



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110461361 A

(43)申请公布日 2019.11.15

(21)申请号 201880021558.4

(22)申请日 2018.02.09

(30)优先权数据

62/457,780 2017.02.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/017653 2018.02.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/148566 EN 2018.08.16

(71)申请人 蜻蜓治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 格雷戈里·P·张 安·F·张

威廉·哈尼 布拉德利·M·伦德

比昂卡·普林茨

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 武晶晶

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

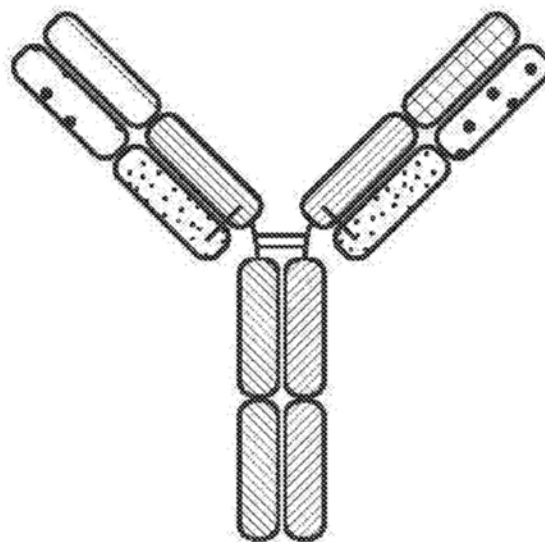
权利要求书3页 说明书33页
序列表56页 附图21页

(54)发明名称

结合BCMA、NKG2D和CD16的蛋白

(57)摘要

描述了结合BCMA、NKG2D受体和CD16的多特异性结合蛋白,以及用于治疗癌症的药物组合物 and 治疗方法。



1. 一种蛋白,其包含:
 - (a) 结合NKG2D的第一抗原结合位点;
 - (b) 结合BCMA的第二抗原结合位点;和
 - (c) 足以结合CD16的抗体Fc结构域或其部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。
2. 根据权利要求1所述的蛋白,其中所述第一抗原结合位点结合于人、非人灵长类动物和啮齿动物中的NKG2D。
3. 根据权利要求1或2所述的蛋白,其中所述第一抗原结合位点包含重链可变结构域和轻链可变结构域。
4. 根据权利要求3所述的蛋白,其中所述重链可变结构域和所述轻链可变结构域存在于相同的多肽上。
5. 根据权利要求3-4中任一项所述的蛋白,其中所述第二抗原结合位点包含重链可变结构域和轻链可变结构域。
6. 根据权利要求5所述的蛋白,其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域和轻链可变结构域存在于相同的多肽上。
7. 根据权利要求5或6所述的蛋白,其中所述第一抗原结合位点的轻链可变结构域的氨基酸序列与所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域的氨基酸序列相同。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的蛋白,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:1至少90%相同的重链可变结构域。
9. 根据权利要求1-7中任一项所述的蛋白,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:41至少90%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:42至少90%相同的轻链可变结构域。
10. 根据权利要求1-7中任一项所述的蛋白,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:43至少90%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:44至少90%相同的轻链可变结构域。
11. 根据权利要求1-7中任一项所述的蛋白,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:45至少90%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:46至少90%相同的轻链可变结构域。
12. 根据权利要求1-7中任一项所述的蛋白,其中所述第一抗原结合位点包含与SEQ ID NO:47至少90%相同的重链可变结构域和与SEQ ID NO:48至少90%相同的轻链可变结构域。
13. 根据权利要求1或2所述的蛋白,其中所述第一抗原结合位点是单结构域抗体。
14. 根据权利要求13所述的蛋白,其中所述单结构域抗体是V_HH片段或V_{NAR}片段。
15. 根据权利要求1-2或13-14中任一项所述的蛋白,其中所述第二抗原结合位点包含重链可变结构域和轻链可变结构域。
16. 根据权利要求15所述的蛋白,其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域和轻链可变结构域存在于相同的多肽上。
17. 根据前述权利要求中任一项所述的蛋白,其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:49至少90%相同的氨基酸序列,并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54至少90%相同的氨基酸序列。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的蛋白, 其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含含有以下的氨基酸序列:

与SEQ ID NO:50的氨基酸序列相同的重链CDR1序列;
与SEQ ID NO:51的氨基酸序列相同的重链CDR2序列; 和
与SEQ ID NO:52的氨基酸序列相同的重链CDR3序列。

19. 根据权利要求18所述的蛋白, 其中所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含含有以下的氨基酸序列:

与SEQ ID NO:55的氨基酸序列相同的轻链CDR1序列;
与SEQ ID NO:56的氨基酸序列相同的轻链CDR2序列; 和
与SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:57的氨基酸序列相同的轻链CDR3序列。

20. 根据权利要求1-16中任一项所述的蛋白, 其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:59至少90%相同的氨基酸序列, 并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:60至少90%相同的氨基酸序列。

21. 根据权利要求1-16或20中任一项所述的蛋白, 其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含含有以下的氨基酸序列:

与SEQ ID NO:79的氨基酸序列相同的重链CDR1序列;
与SEQ ID NO:80的氨基酸序列相同的重链CDR2序列; 和
与SEQ ID NO:81的氨基酸序列相同的重链CDR3序列。

22. 根据权利要求21所述的蛋白, 其中所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含含有以下的氨基酸序列:

与SEQ ID NO:82的氨基酸序列相同的轻链CDR1序列;
与SEQ ID NO:83的氨基酸序列相同的轻链CDR2序列; 和
与SEQ ID NO:84的氨基酸序列相同的轻链CDR3序列。

23. 根据权利要求1-16中任一项所述的蛋白, 其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含与SEQ ID NO:61至少90%相同的氨基酸序列, 并且所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:62至少90%相同的氨基酸序列。

24. 根据权利要求1-16或23中任一项所述的蛋白, 其中所述第二抗原结合位点的重链可变结构域包含含有以下的氨基酸序列:

与SEQ ID NO:85的氨基酸序列相同的重链CDR1序列;
与SEQ ID NO:86的氨基酸序列相同的重链CDR2序列; 和
与SEQ ID NO:87的氨基酸序列相同的重链CDR3序列。

25. 根据权利要求24中所述的蛋白, 其中所述第二抗原结合位点的轻链可变结构域包含含有以下的氨基酸序列:

与SEQ ID NO:88的氨基酸序列相同的轻链CDR1序列;
与SEQ ID NO:89的氨基酸序列相同的轻链CDR2序列; 和
与SEQ ID NO:90的氨基酸序列相同的轻链CDR3序列。

26. 根据权利要求1-4或8-14中任一项所述的蛋白, 其中所述第二抗原结合位点是单结构域抗体。

27. 权利要求26所述的蛋白, 其中所述第二抗原结合位点是V_HH片段或V_{NAR}片段。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的蛋白, 其中所述蛋白包含足以结合CD16的抗体Fc结构域的部分, 其中所述抗体Fc结构域包含铰链和CH2结构域。

29. 根据权利要求28所述的蛋白, 其中所述抗体Fc结构域包含人IgG1抗体的铰链和CH2结构域。

30. 根据权利要求28或29所述的蛋白, 其中所述Fc结构域包含与人IgG1抗体的氨基酸234-332至少90%相同的氨基酸序列。

31. 根据权利要求28-30中任一项所述的蛋白, 其中所述Fc结构域包含与人IgG1的Fc结构域至少90%相同的氨基酸序列, 并且在选自以下的一个或多个位置不同: Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411、K439。

32. 一种制剂, 其包含根据前述权利要求中任一项所述的蛋白和药学上可接受的载体。

33. 一种细胞, 其包含一种或多种表达根据权利要求1-31中任一项所述的蛋白的核酸。

34. 一种直接和/或间接增强肿瘤细胞死亡的方法, 所述方法包括将肿瘤和自然杀伤细胞暴露于根据权利要求1-31中任一项所述的蛋白。

35. 一种治疗癌症的方法, 其中所述方法包含向患者施用根据权利要求1-31中任一项所述的蛋白或根据权利要求32所述的制剂。

36. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述癌症选自多发性骨髓瘤、急性髓单核细胞白血病、T细胞淋巴瘤、急性单核细胞白血病和滤泡性淋巴瘤。

结合BCMA、NKG2D和CD16的蛋白

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年2月10日提交的第62/457,780号美国临时专利申请的权益和优先权,出于所有目的将其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,其已经以ASCII格式电子提交,并且将其全部内容通过引用并入本文。所述ASCII拷贝创建于2018年2月8日,命名为DFY-003PC_SL.txt,大小为91,310字节。

发明领域

[0005] 本发明涉及结合于B细胞成熟抗原(BCMA)、NKG2D受体和CD16的多特异性结合蛋白。

[0006] 背景

[0007] 尽管在文献中报道了用于治疗该疾病的大量研究努力和科学进展,但癌症仍然是重要的健康问题。血癌和骨髓癌是经常确诊的癌症类型,包括多发性骨髓瘤、白血病和淋巴瘤。目前针对这些癌症的治疗选择并不是对所有患者都有效和/或可能具有显著的不良副作用。使用现有治疗选择治疗其他类型的癌症仍然具有挑战性。

[0008] 癌症免疫疗法是理想的,因为它们是具有高度特异性的并且可以利用患者自身的免疫系统促进癌细胞的破坏。融合蛋白,如双特异性T细胞衔接器(engager)是文献中描述的癌症免疫疗法,其结合于肿瘤细胞和T细胞以促进肿瘤细胞的破坏。文献中已经描述了结合于某些肿瘤相关抗原和某些免疫细胞的抗体。参见例如,WO 2016/134371和WO 2015/095412。

[0009] 自然杀伤(NK)细胞是先天免疫系统的组分,并且占循环淋巴细胞的约15%。NK细胞几乎渗透到所有组织中,原始的特征在于它们能够有效杀死肿瘤细胞而无需事先致敏。活化的NK细胞通过类似于细胞毒性T细胞的方式杀死靶细胞—即通过含有穿孔素和颗粒酶的细胞溶解颗粒以及通过死亡受体途径。活化的NK细胞还分泌炎性细胞因子,例如IFN- γ 和趋化因子,其促进其他白细胞向靶组织的募集。

[0010] NK细胞通过其表面上的各种活化和抑制受体对信号作出反应。例如,当NK细胞遇到健康的自体细胞时,它们的活性通过活化杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)而被抑制。供选择地,当NK细胞遇到外来细胞或癌细胞时,它们通过其活化受体(例如,NKG2D、NCR、DNAM1)被活化。NK细胞也通过其表面上的CD16受体被一些免疫球蛋白的恒定区活化。NK细胞对活化的总体敏感性取决于刺激和抑制信号的总和。

[0011] BCMA是属于TNF-受体超家族的跨膜蛋白。它特异性结合于肿瘤坏死因子(配体)超家族成员13b(TNFSF13B/TALL-1/BAFF),导致NF- κ B和MAPK8/JNK活化。其表达局限于B细胞谱系,并且已显示对B细胞发育和自身免疫应答是重要的。BCMA还结合于各种TRAF家族成员,因此可能转导细胞存活和增殖的信号。BCMA涉及多种癌症,如多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。本发明提供了改善表达BCMA的癌症的治疗的某些优点。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供了与癌细胞上的BCMA和自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体结合的多特异性结合蛋白。这样的蛋白可以与多于一种的NK活化受体结合,并且可以阻断天然配体与NKG2D的结合。在某些实施方案中,蛋白可以激动人和其他物种,如啮齿动物和食蟹猴中的NK细胞。下面进一步详细描述本发明的各方面和实施方案。

[0014] 因此,本发明的一个方面提供了一种蛋白,其包含结合NKG2D的第一抗原结合位点;结合于BCMA的第二抗原结合位点;和足以结合CD16的抗体Fc结构域或其部分,或结合CD16的第三抗原结合位点。所述抗原结合位点可以各自包含抗体重链可变结构域和抗体轻链可变结构域(例如,如在抗体中排列,或融合在一起以形成scFv),或所述抗原结合位点中的一个或多个可以是单结构域抗体,例如V_HH抗体,如骆驼抗体,或V_{NAR}抗体,如在软骨鱼中发现的那些。

[0015] 在一个实施方案中,例如通过使氨基酸序列与SEQ ID NO:1至少90%、至少95%或100%相同,和/或包含与SEQ ID NO:1的CDR1(SEQ ID NO:64)、CDR2(SEQ ID NO:65)和CDR3(SEQ ID NO:66)序列相同的氨基酸序列,结合于NKG2D的第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:1相关的重链可变结构域。供选择地,第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:41相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:42相关的轻链可变结构域。例如,第一抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:41至少90%、至少95%或100%相同,和/或包含与SEQ ID NO:41的CDR1(SEQ ID NO:67)、CDR2(SEQ ID NO:68)和CDR3(SEQ ID NO:69)序列相同的氨基酸序列。类似地,第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:42至少90%、至少95%或100%相同,和/或包含与SEQ ID NO:42的CDR1(SEQ ID NO:70)、CDR2(SEQ ID NO:71)和CDR3(SEQ ID NO:72)序列相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:43相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:44相关的轻链可变结构域。例如,第一抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:43至少90%、至少95%或100%相同,和/或包含与SEQ ID NO:43的CDR1(SEQ ID NO:73)、CDR2(SEQ ID NO:74)和CDR3(SEQ ID NO:75)序列相同的氨基酸序列。类似地,第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:44至少90%、至少95%或100%相同,和/或包含与SEQ ID NO:44的CDR1(SEQ ID NO:76)、CDR2(SEQ ID NO:77)和CDR3(SEQ ID NO:78)序列相同的氨基酸序列。

[0016] 供选择地,例如通过分别使氨基酸序列与SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46至少90%、至少95%或100%相同,第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:45相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:46相关的轻链可变结构域。在另一个实施方案中,例如通过使氨基酸序列分别与SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48至少90%、至少95%或100%相同,第一抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:47相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:48相关的轻链可变结构域。

[0017] 第二抗原结合位点可以任选地包含与SEQ ID NO:49相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54相关的轻链可变结构域。例如,第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:49至少90%、至少95%或100%相同,和/或包含与SEQ ID NO:49的CDR1(SEQ ID NO:50)、CDR2(SEQ ID NO:51)和CDR3(SEQ ID NO:52)序列相同的氨基酸序列。类似地,第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:53至少90%、至少95%或100%相同和/或包含与SEQ ID NO:53的CDR1(SEQ ID NO:55)、CDR2(SEQ ID NO:56)

和CDR3 (SEQ ID NO:57) 序列相同的氨基酸序列。供选择地, 第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:54至少90%、至少95%或100%相同和/或包含与SEQ ID NO:54的CDR1 (SEQ ID NO:55)、CDR2 (SEQ ID NO:56) 和CDR3 (SEQ ID NO:58) 序列相同的氨基酸序列。

[0018] 供选择地, 第二抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:59相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:60相关的轻链可变结构域。例如, 第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:59至少90%、至少95%或100%相同, 和/或包含与SEQ ID NO:59的CDR1 (SEQ ID NO:79)、CDR2 (SEQ ID NO:80) 和CDR3 (SEQ ID NO:81) 序列相同的氨基酸序列。类似地, 第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:60至少90%、至少95%或100%相同, 和/或包含与SEQ ID NO:60的CDR1 (SEQ ID NO:82)、CDR2 (SEQ ID NO:83) 和CDR3 (SEQ ID NO:84) 序列相同的氨基酸序列。

[0019] 在另一个实施方案中, 第二抗原结合位点可以包含与SEQ ID NO:61相关的重链可变结构域和与SEQ ID NO:62相关的轻链可变结构域。例如, 第二抗原结合位点的重链可变结构域可以与SEQ ID NO:61至少90%、至少95%或100%相同, 和/或包含与SEQ ID NO:61的CDR1 (SEQ ID NO:85)、CDR2 (SEQ ID NO:86) 和CDR3 (SEQ ID NO:87) 序列相同的氨基酸序列。类似地, 第二抗原结合位点的轻链可变结构域可以与SEQ ID NO:62至少90%、至少95%或100%相同, 和/或包含与SEQ ID NO:62的CDR1 (SEQ ID NO:88)、CDR2 (SEQ ID NO:89) 和CDR3 (SEQ ID NO:90) 序列相同的氨基酸序列。

[0020] 在一些实施方案中, 第二抗原结合位点包含的轻链可变结构域的氨基酸序列与第一抗原结合位点中存在的轻链可变结构域的氨基酸序列相同。

[0021] 在一些实施方案中, 蛋白包含足以结合CD16的抗体Fc结构域的部分, 其中所述抗体Fc结构域包含铰链和CH2结构域, 和/或与人IgG抗体的氨基酸序列234-332至少90%相同的氨基酸序列。

[0022] 还提供了包含这些蛋白之一的制剂; 包含一种或多种表达这些蛋白的核酸的细胞, 和使用这些蛋白增强肿瘤细胞死亡的方法。

[0023] 本发明的另一个方面提供治疗患者的癌症的方法。所述方法包括向有此需要的患者施用治疗有效量的本文所述的多特异性结合蛋白。使用该多特异性结合蛋白治疗的示例性癌症包括例如, 多发性骨髓瘤、急性髓单核细胞白血病、T细胞淋巴瘤、急性单核细胞白血病和滤泡性淋巴瘤。

[0024] 附图简要说明

[0025] 图1是异源二聚多特异性抗体的图示。NKG2D结合结构域(右臂); 肿瘤抗原结合结构域(左臂)。共同的轻链在图中用相同的阴影或图案表示。

[0026] 图2是异源二聚多特异性抗体的图示。NKG2D结合结构域-scFv(右臂); 肿瘤抗原结合结构域(左臂)。

[0027] 图3是三功能抗体 (Triomab) 形式的TriNKET的图示, 其为保持IgG样形状的三功能双特异性抗体。该嵌合体由源自两种亲本抗体的两个半抗体组成, 每个半抗体具有一条轻链和一条重链。三功能抗体形式可以是包含 $1/2$ 的大鼠抗体和 $1/2$ 的小鼠抗体的异源二聚体构建体。

[0028] 图4是KiH共同轻链 (LC) 形式的TriNKET的图示, 其涉及杵臼 (knobs-into-holes)

(KIH) 技术。KiH是包含2种与靶标1和2结合的Fab和通过异源二聚化突变稳定的Fc的异源二聚体。KiH形式的TriNKET可以是具有2种与靶标1和2结合的fab的异源二聚体构建体,包含两条不同的重链和与两条重链配对的共同轻链。

[0029] 图5是双可变结构域免疫球蛋白 (DVD-IgTM) 形式的TriNKET的图示,其通过柔性的天然存在的接头组合两种单克隆抗体的靶结合结构域,并产生四价IgG样分子。DVD-IgTM是同源二聚体构建体,其中靶向抗原2的可变结构域融合到靶向抗原1的Fab的可变结构域的N末端。构建体包含正常Fc。

[0030] 图6是正交Fab界面 (Orthogonal Fab interface) (Ortho-Fab) 形式的TriNKET的图示,其为包含融合到Fc的2种与靶标1和靶标2结合的Fab异源二聚体构建体。通过正交界面确保LC-HC配对。通过Fc中的突变确保异源二聚化。

[0031] 图7是2合1Ig形式的TrinKET的图示。

[0032] 图8是ES形式的TriNKET的图示,其为包含融合到Fc的2种不同的与靶标1和靶标2结合的Fab的异源二聚体构建体。通过Fc中的静电转向突变确保异源二聚化。

[0033] 图9是Fab臂交换形式的TriNKET的图示:抗体通过将重链和附着的轻链(半分子)与来自另一个分子的重链-轻链对对换来交换Fab臂,产生双特异性抗体。Fab臂交换形式(cFae)是包含2种与靶标1和2结合的Fab以及通过异源二聚化突变稳定的Fc的异源二聚体。

[0034] 图10是SEED体形式的TriNKET的图示,其为包含2种与靶标1和2结合的Fab以及通过异源二聚化突变稳定的Fc的异源二聚体。

[0035] 图11是LuZ-Y形式的TriNKET的图示,其中亮氨酸拉链用于诱导两条不同的HC的异源二聚化。LuZ-Y形式是包含融合到Fc的两种不同的与靶标1和2结合的scFab的异源二聚体。通过融合到Fc的C末端的亮氨酸拉链基序确保异源二聚化。

[0036] 图12是Cov-X-体形式的TriNKET的图示。

[0037] 图13A-13B是Kλ-体形式的TriNKET的图示,其为具有两种不同的融合到通过异源二聚化突变稳定的Fc的Fab的异源二聚体构建体:靶向抗原1的Fab1包含κLC,而靶向抗原2的第二Fab包含λLC。图13A是一种Kλ-体形式的示例性图示;图13B是另一种Kλ-体的示例性图示。

[0038] 图14是显示在ELISA分析中NKG2D结合结构域(作为克隆列出)与人重组NKG2D的结合亲和力的线形图。

[0039] 图15是显示在ELISA分析中NKG2D结合结构域(作为克隆列出)与食蟹猴重组NKG2D的结合亲和力的线形图。

[0040] 图16是显示在ELISA分析中NKG2D结合结构域(作为克隆列出)与小鼠重组NKG2D的结合亲和力的线形图。

[0041] 图17是显示通过流式细胞术得到的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)与表达人NKG2D的EL4细胞的结合的条形图,显示相对于背景的平均荧光强度(MFI)倍数。

[0042] 图18是显示通过流式细胞术得到的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)与表达小鼠NKG2D的EL4细胞的结合的条形图,显示相对于背景的平均荧光强度(MFI)倍数。

[0043] 图19是显示通过与天然配体ULBP-6竞争得到的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)与重组人NKG2D-Fc的特异性结合亲和力的线形图。

[0044] 图20是显示通过与天然配体MICA竞争得到的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)与

重组人NKG2D-Fc的特异性结合亲和力的线形图。

[0045] 图21是显示通过与天然配体Rae-1 δ 竞争得到的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)与重组小鼠NKG2D-Fc的特异性结合亲和力的线形图。

[0046] 图22是显示通过定量TNF- α 阳性细胞(其表达人NKG2D-CD3 ζ 融合蛋白)的百分比得到的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对人NKG2D的活化的条形图。

[0047] 图23是显示通过定量TNF- α 阳性细胞(其表达小鼠NKG2D-CD3 ζ 融合蛋白)的百分比得到的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对小鼠NKG2D的活化的条形图。

[0048] 图24是显示NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对人NK细胞的活化的条形图。

[0049] 图25是显示NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对人NK细胞的活化的条形图。

[0050] 图26是显示NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对小鼠NK细胞的活化的条形图。

[0051] 图27是显示NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对小鼠NK细胞的活化的条形图。

