



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105530959 B

(45) 授权公告日 2021. 09. 17

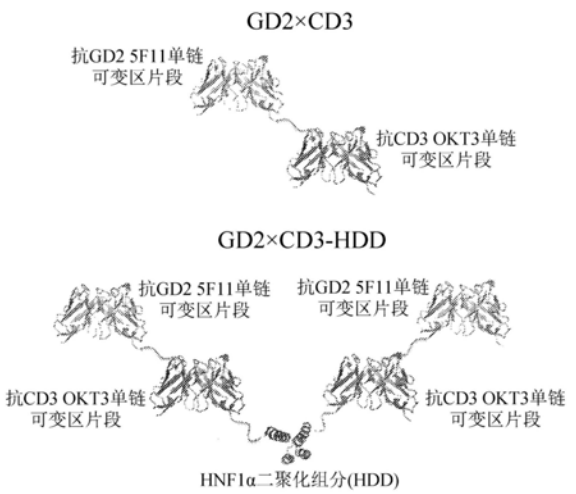
(21) 申请号 201480028543.2
(22) 申请日 2014.03.14
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 105530959 A
(43) 申请公布日 2016.04.27
(30) 优先权数据
 61/791,600 2013.03.15 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2015.11.16
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2014/029041 2014.03.14
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02014/144573 EN 2014.09.18
(73) 专利权人 纪念斯隆-凯特琳癌症中心
 地址 美国纽约州
(72) 发明人 马希乌丁·艾哈迈德
 乃功·V·张
(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司
 代理人 沈锦华
(51) Int.Cl.
 A61K 39/395 (2006.01)

(56) 对比文件
 CN 101583376 A,2009.11.18
 CN 101583376 A,2009.11.18
 EP 2050764 A1,2009.04.22
 CN 1745102 A,2006.03.08
 Kristian M. Mueller,et al.A dimeric bispecific miniantibody combines two specificities with avidity.《FEBS Letters》.1998,第432卷45-49.
 Taizo nitta,et al.Priliminary trial of specific targeting therapy against malignant glioma.《THE LANCET》.1990,第335卷368-371.
 于淼,杨晓明.HNF1 α 的蛋白质复合体.《医学分子生物学杂志》.2007,第4卷(第4期),335-338.
 Ming Cheng,et al.Structural design of disialoganglioside GD2 and CD3-bispecific antibodies to redirect T cells for tumor therapy.《Int J Cancer》.2015,第136卷(第2期),476-486.
审查员 毛颖

权利要求书2页 说明书39页
序列表57页 附图11页

(54) 发明名称
多聚化技术
(57) 摘要

本发明尤其提供相比于无二聚化能力的多特异性结合剂具有改进的特性的二聚多特异性结合剂(例如包含抗体组分的融合蛋白)。在某些实施例中,提供的药剂包含个别多肽,所述多肽中的每一个包括至少一个,且更通常至少两个或两个以上特异性地与特定靶靶相互作用的结合部分。在多个实施例中,此类多肽包括二聚化组分。在多个实施例中,所述二聚化组分为人类肝细胞核因子-1 α 的元件。



CN 105530959 B

1. 一种包含两个融合蛋白的双特异性结合剂,其中所述融合蛋白中的每一个都包含两种抗体组分,以及其中所述融合蛋白中的每一个由N端到C端依次包含:

(i) 结合肿瘤抗原的第一scFv;

(ii) 结合CD3的第二scFv;和

(iii) 人类肝细胞核因子-1 α (HNF-1 α) 二聚化组分,所述二聚化组分包含SEQ ID NO:1的残基1-32的序列,

其中所述融合蛋白通过HNF-1 α 的二聚化组分进行二聚化以形成同型二聚体,其中结合存在于T细胞上的抗原的scFv位于所述HNF-1 α 二聚化组分近端且结合肿瘤抗原的scFv位于所述HNF-1 α 二聚化组分远端。

2. 根据权利要求1所述的结合剂,其中所述肿瘤抗原为GD2。

3. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1或2所述的双特异性结合剂和药学上可接受的载剂。

4. 一种融合蛋白,其包含两个抗体组分,其中所述融合蛋白由N端到C端依次包含:结合肿瘤抗原的第一scFv、结合CD3的第二scFv和人类肝细胞核因子-1 α (HNF-1 α) 二聚化组分,所述二聚化组分包含SEQ ID NO:1的残基1-32的序列,其中所述融合蛋白能够通过HNF-1 α 的二聚化组分进行二聚化以形成同型二聚体,其中结合存在于T细胞上的抗原的scFv位于所述HNF-1 α 二聚化组分近端且结合肿瘤抗原的scFv位于所述HNF-1 α 二聚化组分远端。

5. 根据权利要求4所述的融合蛋白,其中所述肿瘤抗原为GD2。

6. 一种二聚双特异性结合剂,其包含两个根据权利要求5所述的融合蛋白。

7. 一种药物组合物,其包含根据权利要求6所述的二聚双特异性结合剂和药学上可接受的载剂。

8. 一种核酸序列,其编码根据权利要求4或5所述的融合蛋白。

9. 一种载体,其包含根据权利要求8所述的核酸序列。

10. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求9所述的载体。

11. 根据权利要求10所述的宿主细胞,其中所述细胞选自由细菌、酵母、昆虫或哺乳动物细胞组成的群组。

12. 根据权利要求11所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞选自由大肠杆菌、甲醇酵母、Sf9、COS、HEK293和CHO细胞组成的群组。

13. 一种产生二聚双特异性结合剂的方法,其包含在适合于表达所述二聚双特异性结合剂的条件下培养根据权利要求12所述的宿主细胞,和回收所述二聚双特异性结合剂。

14. 一种双特异性结合剂的用途,其用于制造杀死肿瘤细胞的药剂,

其中所述双特异性结合剂包含两个融合蛋白,其中所述融合蛋白中的每一个由N端到C端依次包含结合到GD2的第一scFv、结合到T细胞上的CD3的第二scFv和HNF-1 α 二聚化组分,所述二聚化组分包含SEQ ID NO:1的残基1-32的序列,且其中所述融合蛋白二聚化以形成同型二聚体,其中结合CD3的scFv位于所述HNF-1 α 二聚化组分近端且结合GD2的scFv位于所述HNF-1 α 二聚化组分远端,所述杀死在所述同型二聚体所结合的T细胞足以介导杀死所述肿瘤细胞的条件和时间下进行。

15. 一种双特异性结合剂的用途,其用于制造抑制肿瘤生长的药剂,

其中所述双特异性结合剂包含两个融合蛋白,其中所述融合蛋白中的每一个由N端到C

端依次包含结合到GD2的第一scFv、结合到T细胞上的CD3的第二scFv和HNF-1 α 二聚化组分,所述二聚化组分包含SEQ ID NO:1的残基1-32的序列,且其中所述融合蛋白二聚化以形成同型二聚体,其中结合CD3的scFv位于所述HNF-1 α 二聚化组分近端且结合GD2的scFv位于所述HNF-1 α 二聚化组分远端,所述抑制在所述同型二聚体所结合的T细胞足以抑制肿瘤生长的条件和时间下进行。

多聚化技术

[0001] 相关申请案交叉引用

[0002] 本申请要求2013年3月15日提交的美国临时专利申请序号61/791,600的35 U.S.C. §119(e)的权益,所述申请以全文引用的方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本说明书参考2014年3月14日以名称为“2003080-0636_ST25”的ascii.txt文件的电子形式提交的序列表。.txt文件产生于2014年3月7日且大小为100kb。

背景技术

[0005] 当前正开发用于多种治疗、诊断和研究应用的双特异性和多特异性结合剂。许多此类药剂由将靶向不同抗原的抗体组分彼此缔合,例如以融合蛋白形式或通过抗体组分的交联产生。此类方法尤其包括通过各自表达单特异性抗体的细胞的融合(例如融合瘤)、两个或两个以上单特异性抗体的化学共轭和/或重组DNA技术产生多特异性抗体。但是,此类方法不受限制。

[0006] 确切地说,重组DNA技术已产生若干多特异性和多功能性的工程改造抗体。随着单链Fv分子的出现,已取得工程改造抗体中的许多进步。此类工程改造抗体已展现相比于传统抗体改进的特性,其至少部分归因于已产生的独特形式。尽管存在若干用于工程改造多特异性抗体药剂的策略,大部分努力聚焦于仅改进某些功能方面。因此,由抗体组分制得的大部分工程改造蛋白质不具有将带来大部分药理学意义的所有所需功能特性。

发明内容

[0007] 本发明尤其提供包括多聚化组分的改进的多特异性结合剂。此类提供的药剂具有相比于不具有此类多聚化组分的亲本结合剂改进的功能特性。

[0008] 在某些实施例中,提供的药剂由个别多肽组成,其中的每一者包括至少一个,且更通常至少两个或两个以上特异性地与特定标靶相互作用的结合部分。在多个实施例中,此类结合部分为抗体组分或包含抗体组分。在一些实施例中,本发明尤其提供包含具有包含至少抗体5F11的结合元件的氨基酸序列的抗体组分的多肽。根据本发明,提供的药剂内的此类个别多肽经工程改造以包括多聚化组分。在多个实施例中,此类多肽包括二聚化组分。在多个实施例中,二聚化组分为人类肝细胞核因子-1 α 的元件。

[0009] 在本文所述的某些特定实施例中,提供的药剂包含经工程改造以含有多聚化组分的双特异性抗体多肽。

[0010] 在一些实施例中,本发明提供包含两个融合蛋白的双特异性结合剂,其中的每一者包含结合第一抗原的第一抗体组分;结合第二抗原的第二抗体组分,和包含人类肝细胞核因子-1 α (HNF-1 α) 元件的二聚化组分。

[0011] 在一些实施例中,本发明的第一和第二抗原是不相同的。在一些实施例中,本发明的第一抗原为肿瘤抗原。在一些实施例中,肿瘤抗原与B细胞或T细胞相关。在一些实施例中,本发明的肿瘤抗原为GD2。在一些实施例中,本发明的肿瘤抗原为GD3。

[0012] 在一些实施例中,本发明的第二抗原存在于T细胞上。在一些实施例中,本发明的第二抗原为CD3。

[0013] 在一些实施例中,本发明的二聚化组分具有与人类HNF-1 α (SEQ ID NO:1)的氨基酸残基1-32具有至少约50% (例如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)一致性的序列。在一些实施例中,本发明的二聚化域具有与人类HNF-1 α (SEQ ID NO:1)的氨基酸残基1-32实质上一致的序列。在一些实施例中,本发明的二聚化域包含人类HNF-1 α (SEQ ID NO:1)的氨基酸残基1-32。在一些实施例中,本发明的二聚化域为人类HNF-1 α (SEQ ID NO:1)的氨基酸残基1-32。

[0014] 在一些实施例中,本发明的双特异性粘合剂具有与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23具有至少约50% (例如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)一致性的序列。

[0015] 在一些实施例中,本发明的双特异性粘合剂具有与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23实质上一致的序列。

[0016] 在一些实施例中,本发明的双特异性粘合剂具有与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23一致的序列。

[0017] 在一些实施例中,本发明的双特异性粘合剂包含选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23的序列。

[0018] 在一些实施例中,提供包含本发明的双特异性粘合剂和药学上可接受的载剂的药物组合物。

[0019] 在一些实施例中,提供融合蛋白,其从5'到3'包含第一抗体组分、第二抗体组分和包含人类肝细胞核因子-1 α (HNF-1 α)元件的二聚化组分。在一些实施例中,人类HNF-1 α 元件包含人类HNF-1 α 的氨基酸残基1-32。

[0020] 在一些实施例中,本发明的融合蛋白的第一和第二抗体组分为单链可变区片段(scFvs)。

[0021] 在一些实施例中,本发明的融合蛋白的第一scFv结合到肿瘤抗原。在一些实施例中,本发明的融合蛋白的第一scFv结合到为GD2的肿瘤抗原。在一些实施例中,本发明的融合蛋白的第一scFv结合到为GD3的肿瘤抗原。

[0022] 在一些实施例中,本发明的融合蛋白的第二scFv结合到存在于T细胞上的抗原。在一些实施例中,本发明的融合蛋白的第二scFv结合到为CD3的存在于T细胞上的抗原。

[0023] 在一些实施例中,本发明的融合蛋白具有与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23具有至少约50% (例如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)一致性的序列。

[0024] 在一些实施例中,本发明的融合蛋白具有与SEQ ID:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23实质上一致的序列。

[0025] 在一些实施例中,本发明的融合蛋白具有与SEQ ID:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23一致的序列。

[0026] 在一些实施例中,本发明的融合蛋白包含选自SEQ ID:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23的序列。

[0027] 在一些实施例中,提供包含两个本发明的融合蛋白的二聚双特异性粘合剂。

[0028] 在一些实施例中,提供包含含两个本发明的融合蛋白的二聚双特异性粘合剂和药学上可接受的载剂的药物组合物。

[0029] 在一些实施例中,提供编码本发明的融合蛋白的核酸序列。

[0030] 在一些实施例中,提供包含本发明的核酸序列的载体。

[0031] 在一些实施例中,提供包含本发明的载体的宿主细胞。在一些实施例中,本发明的宿主细胞选自由以下组成的群组:细菌、酵母、昆虫或哺乳动物细胞。在一些实施例中,本发明的宿主细胞选自由以下组成的群组:大肠杆菌、甲醇酵母、Sf9、COS、HEK293和CHO细胞。

[0032] 在一些实施例中,提供产生本发明的二聚双特异性结合剂的方法,所述方法包含在适合于表现二聚双特异性粘合剂的条件培养含有包含编码本发明的融合蛋白的核酸序列的载体的宿主细胞,和回收二聚双特异性结合剂。

[0033] 在一些实施例中,在提供包含包括第一和第二抗体组分的双特异性抗体药剂的高亲和力双特异性抗体组合物的方法中,提供一改进,所述改进包含将此类第一和第二抗体组分中的至少一个提供为与由人类HNF-1 α 二聚化元件组成的二聚化组分的融合物,以使得抗体组分-二聚化组分融合物能够形成同型二聚体。在一些实施例中,本发明的二聚化组分包含人类HNF-1 α 的氨基酸残基1-32。

[0034] 在一些实施例中,提供杀死肿瘤细胞的方法,所述方法包含以下步骤:使肿瘤细胞与双特异性结合剂接触,所述结合剂包含两个从5'到3'各自包含结合到肿瘤抗原的第一抗体组分、结合到T细胞上的CD3的第二抗体组分和包含人类HNF-1 α 元件的二聚化组分的融合蛋白,使得双特异性结合剂能够二聚化以形成同型二聚体,接触在同型二聚体所结合的T细胞足以介导杀死肿瘤细胞的条件和时间下进行。在一些实施例中,本发明的二聚化组分包含人类HNF-1 α 的氨基酸残基1-32。在一些实施例中,本发明的双特异性结合剂的第一和第二抗体组分为单链可变区片段(scFvs)。在一些实施例中,本发明的肿瘤抗原为GD2。在一些实施例中,本发明的肿瘤抗原为GD3。

[0035] 在一些实施例中,提供抑制肿瘤生长的方法,所述方法包含以下步骤:使肿瘤与双特异性结合剂接触,所述结合剂包含两个从5'到3'各自包含结合到肿瘤抗原的第一抗体组分、结合到T细胞上的CD3的第二抗体组分和包含人类HNF-1 α 元件的二聚化组分的融合蛋白,使得双特异性结合剂能够二聚化以形成同型二聚体,接触在同型二聚体所结合的T细胞足以抑制肿瘤生长的条件和时间下进行。在一些实施例中,本发明的二聚化域包含人类HNF-1 α 的氨基酸残基1-32。在一些实施例中,本发明的双特异性结合剂的第一和第二抗体组分为单链可变区片段(scFvs)。在一些实施例中,本发明的肿瘤抗原为GD2。在一些实施例中,本发明的肿瘤抗原为GD3。

[0036] 在一些实施例中,提供双特异性结合剂,所述结合剂包含两个从5'到3'各自包含结合到肿瘤抗原的第一抗体组分、结合到T细胞上的CD3的第二抗体组分和包含人类HNF-1 α 元件的二聚化组分的融合蛋白,使得双特异性结合剂能够二聚化以形成同型二聚体;其中同型二聚体的特征在于相比于不包含二聚化组分的其它方面类似的双特异性结合剂,半衰期较长。在一些实施例中,本发明的二聚化组分包含人类HNF-1 α 的氨基酸残基1-32。在一些实施例中,本发明的双特异性结合剂的第一和第二抗体组分为单链可变区片段(scFvs)。在一些实施例中,本发明的肿瘤抗原为GD2。在一些实施例中,本发明的肿瘤抗原为GD3。

附图说明

[0037] 包含以下诸图的本文中包括的图式仅出于说明的目的而非限制性的。

[0038] 图1不按比例地显示scFv_{5F11}-scFv_{OKT3}(GD2 \times CD3)和二聚scFv_{5F11}-scFv_{OKT3}-HDD双特异性结合剂的示意图。

[0039] 图2A显示GD2 \times CD3和GD2 \times CD3-HDD双特异性结合剂的GD2结合(上图)和杰卡特细胞上的CD3结合(下图)的ELISA结合曲线。

[0040] 图2B显示GD2 \times CD3和GD2 \times CD3-HDD双特异性结合剂的杰卡特细胞上的CD3结合。

[0041] 图3A和3B显示GD2 \times CD3和GD2 \times CD3-HDD双特异性结合剂的GD2结合的Biacore传感图。显示以下双特异性抗体浓度处的痕量:62.5、125、250、500、1000、2000nM。

[0042] 图4显示GD2 \times CD3和GD2 \times CD3-HDD双特异性结合剂的黑素瘤和神经母细胞瘤细胞系的T细胞介导的体外杀死的百分比。

[0043] 图5显示植入到异种移植研究模型的对照(无处理)、GD2 \times CD3和GD2 \times CD3-HDD处理组中的BALB/cA-Rag2KO/IL-2R γ KO(DKO)小鼠中的皮下SKNLD肿瘤的肿瘤体积(mm³)。

[0044] 图6显示植入到异种移植研究模型的对照(无处理)、GD2 \times CD3和GD2 \times CD3-HDD处理组中的BALB/cA-Rag2KO/IL-2R γ KO(DKO)小鼠中的皮下M14肿瘤的肿瘤体积(mm³)。

[0045] 图7显示3LHBT和3LHBT-HDD双特异性结合剂的GD2结合的ELISA结合曲线。

[0046] 图8显示具有不同二聚化域的GD2×CD3双特异性结合剂的GD2结合的ELISA结合曲线。

[0047] 图9显示具有不同二聚化域的GD2×CD3双特异性结合剂的黑素瘤和神经母细胞瘤细胞系的T细胞介导的体外杀死的百分比。

具体实施方式

[0048] 本发明不限于描述的特定方法和实验条件,因此方法和条件可以变化。还应了解,本文中所使用的术语仅仅是为了描述特定实施例,而并不意图为限制性的,除非指示如此,这是由于本发明的范围将仅仅受到所附权利要求书的限制。

[0049] 除非另有说明,否则本文中所用的所有技术和科学术语和短语均具有与所属领域的技术人员通常所理解相同的含义。尽管在本发明的操作或测试中也可以使用与本文中描述的方法和材料类似或等效的任何方法和材料,但是现在描述优选的方法和材料。本文中所提及的所有公开案都以引用的方式并入。

[0050] 定义

[0051] 为了使本发明更易于理解,在下文中首先对某些术语进行定义。以下术语和其它术语的其它定义阐述在整个说明书中。

[0052] 除非上下文另外明确规定,否则如在本说明书和所附权利要求书中所使用的单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”包括复数个指示物。因此,举例来说,提及的“一种方法”包括一或多种本文所述类型和/或所属领域的技术人员在阅读本发明之后将变得显而易见等方法和/或步骤。

[0053] 如本文所用,“亲和力成熟”(或“亲和力成熟抗体”)是指在抗体的一或多个CDR中具有一或多个改变的抗体,所述改变导致相比于不具有那些改变的亲本抗体的抗体对于抗原的亲和力的改进。在一些实施例中,亲和力成熟抗体对标靶抗原将具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。亲和力成熟抗体可通过所属领域中已知的多种程序中的任一种产生。马克斯(Marks)等人生物技术(BioTechnology) 10:779-783 (1992) 描述通过 V_H 和 V_L 域改组产生的亲和力成熟。CDR和/或构架残基的随机突变诱发由以下各者描述:巴巴斯(Barbas)等人美国国家科学院院刊(Proc Natl. Acad. Sci. USA) 91:3809-3813 (1994);希尔(Schier)等人基因(Gene) 169:147-155 (1995);耶尔顿(Yelton)等人免疫学杂志(J. Immunol.) 155:1994-2004 (1995);杰克逊(Jackson)等人,免疫学杂志 154 (7):3310-9 (1995);以及霍金斯(Hawkins)等人,分子生物学杂志(J. Mol. Biol.) 226:889-896 (1992)。

[0054] 如本文所用,“抗体”具有其技术理解如本文所用,“抗体”具有其技术理解含义且是指特异性结合于特定抗原的免疫球蛋白(Ig)。如所属领域的一般技术人员所已知,在自然界中产生的抗体通常包含四个多肽链,两个重(H)链和两个轻(L)链。每一重链和轻链包含可变区(在本文中分别缩写为HCVR或 V_H 和LCVR或 V_L)和恒定区。重链的恒定区包含 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 域(和任选地 C_H4 域,在IgM和IgE的情况下)。轻链的恒定区包含一个域(CL)。 V_H 和 V_L 区可以进一步含有高变区,称为互补决定区(CDR),穿插有称为构架区(FR)的更保守区。每一 V_H 和 V_L 包含三个CDR和四个FR,从氨基末端到羧基末端按以下次序配置:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如IgM、IgD、IgG、IgA和IgE)、类别

