



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108463248 B

(45) 授权公告日 2022. 10. 21

(21) 申请号 201680078704.8

(22) 申请日 2016.11.10

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108463248 A

(43) 申请公布日 2018.08.28

(30) 优先权数据

62/254,278 2015.11.12 US

62/274,572 2016.01.04 US

62/287,666 2016.01.27 US

62/293,989 2016.02.11 US

62/345,515 2016.06.03 US

62/382,835 2016.09.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.07.12

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/061427 2016.11.10

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/083582 EN 2017.05.18

(73) 专利权人 西雅图基因公司
地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 D·A·埃瓦罗恩

J·M·普伦德加斯特 J·贝伦斯

A·A·卢格夫斯科伊

D·T·德兰斯菲尔德

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

专利代理师 付文川 吴小瑛

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2009326203 A1, 2009.12.31

CN 103221537 A, 2013.07.24

US 2014178365 A1, 2014.06.26

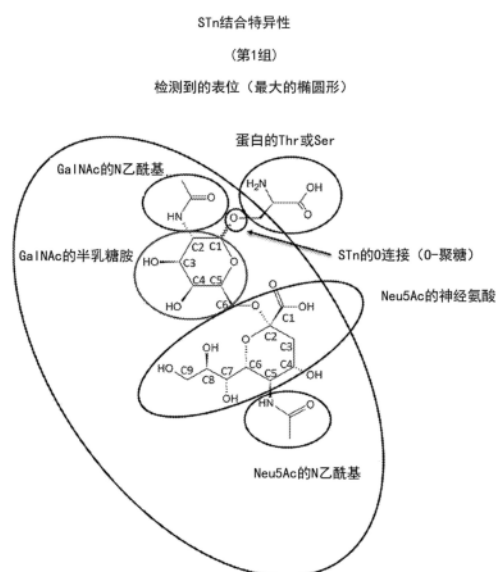
审查员 张艳青

(54) 发明名称

聚糖相互作用化合物及使用方法

(57) 摘要

本发明提供用于治疗和预防人的疾病的聚糖相互作用抗体以及用于生产聚糖相互作用抗体的方法,所述疾病包括癌症。这种聚糖相互作用抗体包括人源化抗体、其衍生物和片段,以及相关的组合物和试剂盒。还包括使用聚糖相互作用抗体进行治疗和诊断的方法。



1. 一种抗体,其结合唾液酸(α 2,6)N-乙酰半乳糖胺(STn),其中所述抗体包含序列如选自SEQ ID NO:237-241的氨基酸序列所示的重链可变结构域(VH)和序列如SEQ ID NO:235或236的氨基酸序列所示的轻链可变结构域。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含序列如SEQ ID NO:240的氨基酸序列所示的VH;以及序列如SEQ ID NO:235的氨基酸序列所示的VL。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中所述抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。

4. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

5. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中所述抗体是人IgG1抗体。

6. 根据权利要求4所述的抗体,其中所述抗体是人IgG1抗体。

7. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中所述抗体以0.01nM至30nM的半数最大有效浓度(EC50)结合细胞相关STn。

8. 一种抗体-药物缀合物,其包含缀合至治疗剂的权利要求1-7任一项所述的抗体。

9. 根据权利要求8所述的抗体-药物缀合物,其中所述治疗剂是细胞毒性剂。

10. 根据权利要求9所述的抗体-药物缀合物,其中所述细胞毒性剂是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)或单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。

11. 根据权利要求10所述的抗体-药物缀合物,其中所述细胞毒性剂是MMAE。

12. 根据权利要求11所述的抗体-药物缀合物,其中所述抗体包含序列如SEQ ID NO:240的氨基酸序列所示的VH;以及序列如SEQ ID NO:235的氨基酸序列所示的VL。

13. 根据权利要求11所述的抗体-药物缀合物,其中所述细胞毒性剂是MMAE并且其中所述抗体-药物缀合物能够以0.1nM至20nM的半数最大抑制浓度(IC50)杀死STn相关细胞。

14. 一种药物组合物,其包含权利要求1-7任一项所述的抗体或权利要求8-13任一项所述的抗体-药物缀合物及药学上可接受的赋形剂。

15. 一种药物组合物,其包含权利要求12所述的抗体-药物缀合物及药学上可接受的赋形剂。

16. 一种分离的核酸,其编码权利要求1-7中任一项所述的抗体。

17. 一种载体,其包含权利要求16所述的核酸。

18. 一种分离的细胞,其包含权利要求16所述的核酸或权利要求17所述的载体。

19. 一种生产权利要求1-7任一项所述的抗体的方法,其包括在适于表达所述抗体的条件下培养权利要求18所述的细胞。

20. 根据权利要求19所述的方法,进一步包括纯化所述抗体。

21. 一种抗体,其由权利要求18所述的细胞产生。

22. 权利要求1-7任一项所述的抗体或权利要求8-13任一项所述的抗体-药物缀合物在制备用于治疗受试者中癌症的药物中的用途。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述受试者患有至少一种实体瘤。

24. 根据权利要求23所述的用途,其中施用药物组合物后减少所述至少一种实体瘤的体积。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述至少一种实体瘤的体积减少至少20%。

26. 根据权利要求23所述的用途,其中所述癌症包含至少一种癌症细胞表面上的肿瘤相关糖抗原(TACA)。

27. 根据权利要求26所述的用途,其中所述至少一种TACA包含唾液酸($\alpha 2,6$)N-乙酰半乳糖胺(STn)。

28. 根据权利要求22-27任一项所述的用途,其中所述癌症是乳癌、结肠癌、胰腺癌、肺癌、宫颈癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌、肝癌、子宫内膜癌、食管癌或结肠直肠癌。

29. 根据权利要求22-27任一项所述的用途,其中所述药物与化学治疗剂和/或治疗性抗体组合施用。

30. 根据权利要求29所述的用途,其中所述化学治疗剂选自氟嘧啶、奥沙利铂、伊立替康及其组合。

31. 根据权利要求29所述的用途,其中所述治疗性抗体选自贝伐单抗和抗表皮生长因子受体(EGFR)抗体。

32. 权利要求12所述的抗体-药物缀合物在制备用于治疗受试者中癌症的药物中的用途。

33. 根据权利要求32所述的用途,其中所述受试者患有至少一种实体瘤。

34. 根据权利要求32所述的用途,其中所述癌症包含至少一种癌症细胞表面上的肿瘤相关糖抗原(TACA)。

35. 根据权利要求34所述的用途,其中所述至少一种TACA包含唾液酸($\alpha 2,6$)N-乙酰半乳糖胺(STn)。

36. 根据权利要求32-35任一项所述的用途,其中所述癌症是乳癌、结肠癌、胰腺癌、肺癌、宫颈癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌、肝癌、子宫内膜癌、食管癌或结肠直肠癌。

37. 根据权利要求32-35任一项所述的用途,其中所述药物与化学治疗剂和/或治疗性抗体组合施用。

38. 根据权利要求22-27任一项所述的用途,其中以0.1mg/kg至30mg/kg的剂量施用所述抗体或抗体-药物缀合物。

39. 根据权利要求38所述的用途,其中以2.5mg/kg至5mg/kg的剂量施用所述抗体或抗体-药物缀合物。

40. 根据权利要求38所述的用途,其中在施用所述抗体或抗体-药物缀合物后,在治疗后约1天至治疗后约1个月获得的至少一个受试者样本中可检测到所述抗体或抗体-药物缀合物。

41. 根据权利要求40所述的用途,其中所述抗体-药物缀合物包含MMAE,并且其中在所述至少一个受试者样本中,所述MMAE对所述抗体的药物对抗体比(DAR)改变少于50%。

42. 权利要求1-7任一项所述的抗体在制备用于筛选细胞或样本中是否存在至少一种TACA的试剂中的用途,其中所述筛选包括使所述细胞或样本与所述抗体接触。

43. 根据权利要求42所述的用途,其中所述至少一种TACA包含STn。

44. 根据权利要求42或43所述的用途,其中所述样本是生物样本,所述生物样本获自受试者。

45. 根据权利要求44所述的用途,其中所述受试者患有或疑似患有癌症。

46. 根据权利要求44所述的用途,其中所述生物样本包含细胞、组织、组织切片和体液中的一种或更多种。

47. 根据权利要求42或43所述的用途,其中所述抗体包含可检测标记。

48. 根据权利要求42或43所述的用途,其中所述筛选包括使用检测剂来检测结合至所述至少一种TACA的所述抗体。

49. 根据权利要求48所述的用途,其中所述检测剂是二抗。

50. 根据权利要求49所述的用途,其中所述二抗包含可检测标记。

51. 根据权利要求42或43所述的用途,其中所述筛选用于鉴定可能受益于用权利要求1-7任一项所述的抗体或权利要求8-13任一项所述的抗体-药物缀合物进行的治疗的患有癌症的受试者。

52. 根据权利要求51所述的用途,其中如果存在至少一种TACA则用权利要求1-7任一项所述的抗体或权利要求8-13任一项所述的抗体-药物缀合物治疗所述受试者。

53. 根据权利要求47所述的用途,其中所述筛选用于鉴定可能受益于用权利要求1-7任一项所述的抗体或权利要求8-13任一项所述的抗体-药物缀合物进行的治疗的患有癌症的受试者。

54. 根据权利要求53所述的用途,其中如果存在至少一种TACA则用权利要求1-7任一项所述的抗体或权利要求8-13任一项所述的抗体-药物缀合物治疗所述受试者。

55. 根据权利要求48所述的用途,其中所述筛选用于鉴定可能受益于用权利要求1-7任一项所述的抗体或权利要求8-13任一项所述的抗体-药物缀合物进行的治疗的患有癌症的受试者。

56. 根据权利要求55所述的用途,其中如果存在至少一种TACA则用权利要求1-7任一项所述的抗体或权利要求8-13任一项所述的抗体-药物缀合物治疗所述受试者。

57. 根据权利要求51所述的用途,其中所述筛选用于癌症严重性分层、癌症风险分层、选择用于临床试验的受试者、开发治疗方案、调节治疗方案、增加治疗安全性和调节治疗有效性中的一种或更多种。

58. 一种试剂盒,其用于执行权利要求42-57任一项所述的用途,所述试剂盒包含权利要求1-7中任一项所述的抗体。

59. 根据权利要求58所述的试剂盒,其包含二抗。

60. 根据权利要求59所述的试剂盒,其中所述二抗包含可检测标记。

聚糖相互作用化合物及使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2015年11月12日提交的标题为聚糖相互作用化合物及使用方法的美国临时申请号62/254,278、于2016年1月4日提交的标题为聚糖相互作用化合物及使用方法的美国临时申请号62/274,572、于2016年1月27日提交的标题为聚糖相互作用化合物及使用方法的美国临时申请号62/287,666、于2016年2月11日提交的标题为聚糖相互作用化合物及使用方法的美国临时申请号62/293,989、于2016年6月3日提交的标题为聚糖相互作用化合物及使用方法的美国临时申请号62/345,515、以及于2016年9月2日提交的标题为聚糖相互作用化合物及使用方法的美国临时申请号62/382,835的优先权,其各自的内容通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含以ASCII格式电子提交的序列表,并且通过引用将其全部内容并入本文。2016年11月10日创建的所述ASCII副本被命名为2033_1021PCT_SL.txt并且大小为159,457字节。

技术领域

[0005] 本公开涉及聚糖相互作用化合物如抗体,以及用于开发这类化合物的方法,以及用于检测和/或从生物体去除糖基化物质的相关组合物。本发明还涉及用本文提供的聚糖相互作用化合物和组合物治疗与异常糖基化相关的疾病例如癌症的方法。

背景技术

[0006] 异常糖基化伴随着在癌中常见的一些其它突变。据估计,约80%的所有癌均表达截短的聚糖,Tn抗原和唾液酸化形式的唾液酸化Tn(STn)。除少数例外,在正常健康组织中不表达Tn和STn。此外,非人免疫原性唾液酸N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)以Neu5Gc-STn(GcSTn)的形式似乎在癌症如乳癌上差异表达。

[0007] 已经在人的癌症中描述了多种异常糖基化形式,将特定聚糖鉴定为适用于特定肿瘤靶向的细胞表面分子类别(Cheever,M.A.等人,Clin Cancer Res.2009年9月1日;15(17):5323-37)。例如,各种人的癌症类型(例如膀胱癌、乳癌、宫颈癌、结肠癌、肺癌和卵巢癌等)显示STn抗原的高表达,这在正常人组织中是罕见的(Karlen,P.等人,Gastroenterology.1998年12月;115(6):1395-404;Ohno,S.等人,Anticancer Res.2006年11月-12月;26(6A):4047-53)。此外,肿瘤相关粘蛋白上STn的存在与癌症预后不良有关,因此被认为是用于癌症检测和靶向疗法有吸引力的表位(Cao,Y.等人,Virchows Arch.1997年9月;431(3):159-66;Julien,S.等人,Br J Cancer.2009年6月2日;100(11):1746-54;Itzkowitz,S.H.等人,Cancer,1990年11月1日;66(9):1960-6;Motoo,Y.等人,Oncology,1991;48(4):321-6;Kobayashi,H.等人,J Clin Oncol.1992年1月;10(1):95-101)。Tn和STn形成与基因Cosmc中的体细胞突变相关,所述基因Cosmc编码形成激活的T-合酶所需的分子伴侣(Ju,T.等人,Nature.2005年10月27日;437(7063):1252;Ju,T.等人,

Cancer Res.2008年3月15日;68(6):1636-46)。它也可以是由唾液酸转移酶ST6GalNAc-I的表达增加所致(Ikehara,Y.等人,Glycobiology,1999年11月;9(11):1213-24;Brockhausen,I.等人,Biol Chem.2001年2月;382(2):219-32)。STn的从头表达可以调节癌细胞,改变恶性表型,并导致更侵袭性的细胞行为(Pinho,S.等人,Cancer Lett.2007年5月8日;249(2):157-70)。虽然STn在恶性组织中高表达,但在健康人细胞上也发现低水平表达(Jass,J.R.等人,J Pathol.1995年6月;176(2):143-9;Kirkeby,S.等人,Arch Oral Biol.2010年11月;55(11):830-41)。作为癌症检测和疗法的靶标,单独的STn已经引起关注(Cheever,M.A.等人,Clin Cancer Res.2009年9月1日;15(17):5323-37)。STn也存在于与癌症干细胞相关的粘蛋白中(Engelmann等人,Cancer research,2008,68,2419-2426)并且STn涉及免疫抑制(Carrascal,M.A.等人,Molecular Oncolog.2014,8(3):753-65)。

[0008] 除了存在STn之外,还描述了癌症中其它糖基化改变。其中之一涉及Neu5Gc。N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)和Neu5Gc是哺乳动物细胞表面上的两种主要唾液酸。Neu5Ac和Neu5Gc的不同之处仅在于Neu5Gc包含与附着至碳5的化学基团相关的额外氧原子。由于功能基因的丧失,人只能以Neu5Ac形式合成唾液酸,但不能合成Neu5Gc。然而,Neu5Gc可以从动物起源饮食来源例如红肉代谢地结合到人体中(Tangvoranuntakul,P.等人,Proc Natl Acad Sci U S A.2003年10月14日;100(21):12045-50;Nguyen,D.H.等人,J Immunol.2005年7月1日;175(1):228-36;US7,682,794、US8,084,219、US2012/0142903、W02010030666和W02010030666)。Neu5Gc在人肿瘤中丰度显著(Higashi,H.等人,Cancer Res.1985年8月;45(8):3796-802;Miyoshi I.等人,Mol Immunol.1986.23:631-638;Hirabayashi,Y.等人,Jpn J Cancer Res.1987.78:614-620;Kawachi S.等人,Int Arch Allergy Appl Immunol.1988,85:381-383;Devine,P.L.等人,Cancer Res.51:5826-5836;Malykh,Y.N.等人,Biochimie.2001.83:623-634和Inoue,S.等人,2010.Glycobiology.20(6):752-762)并且在正常人组织中显著的低,其几十年来一直被忽视(Diaz,S.L.等人,PLoS One.2009 4:e4241;Tangvoranuntakul,P.等人,Proc Natl Acad Sci USA.2003.100:12045-12050;Varki,A.等人,Glycoconj J.2009.26:231-245)。与健康人组织相比,在癌症组织中饮食源性Neu5Gc的代谢积累增加可能至少通过三个因素解释:快速生长并伴随着竞争性内源Neu5Ac的产生不足,由生长因子诱导的巨胞饮作用增强(Dharmawardhane,S.等人,Mol Biol Cell.2000年10月;11(10):3341-52;Simonsen,A.等人,Curr Opin Cell Biol.2001年8月;13(4):485-92;Johannes L.等人,Traffic 2002年7月;3(7):443-51;Amyere,M.等人,Int J Med Microbiol.2002年2月;291(6-7):487-94),以及通过缺氧上调溶酶体唾液酸转运蛋白基因sialin的基因表达(Yin,J.等人,Cancer Res.2006年3月15日;66(6):2937-45)。此外,迄今为止测试的所有人都包括针对非人Neu5Gc的多克隆抗体库,这使得它成为异种自体抗原的第一个例子(Padler-Karavani,V.等人,Glycobiology.2008年10月;18(10):818-30;Varki,N.M.等人,Annu Rev Pathol.2011;6:365-93)。面对抗Neu5Gc应答时,饮食Neu5Gc在恶性肿瘤中的积累显示通过诱导低度慢性炎症而促进肿瘤进展(Hedlund,M.等人,Proc Natl Acad Sci USA.2008年12月2日;105(48):18936-41)。因此,在人肿瘤上含有聚糖表位的Neu5Gc为药物靶向提供了有价值的可能性。最近的研究表明在癌症患者中存在针对含有Neu5Gc的STn(GcSTn)但不针对Neu5Ac-STn(AcSTn)的抗体,并探索其作为用于癌症检测的特异性生物标志物的潜力(Padler-Karavani,V.等人,Cancer

Res. 2011年5月1日;71 (9):3352-63)。

[0009] 本领域仍然需要能够结合聚糖(包括与疾病和患病细胞和组织相关的聚糖)的治疗性抗体。此外,仍然需要更好的方法来开发这种抗体以及使用这些抗体靶向患病细胞和组织的方法。本公开通过提供相关化合物和方法来满足这些需求。

发明内容

[0010] 在一些实施方案中,本公开提供了一种抗体,其包含具有CDR-H3互补决定区的重链可变结构域(VH),所述CDR-H3互补决定区和选自SEQ ID NO:114-120、140和141的氨基酸序列具有至少50%的氨基酸序列同一性。VH可包含CDR-H1和CDR-H2,其中CDR-H1和选自SEQ ID NO:105、106和136的氨基酸序列具有至少50%的序列同一性,CDR-H2和选自SEQ ID NO:107-113和137-139的氨基酸序列具有至少60%的序列同一性。

[0011] 在一些实施方案中,抗体包含具有CDR-L3的轻链可变结构域(VL),所述CDR-L3和选自SEQ ID NO:89、91、93、95-98、101-103、133-135和148的氨基酸序列具有至少50%的氨基酸序列同一性。VL可包含CDR-L1和CDR-L2,其中CDR-L1和选自SEQ ID NO:121-129和142-146的氨基酸序列具有至少50%的序列同一性,CDR-L2和选自SEQ ID NO:77、79-81、83-86、88、130-132和147的氨基酸序列具有至少50%的序列同一性。抗体可包含至少一个人的框架区,其中框架区具有和选自SEQ ID NO:206-216的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列。

[0012] 在一些实施方案中,抗体包含VH,所述VH和选自SEQ ID NO:220-224、230-234、237-241、249-253和256-260的氨基酸序列具有至少70%的序列同一性。抗体可包含VL,所述VL和选自SEQ ID NO:217-219、225-229、235、236、242-248、254和255的氨基酸序列具有至少70%的序列同一性。VH和选自SEQ ID NO:220-224的氨基酸序列可具有至少95%的序列同一性,VL和选自SEQ ID NO:217-219的氨基酸序列可具有至少95%的序列同一性。VH和选自SEQ ID NO:237-241的氨基酸序列可具有至少95%的序列同一性,VL和选自SEQ ID NO:235和236的氨基酸序列可具有至少95%的序列同一性。抗体可以是选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3和IgG4的同种型。抗体可以是人或人源化抗体。抗体可以是人IgG1抗体。

[0013] 在一些实施方案中,本公开提供编码所述抗体的构建体。还提供包含构建体的细胞。构建体包含在载体中。在一些实施方案中,提供产生自细胞的抗体,所述细胞包含编码本公开抗体的构建体。

[0014] 在一些实施方案中,提供的抗体以约0.01nM至约30nM的半数最大有效浓度(EC50)与细胞相关(cell-associated)STn结合。

[0015] 在一些实施方案中,抗体可以与治疗剂缀合。治疗剂可以是选自单甲基溴瑞他汀E(MMAE)和单甲基溴瑞他汀F(MMAF)的细胞毒性剂。抗体能够以约0.1nM至约20nM的半数最大抑制浓度(IC50)杀伤STn相关细胞。

[0016] 在一些实施方案中,提供了治疗癌症的方法,其包括施用所公开的抗体。癌症可能包含至少一种肿瘤。治疗可减少肿瘤体积。肿瘤大小的减少可能至少为20%。肿瘤可以包含至少一种肿瘤细胞,其可以包含至少一种肿瘤相关糖抗原(TACA)。TACA可以包含唾液酸(α 2,6)N-乙酰半乳糖胺(STn)。癌症可以包括乳癌、结肠癌、胰腺癌、肺癌、宫颈癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌和肝癌中的一种或更多种。抗体可以与化学治疗剂和/或治疗性抗体组合施

用。化学治疗剂可以选自氟嘧啶、奥沙利铂和伊立替康中的至少一种。治疗性抗体可以选自贝伐单抗和抗表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体中的至少一种。抗体可以以约 0.1mg/kg 至约 30mg/kg 的剂量施用。剂量可以从约 2.5mg/kg 至约 5mg/kg。在治疗后约 1 天至治疗后约 1 个月获得的至少一个受试者样本中可检测到抗体。抗体可以与 MMAE 缀合。在至少一个受试者样本中, 样本中 MMAE 对抗体的药物对抗体比 (DAR) 可改变少于 50%。

[0017] 在一些实施方案中, 提供了筛选细胞或样本中是否存在至少一种 TACA 的方法, 其包括使细胞或样本与所公开的抗体接触。至少一种 TACA 可以包含 STn。样本可能是生物样本。生物样本可以从受试者获得。受试者可能有或疑似患有癌症。生物样本可以包含细胞、组织、组织切片和体液中的一种或更多种。抗体可以包含可检测标记。可以使用检测剂来检测抗体。检测剂可以是二抗。二抗可以包含可检测标记。方法可以用于诊断受试者中的癌症。方法可能是伴随诊断的一部分。伴随诊断可以用于癌症严重性分层、癌症风险分层、选择用于临床试验的受试者、开发治疗方案、调节治疗方案、增加治疗安全性和调节治疗有效性中的一种或更多种。方法可以包括使用蛋白阵列。蛋白阵列可以包含一种或更多种抗体, 其经配置而结合样本中存在的一种或更多种蛋白。

[0018] 在一些实施方案中, 本公开提供了执行所述方法的试剂盒。试剂盒可以包含所述抗体。试剂盒可包含二抗。二抗可以包含可检测标记。

[0019] 在一些实施方案中, 本公开提供了包含一种或更多种所述抗体的组合物。组合物可以包含至少一种赋形剂。组合物可以包含药学上可接受的赋形剂。组合物可以包含抗体包被的试剂。抗体包被的试剂可以包含颗粒、纳米颗粒、蛋白、融合蛋白、脂质、脂质体和细胞中的一种或更多种。抗体可以是抗体片段。抗体片段可以选自 Fab 片段和单链 Fv 中的一种或更多种。

[0020] 在一些实施方案中, 本公开提供了具有合成构建体的修饰细胞。合成构建体可以编码调节细胞 STn 水平的因子。因子可包含参与 STn 合成的至少一种因子。因子可选自 (α -N-乙酰-神经氨酸基-2,3- β -半乳糖基-1,3)-N-乙酰半乳糖胺、 α -2,6-唾液酸转移酶 I (ST6GalNAc I)、T-合酶和核心 1 β 3-半乳糖基转移酶特异性分子伴侣 (COSMC) 中的至少一种。与至少一种未修饰的细胞相比, 修饰的细胞可以包含升高的 STn 水平。因子可降低 ST6GalNAc 的表达。因子可以是抑制性核糖核酸 (RNA) 分子。修饰的细胞可以是经过修饰的卵巢肿瘤细胞。修饰的卵巢肿瘤细胞可以选自 SKOV3 细胞、OVCAR3 细胞、OVCAR4 细胞、BRCA1 突变肿瘤细胞和非 BRCA1 突变肿瘤细胞中的一种或更多种。

[0021] 在一些实施方案中, 提供了表征抗体结合的方法。方法可以包括使聚糖阵列与抗体接触。聚糖阵列可以包含多个聚糖。多个聚糖可以包含聚糖组, 其由 Neu5Ac α 6GalNAc α 0 (CH2) 2CH2NH₂; Neu5Gc α 6GalNAc α 0 (CH2) 2CH2NH₂; Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 0 (CH2) 2CH2NH₂; Neu5Gc α 6Gal β 4GlcNAc β 0 (CH2) 2CH2NH₂; Neu5Ac α 6Gal β 4Glc β 0 (CH2) 2CH2NH₂; Neu5Gc α 6Gal β 0 (CH2) 2CH2NH₂; Neu5Gc α 6Gal β 0 (CH2) 2CH2NH₂; GalNAc α 0 (CH2) 2CH2NH₂; Gal β 3GalNAc β 0 (CH2) 2CH2NH₂; Gal β 3GalNAc α 0 (CH2) 2CH2NH₂; Neu5Ac α 3Gal β 1-3GalNAc α 0 (CH2) 2CH2NH₂; 和 Neu5Gc α 3Gal β 1-3GalNAc α 0 (CH2) 2CH2NH₂ 中的一种或更多种组成。多个聚糖中的每一个可以是拟糖脂 (neoglycolipid) 探针的一部分。

附图说明

[0022] 如附图所示,其中相似的参考字符在不同的视图中指的是相同的部分,根据下面对本发明具体实施方案的描述,前述和其它目的、特征和优点将变得显而易见。附图不一定按比例绘制,而是将重点放在说明本发明的各种实施方案的原理上。

[0023] 图1A-1D的图描绘 α 2,6-唾液酸化N-乙酰半乳糖胺(STn)并且指示参与抗STn抗体结合的推定表位。各图中最大的椭圆表示4个抗体组各自靶向的STn的特定区。这些组包括第1组抗体(结合图1A中显示的大椭圆区),第2组抗体(结合图1B中显示的大椭圆区),第3组抗体(结合图1C中显示的大椭圆区)和第4组抗体(结合图1D所示的大椭圆区)。

[0024] 图2是可变结构域的示意图。

具体实施方式

[0025] 简介

[0026] 根据本发明,对表位具有特异性或与表位相互作用的抗体,所述表位包含本文称为聚糖的碳水化合物基团。本文所述的一些聚糖相互作用抗体可用作生物治疗剂。其它实施方案提供了用于产生这类聚糖相互作用抗体的方法。

[0027] 在自然界中,STn可以经N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)或N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)被唾液酸化。根据本发明的聚糖相互作用抗体可针对具有任何STn的聚糖(泛STn抗体)、具有包含Neu5Ac特异性的STn的聚糖(AcSTn)或具有包含Neu5Gc特异性的STn的聚糖(GcSTn)。在一些实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体靶向癌症相关聚糖抗原,例如 α 2,6-唾液酸化N-乙酰半乳糖胺(STn)。

[0028] 在一些实施方案中,本公开提供了生产聚糖相互作用抗体的方法。这样的方法可以包括用小鼠产生对一种或更多种抗原的免疫应答,所述抗原包括STn(例如,AcSTn和/或GcSTn)。如本文所述,可以使用多种方法来操纵通过小鼠免疫产生的所得抗体。这些方法可以包括改变免疫小鼠株和/或性别、改变使用的抗原、改变抗原施用中包含的佐剂类型和剂量以及在杂交瘤融合开始前的免疫时间过程。

[0029] 在一些实施方案中,本公开提供了使用聚糖相互作用抗体消除癌症干细胞的方法。在其它实施方案中,本发明提供了通过使用聚糖相互作用抗体消除癌症干细胞来治疗受试者中的癌症的方法。在一些方面,聚糖相互作用抗体可以单独使用。在其它方面,聚糖相互作用抗体与化学治疗剂组合使用。

[0030] 进一步提供了本文公开的聚糖相互作用抗体的优化的、人源化的和缀合形式。另外,提供了包含本发明的抗体和/或方法的试剂盒、分析和试剂。

[0031] 定义

[0032] 相邻:如本文所用,术语“相邻”是指有些事物临近、比邻或挨近给定实体。在一些实施方案中,“相邻残基”是聚糖链内相互连接的糖残基。在一些实施方案中,“相邻聚糖”是彼此相邻的、或直接接触的、或者紧密接近且两者之间没有其它聚糖的聚糖链。

[0033] 组合施用:如本文所用,术语“组合施用”或“联合施用”意指受试者同时暴露于两种或更多种试剂,所述试剂在相同时间或在一段时间内施用,从而使得受试者在某个时间点同时暴露于两者/或者使得每种试剂对患者的作用可能存在重叠。在一些实施方案中,在约24小时,12小时,6小时,3小时,1小时,30分钟,15分钟,10分钟,5分钟或1分钟内施用至少

一个剂量的一种或更多种试剂,至少一个剂量的一种或更多种其它试剂。在一些实施方案中,施用发生在重叠的剂量方案中。如本文所用,术语“剂量方案”是指时间间隔分开的多个剂量。这样的剂量可以按照规则的间隔发生,或者施用中可以包括一个或更多个间歇。在一些实施方案中,如本文所述一种或更多种聚糖相互作用抗体其单个剂量的施用被足够紧密地间隔开,从而实现组合(例如协同)作用。

[0034] 氨基酸:如本文所用,术语“氨基酸”是指所有天然存在的L- α -氨基酸以及非天然存在的氨基酸。氨基酸通过以下单字母或三字母符号表示:天冬氨酸(Asp:D),异亮氨酸(Ile:I),苏氨酸(Thr:T),亮氨酸(Leu:L),丝氨酸(Ser:S),酪氨酸(Tyr:Y),谷氨酸(Glu:E),苯丙氨酸(Phe:F),脯氨酸(Pro:P),组氨酸(His:H),甘氨酸(Gly:G),赖氨酸(Lys:K),丙氨酸(Ala:A),精氨酸(Arg:R),半胱氨酸(Cys:C),色氨酸(Trp:W),缬氨酸(Val:V),谷氨酰胺(Gln:Q)甲硫氨酸(Met:M),天冬酰胺(Asn:N),其中氨基酸首先列出,然后分别用三字母和单字母代码括起来。

[0035] 动物:如本文所用,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中,“动物”是指任何发育阶段的人。在一些实施方案中,“动物”是指在任何发育阶段的非人动物。在一些实施方案中,非人动物是哺乳动物(例如啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、羊、牛、灵长类动物或猪)。在一些实施方案中,动物包括但不限于哺乳动物、鸟、爬行动物、两栖动物、鱼和虫。在一些实施方案中,动物是转基因动物,遗传工程改造的动物或克隆。

[0036] 抗体:如本文所用,术语“抗体”以最广泛的含义使用,并具体涵盖各种实施方案,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,由至少两个完整抗体形成的双特异性抗体)和抗体片段(如双体),只要它们表现出期望的生物学活性即可。抗体是主要基于氨基酸的分子,但也可以包括一个或更多个修饰,例如糖部分。

[0037] 抗体片段:如本文所用,术语“抗体片段”是指完整抗体的部分,优选包括其抗原结合区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双体;线性抗体;单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,每个片段具有单个抗原结合位点。还产生残余的“Fc”片段,其名称反映了其容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点并仍能够交联抗原的F(ab')₂片段。聚糖相互作用抗体可以包括这些片段中的一个或更多个。出于本文的目的,抗体可包含重链和轻链可变结构域以及Fc区。

[0038] 抗原结合区:如本文所用,术语“抗原结合区”是指与靶分子或表位直接相互作用的抗体、抗体片段或相关分子的部分。抗原结合区通常包括可变结构域对,如在抗体的Fab区中或者在scFv中连接在一起。

[0039] 大约:如本文所用,术语“大约”或“约”用于一个或更多个感兴趣的值时,指的是与所述参考值相似的值。在一些实施方案中,术语“大约”或“约”是指落入所述参考值任一方向(大于或小于)的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少之内的值的范围,除非上下文另有说明或上下文中显而易见的(除非该数目将超过可能值的100%)。

[0040] 与.....结合:如本文所用,术语“与.....结合”、“缀合”、“连接”、“附着”和“结合”(tethered),当用于两个或更多个部分时,表示部分与另一部分直接地或通过一种或更多种作为连接剂的额外部分进行物理结合或连接,形成足够稳定的结构,使得所述部分在

使用结构的条件下例如生理条件下保持物理结合。“结合”不需要严格地通过直接的共价化学键合。也可能是离子或氢键或基于杂交的连接,其足够稳定从而使得“结合”的实体保持物理结合。

[0041] 双功能:如本文所用,术语“双功能”是指能够或维持至少两种功能的任何物质、分子或部分。功能可能影响相同的结果或不同的结果。产生功能的结构可以相同或不同。

[0042] 生物分子:如本文所用,术语“生物分子”是基于氨基酸、基于核酸、基于碳水化合物或基于脂质等的任何天然分子。

[0043] 双特异性抗体:如本文所用,术语“双特异性抗体”是指能够结合两种不同抗原的抗体。这样的抗体通常包含来自至少两种不同抗体的区。双特异性抗体可以包括在 Riethmuller, G, 2012. *Cancer Immunity*. 12:12-18, Marvin, J. S. 等人, 2005. *Acta Pharmacologica Sinica*. 26 (6) :649-58 和 Schaefer, W. 等人, 2011. *PNAS*. 108 (27) :11187-92 中描述的那些中的任一种,其中每一个的全部内容通过引用并入本文。

[0044] 分支:如本文所用,术语“分支”是指从主要实体或来源连接或延伸出的实体、部分或附属物。在一些实施方案中,“支链”或“分支链”包括从母链延伸的一个或更多个残基(包括但不限于糖残基)。如本文所用,“母链”用于指从其上连接有分支链的残基链(包括但不限于糖残基)。在具有多个分支的聚糖的情况下,母链也可以指所有这些分支直接或间接附着的源链。在具有己糖残基链的多糖的情况下,母链链通常发生在相邻残基的碳1和4之间,而支链通过分支残基的碳1与(分支从其延伸的)母体残基的碳3之间的连接附着至母链。如本文所用,术语“分支残基”是指在分支链中与母链附着的残基。

[0045] 癌症干细胞:如本文所用,癌症干细胞(CSC)是指具有自我更新能力的肿瘤细胞子集。CSC可能能够再生不同的细胞类型。在一些情况下,这些细胞难以或不可能通过肿瘤的手术或化学治疗来移除。

[0046] 化合物:如本文所用,术语“化合物”是指不同的化学实体。在一些实施方案中,特定化合物可以以一种或更多种异构体或同位素形式(包括但不限于立体异构体、几何异构体和同位素)存在。在一些实施方案中,化合物仅以单一的这种形式提供或使用。在一些实施方案中,化合物以两种或更多种这类形式(包括但不限于立体异构体的外消旋混合物)的混合物形式提供或使用。本领域技术人员认识到一些化合物以不同的这类形式存在,表现出不同的性质和/或活性(包括但不限于生物活性)。在这类情况下,本领域普通技术人员可以选择或避免根据本发明使用的特定形式的化合物。例如,含有不对称取代的碳原子的化合物可以根据光学活性或外消旋形式分离。关于如何从光学活性起始材料制备光学活性形式的方法是本领域已知的,例如通过外消旋混合物的解析或通过立体选择性合成。

[0047] 环状或成环的:如本文所用,术语“环状”是指存在连续的环。环状分子不必是圆形的,只需连接形成完整的亚基链。

[0048] 单磷酸胞苷-N-乙酰神经氨酸羟化酶:如本文所用,术语“单磷酸胞苷-N-乙酰神经氨酸羟化酶”或“CMAH”是指在人中不存在但存在于大多数其它哺乳动物(包括但不限于小鼠、猪和黑猩猩)的酶,其催化由N-乙酰神经氨酸形成N-羟乙酰神经氨酸。人中缺乏该酶是由于移码突变导致CMAH转录物的提前终止和非功能性蛋白的产生。

[0049] 细胞毒性:如本文所用,术语“细胞毒性”用于指杀伤或导致细胞(例如哺乳动物细胞(例如人细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合的损伤、毒性或致

死作用的试剂。

[0050] 递送:如本文所用,“递送”是指将化合物、物质、实体、部分、物品(cargo)或有效载荷(payload)运输到预定目的地的行为或方式。

[0051] 递送剂:如本文所用,“递送剂”是指至少部分促进化合物、物质、实体、部分、物品或有效载荷的体内递送的任何物质。

[0052] 可检测标记:如本文所用,“可检测标记”是指与另一个实体附着、并入或结合的一种或更多种标志物、信号或部分,所述标志物、信号或部分易于通过本领域已知的方法检测,包括放射线照相术、荧光、化学发光、酶活性、吸光度等。可检测标记包括放射性同位素、荧光团、发色团、酶、染料、金属离子、配体如生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素和半抗原、量子点等。可检测标记可以位于它们所附着、并入或结合的实体中的任何位置。例如,当附着、并入或结合肽或蛋白时,它们可以位于氨基酸、肽或蛋白内,或位于N-或C-末端。

[0053] 展示文库:如本文所用,术语“展示文库”是指用于科学发现以识别生物分子相互作用的工具。存在展示文库的不同变体,其包括利用噬菌体、酵母和核糖体。在每种情况下,给定文库内的蛋白(在本文中也称为“文库成员”)与编码蛋白的核酸连接(物理或通过与宿主结合)。靶标分子与展示文库的成员孵育时,可以与靶标结合的任何文库成员得以分离,并且可以通过分析连接的核酸确定编码结合蛋白的序列。在一些实施方案中,展示文库是“噬菌体展示文库”,其中展示文库由噬菌体病毒颗粒(本文也称为“噬菌体颗粒”)组成,其中核酸已并入噬菌体基因组中,产生融合到蛋白的病毒外壳蛋白,所述蛋白由已被引入的核酸所编码。在装配的噬菌体颗粒的外表面上“展示”这种融合蛋白,在噬菌体颗粒中可以与给定的靶标相互作用。

[0054] 远端:如本文所用,术语“远端”表示远离中心或远离兴趣点或区。

[0055] 工程改造:如本文所用,当本发明的实施方案经设计而具有不同于起点、野生型或天然分子的结构或化学方面的特征或性质时,则认为是“工程改造的”。因此,工程改造的试剂或实体是其设计和/或生产包括人为的行为的那些。

[0056] 表位:如本文所用,“表位”是指分子上能够与免疫系统组分(包括但不限于抗体)相互作用的表面或区。在一些实施方案中,表位可以包括靶标位点。表位可以包括抗原上的区或在两个或更多个抗原之间的区,其被相应的抗体特异性识别和结合。一些表位可以包括沿着一个或更多个聚糖的一个或更多个糖残基。这样的表位可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或至少10个糖残基。表位还可以包括一个或更多个实体之间的相互作用区。在一些实施方案中,表位可以包括两个糖残基之间、支链与母链之间或聚糖与蛋白之间的连接。

[0057] 醚键:如本文所用,“醚键”是指包含两个碳原子之间键合的氧的化学键。在一些实施方案中,醚键将糖残基连接至其它实体,包括但不限于其它糖残基以形成聚糖链。这样的键也被称为“糖苷键”或“糖苷键合”。在至少一个糖残基的情况下,当提及糖苷键时,术语“连接”和/或“键合”也在本文中使用。在一些实施方案中,连接可以将聚糖连接到其它实体,包括但不限于蛋白、脂质、磷脂和鞘脂。在一些实施方案中,糖残基可能与蛋白相连,通常在糖残基和氨基酸残基之间形成连接。这种氨基酸残基包括丝氨酸和苏氨酸。在一些实施方案中,醚键通过参与键形成的碳水化合物接头将聚糖连接到聚糖阵列。糖苷键在它们的立体化学性质上可能不同。在一些实施方案中, α 取向的糖苷键(在本文中也称为“ α 键”)导致醚键的键合氧和糖残基的环己烷环之间的轴向取向。在一些实施方案中, β 取向的糖苷

键(在本文中也称为“β键”)导致醚键的键合氧与糖残基的环己烷环之间的赤道取向(equatorial orientation)。

[0058] 表达:如本文所用,核酸序列的“表达”是指以下事件中的一个或多个:(1)从DNA序列(例如通过转录)产生RNA模板;(2)RNA转录物的加工(例如,通过剪接、编辑、5'帽形成和/或3'末端加工);(3)将RNA翻译成多肽或蛋白;(4)多肽或蛋白的折叠;和(5)多肽或蛋白的翻译后修饰。

[0059] 特征:如本文所用,“特征”是指特性、性质或区别元素。

[0060] 制剂:如本文所用,“制剂”是指根据配方而制备的材料或混合物,并且可以包含至少一种抗体、化合物、物质、实体、部分、物品或有效载荷和递送剂、载体或赋形剂。

[0061] 功能性:如本文所用,“功能性”生物分子是具有表现出特有性质和/或活性的结构和形式的生物实体。如本文所用,“官能团”或“化学基团”是指原子或化学键的特征组,其作为大分子一部分。在一些实施方案中,官能团可能与不同的分子结合,但可能参与类似的化学反应,而不管它们所属的分子如何。常见官能团包括但不限于羧基(-COOH)、乙酰基(-COH)、氨基(-NH₂)、甲基(-CH₃)、硫酸基(-SO₃H)和酰基。在一些实施方案中,可以使用修饰官能团名称的术语来传达向分子中添加一个或多个官能团,所述术语以“-化”结尾,例如乙酰化、甲基化和硫酸化。

[0062] 聚糖:如本文所用,术语“聚糖”、“寡糖”和“多糖”可互换使用,是指由糖单体构成的聚合物,通常通过糖苷键连接,在本文中也称为键。在一些实施方案中,术语“聚糖”、“寡糖”和“多糖”可以用于指糖缀合物(glycoconjugate)(例如糖蛋白、糖脂或蛋白聚糖)的碳水化合物部分。

[0063] 聚糖链:如本文所用,术语“聚糖链”是指包含两种或更多种糖的糖聚合物。在一些实施方案中,聚糖链通过蛋白上的丝氨酸或苏氨酸残基与蛋白共价连接。

[0064] 富含聚糖的组合物:如本文所用,术语“富含聚糖的组合物”是指包含大百分比聚糖的混合物。在一些实施方案中,富含聚糖的组合物内的聚糖可以构成组合物总重量的约1%至约10%、约5%至约15%、约20%至约40%、约30%至约50%、约60%至约80%、约70%至约90%或至少100%。

[0065] 糖苷键:如本文所用,术语“糖苷键”是指碳水化合物与另一化学基团之间形成的共价键。在一些实施方案中,在一个糖分子的还原末端和第二个糖分子或多糖链的非还原末端之间形成糖苷键。归因于连接的糖之间的氧(或醚键),这种糖苷键也被称为O-糖苷键。在一些实施方案中,两个糖之间或糖与接头之间的糖苷键也可以被称为“连接”。

[0066] 体外:如本文所用,术语“体外”指在人造环境中发生的事件,例如在试管或反应容器中、在细胞培养中、在培养皿中等,而不是在生物体内(如动物、植物或微生物)。

[0067] 体内:如本文所用,术语“体内”是指在生物体内(例如动物、植物或微生物或其细胞或组织)发生的事件。

[0068] 分离的:如本文所用,术语“分离的”与“分开的”同义,但是涵盖有推定分开由人为进行的含义。在一个实施方案中,分离的物质或实体是指已经和至少一些组分分开的物质或实体,而所述物质或实体原先和所述组分是结合的(无论是在自然环境还是在实验环境中)。分离的物质相对于它们所分离自的物质而言,可能具有不同的纯度水平。分离的物质和/或实体可以脱离至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、

约90%或更多最初其所结合的其它组分。在一些实施方案中,分离的试剂超过约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或超过约99%的纯度。如本文所用,如果物质上基本不含其它组分,则该物质是“纯的”。

[0069] 试剂盒:如本文所用,术语“试剂盒”是指包含一种或更多种适于合作性目的的组分及其使用说明书的组。

[0070] 敲除:如本文所用,术语“敲除”是指其中现有基因已通过通常涉及人为方法而被失活的生物体。在敲除的生物体中,已被失活的基因称为已被“敲除”。在一些实施方案中,敲除的基因可以通过将核苷酸序列插入基因或通过完全替换基因而失活。

[0071] 接头:如本文所用,“接头”是指连接两个或更多个结构域、部分或实体的部分。在一个实施方案中,接头可以包含10、11、12、13、14、15或更多个原子。在进一步的实施方案中,接头可以包括原子组,例如10-1000个原子。这样的原子或其基团可以包括但不限于碳、氨基、烷基氨基、氧、硫、亚砷、磺酰基、羰基和亚胺。在一些实施方案中,接头可以包括氨基酸、肽、多肽或蛋白。在一些实施方案中,接头结合的部分可以包括但不限于原子、化学基团、核苷、核苷酸、核碱基、糖、核酸、氨基酸、肽、多肽、蛋白、蛋白复合物、有效载荷(例如治疗剂)或标志物(包括但不限于化学、荧光、放射性或生物发光标志物)。如本文所述,接头可用于任何有用的目的,例如形成多聚体或缀合物,以及施用有效载荷。如本文所述,可并入接头的化学基团的实例包括但不限于烷基、烯基、炔基、酰氨基、氨基、醚、硫醚、酯、亚烷基、杂亚烷基、芳基或杂环基,它们各自可任选是取代的。接头的实例包括但不限于不饱和烷烃、聚乙二醇(例如乙二醇或丙二醇单体单元,例如二甘醇、二丙二醇、三甘醇、三丙二醇、四甘醇或四甘醇)和葡聚糖聚合物,其它实例包括但不限于接头内的可切割部分,诸如例如二硫键(-S-S-)或偶氮键(-N=N-),其可以使用还原剂或光解作用进行切割。选择性可切割的键的非限制性实例包括酰胺键,其可以例如通过使用三(2-羧乙基)膦(TCEP)或其它还原剂、和/或光解作用进行切割,以及可以例如通过酸性或碱性水解进行切割的酯键。在一些实施方案中,接头是用于将聚糖与底物连接的碳水化合物部分,如在聚糖阵列中。这类碳水化合物接头包括但不限于 $-O(CH_2)_2CH_2NH_2$ 和 $-O(CH_2)_3NHC(=O)CH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$ 。

[0072] mRNA:如本文所用,术语“mRNA”是指由于基因转录和产生的转录物加工而产生的信使RNA。在一些实施方案中,可从细胞或细胞集合中提取已离开细胞核的mRNA,并分析确定哪些基因在给定时间或在给定情况下经历了转录。

[0073] 粘蛋白:如本文所用,术语“粘蛋白”是指高度糖基化的蛋白家族。在一些实施方案中,粘蛋白由颌下腺产生并发现于唾液和粘液中。

[0074] 负向选择:如本文所用,术语“负向选择”是指基于结合不包含靶标抗原的实体和/或组合物组分的能力从展示文库中选择文库成员。在一些实施方案中,在正向选择之前使用负向选择以去除可能非特异性结合靶标的元素。

[0075] 脱靶:如本文所用,“脱靶”是指对任何一个或更多个靶标、基因或细胞转录物的任何不希望的作用。

[0076] 患者:如本文所用,“患者”是指可能寻求或需要治疗、要求治疗、正在接受治疗、将接受治疗的受试者,或者针对特定疾病或状况在受过培训(如许可)的专业人员护理下的受试者。

[0077] 肽:如本文所用,“肽”是长度小于或等于50个氨基酸,例如约5、10、15、20、25、30、

35、40、45或50个氨基酸的蛋白或多肽。

[0078] 药学上可接受的：在本文中短语“药学上可接受的”用于指在合理的医学判断范围内适用于与人和动物组织接触，而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症的那些化合物、材料、组合物和/或剂型，与合理的益处/风险比相称。

[0079] 药学上可接受的赋形剂：如本文所用的短语“药学上可接受的赋形剂”是指存在于药物组合中活性剂(例如，如本文所述)以外的并且在患者中具有基本无毒且无炎症性质的任何成分。在一些实施方案中，药学上可接受的赋形剂是能够悬浮或溶解活性剂的载体。赋形剂可以包括例如：抗粘附剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料(颜料)、润湿剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、成膜剂或包衣、矫味剂、香料、助流剂(流动促进剂)、润滑剂、防腐剂、印刷墨、吸收剂、悬浮剂或分散剂、甜味剂和水合水。示例性赋形剂包括但不限于：丁基化羟基甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸钙(二碱式)、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交聚维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、对羟基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预胶化淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、棕榈酸视黄酯、虫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、羧基乙酸淀粉钠、山梨醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C和本糖醇。

[0080] 药学上可接受的盐：本文所述化合物的药学上可接受的盐是公开的化合物的形式，其中酸或碱部分为其盐形式(例如，通过使游离碱基团与合适的有机酸反应而产生)。药学上可接受的盐的实例包括但不限于碱性残基例如胺的无机或有机酸盐；酸性残基如羧酸的碱或有机盐；等。代表性的酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐(heptonate)、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等以及无毒的铵、季铵和胺阳离子，包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。药学上可接受的盐包括常规的无毒盐，例如来自无毒的无机或有机酸。在一些实施方案中，通过常规化学方法从含有碱性或酸性部分的母体化合物制备药学上可接受的盐。通常，可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量适当的碱或酸在水或有机溶剂中、或在两者的混合物中反应来制备这种盐；通常非水介质如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。适当的盐的列表见于Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,Mack Publishing Company,Easton,Pa,1985,p1418,Pharmaceutical Salts:Properties,Selection and Use,P.H.Stahl和C.G.Wermuth(编),Wiley-VCH,2008和Berge等,Journal of Pharmaceutical Science,66,1-19(1977),其每一篇均通过引用整体并入本文。药学上可接受的溶剂化物：术语“药学上可接受的溶剂化物”，如本文所用，是指化合物的结晶形式，在其中合适溶剂的分子并入晶格中。例如，可以通过从包含有机溶剂、水或其混合物的溶液中结晶、重结晶或沉淀来制备溶剂化物。适当溶剂化物的实例是乙

醇、水(例如单水合物、二水合物和三水合物)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基亚砜(DMSO)、N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N'-二甲基乙酰胺(DMAC)、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMEU)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2-(1H)-嘧啶酮(DMPU)、乙腈(ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苯甲醇、2-吡咯烷酮、苯甲酸苄酯等。当水是溶剂时,溶剂化物被称为“水合物”。在一些实施方案中,并入溶剂化物中的溶剂是这样的类型或水平,其生理上可耐受于溶剂化物所施用的生物体(例如,药物组合物的单位剂量形式)。

[0081] 药代动力学:如本文所用,“药代动力学”是指与确定施用于活生物体中物质的命运相关的分子或化合物的任何一种或更多种性质。药代动力学分为几个方面,包括吸收、分布、代谢和排泄的程度和速度。这通常被称为ADME,其中:(A)吸收是物质进入血液循环的过程;(D)分布是物质在身体流体和组织中的分散或扩散;(M)代谢(或生物转化)是母体化合物向子代谢物的不可逆转化;以及(E)排泄(或消除)指物质从身体中消除。在极少数情况下,一些药物不可逆地积聚在身体组织中。

[0082] 物理化学:如本文所用,“物理化学”指关于物理和/或化学性质。

[0083] 正向选择:如本文所用,术语“正向选择”是指从独特实体组中选择给定实体。这样的实体及其组可以例如是抗体。在一些情况下,它们可以是抗体片段,或表达的抗体片段与能够表达这种片段的试剂(例如,来自展示文库的文库成员)结合。选择可以基于所选实体结合期望的靶标或表位的能力。在一些实施方案中,正向选择可与噬菌体展示文库联合使用以鉴定表达scFv的噬菌体颗粒,其中scFv结合期望的靶标。在其它实施方案中,正向选择可以指从抗体池(pool)中选择抗体候选物。在其它情况下,实体可以是细胞、细胞系或克隆,如在杂交瘤选择期间选择克隆一样。在这类情况下,正向选择可以指基于这些克隆产生的抗体的一种或更多种特征(例如,对一种或更多种期望表位的特异性)的克隆选择。在一些情况下,正向选择方法中期望的表位可以包括STn(例如,AcSTn和/或GcSTn)。

[0084] 相反,如本文所用的“负向选择”包括针对正向选择所描述的相同原理和实例,但区别特征在于其用于从独特实体组中去除不希望的实体。

[0085] 预防:如本文所用,术语“预防”是指部分或完全延迟感染、疾病、病症和/或病况的发作;部分或完全延迟特定感染、疾病、病症和/或病况的一种或更多种症状、特征或临床表现的发作;部分或完全延迟特定感染、疾病、病症和/或病况的一种或更多种症状、特征或表现的发作;部分或完全延迟感染、特定疾病、病症和/或病况的进展;和/或降低与感染、疾病、病症和/或病况相关的病理发展风险。

[0086] 前药:本公开还包括本文所述化合物的前药。如本文所用,“前药”是指处于这样一种形式的任何物质、分子或实体,即当发生化学或物理改变时,预测这种物质、分子或实体发挥治疗作用。前药可通过某种方式共价键合或隔绝(sequestered),并且在施用于哺乳动物受试者之前、之时或之后释放或转化为活性药物部分。可以通过修饰化合物中存在的官能团来制备前药,使得修饰在常规操作或体内切割成母体化合物。前药包括这样的化合物,其中当施用于哺乳动物受试者时,羟基、氨基、巯基或羧基与任何分别切割以形成游离羟基、氨基、巯基或羧基的基团键合。前药的制备和使用于T.Higuchi和V.Stella,“Pro-drugs as Novel Delivery Systems”Vol.14A.C.S.Symposium Series以及Bioreversible Carriers in Drug Design,Edward B.Roche编,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987中讨论,两者均通过引用整体并入本文。

- [0087] 近端:如本文所用,术语“近端”意思是位于更接近中心或感兴趣的点或区的位置。
- [0088] 相互作用区:如本文所用,术语“相互作用区”是指沿着两个或更多实体中的任何一个,这种实体相互作用或重叠的区。在一些实施方案中,相互作用的区可以包含沿着聚糖链的接触第二聚糖链的一个或更多个糖残基。在一些实施方案中,聚糖链是来自同一母链的分支链。在一些实施方案中,相互作用的区可能发生在两条聚糖链之间,其中一条链是分支链而第二条链是母链。在聚糖链的情况下,相互作用的区可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或至少10个糖残基。在一些实施方案中,相互作用的区也可能发生在聚糖与蛋白之间或聚糖与脂质之间。
- [0089] 残基:如本文所用,术语“残基”是指与聚合物结合或能够与聚合物结合的单体。在一些实施方案中,残基包含糖分子,包括但不限于葡萄糖、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、唾液酸。在一些实施方案中,残基包含氨基酸。
- [0090] 样本:如本文所用,术语“样本”是指从来源获取的等份或部分和/或提供用于分析或处理的等份或部分。在一些实施方案中,样本来自生物来源(在本文中也称为“生物样本”),例如组织、细胞或组分部分(例如体液,包括但不限于血液、血浆、血清、粘液、淋巴液、滑液、脑脊液、唾液、羊水、羊膜脐带血、尿液、阴道液和精液)。在一些实施方案中,样本可以是或包括从整个生物体或其组织、细胞或组分部分的子集、或其流分或部分制备的匀浆、裂解物或提取物,包括但不限于例如血浆、血清、脊髓液、淋巴液、皮肤外部切片、呼吸道、肠道和泌尿生殖道、眼泪、唾液、乳汁、血细胞、肿瘤、器官。在一些实施方案中,样本包含介质,如营养肉汤或凝胶,其可含有细胞组分,如蛋白或核酸分子。在一些实施方案中,“主要”样本是来源的等份。在一些实施方案中,主要样本经受一个或更多个处理(例如分离,纯化等)步骤以制备用于分析或其它用途的样本。
- [0091] 唾液酸的(Sialyl):如本文所用,前缀“唾液酸的”以及术语“唾液酸化(sialylated)”描述包含唾液酸的化合物。
- [0092] 单位剂量:如本文所用,“单位剂量”是指以一个/一次/单一途径/单点接触的方式(即单次施用事件)施用的任何治疗剂的剂量。在一些实施方案中,以离散剂型(例如片剂、胶囊、贴剂、装载的注射器、小瓶等)提供单位剂量。
- [0093] 分割剂量:如本文所用,“分割剂量”是将单位剂量或总的日剂量分成两个或更多个剂量。
- [0094] 稳定的:如本文所用,“稳定的”是指化合物或实体足够稳定以经受从反应混合物分离至有用程度的纯度,并且优选能够配制成有效的治疗剂。
- [0095] 稳定化的:如本文所用,术语“稳定化”、“稳定化的”、“稳定化的区”是指使得稳定或变得稳定。在一些实施方案中,稳定性是相对于绝对值来测量的。在一些实施方案中,稳定性是相对于参考化合物或实体测量的。
- [0096] 受试者:如本文所用,术语“受试者”或“患者”是指例如为了实验、诊断、预防和/或治疗目的,而向其施用根据本发明组合物的任何生物体。典型的受试者包括动物(例如哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和人)和/或植物。
- [0097] 颌下腺:如本文所用,术语“颌下腺”或“下颌下(submandibular)腺”是指位于口底下的粘液产生腺。这些腺体能够产生粘蛋白,并且在一些实施方案中,可以从哺乳动物中提取作为粘蛋白的来源。

[0098] 患有:“患有”疾病、病症和/或病况的个体已被诊断患有或表现出疾病、病症和/或病况的一种或更多种症状。

[0099] 易感:对疾病、病症和/或病况“易感”的个体尚未被诊断患有和/或可不表现疾病、病症和/或病况的症状,但具有发展出疾病或其症状的倾向。在一些实施方案中,对疾病、病症和/或病况(例如癌症)易感的个体特征在于以下一种或更多种:(1)与疾病、病症和/或病况发展相关的基因突变;(2)与疾病、病症和/或病况的发展相关的遗传多态性;(3)与疾病、病症和/或病况相关的蛋白和/或核酸的表达和/或活性增加和/或降低;(4)与疾病、病症和/或病况的发展相关的习惯和/或生活方式;(5)疾病、病症和/或病况的家族史;和(6)暴露于和/或感染与疾病、病症和/或病况发展相关的微生物。在一些实施方案中,疾病、病症和/或病况易感的个体会患上疾病、病症和/或病况。在一些实施方案中,疾病、病症和/或病况易感的个体不会发展出疾病、病症和/或病况。

[0100] 合成的:术语“合成的”是指人为生产、制备和/或制造。本发明的多核苷酸或多肽或其它分子的合成可以是化学或酶促的。

[0101] 靶标:如本文所用,术语“靶标”是指受作用影响的对象或实体。在一些实施方案中,靶标是指用于开发特异性结合抗原的抗体的抗原。

[0102] 靶标筛选:如本文所用,术语“靶标筛选”是指使用靶标物质来鉴定该物质的结合配偶体。

[0103] 靶标位点:如本文所用,术语“靶标位点”是指在细胞、细胞外空间、组织、器官和/或生物体之上或之内的一种或更多种聚糖、糖蛋白、生物分子和/或生物结构之上或之内的区,其被结合剂或效应分子(例如抗体)所识别。在一些实施方案中,聚糖靶标位点可以仅存在于一个糖残基上,可以由两个或更多个残基形成,或者可以包括聚糖和非聚糖组分。在一些实施方案中,靶标位点是在两个或更多个聚糖或糖蛋白之间形成的。在一些实施方案中,靶标位点在相同聚糖的分支链之间或一个或更多个分支链与母链之间形成。

[0104] 靶标细胞:如本文所用,“靶标细胞”是指任何一个或更多个感兴趣的细胞。细胞可以在体外、体内、原位或在生物体的组织或器官中发现。生物体可以是动物,优选哺乳动物,更优选人,最优选患者。

[0105] 末端残基:如本文所用,术语“末端残基”是指聚合链中的最后一个残基。在一些实施方案中,末端残基是位于多糖链的非还原末端的糖残基。

[0106] 治疗剂:术语“治疗剂”是指当施用给受试者时具有治疗、诊断和/或预防作用和/或引发期望的生物学和/或药理学作用的任何试剂。

[0107] 治疗有效量:如本文所用,术语“治疗有效量”是指当施用至患有或易感于感染、疾病、病症和/或病况的受试者时,足以治疗、改善症状、诊断、预防、和/或延迟感染、疾病、病症和/或病况的发作的待递送的试剂的量(例如,核酸、药物、治疗剂、诊断剂、预防剂等)。在一些实施方案中,以单剂量提供治疗有效量。在一些实施方案中,以包含多个剂量的剂量方案施用治疗有效量。本领域技术人员将理解,在一些实施方案中,如果包含当作为这种剂量方案一部分而施用时有有效的量,则单位剂型可考虑包含治疗有效量的特定试剂或实体。

[0108] 治疗有效结果:如本文所用,术语“治疗有效结果”是指在患有或易感于感染、疾病、病症和/或病况的受试者中足以治疗、改善症状、诊断、预防和/或延迟感染、疾病、病症和/或病况发作的结果。

[0109] 每日总剂量:如本文所用,“每日总剂量”是在24小时内施用或规定的量。它可以作为单位剂量施用。

[0110] 转基因的:如本文所用,术语“转基因的”是指生物体包含一个或更多个并入生物体基因组中的基因,所述基因在该生物体中不是天然存在的。

[0111] 治疗:如本文所用,术语“治疗”是指部分或完全缓和、减轻、改善、缓解、延缓特定感染、疾病、病症和/或病况的一种或更多种症状或特征的发作、抑制进展、降低严重程度和/或降低发病率。例如,“治疗”癌症可以指抑制肿瘤的存活、生长和/或扩散。治疗可以施用于没有表现出疾病、病症和/或病况迹象的受试者和/或仅表现出疾病、病症和/或病况早期迹象的受试者,目的在于降低发展成与疾病、病症和/或病况相关病理的风险。

[0112] 可变区:如本文所用,术语“可变区”或“可变结构域”是指在抗体之间序列广泛不同的特异性抗体结构域,并用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。

[0113] 完整IgG:如本文所用,术语“完整IgG”是指完整的IgG分子。在一些实施方案中,完整IgG分子包括在两种或更多种其它生物中天然存在的区。

[0114] 野生型:如本文所用,术语“野生型”是指包括天然基因组的生物体(不含来自其它生物体的基因)。

[0115] I. 本发明的组合物

[0116] 在一些实施方案中,本发明提供了包含至少一种聚糖相互作用抗体的化合物以及组合物。在聚糖内,单糖单体可以全部相同或可以不同。常见的单体包括但不限于丙糖、丁糖、戊糖、葡萄糖、果糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、来苏糖、阿洛糖、阿卓糖、甘露糖、古洛糖、碘糖、核糖、甘露庚酮糖、景天庚酮糖和塔罗糖。氨基糖也可以是聚糖内的单体。包括这些糖的聚糖在本文中被称为氨基聚糖。如本文所用,氨基糖是包含胺基而非羟基的糖分子,或在一些实施方案中,由这种糖衍生的糖。氨基糖的实例包括但不限于葡糖胺、半乳糖胺、N-乙酰葡糖胺、N-乙酰半乳糖胺、唾液酸(包括但不限于N-乙酰神经氨酸和N-羟乙酰神经氨酸)和L-氨基糖柔胺。

[0117] 如本文所用,术语“聚糖相互作用抗体”是指可以与聚糖部分相互作用的抗体。这种抗体可以仅结合聚糖部分、结合多个聚糖部分、或结合包含聚糖和非聚糖组分的表位。非聚糖组分可以包含但不限于蛋白、蛋白相关部分(例如翻译后修饰)、细胞和细胞相关分子/结构。聚糖相互作用抗体可发挥作用以结合、改变、激活、抑制、稳定、降解和/或调节聚糖或聚糖相关分子或实体。对此,聚糖相互作用抗体可以起到治疗作用,而无论是缓解性(palliative)、预防性还是正在进行治疗的组合物。在一些实施方案中,聚糖相互作用抗体可以包含缀合物或与其它分子的组合。在一些实施方案中,聚糖相互作用抗体针对具有一个或更多个氨基糖的聚糖。在进一步的实施方案中,一种或更多种氨基糖是唾液酸。在进一步的实施方案中,一种或更多种唾液酸是N-乙酰神经氨酸和/或N-羟乙酰神经氨酸。

[0118] 抗体

[0119] 聚糖相互作用抗体可以包含完整的抗体或其片段。如本文所用,术语“抗体”以最广泛的含义使用并且包括各种形式,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如由至少两个完整抗体形成的双特异性抗体)、抗体缀合物(包括但不限于抗体-药物缀合物)、抗体变体(包括但不限于抗体模拟物、嵌合抗体(例如具有衍生自一种以上物种的氨基酸序列的抗体)和合成变体)以及抗体片段,只要它们表现出期望的生物学活性(例如结

合、激活、抑制、稳定、降解和/或调节一种或更多种靶标)。抗体主要是基于氨基酸的分子,但可能包含一种或更多种翻译后或合成修饰。翻译后修饰可包括糖基化。

[0120] 如本文所用,术语“抗体片段”是指完整抗体或其融合蛋白的部分,在一些情况下包含至少一个抗原结合区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、单链可变片段(scFv);双体;三体;线性抗体;单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,每个片段具有单个抗原结合位点。还产生残余的“Fc”片段,其名称反映了其容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点并仍能够交联抗原的F(ab')₂片段。聚糖相互作用抗体可以包含一个或更多个这些片段,并且可以例如通过酶消化完整抗体或通过重组表达而产生。

[0121] “天然抗体”通常是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,其由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成。编码抗体重链和轻链的基因是已知的,并且构成每一个的片段已被很好地表征和描述(Matsuda,F.等人,1998.Journal of Experimental Medicine.188(11):2151-62和Li,A.等人,2004.Blood.103(12):4602-9,其各自的内容通过引用整体并入本文)。各轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而不同免疫球蛋白同种型的重链之间二硫键的数量不同。各重链和轻链也有规则间隔的链间二硫桥。各重链的一端有可变结构域(V_H),后面是一些恒定结构域。各轻链的一端有可变结构域(V_L)以及在另一端有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。

[0122] 如本文所用,术语“可变结构域”是指在抗体重链和轻链上发现的特异性抗体结构域,其在抗体间的序列中广泛不同,并用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。可变结构域包含高变区。如本文所用,术语“高变区”是指可变结构域内包含负责抗原结合的氨基酸残基的区。存在于高变区内的氨基酸决定互补决定区(CDR)的结构,其是抗体的抗原结合位点的一部分。如本文所用,术语“CDR”是指包含与其靶标抗原或表位互补的结构抗体区。不与抗原相互作用的可变结构域的其他部分,称为框架(FW)区。抗原结合位点(也称为抗原组合位点或互补位)包括与特定抗原相互作用所必需的氨基酸残基。通常通过与结合抗原的共结晶学来阐明构成抗原结合位点的确切残基,然而计算评估也可以基于与其它抗体的比较来使用(Strohl,W.R.Therapeutic Antibody Engineering.Woodhead Publishing,Philadelphia PA.2012Ch3,p47-54,其内容通过引用整体并入本文)。确定构成CDR的残基可以包括使用编号方案,包括但不限于由Kabat(Wu,T.T.等人,1970,JEM,132(2):211-50和Johnson,G.等人,2000,Nucleic Acids Res.28(1):214-8,其各自的内容通过引用整体并入本文)、Chothia(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196,901(1987),Chothia等,Nature 342,877(1989)和Al-Lazikani,B.等人,1997,J.Mol.Biol.273(4):927-48,其内容各自通过引用整体并入本文)、Lefranc(Lefranc,M.P.等人,2005,Immunome Res.1:3)和Honegger(Honegger,A和Pluckthun,A.2001.J.Mol.Biol.309(3):657-70,其内容通过引用整体并入本文)所教导的。

[0123] V_H和V_L结构域各有三个CDR。V_L CDR在本文中被称为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,按照沿可变结构域多肽从N-向C-端移动时出现的顺序。V_H CDR在本文中被称为CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,按照沿着可变结构域多肽从N-向C-端移动时出现的顺序。除了CDR-H3之外,每个CDR具有偏好的规范结构,其包含可能在抗体之间序列和长度方面高度可变的氨基酸序

列,从而产生抗原结合结构域中的各种三维结构(Nikoloudis,D.等人,2014PeerJ.2:e456)。在一些情况下,可以在相关抗体组中分析CDR-H3以评估抗体多样性。确定CDR序列的各种方法在本领域中是已知的并且可以应用于已知的抗体序列(Strohl,W.R.Therapeutic Antibody Engineering.Woodhead Publishing,Philadelphia PA.2012Ch3,p47-54,其内容通过引用整体并入本文)。

[0124] 如本文所用,术语“Fv”是指包含形成完整抗原结合位点所需的抗体上最小片段的抗体片段。这些区由紧密非共价结合的一个重链的二聚体和一个轻链可变结构域组成。Fv片段可以通过蛋白水解切割产生,但是相当不稳定。本领域已知用于产生稳定Fv片段的重组方法,通常通过在轻链可变结构域和重链可变结构域之间插入柔性接头(以形成单链Fv(scFv))或通过重链和轻链可变结构域之间引入二硫桥(Strohl,W.R.Therapeutic Antibody Engineering.Woodhead Publishing,Philadelphia PA.2012.Ch3,p46-47,其内容通过引用整体并入本文)。

[0125] 根据其恒定结构域的氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的抗体“轻链”可被分为两种明显不同的类型之一,称为 κ 和 λ 。根据其重链恒定结构域的氨基酸序列,可将抗体分为不同的类别。有五种主要类型的完整抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中几种可以进一步分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。

[0126] 如本文所用,术语“单链Fv”或“scFv”是指VH和VL抗体结构域的融合蛋白,其中这些结构域通过柔性肽接头连接在一起形成单一多肽链。在一些实施方案中,Fv多肽接头使得scFv能够形成抗原结合所需的结构。在一些实施方案中,将scFv与噬菌体展示、酵母展示或其它展示方法联合使用,其中它们可以与表面成员(例如,噬菌体外壳蛋白)组合表达,并用于鉴定给定抗原的高亲和性肽。

[0127] 术语“双体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包括与相同多肽链中的轻链可变结构域 V_L 连接的重链可变结构域 V_H 。通过使用太短而不允许在同一链上两个结构域之间配对的接头,结构域被迫与另一个链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。双体在以下有更充分的描述,例如EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993),其全部内容通过引用整体并入本文。

[0128] 术语“细胞内抗体”指的是一种抗体形式,其不从由产生自的细胞分泌,而是靶向一种或更多种细胞内蛋白。细胞内抗体可用于影响多种细胞过程,包括但不限于细胞内运输、转录、翻译、代谢过程、增殖信号传导和细胞分裂。在一些实施方案中,本发明的方法可以包括基于细胞内抗体的疗法。在一些这样的实施方案中,本文公开的可变结构域序列和/或CDR序列可并入用于基于细胞内抗体的疗法的一个或更多个构建体中。在一些情况下,本发明的细胞内抗体可靶向一种或更多种糖化细胞内蛋白或可调节一种或更多种糖化细胞内蛋白与替代蛋白之间的相互作用。

[0129] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指经工程化以在免疫效应细胞表面上表达的人工受体,导致这种免疫效应细胞特异性靶向表达实体的细胞,所述实体以高亲和性结合人造受体。CAR可被设计为包含抗体、抗体可变结构域和/或抗体CDR的一个或更多个区段,使得当这类CAR在免疫效应细胞上表达时,免疫效应细胞结合并清除被CAR抗体部分识别的任何细胞。在一些情况下,CAR被设计为特异性结合癌细胞,导致癌细胞的免疫调节清除。

[0130] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的细胞(或克隆)群体获得的抗体,即除了在单克隆抗体生产期间可能出现的可能变体之外,构成群体的单个抗体是相同的和/或结合相同的表位,其中通常这种变体少量存在。与多克隆抗体制备物(通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体)不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。

[0131] 修饰语“单克隆”表示抗体获自基本上同质的抗体群的特征,并且不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。本文中的单克隆抗体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)以及这种抗体的片段,其中重链和/或轻链的部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中对应序列相同或同源,而链的其余部分与源自另一物种或属于另一种抗体类别或亚类的抗体中对应序列相同或同源。

[0132] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。对于大部分,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的抗体高变区的残基被来自非人物种(供体抗体)(如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物)抗体高变区的残基替代,其具有所需的特异性、亲和性和能力。人源化抗体可包含一个或更多个回复突变,其包括一个或更多个氨基酸逆转回供体抗体中发现的氨基酸。相反,来自人源化抗体中包含的供体抗体的残基可以突变以匹配存在于人受体抗体中的残基。

[0133] 在一些实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体可以是抗体模拟物。术语“抗体模拟物”是指模拟抗体的功能或作用并且特异性且高亲和性与其分子靶标结合的任何分子。在一些实施方案中,抗体模拟物可以是单体,其设计为包含纤连蛋白III型结构域(Fn3)作为蛋白支架(US 6,673,901;US 6,348,584)。在一些实施方案中,抗体模拟物可以是本领域已知的那些,包括但不限于亲和体(affibody)分子、affilin、affitin、anticalin、avimer、DARPin、Fynomer和Kunitz和结构域肽。在其它实施方案中,抗体模拟物可以包括一个或更多个非肽区。

[0134] 如本文所用,术语“抗体变体”是指在结构、序列和/或功能上与抗体类似的生物分子,但与其它抗体或天然抗体相比在氨基酸序列、组成或结构上包含一些差异。

[0135] 抗体开发

[0136] 开发本发明的聚糖相互作用抗体以结合例如本文所述的抗原。如本文所用,“抗原”是诱导或唤起生物体中免疫应答的实体。免疫应答的特征在于生物体的细胞、组织和/或器官对存在外来实体的反应。这种免疫应答通常导致生物体产生一种或更多种针对外来实体的抗体,例如抗原或抗原的一部分。在一些情况下,基于一种或更多种期望的免疫结果可以改变免疫方法。如本文所使用的,术语“免疫结果”是指一种或更多种期望的免疫作用。实例包括高抗体滴度和/或对目标靶标提高的抗体特异性。

[0137] 本发明的抗原可以包括聚糖、糖缀合物(包括但不限于糖蛋白和糖脂)、肽、多肽、融合蛋白或任何前述物质,并且可以与一种或更多种单独的佐剂或异源蛋白缀合或复合。在一些实施方案中,根据本发明的方法使用的抗原可以包括唾液酸化聚糖,例如STn。具有STn的抗原可以包括粘蛋白。粘蛋白是高度糖基化的蛋白家族。它们是起源于上皮细胞的许多肿瘤的组分(Ishida,A.等人,2008.Proteomics.8:3342-9,其内容通过引用整体并入本文)。它们由颌下腺高度表达,并且可高水平见于唾液和粘液中。动物衍生的颌下粘蛋白可用作抗原以在免疫原性宿主中产生抗STn抗体。来自不同物种的颌下粘蛋白差别在于AcSTn相对于GcSTn形式相关的STn含量。猪颌下黏蛋白(PSM)尤其富含GcSTn,占总STn的约90%。

来自牛颌下粘蛋白 (BSM) 的STn包括大致相等百分比的GcSTn和AcSTn。绵羊颌下粘蛋白 (OSM) 尤其富含AcSTn, 占总STn的约90%。在一些情况下, 根据由这种免疫所产生的抗体期望靶标, 为免疫所制备的溶液可以经改变而包含PSM、BSM和OSM中的一种或更多种。PSM可用于免疫接种以在免疫原性宿主中产生更可能特异于GcSTn的抗体。PSM富含含有Neu5Gc的粘蛋白型糖蛋白, 其修饰有GcSTn。目前已知的高Neu5Gc含量的源是红肉; 特别是颌下腺先前被描述为由CMAH酶高表达所致的Neu5Gc丰富来源, 所述CMAH酶催化产生Neu5Gc前体CMP-Neu5Ac的反应。在一些情况下, PSM可用于防止泛抗Neu5Gc应答并诱导针对GcSTn的更特异性免疫应答。OSM可用于免疫以在免疫原性宿主中产生更可能特异于AcSTn的抗体。

[0138] 在一个实施方案中, 本发明提供了GcSTn特异性的聚糖相互作用抗体。抗体对Neu5Ac-STn或Tn几乎没有交叉反应性。抗体可以结合GcSTn但对AcSTn具有降低的亲和性。

[0139] 在一些实施方案中, 可以在免疫之前使抗原经受酶消化以调节免疫原性宿主中产生的免疫应答。在一个实例中, 颌下粘蛋白可以在免疫之前用胰蛋白酶或蛋白酶K酶进行处理。这些酶的活性可能有助于切割并由此降低非STn表位的百分比和变异性。聚糖部分可以屏蔽它们所连接的肽区免于酶促蛋白水解, 并因此保持完整。根据这种免疫中使用的抗原类型和量, 免疫产生的抗体滴度可能具有不同的抗体水平。在一些情况下, 可根据预期滴度选择一些抗原用于免疫接种。

[0140] 如本文所用, “佐剂” 是改变其它试剂作用的药理学或免疫学试剂。根据本发明的佐剂包括但不限于化学组合物、生物分子、治疗剂和/或治疗方案。佐剂可以包括弗氏佐剂 (完全和/或不完全)、免疫刺激性寡核苷酸 (例如, CpG寡脱氧核苷酸 (ODN))、含矿物组合物、细菌ADP-核糖基化毒素、生物粘附剂、粘膜粘附剂、微粒、脂质、脂质体、胞壁酰肽、N-氧化聚乙烯-哌嗪衍生物、皂苷和/或免疫刺激复合物 (ISCO)。在一些实施方案中, 佐剂可以包含水包油乳剂 (例如亚微米水包油乳剂)。

[0141] 根据本发明的佐剂还可以包含美国专利公开号US20120027813和/或美国专利号US8506966中公开的那些中的任一种, 其中每一个的内容通过引用整体并入本文。

