



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109891245 B

(45) 授权公告日 2023.05.05

(21) 申请号 201780062647.9

G01N 33/53 (2006.01)

(22) 申请日 2017.08.11

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109891245 A

CN 102159951 A, 2011.08.17  
EP 0365087 A1, 1990.04.25  
WO 0209649 A2, 2002.02.07

(43) 申请公布日 2019.06.14

Victor S. Goldmacher, et

(30) 优先权数据  
62/374,382 2016.08.12 US

al..Antibody-Drug Conjugates for Targeted  
Cancer Therapy.《Annual Reports in  
Medicinal Chemistry》.2012,第47卷

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.04.10

Liyo Kao, et al..Identification of  
the Immunodominant Epitope Region in  
Phospholipase A 2 Receptor-Mediating  
Autoantibody Binding in Idiopathic  
Membranous Nephropathy.《J Am Soc  
Nephrol》.2014,

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2017/046626 2017.08.11

C.M.PROBY, ET AL..Development of  
chimeric molecules for recognition and  
targeting of antigen-specific B cells in  
pemphigus vulgaris..《British Journal of  
Dermatolog》.2000,

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02018/031947 EN 2018.02.15

(73) 专利权人 美国创新免疫科技有限公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 朱全胜

(74) 专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理  
有限公司 11444  
专利代理师 王刚 龚敏

审查员 张绚

(51) Int.Cl.  
G01N 33/68 (2006.01)

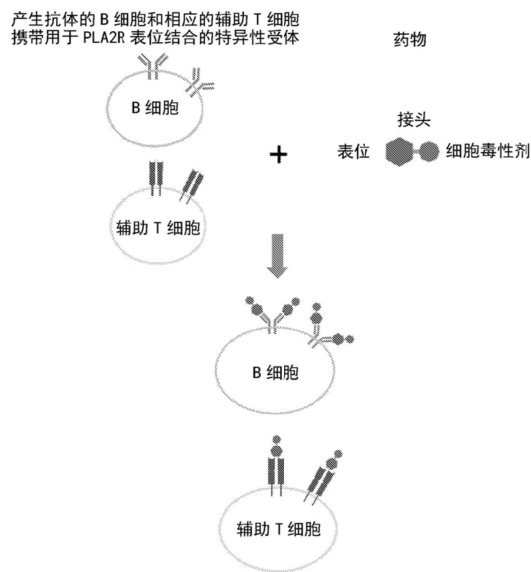
权利要求书2页 说明书27页  
序列表31页 附图24页

(54) 发明名称

自身免疫疾病的诊断、预防和/或治疗

(57) 摘要

用于通过检测、靶向和/或消除表位特异性的自身免疫细胞来诊断、预防和/或治疗自身免疫疾病的组合物、方法和试剂盒。该组合物包括表位和允许检测、靶向和/或消除表位特异性的自身免疫细胞的试剂的缀合物。



CN 109891245 B

[接上页]

**(56) 对比文件**

翟志芳. 重组Dsg3EC1-2嵌合毒素对寻常型天疱疮外周血T、B淋巴细胞的影响.《中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士) 医药卫生科技辑》.2005, (第1期),

Maryline Fresquet, et al..Identification of a Major Epitope Recognized by PLA2R Autoantibodies in Primary Membranous Nephropathy..《J Am Soc Nephrol》.2014,

1. 一种复合物,包括:连接到减少或消除产生抗PLA2R自身抗体的B细胞的药物且与膜性肾病相关联的PLA2R表位,其中,所述PLA2R表位包含在PLA2R片段内,所述复合物的分子量为14 kDa至75kDa,所述PLA2R片段的序列如SEQ ID NO: 1、如SEQ ID NO: 2、如SEQ ID NO: 2且所述序列的至少5%如SEQ ID NO: 3、如SEQ ID NO: 4、如SEQ ID NO: 5、或如SEQ ID NO: 5且所述序列的至少5%如SEQ ID NO: 6中所提供的。

2. 根据权利要求1所述的复合物,其中,所述PLA2R表位如SEQ ID NO: 13中所提供的。

3. 根据权利要求1所述的复合物,其中,所述药物通过缬氨酸-瓜氨酸接头与所述PLA2R片段连接。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的复合物,其中,所述药物选自由以下所列组成的组:反义RNA、miRNA、siRNA、Duocarmycin类似物,CC-1065,单甲基奥瑞他汀E,葱环类药物、奥沙利铂,硼替佐米,以及其组合物。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的复合物,其中,所述药物是用于RNAi的RNA片段。

6. 根据权利要求1-3中任一项所述的复合物,其中,所述药物是细胞毒性药物。

7. 根据权利要求4所述的复合物,其中,所述Duocarmycin类似物包括Duocarmycin A、Duocarmycin B1、Duocarmycin B2、Duocarmycin C1、Duocarmycin C2、Duocarmycin D以及Duocarmycin SA;所述细胞毒性药物包括阿多来新、比折来新、卡折来新、环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、多柔比星、表柔比星、顺铂以及卡培他滨。

8. 根据权利要求1-3中任一项所述的复合物,其中,所述药物选自由雷帕霉素、环孢菌素、他克莫司、霉酚酸酯、芬戈莫德、伊马替尼、替西罗莫司、索拉非尼、舒尼替尼、吡非尼酮、Src家族酪氨酸激酶抑制剂、以及MEK激酶抑制剂组成的组。

9. 根据权利要求8所述的复合物,其中,所述Src家族酪氨酸激酶抑制剂包括达沙替尼、塞卡替尼、博苏替尼和巴非替尼。

10. 根据权利要求8所述的复合物,其中,所述MEK激酶抑制剂包括司美替尼、曲美替尼和Refametinib。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的复合物在生产用于通过消除或减少患者中产生抗PLA2R自身抗体的B细胞群而治疗膜性肾病的药物中的用途。

12. 根据权利要求1-10中任一项所述的复合物在生产用于通过消除或减少患者中产生抗PLA2R自身抗体的B细胞群和给所述产生抗PLA2R自身抗体的B细胞群提供T细胞辅助的T细胞群而治疗膜性肾病的药物中的用途。

13. 根据权利要求11或12所述的用途,其中,所述药物是皮内或皮下施用形式的。

14. 根据权利要求11或12所述的用途,其中,所述产生抗PLA2R自身抗体的B细胞群在所述患者的血液中循环或在所述患者的淋巴结中。

15. 根据权利要求11或12所述的用途,其中,所述药物消除所述产生抗PLA2R自身抗体的B细胞群的功效的范围为70%至100%。

16. 根据权利要求12所述的用途,其中,所述药物阻断细胞因子从所述B细胞或所述T细胞的释放、或阻断所述B细胞或所述T细胞中的细胞因子信号传导。

17. 根据权利要求11或12所述的用途,其中,所述患者不处于主动性自身免疫疾病的急性期。

18. 根据权利要求13所述的用途,其中,所述患者已用免疫抑制剂进行治疗,使得所述

患者不处于主动性自身免疫疾病的急性期。

19. 根据权利要求11或12所述的用途,其中,消除或减少所述患者中产生抗PLA2R自身抗体的B细胞群的所述复合物包括额外的修饰。

20. 根据权利要求19的用途,其中,所述额外的修饰选自:插入2至10个氨基酸N-端肽,插入2至10个氨基酸C-端肽,进行氨基酸取代,将试剂附着于表位,和添加一个或多个异源序列。

## 自身免疫疾病的诊断、预防和/或治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年8月12日提交的序列号为62/374,382的美国临时专利申请的权益,其全部内容以引用的方式结合于此。

[0003] 以电子格式的序列列表

[0004] 本申请连同通过EFS-Web作为ASCII文本文件的电子序列列表一起提交。该电子序列列表作为命名为IMW0001W0SEQLIST.txt的文件提供,其创建并最终保存于2017年8月11日,大小为72810字节。根据35U.S.C.§1.52(e),该电子序列列表中的信息通过引用的方式整体并入本文。

### 背景技术

[0005] 领域

[0006] 本公开整体涉及通过检测、靶向和/或消除表位特异性的自身免疫细胞来诊断、预防和/或治疗自身免疫系统疾病的组合物、方法和/或试剂盒。

[0007] 现有技术的描述

[0008] 自身免疫疾病可以由T细胞介导的、B细胞介导的或两者共同介导的,并且可以与器官和/或组织损伤相关。

### 发明内容

[0009] 在一些实施例中,提供了一种治疗患有膜性肾病(MN)的患者的方法。在一些实施例中,该治疗患有MN的患者的方法包括:识别患有MN的患者;和对该患者施用包括PLA2R表位和药物的复合物,其中,该表位包含在PLA2R片段内,藉此消除或减少该患者中产生抗PLA2R自身抗体的B细胞群。

[0010] 在治疗患有MN的患者的方法的一些实施例中,PLA2R表位如SEQ ID NO:13中所提供的。在该方法的一些实施例中,PLA2R片段的序列如SEQ ID NO:1中所提供的。在该方法的一些实施例中,PLA2R片段的序列如SEQ ID NO:2中所提供的。在该方法的一些实施例中,PLA2R片段如SEQ ID NO:2中所提供的并且该序列的至少约5%如SEQ ID NO:3中所提供的。在该方法的一些实施例中,PLA2R片段如SEQ ID NO:4中所提供的。在该方法的一些实施例中,PLA2R片段如SEQ ID NO:5中所提供的。在该方法的一些实施例中,PLA2R片段如SEQ ID NO:5中所提供的并且该序列的至少约5%如SEQ ID NO:6中所提供的。在该方法的一些实施例中,药物选自自由反义RNA、miRNA、siRNA或用于RNAi的RNA片段,一种或多种Duocarmycin类似物,或诸如阿多来新(adozelesin)、比折来新(bizelesin)、卡折来新(carzelesin)、环磷酰胺(Cyclophosphamide)、甲氨蝶呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶、多柔比星(Doxorubicin)、环磷酰胺、表柔比星(Epirubicin)、顺铂(cisplatin)、5-氟尿嘧啶和卡培他滨(capecitabine)的细胞毒性药物组成的组。在该方法的一些实施例中,消除产生抗PLA2R自身抗体的B细胞群的功效的范围为约70%至约100%。在该方法的一些实施例中,复合物还消除T细胞群,其中,该T细胞群为产生抗PLA2R自身抗体的B细胞群提供T细胞辅助。

[0011] 在一些实施例中,提供了一种包括PLA2R表位和药物的复合物。在该复合物的一些实施例中,该表位包含在PLA2R片段内。在该复合物的一些实施例中,PLA2R表位如SEQ ID NO:13中所提供的。在该复合物的一些实施例中,PLA2R片段的序列如SEQ ID NO:1中所提供的。在该复合物的一些实施例中,PLA2R片段的序列如SEQ ID NO:2中所提供的。在该复合物的一些实施例中,PLA2R片段的序列如SEQ ID NO:2中所提供的并且该序列的至少约5%如SEQ ID NO:3中所提供的。在该复合物的一些实施例中,PLA2R片段的序列如SEQ ID NO:4中所提供的。在该复合物的一些实施例中,PLA2R片段的序列如SEQ ID NO:5中所提供的。在该复合物的一些实施例中,PLA2R片段的序列如SEQ ID NO:5中所提供的并且该序列的至少约5%如SEQ ID NO:6中所提供的。在该复合物的一些实施例中,所述药物选自由反义RNA、miRNA、siRNA或用于RNAi的RNA片段,一种或多种Duocarmycin类似物,或诸如阿多来新、比折来新、卡折来新、环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、多柔比星、环磷酰胺、表柔比星、顺铂、5-氟尿嘧啶和卡培他滨的细胞毒性药物组成的组。在该复合物的一些实施例中,所述药物通过缬氨酸-瓜氨酸接头与PLA2R片段连接。

[0012] 在一些实施例中,提供了一种向具有自身免疫B细胞或T细胞的受试者递送药物的方法。在一些实施例中,该递送药物的方法包括:以表位-药物缀合物(EDC)形式提供药物,该表位-药物缀合物包括通过接头与药物缀合的表位,该表位由受试者中的所述自身免疫B细胞或T细胞上的受体识别,药物具有阻断B细胞刺激其他细胞的活性;和向该受试者皮内或皮下施用EDC。在该递送药物的方法的一些实施例中,自身免疫B细胞或T细胞在受试者的血液中循环。在该递送药物的方法的一些实施例中,自身免疫B细胞或T细胞在所述受试者的淋巴结中。在该递送药物的方法的一些实施例中,所述药物杀死B细胞或T细胞。在该递送药物的方法的一些实施例中,所述药物选自由Duocarmycin A、Duocarmycin B1、Duocarmycin B2、Duocarmycin C1、Duocarmycin C2、Duocarmycin D、Duocarmycin SA、CC-1065、阿多来新、比折来新、卡折来新、环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、多柔比星、环磷酰胺、表柔比星、顺铂、5-氟尿嘧啶或卡培他滨、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)、蒽环类药物(anthracyclines)、奥沙利铂(oxaliplatin)和硼替佐米(bortezomib)组成的组。在该递送药物的方法的一些实施例中,所述药物阻断细胞因子从B细胞或T细胞的释放或阻断B细胞或T细胞中的细胞因子信号传导。在该递送药物的方法的一些实施例中,所述药物选自由雷帕霉素(Rapamycin)、环孢菌素(Ciclosporin)、他克莫司(Tacrolimus)、霉酚酸酯(Mycophenolate)、芬戈莫德(Fingolimod)、伊马替尼(Imatinib)、替西罗莫司(Temsirolimus)、索拉非尼(Sorafenib)、舒尼替尼(Sunitinib)、吡非尼酮(Pirfenidone)、Src家族酪氨酸激酶抑制剂(达沙替尼(Dasatinib)、塞卡替尼(Saracatinib)、博苏替尼(Saracatinib)、巴非替尼(Bafetinib))、MEK激酶抑制剂(司美替尼(Selumetinib)、曲美替尼(Trametinib)和Refametinib)组成的组。在该递送药物的方法的一些实施例中,受试者未处于主动性自身免疫疾病的急性期。在该递送药物的方法的一些实施例中,受试者已用免疫抑制剂进行治疗,使得患者不处于主动性自身免疫疾病的急性期。在该递送药物的方法的一些实施例中,EDC的分子量为14kDa-70kDa。

[0013] 在一些实施例中,提供了一种治疗患有寻常型天疱疮(PV)的患者的方法。在一些实施例中,该治疗患有PV的患者的方法包括:识别患有PV的患者;并且向该患者施用包括桥粒芯糖蛋白1或桥粒芯糖蛋白3表位和药物的复合物,其中,表位包含在桥粒芯糖蛋白1或桥

粒芯糖蛋白3片段中,藉此消除或减少患者中产生抗桥粒芯糖蛋白1或抗桥粒芯糖蛋白3自身抗体的B细胞群。

[0014] 在治疗患有PV的患者的方法的一些实施例中,桥粒芯糖蛋白1表位如SEQ ID NO:16中所提供的。在治疗患有PV的患者的方法的一些实施例中,桥粒芯糖蛋白1片段的序列如SEQ ID NO:16中所提供的。在治疗患有PV的患者的方法的一些实施例中,桥粒芯糖蛋白3表位如SEQ ID NO:17中所提供的。在治疗患有PV的患者的方法的一些实施例中,桥粒芯糖蛋白3片段的序列如SEQ ID NO:17中所提供的。在该方法的一些实施例中,药物选自自由反义RNA、miRNA、siRNA或用于RNAi的RNA片段,一种或多种Duocarmycin类似物,或诸如阿多来新、比折来新、卡折来新、环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、多柔比星、环磷酰胺、表柔比星、顺铂、5-氟尿嘧啶和卡培他滨的细胞毒性药物组成的组。在该方法的一些实施例中,消除产生抗桥粒芯糖蛋白1自身抗体的B细胞群的功效的范围为约70%至约100%。在该方法的一些实施例中,消除产生抗桥粒芯糖蛋白3自身抗体的B细胞群的功效的范围为约70%至约100%。在该方法的一些实施例中,复合物还消除T细胞群,其中,该T细胞群为产生抗桥粒芯糖蛋白1自身抗体的B细胞群提供T细胞辅助。在该方法的一些实施例中,复合物还消除T细胞群,其中,该T细胞群为产生抗桥粒芯糖蛋白3自身抗体的B细胞群提供T细胞辅助。

[0015] 在一些实施例中,提供了一种表位药物复合物(EDC)。在一些实施例中,EDC包括药物和桥粒芯糖蛋白1表位或桥粒芯糖蛋白3表位,其中,桥粒芯糖蛋白1表位包含在桥粒芯糖蛋白1片段中,并且其中,桥粒芯糖蛋白3表位包含在桥粒芯糖蛋白3片段中。

[0016] 在EDC的一些实施例中,桥粒芯糖蛋白1表位如SEQ ID NO:16中所提供的。在EDC的一些实施例中,桥粒芯糖蛋白1片段的序列如SEQ ID NO:16中所提供的。在EDC的一些实施例中,桥粒芯糖蛋白3表位如SEQ ID NO:17中所提供的。在EDC的一些实施例中,桥粒芯糖蛋白3片段的序列如SEQ ID NO:17中所提供的。在EDC的一些实施例中,所述药物选自自由反义RNA、miRNA、siRNA或用于RNAi的RNA片段,一种或多种Duocarmycin类似物,或诸如阿多来新、比折来新、卡折来新、环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、多柔比星、环磷酰胺、表柔比星、顺铂、5-氟尿嘧啶和卡培他滨的细胞毒性药物组成的组。

[0017] 在一些实施例中,提供了一种用于诊断受试者中自身免疫疾病的方法。在一些实施例中,该诊断方法包括:通过从受试者收集样品检测所述受试者中自身免疫B和/或T细胞群的存在;用包括表位和荧光团的EDC培养所述样品,其中,该表位对由自身免疫B细胞表达的一种或多种B细胞受体和/或由自身免疫T细胞表达的一种或多种T细胞受体是特异性的;通过显微镜法检测EDC与B细胞和/或T细胞的结合,从而对所述受试者中的自身免疫疾病进行诊断。

## 附图说明

[0018] 图1示出了细胞膜中PLA2R的拓扑折叠和结构域的实施例。

[0019] 图2示出了具有显性构象表位的PLA2R的拓扑折叠的实施例。

[0020] 图3示出了T细胞辅助的B细胞的抗原加工和募集的实施例的示意图。

[0021] 图4示出了表位-药物缀合物(EDC)设计的实施例的分子基础的示意图。

[0022] 图5示出了EDC治疗机制的实施例的示意图。

[0023] 图6示出了PLA2R片段的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

- [0024] 图7示出了PLA2R片段的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。
- [0025] 图8示出了PLA2R片段的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。
- [0026] 图9示出了PLA2R片段的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。
- [0027] 图10示出了PLA2R片段的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)。
- [0028] 图11示出了PLA2R片段的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。
- [0029] 图12示出了PLA2R的CysR结构域的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)。
- [0030] 图13示出了PLA2R的CysR结构域和FNII结构域的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。
- [0031] 图14示出了PLA2R的CysR结构域、FNII结构域和CTLD1结构域的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:9)。
- [0032] 图15示出了PLA2R的CysR结构域、FNII结构域和CTLD1,2结构域的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:10)。
- [0033] 图16示出了PLA2R的CysR结构域、FNII结构域和CTLD1,2,3结构域(PLA2R-1-5结构域)的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:11)。
- [0034] 图17示出了PLA2R的CysR结构域、FNII结构域和CTLD1,2,3,4结构域的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:12)。
- [0035] 图18示出了PLA2R的表位的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:13),针对该表位的自身抗体存在于MN患者中。
- [0036] 图19示出了全长PLA2R的一个实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:14)。阴影区域表示PLA2R的表位的一个实施例(SEQ ID NO:13),针对该表位的自身抗体存在于MN患者中。下划线区域表示PLA2R的CysR结构域、FNII结构域和CTLD1结构域的一个实施例(SEQ ID NO:9)。
- [0037] 图20示出了PLA2R的N端的272个氨基酸(SEQ ID NO:15)中潜在的N-连接糖基化位点。
- [0038] 图21示出了用于自身免疫疾病治疗的药物开发平台的示意图。上部示出了表位药物缀合物(EDC)的设计。中部示出了EDC结合到B细胞和T细胞的表面上的抗原特异性受体。下部示出了EDC对靶向免疫细胞(例如,细胞死亡)的影响。
- [0039] 图22示出了向驻留在外周淋巴结中的记忆B细胞递送EDC的示意图。
- [0040] 图23示出了PLA2R表位药物缀合物(EDC)的一个实施例的设计。
- [0041] 图24示出了从PLA2R-Ab阳性的PMN患者血液样品中分离的总B细胞中PLA2R表位特异性记忆B细胞的检测。
- [0042] 图25示出了PLA2R-表位-MMAE缀合物对从PLA2RAb阳性的PMN患者分离的B细胞的影响。
- [0043] 图26示出了细胞膜中桥粒芯糖蛋白的拓扑折叠。较短的竖直线表示Dsg1中用于自身抗体结合的免疫显性表位区域(EC1-2),较长的竖直线表示Dsg3中用于自身抗体结合的免疫显性区域(EC1-3)。
- [0044] 图27示出了用于粘膜皮肤PV治疗的表位药物缀合物(EDC)的一个实施例的设计。
- [0045] 图28示出了纯化和结合到药物缀合的表位的自身抗体。
- [0046] 图29示出了从粘膜皮肤PV患者血液样品中分离的总B细胞中的Dsg1和Dsg3表位特

异性记忆B细胞的检测。

[0047] 图30示出了Dsg1-表位-MMAE和Dsg3-表位-MMAE缀合物对从粘膜皮肤PV患者分离的B细胞的影响。

[0048] 图31示出了用于开发EDC的Dsg1的表位序列的一个实施例的氨基酸序列 (SEQ ID NO:16)。

[0049] 图32示出了用于开发EDC的Dsg3的表位序列的一个实施例的氨基酸序列 (SEQ ID NO:17)。

### 具体实施例

[0050] 目前,除了使用高剂量的甾类激素和免疫抑制剂外,还没有有效的自身免疫疾病治疗方法。这些治疗是非特异性的,具有显著的副作用,并且通常不能阻止疾病进展。这些治疗的主要挑战是当试剂剂量减少时(例如,在疾病处于临床缓解后)频繁的疾病复发,这严重损害了受影响器官的功能。

[0051] 用于自身免疫疾病的诊断、预防和/或治疗的新药物开发平台

[0052] B细胞中的抗体产生是通过抗原与细胞表面B细胞受体 (BCR) 结合而引发的。抗原与BCR的初始结合诱导导致B细胞活化的细胞内信号传导事件的级联。与BCR结合的抗原引发BCR-抗原复合物的快速内化。内化后,BCR-抗原复合物被分类为早期核内体,随后被分类为含有主要组织相容性复合物II类 (MHCII) 的晚期核内体。在与溶酶体融合后,这些区室将抗原降解成肽,所述肽加载到MHCII上以呈递给辅助T细胞 (图3)。特异性的辅助T细胞的参与刺激活化的B细胞产生抗体。(图3)

[0053] 自身免疫疾病由于针对正常身体组织和/或器官的免疫应答(例如,B细胞产生的抗体)而发生。在人类中已知大约80种类型的自身免疫疾病,并且几乎任何组织和/或器官都可能受到影响。

[0054] 在临床上,患者中频繁的自身免疫性疾病复发是由于存在特定组的记忆B细胞,其在患者体内以静止状态存在并且在外周血和外周淋巴组织和/或器官(例如淋巴结)之间循环。在与它们对其有特异性的抗原再次相遇时,这些记忆B细胞被快速激活并随后分化成浆细胞,浆细胞在短时间内产生大量导致疾病的抗体(致病性抗体)。另外,这些记忆B细胞充当抗原呈递细胞 (APC),其将加工过的抗原呈递给抗原特异性的辅助T细胞,从而触发和/或增强T细胞介导的器官和/或组织损伤。这些记忆B细胞和抗原特异性的T细胞分别具有独特的抗原特异性的BCR和T细胞受体 (TCR),两者都与抗原特异性地结合。目前还没有可以特异性靶向这组致病记忆B细胞和抗原特异性的T细胞(自身免疫的记忆B细胞和T细胞)的治疗。特别是还没有可以特异性地靶向在外周血和外周淋巴组织和/或器官(例如淋巴结)之间循环的这组自身免疫的记忆B细胞和自身免疫T细胞的治疗。

[0055] 在一些实施例中,本公开内容涉及一种新的药物开发平台,其特异性地靶向受试者/患者的外周血和外周淋巴器官中的所有这些自身免疫细胞。在一些实施例中,靶向外周血和外周淋巴器官中的所有这些自身免疫细胞将产生终身治疗效果。

[0056] 负责自身免疫抗体结合的抗原部分是被称为表位的特定区域。如本文所用,“表位”可以是天然肽、合成肽、人工肽、生物类似物、适体、蛋白质结构域或它们的组合。在一些实施例中,表位是构象的。在一些实施例中,表位是非构象的。在一些实施例中,表位同时是

构象的和非构象的。可以使用表位合成和纯化领域中熟知的一种或多种技术重组表达以及大量地获得肽/蛋白质表位。表位对引起疾病的自身抗体以及对记忆B细胞上表达的抗原特异性BCR、在辅助T细胞上表达的TCR或两者具有高亲和力。在一些实施例中，表位可以是非肽/蛋白质表位。非限制性实例包括DNA、RNA、小分子和有机化学品。

[0057] 本公开涉及表位-药物缀合物(EDC)以及包含EDC的组合物、方法和/或试剂盒。在一些实施例中，本公开涉及包括肽表位的EDC，该肽表位靶向在记忆B细胞上表达的抗原特异性BCR、在辅助T细胞上表达的TCR或两者(图21)。在一些实施例中，EDC还靶向吞噬和/或内吞EDC的APC(图21)。由于该平台基于由免疫细胞特异性识别的表位，因此根据本发明的平台可适用于任何自身免疫疾病。图21示出了用于自身免疫疾病治疗的药物开发平台的示意图。图21(上部)示出了EDC的设计。图21(中部)示出了EDC结合B细胞和T细胞表面上的抗原特异性受体。EDC可以通过BCR介导的内吞作用内化到细胞中。

[0058] 在一些实施例中，根据本公开的EDC包括表位、接头和药物。在一些实施例中，接头在患者体内和/或在细胞外的循环中是稳定的(即，不发生水解或降解)。在一些实施例中，接头是可断裂的，以允许表位和药物的分离。在一些实施例中，接头在细胞内部断裂。在一些实施例中，接头在细胞外断裂。在一些实施例中，接头在细胞的内部和外部均发生断裂。在一些实施例中，接头在细胞外部部分断裂并在细胞内部分完全断裂。在一些实施例中，接头的初始断裂发生在细胞外部，而最终断裂发生在细胞内部。可断裂的接头的非限制性实例包括脘接头、基于二硫化物的接头和肽接头。在一些实施例中，基于二硫化物的接头在细胞内部选择性地分解。在一些实施例中，由于硫醇的细胞内浓度较高，基于二硫化物的接头在细胞内部选择性地分解。在一些实施例中，肽接头通过细胞内酶选择性地分解。

[0059] 在一些实施例中，接头是不可断裂的。不可断裂的接头的非限制性实例包括硫醚接头、PEG4Ma1接头等。在一些实施例中，接头与表位上的一个或多个氨基酸连接。在一些实施例中，接头与表位上的半胱氨酸残基连接。在一些实施例中，接头与表位上的半胱氨酸以外的残基(例如赖氨酸)连接。在一些实施例中，表位上用于接头连接的一个或多个位点可以是一种或多种溶剂可及的半胱氨酸、赖氨酸或两者。

[0060] 其他类型的接头、缀合化学成分、以及表位上用于生成EDC的缀合位点均包括在本公开的范围。非限制性实例在美国专利号9,156,854和美国专利号9,388,408中公开，其全部内容以引用的形式并入本文。接头的其他非限制性实例包括亚氨酸酯(Imidoester)、马来酰亚胺(Maleimide)、碳二亚胺(Carbodiimide)、吡啶二硫醇、异氰酸酯、Isopeptag、SpyTag、SnoopTag和SNAP-tag。

[0061] 在一些实施例中，接头包含用于表位和药物二者的连接位点以使两种组分连接。在一些实施例中，接头是可断裂的。在一些实施例中，接头能够与表位和药物中的一者或两者断开。在一些实施例中，接头是不可断裂的。在一些实施例中，接头不能与表位和药物中的一者或两者断开。

