



(10) 申请公布号 CN 117203226 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 08

(21) 申请号 202280026401.7

(22) 申请日 2022.02.03

(30) 优先权数据

63/145,188 2021.02.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/015127 2022.02.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/169984 EN 2022.08.11

(71) 申请人 北卡罗来纳查佩尔山大学

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 查尔斯·艾斯丘 李成文

布赖恩·库尔曼

戴维·福里斯特·蒂克

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理

有限公司 51258

专利代理师 刘书芝

(51) Int.Cl.

C07K 14/30 (2006.01)

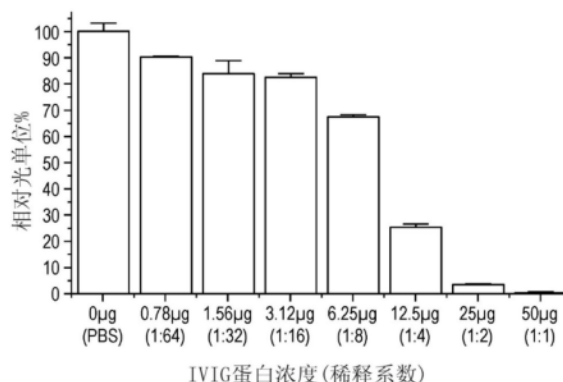
权利要求书7页 说明书82页 附图26页

(54) 发明名称

蛋白M类似物和融合蛋白及其用于抑制抗体功能的用途

(57) 摘要

本发明涉及用于结合抗体的方法和组合物。这些方法可以用于分离抗体,治疗与过量抗体相关的疾患,急性阻断抗体以阻止自身免疫或炎症反应,以及抑制中和抗体。在实施方案中,本发明涉及在向受试者施用异源剂时,抑制针对该异源剂的中和抗体的方法,包括向受试者施用有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物,从而抑制该异源剂的中和。本发明还涉及相对于野生型蛋白M具有增加的热稳定性的修饰的支原体蛋白M或其功能片段及其在本发明方法中的用途。



1. 一种修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其具有相对于野生型支原体蛋白M或其功能片段增加或维持所述支原体蛋白M或其功能片段的pH稳定性或热稳定性的一个或多个氨基酸突变,其中热稳定性维持在高达75℃、70℃、65℃、60℃、55℃、50℃、45℃、40℃或38℃,和/或pH稳定性维持在2至8的pH、2.5至7.5的pH或4.5至7.5的pH。

2. 根据权利要求1所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其具有相对于野生型支原体蛋白M或其功能片段增加所述支原体蛋白M或其功能片段的pH稳定性或热稳定性的一个或多个氨基酸突变。

3. 根据权利要求1或2所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中所述蛋白M或其功能片段或衍生物是蛋白M片段。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中所述蛋白M源自生殖支原体、肺炎支原体或穿透支原体的蛋白M。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中所述蛋白M功能片段包含生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的氨基酸残基17-537、37-556、37-482、37-468、37-442、74-468、74-479、74-482、74-468或74-442或来自另一蛋白M的等效残基。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其为生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:3)的约残基74至约残基479或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基的片段。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中所述一个或多个突变位于肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的残基77、125、165、170和280或其任何组合处。

8. 根据权利要求7所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中所述一个或多个突变是肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的A77E、K125R、V165Q、H170T和A280V或其任何组合处。

9. 根据权利要求1-6中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中所述一个或多个突变位于选自以下的残基处:生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的

- a) 159;
- b) 182;
- c) 102;
- d) 161;
- e) 86;
- f) 101;
- g) 147;
- h) 236;
- i) 348;
- j) 424;
- k) 147;
- l) 321;
- m) 389;
- n) 442;
- o) 119;

- p) 179;
- q) 186;或
- r) 103

或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基或其任何组合。

10. 根据权利要求9所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中所述一个或多个突变选自:生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的

- a) Q159C和A182C;
- b) A102C和T161C;或
- c) I86C和F101C

或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基或其任何组合,其中a)、b)或c)中的修饰的残基能够在修饰的残基(例如SEQ ID NO:34)之间形成二硫键。

11. 根据权利要求9所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中所述一个或多个突变选自:生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的

- a) H147Y;
- b) H236Y;
- c) H348Y;
- d) H424Y;或
- e) H147Q

或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基或其任何组合,其中所述突变可在低pH下防止所述位点处的组氨酸质子化,从而防止蛋白质不稳定。

12. 根据权利要求9所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中所述一个或多个突变选自:生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的

- a) N321H;
- b) Y389H;
- c) N442H;
- d) P119H;
- e) T179H;
- f) G186H;或
- g) N103H

或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基或其任何组合,其中所述突变能够增加pH敏感性,从而改善用于抗体纯化的洗脱条件。

13. 根据权利要求1-6中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中所述突变位于生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的残基338(例如Y388N)处或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基处。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中所述修饰的支原体蛋白M或其功能片段被进一步修饰以去除一个或多个糖基化位点。

15. 一种修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其具有生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的约残基185至约残基342的缺失或另一支原体蛋白M的等效残基。

16. 根据权利要求15所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中所述缺失是氨基酸

185-342。

17. 根据权利要求15或16所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中缺失的氨基酸被短接头取代。

18. 根据权利要求15-17中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其中新暴露的疏水残基具有一个或多个突变。

19. 一种融合蛋白,其包含:

权利要求1-18中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段的多核苷酸;

接头;和

肽。

20. 根据权利要求19所述的融合蛋白,其中所述修饰的支原体蛋白M或其功能片段具有增强所述修饰的支原体蛋白M或其功能片段对抗体的亲和力或亲合力的一个或多个突变。

21. 根据权利要求19或20的融合蛋白,其中所述肽是二聚化肽(例如,IL-GCN4、C-IL-GCN4、SEQ ID NO:36)。

22. 根据权利要求19或20所述的融合蛋白,其中所述肽是Fab结合多肽或Fc结合多肽。

23. 根据权利要求22所述的融合蛋白,其中所述Fab结合多肽是蛋白L。

24. 根据权利要求22所述的融合蛋白,其中所述Fab或Fc结合多肽是蛋白A或其功能片段。

25. 根据权利要求24所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白结合免疫球蛋白的Fc部分和/或减少所述免疫球蛋白的Fc受体再循环和/或增加所述融合蛋白与免疫球蛋白的结合。

26. 根据权利要求22所述的融合蛋白,其中所述Fab或Fc结合多肽是蛋白G或其功能片段。

27. 根据权利要求26所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白结合免疫球蛋白的Fc部分和/或减少所述免疫球蛋白的Fc受体再循环和/或增加所述融合蛋白与免疫球蛋白的结合。

28. 根据权利要求19或20所述的融合蛋白,其中所述肽包含二聚化肽和蛋白L。

29. 根据权利要求28所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白从N-末端开始依次包含二聚化肽、第一接头、蛋白L、第二接头、以及权利要求1-18中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段。

30. 根据权利要求19或20所述的融合蛋白,其中所述肽是Fc结合多肽。

31. 根据权利要求19或20所述的融合蛋白,其中所述Fc结合多肽是Fc受体。

32. 根据权利要求19或20所述的融合蛋白,其中所述肽包含Fab结合多肽和蛋白L。

33. 根据权利要求32所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白从N-末端开始依次包含Fc结合多肽、第一接头、蛋白L、第二接头、以及权利要求1-18中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段。

34. 根据权利要求19或20所述的融合蛋白,其中所述肽是Fc结构域。

35. 根据权利要求34所述的融合蛋白,其中所述Fc结构域包含用于结合至Fc受体的补体结合残基。

36. 根据权利要求35所述的融合蛋白,其中所述Fc结构域具有用于结合至Fc受体的补体结合残基的一个或多个突变。

37. 根据权利要求19或20所述的融合蛋白,其中所述肽是Fc受体蛋白,并且其中所述融

合蛋白减少抗体的细胞摄取,减少抗体再循环并通过减少抗体再循环而引起免疫球蛋白耗竭,或增加所述融合蛋白对免疫球蛋白的亲合力。

38. 根据权利要求19-37中任一项所述的融合蛋白,其进一步包含权利要求1-18中任一项所述的第二修饰的支原体蛋白M或其功能片段。

39. 根据权利要求1-18所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段或权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白,进一步包含半衰期延长部分,例如人白蛋白或添加聚乙二醇(PEG),蛋白质修饰,例如酰化、甲基化、磷酸化、硫酸化、法尼基化、泛素化、位点选择性缀合、糖基化、引入PTMs、聚乙二醇化、连接、基于蛋白质的起始物的聚合,或可以改变结合、亲合力、结合靶标的任何修饰,或其任何组合。

40. 一种多核苷酸,其编码权利要求1-18中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段或权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白。

41. 根据权利要求40所述的多核苷酸,其可操作地连接至启动子。

42. 根据权利要求41所述的多核苷酸,其中所述启动子为细菌启动子。

43. 根据权利要求41所述的多核苷酸,其中所述启动子为哺乳动物启动子。

44. 根据权利要求40-43中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸经密码子优化以在细菌诸如大肠杆菌中表达。

45. 根据权利要求40-43中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸经密码子优化以在哺乳动物细胞诸如人类细胞中表达。

46. 根据权利要求40-43中任一项所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸经密码子优化以在细菌诸如大肠杆菌中和哺乳动物细胞诸如人类细胞两者中表达。

47. 一种载体,其包含权利要求40-46中任一项所述的多核苷酸。

48. 根据权利要求47所述的载体,其中所述载体为细菌载体。

49. 根据权利要求47所述的载体,其中所述载体为哺乳动物载体。

50. 一种转化细胞,其包含权利要求40-46中任一项所述的多核苷酸和/或权利要求47-49中任一项所述的载体。

51. 根据权利要求50所述的转化细胞,其为细菌细胞,诸如大肠杆菌。

52. 根据权利要求50所述的转化细胞,其为哺乳动物细胞,诸如人类细胞。

53. 根据权利要求50-52中任一项所述的转化细胞,其中所述多核苷酸稳定地掺入所述细胞的基因组中。

54. 一种通过在向受试者施用异源剂后中和抗体来抑制所述异源剂的中和的方法,其包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-18中任一项所述的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物或者权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白,从而抑制所述异源剂的中和。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述异源剂是核酸递送载体。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述核酸递送载体是病毒载体。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中所述病毒载体是溶瘤载体。

58. 根据权利要求56所述的方法,其中所述病毒载体是腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒、痘病毒、甲病毒、杆状病毒、痘苗病毒、疱疹病毒、EB病毒或腺病毒载体。

59. 根据权利要求55所述的方法,其中所述核酸递送载体是非病毒载体。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述非病毒载体是质粒、脂质体、带电脂质、核

酸-蛋白质复合物或生物聚合物(例如PEG)。

61. 根据权利要求54所述的方法,其中所述异源剂是基因编辑复合物。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述基因编辑复合物是CRISPR复合物。

63. 根据权利要求54所述的方法,其中所述异源剂是蛋白质或核酸。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中所述蛋白质是酶。

65. 根据权利要求63所述的方法,其中所述核酸是反义核酸或抑制性RNA。

66. 根据权利要求54-65中任一项所述的方法,其中所述蛋白M的有效量是足以将中和抑制至少约50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%的量。

67. 根据权利要求54-66中任一项所述的方法,其中所述蛋白M的有效量是足以在所述受试者中产生基于摩尔计约0.5:1至约5:1,例如约2:1的蛋白M与总免疫球蛋白的比率的量。

68. 根据权利要求54-67中任一项所述的方法,其中在施用所述异源剂之前(例如,在施用所述异源剂之前约1分钟至约3天、约5分钟至约48小时、约10分钟至约24小时、约20分钟至约12小时、约30分钟至约6小时或约1小时至约3小时)向所述受试者施用所述蛋白M或其功能片段或衍生物或所述融合蛋白。

69. 根据权利要求54-67中任一项所述的方法,其中在施用所述异源剂的同时,向所述受试者施用所述蛋白M或其功能片段或衍生物。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中在施用于所述受试者之前,所述异源剂与所述蛋白M或其功能片段或衍生物组合。

71. 根据权利要求54-70中任一项所述的方法,其中不止一次地将所述蛋白M或其功能片段或衍生物施用于所述受试者。

72. 根据权利要求71所述的方法,其中在第一剂量之后约两天至约10年或更长时间施用第二剂量。

73. 根据权利要求71所述的方法,其中每次向所述受试者施用所述异源剂时,向所述受试者施用所述蛋白M或其功能片段或衍生物。

74. 根据权利要求71-73中任一项所述的方法,其中每次施用相同的蛋白M或其功能片段或衍生物。

75. 根据权利要求71-73中任一项所述的方法,其中每次施用不同的蛋白M或其功能片段或衍生物。

76. 根据权利要求54-75中任一项所述的方法,进一步包括向所述受试者施用用于降低所述受试者中的抗体浓度的附加治疗。

77. 根据权利要求76所述的方法,其中所述附加治疗是血浆置换,施用抗体消化酶例如IdeS或IdeZ,施用结合FcRn受体的抗体,施用结合FcRn受体的Fc片段,施用结合B细胞上的CD19或CD20并耗竭B细胞的抗体,或其他B细胞耗竭方法例如脾切除术、化疗、免疫疗法或放射疗法。

78. 根据权利要求76或77所述的方法,其中在施用所述蛋白M或其功能片段或衍生物之前、期间和/或之后施用所述附加治疗。

79. 根据权利要求54-78中任一项所述的方法,其中所述施用是局部的。

80. 根据权利要求54-78中任一项所述的方法,其中所述施用是全身性的。
81. 根据权利要求54-80中任一项所述的方法,其中所述施用减少抗体循环的量,并且所述减少在约5分钟至约8周、约5分钟至约1小时、约1小时至约2天或约2天至约8周内开始。
82. 根据权利要求54-80中任一项所述的方法,其中所述施用减少抗体循环的量,并且所述减少在约1小时至约3小时内开始。
83. 根据权利要求54-82中任一项所述的方法,其中所述施用包含约 $1e9$ vg/kg至约 $1e14$ vg/kg、约 $1e10$ vg/kg至约 $1e13$ vg/kg、或约 $1e11$ vg/kg至约 $1e12$ vg/kg的AAV、约 1μ l至约6L的血清,以及约1mg/kg至约1000mg/kg、约10mg/kg至约900mg/kg、约25mg/kg至约800mg/kg、约50mg/kg至约600mg/kg、约100mg/kg至约500mg/kg或约200mg/kg至约400mg/kg的蛋白M。
84. 根据权利要求54-82任一项所述的方法,其中所述施用包含足够的蛋白M以实现蛋白M与血清免疫球蛋白的约0.5:1至约50:1的摩尔比。
85. 根据权利要求54-84中任一项所述的方法,其中施用胜过自身中和抗体。
86. 一种在受试者中表达多肽或功能性核酸的方法,其包括向受试者施用(A) 编码所述多肽或功能性核酸的核酸递送载体,和(b) 有效量的权利要求1-18中任一项所述的支原体蛋白M或其功能性片段或衍生物或者权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白,从而在所述受试者中表达所述多肽或功能性核酸。
87. 一种治疗有需要的受试者的疾患的方法,其中所述疾患能够通过所述受试者中表达多肽或功能性核酸来治疗,所述方法包括向所述受试者施用(A) 治疗有效量的编码所述多肽或功能性核酸的核酸递送载体,和(b) 有效量的权利要求1-18中任一项所述的支原体蛋白M或其功能性片段或衍生物或者权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白,从而治疗所述受试者的所述疾患。
88. 一种在受试者中编辑基因的方法,其包括向所述受试者施用(A) 有效量的基因编辑复合物,和(b) 有效量的权利要求1-18中任一项所述的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物或者权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白,从而在所述受试者中表达所述多肽或功能性核酸。
89. 一种治疗有需要的受试者的自身免疫疾病的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-18中任一项所述的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物或者权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白,从而治疗所述自身免疫疾病。
90. 一种治疗有需要的受试者的与过量抗体相关的疾患的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-18中任一项所述的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物或者权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白,从而治疗所述与过量抗体相关的疾患。
91. 根据权利要求90所述的方法,其中所述与过量抗体相关的疾患是多发性骨髓瘤、意义未明单克隆丙种球蛋白血症(MGUS)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、细胞因子释放综合征或急性自身免疫攻击如突然发作的严重自身免疫性血管炎。
92. 一种治疗和/或预防有需要的受试者的与受体抗体对移植物的识别相关的实体器官的急性移植物排斥的方法,其包括在所述移植物之前和/或之后向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-18中任一项所述的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物或者权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白,从而治疗所述急性移植物排斥。

93. 根据权利要求54-92中任一项所述的方法,其中通过选自以下的途径将所述支原体蛋白M或其功能片段或衍生物施用于所述受试者:口服、直肠、经粘膜、鼻内、吸入、含服(例如,舌下)、阴道、鞘内、眼内、玻璃体内、耳蜗内、经皮、内皮内、子宫内(或卵内)、肠胃外(例如,静脉内、皮下、皮内、颅内、肌内[包括向骨骼肌、膈肌和/或心肌施用]、胸膜内、脑内和关节内)、局部(例如,向皮肤和粘膜两者表面,包括气道表面,和经皮施用)、淋巴内等,以及直接的组织或器官注射(例如,向肝脏、眼睛、骨骼肌、心肌、膈肌或大脑)。

94. 根据权利要求54-92中任一项所述的方法,其中将所述支原体蛋白M或其功能片段或衍生物施用于骨骼肌、平滑肌、心脏、膈肌、气道上皮、肝脏、肾脏、脾脏、胰腺、皮肤、肺、耳朵或眼睛。

95. 根据权利要求54-94中任一项所述的方法,其中将所述支原体蛋白M或其功能片段或衍生物施用于患病的组织和器官。

96. 根据权利要求54-95中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类。

97. 一种从样品中分离包含抗体轻链可变区和/或重链可变区的化合物的方法,所述方法包括使所述化合物与附着于固相载体的权利要求1-18中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段或权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白接触,然后从所述修饰的支原体蛋白M或其功能片段或所述融合蛋白洗脱所述化合物。

98. 根据权利要求97所述的方法,其中包含抗体轻链可变区和/或重链可变区的所述化合物是抗体或其抗原结合片段。

99. 根据权利要求97或98所述的方法,其中所述固相载体是珠粒或颗粒。

100. 根据权利要求97-99中任一项所述的方法,其中所述固相载体包括琼脂糖、聚丙烯酰胺、葡聚糖、纤维素、多糖、硝化纤维素、二氧化硅、矾土、氧化铝、二氧化钛、氧化钛、氧化锆、苯乙烯、聚偏二氟乙烯尼龙、苯乙烯和二乙烯基苯的共聚物、聚甲基丙烯酸酯、衍生的吡内酯聚合物或共聚物、玻璃或纤维素。

101. 根据权利要求97-100中任一项所述的方法,其中通过改变pH来洗脱所述化合物。

102. 根据权利要求1-18中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段或权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白,其中所述修饰的支原体蛋白M或其功能片段附着于固相载体。

103. 一种进行免疫测定的方法,所述方法包括使用权利要求1-18中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段或权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白结合包含抗体轻链可变区和/或重链可变区的化合物。

104. 根据权利要求103所述的方法,其中所述免疫测定选自放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)测定、酶免疫测定(EIA)、夹心法测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、凝集测定、免疫荧光测定、荧光激活细胞分选(FACS)测定、免疫组织化学测定、蛋白A免疫测定、蛋白G免疫测定、蛋白L免疫测定、生物素/抗生物素蛋白测定、生物素/链霉亲和素测定、免疫电泳测定、沉淀/絮凝反应、免疫印迹(蛋白质印迹;斑点/狭线印迹);免疫扩散测定;脂质体免疫测定、化学发光测定、文库筛选、表达阵列、免疫沉淀、竞争性结合测定和免疫组织化学染色。

105. 一种试剂盒,其包含权利要求1-18中任一项所述的修饰的支原体蛋白M或其功能片段或权利要求19-38中任一项所述的融合蛋白或权利要求102所述的固相载体。

蛋白M类似物和融合蛋白及其用于抑制抗体功能的用途

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求于2021年2月3日提交的美国临时申请序列号63/145,188的优先权,其全部内容通过引用并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于结合抗体的方法和组合物。这些方法可以用于分离抗体,治疗与过量抗体相关的疾患,急性阻断抗体以阻止自身免疫或炎症反应,以及抑制中和抗体。在实施方案中,本发明涉及在向受试者施用异源剂时,抑制针对该异源剂的中和抗体的方法,包括向受试者施用有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物,从而抑制该异源剂的中和。本发明还涉及相对于野生型蛋白M具有增加的热稳定性的修饰的支原体蛋白M或其功能片段及其在本发明方法中的用途。

背景技术

[0004] 美国约有1/10人患有罕见的遗传病,其能够严重影响寿命、生活质量、独立性和经济潜力。基因治疗是矫正遗传性疾病最有希望的治疗形式。在基因治疗递送载体中,腺相关病毒(AAV)载体已在许多临床试验中显示出治疗效果。首个FDA批准的基因治疗已经被用于失明患者。AAV基因治疗的临床试验数量大幅增加,这是由于它能够安全、成功地靶向多种不同类型的器官进行长期治疗性基因表达。尽管在临床上取得了成功,但AAV介导的基因递送的主要障碍是中和抗体(NAbs)的高发生率,其阻碍了靶组织的载体转导。超过90%的普通人群通过自然感染暴露于AAV,超过50%的人对于针对AAV的NAbs呈血清阳性。在临床试验筛选期间鉴定高于特定阈值的预先存在的NAbs使患者失去登记的资格,因为NAbs严重削弱了治疗的有效性并导致结果的可变性。

[0005] 为了克服AAV NAbs,已经采用了几种方法:连续血浆置换、免疫抑制药物和改变载体衣壳以消除免疫表位。血浆置换是低效的,需要多轮以在每个阶段去除2-3倍的剩余NAbs,并且仅能够处理低滴度的NAbs。血浆置换也很费时,并且通过同时消耗抗体和重复静脉内针头暴露使患者处于院内感染的传播风险中。用甾体或药理学免疫抑制来杀死B细胞会带来重大的健康风险,并且需要延长方案以减少甚至10倍的NAbs。AAV衣壳工程化是一种创新的方法,但最终不足以对抗多克隆抗AAV血清,在体内观察到抗体逃逸适度增加10倍。此外,修饰衣壳结构以改变NAb识别表位通常会导致效力较低的载体和缺陷载体产生,因为这些改变的表面区域是多功能的。目前没有一种方法能够成功克服临床试验排除的高于典型阈值的预先存在的抗AAV NAbs,或允许重复施用相同的AAV载体。

[0006] 支原体蛋白M已被鉴定为能够非特异性结合抗体并阻断其结合抗原的能力(美国专利号9,593,150;美国公开号2017/0320921)。

[0007] 本发明通过提供基于载体非依赖性蛋白(vector independent protein)的方法来普遍地阻断Nabs和基于抗体结合的其他方法和组合物克服了本领域的缺点。

发明内容

[0008] 本发明部分基于一种基于载体非依赖性蛋白的方法的开发,该方法可普遍阻断NAb,并证明该方法对浓度范围广泛的预先存在的NAb有效。本发明首创了一种独一无二的支原体衍生蛋白及其类似物(称为蛋白M)的用途,以通过向受试者施用异源剂后通过NAb防止异源剂(例如AAV载体)的中和,实现成功的基因递送。表明了,蛋白M通过与抗体轻链和重链上的保守区域普遍地结合,以物种和抗原非依赖性的方式阻断哺乳动物IgG、IgM和IgA抗体类别,从而导致与抗原识别CDR区域的结构性干扰。蛋白M以纳摩尔亲和力结合抗体,并防止多种不同的测试免疫球蛋白/抗原对的抗原-抗体结合。发明人发现,蛋白M阻断AAV的抗体识别,并防止抗体介导的AAV的中和。已经证明,AAV载体从NAb逃逸的水平与NAb滴度和体积、蛋白M的量和AAV的量成正比。在体外和体内,使用人类血清(IVIG)和AAV免疫小鼠的血清证实了蛋白M介导的NAb逃逸。已经证明,蛋白M可以在AAV施用之前单独施用,或与AAV一起配制用于NAb逃逸。这种方法的有效性取决于在AAV被中和前蛋白M与免疫球蛋白的相互作用。这种方法能够用于克服针对多种异源剂(例如,AAV载体血清型)的NAb,同时保持每种剂在特定基因治疗应用中的独特或有益的性质。

[0009] 本发明还涉及蛋白M在有益的抗体结合的其他方法中的用途,包括自身免疫性疾患的治疗、与过量抗体相关的疾患的治疗、分离抗体的方法以及执行免疫测定的方法。

[0010] 本发明还涉及具有增加的热稳定性和/或其他有利特征(例如,相对于野生型支原体蛋白M或其功能片段增加或维持的pH稳定性)的修饰的蛋白M,其用于在体内或在升高的温度下实施本发明的方法。

[0011] 因此,本发明的一方面涉及修饰的支原体蛋白M或其功能片段,具有相对于野生型支原体蛋白M或其功能片段增加或维持该支原体蛋白M或其功能片段的热稳定性和/或pH稳定性的一个或多个氨基酸突变。在一些实施方案中,热稳定性维持在高达75℃、70℃、65℃、60℃、55℃、50℃、45℃、40℃或38℃,和/或pH稳定性维持在2至8的pH、2.5至7.5的pH或4.5至7.5的pH。

[0012] 本发明的另一方面涉及包含修饰的支原体蛋白M或其功能片段、接头和肽的融合蛋白。

[0013] 本发明的另一方面涉及编码本发明的修饰的支原体蛋白M或其功能片段的多核苷酸和包括该多核苷酸的载体或转化细胞。

[0014] 本发明的另一方面涉及一种通过在向受试者施用异源剂后通过中和抗体来抑制异源剂的中和的方法,包括向受试者施用有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物,从而抑制异源剂的中和。

[0015] 本发明的另一方面涉及在受试者中表达多肽或功能性核酸的方法,包括向受试者施用(a)编码该多肽或功能性核酸的核酸递送载体,以及(b)有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物,从而在受试者中表达该多肽或功能性核酸。

[0016] 本发明的另一方面涉及一种治疗有需要的受试者的疾患的方法,其中所述疾病可通过在受试者中表达多肽或功能性核酸来治疗,包括向受试者施用(a)治疗有效量的编码多肽或功能性核酸的核酸递送载体,和(b)有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物,从而治疗受试者的疾患。

[0017] 本发明的另一方面涉及编辑受试者基因的方法,包括向受试者施用(a)基因编辑

复合物,和(b)有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物,从而在受试者中表达多肽或功能性核酸。

[0018] 本发明的另一方面涉及一种治疗有需要的受试者的自身免疫性疾病的方法,包括向受试者施用有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物,从而治疗自身免疫性疾病。

[0019] 本发明的另一方面涉及一种治疗有需要的受试者的与过量抗体相关的疾患的方法,包括向受试者施用治疗有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物,从而治疗与过量抗体相关的疾患。

[0020] 本发明的另一方面涉及一种治疗和/或预防有需要的受试者的与受体抗体对移植物的识别相关的实体器官的急性移植排斥的方法,其包括在移植之前和/或之后向受试者施用治疗有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物。

[0021] 本发明的另一方面涉及从样品中分离包含抗体轻链可变区和/或重链可变区的化合物的方法,该方法包括将该化合物与附着于固体载体的本发明的修饰的支原体蛋白M或其功能片段接触,然后从修饰的支原体蛋白M或其功能片段中洗脱该化合物。

[0022] 本发明的另一方面涉及进行免疫测定的方法,该方法包括使用本发明的修饰的支原体蛋白M或其功能片段去结合包含抗体轻链可变区和/或重链可变区的化合物。

[0023] 本发明的另一方面涉及包括本发明的修饰的支原体蛋白M或其功能片段的试剂盒。

[0024] 本发明的这些和其他方面在下文对本发明的描述中更详细地阐述。

附图说明

[0025] 图1示出人类IVIG含有AAV中和抗体,其剂量依赖性地抑制AAV转导。使用2倍稀释系列的人类IVIG生成AAV2中和图表。从50 μ g开始,逐步地将IVIG稀释至小于1 μ g,并且在接种孔之前,将各稀释液与 2×10^8 个AAV2-荧光素酶病毒基因组在4 $^{\circ}$ C下孵育1h。由AAV2转基因表达产生的发光报道信号是AAV转导的功能读出,并与可用于转导培养的HEK-293细胞的AAV量成正比。在这项实验中,48孔板的每个孔接种有 1×10^5 个细胞,并在无血清培养基中以2000的MOI进行转导(每种条件n=3次技术重复)。在细胞裂解和加入荧光素后,于转导后48h,在培养板读数器上进行荧光素酶活性的测量。与含有等体积的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的无IVIG对照相比,在12.5 μ g的IVIG下,测定给定IVIG量的AAV中和百分比之间的关系为72% (+/-1.3%)中和。此外,25 μ g的IVIG中和了96% (+/-0.2%),而50 μ g的IVIG中和了99% (+/-0.17%)的AAV2。

[0026] 图2示出了蛋白M保护AAV免受人类IVIG中存在的中和抗体的影响。使用上图中确定的12.5 μ g的IVIG,以 2×10^8 vg的剂量中和约70%的AAV2,使用蛋白M的2倍稀释系列研究从抗体介导的中和中逃逸。在这种情况下,考虑到1个IgG分子有2个蛋白M结合位点,必须占据这些位点才能使抗体完全失活,该实验从8个蛋白M分子比1个IgG分子的摩尔比开始,其为4倍过量的蛋白M。在每个孔中,首先将IVIG与单独的蛋白M稀释液在4 $^{\circ}$ C下孵育1h,然后添加AAV2-荧光素酶(2×10^8 vg)并在4 $^{\circ}$ C下再孵育1h。然后将HEK-293细胞(1×10^5)添加到孔中并孵育48h,然后再测量荧光素酶报道信号。与含有磷酸盐缓冲盐水(PBS)的无IVIG对照孔相比,含有IVIG但不含蛋白M的孔显示AAV信号减少约68% (+/-3.3%)。然而,蛋白M在摩尔比大于2:1时剂量依赖性地阻断了AAV的中和,其完全阻止了中和(无IVIG对照的108% -

193%),而1:1或0.5:1的比率仅部分阻断了中和(分别为无IVIG对照的52%和40%)。此外,在8:1和4:1的比率下,观察到AAV荧光素酶信号比无IVIG对照的剂量依赖性增加。在48孔板中,所有孔均在无血清培养基中重复同样三次地完成(每种条件 $n=3$ 次技术重复),并在转导后48h测量荧光素酶信号。

