



(45)授权公告日 2019.08.30

代理人 谢梦欣

C07K 16/28(2006.01)

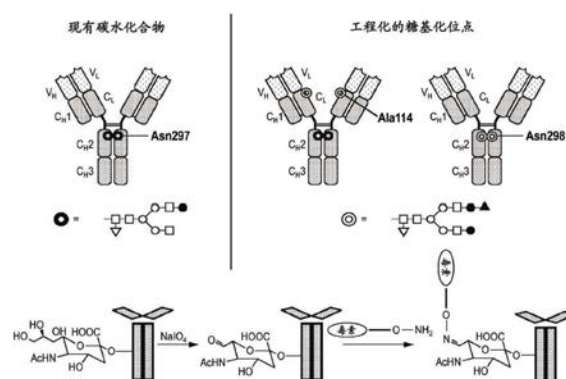
CN 1867583 A, 2006.11.22,

W02014/043361 EN 2014.03.20

序列表69页 附图41页

(57)摘要

提供了结合多肽(例如,抗体)及其药物偶联物,其包含具有改变的糖基化概貌和降低的效应物功能的Fc结构域。在具体的实施方案中,所述Fc结构域包含:根据EU编号在氨基酸位点298的天冬酰胺残基;和根据EU编号在氨基酸位点300的丝氨酸或苏氨酸残基。还提供了编码抗原结合多肽的核酸、用于制造这种抗原-结合多肽的重组表达载体和宿主细胞。还提供了使用本文公开的抗原-结合多肽来治疗疾病的方法。



1. 一种分离的结合多肽,其包含具有改变的糖基化的人IgG Fc结构域,其中所述Fc结构域包含:根据EU编号在氨基酸位点298的糖基化的天冬酰胺残基;和根据EU编号在氨基酸位点300的丝氨酸或苏氨酸,且其中由于所述改变的糖基化,所述结合多肽与具有天然Fc结构域的结合多肽相比具有较低的对于Fc γ 受体的亲和力。

2. 权利要求1的结合多肽,其中满足下列条件中的一种或多种:

所述结合多肽进一步包含根据EU编号在氨基酸位点299的丙氨酸残基;和

所述结合多肽进一步包含根据EU编号在氨基酸位点297的谷氨酰胺残基。

3. 权利要求1的结合多肽,其中所述天冬酰胺残基的侧链与聚糖通过 β -糖基酰胺连接基连接。

4. 权利要求3的结合多肽,其中所述聚糖包含具有反应性的醛基;或所述Fc γ 受体是Fc γ RI和/或Fc γ RIIIa。

5. 权利要求3的结合多肽,其中满足下列条件中的一种或多种:

a) 所述聚糖是双触角聚糖;

b) 所述聚糖是天然存在的哺乳动物糖形;和

c) 所述Fc γ 受体是Fc γ RI和/或Fc γ RIIIa。

6. 权利要求3的结合多肽,其中所述聚糖包含氧化的糖类残基,所述氧化的糖类残基包含具有反应性的醛基,和/或所述聚糖与效应物部分连接。

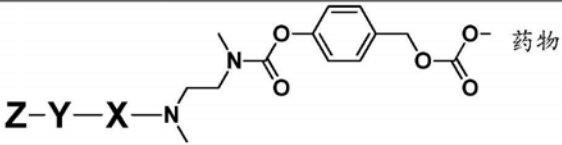
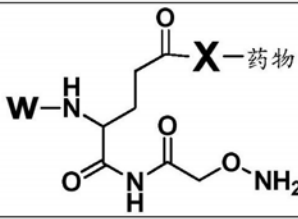
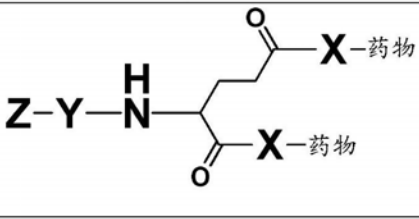
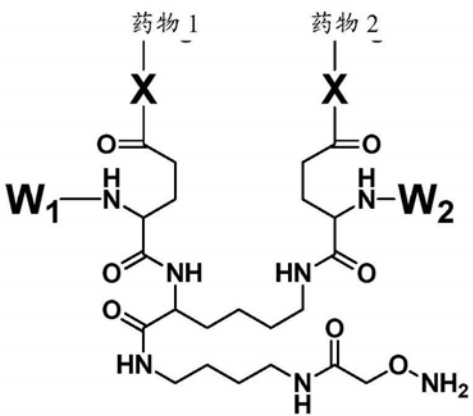
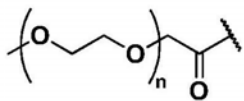
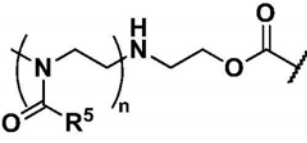
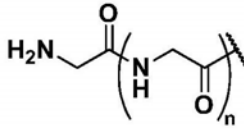
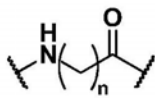
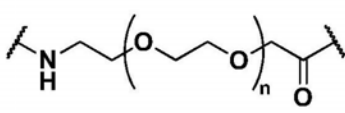
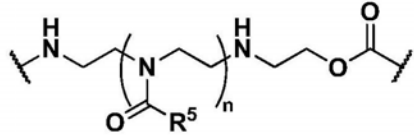
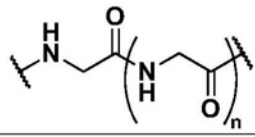
7. 权利要求6的结合多肽,其中满足下列条件中的一种或多种:

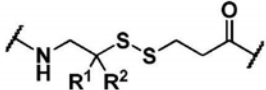
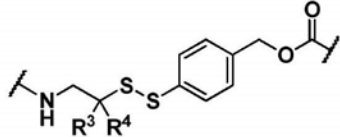
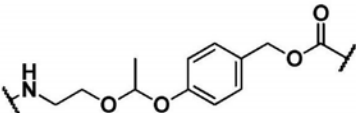
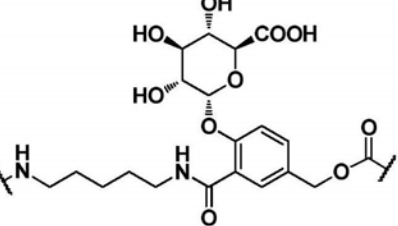
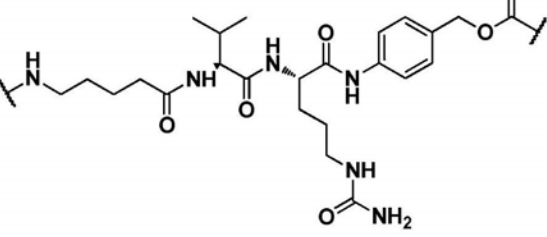
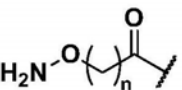
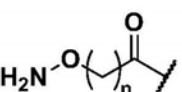
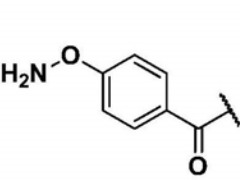
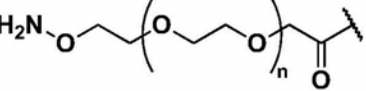
a) 所述氧化的糖类残基是末端唾液酸或半乳糖;

b) 所述效应物部分是检测剂;和

c) 所述效应物部分包括pH-敏感的接头、二硫化物接头、酶-敏感的接头或其它可裂解的接头部分。

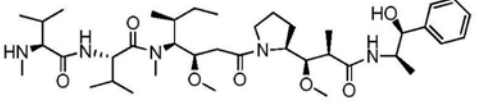
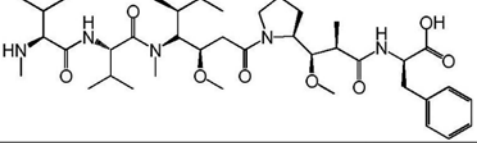
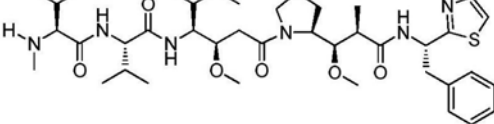
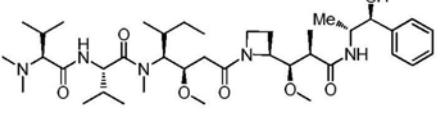
8. 权利要求6的结合多肽,其中所述效应物部分包括选自如下描述的接头部分的组的接头部分:

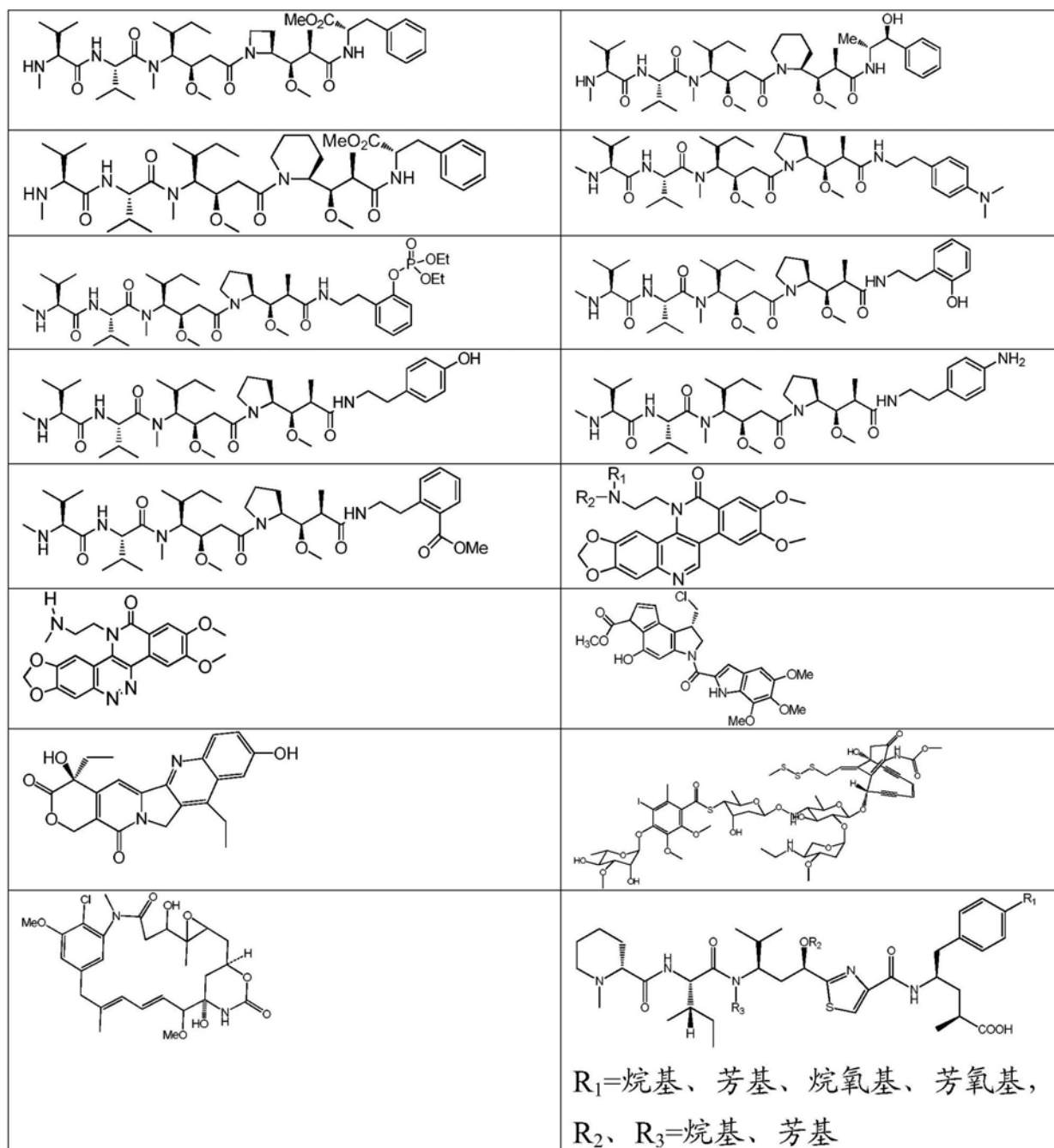
Z-Y-X-药物	
	
	<p>W、W1 和 W2=</p>   
	<p>Y =</p>    

X =	Z =
     <p>$R^{1-5} = H$、烷基或芳基</p>	   

9. 权利要求6的结合多肽,其中所述效应物部分是细胞毒素。

10. 权利要求9的结合多肽,其中所述细胞毒素选自如下的细胞毒素组:



16. 权利要求15的结合多肽,其中所述效应物部分与聚糖的糖类残基通过肟或腙连接基连接。

17. 权利要求15的结合多肽,其中所述糖类残基是聚糖的末端唾液酸或半乳糖残基。

18. 权利要求15的结合多肽,其中所述修饰的天冬酰胺残基与药物效应物部分连接以形成抗体药物偶联物(ADC)。

19. 权利要求13的结合多肽,其中所述免疫粘附素包含非抗体结合区。

20. 权利要求19的结合多肽,其中所述非抗体结合区是受体。

21. 权利要求19的结合多肽,其中所述非抗体结合区是受体的配体。

22. 权利要求14的结合多肽,其中所述结合多肽包含至少一个结合位点,所述结合位点是受体的配体结合位点。

23. 权利要求14的结合多肽,其中所述结合多肽包含至少一个结合位点,所述结合位点是配体的受体结合位点。

24. 权利要求1的分离的结合多肽,其中所述Fc结构域进一步包含:根据EU编号在氨基酸位点297的天冬酰胺残基;和在位点299的氨基酸,其中所述在位点299的氨基酸不是脯氨酸。

25. 权利要求1的分离的结合多肽,其中所述Fc结构域进一步包含:根据EU编号在氨基酸位点297的谷氨酰胺残基;和在位点299的氨基酸,其中所述在位点299的氨基酸不是脯氨酸。

26. 权利要求1的分离的结合多肽,其中所述Fc结构域进一步包含:根据EU编号在氨基酸位点297的天冬酰胺残基;和根据EU编号在位点299的丙氨酸残基。

27. 权利要求1的分离的结合多肽,其包含人IgG4Fc结构域,其中所述Fc结构域进一步包含根据EU编号在位点299的丙氨酸残基。

28. 权利要求27的分离的结合多肽,其中所述Fc结构域包含具有Ser228Pro突变(Eu编号)的铰链区。

29. 一种组合物,其包含在先权利要求任一项的结合多肽和药学上可接受的载剂或赋形剂。

30. 有效量的权利要求29的组合物在制备药物中的用途。

31. 一种分离的多核苷酸,其编码权利要求1-28任一项的结合多肽,其中所述结合多肽包含人IgG1Fc结构域。

32. 一种载体,其包含权利要求31的多核苷酸。

33. 一种宿主细胞,其包含权利要求31的多核苷酸或权利要求32的载体。

34. 一种制造结合多肽的方法,其包括在细胞中表达权利要求31的多核苷酸或权利要求32的载体。

具有改变的糖基化和降低的效应物功能的包含Fc的多肽

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求保护2012年9月12日提交的国际申请号为PCT/EP2012/003819, 名称为“抗 α BTCTCR抗体”的申请和2013年3月11日提交的美国临时申请61/776,715, 名称为“具有改变的糖基化和降低的效应物功能的包含Fc的多肽”的申请的优先权。

[0003] 本申请还与2013年3月11日提交的名称为“通过糖基工程化的位点特异性抗体药物偶联”的美国临时申请61/776,724、2013年3月11日提交的名称为“高度糖基化的结合多肽”的美国临时申请61/776,710相关。前文提到的申请的内容在本文通过提述以其全文并入。

[0004] 发明背景

[0005] 具有降低或消除的Fc糖基化的抗体已被用于炎症和自身免疫性疾病或病症的治疗以降低与不需要的效应物功能相关的副作用或毒性(参见例如, Chan and Carter, Nat.Reviews Immunology, 2010)。但是, 抗体Fc结构域糖基化对于抗体结构、稳定性和功能至关重要且糖基化可导致抗体具有较差的生物物理特性。相应地, 本领域对具有降低的效应物功能但仍保留理想的糖基化的Fc结构域特性的工程化的结合蛋白存在着需求。

[0006] 发明概述

[0007] 本公开通过提供包含具有改变的糖基化和降低的效应物功能的Fc结构域的结合多肽(例如, 抗体或融合物)和任选的其药物偶联物改进了现有技术。在具体的实施方案中, 所述Fc结构域包含: 根据EU编号在氨基酸位点298的天冬酰胺残基; 和根据EU编号在氨基酸位点300的丝氨酸或苏氨酸残基。本公开还提供编码抗原-结合多肽的核酸、用于制造这种抗原-结合多肽的重组表达载体和宿主细胞。还提供使用本文公开的抗原-结合多肽来治疗疾病的方法。

[0008] 发明人还惊讶地发现本公开的结合多肽(例如, 抗体)展示改变的糖基化概貌, 其优势在于消除了结合多肽与Fc γ 受体的结合, 进而改变结合多肽的效应物功能, 同时保留糖基化赋予的理想的生物物理特性。此外, 在氨基酸位点298的工程化的N-连接糖基化位点也可用于作用于效应物部分偶联的位点(如细胞毒性药物)。

[0009] 相应地, 一方面本发明提供分离的结合多肽, 其包含具有改变的糖基化的Fc结构域, 其中所述Fc结构域包含: 根据EU编号在氨基酸位点298的天冬酰胺残基; 以及根据EU编号在氨基酸位点300的丝氨酸或苏氨酸, 且其中所述结合多肽由于所述改变的糖基化展示降低的效应物功能。在一个实施方案中, 所述结合多肽在根据EU编号的氨基酸位点299进一步包含丙氨酸残基。在另一实施方案中, 所述结合多肽在根据EU编号的氨基酸位点297进一步包含谷氨酰胺残基。在一个实施方案中, 所述Fc结构域是IgG1Fc结构域。在另一实施方案中, 所述Fc结构域是人的。

[0010] 在一个实施方案中, 所述天冬酰胺残基的侧链与聚糖通过 β -糖基酰胺连接基连接。在另一实施方案中, 所述聚糖是双触角聚糖。在另一实施方案中, 所述糖是天然存在的哺乳动物糖形。

[0011] 在另一实施方案中, 所述结合多肽与具有天然Fc结构域的结合多肽相比具有对于

Fc γ 受体较低的亲和力。在一个实施方案中,所述Fc γ 受体是Fc γ RI和/或Fc γ RIIIa。在另一实施方案中,所述结合多肽具有与具有天然Fc结构域的结合多肽对于FcRn受体相似的亲和力。

[0012] 在另一实施方案中,所述聚糖包含具有反应性的醛基。在另一实施方案中,所述聚糖包括包含具有反应性的醛基的氧化的糖类残基。在另一实施方案中,所述氧化的糖类残基是末端唾液酸或半乳糖。

[0013] 在另一实施方案中,所述聚糖与效应物部分连接。在另一实施方案中,所述效应物部分是细胞毒素。在另一实施方案中,所述细胞毒素选自列于表1的细胞毒素组。在另一实施方案中,所述效应物部分是检测剂。在另一实施方案中,所述效应物部分与聚糖的糖类残基通过脞或脞连接基连接。在另一实施方案中,所述糖类残基是聚糖的末端唾液酸或半乳糖残基。在另一实施方案中,所述效应物部分包括pH-敏感的接头、二硫化物接头、酶-敏感的接头或其它可裂解的接头部分。在另一实施方案中,所述效应物部分包括选自表2或14中描述的接头部分的组的接头部分。

[0014] 在一些实施方案中,所述结合多肽是抗体或免疫粘附素。

[0015] 另一方面,本发明提供了分离的结合多肽,其包含Fc结构域,其中所述Fc结构域包含:根据EU编号在氨基酸位点298的游离的天冬酰胺残基;和根据EU编号在氨基酸位点300的游离的丝氨酸或苏氨酸残基。

[0016] 另一发面,本发明提供了分离的结合多肽,其包含Fc结构,其中所述Fc结构域包含:根据EU编号在氨基酸位点298的修饰的天冬酰胺残基;和根据EU编号在氨基酸位点300的游离的丝氨酸或苏氨酸残基。

[0017] 在另一实施方案中,所述效应物部分与聚糖的糖类残基通过修饰的天冬酰胺残基的侧链连接。在一个实施方案中,所述糖类是聚糖的末端唾液酸或半乳糖残基。在一个实施方案中,所述效应物部分与聚糖的糖类残基通过脞或脞连接基连接。在一个实施方案中,所述糖类是聚糖的末端唾液酸或半乳糖残基。在另一实施方案中,所述修饰的天冬酰胺残基与药物效应物部分连接以形成抗体药物偶联物(ADC)。

[0018] 在另一实施方案中,组合物包含在先权利要求任一项的结合多肽和药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0019] 在另一实施方案中,本发明提供治疗患者的方法,包括施用有效量的本发明的组合物。

[0020] 另一方面,本发明提供编码本发明的结合多肽的分离的多核苷酸。另一发面,本发明提供包含所述多核苷酸的载体或包含所述多核苷酸或载体的宿主细胞。

[0021] 又另一方面,本发明提供了一种制造结合多肽的方法,其包括在细胞中表达所述多核苷酸或所述载体。

[0022] 附图简述

[0023] 图1是抗体药物偶联物合成的简要说明,其中毒素部分与抗体聚糖的氧化唾液酸残基使用脞连接基相连。

[0024] 图2是展示糖基化突变体的表达和纯化的考马斯蓝染色凝胶。

[0025] 图3描绘表面等离子体共振实验的结果,用以评估 α BTCTR HEBE1 IgG抗体突变体与重组人Fc γ RIIIa的结合(V158&F158)。

[0026] 图4描绘表面等离子体共振实验的结果,用以评估 α BTCTR HEBE1 IgG抗体突变体与重组人Fc γ RI的结合。

[0027] 图5描绘在突变抗 α BTCTR抗体存在下来自PBMC的关于TNFa、GM-CSF、IFN γ 和IL10的细胞因子释放概貌(第2天)。

[0028] 图6描绘在突变抗 α BTCTR抗体存在下来自PBMC的关于IL6、IL4和IL2的细胞因子释放概貌(第2天)。

[0029] 图7描绘在突变抗 α BTCTR抗体存在下来自PBMC的关于TNFa、GM-CSF、IFN γ 和IL10的细胞因子释放概貌(第4天)。

[0030] 图8描绘在突变抗 α BTCTR抗体存在下来自PBMC的关于IL6、IL4和IL2的细胞因子释放概貌(第4天)。

[0031] 图9描绘通过免疫印迹分析和表面等离子体共振研究2C3突变体表达水平的实验结果。

[0032] 图10描绘PNGase F治疗之前和之后对2C3突变体糖基化进行研究的实验结果。

[0033] 图11描绘对分离自细胞培养的2C3突变体上的糖基化位点进行研究的SDS-PAGE实验结果。

[0034] 图12描绘用以评估修饰的抗CD52与重组人Fc γ RIIIa (V158) 结合的表面等离子体共振实验结果。使用在Fc结构域中包含S298N/Y300S突变的抗CD52来评估修饰的分子与CD52肽(A)结合、与Fc γ RIIIa (V158,B)结合,和对照与小鼠FcRn(C)结合的效应物功能。

[0035] 图13描绘对2C3突变体的Fc结合特性进行研究的表面等离子体共振实验结果。

[0036] 图14描绘对修饰的抗CD52与Fc γ RIIIa (Val158) (如上)和Fc γ RIIIa (Phe158)结合进行研究的表面等离子体共振实验结果。使用在Fc结构域中包含S298N/Y300S突变的抗CD52抗体来评估修饰的分子与Fc γ RIIIa (Val158,图14A)和Fc γ RIIIa (Phe58,图14B)结合的效应物功能。

[0037] 图15描绘对S298N/Y300S突变体和野生型2C3对照中C1q结合的分析(A),以及确认孔的等同包被的Eliza分析结果。

[0038] 图16描绘测量2C3突变体与CD-52肽741结合动力学的表面等离子体共振实验结果。

[0039] 图17描绘比较野生型抗CD-52 2C3和A114N高度糖基化突变体抗原结合亲和力的表面等离子体共振实验结果。

[0040] 图18描绘测定2C3突变体的聚糖含量的等电子聚焦以及质谱电荷标准实验的结果。

[0041] 图19描绘浓度(八等分)和比较野生型抗CD-52 2C3和突变体的抗原结合亲和力的等离子共振实验的结果。

[0042] 图20描绘测定抗TME1A114N突变体的葡聚糖含量的SDS-PAGE实验的结果。

[0043] 图21描绘A114N抗Her2突变体的SDS-PAGE和疏水相互作用色谱分析的结果。

[0044] 图22描绘证明PEG与2C3A114N突变体通过氨基氧基连接基偶联的SDS-PAGE实验结果。

[0045] 图23描绘测定抗TME1A114N高度糖基化突变体的葡聚糖含量的LC-MS实验结果。

[0046] 图24描绘测定野生型HER2抗体和A114N抗Her-2高度糖基化突变体的葡聚糖含量

的LC-MS实验结果。

[0047] 图25描绘根据本发明的方法实施抗体的位点特异性偶联的典型方法。

[0048] 图26描绘本发明的如下典型效应物部分的合成:氨基氧基-Cys-MC-VC-PABC-MMAE和氨基氧基-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Do110。

[0049] 图27描绘唾液酸化的HER2抗体的表征信息。

[0050] 图28描绘氧化的唾液酸化的抗HER 2抗体的表征信息。

[0051] 图29描绘用三种不同的唾液酸化抗体以两种不同的氨基氧基基团制备的糖基偶联物的疏水相互作用色谱。

[0052] 图30展示使用GAM(+)化学制备的具有A0-MMAE的抗Her2 A114糖基化突变体偶联物的HIC色谱。

[0053] 图31描绘抗HER2糖基偶联物和巯基偶联物在体外的效力比较。

[0054] 图32描绘抗FAP B11糖基偶联物和巯基偶联物在体外的效力比较。

[0055] 图33描绘抗HER2糖基偶联物和巯基偶联物在Her2+肿瘤细胞异种移植模型中的体内效力的比较。

[0056] 图34描绘测定包含S298N/Y300S突变的突变抗 α BTCTCR抗体的葡聚糖含量的LC-MS实验结果。

[0057] 图35描绘确定野生型抗 α BTCTCR抗体和包含S298N/Y300S突变的突变抗 α BTCTCR抗体的相对热稳定性的圆二色实验结果。

[0058] 图36描绘用带有A114N高度糖基化突变的抗HER抗体和A0-MMAE制备的ADC的细胞增殖实验结果。

[0059] 发明详述

[0060] 本公开提供结合多肽(例如,抗体)及其药物偶联物,其包含Fc结构域,其中所述Fc结构域包含:根据EU编号在氨基酸位点298的天冬酰胺残基;和根据EU编号在氨基酸位点300的丝氨酸或苏氨酸残基。本公开还提供了编码抗原结合多肽的核酸、用于制造这种抗原结合多肽的重组表达载体和宿主细胞。并且提供了使用本文公开的抗原结合多肽治疗疾病的方法。

[0061] I. 定义

[0062] 本文所用术语“结合多肽”或“结合多肽”指包含至少一个负责与感兴趣的靶抗原(例如,人抗原)选择性结合的结合位点的多肽(例如,抗体)。典型的结合位点包括抗体可变结构域、受体的配体结合位点或配体的受体结合位点。某些方面,本发明的结合多肽包含多个(例如,二、三、四或更多)结合位点。

[0063] 本文所用术语“天然残基”指在结合多肽(例如,抗体或其片段)的特定氨基酸位点天然存在的并未通过人工进行修饰、引入或改变的氨基酸残基。本文所用术语“改变的结合多肽”或“改变的结合多肽”包括包含至少一个非天然的突变氨基酸残基的结合多肽(例如,抗体或其片段)。

[0064] 本文使用的术语“特异性结合”指抗体或其抗原结合片段与抗原以至多约 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M或更少的解离常数(Kd)结合的能力,和/或与抗原以与其对非特异性抗原结合的亲和力相比至少两倍的亲和力结合的能力。

[0065] 本文所用术语“抗体”指对感兴趣的抗原(例如,肿瘤相关抗原)具有显著的已知特异性免疫反应活性的这些装配体(例如,完整的抗体分子、抗体片段或其变体)。抗体和免疫球蛋白包含轻和重链,它们之间具有或不具有链间共价连接基。对脊椎动物系统中基本的免疫球蛋白结构的了解相对充分。

[0066] 下文将进一步详述,遗传学术语“抗体”包括可在生化上区分的五种不同抗体类型。所有的五种抗体类型显然都在本公开的保护范围内,接下来的讨论将主要针对IgG类免疫球蛋白分子。对于IgG,免疫球蛋白包括分子量大约为23,000道尔顿的两条相同轻链以及分子量为53,000-70,000的两条相同重链。四条链通过二硫键以“Y”构型结合,其中所述轻链以“Y”的开口处为起点托架起重链并延续通过可变区。

[0067] 免疫球蛋白的轻链以 κ 或 λ 进行分类(κ , λ)。每类重链可与 κ 或 λ 轻链结合。总的来说,轻和重链彼此共价连接,且当免疫球蛋白通过杂交瘤、B细胞或基因工程化的宿主细胞生成时两条重链的“尾”部通过共价二硫键或非共价连接基彼此连接。在重链中,氨基酸序列从位于Y构型的叉状末端的N末端延续至位于每条链底部的C末端。本领域的技术人员将理解,重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其中还有一些亚类(例如, $\gamma 1-\gamma 4$)。这种链的性质决定了抗体的“种类”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白同种型亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等)已被充分表征且已知可赋予功能上的特性。每个这些类型和同种型的修饰版本可被本领域的技术人员鉴于本公开轻易辨别,并且因此也在本公开的保护范围内。

[0068] 轻和重链都被分为具有结构和功能同源性的区。术语“区”指免疫球蛋白或抗体链的一部分或一份且包括恒定区或可变区,以及更多所述区的离散部分或份。举例来说,轻链可变区包括如本文定义的分散在“框架区”或“FR”中的“互补性决定区”或“CDR”。

[0069] 免疫球蛋白重链或轻链中的区可定义为“恒定”(C)区或“可变”(V)区,其依据在“恒定区”的情况中是多种类别成员在所述区域内相对缺乏序列变异,或在“可变区”的情况中是多种类别成员在所述区域内的显著变异。术语“恒定区”和“可变区”也可用在功能上。在这种情况下,应该理解的是免疫球蛋白或抗体的可变区决定抗原识别和特异性。反过来,免疫球蛋白或抗体的恒定区赋予重要的效应物功能如分泌、胎盘流动性、Fc受体结合、补体结合等等。多种免疫球蛋白类别的恒定区的亚基结构和三维构型已众所周知。

[0070] 免疫球蛋白重链和轻链的恒定区和可变区折叠成结构域。术语“结构域”指重链或轻链的球形区,其包括通过例如 β -折叠片层和/或链内二硫键稳定的肽环(例如,包括3至4个肽环)。免疫球蛋白轻链上的恒定区结构域可与“轻链恒定区结构域”、“CL区”或“CL结构域”互换指代。重链上的恒定区(例如,铰链、CH1、CH2或CH3结构域)可与“重链恒定区结构域”、“CH”区结构域或“CH结构域”互换指代。轻链上的可变区可与“轻链可变区结构域”、“VL区结构域”或“VL结构域”互换指代。重链上的可变结构域可与“重链可变区结构域”、“VH区结构域”或“VH结构域”互换指代。

[0071] 按惯例可变恒定区结构域的编号随其距离免疫球蛋白或抗体的抗原结合位点或氨基末端越来越远而增加。每条重和轻免疫球蛋白链的N末端为可变区且在C末端为恒定区;CH3和CL结构域实际上分别包含重和轻链的羧基末端。相应地,轻链免疫球蛋白的结构域以VL-CL方向排列,同时重链的结构域以VH-CH1-铰链-CH2-CH3方向排列。

[0072] 重链恒定区中的氨基酸位点,包括在CH1、铰链、CH2、CH3和CL结构域中的氨基酸位点,可根据Kabat索引编号系统进行编号(参见Kabat et al, in "Sequences of Proteins

of Immunological Interest”, U.S. Dept. Health and Human Services, 第5版, 1991)。可选地, 抗体氨基酸位点可根据EU索引编号系统进行编号 (参见Kabat et al, 同上)。

[0073] 本文所用术语“VH结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变结构域, 且术语“VL结构域”包括免疫球蛋白轻链的氨基末端可变结构域。

[0074] 本文所用术语“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一(最靠氨基末端)恒定区结构域, 其例如在Kabat索引编号系统中延伸自约114-223位点(EU位点118-215)。CH1结构域与VH结构域相邻且在免疫球蛋白重链分子的铰链区的氨基末端, 且并不构成免疫球蛋白重链的Fc区中的一部分。

[0075] 本文所用术语“铰链区”包括重链分子中连接CH1结构域与CH2结构域的部分。铰链区包含约25个残基且是柔性的, 因此允许两个N末端抗原结合区独立运动。铰链区可进一步分为三个不同结构域: 上、中和下铰链结构域(Roux等J. Immunol. 1998, 161: 4083)。

[0076] 本文所用术语“CH2结构域”包括重链免疫球蛋白分子的如下部分, 该部分例如在Kabat索引编号系统中延伸自约244-360位点(EU位点231-340)。CH2结构域的独特之处在于它与另一个结构域并非紧密配对。相反, 两个N-连接的分支碳水化合物链插入在完整的天然IgG分子的两个CH2结构域之间。在一个实施方案中, 本公开的结合多肽包括来自IgG1分子的CH2结构域(例如, 人IgG1分子)。

[0077] 本文所用术语“CH3结构域”包括免疫球蛋白分子的重链部分, 其从CH2结构域的N末端延伸约110个残基, 例如, 在Kabat索引编号系统中从约361-476位点(EU位点341-445)。CH3结构域通常形成抗体的C末端部分。然而在一些免疫球蛋白中, 额外的结构域可从CH3结构域延伸以形成分子的C末端部分(例如, IgM的 μ 链和IgE的e链的CH4结构域)。在一个实施方案中, 本公开的结合多肽包括来自IgG1分子(例如, 人IgG1分子)的CH3结构域。

[0078] 本文所用术语“CL结构域”包括免疫球蛋白轻链的恒定区结构域, 其例如延伸自约107A-216Kabat位点。CL结构域与VL结构域相邻。在一个实施方案中, 本公开的结合多肽包括来自 κ 轻链的CL结构域(例如, 人 κ 轻链)。

[0079] 本文所用术语“Fc区”定义为重链恒定区的部分, 其开始于木瓜蛋白酶切割位点直接上游的铰链区(即IgG中的残基216, 以重量可变区的第一残基为114)并终止于抗体的C末端。相应地, 完整的Fc区至少包含铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。

[0080] 本文所用术语“天然的Fc”指包含由抗体消化导致的或以其它方式产生的非抗原结合片段序列的分子, 无论是单体或多聚体形式, 且可包含铰链区。天然Fc的最初免疫球蛋白来源优选为人来源且所述免疫球蛋白可以是任何免疫球蛋白, 虽然IgG1和IgG2为优选。天然Fc分子由单体多肽组成, 通过共价(即, 二硫键)和非共价结合成为二聚体或多聚体形式。天然Fc分子的单体亚基之间的分子间二硫键的数目范围为1至4, 取决于类型(例如, IgG、IgA和IgE)或亚类(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgA1和IgGA2)。天然Fc的一个实例是木瓜蛋白酶消化的IgG产生的二硫键键合的二聚体。本文使用的术语“天然Fc”可通用于单体、二聚体和多聚体形式。

[0081] 本文所用术语“Fc变体”指从天然Fc修饰得到但仍包含用于挽救受体FcRn(新生Fc受体)的结合位点的分子或序列。典型的Fc变体和它们与挽救受体(salvage receptor)的相互作用为本领域熟知。因此, 术语“Fc变体”可包含从非人的天然Fc人源化的分子或序列。此外, 天然Fc包括可被去除的区, 因为这些区提供本发明的抗体样结合多肽不需要的结构

特征或生物活性。因此,术语“Fc变体”包含缺少一个或多个天然Fc位点或残基的分子或序列,或其中的一个或多个Fc位点或残基已被修饰的分子或序列,所述Fc位点或残基影响或参与:(1)二硫键形成,(2)与选择的宿主细胞的不相容性,(3)当在选择的宿主细胞中表达时的N末端异质性,(4)糖基化,(5)与补体相互作用,(6)与Fc受体而非挽救受体结合,或(7)抗体依赖的细胞毒性(ADCC)。

[0082] 本文所用术语“Fc结构域”涵盖天然的Fc和Fc变体以及上文定义的序列。如同Fc变体和天然Fc分子,术语“Fc结构域”包括单体或多聚体形式的分子,无论是从完整抗体消化得到还是由其它方式产生。

[0083] 上文表明,抗体的可变区使其选择性地识别和特异性地结合在抗原上的表位。也就是说,抗体的VL结构域和VH结构域联合形成限定三维的抗原结合位点的可变区(Fv)。该四分抗体结构形成在Y的每个臂的末端出存在的抗原结合位点。更具体地,抗原结合位点通过在每个重链和轻链可变区上的三个互补决定区(CDR)限定。本文所用术语“抗原结合位点”包括特异性地结合抗原(与其发生免疫反应)的位点(例如,细胞表面或可溶抗体)。抗原结合位点包括免疫球蛋白重链和轻链可变区且由这些可变区形成的结合位点决定抗体的特异性。抗原结合位点通过一个抗体与另一个不同的可变区来形成。本公开的改变的抗体包括至少一个抗原结合位点。

[0084] 在一些实施方案中,本公开的结合多肽包括至少两个提供用于使结合多肽与选择的抗原结合的抗原结合结构域。抗原结合结构域不需要来自相同的免疫球蛋白分子。在这方面,可变区可以是或是来自任何类型的动物,所述动物可被诱导以针对期望的抗原产生体液应答并生成免疫球蛋白。因此,结合多肽的可变区可以举例来说是哺乳动物来源的,例如,可以是人、鼠类、大鼠、山羊、绵羊、非人灵长类动物(如食蟹猴、猕猴等)、羽扇豆或驼类(camelid)(例如,来自骆驼、美洲驼及相关物种)。

[0085] 在自然存在的抗体中,每种单体抗体上存在的六个CDR是短的、不连续的氨基酸序列,随着抗体在含水环境中呈现出三维构象,CDR特异性地定位来形成抗原结合位点。重和轻可变结构域的剩余部分展示较少的氨基酸序列分子内变化性并称为框架区。框架区主要采取 β 折叠构型而CDR形成环,其连接并且在某些情况下形成所述 β 折叠结构的一部分。因此,这些构架区作用以形成支架,通过链间非共价相互作用为六个CDR提供以正确方向的定位。通过定位的CDR形成的抗原结合结构域界定了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。该互补表面促进抗体与免疫反应性抗原表位之间的非共价结合。

[0086] 本发明典型的结合多肽包括抗体变体。本文所用术语“抗体变体”包括改变的合成和工程化形式的抗体,因此其并非天然存在的,例如,包含至少两条重链的部分而非两条完全重链的抗体(如,结构域删除的抗体或小抗体(minibody));抗体的多重特异形式(例如,双特异性、三特异等),其经改变以与两种或多种不同的抗原或与单一抗原上的不同表位结合);与scFv分子结合的重链分子等等。此外,术语“抗体变体”包括多价形式的抗体(例如,三价、四价等,与相同抗原的三个、四个或更多拷贝结合的抗体)。

[0087] 本文所用术语“价”指在多肽中潜在的靶结合位点的数目。每个靶结合位点特异性地结合一个靶分子或靶分子上的特异性位点。当多肽包含多于一个靶结合位点时,每个靶结合位点可特异性地结合相同或不同分子(例如,可结合不同配体或不同抗原,或相同抗原上的不同表位)。题述结合多肽优选地具有至少一个特异性针对人抗原分子的结合位点。

[0088] 术语“特异性”指特异性地结合(例如,与其发生免疫反应)给定靶抗原(例如,人的靶抗原)的能力。结合多肽可以是单一特异性的并包含一个或多个与靶特异性结合的结合位点,或者多肽可以是多重特异性的并包含两个或更多个与相同或不同靶特异性结合的结合位点。在一些实施方案中,本发明的结合多肽特异性地针对相同靶的两个不同(例如,不重叠的)部分。在某些实施方案中,本发明的结合多肽特异性地针对多于一个靶。包含与表达在肿瘤细胞上的抗原结合的抗原结合位点的典型结合多肽(例如,抗体)为本领域公知且来自这种抗体的一种或多种CDR可包括在本发明的抗体中。

[0089] 术语“连接部分”包括能够连接效应物部分和本文公开的结合多肽的部分。可对连接部分进行选择进而使其是可裂解(例如,可酶促裂解或pH敏感)或不可裂解的。典型的连接部分在本文的表2中阐述。