[0062] 在一些实施例中，在表位的C端引入游离半胱氨酸残基。然后将游离半胱氨酸的巯基与可断裂的接头缀合。在一些实施例中，可断裂的接头是缬氨酸-瓜氨酸接头。在一些实施例中，缬氨酸-瓜氨酸接头与药物(例如duocarmycin类似物)预缀合。在一些实施例中，在表位的C端引入游离半胱氨酸残基，并且与药物(例如duocarmycin类似物)预缀合的可断裂

的缬氨酸-瓜氨酸接头与游离半胱氨酸的巯基缀合。

[0063] 在一些实施例中,将CXPXR的短序列引入表位的C端。在一些实施例中,半胱氨酸残基被转化为甲酰甘氨酸醛标签。在一些实施例中,使用甲酰甘氨酸生成酶将半胱氨酸残基转化为甲酰甘氨酸醛标签。在一些实施例中,甲酰甘氨酸醛标签随后通过不可断裂的连接缀合至药物-接头。在一些实施例中,甲酰甘氨酸醛标签通过不可断裂的连接经由脲化学作用与药物-接头缀合。在一些实施例中,甲酰甘氨酸醛标签通过不可断裂的连接经由Pictet-Spengler反应与药物-接头缀合。在一些实施例中,药物-接头中的药物是细胞毒性试剂。

[0064] 在一些实施例中,药物缀合至表位的BCR/TCR相互作用位点以外的区域。在一些实施例中,药物缀合至表位的BCR/TCR相互作用位点以外的区域,在上述位点引入一个或多个赖氨酸残基。在一些实施例中,药物缀合至表位的BCR/TCR相互作用位点以外的区域,在上述位点引入一个或多个赖氨酸残基,所述一个或多个赖氨酸残基通过酰胺键连接至与药物-接头连接的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯。

[0065] 在一些实施例中,可以如实施例4和实施例7中所述地改造表位。在一些实施例中,将一个或多个化学缀合位点引入表位。在一些实施例中,一个或多个化学缀合位点是非天然氨基酸。在一些实施例中,一个或多个化学缀合位点包括一个或多个半胱氨酸残基。

[0066] 在一些实施例中,表位可以是其天然氨基酸序列。在一些实施例中,可以修饰表位的天然氨基酸序列。例如,表位中的糖基化位点(例如,PLA2R的细胞外部分是糖基化的)可以增加表位的大小、体积和构象复杂性。PLA2R的前272个氨基酸(SEQ ID NO:15)中的潜在的N-连接糖基化位点(下划线的Asn残基)在图20中示出,在Dsg1表位(SEQ ID NO:16)中的在图31中示出,在Dsg3表位(SEQ ID NO:17)中的在图32中示出。在一些实施例中,通过用Gln或任何其他不会影响用于自身抗体识别的蛋白质结构和/或构象的非糖基化氨基酸取代潜在的糖基化位点(例如,在图20中的Asn70和Asn89),可以减小表位的大小、体积、构象复杂性。

[0067] 在一些实施例中,可以使用例如定点诱变来取代潜在糖基化的残基。在一些实施例中,当使用表达载体表达表位时,可以使用例如定点诱变来取代潜在糖基化的残基。在一些实施例中,可以直接合成表位。在一些实施例中,当直接合成表位时,可以定制肽和/或蛋白质合成,使得潜在糖基化残基被非糖基化残基取代,所述非糖基化残基不会影响用于自身抗体识别的蛋白质结构和/或构象。

[0068] 在一些实施例中,可以对表位进行额外的修饰,例如,将试剂(例如药物)附着于表位,改善表位对细胞表面上的受体的可及性,和/或改善蛋白质表达和产量。例如,可以通过插入小的(约2至10个氨基酸)N-或C-端肽或两者来修饰表位,以进行保守和/或非保守取代,和/或添加一个或多个异源序列以实现所需的目标。

[0069] 在一些实施例中,本文提供的一个或多个表位由核酸编码。在一些实施例中,编码表位的核酸是cDNA或mRNA。在一些实施例中,编码表位的核酸可包含在蛋白质表达载体内。在一些实施例中,蛋白质表达载体是DNA载体或RNA载体。在一些实施例中,蛋白质表达载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一些实施例中,蛋白质表达载体是哺乳动物细胞表达载体。在一些实施例中,蛋白质表达载体是昆虫细胞表达载体。在一些实施例中,包含在蛋白质表达载体内的编码表位的核酸与调控因子可操作地连接以调节表位的表达。

[0070] 调控因子可包括启动子、终止子、增强子等。如本文所用,“可操作地连接”是指调控因子正性或负性地控制蛋白质从核酸的表达。

[0071] 本文提供的一种或多种蛋白质表达载体以及本领域普通技术人员已知的其他蛋白质表达载体可用于获得大量在本文中公开的一种或多种表位以及它们的片段和变体,以并入到本文提供的一种或多种组合物、方法和/或试剂盒。在一些实施例中,表位的变体相对于表位可具有约70%至约99.99%的同一性。在一些实施例中,表位的变体有相对于表位可具约65%、70%、57%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.25%、99.5%、99.75%、99.99%的同一性,或者由前述数值中的任意两个所限定的范围内的数值。

[0072] 在一些实施例中,蛋白质表达载体在编码的表位上引入标签。在一些实施例中,一个或多个标签实现了表位的纯化。在一些实施例中,标签位于N端。在一些实施例中,标签位于C端。在一些实施例中,标签位于N-端和C-端。标签的非限制性实例包括几丁质结合蛋白、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、硫氧还蛋白、聚(NANP)、FLAG、V5、Myc、HA、NE、生物素、生物素羧基载体蛋白、GFP、Halo、Nus、Fc、AviTag、钙调蛋白、聚谷氨酸(poly-Glu)、E,S,SBP、Softag 1、Softag3、Strep、TC、VSV、Ty和Xpress。在一些实施例中,标签是聚组氨酸(poly-His)标签。

[0073] 在一些实施例中,蛋白质表达载体另外在表位和标签之间引入断裂位点以允许表位与标签分离。在一些实施例中,断裂位点是蛋白水解位点。在一些实施例中,断裂位点是非蛋白水解位点。蛋白水解位点的非限制性实例包括用于TEV蛋白酶、因子Xa或肠肽酶的位点。在一些实施例中,蛋白水解位点是凝血酶断裂位点。预期的其他蛋白酶和非蛋白酶断裂位点的非限制性实例包括口蹄疫病毒(FMDV)蛋白酶、Arg-C蛋白酶、Asp-N肽链内切酶、BNPS-粪臭素(BNPS-Skatole)、半胱天冬酶、胰凝乳蛋白酶-高特异性、胰凝乳蛋白酶-低特异性、梭菌蛋白酶(Clostripain)(梭状杆菌肽酶B(Clostridiopeptidase B))、CNBr、肠激酶、Xa因子、甲酸、谷氨酰胺链内切酶、颗粒酶B(GranzymeB)、羟胺、亚碘酰基苯甲酸、LysC、LysN、NTCB(2-硝基-5-硫氰基苯甲酸)、中性粒细胞弹性蛋白酶、胃蛋白酶、脯氨酸-肽链内切酶、蛋白酶K、葡萄球菌肽酶I、嗜热菌蛋白酶、凝血酶、胰蛋白酶和本领域普通技术人员已知的其他位点特异性酶。

[0074] 一种或多种可商购的细胞系可用于表达表位。例如,在一些实施例中,poly-His-标记的表位可以在哺乳动物细胞(例如,HEK 293细胞)中表达,并使用Ni亲和纯化和凝胶过滤柱从细胞培养基中纯化。随后可以通过蛋白水解消化(例如,使用凝血酶)除去poly-His标签,并使用凝胶过滤色谱将表位进一步纯化至均一,以除去凝血酶以及释放的poly-His标签。可以使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)在蛋白质提取物上测试表位表达和纯化(图23和图28)。还可以使用一种或多种抗体和/或患者血浆和/或血清使用蛋白质印迹法(Western blotting)(图23和图28)测试表位表达。SDS-PAGE凝胶可以用考马斯染色剂(Coomassie dye stains)(图23和图28)、银染色剂、锌染色剂、荧光染色剂和官能团特异性染色剂中的一种或多种染色。

[0075] 如本文所用,EDC中的“药物”也可称为“治疗药剂”(图21,上部)或“药剂”。药物包括专门用于预防和/或治疗一种或多种疾病的药剂。该药物可以是细胞抑制剂、细胞毒性剂、免疫抑制剂或任何可用于治疗目的的药剂。例如,EDC与TCR的结合可导致药物诱导的免疫耐受或EDC到APC的内化可导致APC死亡(图21,下部)。在一些实施例中,免疫耐受通过一

种或多种已知机制发生。例如,药物阻止自身免疫B细胞、T细胞或两者释放一种或多种细胞因子,或抑制自身免疫B细胞、T细胞或两者中的细胞因子信号传导。非限制性实例包括克隆缺失、受体编辑、滤泡排除和无反应性。在一些实施例中,药物抑制自身免疫B细胞向T细胞的抗原呈递。在一些实施例中,药物抑制一种或多种信号传导通路。非限制性实例包括IL-6受体信号传导、NF- $\kappa$ B信号传导、Toll样受体信号传导、B细胞受体信号传导、T细胞受体信号传导和炎性体信号传导。在一些实施例中,药物可靶向一种或多种信号传导通路中的一个或多个靶标。非限制性实例包括COX、CCR、组胺受体、白细胞介素受体、gp120/CD4、CXCR、PD-1/PD-L1、MALT、LTR、ROS、NOS、TLR、NADPH-氧化酶和Nrf2。

[0076] 药物的非限制性实例包括Duocarmycin A、Duocarmycin B1、Duocarmycin B2、Duocarmycin C1、Duocarmycin C2、Duocarmycin D、Duocarmycin SA、CC-1065、阿多来新、比折来新、卡折来新、环磷酰胺、雷帕霉素、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、多柔比星、环磷酰胺、表柔比星、顺铂、5-氟尿嘧啶或卡培他滨、单甲基奥瑞他汀E (MMAE)、葱环类药物、奥沙利铂或硼替佐米。

[0077] 在一些实施例中,EDC可以基于免疫毒素,免疫毒素是与用于细胞杀伤的细菌毒素融合的基于抗体的靶向结构域(Alewine, C., et al, *The Oncologist*, Vol. 20, pp. 176-185, 2015, 其在此通过引用整体并入本文)。基于免疫毒素的EDC可以通过抑制蛋白质合成来杀死细胞,并且可以靶向分裂中和非分裂中的细胞。

[0078] 药物可以是检测试剂,例如荧光团。非限制性实例包括FITC、羟基香豆素、氨基香豆素、甲氧基香豆素、Cascade Blue、Pacific Blue、Pacific Orange、Lucifer yellow、NBD、NBD-X、R-藻红素(PE)、PE-Cy5缀合物、PE-Cy7缀合物、Red 613(PE-Texas Red)、多甲藻素叶绿素蛋白(Peridinin chlorophyll protein)(PerCP)、TruRed(PerCP-Cy5.5缀合物)、FluorX、荧光黄、BODIPY-FL、Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、TRITC、X-罗丹明、丽丝胺罗丹明B(Lissamine Rhodamine B)、Texas Red、别藻蓝蛋白(APC)和APC-Cy7缀合物。

[0079] 在一些实施例中,可以设计基于FACS和/或显微镜法的试验用于筛选和鉴定能够用作EDC中的药物的小分子。在一些实施例中,基于FACS的试验(基于实例1)可用于筛选一种或多种可商购的小分子库并鉴定可用作EDC中的药物的小分子。在一些实施例中,基于显微镜法的试验(基于实例2)可用于筛选一种或多种可商购的小分子库并鉴定可用作EDC中药物的小分子。

[0080] 在一些实施例中,药物可以是能够诱导自身免疫细胞死亡的化学品、试剂、蛋白质或肽中的一种或多种。在一些实施例中,药物可以是能够干扰B细胞中的抗体mRNA稳定性、转换(turnover)和/或翻译的反义RNA、miRNA、siRNA或用于RNAi的RNA片段中的一种或多种。在一些实施例中,药物是细胞毒性药物并且对B细胞和T细胞具有细胞毒性作用,导致细胞死亡。在一些实施例中,通过程序性细胞死亡、细胞凋亡、巨自噬、自噬、坏死、坏死性凋亡、有丝分裂障碍、活化诱导的细胞死亡、失巢凋亡、角质化、兴奋性毒性、铁死亡(ferroptosis)、沃勒变性(Wallerian degeneration)和免疫原性细胞凋亡中的一种或多种发生细胞死亡。

[0081] 一旦EDC与记忆B细胞表面上的抗原特异性受体结合,蛋白质复合物通过胞吞作用被内化,随后释放缀合的药物以触发细胞效应。当EDC与辅助T细胞表面上的抗原特异性受体结合时,其诱导细胞效应。细胞效应的非限制性实例包括细胞生长停滞、细胞死亡、细胞

凋亡、自噬、免疫耐受等。在一些实施例中,EDC由APC内化。在一些实施例中,由APC内化的EDC阻止APC将抗原呈递给T细胞。

[0082] EDC和BCR/TCR之间的相互作用可以用“亲和力”表示,“亲和力”可以定义为单个EDC与其受体结合的强度。亲和力表示为平衡解离常数( $K_D$ ),其是EDC与其受体结合速率与EDC与受体解离速率之间存在平衡的浓度。较小的 $K_D$ 值意味着较高的亲和力,反之亦然。

[0083] 在一些实施例中,EDC对BCR和TCR的亲和力可以为约 $10^{-7}$ 至约 $10^{-13}$ 。在一些实施例中,亲和力可以为约 $10^{-4}$ 至约 $10^{-10}$ 。在一些实施例中,亲和力可以为约 $10^{-9}$ 至约 $10^{-15}$ 。在一些实施例中,亲和力可以为约 $10^{-4}$ 至约 $10^{-10}$ 。在一些实施例中,亲和力为约 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-12}$ 、 $10^{-13}$ 、 $10^{-14}$ 、 $10^{-15}$ 、 $10^{-16}$ 、 $10^{-17}$ 或 $10^{-18}$ ,或者由任何上述数值中的任意两个限定的范围内的数值。

[0084] 在一些实施例中,可以组合使用多于一种的EDC。在一些实施例中,可以使用多于一种EDC,在这种情况下可观察到对自身免疫细胞的增强作用。增强可以是累加的或协同的。协同效应大于累加效应。当增强作用等于不同EDC的各个作用的总和时,则观察到累加效应。当增强作用大于不同EDC的各个作用的总和时,则观察到协同效应。协同效应、累加效应或两者均可以在人类患者、非人类患者、非患者人类志愿者、体内模型、间接体外模型、体外模型等中发生。增强可以在约<1至约100倍的范围内。在一些实施例中,协同效应为约3至约30倍。在一些实施例中,增强的范围为<1,1,>1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,20,30,40,50,60,70,80,90或100倍,或者由任何上述数值中的任意两个限定的范围内的数值。

[0085] 由于表位对BCR和TCR的特异性,EDC特异性地仅靶向引起疾病的自身免疫细胞(例如抗原特异性B和T细胞)而不影响正常免疫细胞的功能。因此,根据本公开的平台以没有/最小副作用或没有显著的副作用仅针对引起疾病的自身免疫细胞的特定组库。因此减轻疾病进展和复发,从而产生持久的保护作用。

[0086] EDC可以是任何分子大小范围。例如,在一些实施例中,该尺寸可以为约2.5kDa至约75kDa。在一些实施例中,该尺寸可以为约50kDa至约500kDa。在一些实施例中,该尺寸可以为约250kDa至约2500kDa。在一些实施例中,尺寸可以是约2.5,5,10,25,50,100,250,500,750,1000,1250,1500,1750,2000,2250或2500kDa,或者由任何上述数值中的任意两个限定的范围内的数值。

[0087] 图22示出了向驻留在外周淋巴结中的记忆B细胞递送EDC的示意图。为了有效地向患者递送EDC并使EDC最大限度地进入记忆B细胞,根据本发明的EDC被设计为在约14kDa至约70kDa的分子范围内。当EDC的分子大小在约14kDa至约70kDa的范围内时,当通过皮下和/或皮内途径给药时,EDC可直接排至传入淋巴(afferent lymph)(Pape,K.A.,et al; Roozendaal,R.,et al)。因此,在一些优选的实施例中,EDC的大小范围为约14kDa至约70kDa。在一些优选的实施例中,EDC的大小为约10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75kDa,或者由任何上述数值中的任意两个限定的范围内的数值。

[0088] 当通过皮下和/或皮内途径递送时,尺寸范围为约14kDa至约70kDa的EDC直接排至传入淋巴(图22)。因此,在一些更优选的实施例中,在约14kDa至约70kDa尺寸范围内的EDC的施途径是皮下、皮内或两者,以将它们直接递送至传入淋巴。

[0089] 当通过皮下和/或皮内途径递送时,在约14kDa至约70kDa的尺寸范围内的EDC直接排至传入淋巴,并且在没有抗原呈递细胞辅助的条件下直接地遇到并结合淋巴结中的记忆

B细胞(图22)。因此,在一些更优选的实施例中,在约14kDa至约70kDa的尺寸范围内的EDC的施用途径是皮下、皮内或两者,以将它们直接递送至传入淋巴并在无需抗原呈递细胞辅助的条件下将它们直接递送至淋巴结中的记忆B细胞。

[0090] 在一些优选的实施例中,当通过皮下和/或皮内途径递送时,在约14kDa至约70kDa的分子量范围的EDC可以快速地排至淋巴结以靶向抗原特异性记忆B细胞(和T细胞)。但是,EDC可以根据需要通过所有可能的递送途径递送至患者。例如,在一些实施例中,可以考虑经局部、肠外、关节内、支气管内、腹腔内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、侧脑室内、结肠内、宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹腔、肌肉内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、鞘内、胸内、子宫内、膀胱内、病灶内、团注(bolus)、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或透皮途径中的一种或多种进行EDC施用。

[0091] 在一些患者中,循环的自身抗体水平很高,例如患有主动性自身免疫疾病的患者。在主动性疾病期间,自身抗体存在于患者的循环中并且患者正在经历疾病的影响。循环的自身抗体,特别是当静脉内施用时,通过与EDC中的表位结合,可以中和EDC的作用。此外,自身抗体可能与EDC形成免疫复合物,从而导致不希望副作用。因此,在一些实施例中,特别是在活动性疾病状态期间和/或当受试者的循环中存在高水平的自身抗体时,优选的施用途径是皮下、皮内或口服中的一种或多种。在这些患者中,皮下和/或皮内递送途径使EDC被自身抗体中和的机会最小化,并使EDC到达淋巴组织和/或淋巴器官中的记忆B细胞(和T细胞)的机会最大化(图22)。一旦活动性疾病阶段已经过去并且患者处于具有较低循环的抗体水平的缓解状态,则除了经皮内和/或皮下途径施用EDC之外,可以通过静脉途径给予患者EDC,以靶向循环外周的自身免疫细胞。

[0092] 然而,在一些患者(例如寻常天疱疮)中,可能需要通过组合途径来施用EDC。在这些患者中,在患者循环中的自身抗体滴度(titer)降低后递送EDC。例如,在患者循环中的自身抗体滴度降低后,EDC可以以皮内、皮下和静脉内途径的组合方式递送。

[0093] 在一些实施例中,通过替代疗法管理患者的活动性疾病,直到由于再循环、降解或两者循环的自身抗体水平基于抗体半衰期而自然降低,然后再施用EDC。在通过替代疗法管理患者的活动性疾病的情况下,EDC可以通过皮内、皮下、口服或静脉内途径中的一种或多种施用。

[0094] 在一些实施例中,EDC可以递送给施用替代疗法并且处于缓解期的患者。在这种情况下,可以施用EDC以消除任余留的致病记忆B细胞和T细胞群,从而防止潜在的后继疾病复发。

[0095] 在一些实施例中,根据本公开的药物开发平台可用于诊断、预防和/或有效地治疗任何T细胞和B细胞介导的自身免疫疾病。在一些实施例中,根据本公开的药物开发平台可用于诊断、预防和/或有效地治疗任何抗原特异性自身免疫疾病,包括但不限于:艾迪生氏病(Addison's disease)、无丙种球蛋白血症、斑秃、淀粉样变性、强直性脊柱炎、抗GBM/抗TBM肾炎、抗磷脂综合征、自身免疫性血管神经性水肿、自身免疫性自主神经异常、自身免疫性脑脊髓炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病(AIED)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性视网膜病变、自身免疫性荨麻疹、轴突和神经元神经病变(AMAN)、Baló病、Behcet病、良性粘膜类天疱疮、大疱性类天疱疮、巨大淋巴结增生症(Castleman disease)(CD)、乳糜泻、南美锥虫病(Chagas disease)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病

(CIDP)、慢性复发多灶性骨髓炎(CRMO)、过敏性肉芽肿(Churg-Strauss)、瘢痕性类天疱疮、柯根综合征(Cogan's syndrome)、冷凝集素病、先天性心脏传导阻滞、柯萨奇病毒性心肌炎(Coxsackie myocarditis)、CREST综合征、克罗恩病(Crohn's disease)、疱疹样皮炎、皮炎、德威克氏病(Devic's disease)(视神经脊髓炎)、盘状狼疮(Discoid lupus)、德雷斯勒氏综合征(Dressler's syndrome)、子宫内膜异位症、嗜酸细胞性食管炎(EoE)、嗜酸细胞性筋膜炎、结节性红斑、原发性混合型冷球蛋白血症、伊文氏综合征(Evans syndrome)、纤维肌痛、纤维化肺炎、巨细胞动脉炎(颞动脉炎)、巨细胞心肌炎、肾小球性肾炎、肺出血肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)、肉芽肿性多血管炎(Granulomatosis with Polyangiitis)、格雷夫斯病(Graves' disease)、吉兰-巴雷综合症(Guillain-Barre syndrome)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、溶血性贫血、过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura, HSP)、妊娠疱疹或妊娠性类天疱疮(PG)、低丙种球蛋白血症(Hypogammaglobulinemia)、IgA肾病、IgG4相关硬化性疾病、免疫性血小板减少性紫癜(Immune thrombocytopenic purpura, ITP)、包涵体肌炎(IBM)、间质性膀胱炎(IC)、青少年关节炎、青少年糖尿病(1型糖尿病)、青少年肌炎(JM)、川崎病(Kawasaki disease)、兰伯特-伊顿综合征(Lambert-Eaton syndrome)、白细胞破坏性脉管炎(Leukocytoclastic vasculitis)、扁平苔藓、硬化性苔藓、木性结膜炎(Ligneous conjunctivitis)、线性IgA病(LAD)、狼疮、慢性莱姆病(Lyme disease chronic)、美尼尔病(Meniere's disease)、显微镜下多血管炎(Microscopic polyangiitis, MPA)、混合性结缔组织病(MCTD)、蚕食性角膜溃疡(Mooren's ulcer)、Mucha-Habermann disease、多发性硬化症、重症肌无力、肌炎、发作性睡眠、视神经脊髓炎、中性粒细胞减少症、眼瘢痕性类天疱疮、视神经炎、复发性风湿病(Palindromic rheumatism, PR)、伴链球菌感染性小儿自身免疫性神经精神病(PANDAS)、副肿瘤性小脑变性(PCD)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、帕罗综合征(Parry Romberg syndrome)、睫状体扁平部炎(周围葡萄膜炎)、Parsonnage-Turner syndrome、天疱疮、周围神经病变、静脉周围脑脊髓炎(Perivenous encephalomyelitis)、恶性贫血(PA)、POEMS综合征、结节性多动脉炎、多腺综合征I、II、III型、风湿性多肌痛、多发性肌炎、心肌梗死后综合征、心包切开术后综合征、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、黄体酮皮炎、银屑病、银屑病性关节炎、纯红细胞再生障碍(PRCA)、坏疽性脓皮病、雷诺现象(Raynaud's phenomenon)、反应性关节炎、反射性交感神经营养不良、复发性多软骨炎、不宁腿综合征(RLS)、腹膜后纤维化、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、施密特氏综合征、巩膜炎、硬皮病、干燥综合征、精子和睾丸自身免疫、僵硬人综合征(SPS)、亚急性细菌性心内膜炎(SBE)、Susac综合征、交感性眼炎(SO)、大动脉炎(Takayasu's arteritis)、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、血小板减少性紫癜(TTP)、托洛萨-亨特综合征(Tolosa-Hunt syndrome)(THS)、横贯性脊髓炎、1型糖尿病、溃疡性结肠炎(UC)、未分化结缔组织病(UCTD)、葡萄膜炎、血管炎、白癜风、韦格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis)(或肉芽肿性多血管炎(GPA))。

[0096] 在一些实施例中,考虑了其他免疫疾病的诊断、预防和/或治疗,该其他免疫疾病中的一些中一种或多种免疫细胞的功能偏离导致不一定是自身免疫疾病的疾病。因此,本文的药物开发平台还可用于诊断、预防和/或有效治疗不是自身免疫疾病的疾病。在优选的实施例中,平台靶向人自身免疫疾病。在一些实施例中,靶向非人的自身免疫疾病。非人类的非限制性实例包括狗、猫、兔、小鼠、豚鼠、猴子、牛、绵羊、山羊和斑马。在一些实施例中,

本发明的平台靶向作为人和非人的非自身免疫疾病的免疫系统疾病。

[0097] 在一些实施例中,患者已经患有自身免疫疾病约1个月至约5年。在一些实施例中,患者已经患有自身免疫疾病约1、2、3或4周或在由上述数值中的任意两个定义的范围,或者2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月或由上述数值中的任意两个定义的范围,或者2、3、4、5、6、7、8、9、10年或由上述数值中的任意两个定义的范围。

[0098] 在一些实施例中,患者先前未接受任何针对自身免疫疾病的治疗。在一些实施例中,患者先前已接受自身免疫疾病的治疗(免疫抑制药物或甾类激素或两者)。在一些实施例中,患者先前已经用免疫抑制药物或甾类激素或两者成功地治疗了自身免疫疾病。在一些实施例中,患者先前已经用免疫抑制药物或甾类激素或两者成功地治疗自身免疫疾病,然而,自身免疫疾病已经复发。在一些实施例中,患者先前用免疫抑制药物或甾类激素或两者没有成功地治疗自身免疫疾病。

[0099] 患者的年龄可以为约20岁至约95岁。在一些实施例中,患者的年龄范围为约5岁至约70岁。在一些实施例中,患者的年龄小于5岁。在一些实施例中,患者的年龄超过70岁。在一些实施例中,患者的年龄为约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95岁,或由上述数值中的任意两个定义的范围。在一些实施例中,患者是男性。在一些实施例中,患者是女性。

[0100] 在一些实施例中,EDC以组合物的形式提供。在一些实施例中,EDC组合物可以配制用于通过本文的一种或多种施用途径递送。组合物可以不受限地为:水性和非水性的等渗无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质,使得制剂与预期接受者的血液等渗;以及水性和非水性的无菌悬浮液,其可以包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。

[0101] 组合物可以存在于单位剂量或多剂量的密封容器中,例如安瓿和小瓶。注射溶液和悬浮液可以由无菌粉末、颗粒、胶囊和片剂中的一种或多种制备。也可以考虑其他非限制性的组合物,例如基于气溶胶或喷雾器和基于皮肤贴剂的递送。在一些实施例中,在施用于人类患者、非人类患者或两者之前,可以在非患者人类志愿者、体内模型、间接体内模型、体外模型中测试组合物的功效。

[0102] 在一些实施例中,每日、每周、每两周或每月施用EDC。在一些实施例中,EDC每天施用1、2、3、4、5、6、7或8次。

[0103] 在一些实施例中,用EDC治疗的持续时间为约2周至约4个月。在一些实施例中,根据疾病的严重程度,EDC治疗的持续时间为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24周,或由上述数值中的任意两个定义的范围。

[0104] 在一些实施例中,治疗的治疗功效范围为约80%至约95%,其通过患者中循环的自身抗体水平和/或表位特异性免疫细胞(例如B和T细胞)的数量来确定。在一些实施例中,治疗功效为约70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%,或由上述数值中的任意两个定义的范围,其通过患者中循环的自身抗体水平和/或表位特异性免疫细胞(例如B和T细胞)的数量来确定。