[0142] 本发明的抗体可以是多克隆的或单克隆的或重组的, 通过本领域已知的方法或本申请中所述的方法产生。在一些实施方案中, 为了用本领域技术人员已知的可检测标记进行检测的目的, 可以标记本发明的抗体。标记可以是放射性同位素、荧光化合物、化学发光化合物、酶或酶辅因子或本领域已知的任何其它标记。在一些方面, 与期望抗原结合的抗体不被标记, 但可以通过结合与一抗特异性结合的标记二抗来检测。

[0143] 本发明的抗体 (例如聚糖相互作用抗体) 包括但不限于多克隆、单克隆、多特异性、人、人源化或嵌合抗体、单链抗体、Fab片段、F(ab') 片段、由Fab表达文库产生的片段、抗独特型 (抗-Id) 抗体 (包括例如针对本发明抗体的抗-Id抗体)、细胞内产生的抗体 (即细胞内抗体) 和以上任一种的表位结合片段。本发明的抗体 (例如聚糖相互作用抗体) 可以来自任何动物来源, 包括鸟和哺乳动物。优选地, 这样的抗体是人、鼠 (例如小鼠和大鼠)、驴、绵羊、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡的来源。本发明的抗体可以是单特异性的或多特异性的 (例如双特异性、三特异性或更多的多特异性)。多特异性抗体可以对本发明的靶标抗原的不同表位具有特异性, 或者可以对本发明的靶标抗原和异源表位 (例如异源聚糖、肽或固体支持材料) 都是特异性的 (参见例如WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, A. 等人, Trispecific F(ab')₃ derivatives that use cooperative signaling via TCR/

CD3complex and CD2to activate and redirect resting cytotoxic T cells.J Immunol.1991七月一日;147(1):60-9;美国专利号4,474,893;4,714,681;4,925,648;5,573,920;5,601,819;和Kostelny,S.A.等人,Formation of bispecific antibody by the use of leucine zippers.J Immunol.1992三月一日148(5):1547-53)。

[0144] 本公开的聚糖相互作用抗体可以使用本领域已知用于开发单克隆抗体的已建立方法来制备。在一个实施方案中,使用杂交瘤技术制备单克隆抗体(Kohler,G.等人,Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.Nature.1975八月7;256(5517):495-7)。对于杂交瘤的形成,首先通常用免疫剂(例如本发明的靶标抗原)免疫小鼠、仓鼠或其它合适的宿主动物以引发淋巴细胞产生或能够产生与免疫剂特异性结合的抗体。另外,可以在体外免疫淋巴细胞。然后使用合适的融合剂(例如聚乙二醇)将淋巴细胞与永生化细胞系融合以形成杂交瘤细胞(Goding,J.W., Monoclonal Antibodies:Principles and Practice.Academic Press.1986;59-1031)。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物、兔、牛和人来源的骨髓瘤细胞。通常,使用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可以在合适的培养介质中培养,所述培养介质优选含有一种或更多种抑制未融合的永生化细胞生长或存活物质。例如,如果亲本细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤的培养介质通常包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(“HAT介质”),该物质阻止HGPRT-缺陷细胞的生长。

[0145] 优选的永生化细胞系是那些有效融合、支持所选的抗体产生细胞稳定高水平表达抗体、并对介质(如HAT介质)敏感的细胞系。更优选的永生化细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,其可以例如获自加利福尼亚州圣地亚哥的Salk研究所细胞分配中心和弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已被描述用于生产人单克隆抗体(Kozbor,D.等人,A Human hybrid myeloma for production of human monoclonal antibodies.J Immunol.1984十二月;133(6):3001-5;Brodeur,B.等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications.Marcel Dekker, Inc.,New York.1987;33:51-63)。

[0146] 在一些实施方案中,可对骨髓瘤细胞进行基因操作。这种操作可以使用本文所述的锌指核酸酶(ZFN)诱变来进行。替代地,可以使用本领域已知的转染方法。可以使用NS0骨髓瘤细胞或其它小鼠骨髓瘤细胞系。例如,Sp2/0-Ag14可以是用于开发杂交瘤的替代细胞系。

[0147] 转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)诱导的基因编辑提供替代基因敲除方法。TALEN是通过将TAL效应子DNA结合结构域与DNA切割结构域融合而产生的人工限制酶。与ZFN类似,TALEN在期望的基因座处诱导双链断裂,双链断裂可以通过易错的NHEJ修复从而在断裂位点产生插入/缺失(Wood,A.J.等人,Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs.Science.2011七月15;333(6040):307)。Collectis Bioresearch(马萨诸塞州剑桥)提供TALEN设计和质粒构建服务。然后,可以分析培养杂交瘤细胞的培养介质中单克隆抗体的存在。优选地,通过免疫沉淀或通过体外结合测定法如放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)来确定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性(即特异性免疫反应性)。这些技术和测定法是本领域技术人员已知的。例如,可以通过Scatchard分析(Munson,P.J.等人,Ligand:a versatile computerized approach for

characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem.* 1980年9月1日; 107(1): 220-39) 来确定单克隆抗体的结合特异性。在一些情况下, 在测定抗体结合之前, 可以通过抗原化学修饰来表征针对给定抗原区的抗体特异性。在一个实例中, 高碘酸盐处理可用于破坏唾液酸的C6侧链。在进行和不进行高碘酸盐处理的情况下, 可以进行分析以揭示未经处理样本中的结合是否是唾液酸特异性的。在一些情况下, 可以对具有9-0-乙酰化唾液酸的抗原进行温和碱处理 (例如, 用0.1M NaOH) 以破坏9-0-乙酰基。在有和没有温和碱处理的情况下进行测定, 以揭示未处理样本中的结合是否依赖唾液酸的9-0-乙酰化。

[0148] 在鉴定出期望杂交瘤细胞后, 可以通过有限稀释程序将克隆进行亚克隆并通过标准方法培养。用于此目的合适培养介质包括例如Dulbecco改良Eagle介质或RPMI-1640介质。替代地, 杂交瘤细胞可以在哺乳动物体内以腹水形式生长。

[0149] 克隆杂交瘤的替代方法可包括来自STEMCELL Technologies (Vancouver, BC, 加拿大) 的试剂盒提供的那些方法, 例如, ClonaCell™-HY试剂盒, 其含有基于甲基纤维素的半固体介质和其它介质和试剂, 以支持杂交瘤克隆的选择和生长。然而, 该试剂盒中的介质含有FCS, 它为Neu5Gc的并入提供外源来源。尽管内源性Neu5Gc的合成机制在Cmah^{-/-}杂交瘤中被破坏, 但从培养介质中并入的Neu5Gc在一些情况下也可能造成问题 (Bardor, M. 等人, Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem.* 2005. 280:4228-4237)。在这类情况下, 培养介质可补充有Neu5Ac以通过代谢竞争消除Neu5Gc并入 (Ghaderi, D. 等人, Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. *Nat Biotechnol.* 2010. 28:863-867)。

[0150] 亚克隆分泌的单克隆抗体可以通过常规免疫球蛋白纯化方法 (例如蛋白A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析) 从培养介质或腹水中分离或纯化。

[0151] 在另一个实施方案中, 本发明的单克隆抗体也可以通过重组DNA方法来制备, 例如美国专利号4,816,567中所述的那些, 其内容通过引用整体并入本文。通过使用常规程序, 编码本发明单克隆抗体的DNA可以容易地分离并测序 (例如, 通过使用能够特异性结合编码鼠抗体的重链和轻链基因的寡核苷酸探针)。本发明的杂交瘤细胞用作DNA的优选来源。一旦分离后, 可将DNA置于表达载体中, 然后将其转染至宿主细胞中。宿主细胞可以包括但不限于HEK293细胞、HEK293T细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞和不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞, 以获得重组宿主细胞中单克隆抗体的合成。例如, 也可以通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源的鼠序列 (美国专利号4,816,567), 或通过共价连接至全部或部分编码非免疫球蛋白多肽序列的免疫球蛋白编码序列。这种非免疫球蛋白多肽可以代替本发明抗体的恒定结构域, 或者可以替代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变结构域来产生嵌合二价抗体。

[0152] 在一些实施方案中, 本发明的抗体 (例如聚糖相互作用抗体) 可以通过本领域技术人员已知的各种程序产生。为了在体内产生多克隆抗体, 用游离或载体偶联的抗原免疫宿主动物如兔、大鼠、小鼠、牛、马、驴、鸡、猴、绵羊或山羊, 例如通过腹膜内和/或皮内注射。在一些实施方案中, 注射材料可以是含有约100μg抗原或载体蛋白的乳剂。在一些实施方案中, 注射材料可以包括富含聚糖的组合物, 比如溶液中的非人哺乳动物颌下粘蛋白。根据宿主物种, 各种佐剂也可用于增加免疫应答。佐剂包括但不限于弗氏 (完全和不完全)、矿物凝

胶例如氢氧化铝、表面活性物质例如溶血卵磷脂、普卢兰尼克多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、**TITERMAX®** (CytRx Corp, Los Angeles, CA)、匙孔血蓝蛋白、二硝基苯酚和潜在有用的人佐剂如BCG (卡介苗) 和短小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。这样的佐剂在本领域中也是众所周知的。可能需要几次加强注射, 例如以约两周的间隔, 以提供有用的抗体滴度, 例如可使用吸附在固体表面上的聚糖和/或游离肽通过ELISA测定来检测抗体滴度。通过抗体选择, 例如通过将抗原吸附到固体支持物上, 并根据本领域公知的方法洗脱所选抗体, 可以增加来自免疫动物的血清中抗体的滴度。

[0153] 聚糖相互作用抗体、其变体和片段可以使用高通量发现方法来选择和生产。在一个实施方案中, 通过使用展示文库产生包括合成抗体、其变体和片段的聚糖相互作用抗体。术语“展示”如本文所用, 是指在给定宿主表面上表达或“展示”蛋白或肽。术语“文库”如本文所用指的是由它们编码的独特cDNA序列和/或蛋白的集合。文库可能含有至少两种独特的cDNA到数万亿独特的cDNA。在一些实施方案中, 使用抗体展示文库或抗体片段展示文库生产合成抗体的聚糖相互作用抗体。如本文所用的术语“抗体片段展示文库”是指其中每个成员编码含有至少一个抗体可变区的抗体片段的展示文库。这样的抗体片段优选为Fab片段, 但也考虑其它抗体片段如单链可变片段(scFv)。在Fab抗体片段文库中, 除了包含在Fab片段互补决定区(CDR) 可变环内的氨基酸序列, 所编码的每个Fab可以是相同的。在替代或另外的实施方案中, 个体 V_H 和/或 V_L 区内的氨基酸序列也可以不同。

[0154] 可以在多种可能的宿主中表达展示文库, 包括但不限于酵母、噬菌体、细菌和逆转录病毒。可以使用的其它展示技术包括核糖体展示、微珠展示和蛋白-DNA连接技术。在优选的实施方案中, Fab展示文库在酵母或噬菌体 (本文中也称为“噬菌体”或“噬菌体颗粒”) 中表达。当表达时, Fabs装饰噬菌体或酵母的表面, 在那里它们可以与给定的抗原相互作用。包含聚糖的抗原或来自期望靶标的其它抗原可用于选择表达对该抗原具有最高亲和性的抗体片段的噬菌体颗粒或酵母细胞。然后, 使用结合的颗粒或细胞通过测序确定编码所结合的抗体片段的CDR的DNA序列。在一个实施方案中, 正向选择用于开发抗体。在一些实施方案中, 在使用展示文库开发抗体的多轮选择期间, 使用负向选择和正向选择方法。

[0155] 如Chao等人所述, 在酵母展示中, 编码不同抗体片段的cDNA引入到表达它们的酵母细胞中, 将抗体片段“展示”在细胞表面上 (Chao, G. 等人, Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. Nat Protoc. 2006;1 (2):755-68)。在酵母表面展示中, 表达的抗体片段可能含有另外的包括酵母凝集素蛋白Aga2p的结构域。这种结构域允许抗体片段融合蛋白通过与表面表达的Aga1p形成二硫键而附着到酵母细胞的外表面。结果是酵母细胞, 包被在特定抗体片段中。首先, 利用编码这些抗体片段的cDNA的展示文库, 其中每个抗体片段具有独特的序列。这些融合蛋白在数百万酵母细胞的细胞表面表达, 在那里它们可以与所需的抗原性靶标抗原相互作用, 并与细胞一起孵育。靶标抗原可以共价或用化学或磁性基团修饰, 以便在与合适的抗体片段发生成功结合后进行有效的细胞分选。可以通过磁激活细胞分选 (MACS)、荧光激活细胞分选 (FACS) 或本领域已知的其它细胞分选方法进行回收。一旦选择了酵母细胞亚群, 就可以分析相应的质粒以确定CDR序列。

[0156] 噬菌体展示技术通常利用丝状噬菌体, 包括但不限于fd、F1和M13病毒颗粒。这种菌株是非裂解性的, 允许宿主的继续繁殖和病毒滴度增加。可用于制备本发明抗体的噬菌

体展示方法的实例包括下述中公开的那些:Miersch等人(Miersch,S.等人,Synthetic antibodies:Concepts,potential and practical considerations.Methods.2012八月;57(4):486-98)、Bradbury等人(Bradbury,A.R.等人,Beyond natural antibodies:the power of in vitro display technologies.Nat Biotechnol.2011三月;29(3):245-54)、Brinkman等人(Brinkmann,U.等人,Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments.J Immunol Methods.1995五月11;182(1):41-50);Ames等人(Ames,R.S.等人,Conversion of murine Fabs isolated from a combinatorial phage display library to full length immunoglobulins.J Immunol Methods.1995八月18;184(2):177-86);Kettleborough等人(Kettleborough,C.A.等人,Isolation of tumor cell-specific single-chain Fv from immunized mice using phage-antibody libraries and the re-construction of whole antibodies from these antibody fragments.Eur J Immunol.1994四月;24(4):952-8);Persic等人(Persic,L.等人,An integrated vector system for eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries.Gene.1997五月10;187(1):9-18);PCT申请号PCT/GB91/01134;PCT公开WO 90/02809;WO 91/10737;WO 92/01047;WO 92/18619;WO 93/11236;WO 95/15982;WO 95/20401;及美国专利5,698,426;5,223,409;5,403,484;5,580,717;5,427,908;5,750,753;5,821,047;5,571,698;5,427,908;5,516,637;5,780,225;5,658,727;5,733,743和5,969,108,其中每一个通过引用整体并入本文。可以通过将编码片段的cDNA插入表达病毒外壳蛋白的基因中来进行噬菌体上的抗体片段表达。丝状噬菌体的病毒外壳由五个外壳蛋白组成,由单链基因组编码。外壳蛋白pIII是用于抗体片段表达的优选蛋白,通常在N-末端。如果抗体片段表达损害pIII的功能,则可通过野生型pIII的共表达来恢复病毒功能,虽然这种表达会减少病毒外壳上表达的抗体片段的数量,但可增强靶抗原对抗体片段的接近。病毒以及抗体片段蛋白的表达可替代地编码在多个质粒上。该方法可用于减少感染质粒的总体大小并提高转化效率。

[0157] 如上所述,在选择表达高亲和性抗体或抗体片段(例如,聚糖相互作用抗体)的宿主后,可以分离来自抗体或抗体片段的编码区,并将其用于产生完整抗体,包括人抗体或任何其它期望抗原结合片段,并且在任何期望的宿主中表达,包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌,例如如下文详述的。

[0158] 编码高亲和性抗体的DNA序列可以在称为亲和性成熟的过程的额外的多轮选择中进行突变。如本文所用,术语“亲和性成熟”是指这样的方法,其中通过连续轮的突变和选择编码抗体或抗体片段的cDNA序列而产生对给定抗原亲和性增加的抗体。在一些情况下,这个过程是在体外进行的。为了实现这一点,可以使用易错PCR进行CDR编码序列的扩增以产生数百万个含有突变的拷贝,所述突变包括但不限于点突变、区突变、插入突变和缺失突变。如本文所用,术语“点突变”是指核苷酸序列内的一个核苷酸被改变为不同核苷酸的核酸突变。如本文所用,术语“区突变”是指其中两个或更多个连续核苷酸被改变为不同核苷酸的核酸突变。如本文所用,术语“插入突变”是指其中一个或更多个核苷酸插入核苷酸序列的核酸突变。如本文所用,术语“缺失突变”是指其中一个或更多个核苷酸从核苷酸序列中去除的核酸突变。插入或缺失突变可以包括通过改变起始密码子的一个或两个核苷酸完全替代整个密码子或一个密码子改变为另一个。

[0159] 可以在编码CDR的cDNA序列上进行诱变以产生数百万个CDR重链和轻链区中具有单一突变的突变体。在另一种方法中,只在最可能改善亲和性的CDR残基处引入随机突变。这些新产生的诱变文库可用于重复过程以筛选编码对靶标抗原具有更高亲和性的抗体片段的克隆。连续轮的突变和选择促进合成具有越来越高亲和性的克隆(Chao,G.等人, Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat Protoc.* 2006;1(2):755-68)。

[0160] 可以用于产生抗体和抗体片段(例如Fab和scFv)的技术的实例包括美国专利4,946,778和5,258,498;Miersch等人(Miersch,S.等人, *Synthetic antibodies: Concepts, potential and practical considerations.* *Methods.* 2012八月;57(4):486-98)、Chao等人(Chao,G.等人, *Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display.* *Nat Protoc.* 2006;1(2):755-68)、Huston等人(Huston,J.S.等人, *Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins.* *Methods Enzymol.* 1991;203:46-88);Shu等人(Shu,L.等人, *Secretion of a single-gene-encoded immunoglobulin from myeloma cells.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993九月1;90(17):7995-9)以及Skerra等人(Skerra,A.等人, *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli.* *Science.* 1988五月20;240(4855):1038-41)中描述的那些,其每一篇通过引用整体并入本文。

[0161] 对于一些用途,包括在人中体内使用抗体(例如聚糖相互作用抗体)和体外检测测定,可优选使用嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。嵌合抗体是其中抗体的不同部分源自不同动物物种的分子,例如具有源自鼠单克隆免疫球蛋白的可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体。产生嵌合抗体的方法是本领域已知的(Morrison,S.L., *Transfectomas provide novel chimeric antibodies.* *Science.* 1985 Sep 20;229(4719):1202-7;Gillies,S.D.等人, *High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes.* *J Immunol Methods.* 1989 Dec 20;125(1-2):191-202.;及美国专利5,807,715;4,816,567和4,816,397,其内容通过引用整体并入本文)。

[0162] 人源化抗体是来自非人物种的与期望抗原结合并具有来自非人物种的一个或多个互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区的抗体分子。通常,人框架区中的框架残基被来自供体抗体的CDR和框架区的相应残基取代,以改变、优选改善抗原结合。这些框架取代通过本领域公知的方法鉴定,例如通过建模CDR和框架残基的相互作用以鉴定对抗原结合重要的框架残基,并通过序列比较鉴定在特定位置的不寻常框架残基(美国专利号5,693,762和5,585,089;Riechmann,L.等人, *Reshaping human antibodies for therapy.* *Nature.* 1988 Mar 24;332(6162):323-7,其内容通过引用整体并入本文)。可以使用本领域已知的多种技术使抗体人源化,所述技术包括例如CDR移植(EP 239,400;PCT公开WO 91/09967;美国专利5,225,539;5,530,101;和5,585,089);镶面(veneering)或表面重塑(resurfacing)(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,E.A., *A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties.* *Mol Immunol.* 1991四月-五月;28(4-5):489-98;Studnicka,G.M.等人, *Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating*

residues. *Protein Eng.* 1994六月;7 (6) :805-14; Roguska, M.A. 等人, Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994二月1;91 (3) :969-73) 以及链重排 (美国专利5,565,332); 其中的每一个通过引用整体并入本文。可以开发本发明的人源化抗体以提供期望的结合特异性、补体依赖性细胞毒性和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性等。

[0163] 在一些情况下, 通过将供体抗体序列与人框架序列进行比对来选择人框架, 以找到具有最高同源性水平的人框架候选者。在一些情况下, 框架区可以从多于一个人框架候选者中选择 (例如, 可以从一个候选者中选择框架区1-3并且可以从替代候选者中选择框架区4)。在一些情况下, 可以从人一致序列中选择框架区以避免包含由体细胞突变产生免疫原性表位的风险。一致序列是通过比较多个序列并采用每个位置上最常见残基而形成的序列。在一些情况下, 人框架可以从人种系列中选择。这些可以通过数据库搜索来鉴定 (例如, 使用NCBI蛋白数据库或其它数据库)。

[0164] 轻链和重链人框架可以选自相同或不同的克隆。源自同一克隆的轻链和重链具有更大的结合可能性, 从而形成功能性的结合位点; 然而, 重链和轻链之间界面的保守性质通常允许来自不同克隆的轻链和重链结合并起作用。人轻链和重链框架之间的配对频率综述于例如Tiller等人, 2013, *MAbs.* 5 (3) :445-70, 其内容通过引用整体并入本文。

[0165] 人源化抗体序列中的残基可被认为是“回复突变”以改善或恢复人源化期间失去的抗体亲和性。回复突变涉及将在人源化过程中改变的残基变回原始非人抗体序列中存在的那些残基。例如, 通过与典型抗体结构中发现的标准构象相比较, 可以鉴定作为回复突变候选的残基 (参见Al-Lazikani等, 1997. *J. Mol. Biol.* 273:927-48, 其内容通过引用整体并入本文)。不典型残基可能被鉴定并作为回复突变的靶标。在一些情况下, 作为回复突变候选的残基可以是“Vernier残基”, 该术语用于指与CDR接触的残基。这些残基具有影响CDR定位和构象的更高可能性, 因此具有抗体亲和性和/或特异性 (Strohl, W.R. *Therapeutic Antibody Engineering*. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch.6, p117)。在一些情况下, 人框架区保持恒定, 并且来自供体抗体的CDR经回复突变以适应人CDR区, 同时通过经验方法保持结合。

[0166] 完全人抗体 (例如聚糖相互作用抗体) 对于人患者的治疗性治疗是特别理想的, 以避免或减轻对外源蛋白的免疫应答。人抗体可以通过本领域已知的多种方法制备, 包括使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库的上述抗体展示方法。另见, 美国专利4,444,887和4,716,111; 和PCT公开WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735和WO 91/10741; 其中的每一个通过引用整体并入本文。

[0167] 也可使用不能表达功能性内源性免疫球蛋白但能表达人免疫球蛋白多核苷酸的转基因小鼠产生人抗体 (例如聚糖相互作用抗体)。例如, 人重链和轻链免疫球蛋白多核苷酸复合物可以随机或通过同源重组导入小鼠胚胎干细胞。或者, 除人重链和轻链多核苷酸外, 人可变区、恒定区和多样性区也可引入小鼠胚胎干细胞中。随着通过同源重组引入人免疫球蛋白基因座, 可以使小鼠重链和轻链免疫球蛋白多核苷酸分别或同时失去功能。特别地, J_H 区的纯合缺失可防止内源性抗体产生。扩增修饰的胚胎干细胞并显微注射入胚泡以产生嵌合小鼠。然后繁殖嵌合小鼠以产生表达人抗体的纯合后代。以正常方式用选择的抗原 (例如本发明的全部或部分聚糖、糖缀合物和/或多肽) 免疫转基因小鼠。

[0168] 因此,使用这种技术,可能产生有用的人IgG、IgA、IgM、IgD和IgE抗体。关于生产人抗体技术的综述,参见Lonberg和Huszar (Lonberg, N.等人, Human antibodies from transgenic mice. Int Rev Immunol. 1995;13 (1) :65-93)。关于生产人抗体和人单克隆抗体的技术以及生产这些抗体的方案的详细讨论,参见例如PCT公开WO 98/24893;WO 92/01047;WO 96/34096;WO 96/33735;美国专利5,413,923;5,625,126;5,633,425;5,569,825;5,661,016;5,545,806;5,814,318;5,885,793;5,916,771;5,939,598;6,075,181;和6,114,598,其中的每一个通过引用整体并入本文。此外,如Abgenix, Inc. (Fremont, 加州)、Protein Design Labs, Inc. (Mountain View, 加州) 和Genpharm (San Jose, 加州) 等公司,使用与上述技术类似的技术可以参与提供针对所选抗原的人抗体。

[0169] 一旦通过动物、细胞系、化学合成或重组表达产生了本发明的抗体分子,就可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白或多肽分子的任何方法来纯化(即分离)本发明的抗体分子,例如通过色谱法(例如离子交换、亲和性,特别是通过对特异性抗原、蛋白A的亲和性、以及尺寸柱色谱法)、离心、差异溶解度或通过用于纯化蛋白的任何其它标准技术。另外,本发明的抗体或其片段可以与本文所述的或本领域已知的异源多肽序列融合以促进纯化。

[0170] 使用本文所述的一种或更多种结合测定法,可以按照 K_D 测量抗体与靶标或配体(例如用于产生给定抗体的抗原)之间的亲和性。根据给定抗体的期望应用,可能需要改变 K_D 值。高亲和性抗体通常以约 10^{-5} M或更低、如约 10^{-6} M或更小、约 10^{-7} M或更小、约 10^{-8} M或更小、约 10^{-9} M或更小、约 10^{-10} M或更小、约 10^{-11} M或更小或约 10^{-12} M或更少的 K_D 形成配体键。

[0171] 在一些实施方案中,本发明的抗体可根据其半数有效或抑制浓度(分别为 EC_{50} 或 IC_{50})来表征。在一些情况下,该值可代表,以等于最高浓度抗体所观察到的最大抑制一半的水平,抑制表达STn的细胞所需的抗体浓度(例如,杀伤、减少增殖和/或减少一种或更多种细胞功能)。这样的 IC_{50} 值可以为约0.001nM至约0.01nM、约0.005nM至约0.05nM、约0.01nM至约1nM、约0.05nM至约5nM、约0.1nM至约10nM、约0.5nM至约25nM、约1nM至约50nM、约5nM至约75nM、约10nM至约100nM、约25nM至约250nM、约200nM至约1000nM或大于1000nM。

[0172] 在一些实施方案中,可测试本公开中教导的抗体靶向患者来源的癌细胞和/或癌症干细胞(CSC)的能力。根据这样的实施方案,可以体外培养患者来源的癌细胞,本公开的抗体可以用于靶向这些细胞。

[0173] 在其它实施方案中,可以使用患者来源的细胞来产生患者来源的异种移植(PDX)肿瘤。在一些情况下,通过手术或活检程序可以收集维持为组织结构的原发性或转移性实体肿瘤碎片。在一些情况下,可以使用从恶性腹水或胸腔积液中排出的液体。肿瘤作为碎片或单细胞悬液可以单独、也可以在一些研究中涂有MATRIGEL® (Corning Life Sciences, Corning, NY)、或与人成纤维细胞或间充质干细胞混合植入。尽管可以选择植入与原始肿瘤相同的器官(原位植入,即胰腺、口腔、卵巢、乳房脂肪垫、脑等),但植入部位可包括小鼠的背部区(皮下植入)。此外,与肿瘤起源无关,一些方法可包括在肾囊内植入原发性肿瘤以努力提高植入成功率。在这样的研究中可以使用具有不同程度免疫抑制的各种小鼠品系。对于激素敏感性肿瘤,一些研究可能会使用激素补充来意图增加植入率。在一些实施方案中,在非肥胖糖尿病/严重联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠中产生PDX肿瘤。可以将抗体施用给患有PDX肿瘤的小鼠,并且可以分析对肿瘤体积的影响。在一些情况下,可以解剖

PDX肿瘤,进行细胞解离,并使得到的细胞在培养物中生长。可以在体外评估本公开的抗体靶向这些细胞的能力。

[0174] 无论是单克隆的还是多克隆的抗体的制备在本领域中是已知的。生产抗体的技术在本领域中是公知的,并且描述在例如Harlow和Lane的“Antibodies,A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988以及Harlow和Lane的“Using Antibodies:A Laboratory Manual”Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999中。

[0175] 靶标

[0176] 本发明的聚糖相互作用抗体可以通过与一种或更多种聚糖或聚糖结合的或聚糖相关的靶标结合(可逆地或不可逆地)来发挥它们的作用。在一些实施方案中,聚糖相互作用抗体可以从本文教导的任何靶标区制备。在一些实施方案中,本发明的靶标包括聚糖。用于产生抗体的聚糖可以包括含有至少2个,至少3个,至少4个,至少5个,至少6个,至少7个,至少8个,至少9个,至少10个,至少11个,至少12个,至少13个,至少14个,至少15个,至少16个,至少17个,至少18个,至少19个或至少20个残基的糖链。用于产生抗体的一些聚糖可以包括约2个残基至约5个残基。

[0177] 在一些实施方案中,聚糖相互作用抗体靶向包含唾液酸的抗原。N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)和N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)是哺乳动物细胞表面的主要唾液酸。其中,Neu5Ac在人体内天然产生。Neu5Gc在大多数哺乳动物中天然产生,但人除外,因为负责从CMP-Neu5Ac产生CMP-Neu5Gc的胞苷单磷酸(CMP)-N-乙酰神经氨酸羟化酶(CMAH)基因发生了突变。实际上,人中的Neu5Gc对几乎所有表达抗Neu5Gc抗体的人都具有免疫原性。尽管缺乏生产,但大多数人体系由于饮食的摄入而含有一定水平的Neu5Gc。这些外来产物随后被并入人糖蛋白中。这样的糖蛋白被认为是本发明的靶标。本发明的聚糖靶标抗原可以包括但不限于下表中列出的那些。

[0178] 表1.聚糖靶标抗原

[0179]

聚糖
GalNAc α -R
Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc β -R
Gal β 1,3GalNAc β -R
Gal β 1,3GlcNAc α -R
Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β -R
Gal β 1,3GlcNAc β -R
Gal β 1,4GlcNAc6S β -R
Gal β 1,4GlcNAc β -R
Gal β 1,4Glc β -R
KDN α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
KDN α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β -R
Neu5,9Ac2 α 2,6GalNAc α -R
Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4Glc β -R
Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R

[0180]

Neu5Aca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAc6Sβ-R
Neu5Aca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ-R
Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcNAc6Sβ-R
Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,3Galβ-R
Neu5Aca2,6(KDNα2,3)Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,6(Neu5Aca2,3)Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,6(Neu5Gca2,3)Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,6GalNAcα-R
Neu5Aca2,6Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Aca2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,6Galβ-R
Neu5Aca2,8KDNα2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Aca2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Gca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Aca2,8Neu5Gca2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gc9Aca2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,3GalNAcα-R
Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,3GalNAcβ-R
Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,3GlcNAcβ-R
Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gc9Aca2,3Galβ-R
Neu5Gc9Aca2,6GalNAcα-R
Neu5Gc9Aca2,6Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gc9Aca2,6Galβ-R
Neu5GcOMeα2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,3GalNAcα-R
Neu5Gca2,3Galβ1,3GalNAcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,3GlcNAcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAc6Sβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcNAc6Sβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gca2,3Galβ1,4Glcβ-R

[0181]

Neu5Gc α 2,3Gal β -R
Neu5Gc α 2,6GalNAc α -R
Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R
Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Gc α 2,6Gal β -R
Neu5Gc α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R
Neu5Gc α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β -R

[0182] 本文使用以下缩写:Glc-葡萄糖、Gal-半乳糖、GlcNAc-N-乙酰葡萄糖胺、GalNAc-N-乙酰半乳糖胺、GlcNAc6S-6-磺基-N-乙酰葡萄糖胺、KDN-2-酮基-3-脱氧-D-甘油基-D-半乳糖醛酸、Neu5,9Ac2-N-乙酰基-9-O-乙酰神经氨酸、Fuc-岩藻糖和Neu5GcOMe-2-O-甲基-N-羟乙酰基神经氨酸。0-糖苷键存在于列出的聚糖中每个残基之间, α 和 β 指示通过键连接的两个残基之间的相对化学计量,其中 α 表示轴向取向,而 β 表示赤道取向。 α 和/或 β 后面的数字(以x,x形式表示)表示来自参与成键的每个邻接残基的每个碳的碳数。虽然前面表中列出的聚糖代表所考虑的单个聚糖靶标抗原,本发明还包括这样的实施方案,在其中上述聚糖包括区别于前述的 α 和 β 取向0-糖苷键的不同组合。同样在前面的表中,R表示可以与聚糖偶联的实体。在一些实施方案中,R是蛋白,其中聚糖通常与丝氨酸或苏氨酸残基连接。在一些实施方案中,R是用于将聚糖与底物连接的接头分子,例如在聚糖阵列中。在一些实施方案中,R可以是具有式 $-(CH_2)_2CH_2NH_2$ 或 $-(CH_2)_3NHC(=O)CH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$ 的接头。在一些实施方案中,R可以是生物素、白蛋白、 $ProNH_2$ 、 $-CH-$ 、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-OCH_2CH_3$ 、 $-H$ 、hydrido、羟基、烷氧基、氧、碳、硫、氮、聚丙烯酰胺、磷、 NH_2 、 $ProNH_2=O$ 、 $(CH_2)_2CH_2NH_2$ 、 $(OCH_2CH_2)_6NH_2$ 、 $O(CH_2)_3NHC(=O)CH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$ 、荧光标记2-氨基苯甲酰胺(AB)和/或2-氨基苯甲酸(AA)、包含烷基胺(AEAB)、氨基、甲氨基氧基、酰肼基团的2-氨基苯甲酰胺类似物、氨基脂1,2-二十六烷基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DHPE)、氨基(AO)官能化DHPE和糖基磷脂酰肌醇(GPI)。不打算限制R的来源或性质,这可能包括影响聚糖残基物理间距(spacing)的结构。在一些实施方案中,R基团可包括本文所示R基团的组合,例如,生物素化聚丙烯酰胺。在一些实施方案中,R基团与底层底物共同影响聚糖残基间距。

[0183] 本发明的聚糖靶标可以包括一个或更多个抗体识别区。如本文所用,术语“抗体识别区”是指这样的区段,其位于分子的任何部分、附着的基团、或者位于聚糖与另一分子之间相互作用的区,其包括但不限于另一种聚糖、蛋白、膜、细胞表面结构或细胞外基质成分。在一些实施方案中,抗体识别的区位于链间靶标位点,其中术语“链间”是指在本聚合链之内(within)。链间靶标位点可包括具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或至少10个残基的抗体识别区、残基之间的键或残基与键的组合。在一些实施方案中,抗体识别的区位于一条或多条聚糖链之间的相互作用区。这样的区可以在2、3、4或至少5个聚糖链之间。

[0184] 在一些实施方案中,抗体识别区位于与共同母链连接的聚糖支链之间的相互作用区。在一些实施方案中,抗体识别的区位于聚糖支链和母链之间的相互作用区。在一些实施方案中,抗体识别的区位于聚糖和蛋白之间的相互作用区。这种相互作用的区可以包括聚糖和蛋白之间的化学键,包括但不限于共价键、离子键、流体静力键、疏水键和氢键。在一些实施方案中,抗体识别的区位于聚糖与其它生物分子(包括但不限于脂质和核酸)之间的相互作用区。这样的相互作用区可以包括聚糖和生物分子之间的化学键,包括但不限于共价

键、离子键、流体静力键、疏水键和氢键。

[0185] 在一些实施方案中,本发明的聚糖靶标是糖缀合物的组分。如本文所用,术语“糖缀合物”是指与聚糖部分连接的任何实体。在一些实施方案中,糖缀合物是糖脂。如本文所用,术语“糖脂”是指其中共价连接有碳水化合物部分的脂质类别。在一些实施方案中,存在于糖脂上的碳水化合物部分可以是聚糖。在一些实施方案中,糖脂的脂质组分包括神经酰胺部分。预期作为本发明靶标的糖脂实例包括但不限于甘油糖脂(包括但不限于半乳糖脂和磷脂)、糖鞘脂(包括但不限于脑苷脂(例如半乳糖脑苷脂、葡萄糖脑苷脂和硫苷脂)、神经节苷脂、红细胞糖苷酯和糖磷酸鞘脂(glycophosphosphingolipid))以及糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol)。当位于细胞膜内时,糖脂的聚糖部分位于膜的细胞外侧,在那里它们可以与其它细胞以及细胞信号传导配体相互作用(Maccioni, H.J. 等人, Organization of the synthesis of glycolipid oligosaccharides in the Golgi complex. FEBS Lett. 2011 六月 6; 585 (11): 1691-8)。

[0186] 在一些实施方案中,本发明的糖缀合物靶标是糖蛋白和/或蛋白聚糖。糖蛋白是指与聚糖共价结合的任何蛋白。蛋白聚糖是一类高度聚糖糖基化的蛋白,聚糖通常带有负电荷。这种性质使得它们非常亲水并且是结缔组织的重要组分。

[0187] 癌症相关靶点

[0188] 在一些实施方案中,本发明的靶标是癌症相关抗原或表位。如本文所用,术语“癌症相关”用于描述可能以某种方式与癌症、癌细胞和/或癌组织相关联的实体。已经鉴定了许多与肿瘤细胞相关而表达的癌症相关的包括聚糖的抗原或表位(Heimburg-Molinaro, J. 等人, Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. Vaccine. 2011 Nov 8; 29 (48): 8802-26)。这些在本文中被称为“肿瘤相关碳水化合物抗原”或“TACA”。TACA包括但不限于粘蛋白相关抗原(包括但不限于Tn、唾液酸化Tn (STn) 和Thomsen-Friedenreich抗原)、血型Lewis相关抗原(包括但不限于Lewis^Y (Le^Y)、Lewis^X (Le^X)、唾液酸化Lewis^X (SLe^X) 和唾液酸化Lewis^A (SLe^A))、鞘糖脂相关抗原(包括但不限于Globo H、阶段特异性胚胎抗原-3 (SSEA-3) 和包括唾液酸的鞘糖脂)、神经节苷脂相关抗原(包括但不限于神经节苷脂GD2、GD3、GM2、岩藻糖基GM1和Neu5GcGM3)以及聚唾液酸相关抗原。国际公开号W02015054600中描述了许多这样的抗原,其内容以引用方式整体并入本文。

[0189] 在一些实施方案中,本发明的TACA靶标包括Lewis血型抗原。Lewis血型抗原包括通过 α 1-3连接或 α 1-4连接与GlcNAc连接的岩藻糖残基。它们可以在糖脂和糖蛋白上找到。Lewis血型抗原可能存在于这些抗原分泌者个体的体液中。它们在红细胞上的出现是由于红细胞从血清中吸收了Lewis抗原。

[0190] 在一些实施方案中,本发明的TACA靶标包括Le^Y。Le^Y (也称为CD174) 由Gal β 1, 4GlcNAc构成, Gal β 1, 4GlcNAc具有 α 1, 2-以及 α 1, 3-连接的岩藻糖残基,其产生Fuca (1, 2) Gal β (1, 4) Fuca (1, 3) GlcNAc表位。它通过 α 1, 3岩藻糖基转移酶由H抗原合成, α 1, 3岩藻糖基转移酶将 α 1, 3岩藻糖连接到亲本链的GlcNAc残基。Le^Y可以在各种癌症中表达,包括但不限于卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌和上皮癌。由于其在正常组织中的低表达水平和许多癌症中升高的表达水平,Le^Y抗原是治疗性抗体有吸引力的靶标。

[0191] 在一些实施方案中,本发明的TACA靶标包括Le^X。Le^X包括表位Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc β -R。它也被称为CD15和阶段特异性胚胎抗原-1 (SSEA-1)。利用取自F9畸胎瘤细胞免

疫的小鼠的血清,这种抗原首先被认为具有免疫反应性。也发现Le^X与特定阶段的胚胎发育相关。癌症存在和不存在的条件下,它也在各种组织中表达,但也可以在乳癌和卵巢癌中发现,在其中仅由癌细胞表达。

[0192] 在一些实施方案中,本发明的TACA靶标包括SLe^A和/或SLe^X。SLe^A和SLe^X分别由结构Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc β -R和Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc β -R构成。它们的表达在癌细胞中上调。血清中存在这些抗原与恶性肿瘤和预后不良相关。发现SLe^X主要为粘蛋白末端表位。它在不同癌症中表示,包括乳癌、卵巢癌、黑色素瘤、结肠癌、肝癌、肺癌和前列腺癌。在本发明的一些实施方案中,SLe^A和SLe^X靶标包括Neu5Gc (本文分别称为GcSLe^A和GcSLe^X)。

[0193] 在一些情况下,本发明的癌症相关靶标可以包括粘蛋白。Ishida等证明MUC2与树突细胞(具有抗肿瘤活性)的相互作用导致树突细胞凋亡(Ishida, A. 等人, 2008. Proteomics. 8:3342-9, 其内容通过引用整体并入本文)。在一些方面,本发明提供抗粘蛋白抗体以预防树突细胞凋亡并支持抗肿瘤活性。

[0194] 在一些实施方案中,本发明的TACA靶标包括糖脂和/或存在于糖脂上的表位,包括但不限于鞘糖脂。鞘糖脂包括通过神经酰胺羟基与聚糖连接的脂质神经酰胺。在细胞膜上,鞘糖脂形成被称为“脂质筏”的簇。

[0195] 在一些实施方案中,本发明的TACA靶标包括Globo H。Globo H是在乳癌细胞中首个鉴定的癌症相关鞘糖脂。Globo H的聚糖部分包括Fuc α (1-2) Gal β (1-3) GalNAc β (1-3) Gal α (1-4) Gal β (1-4) Glc β (1)。虽然在一些正常上皮组织中发现,但已鉴定Globo H与许多肿瘤组织(包括但不限于小细胞肺癌、乳癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌和子宫内膜癌)相关联。

[0196] 在一些实施方案中,本发明的癌症相关鞘糖脂靶标包括神经节苷脂。神经节苷脂是具有一种或更多种唾液酸的鞘糖脂。根据神经节苷脂命名法,G用作神经节苷脂的缩写。该缩写后面跟着字母M、D或T,指的是附着的唾液酸残基的数目(分别为1、2或3)。最后,数字1、2或3用于表示通过薄层色谱分析时每个迁移的距离顺序(其中3迁移的距离最远,然后是2,然后1)。已知神经节苷脂参与癌症相关的生长和转移,并且可以在肿瘤细胞的细胞表面上表达。在肿瘤细胞上表达的神经节苷脂可包括但不限于GD2、GD3、GM2和岩藻糖基GM1 (在本文中也称为Fuc-GM1)。在本发明的一些实施方案中,聚糖相互作用抗体针对GD3。GD3是细胞生长的调节因子。在一些实施方案中,使用针对GD3的抗体来调节细胞生长和/或血管生成。在一些实施方案中,使用针对GD3的抗体来调节细胞附着。与一些肿瘤细胞相关的GD3可能包括9-O-乙酰化唾液酸残基(Mukherjee, K. 等人, 2008. J Cell Biochem. 105:724-34和Mukherjee, K. 等人, 2009. Biol Chem. 390:325-35, 其全部内容通过引用整体并入本文)。在一些情况下,本发明的抗体对9-O-乙酰化唾液酸残基是选择性的。一些抗体可能对9-O-乙酰化GD3具有特异性。这些抗体可用于靶向表达9-O-乙酰化GD3的肿瘤细胞。在本发明的一些实施方案中,聚糖相互作用抗体针对GM2。在一些实施方案中,针对GM2的抗体用于调节细胞与细胞的接触。在一些实施方案中,本发明的神经节苷脂靶标包括Neu5Gc。在一些实施方案中,这样的靶标可以包括具有Neu5Gc的GM3变体(在本文中称为GcGM3)。GcGM3的聚糖组分是Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4Glc。GcGM3是肿瘤细胞的已知成分(Casadesus, A. V. 等人, 2013. Glycoconj J. 30 (7):687-99, 其内容以引用的方式整体并入本文中)。

[0197] 在一些实施方案中,本公开的TACA包含至少一个Neu5Gc残基。

[0198] 重组抗体

[0199] 本发明的重组抗体(例如聚糖相互作用抗体)可以使用本领域已知的标准技术产生。在一些实施方案中,重组抗体可以是抗聚糖抗体。其它抗体可以是抗STn抗体(例如抗GcSTn或抗AcSTn抗体)。本发明的重组抗体可使用根据本文所述方法产生的杂交瘤细胞衍生抗体获得的可变结构域来产生。可以使用标准生物化学技术来确定抗体的重链和轻链可变区cDNA序列。可以从产生抗体的杂交瘤细胞中提取总RNA,并通过逆转录酶(RT)聚合酶链式反应(PCR)将其转化为cDNA。可以对得到的cDNA进行PCR扩增以扩增可变区基因。这种扩增可能包括使用扩增重链和轻链序列的特异性引物。在其它实施方案中,重组抗体可以使用从其它来源获得的可变结构域来生成。这包括使用选自一个或更多个抗体片段文库的可变结构域,例如用于抗原淘选的scFv文库。然后可将所得PCR产物亚克隆到质粒中进行序列分析。一旦测序,可将抗体编码序列置于表达载体中。为了人源化,人重链和轻链恒定区的编码序列可用于替代同源鼠序列。然后可将所得构建体转染到哺乳动物细胞中用于大规模翻译。

[0200] 抗Tn抗体

[0201] 在一些实施方案中,本发明的重组抗体(例如聚糖相互作用抗体)可以是抗Tn抗体。这样的抗体可以结合具有Tn的靶标。抗Tn抗体可以特异于Tn,或者可以结合其它修饰形式的Tn,例如与其它部分连接的Tn,包括但不限于额外的碳水化合物残基。在一些情况下,抗Tn抗体可以是抗唾液酸化Tn抗体。这样的抗体可以结合包含Neu5Ac的唾液酸化Tn和/或包含Neu5Gc的唾液酸化Tn。一些抗Tn抗体可特异性结合Tn抗原簇。

[0202] 抗STn抗体

[0203] 在一些实施方案中,本发明的抗体(例如聚糖相互作用抗体)可特异性结合STn。本发明的抗STn抗体可以通过它们与STn抗原特定部分的结合和/或通过它们对AcSTn和GcSTn的特异性来进行分类。在一些情况下,本发明的抗STn抗体是第1组抗体。根据本发明的“第1组”抗体是能够结合AcSTn和GcSTn的抗体。由于与更广范STn结构结合的能力,这些抗体在本文中也可以称为泛STn抗体。在一些实施方案中,第1组抗体可能与图1A中大椭圆所示的部分STn相关联。在一些情况下,本发明的抗STn抗体是第2组抗体。根据本发明,“第2组”抗体是能够结合STn和一些相关结构的抗体,所述结构包括与丝氨酸或苏氨酸的O-连接。在一些实施方案中,第2组抗体可以与包含唾液酸化半乳糖残基的聚糖结合。在一些情况下,第2组抗体可能与图1B中大椭圆形所示的STn部分结合。一些第2组抗体优选结合具有AcSTn的结构,而非具有GcSTn的结构。其它抗STn抗体可以是第3组抗体。如本文所述,“第3组”抗体是能够结合STn的抗体,但也可以结合更广泛的相关结构。与第2组抗体不同,第3组抗体不要求这样的结构与丝氨酸或苏氨酸具有O-连接。在一些实施方案中,第3组抗体可以与图1C中大椭圆所示的STn部分结合。最后,本发明的一些抗STn抗体可以是第4组抗体。如本文所述,“第4组”抗体能够结合AcSTn和GcSTn以及未唾液酸化的Tn抗原,因此具有更广泛的特异性。在一些实施方案中,第4组抗体可以与图1D中大椭圆所示的STn部分结合。

[0204] 在一些情况下,本发明的抗STn抗体可特异性结合特定抗原或细胞表面上的STn簇。一些这类抗体可识别通过STn聚簇形成的表位,包括包含相邻STn结构之间接触区的表位。这种表位可以通过2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个STn结构的聚簇形成。

[0205] 在一些实施方案中,本公开的抗STn抗体可以用于结合携带STn的细胞蛋白。这类抗体可用于靶向与癌细胞相关的细胞蛋白,其可通过STn表达与非癌细胞中的相似蛋白区分开。在一些情况下,这些蛋白可能包括细胞表面蛋白。可以在癌症治疗和/或诊断过程中通过抗STn抗体靶向携带STn的癌细胞表面蛋白。可以使用质谱法和/或使用免疫学方法(例如FACS分析、免疫沉淀、免疫印迹、ELISA等)来鉴定携带STn的细胞表面蛋白。在一些情况下,携带STn的细胞蛋白可包括癌细胞标志物、癌症干细胞标志物和/或癌症干细胞信号蛋白。在一些实施方案中,携带STn的细胞蛋白可以包括但不限于CD44、CD133、CD117、整联蛋白、Notch和Hedgehog。

[0206] 抗体组分

[0207] 在一些情况下,本发明的抗体或其抗原结合片段可以包括本文提供的可变结构域和/或CDR氨基酸序列。一些抗体或抗原结合片段可以包括这种序列的不同组合。在一些情况下,本发明的抗体或抗原结合片段可以包括下表中列出的一种或更多种可变结构域序列。用“X”表示的残基可以不存在或选自任何氨基酸残基。表中列出的轻链可变结构域可以表达有或没有C-末端精氨酸残基。该残基通常将轻链可变结构域与轻链恒定结构域连接,并且可以作为轻链恒定结构域而不是轻链可变结构域一部分进行表达。一些情况下,抗体或其抗原结合片段可以包括与下表中列出的一个或更多个可变结构域序列具有约50%至约99.9%的序列同一性的氨基酸序列(例如,约50%至约60%、约55%至约65%、约60%至约70%、约65%至约75%、约70%至约80%、约75%至约85%、约80%至约90%、约85%至约95%、约90%至约99.9%、约95%至约99.9%、约97%、约97.5%、约98%、约98.5%、约99%、约99.5%、约99.6%、约99.7%或约99.8%)。在一些情况下,本发明的抗体或其抗原结合片段可以包括具有下表中所列任何序列的一个或更多个片段的氨基酸序列。

[0208] 表2.可变结构域序列

[0209]

抗体 ID 编号	可变 结构 域	序列	SEQ ID NO
7D3-2C10	重链	QVQLLQYDAELVKPGGSVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKY SEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSED SAVYFCKRSITTPYWGQGTLVTVSA	1
7D3-2C10	轻链	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINV WLSWYQQKPGNIPKLLIYKVSNLHTGVPSR FSGSGSGTGFTLTISLQPEDATYYCQQDQ SYPYTFGGGGTKLKK	2
A5-2G12	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNDDIKY NEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSED SAVYFCKRSITTSYWGQGTLVTVSA	3
A5-2G12	轻链	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENV VIYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVP DRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCG QGYSYPYTFGGGGTKLEIKR	4
1A5-2C9	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYVSPGNDDIK YNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSE DSAVYFCKRSLIGDYWGQGTTTLTVSS	5
1A5-2C9	轻链	DIVMTQSQKFMSSSVGDRVITITCKASQNVG TAVAWYQQKPGQSPKFLIYSASNRYTGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQ YSSYRLTFGGGGTKLEIK	6
4D9-2C11	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYLSPGNDDIK YSEKFKDKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSE DSAVYFCKRSIGGDHWGQGTTTLTVSS	7
4D9-2C11	轻链	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINV WLNWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSR FSGSGSGTGFTLTIGSLQPEDATYYCQQGQ SYPFTFGGGGTKLEIKR	8

[0210]

2F4-1E2	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKY NEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSED SAVYFCQRQLGQGYWGQGTTTLTVSS	9
2F4-1E2	轻链	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVH SYGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYF CSQNTHVPYTFGGGTKLEIKR	10
2F4-1H8	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKY NEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSED SAVYFCQRQLGQGYWGQGTTTLTVSS	9
2F4-1H8	轻链	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVH SYGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYF CSQNTHVPYTFGGGTKLEIKR	10
2C6-2F11	重链	QVQLQQSDAELGKPGASVKISCKASGYTFS DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNDDIKY NEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSED SAVYFCERSMIGVYWGGGTLTVSA	11
2C6-2F11	轻链	DVVMTQTPLSLTVSLGDQASISCRFSQSLVQ SNGNTYLQWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFC GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYF CSQSTHAPLTFGAGTKLELK	12
2B2-2A7	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKTSGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKY NEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTPED SAVYFCKISYYGIWGQGTTTLTVSS	13
2B2-2A7	轻链	DIQMTQSPASLSVSVGESVTITCRLSEDIYSN LAWFQQRPGKSPQLLVYKATNLADGVPSR FSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGTYYCQHF WGTPFTFGSGTKVEIK	14
5G2-1B3	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKY NEKFKVKATLTADKSSSTAYMQLTSLTSED SAVYFCKRSYYGDWGQGTTTLTVSS	15
5G2-1B3	轻链	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYS HLAWYQQKQKGKSPQLLVYGATNLADGVPS RFSGSGSGTQFSLKIHSLSQSEDFGSYYCQHF WGAPFTFGSGTKLEIK	16
7A6-2A2	重链	QIQLQQSDAELVKPGTSVKMSCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKY	17

[0211]

		NVKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSED SAVYFCSVGYALDYWGLGTTTLTVSS	
7A6-2A2	轻链	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENV VTYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVP DRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCG QGYSYPYTFGGGGTKLEIKR	18
10C9-2G7	重链	QVQLQQSDAELVKPGTTVKISCKASGYTFT DHAIHWVKEKPEQGLEWIGYISPGNDDIKY SEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSD SAVYFCKRSLSTPYWGQGLTVSA	19
10C9-2G7	轻链	未知	
1C11-2G9	重链	未知	
1C11-2G9	轻链	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCRSSQSLL NSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIWAST RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNDYSYPYTFGGGGTKLEIKR	20
1F6-1B7 (也是 1F6-1C10 的序列)	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVMQMPEQGLEWIGYISPGNGDVK YSEKFKGRATLTADKSSSSAYMQLNSLTSE DSAVYFCKRSLSTPYWGQGLTVS	21
1F6-1B7 (也是 1F6-1C10 的序列)	轻链	DIVMTQSPSSLTVTAGERTVMSCKSSQSLL NSGNQKSYLTWYQQKPGQPPKLLISWASTR DSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQSDYSYPYTFGGGGTKLEIKR	22
2G12-2B2	重链	QVQLQQSDXELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKY NEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLNSLSSDD SAVYFCKRSLSTPYWGQGLXTVSA	23
2G12-2B2	轻链	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLL NRGNHKNYLTWYRQKPGLPKLLIWAST RESGVPDRFTGSGSGTDFALTISSVQAEDLA VYYCQNDYTYPYTFGGGGTKLEIKR	24
5E6-2E7	重链	QVQLQQSDAELVKPGASMKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKY NEKFKVKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSED SAVYFCKRSITTPYWGQGLTVSA	25
5E6-2E7	轻链	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLL NSGKTKNYLTWYQQKPGQPPKLLIWAST RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCKNDYSYPYTFGGGGTKLEIKR	26
9E5-1A8	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKTSGYTFT	27

[0212]

		DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNDDIKY TEKFKGKVTLTADKSSSTAYMQLNSLTSED SAVYFCKRSITTPYWGQGLTVSA	
9E5-1A8	轻链	未知	
9F11-1F7	重链	QVQLQQSDAELVKPGASMKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKY NEKFKVKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSED SAVYFCKRSITTPYWGQGLTVSA	25
9F11-1F7	轻链	DIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLL NSGKTKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCKNDYSYPYTFGGGGTKLEIKR	26
10F4-2F2	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKY DEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSED SAVYFCKRSITTSYWGQGLTVSA	28
10F4-2F2	轻链	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENV VTYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVP DRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCG QGYSYPYTFGGGGTKLEIKR	18
2B8-2F10	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNDDIKY NEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSED SAVFFCKRSITTSYWGQGLTVSA	29
2B8-2F10	轻链	未知	
4G8-1E3	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKY NEKFKGKATLTADKSSSTAYMHLNSLTSED SAVYFCKRSITTSYWGQGLTVSA	30
4G8-1E3	轻链	DIQMNQSPSSLSASLGDITITICHASQHINF WLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSR FSGSGSGTGFTLTISLLPEDVATYYCQQDQ SYPYMFGGGGTKLEIKR	31
6B11-2E3	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNDDIKY NEKFKGKATLTADKSSSTAYMLLNSLTSED SAVYFCKRSITTSYWGQGLTVSA	32
6B11-2E3	轻链	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENV VTYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVP DRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCG QGYSYPYTFGGGGTKLEIKR	18
8C2-2D6	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT	33

[0213]

		DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKY NEKFKGKATLTADTSSTAYMQLNSLTSED SAMYFCKRSITTSYWGQGTLVTVSA	
8C2-2D6	轻链	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENV VTYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVP DRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCG QGYSYPYTFGGGGTKLEIKR	18
8C2-2D6	轻链 (V2)	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINV WLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLYTGVP SRFSGSGGTGFTLTISSLQPEDVATYYCQHDQ SYPYTFGGGGTKLEIK	34
7D4-2A2- 2F2	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKY IEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDS AVYFCKRSLSTPYWGQGTLVTVSA	35
7D4-2A2- 2F2	轻链	NILMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVV NYVSWYQQKPEQSPKLLIFGASNRYSGVPD RFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGSK WITSYPYTFGGGGTKLEIKR	36
7D4-1H12 -2B3	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKY IEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDS AVYFCKRSLSTPYWGQGTLVTVSA	35
7D4-1H12 -2B3	轻链	NILMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVV NYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYSGVPD RFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGA RVTSYPYTFGGGGTKLEIKR	37
2C2-2C5	重链	QVQLQQSDAELVKPGTSVKISCRASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKY NEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSD DSAVYFCKRSITTPYWGQGTTTLTVSS	38
2C2-2C5	轻链	SFVMTQTPKFLLVSAGDRVITITCKASQSVN NNVAWYQQKPGQSPKQLIYYASNRYTGVP DRFTGSGYGTDFTFITITVQAEDLAVYFCQ QGYSSPWTFGGGGTKLK	39
10F4-2A9	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKY DEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSED SAVYFCKRSITTSYWGQGTLVTVSA	28
3F1	重链	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLDWIGYISPGNGDIKY NEKFKDKVTLTADKSSSTACMHLNSLTSED	40

[0214]	3F1	轻链	SAVYFCKRSLALDYWGQGTTLVSS DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVG TNIAWYQQKPGRSPKVLISASTRHTGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLTDYFCQQY SSFPLTFGVGKLELK	41
	3F1	重链 (带有 C80S 突变)	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFT DHAIHWVKQKPEQGLDWIGYISPGNGDIKY NEKFKDKVTLTADKSSSTASMHLSLTSED SAVYFCKRSLALDYWGQGTTLVSS	42

[0215] 在一些情况下,本发明的抗体或其抗原结合片段可以包括下表中列出的一种或更多种CDR氨基酸序列。用“X”表示的残基可以不存在或选自任何氨基酸残基。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段可以包括与下表中列出的一个或更多个CDR序列具有约50%至约99.9%序列同一性的氨基酸序列(例如,约50%至约60%、约55%至约65%、约60%至约70%、约65%至约75%、约70%至约80%、约75%至约85%、约80%至约90%、约85%至约95%、约90%至约99.9%、约95%至约99.9%、约97%、约97.5%、约98%、约98.5%、约99%、约99.5%、约99.6%、约99.7%或约99.8%)。在一些情况下,本发明的抗体或其抗原结合片段可以包括氨基酸序列,该氨基酸序列具有下表中列出的任何序列的一个或更多个片段。

[0216] 表3.CDR序列

抗体 ID 编号	CDR	序列	SEQ ID NO
7A6-2A2	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2B2-2A7	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
5G2-1B3	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
4D9-2C11	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2F4-1E2	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2F4-1H8	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
1A5-2C9	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
1F6-1B7 (也是 1F6-1C10 的序列)	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2C2-2C5	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2G12-2B2	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
10C9-2G7	CDR-H1	GYTFTDHAIHWV	43
2C6-2F11	CDR-H1	GYTFSDHAIHWV	44
7D4-2A2-2F2	CDR-H1	GYIFTDHAIHWV	45

[0218]

7D4-1H12-2B3	CDR-H1	GYIFTDHAIHWV	45
7D3-2C10	CDR-H1	GYTFTDHAHWV	43
8C2-2D6	CDR-H1	GYTFTDHAHWV	43
9E5-1A8	CDR-H1	GYTFTDHAHWV	43
5E6-2E7	CDR-H1	GYTFTDHAHWV	43
9F11-1F7	CDR-H1	GYTFTDHAHWV	43
4G8-1E3	CDR-H1	GYIFTDHAIHWV	45
10F4-2F2	CDR-H1	GYTFTDHAHWV	43
10F4-2A9	CDR-H1	GYTFTDHAHWV	43
6B11-2E3	CDR-H1	GYTFTDHAHWV	43
2B8-2F10	CDR-H1	GYTFTDHAHWV	43
7A5-2G12	CDR-H1	GYTFTDHAHWV	43
7A6-2A2	CDR-H2	FSPGNDDIKY	46
2B2-2A7	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
5G2-1B3	CDR-H2	FSPGNDDIKY	46
4D9-2C11	CDR-H2	LSPGNDDIKY	48
2F4-1E2	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
2F4-1H8	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
1A5-2C9	CDR-H2	VSPGNGDIKY	49
1F6-1B7 (也是 1F6-1C10 的序列)	CDR-H2	ISPGNGDVKY	50
2C2-2C5	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
2G12-2B2	CDR-H2	FSPGNDDIKY	46
10C9-2G7	CDR-H2	ISPGNDDIKY	51
2C6-2F11	CDR-H2	ISPGNDDIKY	51
7D4-2A2-2F2	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
7D4-1H12-2B3	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
7D3-2C10	CDR-H2	FSPGNDDIKY	46
8C2-2D6	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
9E5-1A8	CDR-H2	ISPGNDDIKY	51
5E6-2E7	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
9F11-1F7	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
4G8-1E3	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
10F4-2F2	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
10F4-2A9	CDR-H2	ISPGNGDIKY	47
6B11-2E3	CDR-H2	ISPGNDDIKY	51
2B8-2F10	CDR-H2	ISPGNDDIKY	51
7A5-2G12	CDR-H2	ISPGNDDIKY	51
7A6-2A2	CDR-H3	SVGYALDY	52
2B2-2A7	CDR-H3	KISYYGI	53
5G2-1B3	CDR-H3	KRSYYGD	54

[0219]

4D9-2C11	CDR-H3	KRSIGGDH	55
2F4-1E2	CDR-H3	QRQLGQGY	56
2F4-1H8	CDR-H3	QRQLGQGY	56
1A5-2C9	CDR-H3	KRSLIGDY	57
1F6-1B7 (也是 1F6-1C10 的序列)	CDR-H3	KRSLSTPY	58
2C2-2C5	CDR-H3	KRSITTPY	59
2G12-2B2	CDR-H3	KRSLSTPY	58
10C9-2G7	CDR-H3	KRSLSTPY	58
2C6-2F11	CDR-H3	ERSMIGVY	60
7D4-2A2-2F2	CDR-H3	KRSLSTPY	58
7D4-1H12-2B3	CDR-H3	KRSLSTPY	58
7D3-2C10	CDR-H3	KRSITTPY	59
8C2-2D6	CDR-H3	KRSITTSY	61
9E5-1A8	CDR-H3	KRSITTPY	59
5E6-2E7	CDR-H3	KRSITTPY	59
9F11-1F7	CDR-H3	KRSITTPY	59
4G8-1E3	CDR-H3	KRSITTSY	61
10F4-2F2	CDR-H3	KRSITTSY	61
10F4-2A9	CDR-H3	KRSITTSY	61
6B11-2E3	CDR-H3	KRSITTSY	61
2B8-2F10	CDR-H3	KRSITTSY	61
7A5-2G12	CDR-H3	KRSITTSY	61
7A6-2A2	CDR-L1	ENVVTY	62
2B2-2A7	CDR-L1	EDIYSN	63
5G2-1B3	CDR-L1	ENIYSH	64
4D9-2C11	CDR-L1	QNIN VW	65
2F4-1E2	CDR-L1	QSLVHSYGNTY	66
2F4-1H8	CDR-L1	QSLVHSYGNTY	66
1A5-2C9	CDR-L1	QNVGTA	67
1F6-1B7 (也是 1F6-1C10 的序列)	CDR-L1	QSLN SGNQKSY	68
2C2-2C5	CDR-L1	QSVNNN	69
2G12-2B2	CDR-L1	QSLN RGNHKNY	70
2C6-2F11	CDR-L1	QSLVQSNGNTY	71
7D4-2A2-2F2	CDR-L1	ENVVNY	72
7D4-1H12-2B3	CDR-L1	ENVVNY	72
7D3-2C10	CDR-L1	QNIN VW	65
8C2-2D6	CDR-L1	ENVVTY	62
5E6-2E7	CDR-L1	QSLN SGNKTKNY	73
9F11-1F7	CDR-L1	QSLN SGNKTKNY	73

[0220]

4G8-1E3	CDR-L1	QHINFW	74
10F4-2F2	CDR-L1	ENVVTY	62
10F4-2A9	CDR-L1	ENVVTY	62
6B11-2E3	CDR-L1	ENVVTY	62
7A5-2G12	CDR-L1	ENVVIY	75
1C11-2G9	CDR-L1	QSLNLSGNQKNY	76
7A6-2A2	CDR-L2	GASNRYT	77
2B2-2A7	CDR-L2	KATNLAD	78
5G2-1B3	CDR-L2	GATNLAD	79
4D9-2C11	CDR-L2	KASNLHT	80
2F4-1E2	CDR-L2	KVSNRFS	81
2F4-1H8	CDR-L2	KVSNRFS	81
1A5-2C9	CDR-L2	SASNRYT	82
1F6-1B7 (也是 1F6-1C10 的序列)	CDR-L2	WASTRDS	83
2C2-2C5	CDR-L2	YASNRYT	84
2G12-2B2	CDR-L2	WASTRES	85
2C6-2F11	CDR-L2	KVSNRFC	86
7D4-2A2-2F2	CDR-L2	GASNRYS	87
7D4-1H12-2B3	CDR-L2	GASNRYS	87
7D3-2C10	CDR-L2	KVSNLHT	88
8C2-2D6	CDR-L2	GASNRYT	77
5E6-2E7	CDR-L2	WASTRES	85
9F11-1F7	CDR-L2	WASTRES	85
4G8-1E3	CDR-L2	KASNLHT	80
10F4-2F2	CDR-L2	GASNRYT	77
10F4-2A9	CDR-L2	GASNRYT	77
6B11-2E3	CDR-L2	GASNRYT	77
7A5-2G12	CDR-L2	GASNRYT	77
1C11-2G9	CDR-L2	WASTRES	85
7A6-2A2	CDR-L3	QGGYSYPYT	89
2B2-2A7	CDR-L3	QHFWGTPFT	90
5G2-1B3	CDR-L3	QHFWGAPFT	91
4D9-2C11	CDR-L3	QQGQSYPT	92
2F4-1E2	CDR-L3	SQNTHTVPYT	93
2F4-1H8	CDR-L3	SQNTHTVPYT	93
1A5-2C9	CDR-L3	QQYSSYRLT	94
1F6-1B7 (也是 1F6-1C10 的序列)	CDR-L3	QSDYSYPYT	95
2C2-2C5	CDR-L3	QQGYSSPWT	96
2G12-2B2	CDR-L3	QNDYTYPYT	97

[0221]

2C6-2F11	CDR-L3	SQSTHAPLT	98
7D4-2A2-2F2	CDR-L3	GSKWITSYPYT	99
7D4-1H12-2B3	CDR-L3	GARVTSYPYT	100
7D3-2C10	CDR-L3	QQDQSYYPYT	101
8C2-2D6	CDR-L3	GQGYSYPYT	89
5E6-2E7	CDR-L3	KNDYSYPYT	102
9F11-1F7	CDR-L3	KNDYSYPYT	102
4G8-1E3	CDR-L3	QQDQSYPYM	103
10F4-2F2	CDR-L3	GQGYSYPYT	89
10F4-2A9	CDR-L3	GQGYSYPYT	89
6B11-2E3	CDR-L3	GQGYSYPYT	89
7A5-2G12	CDR-L3	GQGYSYPYT	89
1C11-2G9	CDR-L3	QNDYSYPYT	104

[0222] 在一些情况下,本公开的抗体可以包括重链可变结构域,所述重链可变结构域具有来自下表中所列CDR序列组中的一个或多个CDR氨基酸序列。用“X”表示的残基可以不存在或选自任何氨基酸残基。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段可以包括与下表中列出的一个或多个CDR序列具有约50%至约99.9%序列同一性的氨基酸序列(例如,约50%至约60%、约55%至约65%、约60%至约70%、约65%至约75%、约70%至约80%、约75%至约85%、约80%至约90%、约85%至约95%、约90%至约99.9%、约95%至约99.9%、约97%、约97.5%、约98%、约98.5%、约99%、约99.5%、约99.6%、约99.7%或约99.8%)。在一些情况下,抗体包括具有下表所列任一序列中的一个或多个片段的氨基酸序列。

[0223] 表4.VH CDR序列组

[0224]

克隆 ID	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3	SEQ ID NO
8C2-2D6	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKG	107	SITTSY	114
4G8-1E3	GYIFTDHAIH	106	YISPGNGDIKYNEK FKG	107	SITTSY	114
2G12-2B2	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDIKYNEK FRG	108	SLSTPY	115
5G2-1B3	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDIKYNEK FKV	109	SYYG D	116
5E6-2E7	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKV	110	SITTPY	117

[0225]

2C2-2C5	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKG	107	SITTPY	117
9F11-1F7	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKV	110	SITTPY	117
1F6-1C10	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDVKYSER FKG	137	SLSTPY	115
7D3-2C10	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDIKYSEK FKG	138	SITTPY	117
7A5-2G12	GYTFTDHAIH	105	YISPGNDDIKYNEK FKG	113	SITTSY	114
10F4-2A9	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYDEK FKG	139	SITTSY	114
2F4-1E2	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKG	107	QLGQG Y	140
2C6-2F11	GYTFSDHAIH	136	YISPGNDDIKYNEK FKG	113	SMIGVY	141
6B11-2E3	GYTFTDHAIH	105	YISPGNDDIKYNEK FKG	113	SITTSY	114
3F1	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKD	111	SLLALD Y	118
CC49	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDFKYNE KFKG	112	SLNMA Y	119
B72.3	GYTFTDHAIH	105	YISPGNDDIKYNEK FKG	113	SYIGH	120
一致	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKG	107	SITTSY	114

[0226] 在一些情况下,本公开的抗体可以包括轻链可变结构域,其具有来自下表中列出的CDR序列组中的一个或多个CDR氨基酸序列。用“X”表示的残基可以不存在或选自任何氨基酸残基。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段可以包括与下表中列出的一个或多个CDR序列具有约50%至约99.9%序列同一性的氨基酸序列(例如,约50%至约60%、约55%至约65%、约60%至约70%、约65%至约75%、约70%至约80%、约75%至约85%、约80%至约90%、约85%至约95%、约90%至约99.9%、约95%至约99.9%、约97%、约97.5%、约98%、约98.5%、约99%、约99.5%、约99.6%、约99.7%或约99.8%)。在一些情况下,抗体可以包括具有下表中列出的任何序列的一个或多个片段的氨基酸序列。

[0227] 表5.VL CDR序列组

[0228]

克隆 ID	CDR-L1	SEQ ID NO	CDR-L2	SEQ ID NO	CDR-L3	SEQ ID NO
8C2-2D6	KASENVVITYVS	121	GASNR YT	77	GQGYSYP YT	89
8C2-2D6 (V2)	HASQNIN VWLS	142	KASNLY T	147	QHDQSYPT Y	148
4G8-1E3	HASQHINFWLS	122	KASNLH T	80	QQDQSYYP YM	103
2G12-2B2	KSSQSLLNRGNHKN YLT	123	WASTR ES	85	QNDYTYP YT	97
5G2-1B3	RASENIYSHLA	124	GATNL AD	79	QHFWGAP FT	91
5E6-2E7	KSSQSLLNSGKTKN YLT	125	WASTR ES	85	KNDYSYP YT	102
2C2-2C5	KASQSVNNNVA	126	YASNR YT	84	QQGYSSP WT	96
1F6-1C10	KSSQSLLNSGNQKS YLT	143	WASTR DS	83	QSDYSYPY T	95
7D3-2C10	HASQNIN VWLS	142	KVSNLH T	88	QQDQSYYP YT	101
7A5-2G12	KASENVVIYVS	144	GASNR YT	77	GQGYSYP YT	89
10F4-2A9	KASENVVITYVS	121	GASNR YT	77	GQGYSYP YT	89
2F4-1E2	RSSQSLVHSYGNTY LH	145	KVSNRF S	81	SQNTHTV PYT	93
2C6-2F11	RFSQSLVQSNGNTY LQ	146	KVSNRF C	86	SQSTHAPL T	98
6B11-2E3	KASENVVITYVS	121	GASNR YT	77	GQGYSYP YT	89
3F1	KASQDVGTNIA	127	SASTRH T	130	QQYSSFPL T	133
CC49	KSSQSLLYSGNQKN YLA	128	WASAR ES	131	QQYYSYPL T	134
B72.3	RASENIYSNLA	129	AATNL AD	132	QHFWGTP YT	135

[0229] 在一些情况下,本发明的抗体或抗原结合片段可由核苷酸序列编码,所述核苷酸序列包括下表中列出的一个或更多个可变结构域序列。标记为“N”的残基可以不存在或选自核苷酸A、C、G或T。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段可由核苷酸序列编码,所述核苷酸序列包含与下表中列出的一个或更多个可变结构域序列具有约50%至约99.9%序列同一性的序列(例如,约50%至约60%、约55%至约65%、约60%至约70%、约65%至约75%、约70%至约80%、约75%至约85%、约80%至约90%、约85%至约95%、约90%至约99.9%、约95%至约99.9%、约97%、约97.5%、约98%、约98.5%、约99%、约99.5%、约99.6%、约

99.7%或约99.8%)。在一些情况下,本发明的抗体或其抗原结合片段可以由核苷酸序列编码,所述核苷酸序列包括下表中列出的任何序列的一个或更多个片段。

[0230] 表6.可变结构域核苷酸序列

抗体 ID 编号	可变 链	序列	SEQ ID NO
7D3-2C 10	重链	CAGGTTTCAGTTGCTGCAGTATGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGGGTCAGTGAAGATA TCGTGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATT TTTCTCCCGGAAATGATGATATTAAGTACAG TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAGTCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTC TGCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCCATTACT ACGCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA	149
7D3-2C 10	轻链	GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGT CTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATTACCA TCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAATGT TTGGTTAAGCTGGTACCAGCAGAAACCAGG AAATATTCCTAAACTATTGATCTATAAGGTT TCCAACCTTGCACACAGGCGTCCCATCAAGG TTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGGTTTC ACATTAACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GACATTGCCACTTACTACTGTCAACAGGATC AAAGTTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGA CCAAGCTGAAAAAAA	150
7A5-2G 12	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACTG	151

[0232]

		ACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGATGATATTAAGTACAA TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTC TGCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCCATTACT ACGTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA	
7A5-2G 12	轻链	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACC TTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGTT ATTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAACCAG AGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACGGGG CATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGATC GCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATT TCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTG AAGACCTTGCAGATTATCACTGTGGACAGG GTTACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGG GGACCAAGCTGGAAATAAAACG	152
1A5-2C 9	重链	CAGGTTCAAGTTCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCCATTCAATTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATG TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTACAA TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCGGAGGATTC TGCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCTTTAATT GGAGACTATTGGGGCCAAGGCACCACTCTC ACAGTCTCCTCA	153
1A5-2C 9	轻链	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTC ATGTCCTCATCAGTAGGAGACAGGGTCACC ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGT ACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCA GGACAATCTCCTAAATTTCTGATTTACTCGG CATCCAATCGGTACACTGGAGTCCCTGATC GCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATT TCACTCTCACGATCAGCAATATGCAGTCTGA AGACCTGGCAGATTATTTCTGCCAGCAATAT AGCAGCTATCGTCTGACGTTTCGGTGGAGGC	154

[0233]

		ACCAAGCTGGAAATCAAAC	
4D9-2C 11	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAA TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATC TTTCTCCCGGAAATGATGATATTAAGTACAG TGAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTC TGCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCCATAGG GGGGGACCACTGGGGCCAAGGCACCACTCT CACAGTCTCCTCA	155
4D9-2C 11	轻链	GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGT CTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATTACCA TCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAATGT TTGGTTAAACTGGTACCAGCAGAAACCAGG AAATATTCCTAAACTATTGATCTATAAGGCT TCCAACCTTGCACACAGGCGTCCCATCAAGG TTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGGTTTC ACATTAACCATCGGCAGCCTGCAGCCTGAA GACATTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTC AAAGTTATCCGTTACGTTTCGGAGGGGGGA CCAAGCTGGAAATAAAAACG	156
2F4-1E2	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCAGTGGGTGAAACAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTATAA TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTC TGCAGTGTATTTCTGTCAAAGACAACCTGGG ACAAGGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCT CACAGTCTCCTCA	157
2F4-1E2	轻链	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCC TGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT CTCTTGCAAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACAC AGTTATGGAAACACCTATTTACATTGGTACC TGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCC TGATTTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGG	158

[0234]

		GGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATC AGGGACAGATTTTCACACTCAAGATCAGCAG AGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTT CTGCTCTCAAATAACACATGTTCCGTACACG TTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAA CG	
2F4-1H 8	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTTCACTGGGTGAAACAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTATAA TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTC TGCAGTGTATTTCTGTCAAAGACAACTGGG ACAAGGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCT CACAGTCTCCTCA	157
2F4-1H 8	轻链	GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCC TGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT CTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACAC AGTTATGGAAACACCTATTTACATTGGTACC TGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCC TGATTTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGG GGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATC AGGGACAGATTTTCACACTCAAGATCAGCAG AGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTT CTGCTCTCAAATAACACATGTTCCGTACACG TTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAA CG	158
2C6-2F 11	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGGGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTTCACTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TCTCTCCCGGAAACGATGATATTAAGTACA ATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGA CTGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACA TGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATT CTGCAGTGTATTTCTGTGAAAGATCGATGAT TGGGGTTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT CACTGTCTCTGCA	159

[0235]