[0027] 图3示出,过量蛋白M在摩尔比大于8:1时对NAbs几乎没有额外的保护作用且蛋白M增强AAV转导。为了建立保护或增强AAV转导的蛋白M摩尔比上限,在或不在中和抗体条件下,以8:1或20:1的摩尔比重复NAb逃逸测定。与无IVIG PBS对照孔相比,添加12.5 μg 的IVIG中和了80% (+/-2.6%)的AAV2荧光素酶信号。与之前的实验类似,蛋白M与12.5 μg 的IVIG(8:1摩尔比,33 μg 蛋白M)在4 $^{\circ}\text{C}$ 下预孵育1h,然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 下与AAV孵育1h,防止了AAV中和,并将荧光素酶信号增强至有PBS的无IVIG对照的194% (+/-24%)。在10倍于NAb逃逸所必需的蛋白M量(20:1摩尔比,75 μg 蛋白M)时,观察到荧光素酶活性比含PBS的无IVIG对照适度增加256% (+/-44%)。20:1比率的荧光素酶信号与IVIG存在时的8:1比率没有统计学差异。此外,在没有IVIG的情况下,当75 μg 或33 μg 的蛋白M单独与AAV2荧光素酶在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1h时,荧光素酶信号量没有显著差异(分别为208%与216%),证实相对于PBS对照,荧光素酶信号的增加是由于基于蛋白M的增强。每个孔在无血清培养基中接种 1×10^5 HEK-293细胞,并以48孔板形式以2000的MOI(每孔条件 $n=3$ 次技术重复)进行转导。

[0028] 图4示出AAV转导的蛋白M增强呈剂量依赖性。蛋白M的2倍稀释系列(从33 μg 开始)表明,与PBS+AAV对照相比,AAV2荧光素酶与蛋白M的孵育导致荧光素酶信号增加。当对于 2×10^8 个病毒基因组,蛋白M的浓度低于2 μg 时,或者当在40000个蛋白M分子对1个含有AAV2-荧光素酶颗粒的基因组的摩尔比时,该荧光素酶信号的增强被消除。当对于 2×10^8 个载体颗粒,蛋白M约为33 μg 时,或者当大致700000个蛋白M分子对1个含有AAV2-荧光素酶颗粒的基因组时,增强开始饱和。在转导之前,将蛋白M稀释液与AAV在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1h。每个孔在无血清培养基中接种 1×10^5 HEK-293细胞,并以48孔板形式以2000的MOI(每孔条件 $n=3$ 次技术重复)进行转导。

[0029] 图5示出基于蛋白M的AAV转导增强是依赖于蛋白M与AAV衣壳的直接相互作用。用AAV2-荧光素酶测试了三种不同的条件:蛋白M在转导前与AAV预孵育1h(-1h),在转导临近时间点向AAV中添加蛋白M(0h),或在AAV转导后18h向孔中添加蛋白M(18h)。使用两种不含蛋白M的阴性对照条件:在细胞接种和转导之前,将AAV在4 $^{\circ}\text{C}$ 下于细胞培养基中单独孵育1h(代表预孵育组和转导临近组的条件),或在PBS中稀释AAV并在细胞接种和转导时添加到细胞培养物中(代表转导后组的条件)。在转导后18h,向PBS对照组添加额外体积的PBS,以模拟向转导后组添加等量蛋白M的条件。在转导临近或转导后添加蛋白M的孔中未见到AAV荧光素酶信号的增强,而在预孵育组中观察到剂量依赖性增强,表明蛋白M与AAV的相互作用对于增强机制是必要的。所有孔接种 1×10^5 个Huh7细胞,每个孔用 2×10^8 vg的AAV转导,以48孔板形式每个孔条件 $n=3$ 次技术重复。

[0030] 图6示出,在NAbs结合衣壳后,蛋白M不会防止AAV中和。AAV2-荧光素酶首先与不同稀释度的IVIG在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1h,然后添加蛋白M并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下再孵育1h。双阴性对照组仅接受AAV,而阳性对照组接受在转导前与AAV在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1h的33 μg 蛋白M。使用三种不同的IVIG稀释液,分别含有200 μg 、50 μg 或12.5 μg 。与仅含有与IVIG稀释液一起孵育的AAV的蛋白M阴性对照组相比,当99%的AAV已被50 μg 或200 μg 的IVIG中和时,33 μg 的蛋白M不能实现中和后

增强或从中和抗体逃逸。然而,当12.5 μ g的IVIG与AAV孵育时,约30%的载体保持未中和(见图1、2和3),并且与含有AAV和12.5 μ g的IVIG的蛋白M阴性对照孔相比,33 μ g的蛋白M能够增强中和后该级分的转导。与之前的图不同,荧光素酶测量仅在转导后24h进行,这可以解释为什么12.5 μ g的IVIG加AAV组的荧光素酶信号低于双阴性对照组的30%。每个孔在无血清培养基中接种 1×10^5 HEK-293细胞,并以48孔板形式以2000的MOI(每孔条件n=3次技术重复)进行转导。

[0031] 图7示出,蛋白M与AAV预孵育保护载体免于随后被IVIG中和。对于该中和测定,蛋白M的量保持不变(8.25 μ g),同时使用不同量的IVIG以获得不同的摩尔比(从50 μ g到3.12 μ g的IVIG)。蛋白M首先在4 $^{\circ}$ C下与AAV2-荧光素酶孵育1h,然后在4 $^{\circ}$ C下添加IVIG 1h,然后再转导细胞培养物。阳性对照组含有AAV加33 μ g、8.25 μ g或1 μ g的蛋白M,而阴性对照组仅含有与PBS孵育的AAV。可以观察到蛋白M介导的AAV非中和级分增强2-3倍。每个孔在无血清培养基中接种 1×10^5 HEK-293细胞,并以48孔板形式以2000的MOI(每孔条件n=3次技术重复)进行转导。在转导后24h进行荧光素酶测定。

[0032] 图8示出,将蛋白M与AAV预孵育可保护载体免于被过量背景血清免疫球蛋白中的IVIG中和。在本实验中,使用了25 μ g的IVIG,其在之前示出,在 2×10^8 个病毒基因组的剂量下,能够中和约95%的AAV2荧光素酶。将25 μ g人类IVIG添加到含有10%胎牛血清(FBS)的细胞培养孔中,根据制造商进行的ELISA测定,估计牛IgG浓度为350 μ g。另一组含有相同量的10%FBS的细胞培养孔用作无IVIG对照。蛋白M以摩尔比为4:1、2:1和1:1(基于牛IgG含量)在4 $^{\circ}$ C下与AAV孵育1h,然后添加无IVIG对照孔或含有25 μ g的IVIG的孔,每个孔含有10%的FBS。在阴性对照组中,用PBS替代蛋白M与AAV一起孵育,并添加到含有10%FBS或含有25 μ g IVIG的10%FBS的孔中。结果表明,即使在1个蛋白M分子对1个牛IgG分子的比率下,蛋白M预孵育也能保护AAV2荧光素酶免于被IVIG中和,尽管这一数量的蛋白M(108 μ g)仍比人类IVIG(25 μ g)高12倍的比率。每个孔接种 1×10^5 个HEK-293细胞,并以48孔板形式以2000的MOI(每个孔条件n=3次技术重复)进行转导。在转导后24h进行荧光素酶测定。

[0033] 图9示出,蛋白M允许AAV8从收集自AAV8免疫小鼠的合并的多克隆血清中发现的中和抗体体外逃逸。在本实验中,将来自AAV8免疫小鼠的10 μ l的合并的多克隆血清在PBS中系列稀释,首先以10倍,生成1 μ l和0.1 μ l含血清的孔。然后以2倍稀释系列进一步稀释0.1 μ l血清孔。将AAV8-荧光素酶载体(每孔 2×10^8 个病毒基因组)与中和血清稀释液在4 $^{\circ}$ C下孵育1h,然后进行转导。将蛋白M以2个蛋白M分子对估计的1个免疫球蛋白分子的比率添加到10倍稀释系列的相同的AAV8中和小鼠血清中。开始从6.5 μ g的蛋白M对估计的1 μ l中和小鼠血清中的10 μ g免疫球蛋白,在将每个蛋白M和血清样品在4 $^{\circ}$ C下混合孵育1h之前进行相互稀释。然后将所有样品在4 $^{\circ}$ C下与AAV8-荧光素酶一起孵育1h,然后添加到细胞中。中和实验结果的数据被归一化为仅含有AAV8的无血清对照孔,然后荧光素酶信号用双指数衰减函数拟合,以估计数据点之间的曲线。使用模型曲线发现,多克隆血清对AAV8的50%中和发生于0.0039 μ l的体积,有效滴度为1:2564。然而,在0.2744 μ l血清体积时,与2:1摩尔比的蛋白M一起孵育的相同血清发生50%中和,导致估计的有效滴度为1:36。这一结果表明,在体外,蛋白M能够在将近100倍的血清浓度差异下保护AAV。将 5×10^4 个HEK-293细胞以96孔板形式(MOI为4000)接种到所有孔中,每个孔条件n=3次技术重复,并在转导后48h测量荧光素酶。

[0034] 图10示出,对AAV8被动免疫的小鼠体内注射蛋白M可导致中和抗体逃逸。在本实验

中,通过IV注射被动转移给小鼠不同体积的多克隆AAV8血清(上图中的滴度为1:2564),然后在15-20分钟内IV施用 2×10^{10} 个AAV8-荧光素酶病毒基因组。这建立了基于递送至每只小鼠的血清体积的中和曲线。研究发现,与未被动转移血清的一组原始小鼠相比,在转移1 μ l至0.001 μ l的血清时,AAV8-荧光素酶信号的超过50%中和发生。然而,当被动转移后但在AAV施用之前,向小鼠递送估计2:1比率的蛋白M(6.3mg)时,然后,在0.3 μ l和1 μ l的转移血清体积下实现完全中和抗体逃逸,表明蛋白M介导逃NAb浓度变化1000倍的中和抗体逃逸。此外,与无血清对照组相比,0.3 μ l被动转移血清组的中和逃逸呈剂量依赖性,表明NAb逃逸在1:1(3.15mg)和0.5:1(1.58mg)的估计摩尔比下减少。对于所有组,每组n=5只小鼠的条件,在AAV施用后24h测量来自肝脏的荧光素酶信号。

[0035] 图11显示了根据图10中的结果量化的平均原始发光。

[0036] 图12显示蛋白M/抗体复合物在体外形成后是稳定的。在本实验中,在加入AAV8-荧光素酶之前,使用含有估计10 μ g的免疫球蛋白的1 μ l的多克隆血清(滴度1:2564)与蛋白M(2:1摩尔比,6.6 μ g)孵育不同的持续时间。该阴性对照组包含中和血清加培养基,而阳性对照组包含培养基加PBS或蛋白M加培养基。所有组均采用72h、48h、24h、16h、4h、2h和1h的孵育间隔。与培养基加PBS阴性对照相比,所有孵育持续时间均显示蛋白M介导保护AAV8免受中和。在接种 5×10^4 个HEK-293细胞时(0h),将AAV8荧光素酶添加到孔中,并以96孔板形式以4000的MOI(每个孔条件n=3次技术重复)进行转导。在转导后48h进行荧光素酶测定。

[0037] 图13显示了蛋白M在体内中和抗体逃逸的效力不稳定。进行与图10和11相同的实验,但这次在蛋白M施用后5分钟或蛋白M施用后3h加入AAV8以测试NAb逃脱的持久性。在等待3h施用AAV8后,AAV8-荧光素酶信号为无血清对照组的约1/3,而在蛋白M后仅等待5分钟施用AAV8时,荧光素酶信号大致相当于无血清对照组。被动转移后但在AAV施用前,估计2:1比率的蛋白M(6.3mg)被递送给小鼠,除包含n=3只小鼠的3h间隔组外,每组条件n=5只小鼠。在AAV施用后24h测量来自肝脏的荧光素酶信号。

[0038] 图14显示生殖支原体(M.genitalium)截短的蛋白M(MG WT)在体温下不稳定。解链温度(T_m)用纳米差示扫描荧光镜透视检查(NanoDSF)测定。一阶导数的拐点表示T_m。蛋白质在大肠杆菌(E.coli)中重组表达,并在测量前用镍柱色谱纯化。圆二色性测定表明,MG WT在20℃下稳定至少2h,并且没有可见的沉淀物形成。然而,在37℃下,MG WT在15分钟后开始解折叠,并产生可见的沉淀物。这表明该蛋白质在接近标准人体温度时不稳定。从0-100℃的温度梯度显示出了MG WT的瞬时解折叠,解链温度(T_m)约为41.2℃。解折叠伴随着可见沉淀物的聚集。

[0039] 图15A-15B示出了生殖支原体(M.genitalium)(MG WT)和肺炎支原体(M.pneumoniae)(MP WT)的截短蛋白M的解链温度,以及蛋白M的类似物,其解链温度比MG-WT至少提高1度(A)或保持MG-WT(B)的解链温度。通过差示扫描荧光镜透视检查(NanoDSF)测定由大肠杆菌小规模蛋白质生产产生的WT和突变体蛋白质类似物的解链温度。右边列出了突变的数量及其相应的氨基酸取代。该类似物表明了一系列热稳定性,其中多个突变导致增加解链温度的加性效应。

[0040] 图16显示了使用差示扫描荧光镜透视检查(DSF)测量MG WT和MG 29的解链温度的实施例数据。测定了所有类似物的解链温度,如图所示,结果为MG WT(T_m=41.9℃)和MG 29(T_m=55.2℃)。一阶导数的拐点表示解链温度(T_m)。蛋白质在大肠杆菌中重组表达,并在测

量前用镍柱色谱纯化。

[0041] 图17A-17C显示了通过SDS-PAGE测定的蛋白M类似物的可溶性级分评估。将每种蛋白质的七个等分样品(0.4mg/mL)在37℃下孵育不同量的时间。在SDS-PAGE凝胶上运行可溶性级分之前,通过以15000xg离心样品10分钟将沉淀的蛋白质制成球团。在评估之前,将蛋白质加热0、1、4、24、48、72或96h。结果表明,加热后1-4h, MG WT(A)开始从溶液中沉淀出来。MG 27(B)和MG 29(A)在72h内保持可溶,而MG 31(B)和MG 40(C)在24h内保持可溶。

[0042] 图18A-18C示出在体外中和测定期间,不同的蛋白M类似物阻断合并的人静脉内免疫球蛋白 γ (IVIG)以防止AAV2-荧光素酶载体中和:1h(A和B)或24h(C)孵育的4℃与37℃热激发的比较。蛋白M与IVIG的比率为4:1。在通过以96孔板形式进行重复同样三次的AAV2-荧光素酶报道载体(2E8vg)转导细胞培养物24h后,测量荧光素酶活性产生的相对光单位。结果归一化为仅含有AAV2和磷酸盐缓冲盐水(PBS)的孔,白色条形。AAV2与IVIG(12 μ g)孵育1h,表明AAV几乎完全中和。在4℃下孵育的蛋白M类似物(16 μ g)在AAV前一起孵育1h时,可防止IVIG中和AAV。这与在4℃下孵育但未经IVIG孵育的蛋白M类似物进行了比较(未对MG 8和MG 24进行)。MG-WT和一些解链温度较低的类似物在与IVIG孵育前在37℃下热激发该类似物时不能保护AAV免受中和,而其他 T_m 较高的类似物保留了保护AAV免受中和的能力。大多数突变体MG类似物在37℃激发1h后仍保留中和抗体阻断能力。然而, MG 27、MG 29和MG 46在37℃激发24h后防止AAV中和。

[0043] 图19示出了在初次AAV施用后1个月, MG WT阻断NAbs用于AAV再给药。通过腹腔施用AAV8-GFP(1E9 vg)免疫野生型C57BL6雌性小鼠,一个月后收集血清以评估体外AAV中和抗体滴度。然后,对小鼠肌肉内施用AAV8-荧光素酶报道载体(每条腿1E9 vg),其中将AAV配制成与MG WT的简单混合物(每条腿33 μ g)施用于小鼠的右腿,或者将AAV与磷酸盐缓冲盐水配制成载体对照施用于小鼠的左腿。在AAV8-荧光素酶施用后2周,进行腿部肌肉的发光成像。具有AAV中和抗体滴度为1:10的三只小鼠证明了在该盐水配制的腿中AAV荧光素酶报道载体的中和,而在相同小鼠的MG WT配制的腿中AAV荧光素酶报道载体被保护免受中和抗体的影响。在该盐水腿的AAV的中和产生的平均荧光素酶信号比MG WT配制的腿低80%。这一结果证明,在由先前AAV剂量引发的中和抗体的产生后,使用蛋白M成功地重复施用AAV的能力。

[0044] 图20示出了在初次AAV施用1个月, MG 29阻断NAbs用于AAV再给药。通过腹腔施用AAV8-GFP(5E8 vg)免疫野生型C57BL6雌性小鼠,一个月后收集血清以评估体外AAV中和抗体滴度。然后对小鼠肌肉内施用AAV8-荧光素酶报道载体(每条腿2E9 vg),其中将AAV配制成与工程类似物MG 29的简单混合物(每条腿500 μ g)施用于小鼠的右腿,或者将AAV与磷酸盐缓冲盐水配置成载体对照施用于小鼠的左腿。在AAV8-荧光素酶施用后2周,进行腿部肌肉的发光成像。具有AAV中和抗体滴度小于1:100(分别为1:8、1:32和1:64)的三只小鼠证明了在盐水配制的腿中AAV荧光素酶报道载体的中和,而在相同小鼠的MG 29配制的腿中AAV荧光素酶报道载体被保护免受中和抗体的影响。在该盐水腿的AAV的中和产生的平均荧光素酶信号比MG WT配制的腿低至少98%。这一结果证明,在由先前AAV剂量引发的中和抗体的产生后,使用工程蛋白M类似物成功地重复施用AAV的能力。

[0045] 图21示出工程蛋白M类似物对IgG表现出不同的亲和力。使用生物膜层干涉技术(BLI)测量特定蛋白M类似物的亲和力。结合常数(KD)是在15.6nM-250nM的蛋白M浓度范围

内,使用关联和解离速率(动力学分析)计算的。结果表明,与MG WT相比,附在BLI探针上的IgG的亲合力是增强的或降低的。

[0046] 图22示出通过动力学分析生成的BLI亲和力数据的实例。该曲线用于预测动力学KD值。该曲线拟合覆盖在收集的数据上。

[0047] 图23显示了突变体稳定成功率。示出了Rosetta预测的MG WT突变频率的增加($T_m+1^{\circ}\text{C}$)、减少($T_m-1^{\circ}\text{C}$)或对稳定性没有影响。“组合突变”表示通过合并单独稳定MG-WT的突变构建体而建的构建体。

[0048] 图24示出了MP WT序列保守性。根据BLOSUM62矩阵,MP WT的同源模型以两个方向描述,通过与MG WT序列的保守性着色。根据保守性程度,残基被着色,从白色(相同)到黑色(显著不同)。以PDB ID:4NZR为模板建同源模型。

[0049] 图25示出了蛋白M DNA序列的密码子优化提高了制造产率。编码MG WT蛋白的DNA质粒通过使用MG281天然的细菌密码子(原始PM),或对细菌和人类密码子的使用都优化的密码子(优化的PM)而产生。将由同等浓度的原始PM质粒或优化的PM质粒转化的三个合并的细菌菌落在同等的生长培养基体积(10mL)中以同等的过夜时间周期培养和繁殖。细菌被制成球团并且通过冻融和在等体积的裂解缓冲液中裂解产生粗裂解物。将粗裂解物离心,收集上清液,用于SDS-PAGE凝胶上的蛋白质分离。将等体积的每种裂解物在SDS-PAGE凝胶上跑电泳,转移至蛋白质印迹,然后用针对存在于MG WT氨基末端的6X组氨酸标签的小鼠抗体探测,接着用缀合至辣根过氧化物酶(HRP)的山羊抗小鼠二级抗体探测。用鲁米诺化学发光法测定MG WT蛋白的条带强度。基于归一化为细菌球团的重量的蛋白质印迹带强度计算得到的MG WT产率。与原始PM质粒相比,优化的PM质粒产生的MG WT蛋白质产率大约增加了4倍。

[0050] 图26示出了突变体改善的pH稳定性。在不同的pH条件下,用NanoDSF测定解链温度(T_m)。在PBS中通过SEC纯化蛋白质,并将缓冲液交换成甘氨酸(pH 2.5&3.5)、乙酸盐(pH 4.5&5.5)和磷酸盐(pH 6.5和7.5)缓冲液。

[0051] 图27A-27D示出了野生型生殖支原体蛋白M氨基酸74-479(SEQ ID NO:3)与修饰蛋白M MG1(SEQ ID NO:4)、MG8(SEQ ID NO:5)、MG13(SEQ ID NO:6)、MG15(SEQ ID NO:7)、MG21(SEQ ID NO:8)、MG22(SEQ ID NO:9)、MG23(SEQ ID NO:10)、MG24(SEQ ID NO:11)、MG27(SEQ ID NO:12)、MG28(SEQ ID NO:13)、MG29(SEQ ID NO:14)、MG31(SEQ ID NO:15)、MG33(SEQ ID NO:16)、MG38(SEQ ID NO:17)、MG40(SEQ ID NO:18)、MG43(SEQ ID NO:19)、MG44(SEQ ID NO:20)、MG45(SEQ ID NO:21)、and MG46(SEQ ID NO:22)的序列比对。

[0052] 图28示出了野生型生殖支原体蛋白M氨基酸74-479(SEQ ID NO:3)与肺炎支原体蛋白M的等效片段(SEQ ID NO:23)的序列比对。

[0053] 图29是施用后发光的柱状图。图29显示施用后7天的体内抗体中和。从用AAV8连续免疫的小鼠收集并合并血清。体外中和测定确定合并血清的抗AAV8中和滴度为约1:10,000。在被动转移实验中,通过IV注射将不同量的抗AAV8血清(通过血清体积测定)施用给未接触过AAV的小鼠组,在20至25分钟后IV注射AAV8-荧光素酶报道载体的 2×10^6 病毒基因组(vg)。在AAV施用前5分钟,通过IV注射向一些组的小鼠给予蛋白M。7天后进行荧光素酶活性的非侵入性体内成像以定量作为AAV8载体基因表达的代表的光,并且发光信号的任何降低指示血清对AAV8-荧光素酶的中和。给予0.0003uL血清的小鼠不能中和AAV8,并且与没有

血清的单独注射 2×10^{10} vg AAV8-荧光素酶的原始小鼠相比,产生几乎100%的发光信号。施用增加量的中和血清的小鼠组逐渐中和越来越多的AAV8-荧光素酶,其中0.001u1-0.003u1血清中和AAV的大约一半,并且0.3u1血清或更多中和超过AAV的99%。施用3u1血清,然后施用MG88或MG118,然后施用 2×10^{10} vg AAV8荧光素酶的小鼠组,由于蛋白M融合蛋白MG29 (6.3mg)、MG29* (6.3mg)和MGWT* (6.3mg)、MG118 (9mg)和MG88 (6.3mg)对中和抗体的抑制,导致基因表达显示逃逸中和。

[0054] 图30显示体外中和测定,其中以2倍稀释滴定来自小鼠的高滴度抗AAV8血清,并如X轴所示添加到孔中。然后,将不同的蛋白M类似物(MG29、MG66、MG71和MG64)以图中所示的分子比率添加到孔中,孵育1小时。仅在血清孔中添加盐水(黑色圆圈)。然后将AAV8-荧光素酶(2×10^{10} 个病毒基因组)添加到每个孔中并孵育1小时,然后将 5×10^4 个Huh7细胞添加到无血清培养基中。将细胞培养48小时,然后读取并定量作为中和的代表的萤光素酶报道信号。这些数据表明这些类似物具有中和抗体阻断功能,从而改变了中和曲线,并且MG64 Fc-蛋白M融合二聚体(Fc-PM)的曲线改变大于蛋白M单体类似物。

具体实施方式

[0055] 下面更详细地解释本发明。本说明书不是要详细列出本发明可以实施的所有不同方式,或者可以添加到本发明的所有特征。例如,关于一个实施方案示出的特征可以结合进其他实施方案中,并且关于特定实施方案示出的特征可以从该实施方案中删除。另外,根据本公开,在此提出的各个实施方案的多种变化和添加对于本领域技术人员将是显而易见的,其不偏离本发明。因此,以下说明书旨在说明本发明的一些特定实施方案,而不是详尽地具体说明其所有置换、组合和变化。

[0056] 除非上下文另外指出,否则特别旨在本文所述的本发明的各种特征可以以任何的组合使用。此外,本发明还考虑,在本发明的一些实施方案中,本文中阐述的任何特征或特征的组合能够被排除或省略。为了说明,如果说明书说明复合物由组分A、B和C组成,那么具体地说,A、B或C中的任何一个或其组合都能够以单独或以任何组合省略和放弃要求保护。

[0057] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所述领域的一般技术人员通常所理解的相同的含义。在本发明的描述中使用的术语的目的仅仅是为了描述特定的实施方案,而不是为了限制本发明。

[0058] 除非另有明确说明,否则本文仅以单链形式以5'至3'方向从左到右呈现核苷酸序列。本文中的核苷酸和氨基酸以IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的方式表示,或(对于氨基酸)以单字母代码或三字母代码表示,两者均符合37 C.F.R. §1.822和既定用途。

[0059] 除非另有说明,本领域技术人员已知的标准方法可用于生产重组和合成多肽、抗体或其抗原结合片段、操作核酸序列、生产转化细胞、构建rAAV构建体、修饰的衣壳蛋白、表达AAV rep和/或cap序列的包装载体以及瞬时和稳定转染的包装细胞。这些技术是本领域技术人员已知的。参见例如,SAMBROOK等人,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,第2版(Cold Spring Harbor,NY,1989);F.M.AUSUBEL等人CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(Green Publishing Associates,Inc.和John Wiley&Sons,Inc.,New York)。

[0060] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利、核苷酸序列、氨基酸序列和其他参考文献都通过引用整体并入本文。

[0061] 定义

[0062] 如在本发明的说明书和所附权利要求书中所用的,单数形式“一(a)”、“一个/种(an)”和“该”也旨在包括复数形式,除非上下文清楚地另外说明。

[0063] 如本文所用,“和/或”是指并涵盖一个或多个相关所列项目的任何和所有可能的组合,以及当以替换方式(“或”)解释时缺少组合。

[0064] 此外,本发明还考虑,在本发明的一些实施方案中,本文中阐述的任何特征或特征的组合能够被排除或省略。

[0065] 此外,如本文所用,术语“约”,当提及可测量值,例如本发明的化合物或剂的量、剂量、时间、温度等时,意指涵盖指定量的 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或甚至 $\pm 0.1\%$ 的变化。

[0066] 如本文所用,过渡短语“基本上由……组成(consisting essentially of)”应解释为包括所述材料或步骤以及那些本质上不影响所要求保护的发明的一个或多个基本和新颖特性的材料或步骤。因此,如本文所用的术语“基本上由……组成(consisting essentially of)”不应解释为等同于“包括”。

[0067] 术语“基本上由...组成(consists essentially of)”(及语法变体),适用于本发明的多核苷酸或多肽序列,指一种多核苷酸或多肽,其由所述序列(例如,SEQ ID NO)和位于所述序列的5'和/或3'或N-末端和/或C-末端或位于两个末端之间(例如,结构域之间)总共十个或更少(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)额外核苷酸或氨基酸组成,如此多核苷酸或多肽的功能没有实质性改变。十个或更少额外核苷酸或氨基酸的总数包括额外核苷酸或氨基酸加在一起的总数。术语“实质性改变”,适用于本发明的多核苷酸,是指与由所述序列组成的多核苷酸的表达水平相比,表达至少约50%或更多的编码多肽的能力的增加或减少。术语“实质性改变”,适用于本发明的多肽,是指与由所述序列组成的多肽的活性相比,生物活性增加或减少至少约50%或更多。

[0068] 本文所用的术语“细小病毒”涵盖细小病毒(Parvoviridae)科,包括自主复制的细小病毒和依赖病毒。自主性细小病毒包括细小病毒属(Parvovirus)、红病毒属(Erythrovirus)、浓核病毒属(Densovirus)、伊特拉病毒属(Iteravirus)和反病毒属(Contravirus)的成员。示例性自主性细小病毒包括但不限于小鼠细小病毒、牛细小病毒、犬细小病毒、鸡细小病毒、猫泛白细胞减少症病毒、猫细小病毒、鹅细小病毒、H1细小病毒、番鸭细小病毒、蛇细小病毒和B19病毒。其他自主性细小病毒是本领域技术人员已知的。参见,例如FIELDS等人,VIROLOGY,第2卷,第69章(第4版,Lippincott-Raven Publishers)。

[0069] 依赖病毒(Dependovirus)属包含腺相关病毒(AAV),包括但不限于1型AAV、2型AAV、3型AAV(包括3A和3B型)、4型AAV、5型AAV、6型AAV、7型AAV、8型AAV、9型AAV、10型AAV、11型AAV、12型AAV、13型AAV、禽AAV、牛AAV、犬AAV、山羊AAV、蛇AAV、马AAV和羊AAV。参见,例如,FIELDS等人,VIROLOGY,第2卷,第69章(第4版,Lippincott-Raven Publishers);以及表1。

[0070] 本发明上下文中的术语“腺相关病毒”(AAV)包括但不限于1型AAV、2型AAV、3型AAV(包括3A和3B型)、4型AAV、5型AAV、6型AAV、7型AAV、8型AAV、9型AAV、10型AAV、11型AAV、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV以及羊AAV和现在已知或后来发现的任何其他AAV。参见,例如,BERNARD N. FIELDS等人,VIROLOGY,第2卷,第69章(第4版,Lippincott-Raven Publishers)。已经确定了许多额外的AAV血清型和分支(参见,例如,(参见,例如,Gao等人,

(2004) 1Virol.78:6381-6388和表1)), 其也涵盖在该术语“AAV”中。

[0071] 本发明的细小病毒颗粒和基因组可以来自,但不限于AAV。AAV和自主细小病毒的各种血清型的基因组序列,以及天然ITRs、Rep蛋白和衣壳亚基的序列是本领域已知的。这些序列可以在文献或在公共数据库诸如GenBank中找到。参见,例如GenBank登录号NC 002077、NC 001401、NC 001729、NC 001863、NC 001829、NC 001862、NC 000883、NC 001701、NC 001510、NC 006152、NC 006261、AF063497、U89790、AF043303、AF028705、AF028704、J02275、J01901、J02275、X01457、AF288061、AH009962、AY028226、AY028223、AY631966、AX753250、EU285562、NC 001358、NC 001540、AF513851、AF513852和AY530579;其公开内容通过引用并入本文,用于教导细小病毒和AAV核酸和氨基酸序列。另请参见,例如,Bantel-Schaal等人,(1999) 1Virol.73:939;Chiorini等人,(1997) 1Virol.71:6823;Chiorini等人,(1999) 1Virol.73:1309;Gao等人,(2002) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 99:11854;Moris等人,(2004) Virol.33-:375-383;Mori等人,(2004) Virol.330:375;Muramatsu等人,(1996) Virol.221:208;Ruffing等人,(1994) J Gen.Virol.75:3385;Rutledge等人,(1998) J Virol.72:309;Schmidt等人,(2008) J Virol.82:8911;Shade等人,(1986) 1Virol.58:921;Srivastava等人,(1983) 1Virol.45:555;Xiao等人,(1999) 1Virol.73:3994;国际专利公布WO 00/28061、WO 99/61601、WO 98/11244和美国专利号6,156,303;其公开内容通过引用并入本文,用于教导细小病毒和AAV核酸和氨基酸序列。另请参见表1。AAV1、AAV2和AAV3 ITR序列的早期描述由Xiao,X.,(1996),“Characterization of Adeno-associated virus (AAV) DNA replication and integration,”Ph.D.Dissertation,University of Pittsburgh,Pittsburgh,PA(其全部并入本文)提供。