[0090] 本文所用术语“效应物部分”包括具有生物或其它功能活性的诊断和治疗剂(例如,蛋白、核酸、脂质、药物部分及其片段)。举例来说,包含与结合多肽偶联的效应物部分的修饰结合多肽与非偶联的抗体相比具有至少一种额外的功能或特性。举例来说,细胞毒性药物(例如,效应物部分)与结合多肽的偶联导致具有药物细胞毒性作为第二功能的结合多肽(即,除抗原结合外)的形成。在另一个实例中,第二结合多肽与结合多肽的偶联可赋予额外的结合特性。在某些实施方案中,当效应物部分是基因编码的治疗或诊断蛋白或核酸时,效应物部分可由本领域熟知的肽合成或重组DNA方法合成或表达。另一方面,当效应物是非基因编码的肽或药物部分时,效应物部分可以人工合成或从天然来源纯化。本文所用术语“药物部分”包括抗炎、抗癌、抗感染(例如,抗真菌、抗细菌、抗寄生物、抗病毒等)和麻醉治疗剂。在另一实施方案中,所述药物部分是抗癌或细胞毒性剂。相容的药物部分还可包括前体药物。典型的效应物部分在本文的表1中阐述。

[0091] 本文所用术语“前体药物”指与母体药物相比不那么具有活性、反应性或易于发生副作用的且能够被酶激活或以其他方式在体内转化成为更有活性的形式的药物活性剂的前体或衍生形式。与本公开的组合物相容的前体药物包括但不限于,含磷酸盐的前体药物、含氨基酸的前体药物、含硫代磷酸的前体药物、含硫酸盐的前体药物、含肽前体药物、含 β -内酰胺的前体药物、含任选地取代的苯氧基乙酰胺的前体药物或含任选地取代的苯基乙酰胺的前体药物、5-氟胞嘧啶及其它可转化成更有活性的、无细胞毒性的药物的5-氟尿嘧啶前体药物。本领域的技术人员可对预期的药物部分或其前体药物进行化学修饰,进而使该化合物的反应更便于制备本公开的修饰的结合多肽。所述药物部分还包括本文所述的药物部分的衍生物、药学上可接受的盐、酯、酰胺和醚。衍生物包括对本文鉴定的药物的修饰,其可改进或不显著降低特定药物的预期治疗活性。

[0092] 本文所用术语“抗癌剂”包括不利于赘生物或肿瘤细胞生长和/或增殖的作用剂,且可作用以降低、抑制或破坏恶性肿瘤。这些作用剂的实例包括但不限于,细胞抑制剂、烷化剂、抗生素、细胞毒性核苷、微管蛋白结合剂、激素、激素拮抗剂、细胞毒性剂等等。细胞毒性剂包括托马霉素衍生物(tomaymycin derivatives)、美登素衍生物(maytansine derivatives)、Cryptophycin衍生物、蒽环类衍生物、二磷酸衍生物、细霉菌衍生物(leptomycin derivatives)、链黑菌素衍生物(streptonigrin derivatives)、auristatine衍生物和duocarmycin衍生物。作用于阻止或减慢免疫反应性细胞或恶性肿瘤细胞生长的任何作用剂都在本公开的范围之内。

[0093] 本文所用术语“抗原”或“靶抗原”指能够由结合多肽的结合位点结合的分子或分子的部分。靶抗原可以具有一个或多个表位。

[0094] II. 结合多肽

[0095] 一方面,本公开提供结合多肽(例如,抗体、抗体片段、抗体变体和融合蛋白),其包含Fc结构域,其中所述Fc结构域包括:根据EU编号在氨基酸位点298的天冬酰胺残基;和根据EU编号在氨基酸位点300的丝氨酸或苏氨酸残基。

[0096] 来自任何免疫球蛋白(例如,IgM、IgG、IgD、IgA和IgE)类型和物种的Fc结构域可用于本文公开的结合多肽。也可采用包含来自不同物种或Ig类型的Fc结构域的部分的嵌合Fc结构域。在一些实施方案中,所述Fc结构域是人IgG1 Fc结构域。在人IgG1 Fc结构域的情况下,在野生型氨基酸Kabat 298位点成为天冬酰胺和在Kabat 300位点成为丝氨酸或苏氨酸的突变导致N-连接糖基化共有位点的形成(即,N-X-T/S序列子,其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸)。然而,在其它物种和/或Ig类型或同种型的Fc结构域的情况下,本领域的技术人员应理解如果存在脯氨酸,那么有必要将Fc结构域的Kabat 299位点突变以重新生成N-X-T/S序列子。

[0097] 本文公开的结合多肽涵盖任何包含在根据Kabat编号的298位点具有N-连接的糖基化位点的Fc结构域的结合多肽。在某些实施方案中,结合多肽是抗体,或其片段或衍生物。来自任何来源或品种的任何抗体可被用于本文公开的结合多肽。适当的抗体包括但不限于,人抗体、人源化的抗体或嵌合抗体。

[0098] 在一些实施方案中,本公开的结合多肽可包含抗体的抗原结合片段。术语“抗原结合片段”指结合抗原或针对抗原结合(即,特异性结合)与完整抗体(即,与其衍生来自的完整抗体)竞争的免疫球蛋白或抗体的多肽片段。抗原结合片段可由本领域熟知的重组或生化方法产生。典型的抗原结合片段包括Fv、Fab、Fab'和(Fab')₂。在优选的实施方案中,本公开的抗原结合片段是改变的抗原结合片段,其包括至少一个工程化的糖基化位点。在一个典型的实施方案中,本公开的改变的抗原结合片段包含如上文所述的改变的VH结构域。在另一个典型的实施方案中,本公开的改变的抗原结合片段包含如上文所述的改变的CH1结构域。

[0099] 在典型的实施方案中,所述结合多肽包含单链可变区序列(ScFv)。单链可变区序列包含具有一个或多个抗原结合位点的单个多肽,例如,通过柔性接头与VH结构域连接的VL结构域。ScFv分子可以VH-接头-VL的方向或VL-接头-VH的方向构建。连接构成抗原结合位点的VL和VH结构域的柔性铰链优选地包含约10至约50个氨基酸残基。连接肽为本领域已知。本发明的结合多肽可包含至少一个scFv和/或至少一个恒定区。在一个实施方案中,本公开的结合多肽可包括至少一个与抗体或包含CH1结构域(例如,包含在Kabat 114位点的天冬酰胺残基的CH1结构域)和/或CH2结构域的片段(例如,包含在EU 298位点的天冬酰胺残基和在EU300位点的丝氨酸或苏氨酸残基的CH2结构域)连接或融合的scFv。

[0100] 在一些典型的实施方案中,本公开的结合多肽是通过编码抗体的DNA序列与ScFv分子(例如,改变的ScFv分子)融合产生的多价(例如,四价)抗体。举例来说,在一个实施方案中,对这些序列进行组合,从而将ScFv分子(例如,改变的ScFv分子)在其N末端或C末端与抗体的Fc片段经由柔性接头(例如,gly/ser接头)连接。在另一个实施方案中,本公开的四价抗体可通过将ScFv分子与连接肽融合生成,其与CH1结构域融合(例如,在Kabat第114位

点包含天冬酰胺残基的CH1结构域)以构建ScFv-Fab四价分子。

[0101] 在另一个实施方案中,本公开的结合多肽是改变的小抗体。本公开的改变的小抗体是由两条多肽链组成的二聚分子,所述每条多肽链包含与CH3结构域或其部分经由连接肽融合的ScFv分子(例如,包含如上文所述的改变的VH结构域的改变的ScFv分子)。小抗体可通过构建ScFv组分以及使用本领域描述的方法(参见,例如美国专利5,837,821或W0 94/09817A1)连接肽-CH3组分生成。在另一实施方案中,可构建四价小抗体。除两个ScFv分子使用柔性接头连接外,四价小抗体可以与小抗体相同的方式构建。连接的scFv-scFv构建体随后与CH3结构域连接。

[0102] 在另一实施方案中,本公开的结合多肽包含双特异性抗体。双特异性抗体是二聚体四价分子,每个分子具有与scFv分子相似的多肽,但通常具有连接两个可变结构域的短(少于10且优选为1-5)氨基酸残基接头,从而使在相同多肽链上的VL和VH结构域不能相互作用。取而代之的是,一条多肽链上的VL和VH结构域与在第二多肽链上的VH和VL结构域(分别)相互作用(参见,举例来说,W0 02/02781)。本公开的双特异性抗体包含与CH3结构域融合的scFv分子。

[0103] 在其他实施方案中,本发明的结合多肽包含多重特异性或多价抗体,其包含一个或多个在相同多肽链上的系列可变结构域,例如,串联可变结构域(TVD)多肽。典型的TVD多肽包括描述于美国专利No. 5,989,830中的“双头”或“双Fv”构型。在双Fv构型中,两种不同抗体的可变结构域在两条分离的链上(一条重链和一条轻链)以串联的方向表达,其中一条多肽链具有通过肽接头分开的串联的两倍VH(VH1-接头-VH2),而另一条多肽链由肽接头串联连接的互补的VL结构域组成(VL2-接头-VL1)。在交叉双头构型中,两种不同抗体的可变结构域在两条分离的多肽链上(一条重链和一条轻链)以串联方向表达,其中一条多肽链具有串联的两个由肽接头分开的VH(VH1-接头-VH2),而另一条多肽链由在相反方向通过肽接头串联连接的互补VL结构域组成(VL2-接头-VL1)。基于“双-Fv”形式的其它抗体变体包括双-可变-结构域IgG(DVD-IgG)双特异性抗体(参见美国专利No. 7,612,181)和TBTI形式(参见US2010/0226923A1)。向双-Fv的各条链添加恒定结构域(CH1-Fc向重链添加而κ或λ恒定结构域向轻链添加)导致功能性双特异性抗体而无需任何额外修饰(即,恒定结构域的明显添加以增强稳定性)。

[0104] 在另一典型实施方案中,结合多肽包括基于“双头”构型的交叉双可变结构域IgG(CODV-IgG)双特异性抗体(参见US20120251541A1,其在本文通过提述以其全文并入)。CODV-IgG抗体变体具有一条具有与CL结构域串联连接的VL结构域的多肽链(VL1-L1-VL2-L2-CL)和第二条具有与CH1结构域以相反方向串联连接的互补VH结构域的多肽链(VH2-L3-VH1-L4-CH1),其中所述多肽链形成交叉的轻链-重链对。在一些实施方案中,所述第二多肽可进一步与Fc结构域连接(VH2-L3-VH1-L4-CH1-Fc)。在某些实施方案中,接头L3至少是接头L1长度的两倍并且/或者接头L4至少是接头L2长度的两倍。举例来说,L1和L2在长度上可以是1-3个氨基酸残基,L3在长度上可以是2至6个氨基酸残基,且L4在长度上可以是4至7个氨基酸残基。合适的接头的实例包括单甘氨酸(Gly)残基;双甘氨酸肽(Gly-Gly);三肽(Gly-Gly-Gly);具有四个甘氨酸残基的肽(Gly-Gly-Gly-Gly);具有五个甘氨酸残基的肽(Gly-Gly-Gly-Gly-Gly);具有六个甘氨酸残基的肽(Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly);具有七个甘氨酸残基的肽(Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly);具有八个甘氨酸残基的肽(Gly-Gly-

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly)。可使用氨基酸残基的其它组合如肽Gly-Gly-Gly-Gly-Ser和肽Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser。

[0105] 在一些实施方案中,结合多肽包括免疫粘附素分子,其包含与抗体恒定区融合的非抗体结合区(例如,受体、配体或细胞粘附分子)(参见,例如,Ashkenazi等,Methods,1995 8(2),104-115,其在本文以其全文通过提述并入)。

[0106] 在某些实施方案中,所述结合多肽包括免疫球蛋白样结构域。合适的免疫球蛋白样结构域包括但不限于纤连蛋白结构域(参见,举例来说,Koide等)(2007),Methods Mol.Biol.352:95-109,其在本文通过提述以其全文并入)、DARPin(参见,举例来说,Stumpp等(2008)Drug Discov.Today 13(15-16):695-701,其在本文通过提述以其全文并入)、蛋白A的Z结构域(参见,Nygren等(2008)FEBS J.275(11):2668-76,其在本文通过提述以其全文并入)、Lipocalins(参见,举例来说,Skerra等(2008)FEBS J.275(11):2677-83,其在本文通过提述以其全文并入)、Affilins(参见,举例来说,Ebersbach等(2007)J.Mol.Biol.372(1):172-85,其在本文通过提述以其全文并入)、Affitins(参见,举例来说,Krehenbrink等(2008)J.Mol.Biol.383(5):1058-68,其在本文通过提述以其全文并入)、Avimers(参见,举例来说Silverman等(2005)Nat.Biotechnol.23(12):1556-61,其在本文通过提述以其全文并入)、Fynomers(参见,举例来说,Grabulovski等(2007)J Biol Chem 282(5):3196-3204,其在本文通过提述以其全文并入)和Kunitz结构域肽(参见,举例来说,Nixon等(2006)Curr Opin Drug Discov Devel 9(2):261-8,其在本文通过提述以其全文并入)。

[0107] III.N-连接聚糖

[0108] 在一些实施方案中,本文公开的结合多肽的Fc结构域在根据EU编号的298位(N298)的工程化精氨酸处是糖基化的。N-连接聚糖通常通过 β -糖基酰胺连接基连接至N298侧链的氮基团。但也可采用其它合适的本领域认可的连接基。

[0109] 任何类型的天然存在或合成的(即,非天然的)N-连接聚糖可连接至N114。举例来说,聚糖可以是天然聚糖或工程化的包含非天然连接基的聚糖。在某些实施方案中,聚糖包含可被氧化(例如,通过高碘酸盐处理)的糖来产生适于与效应物部分(例如,活性醛基团)偶联的基团。合适的可被氧化的糖包括但不限于半乳糖和唾液酸(例如,N-乙酰神经氨酸)。在一些实施方案中,所述聚糖是双触角聚糖。在一些实施方案中,聚糖是天然存在的哺乳动物糖形。

[0110] 糖基化可通过本领域任何已知的方式实现。在一些实施方案中,所述糖基化通过在能够进行N-连接糖基化的细胞中表达结合多肽获得。可采用任何天然或工程化的细胞(例如,原核或真核)。大体上,采用哺乳动物细胞来影响糖基化。在哺乳动物细胞中产生的N-聚糖通常指复合N-聚糖(参见,例如,Drickamer K,Taylor ME(2006).Introduction to Glycobiology,第2版,其在本文以其全文通过提述并入)。这些复合N-聚糖具有通常具有二至六条外部支链,所述外部支链具有与内部核心结构Man₃GlcNAc₂连接的唾液酸唾液酰乳糖胺(sialyllactosamine)序列。复合N-聚糖至少具有一条支链,且优选地具有至少两个交替的GlcNAc和半乳糖(Gal)残基来终止寡糖,例如,举例来说:NeuNAc-;NeuAc α 2,6 GalNAc α 1-;NeuAc α 2,3 Gal β 1,3 GalNAc α 1-;和NeuAc α 2,3/6 Gal β 1,4 GlcNAc β 1.;此外,硫酸酯可存在于半乳糖、GalNAc和GlcNAc残基上,而磷酸酯可存在于甘露糖残基上。NeuAc可

以是O-乙酰化的或由NeuG1 (N-羟乙酰神经氨酸) 取代。复合N-聚糖还可以具有将GlcNAc和核心岩藻糖(Fuc)一分为二的链内取代。

[0111] 除此之外或可替换地,糖基化可在体外通过酶的方式实现或修饰。举例来说,可采用一种或多种糖基转移酶来将特定的糖残基添加至N298,且可采用一种或多种糖苷酶来从N-连接聚糖去除不需要的糖。这些酶方法为本领域已知(参见,例如,WO/2007/005786,其在本文以其全文通过提述并入)。

[0112] IV. 免疫效应物功能和Fc修饰

[0113] 在某些实施方案中,本发明的结合多肽可包含抗体恒定区(例如,IgG恒定区,例如,人IgG恒定区,例如,人IgG1或IgG4恒定区),其介导一种或多种效应物功能。举例来说,补体的C1组分与抗体恒定区的结合可激活补体系统。补体的激活在调理作用和细胞病原体的裂解中至关重要。补体的激活还刺激炎症应答且可参与自身免疫性变态反应。此外,抗体经由Fc区与在多种细胞上的受体结合,其中抗体Fc区上的Fc受体结合位点与细胞上的Fc受体(FcR)结合。存在多种特异性针对不同种类抗体的Fc受体,所述不同种类的抗体包括IgG(γ 受体)、IgE(ϵ 受体)、IgA(α 受体)和IgM(μ 受体)。抗体与细胞表面的Fc受体的结合可触发许多重要且多样的生物应答包括对抗体包被微粒的吞噬和破坏、免疫复合体的清除、杀伤细胞对抗体包被靶细胞的裂解(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,或ADCC)、炎症介导物的释放、胎盘转移和对免疫球蛋白生产的控制。在优选的实施方案中,本发明的结合多肽(例如,抗体或其抗原结合片段)与Fc- γ 受体结合。在可选的实施方案中,本发明的结合多肽可包含恒定区,其缺乏一种或多种效应物功能(例如,ADCC活性)且/或不能与Fc γ 受体结合。

[0114] 本发明的某些实施方案包括如下抗体,在所述抗体中一个或多个恒定区结构域中的至少一个氨基酸被缺失或以其他方式发生改变进而提供了理想的生化特性,如降低或增强的效应物功能、非共价二聚化的能力、增加的定位于肿瘤位点的能力、降低的血清半衰期或当与具有大致相同的免疫原性的完整的、未改变的抗体相比增加的血清半衰期。举例来说,本文所述的某些用于诊断和治疗方法的抗体是结构域缺失的抗体,其包括与免疫球蛋白重链相似的多肽链,但缺乏一个或多个重链结构域的至少一部分。举例来说,在某些抗体中,修饰的抗体的恒定区的一个完整结构域将被缺失,举例来说,全部或部分CH2结构域将被缺失。

[0115] 在某些其它实施方案中,结合多肽包括源自不同抗体同种型的恒定区(例如,来自两种或更多种人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区)。在其它实施方案中,结合多肽包括嵌合铰链(即,包含源自不同抗体同种型的铰链结构域的铰链部分的铰链,例如,来自IgG4分子的上部铰链结构域和IgG1的中部铰链结构域)。在一个实施方案中,结合多肽包括来自人IgG4分子的Fc区或其部分以及在分子的核心铰链区的Ser228Pro突变(Eu编号)。

[0116] 在某些实施方案中,可使用本领域已知的技术来突变Fc部分以增加或降低效应物功能。举例来说,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其它方式)可降低循环中的经修饰抗体的Fc受体结合,进而增加肿瘤定位。在其它情况中,与本发明一致的恒定区修饰可能缓和补体结合并因此降低血清半衰期和偶联的细胞毒素的非特异结合。而对恒定区进行的其它修饰可用于修饰二硫键或寡糖部分,其由于增加了抗原特异性和柔性而使定位得以提高。可以很容易地使用公知的免疫学技术且无须过度实验就可测量和量化所述修饰产生

的生理学概貌、生物利用度以及其它生化效果,如肿瘤定位、生物分布和血清半衰期。

[0117] 在某些实施方案中,在本发明的抗体中采用的Fc结构域是Fc变体。本文使用的术语“Fc变体”指相对于所述Fc结构域所来源的野生型Fc结构域而言具有至少一个氨基酸取代的Fc结构域。举例来说,其中所述Fc结构域源自人IgG1抗体,所述人IgG1 Fc结构域的Fc变体相对于所述Fc结构域包含至少一个氨基酸取代。

[0118] Fc变体的氨基酸取代可位于Fc结构域内的任何位点(即,任何EU惯例下的氨基酸位点)。在一个实施方案中,Fc变体包括在位于铰链结构域或其部分中的氨基酸位点处的取代。在另一实施方案中,Fc变体包括在位于CH2结构域或其部分的氨基酸位点处的取代。在另一实施方案中,Fc变体包括在位于CH3结构域或其部分的氨基酸位点处的取代。在另一实施方案中,Fc变体包括在位于CH4结构域或其部分的氨基酸位点处的取代。

[0119] 本发明的结合多肽可采用任何本领域认可的已知可在效应物功能和/或FcR结合方面赋予改进的(例如,降低或增强)Fc变体。所述Fc变体可包括,举例来说,国际PCT公开W088/07089A1、W096/14339A1、W098/05787A1、W098/23289A1、W099/51642A1、W099/58572A1、W000/09560A2、W000/32767A1、W000/42072A2、W002/44215A2、W002/060919A2、W003/074569A2、W004/016750A2、W004/029207A2、W004/035752A2、W004/063351A2、W004/074455A2、W004/099249A2、W005/040217A2、W005/070963A1、W005/077981A2、W005/092925A2、W005/123780A2、W006/019447A1、W006/047350A2和W006/085967A2或U.S.Pat.Nos.5,648,260;5,739,277;5,834,250;5,869,046;6,096,871;6,121,022;6,194,551;6,242,195;6,277,375;6,528,624;6,538,124;6,737,056;6,821,505;6,998,253;和7,083,784中公开的任何一种氨基酸取代,上述中的每一篇在本文通过提述并入。在一个典型的实施方案中,本发明的结合多肽可包括在EU 268位点包含氨基酸取代(例如,H268D或H268E)的Fc变体。在另一典型的实施方案中,本发明的结合多肽可在EU 239位点(例如,S239D或S239E)和/或EU 332位点(例如,I332D或I332Q)包含氨基酸取代。

[0120] 在某些实施方案中,本发明的结合多肽可包含含有改变抗体的抗原依赖性效应物功能特别是结合多肽的循环半衰期的氨基酸取代的Fc变体。当与缺乏这些取代的结合多肽比较时,这样的结合多肽展示出与FcRn升高的或降低的结合,因此,在血清中分别具有升高或降低的半衰期。具有对于FcRn改进的亲力的Fc变体预期具有更长的血清半衰期,且这些分子如下治疗处理哺乳动物的方法中具有有效应用,在该方法中期望施用的抗体具有长半衰期,例如,用于治疗慢性疾病或病症。相反,具有降低的FcRn结合亲和力的Fc变体预期具有较短的半衰期,且这种分子也可用于,举例来说,向哺乳动物施用,在所述哺乳动物中缩短的循环时间可能是有利的,例如,用于体内诊断成像或在初始抗体当长时间存在于循环中时具有毒性副作用的情况下。具有降低的FcRn结合亲和力的Fc变体也不太可能穿过胎盘,并因此可用于在孕妇中治疗疾病或病症。此外,可能期待降低的FcRn结合亲和力的其他应用包括那些预期定位于脑、肾和/或肝的应用。在一个典型的实施方案中,本发明的改变的结合多肽(例如,抗体或其抗原结合片段)展示出从血管系统穿越肾小球上皮的运输的降低。在另一实施方案中,本发明的改变的结合多肽(例如,抗体或其抗原结合片段)展示出从脑穿越血脑屏障(BBB)进入血管间隙的运输的降低。在一个实施方案中,具有改变的FcRn结合的抗体包括在Fc结构域的“FcRn结合环”内具有一个或多个氨基酸取代的Fc结构域。FcRn结合环包括氨基酸残基280-299(根据EU编号)。改变FcRn结合活性的典型的氨基酸取代公

开于国际PCT公开No. W005/047327中,其在本文通过提述并入。在一些典型的实施方案中,本发明的结合多肽(例如,抗体或其抗原结合片段)包括具有一个或多个下列取代的Fc结构域:V284E、H285E、N286D、K290E和S304D(EU编号)。在另外的其他典型实施方案中,本发明的结合分子包含具有双突变H433K/N434F的人Fc结构域(参见,例如,美国专利No. 8,163,881)。

[0121] 在其他实施方案中,描述于本文的用于诊断和治疗方法的结合多肽具有恒定区,例如,IgG1或IgG4重链恒定区,其经改变来降低或消除糖基化。举例来说,本发明的结合多肽(例如,抗体或其抗原结合片段)也可包含含有改变抗体Fc糖基化的氨基酸取代的Fc变体。举例来说,所述Fc变体可具有降低的糖基化(例如,N-或O-连接糖基化)。在典型的实施方案中,Fc变体包含正常存在于氨基酸位点297(EU编号)处的N-连接聚糖降低的糖基化。在另一实施方案中,所述抗体在糖基化基序附近或之内具有氨基酸取代,举例来说,包含氨基酸序列NXT或NXS的N-连接糖基化基序。在具体的实施方案中,所述抗体包含在第228或229(EU编号)氨基酸位点具有氨基酸取代的Fc变体。在更多具体的实施方案中,所述抗体包含含有S228P和T299A突变(EU编号)的IgG1或IgG4恒定区。

[0122] VIII. 效应物部分

[0123] 在某些实施方案中,本公开的结合多肽包括效应物部分。总的来说,这些效应物部分与结合多肽上的N-连接聚糖偶联(直接或通过接头部分),(例如,与CH2结构域的N298(EU编号)和/或CH1结构域的N114(Kabat编号)连接的N-连接聚糖)。在某些实施方案中,结合多肽是包含两个在114Kabat位点具有聚糖的CH1结构域的全长抗体,其中两个聚糖都与一个或多个效应物部分偶联。

[0124] 任何效应物部分均可被添加至本文公开的结合多肽。效应物部分优选向改变的抗体或其片段添加非天然功能,而不显著改变结合多肽的固有活性。效应物部分可以是,举例来说但不限于,治疗剂或诊断剂。本公开的修饰的结合多肽(例如,抗体)可包括一个或多个效应物部分,其可以相同或不同。

[0125] 在一个实施方案中,所述效应物部分可为式(I)所示:

[0126] $H_2N-Q-CON-X$

[0127] 式(I),

[0128] 其中:

[0129] A) Q是NH或O;且

[0130] B) CON是连接部分;且

[0131] C) X是如本文定义的治疗剂。

[0132] 连接体(connector)部分连接治疗剂与 H_2N-Q- 。连接体部分可包括至少任何本领域的技术人员已知的合适的组分之一,包括,举例来说,亚烷基组分、聚乙二醇组分、聚(甘氨酸)组分、聚(噁唑啉)组分、羰基组分、从半胱氨酰胺衍生的组分、从与瓜氨酸偶联的缬氨酸衍生的组分,以及从4-氨基苄基氨基甲酸酯衍生的组分或其任意组合。

[0133] 在另一实施方案中,式(I)的效应物部分可以是式(Ia):

[0134] $H_2N-Q-CH_2-C(O)-Z-X$

[0135] 式(Ia)

[0136] 其中:

[0137] A) Q是NH或O;且

[0138] B) Z是Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f,

[0139] 其中

[0140] i.Cys是源自半胱氨酸的组分;

[0141] ii.MC是源自马来酰亚胺的组分;

[0142] iii.VC是源自与瓜氨酸偶联的缬氨酸的组分;

[0143] iv.PABC是源自4-氨基苄基氨基甲酸酯的组分;

[0144] v.X是如本文所定义的治疗剂;

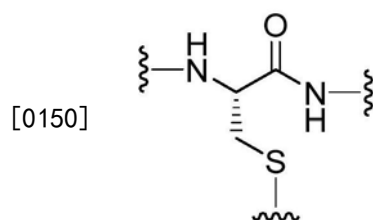
[0145] vi.a是0或1;

[0146] vii.b是0或1;

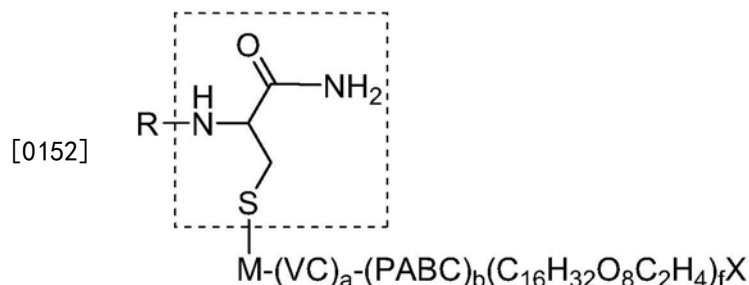
[0147] viii.c是0或1;且

[0148] ix.f是0或1

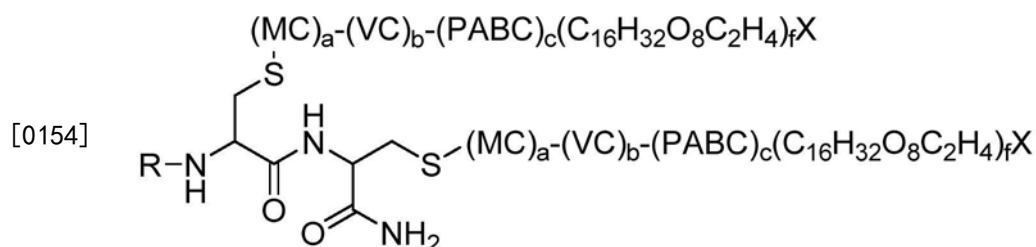
[0149] “源自半胱氨酸的组分”是与H₂N-Q-CH₂-C(O)-附着的点。在一个实施方案中,所述“源自半胱氨酸的组分”可指具有如下结构的效应物部分的一个或多个部分:



[0151] 在一个实施方案中,效应物部分的“Cys”组分可包括一个这样的部分。举例来说,下列结构表明具有一个这样的部分的效应物部分(其中所述“Cys”组分由虚线框表明):



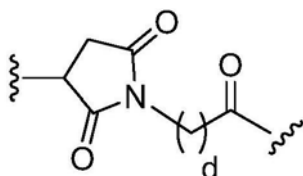
[0153] 在另一个实施方案中,效应物部分的“Cys”组分可包括两个或多个这样的部分。举例来说,下列部分包括两个这样的部分:



[0155] 从所述结构可以看出,每个“Cys”组分都带有(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X基团。

[0156] 在一个实施方案中,短语“衍生于马来酰亚胺的组分”可指具有下列结构的效应物部分的任何部分:

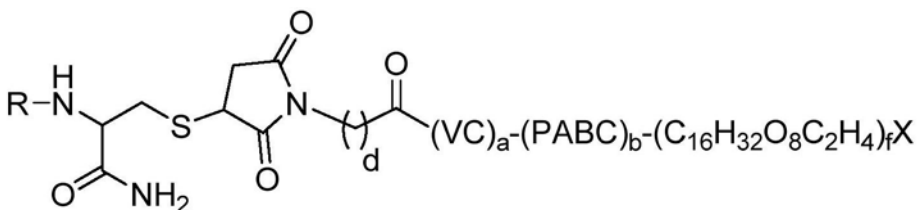
[0157]



[0158] 其中d是2至5的整数。包括于效应物部分中的任何Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X基团中的MC组分的数目通过下标“a”表示,且可以是0或1。在一个实施方案中,a为1。在另一实施方案中,b是0。

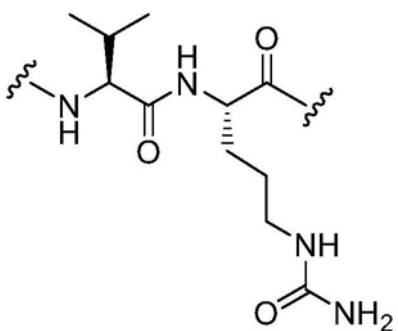
[0159] 在一个实施方案中,“Cys”组分可与“MC”组分经由“Cys”组分中的硫原子连接,如下列结构中的虚线框所示:

[0160]



[0161] 在一个实施方案中,短语“与瓜氨酸偶联的来源于缬氨酸的组分”可指具有下列结果的效应物部分的任何部分:

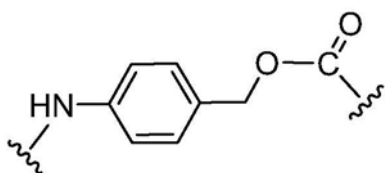
[0162]



[0163] 包括于效应物部分中任何Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X基团中的VC组分的数目通过下标“b”表示,且可以是0或1。在一个实施方案中,b是1。在另一实施方案中,b是0。

[0164] 在一个实施方案中,短语“来源于4-氨基苄基氨基甲酸酯的组分”可指具有下列结构的效应物部分的任何部分:

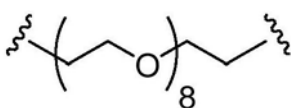
[0165]



[0166] 包括于效应物部分中任何Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X基团中的PABC组分的数目可通过下标“c”表示,且可以是0或1。在一个实施方案中,c是1。在另一实施方案中,c是0。

[0167] 在一个实施方案中,“C₁₆H₃₂O₈C₂H₄”指下列结构:

[0168]



[0169] 包括于效应物部分中的任何Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X基团中的C₁₆H₃₂O₈单位的数目可通过下标“f”表示。在一个实施方案中,f是1。在另一实施方案中,f是0。

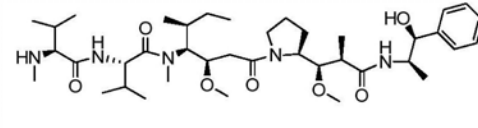
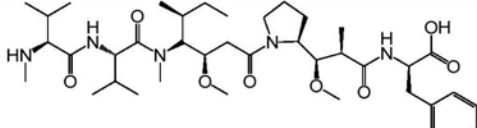
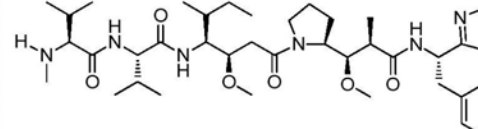
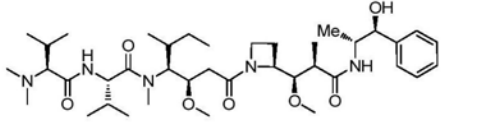
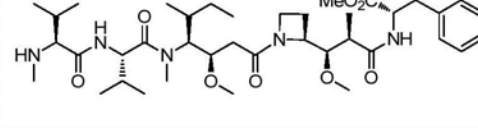
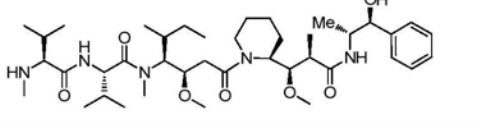
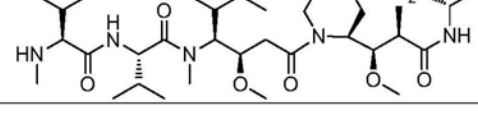
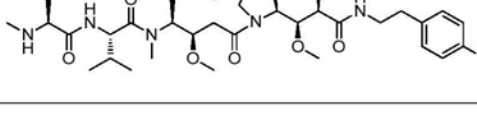
[0170] 在一个实施方案中,a是1,b是1,c是1,且f是0。

[0171] a) 治疗性效应物部分

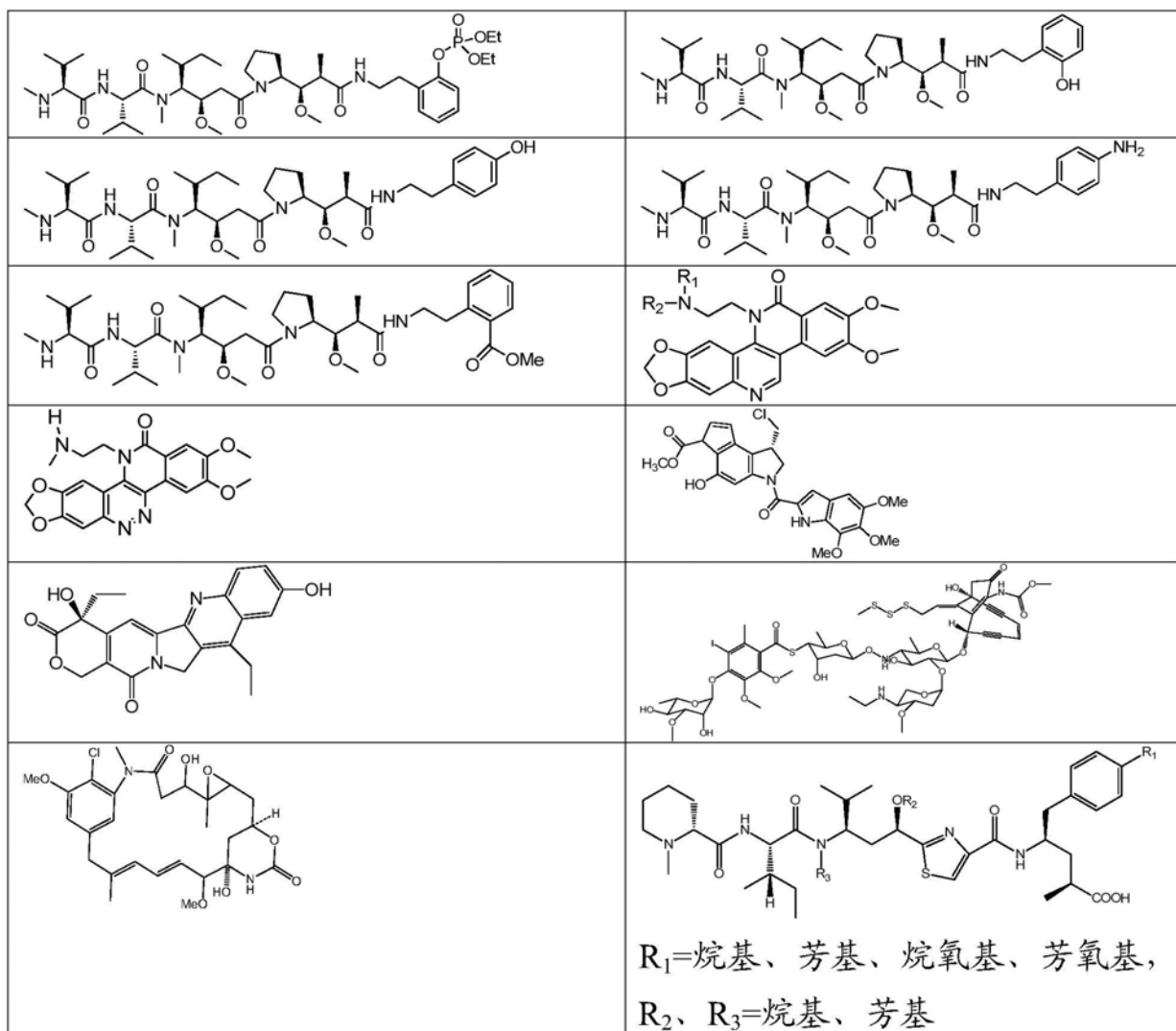
[0172] 在某些实施方案中,本公开的结合多肽偶联至包含治疗剂的效应物部分,例如,药物部分(或其前体药物)或放射性标记的化合物。在一个实施方案中,治疗剂是细胞毒素。典型的细胞毒性效应物部分阐述于本文的表1中。

[0173] 表1典型的细胞毒性效应物部分

[0174]

[0175]



[0176] 进一步的典型的药物部分包括抗炎、抗癌、抗感染(例如,抗真菌、抗细菌、抗寄生虫、抗病毒等),以及麻醉剂治疗剂。在进一步的实施方案中,所述药物部分是抗癌剂。典型的抗癌剂包括但不限于,细胞抑制剂、酶抑制剂、基因调节剂、细胞毒性核苷、微管蛋白结合剂或微管蛋白抑制剂、蛋白酶体抑制剂、激素和激素拮抗剂、抗血管生成剂等等。典型的细胞抑制性抗癌剂包括烷化剂如蒽环类药物家族(例如,阿霉素、洋红霉素、环孢菌素-A、氯喹、甲氨蝶呤、光辉霉素、甲基丝裂霉素、链黑菌素、甲基丝裂霉素、蒽二酮和环乙亚胺)。其它细胞抑制性抗癌剂包括DNA合成抑制剂(例如,甲氨蝶呤和二氯甲氨蝶呤、3-氨基-1,2,4-苯并三嗪-1,4-二氧化物、氨基蝶呤、胞嘧啶β-D-阿拉伯呋喃糖苷、5-氟-5'-脱氧尿苷、5-氟尿嘧啶、更昔洛韦、羟基脲、放线菌素-D和丝裂霉素C),DNA嵌入剂或交联剂(例如,博来霉素,卡铂,卡莫司汀,苯丁酸氮芥,环磷酰胺,顺式-二氯二氨铂(II)(顺铂),美法仑,米托蒽醌和奥沙利铂),以及DNA-RNA转录调节剂(例如,放线菌素D、柔红霉素、阿霉素、高三尖杉酯和伊达比星)。其它典型的与本公开兼容的细胞抑制剂包括安沙霉素苯醌类、醌类衍生物(例如,喹诺酮类、染料木素、bactacyclin)、白消安、异环磷酰胺、氮芥、二氯甲基二乙胺、三乙撑亚胺苯醌、地吡醌、卡巴醌、吲哚醌(indoloquinone)E09、双氮丙定基-苯醌甲基DZQ、三亚乙基磷酰胺以及亚硝脲化合物(例如,卡莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀)。

[0177] 典型的细胞毒性核苷抗癌剂包括,举例来说,阿糖腺苷、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氟达拉滨、氟尿苷、呋氟尿嘧啶以及6-巯基嘌呤。典型的抗癌微管蛋白结合剂包括紫杉烷类(taxoids)(例如,紫杉醇、多西紫杉醇、紫杉烷)、诺考达唑、根霉素、多拉司他汀(例如,多拉司他汀-10、-11或-15)、秋水仙碱和类秋水仙碱(colchicinoids)(例如,ZD6126)、考布他汀(例如,考布他汀A-4、AVE-6032)以及长春花生物碱(例如,长春碱,长春新碱,长春地辛和长春瑞滨(诺维本))。典型的抗癌激素和激素拮抗剂,包括皮质类固醇(例如强的松)、孕激素(例如羟孕酮或醋酸甲羟孕酮)、雌激素(例如己烯雌酚)、抗雌激素(例如他莫昔芬)、雄激素(例如睾酮)、芳香酶抑制剂(例如氨鲁米特)、17-(烯丙基氨基)-17-去甲氧基格尔德霉素、4-氨基-1,8-萘二甲酰亚胺、芹菜素、布雷菲德菌素A、西咪替丁、二氯亚甲基二膦酸、亮脯利特(亮丙瑞林)、促黄体生成激素释放激素、皮斐松-A、雷帕霉素、性激素结合球蛋白和毒胡萝卜素。典型的抗癌、抗血管生成化合物包括血管抑素K1-3、DL- α -二氟甲基-鸟氨酸、内皮他丁、夫马菌素、染料木素、米诺环素、星形孢菌素和(±)沙利度胺。