[0052] 图28是显示NKG2D结合结构域(作为克隆列出)对肿瘤细胞的细胞毒性作用的条形图。

[0053] 图29是显示通过差示扫描荧光测定法测量的NKG2D结合结构域(作为克隆列出)的解链温度的条形图。

[0054] 图30是显示靶向BCMA的TriNKET与EL4细胞上表达的NKG2D的结合曲线的线形图。

[0055] 图31是显示靶向BCMA的TriNKET与MM.1S人骨髓瘤细胞上表达的BCMA的结合曲线的线形图。

[0056] 图32是显示在具有BCMA阳性MM.1S人骨髓瘤细胞的培养物中的人NK活化的条形图。

[0057] 图33是显示具有不同NKG2D结合结构域的靶向BCMA的TriNKET提高KMS12-PE骨髓瘤细胞的人NK细胞裂解的线形图。

[0058] 图34A-34C是使用CD16和NKG2D协同活化NK细胞的条形图。图34A显示CD107a的水平;图34B显示IFN γ 的水平;图34C显示CD107a和IFN γ 的水平。图表表示平均(n=2) $\pm$ SD。数据表示使用五种不同健康供体进行的五个独立实验。

[0059] 图35是Oasc-Fab异源二聚体构建体,其包含与靶标1结合的Fab和融合到Fc的与靶标2结合的scFab。通过Fc中的突变确保异源二聚化。

[0060] 图36是DuetMab,其为包含两种不同的与抗原1和2结合的Fab和通过异源二聚化突变稳定的Fc的异源二聚体构建体。Fab 1和2包含不同的S-S桥,其确保正确的轻链(LC)和重链(HC)配对。

[0061] 图37是CrossmAb,其为具有融合到通过异源二聚化稳定的Fc的两种不同的与靶标1和2结合的Fab的异源二聚体构建体。CL和CH1结构域与VH和VL结构域交换,例如,CH1与VL在一列融合,而CL与VH在一列融合。

[0062] 图38是Fit-Ig,其为同源二聚体构建体,其中与抗原2结合的Fab融合到与抗原1结合的Fab的HC的N末端。所述构建体包含野生型Fc。

[0063] 图39是显示TriNKET增强KMS12-PE骨髓瘤细胞的人NK细胞裂解的图表。

[0064] 详述

[0065] 本发明提供了结合癌细胞上的BCMA和自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体以活化自然杀伤细胞的多特异性结合蛋白,包含这样的多特异性结合蛋白的药物组合物,和

使用这样的这样的多特异性蛋白和药物组合物的治疗方法,包括用于治疗癌症。下面分节阐述本发明的各个方面;然而,在一个特定章节中描述的本发明的方面不限于任何特定章节。

[0066] 为了便于理解本发明,下面定义了许多术语和短语。

[0067] 除非上下文不合适,否则本文所用的术语“一种(a)”和“一种(an)”表示“一种或多种”并且包括复数。

[0068] 如本文所使用的,术语“抗原结合位点”是指参与抗原结合的免疫球蛋白分子的部分。在人抗体中,抗原结合位点由重链(“H”)和轻链(“L”)的N-末端可变区(“V”)的氨基酸残基形成。重链和轻链的V区内的三个高度发散的区段称为“高变区”,其插入称为“框架区”或“FR”的更保守的侧翼区段之间。因此,术语“FR”是指天然存在于免疫球蛋白中的高变区之间和邻近免疫球蛋白中的高变区的氨基酸序列。在人抗体分子中,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,并且重链和轻链中的每条的三个高变区被称为“互补决定区”或“CDR”。在某些动物,如骆驼和软骨鱼中,抗原结合位点由提供“单结构域抗体”的单一抗体链形成。抗原结合位点可以存在于完整抗体中,存在于保留抗原结合表面的抗体的抗原结合片段中,或存在于使用肽接头将单一多肽中的重链可变结构域与轻链可变结构域连接的重组多肽如scFv中。

[0069] 本文所使用的术语“肿瘤相关抗原”是指任何抗原,包括但不限于与癌症相关的蛋白、糖蛋白、神经节苷脂、碳水化合物、脂质。这样的抗原可以在恶性肿瘤细胞上或在肿瘤微环境中表达,如在肿瘤相关血管、细胞外基质、间充质基质或免疫浸润物上表达。

[0070] 如本文所使用的,术语“对象”和“患者”是指通过本文所述的方法和组合物治疗的生物。这样的生物优选包括但不限于哺乳动物(例如鼠、猿、马、牛、猪、犬、猫等),更优选包括人。

[0071] 如本文所使用的,术语“有效量”是指足以产生有益或期望结果的化合物(例如,本发明的化合物)的量。有效量可以在一次或多次施用、应用或给药中施用,并且不旨在限于特定的制剂或施用途径。如本文所使用的,术语“治疗”包括导致病症、疾病、障碍等的改善或改善其症状的任何作用,例如减轻、减少、调节、改善或消除。

[0072] 如本文所使用的,术语“药物组合物”是指活性剂与惰性或活性载体的组合,使得该组合物特别适用于体内或离体的诊断或治疗用途。

[0073] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的载体”是指任何标准药物载体,例如磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳液(例如,油/水或水/油乳液),和各种类型的润湿剂。组合物还可以包含稳定剂和防腐剂。对于载体、稳定剂和佐剂的实例,参见例如Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences,第15版, Mack Publ. Co., Easton, PA[1975]。

[0074] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的盐”是指本发明的化合物的任何药学上可接受的盐(例如,酸或碱),其在施用于对象后能够提供本发明的化合物或其活性代谢物或残留物。如本领域技术人员所知,本发明的化合物的“盐”可源自无机或有机酸和碱。示例性的酸包括但不限于,盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸、富马酸、马来酸、磷酸、乙醇酸、乳酸、水杨酸、琥珀酸、对甲苯磺酸、酒石酸、乙酸、柠檬酸、甲磺酸、乙磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、萘-2-磺酸、苯磺酸等。其它酸,如草酸,虽然本身不是药学上可接受的,但可用于制备用作

获得本发明的化合物及其药学上可接受的酸加成盐的中间体的盐。

[0075] 示例性的碱包括但不限于,碱金属(例如钠)氢氧化物、碱土金属(例如镁)氢氧化物、氨和式 NW_4^+ 的化合物,其中W是 C_{1-4} 烷基,等等。

[0076] 示例性的盐包括但不限于:乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡萄糖庚酸盐(flucosheptanoate)、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、苯丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一酸盐等。盐的其他实例包括与适合的阳离子如 Na^+ 、 NH_4^+ 和 NW_4^+ (其中W为 C_{1-4} 烷基)等配混的本发明的化合物的阴离子。

[0077] 对于治疗用途,预期本发明化合物的盐是药学上可接受的。然而,非药学上可接受的酸和碱的盐也可用于例如制备或纯化药学上可接受的化合物。

[0078] 在整个说明书中,当组合物被描述为具有、包括或包含特定组分,或者当工艺和方法被描述为具有、包括或包含特定步骤时,预期另外有基本上由所述组分组成或由所述组分组成的本发明的组合物,并且有基本上由所述工艺步骤组成或由所述工艺步骤组成的根据本发明的工艺和方法。

[0079] 一般而言,除非另有说明,否则指定百分比的组合物是按重量计的。此外,如果变量没有伴随定义,那么以变量的先前定义为主。

[0080] I. 蛋白

[0081] 本发明提供了结合癌细胞上的BCMA和自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体以活化自然杀伤细胞的多特异性结合蛋白。所述多特异性结合蛋白可用于本文所述的药物组合物和治疗方法中。多特异性结合蛋白与自然杀伤细胞上的NKG2D受体和CD16受体的结合增强了自然杀伤细胞破坏癌细胞的活性。多特异性结合蛋白与癌细胞上的BCMA的结合使癌细胞接近自然杀伤细胞,这有利于自然杀伤细胞直接和间接破坏癌细胞。以下提供示例性多特异性结合蛋白的进一步描述。

[0082] 多特异性结合蛋白的第一组分结合于表达NKG2D受体的细胞,其可以包括但不限于NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和 $CD8^+\alpha\beta$ T细胞。在NKG2D结合时,多特异性结合蛋白可以阻断天然配体(如ULBP6和MICA)与NKG2D结合。

[0083] 多特异性结合蛋白的第二组分结合于表达BCMA的细胞,其可以包括但不限于多发性骨髓瘤、急性髓单核细胞白血病、T细胞淋巴瘤、急性单核细胞白血病和滤泡性淋巴瘤。

[0084] 多特异性结合蛋白的第三组分结合于表达CD16的细胞,CD16是白细胞表面上的Fc受体,所述白细胞包括自然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞和滤泡树突细胞。

[0085] 多特异性结合蛋白可以呈现几种形式,例如以下实例中所述,但不限于以下实例。一种形式是异源二聚多特异性抗体,其包含第一免疫球蛋白重链、第二免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链。第一免疫球蛋白重链包含第一Fc(铰链-CH₂-CH₃)结构域、第一可变重链结构域和任选的第一CH₁重链结构域。免疫球蛋白轻链包含可变轻链结构域和恒定轻链结构域;免疫球蛋白轻链与第一免疫球蛋白重链一起形成结合NKG2D的抗原结合位点。第二免

疫球蛋白重链包含第二Fc(铰链-CH2-CH3)结构域、第二可变重链结构域和第二CH1重链结构域,除了当免疫球蛋白轻链与第二免疫球蛋白重链配对以外,其可以与与第一免疫球蛋白重链配对的免疫球蛋白轻链相同的免疫球蛋白轻链配对,得到的抗原结合位点结合于BCMA。第一Fc结构域和第二Fc结构域能够一起结合于CD16(图1)。

[0086] 另一种示例性形式涉及异源二聚多特异性抗体,其包含第一免疫球蛋白重链、免疫球蛋白轻链和第二免疫球蛋白重链。第一免疫球蛋白重链包含第一Fc(铰链-CH2-CH3)结构域,其通过接头或抗体铰链融合到结合NKG2D的单链Fv(scFv)。各种接头可以用于将scFv连接到第一Fc结构域或在scFv自身内连接。此外,scFv可以包含能够形成二硫键的突变,以稳定整个scFv结构。scFv还可以包含突变以改变整条第一免疫球蛋白重链的等电点和/或实现更容易的下游纯化。第二免疫球蛋白重链包含第二Fc(铰链-CH2-CH3)结构域和第二可变重链结构域和第二任选的CH1重链结构域。免疫球蛋白轻链包含可变轻链结构域和恒定轻链结构域。第二免疫球蛋白重链与免疫球蛋白轻链配对并结合于BCMA。第一Fc结构域和第二Fc结构域能够一起结合于CD16(图2)。

[0087] 一种或多种另外的结合基序可以融合到恒定区CH3结构域的C末端,任选地通过接头序列链接。在某些实施方案中,抗原结合位点可以是单链或二硫键稳定的可变区(scFv)或可以形成四价或三价分子。

[0088] 在一些实施方案中,多特异性结合蛋白为三功能抗体形式,其为保持IgG样形状的三功能双特异性抗体。该嵌合体由源自两种亲本抗体的两个半抗体组成,每个半抗体具有一条轻链和一条重链。

[0089] 在一些实施方案中,多特异性结合蛋白为KiH共同轻链(LC)形式,其涉及杵臼(KIH)技术。KIH涉及工程化CH3结构域以在每条重链中产生“杵”或“臼”,以促进异源二聚化。“杵臼(KiH)”Fc技术背后的概念是通过用体积大的残基替代小残基在一个CH3结构域(CH3A)引入“杵”(即,EU编号中的T366W_{CH3A})。为了容纳“杵”,通过用更小的残基替代与杵最接近的邻近残基,在另一个CH3结构域(CH3B)上建立互补的“臼”表面(即,T366S/L368A/Y407V_{CH3B})。通过结构化导向的噬菌体文库筛选优化“臼”突变(Atwell S,Ridgway JB,Wells JA,Carter P.Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library.J.Mol.Biol.(1997)270(1):26-35)。KiH Fc变体的X射线晶体结构(Elliott JM,Ultsch M,Lee J,Tong R,Takeda K,Spiess C等人,Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction.J.Mol.Biol.(2014)426(9):1947-57;Mimoto F,Kadono S,Katada H,Igawa T,Kamikawa T,Hattori K.Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγRs.Mol Immunol(2014)58(1):132-8)证明CH3结构域间核心界面处的空间互补性驱动的疏水相互作用在热力学上有利于异源二聚化,而杵-杵和臼-臼界面分别由于空间位阻和有利的相互作用的破坏而不利同源二聚化。

[0090] 在一些实施方案中,多特异性结合蛋白为双可变结构域免疫球蛋白(DVD-IgTM)形式,其通过柔性的天然存在的接头组合两种单克隆抗体的靶结合结构域,并产生四价IgG样分子。

[0091] 在一些实施方案中,多特异性结合蛋白为正交Fab界面(Ortho-Fab)形式。在

ortho-Fab IgG方法中 (Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL 等人. Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. Nat. Biotechnol. (2014) 32 (2) :191-8), 基于结构的区域设计仅在一个Fab中在LC和HC_{VH-CH1}界面处引入互补突变, 而对其他Fab没有任何改变。

[0092] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为2合1Ig形式。在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为ES形式, 其为包含融合到Fc的2种不同的与靶标1和靶标2结合的Fab的异源二聚体构建体。通过Fc中的静电转向突变确保异源二聚化。在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为K λ -体形式, 其为具有两种不同的融合到通过异源二聚化突变稳定的Fc的Fab的异源二聚体构建体: 靶向抗原1的Fab1包含 κ LC, 而靶向抗原2的第二Fab包含 λ LC。图13A是一种K λ -体形式的示例性图示; 图13B是另一种K λ -体的示例性图示。

[0093] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为Fab臂交换形式 (抗体通过将重链和附着的轻链 (半分子) 与来自另一个分子的重链-轻链对对换来交换Fab臂, 产生双特异性抗体)。在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为SEED体形式。链交换工程化结构域 (SEED) 平台被设计用于产生不对称和双特异性抗体样分子, 这种能力扩展了天然抗体的治疗应用。该蛋白工程化平台基于在保守的CH3结构域内交换结构相关的免疫球蛋白的序列。SEED设计允许有效产生AG/GA异源二聚体, 同时不利于AG和GA SEED CH3结构域的同源二聚化。(Muda M. 等人., Protein Eng. Des. Sel. (2011, 24 (5) :447-54))。在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为LuZ-Y形式, 其中亮氨酸拉链用于诱导两条不同的HC的异源二聚化 (Wranik, BJ. 等人., J. Biol. Chem. (2012) , 287:43331-9)。

[0094] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为Cov-X-体形式。在双特异性CovX-体中, 使用支链氮杂环丁酮接头将两种不同的肽连接在一起, 并在温和条件下以位点特异性方式与支架抗体融合。尽管药效团与功能活性有关, 但抗体支架赋予长半衰期和Ig样分布。可以化学优化药效团或用其他药效团替代药效团以产生优化的或独特的双特异性抗体。(Doppalapudi VR 等人., PNAS (2010) , 107 (52) :22611-22616)。

[0095] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为Oasc-Fab异源二聚体形式, 其包含与靶标1结合的Fab和融合到Fc的与靶标2结合的scFab。通过Fc中的突变确保异源二聚化。

[0096] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为DuetMab形式, 其为包含两种不同的与抗原1和2结合的Fab和通过异源二聚化突变稳定的Fc的异源二聚体构建体。Fab 1和2包含不同的S-S桥, 其确保正确的LC和HC配对。

[0097] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为CrossmAb形式, 其为具有融合到通过异源二聚化稳定的Fc的两种不同的与靶标1和2结合的Fab的异源二聚体构建体。CL和CH1结构域与VH和VL结构域交换, 例如, CH1与VL在一列融合, 而CL与VH在一列融合。

[0098] 在一些实施方案中, 多特异性结合蛋白为Fit-Ig形式, 其为同源二聚体构建体, 其中与抗原2结合的Fab融合到与抗原1结合的Fab的HC的N末端。所述构建体包含野生型Fc。

[0099] 表1列出了重链可变结构域和轻链可变结构域的肽序列, 其组合可以结合于NKG2D。

[0100]

表 1		
克隆	重链可变区氨基酸序列	轻链可变区氨基酸序列
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:1) CDR1 (SEQ ID NO:64) – GSFSGYYWS CDR2 (SEQ ID NO:65) – EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:66) – ARARGPWSFDP	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYNSYPIT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:3)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPIT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:4)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:5)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYHSFYT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:6)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:7)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQNSYYT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYNSYPT

[0101]

	SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:9)	FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:10)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW GFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:11)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITTCR TSQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDSATYYCQQSYDIPYT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:12)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQYGSFPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:14)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPDDEFATYYCQQSKEVPW TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:16)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:17)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQQYNSFPTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:18)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:19)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLLI IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQQYDIYPTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:20)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:21)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQQYDSYPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:22)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:23)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQQYGSFPTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:24)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQQYQSFPF

[0102]

	SFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:25)	GGGTKVEIK (SEQ ID NO:26)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQQYSSSFSTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:28)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:29)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQQYESYSTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:30)
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:31)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQQYDSFITF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:32)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:33)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQQYQSYPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:34)
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:35)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQQYHSFPTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:36)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQQYELYSY TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:38)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDEFATYYCQQYDTFITF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:40)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDVAVYYCARGDSSIR	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPRFSGS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ

[0103]

	HAYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:41) CDR1 (SEQ ID NO:67) - GTFSSYAIS CDR2 (SEQ ID NO:68) - GIIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:69) - ARGDSSIRHAYYYYGMDV	QYYSTPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:42) CDR1 (SEQ ID NO:70) - KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2 (SEQ ID NO:71) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:72) - QYYSTPIT
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARGSDRFH PYFDYWGGGTLTVTVSS (SEQ ID NO:43) CDR1 (SEQ ID NO:73) - GSISSSSYYWG CDR2 (SEQ ID NO:74) - SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:75) - ARGSDRFHPYFDY	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISLPEPDAFVYYCQQFDTPWPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:44) CDR1 (SEQ ID NO:76) - RASQSVSRYLA CDR2 (SEQ ID NO:77) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:78) - QQFDTPWPT
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGGGTLTVTVSS (SEQ ID NO:95)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDFAFYCEQYDSYPTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO:96)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS GGTFFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDVAVYYCARRGRKA SGSFYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:97)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCES SQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKPLIYWASTRESGVDPDRFSGS GSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQ NDYSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:98)
ADI-27744 (A44)	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGGY YDSGAGDYWGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO:99) CDR1 (SEQ ID NO:105) - FTFSSYAMS CDR2 (SEQ ID NO:106) -	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFAFYCQQGVSYPR FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:100) CDR1 (SEQ ID NO:108) - RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO:109) - AASSLQS

[0104]

	AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:107) - AKDGGYYDSGAGDY	CDR3 (SEQ ID NO:110) - QQGVSYPR
ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI SSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMG AAAGWFDPPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:101) CDR1 (SEQ ID NO:111) - FTFSSYSMN CDR2 (SEQ ID NO:112) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:113) - ARGAPMGAAAGWFDPP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGVSPFR FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:102) CDR1 (SEQ ID NO:114) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:115) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:116) - QQGVSPFR
ADI-29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWM GWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRD TSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARD TGEYYDTDDHGMDVWGQGTITVTS S (SEQ ID NO:103) CDR1 (SEQ ID NO:117) - YTFTGYYMH CDR2 (SEQ ID NO:118) - WINPNSGGTNYAQKFQ CDR3 (SEQ ID NO:119) - ARDTGEYYDTDDHGMDV	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLI YGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYCQQDDYWPPT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:104) CDR1 (SEQ ID NO:120) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:121) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:122) - QQDDYWPPT

[0105] 供选择地,由SEQ ID NO:45定义的重链可变结构域可以与由SEQ ID NO:46定义的轻链可变结构域配对,以形成可以结合于NKG2D的抗原结合位点,如US 9,273,136中所示。

[0106] QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDYWGGTITVTVSS (SEQ ID NO:45)

[0107] QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLPSGVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:46)

[0108] 供选择地,由SEQ ID NO:47定义的重链可变结构域可以与由SEQ ID NO:48定义的轻链可变结构域配对,以形成可以结合于NKG2D的抗原结合位点,如US 7,879,985中所示。

[0109] QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGSANYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:47)

[0110] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWFQGTKEIK (SEQ ID NO:48)

[0111] 表2列出了重链可变结构域和轻链可变结构域的肽序列,其组合可结合于BCMA。

[0112]

表 2		
克隆	重链可变结构域肽序列	轻链可变结构域肽序列
1 (US14,776,649)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYSPDYINWVRQAPG QGLEWMGWIFYASGNSEYNQ KFTGRVTMTRDTSSSTAYMELS SLRSEDVAVYFCASLYDYDWY FDVWGQGTMTVSS (SEQ ID NO:49) CDR1 (SEQ ID NO:50) - DYYIN CDR2 (SEQ ID NO:51) - WIYFASGNSEYNQKFTG CDR3 (SEQ ID NO:52) - LYDYDWYFDV	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISC KSSQSLVHSNGNTYLHWYLQ KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGADFTLKISRVEAED VGVYYCAETSHVPWTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO:53) 或 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS CKSSQSLVHSNGNTYLHWYL QKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGIIYCSQSSIYPWTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO:54) CDR1 (SEQ ID NO:55) - KSSQSLVHSNGNTYLH CDR2 (SEQ ID NO:56) - KVSNRFS CDR3 - AETSHVPWT (SEQ ID NO:57) 或 SQSSIYPWT (SEQ ID NO:58)
2 (PCT/US15/6426 9)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYTFTDYSINWVKRAPGK GLKWMGWINTETREPAYAYDF RGRFAFSLETSASTAYLQINNL KYEDTATYFCALDYSYAMDY WGQGTSTVSS (SEQ ID NO:59) CDR1 (SEQ ID NO:79) - DYSIN	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATIS CRASESVTILGSHLIHWYQQK PGQPPTLLIQLASNVQTGVPAR FSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDV AVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLE IK (SEQ ID NO:60) CDR1 (SEQ ID NO:82) - RASESVTILGSHLIH

[0113]

	CDR2 (SEQ ID NO:80) - WINTETREPAYAYDFR CDR3 (SEQ ID NO:81) - DYSYAMDY	CDR2 (SEQ ID NO:83) - LASNVQT CDR3 (SEQ ID NO:84) - LQSRTIPRT
3 (US14,122,391)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKASGGTFSNYWMHWVRQAP GQGLEWMGATYRGHSDTYYN QKFKGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSED TAVYYCARGAIYNGY DVLDN WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:61) CDR1 (SEQ ID NO:85) - NYWMH CDR2 (SEQ ID NO:86) - ATYRGHSDTYYNQKFKG CDR3 (SEQ ID NO:87) - GAIYNGYDVLDN	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CSASQDISNYLNWYQQKPGK APKLLIYYTSNLHSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYRKLPWTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:62) CDR1 (SEQ ID NO:88) - SASQDISNYLN CDR2 (SEQ ID NO:89) - YTSNLHS CDR3 (SEQ ID NO:90) - QQYRKLPWT
4 (US20170051068)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTC TVSGGSISSSYFWGWIRQPPG KGLEWIGSIYYSGITYYNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARHDGATAGLFDY WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:123) CDR1: SSSYFWG (SEQ ID NO:125) CDR2: SIYYSGITYYNPSLKS (SEQ ID NO:126) CDR3: HDGATAGLFDY (SEQ ID NO:127)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQA PVVVVYDDSDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEAVYYCQVWD SSSDHVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:124) CDR1: GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO:128) CDR2: DDSDRPS (SEQ ID NO:129) CDR3: QVWDSSSDHV (SEQ ID NO:130)
5 (WO2017021450)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFS DNAMGWVRQAPG KGLEWVSAISGPSSTYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKVLGWFDYW GQGLTVTVSS (SEQ ID NO:93) CDR1: RASQSVSDEYLS (SEQ ID NO:131) CDR2: SASTRAT (SEQ ID NO:132) CDR3: QQYGYPPDFT (SEQ ID NO:133)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC RASQSVSDEYLSWYQQKPGQ APRLLIHSASTRATGIPDRFSGS GSGTDFTLAISRLPEDEFAVYY CQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:94) CDR1: RASQSVSDEYLS (SEQ ID NO:134) CDR2: SASTRAT (SEQ ID NO:135) CDR3: QQYGYPPDFT (SEQ ID NO:136)

