



(45) 授权公告日 2021.05.14

序列表24页 附图12页

抗-Her2 V_H (XBB08)

1. 分离的双特异性抗原结合多肽, 其包含抗体重链, 所述抗体重链包含特异性结合人HER2的第一VH结构域、抗体重链恒定区或恒定区片段以及特异性结合人PDGFR β 的第二VH结构域, 其中所述第一VH结构域和所述第二VH结构域经由所述抗体重链恒定区或恒定区片段连接;

其中所述特异性结合人HER2的VH结构域包含选自SEQ ID NO:13和14的氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的抗原结合多肽, 其中所述重链恒定区或恒定区片段通过氨基酸连接物与所述第二VH结构域基因连接。

3. 如权利要求2所述的抗原结合多肽, 其中所述连接物包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列。

4. 如权利要求1所述的抗原结合多肽, 其还包含抗体轻链, 所述轻链包含特异性结合人HER2或人PDGFR β 的VL结构域, 其中所述重链和所述轻链天然配对。

5. 抗原结合多肽, 其包含两个前述权利要求中任一项所述的抗原结合多肽的二聚体, 所述两个抗原结合多肽通过重链恒定区天然二聚化。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的抗原结合多肽, 其中所述特异性结合人PDGFR β 的第二VH结构域包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列。

7. 如权利要求1所述的抗原结合多肽, 其包含含有选自SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的重链。

8. 如权利要求1所述的抗原结合多肽, 还包含特异性结合人PDGFR β 的VL结构域, 其中所述VL结构域包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列。

9. 如权利要求8所述的抗原结合多肽, 其包含含有SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的抗体轻链。

10. 特异性结合人HER2的分离的抗原结合多肽, 其中所述抗原结合多肽包含VH结构域, 所述VH结构域包含选自SEQ ID NO:13和14的氨基酸序列。

11. 分离的核酸, 其编码前述权利要求中任一项所述的抗原结合多肽。

12. 重组表达载体, 其包含权利要求11所述的核酸。

13. 宿主细胞, 其包含权利要求12所述的重组表达载体。

14. 制备抗原结合多肽的方法, 其包括在使得权利要求13所述的宿主细胞产生抗原结合多肽的条件下, 培养所述宿主细胞。

15. 药物组合物, 其包含权利要求1-10中任一项所述的抗原结合多肽以及一种或多种药学可接受的载体。

16. 权利要求1-10中任一项所述的抗原结合多肽或权利要求15所述的药物组合物在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途, 其中所述疾病或病症是表达HER2和/或PDGFR β 的癌症。

双特异性抗原结合多肽

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2014年3月21日提交的美国临时申请第61/968,437号的优先权的权益。上述申请的内容据此通过引用整体并入。

[0003] 背景

[0004] 由于能够同时靶向多个抗原,双特异性抗原结合多肽(如抗体和抗体样分子)为治疗学带来巨大希望。然而,制备这些分子是一种挑战。就双特异性抗体而言,重链和轻链的错配在产生期间经常发生,这降低双特异性抗体的产量并且使纯化具有挑战性。

[0005] 为了克服与双特异性抗体的制备相关的问题,已经尝试了抗体恒定区或可变区的复杂的工程化。例如,已经生成这样的双特异性抗体,其中各个抗体的VH和VL经由连接物在基因上融合(参见例如,US2010/0254989A1)。在另一方法中,制备的各个抗体在负责Fab交换的人IgG4的残基的Fc中的突变(参见例如, Van der Neut等, Science (2007) 317:1554)。在另一方法中,采用小鼠四元杂交瘤(quadromas)生成双特异性抗体。在该方法中,小鼠和大鼠抗体主要形成最初的VH/VL配对,并且双特异性抗体由大鼠和小鼠Fc组成(参见例如, Lindhofer等, J Immunol. (1995) 155:1246-1252)。最后,已经生成了使用不会促成抗原结合的单个常见轻链的双特异性抗体(参见例如, Merchant等, Nature Biotechnology (1998) 16:677-681)。然而,尽管在抗体工程方面做出了大量努力,双特异性抗体仍然遭受差的稳定性和低的功能性表达产量。

[0006] 因此,本领域需要高度表达并且容易纯化的新型抗原结合多肽。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供双特异性抗原结合多肽,其是高度表达的、容易纯化的、高度稳定的以及对它们的靶抗原具有高亲和力。在某些实施方案中,双特异性抗原结合多肽以高亲和力结合PDGFR β 和HER2两者,并且拮抗PDGFR β 和HER2两者的活性。在某些实施方案中,双特异性抗原结合多肽以高亲和力结合PDGFR β 和VEGF两者,并且拮抗PDGFR β 和VEGF两者的活性。本发明还提供特异性结合HER2并且拮抗HER2激活的新型抗原结合多肽(例如,VH结构域)。此类抗原结合多肽尤其可用于治疗癌症。本发明还提供编码抗原结合多肽的核酸,用于制备此类抗原结合多肽的重组表达载体和宿主细胞。本发明还涵盖使用本发明的抗原结合多肽治疗疾病(例如,癌症)的方法。

[0009] 因此,在一个方面,本发明提供分离的双特异性抗原结合多肽,其包含抗体重链,所述抗体重链包含第一VH结构域并在其C-末端连接第二VH结构域,所述第一VH结构域特异性结合第一抗原,所述第二VH结构域特异性结合第二抗原,其中所述多肽不含抗体轻链。

[0010] 在某些实施方案中,抗体重链通过氨基酸连接物与第二VH结构域基因连接。在一个具体实施方案中,连接物包含SEQ ID No:23所示的氨基酸序列。

[0011] 在某些实施方案中,抗原结合多肽还包含抗体轻链,所述轻链包含特异性结合抗原的VL结构域,其中所述重链和所述轻链天然配对。在一个具体实施方案中,VL结构域结合第一抗原。在一个具体实施方案中,VL结构域结合第三抗原。在一个具体实施方案中,第一抗原和第三抗原在同一分子的不同区域中。在一个具体实施方案中,第一抗原和第三抗原

在不同分子上。

[0012] 在某些实施方案中,本发明提供抗原结合多肽,其包含本文公开的两个抗原结合多肽的二聚体,所述两个抗原结合多肽通过重链恒定区天然二聚化。

[0013] 在某些实施方案中,第一抗原和第二抗原是不同的。在一个具体实施方案中,第一抗原和第二抗原在同一分子的不同区域中。在一个具体实施方案中,第一抗原和第二抗原在不同分子上。

[0014] 在某些实施方案中,第一抗原是人PDGFR β 或HER2。在某些实施方案中,第二抗原是人PDGFR β 或HER2。

[0015] 在某些实施方案中,抗原结合多肽包含VH结构域,所述VH结构域特异性结合人HER2并且包含含有选自SEQ ID NO:1、4、7和10的氨基酸序列的HCDR3。在某些实施方案中,VH结构域还包含含有选自SEQ ID NO:2、5、8或11的氨基酸序列的HCDR2。在某些实施方案中,VH结构域还包含含有选自SEQ ID NO:3、6、9或12的氨基酸序列的HCDR1。在某些实施方案中,VH结构域氨基酸序列与选自SEQ ID NO:13、14、15和16的VH结构域氨基酸序列共有至少80%的氨基酸序列同一性。在某些实施方案中,VH结构域包含选自SEQ ID NO:13、14、15和16的氨基酸序列。

[0016] 在某些实施方案中,抗原结合多肽包含VH结构域,所述VH结构域特异性结合人PDGFR β 并且包含含有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的HCDR3。在某些实施方案中,VH结构域还包含含有SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的HCDR2。在某些实施方案中,VH结构域还包含含有SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的HCDR1。在某些实施方案中,VH结构域包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列。

[0017] 在某些实施方案中,抗原结合多肽包含含有SEQ ID NO:18或20所示的氨基酸序列的重链。

[0018] 在某些实施方案中,抗原结合多肽包含VL结构域,所述VL结构域特异性结合人PDGFR β 并且包含含有SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的LCDR3。在某些实施方案中,VL结构域还包含含有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的LCDR2。在某些实施方案中,VL结构域还包含含有SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列的LCDR1。在某些实施方案中,VL结构域包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列。

[0019] 在某些实施方案中,抗原结合多肽包含含有SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的抗体轻链。

[0020] 在另一方面,本发明提供特异性结合HER2的分离的抗原结合多肽,其包含含有选自SEQ ID NO:1、4、7和10的氨基酸序列的CDR3。

[0021] 在某些实施方案中,抗原结合多肽包含VH结构域,所述VH结构域包含含有选自SEQ ID NO:1、4、7和10的氨基酸序列的CDR3。在某些实施方案中,VH结构域还包含含有选自SEQ ID NO:2、5、8或11的氨基酸序列的CDR2。在某些实施方案中,VH结构域还包含含有选自SEQ ID NO:3、6、9或12的氨基酸序列的CDR1。在某些实施方案中,VH结构域包含与选自SEQ ID NO:13、14、15和16的氨基酸序列共有至少80%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,VH结构域包含选自SEQ ID NO:13、14、15和16的氨基酸序列。

[0022] 在另一方面,本发明提供抗原结合多肽,其与具有选自SEQ ID NO:13、14、15和16的氨基酸序列的VH结构域结合HER2上的同一表位。在某些实施方案中,抗原结合多肽包含

VH结构域。

[0023] 在另一方面,本发明提供抗原结合多肽,其与具有选自SEQ ID NO:13、14、15和16的氨基酸序列的VH结构域竞争结合HER2。在某些实施方案中,抗原结合多肽包含VH结构域。

[0024] 在其它方面,本发明提供编码本发明的抗原结合多肽的分离的核酸。

[0025] 在其它方面,本发明提供重组表达载体,其包含编码本发明的抗原结合多肽的分离的核酸。

[0026] 在其它方面,本发明提供表达本发明的抗原结合多肽的宿主细胞。

[0027] 在其它方面,本发明提供制备本发明的抗原结合多肽的方法,其包括在使得宿主细胞产生抗原结合多肽的条件下培养能够表达本发明的结合多肽的宿主细胞。

[0028] 在其它方面,本发明提供药物组合物,其包含本发明的抗原结合多肽和一种或多种药学可接受的载体。

[0029] 在其它方面,本发明提供用于治疗疾病或病症的方法,所述方法包括向有需要的对象施用本发明的药物组合物。在某些实施方案中,所述疾病或病症是癌症(例如,乳腺癌和卵巢癌)。

[0030] 附图简述

[0031] 图1是本发明的示例性双特异性抗原结合多肽的图示。

[0032] 图2是本发明的示例性双特异性抗原结合多肽的图示。

[0033] 图3是本发明的示例性双特异性抗原结合多肽的图示。

[0034] 图4是本发明的示例性双特异性抗原结合多肽的图示。

[0035] 图5显示在还原和非还原条件下本发明的示例性双特异性抗原结合多肽的SDS-PAGE凝胶。

[0036] 图6显示检测HEK293细胞培养上清液中HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽的表达的ELISA分析的结果。

[0037] 图7显示测量HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽同时结合HER2和PDGFR β 的ELISA分析的结果。

[0038] 图8显示测量HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽同时结合细胞表面表达的HER2和PDGFR β 的基于FACS的结合分析的结果。

[0039] 图9显示本文公开的示例性抗-HER2VH结构域的Biacore和FACS分析的结果。

[0040] 图10显示本文公开的示例性抗-HER2VH结构域和scFv衍生物的Biacore和FACS分析的结果。

[0041] 图11显示测量抗-HER2VH B12、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗以及它们的组合对SK-BR-3细胞增殖的影响的MTS细胞增殖分析的结果。

[0042] 图12是本发明的示例性抗-HER2双特异性抗原结合多肽的图示。

[0043] 详述

[0044] 本发明提供双特异性抗原结合多肽,其是高度表达的、容易纯化的、高度稳定的以及对它们的靶抗原具有高亲和力。在某些实施方案中,双特异性抗原结合多肽以高亲和力结合PDGFR β 和HER2两者并且拮抗PDGFR β 和HER2两者的活性。在某些实施方案中,双特异性抗原结合多肽以高亲和力结合PDGFR β 和VEGF两者并且拮抗PDGFR β 和VEGF两者的活性。本发明还提供特异性结合HER2并且拮抗HER2激活的新型抗原结合多肽(例如,VH结构域)。此类

抗原结合多肽尤其可用于治疗癌症。本发明还提供编码抗原结合多肽的核酸,用于制备此类抗原结合多肽的重组表达载体和宿主细胞。本发明还涵盖使用本发明的抗原结合多肽治疗疾病(例如,癌症)的方法。

[0045] I. 定义

[0046] 为了可以更容易地理解本发明,首先定义了某些术语。

[0047] 如本文所用,术语“PDGFR β ”是指血小板衍生的生长因子受体 β 。PDGFR β 的核苷酸和多肽序列是本领域熟知的。示例性人PDGFR β 的氨基酸序列示于GenBank保藏号GI:4505683,以及示例性小鼠PDGFR β 的氨基酸序列示于GenBank保藏号GI:226371752。

[0048] 如本文所用,术语“HER2”是指受体酪氨酸蛋白激酶erbB-2。HER2的核苷酸和多肽序列是本领域熟知的。示例性人HER2的氨基酸序列示于GenBank保藏号GI:54792096,以及示例性小鼠HER2的氨基酸序列示于GenBank保藏号GI:54873610。

[0049] 如本文所用,术语“VEGF”是指血管内皮生长因子家族的所有成员,其包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGF、它们的蛋白和剪接变体,其包括VEGF₁₂₁、VEGF₁₂₁b、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF₁₆₅b、VEGF₁₈₉和VEGF₂₀₆。VEGF的核苷酸和多肽序列是本领域熟知的。示例性人VEGF的氨基酸序列示于GenBank保藏号GI:32699990,以及示例性小鼠VEGF的氨基酸序列示于GenBank保藏号GI:GI:160358815。

[0050] 如本文所用,术语“双特异性抗原结合多肽”是指能够同时特异性结合两种或更多种不同抗原的抗原结合多肽。

[0051] 如本文所用,术语“抗原”是指抗原结合多肽识别的结合位点或表位。

[0052] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子,其包含四条多肽链(通过二硫键互相连接的两条重(H)链和两条轻(L)链)以及它们的多聚体(例如,IgM)。每条重链包含重链可变区(缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域:CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(CL1)。VH和VL区可以被进一步细分为被称为互补决定区(CDR)的高变区,其间穿插有较保守的被称为框架区(FR)的区域。

[0053] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”包括特异性结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因工程化的多肽或糖蛋白。抗体的抗原结合片段可以使用任何合适的标准技术,如蛋白水解性消化或涉及编码抗体可变结构域以及任选地恒定结构域的DNA的操作和表达的重组基因工程技术从例如完整的抗体分子得到。抗原结合部分的非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;以及(vii) 由模拟抗体的高变区的氨基酸残基(例如,分离的互补决定区(CDR))组成的最小识别单位。其它工程化分子,如双链抗体、三链抗体、四链抗体和微抗体也涵盖在表述“抗原结合部分”内。

[0054] 如本文所用,术语“VH结构域”和“VL结构域”分别指单个抗体的可变重链结构域和可变轻链结构域,其包含FR(框架区)1、2、3和4以及CDR(互补决定区)1、2和3(参见Kabat等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. (NIH公开号91-3242, Bethesda)。

[0055] 如本文所用,术语“天然二聚化”是指抗原结合多肽的二聚体,其中重链恒定区以与天然存在的四聚体抗体分子相同的方式缔合。

[0056] 如本文所用,术语“天然配对”是指以与天然存在的四聚体抗体分子相同的方式通过天然重链/轻链相互作用界面缔合的抗体重链和轻链配对。

[0057] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”意指重链和轻链多肽的可变区内存在的非连续抗原结合位点。这些特定区域已经由Kabat等,J.Biol.Chem.252,6609-6616(1977).Kabat等,Sequences of protein of immunological interest.(1991),Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)以及MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)(其各自通过引用整体并入本文)描述,其中当彼此比较时,定义包括氨基酸残基的重叠或子集。为了比较,示出了氨基酸残基,其涵盖如以上引用的每个参考文献所定义的CDR。优选地,基于序列比较,术语“CDR”是Kabat定义的CDR。