2C6-2F 11	轻链	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCC TGA CTGTCAGTCTTGGCGATCAAGCCTCCAT CTCTTGCAGATTTAGTCAGAGCCTTGTACAA AGTAATGGAAATACCTATTTACAGTGGTAT CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTC CTGATTTACAAAGTCTCCAACCGATTTTGTG GGGTCCCAGACAGGTTTCA GTGGCAGTGGAT CAGGGACAGATTTTCACTCAAGATCAGCA GAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATT TCTGCTCTCAAAGTACACATGCTCCGCTCAC GTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA AC	160
2B2-2A 7	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGACTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCAATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTACAA TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTATAT GCAGCTCAGCAGCCTGACACCTGAGGATTC TGCAGTGTATTTCTGTAAAATATCTTACTAC GGTATTTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACA GTCTCCTCA	161
2B2-2A 7	轻链	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCC CTATCTGTATCTGTGGGAGAGTCTGTACCA TCACATGTCGACTAAGTGAAGATATTTACA GTAATTTAGCATGGTTTCAGCAGAGACCGG GAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTTTATAAAGC AACAACTTAGCAGACGGTGTGCCATCAAG GTTCA GTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTA TTCCCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCTGA AGATTTTGGGACTTATTACTGTCAACATTTT TGGGGTACTCCATTACGTTTCGGCTCGGGG ACCAAGGTGGAAATAAAAC	162
5G2-1B 3	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATT TTTCTCCCGGAAATGATGATATTAAGTATAA TGAGAAGTTCAAGGTCAAGGCCACACTGAC	163

[0236]

		TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAACTCACCAGCCTGACATCTGAAGATTC TGCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCTTACTAC GGTGATTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACA GTCTCCTCA	
5G2-1B 3	轻链	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCC CTATCTGTTTCTGTGGGAGAACTGTCACCA TCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACA GTCATTTAGCATGGTATCAACAGAAACAGG GAAAATCTCCTCAACTCCTGGTCTATGGTGC AACTAACTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAG GTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTT TTCCCTCAAGATCCACAGCCTGCAGTCTGA AGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTT TGGGGTGCTCCATTACGTTTCGGCTCGGGG ACAAAGTTGGAAATAAAAC	164
7A6-2A 2	重链	CAAATTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGACTTCAGTGAAGATG TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTTCACTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATT TTTCTCCCGGAAATGATGATATTAAGTATAA TGTGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAAGATTC TGCAGTGTATTTCTGTTCGGTGGGATACGCC CTTGACTACTGGGGCCTAGGCACCACTCTC ACAGTCTCCTCA	165
7A6-2A 2	轻链	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACC TTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGTT ACTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAACCAG AGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACGGGG CATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGATC GCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATT TCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTG AAGACCTTGCAGATTATCACTGTGGACAGG GTTACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGG GGACCAAGCTGGAAATAAAACG	166
10C9-2 G7	重链	CAGGTTCACTGCAACAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGACTACAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTCCTG	167

[0237]

		ACCATGCTATTCAGTGGGTGAAGGAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATCGGATATA TTTCTCCCGGAAATGATGATATTAAGTACAG TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCTTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGATGATTCT GCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCGCTTAGTA CGCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCA CTGTCTCTGCA	
10C9-2 G7	轻链	TTTTTAATACGACTCCCTATAGGGCAAGCAG TGGTATCAATGCAGATTACAAGGGGGAAAG GCATCAGACCAGCATGGGCATCAAGGTGGA ATCACAGACTCTGGTCTTCATATCCATACTG TTTGGGTTATATGGAGCTGATGGGAACACA TTAATGACCCAATCTCCACATCCATGTACA TGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACCTTGACTT GCAAGGCCAGTGAGAATGAGATTAATTATG TTTCCTGGTATCAACAGAAACCAGAGCAGT CTCCTAAACTGTTGATATACGGGGCATCCA ACCGGTACTCTGGGGTCCCCGATCGCTTCAC AGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCACTCT GACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCT TGCAGATTATCCCTGTGGAGCAAGGGATTA ACTAGCTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGG ACCAAGCTGGAAATAAAACGGGC	168
1C11-2 G9	重链	未知	
1C11-2 G9	轻链	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCC TGA CTGTGACAGCAGGAGAGAAGGTCATA TGAGCTGCAGGTCCAGTCAGAGTCTGTAA ACAGTGGAATCAAAAGAACTACTTGACCT GGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTA AACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGG AATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCA GTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCAT CAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGT TTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTATCCG TACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAA ATAAAACG	169
1F6-1B 7 (也是 1F6-1C	重链	CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG	170

[0238]

10 的序列)		ACCATGCTATTCAGTGGGTGATGCAGATGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGGTGATGTAAAGTACAG TGAGAGGTTCAAGGGCAGGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCTCTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTC TGCAGTTTATTTCTGTAAAAGATCGCTTAGT ACGCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTG	
1F6-1B 7 (也是 1F6-1C 10 的序 列)	轻链	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCC TGACTGTGACAGCAGGAGAGAGGGTCACTA TGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAA ACAGTGGAATCAAAAGAGCTACTTGACCT GGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTA AACTGTTGATCTCCTGGGCATCCACTAGGG ATTCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG TGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTT TATTACTGTCAGAGTGATTATAGTTATCCGT ACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAA TAAAACG	171
2G12-2 B2	重链	CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGACGNTGAG TTGGTGAAACCGGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATT TTTCTCCCGGAAATGATGATATTAAGTACAA TGAGAAGTTTAGGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGTCATCTGATGATTCT GCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCGCTTAGTA CGCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGNCA CTGTCTCTGCA	172
2G12-2 B2	轻链	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCC TGACTGTGACAGCAGGAGAGAAAGTCACTA TGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAA ACCGTGGAATCATAAGAACTACTTGACCT GGTACCGGCAGAAACCAGGGCTGCCTCCTA AACTGTTGATTTACTGGGCATCCACTAGGG AATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCA GTGGATCTGGAACAGATTTGCTCTCACCAT CAGCAGTGTTCAAGGCTGAAGACCTGGCAGT	173

[0239]

		TTATTACTGTCAGAATGATTATACTTATCCG TACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAG ATAAAACG	
5E6-2E 7	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAATGAAGATT TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTACAA TGAGAAGTTCAAGGTCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTC TGCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCGATTACT ACGCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA	174
5E6-2E 7	轻链	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCC TGACTGTGACAGCAGGAGAGAAGGTCACTA TGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAA ACAGTGGA AAAACAAAGAACTACTTGACGT GGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTA AACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGG AATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCA GTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCAT CAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGT TTATTACTGTAAGAATGATTATAGTTATCCG TACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAA ATAAAACG	175
9E5-1A 8	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAA TTGGTGAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGACTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TCTCTCCCGGAAATGATGATATTAAGTACAC TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGTCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTC TGCAGTCTATTTCTGTAAAAGATCGATTACT ACGCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA	176
9E5-1A 8	轻链	TTTTTATACGCCACTTTCTAATACGCCTCAC TATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAT TACAAAGGGGAAAGGAATCAGACCGACTCG	177

[0240]

		CGCATCAAGATGGAATCACAGACTCTGGTC TTCATATCCAGTACGCTCGGGGACTATGGA GNGGAACAGTACATTTTAATGACCCAATGT CCCAAAGGCAAGAACATGTCAGTAGGAGAG AGGGTCACTCAGAGTGCAAGGCCAGGAGAA ATCAAAACACTTATGTTTCCTGGTATCAACA GAAACCAGAGCANNCTNTAAAATGNNGATT ACGGGGCATCCAACCGGGAATCTGGGGTCN CCGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCA GGCTGAAGACCNNGCAGTNTTCACTGTGGA CAGGGNTACAGTTATCCGTACACGTTTCGGA GGGGGGACCAAGCTGAAAAAACGGGC	
9F11-1F 7	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAATGAAGATT TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTACAA TGAGAAGTTCAAGGTCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTC TGCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCGATTACT ACGCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA	174
9F11-1F 7	轻链	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCC TGACTGTGACAGCAGGAGAGAAGGTCACTA TGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAA ACAGTGGA AAAACAAAGAACTACTTGACGT GGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTA AACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGG AATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCA GTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCAT CAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGT TTATTACTGTAAGAATGATTATAGTTATCCG TACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAA ATAAAACG	175
10F4-2F 2	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA	178

[0241]

		TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTACGA TGAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCTCCACTGCCTACATG CAGCTCAACAGCCTGACATCTGAAGATTCT GCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCGATTACTA CCTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCA CTGTCTCTGCA	
10F4-2F 2	轻链	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACC TTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGTT ACTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAACCAG AGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACGGGG CATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGATC GCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATT TCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTG AAGACCTTGCAGATTATCACTGTGGACAGG GTTACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGG GGACCAAGCTGGAAATAAAACG	166
2B8-2F 10	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTTCACTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGATGATATTAAGTACAA TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAGTCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTC TGCAGTGTTTTTCTGTAAAAGATCGATTACT ACCTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA	179
2B8-2F 10	轻链	TTNATAGGACTCAATATAGGGCAAGCAGTG GTATTAACGCCGAGTACATGGGGAGGGCAA GGGCAGAAAGTCACTTTCAGTGAGGATACA CCATCAGCATGAGGGTCCTTGTTGAGCTCCT GGGGGGGCTGGTGTNTGCTTTTTAGGTGTG AGATGTGACATCCAGATGAACCAGTCTCCA TCCAGTCTGTNTGCATCCTTTGGAGACACAA TTACCATCATTTGCCATTCCAGTCAGAACAT TAATGTTTGGTTAAGATGGTACCAGCAGAA ACCAGGAAATATTCCTAAAATATTGATATA TAAGGGTTCCAACCTTGTACACAGGCGTCCC ATCAAGGTTTAGTGGCAGTGGATTGGAAC	180

[0242]

		AGGTTTCACATTAACCATCAGCAGCGTGCA GCGGGAAGACATTGCCACTTACTACTGTCA ACAGGATCAAAGTTATCCGTACACGTTCCG AGGGGGGACCAAGCTGAAATAAAACGGGC	
4G8-1E 3	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCCGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCACTG ACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTACAA TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCATCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTCT GCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCGATTACTA CCTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCA CTGTCTCTGCA	181
4G8-1E 3	轻链	GACATCCAGATGAACCAGTCCCCATCCAGT CTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATTACCA TCACTTGCCATGCCAGTCAGCACATTAATTT TTGGTTAAGCTGGTACCAGCAGAAACCAGG AAATATTCCTAAACTCTTGATCTATAAGGCT TCCAACCTTGCACACAGGCGTCCCATCAAGG TTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGGTTTC ACATTAACCATCAGCAGCCTGCTGCCTGAA GACGTTGCCACTTACTACTGTCAACAGGATC AAAGTTATCCGTATATGTTTCGGAGGGGGGA CCAAGCTGGAAATAAAACG	182
6B11-2 E3	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGATGATATTAAGTACAA TGAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCTGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTCT GCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCGATTACTA CCTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCA CTGTCTCTGCA	183
6B11-2 E3	轻链	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCAACC TTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGTT	184

[0243]

		ACTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAACCAG AGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACGGGG CATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGATC GCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATT TCACTTTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTG AAGACCTTGCAGATTATCACTGTGGACAGG GTTACAGCTATCCGTACACGTTCCGAGGGG GGACCAAGCTGGAAATAAAACG	
8C2-2D 6	重链	CAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTACAA TGAGAAGTTCAAGGGTAAGGCCACACTGAC TGCAGACACTTCCTCCACCACTGCCTACATG CAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTCT GCAATGTATTTCTGTAAAAGATCCATTACTA CGTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCA CTGTCTCTGCA	185
8C2-2D 6	轻链	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACC TTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGTT ACTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAACCAG AGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACGGGG CATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGATC GCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATT TCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTG AAGACCTTGCAGATTATCACTGTGGACAGG GTTACAGCTATCCGTACACGTTCCGAGGGG GGACCAAGCTGGAAATAAAACG	152
8C2-2D 6	轻链 (V2)	GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGT CTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATTACCA TCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAATGT TTGGTTAAGCTGGTACCAGCAGAAACCAGG AAATATTCCTAAACTATTGATCTATAAGGCT TCCAATTTGTATACAGGCGTCCCATCAAGGT TTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGGTTTCA CATTAAACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAG ACGTTGCCACGTACTACTGTCAACACGATC AAAGTTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGGA CCAAGCTGGAAATAAAA	186

[0244]

7D4-2A 2-2F2	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCACTG ACCATGCAATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTACAT TGAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTC TGCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCGCTTAGT ACGCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA	187
7D4-2A 2-2F2	轻链	AACATTTTAATGACCCAATCTCCCAAATCCA TGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACCT TGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGTTA ATTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAACCAG AGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATTCGGGG CATCCAACCGGTACTCTGGGGTCCCCGATC GCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATT TCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTG AAGACCTTGCAGATTATCACTGTGGAAGCA AGTGGATTACTAGCTATCCGTACACGTTCCG AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG	188
7D4-1H 12-2B3	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCACTG ACCATGCAATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTACAT TGAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTC TGCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCGCTTAGT ACGCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA	187
7D4-1H 12-2B3	轻链	AACATTTTAATGACCCAATCTCCCAAATCCA TGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACCT TGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGTTA ATTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAACCAG AGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACGGGG CATCCAACCGGTACTCTGGGGTCCCCGATC GCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATT	189

[0245]

		TCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTG AAGACCTTGCAGATTATCACTGTGGAGCAA GGGTTACTAGCTATCCGTACACGTTCCGAG GGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG	
2C2-2C 5	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGACTTCAGTGAAGATA TCCTGCAGGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTACAA TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGACGATTCT TGCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCCATTACT ACGCCTTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTC ACAGTCTCCTCA	190
2C2-2C 5	轻链	AGTTTTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCC TGCTTGTGTCAGCAGGAGACAGGGTTACCA TAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAATA ATAATGTAGCTTGGTACCAACAGAAGCCAG GGCAGTCTCCTAAACAGCTGATATACTATG CATCCAATCGCTACACTGGAGTCCCTGATC GCTTCACTGGCAGTGGATATGGGACGGATT TCACTTTCACCATCTACACTGTGCAGGCTGA AGACCTGGCAGTTTATTTCTGTGTCAGCAGGGT TATAGCTCTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGC ACCAAGCTGAAA	191
10F4-2 A9	重链	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTG ACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAGAAGC CTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGATATA TTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAAGTACGA TGAGAAGTTTAAAGGGCAAGGCCACACTGAC TGCAGACAAATCCTCCTCCACTGCCTACATG CAGCTCAACAGCCTGACATCTGAAGATTCT GCAGTGTATTTCTGTAAAAGATCGATTACTA CCTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCA CTGTCTCTGCA	178
10F4-2 A9	轻链	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCAACC TTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGTT	152

[0246]

		ACTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAACCAG AGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACGGGG CATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGATC GCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATT TCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTG AAGACCTTGACAGATTATCACTGTGGACAGG GTTACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGG GGACCAAGCTGGAAATAAAACG	
--	--	---	--

[0247] 在一些情况下,本发明的抗体或抗原结合片段可以包括下表所示的任一IgG框架区。在一些情况下,抗体或其片段可以包括与下表中列出的一个或多个恒定结构域序列具有约50%至约99.9%序列同一性的氨基酸序列(例如,约50%至约60%、约55%至约65%、约60%至约70%、约65%至约75%、约70%至约80%、约75%至约85%、约80%至约90%、约85%至约95%、约90%至约99.9%、约95%至约99.9%、约97%、约97.5%、约98%、约98.5%、约99%、约99.5%、约99.6%、约99.7%或约99.8%)。在一些情况下,本发明的抗体或其片段可以包括具有下表中列出的任何序列的一个或多个片段的氨基酸序列。

[0248] 表7. IgG恒定结构域序列

[0249]

结构域	序列	SEQ ID NO
鼠 IgG2a 重链恒定结构域区	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT LSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKV DKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPK IKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSD GSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEG LHNHHTTKSFSRTPGK	192
鼠 IgG2a kappa 轻链恒定区	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNF YPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKT STSPIVKSFNREK	193

[0250]	人 IgG1 重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	194
	人 IgG1 轻链恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	195

[0251] 在一些情况下,抗体可以包括下表中的一个或两个氨基酸序列和/或由下表中所示的一个或两个核苷酸序列或其优化版本编码。

[0252] 表8. 3F1抗体序列

	抗体	结构域	序列	SEQ ID NO
[0253]	3F1	重链全长, 氨基酸	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYT FTDHAHWVKQKPEQGLDWIGYISPGNG DIKYNEKFKDKVTLTADKSSSTACMHLN SLTSEDSAVYFCKRSLALDYWGQGTTL TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTL GCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTF PAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCK CPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIV TCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHT AQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHGDW MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGS VRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSC SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	196
	3F1	重链全长, 核苷酸	ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGG GTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCCGGCTCC ACCGGACAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCT	197

[0254]

GACGCTGAGTTGGTGAAACCTGGGGCT
TCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCT
GGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTC
ACTGGGTGAAGCAAAAGCCTGAACAG
GGCCTGGACTGGATTGGATATATTTCTC
CCGGAAATGGTGATATTAAGTACAATG
AGAAGTTCAAGGACAAGGTCACACTGA
CTGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCT
GCATGCACCTCAACAGCCTGACATCTG
AGGATTCTGCAGTGTATTTCTGCAAAA
GATCCCTACTAGCTCTTGACTACTGGG
GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCT
CAGCTAAAACAACAGCCCCATCGGTCT
ATCCAATGGCCCCTGTGTGTGGAGATA
CAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGAT
GCCTGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAGC
CAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGTT
CCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCC
AGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACC
CTCAGCTCAAGCGTGACTGTAACCAGC
TCGACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACC
TGCAATGTGGCCCACCCGGCAAGCAGC
ACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCC
AGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCTC
CCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTC
TTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCC
CTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGA
TCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGT
AGTCGTTGATGTGAGCGAGGATGACCC
AGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAA
CAACGTGGAAGTGACACTGCTCAGAC
ACAGACGCATAGAGAGGATTACAACA
GTACTCTCCGGGTTGTCAGTGCCCTCCC
CATCCAGCACCAAGGACTGGATGAGTGG
CAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAA
CAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAG
AACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGT
AAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCC
TCCACCAGAAGAGGAGATGACTAAGA
AACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCA
CAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACG
TGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACA
GAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCA

[0255]

		GTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCA TGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAGAAG AAGAACTGGGTGGAGAGAAATAGCTA CTCCTGTTCAAGTGGTCCACGAGGGTCT GCACAATCACCACACGACTAAGAGCTT CTCCCGGACTCCGGGTAAATAG	
3F1	轻链全 长, 氨 基酸	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VGTNIAWYQQKPGRSPKVLISASTRHT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLTD YFCQQYSSFPPLTFGVGKLELKRADAAP TVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYK DINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEAT HKTSTSPIVKSFNREC	198
3F1	轻链全 长, 核 苷酸	ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTCTGG GTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCCGGCTCC ACCGGAGACATTGTGATGACCCAGTCT CACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGA GACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCC AGTCAGGATGTGGGCACTAATATAGCC TGGTATCAACAGAAACCAGGCCGATCT CCTAAAGTACTGATTTACTCGGCATCC ACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT TTCCTCTCACCATTAGCAATGTGCAGT CTGAAGACTTGACAGATTATTTCTGTCA GCAATATAGCAGCTTTCCTCTCACGTTT GGTGTGTTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA CGGGCAGATGCTGCACCAACTGTATCC ATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTA ACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGC TTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGAC ATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGC AGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAAC AGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGAC AGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTC ACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGA CATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACT CACAAGACATCAACTTCACCCATTGTC AAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTGA	199

[0256] 在一些情况下, 抗体或其片段可以包括与上表中列出的一种或更多种氨基酸序列具有约50%至约99.9%序列同一性的氨基酸序列(例如, 约50%至约60%、约55%至约65%、约60%至约70%、约65%至约75%、约70%至约80%、约75%至约85%、约80%至约90%、约85%至约95%、约90%至约99.9%、约95%至约99.9%、约97%、约97.5%、约98%、

约98.5%、约99%、约99.5%、约99.6%、约99.7%或约99.8%)。在一些情况下,抗体或其片段可以由与上表中列出的一种或更多种核苷酸序列具有约50%至约99.9%序列同一性的核苷酸序列编码(例如,约50%至约60%、约55%至约65%、约60%至约70%、约65%至约75%、约70%至约80%、约75%至约85%、约80%至约90%、约85%至约95%、约90%至约99.9%、约95%至约99.9%、约97%、约97.5%、约98%、约98.5%、约99%、约99.5%、约99.6%、约99.7%或约99.8%)。

[0257] 在一些实施方案中,本公开包括使用一种或更多种上述抗体序列或相关变体产生的抗体片段。这种抗体片段可包括scFv、Fab片段或任何其它抗体片段,包括本文所述的任何抗体片段。

[0258] 人源化抗体

[0259] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是含有来自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合抗体。对于绝大部分,人源化抗体是这样的人免疫球蛋白(受体抗体),在其中来自受体抗体高变区的残基被具有期望特异性、亲和性和能力的来自非人物种(供体抗体)(如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物)的抗体高变区的残基所取代。

[0260] 在一些实施方案中,完全人源化的重链和轻链可以从抗体序列和/或本文提供的CDR中设计。可以使用现有的抗体结构作为模板产生抗体可变区的蛋白模型。可将起始重链和轻链可变区氨基酸序列的片段与人序列进行比较以鉴定具有相似序列的人种系抗体。可以使用人可变结构域框架区序列设计一系列的人源化重链和轻链可变区,目的是避免T细胞表位。然后,可以弃去通过计算机技术确定的具有潜在T细胞表位显著发生率的变体人序列片段。在一些情况下,得到的可变结构域中的一些氨基酸残基可能会突变回原始小鼠可变结构域中的氨基酸。在一些情况下,可突变所得可变结构域中的一些小鼠残基以匹配人种系序列中存在的残基。

[0261] 使用连接酶链式反应(LCR),从重叠的寡核苷酸组装成长基因,来构建人源化重链和轻链可变区基因。可以扩增LCR产物,并且可以添加合适的限制性位点用于克隆入表达载体。可以将PCR产物克隆入中间载体并通过测序确认。

[0262] 为了用人恒定区构建编码完全人源化抗体的表达质粒,可在上游启动子/增强子例如巨细胞病毒立即/早期启动子/增强子(CMV IE)之间,将编码抗体可变区的DNA序列连同免疫球蛋白信号序列和下游免疫球蛋白恒定区基因插入表达载体(例如哺乳动物表达载体)。然后可以制备DNA样本用于转染到哺乳动物细胞中。

[0263] 为了产生细胞系和选择完全人源化的抗体,可以将重链和轻链质粒DNA对转染到细胞中用于表达。在一些实施方案中,可以使用哺乳动物NS0细胞。可以扩增产生人源化抗体的细胞系用于可以从细胞培养介质中收集和纯化的表达抗体。

[0264] 在一些实施方案中,本公开的抗体可以根据本领域已知的人源化方法来制备。这样的方法可以包括但不限于CDR移植、表面重塑、超人源化和人字符串内容优化(string content optimization)(参见,例如,Almagro等人,2008.Front.Biosci.13:1619-33)。在一些实施方案中,使用经验方法。这些方法可以包括产生大的组合文库并通过富集技术选择所需的变体,如噬菌体展示、酵母展示、核糖体展示或其它高通量筛选技术。这些方法可以单独使用或与框架文库、引导选择、框架重排(shuffling)和人工程化组合使用。

[0265] 在一些实施方案中,人源化抗体可通过利用下表中所示的一个或更多个人可变结

构域来制备。这样的抗体可以包括本文所示任何CDR序列中的一个或多个或其片段或变体,其取代人可变结构域中存在的CDR序列。在一些情况下,使用人可变结构域序列的变体,其中这样的变体与下表所示的任何人可变结构域序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少99.9%序列同一性。

[0266] 表9. 人可变结构域

[0267]	可变 结构 域	Kabat 种系	序列	SEQ ID NO
	VH	IGHV1-18*0	CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGC	200

[0268]

	1, 核苷酸	TGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTT ACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGG CTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGC TTACAATGGTAACACAACTATGCAC AGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATG ACCACAGACACATCCACGAGCACAGC CTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGAT CTGACGACACGGCCGTGTATTACTGT GCGAGAGA	
VL	IGKV1-39*0 1, 核苷酸	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC CTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT CAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTG GTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCA GTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGG TTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGA TTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCA ACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTG TCAACAGAGTTACAGTACCCCTC	201
VL	IGKV4-1*01 , 核苷酸	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGA CTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGA GGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGC CAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAA TAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAGC AGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTG CTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGA ATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTG GCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGA AGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGC AATATTATAGTACTCCTCC	202
VH	IGHV1-18*0 1, 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWIS AYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTST AYMELRSLRSDDTAVYYCAR	203
VL	IGKV1-39*0 1, 氨基酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQSYSTP	204

[0269]	VL	IGKV4-1*01 ， 氨基酸	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS VLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTSS LQAEDVAVYYCQQYYSTPC	205
--------	----	---------------------	---	-----

[0270] 在一些实施方案中，本公开的人源化抗体可包括下表中所示一个或更多个人框架区。一些抗体可以包括与下表中列出的任何框架区具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%序列同一性的框架区。

[0271] 表10.人框架区

	框架区， 可变结构域	Kabat 种系	氨基酸序列	SEQ ID NO
[0272]	FR1, VH	IGHV1-18*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCAS	206
	FR1, VL	IGKV1-39*01	IQMTQSPSSLSASVGDRVTIT C	207
	FR1, VL	IGKV4-1*01	DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NC	208
	FR2, VH	IGHV1-18*01	WVRQAPGQGLEWMG	209
	FR2, VL	IGKV1-39*01	WYQQKPGKAPKLLIY	210
	FR2, VL	IGKV4-1*01	WYQQKPGQPPKLLIY	211
	FR3, VH	IGHV1-18*01	RVTMTTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCAR	212
	FR3, VL	IGKV1-39*01	GVPSRFSGSGSGTDFTLTSS LPEDFATYYC	213
	FR3, VL	IGKV4-1*01	GVPDRFSGSGSGTDFTLTSS LQAEDVAVYYC	214
	FR4, VH	人一致序列 1	WGQGTLVTVSS	215
	FR4, VL	人一致序列 1	FGQGTKVEIK	216

[0273] 在一些实施方案中，可以回交人源化抗体的一个或更多个残基以提高抗体结合或其它性质。

[0274] 在一些实施方案中，在本公开的抗体中存在的人源化可变结构域可包括下表中所示任何可变结构域。在一些情况下，抗体包括具有至少70%、至少75%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%序列同一性的这些可变结构域的一个或更多个变体。

[0275] 表11.人源化可变结构域

[0276]

mAb	链	序列	SEQ ID NO
5G2-1B3	VL 0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIY SHLAWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQHFWGAPFTFGQGGTKVEIK	217
5G2-1B3	VL 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIY SHLAWYQQKPGKAPKLLVYGATNLASG VPSRFSGSGSGTQFTLTISSLQPEDFATYY CQHFWGAPFTFGQGGTKVEIK	218
5G2-1B3	VL 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIY SHLAWYQQKPGKAPKLLVYGATNLADG VPSRFSGSGSGTQFTLTISSLQPEDFATYY CQHFWGAPFTFGQGGTKVEIK	219
5G2-1B3	VH 0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYFSPG NDDIKYNEKFKVRVTMTTDTSTSTAYME LRSLRSDDTAVYYCARSYYGDWGQGTL VTVSS	220
5G2-1B3	VH 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYFSPG NDDIKYNEKFKVRVTMTADKSSSTAYME LRSLRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQGTL VTVSS	221
5G2-1B3	VH 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYT FTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYFSPGND DIKYNEKFKVRATLTADKSSSTAYMELR SLRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQGTLVT VSS	222
5G2-1B3	VH 3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYFSPGN DDIKYNEKFKVRVTMTADKSSSTAYMEL RSLRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQGTLV TVSS	223
5G2-1B3	VH 4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYT FTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYFSPGND DIKYNEKFKVRATLTADKSSSTAYMELR SLRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQGTLVT VSS	224

[0277]

4G8-1E3	VL 0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQHIN FWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQDQSYPYMFGQGGTKVEIK	225
4G8-1E3	VL 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQHIN FWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLHTGV PSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFATYYC QQDQSYPYMFGQGGTKVEIK	226
4G8-1E3	VL 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCHASQHIN FWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLHTGV PSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDVATYYC QQDQSYPYMFGQGGTKLEIK	227
4G8-1E3	VL 3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQHIN FWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLHTGV PSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFATYYC QQDQSYPYFFGQGGTKVEIK	228
4G8-1E3	VL 4	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCHASQHIN FWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLHTGV PSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDVATYYC QQDQSYPYFFGQGGTKLEIK	229
4G8-1E3	VH 0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYI FTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISPGN GDIKYNEKFKGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARSITTSYWGQGTLV TVSS	230
4G8-1E3	VH 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYI FTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISPGN GDIKYNEKFKGRVTMTADKSSSTAYMEL RSLRSDDTAVYFCKRSITTSYWGQGTLVT VSS	231
4G8-1E3	VH 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYIF TDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYISPGNGDI KYNEKFKGRATLTADKSSSTAYMHLRSL RSDDTAVYFCKRSITTSYWGQGTLVTVSS	232
4G8-1E3	VH 3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYI FTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISPGSG DIKYNEKFKGRVTMTADKSSSTAYMELR SLRSDDTAVYFCKRSITTSYWGQGTLVT VSS	233

[0278]

4G8-1E3	VH 4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYIF TDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYISPGSGDI KYNEKFKGRATLTADKSSSTAYMHLRSL RSDDTAVYFCKRSITTSYWGQGTLLTVSS	234
2G12-2B 2	VL 0	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSL LNRGNHKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQNDYTPYTFGQGTKVEIK	235
2G12-2B 2	VL 2	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSL LNRGNHKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQNDYTPYTFGQGTKVEIK	236
2G12-2B 2	VH 0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGY TFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYFSPG NDDIKYNEKFRGRVTMTTDTSTSTAYME LRSLRSDDTAVYYCARSLSTPYWGQGTLL TVSS	237
2G12-2B 2	VH 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGY TFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYFSPG NDDIKYNEKFRGRVTMTADKSSSTAYME LRSLRSDDTAVYFCKRSLSTPYWGQGTLL TVSS	238
2G12-2B 2	VH 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYT FTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYFSPGND DIKYNEKFRGRVTLTADKSSSTAYMELRS LRSDDTAVYFCKRSLSTPYWGQGTLLTV SS	239
2G12-2B 2	VH 3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYT FTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYFSPGN DDIKYNEKFRGRVTMTADKSSSTAYMEL RSLRSDDTAVYFCKRSLSTPYWGQGTLLV TVSS	240
2G12-2B 2	VH 4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYT FTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYFSPGND DIKYNEKFRGRVTLTADKSSSTAYMELRS LRSDDTAVYFCKRSLSTPYWGQGTLLTV SS	241
8C2-2D6	VL 0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENV VTYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CGQGYSYPYTFGQGTKVEIK	242

[0279]

8C2-2D6	VL 1	NIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASENV VTYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTG VPSRFSGSGSATDFTLTISLQPEDFATYY CGQGYSYPYTFGQGGTKVEIK	243
8C2-2D6	VL 2	NIVMTQSPSSMSMSVGDRVTLTCKASEN VVTYVSWYQQKPGKSPKLLIYGASNRYT GVPSRFSGSGSATDFTLTISSVQPEDLATY HCGQGYSYPYTFGQGGTKLEIK	244
8C2-2D6 (V2)	VL 0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQNIN VWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASNLYTG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQHDQSYYPYTFGQGGTKVEIK	245
8C2-2D6 (V2)	VL 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQNIN VWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLYTGV PSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDFATYYC QHDQSYYPYTFGQGGTKVEIK	246
8C2-2D6 (V2)	VL 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCHASQNIN VWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLYTGV PSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDFATYYC QHDQSYYPYTFGQGGTKLEIK	247
8C2-2D6 (V2)	VL 3	DIQMNQSPSSLSASVGDRITITCHASQNIN VWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLYTGV PSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDFATYYC QHDQSYYPYTFGQGGTKLEIK	248
8C2-2D6	VH 0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISPGN GDIKYNEKFKGRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARSITTSYWGQGTLLV TVSS	249
8C2-2D6	VH 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISPGN GDIKYNEKFKGRVTMTADKSSTTAYMEL RSLRSDDTAVYFCKRSITTSYWGQGTLLV VSS	250
8C2-2D6	VH 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYT FTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYISPGNG DIKYNEKFKGRATLTADKSSTTAYMELR SLRSDDTAMYFCKRSITTSYWGQGTLLV VSS	251

[0280]

8C2-2D6	VH 3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISPGSG DIKYNEKFKGRVTMTADKSSTTAYMELR SLRSDDTAVYFCKRSITTSYWGQGTLVT VSS	252
8C2-2D6	VH 4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYT FTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYISPGSG DIKYNEKFKGRATLTADKSSTTAYMELR SLRSDDTAMYFCKRSITTSYWGQGTLVT VSS	253
3F1	VL 0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDV GTNIAWYQQKPGKAPKLLIYSASTRHTG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYSSFPLTFGQGGTKVEIK	254
3F1	VL 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDV GTNIAWYQQKPGKAPKVLIIYSASTRHTG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYF CQQYSSFPLTFGQGGTKVEIK	255
3F1	VH 0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISPGN GDIKYNEKFKDRVTMTTDTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARSLALDYWGQGT LTVSS	256
3F1	VH 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISPGN GDIKYNEKFKDRVTMTADKSSTAYMQL RSLRSDDTAVYFCKRSLLALDYWGQGT LTVSS	257
3F1	VH 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYT FTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYISPGNG DIKYNEKFKDRVTLTADKSSTASMHLS LRSDDTAVYFCKRSLLALDYWGQGT LTVSS	258
3F1	VH 3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISPGSG DIKYNEKFKDRVTMTADKSSTAYMQLR SLRSDDTAVYFCKRSLLALDYWGQGT LTVSS	259

[0281]	3F1	VH 4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYT FTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYISPGSG DIKYNEKFKDRVTLTADKSSSTASMHLRS LRSDDTAVYFCKRSLALDYWGQGLVT VSS	260
--------	-----	---------	--	-----

[0282] 抗体序列优化

[0283] 可以分析可变结构域序列的可能影响抗体功能、表达、稳定性和/或免疫原性的序列特征。在一些情况下,这些特征可能包括NG残基对。NG残基对可能对天冬酰胺脱酰胺敏感,随着时间的推移可能以3:1的比例转化为谷氨酸和焦谷氨酸。例如,这些残基对可以突变为SG或QG对,以防止在这些位点发生脱酰胺作用。替代地,可以配制这些抗体以减少脱酰胺作用。

[0284] 在一些实施方案中,可以鉴定和改变天冬氨酸异构化位点。天冬氨酸异构化位点包括DG氨基酸残基对。随着时间的推移,这些位点的天冬氨酸可以3:1的比例转化为谷氨酸和焦谷氨酸。DG残基对可以突变为SG或QG残基对以防止这些位点的异构化。替代地,可以配制这些抗体以减少脱酰胺作用。

[0285] 在一些实施方案中,N-末端谷氨酰胺残基可以转化为N-末端谷氨酸残基。这可以防止N-末端热解(pyrolization)。

[0286] 在一些实施方案中,可以突变一个或更多个易于聚集的氨基酸残基的片层(patch)。这些可以包括具有大体积侧链的氨基酸的片,例如组氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。

[0287] 在一些实施方案中,可以突变一个或更多个半胱氨酸残基以防止存在未配对的半胱氨酸。未配对的半胱氨酸可能是反应性的,例如,当作为抗体的一部分接近溶剂时。在一些情况下,未配对的半胱氨酸残基可以突变为丝氨酸。

[0288] 在一些实施方案中,突变一个或更多个糖基化位点(例如N连接的NXS/T位点)、酸裂解位点和氨基酸氧化位点以提高抗体的产生、稳定性、结合和/或活性。

[0289] IgG合成

[0290] 可以合成包含本文所示一个或更多个可变结构域和/或CDR氨基酸序列的IgG抗体(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)(或其片段或变体),用于进一步测试和/或产品开发。可通过将编码所需氨基酸序列的一个或更多个cDNA片段插入适于IgG生产的表达载体中来产生这种抗体。表达载体可以包括适用于在哺乳动物细胞中表达IgG的哺乳动物表达载体。可以进行IgG的哺乳动物表达以确保产生的抗体包括哺乳动物蛋白的修饰特征(例如,糖基化)和/或确保抗体制剂不存在可能存在于细菌表达系统的蛋白制剂中的内毒素和/或其它污染物。

[0291] 免疫原性宿主

[0292] 在一些实施方案中,可以通过使用非人动物作为免疫宿主而开发本发明的聚糖相互作用抗体,在此称为“免疫原性宿主”。在一些实施方案中,免疫原性宿主是哺乳动物。在一些实施方案中,免疫原性宿主是转基因敲除小鼠。具有聚糖相互作用抗体靶标位点和/或表位靶标的抗原可用于与免疫原性宿主接触以刺激免疫应答并在免疫原性宿主中产生特异性结合所引入抗原上存在的靶标位点和/或表位靶标的抗体。

[0293] 根据本发明的一些方法,抗STn抗体的开发可以包括免疫Cmah基因已被破坏的小

鼠。这类突变可能导致更加类似人的生理学,因为在这些小鼠中不再产生免疫原性的非人形式的唾液酸Neu5Gc。还提供了用于产生不表达Neu5Gc的杂交瘤的Cmah^{-/-}骨髓瘤细胞,通过减少可回收的抗GcSTn的量来生产GcSTn单克隆抗体,或者由于抗体与杂交瘤的结合,杂交瘤将开始死亡。在Cmah^{-/-}骨髓瘤细胞背景中敲除其它基因。例如,可以在Cmah^{-/-}骨髓瘤细胞的背景中敲除 α 1,3-半乳糖基转移酶基因,其编码对形成对人高度免疫原性的表位至关重要的酶 (Chung, C.H. 等人, Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose- α -1,3-galactose. *N Engl J Med.* 2008年3月13日; 358(11):1109-17)。

[0294] 根据本发明的其它方法,野生型小鼠可以用于免疫。这些方法有时可能有利于产生与AcSTn或泛STn表位相互作用的抗体。在一些情况下,野生型小鼠中的免疫应答可能更强力。

[0295] 通过免疫产生的抗体可以从免疫原性宿主的血清中分离。来自免疫原性宿主的抗体产生细胞也可用于生成产生所需抗体的细胞系。在一些实施方案中,从免疫原性宿主中筛选抗体和/或抗体产生细胞,可以通过使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和/或聚糖阵列来进行。

[0296] 佐剂

[0297] 用本文描述的抗原来免疫免疫原性宿主包括使用一种或更多种佐剂。佐剂可用于在这种免疫原性宿主中引起更高的免疫应答。如此,根据本发明使用的佐剂可以基于其影响抗体滴度的能力来选择。

[0298] 在一些实施方案中,油包水乳剂可用作佐剂。油包水乳剂可通过形成移动抗原贮库起作用,促进缓慢的抗原释放并增强抗原呈递给免疫组分。弗氏佐剂可作为弗氏完全佐剂 (CFA) 使用,其包括已经干燥和失活的分枝杆菌颗粒,或作为弗氏不完全佐剂 (IFA),其不含这种颗粒。其它油包水佐剂可以包括 **EMULSIGEN®** (MVP Technologies, Omaha, NE)。**EMULSIGEN®** 包括不含动物基成分的微米级油滴。它可以单独使用或与其它佐剂组合使用,包括但不限于氢氧化铝和 **CARBIGEN™** (MVP Technologies, Omaha, NE)。

[0299] 在一些实施方案中,可以使用 **TITERMAX®** 佐剂。**TITERMAX®** 是另一种油包水乳剂,包括角鲨烯以及山梨糖醇酐单油酸酯80 (作为乳化剂) 和其它组分。在一些情况下, **TITERMAX®** 可以提供更高的免疫应答,但对免疫原性宿主的毒性降低。

[0300] 免疫刺激寡核苷酸也可以用作佐剂。这种佐剂包括CpG寡脱氧核苷酸 (ODN)。CpG ODN由Toll样受体9 (TLR9) 识别,导致强烈的免疫刺激作用。C型CpG ODN诱导浆细胞样树突细胞 (pDC) 强烈产生IFN- α 和B细胞刺激以及T辅助 (TH) 细胞产生IFN- γ 。CpG ODN佐剂已显示显著增强小鼠中的肺炎球菌多糖 (19F和6B型) 特异性IgG2a和IgG3。CpG ODN还增强了对蛋白载体CRM197的抗体应答,特别是CRM197特异性IgG2a和IgG3 (Chu等, *Infection Immunity* 2000, vol 68(3):1450-6)。此外,用肺炎球菌荚膜多糖血清型14 (PPS14) 与CpG-ODN联合免疫老年小鼠可将IgG抗PPS14应答恢复至年轻成年水平 (Sen等, *Infection Immunity*, 2006, 74(3):2177-86)。根据本发明使用的CpG ODN可以包括A类、B类或C类ODN。在一些实施方案中,ODN可以包括任何商业上可获得的那些,例如ODN-1585、ODN-1668、ODN-1826、ODN-2006、ODN-2007、ODN-2216、ODN-2336、ODN-2395和/或ODN-M362,它们中的每一种可以例如从InvivoGen (San Diego, CA) 购买。在一些情况下,可以使用ODN-2395。ODN-2395

是C类CpG ODN,其尤其刺激人以及小鼠TLR9。这些ODN包括硫代磷酸酯骨架和CpG回文基序。

[0301] 在一些实施方案中,免疫刺激复合物 (ISCOM) 可用作佐剂。ISCOM是在特定化学计量下将胆固醇、磷脂和皂树皂苷混合在一起时自发形成的球形开放笼状结构 (通常直径为40nm)。ISCOM技术已被证明可用于各种来自大糖蛋白的抗原,例如来自Epstein-Barr病毒的gp340 (由80%碳水化合物组成的340kDa抗原),以及载体缀合的合成肽和小的半抗原如生物素。一些ISCOM能够产生平衡的免疫应答,同时具有 T_{H1} 和 T_{H2} 特征。对ISCOM的免疫应答是在引流淋巴结时开始的,但是可以有效地重新定位到脾脏,这使得它也特别适用于产生单克隆抗体。在一些实施方案中,可以使用ISCOM佐剂AbISCO-100 (Isconova, Uppsala, 瑞典)。AbISCO-100是基于皂苷的佐剂,其专门开发用于对其它皂苷类敏感的免疫原性宿主,如小鼠。

[0302] 根据本发明的实施方案,可以改变免疫溶液的佐剂成分以获得期望的结果。这样的结果可能包括调节免疫应答的总体水平和/或免疫原性宿主的毒性水平。

[0303] 抗体序列和结构分析和优化

[0304] 在一些实施方案中,可以对本发明的抗体进行序列分析和/或结构分析,其中分析它们可能影响抗体化学、亲和性、特异性、蛋白折叠、稳定性、制造、表达和/或免疫原性的性质 (即用这种抗体治疗的受试者中的免疫应答)。这样的分析可以包括结合相同或相似表位的抗体之间的比较。

[0305] 可分析结合相同表位的抗体的抗体序列的轻链和/或重链序列的变异。这种分析可以包括种系序列和/或CDR序列。从这种分析获得的信息可用于鉴定 (和任选修饰、删除、置换或修复) 保守氨基酸残基;氨基酸保守片段;具有保守侧链特征的氨基酸位置;保守的CDR长度;和在结合相同表位的抗体中保守的其它特征。该信息可用于设计变体或为抗体优化程序提供信息以改善抗体亲和性、特异性、蛋白折叠、稳定性、制造、表达和/或免疫原性。

[0306] 序列分析可包括比对两种或更多种结合相同或相似表位的抗体以鉴定相似性。这样的分析可以比较抗体区 (例如,CDR、可变结构域、种系区段) 的序列和/或长度。可以鉴定和评估氨基酸插入、氨基酸缺失和取代。可以将序列差异与抗体亲和性和/或特异性进行比较。

[0307] 在一些情况下,进行序列分析以鉴定 (并任选地修饰、删除、置换或修复) 一个或更多个未配对的半胱氨酸或不规则的二硫化物;糖基化位点 (例如N连接的NXS/T位点);酸性切割位点、氨基酸氧化位点、和小鼠种系序列的符合性;天冬酰胺脱酰胺位点;天冬氨酸异构化位点;N-末端焦谷氨酸形成位点;和CDR中聚集倾向性的片。

[0308] 在一些情况下,本发明提供了本文所示抗体的序列分析知情的 (sequence analysis-informed) 变体。如本文所用,术语“序列分析知情的变体”是指基于源自抗体序列分析的一个或更多个结论已被修饰的抗体变体。在一些情况下,可修饰本发明的抗体以产生抗体变体,所述抗体变体包括对抗体亲和性、特异性、蛋白折叠、稳定性、制造、表达和/或免疫原性中的一种或更多种进行的修饰。

[0309] 一些序列分析知情的变体包括一种或更多种CDR长度修饰。相对于原始抗体序列,CDR长度修饰的抗体可在一个或更多个CDR中包含一个或更多个添加的或缺失的氨基酸。在一些情况下,序列分析知情的变体可以包括用一个或更多个来源于另一种抗体的CDR (例如,结合相同或类似表位的抗体) 取代一个或更多个CDR。在一些情况下,序列分析知情的变

体可包括另一种抗体(例如,结合相同或类似表位的抗体)的重链或轻链可变结构域取代。序列分析知情的变体可以包括对表达抗体的一种或更多种种系基因的修饰。这种修饰可能包括点突变、区突变、插入突变或缺失突变。在一些情况下,进行种系基因修饰以将CDR从一个已知的种系基因移动到另一个。序列分析知情的变体可以包括本文所述的其它变体,包括但不限于scFv、单体、双体、细胞内抗体、CAR、抗体模拟物等。

[0310] 在一些实施方案中,序列和/或结构分析可用于为抗体片段展示文库的构建提供信息(包括但不限于scFv文库、噬菌体展示文库和酵母展示文库)。在一个实例中,可以进行序列比对以比对具有共同抗原或表位的两种或更多种抗体,并且可以鉴定比对抗体中保守的或比对抗体中可变的氨基酸残基。在这些情况下,可以构建抗体片段展示文库,使得文库成员之间的差异主要限于在序列分析中鉴定的可变氨基酸。在一些情况下,这些文库可用于鉴定对靶标抗原(例如STn)或靶标抗原的特异性表位(例如,在下面实施例1中所述第1、2、3和4组抗体所识别的表位)具有改变的亲和性和/或特异性的变体。

[0311] 在一些实施方案中,本发明的抗体可以被修饰以去除、置换或以其它方式消除一个或更多个未配对的半胱氨酸残基。在一些情况下,未配对的半胱氨酸残基可能是反应性的,并且在一些情况下可能影响抗体亲和性和/或特异性。因此,本发明的一些抗体已被修饰以消除未配对的半胱氨酸残基。在一些情况下,这些变体可能具有修饰的表位特异性和/或亲和性。在一些情况下,修饰未配对的半胱氨酸残基可能会改变抗体折叠。在一些情况下,这些变体包括一个或更多个半胱氨酸残基的取代或缺失。在一些情况下,这些变体包括一个或更多个额外的氨基酸残基(包括但不限于添加一个或更多个半胱氨酸残基)以预防或减少未配对半胱氨酸残基的不期望作用。在一些情况下,用具有疏水性侧链的氨基酸(例如酪氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸或色氨酸)取代半胱氨酸残基。

[0312] 抗体测试和表征

[0313] 可以使用各种方法测试和/或表征本文描述的抗体。这样的方法可以用于确定多种特征,这些特征可以包括但不限于抗体亲和性;特异性;和活性(例如,激活或抑制细胞信号传导通路或其它细胞或生物活性)。抗体测试可进一步包括在体内(例如在动物和/或人研究中)测试毒性、治疗效果、药效学、药代动力学、吸收、沉积、代谢和排泄中的一种或更多种。在动物中的测试可以包括但不限于在小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猪、灵长类动物(例如食蟹猴)、绵羊、山羊、马和牛中进行测试。

[0314] 基于细胞的测定

[0315] 在一些实施方案中,可以通过使用一种或更多种基于细胞的测定来测试或表征本发明的抗体。这种基于细胞的测定可以在体外用培养物中的细胞进行。在一些情况下,基于细胞的测定可以在体内进行。基于细胞的体内测定的实例包括肿瘤模型,其中肿瘤细胞被注射或以其它方式引入宿主。

[0316] 在一些情况下,用于基于细胞的测定中的细胞可以表达一种或更多种由一种或更多种本发明抗体识别的靶标聚糖。这样的聚糖可以由这些细胞天然表达,或者可替代地,可以诱导细胞表达一种或更多种特定测定目的所需的聚糖。诱导的表达可以通过一种或更多种上调糖基化蛋白或调节糖基化的酶的表达的处理。在其它情况下,诱导的表达可以包括引入一种或更多种基因或转录物的转染、转导或其它形式,以用于内源性表达一种或更多

种参与糖基化调节的糖基化蛋白或酶。

[0317] 在一些情况下,本文使用的基于细胞的测定可以包括癌细胞的使用。许多癌细胞系可用于实验以测试本发明的抗体。这样的细胞可以表达靶标聚糖或可以被诱导以表达靶标聚糖。另外,癌细胞系可用于测试本发明的抗体,其中癌细胞系代表癌症干细胞。可以分离癌症干细胞(CSC)细胞系,或从培养物中生长的癌细胞分化而来(例如,通过基于癌症干细胞特异性标志物进行分选)。基于细胞的测定中所用细胞系可以包括但不限于乳房、结肠、卵巢、淋巴细胞、骨髓和皮肤细胞系。特定细胞系可以包括但不限于SNU-16细胞、LS-174T细胞、MC38细胞、TOV-112D细胞、TOV-21G细胞、Jurkate E6.1细胞、K-562细胞、B16-F0细胞、B16-F10细胞、LS180细胞、COL0205细胞、TB4细胞、HT29细胞、Panc1细胞、HPAC细胞、HPAFII细胞、RKO细胞、SW480细胞和SNU-C2A细胞。

[0318] 在一些实施方案中,可以使用卵巢癌细胞系。这样的细胞系可以包括但不限于SKOV3、OVCAR3、OV90和A2870细胞系。在一些情况下,可通过分离表达CD44和/或CD133细胞标志物的细胞从这些细胞系分离CSC细胞。

[0319] 首先使用从患有进行性卵巢腺癌的患者获得的恶性腹水建立OVCAR3细胞(Hamilton,T.C.等人,1983.Cancer Res.43:5379-89)。可以通过基于特异性细胞表面标志物如CD44(参与细胞粘附和迁移)、CD133和CD117的选择,从OVCAR3细胞培养物分离癌症干细胞群体(Liang,D.等人,2012.BMC Cancer.12:201,其内容通过引用整体并入本文)。OV90细胞是同样源自人腹水的上皮卵巢癌细胞(参见美国专利号5,710,038)。当激活时OV-90细胞也可表达CD44(Meunier,L.等人,2010.Transl Oncol.3(4):230-8)。

[0320] 在一些实施方案中,可以使用源自胃癌的细胞系。这样的细胞系可以包括但不限于SNU-16细胞(参见Park J.G.等人,1990.Cancer Res.50:2773-80,其内容通过引用整体并入本文)。SNU-16细胞天然表达STn,但处于低水平。

[0321] 在一些实施方案中,本公开的方法包括,通过使结肠直肠细胞接触聚糖相互作用抗体并评估抗体与细胞的结合、抗体的细胞内在化和/或抗体杀伤细胞来表征聚糖相互作用抗体的方法。根据一些这样的方法,结肠直肠细胞可以来源于体外生长的结肠直肠细胞系(例如通过细胞培养繁殖)。在一些情况下,结肠直肠细胞系来源于肿瘤。在其它实施方案中,结肠直肠细胞系可以来源于使用异种移植动物模型(例如,异种移植小鼠模型)形成的肿瘤。用于表征聚糖相互作用抗体的结肠直肠细胞可以来自患者(例如患者肿瘤)。表征聚糖相互作用抗体的方法可以包括使用组织微阵列,包括具有一种或更多种结肠直肠细胞的组织微阵列。

[0322] 使用结肠直肠细胞表征聚糖相互作用抗体可包括通过确定聚糖相互作用抗体与结肠直肠细胞结合的EC₅₀来评估这种抗体与细胞之间的结合。可以通过使用流式细胞术分析和ELISA分析中的一种或更多种来确定EC₅₀。在一些实施方案中,用结肠直肠细胞表征聚糖相互作用抗体可包括评估聚糖相互作用抗体对这些细胞的杀伤。这可以通过用聚糖相互作用抗体处理结肠直肠细胞、并使用细胞活力测定确定处理所致杀伤的细胞的百分比来进行。在一些情况下,通过聚糖相互作用抗体评估对结肠直肠细胞的杀伤作用包括确定聚糖相互作用抗体杀伤结肠直肠细胞的IC₅₀。在一些情况下,可以将抗体与细胞毒性剂(例如MMAE或MMAF)缀合。

[0323] 聚糖阵列

[0324] 在一些实施方案中,可以通过使用聚糖阵列开发本发明的聚糖相互作用抗体。如本文所用,术语“聚糖阵列”是指这样的工具,其用于鉴定与阵列基质所连接的任何数量不同聚糖相互作用的试剂。在一些实施方案中,聚糖阵列包括一些化学合成聚糖,在此称为“聚糖探针”。在一些实施方案中,聚糖阵列包括至少2个、至少5个、至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少150个、至少350个、至少1000个或至少1500个聚糖探针。在一些实施方案中,可以定制聚糖阵列以呈现期望的一组聚糖探针。在一些实施方案中,聚糖探针可以通过接头分子与阵列基质连接。这种接头可以包括这样的分子,其包括但不限于 $-O(CH_2)_2CH_2NH_2$ 和 $O(CH_2)_3NHC(=O)CH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$ 。

[0325] 在一些实施方案中,聚糖阵列具有70种以上化学合成的聚糖,其中大部分以Neu5Ac和含有Neu5Gc的聚糖对呈现。聚糖探针的一些实例可以包括:Neu5Ac- α -2-6-GalNAc(AcSTn);Neu5Gc- α -2-6-GalNAc(GcSTn);Neu5,9Ac2- α -2,6-GalNAc;Neu9Ac5Gc- α -2,6-GalNAc和GalNAc(Tn)。可以使用本领域已知的阵列或其它确定特异性的方法来确定对AcSTn以及对GcSTn的抗体结合特异性。另外,可以确定抗体与O-乙酰化STn的结合谱。STn上O-乙酰化的缺失与癌症相关,因为癌症相关表达与抗体对STn识别增加相关(Ogata,S.等人,Tumor-associated sialylated antigens are constitutively expressed in normal human colonic mucosa.Cancer Res.1995五月1;55(9):1869-74)。在一些情况下,聚糖阵列可用于确定对STn vs.Tn的识别。

[0326] 抗体片段展示文库筛选技术

[0327] 在一些实施方案中,使用高通量发现方法来产生和/或优化本发明的抗体。这些方法可以包括国际专利申请No.WO2014074532中公开的任何展示技术(例如,展示文库筛选技术),其内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,可以通过使用展示技术(例如噬菌体展示技术)筛选靶标抗原来设计、选择或优化合成抗体。噬菌体展示文库可能包含数百万至数十亿个噬菌体颗粒,每个噬菌体颗粒在其病毒外壳上表达独特的抗体片段。这样的文库可提供丰富多样的资源,可用于选择对一种或更多种感兴趣的抗原具有不同亲和性水平的数百种潜在抗体片段(McCafferty等,1990.Nature.348:552-4;Edwards,B.M.等人,2003.JMB.334:103-18;Schofield,D.等人,2007.Genome Biol.8,R254和Pershad,K.等人,2010.Protein Engineering Design and Selection.23:279-88;其中每一个的内容通过引用整体并入本文)。通常,存在于这些文库中的抗体片段包括scFv抗体片段,其包括通过柔性接头连接的 V_H 和 V_L 抗体结构域的融合蛋白。在一些情况下,除编码互补决定区(CDR)可变环的独特序列以外,scFv可以包含相同序列。在一些情况下,scFv表达为与病毒外壳蛋白(例如,病毒pIII外壳蛋白的N-末端)连接的融合蛋白。在复合物并入病毒外壳之前,可以单独表达 V_L 链从而和 V_H 链在周质中组装。沉淀的文库成员可以根据结合的噬菌体进行测序以获得编码所需scFv的cDNA。这种序列可直接并入抗体序列中用于重组抗体的生产,或经突变用于通过体外亲和性成熟进一步优化。

[0328] 细胞毒性抗体的开发

[0329] 在一些实施方案中,本发明的抗体可能能够诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。ADCC是免疫机制,借此细胞因受到免疫细胞攻击而裂解。这样的免疫细胞可以包括CD56+细胞、CD3-天然杀伤(NK)细胞、单核细胞和嗜

中性粒细胞 (Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch8, p186, 其内容通过引用整体并入本文)。

[0330] 在一些情况下, 取决于在抗体结合时是否需要ADCC或ADCP, 可以将本发明的抗体工程化以包括给定的同种型。例如, 可以根据Alderson, K.L. 等人, J Biomed Biotechnol. 2011. 2011:379123公开的任何方法对这样的抗体进行工程化改造。在小鼠抗体的情况下, 抗体的不同同种型在促进ADCC方面更有效。例如, IgG2a在诱导ADCC方面比IgG2b更有效。本发明的一些抗体, 包括小鼠IgG2b抗体可以被重新改造成IgG2a抗体。这种重新改造的抗体在结合细胞相关抗原时可以更有效地诱导ADCC。在一些实施方案中, 通过修饰或引入一种或更多种翻译后修饰来重新改造抗体以改善ADCC和/或CDC生物学活性。

[0331] 在一些实施方案中, 编码根据本发明方法开发的抗体可变区的基因可被克隆到编码人Fc区的哺乳动物表达载体中。这样的Fc区可以是来自人IgG1 κ 的Fc区。IgG1 κ Fc区可以包括已知增强Fc-受体结合和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的氨基酸突变。

[0332] 在一些实施方案中, 可开发本发明的抗体用于抗体-药物缀合物 (ADC) 治疗应用。ADC是其中附着有一种或更多种物品 (例如治疗剂) 的抗体 (例如, 直接或通过接头 (例如, 可切割的接头或不可切割的接头))。ADC用于将治疗剂 (例如药物或细胞毒性剂) 递送至一个或更多个靶标细胞或组织 (Panowski, S. 等人, 2014. mAbs 6:1, 34-45)。在一些情况下, ADC可能被设计成与靶标细胞上的表面抗原结合。结合后, 整个抗体-抗原复合物可以被内在化并且被引导至细胞溶酶体。然后可能降解ADC, 释放结合的物品。在物品是细胞毒性剂的情况下, 靶标细胞将被杀伤或以其它方式失活。细胞毒性剂可以包括但不限于细胞骨架抑制剂 (例如, 微管蛋白聚合抑制剂如美登素或澳瑞他汀 (例如, 单甲基澳瑞他汀E (MMAE) 和单甲基澳瑞他汀F (MMAF))) 和DNA损伤剂 (例如, DNA聚合抑制剂如钙凝集素和多卡霉素 (duocarmycin))。

[0333] 在一些实施方案中, 当作为ADC开发时, 可以测试本发明的抗体促进细胞死亡的能力。可以在存在和不存在二抗-药物缀合物的情况下进行细胞活力测定。然后可以使用具有有效细胞生长抑制的抗体来设计直接抗体-药物缀合物 (ADC)。在基于细胞的细胞毒性测定中使用这些二抗-药物缀合物可以允许对许多ADC候选物进行快速预筛选。基于这些测定, 在与一种或更多种细胞毒素剂缀合的二抗 (本文称为2oADC) 存在时, 将未缀合的抗体候选物直接添加至细胞。将抗体/2oADC复合物内在化至表达高密度靶标抗原的细胞中, 可实现细胞内的剂量依赖性药物释放, 从而引起杀伤细胞 (例如肿瘤细胞) 的细胞毒性作用, 而表达低密度靶标抗原的细胞不受影响 (例如正常细胞)。

[0334] 本发明的ADC可被设计成靶向癌细胞。这些ADC可包括针对一种或更多种肿瘤相关碳水化合物抗原 (TACA) 的抗体。在一些情况下, 本发明的ADC是抗STn抗体。

[0335] 嵌合抗原受体的开发

[0336] 在一些实施方案中, 本发明的抗体序列可用于开发嵌合抗原受体 (CAR)。CAR是在免疫细胞上表达的促进识别和杀伤靶标细胞 (例如, 肿瘤细胞) 的跨膜受体。CAR通常包括三个基本部分。这些包括细胞外结构域 (也称为识别结构域)、跨膜结构域和细胞内 (信号传导) 结构域。细胞外结构域促进与靶标细胞上的细胞抗原结合, 而细胞内结构域通常包括细胞信号传导功能来促进杀伤结合的靶标细胞。此外, 它们可具有带有本文所述的一个或更多个抗体可变结构域或其片段的细胞外结构域。本发明的CAR还包含跨膜结构域和细胞质

尾部。CAR可被设计为包含抗体、抗体可变结构域和/或抗体CDR的一个或更多个区段,使得当这些CAR在免疫效应细胞上表达时,免疫效应细胞结合并清除被CAR抗体部分识别的任何细胞。

[0337] CAR的特征包括,其以非MHC限制性的方式,利用单克隆抗体的抗原结合特性重定向T细胞特异性和对选定靶标反应性的能力。非MHC限制性抗原识别使T细胞表达CAR能够识别独立于抗原加工的抗原,从而绕过了肿瘤逃逸的主要机制。此外,当在T细胞中表达时,CAR有利地不与内源T细胞受体(TCR) α 和 β 链发生二聚化。

[0338] 经改造用于靶向肿瘤的CAR可能对一种或更多种肿瘤相关的碳水化合物抗原(TACA)具有特异性。在一些实施方案中,这些CAR的细胞外域可以包括一个或更多个抗体可变结构域或其片段。在一些实施方案中,在T细胞中表达CAR,可以称为“CAR工程化T细胞”或“CAR-T”。可以用具有一个或更多个抗体可变结构域的CAR细胞外结构域工程改造CAR-T。

[0339] 嵌合抗原受体的结构特征

[0340] 利用基因转移技术,T细胞可以被工程改造从而在其表面上稳定表达抗体,赋予所需的抗原特异性。嵌合抗原受体(CAR)将特异性抗体的抗原识别结构域以及具有T细胞激活特性的CD3 ζ 链或Fc γ RI蛋白的细胞内结构域组合成单一嵌合融合蛋白。CAR技术通过T细胞提供MHC非限制性识别靶标细胞。去除T细胞的MHC限制有助于在任何患者中在CD8⁺和CD4⁺T细胞中使用这些分子,通常分别限于MHC I类或II类表位。Ab-结合区的使用允许T细胞不仅应答由蛋白形成的表位,还应答由碳水化合物和脂质形成的表位。这种嵌合受体方法特别适用于癌症的免疫治疗,能够绕过肿瘤逃避免疫识别的许多机制,例如MHC下调、缺乏共刺激分子表达、CTL耐受性和诱导T细胞抑制,以及其中最好组合使用CD8⁺CTL和CD4⁺T细胞以获得最佳抗肿瘤效力。除了诸如HIV之类的病毒之外,该方法已被证明适用于广泛的肿瘤抗原(Finney等,J.Immunology,2004,172:104-113)。

[0341] 尽管嵌合抗原受体可以以类似于内源性T细胞受体的方式触发T细胞激活,但实际上,CAR技术的临床应用受到嵌合抗原受体T细胞体内扩增不足的阻碍。例如,第一代CAR包括CD3 ζ 或Fc受体 γ 链的信号传导结构域胞质区。在卵巢癌、肾癌、淋巴瘤和神经母细胞瘤患者的I期临床研究中测试了这些第一代CAR,并且发现其诱导适度反应,有效地重定向T细胞的细胞毒性,但重复暴露于抗原时不能使T细胞增殖和存活。第二代CAR的原型涉及包含CD28和CD3 ζ 的受体,并且已经测试了第二代CAR用于治疗B细胞恶性肿瘤和其它癌症(Sadelain等,(2009)Current Opinion in Immunology,21(2):215-223)。因此,CAR已经迅速扩展到具有不同功能特性的不同阵列的受体中。

[0342] 最近,发现CAR介导的T细胞应答可以通过加入共刺激结构域而增强。在临床前模型中,与仅并入CD3 ζ 链相比,发现并入CD137(4-1BB)信号传导结构域显著增加抗肿瘤活性和嵌合抗原受体的体内持久性(Porter等,N.Engl.J.Med.2011,365:725-733)。

[0343] 因此,在本公开的一些实施方案中,本发明的抗体序列可用于开发嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,CAR是免疫细胞上表达的促进识别和杀伤靶标细胞(例如,肿瘤细胞)的跨膜受体。

[0344] 在许多癌症中,用于靶向的肿瘤特异性抗原尚未被定义,但在B细胞肿瘤中,CD19是有吸引力的靶标。CD19的表达限于正常和恶性B细胞和B细胞前体。在晚期p53缺陷型慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者中,通过表达抗CD19嵌合抗原受体(CART19)的自体T细胞进行治

疗,实施了试验性临床试验。通过细胞因子的暂时释放和白血病细胞的消融(这与嵌合抗原受体T细胞的峰值浸润一致)证实了骨髓中CD19特异性免疫应答的产生(Porter等, N.Engl. J. Med. 2011, 365:725-733)。

[0345] CAR的进一步结构特征可以包括受让给希望之城(City of Hope)且共同发明人为Michael Jensen的一些PCT公开中公开的任何那些结构特征。例如,PCT公开W0 00/23573描述了遗传工程改造的CD20特异性重定向T细胞,其表达细胞表面蛋白,所述细胞表面蛋白具有包含CD20特异性受体的细胞外结构域、细胞内信号传导结构域和跨膜结构域。这些细胞用于CD20⁺恶性肿瘤的细胞免疫治疗和废除任何不良B细胞功能。在一个实施方案中,细胞表面蛋白是单链FvFc:ζ受体,其中Fv表示通过肽连接的针对CD20的单链单克隆抗体的VH和VL链,Fc表示人IgG1的铰链-CH2-CH3区,ζ表示人CD3的ζ链的细胞内信号传导结构域。使用编码受体的裸DNA通过电穿孔制备表达嵌合T细胞受体的重定向T细胞的方法。类似地,PCT公开W0 02/077029描述了遗传工程改造的CD19特异性重定向免疫细胞,其表达细胞表面蛋白,所述细胞表面蛋白具有包含CD19特异性受体的细胞外结构域、细胞内信号传导结构域和跨膜结构域。这种细胞用于CD19⁺恶性肿瘤的细胞免疫治疗和废除任何不良B细胞功能。在一个实施方案中,免疫细胞是T细胞并且细胞表面蛋白是单链svFvFc:ζ受体,其中scFc表示针对CD19的单链单克隆抗体的VH和VL链,Fc表示IgG1的恒定区的至少一部分,并且ζ代表T细胞抗原受体复合物ζ链的细胞内信号传导结构域(人CD3的ζ链)。细胞外结构域scFvFc和细胞内结构域ζ通过跨膜结构域如CD4的跨膜结构域连接。使用编码受体的裸DNA通过电穿孔制备表达嵌合T细胞受体的重定向T细胞的方法。当在T细胞中表达时,这些嵌合抗原受体具有根据单克隆抗体的特异性重定向抗原识别的能力。设计具有肿瘤细胞表面表位靶向特异性的scFvFc:受体,对于产生抗肿瘤免疫效应细胞用于过继疗法而言,概念上是有吸引力的策略,因为它不依赖于预先存在的抗肿瘤免疫性。这些受体是“通用的”,因为它们以不依赖MHC的方式结合抗原,因此,一种受体构建体可用于治疗抗原阳性肿瘤的患者群。希望之城的PCT公开W0 02/088334、W0 2007/059298和W0 2010/065818描述了由细胞外结构域组成的“zetakine”,其包括连接到支持区的可溶性受体配体、跨膜区和细胞内信号传导结构域,支持区能够将细胞外结构域锚定到细胞表面。当在T淋巴细胞表面表达时,Zetakine将T细胞活性引导至那些表达特异于可溶性受体配体的受体的特定细胞。

[0346] CAR的额外特征可以包括受让给德克萨斯大学且共同发明人为Lawrence Cooper的两个PCT公开中公开的那些中的任何一个。PCT公开号W0 2009/091826描述了包含人CD19特异性嵌合T细胞受体(或嵌合抗原受体,CAR)多肽(命名为hCD19CAR)的组合物,所述多肽包含细胞内信号传导结构域、跨膜结构域和细胞外结构域,细胞外结构域包括人CD19结合区。另一方面,CD19结合区是F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv或scFv。细胞内结构域可以包括人CD3ζ的细胞内信号传导结构域,并且可以进一步包括人CD28细胞内区段。在一些方面,跨膜结构域是CD28跨膜结构域。PCT公开号W02013/074916描述了利用CAR⁺T细胞经遗传修饰而消除了T细胞受体和/或HLA表达的用于免疫疗法的方法和组合物。在具体的实施方案中,例如使用锌指核酸酶产生T细胞受体阴性和/或HLA阴性T细胞。来自同种异体健康供体的CAR⁺T细胞可施用至任何患者,而不引起移植抗宿主病(GVHD),其作为医学疾病(例如癌症、自身免疫和感染)现成治疗的通用试剂。

[0347] 受让给美国卫生和公众服务部的PCT公开W0 2011/041093描述了抗血管内皮生长

因子受体-2嵌合抗原受体,其包括KDR-1121或DC101抗体的抗原结合结构域、细胞外铰链结构域、T细胞受体跨膜结构域和细胞内T细胞受体信号传导结构域,及其治疗癌症中的用途。

[0348] PCT公开WO 2012/079000和WO 2013/040557,其内容各自通过引用整体并入本文,该公开受让给宾夕法尼亚大学,并共享相同的发明人Carl H. June;这些公开分别描述了含抗原结合结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导区和CD3 ζ 信号传导结构域的CAR,以及产生RNA嵌合抗原受体(CAR)转染的T细胞的方法。

[0349] 同样受让给宾夕法尼亚大学并共享相同发明人Carl H. June的PCT公开WO2013/126712描述了组合物和方法,其用于产生在培养中表现出延长的指数扩增的持久性T细胞群,这种扩增不依赖于配体以及不依赖于外源细胞因子或饲养层细胞的添加,这对于癌症的治疗是有用的。在一些实施方案中,抗原结合结构域是抗cMet结合结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域是抗间皮素结合结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域是抗CD19结合结构域。铰链结构域是IgG4,跨膜结构域是CD28跨膜结构域。在一些实施方案中,共刺激信号传导区是CD28信号传导区。还提供了包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列的载体,CAR包含抗原结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号传导区和CD3 ζ 信号传导区。

[0350] 受让给宾夕法尼亚大学的PCT公开WO 2014/039513描述了组合物和方法,其用于在细胞中抑制一种或更多种二酯酰甘油激酶(DGK)同种型从而增强细胞的细胞溶解活性。细胞可用于过继性T细胞转移,其中细胞经修饰而表达嵌合抗原受体(CAR)。用于过继性T细胞转移的T细胞中的DGK抑制提高T细胞的细胞溶解活性,因此可用于治疗各种疾病,包括癌症、感染和免疫病症。

[0351] 受让给宾夕法尼亚大学的PCT公开WO 2014/055771描述了用于治疗卵巢癌的组合物和方法。具体地,本发明涉及施用具有 α 叶酸受体(FR α)结合结构域和CD27共刺激结构域的遗传修饰T细胞,来治疗卵巢癌。在一些实施方案中,认为FR α 结合结构域是全人的,从而防止宿主免疫应答。

[0352] 在一些实施方案中,本发明的CAR可工程改造以靶向肿瘤。这类CAR可对一种或更多种TACA具有特异性。在一些情况下,这些CAR的细胞外结构域可包含一个或更多个本文所述的抗体可变结构域或其片段。在一些实施方案中,本发明的CAR在T细胞中表达,本文称为“CAR工程改造的T细胞”或“CAR-T”。可用包含一个或更多个本文所述抗体可变结构域的CAR细胞外结构域来工程改造CAR-T。

[0353] 多特异性抗体

[0354] 在一些实施方案中,本发明的抗体可结合不止一种表位。如本文所用,术语“多抗体”或“多特异性抗体”是指这样的抗体,其中两个或更多个可变区结合不同的表位。表位可以在相同或不同的靶标上。在具体的实施方案中,多特异性抗体是“双特异性抗体”,其识别相同或不同抗原上的两种不同表位。

[0355] 双特异性抗体

[0356] 双特异性抗体能够结合两种不同抗原。这种抗体通常包含来自至少两种不同抗体的抗原结合区。例如,双特异单克隆性抗体(BsMAb、BsAb)是由两种不同单克隆抗体的片段组成的人工蛋白,从而允许BsAb结合两种不同类型的抗原。这种技术的一种常见应用是癌症免疫疗法,其中BsMAb经工程改造而同时结合细胞毒性细胞(利用受体样CD3)和待破坏的

靶标样肿瘤细胞。

[0357] 双特异性抗体可包括Riethmuller,G.,2012.Cancer Immunity.12:12-18; Marvin,J.S.等人,2005.Acta Pharmacologica Sinica.26(6):649-58和Schaefer,W.等人,2011.PNAS.108(27):11187-92中描述的那些中的任一个,其各自的内容通过引用整体并入本文。

[0358] 已经开发了新一代的BsMAb,被称为“三官能双特异性”抗体。它们由两条重链和两条轻链组成,每个来自两种不同的抗体,其中两个Fab区(臂)针对两种抗原,而Fc区(足)包含两条重链并形成第三结合位点。

[0359] 在形成双特异性抗体可变结构域顶部的两个互补位中,一个针对靶标抗原,另一个针对T淋巴细胞抗原样CD3。在三官能抗体的情况下,Fc区可以另外结合表达Fc受体的细胞,如巨噬细胞、自然杀伤(NK)细胞或树突细胞。总之,靶标细胞与一个或两个免疫系统细胞相连,随后将其破坏。

[0360] 已经设计了其它类型的双特异性抗体来克服一些问题,例如由细胞因子释放引起的半衰期短、免疫原性和副作用。它们包括仅由Fab区组成的化学连接的Fab,以及各种类型的二价和三价单链可变片段(scFv)、模拟两种抗体可变结构域的融合蛋白。最新开发的这些更新的形式是双特异性T细胞接合体(BiTE)和mAb2',工程改造为含有Fcab抗原结合片段而不是Fc恒定区的抗体。

[0361] 双特异性单链抗体Fv片段(Bs-scFv)被成功用于杀伤癌细胞。一些人癌症是由p53功能缺陷引起的,其用野生型p53的基因治疗恢复。Weisbart等描述了双特异性单链抗体的构建和表达,所述抗体穿透活结肠癌细胞,结合细胞内p53并靶向和恢复其野生型功能(Weisbart等人,Int.J.Oncol.2004Oct;25(4):1113-8;以及Weisbart等人,Int.J.Oncol.2004Dec;25(6):1867-73)。在这些研究中,双特异性单链抗体Fv片段(Bs-scFv)由以下构成:(i)穿透活细胞并定位于细胞核中的mAb 3E10的单链Fv片段和(ii)结合p53C末端的非穿透抗体mAb PAb421的单链Fv片段。PAb421结合恢复一些p53突变体的野生型功能,包括SW480人结肠癌细胞的功能。Bs-scFv穿透SW480细胞并具有细胞毒性,表明能够恢复突变p53活性的能力。COS-7细胞(具有野生型p53的猴肾细胞)用作对照,由于存在抑制PAb421与p53结合的SV40大T抗原,它们对PAb421无反应。但Bs-scFv穿透的COS-7细胞不具有细胞毒性,从而消除与p53结合无关的Bs-scFv的非特异性毒性。单独的Fv片段不具有细胞毒性,表明杀伤是由于p53的传导。PAb421VH的CDR1中的单突变消除了Bs-scFv与p53的结合,并消除了SW480细胞的细胞毒性而不改变细胞穿透性,这进一步支持了对于细胞毒性而言需要PAb421与p53的结合(Weisbart等人,J.Oncol.2004年10月;25(4):1113-8;和Weisbart等人,Int.J.Oncol.2004年12月;25(6):1867-73)。

[0362] 在一些实施方案中,本发明的抗体可以是双体。双体是功能性双特异性单链抗体(bscAb)。这些二价抗原结合分子由scFv的非共价二聚体组成,并且可以使用重组方法在哺乳动物细胞中生产(参见例如Mack等,Proc.Natl.Acad.Sci.92:7021-7025,1995)。很少有双体进入临床开发阶段。在由希望之城的Beckman Research Institute(Clinicaltrials.gov NCT00647153)(Nelson,AL,MAbs.2010一月-二月2(1):77-83)发起的研究中,已经评估了碘-123标记的双体形式的抗CEA嵌合抗体cT84.66用于结肠直肠癌的术前免疫显像检测。

[0363] 通过使用分子遗传学,可将两个scFv串联工程化为单一多肽,通过接头结构域隔开,称为“串联scFv”(tascFv)。已经发现TascFv溶解性差,在细菌中生产时需要再折叠,或者它们可以在哺乳动物细胞培养系统中生产,这避免了重折叠要求,但可能导致产量差。用两种不同scFv的基因构建tascFv产生“双特异性单链可变片段”(bis-scFv)。商业公司临床上只开发了两种tascFv;两者都是Micromet为肿瘤学适应症而开发的活性早期的双特异性试剂,并且被描述为“双特异性T细胞衔接蛋白(BiTE)”。博纳吐单抗(Blinatumomab)是抗CD19/抗CD3双特异性tascFv,其增强T-细胞对2期B-细胞非霍奇金淋巴瘤的应答。MT110是增强T细胞对1期实体瘤应答的抗EP-CAM/抗CD3双特异性tascFv。Affimed还研究了双特异性四价“TandAb”(Nelson,A.L.,MAbs.2010一月-二月2(1):77-83)。