[0105] 在一些实施例中,EDC组合物的体积范围为约0.1ml至约10ml。在一些实施例中,EDC组合物的体积范围为约0.05ml至约100ml。在一些实施例中,EDC组合物的体积为约0.005、0.0075、0.01、0.025、0.05、0.075、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、

4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、50、100或150ml,或在由上述数值中的任意两个定义的范围內。

[0106] 由于EDC的非常高的亲和力和特异性(例如,对于BCR和TCR)以及对身体中相对难以接近的位置的可及性,在一些实施例中,与单独施用EDC中的药物相比,在更低剂量的EDC中的药物可实现自身免疫疾病的有效治疗。另外,在一些实施例中,与单独施用EDC中的药物相比,EDC所需的治疗持续时间要短得多。例如,在一些实施例中,当EDC中的药物是抗癌/抗肿瘤药物时,EDC的起始剂量是EDC中的药物用于实体瘤治疗的剂量的约1/10。

[0107] 由于在外周循环和外周淋巴组织/器官中EDC对BCR具有更好的可及性,因此以EDC形式的药物的起始剂量可远低于药物本身的剂量(例如,对于身体中位于相对难以接近位置的肿瘤/癌症)。例如,以EDC形式的药物起始剂量可以是EDC中的药物用于疾病治疗的剂量的约1/5、1/10、1/15、1/20、1/25、1/30、1/35、1/40、1/45、1/50、1/55、1/60、1/65、1/70、1/75、1/80、1/85、1/90、1/95、1/100、1/200、1/250、1/500、1/1000、1/2000或1/5000,或在由上述数值中的任意两个定义的范围內。

[0108] 在一些实施例中,与用免疫抑制药物和/或甾族化合物治疗相比,本文提供了一种或多种基于EDC的治疗选项是快速有效的、仅需要低得多的剂量并引起最小的副作用。

[0109] 在一些实施例中,单位剂量的EDC可以为约0.001mg/kg至约5mg/kg。在一些实施例中,单位剂量的EDC可以为约0.01mg/kg至约50mg/kg。在一些实施例中,用于靶向B细胞的单位剂量的EDC可以为约0.001mg/kg至约50mg/kg。在一些实施例中,用于靶向T细胞的单位剂量的EDC可以为约0.001mg/kg至约50mg/kg。在一些实施例中,单位剂量的EDC可为约0.001、0.01、0.1、0.5、1、2.5、5、7.5、10、15、20、25、30、35、40、45或50mg/kg,或在由上述数值中的任意两个定义的范围內的数值。

[0110] 在一些实施例中,EDC作为单日剂量施用。在一些实施例中,EDC以每天多于一剂的剂量施用。在一些实施例中,每天的剂量数量范围为1至6。在一些实施例中,每天的剂量数是1、2、3、4、5、6、7或8。

[0111] 在一些实施例中,本文的EDC可用于在血浆置换术、分离术(apheresis)和白细胞减少期间去除和/或消除循环的自身免疫细胞。

[0112] 诊断和治疗后患者监测

[0113] 疾病诊断和监测治疗后疾病进展对于确定患者治疗选项、患者对治疗的反应和患者疾病管理而言是至关重要的。

[0114] 在一些情况下,使用疼痛和有创性方法进行疾病进展的诊断和治疗后患者监测。例如,对膜性肾病(MN)进展的诊断和治疗后患者监测完全依赖于肾脏活组织检查,这些活检是有创性的并且可能导致严重的肾脏出血和许多其他副作用。

[0115] 在一些实施例中,本文提供了用于无创的和/或微创的诊断和治疗后监测自身免疫疾病的EDC。

[0116] 在一些实施例中,用于无创的和/或微创的诊断和自身免疫疾病的治疗后监测的EDC包含本文提供的一种或多种表位。表位可以在溶液中、固定在基底上或者同时在溶液中和基底上。基底可以是多种基底中的任何一种,例如柱、珠、微球、测试条或已知可用于诊断和治疗后监测的试验(assay)的多孔板。在一些实施例中,自身免疫疾病的诊断和治疗后监测基于一种或多种试验。在一些实施例中,试验可以是免疫试验中的一种或多种,例如酶联

免疫吸附试验 (ELISA)、FACS、酶联免疫斑点试验 (ELISPOT)、放射免疫试验、磁免疫试验。

[0117] 在一些实施例中,可使用标准方法将本文提供的一个或多个表位附着至基底(例如,ELISA板)。可以使用标准临床方法在访问诊所期间收集患者样品(例如血液、血清和/或血浆)。可以用适当的对照样品以不同的稀释度(例如,1/10、1/100、1/1000等)将患者样品加入ELISA板中。标准培养后,可以使用标准板读数仪读取ELISA板。

[0118] 在一些实施例中,相对于对照样品,患者样品中的抗表位自身抗体可检测地增加。在一些实施例中,相对于对照样品,抗表位自身抗体可检测地增加至少10%,表明患者中存在自身免疫疾病。在一些实施例中,相对于对照样品,患者样品中抗表位自身抗体可检测地增加大于10%。在一些实施例中,患者样品中抗表位自身抗体的可检测的增加相对于对照样品为约5%至约15%。在一些实施例中,相对于对照样品,患者样品中抗表位自身抗体的可检测增加为约1、2.5、5、7.5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100%,或在由上述数值中的任意两个定义的范围內。

[0119] 在一些实施例中,相对于对照样品,患者样品中的抗表位自身抗体可检测地增加。使用本文提供的组合物、方法和/或试剂盒中的一种或多种可检测患者样品中抗表位自身抗体的增加。如本文所用,“对照样品”是指代表抗表位自身抗体的正常水平的样品或从已知没有自身免疫疾病的受试者获得的样品。

[0120] 在一些实施例中,患者样品可以例如是体液(如血液、血浆、血清、尿液、脑脊髓液和淋巴液中的一种或多种)、受自身免疫性疾病影响的组织和/或器官的活检样本。例如,在一些实施例中,可以在患有MN的患者中进行肾活组织检查。在一些实施例中,可以在患有寻常天疱疮的患者中进行粘膜皮肤损伤的活组织检查。

[0121] 用于自身免疫疾病的诊断和治疗后监测的、基于显微镜方法的试验可包括获得患者血液样品。使用本文中的一个或多个EDC,可以原样分析血液样品,或者可以在分析患者中自身免疫细胞的存在之前,使用本领域已知的一种或多种细胞纯化技术(例如FACS)分离一种或多种特定的细胞群(例如总B细胞或总T细胞)。例如,本文中一种或多种EDC可用于检测患者样品中产生自身抗体的B细胞的存在(实例5;图24和实例8;图29)。本文的一种或多种EDC也可用于检测患者中自身抗体的水平。

[0122] 在一些实施例中,所述试验还可以适于监测患者中自身免疫疾病的状态和/或对本文提供的一种或多种治疗选项的响应性。例如,可以在第一时间点从患者收集血液、血清和/或血浆样品。第一个时间点可以是患者首次访问诊所且患者未被诊断患有自身免疫疾病,并且之前从未接受过自身免疫性疾病的治疗。

[0123] 在一些实施例中,第一时间点可以在先前已经历过其他形式治疗的患者开始本文提供的一种或多种治疗选项之前。在一些实施例中,在开始本文提供的一种或多种治疗选项之后,可以在第二时间点以及在其他后续时间点从患者收集血液、血清和/或血浆样品。

[0124] 在一些实施例中,可以在不同时间点比较患者样品中产生抗表位自身抗体的B细胞的量。在一些实施例中,相对于第一时间点,在第二时间点和/或后续时间点患者样品中产生自身抗体的B细胞的量的减少象征疾病的缓解。在一些实施例中,相对于第一时间点,在第二时间点和/或后续时间点患者样品中产生自身抗体的B细胞的量的减少象征产生自身抗体的B细胞的消除和疾病的100%治疗。在一些实施例中,自身免疫细胞的消除和疾病的缓解可以为约50%至100%。在一些实施例中,自身免疫细胞的消除和疾病的缓解为约

25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95或100%。在一些实施例中,在仅一轮治疗后,自身免疫细胞的消除为100%。在一些实施例中,当在一轮治疗后自身免疫细胞消除较低(例如低于50%)时,可提供一轮或多轮额外的治疗以消除自身免疫细胞和/或对患者施用一个或多个其它疗法。

[0125] 在一些实施例中,可以在向患者施用EDC之前使用患者样品在体外测试EDC的功效。例如,在从患者外周血单核细胞(PBMC)分离的B细胞上测试EDC的功效(图25;实例6,和图30;实例9)。包括荧光团(例如FITC)的EDC用于在将样品暴露于包括细胞毒性药物的EDC之前检测患者样品中的产生自身抗体的B细胞的存在(图25中的左部(MN患者样品)和图30(寻常天疱疮患者样品))。随后用包括细胞毒性药物(例如MMAE)的EDC治疗患者样品。随后使用包括荧光团的EDC确定患者样品中包括产生自身抗体的B细胞的细胞毒性药物的EDC的功效(图25的中部(MN患者样品)和图30(寻常天疱疮患者样品))。

[0126] 在一些实施例中,包括细胞毒性药物的EDC在消除产生患者自身抗体的B细胞方面的功效是100%(图25的中部(MN患者样品)和图30(寻常天疱疮患者样品))。在一些实施例中,功效在约50%至100%的范围内。在一些实施例中,功效为约25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95或100%。在一些实施例中,当第一轮治疗后的功效不是100%时,可以进行一轮或多轮额外的治疗,并且可以在每轮治疗后进行功效的重新评价。

[0127] 在一些实施例中,包括荧光团的一种或多种EDC用作诊断工具以确定患者中表位特异性细胞的数量。例如,图24示出了基于PLA2R表位和FITC的EDC用作诊断工具用于确定患有MN的患者的外周循环中自身免疫B细胞的存在。图29示出了基于Dsg表位和FITC的EDC用作诊断工具以确定患有PV的患者的外周循环中自身免疫B细胞的存在。

[0128] 在一些实施例中,包括荧光团的一种或多种EDC用作诊断工具以确定患者在第一时间点的表位特异性自身免疫细胞的数量。如果患者中在第一时间点的表位特异性自身免疫细胞的数量高于预确定的阈值(指示患者需要一种或多种疾病疗法),则对患者施用包含药物的一种或多种EDC本身,或结合一种或多种辅助疗法。使用包括荧光团的一种或多种EDC在第二时间点重新评价表位特异性自身免疫细胞的数量。如果在第二时间点的表位特异性自身免疫细胞的数量低于预确定的阈值,则停止治疗。如果在第二时间点的表位特异性自身免疫细胞的数量仍高于预确定的阈值,则继续治疗并进行后续的评价。

[0129] 可以在血液、其他生物流体、以及组织和器官活组织检查(例如在手术期间收集)中检测患者中自身免疫细胞的存在。EDC可用于检测可结合表位的任何细胞群(例如B细胞、T细胞、PBMC中的其他细胞和其他生物流体中的细胞)。

[0130] 在一些实施例中,本文的平台可适用于任何肽、蛋白质结构域、小分子和其他配体(例如,靶向特定受体的配体结构域或肽配体)。

[0131] 在一些实施例中,可以使用标准自动计算机程序计算患者中产生自身抗体的B细胞的水平/数量。在一些实施例中,可以在用本文提供的一种或多种治疗选项治疗之前和之后比较产生自身抗体的B细胞的水平。在一些实施例中,可以大量地产生和纯化本文提供的一种或多种表位,并且可以制备标准商业级ELISA板并将其用作临床实验室中诊断和治疗后患者监测的常规程序。

[0132] 在一些实施例中,试验是无创的和/或微创的、简单、时间有效、成本有效的并且

可以在临床实验室中以常规地进行。例如,在一些实施例中,可以在不需要用于MN患者的有创性肾活组织检查的情况下进行试验。

[0133] 在一些实施例中,可以设计PLA2R表位特异性ELISA试验用于筛选和鉴定用于MN治疗的小分子。例如,在一些实施例中,可以鉴定特异性阻断PLA2R自身抗体与PLA2R结合的小分子。例如,本文提供的ELISA板的一个实施例可用于筛选一种或多种可商购的小分子库。

[0134] 在一些实施例中,一种或多种可商购的小分子库可包括但不限于代谢物(例如生物碱、配糖物和脂质)、肽、天然酚(例如类黄酮)、聚酮化合物、萜烯、甾族化合物和四吡咯。

[0135] 在一些实施例中,本文所述的任何组合物和/或方法作为一个或多个试剂盒提供。试剂盒可包含一种或多种本文所述的多肽、抗体、探针和/或其他试验试剂。试剂盒可以包括固体支撑物,测定试剂可以结合或固定在该固体支撑物上。试剂可选地用能够标记有可检测的标记物。该试剂盒还可以包括一个或多个容器,用于容纳、储存和/或运输本文所述的多肽、抗体、探针和其他试剂。

[0136] 在一些实施例中,提供了特异性靶向和消除表位特异性免疫细胞(例如B和T细胞)的组合物、方法和/或试剂盒。在一些实施例中,使用本文提供的组合物、方法和/或试剂盒选择和治疗一名或多名患者,以特异性地靶向并消除识别来自患者的免疫细胞(例如B和T细胞)的表位。

#### [0137] 膜性肾病(MN)

[0138] 膜性肾病(MN)(也称为原发性MN或特发性MN)是常见的肾小球疾病。在大于40岁的患者中MN的发病率很高。频繁的疾病复发是临床治疗的主要挑战。除了使用高剂量的甾类激素和免疫抑制剂之外还没有有效的治疗方法,并且患者在目前的管理下会在5到10年内发展为肾功能衰竭。美国每年有4000至6000个新病例,欧洲每年有10000个新病例,全球每年有80000个新病例。

[0139] MN是自身免疫性肾小球疾病。最近确定MN的致病机制是由于与由产生抗体的B细胞产生的循环的自身免疫抗体(自身抗体)的肾足细胞表面上的膜受体、磷脂酶A2受体(PLA2R)的结合。超过70%的患者是由抗PLA2R自身抗体引起的。MN经常在5-10年内复发,导致肾功能衰竭。

[0140] 目前对MN的临床治疗使用免疫抑制药物(例如环孢菌素、利妥昔单抗(Rituximab)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil)、他克莫司(Tacrolimus)、环磷酰胺、霉酚酸酯(Mycophenolate mofetil)或甾类激素(例如皮质甾类)。然而,这两种治疗方案都是非特异性的并且产生显著的副作用。当这些治疗的剂量减少时,通常会发生疾病复发。而且,在许多患者中,这些治疗无效。因此,仍然非常需要对MN进行特定治疗而没有有害的副作用。

[0141] 最近确定的MN致病机制是由于循环的自身抗体与肾足细胞表面上的PLA2R结合。另外,C型外源凝集素样结构域1(CTLD1)中的多态性M292V和H300D以及CTLD6和CTLD7之间的接头区域中的G1106S可能与患者中MN的发生相关(Kao,L.,et al.)。

[0142] 患有MN的患者血浆中的抗体水平与疾病的严重程度和患者对医学治疗的反应直接相关。因此,需要从患者中除去产生自身抗体的B细胞以治疗疾病,同时避免有害的副作用。

[0143] PLA2R是大的整合膜蛋白,分子量为约180-185kDa(SEQ ID NO:14)。提出的基于甘露糖受体的PLA2R的拓扑结构在图1中提供。PLA2R含有大的糖基化细胞外部分,其与配体、

单个跨膜结构域和短的胞质尾部相互作用(图1)。大的细胞外部分可以进一步分为10个结构域:富含半胱氨酸的结构域(CysR)、纤连蛋白样II型结构域(FnII)和8个串联的重复C型外源凝集素样结构域(CTLD)(图1)。

[0144] 图1表示划分PLA2R的各个结构域(由箭头指示)的氨基酸的位置。一些结构域的氨基酸序列提供在SEQ ID NO:7-SEQ ID NO:12中(图12-图17)。被MN患者中自身抗体识别的PLA2R表位(SEQ ID NO:13)位于受体的细胞外部分,是构象的且对还原敏感的,并且对自身抗体具有非常高的亲和力。

[0145] 然而,PLA2R表位(图18;SEQ ID NO:13)当其自身表达时不能正确折叠成正确的构象。包含前两个结构域允许抗原的正确构象折叠。全长的PLA2R蛋白(图19;SEQ ID NO:14)也不能被大规模地表达和纯化,因为其不是生物化学稳定的。然而,结构域1-3结构域和直至结构域1-6适合于表达和获得大量蛋白质。结构域1-5提供最佳的蛋白质表达。例如,通过使用SEQ ID NO:9中提供的序列可以获得正确折叠的构象。

[0146] MN患者中抗PLA2R自身抗体的产生是由于携带识别PLA2R中表位的特异性BCR的特定B细胞群的激活和扩增。当携带对相同PLA2R表位有特异性的T细胞受体的特异性辅助T细胞群参与时,特异性B细胞群被激活。这些特异性B和T细胞仅代表B和T细胞总库的一小部分。

[0147] 通过靶向B和T细胞来治疗MN

[0148] 从患者中去除抗PLA2R自身抗体可以减轻自身抗体的病理学作用。然而,从患者中去除自身抗体仍然使患者易于疾病复发。这是因为尽管从患者血液中除去了引起疾病的自身抗体,但产生PLA2R自身抗体的B细胞仍继续产生自身抗体。因此,特异性靶向识别免疫细胞(例如B和T细胞)的PLA2R表位可以消除致病性的自身抗体产生而不影响其他免疫细胞的正常功能。

[0149] 在一些实施例中,组合物、方法和/或试剂盒特异性地靶向并消除识别PLA2R表位的免疫细胞。在一些实施例中,该组合物、方法和/或试剂盒特异性地靶向并消除识别PLA2R表位的B细胞。在一些实施例中,该组合物、方法和/或试剂盒特异性地靶向并消除识别PLA2R表位的T细胞。在一些实施例中,该组合物、方法和/或试剂盒特异性地靶向并消除识别PLA2R表位的B和T细胞。在一些实施例中,EDC包括本文提供的一种或多种PLA2R片段、接头和药物。

[0150] 目前对MN的治疗是非特异性的,具有显著的副作用和频繁的疾病复发。本文的EDC对MN有特异性,具有最小的副作用/无副作用,并且消除了疾病复发。

[0151] 患者呈现MN的至少一种临床症状。MN的症状包括肾病综合征、水肿(身体任何部位肿胀)、蛋白尿、尿液泡沫状外观(由于大量蛋白质)、排尿(夜间过量)、疲劳、食欲不振和体重增加中一种或多种。

[0152] 在一些实施例中,患者患有MN约1个月至约5年。在一些实施例中,患者患有MN约1、2、3或4周,或者2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月,或者2、3、4、5、6、7、8、9或10年,或者在上述数值中的任意两个限定的范围内。

[0153] 在一些实施例中,患者先前未接受任何MN治疗。在一些实施例中,患者先前已接受MN的治疗(免疫抑制药物、甾类激素或两者)。在一些实施例中,患者先前已成功地用免疫抑制药物、甾类激素或两者治疗MN。在一些实施例中,患者先前未能成功地用免疫抑制药物、

甾类激素或两者治疗MN。

[0154] 在一些实施例中,可对患者进行肾活组织检查以确认患者患有MN。在一些实施例中,即使相对于对照样品在患者样品中存在抗PLA2R自身抗体的能够检测到的增加,患者也要进行肾活组织检查。在一些实施例中,如果相对于对照样品在患者样品中存在抗PLA2R的能够检测到的增加,则不对患者进行肾活组织检查。

[0155] 全长PLA2R(图19;SEQ ID NO:14)难以纯化,因此在临床环境中应用有限。因此,在一些实施例中,用于从患者样品中去除产生自身抗体的B细胞的组合物、方法和/或试剂盒包括全长PLA2R的纯化的片段。在一些实施例中,该片段包括CysR、FnII和一种或多种CTLD(图2)。

[0156] 在一些实施例中,该片段至少包含PLA2R的结构域1-5。在一些实施例中,该片段的序列如SEQ ID NO:1中提供的(长度为约658个氨基酸)(图6)。在一些实施例中,该片段的序列如SEQ ID NO:2中所提供。在一些实施例中,该片段的序列如SEQ ID NO:2(图7)中提供的并且该序列的约5%至约95%如SEQ ID NO:3(图8)中提供的。在一些实施例中,片段的序列如SEQ ID NO:2(图7)中提供的和该序列的约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%如SEQ ID NO:3(图8)中提供的。

[0157] 在一些实施例中,该片段的序列如SEQ ID NO:4(长度约805个氨基酸)(图9)中提供的。在一些实施例中,该片段的序列如SEQ ID NO:5(图10)中所提供。在一些实施例中,该片段的序列如SEQ ID NO:5(图10)中提供的并且该序列的约5%至约95%如SEQ ID NO:6(图11)中提供的。在一些实施例中,该片段的序列如SEQ ID NO:5中提供的并且该序列的约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%如SEQ ID NO:6(图11)中提供的。

[0158] 在一些实施例中,特异性靶向和消除识别PLA2R表位的免疫细胞的组合物、方法和/或试剂盒包含一种或多种本文提供的PLA2R片段作为一种或多种药物的载体(EDC)(图4)。PLA2R片段将特异性将药物靶向至负责在患者中产生抗PLA2R自身抗体的特定的B细胞和相应的辅助T细胞。EDC可以与B和T细胞表面上的特异性受体结合,并通过胞吞作用进入细胞。

[0159] 在一些实施例中,在PLA2R片段的C端引入游离半胱氨酸残基。然后将游离半胱氨酸的巯基与可断裂的接头缀合。在一些实施例中,可断裂接头是缬氨酸-瓜氨酸接头。在一些实施例中,缬氨酸-瓜氨酸接头与药物预缀合。在一些实施例中,药物是duocarmycin类似物。在一些实施例中,在PLA2R片段的C端引入游离半胱氨酸残基,并且游离半胱氨酸的巯基与可断裂的缬氨酸-瓜氨酸接头缀合,且可断裂的缬氨酸-瓜氨酸接头与duocarmycin类似物预缀合。

[0160] 在一些实施例中,将短序列的CXPXR引入PLA2R片段的C端。在一些实施例中,半胱氨酸残基被转化为甲酰甘氨酸醛标签。在一些实施例中,使用产生甲酰甘氨酸的酶将半胱氨酸残基转化为甲酰甘氨酸醛标签。在一些实施例中,然后通过不可断裂的连接将甲酰甘氨酸醛标签缀合至药物-接头。在一些实施例中,甲酰甘氨酸醛标签通过不可断裂的连接经由脎化学作用与药物-接头缀合。在一些实施例中,通过不可断裂的连接经由Pictet-Spengler反应将甲酰甘氨酸醛标签与药物-接头缀合。在一些实施例中,药物-接头中的药

物是细胞毒性试剂。

[0161] 在一些实施例中,药物缀合在PLA2R片段的BCR相互作用位点以外的区域。在一些实施例中,药物缀合在PLA2R片段的BCR相互作用位点以外的区域,而在上述位点引入一个或多个赖氨酸残基。在一些实施例中,药物缀合在PLA2R片段的BCR相互作用位点以外的区域,而在上述位点引入一个或多个赖氨酸残基,所述一个或多个氨基酸残基经由酰胺键连接至与药物-接头连接的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯。

[0162] 例如,在一些实施例中,通过静脉内途径将EDC施用到患者循环中。在一些实施例中,EDC与产生识别PLA2R的自身抗体的B细胞的结合通过胞吞作用引发受体-EDC复合物的快速内化(图5)。在一些实施例中,EDC与识别PLA2R的T细胞的结合通过胞吞作用引发受体-EDC复合物的快速内化。在内体(endosome)中,内化的受体-EDC复合物被消化,导致缀合的药物释放。在一些实施例中,释放的药物然后引起产生识别PLA2R的自身抗体的B细胞的死亡(图5)。在一些实施例中,释放的药物随后导致识别PLA2R的T细胞死亡。在一些实施例中,药物通过细胞凋亡导致B和T细胞死亡。在一些实施例中,药物通过非凋亡机制导致B和T细胞死亡。

### [0163] 寻常型天疱疮

[0164] 寻常型天疱疮(PV)是一种潜在的威胁生命的自身免疫性起泡疾病,其特征是由细胞-细胞粘附丧失引起的上皮内水疱形成。PV影响皮肤和粘膜,并且由针对角质形成细胞表面分子桥粒芯糖蛋白1(Dsg1)和桥粒芯糖蛋白3(Dsg3)的循环的致病性自身抗体介导。

[0165] 自身抗体与桥粒芯糖蛋白的结合损害了桥粒的完整性,导致细胞与细胞粘附的丧失,从而导致起泡,并且还引发导致棘层松解(acantholysis)的细胞过程。患有粘膜皮肤形式的PV的患者具有致病性的抗Dsg1自身抗体和抗Dsg3自身抗体。患有粘膜形式的PV的患者仅具有抗Dsg3自身抗体。

[0166] Dsg3和Dsg1都是具有相似分子结构的跨膜蛋白,其中各包含5个细胞外钙粘蛋白(EC)结构域、单次跨膜区和细胞内尾部(图26)。Dsg3中的显性表位位于EC1-3结构域(图26),其结合所有抗Dsg3致病性的自身抗体。Dsg3EC1-3结构域含有334个氨基酸。Dsg1中的显性表位位于EC1-2结构域(图26),其结合所有抗Dsg1致病性的自身抗体。Dsg1EC1-2分别含有221个氨基酸。表位中的钙结合位点对于自身抗体结合是关键的(图26)(Ohyama,B.,et al.)。

[0167] 在一些实施例中,提供了基于Dsg1中的表位的EDC。图31示出了用于开发根据本发明的基于Dsg1表位的EDC的Dsg1的表位的实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:16;336个氨基酸)。在一些实施例中,提供了基于Dsg3中的表位的EDC。图32示出了用于开发根据本发明的基于Dsg3表位的EDC的Dsg3的表位的实施例的氨基酸序列(SEQ ID NO:17;450个氨基酸)。在一些实施例中,提供了基于Dsg1和Dsg3中的表位的EDC。

[0168] 基于Dsg1和Dsg3中的表位的EDC的实施例的示意图在图27中示出。基于Dsg1和Dsg3中的表位的、用于治疗PV的EDC的开发在实例7中描述。

[0169] 在一些实施例中,当使用表达载体表达Dsg1片段或Dsg3片段时,可以使用例如定点诱变来取代潜在糖基化的残基。在一些实施例中,当直接合成Dsg1或Dsg3蛋白片段时,可以定制蛋白质合成,使得潜在糖基化残基被非糖基化残基取代,所述非糖基化残基不会影响用于自身抗体识别的蛋白质结构和/或构象。

[0170] 在一些实施例中,可以对Dsg1或Dsg3片段进行额外的修饰,例如,将试剂(例如药物)附着到Dsg1或Dsg3片段,以改善Dsg1或Dsg3表位对细胞表面上的受体的可及性,和/或改善蛋白质表达和产量。例如,可以通过插入小的(约2至10个氨基酸)N-端肽、C-端肽或两者来修饰Dsg1或Dsg3片段,以进行保守和/或非保守取代,和/或添加一个或多个异源序列以实现期望的目标。

[0171] 在一些实施例中,本文提供的一种或多种Dsg1或Dsg3片段由核酸编码。在一些实施例中,编码Dsg1或Dsg3的核酸是cDNA或mRNA。在一些实施例中,编码Dsg1或Dsg3的核酸可包含在蛋白质表达载体中。在一些实施例中,蛋白质表达载体是DNA载体或RNA载体。在一些实施例中,蛋白质表达载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一些实施例中,蛋白质表达载体是哺乳动物细胞表达载体。在一些实施例中,蛋白质表达载体是昆虫细胞表达载体。在一些实施例中,包含在蛋白质表达载体内的编码Dsg1或Dsg3片段的核酸与调控因子可操作地连接以调节PLA2R片段的表达。

[0172] 调控因子可包括启动子、终止子、增强子等。如本文所用,“可操作地连接”是指调控因子正性或负性控制蛋白质从核酸的表达。

[0173] 本文提供的一种或多种蛋白质表达载体和本领域普通技术人员已知的其它蛋白质表达载体可用于获得大量的一种或多种本文提供的Dsg1或Dsg3片段,用于并入本文提供的组合物、方法和/或试剂盒中的一种或多种。