[0178] 典型的抗癌酶抑制剂包括但不限于S(+)-喜树碱、姜黄素、(-)-鱼藤素、5,6-二氯苯-咪唑1- β -D-呋喃核糖苷、依托泊苷、福美坦、福司曲星、hispidin、2-亚氨基-1-咪唑烷乙酸(环肌酸)、梅奴灵、曲古抑菌素A、酪氨酸磷酸化抑制剂AG34和酪氨酸磷酸化抑制剂AG879。

[0179] 典型的抗癌基团调节剂包括5-氮杂-2'-脱氧胞苷、5-氮杂胞苷、胆钙化醇(维生素D3)、4-羟基他莫昔芬、褪黑激素、米非司酮、雷洛昔芬、反式-视黄醛(维生素A醛)、视黄酸、维生素A酸、9-顺-视黄酸、13-顺式-视黄酸、视黄醇(维生素A)、他莫昔芬和曲格列酮。

[0180] 其它优选的抗癌剂种类包括,举例来说,蝶啶族药物、Diynenes和鬼臼毒素。这些种类中特别有效的成员包括,举例来说,甲氨喋呤、鬼臼毒素或鬼臼毒素衍生物,例如依托泊苷或磷酸依托泊苷、异长春碱、长春地辛、环氧长春碱等等。

[0181] 此外其它与本文教导兼容的抗癌作用剂包括阿里他汀(auristatin)(例如,阿里他汀E和单甲基阿里他汀E)、格尔德霉素、卡奇霉素、短杆菌肽D、类美登素(maytansanoids)(例如美登素)、新制癌菌素(neocarzinostatin)、拓扑替康、紫杉烷类、细胞松弛素B、溴化乙锭、吐根碱、替尼泊苷、秋水仙碱、dihydroxy anthracindione、米托蒽醌、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素及其类似物或其同源物。

[0182] 而其它与本文教导兼容的抗癌剂包括茅屋霉素(tomaymycin)衍生物、美登素衍生物、cryptophycine衍生物、蒽环类衍生物、二膦酸衍生物、来普霉素衍生物、链黑菌素衍生物、阿里他汀衍生物和倍癌霉素(duocarmycin)衍生物。

[0183] 另一类可用作药物部分的兼容的抗癌剂是可有效针对肿瘤或免疫反应细胞的放射增敏药物。这种药物部分增强对电离辐射的敏感性,进而增加放射治疗的效力。不被理论限制,由放射增敏药物部分修饰和通过肿瘤细胞内化的抗体可将放射增敏剂递送至核的附近,在那里放射增敏将被最大化。失去放射增敏部分的抗体会迅速从血液清除,将残留的放射增敏剂定位于靶肿瘤中并在正常组织中提供最小吸收。从血液中清除后,辅助放射治疗可以通过特异性针对肿瘤的外部成束辐射、直接植入肿瘤的放射性或具有相同修饰抗体的系统性放射免疫治疗进行施用。

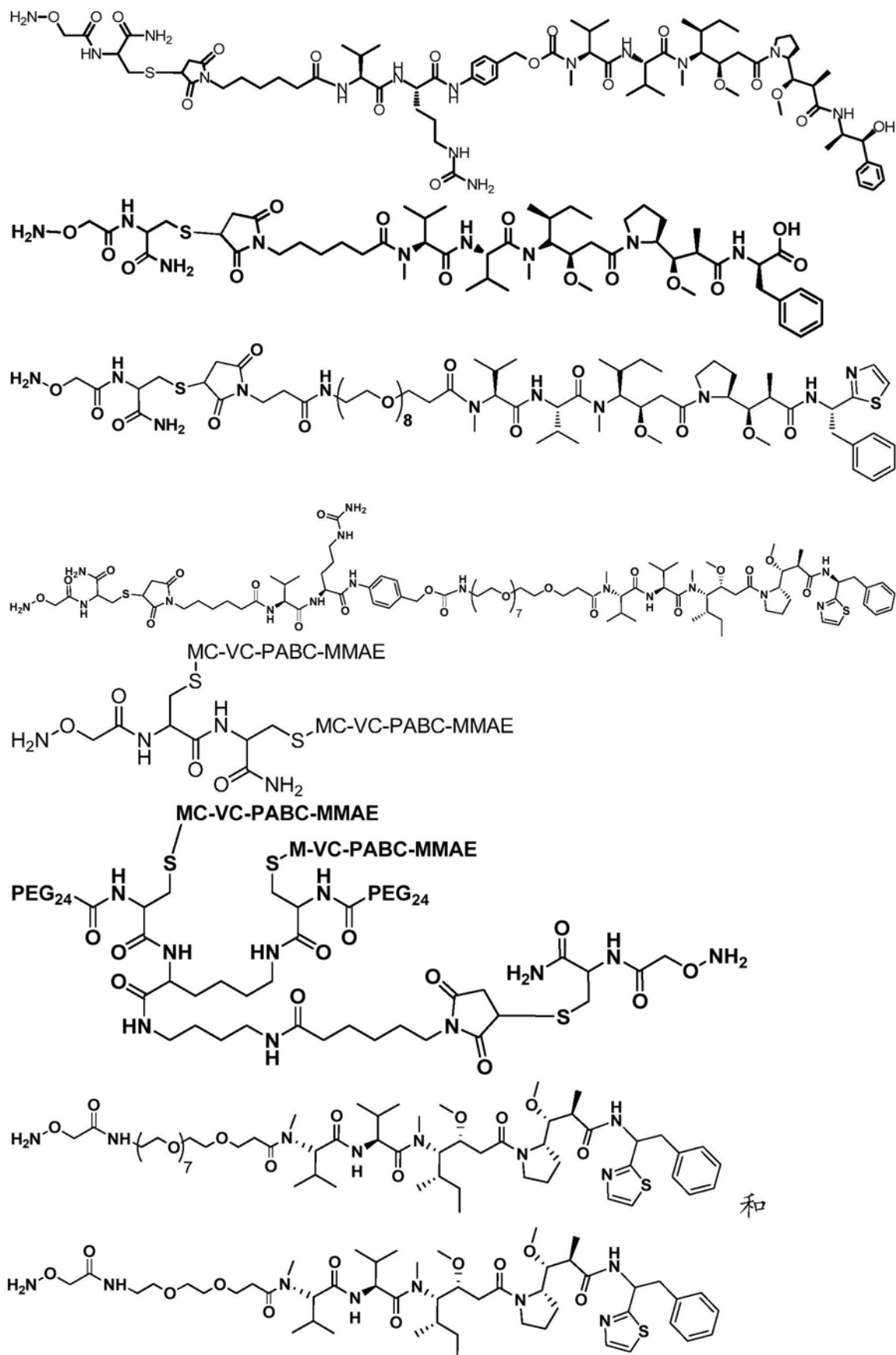
[0184] 在一个实施方案中,治疗剂包括具有高能电离辐射、能够引起核DNA中多重链断裂导致细胞死亡的放射性核素或放射性标记。典型的高能放射性核素包括: ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、

^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 和 ^{188}Re 。这些同位素通常产生具有短路径长度的高能 α -或 β -微粒。这种放射性核素杀伤与其非常接近的细胞,举例来说偶联物附着或进入的赘生物细胞。其对未定位的细胞具有很少或无影响且本质上无免疫原性。可选地,高能量同位素可通过对其他稳定同位素的热辐射生成,举例来说如硼中子捕获治疗(Guan等,PNAS,95:13206-10,1998)。

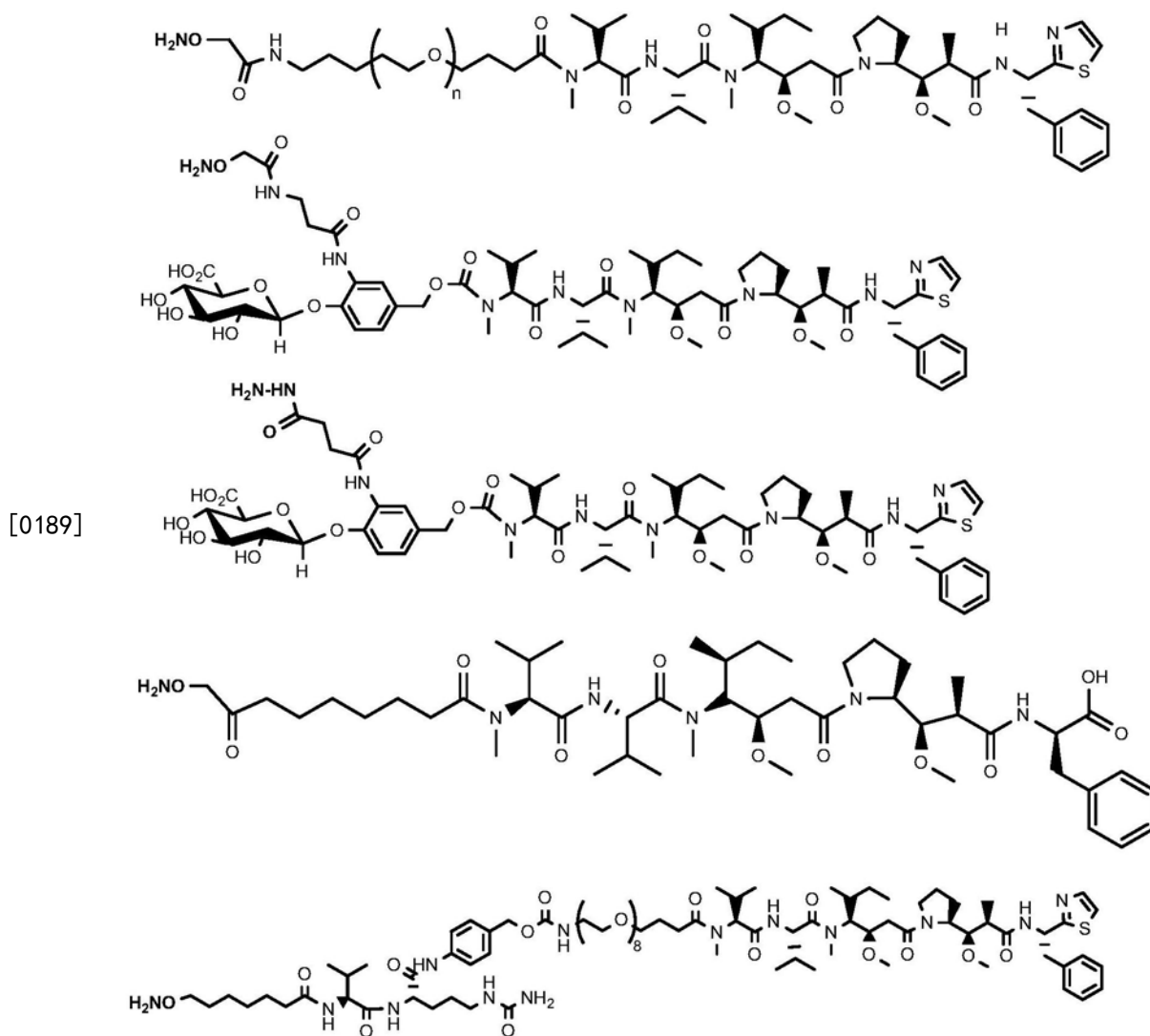
[0185] 在一个实施方案中,治疗剂选自MMAE、MMAF和PEG8-Do110。

[0186] 典型的治疗效应物部分包括以下结构:

[0187]



[0188] 在一个实施方案中,效应物部分选自:



[0190] 在一些实施方案中,效应物部分包括多于一个治疗剂。这些多重治疗剂可以相同或不同。

[0191] i. 诊断效应物部分

[0192] 在某些实施方案中,本公开的结合多肽与包含诊断剂的效应物部分偶联。在一个实施方案中,诊断剂是可检测的小分子标记例如生物素、荧光团、生色团、自旋共振探针或放射性标记。典型的荧光团包括荧光染料(例如,荧光素、若丹明等)和其它发光分子(例如,鲁米诺)。荧光团可以是环境敏感的,从而如果其位于在结合底物(例如丹酰探针)时经历结构改变的经修饰结合多肽中的一个或多个残基附近,那么其荧光会发生改变。典型的放射性标记包含含有具有一个或多个低敏感核的原子(^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H 、 ^{125}I 、 ^{124}I 、 ^{123}I 、 ^{99}Tc 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 及类似)的小分子。优选地,放射性核素是具有如下半衰期的 γ 、光子或正电子发射放射性核素,所述半衰期适于在施用和定位至成像位点之间所经过的时间之后允许活性或检测。

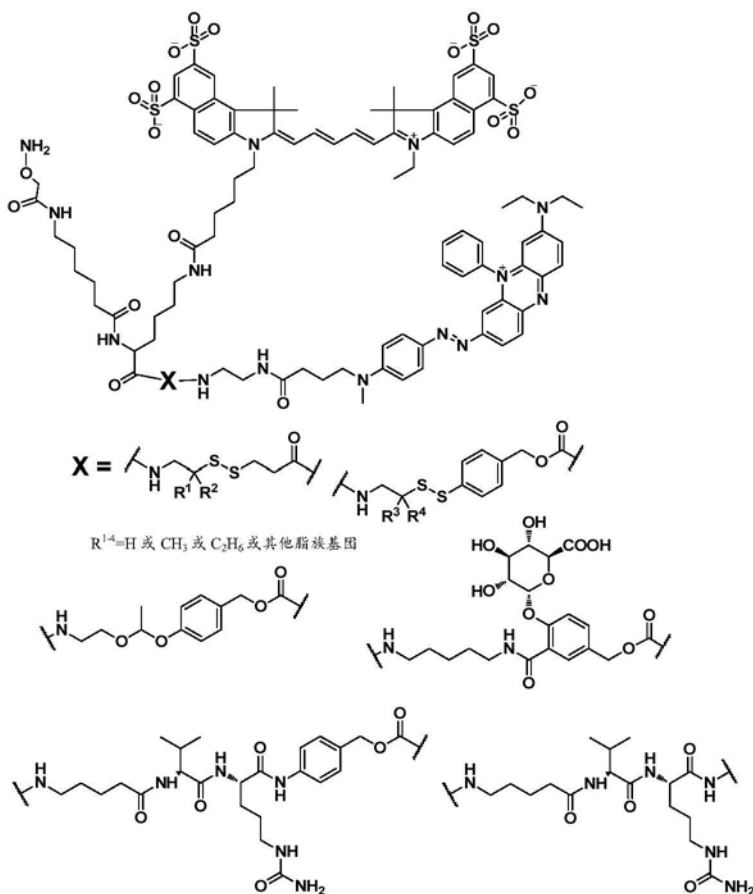
[0193] 在一个实施方案中,诊断剂是多肽。典型的诊断多肽包括具有发荧光或发色活性的酶,例如具有裂解形成荧光团或发色团作为产物的底物的能力的酶(即,报告蛋白如萤光素酶)。其它诊断蛋白可具有固有的发荧光或发色活性(例如,来自生物发光海洋生物的绿色、红色和黄色荧光生物发光水母的蛋白(aequorin protein))或其可包含含有一个或多

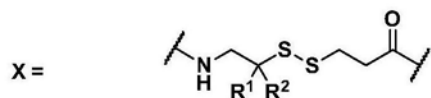
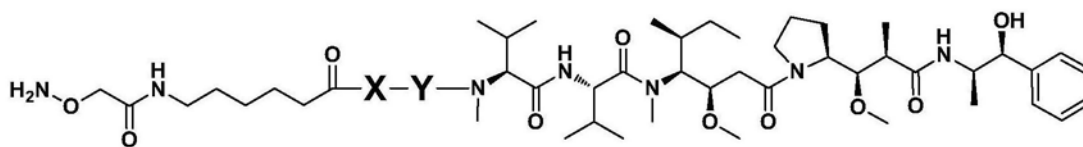
个低能量放射性核的蛋白 (^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H 、 ^{125}I 、 ^{124}I 、 ^{123}I 、 ^{99}Tc 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 等)。

[0194] 关于结合本公开的放射标记的偶联物的用途,本公开的结合多肽可直接标记(如通过碘化作用)或可间接通过螯合剂的使用进行标记。本文所用短语“间接标记”以及“间接标记方式”都意为将螯合剂与结合多肽共价附着和将至少一种放射性核素与螯合剂结合。这种螯合剂通常指双功能螯合剂,因为它们结合多肽和放射性同位素二者。典型的螯合剂包括1-异硫氰基苄基-3-甲基二乙三胺五乙酸(1-isothiocycmatobenzyl-3-methyldiothelene triaminepentaacetic acid) (“MX-DTPA”)以及环己基二乙三胺五乙酸(cyclohexyl diethylenetriamine pentaacetic acid) (“CHX-DTPA”)衍生物。其它螯合剂包括P-DOTA和EDTA衍生物。用于间接标记的特别优选的放射性核素包括 ^{111}In 和 ^{90}Y 。多数影像学利用 5mCi ^{111}In 标记的抗体,由于这种高剂量既安全且与较低的剂量相比具有增加的成像效率,最佳的成像发生在抗体施用后的第三至六天。参见,举例来说,Murray, (1985), J.Nuc.Med.26:3328 and Carraguiillo et al, (1985), J.Nuc.Med.26:67。用于直接标记的特别优选的放射性核素是 ^{131}I 。本领域的技术人员可以理解的是非放射性偶联物也可依赖选择的待偶联的作用剂进行组装。

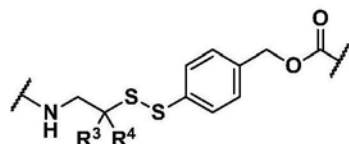
[0195] 在某些实施方案中,诊断效应物部分是FRET(荧光共振能量转移)探针。FRET已被用于多种诊断应用包括癌症的诊断。FRET探针可包括与供体和FRET探针的受体部分连接的可裂解接头(酶敏感或pH接头),其中裂解导致增强的荧光(包括近红外线)(参见,例如,A.Cobos-Correa等.Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation, Nature Chemical Biology (2009), 5(9), 628-63; S.Gehrig等, Spatially Resolved Monitoring of Neutrophil Elastase Activity with Ratiometric Fluorescent Reporters (2012) Angew.Chem.Int.Ed., 51, 6258-6261)。

[0196] 在一个实施方案中,效应物部分选自:

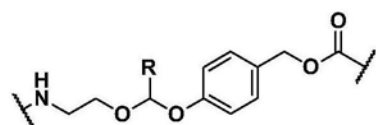




[0200]

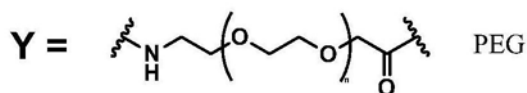
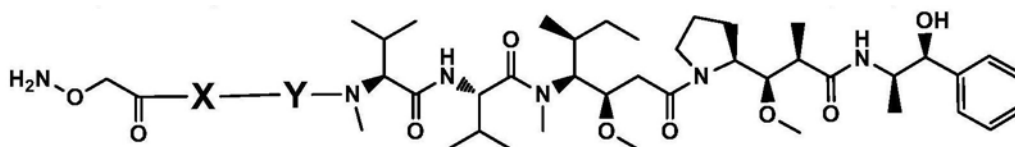


R^{1-4} = H 或 CH_3 或 C_2H_5 或其他脂族基团

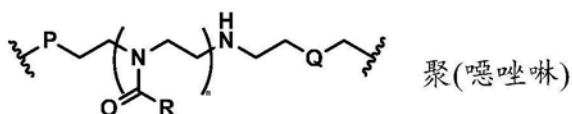
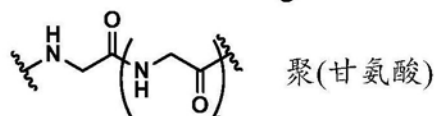


R = H 或取代的或未取代的烷基、烷基芳基

[0201] 在另一实施方案中,效应物部分可包括亲水性和生物相容性部分如聚(甘氨酸), 聚(噁唑啉)或PEG部分。下文提供了典型的结构(“Y”):



[0202]



[0203] R = H、未取代的或含烷基的官能团

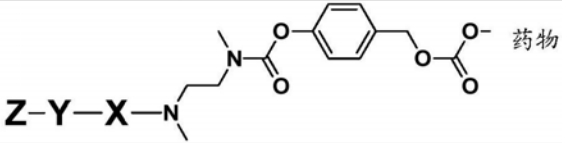
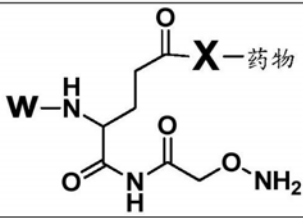
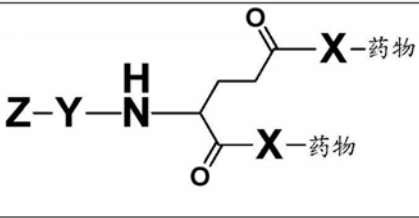
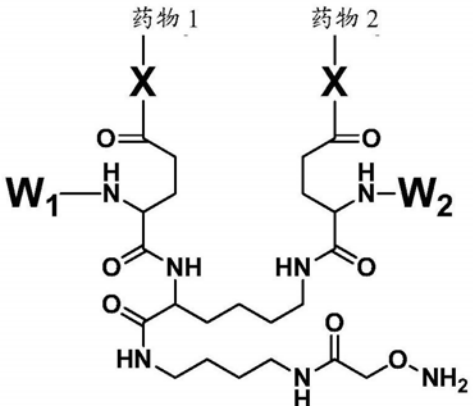
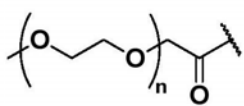
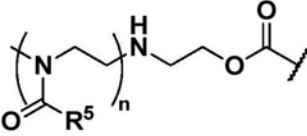
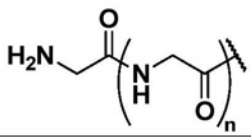
[0204] P和Q = 相同或不同的官能团,用于连接药物、报道分子和蛋白质

[0205] 在某些实施方案中,效应物部分包括促进经由稳定的脲连接基与结合多肽偶联的氨基氧基团。典型的包括氨基氧基的效应物部分阐述于本文的表2中。

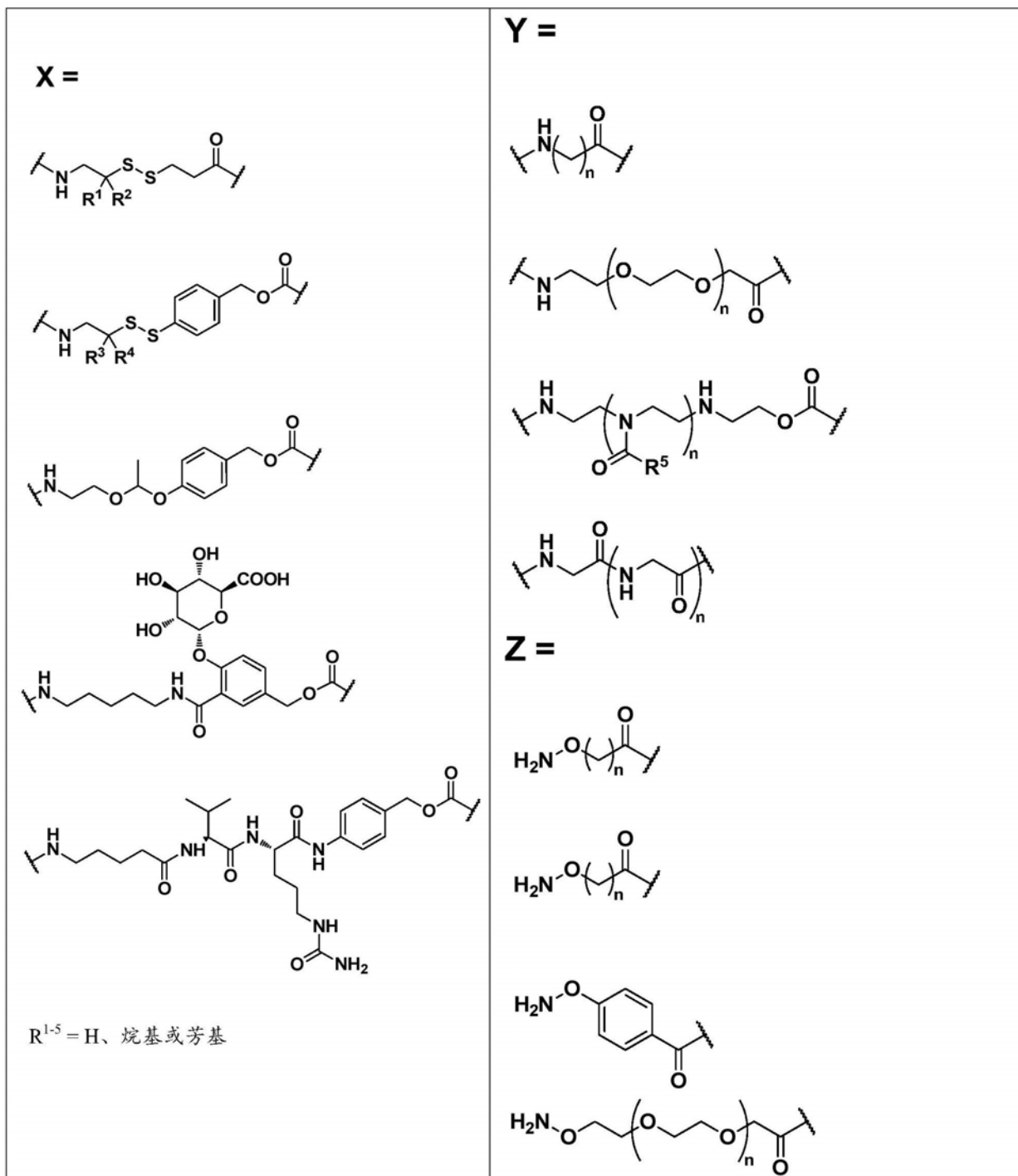
[0206] 表2. 典型的氨基氧基效应物部分 (其中X可以是任何接头,Y是任何间隔物,且其中X和/或Y是任选的)

[0207] 此处的药物可以是任何文中表1的药物。药物1和药物2可以是相同或不同的药物。

[0208]

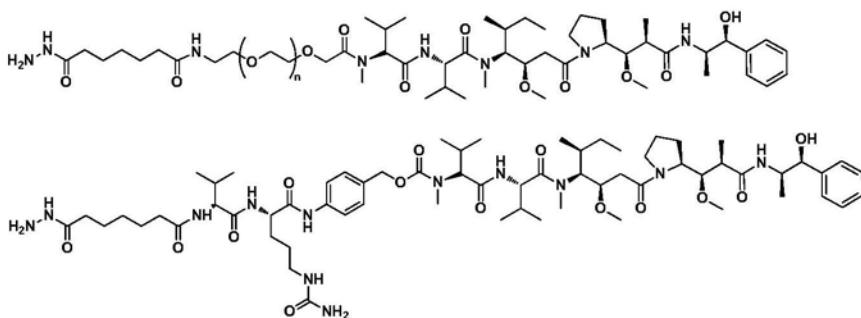
Z-Y-X-药物	
	
	<p>W、W1 和 W2=</p>   

[0209]

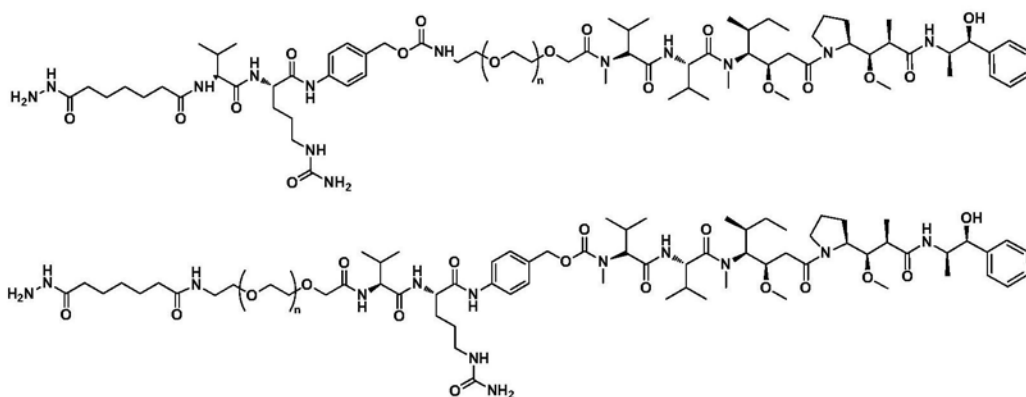


[0210] 在其他实施方案中,效应物部分包括胍和/或N-烷基化的胍基团来促进经由稳定的脰连接基与结合多肽的偶联。典型的包含氨基氧基的效应物部分于本文的表14中阐述。

[0211] 表14. 典型的胍和/或胍效应物部分



[0212]



[0213] V. 效应物部分与结合多肽的偶联

[0214] 在某些实施方案中,效应物部分与改变的结合多肽的氧化聚糖(例如,氧化的N-连接聚糖)偶联(直接或通过接头部分)(例如,在抗体Fc结构域的N298处的工程化的聚糖)。术语“氧化的聚糖”意为聚糖上的醇取代基被氧化,成为羰基取代基。羰基取代基可与合适的氮亲核试剂反应以形成碳-氮双键。举例来说,羰基与氨基氧基或肼基团的反应将分别形成肟或腙。在一个实施方案中,羰基取代基是醛。合适的氧化的聚糖包括氧化的半乳糖和氧化的唾液酸。

[0215] 在一个实施方案中,式(II)的修饰的多肽可以是式(II):

[0216] $Ab(Gal-C(O)H)_x(Gal-Sia-C(O)H)_y$

[0217] 式(II),

[0218] 其中

[0219] A) Ab是本文定义的抗体或其它结合多肽;

[0220] B) Gal是来源于半乳糖的组分;

[0221] C) Sia是来源于唾液酸的组分;

[0222] D) x是0至5;且

[0223] E) y是0至5,

[0224] 其中x和y至少之一不为0。

[0225] 任何领域公认的化学可用于将效应物部分(例如,包含接头部分的效应物部分)与聚糖偶联(参见,例如,Hermanson,G.T.,Bioconjugate Techniques.Academic Press (1996),其以其整体并入本文)。在某些实施方案中,聚糖的糖残基(例如,唾液酸或半乳糖残基)首先被氧化(例如,使用高碘酸钠或半乳糖氧化酶处理)以生成反应性醛基团。该醛基团与效应物部分氨基氧基或肼基反应来分别形成肟或腙接头。应用该通用反应方案的典型方法阐述于实施例10至15中。

[0226] 在某些实施方案中,结合多肽的天然或工程化的聚糖首先在体外用糖基转移酶预处理以提供具有适当反应性的末端糖残基。举例来说,首先可使用半乳糖基转移酶(Gal T)和唾液酸转移酶(Sial T)的组合来实现唾液酸化。在某些实施方案中,缺乏半乳糖的(G0F或G0)或仅包含一个半乳糖的(G1F或G1)双触角聚糖可被转化成适于偶联的高价半乳糖基化的或唾液酸化的结构(G1F、G1、G2F、G2、G1S1F、G1S1、G2S1F、G2S1、G2S2F或G2S2)。

[0227] 典型的用于产生唾液酸化的糖偶联物的偶联方案示于附图25C。使用半乳糖基转移酶(Gal T)和唾液酸转移酶(Sial T)的组合将唾液酸残基通过酶且位点特异性地引入抗体的聚糖(例如,在Fc结构域的N298处的工程化的聚糖)。引入的唾液酸残基随后用低浓度的高碘酸钠氧化来产生反应性唾液酸醛,其具有与药物接头(例如,氨基氧基药物接头)的适当反应性以生成抗体药物偶联物(ADC)(例如,肟连接的ADC)。通过体外重塑控制聚糖数目和唾液酸残基数目,本领域的技术人员可对ADC的药物-抗体比(DAR)进行精确控制。举例来说,如果添加~1唾液酸至每条重链中的单一双触角聚糖(A1F),那么可均匀获得具有DAR为2的抗体或结合多肽。

[0228] VI. 修饰的结合多肽

[0229] 在某些实施方案中,本发明提供了修饰多肽,其为偶联效应物部分与改变的结合多肽(例如,在抗体Fc结构域的N298处的工程化的聚糖)的氧化聚糖(例如,氧化的N-连接聚糖)偶联(直接或通过接头部分)的产物。

[0230] 在某些实施方案中,

[0231] 在一个实施方案中,结合多肽可以为式(III):

[0232] $Ab-(Gal-C(H)=N-Q-CON-X)_x(Gal-Sia-C(H)=N-Q-CON-X)_y$

[0233] 式(III),

[0234] 其中:

[0235] A) Ab是如本文定义的抗体;

[0236] B) Q是NH或O;

[0237] C) CON是如本文定义的连接物部分;且

[0238] D) X是如本文定义的治疗或诊断剂;

[0239] E) Gal是来源于半乳糖的组分;

[0240] F) Sia是来源于唾液酸的组分;

[0241] G) x是0至5;且

[0242] H) y是0至5,

[0243] 其中x和y至少之一不为0。

[0244] 在一个实施方案中,结合多肽可以为式(III)可以为式(IIIa):

[0245] $Ab(Gal-C(H)=N-Q-CH_2-C(O)-Z-X)_x(Gal-Sia-C(H)=N-Q-CH_2-C(O)-Z-X)_y$

[0246] 式(IIIa),

[0247] 其中:

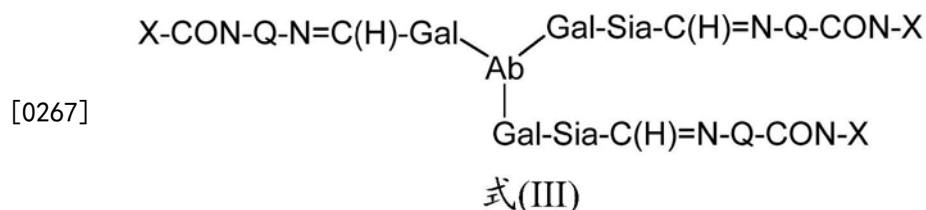
[0248] A) Ab是抗体;

[0249] B) Q是NH或O;

[0250] C) Z是Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-,其中

[0251] i. Cys是来源于半胱氨酸的组分;

- [0252] ii.MC是来源于马来酰亚胺的组分；
 [0253] iii.VC是来源于与瓜氨酸偶联的缬氨酸的组分；
 [0254] iv.PABC是来源于4-氨基苄基氨基甲酸酯的组分；
 [0255] v.X是如本文定义的治疗或诊断剂；
 [0256] vi.a是0或1；
 [0257] vii.b是0或1；
 [0258] viii.c是0或1；且
 [0259] ix.f是0或1；
 [0260] D) X是如本文定义的治疗剂；
 [0261] E) Gal是来源于半乳糖的组分；
 [0262] F) Sia是来源于唾液酸的组分；
 [0263] G) x是0至5；且
 [0264] H) y是0至5，
 [0265] 其中x和y至少之一不为0。
 [0266] 应该理解的是式(III)并非意在暗示抗体、Gal取代基和Gal-Sia取代基以链样方式连接。而是当这些取代基存在时，抗体直接与每个取代基连接。举例来说，其中x为1且y为2的式(III)的结合多肽可具有如下文所示的排列：



- [0268] 式(III)中的CON取代基和其中的组分参考式(I)关于效应物部分的描述。
 [0269] 在一个实施方案中，Q是NH。在另一实施方案中，Q是O。
 [0270] 在一个实施方案中，x是0。
 [0271] 式(III)的抗体Ab可以是如本文描述的任何合适的抗体。
 [0272] 在一个实施方案中，提供用于制备式(III)的结合多肽的方法，所述方法包括使如下式(I)的效应物部分：
 [0273] $\text{NH}_2\text{-Q-CON-X}$
 [0274] 式(I)
 [0275] 其中
 [0276] A) Q是NH或O；
 [0277] B) CON是连接物部分；且
 [0278] C) X是如本文定义的治疗或诊断剂，
 [0279] 与如下式(II)的修饰的抗体反应：
 [0280] Ab (OXG)_r
 [0281] 式(II)
 [0282] 其中
 [0283] A) OXG是氧化的聚糖；且

[0284] B) r选自0至4;

[0285] 在一个实施方案中,提供用于制备式(III)的结合多肽的方法,所述方法包括将如下式(I)的效应物部分:

[0286] $\text{NH}_2\text{-Q-CON-X}$

[0287] 式(I),

[0288] 其中:

[0289] A) Q是NH或O;

[0290] B) CON是连接物部分;且

[0291] C) X是如本文定义的治疗或诊断剂,

[0292] 与具有如下式(IIa)的修饰的抗体反应:

[0293] $\text{Ab}(\text{Gal-C}(\text{O})\text{H})_x(\text{Gal-Sia-C}(\text{O})\text{H})_y$

[0294] 式(IIa),

[0295] 其中

[0296] A) Ab是如本文所述的抗体;

[0297] B) Gal是来源于半乳糖的组分;

[0298] C) Sia是来源于唾液酸的组分;

[0299] D) x是0至5;且

[0300] E) y是0至5,

[0301] 其中x和y至少之一不为0。

[0302] IX.用修饰抗体的治疗方法

[0303] 一方面,本发明提供治疗或诊断患者的方法,其中包括施用有效量的本文公开的结合多肽。本公开的优选实施方案提供用于在需要该种治疗的哺乳动物受试者中用于诊断和/或治疗病症例如赘生性病症的试剂盒和方法。优选地,所述受试者是人。

[0304] 本公开的结合多肽在许多不同的应用中都非常有效。举例来说,在一个实施方案中,提述的结合多肽可用于减少或消除带有通过结合多肽的结合结构域识别的表位的细胞。在另一实施方案中,提述的结合多肽可有效消除循环中的可溶性抗原或降低循环中可溶性抗原的浓度。在一个实施方案中,结合多肽可降低肿瘤大小,抑制肿瘤生长和/或延长带有肿瘤的动物的生存时间。相应地,本公开还涉及在人或其它动物中通过对这些人或动物施用有效的、非毒性量的修饰抗体来治疗肿瘤的方法。本领域的技术人员会能够通过常规的实验来确定用于治疗恶性肿瘤目的的修饰的结合多肽的有效的、非毒性的量为多少。举例来说,修饰抗体或其片段治疗上具有活性的量可根据下列因素变化,如疾病阶段(例如,阶段I对阶段IV)、年龄、性别、医学并发症(例如,免疫抑制状态或疾病)和受试者的重量以及修饰抗体在该受试者中引起预期反应的能力。可调整给药方案来提供最佳治疗反应。举例来说,可每天施用多个分开剂量,或可将剂量按治疗情况的紧急程度所示按比例减少。

[0305] 总的来说,本公开中提供的组合物可用于预防或治疗性地处理任何包含允许所述修饰抗体靶向癌细胞的抗原标记的任何赘生物。

[0306] X.施用修饰抗体或其片段的方法

[0307] 制备和向受试者施用本公开的结合多肽的方法为本领域熟知且可由本领域的技术人员轻而易举确定。施用本公开的结合多肽的途径可以为口服、胃肠外、通过吸入或局

部。本文所用术语肠外包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、直肠或阴道施用。通常优选的为静脉内、动脉内、皮下和肌内形式的胃肠外的施用。尽管所有这些形式的施用明确地被考虑在本公开的保护范围之内，用于施用的形式将为用于注射的溶液，特别是用于静脉内或动脉内注射或滴注的溶液。通常，用于注射的合适的药物组合物可以包括缓冲液（例如，乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液）、表面活性剂（例如，聚山梨酯）、任选的稳定剂（例如，人白蛋白）等。然而，在其它与本文的教导兼容的方法中，修饰的抗体可直接递送至不良细胞群体的位点进而增加疾病组织向治疗剂的暴露。

[0308] 在一个实施方案中，施用的结合多肽是如下式 (III) 的结合多肽：

[0309]
$$\text{Ab}(\text{Gal-C}(\text{H})=\text{N-Q-CON-X})_x(\text{Gal-Sia-C}(\text{H})=\text{N-Q-CON-X})_y$$

[0310] 式 (III)

[0311] 其中：

[0312] A) Ab 是如本文定义的抗体；

[0313] B) Q 是 NH 或 O；

[0314] C) CON 是如本文定义的连接物部分；且

[0315] D) X 是如本文定义的治疗或诊断剂；

[0316] E) Gal 是来源于半乳糖的组分；

[0317] F) Sia 是来源于唾液酸的组分；

[0318] G) x 是 0 至 5；且

[0319] H) y 是 0 至 5，

[0320] 其中 x 和 y 至少之一不为 0。

[0321] 用于胃肠外施用的配制物包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油以及可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载剂包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液，包括盐水和缓冲介质。在本公开的组合物和方法中，药学上可接受的载剂包括但不限于 0.01-0.1M 并且优选 0.05M 磷酸盐缓冲液或 0.8% 盐水。其它常用的胃肠外媒介物包括磷酸钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏溶液或不挥发性油。静脉内媒介物包括液体和营养补充剂、电解质补充剂，如基于林格氏葡萄糖的那些等。防腐剂以及其它添加剂也可存在，如举例来说，抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。更具体地，适于可注射用途的药物组合物包括无菌水性溶液（在水溶性的情况下）或分散剂以及用于临场制备无菌可注射溶液或分散剂的无菌粉末。在这些情况中，组合物必须是无菌的且应该以存在轻松可注射性的程度流动。其在加工和保存条件下应该是稳定的，且将优选针对微生物如细菌和真菌的污染进行防腐。载剂可以是溶剂或分散培养基，其包括举例来说水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等），及其合适的混合物。举例来说，适当的流动性可以通过包衣如卵磷脂的使用、在分散剂的情况下通过维持所需微粒大小以及通过表面活性剂的使用进行维持。