(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂)或子类的。

[0055] 如本文所用,“抗体组分”是指特异性结合到表位或抗原且包括一或多个免疫球蛋白结构特征的多肽元件(可以是完整多肽,或较大多肽,例如如本文所述的融合多肽的一部分)。一般来说,抗体组分为氨基酸序列包括抗体结合区(例如其抗体轻链或可变区或一或多个互补决定区(“CDR”),或其抗体重链或可变区或一或多个CDR,任选地在一或多个构架区的存在下)的元件特征的任何多肽。在一些实施例中,抗体组分为或包含全长抗体。在一些实施例中,抗体组分小于全长但包括至少一个结合位点(包含至少一个,且优选地至少两个具有已知抗体“可变区”的结构的序列)。在一些实施例中,术语“抗体组分”涵盖任何具有与免疫球蛋白结合域同源或在很大程度上同源的结合域的蛋白质。在特定实施例中,包括的“抗体组分”涵盖具有显示与免疫球蛋白结合域的至少99%一致性的结合域的多肽。在一些实施例中,包括的“抗体组分”为任何具有显示与免疫球蛋白结合域,例如参考免疫球蛋白结合域的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%一致性的结合域的多肽。包括的“抗体组分”可以具有与发现于天然来源中的抗体(或其一部分,例如其抗原结合部分)一致的氨基酸序列。抗体组分可以是单特异性、双特异性或多特异性的。抗体组分可以包括任何免疫球蛋白类别的结构元件特征,包括人类类别中的任一个:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。已展示抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段进行。此类抗体实施例也可以是双特异性、双重特异性或多特异性形式的;特异性地结合到两个或两个以上不同抗原。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由V_H、V_L、C_H1以及C_L域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含两个在铰链区由二硫桥键连接的Fab片段的二价片段;(iii) Fd片段,由V_H和C_H1域组成;(iv) Fv片段,由抗体的单臂的V_H和V_L域组成;(v) dAb片段(沃德(Ward)等人,(1989)自然(Nature) 341:544-546),所述片段包含单一可变域;以及(vi) 经分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个域(V_H和V_L)是通过独立基因编码的,但其可以使用重组方法通过合成连接子接合,所述连接子使其能够制造成V_H和V_L区配对以形成单价分子的单一蛋白链(称为单链Fv(scFv);参见例如,伯德(Bird)等人,(1988)科学(Science) 242:423-426;和休斯顿(Huston)等人,(1988)美国国家科学院院刊85:5879-5883)。在一些实施例中,如本文所述的“抗体组分”为或包含此类单链抗体。在一些实施例中,“抗体组分”为或包含双功能抗体。双功能抗体为二价、双特异性抗体,其中V_H和V_L域在单一多肽链上表达,但使用过短而不允许相同链上的两个域之间进行配对的连接子,由此迫使所述域与另一链的互补域配对且产生两个抗原结合位点(参见例如,霍利格尔(Holliger)等人(1993)美国国家科学院院刊90:6444-6448;鲍良克,R.J.等人(1994)结构2:1121-1123)。此类抗体结合部分为所属领域中已知的(孔特曼(Kontermann)和杜贝尔(Dubel)编,抗体工程改造(Antibody Engineering)(2001)纽约施普林格出版社(Springer-Verlag,New York.)第790页(ISBN3-540-41354-5)。在一些实施例中,抗体组分为或包含包含一对串联Fv片段(V_H-C_H1-V_H-C_H1)的单链“线抗体”,所述片段连同互补轻链多肽形成一对抗原结合区(萨帕塔(Zapata)等人蛋白质工程(Protein Eng.) 8(10):1057-1062(1995);和美国专利第5,641,870号)。在一些实施例中,抗体组分可以具有嵌合或人类化抗体的结构元件特征。一般来说,人类化抗体为人类免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基经具有所要特异性、亲和力和能力的来自非人类物种(供体抗体)(如小鼠、大鼠或兔)的CDR的残基置换。在一些实施例中,抗体组分可以具有人类抗体的

结构元件特征。

[0056] 如本文所用,“生物活性”是指通过相关药剂或实体实现的可观测的生物效应或结果。举例来说,在一些实施例中,特异性结合相互作用为生物活动。在一些实施例中,生物路径或事件的调变(例如诱导、增强或抑制)为生物活动。在一些实施例中,生物活动的存在或程度通过检测由相关生物路径或事件产生的直接或间接产物评估。

[0057] 如本文所用,“双特异性抗体”是指双特异性结合剂,其中至少一个,且通常两个结合部分为或包含抗体组分。多种不同双特异性抗体结构为所属领域中已知的。在一些实施例中,为或包含抗体组分的双特异性抗体中的每一结合部分包括 V_H 和/或 V_L 区;在一些此类实施例中 V_H 和/或 V_L 区为发现于特定单克隆抗体中的那些。在一些实施例中,当双特异性抗体含有两个抗体组分结合部分时,其各自包括来自不同单克隆抗体的 V_H 和/或 V_L 区。

[0058] 如本文所用,“双特异性结合剂”是指具有两个离散结合部分的多肽剂,所述结合部分中的每一者与相异的标靶结合。在一些实施例中,双特异性结合剂为单一多肽;在一些实施例中,双特异性结合剂为或包含多个肽,其在一些此类实施例中可以例如通过交联彼此共价缔合。在一些实施例中,双特异性结合剂的两个结合部分识别相同标靶(例如抗原)的不同位点(例如表位);在一些实施例中,其识别不同标靶。在一些实施例中,双特异性结合剂能够同时结合到具有结构的两个标靶。

[0059] 如本文所用,“载剂”是指投与组合物所用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒剂。在一些示例性实施例中,载剂可以包括无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。在一些实施例中,载剂为或包括一或多种固体组分。

[0060] 如本文中所用,“CDR”是指抗体可变区内的互补决定区。在重链和轻链的每一可变区中有三个CDR,对于每一可变区,其被指定为CDR1、CDR2和CDR3。“CDR的组”或“CDR组”是指在能够结合抗原的单一可变区中存在的三个或六个CDR群组或能够结合抗原的同源重链和轻链可变区的CDR。CDR的界限已取决于系统以不同方式定义,在所述系统中数种是所属领域中已知的(例如卡巴特(Kabat)、科西亚(Chothia)等)。

[0061] 如本文所用,“CDR移植抗体”是指氨基酸序列包含来自一个物种重链和轻链可变区序列,但其中 V_H 和/或 V_L 的CDR区中的一或多个的序列经另一物种的CDR序列替换的抗体,如具有鼠类 V_H 和 V_L 区的抗体,其中鼠类CDR中的一或多个(例如CDR3)已经人类CDR序列替换。同样,“CDR移植抗体”也可以指具有人类 V_H 和 V_L 区的抗体,其中人类CDR中的一或多个(例如CDR3)已经小鼠CDR序列替换。

[0062] 如本文所用,“嵌合抗体”是指氨基酸序列包括发现于第一物种中的 V_H 和 V_L 区序列和发现于不同于第一物种的第二物种中的恒定区序列的抗体。在多个实施例中,嵌合抗体具有连接到人类恒定区的鼠类 V_H 和 V_L 区。在一些实施例中,具有连接到非人类恒定区(例如小鼠恒定区)的人类 V_H 和 V_L 区的抗体称为“反向嵌合抗体”。

[0063] 如本文所用,术语“可比的”是指彼此可能并非一致但充分类似以允许在其间比较,使得可基于所观察到的差异或类似性而合理地得到结论的两种或两种以上药剂、实体、情形、状况组等。所属领域的技术人员将了解,在情形中,在待视为可比的两种或两种以上此类药剂、实体、情形、条件组的任何给定情况中需要何种程度的一致性。

[0064] 如本文所用,“二聚化组分”是指当包括于多肽链中时,介导链与也含有二聚化组

分的一或多个其它多肽非共价缔合为高阶络合物的多肽元件。当相互作用多肽链具有相同序列时,所得缔合高阶络合物称为“同型二聚体”(或“同型多聚体”,如果涉及两个以上的链);当相互作用多肽链具有不同序列时,所得缔合络合物称为“异质二聚体”(或“异质多聚物”)。在一些实施例中,二聚化组分的长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多个氨基酸。如本文所述,多种潜在二聚化组分为所属领域中已知的。在一些实施例中,二聚化组分可以包括用于例如通过二硫键形成共价缔合的位点。在某些实施例中,根据本发明使用的二聚化组分为或包含发现于在引入到除HNF-1 α 以外的多肽中时介导二聚化的人类HNF-1 α 中的元件。

[0065] 如本文所用,“表位”包括通过免疫球蛋白(例如抗体或受体)结合组分特异性地识别的任何部分。在一些实施例中,表位包含抗原上的多个化学原子或基团。在一些实施例中,此类化学原子或基团在抗原采取相关三维构形时经表面暴露。在一些实施例中,此类化学原子或基团在抗原采取此类构形时在空间上彼此物理接近。在一些实施例中,至少一些此类化学原子为在抗原采取替代构形(例如经线性化)时彼此物理分离的基团。

[0066] 如本文所用,“赋形剂”是指可以包括于药物组合物中,例如以提供或促进所需一致性或稳定化效应的非治疗剂。药物赋形剂的合适的实例包括例如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻谷、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。

[0067] 如本文所用,“构架”或“构架区”是指减去CDR的可变区的序列。由于CDR序列可以通过不同系统测定,同样,构架序列相应地经受不同解读。六个CDR将重链和轻链上的构架区在每一链上分成四个子区(FR1、FR2、FR3和FR4),其中CDR1安置在FR1与FR2之间,CDR2在FR2与FR3之间,且CDR3在FR3与FR4之间。在不将特定子区指定为FR1、FR2、FR3或FR4的情况下,如通过其他构架区提及的构架区表示单一、天然存在的免疫球蛋白链的可变区内的组合FR。如本文中所用,FR代表四个子区中的一个,FR1例如代表最接近于可变区的氨基末端并且相对于CDR1的5'的第一框架区,并且FRs代表构成框架区的子区中的两个或两个以上。

[0068] 如本文所用,“宿主细胞”是指已向其中引入外源DNA(重组或以其他方式)的细胞。所属领域的技术人员在阅读本发明后将理解此类术语不仅指特定受试者细胞,而且指此类细胞的后代。因为某些修饰可以在后代中由于突变或环境影响而发生,此类子代可能在事实上与亲本细胞不同,但是仍包括在如本文使用的术语“宿主细胞”的范围内。在一些实施例中,宿主细胞包括选自适合于表达外源DNA(例如重组核酸序列)的生命界中的任一个的原核和真核细胞。示例性细胞包括原核生物和真核生物细胞(单细胞或多细胞)、细菌细胞(例如大肠杆菌、芽孢杆菌属、链霉菌属等的菌株)、分枝杆菌细胞、真菌细胞、酵母细胞(例如酿酒酵母(*S.cerevisiae*)、裂殖酵母(*S.pombe*)、巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*)、嗜甲醇毕赤酵母(*P.methanolica*)等)、植物细胞、昆虫细胞(例如SF-9、SF-21、杆状病毒感染的昆虫细胞、粉纹夜蛾等)、非人类动物细胞、人类细胞或细胞融合物,如融合瘤或四源杂交瘤。在一些实施例中,细胞为人类、猴、猿、仓鼠、大鼠或小鼠细胞。在一些实施例中,细胞为真核的且选自以下细胞:CHO(例如CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO)、COS(例如COS-7)、视网膜细胞、维罗(Vero)、CV1、肾(例如HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、海拉(HeLa)、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60(例如BHK21)、杰卡特(Jurkat)、道迪(Daudi)、

A431 (表皮)、CV-1、U937、3T3、L细胞、C127细胞、Sp2/0、NS-0、MMT 060562、塞特利氏细胞 (Sertoli cell)、BRL 3A细胞、HT1080细胞、骨髓瘤细胞、肿瘤细胞和衍生自上述细胞的细胞系。在一些实施例中,细胞包含一或多个病毒基因,例如表达病毒基因的视网膜细胞(例如PER.C6TM细胞)。

[0069] 如本文中所用,术语“人类抗体”意图包括具有产生(或组装)自人类免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。在一些实施例中,抗体(或抗体组分)可视为“人类”,尽管其氨基酸序列例如在一或多个CDR并且尤其是CDR3中包括不由人类生殖系免疫球蛋白序列(例如包括序列变异体,例如可能(原先)已通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的序列变异体)编码的残基或元件。

[0070] “人类化”如所属领域中已知,术语“人类化”常用于指氨基酸序列包括来自在非人类物种(例如小鼠)中产生的参考抗体的 V_H 和 V_L 区序列而且在那些序列中包括打算使其更“人类样”(即,与人类生殖系可变序列更类似)的相对于参考抗体的修饰的抗体(或抗体组分)。在一些实施例中,“人类化”抗体(或抗体组分)是免疫特异性地结合到所关注抗原的抗体,并且其具有具备实质上如人类抗体的氨基酸序列般的氨基酸序列的构架(FR)区以及具备实质上如非人类抗体的氨基酸序列般的氨基酸序列的互补决定区(CDR)。人类化抗体包含实质上所有的至少一个并且通常是两个可变域(Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 $FabC$ 、 Fv),其中所有或实质上所有的CDR区对应于非人类免疫球蛋白(即供体免疫球蛋白)的CDR区,并且所有或实质上所有构架区是人类免疫球蛋白共同序列的构架区。在一些实施例中,人类化抗体还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人类免疫球蛋白恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人类化抗体含有轻链以及至少重链可变域两者。抗体也可以包括重链恒定区的 C_H1 、铰链、 C_H2 、 C_H3 和任选地 C_H4 区。在一些实施例中,人类化抗体仅含有人类化 V_L 区。在一些实施例中,人类化抗体仅含有人类化 V_H 区。在某些特定实施例中,人类化抗体含有人类化 V_H 和 V_L 区。

[0071] 如本文中所用,“经分离”是指如下物质和/或实体:(1)已与最初产生时与其结合的至少一些组分分离(无论在自然界中和/或在实验环境中);和/或(2)通过人力设计、产生、制备和/或制造。经分离物质和/或实体可与约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或大于约99%的与其最初结合的其它组分分离。在一些实施例中,经分离药剂是约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或大于约99%纯。如本文中所用,物质在其实质上不含其它组分时是“纯的”。在一些实施例中,如所属领域的技术人员将了解,在与某些其它组分(如一或多种载剂或赋形剂(例如缓冲剂、溶剂、水等))组合之后,物质仍可被视为“经分离”或甚至“纯”;在此类实施例中,在不包括此类载剂或赋形剂的情况下计算物质的分离或纯度百分比。仅举一例,在一些实施例中,如存在于自然界中的多肽或聚核苷酸的生物聚合物在以下情况下时视为“经分离”:a) 凭借其衍生起源或来源不与伴随其(呈其自然界中的天然状态)的组分中的一些或全部结合;b) 其实质上不含来自在自然界中产生其的物质的相同物质的其它多肽或核酸;c) 通过来自不具在自然界中产生其的物质的细胞或其它表达系统的组分表示或以其它方式与所述组分结合。因此,举例来说,在一些实施例中,经化学合成或在不同于在自然界中产生多肽的细胞系统中合成的多肽被视为“经分离”多肽。或者或另外,在一些实施例中,

已经受一或多种纯化技术的多肽就其已与a)在自然界中结合;和/或b)在最初产生时结合的其它组分分离来说可被视为“经分离”多肽。

[0072] 如本文所用,“ K_D ”是指来自结合剂与其搭配物(例如抗体或其结合组分所结合的表位)的络合物的结合剂(例如抗体或其结合组分)的解离常数。

[0073] 如本文所用,“ $k_{\text{离}}$ ”是指从结合剂与其搭配物(例如抗体或其结合组分所结合的表位)的络合物解离结合剂(例如抗体或其结合组分)的解离速率常数。

[0074] 如本文所用,“ $k_{\text{合}}$ ”是指缔合结合剂(例如抗体或其结合组分)与其搭配物(例如抗体或其结合组分所结合的表位)的缔合速率常数。

[0075] 如本文所用,“连接子”用于指将不同元件彼此连接的多元件多肽的部分。举例来说,所属领域的一般技术人员了解结构包括两个或两个以上功能或组织域的多肽通常包括将此类域彼此连接的此类域之间的氨基酸伸长部。在一些实施例中,多肽包含具有一般形式S1-L-S2的总体结构的连接子元件,其中S1和S2可相同或不同且表示两个通过连接子彼此缔合的域。在一些实施例中,连接子的长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多个氨基酸。在一些实施例中,连接子的特征在于其趋向于不采用刚性三维结构,而是向多肽提供柔性。在工程改造多肽(例如)时可恰当地使用的多种不同连接子元件为所属领域中已知的(参见例如霍利格尔,P. (Holliger,P.) 等人(1993)美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 90:6444-6448;鲍良克,R.J. (Poljak,R.J.) 等人(1994)结构(Structure) 2:1121-1123)。

[0076] 如本文所用,“多价结合剂”是指能够结合到两个或两个以上抗原的结合剂,所述抗原可以在相同分子或不同分子上。如本文所述的多价结合剂在一些实施例中经工程改造以具有三个或三个以上抗原结合位点,且通常不为天然存在的蛋白质。如本文所述的多价结合剂是指能够结合两个或两个以上相关或不相关标靶的结合剂。多价结合剂可以包含单一抗体组分的多个复本或不同抗体组分的多个复本。此类结合剂能够结合到两个或两个以上抗原且为四价或多价结合剂。多价结合剂可以另外包含治疗剂,如免疫调节剂、毒素或RNA酶。如本文所述的多价结合剂在一些实施例中能够同时结合到至少两个具有不同结构的标靶,例如两个不同抗原、相同抗原上的两个不同表位或半抗原和/或抗原或表位。在多个实施例中,本发明的多价结合剂为经工程改造以具有如本文所述的多价结合剂的特征的蛋白质。本发明的多价结合剂可以是单特异性(能够结合一个抗原)或多特异性(能够结合两个或两个以上抗原)的,且可以包含两个重链多肽和两个轻链多肽。在一些实施例中,每一结合位点包含重链可变域和轻链可变域,每个抗原结合位点总共六个CDR参与抗原结合。

[0077] 如本文中所用,术语“核酸”在其最广泛意义上是指并入或可以并入寡核苷酸链中的任何化合物和/或物质。在一些实施例中,核酸是通过磷酸二酯键并入或可以通过磷酸二酯键并入寡核苷酸链中的化合物和/或物质。如可从上下文知晓,在一些实施例中,“核酸”是指个别核酸残基(例如核苷酸和/或核苷);在一些实施例中,“核酸”是指包含个别核酸残基的寡核苷酸链。在一些实施例中,“核酸”为或包含RNA;在一些实施例中,“核酸”为或包含DNA。在一些实施例中,核酸是一个或多个天然核酸残基、包含一个或多个天然核酸残基或由一个或多个天然核酸残基组成。在一些实施例中,核酸是一或多个核酸类似物、包含一个或多个核酸类似物或由一个或多个核酸类似物组成。在一些实施例中,核酸类似物与核酸

的不同之处在于其不利用磷酸二酯主链。举例来说,在一些实施例中,核酸是一个或多个“肽核酸”、包含一个或多个“肽核酸”或由一个或多个“肽核酸”组成,其在所属领域中已知并且在主链中具有代替磷酸二酯键的肽键,其视为属于本发明的范围内。或者或另外,在一些实施例中,核酸具有一个或多个硫代磷酸酯和/或5'-N-亚磷酰胺键而非磷酸二酯键。在一些实施例中,核酸是一或多个天然核苷(例如腺苷、胸苷、鸟苷、胞嘧啶核苷、尿苷、去氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)、包含一或多个天然核苷或由一或多个天然核苷组成。在一些实施例中,核酸一个或多个核苷类似物(例如2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞嘧啶核苷、C-5丙炔基-胞嘧啶核苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞嘧啶核苷、C5-甲基胞嘧啶核苷、2-氨基胞嘧啶核苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧腺苷、8-氧鸟苷、0(6)-甲基鸟嘌呤、2-硫代胞嘧啶核苷、甲基化碱、插层碱和其组合)、包含一或多个核苷类似物或由一或多个核苷类似物组成。在一些实施例中,核酸与天然核酸相比包含一或多种经修饰的糖(例如2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核苷、阿拉伯糖和己糖)。在一些实施例中,核酸具有编码功能性基因产物(如RNA或蛋白质)的核苷酸序列。在一些实施例中,核酸包括一或多个内含子。在一些实施例中,通过从天然来源分离、通过基于互补模板的聚合进行酶促合成(在体内或体外)、在重组细胞或系统中繁殖和化学合成中的一或多种来制备核酸。在一些实施例中,核酸的长度是至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000个或更多个残基。在一些实施例中,核酸为单链;在一些实施例中,核酸为双链。在一些实施例中,核酸具有包含至少一个编码编码多肽的序列的补体或为所述补体的元件的核苷酸序列。在一些实施例中,核酸具有酶活性。

[0078] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指所描述的组分处于准许其以其预期方式作用的关系中的并接。“可操作地连接”至编码序列的控制序列为以使编码序列的表达在与控制序列相容的条件下达成的方式接合。“可操作地连接”序列包括与相关基因相邻的表达控制序列以反式作用或以一定距离作用以控制相关基因的表达控制序列。如本文所用,术语“表达控制序列”是指实现多核苷酸序列所接合的编码序列的表达和处理必需的多核苷酸序列。表达控制序列包括适当转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效RNA处理信号,如剪接和聚腺苷酸化信号;使细胞质mRNA稳定化的序列;增强翻译效率的序列(即克扎克共同序列(Kozak consensus sequence));增强蛋白质稳定性的序列;及必要时,增强蛋白质分泌的序列。此类控制序列的性质视宿主有机体而不同。举例来说,在原核生物中,此类控制序列总体上包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列,而在真核生物中,通常,此类控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”意图包括存在对表达和处理至关重要的组分,且也可以包括存在例如对前导序列和融合搭配物序列有利的额外组分。

[0079] 如本文所用,“生理条件”具有其参考细胞或有机体存活和/或再生的条件的技术理解含义。在一些实施例中,术语是指对于有机体或细胞系统来说可以存在于自然界中的外部或内部环境的条件。在一些实施例中,生理条件为人类或非人类动物的体内存在的那些条件,尤其是存在于手术部位处和/或手术部位内部的那些条件。生理条件通常包括例如20-40℃的温度范围、1的大气压、6-8的pH、1-20mM的葡萄糖浓度、大气压水平的氧浓度和如

地球上所遇到的重力。在一些实施例中,实验室中的条件经操纵和/或维持于生理条件。在一些实施例中,在有机体中遇到生理条件。

[0080] 如本文所用,“多肽”是指任何氨基酸聚合链。在一些实施例中,多肽具有存在于自然界中的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽具有不存在于自然界中的氨基酸序列。在一些实施例中,多肽具有经工程改造的氨基酸序列,因为其通过人手的动作设计和/或生产。

