1 5
[1323]	<210> 204
[1324]	<211> 5

- [1325] <212> PRT
[1326] <213> 合成 (Synthetic)
[1327] <400> 204
[1328] Gly Ser Gly Ser Gly
[1329] 1 5
[1330] <210> 205
[1331] <211> 5
[1332] <212> PRT
[1333] <213> 合成 (Synthetic)
[1334] <400> 205
[1335] Gly Ser Gly Gly Gly
[1336] 1 5
[1337] <210> 206
[1338] <211> 5
[1339] <212> PRT
[1340] <213> 合成 (Synthetic)
[1341] <400> 206
[1342] Gly Gly Gly Ser Gly
[1343] 1 5
[1344] <210> 207
[1345] <211> 5
[1346] <212> PRT
[1347] <213> 合成 (Synthetic)
[1348] <400> 207
[1349] Gly Ser Ser Ser Gly
[1350] 1 5
[1351] <210> 208
[1352] <211> 13
[1353] <212> PRT
[1354] <213> 合成 (Synthetic)
[1355] <400> 208
[1356] Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
[1357] 1 5 10
[1358] <210> 209
[1359] <211> 11
[1360] <212> PRT
[1361] <213> 合成 (Synthetic)
[1362] <400> 209
[1363] Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

[1364]	1	5	10
[1365]	<210> 210		
[1366]	<211> 12		
[1367]	<212> PRT		
[1368]	<213> 合成 (Synthetic)		
[1369]	<400> 210		
[1370]	Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser		
[1371]	1	5	10
[1372]	<210> 211		
[1373]	<211> 16		
[1374]	<212> PRT		
[1375]	<213> 合成 (Synthetic)		
[1376]	<400> 211		
[1377]	Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
[1378]	1	5	10 15
[1379]	<210> 212		
[1380]	<211> 10		
[1381]	<212> PRT		
[1382]	<213> 合成 (Synthetic)		
[1383]	<400> 212		
[1384]	Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly		
[1385]	1	5	10
[1386]	<210> 213		
[1387]	<211> 11		
[1388]	<212> PRT		
[1389]	<213> 合成 (Synthetic)		
[1390]	<400> 213		
[1391]	Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser		
[1392]	1	5	10
[1393]	<210> 214		
[1394]	<211> 8		
[1395]	<212> PRT		
[1396]	<213> 合成 (Synthetic)		
[1397]	<400> 214		
[1398]	Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser		
[1399]	1	5	
[1400]	<210> 215		
[1401]	<211> 4		
[1402]	<212> PRT		

[1403]	<213>	合成 (Synthetic)
[1404]	<400>	215
[1405]	Gly Gly Gly Ser	
[1406]	1	
[1407]	<210>	216
[1408]	<211>	5
[1409]	<212>	PRT
[1410]	<213>	合成 (Synthetic)
[1411]	<400>	216
[1412]	Gly Ser Ser Gly Thr	
[1413]	1	5
[1414]	<210>	217
[1415]	<211>	4
[1416]	<212>	PRT
[1417]	<213>	合成 (Synthetic)
[1418]	<400>	217
[1419]	Gly Ser Ser Gly	
[1420]	1	
[1421]	<210>	218
[1422]	<211>	6
[1423]	<212>	PRT
[1424]	<213>	合成 (Synthetic)
[1425]	<400>	218
[1426]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser	
[1427]	1	5
[1428]	<210>	219
[1429]	<400>	219
[1430]	000	
[1431]	<210>	220
[1432]	<211>	5
[1433]	<212>	PRT
[1434]	<213>	合成 (Synthetic)
[1435]	<400>	220
[1436]	Asn Tyr Gly Val His	
[1437]	1	5
[1438]	<210>	221
[1439]	<211>	16
[1440]	<212>	PRT
[1441]	<213>	合成 (Synthetic)

[1442]	<400> 221
[1443]	Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
[1444]	1 5 10 15
[1445]	<210> 222
[1446]	<211> 11
[1447]	<212> PRT
[1448]	<213> 合成 (Synthetic)
[1449]	<400> 222
[1450]	Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
[1451]	1 5 10
[1452]	<210> 223
[1453]	<211> 11
[1454]	<212> PRT
[1455]	<213> 合成 (Synthetic)
[1456]	<400> 223
[1457]	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
[1458]	1 5 10
[1459]	<210> 224
[1460]	<211> 8
[1461]	<212> PRT
[1462]	<213> 合成 (Synthetic)
[1463]	<400> 224
[1464]	Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
[1465]	1 5
[1466]	<210> 225
[1467]	<211> 9
[1468]	<212> PRT
[1469]	<213> 合成 (Synthetic)
[1470]	<400> 225
[1471]	Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
[1472]	1 5
[1473]	<210> 226
[1474]	<211> 16
[1475]	<212> PRT
[1476]	<213> 合成 (Synthetic)
[1477]	<400> 226
[1478]	Leu Ser Gly Arg Ser Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Gly Ser
[1479]	1 5 10 15
[1480]	<210> 227

[1481]	<211> 17
[1482]	<212> PRT
[1483]	<213> 合成 (Synthetic)
[1484]	<400> 227
[1485]	Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Ser Gly Arg Ser Ala Asn Gly Gly Gly
[1486]	1 5 10 15
[1487]	Ser
[1488]	<210> 228
[1489]	<211> 15
[1490]	<212> PRT
[1491]	<213> 合成 (Synthetic)
[1492]	<400> 228
[1493]	His Val Pro Arg Gln Val Leu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Ser
[1494]	1 5 10 15
[1495]	<210> 229
[1496]	<211> 17
[1497]	<212> PRT
[1498]	<213> 合成 (Synthetic)
[1499]	<400> 229
[1500]	His Val Pro Arg Gln Val Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Gly Gly Gly
[1501]	1 5 10 15
[1502]	Ser
[1503]	<210> 230
[1504]	<211> 16
[1505]	<212> PRT
[1506]	<213> 合成 (Synthetic)
[1507]	<400> 230
[1508]	Thr Ala Arg Gly Pro Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Gly Ser
[1509]	1 5 10 15
[1510]	<210> 231
[1511]	<211> 14
[1512]	<212> PRT
[1513]	<213> 合成 (Synthetic)
[1514]	<400> 231
[1515]	Thr Ala Arg Gly Pro Val Pro Arg Gln Val Gly Gly Gly Ser
[1516]	1 5 10
[1517]	<210> 232
[1518]	<211> 15
[1519]	<212> PRT

[1520]	<213> 合成 (Synthetic)
[1521]	<400> 232
[1522]	Ala Pro Arg Ser Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Gly Ser
[1523]	1 5 10 15
[1524]	<210> 233
[1525]	<211> 16
[1526]	<212> PRT
[1527]	<213> 合成 (Synthetic)
[1528]	<400> 233
[1529]	Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Ala Pro Arg Ser Phe Gly Gly Gly Ser
[1530]	1 5 10 15
[1531]	<210> 234
[1532]	<211> 15
[1533]	<212> PRT
[1534]	<213> 合成 (Synthetic)
[1535]	<400> 234
[1536]	His Val Pro Arg Gln Val Ala Pro Arg Ser Phe Gly Gly Gly Ser
[1537]	1 5 10 15
[1538]	<210> 235
[1539]	<211> 16
[1540]	<212> PRT
[1541]	<213> 合成 (Synthetic)
[1542]	<400> 235
[1543]	Ala Leu Ala His Gly Leu Pro Thr Phe Val His Leu Gly Gly Gly Ser
[1544]	1 5 10 15
[1545]	<210> 236
[1546]	<211> 16
[1547]	<212> PRT
[1548]	<213> 合成 (Synthetic)
[1549]	<400> 236
[1550]	Gly Leu Pro Thr Phe Val His Leu Pro Arg Gln Val Gly Gly Gly Ser
[1551]	1 5 10 15
[1552]	<210> 237
[1553]	<211> 14
[1554]	<212> PRT
[1555]	<213> 合成 (Synthetic)
[1556]	<400> 237
[1557]	Ala Ala Asn Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Gly Ser
[1558]	1 5 10

[1559]	<210>	238
[1560]	<211>	15
[1561]	<212>	PRT
[1562]	<213>	合成(Synthetic)
[1563]	<400>	238
[1564]	Gly Pro Thr Asn Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Gly Ser	
[1565]	1	5 10 15
[1566]	<210>	239
[1567]	<211>	16
[1568]	<212>	PRT
[1569]	<213>	合成(Synthetic)
[1570]	<400>	239
[1571]	Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asn Ile Gly Gly Gly Ser	
[1572]	1	5 10 15
[1573]	<210>	240
[1574]	<211>	21
[1575]	<212>	PRT
[1576]	<213>	合成(Synthetic)
[1577]	<400>	240
[1578]	Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asn	
[1579]	1	5 10 15
[1580]	Ile Gly Gly Gly Ser	
[1581]		20
[1582]	<210>	241
[1583]	<211>	15
[1584]	<212>	PRT
[1585]	<213>	合成(Synthetic)
[1586]	<400>	241
[1587]	Leu Ser Gly Arg Ser Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Ser	
[1588]	1	5 10 15
[1589]	<210>	242
[1590]	<211>	16
[1591]	<212>	PRT
[1592]	<213>	合成(Synthetic)
[1593]	<400>	242
[1594]	Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Ser Gly Arg Ser Ala Asn Gly Gly Ser	
[1595]	1	5 10 15
[1596]	<210>	243
[1597]	<211>	14

[1598]	<212>	PRT
[1599]	<213>	合成(Synthetic)
[1600]	<400>	243
[1601]	His Val Pro Arg Gln Val Leu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Ser	
[1602]	1	5 10
[1603]	<210>	244
[1604]	<211>	16
[1605]	<212>	PRT
[1606]	<213>	合成(Synthetic)
[1607]	<400>	244
[1608]	His Val Pro Arg Gln Val Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Gly Gly Ser	
[1609]	1	5 10 15
[1610]	<210>	245
[1611]	<211>	15
[1612]	<212>	PRT
[1613]	<213>	合成(Synthetic)
[1614]	<400>	245
[1615]	Thr Ala Arg Gly Pro Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Ser	
[1616]	1	5 10 15
[1617]	<210>	246
[1618]	<211>	13
[1619]	<212>	PRT
[1620]	<213>	合成(Synthetic)
[1621]	<400>	246
[1622]	Thr Ala Arg Gly Pro Val Pro Arg Gln Val Gly Gly Ser	
[1623]	1	5 10
[1624]	<210>	247
[1625]	<211>	14
[1626]	<212>	PRT
[1627]	<213>	合成(Synthetic)
[1628]	<400>	247
[1629]	Ala Pro Arg Ser Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Ser	
[1630]	1	5 10
[1631]	<210>	248
[1632]	<211>	15
[1633]	<212>	PRT
[1634]	<213>	合成(Synthetic)
[1635]	<400>	248
[1636]	Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Ala Pro Arg Ser Phe Gly Gly Ser	

[1637]	1	5	10	15
[1638]	<210> 249			
[1639]	<211> 14			
[1640]	<212> PRT			
[1641]	<213> 合成 (Synthetic)			
[1642]	<400> 249			
[1643]	His Val Pro Arg Gln Val Ala Pro Arg Ser Phe Gly Gly Ser			
[1644]	1	5	10	
[1645]	<210> 250			
[1646]	<211> 15			
[1647]	<212> PRT			
[1648]	<213> 合成 (Synthetic)			
[1649]	<400> 250			
[1650]	Ala Leu Ala His Gly Leu Pro Thr Phe Val His Leu Gly Gly Ser			
[1651]	1	5	10	15
[1652]	<210> 251			
[1653]	<211> 15			
[1654]	<212> PRT			
[1655]	<213> 合成 (Synthetic)			
[1656]	<400> 251			
[1657]	Gly Leu Pro Thr Phe Val His Leu Pro Arg Gln Val Gly Gly Ser			
[1658]	1	5	10	15
[1659]	<210> 252			
[1660]	<211> 13			
[1661]	<212> PRT			
[1662]	<213> 合成 (Synthetic)			
[1663]	<400> 252			
[1664]	Ala Ala Asn Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Ser			
[1665]	1	5	10	
[1666]	<210> 253			
[1667]	<211> 14			
[1668]	<212> PRT			
[1669]	<213> 合成 (Synthetic)			
[1670]	<400> 253			
[1671]	Gly Pro Thr Asn Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Ser			
[1672]	1	5	10	
[1673]	<210> 254			
[1674]	<211> 15			
[1675]	<212> PRT			

[1676]	<213>	合成 (Synthetic)
[1677]	<400>	254
[1678]	Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asn Ile Gly Gly Ser	
[1679]	1	5 10 15
[1680]	<210>	255
[1681]	<211>	20
[1682]	<212>	PRT
[1683]	<213>	合成 (Synthetic)
[1684]	<400>	255
[1685]	Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asn	
[1686]	1	5 10 15
[1687]	Ile Gly Gly Ser	
[1688]		20
[1689]	<210>	256
[1690]	<400>	256
[1691]	000	
[1692]	<210>	257
[1693]	<400>	257
[1694]	000	
[1695]	<210>	258
[1696]	<400>	258
[1697]	000	
[1698]	<210>	259
[1699]	<400>	259
[1700]	000	
[1701]	<210>	260
[1702]	<400>	260
[1703]	000	
[1704]	<210>	261
[1705]	<400>	261
[1706]	000	
[1707]	<210>	262
[1708]	<400>	262
[1709]	000	
[1710]	<210>	263
[1711]	<400>	263
[1712]	000	
[1713]	<210>	264
[1714]	<400>	264

[1715]	000
[1716]	<210> 265
[1717]	<400> 265
[1718]	000
[1719]	<210> 266
[1720]	<400> 266
[1721]	000
[1722]	<210> 267
[1723]	<400> 267
[1724]	000
[1725]	<210> 268
[1726]	<400> 268
[1727]	000
[1728]	<210> 269
[1729]	<400> 269
[1730]	000
[1731]	<210> 270
[1732]	<400> 270
[1733]	000
[1734]	<210> 271
[1735]	<400> 271
[1736]	000
[1737]	<210> 272
[1738]	<400> 272
[1739]	000
[1740]	<210> 273
[1741]	<400> 273
[1742]	000
[1743]	<210> 274
[1744]	<400> 274
[1745]	000
[1746]	<210> 275
[1747]	<400> 275
[1748]	000
[1749]	<210> 276
[1750]	<400> 276
[1751]	000
[1752]	<210> 277
[1753]	<400> 277