[0364] 还包括最大抗体(maxibodies),与IgG的Fc(CH₂-CH₃结构域)氨基末端融合的二价scFv。

[0365] 双特异性T细胞衔接蛋白(BiTE)抗体被设计为瞬时接合细胞毒性T细胞以裂解选定的靶标细胞。这些通常包括两个scFv(一个与T细胞上的CD3结合,另一个与待靶向破坏的细胞表面上的靶标抗原结合)。在一些实施方案中,两个scFv由接头连接。在其它实施方案中,两个scFv是抗体上的不同区。BiTE抗体的临床活性证实了这样的发现,即源自肿瘤组织的或转染有特异性T细胞受体的离体扩增的自体T细胞显示出治疗实体瘤的治疗潜力。虽然这些个性化方法证明,即使在晚期癌症中T细胞单独可以具有相当大的治疗活性,但是在广泛的基础上实施是麻烦的。对于促进肿瘤特异性T细胞克隆产生的细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)抗体而言,这是困难的,对于直接参与大部分患者T细胞的癌细胞裂解的双特异性和三特异性抗体而言,同样如此。通过T细胞连接抗体来治疗人癌症的全球T细胞参与潜力正在积极研究之中(Baeuerle PA,等人,Current Opinion in Molecular Therapeutics.2009,11(1):22-30以及Baeuerle PA和Reinhardt C,Cancer Res.2009,69(12):4941-4,其全部内容通过引用整体并入本文)。

[0366] 第三代分子包括“小型化”抗体。mAb小型化的最佳实例是来自Trubion Pharmaceuticals的小型模块化免疫药物(SMIP)。这些分子是单价或二价的重组单链分子,其包含全都通过接头结构域连接的一个V_L、一个V_H抗原结合结构域和一个或两个恒定“效应”结构域。据推测,这种分子可能提供增强片段的组织或肿瘤穿透的优势,同时保留恒定结构域赋予的免疫效应功能。至少有三个“小型化”的SMIP已经进入临床开发阶段。与惠氏合作开发的TRU-015、抗CD20SMIP是进展最快的项目,已进入类风湿性关节炎(RA)的2期。系统性红斑狼疮(SLE)和B细胞淋巴瘤的早先尝试最终停止。Trubion和Facet Biotechnology正在合作开发TRU-016(一种抗CD37SMIP)用于治疗CLL和其它淋巴瘤形成,该项目已进入2期。惠氏已被批准用于治疗自身免疫性疾病的抗CD20SMIP SBI-087,包括RA、SLE和可能的多发性硬化症,尽管这些项目仍处于临床试验的最初阶段(Nelson,A.L.,MAbs.2010一月-二月2(1):77-83)。

[0367] Genmab正在研究其“Unibody”技术的应用,其中铰链区已从IgG4分子中去除。尽管IgG4分子不稳定并且可以彼此交换轻链-重链异源二聚体,铰链区的缺失完全阻止重链-重链配对,留下高度特异性的单价轻/重异二聚体,同时保留Fc区以确保稳定性和延长的体内半衰期。这种结构可以使免疫激活或致癌性生长的风险最小化,因为IgG4与FcR相互作用较差并且单价单抗体(unibodies)不能促进细胞内信号传导复合物形成。然而,这些争论主要

由实验室支持,而不是临床证据。Biotechnol还在开发“小型化”mAb CAB051,它是临床前研究中“压缩”的100kDa抗HER2抗体(Nelson,A.L.,MAbs.2010一月-二月2(1):77-83)。

[0368] 由单一抗原结合结构域组成的重组治疗药物也已经开发出来,尽管它们目前仅占临床用药的4%。这些分子非常小,分子量约为全尺寸单克隆抗体的十分之一。Arana和Domantis工程师分子由人免疫球蛋白轻链或重链的抗原结合结构域组成,然而只有Arana在临床试验中有候选物ART-621,是治疗牛皮癣和类风湿性关节炎2期研究中的一种抗TNF α 分子。Ablynx生产的源自自骆驼和美洲驼重链抗体抗原结合可变重链区(V_H)的“纳米抗体”,缺少轻链。两个Ablynx抗血管假性血友病因子(von willebrand factor)的纳米抗体已进入临床开发阶段,包括ALX-0081以及ALX-0681,在2期开发中ALX-0081作为静脉注射治疗在经历急性冠脉综合征经皮冠状动脉介入治疗的患者中用于预防血栓形成,ALX-0681是一种皮下施用而用于急性冠脉综合征患者和血栓性血栓血细胞减少性紫癜患者的1期分子(Nelson,A.L.,MAbs.2010一月-二月2(1):77-83)。

[0369] 多特异性抗体的开发

[0370] 在一些实施方案中,本发明的抗体序列可用于开发多特异性抗体(例如双特异性、三特异性或更大的多特异性)。多特异性抗体可以对本发明靶标抗原的不同表位具有特异性,或者可以对本发明的靶标抗原和异源表位(例如异源聚糖、肽或固体支持物材料)都是特异性的。(参见例如WO 93/17715;WO 92/08802;WO 91/00360;WO 92/05793;Tutt,A.等人,Trispecific F(ab')₃ derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells.J.Immunol.1991Jul 1;147(1):60-9;美国专利号4,474,893;4,714,681;4,925,648;5,573,920;5,601,819;和Kostelny,S.A.等人,Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers.J.Immunol.1992Mar 1;148(5):1547-53;美国专利号5,932,448。

[0371] 在Memorial Sloan-Kettering癌症中心的PCT公开W02014144573中公开并要求保护的是用于制备二聚多特异性结合剂(例如包含抗体组分的融合蛋白)的多聚技术,所述二聚多特异性结合剂相对于不具有二聚化能力的多特异性结合剂具有改进的性质。

[0372] 在Merck Patent GMBH的PCT公开W02014144357中公开并要求保护的是四价双特异性抗体(TetBiAb),以及用于诊断和治疗癌症或免疫病症的TetBiAb的制备方法和使用方法。TetBiAb的特征在于具有第二对Fab片段,其第二抗原特异性与抗体的C-末端连接,因此提供了对于两种抗原特异性中的每一种都是二价的分子。将抗体重链共价连接至Fab轻链,通过基因工程改造方法产生四价抗体,其与其同源物共表达的Fab重链得以共同表达。

[0373] 在IBC Pharmaceuticals,Inc的PCT公开W02014028560中公开并要求保护的是用于治疗疾病的T细胞重定向双特异性抗体(bsAb),其具有至少一个T细胞抗原结合位点和至少一个病变细胞或病原体抗原结合位点。优选地,该bsAb是抗CD3x抗CD19双特异性抗体,然而也可以使用针对其它T细胞抗原和/或疾病相关抗原的抗体。复合物能够靶向效应T细胞以诱导与疾病(如癌症、自身免疫疾病或感染性疾病)相关的细胞的T细胞介导的细胞毒性。通过共施用基于干扰素的试剂(包含干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- λ 1、干扰素- λ 2或干扰素- λ 3)增强细胞毒性免疫应答。

[0374] 在Synimmune GMBH的PCT公开W02013092001中公开并要求保护的是双特异性抗体

分子,以及其制备方法,其用途和编码双特异性抗体分子的核酸分子。具体而言,提供了能够介导免疫细胞的靶标细胞限制性激活的抗体分子。

[0375] PCT公开W02012007167公开并要求保护的是特异性结合肿瘤细胞表面上的至少糖表位和erbB类受体的多特异性模块化抗体,从而交联糖表位和受体,该抗体具有凋亡活性而不依赖于NK细胞进行细胞溶解。

[0376] PCT公开W02012048332和W02013055404中公开并要求保护的是中间位(meditope)、中间位结合抗体、中间位递送系统以及中间位的单克隆抗体框架结合界面及其使用方法。特别地,显示两种抗体结合肽C-QFDLSTRRLK-C(“cQFD”;其中的序列标识号1;本文中的SEQ ID NO:261)和C-QYNLSSRALK-C(“cQYN”;其中的序列标识号2;本文的SEQ ID NO:262)具有新的mAb结合性质。也称为“中间位”,cQFD和cQYN显示结合抗EGFR mAb西妥昔单抗的Fab框架区,而不结合结合抗原的互补决定区(CDR)。Fab框架上的结合区不同于其它框架结合抗原,例如超抗原葡萄球菌蛋白(SpA)(Graille等,2000)和大消化链球菌(*Peptostreptococcus magnus*)蛋白L(PpL)(Graille等,2001)。因此,公开的一个实施方案是框架结合界面,其包含结合环状中间位的独特鼠-人抗体或其功能片段的框架区。

[0377] 感兴趣的示例性专利和专利出版物是:均受让给Protein Design Labs,Inc的全部提交于1995年6月7日的美国专利号5,585,089;5,693,761;和5,693,762,以及美国专利号6,180,370,描述了用于制备人源化免疫球蛋白的方法及其组合物,所述人源化免疫球蛋白具有一个或更多个互补决定区(CDR)和来自供体免疫球蛋白的可能额外氨基酸以及来自接受人免疫球蛋白的框架区。除了CDR之外,通常还认为每个人源化免疫球蛋白链都包含来自供体免疫球蛋白构架的氨基酸,所述来自供体免疫球蛋白构架的氨基酸例如能够与CDR相互作用以实现结合亲和性,例如与供体免疫球蛋白中CDR紧邻的一个或更多个氨基酸或者如分子模型预测的约3Å范围内的那些。可以通过使用任何一种或全部不同的位置标准来设计各重链和轻链。当组合成完整抗体时,本发明的人源化免疫球蛋白在人体中基本上是非免疫原性的,并且保持与供体免疫球蛋白对抗原(如蛋白或其它含有表位的化合物)基本相同的亲和性。

[0378] 受让给Universite Catholique De Louvain和Bio Transplant,Inc的美国专利5,951,983描述了针对T淋巴细胞的人源化抗体。来自人V_K基因的框架区,命名为HUM5400(EMBL登录号X55400)以及来自人抗体克隆Amu5-3(GenBank登录号U00562)的框架区,如其中所述。

[0379] Creative Biomolecules,Inc.的美国专利号5,091,513描述了对预选抗原具有亲和性的合成蛋白家族。蛋白的特征在于一个或更多个氨基酸序列构成表现为生物合成抗体结合位点(BABS)的区。位点包含1)非共价结合的或二硫键结合的合成V_H和V_L二聚体,2)V_H-V_L或V_L-V_H单链,其中V_H和V_L通过多肽接头连接,或3)个体V_H或V_L结构域。结合结构域包含连接的CDR和FR区,其可以源自独立的免疫球蛋白。蛋白还可以包括其它多肽序列,其功能例如作为酶、毒素、结合位点或与固定介质连接的位点或放射性原子。公开了用于生产蛋白及其类似物的方法,方法用于设计具有任何特异性的BABS,通过体内产生抗体引发所述特异性。

[0380] ESBATech,Alcon Biomedical Research Unit,LLC的美国专利8,399,625描述了使用特别合适的抗体受体框架来移植非人抗体(例如兔抗体)的抗体受体框架和方法。

[0381] 细胞内抗体 (intrabody)

[0382] 在一些实施方案中,本发明的抗体可以是细胞内抗体。细胞内抗体是不从其产生细胞分泌的抗体形式,而是靶向一种或更多种细胞内蛋白。在细胞内表达细胞内抗体并发挥功能,并可用于影响多种细胞过程,包括但不限于细胞内运输、转录、翻译、代谢过程、增殖信号传导和细胞分裂。在一些实施方案中,本文所述的方法包括基于细胞内抗体的疗法。在一些这样的实施方案中,本文公开的可变结构域序列和/或CDR序列被并入基于细胞内抗体疗法的一种或更多种构建体中。例如,细胞内抗体可靶向一种或更多种糖化细胞内蛋白或可调节一种或更多种糖化细胞内蛋白和替代蛋白之间的相互作用。

[0383] 二十多年前,首先描述了针对细胞内靶标的细胞内抗体 (Biocca,Neuberger和Cattaneo,EMBO J.9:101-108,1990)。细胞内抗体在哺乳动物细胞不同区室中的细胞内表达允许阻断或调节内源性分子的功能 (Biocca等,EMBO J.9:101-108,1990;Colby等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101:17616-21,2004)。细胞内抗体可以改变蛋白折叠、蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA相互作用和蛋白修饰。它们可以诱导表型敲除,并通过直接结合靶标抗原、通过转移其细胞内运输或通过抑制其与结合伴侣的结合而作为中和剂起作用。它们主要被用作研究工具,并正在成为治疗人疾病的治疗性分子,如病毒病、癌症和错误折叠疾病。快速增长的重组抗体生物市场提供了具有增强的结合特异性、稳定性和溶解性、以及较低免疫原性的细胞内抗体用于治疗的用途 (Biocca,Antibody Expression and Production Cell Engineering的摘要,卷7,2011,pp.179-195)。

[0384] 在一些实施方案中,细胞内抗体优于干扰RNA (iRNA);例如,已显示iRNA发挥多种非特异性作用,而细胞内抗体已显示对靶标抗原具有高特异性和亲和性。此外,作为蛋白,细胞内抗体具有比iRNA更长的活性半衰期。因此,当细胞内靶标分子的活性半衰期较长时,通过iRNA进行基因沉默可能会缓慢产生效应,而细胞内抗体表达的效应可能几乎是瞬时的。最后,有可能设计细胞内抗体以阻断特定靶标分子的一些结合相互作用,同时节省其它。

[0385] 开发细胞内抗体

[0386] 细胞内抗体通常是重组核酸分子表达的并且工程改造以保留在细胞内 (例如保留在细胞质、内质网或周质中) 的单链可变片段 (scFv)。例如,细胞内抗体可用于消除细胞内抗体所结合的蛋白的功能。也可以通过在包含细胞内抗体的核酸表达载体中使用诱导型启动子来调节细胞内抗体的表达。可以使用本领域已知的方法生产细胞内抗体,例如在以下文献中公开和综述的那些: (Marasco等人,1993Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:7889-7893;Chen等人,1994,Hum.Gene Ther.5:595-601;Chen等人,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91:5932-5936;Maciejewski等人,1995,Nature Med.,1:667-673;Marasco,1995,Immunotech,1:1-19;Mhashilkar,等人,1995,EMBO J.14:1542-51;Chen等人,1996,Hum.Gene Therap.,7:1515-1525;Marasco,Gene Ther.4:11-15,1997;Rondon和Marasco,1997,Annu.Rev.Microbiol.51:257-283;Cohen,等人,1998,Oncogene 17:2445-56;Proba等人,1998,J.Mol.Biol.275:245-253;Cohen等人,1998,Oncogene 17:2445-2456;Hassanzadeh等人,1998,FEBS Lett.437:81-6;Richardson等人,1998,Gene Ther.5:635-44;Ohage和Steipe,1999,J.Mol.Biol.291:1119-1128;Ohage等人,1999,J.Mol.Biol.291:1129-1134;Wirtz和Steipe,1999,Protein Sci.8:2245-2250;Zhu等人,1999,

J.Immunol.Methods 231:207-222;Arafat等人,2000,Cancer Gene Ther.7:1250-6;der Maur等人,2002,J.Biol.Chem.277:45075-85;Mhashilkar等人,2002,Gene Ther.9:307-19;以及Wheeler等人,2003,FASEB J.17:1733-5;及其引用的文献)。具体而言,通过Marasco,WA,1998"_intrabodies:Basic Research and Clinical Gene Therapy Applications"Springer:New York产生CCR5细胞内抗体,以及scFv的综述参见Pluckthun于"The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,"1994,vol.113,Rosenburg和Moore编Springer-Verlag,New York,pp.269-315。

[0387] 在一些实施方案中,使用抗体序列来开发细胞内抗体。细胞内抗体通常重组表达为单个结构域片段,例如分离的VH和VL结构域或者在细胞内作为单链可变片段(scFv)抗体。例如,细胞内抗体通常表达为单一多肽以形成包含由柔性接头多肽连接的重链和轻链可变结构域的单链抗体。细胞内抗体通常缺乏二硫键并且能够通过其特异性结合活性来调节靶标基因的表达或活性。单链抗体也可以表达为与轻链恒定区连接的单链可变区片段。

[0388] 如本领域已知的,可以将细胞内抗体工程化为重组多核苷酸载体以在其N或C-末端编码亚细胞运输信号以允许在靶标蛋白所处的亚细胞区室中以高浓度表达。例如,靶向内质网(ER)的细胞内抗体被工程化以并入前导肽和任选的C-末端ER保留信号,例如KDEL氨基酸基序。旨在在细胞核中发挥活性的细胞内抗体被设计为包含核定位信号。将脂质部分连接至细胞内抗体以将细胞内抗体锚定至质膜胞质侧。细胞内抗体也可以被靶向以在细胞溶质中发挥功能。例如,使用细胞溶质细胞内抗体来螯合细胞溶质内的因子,从而防止它们被运输到其天然细胞目的地。

[0389] 细胞内抗体的表达存在一定的技术挑战。特别地,细胞内新合成的细胞内抗体的蛋白构象折叠和结构稳定性受细胞内环境还原型条件的影响。在人临床治疗中,围绕转染重组DNA的应用存在安全性问题,其用于实现细胞内的细胞内抗体表达。特别值得关注的是基因操作中常用的各种基于病毒的载体。因此,解决这些问题的一种方法是将蛋白转导结构域(PTD)融合到scFv抗体中,以产生“细胞可渗透的”抗体或“Transbody”。Transbody是在其中蛋白转导结构域(PTD)和单链可变片段(scFv)抗体融合的细胞可渗透抗体(Heng和Cao,2005,Med Hypotheses.64:1105-8)。

[0390] 在与靶标基因相互作用后,细胞内抗体通过机制(例如加速靶标蛋白降解和在非生理亚细胞区室中隔离靶标蛋白)来调节靶标蛋白功能和/或实现表型/功能敲除。细胞内抗体介导的基因失活的其它机制可取决于细胞内抗体靶向的表位,例如与靶标蛋白上的催化位点结合或参与蛋白-蛋白、蛋白-DNA或蛋白-RNA相互作用的表位。

[0391] 在一个实施方案中,细胞内抗体用于捕获细胞核中的靶标,从而阻止其在细胞核内的活性。核靶向信号被工程化到这样的细胞内抗体中以实现期望的靶向。这种细胞内抗体被设计为特异性结合特定的靶标结构域。在另一个实施方案中,使用与靶标蛋白特异性结合的细胞溶质内细胞内抗体来防止靶标进入细胞核,由此防止其在细胞核内发挥任何生物学活性(例如,防止靶标与其它因子形成转录复合物)。

[0392] 为了特异性指导特定细胞对这些细胞内抗体的表达,将细胞内抗体的转录置于合适的肿瘤特异性启动子和/或增强子的调控下。例如为了特异性地将细胞内抗体表达靶向前列腺,可以使用PSA启动子和/或启动子/增强子(参见例如1999年7月6日公开的美国专利号5,919,652)。

[0393] 蛋白转导结构域(PTD)是短肽序列,其使蛋白穿过细胞膜进行易位,并通过非典型分泌和内在化途径内在化至细胞溶质中。“Transbody”拥有一些显著优于细胞内表达的常规细胞内抗体的优势。首先,“正确的”构象折叠和二硫键形成可以在引入靶标细胞之前发生。更重要的是,细胞渗透性抗体或“Transbodies”的使用将避免关于在人临床治疗中直接应用重组DNA技术的重大安全和道德问题,这是细胞内进行细胞内抗体的表达所需的。导入细胞内的‘Transbody’只具有有限的活性半衰期,不会导致任何永久的基因改变。这将减少任何在人临床治疗中应用的安全方面的顾虑(Heng和Cao 2005,Med Hypotheses.64:1105-8)。

[0394] 细胞内抗体是用于治疗错误折叠疾病(包括阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病和朊病毒病)的有希望的治疗剂,因为它们实际上具有无限的特异性识别蛋白的不同构象(包括病理学同种型)的能力,并且因为它们可以靶向潜在聚集位点(包括细胞内和细胞外位点)。这些分子可以通过阻止它们聚集而作为抗淀粉样蛋白的中和剂,和/或通过使蛋白从其潜在聚集位点改变路线(reroute)而作为细胞内运输的分子扳道工(Cardinale和Biocca,Curr.Mol.Med.2008,8:2-11)。

[0395] 描述细胞内的抗体或细胞内抗体的示例性专利公开在下文中阐述,其中的每一个通过引用整体并入。

[0396] 授予Cattaneo等的PCT公开W003014960和美国专利7,608,453描述了鉴定细胞内抗体(ICS)至少一个一致序列的细胞内的抗体捕获技术方法,其包括以下步骤:创建包含经验证的细胞内抗体序列的数据库(VIDA数据库)并根据Kabat比对验证的细胞内抗体的序列;确定比对抗体在每个位置中特定氨基酸出现的频率;在70%到100%的范围内选择频率阈值(LP或一致阈值);鉴定特定氨基酸频率大于或等于LP值的比对位置;并在所述比对的位置鉴定最常见的氨基酸。

[0397] 全部受让给医学研究委员会的且包括发明人Cattaneo等人的PCT公开W00054057;W003077945;W02004046185;W02004046186;W02004046187;W02004046188;W02004046189;美国专利申请公开US2005272107;US2005276800;US2005288492;US2010143939;授权的美国专利7,569,390和7,897,347以及授权的欧洲专利EP1560853;和EP1166121描述了细胞内细胞内单结构域免疫球蛋白,以及确定免疫球蛋白单结构域在细胞内环境中与靶标结合的能力的方法,以及产生细胞内抗体的方法。

[0398] Cattaneo作为发明人并受让给S.I.S.S.A Scuola Internazionale Superiore的PCT公开W00235237;美国专利申请公开2003235850以及授权的欧洲专利EP1328814描述了用于体内鉴定细胞内抗原表位的方法。

[0399] 受让给Lay line Genomics SPA并且发明人为Cattaneo的PCT公开W02004046192和欧洲专利EP1565558描述了用于分离细胞内的抗体的方法,所述抗体破坏和中和细胞内蛋白配体x和蛋白配体y之间的相互作用。还公开了,使用能够在x和y之间相互作用的细胞内的抗体,来鉴定能够结合已知y配体的蛋白配体x的方法;以及一种分离一组抗体片段的方法,所述抗体片段针对给定细胞(交互作用体(interactome))大部分蛋白-蛋白相互作用或针对构成细胞内途径或网络的蛋白相互作用。

[0400] 名称为“Intrabody-mediated control of immune reactions”、受让给Dana Farber Cancer Institute Inc.且发明人为Marasco和Mhashilkar的美国专利申请公开

2006034834和PCT公开W09914353涉及改变免疫系统调节的方法,例如通过选择性靶向细胞上的免疫调节受体分子(IRM)个体或类别,方法包括用细胞内表达的抗IRM抗体或细胞内抗体转导细胞。在优选的实施方案中,细胞内抗体包含针对IRM(例如MHC-1分子)的单链抗体。

[0401] 受让给Dana Farber Cancer Institute Inc.和Whitehead Biomediacal Institute以及发明人为Bradner,Rahl和Young的PCT公开W02013033420描述了用于抑制溴结构域蛋白和免疫球蛋白(Ig)调节元件之间相互作用以及下调Ig基因座易位的致癌基因表达的方法和组合物,以及用于治疗Ig基因座易位的致癌基因的表达增加为特征的癌症(例如血液恶性肿瘤)。通常描述的是细胞内抗体。

[0402] 标题为“Methods of producing or identifying intrabodies eukaryotic cells”、受让给罗彻斯特大学医学中心且发明人为Zauderer,Wei和Smith的PCT公开W002086096和美国专利申请公开2003104402描述了使用三分子重组方法在真核细胞中表达细胞内免疫球蛋白分子和细胞内免疫球蛋白文库的高效方法。进一步提供了细胞内免疫球蛋白分子及其片段的选择和筛选方法,以及用于生产、筛选和选择细胞内免疫球蛋白分子的试剂盒,以及使用这些方法生产的细胞内免疫球蛋白分子及其片段。

[0403] 受让给Affinity Biosciences PTY LTD并且发明人为Beasley,Niven和Kiefel的PCT公开W02013023251描述了多肽,如抗体分子和编码这种多肽的多核苷酸、及其文库,其中表达的多肽具有高稳定性和可溶性。具体而言,描述了包含配对VL和VH结构域的多肽,其在还原性的或细胞内环境中显示出可溶性表达和折叠,其中筛选人scFv文库,导致分离得到与人种序列具有相同框架区的可溶性scFv基因,所述可溶性scFv基因具有显著的热稳定性和对CDR3嫁接到scFv支架上的耐受性。

[0404] 受让给Esbatech AG和苏黎世大学且发明人为Ewert、Huber、Honneger和Plueckthun的欧洲专利申请EP2314622和PCT公开W003008451和W003097697描述了人可变结构域的修饰,并提供了可为创建非常稳定且可溶性的单链Fv抗体片段而用作框架的组合物。这些框架已经选择用于细胞内性能,因此理想地适用于产生scFv抗体片段或scFv抗体文库,以便用于稳定性和可溶性成为抗体片段的性能限制性因素(例如还原性的细胞环境)的应用。这样的框架也可用于鉴定显示出增强的溶解度和稳定性的高度保守的残基和一致序列。

[0405] 标题为“Systems devices and methods for intrabody targeted delivery and reloading of therapeutic agents”的PCT公开W002067849和美国专利申请公开2004047891描述了用于细胞内抗体靶向递送分子的系统、装置和方法。更具体地讲,一些实施方案涉及可再装载的药物递送系统,其能够以局部且及时的方式将治疗剂靶向递送至受试者的组织区。

[0406] 受让给Amgen Inc.且发明人为Zhou,Shen和Martin的PCT公开W02005063817和美国专利7,884,054描述了用于鉴定功能性抗体(包括细胞内抗体)的方法。具体而言,描述了同型二聚化细胞内抗体,其中同型二聚体的每条多肽链包含Fc区、scFv和细胞内定位序列。细胞内定位序列可能导致细胞内抗体定位于ER或高尔基体。任选地,每条多肽链包含不超过一个scFv。

[0407] Vogan等人的并受让给Permeon Biologics Inc.的PCT公开W02013138795描述了用于递送细胞内抗体和抗体样部分的细胞穿透组合物和用于向细胞递送它们的方法(在本

文中称为“AAM部分”)。不受理论束缚,本公开至少部分基于这样的发现,即可以通过使AAM部分与具有表面正电荷的细胞穿透多肽(本文中称为“Surf+穿透多肽”)复合而将AAM部分递送至细胞中。还提供了intraphilin技术的一些应用实例。

[0408] 受让给巴斯德研究所的PCT公开W02010004432描述了来自骆驼科(骆驼、单峰驼、美洲驼和羊驼)的免疫球蛋白,其中约50%是不含轻链的抗体。这些重链抗体仅凭借一个单一的可变结构域与抗原相互作用,称为VHH、VHH结构域或VHH抗体。尽管没有轻链,但是当VHH结构域针对细胞内靶标时,这些同型二聚体抗体通过扩大它们的高变区而表现出广泛的抗原结合库,并且可以在体外以及体内作为transbody和/或细胞内抗体。

[0409] PCT公开W02014106639描述了通过鉴定可修饰细胞表型的细胞内抗体,来鉴定涉及细胞表型的细胞靶标的方法以及鉴定细胞内抗体的直接或间接细胞靶标的方法。特别地,细胞内抗体3H2-1、3H2-VH和5H4能够抑制由变应性刺激引发的肥大细胞中的脱粒反应;此外,细胞内抗体3H2-1和5H4分别直接或间接靶向ABCF1家族和C12ORF4家族的蛋白。据称这些ABCF1和C12ORF4抑制剂可用于治疗,特别是用于治疗过敏性和/或炎症病症。

[0410] 受让给Urogenesis Inc.的PCT公开W00140276一般地描述了使用细胞内的抗体(细胞内抗体)抑制STEAP(前列腺的六跨膜上皮抗原)蛋白的可能性。

[0411] 受让给曼彻斯特大学且发明人为Simon和Benton的PCT公开W002086505和美国专利申请公开US2004115740描述了用于靶标分子的细胞内分析的方法,其中细胞内抗体是优选的。在一个实施方案中,描述了能够表达与CFP偶联的抗MUC1细胞内抗体的载体(命名为pScFv-ECFP)。

[0412] 受让给Gene Therapy Systems Inc.的PCT公开W003095641和W00143778描述了用于细胞内蛋白递送的组合物和方法,并且通常描述了细胞内抗体。

[0413] 受让给Selective Genetics Inc.的PCT公开W003086276描述了用于治疗细胞内感染的平台技术。其中描述的组合物和方法包括非靶标特异性载体,其通过连接的配体靶向可感染的细胞,通过与感染相关的细胞表面受体/部分结合进行内在化。载体包含在内在化至靶标细胞后进行表达的外源核酸序列。可以改变载体相关的配体和核酸分子以靶向不同的感染剂。另外,本发明提供了鉴定能够指导载体内在化并且能够阻止病毒进入的表位和配体的方法。

[0414] 受让给伊拉斯谟大学的PCT公开W003062415描述了转基因生物,所述转基因生物包含编码细胞内抗体的多核苷酸构建体,所述细胞内抗体破坏异种抗原半乳糖 α 1,3-半乳糖的产生催化,和/或所述转基因生物包含编码细胞内抗体的多核苷酸构建体,所述细胞内抗体特异性结合逆转录病毒蛋白如PERV颗粒蛋白。转基因生物的细胞、组织和器官可以用于异种移植。

[0415] 标题为“Means for detecting protein conformation and applications thereof”的PCT公开W02004099775描述了scFv片段作为用于特异性检测构象蛋白状态的构象特异性抗体的用途,据称其作为传感器在细胞内表达后在活细胞中跟踪内源蛋白的行为。

[0416] 受让给Imclone Systems Inc.的PCT公开W02008070363描述了结合细胞内蛋白或细胞内蛋白的细胞内结构域(如Etk、内皮和上皮酪氨酸激酶,其是非受体酪氨酸激酶Tec家族的成员)的单结构域内抗体。还提供了通过施用细胞内抗体或表达细胞内抗体的核酸来

抑制细胞内酶和治疗患者肿瘤的方法。

[0417] 受让给康奈尔研究基金会公司 (Cornell Research Foundation Inc.) 的PCT公开W02009018438描述了通过提供包含DNA分子的构建体来鉴定结合靶标分子并具有细胞内功能的蛋白的方法,所述DNA分子编码结合靶标分子的蛋白,其中DNA分子偶联于失活(stall)序列。用构建体转化宿主细胞,然后在宿主细胞内有效形成蛋白、编码蛋白的mRNA和核糖体的复合物的条件下培养宿主细胞,所述蛋白的翻译被阻止。复合物中的蛋白正确折叠,从细胞中回收活性形式和复合物。用含有核糖体而不是宿主细胞的无细胞提取制备物可以进行这种方法。本发明还涉及包含DNA分子和偶联于DNA分子的SecM失活序列的构建体,所述DNA分子编码结合靶标分子的蛋白。DNA分子和SecM失活序列在它们之间以足够的距离进行偶联以允许它们编码的蛋白在细胞内以适当折叠的活性形式表达。总体上描述了细胞内抗体的用途。

[0418] 受让给Mogam Biotech Research Institute的PCT公开W02014030780描述了称为Tat相关蛋白工程(TAPE)的方法,通过制备其中靶标蛋白和抗生素耐受性蛋白与Tat信号序列连接的基因构建体,然后在大肠杆菌内表达,所述方法用于筛选具有更高溶解度和优异热稳定性的靶标蛋白,特别是源自人生殖细胞的免疫球蛋白可变结构域(VH或VL)。还公开了人或工程化的VH和VL结构域抗体以及具有溶解性和优异热稳定性的人或工程化VH和VL结构域抗体支架,其是通过TAPE方法筛选的。还提供了一种文库,其在TAPE方法筛选所得的人或工程化VH和VL结构域抗体支架中包含随机CDR序列,还提供了其制备方法、对通过使用文库筛选的靶标蛋白具有结合能力的VH或VL结构域抗体、以及包含结构域抗体的药物组合物。

[0419] 欧洲专利申请EP2422811描述了与细胞内表位结合的抗体;这种细胞内抗体包含能够特异性结合抗原的抗体的至少一部分,并且优选不含有编码其分泌的可操作序列,因此保留在细胞内。在一个实施方案中,细胞内抗体包含scFv。scFv多肽在VH和VL结构域之间还包含多肽接头,其使得scFv能够形成用于抗原结合的所需结构。还描述了其中细胞内抗体与Eph受体的胞质结构域结合并防止其信号传导(例如自磷酸化)的具体实施方案。在另一具体实施方案中,细胞内抗体结合B型肝配蛋白的胞质结构域(例如肝配蛋白B1、肝配蛋白B2或肝配蛋白B3)。

[0420] PCT公开W02011003896和欧洲专利申请EP2275442描述了使用编码特异性结合增殖细胞核抗原(PCNA)的多肽的核酸分子制备的细胞内功能性PCNA-染色体。在一个或两个框架区中包含一个或多个氨基酸保守取代的这种多肽的实例包括MANVQLNESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISPSGAVKAYSDSVKGRFTISRDNANKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVQSPRTRIPAPSSQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 263)和MANVQLNESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSEISPSGAVKAYSDSVKGRFTISRDNANKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVQSPRTRIPAPSSQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 264),包括多肽的框架区。在实例中,确定了参与PCNA结合的框架区以及CDR区。

[0421] 欧洲专利申请EP2703485描述了用于选择浆细胞或浆母细胞以及用于产生靶标抗

原特异性抗体和新型单克隆抗体的方法。在一个实施方案中,鉴定了表达细胞内免疫球蛋白的细胞。

[0422] 抗体包被的试剂

[0423] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗体片段可用于制备包含抗体包被的试剂的组合物。如本文所用,术语“抗体包被的试剂”是指包含一种或更多种表面结合抗体或抗体片段的任何颗粒、纳米颗粒、分子、蛋白、融合蛋白、脂质、脂质体、细胞膜、细胞或其它结构。基于用于包被的抗体或抗体片段的特异性,抗体包被的试剂可以靶向一种或更多种聚糖、蛋白、细胞、组织和/或器官。

[0424] 抗体包被的试剂可以包括结合的、封闭的或嵌入的物品。物品可能是可检测的标签。一些物品可能包括一种或更多种治疗剂。这样的治疗剂可以包括但不限于药物、化学治疗剂和细胞毒性剂。细胞毒性剂可用于杀伤或以其它方式使细胞失活。细胞毒性剂可以包括但不限于细胞骨架抑制剂(例如,微管蛋白聚合抑制剂,如美登素或澳瑞他汀(例如,单甲基澳瑞他汀E(MMAE)和单甲基澳瑞他汀F(MMAF)))和DNA损伤剂(例如,DNA聚合抑制剂如钙凝集素和多卡霉素)。

[0425] 在一些实施方案中,抗体包被的试剂可以包括用本文所述的一种或更多种抗体或抗体片段包被的纳米颗粒。这种抗体包被的试剂可以靶向一种或更多种聚糖,包括但不限于细胞结合聚糖。一些这样的抗体包被的试剂包括一种或更多种细胞毒性剂。

[0426] 蛋白和变体

[0427] 本发明的聚糖相互作用抗体可以作为完整多肽、多种多肽或多肽片段存在,其独立地可以由一种或更多种核酸、多种核酸、核酸片段或任何前述的变体所编码。如本文所用,“多肽”是指通常通过肽键连接在一起的氨基酸残基(天然或非天然)的聚合物。如本文所用,该术语是指任何大小、结构或功能的蛋白、多肽和肽。在一些情况下,编码的多肽小于约50个氨基酸,然后多肽称为肽。如果多肽是肽,则它将至少约2、3、4或至少5个氨基酸残基长。因此,多肽包括前述的基因产物、天然存在的多肽、合成多肽、同系物、直系同源物、旁系同源物、片段和其它等价物、变体和类似物。多肽可以是单分子或可以是多分子复合物,例如二聚体、三聚体或四聚体。它们也可以包括单链或多链多肽并且可以是结合的或连接的。术语多肽也可以应用于其中一个或更多个氨基酸残基是相应天然存在氨基酸的人造化学类似物的氨基酸聚合物。

[0428] 术语“多肽变体”是指其氨基酸序列与天然或参考序列不同的分子。与天然或参考序列相比,氨基酸序列变体可以在氨基酸序列内一些位置上具有取代、缺失和/或插入。通常,变体与天然或参考序列具有至少约50%的同一性(同源性),并且优选地,它们与天然或参考序列具有至少约80%、更优选至少约90%的同一性(同源性)。

[0429] 在一些实施例中,提供了“变体模拟物”。如本文所用,术语“变体模拟物”是含有一个或更多个模拟激活序列的氨基酸的模拟物。例如,谷氨酸可以用作磷酸苏氨酸和/或磷酸丝氨酸的模拟物。或者,变体模拟物可导致失活或含有模拟物的失活产物,例如苯丙氨酸可作为酪氨酸的失活取代;或丙氨酸可作为丝氨酸的失活取代。本发明的聚糖相互作用抗体的氨基酸序列可包含天然存在的氨基酸,并且因此可以被认为是蛋白、肽、多肽或其片段。

[0430] 或者,聚糖相互作用抗体可包含天然存在或非天然存在的氨基酸。

[0431] 术语“氨基酸序列变体”是指与天然或起始序列相比在其氨基酸序列上有一些差

异的分子。氨基酸序列变体可以在氨基酸序列内的一些位置上具有取代、缺失和/或插入。“天然的”或“起始的”序列不应与野生型序列混淆。如本文所用，天然或起始序列是参照着原始分子的相对术语，其中比较可以相对于所述原始分子进行。“天然”或“起始”序列或分子可以代表野生型（自然界中发现的那个序列），但不一定是野生型序列。

[0432] 通常，变体与天然序列相比将具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.8%或至少99.9%的序列同一性。当应用于氨基酸序列或核苷酸序列时，“序列同一性”定义为，在序列比对并考虑空位(gap)和片段(必要时)以实现最大序列百分比同一性之后，候选序列中与第二序列中相同的残基的百分比。例如，为了最佳比较目的，可以通过比对两个序列来计算两个聚合物序列的百分比同一性(例如，可以在第一和第二聚合物序列的一个或两个当中引入空位以获得最佳比对，并且可以为了比较目的而忽略不一致的序列)。在一些实施方案中，为比较目的，比对的序列长度为参考序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。然后比较相应位置的残基。当第一序列中的位置被第二序列中相应位置的相同残基所占据时，分子在该位置上是相同的。两个序列之间的百分比同一性是序列共享的相同位置的数量的函数，将空位的数量和每个空位的长度纳入考虑，需要将其引入以便两个序列的最佳对齐。可以使用数学算法完成序列的比较和确定两序列之间的百分比同一性。例如，两个核苷酸序列之间的百分比同一性可以使用比如Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编, Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M 和 Griffin, H.G. 编, Humana Press, New Jersey, 1994; 和 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编, M Stockton Press, New York, 1991所述的那些方法进行确定；其中的每一个通过引用并入本文。例如，两个核苷酸序列之间的百分比同一性可以使用Meyer和Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17) 的算法确定，该算法已经并入ALIGN程序(版本2.0)，该程序采用PAM120残基权重表、12空位长度罚分和4的空位罚分。替代地，可以使用GCG软件包中的GAP程序、使用NWSgapdna.CMP矩阵来确定两个核苷酸序列之间的百分比同一性。常用于确定序列间百分比同一性的方法包括但不限于Carillo, H 和 Lipman, D., SIAM J Applied Math, 48:1073 (1988) 所公开的；通过引用并入本文。用于确定同一性的技术被编入公共可用的计算机程序中。用于确定两个序列之间的同源性的示例性计算机软件包括但不限于GCG程序包、Devereux, J. 等, Nucleic Acids Research, 12(1), 387 (1984)、BLASTP、BLASTN和FASTA、Altschul, S.F. 等人, J. Molec. Biol, 215, 403 (1990)。

[0433] 当应用于氨基酸序列时，“同系物”是指与第二物种的第二序列具有实质同一性的其它物种的相应序列

[0434] “类似物”意在包括多肽变体，其区别在于一个或更多个氨基酸改变，例如仍保持亲本多肽性质的氨基酸残基的取代、添加或缺失。

[0435] 本发明设想了几种类型的基于氨基酸的聚糖相互作用抗体，包括变体和衍生物。这些包括取代、插入、缺失和共价变体和衍生物。因此，包括在本发明范围内的是包含取代、插入和/或添加、缺失和共价修饰的聚糖相互作用抗体分子。例如，序列标签或氨基酸(例如

一个或多个赖氨酸)可以添加到本发明的肽序列中(例如,在N末端或C末端)。序列标签可用于肽的纯化或定位。赖氨酸可用于增加肽的溶解度或允许生物素化。替代地,位于肽或蛋白的氨基酸序列的羧基和氨基末端区的氨基酸残基可以任选地被删除,提供截短的序列。根据序列的用途,一些氨基酸(例如C末端或N末端残基)可以替代地被删除,例如序列的表达作为可溶或与固体支持物连接的更大序列的一部分。

[0436] 当提到蛋白时,“取代变体”是在天然或起始序列中至少有一个氨基酸残基被去除并且在相同位置上有不同的氨基酸插入其位置的那些。取代可以是单一的,其中分子中只有一个氨基酸被取代,或者它们可以是多个,其中在同一分子中两个或多个氨基酸已被取代。

[0437] 如本文所用,术语“保守性氨基酸取代”是指用相似大小、电荷或极性的不同氨基酸取代序列中正常存在的氨基酸。保守取代的实例包括非极性(疏水)残基(如异亮氨酸、缬氨酸和亮氨酸)取代为另一种非极性残基。同样,保守取代的实例包括一个极性(亲水)残基取代为另一个,例如精氨酸和赖氨酸之间、谷氨酰胺和天冬酰胺之间以及甘氨酸和丝氨酸之间。此外,将碱性残基(如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)取代为另一种,或将一种酸性残基(例如天冬氨酸或谷氨酸)取代为另一种酸性残基,是保守取代的其它实例。非保守取代的实例包括非极性(疏水)氨基酸残基(例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸)取代为极性(亲水)残基(如半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或赖氨酸)和/或极性残基取代为非极性残基。

[0438] 当涉及蛋白时,“插入变体”是指在天然或起始序列中的特定位置处紧邻氨基酸插入一个或多个氨基酸的那些。与氨基酸“紧邻”意指氨基酸连接至氨基酸的 α -羧基或 α -氨基官能基。

[0439] 当涉及蛋白时,“缺失变体”是指在天然或起始氨基酸序列中除去一个或多个氨基酸的那些。通常,缺失变体将在分子的特定区中缺失一个或多个氨基酸。

[0440] 如本文所用,术语“衍生物”与术语“变体”同义使用,并且指相对于参考分子或起始分子以任何方式被修饰或改变的分子。在一些实施方案中,衍生物包括修饰有有机蛋白或非蛋白衍生剂以及翻译后修饰的天然或起始蛋白。通常通过使蛋白的靶向氨基酸残基与有机衍生剂反应、或者通过在所选重组宿主细胞中发挥功能的翻译后修饰机制来引入共价修饰,其中所述有机衍生剂能够与所选侧链或末端残基发生反应。所得共价衍生物可用于针对以下的程序:鉴定对生物活性、免疫测定或制备用于免疫亲和纯化重组糖蛋白的抗蛋白抗体重要的残基。这种修饰在本领域普通技术人员能力之内,无需过度实验即可完成。

[0441] 一些翻译后修饰是重组宿主细胞对表达的多肽的作用的结果。谷氨酰胺酰基残基和天冬酰胺酰基残基经常在翻译后脱酰胺形成相应的谷氨酰胺和天冬酰胺残基。另外,这些残基在弱酸性条件下脱酰胺。这些残基的任一种形式都可以存在于根据本发明使用的蛋白中。

[0442] 其它翻译后修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T.E.Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983))。

[0443] 共价衍生物具体包括其中本发明的蛋白与非蛋白聚合物共价结合的融合分子。非蛋白聚合物通常是亲水性合成聚合物,即在自然界中不存在的聚合物。然而,天然存在的以

及通过重组或体外方法产生的聚合物是有用的,如从自然界分离出的聚合物。亲水聚乙烯聚合物落入本发明的范围内,例如,聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。特别有用的是聚乙烯基亚烷基醚如聚乙二醇、聚丙二醇。按照美国专利4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192或4,179,337所述的方式,蛋白可以与各种非蛋白聚合物连接,如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯。

[0444] 当涉及蛋白时,“特征”被定义为分子的不同氨基酸序列组分。本发明的蛋白的特征包括表面表现(manifestation)、局部构象形状、折叠、环、半环、结构域、半结构域、位点、末端或其任何组合。

[0445] 如本文所用,当涉及蛋白时,术语“表面表现”是指出现在最外表面上的基于多肽的蛋白组分。

[0446] 如本文所用,当提及蛋白时,术语“局部构象形状”是指基于多肽的蛋白结构表现,其位于蛋白的可限定的空间内。

[0447] 如本文所用,当涉及蛋白时,术语“折叠”意指氨基酸序列在能量最小化时的最终构象。折叠可能发生在折叠过程中的二级或三级水平。二级水平折叠的实例包括 β 片和 α 螺旋。三级折叠的实例包括由于能量力的聚集或分离而形成的结构域和区。以这种方式形成的区包括疏水性和亲水性袋等。

[0448] 如本文所用,术语“转角(turn)”涉及蛋白构象意指弯曲,其改变肽或多肽骨架的方向并可涉及一个、两个、三个或更多个氨基酸残基。

[0449] 如本文所用,当提及蛋白时,术语“环”是指肽或多肽的结构特征,其反转肽或多肽骨架的方向并且包括四个或更多个氨基酸残基。Oliva等人已经鉴定了至少5类蛋白环(J.Mol Biol 266(4):814-830;1997)。

[0450] 如本文所用,当提及蛋白时,术语“半环”是指鉴定的环的部分,其具有其来源的环的至少一半数量的氨基酸残基。可以理解,环可能并不总是包含偶数个氨基酸残基。因此,在环包含或被鉴定为包含奇数个氨基酸的情况下,奇数环的半环将包括环的整数部分或下一个整数部分(环的氨基酸数/2+/-0.5个氨基酸)。例如,鉴定为7个氨基酸环的环,可产生3氨基酸或4氨基酸的半环($7/2=3.5+/-0.5$ 为3或4)。

[0451] 如本文所用,当提及蛋白时,术语“结构域”是指具有一个或更多个可鉴定结构或功能特征或性质(例如结合能力、用作蛋白-蛋白相互作用的位点)的多肽的基序。

[0452] 如本文所用,当提及蛋白时,术语“半结构域”是指鉴定的结构域的部分,其具有其所来源的结构域中至少一半数目的氨基酸残基。应该理解,结构域可能并不总是包含偶数个氨基酸残基。因此,结构域含有或被鉴定为包含奇数个氨基酸的情况下,奇数结构域的半结构域将包括结构域的整数部分或下一个整数部分(结构域的氨基酸数量/2+/-0.5个氨基酸)。例如,鉴定为7个氨基酸结构域的结构域可产生3个氨基酸或4个氨基酸的半结构域($7/2=3.5+/-0.5$ 为3或4)。还应该理解的是,可以在结构域或半结构域内鉴定亚结构域,这些亚结构域具有的结构或功能特性小于其所源自的结构域或半结构域中所鉴定全部结构或功能特性。还应该理解的是,本文中任何结构域类型的氨基酸不需要连续沿着多肽的骨架(即,不相邻的氨基酸可以在结构上折叠以产生结构域、半结构域或亚结构域)。

[0453] 如本文所用,当涉及蛋白时,术语“位点”因为其涉及基于氨基酸的实施方案,与“氨基酸残基”和“氨基酸侧链”同义使用。位点表示可以在本发明基于多肽的分子内进行修

饰、操纵、改变、衍生或变化的肽或多肽内位置。

[0454] 如本文所用,当提及蛋白时,术语“端或末端”是指肽或多肽的末端。这样的末端不仅限于肽或多肽的第一或最终位点,还可以在末端区包含额外的氨基酸。本发明的基于多肽的分子特征可在于具有N末端(由具有游离氨基(NH₂)的氨基酸终止)和C末端(由具有游离羧基(COOH)的氨基酸终止)。本发明的蛋白在一些情况下由通过二硫键或通过非共价力结合在一起的多条多肽链组成(多聚体,寡聚体)。这种蛋白将具有多个N和C末端。另外,可以修饰多肽的末端,使得它们能够(视情况而定)以非多肽基部分(如有机缀合物)为开始或结束。

[0455] 任何特征一经鉴定或确定为本发明的分子的组分,可以通过移动、交换、反转、删除、随机化或复制来执行这些特征的若干操作和/或修饰中的任何一个。此外,可以理解的是,对特征的操作可以产生与对本发明分子进行修饰相同的结果。例如,涉及删除结构域的操作将导致分子长度的改变,正如修饰核酸以编码少于全长的分子一样。

[0456] 修饰和操作可以通过本领域已知的方法如定点诱变来完成。然后可以使用体外或体内测定法(例如本文所述的测定法)或本领域已知的任何其它合适的筛选测定法来测试所得修饰的分子的活性。

[0457] 同位素变异

[0458] 本发明的聚糖相互作用抗体可含有一个或更多个是同位素的原子。如本文所用,术语“同位素”是指含有一个或更多个额外中子的化学元素。在一个实施方案中,本发明的化合物可以是氘代的。如本文所用,术语“氘代”是指这样的物质,其已经有一个或更多个氢原子被氘同位素取代。氘同位素是氢的同位素。氢原子核包含一个质子,而氘原子核包含质子和中子。聚糖相互作用抗体可以被氘化以改变化合物的物理性质,例如稳定性,或者允许化合物用于诊断和实验应用。

[0459] 缀合物和组合物

[0460] 本发明涉及本发明的聚糖相互作用抗体可以与一种或多种同源或异源分子复合、缀合或组合。如本文所用,“同源分子”意指相对于起始分子至少在结构或功能之一上相似的分子,而“异源分子”是相对于起始分子在结构或功能之一上不同的分子。因此,结构同系物是结构上基本相似的分子。它们可以是相同的。功能同系物是功能上基本相似的分子。它们可以是相同的。

[0461] 本发明的聚糖相互作用抗体可以包含缀合物。本发明的这种缀合物可包含天然存在的物质或配体,比如蛋白(例如人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)或者球蛋白);碳水化合物(例如葡聚糖、支链淀粉、壳多糖、壳聚糖、菊粉、环糊精或透明质酸);或者脂质体。配体也可以是重组分子或合成分子,例如合成聚合物,例如合成聚氨基酸、寡核苷酸(如,适体)。聚氨基酸的实例包括聚氨基酸为聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或聚膦嗪。聚胺的实例包括:聚乙烯亚胺、聚赖氨酸(PLL)、精胺、亚精胺、聚胺、假肽-聚胺、拟肽聚胺、树状聚胺、精氨酸、胍、鱼精蛋白、阳离子脂质、阳离子卟啉、聚胺的季盐或 α 螺旋肽。

[0462] 缀合物还可以包括靶标基团,例如细胞或组织靶向剂或基团,如与特定细胞类型

例如肾细胞结合的凝集素、糖蛋白、脂质或者蛋白例如抗体。靶标基团可以是促甲状腺激素、促黑激素、凝集素、糖蛋白、表面活性剂蛋白A、粘蛋白碳水化合物、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、二磷酸盐、聚谷氨酸盐、聚天冬氨酸盐、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸、维生素B12、生物素、RGD肽、RGD肽模拟物或适体。

[0463] 靶标基团可以是蛋白质，例如糖蛋白、或者肽，例如对共配体具有特异亲和性的分子，或者可以是抗体，例如与特定细胞类型例如癌细胞、内皮细胞或者骨细胞结合的抗体。靶标基团也可能包括激素和激素受体。它们还可以包括非肽类物质，例如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺多价甘露糖、多价岩藻糖或适体。

[0464] 靶标基团可以是能够靶向特异性受体的任何配体。实例包括但不限于叶酸、GalNAc、半乳糖、甘露糖、甘露糖-6P、适体(apatamers)、整联蛋白受体配体、趋化因子受体配体、转铁蛋白、生物素、血清素受体配体、PSMA、内皮素、GCPII、生长抑素、LDL和HDL配体。在具体的实施方案中，靶标基团是适体。适体可以是未修饰的或者具有本文公开修饰的任何组合。

[0465] 在其它实施方案中，聚糖相互作用抗体共价缀合至细胞穿透多肽。细胞穿透肽也可以包括信号序列。本发明的缀合物可被设计为具有增加的稳定性，增加的细胞转染和/或改变的生物分布(例如靶向特定组织或细胞类型)。

[0466] 缀合部分可以添加到聚糖相互作用抗体中，使得它们允许加标签(tagging)或标记(flagging)靶标以用于清除。这样的标签/标记分子包括但不限于泛素、荧光分子、人流感血凝素(HA)、c-myc(具有序列EQKLISEEDL(SEQ ID NO:265)的人原癌基因myc的10个氨基酸区段)、组氨酸(His)、标记(序列DYKDDDDK(SEQ ID NO:266)的短肽)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、V5(猿猴病毒5表位的副粘病毒)、生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、辣根过氧化物酶(HRP)和地高辛。

[0467] 在一些实施方案中，聚糖相互作用抗体可以彼此组合或与其它分子组合用于治疗疾病或病症。

[0468] 核酸

[0469] 本发明包含核酸分子。在一些实施方案中，核酸编码本发明的抗体(包括但不限于抗体、抗体片段、细胞内抗体和嵌合受体抗原)。这类核酸分子包括但不限于DNA分子、RNA分子、多核苷酸、寡核苷酸、mRNA分子、载体、质粒和其它构建体。如本文所用，术语“构建体”是指任何重组核酸分子，包括但不限于质粒、粘粒、自主复制的多核苷酸分子或者线性或环状单链或者双链DNA或者RNA多核苷酸分子。本发明还包括编程或产生的细胞，以表达编码聚糖相互作用抗体的核酸分子。可以通过使用转染、电穿孔、病毒递送等来产生这些细胞。用本发明的构建体所工程改造的病毒可以包括但不限于慢病毒、腺病毒、腺相关病毒和噬菌体。在一些情况下，本发明的核酸包括密码子优化的核酸。产生密码子优化的核酸的方法是本领域已知的，可包括但不限于美国专利号5,786,464和6,114,148中描述的那些，其中每一个的内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中，对核酸序列进行密码子优化以改善蛋白表达或去除隐蔽剪接位点。

[0470] II. 方法和用途

[0471] 本公开的方法包括但不限于利用一种或多种聚糖相互作用抗体用于治疗、诊断、定量、生物加工、实验和/或研究目的的方法。这种聚糖相互作用抗体可以包括抗STn抗体。

[0472] 治疗

[0473] 癌症相关应用

[0474] 异常糖基化是癌细胞转化的标志。已经在人癌症中描述了多种异常糖基化形式，将特定的肿瘤相关碳水化合物抗原 (TACA) 鉴定为适用于特定肿瘤靶标的细胞表面分子类别 (Cheever, M.A. 等人, Clin Cancer Res. 2009年9月1日; 15 (17) : 5323-37)。已在上皮癌中发现TACA抗原表达, 包括但不限于乳癌、结肠癌、肺癌、膀胱癌、宫颈癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌和肝癌。已经在胚胎癌症中发现TACA抗原表达, 包括但不限于卵黄囊肿瘤和精原细胞瘤。另外, 在各种组织的许多黑色素瘤、癌和白血病中已经发现了TACA抗原表达 (Heimburg-Molinaro 等, Vaccine. 2011年11月8日: 29 (48) : 8802-8826)。靶向一种或多种TACA的本发明的抗体在本文中被称为“抗TACA抗体”。

[0475] MUC1是通常广泛糖基化但在肿瘤细胞中低糖基化的关键细胞表面糖蛋白。MUC1的稀疏糖基化导致免疫原性抗原的暴露。这些可能沿着MUC1核心肽序列或核心碳水化合物残基。这些TACA包括但不限于N-乙酰半乳糖胺 (Tn)、唾液酸($\alpha 2, 6$) N-乙酰半乳糖胺 (STn) 和半乳糖($\beta 1-3$) N-乙酰半乳糖胺 (也称为Thomsen-Friedenreich抗原或TF)。据估计, 所有癌中约80%在MUC1的核心碳水化合物中表达Tn, 其中STn在人癌细胞上强烈表达且与癌症进展和转移相关。除少数例外, Tn和STn在正常健康组织中不表达。唾液酸在STn上形成突出的表位。本发明利用了这样的事实, 即异常的Neu5Gc-STn (GcSTn) 聚糖表达似乎对各种癌具有高度特异性。

[0476] 在MUC1的情况下, 将Neu5Gc并入STn产生肿瘤特异性靶标, 该靶标是用于治疗肿瘤组织的基于抗体的疗法中引人注目的靶标位点。在本发明的一些实施方案中, 聚糖相互作用抗体靶向表达MUC1的癌细胞, 其包括Neu5Gc。迄今为止, 已从多种人癌组织的糖缀合物中检测到Neu5Gc, 包括但不限于结肠癌、视网膜母细胞瘤组织、黑色素瘤、乳癌和卵黄囊肿瘤组织。在本发明的一些实施方案中, 考虑了聚糖相互作用抗体治疗这些形式的癌症以及其它形式癌症的方法, 其它形式癌症在本文未具体列出, 其特征在于存在包含Neu5Gc的癌细胞。

[0477] 已经鉴定出包括聚糖在内的其它抗原, 其表达与癌症相关 (Heimburg-Molinaro, J. 等人, Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. Vaccine. 2011年11月8日; 29 (48) : 8802-26)。这些肿瘤相关碳水化合物抗原包括但不限于血型Lewis相关抗原 (包括但不限于Lewis^Y (Le^Y)、Lewis^X (Le^X)、唾液酸化Lewis^X (SLe^X) 和唾液酸化Lewis^A (SLe^A))、鞘糖脂相关抗原 (包括但不限于Globo H、阶段特异性胚胎抗原-3 (SSEA-3) 和包括唾液酸的鞘糖脂)、神经节苷脂相关抗原 (包括但不限于神经节苷脂GD2、GD3、GM2、岩藻糖基GM1和Neu5GcGM3) 以及聚唾液酸相关抗原。

[0478] 在一些实施方案中, 本发明的治疗剂可以针对Lewis血型抗原。Lewis血型抗原包括通过 $\alpha 1-3$ 连接或 $\alpha 1-4$ 连接与GlcNAc连接的岩藻糖残基。它们可以在糖脂和糖蛋白上找到。Lewis血型抗原可能存在于这些抗原分泌者个体的体液中。它们在红细胞上的出现是由于红细胞从血清中吸收了Lewis抗原。

[0479] 在一些实施方案中, 本发明的治疗剂可以针对Le^Y。Le^Y (也称为CD174) 由Gal $\beta 1$, 4GlcNAc组成, 包括 $\alpha 1, 2-\alpha 1, 3$ 连接的岩藻糖残基, 其产生Fuca (1, 2) Gal β (1, 4) Fuca (1, 3)

GlcNAc表位。它由H抗原通过 $\alpha 1,3$ 岩藻糖基转移酶将 $\alpha 1,3$ 岩藻糖连接到亲本链的GlcNAc残基而合成。 Le^Y 可以在各种癌症中表达,包括但不限于卵巢癌、乳癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌和上皮癌。由于其在正常组织中的低表达水平,以及许多癌症中升高的表达水平, Le^Y 抗原对于治疗性抗体而言是有吸引力的靶标。

[0480] 在一些实施方案中,本发明的治疗剂可以针对 Le^X 。 Le^X 包括表位Gal $\beta 1-4$ (Fuc $\alpha 1-3$) GlcNAc β -R。它也被称为CD15和阶段特异性胚胎抗原-1 (SSEA-1)。利用取自F9畸胎瘤细胞免疫的小鼠的血清,这种抗原首先被认为具有免疫反应性。也发现 Le^X 与特定阶段的胚胎发育相关。癌症存在和不存在的条件下,它也在各种组织中表达,但也可以在乳癌和卵巢癌中发现,在其中仅由癌细胞表达。

[0481] 在一些实施方案中,本发明的治疗剂可以针对 SLe^A 和/或 SLe^X 。 SLe^A 和 SLe^X 分别包括结构Neu5Ac $\alpha 2-3$ Gal $\beta 1-3$ (Fuc $\alpha 1-4$) GlcNAc β -R和Neu5Ac $\alpha 2-3$ Gal $\beta 1-4$ (Fuc $\alpha 1-3$) GlcNAc β -R。它们的表达在癌细胞中上调。血清中存在这些抗原与恶性肿瘤和预后不良相关。发现 SLe^X 主要为粘蛋白末端表位。它在不同癌症中表达,包括乳癌、卵巢癌、黑色素瘤、结肠癌、肝癌、肺癌和前列腺癌。在本发明的一些实施方案中, SLe^A 和 SLe^X 靶标包括Neu5Gc (本文分别称为Gc SLe^A 和Gc SLe^X)。

[0482] 在一些实施方案中,本发明的治疗剂可以针对糖脂和/或存在于糖脂上的表位,包括但不限于鞘糖脂。鞘糖脂包括通过神经酰胺羟基与聚糖连接的脂质神经酰胺。在细胞膜上,鞘糖脂形成被称为“脂质筏”的簇。

[0483] 在一些实施方案中,本发明的治疗剂可以针对Globo H。Globo H是在乳癌细胞中首个鉴定的癌症相关鞘糖脂。Globo H的聚糖部分包括Fuc α (1-2) Gal β (1-3) GalNAc β (1-3) Gal α (1-4) Gal β (1-4) Glc β (1)。虽然在一些正常上皮组织中发现,但已鉴定Globo H与许多肿瘤组织 (包括但不限于小细胞肺癌、乳癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌和子宫内膜癌) 相关联。

[0484] 在一些实施方案中,本发明的治疗剂可以针对神经节苷脂。神经节苷脂是具有一种或更多种唾液酸的鞘糖脂。根据神经节苷脂命名法,G用作神经节苷脂的缩写。该缩写后面跟着字母M、D或T,指的是附着的唾液酸残基的数目 (分别为1、2或3)。最后,数字1、2或3用于表示通过薄层色谱分析时每个迁移的距离顺序 (其中3迁移的距离最远,然后是2,然后1)。已知神经节苷脂参与癌症相关的生长和转移,并且可以在肿瘤细胞的细胞表面上表达。在肿瘤细胞上表达的神经节苷脂可包括但不限于GD2、GD3、GM2和岩藻糖基GM1 (在本文中也称为Fuc-GM1)。在本发明的一些实施方案中,聚糖相互作用抗体针对GD3。GD3是细胞生长的调节因子。在一些实施方案中,使用针对GD3的抗体来调节细胞生长和/或血管生成。在一些实施方案中,使用针对GD3的抗体来调节细胞附着。在本发明的一些实施方案中,聚糖相互作用抗体针对GM2。在一些实施方案中,针对GM2的抗体用于调节细胞与细胞的接触。在一些实施方案中,本发明的神经节苷脂靶标包含一个或多个Neu5Gc残基。在一些实施方案中,这样的靶标可以包括具有Neu5Gc的GM3变体 (在本文中称为GcGM3)。GcGM3的聚糖组分是Neu5Gc $\alpha 2-3$ Gal $\beta 1-4$ Glc。GcGM3是肿瘤细胞的已知成分。

[0485] 在一些实施方案中,通过本发明的抗TACA抗体靶向的TACA可以包括但不限于美国公开号US2013/0236486A1、US2013/0108624A1、US2010/0178292A1、US2010/0104572A1、US2012/0039984A1、US2009/0196916A1和US2009/0041836A1中公开的那些,其每一个的内

容通过引用整体并入本文。

[0486] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗癌症的方法,其包括施用本文教导的抗聚糖抗体或施用这种抗体的组合物(例如具有至少一种赋形剂的抗聚糖抗体的组合物)。

[0487] 在一些实施方案中,本公开的方法包括通过施用一种或多种聚糖相互作用抗体来完全根除肿瘤细胞以诱导持久的初步缓解。其它方法包括在一段时间内抑制肿瘤复发,在一些情况下没有过度的毒性。这样的时间可能从约1个月至约18个月,约1年至约5年,约2年至约10年,或大于10年。

[0488] 癌症中STn

[0489] 免疫系统具有促进抗肿瘤细胞免疫活性的多种机制,包括先天性和获得性免疫活性。如本文所用,术语“抗肿瘤细胞免疫活性”是指免疫系统杀伤或阻止肿瘤细胞生长和/或增殖的任何活性。在某些情况下,抗肿瘤免疫活性包括由自然杀伤(NK)细胞识别和杀伤肿瘤细胞以及巨噬细胞的吞噬作用。获得性抗肿瘤免疫应答包括抗原呈递细胞(APC)(例如树突细胞(DC))的肿瘤抗原摄取和呈递,导致通过分泌肿瘤特异性抗体来调节T细胞抗肿瘤活性和/或B细胞的扩增。肿瘤特异性抗体与肿瘤的结合可导致肿瘤细胞死亡的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)机制。

[0490] 如本文所用,术语“免疫耐受性肿瘤细胞”是指减少或避免抗肿瘤细胞免疫活性的肿瘤细胞。一些研究表明STn(一种已知的TACA)在肿瘤细胞表面表达或者分泌到肿瘤细胞微环境中可以促进肿瘤细胞逃避抗肿瘤免疫活性。如本文所用,术语“肿瘤细胞微环境”是指与肿瘤细胞相邻的或周围的任何区域。这些区域包括但不限于肿瘤细胞之间,肿瘤细胞与非肿瘤细胞之间,细胞外基质周围流体和周围组分之间的区域。

[0491] Ogata等人证明具有STn的唾液酸化粘蛋白可降低肿瘤细胞的NK细胞靶向(Ogata, S.等人,1992.Canc.Res.52:4741-6,其内容通过引用整体并入本文)。该研究发现绵羊、牛和猪颌下存在黏蛋白(分别为OSM、BSM和PSM)导致细胞毒性的近100%抑制(参见Ogata等的表2)。Jandus等人的进一步研究表明,由于可与NK细胞siglec受体相互作用的唾液酸聚糖配体的表达,某些肿瘤细胞可避免NK破坏,从而导致NK抑制(Jandus, C.等人,2014, JCI.pii:65899,其内容通过引用整体并入本文)。

[0492] Toda等人的研究表明STn可以结合B细胞上的CD22受体,导致信号传导减少和B细胞激活降低(Toda, M.等人,2008.Biochem Biophys Res Commun.372(1):45-50,其内容通过引用整体并入本文)。树突状细胞(DC)可以通过调节T细胞活性来影响获得性免疫活性。Carrascal等人的研究发现膀胱癌细胞的STn表达诱导DC的耐受性,降低其在T细胞中诱导抗肿瘤细胞免疫活性的能力(Carrascal, M.A.等,2014.Mol Oncol.pii:S1574-7891(14)00047-7,其内容通过引用整体并入本文)。这些研究揭示了与STn阳性膀胱癌细胞接触的DC显示出具有CD80、CD86、IL-12和TNF- α 低表达的甲状腺生成表达谱。此外,发现DC调节调节性T细胞,使得T细胞具有IFN γ 的低表达和FoxP3的高表达。van Vliet等人和其它人的其它研究表明,巨噬细胞半乳糖型凝集素(MGL)的DC表面表达可导致将这些细胞靶向肿瘤组织(van Vliet, SJ, 2007.Amsterdam:Vrije Universiteit p1-232和van Vliet, S.J.等人, 2008.J Immunol.181(5):3148-55, Nollau, P.等人, 2013.J Histochem Cytochem.61(3):199-205,其全部内容通过引用整体并入本文)。由于MGL相互作用而到达组织的DC可能以三种方式之一影响T辅助(Th)细胞。DC可诱导T细胞耐受,T细胞免疫活性或者效应T细胞的下

调。已显示MGL与AcSTn和GcSTn结合,亲和性已被深入分析(Mortezai,N.等人,2013.Glycobiology.23(7):844-52,其内容通过引用整体并入本文)。有趣的是,肿瘤上的MUC1表达已显示导致T细胞耐受,从而保护肿瘤细胞免于免疫根除。

[0493] 在一些实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体(包括但不限于抗STn抗体)可用于治疗具有表达一种或更多种TACA的一种或更多种肿瘤细胞的受试者。在一些情况下,本发明的聚糖相互作用抗体(包括但不限于抗STn抗体)可用于增加对表达STn的肿瘤细胞的抗肿瘤细胞免疫活性。这种抗体可增加对免疫耐受性肿瘤细胞的获得性免疫应答和/或先天性免疫应答。一些聚糖相互作用抗体可用于增加NK抗肿瘤细胞活性。在某些情况下,这种聚糖相互作用抗体可以阻断NK细胞上表达的聚糖受体和癌细胞上或其周围组织中STn聚糖之间的相互作用。

[0494] 在一些实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体(包括但不限于抗STn抗体)可用于增加B细胞抗肿瘤细胞活性。这类抗体可减少B细胞上的CD22受体与癌细胞上或周围组织中STn聚糖之间的相互作用。Sjoberg等人的研究证明了糖蛋白上 α 2,-6-连接的唾液酸的9-0-乙酰化也降低了B细胞CD22受体和这种糖蛋白之间的相互作用(Sjoberg,E.R.等人,JCB.126(2):549-562)。Shi等人的另一项研究揭示在鼠红白血病细胞上更高水平的9-0-乙酰化唾液酸残基使得这些细胞更容易受补体介导的裂解的影响(Shi,W-X.等人,1996.J of Biol Chem.271(49):31526-32,其内容通过引用整体并入本文)。在一些实施方案中,本发明的抗STn抗体能够选择性地结合非9-0-乙酰化STn,减少总体STn结合,但是降低肿瘤细胞生长和/或增殖(例如,通过提高B细胞抗肿瘤活性和增加补体介导的肿瘤细胞破坏)。在一些实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体(包括但不限于抗STn抗体)可用于增加DC抗肿瘤活性。这种抗体可用于降低对肿瘤细胞的DC耐受性。DC耐受性降低可能包括增加CD80、CD86、IL-12和/或TNF- α 的DC表达。在一些情况下,DC抗肿瘤细胞活性可能包括促进T细胞抗肿瘤细胞活性。这种抗体可以阻止DC MGL与癌细胞之上或周围表达的聚糖之间的结合。

[0495] Ibrahim等人的一项研究提示高水平的抗STn抗体和内分泌疗法可能会增加转移性乳腺癌患者的总生存期和进展时间(TTP)(Ibrahim,N.K.等人,2013.4(7):577-584,其内容通过引用整体并入本文)。在这项研究中,抗STn抗体水平在用连接到钥孔血蓝蛋白(KLH)的STn接种后升高。在一些实施方案中,本发明的抗STn抗体可以与内分泌疗法(例如他莫昔芬和/或芳香酶抑制剂)联合使用。

[0496] 在一些实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体可用于减少或消除表达STn的癌细胞和/或细胞。这样的细胞包括可能是肿瘤一部分的细胞。

[0497] 在一些情况下,本发明提供了通过向患有的一种或更多种肿瘤的受试者施用本发明的抗聚糖抗体来减少肿瘤体积的方法。通过比较治疗前后受试者的肿瘤体积,或通过比较抗聚糖抗体治疗的受试者和对照治疗的受试者之间的肿瘤体积来确定肿瘤体积的减少。

[0498] 在一些情况下,可以施用本发明的抗聚糖抗体以达到期望的受试者肿瘤体积百分比降低。这可以通过确定在用抗聚糖抗体治疗之前和之后受试者中一个或多个肿瘤的体积(例如通过使用卡尺或者成像技术如CT扫描),然后根据两个值计算肿瘤体积减少的百分比来评估。在一些实施方案中,用抗聚糖抗体治疗的受试者的肿瘤体积可以减少约0.1%至约2%、约1%至约5%、约3%至约12%、约10%至约30%、约20%至约50%、约40%至约60%、约50%至约75%、约60%至约85%、或约80%至约99%。在一些情况下,用抗聚糖抗体

治疗的受试者的肿瘤体积可以减少至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少40%、至少50%、至少60%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%。

[0499] 在一些情况下,可以施用本发明的抗聚糖抗体以实现期望的肿瘤生长抑制百分比(%T/C)。通过确定经治疗的受试者的肿瘤体积并将它们与未治疗或安慰剂治疗受试者的肿瘤体积进行比较来计算%T/C。在一些实施方案中,本发明提供了通过施用抗聚糖抗体来减少受试者的肿瘤体积的方法,其中%T/C为约0.1%至约1%、约0.5%至约5%、约2%至约20%、约3%至约16%、约10%至约30%、约20%至约60%、或约40%至约80%。在某些情况下,%T/C至少为80%。在一些情况下,%T/C小于0.1%。

[0500] 在一些实施方案中,基于其结合细胞表面聚糖(例如STn)的能力和/或其杀伤癌细胞的能力,可以选择用于减少受试者肿瘤体积的抗体。在一些情况下,可以基于其结合具有细胞表面STn的细胞的半数最大有效浓度(EC_{50})来选择抗体。例如通过用流式细胞术分析具有细胞表面STn的细胞,可以确定这些抗体的 EC_{50} 值。这样的抗体可具有约0.1nM至约2nM、约0.5nM至约5nM、约1nM至约10nM、约5nM至约20nM或约10nM至约30nM的 EC_{50} 值。

[0501] 在一些实施方案中,本发明提供了通过施用一种或更多种本文所述抗体来杀伤癌细胞(例如肿瘤细胞)的方法。

[0502] 在一些实施方案中,本公开提供了通过分离癌细胞(包括但不限于癌症干细胞)和/或从受试者获得活检材料并筛选癌细胞和/或活检材料的STn表达鉴定需要抗STn抗体治疗的受试者的方法。根据这些方法,具有表达STn的癌细胞和/或活检材料的受试者被认为可能受益于抗STn抗体治疗或需要抗STn抗体治疗(例如用本文所述的一种或更多种抗体治疗)。在一些情况下,本文所述的抗体可用于筛选癌细胞和/或活检材料。可以通过培养癌细胞并使用标准免疫学测定法(例如ELISA、Western印迹或其它标准免疫学测定法)检测STn表达来体外筛选癌细胞。在一些情况下,可以使用流式细胞术技术筛选癌细胞的STn表达。在其它实施方案中,癌细胞可以在培养物中生长并且在用抗STn抗体(抗体-药物缀合物(ADC))治疗后测试活力。这样的ADC可以包括细胞毒素剂,包括但不限于本文所述的那些。细胞毒剂可以包括MMAE。抗STn抗体可以包括人源化抗体,包括但不限于本文所述的那些。在其它实施方案中,可以通过使用癌细胞在鼠(例如NOD/SCID鼠)中形成肿瘤来筛选癌细胞。通过制备来自这些肿瘤的组织切片,并且使用抗STn抗体(包括但不限于本文所述的抗STn抗体)对组织切片进行免疫组织化学分析来筛选在鼠中发展的肿瘤。在一些情况下,可以评估鼠中形成的肿瘤中用抗STn抗体治疗鼠后的肿瘤体积变化,包括但不限于本文所述的抗STn抗体。这些抗STn抗体可以包含ADC。ADC可以包括一种或更多种细胞毒性剂,包括但不限于本文所述的任何一种(例如MMAE)。筛选后表现出STn表达的癌细胞的受试者可以确定需要抗STn抗体治疗。

[0503] 在一些实施方案中,本公开通过从受试者中分离癌细胞(包括但不限于癌症干细胞),筛选癌细胞的STn表达,并使表达STn的癌细胞与一种或更多种STn特异性候选抗体接触,以确定一种或更多种候选抗体中的任一种是否能够结合癌细胞,提供了鉴定适合治疗癌症的抗体的方法。如本文所用,术语“候选抗体”是指为了一个或更多个目的进行评估的抗体或抗体组之一。可以通过培养癌细胞并使用标准免疫学测定(例如ELISA、Western印迹或其它标准免疫学测定法)或使用流式细胞术技术,用STn检测抗体检测STn表达,来体外筛选受试癌细胞。如本文所用,术语“STn-检测抗体”是指结合STn并允许通过存在掺入的可检

测标记或通过使用具有可检测标记的二抗来观察这种结合的抗体。在其它实施方案中,筛选癌细胞可涉及使用它们在小鼠(例如NOD/SCID小鼠)中形成肿瘤。可以通过评估小鼠肿瘤的STn表达或者施用抗STn抗体后的体积减少来进行筛选,所述抗STn抗体包括但不限于ADC。

[0504] 在一些实施方案中,本发明包括通过从受试者获得癌细胞,使用癌细胞在小鼠(例如NOD/SCID小鼠)中形成肿瘤,向小鼠施用抗STn抗体并测量小鼠中肿瘤体积的变化,评估抗体用于治疗受试者癌症的适合性的方法,其中如果小鼠中的肿瘤体积减小,则确定抗STn抗体适合于治疗受试者中的癌症。在一些情况下,多次施用抗STn抗体。根据这样的方法,可以每小时,每天,每周,每月和/或每年施用抗体。在一些情况下,每周施用抗体持续约2周至约12周的时间。在一些情况下,每周施用抗体持续至少12周的时间。

[0505] STn表达涉及促进癌细胞的转移潜能。根据一些公开的方法,聚糖相互作用抗体可用于减少转移。这种方法可包括将转移减少约1%至约15%、约5%至约25%、约10%至约50%、约20%至约60%、约30%至约70%、约40%至约80%、约50%至约90%、约75%至约95%、或至少95%。

[0506] 作为治疗靶标的癌症干细胞

[0507] 癌症干细胞或者CSC(也称为肿瘤起始细胞)是异源肿瘤群体内驱动原发和转移肿瘤的起始、生长、播散和复发的癌细胞子集(Karsten和Goletz, SpringerPlus, 2013, 2, 301),其可以根据肿瘤类型以总人口的不同比例发生。CSC由于其自我更新能力而区别于终末分化的细胞,并产生非CSC分化后代(Gupta等, Nature medicine, 2009, 15, 1010-1012)。这些特性类似于正常干细胞的特性。正常干细胞和CSC之间的这种区别对治疗具有重要意义。

[0508] 已经鉴定了越来越多的细胞表面生物标志物,其目的在于将CSC与它们的非CSC对应物区分开(Medema等, Nature cell biology, 2013, 15, 338-344; Zoller, Cancer, 2011, 11, 254-267)。这些可能包括但不限于CD44、CD133、CD117和醛脱氢酶同种型1(ALDH1)。尽管其中一些来源于小鼠肿瘤和人细胞系的研究,但其它已经使用原发性人肿瘤样本进行了验证。其中之一,跨膜CD44糖蛋白或透明质酸受体是众所周知的多种肿瘤类型的组成部分,最近也被发现在人癌症中被接受为真正的CSC标志物,并且事实上是最常见的之一(Lobo等, 2007, 23, 675-699)。