[0072] “嵌合”AAV核酸衣壳编码序列或AAV衣壳蛋白是将两个或更多个衣壳序列的部分结合在一起。“嵌合”AAV病毒粒子或颗粒包括嵌合AAV衣壳蛋白。

[0073] 本文所用的术语“嗜性”是指载体(例如,病毒载体)优先但不一定排他地进入某细胞或一种或多种组织类型和/或优先但不一定排他地与细胞表面相互作用,其促使进入某细胞或组织类型,随后任选地和优选地由载体内容物(例如,病毒基因组)携带的序列在细胞中表达(例如,转录和任选地翻译),例如对于重组病毒,一个或多个异源核苷酸序列的表达。本领域技术人员将会理解,在缺少反式作用因子的情况下,例如,对于可诱导启动子或以其他方式调节的核酸序列,可能不会起始来自病毒基因组的异源核酸序列的转录。在rAAV基因组的情况下,来自病毒基因组的基因表达可能来自稳定整合的原病毒和/或来自非整合的附加体,以及病毒核酸可能在细胞内采取的任何其他形式。

[0074] 术语“嗜性图谱”是指一个或多个靶细胞、组织和/或器官的转导模式。嵌合AAV衣壳的代表性实例具有嗜性图谱,其特征为中枢神经系统(CNS)细胞的有效转导,而外周器官的仅转导率较低(参见,例如,美国专利号9,636,370McCown等人,和美国专利公开号2017/0360960Gray等人)。表达特定嗜性图谱的载体(例如,病毒载体,例如,AAV衣壳)因其嗜性图谱(例如,神经嗜性、肝嗜性等)可被称为“嗜性”。

[0075] 如本文所用,通过病毒载体(例如,AAV载体)“转导”细胞是指载体进入细胞并通过将核酸掺入病毒载体将遗传物质转移到细胞中并随后通过病毒载体转移到细胞中。

[0076] 表1

[0077]

AAV 血清型/分离株	GenBank 登 录号	AAV 血清型/分离株	GenBank 登 录号	AAV 血清型/分离株	GenBank 登 录号
克隆分离株		Hu52	AY530614	Cy3	AY243019
禽 AAV ATCC VR-865	AY186198, AY629583, NC 004828	Hu T41	AY695378	Cy5	AY243017
禽 AAV DA-1 株	NC 006263, AY629583	Hu S17	AY695376	Rh13	AY243013

[0078]

Bovine AAV	NC 005889, AY388617	Hu T88	AY695375		
AAV4	NC 001829	Hu T71	AY695374	Clade E	
AAV5	AY18065, AF085716	Hu T70	AY695373	Rh38	AY530558
Rh34	AY243001	Hu T40	AY695372	Hu66	AY530626
Rh33	AY243002	Hu T32	AY695371	Hu42	AY530605
Rh32	AY243003	Hu T17	AY695370	Hu67	AY530627
AAV10	AY631965	Hu LG15	AY695377	Hu40	AY530603
AAV11	AY631966			Hu41	AY530604
AAV12	DQ813647	Clade C		Hu37	AY530600
AAV13	EU285562	AAV 3	NC 001729	Rh40	AY530559
		AAV 3B	NC 001863	Rh2	AY243007
Clade A		Hu9	AY530629	Bbl	AY243023
AAV1	NC 002077, AF063497	Hu1 0	AY530576	Bb2	AY243022
AAV6	NC 001862	Hu11	AY530577	Rh10	AY243015
Hu.48	AY530611	Hu53	AY530615	Hu11	AY530582
Hu 43	AY530606	Hu55	AY530617	Hu6	AY530621
Hu 44	AY530607	Hu54	AY530616	Rh25	AY530557
Hu 46	AY530609	Hu7	AY530628	Pi2	AY530554
		Hu1 8	AY530583	Pi1	AY530553
进化枝 B		Hu15	AY530580	Pi3	AY530555
Hu1 9	AY530584	Hu16	AY530581	Rh57	AY530569
Hu20	AY530586	Hu25	AY530591	Rh50	AY530563
Hu23	AY530589	Hu60	AY530622	Rh49	AY530562
Hu22	AY530588	Ch5	AY243021	Hu39	AY530601
Hu24	AY530590	Hu1	AY530595	Rh58	AY530570
Hu21	AY530587	Hu1	AY530575	Rh61	AY530572
Hu27	AY530592	Hu4	AY530602	Rh52	AY530565
Hu28	AY530593	Hu2	AY530585	Rh53	AY530566
Hu29	AY530594	Hu61	AY530623	Rh51	AY530564
Hu63	AY530624			Rh64	AY530574
Hu64	AY530625	进化枝 D		Rh43	AY530560
Hu13	AY530578	Rh62	AY530573	AAV8	AF513852
Hu56	AY530618	Rh48	AY530561	Rh8	AY242997
Hu57	AY530619	Rh54	AY530567	Rh1	AY530556
Hu49	AY530612	Rh55	AY530568		
Hu58	AY530620	Cy2	AY243020	Clade F	
Hu34	AY530598	AAV7	AF513851	AAV9 (Hu14)	AY530579
Hu35	AY530599	Rh35	AY243000	Hu31	AY530596
AAV2	NC 001401	Rh37	AY242998	Hu32	AY530597
Hu45	AY530608	Rh36	AY242999		
Hu47	AY530610	Cy6	AY243016		
Hu51	AY530613	Cy4	AY243018		

[0079] 除非另有说明,“有效转导”或“有效嗜性”或类似术语,可通过参考合适的阳性或阴性对照来确定(例如,阳性对照的转导或嗜性分别至少约50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或更多的,或阴性对照的转导或嗜性分别至少约110%、120%、150%、200%、

300%、500%、1000%或更多)。

[0080] 类似地,可以通过参考合适的对照来确定病毒是否对靶组织“没有有效的转导”或“没有有效的嗜性”,或类似的术语。在特定实施方案中,病毒载体不能有效地转导(即,没有有效的嗜性)对CNS以外的组织,例如肝、肾、性腺和/或生殖细胞。在特定实施方案中,一种或多种组织(例如,肝脏)的不良转导为一种或多种所需靶组织(例如,CNS细胞)的转导水平的20%或更少、10%或更少、5%或更少、1%或更少、0.1%或更少。

[0081] 术语“5'部分”和“3'部分”是定义两个或更多个元素之间空间关系的相对术语。因此,例如,多核苷酸的“3'部分”表示位于另一区段下游的多核苷酸的区段。术语“3'部分”并不意味着区段必须位于多核苷酸的3'端,或甚至不意味着它必须位于多核苷酸的3'半部分,尽管它可能是。同样,多核苷酸的“5'部分”表示位于另一区段上游的多核苷酸的区段。术语“5'部分”并不意味着区段必须位于多核苷酸的5'端,或甚至不意味着它必须位于多核苷酸的5'半部分,尽管它可能是。

[0082] 如本文所用,术语“多肽”涵盖肽和蛋白质二者,除非另有说明。

[0083] “多核苷酸”、“核酸”或“核苷酸序列”可以是RNA、DNA或DNA-RNA杂交序列(包括自然存在和非自然存在的核苷酸),但优选为单链或双链DNA序列。

[0084] 术语“调控元件”指控制核酸序列表达的某些方面的遗传元件。例如,启动子是一种调控元件,其有助于起始可操作连接编码区的转录。其他调控元件包括剪接信号、多腺苷酸化信号、终止信号等。在核酸序列或多核苷酸中发现一个或多个调控元件的区域可称为“调控区”。

[0085] 术语“片段”,适用于多肽,将被理解为相对于参考多肽或氨基酸序列,长度减少的氨基酸序列,并且包括、基本上由和/或由与参考多肽或氨基酸序列相同的连续氨基酸的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,此类片段可包括、基本上由和/或由具有根据本发明的多肽或氨基酸序列的至少约4、6、8、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200个或更多个连续氨基酸的长度的肽组成。在一些实施方案中,此类片段可包括、基本上由和/或由根据本发明的多肽或氨基酸序列的小于约4、6、8、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450或500个连续氨基酸的长度的肽组成。

[0086] 如本文所用,“功能片段”是基本上保留通常与该多肽相关的至少一种生物活性(例如,抗体结合)的一个片段。在“功能片段”中基本上保留了未修饰多肽所具有的所有活性。所谓“基本上保留”生物活性,是指多肽保留至少约20%、30%、40%、50%、60%、75%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或更多天然多肽的生物活性(甚至可以具有比天然多肽更高的活性水平)。“非功能”多肽是表现出很少或基本上没有通常与该多肽相关的可检测的生物活性的一种多肽(例如,最多只有微不足道的量,例如,少于约10%或甚至5%)。诸如抗体结合的生物活性可以使用本领域众所周知的测定法来测量,如本文所述。

[0087] 如本文关于核酸所用,术语“可操作地连接的”是指两个或更多个核酸之间的功能连接。例如,启动子序列可以被描述为与异源核酸序列“可操作地连接”,因为启动子序列起始和/或介导异源核酸序列的转录。在一些实施方案中,上述可操作连接的核酸序列是连续的和/或在同一阅读框中。

[0088] 如本文所用的术语“开放阅读框(ORF)”是指编码多肽的多核苷酸(例如基因)的部分,并且包括起始多肽转录的起始开端位点(即,Kozak序列)。术语“编码区”可与开放阅读

框互换使用。

[0089] 如本文所用的术语“密码子优化的”是指通过用相同(同义)氨基酸的密码子取代通常存在于编码序列(例如,在野生型序列中,包括例如蛋白M的编码序列)中的一个或多个密码子来优化以增加表达的基因编码序列。以这种方式,由基因编码的蛋白质是相同的,但是基因或相应mRNA的潜在核碱基序列是不同的。在一些实施方案中,优化是用更频繁出现的同义密码子取代一个或多个稀有密码子(即,在特定物种的细胞中相对不频繁出现的tRNA的密码子)以提高翻译效率。例如,在人类密码子优化中,编码序列中的一个或多个密码子被相同氨基酸在人类细胞中更频繁出现的密码子所替代。密码子优化也可以通过可以提高转录和/或翻译效率的其他机制来增加基因表达。策略包括,但不限于,增加总GC含量(即,鸟嘌呤和胞嘧啶在整个编码序列中的百分比),减少CpG含量(即,CG或GC二核苷酸在编码序列中的数量),去除隐蔽剪接供体或受体位点,和/或添加或去除核糖体进入和/或起始位点,如Kozak序列。理想地,密码子优化的基因表现出改善的蛋白质表达,例如,与野生型基因在其他类似细胞中提供的蛋白质表达水平相比,由此编码的蛋白质在细胞中以可检测到的更高水平表达。密码子优化还提供了在体外或体内区分密码子优化的基因和/或相应mRNA与内源性基因和/或相应mRNA的能力。

[0090] 如本文使用的术语“序列”具有本领域的标准含义。如本领域已知的,许多不同的程序可用于鉴定多核苷酸或多肽是否与已知序列具有序列同一性或相似性。序列同一性或相似性可以使用本领域已知的标准技术来测定,包括但不限于Smith&Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981) 的局部序列同一性算法,通过Needleman&Wunsch, I Mol. Biol. 48:443 (1970) 的序列同一性比对算法,通过Pearson&Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) 的相似性搜索方法,通过这些算法(威斯康星遗传学软件包,遗传学计算机组,575 Science Drive, Madison, WI 中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)的计算机化实现工具,由Devereux等人, Nucl. Acid Res. 12:387 (1984) 描述的最佳Fit序列程序,优选地使用默认设置或通过检查。

[0091] 有用算法的实例是PILEUP。PILEUP使用渐进的、配对比对从相关序列组创建多序列比对。它还可以绘制显示用于创建比对的聚类关系的树。PILEUP使用了J. Mol. Evol. 35:351 (1987) 的渐进比对方法的简化;该方法与Higgins&Sharp, CABIOS 5:151 (1989) 描述的方法类似。

[0092] 有用算法的另一实例是BLAST算法,在Altschul等人, J. Mol. Biol. 215:403 (1990) 和Karlin等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873 (1993) 中描述。一个特别有用的BLAST程序是WU-BLAST-2程序,该程序从Altschul等人, Meth. Enzymol., 266:460 (1996); blast.wustl.edu/blast/README.html 获得。WU-BLAST-2使用若干个搜索参数,这些参数优选地设置为默认值。上述参数是动态的值,由程序本身根据特定序列的组成和正在搜索感兴趣的序列的特定数据库的组成来确定;然而,也可以调整这些值以增加灵敏度。

[0093] 额外有用的算法是间隙BLAST,如Altschul等人, Nucleic Acids Res. 25:3389 (1997) 所报道的。

[0094] 氨基酸序列同一性百分比值由匹配的相同残基数除以比对区域(对齐区域)中“较长”序列的残基总数而测定。“较长”序列是在比对区域中具有最多实际残基(忽略WU-Blast-2为最大化比对分数而引入的间隙)的序列。

[0095] 以类似方式,核酸序列同一性百分比被定义为候选序列中与本文具体公开的多核苷酸中的核苷酸相同的核苷酸残基的百分比。

[0096] 比对可能包括在要比对的序列中引入间隙。此外,对于含有比本文具体公开的多核苷酸更多或更少核苷酸的序列,应理解,在一个实施方案中,将基于与核苷酸总数相关的相同核苷酸的数量来测定序列同一性的百分比。因此,例如,在一个实施方案中,比本文具体公开的序列更短的序列的序列同一性将使用更短序列中的核苷酸数目来测定。在同一性百分比计算中,相对权重没有分配给序列变异的各种表现形式,例如插入、缺失、取代等。

[0097] 在一个实施方案中,只有同一性被评分为正(+1),包括间隙的所有形式的序列变化都被赋值为“0”,这就避免了如下所述的序列相似性计算的加权尺度或参数的需要。例如,可以通过将匹配的相同残基的数量除以比对区域中“较短”序列的残基总数并乘以100来计算序列同一性百分比。“较长”序列是在比对区域中具有最多实际残基的序列。

[0098] 如本文所用,“分离的”核酸或核苷酸序列(例如,“分离的DNA”或“分离的RNA”)是指从天然存在的生物体或病毒的至少一些其他组分分离或基本上不含天然存在的生物体或病毒的至少一些其他组分的核酸或核苷酸序列,例如,通常发现与该核酸或核苷酸序列相关的细胞或病毒结构组分或其他多肽或核酸。

[0099] 同样,“分离的”多肽是指从天然存在的生物体或病毒的至少一些其他组分中分离或基本上不含天然存在的生物体或病毒的至少一些其他组分的多肽,例如,通常发现与该多肽相关的细胞或病毒结构组分或其他多肽或核酸。

[0100] 如本文所用,术语“修饰的”,适用于多核苷酸或多肽序列,是指由于一个或多个缺失、添加、取代或其任何组合而不同于野生型序列的序列。

[0101] 如本文所用,“分离”(或语法同等成分)病毒载体,它意为病毒载体至少部分地从原料中的至少一些其他组分分离。

[0102] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”或“……的治疗(treatment of)”(或语法同等成分)是指减轻或至少部分改善或缓解受试者病症的严重程度和/或减轻、缓解或减少至少一种临床症状和/或推迟病症的进展。

[0103] 如本文所用,术语“预防(prevent)”、“预防(prevents)”或“预防(prevention)”(及其语法同等成分)是指推迟或抑制疾病的发作。这些术语并不意味着要求完全消除疾病,而是涵盖任何类型的预防性治疗,以减少病症的发生率或推迟病症的发作。

[0104] 本文所用的“治疗有效”量是足以给受试者提供一些改善或益处的量。换言之,“治疗有效”量是对受试者的至少一种临床症状提供某种减轻、缓解、减少或稳定的量。本领域技术人员将会理解,治疗效果不必是完全的或可治愈的,只要给受试者提供一些益处即可。

[0105] 本文所用的“预防有效”量是相对于在没有本发明方法的情况下会发生的情况而言,足以预防和/或推迟受试者的疾病、疾患和/或临床症状的发作和/或减少和/或推迟受试者的疾病、疾患和/或临床症状的发作的严重程度的量。本领域技术人员将理解,预防水平不必是完全的,只要向受试者提供一些益处即可。

[0106] 相对于病毒,“异源核苷酸序列”或“异源核酸”分别是病毒中非天然存在的序列或核酸。通常,异源核酸或核苷酸序列包含编码多肽和/或非翻译RNA的开放阅读框。

[0107] “载体”是指用作运载工具将外源遗传物质携带到另一细胞中的化合物,在所述另一细胞中所述外源遗传物质可以被复制和/或表达。含有外源核酸的克隆载体称为重组载

体。核酸载体的实例为质粒、病毒载体、黏粒、表达盒和人工染色体。重组载体通常含有复制起点、多克隆位点和选择性标志物。核酸序列通常由插入物(重组核酸或转基因)和充当载体“骨架”的较大序列组成。将遗传信息转移到另一细胞的载体的目的通常是分离、增殖或表达靶细胞中的插入物。表达载体(表达构建体或表达盒)用于外源基因在靶细胞中的表达,并通常具有驱动外源基因/ORF表达的启动子序列。将载体插入靶细胞是指细菌和真核细胞的转化或转染,尽管插入病毒载体通常称为转导。术语“载体”也可以一般地用于描述用于将外源遗传物质携带到另一细胞中的物质,例如但不限于转化的细胞或纳米颗粒。

[0108] 如本文所用,在特定实施方案中,术语“载体”、“病毒载体”、“递送载体”(和类似术语)通常是指起核酸递送载体作用的病毒颗粒,并且其包括包装在病毒粒子内的病毒核酸(即载体基因组)。根据本发明的病毒载体包括根据本发明的嵌合AAV衣壳,并且能够包装AAV或rAAV基因组或任何其他包括病毒核酸的核酸。可替换地,在一些上下文中,术语“载体”、“病毒载体”、“递送载体”(和类似术语)可用于指在病毒粒子不存在的情况下的载体基因组(例如,vDNA)和/或指充当转运蛋白以递送拴系至衣壳或包装在衣壳内的分子的病毒衣壳。

[0109] 本发明的病毒载体还可以是国际专利公开W0 01/92551(其公开内容通过引用整体并入本文)中所述的双链体细小病毒颗粒(duplexed parvovirus particles)。因此,在一些实施方案中,双链(双链体)基因组能够被包装。

[0110] “重组AAV载体基因组”或“rAAV基因组”是AAV基因组(即,vDNA),其包含至少一个反向末端重复(例如,一个、两个或三个反向末端重复)和一个或多个异源核苷酸序列。rAAV载体通常在顺式结构中保留145个碱基末端重复(TR(s))以产生病毒;然而,包括部分或完全合成序列的修饰AAV-TRs和非AAV-TRs也可用于此目的。所有其他病毒序列都是不重要的,并可以以反式提供(Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97)。rAAV载体任选地包含两个TRs(例如,AAV TRs),它们通常位于异源核苷酸序列的5'和3'端,但不需要与之相邻。TRs可以相同,也可以不同。载体基因组也可以在其3'或5'端包含单一ITR。

[0111] 术语“末端重复”或“TR”包括形成发夹结构并作为反向末端重复(ITR)起作用的任何病毒末端重复或合成序列(即,介导所需功能,例如复制、病毒包装、整合和/或原病毒拯救等)。TR可以是AAV ITR或非AAV TR。例如,非AAV TR序列,例如其他细小病毒中的那些(例如犬细小病毒(CPV)、小鼠细小病毒(MVM)、人类细小病毒B-19)或作为SV40复制来源的SV40发夹,可以用作TR,其可以通过截短、取代、缺失、插入和/或添加来进一步修改。此外,TR可以部分或完全合成,例如Samulski等人的美国专利号5,478,745中所述的“双D序列”。

[0112] 细小病毒基因组的5'端和3'端都有回文序列。序列的回文本质导致发夹结构的形成,发夹结构通过互补碱基对之间氢键的形成而稳定。这种发夹式结构被认为采用“Y”形或“T”形。参见,例如FIELDS等人,VIROLOGY,第2卷,第69和70章(第4版,Lippincott-Raven Publishers)。

[0113] “AAV反向末端重复”或“AAV ITR”可以来自任何AAV,包括但不限于血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11或任何其他现在已知或以后发现的AAV(参见,例如,表1)。AAV ITR序列不必具有天然ITR序列(例如,天然AAV ITR序列可通过插入、缺失、截短和/或错义突变而改变),只要ITR介导需要的功能,例如复制、病毒包装、整合和/或原病毒拯救等。

[0114] 术语“rAAV颗粒”和“rAAV病毒粒子”在此可互换使用。“rAAV颗粒”或“rAAV病毒粒

子”包括包装在AAV衣壳内的rAAV载体基因组。

[0115] 本发明的病毒载体还可以是如国际专利公开W0 00/28004和Chao等人, (2000) Mol. Therapy 2:619中所述的“靶向”病毒载体 (例如, 具有定向嗜性) 和/或“杂交”病毒 (即, 其中病毒ITRs和病毒衣壳来自不同的细小病毒)。

[0116] 此外, 病毒衣壳或基因组元件可以包含其他修饰, 包括插入、缺失和/或取代。

[0117] 如本文所用, 术语“氨基酸”涵盖任何天然存在的氨基酸、其修饰形式和合成氨基酸, 包括非天然存在的氨基酸。

[0118] 天然存在的、左旋的 (L-) 氨基酸如表2所示。

[0119] 表2

[0120]

氨基酸残基	缩写	
	三字母代码	单字母代码
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸(Aspartic acid/Aspartate)	Asp	D
半胱氨酸	Cy s	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸(Glutamic acid/Glutamate)	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

[0121] 可替换地, 氨基酸可以是修饰的氨基酸残基 (非限制性

[0122] 实例显示在表3中) 或可以通过翻译后修饰 (例如, 乙酰化、酰胺化、甲酰化、羟基化、甲基化、磷酸化或硫酸化) 修饰的氨基酸。

[0123] 表3: 氨基酸残基衍生物

[0124]

修饰的氨基酸残基	缩写
2-氨基己二酸	Aad
3-氨基己二酸	bAad
β -丙氨酸、 β -氨基丙酸	bAla
2-氨基丁酸	Abu
4-氨基丁酸、哌啶酸	4Abu
6-氨基己酸	Acp
2-氨基庚酸	Ahe
2-氨基异丁酸	Aib
3-氨基异丁酸	bAib
2-氨基庚二酸	Apm
叔丁基丙氨酸	t-BuA
瓜氨酸	Cit
环己基丙氨酸	Cha
2,4-二氨基丁酸	Dbu
锁链素	Des
2,2'-二氨基庚二酸	Dpm
2,3-二氨基丙酸	Dpr
N-乙基甘氨酸	EtGly
N-乙基天冬酰胺	EtAsn
高精氨酸	hArg
高半胱氨酸	hCys
高丝氨酸	hSer
羟赖氨酸	Hyl
别羟赖氨酸	aHyl
3-羟脯氨酸	3Hyp
4-羟脯氨酸	4Hyp
异锁链素	Ide
别异亮氨酸	alle
甲硫氨酸亚砷	MSO
N-甲基甘氨酸、肌氨酸	Me Gly
N-甲基异亮氨酸	MeIle
6-N-甲基赖氨酸	MeLys
N-甲基缬氨酸	Me Val
2-萘丙氨酸	2-Nal
正缬氨酸	Nva
正亮氨酸	Nle
鸟氨酸	Orn
4-氯苯丙氨酸	Phe(4-Cl)
2-氟苯丙氨酸	Phe(2-F)
3-氟苯丙氨酸	Phe(3-F)
4-氟苯丙氨酸	Phe(4-F)
苯基甘氨酸	Phg
β -2-噻吩基丙氨酸	Thi

[0125] 此外,非天然存在的氨基酸可以是“非天然的”氨基酸

[0126] ,如Wang等人,(2006)Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.35:225-49所描述的。这

些非天然氨基酸可有利地用于将感兴趣的分子化学连接到AAV衣壳蛋白上。

[0127] 保守氨基酸取代是本领域已知的。在特定的实施方案中,保守氨基酸取代包括一个或多个以下组中的取代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸;天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;和/或苯丙氨酸、酪氨酸。

[0128] 术语“模板”或“底物”在本文中用于指可被复制以产生细小病毒DNA的多核苷酸序列。为了载体生产的目的,模板通常被包埋在更大的核苷酸序列或构建体中,包括但不限于质粒、裸DNA载体、细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)或病毒载体(例如,腺病毒、疱疹病毒、EB病毒(Epstein-Barr Virus)、AAV、杆状病毒、逆转录病毒载体等)。可替换地,模板可以稳定地掺入到包装细胞的染色体中。

[0129] 如本文所用,细小病毒或AAV“Rep编码序列”指编码介导病毒复制和新病毒颗粒产生的细小病毒或AAV非结构蛋白的核酸序列。细小病毒和AAV复制基因和蛋白质已在例如FIELDS等人,VIROLOGY,第2卷,第69和70章(第4版,Lippincott-Raven Publishers)中被描述。

[0130] 上述“Rep编码序列”不需要编码所有的细小病毒或AAV Rep蛋白。例如,关于AAV,Rep编码序列不需要编码所有四种AAV Rep蛋白(Rep78、Rep68、Rep52和Rep40),事实上,据信AAV5仅表达剪接的Rep 68和Rep40蛋白。在代表性实施方案中,Rep编码序列至少编码病毒基因组复制和包装成新病毒粒子所必需的那些复制蛋白。Rep编码序列通常编码至少一种大Rep蛋白(即,Rep78/68)和一种小Rep蛋白(即,Rep52/40)。在特定的实施方案中,Rep编码序列编码AAV Rep78蛋白和AAV Rep52和/或Rep40蛋白。在其他实施方案中,Rep编码序列编码Rep68和Rep52和/或Rep40蛋白。在又另一实施方案中,Rep编码序列编码Rep68和Rep52蛋白、Rep68和Rep40蛋白、Rep78和Rep52蛋白或Rep78和Rep40蛋白。

[0131] 如本文所用,术语“大Rep蛋白”是指Rep68和/或Rep78。本要求保护的发明的大Rep蛋白可以是野生型的或合成的。野生型大Rep蛋白可以来自任何细小病毒或AAV,包括但不限于血清型1、2、3a、3b、4、5、6、7、8、9、10、11或13,或任何其他现在已知或以后发现的AAV(参见,例如,表1)。合成的大Rep蛋白可以通过插入、缺失、截短和/或错义突变而改变。

[0132] 本领域技术人员将进一步理解,复制蛋白不必由相同的多核苷酸编码。例如,对于MVM,NS-1和NS-2蛋白(它们是剪接变体)可以彼此独立地表达。同样,对于AAV,p19启动子可以失活,并且一种或多种大Rep蛋白由一种多核苷酸表达并且一种或多种小Rep蛋白由不同的多核苷酸表达。然而,通常由单一构建体表达复制蛋白会更容易达到。在一些系统中,病毒启动子(例如,AAV p19启动子)可能不被细胞识别,因此有必要由单独的表达盒表达大和小Rep蛋白。在其他情况下,可能需要单独表达大Rep和小Rep蛋白,即在单独的转录和/或翻译控制元件的控制下。例如,可能需要控制大Rep蛋白的表达,以降低大Rep蛋白与小Rep蛋白的比率。在昆虫细胞的情况下,下调大Rep蛋白(例如,Rep78/68)的表达以避免对细胞的毒性可能是有利的(参见,例如,Urabe等人,(2002)Human Gene Therapy13:1935)。

[0133] 如本文所用,细小病毒或AAV“cap编码序列”编码形成功能细小病毒或AAV衣壳的结构蛋白(即,可包装DNA并感染靶细胞)。通常,cap编码序列将编码所有细小病毒或AAV衣壳亚基,但是只要产生功能衣壳,可以编码少于所有的衣壳亚基。通常,但不是必须地,cap编码序列将存在于单一核酸分子上。

[0134] 自主性细小病毒和AAV的衣壳结构更加详细地描述于BERNARD N.FIELDS等人,

VIROLOGY,第2卷,第69和70章(第4版,Lippincott-Raven Publishers)。

[0135] “基本上保留”性质,它意为保留了至少约75%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%的性质(例如,活性或其他可测量的特征)。

[0136] 使用蛋白M及其衍生物结合抗体的方法

[0137] 本发明的一个方面涉及一种通过在向受试者施用异源剂后通过中和抗体来抑制异源剂的中和的方法,包括向受试者施用有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白,从而抑制异源剂的中和。

[0138] 本发明的另一方面涉及在受试者中表达多肽或功能性核酸的方法,包括向受试者施用(a)编码该多肽或功能性核酸的核酸递送载体,以及(b)有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白,从而在受试者中表达该多肽或功能性核酸。

[0139] 本发明的另一方面涉及编辑受试者基因的方法,包括向受试者施用(a)基因编辑复合物,和(b)有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白,从而在受试者中表达多肽或功能性核酸。

[0140] 如本文所用,术语“异源剂”指的是在待施用该剂的受试者中非天然发现的剂。该术语还包括在受试者中天然发现的剂的重组或合成形式。异源剂可以是在施用该异源剂之前在受试者体内存在中和抗体的剂,或者是在施用于受试者后可能立即产生中和抗体的剂。异源剂可能是从未施用于受试者的剂。异源剂可能是之前已经施用于受试者的剂。

[0141] 如本文所用,术语“中和抗体”指特异性结合异源剂并在施用于受试者后抑制异源剂的一种或多种生物活性的抗体。

[0142] 在一些实施方案中,异源剂可以是核酸递送载体,例如,病毒载体或非病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是溶瘤载体。在一些实施方案中,病毒载体是腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒、痘病毒、甲病毒、杆状病毒、痘苗病毒、疱疹病毒、EB病毒、脊髓灰质炎病毒或腺病毒载体。在一些实施方案中,非病毒载体是质粒、脂质体、带电脂质、核酸-蛋白质复合物或生物聚合物。

[0143] 在一些实施方案中,所述异源剂是基因编辑复合物,例如,CRISPR复合物。

[0144] 在一些实施方案中,异源剂是蛋白质或核酸。在一些实施方案中,蛋白质是酶、调控蛋白或结构蛋白,例如可以取代受试者的缺失或有缺陷蛋白质的蛋白质。在一些实施方案中,核酸是功能性核酸,例如,反义核酸或抑制性RNA。