[0058] 如本文所用,术语“框架(FR)氨基酸残基”是指在免疫球蛋白链的框架区中的那些氨基酸。本文使用的术语“框架区”或“FR区”包括是可变区的一部分,但不是CDR(例如,使用Kabat定义的CDR)的一部分的氨基酸残基。

[0059] 如本文所用,术语“基因连接”是指使用重组DNA技术连接两个或更多个多肽。在某些实施方案中,这涉及编码两个或更多个多肽的融合物的嵌合基因的产生。

[0060] 如本文所用,术语“特异性结合”是指结合多肽以至少约 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M或更多的Kd结合抗原的能力,和/或结合多肽以比对非特异性抗原的亲和力大至少两倍的亲和力结合抗原的能力。然而,应理解,结合多肽能够特异性结合两种或更多种序列相关的抗原。例如,本发明的结合多肽能够特异性结合人抗原和该抗原的非人直系同源物。

[0061] 如本文所用,术语“载体”意指能够转运其已经连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指其中可以连接额外DNA区段的环状双链DNA环。另一类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA区段可以被连接至病毒基因组中。某些载体能够在其被导入的宿主细胞中自我复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体以及附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可以在导入宿主细胞后整合至宿主细胞的基因组中,由此随宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够引导与其可操作连接的基因表达。此类载体在本文被称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。通常,在重组DNA技术中有用的表达载体通常呈质粒形式。术语“质粒”和“载体”可以互换使用。然而,本发明意图包括起等价功能的此类其它形式的表达载体,如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0062] 如本文所用,术语“宿主细胞”意指已经导入重组表达载体的细胞。应理解,该术语不仅意指特定的主体细胞,而且意指此类细胞的后代。因为在后续传代中由于突变或环境影响而可能发生某些修饰,所以此类后代可能实际上并不等同于亲代细胞,但仍被包括在本文所用术语“宿主细胞”的范围内。

[0063] 如本文所用,术语“PDGFR β -相关的疾病或病症”包括与PDGFR β 活性相关的疾病状态和/或症状。示例性PDGFR β -相关的疾病或症状包括但不限于年龄相关性黄斑变性(AMD)和癌症。

[0064] 如本文所用,术语“HER2-相关的疾病或病症”包括与HER2活性相关的疾病状态和/或症状。示例性HER2-相关的疾病或病症包括但不限于癌症(例如,乳腺癌和卵巢癌)。

[0065] 如本文所用,术语“VEGF-相关的疾病或病症”包括与VEGF活性相关的疾病状态和/

或症状。示例性VEGF-相关的疾病或病症包括但不限于与新血管形成相关的病况,例如,年龄相关性黄斑变性(AMD)和癌症。

[0066] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”是指本文所述的治疗性或预防性措施。“治疗”的方法采用向对象,例如患有疾病或病症(例如,癌症)或者易患疾病或病症的对象,施用本发明的抗体或抗原结合部分,以便预防、治疗、延迟或降低疾病或病症或者复发性疾病或病症的一种或多种症状的严重性,或者减轻疾病或病症或者复发性疾病或病症的一种或多种症状,或者以便延长超过不存在此类治疗下预期的对象的存活。

[0067] 如本文所用,术语“有效量”是指当施用于对象时,足以使疾病或病症的治疗、预后或诊断生效的结合多肽的量。治疗有效量将根据以下变化:正治疗的对象和疾病状况、对象的体重和年龄、疾病状况的严重性、施用方式等,所述治疗有效量可以由本领域普通技术人员容易地确定。根据本发明,施用的剂量范围可以为,例如,约1ng至约10,000mg、约1μg至约5,000mg、约1mg至约1,000mg或者约10mg至约100mg结合多肽。可以调节剂量方案以提供最佳治疗反应。有效量也是其中结合多肽的任何毒性作用或有害作用(即,副作用)最小化和/或被有益作用超过的量。

[0068] 如本文所用,术语“对象”包括任何人或非人动物。

[0069] II. 抗-HER2抗原结合多肽

[0070] 在一个方面,本发明提供特异性结合HER2并且抑制HER2活性的抗原结合多肽(例如,双特异性抗原结合多肽、抗体或其抗原结合片段)。此类结合多肽尤其可用于治疗HER2-相关的疾病或病症(例如,癌症,如乳腺癌和卵巢癌)。

[0071] 通常,本发明的抗-HER2抗原结合多肽包含特异性结合HER2的重链CDR3(HCDR3)氨基酸序列。适合用于本发明的结合多肽的非限制性HCDR3序列包括SEQ ID NO:1、4、7或10所示的HCDR3氨基酸序列。在其它实施方案中,HCDR3序列是SEQ ID NO:1、4、7或10的变体,其包含相对于SEQ ID NO:1、4、7或10的至少一个(例如,一个、两个、三个等)保守性氨基酸取代。

[0072] 能够掺入本文公开的HER2-结合HCDR3序列的任何多肽可以被用于产生本发明的抗原结合多肽,其包括但不限于抗体或其片段(例如,VH结构域)和免疫球蛋白样结构域。合适的免疫球蛋白样结构域包括但不限于纤连蛋白结构域(参见,例如,Koide等(2007), *Methods Mol. Biol.* 352:95-109,将其通过引用整体并入本文)、DARPin(参见,例如,Stumpp等(2008) *Drug Discov. Today* 13(15-16):695-701,将其通过引用整体并入本文)、蛋白A的Z结构域(参见,Nygren等(2008) *FEBS J.* 275(11):2668-76,将其通过引用整体并入本文)、脂质运载蛋白(Lipocalins)(参见,例如,Skerra等(2008) *FEBS J.* 275(11):2677-83,将其通过引用整体并入本文)、人泛素(Affilins)(参见,例如,Ebersbach等(2007) *J. Mol. Biol.* 372(1):172-85,将其通过引用整体并入本文)、Affitins(参见,例如,Krehenbrink等(2008) *J. Mol. Biol.* 383(5):1058-68,将其通过引用整体并入本文)、Avimers(参见,例如,Silverman等(2005) *Nat. Biotechnol.* 23(12):1556-61,将其通过引用整体并入本文)、Fynomers(参见,例如,Grabulovski等(2007) *J Biol Chem* 282(5):3196-3204,将其通过引用整体并入本文)和Kunitz结构域肽(参见,例如,Nixon等(2006) *Curr Opin Drug Discov Devel* 9(2):261-8,将其通过引用整体并入本文)。

[0073] 在某些实施方案中,抗-HER2抗原结合多肽包含抗体或含有VH结构域的抗体片段。适用于本发明的示例性CDR和VH结构域氨基酸序列示于此处的表1和2中。

[0074] 表1. 示例性抗-HER2VH结构域的CDR氨基酸序列。

克隆名称	CDR3	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR1	SEQ ID NO.
B8	WARGSTSPHG LDV	1	WMGWMNPKSGGTYYA QKFQG	2	GNYMH	3
B12	DPRAATFDY	4	WINPNSGGTYYAQKLQ G	5	GYMH	6
E5	GYGGSGSYLF DY	7	GINWNGGSTGYADSVK G	8	DYGMS	9
H6	GFGGNGSYTTP L	10	GINWNGGSTGYADSVK G	11	DYGMS	12

[0076] 表2. 示例性抗-HER2VH结构域的氨基酸序列。

克隆名称	VH 氨基酸序列	SEQ ID NO.
B8	EVQLVESGAIEVKEPGASVKVSCSSGYSFTGNYMHWVRQAPGQGLE WMGWMNPKSGGTYYAQKFQGRVTMTWDTSTSTAYMELSLGTSDDTA VYYCARWARGSTSPHGLDVWGQGLTVTVSS	13
B12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTGYYMHWVRQAPGQGL EWMGWINPNSGGTYYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTA VYYCARDPRAATFDYWGQGLTVTVSS	14
E5	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLE WWSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAL YHCARGYGGSGSYLFDYWGQGLTVTVSS	15
H6	QVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLE WWSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNANKFLYLQMNSLRAEDTAL YHCARGFGGNGSYTTPLRGQGMVTVSS	16

[0078] 在某些实施方案中,抗-HER2VH结构域包含SEQ ID NO:1、4、7或10所示的HCDR3氨基酸序列,以及独立地选自表1中所示的重链HCDR2或HCDR1氨基酸序列中任一个的HCDR2和/或HCDR1序列。

[0079] 在某些实施方案中,抗-HER2抗原结合多肽包含分别选自SEQ ID NO:1、2和3;4、5和6;7、8和9;以及10、11和12的HCDR3、HCDR2和HCDR1氨基酸序列。

[0080] 在某些实施方案中,抗-HER2抗原结合多肽包含SEQ ID NO:13、14、15或16所示的VH氨基酸序列中的至少一个。

[0081] 在某些实施方案中,抗-HER2抗原结合多肽包含一个或多个选自SEQ ID NO:1-12的CDR氨基酸序列,其中一个或多个CDR区氨基酸序列包含至少一个或多个保守性氨基酸取代(例如,1、2、3、4或5个保守性氨基酸取代)。保守性氨基酸取代包括在一个类别中的氨基酸被同一类别的氨基酸取代,其中通过常见的物理化学氨基酸侧链性质和自然中发现的同源蛋白中的高取代频率(如通过例如标准Dayhoff频率交换矩阵或BLOSUM矩阵测定的)定义类别。已经被分类成六个一般类别的氨基酸侧链并且包括:I类(Cys);II类(Ser、Thr、Pro、Ala、Gly);III类(Asn、Asp、Gln、Glu);IV类(His、Arg、Lys);V类(Ile、Leu、Val、Met);和VI类(Phe、Tyr、Trp)。例如,Asp取代另一III类残基,如Asn、Gln或Glu是保守性取代。因此,预测的抗-PDGF β 抗体中的非必需氨基酸残基优选被来自同一类别的另一氨基酸残基替换。鉴定不会消除抗原结合的氨基酸保守性取代的方法是本领域熟知的(参见,例如,Brummell等,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi等,Protein Eng.12(10):879-884(1999);以

及Burks等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417 (1997),将其各自通过引用整体并入本文)。

[0082] 在某些实施方案中,本发明提供抗-HER2抗原结合多肽,其包含与SEQ ID NO:13、14、15或16所示的VH区氨基酸序列具有约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性的VH和/或VL区氨基酸序列。

[0083] 在某些实施方案中,抗-HER2抗原结合多肽以1.2nM的Kd结合HER2。在某些实施方案中,抗-HER2抗原结合多肽以 $1.39 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 的结合速率结合HER2。在某些实施方案中,抗-HER2抗原结合多肽以 $1.67 \times 10^4 \text{s}^{-1}$ 的解离速率结合HER2。在某些实施方案中,当呈scFv分子形式时,抗-HER2抗原结合多肽以0.87nM的Kd结合HER2。

[0084] 在某些实施方案中,抗-HER2抗原结合多肽与曲妥珠单抗(CAS#180288-69-1)和/或帕妥珠单抗(CAS#380610-27-5)结合HER2上的不同表位。在某些实施方案中,抗-HER2抗原结合多肽与曲妥珠单抗和/或帕妥珠单抗结合HER2上的同一表位。在某些实施方案中,抗-HER2抗原结合多肽与曲妥珠单抗和/或帕妥珠单抗竞争结合HER2。

[0085] 在某些实施方案中,本文公开的抗-HER2抗原结合多肽在结合HER2后内化。在一个具体实施方案中,内化的抗-HER2抗原结合多肽与细胞毒性部分(例如,抗癌剂)连接。本文公开了合适的非限制性细胞毒性部分。

[0086] 在另一方面,本发明提供抗-HER2抗原结合多肽,其与包含SEQ ID NO:13、14、15或16所示的VH结构域氨基酸序列的抗原结合多肽结合HER2上的同一表位和/或与其交叉竞争。可以使用常规的竞争结合分析鉴定此类抗体,所述竞争结合分析包括例如,基于表面等离子体共振(SPR)的竞争分析。

[0087] III. 双特异性抗原结合多肽

[0088] 在另一方面,本发明提供特异性结合第一靶抗原和第二靶抗原的双特异性抗原结合多肽。使用本发明的双特异性抗原结合多肽可以靶向任何两种抗原。通常,本发明的双特异性抗原结合多肽包含抗体重链,所述重链包含特异性结合第一抗原的第一VH结构域,其中所述重链与特异性结合第二抗原的第二VH结构域连接。

[0089] 可以使用本领域公认的手段(化学的和/或基因的),将抗体重链与第二VH结构域连接。在某些实施方案中,抗体重链和第二VH结构域是基因连接的。在一个实施方案中,抗体重链的C-末端氨基酸与第二VH结构域的N-末端氨基酸连接。该连接可以是直接的,或者通过连接物连接。在一个实施方案中,抗体重链通过包含SEQ ID No:23所示的序列的氨基酸连接物与第二VH结构域的N-末端氨基酸连接。

[0090] 在某些实施方案中,双特异性抗原结合多肽是两条抗体重链的二聚体,每个抗体重链包含特异性结合第一抗原的第一VH结构域,并且其中每个抗体重链与特异性结合第二抗原的第二VH结构域连接。二聚体中的两条抗体重链以与天然存在的四聚体抗体分子中存在的缔合相同的方式通过天然重链二聚体界面缔合。具有该结构的示例性双特异性抗原结合多肽描述在本文的图2和图3中。

[0091] 在某些实施方案中,双特异性抗原结合多肽还包含抗体轻链。在某些实施方案中,轻链以与天然存在的四聚体抗体分子中存在的配对相同的方式通过天然轻链/重链二聚体界面与重链天然配对。具有该结构的示例性双特异性抗原结合多肽描述在本文的图1和图4

中。

[0092] 第一抗原和第二抗原可以是相同或不同的。如果抗原是不同的，它们可以在同一分子的不同区域中，或者在不同分子上。在某些实施方案中，第一抗原和第二抗原是细胞表面受体。在某些实施方案中，第一抗原是PDGFR β 或HER2（例如，人PDGFR β 或HER2）。在某些实施方案中，第二抗原是PDGFR β 或HER2（例如，人PDGFR β 或HER2）。在一个具体实施方案中，第一抗原是PDGFR β ，并且第二抗原是HER2。在另一具体实施方案中，第一抗原是HER2，并且第二抗原是PDGFR β 。

[0093] 在某些实施方案中，一个抗原（第一抗原或第二抗原）是细胞表面受体，并且一个抗原（第一或第二）是配体（例如，生长抑制，如VEGF、PDGF或EGF）。在某些实施方案中，第一抗原是PDGFR β 或VEGF（例如，人PDGFR β 或VEGF）。在某些实施方案中，第二抗原是PDGFR β 或VEGF（例如，人PDGFR β 或VEGF）。在一个具体实施方案中，第一抗原是PDGFR β ，并且第二抗原VEGF。在另一具体实施方案中，第一抗原是VEGF，并且第二抗原PDGFR β 。此类双特异性抗原结合多肽尤其可用于治疗PDGFR β -相关的病症和VEGF-相关的病症，如AMD和癌症。

[0094] 第一抗原和第三抗原可以在同一分子的不同区域中或不同分子上。在某些实施方案中，轻链结合第一抗原，并且重链和轻链合作以产生第二抗原的单一结合位点。在某些实施方案中，轻链结合第三抗原。应注意，如果第一抗原、第二抗原和第三抗原是不同的，则这允许具有三个特异性的抗原结合多肽的产生。本发明也涵盖此类分子。

[0095] 可以将任何抗体重链、轻链、VH结构域、VL结构域或CDR氨基酸序列用于本发明的抗原结合多肽中。示例性抗体重链、轻链、VH结构域、VL结构域和CDR氨基酸序列示于本文的表1-4中。