[0114] 供选择地,可以通过筛选与由SEQ ID NO:63定义的氨基酸序列的结合来确定可以结合于BCMA的新的抗原结合位点。

[0115] SEQ ID NO:63

[0116] MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLA

VFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDFHCFPL
PAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR

[0117] 在Fc结构域内,通过铰链区和CH2结构域介导CD16结合。例如,在人IgG1内,与CD16的相互作用主要集中在CH2结构域中的氨基酸残基Asp 265-Glu 269、Asn 297-Thr 299、Ala 327-Ile 332、Leu 234-Ser 239和碳水化合物残基N-乙酰基-D-葡萄糖胺(参见Sondermann等人.,Nature,406(6793):267-273)。例如通过使用噬菌体展示文库或酵母表面展示cDNA文库,可以基于已知的结构域选择突变以增强或降低与CD16的结合亲和力,或可以基于已知的相互作用的三维结构设计突变。

[0118] 异源二聚体抗体重链的组装可以通过在相同的细胞中表达两种不同的抗体重链序列来完成,这可以导致每条抗体重链的同源二聚体的组装以及异源二聚体的组装。促进异源二聚体的优先组装可以通过在每个抗体重链恒定区的CH3结构域中掺入不同的突变来实现,如US13/494870、US16/028850、US11/533709、US12/875015、US13/289934、US14/773418、US12/811207、US13/866756、US14/647480和US14/830336中所示。例如,基于人IgG1,可以在CH3结构域中产生突变,并且在第一多肽和第二多肽内掺入允许这两条链彼此选择性地异源二聚化的不同的氨基酸取代对。下面示出的氨基酸取代的位置均根据Kabat中的EU索引编号。

[0119] 在一种情况下,第一多肽中的氨基酸取代用选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W)的较大氨基酸替代原始氨基酸,并且第二多肽中的至少一种氨基酸取代用选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或缬氨酸(V)的较小氨基酸(多种较小氨基酸)替代原始氨基酸(多种原始氨基酸),使得较大的氨基酸取代(突起)配合较小氨基酸取代(空腔)的表面。例如,一种多肽可以包含T366W取代,另一种可以包含三种取代,包括T366S、L368A和Y407V。

[0120] 本发明的抗体重链可变结构域可以任选地偶联于与抗体恒定区至少90%相同的氨基酸序列,如具有或没有CH1结构域的包含铰链、CH2和CH3结构域的IgG恒定区。在一些实施方案中,恒定区的氨基酸序列与人抗体恒定区,如人IgG1恒定区、IgG2恒定区、IgG3恒定区或IgG4恒定区至少90%相同。在一些其他实施方案中,恒定区的氨基酸序列与来自另外的哺乳动物,如兔、犬、猫、小鼠或马的抗体恒定区至少90%相同。与人IgG1恒定区相比,一种或多种突变可以掺入恒定区中,例如位于Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和/或K439。示例性的取代包括例如,Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、T350V、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、T394W、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D和K439E。

[0121] 在某些实施方案中,可以掺入人IgG1恒定区的CH1中的突变可以位于氨基酸V125、F126、P127、T135、T139、A140、F170、P171,和/或V173。在某些实施方案中,可以掺入人IgG1恒定区的C_k中的突变C_k可以位于氨基酸E123、F116、S176、V163、S174和/或T164。

[0122] 氨基酸取代可以选自表3中所示的以下组的取代。

[0123]

表3		
	第一多肽	第二多肽
组1	S364E/F405A	Y349K/T394F
组2	S364H/D401K	Y349T/T411E
组3	S364H/T394F	Y349T/F405A
组4	S364E/T394F	Y349K/F405A
组5	S364E/T411E	Y349K/D401K
组6	S364D/T394F	Y349K/F405A
组7	S364H/F405A	Y349T/T394F
组8	S364K/E357Q	L368D/K370S
组9	L368D/K370S	S364K
组10	L368E/K370S	S364K
组11	K360E/Q362E	D401K
组12	L368D/K370S	S364K/E357L
组13	K370S	S364K/E357Q
组14	F405L	K409R
组15	K409R	F405L

[0124] 供选择地,氨基酸取代可以选自表4中所示的以下组的取代。

[0125]

表4		
	第一多肽	第二多肽
组1	K409W	D399V/F405T
组2	Y349S	E357W
组3	K360E	Q347R
组4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
组5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
组6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

[0126] 供选择地,氨基酸取代可以选自表5中所示的以下组的取代。

[0127]

表5		
	第一多肽	第二多肽
组1	T366K/L351K	L351D/L368E
组2	T366K/L351K	L351D/Y349E
组3	T366K/L351K	L351D/Y349D
组4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
组5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
组6	E356K/D399K	K392D/K409D

[0128] 供选择地,每条多肽链中的至少一种氨基酸取代可以选自表6。

[0129]	表 6	
	第一多肽	第二多肽
	L351Y、D399R、D399K、S400K、S400R、Y407A、Y407I、Y407V	T366V、T366I、T366L、T366M、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F K392D、K392E、K409F、K409W、T411D 和 T411E

[0130] 供选择地,至少一种氨基酸取代可以选自表7中的以下一组取代,其中第一多肽列中所示的位置(多个位置)被任何已知的带负电的氨基酸替代,并且第二多肽列中所示的位置(多个位置)被任何已知的带正电的氨基酸替代。

[0131]

表 7	
第一多肽	第二多肽

[0132]

K392、K370、K409 或 K439	D399、E356 或 E357
-----------------------	------------------

[0133] 供选择地,至少一种氨基酸取代可以选自表8中的以下一组,其中第一多肽列中所示的位置(多个位置)被任何已知的带正电的氨基酸替代,并且第二多肽列中所示的位置(多个位置)被任何已知的带负电的氨基酸替代。

[0134]

表8	
第一多肽	第二多肽
D399、E356或E357	K409、K439、K370或K392

[0135] 供选择地或另外地,异源多聚体蛋白的结构稳定性可以通过在第一或第二多肽链中的任一条上引入S354C,并且在相对的多肽链上引入Y349C提高,其在两条多肽的界面内形成人工二硫桥。

[0136] 可以使用本领域技术人员熟知的重组DNA技术制备上述多特异性蛋白。例如,编码第一免疫球蛋白重链的第一核酸序列可以克隆到第一表达载体中;编码第二免疫球蛋白重链的第二核酸序列可以克隆到第二表达载体中;编码免疫球蛋白轻链的第三核酸序列可以克隆到第三表达载体中;第一、第二和第三表达载体可以一起稳定转染到宿主细胞中以产生多聚体蛋白。

[0137] 为了实现多特异性蛋白质的最高产率,可以探索第一、第二和第三表达载体的不同比例以确定转染到宿主细胞中的最佳比例。转染后,可以使用本领域已知的方法分离单个克隆用于细胞库生成,例如有限稀释法、ELISA、FACS、显微镜检查或Clonepix。

[0138] 可以在适于生物反应器放大的条件下培养克隆并保持多特异性蛋白质的表达。可以使用本领域已知的方法分离和纯化多特异性蛋白,包括离心、深度过滤、细胞裂解、匀浆、冻融、亲和纯化、凝胶过滤、离子交换色谱、疏水相互作用交换色谱和混合模式色谱。

[0139] II.TriNKET的特征

[0140] 在某些实施方案中,包含NKG2D结合结构域和肿瘤相关抗原的结合结构域的本文所述的TriNKET与表达人NKG2D的细胞结合。在某些实施方案中,包含NKG2D结合结构域和肿瘤相关抗原的结合结构域的TriNKET以与具有相同肿瘤相关抗原结合结构域的单克隆抗体相当的水平结合于肿瘤相关抗原。

[0141] 本文所述的TriNKET在降低肿瘤生长和杀死癌细胞方面更有效。

[0142] 在某些实施方案中,当与表达抗原的肿瘤细胞一起培养时,包含NKG2D结合结构域和肿瘤相关抗原的结合结构域的本文所述的TriNKET活化原代人NK细胞。NK细胞活化的特征在于CD107a脱粒和IFN γ 细胞因子产生的增加。此外,与包含肿瘤相关抗原结合结构域的单克隆抗体相比,TriNKET显示在表达抗原的肿瘤细胞的存在下对人NK细胞的优越活化。例如,与抗BCMA单克隆抗体相比,具有BCMA结合结构域的本公开的TriNKET在表达BCMA的癌细胞的存在下对人NK细胞具有优越的活化。

[0143] 在某些实施方案中,本文所述的TriNKET包含NKG2D结合结构域和肿瘤相关抗原的结合结构域,其在表达抗原的肿瘤细胞的存在下增强静止的和IL-2活化的人NK细胞的活性。与IL-2活化的NK细胞相比,静止的NK细胞显示较少的背景IFN γ 产生和CD107a脱粒。在某些实施方案中,与IL-2活化的NK细胞相比,静止的NK细胞显示IFN γ 产生和CD107a脱粒的变化更大。在某些实施方案中,IL-2活化的NK细胞显示在使用TriNKET刺激后,更大百分比的细胞变成IFN γ +;CD107a+。

[0144] 在某些实施方案中,本文所述的TriNKET包含NKG2D结合结构域和肿瘤相关抗原BCMA的结合结构域,在表达抗原的肿瘤细胞的存在下增强静止的和IL-2活化的人NK细胞的细胞毒活性。此外,TriNKET(例如,A40-TriNKET、A44-TriNKET、A49-TriNKET、C26-TriNKET、F04-TriNKET、F43-TriNKET、F47-TriNKET和F63-TriNKET)包含肿瘤相关抗原BCMA的结合结构域,其与包含相同肿瘤相关抗原结合位点的单克隆抗体相比,更有效地引导活化的和静止的NK细胞对肿瘤细胞的反应。在某些实施方案中,与包含BCMA结合位点的单克隆抗体相比,TriNKET提供针对表达中和低BCMA的肿瘤细胞的优势。因此,包括TriNKET的疗法可以优于抗BCMA单克隆抗体疗法。

[0145] 在某些实施方案中,与单克隆抗体相比,本文所述的TriNKET(例如,A40-TriNKET、A44-TriNKET、A49-TriNKET、C26-TriNKET、F04-TriNKET、F43-TriNKET、F47-TriNKET和F63-TriNKET)包含肿瘤相关抗原BCMA的结合结构域,其有利于治疗具有高表达的Fc受体(FcR)的癌症或存在于具有高水平的FcR的肿瘤微环境中的癌症。单克隆抗体通过多种机制对肿瘤生长发挥作用,包括ADCC、CDC、吞噬作用和信号阻断等。在Fc γ R中,CD16对IgG Fc的亲合力最低;Fc γ RI (CD64) 是高亲合力FcR,其与IgG Fc的结合比CD16强1000倍。CD64通常在许多造血谱系如髓系中表达,并且可以在源自这些细胞类型的肿瘤,如急性髓性白血病(AML)中表达。浸润到肿瘤中的免疫细胞,如MDSC和单核细胞,也表达CD64,并且已知浸润肿瘤微环境。肿瘤或肿瘤微环境中CD64的表达可以对单克隆抗体治疗产生不利影响。CD64在肿瘤微环境中的表达使得这些抗体难以在NK细胞表面上接合CD16,因为抗体优选结合高亲合力受体。TriNKET通过靶向NK细胞表面上的两种活化受体,可以克服单克隆抗体治疗中CD64表达(在肿瘤或肿瘤微环境中)的不利影响。无论肿瘤细胞上的CD64表达如何,TriNKET都能够介导针对所有肿瘤细胞的人NK细胞应答,因为NK细胞上两种活化受体的双重靶向提供了对NK细胞更强的特异性结合。

[0146] 在一些实施方案中,本文所述的TriNKET(例如,A40-TriNKET、A44-TriNKET、A49-TriNKET、C26-TriNKET、F04-TriNKET、F43-TriNKET、F47-TriNKET和F63-TriNKET)包含肿瘤相关抗原BCMA的结合结构域,其通过降低的靶向肿瘤外靶点的副作用提供更好的安全性。自然杀伤细胞和CD8 T细胞都能够直接裂解肿瘤细胞,但是NK细胞和CD8 T细胞识别正常自身细胞与肿瘤细胞的机制不同。NK细胞的活性由来自活化受体(NCR、NKG2D、CD16等)和抑制受体(KIR、NKG2A等)的信号的平衡调节。这些活化和抑制信号的平衡允许NK细胞从应激的、病毒感染的或转化的自身细胞中确定健康的自身细胞。这种“内置”自身耐受机制将有助于保护正常的健康组织免受NK细胞反应。为了扩展这一原理,NK细胞的自身耐受将允许TriNKET靶向在自身和肿瘤上表达的抗原,而没有肿瘤外副作用,或具有增加的治疗窗口。与自然杀伤细胞不同,T细胞需要识别由MHC分子呈递的特定肽用于活化和效应功能。T细胞已经成为免疫疗法的主要目标,并且已经开发了许多策略来重定向T细胞对肿瘤的应答。T细胞双特异性、检查点抑制剂和CAR-T细胞均已获得FDA批准,但常常遭受剂量限制性毒性。T细胞双特异性和CAR-T细胞通过使用结合结构域靶向肿瘤细胞表面上的抗原并使用工程化的信号传导结构域将活化信号转导到效应细胞中而在TCR-MHC识别系统周围起作用。尽管有效引发抗肿瘤免疫应答,但这些疗法通常伴有细胞因子释放综合征(CRS)和靶向肿瘤外靶点的副作用。TriNKET在这方面是独特的,因为它们不会“越过”NK细胞活化和抑制的天然系统。相反,TriNKET旨在影响平衡,并为NK细胞提供另外的活化信号,同时保持NK对健康自身的耐受性。

[0147] 在一些实施方案中,本文所述的TriNKET包含NKG2D结合结构域(例如,A40-TriNKET、A44-TriNKET、A49-TriNKET、C26-TriNKET、F04-TriNKET、F43-TriNKET、F47-TriNKET和F63-TriNKET)和肿瘤相关抗原BCMA的结合结构域,其比包含相同肿瘤抗原结合结构域的单克隆抗体更有效地延迟肿瘤的进展。在一些实施方案中,TriNKET包含NKG2D结合结构域和肿瘤抗原BCMA结合结构域,其比包含抗BCMA结合结构域的单克隆抗体更有效地抵抗癌症转移。

[0148] III. 治疗应用

[0149] 本发明提供使用本文所述的多特异性结合蛋白和/或本文所述的药物组合物治疗癌症的方法。所述方法可以通过向有此需要的患者施用治疗有效量的本文所述的多特异性结合蛋白,用于治疗表达BCMA的各种癌症。

[0150] 可以根据待治疗的癌症表征所述治疗方法。例如,在某些实施方案中,癌症是血液或骨髓源性的。示例性的癌症包括多发性骨髓瘤、急性髓单核细胞白血病、T细胞淋巴瘤、急性单核细胞白血病和滤泡性淋巴瘤T细胞淋巴瘤可以包括前体T-淋巴母细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤、肠病型T细胞淋巴瘤、皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤或外周T细胞淋巴瘤。

[0151] 在某些实施方案中,癌症为B细胞淋巴瘤,如弥漫性大B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、毛细胞白血病或原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤。

[0152] 在某些其他实施方案中,癌症为实体瘤,如脑癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、

结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、白血病、肺癌、肝癌、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、胃癌、睾丸癌或子宫癌。在又其他实施方案中,癌症是血管化肿瘤、鳞状细胞癌、腺癌、小细胞癌、黑色素瘤、胶质瘤、神经母细胞瘤、肉瘤(例如,血管肉瘤或软骨肉瘤)、喉癌、腮腺癌、胆道癌、甲状腺癌、肢端雀斑样黑色素瘤、光化性角化病、急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、腺样囊性癌、腺瘤、腺肉瘤、腺鳞癌、肛管癌、肛门癌、肛门直肠癌、星形细胞瘤、前庭大腺癌、基底细胞癌、胆管癌、骨癌、骨髓癌、支气管癌、支气管腺癌、类癌、胆管癌、软骨肉瘤、脉络丛乳头状瘤/癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、透明细胞癌、结缔组织癌、囊腺瘤、消化系统癌、十二指肠癌、内分泌系统癌、内胚窦瘤、子宫内膜增生、子宫内膜间质肉瘤、子宫内膜样腺癌、内皮细胞癌、室管膜癌、上皮细胞癌、尤文氏肉瘤、眼和眼眶癌、女性生殖器癌、局灶性结节性增生、胆囊癌、胃窦癌、胃底癌、胃泌素瘤、胶质母细胞瘤、胰高血糖素瘤、心脏癌、血管母细胞瘤、血管内皮瘤、血管瘤、肝腺瘤、肝腺瘤病、肝胆管癌、肝细胞癌、霍奇金病、回肠癌、胰岛素瘤、上皮内瘤变、上皮间鳞状细胞瘤、肝内胆管癌、浸润性鳞状细胞癌、空肠癌、关节癌、卡波西肉瘤、盆腔癌、大细胞癌、大肠癌、平滑肌肉瘤、恶性雀斑样痣黑色素瘤、淋巴瘤、男性生殖器癌、恶性黑色素瘤、恶性间皮瘤、髓母细胞瘤、髓质上皮瘤、脑膜癌、间皮癌、转移癌、口腔癌、粘液表皮样癌、多发性骨髓瘤、肌肉癌、鼻腔癌、神经系统癌、神经上皮腺癌、结节性黑色素瘤、非上皮性皮肤癌、非霍奇金淋巴瘤、燕麦细胞癌、少突神经胶质癌、口腔癌、骨肉瘤、乳头状浆液性腺癌、阴茎癌、咽癌、垂体瘤、浆细胞瘤、假肉瘤、肺母细胞瘤、直肠癌、肾细胞癌、呼吸系统癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、浆液性癌、鼻窦癌、皮肤癌、小细胞癌、小肠癌、平滑肌癌、软组织癌、生长抑素分泌肿瘤、脊柱癌、鳞状细胞癌、横纹肌癌、间皮下癌、浅表扩散性黑色素瘤、T细胞白血病、舌癌、未分化癌、输尿管癌、尿道癌、泌尿膀胱癌、泌尿系统癌、子宫颈癌、子宫体癌、葡萄膜黑色素瘤、阴道癌、疣状癌、舒血管肠肽瘤、外阴癌、高分化癌或威尔姆氏瘤。

[0153] 可以根据癌细胞表面上表达的特定抗原的存在来表征待治疗的癌症。在某些实施方案中,除BCMA外,癌细胞还可表达以下一种或多种:CD2、CD19、CD20、CD30、CD38、CD40、CD52、CD70、EGFR/ERBB1、IGF1R、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、cMET、SLAMF7、PSCA、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4和PD1。

[0154] IV. 组合疗法

[0155] 本发明的另一个方面提供组合疗法。本文所述的多特异性结合蛋白可以与另外的治疗剂组合使用以治疗癌症。

[0156] 可以用作治疗癌症的组合疗法的部分的示例性的治疗剂包括例如,放射、丝裂霉素、维甲酸、苯达莫司汀、吉西他滨、长春新碱、依托泊苷、克拉曲滨、二溴甘露醇、甲氨蝶呤、多柔比星、卡波醌、喷司他丁、硝基可润(nitracrine)、净司他丁、西曲瑞克、来曲唑、雷替曲塞、柔红霉素、法屈唑、福莫司汀、胸腺法新、索布佐生、奈达铂、阿糖胞苷、比卡鲁胺、长春瑞滨、维司力农、氨鲁米特、安吡啶、丙谷胺、依利醋铵、酮色林、去氧氟尿苷、依曲替酯、异维甲酸、链脲菌素、尼莫司汀、长春地辛、氟他米特、氟他胺、布缩宫素(butocin)、卡莫氟、雷佐生、西佐喃、卡铂、二溴卫矛醇、替加氟、异环磷酰胺、泼尼莫司汀、沙培林、左旋咪唑、替尼泊苷、英丙舒凡、依诺他滨、麦角乙脲、羟甲烯龙、他莫昔芬、黄体酮、美雄烷、环硫雄醇、福美司坦、干扰素- α 、干扰素-2 α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、集落刺激因子-1、集落刺激因子-2、地尼白介素、白介素-2、促黄体激素释放因子和可以表现出与其同源受体的差异结合,以及增加或

减少的血清半衰期的上述药剂的变体。

[0157] 可以用作治疗癌症的组疗法的部分的其他一类药剂是免疫检查点抑制剂。示例性的免疫检查点抑制剂包括抑制以下一种或多种的药剂：(i) 细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (CTLA4)，(ii) 程序性细胞死亡蛋白1 (PD1)，(iii) PDL1，(iv) LAG3，(v) B7-H3，(vi) B7-H4和(vii) TIM3。CTLA4抑制剂伊匹单抗已经被美国食品和药品管理局批准用于治疗黑色素瘤。

[0158] 可以用作治疗癌症的组疗法的部分的其他药剂是靶向非检查点靶标的单克隆抗体药剂(例如，赫赛汀)和非细胞毒性药剂(例如，酪氨酸激酶抑制剂)。

[0159] 抗癌剂的其他类别包括例如：(i) 抑制剂，其选自ALK抑制剂、ATR抑制剂、A2A拮抗剂、碱基切除修复抑制剂、Bcr-Abl酪氨酸激酶抑制剂、布鲁顿氏酪氨酸激酶抑制剂、CDC7抑制剂、CHK1抑制剂、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂、DNA-PK抑制剂、DNA-PK和mTOR二者的抑制剂、DNMT1抑制剂、DNMT1抑制剂加2-氯-脱氧腺苷、HDAC抑制剂、刺猬信号传导途径抑制剂、IDO抑制剂、JAK抑制剂、mTOR抑制剂、MEK抑制剂、MELK抑制剂、MTH1抑制剂、PARP抑制剂、磷酸肌醇3-激酶抑制剂、PARP1和DHODH二者的抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶-II抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、VEGFR抑制剂和WEE1抑制剂；(ii) OX40、CD137、CD40、GITR、CD27、HVEM、TNFRSF25或ICOS的激动剂；和(iii) 选自IL-12、IL-15、GM-CSF和G-CSF的细胞因子。