[0081] 如本文所用,“重组”意图指通过重组手段设计、工程改造、制备、表达、产生分离的多肽(例如如本文所述的抗体或抗体组分,或多特异性结合剂),如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的多肽、自重组、组合人类多肽库分离的多肽(霍根布姆H.R. (Hoogenboom H.R.), (1997) TIB技术(TIB Tech.) 15:62-70;阿扎齐H. (Azzazy H.) 和海史密斯W.E. (Highsmith W.E.), (2002) 临床生物化学(Clin.Biochem.) 35:425-445;加威隆多J.V. (Gavilondo J.V.) 和拉里克J.W. (Larrick J.W.) (2002) 生物技术(BioTechniques) 29:128-145;霍根布姆H. (Hoogenboom H.) 和查恩斯P. (Chames P.) (2000) 今日免疫学21:371-378)、自对于人类免疫球蛋白基因转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体(参见例如泰勒,L.D. (Taylor,L.D.) 等人(1992) 核酸研究(Nucl.Acids Res.) 20:6287-6295;凯勒曼S-A. (Kellermann S-A.) 和格林L.L. (Green L.L.) (2002) 生物技术新见(Current Opinion in Biotechnology) 13:593-597;利特尔M. (Little M.) 等人(2000) 今日免疫学21:364-370)或通过涉及将选择的序列元件剪接到彼此的任何其它手段制备、表达、产生或分离的多肽。在一些实施例中,此类选择的序列元件中的一或多个发现于自然界中。在一些实施例中,此类选择的序列元件中的一或多个计算机模拟地设计。在一些实施例中,一或多个此类选择的序列元件由已知序列元件的突变诱发(例如在体内或体外)产生,例如来自天然或合成源。举例来说,在一些实施例中,重组抗体多肽包含发现于相关来源有机体(例如人类、小鼠等)的生殖系中的序列。在一些实施例中,重组抗体具有由突变诱发(例如体外或体内,例如在转基因动物中)产生的氨基酸序列,以使得重组抗体的 V_H 和 V_L 区的氨基酸序列为尽管源自生殖系 V_H 和 V_L 序列且与其相关,但可能不体内天然存在于生殖系抗体谱系内的序列。

[0082] 如本文所用,“回收”是指例如通过分离,例如使用所属领域中已知的纯化技术呈现实质上不含其它先前缔合的组分的药剂或实体的方法。在一些实施例中,药剂或实体回收自天然源和/或包含细胞的源。

[0083] 如本文所用,“特异性结合”是指结合剂在发生结合的环境中可能的搭配物之间进行辨别的能力。在存在其它潜在标靶时与一个特定标靶相互作用的结合剂称为“特异性地结合”到其所相互作用的标靶。在一些实施例中,特异性结合通过检测或测定结合剂与其搭配物之间的缔合度评估;在一些实施例中,特异性结合通过检测或测定结合剂-搭配物络合物的解离度评估;在一些实施例中,特异性结合通过检测或测定结合剂竞争其搭配物与另一实体之间的替代相互作用的能力评估。在一些实施例中,特异性结合通过跨越一系列浓度进行此类检测或测定评估。

[0084] 如本文所用,“个体”意味着任何哺乳动物,包括人类。在本发明的某些实施例中,受试者为成人、青少年或婴儿。在一些实施例中,使用术语“个体”或“患者”且意图与“受试者”可互换。本发明也涵盖在子宫内投与药物组合物和/或进行治疗方法。

[0085] “实质上”:如本文所用,术语“实质上”是指展现总或接近总范围或程度的相关特征或特性的定性条件。生物技术中的一般技术者应理解生物和化学现象很少(若曾经)进行

完全和/或继续进行至完全或获得或避免绝对结果。因此,术语“实质上”在本文中用于捕获许多生物学和化学现象中所固有的潜在完全性缺乏。

[0086] “实质序列同源性”:本文中使用的短语“实质同源性”来指氨基酸或核酸序列之间的比较。如所属领域的技术人员将了解,如果两个序列在相应位置中含有同源残基,那么通常认为它们是“实质上同源的”。同源残基可以是相同残基。或者,同源残基可以是适当地具有类似结构和/或功能特征的不相同残基。举例来说,如所属领域的技术人员众所周知的,某些氨基酸通常被归类为“疏水性”或“亲水性”氨基酸,和/或归类为具有“极性”或“非极性”侧链。一种氨基酸取代相同类型的另一种氨基酸往往可以认为是“同源”取代。典型氨基酸分类概述于表1和2中。

[0087] 表1

[0088]	丙氨酸	Ala	A	非极性	中性	1.8
	精氨酸	Arg	R	极性	阳性	-4.5
	天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	-3.5
	天冬氨酸	Asp	D	极性	阴性	-3.5
	半胱氨酸	Cys	C	非极性	中性	2.5
	谷氨酸	Glu	E	极性	阴性	-3.5
	谷酰胺	Gln	Q	极性	中性	-3.5
	甘氨酸	Gly	G	非极性	中性	-0.4
	组氨酸	His	H	极性	阳性	-3.2
	异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性	4.5
	亮氨酸	Leu	L	非极性	中性	3.8
	赖氨酸	Lys	K	极性	阳性	-3.9
	甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性	1.9
	苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性	2.8
	脯氨酸	Pro	P	非极性	中性	-1.6
	丝氨酸	Ser	S	极性	中性	-0.8
	苏氨酸	Thr	T	极性	中性	-0.7
	色氨酸	Trp	W	非极性	中性	-0.9
	酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	-1.3
	缬氨酸	Val	V	非极性	中性	4.2

[0089] 表2

[0090]	多义氨基酸	3 字母	1 字母
	天冬酰胺或天冬氨酸	Asx	B
	谷酰胺或谷氨酸	Glx	Z
	亮氨酸或异亮氨酸	Xle	J
	未规定或未知的氨基酸	Xaa	X

[0091] 如所属领域中众所周知,可以使用任何各种算法比较氨基酸或核酸序列,包括在商业计算机程序(如用于核苷酸序列的BLASTN和用于氨基酸序列的BLASTP、空隙BLAST以及PSI-BLAST)中可获得的那些算法。示例性所述程序描述于阿尔丘尔(Altschul)等人,基础局部比对检索工具(Basic local alignment search tool),分子生物杂志

(J.Mol.Biol.), 215 (3): 403-410, 1990; 阿尔丘尔等人, 酶学方法 (Methods in Enzymology); 阿尔丘尔等人, “空隙BLAST和PSI-BLAST: 新一代蛋白质数据库检索程序 (Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs)”, 核酸研究 (Nucleic Acids Res.), 25: 3389-3402, 1997; 巴谢瓦尼斯 (Baxeavanis) 等人, 生物信息学: 基因和蛋白质分析的实用指南 (Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins), 威利出版社 (Wiley), 1998; 以及密申纳 (Misener) 等人 (编), 生物信息学方法和方案 (Bioinformatics Methods and Protocols) (分子生物学方法 (Methods in Molecular Biology), 第132卷), 胡马纳出版社 (Humana Press), 1999; 所有前述文献均以引用的方式并入本文中。除识别同源序列以外, 上述程序通常还指示同源程度。在一些实施例中, 如果两个序列中至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或99%以上的相应残基在残基的相关伸长部上为同源的, 那么认为它们为实质上同源的。在一些实施例中, 相关伸长部为整个序列。在一些实施例中, 相关伸长部为至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75、至少80、至少85、至少90、至少95、至少100、至少125、至少150、至少175、至少200、至少225、至少250、至少275、至少300、至少325、至少350、至少375、至少400、至少425、至少450、至少475、至少500或500个以上的残基。

[0092] “实质一致性”: 本文中使用的短语“实质一致性”来指氨基酸或核酸序列之间的比较。如所属领域的技术人员将了解, 如果两个序列在相应位置中含有相同残基, 那么通常认为它们是“实质上一致的”。如所属领域中众所周知, 可以使用任何各种算法比较氨基酸或核酸序列, 包括在商业计算机程序 (如用于核苷酸序列的BLASTN和用于氨基酸序列的BLASTP、空隙BLAST以及PSI-BLAST) 中可获得的那些算法。示例性所述程序描述于阿尔丘尔等人, 基础局部比对检索工具, 分子生物杂志, 215 (3): 403-410, 1990; 阿尔丘尔等人, 酶学方法; 阿尔丘尔等人, 核酸研究, 25: 3389-3402, 1997; 巴谢瓦尼斯等人, 生物信息学: 基因和蛋白质分析的实用指南, 威利出版社, 1998; 以及密申纳等人 (编), 生物信息学方法和方案 (分子生物学方法, 第132卷), 胡马纳出版社, 1999。除识别一致序列以外, 上述程序通常还提供对一致性程度的指示。在一些实施例中, 如果两个序列中在相关残基伸长部上至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或99%以上的对应残基为一致的, 那么认为它们为实质上一致的。在一些实施例中, 相关伸长部为整个序列。在一些实施例中, 相关伸长部为至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500或500个以上的残基。在CDR的情况下, 提及的“实质一致性”通常是指与参考CDR的氨基酸序列具有至少80%、优选地至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%一致性的氨基酸序列的CDR。

[0093] 如本文所用, “表面等离子体共振”是指允许实时分析特异性结合相互作用的光学现象, 例如通过检测生物传感器基质内的蛋白质浓度的改变, 如通过使用BIAcore系统 (法玛西亚生物传感器 (Pharmacia Biosensor) AB, 瑞典乌普萨拉 (Uppsala, Sweden) 和新泽西

州皮斯卡塔威(Piscataway,N.J.))。对于进一步描述,参见约翰逊,U.(Jonsson,U.)等人(1993)临床生物学年鉴(Ann.Biol.Clin.)51:19-26;约翰逊,U.,等人(1991)生物技术(Biotechniques)11:620-627;约翰逊,B.(Johnsson,B.)等人(1995)分子识别杂志(J.Mol.Recognit.)8:125-131;和约翰逊,B.等人(1991)分析生物化学(Anal.Biochem.)198:268-277。

[0094] 如本文所用,“治疗有效量”意指对于其所投与的对象产生所需效应的量。在一些实施例中,术语是指当根据治疗给药方案向罹患或易患疾病、病症和/或病况的群体投与时足以治疗疾病、病症和/或病况的量。在一些实施例中,治疗有效量为降低疾病、病症和/或病况的一或多种症状的发生率和/或严重程度,和/或延迟其起始的量。所属领域的一般技术人员将了解术语“治疗有效量”不实际上需要在特定个体中实现成功治疗。更确切些,治疗有效量可以是当向需要此类治疗的患者投与时在显著数目的个体中提供特定所需药理学反应的所述量。在一些实施例中,提及的治疗有效量的可以是如在一或多种特定组织(例如受疾病、病症或病况影响的组织)或流体(例如血液、唾液、血清、汗液、泪液、尿液等)中测量的提及量。所属领域的一般技术人员将了解,在一些实施例中,特定药剂或疗法的治疗有效量可以单一剂量调配和/或投与。在一些实施例中,治疗有效药剂可以多个剂量,例如作为给药方案的一部分调配和/或投与。

[0095] 如本文所用的“转型”是指将外源DNA引入到宿主细胞中的任何方法。转型可以在天然或人工条件下使用所述领域中熟知的多种方法进行。转型可以依赖于将外来核酸序列插入到原核或真核宿主细胞中的任何已知方法。在一些实施例中,特定转型方法基于所转型的宿主细胞选择且可包括(但不限于)病毒感染、电穿孔、配对、脂质体转染。在一些实施例中,“转型”细胞经稳定转型,因为插入的DNA能够作为自主复制质粒或作为宿主染色体的一部分复制。在一些实施例中,转型细胞持续有限时间段暂时表达引入的核酸。

[0096] 如本文中所用,“载体”是指一种核酸分子,其能够转运其所连接的另一核酸。载体的一种类型为“质粒”,其指可接合额外DNA片段的环形双股DNA环。另一类型的载体为病毒载体,其中其它DNA片段可接合到病毒基因组。某些载体能够在其被引入到其中的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如非游离型哺乳动物载体)当引入至宿主细胞中时可整合到宿主细胞的基因组中,且进而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够引起其以可操作方式连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0097] 对于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转型可使用标准技术(例如电穿孔、脂质体转染)。酶促反应和纯化技术可根据制造商的说明书或如所属领域中通常所实现或如本文中所述来执行。前述技术和程序一般可根据所属领域中众所周知和如本发明的说明书通篇中所引用和论述的各种一般性和较特定的参考文献中所述的常规方法来执行。参见例如萨姆布鲁克(Sambrook)等人分子克隆实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(第2版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港(Cold Spring Harbor,N.Y.)(1989)),其出于任何目的以引用的方式并入本文中。

[0098] 多价结合剂

[0099] 如所属领域的技术人员所了解,多价结合剂为包括特异性地结合于两个或两个以上标靶(例如表位)的结合组分的分子实体或络合物。此类多价结合剂在所属领域中发现多

种用途,包括治疗用途。仅举一例,如所属领域的技术人员了解,多价结合剂已经工程改造以促进通过将细胞毒性T细胞导引(或招募)到肿瘤位点的肿瘤细胞的杀死。肿瘤抗原的实例包括(但不限于) α 胎蛋白(AFP)、CA15-3、CA27-29、CA19-9、CA-125、钙网膜蛋白、癌胚抗原、CD34、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、上皮膜蛋白(EMA)、因子VIII、CD31、FL1、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病流体蛋白(GCDFP-15)、HMB-45、人类绒毛膜促性腺激素(hCG)、抑制素、角蛋白、CD45、淋巴细胞标记、MART-1(Melan-A)、Myo D1、肌肉特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶(PLAP)、前列腺特异性抗原、S100蛋白、平滑肌肌动蛋白(SMA)、突触素、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、肿瘤M2-PK和波形蛋白。

[0100] 接合T细胞的多特异性结合剂的潜在功效在于这些药剂将T细胞导引到进行T细胞介导的杀死的肿瘤位点的能力。T细胞为免疫系统中杀死异常细胞最强力的效应细胞且不能够进行Fc介导的抗体依赖性细胞毒性作用(ADCC)。此类多价结合剂将T细胞导引到肿瘤位点的机制为通过肿瘤表面上的肿瘤抗原和T细胞表面上的共受体CD3的结合。CD3为表达于所有成熟T细胞的表面上的三种链(γ 、 δ 和 ϵ)的络合物。CD3的表达几乎完全限制于T细胞。双特异性结合剂的抗CD3组分可以转化为先前未刺激和未定型的非克隆T细胞以变为肿瘤细胞的强力连环杀手(伍尔夫(Wolf)等人,2005,今日药物发现(Drug Discov Today)10:1237-1244)。除其它靶标以外,这种类型的结合剂还在表达上皮细胞粘附分子(EpCAM)抗原的实体肿瘤的动物异种移植研究中展示功效(巴尔格等人,前述;布里施魏茵(Brischwein)等人,2006,分子免疫学(Mol Immunol)43:1129-1143;博伊尔勒(Baeuerle)和莱因哈特(Reinhardt),2009,癌症研究(Cancer Res)69:4941-4944)。

[0101] 在一些实施例中,根据本发明使用的多价结合剂为双特异性结合剂。在多个实施例中,此类双特异性结合剂能够结合到T细胞。在多个实施例中,此类双特异性结合剂能够结合到T细胞上的CD3。

[0102] 在一些实施例中,根据本发明使用的多价或双特异性结合剂为或包含抗体组分。用于设计、构筑和/或产生包含抗体组分的多特异性或双特异性结合剂的多种技术为所属领域中已知的。

[0103] 举例来说,已构筑利用完全免疫球蛋白构架(例如IgG)、单链可变区片段(scFv)或其组合的双特异性结合剂。已显示包含串联的两个scFv单元的双特异性结合剂为临床最成功的双特异性抗体形式中的一种。在抗肿瘤免疫疗法的情况下,已设计包含串联的两个单链可变区片段(scFv)的双特异性结合剂,使得结合肿瘤抗原的scFv与通过结合CD3接合T细胞的scFv连接。以此方式,T细胞被招募到肿瘤位点,希望其可以通过某些T细胞具有的细胞毒性特性介导构成肿瘤的肿瘤细胞的杀死。已制得关于淋巴瘤靶向CD19和CD3的此类双特异性结合剂的实例(称为双特异性T细胞接合,或BiTE;例如参见德雷尔(Dreier)等人,2003,免疫学杂志(J Immunol)170:4397-4402;巴尔格(Bargou)等人,2008,科学321:974-977),其已在动物异种移植研究中的预防肿瘤生长中成功。在人类研究中,此双特异性结合剂展示客观肿瘤反应,包括五个部分和两个完全缓解。

[0104] 示例性双特异性结合剂包括具有对肿瘤抗原具有特异性的第一抗体组分和对细胞毒性标记,例如Fc受体(例如Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII等)或T细胞标记(例如CD3、CD28等)具有特异性的第二抗体组分的那些。另外,第二抗体组分可经具有不同所需特异性的抗

体组分取代。举例来说,具有对肿瘤抗原具有特异性的第一抗体组分和对毒素具有特异性的第二抗体组分的双特异性结合剂可经配对以传递毒素(例如沙泊宁(saporin)、长春花生物碱等)到肿瘤细胞。其它示例性双特异性结合剂包括具有对活化受体(例如B细胞受体、Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA、Fc γ RI、T细胞受体等)具有特异性的第一抗体组分和对抑制受体(例如Fc γ RIIB、CD5、CD22、CD72、CD300a等)具有特异性的第二抗体组分的那些。另一实例包括对相同细胞类型上的不同抗原具有特异性的第二抗体组分,其中第一抗体组分为特异性的,例如B细胞上的CD20、CD19、CD21、CD23、CD46、CD80、HLA-DR、CD74、MUC1和CD22。此类双特异性结合剂可以关于与细胞活化相关的治疗病况(例如过敏和哮喘)构筑。双特异性结合剂可例如通过组合识别相同或不同抗原的不同表位的重链和/或轻链制得。在一些实施例中,通过分子功能,双特异性结合剂在一个抗原的两个结合臂中的一个上结合所述抗原(或表位)(一个V_H/V_L对),且在不同抗原的第二臂上结合所述抗原(或表位)(不同V_H/V_L对)。通过此定义,双特异性结合剂具有两个相异的抗原结合臂(在特异性和CDR序列两者中),且对于其所结合的每一抗原为单价的。

[0105] 在一些实施例中,本发明的双特异性结合剂的特征为可以同时结合到具有不同结构的两个标靶的能力。在一些实施例中,本发明的双特异性结合剂具有至少一种特异性结合到例如B细胞、T细胞、骨髓、血浆或肥大细胞抗原或表位的组分和至少一种特异性结合到携有治疗剂或诊断剂的可靶向共轭物的其它组分。

[0106] 通常,结合到碳水化合物抗原,如GD2的抗体总体上具有低亲和力。因此,使用如本文所述的稳定非免疫原性肽序列诱导均二聚呈现一种增强T细胞靶向癌症免疫疗法的独特方法。另外,本发明的双特异性结合蛋白(其包含呈单体形式的约50-55kDa的串联抗体组分(例如scFv))的二聚化无关于肿瘤亲和力地实质上增加血清半衰期和潜在疗效。

[0107] 肿瘤抗原GD2高度表达于若干转移癌类型中,且当前不存在有效治疗。已在随机化试验中论证抗GD2抗体安全且有效,但是,在抗体输注期间的补体介导的急性疼痛已报导为主要缺点(杨(Yang)等人,2010,药物未来(Drugs Future) 35(8):665)。如本文所述的双特异性结合蛋白能够在不存在Fc,一种传统抗体的组分的情况下进行二价结合。此类二价由使用不诱导补体活化的二聚化组分产生。因此,如所描述的双特异性结合蛋白的二聚化的策略表示强化的肿瘤杀死、减少的副作用的独特方法,且表明用于治疗若干GD2阳性癌症的强力治疗剂。

[0108] 二聚化组分

[0109] 本发明提供在与二聚化组分偶合时,如本文所述的多特异性结合剂(且确切地说双特异性结合剂,如双特异性抗体)的示例性特性尤其适用于某些体内应用和/或在所述应用中提供特定优点的洞察。举例来说,本发明尤其涵盖构筑为能够如本文所述二聚化的多特异性结合剂提供多特异性结合剂与其标靶的功能亲和力的增加的认知。确切地说,本文中呈现的各种实例展示双特异性抗体二聚物(包含两个融合多肽,其中的每一个包括第一和第二抗体组分和二聚化组分)相比于其缺乏二聚化组分的对应单体多肽改进的特性。特定示例双特异性抗体二聚物靶向双唾液酸神经节苷脂GD2和CD3;在一些实施例中,如所展示,二聚物的特征在于通过T细胞引起肿瘤细胞破坏的强化的效能。

[0110] 在一些实施例中,本发明涵盖尤其在双特异性结合剂的情况下使用二聚化组分可以诱发双特异性结合剂与其标靶中的至少一个的二价结合的认知。全长IgG抗体利用二价

结合,相比于scFv片段的单价结合特征,其可以数量级地增强对抗原的亲合力(普鲁克通(Pluckthun)和帕克(Pack),1997,免疫技术(Immunotechnol.)3:83-105)。本发明涵盖可以通过将二聚化组分引入到二价结合剂多肽中实现类似或甚至较大亲合力改进的认知。

[0111] 在一些实施例中,本发明涵盖如本文所述的二聚化组分尤其适合于二聚合其所附接的任何工程改造蛋白质的认知。在某些特定实施例中,工程改造蛋白质包括抗体组分、双特异性结合剂或多价结合剂。在一些实施例中,本发明尤其提供可操作地连接于二聚化组分的双特异性结合剂,其中此类二聚双特异性结合剂的特征在于相比于缺乏二聚化组分的双特异性结合剂较大的对于至少一个标靶的亲合力。在一些实施例中,对于治疗标靶,例如肿瘤抗原实现较大亲合力。在一些实施例中,对于如本文所述的双特异性结合剂的抗体组分实现较大亲合力。在一些实施例中,如本文所述的二聚化组分尤其适用于包含结合双唾液酸神经节苷脂GD2的抗体组分的双特异性结合剂中的结合改进和/或在所述结合改进中提供特定优点。示例性抗体组分包括组装自先前表征的抗体,如5F11和3F8的那些。

[0112] 多种可根据本发明使用的二聚化组分序列为所述领域中已知的(参见例如普鲁克通和帕克,前述;奎斯塔(Cuesta)等人,2010,生物技术趋势(Trends Biotechnol.)28:355-362)。此类组分的一些特定实例包括螺旋束或卷曲螺旋的合成或酵母肽(表3)。

[0113] 表3

	类型	实例
[0114]	螺旋自缔合肽	单一或螺旋-转角-螺旋
	卷曲螺旋(亮氨酸拉链)	GCN4, ZIP, TETRAZIP, Jun/Fos
	人类蛋白质	p53, 人类胶原蛋白 XVIII NC1
	细胞因子	TNF α , IL-12
	细菌蛋白质	抗生素链菌素, 碱性磷酸酶, 芽胞杆菌 RNA 酶-芽胞杆菌 RNA 酶抑制剂
[0115]	免疫球蛋白恒定区	Fc, C _L -C _H 1, C _H 3-C _H 3, 铰链
	蛋白质-蛋白质相互作用	蛋白激酶 A-A 激酶锚定蛋白质(“对接锁定”)
	氨基酸取代	基于大小取代抗体的 Fc 中的对应氨基酸(“旋钮进洞(knobs-into-holes)”)

[0116] 本发明尤其涵盖并入多价结合剂中,且确切地说并入二价抗体中尤其适用的二聚化组分为或包含人类肝细胞核因子-1 α (HNF-1 α)的二聚化元件的发现。