[0096] 在某些实施方案中，双特异性抗原结合多肽包含本文公开的抗-PDGFR β VH结构域（例如，如SEQ ID No:24所示）以及结合EGFR家族受体蛋白（例如，EGFR、HER2、HER3和/或HER4）的抗体的VH和VL结构域。可以获得VH和VL结构域的合适的治疗性抗体包括但不限于曲妥珠单抗（CAS#180288-69-1）、帕妥珠单抗（CAS#380610-27-5）和西妥昔单抗（CAS#205923-56-4）。在一个具体实施方案中，双特异性抗原结合多肽呈图4所示的形式。

[0097] 在某些实施方案中，双特异性抗原结合多肽包含本文公开的抗-HER2VH结构域（例如，SEQ ID NO:13-16所示的那些）以及结合EGFR家族成员（例如，EGFR、HER2、HER3和/或HER4）的抗体的VH和VL。可以获得VH和VL结构域的合适的治疗性抗体包括但不限于曲妥珠单抗（CAS#180288-69-1）、帕妥珠单抗（CAS#380610-27-5）和西妥昔单抗（CAS#205923-56-4）。在一个具体实施方案中，双特异性抗原结合多肽呈图12所示的形式。

[0098] 表3. 示例性抗-PDGFR β VH和VL结构域的CDR、VH和VL氨基酸序列。

[0099]

标识符	氨基酸序列	SEQ ID NO.
XB2202 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSRHAISWV RQAPGQGLEWIGGILPILKTPNYAQRFGGRVTINADEST STVYMEMSSLRSED TAVYYCATHGGDRSYWGQGT LVSS	24
XB2202 HCDR3	HGGDRSY	25
XB2202 HCDR2	GILPILKTPNYAQRFGG	26
XB2202 HCDR1	RHAIS	27
A4 VL	DVVM TQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNWLNWYQ QKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGDTFTIS SLQPEDIATYYCQYNNVLR TFGQGTKVEIK	28
A4 LCDR3	QYNNVLR T	29
A4 LCDR3	EASNLET	30
A4 LCDR3	QASQDISNWL N	31

[0100] 表4. 示例性双特异性抗原结合多肽的重链和轻链氨基酸序列。

[0101]

克隆名称	氨基酸序列 (信号序列加下划线)	SEQ ID NO.
形式-1 和 2 重链	<u>METDTLLLWVLLLWVPGSTG</u> QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCK ASGGTFSRHAISWVRQAPGQGLEWIGGILPILKTPNYAQRFGGR VTINADESTSTVYMEMSSLRSED TAVYYCATHGGDRSYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGG GSGGGGSEVQLVESGAIEVKEPGASVKVSKSSGYSTGNYMH WVRQAPGQGLEWMGMWNP KSGGTYYAQKFQGRVTMTWDTSI STAYMELSGLTSDDTAVYYCARWARGSTSPHGLDVWGQGT LVTVSS	17
减去信号序列 的形式-1 和 2 重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSRHAISWVRQAPGQ GLEWIGGILPILKTPNYAQRFGGRVTINADESTSTVYMEMSSLRS EDTAVYYCATHGGDRSYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGAIEVKEP GASVKVSKSSGYSTGNYMHWVRQAPGQGLEWMGMWNP KS GGTYYAQKFQGRVTMTWDTSI STAYMELSGLTSDDTAVYYCAR WARGSTSPHGLDVWGQGT LTVTVSS	18

[0102]

形式-3 重链	<u>METDTLLLWVLLLWVPGSTGEVQLVESGAEVKEPGASVKVCSK</u> SSGYSFTGNMHWVRQAPGQGLEWMGMNPKSGGTYYAQKF QGRVTMTWDTISISTAYMELSGLTSDDTAVYYCARWARGSTSPH GLDVWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGG TFSRHAISWVRQAPGQGLEWIGILPILKTPNYAQRFGQGRVTINA DESTSTVYMEMSSLRSED TAVYYCATHGGDRSYWGQGTTLTVS S	19
减去信号序列 的形式-3 重链	EVQLVESGAEVKEPGASVKVCSKSSGYSFTGNMHWVRQAPG QGLEWMGMNPKSGGTYYAQKFQGRVTMTWDTISISTAYMEL SGLTSDDTAVYYCARWARGSTSPHGLDVWGQGTTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSTLTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSRHAISWVRQAPGQGL EWIGILPILKTPNYAQRFGQGRVTINADSTSTVYMEMSSLRSED TAVYYCATHGGDRSYWGQGTTLTVSS	20
形式-1 轻链	<u>METDTLLLWVLLLWVPGSTGDVVM</u> TSQSPSSLSASVGDRVTITC QASQDISNWLNWYQQKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFGSGS SGTDFTFTISLQPEDATYYCQQYNNVLRFTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	21
减去信号序列 的形式-1 轻链	DVVMTSQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNWLNWYQQKPGKA PKLLIYEASNLETGVPSRFGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQ QYNNVLRFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	22
重链连接物	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	23

[0103] 在某些实施方案中,本发明的双特异性抗原结合多肽包含特异性结合人HER2的第一VH结构域和/或第二VH结构域。在某些实施方案中,抗-HER2VH结构域包含SEQ ID NO:1、4、7或10示出的HCDR3氨基酸序列,以及独立地选自表1中所示的重链HCDR2或HCDR1氨基酸序列中任一个的HCDR2和/或HCDR1序列。在某些实施方案中,抗-HER2VH结构域包含分别选自SEQ ID NO:1、2和3;4、5和6;7、8和9;以及10、11和12的HCDR3、HCDR2和HCDR1氨基酸序列。在某些实施方案中,抗-HER2VH结构域包含SEQ ID NO:13、14、15或16所示的氨基酸序列。

[0104] 在某些实施方案中,本发明的双特异性抗原结合多肽包含特异性结合人PDGFR β 的第一VH结构域和/或第二VH结构域。可以将结合PDGFR β 的任何VH结构域用于本发明的方法中。合适的VH结构域包括2012年12月5日提交的美国申请第13/705,978号(将其通过引用整体并入本文)中所示的那些。在某些实施方案中,抗-PDGFR β VH结构域包含SEQ ID NO:25所示的HCDR3氨基酸序列。在某些实施方案中,抗-PDGFR β VH结构域包含分别在SEQ ID NO:25、26和27所示的HCDR3、HCDR2和HCDR1氨基酸序列。在某些实施方案中,抗-PDGFR β VH结构域包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列。

[0105] 在某些实施方案中,本发明的双特异性抗原结合多肽包含特异性结合人PDGFR β 的VL。可以将结合PDGFR β 的任何VL结构域用于本发明的方法中。合适的VL结构域包括2012年12月5日提交的美国申请第13/705,978号所示的那些。在某些实施方案中,抗-PDGFR β VH结构域包含SEQ ID NO:25所示的HCDR3氨基酸序列。在某些实施方案中,抗-PDGFR β VL结构域包含分别在SEQ ID NO:29、30和31所示的HCDR3、HCDR2和HCDR1氨基酸序列。在某些实施方案中,抗-PDGFR β VL结构域包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列。

[0106] 在一个具体实施方案中,本发明的双特异性抗原结合多肽包含SEQ ID NO:18或20所示的重链。

[0107] 在一个具体实施方案中,本发明的双特异性抗原结合多肽包含SEQ ID NO:22所示的抗体轻链。

[0108] 在某些实施方案中,本发明的双特异性抗原结合多肽包含含有至少一个或多个保守性氨基酸取代(例如,1、2、3、4或5个保守性氨基酸取代等)的CDR、VH结构域、VL结构域、重链或轻链中的一个或多个。保守性氨基酸取代包括在一个类别中的氨基酸被同一类别的氨基酸取代,其中通过常见的物理化学氨基酸侧链性质和自然中发现的同源蛋白中的高取代频率(如通过例如标准Dayhoff频率交换矩阵或BLOSUM矩阵测定的)定义类别。已经被分类成六个一般类别的氨基酸侧链并且包括:I类(Cys);II类(Ser、Thr、Pro、Ala、Gly);III类(Asn、Asp、Gln、Glu);IV类(His、Arg、Lys);V类(Ile、Leu、Val、Met);和VI类(Phe、Tyr、Trp)。例如,Asp取代另一III类残基,如Asn、Gln或Glu是保守性取代。因此,预测的抗-PDGFR β 抗体中的非必需氨基酸残基优选被来自同一类别的另一氨基酸残基替换。鉴定不会消除抗原结合的氨基酸保守性取代的方法是本领域熟知的(参见,例如,Brummell等,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi等,Protein Eng.12(10):879-884(1999);以及Burks等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997),将其各自通过引用整体并入本文)。

[0109] 在某些实施方案中,本发明提供双特异性抗原结合多肽,其包含与本文公开的CDR、VH结构域、VL结构域、重链或轻链氨基酸序列具有约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性的CDR、VH结构域、VL结构域、重链或轻链氨基酸序列。

[0110] IV. 修饰的抗原结合多肽

[0111] 在某些实施方案中,本发明的抗原结合多肽可以包含一个或多个修饰。可以利用本领域已知的任何技术制备本发明的抗原结合多肽的修饰形式。

[0112] i) 降低免疫原性

[0113] 在某些实施方案中,利用本领域公认的技术对本发明的抗原结合多肽(例如双特异性抗原结合多肽、抗体或其抗原结合片段)进行修饰,以降低它们的免疫原性。例如,可将抗体或其片段嵌合化、人源化和/或去免疫化。

[0114] 在一个实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段可以是嵌合的。嵌合抗体是抗体的不同部分来源于不同的动物物种的抗体,如具有来源于鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体。生产嵌合抗体或其片段的方法在本领域是已知的。参见,例如Morrison,Science229:1202(1985);Oi等,BioTechniques 4:214(1986);Gillies等,J.Immunol.Methods 125:191-202(1989);美国专利第5,807,715号,第4,816,567号以及第4,816,397号,将其通过引用整体并入本文。可将为生产“嵌合抗体”所开发的技术

(Morrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855 (1984); Neuberger等, *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda等, *Nature* 314:452-454 (1985)) 用于所述分子的合成。例如, 可将编码小鼠抗PDGFR β 抗体分子的结合特异性的基因序列与来自具有合适的生物活性的人抗体分子的序列融合在一起。如本文所使用的, 嵌合抗体是不同部分来源于不同的动物物种的分子, 如具有来源于鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些抗体, 例如人源化抗体。

[0115] 在另一实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合部分是人源化的。人源化抗体具有结合特异性, 其包含来自非人抗体的一个或多个互补决定区 (CDR) 和来自人抗体分子的框架区。通常, 将用CDR供体抗体的相应残基取代人框架区的框架残基, 从而改变以及优选地提高抗原结合。通过本领域熟知的方法来确定这些框架取代, 例如通过对CDR与框架残基之间的相互作用进行建模以确定对抗原结合而言重要的框架残基, 以及通过序列比较确定位于具体位置的不寻常的框架残基。(参见, 例如Queen等, 美国专利第5,585,089号; Riechmann等, *Nature* 332:323 (1988), 将它们通过引用整体并入本文)。可以利用本领域已知的各种技术将抗体人源化, 包括例如, CDR移植 (EP 239,400; PCT公开WO 91/09967; 美国专利第5,225,539号, 第5,530,101号以及第5,585,089号, 将它们通过引用整体并入本文)、镶饰 (veneering) 或表面重塑 (resurfacing) (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology* 28 (4/5):489-498 (1991); Studnicka等, *Protein Engineering* 7 (6):805-814 (1994); Roguska等, *PNAS* 91:969-973 (1994), 将它们通过引用整体并入本文) 以及链替换 (美国专利第5,565,332号, 将其通过引用整体并入本文)。

[0116] 在一些实施方案中, 可将去免疫用于降低PDGFR β 抗原结合多肽 (例如抗体或其抗原结合部分) 的免疫原性。本文使用的术语“去免疫”包括为修饰T细胞表位进行的多肽 (例如抗体或其抗原结合部分) 改变 (参见, 例如W09852976A1、W00034317A2, 将它们通过引用整体并入本文)。例如, 可对来自本发明的起始PDGFR β 特异性抗体的VH和VL序列或其抗原结合部分进行分析, 以及可由各V区产生显示与序列内的互补决定区 (CDR) 以及其它关键残基相关的表位的位置的人T细胞表位“图谱”。对来自T细胞表位图谱的各T细胞表位进行分析, 以确定具有低的改变最终抗体的活性的风险的可选氨基酸取代。设计包含氨基酸取代的组合的一系列可选VH和VL序列, 并且随后将这些序列并入一系列抗原结合多肽, 以用于本文公开的诊断和治疗方法, 然后对其功能进行测试。然后将包含修饰的V区和人C区的完整重链和轻链基因克隆进表达载体, 并将后续质粒导入细胞系以产生全抗体。然后在合适的生物化学和生物分析中对抗体进行比较, 并确定最佳变体。

[0117] ii) 效应子功能和Fc修饰

[0118] 本发明的抗原结合多肽通常包含介导一种或多种效应子功能的抗体恒定区 (例如IgG恒定区, 例如人IgG恒定区, 例如人IgG1、2、3或4恒定区)。例如, 补体的C1组分与抗体恒定区的结合可以激活补体系统。补体的激活在调理作用 (opsonisation) 和细胞病原体的裂解中至关重要。补体的激活也刺激炎症应答, 并且还可能参与自身免疫性过敏。此外, 抗体经Fc区与不同细胞上的受体结合, 其中抗体Fc区上的Fc受体结合位点与细胞上的Fc受体 (FcR) 结合。存在许多对不同类别的抗体具有特异性的Fc受体, 所述抗体包括IgG (γ 受体)、IgE (ϵ 受体)、IgA (α 受体) 和IgM (μ 受体)。抗体与细胞表面上的Fc受体的结合引发了许多重要且不同的生物反应, 包括抗体包被颗粒的吞入与破坏、免疫复合物的清除、通过杀伤细胞

的抗体包被的靶细胞的裂解(被称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用或ADCC)、炎症介质的释放、胎盘转移以及免疫球蛋白产生的控制。在优选实施方案中,本发明的抗原结合多肽(例如抗体或其抗原结合片段)与Fc- γ 受体结合。在可选实施方案中,本发明的抗原结合多肽可以包含缺乏一种或多种效应子功能(例如ADCC活性)和/或不能与Fc γ 受体结合的恒定区。

[0119] 本发明的某些实施方案包括这样的抗原结合多肽:一个或多个恒定区结构域内的至少一个氨基酸被缺失或被以其它方式改变,以当与具有近似相同的免疫原性的全、未改变的抗体相比时,提供期望的生物化学特性,如降低的或增强的效应子功能、非共价二聚化的能力、增强的定位于肿瘤部位的能力、降低的血清半衰期或增加的血清半衰期。例如,用于本文所述的诊断和治疗方法的某些抗体或其片段是结构域缺失的抗体,其包含与免疫球蛋白重链类似的多肽链,但缺乏一个或多个重链结构域的至少一部分。例如,在某些抗体中,可以缺失修饰的抗体的恒定区的一整个结构域,例如可以缺失CH2结构域的全部或部分。

[0120] 在某些其它实施方案中,抗原结合多肽包含来源于不同抗体同种型的恒定区(例如来自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的两种或更多种的恒定区)。在其它实施方案中,抗原结合多肽包含嵌合铰链(即包含来源于不同抗体同种型的铰链结构域的铰链部分的铰链,例如来自IgG4分子的上铰链结构域和IgG1中交联结构域)。在一个实施方案中,抗原结合多肽包含来自人IgG4分子的Fc区或其部分以及所述分子的核心铰链区内的Ser228Pro突变(EU编号)。

[0121] 在某些实施方案中,可利用本领域已知的技术对Fc部分进行突变,以增加或减少效应子功能。例如,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其它方式)可以降低Fc受体与循环的修饰抗体的结合,从而增强肿瘤定位。在其它情况下,可能的是,与本发明一致的恒定区修饰减轻了补体结合,从而减少了血清半衰期以及缀合的细胞毒素的非特异性缔合。但是可将恒定区的其它修饰用于修饰允许由于增加的抗原特异性或柔性而增强定位的二硫键或寡糖部分。利用熟知的免疫学技术可以容易地测量和定量修饰所产生的生理学特征、生物利用度和其它生物化学效应,如肿瘤定位、生物分布和血清半衰期,而无需过度实验。