[0145] 蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白的有效量是至少部分阻断中和抗体对异源剂的抑制和/或胜过自身中和抗体结合异源剂的能力的量。在一些实施方案中,蛋白M的有效量是足以将中和抑制至少约50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%的量。在一些实施方案中,蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白的有效量是足以在受试者中产生基于摩尔计约0.5:1至约8:1的蛋白M与总免疫球蛋白的比率的量,或其中的任何范围,例如,约0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1或8:1或其中的任何范围。在其他实施方案中,该比率为约8:1至约50:1。在一些实施方案中,该比率为约0.5:1至约6:1,约0.5:1至约4:1,约0.5:1至约2.5:1,约0.5:1至约2:1,约1:1至约8:1,约

1.5:1至约8:1,或约2:1至约8:1。在一个实施方案中,该比率为约1:1至约3:1,例如,约2:1。

[0146] 在一些实施方案中,施用包含约 $1e9$ vg/kg至约 $1e14$ vg/kg、约 $1e10$ vg/kg至约 $1e13$ vg/kg、或约 $1e1$ lvg/kg至约 $1e12$ vg/kg的AAV、约 1μ l至约6L的血清,以及约1mg/kg至约1000mg/kg、约10mg/kg至约900mg/kg、约25mg/kg至约800mg/kg、约50mg/kg至约600mg/kg、约100mg/kg至约500mg/kg或约200mg/kg至约400mg/kg的蛋白M。

[0147] 总免疫球蛋白可以是总血清免疫球蛋白(例如,用于蛋白M的全身施用)。总免疫球蛋白可以是局部流体或组织中的总水平(例如,用于眼、耳、肺、脑、肌肉、关节等的特异性递送)。总免疫球蛋白可通过本领域已知的任何技术来测量,例如通过使用结合免疫球蛋白Fc区的抗体或通过使用蛋白A或G结合免疫球蛋白对血清进行ELISA。此外,对于小鼠,已知其血清含有5mg/ml至10mg/ml的免疫球蛋白。人体内血清免疫球蛋白的正常范围是8-10mg/ml。对于体内估计,可以使用10mg/ml的高端来计算比率。局部免疫球蛋白含量可基于组织重量(每1kg重量40mL血清),或特定体液中Ig的浓度和如果该器官中的体液体积低于血清(例如,眼、脑脊液)时该器官中的体液体积进行估计。

[0148] 蛋白M可通过发现有效阻断通过中和抗体对异源剂的抑制的任何时间表施用于受试者。在一些实施方案中,在施用异源剂之前,例如在施用异源剂之前至少约1、5、10、15、20、30、40或50分钟或至少约1、2、3、4、5、6、12、18、24、48或72小时,向受试者施用蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白。在一些实施方案中,在施用异源剂的同时,向受试者施用蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白。如本文所用,术语“同时”是指时间上足够接近以产生组合效应(即,同时可以是同时发生的,或者可以是在彼此之前或之后的短时间内发生的两个或更多个事件)。

[0149] 例如,在一些实施方案中,异源剂在施用于受试者之前与蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白组合,在以单一组合物施用之前将两种组分混合在一起。异源剂可以在施用于受试者前至少约1、5、10、15、20、30、40或50分钟或至少约1、2、3、4、5、6、12、18或24小时与蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白组合。在其他实施方案中,蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白以及异源剂以单独的组合物施用。

[0150] 在一些实施方案中,可能需要不止一次地将异源剂和/或蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白施用于受试者,以提供治疗或其他有益效果。蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的M支原体蛋白或其功能片段或衍生物的融合蛋白可施用例如1次、2次、3次、4次或更多次。施用可以相隔数天、数周、数月或数年(例如,从约两天至约10年或更长)。在一些实施方案中,施用减少抗体循环的量,并且减少在约1小时至约3小时内开始。在一些实施方案中,施用减少抗体循环的量,并且减少在约5分钟至约8周、约5分钟至约1小时、约1小时至约2天或约2天至约8周内开始。在一些实施方案中,每次向受试者施用异源剂时,例如以如上所述的相同方式,例如在施用异源剂,之前或同时,向受试者施用蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白。每次施用异源剂时使用蛋白M可以抑制NAb对抗异源剂的作用,这经常在再次施用时是一个问题。在一些实施方案中,每次施用相同的

蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白。在其他实施方案中,每次施用不同的蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白,例如,如下文进一步描述的不同的修饰蛋白M。不受理论的束缚,认为每次施用使用不同的蛋白M衍生物可以限制针对蛋白M的抑制性抗体的作用,该作用可能在再次施用相同蛋白时发生。还认为施用饱和剂量的蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白将胜过任何针对蛋白M的抑制性抗体并防止抗原识别。在一些实施方案中,施用胜过自身中和抗体。

[0151] 蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白非特异性结合抗体的能力可有利地用于其他方法中,其中抑制抗体与抗原结合是有益的,例如,其中需要免疫抑制或存在过量抗体。

[0152] 本发明的另一方面涉及一种治疗有需要的受试者的自身免疫性疾病的方法,包括向受试者施用治疗有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白,从而治疗自身免疫性疾病。

[0153] 本文所用术语“自身免疫性疾病”是指与自身免疫反应相关的任何疾患。实例包括但不限于多发性硬化症、克罗恩病、溃疡性结肠炎、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、炎性肠综合征、肠易激综合征、葡萄膜炎、胰岛素依赖型糖尿病、溶血性贫血(例如,温热自身免疫性溶血性贫血)、风湿热、古德帕斯丘综合征(Goodpasture's syndrome)、格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)、银屑病、甲状腺炎、格雷夫斯病、重症肌无力、肾小球肾炎、自身免疫性肝炎、免疫性血小板减少性紫癜、急性炎性脱髓鞘性多发性神经病、抗体介导的快速进行性肾小球肾炎、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经根神经病、高粘度综合征、复发性局灶节段性肾小球硬化、视神经脊髓炎谱系障碍、冷球蛋白血症、自身免疫性脑炎、自身免疫性神经病、ANCA血管炎、自身免疫性中性粒细胞减少症、抗GBM病、寻常天疱疮、舍格伦综合征、狼疮肾炎和免疫血细胞减少症。

[0154] 本发明的另一方面涉及一种治疗有需要的受试者的与过量抗体相关的疾患的方法,包括向受试者施用治疗有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白,从而治疗与过量抗体相关的疾患。如本文所用术语“与过量抗体相关的疾患,”是指其中所述疾患的原因或至少一种症状是由于血液或身体其他部位中高于平均水平的抗体引起的任何疾患。实例包括但不限于多发性骨髓瘤、意义未明单克隆丙种球蛋白血症(MGUS)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)、细胞因子释放综合征或急性自身免疫攻击如突然发作的严重自身免疫性血管炎。该方法还可用于急性阻断所有抗体,以快速停止诸如细胞因子释放综合征的自身免疫事件或诸如突然发作的严重自身免疫性血管炎的急性自身免疫攻击,或防止由抗体介导的免疫复合物形成引起的移植组织损伤。

[0155] 对于本发明的任何方法,蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的M支原体蛋白或其功能片段或衍生物的融合蛋白可通过任何发现有效的施用途径(例如局部或全身)施用于受试者。

[0156] 最合适的途径将取决于被治疗的受试者和被治疗的疾患或病症。在一些实施方案中,通过选自以下的途径将蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或

其功能片段或衍生物的融合蛋白施用于受试者：口服、直肠、经粘膜、鼻内、吸入（例如，通过气溶胶）、含服（例如，舌下）、阴道、鞘内、眼内、玻璃体内、耳蜗内、经皮、内皮内、子宫内（或卵内）、肠胃外（例如，静脉内、皮下、皮内、颅内、肌肉[包括向骨骼肌、膈肌和/或心肌施用]、胸膜内、脑内和关节内）、局部（例如，向皮肤和粘膜两者表面，包括气道表面，和经皮施用）、淋巴内等，以及直接的组织或器官注射（例如，向肝脏、眼睛、骨骼肌、心肌、膈肌或大脑）。

[0157] 可将蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白递送或靶向到受试者中的任何组织或器官。在一些实施方案中，将蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白施用于，例如，骨骼肌、平滑肌、心脏、膈肌、气道上皮、肝脏、肾脏、脾脏、胰腺、皮肤、肺、耳朵和眼睛。在一些实施方案中，将蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白施用于患病组织或器官，例如肿瘤。

[0158] 在一些实施方案中，异源剂和蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白通过相同途径施用。在其他实施方案中，异源剂和蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白通过不同途径施用，例如静脉内施用蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白，并且将异源剂局部施用于靶组织或器官（例如患病组织或器官）。

[0159] 任何上述方法还可以包括对受试者施用附加治疗，为了降低受试者的抗体浓度或抑制抗体功能。附加治疗可以是本领域已知的任何方法，包括但不限于血浆置换、施用抗体消化酶例如IdeS或IdeZ、施用结合FcRn受体的抗体、施用结合FcRn受体的Fc片段、施用免疫抑制药（例如皮质类固醇（例如泼尼松、布地奈德、泼尼松龙）、詹纳斯激酶抑制剂（例如托法替尼）、钙调磷酸酶抑制剂（例如环孢菌素、他克莫司）、mTOR抑制剂（例如西罗莫司、依维莫司）、IMDH抑制剂（例如硫唑嘌呤、来氟米特、霉酚酸酯）或生物制剂（例如阿巴西普（abatacept）、阿达木单抗、阿那白滞素、赛妥珠单抗、依那西普、戈利木单抗、英夫利昔单抗、伊西贝单抗、那他珠单抗、利妥昔单抗、苏金单抗、托珠单抗、尤特克单抗、维多珠单抗、巴利昔单抗、达利珠单抗），施用结合B细胞上的CD19或CD20并耗竭B细胞的抗体或设计用于抑制或破坏B细胞的其他治疗（例如，脾切除术、化疗、免疫疗法、放射疗法）。附加治疗可在施用蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白之前、期间和/或之后施用。

[0160] 蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量的M支原体蛋白或其功能片段或衍生物的融合蛋白非特异性结合抗体的能力可有利地用于纯化方法中。虽然抗体的纯化通常依赖于与抗体Fc区结合的剂（如蛋白A和蛋白G），但蛋白M与抗体的可变区非特异性结合。因此，蛋白M可用于分离不含Fc区的抗体片段和抗体衍生物（如单链可变片段）以及掺入抗体可变区的其他分子。

[0161] 因此，本发明的一个方面涉及从样品中分离包含抗体轻链可变区和/或重链可变区的化合物的方法，该方法包括将该化合物与附着于固体载体的本发明的修饰的支原体蛋白M或其功能片段或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白接触，然后从修饰的支原体蛋白M或其功能片段或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白中洗脱该化合物。在一些实施方案中，包含抗体轻链可变区和/或重链可

变区的化合物是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,包含抗体轻链可变区和/或重链可变区的化合物是抗体衍生物、免疫球蛋白支架等。由于增加的热稳定性,本发明的修饰的蛋白M或其功能片段或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白优于野生型蛋白M。这使得蛋白M可重复用于多次纯化,并允许使用会破坏野生型蛋白M的稳定性的洗脱条件。

[0162] 该方法可以使用亲和纯化领域众所周知的技术进行。固相载体可以是任何适于亲和色谱或批量纯化的材料。合适的材料包括但不限于琼脂糖、聚丙烯酰胺、葡聚糖、纤维素、多糖、硝化纤维素、二氧化硅、矾土、氧化铝、二氧化钛、氧化钛、氧化锆、苯乙烯、聚偏二氟乙烯尼龙、苯乙烯和二乙烯基苯的共聚物、聚甲基丙烯酸酯、衍生的吡内酯聚合物或共聚物、玻璃或纤维素。在一些实施方案中,固相载体是树脂。在一些实施方案中,固相载体是珠粒或颗粒。在一些实施方案中,固相载体是例如板、小瓶或柱的表面。

[0163] 接触步骤可通过任何合适的方法进行,例如通过使包含化合物的样品在柱中经过修饰的支原体蛋白M或其功能片段或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白,或在容器或板的孔中将包含化合物的组合物与修饰的支原体蛋白M或其功能片段或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白一起孵育。接触步骤可以进行足够长的时间以使化合物与修饰的支原体蛋白M或其功能片段或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白结合。将与修饰的支原体蛋白M或其功能片段或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白与样品中其他组分进行洗涤、离心或其他形式的分离后,从修饰的支原体蛋白M或其功能片段或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白洗脱该化合物。洗脱可以通过本领域已知的任何方法进行,例如改变离子浓度、温度等。在一个实施方案中,通过改变pH进行洗脱。本发明的修饰的支原体蛋白M或其功能片段有利地稳定于比野生型蛋白M更宽的pH范围内。这使得修饰的蛋白M在允许洗脱化合物的较低pH下保持稳定。

[0164] 在一些实施方案中,接触步骤在结合缓冲液(例如,在中性pH下)中进行,洗脱在低pH缓冲液(例如,pH 2-3.5的0.1M甘氨酸或pH 3.5-4.5的0.1M乙酸盐)成为中和缓冲液(例如,pH 8-9的诸如1M磷酸盐或1M Tris的高离子强度碱性缓冲液)下进行。

[0165] 本发明的另一方面涉及修饰的支原体蛋白M或其功能片段或融合蛋白,其包含有效量的附着于如上所述的固相载体的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物。修饰的支原体蛋白M或其功能片段或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白可通过本领域已知的任何方式附着于固相载体,例如共价连接,例如使用接头分子。

[0166] 蛋白M或其功能片段或衍生物或者包含有效量M支原体蛋白或其功能片段或衍生物的融合蛋白非特异性结合抗体的能力可有利地用于任何免疫测定,该免疫测定包括结合抗体或其片段或衍生物或包含有效量M支原体蛋白或其功能片段或衍生物的融合蛋白的步骤。

[0167] 本发明的一个方面涉及进行免疫测定的方法,该方法包括使用本发明的修饰的支原体蛋白M或其功能片段或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白来结合包含抗体轻链可变区和/或重链可变区的化合物。

[0168] 修饰的支原体蛋白M或其功能片段或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白可取代任何通用或特异性抗体结合分子,例如蛋白A、蛋白G或二级抗

体。修饰的支原体蛋白M或其功能片段或者包含有效量的支原体蛋白M或其功能片段或衍生物的融合蛋白可如本领域众所周知的那样进行标记,例如用于放射性、化学发光或酶检测。

[0169] 免疫测定的实例包括但不限于放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)测定、酶免疫测定(EIA)、夹心法测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、凝集测定、免疫荧光测定、荧光激活细胞分选(FACS)测定、免疫组织化学测定、蛋白A免疫测定、蛋白G免疫测定、蛋白L免疫测定、生物素/抗生物素蛋白测定、生物素/链霉亲和素测定、免疫电泳测定、沉淀/絮凝反应、免疫印迹(蛋白质印迹;斑点/狭缝印迹);免疫扩散测定;脂质体免疫测定、化学发光测定、文库筛选、表达阵列、免疫沉淀、竞争性结合测定和免疫组织化学染色。

[0170] 蛋白M及其衍生物

[0171] 本发明方法中使用的蛋白M或其功能片段或衍生物可以来自任何产生与抗体结合的蛋白M的分枝杆菌物种。在一些实施方案中,蛋白M或其功能片段或衍生物来自生殖支原体、肺炎支原体或穿透支原体(穿透支原体, *Mycoplasma penetrans*)。

[0172] 在一些实施方案中,蛋白M或其功能片段或衍生物可以是PCT公开号W0 2014/014897和美国公开号2017/0320921中描述的任何蛋白M序列,其全部内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,蛋白M或其功能片段或衍生物是生殖支原体蛋白M(MG281, SEQ ID NO:1)或其功能片段或衍生物(例如,SEQ ID NO:3所示的片段或其衍生物)。在一些实施方案中,蛋白M或其功能片段或衍生物是肺炎支原体蛋白M(MPN400, SEQ ID NO:23)或其功能片段或衍生物(例如,SEQ ID NO:24所示的片段或其衍生物)。在一些实施方案中,蛋白M或其功能片段或衍生物是穿透支原体蛋白M或其功能片段或衍生物。在一些实施方案中,蛋白M或其功能片段或衍生物是蛋白M片段或该片段的衍生物,例如不含跨膜结构域和/或不含C-末端的片段,例如包括、基本上由或由生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的约氨基酸残基17-537、37-556、37-482、37-468、37-442、74-468、74-479、74-482、74-468、74-442或74-556组成的功能片段或来自其他蛋白M的等效残基。术语“约”,适用于每个所列片段末端,是指末端残基中的一个或两个可以有小范围的变化,例如通过在所述残基的任一侧上约5、4、3或2个氨基酸。本领域技术人员可以通过在生殖支原体蛋白M和其他蛋白M之间执行序列比对能够容易地确定另一蛋白M的等效残基。例如,图27显示了野生型生殖支原体蛋白M氨基酸74-479(SEQ ID NO:3)和肺炎支原体蛋白M的等效片段(SEQ ID NO:24)的序列比对。在一些实施方案中,蛋白M或其功能片段或衍生物包括、基本上由或由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成,其为蛋白M(SEQ ID NO:1)的氨基酸残基37-556)的可溶形式,具有N-末端6-His标签,其后是凝血酶切割位点。

[0173] 如本文所用,术语“衍生物”用于指通过对天然存在的多肽进行较小的修饰而不同于天然存在的蛋白M或蛋白M功能片段的多肽,但其显著保留了蛋白M的生物活性。较小的修饰包括但不限于一个或几个氨基酸侧链的改变,一个或几个氨基酸的改变(包括缺失、插入和/或取代),一个或几个原子(例如,D-氨基酸)的立体化学变化,以及少量衍生化,包括但不限于甲基化、糖基化、磷酸化、乙酰化、豆蔻酰化、异戊二烯化、棕榈酸化、酰胺化和糖基磷脂酰肌醇的添加。如本文所用的术语“基本上保留”是指多肽的片段、衍生物或其他变体保留了天然存在的多肽的至少约20%的活性(例如,抗体结合),例如,约30%、40%、50%或更多。在一些实施方案中,蛋白M或蛋白M功能片段的衍生物包含20个或更少氨基酸残基的突变(任何组合的缺失、插入和/或取代),例如,20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、

6、5、4、3或2个或更少突变。在一些实施方案中,蛋白M衍生物包括与肺炎支原体蛋白M的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列或另一支原体蛋白M或其功能片段的野生型序列至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%相同的氨基酸序列。

[0174] 在一些实施方案中,可通过在氨基末端和/或羧基末端添加阻断剂来修饰蛋白M或其功能片段或衍生物以用于体内使用,从而促进相关多肽在体内的存活。这在肽末端易于被蛋白酶降解的情况下是有用的。这种阻断剂可以包括但不限于附加的相关或不相关的肽序列,其可以附着于待施用的蛋白质的氨基和/或羧基末端残基。这可以通过蛋白质合成过程中的化学方法或普通技术人员熟悉的重组DNA技术来完成。可替换地,阻断剂如焦谷氨酸或本领域已知的其他分子可以附着于氨基和/或羧基末端残基,或者氨基末端的氨基或羧基末端的羧基能够用不同的部分替代。同样,在施用前,蛋白质可以共价或非共价偶联到药学上可接受的“载体”蛋白质上。

[0175] 在本发明的一方面,蛋白M衍生物是修饰的支原体蛋白M或其功能片段,包括增加或至少维持蛋白M热稳定性的突变。这些修饰的蛋白M衍生物在体内方法和需要高温(例如,约37°C)的其他方法中具有增加的适用性,在所述高温下野生型蛋白M可能变性。

[0176] 在一些实施方案中,蛋白M衍生物是修饰的支原体蛋白M或其功能片段,具有一个或一个以上氨基酸突变,所述突变相对于野生型支原体蛋白M或其功能片段增加或维持支原体蛋白M或其功能片段的热稳定性。在一些实施方案中,修饰的蛋白M或其功能片段具有比野生型蛋白M或其功能片段的解链温度(T_m)增加至少0.5°C的解链温度(T_m),例如,0.5°C、1.0°C、1.5°C、2.0°C、2.5°C、3.0°C、3.5°C、4.0°C、4.5°C、5.0°C、5.5°C、6.0°C、6.5°C、7.0°C、7.5°C、8.0°C、8.5°C、9.0°C、9.5°C、10.0°C、11.0°C、12.0°C、13.0°C、14.0°C、15.0°C、16.0°C、17.0°C、18.0°C、19.0°C、20.0°C、25.0°C、30.0°C或更高。在一些实施方案中,修饰的蛋白M或其功能片段具有相对于野生型蛋白M或其功能片段的 T_m 保持不变(即,在0.5°C以内)的 T_m 。 T_m 可以通过差示扫描荧光镜透视检查或任何其他合适的技术来测量。野生型生殖支原体蛋白M的 T_m 约为41.9°C,野生型肺炎支原体蛋白M的 T_m 约为44.1°C。

[0177] 在一些实施方案中,修饰的支原体蛋白M或其功能片段可具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个或更多的突变。在一些实施方案中,修饰的支原体蛋白M或其功能片段可具有20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或更少的突变。

[0178] 在一些实施方案中,修饰的支原体蛋白M或其功能片段源自生殖支原体、肺炎支原体或穿透支原体的蛋白M。

[0179] 在一些实施方案中,修饰的支原体蛋白M或其功能片段是生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:3)的约残基74(例如,69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79)至约残基479(例如,残基474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484)的或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:24)的等效残基的片段。

[0180] 在一些实施方案中,一个或多个突变位于已知实现热稳定性的蛋白M部分。在一些实施方案中,一个或多个突变不位于已知在蛋白M的生物活性中具有其他作用的蛋白M的蛋白质中。在一个实施方案中,一个或多个突变不位于生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的蛋白M的抗体结合位点5Å内的残基处(即,残基95、99、102、103、105、106、107、109、110、114、

116、117、118、119、120、144、158、160、161、162、163、177、178、179、180、181、186、187、188、191、321、338、340、341、345、381、384、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、426、427、429、436、438、439、440、441、442、444、445、446、447、448、449、452、453、455、456、457、462、466))或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基处。在一个实施方案中,一个或多个突变不位于肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的蛋白M的抗体结合位点5Å内的残基处(即,残基100、104、107、108、110、111、112、114、115、119、121、122、123、124、125、149、163、165、166、167、168、182、183、184、185、186、192、193、196、337、338、354、356、357、399、402、404、405、406、407、408、409、410、411、412、442、443、445、454、455、456、457、458、460、461、462、463、464、465、468、469、472、473、478)。在一个实施方案中,一个或多个突变不位于生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的残基469-479中的任何残基处或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基处。

[0181] 本发明者已经使用计算机分析(computational analysis)来识别蛋白M中的残基,这些残基被预测在突变时会增加或维持蛋白质的T_m。因此,在一些实施方案中,一个或多个突变位于生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的残基78、81、83、84、85、89、90、91、92、93、94、96、97、100、101、108、111、112、113、122、123、125、126、127、128、130、131、133、134、136、137、139、141、142、146、147、148、149、150、153、154、155、156、164、167、170、175、176、184、185、189、192、193、196、198、201、202、204、205、206、207、209、211、215、218、220、224、225、226、227、231、232、234、235、236、237、239、241、243、244、245、246、247、249、250、252、253、254、255、256、257、258、259、264、269、270、272、274、275、276、279、282、284、286、287、288、291、297、299、300、302、303、304、305、307、308、309、310、311、313、317、318、319、320、322、326、327、329、331、332、333、335、337、342、343、347、348、351、354、355、357、358、359、360、361、362、363、367、369、370、371、372、373、374、375、378、385、399、400、401、402、405、406、407、408、409、411、413、414、417、418、419、424、428、434、435、443、450、459、460、463、464、465、468或其任何组合或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基处。在一些实施方案中,一个或多个突变是表4中列出的突变或其任何组合。在一些实施方案中,一个或多个突变位于肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的残基83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、101、102、103、105、106、109、113、116、117、118、120、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、164、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、187、188、189、190、191、194、195、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、355、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、

377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、400、401、403、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、444、446、447、448、449、450、451、452、453、459、466、467、470、471、474、475、476、477、479、480、481、482、483、484或其任何组合处。

[0182] 在一些实施方案中,一个或多个突变位于生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的残基83、90、92、94、137、142、147、150、156、184、196、198、205、211、215、225、231、232、234、235、236、237、239、243、245、250、255、256、259、264、272、274、275、276、279、282、297、300、302、310、320、326、331、332、335、342、343、347、348、355、357、361、371、374、378、385、401、402、409、413、424、460、463、464、468或其任何组合或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基处。在一些实施方案中,一个或多个突变是表5中列出的突变或其任何组合。

[0183] 本发明者单独或结合提高热稳定性(稳定突变)或至少保持热稳定性(中性突变)的高成功率,从预测的残基列表制备并测试了许多突变。参见图23,其显示79%的测试点突变是稳定的或中性的。数据进一步显示增加T_m的点突变的组合倾向于产生具有甚至更高T_m的修饰蛋白M(参见图15A)。

[0184] 因此,在一些实施方案中,一个或多个突变位于已被证明单独或与其他突变组合增加T_m的残基,例如,其中一个或多个突变位于生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的残基150、196、198、201、205、224、232、237、274、282、342、355、373、400、402、407、409、413、135或其任何组合或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基处。

[0185] 在一些实施方案中,一个或多个突变位于从以下残基或残基组合中选择的残基:生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的

[0186] a) 237 (MG1) ;

[0187] b) 232 (MG8) ;

[0188] c) 282 (MG13) ;

[0189] d) 150, 196, 198, 400, 402, 407, 409 (MG15) ;

[0190] e) 413, 435 (MG21) ;

[0191] f) 373, 400 (MG22) ;

[0192] g) 402, 407, 409, 413 (MG23) ;

[0193] h) 342 (MG24) ;

[0194] i) 150, 196, 198, 232, 237, 282, 342, 373, 400, 402, 407, 409, 413, 435 (MG27) ;

[0195] j) 274 (MG28) ;

[0196] k) 150, 196, 198, 232, 237, 342, 400, 402, 407, 409 (MG29) ;

[0197] l) 373, 413, 435 (MG31)

[0198] m) 205 (MG33) ;

[0199] n) 355 (MG38, MG40) ;

[0200] o) 150, 196, 198, 342, 373, 400, 402, 407, 409 (MG43) ;

[0201] p) 150, 196, 198, 232, 237, 342, 373, 400, 402, 407, 409 (MG44) ;

[0202] q) 201, 224 (MG45) ;

[0203] r) 150, 196, 198, 201, 224, 232, 237, 342, 400, 402, 407, 409 (MG46) ;

- [0204] s) 150, 196, 198, 232, 237, 342, 390, 400, 402, 407, 409, 444 (MG47) ;
- [0205] t) 150, 196, 198, 201, 205, 224, 232, 237, 274, 342, 355, 400, 402, 407, 409 (MG48) ;
- 或
- [0206] u) 150, 196, 198, 232, 237, 342, 391, 400, 402, 407, 409 (MG49)
- [0207] 或肺炎支原体蛋白M (SEQ ID NO:23) 的等效残基处。
- [0208] 一个或多个突变选自:生殖支原体蛋白M (SEQ ID NO:1) 的
- [0209] a) F237T (MG1) ;
- [0210] b) S232Q (MG8) ;
- [0211] c) Q282D (MG13) ;
- [0212] d) S150E, S196R, S198P, V400I, N402I, K407P, S409V (MG15) ;
- [0213] e) L413I, T435I (MG21) ;
- [0214] f) V373I, V400I (MG22) ;
- [0215] g) N402L, K407P, S409V, L413I (MG23) ;
- [0216] h) A342V (MG24) ;
- [0217] i) S150E, S196R, S198P, S232Q, F237T, Q282D, A342V, V373I, V400I, N402I, K407P, S409V, L413I, T435I (MG27) ;
- [0218] j) N274D (MG28) ;
- [0219] k) S150E, S196R, S198P, S232Q, F237T, A342V, V400I, N402I, K407P, S409V (MG29) ;
- [0220] l) V373I, L413I, T435I (MG31)
- [0221] m) A205P (MG33) ;
- [0222] n) T355D (MG38) ;
- [0223] o) T355P (MG40) ;
- [0224] p) S150E, S196R, S198P, A342V, V373I, V400I, N402I, K407P, S409V (MG43) ;
- [0225] q) 150, 196, 198, 232, 237, 342, 373, 400, 402, 407, 409 (MG44) ;
- [0226] r) S201C, A224C (MG45) ;
- [0227] s) S150E, S196R, S198P, S201C, A224C, S232Q, F237T, A342V, V400I, N402I, K407P, S409V (MG46)
- [0228] t) S150E, S196R, S198P, S232Q, F237T, A342V, F390E, V400I, N402I, K407P, S409V, Y444K (MG47) ;
- [0229] u) S150E, S196R, S198P, S201C, A205P, A224C, S232Q, F237T, N274D, A342V, T355P, V400I, N402I, K407P, S409V (MG48) ; 或
- [0230] v) S150E, S196R, S198P, S232Q, F237T, A342V, A391P, V400I, N402I, K407P, S409V (MG49)
- [0231] 或肺炎支原体蛋白M (SEQ ID NO:23) 的等效残基。
- [0232] 在一些实施方案中, 一个或多个突变位于已被证明单独或与其他突变组合维持 T_m 的残基处, 例如, 其中一个或多个突变位于生殖支原体蛋白M (SEQ ID NO:1) 的残基147、150、156、225、232、245、272、276、277、279、300、310、355、378、468或其任何组合或肺炎支原体蛋白M (SEQ ID NO:23) 的等效残基处。
- [0233] 在一些实施方案中, 一个或多个突变位于从以下残基或残基组合中选择的残基:

生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的

- [0234] a) 468 (MG2) ;
- [0235] b) 150 (MG4) ;
- [0236] c) 147 (MG5) ;
- [0237] d) 272 (MG10) ;
- [0238] e) 355 (MG12) ;
- [0239] f) 276, 277, 279 (MG17) ;
- [0240] g) 300 (MG18) ;
- [0241] h) 378 (MG20) ;
- [0242] i) 156 (MG32) ;
- [0243] j) 232 (MG34) ;
- [0244] k) 245 (MG35) ;
- [0245] l) 276 (MG36)
- [0246] m) 225 (MG41) ;或
- [0247] n) 310 (MG42)

[0248] 或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基。

[0249] 在一些实施方案中,一个或多个突变选自:生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的

- [0250] a) R468Q (MG2) ;
- [0251] b) S150E (MG4) ;
- [0252] c) H147F (MG5) ;
- [0253] d) S272G (MG10) ;
- [0254] e) T355G (MG12) ;
- [0255] f) S276E、Q277L、N279R (MG17) ;
- [0256] g) N300Q (MG18) ;
- [0257] h) N378Y (MG20) ;
- [0258] i) S156K (MG32) ;
- [0259] j) S232L (MG34) ;
- [0260] k) A245Q (MG35) ;
- [0261] l) S276D (MG36)
- [0262] m) K225P (MG41) ;或
- [0263] n) V310E (MG42)

[0264] 或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基。

[0265] 在一些实施方案中,一个或多个突变选自:肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的