[0117] HNF-1 α 包含四个区:氨基末端二聚化组分、柔性连接子、二分DNA结合基序和羧基末端反式激活组分。柔性连接子连接DNA结合基序和二聚化组分。HNF-1 α 为肾和肝基因表达两者的重要调节子。人类HNF-1 α 的残基1-32的示例性氨基酸序列显示于下文SEQ ID NO:1中。

[0118] 人类HNF-1 α ₁₋₃₂ MVSKLSQLQTELLAALLESGLSKEALIQLGE (SEQ ID NO:1)

[0119] 通常,二聚化组分可参考已知自缔合的氨基酸序列蛋白质设计或选择。所属领域中已知的此类二聚化组分的实例包括螺旋束、卷曲螺旋(例如亮氨酸拉链)、合成肽和酵母蛋白质。本发明提供采用二聚化组分的双特异性结合剂包含人类肝细胞核因子-1 α 的元件的洞察,已报导其形成紧密卷绕的四个螺旋束(那罗延(Narayana)等人,2001,分子生物学杂志310:635-658)。举例来说,包含人类HNF-1 α 的元件的二聚化组分可以具有与人类HNF-1 α (SEQ ID NO:1)的氨基酸残基1-32实质上一致的序列。在一些实施例中,根据本发明的二

聚化组分具有与人类HNF-1 α (SEQ ID NO:1) 氨基酸残基1-32具有至少约50% (例如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%) 一致性的序列。

[0120] 本发明的示例性双特异性结合剂显示于表4中。本发明的示例性抗体可变区为带下划线的。本发明的示例性二聚化组分以斜体字示出。

[0121] 表4

5HLBT (SEQ ID NO:2)	<u>QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYKFTEYTMHWVKQS</u> <u>HGKSLEWIGGINPNNGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM</u> <u>ELRSLTSEDSAVYYCARDTTVPFAYWGQGTTVTVSSGGGGS</u> <u>GGGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSISYM</u> <u>HWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTI</u> [0122] <u>SSMEAEDAATYYCHQRSSYPLTFGAGTKLEIKRASTKGPGG</u> <u>GGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGY</u> <u>TFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDR</u> <u>FTISRDNSKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYCLDY</u> <u>WGQGTPTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS</u> <u>VGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDYFTISSLPEDIATYYCQWSSNPFTFG</u>
------------------------	--

	<u>QGTKLQITR</u>
5LHBT (SEQ ID NO:3)	<u>DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSISYMHWYQQKPGTS</u> <u>PKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAAT</u> <u>YYCHQRSSYPLTFGAGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQV</u> <u>QLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYKFTEYTMHWVKQSHG</u> <u>KSLEWIGGINPNNGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMEL</u> <u>RLTSEDSAVYYCARDTTVPFAYWGQTTVTVSSASTKGPG</u> <u>GGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASG</u> <u>YTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKD</u> <u>RFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYCLD</u> <u>YWGQGTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL SA</u> <u>SVGDRV TITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLA</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTF</u> <u>QGTKLQITR</u>
5HLDS ₁₅ BT (SEQ ID NO:4)	<u>QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYKFTEYTMHWVKQS</u> <u>HGKCLEWIGGINPNNGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY</u> <u>MELRLTSEDSAVYYCARDTTVPFAYWGQTTVTVSSGGG</u> <u>GSGGGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSIS</u> <u>YMHWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSY</u> <u>SLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYPLTFGCGTKLEIKRASTKG</u> <u>PGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKA</u> <u>SGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKF</u> <u>KDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYC</u> <u>LDYWGQGTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL</u> <u>SASVGDRV TITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSK</u> <u>LASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNP</u> <u>FTFGQGTKLQITR</u>
[0123]	
5LHDS ₁₅ BT (SEQ ID NO:5)	<u>DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSISYMHWYQQKPGTS</u> <u>PKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAAT</u> <u>YYCHQRSSYPLTFGCGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQV</u> <u>QLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYKFTEYTMHWVKQSHG</u> <u>KCLEWIGGINPNNGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMEL</u> <u>RLTSEDSAVYYCARDTTVPFAYWGQTTVTVSSASTKGPG</u> <u>GGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASG</u> <u>YTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKD</u> <u>RFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYCLD</u> <u>YWGQGTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL SA</u> <u>SVGDRV TITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLA</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTF</u> <u>QGTKLQITR</u>
5HLDS ₅ BT (SEQ ID NO:6)	<u>QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYKFTEYTMHWVKQS</u> <u>HGKCLEWIGGINPNNGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY</u> <u>MELRLTSEDSAVYYCARDTTVPFAYWGQTTVTVSSGGG</u> <u>GSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSISYMHWYQQKPG</u> <u>TSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDA</u> <u>ATYYCHQRSSYPLTFGCGTKLEIKRASTKGPGGGGSGGGGS</u> <u>GGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMH</u> <u>WVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SK</u>

	<u>NTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPV</u> <u>TVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVIT</u> <u>CSASSSVSYMNWYQOTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFS</u> <u>GSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQI</u> <u>TR</u>
5LHDS ₅ BT (SEQ ID NO:7)	<u>DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSISYMHWYQQKPGTS</u> <u>PKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAAT</u> <u>YYCHQRSSYPLTFGCGTKLEIKRGGGGSQVQLQQSGPELVK</u> <u>PGASVKISCKTSGYKFTEYTMHWVKQSHGKCLEWIGGINPN</u> <u>NGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYY</u> <u>CARDTTVPFAYWGQGTTVTVSSASTKPGGGGSGGGGSGG</u> <u>GGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWV</u> <u>RQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNT</u> <u>AFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVT</u> <u>SSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVITITCSA</u> <u>SSSVSYMNWYQOTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGS</u> <u>GTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR</u>
Y-BT (SEQ ID NO:8)	<u>QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYKFTEYTMHWVKQS</u> <u>HGKCLEWIGGINPNNGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY</u> <u>MELRSLTSEDSAVYYCARDTTVPYAYWGQGTTVTVSSGGG</u> <u>GSGGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSIS</u> <u>YMHWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSY</u> <u>SLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYPLTFGCGTKLEIKRASTKG</u> <u>PGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKA</u> <u>SGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKF</u> <u>KDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYC</u> <u>LDYWGQGTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL</u> <u>SASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQOTPGKAPKRWIYDTSK</u> <u>LASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNP</u> <u>FTFGQGTKLQITR</u>
[0124]	
Q-BT (SEQ ID NO:9)	<u>QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYKFTQYTMHWVKQS</u> <u>HGKSLEWIGGINPNNGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM</u> <u>ELRSLTSEDSAVYYCARDTTVPFAYWGQGTTVTVSSGGGGS</u> <u>GGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSISYM</u> <u>HWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTI</u> <u>SSMEAEDAATYYCHQRSSYPLTFGAGTKLEIKRASTKGPGG</u> <u>GGSGGGSGGGGSGVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGY</u> <u>TFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDR</u> <u>FTISRDNKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYCLDY</u> <u>WGQGTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLAS</u> <u>VGDRVITITCSASSSVSYMNWYQOTPGKAPKRWIYDTSKLAS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFG</u> <u>QGTKLQITR</u>
Y-BT-HDD (SEQ ID NO:10)	<u>QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYKFTEYTMHWVKQS</u> <u>HGKCLEWIGGINPNNGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY</u> <u>MELRSLTSEDSAVYYCARDTTVPYAYWGQGTTVTVSSGGG</u> <u>GSGGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSIS</u> <u>YMHWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSY</u>

	<u>SLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYPLTFGCGTKLEIKRASTKG</u> <u>PGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQGRSLRLSCKA</u> <u>SGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKF</u> <u>KDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYC</u> <u>LDYWGGQTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL</u> <u>SASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSK</u> <u>LASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLOPEDIATYYCQQWSSNPF</u> <u>TFGQGTKLQITRTP LGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGL</u> <u>LSKEALIQALGEGSGGAP</u>
3LHBT-HDD (SEQ ID NO:11)	<u>EIVMTQTPATLSVSAGERVTITCKASQSVSNDVTWYQQKPG</u> <u>QAPRLLIYSASNRYSGV PARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDFA</u> <u>VYFCQQDYSSFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVQL</u> <u>VESGPGVVQGRSLRISCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGL</u> <u>EWLGVIWAGGITNYNSAFMSRLTISKDNSKNTVYLQMNSLR</u> <u>AEDTAMYYCASRGGHYGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGP</u> <u>GGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQGRSLRLSCKAS</u> <u>GYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFK</u> <u>DRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCL</u> <u>DYWGGQTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL</u> <u>ASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL</u> <u>ASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLOPEDIATYYCQQWSSNPFT</u> <u>FGQGTKLQITRTP LGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGL</u> <u>SKEALIQALGEGSGGAP</u>
[0125] 3LHBT _(D32H) -HDD (SEQ ID NO:12)	<u>EIVMTQTPATLSVSAGERVTITCKASQSVSNHVTWYQQKPG</u> <u>QAPRLLIYSASNRYSGV PARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDFA</u> <u>VYFCQQDYSSFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVQL</u> <u>VESGPGVVQGRSLRISCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGL</u> <u>EWLGVIWAGGITNYNSAFMSRLTISKDNSKNTVYLQMNSLR</u> <u>AEDTAMYYCASRGGHYGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGP</u> <u>GGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQGRSLRLSCKAS</u> <u>GYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFK</u> <u>DRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCL</u> <u>DYWGGQTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL</u> <u>ASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL</u> <u>ASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLOPEDIATYYCQQWSSNPFT</u> <u>FGQGTKLQITRTP LGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGL</u> <u>SKEALIQALGEGSGGAP</u>
3LHBT _(E1K, D32H) -HDD (SEQ ID NO:13)	<u>KIVMTQTPATLSVSAGERVTITCKASQSVSNHVTWYQQKPG</u> <u>QAPRLLIYSASNRYSGV PARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDFA</u> <u>VYFCQQDYSSFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVQL</u> <u>VESGPGVVQGRSLRISCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGL</u> <u>EWLGVIWAGGITNYNSAFMSRLTISKDNSKNTVYLQMNSLR</u> <u>AEDTAMYYCASRGGHYGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGP</u> <u>GGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQGRSLRLSCKAS</u> <u>GYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFK</u> <u>DRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCL</u> <u>DYWGGQTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL</u> <u>ASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL</u> <u>ASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLOPEDIATYYCQQWSSNPFT</u>

[0126]

3LHBT_(E1K, D32H, G54I)-HDD
(SEQ ID NO:14)

FGQGTKLQITRTPLGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGL
SKEALIQALGEGSGGAP

KIVMTQTPATLSVSAGERVTITCKASQSVSNHVTWYQQKPG
QAPRLLIYSASNRYSGVPARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDF
VYFCQQDYSSFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSGVQL
VESGPGVVQPGRSLRISCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGL
EWLGVIWAIGITNYNSAFMSRLTISKDNSKNTVYLQMNLSR
AEDTAMYYCASRGGHYGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGP
GGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKAS
GYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFK
DRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCL
DYWGQGTPTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL
ASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQOTPGKAPKRWIYDTSKL
ASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLOPEDIATYYCQQWSSNPFT
FGQGTKLQITRTPLGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGL
SKEALIQALGEGSGGAP

3LHBT_{v5}-HDD
(SEQ ID NO:15)

EIVMTQTPATLSVSAGERVTITCRASQSVSNDVTWYQQKPG
QAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDF
YFCQQDYSSFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSGVQLV
ESGPGVVQPGRSLRLSCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGL
EWLGVIWAGGITNYNSSVKGRITISKDNSKNTVYLQMNLSR
AEDTAVYYCASRGGHYGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGP
GGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASG
YTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKD
RFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLD
YWGQGTPTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL
SA
SVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQOTPGKAPKRWIYDTSKLA
SGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLOPEDIATYYCQQWSSNPFTF
GQGTKLQITRTPLGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGLS
KEALIQALGEGSGGAP

3LHBT_{v5(D32H)}-HDD
(SEQ ID NO:16)

EIVMTQTPATLSVSAGERVTITCRASQSVSNHVTWYQQKPG
QAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDF
YFCQQDYSSFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSGVQLV
ESGPGVVQPGRSLRLSCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGL
EWLGVIWAGGITNYNSSVKGRITISKDNSKNTVYLQMNLSR
AEDTAVYYCASRGGHYGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGP
GGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASG
YTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKD
RFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLD
YWGQGTPTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL
SA
SVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQOTPGKAPKRWIYDTSKLA
SGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLOPEDIATYYCQQWSSNPFTF
GQGTKLQITRTPLGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGLS
KEALIQALGEGSGGAP

3LHBT_{v5(E1K, D32H)}-HDD
(SEQ ID NO:17)

KIVMTQTPATLSVSAGERVTITCRASQSVSNHVTWYQQKPG
QAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDF
YFCQQDYSSFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSGVQLV
ESGPGVVQPGRSLRLSCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGL

EWLGVIWAGGITNYNSSVKGRLTISKDNSKNTVYLQMNLSR
AEDTAVYYCASRGGHYGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGPG
GGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASG
YTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKD
RFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYCLD
YWGQGTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA
SVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTGKAPKRWIYDTSKLA
SGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDATYYCQQWSSNPFTF
QQGTKLQITRTP LGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGLS
KEALIQALGEGSGGAP

3LHBT_{v5(E1K, D32H, G54I)}-HDD
 (SEQ ID NO:18)

KIVMTQTPATLSVSAGERVTITCRASQSVSNHVTWYQQKPG
QAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDAV
YFCQQDYSSFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVQLV
ESGPGVVQGRSLRLSCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGL
EWLGVIWAIGITNYNSSVKGRLTISKDNSKNTVYLQMNLSR
AEDTAVYYCASRGGHYGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGPG
GGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASG
YTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKD
RFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYCLD
YWGQGTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA
SVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTGKAPKRWIYDTSKLA
SGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDATYYCQQWSSNPFTF
QQGTKLQITRTP LGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGLS
KEALIQALGEGSGGAP

[0127]

641HLBT-HDD
 (SEQ ID NO:19)

EVTLVESGGDFVKPGGSLKVS CAASGFAFSHYAMSWVRQTP
AKRLEWVAYISSGGSGTYYSDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQ
MRLRSEDSAMYFCTRVKLGTY YFDSWGQGTTLTVSSGGG
GSGGGGSGGGGSDIQMTQTASSLPASLGDRVITISCSASQDIS
NYLNWYQQKPDGTVKLLIFYSSNLHSGVPSRFSGGGSGTDY
SLTISNLEPEDIATYFCHQYSKLPWTFGGG TKLEIKRASTKGP
GGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKAS
GYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFK
DRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYCL
DYWGQGTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS
ASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTGKAPKRWIYDTSKL
ASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDATYYCQQWSSNPFT
FGQGTKLQITRTP LGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGL
SKEALIQALGEGSGGAP

3LHBT_(D32H, G54I)-HDD
 (SEQ ID NO:20)

EIVMTQTPATLSVSAGERVTITCKASQSVSNHVTWYQQKPG
QAPRLLIYSASNRYSGV PARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDA
VYFCQQDYSSFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVQL
VESGPGVVQGRSLRISCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGL
EWLGVIWAIGITNYNSAFMSRLTISKDNSKNTVYLQMNLSR
AEDTAMYYCASRGGHYGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGP
GGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKAS
GYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFK
DRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYCL
DYWGQGTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS
ASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTGKAPKRWIYDTSKL

	<u>ASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFT</u> <u>FGQGTKLQITRTPLGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGL</u> <u>SKEALIQALGEGSGGAP</u>
3LHBT _(E1K, G54I) -HDD (SEQ ID NO:21)	<u>KIVMTQTPATLSVSAGERVTITCKASQSVSNDVTWYQQKPG</u> <u>QAPRLLIYSASNRYSGVPARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDA</u> <u>VYFCQQDYSSFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVQL</u> <u>VESGPGVVQPGRSLRISCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGL</u> <u>EWLGVIWAIGITNYSNFAFMSRLTISKDNSKNTVYLQMNLSR</u> <u>AEDTAMYYCASRGGHYGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGP</u> <u>GGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKAS</u> <u>GYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFK</u> <u>DRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYCL</u> <u>DYWGQGTPTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL</u> <u>ASVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKL</u> <u>ASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFT</u> <u>FGQGTKLQITRTPLGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGL</u> <u>SKEALIQALGEGSGGAP</u>
3LHBT _{v5(D32H, G54I)} -HDD (SEQ ID NO:22)	<u>EIVMTQTPATLSVSAGERVTITCRASQSVSNHVTWYQQKPG</u> <u>QAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDA</u> <u>YFCQQDYSSFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVQLV</u> <u>ESGPGVVQPGRSLRLSCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGL</u> <u>EWLGVIWAIGITNYSNVSVKGRLTISKDNSKNTVYLQMNLSR</u> <u>AEDTAVYYCASRGGHYGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGP</u> <u>GGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASG</u> <u>YTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKD</u> <u>RFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYCLD</u> <u>YWGQGTPTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL</u> <u>SA</u> <u>SVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLA</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFT</u> <u>FGQGTKLQITRTPLGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGLS</u> <u>KEALIQALGEGSGGAP</u>
[0128]	
3LHBT _{v5(E1K, G54I)} -HDD (SEQ ID NO:23)	<u>KIVMTQTPATLSVSAGERVTITCRASQSVSNDVTWYQQKPG</u> <u>QAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGYGTEFTFTISSVQSEDA</u> <u>YFCQQDYSSFGQGTKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVQLV</u> <u>ESGPGVVQPGRSLRLSCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGL</u> <u>EWLGVIWAIGITNYSNVSVKGRLTISKDNSKNTVYLQMNLSR</u> <u>AEDTAVYYCASRGGHYGYALDYWGQGLTVTVSSASTKGP</u> <u>GGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASG</u> <u>YTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKD</u> <u>RFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTG VYFCARYYDDHYCLD</u> <u>YWGQGTPTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL</u> <u>SA</u> <u>SVGDRVITITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLA</u> <u>SGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFT</u> <u>FGQGTKLQITRTPLGDTTHTSGMVSKLSQLQTELLAALLESGLS</u> <u>KEALIQALGEGSGGAP</u>

[0129] 在各种实施例中,根据本发明的双特异性结合剂包含第一结合组分和第二结合组分和二聚化组分。在多个实施例中,如本文所述的双特异性结合剂的第一和第二结合组分各自包含通过不同特异性表征的抗体组分。在多个实施例中,抗体组分选自表4。

[0130] 在各种实施例中,根据本发明的双特异性结合剂包含第一结合组分、第二结合组分和连接到第二结合组分的二聚化组分。在各种实施例中,根据本发明的双特异性结合剂包含第一结合组分、第二结合组分和连接到第一结合组分的二聚化组分。在各种实施例中,

根据本发明的双特异性结合剂包含第一结合组分、第二结合组分和连接到第一和第二结合组分两者(例如安置在第一与第二结合组分之间)的二聚化组分。

[0131] 在某些特定实施例中,根据本发明的双特异性结合剂从5'到3'包含第一结合组分、第二结合组分和二聚化组分。在某些特定实施例中,根据本发明的双特异性结合剂从5'到3'包含二聚化组分、第一结合组分和第二结合组分。在某些特定实施例中,根据本发明的双特异性结合剂从5'到3'包含第一结合组分、二聚化组分和第二结合组分。

[0132] 在各种实施例中,如本文所述的第一和/或第二结合组分包含抗体组分或为抗体组分。在各种实施例中,如本文所述的第一和/或第二结合组分包含连接子序列。

[0133] 在一些实施例中,本发明的双特异性结合剂具有与表4中呈现的序列具有至少约50%(例如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)一致性的序列。

[0134] 在一些实施例中,本发明的双特异性结合剂具有与表4中呈现的序列实质上一致的序列。

[0135] 在一些实施例中,本发明的双特异性结合剂具有与表4中呈现的序列一致的序列。

[0136] 在一些实施例中,本发明的双特异性结合剂选自表4中呈现的序列。

[0137] 在各种实施例中,如本文所述的双特异性结合剂的第一结合组分包含具有与表4中呈现的抗体组分具有至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)一致性的序列的抗体组分。

[0138] 在各种实施例中,如本文所述的双特异性结合剂的第一结合组分包含具有与表4中呈现的抗体组分一致的序列的抗体组分。

[0139] 在各种实施例中,如本文所述的双特异性结合剂的第二结合组分包含具有与表4中呈现的抗体组分具有至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)一致性的序列的抗体组分。

[0140] 在各种实施例中,如本文所述的双特异性结合剂的第二结合组分包含具有与表4中呈现的抗体组分一致的序列的抗体组分。

[0141] 在各种实施例中,本发明的双特异性结合剂具有与表4中呈现的双特异性结合剂具有至少50%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)一致性的序列。

[0142] 在各种实施例中,本发明的双特异性结合剂具有与表4中呈现的双特异性结合剂一致的序列。

[0143] 标靶

[0144] 本发明尤其涵盖多特异性结合剂,且确切地说双特异性结合剂,如双特异性抗体的二聚化对促进细胞杀死尤其适用和/或有效的认知。确切地说,本发明表明特异性地结合于标靶细胞相关表位和淋巴细胞相关表位两者的多价结合剂的活性可通过引入二聚化域显著增加。

[0145] 举例来说,在本发明的一些实施例中,多价结合剂特异性结合于肿瘤细胞相关表位和T细胞表位。根据此类实施例,多价结合剂中包括二聚化域可促进药剂与其标靶表位中

的一者或两者的结合和/或可增强如通过标靶T细胞介导的标靶肿瘤细胞的杀死。

[0146] 在一些实施例中,待杀死的靶细胞包括例如病毒感染细胞(例如HCV感染细胞、HIV感染CD4⁺T细胞、HPV感染角化细胞)、经细胞内细菌或原虫感染的细胞和癌细胞。所属领域的一般技术人员将了解如本文所述的多价结合剂所合意地结合的此类细胞上的适当标靶表位。代表性此类表位可发现于抗原,如包膜蛋白、蛋白酶、逆转录酶蛋白、整合酶蛋白等上。

[0147] 在一些实施例中,可介导如本文所述的靶细胞的杀死的淋巴细胞包括T细胞(例如CD8⁺T细胞)、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、粒细胞和抗体依赖性细胞毒性细胞。所属领域的一般技术人员将了解如本文所述的多价结合剂所合意地结合的此类淋巴细胞上的适当目标表位。代表性此类表位可发现于抗原,如IgG(例如Fc γ RIIB)、CD1d、CD3、CD4、CD7、CD8、CD13、CD14、CD16、CD31、CD38、CD56、CD68、MAC-1/MAC-3、IL-2R α 、OX40、Ly49和CD94的Fc受体上。