[0122] 在某些实施方案中,本发明的抗体中使用的Fc结构域是Fc变体。本文使用的术语“Fc变体”指这样的Fc结构域:相对于所述Fc结构域所来源的野生型Fc结构域,其含有至少一个氨基酸取代。例如,其中Fc结构域来源于人IgG1抗体,相对于所述Fc结构域,所述人IgG1Fc结构域的Fc变体包含至少一个氨基酸取代。

[0123] Fc变体的氨基酸取代可以位于Fc结构域内的任何位置(即任何EU约定的氨基酸位置)。在一个实施方案中,Fc变体包含位于铰链结构域或其部分的氨基酸位置处的取代。在另一实施方案中,Fc变体包含位于CH2结构域或其部分的氨基酸位置处的取代。在另一实施方案中,Fc变体包含位于CH3结构域或其部分的氨基酸位置处的取代。在另一实施方案中,Fc变体包含位于CH4结构域或其部分的氨基酸位置处的取代。

[0124] 本发明的抗原结合多肽可以使用已知赋予效应子功能和/或FcR结合的改进(例如降低或增强)的任何本领域公认的Fc变体。Fc变体可以包括,例如公开于下述的氨基酸取代的任何一种:国际PCT公开W088/07089A1、W096/14339A1、W098/05787A1、W098/23289A1、

W099/51642A1、W099/58572A1、W000/09560A2、W000/32767A1、W000/42072A2、W002/44215A2、W002/060919A2、W003/074569A2、W004/016750A2、W004/029207A2、W004/035752A2、W004/063351A2、W004/074455A2、W004/099249A2、W005/040217A2、W005/070963A1、W005/077981A2、W005/092925A2、W005/123780A2、W006/019447A1、W006/047350A2和W006/085967A2,或者美国专利第5,648,260号、第5,739,277号、第5,834,250号、第5,869,046号、第6,096,871号、第6,121,022号、第6,194,551号、第6,242,195号、第6,277,375号、第6,528,624号、第6,538,124号、第6,737,056号、第6,821,505号、第6,998,253号以及第7,083,784号,将其各自通过引用整体并入本文。在一个示例性实施方案中,本发明的结合多肽可以包含含有在EU位置268处的氨基酸取代(例如H268D或H268E)的Fc变体。在另一示例性实施方案中,本发明的结合多肽可以包含在EU位置239处的氨基酸取代(例如S239D或S239E)和/或在EU位置332处的氨基酸取代(例如I332D或I332Q)。

[0125] 在某些实施方案中,本发明的抗原结合多肽可以包含含有氨基酸取代的Fc变体,所述氨基酸取代改变了抗体的抗原独立的效应子功能,特别是结合多肽的循环半衰期。当与缺乏这些取代的抗原结合多肽相比时,此类抗原结合多肽显示出增加的或降低的与FcRn的结合,因此分别具有增加的或降低的血清半衰期。对FcRn具有增加的亲和力的Fc变体预期具有更长的血清半衰期,并且此类分子可应用于期望施用的抗原结合多肽具有长半衰期的治疗哺乳动物的方法中,例如以治疗慢性疾病或病症。相反地,具有降低的FcRn结合亲和力的Fc变体预期具有较短的半衰期,并且此类分子也可用于例如缩短循环时间可能有利的向哺乳动物的施用,例如用于体内诊断成像或者用于当长时间存在于循环中时起始抗体具有毒副作用的情况。具有降低的FcRn结合亲和力的Fc变体也不太可能穿过胎盘,因此也可用于孕妇的疾病或病症的治疗。此外,期望降低的FcRn结合亲和力的其它应用包括期望定位脑、肾和/或肝脏的那些应用。在一个示例性实施方案中,本发明的改变的抗原结合多肽显示出降低的由脉管系统穿过肾的肾小球上皮的运输。在另一实施方案中,本发明的改变的抗原结合多肽显示出降低的由脑穿过血脑屏障(BBB)至脉管间隙的运输。在一个实施方案中,具有改变的FcRn结合的抗体包含在Fc结构域的“FcRn结合环”内具有一个或多个氨基酸取代的Fc结构域。FcRn结合环由氨基酸残基280-299(根据EU编号)组成。改变了FcRn结合活性的示例性的氨基酸取代公开于国际PCT公开第W005/047327号中,将其通过引用并入本文。在某些示例性实施方案中,本发明的抗原结合多肽包含具有下述取代的一个或多个的Fc结构域:V284E、H285E、N286D、K290E和S304D(EU编号)。

[0126] 在其它实施方案中,用于本文描述的诊断和治疗方法的抗原结合多肽具有恒定区,例如IgG1重链恒定区,将其改变以降低或消除糖基化。例如,本发明的抗原结合多肽还可以包含含有改变抗体Fc的糖基化的氨基酸取代的Fc变体。例如,所述Fc变体可以具有降低的糖基化(例如N-或O-连接的糖基化)。在示例性实施方案中,Fc变体包含通常见于氨基酸位置297(EU编号)的N-连接的聚糖的降低的糖基化。在另一实施方案中,抗原结合多肽具有邻近糖基化基序或者在糖基化基序内的氨基酸取代,例如含有氨基酸序列NXT或NXS的N-连接的糖基化基序。在具体实施方案中,抗原结合多肽包含具有在氨基酸位置228或299(EU编号)处的氨基酸取代的Fc变体。在更具体的实施方案中,抗原结合多肽包含含有S228P和T299A突变(EU编号)的IgG1或IgG4恒定区。

[0127] 赋予降低的或改变的糖基化的示例性的氨基酸取代公开于国际PCT公开第W005/

018572号,将其通过引用整体并入本文。在优选实施方案中,修饰本发明的抗原结合多肽以消除糖基化。此类抗原结合多肽可被称作“agly”抗原结合多肽。尽管不受理论束缚,据信“agly”抗原结合多肽在体内可能具有提高的安全性和稳定性特征。示例性的agly抗原结合多肽包含IgG4抗体的非糖基化的Fc区域,其缺乏Fc-效应子功能,从而消除了Fc介导的对表达PDGFR β 的正常生命器官的毒性的可能性。在其它实施方案中,本发明的抗原结合多肽包含改变的聚糖。例如,抗原结合多肽在Fc区的Asn297处的N-聚糖上可以含有降低数量的海藻糖残基,即是无海藻糖基化的(afucosylated)。在另一实施方案中,抗原结合多肽在Fc区的Asn297处的N-聚糖上可以具有改变数量的唾液酸残基。

[0128] iii) 共价连接

[0129] 可以通过下述对本发明的抗原结合多肽进行修饰:将分子共价连接至结合多肽以使共价连接不阻止结合多肽与其同源表位的特异性结合。例如但不限于,可以通过下述对本发明的抗原结合多肽进行修饰:糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团的衍生、蛋白水解剪切、与细胞配体或其它蛋白连接等。可以通过已知的技术进行任何大量化学修饰,包括但不限于特定的化学剪切、乙酰化、甲酰化等。此外,衍生物可以包含一种或多种非经典氨基酸。

[0130] 还可将本发明的抗原结合多肽在N-或C-端与异源多肽重组融合或者与多肽或其它组合物化学缀合(包括共价和非共价连接缀合)。例如,可将抗原结合多肽与可用作检测分析中的标记的分子以及效应分子重组融合或缀合,所述分子如异源多肽、药物、放射性核素或毒素。参见,例如PCT公开WO 92/08495、WO 91/14438、WO 89/12624,美国专利第5,314,995号以及EP 396,387,将其各自通过引用整体并入本文。

[0131] 利用本领域已知的方法,可将抗原结合多肽与异源多肽融合以增加体内半衰期或用于免疫分析。例如,在一个实施方案中,可将PEG与本发明的抗原结合多肽缀合,以增加它们在体内的半衰期(参见Leong, S.R.等, Cytokine 16:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); 或Weir等, Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002), 将它们通过引用整体并入本文。

[0132] 此外,可将本发明的抗原结合多肽与标志物序列(例如肽)融合,以促进它们的纯化或检测。在优选实施方案中,标志物氨基酸序列为六个组氨酸的肽,如pQE载体(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)中提供的标签等,其中许多可商购得到。如Gentz等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989) (将其通过引用整体并入本文)中所述的,例如六个组氨酸提供了方便的融合蛋白纯化。可用于纯化的其它肽标签包括但不限于“HA”标签和“flag”标签,所述“HA”标签与来源于流感血细胞凝集素蛋白的表位相对应(Wilson等, Cell 37:767 (1984), 将其通过引用整体并入本文)。

[0133] 本发明的抗原结合多肽可以以非缀合的形式使用或者可以与多种分子的至少一种缀合,例如以改善所述分子的治疗特性,以促进靶标检测或者用于成像或患者的治疗。当进行纯化时,可在纯化之前或之后将本发明的抗原结合多肽进行标记或缀合。特别地,可将本发明的抗原结合多肽与下述缀合:治疗剂、前药、肽、蛋白、酶、病毒、脂类、生物效应调节物、药剂或PEG。

[0134] 本发明还涵盖与诊断剂或治疗剂缀合的本发明的抗原结合多肽。可将抗原结合多肽作为临床测试程序的一部分,诊断性地用于例如监测免疫细胞病症(例如CLL)的发展或

进展,从而例如确定给定的治疗和/或预防方案的效力。可以通过将抗原结合多肽与可检测的物质结合来促进检测。可检测的物质的实例包括不同的酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性材料、利用不同的正电子发射断层扫描的正电子发射型金属以及非放射性顺磁金属离子。对于根据本申请可与抗体缀合以被用作诊断剂的金属离子参见,例如美国专利第4,741,900号(将其通过引用整体并入本文)。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括荧光素酶、萤光素和水母素;以及合适的放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 或 ^{99}Tc 。

[0135] 可将用于本文公开的诊断和治疗方法的抗原结合多肽与下述缀合:细胞毒素(如放射性同位素、细胞毒性药物或毒素)治疗剂、细胞抑制剂、生物毒素、前药、肽、蛋白、酶、病毒、脂类、生物效应调节物、药剂、免疫活性配体(例如淋巴因子或其它抗体,其中产生的分子既与赘生性细胞结合又与效应细胞如T细胞结合)或PEG。

[0136] 在另一实施方案中,可将用于本文公开的诊断和治疗方法的抗原结合多肽与降低肿瘤细胞生长的分子缀合。在其它实施方案中,公开的组合物可以包含与药物或前药结合的抗体或其片段。本发明的其它实施方案还包括与特定的生物毒素或其细胞毒性片段缀合的抗原结合多肽的用途,所述生物毒素如蓖麻毒素、白树毒素、假单胞菌外毒素或白喉毒素。选择使用缀合的或未缀合的抗体将取决于癌症的类型和阶段、辅助治疗的使用(例如化疗或外部辐射)以及患者的状况。将会理解,鉴于本文的教导,本领域技术人员能够容易地做出此类选择。

[0137] 将会理解,在之前的研究中,用同位素标记的抗肿瘤抗体已被成功地用于破坏动物模型中的肿瘤细胞,以及在一些情况下破坏人体中的肿瘤细胞。示例性的放射性同位素包括: ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 以及 ^{188}Re 。放射性核素通过产生引起核DNA中多处链断裂,导致细胞死亡的电离辐射发挥作用。用于产生治疗缀合物的同位素通常产生具有短路径长度的高能量 α -或 β -颗粒。此类放射性核素杀死其紧密靠近的细胞,例如结合物与之接触或者已经进入的赘生性细胞。它们对非局部化的细胞影响小或者无影响。放射性核素基本上是非免疫原性的。

[0138] V. 抗原结合多肽的表达

[0139] 在对提供如上文所述的本发明的抗原结合多肽的分离的遗传材料进行操作之后,通常将基因插入表达载体以导入可用于产生期望量的抗原结合多肽的宿主细胞。

[0140] 出于说明书和权利要求的目的,本文使用术语“载体”或“表达载体”意为,根据本发明用作用于将期望的基因导入细胞并在细胞中表达的媒介物的载体。如本领域技术人员所知,可从质粒、噬菌体、病毒和逆转录病毒中容易地选择此类载体。通常,与本发明相容的载体将包含选择标志物、促进期望的基因的克隆的合适的限制性位点以及进入和/或在真核或原核细胞内复制的能力。

[0141] 出于本发明的目的,可以使用许多表达载体系统。例如,利用来源于动物病毒的DNA元件的一类载体,所述动物病毒如牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、痘苗病毒、杆状病毒、逆转录病毒(RSV、MMTV或MOMLV)或SV40病毒。其它的涉及使用具有内部核糖体结合位点

的多顺反子系统。此外,可以通过导入允许选择转染的宿主细胞的一种或多种标志物来选择已将DNA整合进它们的染色体的细胞。所述标志物可以向营养缺陷型宿主提供原养,提供抗微生物抗性(例如抗生素)或对重金属如铜的抗性。可将可选择的标志物基因与待表达的DNA序列直接相连,或者通过共转化将其导入同一细胞。mRNA的优化合成可能还需要其它元件。这些元件可以包括信号序列、剪接信号、转录启动子、增强子以及终止信号。在特别优选的实施方案中,将克隆的可变区基因与如上文所讨论合成的重链和轻链恒定区基因(优选人的)一起插入表达载体中。

[0142] 在其它优选实施方案中,可以利用多顺反子构建体来表达本发明的抗原结合多肽。在此类表达系统中,可由单一多顺反子构建体产生多种目标基因产物,如抗体的重链和轻链。这些系统有利地利用了内部核糖体进入位点(IRES),以在真核宿主细胞中提供相对高水平的本发明的多肽。相容的IRES序列公开于美国专利第6,193,980号,将其通过引用整体并入本文。本领域技术人员将会理解,可将此类表达系统用于有效地产生本申请中公开的全部范围的多肽。

[0143] 更普遍而言,一旦制备了编码抗体或其片段的载体或DNA序列,则可将表达载体导入合适的宿主细胞。即,可以转化宿主细胞。可以通过本领域技术人员熟知的各种技术来完成质粒向宿主细胞的导入。这些包括但不限于:转染(包括电泳和电穿孔)、原生质体融合、磷酸钙沉淀、用包封的DNA进行的细胞融合、显微注射以及用完整病毒进行的感染。参见,Ridgway,A.A.G.“Mammalian Expression Vectors”第24.2章,470-472页,Vectors,Rodriguez and Denhardt,Eds.(Butterworths,Boston,Mass.1988),将其通过引用整体并入本文。最优选地,经电穿孔将质粒导入宿主。转化的细胞在适于轻链和重链产生的条件下生长,并分析重链和/或轻链蛋白的合成。示例性的分析技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或者荧光激活细胞分选仪分析(FACS)、免疫组织化学等。

[0144] 本文使用的术语“转化”应在广义上被用于指DNA向受体宿主细胞的导入,所述导入改变了基因型并随后导致受体细胞的变化。

[0145] 同样地,“宿主细胞”指利用重组DNA技术构建的转化有载体并编码至少一种异源基因的细胞。在用于从重组宿主中分离多肽的过程的描述中,术语“细胞”和“细胞培养物”可互换使用,以表示抗体来源,除非另外明确指定。换言之,从“细胞”回收多肽可以意为从离心的全细胞或者从既含有培养基又含有悬浮细胞的细胞培养物回收多肽。

[0146] 在一个实施方案中,用于表达抗原结合多肽的宿主细胞系是哺乳动物来源的;本领域技术人员可以确定最适合期望的基因产物在其中表达的具体宿主细胞系。示例性的宿主细胞系包括但不限于:DG44和DUXB11(中国仓鼠卵巢细胞系,DHFR阴性)、HELA(人宫颈癌)、CVI(猴肾细胞系)、COS(含有SV40T抗原的CVI的衍生物)、R1610(中国仓鼠成纤维细胞)BALBC/3T3(小鼠成纤维细胞)、HAK(仓鼠肾细胞系)、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT(牛内皮细胞)、RAJI(人淋巴细胞)、293(人肾细胞)。在一个实施方案中,细胞系提供了由其表达的抗体的改变的糖基化,例如无海藻糖基化(例如PER.C6.RTM.(CruCell)或FUT8敲除的CHO细胞系(Potelligent.RTM.Cells)(Biowa,Princeton,N.J.))。在一个实施方案中,可以使用NS0细胞。特别优选CHO细胞。宿主细胞系通常可由商业服务(美国组织培养库)得到或由公开的文献得到。