[0322] 对微生物作用的预防可通过多种抗细菌和抗真菌剂实现，举例来说，对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况下，其优选在组合物中包括等渗剂，例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇或氯化钠。可注射组合物的延长的吸收可通过在组合物中包括延迟吸收的作用剂获得，举例来说，单硬脂酸铝和明胶。

[0323] 在任何情况下，无菌可注射的溶液可通过以所需的量在合适的溶剂中伴随本文枚

举的成分中的一种或组合并入活性化合物(例如,修饰的结合多肽本身或与其它活性剂联合)进行制备,如果需要,随后进行过滤除菌。大体上,分散剂通过将活性化合物并入包含基础分散介质以及所需的其它来自那些上文枚举的成分的无菌媒介物进行制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法为真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分的粉末加任何额外的来自之前其无菌过滤溶液的期望成分。用于注射的制备物被加工、填充入容器,如安瓿、袋、瓶、注射器和小瓶,并根据本领域已知的方法在无菌条件下密封。此外,制备物可被包装并以试剂盒的形式销售,如在共同待审的U.S.S.N.09/259,337和U.S.S.N.09/259,338中所述的那些,其每一篇在本文通过提述并入。这些制品将优选地具有标签和包装内页,其表明相关的组合物可用于治疗患有或易患自身免疫或赘生性病症的受试者。

[0324] 本公开的组合物用于上述状况的治疗的有效剂量依赖于许多不同因素而变化,包括施用方式、靶位点、患者的生理状态、患者为人或动物、其它药物的施用以及治疗是否为预防性还是治疗性。通常,患者是人,但也可治疗非人的哺乳动物包括转基因哺乳动物。治疗剂量可使用本领域的技术人员已知的常规方法滴定测量来优化安全性和效力。

[0325] 对于采用结合多肽的被动免疫,剂量范围可例如从约0.0001至100mg/kg,以及更通常为0.01至5mg/kg(例如,0.02mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg等)的宿主体重。举例来说,剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内,优选至少1mg/kg。在上述范围的中间剂量也意在包括于本公开的保护范围之内。受试者可每日、隔日、每周或根据任何其它通过经验分析确定的日程安排施用这样的剂量。典型的治疗意味着以多重剂量在延长的时程施用,举例来说,施用至少六个月。其它典型的治疗方案意味着每两周施用一次或每月一次或每3至6个月一次。典型的剂量日程安排包括在连续的每日1-10mg/kg或15mg/kg,隔日30mg/kg或每周60mg/kg。在一些方法中,同时使用具有不同结合特异性的两种或更多种单克隆抗体,在这样的情况下每种抗体的施用剂量都落入所示的范围内。

[0326] 本公开的结合多肽可以在多种情况下施用。单剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。间隔可以是不规则的,如通过测量患者中的修饰的结合多肽或抗原的血液水平来指明。在一些方法中,调整剂量来实现修饰的结合多肽的血浆浓度为1-1000 μ g/ml且在一些方法中为25-300 μ g/ml。可选地,结合多肽可以作为缓释制剂施用,在这种情况下需要以较低的频率的施用。对于抗体,剂量和频率的变化取决于抗体在患者中的半衰期。总的来说,人源化的抗体展示出最长的半衰期,随后是嵌合抗体和非人抗体。

[0327] 施用的剂量和频率可取决于治疗是预防性或治疗性进行变化。在预防性的应用中,包含本发明抗体的组合物或其鸡尾酒混合物可施用于未在疾病状态的患者来增强患者的抗性。这种量被定义为“预防有效剂量”。在这种用途中,精确的量也取决于患者的健康和整体免疫力状态,但通常在0.1至25mg每剂量,特别是0.5至2.5mg每剂量的范围。相对低的剂量以相对不频繁的间隔在较长的时程进行施用。一些患者在他们生命的剩余时间内持续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要相对高的剂量(例如,约1至400mg/kg抗体每剂量,对于放射性免疫偶联物更通常使用5至25mg的剂量以及对于细胞毒性药物修饰的抗体使用更高的剂量)以相对短的间隔,直到疾病进展被降低或终止,并且优选直到患者显示出疾病症状的部分或全部缓解。此后,可对患者施用预防性方案。

[0328] 本公开的结合多肽可任选地与其它作用剂组合施用,所述其它作用剂可有效治疗需要(例如,预防性或治疗性)治疗的病症或状况。本公开的90Y-标记的修饰抗体的有效单治疗剂量(即,治疗上有效的量)范围在约5至约75mCi之间,更优选地在约10至约40mCi之间。131I-修饰抗体的有效单治疗非骨髓消融剂量范围为约5和约70mCi之间,更优选地在约5和约40mCi之间。131I-标记的抗体的有效单治疗消融剂量(即,可能需要自体骨髓移植)范围为约30至约600mCi,更优选地在约50和少于约50mCi之间。在与嵌合抗体的偶联中,由于相对小鼠抗体较长的循环半衰期,碘-131标记的嵌合抗体的有效单治疗非骨髓消融剂量在约5和约40mCi之间,更优选地少于约30mCi。对于例如111In标记的成像标准通常少于5mCi。

[0329] 尽管结合多肽可如上文所述施用,但是必须强调的是在其它实施方案中结合多肽可作为一线治疗施用至若非如此则是健康的患者中。在这种实施方案中,可将结合多肽施用至具有正常或平均红骨髓储备的患者和/或施用至从来未经历和没有正在经历其它治疗的患者。如本文所用,修饰抗体或其片段与辅助治疗偶联或联合施用意味着连续、同时、同延(coextensive)、伴随或同期施用或应用所述治疗和公开的抗体。本领域的技术人员将能够理解组合治疗方案的多种组分的施用或应用可定时来增强治疗的整体有效性。举例来说,化疗剂可以标准的、已知的治疗过程施用,随后的数周内进行本公开的放射免疫偶联物施用。反过来,与结合多肽关联的细胞毒素可静脉内施用,随后进行肿瘤定位的外部成束辐射。在另一实施方案中,修饰的结合多肽可同时与一种或多种选择的化疗剂以单一诊所治疗(office visit)进行施用。本领域的技术人员(例如,有经验的肿瘤学家)基于选择的辅助治疗和本说明书的教导能够轻而易举地辨别有效的组合治疗方案而无需过度实验。

[0330] 在这方面应该理解的是结合多肽和化疗剂的组合可以任何顺序、在任何为患者提供治疗益处的时间框架内施用。也就是说,化疗剂和结合多肽可以任何顺序或同时施用。在选择实施方案中,本公开的结合多肽会被施用于之前已经经历化疗的患者。在另外的实施方案中,结合多肽和化疗治疗会基本上同时或共同施用。举例来说,可将结合多肽在经历化疗疗程时给予患者。在优选的实施方案中,修饰抗体会在任何化疗剂或治疗的一年内施用。在其他优选实施方案中,结合多肽会在任何化疗剂或治疗的10、8、6、4或2月内施用。在其他优选实施方案中,结合多肽会在任何化疗剂或治疗的4、3、2或1周内施用。在其他优选实施方案中,结合多肽会在任何化疗剂或治疗的5、4、3、2或1天内施用。应该进一步理解的是两种作用剂或治疗可在大约几小时或分钟内施用至患者(即基本上同时)。

[0331] 应该进一步理解的是本公开的结合多肽可与任何化疗剂或在体内消除、降低、抑制或控制赘生细胞生长的作用剂(例如,提供组合的治疗方案)偶联或组合使用。典型的与本公开兼容的化疗剂包括烷化剂、长春花生物碱(例如,长春新碱和长春碱)、甲基苄肼、氮甲蝶呤和强的松。四种药物的组合MOPP(二氯甲二乙胺(氮芥)、长春新碱(长春新碱(Oncovin))、甲基苄肼和强的松)在治疗许多种类的淋巴瘤中非常有效且包括本公开的优选实施方案。在抗MOPP患者中,可使用ABVD(例如,阿霉素、博来霉素、长春碱和达卡巴嗪)、ChIVPP(苯丁酸氮芥、长春碱、甲基苄肼和强的松)、CABS(洛莫司汀、阿霉素、博来霉素和链脲佐菌素)、MOPP加ABVD、MOPP加ABV(阿霉素、博来霉素和长春碱)或BCVPP(卡莫司汀、环磷酰胺、长春碱、丙卡巴肼和强的松)的组合。Arnold S.Freedman and Lee M.Nadler, Malignant Lymphomas, in HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 1774-1788 (Kurt J.Isselbacher et al, eds., 13th ed. 1994) 和V.T.DeVita等(1997)且其中引用的

参考文献用于标准剂量给药和时间安排。这些治疗剂可不经变化使用,或根据特定患者的需要进行改变,与一种或多种如本文所述的本公开的结合多肽组合。

[0332] 其它在本公开的上下文中有用的方案包括施用单烷基化剂,例如环磷酰胺或苯丁酸氮芥,或组合如CVP(环磷酰胺、长春新碱和强的松)、CHOP(CVP和阿霉素)、C-MOPP(环磷酰胺、长春新碱、强的松和丙卡巴肼)、CAP-BOP(CHOP加甲基苄肼和博来霉素)、m-BACOD(CHOP加甲氨蝶呤、博来霉素和甲酰四氢叶酸)、ProMACE-MOPP(强的松、甲氨蝶呤、阿霉素、环磷酰胺、依托泊苷和甲酰四氢叶酸加标准MOPP)、ProMACE-CytaBOM(强的松、阿霉素、环磷酰胺、依托泊苷、阿糖胞苷、博来霉素、长春新碱、甲氨蝶呤和甲酰四氢叶酸)以及MACOP-B(甲氨蝶呤、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱,固定剂量的强的松、博来霉素和甲酰四氢叶酸)。本领域的技术人员能够轻而易举地确定这些方案的每一种的标准剂量和时间安排。也可将CHOP与博来霉素、甲氨蝶呤、甲基苄肼、氮芥、胞嘧啶阿拉伯糖苷和依托泊苷进行组合。其它兼容的化疗剂包括,但不限于,2-氯脱氧腺苷(2-CDA)、2'-脱氧助间型霉素和氟达拉滨。

[0333] 对于未能实现缓解或复发的具有中度和高度NHL的患者,可使用挽救治疗。挽救治疗应用单独或组合给予的药物如胞嘧啶阿拉伯糖苷、卡铂、顺铂、依托泊苷和异环磷酰胺。在某些赘生性疾病的复发或侵略性(aggressive)形式中,经常使用下列方案:IMVP-16(异环磷酰胺、甲氨蝶呤和依托泊苷)、MIME(甲基-gag、异环磷酰胺、甲氨蝶呤和依托泊苷)、DHAP(地塞米松、高剂量阿糖胞苷和顺铂)、ESHAP(依托泊苷、甲泼尼龙、HD阿糖胞苷、顺铂)、CEPP(B)(环磷酰胺、依托泊苷、丙卡巴肼、强的松和博来霉素)以及CAMP(洛莫司汀、米托蒽醌、阿糖胞苷和强的松),每种都使用已知的剂量比例和时间安排。

[0334] 将与本公开的修饰抗原的组合使用的化疗剂的量可随受试者变化或可以根据本领域已知的进行施用。参见举例来说,Bruce A.Chabner等,Antineoplastic Agents,in GOODMAN&GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287(Joel G.Hardman等,eds.,9th ed.1996)。

[0335] 如之前讨论,本公开的结合多肽、其免疫反应性的片段或其组合可以用于体内治疗哺乳动物病症的药理学上有效的量进行施用。在这方面,应该理解的是会配制公开的结合多肽来促进施用并促进活性剂的稳定性。

[0336] 优选地,本发明的药物组合物包括药理学上可接受的、非毒性的、无菌载剂如生理盐水、无毒缓冲液、防腐剂等。就本发明而言,修饰的结合多肽、其免疫反应性的片段或其组合(与治疗剂偶联或未偶联)的药理学上有效的量将意为足以实现与抗原的有效结合并实现益处例如改善疾病或病症的症状或检测物质或细胞的量。在肿瘤细胞的情况下,修饰的结合多肽将优选能够与在赘生物或免疫反应性细胞上的选择的免疫反应性抗原相互作用并导致这些细胞的死亡增加。当然,本公开的药物组合物可以单一或多重剂量施用来提供修饰的结合多肽的药理学上有效的量。

[0337] 在符合本公开的范围的情况下,可将本公开的结合多肽依照前述的治疗方法以足以产生治疗或预防作用的量施用至人或其它动物。本公开的结合多肽可以通过将本公开的抗体与常规药理学上可接受的载剂或稀释剂根据已知技术组合来制备的常规剂量形式施用至这些人或其它动物。本领域的技术人员将认识到药理学上可接受的载剂或稀释剂的形式和特征由其会与之组合的活性成分的量、施用的途径和其它已知的变量决定。本领域的技术人员可进一步理解包含一个和多个本公开描述的结合多肽品种的鸡尾酒混合物可被证明

特别有效。

[0338] V. 结合多肽的表达

[0339] 一方面,本发明提供了编码本文公开的结合多肽的多核苷酸。还提供了制造包含表达这些多核苷酸的结合多肽的方法。

[0340] 编码本文公开的结合多肽的多核苷酸通常插入在用于引入宿主细胞的表达载体中,所述宿主细胞可用于产生预期数量的要求保护的抗体及其片段。相应地,在某些方面中,本发明提供了包括本文公开的多核苷酸的表达载体和包含这些载体和多核苷酸的宿主细胞。

[0341] 本文使用的术语“载体”或“表达载体”就说明书和权利要求而言,意为根据本发明作为用于在细胞中引入和表达预期基因的运载体使用的载体。如本领域的技术人员所知,这些载体可轻而易举选自自由质粒、噬菌体、病毒和逆转录病毒组成的组。总的来说,与本发明兼容的载体将包含选择标记、合适的限制位点以促进期望基因的克隆以及在进入真核或原核细胞和/或在真核或原核细胞中复制的能力。

[0342] 可采用多种表达载体系统用于本发明的目的。举例来说,一类载体采用来源于动物病毒如牛乳头状瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录病毒(RSV、MMTV或MOMLV)或SV40病毒的DNA元件。其它包括使用具有内部核糖体结合位点的多顺反子系统。此外,已将DNA整合入其染色体的细胞可通过引入一种或多种使得转染的宿主细胞得以选择的标记来进行选择。标记可为营养缺陷型宿主提供原养型、杀生物剂抗性(例如,抗生素)或对重金属如铜的抗性。可选择的标记基因可直接与待表达的DNA序列连接或通过共转化引入相同的细胞。也可能需要其它元件用于mRNA的最佳合成。这些元件可包括信号序列、剪接信号以及转录启动子、增强子和终止信号。在特别优选的实施方案中,克隆的可变区基因与如上文所述的重和轻链恒定区基因(优选人的)合成物一起插入表达载体中。

[0343] 在其它优选的实施方案中,本发明的结合多肽可使用多顺反子构建体进行表达。在这种表达系统中,感兴趣的多个基因产物如抗体的重和轻链可从单一多顺反子构建体生成。这些系统有利地使用内部核糖体进入位点(IRES)来在真核宿主细胞中提供相对高水平的本发明的多肽。兼容的IRES序列公开于美国专利6,193,980中,其在本文通过提述并入。本领域的技术人员将理解的是这种表达系统可用于有效产生本申请公开的全范围的多肽。

[0344] 更普遍的是,一旦制备了编码抗体或其片段的载体或DNA序列,可将表达载体引入合适的宿主细胞。也就是说,可对宿主细胞进行转化。质粒向宿主细胞的引入可通过本领域的技术人员熟知的许多技术实现。这些包括但不限于转染(包括电泳和电穿孔)、原生质体融合、磷酸钙沉淀、使用包膜DNA的细胞融合、显微注射和用完整病毒感染。参见,Ridgway, A.A.G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp.470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988)。更优选地,质粒经由电穿孔引入宿主。转化的细胞在适合轻链和重链产生的条件下生长,且对重和/或轻链蛋白的合成进行测试。典型的实验技术包括酶联免疫吸附实验(ELISA)、放射性免疫实验(RIA)或荧光激活细胞分选分析(FACS)、免疫组化等等。

[0345] 本文所用术语“转化”以其广泛含义使用,指DNA向受体宿主细胞的引入,所述引入改变基因型并继而导致受体细胞的改变。

[0346] 在这些相同的细胞系中,“宿主细胞”指已采用使用重组DNA技术构建并编码至少

一个异源基因的载体转化的细胞。在对用于分离来自重组宿主的多肽方法的描述中,除非另外清楚表明,否则术语“细胞”和“细胞培养物”可互换使用来指代抗体的来源。也就是说,从“细胞”回收多肽可指从离心的全细胞或从包括培养基和悬浮细胞二者的细胞培养物回收。

[0347] 在一个实施方案中,用于抗体表达的宿主细胞系是哺乳动物来源;本领域的技术人员能够确定最适于预期基因产物在其中表达的具体宿主细胞系。典型的宿主细胞系包括但不限于DG44和DUXB11(中国仓鼠卵巢细胞系,DHFR⁻)、HELA(人宫颈癌)、CVI(猴肾细胞系)、COS(具有SV40T抗原的CVI的衍生物)、R1610(中国仓鼠成纤维细胞)、BALBC/3T3(小鼠成纤维细胞)、HAK(仓鼠肾细胞系)、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT(牛内皮细胞)、RAJI(人淋巴细胞)、293(人肾)。在一个实施方案中,细胞系提供从其中表达的抗体的改变的糖基化,例如,无岩藻糖基化(afucosylation)(例如,PER.C6.RTM.(Crucell)或FUT8敲除CHO细胞系(Potelligent.RTM.细胞)(Biowa,Princeton,N.J.))。在一个实施方案中,可使用NS0细胞。CHO细胞为特别优选的。宿主细胞系通常可从商业服务、美国典型培养物保藏中心(American Tissue Culture Collection)或从公开文献处获得。

[0348] 体外生成允许规模扩大以提供大量的期望的多肽。在组织培养条件下用于哺乳细胞培养的技术为本领域公知且包括均匀悬浮培养,例如,在气升式反应器或连续搅拌反应器中,或固定或包埋的细胞培养,例如,在中空纤维中、微胶囊中、在琼脂糖微珠上或在陶瓷筒上。如果有必要和/或有期望,多肽溶液可通过管用色谱方法纯化,举例来说凝胶过滤、离子交换色谱、DEAE-纤维素上的色谱和/或(免疫)亲和色谱。

[0349] 编码本发明的结合多肽的基因也可在非哺乳动物细胞中表达如细菌或酵母或植物细胞中。在这方面,应该理解的是也可对多种单细胞非哺乳动物微生物如细菌进行转化;即能够在培养或发酵中生长的那些。对转化易感的细菌包括肠细菌科(enterobacteriaceae)的成员,如大肠杆菌(*Escherichia coli*)或沙门氏菌属(*Salmonella*);芽孢杆菌科(Bacillaceae)如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);肺炎球菌属(*Pneumococcus*);链球菌属(*Streptococcus*)和流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)的菌株。应该进一步理解的是,当在细菌中表达时,多肽可成为包涵体的部分。多肽必须经分离、纯化且随后组装成功能性分子。

[0350] 除原核细胞,也可使用真核微生物。虽然多个其它株也经常可用,但酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或通用的面包酵母是在真核微生物中最常使用的。对于在酵母属(*Saccharomyces*)中的表达,举例来说,经常使用质粒YRp7(Stinchcomb等,Nature, 282:39(1979);Kingsman等,Gene, 7:141(1979);Tschemper等,Gene, 10:157(1980))。该质粒已包含提供针对缺乏在色氨酸中生长的能力的突变酵母的选择标记的TRP1基因,举例来说ATCC No.44076或PEP4-1(Jones,Genetics, 85:12(1977))。trp1损伤作为酵母宿主细胞基因组特性存在,继而提供用于通过在不存在色氨酸中生长来检测转化的有效环境。

实施例

[0351] 本发明进一步通过下列实施例证明,其应为认为是阐述性而非限制性的。贯穿本申请的序列表、附图和所有参考文献、专利以及发表的专利申请的内容通过提述明确并入本文。

[0352] 实施例1.2C3抗CD-52高度糖基化的抗体突变体的设计、制备和表征

[0353] 将多重高度糖基化突变设计于抗CD-52抗体2C3的重链中,用于添加大基团至相互作用的界面的目的(例如,FcRn结合位点来调节抗体药代动力学),以供通过改变其与Fc γ Rs的相互作用来调节抗体效应物功能,或用于引入新的交联位点亚序列化学修饰以供效应物部分偶联,所述效应物部分包括但不限于药物、毒素、细胞毒性剂和放射性核素。高度糖基化的2C3突变体阐述于表3中。

[0354] 表3.高度糖基化的2C3抗CD-52突变体

突变	预期的益处	应用
A114N	在 Asn-Ser-Thr 的糖基化	1) 对照 2) 效应物部分偶联
Y436T	在 Asn434 的糖基化 对 FcRn 结合的抑制	1) 移植和其他需要较短半衰期的适应症
Y436S	在 Asn434 的糖基化 对 FcRn 结合的抑制	1) 移植和其他需要较短半衰期的适应症
[0355] S440N	在 Asn-Leu-Ser 的糖基化	1) 对照 2) 效应物部分偶联
S442N	在 Asn-Leu-Ser 的糖基化	1) 对照 2) 效应物部分偶联
添加 NGT 至 C 末端	糖基化	1) 对照 2) 效应物部分偶联
S298N/Y300S	在 Asn298 的糖基化 降低的效应物功能	1) 降低的效应物功能 2) 效应物部分偶联

[0356] 1A.2C3抗CD-52抗体高度糖基化突变体的生成

[0357] 将基于Kabat编号系统指定的A114N突变通过诱变PCR引入CH1结构域。为产生全长抗体,将VH结构域加突变的A114N残基通过非连接依赖性克隆(LIC)插入编码抗体CH结构域1-3的pENTR-LIC-IgG1载体。所有其它突变通过定点诱变用QuikChange定点诱变试剂盒(Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)引入pENTR-LIC-IgG1.WT 2C3 VH通过LIC克隆入突变载体。全长突变体通过Gateway克隆来克隆入pCEP4(-E+I)Dest表达载体。Fc突变基于EU编号系统进行指定。通过DNA测序确认突变。WT 2C3重和轻链以及突变的2C3重链的氨基酸序列阐述于表4中。突变的氨基酸以灰色高亮显示且通过突变生成的共有糖基化靶位点以下划线显示。

[0358] 表4.2C3抗CD-52抗体的氨基酸序列

[0359]

SEQ ID NO	名称	氨基酸序列
1	抗CD-52 WT 轻链	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTY LNWLLQKPGQSPQRLLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
2	抗CD-52 WT 重链	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
3	抗 CD-52 A114N 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSNSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG

[0360]

SEQ ID NO	名称	氨基酸序列
		CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	抗 CD-52 Y436S重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNTYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHSTQKSLSLSPGK
5	抗 CD-52 S440N 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNTYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDK

[0361]

SEQ ID NO	名称	氨基酸序列
		VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKNLSLSPGK
6	抗 CD-52 S442N 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNKYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLNLSLSPGK
7	抗 CD-52 NGT 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNKYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

[0362]

SEQ ID NO	名称	氨基酸序列
		NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKNGT
8	抗CD-52 S298N / Y300S 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNKYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNNTSRVVS LTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0363] 将突变体和野生型对照转染入在6孔板形式中的HEK293-EBNA细胞。如在图9中所示,通过SDS-PAGE和免疫印迹分析发现表达水平为 $\sim 0.1\mu\text{g/ml}$ 。突变体在条件培养基中的表达也通过在Biacore上的蛋白质A捕获进行测量。浓度使用注射入固定的蛋白质A之后6分钟的解离响应进行确定。将在培养基中从 $90\mu\text{g/mL}$ 至 1.5ng/mL 系列稀释的CHO-产生的野生型2C3用作标准曲线。浓度通过校准曲线使用4参数拟合计算至最低 $\sim 0.2\mu\text{g/ml}$ 。如图9所示,相对表达浓度较低且大体上与免疫印迹分析的结果对应。

[0364] 1B. 高度糖基化的验证

[0365] 为确定突变是否引入额外的糖基化位点,2C3突变体和野生型蛋白用通用去糖基化酶PNGase F处理且将蛋白样品通过SDS-PAGE和免疫印迹进行分析。如图10所示,只有A114N突变具有增加的表观分子量,表明额外的N-连接碳水化合物的存在。

[0366] 生成小规模抗体制备物来纯化2C3突变体用于对糖基化位点引入的进一步验证。如图11所示,通过SDS-PAGE证实了只有A114N突变体具有额外的引入的糖基化位点。

[0367] 1C.2C3抗CD-52突变体的结合特性

[0368] 使用Biacore来比较纯化蛋白的结合特性。小鼠和SEC-纯化的人FcRn-HPC4经由胺偶联固定在CM5芯片上。每种抗体被稀释至200、50和10nM并注射在固定的Fc受体上。Campath、CHO生成的野生型2C3和DEPC-处理的Campath作为阳性和阴性对照包括在内。如图13所示,Y436S突变体在与FcRn的结合中展示了约2倍的降低。有趣的是,该突变体与小鼠FcRn的结合并未受到影响。其它的2C3突变无一对人或小鼠的FcRn结合具有任何可观的影响。

[0369] 采用Biacore并使用CD-52肽741 Biacore结合实验来比较纯化蛋白的抗原结合特性。CD-52肽741和对照肽777被固定至CM5芯片。抗体在HBS-EP中从60至0.2nM进行2倍系列稀释,并以一式两份注射3分钟,随后是在缓冲液中以50μL/分钟流速的5分钟解离。GLD52批次17200-084作为对照被包括在内。用40mM HCl的1脉冲重新生成表面。使用1:1结合模型来拟合7.5至0.2nM的曲线。如图16所示,与在该实验中的其余突变体相比,A114N突变体具有略低的CD-52结合亲和力,同时NGT突变体具有略高的亲和力。CD-52肽741 Biacore结合实验用从大规模制备纯化的蛋白质进行了重复。如图17所示,A114N突变体展示了与野生型2C3具有可比性的CD-52肽结合。

[0370] 1D.A114N突变体的电荷表征

[0371] 实施了等电聚焦(IEF)来表征2C3突变体的电荷。使纯化蛋白在固定的pH梯度(pH3-10)丙烯酰胺(IPG)凝胶上运行。如图18A所示,发现A114N具有更多的负电荷,可能是由于唾液酸残基。完整的MS数据证实了在A114N突变体上的具有唾液酸的复合结构。相反,野生型2C3表明以G0F和G1F作为主要糖基化类型(分别于图18C和18D)。

[0372] 实施例2.在多种抗体骨架中的高度糖基化突变体的制备

[0373] 除2C3抗CD-52抗体外,将A114N突变工程化在多种抗体骨架中以证实独特的高度糖基化位点可以引入不相关的重链可变区序列。高度糖基化的抗TEM1、抗FAP和抗Her2突变体在表5中进行阐述。

[0374] 表5.设计在多种不相关的抗体骨架中的A114N和/或S298N突变体

[0375]

突变	抗体	预期益处	应用
A114N	抗TEM1 抗FAP 抗Her2	在重链弯头铰链(elbow hinge)处的额外糖基化位点, 用于位点特异性碳水化合物介导的偶联	1) 对照 2) 经由暴露的唾液酸或半乳糖基团(SAM或GAM)的氨基氧基毒素偶联
S298N / T299A / Y300S(NNAS)	抗Her2	将糖基化从Asn297转换成工程化的Asn298。预期在S198N的溶剂暴露和复合碳水化合物, 提供去除效应物功能的偶联位点和手段	1) 经由暴露的唾液酸或半乳糖基团(SAM或GAM)的氨基氧基毒素偶联 2) 降低的效应物功能
A114N / NNAS	抗Her2	潜在用于使用两个偶联位点增加偶联收率	1) 对照 2) 经由暴露的唾液酸或半乳糖基团(SAM或GAM)的氨基氧基毒素偶联

[0376] 2A. 抗TEM1和抗FAP抗体高度糖基化突变体的生成

[0377] 基于Kabat编号系统指定的A114N突变通过诱变PCR被引入抗TEM1和抗FAP的CH1结构域。为生成全长抗体, 突变的VH加残基114通过非连接依赖性克隆(LIC)插入编码抗体CH结构域1-3的pENTR-LIC-IgG1载体。全长突变体随后通过Gateway克隆被克隆入pCEP4(-E+I)Dest表达载体。突变通过DNA测序进行确认。抗TEM1野生型以及突变的重和轻链的氨基酸序列阐述于表6中。突变的氨基酸以灰色高亮标注且通过突变生成的共有糖基化靶位点以下划线标注。

[0378] 表6. 抗TEM1和抗FAP抗体的氨基酸序列

[0379]

SEQ ID NO	名称	氨基酸序列
9	抗TEM1 WT 轻链 (克隆#187)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	抗TEM1 WT 重链 (克隆#187)	QVQLQESAPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYSWSW IRQPPGKGLYIGYIYYTGSAIYNPSLQSRVTISVDTS KNQFSLKLNSVTAADTAVYYCAREGVRGASGYYY YGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	抗TEM1 A114N	QVQLQESAPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYSWSW IRQPPGKGLYIGYIYYTGSAIYNPSLQSRVTISVDTS KNQFSLKLNSVTAADTAVYYCAREGVRGASGYYY YGMDVWGQGTTVTVSSNSTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

[0380]

SEQ ID NO	名称	氨基酸序列
		WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

[0381] 突变体和野生型对照转染入三份烧瓶形式的HEK293-EBNA细胞中并在HiTrap蛋白质A柱上进行纯化 (GE Healthcare Biosciences,Pittsburgh,PA,USA)。如通过在NanoDrop分光光度计上的A280分析,抗FAP A114N和抗FAP A114C的表达分别为约3μg/ml和约1μg/ml。抗TEM1 A114N的表达为约0.04μg/ml。

[0382] 2B.高度糖基化的验证

[0383] 为证实额外的糖基化位点被引入A114N突变体,将来自A114N突变体的纯化蛋白与野生型对照蛋白共同在还原SDS-PAGE进行分析。一个额外的糖基化位点将添加2000-3000道尔顿至重链的分子量。如图20所示,SDS-PAGE表明抗FAP和抗TEM1 A114N突变体的重链带具有增加的表现分子量,与向两种抗体的额外糖基化位点的成功引入相一致。

[0384] 2C.抗Her2抗体高度糖基化突变体的生成

[0385] Her-2A114N、Her-2 A114N/NNAS和野生型Her-2抗体通过非连接依赖性的克隆生成。合成了Herceptin的VH结构域并用LIC-兼容的两组引物 (野生型或携带A114N的突变型) 进行PCR扩增。为获得全长抗体,将扩增的VH插入片段 (野生型或A114N) 克隆入两种编码CH 1-3结构域、pENTR-LIC-IgG1野生型和pENTR-LIC-IgG1NNAS的pENTR载体,产生三种全长的突变体 (A114N、NNAS、A114N/NNAS) 和野生型对照作为在pENTR上的进入克隆。这些突变体通过Gateway克隆被克隆入pCEP4 (-E+I) Dest表达载体。突变通过DNA测序进行确认。抗Her-2野生型和突变的重和轻链的氨基酸序列阐述于表7中。突变的氨基酸以灰色高亮标注且通过突变产生的共有糖基化靶位点以下划线标注。

[0386] 表7. 抗Her-2抗体的氨基酸序列

[0387]

SEQ ID NO	名称	氨基酸序列
12	抗Her-2 WT	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW

[0388]

SEQ ID NO	名称	氨基酸序列
	轻链	YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	抗Her-2 WT 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	抗Her-2 A114N 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSNSTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN

[0389]

<u>SEQ ID NO</u>	<u>名称</u>	<u>氨基酸序列</u>
		VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	抗Her2 NNAS重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN <u>NNAS</u> RVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	抗Her2 A114N / NNAS重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLVTVSS <u>NST</u> KGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN <u>NNAS</u> RVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0390] 2D.A114N抗Her2抗体高度糖基化突变体的表达

[0391] 将A114N抗Her2和野生型构建体用Lipofectamine-2000 (试剂对DNA比为2.5:1) 和

XtremeGene HP (试剂对DNA比为3:1) 转染入在12个三份烧瓶中的HEK293-EBNA细胞。来自第3天的条件培养基 (CM) 的等分试样的八份测量表明蛋白质表达就Lipofectamine-2000和XtremeGene HP二者而言在6个烧瓶之间是一致的。如表8所示,使用XtremeGene HP整体的转染效率为约30%更高。对于两种转染条件将在第3天收集的条件培养基汇集在一起并通过蛋白质A柱进行纯化。八份测量表明1.8ug/ml抗体在包含血清的模仿培养基中相对于0ug/ml在无血清模仿培养基中。

[0392] 表8.A114N抗Her2高度糖基化的突变体的表达

[0393]

		Lipofectamine-2000	XtremeGene HP
从蛋白A柱纯化的蛋白	浓度 (mg/ml)	1.72	3.18
	体积 (ml)	3.5	3.5
	总蛋白 (mg)	6.02	11.13
缓冲液交换的蛋白	浓度(mg/ml)	15.59	16.86
	体积(ml)	0.2	0.36
	总蛋白 (mg)	3.1	6.07
	%回收	51.8	54.5

[0394] 收集来自第6天的条件培养基并对每种转染条件进行单独纯化。将两种洗脱物单独缓冲液交换入pH 7.2的PBS,并使用Amicon-4 (50kD截留) 柱进行浓缩。第6天,CM展示出与第3天的CM相比较高的表达水平。如表8中所示,共3mg的Herceptin A114N 15.59mg/ml (来自Lipofectamine转染) 和6mg的Herceptin A114N 16.86mg/ml (来自XtremeGene HP转染) 从第6天的条件培养基生成,用于其它下游应用,如抗体药物偶联物。

[0395] 2E.A114N抗Her2突变体的SDS-PAGE和HIC分析

[0396] 偶联之前,纯化的A114N Herceptin通过SDS-PAGE和HIC (疏水相互作用色谱) 进行表征。如图21所示,确定纯化的A114N Herceptin的质量适合于进一步的下游应用。

[0397] 2F.与工程化的糖基化的偶联

[0398] 已被证明的是:a) 在抗TEM1上的第114Kabat位点引入了糖基化位点;b) 通过还原SDS-PAGE,A114N突变体在重链上具有高度糖基化;且c) 通过完整LC/MS,A114N高度糖基化的突变体具有复合碳水化合物结构,包括末端唾液酸和半乳糖,其对于SAM和GAM偶联十分理想。为证实工程化的糖基化位点适于偶联,将抗TEM1 A114N与5kDa PEG经由氨基氧基化

学偶联。如图22所示,PEG成功地通过氨基氧基连接基与抗TEM1A114N偶联。该突变体也在抗FAP和抗CD-52 2C3骨架上成功制备(未展示)。这些数据表明在N114的糖基化位点可用于效应物部分的偶联。

[0399] 实施例3:S298N/Y300S Fc突变体的生成

[0400] 设计并生成工程化的Fc突变体,其中将新的糖基化位点引入在EU位点Ser298,比邻天然存在的Asn297位点。维持在Asn297的糖基化或通过突变消除。突变和预期的糖基化结果阐述于表9中。

[0401] 表9:多种抗体变体的糖基化状态

[0402]

#	突变	预期的糖基化状态	应用
17	N297Q	无糖基化(agly)	Agly对照
18	T299A	无糖基化(agly)	Agly对照, 未知效应物功能
19	N297Q/S298N/Y300S (NSY)	在297无糖基化但在298有工程化的糖基化位点	降低的效应物功能; 经由暴露的唾液酸或半乳糖基团偶联
20	S298N/T299A/Y300S (STY)	在297无糖基化但在298有工程化的糖基化位点	降低的效应物功能; 经由暴露的唾液酸或半乳糖基团偶联
21	S298N/Y300S (SY)	在297和298的两个潜在糖基化位点; 糖基化样式的改变	降低的效应物功能; 经由暴露的唾液酸或半乳糖基团偶联
22	野生型	297	对照

[0403] 3A.H66 $\alpha\beta$ -TCR抗体改变的糖基化变体的生成

[0404] 突变在 $\alpha\beta$ T-细胞受体抗体克隆#66的重链上通过使用pENTR_LIC_IgG1模板生成。HEBE1 Δ ab IgG1#66的VH结构域在通过LIC克隆入突变的或野生型pENTR_LIC_IgG1之前用LIC引物扩增来生成全长的突变体或野生型抗体。亚克隆用DraIII/XhoI双消化进行验证,在成功的克隆内产生约1250bp大小的插入片段。那些全长突变体随后经由Gateway克隆被克隆入表达载体pCEP4 (-E+I) Dest。突变通过DNA测序进行确认。野生型H66抗 $\alpha\beta$ TCR重和轻链以及突变的H66重链的氨基酸序列阐述于表10中。突变的氨基酸以灰色高亮标识且通过突变生成的共有的糖基化靶位点以下划线标识。

[0405] 表10:H66抗 $\alpha\beta$ TCR抗体的氨基酸序列

[0406]

<u>SEQ ID</u> <u>NO</u>	<u>名称</u>	<u>氨基酸序列</u>
23	抗 $\alpha\beta$ TCR克隆 H66轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWYQQ KPGQAPRRLIYDTSKLGASGVPARFSGSGSGTSYTLTIS SLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
24	抗 $\alpha\beta$ TCR克隆 H66重链	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYINPYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN

[0407]

<u>SEQ ID</u> <u>NO</u>	<u>名称</u>	<u>氨基酸序列</u>
		HYTQKSLSLSPGK*
25	抗 $\alpha\beta$ TCR克隆 H66 S298N/Y300S 重链	EVQLQLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYN <u>NTSR</u> VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*
26	抗 $\alpha\beta$ TCR克隆 H66 S298N/ T299A/Y300S重链	EVQLQLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYN <u>NASR</u> VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*

[0408]

<u>SEQ ID</u> <u>NO</u>	<u>名称</u>	<u>氨基酸序列</u>
27	抗 $\alpha\beta$ TCR克隆 H66 N297Q/ S298N/Y300S 重链	EVQLQLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYINPYNDVTKYNEKFKGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYQNTSRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*

[0409] 将突变体、野生型和两种糖基化对照(在pCEP4中的HEBE1 Agly IgG4和HEBE1 Δ ab IgG1)构建体转染入在三份烧瓶中的HEK293-EBNA细胞用于表达。蛋白质从160ml条件培养基(CM)用1ml HiTrap蛋白质A柱(GE)使用多通道蠕动泵进行纯化。五微克的每种所得上清在4-20%Tris-甘氨酸还原和非还原SDS-PAGE胶上进行分析(参见图2)。糖基化突变体(N297Q、T299A和Agly对照)的重链进一步迁移(箭头),与这些抗体中聚糖的损失相一致。然而,工程化的糖基化抗体(NSY、STY、SY、 Δ ab和野生型对照,箭头)的重链与野生型对照迁移相似。该结果与在EU 298位点的工程化糖基化的存在相一致。SEC-HPLC分析表明所有的突变体作为单体表达。

[0410] 3B. 通过LC-MS的糖基化分析

[0411] 工程化的H66 IgG1 Fc变体用20mM DTT在37℃部分还原30分钟。样品随后通过毛细管LC/MS在偶联有QSTAR qq TOF杂交系统的Agilent毛细管HPLC系统(Applied Biosystems)上进行分析。使用Analyst QS 1.1(Applied Biosystem)中的带有基线矫正的贝叶斯蛋白重建和计算机建模进行数据分析。在S298N/T299A/Y300S H66抗体突变体中,在氨基酸298处观察到一个糖基化位点,其中检测出双触角和三触角复合型聚糖作为在G0F、G1F和G2F旁侧的主要品种(参见图34)。改变的糖基化概貌与在N298处的迁移的糖基化一致,而非在N297处的野生型糖基化。

[0412] 3C. 使用Biacore的 $\alpha\beta$ TCR抗体突变体对人Fc γ RIIIa和Fc γ RI的结合特性

[0413] Biacore用来评估与重组人Fc γ RIIIa(V158和F158)和Fc γ RI的结合。CM5芯片的

所有四种流动小室(flowcell)用抗HPC4抗体经由Biacore提供的标准胺偶联步骤固定化。抗HPC4抗体在10mM pH5.0乙酸钠中稀释至50 μ g/mL用于偶联反应并以5 μ L/min注射25分钟。将约12,000RU的抗体固定至芯片表面。重组人Fc γ RIIIa-V158和Fc γ RIIIa-F158在结合缓冲液(具有1mM CaCl₂的HBS-P)中稀释至0.6 μ g/mL并分别以5 μ L/min、3分钟注射至流动小室2和4,来捕获在抗HPC4芯片上的300-400RU受体。为在低结合剂之间进行区分,在抗HPC4表面上捕获了与通常用于该实验中的相比三倍更多的rhFc γ RIIIa。流动小室1和3用作参考对照。每种抗体在结合缓冲液中被稀释至200nM并为所有四个流动小室都注射4分钟,随后是在缓冲液中的5分钟解离。用10mM EDTA在HBS-EP缓冲液中以20 μ L/min重新生成表面,持续3分钟。这些实验的结果示于图3中。