[0160] 本发明的蛋白还可以用作手术切除原发病灶的辅助手段。

[0161] 可以选择多特异性结合蛋白和另外的治疗剂的量和施用的相对时机，以便于实现期望的组合治疗效果。例如，当向需要该施用的患者施用组疗法时，组合中的治疗剂或包含该治疗剂的药物组合物或多种药物组合物可以以任何顺序施用，例如，顺序施用、共同施用、一起施用、同时施用等。此外，例如，多特异性结合蛋白可以在当另外的治疗剂(多种另外的治疗剂)发挥其预防或治疗效果期间施用或反之亦然。

[0162] V. 药物组合物

[0163] 本公开的特征还在于包含治疗有效量的本文所述的蛋白的药物组合物。组合物可以配制用于多种药物递送系统。一种或多种生理上可接受的赋形剂或载体也可以包含在组合物中用于适合的制剂。用于本公开的适合的制剂见于Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第17版, 1985。关于药物递送方法的简要回顾，参见例如Langer (Science 249:1527-1533, 1990)。

[0164] 本公开的静脉内药物递送制剂可以包含在袋子、笔或注射器中。在某些实施方案中，袋子可以连接到包含管和/或针的通道。在某些实施方案中，制剂可以是冻干制剂或液体制剂。在某些实施方案中，制剂可以是冷冻干燥的(冻干的)并容纳在约12-60个小瓶中。在某些实施方案中，制剂可以是冷冻干燥的，并且45mg冷冻干燥的制剂可以容纳在一个小瓶中。在某些实施方案中，约40mg-约100mg的冷冻干燥的制剂可以容纳在一个小瓶中。在某些实施方案中，来自12、27或45个小瓶的冷冻干燥的制剂被合并，以在静脉内药物制剂中获得治疗剂量的蛋白。在某些实施方案中，制剂可以是液体制剂，并储存为约250mg/小瓶至约1000mg/小瓶。在某些实施方案中，制剂可以是液体制剂并储存为约600mg/小瓶。在某些实施方案中，制剂可以是液体制剂并储存为约250mg/小瓶。

[0165] 本公开可以存在于液体水性药物制剂中，其包含在形成制剂的缓冲溶液中的治疗有效量的蛋白。

[0166] 这些组合物可以通过常规灭菌技术灭菌,或者可以无菌过滤。得到的水性溶液可以包装以按原样使用或冻干,冻干制剂在施用前与无菌水性载体组合。制剂的pH通常为3至11,更优选为5至9或6至8,最优选地为7至8,如7至7.5。得到的固体形式的组合物可以包装在多个单剂量单位中,每个计量单位包含固定量的上述药剂或多种上述药剂。固体形式的组合物还可以包装在容器中以获得灵活的量。

[0167] 在某些实施方案中,本公开提供了具有延长的保存限期的制剂,其包含本公开的蛋白,与甘露醇、柠檬酸一水合物、柠檬酸钠、磷酸二钠二水合物、磷酸二氢钠二水合物、氯化钠、聚山梨醇酯80、水和氢氧化钠组合。

[0168] 在某些实施方案中,制备了水性制剂,其包含在pH缓冲溶液中的本公开的蛋白。本发明的缓冲液可以具有约4至约8,例如约4.5至约6.0或约4.8至约5.5的pH,或可以具有约5.0至约5.2的pH。上述pH的中间范围也旨在是本公开的一部分。例如,旨在包括使用任何上述值的组合作为上限和/或下限的值的范围。将pH控制在该范围内的缓冲剂的实例包括乙酸盐(例如乙酸钠)、琥珀酸盐(如琥珀酸钠)、葡糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐和其他有机酸缓冲剂。

[0169] 在某些实施方案中,制剂包含缓冲系统,所述缓冲系统包含柠檬酸盐和磷酸盐以使pH保持在约4至约8的范围内。在某些实施方案中,pH范围可以是约4.5至约6.0,或约pH 4.8至约5.5,或约5.0至约5.2的pH范围。在某些实施方案中,缓冲系统包含柠檬酸一水合物、柠檬酸钠、磷酸二钠二水合物和/或磷酸二氢钠二水合物。在某些实施方案中,缓冲系统包含约1.3mg/ml的柠檬酸(例如,1.305mg/ml)、约0.3mg/ml的柠檬酸钠(例如,0.305mg/ml)、约1.5mg/ml的磷酸二钠二水合物(例如,1.53mg/ml)、约0.9mg/ml的磷酸二氢钠二水合物(例如,0.86)和约6.2mg/ml的氯化钠(例如,6.165mg/ml)。在某些实施方案中,缓冲系统包含1-1.5mg/ml的柠檬酸、0.25至0.5mg/ml的柠檬酸钠、1.25至1.75mg/ml的磷酸二钠二水合物、0.7至1.1mg/ml的磷酸二氢钠二水合物和6.0至6.4mg/ml的氯化钠。在某些实施方案中,使用氢氧化钠调节制剂的pH。

[0170] 制剂中还可以包含多元醇,其充当张力剂并且可以稳定抗体。将多元醇添加到制剂,其量可以根据制剂的期望的等张性变化。在某些实施方案中,水性制剂可以是等张的。添加的多元醇的量还可以根据多元醇的分子量改变。例如,与二糖(如海藻糖)相比,可以添加更少量的单糖(例如,甘露醇)。在某些实施方案中,可以在制剂中用作张力剂的多元醇为甘露醇。在某些实施方案中,甘露醇浓度可以为约5至约20mg/ml。在某些实施方案中,甘露醇的浓度可以为约7.5至15mg/ml。在某些实施方案中,甘露醇的浓度可以为约10-14mg/ml。在某些实施方案中,甘露醇的浓度可以为约12mg/ml。在某些实施方案中,多元醇山梨糖醇可以包含在制剂中。

[0171] 还可以将洗涤剂或表面活性剂添加到制剂中。示例性的洗涤剂包括非离子洗涤剂,如聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20、80等)或泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆188)。添加的洗涤剂的量是这样的,使得其降低配制的抗体的聚集和/或使制剂中微粒的形成最小化和/或降低吸附。在某些实施方案中,制剂可以包含表面活性剂,所述表面活性剂为聚山梨醇酯。在某些实施方案中,制剂可以包含洗涤剂聚山梨醇酯80或吐温80。吐温80是用于描述聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯的术语(参见Fiedler, Lexikon der Hifsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 第4版, 1996)。在某些实施方案中,制剂可以包含约0.1mg/mL至

约10mg/mL的聚山梨醇酯80或约0.5mg/mL至约5mg/mL的聚山梨醇酯80。在某些实施方案中，制剂可以添加约0.1%的聚山梨醇酯80。

[0172] 在实施方案中，将本公开的蛋白产物配制成液体制剂。液体制剂可以以10mg/mL的浓度提供在USP/Ph Eur type I 50R小瓶中，该小瓶用橡胶塞封闭并用铝卷边封口盖密封。塞子可以由符合USP和Ph Eur的弹性体制成。在某些实施方案中，小瓶可以填充61.2mL的蛋白产物溶液，以允许60mL的可提取体积。在某些实施方案中，液体制剂可以用0.9%的盐溶液稀释。

[0173] 在某些实施方案中，本公开的液体制剂可以制备成与稳定水平的糖组合的10mg/mL浓度的溶液。在某些实施方案中，液体制剂可以在水性载体中制备。在某些实施方案中，稳定剂的添加的量可以不大于可能导致不期望或不适合用于静脉内施用的粘度。在某些实施方案中，糖可以是二糖，例如蔗糖。在某些实施方案中，液体制剂还可以包含缓冲剂、表面活性剂和防腐剂中的一种或多种。

[0174] 在某些实施方案中，液体制剂的pH可以通过添加药学上可接受的酸和/或碱来设定。在某些实施方案中，药学上可接受的酸可以是盐酸。在某些实施方案中，碱可以是氢氧化钠。

[0175] 除聚合外，脱酰胺是常见的肽和蛋白的产物变体，其可以在发酵、收获/细胞澄清、纯化、药物/药品储存期间和在样品分析期间发生。脱酰胺是形成可经历水解的琥珀酰亚胺中间体的蛋白中NH₃的丧失。琥珀酰亚胺中间体导致母肽的17道尔顿的质量降低。随后的水解导致18道尔顿的质量增加。由于在水性条件下的不稳定性，难以分离琥珀酰亚胺中间体。因此，脱酰胺通常可检测为1道尔顿质量增加。天冬酰胺的脱酰胺产生天冬氨酸或异天冬氨酸。影响脱酰胺速率的参数包括pH、温度、溶剂介电常数、离子强度、一级序列、局部多肽构象和三级结构。肽链中与Asn相邻的氨基酸残基影响脱酰胺速率。蛋白序列中Asn后的Gly和Ser导致对脱酰胺更高的敏感性。

[0176] 在某些实施方案中，本公开的液体制剂可以在pH和湿度条件下保存，以防止蛋白产物脱氨基。

[0177] 本文的目标水性载体是药学上可接受的水性载体（向人施用是安全且无毒的）并且可用于制备液体制剂。说明性载体包括无菌注射用水（SWFI）、抑菌性注射用水（BWFI）、pH缓冲溶液（例如磷酸盐缓冲盐水）、无菌盐溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。

[0178] 可以任选地将防腐剂添加到本文的制剂中以减少细菌作用。添加防腐剂可以例如便于多用途（多剂量）制剂的制备。

[0179] 在特定情况下，例如当患者在移植后在医院中通过IV途径接受所有药物时，静脉内（IV）制剂可以是优选的施途径。在某些实施方案中，在施用前用0.9%氯化钠溶液稀释液体制剂。在某些实施方案中，用于注射的稀释的药品是等张的并且适于通过静脉内输注施用。

[0180] 在某些实施方案中，盐或缓冲剂组分可以10mM–200mM的量加入。盐和/或缓冲剂是药学上可接受的，并且衍生自具有“碱形成”金属或胺的各种已知酸（无机酸和有机酸）。在某些实施方案中，缓冲剂可以是磷酸盐缓冲剂。在某些实施方案中，缓冲剂可以是甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐缓冲剂，在这种情况下，钠离子、钾离子或铵离子可以充当抗衡离子。

[0181] 可以任选地将防腐剂添加到本文的制剂中以减少细菌作用。添加防腐剂可以例如

有利于多用途(多剂量)制剂的制备。

[0182] 本文的目标水性载体是药学上可接受的(向人施用是安全且无毒的),并且可用于制备液体制剂。说明性的载体包括无菌注射用水(SWFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。

[0183] 本公开可存在于包含蛋白和冻干保护剂的冻干制剂中。冻干保护剂可以是糖,例如二糖。在某些实施方案中,冻干保护剂可以是蔗糖或麦芽糖。冻干制剂还可包含缓冲剂、表面活性剂、填充剂和/或防腐剂中的一种或多种。

[0184] 可用于稳定冻干药品的蔗糖或麦芽糖的量可以是蛋白与蔗糖或麦芽糖的重量比为至少1:2。在某些实施方案中,蛋白与蔗糖或麦芽糖的重量比可以为1:2至1:5。

[0185] 在某些实施方案中,在冻干之前,可以通过添加药学上可接受的酸和/或碱来设定制剂的pH。在某些实施方案中,药学上可接受的酸可以是盐酸。在某些实施方案中,药学上可接受的碱可以是氢氧化钠。

[0186] 在冻干之前,可以将包含本公开的蛋白的溶液的pH调节为6至8。在某些实施方案中,冻干药品的pH范围可以为7至8。

[0187] 在某些实施方案中,盐或缓冲液组分可以10mM-200mM的量加入。盐和/或缓冲剂是药学上可接受的,并且衍生自具有“碱形成”金属或胺的各种已知酸(无机酸和有机酸)。在某些实施方案中,缓冲剂可以是磷酸盐缓冲剂。在某些实施方案中,缓冲剂可以是甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐缓冲剂,在这种情况下,钠离子、钾离子或铵离子可以充当抗衡离子。

[0188] 在某些实施方案中,可以添加“填充剂”。“填充剂”是一种化合物,它可以增加冻干混合物的质量并有助于冻干饼的物理结构(例如,有助于制备保持开孔结构的基本上均匀的冻干饼)。示例性填充剂包括甘露醇、甘氨酸、聚乙二醇和山梨糖醇。本发明的冻干制剂可以包含这样的填充剂。

[0189] 可以任选地将防腐剂添加到本文的制剂中以减少细菌作用。添加防腐剂可以例如有利于多用途(多剂量)制剂的制备。

[0190] 在某些实施方案中,冻干药品可以用水性载体配制。本文的目标水性载体是药学上可接受的(例如,向人施用是安全且无毒的)并且在冻干后可用于制备液体制剂。说明性的稀释剂包括无菌注射用水(SWFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。

[0191] 在某些实施方案中,用无菌注射用水USP(SWFI)或0.9%氯化钠注射液USP重新配制本公开的冻干药品。在重新配制期间,冻干粉末溶解成溶液。

[0192] 在某些实施方案中,将本公开的冻干蛋白产物配制到约4.5mL注射用水中,并用0.9%盐溶液(氯化钠溶液)稀释。

[0193] 可以改变本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以便获得有效实现特定患者、组合物和施用方式的期望治疗反应,而对患者无毒的活性成分的量。

[0194] 对于每个患者,特定剂量可以是均一剂量,例如,50-5000mg蛋白。供选择地,可以根据患者的近似体重或表面积来定制患者的剂量。确定适宜剂量的其他因素可以包括待治疗或预防的疾病或病症,疾病的严重程度,施用途径以及患者的年龄、性别和身体状况。本领域技术人员常规地进一步改进确定适宜治疗剂量所必需的计算,特别是根据本文公开的剂量信息和分析。剂量还可以通过使用已知分析来确定,所述分析用于确定与适宜的剂量-

反应数据结合使用的剂量。可以根据疾病进展的监测来调整个体患者的剂量。可以测量患者中可靶向的构建体或复合物的血液水平,以查看是否需要调整剂量以达到或维持有效浓度。药物基因组学可用于确定哪种可靶向的构建体和/或复合物及其剂量最可能对给定个体有效 (Schmitz等人,Clinica Chimica Acta 308:43-53,2001;Steimer等人,Clinica Chimica Acta 308:33-41,2001)。

[0195] 通常,基于体重的剂量为约0.01 μ g至约100mg/kg体重,如约0.01 μ g至约100mg/kg体重、约0.01 μ g至约50mg/kg体重、约0.01 μ g至约10mg/kg体重、约0.01 μ g至约1mg/kg体重、约0.01 μ g至约100 μ g/kg体重、约0.01 μ g至约50 μ g/kg体重、约0.01 μ g至约10 μ g/kg体重、约0.01 μ g至约1 μ g/kg体重、约0.01 μ g至约0.1 μ g/kg体重、约0.1 μ g至约100mg/kg体重、约0.1 μ g至约50mg/kg体重、约0.1 μ g至约10mg/kg体重、约0.1 μ g至约1mg/kg体重、约0.1 μ g至约100 μ g/kg体重、约0.1 μ g至约50 μ g/kg体重、约0.1 μ g至约10 μ g/kg体重、约0.1 μ g至约1 μ g/kg体重、约1 μ g至约100mg/kg体重、约1 μ g至约50mg/kg体重、约1 μ g至约10mg/kg体重、约1 μ g至约1mg/kg体重、约1 μ g至约100 μ g/kg体重、约1 μ g至约50 μ g/kg体重、约1 μ g至约10 μ g/kg体重、约10 μ g至约100mg/kg体重、约10 μ g至约50mg/kg体重、约10 μ g至约10mg/kg体重、约10 μ g至约1mg/kg体重、约10 μ g至约100 μ g/kg体重、约10 μ g至约50 μ g/kg体重、约50 μ g至约100mg/kg体重、约50 μ g至约50mg/kg体重、约50 μ g至约10mg/kg体重、约50 μ g至约1mg/kg体重、约50 μ g至约100 μ g/kg体重、约100 μ g至约100mg/kg体重、约100 μ g至约50mg/kg体重、约100 μ g至约10mg/kg体重、约100 μ g至约1mg/kg体重、约1mg至约100mg/kg体重、约1mg至约50mg/kg体重、约1mg至约10mg/kg体重、约10mg至约100mg/kg体重、约10mg至约50mg/kg体重、约50mg至约100mg/kg体重。

[0196] 剂量可以每天、每周、每月或每年给予一次或多次,或甚至每2至20年给予一次。本领域普通技术人员可以基于测量的停留时间和体液或组织中可靶向的构建体或复合物的浓度,容易地估计给药的重复率。本发明的施用可以是静脉内施用、动脉内施用、腹膜内施用、肌肉内施用、皮下施用、胸膜内施用、鞘内施用、腔内施用、通过导管灌注或通过直接病灶内注射。这可以每天施用一次或多次,每周施用一次或多次,每月施用一次或多次,以及每年施用一次或多次。

实施例

[0197] 通过参考以下实施例将更容易理解现在一般描述的本发明,所述实施例仅出于说明本发明的某些方面和实施方案的目的,并不意图限制本发明。

[0198] 实施例1-NKG2D结合结构域结合于NKG2D

[0199] NKG2D结合结构域结合于纯化的重组NKG2D

[0200] 将人、小鼠或食蟹猴NKG2D胞外结构域的核酸序列与编码人IgG1 Fc结构域的核酸序列融合,并引入哺乳动物细胞中待表达。纯化后,将NKG2D-Fc融合蛋白吸附到微孔板的孔中。在用牛血清白蛋白封闭孔以防止非特异性结合后,滴定NKG2D结合结构域并将其添加到预先吸附有NKG2D-Fc融合蛋白的孔中。使用与辣根过氧化物酶缀合并特异性识别人 κ 轻链以避免Fc交叉反应的二抗检测一抗结合。将辣根过氧化物酶的底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)添加到孔中以显现结合信号,其吸光度在450nm下测量并在540nm下校正。将NKG2D结合结构域克隆、同种型对照或阳性对照(选自SEQ ID NO:45-48或在eBioscience可获得的抗小鼠NKG2D克隆MI-6和CX-5)添加到每个孔中。

[0201] 同种型对照显示与重组NKG2D-Fc蛋白的最小结合,而阳性对照与重组抗原结合最强。由所有克隆产生的NKG2D结合结构域显示跨人(图14)、小鼠(图16)和食蟹猴(图15)重组NKG2D-Fc蛋白的结合,但是在克隆之间具有不同的亲和力。通常,每个抗NKG2D克隆以相似的亲和力结合于人(图14)和食蟹猴(图15)重组NKG2D-Fc,但对小鼠(图16)重组NKG2D-Fc具有较低的亲和力。

[0202] NKG2D结合结构域结合于表达NKG2D的细胞

[0203] 将EL4小鼠淋巴瘤细胞系工程化以表达人或小鼠NKG2D-CD3 ζ 信号传导结构域嵌合抗原受体。以100nM浓度使用NKG2D结合克隆、同种型对照或阳性对照来染色在EL4细胞上表达的细胞外NKG2D。使用荧光团缀合的抗人IgG二抗检测抗体结合。通过流式细胞术分析细胞,并使用表达NKG2D的细胞与亲本EL4细胞相比的平均荧光强度(MFI)计算相对于背景的倍数(fold-over-background, FOB)。

[0204] 由所有克隆产生的NKG2D结合结构域与表达人和小鼠NKG2D的EL4细胞结合。阳性对照抗体(选自SEQ ID NO:45-48,或在eBioscience可获得的抗小鼠NKG2D克隆MI-6和CX-5)给出最佳的FOB结合信号。在表达人NKG2D(图17)和小鼠NKG2D(图18)的细胞之间,每个克隆的NKG2D结合亲和力相似。

[0205] 实施例2-NKG2D结合结构域阻断天然配体与NKG2D的结合

[0206] 与ULBP-6的竞争

[0207] 将重组人NKG2D-Fc蛋白吸附到微孔板的孔中,并用牛血清白蛋白封闭孔以减少非特异性结合。向孔中加入饱和浓度的ULBP-6-His-生物素,然后加入NKG2D结合结构域克隆。孵育2小时后,洗涤孔并通过与辣根过氧化物酶缀合的链霉亲和素和TMB底物检测与NKG2D-Fc包被的孔保持结合的ULBP-6-His-生物素。在450nm下测量吸光度并在540nm下校正。在扣除背景后,NKG2D结合结构域与NKG2D-Fc蛋白的特异性结合由与孔中的NKG2D-Fc蛋白的结合被阻断的ULBP-6-His-生物素的百分比计算。阳性对照抗体(选自SEQ ID NO:45-48)和各种NKG2D结合结构域阻断ULBP-6与NKG2D的结合,而同种型对照显示与ULBP-6的竞争很小(图19)。

[0208] 与MICA的竞争

[0209] 将重组人MICA-Fc蛋白吸附到微孔板的孔中,并用牛血清白蛋白封闭孔以减少非特异性结合。向孔中加入NKG2D-Fc-生物素,然后加入NKG2D结合结构域。孵育和洗涤后,使用链霉亲和素-HRP和TMB底物检测与MICA-Fc包被的孔保持结合的NKG2D-Fc-生物素。在450nm下测量吸光度并在540nm下校正。扣除背景后,NKG2D结合结构域与NKG2D-Fc蛋白的特异性结合由与MICA-Fc包被的孔的结合被阻断的NKG2D-Fc-生物素的百分比计算。阳性对照抗体(选自SEQ ID NO:45-48)和各种NKG2D结合结构域阻断MICA与NKG2D的结合,而同种型对照显示与MICA的竞争很小(图20)。

[0210] 与Rae-1 δ 的竞争

[0211] 将重组小鼠Rae-1 δ -Fc(购自R&D Systems)吸附到微孔板的孔中,并用牛血清白蛋白封闭孔以减少非特异性结合。向孔中加入小鼠NKG2D-Fc-生物素,然后加入NKG2D结合结构域。孵育和洗涤后,使用链霉亲和素-HRP和TMB底物检测与Rae-1 δ -Fc包被的孔保持结合的NKG2D-Fc-生物素。在450nm下测量吸光度并在540nm下校正。扣除背景后,NKG2D结合结构域与NKG2D-Fc蛋白的特异性结合由与Rae-1 δ -Fc包被的孔的结合被阻断的NKG2D-Fc-生物

素的百分比计算。阳性对照(选自SEQ ID NO:45-48或在eBioscience可获得的抗小鼠NKG2D克隆MI-6和CX-5)和各种NKG2D结合结构域克隆阻断Rae-1 δ 与小鼠NKG2D的结合,而同种型对照抗体显示与Rae-1 δ 的竞争很小(图21)。

[0212] 实施例3-NKG2D结合结构域克隆活化NKG2D

[0213] 将人和小鼠NKG2D的核酸序列与编码CD3 ζ 信号传导结构域的核酸序列融合,以获得嵌合抗原受体(CAR)构建体。然后使用Gibson组装将NKG2D-CAR构建体克隆到逆转录病毒载体中,并转染到expi293细胞中用于逆转录病毒生产。用含有NKG2D-CAR的病毒以及8 μ g/mL聚凝胺感染EL4细胞。感染后24小时,通过流式细胞术分析EL4细胞中NKG2D-CAR的表达水平,并选择在细胞表面上表达高水平NKG2D-CAR的克隆。