- [0266] a) A77E;
- [0267] b) K125R;
- [0268] c) V165Q;
- [0269] d) H170T;或
- [0270] e) A280V。

[0271] 在一些实施方案中,一个或多个突变选自:生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的

- [0272] a) 159;
- [0273] b) 182;
- [0274] c) 102;
- [0275] d) 161;
- [0276] e) 86;
- [0277] f) 101;
- [0278] g) 147;
- [0279] h) 236;
- [0280] i) 348;
- [0281] j) 424;
- [0282] k) 147;
- [0283] l) 321;
- [0284] m) 389;
- [0285] n) 442;
- [0286] o) 119;
- [0287] p) 179;
- [0288] q) 186;或
- [0289] r) 103
- [0290] 或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基或其任何组合。
- [0291] 在一些实施方案中,一个或多个突变选自:生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的
- [0292] a) Q159C和A182C;
- [0293] b) A102C和T161C;或
- [0294] c) I86C和F101C
- [0295] 或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基或其任何组合,其中a)、b)或c)中的修饰的残基能够在修饰的残基之间形成二硫键。
- [0296] 在一些实施方案中,一个或多个突变选自:生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的
- [0297] a) H147Y;
- [0298] b) H236Y;
- [0299] c) H348Y;
- [0300] d) H424Y;或
- [0301] e) H147Q
- [0302] 或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基或其任何组合,其中突变可在低pH下防止该位点处的组氨酸质子化,从而防止蛋白质不稳定。
- [0303] 在一些实施方案中,一个或多个突变选自:生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的
- [0304] a) N321H;
- [0305] b) Y389H;
- [0306] c) N442H;
- [0307] d) P119H;
- [0308] e) T179H;

[0309] f)G186H;或

[0310] g)N103H

[0311] 或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基或其任何组合,其中突变可增加pH敏感性,从而改善用于抗体纯化的洗脱条件。

[0312] 在一些实施方案中,一个或多个突变位于肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的残基155、203、243、248和358处。

[0313] 在一些实施方案中,一个或多个突变是肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的A155E、K203R、H243T、V248Q和A358V。

[0314] 在一些实施方案中,突变位于生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的残基338(例如Y388N)处。

[0315] 修饰的支原体蛋白M或其功能片段可包含氨基酸序列突变以外的附加修饰。在一些实施方案中,蛋白M序列中的一个或多个糖基化位点被去除,例如1、2或3个糖基化位点。基于NGlycPred服务器的序列和结构分析,在生殖支原体蛋白M中预测了三个N-糖基化位点。这些包括N177、N213和N274。基于NetOGlyc 4.0服务器的结构分析,在生殖支原体蛋白M中预测了两个O-糖基化位点。这些包括T110和T206。合适的突变包括但不限于N177D、T215Y、N274D、S112I和T206Y的任何组合。在一些实施方案中,将一个或多个糖基化位点添加到修饰的支原体蛋白M或其功能片段中。糖基化模式的改变可能增加蛋白质的热稳定性和/或通过阻断抗体识别改变蛋白质的免疫原性。

[0316] 出于表达和纯化的目的,修饰的支原体蛋白M或功能片段可包含分泌肽,例如在N-末端,以使表达的蛋白质可从其表达的细胞中分泌并从培养基中收集。合适的分泌肽包括但不限于用于哺乳动物细胞的人类血清白蛋白、白细胞介素-2、CD5、免疫球蛋白κ轻链、胰蛋白酶原或催乳素,以及用于细菌细胞的Sec或Tat。在将分泌肽用于本发明的方法之前,可以从蛋白M中去除分泌肽,也可以不去除分泌肽。

[0317] 在一些实施方案中,修饰的支原体蛋白M或功能片段可包括一个或多个改变蛋白质的一个或多个生物功能或物理特征的附加突变。在一些实施方案中,修饰的支原体蛋白M或功能片段可包括一个或多个改变蛋白质对抗体亲和力的附加突变。本发明者已经使用计算机分析来识别蛋白M中的残基,这些残基被预测在突变时会增加蛋白质对抗体的亲和力。因此,在一些实施方案中,一个或多个突变位于生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的残基95、102、103、106、107、114、116、160、161、162、163、181、186、321、381、384、389、390、391、396、397、426、429、436、438、439、441、442、447、448、449、452、453、455、456、462或466或其任何组合或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基处。在一些实施方案中,一个或多个突变是表6中列出的突变或其任何组合。在一些实施方案中,一个或多个突变位于肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的残基100、104、107、108、110、111、112、114、115、119、121、122、123、124、125、149、163、165、166、167、168、182、183、184、185、186、192、193、196、337、338、354、356、357、399、402、404、405、406、407、408、409、410、411、412、442、443、445、454、455、456、457、458、460、461、462、463、464、465、468、469、472、473、478或其任何组合处。

[0318] 在一些实施方案中,修饰的支原体蛋白M或功能片段可包括一个或多个通过修饰蛋白质的pH敏感性改变蛋白质对抗体的亲和力的附加突变。本发明者已经使用计算机分析来识别蛋白M中的残基,这些残基被预测通过突变时改变pH敏感性来增加对抗体的亲和力。

由于利用pH变化进行洗脱的能力,这些突变体可能对抗体分离特别有用。因此,在一些实施方案中,一个或多个突变位于生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)残基95、103、116、186、321、389、429、442或466或其任何组合或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基处。在一些实施方案中,一个或多个突变是表7中列出的突变或其任何组合。

[0319] 在一些实施方案中,修饰的支原体蛋白M或功能片段可包括一个或多个降低或消除对抗体亲和力的附加突变。实例包括但不限于生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的残基390和444例如390E和Y444K处的或肺炎支原体蛋白M(SEQ ID NO:23)的等效残基处的突变。

[0320] 在一些实施方案中,修饰的支原体蛋白M或功能片段可包含生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1)的约残基185至约残基342或另一支原体蛋白M的等效残基的缺失。在一些实施方案中,缺失产生新暴露的疏水残基,并且这些新暴露的残基具有一个或多个突变。

[0321] 在本发明的一个方面,融合蛋白包含修饰的支原体蛋白M或其功能片段、接头和肽。在一些实施方案中,融合蛋白具有修饰的支原体蛋白M或其功能片段,其具有一个或多个增强修饰的支原体蛋白M或其功能片段对抗体的亲和力或亲合力的突变。在一些实施方案中,肽是二聚化肽(例如,IL-GCN4、C-IL-GCN4)。在其他实施方案中,肽是Fab结合多肽或Fc结合多肽。在一些实施方案中,Fab结合多肽是蛋白L、蛋白A或蛋白G。在一些实施方案中,Fab结合多肽结合免疫球蛋白的Fc部分和/或减少免疫球蛋白的Fc受体再循环和/或增加融合蛋白与免疫球蛋白的结合。在其他实施方案中,肽包含二聚化肽和蛋白L。在一个实施方案中,融合蛋白从N-末端开始依次包含二聚化肽、第一接头、蛋白L、第二接头和修饰的支原体蛋白M或其功能片段

[0322] 在其他实施方案中,肽是Fc结合多肽,其可以是Fc受体多肽。在一些实施方案中,肽包含Fc结合多肽和蛋白L。在一个实施方案中,融合蛋白从N-末端开始依次包含Fc结合多肽、第一接头、蛋白L、第二接头和修饰的支原体蛋白M或其功能片段。在一些实施方案中,肽是Fc结构域,其可包含用于结合至Fc受体多肽的补体结合残基和/或用于结合至Fc受体多肽的补体结合残基的一个或多个突变。在一些实施方案中,肽是Fc受体蛋白,融合蛋白减少抗体的细胞摄取,减少抗体再循环并通过减少抗体再循环而引起免疫球蛋白耗竭,和/或增加融合蛋白对免疫球蛋白的亲和力。在其他实施方案中,融合蛋白包含两个或多个修饰的支原体蛋白M或其功能片段。在其他实施方案中,融合蛋白包含半衰期延长部分,例如人白蛋白或添加聚乙二醇(PEG),蛋白质修饰,例如酰化、甲基化、磷酸化、硫酸化、法尼基化、泛素化、位点选择性缀合、糖基化、引入PTMs、聚乙二醇化、连接、基于蛋白质的起始物的聚合,或可以改变结合、亲和力、结合靶标的任何修饰,或其任何组合。

[0323] 根据本发明的蛋白M蛋白质通过本领域公知且如本文所述的方法例如重组表达来生产并表征。

[0324] 本发明的另一方面提供了编码本发明的蛋白M或其功能片段或衍生物的分离的多核苷酸,以及用于产生蛋白M或其功能片段或衍生物的表达盒。

[0325] 多核苷酸可操作地连接到调控元件以助于蛋白质的表达。在一些实施方案中,多核苷酸可操作地连接到启动子。启动子可以是细菌启动子(例如,在大肠杆菌中可操作的)或哺乳动物启动子(例如,人类启动子)。

[0326] 在一些实施方案中,多核苷酸可经密码子优化以增强蛋白质在宿主细胞中的表达。在一个实施方案中,多核苷酸是在细菌诸如大肠杆菌中表达而优化的密码子。在另一实

施方案中,多核苷酸经密码子优化以在哺乳动物细胞诸如人类细胞中表达。一个实例是经密码子优化以在人类细胞中表达的SEQ ID NO:26的序列,或与该序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的序列。在另一实施方案中,多核苷酸经密码子优化以在细菌诸如大肠杆菌中和哺乳动物细胞诸如人类细胞两者中表达。一个实例是经密码子优化以在大肠杆菌和人类细胞中都表达的SEQ ID NO:25的序列,或与该序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的序列。

[0327] 本发明的另一方面是包括本发明多核苷酸的载体,例如表达载体。载体可以是本领域已知的任何类型的载体,包括但不限于质粒载体和病毒载体。载体可以是例如细菌载体(例如,大肠杆菌载体)或哺乳动物细胞载体(例如,人类细胞载体)。

[0328] 本发明的另一方面涉及包括本发明的多核苷酸和/或载体的细胞(例如,分离细胞、转化细胞、重组细胞等)。因此,本发明的各个实施方案针对含有载体(例如,表达盒)的重组宿主细胞。这样的细胞可以是分离的细胞。在一些实施方案中,多核苷酸稳定地掺入细胞基因组中。在一些实施方案中,细胞可以是细菌细胞诸如大肠杆菌,或哺乳动物细胞诸如人类细胞。

[0329] 本发明的另一方面涉及包括本发明的修饰的支原体蛋白M或其功能片段、多核苷酸、载体和/或转化细胞的试剂盒。试剂盒可包括用于执行本文所述方法之一的额外试剂。试剂可包括在合适的包装或容器中。额外试剂包括但不限于缓冲液、标签、酶、检测试剂等。

[0330] 当提供试剂盒时,不同的组分可以包装在单独的容器中,并在使用前立即混合。组分的这种单独包装可以允许长期储存而不丧失活性组分的功能。试剂盒也可以与说明材料一起提供。说明可以打印在纸张或其他基底上,和/或作为电子可读媒体提供。

[0331] 异源剂

[0332] 如上文所述,异源剂可以是在施用该异源剂之前在受试者体内存在中和抗体的剂,或者是在施用于受试者后可能立即产生中和抗体的剂。在一些实施方案中,异源剂可以是核酸递送载体(例如,病毒载体或非病毒载体)、基因编辑复合物(例如,CRISPR复合物)、蛋白质或核酸。

[0333] 任何感兴趣的一种或多种核酸序列可以在本发明的核酸递送载体中递送。感兴趣的核酸包括编码多肽的核酸,包括治疗性(例如,用于医学或兽医用途)、免疫原性(例如,用于疫苗)或诊断性多肽。

[0334] 治疗性多肽包括但不限于囊性纤维化跨膜调节蛋白(CFTR),抗肌萎缩蛋白(包括小型(mini-)和微型(micro-)抗肌萎缩蛋白(参见,例如,Vincent等人,(1993) *Nature Genetics* 5:130;美国专利公开号2003/017131;国际公开W0/2008/088895,Wang等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 97:13714-13719(2000);和Gregorevic等人, *Mol.Ther.* 16:657-64(2008)),肌生成抑制蛋白前肽,卵泡抑制素,激活素II型可溶性受体,IGF-1,抗炎多肽诸如I κ B显性突变体,肌长(sarcospan),抗肌萎缩蛋白相关蛋白(Tinsley等人,(1996) *Nature* 384:349),小型肌营养相关蛋白,凝血因子(例如,因子VIII,因子IX,因子X等),红细胞生成素,血管抑制素,内皮抑制素,过氧化氢酶、酪氨酸羟化酶、超氧化物歧化酶、瘦素、LDL受体、脂蛋白脂肪酶、鸟氨酸转氨淀粉酶、 β -珠蛋白、 α -珠蛋白、血影蛋白、 α 1-抗胰蛋白酶、腺苷脱氨酶、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶、 β -葡萄糖脑苷酶、鞘磷脂酶、溶酶体己糖胺酶A、支

链酮酸脱氢酶、RP65蛋白、细胞因子(例如, α -干扰素、 β -干扰素、干扰素- γ 、白细胞介素-2、白细胞介素-4、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、淋巴毒素等),肽生长因子,神经营养因子和激素(例如,生长激素、胰岛素、胰岛素样生长因子1和2、血小板衍生生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经生长因子、神经营养因子-3和-4、脑衍生神经营养因子、骨形态发生蛋白[包括RANKL和VEGF]、胶质衍生生长因子、转化生长因子- α 和- β 等),溶酶体酸 α -葡萄糖苷酶, α -半乳糖苷酶A,受体(例如,肿瘤坏死生长因子 α 可溶性受体),S100A1,小清蛋白,腺苷酸环化酶6型,影响G蛋白偶联受体激酶2型敲除的分子如截短的组成性活性bARKct,抗炎因子如IRAP,抗肌生成抑制蛋白,天冬氨酰化酶和单克隆抗体(包括单链单克隆抗体;示例性的单克隆抗体是Herceptin®单克隆抗体)。其他说明性异源核酸序列编码自杀基因产物(例如,胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、白喉毒素和肿瘤坏死因子),对癌症治疗中使用的药产生耐药性的蛋白质、肿瘤抑制基因产物(例如,p53、Rb、Wt-1)、TRAIL、FAS配体,以及对有需要的受试者具有治疗效果的任何其他多肽。细小病毒载体也可用于递送单克隆抗体和抗体片段,例如,针对肌生成抑制蛋白的抗体或抗体片段(参见,例如,Fang等人, Nature Biotechnol.23:584-590(2005))。

[0335] 例如,编码多肽的核酸序列包括那些编码报道多肽(酶)的核酸序列。本领域已知报道多肽,包括但不限于绿色荧光蛋白、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、荧光素酶和氯霉素乙酰转移酶基因。

[0336] 可替换地,在本发明的特定实施方案中,核酸可编码功能性核酸,即,在不被翻译成蛋白质的情况下发挥功能的核酸,例如反义核酸,核酶(例如,如美国专利号5,877,022所述)、影响剪接体介导的反式剪接的RNA(参见,Puttaraju等人,(1999)Nature Biotech.17:246;美国专利号6,013,487;美国专利号6,083,702),干扰RNA(RNAi)包括介导基因沉默的siRNA、shRNA或miRNA(参见Sharp等人,(2000)Science 287:2431)以及其他非翻译RNA,如“引导”RNA(Gorman等人,(1998)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 95:4929;授予Yuan等人的美国专利号5,869,248)等。示例性非翻译RNA包括针对多药耐药(MDR)基因产物的RNAi(例如,用于治疗/或预防肿瘤和/或用于心脏给药以防止化疗损伤)、针对肌生成抑制蛋白的RNAi(例如,用于Duchenne肌营养不良)、针对VEGF的RNAi(例如,用于治疗/或预防肿瘤),针对受磷蛋白的RNAi(例如,用于治疗心血管疾病,参见,例如,Andino等人,J.Gene Med.10:132-142(2008)和Li等人,Acta Pharmacol Sin.26:51-55(2005));受磷蛋白抑制性或显性-负相分子,如受磷蛋白S16E(例如,用于治疗心血管疾病,参见,例如Hoshijima等人Nat.Med.8:864-871(2002))、腺苷激酶的RNAi(例如,用于癫痫)、肉瘤聚糖的RNAi[例如, α 、 β 、 γ],针对肌生成抑制蛋白、肌生成抑制蛋白前肽、卵泡抑素或激活素II型可溶性受体的RNAi,针对抗炎多肽如I κ B显性突变体的RNAi,和针对致病生物和病毒(例如乙型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒、CMV、单纯疱疹病毒、人乳头瘤病毒等)的RNAi。

[0337] 可替换地,在本发明的特定实施方案中,核酸可编码蛋白磷酸酶抑制剂I(I-1)、serca2a、调节受磷蛋白基因的锌指蛋白、Barkct、 β 2-肾上腺素能受体、 β 2-肾上腺素能受体激酶(BARK)、磷酸肌醇-3-激酶(PI3激酶)、影响G-蛋白偶联受体激酶2型敲除的分子例如截短的组成型活性bARKct;钙调神经磷酸酶(calsarcin),针对受磷蛋白的RNAi;受磷蛋白抑制性或显性-负相分子,例如受磷蛋白S16E、enos、inos或骨形态发生蛋白(包括BNP 2、7等、RANKL和/或VEGF)。

[0338] 核酸递送载体还可包括与宿主染色体上的位点共享同源性并与之重组的核酸。例如,这种方法可用于纠正宿主细胞中的遗传缺陷。

[0339] 本发明还提供表达免疫原性多肽的核酸递送载体,用于疫苗接种。核酸可编码本领域已知的任何感兴趣的免疫原,包括但不限于来自人类免疫缺陷病毒(HIV)、猴免疫缺陷病毒(SIV)、流感病毒、HIV或SIV gag蛋白、肿瘤抗原、癌症抗原、细菌抗原、病毒抗原等的免疫原。

[0340] 本领域已知使用细小病毒作为疫苗载体(参见,例如,Miyamura等人,(1994) Proc.Nat.Acad.Sci USA 91:8507;Young等人的美国专利号5,916,563;Mazzara等人的美国专利号5,905,040,美国专利号5,882,652,Samulski等人的美国专利号5,863,541)。抗原可能存在于细小病毒衣壳中。可替换地,抗原可以从引入重组载体基因组的核酸表达。如本文所述和/或本领域已知的任何感兴趣的免疫原可由核酸递送载体提供。

[0341] 免疫原性多肽可以是适于引发免疫应答和/或保护受试者免受感染和/或疾病的任何多肽,包括但不限于微生物、细菌、原生动物、寄生虫、真菌和/或病毒感染和疾病。例如,免疫原性多肽可以是正粘病毒免疫原(例如,流感病毒免疫原,如流感病毒血凝素(HA)表面蛋白或流感病毒核蛋白,或马流感病毒免疫原)或慢病毒免疫原(例如,马传染性贫血病毒免疫原,猴免疫缺陷病毒(SIV)免疫原,或人类免疫缺陷病毒(HIV)免疫原,如HIV或SIV包膜GP160蛋白,HIV或SIV基质/衣壳蛋白,以及HIV或SIV gag、pol和env基因产物)。免疫原性多肽也可以是沙粒病毒免疫原(例如,拉沙热病毒免疫原诸如拉沙热病毒核衣壳蛋白和拉沙热包膜糖蛋白)、痘病毒免疫原(例如,痘苗病毒免疫原,诸如L1痘苗或L8基因产物)、黄病毒免疫原(例如,黄热病毒免疫原或日本脑炎病毒免疫原)、丝状病毒免疫原(例如,埃博拉病毒免疫原或马尔堡病毒免疫原,诸如NP和GP基因产物)、布尼亚病毒免疫原(例如,RVFPV、CCHF和/或SFS病毒免疫原),或冠状病毒免疫原(例如,传染性人类冠状病毒免疫原,诸如人类冠状病毒包膜糖蛋白,或猪传染性胃肠炎病毒免疫原,或禽传染性支气管炎病毒免疫原)。免疫原性多肽还可以是脊髓灰质炎免疫原、疱疹免疫原(例如,CMV、EBV、HSV免疫原)、腮腺炎免疫原、麻疹免疫原、风疹免疫原、白喉毒素或其他白喉免疫原、百日咳抗原、肝炎(例如,甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎等)免疫原,和/或现有技术中已知或后来确定为免疫原的任何其他疫苗免疫原。

[0342] 可替换地,免疫原性多肽可以是任何肿瘤或癌细胞抗原。任选地,肿瘤或癌抗原在癌细胞表面上表达。S.A.Rosenberg (Immunity 10:281(1991))描述了示例性癌症和肿瘤细胞抗原。其他说明性癌症和肿瘤抗原包括但不限于:BRCA1基因产物、BRCA2基因产物、gp100、酪氨酸酶、GAGE-1/2、BAGE、RAGE、LAGE、NY-ESO-1、CDK-4、 β -联蛋白、MUM-1、半胱氨酸蛋白酶-8、KIAA0205、HPVE、SART-1、PRAME、p15、黑素瘤肿瘤抗原(Kawakami等人,(1994) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:3515;Kawakami等人,(1994) 1.Exp.Med.,180:347;Kawakami等人,(1994) Cancer Res.54:3124)、MART-1、gp100、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、CEA、TRP-1、TRP-2、P-15、酪氨酸酶(Brichard等人,(1993) 1 Exp.Med.178:489);HER-2/neu基因产物(美国专利号4,968,603)、CA 125、LK26、FB5(内皮唾液酸蛋白)、TAG 72、AFP、CA19-9、NSE、DU-PAN-2、CA50、SPan-1、CA72-4、HCG、STN(唾液酸Tn抗原)、c-erbB-2蛋白、PSA、L-CanAg、雌激素受体、乳脂球蛋白、p53肿瘤抑制蛋白质(Levine,(1993) Ann.Rev.Biochem.62:623);黏蛋白抗原(国际专利公开号WO 90/05142);端粒酶;核基质蛋白;前列腺酸性磷酸酶;乳头瘤

病毒抗原；和/或目前已知或后来发现与以下癌症相关的抗原：黑素瘤、腺癌、胸腺瘤、淋巴瘤（例如，非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤）、肉瘤、肺癌、肝癌、结肠癌、白血病、子宫癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌、脑癌以及现在已知或后来确定的任何其他癌症或恶性病症（参见例如Rosenberg, (1996) Ann. Rev. Med. 47:481-91）。

[0343] 本领域技术人员将理解，感兴趣的一种或多种核酸能够与适当的控制序列可操作地相关联。例如，异源核酸与表达控制元件可操作地相关联，例如转录/翻译控制信号、复制起源、多聚腺苷酸化信号、内部核糖体进入位点（IRES）、启动子和/或增强子等。

[0344] 本领域技术人员将理解，根据所需的水平和组织特异性表达，可以使用多种启动子/增强子元件。启动子/增强子可以是组成型的或诱导型的，这取决于所需的表达模式。启动子/增强子可以是天然的或外源的，也可以是天然的或合成的序列。外源的是指，在引入转录起始区的野生型宿主中未发现转录起始区。

[0345] 在特定实施方案中，启动子/增强子元件可为靶细胞或待治疗受试者所固有的。在代表性实施方案中，启动子/增强子元件可以为核酸序列所固有的。通常选择启动子/增强子元件，使其在感兴趣的一个或多个靶细胞中发挥作用。此外，在特定实施方案中，启动子/增强子元件是哺乳动物启动子/增强子元件。启动子/增强子元件可以是组成型的或诱导型的。

[0346] 诱导型表达控制元件通常在需要提供对一个或多个核酸序列表达的调控的那些应用中是有利的。用于基因递送的诱导型启动子/增强子元件可以是组织特异性或优选的启动子/增强子元件，并且包括肌肉特异性或优选的（包括心肌、骨骼肌和/或平滑肌特异性或优选的）、神经组织特异性或优选的（包括大脑特异性或优选的）、眼睛特异性或优选的（包括视网膜特异性和角膜特异性）、肝脏特异性或优选的、骨髓特异性或优选的、胰腺特异性或优选的、脾脏特异性或优选的以及肺特异性或优选的启动子/增强子元件。其他诱导型启动子/增强子元件包括激素诱导型元件和金属诱导型元件。示例性诱导型启动子/增强子元件包括但不限于Tet开/关元件、RU486诱导型启动子、蜕皮激素诱导型启动子、雷帕霉素诱导型启动子和金属硫蛋白启动子。

[0347] 在一个或多个核酸序列被转录并随后在靶细胞中翻译的实施方案中，通常包括特定的起始信号以有效翻译插入的蛋白质编码序列。这些外源性翻译控制序列，其可能包括ATG起始密码子和相邻序列，可以是多种来源，包括天然的和合成的。

[0348] 核酸递送载体提供了将核酸递送到包括分裂细胞和非分裂细胞在内的广泛细胞中的方法。核酸递送载体可用于在体外将感兴趣的核酸递送至细胞，例如用于离体基因治疗。核酸递送载体在将核酸递送至需要其的受试者的方法中额外有用，例如，以表达免疫原性或治疗性多肽或功能RNA。通过这种方式，可在受试者体内产生多肽或功能RNA。受试者可能需要这种多肽，因为受试者缺乏这种多肽。此外，可以实施该方法，因为在受试者中产生多肽或功能RNA可能会带来一些有益的效果。

[0349] 核酸递送载体还可用于在受试者中产生感兴趣的多肽或功能RNA（例如，将受试者用作生物反应器来产生多肽或观察功能性核酸对受试者的影响，例如，与筛选方法有关）。

[0350] 通常，本发明的核酸递送载体可用于递送编码多肽或功能性核酸的核酸，以治疗和/或预防任何疾病状态，对于所述疾病状态递送治疗性多肽或功能性核酸是有益的。说明性疾病状态包括但不限于：囊性纤维化（囊性纤维化跨膜调节蛋白）和其他肺部疾病、血友

病A(因子VIII)、血友病B(因子IX)、地中海贫血(β -珠蛋白)、贫血(红细胞生成素)和其他血液疾患、阿尔茨海默病(GDF;脑啡肽酶)、多发性硬化(β -干扰素)、帕金森病(胶质细胞系源性神经营养因子[GDNF])、亨廷顿病(RNAi去除重复)、肌萎缩性侧索硬化、癫痫(甘丙肽、神经营养因子)和其他神经障碍疾患、癌症(内皮抑制素、血管抑制素、TRAIL、FAS-配体、包括干扰素在内的细胞因子;包括针对VEGF或多重药物抗性基因产物的RNAi)、糖尿病(胰岛素)、包括杜氏的肌营养不良(抗肌萎缩蛋白、小型抗肌萎缩蛋白、胰岛素样生长因子I、肌蛋白聚糖[例如, α 、 β 、 γ])、针对肌生成抑制蛋白的RNAi、肌生成抑制蛋白前肽、卵泡抑素、激活素II型可溶性受体、抗炎多肽例如I κ B显性突变体、肌长、肌营养相关蛋白、小肌营养相关蛋白、针对抗肌萎缩蛋白基因中的剪接点以诱导外显子跳跃的RNAi[参见,例如,W0/2003/095647]、针对U7 snRNA以诱导外显子跳跃的反义[参见,例如,W02006/021724]和针对肌生成抑制蛋白或肌生成抑制蛋白前肽的抗体或抗体片段)和Becker、高歌病(葡萄糖脑苷脂酶)、赫尔勒氏病(α -L-艾杜糖苷酸酶)、腺苷脱氨酶缺乏症(腺苷脱氨酶)、糖原贮存疾病(例如,法布里病[α -半乳糖苷酶]和糖原贮积症II型[溶酶体酸 α -葡萄糖苷酶])和其他代谢缺陷、先天性肺气肿(α 1-抗胰蛋白酶)、莱施-奈恩综合征(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶)、尼曼-皮克病(鞘磷脂酶)、泰-萨克斯病(溶酶体己糖胺酶A)、枫糖浆尿病(支链酮酸脱氢酶)、视网膜变性疾病(以及眼睛和视网膜的其他疾病;例如,用于黄斑退化变性的PDGF)、诸如脑的实体器官疾病(包括帕金森氏病[GDNF]、星形细胞瘤[内皮抑制素、血管抑制素和/或针对VEGF的RNAi]、胶质母细胞瘤[内皮抑制素、血管抑制素和/或针对VEGF的RNAi])、肝、肾、心脏包括充血性心力衰竭或外周动脉疾病(PAD)(例如,通过递送蛋白磷酸酶抑制剂I(I-1)、serca2a、调节受磷蛋白基因的锌指蛋白、Barkct、 β 2-肾上腺素能受体、 β 2-肾上腺素能受体激酶(BARK)、磷酸肌醇-3激酶(PI3激酶)、S100A1、小清蛋白、腺苷酸环化酶类型6、影响G-蛋白偶联受体激酶类2型敲除的分子例如截短的组成型活性bARKct;钙调神经磷酸酶(calsarcin),针对受磷蛋白的RNAi;受磷蛋白抑制性或显性负相分子如受磷蛋白S16E等)、关节炎(胰岛素样生长因子)、关节疾患(胰岛素样生长因子1和/或2)、内膜增生(例如,通过递送enos、inos),改善心脏移植物的存活(超氧化物歧化酶),AIDS(可溶性CD4),肌肉萎缩(胰岛素样生长因子I)、肾缺陷(红细胞生成素)、贫血(红细胞生成素)、关节炎(抗炎因子如IRAP和TNF α 可溶性受体)、肝炎(α -干扰素)、LDL受体缺陷(LDL受体)、高氨血症(鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、克拉伯病(半乳糖脑苷酶)、巴滕病、脊髓大脑脑梗死包括SCA1、SCA2和SCA3、苯丙酮尿症(苯丙氨酸羟化酶)、自身免疫性疾病等。本发明还可在器官移植之前和/或之后用于增加移植的成功率和/或减少器官移植或辅助治疗的负面副作用(例如,通过施用免疫抑制剂或抑制性核酸来阻断细胞因子的产生)。另一实例是,骨形态发生蛋白(包括BNP 2、7等、RANKL和/或VEGF)可与同种异体骨一起施用,例如,在癌症患者的骨折或手术切除后。

[0351] 基因转移在理解疾病状态并为其提供治疗方面具有巨大的潜在用途。有许多遗传性疾病的缺陷基因是已知的,并已被克隆。一般来说,上述疾病状态分为两类:缺乏状态,通常是酶,通常以隐性方式遗传;以及不平衡状态,其可能涉及调控或结构蛋白,通常以显性方式遗传。对于缺乏状态的疾病,基因转移可用于将正常基因带入受影响的组织进行替代治疗,以及使用反义突变创建疾病的动物模型。对于不平衡的疾病状态,基因转移可用于在模型系统中创建疾病状态,其能够用于对抗疾病状态。因此,核酸递送载体允许治疗和/或预防遗传疾病。

[0352] 核酸递送载体还可用于在体外或体内向细胞提供功能性核酸。例如,功能性核酸在细胞中的表达可以减少细胞对特定靶蛋白的表达。因此,可施用功能性核酸以减少需要其的受试者的特定蛋白质的表达。