[0509] CD44以几种变体同种型的形式存在,其由全长CD44基因的20个外显子和19个内含子中发生的替代剪接事件产生(Williams等人, Experimental biology and medicine, 2013, 238, 324-338)。越来越多的实验证据表明支持CD44及其变体在促进CSC先天性转移和药物耐受性表型中的作用(Negi等, Journal of drug targeting, 2012, 20, 561-573),部分是由于调节细胞内的信号传导途径(Williams等人, Experimental biology and medicine, 2013, 238, 324-338)。此外,显示高水平CD44细胞的三阴性乳腺癌患者以及几种其它类型的癌症已知具有不良预后和更高的死亡率(Negi等, Journal of drug targeting, 2012, 20, 561-573)。这些观察结果支持了这样的观点,除了成熟癌细胞之外,靶CD44还提供通过抑制或消除CSC来治疗癌症的手段。实际上,已经实验性尝试了多种靶向CD44的方法,取得了不同程度的成功。这些包括广泛的技术,包括使用缀合和未缀合的抗体、纳米载体药物系统和透明质酸缀合药物(Negi等, Journal of drug targeting, 2012, 20, 561-

573)。然而,在一些情况下,在体内研究中观察到毒性作用;除了存在于靶向的CSC和成熟肿瘤细胞的表面之外,这些不利的副作用可能归因于大多数脊椎动物细胞膜上广泛存在CD44和变体(Naor等人,Seminars in cancer biology,2008,18,260-267)。作为正常人干细胞组成成分的CD44蛋白,靶向CD44蛋白(Williams等人,Experimental biology and medicine,2013,238,324-338)也可能损害正常的干细胞功能(Leth-Larsen等,Molecular medicine,2012,18,1109-1121)。尽管大量研究指出了靶向CSC以及成熟肿瘤细胞上的CD44蛋白的可取性,但是该方法的内在问题是在抑制剂设计中仍然存在困难,所述抑制剂将忽略(spare)正常组织以及正常干细胞。

[0510] 另一个众所周知的与CSC生物学有关的肿瘤抗原是上皮粘蛋白MUC1(一种膜锚定糖蛋白),其在大部分腺癌上以高水平差异表达,但是在正常上皮细胞上低水平或完全不表达。最近,MUC1被鉴定为包括乳癌和胰腺癌在内的多种瘤形成的CSC生物标志物(Engelmann等,Cancer research,2008,68,2419-2426),其表达与高转移和不良预后相关。作为CSC的组分,MUC1已显示在细胞粘附、增殖、存活和信号传导中起作用(Engelmann等人,Cancer research,2008,68,2419-2426),并且也可以与CD44共表达(Leth-Larsen等,Molecular medicine,2012,18,1109-1121)。在癌症中靶向MUC1的免疫治疗方法正在使用疫苗以及其它方法进行,但主要在成熟癌细胞治疗的背景下进行(Julien等,Biomolecules,2012,2,435-466;Acres等,Expert review of vaccines,2005,4,493-502)。

[0511] 已经推测,通过在转移位点发生的上皮-间质(EMT)转变(Gupta等人,Nature medicine,2009,15,1010-1012)和/或反过来间充质-上皮(MET)转变而产生癌症干细胞(Leth-Larsen等,Molecular medicine,2012,18,1109-1121)(也称为CSC可塑性,其中非CSC可产生CSC)。该发现进一步强调需要消除肿瘤群体中的CSC和非CSC。

[0512] 最近用富含CSC的群体进行的研究表明,与大多数肿瘤不同,这些细胞相对静止并且优选耐受多种类型的现有疗法,包括化学治疗和放疗(Leth-Larsen等,Molecular medicine,2012,18,1109-1121)。因此,目前的治疗策略靶向肿瘤的非CSC组分,使得CSC在很大程度上不受影响,只是在适当的治愈(cues)之后再次出现在初始部位重新形成复发性原发性肿瘤,或者扩散至远处部位、定居并产生转移性疾病(导致癌症死亡率的主要原因)。

[0513] 当前对癌症干细胞性质的理解明确强调,不仅需要如现有实践中那样靶向存在于肿瘤中的大量细胞,而且还需要靶向CSC区室以潜在地实现完全治愈。

[0514] 如上所述,基于肿瘤相关生物标志物(包括CSC)开发的策略面临的挑战是大多数癌症生物标志物也存在于包括正常干细胞的正常细胞中。靶向蛋白生物标志物以消除CSC的治疗也可以靶向正常干细胞,引起正常细胞的消除。

[0515] CSC中的肿瘤特异性聚糖

[0516] 异常形式的糖基化在许多人癌症中已有描述,包括出现Thomsen-nouveau (Tn) 抗原(GalNAc-0-Ser/Thr)将聚糖鉴定为适用于特定肿瘤靶标的全新类别的肿瘤-相关碳水化合物抗原(Rabu等人,Future oncology,2012,8,943-960)。Tn的唾液酸化衍生物(STn)的形成由唾液酸化转移酶ST6GalNAc-I介导,其将唾液酸添加至 $\alpha 2,6$ 连接形成Tn抗原。STn的唾液酸化防止了进一步的糖添加,从而截断了进一步的聚糖延伸(Schultz等,Cancer metastasis reviews,2012,31,501-518)。

[0517] 虽然STn在正常成人组织中的存在是罕见的,但STn存在于各种人癌症中,包括卵

巢癌、膀胱癌、乳癌、宫颈癌、结肠癌和肺癌等 (Ferreira等, *Molecular oncology*, 2013, 7, 719-731; Kinney等, *Cancer*, 1997, 80, 2240-2249)。此外, 肿瘤中STn的存在与转移性疾病、预后不良和总体存活率降低相关 (Ferreira等, *Molecular oncology*, 2013, 7, 719-731; Kinney等, *Cancer*, 1997, 80, 2240-2249); 因此, STn被认为是癌症检测和治疗中非常有吸引力的靶标。有两种不同形式的唾液酸-Neu5Ac和Neu5Gc-位于STn的末端位置。由于CMP-Neu5Ac羟化酶 (CMAH) 基因无活性, 人不能合成Neu5Gc, 因此Neu5Ac-唾液酸化形式在人中占主导地位。然而, 消耗富含Neu5Gc的食物导致外源Neu5Gc掺入人细胞, 特别是在癌中。先前的研究显示实体瘤吸收并表达Neu5Gc形式的唾液酸 (Inoue等, *Glycobiology*, 2010, 20, 752-762; Malykh等, *Biochimie*, 2001, 83, 623-634; Padler-Karavani等人, *Cancer research*, 2011, 71, 3352-3363)。与作为潜在癌症靶标的STn糖基同种型结合的mAb: Neu5Ac-STn (AcSTn) 和Neu5Gc-STn (GcSTn) (即指定为泛STn抗体)。

[0518] STn积累与在实体瘤中重复观察到的特定体细胞突变相关, 并与编码分子伴侣核心1 β 3-半乳糖基转移酶特异性分子伴侣 (COSMC) 的基因失活相关, 其是形成活性T-合酶所需的 (Ju等人, *Nature*, 2005, 437, 125)。T-合酶与ST6GalNAc-I竞争GalNAc底物, 因此当通过突变失活时导致STn合成增加。此外, STn积累还可由经常观察到的ST6GalNAc-I表达增加引起 (Brockhausen等, *Biological chemistry*, 2001, 382, 219-232; Ikehara等, *Glycobiology*, 1999, 9, 1213-1224)。STn的从头表达可调节癌细胞, 改变恶性表型, 并导致更具侵袭性的细胞行为 (Pinho等, *Cancer letters*, 2007, 249, 157-170)。因此, STn不仅是有趣的癌症生物标志物和治疗靶标, 而且对STn功能的干扰为实现显著的功能性抗转移治疗益处提供了有吸引力的潜力。

[0519] 虽然众所周知细胞糖蛋白的糖基化在癌症中发生改变, 但似乎异常的糖基化对于所讨论的糖蛋白和聚糖都是选择性的。事实上, 在人肿瘤CSC中, 仅CD44和MUC1是STn抗原的主要携带者 (Cazet等人, *Breast cancer research: BCR*, 2010, 12, 204; Julien等人, *Glycobiology*, 2006, 16, 54-64), 这直接表明选择性方法不仅靶向成熟的肿瘤细胞, 而且也靶向CSC。然而, MUC1是一些上皮细胞的正常表面成分, 在上皮细胞上其发挥屏障功能, 肿瘤相关MUC1特征在于, 按照和成熟癌细胞中观察到的相同方式, CSC上的低糖基化和增加的唾液酸化, STn作为CSC和成熟肿瘤细胞的特异性标志物 (Curry等, *Journal of surgical oncology*, 2013, 107, 713-722)。MUC1的异常寡糖谱引起新标志物的表达, 例如癌细胞 (例如CSC) 中的唾液酸化-Le^a (用于CA19-9测试)、唾液酸化-Le^x和唾液酸化-Tn (TAG-72) 以及隐蔽表位例如Tn。此外, 由于低糖基化, 粘蛋白的肽核心暴露, 使得核心内的表位 (正常组织来源的MUC1内不可获得) 可充当潜在的抗原。

[0520] 目前靶向STn的临床方法仅由STn疫苗组成。进展最快的临床候选是Theratope, 一种由偶联到匙孔血蓝蛋白的STn组成的治疗性疫苗。在体内小鼠研究中, Theratope免疫诱导有效的抗体应答, 其显示介导注射的表达STn的乳癌细胞的生长延迟 (Julien等, *British journal of cancer*, 2009, 100, 1746-1751)。然而, Theratope在转移性乳癌的III期临床试验中未能达到其主要终点。为什么Theratope试验未能达到其主要终点的主要假设是患者人群在入选前未评估STn表达。由于STn在乳癌中的表达在患者之间高度异质性, 根据研究和检测方法, 范围从25%-80%不等, 因此缺乏将STn表达与应答相关联的能力可能已经掩盖了Theratope的任何益处。重要的是, 接受激素疗法的患者亚组与单纯激素疗法相比, 用

Theratope治疗时中位总生存期显著增加7.5个月(Ibrahim等,Journal of clinical oncology:美国临床癌症学会的官方杂志,2004,22,2547;以及Miles等,The oncologist,2011,16,1092-1100),验证了在特定患者群体中靶向STn的治疗潜力。此外,由于疫苗接种患者的免疫应答往往差异很大,疫苗接种方法缺乏控制或调节抗体滴度的能力,导致患者中治疗性抗体暴露的范围很宽。尽管如此,Theratope具有很好的耐受性并具有最小的毒性,表明靶向STn用于癌症治疗的安全性。

[0521] 对癌细胞中STn表达的分子基础的日益了解强烈表明,在任何细胞表面蛋白上表达STn的细胞还将在许多(如果不是全部的话)其它O糖基化细胞表面蛋白上表达STn,使其成为优异的广泛分布的癌症相关治疗靶标。因此,STn阳性癌细胞群可以富集CSC。此外,最近的数据表明,废除STn表达使得癌症具有较小的侵袭性,转移行为显著降低(Gill等人,Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 2013,110,E3152-3161)。

[0522] 靶向CSC的抗STn抗体作为癌症治疗

[0523] 几种抗STn抗体已经在本领域得以描述,但是一些对STn抗原或唾液酸化同种型表现出低特异性。例如,商业B72.3抗STn抗体已经显示不仅与STn结合,而且与Tn抗原结合(Bapat,S.A.(2010)Human ovarian cancer stem cells.Reproduction 140,33-41)。靶向STn的单克隆抗体(mAb)或缀合有细胞毒性有效载荷(例如,抗体药物缀合物(ADC))的可用性为具有表达STn的肿瘤的癌症患者显著治疗益处提供了潜能,其中所述抗体经工程改造以诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。此外,这种抗体还可用于伴随诊断的开发,以预先选择最有可能对治疗有响应的患者。

[0524] STn通常存在于一个或多个CSC表面抗原上,并且它们一起用于促进与CSC相关的干性和化学耐受性性质。因此,抗STn抗体提供CSC相关癌靶向试剂,其不仅具有可通过直接参与和/或ADCC直接杀伤CSC的能力,而且还为结合广泛阵列的细胞表面蛋白提供独特的机会,并干扰对于CSC活力、自我更新和复制必不可少的相关功能。

[0525] 如本文讨论的,靶向在CSC上的STn基本理由和优势可能包括:(1)在肿瘤中很多肿瘤特异性截短糖蛋白携带STn;(2)无论增殖状态如何,在CSC和成熟肿瘤细胞中,STn是独特的聚糖靶标,其优先表达于CD44、MUC1及潜在的其它重要细胞表面标志物上,从而允许通过单一治疗剂靶向这两种肿瘤组分;(3)STn也是CA-125的组分,一种卵巢癌等的生物标志物;(4)STn是卵巢CSC标志物CD44的组分。因此,使用泛STn鼠mAb借助共同的表位将结合并且杀伤或者损害CSC的功能,而非CSC肿瘤细胞,其中所述mAb靶向包含Tn连接的唾液酸Neu5Ac和Neu5Gc两种形式的表位。

[0526] 在一些实施方案中,本发明提供了用于特异性消除人CSC以及成熟肿瘤细胞的新型抗泛STn mAb。在本发明的一个方面中,抗STn抗体将靶向经确认的STn聚糖本身-并非特定的糖肽或载体蛋白,其应在CSC和非CSC肿瘤群上提供与CD44、MUC1或其它STn-糖基化标志物结合的广泛潜能。在一些实施方案中,本公开的聚糖相互作用抗体可用于靶向具有一个或多个相关聚糖的干细胞相关蛋白。如本文所用,术语“干细胞相关蛋白”是指与一种或更多种干细胞相关的任何蛋白。这种蛋白可以包括但不限于细胞表面蛋白、标志物、细胞内蛋白、转录因子和涉及影响干细胞存活、生长、复制和/或维持的细胞信号传导的蛋白。在某些情况下,这种聚糖包括STn。干细胞相关蛋白可包括但不限于Notch、Hedgehog、CD44、

CD117、CD133和整联蛋白。

[0527] 鉴于靶向肿瘤相关STn的专门特异性,本发明可以避免正常组织,包括正常成体干细胞,从而允许出色的治疗窗口。

[0528] 根据本发明,本文提供了旨在通过消除肿瘤区室内包含的CSC和成熟癌细胞来消除人瘤形成的独特免疫治疗方案。本发明提供特异性靶向肿瘤的疗法和方法,其现在包括靶向CSC,并且因此通过这些潜在靶标的靶向相关肿瘤特异性碳水化合物部分而扩大治疗窗口。通过靶向癌症组织(包括癌症干细胞)中独特存在的肿瘤相关细胞表面唾液酸化Tn抗原(STn)结构,特异性地赋予了消除。

[0529] 卵巢CSC

[0530] 卵巢癌是2013年在美国影响女性的主要妇科癌症。估计22,240名妇女将被诊断患有此病,14030名患者将死于此病,这使其成为美国女性相关癌症死亡和最致命的妇科恶性肿瘤的第五大原因(Siegel等人,Cancer statistics,2013.CA:a cancer journal for clinicalians 63,11-30)。这种高死亡率可归因于无症状发作、晚期初始诊断、这类癌症的侵袭性以及普遍缺乏治疗上可靶向的遗传变化。目前的护理标准是肿瘤减灭,然后是紫杉烷和铂基化学治疗。虽然这种初始治疗导致约70%的患者达到初始完全临床应答,但这些患者中的大多数将不幸地复发有化学耐受性疾病(Foster等,Cancer letters,2013,338,147-157;和McCann等,PloS one,2011,6,e28077)。与其它癌症类型一样,复发性疾病部分归因于CSC在总肿瘤群体内的存在。实际上,卵巢CSC已被鉴定并显示对化学治疗和放疗有耐受性(Burgos-Ojeda等,Cancer letters,2012,322,1-7)。因此,与其它形式的癌症一样,在肿瘤群体中消除CSC以及成熟细胞为治疗复发性疾病并理想地实现治愈提供了最好的希望。

[0531] 在本发明的一些实施方案中,卵巢CSC可以作为卵巢癌治疗的靶标。尽管CD133是最广泛研究的推测卵巢CSC标志物,但已经认识到CD44(如上所述STn的已知载体)与卵巢癌相关,并且被纳入一组鉴定卵巢CSC的标志物中(Zhang等人,Cancer research,2008,68,4311-4320;Foster等,Cancer letters,2013,338,147-157;和Zoller,Cancer,2011,11,254-267)。此外,STn在已知的卵巢癌生物标志物CA-125(MUC16)以及MUC1上表达,其中这些STn相关粘蛋白血清中的水平最近已被用作进一步区分癌性与良性卵巢疾病。在约50%的卵巢癌患者中出现STn血清水平升高并且与较低的5年存活率相关(Kobayashi等人,Journal of clinical oncology:美国临床癌症学会的官方杂志,1991,9,983-987;Kobayashi等人,Journal of clinical oncology:美国临床癌症学会的官方杂志,1992,10,95-101;以及Chen等人,Journal of proteome research,2013,12,1408-1418)。最后,Vathipadiekal等人在人原发性卵巢癌CSC和非CSC群体之间差异基因表达的研究中,发现生成STn的唾液酸转移酶ST6GalNAc-1的表达在两个区室的细胞中没有差异。

[0532] 在一些实施方案中,本发明提供了用于靶向CSC的抗体,以预防控制或治愈与CSC相关的癌症。这类抗体可包括抗STn抗体,包括但不限于国际申请号PCT/US14/60079中描述(或衍生自任何所述那些)的那些中的任一种,其内容以引用的方式整体并入本文。其它抗STn抗体可包括抗体3F1(SBH Sciences,Natick,MA)或其衍生物,包括具有来自3F1的CDR的重组抗体和/或人源化衍生物。

[0533] 在一些实施方案中,本发明的抗体可用于靶向对其它形式的治疗具有耐受性的卵

巢癌干细胞。这些治疗可能包括化学治疗。化疗治疗可以包括本文所述的任何治疗,并且可以包括但不限于用卡铂和/或紫杉醇治疗。靶向化学治疗耐受性卵巢癌干细胞的方法可以利用化疗治疗后发生的卵巢癌干细胞中细胞表面聚糖表达的变化。在一些情况下,化学治疗耐受性卵巢癌干细胞在化疗治疗之前和/或之后表达STn。化疗治疗后,一些化学治疗耐受性卵巢癌干细胞可能增殖,导致表达一种或更多种细胞表面聚糖(例如STn)的肿瘤细胞群,所述细胞表面聚糖将这些细胞与周围细胞相区分。通过靶向这些区别性聚糖,可以使用抗聚糖抗体来杀伤这些卵巢癌干细胞的群体,所述抗聚糖抗体包括但不限于本文所示的抗体。在一些情况下,可以提供抗STn抗体。这样的抗体可以包括但不限于本文所述的任何抗体。在一些情况下,这样的抗体可以具有至少一个人或人源化的可变结构域。在一些实施方案中,在用卡铂和/或紫杉醇治疗后,可以用本发明的抗STn抗体治疗带有一种或更多种化学治疗耐受性卵巢癌干细胞的受试者。

[0534] 结肠直肠癌

[0535] 结肠直肠癌(CRC)具有第四大发病率,目前是美国癌症相关死亡的第三大原因。目前,20%的患者被诊断为转移性疾病,大约50%的CRC患者最终会发生转移。对于确诊为转移性疾病的患者,5年生存率为13.1%。在转移性结肠癌(mCRC)患者中,优先使用治疗性抗体(例如单克隆抗体),例如抗表皮生长因子受体(EGFR)单克隆抗体和抗VEGF单克隆抗体。

[0536] 在一些实施方案中,本公开的聚糖相互作用抗体可用于治疗CRC和/或mCRC。在一些情况下,这种聚糖相互作用抗体是抗STn抗体,包括但不限于本文所述的任何抗体。用于治疗CRC和/或mCRC的聚糖相互作用抗体可以与细胞毒剂(例如MMAE和MMAF)缀合。聚糖相互作用抗体可以与其它疗法例如与化学治疗剂(例如氟嘧啶、奥沙利铂和/或伊立替康)和/或与治疗性抗体(例如贝伐单抗和/或抗EGFR)的疗法组合使用。

[0537] 根据一些实施方案,用于治疗结肠直肠癌的聚糖相互作用抗体可以以约0.5mg/kg至约20mg/kg的剂量施用。例如,抗体可以以约0.5mg/kg至约2mg/kg,约1mg/kg至约5mg/kg,约2.5mg/kg至约10mg/kg或者约5mg/kg至约20mg/kg的剂量施用。

[0538] 联合的癌症疗法

[0539] 在一些实施方案中,本发明的化合物和组合物可以与一种或更多种其它形式的癌症治疗组合。在一些情况下,这些其它形式可以包括化疗治疗。因此,本发明的一些方法包括通过向患有癌症的受试者施用至少一种化学治疗剂并施用聚糖相互作用抗体来治疗癌症的方法。这种抗体可以包括本文所述的抗STn抗体。

[0540] 如本文所用,术语“化学治疗”是指使用化学物质进行治疗的形式。这种化学物质在本文中被称作“化学治疗剂”。在癌症治疗中,化学治疗剂是减慢或阻止癌细胞增殖的药剂。

[0541] 在一些实施方案中,本发明的化学治疗剂可以是核酸拮抗剂。这些试剂主要影响增殖细胞,例如癌细胞,并且通常通过破坏DNA修复和/或合成而起作用。在一些情况下,核酸拮抗剂是烷化剂(例如双功能烷化剂或单官能烷化剂)。烷化剂是可用于破坏分裂细胞中的DNA合成的反应性化合物。本发明的烷化剂可以包括但不限于环磷酰胺、氮芥、苯丁酸氮芥、美法仑、达卡巴嗪、亚硝基脲和替莫唑胺。

[0542] 在其它实施方案中,本发明的核酸拮抗剂可以包括蒽环霉素。蒽环霉素是破坏核酸合成的细菌衍生化合物。本发明的蒽环霉素可以包括但不限于柔红霉素、多柔比星、表柔

比星、伊达比星、米托蒽醌和戊柔比星。在一些实施方案中，蒽环霉素可以被脂质体包封。

[0543] 在进一步的实施方案中，核酸拮抗剂可以是组蛋白脱乙酰酶抑制剂和/或拓扑异构酶抑制剂。这些抑制剂可以防止DNA合成和修复所必需的DNA超螺旋变化。拓扑异构酶I的抑制剂可以包括但不限于伊立替康和拓扑替康。拓扑异构酶II的抑制剂可以包括但不限于依托泊苷、替尼泊苷和塔夫糖苷。组蛋白脱乙酰酶抑制剂可以包括但不限于伏立诺他和罗米地辛。

[0544] 在一些实施方案中，本发明的核酸拮抗剂可以包括核苷酸类似物和/或核苷酸前体类似物。增殖细胞需要在产生的子细胞中将核苷酸掺入核酸中。核苷酸类似物可能破坏这些核酸的形成，或者使它们失去功能。本发明的核苷酸类似物可以包括但不限于阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡培他滨、去氧氟尿苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、巯嘌呤、甲氨蝶呤和硫鸟嘌呤。在一些实施方案中，甲酰四氢叶酸与核苷酸类似物一起施用以增强它们的作用和/或减少有害的副作用。

[0545] 在一些实施方案中，本发明的核酸拮抗剂是基于铂的试剂。这些试剂通过交联核酸来破坏它们。本发明的基于铂的试剂可以包括但不限于奥沙利铂、顺铂和卡铂。

[0546] 在一些情况下，本发明的化学治疗剂包括细胞骨架破坏剂。积极分裂的细胞经历可能被这些化合物破坏的主要细胞骨架变化。本发明的细胞骨架破坏剂可包括但不限于长春花生物碱、埃坡霉素、紫杉醇、ABRAXANE® (注射用悬浮液的紫杉醇蛋白结合颗粒) 和多西他赛。

[0547] 尽管对靶向增殖癌细胞有效，但化学治疗剂也常常影响一些非癌细胞。正因为如此，它们的施用通常受剂量、治疗时间长度或治疗区域的限制。此外，因为化学治疗剂主要影响增殖细胞，所以非增殖性癌症干细胞在治疗后可保持存活并能够重新形成癌细胞。因此，在一些实施方案中，本发明的方法包括治疗癌症的方法，其中首先将至少一种化学治疗剂施用至患有癌症的受试者，接着施用聚糖相互作用抗体。在某些情况下，选择聚糖相互作用抗体来靶向化学治疗耐受性细胞相关的特异性细胞表面聚糖。如本文所用，术语“化学疗法耐受性”用于指细胞不受化疗治疗影响或对化疗治疗的易感性有限。

[0548] 靶向化学治疗耐受性细胞 (例如化学治疗耐受性癌症干细胞) 的方法可以利用这些细胞中化疗治疗后发生的STn表达的变化。在一些情况下，化学治疗耐受性细胞在化疗治疗之前和/或之后表达STn。在一些情况下，化学治疗耐受性细胞中的细胞表面STn表达可能在化学治疗后增加 (例如由于参与STn合成的因子 (例如STnGalNAc I、T-合酶或者Cosmc) 的表达改变、降低的降解或导致细胞表面STn表达增加其它机制)。化疗治疗后，一些表达细胞表面STn的化学治疗耐受性细胞可能增殖，产生对化学治疗耐受性的表达STn的肿瘤细胞的群体。在一些实施方案中，抗STn抗体可用于靶向化学治疗耐受性细胞。在某些情况下，这些细胞是癌症干细胞。因此，本发明的方法可以包括施用抗STn抗体以靶向在施用一种或更多种化学治疗剂之后存在的表达STn的化学治疗耐受细胞的方法。

[0549] 化学治疗耐受细胞上细胞表面聚糖的鉴定可以通过在化疗治疗后分析化学治疗耐受细胞以鉴定细胞表面聚糖来进行，其中所述细胞表面聚糖将这些细胞与周围细胞区分开。在一些实施方案中，这类细胞表面聚糖可以包括但不限于粘蛋白相关抗原 (包括但不限于Tn、STn和Thomsen-Friedenreich抗原)、血型Lewis相关抗原 (包括但不限于Lewis^Y (Le^Y)、Lewis^X (Le^X)、唾液酸化Lewis^X (SLe^X) 和唾液酸化Lewis^A (SLe^A)、鞘糖脂相关抗原 (包括但不

限于Globo H、阶段特异性胚胎抗原-3 (SSEA-3) 和包括唾液酸的鞘糖脂)、神经节苷脂相关抗原(包括但不限于神经节苷脂GD2、GD3、GM2、岩藻糖基GM1和Neu5GcGM3)以及聚唾液酸相关抗原。国际公开号W02015054600中描述了许多这样的抗原,其内容以引用方式整体并入本文。为了鉴定化学治疗后剩余的癌症干细胞上表达的细胞表面聚糖而进行的分析可以根据本领域已知的任何方法进行。在一些情况下,使用一种或更多种免疫学测定法(例如免疫组织化学分析、ELISA分析、流式细胞分析、抗体阵列或质谱法),通过获得组织样本并评估组织样本中细胞表面聚糖的表达来进行这种分析。

[0550] 在一些实施方案中,分析化学治疗耐受性细胞以评估细胞表面STn的表达水平。这可以通过获得组织样本和分析样本的细胞表面STn表达来进行(例如,使用一种或更多种免疫学测定(例如免疫组织化学分析、ELISA分析、流式细胞分析、抗体阵列或质谱法)。在化学治疗耐受性细胞表达STn的情况下,施用化学治疗剂后可以向受试者施用抗STn抗体。

[0551] 在一些实施方案中,通过使肿瘤与至少一种化学治疗剂接触,将一种或更多种肿瘤引发(prime)以使用一种或更多种聚糖相互作用抗体进行治疗。根据这样的实施方案,引发肿瘤用于聚糖相互作用抗体的治疗是指减少肿瘤中的增殖细胞,留下一个或更多个化学治疗耐受性肿瘤细胞。根据这种方法,通过消除用一种或更多种化学治疗剂治疗后残留的化学治疗耐受性细胞,聚糖相互作用抗体可用于进一步减少肿瘤体积。

[0552] 在施用一种或更多种化学治疗剂之后聚糖相互作用抗体的施用,可以在用一种或更多种化学治疗剂治疗后约1天至约1年进行(例如约1天至约10天、1周至约4周、约2周至约10周、约1个月至约3个月、约2个月至约6个月、或约3个月至约12个月)。在一些情况下,可以在用一种或更多种化学治疗剂治疗后至少1年进行聚糖相互作用抗体的施用。

[0553] 在一些实施方案中,用一种或更多种化学治疗剂多轮施用之后,施用聚糖相互作用抗体(例如2轮、3轮、4轮、5轮、6轮、7轮、8轮、9轮、10轮或至少10轮)。在一些情况下,重复几轮治疗,直到组织分析显示癌细胞和/或化学治疗耐受性细胞减少或消除。

[0554] 可根据接受治疗的受试者的大小调整化学治疗剂的剂量。在一些实施方案中,剂量包括由Calvo等人2014描述的那些(Calvo,E.等人,2014.Chemotherapeutic agents and their uses,dosages,and toxicities.Cancer Network.p1-12)。在某些情况下,根据被治疗患者的表面积调整剂量(通常以平方米(m^2)衡量)。本发明的化学治疗剂可以以约 $0.01mg/m^2$ 至约 $1mg/m^2$,约 $0.1mg/m^2$ 至约 $5mg/m^2$,约 $1mg/m^2$ 至约 $20mg/m^2$,约 $10mg/m^2$ 至约 $100mg/m^2$,约 $50mg/m^2$ 至约 $500mg/m^2$,约 $200mg/m^2$ 至约 $2000mg/m^2$,或约 $1000mg/m^2$ 至约 $10000mg/m^2$ 的剂量施用。在一些情况下,本发明的化学治疗剂以至少 $10000mg/m^2$ 的剂量施用。根据一些方法,化学治疗剂通过静脉内施用。

[0555] 在一些实施方案中,化学治疗剂的施用包括施用卡铂。根据一些方法,卡铂以约 $200mg/m^2$ 至约 $400mg/m^2$ 的剂量施用。在一些实施方案中,施用化学治疗剂包括施用紫杉醇。根据一些方法,紫杉醇以约 $20mg/m^2$ 至约 $300mg/m^2$ 的剂量施用。

[0556] 在一些实施方案中,本公开的聚糖相互作用抗体与抗血管生成疗法(例如贝伐单抗)组合施用。根据一些实施方案,提供了治疗癌症的方法,其包括鉴定需要癌症治疗的受试者,其中受试者的癌症对用至少一种聚-ADP-核糖聚合酶抑制剂的治疗不完全应答,并且向受试者施用抗STn抗体。这种抗STn抗体可以包括那些本领域已知的或本文所述的任何一种。

[0557] 免疫相关靶标

[0558] 在一些实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体可以是免疫调节性抗体。如本文所用,免疫调节抗体是增强或抑制一种或更多种免疫功能或途径的抗体。

[0559] 已知许多细菌聚糖包括唾液酸。在某些情况下,这种聚糖可以让细菌逃避宿主(包括但不限于人)的先天免疫系统。在一个实例中,通过因子H识别,细菌聚糖抑制交替补体途径激活。在另一个实例中,细菌聚糖掩盖可能是抗原性的潜在残基。通过激活抑制性唾液酸结合Ig样凝集素(Siglecs),一些细菌聚糖参与细胞信号传导事件,所述唾液酸结合Ig样凝集素抑制对包括某些唾液酸化部分的实体的免疫应答(Chen,X.等人,Advances in the biology and chemistry of sialic acids.ACS Chem Biol.2010年2月19日;5(2):163-76)。在一些实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体可用于治疗与细菌聚糖有关的免疫并发症。

[0560] 由于如本文所述的Neu5Gc的外来性质,一些Neu5Gc聚糖是免疫原性的,导致表达这些聚糖的细胞和其它实体的免疫相关破坏。这种自身免疫破坏可能是致病的。在一些实施方案中,聚糖相互作用抗体可用于治疗患有与Neu5Gc聚糖相关的自身免疫性疾病的患者。

[0561] 在一些实施方案中,本发明的免疫调节性抗体可用于促进或抑制T细胞介导的免疫。这种抗体可能与T细胞、T细胞相关蛋白和/或与T细胞相互作用的一种或更多种其它细胞类型上存在的一种或更多种聚糖相互作用。增强T细胞介导的免疫的免疫调节抗体可用于刺激T细胞介导的癌细胞靶向。

[0562] 在一些肿瘤中,肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的浸润可能导致促进肿瘤细胞活力和生长的免疫抑制。这被认为是由于免疫抑制性细胞信号传导,其通过存在于TAM上的骨髓C型凝集素受体(CLR)与肿瘤相关粘蛋白之间的相互作用而发生(Allavena,P.等人,Clin Dev Immunol.2010;2010:547179)。在一些实施方案中,本发明的免疫调节性抗体与一种或更多种肿瘤相关粘蛋白或TACA的结合防止TAM中的免疫抑制性细胞信号传导。

[0563] 抗病毒应用

[0564] 在一些实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体靶向病毒。病毒外壳蛋白和病毒包膜通常包括聚糖,在本文中称为病毒表面聚糖。这类聚糖可以是聚糖相互作用抗体的靶标。在一些实施方案中,病毒表面聚糖包括唾液酸化STn。在进一步的实施方案中,病毒表面聚糖可以包括GcSTn。可能被聚糖相互作用抗体靶向的病毒包括但不限于HIV、流感、鼻病毒、水痘-带状疱疹、轮状病毒、疱疹(例如,1和2型)、肝炎(例如,A、B、C、D和E型)、黄热病和人乳头瘤病毒。

[0565] 其它治疗应用

[0566] 在一些实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体可以改变或控制蛋白水解事件。在一些实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体可以在结合到靶标之前内在化至细胞中。

[0567] 兽医应用

[0568] 认为本发明的聚糖相互作用抗体可用于兽医护理领域,包括护理和治疗非人脊椎动物。如本文所述,术语“非人脊椎动物”包括除智人之外的所有脊椎动物,包括野生和驯化物种,例如伴侣动物和牲畜。非人脊椎动物包括哺乳动物,例如羊驼、白臀野牛、北美野牛、骆驼、猫、牛、鹿、狗、驴、大额牛、山羊、豚鼠、马、美洲驼、骡、猪、兔、驯鹿、绵羊、水牛和牦牛。

牲畜包括在农业环境中养的驯养动物,以用于生产材料,例如食物、劳动力和衍生产品,例如纤维和化学品。一般来说,牲畜包括具有潜在农业意义的所有哺乳动物、禽和鱼。具体而言,四足屠宰动物包括阉牛、母牛、奶牛、小牛、公牛、牛、猪和羊。

[0569] 生物加工

[0570] 在本发明的一些实施方案中的是,通过使细胞接触能够调节基因表达的或者改变所产生聚糖的水平和/或类型的一种或更多种聚糖相互作用抗体(例如抗体或融合蛋白),在宿主细胞中生产生物产品的方法,其中所述调节或改变提高生物产品的产量。根据本发明,可以通过使用本发明的一种或更多种聚糖相互作用抗体来改进生物加工方法。它们也可以通过补充、替代或添加一种或更多种聚糖相互作用抗体来改进。

[0571] 诊断

[0572] 在一些实施方案中,本发明的化合物和组合物可以用作诊断剂。在一些情况下,本发明的抗体可用于鉴定、标记或染色表达靶标抗原的细胞、组织、器官等。在进一步的实施方案中,本发明的抗体可用于鉴定存在于组织切片(即组织学组织切片)中的STn,包括已知或疑似携带癌细胞的组织。使用本发明抗体的这些方法在某些情况下可用于鉴定组织切片中的癌细胞或者肿瘤。组织切片可以来自任何组织或器官,包括但不限于乳房、结肠、胰腺、卵巢、脑、肝、肾、脾、肺、皮肤、胃、肠、食道或骨。

[0573] 在一些实施方案中,本发明的诊断方法可以包括使用免疫组织化学技术分析一个或更多个细胞或组织。这样的方法可以包括使用一种或更多种本文所述的任何聚糖相互作用抗体。本发明的免疫组织化学方法可以包括染色组织切片以确定一个或更多个糖基化蛋白或其它标志物的存在和/或水平。组织切片可以来自受试者肿瘤(例如患者肿瘤和动物肿瘤,例如动物模型肿瘤)。组织切片可能来自福尔马林固定或未固定的新鲜冷冻组织。在某些情况下,组织切片来自福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织。本文描述的聚糖相互作用抗体可以用作一抗。一抗用于直接接触组织切片并结合靶标表位。一抗可能直接与可检测标记缀合或可以通过使用检测剂(例如二抗)来检测。在一些实施方案中,一抗或者检测剂包括可用于与底物反应以产生可见产物的酶(例如沉淀物)。这些酶可以包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶和过氧化氢酶。

[0574] 本文所述的抗STn抗体可根据本公开的免疫组织化学方法用于检测组织或细胞中的STn糖基化蛋白。在一些情况下,这些抗体用于检测和/或确定肿瘤组织中STn的水平。这样的肿瘤组织可以包括肿瘤微阵列中包含的肿瘤组织。合适的肿瘤类型包括但不限于乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、胰腺癌、皮肤癌、肠癌、肺癌和脑肿瘤。可以改变免疫组织化学染色技术中所用的抗STn抗体水平,以增加可见染色或降低背景染色水平。在一些实施方案中,采用约0.01 μ g/ml至约50 μ g/ml的抗体浓度。例如,可以使用约0.01 μ g/ml至约1 μ g/ml,约0.05 μ g/ml至约5 μ g/ml,约0.1 μ g/ml至约3 μ g/ml,约1 μ g/ml至约10 μ g/ml,约2 μ g/ml至约20 μ g/ml,约3 μ g/ml至约25 μ g/ml,约4 μ g/ml至约30 μ g/ml或约5 μ g/ml至约50 μ g/ml的抗体浓度。

[0575] 在一些实施方案中,本发明的诊断方法包括产生STn连接的糖蛋白谱的方法。如本文所用,术语“STn连接的糖蛋白谱”是指指示样本或者受试者中STn连接的糖蛋白的水平和/或同一性的一组信息。产生STn连接的糖蛋白谱的方法可以在从受试者获得的样本上进行。这样的样本可以是生物样本,包括但不限于本文所述的任何样本。生物样本可以是细胞样本。在某些情况下,细胞样本可能包含至少一个肿瘤细胞。在一些实施方案中,肿瘤细胞

样本可以包括BRCA1突变体或非BRCA1突变体肿瘤细胞。

[0576] 包含在STn连接的糖蛋白谱中的糖蛋白可以包括但不限于癌细胞标志物、干细胞标志物、癌症干细胞标志物和干细胞相关蛋白。在一些实施方案中,被鉴定和/或定量为STn连接的糖蛋白谱一部分的糖蛋白可包括但不限于CD44、CD133、CD117、整联蛋白、Notch和Hedgehog。

[0577] STn连接的糖蛋白谱中STn连接的糖蛋白的水平和/或身份可以根据本领域已知的用于鉴定蛋白和/或定量蛋白水平的任何方法来确定。在一些实施方案中,这些方法可以包括但不限于质谱法、阵列分析(例如抗体阵列或蛋白阵列)、Western印迹、流式细胞术、免疫沉淀和ELISA。STn连接的糖蛋白在某些情况下可以在分析前从样本中免疫沉淀。这种免疫沉淀可以使用抗STn抗体进行。用于免疫沉淀STn连接的糖蛋白的抗STn抗体可以包括任何本领域已知的或本文中描述的那些。在一些实施方案中,使用抗STn抗体从生物样本中免疫沉淀STn糖蛋白,然后使用质谱鉴定和/或定量。

[0578] 在一些实施方案中,通过STn连接的糖蛋白谱为癌症治疗提供信息。因此,本公开提供了治疗癌症的方法,其包括从需要癌症治疗的受试者获得样本,从样本产生STn连接的糖蛋白谱,选择与来自STn连接的糖蛋白谱的STn糖基化蛋白结合的聚糖相互作用抗体,并向受试者施用聚糖相互作用抗体。根据这种方法施用的聚糖相互作用抗体可以包括本文教导的一个或更多个CDR或可变结构域。

[0579] 在一些实施方案中,本公开的方法可以用作伴随诊断。如本文所用,术语“伴随诊断”指测定,其结果帮助诊断或治疗受试者。伴随诊断可用于患者疾病、病症或病况严重程度的分层,允许调整治疗方案和剂量以降低成本、缩短临床试验的持续时间、增加安全性和/或增加有效性。伴随诊断可用于预测疾病、病症或病况发展,并有助于预防性治疗的处方开具。一些伴随诊断可用于选择一个或更多个临床试验的受试者。在一些情况下,伴随诊断测定可以与特定治疗结合以促进治疗最优化。

[0580] 在一些实施方案中,本公开的方法可用作与癌症相关的疾病、病症和/或病况的伴随诊断。本发明的一些伴随诊断可用于预测和/或确定一种或更多种癌症形式的严重程度。根据发展成一种或更多种癌症形式的风险,本发明的一些伴随诊断可以用于将受试者分层。本发明的一些伴随诊断可用于促进和加快用于癌症治疗的药物开发。

[0581] ST表达修饰的细胞

[0582] 在一些实施方案中,本公开提供具有改变的STn水平的修饰细胞。这样的细胞可以用于各种目的(例如实验、治疗、抗体测试等)。在某些情况下,本公开的方法包括在一个或更多个细胞或组织中增强ST6GalNAc I表达的方法。这可能导致产生具有增加的细胞STn表达(例如表面表达的STn)的一个或更多个细胞。例如,可以通过引入携带ST6GalNAc I表达构建体的一个或更多个载体来增强ST6GalNAc I的表达。这种表达构建体可以设计带有天然ST6GalNAc I启动子或增强基因表达的启动子。配置用于增强基因表达的启动子可能具有组成型或者高度活性的启动子元件。在一些情况下,启动子可以被配置用于诱导型基因表达。当与可激活启动子的可诱导元件的因子接触时,这种启动子可能变得有活性或具有提高的活性。STn表达构建体可以包括hST6GalNAc I pRc-CMV,如Julien,S.等人,2001, Glycoconj J,18:883-93中所述的,其内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,表达构建体可以编码涉及STn合成和/或表达的其它因子。这些因子可以包括但不限于T-合酶

和核心1 β 3-半乳糖基转移酶特异性分子伴侣(COSMC)。在一些实施方案中,将具有最小STn表达的细胞转化为表达STn的细胞。这样的细胞可以包括但不限于SKOV3细胞、BRCA1突变细胞和非突变BRCA1细胞。

[0583] 还提供了相对于未修饰的细胞具有降低的STn表达的修饰细胞。因此,本公开的方法包括抑制STn表达的方法。这样的方法可以包括减少ST6GalNAc I表达。在一些实施方案中,这类方法可包括施用抑制ST6GalNAcI表达的一种或更多种核酸分子。这样的核酸分子可以包括但不限于抑制性RNA(例如RNAi或者沉默siRNA)。在一些实施方案中,涉及STn合成和/或表达的其它因子可能会降低。这些因子可能包括但不限于T-合酶和COSMC。在一些实施方案中,天然表达STn的细胞转化为STn缺陷型细胞。这样的细胞可以包括但不限于OVCAR3细胞和OVCAR4细胞。

[0584] III药物组合物

[0585] 在一些实施方案中,本公开包括药物组合物。这种药物组合物可以包含本公开的抗体和/或片段、肽或者衍生自这种抗体的蛋白。药物组合物可特征在于生物利用度、治疗窗口和/或分布体积的一种或更多种。

[0586] 生物利用度

[0587] 当与本文所述的递送/制剂试剂或赋形剂一起配制成组合物时,相较于缺乏本文所述递送剂的组合物,聚糖相互作用抗体可表现出生物利用度的提高。如本文所用,术语“生物利用度”是指施用于哺乳动物的给定量聚糖相互作用抗体的全身性可用性。向哺乳动物施用化合物后,可以通过测量未改变形式的化合物的曲线下面积(AUC)或最大血清或者血浆浓度(C_{max})来评估生物利用度。AUC是曲线下面积的确定,相对于横坐标(X轴)的时间,沿着纵坐标(Y轴)绘制化合物的血清或者血浆浓度。通常,使用本领域普通技术人员已知的方法以及如G.S.Banker, Modern Pharmaceutics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v.72, Marcel Dekker, New York, Inc, 1996中所述,计算特定化合物的AUC,通过引用并入本文。

[0588] C_{max} 值是化合物施用于哺乳动物后在哺乳动物的血清或者血浆中达到的化合物的最大浓度。可以使用本领域普通技术人员已知的方法测量特定化合物的 C_{max} 值。如本文所用,短语“提高生物利用度”或“改善药代动力学”意指,当与本文所述递送剂共施用,聚糖相互作用抗体在哺乳动物中的全身性可用性(测量为AUC、 C_{max} 或 C_{min})高于没有共施用时的情况。在一些实施方案中,聚糖相互作用抗体的生物利用度可以增加至少约2%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%。

[0589] 治疗窗口

[0590] 相较于不含本文所述递送剂的所施用聚糖相互作用抗体组合物的治疗窗口,当与本文所述的递送剂一起配制成组合物时,聚糖相互作用抗体可以表现出所施用聚糖相互作用抗体组合物的治疗窗口增加。如本文所用,“治疗窗口”是指具有引发治疗效果的高概率的血浆浓度的范围,或作用位点处的治疗活性物质的水平范围。在一些实施方案中,当与本文所述的递送剂共施用,聚糖相互作用抗体的治疗窗口可增加至少约2%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至

少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或约100%。

[0591] 在一些实施方案中,施用后至少1天,至少2天,至少5天,至少10天,至少14天,至少1个月,至少2个月,至少6个月,或至少一年,在受试者样本中可检测到聚糖相互作用抗体。当抗体与细胞毒剂(例如MMAE)缀合时,药物与抗体的比率(DAR)可能保持稳定。在一些情况下,在给定的时间段内(例如,在受试者样本中可检测到抗体水平的时段)DAR的变化可小于1%、小于5%、小于10%、小于20%、小于30%、小于40%、小于50%、小于60%或小于75%。

[0592] 分布体积

[0593] 相对于缺乏本文所述递送剂的组合物,当和本文所述递送剂配制成组合物时,聚合相互作用抗体可以表现出改善的分布体积(V_{dist}),例如减少的或者靶向的。分布体积(V_{dist})将体内药物的量与血液或者血浆中药物的浓度相关联。如本文所用,术语“分布体积”是指体内含有与血液或者血浆中相同浓度的药物总量所需的流体体积: V_{dist} 等于体内药物的量/血液或者血浆中的药物浓度。例如,对于10mg剂量和10mg/L的血浆浓度,分布体积将是1升。分布体积反映了药物存在于血管外组织中的程度。与血浆蛋白结合相比,大的分布体积反映了化合物与组织成分结合的趋势。在临床环境中, V_{dist} 可用于确定达到稳态浓度的载荷剂量。在一些实施方案中,当与本文所述的递送剂共施用时,聚糖相互作用抗体的分布体积可以降低至少约2%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%。

[0594] 在一些实施方案中,聚糖相互作用抗体包含在具有一种或更多种药学上可接受的赋形剂的组合物和/或复合物中。药物组合物可以任选地包含一种或更多种额外的活性物质,例如,治疗和/或预防性活性物质。例如可以在Remington:The Science and Practice of Pharmacy第21版,Lippincott Williams&Wilkins,2005(通过引用并入本文)中找到药物的制剂和/或制造中的一般考虑。

[0595] 在一些实施方案中,将组合物施用至人、人患者或受试者。为了本公开的目的,短语“活性成分”通常指如本文所述待递送的聚糖相互作用抗体。

[0596] 虽然本文提供的药物组合物的描述主要涉及适合施用于人的药物组合物,但是本领域技术人员应该理解的是,这样的组合物通常适用于施用于任何其它动物,例如非人动物例如非人哺乳动物。对适于施用于人的药物组合物进行改变以使其成为适于施用于各种动物的组合物是众所周知的,并且兽医药理学普通技术人员可以仅仅通过普通的(如果有的话)实验来设计和/或进行这种改变。预期施用药物组合物的受试者包括但不限于人和/或其它灵长类;哺乳动物,包括商业有关的哺乳动物,例如牛、猪、马、羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠;和/或禽,包括商业上相关的禽,例如鸟、鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[0597] 可以通过药理学领域已知或以后开发的任何方法来制备本文所述药物组合物的制剂。通常,这样的制备方法包括将活性成分与赋形剂和/或一种或更多种其它辅助成分组合的步骤,然后如果需要和/或希望的话,将产品分开、成型和/或包装成期望的单一或多剂量单位。

[0598] 根据本发明的药物组合物可以作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量而

制备、包装和/或批发销售。如本文所用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于施用于受试者的活性成分的剂量和/或该剂量的方便小份(fraction),例如该剂量的一半或三分之一。

[0599] 根据本发明的药物组合物中活性成分的相对量、药学上可接受的赋形剂和/或任何额外成分将根据所治疗受试者的身份、大小和/或病症而变化,并且还取决于组合物施用的途径。举例来说,组合物可包含0.1%至100%,例如0.5至50%、1至30%、5至80%或至少80% (w/w) 的活性成分。在一个实施方案中,活性成分是针对癌细胞的抗体。

[0600] 制剂

[0601] 采用一种或更多种赋形剂来配制本发明的聚糖相互作用抗体以便:(1) 增加稳定性;(2) 增加细胞渗透性;(3) 允许持续释放或延迟释放(例如从聚糖相互作用抗体的制剂中);和/或(4) 改变生物分布(例如将聚糖相互作用抗体靶向特定组织或细胞类型)。除了传统赋形剂,例如任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体载体、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂,本发明的制剂可以包括但不限于脂质体、脂质纳米颗粒、聚合物、脂质复合物、核-壳纳米颗粒、肽、蛋白、用聚糖相互作用抗体转染的细胞(例如移植入受试者)及其组合。

[0602] 赋形剂

[0603] 如本文所用,术语“赋形剂”是指在使用前与本发明化合物和/或组合物结合的任何物质。在一些实施方案中,赋形剂是无活性的并主要用作本发明的化合物和/或组合物的载体、稀释剂或载体。用于配制药物组合物的各种赋形剂和制备组合物的技术在本领域中是已知的(参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro,Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,MD,2006;通过引用并入本文)。

[0604] 目前除了任何常规赋形剂介质可能与物质或其衍生物不相容,例如通过产生任何不希望的生物学作用或者与药物组合物任何其它组分以有害的方式相互作用,在本公开的范围考虑使用常规赋形剂介质。

[0605] 可以通过药理学领域已知或以后开发的任何方法制备本文所述药物组合物的制剂。通常,这样的制备方法包括将活性成分与赋形剂和/或一种或更多种其它辅助成分组合的步骤。

[0606] 根据本公开的药物组合物可以作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量而制备、包装和/或批发销售。

[0607] 根据本公开的药物组合物中活性成分的相对量、药学上可接受的赋形剂和/或任何额外成分将根据所治疗受试者的身份、大小和/或病症而变化,并且还取决于组合物施用的途径。

[0608] 在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂为至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%纯。在一些实施方案中,赋形剂被批准用于人和兽医用途。在一些实施方案中,赋形剂由美国食品和药品监督管理局批准。在一些实施方案中,赋形剂是药物级。在一些实施方案中,赋形剂符合美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0609] 用于制备药物组合物的药学上可接受的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂、分散和/或制粒剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、粘合剂、防腐剂、缓冲液、润滑剂药剂和/或

油。这些赋形剂可以任选地包含在药物组合物中。

[0610] 示例性稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、乳糖磷酸钠、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、糖粉等,和/或它们的组合。

[0611] 示例性的制粒和/或分散剂包括但不限于马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、羟乙酸淀粉钠、粘土、海藻酸、瓜尔胶、柑橘果肉(citrus pulp)、琼脂、膨润土、纤维素和木制品、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交联聚乙烯吡咯烷酮(交联维酮)、羧甲基淀粉钠(羟乙酸淀粉钠)、羧甲基纤维素、交联羧甲基纤维素钠(交联羧甲基纤维素)、甲基纤维素、预胶化淀粉(淀粉1500)、微晶淀粉、水不溶性淀粉、羧甲基纤维素钙、硅酸镁铝(VEEGUM®)、月桂基硫酸钠、季铵化合物等,和/或它们的组合。

[0612] 示例性的表面活性剂和/或乳化剂包括但不限于天然乳化剂(例如阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、海藻酸钠、黄蓍胶、软骨藻、胆固醇、黄原胶、果胶、明胶、蛋黄、酪蛋白、羊毛脂、胆固醇、蜡和卵磷脂)、胶体粘土(如,膨润土(硅酸铝)和VEEGUM®(硅酸镁铝))、长链氨基酸衍生物、高分子量醇(例如,硬脂醇、鲸蜡醇、油醇、甘油单硬脂酸酯、乙二醇二硬脂酸酯、甘油单硬脂酸酯和丙二醇单硬脂酸酯、聚乙烯醇)、卡波姆(例如,羧基聚亚甲基、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物和羧基乙烯基聚合物)、角叉菜胶、纤维素衍生物(例如,羧甲基纤维素钠、粉状纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素)、山梨糖醇脂肪酸酯(如,聚氧乙烯山梨糖醇单月桂酸酯(TWEEN®20)、聚氧乙烯山梨糖醇(TWEENN®60)、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯(TWEEN®80)、山梨糖醇单棕榈酸酯(SPAN®40)、山梨糖醇单硬脂酸酯(SPAN®60)、山梨糖醇三硬脂酸酯(Span®65)、单油酸甘油酯、山梨糖醇单油酸酯(SPAN®80)、聚氧乙烯酯(例如,聚氧乙烯单硬脂酸酯(MYRJ®45)、聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚乙氧基化蓖麻油、聚氧亚甲基硬脂酸酯和SOLUTOL®)、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯(例如CREMOPHOR®)、聚氧乙烯醚(如聚氧乙烯月桂基醚(BRIJ®30)、聚(乙烷基吡咯烷酮)、二乙二醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、油酸钠、油酸钾、油酸乙酯、油酸、月桂酸乙酯、月桂基硫酸钠、PLUORINC®F 68、POLOXAMER®188、西曲溴铵、氯化十六烷基吡啶、苯扎氯铵、多库酯钠等,和/或其组合。

[0613] 示例性的结合剂包括但不限于淀粉(例如玉米淀粉和淀粉糊);明胶;糖(例如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露糖醇);天然和合成树胶(例如阿拉伯胶、海藻酸钠、爱尔兰苔藓提取物、番瓦(panwar)胶、印度(ghatti)胶、车前籽胶(isapol husk)的粘液、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、乙酸纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、硅酸镁铝(Veegum®)和落叶松阿拉伯半乳聚糖);藻酸盐;聚环氧乙烷;聚乙二醇;无机钙盐;硅酸;聚甲基丙烯酸酯;蜡;水;醇等;及其组合。

[0614] 示例性防腐剂可以包括但不限于抗氧化剂、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗真菌防腐剂、乙醇防腐剂、酸性防腐剂和/或其它防腐剂。示例性抗氧化剂包括但不限于α生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、单硫代甘油、偏亚硫酸氢钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠和/或亚硫酸钠。示例性的

螯合剂包括乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸一水合物、乙二胺四乙酸二钠、依地酸二钾、依地酸、富马酸、苹果酸、磷酸、乙二胺四乙酸钠、酒石酸和/或乙二胺四乙酸三钠。示例性的抗微生物防腐剂包括但不限于苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲醇、溴硝丙二醇、溴棕三甲铵、氯化十六烷基吡啶、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲苯酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶、咪脲、苯酚、苯氧乙醇、苯乙醇、硝酸苯汞、丙二醇和/或硫柳汞。示例性的抗真菌防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯甲酸钾、山梨酸钾、苯甲酸钠、丙酸钠和/或山梨酸。示例性的醇防腐剂包括但不限于乙醇、聚乙二醇、苯酚、酚化合物、双酚、氯丁醇、羟基苯甲酸酯和/或苯乙醇。示例性酸性防腐剂包括但不限于维生素A、维生素C、维生素E、 β -胡萝卜素、柠檬酸、乙酸、脱氢乙酸、抗坏血酸、山梨酸和/或植酸。其它防腐剂包括但不限于生育酚、生育酚乙酸酯、甲磺酸去甲肟、溴化三甲铵、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁羟脯氨酸(BHT)、乙二胺、月桂基硫酸钠(SLS)、月桂基醚硫酸钠(SLES)、亚硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钾、偏亚硫酸氢钾、**GLYDANT PLUS[®]**、**PHENONIP[®]**、对羟基苯甲酸甲酯、**GERMALL[®] 115**、**GERMABEN[®] II**、**NEOLONE[™]**、**KATHON[™]**和/或**EUXYL[®]**。

[0615] 示例性缓冲剂包括但不限于柠檬酸盐缓冲溶液、乙酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、D-葡萄糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、丙酸、乙酰丙酸钙、戊酸、磷酸氢钙、磷酸、磷酸三钙、磷酸氢钙、乙酸钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、乙酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、氨基丁三醇、氢氧化镁、氢氧化铝、海藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏液溶液、乙醇等，和/或其组合。

[0616] 示例性的润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、二氧化硅、滑石、麦芽、behanate甘油酯、氢化植物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、月桂基硫酸镁、十二烷基硫酸钠等，及其组合。

[0617] 示例性的油包括但不限于杏仁、杏核、鳄梨、巴巴苏、佛手柑、黑潮籽、琉璃苣、卡德、甘菊、油菜、香菜、巴西棕榈、蓖麻、肉桂、可可脂、椰子、鳕鱼肝、咖啡、玉米、棉籽、鹌鹑、桉树、月见草、鱼、亚麻籽、香叶醇、葫芦、葡萄籽、榛子、海索、肉豆蔻酸异丙酯、西蒙得木、夏威夷(kukui)坚果、醒目薰衣草、薰衣草、柠檬、山苍子、夏威夷果、锦葵、芒果籽、白芒花籽、水貂、肉豆蔻、橄榄、橙、柚子、棕榈、棕榈仁、桃仁、花生、罂粟籽、南瓜籽、油菜籽、米糠、迷迭香、红花、檀香、山茶花(sasquana)、香薄荷(savoury)、沙棘、芝麻、牛油树脂、硅树脂、大豆、向日葵、茶树、蓟、椿树、香根草、胡桃和小麦胚芽油。示例性的油包括但不限于硬脂酸丁酯、辛酸甘油三酯、癸酸甘油三酯、环聚二甲基硅氧烷、癸二酸二乙酯、聚二甲基硅氧烷360、肉豆蔻酸异丙酯、矿物油、辛基十二烷醇、油醇、硅油，和/或其组合。

[0618] 根据配制者的判断，赋形剂(例如可可脂和栓剂蜡、着色剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂和/或芳香剂)可以存在于组合物中。

[0619] 在一些实施方案中，将本发明的抗聚糖抗体与包含柠檬酸盐和/或NaCl的赋形剂一起配制。这种组合物可以包括约1mM至约10mM、约2mM至约20mM、约5mM至约50mM、约10mM至约100mM、约50mM至约200mM、或约100mM到约1,000mM柠檬酸盐。其它组合物可以包括约1mM至约10mM、约5mM至约20mM、约15mM至约50mM、约30mM至约60mM、约50mM至约200mM、约100mM

至约300mM、或约250mM至约1000mMNaCl。

[0620] 载体

[0621] 脂质体、脂质复合物和脂质纳米颗粒

[0622] 可以使用一种或更多种脂质体、脂质复合物或脂质纳米颗粒来配制本发明的聚糖相互作用抗体。在一个实施方案中,包含聚糖相互作用抗体的药物组合物还包含脂质体。脂质体是人工制备的囊泡,其可以包含一个或更多个脂质双层并且可以用作施用营养物和药物制剂的递送载体。脂质体可以具有不同的大小,例如但不限于多层囊泡(MLV)(其可以具有数百纳米的直径并且可以包含由狭窄含水隔室分隔开的一系列同心双层)、直径小于50nm的小单细胞囊泡(SUV)、以及直径在50-500nm之间的大单层囊泡(LUV)。脂质体设计可以包括但不限于调理素(opsonin)或配体,以改善脂质体与不健康组织的附着、或者激活例如但不限于内吞作用的事件。为了改善药物制剂的递送,脂质体可以含有低或高pH值。

[0623] 脂质体的形成可取决于物理化学特性,例如但不限于所包载的药物制剂和脂质体成分、脂质囊泡分散于其中的介质的性质、包载的物质的有效浓度及其潜在毒性、应用期间涉及的任何附加过程和/或囊泡的递送、尺寸优化、多分散性和用于预期应用的囊泡有效期、以及批次间重现性以及大规模生产安全有效的脂质体产品的可能性。

[0624] 在一个实施方案中,还可以构建这样的制剂或改变组合物,使得它们被动地或主动地定向到体内不同的细胞类型。

[0625] 还可以通过在表面上表达不同配体和通过抗体靶向方法来选择性地靶向制剂,配体例如但不限于叶酸、转铁蛋白、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

[0626] 脂质体、脂质体复合物或脂质纳米颗粒可用于改善聚糖相互作用抗体功能的功效,因为这些制剂能够增加聚糖相互作用抗体的细胞转染。脂质体、脂质体复合物或脂质纳米颗粒也可用于增加聚糖相互作用抗体的稳定性。

[0627] 根据本领域已知的技术来制备专门配制用于抗体运输的脂质体,例如由Eppstein等人(Eppstein,D.A.等人,Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon gamma is mediated by a cell membrane receptor.Proc Natl Acad Sci U S A.1985Jun;82(11):3688-92);Hwang等人(Hwang,K.J.等人,Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes:a kinetic study.Proc Natl Acad Sci U S A.1980Jul;77(7):4030-4);US 4,485,045和US 4,544,545所述。具有持续循环时间的脂质体生产也描述于US 5,013,556中。

[0628] 可以使用反相蒸发、使用脂质(例如磷脂酰胆碱、胆固醇以及已经聚乙二醇衍生化的磷脂酰乙醇胺)来产生包括本发明的聚糖相互作用抗体的脂质体。使用具有限定孔径的过滤器来挤出期望直径的脂质体。在另一个实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体可以通过二硫化物交换反应与脂质体的外表面缀合,如Martin等人所述(Martin,F.J.等人,Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles.An improved method for liposome targeting.J Biol Chem.1982Jan 10;257(1):286-8)。

[0629] 聚合物和纳米颗粒

[0630] 可使用天然和/或合成聚合物配制本发明的聚糖相互作用抗体。可用于递送的聚合物的非限制性实例包括但不限于DMRI/DOPE、泊洛沙姆、壳聚糖、环糊精和聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)聚合物。这些可以是生物可降解的。

[0631] 聚合物制剂可以允许聚糖相互作用抗体的持续释放或延迟释放(例如肌肉内或皮下注射后)。改变聚糖相互作用抗体的释放谱可导致例如聚合相互作用抗体在延长的时间段内释放。聚合物制剂也可用于增加聚糖相互作用抗体的稳定性。

[0632] 还可以通过表达不同配体来选择性地靶向聚合物制剂,例如但不限于叶酸、转铁蛋白、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)(Benoit等人,Biomacromolecules.2011 12:2708-2714; Rozema等人,Proc Natl Acad Sci U S A.2007104:12982-12887;Davis,Mol Pharm.2009 6:659-668;Davis,Nature 2010 464:1067-1070;通过引用整体并入在此)。

[0633] 通过使用聚合物、脂质和/或其它生物可降解试剂(例如但不限于磷酸钙)的组合,本发明的聚糖相互作用抗体也可以配制为纳米颗粒。组分可以按核-壳、混合和/或逐层结构进行组合,以允许微调纳米颗粒,因此可以增强聚糖相互作用抗体的递送。对于聚糖相互作用抗体,可以使用基于聚(2-(甲基丙烯酰氧基)乙基磷酸胆碱)-嵌段-(2-(二异丙基氨基)乙基甲基丙烯酸酯)(PMPC-PDPA)(一种pH敏感的二嵌段共聚物)的系统,其在生理pH下自组装形成纳米大小的囊泡(也称为聚合物囊泡)。已显示这些聚合物囊泡在活细胞内成功地递送了相对较高的抗体有效载荷(Massignani等,Cellular delivery of antibodies: effective targeted subcellular imaging and new therapeutic tool.Nature Proceedings,2010年5月)。

[0634] 在一个实施方案中,PEG-电荷转化聚合物(Pitella等,Biomaterials.201132: 3106-3114)可用于形成纳米颗粒以递送本发明的聚糖相互作用抗体。通过在酸性pH下切割成聚阳离子,PEG-电荷转化聚合物可以改进PEG-聚阴离子嵌段共聚物,从而改进内体逃逸。

[0635] 核-壳纳米颗粒的使用另外集中于高通量方法以合成阳离子交联纳米凝胶核和各种壳(Sieglwart等,Proc Natl Acad Sci U S A.2011 108:12996-13001)。可以通过改变纳米颗粒核和壳组分中的化学组成来精确控制聚合物纳米颗粒的复合、递送和内在化。

[0636] 在一个实施方案中,使用聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)的基质来递送本发明的聚糖相互作用抗体。这些基质描述于Nature Biotechnology 10,1446-1449(1992)。

[0637] 抗体制剂

[0638] 本发明的聚糖相互作用抗体可配制用于静脉内施用或血管外施用(Daugherty等,Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics.Adv Drug Deliv Rev.2006Aug 7;58(5-6):686-706;美国专利公开号2011/0135570,所有这些整体并入本文)。血管外施用途可包括但不限于皮下施用、腹膜内施用、脑内施用、眼内施用、病灶内施用、局部施用和肌内施用。

[0639] 可以修饰抗体结构以改善它们作为治疗剂的有效性。改进可以包括但不限于改进的热力学稳定性、降低的Fc受体结合性质和改进的折叠效率。修饰可以包括但不限于氨基酸取代、糖基化、棕榈酰化和蛋白缀合。

[0640] 聚糖相互作用抗体可与抗氧化剂一起配制以减少抗体氧化。聚糖相互作用抗体也可以与添加剂配制以减少蛋白聚集。这些添加剂可以包括但不限于白蛋白、氨基酸、糖、尿素、盐酸胍、聚醚醇、聚合物(例如聚乙二醇和葡聚糖)、表面活性剂(包括但不限于聚山梨酸酯20和聚山梨醇酯80)或甚至其它抗体。

[0641] 可配制本发明的聚糖相互作用抗体以减少水对抗体结构和功能的影响。这种制剂中的抗体制剂可以被冻干。冻干的制剂可包含碳水化合物或多元醇化合物以保护和稳定抗

体结构。这样的化合物包括但不限于蔗糖、海藻糖和甘露糖醇。

[0642] 本发明的聚糖相互作用抗体可以用聚合物配制。在一个实施方案中,聚合物制剂可以含有疏水聚合物。这样的聚合物可以是聚交酯-共-乙交酯通过水包油包固体(solid-in-oil-in-water)包囊法配制的微球。包含乙烯-乙酸乙烯酯共聚物的微球也被考虑用于抗体递送,并且可以用于延长递送位点处抗体释放的时间过程。在另一个实施方案中,聚合物可以是含水凝胶。这类凝胶可以例如包括羧甲基纤维素。含水凝胶还可以包含透明质酸水凝胶。抗体可以通过脰键共价连接到这类凝胶上,该脰键允许在组织中持续递送,包括但不限于中枢神经系统的组织。

[0643] 肽和蛋白制剂

[0644] 用肽和/或蛋白配制本发明的聚糖相互作用抗体。在一个实施方案中,可以使用肽(例如但不限于细胞穿透肽和能够进行细胞内递送的蛋白和肽)来递送药物制剂。可以与本发明的药物制剂一起使用的细胞穿透肽的非限制性实例包括附着至聚阳离子的细胞穿透肽序列,其促进递送至细胞内空间,例如HIV衍生的TAT肽、穿透蛋白、运输蛋白或hCT衍生的细胞-穿透肽(参见,例如Caron等人,Mol. Ther. 3 (3):310-8 (2001); Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, Boca Raton FL, 2002); El-Andaloussi等人,Curr. Pharm. Des. 11 (28):3597-611 (2003); 以及Deshayes等人,Cell. Mol. Life Sci. 62 (16):1839-49 (2005),所有这些通过引用并入本文)。组合物也可以配制成包括细胞穿透剂,例如增强组合物递送到细胞内空间的脂质体。本发明的聚糖相互作用抗体可以与肽和/或蛋白复合,例如但不限于来自Aileron Therapeutics (Cambridge, MA) 和Permeon Biologics (Cambridge, MA) 的肽和/或蛋白以便实现细胞内递送(Cronican等人,ACS Chem. Biol. 2010 5:747-752; McNaughton等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009106:6111-6116; Sawyer, Chem Biol Drug Des. 2009 73:3-6; Verdine和Hilinski,Methods Enzymol. 2012;503:3-33;其全部内容通过引用整体并入本文)。

[0645] 在一个实施方案中,细胞穿透多肽可以包括第一结构域和第二结构域。第一结构域可包含过荷(supercharged)多肽。第二结构域可包含蛋白结合配偶体。如本文所用,“蛋白结合配偶体”包括但不限于抗体及其功能片段、支架蛋白或肽。细胞穿透多肽可以进一步包括蛋白结合配偶体的细胞内结合配偶体。可将聚糖相互作用抗体导入其中的细胞能够分泌细胞穿透性多肽。

[0646] 在本发明的制剂中,可掺入肽或者蛋白以增加聚糖相互作用抗体的细胞转染或改变聚糖相互作用抗体的生物分布(例如通过靶向特定组织或细胞类型)。

[0647] 细胞制剂

[0648] 本发明的聚糖相互作用抗体组合物基于细胞的制剂可用来确保细胞转染(例如在细胞载体中)或改变组合物的生物分布(例如通过将细胞载体靶向特定组织或细胞类型)。

[0649] 细胞转移方法

[0650] 多种方法在本领域中是已知的并且适于将核酸或者蛋白(例如聚糖相互作用抗体)引入细胞,包括病毒和非病毒介导的技术。典型的非病毒介导的技术的实例包括但不限于电穿孔、磷酸钙介导的转移、核转染、超声穿孔、热休克、磁转染、脂质体介导的转移、显微注射、微粒轰击介导的转移(纳米颗粒)、阳离子聚合物介导的转移(DEAE-葡聚糖、聚乙烯亚

胺、聚乙二醇 (PEG) 等) 或细胞融合物。

[0651] 超声穿孔或细胞超声技术是利用声音 (例如超声波频率) 来改变细胞质膜的渗透性。超声穿孔方法是本领域技术人员已知的并且用于在体内递送核酸 (Yoon和Park, Expert Opin Drug Deliv.2010 7:321-330;Postema和Gilja,Curr Pharm Biotechnol.2007 8:355-361;Newman和Bettinger,Gene Ther.2007 14:465-475;全部通过引用整体并入本文)。超声穿孔方法在本领域中是已知的,并且例如在美国专利公开20100196983中涉及细菌时也被教导,并且它涉及例如美国专利公开20100009424中的其它细胞类型,其每一个通过引用整体并入本文。

[0652] 电穿孔技术在本领域中也是众所周知的,并且用于体内和临床递送核酸 (Andre等人,Curr Gene Ther.2010 10:267-280;Chiarella等人,Curr Gene Ther.2010 10:281-286;Hojman,Curr Gene Ther.2010 10:128-138;全部通过引用整体并入本文)。在一个实施方案中,可以通过电穿孔递送聚糖相互作用抗体。

[0653] 施用和递送

[0654] 可以通过本领域已知的任何标准方法或者途径施用本发明的组合物。

[0655] 可以通过导致治疗有效结果的任何途径来施用本发明的聚糖相互作用抗体。这些包括但不限于肠内、胃肠外、硬膜外、口服、经皮、硬膜外 (硬膜外)、脑内 (进入大脑)、脑室内 (进入脑室)、表皮 (施用于皮肤)、皮内 (进入皮肤本身)、皮下 (皮肤下)、鼻施用 (通过鼻腔)、静脉内 (进入静脉)、动脉内 (进入动脉)、肌肉内 (进入肌肉)、心内 (进入心脏)、骨内输注 (进入骨髓)、鞘内 (进入脊管)、腹膜内 (输注或注射入腹膜)、膀胱内输注、玻璃体内 (通过眼睛)、海绵体内注射 (阴茎底部)、阴道内施用、子宫内、羊膜外施用、经皮 (通过完整皮肤扩散到全身分布)、透粘膜 (通过粘膜扩散)、吹入 (鼻吸)、舌下、阴唇、灌肠、滴眼 (结膜上)、或者滴耳。在具体的实施方案中,以允许它们跨血脑屏障、血管屏障或其它上皮屏障的方式施用组合物。如下描述用于本发明的聚糖相互作用抗体的非限制性施用途径。

[0656] 肠胃外和可注射施用

[0657] 用于口服和肠胃外施用的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆剂和/或酞剂。除了活性成分之外,液体剂型还可以包括本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油 (特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物。除了惰性稀释剂之外,口服组合物还可以包含佐剂,例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂和/或芳香剂。在用于肠胃外施用的某些实施方案中,将组合物与增溶剂混合,例如**CREMOPHOR®**、醇、油、改性油、二醇、聚山梨酯、环糊精、聚合物和/或它们的组合。在其它实施方案中,包括表面活性剂,例如羟丙基纤维素。

[0658] 可根据已知技术使用合适的分散剂、润湿剂和/或悬浮剂配制可注射制剂,例如无菌注射用水性或含油悬浮剂。无菌可注射制剂可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂和/或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮剂和/或乳剂,例如在1,3-丁二醇中的溶液。在可接受的载体和溶剂中可以使用的是水、林格溶液、U.S.P. 和等渗氯化钠溶液。通常将无菌的不挥发性油用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸例如油酸可用于制备注射剂。

[0659] 可注射制剂可通过例如通过细菌截留过滤器过滤和/或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,使用前所述无菌固体组合物可溶解或分散于无菌水或其它无菌注射介质。

[0660] 为了延长活性成分的作用,通常需要减缓来自皮下或肌肉注射的活性成分的吸收。这可以通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体悬浮液来完成。药物的吸收速率然后取决于其溶解速率,而溶解速率又取决于晶体大小和结晶形式。另外,通过将药物溶解或悬浮于油载体中来完成肠胃外施用药物形式的延迟吸收。通过在可生物降解的聚合物(例如聚丙交酯-聚乙交酯)中形成药物的微胶囊基质来制备可注射的储库形式。取决于药物与聚合物的比例和所用特定聚合物的性质,可以控制药物释放速率。其它可生物降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。通过将药物包封在与身体组织相容的脂质体或微乳液中制备贮库可注射制剂。

[0661] 直肠和阴道施用

[0662] 用于直肠或阴道施用的组合物通常为栓剂,其可通过将组合物与合适的无刺激性赋形剂混合得以制备,例如可可脂、聚乙二醇或者栓剂蜡,它们在环境温度下为固体但在体温下为液体,因此在直肠或阴道腔中融化并释放活性成分。

[0663] 口服施用

[0664] 用于口服施用的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在这些固体剂型中,将活性成分与至少一种惰性的药学上可接受的赋形剂混合,例如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或填充剂或增量剂(例如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和硅酸)、粘合剂(例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶)、致湿剂(例如,甘油)、崩解剂(例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或者木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠)、溶液阻滞剂(例如,石蜡)、吸收促进剂(例如季铵化合物)、润湿剂(例如鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯)、吸收剂(例如,高岭土和膨润土)和润滑剂(例如,滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠),及其混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型可以包含缓冲液。

[0665] 局部或者经皮施用

[0666] 如本文所述,可以配制含有本发明聚糖相互作用抗体的组合物用于局部施用。皮肤可能是理想的递送靶标位点,因为它很容易接近。基因表达可能不仅限于皮肤,潜在避免非特异性毒性,而且还限于皮肤内的特定层和细胞类型。

[0667] 递送的组合物的皮肤表达位点将取决于核酸递送的途径。通常考虑三种途径将聚糖相互作用抗体递送至皮肤:(i)局部应用(例如,用于局部/区域治疗和/或化妆品应用);(ii)皮内注射(例如用于局部/区域治疗和/或化妆品应用);和(iii)系统递送(例如,用于治疗影响皮肤和皮肤外区域的皮肤疾病)。聚糖相互作用抗体可以通过本领域已知的几种不同方法递送至皮肤。

[0668] 在一个实施方案中,本发明提供了用于方便和/或有效地实施本发明的方法的各种敷料(例如伤口敷料)或绷带(例如粘附绷带)。敷料或绷带可能包含足够量的本文所述的药物组合物和/或聚糖相互作用抗体,以允许使用者对受试者进行多种治疗。

[0669] 在一个实施方案中,本发明提供了包含聚糖相互作用抗体的组合物,其在多于一次注射中递送。

[0670] 用于局部和/或经皮施用组合物的剂型可以包括软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶

剂、粉剂、溶液剂、喷雾剂、吸入剂和/或贴剂。通常,活性成分在无菌条件下与可能需要的药学上可接受的赋形剂和/或任何需要的防腐剂和/或缓冲液混合。

[0671] 另外,本发明考虑使用透皮贴剂,其经常具有提供将化合物可控地递送至身体的额外优点。可以例如通过将化合物溶解和/或分散在适当的介质中来制备这样的剂型。替代地或另外地,可以通过提供速率控制膜和/或通过将化合物分散在聚合物基质和/或凝胶中来控制速率。

[0672] 适用于局部施用的制剂包括但不限于液体和/或半液体制剂,例如搽剂、洗剂、水包油和/或油包水乳剂,例如乳膏、软膏和/或糊剂、和/或溶液和/或悬浮液。

[0673] 尽管活性成分的浓度可以与活性成分在溶剂中的溶解度极限一样高,但局部施用的制剂可以例如包括约1%至约10% (w/w) 的活性成分。用于局部施用的制剂可进一步包括本文所述的一种或更多种额外成分。

[0674] 贮库施用

[0675] 如本文所述,在一些实施方案中,将本发明的组合物配制成用于缓释的贮库。一般来说,靶向特定的器官或组织(“靶标组织”)施用。

[0676] 在本发明的一些方面,聚糖相互作用抗体空间保留在靶标组织内或靠近靶标组织。在组合物(尤其是组合物的聚糖相互作用抗体组分)基本上保留在靶标组织中的条件下,这意味着至少10、20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.99或者大于99.99%组合物保留在靶标组织中,通过使组合物接触一种或更多种靶标组织(包括一种或更多种靶标细胞),提供了向哺乳动物受体的一种或更多种靶标组织提供组合物的方法。有利地,通过测量存在于进入靶标组织和/或细胞的组合物中聚糖相互作用抗体的水平来确定保留。例如,施用于受试者的至少1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.99或大于99.99%的聚糖相互作用抗体在施用后的一段时间内在细胞内存在。例如,可以使用包含一种或更多种聚糖相互作用抗体和转染试剂的含水组合物对哺乳动物受试者进行肌内注射,并且可以通过测量存在于肌细胞中的聚糖相互作用抗体的水平来确定组合物的保留。