[0214] 为了确定NKG2D结合结构域是否活化NKG2D,将它们吸附到微孔板的孔中,并且在布雷菲德菌素-A和莫能菌素的存在下,在抗体片段包被的孔上培养NKG2D-CAR EL4细胞4小时。通过流式细胞术分析细胞内TNF- α 产生,其为NKG2D活化的标志。将TNF- α 阳性细胞的百分比归一化为用阳性对照处理的细胞。所有NKG2D结合结构域均活化人NKG2D(图22)和小鼠(图23)NKG2D二者。

[0215] 实施例4-NKG2D结合结构域活化NK细胞

[0216] 原代人NK细胞

[0217] 使用密度梯度离心从人外周血血沉棕黄层中分离外周血单核细胞(PBMC)。使用利用磁珠的负选择从PBMC中分离NK细胞(CD3 $^-$ CD56 $^+$),并且分离的NK细胞的纯度通常>95%。然后将分离的NK细胞在含有100ng/mL IL-2的培养基中培养24-48小时,然后将它们转移到吸附有NKG2D结合结构域的微孔板的孔中,并在包含荧光团缀合的抗CD107a抗体、布雷菲德菌素A和莫能菌素的培养基中培养。培养后,使用针对CD3、CD56和IFN- γ 的荧光团缀合的抗体,通过流式细胞术分析NK细胞。在CD3 $^-$ CD56 $^+$ 细胞中分析CD107a和IFN- γ 染色以评估NK细胞活化。CD107a/IFN- γ 双阳性细胞的增加表明通过两种活化受体而不是一种受体的参与可以更好地活化NK细胞。NKG2D结合结构域和阳性对照(选自SEQ ID NO:45-48)显示比同种型对照更高百分比的NK细胞变成CD107a $^+$ 和IFN- γ $^+$ (图24和图25表示来自两个独立实验的数据,各自使用不同供体的PBMC用于NK细胞制备)。

[0218] 原代小鼠NK细胞

[0219] 从C57B1/6小鼠获得脾脏并通过70 μ m细胞过滤网压碎以获得单细胞悬液。将细胞沉淀并重悬于ACK裂解缓冲液(购自Thermo Fisher Scientific#A1049201;155mM氯化铵,10mM碳酸氢钾,0.01mM EDTA)中以除去红细胞。剩余的细胞用100ng/mL hIL-2培养72小时,然后收获并准备用于NK细胞分离。然后使用具有通常>90%纯度的磁珠的负耗尽技术从脾细胞中分离NK细胞(CD3 $^-$ NK1.1 $^+$)。将纯化的NK细胞在含有100ng/mL mIL-15的培养基中培养48小时,然后将它们转移到吸附有NKG2D结合结构域的微孔板的孔中,并在含有荧光团缀合的抗CD107a、布雷菲德菌素A和莫能菌素的培养基中培养。在NKG2D结合结构域包被的孔中培养后,使用针对CD3、NK1.1和IFN- γ 的荧光团缀合的抗体,通过流式细胞术分析NK细胞。在CD3 $^-$ NK1.1 $^+$ 细胞中分析CD107a和IFN- γ 染色以评估NK细胞活化。CD107a/IFN- γ 双阳性细胞的增加表明通过两种活化受体而不是一种受体的参与可以更好地活化NK细胞。NKG2D结合结构域和阳性对照(选自抗小鼠NKG2D克隆MI-6和在eBioscience可获得的CX-5)显示比同种型对照更高百分比的NK细胞变成CD107a $^+$ 和IFN- γ $^+$ (图26和图27表示来自两个独立实

验的数据,各自使用不同的小鼠用于NK细胞制备)。

[0220] 实施例5-NKG2D结合结构域实现靶肿瘤细胞的细胞毒性

[0221] 人和小鼠原代NK细胞活化分析显示在与NKG2D结合结构域孵育后NK细胞上的细胞毒性标志物增加。为了确定这是否转化为增加的肿瘤细胞裂解,使用基于细胞的分析,其中每个NKG2D结合结构域形成单特异性抗体。Fc区用作一条靶向臂,而Fab区(NKG2D结合结构域)充当另一条靶向臂以活化NK细胞。具有人类来源并且表达高水平的Fc受体的THP-1细胞用作肿瘤靶标,并使用Perkin Elmer DELFIA细胞毒性试剂盒。用BATDA试剂标记THP-1细胞,并以 10^5 /mL重悬于培养基中。然后将标记的THP-1细胞与NKG2D抗体和分离的小鼠NK细胞在微量滴定板的孔中在37℃下混合3小时。孵育后,取出20μl培养上清液,与200μl钼溶液混合,并在黑暗中振荡孵育15分钟。通过配备有时间分辨荧光模块(激发337nm,发射620nm)的PheraStar读板仪随时间推移测量荧光,并根据试剂盒说明书计算特异性裂解。

[0222] 阳性对照ULBP-6(NKG2D的天然配体)显示小鼠NK细胞对THP-1靶细胞的特异性裂解增加。NKG2D抗体同样增加THP-1靶细胞的特异性裂解,而同种型对照抗体显示降低的特异性裂解。虚线表示在没有添加抗体的情况下,小鼠NK细胞对THP-1细胞的特异性裂解(图28)。

[0223] 实施例6-NKG2D抗体显示高热稳定性

[0224] 使用差示扫描荧光测定法分析NKG2D结合结构域的解链温度。相对于典型的IgG1抗体,外推的表观解链温度高(图29)。

[0225] 实施例7-多特异性结合蛋白结合于NKG2D

[0226] 将EL4小鼠淋巴瘤细胞系工程化以表达人NKG2D。测试如图1所示的各自包含NKG2D结合结构域、肿瘤相关抗原结合结构域(BCMA结合结构域)和结合于CD16的Fc结构域的三特异性结合蛋白(TriNKET)对EL4细胞上表达的细胞外NKG2D的亲和力。使用荧光团缀合的抗人IgG二抗检测多特异性结合蛋白与NKG2D的结合。通过流式细胞术分析细胞,并使用表达NKG2D的细胞与亲本EL4细胞相比的平均荧光强度(MFI)计算相对于背景的倍数(FOB)。

[0227] 测试的TriNKET包括BCMA-TriNKET-C26(ADI-28226和BCMA结合结构域)、BCMA-TriNKET-F04(ADI-29404和BCMA结合结构域)、BCMA-TriNKET-F43(ADI-29443和BCMA结合结构域)和BCMA-TriNKET-F47(ADI-29447和BCMA结合结构域)。

[0228] 用于测试的分子中的BCMA结合结构域由如下所列的重链可变结构域和轻链可变结构域组成。

[0229] EM-801重链可变结构域(SEQ ID NO:91):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG

CDR1

CDR2

[0230]

STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGT

VTVSS

CDR3

[0231] EM-801轻链可变结构域(SEQ ID NO:92):

EIVLTQSPGTL~~SLSPGERATL~~~~SCRASQSVSSSYLA~~WYQQKPGQAPRLLIY~~GASSRATGI~~
 CDR1 CDR2

[0232]

PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC~~QQYGYPPDFT~~FGQGTKVEIK
 CDR3

[0233] EM-901重链可变结构域 (SEQ ID NO:93)

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRL~~~~SCAASGFTFS~~DNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPGS
 ST CDR1 CDR2

[0234]

~~YYADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~VLGWFDYWG~~QGT~~LV~~T
 VSS CDR3

[0235] EM-901轻链可变结构域 (SEQ ID NO:94)

EIVLTQSPGTL~~SLSPGERATL~~~~SCRASQSVSDEYLS~~WYQQKPGQAPRLLIH~~SASTRATGI~~
 PD CDR1 CDR2

[0236]

RFSGSGSGTDFTLAISRLEPEDFAVYYC~~QQYGYPPDFT~~FGQGTKVEIK
 CDR3

[0237] 实施例8-多特异性结合蛋白结合于人肿瘤抗原

[0238] 三特异性结合蛋白结合于BCMA

[0239] 表达BCMA的MM.1S人骨髓瘤细胞用于分析TriNKET与肿瘤相关抗原BCMA的结合。将TriNKET稀释，并与相应细胞一起孵育。将TriNKET和任选的亲本抗BCMA单克隆抗体 (EM-801) 与细胞一起孵育，并使用荧光团缀合的抗人IgG二抗检测结合。通过流式细胞术分析细胞，并使用来自归一化至二抗对照的TriNKET和EM-801的平均荧光强度 (MFI) 计算相对于背景的倍数 (FOB)。与EM-801相比，C26-TriNKET-BCMA、F04-TriNKET-BCMA、F43-TriNKET-BCMA和F47-TriNKET-BCMA显示相当的与MM.1S细胞上表达的BCMA的结合水平 (图31)。

[0240] 实施例9-多特异性结合蛋白活化NK细胞

[0241] TriNKET在与表达靶标的人癌细胞系的共培养物中活化原代人NK细胞

[0242] 用BCMA阳性MM.1S骨髓瘤细胞共培养原代人NK细胞导致TriNKET介导的原代人NK细胞的活化。靶向BCMA的TriNKET (例如，C26-TriNKET-BMCA和F04-TriNKET-BMCA) 介导与MM.1S骨髓瘤细胞共培养的人NK细胞的活化，如CD107a脱粒和IFN γ 细胞因子产生的增加所示 (图32)。与同种型TriNKET相比，靶向BCMA的TriNKET (例如，A44-TriNKET-BMCA、A49-TriNKET-BMCA、C26-TriNKET-BMCA、F04-TriNKET-BMCA、F43-TriNKET-BMCA、F43-TriNKET-BMCA、F47-TriNKET-BMCA和F63-TriNKET-BMCA) 显示增加的NK细胞活性 (图32)。

[0243] 实施例10-三特异性结合蛋白实现靶癌细胞的细胞毒性

[0244] 使用密度梯度离心从人外周血血沉棕黄层中分离外周血单核细胞 (PBMC)。使用利用磁珠的负选择从PBMC中分离NK细胞 (CD3⁺CD56⁺)，并且分离的NK细胞的纯度通常>90%。然后将分离的NK细胞在含有100ng/mL IL-2的培养基中培养以进行活化，或在没有细胞因子的情况下静置过夜。第二天在细胞毒性分析中使用IL-2活化的或静止的NK细胞。

[0245] DELFIA细胞毒性分析：

[0246] 从培养物中收获表达目标靶标的人癌细胞系，用PBS洗涤细胞，并以10⁶/mL重悬浮

于生长培养基中,用BATDA试剂(Perkin Elmer AD0116)标记。按照制造商的说明书标记靶细胞。标记后,用PBS洗涤细胞3次,并以 $0.5-1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 重悬于培养基中。为了准备背景孔,将等份的标记细胞储存备用,并将细胞从培养基中旋出。将100 μL 培养基小心地一式三份加入孔中以避免干扰沉淀的细胞。将100 μL BATDA标记的细胞加入96孔板的每个孔中。保留孔以从靶细胞中自发释放,并通过添加1% Triton-X准备孔以最大程度裂解靶细胞。在培养基中稀释针对目标肿瘤靶标的单克隆抗体或TriNKET,向每个孔中加入50 μL 稀释的mAb或TriNKET。从培养物中收获静止的和/或活化的NK细胞,洗涤细胞,并根据期望的E:T比以 $10^5-2.0 \times 10^6/\text{mL}$ 重悬于培养基中。向板的每个孔中加入50 μL NK细胞以产生总共200 μL 的培养物体积。将板在37°C和5% CO₂下孵育2-3小时,然后进行分析。

[0247] 培养2-3小时后,从培养箱中取出板,并且通过在200g下离心5分钟使细胞沉淀。将20 μL 培养上清液转移至制造商提供的洁净微孔板中,并向每个孔中加入200 μL 室温钨溶液。保护板免受光照,并在板振荡器上以250rpm孵育15分钟。使用Victor 3或SpectraMax i3X仪器读板。特异性裂解%计算如下:特异性裂解% = ((实验释放-自发释放)/(最大释放-自发释放))*100%。

[0248] 分析了TriNKET介导的BCMA阳性骨髓瘤细胞的裂解。图39显示由静止的人NK效应细胞引起的TriNKET介导的BCMA阳性KMS12-PE骨髓瘤细胞的裂解。在体外测试使用相同的NKG2D结合结构域(A49)但不同的BCMA靶向结构域的两种TriNKET(cFAE-A49.801和cFAE-A49.901)的功效。两种TriNKET均以相似的程度增强KMS12-PE细胞的NK细胞裂解,但使用EM-901靶向结构域的TriNKET提供增加的效力(图39)。

[0249] 图33显示使用不同的NKG2D结合结构域(A40、A44、A49、C26和F47)但相同的BCMA靶向结构域的几种TriNKET的细胞毒活性。改变BCMA靶向的TriNKET的NKG2D结合结构域产生最大杀伤以及TriNKET效力的变化。与EM-901单克隆抗体相比,所有TriNKET均显示KMS12-PE靶细胞的杀伤增加(图33)。

[0250] 实施例11

[0251] 研究了交联NKG2D和CD16对人NK细胞的协同活化。

[0252] 原代人NK细胞活化分析

[0253] 使用密度梯度离心从外周人血沉棕黄层中分离外周血单核细胞(PBMC)。使用负磁珠(StemCell#17955)从PBMC中纯化NK细胞。通过流式细胞术测定,NK细胞 $>90\%$ CD3⁻CD56⁺。然后在用于活化分析之前,将细胞在含有100ng/mL hIL-2的培养基(Peprotech#200-02)中扩增48小时。将抗体以2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (抗CD16, Biolegend#302013) 和5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (抗NKG2D, R&D#MAB139) 的浓度包被在96孔平底板上,在100 μL 无菌PBS中在4°C下过夜,然后彻底洗涤孔以除去过量的抗体。为了评估脱粒,将IL-2活化的NK细胞以 5×10^5 个细胞/ mL 重悬于补充有100ng/mL hIL2和1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ APC缀合的抗CD107a mAb(Biolegend#328619)的培养基中。然后将 1×10^5 个细胞/孔添加到抗体包被的板上。分别以1:1000和1:270的最终稀释度加入蛋白转运抑制剂布雷菲德菌素A(BFA, Biolegend#420601)和莫能菌素(Biolegend#420701)。将铺板的细胞在37°C下在5% CO₂中孵育4小时。对于IFN- γ 的细胞内染色,用抗CD3(Biolegend#300452)和抗CD56mAb(Biolegend#318328)标记NK细胞,随后固定并透化并用抗IFN- γ mAb(Biolegend#506507)标记。在活CD56⁺CD3⁻细胞上固相后,通过流式细胞术分析NK细胞的CD107a和IFN- γ 的表达。

[0254] 为了研究受体组合的相对效力,进行由板结合刺激引起的NKG2D或CD16的交联和两种受体的共交联。如图34 (图34A-3C) 所示,CD16和NKG2D的组合刺激导致CD107a的水平(脱粒) (图3A) 和/或IFN- γ 产生 (图34B) 高度升高。虚线表示每种受体的个体刺激的累加效应。

[0255] 在用抗CD16、抗NKG2D或两种单克隆抗体的组合进行板结合刺激4小时后,分析IL-2活化的NK细胞的CD107a水平和细胞内IFN- γ 产生。图表显示平均值 ($n=2$) $\pm$ SD。图34A显示CD107a的水平;图34B显示IFN γ 的水平;图34C显示CD107a的水平。图34A-34C中所示的数据代表使用五种不同健康供体进行的五个独立实验。

[0256] 以引用方式并入

[0257] 出于所有目的,将本文提到的每篇专利文献和科学论文的全部公开内容通过引用并入本文。

[0258] 等同方案

[0259] 在不脱离本发明的精神或基本特征的情况下,本发明可以以其他特定形式实施。因此,前述实施方案在所有方面都被认为是说明性的,而不是限制本文所述的发明。因此,本发明的范围由所附权利要求而不是由前面的描述表示,并且落入权利要求的等同方案的含义和范围内的所有变化都旨在包含在其中。

序列表

<110> ADIMAB, LLC.

<120> 结合BCMA、NKG2D和CD16的蛋白

<130> DFY-003PC

<140>

<141>

<150> 62/457,780

<151> 2017-02-10

<160> 136

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 1

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

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 3

```

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

```

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 5

```

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

```

	85		90		95										
Arg	Ala	Arg	Gly	Pro	Trp	Ser	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
	100							105					110		
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
	115														

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 6

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

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 7

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu
1			5					10					15		
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr
		20						25				30			
Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
	35					40						45			

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

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 8

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

<210> 9

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

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

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 10

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

<210> 11

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 11

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

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 12

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 13

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 13

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

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 14

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

<400> 16

46

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

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 17

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

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 18

```

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

```

<210> 19

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 19

```

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

```

115

<210> 20

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 20

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

<210> 21

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 21

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 22

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

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

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

115

<210> 24

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 24

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

<210> 25

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 25

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

<210> 26

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 26

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

<210> 27

<211> 117

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 27

[illegible]

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 28

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

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Ser Tyr Ser Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 31

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 31

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

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

<210> 33

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 33

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

<210> 34

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 34

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

<210> 35

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 35

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

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 36

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Phe Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 37

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 37

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

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

115

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 38

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

<210> 39

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 39

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr
			20						25					30	

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

<210> 40

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 40

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

<210> 41

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 41

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

<210> 42

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 42

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

Lys

<210> 43

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 43

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

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 44

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

65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Thr Trp Pro Pro			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105		

<210> 45

<211> 121

<212> PRT

<213> 智人

<400> 45

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

<210> 46

<211> 110

<212> PRT

<213> 智人

<400> 46

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

Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 51

Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 52

Leu Tyr Asp Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 53

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 53

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Glu Thr

85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

<210> 55
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的肽
 <400> 55
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 <210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的肽
 <400> 56
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5
 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的肽
 <400> 57
 Ala Glu Thr Ser His Val Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的肽
 <400> 58
 Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 59
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的多肽
 <400> 59
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100	105	110
Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 60		
<211> 111		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
<400> 60		
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Met Ser Leu Gly		
1 5 10 15		
Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu		
20 25 30		
Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
35 40 45		
Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala		
50 55 60		
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp		
65 70 75 80		
Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg		
85 90 95		
Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100 105 110		
<210> 61		
<211> 121		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
<400> 61		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asn Tyr		
20 25 30		
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35 40 45		
Gly Ala Thr Tyr Arg Gly His Ser Asp Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe		
50 55 60		

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Ile Tyr Asn Gly Tyr Asp Val Leu Asp Asn Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 62

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 62

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

<210> 63

<211> 184

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 63

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr

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

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 64

Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 65

Glu Ile Asp His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 66

Ala Arg Ala Arg Gly Pro Trp Ser Phe Asp Pro

1 5 10

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 67

Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 68

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

1 5 10 15

Gly

<210> 69

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 69

Ala Arg Gly Asp Ser Ser Ile Arg His Ala Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met

1 5 10 15

Asp Val

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 70

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 71

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 72

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr

1 5

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 73

Gly Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5 10

<210> 74

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 74

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 75

Ala Arg Gly Ser Asp Arg Phe His Pro Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 76

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 77

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 78

Gln Gln Phe Asp Thr Trp Pro Pro Thr

1 5

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 79

Asp Tyr Ser Ile Asn

1 5

<210> 80

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 80

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg

1 5 10 15

<210> 81

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 81

Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 82

Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His

1 5 10 15

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 83

Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 84

Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr

1 5

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 85

Asn Tyr Trp Met His

1 5

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 86

Ala Thr Tyr Arg Gly His Ser Asp Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 87

Gly Ala Ile Tyr Asn Gly Tyr Asp Val Leu Asp Asn

1 5 10

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 88

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 89

Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 90

Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 91

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 91

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

<210> 92

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 92

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

<210> 93

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 93

```

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

```

<210> 94

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 94

```

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

```

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

<210> 95

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 95

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

<210> 96

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 96

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp			
20	25	30	

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

<210> 97

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 97

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

<210> 98

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 98

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

Lys

<210> 99

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 99

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

<210> 100

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 100

```

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

```

<210> 101

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 101

```

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

```

				85					90					95					
Ala	Arg	Gly	Ala	Pro	Met	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp				
				100					105					110					
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				115					120										

<210> 102

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 102

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

<210> 103

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 103

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

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

<210> 104

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 104

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

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 105

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser

1 5
<210> 106
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 106
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 107
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 107
Ala Lys Asp Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Gly Ala Gly Asp Tyr
1 5 10
<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 108
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asp Ser Trp Leu Ala
1 5 10
<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 109
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5
<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 110

Gln Gln Gly Val Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 111

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 112

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 112

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 113

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 113

Ala Arg Gly Ala Pro Met Gly Ala Ala Ala Gly Trp Phe Asp Pro

1 5 10 15

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 114

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 115

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 116

Gln Gln Gly Val Ser Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 117

Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 118

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 118

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

1 5 10 15

Gly

<210> 119

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 119

Ala Arg Asp Thr Gly Glu Tyr Tyr Asp Thr Asp Asp His Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 120

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 121

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 122

Gln Gln Asp Asp Tyr Trp Pro Pro Thr

1 5

<210> 123

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 123

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 124

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 124

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Tyr

35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50	55	60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly		
65	70	75
Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His		
85	90	95
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
100	105	

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 125

Ser Ser Ser Tyr Phe Trp Gly

1 5

<210> 126

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 126

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 127

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 127

His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 128

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His

1 5 10

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 129

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser

1 5

<210> 130

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 130

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val

1 5 10

<210> 131

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 131

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Glu Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 132

Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5
<210> 133
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 133
Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr
1 5 10
<210> 134
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 134
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Glu Tyr Leu Ser
1 5 10
<210> 135
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 135
Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5
<210> 136
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成的肽
<400> 136
Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Asp Phe Thr
1 5 10