[1754]	000
[1755]	<210> 278
[1756]	<400> 278
[1757]	000
[1758]	<210> 279
[1759]	<400> 279
[1760]	000
[1761]	<210> 280
[1762]	<400> 280
[1763]	000
[1764]	<210> 281
[1765]	<400> 281
[1766]	000
[1767]	<210> 282
[1768]	<400> 282
[1769]	000
[1770]	<210> 283
[1771]	<400> 283
[1772]	000
[1773]	<210> 284
[1774]	<400> 284
[1775]	000
[1776]	<210> 285
[1777]	<400> 285
[1778]	000
[1779]	<210> 286
[1780]	<400> 286
[1781]	000
[1782]	<210> 287
[1783]	<400> 287
[1784]	000
[1785]	<210> 288
[1786]	<400> 288
[1787]	000
[1788]	<210> 289
[1789]	<400> 289
[1790]	000
[1791]	<210> 290
[1792]	<400> 290

[1793]	000
[1794]	<210> 291
[1795]	<400> 291
[1796]	000
[1797]	<210> 292
[1798]	<400> 292
[1799]	000
[1800]	<210> 293
[1801]	<400> 293
[1802]	000
[1803]	<210> 294
[1804]	<400> 294
[1805]	000
[1806]	<210> 295
[1807]	<400> 295
[1808]	000
[1809]	<210> 296
[1810]	<400> 296
[1811]	000
[1812]	<210> 297
[1813]	<400> 297
[1814]	000
[1815]	<210> 298
[1816]	<400> 298
[1817]	000
[1818]	<210> 299
[1819]	<400> 299
[1820]	000
[1821]	<210> 300
[1822]	<400> 300
[1823]	000
[1824]	<210> 301
[1825]	<400> 301
[1826]	000
[1827]	<210> 302
[1828]	<400> 302
[1829]	000
[1830]	<210> 303
[1831]	<400> 303

[1832]	000
[1833]	<210> 304
[1834]	<400> 304
[1835]	000
[1836]	<210> 305
[1837]	<400> 305
[1838]	000
[1839]	<210> 306
[1840]	<400> 306
[1841]	000
[1842]	<210> 307
[1843]	<400> 307
[1844]	000
[1845]	<210> 308
[1846]	<400> 308
[1847]	000
[1848]	<210> 309
[1849]	<400> 309
[1850]	000
[1851]	<210> 310
[1852]	<400> 310
[1853]	000
[1854]	<210> 311
[1855]	<400> 311
[1856]	000
[1857]	<210> 312
[1858]	<400> 312
[1859]	000
[1860]	<210> 313
[1861]	<400> 313
[1862]	000
[1863]	<210> 314
[1864]	<400> 314
[1865]	000
[1866]	<210> 315
[1867]	<400> 315
[1868]	000
[1869]	<210> 316
[1870]	<400> 316

[1871]	000
[1872]	<210> 317
[1873]	<400> 317
[1874]	000
[1875]	<210> 318
[1876]	<400> 318
[1877]	000
[1878]	<210> 319
[1879]	<211> 8
[1880]	<212> PRT
[1881]	<213> 合成 (Synthetic)
[1882]	<400> 319
[1883]	Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly
[1884]	1 5
[1885]	<210> 320
[1886]	<211> 8
[1887]	<212> PRT
[1888]	<213> 合成 (Synthetic)
[1889]	<400> 320
[1890]	Pro Arg Phe Arg Ile Ile Gly Gly
[1891]	1 5
[1892]	<210> 321
[1893]	<211> 9
[1894]	<212> PRT
[1895]	<213> 合成 (Synthetic)
[1896]	<400> 321
[1897]	Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp
[1898]	1 5
[1899]	<210> 322
[1900]	<211> 14
[1901]	<212> PRT
[1902]	<213> 合成 (Synthetic)
[1903]	<400> 322
[1904]	Arg Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu
[1905]	1 5 10
[1906]	<210> 323
[1907]	<211> 15
[1908]	<212> PRT
[1909]	<213> 合成 (Synthetic)

[1910]	<400> 323
[1911]	Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Lys Gly Asp Asp Ala
[1912]	1 5 10 15
[1913]	<210> 324
[1914]	<211> 15
[1915]	<212> PRT
[1916]	<213> 合成 (Synthetic)
[1917]	<400> 324
[1918]	Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Arg Gly Asp Asp Ala
[1919]	1 5 10 15
[1920]	<210> 325
[1921]	<211> 4
[1922]	<212> PRT
[1923]	<213> 合成 (Synthetic)
[1924]	<400> 325
[1925]	Ile Glu Gly Arg
[1926]	1
[1927]	<210> 326
[1928]	<211> 4
[1929]	<212> PRT
[1930]	<213> 合成 (Synthetic)
[1931]	<400> 326
[1932]	Ile Asp Gly Arg
[1933]	1
[1934]	<210> 327
[1935]	<211> 7
[1936]	<212> PRT
[1937]	<213> 合成 (Synthetic)
[1938]	<400> 327
[1939]	Gly Gly Ser Ile Asp Gly Arg
[1940]	1 5
[1941]	<210> 328
[1942]	<211> 6
[1943]	<212> PRT
[1944]	<213> 合成 (Synthetic)
[1945]	<400> 328
[1946]	Pro Leu Gly Leu Trp Ala
[1947]	1 5
[1948]	<210> 329

[1949]	<211> 8
[1950]	<212> PRT
[1951]	<213> 合成 (Synthetic)
[1952]	<400> 329
[1953]	Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln
[1954]	1 5
[1955]	<210> 330
[1956]	<211> 8
[1957]	<212> PRT
[1958]	<213> 合成 (Synthetic)
[1959]	<400> 330
[1960]	Gly Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala
[1961]	1 5
[1962]	<210> 331
[1963]	<211> 5
[1964]	<212> PRT
[1965]	<213> 合成 (Synthetic)
[1966]	<400> 331
[1967]	Gly Ile Ala Gly Gln
[1968]	1 5
[1969]	<210> 332
[1970]	<211> 8
[1971]	<212> PRT
[1972]	<213> 合成 (Synthetic)
[1973]	<400> 332
[1974]	Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Ile
[1975]	1 5
[1976]	<210> 333
[1977]	<211> 8
[1978]	<212> PRT
[1979]	<213> 合成 (Synthetic)
[1980]	<400> 333
[1981]	Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly
[1982]	1 5
[1983]	<210> 334
[1984]	<211> 8
[1985]	<212> PRT
[1986]	<213> 合成 (Synthetic)
[1987]	<400> 334

[1988]	Tyr Gly Ala Gly Leu Gly Val Val
[1989]	1 5
[1990]	<210> 335
[1991]	<211> 8
[1992]	<212> PRT
[1993]	<213> 合成 (Synthetic)
[1994]	<400> 335
[1995]	Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Arg
[1996]	1 5
[1997]	<210> 336
[1998]	<211> 8
[1999]	<212> PRT
[2000]	<213> 合成 (Synthetic)
[2001]	<400> 336
[2002]	Ala Gly Leu Gly Ile Ser Ser Thr
[2003]	1 5
[2004]	<210> 337
[2005]	<211> 8
[2006]	<212> PRT
[2007]	<213> 合成 (Synthetic)
[2008]	<400> 337
[2009]	Glu Pro Gln Ala Leu Ala Met Ser
[2010]	1 5
[2011]	<210> 338
[2012]	<211> 8
[2013]	<212> PRT
[2014]	<213> 合成 (Synthetic)
[2015]	<400> 338
[2016]	Gln Ala Leu Ala Met Ser Ala Ile
[2017]	1 5
[2018]	<210> 339
[2019]	<211> 8
[2020]	<212> PRT
[2021]	<213> 合成 (Synthetic)
[2022]	<400> 339
[2023]	Ala Ala Tyr His Leu Val Ser Gln
[2024]	1 5
[2025]	<210> 340
[2026]	<211> 8

[2027] <212> PRT
[2028] <213> 合成 (Synthetic)
[2029] <400> 340
[2030] Met Asp Ala Phe Leu Glu Ser Ser
[2031] 1 5
[2032] <210> 341
[2033] <211> 8
[2034] <212> PRT
[2035] <213> 合成 (Synthetic)
[2036] <400> 341
[2037] Glu Ser Leu Pro Val Val Ala Val
[2038] 1 5
[2039] <210> 342
[2040] <211> 8
[2041] <212> PRT
[2042] <213> 合成 (Synthetic)
[2043] <400> 342
[2044] Ser Ala Pro Ala Val Glu Ser Glu
[2045] 1 5
[2046] <210> 343
[2047] <211> 8
[2048] <212> PRT
[2049] <213> 合成 (Synthetic)
[2050] <400> 343
[2051] Asp Val Ala Gln Phe Val Leu Thr
[2052] 1 5
[2053] <210> 344
[2054] <211> 8
[2055] <212> PRT
[2056] <213> 合成 (Synthetic)
[2057] <400> 344
[2058] Val Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu
[2059] 1 5
[2060] <210> 345
[2061] <211> 8
[2062] <212> PRT
[2063] <213> 合成 (Synthetic)
[2064] <400> 345
[2065] Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu Gly

[2105]	Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
[2106]	210 215 220
[2107]	Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
[2108]	225 230 235 240
[2109]	Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Ser Leu Tyr Trp
[2110]	245 250 255
[2111]	Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
[2112]	260 265 270
[2113]	Ser
[2114]	<210> 348
[2115]	<400> 348
[2116]	000
[2117]	<210> 349
[2118]	<211> 264
[2119]	<212> PRT
[2120]	<213> 合成(Synthetic)
[2121]	<400> 349
[2122]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
[2123]	1 5 10 15
[2124]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
[2125]	20 25 30
[2126]	Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
[2127]	35 40 45
[2128]	Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
[2129]	50 55 60
[2130]	Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
[2131]	65 70 75 80
[2132]	Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
[2133]	85 90 95
[2134]	Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
[2135]	100 105 110
[2136]	Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys
[2137]	115 120 125
[2138]	Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
[2139]	130 135 140
[2140]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val
[2141]	145 150 155 160
[2142]	Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
[2143]	165 170 175

[2144]	Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
[2145]	180 185 190
[2146]	Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
[2147]	195 200 205
[2148]	Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly
[2149]	210 215 220
[2150]	Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala
[2151]	225 230 235 240
[2152]	Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser
[2153]	245 250 255
[2154]	Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
[2155]	260
[2156]	<210> 350
[2157]	<400> 350
[2158]	000
[2159]	<210> 351
[2160]	<400> 351
[2161]	000
[2162]	<210> 352
[2163]	<400> 352
[2164]	000
[2165]	<210> 353
[2166]	<400> 353
[2167]	000
[2168]	<210> 354
[2169]	<400> 354
[2170]	000
[2171]	<210> 355
[2172]	<400> 355
[2173]	000
[2174]	<210> 356
[2175]	<400> 356
[2176]	000
[2177]	<210> 357
[2178]	<400> 357
[2179]	000
[2180]	<210> 358
[2181]	<400> 358
[2182]	000

[2183]	<210>	359
[2184]	<400>	359
[2185]	000	
[2186]	<210>	360
[2187]	<400>	360
[2188]	000	
[2189]	<210>	361
[2190]	<400>	361
[2191]	000	
[2192]	<210>	362
[2193]	<400>	362
[2194]	000	
[2195]	<210>	363
[2196]	<400>	363
[2197]	000	
[2198]	<210>	364
[2199]	<400>	364
[2200]	000	
[2201]	<210>	365
[2202]	<400>	365
[2203]	000	
[2204]	<210>	366
[2205]	<400>	366
[2206]	000	
[2207]	<210>	367
[2208]	<400>	367
[2209]	000	
[2210]	<210>	368
[2211]	<400>	368
[2212]	000	
[2213]	<210>	369
[2214]	<400>	369
[2215]	000	
[2216]	<210>	370
[2217]	<400>	370
[2218]	000	
[2219]	<210>	371
[2220]	<400>	371
[2221]	000	

[2222]	<210>	372
[2223]	<400>	372
[2224]	000	
[2225]	<210>	373
[2226]	<400>	373
[2227]	000	
[2228]	<210>	374
[2229]	<400>	374
[2230]	000	
[2231]	<210>	375
[2232]	<400>	375
[2233]	000	
[2234]	<210>	376
[2235]	<400>	376
[2236]	000	
[2237]	<210>	377
[2238]	<400>	377
[2239]	000	
[2240]	<210>	378
[2241]	<400>	378
[2242]	000	
[2243]	<210>	379
[2244]	<400>	379
[2245]	000	
[2246]	<210>	380
[2247]	<400>	380
[2248]	000	
[2249]	<210>	381
[2250]	<211>	5
[2251]	<212>	PRT
[2252]	<213>	合成 (Synthetic)
[2253]	<400>	381
[2254]	Gly Ser Gly Gly Ser	
[2255]	1	5
[2256]	<210>	382
[2257]	<211>	4
[2258]	<212>	PRT
[2259]	<213>	合成 (Synthetic)
[2260]	<400>	382

[2261] Gly Gly Gly Ser
[2262] 1
[2263] <210> 383
[2264] <211> 4
[2265] <212> PRT
[2266] <213> 合成 (Synthetic)
[2267] <400> 383
[2268] Gly Gly Ser Gly
[2269] 1
[2270] <210> 384
[2271] <211> 5
[2272] <212> PRT
[2273] <213> 合成 (Synthetic)
[2274] <400> 384
[2275] Gly Gly Ser Gly Gly
[2276] 1 5
[2277] <210> 385
[2278] <211> 5
[2279] <212> PRT
[2280] <213> 合成 (Synthetic)
[2281] <400> 385
[2282] Gly Ser Gly Ser Gly
[2283] 1 5
[2284] <210> 386
[2285] <211> 5
[2286] <212> PRT
[2287] <213> 合成 (Synthetic)
[2288] <400> 386
[2289] Gly Ser Gly Gly Gly
[2290] 1 5
[2291] <210> 387
[2292] <211> 5
[2293] <212> PRT
[2294] <213> 合成 (Synthetic)
[2295] <400> 387
[2296] Gly Gly Gly Ser Gly
[2297] 1 5
[2298] <210> 388
[2299] <211> 5