[0148] 核酸构筑和表达

[0149] 如本文所述的包括二聚化组分的多特异性结合剂可使用所属领域中已知的分子生物学方法产生自核酸分子。核酸分子插入到在引入到适当宿主细胞中时能够表达融合蛋白的载体中。适当宿主细胞包括(但不限于)细菌、酵母、昆虫和哺乳动物细胞。所属领域的技术人员已知的将DNA片段插入到载体中的方法中的任一种可用于在转录/翻译控制信号的控制下构筑编码本发明的融合蛋白的表达载体。这些方法可以包括体外重组DNA和合成技术和体内再结合(参见萨姆布鲁克等人分子克隆实验指南,冷泉港实验室;最新分子生物学实验方法汇编,奥斯贝等人编,格林出版协会(Greene Publ.Assoc.),威立出版公司(Wiley-Interscience),纽约)。

[0150] 根据本发明的核酸分子的表达可以由第二核酸序列调节,使得多肽在经重组DNA分子转型的宿主中表达。举例来说,本发明的核酸分子的表达可以通过所属领域中已知的启动子和/或增强子元件控制。

[0151] 核算构筑体包括编码产生自抗体和/或抗体组分的多特异性结合蛋白的区。通常,此类多特异性结合蛋白将产生自V_H和/或V_L区。在识别和选择展现所需结合和/或功能特性的抗体之后,每一抗体的可变区经分离、扩增、克隆和测序。可对V_H和V_L核苷酸序列作出修饰,包括编码氨基酸和/或携有限制位点的核苷酸序列的添加、编码氨基酸的核苷酸序列的缺失或编码氨基酸的核苷酸序列的取代。抗体和/或抗体组分可产生自人类、人类化或嵌合抗体。

[0152] 本发明的核酸构筑体通过所属领域已知的方法插入到表现载体或病毒载体中,且核酸分子可操作地连接到表达控制序列。

[0153] 含有核酸分子的表达载体转型到合适的宿主细胞中以允许产生由核酸构筑体编码的蛋白质。示例性宿主细胞包括原核生物(例如大肠杆菌)和真核生物(例如COS或CHO细胞)。经表达载体转型的宿主细胞在允许产生本发明的融合蛋白的条件下生长,接着回收由融合蛋白形成的多特异性结合剂。

[0154] 本发明的多特异性结合剂可以通过任何技术纯化,其允许后续形成稳定二聚物。举例来说,不希望受理论束缚,多特异性结合剂可以可溶多肽形式或包涵体形式回收自细胞,其可由此通过8M盐酸胍和透析定量地提取。为了进一步纯化本发明的多特异性结合剂,

可以使用常规离子交换色谱、疏水相互作用色谱、逆相色谱或凝胶过滤。本发明的多特异性结合剂也可以在从真核或原核细胞分泌之后回收自条件培养基。

[0155] 筛选和检测方法

[0156] 本发明的多特异性结合剂也可以用于体外或体内筛选方法,其中需要检测和/或测量一或多个细胞的一或多种活性(例如细胞凋亡或细胞生长)。筛选方法为所属领域中众所周知的且包括无细胞、基于细胞和动物检定。体外检定可以是所属领域中已知的多种方式实现的固态或可溶靶分子检测,包括使用能够识别结合到靶分子(例如细胞表面抗原)的多特异性结合剂的标签或可检测基团。可检测标记可以与使用本发明的多特异性结合剂的检定结合使用。

[0157] 治疗方法

[0158] 本发明的多特异性结合剂对于靶抗原中的一个展现高亲和力结合的能力使其治疗上适用于有效靶向表达靶抗原的细胞。因此,在一些实施例中,可能需要增加多特异性结合剂对于一个靶抗原而不是也通过多特异性结合剂结合的另一靶抗原的亲和力。举例来说,在肿瘤杀死的情况下,某些条件可以受益于对于肿瘤抗原而不是能够介导肿瘤杀死的细胞(例如T细胞)的表面的抗原的亲力的增加。因此,可能有益的是通过使用如本文所述的多特异性结合剂增加多特异性结合剂对于患有表达肿瘤抗原的肿瘤的患者中的肿瘤抗原的结合亲和力。

[0159] 本发明提供一种如本文所述的多特异性结合剂作为治疗剂,用于治疗患有表达能够通过此类多特异性结合剂结合的抗原的肿瘤的患者。此类多特异性结合剂可以用于治疗人类或动物身体的方法中,或诊断方法中。

[0160] 投药

[0161] 本发明提供向需要治疗的受试者投与有效量的本文所述的治疗活性剂(例如多特异性结合剂)的方法。

[0162] 如本文所述的多特异性结合剂可以通过所属领域中已知的各种用于药剂的治疗传递的方法投与,如可用于多特异性结合剂或编码本发明的多特异性结合剂的核酸的治疗传递以杀死受试者中的靶细胞或抑制其生长的蛋白质或核酸,例如细胞转染、基因疗法、用传递媒介或药学上可接受的载体直接投与、通过提供包含编码本发明的多特异性结合剂的核酸的重组细胞间接传递。

[0163] 各种传递系统为已知的且可用于投与本发明的多特异性结合剂,例如脂质体中的囊封、微粒、微胶囊、能够表达化合物的重组细胞、受体介导的内吞作用(参见例如吴(Wu)和吴,1987,生物化学杂志262:4429-4432)、以反转录病毒或其它载体的一部分的形式构筑核酸等。投与途径可以是经肠或非经肠的且包括(但不限于)静脉内、皮下、肌肉内、非经肠、经皮、或经粘膜(例如经口或经鼻)。在一些实施例中,本发明的多特异性结合剂经静脉内投与。在一些实施例中,本发明的多特异性结合剂经皮下投与。在一些实施例中,多特异性结合剂连同其它生物活性剂一起投与。

[0164] 药物组合物

[0165] 本发明进一步提供包含本发明的多特异性结合剂和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。组合物必要时也可以含有一或多种额外治疗活性物质。

[0166] 尽管本文提供的药物组合物的描述大体上涉及适合于向人类的伦理投与的药物

组合物,所属领域的技术人员应了解,此类组合物总体上适合于向所有类型的动物投与。使得组合物适合于向各种动物投与的适合于向人类投与的药物组合物的修改经充分理解,且一般兽医药理学家可以仅用一般实验(如果存在)设计和/或进行此类修改。

[0167] 本文中所描述的药物组合物的调配物可以通过药理学技术中已知或此后研发的任何方法制备。一般来说,此类制备型方法包括使活性成分与稀释剂或另一赋形剂和/或一种或多种其它助剂缔合,且随后必要时和/或需要时将产物成形和/或包装为所需单剂量或多剂量单位的步骤。

[0168] 根据本发明的药物组合物可以散装、以单一单位剂量形式和/或以多个单一单位剂量形式制备、包装和/或出售。如本文中所用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物的个别量。活性成分的量通常等于将向受试者投与的活性成分的剂量或此剂量的适宜部分,如此剂量的一半或三分之一。

[0169] 根据本发明的药物组合物的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何其它成分的相对量将变化,其取决于所治疗的受试者的身份、身材和/或情况并且进一步取决于投与组合物的途径。举例来说,组合物可以包含0.1%与100% (w/w)之间的活性成分。

[0170] 药物调配物可以另外包含药学上可接受的赋形剂,其如本文中所用包括任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂、或其它液体媒剂、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等张剂、增稠或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等,如适于所需特定剂型。雷明顿氏药学科学和实践(Remington's The Science and Practice of Pharmacy),第21版,A.R.根纳罗(A.R.Gennaro)(利平科特,威廉姆斯和威尔金斯出版社(Lippincott,Williams&Wilkins),马里兰州巴尔的摩(Baltimore,MD),2006;以引用的方式并入本文中)公开各种用于配制药组合物的赋形剂和用于其制备的已知技术。除非任何常规赋形剂介质均不与物质或其衍生物相容,如因产生任何非所需生物作用,或另外与医药组合物的任何其它组分以有害方式相互作用,否则预期其使用在本发明的范围内。

[0171] 在一些实施例中,药学上可接受的赋形剂是至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%纯。在一些实施例中,赋形剂经批准用于人类和供兽用。在一些实施例中,赋形剂经美国食品和药物管理局批准。在一些实施例中,赋形剂为医药级的。在一些实施例中,赋形剂符合美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0172] 用于制造药物组合物的药学上可接受的赋形剂包括(但不限于)惰性稀释剂、分散和/或粒化剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、结合剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂和/或油。此类赋形剂可以任选地包括于药物调配物中。如可可脂和栓剂蜡、着色剂、涂层剂、甜味剂、调味剂和/或芳香剂的赋形剂可以根据调配者的判断存在于组合物中。

[0173] 调配和/或制造药剂中的一般考虑因素可以例如发现于雷明顿:医药科学和实践第21版,利平科特威廉姆斯和威尔金斯出版社,2005(以引用的方式并入本文中)。

[0174] 试剂盒

[0175] 本发明进一步提供包含一或多个用至少一种如本文所述的多特异性结合剂填充的容器的药物包或试剂盒。试剂盒可以任何可适用方法使用,包括例如诊断上。与此类容器任选地相关的可以是呈由调控药物或生物产品的制造、使用或出售的政府机构指定的形式的布告,所述布告反映(a)由所述机构批准制造、使用或出售用于人类投与,(b)使用说明,或两者。

[0176] 实例

[0177] 现将通过以下非限制性实例进一步说明本发明。阐述这些实例以帮助理解本发明,但不意图且不应理解为以任何方式限制其范围。实例不包括所属领域的一般技术人员将众所周知的常规方法(分子选殖技术等)的详细描述。除非另外规定,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是以摄氏度计并且压力是处于大气压或接近大气压。

[0178] 实例1. 设计和构筑具有二聚化组分的双特异性融合蛋白

[0179] 本实例描述产生经特异性工程改造以能够二聚化来作为增强其肿瘤杀死效能的策略的多特异性结合剂。此策略测试于可以介导GD2阳性肿瘤细胞的T细胞杀死的双特异性结合蛋白上。双唾液酸神经节苷脂GD2高度表达于小儿和成人癌症的肿瘤上,包括神经母细胞瘤、成视网膜细胞瘤、黑素瘤、脑瘤、肉瘤和小细胞肺癌(莫达克 (Modak) 等人,2007,癌症调查(Cancer Invest.) 25:67-77)。本实例尤其说明称为GD2×CD3-HDD的能够二聚化的融合蛋白的结构,其由通过HNF-1 α 二聚化组分彼此连接且靶向GD2和CD3的来自抗GD2和抗GD3抗体的scFv多肽组成。尽管已知HNF-1 α 本身二聚合,但不清楚HNF-1 α 的二聚化组分是否可用于二聚合其可附接的其它蛋白质,确切地说其抗体或组分。举例来说,本发明人已确定当附接到抗体组分时,已知自身二聚合的人类肽激素内皮素-1 (ET1) 不能够二聚合。

[0180] 本文中呈现的其它实例展示如通过动态光散射检定的此融合蛋白的成功的二聚化、增加的与GD2的功能亲和力、增强的肿瘤细胞的T细胞介导的体外杀死和植入有肿瘤的小鼠中的肿瘤生长的抑制。这些实例展示本发明策略增加T细胞接合抗体对于癌症免疫疗法的效能的潜能。

[0181] 分子克隆

[0182] 抗GD2×抗CD3串联scFv (GD2×CD3) 双特异性结合蛋白在不具有和具有HNF-1 α 二聚化组分的情况下(称为GD2×CD3和GD2×CD3-HDD) 构筑自含有抗GD2单克隆抗体5F11的scFv(胡等人,2009,免疫学杂志(J. Immunol.) 183:5748-5755;张(Cheung) 等人,2004,核医学杂志(J. Nucl. Med.) 45:867-877) 和抗CD3 OKT3的人类化scFv(伍德尔(Woodle) 等人,1992,免疫学杂志148:2756-2763) 的单一多肽链。HDD组分放置在抗GD2 scFv的远端,和抗CD3 ScFv的近端。不希望受任何特定理论束缚,选择此放置以使对远端抗原(GD2) 且并非近端抗原(CD3) 的功能亲和力的潜在增强最大化,其将为几何学上限制的。GD2结合的增强将大概增强肿瘤杀死,而CD3结合的增强可导致增强的细胞激素风暴,T细胞接合双特异性抗体的已知副作用(蔡(Choi) 等人,2011,生物疗法专家观点(Expert Opin. Biol. Ther.) 11:843-853)。另外,串联scFv双特异性结合蛋白(MW约55-60kDa) 的二聚化具有增强血清半衰期的可能性,因为均二聚串联scFv双特异性结合蛋白可以避开小于60kDa的蛋白质经受的肾清除率路径。

[0183] 简单来说,抗GD2抗体5F11和人类化抗CD3 OKT3(衍生自小鼠OKT3抗体) 抗体的可变区已先前地描述。5F11和人类化OKT3(hOKT3) 抗体的单链可变区片段(scFv) 使用15个氨基酸的连接子((G₄S)₃) 沿不同定向遗传组装且分开合成(新泽西州皮斯卡塔威基因脚本公司(Genescript, Piscataway, NJ))。使用5F11抗体的可变区构筑V_HV_L或V_LV_H定向且使用抗CD3 hOKT3抗体的可变区构筑V_HV_L定向。在本发明中利用的抗体组分的特定身份对于添加二聚化组分改进由靶向两个抗原的抗体组分组成的多特异性结合剂的活性的提供的洞察并非至关重要。

[0184] 构筑自5F11抗体的单链可变区片段用NheI和ApaI消化且构筑自hOKT3抗体的scFv用ApaI和BamHI消化。消化片段依序接合到谷胱甘肽合成(GS)载体(茵维特罗根)中以制造双特异性结合蛋白5HLBT和5LHBT。

[0185] 通过突变诱发根据制造商的说明书(加利福尼亚州斯塔津(Stratagene,CA))对5F11 scFv的两个半胱氨酸残基(重链S44C,轻链A100C)作出稳定化突变以产生5HLDSBT和5LHDSBT。在5F11 scFv与hOKT3 scFv之间以及5HLDSBT与5LHDSBT之间克隆长度为15个((G₄S)₃)或5个(G₄S)氨基酸的连接子序列以用于比较。以类似方式,稳定化半胱氨酸突变也引入到OKT3 scFv中以产生5HLDS-DsBT。另外,两个亲和力成熟突变(P104Y和E31Q;胡等人,2009,免疫学杂志183:5748-5755)分别引入到5HLDSBT中以分别产生Y-BT和Q-BT。

[0186] 使用以上所描述的方法,基于具有HNF-1 α 二聚化组分的人类化抗GD2抗体3F8(张等人,2012,肿瘤免疫学(OncoImmunol.)1:4,477-486)和人类化抗CD3 OKT3(GD2 \times CD3)构筑其它抗GD2 \times 抗CD3串联scFv(伍德等人,前述)双特异性结合蛋白;且基于具有HNF-1 α 二聚化组分的单克隆抗GD3抗体KM641(太田(Ohta)等人,1993,癌症免疫与免疫疗法(Cancer Immunol.Immunother.)36(4):260-266)和人类化抗CD3 OKT3(伍德等人,前述)构筑抗GD3 \times 抗CD3串联scFv(GD3 \times CD3)双特异性结合蛋白。二聚化组分使用一部分人类IgG3铰链(TPLGDTTHTSG)融合到抗CD3抗体组分的C末端。如上文所述的示例性融合蛋白显示于表5中。

[0187] 表5

名称	描述
5HLBT	VHVL _{5F11} -(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3}
5LHBT	VLVH _{5F11} -(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3}
5HLDS ₁₅ BT	VHVL _{5F11} (S44C, A100C)-(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3}
5LHDS ₁₅ BT	VLVH _{5F11} (S44C, A100C)-(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3}
5HLDS ₅ BT	VHVL _{5F11} (S44C, A100C)-G ₄ S-VHVL _{hOKT3}
5LHDS ₅ BT	VLVH _{5F11} (S44C, A100C)-G ₄ S-VHVL _{hOKT3}
Y-BT	VHVL _{5F11} (S44C, A100C, P104Y)-G ₄ S-VHVL _{hOKT3}
Q-BT	VHVL _{5F11} (E31Q)-G ₄ S-VHVL _{hOKT3}
3LHBT _{v1} -HDD	VLVH _{hu3F8v1} -(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD
[0188] 3LHBT _{v1} (D32H)-HDD	VLVH _{hu3F8v1} (D32H)-(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD
3LHBT _{v1} (E1K, D32H)-HDD	VLVH _{hu3F8v1} (E1K, D32H)-(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD
3LHBT _{v1} (E1K, D32H, G54I)-HDD	VLVH _{hu3F8v1} (E1K, D32H, G54I)-(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD
3LHBT _{v1} (D32H, G54I)-HDD	VLVH _{hu3F8v1} (D32H, G54I)-(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD
3LHBT _{v1} (E1K, G54I)-HDD	VLVH _{hu3F8v1} (E1K, G54I)-(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD
3LHBT _{v5} -HDD	VLVH _{hu3F8v5} -(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD
3LHBT _{v5} (D32H)-HDD	VLVH _{hu3F8v5} (D32H)-(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD
3LHBT _{v5} (E1K, D32H)-HDD	VLVH _{hu3F8v5} (E1K, D32H)-(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD
3LHBT _{v5} (E1K, D32H, G54I)-HDD	VLVH _{hu3F8v5} (E1K, D32H, G54I)-(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD
3LHBT _{v5} (D32H, G54I)-HDD	VLVH _{hu3F8v5} (D32H, G54I)-(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD
3LHBT _{v5} (E1K, G54I)-HDD	VLVH _{hu3F8v5} (E1K, G54I)-(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD
641HLBT-HDD	VHVL _{KM641} -(G ₄ S) ₃ -VHVL _{hOKT3} -HDD

[0189] 产生和纯化

[0190] 表达构筑体使用scFv_{5F11}-(G₄S)₃-scFv_{hOKT3}融合蛋白(Y-BT, SEQ ID NO:10)的DNA在具有(GD2 \times CD3-HDD)和不具有(GD2 \times CD3)含有HNF-1 α 的元件(氨基酸1-32),接着为6 \times 组

氨酸标签的二聚化组分的情况下制得。DNA通过使用核转染仪II电穿孔机器(阿玛萨(Amaxa))和核转染溶液V的电穿孔转染到DG44 CHO-S细胞(茵维特罗根)中。经转染的细胞用500 μ g/ml G418经受药物选择。在约两周之后,单一细胞通过连续稀释接种到96孔板中。照射的CHO-S细胞以每孔5000个细胞的浓度用作饲养细胞。来自每一克隆体的上清液经三周收获且经受GD2结合检定。展示与GD2的最高结合的克隆体选择用于在细胞达到每毫升2百万个且处于对数期生长时用37 $^{\circ}$ C和8%CO₂下的125rpm的轨道震荡按比例增大为大型培养物。培养物上清液在达到所需抗体产率时或存活力下降到<40%时收获。分泌到培养物上清液中的双特异性融合蛋白(GD2 \times CD3和GD2 \times CD3-HDD)通过Ni²⁺琼脂糖(通用电气医疗集团生物科学,瑞典)纯化且用300mM咪唑洗脱。

[0191] 实例2. 双特异性融合蛋白的体外筛选和亲和力

[0192] 此实例说明根据实例1制得的单链双特异性融合蛋白的二聚化对与其标靶的功能亲和力的效应。在一些情况下,双特异性单体可以持续短时间周期结合到其标靶(例如由于尺寸的不佳滞留)。在此实例中,经工程改造以形成同型二聚体的双特异性融合蛋白展示对于抗原增加的亲和力。

[0193] 动态光散射

[0194] HNF-1 α 的二聚化组分诱导双特异性融合蛋白中的二聚化的能力通过动态光散射测试。纯化双特异性融合蛋白使用动态光散射在Zetasizer Nano(马尔文仪器有限公司(Malvern Instruments, Ltd.))上测量流体动力半径。表6阐述使用在实例1中描述的双特异性融合蛋白的示例性测量。纯化双特异性融合蛋白的额外样品也使用如上文所述的动态光散射测量流体动力半径。结果显示于表7中。

[0195] 如表6和7中所示, GD2 \times CD3 (MW 55kDa) 具有7.2 \pm 1.7nm的流体动力半径, 而GD2 \times CD3-HDD (就单体来说的MW 59kDa, 就二聚物来说的118kDa) 具有13.6 \pm 0.7nm (或11.1 \pm 0.5) 的流体动力半径。如通过光散射所展示的尺寸的增加指示GD2 \times CD3-HDD的二聚构形。

表 6

[0196]	融合蛋白	直径(nm)
	GD2 \times CD3	7.2 \pm 1.7
	GD2 \times CD3-HDD	13.6 \pm 0.7

表 7

[0196]	融合蛋白	直径(nm)
	GD2 \times CD3	7.2 \pm 1.7
	GD2 \times CD3-HDD	11.1 \pm 0.5

[0197] ELISA检定

[0198] 为了确定HDD是否增强与GD2或CD3的功能亲和力,使用纯化GD2和杰卡特全细胞(含有CD3的培养T细胞)进行ELISA检定。简单来说,96孔板在室温下以1微克/毫升/孔的含GD2的90%乙醇涂布过夜。第二天,板在室温下持续一小时用每孔150 μ l的0.5%BSA阻断。在洗涤之后,将稀释系列的双特异性抗体添加到板且在室温下培育两小时。板随后用PBS洗涤四次且随后用每孔100 μ l的1:1000稀释度的含小鼠抗His标签抗体(AbD Serotec公司)的0.5%BSA在室温下培育一小时。板再用PBS洗涤四次且随后用每孔100 μ l的1:3000稀释度的含山羊抗小鼠HRP抗体(杰克逊免疫研究(Jackson ImmunoResearch))的0.5%BSA在室温下培育一小时。板再用PBS洗涤四次且使用每孔150 μ l的OPD缓冲液(西格马(Sigma))显影。反应用每孔30 μ l的5N H₂SO₄停止。板随后在分光光度计上在490nm处读取。表8和图2A(上图)阐述根据实例1制得的双特异性融合蛋白的示例性GD2结合。图2A(下图)阐述根据实例1制得的双特异性融合蛋白的CD3/杰卡特细胞结合。纯化双特异性融合蛋白的额外样品也关于

CD3/杰卡特细胞结合进行测量。结果显示于图2B中。

[0199] 体外结合动力学使用Biacore T-100生物传感器(通用电气医疗集团(GE Healthcare))测定。CM5传感器芯片和相关试剂购自美国Biacore公司(Biacore USA)。神经节苷脂GM1购自厄莱克西斯生物化学品公司(ALEXIS Biochemicals)(阿索拉有限责任公司(AXXORA L.L.C.)),且GD2购自先进免疫化学公司(Advanced ImmunoChemical)。简单来说,神经节苷脂经由疏水相互作用直接固定到CM5传感器芯片上。参考表面用GM1固定。活性表面用1:1比率的GD2和GM1固定。GD2和GM1的稀释混合物(50 μ g/ml)经20分钟以15 μ l/min的流动速率注射(300 μ l)。接着为用10mM NaOH的广泛洗涤(通常为以5 μ l/min的流动速率的20 μ l的五次洗涤)直到获得稳定基线。