[0147] 体外生产允许扩大,以给出大量的期望多肽。在组织培养条件下培养哺乳动物细

胞的技术在本领域是已知的,并且包括均匀悬浮培养(例如在气升式反应器或在连续搅拌反应器中)或者固定化或包裹的细胞培养(例如在中空纤维、微囊体中,在琼脂糖微珠或陶瓷盒(ceramic cartridge)上)。如果需要和/或期望,可通过常规层析法纯化多肽溶液,例如凝胶过滤、离子交换层析、经DEAE-纤维素的层析和/或(免疫-)亲和层析。

[0148] 编码本发明的抗原结合多肽的基因也可在非哺乳动物细胞如细菌或酵母或植物细胞中表达。就这一点而言,将会理解,也可转化不同的单细胞非哺乳动物微生物,如细菌;即能够在培养物或发酵中生长的微生物。易于转化的细菌包括肠杆菌科成员,如大肠杆菌(*Escherichia coli*)或沙门氏菌(*Salmonella*)菌株;芽孢杆菌(*Bacillaceae*),如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);肺炎双球菌(*Pneumococcus*);链球菌(*Streptococcus*)以及流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)。还将会理解,当在细菌中表达时,多肽可以成为包涵体的一部分。必须将多肽分离、纯化,然后组装成功能性分子。

[0149] 除原核生物之外,也可以使用真核微生物。尽管通常可获得许多其它菌株,但是在真核微生物中,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常规的面包酵母是最常用的。对于在酵母中的表达,例如通常使用质粒YRp7(Stinchcomb等, *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman等, *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper等, *Gene*, 10:157 (1980),将其各自通过引用整体并入本文)。该质粒已经包含了TRP1基因,所述基因提供了缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变菌株(例如ATCC第44076号或PEP4-1(Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)))的选择标志物,将其通过引用整体并入本文)。作为酵母宿主细胞基因组的特征的

[0150] VI. 抗原结合多肽的药物制剂和施用方法

[0151] 在另一方面,本发明提供了包含本文公开的抗原结合多肽的药物组合物。

[0152] 制备和向对象施用本发明的抗原结合多肽的方法对本领域人员而言是熟知的,或者可以容易地确定。本发明的抗原结合多肽的施用途径可以是口服施用、肠胃外施用、吸入施用或局部施用。本文使用的术语肠胃外施用包括静脉内施用、动脉内施用、腹膜内施用、肌肉内施用、皮下施用、直肠或阴道施用。通过优选静脉内施用、动脉内施用、皮下施用和肌肉内施用的肠胃外施用形式。尽管所有这些施用形式均被明确地考虑在本发明的范围内,但是对于注射特别是对于静脉内或动脉内注射或滴注,施用形式将是溶液。通常,用于注射的合适的药物组合物可以包含缓冲液(例如醋酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液)、表面活性剂(例如聚山梨酯),任选地稳定剂(例如人白蛋白)等。然而,在与本文的教导相容的其它方法中,可将抗原结合多肽直接递送至不良细胞群的部位,从而增加病变组织对治疗剂的暴露。

[0153] 肠胃外施用的制剂包括无菌水溶液或非水性溶液、悬浮液和乳状液。非水性溶剂的实例为丙二醇,聚乙二醇,植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯类(如油酸乙酯)。水性载体包括水、醇/水溶液、乳状液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。在本发明中,药学可接受的载体包括但不限于0.01-0.1M的磷酸盐缓冲液以及优选地0.05M的磷酸盐缓冲液或者0.8%的盐水。其它常规肠胃外媒介物包括磷酸钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格式液或固定油。静脉内媒介物包括液体和营养补充物、电解质补充物(如基于林格氏葡萄糖的那些)等。也可存在防腐剂和其添加物,如例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。更具体地,适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(如果可溶于水)或分散体以及

用于无菌可注射的溶液或分散体临时制备的无菌粉末。在此类情况下,组合物必须是无菌的,并且应是达到易于注射程度的流体。其在制备和储存条件下应是稳定的,并且将优选保存不受微生物(如细菌和真菌)的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。可以例如通过使用包衣如卵磷脂,通过维持所需的颗粒尺寸(在分散体的情况下)以及通过使用表面活性剂来维持合适的流动性。可以通过不同的抗细菌剂和抗真菌剂来实现对微生物作用的预防,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况下,将优选在组合物中包含等渗剂,例如糖/多元醇(如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)而导致可注射的组合物延长的吸收。

[0154] 在任何情况下,可以通过下述来制备无菌可注射的溶液:在合适的溶剂中以需要的量掺入活性化合物(例如抗体自身或与其它活性剂组合的抗体)和按需要本文列举的成分中一种或组合,然后过滤除菌。通常,通过将活性化合物掺入包含基础分散介质和来自上文所列的那些的所需其它成分的无菌媒介物来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,所述方法由活性成分和任何其它期望成分的预先无菌过滤溶液得到了活性成分和任何其它期望成分的粉末。根据本领域已知的方法,处理用于注射的制剂,将其填充至容器(如安瓿、包、瓶、注射器或小瓶)中,并在无菌条件下密封。此外,可以如共同未决的美国系列号09/259,337和美国系列号09/259,338中所述的那些(将其各自通过引用并入本文),以试剂盒的形式包装并出售制剂。此类制品将优选包含指示相关组合物可用于治疗罹患或者易患自身免疫病症或赘生性病症的对象的标签或包装嵌入物。

[0155] 用于治疗上文所述病况的本发明的稳定的抗原结合多肽的有效剂量根据许多不同的因素而改变,包括施用方式、靶标位置、患者的生理状态、患者是人还是动物、施用的其它药物以及治疗是预防性的还是治疗性的。通常,患者是人,但是也可治疗非人类的哺乳动物包括转基因哺乳动物。可以利用本领域技术人员已知的常规方法来滴定治疗剂量,以优化安全性和效力。

[0156] 对于用本发明的抗体进行的被动免疫,剂量范围可以是,例如约0.0001至100mg/kg对象体重,以及更通常为0.01mg/kg对象体重至5mg/kg对象体重(例如0.02mg/kg对象体重、0.25mg/kg对象体重、0.5mg/kg对象体重、0.75mg/kg对象体重、1mg/kg对象体重、2mg/kg对象体重等)。例如,剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重或者在1-10mg/kg范围内,优选地至少1mg/kg。以上范围中间的剂量也意图在本发明的范围内。

[0157] 可以每天、隔天、每周或者根据通过经验分析确定的任何其它安排向对象施用此种剂量。示例性的治疗需要在例如至少六个月的长时间内以多个剂量施用。其它示例性的治疗方案需要每两周施用一次或者每个月施用一次或者每3至6个月施用一次。示例性的剂量安排包括连续几天1-10mg/kg或15mg/kg,隔天30mg/kg或者每周60mg/kg。在一些方法中,同时施用具有不同结合特异性的两种或更多种抗原结合多肽,在这种情况下,施用的各抗体的剂量可能落入指示的范围内。

[0158] 可以在多个时机施用本发明的抗原结合多肽。单剂量之间的间隔可以是,例如每天、每周、每月或每年。如通过测量患者的多肽或靶标分子的血液水平所示的,间隔也可以是无规律的。在一些方法中,调整剂量以达到某血浆抗体或毒素浓度,例如1-1000 μ g/ml或

25-300 μ g/ml。可选地,可以作为缓释制剂施用抗原结合多肽,在此种情况下,需要较低频率施用。剂量和频率根据患者中的抗原结合多肽的半衰期而改变。通常而言,人源化的抗原结合多肽显示出最长的半衰期,然后是嵌合的抗原结合多肽和非人类抗原结合多肽。在一个实施方案中,可以施用未缀合形式的本发明的抗原结合多肽。在另一实施方案中,可以多次施用缀合形式的本发明的抗原结合多肽。在另一实施方案中,可以施用未缀合形式的本发明的抗原结合多肽,然后施用缀合形式,或者反之亦然。

[0159] 施用的剂量和频率可以根据治疗是预防性的还是治疗性的而改变。在预防性应用中,向还未处于疾病状态的患者施用包含本发明抗体或其混合物的组合物,以增强患者的抵抗力。将此量定义为“预防有效剂量”。在该用途中,精确的量再次取决于患者的健康和全身免疫状态,但是通常范围为每剂量0.1mg至25mg,特别是每剂量0.5mg至2.5mg。在长时间段内,以相对不频繁的间隔施用相对低的剂量。一些患者在其余生继续接受治疗。

[0160] 在治疗性应用中,有时需要在相对短的间隔的相对高剂量(例如每剂量约1至400mg/kg抗体,其中对于放射免疫缀合物,更常使用5mg至25mg的剂量,以及对于细胞毒素-药物缀合的分子,更常使用更高的剂量),直至疾病进展减缓或终止,以及优选地直至患者显示出疾病症状的部分或完全改善。此后,可以向患者施用预防性方案。

[0161] 在一个实施方案中,可以用编码本发明的多肽的核酸(例如在载体内)来治疗对象。编码多肽的核酸的剂量范围为每位患者约10ng至1g、100ng至100mg、1 μ g至10mg或者30-300 μ g DNA。传染性病毒载体的剂量为每剂量10个-100个或者更多个。

[0162] 对于预防性和/或治疗性治疗,可以通过下述方式施用治疗剂:肠胃外施用、局部施用、静脉内施用、口服施用、皮下施用、动脉内施用、颅内施用、腹膜内施用、鼻内施用或肌肉内施用。对于施用本发明的抗体,优选肌肉内注射或静脉灌输。在一些方法中,将治疗性抗体或其片段直接注射进颅内。在一些方法中,将抗体或其片段作为缓释组合物或装置(如MedipadTM装置)来施用。

[0163] 任选地,可将本发明的抗原结合多肽与有效治疗需要治疗(例如预防性的或治疗性的)的病症或病况的其它药剂组合施用。优选的其它药剂为本领域公认的以及规范地施用于具体病症的那些药剂。

[0164] 本发明的⁹⁰Y-标记的抗体的有效单一治疗剂量(即治疗有效量)的范围为约5mCi至约75mCi,更优选约10mCi至约40mCi。¹³¹I-标记的抗原结合多肽的有效单一治疗非骨髓消融剂量的范围为约5mCi至约70mCi,更优选约5mCi至约40mCi。¹³¹I-标记的抗体的有效单一治疗消融剂量(即可能需要自体骨髓移植)的范围为约30mCi至约600mCi,更优选约50mCi至小于约500mCi。

[0165] 尽管已经用¹³¹I和⁹⁰Y获得了大量临床经验,但是其它放射性标记在本领域也是已知的并已用于类似的目的。其它放射性同位素仍被用于成像。例如,与本发明的范围相容的其它放射性同位素包括但不限于:¹²³I、¹²⁵I、³²P、⁵⁷Co、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁷⁷Br、⁸¹Rb、⁸¹Kr、⁸⁷Sr、¹¹³In、¹²⁷Cs、¹²⁹Cs、¹³²I、¹⁹⁷Hg、²⁰³Pb、²⁰⁶Bi、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、²¹²Pb、²¹²Bi、⁴⁷Sc、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹⁵³Sm、¹⁸⁸Re、¹⁹⁹Au、²²⁵Ac、²¹¹At以及²¹³Bi。在这一方面, α 、 γ 和 β 发射体均与本发明相容。此外,鉴于本公开,认为本领域技术人员能够容易地确定哪种放射性核素与选择的疗程相容,而无需过度实验。为此,已用于临床诊断的其它放射性核素包括¹²⁵I、¹²³I、⁹⁹Tc、⁴³K、⁵²Fe、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga以及¹¹¹In。对于在靶向免疫疗法中的可能用途,也用各种放射性核素对抗体进行了标记

(Peirersz等.Immunol.Cell Biol.65:111-125(1987),将其通过引用整体并入本文)。在较小程度上,这些放射性核素包括¹⁸⁸Re和¹⁸⁶Re以及¹⁹⁹Au和⁶⁷Cu。美国专利第5,460,785号提供了关于此类放射性同位素的其它数据,并将其通过引用整体并入本文。

[0166] 如之前所讨论的,对于哺乳动物病症的体内治疗,可以以药学有效的量施用本发明的抗原结合多肽。就这一点而言,将会理解,可以配制公开的抗原结合多肽,从而促进施用以及促进活性剂的稳定性。优选地,根据本发明的药物组合物包含药学可接受的无毒无菌载体,如生理盐水、无毒缓冲液、防腐剂等。出于本申请的目的,与治疗剂缀合或未缀合的本发明的抗原结合多肽的药学有效量应被理解为意为这样的量:其足以实现与靶标的有效结合以及足以达到例如改善疾病或病症的症状的益处或者足以检测物质或细胞。在肿瘤细胞的情况下,多肽将优选地能够与赘生性细胞或免疫反应性细胞上选择的免疫反应性抗原相互作用,以及提供这些细胞的死亡的增加。当然,可以单剂量或多剂量施用本发明的药物组合物,以提供药学有效量的多肽。

[0167] 与本公开的范围一致,根据前述的治疗方法,可以以足以产生治疗或预防效果的量向人或其它动物施用本发明的抗原结合多肽。可以以通过根据已知的技术将本发明的抗体与常规药学可接受的载体或稀释剂组合而制备的常规剂型,向此类人或其它动物施用本发明的抗原结合多肽。本领域技术人员将会认识到,药学可接受的载体或稀释剂的形式和特征由与之组合的活性成分的量、施用途径以及其它熟知的变量决定。本领域技术人员还将理解,包含根据本发明的多肽的一种或多种的混合物可被证明特别有效。

[0168] VII. 治疗疾病或病症的方法

[0169] 本发明的抗原结合多肽可用于拮抗细胞表面受体如HER2和/或PDGFR β 的活性。因此,在另一方面,本发明提供了通过向需要的对象施用包含本发明的一种或多种抗原结合多肽的药物组合物来治疗PDGFR β -和/或HER2-相关疾病或病症的方法。

[0170] 在某些实施方案中,将本文公开的抗PDGFR β 、抗HER2和/或双特异性抗原结合多肽(例如SEQ ID No:13-16、17-22和/或24中所示的那些)与其它治疗剂组合施用。合适的治疗剂包括而限于EGFR家族受体活性抑制剂(例如曲妥珠单抗(CAS#180288-69-1)、帕妥珠单抗(CAS#380610-27-5)、西妥昔单抗(CAS#205923-56-4)和埃罗替尼(CAS#183321-74-6)。在一个具体实施方案中,将抗PDGFR β /抗HER2双特异性抗原结合多肽与曲妥珠单抗和/或帕妥珠单抗组合施用。在一个具体实施方案中,将抗HER2单特异性抗原结合多肽与曲妥珠单抗和/或帕妥珠单抗组合施用。

[0171] 适于治疗的疾病或病症包括而限于癌症,例如乳腺癌和卵巢癌。

[0172] 本领域技术人员将能够通过常规实验确定出于治疗PDGFR β -和/或HER2-相关疾病或病症的目的的抗体(或其它治疗剂)的有效无毒的量将是多少。例如,多肽的治疗有效量可以根据下述因素而改变:诸如疾病阶段(例如阶段I对比阶段IV)、年龄、性别、医学并发症(例如免疫抑制的病况或疾病)和对象的体重以及抗体在对象中引发期望的应答的能力。可以调整剂量方案以提供最佳治疗应答。例如,可以每天施用若干分剂量,或者可以如治疗状况的紧急情况所指示的按比例降低剂量。然而,通常,期望有效剂量在每天每千克体重约0.05至100毫克,以及更优选地每天每千克体重0.5毫克至10毫克的范围内。