[2300]	<212>	PRT
[2301]	<213>	合成 (Synthetic)
[2302]	<400>	388
[2303]	Gly Ser Ser Ser Gly	
[2304]	1	5
[2305]	<210>	389
[2306]	<400>	389
[2307]	000	
[2308]	<210>	390
[2309]	<400>	390
[2310]	000	
[2311]	<210>	391
[2312]	<400>	391
[2313]	000	
[2314]	<210>	392
[2315]	<400>	392
[2316]	000	
[2317]	<210>	393
[2318]	<400>	393
[2319]	000	
[2320]	<210>	394
[2321]	<400>	394
[2322]	000	
[2323]	<210>	395
[2324]	<400>	395
[2325]	000	
[2326]	<210>	396
[2327]	<400>	396
[2328]	000	
[2329]	<210>	397
[2330]	<400>	397
[2331]	000	
[2332]	<210>	398
[2333]	<400>	398
[2334]	000	
[2335]	<210>	399
[2336]	<211>	214
[2337]	<212>	PRT
[2338]	<213>	合成 (Synthetic)

[2339]	<400>	399
[2340]	Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly	
[2341]	1	5 10 15
[2342]	Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn	
[2343]	20	25 30
[2344]	Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile	
[2345]	35	40 45
[2346]	Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[2347]	50	55 60
[2348]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser	
[2349]	65	70 75 80
[2350]	Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr	
[2351]	85	90 95
[2352]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala	
[2353]	100	105 110
[2354]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
[2355]	115	120 125
[2356]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
[2357]	130	135 140
[2358]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
[2359]	145	150 155 160
[2360]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
[2361]	165	170 175
[2362]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
[2363]	180	185 190
[2364]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
[2365]	195	200 205
[2366]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
[2367]	210	
[2368]	<210>	400
[2369]	<211>	449
[2370]	<212>	PRT
[2371]	<213>	合成 (Synthetic)
[2372]	<400>	400
[2373]	Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln	
[2374]	1	5 10 15
[2375]	Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr	
[2376]	20	25 30
[2377]	Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	

[2378]	35	40	45
[2379]	Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr		
[2380]	50	55	60
[2381]	Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe		
[2382]	65	70	75
[2383]	Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Gln Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala		
[2384]	85	90	95
[2385]	Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly		
[2386]	100	105	110
[2387]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
[2388]	115	120	125
[2389]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
[2390]	130	135	140
[2391]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
[2392]	145	150	155
[2393]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
[2394]	165	170	175
[2395]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
[2396]	180	185	190
[2397]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
[2398]	195	200	205
[2399]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
[2400]	210	215	220
[2401]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
[2402]	225	230	235
[2403]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
[2404]	245	250	255
[2405]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
[2406]	260	265	270
[2407]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
[2408]	275	280	285
[2409]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
[2410]	290	295	300
[2411]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
[2412]	305	310	315
[2413]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
[2414]	325	330	335
[2415]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
[2416]	340	345	350

[2417]	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
[2418]				355					360				365			
[2419]	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
[2420]			370					375				380				
[2421]	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
[2422]	385					390				395					400	
[2423]	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
[2424]				405					410					415		
[2425]	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
[2426]			420						425				430			
[2427]	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
[2428]			435					440					445			
[2429]	Lys															
[2430]	<210>	401														
[2431]	<211>	214														
[2432]	<212>	PRT														
[2433]	<213>	合成 (Synthetic)														
[2434]	<400>	401														
[2435]	Gln	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
[2436]	1			5					10					15		
[2437]	Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn
[2438]			20					25					30			
[2439]	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
[2440]		35					40						45			
[2441]	Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[2442]	50					55					60					
[2443]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser
[2444]	65				70				75					80		
[2445]	Glu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr
[2446]			85					90					95			
[2447]	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
[2448]			100					105					110			
[2449]	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
[2450]		115					120						125			
[2451]	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
[2452]	130					135					140					
[2453]	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
[2454]	145					150				155					160	
[2455]	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser

[2456]					165					170						175
[2457]	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
[2458]					180					185						190
[2459]	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
[2460]					195					200						205
[2461]	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
[2462]					210											
[2463]	<210>				402											
[2464]	<211>				258											
[2465]	<212>				PRT											
[2466]	<213>				合成 (Synthetic)											
[2467]	<400>				402											
[2468]	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly
[2469]	1				5					10					15	
[2470]	Pro	Tyr	Val	Met	Tyr	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
[2471]					20					25					30	
[2472]	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Leu	Leu
[2473]					35					40					45	
[2474]	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Val	Ser
[2475]					50					55					60	
[2476]	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr
[2477]	65						70					75				80
[2478]	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser
[2479]					85					90						95
[2480]	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
[2481]					100					105					110	
[2482]	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	Glu	Asp	Ile	Ala
[2483]					115					120					125	
[2484]	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe	Gly	Ala
[2485]					130					135					140	
[2486]	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe
[2487]	145						150				155					160
[2488]	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val
[2489]					165					170						175
[2490]	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp
[2491]					180					185						190
[2492]	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr
[2493]					195					200						205
[2494]	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr

[2495]	210	215	220
[2496]	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val		
[2497]	225	230	235
[2498]	Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly		
[2499]	245	250	255
[2500]	Glu Cys		
[2501]	<210> 403		
[2502]	<211> 254		
[2503]	<212> PRT		
[2504]	<213> 合成 (Synthetic)		
[2505]	<400> 403		
[2506]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly		
[2507]	1	5	10
[2508]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Leu Ala		
[2509]	20	25	30
[2510]	His Gly Leu Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro		
[2511]	35	40	45
[2512]	Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg		
[2513]	50	55	60
[2514]	Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr		
[2515]	65	70	75
[2516]	Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser		
[2517]	85	90	95
[2518]	Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr		
[2519]	100	105	110
[2520]	Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys		
[2521]	115	120	125
[2522]	Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu		
[2523]	130	135	140
[2524]	Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro		
[2525]	145	150	155
[2526]	Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu		
[2527]	165	170	175
[2528]	Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn		
[2529]	180	185	190
[2530]	Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser		
[2531]	195	200	205
[2532]	Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala		
[2533]	210	215	220

[2534]	Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly																		
[2535]	225					230					235							240	
[2536]	Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys																		
[2537]					245					250									
[2538]	<210> 404																		
[2539]	<211> 259																		
[2540]	<212> PRT																		
[2541]	<213> 合成(Synthetic)																		
[2542]	<400> 404																		
[2543]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly																		
[2544]	1				5					10								15	
[2545]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly																		
[2546]				20					25								30		
[2547]	Ser Gly Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu																		
[2548]			35					40							45				
[2549]	Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val																		
[2550]		50					55					60							
[2551]	Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp																		
[2552]	65					70					75							80	
[2553]	Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala																		
[2554]				85						90								95	
[2555]	Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser																		
[2556]				100						105								110	
[2557]	Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile																		
[2558]			115						120						125				
[2559]	Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly																		
[2560]		130						135						140					
[2561]	Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val																		
[2562]	145					150					155							160	
[2563]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser																		
[2564]				165						170								175	
[2565]	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln																		
[2566]				180						185								190	
[2567]	Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val																		
[2568]			195							200								205	
[2569]	Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu																		
[2570]		210						215						220					
[2571]	Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu																		
[2572]	225					230					235							240	

[2573]	Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
[2574]	245 250 255
[2575]	Gly Glu Cys
[2576]	<210> 405
[2577]	<211> 254
[2578]	<212> PRT
[2579]	<213> 合成(Synthetic)
[2580]	<400> 405
[2581]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[2582]	1 5 10 15
[2583]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Asp Leu Ala
[2584]	20 25 30
[2585]	His Pro Leu Leu Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro
[2586]	35 40 45
[2587]	Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg
[2588]	50 55 60
[2589]	Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr
[2590]	65 70 75 80
[2591]	Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
[2592]	85 90 95
[2593]	Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[2594]	100 105 110
[2595]	Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys
[2596]	115 120 125
[2597]	Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
[2598]	130 135 140
[2599]	Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
[2600]	145 150 155 160
[2601]	Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
[2602]	165 170 175
[2603]	Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
[2604]	180 185 190
[2605]	Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
[2606]	195 200 205
[2607]	Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
[2608]	210 215 220
[2609]	Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
[2610]	225 230 235 240
[2611]	Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[2612]		245		250
[2613]	<210>	406		
[2614]	<211>	253		
[2615]	<212>	PRT		
[2616]	<213>	合成 (Synthetic)		
[2617]	<400>	406		
[2618]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly			
[2619]	1	5	10	15
[2620]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Phe Arg			
[2621]		20	25	30
[2622]	His Leu Arg Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val			
[2623]		35	40	45
[2624]	Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala			
[2625]		50	55	60
[2626]	Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn			
[2627]	65	70	75	80
[2628]	Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly			
[2629]		85	90	95
[2630]	Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu			
[2631]		100	105	110
[2632]	Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln			
[2633]		115	120	125
[2634]	Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu			
[2635]		130	135	140
[2636]	Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser			
[2637]	145	150	155	160
[2638]	Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn			
[2639]		165	170	175
[2640]	Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala			
[2641]		180	185	190
[2642]	Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys			
[2643]		195	200	205
[2644]	Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp			
[2645]		210	215	220
[2646]	Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu			
[2647]	225	230	235	240
[2648]	Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
[2649]		245	250	
[2650]	<210>	407		

[2651]	<211>	258
[2652]	<212>	PRT
[2653]	<213>	合成 (Synthetic)
[2654]	<400>	407
[2655]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly	
[2656]	1	5 10 15
[2657]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly	
[2658]	20	25 30
[2659]	Ser Gly Pro His Gly Phe Phe Gln Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu	
[2660]	35	40 45
[2661]	Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser	
[2662]	50	55 60
[2663]	Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr	
[2664]	65	70 75 80
[2665]	Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser	
[2666]	85	90 95
[2667]	Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly	
[2668]	100	105 110
[2669]	Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala	
[2670]	115	120 125
[2671]	Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala	
[2672]	130	135 140
[2673]	Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe	
[2674]	145	150 155 160
[2675]	Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val	
[2676]	165	170 175
[2677]	Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp	
[2678]	180	185 190
[2679]	Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr	
[2680]	195	200 205
[2681]	Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr	
[2682]	210	215 220
[2683]	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val	
[2684]	225	230 235 240
[2685]	Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly	
[2686]	245	250 255
[2687]	Glu Cys	
[2688]	<210>	408
[2689]	<211>	253

[2690]	<212>	PRT
[2691]	<213>	合成 (Synthetic)
[2692]	<400>	408
[2693]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly	
[2694]	1	5 10 15
[2695]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Val His	
[2696]	20	25 30
[2697]	His Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val	
[2698]	35	40 45
[2699]	Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala	
[2700]	50	55 60
[2701]	Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn	
[2702]	65	70 75 80
[2703]	Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly	
[2704]	85	90 95
[2705]	Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu	
[2706]	100	105 110
[2707]	Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln	
[2708]	115	120 125
[2709]	Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu	
[2710]	130	135 140
[2711]	Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser	
[2712]	145	150 155 160
[2713]	Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn	
[2714]	165	170 175
[2715]	Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala	
[2716]	180	185 190
[2717]	Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys	
[2718]	195	200 205
[2719]	Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp	
[2720]	210	215 220
[2721]	Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu	
[2722]	225	230 235 240
[2723]	Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
[2724]	245	250
[2725]	<210>	409
[2726]	<211>	254
[2727]	<212>	PRT
[2728]	<213>	合成 (Synthetic)

[2729]	<400> 409
[2730]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[2731]	1 5 10 15
[2732]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Arg Gly Pro
[2733]	20 25 30
[2734]	Lys Leu Tyr Trp Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro
[2735]	35 40 45
[2736]	Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg
[2737]	50 55 60
[2738]	Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr
[2739]	65 70 75 80
[2740]	Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
[2741]	85 90 95
[2742]	Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[2743]	100 105 110
[2744]	Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys
[2745]	115 120 125
[2746]	Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
[2747]	130 135 140
[2748]	Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
[2749]	145 150 155 160
[2750]	Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
[2751]	165 170 175
[2752]	Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
[2753]	180 185 190
[2754]	Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
[2755]	195 200 205
[2756]	Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
[2757]	210 215 220
[2758]	Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
[2759]	225 230 235 240
[2760]	Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[2761]	245 250
[2762]	<210> 410
[2763]	<211> 259
[2764]	<212> PRT
[2765]	<213> 合成 (Synthetic)
[2766]	<400> 410
[2767]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly

[2768]	1	5	10	15
[2769]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly			
[2770]	20	25	30	
[2771]	Ser Gly Arg Gly Pro Lys Leu Tyr Trp Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu			
[2772]	35	40	45	
[2773]	Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val			
[2774]	50	55	60	
[2775]	Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp			
[2776]	65	70	75	80
[2777]	Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala			
[2778]	85	90	95	
[2779]	Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser			
[2780]	100	105	110	
[2781]	Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile			
[2782]	115	120	125	
[2783]	Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly			
[2784]	130	135	140	
[2785]	Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val			
[2786]	145	150	155	160
[2787]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser			
[2788]	165	170	175	
[2789]	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln			
[2790]	180	185	190	
[2791]	Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val			
[2792]	195	200	205	
[2793]	Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu			
[2794]	210	215	220	
[2795]	Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu			
[2796]	225	230	235	240
[2797]	Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg			
[2798]	245	250	255	
[2799]	Gly Glu Cys			
[2800]	<210> 411			
[2801]	<211> 254			
[2802]	<212> PRT			
[2803]	<213> 合成(Synthetic)			
[2804]	<400> 411			
[2805]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly			
[2806]	1	5	10	15