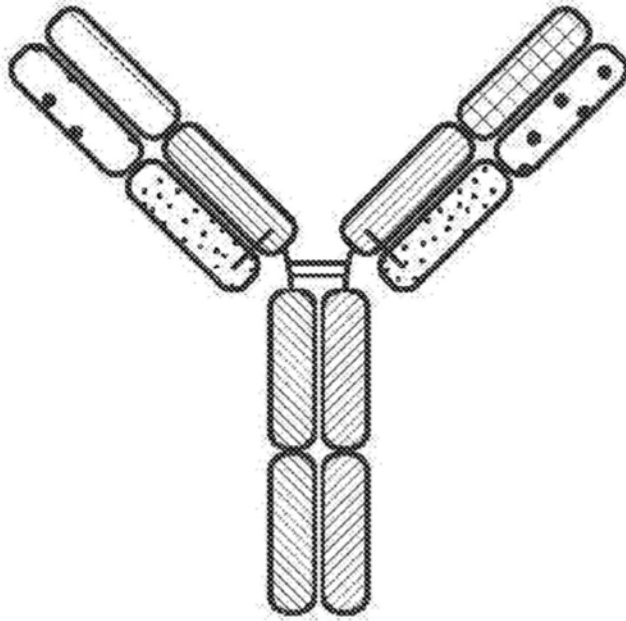


图1

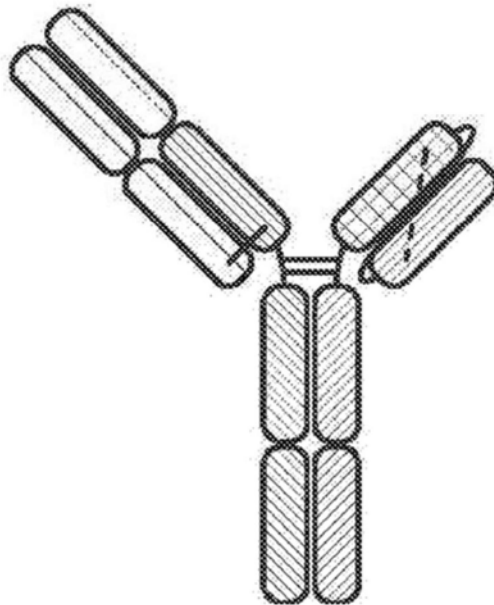


图2

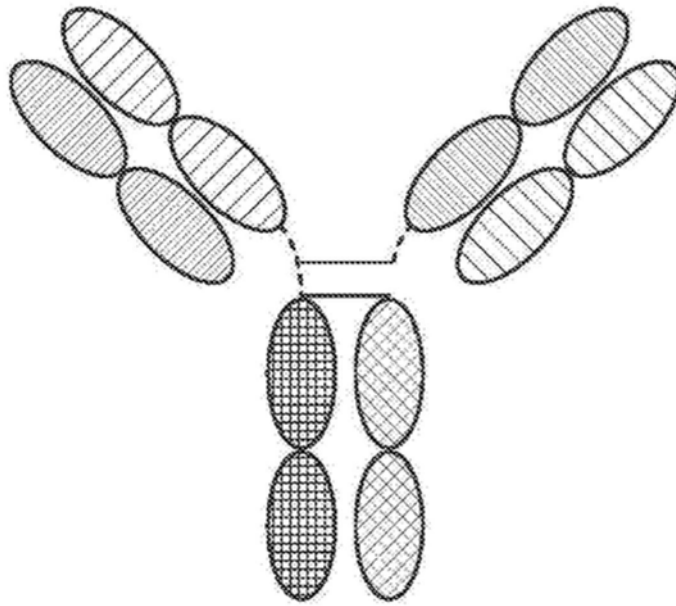


图3

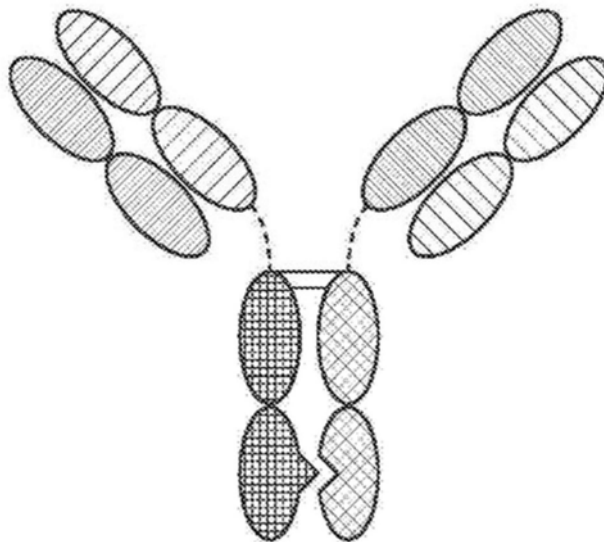


图4

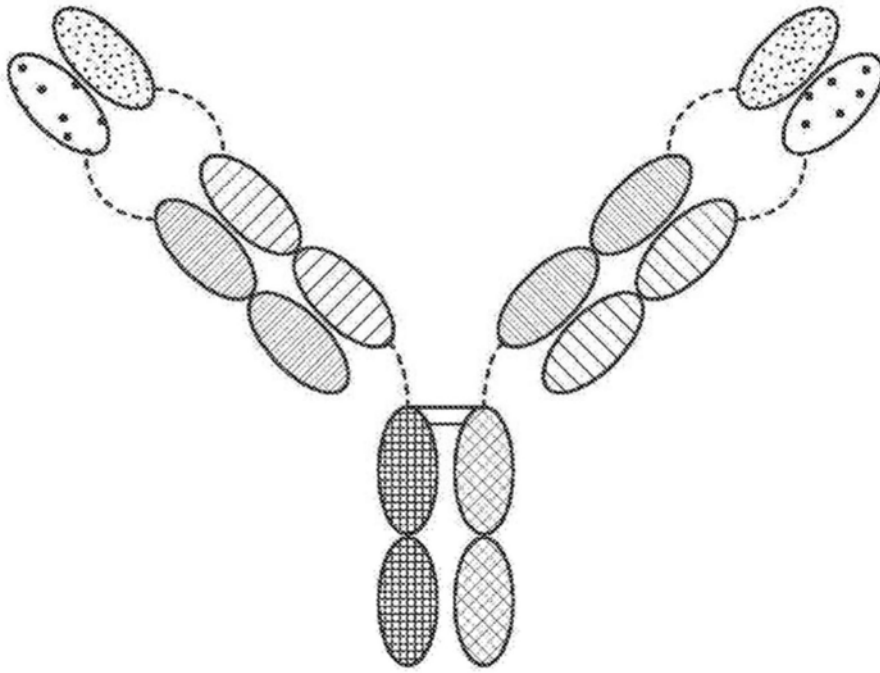


图5

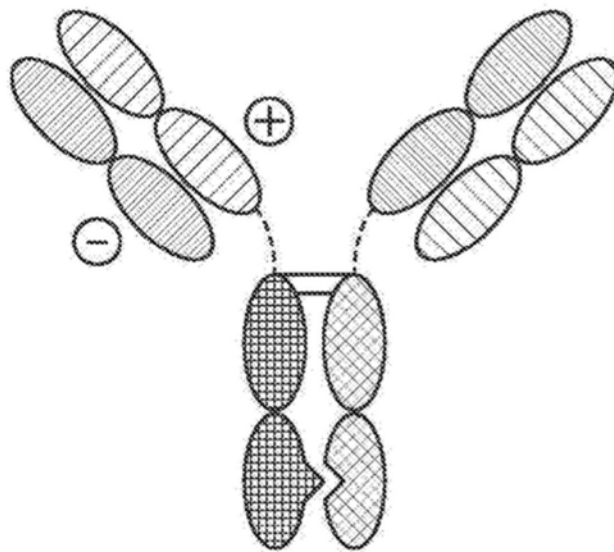


图6

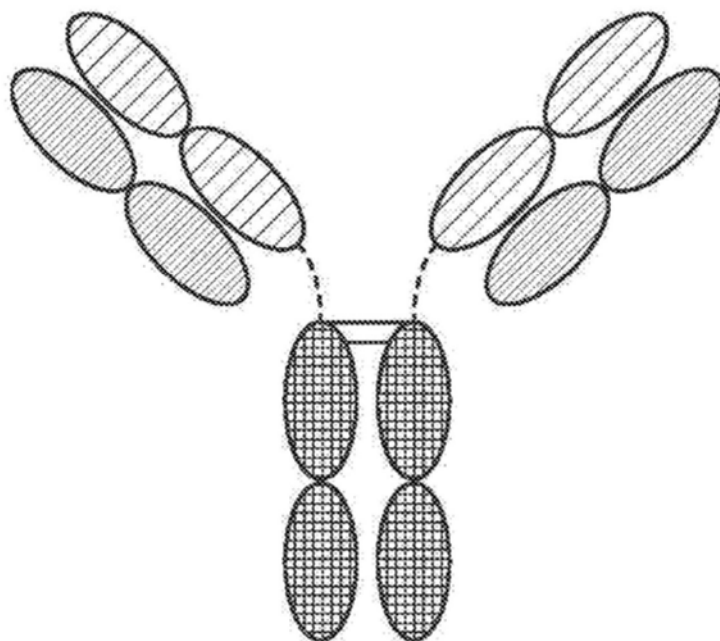


图7

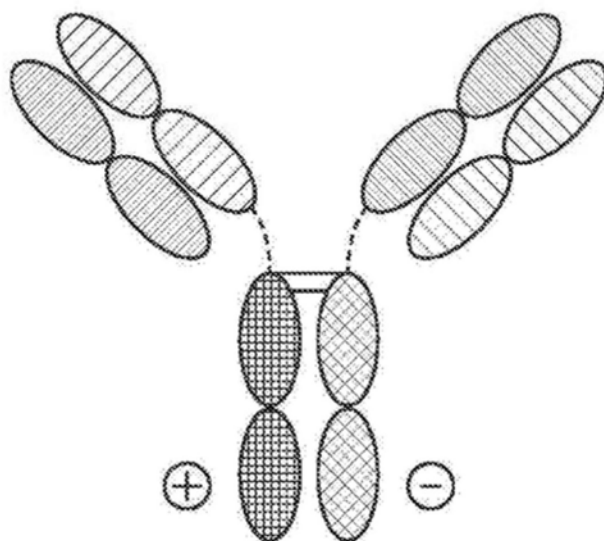


图8

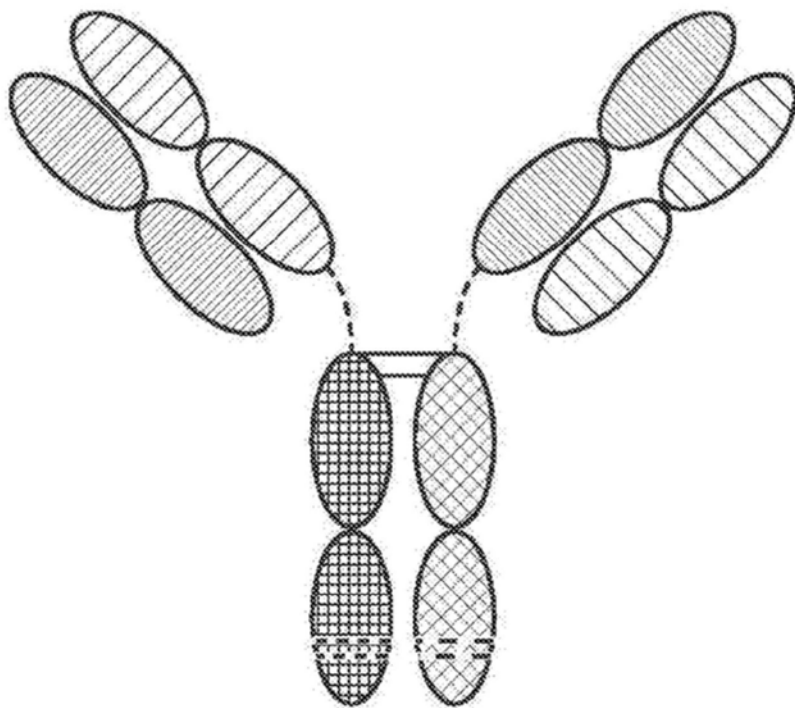


图9

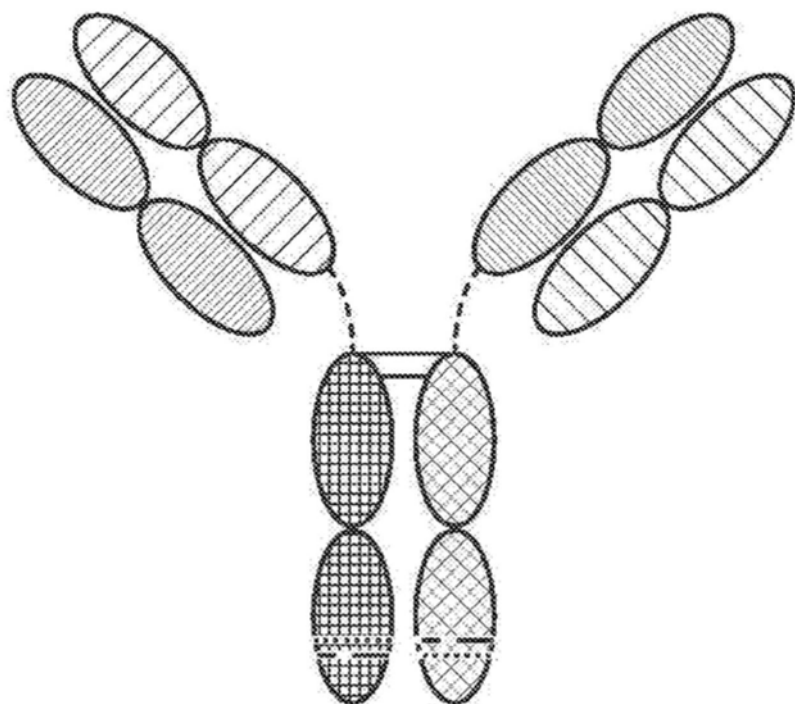


图10

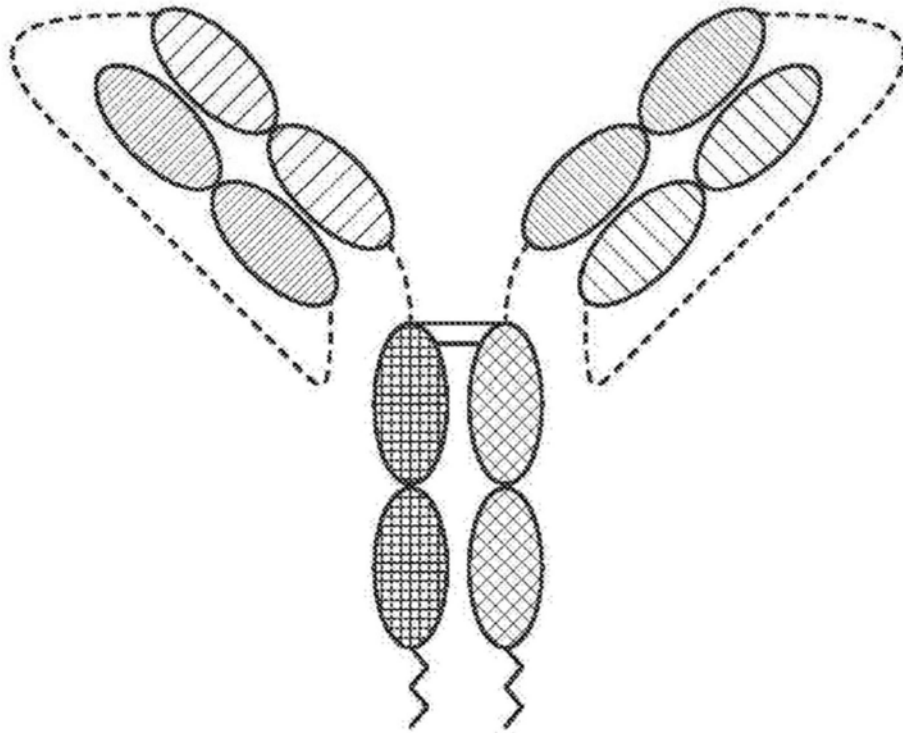


图11

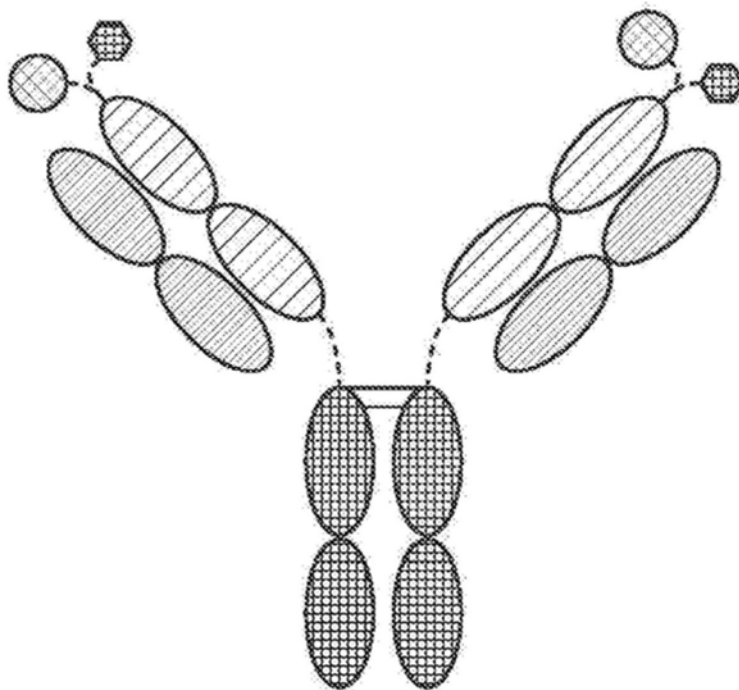


图12

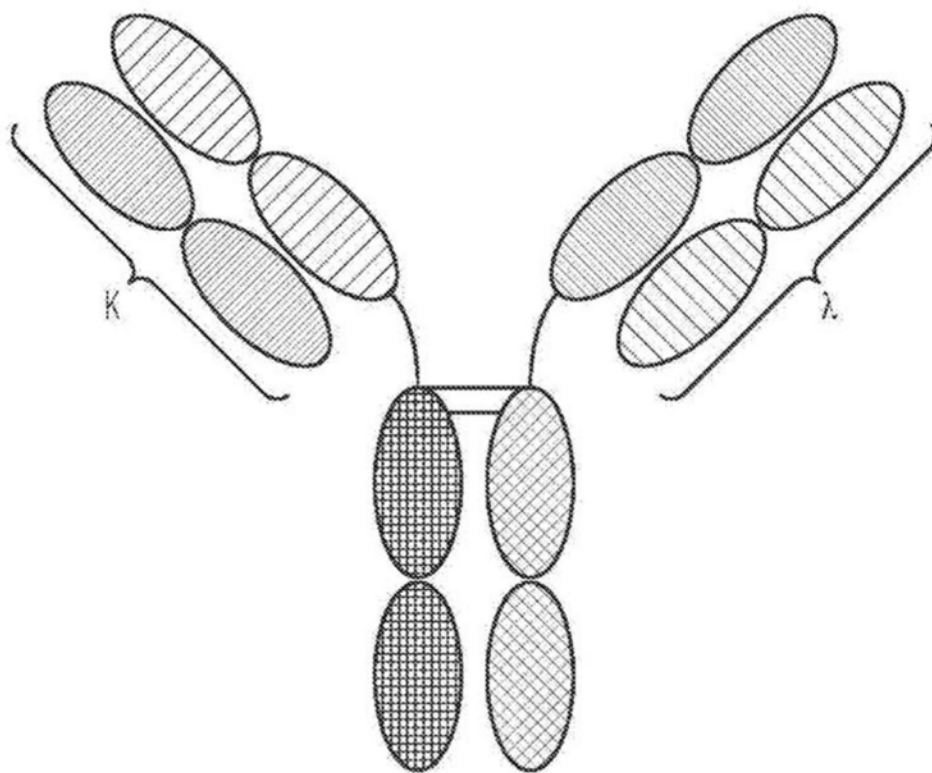


图13A

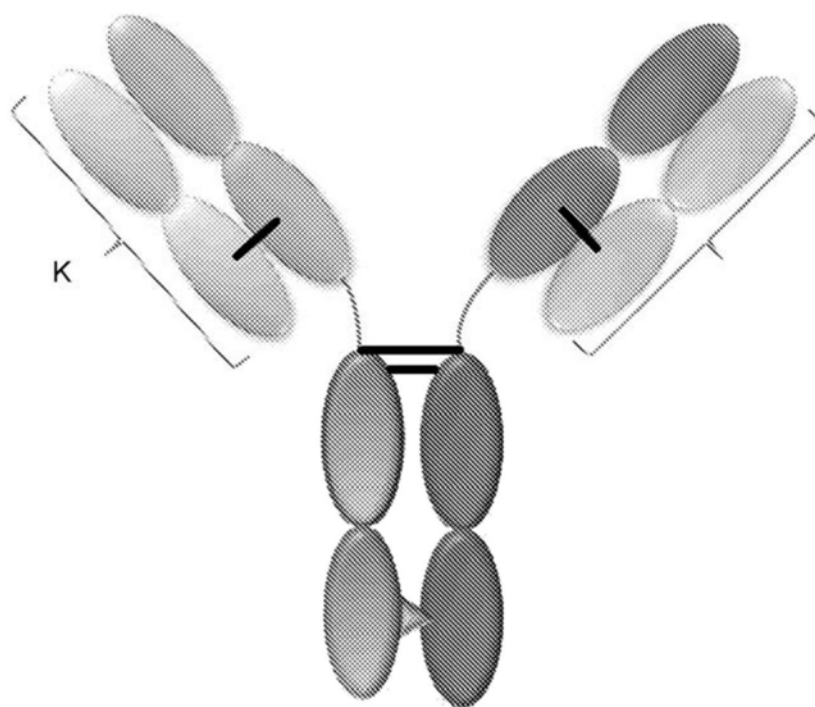


图13B