[0200] 纯化的抗GD2单克隆抗体(5F11)在分析之前稀释于改变浓度(50到1600nM)的含250mM NaCl的HBS-E缓冲液中。样品(60 μ l)经2分钟以30 μ l/min的流动速率在感测器表面上方注射。在完成缔合阶段之后,在含250mM NaCl的HBS-E缓冲液中持续300秒在相同流动速率下监测解离。在每一循环结束时,表面使用经一分钟的50 μ l/min的流动速率下的50 μ l 20mM NaOH和经两分钟的50 μ l/min的流动速率下的100 μ l 4M MgCl₂再生。在固定GD2上方注射样品之后获得的生物传感器曲线减去在动力学分析之前在固定GM1上方注射的样品的情况下获得的控制曲线。数据通过二价分析物模型和使用Biacore T-100评估软件的速率常数的默认参数设定分析。计算缔合速率常数($k_{\text{合}}$)、解离速率常数($k_{\text{离}}$)和平衡解离常数($K_D = k_{\text{离}}/k_{\text{合}}$)。表9和图3A阐述根据实例1制得的双特异性融合蛋白的示例性 K_D 值传感图。纯化双特异性融合蛋白的额外样品也通过Biacore测试。示例性结果显示于表10和图3B中。

[0201] 表8

[0202]	融合蛋白	GD2 ELISA EC ₅₀ (μ g/mL)
	GD2 \times CD3	0.61 \pm 0.11
	GD2 \times CD3-HDD	0.10 \pm 0.02

表 9

表 10

[0203]	融合蛋白	Biacore K _D (nM)	融合蛋白	K _合 (1/Ms)	K _离 (1/s)	K _D (nM)
	GD2 \times CD3	105	GD2 \times CD3	9.07 $\times 10^4$	2.27 $\times 10^{-2}$	250
	GD2 \times CD3-HDD	35	GD2 \times CD3-HDD	8.83 $\times 10^4$	3.45 $\times 10^{-3}$	39

[0204] 如表8中所示,ELISA结合检定显示GD2 \times CD3-HDD相对于GD2 \times CD3双特异性结合蛋白的GD2结合的6倍增强(也参见图2A和2B的上图)。与杰卡特细胞的结合并非显著不同(参见图2A和2B的下图)。GD2结合的Biacore分析(图3A和3B;和表9和10)证实与肿瘤标靶GD2的3到6倍的亲和力增强。

[0205] 在类似实验中,如上文所述地测试3LHBT-HDD(SEQ ID NO:11)的GD2结合。结果显示于表11和图7中。结果证实如本文所述,3LHBT-HDD显示基于GD2结合的较好活性。确切地说,3LHBT-HDD展示比3LHBT低约2.5倍的EC₅₀。

[0206] 表11

[0207]	融合蛋白	ELISA EC ₅₀ (μ g/mL)
	3LHBT	0.096 \pm 0.011
	3LHBT-HDD	0.038 \pm 0.003

[0208] 结合在一起,这些数据展示人类HNF-1 α 的二聚化组分有效地诱发单链双特异性抗体二聚化以形成同型二聚体,其促进与双特异性抗体的抗原中的一个(例如肿瘤抗原)的功能亲和力和。

[0209] 实例3.肿瘤细胞的体外T细胞介导的细胞杀死

[0210] 此实例表明双特异性同型二聚体起始通过T细胞介导的肿瘤细胞杀死的强化的能力。通常,结合T细胞的双特异性结合蛋白能够将T细胞导引到进行肿瘤的T细胞介导的杀死的肿瘤位点。在此实例中,显示示例性双特异性同型二聚体比双特异性单链蛋白质更有效地有效介导肿瘤细胞的T细胞杀死。

[0211] 铬51 (^{51}Cr) 释放检定

[0212] 黑素瘤和神经母细胞瘤细胞 (SKMEL1、NMB-7、M14、BE (1) N、HTB63、H524、SKNJC2、SKMEL28、H69、H196和H345) 在5%CO₂含湿气培育箱中在37℃下在补充有10%FBS (生命技术 (Life Technologies)) 的RPMI1640 (Cellgro) 中培养。神经母细胞瘤细胞系LAN1和黑素瘤M14获自洛杉矶加州大学 (University of California, Los Angeles)。SKNLD开发于纪念斯隆-凯特琳癌症中心 (Memorial Sloan Kettering Cancer Center)。SKLND细胞系衍生自美国标准菌库 (ATCC) IMR-32。验证通过短串联重复 (STR) DNA测序进行。

[0213] 粘附细胞用1 \times EDTA收获。T细胞使用Pan T细胞分离试剂盒根据制造商的说明书 (美天旎生物技术公司 (Miltenyi Biotec)) 纯化自人类PBMC。CD3/CD28戴诺珠粒 (dynabead) (茵维特罗根 (Invitrogen)) 用于根据制造商的说明书刺激和扩增T细胞。扩增的T细胞培养和维持于补充有FBS和30U/mL白介素-2 (IL-2) 的RPMI中。T细胞群体通过使用FACSARIATM的流动式细胞测量术用抗CD3-percep cy5.5、抗CD4-FITC、抗CD8-APC和抗CD56-PE抗体 (碧迪生物科学公司 (BD Biosciences)) 进行鉴别和分析。

[0214] 标靶肿瘤细胞持续一小时在37℃下用每10⁶个细胞100 μCi 的 ^{51}Cr 铬酸钠 (伊利诺伊州阿林顿高地的安玛西亚 (Amersham, Arlington Height, IL)) 标记。细胞经洗涤两次。标靶细胞 (每孔5000个细胞) 与效应细胞和双特异性融合蛋白在96孔聚苯乙烯圆底板 (碧迪生物科学公司) 中掺和到每孔250 μl 的最终体积。板在37℃下培育四小时且随后在400g下离心五分钟。上清液中的 ^{51}Cr 释放在伽玛计数器 (gama counter) (伊利诺伊州唐纳斯格罗夫的填充仪器公司 (Packed Instrument, Downers Grove, IL)) 中计数。特异性释放的百分比使用式100% (实验cpm-背景cpm) / (5%十二烷基硫酸钠[SDS]cpm-背景CPM) 计算,其中cpm为释放的 ^{51}Cr 的每分钟计数。总释放通过5%SDS (密苏里州圣路易斯的西格马 (Sigma, St Louis, Mo)) 的情况下的溶解评估,且背景释放在不存在效应细胞的情况下测量。根据实例1制得的双特异性融合蛋白的T细胞介导的肿瘤细胞杀死的示例性结果阐述于表12和图4中。

[0215] 表12

	标靶细胞	EC ₅₀ (ng/mL) GD2 \times CD3	EC ₅₀ (ng/mL) GD2 \times CD3-HDD	倍数差异	显著性
[0216]	M14	17.35	0.64	27 \times	p<0.001
	LAN1	5.68	0.47	12 \times	p<0.001
	SKNLD	38.8	3.14	12 \times	p<0.001

[0217] 如表12和图4中所示,GD2 \times CD3和GD2 \times CD3-HDD双特异性融合蛋白能够介导选择的GD2阳性肿瘤细胞系的T细胞杀死。确切地说,GD2 \times CD3-HDD显示相对于GD2 \times CD3的导引

肿瘤细胞的T细胞介导的杀死的能力的显著增强(12-27倍增加, $p < 0.001$)。

[0218] 本发明实例尤其刚好展示结合到肿瘤抗原和CD3的双特异性融合蛋白的二聚化可以有效地增强双特异性融合蛋白介导表达肿瘤抗原的肿瘤细胞的T细胞杀死的能力。

[0219] 实例4. 双特异性融合蛋白同型二聚体的体内功效

[0220] 测试先前实例中描述的多特异性融合蛋白的体内功效。

[0221] 异种移植小鼠模型

[0222] 种畜小鼠品系BALB/cA-Rag2KO/IL-2R γ KO (DKO) 由伊东守博士 (Dr. Mamoru Ito) (实验动物中心研究所 [Central Institute for Experimental Animals; CIEA], 日本川崎宫前 (Miyamae, Kawasaki, Japan)) 友善地提供且在纪念斯隆-凯特琳癌症中心繁殖。动物提供有复方新诺明 (Sulfatrim) 食物。所有动物的护理遵守加拿大动物护理委员会 (Canadian Council on Animal Care) 指南。体内实验在小鼠达到6周到12周龄时进行。

[0223] 健康供体的外周血液单核细胞 (PBMC) 来自健康供体 (纽约州的纽约血液中心 (New York Blood Center, NY)) 的丢弃的血沉棕黄层分离。PBMC使用菲科帕克 (Ficoll-paque) (通用电气医疗集团生命科学) 分离且在PBS中洗涤。红细胞通过用ACK裂解缓冲液 (吉毕科 (GIBCO), 生命技术公司) 培育30-60秒排除。

[0224] 纯化PBMC与SKNLD细胞 (快速生长皮下神经母细胞瘤) 以1:1比率 (50,000PBMC:50,000 SKNLD细胞) 在基质胶 (碧迪生物科学公司) 中混合。DKO小鼠经植入PMBC/SKNLD混合细胞。在植入后4天, 每组五只小鼠不给予处理剂、给予GD2 \times CD3注射剂 (每周五次, 持续两周) 或GD2 \times CD3-HDD静脉内注射剂 (每周五次, 持续两周)。肿瘤尺寸通过卡尺从第14天到第44天每周两次地测量。血液经快速注射50 μ g双特异性融合蛋白之后的8小时获自DKO小鼠的尾端静脉。双特异性融合蛋白的血清含量通过双重夹心ELISA测量, 其中双特异性融合蛋白使用固相大鼠抗5F11-个体基因型抗体捕获, 且使用生物素标记的小鼠抗His标签抗体 (AbD Serotec), 接着使用链霉亲和素-HRP (生命技术, 茵维特罗根) 检测结合的双特异性融合蛋白。每一组的肿瘤体积的示例性测量显示于图5中。对于每一小鼠计算曲线下面积, 且平均值显示于表15中。

[0225] GD2 \times CD3和GD2 \times CD3-HDD的示例性药物动力学分析显示于表16中。测试纯化双特异性融合蛋白的额外样品以用于药物动力学分析 (表17)。

[0226] 表15

[0227]	AUC (mm ³ \times 天数) 显著性	无处理	GD2 \times CD3	GD2 \times CD3-HDD
		12,346 \pm 5969	10,165 \pm 6434	3850 \pm 1967
		-	p=0.59	p=0.02

[0228] 表16

[0229]	融合蛋白	半衰期(h)
	GD2 \times CD3	0.78 \pm 0.69
	GD2 \times CD3-HDD	2.56 \pm 0.54

[0230] 表17

	融合蛋白	半衰期(min)
[0231]	GD2×CD3	14.04 ± 10.42
	GD2×CD3-HDD	54.68 ± 17.62
	倍数差异	3.9
	p 值	0.002

[0232] 如表15中所示, GD2×CD3显示肿瘤生长的适度减少(低约18%的AUC), 其并非统计显著的($p=0.59$)。但是, GD2×CD3-HDD显示肿瘤生长的显著减少(低约69%的AUC, $p=0.02$)且大于GD2×CD3。药物动力学分析显示GD2×CD3-HDD相对于GD2×CD3的血清半衰期的大于3倍(或约4倍)增加($p=0.002$, 参见表16和17)。

[0233] 在类似实验中, DK0小鼠经植入如上文所述的PMBC/M14混合细胞。每一组的肿瘤体积的示例性测量显示于图6中。

[0234] 结合在一起, 这些数据显示投与经由CD3靶向肿瘤抗原和T细胞的二聚多特异性结合蛋白(在此状况下, 均二聚双特异性抗体蛋白)有效地降低体内肿瘤生长。确切地说, 肿瘤生长的此类减少相比于单链构形的相同双特异性结合蛋白较大。另外, 均二聚双特异性结合蛋白展示相比于相同双特异性结合蛋白的单链构形较长的半衰期。

[0235] 实例5. 细胞激素释放检定

[0236] 先前实例中描述的多特异性融合蛋白经测试以证实二聚化标签(HDD, SEQ ID NO: 1)将不增强由与CD3的增加的结合产生的细胞因子释放。

[0237] 简单来说, PBMC通过淋巴细胞分离介质离心(美的泰克公司(Mediatech, Inc.))从健康供体的血液分离。人类T细胞通过Pan T细胞分离试剂盒根据制造商说明书(美天旎生物技术公司)纯化。T细胞(50,000/孔)与神经母细胞瘤SKNLD细胞(10,000/孔)在具有BsAb的96孔板中在37°C下共培养。在24小时之后收获上清液。四种不同细胞因子(IL-2、IL-10、IFN- γ 和TNF- α)的浓度使用基于ELISA的细胞激素检定试剂盒(OptEIA™人类细胞激素装置, 碧迪生物科学公司)根据制造商说明书测量。每一细胞激素的含量根据关于检定试剂盒提供的标准定量。阳性对照样品使用经CD3/CD8免疫珠活化的T细胞运行以证实足够细胞激素检测。表18阐述在存在BsAb或亲本人类化OKT3抗体(单位为pg/mL)的情况下从人类T细胞的示例性细胞激素释放。表19阐述在存在BsAb和神经母细胞瘤SKNLD细胞或亲本人类化OKT3抗体(单位为pg/mL)的情况下从人类T细胞的示例性细胞激素释放。

[0238] 表18

	细胞激素	GD2×CD3	GD2×CD3-HDD	BsAb	人类化 OKT3 IgG
[0239]	TNF- α	7.9 ± 0.04	7.6 ± 0.49		86.7 ± 0.01
	IFN- γ	1.7 ± 0.00	2.1 ± 0.03		228.2 ± 10.1
	IL-10	3.6 ± 0.15	2.1 ± 0.06		29.8 ± 0.002
	IL-2	2.0 ± 0.00	2.2 ± 0.01		36.5 ± 1.18

[0240] 表19

	细胞激素	GD2×CD3	GD2×CD3-HDD BsAb	人类化 OKT3 IgG
[0241]	TNF- α	530 \pm 7.4	462 \pm 31	275.4 \pm 1.0
	IFN- γ	431 \pm 7.3	590 \pm 3.1	515.5 \pm 0.7
	IL-10	24 \pm 2.7	23 \pm 0.83	30.5 \pm 4.0
	IL-2	6.2 \pm 0.03	9.5 \pm 0.08	19.9 \pm 0.9

[0242] 如表18和19中所示,未在具有 ($p=0.7$) 或不具有 ($p=0.5$) 添加的肿瘤细胞的情况下在T细胞中观测到GD2×CD3-HDD BsAb相对于GD2×CD3的细胞激素释放的显著增强。结合在一起,这些结果证实如本文所述,在实例1中描述的双特异性融合蛋白最大化与远端抗原 (GD2) 且并非近端抗原 (CD3) 的功能亲和力的增强,进而导致在不增强细胞激素释放的情况下增强的肿瘤杀死,其为T细胞接合双特异性抗体的已知副作用。

[0243] 实例6.具有二聚化组分的多特异性融合蛋白的表征

[0244] 本实例描述进一步产生通过采用不同二聚化组分,例如合成螺旋-转角-螺旋域 (“dHLX”, GELEELLKHLKELLKG-PRK-GELEELLKHLKELLK, SEQ ID NO:24; 普鲁克通 (Pluckthun) 等人,1997,免疫技术 (Immunotechnology) 3 (2):83) 和人类IgG1Fc经特异性地工程改造以能够二聚化的多特异性结合剂。如同HDD,dHLX包含形成非共价二聚物的螺旋-环-螺旋域。相比之下,dHLX为合成的且可以在注射到人体中的情况下为免疫原性的。

[0245] GD2×CD3双特异性结合剂在其对应C末端为HDD、dHLX域或人类IgG1Fc的情况下产生 (如实例1中所述) 且测试GD2结合 (如实例2中所述) 和黑素瘤M14和神经母细胞瘤LAN-1肿瘤细胞系的体外T细胞介导的杀死 (如实例3中所述)。表20和图8阐述具有不同二聚化域的GD2×CD3双特异性结合剂的示例性GD2结合。表21和图9阐述通过具有不同二聚化域的GD2×CD3双特异性结合剂的黑素瘤M14和神经母细胞瘤LAN-1肿瘤细胞系的示例性体外T细胞介导的杀死。

[0246] 表20

	融合蛋白	ELISA EC ₅₀ (nM)
[0247]	GD2×CD3	5.0 \pm 1.4
	GD2×CD3-HDD	0.6 \pm 0.1
	GD2×CD3-Fc	0.3 \pm 0.1
	GD2×CD3-dHLX	2.9 \pm 0.6

[0248] 表21

	融合蛋白	LAN-1		M14	
		EC ₅₀ (nM)	最大杀死(%)	EC ₅₀ (nM)	最大杀死(%)
[0249]	GD2×CD3	0.207 \pm 0.026	55 \pm 1	0.161 \pm 0.013	59 \pm 1
	GD2×CD3-HDD	0.024 \pm 0.003	56 \pm 1	0.020 \pm 0.002	64 \pm 1
	GD2×CD3-Fc	0.045 \pm 0.004	48 \pm 1	0.030 \pm 0.005	50 \pm 1
	GD2×CD3-dHLX	0.316 \pm 0.031	54 \pm 1	0.248 \pm 0.033	62 \pm 2

[0250] 如表20和图8中所示,关于GD2×CD3-HDD和GD2×CD3-Fc二聚双特异性融合蛋白观测到与GD2的类似结合 (0.6nM相对于0.3nM),所述二聚物分别由非共价和共价相互作用产生。相比之下,二聚GD2×CD3-dHLX以及单体GD2×CD3展示低几倍的与GD2的结合亲和力 (即

分别为2.9nM和5.0nM)。另外,不同于其它二聚融合蛋白,GD2×CD3-dHLX展示显著聚集(数据未示出)。

[0251] 如表21和图9中所示,GD2×CD3-HDD展示黑素瘤M14和神经母细胞瘤LAN-1肿瘤细胞系的最有效体外T细胞介导的杀死。此外,尽管具有略微较高的GD2亲合力,GD2×CD3-Fc展示比GD2×CD3-HDD低的体外肿瘤细胞杀死,其如通过EC₅₀和最大肿瘤杀死%两者测量。相比之下,GD2×CD3-dHLX展示最低肿瘤细胞杀死,且显著地低于单体GD2×CD3。

[0252] 结合在一起,这些另外展示如本文所述,HDD可以提供具有增强的肿瘤抗原结合亲合力与在共价二聚化域(例如人类IgG1 Fc)的情况下所实现类似的结合亲合力的二聚双特异性药剂。HDD提供相比于在其它二聚化域的情况下所观测改进的T细胞介导的杀死,证实本发明提供特别适用的二聚化组分,尤其适用于T细胞接合双特异性结合剂。

[0253] 如前述实例中所示,将来自人类HNF-1α的二聚化组分融合到GD2×CD3串联scFv的羧基末端促进稳定二聚物的形成且增强双特异性二聚物的远端抗肿瘤抗体组分的功能亲和力。通常,肿瘤通过下调HLA和上调调节T细胞避开T细胞,干扰总体低克隆频率的溶细胞T细胞(CTL)的归巢。接合T细胞上的CD3的双特异性抗体可以活化多克隆T细胞且将其重导引到肿瘤。本发明的双特异性二聚物对于表达GD2的肿瘤细胞具有增强的功能亲和力且导致在使用活化T细胞作为效应子的GD2阳性肿瘤细胞系的体外检定中的肿瘤细胞杀死显著增强。本发明的二聚化组分不显著增强T细胞结合或细胞激素释放,已知其为T细胞接合双特异性抗体免疫疗法的不良副作用。

[0254] 此外,实例展示HDD标签在如GD2×CD3双特异性抗体(BsAb)中所例示地应用于抗体组分时尤其适用。本发明人已展示BsAb的独特设计(参见图1),其可以增强对于BsAb的一个结合臂的特定表位(即远端抗GD2端且并非近端抗CD3端)的亲合力。T细胞接合双特异性抗体的开发中的主要缺点为由CD3接合产生的T细胞的过度刺激。此类接合可以导致细胞因子的过度的=释放(称为细胞激素风暴),其在患者中导致严重副作用。如实例中所示,在GD2×CD3 BsAb中采用HDD标签在不引起细胞激素释放中的任何显著差异的情况下(参见比较单体GD2×CD3和二聚GD2×CD3-HDD的表18和19)促进与GD2且不与CD3的结合(参见图2)。GD2×CD3和GD2×CD3-HDD抗体均展示比二价抗-CD3 IgG huOKT3少几倍的细胞激素释放。

[0255] 结合在一起,本发明的双特异性二聚物实体具有相比于其非二聚对应物增强的亲合力和杀死效率,且当与增加的血清半衰期一起时导致神经母细胞瘤的小鼠异种移植模型中的显著肿瘤减少。

[0256] 已如此描述本发明的至少一个实施例的若干方面,应了解,各种改变、修改和改进将易于为所属领域的技术人员显而易见。此类改变、修改和改进打算是本发明的一部分,并且打算在本发明的精神和范围内。因此,前述描述和图式仅作为实例且本发明通过后续权利要求书详细地描述。

[0257] 等效物

[0258] 在权利要求书中使用如“第一”、“第二”、“第三”等序数术语修饰权利要求要素本身不意味着一个权利要求要素超过另一要素或进行方法行为的时序的优先权、优先级或排序,而是仅用作区分具有某一名称的一个权利要求要素与具有相同名称的另一要素的标签(除使用序数术语外)以区分权利要求要素。

[0259] 如本文在说明书和权利要求中所使用的冠词“一(a/an)”除非明确相反指示,否则

应理解为包括多个指示物。除非相反地指示或另外从上下文显而易见,否则如果一个、一个以上或所有群组成员存在于、用于给定产物或方法中或另外与给定产物或方法有关,那么在群组的一或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述被视为满足。本发明包括群组中恰好一个成员存在于、使用于给定产品或方法中或另外与其有关的实施例。本发明也包括一个以上或全部群组成员存在于、使用于给定产品或方法中或另外与其有关的实施例。此外,应理解,除非另外指明或除非所属领域的一般技术人员将显而易见的是将产生矛盾或不一致,否则本发明涵盖所有变化形式、组合和排列,其中来自所列权利要求中的一或多个的一或多个限制、要素、条项、描述性用语等引入到另一依附于相同基本权利要求的权利要求(或相关地,任何其它权利要求)中。在要素作为清单(例如以马库西群组(Markush group)或类似形式)呈现时,应理解所述要素的各子组也被公开,且任何要素都可从群组中去除。应理解,一般来说,在本发明或本发明的方面被称为包含具体要素、特征等时,本发明的或本发明的方面的某些实施例由所述要素、特征等组成或主要由所述要素、特征等组成。出于简单性的目的,那些实施例并非在每一情况下以本文中如此多的措辞特定阐述。还应了解,本发明的任何实施例或方面可以从权利要求书明确排除,不管特定排除是否叙述于说明书中。本文中参考以描述发明背景和提供关于其实践的额外细节的出版物、网站和其它参考材料特此以引用的方式并入。