[2807]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Arg Phe Pro		
[2808]	20	25	30
[2809]	Tyr Gly Val Trp Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro		
[2810]	35	40	45
[2811]	Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg		
[2812]	50	55	60
[2813]	Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr		
[2814]	65	70	75
[2815]	Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser		
[2816]	85	90	95
[2817]	Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr		
[2818]	100	105	110
[2819]	Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys		
[2820]	115	120	125
[2821]	Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu		
[2822]	130	135	140
[2823]	Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro		
[2824]	145	150	155
[2825]	Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu		
[2826]	165	170	175
[2827]	Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn		
[2828]	180	185	190
[2829]	Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser		
[2830]	195	200	205
[2831]	Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala		
[2832]	210	215	220
[2833]	Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly		
[2834]	225	230	235
[2835]	Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[2836]	245	250	
[2837]	<210> 412		
[2838]	<211> 253		
[2839]	<212> PRT		
[2840]	<213> 合成 (Synthetic)		
[2841]	<400> 412		
[2842]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly		
[2843]	1	5	10
[2844]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser His Val Pro		
[2845]	20	25	30

[2846]	Arg	Gln	Val	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val
[2847]			35					40					45			
[2848]	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala
[2849]			50					55					60			
[2850]	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn
[2851]	65					70					75				80	
[2852]	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly
[2853]					85					90					95	
[2854]	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu
[2855]				100					105					110		
[2856]	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	Glu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln
[2857]			115					120					125			
[2858]	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
[2859]			130					135					140			
[2860]	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser
[2861]	145					150					155					160
[2862]	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn
[2863]					165					170					175	
[2864]	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala
[2865]				180						185				190		
[2866]	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys
[2867]			195					200						205		
[2868]	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp
[2869]		210						215				220				
[2870]	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu
[2871]	225					230					235					240
[2872]	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys			
[2873]				245						250						
[2874]	<210> 413															
[2875]	<211> 258															
[2876]	<212> PRT															
[2877]	<213> 合成 (Synthetic)															
[2878]	<400> 413															
[2879]	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly
[2880]	1				5					10					15	
[2881]	Pro	Tyr	Val	Met	Tyr	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
[2882]				20					25					30		
[2883]	Ser	Gly	His	Val	Pro	Arg	Gln	Val	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Leu
[2884]			35					40					45			

[2885]	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Val	Ser
[2886]	50						55					60				
[2887]	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr
[2888]	65					70				75					80	
[2889]	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser
[2890]					85					90					95	
[2891]	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
[2892]					100					105					110	
[2893]	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	Glu	Asp	Ile	Ala
[2894]					115					120					125	
[2895]	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe	Gly	Ala
[2896]					130					135					140	
[2897]	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe
[2898]	145					150					155					160
[2899]	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val
[2900]					165					170						175
[2901]	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp
[2902]					180					185					190	
[2903]	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr
[2904]					195					200					205	
[2905]	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
[2906]					210					215					220	
[2907]	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val
[2908]	225					230					235					240
[2909]	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly
[2910]					245					250					255	
[2911]	Glu	Cys														
[2912]	<210>	414														
[2913]	<211>	253														
[2914]	<212>	PRT														
[2915]	<213>	合成 (Synthetic)														
[2916]	<400>	414														
[2917]	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly
[2918]	1				5					10					15	
[2919]	Pro	Tyr	Val	Met	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Asn	Pro
[2920]					20					25					30	
[2921]	Phe	Lys	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val
[2922]					35					40					45	
[2923]	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala

[2924]	50	55	60
[2925]	Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn		
[2926]	65	70	75
[2927]	Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly		
[2928]	85	90	95
[2929]	Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu		
[2930]	100	105	110
[2931]	Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln		
[2932]	115	120	125
[2933]	Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu		
[2934]	130	135	140
[2935]	Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser		
[2936]	145	150	155
[2937]	Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn		
[2938]	165	170	175
[2939]	Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala		
[2940]	180	185	190
[2941]	Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys		
[2942]	195	200	205
[2943]	Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp		
[2944]	210	215	220
[2945]	Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu		
[2946]	225	230	235
[2947]	Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[2948]	245	250	
[2949]	<210> 415		
[2950]	<211> 253		
[2951]	<212> PRT		
[2952]	<213> 合成 (Synthetic)		
[2953]	<400> 415		
[2954]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly		
[2955]	1	5	10
[2956]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Arg Phe Pro		
[2957]	20	25	30
[2958]	Leu Lys Val Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val		
[2959]	35	40	45
[2960]	Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala		
[2961]	50	55	60
[2962]	Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn		

[2963]	65	70	75	80
[2964]	Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly			
[2965]	85	90	95	
[2966]	Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu			
[2967]	100	105	110	
[2968]	Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln			
[2969]	115	120	125	
[2970]	Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu			
[2971]	130	135	140	
[2972]	Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser			
[2973]	145	150	155	160
[2974]	Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn			
[2975]	165	170	175	
[2976]	Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala			
[2977]	180	185	190	
[2978]	Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys			
[2979]	195	200	205	
[2980]	Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp			
[2981]	210	215	220	
[2982]	Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu			
[2983]	225	230	235	240
[2984]	Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
[2985]	245	250		
[2986]	<210> 416			
[2987]	<211> 253			
[2988]	<212> PRT			
[2989]	<213> 合成 (Synthetic)			
[2990]	<400> 416			
[2991]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly			
[2992]	1	5	10	15
[2993]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Pro Phe His			
[2994]	20	25	30	
[2995]	Leu Ser Arg Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val			
[2996]	35	40	45	
[2997]	Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala			
[2998]	50	55	60	
[2999]	Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn			
[3000]	65	70	75	80
[3001]	Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly			

[3002]					85					90						95
[3003]	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu
[3004]					100					105						110
[3005]	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	Glu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln
[3006]					115					120						125
[3007]	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
[3008]					130					135						140
[3009]	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser
[3010]	145								150				155			160
[3011]	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn
[3012]					165					170						175
[3013]	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala
[3014]					180					185						190
[3015]	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys
[3016]					195					200						205
[3017]	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp
[3018]					210					215						220
[3019]	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu
[3020]	225								230				235			240
[3021]	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys			
[3022]					245					250						
[3023]	<210> 417															
[3024]	<211> 253															
[3025]	<212> PRT															
[3026]	<213> 合成(Synthetic)															
[3027]	<400> 417															
[3028]	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly
[3029]	1				5					10						15
[3030]	Pro	Tyr	Val	Met	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Val
[3031]					20					25						30
[3032]	Phe	His	Met	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val
[3033]					35					40						45
[3034]	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala
[3035]					50					55						60
[3036]	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn
[3037]	65								70							80
[3038]	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly
[3039]					85					90						95
[3040]	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu

[3080]	115	120	125
[3081]	Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu		
[3082]	130	135	140
[3083]	Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser		
[3084]	145	150	155
[3085]	Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn		
[3086]	165	170	175
[3087]	Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala		
[3088]	180	185	190
[3089]	Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys		
[3090]	195	200	205
[3091]	Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp		
[3092]	210	215	220
[3093]	Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu		
[3094]	225	230	235
[3095]	Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[3096]	245	250	
[3097]	<210> 419		
[3098]	<211> 258		
[3099]	<212> PRT		
[3100]	<213> 合成(Synthetic)		
[3101]	<400> 419		
[3102]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly		
[3103]	1	5	10
[3104]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly		
[3105]	20	25	30
[3106]	Ser Gly Met Gly Pro Trp Phe Met Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu		
[3107]	35	40	45
[3108]	Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser		
[3109]	50	55	60
[3110]	Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr		
[3111]	65	70	75
[3112]	Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser		
[3113]	85	90	95
[3114]	Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly		
[3115]	100	105	110
[3116]	Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala		
[3117]	115	120	125
[3118]	Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala		

[3119]	130	135	140
[3120]	Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe		
[3121]	145	150	155
[3122]	Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val		
[3123]	165	170	175
[3124]	Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp		
[3125]	180	185	190
[3126]	Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr		
[3127]	195	200	205
[3128]	Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr		
[3129]	210	215	220
[3130]	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val		
[3131]	225	230	235
[3132]	Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly		
[3133]	245	250	255
[3134]	Glu Cys		
[3135]	<210> 420		
[3136]	<211> 253		
[3137]	<212> PRT		
[3138]	<213> 合成(Synthetic)		
[3139]	<400> 420		
[3140]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly		
[3141]	1	5	10
[3142]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Arg His Leu		
[3143]	20	25	30
[3144]	Ala Lys Leu Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val		
[3145]	35	40	45
[3146]	Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala		
[3147]	50	55	60
[3148]	Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn		
[3149]	65	70	75
[3150]	Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly		
[3151]	85	90	95
[3152]	Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu		
[3153]	100	105	110
[3154]	Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln		
[3155]	115	120	125
[3156]	Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu		
[3157]	130	135	140

[3158]	Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
[3159]	145 150 155 160
[3160]	Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
[3161]	165 170 175
[3162]	Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
[3163]	180 185 190
[3164]	Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
[3165]	195 200 205
[3166]	Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
[3167]	210 215 220
[3168]	Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
[3169]	225 230 235 240
[3170]	Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[3171]	245 250
[3172]	<210> 421
[3173]	<211> 254
[3174]	<212> PRT
[3175]	<213> 合成 (Synthetic)
[3176]	<400> 421
[3177]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[3178]	1 5 10 15
[3179]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Pro Leu Gly
[3180]	20 25 30
[3181]	Val Arg Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro
[3182]	35 40 45
[3183]	Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg
[3184]	50 55 60
[3185]	Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr
[3186]	65 70 75 80
[3187]	Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
[3188]	85 90 95
[3189]	Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[3190]	100 105 110
[3191]	Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys
[3192]	115 120 125
[3193]	Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
[3194]	130 135 140
[3195]	Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
[3196]	145 150 155 160

[3197]	Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
[3198]	165 170 175
[3199]	Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
[3200]	180 185 190
[3201]	Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
[3202]	195 200 205
[3203]	Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
[3204]	210 215 220
[3205]	Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
[3206]	225 230 235 240
[3207]	Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[3208]	245 250
[3209]	<210> 422
[3210]	<211> 259
[3211]	<212> PRT
[3212]	<213> 合成(Synthetic)
[3213]	<400> 422
[3214]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[3215]	1 5 10 15
[3216]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
[3217]	20 25 30
[3218]	Ser Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu
[3219]	35 40 45
[3220]	Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val
[3221]	50 55 60
[3222]	Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp
[3223]	65 70 75 80
[3224]	Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala
[3225]	85 90 95
[3226]	Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
[3227]	100 105 110
[3228]	Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile
[3229]	115 120 125
[3230]	Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly
[3231]	130 135 140
[3232]	Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
[3233]	145 150 155 160
[3234]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
[3235]	165 170 175

[3236]	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln
[3237]				180					185					190		
[3238]	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val
[3239]			195					200					205			
[3240]	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu
[3241]		210						215				220				
[3242]	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
[3243]	225					230					235					240
[3244]	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
[3245]				245						250					255	
[3246]	Gly	Glu	Cys													
[3247]	<210>	423														
[3248]	<211>	260														
[3249]	<212>	PRT														
[3250]	<213>	合成 (Synthetic)														
[3251]	<400>	423														
[3252]	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly
[3253]	1			5						10					15	
[3254]	Pro	Tyr	Val	Met	Tyr	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
[3255]				20						25					30	
[3256]	Ser	Gly	Gln	Asn	Gln	Ala	Leu	Arg	Ile	Ala	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile
[3257]			35					40					45			
[3258]	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg
[3259]		50					55					60				
[3260]	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
[3261]	65					70					75					80
[3262]	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr
[3263]				85						90					95	
[3264]	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly
[3265]				100						105				110		
[3266]	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	Glu	Asp
[3267]			115						120				125			
[3268]	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe
[3269]		130					135					140				
[3270]	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser
[3271]	145					150					155					160
[3272]	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala
[3273]				165						170					175	
[3274]	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val

[3275]	180	185	190
[3276]	Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser		
[3277]	195	200	205
[3278]	Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr		
[3279]	210	215	220
[3280]	Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys		
[3281]	225	230	235
[3282]	Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn		
[3283]	245	250	255
[3284]	Arg Gly Glu Cys		
[3285]	260		
[3286]	<210> 424		
[3287]	<400> 424		
[3288]	000		
[3289]	<210> 425		
[3290]	<400> 425		
[3291]	000		
[3292]	<210> 426		
[3293]	<400> 426		
[3294]	000		
[3295]	<210> 427		
[3296]	<400> 427		
[3297]	000		
[3298]	<210> 428		
[3299]	<400> 428		
[3300]	000		
[3301]	<210> 429		
[3302]	<400> 429		
[3303]	000		
[3304]	<210> 430		
[3305]	<400> 430		
[3306]	000		
[3307]	<210> 431		
[3308]	<400> 431		
[3309]	000		
[3310]	<210> 432		
[3311]	<400> 432		
[3312]	000		
[3313]	<210> 433		

[3314]	<400> 433
[3315]	000
[3316]	<210> 434
[3317]	<400> 434
[3318]	000
[3319]	<210> 435
[3320]	<400> 435
[3321]	000
[3322]	<210> 436
[3323]	<400> 436
[3324]	000
[3325]	<210> 437
[3326]	<400> 437
[3327]	000
[3328]	<210> 438
[3329]	<400> 438
[3330]	000
[3331]	<210> 439
[3332]	<400> 439
[3333]	000
[3334]	<210> 440
[3335]	<400> 440
[3336]	000
[3337]	<210> 441
[3338]	<400> 441
[3339]	000
[3340]	<210> 442
[3341]	<400> 442
[3342]	000
[3343]	<210> 443
[3344]	<400> 443
[3345]	000
[3346]	<210> 444
[3347]	<400> 444
[3348]	000
[3349]	<210> 445
[3350]	<400> 445
[3351]	000
[3352]	<210> 446