[0677] 本发明的某些方面涉及,在使组合物基本上保留在靶标组织中的条件下,通过使靶标组织(含有一种或更多种靶标细胞)与组合物接触,向哺乳动物受试者的靶标组织提供组合物的方法。组合物含有有效量的聚糖相互作用抗体,使得在至少一个靶标细胞中产生感兴趣的作用。组合物通常含有细胞穿透剂和药学上可接受的载体,但也涵盖了“裸”聚糖相互作用抗体(例如不含细胞穿透剂或其它试剂的聚糖相互作用抗体)。

[0678] 在一些实施方案中,组合物包含多种不同的聚糖相互作用抗体,其中一种或多于一种聚糖相互作用抗体靶向感兴趣的聚糖。任选地,组合物还含有细胞穿透剂以帮助组合物的细胞内递送。确定在预定体积的靶标组织内所含绝大比例细胞中靶向感兴趣聚糖所需的组合物剂量(通常,在邻近预定体积的组织中或远离靶标组织时不靶向聚糖)。在这种确定之后,确定的剂量可以被直接引入到哺乳动物受试者的组织中。

[0679] 在一个实施方案中,本发明提供了通过多次注射或分次剂量注射递送的聚糖相互作用抗体。

[0680] 肺施用

[0681] 可以按照适用于通过颊腔进行肺施用的制剂来制备、包装和/或销售药物组合物。

这样的制剂可以包括干颗粒,其进一步包含活性成分并且具有约0.5nm至约7nm或约1nm至约6nm范围内的直径。这样的组合物可以适当地以干粉的形式,干粉的施用使用包含干粉贮存器的装置和/或使用自推进溶剂/粉末分散容器(例如包含活性成分的装置,所述活性成分溶解于和/或悬浮于密封容器中低沸点推进剂中),其中推进剂的流被引导至所述干粉贮存器以便分散粉末。这样的粉末可以包括颗粒,其中按重量至少98%的颗粒具有大于0.5nm的直径,并且按数量至少95%的颗粒具有小于7nm的直径。或者,按重量至少95%的颗粒具有大于1nm的直径,并且按数量至少90%的颗粒具有小于6nm的直径。干粉组合物可以包含固体细粉末稀释剂(例如糖)并且方便地以单位剂量形式提供。

[0682] 低沸点推进剂通常包括在大气压下沸点低于65°F的液体推进剂。通常推进剂可以构成组合物的50%至99.9% (w/w),并且活性成分可以构成组合物的0.1%至20% (w/w)。推进剂可以进一步包括额外成分,例如液体非离子和/或固体阴离子表面活性剂和/或固体稀释剂(其可以具有与包含活性成分的颗粒相同的颗粒尺寸)。

[0683] 配制用于肺递送的药物组合物可以以溶液和/或悬浮液滴的形式提供活性成分。可作为含有活性成分的含水和/或稀释的醇溶液和/或悬浮液(任选无菌的)来制备、包装和/或销售这样的制剂,并且可以使用任何雾化和/或雾化装置方便地施用。这样的制剂可以进一步包含一种或更多种额外成分,包括但不限于矫味剂,例如糖精钠、挥发油、缓冲液、表面活性剂和/或防腐剂,例如羟基苯甲酸甲酯。通过该施用途径提供的滴可具有约0.1nm至约200nm范围内的平均直径。

[0684] 鼻内、鼻和口腔施用

[0685] 本文所述的可用于肺递送的制剂可用于鼻内递送药物组合物。适用于鼻内施用的另一种制剂是包含活性成分并具有约0.2 μ m至500 μ m的平均颗粒的粗粉。以采取鼻烟的方式施用这种制剂,即通过鼻通道从靠近鼻子的粉末容器快速吸入来施用。

[0686] 例如,适用于鼻施用的制剂可以包含约少则0.1% (w/w)和多达100% (w/w)的活性成分,并且可以包含一种或更多种本文所述的额外成分。可以按照适用于口腔施用的制剂来制备、包装和/或销售药物组合物。这样的制剂可以例如以使用常规方法制备的片剂和/或锭剂的形式,并且可以例如含有0.1%至20% (w/w)的活性成分,余量包含口服可溶解和/或可降解的组合物,以及任选地一种或更多种本文所述的额外成分。或者,适用于口腔施用的制剂可以包含含有活性成分的粉末和/或气雾化和/或雾化溶液和/或悬浮液。当分散时,这种粉末、气雾化和/或雾化制剂可具有约0.1nm至约200nm范围内的平均颗粒和/或液滴尺寸,并且可进一步包含一种或更多种本文所述的任何额外成分。

[0687] 眼用或者耳部施用

[0688] 可以按照适用于眼部或耳部施用的制剂来制备、包装和/或销售药物组合物。这样的制剂可以例如呈滴眼或滴耳剂的形式,包括例如在水性或油性液体赋形剂中的0.1/1.0% (w/w)活性成分的溶液和/或悬浮液。这种滴剂可以进一步包含本文所述的缓冲液、盐和/或一种或更多种其它任何成分。可用的其它可眼施用的制剂包括微晶形式的和/或脂质体制剂形式的活性成分的制剂。视网膜下插入也可用作施用形式。

[0689] 载荷施用

[0690] 本文所述的聚糖相互作用抗体可用于多种不同的情况,其中例如期望向生物靶标递送物质(“有效载荷”),例如递送用于检测靶标的可检测物质,或递送治疗剂或诊断剂。检

测方法可以包括但不限于体外成像和体内成像方法,例如免疫组织化学、生物发光成像(BLI)、磁共振成像(MRI),正电子发射断层扫描(PET)、电子显微镜、X射线计算机断层扫描、拉曼成像、光学相干断层扫描、吸收成像、热成像、荧光反射成像,荧光显微镜、荧光分子断层成像、磁共振成像、X射线成像、超声成像、光声成像、实验室检测或任何需要标记/染色/成像的情形。

[0691] 在任何有用的方面,聚糖相互作用抗体可以设计成包括接头和有效载荷。例如具有两端的接头用于将一端连接至有效载荷,另一端连接至聚糖相互作用抗体。本发明的聚糖相互作用抗体可包含多于一种的有效载荷以及可切割的接头。在另一个实例中,药物可以通过接头连接到聚糖相互作用抗体,并且可以进行荧光标记用于体内(例如,细胞内)追踪药物。

[0692] 其它实例包括但不限于使用聚糖相互作用抗体以可逆药物递送入细胞。

[0693] 本文所述的聚糖相互作用抗体可用于将有效载荷(例如可检测的或治疗剂)在细胞内靶向至特定细胞器。此外,本文所述的聚糖相互作用抗体可用于将治疗剂递送至细胞或组织,例如在活动物中。例如,本文所述的聚糖相互作用抗体可用于递送化学治疗剂以杀伤癌细胞。通过接头附着于治疗剂的聚糖相互作用抗体可促进成员渗透,从而允许治疗剂进入细胞以到达细胞内靶标。

[0694] 在一些实施方案中,有效载荷可以是治疗剂,例如细胞毒素、放射性离子、化学治疗剂或其它治疗剂。细胞毒素或者细胞毒性剂包括可能对细胞有害的任何试剂。实例包括但不限于紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、道诺霉素、柔红霉素、二羟基昆虫二肽、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-脱氧皮质酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、美登木素生物碱例如美登醇(参见美国专利号5,208,020其整体并入本文)、雷切霉素(CC-1065,参见美国专利号5,475,092、5,585,499和5,846,545,其全部通过引用并入本文)以及其类似物或同系物。放射性离子包括但不限于碘(例如碘125或碘131)、镱89、磷、钷、铯、铊、磷酸盐、钴、钇90、钐153和镨。其它治疗剂包括但不限于抗代谢物(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪)、烷化剂(例如氮芥、噻替派苯丁酸氮芥、雷切霉素(CC-1065)、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露糖醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C和顺氯氨铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环霉素(例如道诺霉素(以前称为道诺霉素)和阿霉素)、抗生素(如更生霉素以前称为放线菌素)、博来霉素、光神霉素和安曲霉素(AMC))和抗有丝分裂剂(例如长春新碱、长春碱、紫杉醇和美登素)。在本发明的抗STn抗体的情况下,可以通过将毒素缀合至这种抗STn抗体来增强肿瘤杀伤。

[0695] 在一些实施方案中,有效载荷可以是可检测试剂,例如各种有机小分子、无机化合物、纳米颗粒、酶或者酶底物、荧光材料、发光材料(例如鲁米诺)、生物发光材料(例如萤光素酶、荧光素、和水母发光蛋白)、化学发光材料、放射性材料(例如 ^{18}F 、 ^{67}Ga 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 ^{82}Rb 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{133}Xe 、 ^{201}Tl 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^3H 或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (例如高锝酸盐(锝酸盐(VII)、 TcO_4^-)和造影剂(例如金纳米颗粒)、钆(例如螯合的Gd)、氧化铁(例如超顺磁性氧化铁(SPIO)、单晶氧化铁纳米颗粒(MION)和超小型超顺磁性氧化铁(USPIO))、锰螯合物(例如Mn-DPDP)、硫酸钡、碘化造影剂(碘海醇)、微泡或全氟化碳)。这样的光学可检测标记包括例如但不限于4-乙酰氨基-4'-异硫氰酰二苯乙烯-2,2'-二磺酸;吡啶和衍生物(例如吡啶和异硫氰酸吡啶);5-

(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS);4-氨基-N-[3-乙烯基磺酰基]苯基]萘二甲酰亚胺-3,5-二磺酸盐;N-(4-苯胺基-1-萘基)马来酰亚胺;邻氨基苯甲酰胺;BODIPY;亮黄;香豆素及其衍生物(例如香豆素、7-氨基-4-甲基香豆素(AMC、香豆素120)和7-氨基-4-三氟甲基香豆素(香豆素151));花青染料;蓝霉素;4',6-二氨基嘧啶-2-苯基吡啶(DAPI);5'5"-二溴邻苯三酚-磺基萘酐(溴邻苯三酚红);7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酰苯基)-4-甲基香豆素;二亚乙基三胺五乙酸酯;4,4'-二异硫氰酸根合二氢-二苯乙烯-2,2'-二磺酸;4,4'-二异硫氰基二苯乙烯-2,2'-二磺酸;5-[二甲基氨基]-萘-1-磺酰氯(DNS,丹磺酰氯);4-二甲基氨基苯偶氮苯-4'-异硫氰酸酯(DABITC);伊红及其衍生物(例如伊红和伊红异硫氰酸酯);赤藓红及其衍生物(例如赤藓红B和赤藓红异硫氰酸酯);乙啶;荧光素和衍生物(例如5-羧基荧光素(FAM)、5-(4,6-二氯三嗪-2-基)氨基荧光素(DTAF)、2',7'-二甲氧基-4,5'-二氯-6-羧基荧光素、荧光素、异硫氰酸荧光素、X-罗丹明-5-(和-6)-异硫氰酸酯(QFITC或XRITC)和荧光胺);2-[2-[3-[[1,3-二氢-1,1-二甲基-3-(3-磺丙基)-2H-苯并[e]吡啶-2-亚基]亚乙基]-2-[4-(乙氧羰基)-1-哌嗪基]-1-环戊烯-1-基]乙烯基]-1,1-二甲基-3-(3-磺基丙基)-1H-苯并[e]吡啶鎓氢氧化物、内盐,与n,n-二乙基乙胺(1:1)的化合物(IR144);5-氯-2-[2-[3-[(5-氯-3-乙基-2(3H)-苯并噻唑-亚基)亚乙基]-2-(二苯基氨基)-1-环戊烯-1-基]乙烯基]-3-乙基苯并噻唑鎓高氯酸盐(IR140);孔雀绿异硫氰酸酯;4-甲基伞形酮邻甲酚酞;硝基酪氨酸;副玫瑰苯胺;酚红;B-藻红蛋白;邻苯二甲醛;苾及其衍生物(例如苾、丁酸苾和琥珀酰亚胺1-苾);丁酸盐量子点;活性红4(CIBACRONTM亮红3B-A);罗丹明及其衍生物(例如6-羧基-X-罗丹明(ROX)、6-羧基罗丹明(R6G)、丽丝胺罗丹明、磺酰氯罗丹明(Rhod)、罗丹明B、罗丹明123、罗丹明X异硫氰酸盐、磺酰罗丹明B、磺酰罗丹明101、磺酰氯罗丹明衍生物101(得克萨斯红)、N,N,N',N'四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)四甲基罗丹明和四甲基罗丹明异硫氰酸酯(TRITC));核黄素;玫瑰酸;铽螯合物衍生物;花青-3(Cy3);花青-5(Cy5);花青-5.5(Cy5.5)、花青-7(Cy7);IRD 700;IRD 800;Alexa 647;La Jolla蓝;酞菁花青和酞菁花青。

[0696] 在一些实施方案中,可检测剂可以是不可检测的前体,其在激活后变得可检测(例如荧光四嗪-荧光团构建体(例如四嗪-BODIPY FL、四嗪-俄勒冈绿488、或者四嗪-BODIPY TMR-X)或者酶可激活的荧光剂(例如PROSENSE®(VisEn Medical)))。可以使用酶标记组合物的体外测定包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀测定、免疫荧光、酶免疫测定(EIA)、放射免疫测定(RIA)和Western印迹分析。

[0697] 组合

[0698] 聚糖相互作用抗体可以与一种或更多种其它治疗剂、预防剂、诊断剂或成像剂组合使用。通过“与……组合”,并不意味着必须将试剂同时施用和/或配制成一起递送,尽管这些递送方法在本公开的范围内。组合物可与一种或更多种其它所需治疗剂或医疗程序同时、在其之前或之后施用。一般而言,每种试剂将按照为该试剂确定的剂量和/或时间表进行施用。在一些实施方案中,本公开包括将药物、预防、诊断和/或成像组合物与可改善其生物利用度、减少和/或改变其代谢、抑制其排泄和/或改变其体内分布的试剂组合递送。

[0699] 剂量

[0700] 考虑到药物递送科学的可能进展,本公开包括通过任何适当的途径递送聚糖相互作用抗体用于任何治疗、药物、诊断或成像。递送可以是裸的或配制的。

[0701] 裸递送

[0702] 本发明的聚糖相互作用抗体可以裸形式递送至细胞、组织、器官或生物体。如本文所用,术语“裸”是指不含促进转染或渗透性的试剂或修饰而递送的聚糖相互作用抗体。可以使用本领域已知和本文描述的施用途径将裸聚糖相互作用抗体递送至细胞、组织、器官和/或生物体。裸递送可包括在单纯缓冲液例如盐水或PBS中配制。

[0703] 配制的递送

[0704] 使用本文所述的方法配制本发明的聚糖相互作用抗体。制剂可以包括修饰和/或未被修饰的聚糖相互作用抗体。制剂可进一步包括但不限于细胞穿透剂、药学上可接受的载体、递送剂、生物蚀解或生物相容性聚合物、溶剂和缓释递送贮库。可以使用本领域已知和本文描述的施用途径将配制的聚糖相互作用抗体递送至细胞。

[0705] 组合物也可配制成以本领域任何方式直接递送至器官或组织,包括但不限于直接浸泡或沐浴,通过导管、凝胶、粉末、软膏、乳膏、凝胶、洗剂和/或滴剂、通过使用底物例如织物或生物可降解材料包被或浸渍有组合物等。

[0706] 给药(dosing)

[0707] 在一些实施方案中,本公开提供了方法,包括将根据本发明的一种或更多种聚糖相互作用抗体施用至有需要的受试者。编码包括聚糖相互作用抗体或其药学、成像、诊断或预防组合物的聚糖相互作用抗体、蛋白或复合物的核酸,可以使用有效预防、治疗、诊断或者成像疾病、病症和/或病况的任何量和任何施用途径而施用至受试者。根据受试者的物种、年龄和一般状况、疾病的严重程度、特定组成、施用模式、活动模式等,所需的确切数量会因受试者而异。根据本发明的组合物通常以剂量单位形式配制,以便于施用和剂量的均匀性。然而,可以理解的是,本发明组合物的总日用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。对于任何特定患者,特定的治疗有效、预防有效、或适当的成像剂量水平将取决于各种因素,包括所治疗的疾病和疾病的严重程度;所使用的具体化合物的活性;所使用的具体组合物;年龄、体重、一般健康状况、性别以及患者的饮食;施用时间、施用途径和所用具体化合物的排泄率;治疗持续时间;组合使用的药物或与所使用的具体化合物一致的药物;以及医学领域众所周知的类似因素。

[0708] 在某些实施方案中,可以以足以递送每天约0.0001mg/kg至约100mg/kg,约0.01mg/kg至约50mg/kg,约0.1mg/kg至约40mg/kg,约0.5mg/kg至约20mg/kg,0.5mg/kg至约30mg/kg,约0.01mg/kg至约10mg/kg,约0.1mg/kg至约10mg/kg,约2.5mg/kg至约5.0mg/kg或约1mg/kg至约25mg/kg受试者体重的剂量水平,来施用根据本发明的组合物,每天一次或更多次以获得期望的治疗、诊断、预防或成像效果。可以每天三次、每天两次、每天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周或每四周递送期望的剂量。某些实施方案中,使用多次施用(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14,或更多次施用)来递送期望的剂量。

[0709] 根据本发明,聚糖相互作用抗体可以以分开剂量方案施用。如本文所用,“分开剂量”是将单位剂量或每日总剂量分为两个或更多个剂量,例如单位剂量的两次或更多次施用。如本文所用,“单一单位剂量”是以一个剂量/一次/单一途径/单一接触点施用的任何治疗剂的剂量,即单次施用事件。如本文所用,“每日总剂量”是在24小时内施用或处方规定的量。它可以作为单一单位剂量施用。在一个实施方案中,本发明的聚糖相互作用抗体以分开剂量施用至受试者。聚糖相互作用抗体可以仅配制在缓冲液中或配制在本文所述的制剂

中。可以将本文所述的包含聚糖相互作用抗体的药物组合物配制成本文所述的剂型,例如局部、鼻内、气管内或可注射(例如静脉内、眼内、玻璃体内、肌内、心内、腹膜内或皮下)。制剂和/或药物制造的一般考虑可见于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy第21版本,Lippincott Williams&Wilkins,2005(通过引用并入本文)。

[0710] 在一些实施方案中,可以调节聚糖相互作用抗体的剂量以减少旁观者效应。如本文所用,“旁观者效应”是指对非靶标细胞或者邻近靶标细胞的细胞(在本文中也称为旁观者细胞)的任何负面影响。根据这样的方法,可以调整抗体剂量或者缀合物类型以减少旁观者效应。这样的调整可能导致治疗中大于95%、大于90%、大于85%、大于80%、大于75%、大于70%、大于65%、大于60%、大于55%、大于50%、大于45%、大于40%、大于35%、大于30%或大于25%的旁观者细胞仍然存活。

[0711] 包衣或者壳

[0712] 可以用包衣和壳制备固体剂型片剂、糖衣丸、胶囊剂、丸剂和颗粒剂,例如肠溶衣和药物制剂领域众所周知的其它包衣。它们可以任选地包含不透明剂,并且可以是仅仅释放活性成分或者优选地在肠道的某个部分中任选以延迟的方式释放活性成分的组合物。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。使用这种赋形剂(如乳糖或奶糖)以及高分子量聚乙二醇等,类似类型的固体组合物可用作软和硬填充明胶胶囊中的填充剂。

[0713] IV. 试剂盒和装置

[0714] 试剂盒

[0715] 本文所述的任何组合物可包含在试剂盒中。在非限制性实例中,用于产生聚糖相互作用抗体(包括抗原分子)的试剂包括在试剂盒中。试剂盒可进一步包括用于产生或合成聚糖相互作用抗体的试剂或者说明书。它也可能包含一种或更多种缓冲液。本发明的其它试剂盒可以包括用于制备聚糖相互作用抗体蛋白或者核酸阵列或文库的组分,并且因此可以包括例如固体支持物。

[0716] 在一些实施方案中,本公开包括用于筛查、监测和/或诊断受试者的试剂盒,其包括一种或更多种聚糖相互作用抗体。这种试剂盒可以单独使用,或者也可以与其它一种或更多种其它筛查、监测和/或诊断方法组合使用(例如作为伴随诊断)。一些试剂盒包括一种或更多种缓冲液、生物标准品、二抗、检测试剂和用于样本预处理(例如抗原恢复、阻断等)的组合物。

[0717] 试剂盒的组分可以在水性介质中或以冻干形式包装。试剂盒的容器装置通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其它容器装置,组分可以放置在其中,并且优选适当等分的。如果试剂盒中有不止一个组分(标记试剂和标记可包装在一起),试剂盒通常还会包含第二、第三或其它额外的容器,其中可以单独放置额外的组分。试剂盒还可以包括用于容纳无菌的药学上可接受的缓冲液和/或其它稀释剂的第二容器装置。然而,组分的各种组合可以被包括在小瓶中。本发明的试剂盒通常还将包括用于容纳聚糖相互作用抗体(例如蛋白、核酸)的装置和任何其它试剂容器,以严格限制用于商业销售。这样的容器可以包括注入或者吹塑的塑料容器,其中保留有期望的小瓶。

[0718] 当试剂盒的组分以一种和/或更多种液体溶液提供时,液体溶液是水溶液,其中无菌水溶液是特别优选的。然而,试剂盒的组分可以作为干粉提供。当试剂和/或组分以干粉形式提供时,可以通过添加合适的溶剂来重构粉末。可以设想,溶剂也可以在另一个容器装

置中提供。在一些实施方案中,标记染料以干粉形式提供。可以设想的是,本发明的试剂盒中提供10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900、1000微克或至少1000微克或至多10克干染料。然后染料可以重新悬浮在任何合适的溶剂中,例如DMSO。

[0719] 试剂盒可以包括使用试剂盒组分以及使用试剂盒中未包括的任何其它试剂的说明书。说明书可能包括可以实施的变化。

[0720] 装置

[0721] 本文所述的任何组合物可以组合、包被到或包埋入装置。装置包括但不限于牙科植入物、支架、骨替代物、人造关节、瓣膜、起搏器或其它植入式治疗装置。

[0722] V. 等价物和范围

[0723] 本领域技术人员将认识到,或者仅仅使用常规实验就能够确定本文所述根据本发明的具体实施方案的许多等价物。本发明的范围并非旨在限于上述说明,而是如所附权利要求书中所述。

[0724] 在权利要求中,冠词“一”、“一个”和“该”可以表示一个或多于一个,除非明确相反或者上下文另有指明。除非明确相反或者上下文另有指明,如果一个、多于一个或所有的组成员存在于、用于或关于给定产品或者方法,则在一个或多个成员之间包含“或”的权利要求或说明书,被认为是可行的。本发明包括这种的实施方案,其中恰好一个成员存在于、用于或关于给定产品或方法。本发明包括这种的实施方案,其中多于一个或所有的组成员存在于、用于或关于给定产品或者方法。

[0725] 还要注意的,术语“包含”意指开放的并且允许但不需要包括额外的元件或步骤。当使用术语“包含”时,因此也涵盖和公开术语“由……组成”。

[0726] 在给出范围的情况下,包括端点。此外,应该理解的是,除非另有说明,或者从上下文和对本领域普通技术人员的理解中明显看出,以范围表示的值可以假设在本发明不同实施方案中所述范围内的任何特定值或子范围,除非上下文另有明确规定,否则达到范围的下限的十分之一单位。

[0727] 此外,应该理解,落入现有技术的本发明的任何特定实施方案可以明确从任何一个或多个权利要求中排除。由于这样的实施方案被认为是本领域普通技术人员已知的,因此即使在本文中沒有明确表示排除,也可以排除它们。出于任何原因,无论是否与现有技术存在相关,本发明组合物的任何特定实施方案(例如任何核酸、或者由此编码的蛋白;任何生产方法;任何使用方法;等)可以从任何一个或多个权利要求中排除。

[0728] 即使未在引文中明确陈述,所有引用的资源(例如参考文献、出版物、数据库、数据库条目和本文引用的技术)通过引用并入本申请中。引用的资源和本申请有冲突陈述时,应以本申请中的陈述为准。

[0729] 章节和表格标题并不是限制性的。

[0730] 实施例

[0731] 实施例1. 聚糖阵列分析

[0732] 利用优化的聚糖阵列在单个实验中测试多种聚糖的抗体亲和性和特异性。聚糖阵列包括71个化学合成和明确定义的聚糖,其中大部分为Neu5Ac和Neu5Gc聚糖对。阵列玻片是商业上获得的(ArrayIt Corp, Sunnyvale, CA)并包括列于下表中的聚糖。

[0733] 表12.阵列聚糖

聚糖 ID No.	聚糖
1	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
2	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
3	Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
4	Neu5Gc9Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
5	Neu5Ac α 2,6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
6	Neu5Gc α 2,6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
7	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
8	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
9	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
10	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
[0734] 11	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
12	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
13	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
14	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
15	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
16	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
17	Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
18	Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
19	Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
20	Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
21	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
22	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
23	Neu5,9Ac2 α 2,6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂

[0735]

24	Neu5Gc9Aca2,6GalNAcaO(CH2)2CH2NH2
25	Neu5Aca2,3GalβO(CH2)2CH2NH2
26	Neu5Gca2,3GalβO(CH2)2CH2NH2
27	Neu5Aca2,6GalβO(CH2)2CH2NH2
28	Neu5Gca2,6GalβO(CH2)2CH2NH2
29	Neu5,9Ac2α2,3GalβO(CH2)2CH2NH2
30	Neu5Gc9Aca2,3GalβO(CH2)2CH2NH2
31	Neu5,9Ac2α2,6GalβO(CH2)2CH2NH2
32	Neu5Gc9Aca2,6GalβO(CH2)2CH2NH2
33	Neu5Aca2,3Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
34	Neu5Gca2,3Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
35	Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
36	Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
37	Neu5,9Ac2α2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
38	Neu5Gc9Aca2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
39	Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
40	Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
41	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
42	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
43	Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
45	Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
47	GalNAcaO(CH2)2CH2NH2
51	Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
52	Galβ1,3GlcNAcaO(CH2)2CH2NH2
53	Galβ1,3GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
54	Galβ1,4GlcNAc6SβO(CH2)2CH2NH2
55	Neu5Aca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
56	Neu5Gca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
57	Neu5Aca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAc6SβO(CH2)2CH2NH2
58	Neu5Gca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAc6SβO(CH2)2CH2NH2
59	Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
60	Neu5Aca2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
61	Neu5Gca2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
62	Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcNAc6SβO(CH2)2CH2NH2
63	Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcNAc6SβO(CH2)2CH2NH2
64	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)3NHCOCH2(OCH2CH2)6NH2
65	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)3NHCOCH2(OCH2CH2)6NH2
66	Neu5Aca2,6(Neu5Aca2,3)Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2

[0736]

67	Neu5Ac α 2,6(Neu5Gc α 2,3)Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
68	Neu5Ac α 2,6(KDN α 2,3)Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
69	Neu5Gc α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
70	KDN α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
71	Neu5Ac α 2,8Kdn α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
72	Neu5Ac α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
73	Neu5Ac α 2,8Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
74	KDN α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
75	Neu5Gc α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
76	Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂

[0737] 通过将15ml 2M Tris缓冲液 (pH8) 与0.9ml 16.6M乙醇胺和284.1ml蒸馏水组合制备300ml环氧封闭缓冲液。用HCl使溶液达到最终pH9.0。使用0.2 μ M硝酸纤维素膜过滤溶液。环氧缓冲溶液以及1升蒸馏水预热至50℃。玻片安放在玻片架 (holder) 上,并迅速浸入带有加热的环氧封闭缓冲液的染色桶中。将玻片在环氧封闭缓冲液中于50℃孵育1小时,并定期摇动以使环氧结合位点失活。接下来,将玻片冲洗并在25℃下用含有1%OVA的PBS封闭1小时。用含1%OVA的PBS稀释含有多克隆抗体 (1:1000) 或纯化单克隆抗体 (1 μ g/mL) 的血清样本,并在25℃下加入到聚糖阵列中1小时。充分洗涤后,通过将聚糖微阵列玻片与Cy3缀合的抗小鼠IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 一起孵育1小时来检测抗体的结合。然后将玻片充分洗涤,干燥并用Genepix 4000B扫描仪 (激光100%;增益350;10 μ m像素) 扫描。使用Genepix软件提取扫描图像的原始数据,并对原始数据进行分析。如果表现出与两种分子的结合,但对阵列上的Tn或任何其它聚糖没有结合,则认为抗体对AcSTn和GcSTn具有高度特异性。

[0738] 基于阵列分析,根据阵列聚糖结合谱对抗体分类。如果抗体与聚糖5、6、23和24结合,则抗体被分类为能够结合AcSTn和GcSTn的“第1组”抗体。由于这些抗体与图1A中大椭圆表示的更宽范围STn结构和STn部分结合的能力,所以这些抗体被称为泛STn抗体。如果抗体与聚糖5、6、23、24、27和31结合,那么抗体被分类为“第2组”抗体,其能够结合STn以及一些包括与丝氨酸或者苏氨酸的O-键相关的结构。这些抗体被认为与图1B中由大椭圆表示的STn部分结合。一些第2组抗体优选结合具有AcSTn的结构,而非具有GcSTn的结构。如果抗体与聚糖5、6、23、24、17、3、19、37、27和31结合,则抗体被分类为“第3组”抗体 (能够结合STn,但也可以结合更广泛的相关结构)。与第2组抗体不同,第3组抗体不要求此类结构具有与丝氨酸或苏氨酸的O-连接。第3组抗体被认为与图1C中大椭圆所示的STn部分结合。最后,如果抗体与聚糖5、6、23、24和47结合,则抗体是“第4组”抗体,它们能够结合AcSTn和GcSTn以及非唾液酸化的Tn抗原 (因此具有更宽的特异性)。认为第4组抗体与图1D中由大椭圆表示的STn部分结合。

[0739] 实施例2. 基于流式细胞术的抗体结合分析

[0740] 进行基于流式细胞术的分析以阐明抗体与细胞表面抗原结合的剂量-反应曲线。对于这些分析,采用各种细胞系。

[0741] MDA-MB-231细胞是人乳癌细胞。它们在补充有10%胎牛血清 (FCS)、100 μ g/ml青霉素、100UI/ml链霉素和45 μ g/ml庆大霉素的Earle氏最低必需介质中生长。MCF-7细胞也是人乳癌细胞,并且在与MDA-MB-231细胞相同的条件下生长。过表达(α -N-乙酰-神经氨酸-2,3-

β -半乳糖基-1,3)-N-乙酰半乳糖胺 α -2,6-唾液酸转移酶I (GalNAc α 2,6-唾液酸转移酶I或ST6GalNAcI)的稳定转染形式MDA-MB-231 (MDA-MB-231-STn,克隆TAH3.P10)和MCF-7细胞(MCF-7细胞的克隆A12.1)也在相同条件下培养,除了加入1mg/ml的G418以支持表达转基因的细胞。ST6GalNAc I是能够唾液酸化GalNAc的酶。由于过表达,转染的细胞表达高水平的Neu5Ac-STn(参见Julien,S.等人,Glycoconjugate journal.2001.18,883-93;其内容在此通过引用整体并入本文)。

[0742] E3细胞是鼠乳癌细胞。它们在含有10%FCS的Dulbecco氏E4介质中培养。用600 μ g/ml G418和200 μ g/ml潮霉素培养表达高水平Neu5Gc-STn (E3-STn)的稳定转染形式的E3细胞。在实验细胞的生长和维持期间,胰蛋白酶不用于细胞传代。

[0743] 也使用OV90和OVCAR3细胞。这些是人卵巢癌细胞系,如前所述。

[0744] 还使用SNU-16细胞。这些是表达低水平STn的胃癌细胞系。

[0745] 为了分析,使用StemPro Accutase (Life Technologies,Carlsbad,CA)收获细胞,并用包含5%FBS的PBS洗涤,然后通过轻微的离心进行沉淀。通过台盼蓝染料排除分析确定细胞数目和活力,并将细胞浓度调整至含有5%FBS的PBS中的 5×10^6 个细胞/ml。将50 μ l细胞加入到测定板的每个孔中。将细胞与50 μ l被分析的抗体溶液或对照抗体组合,并在4 $^{\circ}$ C孵育1小时。用含有5%FBS的PBS洗涤细胞两次,然后用100 μ l PBS处理,其中含有5%FBS、1:1500稀释的别藻蓝蛋白(APC)缀合的抗小鼠IgG (Southern Biotech,Birmingham,阿拉巴马)。将细胞在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,然后洗涤并再悬浮于含有5%FBS的PBS中按1:1000稀释的200 μ l碘化丙啶(PI)中。然后对经处理的细胞进行流式细胞术分析,并对每个样本获得10000个事件。

[0746] 实施例3.抗体人源化

[0747] 用本文所示的CDR设计完全人源化的重链和轻链。使用现有的抗体结构作为模板产生可变区的蛋白模型。将起始重链和轻链可变区氨基酸序列的区段与人序列进行比较,以便可能纳入完全人源化的序列。人源化重链和轻链可变区系列完全由人可变区序列区段设计而来,目的是避免T细胞表位。通过计算机技术确定的具有潜在T细胞表位显著发生率的变体人序列区段将被丢弃。

[0748] 使用连接酶链式反应(LCR)从重叠的寡核苷酸构建人源化的重链和轻链可变区基因,所述重叠的寡核苷酸组装成全长基因。扩增LCR产物并添加合适的限制性位点以克隆入表达载体。将PCR产物克隆入中间载体并通过测序确认。

[0749] 为了构建编码带有人恒定区的完全人源化抗体的表达质粒,在上游巨细胞病毒立即/早期启动子/增强子(CMV IE)加免疫球蛋白信号序列和下游免疫球蛋白恒定区基因之间,将每个可变区的DNA序列插入哺乳动物表达载体。制备DNA样本用于转染入哺乳动物细胞。

[0750] 为了产生细胞系和选择先导完全人源化抗体,将重链和轻链质粒DNA对转染到哺乳动物细胞(NS0)中。扩增产生人源化抗体的细胞系并且纯化抗体样本。在初级和次级结合测定中测试抗体以确定先导候选抗体。先导候选用于进一步分析。

[0751] 实施例4.免疫原性测试

[0752] 使用来自健康志愿者供体的最少20个血液样本对先导抗体进行EpiScreen (Antitope,Paradise Valley,AZ)全抗体人T细胞测定。将先导抗体的免疫原性与具有起始

抗体可变区和匹配的人恒定区的对照嵌合抗体进行比较。对于临床阶段的生物制剂,数据以EpiScreen全蛋白数据为基准。

[0753] 实施例5.抗体序列分析

[0754] 分析抗聚糖抗体可变结构域序列的序列相似性以及可能影响抗体功能、表达、稳定性或免疫原性的特征。所使用的抗体可商购获得,或者如先前美国公开号US2016/0264684和US2016/0130356中所述的进行开发,其内容通过引用整体并入本文。与重链可变结构域相比,轻链可变结构域的分析显示出更多的可变性。此外,确定了抗聚糖抗体的重链可变结构域来源于单种系基因muIGHV1S53,这是一种与本领域已知的与抗STn抗体共享的种系基因:抗体3F1 (SBH Sciences,Natick,MA)、抗体B72.3 (参见Colcher,D.等人,1981,PNAS.78 (5):3199-203) 和抗体CC49 (参见Muraro,R.等人,1988.Cancer Res 48:4588-96)。下表列出了基于分析的重链CDR序列的比较视图。

[0755] 表13.CDR序列重链比较

克隆 ID	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3	SEQ ID NO
8C2-2D6	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKG	107	SITTSY	114
4G8-1E3	GYIFTDHAIH	106	YISPGNGDIKYNEK FKG	107	SITTSY	114
2G12-2B2	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDIKYNEK FRG	108	SLSTP Y	115
5G2-1B3	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDIKYNEK FKV	109	SYYG D	116
5E6-2E7	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKV	110	SITTPY	117
2C2-2C5	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKG	107	SITTPY	117
9F11-1F7	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKV	110	SITTPY	117
1F6-1C10	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDVKYSER FKG	137	SLSTP Y	115
7D3-2C10	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDIKYSEK	138	SITTPY	117

[0757]

			FKG			
7A5-2G12	GYTFTDHAIH	105	YISPGNDDIKYNEK FKG	113	SITTSY	114
10F4-2A9	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYDEK FKG	139	SITTSY	114
2F4-1E2	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKG	107	QLGQ GY	140
2C6-2F11	GYTFSDHAIH	136	YISPGNDDIKYNEK FKG	113	SMIGV Y	141
6B11-2E3	GYTFTDHAIH	105	YISPGNDDIKYNEK FKG	113	SITTSY	114
3F1	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKD	111	SLLAL DY	118
CC49	GYTFTDHAIH	105	YFSPGNDDFKYNE KFKG	112	SLNM AY	119
B72.3	GYTFTDHAIH	105	YISPGNDDIKYNEK FKG	113	SYYG H	120
一致	GYTFTDHAIH	105	YISPGNGDIKYNEK FKG	107	SITTSY	114

[0758] 相对于中值长度,CDR-H3序列的变化在于加或减一个氨基酸。

[0759] 有趣的是,发现靶标特异性轻链来源于5个轻链种系家族:IGKV6、IGKV15、IGKV8、IGKV1和IGKV12。其中,全部具有相同的CDR-L2和CDR-L3序列长度。发现两类CDR-L1序列持续存在(长(IGKV8和IGKV1)和短(IGKV6、IGKV15和IGKV12)),可能在每个类中呈现统一的拓扑结构。

[0760] 轻链CDR序列的比较如下表所示。

[0761] 表14.CDR序列轻链比较

[0762]

克隆 ID	CDR-L1	SEQ ID NO	CDR-L2	SEQ ID NO	CDR-L3	SEQ ID NO
8C2-2D6	KASENVVTVVS	121	GASNR YT	77	GQGYSYP YT	89
8C2-2D6(V2)	HASQNINWLS	142	KASNL YT	147	QHDQSYPT Y	148
4G8-1E3	HASQHINFWLS	122	KASNLH T	80	QQDQSYPT YM	103
2G12-2B2	KSSQSLLNRGNHK NYLT	123	WASTR ES	85	QNDYTYP YT	97

[0763]

5G2-1B3	RASENIYSHLA	124	GATNL AD	79	QHFWGAP FT	91
5E6-2E7	KSSQSLLNSGKTKN YLT	125	WASTR ES	85	KNDYSYP YT	102
2C2-2C5	KASQSVNNNVA	126	YASNR YT	84	QGGYSSP WT	96
1F6-1C10	KSSQSLLNSGNQKS YLT	143	WASTR DS	83	QSDYSYPY T	95
7D3-2C10	HASQNIN VWLS	142	KVSNLH T	88	QQDQSYP YT	101
7A5-2G12	KASENVVIYVS	144	GASNR YT	77	GQGYSYP YT	89
10F4-2A9	KASENVVTYVS	121	GASNR YT	77	GQGYSYP YT	89
2F4-1E2	RSSQSLVHSYGNTY LH	145	KVSNRF S	81	SQNTHPY T	93
2C6-2F11	RFSQSLVQSNGNTY LQ	146	KVSNRF C	86	SQSTHAPL T	98
6B11-2E3	KASENVVTYVS	121	GASNR YT	77	GQGYSYP YT	89
3F1	KASQDVGTNIA	127	SASTRH T	130	QQYSSFPL T	133
CC49	KSSQSLLYSGNQKN YLA	128	WASAR ES	131	QQYYSYPL T	134
B72.3	RASENIYSNLA	129	AATNL AD	132	QHFWGTP YT	135

[0764] 总之,序列分析表明CDR-H3多样性的不同模式与特定轻链种系配对相对应。根据这些配对,鉴定了三个序列组((组A(具有亚组A1和A2)、组B(具有亚组B1和B2)和组C)。下表列出了落入每组的抗体列表。

[0765] 表15.抗体序列组

[0766]

克隆 ID	轻链鼠种系	序列组
8C2-2D6	IGKV6-20	组 A1
7A5-2G12	IGKV6-20	组 A1
10F4-2A9	IGKV6-20	组 A1
6B11-2E3	IGKV6-20	组 A1
2C2-2C5	IGKV6-32	组 A1
3F1	IGKV6-32	组 A1
4G8-1E3	IGKV15-103	组 A2
7D3-2C10	IGKV15-103	组 A2

[0767]	8C2-2D6(V2)	IGKV15-103	组 A2
	2G12-2B2	IGKV8-19	组 B1
	5E6-2E7	IGKV8-19	组 B1
	1F6-1C10	IGKV8-19	组 B1
	CC49	IGKV8-30	组 B1
	2F4-1E2	IGKV1-110	组 B2
	2C6-2F11	IGKV1-110	组 B2
	5G2-1B3	IGKV12-46	组 C
	B72.3	IGKV12-46	组 C

[0768] 组A包括抗体8C2-2D6、4G8-1E3和3F1。除了3F1之外,这些抗体具有相似的CDR-H3序列,就CDR-H3长度而言3F1与所有其它抗体不同(具有额外的氨基酸,产生更长的环)。组A抗体也具有相似的轻链CDR,尤其是CDR残基长度。

[0769] 组B包括抗体2G12-2B2和CC49。在重链序列的相似性中,这些抗体在CDR-H2中具有保守的F和D残基并且在CDR-H3中具有保守的L残基。另外,组B抗体具有高度相似的轻链序列。

[0770] 组C抗体包括5G2-1B3和B72.3。在它们的重链序列之间的相似性中,这些抗体在其CDR-H2序列中具有保守的D残基以及在其CDR-H3序列中具有YYG基序。组C抗体也具有高度相似的轻链序列。

[0771] 鉴定的有限数量的组显示了抗STn结合所需的相对罕见的序列特异性。抗体分组有助于鉴定相关的基于组内序列的对表位结合的贡献。值得注意的是,在组A内,3F1独特地包含可能有助于新型结合谱的扩展CDR-H3环。有趣的是,免疫组织化学数据表明3F1可以结合更广泛的靶标,包括与内皮细胞的不希望的结合。

[0772] 实施例6. 抗体变体

[0773] 分析本发明抗聚糖抗体的可变结构域序列中可能影响抗体功能、表达、稳定性和/或免疫原性的序列特征。

[0774] 分析的许多抗体具有含有NG残基对的CDR-H2序列,使它们对天冬酰胺脱酰胺化敏感,随着时间的推移可能以3:1的比例转化为谷氨酸和焦谷氨酸。可以对这些序列进行诱变以将NG残基对转换为SG或QG对,以防止在这些位点上脱酰胺。另外,可以配制这些抗体以减少脱酰胺作用。

[0775] 抗体2B2-2A7和5G2-1B3在其轻链可变结构域中具有天冬氨酸异构化位点(由DG氨基酸残基对鉴定)。随着时间的推移,这些位点的天冬氨酸可以3:1的比例转化为谷氨酸和焦谷氨酸。可以对这些序列进行诱变以将DG残基对转化为SG或QG以防止在这些位点的异构化。另外,可以配制这些抗体以减少异构化。

[0776] 许多抗体具有含N-末端谷氨酰胺残基的重链。这些序列可以进行诱变以将N-末端谷氨酰胺残基转化为谷氨酸残基。

[0777] 聚集倾向片层的序列分析揭示了5G2-1B3的CDR-L3中HFW区段携带增加抗体聚集的一些风险。用这种基序的变体进行聚集稳定性研究以鉴定更少聚集倾向的抗体。

[0778] 实施例7. 抗体人源化

[0779] 使用序列和结构分析开发了先导抗体的人源化形式。首先,鉴定每种抗体的小鼠种系抗体序列(参见下表)。

[0780] 表16.抗体小鼠种系序列

抗体	VH小鼠种系	VL小鼠种系
4G8-1E3	muIGHV1S53	muIGKV15-103
5G2-1B3	muIGHV1S53	muIGKV12-46
2G12-2B2	muIGHV1S53	muIGKV8-19
8C2-2D6	muIGHV1S53	muIGKV6-20
3F1	muIGHV1S53	muIGKV6-23

[0782] 然后,将抗体可变结构域序列与人框架序列进行比较,并且通过同源性鉴定适合CDR移植的人框架序列。可变结构域示意图如图2所示,表示与CDR有关的抗体可变结构域框架区布局(框架区1(FR1)、框架区2(FR2)、框架区3(FR3)和框架区4(FR4))。下表显示人框架或人一致序列,其经选择以取代抗体4G8-1E3、5G2-1B3、2G12-2B2、8C2-2D6和3F1的相应框架区。人一致1重链的FR4对应于氨基酸序列WGQGTILTVSS(SEQ ID NO:215),人一致1轻链的FR4对应于氨基酸序列FGQGTVKVEIK(SEQ ID NO:216)。

[0783] 表17.所选人框架区

mAb	链	FR1	CDR1 (SEQ ID NO)	FR2	CDR2 (SEQ ID NO)	FR3	CDR3 (SEQ ID NO)	FR4
4G8-1E3	VH	IGHV1-18*01	106	IGHV1-18*01	107	IGHV1-18*01	114	人一致 1, 重链
4G8-1E3	VL	IGKV1-39*01	122	IGKV1-39*01	80	IGKV1-39*01	103	人一致 1, 轻链
5G2-1B3	VH	IGHV1-18*01	105	IGHV1-18*01	109	IGHV1-18*01	116	人一致 1, 重链
5G2-1B3	VL	IGKV1-39*01	124	IGKV1-39*01	79	IGKV1-39*01	91	人一致 1, 轻链
2G12-2B2	VH	IGHV1-18*01	105	IGHV1-18*01	108	IGHV1-18*01	115	人一致 1, 重链
2G12-2B2	VL	IGKV4-1*01	123	IGKV4-1*01	85	IGKV4-1*01	97	人一致 1, 轻链
8C2-2D6	VH	IGHV1-18*01	105	IGHV1-18*01	107	IGHV1-18*01	114	人一致 1, 重链
8C2-2D6	VL	IGKV1-39*01	121	IGKV1-39*01	77	IGKV1-39*01	89	人一致 1, 轻链
8C2-2D6	VL (V2)	IGKV1-39*01	142	IGKV1-39*01	147	IGKV1-39*01	148	人一致 1, 轻链
3F1	VH	IGHV1-18*01	105	IGHV1-18*01	111	IGHV1-18*01	118	人一致 1, 重链
3F1	VL	IGKV1-39*01	127	IGKV1-39*01	130	IGKV1-39*01	133	人一致 1, 轻链

[0785] 进行另外的分析以鉴定可以回交以提高抗体结合或其它性质的残基。基于此分析,设计了几种人源化的VL和VH序列用于合成和测试。这些包括下表中列出的可变结构域序列。在表中,表示了VH或者VL结构域,接着是数字以显示变体编号。带有数字“0”的结构域

表示没有任何回复突变的人源化序列。

[0786] 表18.人源化的可变结构域

	mAb	链	序列	SEQ ID NO
[0787]	5G2-1B3	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENI YSHLAWYQQKPGKAPKLLIYGATNLA DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQHFWGAPFTFGQGTKVEIK	217

[0788]

5G2-1B3	VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENI YSHLAWYQQKPGKAPKLLVYGATNLA SGVPSRFSGSGSGTQFTLTISSLQPEDFA TYYCQHFHWGAPFTFGQGGTKVEIK	218
5G2-1B3	VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENI YSHLAWYQQKPGKAPKLLVYGATNLA DGVPSRFSGSGSGTQFTLTISSLQPEDFA TYYCQHFHWGAPFTFGQGGTKVEIK	219
5G2-1B3	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTDHAHWVRQAPGQGLEWMGYFS PGNDDIKYNEKFKVRVTMTTDTSTSTA YMELRSLRSDDTAVYYCARSYYGDWG QGTLVTVSS	220
5G2-1B3	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTDHAHWVRQAPGQGLEWMGYFS PGNDDIKYNEKFKVRVTMTADKSSSTA YMELRSLRSDDTAVYFCKRSYYGDWG QGTLVTVSS	221
5G2-1B3	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGY TFTDHAHWVRQAPGQGLEWIGYFSPG NDDIKYNEKFKVRATLTADKSSSTAYM ELRSLRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQG TLVTVSS	222
5G2-1B3	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTDHAHWVRQAPGQGLEWMGYFS PGNDDIKYNEKFKVRVTMTADKSSSTA YMELRSLRSDDTAVYFCKRSYYGDWG QGTLVTVSS	223
5G2-1B3	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGY TFTDHAHWVRQAPGQGLEWIGYFSPG NDDIKYNEKFKVRATLTADKSSSTAYM ELRSLRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQG TLVTVSS	224
4G8-1E3	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQH INFWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASNLH TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQDQSYPMFGQGGTKVEIK	225
4G8-1E3	VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQH INFWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLHT GVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFAT YYCQQDQSYPMFGQGGTKVEIK	226

4G8-1E3	VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCHASQHI NFWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLHT GVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDVAT YYCQQDQSYPYMFGQGGTKLEIK	227
4G8-1E3	VL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQH INFWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLHT GVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFAT YYCQQDQSYPYFFGQGGTKVEIK	228
4G8-1E3	VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCHASQHI NFWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLHT GVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDVAT YYCQQDQSYPYFFGQGGTKLEIK	229
4G8-1E3	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG YIFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISP GNGDIKYNEKFKGRVTMTTDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVYYCARSITTSYWGQ GTLVTVSS	230
4G8-1E3	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG YIFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISP GNGDIKYNEKFKGRVTMTADKSSSTAY MELRSLRSDDTAVYFCKRSITTSYWGQ GTLVTVSS	231
4G8-1E3	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGY IFTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYISPGN GDIKYNEKFKGRATLTADKSSSTAYMH LRSLRSDDTAVYFCKRSITTSYWGQGT LTVSS	232
4G8-1E3	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG YIFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYISP GSGDIKYNEKFKGRVTMTADKSSSTAY MELRSLRSDDTAVYFCKRSITTSYWGQ GTLVTVSS	233
4G8-1E3	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGY IFTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYISPGS GDIKYNEKFKGRATLTADKSSSTAYMH LRSLRSDDTAVYFCKRSITTSYWGQGT LTVSS	234
2G12-2B2	VL0	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS LLNRGNHKNYLTWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS LQAEDVAVYYCQNDYTPYTFGQGGTK VEIK	235

[0789]

2G12-2B2	VL2	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQ SLLNRGNHKNYLTWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQNDYTYPYTFGQGT KVEIK	236
2G12-2B2	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYFS PGNDDIKYNEKFRGRVTMTTDTSTSTA YMELRSLRSDDTAVYYCARSLSTPYW GQGTLLTVSS	237
2G12-2B2	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYFS PGNDDIKYNEKFRGRVTMTADKSSSTA YMELRSLRSDDTAVYFCKRSLSTPYWG QGTLLTVSS	238
2G12-2B2	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGY TFTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYFSPG NDDIKYNEKFRGRVTLTADKSSSTAYM ELRSLRSDDTAVYFCKRSLSTPYWGQG TLTVSS	239
2G12-2B2	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYFS PGNDDIKYNEKFRGRVTMTADKSSSTA YMELRSLRSDDTAVYFCKRSLSTPYWG QGTLLTVSS	240
2G12-2B2	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGY TFTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYFSPG NDDIKYNEKFRGRVTLTADKSSSTAYM ELRSLRSDDTAVYFCKRSLSTPYWGQG TLTVSS	241
8C2-2D6	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASEN VVTYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNR YTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCGQGYSYPYTFGQGTKVEIK	242
8C2-2D6	VL1	NIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASEN VVTYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNR YTGVPSPRFSGSGSATDFTLTISLQPEDF ATYYCGQGYSYPYTFGQGTKVEIK	243
8C2-2D6	VL2	NIVMTQSPSSMSMSVGDRVTLTCKASE NVVTYVSWYQQKPGKSPKLLIYGASNR YTGVPSPRFSGSGSATDFTLTISVQPEDL ATYHCGQGYSYPYTFGQGTKLEIK	244

[0790]

8C2-2D6(V2)	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQN INVWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASNLY TGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFA TYYCQHDQSYPTYFGQGTKVEIK	245
8C2-2D6(V2)	VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQN INVWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLY TGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFA TYYCQHDQSYPTYFGQGTKVEIK	246
8C2-2D6(V2)	VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCHASQNI NVWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLYT GVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFAT YYCQHDQSYPTYFGQGTKLEIK	247
8C2-2D6(V2)	VL3	DIQMNQSPSSLSASVGDRITITCHASQNI NVWLSWYQQKPGKIPKLLIYKASNLYT GVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFAT YYCQHDQSYPTYFGQGTKLEIK	248
8C2-2D6	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYIS PGNGDIKYNEKFKGRVTMTTDTSTSTA YMELRSLRSDDTAVYYCARSITTSYWG QGTLVTVSS	249
8C2-2D6	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYIS PGNGDIKYNEKFKGRVTMTADKSSTTA YMELRSLRSDDTAVYFCKRSITTSYWG QGTLVTVSS	250
8C2-2D6	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGY TFTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYISPG NGDIKYNEKFKGRATLTADKSSTTAYM ELRSLRSDDTAMYFCKRSITTSYWGQG TLVTVSS	251
8C2-2D6	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGYIS PGSGDIKYNEKFKGRVTMTADKSSTTA YMELRSLRSDDTAVYFCKRSITTSYWG QGTLVTVSS	252
8C2-2D6	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGY TFTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYISPG SGDIKYNEKFKGRATLTADKSSTTAYM ELRSLRSDDTAMYFCKRSITTSYWGQG TLVTVSS	253

[0791] 选择可变结构域对用于完整抗体的初始表达和测试。在针对5G2-1B3选择的对中，有VL0和VH0(无回复突变)；VL1和VH1；VL1和VH2；VL2和VH1；VL2和VH2；以及VL1和VH3。在针

对4G8-1E3选择的对中,有VL0和VH0(无回复突变);VL1和VH1;VL1和VH2;VL2和VH1;VL2和VH2;VL1和VH3;VL3和VH1;以及VL3和VH3。在针对2G12-2B2选择的对中,有VL0和VH0(无回复突变);VL0和VH1;VL0和VH2;VL2和VH1;VL2和VH2;以及VL0和VH3。在针对8C2-2D6选择的对中,有VL0和VH0(无回复突变);VL1和VH1;VL1和VH2;VL2和VH1;VL2和VH2;以及VL1和VH3。在针对8C2-2D6(V2)选择的对中,有VL0和VH0(无回复突变);VL1和VH1;VL1和VH2;VL2和VH1;VL2和VH2;VL3和VH2;以及VL1和VH3。

[0792] 评估3F1全长重链氨基酸序列(SEQ ID NO:40)是否存在未配对的半胱氨酸残基。当是部分IgG时,重链残基80被鉴定为不配对的半胱氨酸。在溶液中时,该半胱氨酸被确定为接近溶剂并因此是反应性的。将鼠3F1VH变体设计为用丝氨酸残基取代该残基(SEQ ID NO:40的残基80)

(QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHWVKQKPEQGLDWIGYISPGNG
DIKYNEKFKDKVTLTADKSSSTASMLNSLTSEDSAVYFCKRSLALDYWGQGTTLT
VSS; SEQ ID NO: 42).

[0793] 还设计了人源化3F1抗体可变结构域并将其呈现在下表中。在表中,表示了VH或者VL结构域,接着是数字以显示变体编号。带有数字“0”的结构域表示没有任何回复突变的人源化序列。提供的所有VH变体设计为用丝氨酸残基或具有疏水性侧链的氨基酸(例如酪氨酸)取代未配对的半胱氨酸残基(SEQ ID NO:40的残基80)。

[0794] 表19.3F1变体可变结构域

mAb	链	序列	SEQ
			ID NO
3F1	VL0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTNIA WYQQKPGKAPKLLIYSASTRHTGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQYSSFPLTFGQGGTK VEIK	254
	VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTNIA WYQQKPGKAPKVLIIYSASTRHTGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYFCQYSSFPLTFGQGGTK VEIK	255

[0796]

3F1	VH0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHA IHWVRQAPGQGLEWMGYISPGNGDIKYNEKFKD RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARS LLALDYWGQGTLVTVSS	256
3F1	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHA IHWVRQAPGQGLEWMGYISPGNGDIKYNEKFKD RVTMTADKSSSTAYMQLRSLRSDDTAVYFCKRS LLALDYWGQGTLVTVSS	257
3F1	VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAI HWVRQAPGQGLEWIGYISPGNGDIKYNEKFKDR VTLTADKSSSTASMHLRSLRSDDTAVYFCKRSLL ALDYWGQGTLVTVSS	258
3F1	VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHA IHWVRQAPGQGLEWMGYISPGSGDIKYNEKFKD RVTMTADKSSSTAYMQLRSLRSDDTAVYFCKRS LLALDYWGQGTLVTVSS	259
3F1	VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAI HWVRQAPGQGLEWIGYISPGSGDIKYNEKFKDR VTLTADKSSSTASMHLRSLRSDDTAVYFCKRSLL ALDYWGQGTLVTVSS	260

[0797] 选择可变结构域对用于完整抗体的初始表达和测试。在针对3F1选择的对位中,有VL0和VH0,VL1和VH1,VL1和VH2,VL1和VH3,VL1和VH4,VL0和VH3。

[0798] 实施例8.人源化抗体的表征

[0799] 如先前实施例中所述,表达具有可变结构域的人源化IgG1抗体并进行特征分析,包括使用MDA-MB-231-STn细胞的基于流式细胞术的结合分析;通过BSM ELISA的结合分析;以及聚糖阵列分析。

[0800] 在基于流式细胞术的结合研究中,在0至300nM浓度范围内筛选抗体,对有或没有转染诱导型STn表达的MDA-MB-231细胞的结合进行比较。使用抗人APC缀合的二抗确定结合,并且仅考虑活细胞(基于碘化丙啶阴性门控)。每个样本平均收集5,000个事件。使用FlowJo软件(Asland,OR)分析数据,获得所得APC平均值和%APC。将这些数据进行对数转换,然后拟合至非线性回归模型以获得剂量响应曲线和 EC_{50} 结合信息。人同种型IgG1抗体被用作同种型阴性对照。使用表皮生长因子受体(LA22,EMDMillipore,Billerica,MA)作为阳性对照。

[0801] 对于BSM ELISA分析,在牛下颌黏蛋白(BSM)包被的孔上筛选浓度范围为0至100nM的抗体。在抗体结合以去除末端唾液酸残基上的侧链(破坏STn抗原)之前,用温和的高碘酸盐溶液处理子集的孔。确定高碘酸盐和非高碘酸盐处理的孔的光密度并进行对数转换,然后拟合至非线性回归模型以获得剂量响应曲线。非高碘酸盐处理的孔减去高碘酸盐处理的孔中获得的光密度值,以获得高碘酸盐敏感的STn结合曲线和相应的 EC_{50} 值。

[0802] 如前所述进行聚糖阵列分析,根据其中描述的参数将抗体分配为阵列聚糖结合谱。

[0803] 流式细胞术、ELISA和聚糖阵列分析的结果列于下表中。

[0804] 表20.抗体表征结果

克隆 ID	人源化可变结构域对	MDA-MB-231-STn 细胞结合 (EC ₅₀ (nM))	BSM ELISA (EC ₅₀ (nM))	阵列聚糖 结合谱	
[0805]	3F1	VL1,VH1	0.3	1.8	第 1 组
	3F1	VL1,VH2	0.7	1.4	第 1 组
	3F1	VL1,VH4	9.8	6.5	第 1 组
	3F1	VL1,VH3	20.1	12.2	第 1 组
	2G12-2B2	VL0,VH3	2.0	4.2	第 1 组
	2G12-2B2	VL2,VH2	0.6	2.9	第 1 组
	2G12-2B2	VL0,VH2	0.8	1.8	第 1 组
	2G12-2B2	VL2,VH1	1.4	4.4	第 1 组
	2G12-2B2	VL0,VH1	2.1	4.5	第 1 组
	5G2-1B3	VL1,VH2	0.1	未确定	第 4 组
	5G2-1B3	VL1,VH3	0.2	未确定	第 4 组
	5G2-1B3	VL2,VH2	0.2	未确定	第 4 组
	5G2-1B3	VL2,VH1	0.3	未确定	第 4 组
	5G2-1B3	VL1,VH1	0.1	未确定	第 4 组

[0806] 所有测试的抗体均显示出与细胞-和BSM-相关STn的结合。用人IgG1同种型对照(Southern Biotech,Birmingham,AL)未观察到结合。在ELISA测定中人源化5G2-1B3结合对高碘酸盐不敏感,因此不能通过BSM ELISA确定可靠的EC₅₀。

[0807] 基于表征实验的结果,针对1升的表达从每个克隆组选择两种抗体,并且根据相同程序再次测试所得抗体(参见下表中的结果)。

[0808] 表21. 一升的生产之后抗体表征结果

[0809]

克隆 ID	人源化可变结构域对	MDA-MB-231-STn 细胞结合 (EC ₅₀ (nM))	BSM ELISA (EC ₅₀ (nM))
3F1	VL1,VH1	0.48	0.86
3F1	VL1,VH2	0.67	0.57
2G12-2B2	VL0,VH3	1.20	0.80
2G12-2B2	VL2,VH2	0.45	1.82
5G2-1B3	VL1,VH2	0.34	未确定
5G2-1B3	VL1,VH3	1.57	未确定

[0810] 对于细胞相关和BSM相关STn结合,所有表达的抗体都表现出小于2nM的EC₅₀。

[0811] 实施例9. 用抗体-药物缀合物分析人源化抗体

[0812] 通过与单甲基溴瑞他汀E(MMAE)缀合而开发前一实施例中描述的人源化抗体的抗体药物缀合物(ADC)形式。这通过使抗体与马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基-单甲基溴瑞他汀E(MC- γ c-PAB-MMAE,在本文中称为CL-MMAE)接触而进行。产生的缀合是基于马来酰亚胺-半胱氨酸,其中抗体链间二硫键用TCEP还原,然后与药物的马来酰亚胺部分连接。

[0813] 将缀合的抗体在Sephadex G50柱上脱盐以去除残留的非活性毒素,然后在具有

150mM NaCl的30mM HEPES pH 7.7中透析。

[0814] 然后使用MDA-MB-231细胞(亲本的或者被转染以增强STn表达)在ADC细胞毒性测定中评估ADC抗体。在补充有10%FBS、1x Pen/Strep和45μg/mL庆大霉素的Eagle氏最低必需介质(EMEM)中培养亲本细胞。除了添加1mg/mL G418用于抗生素选择之外,STn阳性细胞在相同介质中生长。使用上述合适的介质在96孔板中分开接种细胞(亲代细胞为4,000个细胞/孔或对于STn阳性细胞为2,000个/孔)。细胞生长过夜。16-20小时后,将细胞用不同浓度的测试抗体一式三份(50nM至0.012nM)处理72小时。然后,使用ADC **CELLTITER-GLO®** 发光细胞活力测定试剂盒(Promega, Madison, WI)分析细胞以确定存在的ATP的量,其是一种代谢活性细胞的指标。测定使用单一试剂,其直接加入到补充有血清的介质中培养的细胞中。试剂溶解细胞,并产生与存在的ATP量成比例的发光信号。分析发光信号,并基于它们杀伤STn阳性细胞的能力,用于计算所用每种抗体的IC₅₀值(参见下表)。

[0815] 表22. 人源化ADC抗体的IC₅₀值

人源化抗体	IC ₅₀ (nM)
3F1, VL1, VH1	1.30
3F1, VL1, VH2	1.04
5G12-1B3, VL1, VH2	2.58
5G12-1B3, VL1, VH3	7.89
2G12-2B2, VL0, VH3	7.55
2G12-2B2, VL2, VH2	5.17

[0817] 所有测试的抗体显示单纳摩尔范围内IC₅₀值,这表明了每种抗体杀伤STn表达细胞的强大能力。

[0818] 实验例10. MDA-MB-231异种移植模型研究

[0819] 进行异种移植模型研究以体内测试人源化ADC抗体。通过皮下注射癌细胞在小鼠中诱导肿瘤。用于注射的癌细胞选自:(1)转染以诱导STn表达的细胞(MDA-MB-231STn+细胞), (2)在其表面天然表达STn的癌细胞系,和(3)患者衍生的肿瘤细胞,取自原发性人类患者肿瘤。

[0820] 使用患者肿瘤细胞的模型可以比其它模型更忠实地复制人肿瘤生物学并且更好地预测药物响应。在一些实验中,患者肿瘤细胞来源于结直肠癌患者。在一些实验中,在搜索RNA序列数据库后选择患者肿瘤细胞以鉴定表达ST6GalNAc I的细胞。在一些实验中,基于STn的表达来选择患者肿瘤细胞,如使用抗STn抗体通过免疫染色或流式细胞术分析评估的。

[0821] 一旦将肿瘤细胞注射到研究小鼠中,允许肿瘤发展直至达到期望的肿瘤体积(通常在约175mm³至约225mm³之间)。此时,将小鼠分成治疗组。然后,用包含人源化MMAE缀合抗体、无关对照抗体或裸(非缀合)抗体对照的组合物处理小鼠。剂量足以递送每千克小鼠体重约1至约20mg的抗体。小鼠接受单剂量或多剂量(例如每周一次,持续三周)。治疗期间,监测小鼠体重和肿瘤体积的变化。用人源化ADC抗体处理的小鼠中的肿瘤体积减少约20至100%。

[0822] 实施例11. 组织研究

[0823] 用生物素直接标记人源化抗体或者与抗人IgG生物素标记的二抗预先复合。将福尔马林固定的石蜡包埋的组织微阵列组织切片脱石蜡,再水化,并在用生物素化抗体或抗体复合物处理之前进行抗原恢复。使用VECTASTAIN™ ABC试剂盒(Vector Laboratories, Burlingame, CA)检测与组织结合的抗体以产生视觉沉淀。在用苏木精复染后,以盲法方式在显微镜下对玻片的染色强度、频率和定位进行评分。对于每个候选抗体,使用含有60个样本(2个人供体,各自30个器官或器官的子区域)的正常组织微阵列(AC1, Super Bio Chips, 韩国首尔)来评估正常组织结合。对含有118个供体肿瘤样本的人癌组织微阵列(MA2和MA4, Super Bio Chips, 韩国首尔)进行测试以评估抗体与癌细胞的结合。总共测试了13种不同的常见肿瘤类型。人源化抗体与人癌组织切片中的癌细胞(包括胰腺癌和结直肠癌细胞)结合,在正常组织切片中具有最小的或不结合细胞。

[0824] 实施例12. 体外活力测定

[0825] 进行实验以鉴定本质上表达STn的癌细胞系(例如胰腺和结肠直肠细胞系)。在这些测试中的是结肠直肠癌细胞系(例如LS180 (CL-187)、COL0205 (CL-222)、TB4 (CCL-248)、HT29 (HTB-38)、RK0 (CRL-2577)、SW480 (CCL-228)和SNU-C2A (CCL-250.1)细胞系)和胰腺细胞系(例如Panc-1 (CRL-1469)、CFPAC1 (CRL-1918)、HPAC (CRL-2119)、ASPC1 (CRL-1682)、BXPC3 (CRL-1687)、CPAN1 (HTB-79)和HPAFII (CRL-1997)细胞系)。

[0826] 流式细胞术用于评估STn表达。将抗STn抗体与来自正在测试的细胞系的细胞组合。使用APC缀合的二抗确定结合并且仅考虑活细胞(使用碘化丙锭阴性门控过滤出死细胞)。每个样本平均收集5,000个事件。使用FlowJo软件(Asland, OR)分析数据,获得所得APC平均值和%APC。使用正常IgG1抗体作为同种型对照。鉴定表达STn的细胞系。使用发现表达STn的细胞系、用人源化抗体重复流式细胞术。发现人源化抗体结合表达STn的癌细胞系。

[0827] 用鉴定的表达STn的癌细胞系进行细胞活力研究。人源化抗体用于形成与MMAE缀合的ADC抗体。用人源化ADC抗体处理细胞,对每种细胞系计算 IC_{50} 值。测试的人源化ADC抗体有效杀伤测试的表达STn的癌细胞系。

[0828] 实施例13. 组织交叉反应性研究

[0829] 进行组织交叉反应性(TCR)研究,以评估抗体对非临床安全性测试所用人和相关物种的结合谱(在靶标上的结合和潜在脱靶结合)。对于初始表征和优化,进行初步TCR研究以评估人组织(正常相对于癌性)中的人源化先导ADC抗体的染色模式。先导候选表现出最佳的染色谱,其中特异性癌细胞染色并且正常组织没有染色或最小染色。

[0830] 探测人、小鼠、大鼠和食蟹猴正常组织组(例如脑、结肠、心、肝、肺、胰腺、小肠、脾和胃)冷冻切片以检测抗STn抗体的结合。将人胰腺肿瘤内的癌细胞用作阳性对照组织,并将同一组织内的基质细胞用作阴性对照。检测利用间接免疫过氧化物酶技术,然后是ABC三级系统,其中抗STn人源化抗体在组织孵育之前与生物素化二抗预先复合。使用有限的一组组织进行验证染色运行,以在染色整个组织组之前确定适当的抗体浓度和条件。

[0831] 实施例14. 毒理学和药代动力学研究

[0832] 使用人源化ADC抗体在大鼠中进行毒理学研究以鉴定具有毒性作用的抗体并确定每种抗体的未观察到的不良作用水平(NOEL)。大鼠是合适的模型,因为小鼠对ADC抗体的细胞毒性成分溴瑞他汀有耐受性。单剂量和多剂量研究均使用1mg/kg、2.5mg/kg或5mg/kg剂量进行。每个治疗组包括多只大鼠。对于单剂量研究,监测动物健康和体重,并在腹膜内

(IP) 抗体施用后的不同时间点处死大鼠,包括治疗后72小时和治疗后2周。对于多剂量研究,大鼠在第0天、第2周和第4周接受IP抗体注射。在这些研究中,监测大鼠健康和体重,并在施用后的不同时间点处死大鼠,包括最后一次施用后24小时和最后一次施用后2周。

[0833] 处死后,收集器官(肾上腺、脑、结肠、肠、心、肾、肺、下颌唾液腺、胰腺、脾、胃和甲状腺),福尔马林固定以及石蜡包埋以便苏木精和伊红(H&E)染色和病理评估。

[0834] 单剂量施用和多剂量施用有测试的人源化ADC抗体的大鼠没有显示体重减轻或不利健康影响的任何迹象。在所有测试时间点,器官也显示正常。

[0835] 在用于药代动力学分析的大鼠中,在研究期间之前和整个研究期间获得血液样本以定量研究抗体的血清浓度水平并进行药代动力学建模。基于单剂量结果和多剂量研究设计,在施用之前至少24小时、在第1天(施用后约1、4和8小时)、第2天(在施用后约24小时)、第3天(在施用后约48小时)、第4天(在施用后大约72小时)以及在施用后不同时间,获取血液。

[0836] 使血液样本凝固并通过离心分离血清。所得样本经临床病理评估(临床化学、血液学和凝血)。临床化学评估包括分析肌酸钠、总蛋白、钾、碱性磷酸酶、甘油三酯、氯化物、丙氨酸转氨酶、总胆红素、钙天冬氨酸转氨酶、白蛋白、无机磷、葡萄糖、球蛋白、尿素、氮、胆固醇和白蛋白/球蛋白比。血液学评估包括评估红细胞压积、平均红细胞血红蛋白浓度、血红蛋白、网织红细胞计数(绝对和相对)、血小板计数、红细胞计数、平均血小板体积、总白细胞计数、平均红细胞血红蛋白、白细胞分类计数(绝对和相对)、平均红细胞体积和红细胞分布宽度。对于凝血分析,确定凝血酶原时间和活化的部分凝血活酶时间。临床病理学评估表明用人源化ADC抗体进行治疗没有副作用。

[0837] 实施例15. 患者衍生肿瘤细胞的评估

[0838] 进行实验以表征患者衍生异种移植物(PDX)细胞的STn表达谱。如前所述,患者衍生癌细胞用于在NOD/SCID小鼠中产生肿瘤。将得到的PDX肿瘤细胞去除,解离并筛选STn表达。首先通过免疫组织化学(IHC)进行筛选,然后通过流式细胞术分析进行确认。选择具有STn最佳表达的来自PDX肿瘤的细胞用于继续研究。

[0839] 在一项持续研究中,来自选定的PDX肿瘤的细胞在体外培养。一些培养物用本文所述的人源化抗STn抗体处理,其与细胞毒性剂MMAE缀合以形成抗体-药物缀合物(ADC)。使用细胞活力测定来确定这些ADC杀伤培养细胞的能力。进行研究以比较用或不用化学治疗剂对这些培养物的治疗。人源化抗STn ADC能够杀伤表达STn的PDX肿瘤细胞。当首先用化学治疗剂处理细胞时,增强了人源化抗STn ADC杀伤这些细胞的能力。

[0840] 在另一项继续研究中,来自选择的PDX肿瘤的细胞在体外培养,并用或者不用化学治疗剂治疗。评估化学治疗剂治疗之前和之后的STn表达。在化学治疗剂治疗之后,提高了所评估的细胞中STn表达。

[0841] 实施例16. 使用OVCAR3异种移植模型的抗体测试

[0842] 评估人源化抗STn抗体在体内肿瘤模型中减少癌细胞的有效性。给NOD/SCID小鼠注射 **MATRIGEL®** (Corning Life Sciences, Corning, NY) 悬浮液中的 5×10^5 OVCAR3 细胞以诱导OVCAR3肿瘤形成。一旦小鼠表现出175-225mm³的肿瘤体积,将它们随机分组,使具有基本相等的平均肿瘤体积。以2.5mg/kg的剂量施用具有MMAE缀合的人源化抗STn抗体、同种型对照抗体或载体对照(20mM柠檬酸盐(pH 5.5)和150mM NaCl),并且治疗后持续4周每

周两次监测小鼠的肿瘤体积和体重的变化(或直到肿瘤大小达到终点体积 $\geq 1000\text{mm}^3$)。然后提取肿瘤,并评估存活肿瘤细胞的存在和STn表达。鉴定能够在肿瘤中抑制或降低肿瘤体积;降低癌细胞数;和/或STn表达的抗体,并用于后续研究。

[0843] 实施例17.在单次抗体治疗后评估PDX样本

[0844] 在不同抗体剂量下,进行实验以比较具有不同特征的PDX模型对抗STn抗体治疗的反应性。将来自传代卵巢癌PDX肿瘤的慢速冷冻组织植入NOD/SCID小鼠中,在16周内在这类小鼠中产生PDX肿瘤。收获肿瘤并将其重新注射入25只NOD/SCID小鼠中以在12周内产生PDX肿瘤。再次收获产生的肿瘤并将其再注入52只NOD/SCID小鼠中,并允许肿瘤形成12周。然后,用腹腔内注射2.5mg/kg或5mg/kg剂量的人源化抗STn抗体(缀合有MMAE)、同种型对照抗体或载体对照(20mM柠檬酸盐(pH5.5)和150mM NaCl)处理这些小鼠。处理后每周两次监测小鼠体重和肿瘤体积的变化(或直至肿瘤大小达到终点体积 $\geq 1000\text{mm}^3$)。然后提取肿瘤,并使用流式细胞术评估肿瘤细胞活力和STn表达。鉴定了对抗STn抗体治疗有响应的PDX肿瘤。

[0845] 实施例18.PDX肿瘤的多剂量治疗

[0846] 选择对人源化抗STn治疗有响应性的来自PDX肿瘤细胞用于多剂量抗体治疗研究。将来自传代卵巢癌PDX肿瘤的慢速冷冻组织植入NOD/SCID小鼠中,在16周内在这类小鼠中产生PDX肿瘤。收获肿瘤并将其重新注射入25只NOD/SCID小鼠中以在12周内产生PDX肿瘤。再次收获产生的肿瘤并将其再注入52只NOD/SCID小鼠中,并允许肿瘤形成12周。然后,腹腔内注射剂量为5mg/kg的人源化抗STn抗体(缀合有MMAE);同种型对照抗体;或载体对照(20mM柠檬酸盐(pH 5.5)和150mM NaCl)每周处理这些小鼠,持续4周。处理后每周两次监测小鼠体重和肿瘤体积的变化(或直至肿瘤大小达到终点体积 $\geq 1000\text{mm}^3$)。然后提取肿瘤并使用流式细胞术评估肿瘤细胞活力和STn表达。鉴定了对抗STn抗体治疗有响应的PDX肿瘤。MMAE缀合的人源化抗STn抗体对于降低肿瘤体积是最有效的。

[0847] 实施例19.交叉反应性、毒理学

[0848] 通过使用组织组的免疫组织化学染色,进行交叉反应性研究以确定人源化抗STn抗体在人、食蟹猴和大鼠受试者之间的交叉反应性。发现人源化抗STn抗体与食蟹猴和大鼠受试者交叉反应。在大鼠中进行进一步的毒理学研究以评估人源化抗STn抗体的毒性。评估包括生命评估,例如死亡率/发病率、临床观察、体重、食物消耗、体温、局部刺激和眼科学。人源化抗STn抗体在10mg/kg及以下剂量下未发现有毒性。

[0849] 实施例20.药代动力学研究

[0850] 缀合有MMAE的人源化抗STn抗体以2.5mg/kg或5mg/kg的剂量施用于啮齿动物(例如大鼠)或灵长类动物研究模型以评估抗体半衰期和临床病理学(例如临床化学、血液学和凝血)。在72小时、2周和4周的时间点进行评估。

[0851] 对于半衰期分析,抗体施用后1小时、4小时后、8小时后、24小时后、48小时后和72小时后确定抗体体液浓度。

[0852] 对于临床病理学,在施用之前(测试前)以及施用后的多个时间点从研究受试者收集血液样本。对于临床化学,测量肌酸酐、总蛋白、钾、碱性磷酸酶、甘油三酯、氯化物、丙氨酸氨基转移酶、总胆红素、钙天冬氨酸转氨酶、白蛋白、无机磷、葡萄糖、球蛋白、尿素、氮、胆固醇和白蛋白/球蛋白比。对于血液学,确定红细胞压积、平均红细胞血红蛋白浓度、血红蛋白、网织红细胞计数(绝对和相对)、血小板计数、红细胞计数、平均血小板体积、总白细胞计

数、平均红细胞血红蛋白、白细胞分类计数(绝对和相对)、平均红细胞体积和红细胞分布宽度。对于凝血,评估凝血酶原时间和活化的部分凝血活酶时间。

[0853] 最后,将研究动物安乐死并收获器官(肾上腺、脑、结肠、肠、心、肾、肺、下颌唾液腺、胰腺、脾、胃和甲状腺),福尔马林固定以及石蜡包埋以便用于H&E染色以及由委员会认证的病理学家进行病理评估。测试的人源化抗体没有观察到副作用。