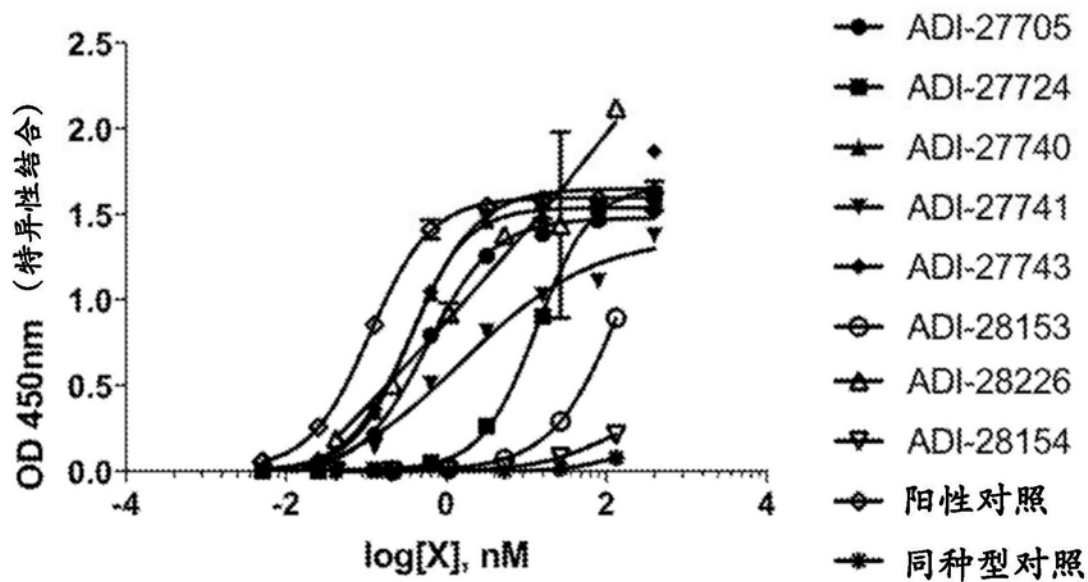


图14

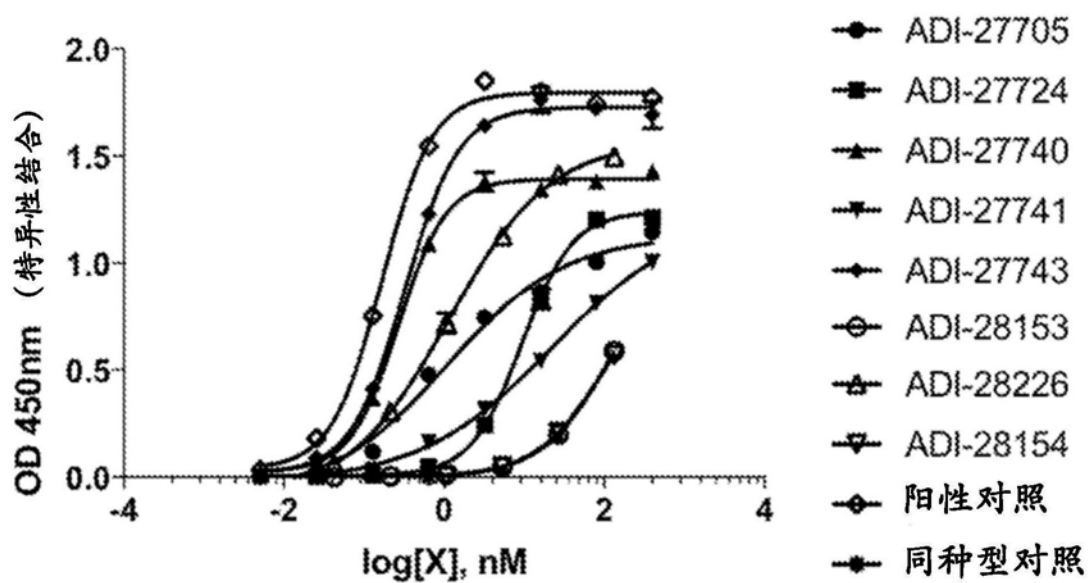


图15

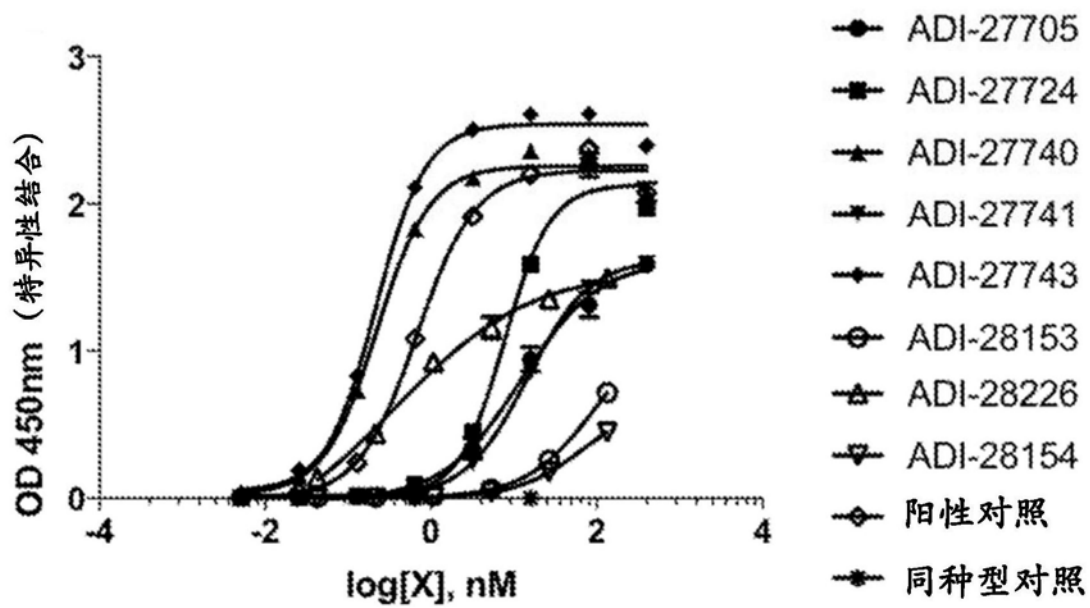


图16

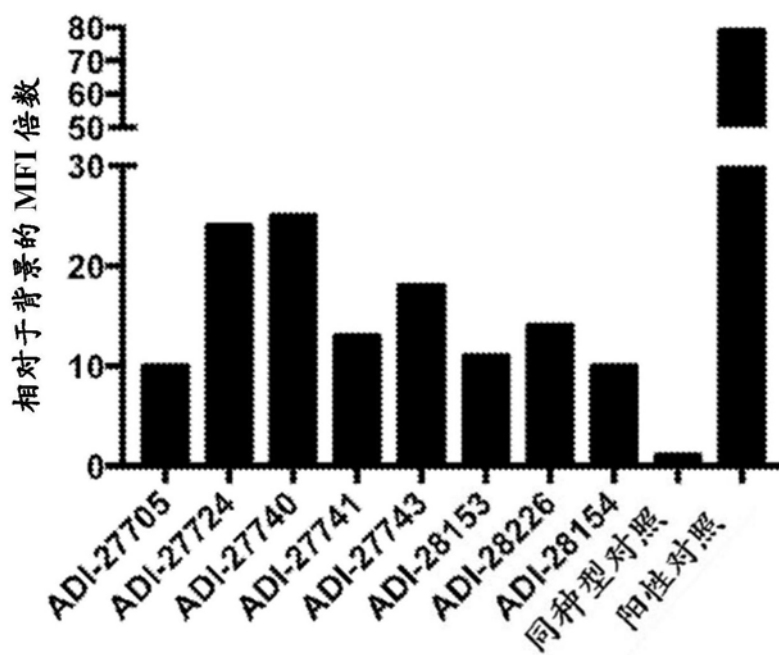


图17

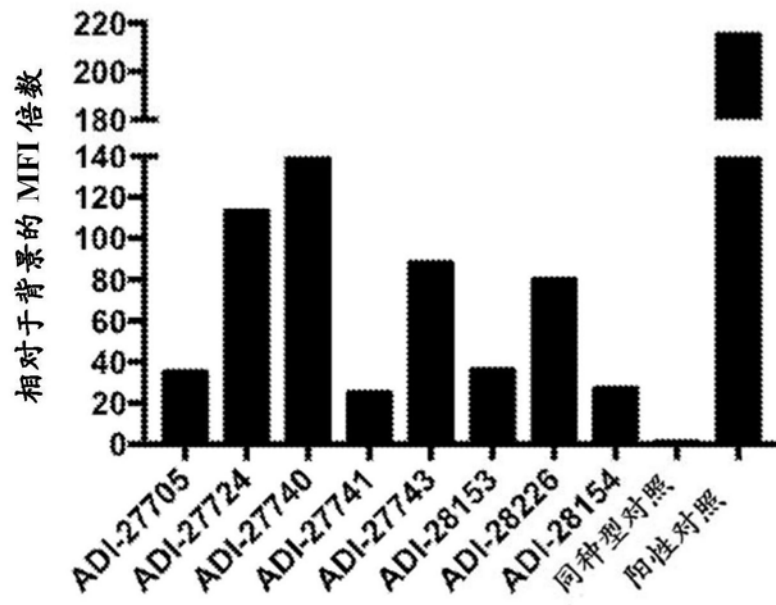


图18

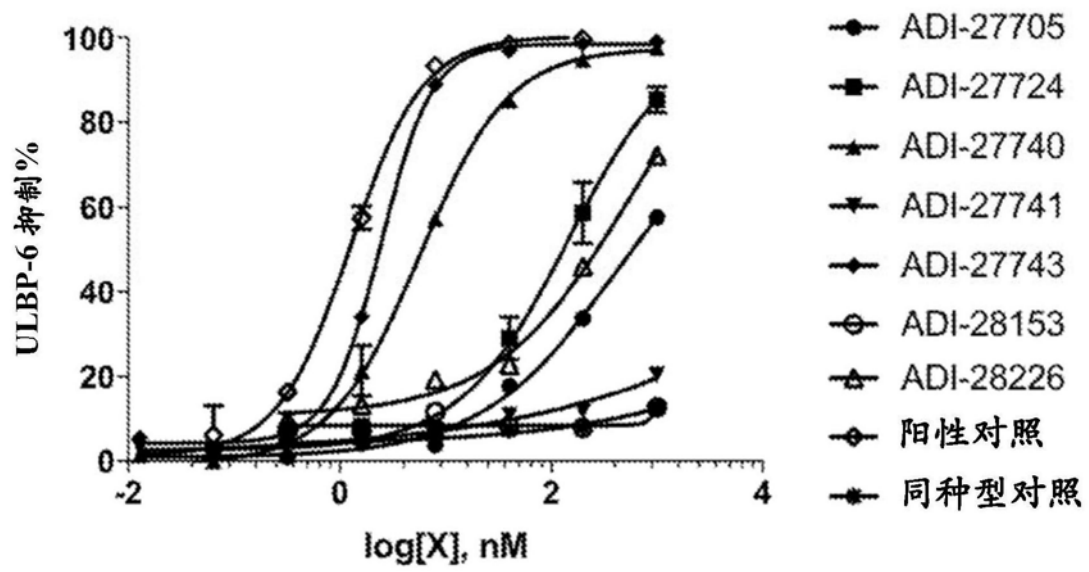


图19

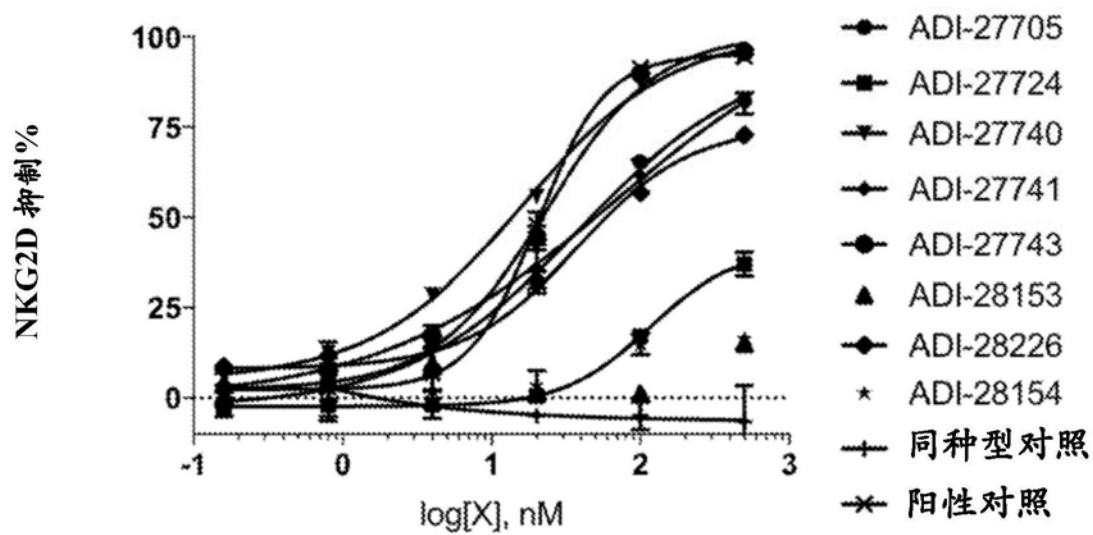


图20

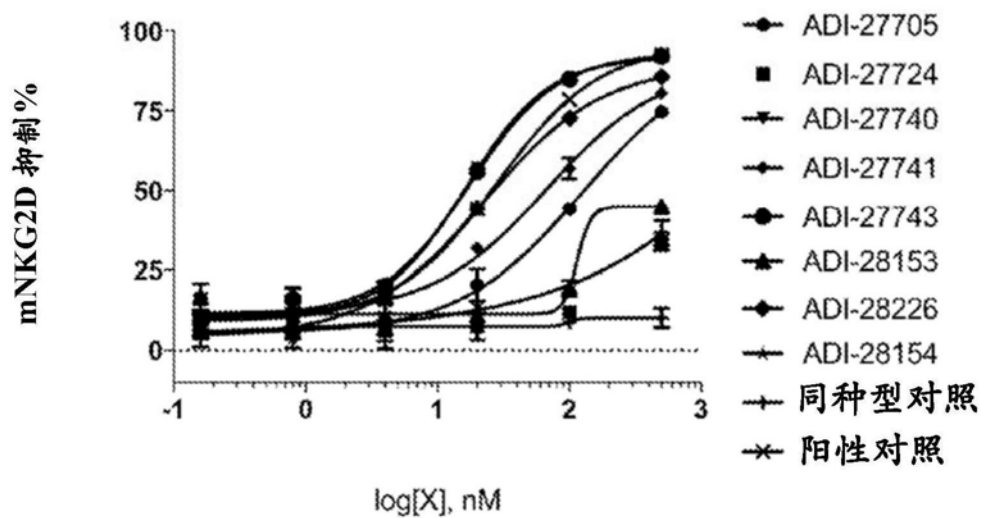


图21

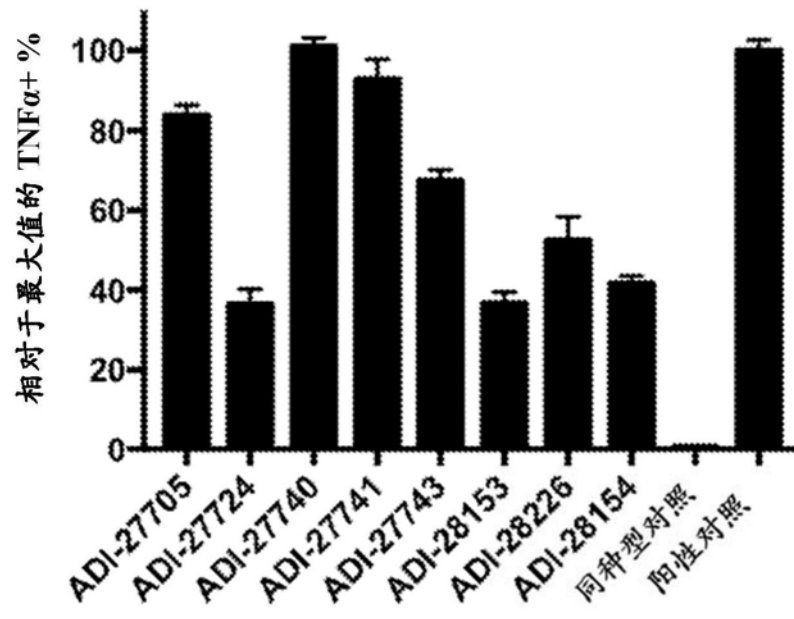


图22

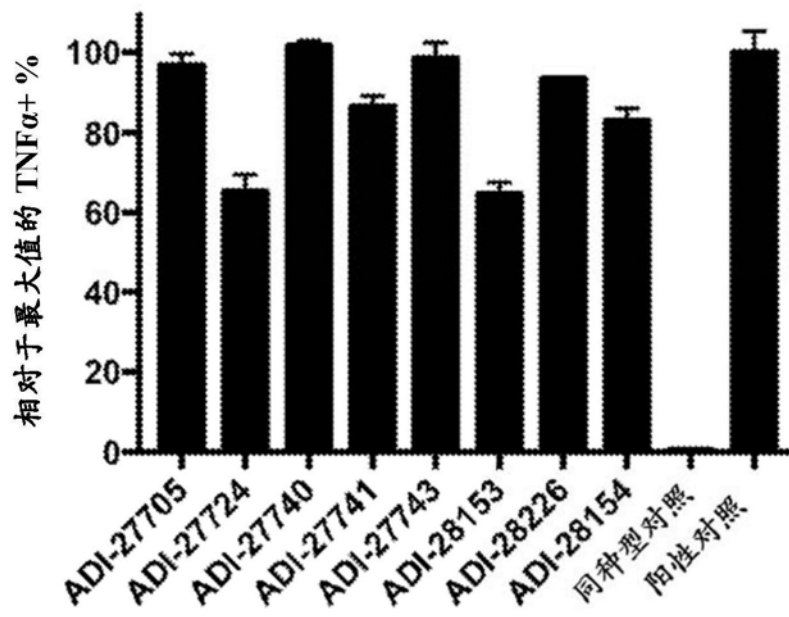


图23

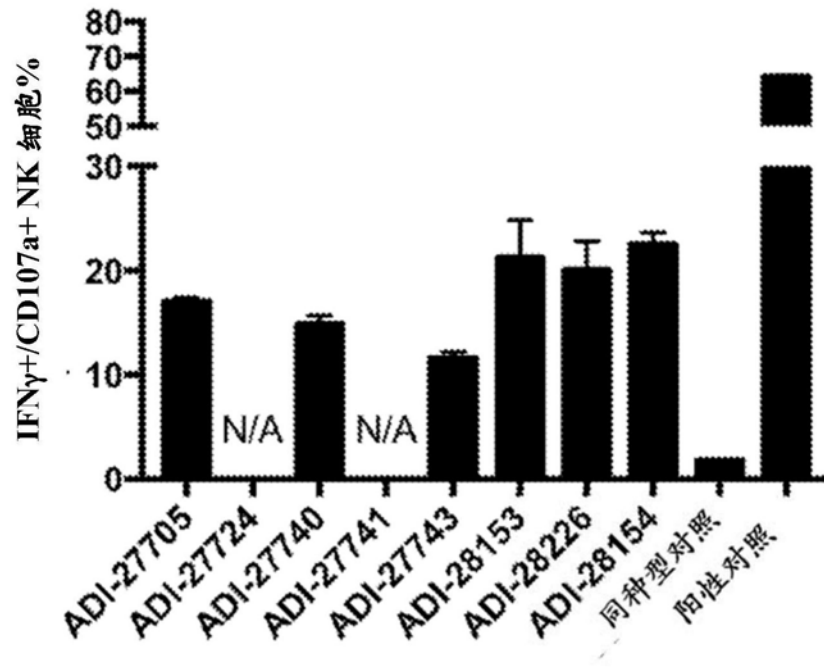


图24

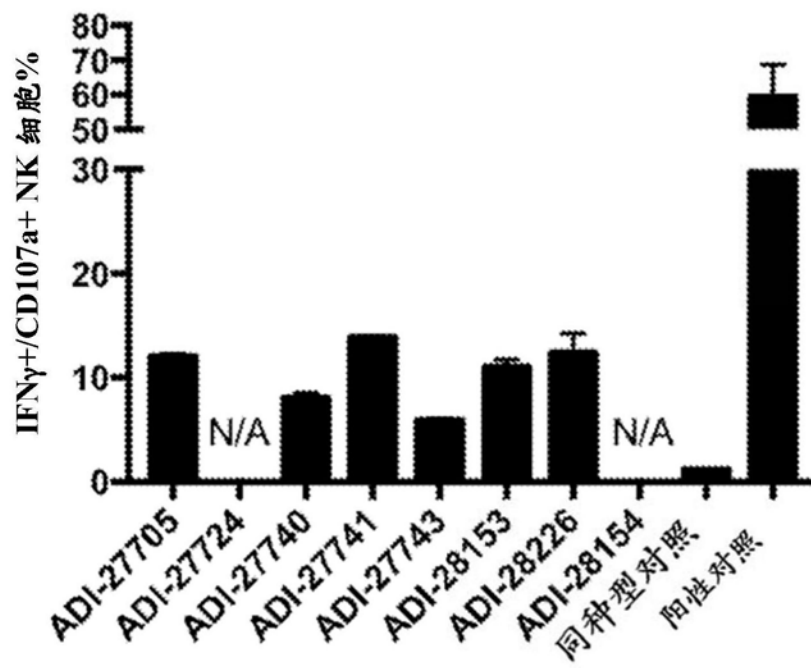


图25

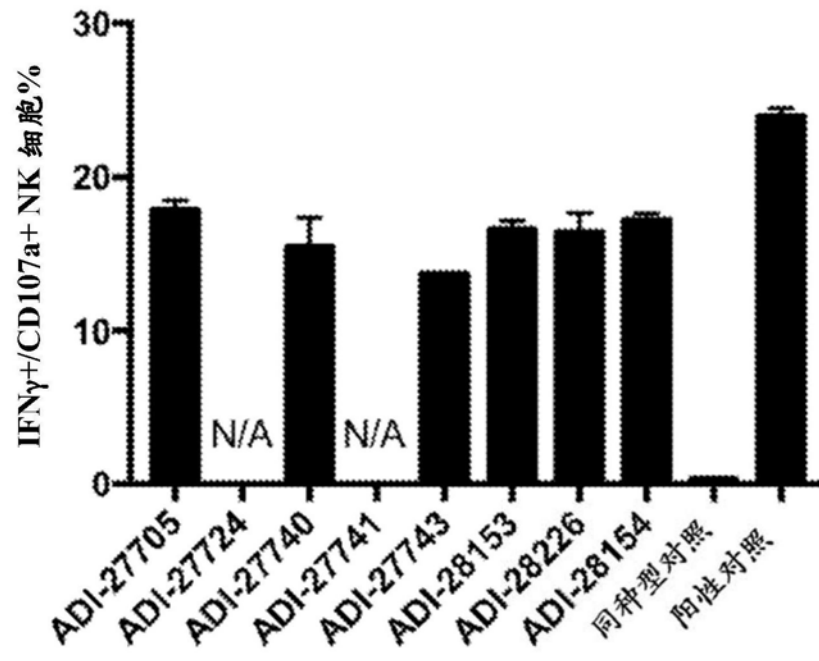


图26

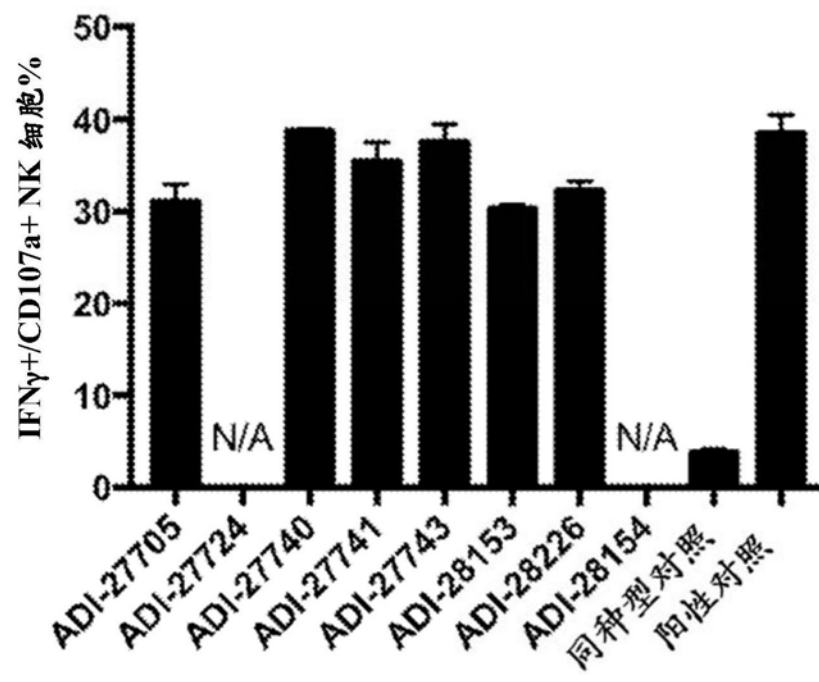


图27