206

[3392]	180							185							190													
[3393]	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val												
[3394]	195							200							205													
[3395]	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu												
[3396]	210							215							220													
[3397]	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu												
[3398]	225							230							235							240						
[3399]	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg												
[3400]	245							250							255													
[3401]	Gly	Glu	Cys																									
[3402]	<210>	451																										
[3403]	<211>	260																										
[3404]	<212>	PRT																										
[3405]	<213>	合成 (Synthetic)																										
[3406]	<400>	451																										
[3407]	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly												
[3408]	1	5							10							15												
[3409]	Pro	Tyr	Val	Met	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Leu	Ala												
[3410]	20							25							30													
[3411]	His	Gly	Leu	Phe	Ser	Gly	Arg	Ser	Ala	Asn	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile												
[3412]	35							40							45													
[3413]	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg												
[3414]	50							55							60													
[3415]	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His												
[3416]	65							70							75							80						
[3417]	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr												
[3418]	85							90							95													
[3419]	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly												
[3420]	100							105							110													
[3421]	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	Glu	Asp												
[3422]	115							120							125													
[3423]	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe												
[3424]	130							135							140													
[3425]	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser												
[3426]	145							150							155							160						
[3427]	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala												
[3428]	165							170							175													
[3429]	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val												
[3430]	180							185							190													

[3431]	Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
[3432]	195 200 205
[3433]	Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
[3434]	210 215 220
[3435]	Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
[3436]	225 230 235 240
[3437]	Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
[3438]	245 250 255
[3439]	Arg Gly Glu Cys
[3440]	260
[3441]	<210> 452
[3442]	<211> 258
[3443]	<212> PRT
[3444]	<213> 合成 (Synthetic)
[3445]	<400> 452
[3446]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[3447]	1 5 10 15
[3448]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser His Val Pro
[3449]	20 25 30
[3450]	Arg Gln Val Leu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu
[3451]	35 40 45
[3452]	Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser
[3453]	50 55 60
[3454]	Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr
[3455]	65 70 75 80
[3456]	Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser
[3457]	85 90 95
[3458]	Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[3459]	100 105 110
[3460]	Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala
[3461]	115 120 125
[3462]	Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala
[3463]	130 135 140
[3464]	Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
[3465]	145 150 155 160
[3466]	Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
[3467]	165 170 175
[3468]	Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
[3469]	180 185 190

[3470]	Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
[3471]	195 200 205
[3472]	Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
[3473]	210 215 220
[3474]	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
[3475]	225 230 235 240
[3476]	Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
[3477]	245 250 255
[3478]	Glu Cys
[3479]	<210> 453
[3480]	<211> 260
[3481]	<212> PRT
[3482]	<213> 合成(Synthetic)
[3483]	<400> 453
[3484]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[3485]	1 5 10 15
[3486]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser His Val Pro
[3487]	20 25 30
[3488]	Arg Gln Val Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Gly Gly Gly Ser Gln Ile
[3489]	35 40 45
[3490]	Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg
[3491]	50 55 60
[3492]	Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
[3493]	65 70 75 80
[3494]	Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr
[3495]	85 90 95
[3496]	Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
[3497]	100 105 110
[3498]	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp
[3499]	115 120 125
[3500]	Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe
[3501]	130 135 140
[3502]	Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
[3503]	145 150 155 160
[3504]	Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
[3505]	165 170 175
[3506]	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
[3507]	180 185 190
[3508]	Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser

[3509]	195	200	205
[3510]	Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr		
[3511]	210	215	220
[3512]	Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys		
[3513]	225	230	235
[3514]	Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn		
[3515]	245	250	255
[3516]	Arg Gly Glu Cys		
[3517]	260		
[3518]	<210> 454		
[3519]	<211> 259		
[3520]	<212> PRT		
[3521]	<213> 合成(Synthetic)		
[3522]	<400> 454		
[3523]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly		
[3524]	1	5	10
[3525]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Thr Ala Arg		
[3526]	20	25	30
[3527]	Gly Pro Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu		
[3528]	35	40	45
[3529]	Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val		
[3530]	50	55	60
[3531]	Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp		
[3532]	65	70	75
[3533]	Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala		
[3534]	85	90	95
[3535]	Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser		
[3536]	100	105	110
[3537]	Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile		
[3538]	115	120	125
[3539]	Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly		
[3540]	130	135	140
[3541]	Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val		
[3542]	145	150	155
[3543]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser		
[3544]	165	170	175
[3545]	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln		
[3546]	180	185	190
[3547]	Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val		

[3548]	195	200	205
[3549]	Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu		
[3550]	210	215	220
[3551]	Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu		
[3552]	225	230	235
[3553]	Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg		
[3554]	245	250	255
[3555]	Gly Glu Cys		
[3556]	<210> 455		
[3557]	<211> 257		
[3558]	<212> PRT		
[3559]	<213> 合成 (Synthetic)		
[3560]	<400> 455		
[3561]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly		
[3562]	1	5	10
[3563]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Thr Ala Arg		
[3564]	20	25	30
[3565]	Gly Pro Val Pro Arg Gln Val Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr		
[3566]	35	40	45
[3567]	Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe		
[3568]	50	55	60
[3569]	Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln		
[3570]	65	70	75
[3571]	Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu		
[3572]	85	90	95
[3573]	Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
[3574]	100	105	110
[3575]	Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp		
[3576]	115	120	125
[3577]	Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly		
[3578]	130	135	140
[3579]	Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile		
[3580]	145	150	155
[3581]	Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val		
[3582]	165	170	175
[3583]	Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys		
[3584]	180	185	190
[3585]	Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu		
[3586]	195	200	205

[3587]	Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
[3588]	210 215 220
[3589]	Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
[3590]	225 230 235 240
[3591]	His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
[3592]	245 250 255
[3593]	Cys
[3594]	<210> 456
[3595]	<211> 258
[3596]	<212> PRT
[3597]	<213> 合成(Synthetic)
[3598]	<400> 456
[3599]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[3600]	1 5 10 15
[3601]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Pro Arg
[3602]	20 25 30
[3603]	Ser Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu
[3604]	35 40 45
[3605]	Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser
[3606]	50 55 60
[3607]	Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr
[3608]	65 70 75 80
[3609]	Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser
[3610]	85 90 95
[3611]	Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[3612]	100 105 110
[3613]	Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala
[3614]	115 120 125
[3615]	Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala
[3616]	130 135 140
[3617]	Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
[3618]	145 150 155 160
[3619]	Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
[3620]	165 170 175
[3621]	Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
[3622]	180 185 190
[3623]	Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
[3624]	195 200 205
[3625]	Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr

[3626]	210	215	220
[3627]	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val		
[3628]	225	230	235
[3629]	Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly		
[3630]	245	250	255
[3631]	Glu Cys		
[3632]	<210> 457		
[3633]	<211> 259		
[3634]	<212> PRT		
[3635]	<213> 合成 (Synthetic)		
[3636]	<400> 457		
[3637]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly		
[3638]	1	5	10
[3639]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Leu Ala		
[3640]	20	25	30
[3641]	His Gly Leu Phe Ala Pro Arg Ser Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu		
[3642]	35	40	45
[3643]	Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val		
[3644]	50	55	60
[3645]	Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp		
[3646]	65	70	75
[3647]	Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala		
[3648]	85	90	95
[3649]	Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser		
[3650]	100	105	110
[3651]	Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile		
[3652]	115	120	125
[3653]	Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly		
[3654]	130	135	140
[3655]	Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val		
[3656]	145	150	155
[3657]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser		
[3658]	165	170	175
[3659]	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln		
[3660]	180	185	190
[3661]	Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val		
[3662]	195	200	205
[3663]	Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu		
[3664]	210	215	220

[3665]	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
[3666]	225					230					235					240
[3667]	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
[3668]					245					250					255	
[3669]	Gly	Glu	Cys													
[3670]	<210>	458														
[3671]	<211>	258														
[3672]	<212>	PRT														
[3673]	<213>	合成 (Synthetic)														
[3674]	<400>	458														
[3675]	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly
[3676]	1				5					10					15	
[3677]	Pro	Tyr	Val	Met	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	His	Val	Pro
[3678]				20					25					30		
[3679]	Arg	Gln	Val	Ala	Pro	Arg	Ser	Phe	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Leu
[3680]			35					40					45			
[3681]	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Val	Ser
[3682]		50					55					60				
[3683]	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr
[3684]	65					70				75						80
[3685]	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser
[3686]					85				90						95	
[3687]	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
[3688]				100					105					110		
[3689]	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	Glu	Asp	Ile	Ala
[3690]			115					120					125			
[3691]	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe	Gly	Ala
[3692]		130					135					140				
[3693]	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe
[3694]	145					150					155					160
[3695]	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val
[3696]					165				170						175	
[3697]	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp
[3698]				180					185					190		
[3699]	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr
[3700]			195						200				205			
[3701]	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
[3702]		210						215				220				
[3703]	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val

[3704]	225	230	235	240
[3705]	Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly			
[3706]	245	250	255	
[3707]	Glu Cys			
[3708]	<210> 459			
[3709]	<211> 259			
[3710]	<212> PRT			
[3711]	<213> 合成(Synthetic)			
[3712]	<400> 459			
[3713]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly			
[3714]	1	5	10	15
[3715]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Leu Ala			
[3716]	20	25	30	
[3717]	His Gly Leu Pro Thr Phe Val His Leu Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu			
[3718]	35	40	45	
[3719]	Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val			
[3720]	50	55	60	
[3721]	Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp			
[3722]	65	70	75	80
[3723]	Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala			
[3724]	85	90	95	
[3725]	Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser			
[3726]	100	105	110	
[3727]	Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile			
[3728]	115	120	125	
[3729]	Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly			
[3730]	130	135	140	
[3731]	Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val			
[3732]	145	150	155	160
[3733]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser			
[3734]	165	170	175	
[3735]	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln			
[3736]	180	185	190	
[3737]	Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val			
[3738]	195	200	205	
[3739]	Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu			
[3740]	210	215	220	
[3741]	Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu			
[3742]	225	230	235	240

[3743]	Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
[3744]	245 250 255
[3745]	Gly Glu Cys
[3746]	<210> 460
[3747]	<211> 259
[3748]	<212> PRT
[3749]	<213> 合成(Synthetic)
[3750]	<400> 460
[3751]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[3752]	1 5 10 15
[3753]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Leu Pro
[3754]	20 25 30
[3755]	Thr Phe Val His Leu Pro Arg Gln Val Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu
[3756]	35 40 45
[3757]	Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val
[3758]	50 55 60
[3759]	Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp
[3760]	65 70 75 80
[3761]	Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala
[3762]	85 90 95
[3763]	Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
[3764]	100 105 110
[3765]	Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile
[3766]	115 120 125
[3767]	Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly
[3768]	130 135 140
[3769]	Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
[3770]	145 150 155 160
[3771]	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
[3772]	165 170 175
[3773]	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
[3774]	180 185 190
[3775]	Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
[3776]	195 200 205
[3777]	Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
[3778]	210 215 220
[3779]	Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
[3780]	225 230 235 240
[3781]	Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg

[3782]		245		250		255
[3783]	Gly Glu Cys					
[3784]	<210> 461					
[3785]	<211> 257					
[3786]	<212> PRT					
[3787]	<213> 合成(Synthetic)					
[3788]	<400> 461					
[3789]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly					
[3790]	1	5		10		15
[3791]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Ala Asn					
[3792]		20		25		30
[3793]	Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr					
[3794]		35		40		45
[3795]	Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe					
[3796]		50		55		60
[3797]	Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln					
[3798]	65	70		75		80
[3799]	Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu					
[3800]		85		90		95
[3801]	Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr					
[3802]		100		105		110
[3803]	Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp					
[3804]		115		120		125
[3805]	Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly					
[3806]		130		135		140
[3807]	Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile					
[3808]	145	150		155		160
[3809]	Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val					
[3810]		165		170		175
[3811]	Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys					
[3812]		180		185		190
[3813]	Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu					
[3814]		195		200		205
[3815]	Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu					
[3816]		210		215		220
[3817]	Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr					
[3818]	225	230		235		240
[3819]	His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu					
[3820]		245		250		255

[3821]	Cys
[3822]	<210> 462
[3823]	<211> 258
[3824]	<212> PRT
[3825]	<213> 合成(Synthetic)
[3826]	<400> 462
[3827]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[3828]	1 5 10 15
[3829]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Pro Thr
[3830]	20 25 30
[3831]	Asn Ala Leu Ala His Gly Leu Phe Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu
[3832]	35 40 45
[3833]	Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser
[3834]	50 55 60
[3835]	Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr
[3836]	65 70 75 80
[3837]	Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser
[3838]	85 90 95
[3839]	Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[3840]	100 105 110
[3841]	Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala
[3842]	115 120 125
[3843]	Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala
[3844]	130 135 140
[3845]	Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
[3846]	145 150 155 160
[3847]	Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
[3848]	165 170 175
[3849]	Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
[3850]	180 185 190
[3851]	Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
[3852]	195 200 205
[3853]	Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
[3854]	210 215 220
[3855]	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
[3856]	225 230 235 240
[3857]	Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
[3858]	245 250 255
[3859]	Glu Cys

[3860]	<210>	463
[3861]	<400>	463
[3862]	000	
[3863]	<210>	464
[3864]	<400>	464
[3865]	000	
[3866]	<210>	465
[3867]	<400>	465
[3868]	000	
[3869]	<210>	466
[3870]	<400>	466
[3871]	000	
[3872]	<210>	467
[3873]	<400>	467
[3874]	000	
[3875]	<210>	468
[3876]	<400>	468
[3877]	000	
[3878]	<210>	469
[3879]	<400>	469
[3880]	000	
[3881]	<210>	470
[3882]	<400>	470
[3883]	000	
[3884]	<210>	471
[3885]	<400>	471
[3886]	000	
[3887]	<210>	472
[3888]	<400>	472
[3889]	000	
[3890]	<210>	473
[3891]	<400>	473
[3892]	000	
[3893]	<210>	474
[3894]	<400>	474
[3895]	000	
[3896]	<210>	475
[3897]	<400>	475
[3898]	000	

[3899]	<210>	476
[3900]	<400>	476
[3901]	000	
[3902]	<210>	477
[3903]	<400>	477
[3904]	000	
[3905]	<210>	478
[3906]	<400>	478
[3907]	000	
[3908]	<210>	479
[3909]	<400>	479
[3910]	000	
[3911]	<210>	480
[3912]	<211>	265
[3913]	<212>	PRT
[3914]	<213>	合成(Synthetic)
[3915]	<400>	480
[3916]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly	
[3917]	1	5 10 15
[3918]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly	
[3919]	20	25 30
[3920]	Ser Gly Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro Gly	
[3921]	35	40 45
[3922]	Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val	
[3923]	50	55 60
[3924]	Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile	
[3925]	65	70 75 80
[3926]	Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg	
[3927]	85	90 95
[3928]	Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg	
[3929]	100	105 110
[3930]	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser	
[3931]	115	120 125
[3932]	Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn	
[3933]	130	135 140
[3934]	Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr	
[3935]	145	150 155 160
[3936]	Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu	
[3937]	165	170 175