[0353] 核酸递送载体发现可用于诊断和筛选方法,其中感兴趣的核酸在转基因动物模型中瞬时或稳定表达。

[0354] 核酸递送载体还可用于各种非治疗目的,包括但不限于在协议中用于评估基因靶向、清除、转录、翻译等,这对本领域技术人员来说是显而易见的。核酸递送载体也可用于评估安全性(扩散、毒性、免疫原性等)的目的。例如,美国食品和药物管理局在评估临床疗效之前将此类数据视为监管审批流程的一部分。

[0355] 作为另一方面,本发明的核酸递送载体可用于在受试者中产生免疫应答。根据此实施方案,可向受试者施用包括编码免疫原性多肽的核酸序列的核酸递送载体,并且受试者产生针对免疫原性多肽的主动免疫应答。免疫原性多肽如上文所述。在一些实施方案中,保护性免疫应答被引发。

[0356] 可替换地,可以将核酸递送载体离体施用于细胞,并将改变的细胞施用于受试者。将包括核酸的核酸递送载体引入细胞,并将细胞施用于受试者,其中编码所述免疫原的核酸可在受试者中表达并诱导针对免疫原的免疫应答。在特定实施方案中,细胞是抗原呈递细胞(例如,树突状细胞)。

[0357] “主动免疫应答”或“主动免疫”的特点是“在接触免疫原后宿主组织和细胞的参与。它涉及淋巴网状组织中免疫活性细胞的分化和增殖,其导致抗体的合成或细胞介导反应的发展,或两者兼而有之。”Herbert B.Herscowitz, Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation, in IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117 (Joseph A. Bellanti 编, 1985)。换言之,在通过感染或疫苗接种暴露于免疫原后,宿主会产生主动免疫应答。主动免疫可与被动免疫形成对比,被动免疫是通过“将预先形成的物质(抗体、转移因子、胸腺移植物、白细胞介素-2)从主动免疫宿主转移到非免疫宿主”获得的。同上。

[0358] 本文所用的“保护性”免疫应答或“保护性”免疫是指免疫应答给受试者带来一些益处,因为它预防或降低了疾病的发病率。可替换地,保护性免疫应答或保护性免疫可用于治疗和/或预防疾病,特别是癌症或肿瘤(例如,通过预防癌症或肿瘤形成,通过引起癌症或肿瘤消退和/或通过预防转移和/或通过预防转移结节生长)。保护作用可以是完全的或部分的,只要治疗的益处大于其缺点。

[0359] 在特定实施方案中,如下文所述,可以以免疫原性地有效量施用包括核酸的核酸递送载体或细胞。

[0360] 还可以通过施用表达一种或多种癌细胞抗原(或免疫相似分子)的核酸递送载体或产生针对癌细胞的免疫应答的任何其他免疫原,来施用所述核酸递送载体以用于癌症免疫治疗。举例来说,通过施用包括编码癌细胞抗原的核酸的核酸递送载体,例如治疗癌症患者和/或防止癌症在受试者体内的发展,可针对受试者中的癌细胞抗原产生免疫应答。如本文所述,可在体内或通过使用离体方法将核酸递送载体施用于受试者。可替换地,癌症抗原可以作为核酸递送载体的一部分表达。

[0361] 作为另一替代方案,可施用本领域已知的任何其他治疗性核酸(例如, RNAi) 或多

肽(例如,细胞因子)以治疗和/或预防癌症。

[0362] 如本文所用,术语“癌症”涵盖肿瘤形成的癌症。同样,术语“癌组织”涵盖肿瘤。“癌细胞抗原”涵盖肿瘤抗原。

[0363] 术语“癌症”在本领域中具有其可理解的含义,例如,组织的不受控制的生长有可能扩散到身体的远处位点(即转移)。示例性癌症包括但不限于黑素瘤、腺癌、胸腺瘤、淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤)、肉瘤、肺癌、肝癌、结肠癌、白血病、子宫癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌、脑癌和现在已知或后来确定的任何其他癌症或恶性病症。在代表性实施方案中,本发明提供了一种治疗和/或预防肿瘤形成的癌症的方法。

[0364] 例如,术语“肿瘤”在本领域中也理解多细胞生物体内未分化细胞的异常团块。肿瘤可以是恶性的或良性的。在代表性实施方案中,本文公开的方法用于预防和治疗恶性肿瘤。

[0365] 通过术语“治疗癌症”、“癌症治疗”和等效术语,旨在降低或至少部分消除癌症的严重性和/或减缓和/或控制疾病的进展和/或稳定疾病。在特定实施方案中,这些术语表示预防或减少或至少部分消除癌症的转移和/或预防或减少或至少部分消除转移结节的生长。

[0366] 通过术语“癌症预防”或“预防癌症”及等效术语,旨在所述方法至少部分消除或减少和/或延迟癌症发病率和/或严重性。换言之,受试者的癌症的发作的可能性或概率可以降低和/或延迟。

[0367] 在特定实施方案中,可从患有癌症的受试者中去除细胞并与核酸递送载体接触。然后将修饰的细胞施用于受试者,由此引发针对癌细胞抗原的免疫应答。该方法可有利地用于免疫受损的受试者,这些受试者不能在体内产生足够的免疫应答(即不能产生足够数量的增强抗体)。

[0368] 本领域已知,免疫调节细胞因子(例如, α -干扰素、 β -干扰素、 γ -干扰素、 ω -干扰素、 τ -干扰素、白细胞介素-1 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素2、白细胞介素3、白细胞介素4、白细胞介素5、白细胞介素6、白细胞介素7、白细胞介素8、白细胞介素9、白细胞介素-10、白细胞介素11、白细胞介素12、白细胞介素-13、白细胞介素-14、白细胞介素-18、B细胞生长因子、CD40配体、肿瘤坏死因子- α 、肿瘤坏死因子- β 、单核细胞趋化蛋白-1、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和淋巴毒素)可增强免疫应答。因此,免疫调节细胞因子(优选CTL诱导细胞因子)可与病毒载体一起联合施用于受试者。

[0369] 细胞因子可通过本领域已知的任何方法施用。可以向受试者施用外源性细胞因子,或者可替换地,可以使用合适的载体将编码细胞因子的核酸递送至受试者,并且在体内产生细胞因子。

[0370] 受试者、药物制剂和施用方式

[0371] 本发明的方法可用于兽医和医学应用。合适的受试者包括鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼类和哺乳动物。本文使用的术语“哺乳动物”包括但不限于人类、灵长类、非人灵长类(例如,猴子和狒狒)、牛、羊、山羊、猪、马、猫、狗、兔子、啮齿动物(例如,大鼠、小鼠、仓鼠等)等。人类受试者包括新生儿、婴儿、青少年和成人。任选地,受试者“需要”本发明的方法,例如,因为受试者具有或被认为存在包括本文所述的疾患的风险,或将受益于包括本文所述

的多核苷酸的递送。作为进一步的选择,受试者可以是实验动物和/或疾病的动物模型。优选地,受试者是人类。

[0372] 在某些实施方案中,在受试者生命中尽早(例如,一旦受试者被诊断患有疾病或疾患)将异源剂和蛋白M或其功能片段或衍生物施用于需要其的受试者。在一些实施方案中,该方法在新生儿受试者上实施,例如,在新生儿筛查已确认出疾病或疾患之后。在一些实施方案中,对10岁之前的受试者实施方法,例如,在1、2、3、4、5、6、7、8、9或10岁的年龄之前。在一些实施方案中,对10岁后的青少年或成人受试者实施所述方法。在一些实施方案中,所述方法在子宫内的胎儿上实施,例如,在产前筛查已经确认出疾病或疾患之后。在一些实施方案中,一旦受试者出现与疾病或疾患相关的症状,就对受试者实施所述方法。在一些实施方案中,在受试者出现与疾病或疾患相关的症状之前,对受试者实施所述方法,例如,被怀疑或诊断为患有疾病或疾患但尚未开始表现出症状的受试者。

[0373] 在特定实施方案中,本发明提供一种或多种药物组合物,其包括蛋白M或其功能片段或衍生物,单独或与异源剂一起,在药学上可接受的载体中,以及任选地,在其他药剂、药理学剂、稳定剂、缓冲剂、载体、佐剂、稀释剂等中。对于注射,载体通常为液体。对于其他施用方法,载体可以是固体或液体。对于吸入施用,载体将是可吸入的,并且可选地可以是固体或液体颗粒形式。

[0374] “药学上可接受的”指的是无毒或别的不需要的材料,即可将该材料施用于受试者而不会造成任何不需要的生物效应。

[0375] 本发明的一方面是在体外将核酸转移到细胞的方法,例如,作为离体方法的一部分。异源剂(例如,核酸递送载体,例如,病毒载体)可根据适合于特定靶细胞的标准转导方法以适当量(例如,多重感染)引入细胞中。要施用的病毒载体的滴度可以根据靶细胞类型和数量以及特定病毒载体而变化,并且可以由本领域技术人员在不进行过度实验的情况下确定。在代表性实施方案中,将至少约 10^3 个感染单位、更优选的至少约 10^5 个感染单位引入细胞。

[0376] 引入了核酸递送载体的一种或多种细胞可以是任何类型的细胞,包括但不限于神经细胞(包括外周和中枢神经系统的细胞,特别是脑细胞,例如神经元和少突胶质细胞)、肺细胞、眼睛细胞(包括视网膜细胞、视网膜色素上皮细胞和角膜细胞)、血管细胞(例如,内皮细胞、内膜细胞)、上皮细胞(例如,肠和呼吸上皮细胞)、肌肉细胞(例如,骨骼肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞和/或膈肌细胞)、树突细胞、胰腺细胞(包括胰岛细胞)、肝细胞、肾细胞、心肌细胞、骨细胞(例如,骨髓干细胞)、造血干细胞、脾细胞、角质形成细胞、成纤维细胞、内皮细胞、前列腺细胞、生殖细胞等。在代表性实施方案中,细胞可以是任何祖细胞。作为进一步的可能性,细胞可以是干细胞(例如,神经干细胞、肝干细胞)。又作为另一替代方案,细胞可以是癌症或肿瘤细胞。此外,如上所述,细胞可以来自任何物种。

[0377] 核酸递送载体可在体外被引入细胞中,以向受试者施用修饰的细胞。在特定实施方案中,已从受试者去除细胞,将核酸递送载体引入其中,然后将细胞施用回到受试者中。本领域已知从受试者体内去除细胞以进行离体操作,然后将其引入受试者体内的方法(参见,例如,美国专利号5,399,346)。可替换地,可将核酸递送载体引入来自供体受试者的细胞、培养的细胞或来自任何其他合适来源的细胞,并将所述细胞施用于需要其的受试者(即,“受体”受试者)。

[0378] 用于离体基因递送的合适细胞如上所述。施用于受试者的细胞剂量将根据受试者的年龄、条件和物种、细胞类型、细胞表达的核酸、施用模式等而变化。通常,每剂量在药学上可接受的载体中将施用至少约 10^2 至约 10^8 个细胞或至少约 10^3 至约 10^6 个细胞。在特定实施方案中,以治疗有效量或预防有效量结合药学的载体向受试者施用用核酸递送载体转导的细胞。

[0379] 在一些实施方案中,将核酸递送载体引入细胞中,并且可将该细胞施用于受试者以引发针对递送的多肽(例如,以转基因或衣壳表达)的免疫原性应答。通常,施用一定量的表达免疫原有效量的多肽的细胞与药学上可接受的载体的组合。“免疫原有效量”是表达的多肽的量,其足以在施用药物制剂的受试者中引发针对该多肽的主动免疫应答。在特定实施方案中,该剂量足以产生保护性免疫应答(如上文所定义)。所给予的保护程度不必是完全的或永久的,只要施用免疫原性多肽的益处大于其任何缺点。

[0380] 本发明的另一方面是向受试者施用异源剂(例如,核酸递送载体)的方法。可通过本领域已知的任何方式将核酸递送载体施用于人类受试者或需要其的动物。任选地,核酸递送载体以药学上可接受的载体中的治疗有效或预防有效剂量递送。

[0381] 可进一步施用核酸递送载体以引发免疫原性应答(例如,作为疫苗)。通常,本发明的免疫原性组合物包含免疫原有效量的核酸递送载体与药学上可接受的载体的组合。可选地,该剂量足以产生保护性免疫应答(如上所述)。所给予的保护程度不必是完全的或永久的,只要施用免疫原性多肽的益处大于其任何缺点。受试者和免疫原如上所述。

[0382] 待施用于受试者的核酸递送载体(例如,病毒载体)的剂量取决于施用模式、待治疗和/或预防的疾病或病症、个体受试者的条件、特定核酸递送载体和待递送的核酸等,可以通过常规方式确定。用于实现治疗效果的示例性剂量是至少约 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 个转导单位的滴度,可选地约 10^8 - 10^{13} 个转导单位的滴度。

[0383] 在特定实施方案中,可以采用多于一次施用(例如,两次、三次、四次或更多次施用)以在各种间隔的时期内,例如,每天、每周、每月、每年等实现期望的基因表达水平。

[0384] 示例性的施用方式包括口服、直肠、经粘膜、鼻内、吸入(例如,通过气溶胶)、含服(例如,舌下)、阴道、鞘内、眼内、经皮、内皮内、子宫内(或卵内)、肠胃外(例如,静脉内、皮下、皮内、颅内、肌内[包括向骨骼肌、膈肌和/或心肌施用]、胸膜内、脑内和关节内)、局部(例如,向皮肤和粘膜表面,包括气道表面,和经皮施用)、淋巴内等,以及直接组织或器官注射(例如,向肝、眼睛、骨骼肌、心肌、膈肌或脑)。

[0385] 施用可用于受试者的任何部位,部位包括但不限于选自由以下组成的组:大脑、骨骼肌、平滑肌、心脏、膈肌、气道上皮、肝脏、肾脏、脾脏、胰腺、皮肤和眼睛。

[0386] 施用也可用于肿瘤(例如,在肿瘤或淋巴结内或附近)。在任何给定情况下,最合适的途径将取决于正在治疗和/或预防的病症的性质和严重程度,以及正在使用的特定载体的性质。

[0387] 根据本发明,对骨骼肌的施用包括但不限于对四肢(例如上臂、下臂、大腿和/或小腿)、背部、颈部、头部(例如舌头)、胸部、腹部、骨盆/会阴和/或手指的骨骼肌的施用。合适的骨骼肌包括但不限于小指外展肌(手部)、小指外展肌(足部)、拇展肌、跖骨外展肌、拇短展肌、拇外展肌、短收肌、拇收肌、长收肌、大收肌、拇收肌、肘收肌、前斜角肌、膝关节肌、肱二头肌、股二头肌、肱肌、肱桡肌、颊肌、喙肱肌、皱眉肌、三角肌、降口角肌、降下唇肌、二腹

肌、骨间背侧肌(手部)、骨间背侧肌(足部)、桡侧腕短伸肌、桡侧腕长伸肌、尺侧腕伸肌、小指伸肌、指伸肌、趾短伸肌、趾长伸肌、拇短伸肌(extensor hallucis brevis)、拇长伸肌(extensor hallucis longus)、示指伸肌、拇短伸肌(extensor pollicis brevis)、拇长伸肌(extensor pollicis longus)、桡侧腕屈肌、尺侧腕屈肌、小指短屈肌(手部)、小趾短屈肌(足部)、趾短屈肌、趾长屈肌、指深屈肌、指浅屈肌、拇短屈肌(flexor hallucis brevis)、拇长屈肌(flexor hallucis longus)、拇短屈肌(flexor pollicis brevis)、拇长屈肌(flexor pollicis longus)、额肌、腓肠肌、颏舌骨肌、臀大肌、臀中肌、臀小肌、股薄肌、颈髂肋肌、腰髂肋肌、胸髂肋肌、髂肌(iliacus)、下孖肌、下斜肌、下直肌、冈下肌、棘间肌、横突间肌、翼外肌、外直肌、背阔肌、提口角肌、提上唇肌、提上唇鼻翼肌、提上睑肌、肩胛提肌、长回旋肌、头最长肌、颈最长肌、胸最长肌、头长肌、颈长肌、蚓状肌(手部)、蚓状肌(足部)、咬肌、翼内肌、内直肌、中斜角肌、多裂肌、下颌舌骨肌、头下斜肌、头上斜肌、闭孔外肌、闭孔内肌、枕肌、肩胛舌骨肌、小趾对跖肌、拇对掌肌、眼轮匝肌、口轮匝肌、骨间掌侧肌、掌短肌、掌长肌、趾骨肌、胸大肌、胸小肌、腓骨短肌、腓骨长肌、第三腓骨肌、梨状肌、骨间足底肌、跖肌、颈阔肌、腭肌、后斜角肌、旋前方肌、旋前圆肌、腰大肌、股方肌、足底方肌、头前直肌、头外侧直肌、头后大直肌、头后小直肌、股直肌、大菱形肌、小菱形肌、笑肌、缝匠肌、小斜角肌、半膜肌、头半棘肌、颈半棘肌、胸半棘肌、半腱肌、前锯肌、短回旋肌、比目鱼肌、头棘肌、颈棘肌、胸棘肌、头夹肌、颈夹肌、胸锁乳突肌、胸骨舌骨肌、胸骨甲状肌、茎突舌骨肌、锁骨下肌、肩胛下肌、上孖肌、上斜肌、上直肌、旋后肌、冈上肌、颞肌、阔筋膜张肌、大圆肌、小圆肌、胸的(thoracis)、甲状舌骨肌、胫骨前肌、胫骨后肌、斜方肌、肱三头肌、股中间肌、股外侧肌、股内侧肌、颞大肌和颞小肌,以及本领域已知的任何其他合适的骨骼肌。

[0388] 异源剂可通过静脉内施用、动脉内施用、腹腔内施用、肢体灌注(可选地,腿部和/或臂部的隔离肢体热灌注化疗;参见,例如,Arruda等人,(2005) Blood 105:3458-3464),和/或直接肌内注射递送至骨骼肌。在特定实施方案中,通过肢体灌注、任选地隔离肢体热灌注化疗(例如,通过静脉内或关节内施用)将异源剂施用于受试者(例如,患有肌肉营养不良的受试者,例如DMD)的肢体(臂部和/或腿部)。现有技术载体的组织递送(例如,到肌肉)通常通过流体动力学技术(例如,大容量静脉内/静脉内施用)增强,其增加脉管系统中的压力并促进该剂穿过内皮细胞屏障的能力。在特定实施方案中,异源剂可以在没有流体动力学技术的情况下施用,例如大容量输注和/或血管内压升高(例如,大于正常收缩压,例如,血管内压比正常收缩压增加小于或等于5%、10%、15%、20%、25%)。这些方法可以减少或避免与流体动力学技术相关的副作用,例如水肿、神经损伤和/或筋膜室综合征。

[0389] 心肌施用包括左心房、右心房、左心室、右心室和/或隔膜施用。异源剂可通过静脉内施用、动脉内施用(如主动脉内施用)、直接心脏注射(如进入左心房、右心房、左心室、右心室)和/或冠状动脉灌注递送至心肌。

[0390] 对膈肌的施用可以通过任何合适的方法,包括静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用。

[0391] 对平滑肌的施用可以通过任何合适的方法,包括静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用。在一个实施方案中,可以对平滑肌中、平滑肌附近和/或平滑肌上存在的内皮细胞进行施用。

[0392] 向靶组织的递送也可以通过递送包括异源剂的贮库来实现。在代表性实施方案

中,将包括异源剂的贮库植入骨骼肌、平滑肌、心脏和/或膈肌组织中,或者该组织可以与包括异源剂的膜或其他基质接触。美国专利号7,201,898中描述了此类可植入基质或基底。

[0393] 在特定实施方案中,向骨骼肌、膈肌和/或心肌施用异源剂(例如,用于治疗 and/或预防肌营养不良或心脏病[例如,PAD或充血性心力衰竭])。

[0394] 在代表性实施方案中,本发明用于治疗 and/或预防骨骼肌、心肌和/或膈肌的疾患。

[0395] 在代表性实施方案中,本发明提供了治疗和/或预防有需要的受试者的肌营养不良的方法,所述方法包括:向哺乳动物受试者施用治疗或预防有效量的异源剂,其中所述异源剂包括编码以下的核酸:抗肌萎缩蛋白、小型抗肌萎缩蛋白、微型抗肌萎缩蛋白、肌生成抑制蛋白前肽、卵泡抑素、激活素II型可溶性受体、IGF-1、抗炎多肽如I κ B显性突变体、肌长、肌营养相关蛋白、微型抗肌萎缩蛋白(抗肌萎缩蛋白小基因)、层粘连蛋白- α 2、 α -肌蛋白聚糖、 β -肌蛋白聚糖、 γ -肌蛋白聚糖、 δ -肌蛋白聚糖、IGF-1、针对肌生成抑制蛋白或肌生成抑制蛋白前肽的抗体或抗体片段和/或针对肌生成抑制蛋白的RNAi。在特定实施方案中,如本文其他地方所述,可将异源剂施用于骨骼肌、膈肌和/或心肌。

[0396] 可替换地,本发明可以用于将核酸递送至骨骼肌、心肌或膈肌,其用作平台以用于产生正常在血液中循环的多肽(例如酶)或功能性核酸(例如功能RNA,例如RNAi、microRNA、反义RNA)的平台,或用于全身递送至其他组织以治疗和/或预防疾患(例如代谢紊乱,如糖尿病(例如胰岛素)、血友病(例如因子IX或因子VIII)、粘多糖疾患(例如Sly综合征,Hurler综合征,Scheie综合征,Hurler-Scheie综合征,Hunter综合征,Sanfilippo综合征A、B、C、D,Morquio综合征,Marotau-Lamy综合征等)或溶酶体贮积疾患(例如高歇氏病[葡萄糖脑苷脂酶]、糖原贮积症II型[波普酸 α -葡萄糖苷酶]或法布里病[α -半乳糖苷酶A]或糖原贮积疾患(诸如糖原贮积症II型[溶酶体酸 α 葡萄糖苷酶])。用于治疗 and/或预防代谢紊乱的其他合适的蛋白质如上所述。美国专利公开号2002/0192189中描述了使用肌肉作为平台来表达感兴趣的核酸。

[0397] 因此,作为一方面,本发明还涵盖治疗和/或预防有需要的受试者的代谢紊乱的方法,该方法包括:向受试者施用治疗或预防有效量的异源剂(例如,向受试者的骨骼肌),其中所述异源剂包括编码多肽的核酸,其中所述代谢紊乱是多肽缺乏和/或缺陷的结果。本文描述了示例性的代谢紊乱和编码多肽的核酸。任选地,多肽是分泌型的(例如,多肽在其天然状态下是分泌型多肽,或者例如通过与本领域已知的分泌信号序列可操作地关联而被工程化为分泌型的多肽)。不受本发明任何特定理论的限制,根据该实施方案,对骨骼肌的施用可以导致多肽分泌到体循环中并递送到一个或多个靶组织。本文更详细地描述了将异源剂递送至骨骼肌的方法。

[0398] 本发明也可用于产生反义RNA、RNAi或其他功能RNA(例如核酶)用于全身递送。

[0399] 本发明还提供了一种治疗和/或预防有需要的受试者的先天性心力衰竭或PAD的方法,该方法包括向哺乳动物受试者施用治疗或预防有效量的本发明异源剂,其中所述异源剂包括核酸编码的,例如,肌浆内质网Ca²⁺-ATP酶(SERCA2a)、血管生成因子、磷酸酶抑制剂I(I-1)、针对受磷蛋白的RNAi;受磷蛋白抑制性或显性-负相分子,如受磷蛋白S16E、调控磷蛋白基因的锌指蛋白、 β 2-肾上腺素能受体、 β 2-肾上腺素能受体激酶(BARK)、PI3激酶、calsarcan、 β -肾上腺素能受体激酶抑制剂(β ARKct)、蛋白磷酸酶1的抑制剂1、S100A1、小清蛋白、腺苷酸环化酶6型、影响G蛋白偶联受体激酶2型敲除的分子,如截短的组成性活性

bARKct、Pim-1、PGC-1 α 、SOD-1、SOD-2、EC-SOD、激肽释放酶、HIF、胸腺肽 β 4、mir-1、mir-133、mir-206和/或mir-208。

[0400] 可注射制剂可以制备成常规形式,液体溶液或悬浮液,适于注射前在液体中溶解或悬浮的固体形式,或为乳剂。可替换地,可以以局部而非全身的方式施用异源剂,例如,以贮库或缓释制剂的形式。此外,可以将异源剂粘附在手术植入的基质上而被递送(例如,如美国专利公开号2004-0013645所述)。

[0401] 本文所公开的异源剂可通过任何合适的方式施用到受试者的肺部,可选地通过施用由受试者吸入的异源剂组成的可吸入颗粒的气溶胶悬浮液。可吸入颗粒物可以是液体或固体。如本领域技术人员所知,包括异源剂的液体颗粒的气溶胶可以通过任何合适的方式产生,例如使用压力驱动的气溶胶雾化器或超声波雾化器。参见,美国专利号4,501,729。包括异源剂的固体颗粒的气溶胶同样可以通过制药领域已知的技术与任何固体颗粒药物气溶胶发生器一起生产。

[0402] 异源剂可被施用于CNS的组织(例如,大脑、眼睛),并且可有利地使异源剂的分布比在没有本发明的情况下所观察到的更广泛。

[0403] 在特定实施方案中,可施用异源剂以治疗CNS疾病,包括遗传疾患、神经系统变性疾患、精神疾患和肿瘤。CNS的示例性疾病包括但不限于阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、坎阿瓦病、雷利氏病、雷夫叙姆病、图雷特综合征、原发性侧索硬化、肌萎缩性侧索硬化、进行性肌萎缩、皮克氏病、肌营养不良、多发性硬化、重症肌无力、宾斯旺格病、脊髓或头部损伤引起的创伤、泰萨克斯病、雷西-纳氏病、癫痫、脑梗塞、精神疾患包括心境障碍(例如,抑郁、双相情感障碍、持续性情感障碍、继发性心境障碍)、精神分裂症、药物依赖性(例如,酒精中毒和其他物质依赖性)、神经官能症(例如,焦虑、强迫性障碍、躯体形式障碍、分离障碍、格雷夫斯病、产后抑郁)、精神病(例如幻觉和妄想)、痴呆、偏执狂、注意缺陷障碍、性精神障碍、睡眠障碍、疼痛障碍、进食或体重障碍(例如,肥胖症、恶病质、神经性厌食症和食欲过盛)以及CNS的癌症和肿瘤(例如,垂体瘤)。

[0404] CNS疾患包括涉及视网膜、后束和视神经的眼科疾患(例如,色素性视网膜炎、糖尿病性视网膜病和其他视网膜退化变性疾病、葡萄膜炎、年龄相关性黄斑变性、青光眼)。

[0405] 大多数(如果不是全部的话)眼科疾病和疾患与三种类型的适应症中的一种或多种相关:(1)血管生成,(2)炎症,和(3)退化变性。本发明的异源剂可用于递送抗血管生成因子;抗炎因子;延缓细胞退化变性、促进细胞免毒(cell sparing)或促进细胞生长的因子以及前述的组合。

[0406] 例如,糖尿病视网膜病的特点是血管生成。糖尿病视网膜病可通过眼内(如玻璃体中)或眼周(如睫下区中)递送一种或多种抗血管生成因子来治疗。一种或多种神经营养因子也可以通过眼内(如玻璃体内)或眼周联合递送。

[0407] 葡萄膜炎涉及炎症。一种或多种抗炎因子可通过眼内(例如,玻璃体或前房)施用本发明的递送载体来施用。

[0408] 相比之下,色素性视网膜炎的特征是视网膜退化变性。在代表性实施方案中,可通过眼内(例如,玻璃体施用)编码一种或多种神经营养因子的异源剂来治疗色素性视网膜炎。

[0409] 年龄相关性黄斑变性涉及血管生成和视网膜退化变性。这种疾患可以通过在眼内

(例如玻璃体)施用编码一种或多种神经营养因子的异源剂和/或在眼内或眼周(例如在眼球筋膜下区域)施用一种或多种抗血管生成因子来治疗。

[0410] 青光眼的特征是眼压升高和视网膜神经节细胞丧失。青光眼的治疗包括使用异源剂施用一种或多种保护细胞免受兴奋毒性损伤的神经保护剂。这些剂包括N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)拮抗剂、细胞因子和神经营养因子,眼内递送,任选玻璃体内。

[0411] 在其他实施方案中,本发明可用于治疗惊厥,例如,减少惊厥的发作、发生率或严重性。惊厥治疗的疗效可以通过行为(例如,颤抖、眼睛或嘴巴的滴答声)和/或电图方法(大多数惊厥都有标志性的电图异常)来评估。因此,本发明还可用于治疗癫痫,其标志是随着时间的推移多次惊厥。

[0412] 在一个代表性实施方案中,使用本发明的异源剂向大脑施用生长抑素(或其活性片段)以治疗垂体瘤。根据本实施方案,编码生长抑素(或其活性片段)的异源剂通过微量输注到垂体中来施用。同样,这种治疗方法也可用于治疗肢端肥大症(垂体生长激素分泌异常)。本领域已知生长抑素的核酸(例如,GenBank登录号J00306)和氨基酸(例如,GenBank登录号P01166;包含加工活性肽生长抑素-28和生长抑素-14)序列。

[0413] 在特定实施方案中,异源剂可包含如美国专利号7,071,172中所描述的分泌信号。

[0414] 在本发明的代表性实施方案中,将异源剂施用于CNS(例如,施用于大脑或眼睛)。可将异源剂引入脊髓、脑干(延髓、脑桥)、中脑(下丘脑、丘脑、上丘脑、脑垂体、黑质、松果腺)、小脑、端脑(纹状体、大脑包括枕叶、颞叶、顶叶和额叶。皮质、基底节、海马和门杏仁核)、边缘系统、新皮质、纹状体、大脑和下丘。异源剂也可施用于眼睛的不同区域,例如视网膜、角膜和/或视神经。

[0415] 异源剂可被递送到脑脊液中(例如,通过腰椎穿刺),以便更分散地施用异源剂。在血脑屏障已经被扰乱的情况下(例如,脑肿瘤或脑梗塞),异源剂可以进一步血管内施用至CNS。

[0416] 可以通过本领域已知的任何途径将异源剂施用到CNS的一个或多个所需区域,包括但不限于鞘内、眼内、脑内、心室内、静脉内(例如,在糖诸如甘露醇的存在下)、鼻内、耳内、眼内(例如,玻璃体内、视网膜下、前房)和眼周(例如,眼球筋膜下区域)递送以及逆行递送到运动神经元的肌内递送。

[0417] 在具体实施方案中,通过直接注射(例如立体定向注射)至CNS中的所需区域或区室,以液体制剂施用异源剂。在其他实施方案中,可通过局部应用到所需区域或通过经鼻施用气溶胶制剂来提供异源剂。眼部施用,可通过局部应用液滴。作为另一替代方案,异源剂可作为固体缓释制剂施用(例如,参见美国专利号7,201,898)。