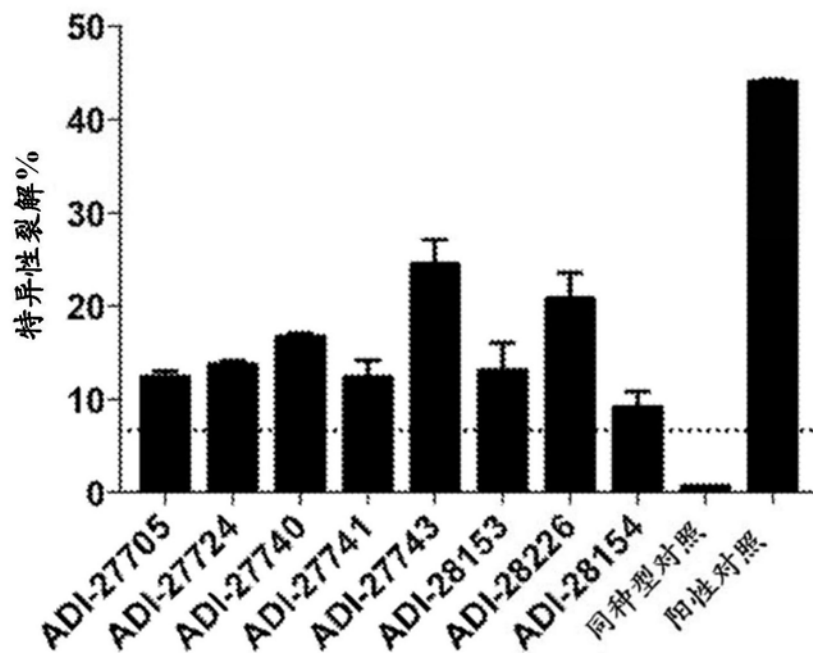


图28

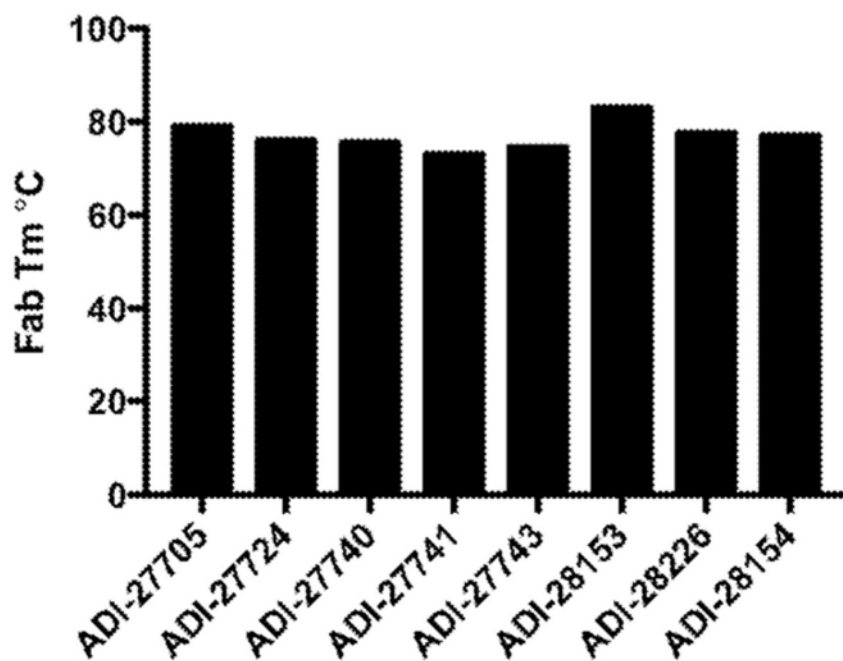


图29

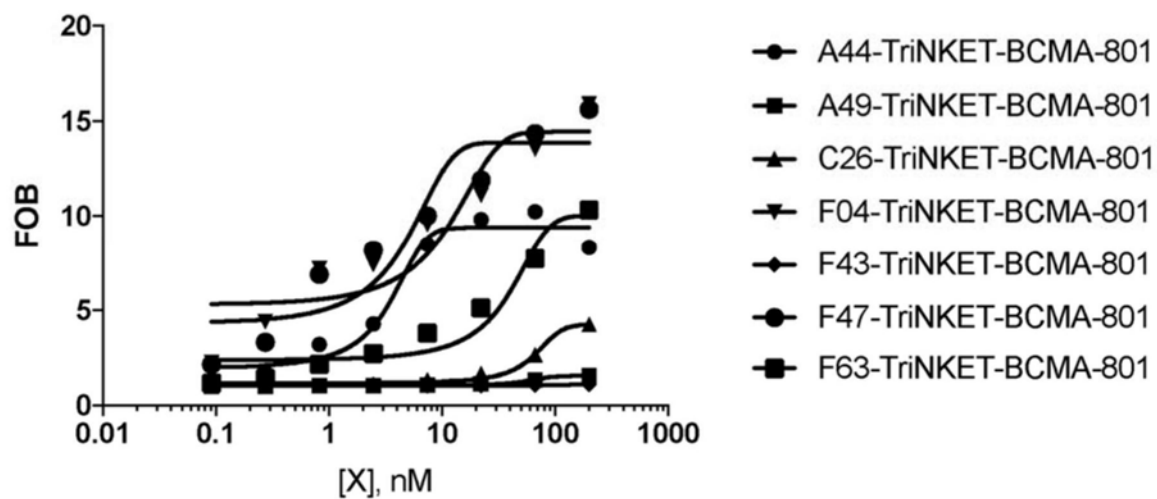


图30

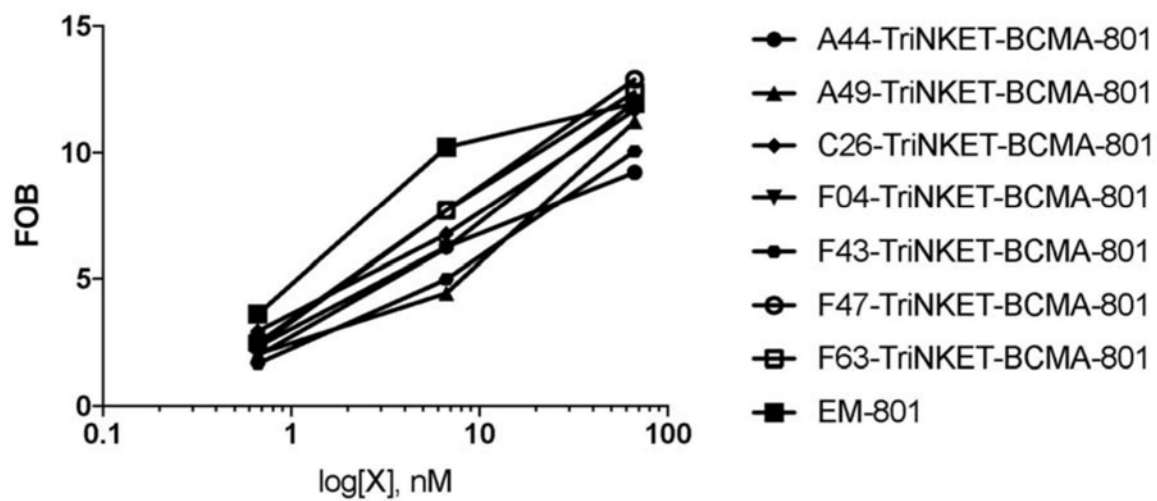


图31

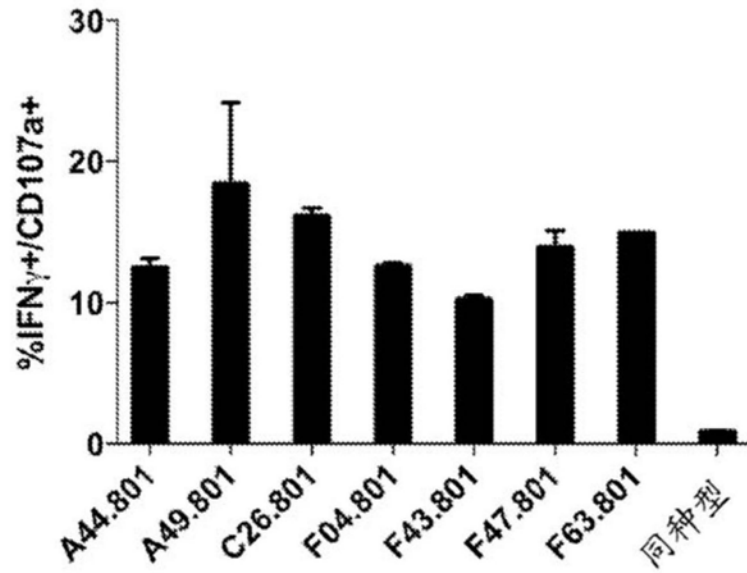


图32

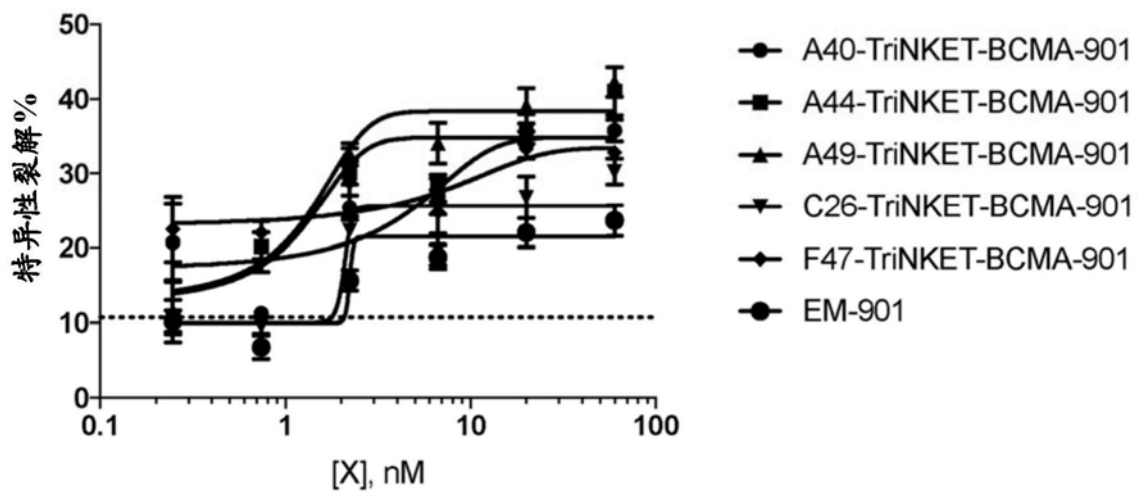


图33

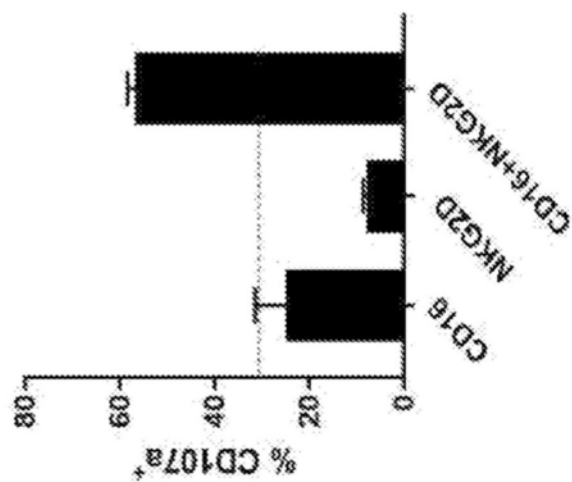


图34A

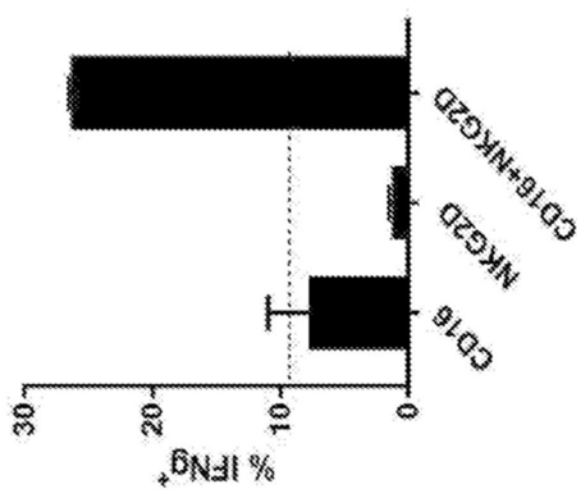


图34B

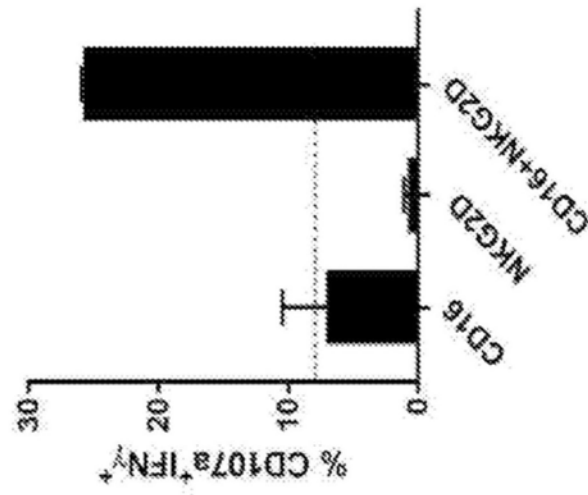


图34C

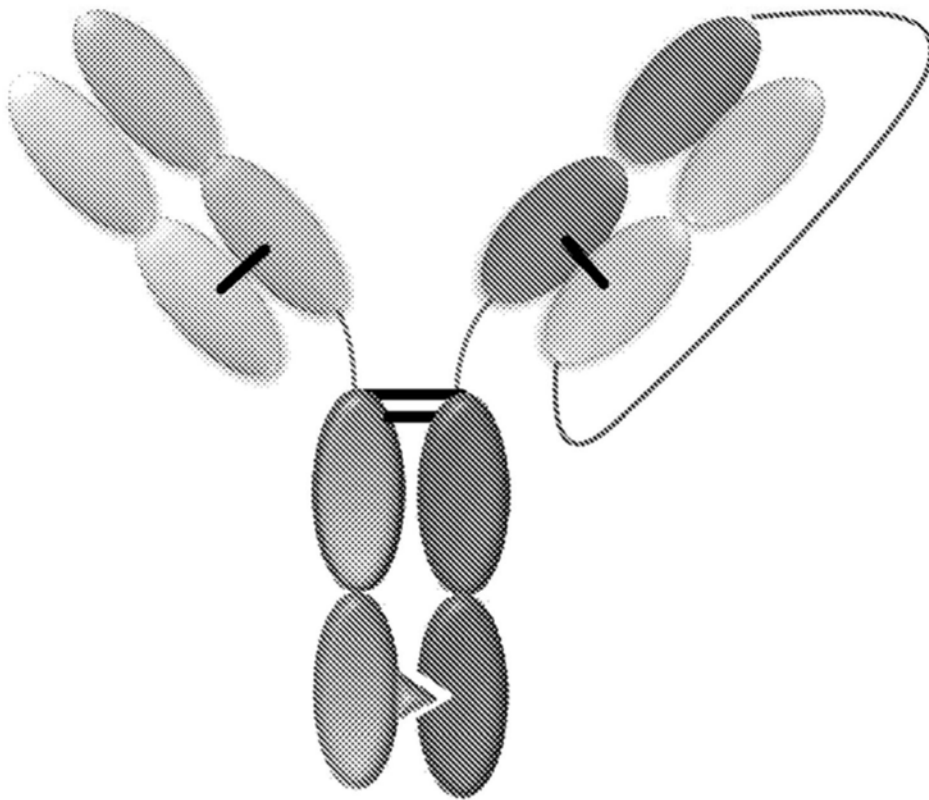


图35

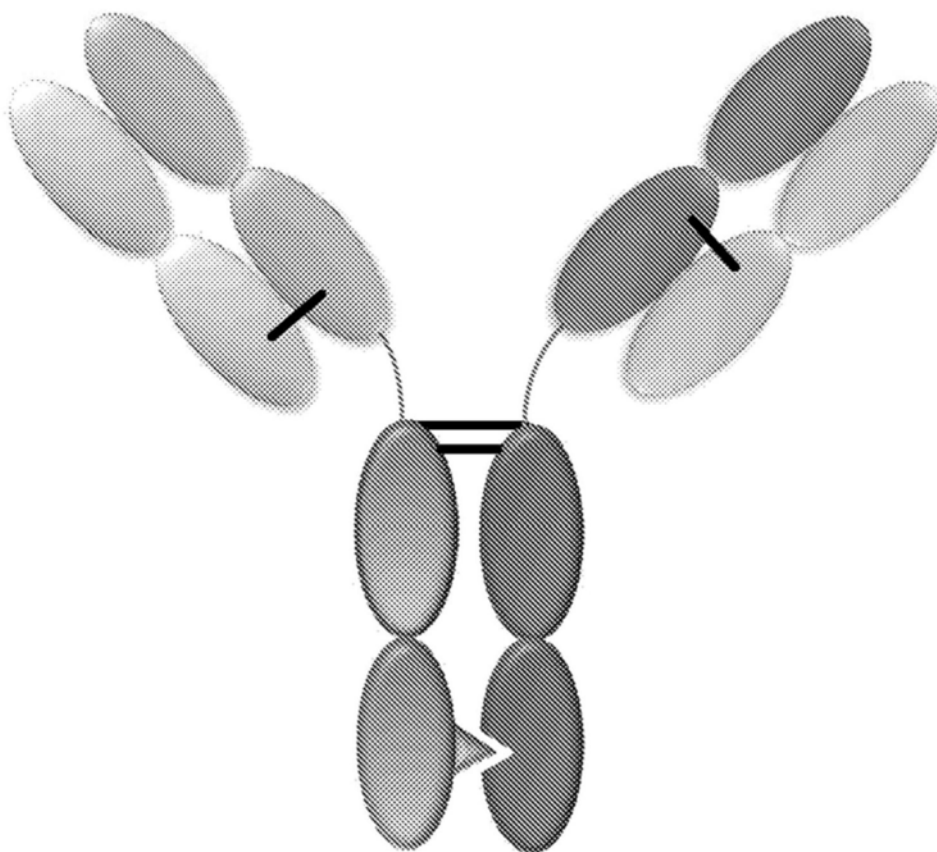


图36

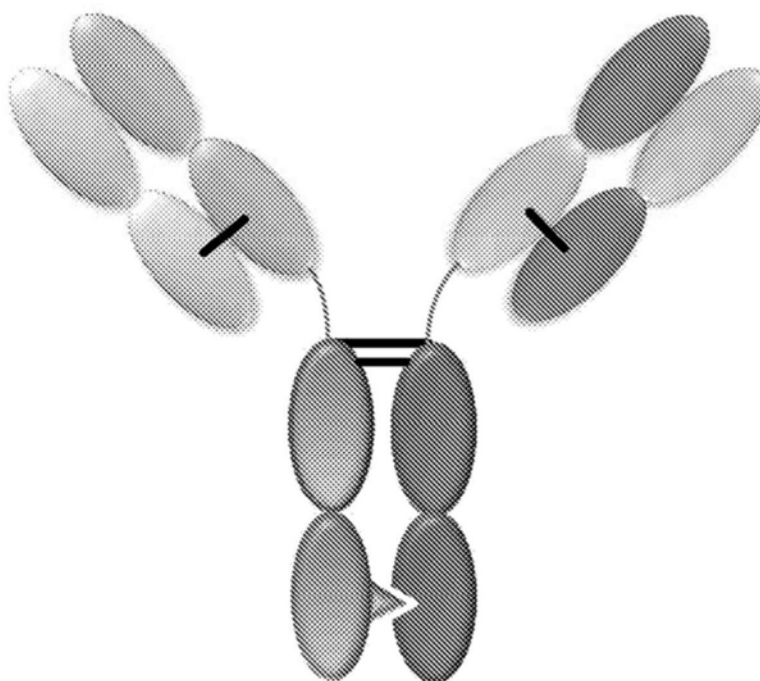


图37

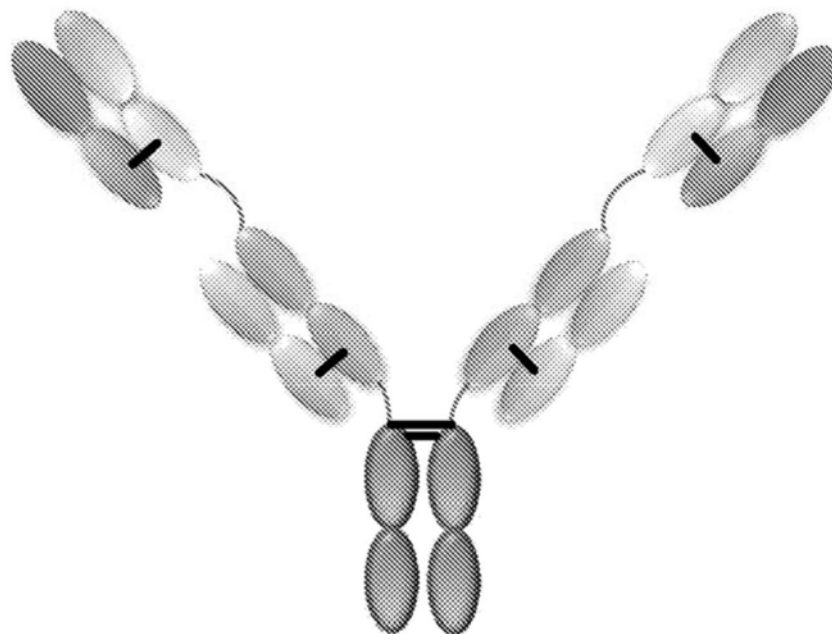


图38

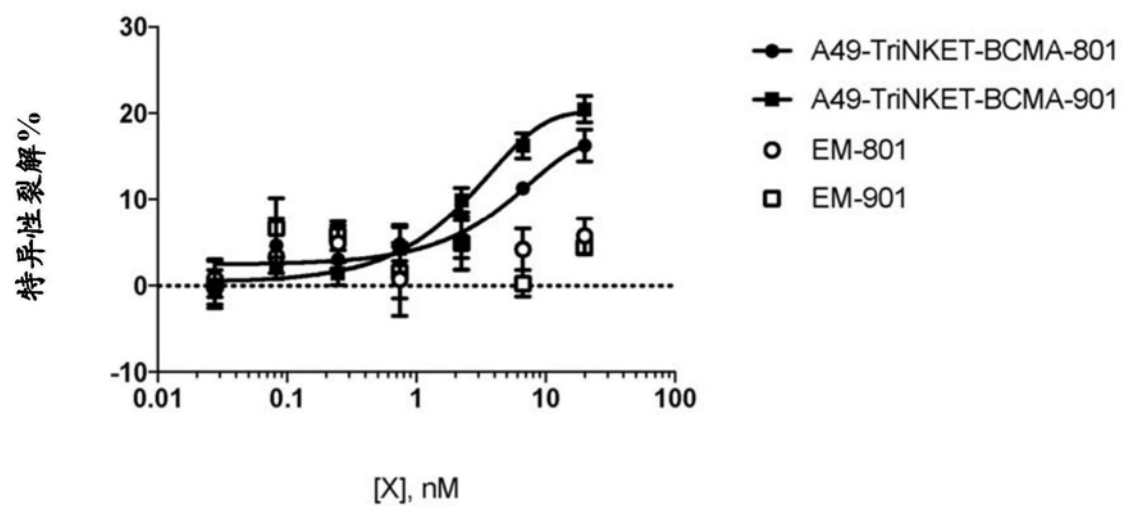


图39