[0174] 在一些实施例中,蛋白质表达载体在编码的Dsg1或Dsg3片段上引入标签。在一些实施例中,标签位于N端。在一些实施例中,标签位于C端。在一些实施例中,标签位于N-端和C-端。标签的非限制性实例包括几丁质结合蛋白、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、硫氧还蛋白、聚(NANP)、FLAG、V5、Myc、HA、NE、生物素、生物素羧基载体蛋白、GFP、Halo、Nus、Fc、AviTag、钙调蛋白、poly-Glu、E,S,SBP、Softag 1、Softag 3、Strep、TC、VSV、Ty和Xpress。在一些实施例中,标签是聚组氨酸(poly-His)标签。

[0175] 在一些实施例中,蛋白质表达载体在Dsg1或Dsg3片段与标签之间额外地引入断裂位点。在一些实施例中,断裂位点是蛋白水解位点。蛋白水解位点的非限制性实例包括TEV蛋白酶、因子Xa或肠肽酶的位点。在一些实施例中,蛋白水解位点是凝血酶断裂位点。其他断裂位点

[0176] 例如,在一些实施例中,poly-His标记的Dsg1或Dsg3片段可以在哺乳动物细胞(例如,HEK 293细胞)中表达并使用Ni<sup>2+</sup>-亲和纯化从细胞培养基中纯化。然后可以通过蛋白水解消化(例如使用凝血酶)除去poly-His标签,并使用凝胶过滤色谱进一步纯化Dsg1或Dsg3片段以除去凝血酶和释放的poly-His标签。

[0177] 在一些实施例中,自身抗体可以在真皮(真皮区室中的靶向细胞连接处)和/或皮下区室中累积,例如在患有PV的患者中。在这种情况下,如果皮下递送EDC,EDC可在注射部位直接中和而无法使其进入淋巴结。因此,由于真皮和/或皮下区室中的自身抗体可能中和一种或多种本文所述的EDC,PV患者最初用一种或多种免疫抑制剂(例如利妥昔单抗(Rituxan))治疗,以降低和/或消除自身抗体。尽管免疫抑制剂不特异性地靶向真皮和/或皮下区室中的自身抗体,免疫抑制剂抑制免疫系统,因此抑制自身抗体的产生。这导致抑制新抗体的产生和消除循环的自身抗体(循环的自身抗体基于它们的半衰期被再循环和/或降解)。然后可以通过静脉内、皮下和/或皮内途径给PV患者施用一种或多种EDC以靶向淋巴

结中的自身免疫记忆B细胞以防止疾病复发。因此,在一些实施例中,本文提供一种或多种EDC可以与一种或多种免疫抑制疗法联合使用以预防疾病复发。例如,PV具有高复发率且重复的利妥昔单抗治疗导致致命的感染。因此,在施用利妥昔单抗后施用一种或多种EDC可以预防PV患者的致命感染。另外,利妥昔单抗不能到达淋巴结中的自身免疫记忆B细胞。相反,EDC可以到达淋巴结中的自身免疫记忆B细胞。因此,除了预防复发外,EDC还可以通过消除淋巴结中的自身免疫记忆B细胞来治愈PV患者。

[0178] 实例

[0179] 以下实施例是非限制性的,仅用于说明本发明并辅助本领域普通技术人员实施和使用本发明。这些实例并不旨在以任何方式限制本发明的范围。

[0180] 实例1

[0181] 收集来自患有MN的患者的血液。从血液中分离总B细胞。用FACS鉴定和分离表达PLA2R表位受体的细胞。将EDC添加到携带PLA2R表位受体的细胞中。不表达PLA2R表位受体的细胞用作对照。以EDC中的药物的常规剂量的1/1000的剂量将EDC加入每个细胞群中。将细胞群与EDC一起培养过夜。表达PLA2R表位受体的细胞被EDC杀死,而不表达受体的细胞不受影响并存活。可以用台盼蓝 (trypan blue) 染色细胞以评价EDC杀死表达PLA2R表位受体的细胞的有效性。

[0182] 实例2

[0183] 收集来自患有MN的患者的血液。表达PLA2R表位受体的细胞用荧光标记的PLA2R表位标记。使用显微镜法分离标记的和未标记的细胞。未标记的细胞用作对照。以EDC中的药物的常规剂量的1/1000的剂量将EDC加入每个细胞群中。将细胞群与EDC一起培养过夜。表达PLA2R表位受体的细胞被EDC杀死,而不表达受体的细胞不受影响并存活。可以用台盼蓝 (trypan blue) 染色细胞以评价EDC杀死表达PLA2R表位受体的细胞的有效性。

[0184] 实例3

[0185] 在一个实施例中,在用本文提供一种或多种治疗选项治疗后,与以前的治疗方案约6个月恢复相比,患有MN的患者在约1个月内恢复。通过尿液中的蛋白质水平测量患者恢复。

[0186] 实例4-用于位点特异性化学缀合的修饰的PLA2R表位的设计

[0187] PLA2R-表位至少含有3个结构域,即N端富含半胱氨酸结构域(CysR)、纤连蛋白样II型结构域(FnII)和C型外源凝集素样结构域1(CTLD1)(图1、图2和图23)。表位与自身抗体和/或B细胞受体(BCR)的相互作用的性质仍不清楚。关键是化学物质与表位的缀合不会干扰抗体-抗原相互作用。

[0188] 为此,开发了用于缀合的PLA2R-表位中的特定位点。具体地,将游离半胱氨酸设计成表位的C-端尾部以产生化学缀合的特定位点。还将TEV断裂位点和His-标签(6个组氨酸残基)设计到所引入的半胱氨酸C-端的表位蛋白中用于蛋白质纯化。图23(上)示出了用于蛋白质纯化和药物缀合的修饰的PLA2R-表位构建体的设计示意图。图23(中)示出了药物(细胞毒性剂)如何与纯化的PLA2R表位缀合的示意图。

[0189] 蛋白质表达的评价显示修饰的PLA2R-表位得到了良好表达并且与抗PLA2R自身抗体强烈反应,表明引入的半胱氨酸对表位折叠没有影响。该构建体随后在HEK293细胞中表达,并使用镍和凝胶过滤柱纯化表位蛋白,然后进行TEV断裂以除去His-标签。然后将蛋白

质与荧光剂(例如FITC)或细胞毒性试剂(例如单甲基奥瑞他汀E(MMAE))连接。

[0190] 图23(上)示出了用于蛋白质纯化和药物缀合的修饰的PLA2R-表位构建体的设计。将位点特异性缀合位点引入PLA2R表位,然后在PLA2R EDC的设计中引入TEV断裂位点和His-标签。图23(中)示出了药物如何与纯化的PLA2R-表位缀合。纯化的表位蛋白以位点特异性方式与细胞毒性剂缀合。图23(下)示出了纯化后PLA2R-表位蛋白的纯度。缀合的PLA2R表位蛋白得到纯化并在SDS-PAGE上分解。在7%SDS-PAGE上分析表位,其显示具有正确分子量(约37kDa)的单个蛋白质条带(图23;左下)。

[0191] 在单独的实验中(图23;右下),等量的表位、FITC缀合的表位和MMAE缀合的表位蛋白在非还原条件下在SDS-PAGE上分解,转移至膜,并由含有抗PLA2R自身抗体的患者血清探测。未缀合的和缀合的PLA2R-表位蛋白在非还原条件下在4-20%SDS-PAGE上分解,并用含有抗PLA2R自身抗体的患者血清进行探测(图23,右下)。结果显示药物缀合的PLA2R-表位与未缀合的PLA2R-表位一样强烈结合自身抗体(图23;右下)。

[0192] 抗PLA2R自身抗体的蛋白质印迹法显示PLA2R表位与抗PLA2R自身抗体强烈反应,表明引入的半胱氨酸不影响表位的折叠(图23(右下;蛋白质印迹法))。然后在HEK293细胞中表达构建体,并使用镍和凝胶过滤柱纯化表位蛋白,然后进行TEV断裂以除去His-标签。然后将蛋白质与荧光剂(例如FITC)或细胞毒性试剂(例如单甲基奥瑞他汀E(MMAE))连接(图23)。

[0193] 实例5-PLA2R-表位-FITC与从PMN患者分离的记忆B细胞的结合的评价

[0194] PMN是B细胞介导的自身免疫疾病。致病性的自身抗体由来自一组记忆B细胞的浆细胞分泌,该记忆B细胞具有特异性结合PLA2R-表位的独特B细胞受体(BCR)。为了区分这组记忆B细胞并评价PLA2R表位药物缀合物是否能够有效结合该组记忆B细胞表面上的BCR,使用PLA2R-表位-FITC分析对从PMN患者的血液样品中分离的总B细胞进行结合试验。从患者的外周血中分离的总B细胞在补充有胎牛血清和抗生素的RPMI培养基中于37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养过夜。然后通过上下吸移使细胞分散,收集并用冰冷的PBS洗涤两次。随后将细胞与PBS中的PLA2R-表位-FITC在4℃下培养1小时。用冰冷的PBS洗涤细胞3次,并在荧光显微镜下在激发波长488nm和发射波长520nm下成像。图24示出了用PLA2R-表位-FITC标记的B细胞群,表明在PMN患者中存在结合PLA2R表位的记忆B细胞的特定群,以及PLA2R-表位-FITC与在这些记忆B细胞的表面上的BCR的强结合。

[0195] 实例6-PLA2R-表位-MMAE对从PMN患者分离的记忆B细胞的功效的评价

[0196] 评价了PLA2R-表位-MMAE消除从PMN患者分离的PLA2R-表位特异性记忆B细胞的功效。MMAE是一种有效的细胞毒性剂,可阻断微管蛋白聚合,从而导致细胞死亡。MMAE已被用于开发用于淋巴瘤治疗的抗体-药物缀合物本妥昔单抗(Brentuximab vedotin)(商品名Adcetris)并于2011年获得FDA批准。从患者外周血中分离的总B细胞在RPMI培养基中培养过夜,然后等分到12孔细胞培养板上的两个孔(每孔2ml)。在细胞培养箱中,将一个孔中的细胞与MMAE一起培养,而将另一个孔中的细胞与PLA2R-表位-MMAE培养24小时。然后收集来自两个孔的细胞,用冰冷的PBS洗涤,并与PLA2R-表位-FITC在4℃下培养1小时。用冰冷的PBS洗涤细胞3次,并在荧光显微镜下在激发波长488nm和发射波长520nm下成像。

[0197] 仅用MMAE预培养导致许多B细胞被PLA2R-表位-FITC染色(图25)。相反,用PLA2R-表位-MMAE预培养显示没有被PLA2R-表位-FITC染色,表明PLA2R-表位-MMAE特异性靶向和

消除了PLA2R-表位特异性记忆B细胞(图25)。PLA2R-表位-MMAE处理的B细胞的光学显微镜图像也表明EDC对大多数B细胞几乎没有作用(图25)。

#### [0198] 实例7-寻常型天疱疮的EDC治疗的开发

[0199] 为了保留对自身抗体结合至关重要的Dsg3表位中的钙结合位点,选择Dsg3EC1-4结构域(450个氨基酸;图32;SEQ ID NO:17)作为药物缀合的表位。为了在Dsg3EC1-4中形成特异性缀合位点,所有内源半胱氨酸(图32中下划线)由结构相似的氨基酸丝氨酸取代。另外,用结构相似的氨基酸谷氨酰胺替换2个内源N-糖基化位点(Asn61和Asn131;图32中下划线部分)。采用相同的方法设计用于药物缀合的Dsg1表位,选择修饰的Dsg1EC1-3结构域(336个氨基酸)(图31;SEQ ID NO:16)。产生的表位命名为Dsg1EC1-3和Dsg3EC1-4。Dsg1EC1-3表位的分子量约为35kDa,Dsg3EC1-4表位的分子量约为60kDa。

[0200] 游离半胱氨酸随后被设计到每个表位的C-端尾部中以形成化学缀合的特定位点。在引入的半胱氨酸用于蛋白质纯化后,还将TEV断裂位点和His-标签(6His)设计到表位蛋白中(图27)。

[0201] 设计的表位在HEK 293细胞中表达,并使用镍亲和力和凝胶过滤柱从培养基中纯化,然后进行TEV断裂以除去His-标签(图28,左图;考马斯蓝(Coomassie Blue))。然后将表位与荧光剂(例如FITC)或细胞毒性试剂(例如MMAE)连接。

[0202] 因为Dsg1和Dsg3的自身抗体优先结合非变性的Dsg1或Dsg3蛋白,所以在TEV处理之前将两个表位的纯化的FITC或MMAE缀合形式与PBS缓冲液中的粘膜皮肤PV患者血清混合以形成免疫复合物,然后用蛋白G珠免疫沉淀。将等量的纯化的Dsg1和Dsg3表位的缀合形式(在TEV断裂之前)与PBS缓冲液中的粘膜皮肤PV患者血清在4℃下混合2小时,并用蛋白G珠免疫沉淀。彻底洗涤珠,用SDS-样品缓冲液洗脱结合的表位,在SDS-PAGE上分解,转移到膜上,并用抗His标签抗体探测(图28,中图和右图,蛋白质印迹)。蛋白质印迹结果表明,Dsg1和Dsg3的设计的且化学缀合的表位与自身抗体强烈反应,并能由蛋白G珠很好地免疫沉淀,表明表位蛋白的设计和化学缀合未干扰自身抗体-抗原相互作用。

#### [0203] 实例8-Dsg-表位-FITC与从自粘膜皮肤PV患者分离的记忆B细胞的结合的评价

[0204] 对Dsg-表位-FITC与从粘膜皮肤PV患者的血液样品中分离的记忆B细胞中的特异性BCR结合的能力进行了评价。首先使用密度离心(Histopaque-1077)从全血分离外周血单核细胞,然后使用B细胞阴性分离试剂盒分离总B细胞。然后将分离的总B细胞在补充有胎牛血清和抗生素的RPMI培养基中于37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养过夜。随后对细胞进行处理,用PBS中的Dsg-表位-FITC在4℃下染色1小时,并在荧光显微镜下在激发波长488nm和发射波长520nm下成像。图29示出了Dsg-表位-FITC强烈染色一组B细胞,表明Dsg-表位-FITC与这些记忆B细胞表面上的BCR强烈结合。

#### [0205] 实例9-Dsg-表位-MMAE对从粘膜皮肤PV患者分离的记忆B细胞的功效的评价

[0206] 对与MMAE缀合的Dsg1和Dsg3表位消除从粘膜皮肤PV患者分离的Dsg1和Dsg3-表位特异性记忆B细胞的功效分别进行了评估。从患者外周血中分离的总B细胞在RPMI培养基中培养过夜,然后等分到12孔细胞培养板(2ml/孔)的两个孔中。在细胞培养箱中,将一个孔中的细胞与MMAE一起培养,而另一个孔中的细胞与Dsg1和Dsg3-表位-MMAE培养24小时。然后收集来自两个孔的细胞,用冰冷的PBS洗涤,并与Dsg1和Dsg3-表位-FITC在4℃下培养1小时。用冰冷的PBS洗涤细胞3次,并在荧光显微镜下在激发波长488nm和发射波长520nm下成

像。

[0207] 仅用MMAE预培养导致许多B细胞被Dsg1和Dsg3-表位-FITC染色(图30)。相反,用Dsg1和Dsg3-表位-MMAE预培养显示未被Dsg1和Dsg3-表位-FITC染色,表明Dsg1和Dsg3-表位-MMAE特异性靶向和消除Dsg1和Dsg3-表位特异性记忆B细胞(图30)。Dsg 1和Dsg3-表位-MMAE处理的B细胞的光学显微镜图像也表明EDC对大多数B细胞产生很小的作用(图30)。

[0208] 如本文所使用的,章节标题仅用于组织目的,不应被解释为以任何方式限制所描述的主题。本申请中引用的所有文献和类似材料,包括但不限于专利、专利申请、文献、书籍、论文和互联网网页,出于任何目的通过引用明确地并入本文。当并入的参考文献中的术语的定义看起来与本教导中提供的定义不同时,以本教导中提供的定义为准。应当理解,在本教导中讨论的温度、浓度、时间等之前存在暗示的“约”,从而轻微和非实质性的偏差均在本文的教导的范围内。

[0209] 在本申请中,除非另外特别说明,否则单数的使用也包括复数的含义。而且“包含”、“包括”和“含有”的使用不是限制性的。

[0210] 如在本说明书和权利要求书中所使用的,单数形式“一”,“一个”和“该”包括复数指代,除非内容另有明确说明。

[0211] 如本文所用,“约”是指数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度,其变化最多可为参考数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。

[0212] 尽管已经在某些实施例和实例的背景下公开了本发明,但本领域技术人员将理解,本发明超出具体公开的实施例,延伸到本发明的其他替代实施例和/或用途以及其明显的修改和等同物。另外,虽然已经详细示出和描述了本发明的若干变型,但是基于本公开,本领域技术人员能够容易地得到在本发明范围内的其他变型。还预期可以进行实施例的特定特征和方面的各种组合或子组合,并且仍然落入本发明的范围内。应当理解,所公开的实施例的各种特征和方面可以彼此组合或替代,以便形成所公开发明的变化模式或实施例。因此,意图是本文公开的本发明的范围不应受上述具体公开的实施例的限制。

[0213] 然而,应该理解,该详细描述虽然表明了本发明的优选实施例,但是仅以说明的方式给出,因为在本发明的精神和范围内的各种改变和修改对于本领域技术人员来说将变得显而易见。

[0214] 在此呈现的描述中使用的术语不旨在以任何限制或限制的方式解释。相反,术语仅与系统,方法和相关组件的实施例的详细描述一起使用。此外,实施例可以包括若干新颖特征,其中没有一个特征单独负责其期望的属性,或者被认为对于实践本文所述的发明是必要的。

[0215] 本领域技术人员将理解,前述说明书中公开的概念和具体实施例可以容易地用作修改或设计以实现本发明相同目的的其他实施例的基础。

[0216] 除非另有说明,否则本申请中使用的所有科学和技术术语具有本领域常用的含义。如在本申请中所使用的,以下单词或短语具有指定的含义。

[0217] 如本文所用,“能够检测的标记物”或“标记”是作为试剂的一部分附着或合成的分子。该分子应该是能够唯一检测的并且将允许试剂被检测作为结果。这些能够检测的部分通常是放射性同位素、化学发光分子、酶、半抗原或甚至是独特的寡核苷酸序列。

[0218] 如本文所用,“多肽”包括蛋白质、蛋白质片段和肽,无论是从天然来源分离、通过重组技术产生还是化学合成。多肽通常包含至少约6个氨基酸。较短的多肽,例如长度小于约50个氨基酸的多肽,通常称为“肽”。

[0219] 在一些实施例中,本发明的多肽可包含天然蛋白质的变体。如本文所用的多肽“变体”是在一个或多个取代、缺失、添加和/或插入方面与天然蛋白质不同的多肽,使得多肽的治疗功效基本上不降低。换句话说,相对于天然蛋白质功效可以增强或不变,或者相对于天然蛋白质功效可以减少小于50%、优选小于20%。优选的变体包括其中已除去一个或多个部分(例如N-端前导序列)的变体。其他优选的变体包括其中从成熟蛋白的N-和/或C-端除去一小部分(例如1-30个氨基酸、优选5-15个氨基酸)的变体。多肽变体优选表现出与鉴定的多肽至少约70%、更优选至少约90%、最优选至少约95%的同一性(如上所述测定)。如本领域所知,还可以选择变体以优化多肽对结合配对体的亲和力。

[0220] 优选地,变体含有保守取代。“保守取代”是这样一种取代,即氨基酸由具有相似性质的另一种氨基酸取代,使得肽化学领域的技术人员能够预期到多肽的二级结构和水疗性质基本上不变。氨基酸取代通常可以基于残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性来进行。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;具有相似亲水性值的不带电荷的极性头部基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸;甘氨酸和丙氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;和丝氨酸,苏氨酸,苯丙氨酸和酪氨酸。可代表保守变化的其他氨基酸组包括:(1) Ala、Pro、Gly、Glu、Asp、Gln、Asn、Ser、Thr;(2) Cys、Ser、Tyr、Thr;(3) Val、Ile、Leu、Met、Ala、Phe;(4) Lys、Arg、His;(5) Phe、Tyr、Trp、His。变体还可以或替代性地包含非保守变化。在一个优选的实施例中,变体多肽与天然序列的不同之处在于五个或更少的氨基酸的取代、缺失或添加。变体也可(或替代地)通过例如对多肽的免疫原性、二级结构和水疗性质具有最小影响的氨基酸的缺失或添加进行修饰。

[0221] 在本文中呈现的描述中使用的术语并不旨在以任何局限或限制的方式解释。相反,术语仅与系统、方法和相关成分的实施例的详细描述一起使用。此外,实施例可以包括若干新颖的特征,其中没有一个特征单独地负责其期望的属性,或者被认为对于实践本文所述的发明是必要的。

[0222] 然而,应该理解,该详细描述虽然表明了本发明的优选实施例,但是仅以说明的方式给出,因为在本发明的精神和范围内的各种改变和修改对于本领域的普通技术人员是显而易见的。

#### [0223] 参考文献

[0224] 本公开中引用的所有参考文献都通过引用整体并入本文。

[0225] US 8,507,215 B2

[0226] Beck,L.H.,et al.,N Engl J Med,Vol.361,pp.11-21,2009.

[0227] Beck,L.H.,et al.,J Am Soc Nephrol,Vol.22,pp.1543-1550,2011.

[0228] Kao,L.,et al.,J Am Soc Nephrol,Vol.26,No.2,pp.291-301,2015.

[0229] Ohyama,B.,et al.,J Invest Dermatol,Vol.132,pp.1158-1168,2012.

[0230] Alewine,C.,et al,The Oncologist,Vol.20,pp.176-185,2015.

[0231] Pape,K.A.,et al,Immunity,Vol.26,pp.491-502,2007.

[0232] Roozendaal,R.,et al,Immunity,Vol.30,pp.264-276,2009.

[0001] 序列表

[0002] <110> 美国创新免疫科技有限公司

[0003] <120> 自身免疫疾病的诊断、预防和/或治疗

[0004] <130> IMWO.001WO

[0005] <150> US 62/374,382

[0006] <151> 2016-08-12

[0007] <160> 17

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 658

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工

[0013] <220>

[0014] <223> 合成

[0015] <400> 1

[0016] Met Leu Leu Ser Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Pro

[0017] 1 5 10 15

[0018] Arg Gly Cys Ala Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Thr Pro Glu Arg Leu

[0019] 20 25 30

[0020] Leu Glu Trp Gln Asp Lys Gly Ile Phe Val Ile Gln Ser Glu Ser Leu

[0021] 35 40 45

[0022] Lys Lys Cys Ile Gln Ala Gly Lys Ser Val Leu Thr Leu Glu Asn Cys

[0023] 50 55 60

[0024] Lys Gln Ala Asn Lys His Met Leu Trp Lys Trp Val Ser Asn His Gly

[0025] 65 70 75 80

[0026] Leu Phe Asn Ile Gly Gly Ser Gly Cys Leu Gly Leu Asn Phe Ser Ala

[0027] 85 90 95

[0028] Pro Glu Gln Pro Leu Ser Leu Tyr Glu Cys Asp Ser Thr Leu Val Ser

[0029] 100 105 110

[0030] Leu Arg Trp Arg Cys Asn Arg Lys Met Ile Thr Gly Pro Leu Gln Tyr

[0031] 115 120 125

[0032] Ser Val Gln Val Ala His Asp Asn Thr Val Val Ala Ser Arg Lys Tyr

[0033] 130 135 140

[0034] Ile His Lys Trp Ile Ser Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Cys Glu

[0035] 145 150 155 160

[0036] Tyr Leu His Lys Asp Leu His Thr Ile Lys Gly Asn Thr His Gly Met

[0037] 165 170 175

[0038] Pro Cys Met Phe Pro Phe Gln Tyr Asn His Gln Trp His His Glu Cys

[0039]		180		185		190											
[0040]	Thr	Arg	Glu	Gly	Arg	Glu	Asp	Asp	Leu	Leu	Trp	Cys	Ala	Thr	Thr	Ser	
[0041]			195						200						205		
[0042]	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asp	Glu	Lys	Trp	Gly	Phe	Cys	Pro	Asp	Pro	Thr	Ser	
[0043]			210						215						220		
[0044]	Ala	Glu	Val	Gly	Cys	Asp	Thr	Ile	Trp	Glu	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	His	
[0045]			225						230						235		240
[0046]	Ile	Cys	Tyr	Gln	Phe	Asn	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Trp	Ser	Glu	Ala	
[0047]									245						250		255
[0048]	His	Ser	Ser	Cys	Gln	Met	Gln	Gly	Gly	Thr	Leu	Leu	Ser	Ile	Thr	Asp	
[0049]															260		265
[0050]	Glu	Thr	Glu	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Glu	His	Met	Ser	Ser	Lys	Thr	Val	
[0051]									275						280		285
[0052]	Glu	Val	Trp	Met	Gly	Leu	Asn	Gln	Leu	Asp	Glu	His	Ala	Gly	Trp	Gln	
[0053]															290		295
[0054]	Trp	Ser	Asp	Gly	Thr	Pro	Leu	Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Ser	Pro	Glu	Val	
[0055]															305		310
[0056]	Asn	Phe	Glu	Pro	Phe	Val	Glu	Asp	His	Cys	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	
[0057]																	325
[0058]	Met	Pro	Ser	Ala	Trp	Arg	Ser	Arg	Asp	Cys	Glu	Ser	Thr	Leu	Pro	Tyr	
[0059]																	340
[0060]	Ile	Cys	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	His	Ile	Asp	His	Glu	Ile	Val	Glu	Lys	
[0061]																	355
[0062]	Asp	Ala	Trp	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Thr	His	Cys	Glu	Pro	Gly	Trp	Asn	Pro	
[0063]																	370
[0064]	Tyr	Asn	Arg	Asn	Cys	Tyr	Lys	Leu	Gln	Lys	Glu	Glu	Lys	Thr	Trp	His	
[0065]																	385
[0066]	Glu	Ala	Leu	Arg	Ser	Cys	Gln	Ala	Asp	Asn	Ser	Ala	Leu	Ile	Asp	Ile	
[0067]																	405
[0068]	Thr	Ser	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Phe	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Gly	Asp	Glu	
[0069]																	420
[0070]	Asn	Ala	Ser	Glu	Thr	Trp	Ile	Gly	Leu	Ser	Ser	Asn	Lys	Ile	Pro	Val	
[0071]																	435
[0072]	Ser	Phe	Glu	Trp	Ser	Asn	Asp	Ser	Ser	Val	Ile	Phe	Thr	Asn	Trp	His	
[0073]																	450
[0074]	Thr	Leu	Glu	Pro	His	Ile	Phe	Pro	Asn	Arg	Ser	Gln	Leu	Cys	Val	Ser	
[0075]																	465
[0076]	Ala	Glu	Gln	Ser	Glu	Gly	His	Trp	Lys	Val	Lys	Asn	Cys	Glu	Glu	Arg	
[0077]																	485

[0078]	Leu Phe Tyr Ile Cys Lys Lys Ala Gly His Val Leu Ser Asp Ala Glu
[0079]	500 505 510
[0080]	Ser Gly Cys Gln Glu Gly Trp Glu Arg His Gly Gly Phe Cys Tyr Lys
[0081]	515 520 525
[0082]	Ile Asp Thr Val Leu Arg Ser Phe Asp Gln Ala Ser Ser Gly Tyr Tyr
[0083]	530 535 540
[0084]	Cys Pro Pro Ala Leu Val Thr Ile Thr Asn Arg Phe Glu Gln Ala Phe
[0085]	545 550 555 560
[0086]	Ile Thr Ser Leu Ile Ser Ser Val Val Lys Met Lys Asp Ser Tyr Phe
[0087]	565 570 575
[0088]	Trp Ile Ala Leu Gln Asp Gln Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Thr Trp Lys
[0089]	580 585 590
[0090]	Pro Val Gly Gln Lys Pro Glu Pro Val Gln Tyr Thr His Trp Asn Thr
[0091]	595 600 605
[0092]	His Gln Pro Arg Tyr Ser Gly Gly Cys Val Ala Met Arg Gly Arg His
[0093]	610 615 620
[0094]	Pro Leu Gly Arg Trp Glu Val Lys His Cys Arg His Phe Lys Ala Met
[0095]	625 630 635 640
[0096]	Ser Leu Cys Lys Gln Pro Val Glu Asn Gln Glu Lys Ala Glu Tyr Glu
[0097]	645 650 655
[0098]	Glu Arg
[0099]	<210> 2
[0100]	<211> 364
[0101]	<212> PRT
[0102]	<213> 人工
[0103]	<220>
[0104]	<223> 合成
[0105]	<400> 2
[0106]	Met Leu Leu Ser Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Pro
[0107]	1 5 10 15
[0108]	Arg Gly Cys Ala Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Thr Pro Glu Arg Leu
[0109]	20 25 30
[0110]	Leu Glu Trp Gln Asp Lys Gly Ile Phe Val Ile Gln Ser Glu Ser Leu
[0111]	35 40 45
[0112]	Lys Lys Cys Ile Gln Ala Gly Lys Ser Val Leu Thr Leu Glu Asn Cys
[0113]	50 55 60
[0114]	Lys Gln Ala Asn Lys His Met Leu Trp Lys Trp Val Ser Asn His Gly
[0115]	65 70 75 80
[0116]	Leu Phe Asn Ile Gly Gly Ser Gly Cys Leu Gly Leu Asn Phe Ser Ala