[3938]	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
[3939]	180 185 190
[3940]	Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
[3941]	195 200 205
[3942]	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
[3943]	210 215 220
[3944]	Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
[3945]	225 230 235 240
[3946]	Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
[3947]	245 250 255
[3948]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[3949]	260 265
[3950]	<210> 481
[3951]	<211> 270
[3952]	<212> PRT
[3953]	<213> 合成(Synthetic)
[3954]	<400> 481
[3955]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[3956]	1 5 10 15
[3957]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
[3958]	20 25 30
[3959]	Ser Gly Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg
[3960]	35 40 45
[3961]	Ser Asp Asn Pro Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro
[3962]	50 55 60
[3963]	Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg
[3964]	65 70 75 80
[3965]	Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr
[3966]	85 90 95
[3967]	Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
[3968]	100 105 110
[3969]	Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[3970]	115 120 125
[3971]	Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys
[3972]	130 135 140
[3973]	Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
[3974]	145 150 155 160
[3975]	Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
[3976]	165 170 175

[3977]	Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
[3978]	180 185 190
[3979]	Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
[3980]	195 200 205
[3981]	Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
[3982]	210 215 220
[3983]	Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
[3984]	225 230 235 240
[3985]	Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
[3986]	245 250 255
[3987]	Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[3988]	260 265 270
[3989]	<210> 482
[3990]	<211> 255
[3991]	<212> PRT
[3992]	<213> 合成(Synthetic)
[3993]	<400> 482
[3994]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[3995]	1 5 10 15
[3996]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
[3997]	20 25 30
[3998]	Gly Leu Leu Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser
[3999]	35 40 45
[4000]	Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys
[4001]	50 55 60
[4002]	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg
[4003]	65 70 75 80
[4004]	Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile
[4005]	85 90 95
[4006]	Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[4007]	100 105 110
[4008]	Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr
[4009]	115 120 125
[4010]	Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
[4011]	130 135 140
[4012]	Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
[4013]	145 150 155 160
[4014]	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
[4015]	165 170 175

[4016]	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp
[4017]				180					185					190		
[4018]	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp
[4019]				195				200						205		
[4020]	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys
[4021]			210					215					220			
[4022]	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln
[4023]	225						230				235					240
[4024]	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	
[4025]						245				250					255	
[4026]	<210> 483															
[4027]	<211> 260															
[4028]	<212> PRT															
[4029]	<213> 合成(Synthetic)															
[4030]	<400> 483															
[4031]	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly
[4032]	1				5					10					15	
[4033]	Pro	Tyr	Val	Met	Tyr	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
[4034]				20					25					30		
[4035]	Ser	Gly	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile
[4036]			35					40					45			
[4037]	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg
[4038]		50						55				60				
[4039]	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
[4040]	65					70					75					80
[4041]	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr
[4042]					85					90					95	
[4043]	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly
[4044]				100					105					110		
[4045]	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	Glu	Asp
[4046]			115						120				125			
[4047]	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe
[4048]		130					135					140				
[4049]	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser
[4050]	145					150					155					160
[4051]	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala
[4052]					165					170					175	
[4053]	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val
[4054]				180					185						190	

[4055]	Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
[4056]	195 200 205
[4057]	Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
[4058]	210 215 220
[4059]	Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
[4060]	225 230 235 240
[4061]	Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
[4062]	245 250 255
[4063]	Arg Gly Glu Cys
[4064]	260
[4065]	<210> 484
[4066]	<211> 255
[4067]	<212> PRT
[4068]	<213> 合成(Synthetic)
[4069]	<400> 484
[4070]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[4071]	1 5 10 15
[4072]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val Gly
[4073]	20 25 30
[4074]	Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser
[4075]	35 40 45
[4076]	Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys
[4077]	50 55 60
[4078]	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg
[4079]	65 70 75 80
[4080]	Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile
[4081]	85 90 95
[4082]	Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[4083]	100 105 110
[4084]	Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr
[4085]	115 120 125
[4086]	Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
[4087]	130 135 140
[4088]	Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
[4089]	145 150 155 160
[4090]	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
[4091]	165 170 175
[4092]	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
[4093]	180 185 190

[4094]	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
[4095]	195 200 205
[4096]	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
[4097]	210 215 220
[4098]	Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
[4099]	225 230 235 240
[4100]	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[4101]	245 250 255
[4102]	<210> 485
[4103]	<211> 261
[4104]	<212> PRT
[4105]	<213> 合成 (Synthetic)
[4106]	<400> 485
[4107]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[4108]	1 5 10 15
[4109]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
[4110]	20 25 30
[4111]	Ser Gly Pro Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Gly Ser Gln
[4112]	35 40 45
[4113]	Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu
[4114]	50 55 60
[4115]	Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile
[4116]	65 70 75 80
[4117]	His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
[4118]	85 90 95
[4119]	Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
[4120]	100 105 110
[4121]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu
[4122]	115 120 125
[4123]	Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
[4124]	130 135 140
[4125]	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
[4126]	145 150 155 160
[4127]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
[4128]	165 170 175
[4129]	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
[4130]	180 185 190
[4131]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
[4132]	195 200 205

[4133]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
[4134]	210 215 220
[4135]	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
[4136]	225 230 235 240
[4137]	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
[4138]	245 250 255
[4139]	Asn Arg Gly Glu Cys
[4140]	260
[4141]	<210> 486
[4142]	<211> 255
[4143]	<212> PRT
[4144]	<213> 合成(Synthetic)
[4145]	<400> 486
[4146]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[4147]	1 5 10 15
[4148]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Pro Ser
[4149]	20 25 30
[4150]	His Leu Val Leu Thr Gly Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser
[4151]	35 40 45
[4152]	Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys
[4153]	50 55 60
[4154]	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg
[4155]	65 70 75 80
[4156]	Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile
[4157]	85 90 95
[4158]	Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[4159]	100 105 110
[4160]	Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr
[4161]	115 120 125
[4162]	Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
[4163]	130 135 140
[4164]	Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
[4165]	145 150 155 160
[4166]	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
[4167]	165 170 175
[4168]	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
[4169]	180 185 190
[4170]	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
[4171]	195 200 205

[4172]	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys
[4173]	210						215					220				
[4174]	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln
[4175]	225					230					235					240
[4176]	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	
[4177]					245					250					255	
[4178]	<210>	487														
[4179]	<211>	260														
[4180]	<212>	PRT														
[4181]	<213>	合成 (Synthetic)														
[4182]	<400>	487														
[4183]	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly
[4184]	1				5					10					15	
[4185]	Pro	Tyr	Val	Met	Tyr	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
[4186]				20					25					30		
[4187]	Ser	Gly	Gly	Pro	Ser	His	Leu	Val	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile
[4188]			35					40					45			
[4189]	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg
[4190]	50						55					60				
[4191]	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
[4192]	65					70					75					80
[4193]	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr
[4194]					85					90					95	
[4195]	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly
[4196]				100					105					110		
[4197]	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	Glu	Asp
[4198]			115						120				125			
[4199]	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe
[4200]	130						135					140				
[4201]	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser
[4202]	145					150					155					160
[4203]	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala
[4204]					165					170					175	
[4205]	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val
[4206]				180					185					190		
[4207]	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser
[4208]			195					200					205			
[4209]	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr
[4210]	210						215					220				

[4211]	Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
[4212]	225 230 235 240
[4213]	Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
[4214]	245 250 255
[4215]	Arg Gly Glu Cys
[4216]	260
[4217]	<210> 488
[4218]	<211> 261
[4219]	<212> PRT
[4220]	<213> 合成 (Synthetic)
[4221]	<400> 488
[4222]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[4223]	1 5 10 15
[4224]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
[4225]	20 25 30
[4226]	Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Ser Ser Gly Thr Gln
[4227]	35 40 45
[4228]	Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu
[4229]	50 55 60
[4230]	Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile
[4231]	65 70 75 80
[4232]	His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
[4233]	85 90 95
[4234]	Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
[4235]	100 105 110
[4236]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu
[4237]	115 120 125
[4238]	Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
[4239]	130 135 140
[4240]	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
[4241]	145 150 155 160
[4242]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
[4243]	165 170 175
[4244]	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
[4245]	180 185 190
[4246]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
[4247]	195 200 205
[4248]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
[4249]	210 215 220

[4250]	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala
[4251]	225					230					235					240
[4252]	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe
[4253]					245					250					255	
[4254]	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
[4255]				260												
[4256]	<210>	489														
[4257]	<211>	260														
[4258]	<212>	PRT														
[4259]	<213>	合成 (Synthetic)														
[4260]	<400>	489														
[4261]	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Ile	Ser	Pro	Arg	Gly	Cys	Pro	Asp	Gly
[4262]	1			5					10					15		
[4263]	Pro	Tyr	Val	Met	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser
[4264]			20					25					30			
[4265]	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Asp	Asn	His	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile
[4266]		35				40					45					
[4267]	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg
[4268]	50					55					60					
[4269]	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	Ile	His
[4270]	65				70				75					80		
[4271]	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr
[4272]				85				90						95		
[4273]	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly
[4274]			100					105						110		
[4275]	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	Glu	Asp
[4276]		115						120					125			
[4277]	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe
[4278]	130					135						140				
[4279]	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser
[4280]	145				150					155					160	
[4281]	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala
[4282]				165					170					175		
[4283]	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val
[4284]			180						185				190			
[4285]	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser
[4286]		195						200					205			
[4287]	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr
[4288]	210						215					220				

[4289]	Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
[4290]	225 230 235 240
[4291]	Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
[4292]	245 250 255
[4293]	Arg Gly Glu Cys
[4294]	260
[4295]	<210> 490
[4296]	<211> 265
[4297]	<212> PRT
[4298]	<213> 合成(Synthetic)
[4299]	<400> 490
[4300]	Gln Gly Gln Ser Gly Gln Cys Ile Ser Pro Arg Gly Cys Pro Asp Gly
[4301]	1 5 10 15
[4302]	Pro Tyr Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val Gly
[4303]	20 25 30
[4304]	Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly
[4305]	35 40 45
[4306]	Gly Gly Ser Gln Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val
[4307]	50 55 60
[4308]	Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
[4309]	65 70 75 80
[4310]	Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg
[4311]	85 90 95
[4312]	Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg
[4313]	100 105 110
[4314]	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser
[4315]	115 120 125
[4316]	Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn
[4317]	130 135 140
[4318]	Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr
[4319]	145 150 155 160
[4320]	Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
[4321]	165 170 175
[4322]	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
[4323]	180 185 190
[4324]	Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
[4325]	195 200 205
[4326]	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
[4327]	210 215 220

[4328]	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His
[4329]	225					230					235					240
[4330]	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
[4331]						245					250					255
[4332]	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
[4333]						260					265					