序列表

<110> 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

<120> 多聚化技术

<130> 2003080-0636

<150> 61/791,600

<151> 2013-03-15

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu
 1 5 10 15

[0001]

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu
 20 25 30

<210> 2

<211> 501

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Thr Thr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
130 135 140

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
145 150 155 160

Ile Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys
165 170 175

[0002]

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
180 185 190

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
195 200 205

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser
210 215 220

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
225 230 235 240

Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val
260 265 270

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
275 280 285

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
290 295 300

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
305 310 315 320

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
325 330 335

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

[0003]

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg
500

<210> 3
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 3

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

[0004] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
 115 120 125

Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys
 130 135 140

Lys Thr Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val Lys
 145 150 155 160

Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn
 165 170 175

Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
 180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu
195 200 205

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Thr Val
210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
225 230 235 240

Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val
260 265 270

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
275 280 285

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
290 295 300

[0005]

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
305 310 315 320

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
325 330 335

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg
500

<210> 4
<211> 501
<212> PRT
<213> 人工序列

[0006]

<220>
<223> 合成

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Thr Thr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
130 135 140

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
145 150 155 160

Ile Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys
165 170 175

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
180 185 190

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
195 200 205

[0007]

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser
210 215 220

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
225 230 235 240

Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val
260 265 270

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
275 280 285

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
290 295 300

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
305 310 315 320

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
325 330 335

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

[0008] Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg
500

<210> 5
<211> 501
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 5

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 [0009]
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
 115 120 125
 Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys
 130 135 140
 Lys Thr Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val Lys
 145 150 155 160
 Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn
 165 170 175
 Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu
 195 200 205
 Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Thr Thr Val
 210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 225 230 235 240
 Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val
 260 265 270
 Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 275 280 285
 Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 290 295 300
 Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
 305 310 315 320
 Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 325 330 335
 [0010] Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
 340 345 350
 Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
 355 360 365
 Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 370 375 380
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
 385 390 395 400
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 405 410 415
 Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
 420 425 430
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
 435 440 445
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr

	450	455	460
	Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr		
	465	470	475 480
	Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys		
		485	490 495
	Leu Gln Ile Thr Arg		
		500	
	<210> 6		
	<211> 491		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 6		
[0011]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
	1	5	10 15
	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Glu Tyr		
		20	25 30
	Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile		
		35	40 45
	Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe		
		50	55 60
	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
		65	70 75 80
	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
		85	90 95
	Ala Arg Asp Thr Thr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
		100	105 110
	Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln		
		115	120 125

	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	
	130						135					140					
	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Ile	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	
	145					150					155					160	
	Pro	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	
					165					170					175		
	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	
				180					185					190			
	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	
		195						200					205				
	Cys	His	Gln	Arg	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	
		210					215					220					
	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
	225					230					235					240	
[0012]	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	
					245					250					255		
	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	
				260					265					270			
	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	
		275						280					285				
	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	
		290					295					300					
	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	
	305					310					315					320	
	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Phe	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	
					325					330					335		
	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	
				340					345					350			
	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Pro	Val	Thr	Val	Ser	

	355	360	365
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser 370	Gly Gly Gly Gly Ser 375	Gly Gly Gly Gly Ser 380
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 385	390	395 400
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met 405	410	415
	Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr 420	425	430
	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser 435	440	445
	Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu 450	455	460
[0013]	Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr 465	470	475 480
	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg 485	490	
	<210> 7		
	<211> 491		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 7		
	Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly 1	5	10 15
	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met 20	25	30
	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr 35	40	45

	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
	50						55					60					
	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	
	65					70					75					80	
	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Arg	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	
					85					90					95		
	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
				100					105						110		
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
			115					120					125				
	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Lys	Phe	Thr	Glu	Tyr	
		130					135					140					
	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Cys	Leu	Glu	Trp	Ile	
	145					150					155					160	
[0014]	Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
					165					170					175		
	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
				180					185					190			
	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			195					200					205				
	Ala	Arg	Asp	Thr	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	
		210					215					220					
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
	225					230					235					240	
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	
					245					250					255		
	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	
				260					265					270			
	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	

	275	280	285	
	Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser 290 295 300			
	Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile 305 310 315 320			
	Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu 325 330 335			
	Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp 340 345 350			
	His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser 355 360 365			
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 370 375 380			
[0015]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 385 390 395 400			
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met 405 410 415			
	Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr 420 425 430			
	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser 435 440 445			
	Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu 450 455 460			
	Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr 465 470 475 480			
	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg 485 490			
	<210> 8			
	<211> 501			

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0016] Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Thr Thr Val Pro Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
130 135 140

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
145 150 155 160

Ile Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys
165 170 175

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
180 185 190

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser

	195	200	205	
	Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser 210 215 220			
	Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala 225 230 235 240			
	Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 245 250 255			
	Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val 260 265 270			
	Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr 275 280 285			
	Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly 290 295 300			
[0017]	Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr 305 310 315 320			
	Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys 325 330 335			
	Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly 340 345 350			
	Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr 355 360 365			
	Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser 370 375 380			
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln 385 390 395 400			
	Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr 405 410 415			
	Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr 420 425 430			

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg
500

<210> 9
<211> 501
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

[0018]

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Gln Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Thr Thr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

	100	105	110
	Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 115 120 125		
	Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser 130 135 140		
	Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser 145 150 155 160		
	Ile Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys 165 170 175		
	Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg 180 185 190		
	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser 195 200 205		
[0019]	Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser 210 215 220		
	Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala 225 230 235 240		
	Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 245 250 255		
	Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val 260 265 270		
	Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr 275 280 285		
	Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly 290 295 300		
	Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr 305 310 315 320		
	Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys 325 330 335		

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

[0020]

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg
500

<210> 10

<211> 550

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 10

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

	1			5					10					15		
	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Lys	Phe	Thr	Glu	Tyr
				20					25					30		
	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Cys	Leu	Glu	Trp	Ile
			35					40					45			
	Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
		50					55					60				
	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Arg	Asp	Thr	Thr	Val	Pro	Tyr	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
[0021]			115					120					125			
	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser
		130					135					140				
	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser
	145					150					155					160
	Ile	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys
					165					170					175	
	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg
				180					185					190		
	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser
			195					200					205			
	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Arg	Ser	Ser
		210					215					220				
	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala
	225					230					235					240

Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val
260 265 270

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
275 280 285

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
290 295 300

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
305 310 315 320

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
325 330 335

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

[0022]

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly
500 505 510

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu
515 520 525

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu
530 535 540

Gly Ser Gly Gly Ala Pro
545 550

<210> 11
<211> 550
<212> PRT
<213> 人工序列

[0023]

<220>
<223> 合成

<400> 11

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly
85 90 95

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

[0024]

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
225 230 235 240

Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val
260 265 270

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
275 280 285

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
290 295 300

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
305 310 315 320

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
325 330 335

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

[0025]

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly
500 505 510

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu
515 520 525

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu
530 535 540

Gly Ser Gly Gly Ala Pro
545 550

<210> 12
<211> 550
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 12

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

[0026] Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly
85 90 95

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
225 230 235 240

Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val
260 265 270

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
275 280 285

[0027]

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
290 295 300

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
305 310 315 320

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
325 330 335

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly
500 505 510

[0028]

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu
515 520 525

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu
530 535 540

Gly Ser Gly Gly Ala Pro
545 550

<210> 13
<211> 550
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 13

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly
85 90 95

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val
130 135 140

[0029]

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
225 230 235 240

Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	
				260					265					270			
	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	
			275					280					285				
	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	
		290					295					300					
	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	
	305					310					315					320	
	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	
					325					330					335		
	Asn	Thr	Ala	Phe	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Gly	
				340					345					350			
	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	
			355					360					365				
[0030]	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
		370					375					380					
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	
	385					390					395					400	
	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	
					405					410					415		
	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Thr	
				420					425					430			
	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	
			435					440					445				
	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	
		450					455					460					
	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	
	465					470					475				480		
	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	

	485	490	495
	Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly 500 505 510		
	Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu 515 520 525		
	Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu 530 535 540		
	Gly Ser Gly Gly Ala Pro 545 550		
	<210> 14 <211> 550 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 合成		
[0031]	<400> 14		
	Lys Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Ala Gly 1 5 10 15		
	Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His 20 25 30		
	Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile 35 40 45		
	Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly 50 55 60		
	Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser 65 70 75 80		
	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly 85 90 95		
	Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 100 105 110		

	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	
			115					120					125				
	Pro	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Ala	Val	
		130					135					140					
	Ser	Gly	Phe	Ser	Val	Thr	Asn	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	
	145					150					155					160	
	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Ile	Gly	Ile	
					165					170					175		
	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Phe	Met	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	
				180					185					190			
	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	
			195					200					205				
	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Arg	Gly	Gly	His	Tyr	Gly	Tyr	
	210						215					220					
[0032]	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	
	225					230					235					240	
	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
					245					250					255		
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	
				260					265					270			
	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	
			275					280					285				
	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	
	290						295					300					
	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	
	305					310					315					320	
	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	
					325					330					335		
	Asn	Thr	Ala	Phe	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Gly	

	340	345	350
	Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr 355 360 365		
	Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser 370 375 380		
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln 385 390 395 400		
	Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr 405 410 415		
	Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr 420 425 430		
	Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala 435 440 445		
[0033]	Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr 450 455 460		
	Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr 465 470 475 480		
	Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys 485 490 495		
	Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly 500 505 510		
	Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu 515 520 525		
	Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu 530 535 540		
	Gly Ser Gly Gly Ala Pro 545 550		
	<210> 15 <211> 550		

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 15

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

[0034] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly
85 90 95

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

	195	200	205	
	Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 210	Cys Ala Ser Arg Gly 215	Gly His Tyr Gly Tyr 220	
	Ala Leu Asp Tyr Trp 225	Gly Gln Gly Thr Leu 230	Val Thr Val Ser Ser 235	Ala 240
	Ser Thr Lys Gly 245	Pro Gly Gly Gly Gly 250	Ser Gly Gly Gly Gly 255	Ser Gly
	Gly Gly Gly Ser 260	Gln Val Gln Leu Val 265	Gln Ser Gly Gly Gly 270	Val Val
	Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg 275	Leu Ser Cys Lys Ala 280	Ser Gly Tyr Thr 285	
	Phe Thr Arg Tyr Thr Met 290	His Trp Val Arg Gln 295	Ala Pro Gly Lys Gly 300	
[0035]	Leu Glu Trp Ile Gly Tyr 305	Ile Asn Pro Ser Arg 310	Gly Tyr Thr Asn Tyr 315	320
	Asn Gln Lys Phe 325	Lys Asp Arg Phe Thr 330	Ile Ser Arg Asp Asn 335	Ser Lys
	Asn Thr Ala Phe 340	Leu Gln Met Asp Ser 345	Leu Arg Pro Glu Asp 350	Thr Gly
	Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr 355	Tyr Asp Asp His Tyr 360	Cys Leu Asp Tyr 365	
	Trp Gly Gln Gly Thr Pro 370	Val Thr Val Ser Ser 375	Gly Gly Gly Gly Ser 380	
	Gly Gly Gly Gly Ser 385	Gly Gly Gly Gly Ser 390	Asp Ile Gln Met Thr 395	Gln 400
	Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val 405	Gly Asp Arg Val Thr 410	Ile Thr 415	
	Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser 420	Tyr Met Asn Trp Tyr 425	Gln Gln Thr 430	

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly
500 505 510

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu
515 520 525

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu
530 535 540

[0036]

Gly Ser Gly Gly Ala Pro
545 550

<210> 16
<211> 550
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 16

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

	50	55	60	
	Ser Gly Tyr Gly Thr	Glu Phe Thr Phe Thr	Ile Ser Ser Val Gln Ser	65 70 75 80
	Glu Asp Phe Ala Val	Tyr Phe Cys Gln Gln	Asp Tyr Ser Ser Phe Gly	85 90 95
	Gln Gly Thr Lys	Leu Glu Ile Lys Arg	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	100 105 110
	Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Ser Gln	Val Gln Leu Val Glu Ser Gly	115 120 125
	Pro Gly Val Val	Gln Pro Gly Arg Ser	Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val	130 135 140
	Ser Gly Phe Ser Val	Thr Asn Tyr Gly Val	His Trp Val Arg Gln Pro	145 150 155 160
[0037]	Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Leu Gly	Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile	165 170 175
	Thr Asn Tyr Asn	Ser Ser Val Lys Gly	Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp	180 185 190
	Asn Ser Lys Asn	Thr Val Tyr Leu Gln	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu	195 200 205
	Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys Ala Ser	Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr	210 215 220
	Ala Leu Asp Tyr	Trp Gly Gln Gly Thr	Leu Val Thr Val Ser Ser Ala	225 230 235 240
	Ser Thr Lys Gly	Pro Gly Gly Gly Gly	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	245 250 255
	Gly Gly Gly Ser	Gln Val Gln Leu Val	Gln Ser Gly Gly Gly Val Val	260 265 270
	Gln Pro Gly Arg	Ser Leu Arg Leu Ser	Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr	275 280 285

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
290 295 300

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
305 310 315 320

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
325 330 335

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

[0038]

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly
500 505 510

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu
515 520 525

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu
530 535 540

Gly Ser Gly Gly Ala Pro
545 550

<210> 17
<211> 550
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 17

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

[0039] Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly
85 90 95

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
225 230 235 240

Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

[0040]

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val
260 265 270

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
275 280 285

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
290 295 300

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
305 310 315 320

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
325 330 335

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

[0041]

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly
500 505 510

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu
515 520 525

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu
530 535 540

Gly Ser Gly Gly Ala Pro
545 550

<210> 18
<211> 550
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 18

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly
85 90 95

[0042]

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile
165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
225 230 235 240

Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val
260 265 270

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
275 280 285

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
290 295 300

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
305 310 315 320

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
325 330 335

[0043]

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly
500 505 510

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu
515 520 525

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu
530 535 540

Gly Ser Gly Gly Ala Pro
545 550

[0044]

<210> 19
<211> 553
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 19

Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser His Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Ala Ser Ser
130 135 140

Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser
145 150 155 160

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
165 170 175

Thr Val Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn Leu His Ser Gly Val
180 185 190

[0045]

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
195 200 205

Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln
210 215 220

Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
225 230 235 240

Lys Arg Ala Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly
260 265 270

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser
275 280 285

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
290 295 300

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
 305 310 315 320
 Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 325 330 335
 Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu
 340 345 350
 Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys
 355 360 365
 Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 370 375 380
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
 385 390 395 400
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 405 410 415
 [0046] Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
 420 425 430
 Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
 435 440 445
 Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 450 455 460
 Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala
 465 470 475 480
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln
 485 490 495
 Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His
 500 505 510
 Thr Ser Gly Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu
 515 520 525
 Ala Ala Leu Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala

	530	535	540
	Leu Gly Glu Gly Ser Gly Gly Ala Pro 545	550	
	<210> 20		
	<211> 550		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成		
	<400> 20		
	Glu Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Ala Gly 1	5	10 15
	Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His 20	25	30
	Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile 35	40	45
[0047]	Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly 50	55	60
	Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser 65	70	75 80
	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly 85	90	95
	Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 100	105	110
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 115	120	125
	Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Val 130	135	140
	Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro 145	150	155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile
 165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
 180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 195 200 205

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
 210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 225 230 235 240

Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val
 260 265 270

[0048] Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 275 280 285

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 290 295 300

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
 305 310 315 320

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 325 330 335

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
 340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
 355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln

	385				390					395					400	
	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr
					405					410					415	
	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Thr
				420					425					430		
	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala
			435					440					445			
	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr
	450						455					460				
	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr
	465					470					475					480
	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
					485					490					495	
[0049]	Leu	Gln	Ile	Thr	Arg	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Ser	Gly
				500					505					510		
	Met	Val	Ser	Lys	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	Thr	Glu	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu
			515					520					525			
	Leu	Glu	Ser	Gly	Leu	Ser	Lys	Glu	Ala	Leu	Ile	Gln	Ala	Leu	Gly	Glu
	530						535					540				
	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro										
	545					550										
	<210>	21														
	<211>	550														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	合成														
	<400>	21														
	Lys	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Ala	Gly
	1				5					10					15	

	Glu	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asp	
				20					25					30			
	Val	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
	Tyr	Ser	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	
		50					55					60					
	Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ser	
	65					70					75					80	
	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Ser	Ser	Phe	Gly	
					85					90					95		
	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
				100					105					110			
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	
			115					120					125				
[0050]	Pro	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Ala	Val	
		130					135					140					
	Ser	Gly	Phe	Ser	Val	Thr	Asn	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	
	145					150					155					160	
	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Ile	Gly	Ile	
					165					170					175		
	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Phe	Met	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	
				180					185					190			
	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	
			195					200					205				
	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Arg	Gly	Gly	His	Tyr	Gly	Tyr	
		210					215					220					
	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	
	225					230					235					240	
	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	

	245	250	255
	Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val 260 265 270		
	Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr 275 280 285		
	Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly 290 295 300		
	Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr 305 310 315 320		
	Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys 325 330 335		
	Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly 340 345 350		
[0051]	Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr 355 360 365		
	Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser 370 375 380		
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln 385 390 395 400		
	Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr 405 410 415		
	Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr 420 425 430		
	Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala 435 440 445		
	Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr 450 455 460		
	Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr 465 470 475 480		

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly
500 505 510

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu
515 520 525

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu
530 535 540

Gly Ser Gly Gly Ala Pro
545 550

<210> 22
<211> 550
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

[0052]

<400> 22

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn His
20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly
85 90 95

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

	100	105	110
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 115 120 125		
	Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val 130 135 140		
	Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro 145 150 155 160		
	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile 165 170 175		
	Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp 180 185 190		
	Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu 195 200 205		
[0053]	Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr 210 215 220		
	Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala 225 230 235 240		
	Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 245 250 255		
	Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val 260 265 270		
	Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr 275 280 285		
	Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly 290 295 300		
	Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr 305 310 315 320		
	Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys 325 330 335		

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

[0054]

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly
500 505 510

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu
515 520 525

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu
530 535 540

Gly Ser Gly Gly Ala Pro
545 550

<210> 23
 <211> 550
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 23

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

[0055]

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Phe Gly
 85 90 95

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 115 120 125

Pro Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val
 130 135 140

Ser Gly Phe Ser Val Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro
 145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ile Gly Ile
 165 170 175

Thr Asn Tyr Asn Ser Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
 180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Gly His Tyr Gly Tyr
210 215 220

Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
225 230 235 240

Ser Thr Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val
260 265 270

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
275 280 285

Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
290 295 300

[0056]

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr
305 310 315 320

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
325 330 335

Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly
340 345 350

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
355 360 365

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr
420 425 430

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
435 440 445

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
450 455 460

Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Gln Ile Thr Arg Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Ser Gly
500 505 510

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu
515 520 525

[0057]