[0195] Ala Glu Tyr Glu Glu Arg  
 [0196] 290  
 [0197] <210> 4  
 [0198] <211> 805  
 [0199] <212> PRT  
 [0200] <213> 人工  
 [0201] <220>  
 [0202] <223> 合成  
 [0203] <400> 4  
 [0204] Met Leu Leu Ser Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Pro  
 [0205] 1 5 10 15  
 [0206] Arg Gly Cys Ala Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Thr Pro Glu Arg Leu  
 [0207] 20 25 30  
 [0208] Leu Glu Trp Gln Asp Lys Gly Ile Phe Val Ile Gln Ser Glu Ser Leu  
 [0209] 35 40 45  
 [0210] Lys Lys Cys Ile Gln Ala Gly Lys Ser Val Leu Thr Leu Glu Asn Cys  
 [0211] 50 55 60  
 [0212] Lys Gln Ala Asn Lys His Met Leu Trp Lys Trp Val Ser Asn His Gly  
 [0213] 65 70 75 80  
 [0214] Leu Phe Asn Ile Gly Gly Ser Gly Cys Leu Gly Leu Asn Phe Ser Ala  
 [0215] 85 90 95  
 [0216] Pro Glu Gln Pro Leu Ser Leu Tyr Glu Cys Asp Ser Thr Leu Val Ser  
 [0217] 100 105 110  
 [0218] Leu Arg Trp Arg Cys Asn Arg Lys Met Ile Thr Gly Pro Leu Gln Tyr  
 [0219] 115 120 125  
 [0220] Ser Val Gln Val Ala His Asp Asn Thr Val Val Ala Ser Arg Lys Tyr  
 [0221] 130 135 140  
 [0222] Ile His Lys Trp Ile Ser Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Cys Glu  
 [0223] 145 150 155 160  
 [0224] Tyr Leu His Lys Asp Leu His Thr Ile Lys Gly Asn Thr His Gly Met  
 [0225] 165 170 175  
 [0226] Pro Cys Met Phe Pro Phe Gln Tyr Asn His Gln Trp His His Glu Cys  
 [0227] 180 185 190  
 [0228] Thr Arg Glu Gly Arg Glu Asp Asp Leu Leu Trp Cys Ala Thr Thr Ser  
 [0229] 195 200 205  
 [0230] Arg Tyr Glu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp Pro Thr Ser  
 [0231] 210 215 220  
 [0232] Ala Glu Val Gly Cys Asp Thr Ile Trp Glu Lys Asp Leu Asn Ser His  
 [0233] 225 230 235 240

[0234]	Ile Cys Tyr Gln Phe Asn Leu Leu Ser Ser Leu Ser Trp Ser Glu Ala
[0235]	245 250 255
[0236]	His Ser Ser Cys Gln Met Gln Gly Gly Thr Leu Leu Ser Ile Thr Asp
[0237]	260 265 270
[0238]	Glu Thr Glu Glu Asn Phe Ile Arg Glu His Met Ser Ser Lys Thr Val
[0239]	275 280 285
[0240]	Glu Val Trp Met Gly Leu Asn Gln Leu Asp Glu His Ala Gly Trp Gln
[0241]	290 295 300
[0242]	Trp Ser Asp Gly Thr Pro Leu Asn Tyr Leu Asn Trp Ser Pro Glu Val
[0243]	305 310 315 320
[0244]	Asn Phe Glu Pro Phe Val Glu Asp His Cys Gly Thr Phe Ser Ser Phe
[0245]	325 330 335
[0246]	Met Pro Ser Ala Trp Arg Ser Arg Asp Cys Glu Ser Thr Leu Pro Tyr
[0247]	340 345 350
[0248]	Ile Cys Lys Lys Tyr Leu Asn His Ile Asp His Glu Ile Val Glu Lys
[0249]	355 360 365
[0250]	Asp Ala Trp Lys Tyr Tyr Ala Thr His Cys Glu Pro Gly Trp Asn Pro
[0251]	370 375 380
[0252]	Tyr Asn Arg Asn Cys Tyr Lys Leu Gln Lys Glu Glu Lys Thr Trp His
[0253]	385 390 395 400
[0254]	Glu Ala Leu Arg Ser Cys Gln Ala Asp Asn Ser Ala Leu Ile Asp Ile
[0255]	405 410 415
[0256]	Thr Ser Leu Ala Glu Val Glu Phe Leu Val Thr Leu Leu Gly Asp Glu
[0257]	420 425 430
[0258]	Asn Ala Ser Glu Thr Trp Ile Gly Leu Ser Ser Asn Lys Ile Pro Val
[0259]	435 440 445
[0260]	Ser Phe Glu Trp Ser Asn Asp Ser Ser Val Ile Phe Thr Asn Trp His
[0261]	450 455 460
[0262]	Thr Leu Glu Pro His Ile Phe Pro Asn Arg Ser Gln Leu Cys Val Ser
[0263]	465 470 475 480
[0264]	Ala Glu Gln Ser Glu Gly His Trp Lys Val Lys Asn Cys Glu Glu Arg
[0265]	485 490 495
[0266]	Leu Phe Tyr Ile Cys Lys Lys Ala Gly His Val Leu Ser Asp Ala Glu
[0267]	500 505 510
[0268]	Ser Gly Cys Gln Glu Gly Trp Glu Arg His Gly Gly Phe Cys Tyr Lys
[0269]	515 520 525
[0270]	Ile Asp Thr Val Leu Arg Ser Phe Asp Gln Ala Ser Ser Gly Tyr Tyr
[0271]	530 535 540
[0272]	Cys Pro Pro Ala Leu Val Thr Ile Thr Asn Arg Phe Glu Gln Ala Phe

[0273]	545	550	555	560
[0274]	Ile Thr Ser Leu Ile Ser Ser Val Val Lys Met Lys Asp Ser Tyr Phe			
[0275]		565	570	575
[0276]	Trp Ile Ala Leu Gln Asp Gln Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Thr Trp Lys			
[0277]		580	585	590
[0278]	Pro Val Gly Gln Lys Pro Glu Pro Val Gln Tyr Thr His Trp Asn Thr			
[0279]		595	600	605
[0280]	His Gln Pro Arg Tyr Ser Gly Gly Cys Val Ala Met Arg Gly Arg His			
[0281]		610	615	620
[0282]	Pro Leu Gly Arg Trp Glu Val Lys His Cys Arg His Phe Lys Ala Met			
[0283]		625	630	640
[0284]	Ser Leu Cys Lys Gln Pro Val Glu Asn Gln Glu Lys Ala Glu Tyr Glu			
[0285]		645	650	655
[0286]	Glu Arg Trp Pro Phe His Pro Cys Tyr Leu Asp Trp Glu Ser Glu Pro			
[0287]		660	665	670
[0288]	Gly Leu Ala Ser Cys Phe Lys Val Phe His Ser Glu Lys Val Leu Met			
[0289]		675	680	685
[0290]	Lys Arg Thr Trp Arg Glu Ala Glu Ala Phe Cys Glu Glu Phe Gly Ala			
[0291]		690	695	700
[0292]	His Leu Ala Ser Phe Ala His Ile Glu Glu Glu Asn Phe Val Asn Glu			
[0293]		705	710	720
[0294]	Leu Leu His Ser Lys Phe Asn Trp Thr Glu Glu Arg Gln Phe Trp Ile			
[0295]		725	730	735
[0296]	Gly Phe Asn Lys Arg Asn Pro Leu Asn Ala Gly Ser Trp Glu Trp Ser			
[0297]		740	745	750
[0298]	Asp Arg Thr Pro Val Val Ser Ser Phe Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gly			
[0299]		755	760	765
[0300]	Glu Asp Ala Arg Asn Cys Ala Val Tyr Lys Ala Asn Lys Thr Leu Leu			
[0301]		770	775	780
[0302]	Pro Leu His Cys Gly Ser Lys Arg Glu Trp Ile Cys Lys Ile Pro Arg			
[0303]		785	790	800
[0304]	Asp Val Lys Pro Lys			
[0305]		805		
[0306]	<210> 5			
[0307]	<211> 367			
[0308]	<212> PRT			
[0309]	<213> 人工			
[0310]	<220>			
[0311]	<223> 合成			

[0312] <400> 5  
 [0313] Met Leu Leu Ser Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Pro  
 [0314] 1 5 10 15  
 [0315] Arg Gly Cys Ala Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Thr Pro Glu Arg Leu  
 [0316] 20 25 30  
 [0317] Leu Glu Trp Gln Asp Lys Gly Ile Phe Val Ile Gln Ser Glu Ser Leu  
 [0318] 35 40 45  
 [0319] Lys Lys Cys Ile Gln Ala Gly Lys Ser Val Leu Thr Leu Glu Asn Cys  
 [0320] 50 55 60  
 [0321] Lys Gln Ala Asn Lys His Met Leu Trp Lys Trp Val Ser Asn His Gly  
 [0322] 65 70 75 80  
 [0323] Leu Phe Asn Ile Gly Gly Ser Gly Cys Leu Gly Leu Asn Phe Ser Ala  
 [0324] 85 90 95  
 [0325] Pro Glu Gln Pro Leu Ser Leu Tyr Glu Cys Asp Ser Thr Leu Val Ser  
 [0326] 100 105 110  
 [0327] Leu Arg Trp Arg Cys Asn Arg Lys Met Ile Thr Gly Pro Leu Gln Tyr  
 [0328] 115 120 125  
 [0329] Ser Val Gln Val Ala His Asp Asn Thr Val Val Ala Ser Arg Lys Tyr  
 [0330] 130 135 140  
 [0331] Ile His Lys Trp Ile Ser Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Cys Glu  
 [0332] 145 150 155 160  
 [0333] Tyr Leu His Lys Asp Leu His Thr Ile Lys Gly Asn Thr His Gly Met  
 [0334] 165 170 175  
 [0335] Pro Cys Met Phe Pro Phe Gln Tyr Asn His Gln Trp His His Glu Cys  
 [0336] 180 185 190  
 [0337] Thr Arg Glu Gly Arg Glu Asp Asp Leu Leu Trp Cys Ala Thr Thr Ser  
 [0338] 195 200 205  
 [0339] Arg Tyr Glu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp Pro Thr Ser  
 [0340] 210 215 220  
 [0341] Ala Glu Val Gly Cys Asp Thr Ile Trp Glu Lys Asp Leu Asn Ser His  
 [0342] 225 230 235 240  
 [0343] Ile Cys Tyr Gln Phe Asn Leu Leu Ser Ser Leu Ser Trp Ser Glu Ala  
 [0344] 245 250 255  
 [0345] His Ser Ser Cys Gln Met Gln Gly Gly Thr Leu Leu Ser Ile Thr Asp  
 [0346] 260 265 270  
 [0347] Glu Thr Glu Glu Asn Phe Ile Arg Glu His Met Ser Ser Lys Thr Val  
 [0348] 275 280 285  
 [0349] Glu Val Trp Met Gly Leu Asn Gln Leu Asp Glu His Ala Gly Trp Gln  
 [0350] 290 295 300

[0351]	Trp Ser Asp Gly Thr Pro Leu Asn Tyr Leu Asn Trp Ser Pro Glu Val
[0352]	305 310 315 320
[0353]	Asn Phe Glu Pro Phe Val Glu Asp His Cys Gly Thr Phe Ser Ser Phe
[0354]	325 330 335
[0355]	Met Pro Ser Ala Trp Arg Ser Arg Asp Cys Glu Ser Thr Leu Pro Tyr
[0356]	340 345 350
[0357]	Ile Cys Lys Lys Tyr Leu Asn His Ile Asp His Glu Ile Val Glu
[0358]	355 360 365
[0359]	<210> 6
[0360]	<211> 438
[0361]	<212> PRT
[0362]	<213> 人工
[0363]	<220>
[0364]	<223> 合成
[0365]	<400> 6
[0366]	Lys Asp Ala Trp Lys Tyr Tyr Ala Thr His Cys Glu Pro Gly Trp Asn
[0367]	1 5 10 15
[0368]	Pro Tyr Asn Arg Asn Cys Tyr Lys Leu Gln Lys Glu Glu Lys Thr Trp
[0369]	20 25 30
[0370]	His Glu Ala Leu Arg Ser Cys Gln Ala Asp Asn Ser Ala Leu Ile Asp
[0371]	35 40 45
[0372]	Ile Thr Ser Leu Ala Glu Val Glu Phe Leu Val Thr Leu Leu Gly Asp
[0373]	50 55 60
[0374]	Glu Asn Ala Ser Glu Thr Trp Ile Gly Leu Ser Ser Asn Lys Ile Pro
[0375]	65 70 75 80
[0376]	Val Ser Phe Glu Trp Ser Asn Asp Ser Ser Val Ile Phe Thr Asn Trp
[0377]	85 90 95
[0378]	His Thr Leu Glu Pro His Ile Phe Pro Asn Arg Ser Gln Leu Cys Val
[0379]	100 105 110
[0380]	Ser Ala Glu Gln Ser Glu Gly His Trp Lys Val Lys Asn Cys Glu Glu
[0381]	115 120 125
[0382]	Arg Leu Phe Tyr Ile Cys Lys Lys Ala Gly His Val Leu Ser Asp Ala
[0383]	130 135 140
[0384]	Glu Ser Gly Cys Gln Glu Gly Trp Glu Arg His Gly Gly Phe Cys Tyr
[0385]	145 150 155 160
[0386]	Lys Ile Asp Thr Val Leu Arg Ser Phe Asp Gln Ala Ser Ser Gly Tyr
[0387]	165 170 175
[0388]	Tyr Cys Pro Pro Ala Leu Val Thr Ile Thr Asn Arg Phe Glu Gln Ala
[0389]	180 185 190

[0390]	Phe Ile Thr Ser Leu Ile Ser Ser Val Val Lys Met Lys Asp Ser Tyr
[0391]	195 200 205
[0392]	Phe Trp Ile Ala Leu Gln Asp Gln Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Thr Trp
[0393]	210 215 220
[0394]	Lys Pro Val Gly Gln Lys Pro Glu Pro Val Gln Tyr Thr His Trp Asn
[0395]	225 230 235 240
[0396]	Thr His Gln Pro Arg Tyr Ser Gly Gly Cys Val Ala Met Arg Gly Arg
[0397]	245 250 255
[0398]	His Pro Leu Gly Arg Trp Glu Val Lys His Cys Arg His Phe Lys Ala
[0399]	260 265 270
[0400]	Met Ser Leu Cys Lys Gln Pro Val Glu Asn Gln Glu Lys Ala Glu Tyr
[0401]	275 280 285
[0402]	Glu Glu Arg Trp Pro Phe His Pro Cys Tyr Leu Asp Trp Glu Ser Glu
[0403]	290 295 300
[0404]	Pro Gly Leu Ala Ser Cys Phe Lys Val Phe His Ser Glu Lys Val Leu
[0405]	305 310 315 320
[0406]	Met Lys Arg Thr Trp Arg Glu Ala Glu Ala Phe Cys Glu Glu Phe Gly
[0407]	325 330 335
[0408]	Ala His Leu Ala Ser Phe Ala His Ile Glu Glu Glu Asn Phe Val Asn
[0409]	340 345 350
[0410]	Glu Leu Leu His Ser Lys Phe Asn Trp Thr Glu Glu Arg Gln Phe Trp
[0411]	355 360 365
[0412]	Ile Gly Phe Asn Lys Arg Asn Pro Leu Asn Ala Gly Ser Trp Glu Trp
[0413]	370 375 380
[0414]	Ser Asp Arg Thr Pro Val Val Ser Ser Phe Leu Asp Asn Thr Tyr Phe
[0415]	385 390 395 400
[0416]	Gly Glu Asp Ala Arg Asn Cys Ala Val Tyr Lys Ala Asn Lys Thr Leu
[0417]	405 410 415
[0418]	Leu Pro Leu His Cys Gly Ser Lys Arg Glu Trp Ile Cys Lys Ile Pro
[0419]	420 425 430
[0420]	Arg Asp Val Lys Pro Lys
[0421]	435
[0422]	<210> 7
[0423]	<211> 169
[0424]	<212> PRT
[0425]	<213> 人工
[0426]	<220>
[0427]	<223> 合成
[0428]	<400> 7



[0468]	Leu Phe Asn Ile Gly Gly Ser Gly Cys Leu Gly Leu Asn Phe Ser Ala
[0469]	85 90 95
[0470]	Pro Glu Gln Pro Leu Ser Leu Tyr Glu Cys Asp Ser Thr Leu Val Ser
[0471]	100 105 110
[0472]	Leu Arg Trp Arg Cys Asn Arg Lys Met Ile Thr Gly Pro Leu Gln Tyr
[0473]	115 120 125
[0474]	Ser Val Gln Val Ala His Asp Asn Thr Val Val Ala Ser Arg Lys Tyr
[0475]	130 135 140
[0476]	Ile His Lys Trp Ile Ser Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Cys Glu
[0477]	145 150 155 160
[0478]	Tyr Leu His Lys Asp Leu His Thr Ile Lys Gly Asn Thr His Gly Met
[0479]	165 170 175
[0480]	Pro Cys Met Phe Pro Phe Gln Tyr Asn His Gln Trp His His Glu Cys
[0481]	180 185 190
[0482]	Thr Arg Glu Gly Arg Glu Asp Asp Leu Leu Trp Cys Ala Thr Thr Ser
[0483]	195 200 205
[0484]	Arg Tyr Glu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp Pro Thr Ser
[0485]	210 215 220
[0486]	Ala Glu Val Gly
[0487]	225
[0488]	<210> 9
[0489]	<211> 367
[0490]	<212> PRT
[0491]	<213> 人工
[0492]	<220>
[0493]	<223> 合成
[0494]	<400> 9
[0495]	Met Leu Leu Ser Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Pro
[0496]	1 5 10 15
[0497]	Arg Gly Cys Ala Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Thr Pro Glu Arg Leu
[0498]	20 25 30
[0499]	Leu Glu Trp Gln Asp Lys Gly Ile Phe Val Ile Gln Ser Glu Ser Leu
[0500]	35 40 45
[0501]	Lys Lys Cys Ile Gln Ala Gly Lys Ser Val Leu Thr Leu Glu Asn Cys
[0502]	50 55 60
[0503]	Lys Gln Ala Asn Lys His Met Leu Trp Lys Trp Val Ser Asn His Gly
[0504]	65 70 75 80
[0505]	Leu Phe Asn Ile Gly Gly Ser Gly Cys Leu Gly Leu Asn Phe Ser Ala
[0506]	85 90 95

[0507]	Pro Glu Gln Pro Leu Ser Leu Tyr Glu Cys Asp Ser Thr Leu Val Ser
[0508]	100 105 110
[0509]	Leu Arg Trp Arg Cys Asn Arg Lys Met Ile Thr Gly Pro Leu Gln Tyr
[0510]	115 120 125
[0511]	Ser Val Gln Val Ala His Asp Asn Thr Val Val Ala Ser Arg Lys Tyr
[0512]	130 135 140
[0513]	Ile His Lys Trp Ile Ser Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Cys Glu
[0514]	145 150 155 160
[0515]	Tyr Leu His Lys Asp Leu His Thr Ile Lys Gly Asn Thr His Gly Met
[0516]	165 170 175
[0517]	Pro Cys Met Phe Pro Phe Gln Tyr Asn His Gln Trp His His Glu Cys
[0518]	180 185 190
[0519]	Thr Arg Glu Gly Arg Glu Asp Asp Leu Leu Trp Cys Ala Thr Thr Ser
[0520]	195 200 205
[0521]	Arg Tyr Glu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp Pro Thr Ser
[0522]	210 215 220
[0523]	Ala Glu Val Gly Cys Asp Thr Ile Trp Glu Lys Asp Leu Asn Ser His
[0524]	225 230 235 240
[0525]	Ile Cys Tyr Gln Phe Asn Leu Leu Ser Ser Leu Ser Trp Ser Glu Ala
[0526]	245 250 255
[0527]	His Ser Ser Cys Gln Met Gln Gly Gly Thr Leu Leu Ser Ile Thr Asp
[0528]	260 265 270
[0529]	Glu Thr Glu Glu Asn Phe Ile Arg Glu His Met Ser Ser Lys Thr Val
[0530]	275 280 285
[0531]	Glu Val Trp Met Gly Leu Asn Gln Leu Asp Glu His Ala Gly Trp Gln
[0532]	290 295 300
[0533]	Trp Ser Asp Gly Thr Pro Leu Asn Tyr Leu Asn Trp Ser Pro Glu Val
[0534]	305 310 315 320
[0535]	Asn Phe Glu Pro Phe Val Glu Asp His Cys Gly Thr Phe Ser Ser Phe
[0536]	325 330 335
[0537]	Met Pro Ser Ala Trp Arg Ser Arg Asp Cys Glu Ser Thr Leu Pro Tyr
[0538]	340 345 350
[0539]	Ile Cys Lys Lys Tyr Leu Asn His Ile Asp His Glu Ile Val Glu
[0540]	355 360 365
[0541]	<210> 10
[0542]	<211> 510
[0543]	<212> PRT
[0544]	<213> 人工
[0545]	<220>

[0546] <223> 合成  
 [0547] <400> 10  
 [0548] Met Leu Leu Ser Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Pro  
 [0549] 1 5 10 15  
 [0550] Arg Gly Cys Ala Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Thr Pro Glu Arg Leu  
 [0551] 20 25 30  
 [0552] Leu Glu Trp Gln Asp Lys Gly Ile Phe Val Ile Gln Ser Glu Ser Leu  
 [0553] 35 40 45  
 [0554] Lys Lys Cys Ile Gln Ala Gly Lys Ser Val Leu Thr Leu Glu Asn Cys  
 [0555] 50 55 60  
 [0556] Lys Gln Ala Asn Lys His Met Leu Trp Lys Trp Val Ser Asn His Gly  
 [0557] 65 70 75 80  
 [0558] Leu Phe Asn Ile Gly Gly Ser Gly Cys Leu Gly Leu Asn Phe Ser Ala  
 [0559] 85 90 95  
 [0560] Pro Glu Gln Pro Leu Ser Leu Tyr Glu Cys Asp Ser Thr Leu Val Ser  
 [0561] 100 105 110  
 [0562] Leu Arg Trp Arg Cys Asn Arg Lys Met Ile Thr Gly Pro Leu Gln Tyr  
 [0563] 115 120 125  
 [0564] Ser Val Gln Val Ala His Asp Asn Thr Val Val Ala Ser Arg Lys Tyr  
 [0565] 130 135 140  
 [0566] Ile His Lys Trp Ile Ser Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Cys Glu  
 [0567] 145 150 155 160  
 [0568] Tyr Leu His Lys Asp Leu His Thr Ile Lys Gly Asn Thr His Gly Met  
 [0569] 165 170 175  
 [0570] Pro Cys Met Phe Pro Phe Gln Tyr Asn His Gln Trp His His Glu Cys  
 [0571] 180 185 190  
 [0572] Thr Arg Glu Gly Arg Glu Asp Asp Leu Leu Trp Cys Ala Thr Thr Ser  
 [0573] 195 200 205  
 [0574] Arg Tyr Glu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp Pro Thr Ser  
 [0575] 210 215 220  
 [0576] Ala Glu Val Gly Cys Asp Thr Ile Trp Glu Lys Asp Leu Asn Ser His  
 [0577] 225 230 235 240  
 [0578] Ile Cys Tyr Gln Phe Asn Leu Leu Ser Ser Leu Ser Trp Ser Glu Ala  
 [0579] 245 250 255  
 [0580] His Ser Ser Cys Gln Met Gln Gly Gly Thr Leu Leu Ser Ile Thr Asp  
 [0581] 260 265 270  
 [0582] Glu Thr Glu Glu Asn Phe Ile Arg Glu His Met Ser Ser Lys Thr Val  
 [0583] 275 280 285  
 [0584] Glu Val Trp Met Gly Leu Asn Gln Leu Asp Glu His Ala Gly Trp Gln

[0585]	290	295	300
[0586]	Trp Ser Asp Gly Thr Pro Leu Asn Tyr Leu Asn Trp Ser Pro Glu Val		
[0587]	305	310	315 320
[0588]	Asn Phe Glu Pro Phe Val Glu Asp His Cys Gly Thr Phe Ser Ser Phe		
[0589]	325	330	335
[0590]	Met Pro Ser Ala Trp Arg Ser Arg Asp Cys Glu Ser Thr Leu Pro Tyr		
[0591]	340	345	350
[0592]	Ile Cys Lys Lys Tyr Leu Asn His Ile Asp His Glu Ile Val Glu Lys		
[0593]	355	360	365
[0594]	Asp Ala Trp Lys Tyr Tyr Ala Thr His Cys Glu Pro Gly Trp Asn Pro		
[0595]	370	375	380
[0596]	Tyr Asn Arg Asn Cys Tyr Lys Leu Gln Lys Glu Glu Lys Thr Trp His		
[0597]	385	390	395 400
[0598]	Glu Ala Leu Arg Ser Cys Gln Ala Asp Asn Ser Ala Leu Ile Asp Ile		
[0599]	405	410	415
[0600]	Thr Ser Leu Ala Glu Val Glu Phe Leu Val Thr Leu Leu Gly Asp Glu		
[0601]	420	425	430
[0602]	Asn Ala Ser Glu Thr Trp Ile Gly Leu Ser Ser Asn Lys Ile Pro Val		
[0603]	435	440	445
[0604]	Ser Phe Glu Trp Ser Asn Asp Ser Ser Val Ile Phe Thr Asn Trp His		
[0605]	450	455	460
[0606]	Thr Leu Glu Pro His Ile Phe Pro Asn Arg Ser Gln Leu Cys Val Ser		
[0607]	465	470	475 480
[0608]	Ala Glu Gln Ser Glu Gly His Trp Lys Val Lys Asn Cys Glu Glu Arg		
[0609]	485	490	495
[0610]	Leu Phe Tyr Ile Cys Lys Lys Ala Gly His Val Leu Ser Asp		
[0611]	500	505	510
[0612]	<210> 11		
[0613]	<211> 651		
[0614]	<212> PRT		
[0615]	<213> 人工		
[0616]	<220>		
[0617]	<223> 合成		
[0618]	<400> 11		
[0619]	Met Leu Leu Ser Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Pro		
[0620]	1	5	10 15
[0621]	Arg Gly Cys Ala Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Thr Pro Glu Arg Leu		
[0622]	20	25	30
[0623]	Leu Glu Trp Gln Asp Lys Gly Ile Phe Val Ile Gln Ser Glu Ser Leu		