[0418] 在又额外的实施方案中,异源剂可用于逆行转运,以治疗和/或预防涉及运动神经元的疾病和疾患(例如,肌萎缩侧索硬化症(ALS);脊髓性肌萎缩(SMA)等)。例如,异源剂可以被递送到肌肉组织中,并从中迁移到神经元中。

[0419] 蛋白M或其功能片段或衍生物可通过上述异源剂的任何途径或时间表施用。蛋白M或其功能片段或衍生物可通过与异源剂不同的途径或时间表施用。

[0420] 在描述了本发明之后,将在以下实施例更详细地解释本发明,其中本文包括的实施例仅用于说明目的,并不旨限制本发明。

[0421] 实施例

[0422] 实施例1:方法

[0423] AAV病毒产生:在HEK293细胞中通过三质粒转染的标准方法生产AAV载体。简言之, AAV转基因质粒pTR CBA-Luc与AAV Rep/Cap辅助质粒(pXR2或pXR8)和腺病毒辅助质粒pXX6-80共转染。72小时后,收集细胞培养物,并通过冻融和超声波裂解。澄清的细胞裂解物经DNA酶处理,并以15%/25%/40%/60%碘克沙醇梯度超速离心,并通过阴离子交换Q-柱纯化。纯化的AAV载体通过qPCR滴定,引物用于扩增包装的AAV转基因区段。

[0424] 蛋白质产生:Rajesh广泛提供了质粒pET-28b(+),其编码蛋白M,一种截短的生殖支原体蛋白MG281,缺乏跨膜结构域(氨基酸74至479)并携带N-末端His-标签和凝血酶切割位点。质粒在具有电感受态的DH10B细胞中繁殖,并使用来自Invitrogen的PureLink Maxi Prep试剂盒纯化。使用过夜起始培养物将pET-28b(+)质粒瞬时转染到BL21/DE3细胞中。用起始培养物接种自动诱导培养基(来自Invitrogen的Magic培养基),并在18℃下以1L至4L培养体积生长3天。然后通过离心将培养物制成球团,并在-80℃下冷冻。

[0425] 蛋白质纯化:将冷冻的细菌细胞培养物球团解冻,超声裂解,DNA酶处理,离心澄清。将澄清的细菌裂解物透析至镍结合缓冲液(20mM咪唑,50mM磷酸钠pH 7.4,500mM NaCl, 0.02%叠氮化钠)中,并使用FPLC通过镍His-trap FF柱。然后用相同的但含有500mM咪唑的缓冲液碱洗脱被镍柱结合的蛋白M。然后将蛋白M通过S-100大小排阻柱,透析到含2%甘油的磷酸盐缓冲盐水中,并用分光光度法定量。使用SDS-PAGE蛋白质凝胶电泳进行蛋白质分离,然后使用考马斯蓝蛋白质染色来正确识别48kDa蛋白M条带,从而确认蛋白M本体。

[0426] 蛋白质印迹:在8% SDS-PAGE凝胶上分离蛋白质后,将蛋白质转移到PVDF膜上。使用抗His初级抗体1:1000稀释液(10μg/ml)在5%脱脂乳中进行免疫印迹。将二级山羊抗人IgG抗体与辣根过氧化物酶(1:10000稀释)缀合。

[0427] 细胞培养:HEK-293细胞和Huh7细胞分别用于所有体外AAV中和实验和用于增强转导。细胞在37℃下用补充有10%小牛血清和青霉素-链霉素的Dulbecco's改良Eagle's培养基在5% CO₂中维持。

[0428] 人类IVIG和免疫小鼠血清:从Grifols Therapeutics Inc.(Research Triangle Park,NC,USA)购买了10%的人类IVIG(Gamunex)。在IP施用 3×10^{10} AAV8-FVIII病毒基因组后,收集并合并12只不同小鼠(50%雄性,50%雌性)的血清,然后在2周后加强施用于同一载体,并在第一次施用后6周再次加强施用。将人类IVIG和小鼠血清等分并储存在80℃以备将来使用。

[0429] 体外AAV中和测定:NAb分析如前所述进行并略有修改。通过离心将细胞制成球团,并在无血清X-Vivo 10培养基中重新悬浮,然后以48孔或96孔板的形式进行铺板。将人类IVIG或血清系列稀释两倍或十倍。将AAV-Luc与人类IVIG或小鼠血清在4℃下孵育1h,之后添加AAV,然后在4℃下再孵育1h。然后在铺板时将AAV+血清孵育物与悬浮在无血清培养基中的细胞混合。在使用蛋白M进行的中和实验中,在4℃下,测试3种不同的孵育方案,每一步持续1h:先用蛋白M与中和血清孵育,然后用AAV;先用中和血清与AAV孵育,然后用蛋白M;以及,先用蛋白M与AAV孵育,然后用中和血清。将细胞接种在200μl培养基中的48孔板中,或100μl培养基中的96孔板中。转导后,细胞在37℃下培养24-48h,以允许AAV荧光素酶转基因表达。为了测量Luc活性,用被动裂解缓冲液(Promega, Madison, WI, USA)裂解细胞,用Wallac1420 Victor 2自动读板仪测量荧光素酶信号。NAb滴度被定义为荧光素酶活性比无

血清对照低50%的最高稀释度。

[0430] 体内AAV中和和NAb血清的被动转移:向C57BL/6小鼠的眶后静脉注射不同量的含有AAV NAb的血清,20分钟后注射AAV。对于AAV施用前接受蛋白M治疗的小鼠,在血清注射5-15分钟后,通过眶后静脉递送蛋白M(2:1比率为6.3mg,1:1比率为3.15mg,或0.5:1比率为1.58mg)。5分钟后,通过每千克 2×10^{12} 个颗粒的AAV-Luc载体的全身注射来施用AAV。在AAV施用后1天,以及注射后1周和9天的时间点进行成像。

[0431] 实施例2:蛋白M消除IVIG对AAV转导的抑制活性

[0432] 为了研究蛋白M的抗体阻断功能,建立了人静脉内注射免疫球蛋白 γ (IVIG)体外AAV中和测定。使用系列稀释的IVIG进行AAV中和测定,以确定将给定量的AAV2中和的IVIG的量。由AAV荧光素酶载体细胞转导产生的荧光素酶活性作为基因表达的功能读出。该中和以相对于无IVIG对照归一化的荧光素酶活性的百分比确定。发现12.5 μ g的IVIG中和75% (+/-5%)的AAV2 (图1),选择该量的IVIG进行试验设计,以测试蛋白M阻断IVIG中和AAV。接下来,对蛋白M(SEQ ID NO:2)进行剂量稀释系列,蛋白M通过凝血酶切割去除His-标签来收集,以及其阻断12.5 μ g的IVIG的能力 (图2),其中在细胞培养转导之前,蛋白M与IVIG孵育1h,然后在4 $^{\circ}$ C下与AAV2孵育1h。发现2个蛋白M分子与1个IgG分子的摩尔比足以防止中和,达到与无IVIG对照相当的水平。此外,发现蛋白M与IVIG的较高摩尔比增强了荧光素酶信号,其水平高于无IVIG对照 (图2)。8个蛋白M分子与1个IgG之比,使荧光素酶的表达增强了2倍。为了观察增强是否随着摩尔比的增加而进一步增加,在相同的实验条件下测试了8:1和20:1的蛋白M与IVIG的比率。发现将蛋白M剂量增加2.5倍 (从8:1增加到20:1) 会稍微增强,因为相应的信号比8:1比率时增加仅0.25倍 (图3)。此外,还发现免疫球蛋白的蛋白M阻断活性不依赖于N-末端His标签的切割,

[0433] 因此,在接下来的实验中使用不切割His标签的蛋白M。

[0434] 实施例3:蛋白M与AAV载体病毒粒子的相互作用增强AAV转导

[0435] 发明人之前的研究表明,血清蛋白与AAV病毒粒子的相互作用能够增强AAV转导。为了进一步表征蛋白M对AAV转导的增强功能,在不使用IVIG的情况下进行了剂量响应测定,其中在细胞培养转导之前,蛋白M以系列2倍稀释与AAV孵育1h。在图4中发现,在没有IVIG的情况下,先前实验中蛋白M的8:1比率 (33 μ g的蛋白M) 能够剂量依赖性地增强AAV转导,并且对于 2×10^8 个病毒颗粒,在低于2 μ g的蛋白M的稀释下丧失增强作用。丧失增强作用的蛋白M分子与AAV颗粒的当量摩尔比为低于40000:1。接下来,证明了蛋白M的转导增强依赖于蛋白M与AAV的孵育。在图5中,在添加到细胞前1h (预孵育, -1h时间点)、在未经预孵育的情况下在转导时添加 (转导临近, 0h时间点) 或在将AAV添加到细胞后18h (转导后, 18h时间点),将蛋白M添加到AAV中进行细胞培养转导测定。发现在与图4类似的预孵育组中,可观察到剂量依赖性增强,但在其他两组中,蛋白M和AAV2在测定前未一起孵育,则未观察到剂量依赖性增强。此外,该结果还论证,蛋白M增强的机制涉及与载体衣壳的相互作用,而不是蛋白M对细胞的生物学效应,因为在转导时向细胞中添加蛋白M对荧光素酶信号没有影响。最后,证实当IVIG首先与AAV预孵育1h,然后与蛋白M孵育1h时,蛋白M不能阻断中和,并且只有当AAV2未被IVIG完全中和时,蛋白M才能增强AAV2荧光素酶信号。在本测定中,使用12.5 μ g的IVIG (其中和75-80%的AAV2)、50 μ g的IVIG (其中和99%的AAV2, 见图1) 或200 μ g的IVIG (其中和100%的AAV2)。在图6中观察到,当99-100%的AAV2被IVIG (50 μ g和200 μ g) 中和

时,蛋白M不能阻断中和,也不能提供转导增强。结合图2和图3中的数据,该结果表明,过量的蛋白M在结合免疫球蛋白后能够与AAV病毒粒子相互作用,并导致增强的转导。

[0436] 实施例4:蛋白M与AAV载体病毒粒子的预孵育保护IVIG的AAV中和

[0437] 接下来决定研究先用AAV然后用IVIG预孵育蛋白M的效果,而不是让蛋白M先与IVIG相互作用。在细胞转导前,将蛋白M与AAV2一起孵育1h,然后加入IVIG并在4℃下再孵育1h,检查蛋白M阻断中和的能力。在图7中,发现当蛋白M浓度保持静态(8.25μg),并且IVIG剂量从50μg系列稀释至3.12μg(蛋白M与IVIG的摩尔比为1:2至8:1)时,则以2:1或更大的比率实现载体免于中和的保护,这类似于在AAV添加之前用IVIG孵育蛋白M时的先前结果。为了模拟更接近体内情况的环境,即血清中除IgG外还存在其他类型的蛋白质,在10%胎牛血清(FBS)存在的情况下进行了类似的体外中和试验。根据制造商对牛血清的IgG定量,估计培养基体积每孔含有约350μg的牛IgG。然后在一半的孔中加入25μg的IVIG或无血清培养基,以中和AAV或作为无中和活性的对照。在图8中,当蛋白M在转导前与AAV一起孵育1h,并以4:1、2:1和1:1(蛋白M比IgG)的不同摩尔比添加总IgG(人和牛)时,即使在1:1的比率下,也观察到免受中和的保护作用。这些结果表明,即使存在其他血清蛋白,蛋白M也能够结合和阻断免疫球蛋白。

[0438] 实施例5:蛋白M在体外对AAV中和小鼠血清活性的有效阻断功能

[0439] 为了将IVIG的发现转化为实际情况,使用AAV8衣壳载体免疫的小鼠血清,首先与AAV8-荧光素酶载体进行体外中和实验。当系列稀释来自免疫小鼠的血清和蛋白M以维持2:1的摩尔比时,结果与仅含血清的对照相比,发现在1:2564的滴度下,蛋白M允许在估计约100倍稀释的中和血清中逃逸中和(0.0039μl的血清对在蛋白M存在下0.2744μl的血清下50%中和,图9)。

[0440] 实施例6:蛋白M在体内对AAV中和小鼠血清活性的有效阻断功能

[0441] 接下来,进行体内实验,通过眶后注射将不同体积的中和血清被动转移到原始小鼠中。让血清灌注小鼠5-15分钟后,蛋白M也通过眶后注射全身施用于小鼠,5分钟后用AAV8-Luc(2×10^{10} 病毒基因组)施用。图10示出,蛋白M以与小鼠中总免疫球蛋白的估计的摩尔比为2:1(6.3mg),能够防止1μl的AAV8 NAb血清(滴度1:2564)中和AAV8。这与系列稀释的抗AAV8血清的体内中和测定相比,其中超过50%的AAV8-Luc在1μl至0.001μl的血清体积下被中和,代表AAV NAb逃逸超过1000倍的浓度差(图11)。

[0442] 实施例7:蛋白M/免疫球蛋白复合物的稳定性

[0443] 为了研究蛋白M与免疫球蛋白的复合物有多稳定,测定首先在体外进行。将蛋白M与小鼠血清以2:1的分子比率在37℃预孵育1h至72h的不同持续时间,然后在4℃再加入AAV8载体再一个小时用于中和分析。如图12所示,与含有无蛋白M的中和血清或仅含有PBS或培养基的对照相比,在加入至细胞培养物之前,当在37℃孵育时,小鼠血清中的抗-AAV8免疫球蛋白和蛋白M之间预先形成的复合物稳定超过72h。该结果表明蛋白M和免疫球蛋白之间形成的复合物在体外是高度稳定的。

[0444] 接下来,在被动转移0.3μl的AAV8中和血清后,检测蛋白M的体内稳定性。发现如果施用蛋白M并等待3h而不是5分钟,则蛋白M的抗体阻断功能降低约70%,从 3.5×10^5 至 1×10^5 光子/秒/²/自发速率(图13)。这一结果表明蛋白M的NAb阻断效果在体内是短暂的。

[0445] 用AAV载体进行基因治疗已经在临床试验中获得成功。然而,AAV中和抗体在人群

中的高度流行防止了更多的患者受益于这种有效的基因递送。在这项研究中,发现源自支原体的蛋白M能够与NAb相互作用并增强AAV转导。阻断NAb活性所需的蛋白M的最小剂量比免疫球蛋白的2倍分子还多。蛋白M与AAV病毒粒子的直接相互作用也增加了AAV转导。中和抗体测定显示,当AAV免疫的小鼠血清与蛋白M体外一起孵育时,NAb活性降低约100倍,并且当应用蛋白M时,在过继转移NAb阳性血清的小鼠中观察到超过1000倍的保护作用。尽管蛋白M与免疫球蛋白的复合物在体外随着时间的推移是稳定的,但蛋白M在体内逐渐失去其免受免疫球蛋白中和的保护功能。

[0446] 为了克服AAV NAb,在实验室中开发了许多策略。一种方法是使用用于包被的聚合物或胞外体来掩盖AAV表面以阻断NAb识别。虽然有希望,这种方法可能会改变AAV转导模式。第二种方法是使用易错PCR或DNA混编来生成AAV衣壳变体的文库,并在体外和体内存在NAb的情况下选择NAb逃逸突变体。这种方法产生了新的衣壳;然而,由于这些突变体是从动物组织中分离并在动物组织中检测的,并且来自动物研究的数据并不总是能转化到人类中,并且没有可靠的系统可用于预测人类组织中的AAV转导,因此它具有在人类中生成具有未知转导效率的衣壳的潜在限制。第三种方法是使用显示出低的或没有NAb交叉反应性的替代血清型的AAV。虽然这种流行的策略是合理的,并且在动物模型中是成功的,但人们仍然担心在大多数人类中存在交叉反应,而这种交叉反应在动物中可能是无法预测的。最后的实验室方法是合理地工程化AAV衣壳表面上的NAb结合域,以消除NAb结合位点。这种策略需要关于单克隆抗体表位和AAV病毒粒子结构的信息,并且由于来自人血清的NAb是多克隆的并且不可能从人类获得代表所有产生的NAb的mAb这一事实,这种策略固有地被限制。还研究了几种临床相关的方法:一个实施例是在载体递送之前进行血浆置换。然而,由于每轮单采(apheresis)的相对的低效率以及即使低滴度的NAb($<1:5$)也能消除AAV转导的事实,这种策略仅适用于AAV NAb起始滴度较低的患者,并且需要多次单采。类似地,使用抗CD20抗体(利妥昔单抗)可以实现B细胞消耗,但这需要很长时间(约6-9个月),并且仅在少数受试者中有效降低AAV NAb。最后的临床方法是使用过量的空AAV衣壳作为NAb的诱饵。令人担忧的是,空颗粒的加入增加了AAV衣壳负荷,这潜在地增加了衣壳特异性细胞毒性免疫应答介导AAV转导细胞的消除,并且可能与全AAV颗粒竞争有效的转导。此外,空衣壳可能比全AAV载体引起更严重的肝脏炎症。与上述方法中NAb保护的效率或并发症相比,在本研究中,使用免疫球蛋白结合蛋白M证明了具有更大潜力的阻断中和抗体活性的策略。当使用蛋白M时,NAb逃逸能力在体外达到100倍,在体内达到1000倍以上。

[0447] 蛋白M功能为一种通用抗体结合蛋白,其通过与抗体轻链和重链上的保守区域普遍结合,阻断哺乳动物IgG、IgM和IgA抗体类别,从而对抗原识别或CDR区域造成结构干扰。蛋白M结合抗体并防止抗原-抗体结合,但不破坏先前形成的抗原-抗体复合物。蛋白M与抗体的相互作用已通过蛋白质印迹、ELISA、x射线晶体学、电子显微镜和生物层干涉术进行验证。由于蛋白M可以独立于载体使用,因此可以将其纳入包括先前FDA批准的基因疗法在内的治疗方案中。与基于衣壳的免疫逃逸相比,这是一个优势,因为每个单个衣壳都必须针对每个疾病靶标进行各自的临床试验。基于蛋白M的特性,该蛋白不仅可用于任何病毒载体介导的基因递送,还可用于瞬时蛋白治疗,如CRISPR/cas9,以避免体液免疫应答介导的清除。此外,蛋白M有可能治疗由自身抗体引起的自身免疫性疾病。

[0448] 在本研究中,已证明至少需要2个或更多的蛋白M分子来阻断一个免疫球蛋白分

子,在全身施用后,可能需要大量的蛋白M与血液中的所有免疫球蛋白相互作用用于NAb逃逸。尽管在临床试验中使用了高剂量的重组蛋白,如人血清白蛋白和免疫球蛋白,但在临床试验之前,需要在大型动物中设法解决高剂量蛋白M潜在并发症的问题。如果蛋白M局部用于AAV施用,这可能不是一个主要问题。

[0449] 体外研究表明,蛋白M/免疫球蛋白复合物在相当长的一段时间内是稳定的,而体内实验表明,当在蛋白M应用后很久再给药AAV载体时,蛋白M功能逐渐丧失

[0450] 。弄清楚血液中蛋白M/免疫球蛋白复合物的动力学(dynamics)和运动学(kinetics)很重要;这一信息将为施用蛋白M后的AAV注射窗口提供有价值的信息。

[0451] 另一个问题是重复施用蛋白M的免疫原性。由于蛋白M是一种外源蛋白,它会引发体液免疫应答以产生抗体。蛋白M通过结合所有免疫球蛋白来发挥其保护功能,而蛋白M的特异性Ig量仅占有Ig的很小部分,因此,当高剂量的蛋白M用于阻断AAV NAb时,蛋白M特异性Ig的量应仅中和极少量的蛋白M,然后不能影响施用的蛋白M保护AAV免受AAV NAb的功能。蛋白M能与B细胞表面结合,具有刺激B细胞增殖的潜力。以前的研究表明,完整的蛋白M能够诱导B细胞增殖,然而,截短的蛋白M失去了这一功能。蛋白M施用后应在体内有长期深远的作用。

[0452] 总之,目前的结果表明,当蛋白M以等于或大于2个分子与1个IgG分子的分子比率存在时,蛋白M可防止免疫球蛋白中和AAV。AAV载体的保护依赖于AAV的免疫球蛋白中和前与免疫球蛋白相互作用的蛋白M。蛋白M可在体内保护AAV免受NAb滴度1000倍范围内的中和。本研究提供了重要的见解,即在将来的AAV临床试验中,在NAb患者中使用蛋白M保护AAV载体病毒体免受NAb活性的影响或用于再施用。

[0453] 实施例8:实施增强特性的工程蛋白M变体具有

[0454] 上述实施例描述了使用支原体蛋白M作为抗体阻断蛋白,以逃逸针对基因治疗载体的中和抗体。虽然来自不同支原体物种的天然存在蛋白M同源物以纳摩尔亲和力结合大多数哺乳动物抗体类别(Grover等人,Science343:656(2014)),但天然存在蛋白的许多特征不适合用作治疗药物。天然蛋白M是不溶的,但通过N-末端跨膜结构域结合膜,该结构域将其锚定在细菌质膜中。此外,天然蛋白质具有无序的C-末端,可能作为药物样分子表现出不可预测的行为。使用天然蛋白M(来自Grover等人,Science 343:656(2014)的蛋白M TD)的截短版本进行研究,缺少N-末端跨膜区和作为治疗性抗体阻断分子的无序C-末端区段,但有一个关键发现,即该蛋白质在体温(37℃)下孵育时缺乏结构稳定性。

[0455] 在简单的体外缓冲液悬浮液中,将截短的蛋白M(SEQ ID NO:3)暴露于37℃,导致在短时间内(15min至1h)发生可见的沉淀和聚集。使用圆二色性分析时,发现将蛋白质加热至37℃与1h内的明显蛋白质解折叠事件相关,并且在41.2℃下发生蛋白质瞬时解链,而在20℃下孵育持续超过2h没有发生解折叠事件(图14)。蛋白质的解折叠也与通过蛋白质印迹评估的溶液中可溶性级分的测量的减少相关。为了克服使用不稳定蛋白的治疗局限性,采用合理的设计方法生成截短蛋白M的突变类似物,包括来自生殖支原体(MG281)和肺炎支原体(MPN400)的突变同源物。该方法使用蛋白M(PDBID:4NZR和4NZT)的晶体结构和氨基酸序列作为名为Rosetta蛋白质建模和工程软件的输入。自由能计算和3D建模被用来预测哪些氨基酸序列的变化会导致三级结构的稳定性,输出超过850+个氨基酸取代的列表。通过单个突变体和组合的多个突变体的DNA合成,合理设计的变体文库被用于产生突变蛋白。表4

列出了885个计算确定的点突变,它们在热稳定性方面的得分高于野生型蛋白质。表5列出了165个计算确定的点突变,它们在热稳定性方面的得分显著高于野生型蛋白质(大于3.08得分)。

[0456] 使用差示扫描荧光镜透视检查对不同的蛋白M突变体进行验证,以计算蛋白质解链温度(图15、16)。然后将突变体在37℃下经受不同时间段的温度刺激,以测量溶解度(图17A-17C)和在体外中和测定(图18A-18C)中通过合并的人静脉内IgG(IVIg)防止AAV中和的能力。除了测试来自生殖支原体的蛋白M类似物外,还生产了来自肺炎支原体的类似物。然后通过生物层干涉术(BLI)测试一些突变体,以确定突变体蛋白对小鼠IgG的亲合力,并证明突变体改变突变体对免疫球蛋白底物亲和力的能力(图21、22)。与野生型蛋白M相比,突变体在更宽的pH范围内表现出增加的稳定性如稳定性所证明的(图26)。MG 29是一种先导类似物,在37℃下具有增加的稳定性,并维持对IgG的纳米摩尔亲合力,在小鼠直接免疫AAV衣壳后,用于在体内测试AAV中和抗体的阻断作用。给一条腿肌内注射用磷酸盐缓冲盐水配制的AAV,另一条腿用MG 29配制的AAV,表明MG 29在AAV免疫小鼠中阻断AAV中和抗体,以实现AAV的有效基因递送和再给药(图19、20)。

[0457] 使用Rosetta软件的第二轮合理工程策略包括使用许多人类免疫球蛋白结构的平均模型改变突变蛋白亲合力,以预测突变蛋白M类似物结合位点的修饰,从而增强或减弱亲和力和结合。此外,第三轮合理的设计策略纳入了使用Rosetta建模和来自不同支原体物种的天然存在蛋白M序列的多样性二者,以创建自然界中不存在的抗原性不同的类似物。这些类似物可以是全蛋白或单个表位的嵌合的、镶嵌的或初始合理改变的氨基酸突变体。然后,相同或不同的类似物可与AAV一起联合用于多轮的再给药,即使存在针对蛋白M类似物产生的抑制性抗体。这是因为蛋白M类似物直接竞争抗体结合和阻断抗原识别,甚至通过抑制性抗体识别自身。初始免疫暴露后,蛋白M类似物的饱和剂量将超过针对蛋白M类似物产生的一小部分免疫球蛋白。此外,具有增加的表位多样性的蛋白M类似物的产生可以提供额外层免疫逃逸蛋白M抑制性抗体。人们相信,所列的每一种工程策略都可以相互组合或叠加,以产生具有多种不同特性的蛋白M类似物。

[0458] 最后,产生了DNA密码子优化型式的蛋白M,从而提高了蛋白质产物的产率(图25)。已生成两个密码子优化版的亲本截短蛋白M序列:一个序列针对大肠杆菌和智人密码子使用进行优化,另一个仅针对智人密码子使用进行优化。双大肠杆菌和智人密码子构建体用于在大肠杆菌中产生蛋白质,并证实与未优化的亲本质粒相比,蛋白质产率增加了约4倍。只有智人的优化构建体包含IL-2分泌肽或白蛋白分泌肽序列,以使得能够从哺乳动物细胞系中分泌蛋白质,用于从培养基中收获蛋白M类似物。蛋白M突变体类似物被克隆或合成到两种类型的优化DNA序列中,并用于提高蛋白产量。在37℃下稳定的蛋白M类似物可以在人细胞中生长,分泌后对蛋白解折叠没有敏感性。此外,蛋白M类似物的糖基化位点被取代,以消除结合位点的糖基化或向外表面添加糖基化,例如类似物MG 28(N274D)。在外表面添加糖基化位点是另一种机制,可以增强蛋白M类似物的免疫逃逸,并减少多次施用蛋白M类似物时对蛋白M抑制性抗体的识别。最后,蛋白M类似物的DNA序列将稳定地整合到哺乳动物细胞系中,以产生在37℃下稳定的分泌蛋白质,并去除或添加新的糖基化位点。

[0459] 方法

[0460] AAV病毒产生:在HEK293细胞中通过三质粒转染的标准方法生产AAV载体。简言之,

AAV转基因质粒pTR CBA-Luc与AAV Rep/Cap辅助质粒(pXR2或pXR8)和腺病毒辅助质粒pXX6-80共转染。72小时后,收集细胞培养物,并通过冻融和超声波裂解。澄清的细胞裂解物经DNA酶处理,并以15%/25%/40%/60%碘克沙醇梯度超速离心,并通过阴离子交换Q-柱纯化。纯化的AAV载体通过qPCR滴定,引物用于扩增包装的AAV转基因区段。

[0461] 蛋白质产生:质粒pET-28b(+)编码蛋白M类似物,即源自生殖支原体或肺炎支原体的缺失跨膜结构域的截短蛋白质,并携带N-末端His标签和凝血酶切割位点。质粒在具有电感受态的DH10B细胞中繁殖,并使用来自Invitrogen的PureLink Maxi Prep试剂盒纯化。使用过夜起始培养物将pET-28b(+)质粒瞬时转染到BL21/DE3细胞中。自动诱导培养基(来自Invitrogen的Magic培养基)与起始培养物一起接种,并在18℃下生长3天。然后通过离心将培养物制成球团,并在-80℃下冷冻。

[0462] 蛋白质纯化:将冷冻的细菌细胞培养物球团解冻,超声裂解,DNA酶处理,离心澄清。将澄清的细菌裂解物透析至镍结合缓冲液(20mM咪唑,50mM磷酸钠pH 7.4,500mM NaCl,0.02%叠氮化钠)中,并使用FPLC通过镍His-trap FF柱。然后用相同的但含有500mM咪唑的缓冲液碱洗脱被镍柱结合的蛋白M。然后将蛋白M通过S-100大小排阻柱,透析到含2%甘油的磷酸盐缓冲盐水中,并用分光光度法定量。使用SDS-PAGE蛋白质凝胶电泳进行蛋白质分离,然后使用考马斯蓝蛋白质染色来正确识别45kDa-48kDa蛋白M条带,从而确认蛋白M本体。

[0463] 对于某些蛋白质生产,采用两种策略中的任何一种来纯化蛋白M变体。第一个方案(Ni纯度)用于小规模生产纳米DSF。通过将细胞球团与由2.5mg/mL溶菌酶、25% B-PER、pH为7.4的75%磷酸盐缓冲盐水(PBS)和蛋白酶抑制剂(PMSF、苯丁抑制素和胃酶抑素)组成的缓冲液混合进行裂解。在室温下混合30min后,将粗裂解物在15000rcf下离心20min,并将上清液与Ni树脂在4℃下孵育1h。然后洗涤上述树脂(PBS+20mM咪唑),并用(PBS+500mM咪唑)洗脱蛋白质。在进行稳定性测定之前,用Zeba脱盐柱将洗脱的蛋白质交换到pH7.4的PBS中。第二个方案(SEC纯度)用于大规模生产,并从蛋白质样品中去除额外的污染物/聚集体。细胞通过超声波裂解,用镍树脂(与第一个方案相同的缓冲液)纯化,并在冷冻样品之前,并在PBS+2%甘油中完成尺寸排阻色谱法。

[0464] 蛋白质印迹:在8% SDS-PAGE凝胶上分离蛋白质后,将蛋白质转移到PVDF膜上。使用抗His初级抗体1:1000稀释液(10μg/ml)在5%脱脂乳中进行免疫印迹。将二级山羊抗人IgG抗体与辣根过氧化物酶(1:10000稀释)缀合。

[0465] 蛋白质解链温度和解折叠的测定:解链温度(T_m)用纳米差示扫描荧光法(NanoDSF)测定,蛋白质解折叠用圆二色性测定法在不同温度下测定。一阶导数的拐点表示 T_m 或解折叠。根据方案1(Ni纯度)纯化蛋白质。

[0466] 溶解度测定:通过在37℃下将七等分样品的各SEC纯化蛋白(0.4mg/mL)在不同时间内孵育来进行热稳定性时间过程。在装载SDS-PAGE凝胶之前,通过在15000xG下离心样品10分钟,将沉淀的蛋白质制成球团。根据方案2(SEC-纯度)纯化蛋白质。

[0467] 通过生物层干涉术进行亲和力评估:在37℃下进行生物层干涉术,以评估蛋白M构建体的亲和力。根据方案2(SEC-纯度)纯化蛋白质。使用ForteBio动力学缓冲液(PBS+洗涤剂)对1000nM至15.6nM范围内的每个M构建体进行两倍稀释系列。评估与抗小鼠IgG Fc捕获生物传感器的结合。每个方案包括为10分钟的基线、5分钟的关联和5分钟解离步骤。从与缓