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu
530 535 540

Gly Ser Gly Gly Ala Pro
545 550

<210> 24
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 24

Gly Glu Leu Glu Glu Leu Leu Lys His Leu Lys Glu Leu Leu Lys Gly
1 5 10 15

Pro Arg Lys Gly Glu Leu Glu Glu Leu Leu Lys His Leu Lys Glu Leu
20 25 30

Leu Lys

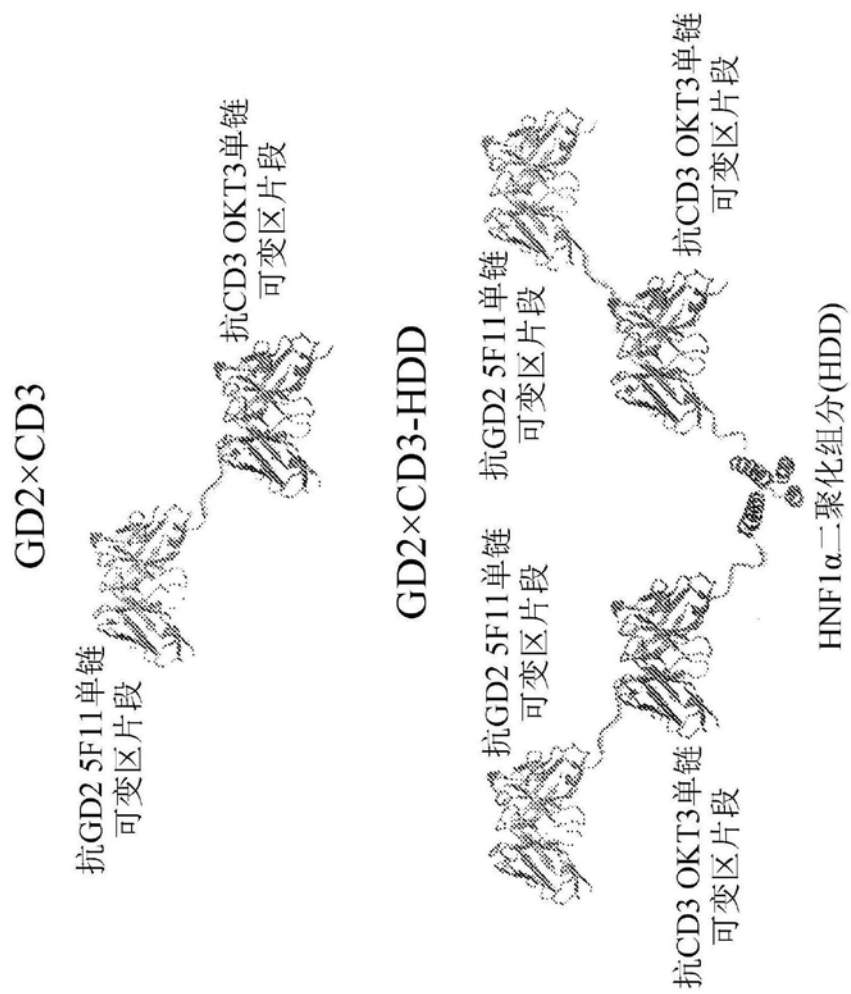


图1

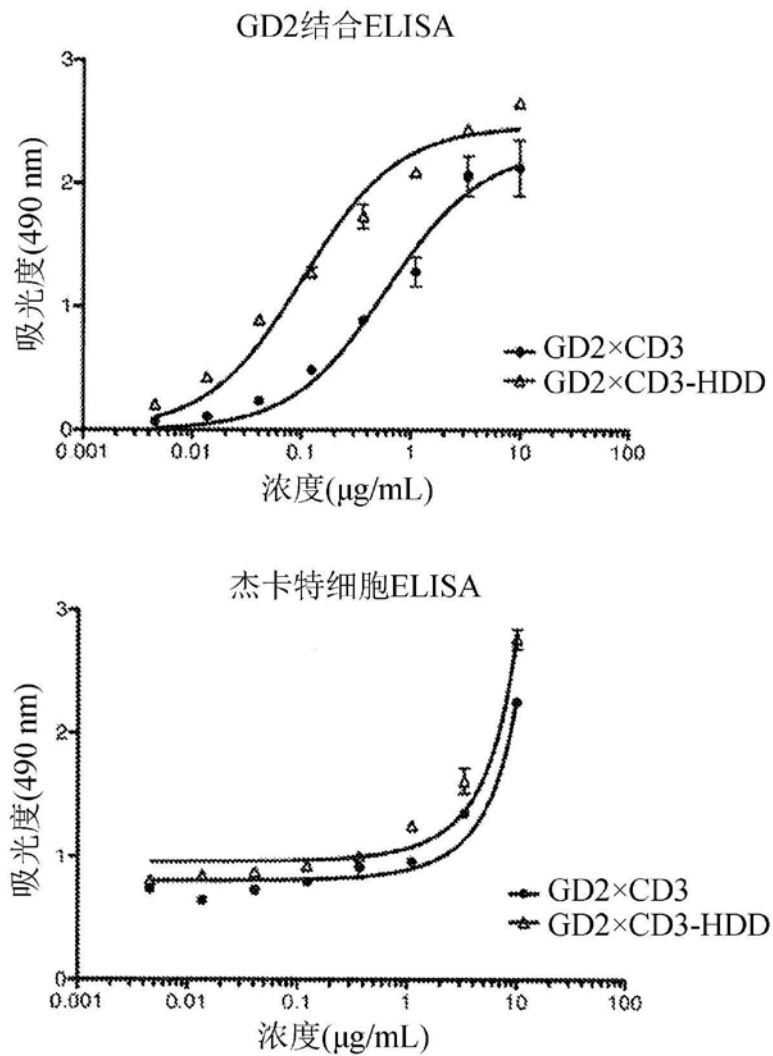


图2A

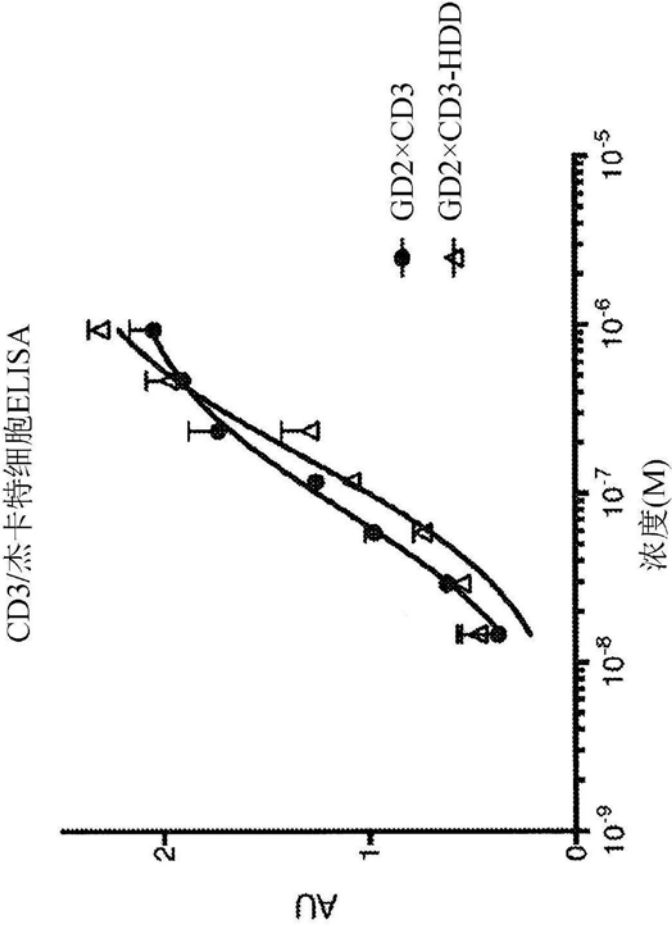


图2B

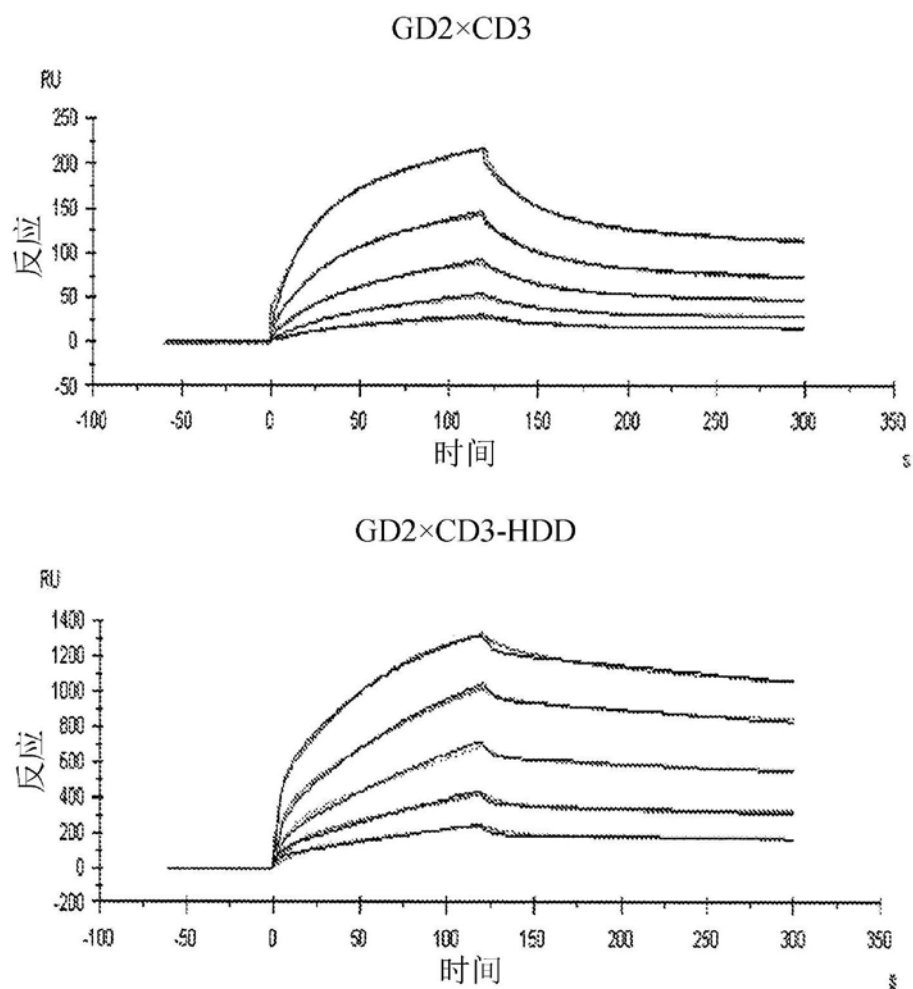


图3A

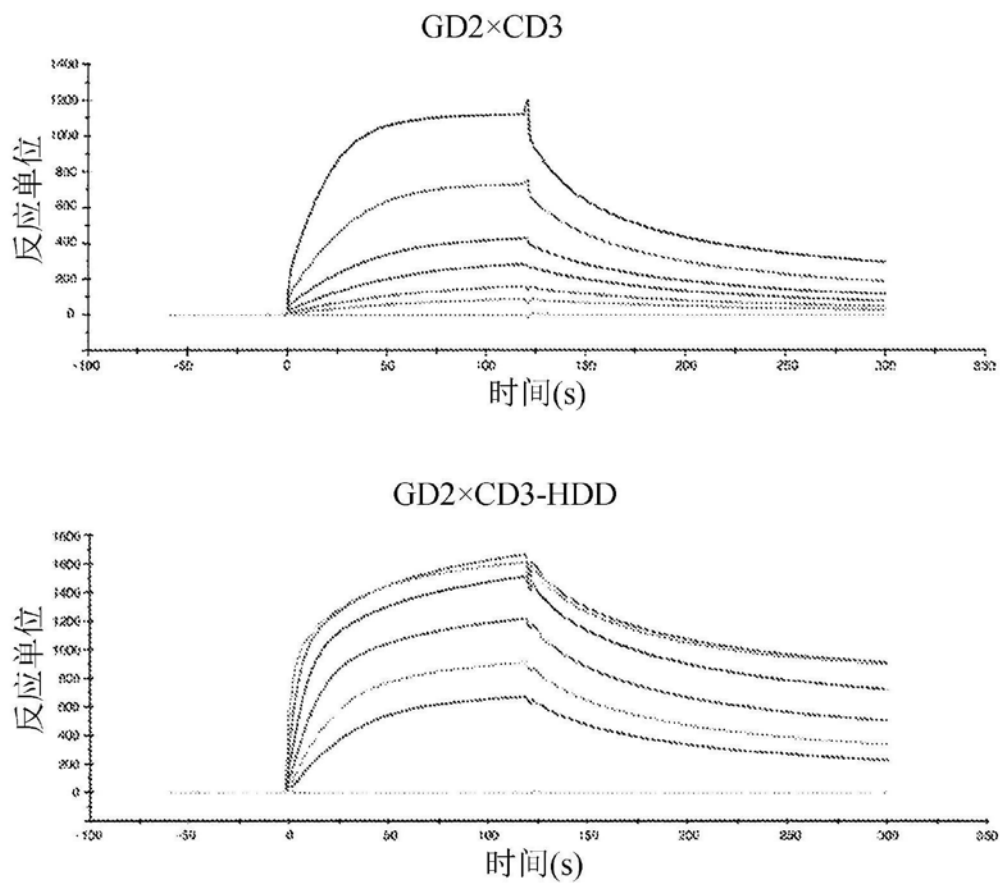


图3B

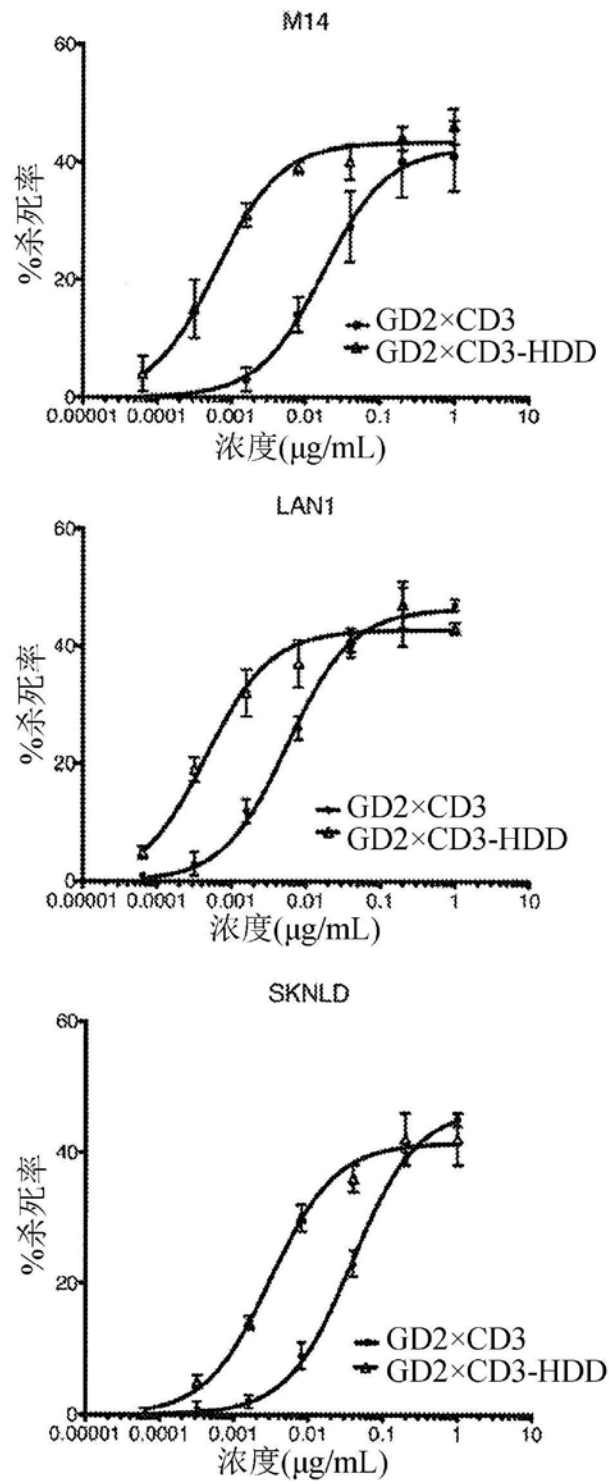


图4

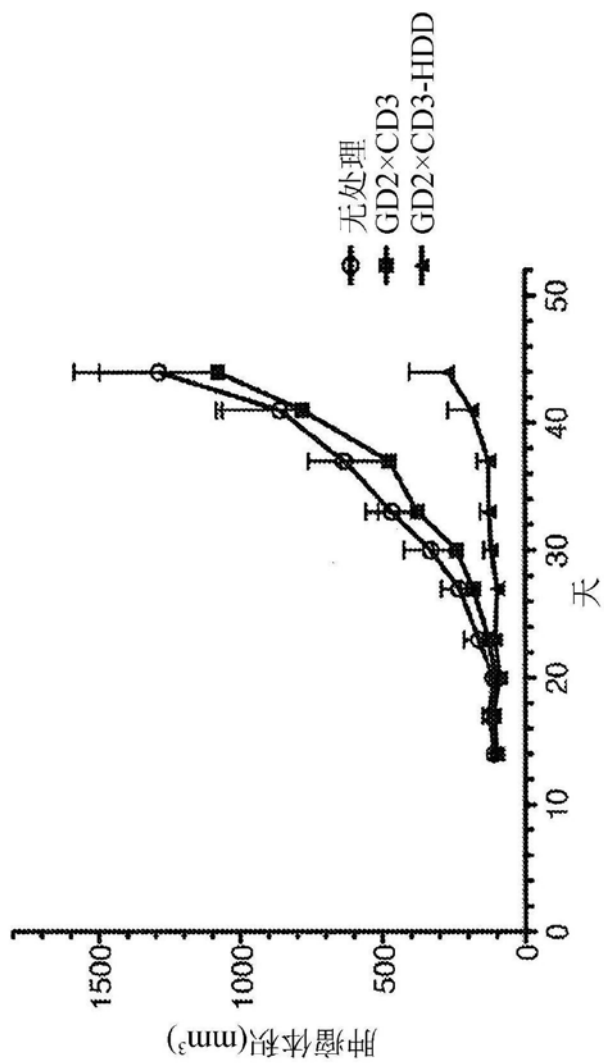


图5

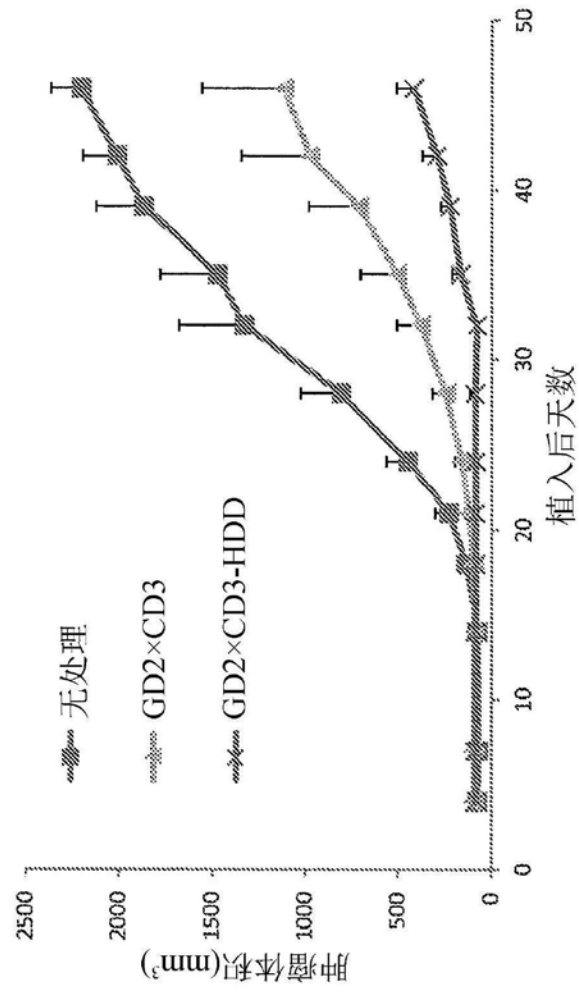


图6

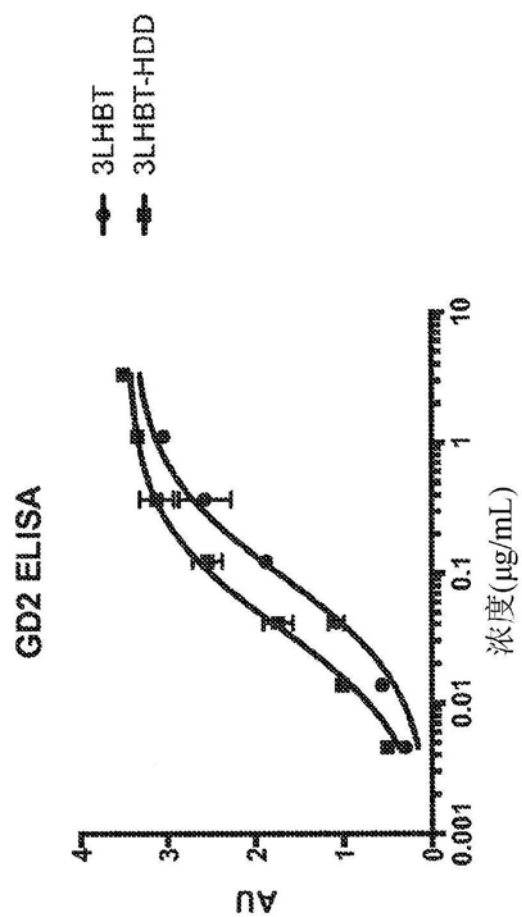


图7

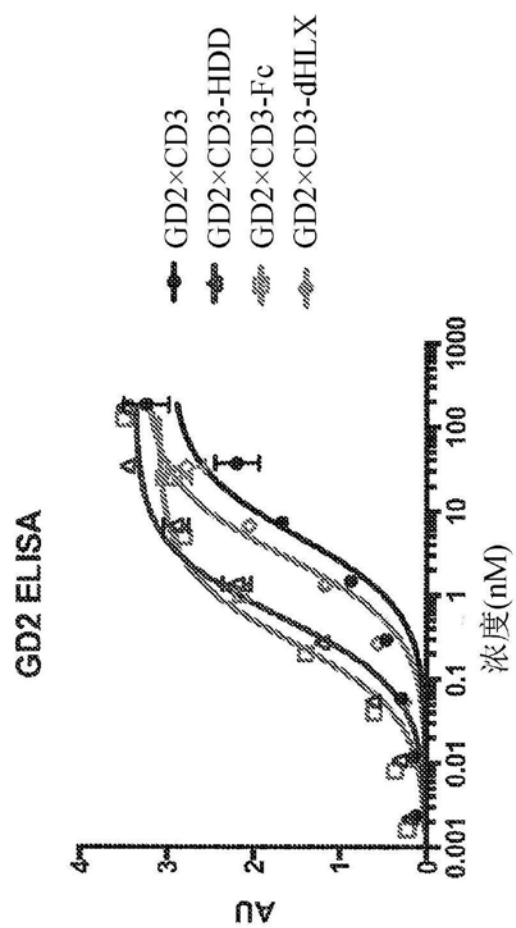


图8

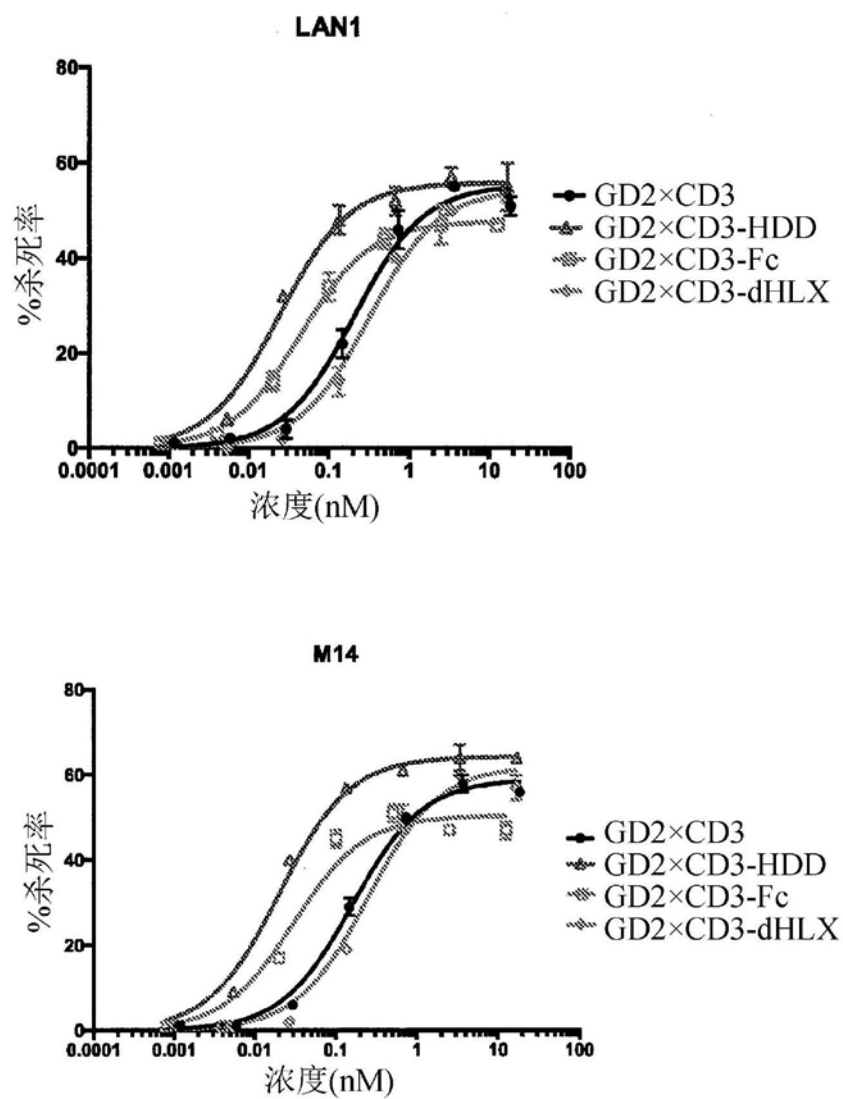


图9