[0624]	35	40	45
[0625]	Lys Lys Cys Ile Gln Ala Gly Lys Ser Val Leu Thr Leu Glu Asn Cys		
[0626]	50	55	60
[0627]	Lys Gln Ala Asn Lys His Met Leu Trp Lys Trp Val Ser Asn His Gly		
[0628]	65	70	75
[0629]	Leu Phe Asn Ile Gly Gly Ser Gly Cys Leu Gly Leu Asn Phe Ser Ala		
[0630]	85	90	95
[0631]	Pro Glu Gln Pro Leu Ser Leu Tyr Glu Cys Asp Ser Thr Leu Val Ser		
[0632]	100	105	110
[0633]	Leu Arg Trp Arg Cys Asn Arg Lys Met Ile Thr Gly Pro Leu Gln Tyr		
[0634]	115	120	125
[0635]	Ser Val Gln Val Ala His Asp Asn Thr Val Val Ala Ser Arg Lys Tyr		
[0636]	130	135	140
[0637]	Ile His Lys Trp Ile Ser Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Cys Glu		
[0638]	145	150	155
[0639]	Tyr Leu His Lys Asp Leu His Thr Ile Lys Gly Asn Thr His Gly Met		
[0640]	165	170	175
[0641]	Pro Cys Met Phe Pro Phe Gln Tyr Asn His Gln Trp His His Glu Cys		
[0642]	180	185	190
[0643]	Thr Arg Glu Gly Arg Glu Asp Asp Leu Leu Trp Cys Ala Thr Thr Ser		
[0644]	195	200	205
[0645]	Arg Tyr Glu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp Pro Thr Ser		
[0646]	210	215	220
[0647]	Ala Glu Val Gly Cys Asp Thr Ile Trp Glu Lys Asp Leu Asn Ser His		
[0648]	225	230	235
[0649]	Ile Cys Tyr Gln Phe Asn Leu Leu Ser Ser Leu Ser Trp Ser Glu Ala		
[0650]	245	250	255
[0651]	His Ser Ser Cys Gln Met Gln Gly Gly Thr Leu Leu Ser Ile Thr Asp		
[0652]	260	265	270
[0653]	Glu Thr Glu Glu Asn Phe Ile Arg Glu His Met Ser Ser Lys Thr Val		
[0654]	275	280	285
[0655]	Glu Val Trp Met Gly Leu Asn Gln Leu Asp Glu His Ala Gly Trp Gln		
[0656]	290	295	300
[0657]	Trp Ser Asp Gly Thr Pro Leu Asn Tyr Leu Asn Trp Ser Pro Glu Val		
[0658]	305	310	315
[0659]	Asn Phe Glu Pro Phe Val Glu Asp His Cys Gly Thr Phe Ser Ser Phe		
[0660]	325	330	335
[0661]	Met Pro Ser Ala Trp Arg Ser Arg Asp Cys Glu Ser Thr Leu Pro Tyr		
[0662]	340	345	350

[0663]	Ile Cys Lys Lys Tyr Leu Asn His Ile Asp His Glu Ile Val Glu Lys
[0664]	355 360 365
[0665]	Asp Ala Trp Lys Tyr Tyr Ala Thr His Cys Glu Pro Gly Trp Asn Pro
[0666]	370 375 380
[0667]	Tyr Asn Arg Asn Cys Tyr Lys Leu Gln Lys Glu Glu Lys Thr Trp His
[0668]	385 390 395 400
[0669]	Glu Ala Leu Arg Ser Cys Gln Ala Asp Asn Ser Ala Leu Ile Asp Ile
[0670]	405 410 415
[0671]	Thr Ser Leu Ala Glu Val Glu Phe Leu Val Thr Leu Leu Gly Asp Glu
[0672]	420 425 430
[0673]	Asn Ala Ser Glu Thr Trp Ile Gly Leu Ser Ser Asn Lys Ile Pro Val
[0674]	435 440 445
[0675]	Ser Phe Glu Trp Ser Asn Asp Ser Ser Val Ile Phe Thr Asn Trp His
[0676]	450 455 460
[0677]	Thr Leu Glu Pro His Ile Phe Pro Asn Arg Ser Gln Leu Cys Val Ser
[0678]	465 470 475 480
[0679]	Ala Glu Gln Ser Glu Gly His Trp Lys Val Lys Asn Cys Glu Glu Arg
[0680]	485 490 495
[0681]	Leu Phe Tyr Ile Cys Lys Lys Ala Gly His Val Leu Ser Asp Ala Glu
[0682]	500 505 510
[0683]	Ser Gly Cys Gln Glu Gly Trp Glu Arg His Gly Gly Phe Cys Tyr Lys
[0684]	515 520 525
[0685]	Ile Asp Thr Val Leu Arg Ser Phe Asp Gln Ala Ser Ser Gly Tyr Tyr
[0686]	530 535 540
[0687]	Cys Pro Pro Ala Leu Val Thr Ile Thr Asn Arg Phe Glu Gln Ala Phe
[0688]	545 550 555 560
[0689]	Ile Thr Ser Leu Ile Ser Ser Val Val Lys Met Lys Asp Ser Tyr Phe
[0690]	565 570 575
[0691]	Trp Ile Ala Leu Gln Asp Gln Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Thr Trp Lys
[0692]	580 585 590
[0693]	Pro Val Gly Gln Lys Pro Glu Pro Val Gln Tyr Thr His Trp Asn Thr
[0694]	595 600 605
[0695]	His Gln Pro Arg Tyr Ser Gly Gly Cys Val Ala Met Arg Gly Arg His
[0696]	610 615 620
[0697]	Pro Leu Gly Arg Trp Glu Val Lys His Cys Arg His Phe Lys Ala Met
[0698]	625 630 635 640
[0699]	Ser Leu Cys Lys Gln Pro Val Glu Asn Gln Glu
[0700]	645 650
[0701]	<210> 12

[0702] <211> 805  
 [0703] <212> PRT  
 [0704] <213> 人工  
 [0705] <220>  
 [0706] <223> 合成  
 [0707] <400> 12  
 [0708] Met Leu Leu Ser Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Pro  
 [0709] 1 5 10 15  
 [0710] Arg Gly Cys Ala Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Thr Pro Glu Arg Leu  
 [0711] 20 25 30  
 [0712] Leu Glu Trp Gln Asp Lys Gly Ile Phe Val Ile Gln Ser Glu Ser Leu  
 [0713] 35 40 45  
 [0714] Lys Lys Cys Ile Gln Ala Gly Lys Ser Val Leu Thr Leu Glu Asn Cys  
 [0715] 50 55 60  
 [0716] Lys Gln Ala Asn Lys His Met Leu Trp Lys Trp Val Ser Asn His Gly  
 [0717] 65 70 75 80  
 [0718] Leu Phe Asn Ile Gly Gly Ser Gly Cys Leu Gly Leu Asn Phe Ser Ala  
 [0719] 85 90 95  
 [0720] Pro Glu Gln Pro Leu Ser Leu Tyr Glu Cys Asp Ser Thr Leu Val Ser  
 [0721] 100 105 110  
 [0722] Leu Arg Trp Arg Cys Asn Arg Lys Met Ile Thr Gly Pro Leu Gln Tyr  
 [0723] 115 120 125  
 [0724] Ser Val Gln Val Ala His Asp Asn Thr Val Val Ala Ser Arg Lys Tyr  
 [0725] 130 135 140  
 [0726] Ile His Lys Trp Ile Ser Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Cys Glu  
 [0727] 145 150 155 160  
 [0728] Tyr Leu His Lys Asp Leu His Thr Ile Lys Gly Asn Thr His Gly Met  
 [0729] 165 170 175  
 [0730] Pro Cys Met Phe Pro Phe Gln Tyr Asn His Gln Trp His His Glu Cys  
 [0731] 180 185 190  
 [0732] Thr Arg Glu Gly Arg Glu Asp Asp Leu Leu Trp Cys Ala Thr Thr Ser  
 [0733] 195 200 205  
 [0734] Arg Tyr Glu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp Pro Thr Ser  
 [0735] 210 215 220  
 [0736] Ala Glu Val Gly Cys Asp Thr Ile Trp Glu Lys Asp Leu Asn Ser His  
 [0737] 225 230 235 240  
 [0738] Ile Cys Tyr Gln Phe Asn Leu Leu Ser Ser Leu Ser Trp Ser Glu Ala  
 [0739] 245 250 255  
 [0740] His Ser Ser Cys Gln Met Gln Gly Gly Thr Leu Leu Ser Ile Thr Asp

[0741]		260		265		270										
[0742]	Glu	Thr	Glu	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Glu	His	Met	Ser	Ser	Lys	Thr	Val
[0743]			275					280						285		
[0744]	Glu	Val	Trp	Met	Gly	Leu	Asn	Gln	Leu	Asp	Glu	His	Ala	Gly	Trp	Gln
[0745]		290						295						300		
[0746]	Trp	Ser	Asp	Gly	Thr	Pro	Leu	Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Ser	Pro	Glu	Val
[0747]	305						310					315				320
[0748]	Asn	Phe	Glu	Pro	Phe	Val	Glu	Asp	His	Cys	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe
[0749]					325						330					335
[0750]	Met	Pro	Ser	Ala	Trp	Arg	Ser	Arg	Asp	Cys	Glu	Ser	Thr	Leu	Pro	Tyr
[0751]				340							345					350
[0752]	Ile	Cys	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	His	Ile	Asp	His	Glu	Ile	Val	Glu	Lys
[0753]			355						360							365
[0754]	Asp	Ala	Trp	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Thr	His	Cys	Glu	Pro	Gly	Trp	Asn	Pro
[0755]		370							375							380
[0756]	Tyr	Asn	Arg	Asn	Cys	Tyr	Lys	Leu	Gln	Lys	Glu	Glu	Lys	Thr	Trp	His
[0757]	385						390						395			400
[0758]	Glu	Ala	Leu	Arg	Ser	Cys	Gln	Ala	Asp	Asn	Ser	Ala	Leu	Ile	Asp	Ile
[0759]					405						410					415
[0760]	Thr	Ser	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Phe	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Gly	Asp	Glu
[0761]				420												430
[0762]	Asn	Ala	Ser	Glu	Thr	Trp	Ile	Gly	Leu	Ser	Ser	Asn	Lys	Ile	Pro	Val
[0763]			435													445
[0764]	Ser	Phe	Glu	Trp	Ser	Asn	Asp	Ser	Ser	Val	Ile	Phe	Thr	Asn	Trp	His
[0765]		450														460
[0766]	Thr	Leu	Glu	Pro	His	Ile	Phe	Pro	Asn	Arg	Ser	Gln	Leu	Cys	Val	Ser
[0767]	465															480
[0768]	Ala	Glu	Gln	Ser	Glu	Gly	His	Trp	Lys	Val	Lys	Asn	Cys	Glu	Glu	Arg
[0769]					485											495
[0770]	Leu	Phe	Tyr	Ile	Cys	Lys	Lys	Ala	Gly	His	Val	Leu	Ser	Asp	Ala	Glu
[0771]				500												510
[0772]	Ser	Gly	Cys	Gln	Glu	Gly	Trp	Glu	Arg	His	Gly	Gly	Phe	Cys	Tyr	Lys
[0773]				515												525
[0774]	Ile	Asp	Thr	Val	Leu	Arg	Ser	Phe	Asp	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr
[0775]		530														540
[0776]	Cys	Pro	Pro	Ala	Leu	Val	Thr	Ile	Thr	Asn	Arg	Phe	Glu	Gln	Ala	Phe
[0777]	545															560
[0778]	Ile	Thr	Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Val	Val	Lys	Met	Lys	Asp	Ser	Tyr	Phe
[0779]					565											575

[0780]	Trp Ile Ala Leu Gln Asp Gln Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Thr Trp Lys
[0781]	580 585 590
[0782]	Pro Val Gly Gln Lys Pro Glu Pro Val Gln Tyr Thr His Trp Asn Thr
[0783]	595 600 605
[0784]	His Gln Pro Arg Tyr Ser Gly Gly Cys Val Ala Met Arg Gly Arg His
[0785]	610 615 620
[0786]	Pro Leu Gly Arg Trp Glu Val Lys His Cys Arg His Phe Lys Ala Met
[0787]	625 630 635 640
[0788]	Ser Leu Cys Lys Gln Pro Val Glu Asn Gln Glu Lys Ala Glu Tyr Glu
[0789]	645 650 655
[0790]	Glu Arg Trp Pro Phe His Pro Cys Tyr Leu Asp Trp Glu Ser Glu Pro
[0791]	660 665 670
[0792]	Gly Leu Ala Ser Cys Phe Lys Val Phe His Ser Glu Lys Val Leu Met
[0793]	675 680 685
[0794]	Lys Arg Thr Trp Arg Glu Ala Glu Ala Phe Cys Glu Glu Phe Gly Ala
[0795]	690 695 700
[0796]	His Leu Ala Ser Phe Ala His Ile Glu Glu Glu Asn Phe Val Asn Glu
[0797]	705 710 715 720
[0798]	Leu Leu His Ser Lys Phe Asn Trp Thr Glu Glu Arg Gln Phe Trp Ile
[0799]	725 730 735
[0800]	Gly Phe Asn Lys Arg Asn Pro Leu Asn Ala Gly Ser Trp Glu Trp Ser
[0801]	740 745 750
[0802]	Asp Arg Thr Pro Val Val Ser Ser Phe Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gly
[0803]	755 760 765
[0804]	Glu Asp Ala Arg Asn Cys Ala Val Tyr Lys Ala Asn Lys Thr Leu Leu
[0805]	770 775 780
[0806]	Pro Leu His Cys Gly Ser Lys Arg Glu Trp Ile Cys Lys Ile Pro Arg
[0807]	785 790 795 800
[0808]	Asp Val Lys Pro Lys
[0809]	805
[0810]	<210> 13
[0811]	<211> 139
[0812]	<212> PRT
[0813]	<213> 人工
[0814]	<220>
[0815]	<223> 合成
[0816]	<400> 13
[0817]	Cys Asp Thr Ile Trp Glu Lys Asp Leu Asn Ser His Ile Cys Tyr Gln
[0818]	1 5 10 15

[0819]	Phe Asn Leu Leu Ser Ser Leu Ser Trp Ser Glu Ala His Ser Ser Cys
[0820]	20 25 30
[0821]	Gln Met Gln Gly Gly Thr Leu Leu Ser Ile Thr Asp Glu Thr Glu Glu
[0822]	35 40 45
[0823]	Asn Phe Ile Arg Glu His Met Ser Ser Lys Thr Val Glu Val Trp Met
[0824]	50 55 60
[0825]	Gly Leu Asn Gln Leu Asp Glu His Ala Gly Trp Gln Trp Ser Asp Gly
[0826]	65 70 75 80
[0827]	Thr Pro Leu Asn Tyr Leu Asn Trp Ser Pro Glu Val Asn Phe Glu Pro
[0828]	85 90 95
[0829]	Phe Val Glu Asp His Cys Gly Thr Phe Ser Ser Phe Met Pro Ser Ala
[0830]	100 105 110
[0831]	Trp Arg Ser Arg Asp Cys Glu Ser Thr Leu Pro Tyr Ile Cys Lys Lys
[0832]	115 120 125
[0833]	Tyr Leu Asn His Ile Asp His Glu Ile Val Glu
[0834]	130 135
[0835]	<210> 14
[0836]	<211> 1462
[0837]	<212> PRT
[0838]	<213> 人工
[0839]	<220>
[0840]	<223> 合成
[0841]	<400> 14
[0842]	Met Leu Leu Ser Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Pro
[0843]	1 5 10 15
[0844]	Arg Gly Cys Ala Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Thr Pro Glu Arg Leu
[0845]	20 25 30
[0846]	Leu Glu Trp Gln Asp Lys Gly Ile Phe Val Ile Gln Ser Glu Ser Leu
[0847]	35 40 45
[0848]	Lys Lys Cys Ile Gln Ala Gly Lys Ser Val Leu Thr Leu Glu Asn Cys
[0849]	50 55 60
[0850]	Lys Gln Ala Asn Lys His Met Leu Trp Lys Trp Val Ser Asn His Gly
[0851]	65 70 75 80
[0852]	Leu Phe Asn Ile Gly Gly Ser Gly Cys Leu Gly Leu Asn Phe Ser Ala
[0853]	85 90 95
[0854]	Pro Glu Gln Pro Leu Ser Leu Tyr Glu Cys Asp Ser Thr Leu Val Ser
[0855]	100 105 110
[0856]	Leu Arg Trp Arg Cys Asn Arg Lys Met Ile Thr Gly Pro Leu Gln Tyr
[0857]	115 120 125

[0858]	Ser Val Gln Val Ala His Asp Asn Thr Val Val Ala Ser Arg Lys Tyr
[0859]	130 135 140
[0860]	Ile His Lys Trp Ile Ser Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Cys Glu
[0861]	145 150 155 160
[0862]	Tyr Leu His Lys Asp Leu His Thr Ile Lys Gly Asn Thr His Gly Met
[0863]	165 170 175
[0864]	Pro Cys Met Phe Pro Phe Gln Tyr Asn His Gln Trp His His Glu Cys
[0865]	180 185 190
[0866]	Thr Arg Glu Gly Arg Glu Asp Asp Leu Leu Trp Cys Ala Thr Thr Ser
[0867]	195 200 205
[0868]	Arg Tyr Glu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp Pro Thr Ser
[0869]	210 215 220
[0870]	Ala Glu Val Gly Cys Asp Thr Ile Trp Glu Lys Asp Leu Asn Ser His
[0871]	225 230 235 240
[0872]	Ile Cys Tyr Gln Phe Asn Leu Leu Ser Ser Leu Ser Trp Ser Glu Ala
[0873]	245 250 255
[0874]	His Ser Ser Gln Met Gln Gly Gly Thr Leu Leu Ser Ile Thr Asp Glu
[0875]	260 265 270
[0876]	Thr Glu Glu Asn Phe Ile Arg Glu His Met Ser Ser Lys Thr Val Glu
[0877]	275 280 285
[0878]	Val Trp Met Gly Leu Asn Gln Leu Asp Glu His Ala Gly Trp Gln Trp
[0879]	290 295 300
[0880]	Ser Asp Gly Thr Pro Leu Asn Tyr Leu Asn Trp Ser Pro Glu Val Asn
[0881]	305 310 315 320
[0882]	Phe Glu Pro Phe Val Glu Asp His Cys Gly Thr Phe Ser Ser Phe Met
[0883]	325 330 335
[0884]	Pro Ser Ala Trp Arg Ser Arg Asp Cys Glu Ser Thr Leu Pro Tyr Ile
[0885]	340 345 350
[0886]	Cys Lys Lys Tyr Leu Asn His Ile Asp His Glu Ile Val Glu Lys Asp
[0887]	355 360 365
[0888]	Ala Trp Lys Tyr Tyr Ala Thr His Cys Glu Pro Gly Trp Asn Pro Tyr
[0889]	370 375 380
[0890]	Asn Arg Asn Cys Tyr Lys Leu Gln Lys Glu Glu Lys Thr Trp His Glu
[0891]	385 390 395 400
[0892]	Ala Leu Arg Ser Cys Gln Ala Asp Asn Ser Ala Leu Ile Asp Ile Thr
[0893]	405 410 415
[0894]	Ser Leu Ala Glu Val Glu Phe Leu Val Thr Leu Leu Gly Asp Glu Asn
[0895]	420 425 430
[0896]	Ala Ser Glu Thr Trp Ile Gly Leu Ser Ser Asn Lys Ile Pro Val Ser

[0897]	435	440	445
[0898]	Phe Glu Trp Ser Asn Asp Ser Ser Val Ile Phe Thr Asn Trp His Thr		
[0899]	450	455	460
[0900]	Leu Glu Pro His Ile Phe Pro Asn Arg Ser Gln Leu Cys Val Ser Ala		
[0901]	465	470	475
[0902]	Glu Gln Ser Glu Gly His Trp Lys Val Lys Asn Cys Glu Glu Arg Leu		
[0903]	485	490	495
[0904]	Phe Tyr Ile Cys Lys Lys Ala Gly His Val Leu Ser Asp Ala Glu Ser		
[0905]	500	505	510
[0906]	Gly Cys Gln Glu Gly Trp Glu Arg His Gly Gly Phe Cys Tyr Lys Ile		
[0907]	515	520	525
[0908]	Asp Thr Val Leu Arg Ser Phe Asp Gln Ala Ser Ser Gly Tyr Tyr Cys		
[0909]	530	535	540
[0910]	Pro Pro Ala Leu Val Thr Ile Thr Asn Arg Phe Glu Gln Ala Phe Ile		
[0911]	545	550	555
[0912]	Thr Ser Leu Ile Ser Ser Val Val Lys Met Lys Asp Ser Tyr Phe Trp		
[0913]	565	570	575
[0914]	Ile Ala Leu Gln Asp Gln Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Thr Trp Lys Pro		
[0915]	580	585	590
[0916]	Val Gly Gln Lys Pro Glu Pro Val Gln Tyr Thr His Trp Asn Thr His		
[0917]	595	600	605
[0918]	Gln Pro Arg Tyr Ser Gly Gly Cys Val Ala Met Arg Gly Arg His Pro		
[0919]	610	615	620
[0920]	Leu Gly Arg Trp Glu Val Lys His Cys Arg His Phe Lys Ala Met Ser		
[0921]	625	630	635
[0922]	Leu Cys Lys Gln Pro Val Glu Asn Gln Glu Lys Ala Glu Tyr Glu Glu		
[0923]	645	650	655
[0924]	Arg Trp Pro Phe His Pro Cys Tyr Leu Asp Trp Glu Ser Glu Pro Gly		
[0925]	660	665	670
[0926]	Leu Ala Ser Cys Phe Lys Val Phe His Ser Glu Lys Val Leu Met Lys		
[0927]	675	680	685
[0928]	Arg Thr Trp Arg Glu Ala Glu Ala Phe Cys Glu Glu Phe Gly Ala His		
[0929]	690	695	700
[0930]	Leu Ala Ser Phe Ala His Ile Glu Glu Glu Asn Phe Val Asn Glu Leu		
[0931]	705	710	715
[0932]	Leu His Ser Lys Phe Asn Trp Thr Glu Glu Arg Gln Phe Trp Ile Gly		
[0933]	725	730	735
[0934]	Phe Asn Lys Arg Asn Pro Leu Asn Ala Gly Ser Trp Glu Trp Ser Asp		
[0935]	740	745	750

[0936]	Arg Thr Pro Val Val Ser Ser Phe Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gly Glu
[0937]	755 760 765
[0938]	Asp Ala Arg Asn Cys Ala Val Tyr Lys Ala Asn Lys Thr Leu Leu Pro
[0939]	770 775 780
[0940]	Leu His Cys Gly Ser Lys Arg Glu Trp Ile Cys Lys Ile Pro Arg Asp
[0941]	785 790 795 800
[0942]	Val Lys Pro Lys Ile Pro Phe Trp Tyr Gln Tyr Asp Val Pro Trp Leu
[0943]	805 810 815
[0944]	Phe Tyr Gln Asp Ala Glu Tyr Leu Phe His Thr Phe Ala Ser Glu Trp
[0945]	820 825 830
[0946]	Leu Asn Phe Glu Phe Val Cys Ser Trp Leu His Ser Asp Leu Leu Thr
[0947]	835 840 845
[0948]	Ile His Ser Ala His Glu Gln Glu Phe Ile His Ser Lys Ile Lys Ala
[0949]	850 855 860
[0950]	Leu Ser Lys Tyr Gly Ala Ser Trp Trp Ile Gly Leu Gln Glu Glu Arg
[0951]	865 870 875 880
[0952]	Ala Asn Asp Glu Phe Arg Trp Arg Asp Gly Thr Pro Val Ile Tyr Gln
[0953]	885 890 895
[0954]	Asn Trp Asp Thr Gly Arg Glu Arg Thr Val Asn Asn Gln Ser Gln Arg
[0955]	900 905 910
[0956]	Cys Gly Phe Ile Ser Ser Ile Thr Gly Leu Trp Gly Ser Glu Glu Cys
[0957]	915 920 925
[0958]	Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Cys Lys Arg Lys Lys Val Trp Leu Ile
[0959]	930 935 940
[0960]	Glu Lys Lys Lys Asp Thr Pro Lys Gln His Gly Thr Cys Pro Lys Gly
[0961]	945 950 955 960
[0962]	Trp Leu Tyr Phe Asn Tyr Lys Cys Leu Leu Leu Asn Ile Pro Lys Asp
[0963]	965 970 975
[0964]	Pro Ser Ser Trp Lys Asn Trp Thr His Ala Gln His Phe Cys Ala Glu
[0965]	980 985 990
[0966]	Glu Gly Gly Thr Leu Val Ala Ile Glu Ser Glu Val Glu Gln Ala Phe
[0967]	995 1000 1005
[0968]	Ile Thr Met Asn Leu Phe Gly Gln Thr Thr Ser Val Trp Ile Gly
[0969]	1010 1015 1020
[0970]	Leu Gln Asn Asp Asp Tyr Glu Thr Trp Leu Asn Gly Lys Pro Val
[0971]	1025 1030 1035
[0972]	Val Tyr Ser Asn Trp Ser Pro Phe Asp Ile Ile Asn Ile Pro Ser
[0973]	1040 1045 1050
[0974]	His Asn Thr Thr Glu Val Gln Lys His Ile Pro Leu Cys Ala Leu

[0975]	1055	1060	1065
[0976]	Leu Ser Ser Asn Pro Asn Phe His Phe Thr Gly Lys Trp Tyr Phe		
[0977]	1070	1075	1080
[0978]	Glu Asp Cys Gly Lys Glu Gly Tyr Gly Phe Val Cys Glu Lys Met		
[0979]	1085	1090	1095
[0980]	Gln Asp Thr Ser Gly His Gly Val Asn Thr Ser Asp Met Tyr Pro		
[0981]	1100	1105	1110
[0982]	Met Pro Asn Thr Leu Glu Tyr Gly Asn Arg Thr Tyr Lys Ile Ile		
[0983]	1115	1120	1125
[0984]	Asn Ala Asn Met Thr Trp Tyr Ala Ala Ile Lys Thr Cys Leu Met		
[0985]	1130	1135	1140
[0986]	His Lys Ala Gln Leu Val Ser Ile Thr Asp Gln Tyr His Gln Ser		
[0987]	1145	1150	1155
[0988]	Phe Leu Thr Val Val Leu Asn Arg Leu Gly Tyr Ala His Trp Ile		
[0989]	1160	1165	1170
[0990]	Gly Leu Phe Thr Thr Asp Asn Gly Leu Asn Phe Asp Trp Ser Asp		
[0991]	1175	1180	1185
[0992]	Gly Thr Lys Ser Ser Phe Thr Phe Trp Lys Asp Glu Glu Ser Ser		
[0993]	1190	1195	1200
[0994]	Leu Leu Gly Asp Cys Val Phe Ala Asp Ser Asn Gly Arg Trp His		
[0995]	1205	1210	1215
[0996]	Ser Thr Ala Cys Glu Ser Phe Leu Gln Gly Ala Ile Cys His Val		
[0997]	1220	1225	1230
[0998]	Pro Pro Glu Thr Arg Gln Ser Glu His Pro Glu Leu Cys Ser Glu		
[0999]	1235	1240	1245
[1000]	Thr Ser Ile Pro Trp Ile Lys Phe Lys Ser Asn Cys Tyr Ser Phe		
[1001]	1250	1255	1260
[1002]	Ser Thr Val Leu Asp Ser Met Ser Phe Glu Ala Ala His Glu Phe		
[1003]	1265	1270	1275
[1004]	Cys Lys Lys Glu Gly Ser Asn Leu Leu Thr Ile Lys Asp Glu Ala		
[1005]	1280	1285	1290
[1006]	Glu Asn Ala Phe Leu Leu Glu Glu Leu Phe Ala Phe Gly Ser Ser		
[1007]	1295	1300	1305
[1008]	Val Gln Met Val Trp Leu Asn Ala Gln Phe Asp Gly Asn Asn Glu		
[1009]	1310	1315	1320
[1010]	Thr Ile Lys Trp Phe Asp Gly Thr Pro Thr Asp Gln Ser Asn Trp		
[1011]	1325	1330	1335
[1012]	Gly Ile Arg Lys Pro Asp Thr Asp Tyr Phe Lys Pro His His Cys		
[1013]	1340	1345	1350

[1014]	Val Ala Leu Arg Ile Pro Glu Gly Leu Trp Gln Leu Ser Pro Cys
[1015]	1355 1360 1365
[1016]	Gln Glu Lys Lys Gly Phe Ile Cys Lys Met Glu Ala Asp Ile His
[1017]	1370 1375 1380
[1018]	Thr Ala Glu Ala Leu Pro Glu Lys Gly Pro Ser His Ser Ile Ile
[1019]	1385 1390 1395
[1020]	Pro Leu Ala Val Val Leu Thr Leu Ile Val Ile Val Ala Ile Cys
[1021]	1400 1405 1410
[1022]	Thr Leu Ser Phe Cys Ile Tyr Lys His Asn Gly Gly Phe Phe Arg
[1023]	1415 1420 1425
[1024]	Arg Leu Ala Gly Phe Arg Asn Pro Tyr Tyr Pro Ala Thr Asn Phe
[1025]	1430 1435 1440
[1026]	Ser Thr Val Tyr Leu Glu Glu Asn Ile Leu Ile Ser Asp Leu Glu
[1027]	1445 1450 1455
[1028]	Lys Ser Asp Gln
[1029]	1460
[1030]	<210> 15
[1031]	<211> 272
[1032]	<212> PRT
[1033]	<213> 人工
[1034]	<220>
[1035]	<223> 合成
[1036]	<400> 15
[1037]	Met Asp Ser Tyr Leu Leu Met Trp Gly Leu Leu Thr Phe Ile Met Val
[1038]	1 5 10 15
[1039]	Pro Gly Cys Gln Ala Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro
[1040]	20 25 30
[1041]	His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn
[1042]	35 40 45
[1043]	Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr
[1044]	50 55 60
[1045]	Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys
[1046]	65 70 75 80
[1047]	Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro
[1048]	85 90 95
[1049]	Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro
[1050]	100 105 110
[1051]	Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro
[1052]	115 120 125