[0173] VIII. 实施例

[0174] 通过下述实施例进一步阐明本发明,所述实施例不应被解释为进一步限定。将序

列表、附图以及贯穿本申请所引用的全部参考文献、专利和公开的专利申请的内容通过引用明确并入本文。

[0175] 实施例1. HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽的产生

[0176] 合成编码不同HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽形式的基因,并将其克隆进哺乳动物表达载体。然后根据标准方案将构建体瞬时转染进HEK293细胞。收集上清液并检测表达。图5显示了表达的双特异性形式2(表4中的SEQ ID No 18)的二聚物的SDS-PAGE凝胶。凝胶显示,在非还原条件下,表达了期望的125Da的多肽(泳道2),以及在还原条件下其解离为期望的62.5kDa的单体(泳道1)。

[0177] 实施例2. 利用ELISA评估HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽的表达

[0178] 开发ELISA分析以测定细胞上清液中HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽的表达。简言之,在Maxisorp Immulon板上过夜捕获2 μ g/mL抗人Fc抗体,并用Superblock封闭。将上清液连续稀释,并负载于板上。将培养基类似地稀释,并作为阴性对照平行负载。用抗人Fab特异性HRP检测双特异性抗原结合多肽。图6中所示的结果显示,ELISA分析能够检测HEK293细胞上清液中的双特异性抗原结合多肽。

[0179] 实施例3. 利用ELISA检测HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽的同时抗原结合

[0180] 开发ELISA分析以检测HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽与HER2和PDGFR β 的同时结合。简言之,将2 μ g/mL人Her2-Fc融合蛋白(不含His表位标签)固定化于Maxisorp Immulon板上过夜,并用Superblock封闭。将包含双特异性抗原结合多肽的HEK293细胞上清液连续稀释,并负载于板上。孵育1小时之后,洗涤板,并将100nM人PDGFR β -Fc融合物(含His表位标签)加载于板,孵育1小时。利用抗His HRP检测双特异性Ab与Her2和PDGFR β 的结合。图7中所示的结果显示,双特异性抗原结合多肽能够同时与HER2和PDGFR β 结合。

[0181] 实施例4. HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽的基于FACS的结合分析

[0182] 开发基于FACS的结合分析,以检测当表达于细胞表面上时,HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽与HER2和PDGFR β 的同时结合。具体地,以1百万个细胞/ml将200 μ l组成型过表达HER2的HEK293细胞或瞬时过表达PDGFR β 的HEK293细胞或者模拟转染的对照细胞铺于新的96孔板上。将细胞维持在4 $^{\circ}$ C以避免受体内化。将包含形式-2或形式-3的HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽(参见表4以及图2和3)的HEK293细胞上清液与25nM重组人PDGFR β -CF647或重组人Her2-CF647孵育,以允许形成双特异性/标记的蛋白复合物。孵育后,向适当表达HER2的细胞、表达PDGFR β 的细胞或者对照细胞添加100 μ l各上清液,在4 $^{\circ}$ C孵育并震动2小时,以允许双特异性/标记的蛋白复合物与细胞表面HER2和PDGFR β 的结合。孵育之后,通过在1500rpm离心4min使细胞成团,用200 μ l新鲜完全培养基洗涤一次,并在200 μ l终体积的新鲜完全培养基中重悬。利用Guava流式细胞仪(Millipore)确定荧光标记的PDGFR β -CF647或Her2-CF647与细胞的结合。沿X-轴的正向位移被认为指示标记的PDGFR β -CF647或Her2-CF647与细胞的缔合。

[0183] 在这些实验中,将抗PDGFR抗体或抗HER2抗体、仅培养基以及CF647标记的受体用作阴性对照。将25nM CF647标记的HER2抗体或者50nM CF647标记的PDGFR β 抗体分别用作表达HER2和PDGFR β 的细胞的阳性对照。

[0184] 这些实验的结果显示于图8中。该数据显示形式-2和形式-3的HER2/PDGFR β 双特异性抗原结合多肽均能同时结合细胞表面的HER2和PDGFR β 。

[0185] 实施例4. 示例性抗HER2VH结构域与HER2的结合分析

[0186] 利用表面等离子体共振分析 (Biacore) 分析B8抗HER2VH结构域 (SEQ ID NO:13) 与HER2的结合动力学。如图9所示, B8VH结构域显示出1.2nM的Kd, $1.39 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 的结合速率以及 $1.67 \times 10^4 \text{s}^{-1}$ 的解离速率。

[0187] 利用基于FACS的分析来分析B8VH结构域与曲妥珠单抗和/或帕妥珠单抗的竞争结合的能力。图9所示的结果证明B8VH结构域可与曲妥珠单抗和帕妥珠单抗同时结合HER2。这些数据证明抗HER2VH结构域与不同于曲妥珠单抗和帕妥珠单抗的HER2上的表位结合。

[0188] 将B8VH结构域重新格式化进scFv, 并确定对HER2的结合亲和力。图10所示的结果显示, B8scFv显示出0.87nM的Kd。

[0189] 实施例5. 细胞增殖分析

[0190] 利用MTS细胞增殖分析确定B12抗HER2VH结构域 (SEQ ID NO:14)、曲妥珠单抗或帕妥珠单抗单独或者组合抑制SK-BR-3细胞的增殖的能力。图11所示的结果显示, B12VH、曲妥珠单抗和帕妥珠单抗的组合导致比单独各试剂或仅曲妥珠单抗与帕妥珠单抗的组合获得的更强的细胞增殖抑制。这些数据证明B12VH可被用于增加曲妥珠单抗和帕妥珠单抗的细胞增殖抑制。

序列表

<110> X博迪公司

<120> 双特异性抗原结合多肽

<130> 566843: XBI-006PC

<140> PCT/US15/21668

<141> 2015-03-20

<150> 61/968,437

<151> 2014-03-21

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 1

[0001] Trp Ala Arg Gly Ser Thr Ser Pro His Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 2

Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Lys Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln
1 5 10 15

Lys Phe Gln Gly
20

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 3

Gly Asn Tyr Met His
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 4
Asp Pro Arg Ala Ala Thr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 5
Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

[0002]

Gly

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 6
Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 7
Gly Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 8
Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

[0003] <400> 9
Asp Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 10
Gly Phe Gly Gly Asn Gly Ser Tyr Thr Thr Pro Leu
1 5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 11
Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 12

Asp Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 13

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 13

[0004] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Asn
20 25 30

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

Gly Trp Met Asn Pro Lys Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Trp Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Ala Arg Gly Ser Thr Ser Pro His Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 14
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 14
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

[0005]

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的多肽

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0006]

<210> 16

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Phe Gly Gly Asn Gly Ser Tyr Thr Thr Pro Leu Arg Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 608

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 17

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

[0007]

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
20 25 30

Lys Pro Gly Ser Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr
35 40 45

Phe Ser Arg His Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Leu Pro Ile Leu Lys Thr Pro Asn Tyr
65 70 75 80

Ala Gln Arg Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Asn Ala Asp Glu Ser Thr
85 90 95

Ser Thr Val Tyr Met Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Thr His Gly Gly Asp Arg Ser Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

	130		135		140														
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala			
	145					150					155					160			
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser			
					165					170					175				
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val			
				180					185					190					
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro			
		195						200					205						
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys			
	210						215					220							
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp			
	225					230					235					240			
[0008]	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly			
					245					250					255				
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile			
				260					265					270					
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu			
			275					280					285						
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His			
	290						295					300							
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg			
	305					310					315					320			
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys			
					325					330					335				
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu			
				340					345					350					
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr			
		355						360					365						

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
465 470 475 480

[0009]

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu
485 490 495

Val Lys Glu Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly
500 505 510

Tyr Ser Phe Thr Gly Asn Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
515 520 525

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Lys Ser Gly Gly Thr
530 535 540

Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Trp Asp Thr
545 550 555 560

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Asp Asp
565 570 575

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Ala Arg Gly Ser Thr Ser Pro
580 585 590

His Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
595 600 605

<210> 18

<211> 588

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 18

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

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg His
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

[0010] Gly Gly Ile Leu Pro Ile Leu Lys Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Asn Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr His Gly Gly Asp Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0011]

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

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

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

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

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 450 455 460

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro
 465 470 475 480

Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
 485 490 495

Gly Asn Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 500 505 510

[0012]

Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Lys Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln
 515 520 525

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Trp Asp Thr Ser Ile Ser Thr
 530 535 540

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr
 545 550 555 560

Tyr Cys Ala Arg Trp Ala Arg Gly Ser Thr Ser Pro His Gly Leu Asp
 565 570 575

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 580 585

<210> 19

<211> 608

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<400> 19

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys
20 25 30

Glu Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ser
35 40 45

Phe Thr Gly Asn Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Lys Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Trp Asp Thr Ser Ile
85 90 95

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala
100 105 110

[0013]

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Ala Arg Gly Ser Thr Ser Pro His Gly
115 120 125

Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
225 230 235 240

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
245 250 255

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
260 265 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
275 280 285

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
305 310 315 320

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
325 330 335

[0014]

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
340 345 350

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
355 360 365

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
370 375 380

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
405 410 415

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
420 425 430

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
465 470 475 480

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
485 490 495

Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Arg Val
500 505 510

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg His Ala Ile Ser Trp
515 520 525

Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Leu
530 535 540

Pro Ile Leu Lys Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Gln Gly Arg Val
545 550 555 560

[0015]

Thr Ile Asn Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Met Ser
565 570 575

Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr His Gly
580 585 590

Gly Asp Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
595 600 605

<210> 20

<211> 588

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 20

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Asn
20 25 30

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

Gly Trp Met Asn Pro Lys Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Trp Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Ala Arg Gly Ser Thr Ser Pro His Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

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

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

[0016]

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

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

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

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

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

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

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

	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
				260					265					270			
	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
			275					280					285				
	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
		290					295					300					
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
	305					310					315					320	
	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
					325					330					335		
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
				340					345					350			
	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
			355					360					365				
[0017]	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
		370					375					380					
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
	385					390				395						400	
	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
					405					410					415		
	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
				420					425					430			
	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	
			435					440					445				
	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
		450					455					460					
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	
	465					470					475					480	
	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Arg	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	

	485	490	495
	Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg His Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala 500	505	510
	Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Leu Pro Ile Leu Lys 515	520	525
	Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Asn Ala 530	535	540
	Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser 545	550	555
	Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr His Gly Gly Asp Arg Ser 565	570	575
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 580	585	
[0018]	<210> 21 <211> 234 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的描述：合成的多肽 <400> 21 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro 1 5 10 15 Gly Ser Thr Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser 20 25 30 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp 35 40 45 Ile Ser Asn Trp Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 50 55 60 Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser 65 70 75 80		

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
100 105 110

Asn Val Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

[0019]

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 22

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0020]

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的多肽

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 24

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 24

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

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg His
 20 25 30

[0021] Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Asn Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Thr His Gly Gly Asp Arg Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 25

His Gly Gly Asp Arg Ser Tyr
1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 26

Gly Ile Leu Pro Ile Leu Lys Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
1 5 10 15

Gly

[0022]

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 27

Arg His Ala Ile Ser
1 5

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 28

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

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

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

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

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

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

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

[0023]

<400> 29
Gln Gln Tyr Asn Asn Val Leu Arg Thr
1 5

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 30
Glu Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 31
Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Trp Leu Asn
1 5 10