[0414] Biacore也被用于比较Fc γ RI结合。将抗四His抗体使用Zeba Desalting柱用缓冲液交换入10mM pH4.0乙酸钠,并在乙酸缓冲液中稀释至25 μ g/mL用于胺偶联。CM5芯片的两个流动小室用~9000RU的抗Tetra-His抗体在以5 μ L/min注射20分钟后固定化。如在之前的实验中,捕获十倍更多的Fc γ RI至抗四-His表面,进而比较具有弱结合的样品。重组人Fc γ RI在HBS-EP结合缓冲液中稀释至10 μ g/mL并以5 μ L/min注射入流动小室2持续1分钟来捕获~1000RU受体至抗四-His芯片。将100nM的抗体单一浓度以30 μ L/min在捕获的受体和对照表面上注射3分钟。随后,对解离监控三分钟。表面随后用两次10mM pH 2.5的甘氨酸以20 μ L/min的30秒注射重新生成。这些实验的结果示于图4中。

[0415] 这些结果证明糖工程化的突变体与Fc γ RIIIa或Fc γ RI结合的显著降低。H66S298N/T299A/Y300S尤其具有对两种受体几乎完全消除的结合。选择该突变体用于更加详细的分析。

[0416] 3D.使用圆二色谱(CD)的稳定性表征

[0417] S298N/T299A/Y300S抗体突变体的稳定性通过Far-UV CD热熔融实验监控,其中由于温度升高导致抗体展开(变性),因此监控在216nm和222nm的CD信号。

[0418] 温度通过热电帕尔帖(Jasco model AWC100)控制并从25-89 $^{\circ}$ C以1 $^{\circ}$ C/min的速率增加。CD谱在Jasco 815分光光度计上以在PBS缓冲液中约0.5mg/mL的蛋白质浓度于具有10mm路径长度的石英比色皿(Hellma, Inc)内收集。扫描速度为50nm/min和0.5nm的数据升降(data pitch)。使用2.5nm的带宽以及介质的敏感性设置。CD信号和HT电压收集自210-260nm,伴随0.5nm的间隔和1 $^{\circ}$ C的温度间隔,且对于每个样品实施四次重复扫描。该结果证实 δ AB H66和S298N/T299A/Y300S H66两种突变体均展示了相似的热行为且具有大致相同的降解发生温度(在63 $^{\circ}$ C左右)(图35),其进一步表明它们具有可比的稳定性。

[0419] 实施例4:Fc-工程化突变体的功能分析

[0420] 对Fc-工程化的突变体通过PBMC增殖实验和细胞因子释放实验进行评估。在PBMC增殖实验中,将人PBMC用浓度逐渐增加的治疗性抗体培养72小时,添加了³H-胸苷且在18小时后收获细胞。对于T细胞消耗/细胞因子释放实验,将人PBMC用浓度逐渐增加的治疗性抗体培养且每日对细胞计数和生存力(Vi-Cell, Beckman Coulter)进行分析直到第7天。还收获了细胞上清,保存在-20 $^{\circ}$ C并在8-丛细胞因子板(Bio-Rad)上进行分析。

[0421] 融化正常的供体PBMC并在下列条件下处理(全部在含有补体的培养基中):未处理;BMA031、moIgG2b 10 μ g/ml;0KT3、moIgG2a 10 μ g/ml;H66、huIgG1 δ AB 10 μ g/ml、1 μ g/ml和0.1 μ g/ml;H66、huIgG1 S298N/T299A/Y300S 10 μ g/ml、1 μ g/ml和0.1 μ g/ml。

[0422] 细胞因子在第2天(D2)和第4天(D4)收获用于Bioplex分析(IL2、IL4、IL6、IL8、IL10、GM-CSF、IFN γ 、TNF α)。在D4就CD4、CD8、CD25和abTCR表达对细胞进行染色。

[0423] 示于图5-8的结果表明H66S298N/T299A/Y300S与H66 δ AB在全部实施的基于细胞的实验中表现相似,表明通过CD25表达的最小T-细胞激活,与abTCR的结合(与 δ AB具有稍微不同的动力学)以及在D2和D4时间点的最小细胞因子释放。S298N/T299A/Y300S突变体因此与 δ AB突变同样有效地消除了效应物功能。

[0424] 实施例5:在抗CD52抗体骨架中工程化的Fc变体的制备和表征

[0425] 除H66抗 $\alpha\beta$ TCR抗体外,S298N/Y300S突变也被工程化入抗CD52抗体骨架中(克隆2C3)。随后对该突变体进行检验进而确定在S298N/Y300S H66抗 α TCR抗体中所见的观察到的效应物功能的调整与在另一抗体骨架中的相一致。

[0426] 5A.2C3抗CD-52抗体改变的糖基化变体的产生

[0427] 首先,S298N/Y300S 2C3变体DNA通过快速变化诱变使用pENTR_LIC_IgG1制备,且将野生型2C3VH通过LIC克隆入突变的载体。全长的突变体使用Gateway技术克隆入pCEP4(-E+I)Dest表达载体。突变随后通过DNA测序进行确认且所述序列被阐述于表11中。随后将突变体转染入在6孔板形式中的HEK293-EBNA细胞且从条件培养基中纯化蛋白质。抗CD52 2C3野生型抗体作为对照平行产生。使用SD-PAGE和免疫印迹分析发现表达水平为0.1 μ g/mL(图9A)。在纯净条件培养基(neat conditioned media)中的突变体的表达也通过蛋白质A捕获在Biacore上测量。浓度使用向固定的蛋白质A注射六分钟后的解离响应进行确定。将CHO产生的野生型2C3在培养基中从90 μ g/mL至1.5ng/mL的系列稀释用作标准曲线。浓度在约0.2 μ g/mL之内通过校准曲线使用4-参数拟合进行计算。相对表达水平较低且基本上与免疫印迹数据吻合(图9B)。

[0428] 表11:抗CD52克隆2C3抗体序列

[0429]

<u>SEQ ID</u> <u>NO</u>	<u>名称</u>	<u>氨基酸序列</u>
28	抗CD-52 2C3 WT 轻链	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWL LQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC*
29	抗CD-52 2C3 WT 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMNWVR QAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV

[0430]

<u>SEQ ID</u> <u>NO</u>	<u>名称</u>	<u>氨基酸序列</u>
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
30	抗CD-52 2C3 S298N/Y300S 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMNWVR QAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQGTITVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN <u>NTSR</u> VVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

[0431] 5B. 使用PNGaseF的糖基化分析

[0432] 为评估通过突变引入的额外糖基化位点,将富集的S298N/Y300S突变体用PNGase F进行去糖基化。未证明任何在分子量上的显著变化,其表明不存在额外的碳水化合物(图10)。实施小规模制备以纯化这些突变体用于进一步的表征,且结果再次确认了在S298N/Y300S突变体上不存在额外的碳水化合物(图11)。

[0433] 5C. 使用Biacore的2C3抗CD52抗体突变体与人Fc γ RIIIa的结合特性

[0434] Biacore也用于表征抗原结合、Fc γ RIII和纯化的抗体的结合特性(参见图12、13和14)。S298N/Y300S 2C3变体与CD52肽紧密结合,且结合传感图与野生型对照并无区别,表明该突变未影响其抗原结合(图12A)。

[0435] 为检验Fc效应物功能,Fc γ RIII受体(Va1158)被用于结合研究。将突变体和野生型对照抗体稀释至200nM并注射至HPC4-标签捕获的Fc γ RIIIa。Fc γ RIIIa结合对于S298N/

Y300S突变体几乎不能检测,表明该变体使效应物功能丧失(图12B和图14A)。为进一步检验Fc效应物功能,Fc γ RIII受体(Phe158)也用于结合研究。将突变体和野生型对照抗体稀释至200nM且注射至HPC4-标签捕获的Fc γ RIIIa。对于S298N/Y300S突变体Fc γ RIIIa结合几乎不能检测,表明Phe158变体(图14B)使得效应物功能丧失。最终,Biacore用于比较纯化的蛋白质的FcRn结合特性。将小鼠和SEC-纯化的人FcRn-HPC4经由胺偶联固定至CM5芯片。每种抗体被稀释至200、50和10nM且注射在受体上。将Campath、CHO-产生的野生型2C3以及DEPC-处理的Campath作为阳性和阴性对照包括在内。这些数据表明突变体与人和鼠FcRn受体两者以与野生型抗体对照相同的亲和力结合,且其很可能在其循环半衰期或其它药代动力学特性方面不具有任何改变(参见图12C、图13A和B)。相应地,S298N/Y300S突变可适用于通常的抗体以降低或去除不需要的Fc效应物功能,举例来说通过人Fc γ 受体的参与。

[0436] 实施例6:在S298N/Y300S突变体中的循环免疫复合体的检测

[0437] 对于S298N/Y300S突变体和野生型对照,还使用C1q结合实验研究了循环免疫复合体的检测。高度结合的Costar 96-孔板在4℃用100 μ l在包被缓冲液(0.1M NaCH₃O₃ pH 9.2)中以范围在10-0.001 μ g/ml的浓度2倍系列稀释的2C3 Abs包被过夜。ELISA分析表明对于S298N/Y300S突变体与野生型相比C1q结合降低。抗Fab Ab与包被的2C3 Abs的结合证实了孔的等同包被(图15B)。

[0438] 实施例7:使用等电聚焦的S298N/Y300S突变体的分离和分析

[0439] 运行pH3-10的等电聚焦(IEF)凝胶来表征S298N/Y300S突变体。发现S298/Y300S具有更多负电荷,且因此可能具有更多的唾液酸分子(图18A)。S298N/Y300S突变体和野生型2C3都通过完整的MS显示以G0F和G1F作为主要糖基化类型(分别参见图18B和D)。

[0440] 实施例8:S298N/Y300S的抗原结合

[0441] Biacore用于比较从更小(图16)或更大(图17)两种规模的表达制备和纯化的野生型抗CD52 2C3 Ab和S298N/Y300S突变体的抗原结合亲和力。获得了用CD52肽741和对照肽777固定的CM5芯片。抗体在HBS-EP中从60nM至0.2nM2倍系列稀释且随后注射至芯片表面3分钟,接下来是在缓冲液中以50 μ l/min的流速解离5分钟。表面随后用40mM HCl的脉冲重新生成。这些分析以一式两份实施且证明S298N/Y300S突变体和野生型2C3抗体展示出可比较的CD52肽结合。

[0442] 设计培养基筛选平台来在纯化前测试功能性结合特性以筛选在小规模转染过程中生成的抗体。这些测试使用八份实验(Octet)实施(图19A)来确定浓度并使用蛋白质A生物传感器和GLD52标准曲线。将样品在HBS-Ep中稀释至7.5和2nM,用于使用Biacore的CD52结合比较(图19B)。肽结合实验的结果表明S298N/Y300S突变体和野生型2C3抗体都具有可比较的CD52肽结合。此外,这些分析证明八份实验和Biacore可充分作用于预测来自小规模转染的抗体的抗原结合。

[0443] 实施例9:S298N/Y300S、S298N/T299A/Y300S和N297Q/S298N/Y300S改变的糖基化突变体在其它抗体骨架中的制备

[0444] 除抗 $\alpha\beta$ -TCR抗体和2C3抗CD-52抗体外,将S298/Y300S、S298N/T299A/Y300S和N297Q/S298N/Y300S突变在其它抗体骨架中工程化以证实额外串联糖基化位点可被引入不相关的重链可变结构域序列。可替换地糖基化的抗CD-52 12G6和抗Her2突变体阐述于表12和13中。

[0445] 表12:抗CD52克隆12G6抗体序列
[0446]

<u>SEQ ID</u> <u>NO</u>	<u>名称</u>	<u>氨基酸序列</u>
31	抗CD-52 12G6 WT 轻链	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWV LQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCVQGSHFHTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
32	抗CD-52 12G6 WT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQAP GKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYL

[0447]

<u>SEQ ID</u> <u>NO</u>	<u>名称</u>	<u>氨基酸序列</u>
	重链	QMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
33	抗CD-52 12G6 S298N/Y300S 重 链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQAP GKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYL QMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNN TSRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
34	抗CD-52 12G6 S298N/ T299A/ Y300S 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQAP GKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYL QMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNN

[0448]

<u>SEQ ID</u> <u>NO</u>	<u>名称</u>	<u>氨基酸序列</u>
		<u>AS</u> RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
35	抗CD-52 12G6 N297Q/ S298N/ Y300S 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQAP GKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYL QMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQN <u>TS</u> RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

[0449] 表13:抗Her2抗体序列

[0450]

<u>SEQ ID</u> <u>NO</u>	<u>名称</u>	<u>氨基酸序列</u>
36	抗Her2 WT 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC*
37	抗Her2 WT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY

[0451]

<u>SEQ ID</u> <u>NO</u>	<u>名称</u>	<u>氨基酸序列</u>
	重链	LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
38	抗Her2 S298N/T299A/ Y300S 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYN <u>N</u> ASRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

[0452] 实施例10. 包含反应性聚糖部分的改变的抗体的生成

[0453] 为生成包含能够与衍生的效应物部分发生反应的聚糖部分的抗体,将抗HER抗体首先在体外使用糖基转移酶和相关的UDP糖供体进行糖基化。举例来说,为引入唾液酸残基,将供体抗体首先用 β -半乳糖基转移酶进行半乳糖基化,随后根据Kaneko等的方法(Kaneko,Y.,Nimmerjahn,F.,and Ravetch,J.V.(2006) Anti-inflammatory activity of

immunoglobulin G resulting from Fc sialylation.Science 313,670-3)用 α 2,6-唾液酸转移酶进行唾液酸化。反应在一锅法合成步骤中使用 β -半乳糖基转移酶(50mU/mg, Sigma)和 α 2,6-唾液酸转移酶(5ug/mg, R&D系统)与供体糖核苷酸底物、UDP-半乳糖(10mM)和CMP-唾液酸(10mM)在包含5mM $MnCl_2$ 的50mM MES缓冲液中实施。包含5mg/ml抗HER2抗体的反应混合物在37℃温育48小时。唾液酸化如下进行验证:使用对释放自用PNGase F处理的抗体的全甲基聚糖进行的MALDI-TOF MS分析、使用Dionex HPLC的唾液酸含量分析和使用SNA(一种特异性用于 α 2,6-唾液酸的凝集素)的凝集素印迹。

[0454] 通过对唾液酸化的抗HER2抗体进行PNGase F处理释放聚糖,对所述聚糖的MALDI-TOF分析表明天然聚糖已完全用主要为单唾液酸化双触角结构A1F(图27A)加上少量的去唾液酸类型重塑。对具有更高量的 α 2,6-唾液酸转移酶的抗体的处理产生了更均质的A1F糖形的群体,表明酶活性或聚糖定位可能防止了全唾液酸化。唾液酸含量测定为 ~ 2 mol每mol抗体,其与A1F聚糖作为主要糖形类型相一致(图27B)。用SAN凝集素(对于 α 2,6-连接的唾液酸特异性的黑接骨木凝集素(*Sambucus nigra* agglutinin))的凝集素印迹证实了唾液酸存在于 α 2,6-连接构型中(图27C)。

[0455] 总之,尽管天然蛋白聚糖在某种程度上是异质的,但是通过半乳糖基和唾液酸转移酶的重塑产生具有单唾液酸化且完全半乳糖化的双触角聚糖的接近同质的抗体。在两种半乳糖受体的每个分支聚糖上仅引入 ~ 1 个唾液酸可能是由于来自经常埋入抗体的聚糖的半乳糖之一的可及性受限或聚糖与蛋白表面的非共价相互作用。

[0456] 实施例11. 包含反应性聚糖部分的改变的抗体的氧化

[0457] 一旦确认了唾液酸化,对伴随多种高碘酸盐浓度(0.25至2mM)的唾液酸化抗HER-2抗体的过程中氧化进行了研究。将唾液酸化的抗体首先缓冲液交换入包含5mM EDTA的25mM Tris-HCl(pH 7.5),随后用PBS缓冲液进行缓冲液交换。缓冲的抗体混合物随后应用于用PBS缓冲液预先平衡的蛋白质A琼脂糖柱。将柱用15个柱体积的PBS、包含5mM EDTA的15个柱体积的PBS和30个柱体积的PBS洗涤之后,随后用25mM柠檬酸盐磷酸盐缓冲液(pH 2.9)洗脱。洗脱物立即用二元磷酸盐缓冲液和使用来自Millipore的Amicon ultra浓缩的抗体中和。纯化后,唾液酸化的抗HER2抗体随后用在100mM乙酸钠缓冲液(pH 5.6)中的高碘酸钠(Sigma)在冰上于暗处氧化30分钟,且该反应用在冰上的3%甘油淬灭15分钟。对产品脱盐并通过在50kDa Amicon上的5轮超滤交换入100mM乙酸钠(pH 5.6)。图28A表明用多种量的高碘酸盐滴定的唾液酸化抗体的唾液酸含量分析。唾液酸残基的完全氧化在0.5mM以上的高碘酸盐浓度实现。实际上,低至0.5mM的高碘酸盐浓度足以完全氧化引入的唾液酸。相应地,选择1mM浓度的高碘酸盐用于唾液酸化抗体的氧化以供药物偶联。

[0458] 氧化可能对抗体的完整性具有不良影响。举例来说,靠近FcRn结合位点、位于Fc CH3区的包括Met252和Met428的甲硫氨酸残基的氧化已知影响FcRn结合,所述FcRn结合对延长抗体血清半衰期至关重要(Wang, W., 等(2011) Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies. Mol Immunol 48,860-6)。相应地,为检测高碘酸盐氧化作用于对FcRn结合至关重要的甲硫氨酸残基(例如, Met-252)的潜在副作用,通过对胰蛋白酶消化进行的LC/MS分析测定了唾液酸化的抗体的氧化状态。该分析揭示出唾液酸化的曲妥珠单抗用1mM高碘酸盐处理后Met-252的氧化为 $\sim 30\%$ 而Met-428的氧化 $<10\%$ 。为测定该甲硫氨酸氧化程度对FcRn结合的影响,使用表面等

离子共振 (BIAcore) 对针对每种抗体的FcRn结合动力学进行了评估。该分析揭示了氧化状态与FcRn结合的微小降低 (对于小鼠和人FcRn在Ka上有12%和26%降低, 分别参见图28B和28C) 相关。应当注意的是, 由于在每个抗体上的单个完整FcRn位点足以提供功能性和PK优势, 人FcRn的Ka方面~25%的降低已被报到对人FcRn转基因小鼠的血清半衰期无影响 (Wang等, 同上)。

[0459] 总之, 这些数据表明高碘酸盐敏感性唾液酸残基通过唾液酸转移酶处理的引入允许使用低得多的高碘酸浓度, 导致对于抗体-FcRn相互作用和抗体完整性的最小副作用, 如通过聚集所评估的 (<1%)。因此, 根据本发明的方法使用唾液酸化抗体为要采用的氧化条件提供了更宽的窗口, 允许活性糖偶联物的可再现生成, 而没有对血清半衰期的影响。

[0460] 在高度糖基化的抗体突变体中的半乳糖还可特异性地使用半乳糖氧化酶氧化来生成用于偶联的醛基。为确认该方法, 将A114N抗TEM1抗体浓缩至13-20mg/ml且随后用在PBS中的20mU/mg唾液酸酶在37°C处理6小时。去唾液酸产物随后用半乳糖氧化酶 (“GAO”) 氧化, 首先在37°C用5ug GAO/mg蛋白质过夜, 随后添加2ug GAO/mg蛋白质并再温育5小时。添加乙酸钠以调整pH至5.6 (0.1v/v, pH5.6), 并添加DMSO以实现16%的最终反应浓度, 在偶联前添加。相似地, 高度糖基化突变体A114N抗HER抗体 (15mg/ml) 用唾液酸酶 (20mU/mg) 去唾液酸化并在单个反应中用5ug GAO每mg蛋白在37°C氧化过夜。

[0461] 实施例12. 反应性效应物部分的合成

[0462] 为促进用本发明的醛衍生化抗体糖形的偶联, 用氨基氧基-胱酰胺 (aminooxycystamide) 衍生化候选药物效应物部分 (例如Momomethyl Auristatin E (MMAE) 和Dolastatin 10 (Dol10)) 来包含与醛特异性反应的功能基团 (例如, 氨基氧基-cys)。

[0463] 简要地, 为生成氨基氧基-胱酰胺作为初始材料, 将S-三苯甲基-L-半胱酰氨 (362mg, 1mmol) 添加至3mL t-BOC-氨基氧基乙酸N-羟基琥珀酰胺酯的DMF溶液 (289mg, 1mmol)。如从HPLC分析显而易见的, 反应在3小时后完成。反应混合物随后用30mL二氯甲烷稀释并用0.1M碳酸氢钠溶液 (2x 20mL)、水 (2x 20mL) 和盐水 (2x 20mL) 洗涤。溶液在无水硫酸钠上干燥、过滤并浓缩至干燥。向该干燥的残余物添加3mL的TFA, 随后是150μL三乙基硅烷。所得溶液从叔丁基甲基醚析出且重复该过程三次。过滤后, 将残余物在降低的压力下干燥, 产生205mg白色 (off white) 固体 (67%收率)。将该化合物用于下一步而无需进一步纯化。

[0464] 为生成氨基氧基-衍生化MMAE (氨基氧基-Cys-MC-VC-PABC-MMAE), 将30.1mg氨基氧基-胱酰胺 (0.098mmol, 2当量) 与64.6mg MC-VC-PABC-MMAE (0.049mmol) 和在3mL DMF中的100μL三乙胺组合。所得反应混合物在室温搅拌15分钟, 根据HPLC分析反应通过这段时间完成。化合物通过制备型HPLC纯化, 产生45mg (62%) 作为白色固体的预期产物。反相HPLC分析表明化合物的纯度为>96%。ESI对于C73H116N14O18S (MH)⁺的计算值为1509.8501; 实测值m/z 1509.8469。

[0465] 为生成氨基氧基-衍生化的Dol10 (氨基氧基-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10), 将7.4mg (0.024mmol, 3当量) 氨基氧基-胱酰胺、12mg (0.008mmol) 的MC-VC-PABC-PEG8-Dol10和30μL三乙胺在3mL的DMF中合并。根据HPLC分析反应在15分钟内完成。制备型HPLC纯化导致6.2mg (46%) 作为白色固体的预期产物。反相HPLC分析表明化合物的纯度为>96%。ESI对于C80H124N16O19S2 (MH)⁺的计算值为1678.0664; 实测值m/z 1678.0613。

[0466] 实施例13. 唾液酸介导 (SAM) 的反应性效应物部分的偶联

[0467] 脱盐后, 将实施例11的药物-接头与在75% DMSO中浓度为25mM的实施例10的氧化的、唾液酸化的抗体组合, 来实现24:1的药物-接头与抗体的摩尔比和5mg/ml的最终抗体浓度。混合物在室温温育过夜。未并入的药物-接头和任何游离的药物使用BioBeads清除。将产物使用PD-10柱缓冲液交换入组氨酸-吐温缓冲液并无菌过滤。测定内毒素水平且实现了少于0.1EU/mg ADC以供体内研究。

[0468] 图29A-C显示与A0-MMAE糖偶联的不同唾液酸化的抗体(实施例11的抗FAP B11和G11以及抗HER2抗体)的疏水相互作用色谱(HIC)。唾液酸化的HER2抗体也与药物-接头A0-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Do110偶联(图29D)。该分析揭示了每个抗体主要存在一个或两个药物偶联物, 且药物-对-抗体比(DAR)的范围在1.3-1.9。Do110糖偶联物(图29D)与MMAE糖偶联物相比(图29C)增加的保留时间很可能是由于Do110更大的疏水性。

[0469] LC-MS分析也采用与两种不同药物-接头(A0-MMAE或A0-PEG8-Do110)偶联的抗HER抗体以30mg规模实施。该分析展示了偶联后为1.7和1.5的相似的DAR值, 其与HIC分析具有可比性。尺寸排阻色谱(SEC)展示了在这些偶联物中非常低水平(1%)的聚集。

[0470] 实施例14. 半乳糖介导 (GAM) 的反应性效应物部分的偶联

[0471] 如实施例11中所示, 用半乳糖氧化酶在A114N抗TEM1高度糖基化突变抗体上生成的半乳糖醛与24倍摩尔过量的抗体上的氨基氧基-MC-VC-PABC-MMAE药物-接头通过在25°C的温育偶联, 产生具有1.72的DAR的ADC偶联物。

[0472] 对于如实施例11中的描述制备的半乳糖氧化酶处理的抗HER抗体, 添加十分之一反应体积的1M乙酸钠(pH5.6)来调节pH为5.6, 并添加DMSO以使终浓度为14%, 然后加入24当量的氨基氧基MC-VC-PABC-MMAE药物-接头。所述反应在室温温育过夜。游离药物和药物-接头用Biobeads清除, 且产物通过SEC进行缓冲液交换(65%收率)。产物偶联物通过HIC进行分析。如在图30中所示, A0-MMAE与~60%的分子进行了偶联。

[0473] 实施例15. 体外ADC细胞增殖试验

[0474] 本发明的抗HER和抗FAP糖偶联物分子的体外活性也与相应的巯基偶联物进行了比较, 所述巯基偶联物包含经由巯基连接基连接至相同供体抗体的铰链区半胱氨酸的相同药物部分。巯基偶联物与糖偶联物相比包含约两倍数目的药物每抗体(DAR)。基于巯基的偶联如Stefano等(Methods in Molecular Biology 2013, 评审中)所述实施。随后采用Her2+SK-BR-3和Her2-MDA-MB-231细胞系来评估每种ADC的相对效力。该分析的结果示于下列的表15中。

[0475] 表15. 糖偶联物和巯基偶联物的EC₅₀的比较

[0476]

	DAR	EC ₅₀ (ng/ml)
抗HER-MC-VC-PABC-MMAE (巯基MMAE)	3.8*	2.3
抗HER-AO-Cys-MC-VC-PABC-MMAE (糖MMAE)	1.7*	4.7
抗HER-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (巯基Dol10)	3.9*	0.45
抗HER-AO-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (糖Dol10)	1.5*	0.97
抗FAP B11-MC-VC-PABC-MMAE (巯基MMAE), CHO+FAP	3.3**	382.4
抗FAP B11-AO-Cys-MC-VC-PABC-MMAE (糖 MMAE), CHO+FAP	1.5**	682.4

[0477] 备注：*通过LC-MS测定的DAR；**通过HIC测定的DAR

[0478] 图31表明抗HER糖偶联物与其对应物的巯基偶联物的体外效力的比较。细胞存活力在偶联物暴露于Her2抗原表达 (SK-BR-3) 细胞 (图31A和C) 或非表达 (MDA-MB-231) 细胞 (图31B和D) 72小时后测定。ADC包含了连接至聚糖 (“糖”) 或通过常规化学连接至铰链区半胱氨酸 (“巯基”) 的MMAE或PEG8-Dol10。如图30A和C所示, 与糖偶联物相比对于巯基偶联物观察到了~2倍更低的EC₅₀, 该结果与前者相比后者具有2倍更高的DAR相一致。使用具有任何抗体的Her-细胞系直至100ug/ml未观察到毒性。

[0479] 在细胞增殖中对于用针对肿瘤抗原 (FAP) 的抗体制备的ADC也观察到了相似的趋势, 所述肿瘤抗原 (FAP) 通过反应性基质成纤维细胞在上皮癌包括结肠癌、胰腺癌和乳腺癌中高度表达 (Teicher, B.A. (2009) Antibody-drug conjugate targets. Curr Cancer Drug Targets 9, 982-1004)。这些偶联物再次通过将氨基氧基MMAE药物-接头或马来酰亚胺MMAE药物-接头与聚糖或巯基基团偶联进行制备。这些偶联物的细胞增殖试验表明巯基偶联物的EC₅₀对于用人FAP转染的CHO细胞具有与缺乏FAP表达的相同细胞相比~100倍更高的效力, 如图32中所示, 该图展示了抗FAP B11糖偶联物和巯基偶联物的体外效力的比较。在将所述偶联物暴露于用或未用FAP抗原转染的CHO细胞后测量了细胞存活力。ADC包含与聚糖 (“糖”) 连接的MMAE或通过常规化学连接至铰链区半胱氨酸 (“巯基”) 的MMAE。值得注意的是, 假设在抗原表达CHO细胞中对于靶结合和内在化的效率相似, 那么与糖偶联物相比~2倍更低的EC₅₀与每抗体递送的药物相对量相一致。并行地, 对如之前所述具有1.5的DAR的抗FAP (B11) ADC的糖偶联物进行了试验, 且显示出与对比物巯基偶联物 (DAR 3.3) 相比~2

倍更高的EC₅₀。

[0480] 如图36所示,当在SK-BR-3表达细胞或MDA-MB-231细胞上试验时,在细胞增殖试验中对于用携带A114N高度糖基化突变的抗HER抗体制备的ADC和如实施例14所述的AO-MMAE观察到相似的趋势。A114N糖偶联物清楚显示出针对抗Her2表达细胞系与非表达细胞系相比增强的细胞毒性。与用相同抗体制备的SialT糖偶联物相比的相对毒性与该制备物的较低药物载量相一致。

[0481] 对于用携带A114N高度糖基化突变的抗TEM1抗体制备的ADC和如实施例14所述制备的AO-MMAE实施了细胞增殖试验。与非表达MDA-MB-231细胞系相比,用TEM1-表达细胞系SJSA-1和A673观察到了较高的毒性。与使用相同抗体的常规巯基偶联物相比,毒性水平符合该制备物的药物载量(DAR)。

	SJSA-1	A673-RPMI	A673-DMEM-RPMI	MDA-MB-231
	IC50	IC50	IC50	IC50
[0482] 抗 TEM1 A114N-AO-MC-VC-PABC-MMAE	3 µg/ml	3.2 µg/ml	2.2 µg/ml	40 µg/ml
抗 TEM1-MC-VC-PABC-MMAE	4 µg/ml	1 µg/ml	0.9 µg/ml	20 µg/ml

[0483] 总之,药物通过聚糖与可裂解接头的位点特异性偶联产生具有与常规基于巯基的偶联物等同的特性和体外效力ADC,如使用不同抗体和不同药物-接头所证实的。此外,在2mM高碘酸盐以下,药物偶联物的水平与唾液酸的降低相关。2mM以上逐渐增加的高碘酸盐浓度产生很小的益处,如从唾液酸至氧化形式的完全转化所预期的。然而,在所有条件下,每抗体的药物数目稍低于唾液酸含量,表明一些氧化的唾液酸可能类似地不能用于偶联,或是由于包埋或是另外由于因药物-接头的大体积导致的空间位阻。

[0484] 实施例16. 抗体药物偶联物的体内表征

[0485] 抗HER糖偶联物的效力也在Her2+肿瘤细胞异种移植模型中进行了评估,且与具有~2倍更高的DAR的巯基偶联物对比物进行了比较。将在处理开始前使其建立了~150mm³的肿瘤的SK-OV-3 Her2+肿瘤细胞植入Beige/SCID小鼠。将3或10mg/kg剂量的ADC通过尾静脉在第38、45、52和59天进行注射。~10只小鼠每组。对在不同组中的小鼠的肿瘤体积进行测量且记录其生存率。基于Kaplan-Meier方法绘制了生存曲线。

[0486] 图33展示了抗HER糖偶联物和巯基偶联物在Her2+肿瘤细胞异种移植模型中的体内效力的比较。用SK-OV-3 Her2+肿瘤细胞植入的米色/SCID小鼠用包含糖偶联物或具有~2-倍更高DAR的巯基偶联物对比物的MMAE(图33A和B)和PEG8-Do110(图33C和D)给药。MMAE偶联物的肿瘤生长动力学示于图33A。在这种情况下,糖偶联物与裸抗体本身(黑色)相比展示了明显更高的效力,但少于具有~2-倍更高DAR的巯基偶联物对比物。MMAE糖偶联物展示了从第一次给药起显著的肿瘤退化和肿瘤生长中~20天的延迟(图33A)和生存时间~2-倍的增加。在相同的ADC剂量(10mg/kg),巯基MMAE偶联物展示了几近完全的肿瘤阻抑。

[0487] PEG8-Do110糖偶联物(“糖Do110”)和具有~2倍更高DAR的巯基偶联物对比物(“巯基Do110”)的体内效力也在相同的Her2+肿瘤细胞异种移植模型中进行了测定。如之前所述,两种偶联物与MMAE偶联物相比都表现出较低的效力。然而,10mg/kg的氨基氧基-PEG8-Do110糖偶联物(“糖Do110”)显示出在第一次施用后在肿瘤生长方面15天的延迟(图33C)和在生存时间方面~20天(1.7-倍)的增加(图33D)。巯基偶联物在相同的剂量更加有效,在生存率方面展示了2倍增加。在较低剂量(3mg/kg),巯基偶联物与10mg/kg的糖偶联物相比展

示了较少的效力。相比对于糖偶联物的110 μ mol PEG8-Do110药物每kg剂量,该剂量与80 μ mol PEG8-Do110药物每kg剂量对应。

[0488] 这些数据表明将药物位点特异性偶联至抗体聚糖的唾液酸上产生了具有与经由基于巯基的化学生成的ADC可比较的效力的分子。在体内稍低的效力可能源于由每种抗体经每种抗体结合抗原的内在化携带进入肿瘤细胞的药物数量较少。虽然我们还未将这些糖偶联物与具有相同DAR的巯基偶联物进行比较,但是在代表了可比较水平的施用药物的两种ADC的不同剂量下观察到的效力表明糖偶联物与其巯基对应物具有可比较的固有功效,表明在该位点的偶联没有有害作用。此外,仅引入了多28%的药物的10mg/kg剂量的Do110糖偶联物提供了与巯基偶联物相比增加2倍的存活力,表明这些偶联物在相同的DAR甚至可提供更卓越的效力。考虑到在天然聚糖中并入唾液酸的明显限制,较高的药物载量可通过多个不同策略获得,所述策略包括使用支链药物接头或引入额外糖基化位点以及使用相同的方法。

序列表

<110> 建新公司

<120> 具有改变的糖基化和降低的效应物功能的包含 Fc 的多肽

<130> 550502 SA9-109PC

<140> PCT/US2013/059481

<141> 2013-09-12

<150> 61/776, 715

<151> 2013-03-11

<150> PCT/EP2012/003819

<151> 2012-09-12

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001] <220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成多肽"

<400> 1

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Leu His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

[0002]

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 2

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 2

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Trp
20 25 30

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
35 40 45

Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
50 55 60

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

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

[0003]

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

[0004]

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 3

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 3
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80

 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

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

 Ser Ser Asn Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125

 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140

 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160

 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175

 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190

 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205

 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

[0005]

210	215	220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe 225	230	235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val 245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe 260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro 275	280	285
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr 290	295	300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 305	310	315 320
[0006]		
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 325	330	335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg 340	345	350
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 355	360	365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 370	375	380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser 385	390	395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 405	410	415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 420	425	430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 4

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0007]

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

[0008]

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Ser Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 5

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

[0009]

<400> 5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

[0010]

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Asn Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

[0011]

<210> 6

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

[0012]

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

	275	280	285
	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
	290	295	300
	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
	305	310	315 320
	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
	325	330	335
	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
	340	345	350
	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
	355	360	365
	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
	370	375	380
[0013]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
	385	390	395 400
	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
	405	410	415
	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
	420	425	430
	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Asn Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	440	
	<210> 7		
	<211> 447		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="对人工序列的描述：合成多肽"		
	<400> 7		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		

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

[0014]

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

[0015]

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Thr
435 440 445

<210> 8

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成多肽"

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

[0016]

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

[0017]

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Thr Ser Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 9

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 9

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

[0018]

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

[0019]

<210> 10

<211> 454

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 10

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Ala Ile Tyr Asn Pro Ser Leu Gln
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Gly Val Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

[0020]

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

	290	295	300
	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
	305	310	315 320
	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
		325	330 335
	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
		340	345 350
	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		
		355	360 365
	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
		370	375 380
	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
		385	390 395 400
[0021]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
		405	410 415
	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
		420	425 430
	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
		435	440 445
	Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
		450	
	<210> 11		
	<211> 454		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="对人工序列的描述：合成多肽"		
	<400> 11		
	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Ala Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		

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

[0022]

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

[0023]

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

[0024]

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

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

[0025]

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

[0026]

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

[0027]

Gly Lys
450

<210> 14

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asn Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

[0028]

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

	260	265	270
	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
	275	280	285
	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
	290	295	300
	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
	305	310	315
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
	325	330	335
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
	340	345	350
	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
	355	360	365
[0029]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
	370	375	380
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
	385	390	395
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
	405	410	415
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
	420	425	430
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	435	440	445
	Gly Lys		
	450		
	<210> 15		
	<211> 450		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

[0030]

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
290 295 300

[0031]

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 16

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 16

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

[0032]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asn Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

[0033]

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

[0034]

<210> 17

<400> 17
000

<210> 18

<400> 18
000

<210> 19

<400> 19
000

<210> 20

<400> 20
000

<210> 21

<400> 21
000

<210> 22

<400> 22
000

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

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 23
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

[0035]

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Leu 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 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130	135	140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
145	150	155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
	165	170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
	180	185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
	195	200 205
Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 24		
<211> 450		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
[0036]		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="对人工序列的描述：合成多肽"		
<400> 24		
Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr		
20 25 30		
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
50 55 60		
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65 70 75 80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		

85	90	95
Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
		160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
[0037]		
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
		240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

[0038]

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 25

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 25

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

[0039]

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Thr Ser Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

[0040]

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 26

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成多肽"

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

[0041]

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

[0042]

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 27
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 27
Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln

[0043]

100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
160		
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
[0044]		
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
240		
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Asn Thr Ser Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
320		

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

[0045]

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 28

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 28

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Leu His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

[0046]

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 29

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 29

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

[0047]

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

[0048]

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 30

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 30

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0049]

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

[0050]

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Thr Ser Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 31

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

[0051]

<400> 31

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Val Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

	100	105	110
	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
	115	120	125
	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
	130	135	140
	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
	145	150	155
			160
	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
	165	170	175
	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
	180	185	190
	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
	195	200	205
[0052]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210	215	
<210>	32		
<211>	444		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<221>	来源		
<223>	/注释="对人工序列的描述：合成多肽"		
<400>	32		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu			

50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser 65	70	75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr 85	90	95
Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val 100	105	110
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser 115	120	125
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys 130	135	140
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu 145	150	155 160
[0053]		
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu 165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr 180	185	190
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val 195	200	205
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro 210	215	220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe 225	230	235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val 245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe 260	265	270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

[0054]

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 33

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

[0055]

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Thr Ser Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

[0056]

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 34
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

[0057]

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

[0058]

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385	390	395	400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln			
405	410	415	
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His			
420	425	430	
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440		
<210> 35			
<211> 444			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="对人工序列的描述：合成多肽"			
<400> 35			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu			
50	55	60	
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser			
65	70	75	80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
85	90	95	
Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val			
100	105	110	
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser			

[0059]

115	120	125
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys		
130	135	140
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu		
145	150	155 160
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu		
165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
180	185	190
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val		
195	200	205
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
210	215	220
[0060]		
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
225	230	235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
275	280	285
Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Asn Thr Ser Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
290	295	300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
305	310	315 320
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
325	330	335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

[0061]

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 36

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

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

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

[0062]

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 37

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 37

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

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

[0063]

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

[0064]

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 38

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="对人工序列的描述：合成多肽"

<400> 38

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

[0065]

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

[0066]

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

[0067]

<210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成
peptide"

<400> 39
Gly Gly Gly Gly
1

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成
peptide"

<400> 40
Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0068]

<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成
peptide"

<400> 41
Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成
peptide"

<400> 42
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成
peptide"

<400> 43
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成
peptide"

<400> 44
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 45

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

[0069] <220>
<221> 来源
<223> /注释="对人工序列的描述：合成
peptide"