[1053]	Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val
[1054]	130 135 140
[1055]	Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His
[1056]	145 150 155 160
[1057]	Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg
[1058]	165 170 175
[1059]	Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln
[1060]	180 185 190
[1061]	Phe Pro Gly Glu Glu Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu
[1062]	195 200 205
[1063]	Ser Glu Thr Ser Cys Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr
[1064]	210 215 220
[1065]	Glu Met Ala Ala Thr Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln
[1066]	225 230 235 240
[1067]	Val Ala Val Ala Gly Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu
[1068]	245 250 255
[1069]	Ser Gly Leu Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile
[1070]	260 265 270
[1071]	<210> 16
[1072]	<211> 336
[1073]	<212> PRT
[1074]	<213> 人工
[1075]	<220>
[1076]	<223> 合成
[1077]	<400> 16
[1078]	Glu Trp Ile Lys Phe Ala Ala Ala Cys Arg Glu Gly Glu Asp Asn Ser
[1079]	1 5 10 15
[1080]	Lys Arg Asn Pro Ile Ala Lys Ile His Ser Asp Cys Ala Ala Asn Gln
[1081]	20 25 30
[1082]	Gln Val Thr Tyr Arg Ile Ser Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro Tyr
[1083]	35 40 45
[1084]	Gly Ile Phe Val Ile Asn Gln Lys Thr Gly Glu Ile Asn Ile Thr Ser
[1085]	50 55 60
[1086]	Ile Val Asp Arg Glu Val Thr Pro Phe Phe Ile Ile Tyr Cys Arg Ala
[1087]	65 70 75 80
[1088]	Leu Asn Ser Met Gly Gln Asp Leu Glu Arg Pro Leu Glu Leu Arg Val
[1089]	85 90 95
[1090]	Arg Val Leu Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Val Phe Ser Met Ala Thr
[1091]	100 105 110

[1092]	Phe Ala Gly Gln Ile Glu Glu Asn Ser Asn Ala Asn Thr Leu Val Met
[1093]	115 120 125
[1094]	Ile Leu Asn Ala Thr Asp Ala Asp Glu Pro Asn Asn Leu Asn Ser Lys
[1095]	130 135 140
[1096]	Ile Ala Phe Lys Ile Ile Arg Gln Glu Pro Ser Asp Ser Pro Met Phe
[1097]	145 150 155 160
[1098]	Ile Ile Asn Arg Asn Thr Gly Glu Ile Arg Thr Met Asn Asn Phe Leu
[1099]	165 170 175
[1100]	Asp Arg Glu Gln Tyr Gly Gln Tyr Ala Leu Ala Val Arg Gly Ser Asp
[1101]	180 185 190
[1102]	Arg Asp Gly Gly Ala Asp Gly Met Ser Ala Glu Cys Glu Cys Asn Ile
[1103]	195 200 205
[1104]	Lys Ile Leu Asp Val Asn Asp Asn Ile Pro Tyr Met Glu Gln Ser Ser
[1105]	210 215 220
[1106]	Tyr Thr Ile Glu Ile Gln Glu Asn Thr Leu Asn Ser Asn Leu Leu Glu
[1107]	225 230 235 240
[1108]	Ile Arg Val Ile Asp Leu Asp Glu Glu Phe Ser Ala Asn Trp Met Ala
[1109]	245 250 255
[1110]	Val Ile Phe Phe Ile Ser Gly Asn Glu Gly Asn Trp Phe Glu Ile Glu
[1111]	260 265 270
[1112]	Met Asn Glu Arg Thr Asn Val Gly Ile Leu Lys Val Val Lys Pro Leu
[1113]	275 280 285
[1114]	Asp Tyr Glu Ala Met Gln Ser Leu Gln Leu Ser Ile Gly Val Arg Asn
[1115]	290 295 300
[1116]	Lys Ala Glu Phe His His Ser Ile Met Ser Gln Tyr Lys Leu Lys Ala
[1117]	305 310 315 320
[1118]	Ser Ala Ile Ser Val Thr Val Leu Asn Val Ile Glu Gly Pro Val Phe
[1119]	325 330 335
[1120]	<210> 17
[1121]	<211> 450
[1122]	<212> PRT
[1123]	<213> 人工
[1124]	<220>
[1125]	<223> 合成
[1126]	<400> 17
[1127]	Glu Trp Val Lys Phe Ala Lys Pro Cys Arg Glu Gly Glu Asp Asn Ser
[1128]	1 5 10 15
[1129]	Lys Arg Asn Pro Ile Ala Lys Ile Thr Ser Asp Tyr Gln Ala Thr Gln
[1130]	20 25 30

[1131]	Lys Ile Thr Tyr Arg Ile Ser Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro Phe
[1132]	35 40 45
[1133]	Gly Ile Phe Val Val Asp Lys Asn Thr Gly Asp Ile Asn Ile Thr Ala
[1134]	50 55 60
[1135]	Ile Val Asp Arg Glu Glu Thr Pro Ser Phe Leu Ile Thr Cys Arg Ala
[1136]	65 70 75 80
[1137]	Leu Asn Ala Gln Gly Leu Asp Val Glu Lys Pro Leu Ile Leu Thr Val
[1138]	85 90 95
[1139]	Lys Ile Leu Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Val Phe Ser Gln Gln Ile
[1140]	100 105 110
[1141]	Phe Met Gly Glu Ile Glu Glu Asn Ser Ala Ser Asn Ser Leu Val Met
[1142]	115 120 125
[1143]	Ile Leu Asn Ala Thr Asp Ala Asp Glu Pro Asn His Leu Asn Ser Lys
[1144]	130 135 140
[1145]	Ile Ala Phe Lys Ile Val Ser Gln Glu Pro Ala Gly Thr Pro Met Phe
[1146]	145 150 155 160
[1147]	Leu Leu Ser Arg Asn Thr Gly Glu Val Arg Thr Leu Thr Asn Ser Leu
[1148]	165 170 175
[1149]	Asp Arg Glu Gln Ala Ser Ser Tyr Arg Leu Val Val Ser Gly Ala Asp
[1150]	180 185 190
[1151]	Lys Asp Gly Glu Gly Leu Ser Thr Gln Cys Glu Cys Asn Ile Lys Val
[1152]	195 200 205
[1153]	Lys Asp Val Asn Asp Asn Phe Pro Met Phe Arg Asp Ser Gln Tyr Ser
[1154]	210 215 220
[1155]	Ala Arg Ile Glu Glu Asn Ile Leu Ser Ser Glu Leu Leu Arg Phe Gln
[1156]	225 230 235 240
[1157]	Val Thr Asp Leu Asp Glu Glu Tyr Thr Asp Asn Trp Leu Ala Val Tyr
[1158]	245 250 255
[1159]	Phe Phe Thr Ser Gly Asn Glu Gly Asn Trp Phe Glu Ile Gln Thr Asp
[1160]	260 265 270
[1161]	Pro Arg Thr Asn Glu Gly Ile Leu Lys Val Val Lys Ala Leu Asp Tyr
[1162]	275 280 285
[1163]	Glu Gln Leu Gln Ser Val Lys Leu Ser Ile Ala Val Lys Asn Lys Ala
[1164]	290 295 300
[1165]	Glu Phe His Gln Ser Val Ile Ser Arg Tyr Arg Val Gln Ser Thr Pro
[1166]	305 310 315 320
[1167]	Val Thr Ile Gln Val Ile Asn Val Arg Glu Gly Ile Ala Phe Arg Pro
[1168]	325 330 335
[1169]	Ala Ser Lys Thr Phe Thr Val Gln Lys Gly Ile Ser Ser Lys Lys Leu

[1170]		340		345		350											
[1171]	Val	Asp	Tyr	Ile	Leu	Gly	Thr	Tyr	Gln	Ala	Ile	Asp	Glu	Asp	Thr	Asn	
[1172]		355		360		365											
[1173]	Lys	Ala	Ala	Ser	Asn	Val	Lys	Tyr	Val	Met	Gly	Arg	Asn	Asp	Gly	Gly	
[1174]		370		375		380											
[1175]	Tyr	Leu	Met	Ile	Asp	Ser	Lys	Thr	Ala	Glu	Ile	Lys	Phe	Val	Lys	Asn	
[1176]	385			390		395										400	
[1177]	Met	Asn	Arg	Asp	Ser	Thr	Phe	Ile	Val	Asn	Lys	Thr	Ile	Thr	Ala	Glu	
[1178]				405		410										415	
[1179]	Val	Leu	Ala	Ile	Asp	Glu	Tyr	Thr	Gly	Lys	Thr	Ser	Thr	Gly	Thr	Val	
[1180]				420		425										430	
[1181]	Tyr	Val	Arg	Val	Pro	Asp	Phe	Asn	Asp	Asn	Cys	Pro	Thr	Ala	Val	Leu	
[1182]				435		440										445	
[1183]	Glu	Lys															
[1184]				450													

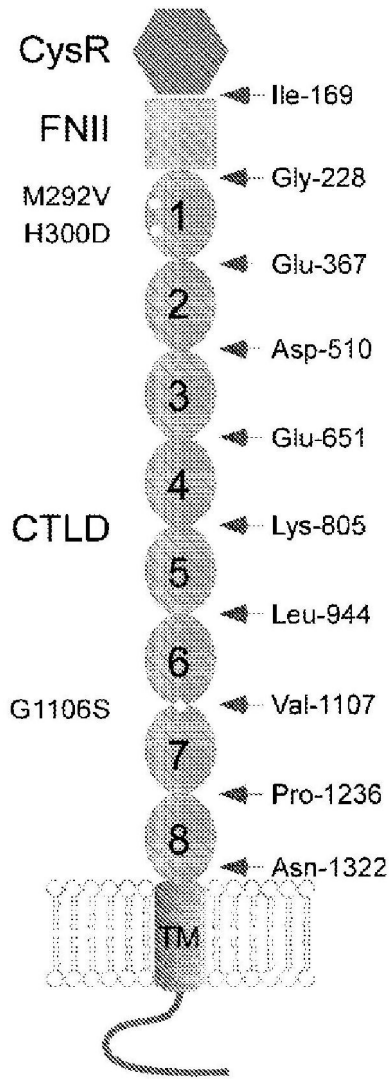


图1

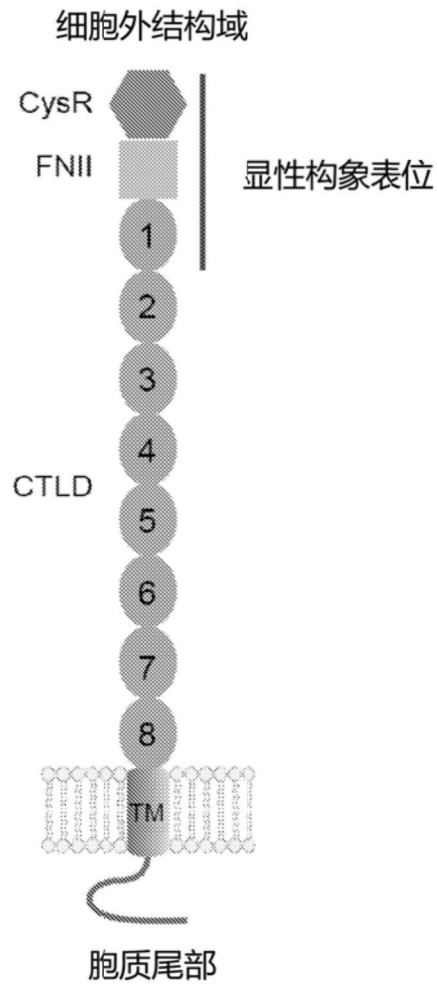


图2

B 细胞中的抗体产生

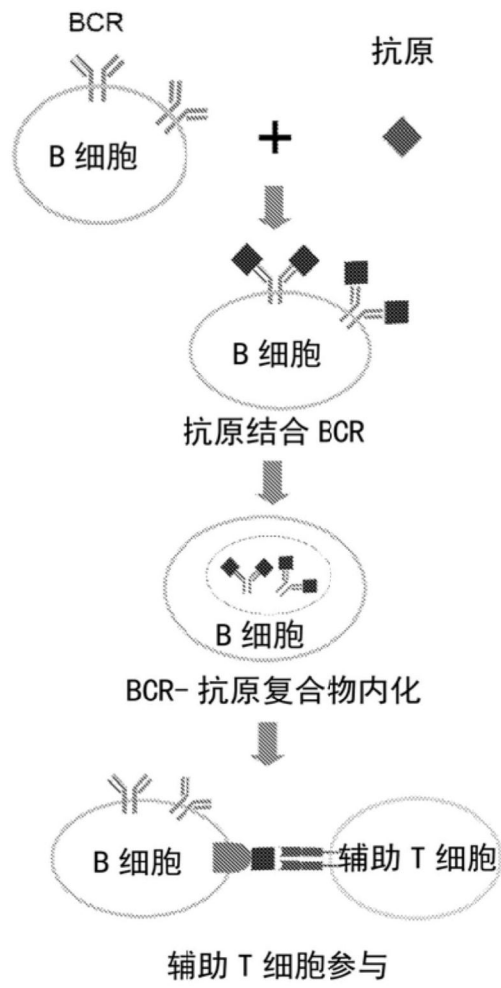


图3

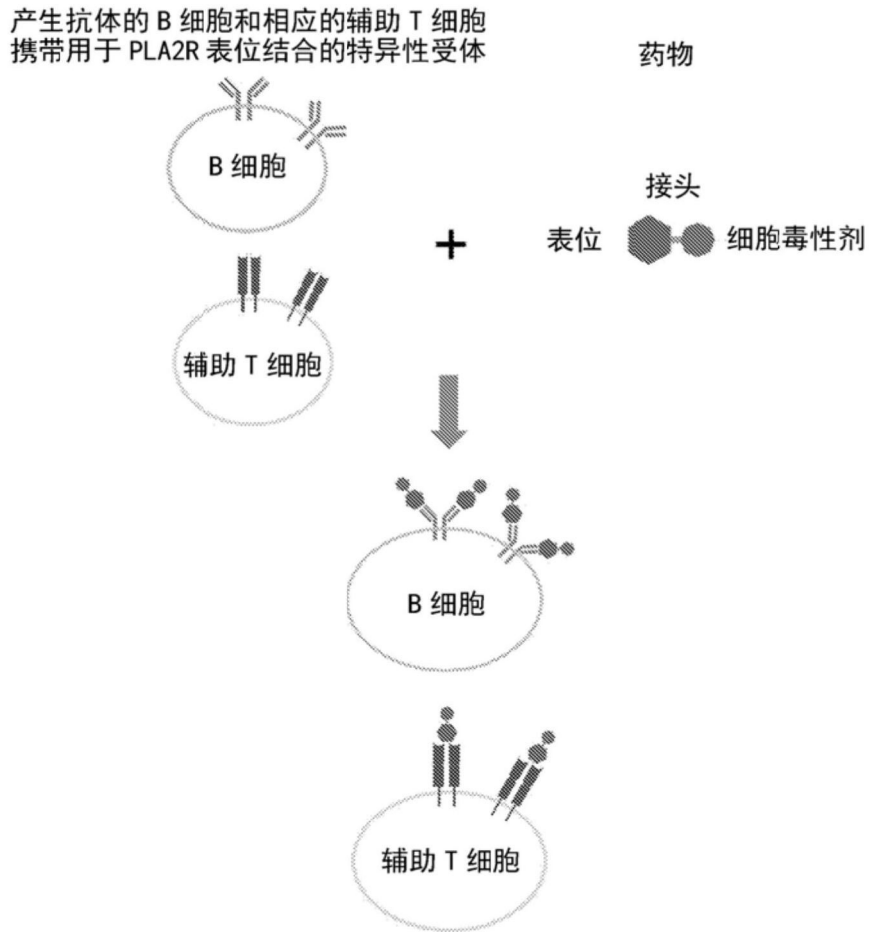


图4

B 细胞

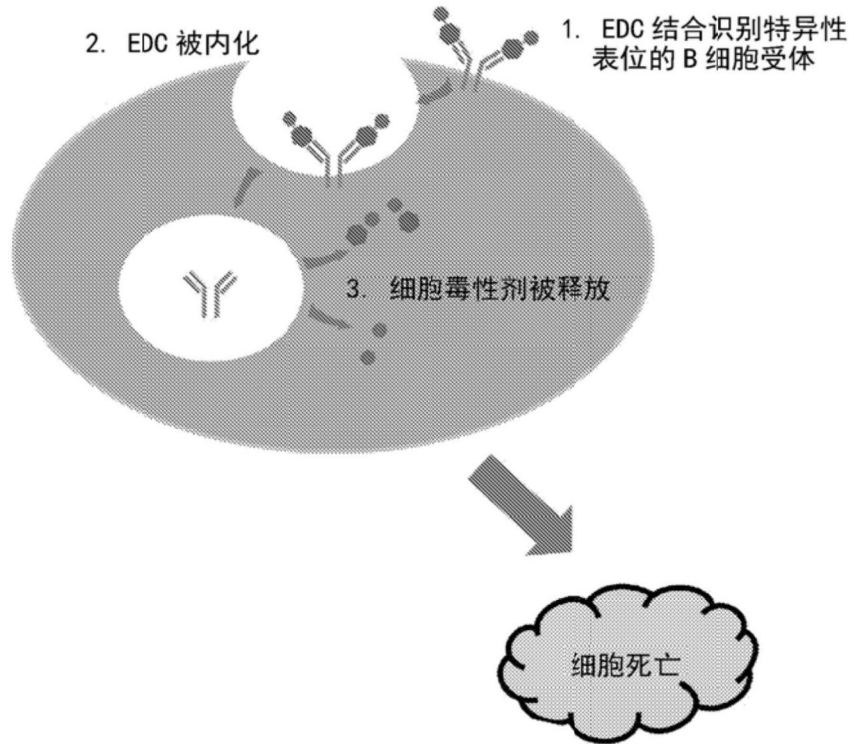


图5

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKCCI  
 QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP  
 LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS  
 YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMPFQYNHQWHHECTREGRE  
 DDLLWCATTSRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL  
 LSSLWSSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ  
 LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS  
 RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLO  
 KEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLGDNASETWIGLSSN  
 KIPVSFEWSNDSSVIFTNWHTLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNC  
 EERLFYICKKAGHVLSDAESGCQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSG  
 YYCPPALVTITNRFEQAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWP  
 VGQKPEPVQYTHWNTHQPRYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKA  
 MSLCKQPVENQEKAIEEER (SEQ ID NO: 1)

图6

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKCCI  
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP  
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS  
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFQYNHQWHHECTREGRE  
DDLLWCATTSRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL  
LSSLWSSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ  
LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS  
RDCESTLPYICKKYLNHIDHE (SEQ ID NO: 2)

图7

IVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLQKEEKTWHEALRSCQADNSA  
LIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSNKIPVSFEWSNDSSVIFTNWH  
TLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNCEERLFYICKKAGHVLSDAESG  
CQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSGYCPCPALVTITNRFEQAFITSLI  
SSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKPVGQKPEPVQYTHWNTHQPR  
YSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKAMSLCKQPVENQEKA EYEER  
(SEQ ID NO: 3)

图8

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI  
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP  
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS  
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFQYNHQQWHHECTREGRE  
DDLLWCATTSRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL  
LSSLSWSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ  
LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS  
RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLQ  
KEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSN  
KIPVSFEWSNDSSVIFTNWHTLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNC  
EERLFYICKKAGHVLSDAESGCQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSG  
YYCPPALVTITNRFEQAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKP  
VGQKPEPVQYTHWNTHQPRYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKA  
MSLCKQPVENQEKA EYEERWPFHPCYLDWESEPLASC FKVHSEKVL  
MKRTWREAEAFCEEFGAHLASF AHIEEENFVNELLH SKFNWTEERQFWI  
GFNKRNPLNAGSWEWSDRTPVSSFLDNTYFGEDARNCAVYKANKTLL  
PLHCGSKREWICKIPRDVKPK (SEQ ID NO: 4)

图9

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI  
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP  
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS  
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFQYNHQQWHHECTREGRE  
DDLLWCATTSRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL  
LSSLSWSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ  
LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS  
RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVE (SEQ ID NO: 5)

图10

KDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLQKEEKTWHEALRSCQADNSALIDI  
TSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSNKIPVSFEWSNDSSVIFTNWHLE  
PHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNCEERLFYICKKAGHVLSDAESGCQ  
EGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSGYCPCPALVTITNRFEQAFITSLISS  
VVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKPVGQKPEPVQYTHWNTHQPRYS  
GGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKAMSLCKQPVENQEKA EYEERWPF  
HPCYLDWESEPLASCFKVFHSEKVLKRTWREAEAFCEEFGAHLASFA  
HIEEENFVNELLHSKFNWTEERQFWIGFNKRNPLNAGSWEWSDRTPVVS  
SFLDNTYFGEDARNCAVYKANKTLLPLHCGSKREWICKIPRDVKPK (SEQ  
ID NO: 6)

图11

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI  
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP  
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS  
YGSGGGDICEYLHKDLHTI (SEQ ID NO: 7)

图12

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI  
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP  
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS  
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPFCMFPFQYNHQWHHECTREGRE  
DDLLWCATTSRYERDEKWGFCPDPTSAEVG (SEQ ID NO: 8)

图13

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI  
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP  
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS  
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFQYNHQWHHECTREGRE  
DDLLWCATTSRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL  
LSSLWSSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ  
LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS  
RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVE (SEQ ID NO: 9)

图14

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI  
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP  
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS  
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFQYNHQWHHECTREGRE  
DDLLWCATTSRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL  
LSSLWSSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ  
LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS  
RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLQ  
KEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSN  
KIPVSFEWSNDSSVIFTNWHITLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNC  
EERLFYICKKAGHVLSD (SEQ ID NO: 10)

图15

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI  
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP  
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS  
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFQYNHQWHHECTREGRE  
DILLWCATTSRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL  
LSSLWSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVMMGLNQ  
LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS  
RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLQ  
KEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSN  
KIPVSFEWSNDSSVIFTNWHTLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNC  
EERLFYICKKAGHVLSDAESGCQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSG  
YYCPPALVTITNRFEQAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKP  
VGQKPEPVQYTHWNTHQPRYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKA  
MSLCKQPVENQE (SEQ ID NO: 11)

图16

MLLSPSLLLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKKCI  
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP  
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS  
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFQYNHQWHHECTREGRE  
DDLLWCATTSRYERDEKWGFCDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL  
LSSLSWSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQ  
LDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRS  
RDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLQ  
KEEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSN  
KIPVSFEWSNDSSVIFTNWHTLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNC  
EERLFYICKKAGHVLSDAESGCQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSG  
YYCPPALVTITNRFEQAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKP  
VGQKPEPVQYTHWNTHQPRYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKA  
MSLCKQPVENQEKAEYEERWPFHPCYLDWESEPLASCFKVFHSEKVL  
MKRTWREAEAFCEEFGAHLASFAHIEEENFVNELLHSKFNWTEERQFWI  
GFNKRNPLNAGSWEWSDRTPVSSFLDNTYFGEDARNCAVYKANKTLL  
PLHCGSKREWICKIPRDVKPK (SEQ ID NO: 12)

图17

CDTIWEKDLNSHICYQFNLLSSLSWSEAHSSCQMGGTLLSITDETEENFI  
REHMSSKTVEVWMGLNQLDEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFV  
EDHCGTFSSFMPSAWRSRDCESTLPYICKKYLNHIDHEIVE (SEQ ID NO:  
13)

图18

MLLSPSLLLLLLGAPRGCAEGVAAALTPERLLEWQDKGIFVIQSESLKCCI  
QAGKSVLTLENCKQANKHMLWKWWSNHGLFNIGGSGCLGLNFSAPEQP  
LSLYECDSTLVSLRWRCNRKMITGPLQYSVQVAHDNTVVASRKYIHKWIS  
YGSGGGDICEYLHKDLHTIKGNTHGMPCMFQYNHQWHHECTREGRE  
DDLWCATTSTRYERDEKWFPCPDPTSAEVGCDTIWEKDLNSHICYQFNL  
LSSLWSEAHSSQMOGGTLLSITDETEENFIREHMSSKTVEVWMGLNQL  
DEHAGWQWSDGTPLNYLNWSPEVNFEPFVEDHCGTFSSFMPSAWRSR  
DCESTLPYICKKYLNHIDHEIVEKDAWKYYATHCEPGWNPYNRNCYKLQK  
 EEKTWHEALRSCQADNSALIDITSLAEVEFLVTLLGDENASETWIGLSSNK  
 IPVSFWSNDSSVIFTNWHTLEPHIFPNRSQLCVSAEQSEGHWKVKNCE  
 ERLFYICKKAGHVLSDAESGCQEGWERHGGFCYKIDTVLRSFDQASSGY  
 YCPPALVTITNRFEQAFITSLISSVVKMKDSYFWIALQDQNDTGEYTWKPV  
 GQKPEPVQYTHWNTHQPRYSGGCVAMRGRHPLGRWEVKHCRHFKAM  
 SLCKQPVENQEKAEYEERWPFHPCYLDWESEPLASCVKVFHSEKVLN  
 KRTWREAEAFCEEFGAHLASFAHIEEENFVNELLHSKFNWTEERQFWIG  
 FNKRNPLNAGSWEWSDRTPVSSFLDNTYFGEDARNCVYKANKTLLPL  
 HCGSKREWICKIPRDVKPKIPFWYQYDVPWLFYQDAEYLFHTFASEWLN  
 FEFVCSWLHSDLLTIHSAHEQEFHISKIKALSKYGASWWIGLQEERANDEF  
 RWRDGTPIYQNWDTGRERTVNNQSQRCGFISSITGLWGSEECVSMP  
 SICKRKKVWLIEKKKDTPKQHGTCPKGWL YFNKCLLLNIPKDPSSWKN  
 WTHAQHFCAEEGGTLVAIESEVEQAFITMNLFGQTTSVWIGLQNDYET  
 WLNGKPVVYSNWSPFDIINIPSHNTTEVQKHIPLCALLSSNPNFHFTGKW  
 YFEDCGKEGYGFVCEKMQDTSGHGVNTSDMYPMPNTLEYGNRTYKIINA  
 NMTWYAAIKTCLMHKAQLVSITDQYHQSFLLTVVLNRLGYAHWIGLFTTDN  
 GLNFDWSDGTKSSFTFWKDEESSLLGDCVFADSNGRWHSTACESFLQG  
 AICHVPPETRQSEHPELCSETSIPWIKFKSNCYSFSTVLDSMSFEAAHEFC  
 KKEGSNLLTIKDEAENAFLEELFAFGSSVQMVWLNAQFDGNNETIKWFD  
 GTPTDQSNWGIRKPD TDYFKPHHCVALRIPEGLWQLSPCQEKKGFICKM  
 EADIHTAEALPEKGPSHSIPLAVVLT LIVIVAICTLSFCIYKHNGGFFRRLAG  
 FRNPYYPATNFSTVYLEENILISDLEKSDQ (SEQ ID NO: 14)

图19

MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCE  
 ECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQ  
 PEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVG  
 QMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQF  
 PGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAV  
 AGCVFLLISVLLLSGLTWQRRQRKSRRTI (SEQ ID NO: 15)

位置	残基	分数	预测
48	NCE	-0.32701759	非糖基化的
70	NSS	0.37511271	潜在糖基化的
78	NQC	-0.35326057	非糖基化的
89	NTT	0.24039211	潜在糖基化的
133	NEA	-0.58545335	非糖基化的