[0854] 实施例21.产生人源化抗STn抗体的稳定细胞系

[0855] 产生适于转化为GMP设施生产的稳定细胞系,以便产生人源化抗STn抗体。使用FREEDOM®pCH01.0载体(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)产生表达人源化抗体的构建体,所述人源化抗体具有一个或多个本文中提出的可变结构域。使用Gibco FREEDOM®CHO-S®试剂盒(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA),通过转染入中国仓鼠卵巢(CHO)悬浮细胞来引入构建体,根据试剂盒说明书培养细胞以选择表现出稳定表达所整合的构建体的嘌呤霉素抗性细胞。培养所得稳定细胞系用于抗体生产和储存。

[0856] 实施例22.产生具有增强的ST6GalNAc I表达的SKOV3细胞系

[0857] 用递送ST6GalNAc I表达构建体的慢病毒载体(hST6GalNAc I_pRc-CMV)转导SKOV3细胞。产生稳定的细胞池,并选择6个具有不同ST6GalNAc I表达的克隆(通过定量聚合酶链式反应(qPCR)分析确定的)(参见下表)。

[0858] 表23.ST6GalNAc I在所选克隆中的表达水平

[0859]	克隆 ID	ST6GalNAc mRNA 表达水平(相对于对照表达水平的倍数)
	克隆 7	165
	克隆 8	105
	克隆 10	15
	克隆 13	125
	克隆 15	20
	克隆 16	30

[0860] 相较于非转导细胞系中的水平,克隆7、8和13显示最高水平的ST6GalNAc I mRNA。

[0861] 实施例23.使用具有不同STn表达水平的异种移植肿瘤模型研究

[0862] 进行实验以比较具有不同STn表达水平的异种移植肿瘤对人源化抗STn抗体治疗的响应性。获得具有不同STn表达水平的肿瘤细胞(即,没有STn表达的细胞、具有低STn表达水平的细胞、具有中等STn表达水平的细胞和具有高STn表达水平的细胞)。这些包括已经被修饰以过表达ST6GA1NAC I的细胞;具有ST6GalNAc I表达敲低的细胞;以及没有STn表达、低表达水平,中等表达水平或者高表达水平的未修饰细胞。将肿瘤细胞植入NOD/SCID小鼠中以产生肿瘤。

[0863] 然后用腹膜内注射人源化抗STn抗体(有或者没有缀合的MMAE);同种型对照抗体或载体对照(20mM柠檬酸盐(pH 5.5)和150mM NaCl)处理小鼠8周。治疗后每周两次监测小鼠体重和肿瘤体积的变化。8周后,将接受抗STn抗体治疗的小鼠随机分组,或者再继续8周的初始治疗,或者用载体对照治疗8周。在16周结束时,获得血清样本,并使用流式细胞术提

取肿瘤用于评估肿瘤细胞活力和STn表达。

[0864] MMAE缀合的抗STn抗体产生最高水平的抗肿瘤活性。随机分组后,停止抗STn-MMAE治疗可促进肿瘤复发,同时延长抗STn-MMAE抗体治疗防止肿瘤复发。

[0865] 实施例24. 筛选表达STn的细胞系

[0866] 筛选乳房、结肠、卵巢、淋巴细胞、骨髓、胃、胰腺、结肠直肠、皮肤细胞和其它肿瘤适应症细胞系的STn表达。测试的细胞系包括SNU-16细胞、LS-174T细胞、MC38细胞、COL0205、RK0、HT29、Panc1、HPAC、HPAFII、TOV-112D细胞、TOV-21G细胞、Jurkate E6.1细胞、K-562细胞、B16-F0细胞和B16-F10细胞。

[0867] 基于ST6GalNAcI表达和期望特征(例如倍增时间、致瘤性质、化学耐受性和抗原表达),选择结肠直肠细胞系(例如LS180 (CL-187)、COL0205 (CL-222)、TB4 (CCL-248)、HT29 (HTB-38)、RK0 (CRL-2577)、SW480 (CCL-228)和SNU-C2A (CCL-250.1)用于筛选。鉴于在发育和分化过程中基于细胞生长条件的表面和酶表达可能不同,在体外和体内生长的两种细胞上测试STn表达。

[0868] 通过流式细胞术对细胞系进行STn表达分析。人源化抗STn抗体用于探测STn表达,人同型对照用作阴性对照。

[0869] 每个细胞系在培养物中繁殖并分布在不同的生长形式中。对于体内形式,将MATRIGEL™ (Corning Life Sciences, Corning, NY) 悬浮液中的细胞(与MATRIGEL™按照1:1 (v/v)比的 5×10^6 个细胞)注射到NOD/SCID小鼠中以产生异种移植模型。处死平均肿瘤体积为 200mm^3 、 400mm^3 、 600mm^3 或 1000mm^3 的小鼠,通过流式细胞术提取肿瘤用于STn表达分析,福尔马林固定的石蜡包埋用于免疫组织化学分析。

[0870] 显示STn表达的细胞用于进一步研究,包括抗STn抗体的选择、表征和测试。用于进一步研究之前(如抗STn抗体的选择、表征和测试),将显示出低的或没有STn表达的一些细胞进行转染以表达STn。

[0871] 实施例25. 在表达STn的结肠直肠细胞系中检测人源化抗STn抗体

[0872] 评估人源化抗STn抗体被内在化至表达STn的结肠直肠细胞系中的能力。使用抗CEA抗体作为阳性对照。已知CEA在许多类型的结肠癌细胞的表面上表达,并且和表达CEA的其它细胞类型一起可内在化至结肠直肠细胞中。根据制造商的指导,用ALEXA FLUOR™488 (Thermo Fisher, Waltham, MA) 共价标记抗STn抗体以及对照。在通过流式细胞术评估内在化之前,使用抗ALEXA FLUOR™488抗体阻断表面结合的抗体信号。结果表明抗STn抗体被表达STn的结肠直肠细胞系内在化。

[0873] 实施例26. 旁观者杀伤测定

[0874] 将STn阳性细胞接种于transwell中,其中将STn-低或者-阴性表达者接种在平板底部。仅包含STn阳性或仅STn阴性细胞的孔作为对照。将0至300nM剂量的MMAE缀合的抗STn抗体加入到培养物中(以及一些孔中的游离MMAE作为毒性对照)并且使用Promega (Madison, WI) ADCCELLTITER-GLO®发光细胞活力测定试剂盒,确定STn-低或者阴性表达细胞的活力,所述试剂盒确定存在的ATP的量,其作为代谢活性细胞的指示剂。

[0875] 结果表明表达的STn细胞内在化抗STn MMAE缀合的抗体。死亡细胞释放切割的游离MMAE,其迁移穿过transwell膜,并且通过非/低STn表达细胞中的毒性,几乎没有或没有观察到旁观者杀伤。

[0876] 实施例27. 血浆稳定性研究

[0877] 在人、食蟹猴、大鼠和小鼠血浆中评估人源化抗STn抗体的血浆稳定性。将抗体体外掺入人、食蟹猴、大鼠和小鼠血浆中,然后在37℃孵育长达14天。使用免疫测定法和基于LC-MS的方法在不同天对血浆样本中总人源化抗体、人源化抗体MMAE缀合物和游离MMAE的浓度进行定量。也在同一样本中评估药物抗体比(DAR)。在血浆中抗体保持相对稳定,整个研究期间DAR显示微小变化。

[0878] 实施例28. 使用抗体微阵列鉴定含STn的蛋白

[0879] 使用具有或不具有转染以诱导STn表达的癌细胞(MDA MB 231)鉴定携带STn糖基化的蛋白。用印制的抗体微阵列探测来自MDA-MB-231STn+/-的粗细胞裂解物(Rho等, 2013)。每个阵列包含约3500个人蛋白特异性抗体,靶向约2100个独特蛋白,一式三份,通过N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)酯反应性3-D薄膜表面玻片(Nexterion H玻片, Schott)共价固定。从癌症相关蛋白、信号传导蛋白和先前鉴定的血浆癌蛋白中选择印制抗体的靶标。

[0880] 将冷冻的微型阵列玻片平衡至室温30分钟,并在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的0.5%吐温20中水化,然后用蒸馏/去离子水(ddH₂O)漂洗。然后通过用50mM硼酸钠pH 8中的0.3%(v/v)乙醇胺孵育30分钟,随后用1%BSA(w/v)、0.5%吐温20的PBS溶液孵育30分钟来封闭玻片。接下来,将阵列用PBS中的0.5%吐温20洗涤,然后用ddH₂O洗涤。然后,通过在具有滑动架(Sorvall Legend RT)的摆动斗式转子中以500rpm离心8分钟使阵列干燥。用盖玻片覆盖阵列的抗体印制区域(mSeries Lifter Slips, 22×25×1mm, Thermo Scientific)。

[0881] 为了检测含有STn的蛋白的存在,培养STn+/-细胞,并在3个生物学重复中收集粗细胞裂解物以获得样本(对于STn+, N=3, 以及对于STn-, N=3)。在微阵列/盖玻片衔接处将裂解物移至玻片上并在室温下孵育60分钟。然后用PBS中的0.5%吐温20将玻片洗涤两次持续5分钟。与荧光花青5染料缀合的Siamab STn抗体(Hu3F1, L1H1; Hu2G12-2B2, L2H2; Hu5G2-1B3, L1H2和Hu3F1, L1H1)孵育后,检测含有STn的糖蛋白。阵列用0.5%吐温20的PBS溶液洗涤2次持续5分钟,接着用PBS洗涤2次(每次5分钟),用ddH₂O水洗涤1次,然后通过离心干燥。为了确定信号的背景水平,将阵列仅与STn抗体一起孵育(不添加细胞裂解物)并将所得信号用于背景扣除。然后在GenePix 4200A微阵列扫描仪(Axon Instruments)上扫描玻片以产生红色(Cy5)图像。使用Genepix Pro 6.0图像分析软件获得扫描阵列图像的荧光点强度。

[0882] 通过3种统计学方法分析STn+和STn-条件之间的荧光强度(FI)差异:(1)有效尺寸(((平均FI STn+细胞-平均FI STn-细胞))/STn-细胞的标准偏差)。有效尺寸>3在该测定中被认为是可取的。(2)p值。在该测定中p值<0.25是理想的。(3)比率($2^{(FI_{STn+细胞} - FI_{STn-细胞})}$)。比率>1.2表示蛋白在STn+细胞中增加,并且比率<0.8表明蛋白在STn+细胞中减少。

[0883] 可以看到每种抗体具有不同的结合特性,但是确认不同抗体之间的某种蛋白结合是癌症中唾液酸化Tn含量总体上调的有力证据。此外,在该测定中检测到已知的STn载体MUC16和MUC1。前35位击中由位于以下的蛋白组成:质膜(7)、细胞外空间(8)、细胞核(6)和细胞质(17)。总体而言,Hu3F1, L1H1具有最广泛的特异性,在检测的总共86种蛋白中有63种检测到上调。在该测定中使用Hu3F1, L1H1、Hu2G12-2B2, L2H2、Hu5G2-1B3, L1H2检测到具有STn糖基化的一些蛋白的实例列于下表中。

[0884] 表24. STn糖基化提高的蛋白

基因	细胞位置	Hu3F1 L1H1 p 值	Hu3F1 L1H1 有效尺寸	Hu2G1 2-2B2 L2H2 p 值	Hu2G12- 2B2 L2H2 有效尺寸	Hu5G2- 1B3 L1H2 p 值	Hu5G2- 1B3 L1H2 有效尺寸
IL10	细胞外空间	0.01	4.11	0.01	6.90	0.00	2.23
SPP1	细胞外空间	0.03	13.76	0.10	2.78	N/D	N/D
LY6D	质膜	0.32	2.63	0.24	1.96	0.02	13.19
MUC16	细胞膜, 分泌的	0.04	2.64	N/D	N/D	0.07	79.10
F5	分泌的, 质膜	0.02	5.69	0.04	2.89	0.20	1.59
PDPK1	细胞膜-外周膜 蛋白, 细胞质	0.08	12.38	0.40	1.36	0.03	7.05
Ihh	细胞外空间	0.15	24.84	0.54	0.93	0.83	0.07
IHH	细胞外空间	0.35	1.32	0.05	3.95	N/D	N/D
IHH	细胞外空间	N/D	N/D	N/D	N/D	0.05	12.07
SMS	细胞质	0.10	3.11	0.13	30.82	0.03	7.22
MAPK3	细胞质	0.01	6.73	0.11	3.07	0.04	11.96
OAS1	细胞质	0.01	4.69	0.05	32.20	0.89	0.28
CRADD	细胞质	0.13	1.26	0.17	1.68	0.06	28.19
GRB2	细胞质	0.01	5.38	0.14	6.83	0.07	7.23
PRDX6	细胞质	0.06	2.48	0.25	9.99	0.19	2.35
PCNA	核	0.05	2.95	0.19	2.79	0.11	21.73
CUX1	核	0.06	2.35	0.00	6.74	N/D	N/D

[0887] 所列出的所有蛋白对于至少一种STn抗体显示出亲和性,表明存在STn糖基化。IHH在列表中作为三个单独的项目显示。这些被三种独特抗体捕获至IHH。以下蛋白显示与两种不同抗体克隆的结合:IL10、SPP1、LY6D、MUC16、F5、PDPK1、SMS、MAPK3、OAS1、CRADD、GRB2、PRDX6、PCNA和CUX1,强烈证明了它们的STn糖基化。

[0888] 在这些当中,IL10、SPP1、LY6D和MUC16具有细胞外或者细胞膜定位并且先前已经表示作为癌症生物标志物。

[0889] IL10:白细胞介素-10抑制许多细胞因子的合成,包括由激活的巨噬细胞和辅助性T细胞产生的IFN- γ 、IL-2、IL-3、TNF和GM-CSF。

[0890] SPP1:骨桥蛋白被配体、唾液酸激活,并且对于I型免疫是必需的。它可以与CD44进行相互作用。SPP1充当细胞因子并增强干扰素- γ 和白细胞介素-12的产生并降低白细胞介素-10的产生。

[0891] MUC16:粘蛋白-16或者CA-125,已知用做卵巢癌的癌症生物标志物。

[0892] LY6D:在B细胞和T细胞发育之间的淋巴细胞指定阶段,淋巴细胞抗原6D作为B细胞特定标志物。

[0893] 通过筛选鉴定的一些蛋白仅对于一个STn抗体克隆是独特的。用Hu3F1,L1H1显示糖基化的蛋白示于下表中。

[0894] 表25.Hu3F1,L1H1识别的蛋白

[0895]	基因	位置	Hu3F1 L1H1 p 值	Hu3F1 L1H1 有效尺寸
	TLN1	质膜/胞质一侧	0.06	25.27
	MUC1	质膜	0.03	9.00
	LIMK2	细胞质	0.02	8.78
	MAPRE1	细胞质	0.03	7.91

[0896] TLN1:人踝蛋白-1(Talin-1)是细胞骨架结构和质膜之间连接的一部分。先前在小鼠插入诱变实验中鉴定了TLN1,表明在癌症中具有因果作用。TLN1表达与癌细胞的侵袭和迁移相关。

[0897] MUC1:粘蛋白-1的 β 亚基含有C末端结构域,其通过磷酸化和蛋白-蛋白相互作用参与细胞信号转导,借此可促进肿瘤生长。在B细胞中,Muc1调节ERK、SRC和NF- κ -B信号传导通路。然而在激活的T细胞中,它调节Ras/MAPK通路。

[0898] 用Hu2G12-2B2,L2H2显示糖基化的蛋白显示于下表中。

[0899] 表26.2G12-2B2,L2H2识别的蛋白

[0900]	基因	位置	Hu2G12-2B2,L 2H2 p 值	Hu2G12-2B2,L 2H2 有效尺寸
	ALDH1A1	细胞质	0.01	12.70
	ANO1	质膜	0.02	6.67

[0901] ALDH1A1:视网膜脱氢酶是癌症干细胞标志物。它也涉及化学耐受性。

[0902] ANO1:Anoctamin-1是钙激活的氯化物通道,在跨上皮细胞的阴离子转运中发挥作用。ANO1在乳腺癌细胞系和原发性肿瘤中扩增并高表达。

[0903] 用Hu5G2-1B3,L1H2显示糖基化的蛋白示于下表中。

[0904] 表27.Hu5G2-1B3,L1H2识别的蛋白

[0905]	基因	位置	Hu5G2-1B3,L 1H2 p 值	Hu5G2-1B3,L 1H2 有效大小
	GPC3	质膜	0.026	8.69
	HAPLN1	细胞外空间	0.003	5.53

[0906] GPC3:磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3是带有硫酸乙酰肝素的细胞表面蛋白聚糖。它参与抑制主要是中胚层组织和器官的生长。已显示抗GPC3单克隆抗体在小鼠中具有抗癌活性。

[0907] 用Hu3F1,L1H1抗体显示STn糖基化的蛋白与使用Mu3F1显示糖基化的蛋白进行比较。结果列于下表中。

[0908] 表28.3F1抗体比较

	基因	位置	Hu3F1,L1H1 1 p 值	Hu3F1,L1H1 有效尺寸	Mu3F1 1 比
[0909]	COL4A3	细胞外空间	0.062	22.63	1.09
	CCR5	质膜	0.104	20.55	1.17
	SLC30A8	细胞质泡和细胞膜蛋白	0.006	8.26	1.03
	CNN1	细胞骨架	0.015	6.42	1.06
	ITSN1	内膜系统	0.007	5.74	1.04
	PKM2	细胞质、质膜和细胞外	0.348	6.59	1.06
[0910]		空间			
	LAMB3	细胞外空间	0.116	5.28	1.12
	F5	分泌的, 以及质膜	0.022	5.69	1.14
	MUC1	质膜	0.028	9.00	1.00
	TK1	细胞质	0.032	7.59	1.07
	SMS	细胞质	0.098	3.11	1.04
	PRDX6	细胞质	0.060	2.48	1.05
	CUX1	核	0.057	2.35	1.07
	MEF2C	核	0.015	8.92	1.04
	CCNE2	核	0.001	10.30	1.05
	PCNA	核	0.050	2.95	1.03

[0911] 实施例29. 使用替代聚糖阵列的人源化抗体测试

[0912] 列出的所有蛋白均显示STn抗体的亲和性, 表明存在STn糖基化。在这些当中, COL4A3、CCR5和MUC1具有细胞外或者细胞膜定位并且先前已经被认为是癌症生物标志物。

[0913] COL4A3: 胶原蛋白 α -3 (IV) 链。IV型胶原蛋白是肾小球基底膜 (GBM) 的主要结构成分, 与层粘连蛋白、蛋白聚糖和内肌动蛋白/巢蛋白 (entactin/nidogen) 一起形成“铁丝网”网状结构。Tumstatin, 一种对应于胶原蛋白 α 3 (IV) NC1结构域的切割片段, 具有抗血管生成和抗肿瘤细胞活性。

[0914] CCR5: C-C趋化因子受体5型是一些炎症性CC-趋化因子的受体。CCR5涉及从血液向人结直肠癌的肿瘤部位募集T调节细胞 (Treg)。在CCR5^{-/-}小鼠中肿瘤生长延迟并且与肿瘤Treg浸润减少相关。

[0915] 在单个实验中, 有13个化学合成和明确定义的聚糖的替代聚糖阵列也用于测试抗体对多种聚糖的亲和性和特异性。替代聚糖阵列包括下表中列出的Neu5Ac和Neu5Gc聚糖对。

[0916] 表29: 替代阵列中的阵列聚糖

	聚糖 ID No.	聚糖
[0917]	1	Neu5Ac α 6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
	2	Neu5Gc α 6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
	3	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
	4	Neu5Gc α 6Gal β 4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
	5	Neu5Ac α 6Gal β 4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
[0918]	6	Neu5Gc α 6Gal β 4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
	7	Neu5Ac α 6Gal β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
	8	Neu5Gc α 6Gal β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
	9	GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
	10	Gal β 3GalNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
	11	Gal3 β GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
	12	Neu5Ac α 3Gal β 1-3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
	13	Neu5Gc α 3Gal β 1-3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂

[0919] 聚丙烯酰胺 (PAA) 缀合的、人血清白蛋白 (HAS) 缀合的或胺缀合的糖缀合物用于聚糖探针制备。根据Yu, H. 等人, 2007. *Org Biomol Chem* 5:2458-63中描述的方法通过化学酶促方法合成糖缀合物, 其内容通过引用整体并入本文。使用Yu等人所述的“一锅三酶”法合成唾液酸聚糖 (Yu, H. 等人, *Nat Protoc.* 2006. 1 (5):2485-92, Yu, H. 等人, *J Am Chem Soc.* 2005. 127:17618-9以及Yu, H. 等人, 2006. *Angew Chem Int Ed Engl.* 45:3938-44, 其全部内容通过引用整体并入本文)。通过HRMS (ESI) 质谱确认化合物结构。通过HPLC分析评估每种合成聚糖的纯度, 仅使用纯度大于95%的聚糖制剂。

[0920] 使用配备有946MP3微阵列打印针在每个玻片上具有16个子阵列块的NanoPrint LM-60微阵列 (Arrayit集团, Sunnyvale, 加利福尼亚州), 将阵列印制在环氧化物衍生玻片 (Corning, 纽约) 上。使用每个样本4个重复孔和每孔8 μ L将聚糖探针分配到384孔源板中。在印制缓冲液 (300mM磷酸盐缓冲液, pH 8.4) 中以100 μ M/聚糖的浓度制备聚糖探针。另外, 在阵列上以四次重复印制单独的接头 (O (CH₂)₂CH₂NH₂) 和单独的缓冲液 (300mM磷酸盐缓冲液, pH8.4)。为了监测印制质量, 在每玻片上还印制鼠IgG和人IgG (在含有10%甘油的PBS中40和20ng/ μ L, Jackson ImmunoResearch Laboratories, WestGrove, 宾夕法尼亚)。用4个946MP3针 (5 μ m尖端, 0.25 μ L样本通道, 约100 μ m斑点直径, Arrayit集团) 印制阵列。每个块 (子阵列) 有10行8列, 点的点间距为275 μ m。在印制过程中, 排列室中的湿度水平保持在约70%。印制的玻片放在阵列平台 (deck) 上过夜, 使湿度降至环境水平 (40-45%)。然后将玻片包装, 真空密封并在室温下储存。

[0921] 使用Hu2G12-2B2, L0H2、Hu8C2-2D6, L1H1、Hu5G2-1B3, L1H2、Mu2G12-2B2和Mu3F1测定聚糖阵列。

[0922] 此外, 还在阵列上测试对照抗体和凝集素以确定阵列中的聚糖是否可以被已知的聚糖结合剂识别。它们包括: (a) 抗Gc抗体, 其结合含Gc的聚糖,

[0923] Neu5Gc α 6GalNAc α O (CH₂)₂CH₂NH₂ (GcSTn) (聚糖ID No. 2),

[0924] Neu5Gc α 6Gal β 4GlcNAc β O (CH₂)₂CH₂NH₂ (聚糖ID No. 4),

[0925] Neu5Gc α 6Gal β 4Glc β 0 (CH₂) 2CH₂NH₂ (聚糖ID No.6) ,

[0926] Neu5Gc α 6Gal β 0 (CH₂) 2CH₂NH₂ (聚糖ID No.8) 和

[0927] Neu5Gc α 3Gal β 1-3GalNAc α 0 (CH₂) 2CH₂NH₂ (聚糖ID No.13) ;

[0928] (b) MAL-II (怀槐凝集素II (Maackia Amurensis Lectin II)), 其结合含有 (2,3) -连接的唾液酸的聚糖, 比如Neu5Ac α 3Gal β 1-3GalNAc α 0 (CH₂) 2CH₂NH₂ (聚糖ID No.12) 和 Neu5Gc α 3Gal β 1-3GalNAc α 0 (CH₂) 2CH₂NH₂ (聚糖ID No.13) ; (c) SNA (黑接骨木凝集素 (Sambucus Nigra Lectin)), 其优先结合含有与末端半乳糖连接的 (2,6) 唾液酸的聚糖, 例如Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 0 (CH₂) 2CH₂NH₂ (聚糖ID No.3) , Neu5Gc α 6Gal β 4GlcNAc β 0 (CH₂) 2CH₂NH₂ (聚糖ID No.4) , Neu5Ac α 6Gal β 4Glc β 0 (CH₂) 2CH₂NH₂ (聚糖ID No.5) 以及Neu5Gc α 6Gal β 4Glc β 0 (CH₂) 2CH₂NH₂ (聚糖ID No.6) ; 以及 (d) Palivizumab作为同型阴性对照, 并且如预期的那样不结合聚糖也不结合接头/缓冲液印制的对照。

[0929] 通过将15ml 2M Tris缓冲液 (pH8) 与0.9ml 16.6M乙醇胺和284.1ml蒸馏水合并来制备环氧封闭缓冲液 (300ml)。溶液使用0.2 μ M硝酸纤维素膜过滤。环氧缓冲溶液以及1升蒸馏水预先加热至50℃。将玻片置于玻片架中并迅速浸入有加热的环氧封闭缓冲液的染色桶中。将玻片在环氧封闭缓冲液中在50℃孵育1小时, 并定期摇动以使环氧结合位点失活。接下来, 将玻片用蒸馏水冲洗, 置于ProPlate玻片架 (Grace Bio-Labs#20486216方形7×7mm室) 中, 然后在25℃用含1%OVA的PBS封闭1小时。在1和2.5 μ g/mL下测试测试抗体和同种型对照抗体。在0.5 μ g/mL和1 μ g/mL下测试对照抗体抗-Gc。在40 μ g/mL (对于MALII) 和20 μ g/mL (对于SNA) 下测试对照生物素标记的凝集素。将所有抗体/凝集素在封闭缓冲液 (1%OVA/PBS) 中稀释并在25℃下与聚糖阵列孵育1小时。充分洗涤后, 通过将聚糖微阵列玻片与缀合有Cy3的抗SA、抗小鼠IgG或抗人IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 孵育1小时来检测多克隆血清抗体的结合。然后将玻片充分洗涤, 干燥并用Genepix 4000B扫描仪 (激光100%; 增益350; 10 μ m像素) 扫描。使用Genepix软件提取来自扫描图像的原始荧光强度数据, 并对原始数据进行分析。如果抗体显示与AcSTn和GcSTn两个分子结合, 但不与Tn或阵列上的任何其它聚糖结合, 则认为抗体对AcSTn和GcSTn具有高度特异性。

[0930] 抗体Hu2G12-2B2, L0H2、Hu8C2-2D6, L1H1、Hu5G2-1B3, L1H2、Mu2G12-2B2和Mu3F1显示与AcSTn和GcSTn (聚糖ID NO.1和2) 的结合, 但不与阵列中的其它聚糖结合, 证明这些抗体仅对STn聚糖具有特异亲和性。正如预期的那样, 与阵列中所有含Gc的聚糖结合的抗-Gc抗体、和阵列中含有 (2,3) -连接的唾液酸的聚糖结合的MALII、与阵列中含有连接至末端半乳糖的 (2,6) 唾液酸的聚糖结合的SNA以及Palivizumab对照, 显示与聚糖不结合。这些结果表明, 聚糖阵列含有可被抗体和蛋白识别的聚糖, 所述抗体和蛋白特异于印制的聚糖。

[0931] 实施例30: 拟糖脂阵列分析

[0932] 从下表中描述的化学合成的聚糖来制备拟糖脂探针。

[0933] 表30: 聚糖列表

聚糖 ID No	聚糖
1	Neu5Ac α 6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂ (AcSTn)
2	Neu5Gc α 6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂ (GcSTn)
3	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
4	Neu5Gc α 6Gal β 4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
5	Neu5Ac α 6Gal β 4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
6	Neu5Gc α 6Gal β 4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
7	Neu5Ac α 6Gal β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
8	Neu5Gc α 6Gal β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
9	GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
10	Gal β 3GalNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
11	Gal β 3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
12	Neu5Ac α 3Gal β 1-3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
13	Neu5Gc α 3Gal β 1-3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂

[0936] 通过将聚糖与氨基磷脂N-氨基乙酰基-N-(9-蒎基甲基)-1,2-二十六烷基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(ADHP)缀合产生荧光探针,或与L-1,2-二十六烷基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DHPE)通过还原胺化,或N-氨氧基乙酰基-1,2-二十六烷基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(AOPE)通过脲连接以生成非荧光探针,来制备拟糖脂。缀合反应允许NGL固定在固体基质上。已经从糖蛋白中还原释放的聚糖在缀合之前经历温和的高碘酸盐反应。缀合后,纯化NGL产物以除去过量的脂质和盐,通过质谱分析法分析并通过密度测定法在高效薄层色谱上定量。

[0937] 在脂质体制剂中,通过将拟糖脂探针自动(robotically)分配到硝化纤维素包被的玻璃片上而制备拟糖脂阵列。以多种浓度和密度印制探针,以确定最佳杂交条件。

[0938] 用纯化的抗STn抗体溶液或含有抗STn抗体的多克隆血清来探测玻片。使用生物素化的二抗,然后用荧光标记的链霉亲和素检测抗体结合。使用ProScanArray (Perkin Elmer Life Sciences)扫描玻片,并且使用ScanArray表达软件(PerkinElmer Life Sciences)对荧光结合信号进行定量。如果纯化的抗体或者血清表现出对AcSTn和GcSTn两种分子的结合,但对Tn或阵列上任何其它聚糖没有结合,则纯化的抗体或者血清被认为对AcSTn和GcSTn具有高度特异性。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 希亚迈博治疗公司 (SIAMAB THERAPEUTICS, INC.)
[0003]	<120> 聚糖相互作用化合物及使用方法
[0004]	<130> 2033.1021PCT
[0005]	<140> PCT/US2016/xxxxxx
[0006]	<141> 2016-11-10
[0007]	<150> 62/382,835
[0008]	<151> 2016-09-02
[0009]	<150> 62/345,515
[0010]	<151> 2016-06-03
[0011]	<150> 62/293,989
[0012]	<151> 2016-02-11
[0013]	<150> 62/287,666
[0014]	<151> 2016-01-27
[0015]	<150> 62/274,572
[0016]	<151> 2016-01-04
[0017]	<150> 62/254,278
[0018]	<151> 2015-11-12
[0019]	<160> 266
[0020]	<170> SIP0SequenceListing 1.0
[0021]	<210> 1
[0022]	<211> 115
[0023]	<212> PRT
[0024]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)
[0025]	<400> 1
[0026]	Gln Val Gln Leu Leu Gln Tyr Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0027]	1 5 10 15
[0028]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
[0029]	20 25 30
[0030]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0031]	35 40 45
[0032]	Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Ser Glu Lys Phe
[0033]	50 55 60
[0034]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0035]	65 70 75 80
[0036]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[0037]	85 90 95
[0038]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[0039]	100 105 110
[0040]	Val Ser Ala
[0041]	115

[0042]	<210> 2
[0043]	<211> 106
[0044]	<212> PRT
[0045]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[0046]	<400> 2
[0047]	Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
[0048]	1 5 10 15
[0049]	Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
[0050]	20 25 30
[0051]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
[0052]	35 40 45
[0053]	Tyr Lys Val Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0054]	50 55 60
[0055]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0056]	65 70 75 80
[0057]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr
[0058]	85 90 95
[0059]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Lys Lys
[0060]	100 105
[0061]	<210> 3
[0062]	<211> 115
[0063]	<212> PRT
[0064]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[0065]	<400> 3
[0066]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0067]	1 5 10 15
[0068]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
[0069]	20 25 30
[0070]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0071]	35 40 45
[0072]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0073]	50 55 60
[0074]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0075]	65 70 75 80
[0076]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[0077]	85 90 95
[0078]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[0079]	100 105 110
[0080]	Val Ser Ala
[0081]	115
[0082]	<210> 4
[0083]	<211> 108

[0084] <212> PRT
 [0085] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [0086] <400> 4
 [0087] Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 [0088] 1 5 10 15
 [0089] Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Ile Tyr
 [0090] 20 25 30
 [0091] Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 [0092] 35 40 45
 [0093] Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 [0094] 50 55 60
 [0095] Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 [0096] 65 70 75 80
 [0097] Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr
 [0098] 85 90 95
 [0099] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 [0100] 100 105
 [0101] <210> 5
 [0102] <211> 115
 [0103] <212> PRT
 [0104] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [0105] <400> 5
 [0106] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [0107] 1 5 10 15
 [0108] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 [0109] 20 25 30
 [0110] Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0111] 35 40 45
 [0112] Gly Tyr Val Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 [0113] 50 55 60
 [0114] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0115] 65 70 75 80
 [0116] Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 [0117] 85 90 95
 [0118] Lys Arg Ser Leu Ile Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 [0119] 100 105 110
 [0120] Val Ser Ser
 [0121] 115
 [0122] <210> 6
 [0123] <211> 107
 [0124] <212> PRT
 [0125] <213> 小鼠属(Mus sp.)

[0126]	<400> 6
[0127]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Ser Ser Val Gly
[0128]	1 5 10 15
[0129]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
[0130]	20 25 30
[0131]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Phe Leu Ile
[0132]	35 40 45
[0133]	Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[0134]	50 55 60
[0135]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
[0136]	65 70 75 80
[0137]	Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Leu
[0138]	85 90 95
[0139]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0140]	100 105
[0141]	<210> 7
[0142]	<211> 115
[0143]	<212> PRT
[0144]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[0145]	<400> 7
[0146]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0147]	1 5 10 15
[0148]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
[0149]	20 25 30
[0150]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0151]	35 40 45
[0152]	Gly Tyr Leu Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Ser Glu Lys Phe
[0153]	50 55 60
[0154]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0155]	65 70 75 80
[0156]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[0157]	85 90 95
[0158]	Lys Arg Ser Ile Gly Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
[0159]	100 105 110
[0160]	Val Ser Ser
[0161]	115
[0162]	<210> 8
[0163]	<211> 108
[0164]	<212> PRT
[0165]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[0166]	<400> 8
[0167]	Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

[0168]	1	5	10	15
[0169]	Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp			
[0170]	20	25	30	
[0171]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile			
[0172]	35	40	45	
[0173]	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0174]	50	55	60	
[0175]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Gly Ser Leu Gln Pro			
[0176]	65	70	75	80
[0177]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Phe			
[0178]	85	90	95	
[0179]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			
[0180]	100	105		
[0181]	<210> 9			
[0182]	<211> 115			
[0183]	<212> PRT			
[0184]	<213> 小鼠属(Mus sp.)			
[0185]	<400> 9			
[0186]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
[0187]	1	5	10	15
[0188]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His			
[0189]	20	25	30	
[0190]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0191]	35	40	45	
[0192]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe			
[0193]	50	55	60	
[0194]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
[0195]	65	70	75	80
[0196]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
[0197]	85	90	95	
[0198]	Gln Arg Gln Leu Gly Gln Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr			
[0199]	100	105	110	
[0200]	Val Ser Ser			
[0201]	115			
[0202]	<210> 10			
[0203]	<211> 113			
[0204]	<212> PRT			
[0205]	<213> 小鼠属(Mus sp.)			
[0206]	<400> 10			
[0207]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly			
[0208]	1	5	10	15
[0209]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser			

[0210]	20	25	30
[0211]	Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
[0212]	35	40	45
[0213]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro		
[0214]	50	55	60
[0215]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[0216]	65	70	75
[0217]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn		
[0218]	85	90	95
[0219]	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0220]	100	105	110
[0221]	Arg		
[0222]	<210> 11		
[0223]	<211> 115		
[0224]	<212> PRT		
[0225]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0226]	<400> 11		
[0227]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Gly Lys Pro Gly Ala		
[0228]	1	5	10
[0229]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp His		
[0230]	20	25	30
[0231]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0232]	35	40	45
[0233]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[0234]	50	55	60
[0235]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0236]	65	70	75
[0237]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[0238]	85	90	95
[0239]	Glu Arg Ser Met Ile Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[0240]	100	105	110
[0241]	Val Ser Ala		
[0242]	115		
[0243]	<210> 12		
[0244]	<211> 112		
[0245]	<212> PRT		
[0246]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0247]	<400> 12		
[0248]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly		
[0249]	1	5	10
[0250]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Phe Ser Gln Ser Leu Val Gln Ser		
[0251]	20	25	30

[0252]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0253]	35 40 45
[0254]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Cys Gly Val Pro
[0255]	50 55 60
[0256]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0257]	65 70 75 80
[0258]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
[0259]	85 90 95
[0260]	Thr His Ala Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0261]	100 105 110
[0262]	<210> 13
[0263]	<211> 114
[0264]	<212> PRT
[0265]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[0266]	<400> 13
[0267]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0268]	1 5 10 15
[0269]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
[0270]	20 25 30
[0271]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0272]	35 40 45
[0273]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0274]	50 55 60
[0275]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0276]	65 70 75 80
[0277]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[0278]	85 90 95
[0279]	Lys Ile Ser Tyr Tyr Gly Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
[0280]	100 105 110
[0281]	Ser Ser
[0282]	<210> 14
[0283]	<211> 107
[0284]	<212> PRT
[0285]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[0286]	<400> 14
[0287]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
[0288]	1 5 10 15
[0289]	Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
[0290]	20 25 30
[0291]	Leu Ala Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
[0292]	35 40 45
[0293]	Tyr Lys Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0294]	50	55	60
[0295]	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser		
[0296]	65	70	75 80
[0297]	Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Phe		
[0298]		85	90 95
[0299]	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0300]	100	105	
[0301]	<210> 15		
[0302]	<211> 114		
[0303]	<212> PRT		
[0304]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0305]	<400> 15		
[0306]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0307]	1	5	10 15
[0308]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His		
[0309]	20	25	30
[0310]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0311]	35	40	45
[0312]	Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[0313]	50	55	60
[0314]	Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0315]	65	70	75 80
[0316]	Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[0317]		85	90 95
[0318]	Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val		
[0319]	100	105	110
[0320]	Ser Ser		
[0321]	<210> 16		
[0322]	<211> 107		
[0323]	<212> PRT		
[0324]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0325]	<400> 16		
[0326]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly		
[0327]	1	5	10 15
[0328]	Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser His		
[0329]	20	25	30
[0330]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val		
[0331]	35	40	45
[0332]	Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0333]	50	55	60
[0334]	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile His Ser Leu Gln Ser		
[0335]	65	70	75 80

[0336]	Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Ala Pro Phe
[0337]	85 90 95
[0338]	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0339]	100 105
[0340]	<210> 17
[0341]	<211> 115
[0342]	<212> PRT
[0343]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[0344]	<400> 17
[0345]	Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
[0346]	1 5 10 15
[0347]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
[0348]	20 25 30
[0349]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0350]	35 40 45
[0351]	Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Val Lys Phe
[0352]	50 55 60
[0353]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0354]	65 70 75 80
[0355]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[0356]	85 90 95
[0357]	Ser Val Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Thr Leu Thr
[0358]	100 105 110
[0359]	Val Ser Ser
[0360]	115
[0361]	<210> 18
[0362]	<211> 108
[0363]	<212> PRT
[0364]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[0365]	<400> 18
[0366]	Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
[0367]	1 5 10 15
[0368]	Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr
[0369]	20 25 30
[0370]	Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
[0371]	35 40 45
[0372]	Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[0373]	50 55 60
[0374]	Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
[0375]	65 70 75 80
[0376]	Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr
[0377]	85 90 95

[0378]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
[0379]	100 105
[0380]	<210> 19
[0381]	<211> 115
[0382]	<212> PRT
[0383]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[0384]	<400> 19
[0385]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
[0386]	1 5 10 15
[0387]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
[0388]	20 25 30
[0389]	Ala Ile His Trp Val Lys Glu Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0390]	35 40 45
[0391]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Ser Glu Lys Phe
[0392]	50 55 60
[0393]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0394]	65 70 75 80
[0395]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[0396]	85 90 95
[0397]	Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[0398]	100 105 110
[0399]	Val Ser Ala
[0400]	115
[0401]	<210> 20
[0402]	<211> 114
[0403]	<212> PRT
[0404]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[0405]	<400> 20
[0406]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
[0407]	1 5 10 15
[0408]	Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[0409]	20 25 30
[0410]	Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0411]	35 40 45
[0412]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0413]	50 55 60
[0414]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0415]	65 70 75 80
[0416]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
[0417]	85 90 95
[0418]	Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0419]	100 105 110

[0420] Lys Arg
 [0421] <210> 21
 [0422] <211> 114
 [0423] <212> PRT
 [0424] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [0425] <400> 21
 [0426] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [0427] 1 5 10 15
 [0428] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 [0429] 20 25 30
 [0430] Ala Ile His Trp Val Met Gln Met Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0431] 35 40 45
 [0432] Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Val Lys Tyr Ser Glu Arg Phe
 [0433] 50 55 60
 [0434] Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ser Ala Tyr
 [0435] 65 70 75 80
 [0436] Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 [0437] 85 90 95
 [0438] Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 [0439] 100 105 110
 [0440] Val Ser
 [0441] <210> 22
 [0442] <211> 114
 [0443] <212> PRT
 [0444] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [0445] <400> 22
 [0446] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 [0447] 1 5 10 15
 [0448] Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 [0449] 20 25 30
 [0450] Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 [0451] 35 40 45
 [0452] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser Gly Val
 [0453] 50 55 60
 [0454] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 [0455] 65 70 75 80
 [0456] Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser
 [0457] 85 90 95
 [0458] Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 [0459] 100 105 110
 [0460] Lys Arg
 [0461] <210> 23

[0462] <211> 115
 [0463] <212> PRT
 [0464] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [0465] <220>
 [0466] <221> MOD_RES
 [0467] <222> (9) .. (9)
 [0468] <223> 任意氨基酸
 [0469] <220>
 [0470] <221> MOD_RES
 [0471] <222> (111) .. (111)
 [0472] <223> 任意氨基酸
 [0473] <220>
 [0474] <221> UNSURE
 [0475] <222> (9) .. (9)
 [0476] <223> The 'Xaa' at location 9 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
 [0477] <220>
 [0478] <221> UNSURE
 [0479] <222> (111) .. (111)
 [0480] <223> The 'Xaa' at location 111 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
 [0481] <400> 23
 [0482] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Xaa Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [0483] 1 5 10 15
 [0484] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 [0485] 20 25 30
 [0486] Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0487] 35 40 45
 [0488] Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 [0489] 50 55 60
 [0490] Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0491] 65 70 75 80
 [0492] Met Gln Leu Asn Ser Leu Ser Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 [0493] 85 90 95
 [0494] Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Xaa Thr
 [0495] 100 105 110
 [0496] Val Ser Ala
 [0497] 115
 [0498] <210> 24
 [0499] <211> 114
 [0500] <212> PRT
 [0501] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [0502] <400> 24
 [0503] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly

[0504]	1	5	10	15
[0505]	Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg			
[0506]	20	25	30	
[0507]	Gly Asn His Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Leu			
[0508]	35	40	45	
[0509]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
[0510]	50	55	60	
[0511]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ala Leu Thr			
[0512]	65	70	75	80
[0513]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn			
[0514]	85	90	95	
[0515]	Asp Tyr Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
[0516]	100	105	110	
[0517]	Lys Arg			
[0518]	<210> 25			
[0519]	<211> 115			
[0520]	<212> PRT			
[0521]	<213> 小鼠属(Mus sp.)			
[0522]	<400> 25			
[0523]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
[0524]	1	5	10	15
[0525]	Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His			
[0526]	20	25	30	
[0527]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0528]	35	40	45	
[0529]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe			
[0530]	50	55	60	
[0531]	Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
[0532]	65	70	75	80
[0533]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
[0534]	85	90	95	
[0535]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr			
[0536]	100	105	110	
[0537]	Val Ser Ala			
[0538]	115			
[0539]	<210> 26			
[0540]	<211> 114			
[0541]	<212> PRT			
[0542]	<213> 小鼠属(Mus sp.)			
[0543]	<400> 26			
[0544]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly			
[0545]	1	5	10	15

[0546]	Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[0547]	20 25 30
[0548]	Gly Lys Thr Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0549]	35 40 45
[0550]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0551]	50 55 60
[0552]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0553]	65 70 75 80
[0554]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Asn
[0555]	85 90 95
[0556]	Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0557]	100 105 110
[0558]	Lys Arg
[0559]	<210> 27
[0560]	<211> 115
[0561]	<212> PRT
[0562]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[0563]	<400> 27
[0564]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0565]	1 5 10 15
[0566]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
[0567]	20 25 30
[0568]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0569]	35 40 45
[0570]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
[0571]	50 55 60
[0572]	Lys Gly Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0573]	65 70 75 80
[0574]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[0575]	85 90 95
[0576]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[0577]	100 105 110
[0578]	Val Ser Ala
[0579]	115
[0580]	<210> 28
[0581]	<211> 115
[0582]	<212> PRT
[0583]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[0584]	<400> 28
[0585]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0586]	1 5 10 15
[0587]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

[0588]	20	25	30
[0589]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0590]	35	40	45
[0591]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asp Glu Lys Phe		
[0592]	50	55	60
[0593]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0594]	65	70	75
[0595]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[0596]	85	90	95
[0597]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[0598]	100	105	110
[0599]	Val Ser Ala		
[0600]	115		
[0601]	<210> 29		
[0602]	<211> 115		
[0603]	<212> PRT		
[0604]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0605]	<400> 29		
[0606]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0607]	1	5	10
[0608]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His		
[0609]	20	25	30
[0610]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0611]	35	40	45
[0612]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[0613]	50	55	60
[0614]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0615]	65	70	75
[0616]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Phe Cys		
[0617]	85	90	95
[0618]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[0619]	100	105	110
[0620]	Val Ser Ala		
[0621]	115		
[0622]	<210> 30		
[0623]	<211> 115		
[0624]	<212> PRT		
[0625]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0626]	<400> 30		
[0627]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0628]	1	5	10
[0629]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His		

[0630]	20	25	30
[0631]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0632]	35	40	45
[0633]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[0634]	50	55	60
[0635]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0636]	65	70	75
[0637]	Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[0638]	85	90	95
[0639]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[0640]	100	105	110
[0641]	Val Ser Ala		
[0642]	115		
[0643]	<210> 31		
[0644]	<211> 108		
[0645]	<212> PRT		
[0646]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0647]	<400> 31		
[0648]	Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
[0649]	1	5	10
[0650]	Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln His Ile Asn Phe Trp		
[0651]	20	25	30
[0652]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile		
[0653]	35	40	45
[0654]	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0655]	50	55	60
[0656]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Leu Pro		
[0657]	65	70	75
[0658]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr		
[0659]	85	90	95
[0660]	Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
[0661]	100	105	
[0662]	<210> 32		
[0663]	<211> 115		
[0664]	<212> PRT		
[0665]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0666]	<400> 32		
[0667]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0668]	1	5	10
[0669]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His		
[0670]	20	25	30
[0671]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		

[0672]	35	40	45
[0673]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[0674]	50	55	60
[0675]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0676]	65	70	75
[0677]	Met Leu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[0678]	85	90	95
[0679]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[0680]	100	105	110
[0681]	Val Ser Ala		
[0682]	115		
[0683]	<210> 33		
[0684]	<211> 115		
[0685]	<212> PRT		
[0686]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0687]	<400> 33		
[0688]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0689]	1	5	10
[0690]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His		
[0691]	20	25	30
[0692]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0693]	35	40	45
[0694]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[0695]	50	55	60
[0696]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Thr Thr Ala Tyr		
[0697]	65	70	75
[0698]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys		
[0699]	85	90	95
[0700]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[0701]	100	105	110
[0702]	Val Ser Ala		
[0703]	115		
[0704]	<210> 34		
[0705]	<211> 107		
[0706]	<212> PRT		
[0707]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0708]	<400> 34		
[0709]	Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
[0710]	1	5	10
[0711]	Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp		
[0712]	20	25	30
[0713]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile		

[0714]	35	40	45
[0715]	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0716]	50	55	60
[0717]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0718]	65	70	75
[0719]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr		
[0720]	85	90	95
[0721]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0722]	100	105	
[0723]	<210> 35		
[0724]	<211> 115		
[0725]	<212> PRT		
[0726]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0727]	<400> 35		
[0728]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0729]	1	5	10
[0730]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His		
[0731]	20	25	30
[0732]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0733]	35	40	45
[0734]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Ile Glu Lys Phe		
[0735]	50	55	60
[0736]	Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0737]	65	70	75
[0738]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[0739]	85	90	95
[0740]	Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[0741]	100	105	110
[0742]	Val Ser Ala		
[0743]	115		
[0744]	<210> 36		
[0745]	<211> 110		
[0746]	<212> PRT		
[0747]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0748]	<400> 36		
[0749]	Asn Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly		
[0750]	1	5	10
[0751]	Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Asn Tyr		
[0752]	20	25	30
[0753]	Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
[0754]	35	40	45
[0755]	Phe Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		

[0756]	50	55	60
[0757]	Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala		
[0758]	65	70	75
[0759]	Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Ser Lys Trp Ile Thr Ser Tyr		
[0760]	85	90	95
[0761]	Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
[0762]	100	105	110
[0763]	<210> 37		
[0764]	<211> 109		
[0765]	<212> PRT		
[0766]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0767]	<400> 37		
[0768]	Asn Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly		
[0769]	1	5	10
[0770]	Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Asn Tyr		
[0771]	20	25	30
[0772]	Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
[0773]	35	40	45
[0774]	Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
[0775]	50	55	60
[0776]	Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala		
[0777]	65	70	75
[0778]	Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Ala Arg Val Thr Ser Tyr Pro		
[0779]	85	90	95
[0780]	Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
[0781]	100	105	
[0782]	<210> 38		
[0783]	<211> 115		
[0784]	<212> PRT		
[0785]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0786]	<400> 38		
[0787]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr		
[0788]	1	5	10
[0789]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His		
[0790]	20	25	30
[0791]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0792]	35	40	45
[0793]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[0794]	50	55	60
[0795]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0796]	65	70	75
[0797]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		

[0798]		85		90		95
[0799]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr					
[0800]		100		105		110
[0801]	Val Ser Ser					
[0802]		115				
[0803]	<210> 39					
[0804]	<211> 105					
[0805]	<212> PRT					
[0806]	<213> 小鼠属(Mus sp.)					
[0807]	<400> 39					
[0808]	Ser Phe Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly					
[0809]	1	5		10		15
[0810]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asn Asn Asn					
[0811]		20		25		30
[0812]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Gln Leu Ile					
[0813]		35		40		45
[0814]	Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly					
[0815]		50		55		60
[0816]	Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Tyr Thr Val Gln Ala					
[0817]	65	70		75		80
[0818]	Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Pro Trp					
[0819]		85		90		95
[0820]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Lys					
[0821]		100		105		
[0822]	<210> 40					
[0823]	<211> 116					
[0824]	<212> PRT					
[0825]	<213> 小鼠属(Mus sp.)					
[0826]	<400> 40					
[0827]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala					
[0828]	1	5		10		15
[0829]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His					
[0830]		20		25		30
[0831]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Asp Trp Ile					
[0832]		35		40		45
[0833]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe					
[0834]		50		55		60
[0835]	Lys Asp Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Cys					
[0836]	65	70		75		80
[0837]	Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys					
[0838]		85		90		95
[0839]	Lys Arg Ser Leu Leu Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu					

[0840]	100	105	110
[0841]	Thr Val Ser Ser		
[0842]	115		
[0843]	<210> 41		
[0844]	<211> 107		
[0845]	<212> PRT		
[0846]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0847]	<400> 41		
[0848]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly		
[0849]	1 5 10 15		
[0850]	Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Asn		
[0851]	20 25 30		
[0852]	Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ser Pro Lys Val Leu Ile		
[0853]	35 40 45		
[0854]	Tyr Ser Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
[0855]	50 55 60		
[0856]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser		
[0857]	65 70 75 80		
[0858]	Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu		
[0859]	85 90 95		
[0860]	Thr Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
[0861]	100 105		
[0862]	<210> 42		
[0863]	<211> 116		
[0864]	<212> PRT		
[0865]	<213> 小鼠属(Mus sp.)		
[0866]	<400> 42		
[0867]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0868]	1 5 10 15		
[0869]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His		
[0870]	20 25 30		
[0871]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Asp Trp Ile		
[0872]	35 40 45		
[0873]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[0874]	50 55 60		
[0875]	Lys Asp Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser		
[0876]	65 70 75 80		
[0877]	Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[0878]	85 90 95		
[0879]	Lys Arg Ser Leu Leu Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu		
[0880]	100 105 110		
[0881]	Thr Val Ser Ser		

[0882] 115
[0883] <210> 43
[0884] <211> 12
[0885] <212> PRT
[0886] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[0887] <400> 43
[0888] Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val
[0889] 1 5 10
[0890] <210> 44
[0891] <211> 12
[0892] <212> PRT
[0893] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[0894] <400> 44
[0895] Gly Tyr Thr Phe Ser Asp His Ala Ile His Trp Val
[0896] 1 5 10
[0897] <210> 45
[0898] <211> 12
[0899] <212> PRT
[0900] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[0901] <400> 45
[0902] Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val
[0903] 1 5 10
[0904] <210> 46
[0905] <211> 10
[0906] <212> PRT
[0907] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[0908] <400> 46
[0909] Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr
[0910] 1 5 10
[0911] <210> 47
[0912] <211> 10
[0913] <212> PRT
[0914] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[0915] <400> 47
[0916] Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr
[0917] 1 5 10
[0918] <210> 48
[0919] <211> 10
[0920] <212> PRT
[0921] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[0922] <400> 48
[0923] Leu Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr

[0924]	1	5	10
[0925]	<210> 49		
[0926]	<211> 10		
[0927]	<212> PRT		
[0928]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)		
[0929]	<400> 49		
[0930]	Val Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr		
[0931]	1	5	10
[0932]	<210> 50		
[0933]	<211> 10		
[0934]	<212> PRT		
[0935]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)		
[0936]	<400> 50		
[0937]	Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Val Lys Tyr		
[0938]	1	5	10
[0939]	<210> 51		
[0940]	<211> 10		
[0941]	<212> PRT		
[0942]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)		
[0943]	<400> 51		
[0944]	Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr		
[0945]	1	5	10
[0946]	<210> 52		
[0947]	<211> 8		
[0948]	<212> PRT		
[0949]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)		
[0950]	<400> 52		
[0951]	Ser Val Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr		
[0952]	1	5	
[0953]	<210> 53		
[0954]	<211> 7		
[0955]	<212> PRT		
[0956]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)		
[0957]	<400> 53		
[0958]	Lys Ile Ser Tyr Tyr Gly Ile		
[0959]	1	5	
[0960]	<210> 54		
[0961]	<211> 7		
[0962]	<212> PRT		
[0963]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)		
[0964]	<400> 54		
[0965]	Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly Asp		

[0966] 1 5
[0967] <210> 55
[0968] <211> 8
[0969] <212> PRT
[0970] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[0971] <400> 55
[0972] Lys Arg Ser Ile Gly Gly Asp His
[0973] 1 5
[0974] <210> 56
[0975] <211> 8
[0976] <212> PRT
[0977] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[0978] <400> 56
[0979] Gln Arg Gln Leu Gly Gln Gly Tyr
[0980] 1 5
[0981] <210> 57
[0982] <211> 8
[0983] <212> PRT
[0984] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[0985] <400> 57
[0986] Lys Arg Ser Leu Ile Gly Asp Tyr
[0987] 1 5
[0988] <210> 58
[0989] <211> 8
[0990] <212> PRT
[0991] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[0992] <400> 58
[0993] Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr
[0994] 1 5
[0995] <210> 59
[0996] <211> 8
[0997] <212> PRT
[0998] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[0999] <400> 59
[1000] Lys Arg Ser Ile Thr Thr Pro Tyr
[1001] 1 5
[1002] <210> 60
[1003] <211> 8
[1004] <212> PRT
[1005] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[1006] <400> 60
[1007] Glu Arg Ser Met Ile Gly Val Tyr

[1008]	1	5
[1009]	<210> 61	
[1010]	<211> 8	
[1011]	<212> PRT	
[1012]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1013]	<400> 61	
[1014]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr	
[1015]	1	5
[1016]	<210> 62	
[1017]	<211> 6	
[1018]	<212> PRT	
[1019]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1020]	<400> 62	
[1021]	Glu Asn Val Val Thr Tyr	
[1022]	1	5
[1023]	<210> 63	
[1024]	<211> 6	
[1025]	<212> PRT	
[1026]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1027]	<400> 63	
[1028]	Glu Asp Ile Tyr Ser Asn	
[1029]	1	5
[1030]	<210> 64	
[1031]	<211> 6	
[1032]	<212> PRT	
[1033]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1034]	<400> 64	
[1035]	Glu Asn Ile Tyr Ser His	
[1036]	1	5
[1037]	<210> 65	
[1038]	<211> 6	
[1039]	<212> PRT	
[1040]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1041]	<400> 65	
[1042]	Gln Asn Ile Asn Val Trp	
[1043]	1	5
[1044]	<210> 66	
[1045]	<211> 11	
[1046]	<212> PRT	
[1047]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1048]	<400> 66	
[1049]	Gln Ser Leu Val His Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr	

[1050]	1	5	10
[1051]	<210> 67		
[1052]	<211> 6		
[1053]	<212> PRT		
[1054]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)		
[1055]	<400> 67		
[1056]	Gln Asn Val Gly Thr Ala		
[1057]	1	5	
[1058]	<210> 68		
[1059]	<211> 12		
[1060]	<212> PRT		
[1061]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)		
[1062]	<400> 68		
[1063]	Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Ser Tyr		
[1064]	1	5	10
[1065]	<210> 69		
[1066]	<211> 6		
[1067]	<212> PRT		
[1068]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)		
[1069]	<400> 69		
[1070]	Gln Ser Val Asn Asn Asn		
[1071]	1	5	
[1072]	<210> 70		
[1073]	<211> 12		
[1074]	<212> PRT		
[1075]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)		
[1076]	<400> 70		
[1077]	Gln Ser Leu Leu Asn Arg Gly Asn His Lys Asn Tyr		
[1078]	1	5	10
[1079]	<210> 71		
[1080]	<211> 11		
[1081]	<212> PRT		
[1082]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)		
[1083]	<400> 71		
[1084]	Gln Ser Leu Val Gln Ser Asn Gly Asn Thr Tyr		
[1085]	1	5	10
[1086]	<210> 72		
[1087]	<211> 6		
[1088]	<212> PRT		
[1089]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)		
[1090]	<400> 72		
[1091]	Glu Asn Val Val Asn Tyr		

[1092]	1	5
[1093]	<210> 73	
[1094]	<211> 12	
[1095]	<212> PRT	
[1096]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1097]	<400> 73	
[1098]	Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Lys Thr Lys Asn Tyr	
[1099]	1	5 10
[1100]	<210> 74	
[1101]	<211> 6	
[1102]	<212> PRT	
[1103]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1104]	<400> 74	
[1105]	Gln His Ile Asn Phe Trp	
[1106]	1	5
[1107]	<210> 75	
[1108]	<211> 6	
[1109]	<212> PRT	
[1110]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1111]	<400> 75	
[1112]	Glu Asn Val Val Ile Tyr	
[1113]	1	5
[1114]	<210> 76	
[1115]	<211> 12	
[1116]	<212> PRT	
[1117]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1118]	<400> 76	
[1119]	Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr	
[1120]	1	5 10
[1121]	<210> 77	
[1122]	<211> 7	
[1123]	<212> PRT	
[1124]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1125]	<400> 77	
[1126]	Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr	
[1127]	1	5
[1128]	<210> 78	
[1129]	<211> 7	
[1130]	<212> PRT	
[1131]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1132]	<400> 78	
[1133]	Lys Ala Thr Asn Leu Ala Asp	

[1134]	1	5
[1135]	<210>	79
[1136]	<211>	7
[1137]	<212>	PRT
[1138]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)
[1139]	<400>	79
[1140]	Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp	
[1141]	1	5
[1142]	<210>	80
[1143]	<211>	7
[1144]	<212>	PRT
[1145]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)
[1146]	<400>	80
[1147]	Lys Ala Ser Asn Leu His Thr	
[1148]	1	5
[1149]	<210>	81
[1150]	<211>	7
[1151]	<212>	PRT
[1152]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)
[1153]	<400>	81
[1154]	Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser	
[1155]	1	5
[1156]	<210>	82
[1157]	<211>	7
[1158]	<212>	PRT
[1159]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)
[1160]	<400>	82
[1161]	Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr	
[1162]	1	5
[1163]	<210>	83
[1164]	<211>	7
[1165]	<212>	PRT
[1166]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)
[1167]	<400>	83
[1168]	Trp Ala Ser Thr Arg Asp Ser	
[1169]	1	5
[1170]	<210>	84
[1171]	<211>	7
[1172]	<212>	PRT
[1173]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)
[1174]	<400>	84
[1175]	Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr	

[1176]	1	5
[1177]	<210> 85	
[1178]	<211> 7	
[1179]	<212> PRT	
[1180]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1181]	<400> 85	
[1182]	Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser	
[1183]	1	5
[1184]	<210> 86	
[1185]	<211> 7	
[1186]	<212> PRT	
[1187]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1188]	<400> 86	
[1189]	Lys Val Ser Asn Arg Phe Cys	
[1190]	1	5
[1191]	<210> 87	
[1192]	<211> 7	
[1193]	<212> PRT	
[1194]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1195]	<400> 87	
[1196]	Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Ser	
[1197]	1	5
[1198]	<210> 88	
[1199]	<211> 7	
[1200]	<212> PRT	
[1201]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1202]	<400> 88	
[1203]	Lys Val Ser Asn Leu His Thr	
[1204]	1	5
[1205]	<210> 89	
[1206]	<211> 9	
[1207]	<212> PRT	
[1208]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1209]	<400> 89	
[1210]	Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr	
[1211]	1	5
[1212]	<210> 90	
[1213]	<211> 9	
[1214]	<212> PRT	
[1215]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)	
[1216]	<400> 90	
[1217]	Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Phe Thr	

[1218] 1 5
[1219] <210> 91
[1220] <211> 9
[1221] <212> PRT
[1222] <213> 小鼠属(Mus sp.)
[1223] <400> 91
[1224] Gln His Phe Trp Gly Ala Pro Phe Thr
[1225] 1 5
[1226] <210> 92
[1227] <211> 9
[1228] <212> PRT
[1229] <213> 小鼠属(Mus sp.)
[1230] <400> 92
[1231] Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Phe Thr
[1232] 1 5
[1233] <210> 93
[1234] <211> 9
[1235] <212> PRT
[1236] <213> 小鼠属(Mus sp.)
[1237] <400> 93
[1238] Ser Gln Asn Thr His Val Pro Tyr Thr
[1239] 1 5
[1240] <210> 94
[1241] <211> 9
[1242] <212> PRT
[1243] <213> 小鼠属(Mus sp.)
[1244] <400> 94
[1245] Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Leu Thr
[1246] 1 5
[1247] <210> 95
[1248] <211> 9
[1249] <212> PRT
[1250] <213> 小鼠属(Mus sp.)
[1251] <400> 95
[1252] Gln Ser Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
[1253] 1 5
[1254] <210> 96
[1255] <211> 9
[1256] <212> PRT
[1257] <213> 小鼠属(Mus sp.)
[1258] <400> 96
[1259] Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Pro Trp Thr

[1260]	1	5	
[1261]	<210>	97	
[1262]	<211>	9	
[1263]	<212>	PRT	
[1264]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1265]	<400>	97	
[1266]	Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Tyr Thr		
[1267]	1	5	
[1268]	<210>	98	
[1269]	<211>	9	
[1270]	<212>	PRT	
[1271]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1272]	<400>	98	
[1273]	Ser Gln Ser Thr His Ala Pro Leu Thr		
[1274]	1	5	
[1275]	<210>	99	
[1276]	<211>	11	
[1277]	<212>	PRT	
[1278]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1279]	<400>	99	
[1280]	Gly Ser Lys Trp Ile Thr Ser Tyr Pro Tyr Thr		
[1281]	1	5	10
[1282]	<210>	100	
[1283]	<211>	10	
[1284]	<212>	PRT	
[1285]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1286]	<400>	100	
[1287]	Gly Ala Arg Val Thr Ser Tyr Pro Tyr Thr		
[1288]	1	5	10
[1289]	<210>	101	
[1290]	<211>	9	
[1291]	<212>	PRT	
[1292]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1293]	<400>	101	
[1294]	Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr		
[1295]	1	5	
[1296]	<210>	102	
[1297]	<211>	9	
[1298]	<212>	PRT	
[1299]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1300]	<400>	102	
[1301]	Lys Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr		

[1302]	1	5	
[1303]	<210>	103	
[1304]	<211>	9	
[1305]	<212>	PRT	
[1306]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1307]	<400>	103	
[1308]	Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr Met		
[1309]	1	5	
[1310]	<210>	104	
[1311]	<211>	9	
[1312]	<212>	PRT	
[1313]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1314]	<400>	104	
[1315]	Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr		
[1316]	1	5	
[1317]	<210>	105	
[1318]	<211>	10	
[1319]	<212>	PRT	
[1320]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1321]	<400>	105	
[1322]	Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His		
[1323]	1	5	10
[1324]	<210>	106	
[1325]	<211>	10	
[1326]	<212>	PRT	
[1327]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1328]	<400>	106	
[1329]	Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His Ala Ile His		
[1330]	1	5	10
[1331]	<210>	107	
[1332]	<211>	17	
[1333]	<212>	PRT	
[1334]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1335]	<400>	107	
[1336]	Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys		
[1337]	1	5	10 15
[1338]	Gly		
[1339]	<210>	108	
[1340]	<211>	17	
[1341]	<212>	PRT	
[1342]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1343]	<400>	108	

[1344]	Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Arg
[1345]	1 5 10 15
[1346]	Gly
[1347]	<210> 109
[1348]	<211> 17
[1349]	<212> PRT
[1350]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1351]	<400> 109
[1352]	Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[1353]	1 5 10 15
[1354]	Val
[1355]	<210> 110
[1356]	<211> 17
[1357]	<212> PRT
[1358]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1359]	<400> 110
[1360]	Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[1361]	1 5 10 15
[1362]	Val
[1363]	<210> 111
[1364]	<211> 17
[1365]	<212> PRT
[1366]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1367]	<400> 111
[1368]	Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[1369]	1 5 10 15
[1370]	Asp
[1371]	<210> 112
[1372]	<211> 17
[1373]	<212> PRT
[1374]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1375]	<400> 112
[1376]	Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[1377]	1 5 10 15
[1378]	Gly
[1379]	<210> 113
[1380]	<211> 17
[1381]	<212> PRT
[1382]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1383]	<400> 113
[1384]	Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[1385]	1 5 10 15

[1386] Gly
[1387] <210> 114
[1388] <211> 6
[1389] <212> PRT
[1390] <213> 小鼠属(Mus sp.)
[1391] <400> 114
[1392] Ser Ile Thr Thr Ser Tyr
[1393] 1 5
[1394] <210> 115
[1395] <211> 6
[1396] <212> PRT
[1397] <213> 小鼠属(Mus sp.)
[1398] <400> 115
[1399] Ser Leu Ser Thr Pro Tyr
[1400] 1 5
[1401] <210> 116
[1402] <211> 5
[1403] <212> PRT
[1404] <213> 小鼠属(Mus sp.)
[1405] <400> 116
[1406] Ser Tyr Tyr Gly Asp
[1407] 1 5
[1408] <210> 117
[1409] <211> 6
[1410] <212> PRT
[1411] <213> 小鼠属(Mus sp.)
[1412] <400> 117
[1413] Ser Ile Thr Thr Pro Tyr
[1414] 1 5
[1415] <210> 118
[1416] <211> 7
[1417] <212> PRT
[1418] <213> 小鼠属(Mus sp.)
[1419] <400> 118
[1420] Ser Leu Leu Ala Leu Asp Tyr
[1421] 1 5
[1422] <210> 119
[1423] <211> 6
[1424] <212> PRT
[1425] <213> 小鼠属(Mus sp.)
[1426] <400> 119
[1427] Ser Leu Asn Met Ala Tyr

[1428]	1	5	
[1429]	<210>	120	
[1430]	<211>	5	
[1431]	<212>	PRT	
[1432]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1433]	<400>	120	
[1434]	Ser Tyr Tyr Gly His		
[1435]	1	5	
[1436]	<210>	121	
[1437]	<211>	11	
[1438]	<212>	PRT	
[1439]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1440]	<400>	121	
[1441]	Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser		
[1442]	1	5	10
[1443]	<210>	122	
[1444]	<211>	11	
[1445]	<212>	PRT	
[1446]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1447]	<400>	122	
[1448]	His Ala Ser Gln His Ile Asn Phe Trp Leu Ser		
[1449]	1	5	10
[1450]	<210>	123	
[1451]	<211>	17	
[1452]	<212>	PRT	
[1453]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1454]	<400>	123	
[1455]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg Gly Asn His Lys Asn Tyr Leu		
[1456]	1	5	10 15
[1457]	Thr		
[1458]	<210>	124	
[1459]	<211>	11	
[1460]	<212>	PRT	
[1461]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1462]	<400>	124	
[1463]	Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser His Leu Ala		
[1464]	1	5	10
[1465]	<210>	125	
[1466]	<211>	17	
[1467]	<212>	PRT	
[1468]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)	
[1469]	<400>	125	

[1470]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Lys Thr Lys Asn Tyr Leu
[1471]	1 5 10 15
[1472]	Thr
[1473]	<210> 126
[1474]	<211> 11
[1475]	<212> PRT
[1476]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)
[1477]	<400> 126
[1478]	Lys Ala Ser Gln Ser Val Asn Asn Asn Val Ala
[1479]	1 5 10
[1480]	<210> 127
[1481]	<211> 11
[1482]	<212> PRT
[1483]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)
[1484]	<400> 127
[1485]	Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Asn Ile Ala
[1486]	1 5 10
[1487]	<210> 128
[1488]	<211> 17
[1489]	<212> PRT
[1490]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)
[1491]	<400> 128
[1492]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
[1493]	1 5 10 15
[1494]	Ala
[1495]	<210> 129
[1496]	<211> 11
[1497]	<212> PRT
[1498]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)
[1499]	<400> 129
[1500]	Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
[1501]	1 5 10
[1502]	<210> 130
[1503]	<211> 7
[1504]	<212> PRT
[1505]	<213> 小鼠属 (Mus sp.)
[1506]	<400> 130
[1507]	Ser Ala Ser Thr Arg His Thr
[1508]	1 5
[1509]	<210> 131
[1510]	<211> 7
[1511]	<212> PRT

[1512] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[1513] <400> 131
[1514] Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser
[1515] 1 5
[1516] <210> 132
[1517] <211> 7
[1518] <212> PRT
[1519] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[1520] <400> 132
[1521] Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
[1522] 1 5
[1523] <210> 133
[1524] <211> 9
[1525] <212> PRT
[1526] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[1527] <400> 133
[1528] Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu Thr
[1529] 1 5
[1530] <210> 134
[1531] <211> 9
[1532] <212> PRT
[1533] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[1534] <400> 134
[1535] Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr
[1536] 1 5
[1537] <210> 135
[1538] <211> 9
[1539] <212> PRT
[1540] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[1541] <400> 135
[1542] Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr
[1543] 1 5
[1544] <210> 136
[1545] <211> 10
[1546] <212> PRT
[1547] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[1548] <400> 136
[1549] Gly Tyr Thr Phe Ser Asp His Ala Ile His
[1550] 1 5 10
[1551] <210> 137
[1552] <211> 17
[1553] <212> PRT

[1554]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)
[1555]	<400>	137
[1556]	Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Val Lys Tyr Ser Glu Arg Phe Lys	
[1557]	1	5 10 15
[1558]	Gly	
[1559]	<210>	138
[1560]	<211>	17
[1561]	<212>	PRT
[1562]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)
[1563]	<400>	138
[1564]	Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Ser Glu Lys Phe Lys	
[1565]	1	5 10 15
[1566]	Gly	
[1567]	<210>	139
[1568]	<211>	17
[1569]	<212>	PRT
[1570]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)
[1571]	<400>	139
[1572]	Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asp Glu Lys Phe Lys	
[1573]	1	5 10 15
[1574]	Gly	
[1575]	<210>	140
[1576]	<211>	6
[1577]	<212>	PRT
[1578]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)
[1579]	<400>	140
[1580]	Gln Leu Gly Gln Gly Tyr	
[1581]	1	5
[1582]	<210>	141
[1583]	<211>	6
[1584]	<212>	PRT
[1585]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)
[1586]	<400>	141
[1587]	Ser Met Ile Gly Val Tyr	
[1588]	1	5
[1589]	<210>	142
[1590]	<211>	11
[1591]	<212>	PRT
[1592]	<213>	小鼠属 (Mus sp.)
[1593]	<400>	142
[1594]	His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser	
[1595]	1	5 10

[1596]	<210>	143
[1597]	<211>	17
[1598]	<212>	PRT
[1599]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1600]	<400>	143
[1601]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu	
[1602]	1	5 10 15
[1603]	Thr	
[1604]	<210>	144
[1605]	<211>	11
[1606]	<212>	PRT
[1607]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1608]	<400>	144
[1609]	Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Ile Tyr Val Ser	
[1610]	1	5 10
[1611]	<210>	145
[1612]	<211>	16
[1613]	<212>	PRT
[1614]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1615]	<400>	145
[1616]	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu His	
[1617]	1	5 10 15
[1618]	<210>	146
[1619]	<211>	16
[1620]	<212>	PRT
[1621]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1622]	<400>	146
[1623]	Arg Phe Ser Gln Ser Leu Val Gln Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln	
[1624]	1	5 10 15
[1625]	<210>	147
[1626]	<211>	7
[1627]	<212>	PRT
[1628]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1629]	<400>	147
[1630]	Lys Ala Ser Asn Leu Tyr Thr	
[1631]	1	5
[1632]	<210>	148
[1633]	<211>	9
[1634]	<212>	PRT
[1635]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1636]	<400>	148
[1637]	Gln His Asp Gln Ser Tyr Pro Thr Tyr	

[1638]	1	5
[1639]	<210>	149
[1640]	<211>	345
[1641]	<212>	DNA
[1642]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1643]	<400>	149
[1644]	caggttcagt	tgctgcagta tgacgtgag ttggtgaaac ctgggggggtc agtgaagata 60
[1645]	tcgtgcaagg	cctctggcta caccttcact gaccatgcta ttacttgggt gaagcagaag 120
[1646]	cctgaacagg	gcctggaatg gattggatat ttttctcccg gaaatgatga tattaagtac 180
[1647]	agtgagaagt	tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca agtcctccag cactgcctac 240
[1648]	atgcagctca	acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aagatccatt 300
[1649]	actacgcctt	actggggcca aggactctg gtcactgtct ctgca 345
[1650]	<210>	150
[1651]	<211>	319
[1652]	<212>	DNA
[1653]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1654]	<400>	150
[1655]	gacatccaga	tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc 60
[1656]	atcacttgcc	atgccagtca gaacattaat gtttggttaa gctggtacca gcagaaacca 120
[1657]	ggaaatattc	ctaaactatt gatctataag gtttccaact tgcacacagg cgtcccatca 180
[1658]	aggttttagt	gcaagtggatc tggaacaggt ttacacattaa ccatcagcag cctgcagcct 240
[1659]	gaagacattg	ccacttacta ctgtcaacag gatcaaagtt atccgtacac gttcggaggg 300
[1660]	gggaccaagc	tgaaaaaaaa 319
[1661]	<210>	151
[1662]	<211>	345
[1663]	<212>	DNA
[1664]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1665]	<400>	151
[1666]	caggttcagc	tgacgcagtc tgacgtgag ttggtgaaac ctgggggttc agtgaagata 60
[1667]	tcctgcaagg	cctctggcta caccttcact gaccatgcta ttacttgggt gaagcagaag 120
[1668]	cctgaacagg	gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatgatga tattaagtac 180
[1669]	aatgagaagt	tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
[1670]	atgcagctca	acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aagatccatt 300
[1671]	actacgtctt	actggggcca aggactctg gtcactgtct ctgca 345
[1672]	<210>	152
[1673]	<211>	323
[1674]	<212>	DNA
[1675]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1676]	<400>	152
[1677]	aacattgtaa	tgaccaatc tcccaaattc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 60
[1678]	ttgacctgca	aggccagtga gaatgtggtt atttatgttt cctggtatca acagaaacca 120
[1679]	gagcagtcct	ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat 180

[1680] cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcaggct 240
 [1681] gaagaccttg cagattatca ctgtggacag ggttacagct atccgtacac gttcggaggg 300
 [1682] gggaccaagc tggaaataaa acg 323
 [1683] <210> 153
 [1684] <211> 345
 [1685] <212> DNA
 [1686] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [1687] <400> 153
 [1688] caggttcagt tgcagcagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
 [1689] tcctgcaagg cttctggcta caccttact gaccatgcca ttcatgggt gaagcagaag 120
 [1690] cctgaacagg gcctggaatg gattggatat gtttctcccg gaaatggtga tattaagtac 180
 [1691] aatgagaagt tcaaggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
 [1692] atgcagctca acagcctgac atcggaggat tctgcagtgt atttctgtaa aagatcttta 300
 [1693] attggagact attggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345
 [1694] <210> 154
 [1695] <211> 322
 [1696] <212> DNA
 [1697] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [1698] <400> 154
 [1699] gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtcctcat cagtaggaga cagggtcacc 60
 [1700] atcacctgca aggccagtc gaatgtgggt actgctgtag cctggatatca acagaaacca 120
 [1701] ggacaatctc ctaaatttct gatttactcg gcatccaatc ggtacactgg agtccttgat 180
 [1702] cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca cgatcagcaa tatgcagtct 240
 [1703] gaagacctgg cagattatct ctgccagcaa tatagcagct atcgtctgac gttcgggtgga 300
 [1704] ggcaccaagc tggaaatcaa ac 322
 [1705] <210> 155
 [1706] <211> 345
 [1707] <212> DNA
 [1708] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [1709] <400> 155
 [1710] caggttcagc tgcagcagtc tgacgctgaa ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
 [1711] tcctgcaagg cttctggcta caccttact gaccatgcta ttactgggt gaagcagaag 120
 [1712] cctgaacagg gcctggaatg gattggatat ctttctcccg gaaatgatga tattaagtac 180
 [1713] agtgagaagt tcaaggaaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
 [1714] atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aagatccata 300
 [1715] gggggggacc actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345
 [1716] <210> 156
 [1717] <211> 323
 [1718] <212> DNA
 [1719] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [1720] <400> 156
 [1721] gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttgaga cacaattacc 60

[1722]	atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa actggtacca gcagaaacca	120
[1723]	ggaaatattc ctaaactatt gatctataag gtttccaact tgcacacagg cgtcccatca	180
[1724]	aggttttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttacacattaa ccatcggcag cctgcagcct	240
[1725]	gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccgttcac gttcggaggg	300
[1726]	gggaccaagc tggaataaaa acg	323
[1727]	<210>	157
[1728]	<211>	345
[1729]	<212>	DNA
[1730]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1731]	<400>	157
[1732]	caggttcagc tgcagcagtc tgacgtgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata	60
[1733]	tcctgcaagg cttctggcta caccttcact gaccatgcta ttactgggt gaaacagaag	120
[1734]	cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatggtga tattaagtat	180
[1735]	aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
[1736]	atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtca aagacaactg	300
[1737]	ggacaaggct actggggcca aggcaccact ctacagtct cctca	345
[1738]	<210>	158
[1739]	<211>	338
[1740]	<212>	DNA
[1741]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1742]	<400>	158
[1743]	gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
[1744]	atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagttagt gaaacaccta ttacattgg	120
[1745]	tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgattt acaaagtttc caaccgattt	180
[1746]	tctggggctcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
[1747]	agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaaatac acatgttccg	300
[1748]	tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacg	338
[1749]	<210>	159
[1750]	<211>	345
[1751]	<212>	DNA
[1752]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[1753]	<400>	159
[1754]	caggttcagc tgcagcagtc tgacgtgag ttggggaaac ctggggcttc agtgaagata	60
[1755]	tcctgcaagg cttctggcta caccttcagt gaccatgcta ttactgggt gaagcagaag	120
[1756]	cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atctctcccg gaaacgatga tattaagtac	180
[1757]	aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
[1758]	atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtga aagatcgatg	300
[1759]	attggggttt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345
[1760]	<210>	160
[1761]	<211>	337
[1762]	<212>	DNA
[1763]	<213>	小鼠属(Mus sp.)