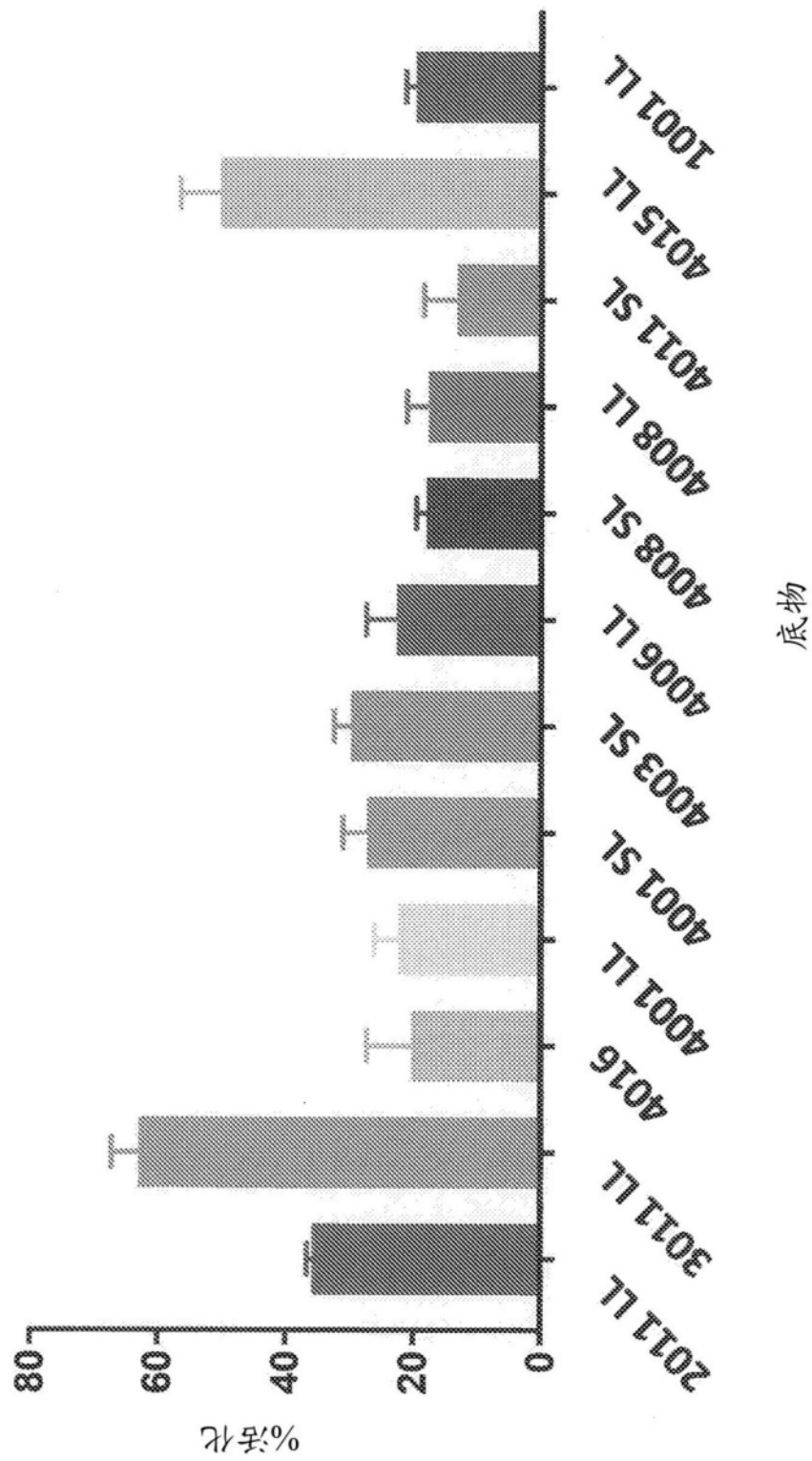


图1

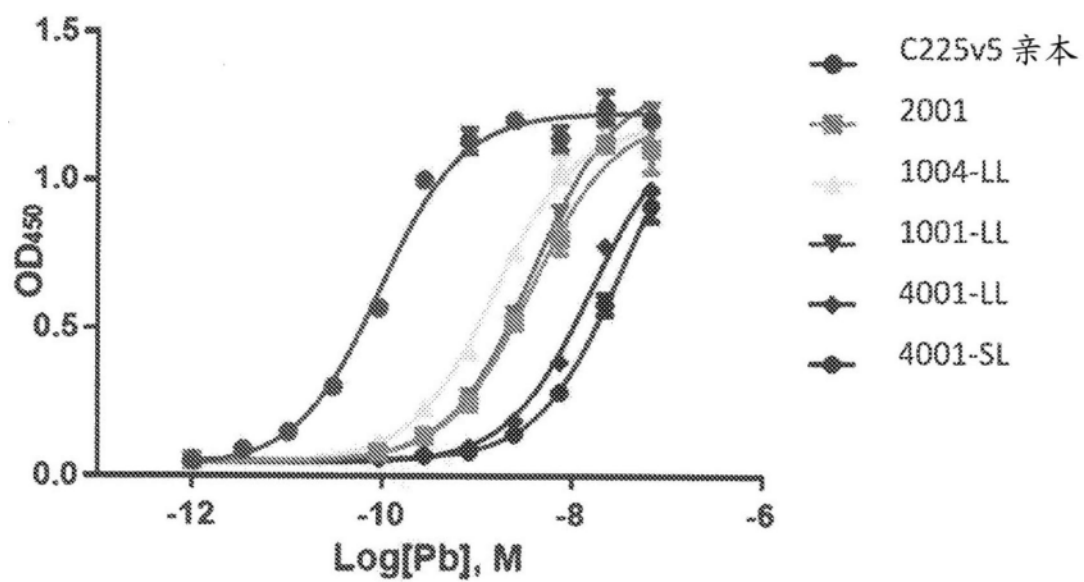


图2A

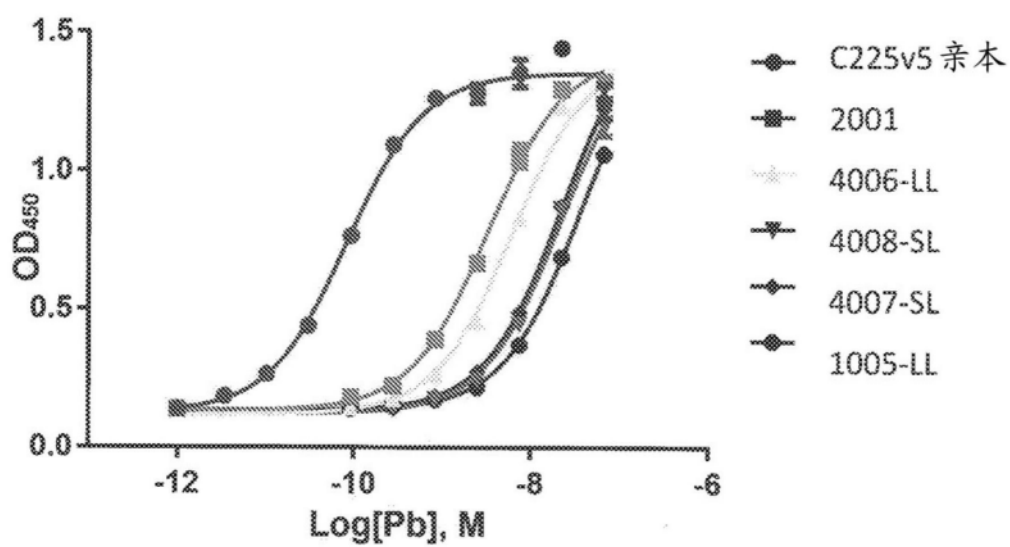


图2B

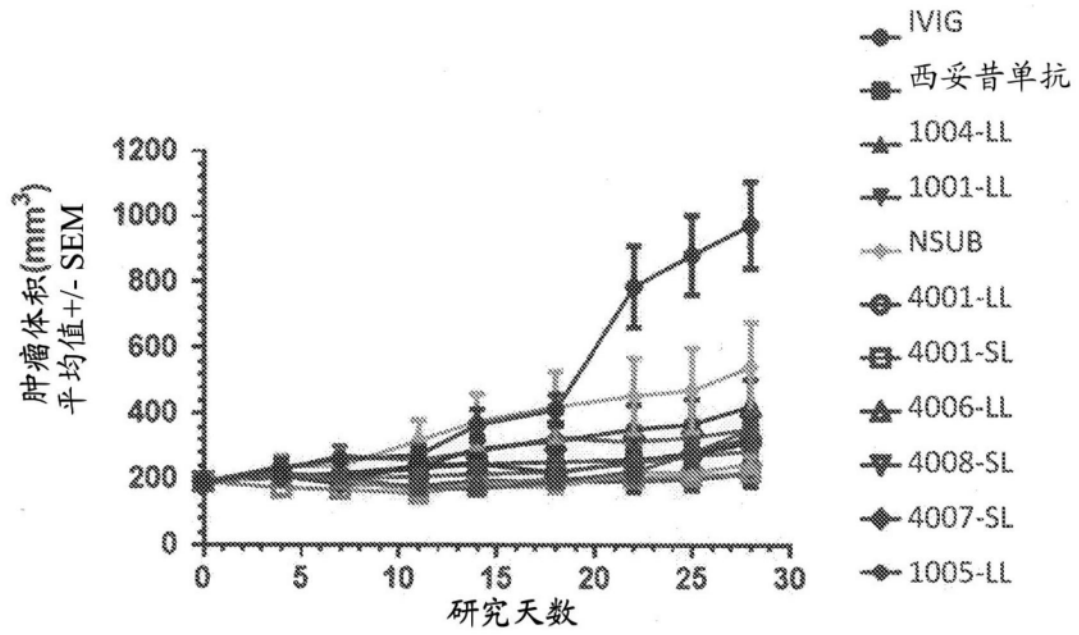


图3A

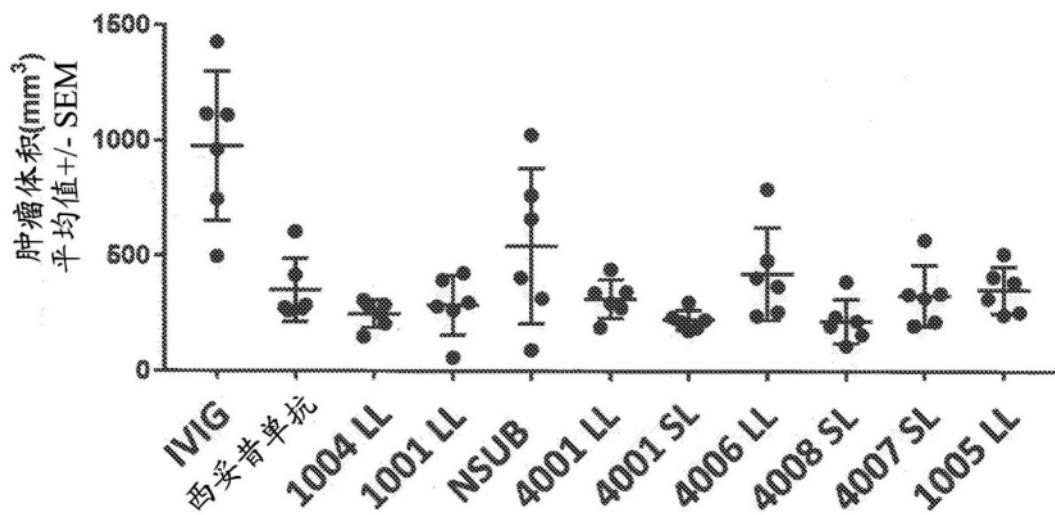


图3B