图20

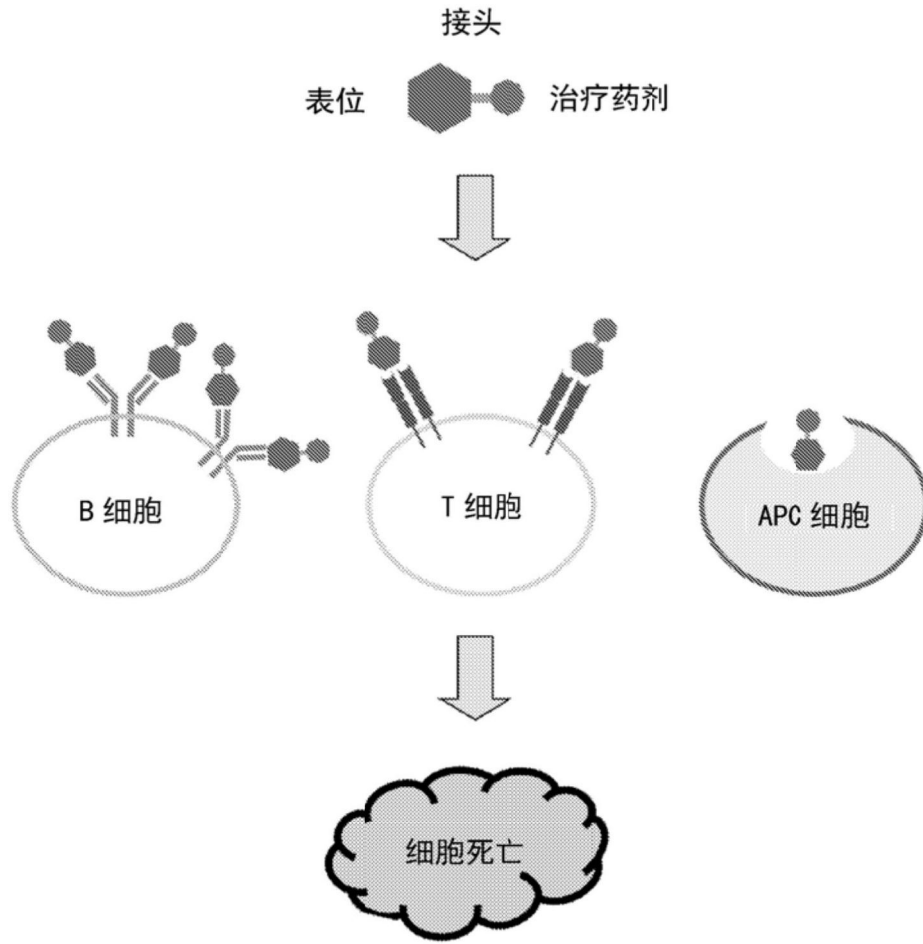


图21

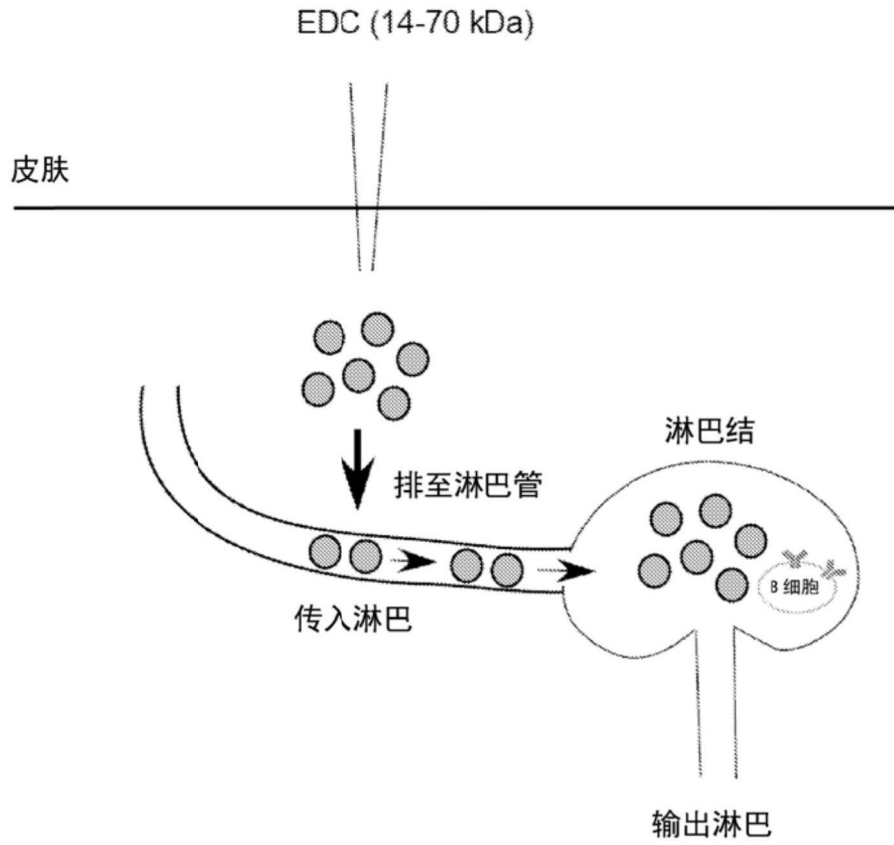


图22

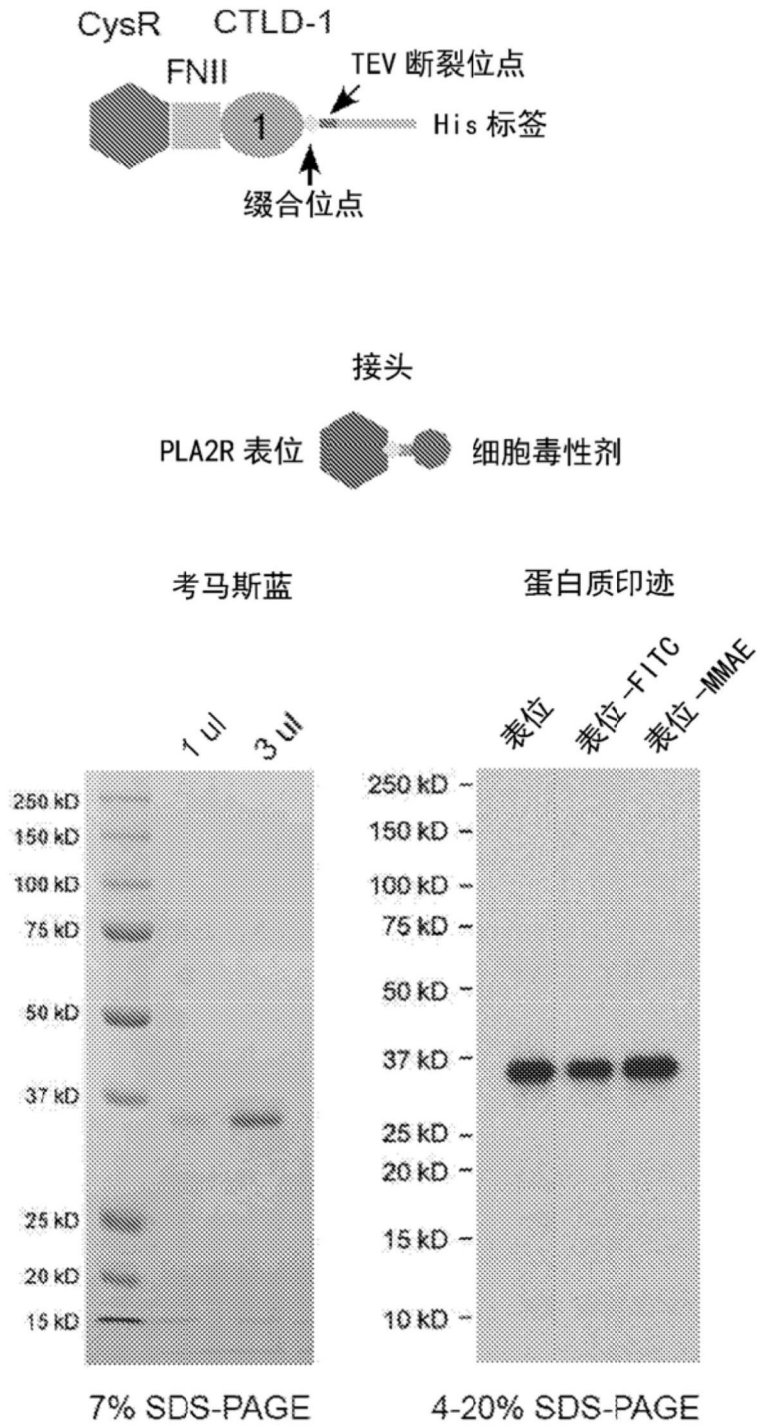


图23

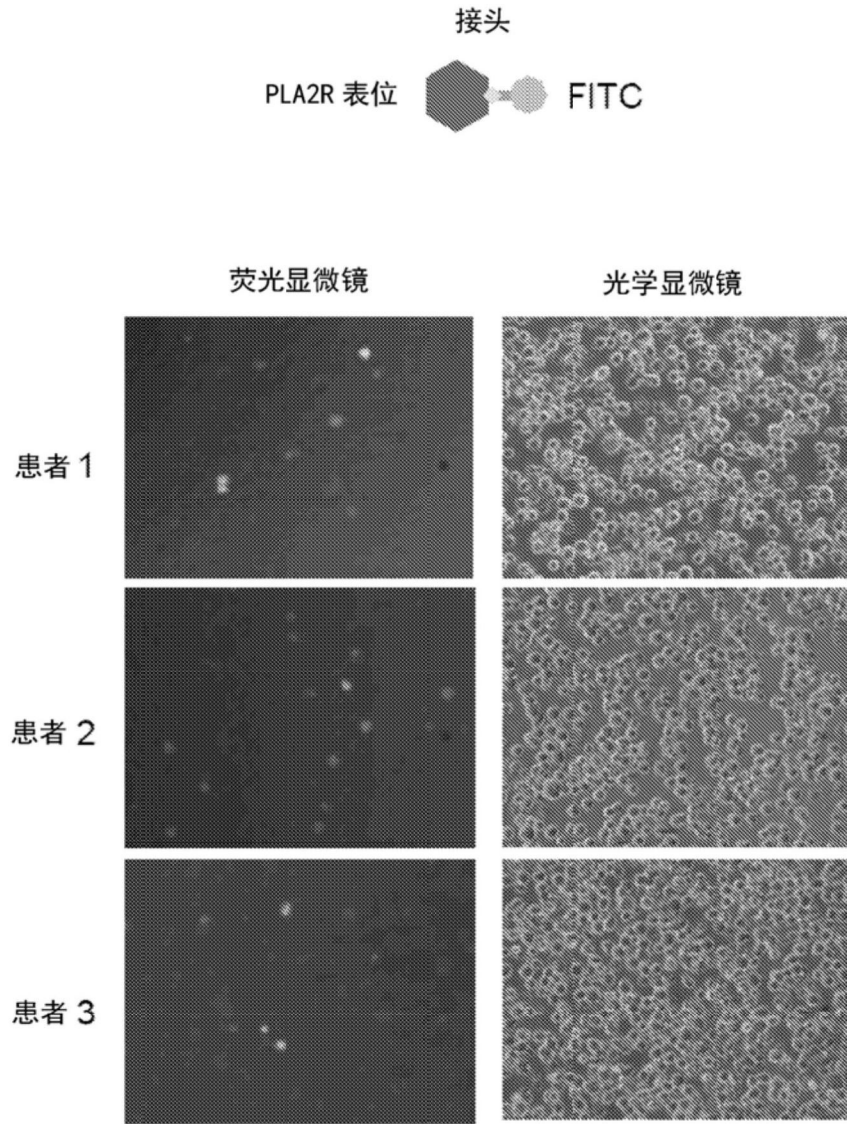


图24

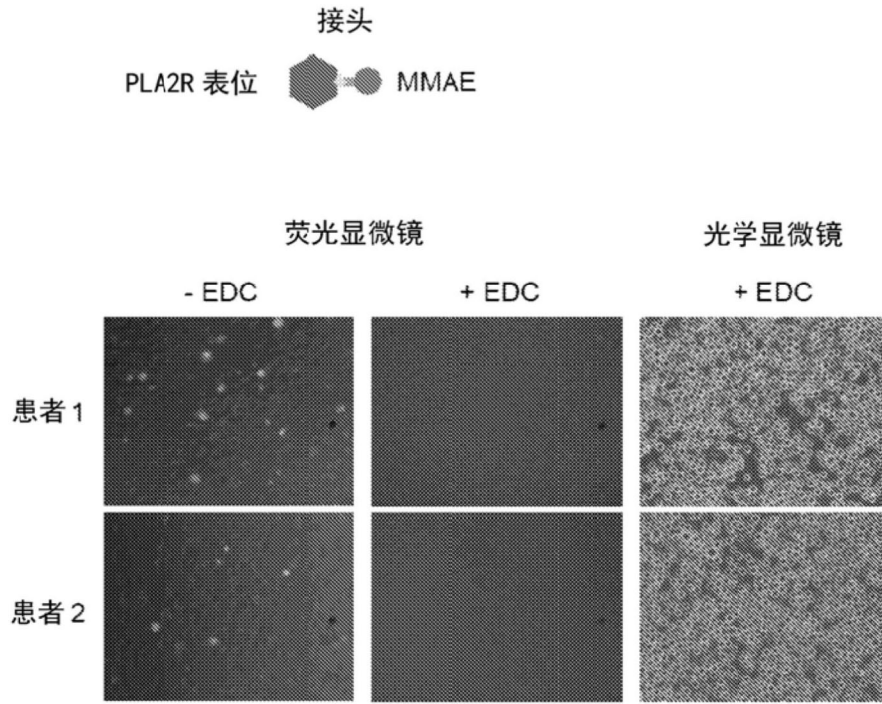


图25

细胞外钙粘蛋白 (EC) 结构域

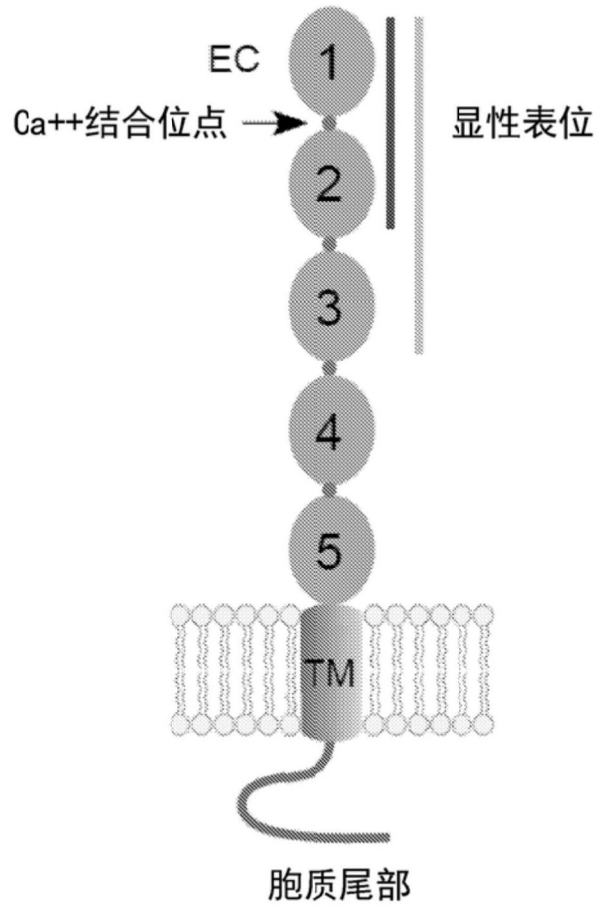
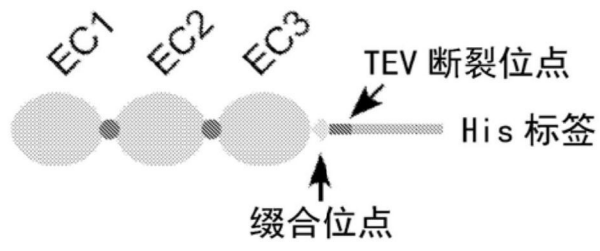


图26

Dsg1



Dsg3

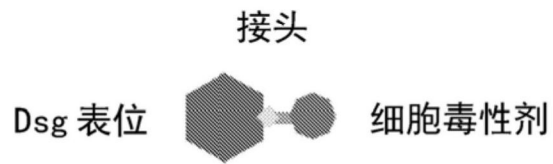
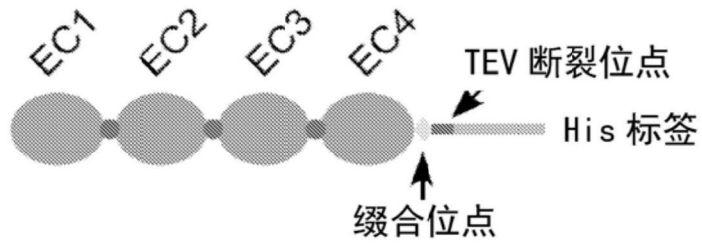


图27

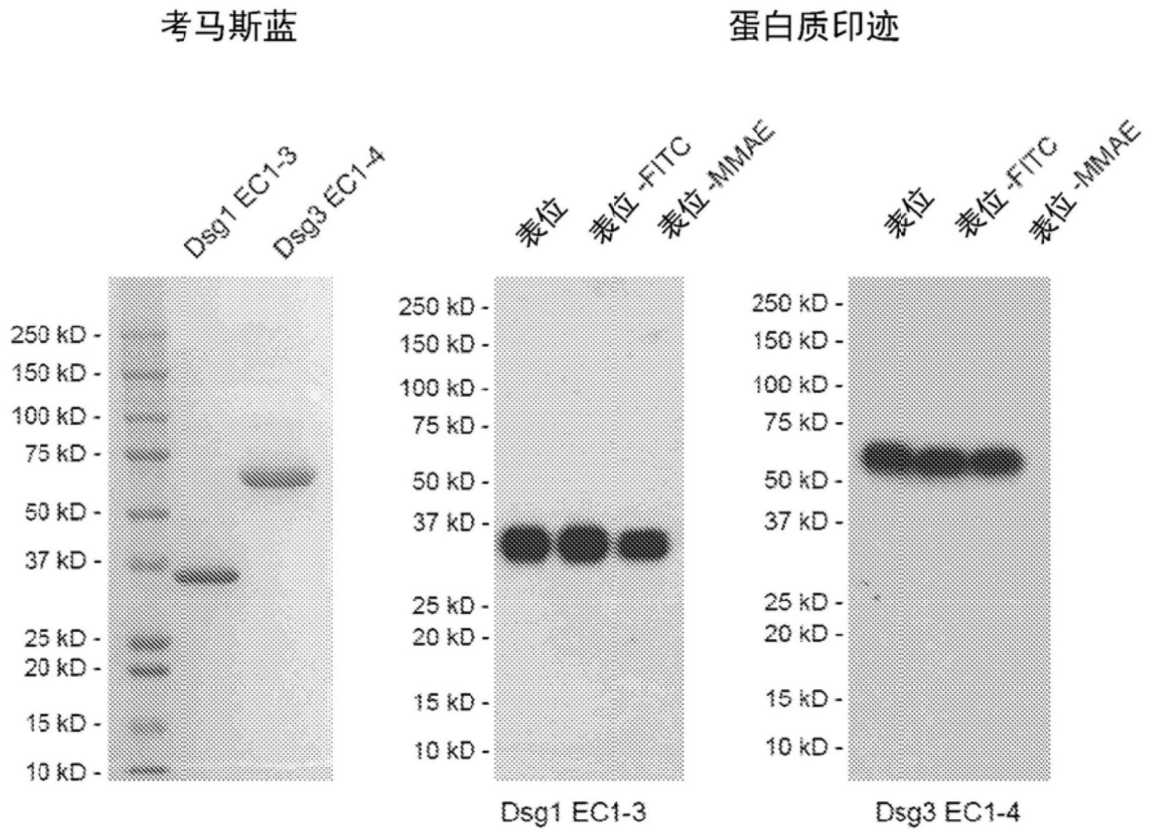


图28

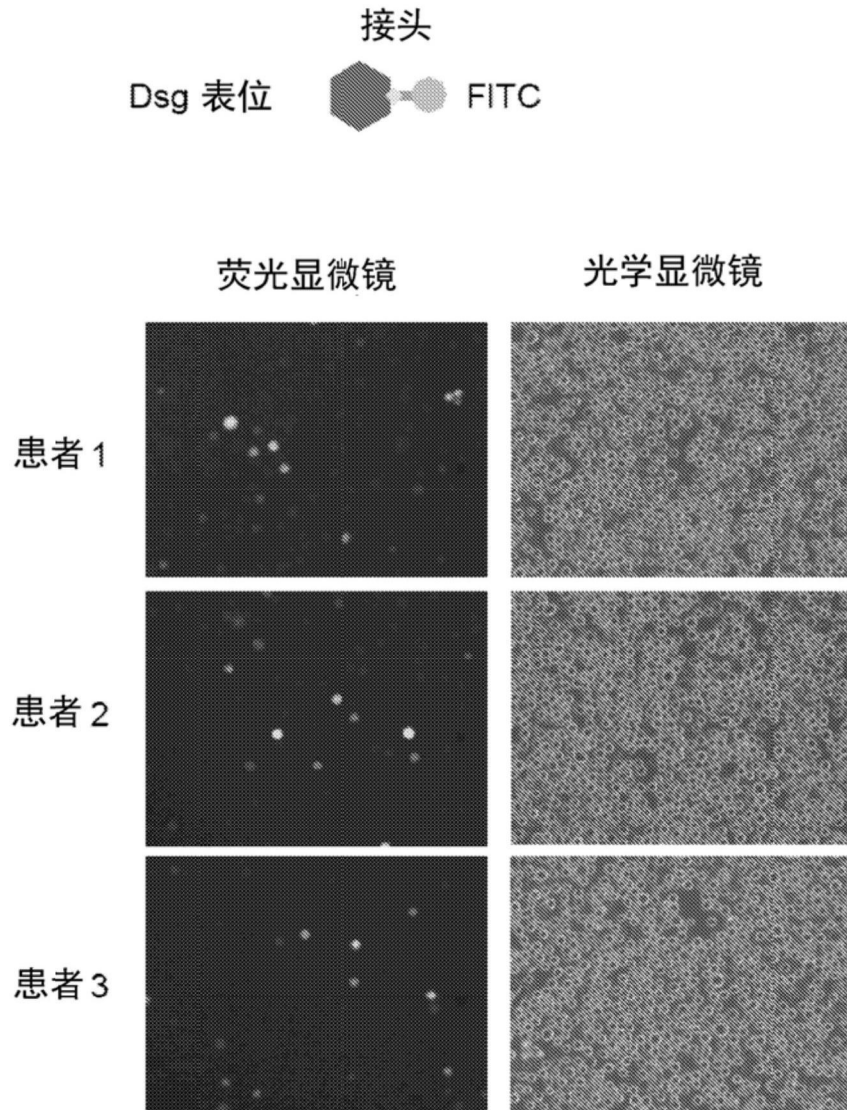


图29

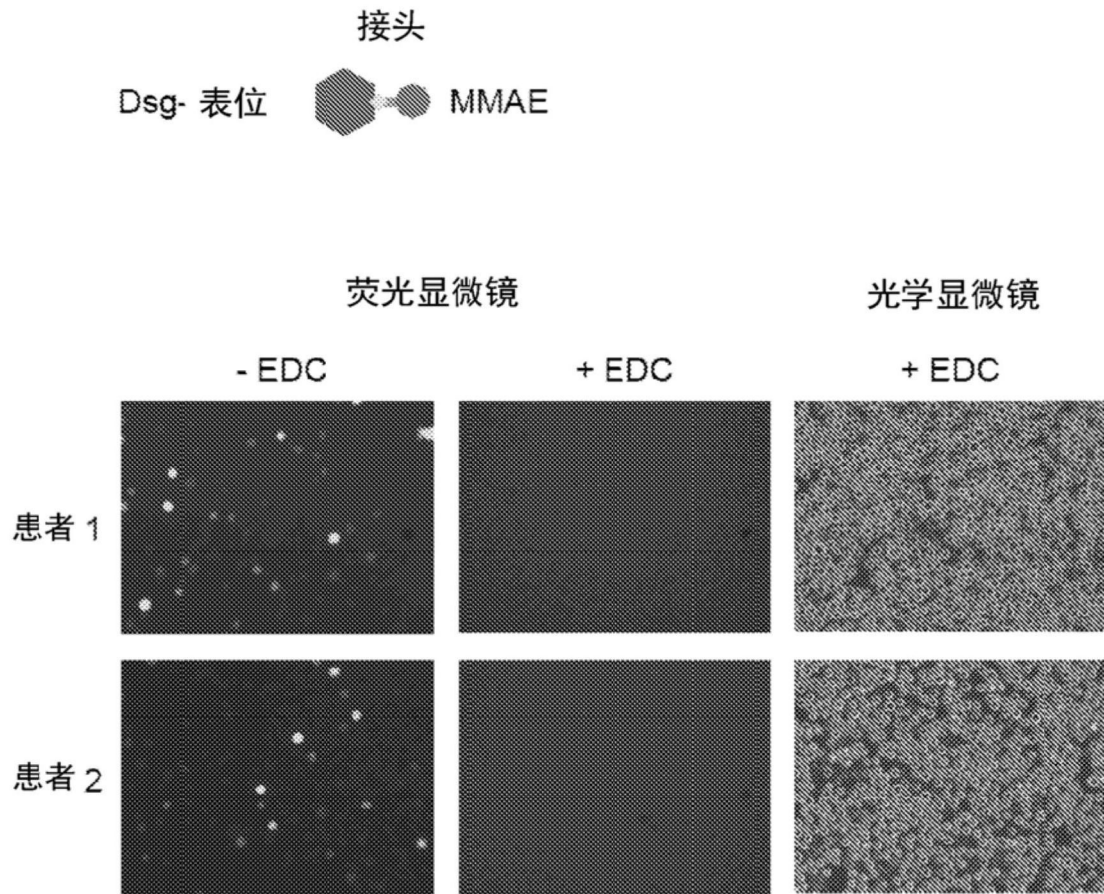


图30

EWIKFAAACREGEDNSKRNP<sup>1</sup>IAKIHSDCAANQQV<sup>2</sup>TYRISGVGIDQPPYGIF  
 VINQKTGEINITSIVDREVTPFFIIYCRALNSMGQDLERPLELRVRVLDINDN  
 PPVFSMATFAGQIEENSNANTLVMILNATDADEPNLNLSKIAFKIIRQEPSD  
 SPMFIINRNTGEIRTMNNFLDREQYGQYALAVRGSDRDGGADGMSAECE  
CNIKILDVNDNIPYMEQSSYTIEIQENTLNSNLL<sup>3</sup>EIRVIDLDEEFSANWMAVI  
 FFISGNEGNWFEIEMNERTNVGILKVVKPLDY<sup>4</sup>EAMQSLQLSIGVRNKA<sup>5</sup>EF  
 HHSIMSQYK<sup>6</sup>LKAS<sup>7</sup>ISVTVLNVIEGPVF (SEQ ID NO: 16)

图31

EWVKFAKP<sub>1</sub>REGEDNSKRNP<sub>2</sub>IAKITS<sub>3</sub>DYQATQKITYRISGVGIDQPPFGIF  
VVDKNTGDIN<sub>4</sub>ITAIVDREETPSFLIT<sub>5</sub>CRALNAQGLDVEKPLILTVKILDINDNP  
PVFSQQIFMGEIEENSASNSLVMIL<sub>6</sub>NATDADEPNHLNSKIAFKIVSQEPAG  
TPMFLLSRNTGEVRTLTNSLDREQASSYRLV<sub>7</sub>SGADKDGEGGLSTQ<sub>8</sub>CE<sub>9</sub>CN  
IKVKDVNDNFPMFRDSQYSARIEENILSSELLRFQVTDLDEEYTDNWLAVY  
FFTSGNEGNWFEIQTDPRTNEGILK<sub>10</sub>VVKALDYEQLQSVKLSIAVKNKAEFH  
QSVISRYRVQSTPVTIQVINVREGIAFRPASKTFTVQKGISSKKLVDYILGT  
YQAIDEDTNKAASN<sub>11</sub>VKYVMGRNDGGYLMIDSKTAEIKFVKNMNRDSTFIV  
NKTITAEVLAIDEYTGKTSTGT<sub>12</sub>VYVRVPDFNDN<sub>13</sub>OPTAVLEK (SEQ ID NO:  
17)

图32