<400> 45
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

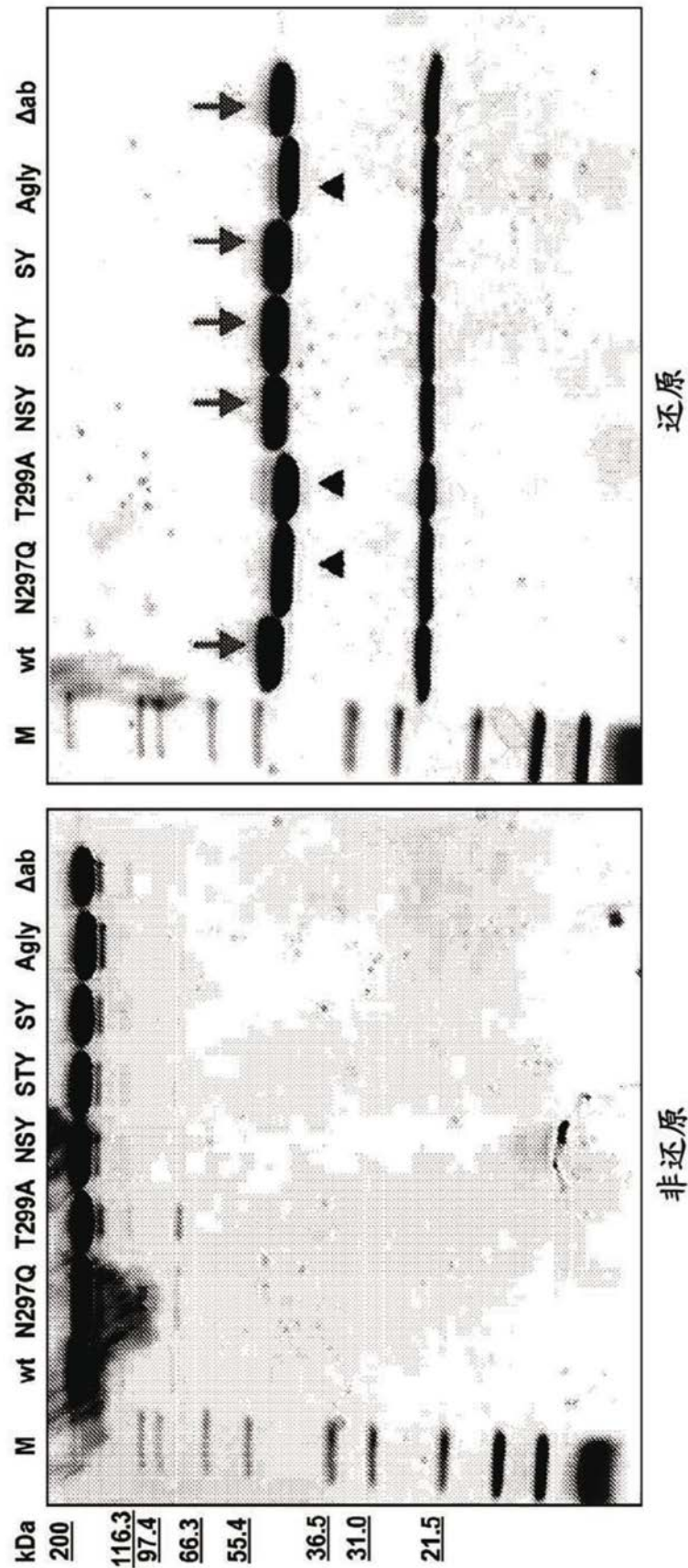


图2

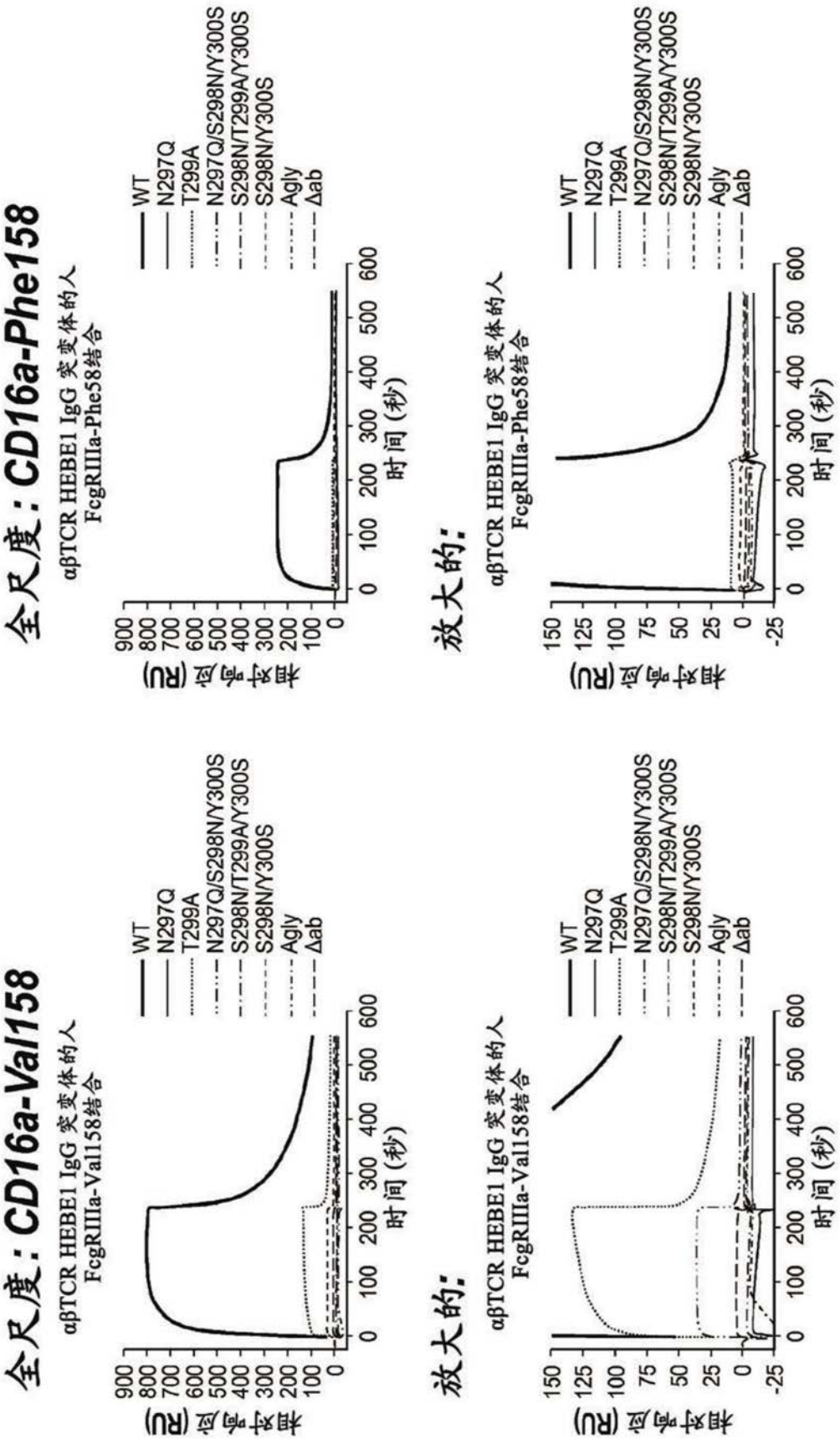


图3

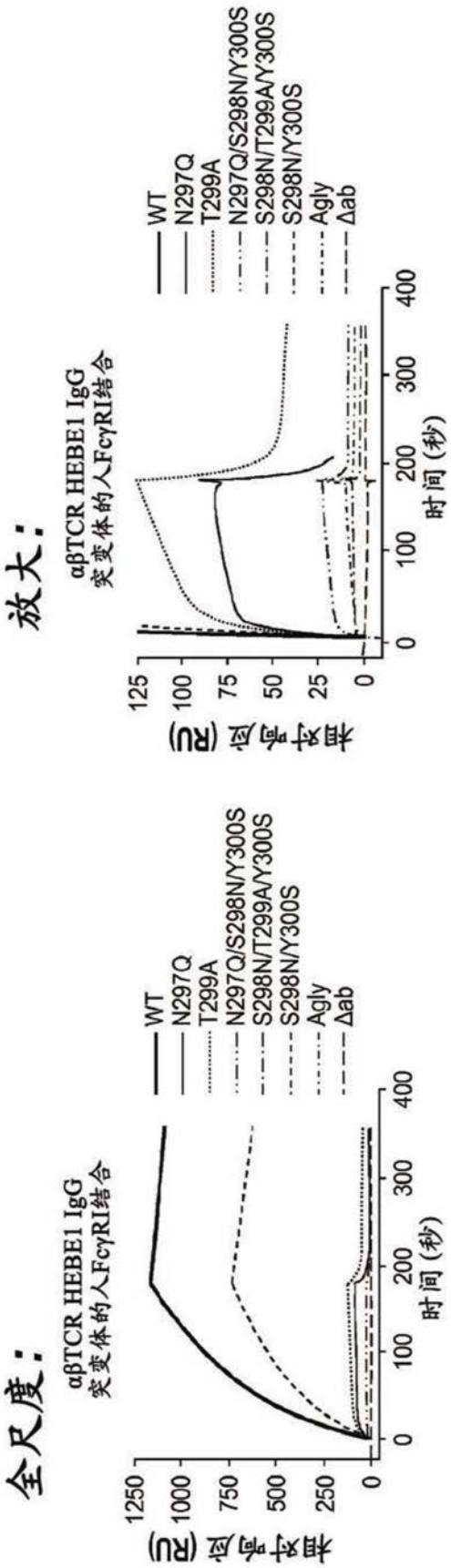


图4

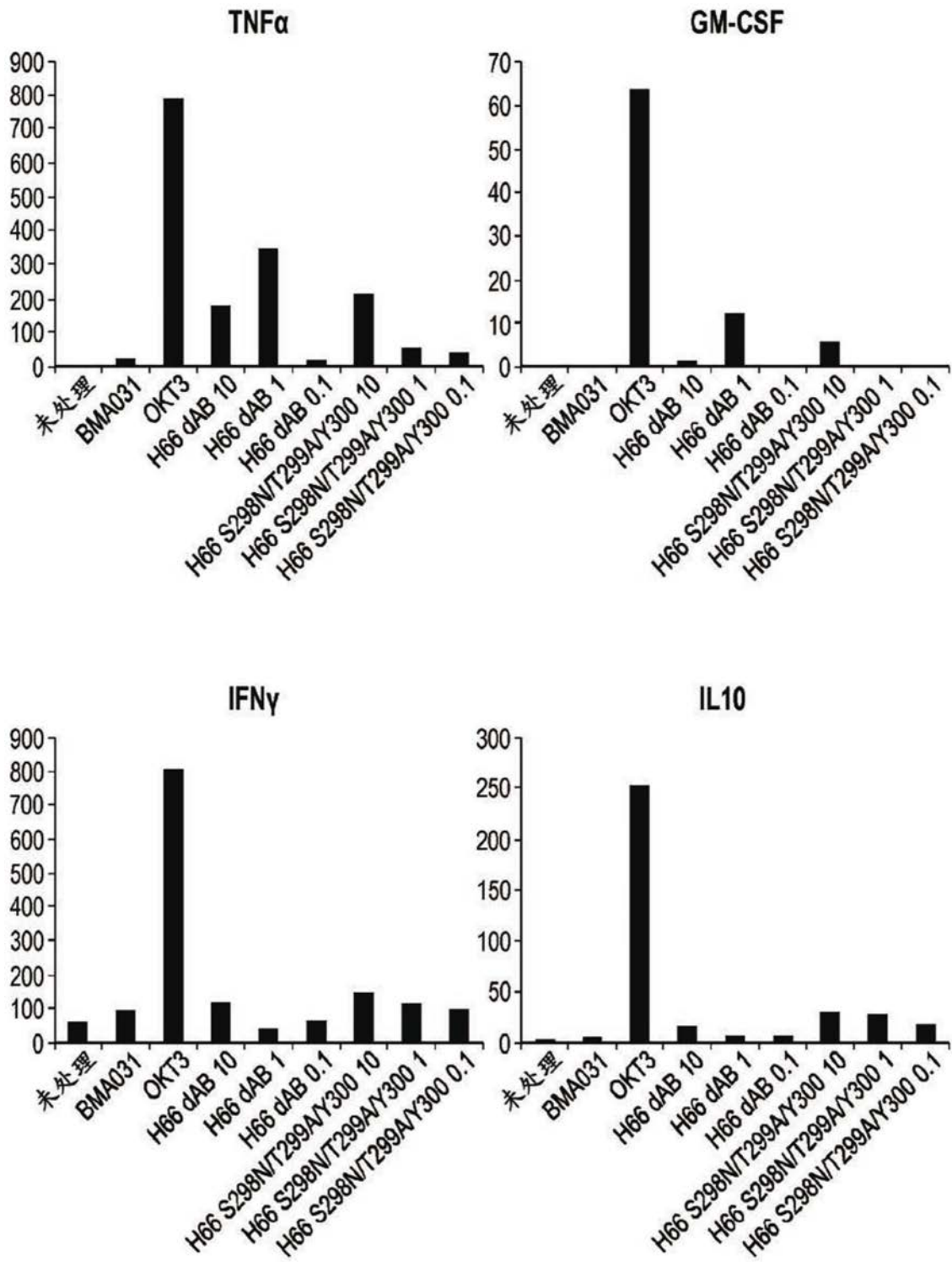


图5

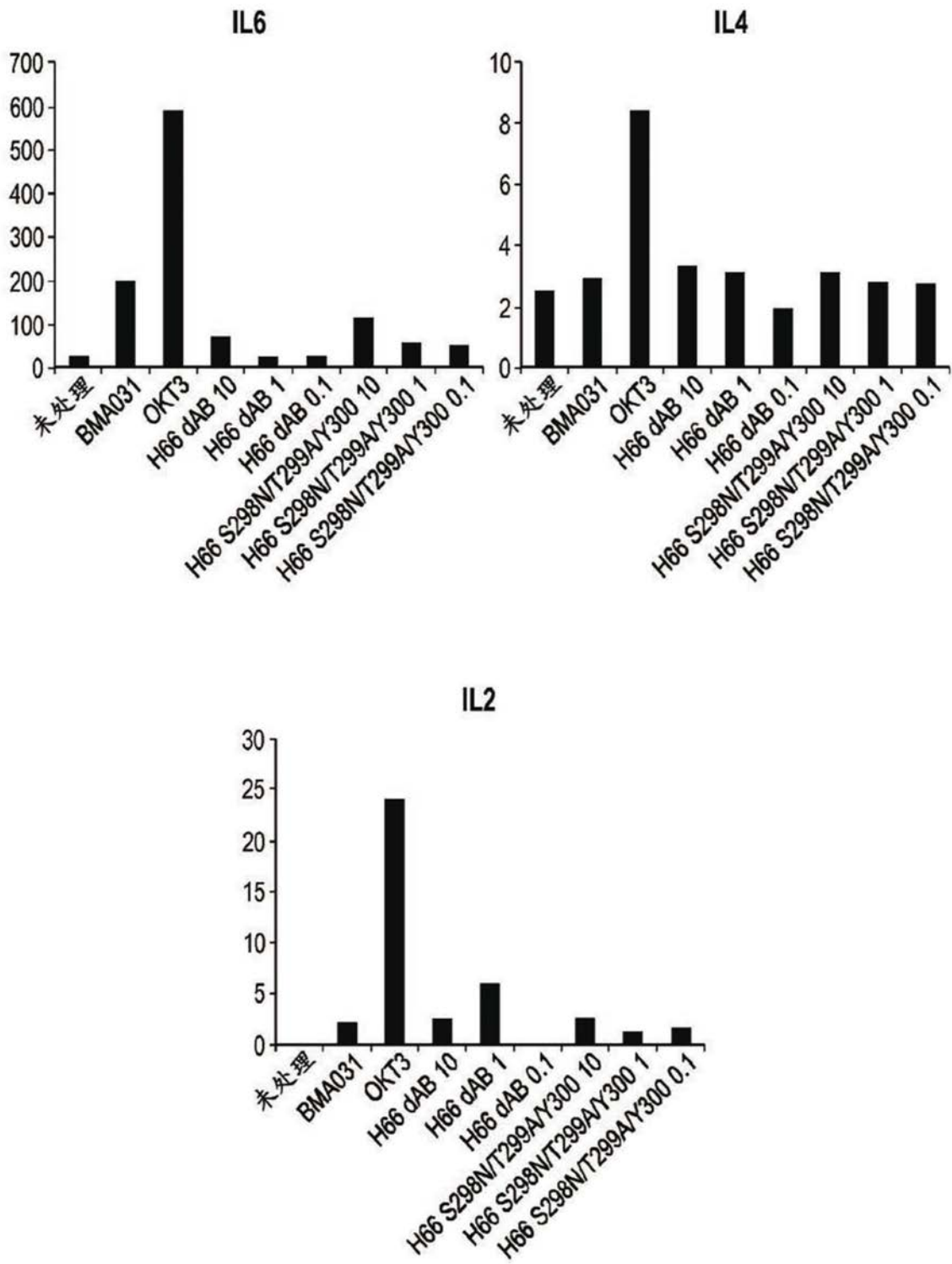


图6

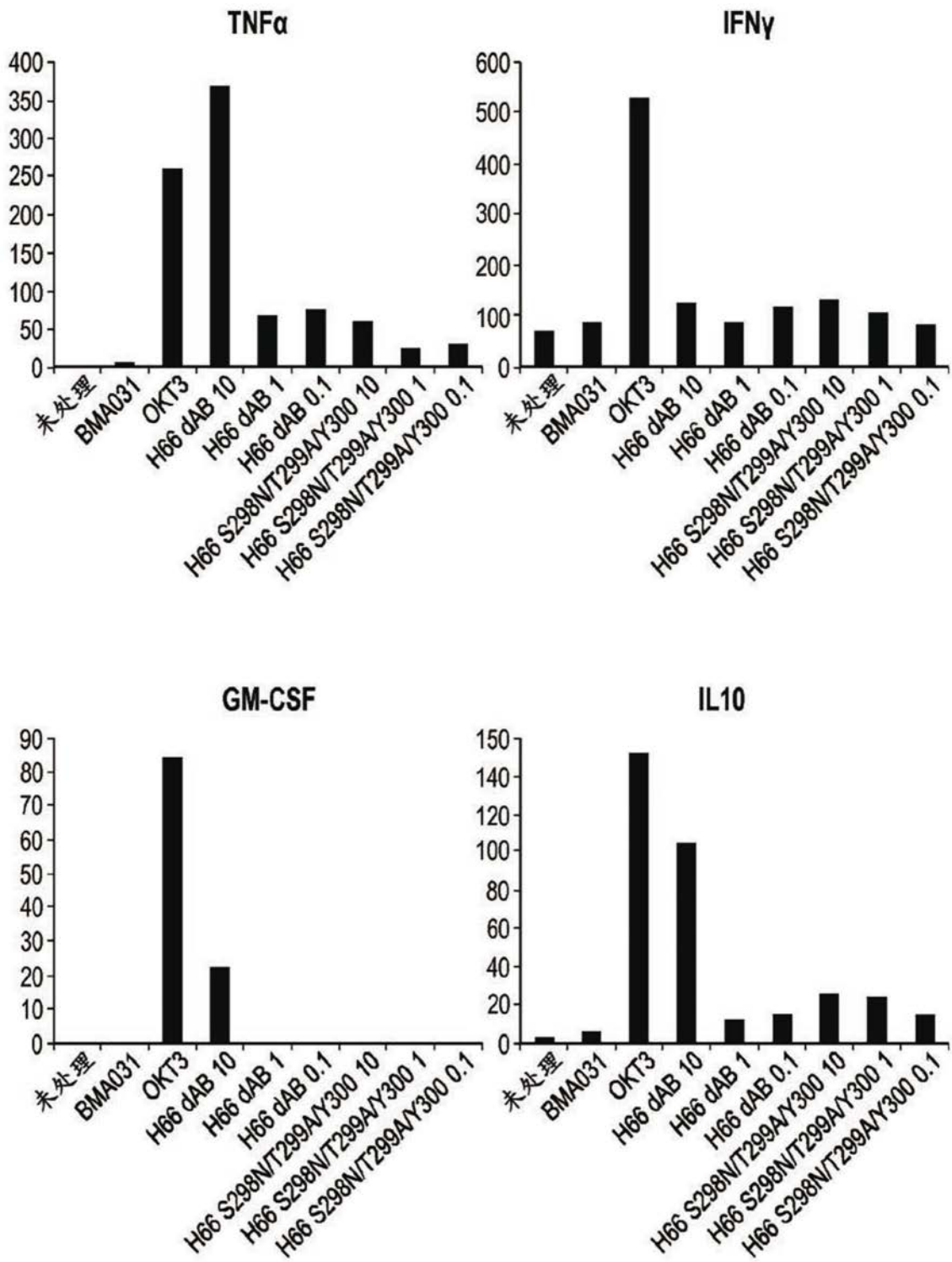


图7

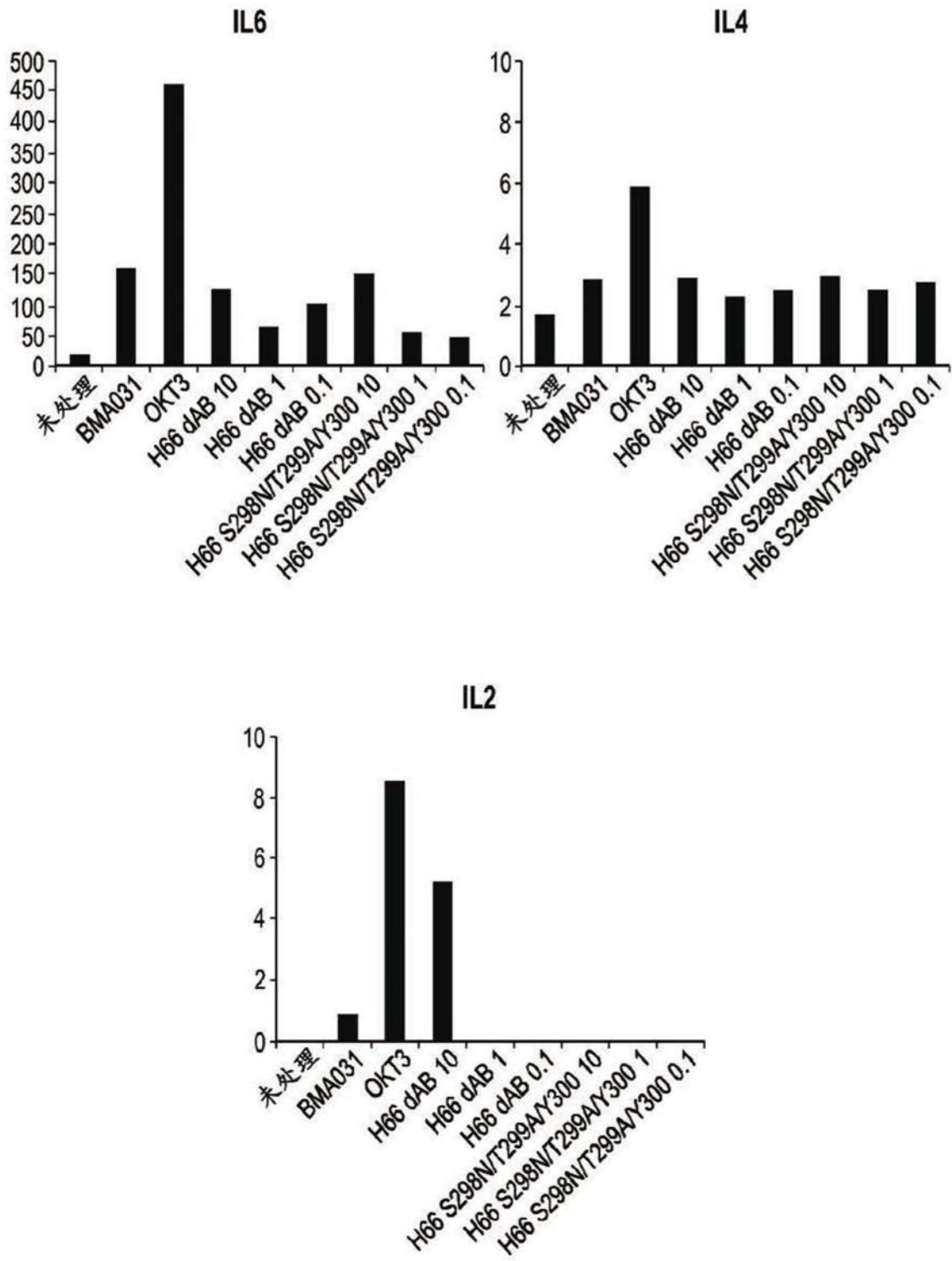
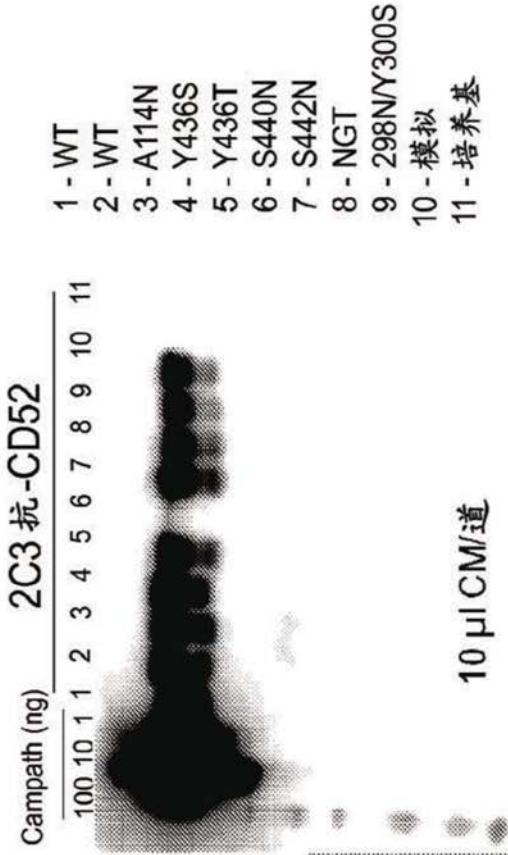


图8

A

蛋白质免疫印迹



B

表面等离子体共振

未知	浓度 (µg/mL)	相对响应 (RU)	计算 浓度 (M)	计算 浓度 (µg/mL)
2C3 在培养基中	3.00	855.75	2.45E-08	3.669
2C3 在培养基中	3.00	860.96	2.47E-08	3.710
2C3 在培养基中	3.00	866.89	2.51E-08	3.758
A114N		146.5	1.60E-09	0.240
Mock		87.84	8.62E-10	0.129
NGT		124.52	1.30E-09	0.196
S298N/Y300S		112.14	1.15E-09	0.172
S440N		146.36	1.60E-09	0.240
S442N		121.21	1.26E-09	0.189
WT (Katya)		148.41	1.63E-09	0.244
WT (Tim)		148.08	1.62E-09	0.244
Y436S		158.72	1.78E-09	0.267
Y436T		84.27	8.23E-10	0.123
温育培养基		87.38	8.57E-10	0.129

图9

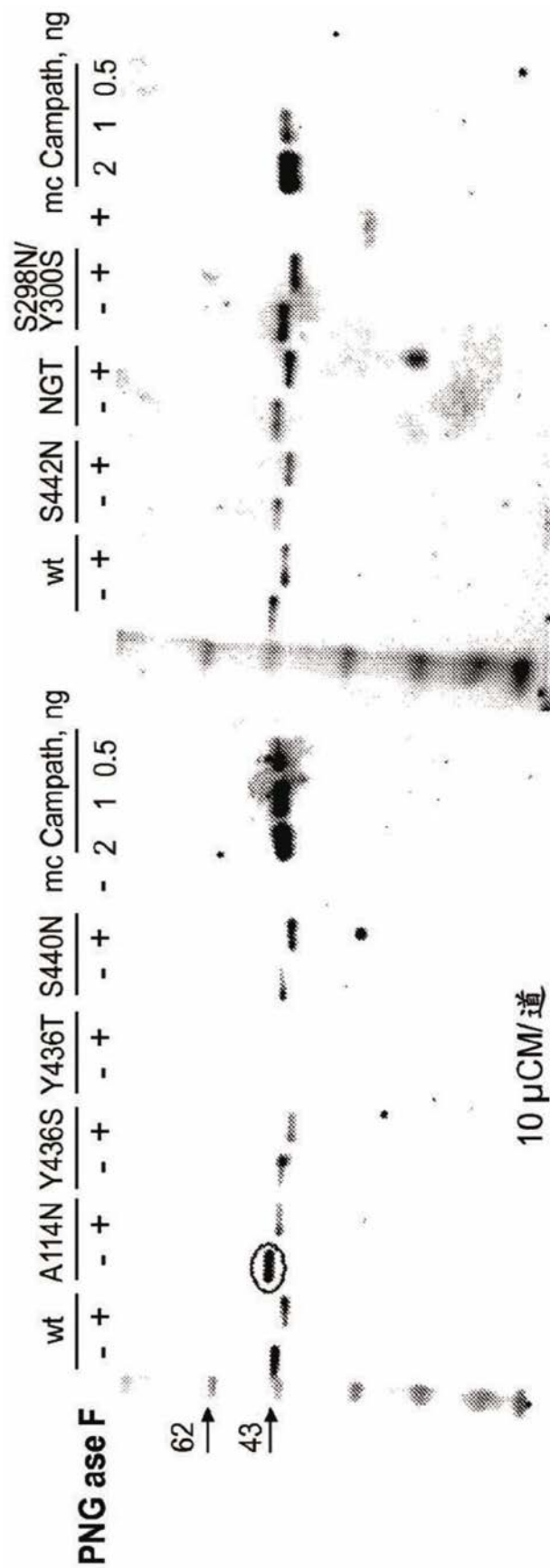


图10

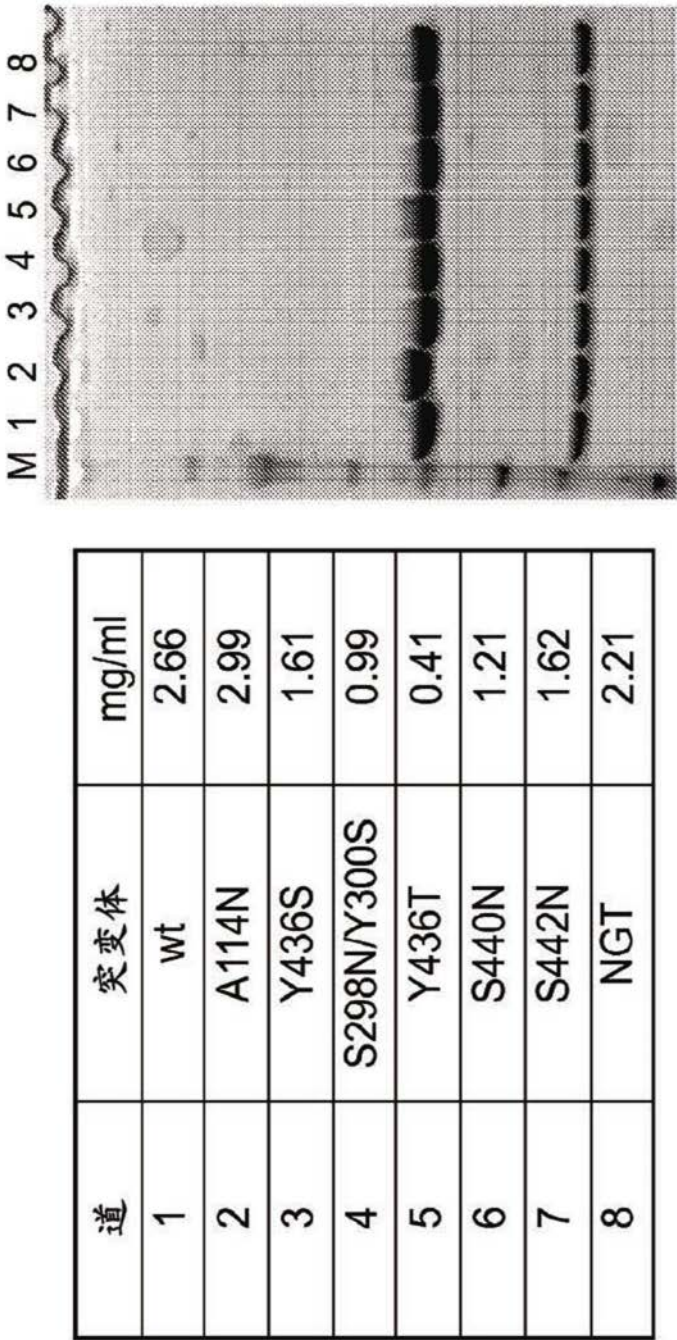


图11

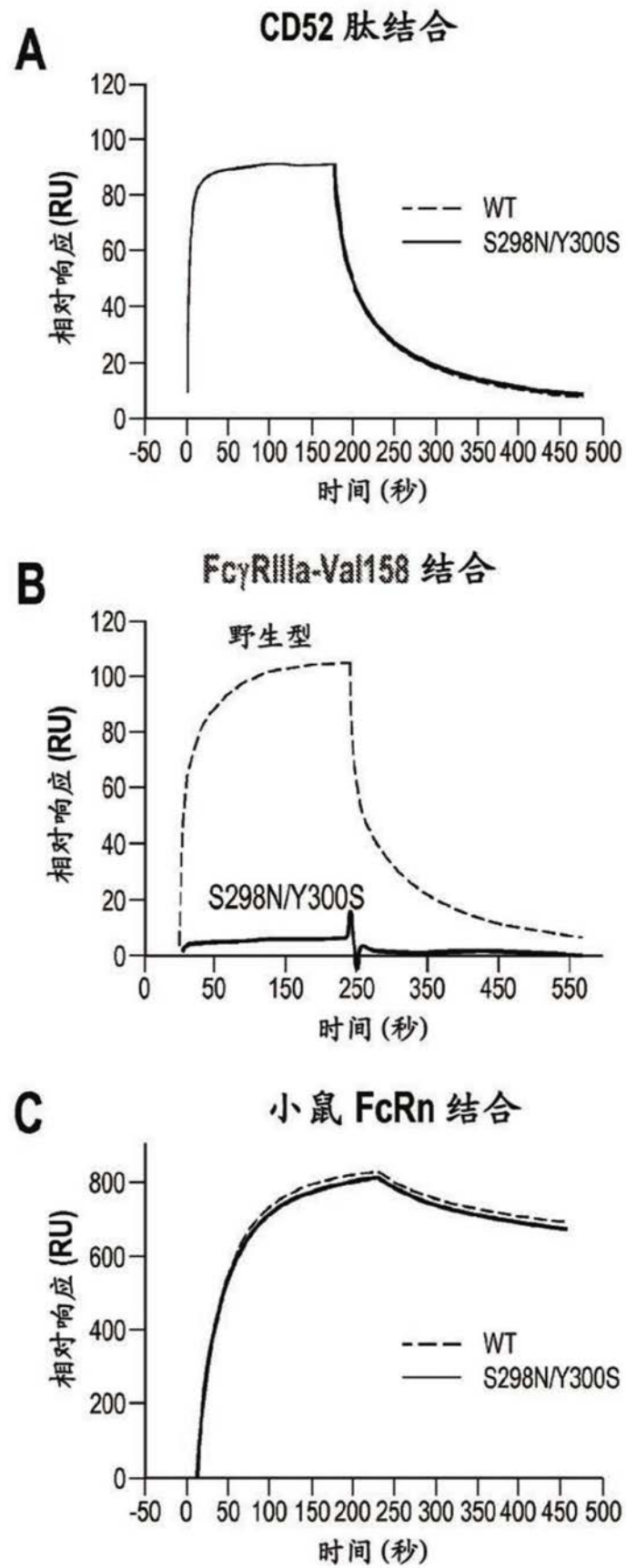


图12

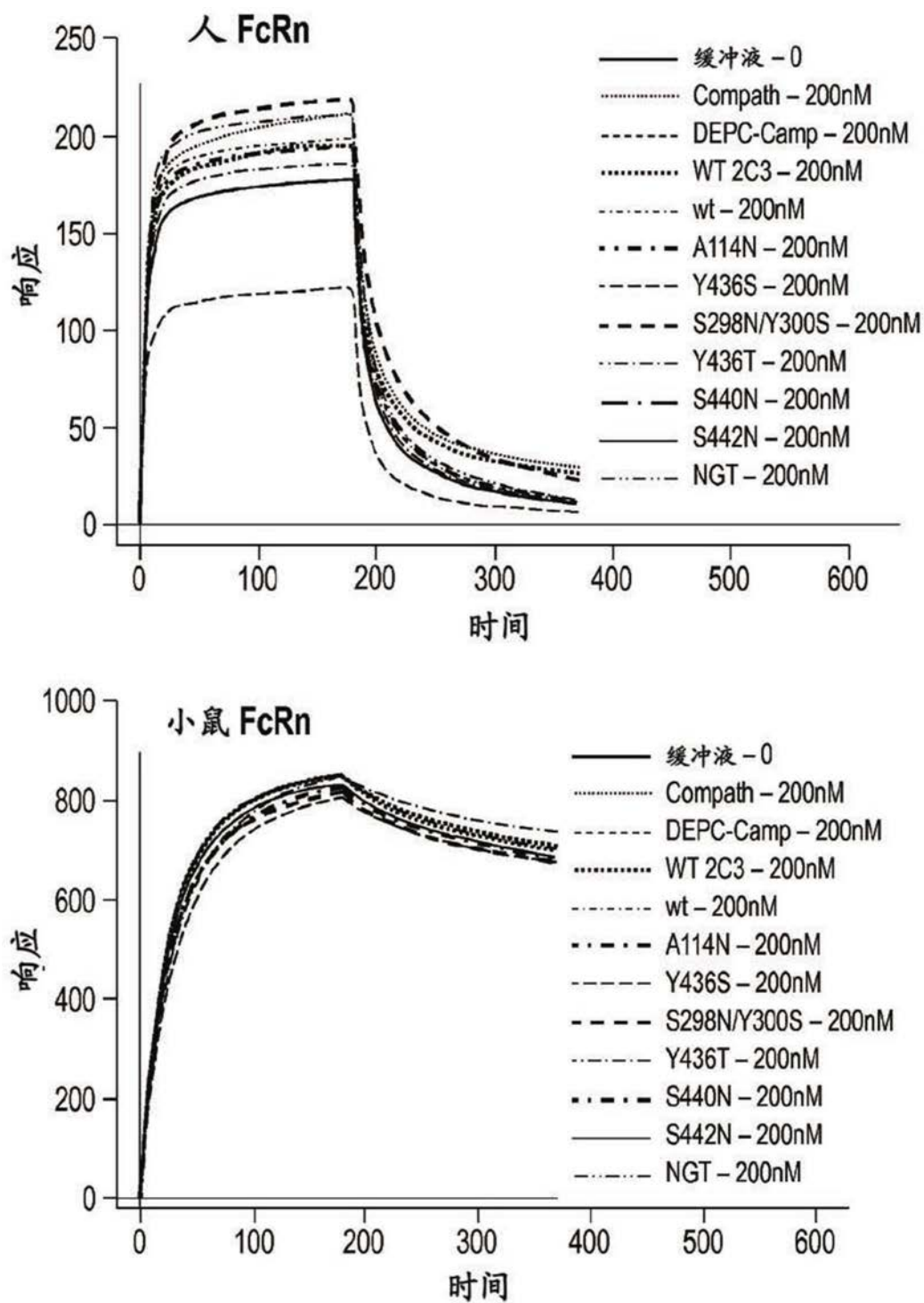


图13

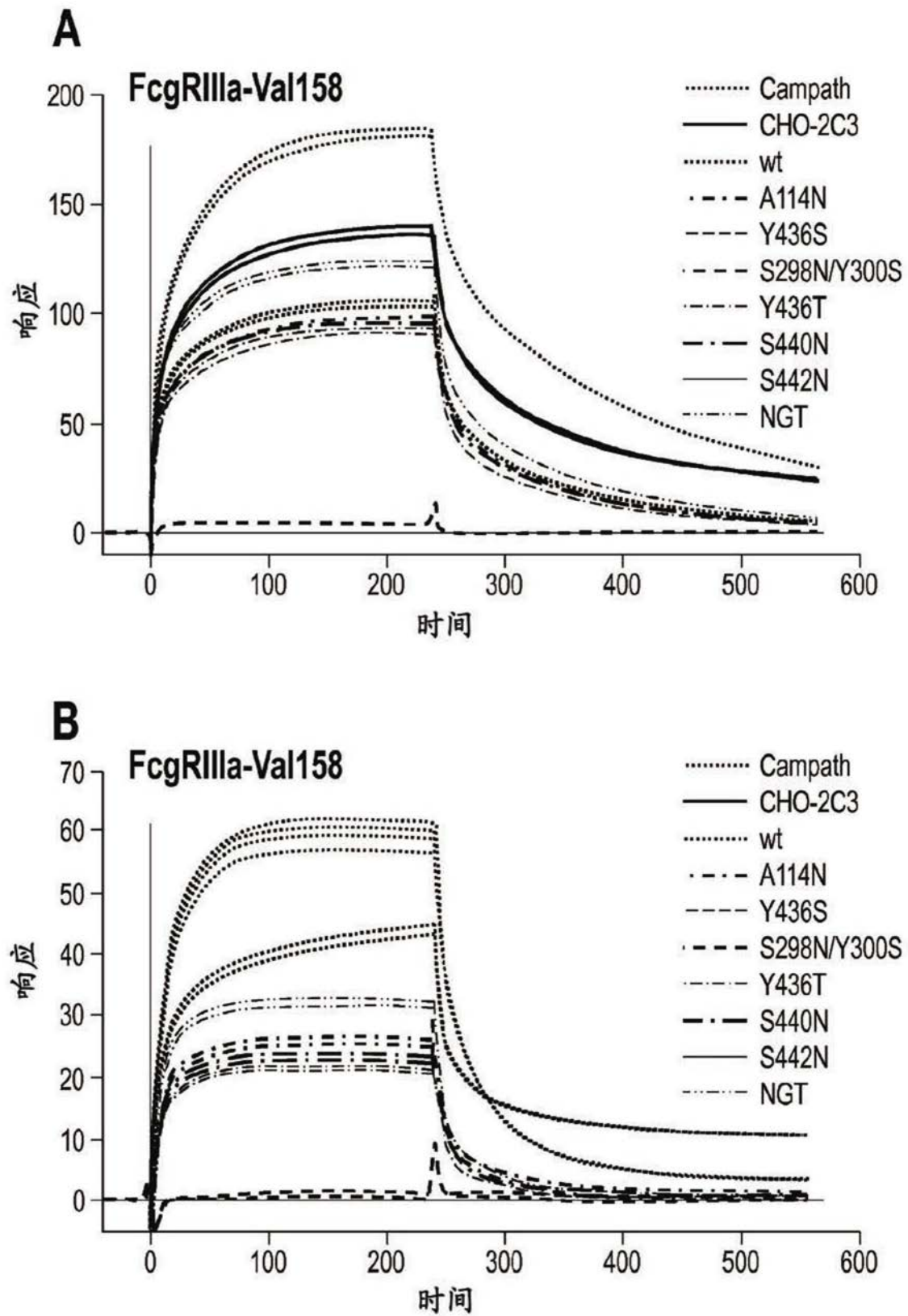


图14

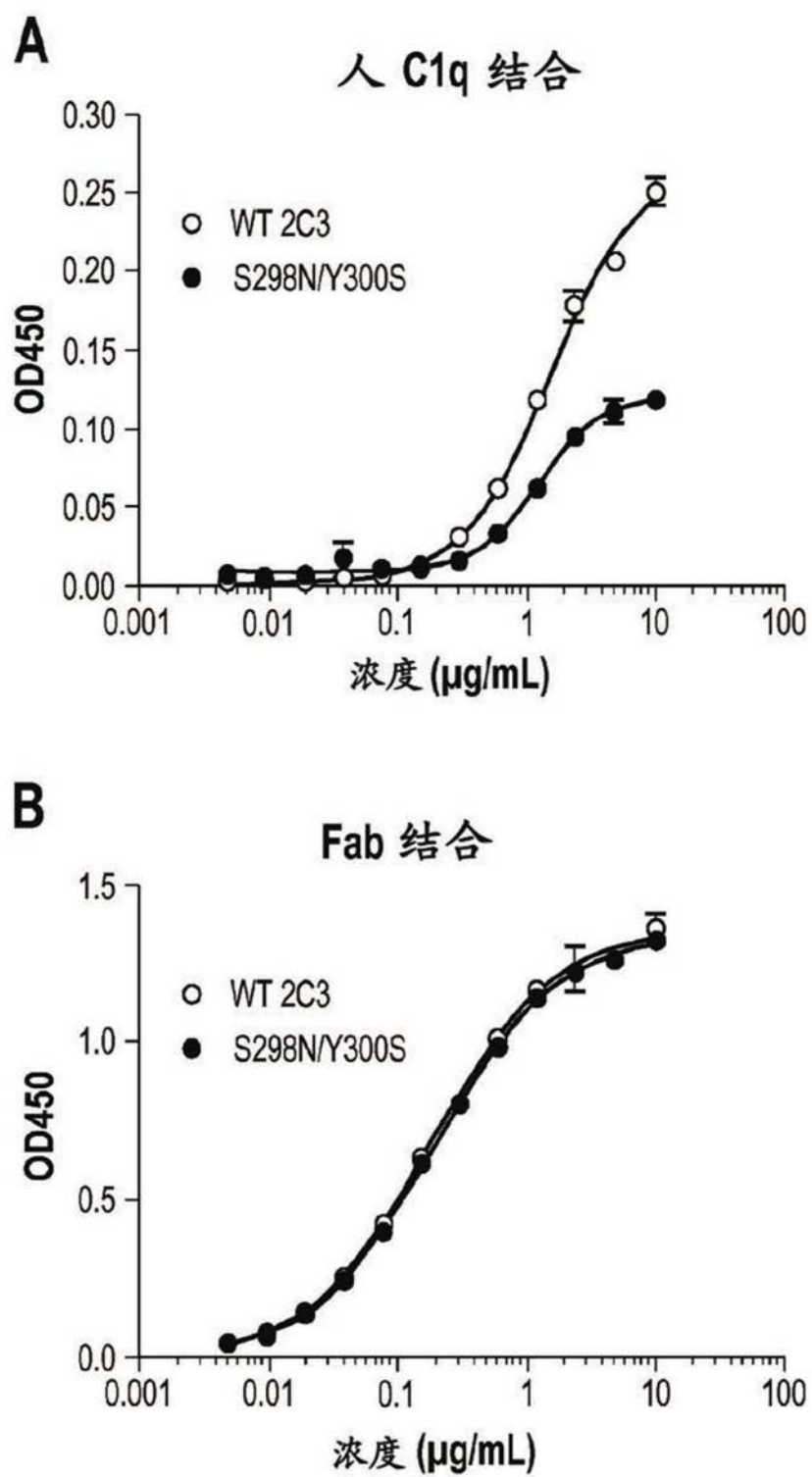


图15

样品	$k_a(\times 10^6/\text{Ms})$	$k_d(\times 10^{-2}/\text{s})$	$R_{\max}(\text{RU})$	$K_D(\text{nM})$
GLD52	7.0	1.7	67.0	2.44
WT2C3	6.0	1.1	64.2	1.75
A114N	4.7	1.1	59.5	2.45
Y436S	5.9	1.0	66.9	1.73
S298N?Y300S	5.7	1.0	63.3	1.80
Y436T	4.8	0.9	65.7	1.95
S440N	5.8	1.1	66.8	1.84
S442N	5.7	1.1	66.2	1.85
NGT	7.9	1.1	70.2	1.35