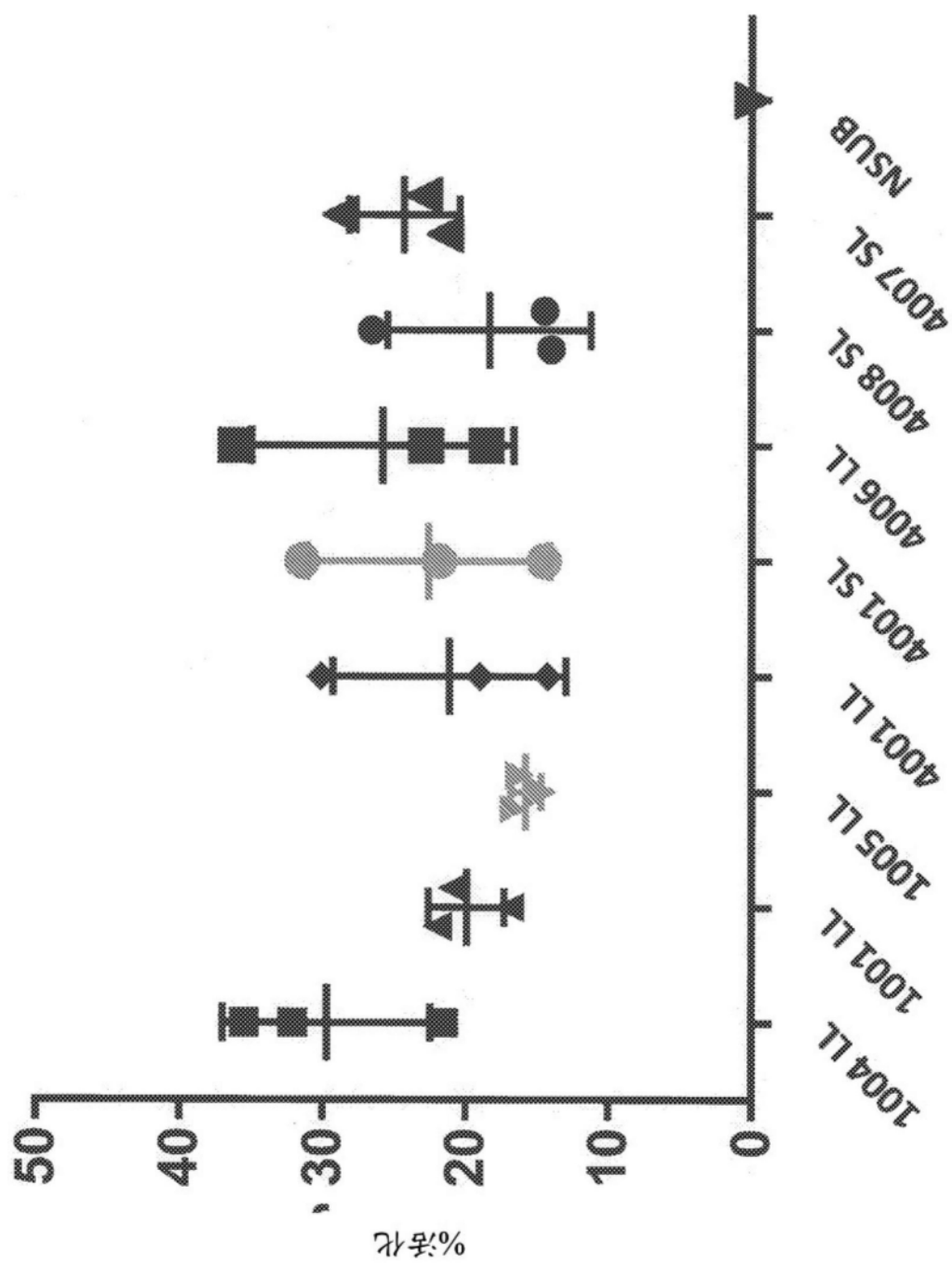


图4

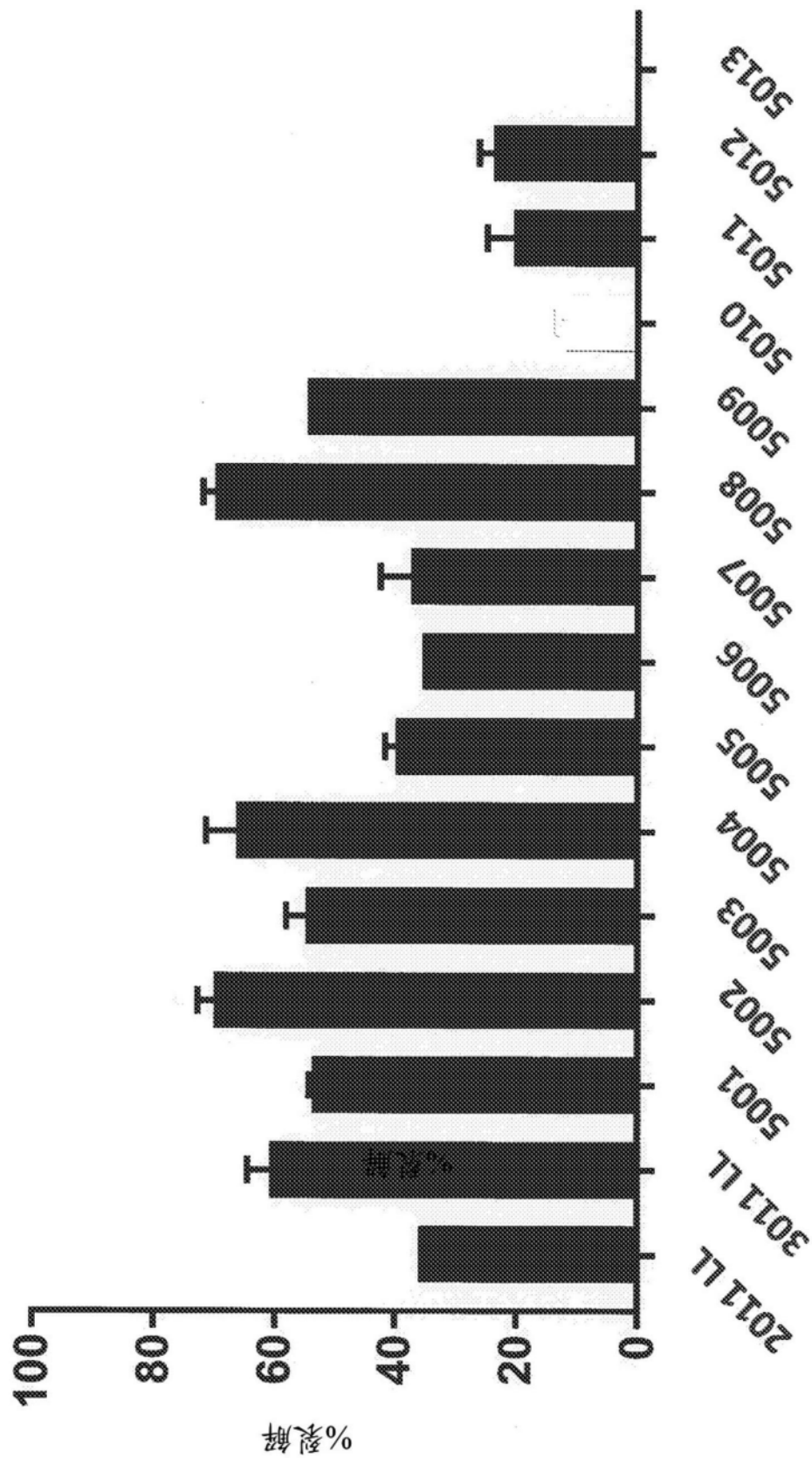


图5

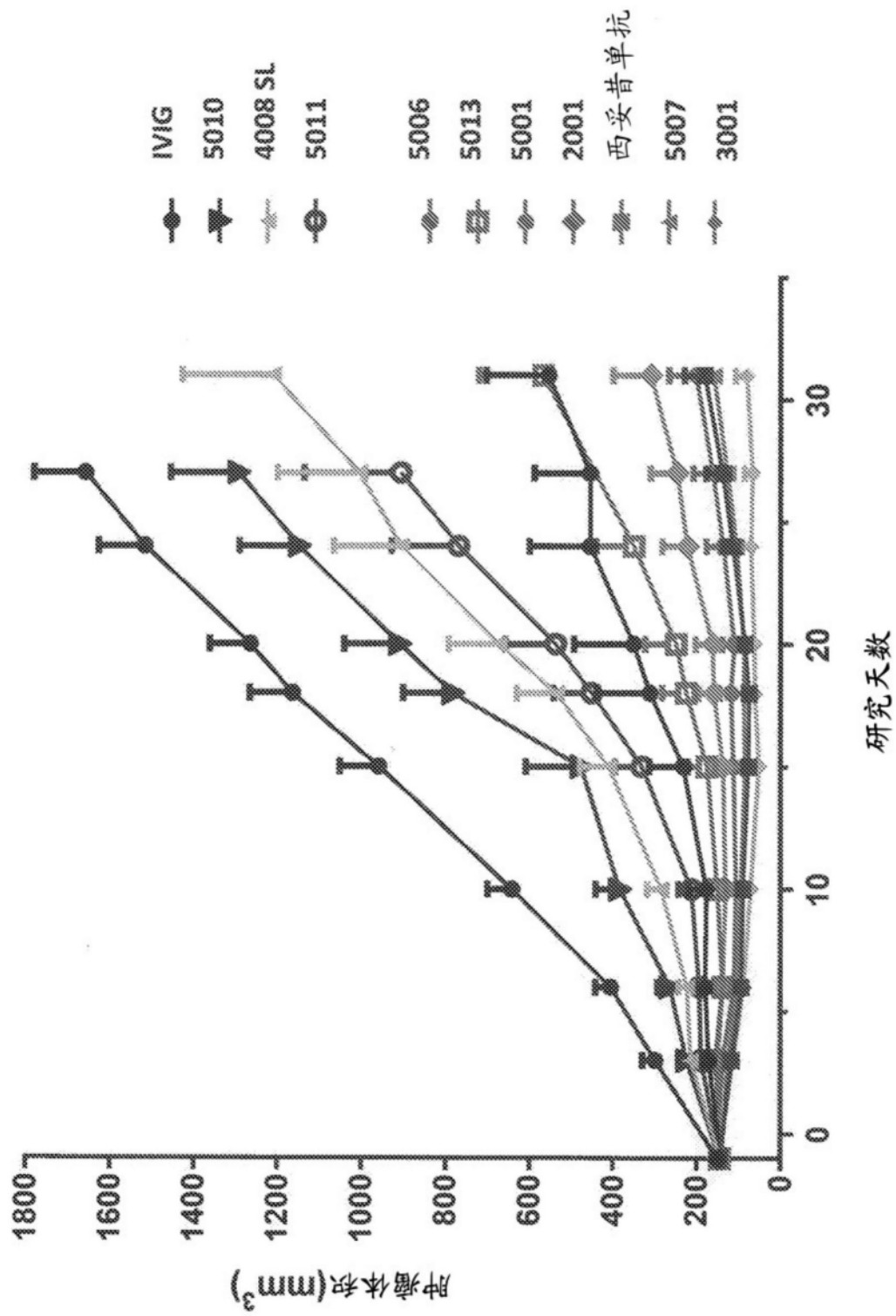


图6

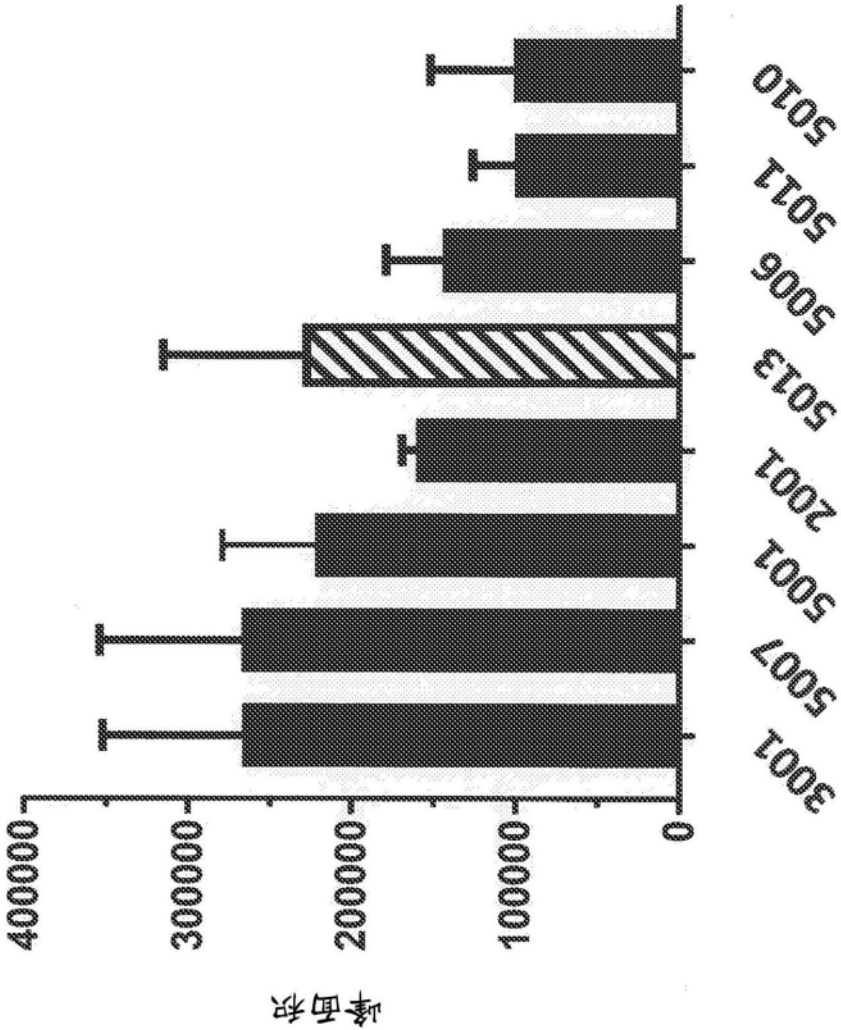


图7

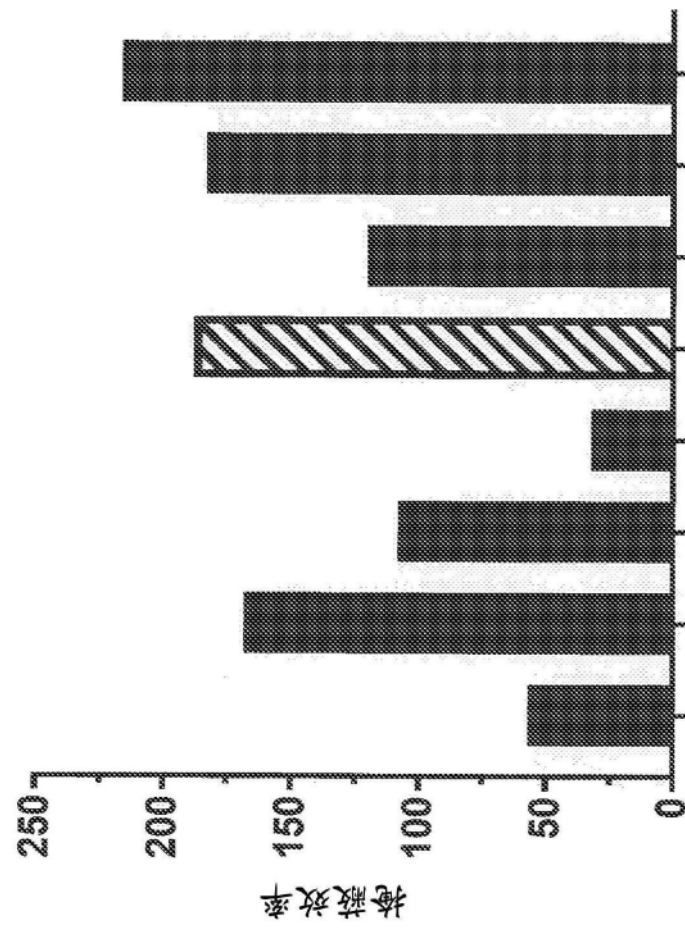


图8

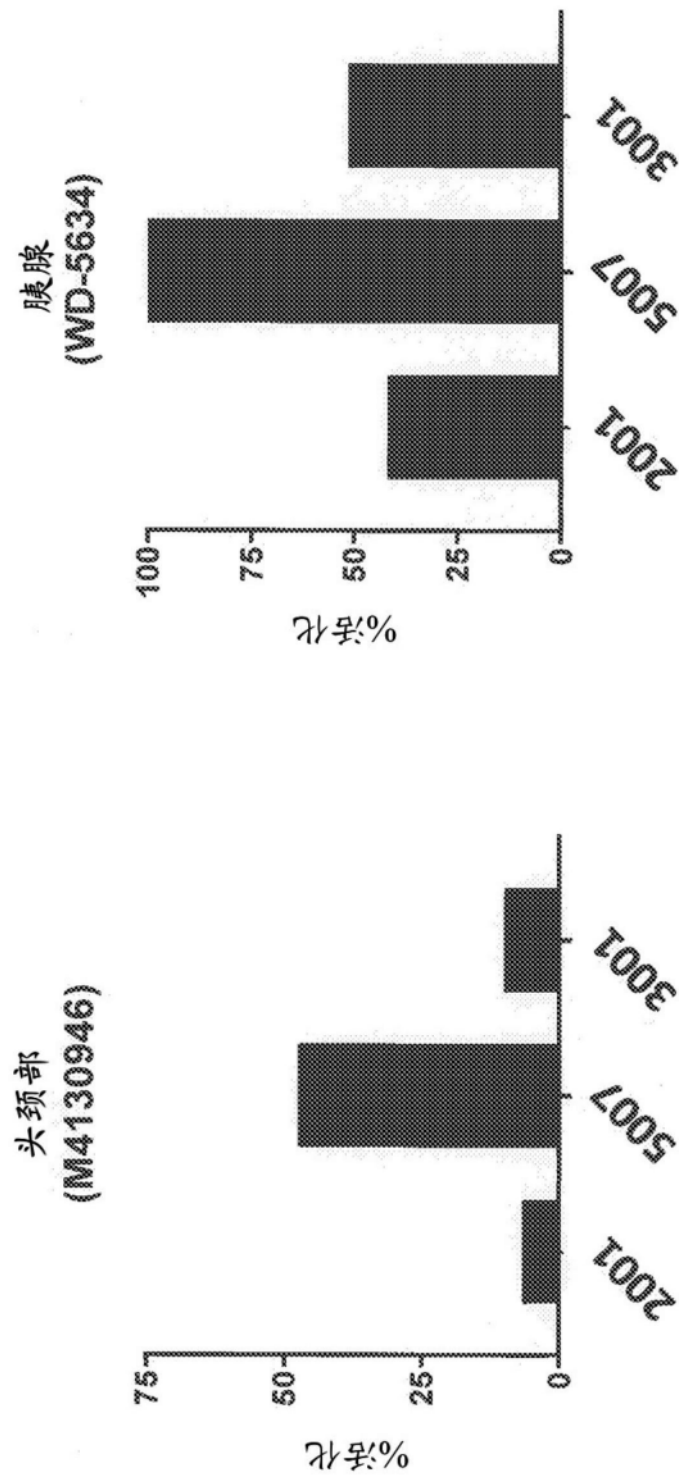


图9