[0024] <210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的6xHis标签

<400> 32
His His His His His His
1 5

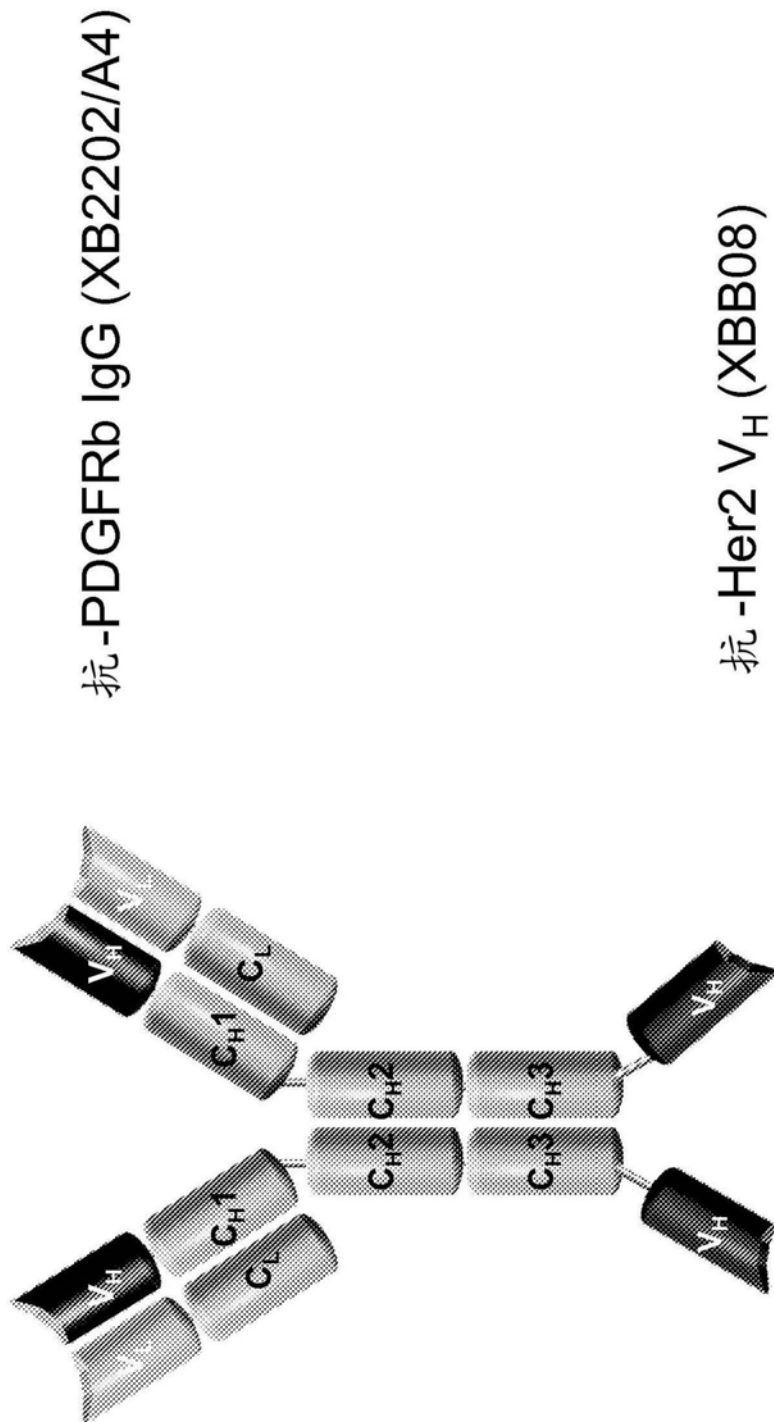


图1

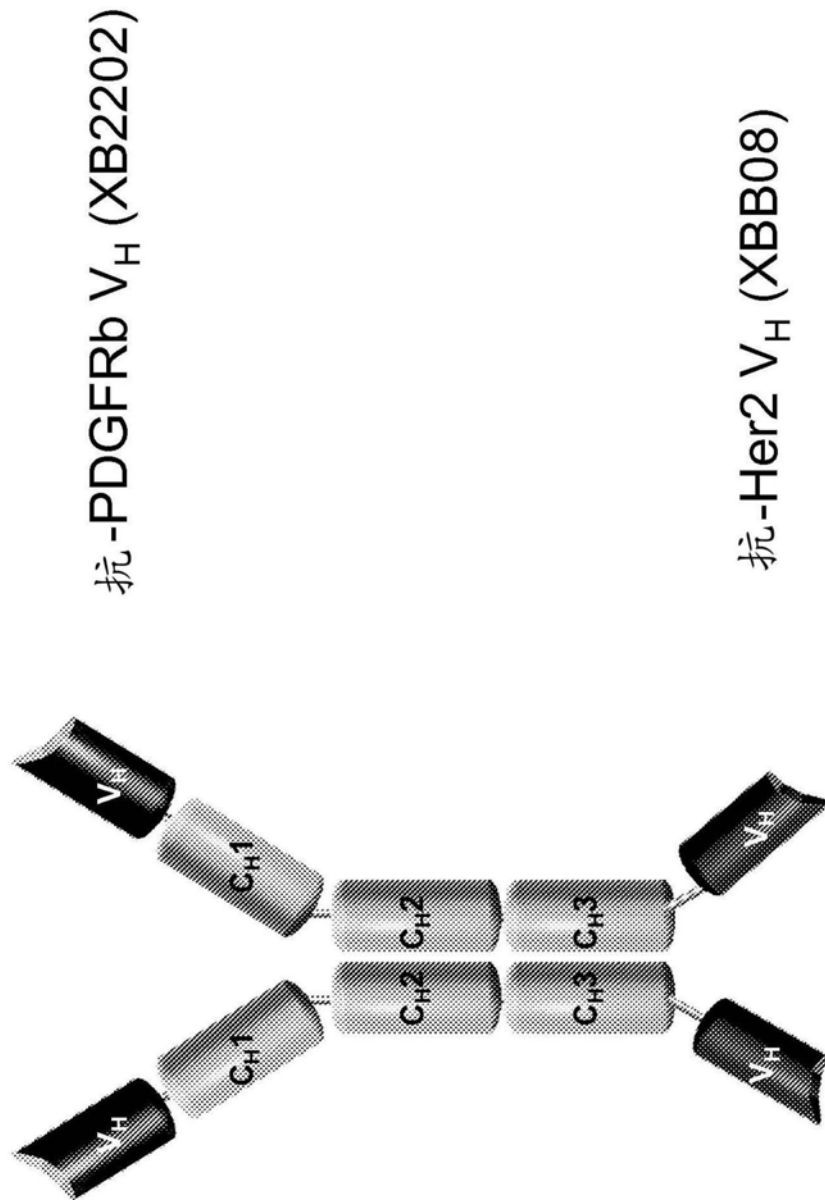


图2

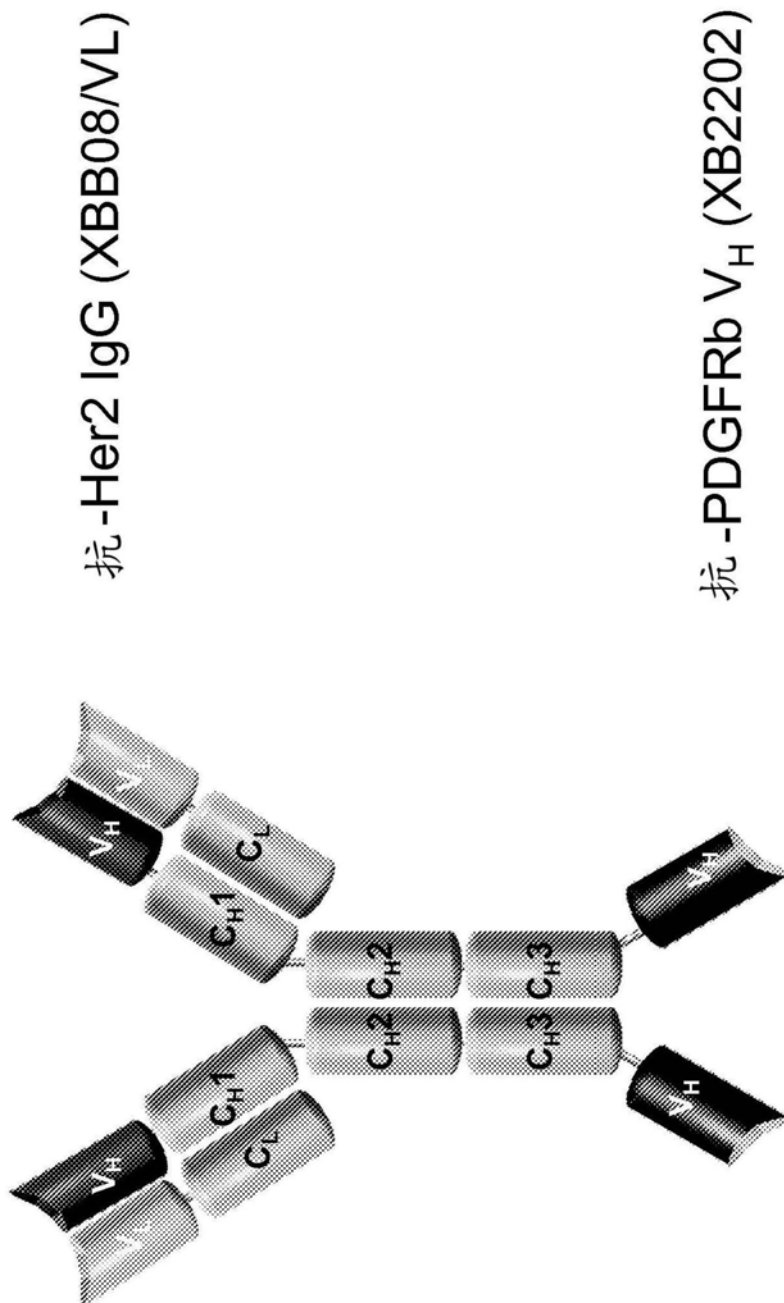


图4

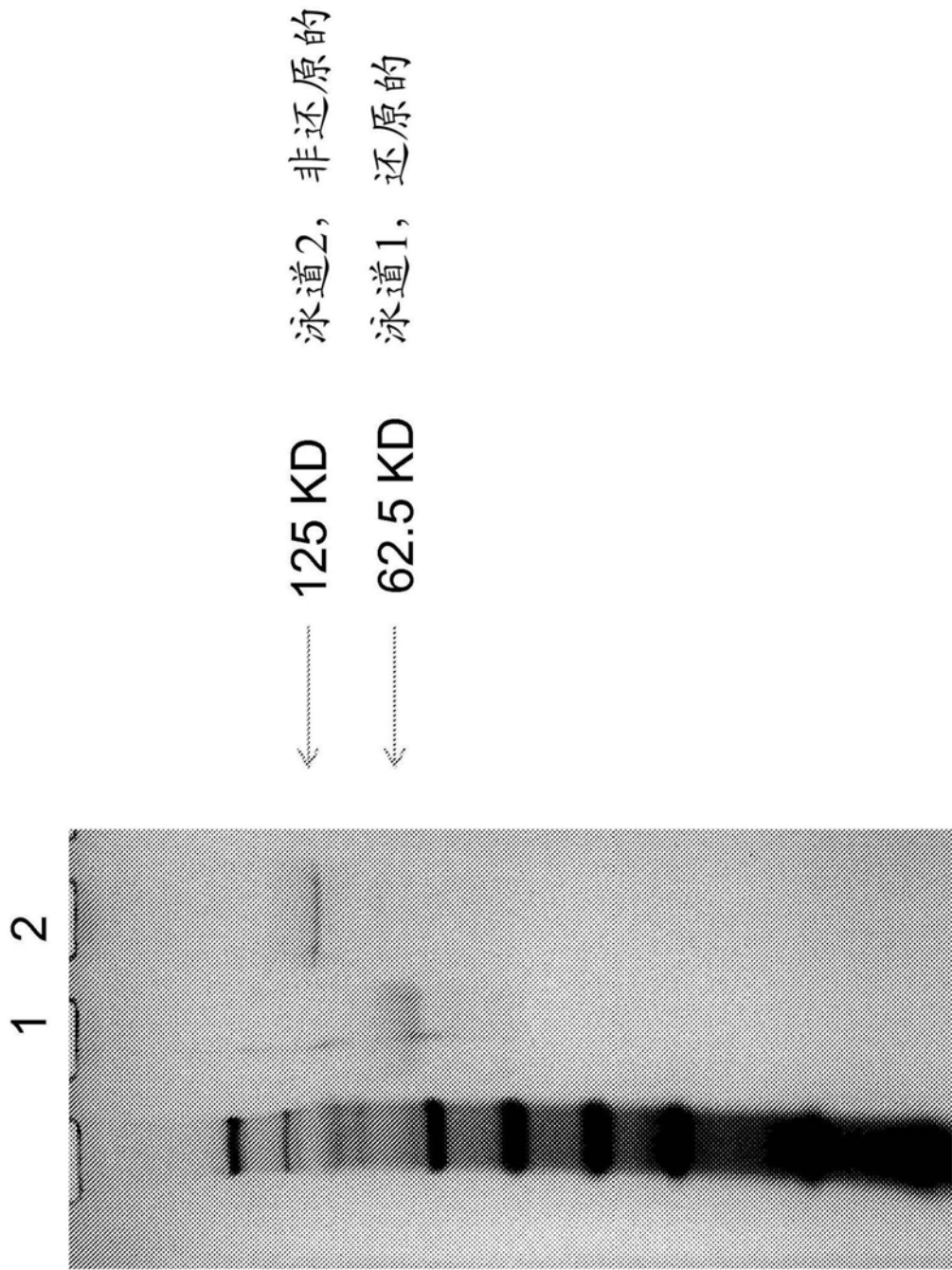


图5

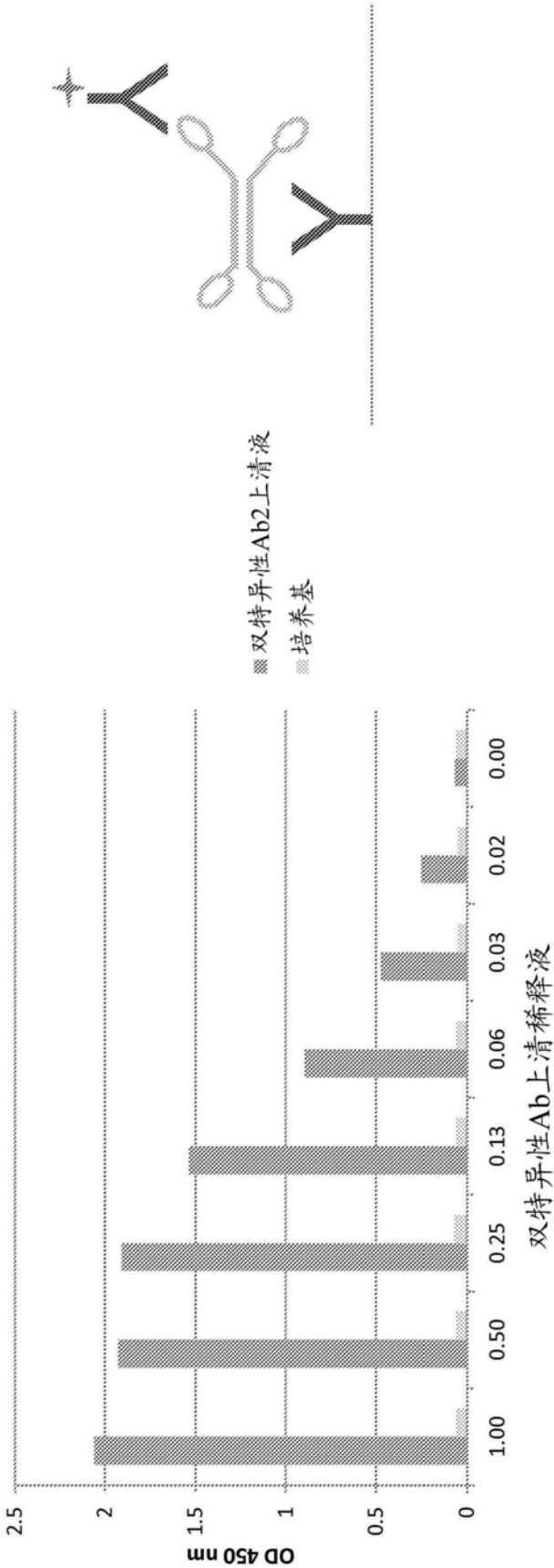