图16

样品	$K_{\text{on}}(\times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_{\text{off}}(\times 10^{-2} \text{s}^{-1})$	$K_D(\text{nM})$
WT 2C3	5.2	1.1	2.1
A114N	5.3	1.3	2.4

图17

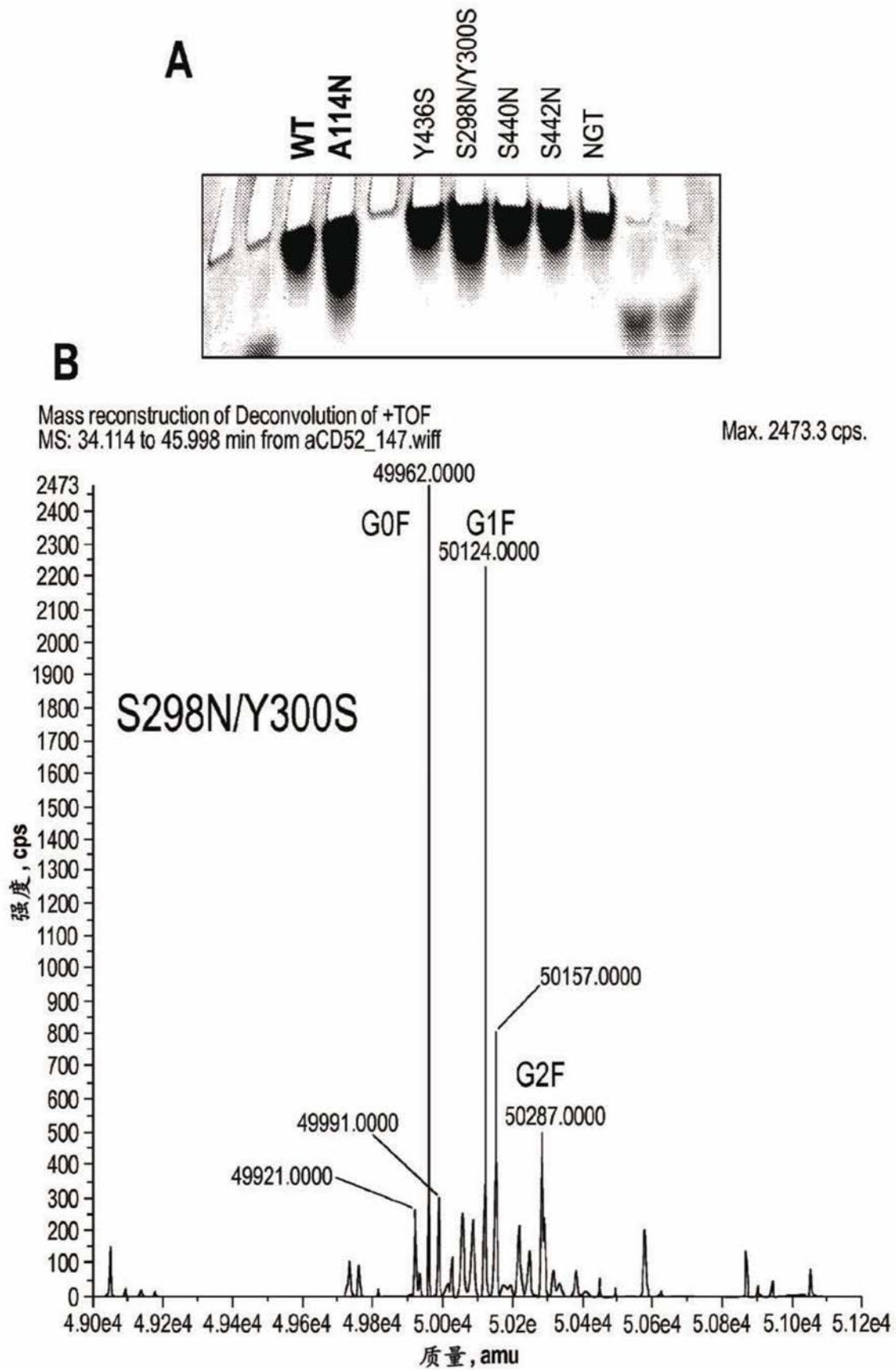


图18

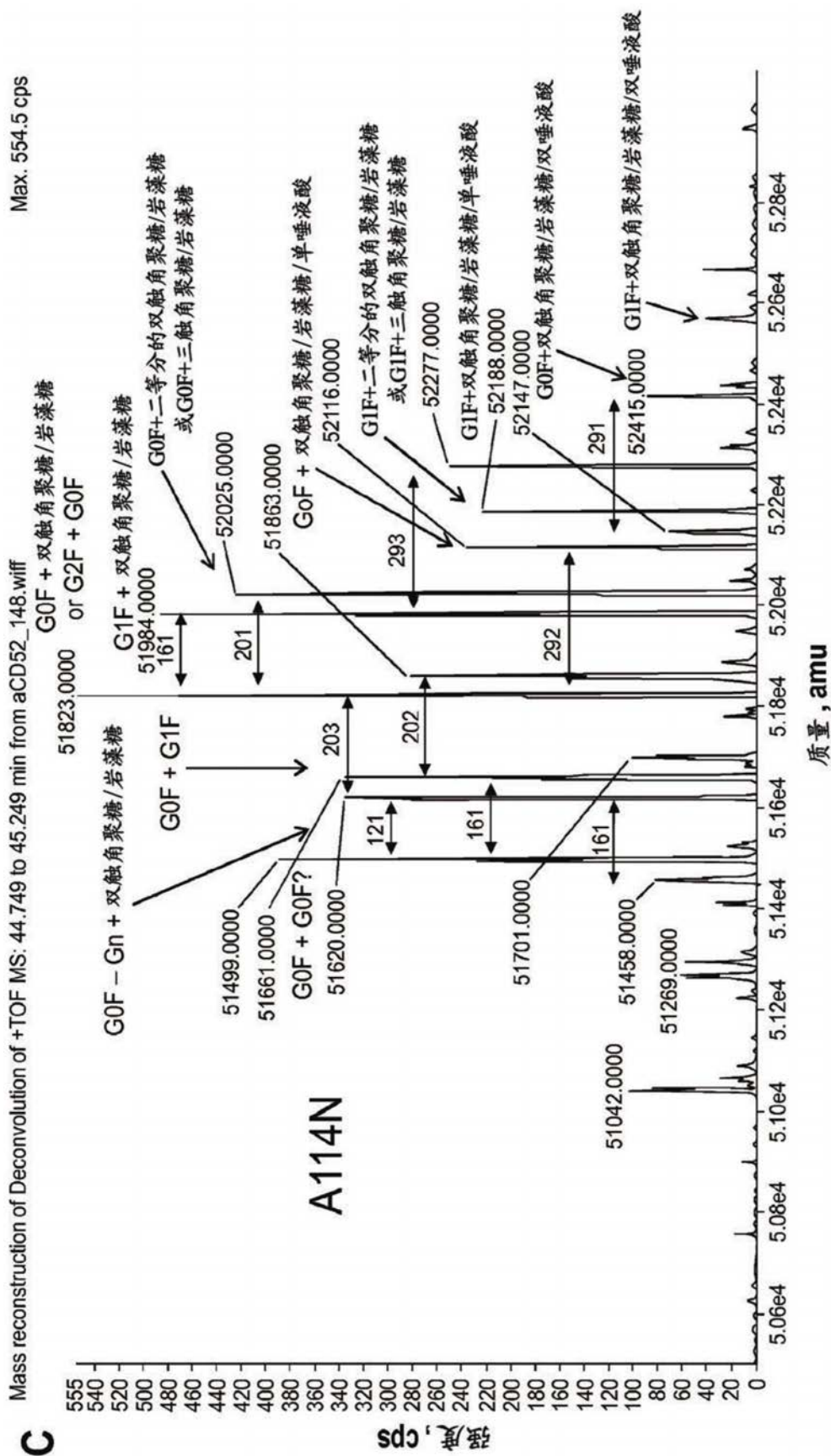


图18(续)

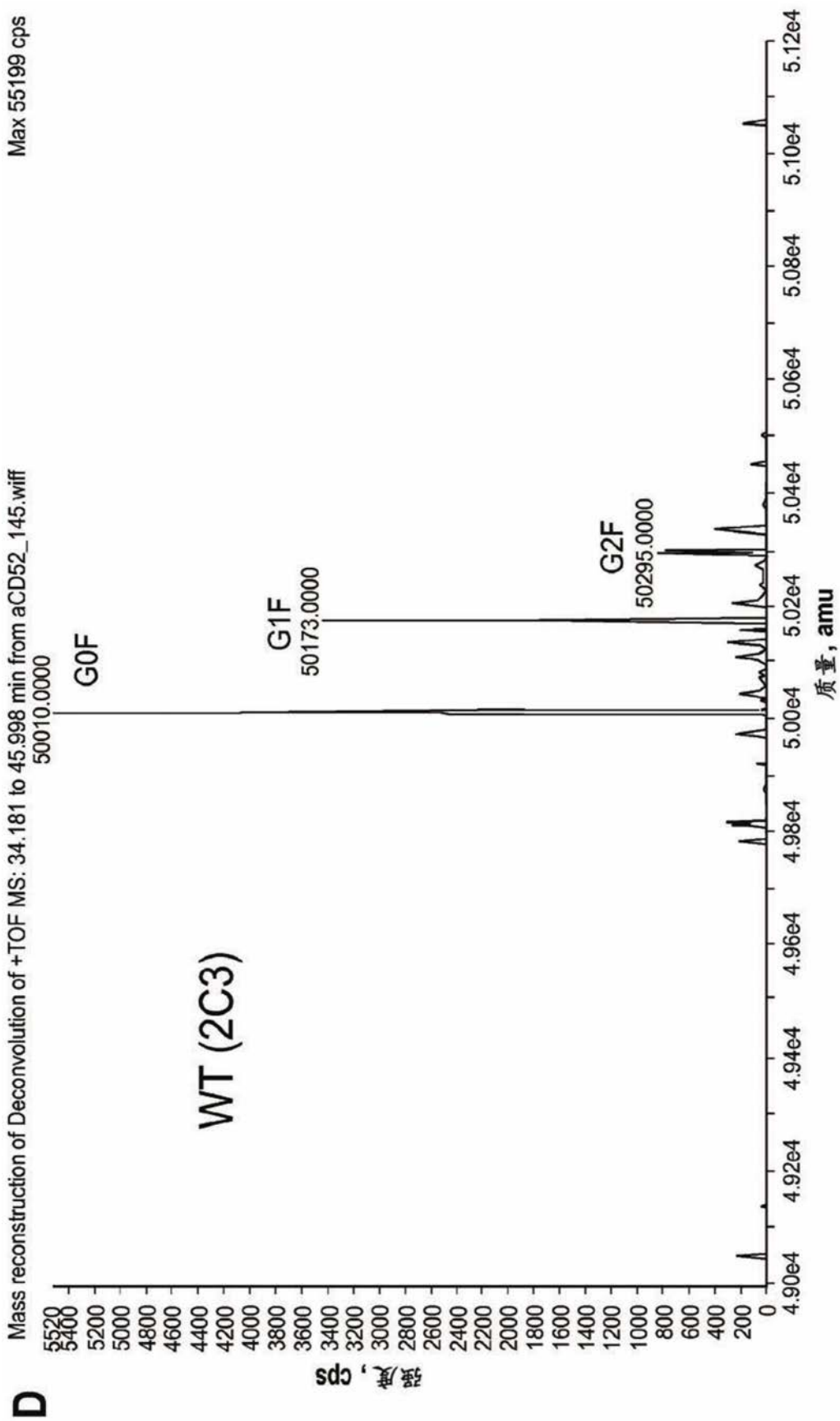


图18(续)

A

样品	批次#	八份浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
模拟培养基	11/23/2009	过低
wt 2C3	11/23/2009	2.54
A114N	11/23/2009	2.83
S298N/Y300S	11/23/2009	1.36
S440N	11/23/2009	1.32
S442N	11/23/2009	1.21
Y436S	11/23/2009	1.92
Y436T	11/23/2009	0.34
NGT	11/23/2009	1.90

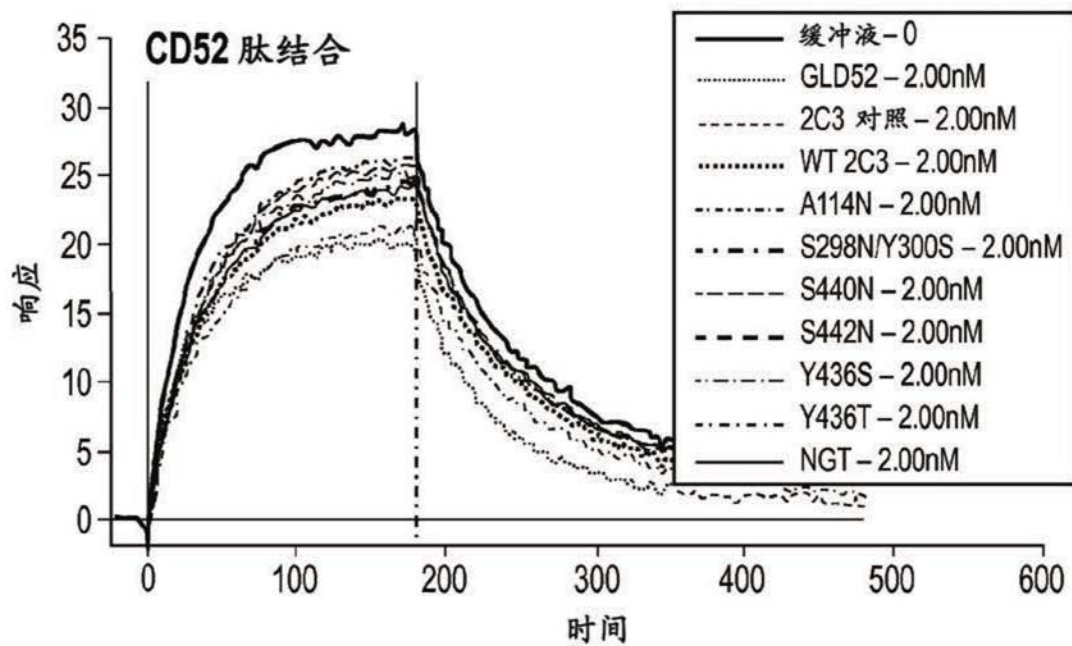
B

图19

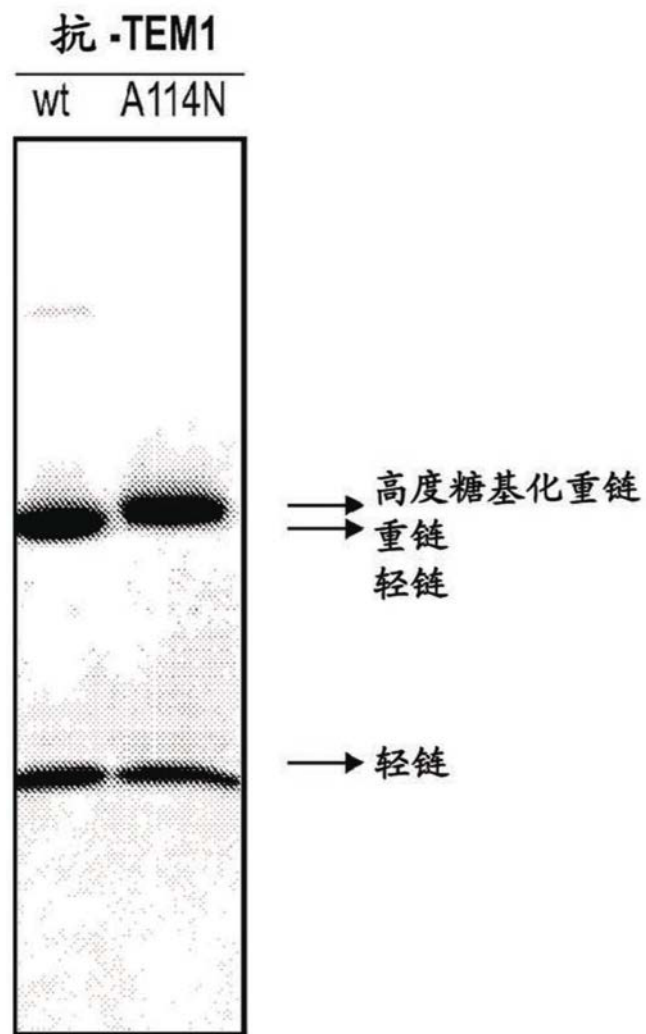


图20

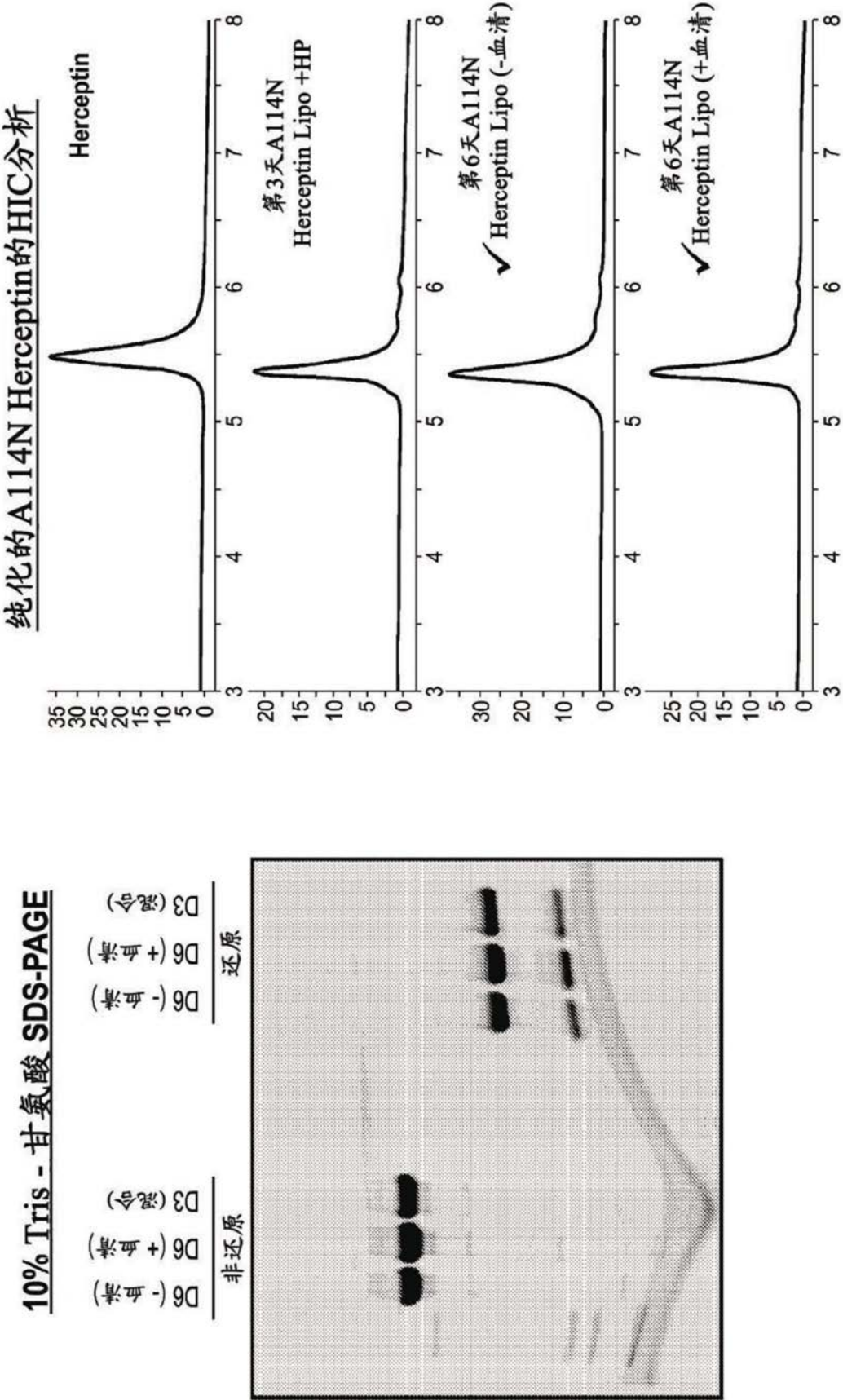


图21

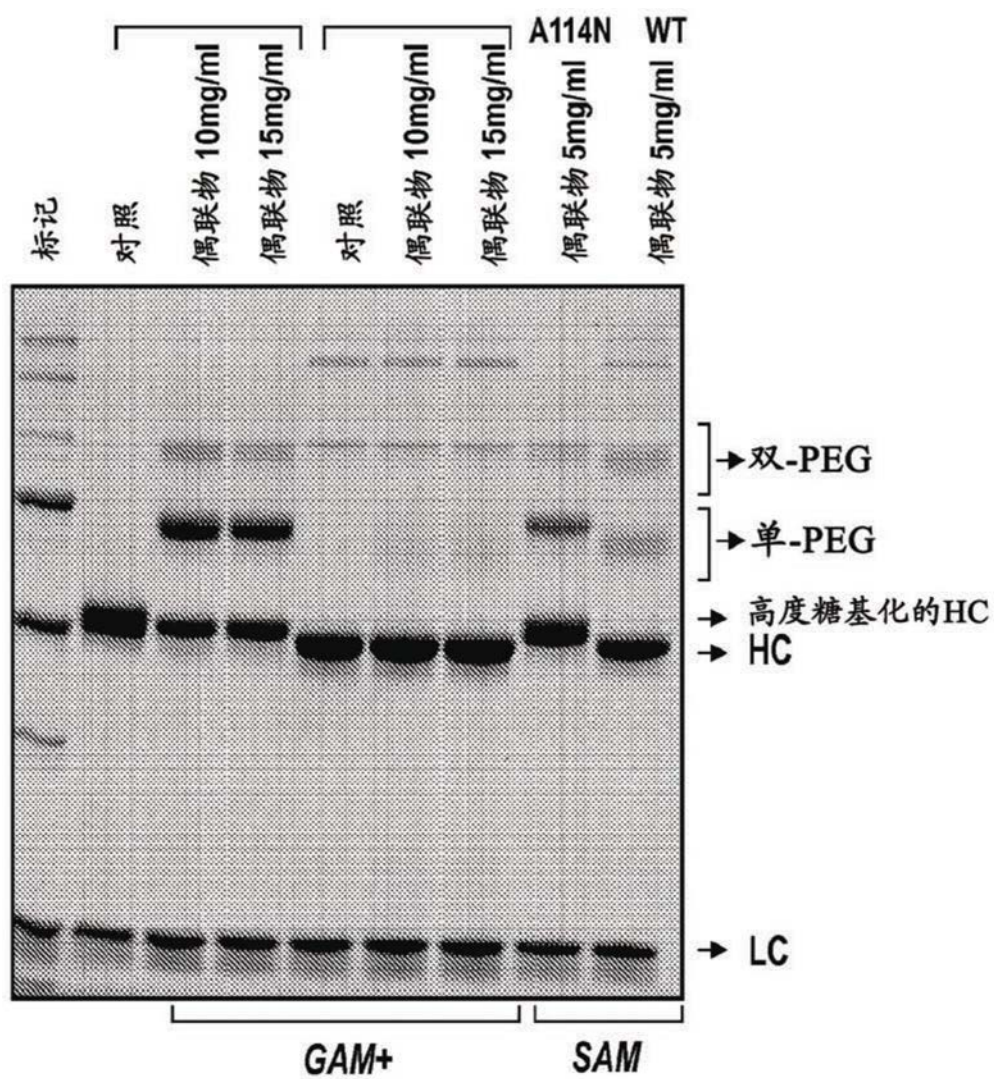


图22

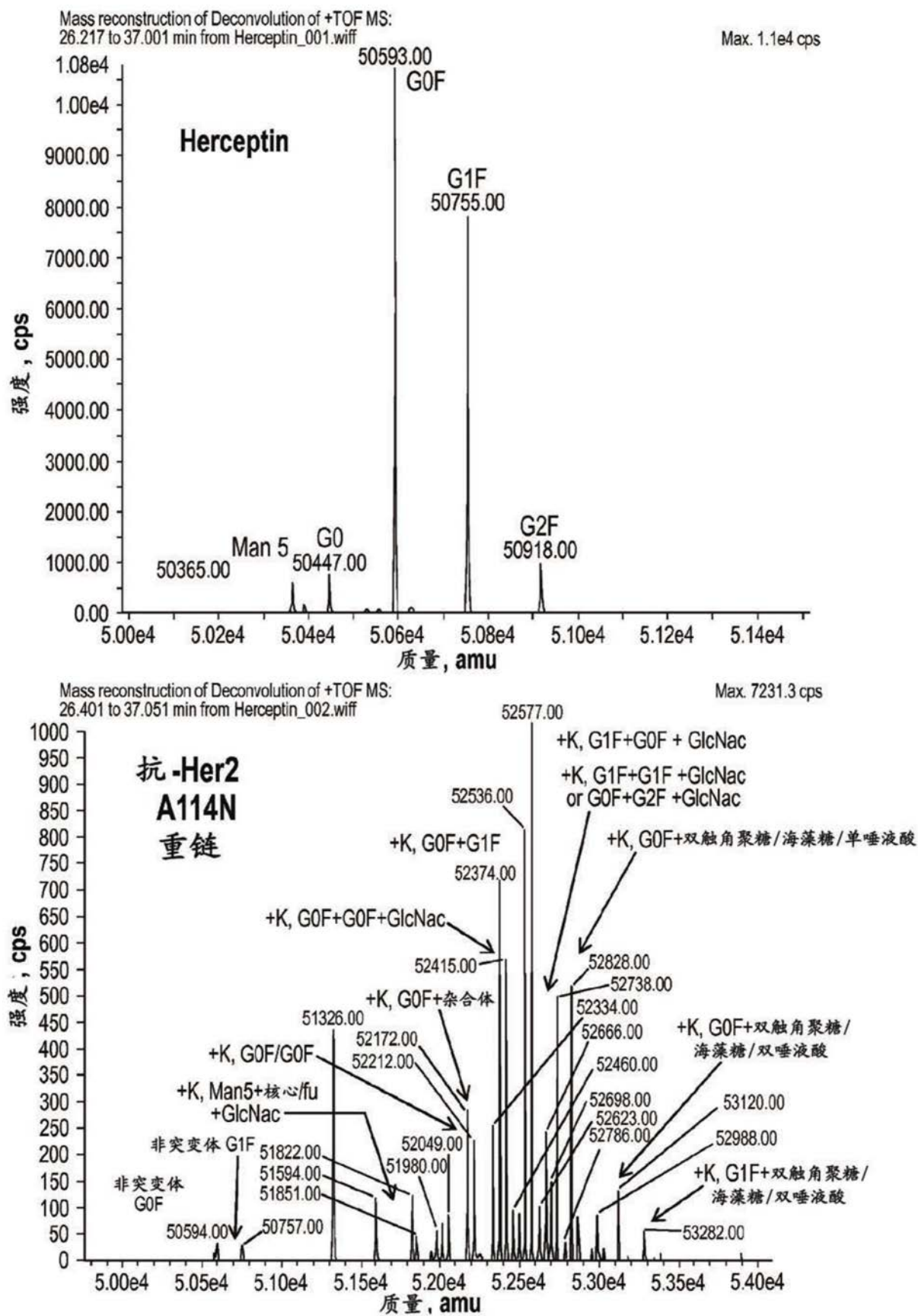


图24

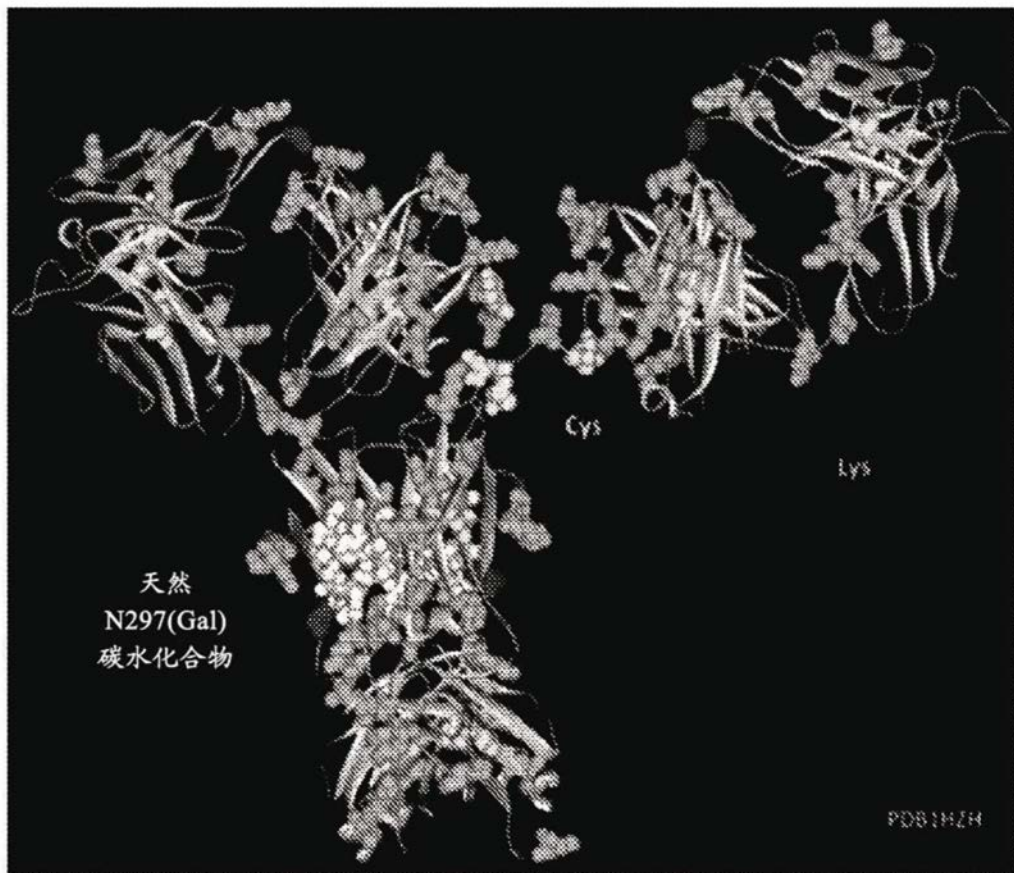
A

图25

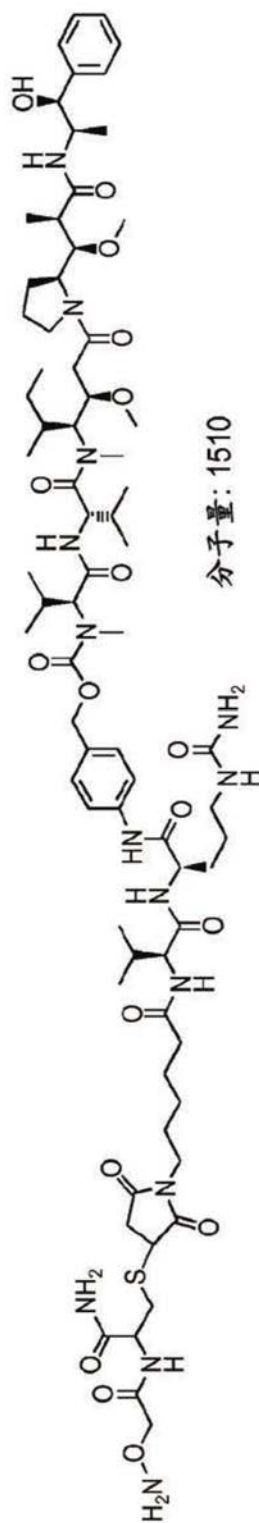
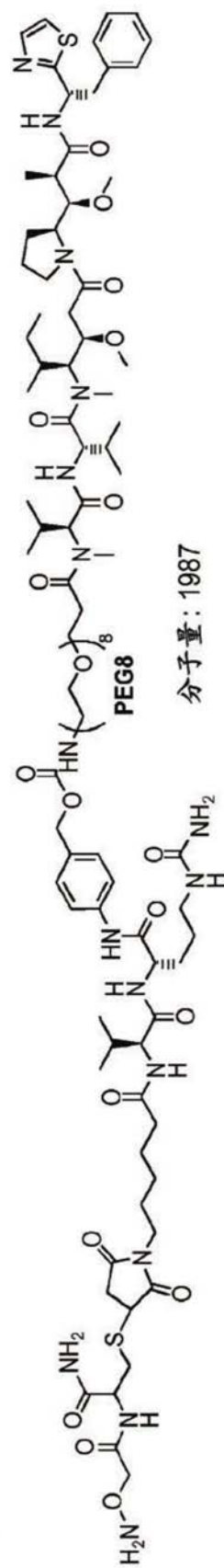
B**氨基氧基-Cys_MC-VC-PABC-MMAE****氨基氧基-Cys_MC-VC-PABC-PEG8-DoI10**

图25(续)

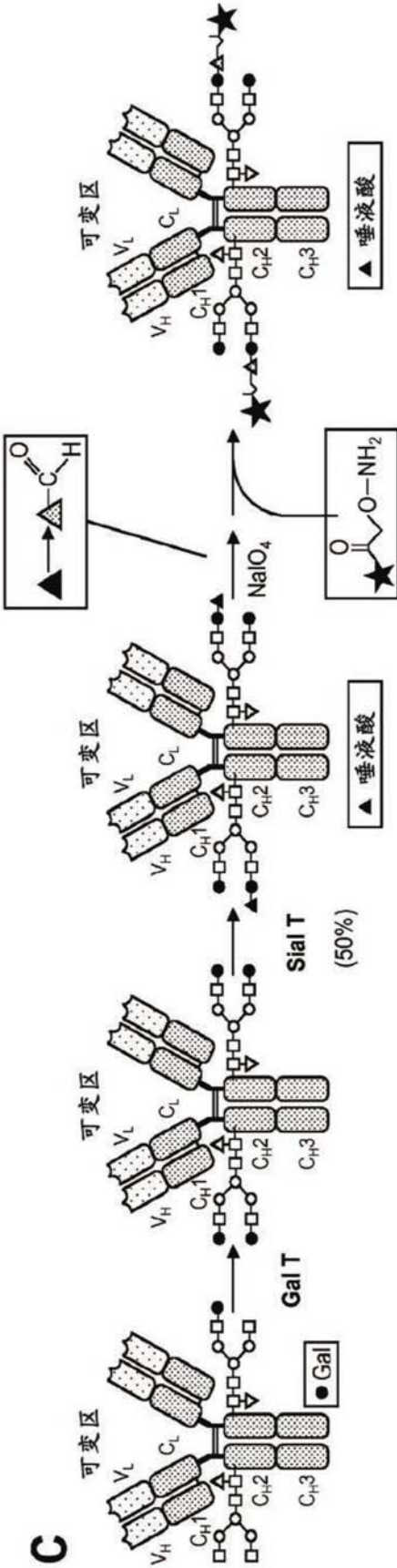


图25 (续)

氨基氧基-Cys-MC-VC-PABC-MMAE和氨基氧基-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10的合成