[1764]	<400> 160
[1765]	gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgactgtca gtcttggcga tcaagcctcc 60
[1766]	atctcttgca gatttagtca gaggcttgta caaagtaatg gaaataccta tttacagtgg 120
[1767]	tatctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcttgattt acaaagtctc caaccgattt 180
[1768]	tgtgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
[1769]	agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgctccg 300
[1770]	ctcaggttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaac 337
[1771]	<210> 161
[1772]	<211> 342
[1773]	<212> DNA
[1774]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1775]	<400> 161
[1776]	caggttcagc tgcagcagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
[1777]	tcctgcaaga cttctggcta caccttcact gaccatgcaa ttactgggt gaagcagaag 120
[1778]	cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatggtga tattaagtac 180
[1779]	aatgagaagt tcaaggcga gccaccctg actgcagaca aatcctccag cactgcctat 240
[1780]	atgcagctca gcagcctgac acctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aatatcttac 300
[1781]	tacggtattt ggggccaagg caccactctc acagtctcct ca 342
[1782]	<210> 162
[1783]	<211> 322
[1784]	<212> DNA
[1785]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1786]	<400> 162
[1787]	gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga gtctgtcacc 60
[1788]	atcacatgtc gactaagtga agatatttac agtaatttag catggtttca gcagagaccg 120
[1789]	ggaaaatctc ctacagtcct gggtttataaa gcaacaaact tagcagacgg tgtgccatca 180
[1790]	aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct 240
[1791]	gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccattcac gttcggctcg 300
[1792]	gggaccaagg tggaataaaa ac 322
[1793]	<210> 163
[1794]	<211> 342
[1795]	<212> DNA
[1796]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1797]	<400> 163
[1798]	caggttcagc tgcagcagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
[1799]	tcctgcaagg cttctggcta caccttcact gaccatgcta ttactgggt gaagcagaag 120
[1800]	cctgaacagg gcctggaatg gattggatat ttttctcccg gaaatgatga tattaagtat 180
[1801]	aatgagaagt tcaaggtcaa gccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
[1802]	atgcaactca ccagcctgac atctgaagat tctgcagtgt atttctgtaa aagatcttac 300
[1803]	tacggtgatt ggggccaagg caccactctc acagtctcct ca 342
[1804]	<210> 164
[1805]	<211> 322

[1806]	<212> DNA
[1807]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1808]	<400> 164
[1809]	gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgttt ctgtgggaga aactgtcacc 60
[1810]	atcacatgtc gagcaagtga gaatatctac agtcatttag catggtatca acagaaacag 120
[1811]	ggaaaatctc ctcaactcct ggtctatggt gcaactaact tagcagatgg tgtgccatca 180
[1812]	aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttccctca agatccacag cctgcagtct 240
[1813]	gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggtg ctccattcac gttcggctcg 300
[1814]	gggacaaagt tggaaataaa ac 322
[1815]	<210> 165
[1816]	<211> 345
[1817]	<212> DNA
[1818]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1819]	<400> 165
[1820]	caaattcagc tgcagcagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctgggacttc agtgaagatg 60
[1821]	tcttgaagg cttctggcta cactttcact gaccatgcta ttcactgggt gaagcagaag 120
[1822]	cctgaacagg gcctggaatg gattggatat ttttctcccg gaaatgatga tattaagtat 180
[1823]	aatgtgaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
[1824]	atgcagctca acagcctgac atctgaagat tctgcagtgt atttctgttc ggtgggatac 300
[1825]	gcccttgact actggggcct aggcaccact ctcacagtct cctca 345
[1826]	<210> 166
[1827]	<211> 323
[1828]	<212> DNA
[1829]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1830]	<400> 166
[1831]	aacattgtaa tgaccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 60
[1832]	ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt acttatgttt cctggtatca acagaaacca 120
[1833]	gagcagctct ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat 180
[1834]	cgtttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcagget 240
[1835]	gaagaccttg cagattatca ctgtggacag ggttacagct atccgtacac gttcggaggg 300
[1836]	gggaccaagc tggaaataaa acg 323
[1837]	<210> 167
[1838]	<211> 345
[1839]	<212> DNA
[1840]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1841]	<400> 167
[1842]	caggttcagc tgcaacagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctgggactac agtgaagata 60
[1843]	tcttgaagg cttctggcta cactttcact gaccatgcta ttcactgggt gaaggagaag 120
[1844]	cctgaacagg gcctggaatg gatcgatat atttctcccg gaaatgatga tattaagtac 180
[1845]	agtgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcttac 240
[1846]	atgcagctca acagcctgac atctgatgat tctgcagtgt atttctgtaa aagatcgctt 300
[1847]	agtacgcctt actggggcca aggactctg gtcactgtct ctgca 345

[1848]	<210> 168
[1849]	<211> 477
[1850]	<212> DNA
[1851]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1852]	<400> 168
[1853]	tttttaatac gactccctat agggcaagca gtggtatcaa tgcagattac aagggggaaa 60
[1854]	ggcatcagac cagcatgggc atcaaggtgg aatcacagac tctggtcttc atatccatac 120
[1855]	tgtttgggtt atatggagct gatgggaaca cattaatgac ccaatctccc acatccatgt 180
[1856]	acatgtcagt aggagagagg gtcacctga cttgcaaggc cagtgagaat gagattaatt 240
[1857]	atgtttcctg gtatcaacag aaaccagagc agtctcctaa actgttgata tacggggcat 300
[1858]	ccaaccgta ctctggggtc ccgatcgct tcacaggcag tggatctgca acagatttca 360
[1859]	ctctgaccat cagcagtgtg caggctgaag acctgcaga ttatccctgt ggagcaaggg 420
[1860]	attaactagc tatccgtaca cgttcggagg ggggaccaag ctggaaataa aacgggc 477
[1861]	<210> 169
[1862]	<211> 341
[1863]	<212> DNA
[1864]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1865]	<400> 169
[1866]	gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 60
[1867]	atgagctgca ggtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120
[1868]	tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180
[1869]	gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
[1870]	atcagcagtg tgcaggtgca agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300
[1871]	ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac g 341
[1872]	<210> 170
[1873]	<211> 343
[1874]	<212> DNA
[1875]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1876]	<400> 170
[1877]	caggttcagc tgcagcagtc tgacgtgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
[1878]	tcctgcaagg cttctggcta cacttcact gaccatgcta ttactgggt gatgcagatg 120
[1879]	cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatggtga tgtaagtac 180
[1880]	agtgaagggt tcaaggcag ggccacactg actgcagaca aatcctccag ctctgcctac 240
[1881]	atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagttt atttctgtaa aagatcgctt 300
[1882]	agtagcctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctg 343
[1883]	<210> 171
[1884]	<211> 341
[1885]	<212> DNA
[1886]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1887]	<400> 171
[1888]	gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaggtcact 60
[1889]	atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagag ctacttgacc 120

[1890] tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctcctgggc atccactagg 180
 [1891] gattctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
 [1892] atcagcagtg tgcaggtga agacctggca gtttattact gtcagagtga ttatagttat 300
 [1893] ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac g 341
 [1894] <210> 172
 [1895] <211> 345
 [1896] <212> DNA
 [1897] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [1898] <220>
 [1899] <221> modified_base
 [1900] <222> (26) .. (26)
 [1901] <223> a、c、t、g、未知或其它
 [1902] <220>
 [1903] <221> modified_base
 [1904] <222> (332) .. (332)
 [1905] <223> a、c、t、g、未知或其它
 [1906] <220>
 [1907] <221> misc_feature
 [1908] <222> (26) .. (26)
 [1909] <223> n is a, c, g, t or u
 [1910] <220>
 [1911] <221> misc_feature
 [1912] <222> (332) .. (332)
 [1913] <223> n is a, c, g, t or u
 [1914] <400> 172
 [1915] caggttcagc tgcagcagtc tgacgntgag ttggtgaaac cgggggcttc agtgaagata 60
 [1916] tcctgtaagg cttctggcta caccttact gaccatgcta ttactgggt gaagcagaag 120
 [1917] cctgaacagg gcctggaatg gattggatat ttttctcccg gaaatgatga tattaagtac 180
 [1918] aatgagaagt ttaggggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
 [1919] atgcagctca acagcctgtc atctgatgat tctgcagtgt atttctgtaa aagatcgctt 300
 [1920] agtagcctt actggggcca agggactctg gncactgtct ctgca 345
 [1921] <210> 173
 [1922] <211> 341
 [1923] <212> DNA
 [1924] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [1925] <400> 173
 [1926] gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaagtcact 60
 [1927] atgagctgca agtccagtc gagtctgtta aaccgtggaa atcataagaa ctacttgacc 120
 [1928] tggtaccggc agaaaccagg gctgcctcct aaactgttga tttactgggc atccactagg 180
 [1929] gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cgctctcacc 240
 [1930] atcagcagtg ttcaggtga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatacttat 300
 [1931] ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gagataaaac g 341

[1932]	<210> 174
[1933]	<211> 345
[1934]	<212> DNA
[1935]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1936]	<400> 174
[1937]	caggttcagc tgcagcagtc tgacgtgag ttggtgaaac ctggggcttc aatgaagatt 60
[1938]	tcttgcaagg cttctggcta caccttcact gaccatgcta ttcactgggt gaagcagaag 120
[1939]	cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatggtga tattaagtac 180
[1940]	aatgagaagt tcaaggtaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
[1941]	atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aagatcgatt 300
[1942]	actacgcctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345
[1943]	<210> 175
[1944]	<211> 341
[1945]	<212> DNA
[1946]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1947]	<400> 175
[1948]	gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 60
[1949]	atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa aaacaaagaa ctacttgacg 120
[1950]	tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180
[1951]	gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
[1952]	atcagcagtg tgcagctga agacctggca gtttattact gtaagaatga ttatagttat 300
[1953]	ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac g 341
[1954]	<210> 176
[1955]	<211> 345
[1956]	<212> DNA
[1957]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1958]	<400> 176
[1959]	caggttcagc tgcagcagtc tgacgtgaa ttggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
[1960]	tcttgcaaga cttctggcta caccttcact gaccatgcta ttcactgggt gaagcagaag 120
[1961]	cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atctctcccg gaaatgatga tattaagtac 180
[1962]	actgagaagt tcaaggcaa ggtcacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
[1963]	atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtct atttctgtaa aagatcgatt 300
[1964]	actacgcctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345
[1965]	<210> 177
[1966]	<211> 480
[1967]	<212> DNA
[1968]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[1969]	<220>
[1970]	<221> modified_base
[1971]	<222> (153) .. (153)
[1972]	<223> a、c、t、g、未知或其它
[1973]	<220>

[1974]	<221> modified_base
[1975]	<222> (285) .. (286)
[1976]	<223> a、c、t、g、未知或其它
[1977]	<220>
[1978]	<221> modified_base
[1979]	<222> (289) .. (289)
[1980]	<223> a、c、t、g、未知或其它
[1981]	<220>
[1982]	<221> modified_base
[1983]	<222> (297) .. (298)
[1984]	<223> a、c、t、g、未知或其它
[1985]	<220>
[1986]	<221> modified_base
[1987]	<222> (332) .. (332)
[1988]	<223> a、c、t、g、未知或其它
[1989]	<220>
[1990]	<221> modified_base
[1991]	<222> (405) .. (405)
[1992]	<223> a、c、t、g、未知或其它
[1993]	<220>
[1994]	<221> modified_base
[1995]	<222> (412) .. (412)
[1996]	<223> a、c、t、g、未知或其它
[1997]	<220>
[1998]	<221> modified_base
[1999]	<222> (429) .. (429)
[2000]	<223> a、c、t、g、未知或其它
[2001]	<220>
[2002]	<221> misc_feature
[2003]	<222> (153) .. (153)
[2004]	<223> n is a, c, g, t or u
[2005]	<220>
[2006]	<221> misc_feature
[2007]	<222> (285) .. (285)
[2008]	<223> n is a, c, g, t or u
[2009]	<220>
[2010]	<221> misc_feature
[2011]	<222> (286) .. (286)
[2012]	<223> n is a, c, g, t or u
[2013]	<220>
[2014]	<221> misc_feature
[2015]	<222> (289) .. (289)

[2016]	<223> n is a, c, g, t or u
[2017]	<220>
[2018]	<221> misc_feature
[2019]	<222> (297) .. (297)
[2020]	<223> n is a, c, g, t or u
[2021]	<220>
[2022]	<221> misc_feature
[2023]	<222> (298) .. (298)
[2024]	<223> n is a, c, g, t or u
[2025]	<220>
[2026]	<221> misc_feature
[2027]	<222> (332) .. (332)
[2028]	<223> n is a, c, g, t or u
[2029]	<220>
[2030]	<221> misc_feature
[2031]	<222> (405) .. (405)
[2032]	<223> n is a, c, g, t or u
[2033]	<220>
[2034]	<221> misc_feature
[2035]	<222> (412) .. (412)
[2036]	<223> n is a, c, g, t or u
[2037]	<220>
[2038]	<221> misc_feature
[2039]	<222> (429) .. (429)
[2040]	<223> n is a, c, g, t or u
[2041]	<400> 177
[2042]	tttttatacg ccactttcta atacgcctca ctataggga agcagtggta tcaacgcaga 60
[2043]	ttacaaaggg gaaaggaatc agaccgactc gcgcatacaag atggaatcac agactctggt 120
[2044]	cttcatatcc agtacgctcg gggactatgg agnggaacag tacattttta tgacccaatg 180
[2045]	tcccaaaggc aagaacatgt cagtaggaga gagggtcact cagagtgcaa ggccaggaga 240
[2046]	aatcaaaaca cttatgtttc ctggtatcaa cagaaaccag agcannctnt aaaatgnnga 300
[2047]	ttacggggca tccaaccggg aatctggggg cnccgatcgc ttcacaggca gtggatctgg 360
[2048]	aacagatttc actctcacca tcagcagtgt gcaggetgaa gaccnggcag tnttactgt 420
[2049]	ggacagggnt acagttatcc gtacacgttc ggagggggga ccaagctgaa aaaaacgggc 480
[2050]	<210> 178
[2051]	<211> 345
[2052]	<212> DNA
[2053]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[2054]	<400> 178
[2055]	caggttcagc tgcagcagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
[2056]	tcctgcaagg cttctggcta caccttact gaccatgcta ttactgggt gaagcagaag 120
[2057]	cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctccc gaaatggtga tattaagtac 180

[2058] gatgagaagt ttaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctcctc cactgcctac 240
[2059] atgcagctca acagcctgac atctgaagat tctgcagtgt atttctgtaa aagatcgatt 300
[2060] actacctctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345
[2061] <210> 179
[2062] <211> 345
[2063] <212> DNA
[2064] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[2065] <400> 179
[2066] caggttcagc tgcagcagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
[2067] tcctgcaagg cttctgcta caccttact gaccatgcta ttcactgggt gaagcagaag 120
[2068] cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatgatga tattaagtac 180
[2069] aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca agtcctccag cactgcctac 240
[2070] atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt ttttctgtaa aagatcgatt 300
[2071] actacctctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345
[2072] <210> 180
[2073] <211> 483
[2074] <212> DNA
[2075] <213> 小鼠属 (Mus sp.)
[2076] <220>
[2077] <221> modified_base
[2078] <222> (3) .. (3)
[2079] <223> a、c、t、g、未知或其它
[2080] <220>
[2081] <221> modified_base
[2082] <222> (137) .. (137)
[2083] <223> a、c、t、g、未知或其它
[2084] <220>
[2085] <221> modified_base
[2086] <222> (193) .. (193)
[2087] <223> a、c、t、g、未知或其它
[2088] <220>
[2089] <221> misc_feature
[2090] <222> (3) .. (3)
[2091] <223> n is a, c, g, t or u
[2092] <220>
[2093] <221> misc_feature
[2094] <222> (137) .. (137)
[2095] <223> n is a, c, g, t or u
[2096] <220>
[2097] <221> misc_feature
[2098] <222> (193) .. (193)
[2099] <223> n is a, c, g, t or u

[2100] <400> 180
 [2101] ttnataggac tcaatatagg gcaagcagtg gtattaacgc cgagtacatg gggagggcaa 60
 [2102] gggcagaaag tcaatttcag tgaggataca ccatcagcat gaggttcctt gttgagctcc 120
 [2103] tgggggggct ggtgttntgc tttttagggtg tgagatgtga catccagatg aaccagtctc 180
 [2104] catccagtct gtntgcatcc tttggagaca caattacat catttgccat tccagtcaga 240
 [2105] acattaatgt ttggttaaga tggtagcagc agaaaccagg aaatattcct aaaatattga 300
 [2106] tatataaggg ttccaacttg tacacaggcg tcccatcaag gtttagtggc agtggatttg 360
 [2107] gaacaggttt cacattaacc atcagcagcg tgcagcggga agacattgcc acttactact 420
 [2108] gtcaacagga tcaaagttat ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg aaataaaacg 480
 [2109] ggc 483
 [2110] <210> 181
 [2111] <211> 345
 [2112] <212> DNA
 [2113] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [2114] <400> 181
 [2115] caggttcagc tgcagcagtc tgacgccgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
 [2116] tcctgcaagg cttctggcta catcttcact gaccatgcta ttactgggt gaagcagaag 120
 [2117] cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatggtga tattaagtac 180
 [2118] aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
 [2119] atgcatctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aagatcgatt 300
 [2120] actacctctt actggggcca aggactctg gtcactgtct ctgca 345
 [2121] <210> 182
 [2122] <211> 323
 [2123] <212> DNA
 [2124] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [2125] <400> 182
 [2126] gacatccaga tgaaccagtc cccatccagt ctgtctgcat cccttgaga cacaattacc 60
 [2127] atcacttgcc atgccagtca gcacattaat ttttggttaa gctggtacca gcagaaacca 120
 [2128] ggaaatattc ctaaaactct gatctataag gtttccaact tgcacacagg cgtcccatca 180
 [2129] aggtttagtg gcagtggatc tggaacagg ttcacattaa ccatcagcag cctgctgcct 240
 [2130] gaagacgttg ccacttacta ctgtcaacag gatcaaagtt atccgtatat gttcggaggg 300
 [2131] gggaccaagc tggaataaaa acg 323
 [2132] <210> 183
 [2133] <211> 345
 [2134] <212> DNA
 [2135] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [2136] <400> 183
 [2137] caggttcagc tgcagcagtc tgacgtgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
 [2138] tcctgcaagg cttctggcta cacttcact gaccatgcta ttactgggt gaagcagaag 120
 [2139] cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatgatga tattaagtac 180
 [2140] aatgagaagt ttaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
 [2141] atgctgctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aagatcgatt 300

[2142] actacctctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345
 [2143] <210> 184
 [2144] <211> 323
 [2145] <212> DNA
 [2146] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [2147] <400> 184
 [2148] aacattgtaa tgaccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 60
 [2149] ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt acttatgttt cctggtatca acagaaacca 120
 [2150] gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat 180
 [2151] cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactttga ccatcagcag tgtgcaggct 240
 [2152] gaagaccttg cagattatca ctgtggacag ggttacagct atccgtacac gttcggaggg 300
 [2153] gggaccaagc tggaataaaa acg 323
 [2154] <210> 185
 [2155] <211> 345
 [2156] <212> DNA
 [2157] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [2158] <400> 185
 [2159] caggttcaac tgcagcagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
 [2160] tcctgcaagg cttctggcta caccttact gaccatgcta ttcactgggt gaagcagaag 120
 [2161] cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatggtga tattaagtac 180
 [2162] aatgagaagt tcaagggtaa ggccacactg actgcagaca ctctctccac cactgcctac 240
 [2163] atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcaatgt atttctgtaa aagatccatt 300
 [2164] actacgtctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345
 [2165] <210> 186
 [2166] <211> 321
 [2167] <212> DNA
 [2168] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [2169] <400> 186
 [2170] gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat ccttggaga cacaattacc 60
 [2171] atcacttgcc atgccagtea gaacattaat gtttggttaa gctggtacca gcagaaacca 120
 [2172] ggaaatattc ctaaactatt gatctataag gcttccaatt tgtatacagg cgteccatca 180
 [2173] aggttttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct 240
 [2174] gaagacgttg ccacgtacta ctgtcaacac gatcaaagtt atccgtacac gttcggaggg 300
 [2175] gggaccaagc tggaataaaa a 321
 [2176] <210> 187
 [2177] <211> 345
 [2178] <212> DNA
 [2179] <213> 小鼠属(Mus sp.)
 [2180] <400> 187
 [2181] caggttcagc tgcagcagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60
 [2182] tcctgcaagg cttctggcta catcttact gaccatgcaa ttcactgggt gaagcagaag 120
 [2183] cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatggtga tattaagtac 180

[2184]	attgagaagt tcaggggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
[2185]	atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aagatcgctt 300
[2186]	agtacgcctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345
[2187]	<210> 188
[2188]	<211> 329
[2189]	<212> DNA
[2190]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[2191]	<400> 188
[2192]	aacattttta tgaccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 60
[2193]	ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt aattatgttt cctggatatca acagaaacca 120
[2194]	gagcagtctc ctaaactgct gatattcggg gcatccaacc ggtactctgg ggtccccgat 180
[2195]	cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcaggct 240
[2196]	gaagaccttg cagattatca ctgtggaagc aagtggatta ctagctatcc gtacacgttc 300
[2197]	ggagggggga ccaagctgga aataaaacg 329
[2198]	<210> 189
[2199]	<211> 326
[2200]	<212> DNA
[2201]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[2202]	<400> 189
[2203]	aacattttta tgaccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 60
[2204]	ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt aattatgttt cctggatatca acagaaacca 120
[2205]	gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtactctgg ggtccccgat 180
[2206]	cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcaggct 240
[2207]	gaagaccttg cagattatca ctgtggagca agggttacta gctatccgta cacgttcgga 300
[2208]	ggggggacca agctggaaat aaaacg 326
[2209]	<210> 190
[2210]	<211> 345
[2211]	<212> DNA
[2212]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[2213]	<400> 190
[2214]	caggttcagc tgcagcagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctgggacttc agtgaagata 60
[2215]	tcctgcaggg cttctggcta caccttcact gaccatgcta ttcactgggt gaagcagaag 120
[2216]	cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttctcccg gaaatggtga tattaagtac 180
[2217]	aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
[2218]	atgcagctca acagcctgac atctgacgat tctgcagtgt atttctgtaa aagatccatt 300
[2219]	actacgcctt actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345
[2220]	<210> 191
[2221]	<211> 315
[2222]	<212> DNA
[2223]	<213> 小鼠属(Mus sp.)
[2224]	<400> 191
[2225]	agttttgtga tgaccagac tcccaaatc ctgcttgtgt cagcaggaga cagggttacc 60

[2226]	ataacctgca aggccagtca gagtgtgaat aataatgtag cttggtacca acagaagcca	120
[2227]	gggcagtctc ctaaacagct gatatactat gcatccaatc gctacactgg agtccttgat	180
[2228]	cgtttcactg gcagtggata tgggacggat ttactttca ccatctacac tgtgcaggct	240
[2229]	gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag ggttatagct ctccgtggac gttcgggtga	300
[2230]	ggcaccaagc tgaaa	315
[2231]	<210>	192
[2232]	<211>	330
[2233]	<212>	PRT
[2234]	<213>	小鼠属(Mus sp.)
[2235]	<400>	192
[2236]	Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly	
[2237]	1 5 10 15	
[2238]	Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr	
[2239]	20 25 30	
[2240]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser	
[2241]	35 40 45	
[2242]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu	
[2243]	50 55 60	
[2244]	Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile	
[2245]	65 70 75 80	
[2246]	Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys	
[2247]	85 90 95	
[2248]	Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys	
[2249]	100 105 110	
[2250]	Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro	
[2251]	115 120 125	
[2252]	Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys	
[2253]	130 135 140	
[2254]	Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp	
[2255]	145 150 155 160	
[2256]	Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg	
[2257]	165 170 175	
[2258]	Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln	
[2259]	180 185 190	
[2260]	His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn	
[2261]	195 200 205	
[2262]	Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly	
[2263]	210 215 220	
[2264]	Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu	
[2265]	225 230 235 240	
[2266]	Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met	
[2267]	245 250 255	

[2268]	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu
[2269]				260					265					270		
[2270]	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe
[2271]				275				280					285			
[2272]	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn
[2273]		290					295					300				
[2274]	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr
[2275]	305					310					315					320
[2276]	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys						
[2277]				325						330						
[2278]	<210> 193															
[2279]	<211> 107															
[2280]	<212> PRT															
[2281]	<213> 小鼠属(Mus sp.)															
[2282]	<400> 193															
[2283]	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu
[2284]	1				5					10					15	
[2285]	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe
[2286]				20					25				30			
[2287]	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg
[2288]			35					40				45				
[2289]	Gln	Asn	Gly	Val	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
[2290]		50					55				60					
[2291]	Thr	Tyr	Ser	Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu
[2292]	65					70					75					80
[2293]	Arg	His	Asn	Ser	Tyr	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser
[2294]					85					90					95	
[2295]	Pro	Ile	Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys					
[2296]				100						105						
[2297]	<210> 194															
[2298]	<211> 330															
[2299]	<212> PRT															
[2300]	<213> 智人(Homo sapiens)															
[2301]	<400> 194															
[2302]	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
[2303]	1				5					10					15	
[2304]	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
[2305]				20					25				30			
[2306]	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
[2307]			35					40				45				
[2308]	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
[2309]		50						55				60				

[2310]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
[2311]	65 70 75 80
[2312]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[2313]	85 90 95
[2314]	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
[2315]	100 105 110
[2316]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
[2317]	115 120 125
[2318]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[2319]	130 135 140
[2320]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
[2321]	145 150 155 160
[2322]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
[2323]	165 170 175
[2324]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[2325]	180 185 190
[2326]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[2327]	195 200 205
[2328]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[2329]	210 215 220
[2330]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
[2331]	225 230 235 240
[2332]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[2333]	245 250 255
[2334]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[2335]	260 265 270
[2336]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[2337]	275 280 285
[2338]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[2339]	290 295 300
[2340]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[2341]	305 310 315 320
[2342]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[2343]	325 330
[2344]	<210> 195
[2345]	<211> 107
[2346]	<212> PRT
[2347]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[2348]	<400> 195
[2349]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[2350]	1 5 10 15
[2351]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

[2352]	20	25	30
[2353]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[2354]	35	40	45
[2355]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[2356]	50	55	60
[2357]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
[2358]	65	70	75
[2359]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
[2360]	85	90	95
[2361]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[2362]	100	105	
[2363]	<210> 196		
[2364]	<211> 446		
[2365]	<212> PRT		
[2366]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2367]	<220>		
[2368]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[2369]	<400> 196		
[2370]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[2371]	1	5	10
[2372]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His		
[2373]	20	25	30
[2374]	Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Asp Trp Ile		
[2375]	35	40	45
[2376]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[2377]	50	55	60
[2378]	Lys Asp Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Cys		
[2379]	65	70	75
[2380]	Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[2381]	85	90	95
[2382]	Lys Arg Ser Leu Leu Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu		
[2383]	100	105	110
[2384]	Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala		
[2385]	115	120	125
[2386]	Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu		
[2387]	130	135	140
[2388]	Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly		
[2389]	145	150	155
[2390]	Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp		
[2391]	165	170	175
[2392]	Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro		
[2393]	180	185	190

[2394]	Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys		
[2395]	195	200	205
[2396]	Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro		
[2397]	210	215	220
[2398]	Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe		
[2399]	225	230	235 240
[2400]	Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro		
[2401]	245	250	255
[2402]	Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val		
[2403]	260	265	270
[2404]	Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr		
[2405]	275	280	285
[2406]	Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala		
[2407]	290	295	300
[2408]	Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys		
[2409]	305	310	315 320
[2410]	Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser		
[2411]	325	330	335
[2412]	Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro		
[2413]	340	345	350
[2414]	Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val		
[2415]	355	360	365
[2416]	Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly		
[2417]	370	375	380
[2418]	Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp		
[2419]	385	390	395 400
[2420]	Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp		
[2421]	405	410	415
[2422]	Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His		
[2423]	420	425	430
[2424]	Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys		
[2425]	435	440	445
[2426]	<210> 197		
[2427]	<211> 1401		
[2428]	<212> DNA		
[2429]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2430]	<220>		
[2431]	<223> 人工序列描述:合成杂交多核苷酸		
[2432]	<400> 197		
[2433]	atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct gggtgcccgg ctccaccgga 60		
[2434]	caggttcagc tgcagcagtc tgacgtgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 120		
[2435]	tctgcaagg cttctggcta caccttcaact gaccatgcta ttactgggt gaagcaaaag 180		

[2436]	cctgaacagg gcctggactg gattggatat atttctcccg gaaatggtga tattaagtac	240
[2437]	aatgagaagt tcaaggacaa ggtcacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctgc	300
[2438]	atgcacctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgcaa aagatcccta	360
[2439]	ctagctcttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc taaaacaaca	420
[2440]	gccccatcgg tctatccact ggccccctgtg tgtggagata caactggctc ctcggtgact	480
[2441]	ctaggatgcc tggtaagggt ttatttccct gagccagtga ccttgacctg gaactctggt	540
[2442]	tccttgtcca gtggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacaccctc	600
[2443]	agctcaagcg tgactgtaac cagctcgacc tggcccagcc agtccatcac ctgcaatgtg	660
[2444]	gcccacccgg caagcagcac caaggtggac aagaaaattg agcccagagg gccacaatc	720
[2445]	aagccctgtc ctccatgcaa atgcccagca cctaacctct tgggtggacc atccgtcttc	780
[2446]	atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagcccat agtcacatgt	840
[2447]	gtagtcttg atgtgagcga ggatgacca gatgtccaga tcagctggtt tgtgaacaac	900
[2448]	gtggaagtgc aactgtctca gacacagac catagagagg attacaacag tactctccgg	960
[2449]	gttgtcagtg ccctcccat ccagcaccag gactggatga gtggcaagga gttcaaatgc	1020
[2450]	aaggtaaca acaaagacct ccagcggccc atcgagagaa ccatctcaa acccaaagg	1080
[2451]	tcagtaagag ctccacaggt atatgtcttg cctccaccag aagaggagat gactaagaaa	1140
[2452]	caggtcactc tgacctgat ggtcacagac ttcatgcctg aagacattta cgtggagtgg	1200
[2453]	accaacaacg ggaaaacaga gctaaactac aagaacactg aaccagtcct ggactctgat	1260
[2454]	ggttcttact tcatgtacag caagctgaga gtggagaaga agaactgggt ggagagaaat	1320
[2455]	agctactcct gttcagtggg ccacgagggt ctgcacaatc accacagac taagagcttc	1380
[2456]	tcccgactc cgggtaaata g	1401
[2457]	<210>	198
[2458]	<211>	214
[2459]	<212>	PRT
[2460]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[2461]	<220>	
[2462]	<223>	人工序列描述:合成杂交多肽
[2463]	<400>	198
[2464]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly	
[2465]	1 5 10 15	
[2466]	Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Asn	
[2467]	20 25 30	
[2468]	Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ser Pro Lys Val Leu Ile	
[2469]	35 40 45	
[2470]	Tyr Ser Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	
[2471]	50 55 60	
[2472]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser	
[2473]	65 70 75 80	
[2474]	Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu	
[2475]	85 90 95	
[2476]	Thr Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala	
[2477]	100 105 110	

[2478]	Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly	
[2479]	115	120 125
[2480]	Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile	
[2481]	130	135 140
[2482]	Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu	
[2483]	145	150 155 160
[2484]	Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser	
[2485]	165	170 175
[2486]	Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr	
[2487]	180	185 190
[2488]	Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser	
[2489]	195	200 205
[2490]	Phe Asn Arg Asn Glu Cys	
[2491]	210	
[2492]	<210> 199	
[2493]	<211> 705	
[2494]	<212> DNA	
[2495]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[2496]	<220>	
[2497]	<223> 人工序列描述:合成杂交多核苷酸	
[2498]	<400> 199	
[2499]	atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct gggtgcccgg ctccaccgga	60
[2500]	gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc	120
[2501]	atcacctgca aggccagtca ggatgtgggc actaatatag cctggtatca acagaaacca	180
[2502]	ggccgatctc ctaaagtact gatttactcg gcatccacc ggcacactgg agtcctgat	240
[2503]	cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccattagcaa tgtgcagtct	300
[2504]	gaagacttga cagattatit ctgtcagcaa tatagcagct ttcctctcac gttcgggtgt	360
[2505]	gggaccaagc tggagctgaa acgggcagat gctgcaccaa ctgtatccat cttccacca	420
[2506]	tccagtgagc agttaacatc tggagtgcc tcaatcgtgt gcttcttgaa caacttctac	480
[2507]	cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg	540
[2508]	aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg	600
[2509]	ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca	660
[2510]	tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttga	705
[2511]	<210> 200	
[2512]	<211> 296	
[2513]	<212> DNA	
[2514]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[2515]	<400> 200	
[2516]	caggttcagc tggatgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
[2517]	tcctgcaagg cttctggtta caccttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc	120
[2518]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat	180
[2519]	gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac	240

[2520] atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaga 296
 [2521] <210> 201
 [2522] <211> 286
 [2523] <212> DNA
 [2524] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [2525] <400> 201
 [2526] gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 [2527] atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 [2528] gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 [2529] aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 [2530] gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctc 286
 [2531] <210> 202
 [2532] <211> 305
 [2533] <212> DNA
 [2534] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [2535] <400> 202
 [2536] gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 [2537] atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 [2538] tggtagcagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccg 180
 [2539] gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 [2540] atcagcagcc tgcaggetga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300
 [2541] cctcc 305
 [2542] <210> 203
 [2543] <211> 98
 [2544] <212> PRT
 [2545] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [2546] <400> 203
 [2547] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [2548] 1 5 10 15
 [2549] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [2550] 20 25 30
 [2551] Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [2552] 35 40 45
 [2553] Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 [2554] 50 55 60
 [2555] Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [2556] 65 70 75 80
 [2557] Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2558] 85 90 95
 [2559] Ala Arg
 [2560] <210> 204
 [2561] <211> 95

[2562]	<212> PRT
[2563]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[2564]	<400> 204
[2565]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[2566]	1 5 10 15
[2567]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
[2568]	20 25 30
[2569]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[2570]	35 40 45
[2571]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[2572]	50 55 60
[2573]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[2574]	65 70 75 80
[2575]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
[2576]	85 90 95
[2577]	<210> 205
[2578]	<211> 102
[2579]	<212> PRT
[2580]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[2581]	<400> 205
[2582]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[2583]	1 5 10 15
[2584]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
[2585]	20 25 30
[2586]	Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[2587]	35 40 45
[2588]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[2589]	50 55 60
[2590]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[2591]	65 70 75 80
[2592]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
[2593]	85 90 95
[2594]	Tyr Tyr Ser Thr Pro Cys
[2595]	100
[2596]	<210> 206
[2597]	<211> 25
[2598]	<212> PRT
[2599]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[2600]	<400> 206
[2601]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[2602]	1 5 10 15
[2603]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

[2604]	20	25
[2605]	<210> 207	
[2606]	<211> 22	
[2607]	<212> PRT	
[2608]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[2609]	<400> 207	
[2610]	Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp	
[2611]	1 5 10 15	
[2612]	Arg Val Thr Ile Thr Cys	
[2613]	20	
[2614]	<210> 208	
[2615]	<211> 23	
[2616]	<212> PRT	
[2617]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[2618]	<400> 208	
[2619]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
[2620]	1 5 10 15	
[2621]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys	
[2622]	20	
[2623]	<210> 209	
[2624]	<211> 14	
[2625]	<212> PRT	
[2626]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[2627]	<400> 209	
[2628]	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly	
[2629]	1 5 10	
[2630]	<210> 210	
[2631]	<211> 15	
[2632]	<212> PRT	
[2633]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[2634]	<400> 210	
[2635]	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
[2636]	1 5 10 15	
[2637]	<210> 211	
[2638]	<211> 15	
[2639]	<212> PRT	
[2640]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[2641]	<400> 211	
[2642]	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
[2643]	1 5 10 15	
[2644]	<210> 212	
[2645]	<211> 32	

[2646]	<212> PRT
[2647]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[2648]	<400> 212
[2649]	Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
[2650]	1 5 10 15
[2651]	Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
[2652]	20 25 30
[2653]	<210> 213
[2654]	<211> 32
[2655]	<212> PRT
[2656]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[2657]	<400> 213
[2658]	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[2659]	1 5 10 15
[2660]	Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
[2661]	20 25 30
[2662]	<210> 214
[2663]	<211> 32
[2664]	<212> PRT
[2665]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[2666]	<400> 214
[2667]	Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[2668]	1 5 10 15
[2669]	Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
[2670]	20 25 30
[2671]	<210> 215
[2672]	<211> 11
[2673]	<212> PRT
[2674]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[2675]	<400> 215
[2676]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[2677]	1 5 10
[2678]	<210> 216
[2679]	<211> 10
[2680]	<212> PRT
[2681]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[2682]	<400> 216
[2683]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2684]	1 5 10
[2685]	<210> 217
[2686]	<211> 107
[2687]	<212> PRT

[2688]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[2689]	<220>															
[2690]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽															
[2691]	<400> 217															
[2692]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[2693]	1				5					10					15	
[2694]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	His
[2695]				20					25					30		
[2696]	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
[2697]			35					40						45		
[2698]	Tyr	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[2699]		50					55					60				
[2700]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
[2701]	65					70					75					80
[2702]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Ala	Pro	Phe
[2703]					85					90						95
[2704]	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
[2705]				100					105							
[2706]	<210> 218															
[2707]	<211> 107															
[2708]	<212> PRT															
[2709]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[2710]	<220>															
[2711]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽															
[2712]	<400> 218															
[2713]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[2714]	1				5					10					15	
[2715]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	His
[2716]				20					25					30		
[2717]	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Val
[2718]			35					40						45		
[2719]	Tyr	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[2720]		50					55					60				
[2721]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
[2722]	65					70					75					80
[2723]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Ala	Pro	Phe
[2724]					85					90						95
[2725]	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
[2726]				100					105							
[2727]	<210> 219															
[2728]	<211> 107															
[2729]	<212> PRT															

[2730]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)																			
[2731]	<220>																			
[2732]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽																			
[2733]	<400> 219																			
[2734]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly				
[2735]	1				5						10					15				
[2736]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	His				
[2737]				20					25					30						
[2738]	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Val				
[2739]			35					40					45							
[2740]	Tyr	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly				
[2741]		50					55					60								
[2742]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro				
[2743]	65					70					75				80					
[2744]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Ala	Pro	Phe				
[2745]					85					90				95						
[2746]	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys									
[2747]				100					105											
[2748]	<210> 220																			
[2749]	<211> 114																			
[2750]	<212> PRT																			
[2751]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)																			
[2752]	<220>																			
[2753]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽																			
[2754]	<400> 220																			
[2755]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala				
[2756]	1				5						10					15				
[2757]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	His				
[2758]				20					25					30						
[2759]	Ala	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met				
[2760]			35					40					45							
[2761]	Gly	Tyr	Phe	Ser	Pro	Gly	Asn	Asp	Asp	Ile	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe				
[2762]		50					55					60								
[2763]	Lys	Val	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr				
[2764]	65					70					75				80					
[2765]	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
[2766]				85					90					95						
[2767]	Ala	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val				
[2768]				100					105					110						
[2769]	Ser	Ser																		
[2770]	<210> 221																			
[2771]	<211> 114																			

[2772]	<212>	PRT
[2773]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[2774]	<220>	
[2775]	<223>	人工序列描述:合成杂交多肽
[2776]	<400>	221
[2777]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[2778]	1 5 10 15	
[2779]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His	
[2780]	20 25 30	
[2781]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[2782]	35 40 45	
[2783]	Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
[2784]	50 55 60	
[2785]	Lys Val Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[2786]	65 70 75 80	
[2787]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
[2788]	85 90 95	
[2789]	Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
[2790]	100 105 110	
[2791]	Ser Ser	
[2792]	<210>	222
[2793]	<211>	114
[2794]	<212>	PRT
[2795]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[2796]	<220>	
[2797]	<223>	人工序列描述:合成杂交多肽
[2798]	<400>	222
[2799]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[2800]	1 5 10 15	
[2801]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His	
[2802]	20 25 30	
[2803]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[2804]	35 40 45	
[2805]	Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
[2806]	50 55 60	
[2807]	Lys Val Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[2808]	65 70 75 80	
[2809]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
[2810]	85 90 95	
[2811]	Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
[2812]	100 105 110	
[2813]	Ser Ser	

[2814]	<210>	223
[2815]	<211>	114
[2816]	<212>	PRT
[2817]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[2818]	<220>	
[2819]	<223>	人工序列描述:合成杂交多肽
[2820]	<400>	223
[2821]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[2822]	1	15
[2823]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His	
[2824]	20	30
[2825]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[2826]	35	45
[2827]	Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
[2828]	50	60
[2829]	Lys Val Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[2830]	65	80
[2831]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
[2832]	85	95
[2833]	Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
[2834]	100	110
[2835]	Ser Ser	
[2836]	<210>	224
[2837]	<211>	114
[2838]	<212>	PRT
[2839]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[2840]	<220>	
[2841]	<223>	人工序列描述:合成杂交多肽
[2842]	<400>	224
[2843]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[2844]	1	15
[2845]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His	
[2846]	20	30
[2847]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[2848]	35	45
[2849]	Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
[2850]	50	60
[2851]	Lys Val Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[2852]	65	80
[2853]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
[2854]	85	95
[2855]	Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	

[2856]	100	105	110
[2857]	Ser Ser		
[2858]	<210> 225		
[2859]	<211> 107		
[2860]	<212> PRT		
[2861]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2862]	<220>		
[2863]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[2864]	<400> 225		
[2865]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[2866]	1 5 10 15		
[2867]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln His Ile Asn Phe Trp		
[2868]	20 25 30		
[2869]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[2870]	35 40 45		
[2871]	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[2872]	50 55 60		
[2873]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[2874]	65 70 75 80		
[2875]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr		
[2876]	85 90 95		
[2877]	Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[2878]	100 105		
[2879]	<210> 226		
[2880]	<211> 107		
[2881]	<212> PRT		
[2882]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2883]	<220>		
[2884]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[2885]	<400> 226		
[2886]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[2887]	1 5 10 15		
[2888]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln His Ile Asn Phe Trp		
[2889]	20 25 30		
[2890]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ile Pro Lys Leu Leu Ile		
[2891]	35 40 45		
[2892]	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[2893]	50 55 60		
[2894]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[2895]	65 70 75 80		
[2896]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr		
[2897]	85 90 95		

[2898]	Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2899]	100 105
[2900]	<210> 227
[2901]	<211> 107
[2902]	<212> PRT
[2903]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2904]	<220>
[2905]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[2906]	<400> 227
[2907]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[2908]	1 5 10 15
[2909]	Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln His Ile Asn Phe Trp
[2910]	20 25 30
[2911]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ile Pro Lys Leu Leu Ile
[2912]	35 40 45
[2913]	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[2914]	50 55 60
[2915]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[2916]	65 70 75 80
[2917]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr
[2918]	85 90 95
[2919]	Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[2920]	100 105
[2921]	<210> 228
[2922]	<211> 107
[2923]	<212> PRT
[2924]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2925]	<220>
[2926]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[2927]	<400> 228
[2928]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[2929]	1 5 10 15
[2930]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln His Ile Asn Phe Trp
[2931]	20 25 30
[2932]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ile Pro Lys Leu Leu Ile
[2933]	35 40 45
[2934]	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[2935]	50 55 60
[2936]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[2937]	65 70 75 80
[2938]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr
[2939]	85 90 95

[2940]	Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2941]	100 105
[2942]	<210> 229
[2943]	<211> 107
[2944]	<212> PRT
[2945]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2946]	<220>
[2947]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[2948]	<400> 229
[2949]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[2950]	1 5 10 15
[2951]	Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln His Ile Asn Phe Trp
[2952]	20 25 30
[2953]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ile Pro Lys Leu Leu Ile
[2954]	35 40 45
[2955]	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[2956]	50 55 60
[2957]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[2958]	65 70 75 80
[2959]	Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr
[2960]	85 90 95
[2961]	Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[2962]	100 105
[2963]	<210> 230
[2964]	<211> 115
[2965]	<212> PRT
[2966]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2967]	<220>
[2968]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[2969]	<400> 230
[2970]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[2971]	1 5 10 15
[2972]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His
[2973]	20 25 30
[2974]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[2975]	35 40 45
[2976]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[2977]	50 55 60
[2978]	Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[2979]	65 70 75 80
[2980]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2981]	85 90 95

[2982]	Ala Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[2983]	100 105 110
[2984]	Val Ser Ser
[2985]	115
[2986]	<210> 231
[2987]	<211> 115
[2988]	<212> PRT
[2989]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2990]	<220>
[2991]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[2992]	<400> 231
[2993]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[2994]	1 5 10 15
[2995]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His
[2996]	20 25 30
[2997]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[2998]	35 40 45
[2999]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[3000]	50 55 60
[3001]	Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[3002]	65 70 75 80
[3003]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[3004]	85 90 95
[3005]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[3006]	100 105 110
[3007]	Val Ser Ser
[3008]	115
[3009]	<210> 232
[3010]	<211> 115
[3011]	<212> PRT
[3012]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3013]	<220>
[3014]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[3015]	<400> 232
[3016]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[3017]	1 5 10 15
[3018]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His
[3019]	20 25 30
[3020]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[3021]	35 40 45
[3022]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[3023]	50 55 60

[3024]	Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[3025]	65 70 75 80
[3026]	Met His Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[3027]	85 90 95
[3028]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[3029]	100 105 110
[3030]	Val Ser Ser
[3031]	115
[3032]	<210> 233
[3033]	<211> 115
[3034]	<212> PRT
[3035]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3036]	<220>
[3037]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[3038]	<400> 233
[3039]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[3040]	1 5 10 15
[3041]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His
[3042]	20 25 30
[3043]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[3044]	35 40 45
[3045]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[3046]	50 55 60
[3047]	Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[3048]	65 70 75 80
[3049]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[3050]	85 90 95
[3051]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[3052]	100 105 110
[3053]	Val Ser Ser
[3054]	115
[3055]	<210> 234
[3056]	<211> 115
[3057]	<212> PRT
[3058]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3059]	<220>
[3060]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[3061]	<400> 234
[3062]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[3063]	1 5 10 15
[3064]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp His
[3065]	20 25 30

[3066]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[3067]	35 40 45
[3068]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[3069]	50 55 60
[3070]	Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[3071]	65 70 75 80
[3072]	Met His Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[3073]	85 90 95
[3074]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[3075]	100 105 110
[3076]	Val Ser Ser
[3077]	115
[3078]	<210> 235
[3079]	<211> 113
[3080]	<212> PRT
[3081]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3082]	<220>
[3083]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[3084]	<400> 235
[3085]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[3086]	1 5 10 15
[3087]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg
[3088]	20 25 30
[3089]	Gly Asn His Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[3090]	35 40 45
[3091]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[3092]	50 55 60
[3093]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[3094]	65 70 75 80
[3095]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
[3096]	85 90 95
[3097]	Asp Tyr Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
[3098]	100 105 110
[3099]	Lys
[3100]	<210> 236
[3101]	<211> 113
[3102]	<212> PRT
[3103]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3104]	<220>
[3105]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[3106]	<400> 236
[3107]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

[3108]	1	5	10	15
[3109]	Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg			
[3110]	20	25	30	
[3111]	Gly Asn His Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
[3112]	35	40	45	
[3113]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
[3114]	50	55	60	
[3115]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
[3116]	65	70	75	80
[3117]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn			
[3118]	85	90	95	
[3119]	Asp Tyr Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile			
[3120]	100	105	110	
[3121]	Lys			
[3122]	<210> 237			
[3123]	<211> 115			
[3124]	<212> PRT			
[3125]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[3126]	<220>			
[3127]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽			
[3128]	<400> 237			
[3129]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[3130]	1	5	10	15
[3131]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His			
[3132]	20	25	30	
[3133]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[3134]	35	40	45	
[3135]	Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe			
[3136]	50	55	60	
[3137]	Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[3138]	65	70	75	80
[3139]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[3140]	85	90	95	
[3141]	Ala Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr			
[3142]	100	105	110	
[3143]	Val Ser Ser			
[3144]	115			
[3145]	<210> 238			
[3146]	<211> 115			
[3147]	<212> PRT			
[3148]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[3149]	<220>			

[3150]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽																			
[3151]	<400> 238																			
[3152]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala				
[3153]	1				5									10					15	
[3154]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	His				
[3155]					20					25					30					
[3156]	Ala	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met				
[3157]					35					40					45					
[3158]	Gly	Tyr	Phe	Ser	Pro	Gly	Asn	Asp	Asp	Ile	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe				
[3159]					50					55					60					
[3160]	Arg	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr				
[3161]	65					70					75					80				
[3162]	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys				
[3163]					85					90					95					
[3164]	Lys	Arg	Ser	Leu	Ser	Thr	Pro	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr				
[3165]					100					105					110					
[3166]	Val	Ser	Ser																	
[3167]					115															
[3168]	<210> 239																			
[3169]	<211> 115																			
[3170]	<212> PRT																			
[3171]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)																			
[3172]	<220>																			
[3173]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽																			
[3174]	<400> 239																			
[3175]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala				
[3176]	1				5									10					15	
[3177]	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	His				
[3178]					20					25					30					
[3179]	Ala	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile				
[3180]					35					40					45					
[3181]	Gly	Tyr	Phe	Ser	Pro	Gly	Asn	Asp	Asp	Ile	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe				
[3182]					50					55					60					
[3183]	Arg	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr				
[3184]	65					70					75					80				
[3185]	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys				
[3186]					85					90					95					
[3187]	Lys	Arg	Ser	Leu	Ser	Thr	Pro	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr				
[3188]					100					105					110					
[3189]	Val	Ser	Ser																	
[3190]					115															
[3191]	<210> 240																			

[3192]	<211> 115
[3193]	<212> PRT
[3194]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3195]	<220>
[3196]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[3197]	<400> 240
[3198]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[3199]	1 5 10 15
[3200]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
[3201]	20 25 30
[3202]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[3203]	35 40 45
[3204]	Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[3205]	50 55 60
[3206]	Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[3207]	65 70 75 80
[3208]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[3209]	85 90 95
[3210]	Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[3211]	100 105 110
[3212]	Val Ser Ser
[3213]	115
[3214]	<210> 241
[3215]	<211> 115
[3216]	<212> PRT
[3217]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3218]	<220>
[3219]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[3220]	<400> 241
[3221]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[3222]	1 5 10 15
[3223]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
[3224]	20 25 30
[3225]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[3226]	35 40 45
[3227]	Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[3228]	50 55 60
[3229]	Arg Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[3230]	65 70 75 80
[3231]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[3232]	85 90 95
[3233]	Lys Arg Ser Leu Ser Thr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

[3234]	100	105	110
[3235]	Val Ser Ser		
[3236]	115		
[3237]	<210> 242		
[3238]	<211> 107		
[3239]	<212> PRT		
[3240]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[3241]	<220>		
[3242]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[3243]	<400> 242		
[3244]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[3245]	1 5 10 15		
[3246]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr		
[3247]	20 25 30		
[3248]	Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[3249]	35 40 45		
[3250]	Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[3251]	50 55 60		
[3252]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[3253]	65 70 75 80		
[3254]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr		
[3255]	85 90 95		
[3256]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[3257]	100 105		
[3258]	<210> 243		
[3259]	<211> 107		
[3260]	<212> PRT		
[3261]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[3262]	<220>		
[3263]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[3264]	<400> 243		
[3265]	Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[3266]	1 5 10 15		
[3267]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr		
[3268]	20 25 30		
[3269]	Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[3270]	35 40 45		
[3271]	Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[3272]	50 55 60		
[3273]	Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[3274]	65 70 75 80		
[3275]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr		

[3276]	85	90	95
[3277]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[3278]	100	105	
[3279]	<210> 244		
[3280]	<211> 107		
[3281]	<212> PRT		
[3282]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[3283]	<220>		
[3284]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[3285]	<400> 244		
[3286]	Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Met Ser Val Gly		
[3287]	1 5 10 15		
[3288]	Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr		
[3289]	20 25 30		
[3290]	Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
[3291]	35 40 45		
[3292]	Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[3293]	50 55 60		
[3294]	Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro		
[3295]	65 70 75 80		
[3296]	Glu Asp Leu Ala Thr Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr		
[3297]	85 90 95		
[3298]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[3299]	100 105		
[3300]	<210> 245		
[3301]	<211> 107		
[3302]	<212> PRT		
[3303]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[3304]	<220>		
[3305]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[3306]	<400> 245		
[3307]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[3308]	1 5 10 15		
[3309]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp		
[3310]	20 25 30		
[3311]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[3312]	35 40 45		
[3313]	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[3314]	50 55 60		
[3315]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[3316]	65 70 75 80		
[3317]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr		

[3318]	85	90	95
[3319]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[3320]	100	105	
[3321]	<210> 246		
[3322]	<211> 107		
[3323]	<212> PRT		
[3324]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[3325]	<220>		
[3326]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[3327]	<400> 246		
[3328]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[3329]	1 5 10 15		
[3330]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp		
[3331]	20 25 30		
[3332]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ile Pro Lys Leu Leu Ile		
[3333]	35 40 45		
[3334]	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[3335]	50 55 60		
[3336]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[3337]	65 70 75 80		
[3338]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr		
[3339]	85 90 95		
[3340]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[3341]	100 105		
[3342]	<210> 247		
[3343]	<211> 107		
[3344]	<212> PRT		
[3345]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[3346]	<220>		
[3347]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[3348]	<400> 247		
[3349]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[3350]	1 5 10 15		
[3351]	Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp		
[3352]	20 25 30		
[3353]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ile Pro Lys Leu Leu Ile		
[3354]	35 40 45		
[3355]	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[3356]	50 55 60		
[3357]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[3358]	65 70 75 80		
[3359]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr		

[3360]	85	90	95
[3361]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[3362]	100	105	
[3363]	<210> 248		
[3364]	<211> 107		
[3365]	<212> PRT		
[3366]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[3367]	<220>		
[3368]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[3369]	<400> 248		
[3370]	Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[3371]	1 5 10 15		
[3372]	Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp		
[3373]	20 25 30		
[3374]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ile Pro Lys Leu Leu Ile		
[3375]	35 40 45		
[3376]	Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[3377]	50 55 60		
[3378]	Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[3379]	65 70 75 80		
[3380]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asp Gln Ser Tyr Pro Tyr		
[3381]	85 90 95		
[3382]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[3383]	100 105		
[3384]	<210> 249		
[3385]	<211> 115		
[3386]	<212> PRT		
[3387]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[3388]	<220>		
[3389]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[3390]	<400> 249		
[3391]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[3392]	1 5 10 15		
[3393]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His		
[3394]	20 25 30		
[3395]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[3396]	35 40 45		
[3397]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[3398]	50 55 60		
[3399]	Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[3400]	65 70 75 80		
[3401]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		

[3402]		85		90		95
[3403]	Ala Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr					
[3404]		100		105		110
[3405]	Val Ser Ser					
[3406]		115				
[3407]	<210> 250					
[3408]	<211> 115					
[3409]	<212> PRT					
[3410]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[3411]	<220>					
[3412]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽					
[3413]	<400> 250					
[3414]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
[3415]	1	5		10		15
[3416]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His					
[3417]		20		25		30
[3418]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met					
[3419]		35		40		45
[3420]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe					
[3421]		50		55		60
[3422]	Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr					
[3423]	65	70		75		80
[3424]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys					
[3425]		85		90		95
[3426]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr					
[3427]		100		105		110
[3428]	Val Ser Ser					
[3429]		115				
[3430]	<210> 251					
[3431]	<211> 115					
[3432]	<212> PRT					
[3433]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[3434]	<220>					
[3435]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽					
[3436]	<400> 251					
[3437]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
[3438]	1	5		10		15
[3439]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His					
[3440]		20		25		30
[3441]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
[3442]		35		40		45
[3443]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe					

[3444]	50	55	60
[3445]	Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr		
[3446]	65	70	75
[3447]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys		
[3448]	85	90	95
[3449]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[3450]	100	105	110
[3451]	Val Ser Ser		
[3452]	115		
[3453]	<210> 252		
[3454]	<211> 115		
[3455]	<212> PRT		
[3456]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[3457]	<220>		
[3458]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[3459]	<400> 252		
[3460]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[3461]	1	5	10
[3462]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His		
[3463]	20	25	30
[3464]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[3465]	35	40	45
[3466]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[3467]	50	55	60
[3468]	Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr		
[3469]	65	70	75
[3470]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys		
[3471]	85	90	95
[3472]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[3473]	100	105	110
[3474]	Val Ser Ser		
[3475]	115		
[3476]	<210> 253		
[3477]	<211> 115		
[3478]	<212> PRT		
[3479]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[3480]	<220>		
[3481]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[3482]	<400> 253		
[3483]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[3484]	1	5	10
[3485]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His		

[3486]	20	25	30
[3487]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[3488]	35	40	45
[3489]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[3490]	50	55	60
[3491]	Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr		
[3492]	65	70	75
[3493]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys		
[3494]	85	90	95
[3495]	Lys Arg Ser Ile Thr Thr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[3496]	100	105	110
[3497]	Val Ser Ser		
[3498]	115		
[3499]	<210> 254		
[3500]	<211> 107		
[3501]	<212> PRT		
[3502]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[3503]	<220>		
[3504]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[3505]	<400> 254		
[3506]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[3507]	1	5	10
[3508]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Asn		
[3509]	20	25	30
[3510]	Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[3511]	35	40	45
[3512]	Tyr Ser Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[3513]	50	55	60
[3514]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[3515]	65	70	75
[3516]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu		
[3517]	85	90	95
[3518]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[3519]	100	105	
[3520]	<210> 255		
[3521]	<211> 107		
[3522]	<212> PRT		
[3523]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[3524]	<220>		
[3525]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽		
[3526]	<400> 255		
[3527]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		

[3528]	1	5	10	15
[3529]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Asn			
[3530]	20	25	30	
[3531]	Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile			
[3532]	35	40	45	
[3533]	Tyr Ser Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[3534]	50	55	60	
[3535]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[3536]	65	70	75	80
[3537]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Phe Pro Leu			
[3538]	85	90	95	
[3539]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[3540]	100	105		
[3541]	<210> 256			
[3542]	<211> 116			
[3543]	<212> PRT			
[3544]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[3545]	<220>			
[3546]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽			
[3547]	<400> 256			
[3548]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[3549]	1	5	10	15
[3550]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His			
[3551]	20	25	30	
[3552]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[3553]	35	40	45	
[3554]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe			
[3555]	50	55	60	
[3556]	Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[3557]	65	70	75	80
[3558]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[3559]	85	90	95	
[3560]	Ala Arg Ser Leu Leu Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
[3561]	100	105	110	
[3562]	Thr Val Ser Ser			
[3563]	115			
[3564]	<210> 257			
[3565]	<211> 116			
[3566]	<212> PRT			
[3567]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[3568]	<220>			
[3569]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽			

[3570]	<400> 257
[3571]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[3572]	1 5 10 15
[3573]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
[3574]	20 25 30
[3575]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[3576]	35 40 45
[3577]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[3578]	50 55 60
[3579]	Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[3580]	65 70 75 80
[3581]	Met Gln Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[3582]	85 90 95
[3583]	Lys Arg Ser Leu Leu Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[3584]	100 105 110
[3585]	Thr Val Ser Ser
[3586]	115
[3587]	<210> 258
[3588]	<211> 116
[3589]	<212> PRT
[3590]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3591]	<220>
[3592]	<223> 人工序列描述:合成杂交多肽
[3593]	<400> 258
[3594]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[3595]	1 5 10 15
[3596]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
[3597]	20 25 30
[3598]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[3599]	35 40 45
[3600]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[3601]	50 55 60
[3602]	Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser
[3603]	65 70 75 80
[3604]	Met His Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[3605]	85 90 95
[3606]	Lys Arg Ser Leu Leu Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[3607]	100 105 110
[3608]	Thr Val Ser Ser
[3609]	115
[3610]	<210> 259
[3611]	<211> 116

[3612]	<212>	PRT
[3613]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[3614]	<220>	
[3615]	<223>	人工序列描述:合成杂交多肽
[3616]	<400>	259
[3617]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[3618]	1	5 10 15
[3619]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His	
[3620]	20	25 30
[3621]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[3622]	35	40 45
[3623]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
[3624]	50	55 60
[3625]	Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[3626]	65	70 75 80
[3627]	Met Gln Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
[3628]	85	90 95
[3629]	Lys Arg Ser Leu Leu Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
[3630]	100	105 110
[3631]	Thr Val Ser Ser	
[3632]	115	
[3633]	<210>	260
[3634]	<211>	116
[3635]	<212>	PRT
[3636]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[3637]	<220>	
[3638]	<223>	人工序列描述:合成杂交多肽
[3639]	<400>	260
[3640]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[3641]	1	5 10 15
[3642]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His	
[3643]	20	25 30
[3644]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[3645]	35	40 45
[3646]	Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
[3647]	50	55 60
[3648]	Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser	
[3649]	65	70 75 80
[3650]	Met His Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
[3651]	85	90 95
[3652]	Lys Arg Ser Leu Leu Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
[3653]	100	105 110

[3654]	Thr Val Ser Ser
[3655]	115
[3656]	<210> 261
[3657]	<211> 12
[3658]	<212> PRT
[3659]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3660]	<220>
[3661]	<223> 人工序列描述:合成肽
[3662]	<400> 261
[3663]	Cys Gln Phe Asp Leu Ser Thr Arg Arg Leu Lys Cys
[3664]	1 5 10
[3665]	<210> 262
[3666]	<211> 12
[3667]	<212> PRT
[3668]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3669]	<220>
[3670]	<223> 人工序列描述:合成肽
[3671]	<400> 262
[3672]	Cys Gln Tyr Asn Leu Ser Ser Arg Ala Leu Lys Cys
[3673]	1 5 10
[3674]	<210> 263
[3675]	<211> 122
[3676]	<212> PRT
[3677]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3678]	<220>
[3679]	<223> 人工序列描述:合成多肽
[3680]	<400> 263
[3681]	Met Ala Asn Val Gln Leu Asn Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
[3682]	1 5 10 15
[3683]	Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
[3684]	20 25 30
[3685]	Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[3686]	35 40 45
[3687]	Trp Val Ser Asp Ile Ser Pro Ser Gly Ala Val Lys Ala Tyr Ser Asp
[3688]	50 55 60
[3689]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Arg
[3690]	65 70 75 80
[3691]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Gly Glu Tyr
[3692]	85 90 95
[3693]	Phe Cys Thr Lys Val Gln Ser Pro Arg Thr Arg Ile Pro Ala Pro Ser
[3694]	100 105 110
[3695]	Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

[3696]	115	120
[3697]	<210> 264	
[3698]	<211> 122	
[3699]	<212> PRT	
[3700]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[3701]	<220>	
[3702]	<223> 人工序列描述:合成多肽	
[3703]	<400> 264	
[3704]	Met Ala Asn Val Gln Leu Asn Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro	
[3705]	1 5 10 15	
[3706]	Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser	
[3707]	20 25 30	
[3708]	Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
[3709]	35 40 45	
[3710]	Trp Val Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ala Val Lys Ala Tyr Ser Asp	
[3711]	50 55 60	
[3712]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Arg	
[3713]	65 70 75 80	
[3714]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Gly Glu Tyr	
[3715]	85 90 95	
[3716]	Phe Cys Thr Lys Val Gln Ser Pro Arg Thr Arg Ile Pro Ala Pro Ser	
[3717]	100 105 110	
[3718]	Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser	
[3719]	115 120	
[3720]	<210> 265	
[3721]	<211> 10	
[3722]	<212> PRT	
[3723]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[3724]	<220>	
[3725]	<223> 人工序列描述:合成肽	
[3726]	<400> 265	
[3727]	Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu	
[3728]	1 5 10	
[3729]	<210> 266	
[3730]	<211> 8	
[3731]	<212> PRT	
[3732]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[3733]	<220>	
[3734]	<223> 人工序列描述:合成肽	
[3735]	<400> 266	
[3736]	Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys	
[3737]	1 5	

STn结合特异性

(第1组)

检测到的表位（最大的椭圆形）

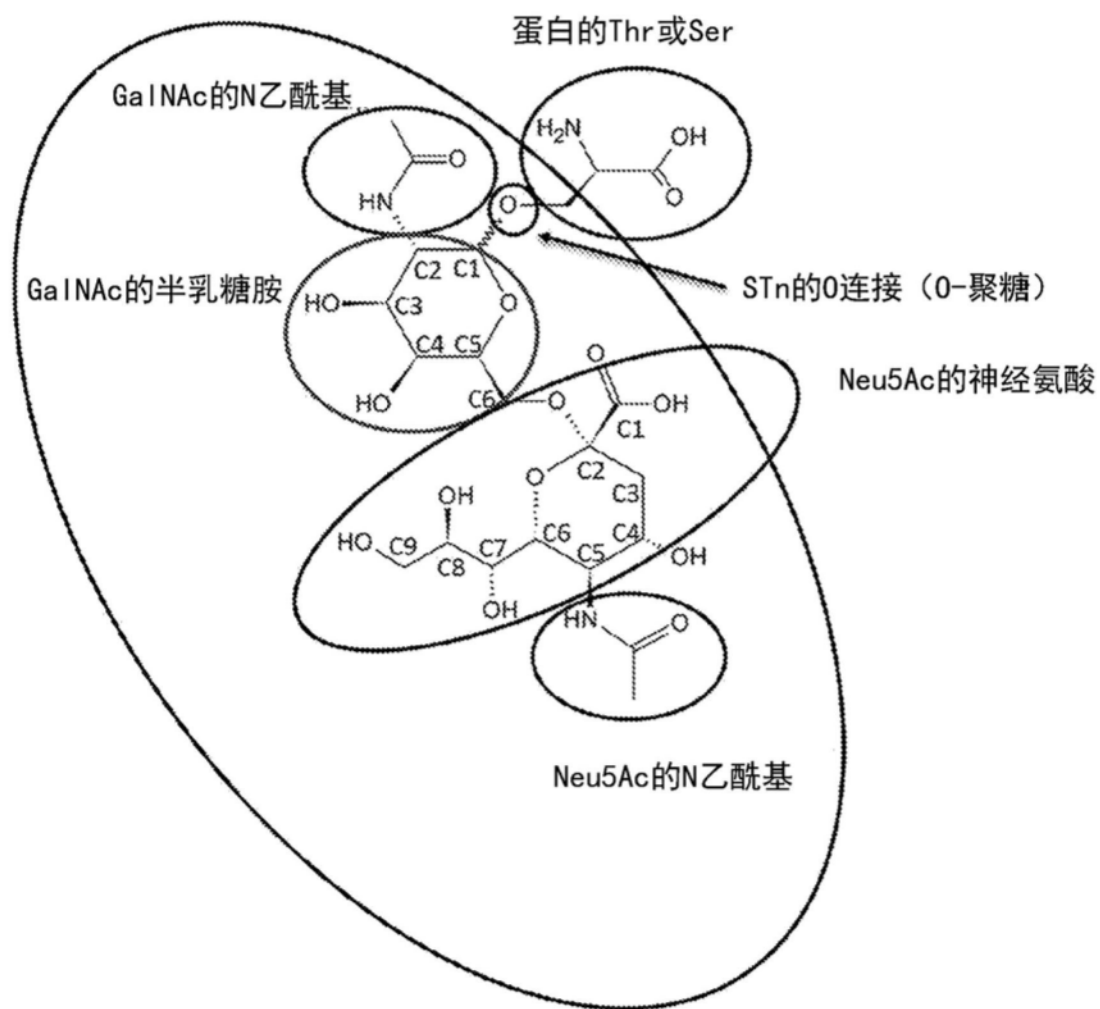


图1A

STn结合特异性

(第2组)

检测到的表位(最大的椭圆形)

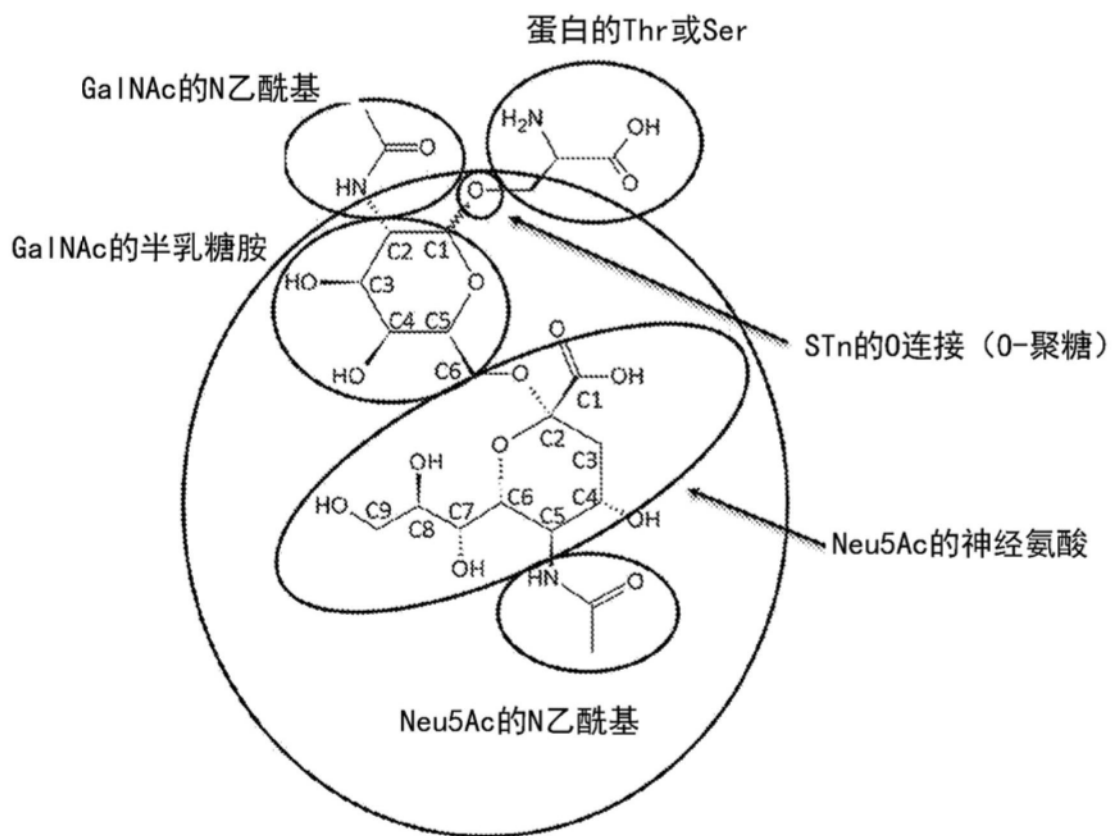


图1B

STn结合特异性

(第3组)

检测到的表位(最大的椭圆形)

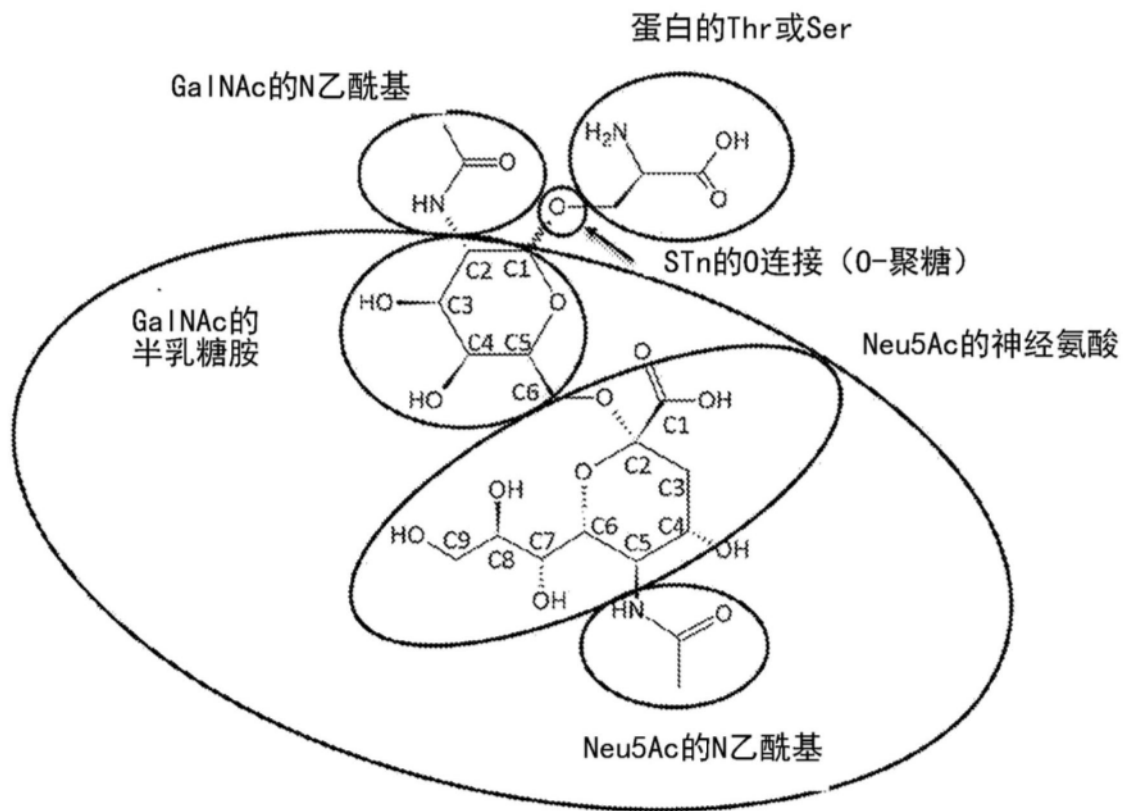


图1C

STn结合特异性

(第4组)

检测到的表位 (最大的椭圆形)

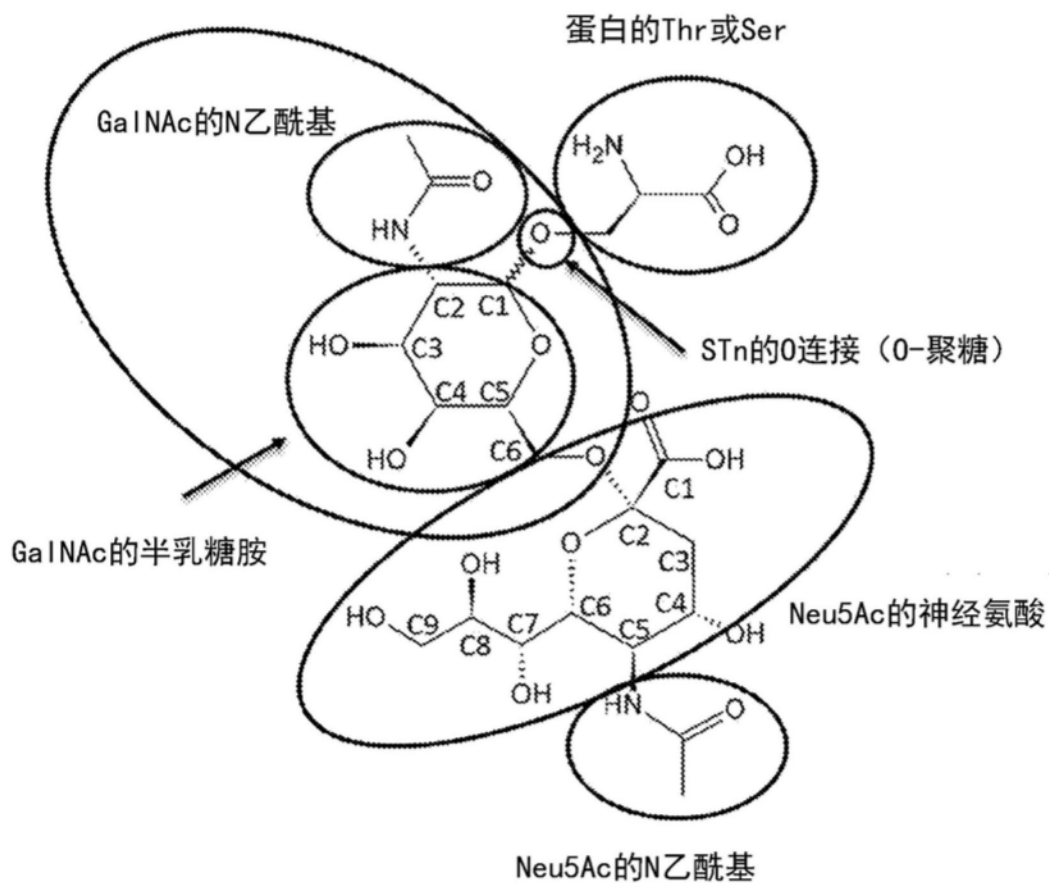


图1D

可变结构域

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
-----	------	-----	------	-----	------	-----

FR = 框架区

CDR = 互补决定区

图2