图9

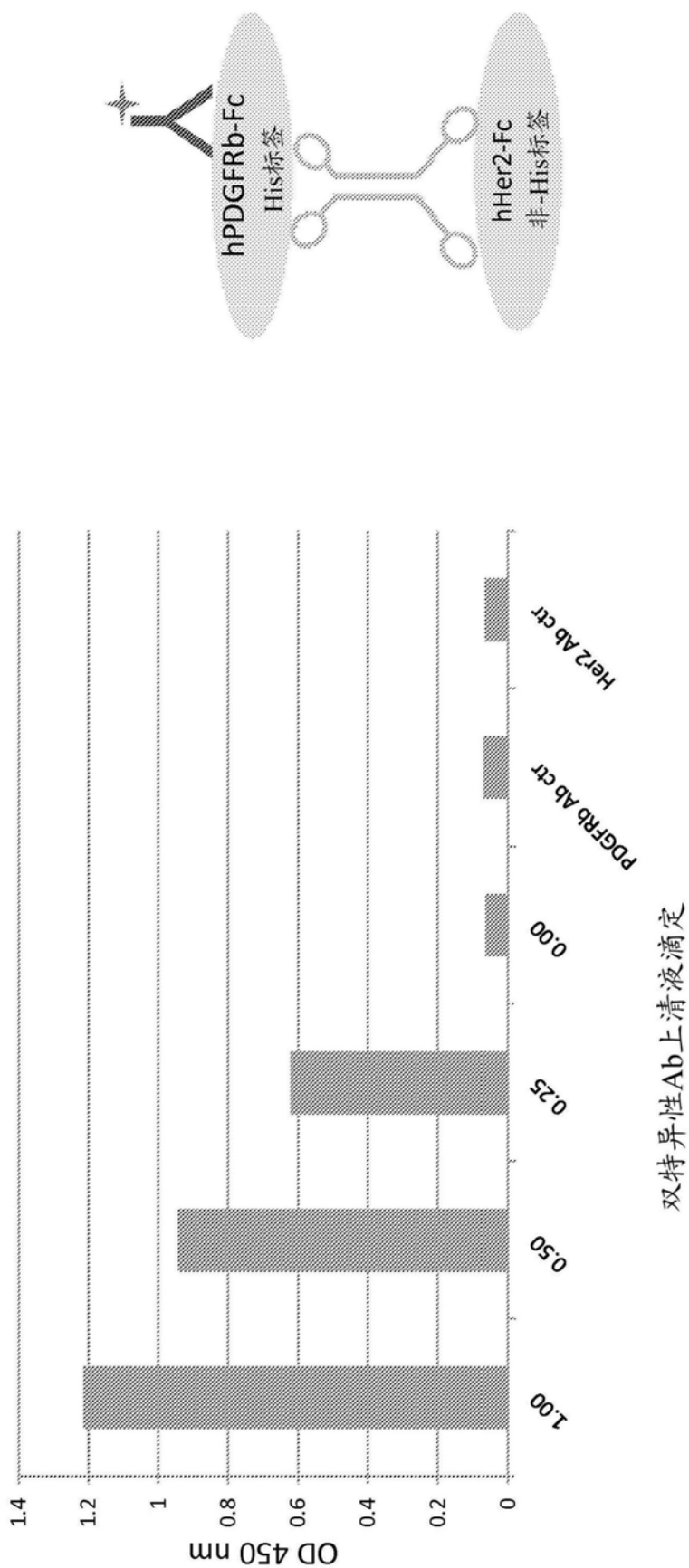


图7

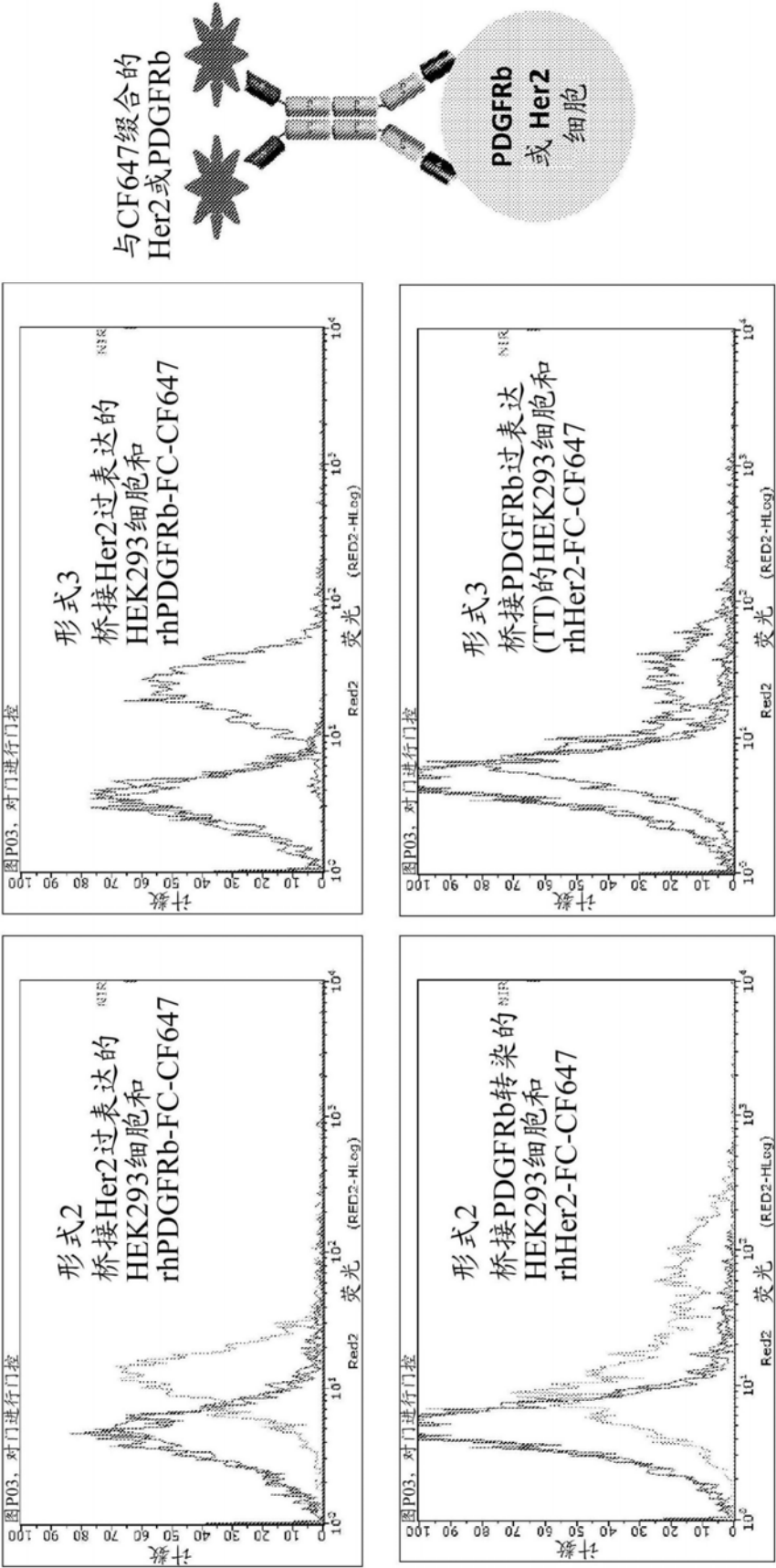


图8

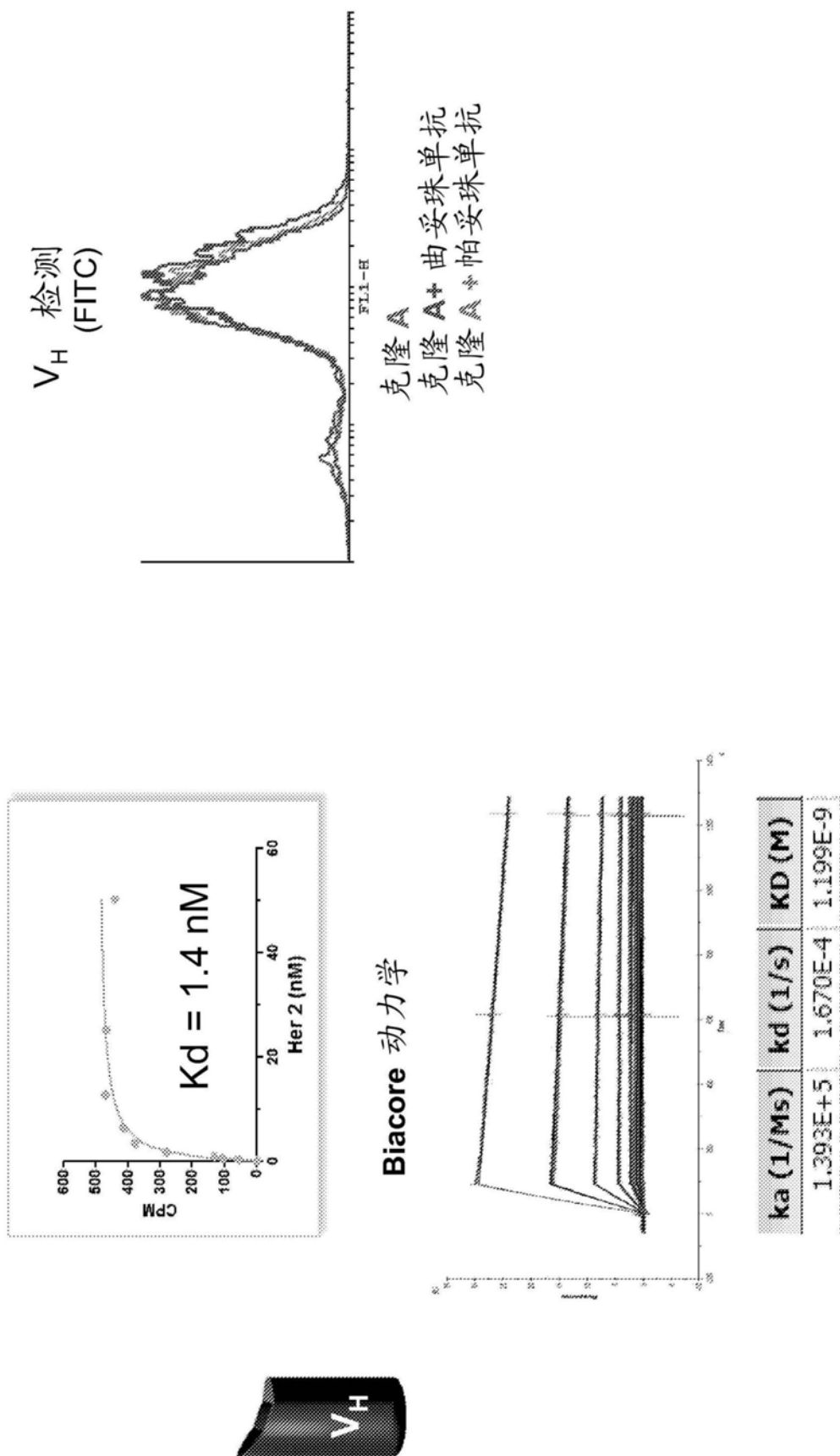


图9

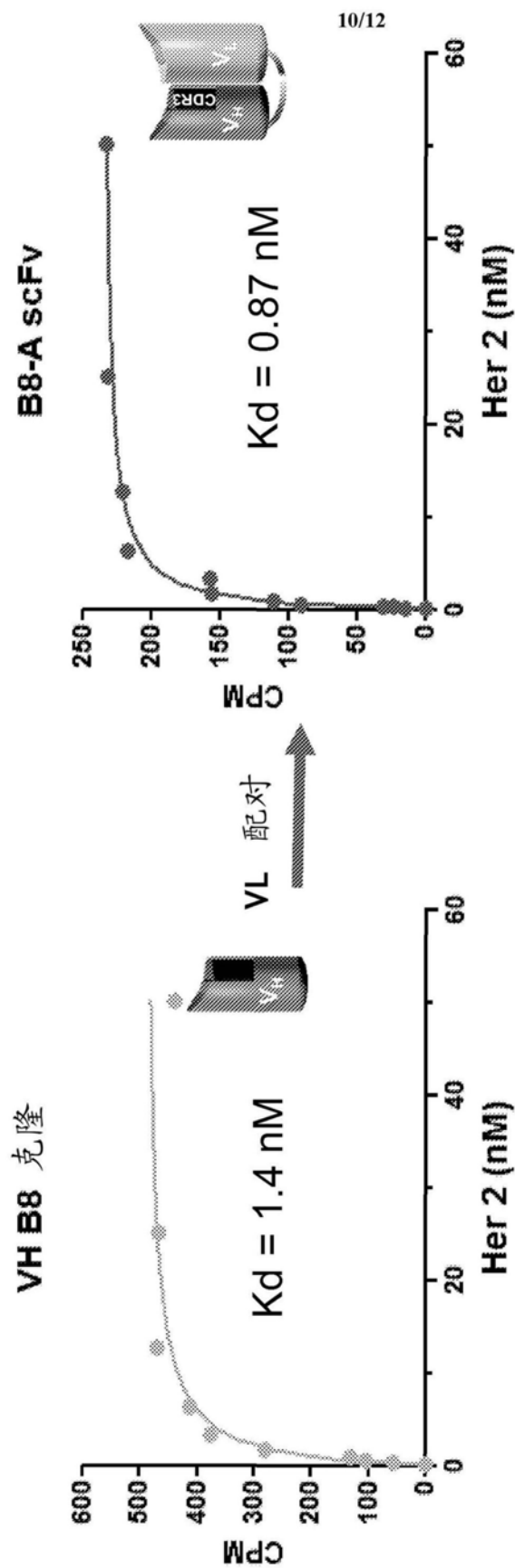


图10

添加_100nM化合物后5天SK-BR-3 MTS增殖分析

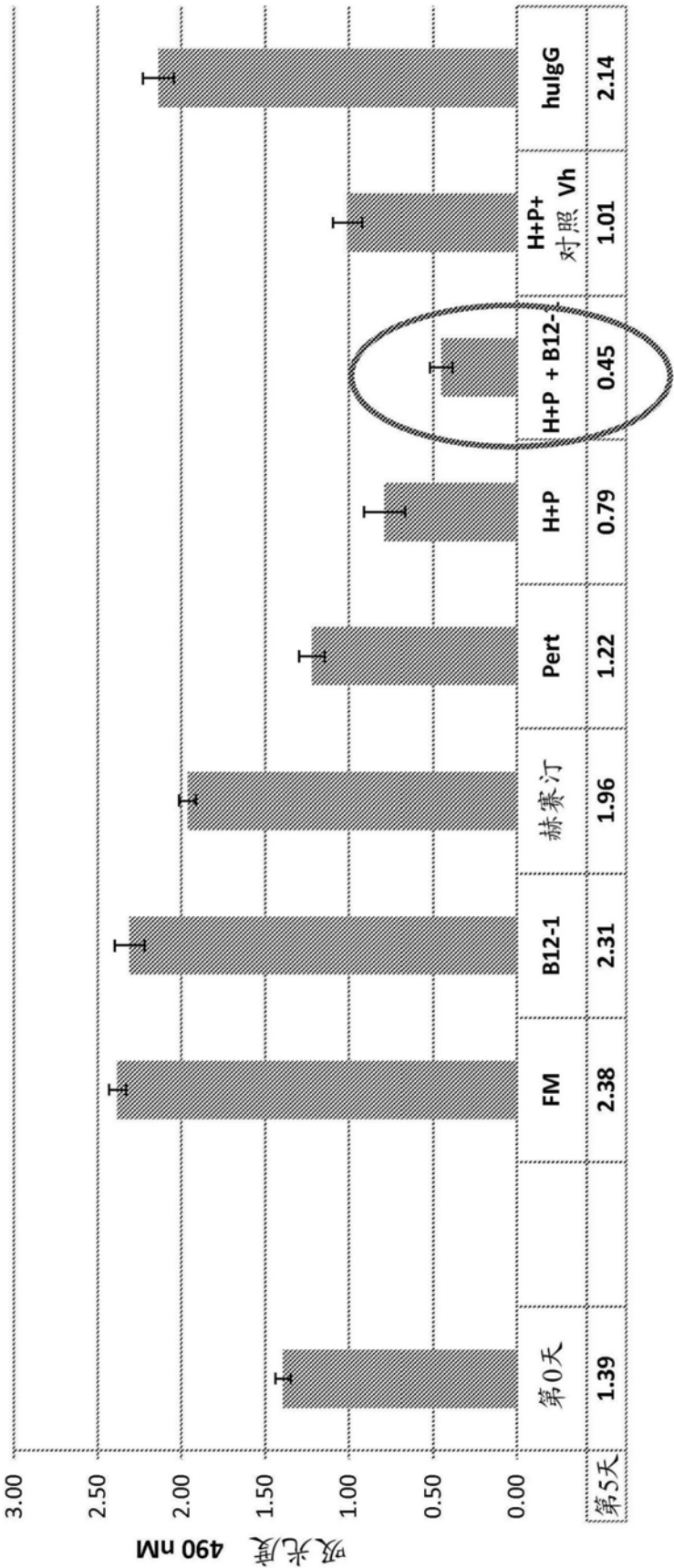


图11

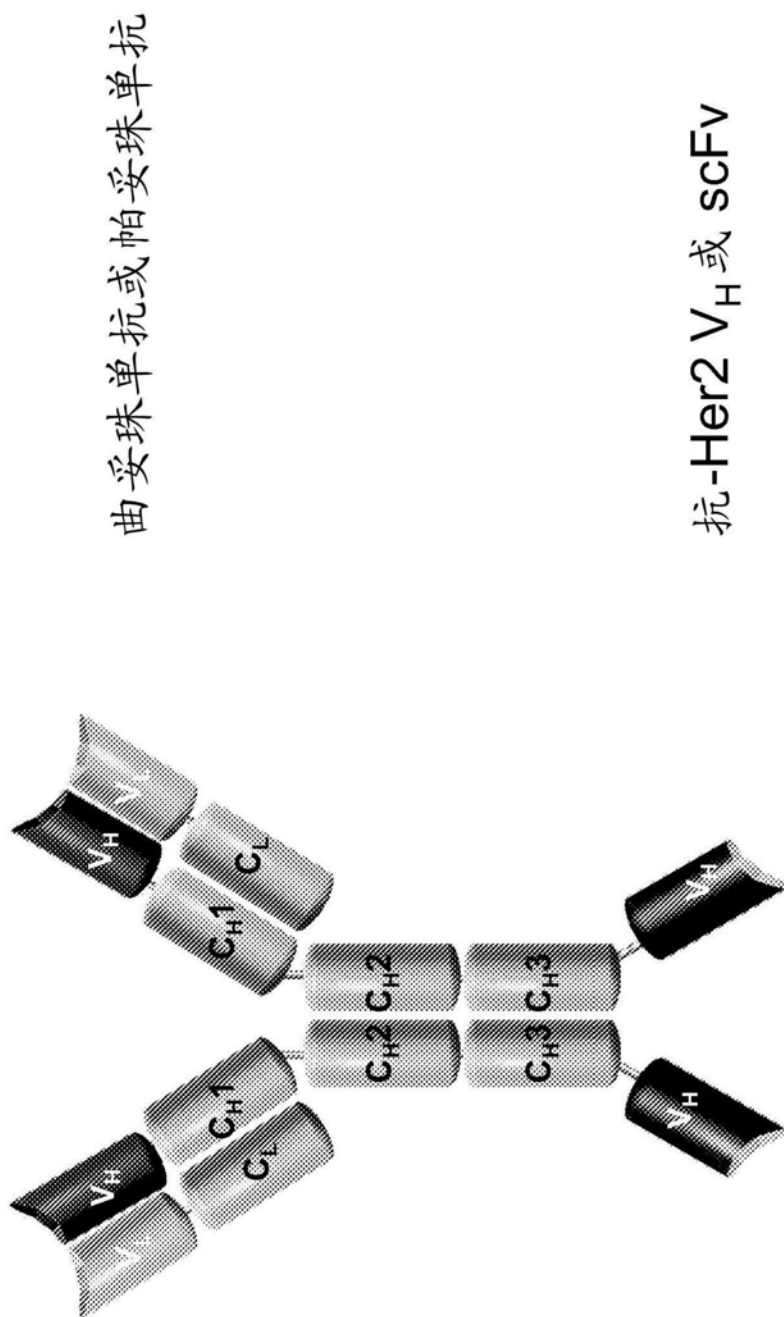


图12