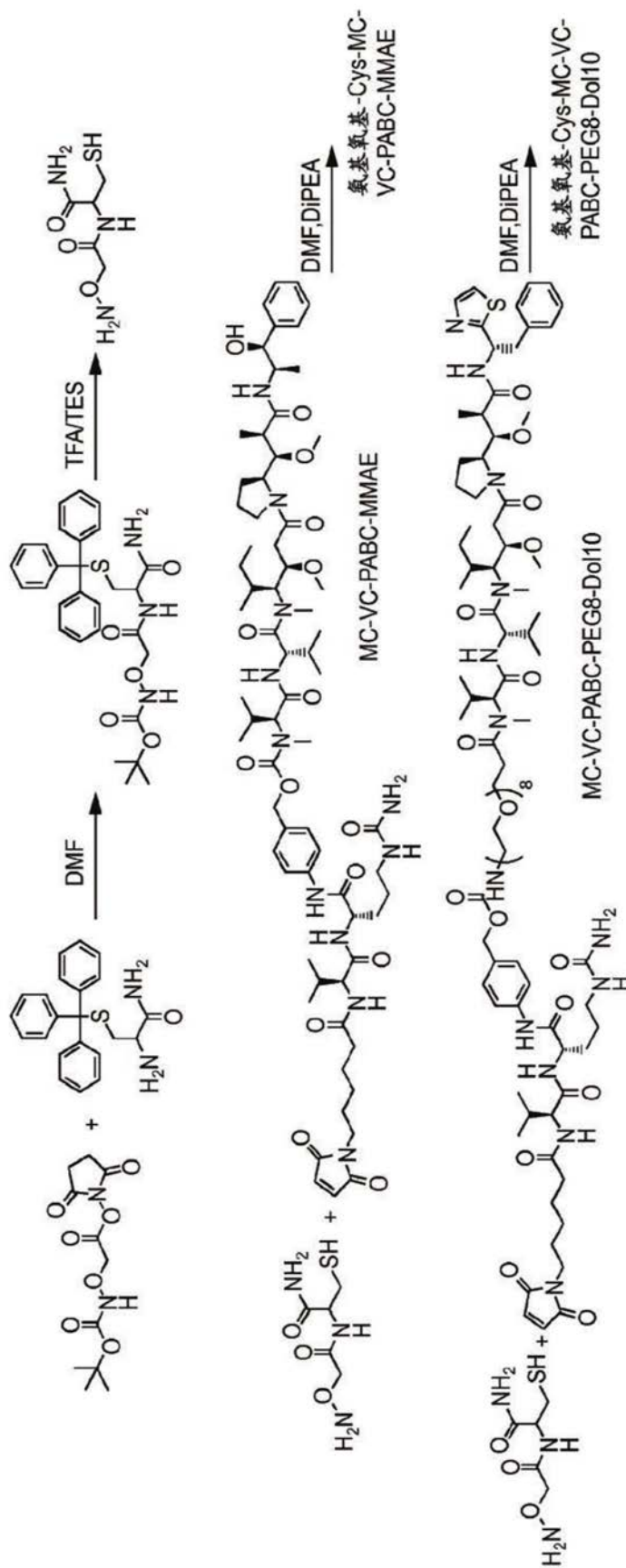


图26

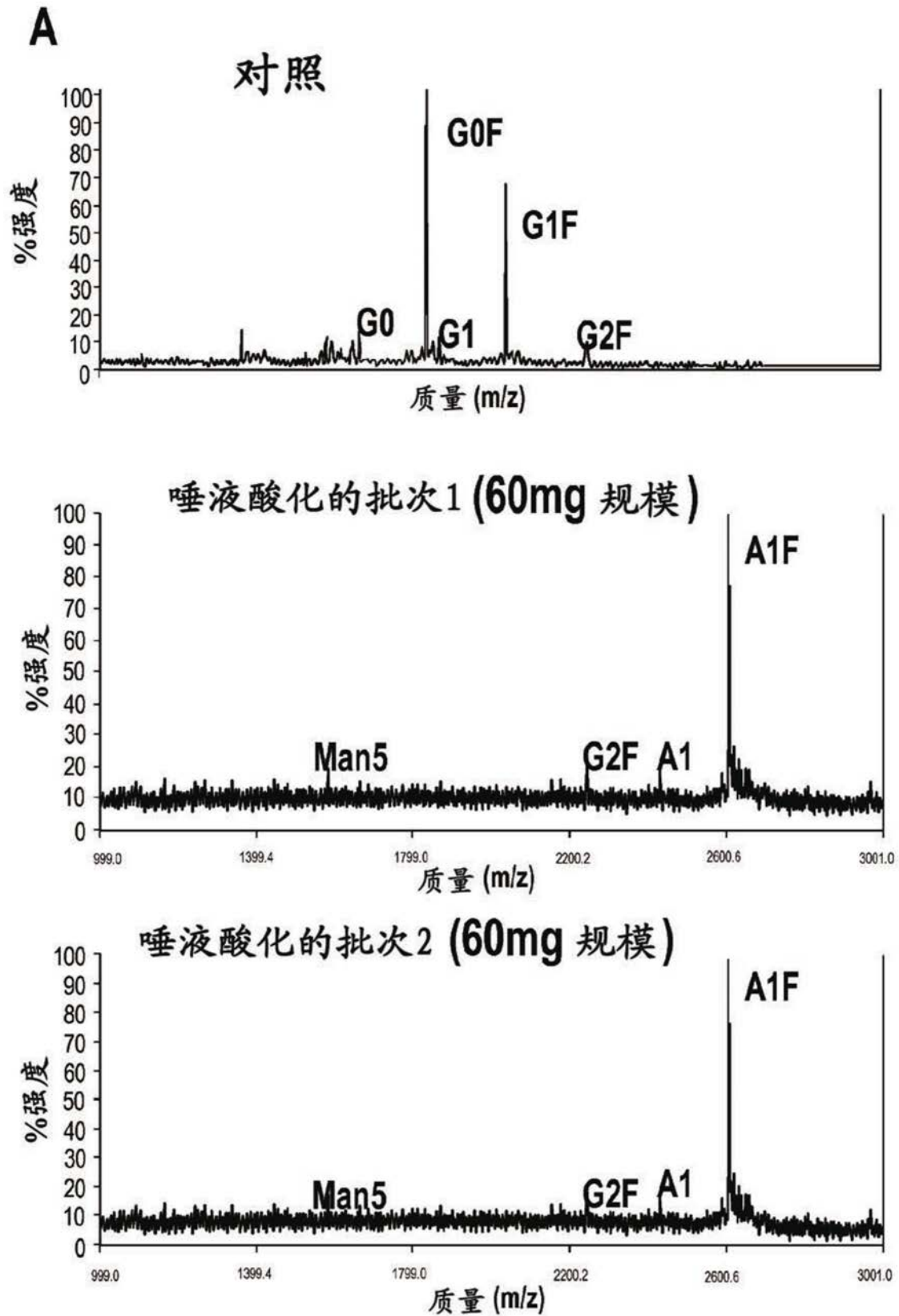


图27

B

	唾液酸, mol/mol
对照	0
唾液酸化的批次1	2.2 ± 0
唾液酸化的批次2	2.3 ± 0.1

C

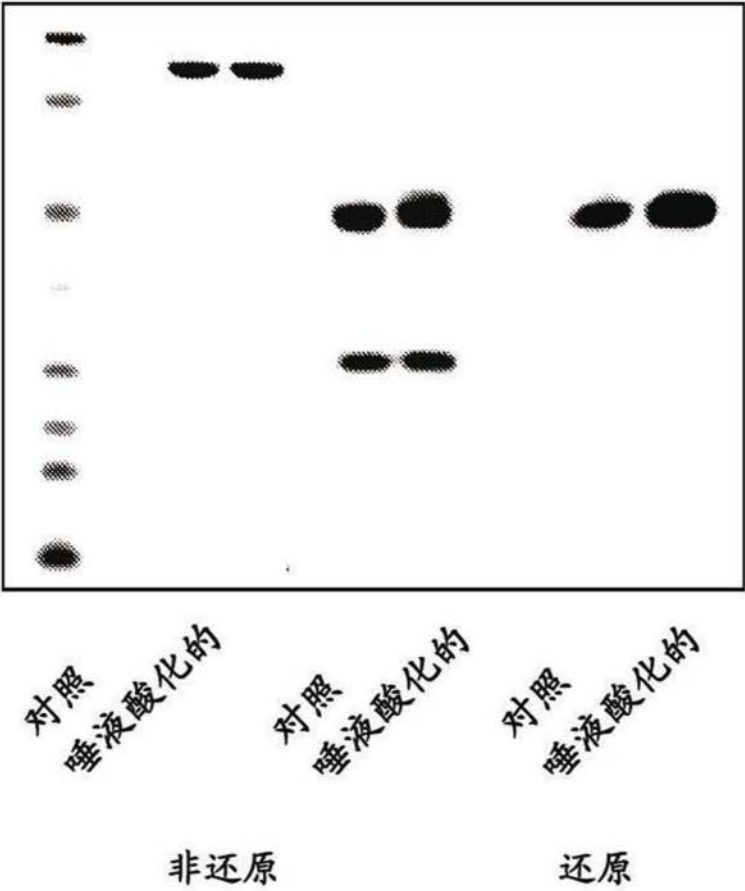


图27 (续)

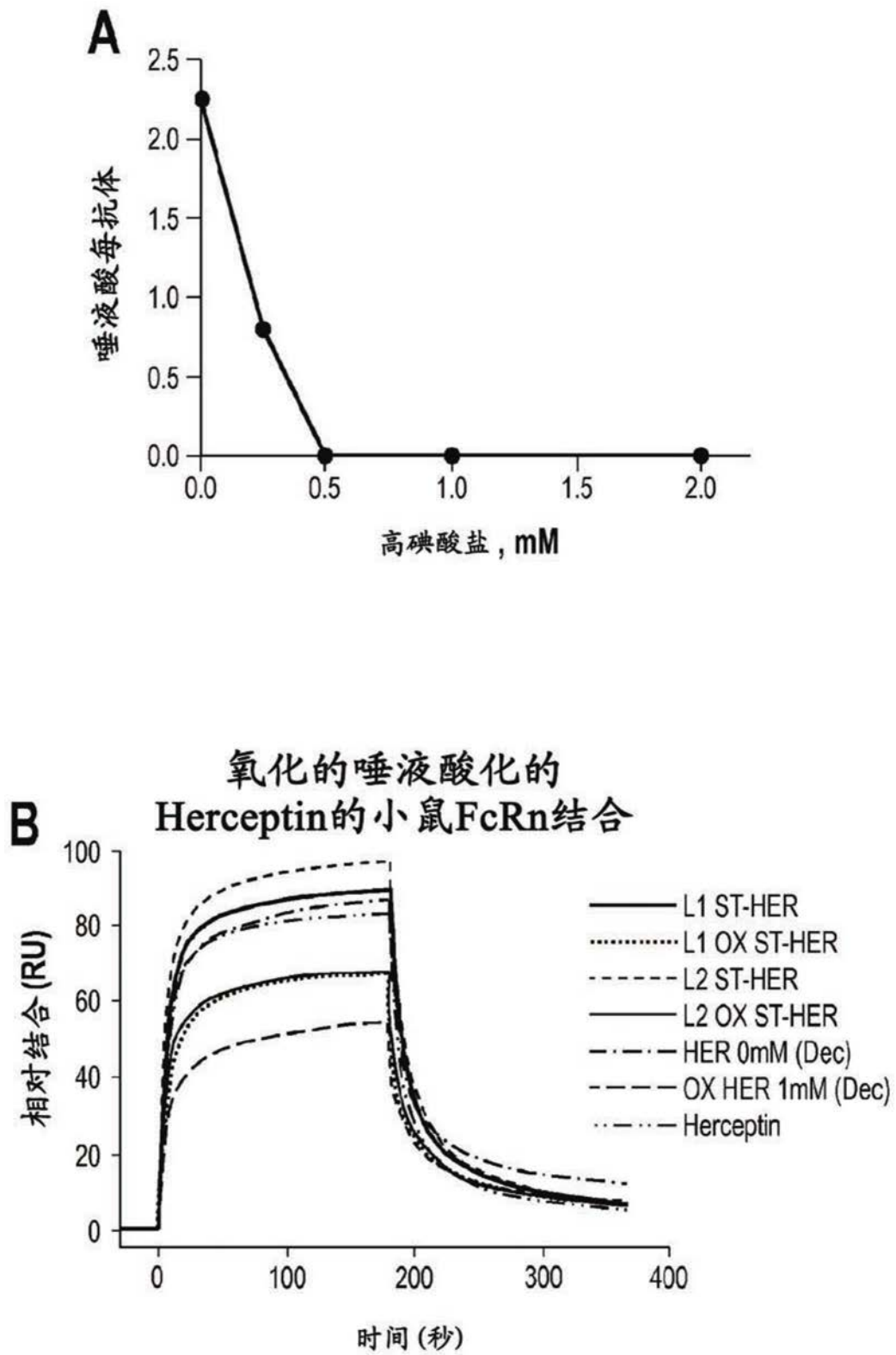


图28

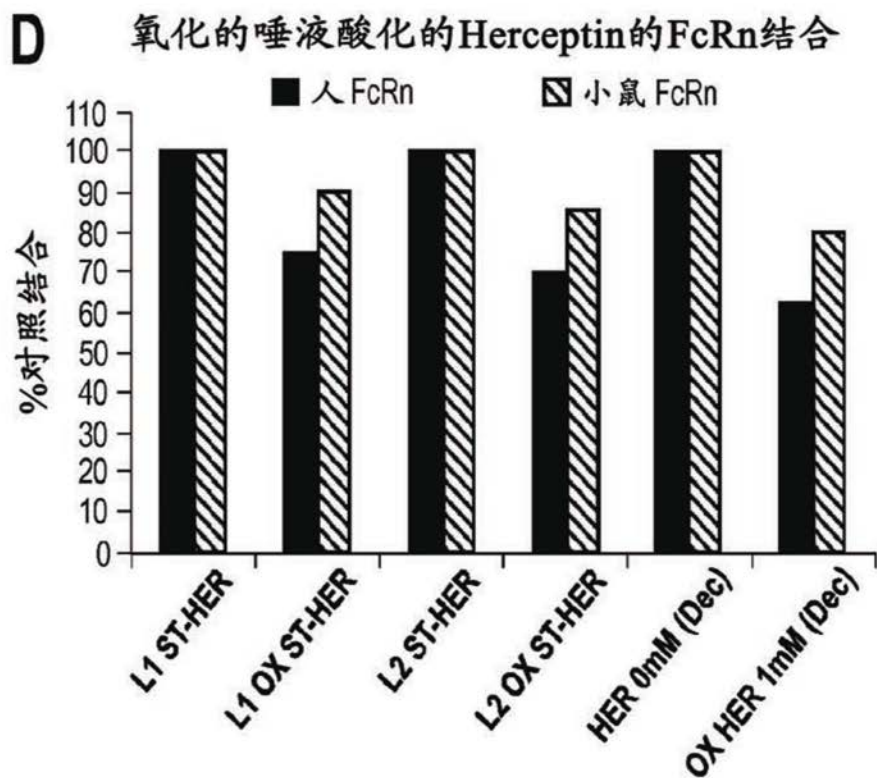
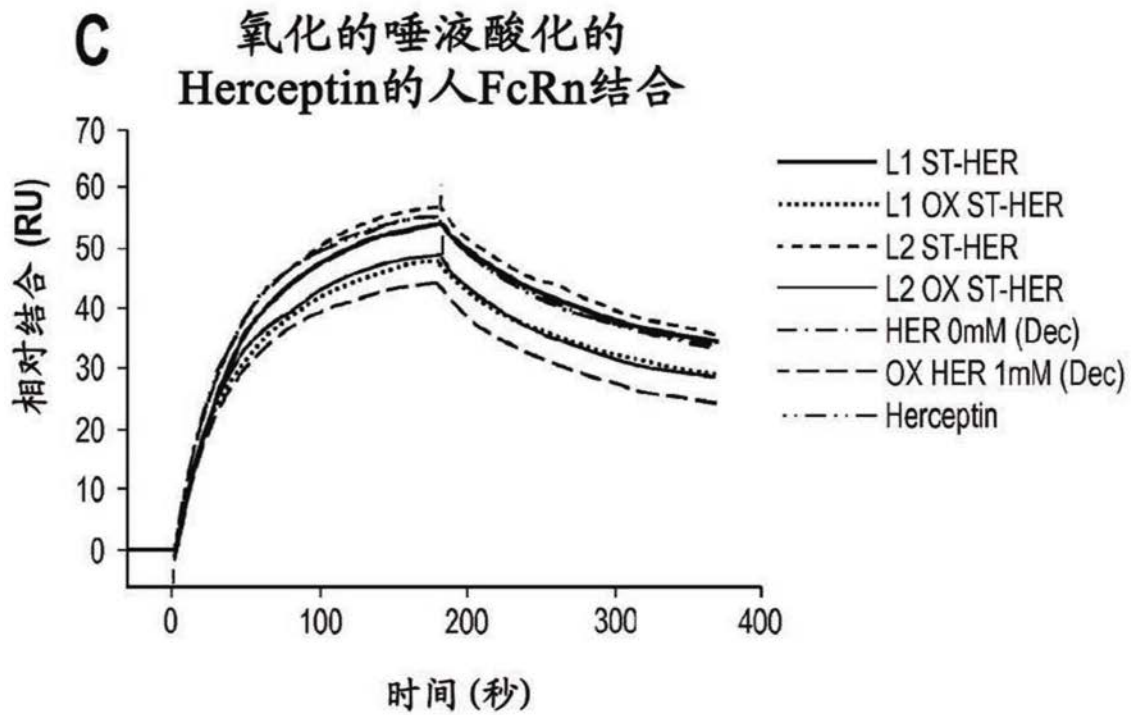


图28 (续)

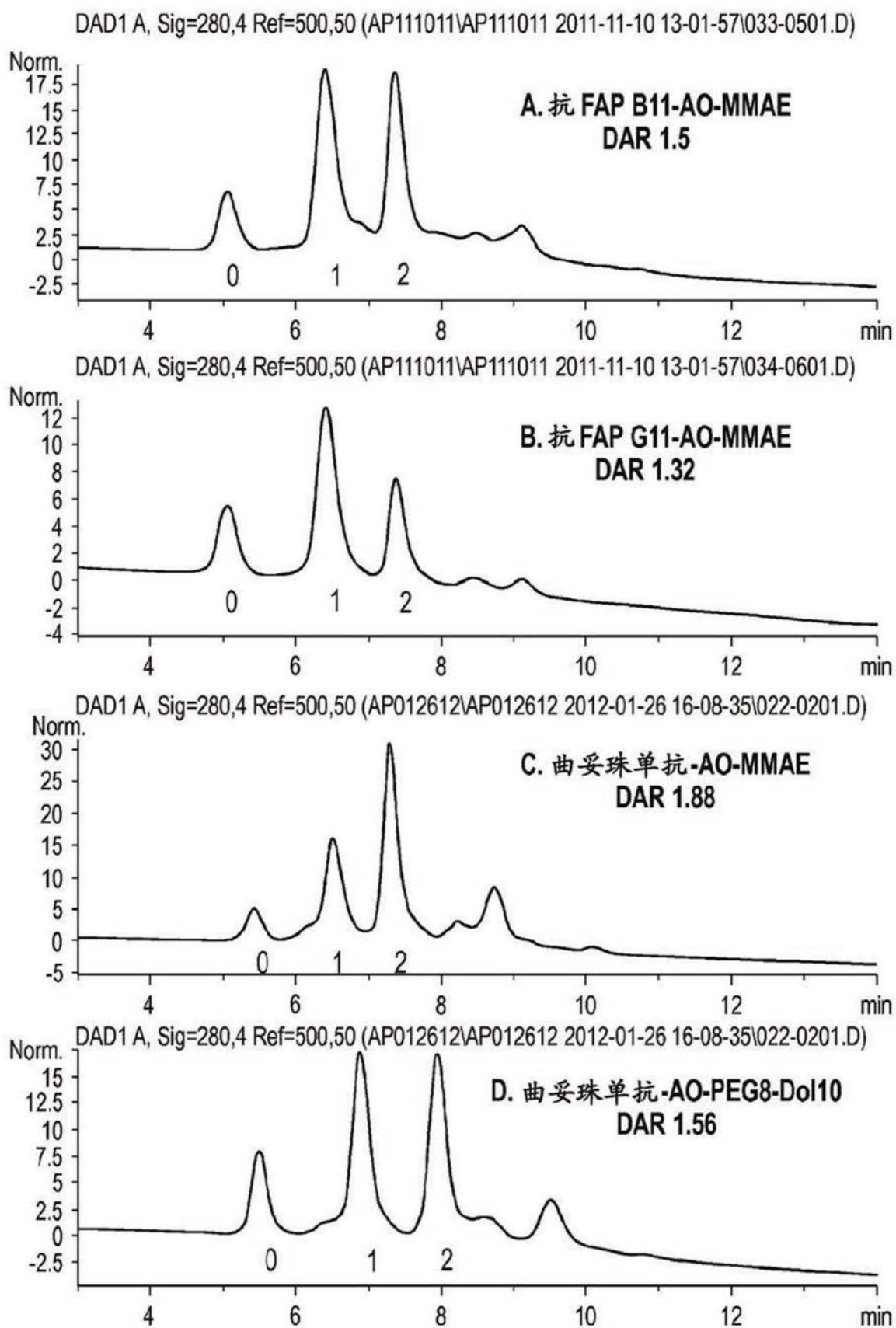


图29

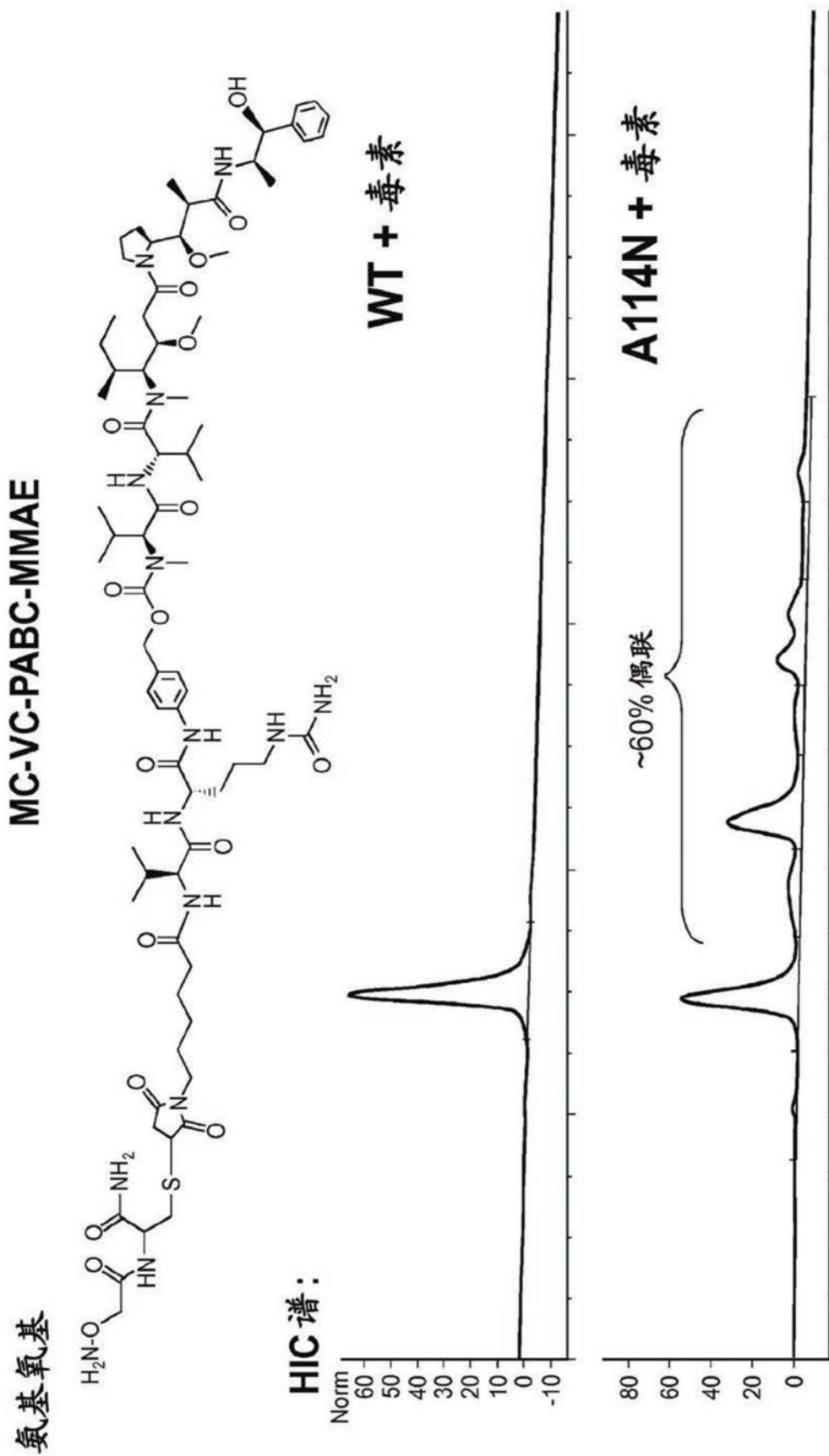


图30

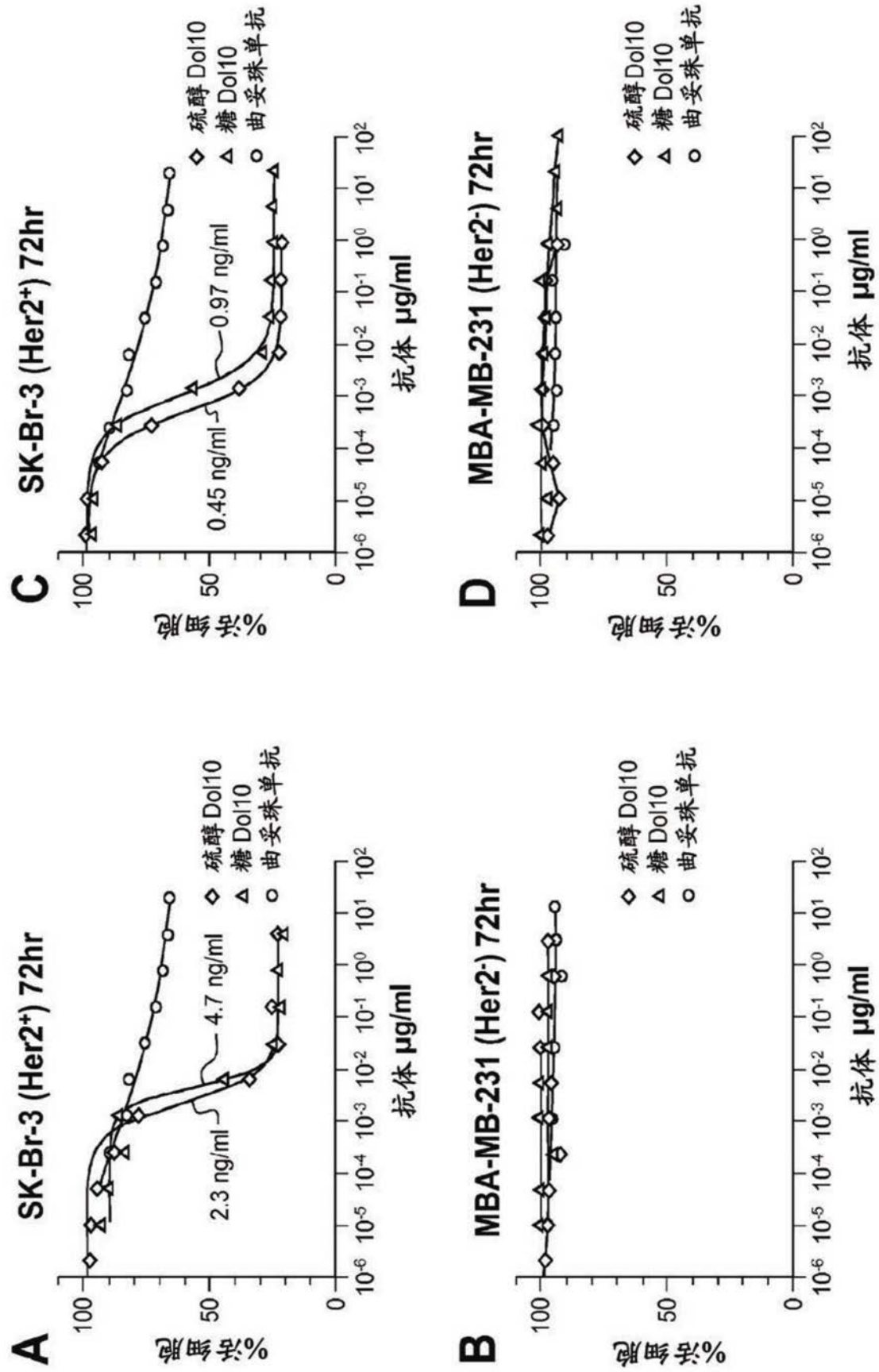


图31

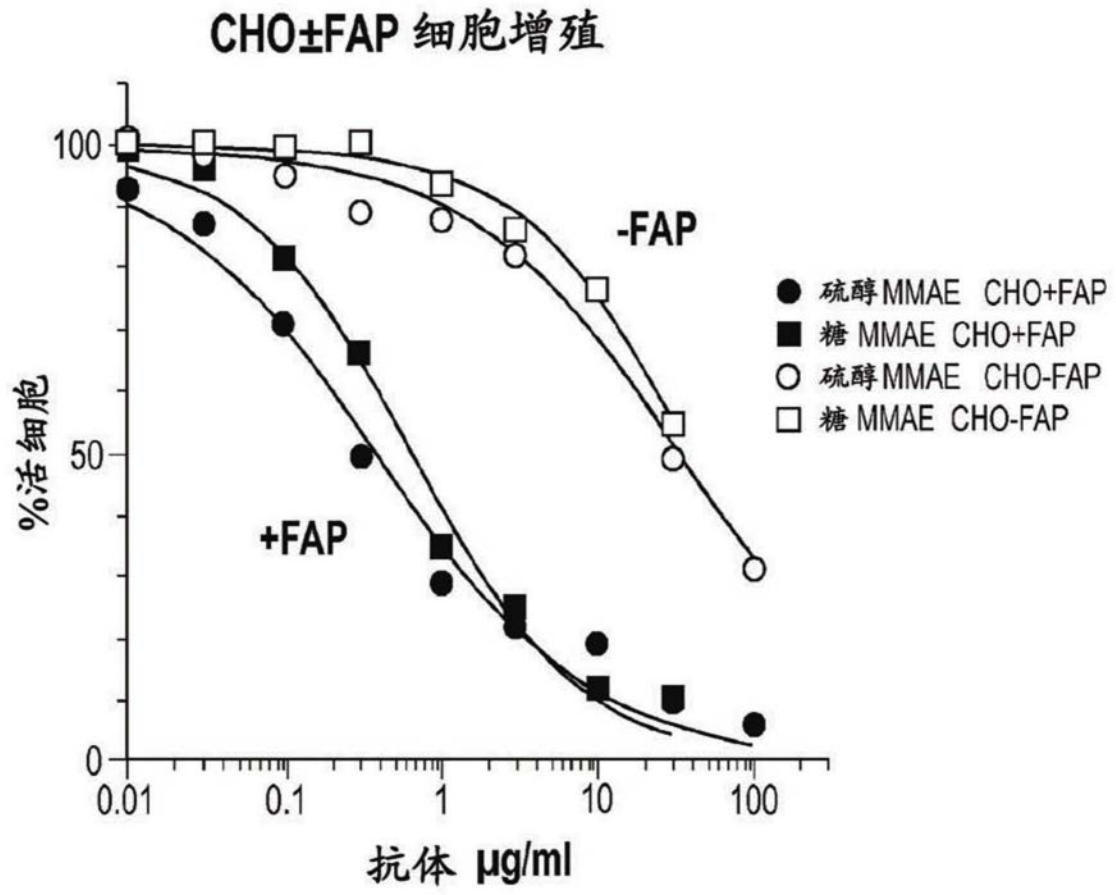


图32

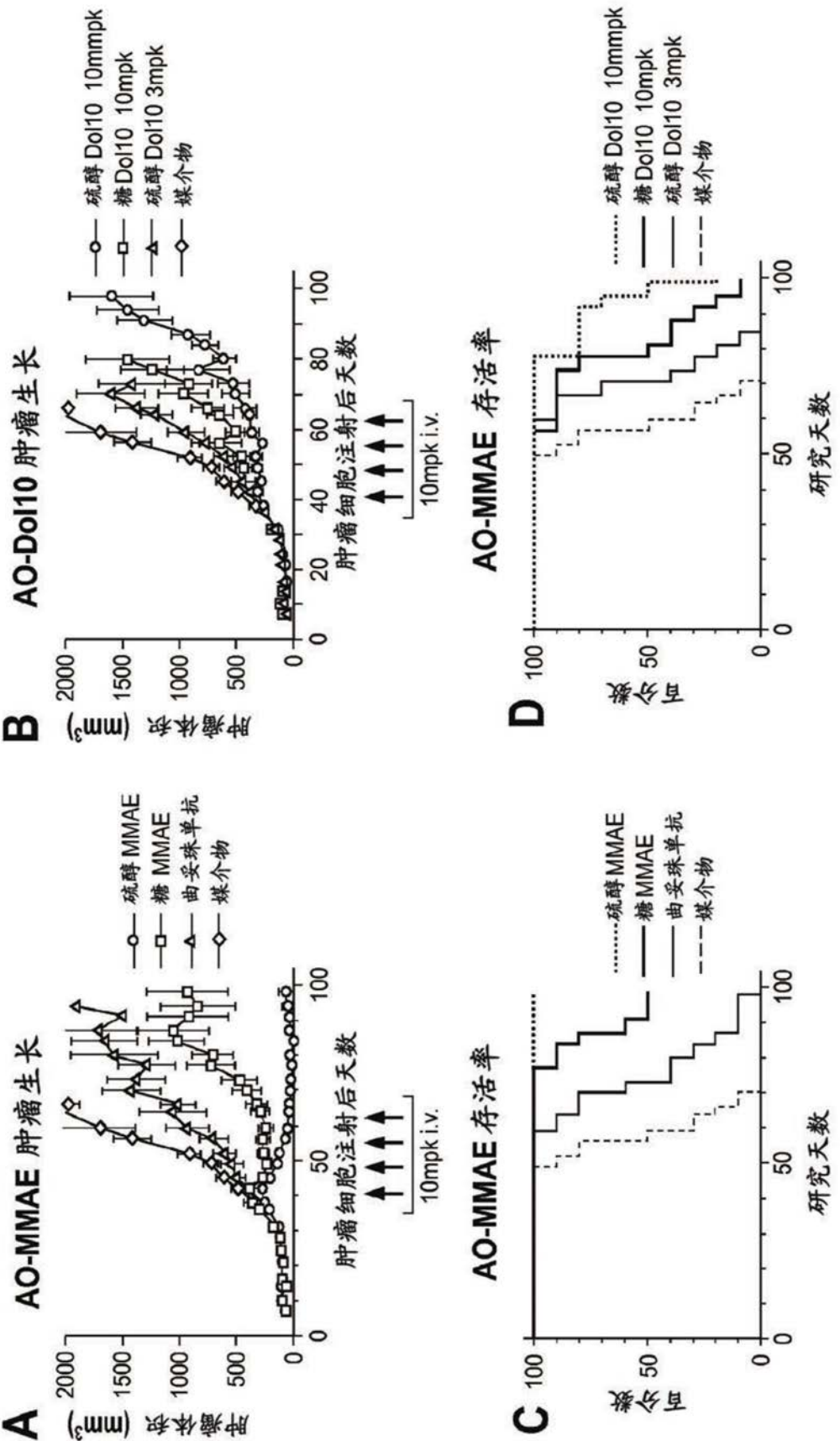


图33

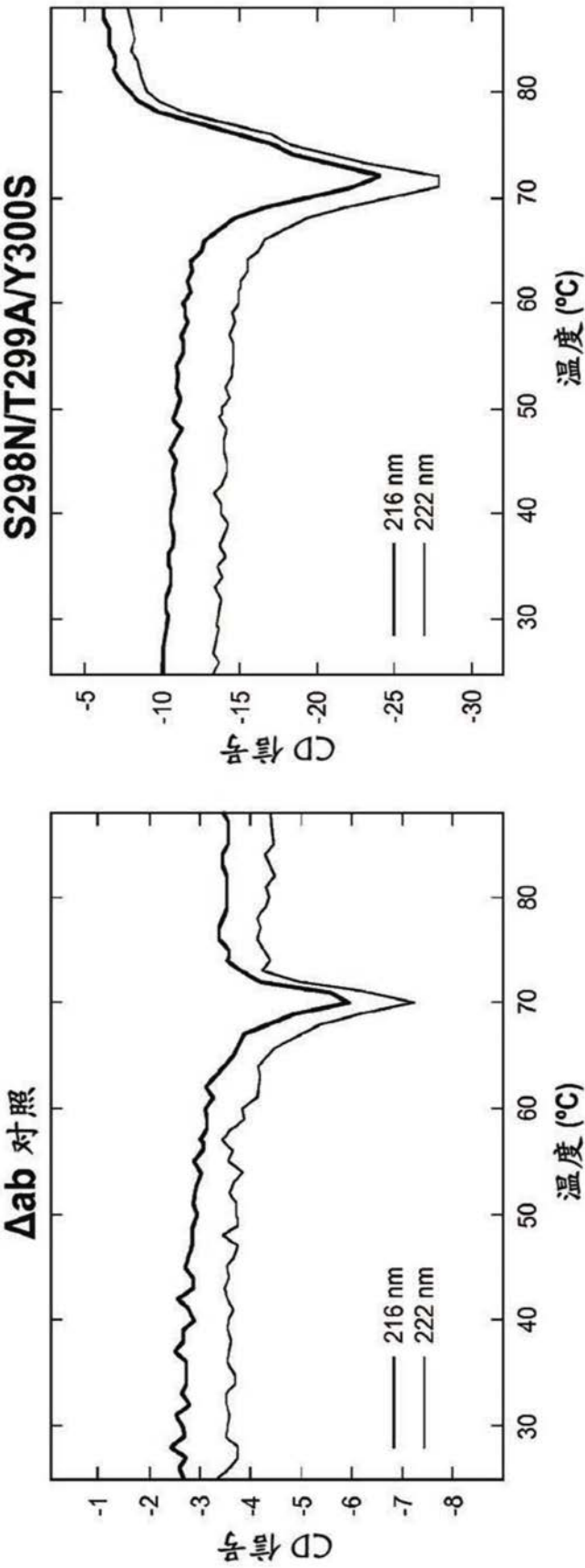


图35

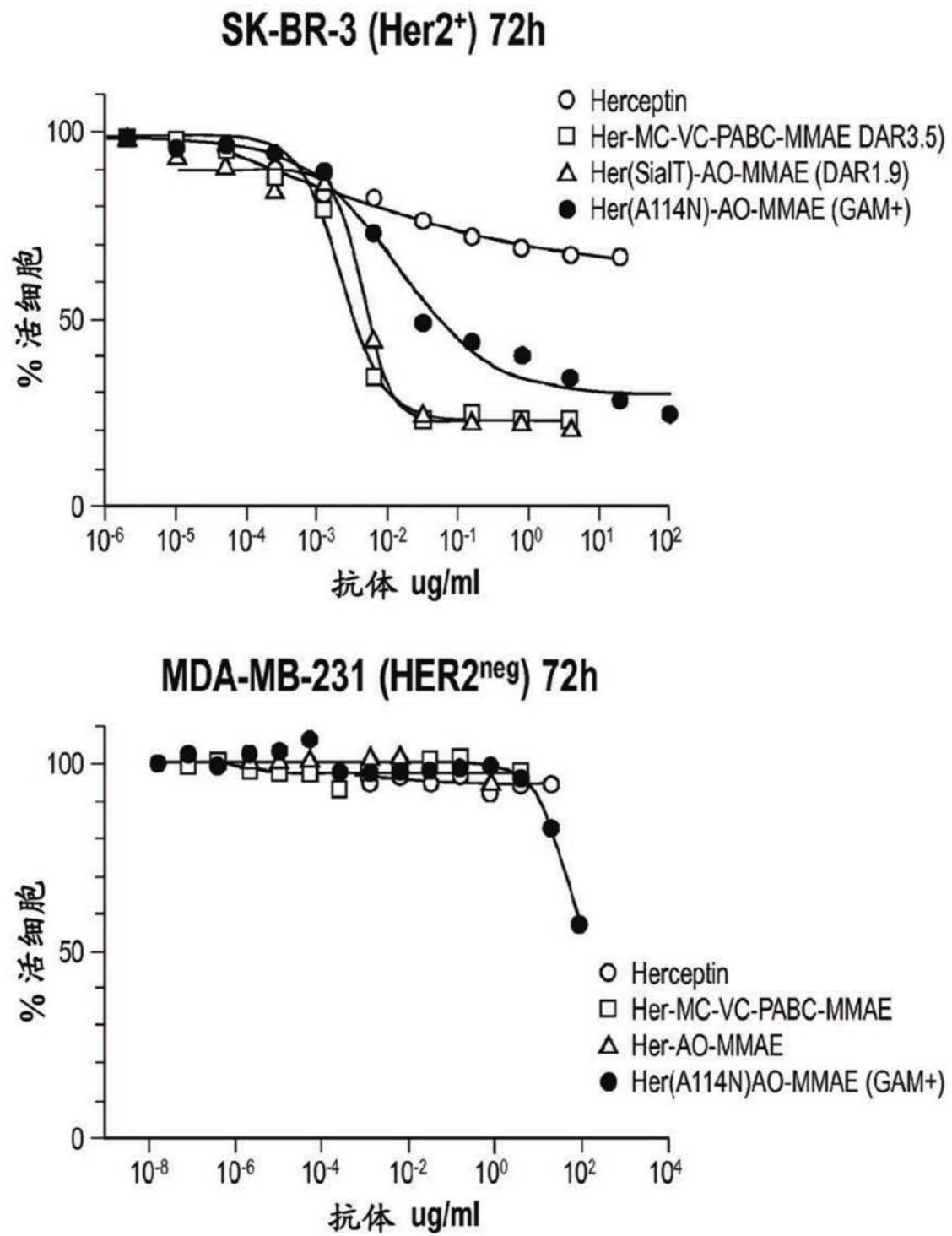


图36