冲液中的关联步骤并行运行的参考传感器中减去数据。亲和力数据是根据ForteBio数据分析v9.0软件中的1:1曲线拟合计算的。基于每个浓度($n=7$)下的最大响应来计算报道的稳态结合常数。为了最小化X2,动力学数据仅包括25015.6nM稀释范围($n=5$)的数据。

[0468] 结构建模和合理蛋白质工程:基于与免疫球蛋白结合的PM的现有晶体结构(4NZT和4NZR),使用计算机模拟合理蛋白质工程方法实现了蛋白M(PM)类似物热稳定性的优化。Rosetta软件包被用于鉴定稳定PM肽的突变。第一种方案在计算机模拟进行位点饱和诱变,允许氨基酸邻近物在突变残基周围重新包装。第二种方案是在晶体结构内未充分包装的区域中产生组合突变。根据野生型氨基酸和取代物之间的得分差异对突变体进行排序。进行额外的目视检查以确定优选的突变体。通过Twist Biosciences将突变克隆到pET-28b+载体中并合成。采用了改变结合位点亲和力和产生具有不同抗原性的PM类似物的额外设计策略。

[0469] 用Swiss-Model网络服务器构建MP WT的同源模型(图24)。根据BLOSUM90矩阵计算MG和MP WT异构体之间的保守性得分。图像是用PyMol提供的。

[0470] 细胞培养:HEK-293细胞或Huh7细胞用于所有体外AAV中和实验。细胞在15cm组织培养板上生长,并在37℃下用补充有10%小牛血清和青霉素-链霉素的Dulbecco的改良Eagle's培养基在5% CO₂中维持。

[0471] 用于体外中和实验的人类IVIG:从Grifols Therapeutics Inc. (Research Triangle Park, NC, USA) 购买了10%的人类IVIG (Gamunex) 的库存。将单个等分样品在磷酸盐缓冲盐水中稀释至1mg/mL,并储存在80℃以备将来使用。在IP施用 3×10^{10} AAV8-FVIII病毒基因组后,收集并合并12只不同小鼠(50%雄性,50%雌性)的血清,然后在2周后加强施用于同一载体,并在第一次施用后6周再次加强施用。将小鼠血清等分并储存在80℃以备将来使用。

[0472] 体外AAV中和测定:Nab分析如前所述进行并略有修改(Wang Gene Ther. 22:984 (2015))。通过离心将细胞制成球团,并在无血清X-Vivo 10培养基中重新悬浮,然后以48孔或96孔板的形式进行铺板。将人类IVIG或血清系列稀释两倍或十倍。将AAV-Luc与人类IVIG或小鼠血清在4℃下孵育1h,之后添加AAV,然后在4℃下再孵育1h。然后在铺板时将AAV+血清孵育物与悬浮在无血清培养基中的细胞混合。在使用蛋白M进行的中和实验中,在4℃下,测试3种不同的孵育方案,每一步持续1h:先用蛋白M与中和血清孵育,然后用AAV;先用中和血清与AAV孵育,然后用蛋白M;以及,先用蛋白M与AAV孵育,然后用中和血清。将细胞接种在200μl培养基中的48孔板中,或100μl培养基中的96孔板中。转导后,细胞在37℃下培养24-48h,以允许AAV荧光素酶转基因表达。为了测量Luc活性,用被动裂解缓冲液(Promega, Madison, WI, USA)裂解细胞,用Wallac1420 Victor 2自动读板仪测量荧光素酶信号。Nab滴度被定义为荧光素酶活性比无血清对照低50%的最高稀释度。

[0473] AAV免疫小鼠的体内AAV再给药:通过I.P.注射8E5vg或1E9vg AAV8-GFP免疫C57BL/6小鼠。大约1个月后,从小鼠中收集血清,通过AAV8体外中和测定进行滴定。一天后,在含有等剂量的1E9vg或2E9vg的AAV8-荧光素酶的每条腿中进行I.M.注射,其中一条腿施用用磷酸盐缓冲盐水配制的AAV,另一条腿就在注射前施用简单掺合物中用蛋白M类似物配制的AAV。每条腿注射的总体积为200μl。在I.P.施用D-荧光素底物后,在AAV-Luc施用2周后进行发光成像。

[0474] 实施例9:修饰的蛋白M和与蛋白M融合的融合蛋白的动力学

[0475] 对蛋白M浓度的系列稀释物进行生物膜层干涉技术。图22示出MG29的示例性数据。MG29和其他蛋白M构建体的数据汇总于表8、9和图21中。

[0476] 表8

	样品	KD (nM)	kon(1/Ms) kdis(1/s)	Full X ²	Full 12 ²	最大浓度(nM)	# 用于拟合的点
[0477]	WT*	0.80	8.38E+04 6.73E-05	1.55	1.00	50	6
	21*	0.74	5.23E+04 3.85E-05	0.48	1.00	50	6
	29*	0.92	8.00E+04 7.35E-05	0.80	1.00	50	6
	27*	1.05	5.65E+04 5.95E-05	0.61	1.00	50	6
	66*	0.69	8.01E+04 5.55E-05	0.84	1.00	50	6

[0478] 表9

	样品 ID	KD (nM)	Kon (1/Ms)	Kdis(1..s)	Full X ²	Full R ²	最大浓度 (nM)	稀释数量
[0479]	MG64	<0.001	2.21E+04	<1.0E-07	0.09	1.00	500	5
	MG29	7.9	4.3E+04	3.4E-04	1.7	1.00	250	5

[0480] 抗人IgG Fc捕获(AHC)生物传感器和抗小鼠IgG Fc捕获生物传感器(AMC)购自ForteBio。实验在37℃进行,缔合和解离10分钟。结果用1:1结合曲线拟合。星号*表示氨基酸Y338。没有*的类似物是N338。

[0481] 实施例10:体内抗体中和

[0482] 从用AAV8连续免疫的小鼠收集并合并血清。体外中和测定确定合并血清的抗AAV8中和滴度为约1:10,000。在被动转移实验中,通过IV注射将不同量的抗AAV8血清(通过血清体积测定)施用给未接触过AAV的小鼠组,在20至25分钟后IV注射AAV8-荧光素酶报道载体的2e10病毒基因组(vg)。在AAV施用前5分钟,通过IV注射向一些组的小鼠给予蛋白M。7天后进行荧光素酶活性的非侵入性体内成像以定量作为AAV8载体基因表达的代表的光,并且发光信号的任何降低指示血清对AAV8-荧光素酶的中和。结果示于图29中。给予0.0003u1血清的小鼠不能中和AAV8,并且与没有血清的单独注射2e10 vg AAV8-荧光素酶的原始小鼠相比,产生几乎100%的发光信号。施用增加量的中和血清的小鼠组逐渐中和越来越多的AAV8-荧光素酶,其中0.001u1-0.003u1血清中和AAV的大约一半,并且0.3u1血清或更多中和超过AAV的99%。施用3u1血清,然后施用MG88或MG118,然后施用2e10 vg AAV8荧光素酶的小鼠组,由于蛋白M融合蛋白对中和抗体的抑制,导致基因表达显示逃逸中和。MG88、MG29、MG29*和MGWT*的具体剂量为6.3mg,并且MG118的剂量为9mg/小鼠,平均小鼠体重为21克。

[0483] 实施例11:蛋白M的二硫键突变的热稳定性

[0484] 将突变添加到蛋白M(Start)的稳定形式中,其包括下列突变:S150E、S196R、S198P、F237T、S232Q、A342V、N274D、A205P和T355P(表10)。用NanoDSF测定解链温度(Tm)。在对同一样品运行两个毛细管(Tm1和Tm2)。ATm代表Tm1和Tm2的平均值与起始构建体的差值。

[0485] 表10

[0486]	内部编号	名称	Tm1	Tm2	ATm	突变*
	66	起始*	61.2°C	61.2°C	0	
	48	Disulf1	64.9°C	64.9°C	3.7	S201C & A224C
	87	Disulf2	64.6°C	64.5°C	3.4	Q159C & A182C
	91	Disulf3	60.8°C	60.7°C	-0.5	A102C & T161C
	92	Disulf4	61.0°C	61.1°C	-0.1	I86C & F101C
	112	Disulf1&2	68.6°C	68.5°C	7.3	

[0487] 实施例12:体外抗体中和

[0488] 图30显示体外中和测定,其中以2倍稀释滴定来自小鼠的高滴度抗AAV8血清,并如X轴所示添加到孔中。然后,将不同的蛋白M类似物(MG29、MG66、MG71和MG64)以图中所示的分子比率添加到孔中,孵育1小时。仅在血清孔中添加盐水(黑色圆圈)。然后将AAV8-荧光素酶(2×10^{10} 个病毒基因组)添加到每个孔中并孵育1小时,然后将 5×10^4 个Huh7细胞添加到无血清培养基中。将细胞培养48小时,然后读取并定量作为中和的代表的萤光素酶报道信号。

[0489] 该数据表明这些类似物具有中和抗体阻断功能,从而改变了中和曲线,并且MG64 Fc-蛋白M融合二聚体(Fc-PM)的曲线改变大于蛋白M单体类似物。基于生物膜层干涉技术, MG64对免疫球蛋白具有亚纳摩尔亲和力。

[0490] 上述实施例是对本发明的说明,不应被解释为对本发明的限制。尽管已经参照优选实施方案详细描述了本发明,但是在如所附权利要求书中描述和限定的本发明的范围和精髓内存在变化和修改。

表 4: 885 个点突变, 预计可改善 MG WT 的稳定性。 δ 得分指的是突变体的得分--WT 残基的得分。该列表考虑了残基 78-468, 但 PDB ID: 4NZR 内抗体界面 5A 内的残基除外。

[0491]

δ 得分	WT 残基	残基号	突变体 残基
-1.941	N	78	A
-1.209	N	78	D
-2.37	N	78	K
-2.042	N	78	P
-0.503	N	78	R
-2.53	S	81	D
-1.123	S	81	Q
-1.913	Q	83	F
-1.083	Q	83	H
-0.893	Q	83	K
-2.313	Q	83	W
-3.922	Q	83	Y
-0.688	s	84	I
-0.532	s	84	N
-1.437	s	84	T
-0.66	E	85	G
-0.797	E	85	M
-0.601	s	89	R
-0.891	G	90	A
-1.407	G	90	D
-2.616	G	90	E
-2.329	G	90	F
-2.57	G	90	H
-2.587	G	90	K
-1.955	G	90	L
-0.961	G	90	M
-2.926	G	90	Q
-1.886	G	90	R
-1.851	G	90	S
-0.542	G	90	T
-0.794	G	90	W
-3.813	G	90	Y
-1.071	G	91	D
-0.548	G	91	S
-1.752	A	92	D
-1.759	A	92	E

-1.217	A	92	F
-3.819	A	92	G
-2.717	A	92	H
-1.365	A	92	K
-2.814	A	92	L
-1.631	A	92	M
-0.523	A	92	N
-2.818	A	92	Q
-2.113	A	92	R
-1.364	A	92	S
-1.66	A	92	T
-1.995	A	92	W
-3.614	A	92	Y
-0.571	N	93	D
-0.867	N	93	E
-3.022	F	94	T
-0.67	F	94	V
-1.789	E	96	D
-0.618	K	97	Y
-0.729	N	100	E
-0.506	N	100	G
-0.817	N	100	K
-0.705	N	100	S
-0.569	N	100	T
-2.662	F	101	W
-0.531	A	108	H
-1.192	A	108	V
-1.094	A	108	w
-0.723	N	111	H
-1.94	N	111	K
-1.372	N	111	R
-0.545	N	111	Y
-1.2	S	112	A
-3	S	112	I
-0.791	s	112	N
-1.232	s	112	Q
-2.525	s	112	T
-1.568	s	112	V
-2.517	s	112	Y
-0.871	p	113	E
-0.828	K	122	Q
-1.059	K	122	R
-0.876	T	123	F
-0.857	T	123	R
-2.035	T	123	V
-0.542	T	123	Y

[0492]

-0.636	I	125	V
-1.039	S	126	A
-1.739	S	126	T
-2.338	s	126	V
-0.914	s	126	Y
-1.447	G	127	V
-0.932	L	128	I
-0.743	L	128	R
-0.66	L	128	V
-0.978	K	130	L
-0.557	K	130	R
-1.688	K	130	Y
-2.35	T	131	L
-0.832	D	133	W
-1.585	N	134	I
-1.077	N	134	K
-1.851	N	134	L
-1.405	N	134	M
-0.653	N	134	R
-0.558	N	134	W
-0.966	N	134	Y
-1.303	I	136	Y
-1.332	T	137	C
-4.319	T	137	I
-0.647	T	137	M
-2.796	T	137	V
-2.106	S	139	D
-0.656	S	139	N
-1.302	s	139	P
-0.713	K	141	I
-0.59	K	141	L
-0.687	K	141	V
-1.754	K	141	w
-3.179	A	142	I
-1.581	A	142	T
-3.178	A	142	V
-0.904	D	146	F
-1.939	D	146	I
-2.182	D	146	L
-0.705	D	146	V
-1.628	D	146	w
-1.335	D	146	Y
-5.122	H	147	F
-2.485	H	147	L
-2.909	H	147	M
-0.596	H	147	W

-3.907	H	147	Y
-2.12	V	148	F
-1.976	V	148	I
-1.402	V	148	L
-1.182	V	148	Q
-0.697	V	148	W
-1.809	V	148	Y
-1.083	A	149	L
-2.315	A	149	T
-1.928	A	149	V
-2.153	S	150	A
-3.033	s	150	D
-7.399	s	150	E
-2.785	s	150	H
-2.321	s	150	K
-1.154	s	150	L
-1.469	s	150	N
-2.975	s	150	Q
-1.326	s	150	R
-0.648	s	150	Y
-1.674	s	153	R
-1.26	L	154	I
-0.729	L	155	R
-1.276	L	155	Y
-0.943	s	156	C
-2.615	s	156	F
-4.064	s	156	I
-4.341	s	156	K
-3.463	s	156	L
-2.776	s	156	M
-0.936	s	156	N
-1.309	s	156	P
-0.846	s	156	R
-4.236	s	156	T
-3.759	s	156	V
-4.005	s	156	w
-2.623	s	156	Y
-1.007	F	164	L
-0.618	F	164	Y
-0.571	R	167	F
-2.262	R	167	W
-1.335	M	170	F
-2.097	T	175	P
-0.937	T	176	N
-1.299	N	184	E
-1.904	N	184	F

[0493]

-2.794	N	184	I
-1.554	N	184	T
-3.268	N	184	V
-1.558	N	184	Y
-0.501	R	185	F
-1.262	R	185	I
-2.285	R	185	L
-2.347	R	185	M
-0.999	D	189	Q
-0.831	R	192	D
-2.382	R	192	G
-1.519	R	192	T
-1.168	R	192	V
-0.527	Q	193	K
-1.143	Q	193	R
-0.963	S	196	E
-1.34	s	196	F
-1.583	s	196	I
-1.214	s	196	K
-1.886	s	196	L
-0.669	s	196	M
-0.517	s	196	N
-3.217	s	196	Q
-3.52	s	196	R
-0.976	s	196	V
-3.279	s	196	Y
-1.692	s	198	A
-2.806	s	198	F
-1.083	s	198	H
-2.867	s	198	I
-3.325	s	198	K
-3.234	s	198	L
-2.335	s	198	M
-1.628	s	198	N
-3.686	s	198	P
-2.556	s	198	Q
-3.722	s	198	R
-0.646	s	198	T
-1.334	s	198	V
-6.127	s	198	Y
-1.375	s	201	D
-1.334	s	201	E
-1.914	s	201	F
-1.701	s	201	G
-0.869	s	201	H
-1.426	s	201	K

-1.078	S	201	N
-1.07	S	201	Q
-2.311	S	201	T
-1.826	S	201	V
-2.775	S	201	Y
-0.788	N	202	A
-2.384	N	202	F
-2.528	N	202	I
-0.825	N	202	S
-2.151	N	202	T
-1.783	N	202	V
-2.941	N	202	w
-2.296	N	202	Y
-2.388	K	204	P
-1.227	K	204	Q
-0.519	A	205	c
-2.228	A	205	I
-1.657	A	205	L
-3.12	A	205	P
-1.408	A	205	Q
-0.669	A	205	T
-0.817	A	205	V
-1.201	T	206	D
-0.502	T	206	E
-0.83	T	206	F
-1.418	T	206	I
-0.654	T	206	L
-0.73	T	206	Q
-1.067	T	206	V
-1.448	T	206	Y
-0.588	T	207	R
-0.717	S	209	E
-1.577	S	209	F
-1.686	s	209	I
-0.958	s	209	K
-1.783	s	209	L
-1.567	s	209	M
-0.791	s	209	Q
-1.454	s	209	R
-1.638	s	209	T
-1.984	s	209	V
-1.384	s	209	w
-2.308	s	209	Y
-1.891	s	211	D
-3.197	s	211	K
-0.9	s	211	N

[0494]

-0.542	S	211	P
-2.202	S	211	Q
-1.875	T	215	F
-1.234	T	215	H
-1.064	T	215	Q
-1.375	T	215	W
-3.349	T	215	Y
-0.856	K	218	I
-0.888	K	218	R
-1.308	K	218	V
-0.656	T	220	F
-1.52	T	220	I
-1.372	T	220	K
-0.646	T	220	L
-0.945	T	220	R
-1.702	T	220	V
-0.666	T	220	w
-0.891	T	220	Y
-1.113	F	222	R
-2.105	A	224	E
-1.543	A	224	Q
-0.698	K	225	E
-3.025	K	225	P
-1.562	G	226	D
-0.743	S	227	T
-2.441	D	231	C
-3.049	D	231	I
-2.346	D	231	K
-0.937	D	231	L
-0.738	D	231	R
-3.258	D	231	T
-0.971	S	232	A
-1.24	S	232	C
-5.712	s	232	D
-6.694	s	232	E
-3.533	s	232	F
-3.132	s	232	H
-6.649	s	232	I
-4.075	s	232	K
-6.718	s	232	L
-4.104	s	232	M
-3.012	s	232	N
-6.497	s	232	Q
-4.977	s	232	R
-3.937	s	232	V
-1.104	s	232	w

-1.517	S	232	Y
-1.935	P	234	A
-3.303	P	234	D
-1.38	P	234	E
-1.214	P	234	F
-3.816	P	234	K
-2.003	P	234	L
-4.159	P	234	Q
-4.154	P	234	R
-2.314	P	234	S
-2.296	P	234	T
-0.924	P	234	W
-1.709	P	234	Y
-3.955	N	235	W
-0.751	H	236	A
-4.755	H	236	F
-3.111	H	236	I
-1.635	H	236	K
-3.932	H	236	M
-2.882	H	236	T
-5.392	H	236	V
-2.542	H	236	w
-3.223	H	236	Y
-1.625	F	237	C
-3.832	F	237	D
-3.074	F	237	E
-3.752	F	237	I
-4.054	F	237	K
-2.101	F	237	L
-1.774	F	237	N
-1.465	F	237	P
-1.24	F	237	Q
-4.499	F	237	R
-3.617	F	237	T
-3.417	F	237	V
-2.078	E	239	D
-4.044	E	239	F
-1.146	E	239	I
-0.577	E	239	K
-0.717	E	239	L
-1.1	E	239	R
-0.829	E	239	S
-0.933	E	239	T
-0.887	E	239	V
-1.193	E	239	w
-3.362	E	239	Y

[0495]

-2.128	V	241	I
-0.684	V	241	M
-2.872	T	243	I
-3.525	T	243	V
-1.174	L	244	M
-2.811	A	245	D
-1.161	A	245	E
-1.134	A	245	F
-3.259	A	245	I
-3.917	A	245	L
-2.947	A	245	M
-5.98	A	245	Q
-2.926	A	245	R
-0.579	A	245	S
-4.056	A	245	V
-0.829	I	246	Y
-1.007	D	247	E
-1.005	D	247	F
-1.068	D	247	G
-2.402	D	247	H
-1.724	D	247	I
-0.822	D	247	L
-0.793	D	247	M
-1.467	D	247	N
-1.068	D	247	V
-1.243	D	247	W
-1.512	D	247	Y
-0.559	K	249	N
-1.533	K	249	R
-2.761	D	250	E
-0.872	D	250	F
-1.268	D	250	H
-1.039	D	250	I
-0.698	D	250	M
-1.318	D	250	N
-3.546	D	250	Q
-0.744	D	250	R
-3.286	D	250	W
-1.838	D	250	Y
-1.447	S	252	G
-2.581	A	253	K
-0.599	A	253	N
-1.189	A	253	Q
-1.419	A	253	R
-0.52	L	254	H
-4.297	K	255	C

-2.226	K	255	F
-0.65	K	255	G
-4.582	K	255	I
-6.318	K	255	L
-4.961	K	255	M
-1.004	K	255	N
-1.368	K	255	Q
-1.305	K	255	R
-1.12	K	255	T
-2.993	K	255	V
-0.79	K	255	w
-2.48	K	255	Y
-1.663	T	256	A
-4.605	T	256	D
-3.077	T	256	E
-2.088	T	256	F
-1.105	T	256	H
-1.273	T	256	I
-2.344	T	256	K
-1.261	T	256	L
-2.018	T	256	N
-1.721	T	256	Q
-1.135	T	256	R
-1.085	T	256	S
-3.685	T	256	w
-3.064	T	256	Y
-1.052	T	257	E
-0.905	T	257	F
-1.179	T	257	H
-1.169	T	257	L
-2.225	T	257	M
-1.898	T	257	V
-0.719	T	257	w
-2.493	T	257	Y
-1.846	I	258	F
-0.602	D	259	I
-2.52	D	259	L
-2.002	D	259	M
-2.419	D	259	N
-4.395	D	259	R
-0.504	D	259	T
-1.555	D	259	Y
-3.113	T	264	D
-0.619	T	264	G
-0.606	T	264	H
-1.036	T	264	I

[0496]

-2.271	T	264	K
-2.231	T	264	N
-1.027	T	264	Q
-1.297	T	264	R
-1.789	T	264	V
-1.162	R	269	F
-2.384	R	269	W
-0.916	R	269	Y
-1.668	G	270	K
-1.018	G	270	N
-7.501	S	272	G
-6.59	N	274	D
-1.29	N	274	H
-1.438	N	274	K
-1.345	N	274	Q
-1.128	N	274	R
-1.046	N	274	S
-6.425	G	275	A
-6.719	G	275	C
-3.004	G	275	E
-3.439	G	275	F
-2.989	G	275	H
-5.834	G	275	L
-5.771	G	275	M
-4.083	G	275	N
-2.832	G	275	Q
-5.141	G	275	s
-6.48	S	276	D
-4.126	S	276	E
-4.296	s	276	F
-3.057	s	276	G
-1.099	s	276	H
-1.014	s	276	L
-1.983	s	276	M
-4.191	s	276	Q
-1.244	s	276	R
-4.129	s	276	T
-2.589	s	276	W
-3.747	s	276	Y
-1.295	N	279	D
-1.316	N	279	E
-1.933	N	279	F
-0.519	N	279	M
-2.816	N	279	R
-1.667	N	279	S
-2.151	N	279	w

-5.197	N	279	Y
-5.082	Q	282	D
-1.912	Q	282	E
-3.221	Q	282	G
-2.608	Q	282	H
-3.413	Q	282	N
-1.175	p	284	A
-0.563	p	284	C
-1.726	p	284	D
-0.948	p	284	R
-0.824	s	286	D
-0.7	s	286	T
-0.836	V	287	I
-1.126	V	287	L
-0.679	K	288	R
-1.935	s	291	T
-4.25	T	297	D
-5.165	T	297	G
-2.506	T	297	H
-0.602	T	297	K
-0.653	T	297	L
-3.168	T	297	N
-3.251	T	297	Q
-0.569	T	297	R
-0.607	T	297	Y
-0.622	V	299	I
-3.283	N	300	A
-0.67	N	300	D
-2.389	N	300	E
-4.801	N	300	F
-0.955	N	300	G
-2.175	N	300	H
-2.688	N	300	K
-1.342	N	300	L
-1.566	N	300	M
-4.67	N	300	Q
-4.369	N	300	R
-2.253	N	300	T
-3.152	N	300	W
-4.116	N	300	Y
-0.711	A	302	D
-1.057	A	302	K
-2.367	A	302	N
-3.445	A	302	P
-1.437	A	302	Q
-1.562	A	302	R

[0497]

-1.241	A	302	S
-1.665	A	302	T
-0.918	A	302	V
-1.631	K	303	M
-1.841	Q	304	P
-1.3	I	305	L
-0.931	A	307	G
-1.57	N	308	I
-1.084	N	308	R
-1.003	N	308	Y
-0.919	V	309	I
-1.968	V	309	L
-3.222	V	310	D
-4.277	V	310	E
-1.284	V	310	G
-2.278	V	310	I
-1.206	V	310	K
-2.64	V	310	L
-1.981	V	310	M
-1.643	V	310	Q
-0.603	V	310	R
-1.476	V	310	Y
-0.969	E	311	D
-0.741	E	313	T
-0.584	T	317	L
-1.56	T	317	Q
-0.974	S	318	T
-1.689	K	319	G
-1.245	K	319	P
-0.645	K	319	Q
-0.662	K	319	s
-1.445	A	320	N
-2.732	A	320	S
-3.457	A	320	T
-1.693	S	322	D
-1.149	S	322	E
-2.31	s	322	F
-0.547	s	322	L
-1.208	s	322	Q
-1.229	s	322	R
-1.363	s	322	W
-2.665	s	322	Y
-1.806	N	326	C
-1.348	N	326	E
-6.807	N	326	I
-3.008	N	326	L

-4.117	N	326	M
-0.912	N	326	Q
-3.518	N	326	T
-6.143	N	326	V
-1.18	N	326	w
-1.944	P	327	I
-0.929	P	327	L
-1.154	V	329	I
-1.555	G	331	C
-7.293	G	331	D
-1.759	G	331	E
-2.826	G	331	H
-0.631	G	331	I
-1.148	G	331	K
-2.247	G	331	M
-5.615	G	331	N
-3.757	G	331	Q
-1.709	G	331	R
-5.193	G	331	S
-6.058	G	331	T
-2.025	G	331	V
-1.709	S	332	D
-4.232	S	332	G
-1.172	K	333	D
-0.711	K	333	F
-1.439	K	333	H
-1.286	K	333	I
-0.779	K	333	M
-0.688	K	333	N
-0.984	K	333	Q
-0.517	K	333	R
-0.911	K	333	V
-2.311	N	335	F
-0.994	N	335	H
-1.861	N	335	I
-0.569	N	335	K
-1.288	N	335	Q
-1.41	N	335	R
-1.375	N	335	V
-2.167	N	335	w
-4.264	N	335	Y
-1.842	I	337	L
-2.65	A	342	F
-2.784	A	342	I
-3.644	A	342	L
-4.974	A	342	V

[0498]

-2.055	S	343	F
-1.081	S	343	H
-2.498	S	343	I
-0.647	S	343	L
-1.148	S	343	M
-2.983	S	343	T
-5.103	S	343	V
-3.4	T	347	L
-0.929	T	347	Y
-2.024	H	348	F
-1.537	H	348	I
-3.436	H	348	L
-0.527	H	348	T
-0.875	H	348	W
-2.087	H	348	Y
-0.64	L	351	W
-2.674	L	351	Y
-0.9	V	354	I
-0.894	V	354	W
-2.123	T	355	A
-6.547	T	355	D
-2.908	T	355	E
-0.505	T	355	F
-6.168	T	355	G
-1.467	T	355	H
-1.937	T	355	I
-2.431	T	355	K
-1.713	T	355	L
-1.509	T	355	M
-2.926	T	355	N
-4.599	T	355	P
-2.548	T	355	Q
-1.312	T	355	R
-1.839	T	355	S
-1.912	T	355	V
-0.851	T	355	w
-3.208	T	355	Y
-1.345	Q	357	A
-2.15	Q	357	D
-1.018	Q	357	E
-2.172	Q	357	F
-0.616	Q	357	K
-0.946	Q	357	L
-0.974	Q	357	M
-2.632	Q	357	N
-3.698	Q	357	P

-1.047	Q	357	R
-3.433	Q	357	S
-1.903	Q	357	T
-2.693	Q	357	W
-3.419	Q	357	Y
-1.398	N	358	A
-0.821	N	358	T
-0.616	N	358	V
-1.062	N	358	Y
-1.438	S	359	D
-1.059	S	359	E
-1.378	s	359	K
-2.104	s	359	R
-1.28	D	360	N
-2.902	N	361	D
-3.808	N	361	G
-0.729	N	361	Q
-3.46	N	361	s
-0.856	S	362	T
-0.513	A	363	F
-0.78	A	363	N
-0.774	A	363	R
-0.558	A	363	T
-0.668	A	363	Y
-1.701	N	367	D
-2.021	N	367	E
-2.692	N	367	R
-1.089	N	367	T
-1.429	L	369	F
-1.334	L	369	Y
-0.878	K	370	Q
-1.132	Q	371	E
-4.072	Q	371	G
-1.78	Q	371	K
-0.776	Q	371	N
-1.402	Q	371	S
-1.278	Q	371	T
-1.584	A	372	F
-1.167	A	372	M
-0.734	A	372	Q
-1.863	A	372	Y
-1.946	V	373	F
-1.549	V	373	I
-0.698	V	373	L
-2.254	V	373	W
-2.226	V	373	Y

[0499]

-2.604	G	374	A
-0.584	G	374	C
-1.9	G	374	D
-2.244	G	374	E
-1.248	G	374	F
-2.467	G	374	H
-2.244	G	374	I
-2.238	G	374	K
-2.56	G	374	L
-2.589	G	374	M
-1.682	G	374	N
-2.086	G	374	Q
-1.912	G	374	R
-2.461	G	374	S
-1.343	G	374	T
-1.743	G	374	V
-1.968	G	374	w
-3.292	G	374	Y
-2.883	D	375	E
-2.01	D	375	F
-2.704	D	375	Y
-1.033	N	378	D
-2.421	N	378	F
-0.527	N	378	H
-4.306	N	378	I
-2.095	N	378	L
-2.91	N	378	V
-2.298	N	378	w
-5.452	N	378	Y
-1.64	Q	385	I
-1.14	Q	385	L
-6.284	Q	385	Y
-1.657	L	399	Y
-2.025	V	400	I
-1.497	V	400	L
-0.776	V	400	M
-4.382	K	401	G
-0.99	N	402	D
-0.666	N	402	H
-3.648	N	402	I
-0.629	N	402	K
-3.676	N	402	L
-1.291	N	402	M
-4.123	N	402	Q
-1.9	N	402	R
-0.632	N	402	T

-2.535	N	402	V
-2.104	N	402	Y
-1.381	T	405	D
-1.16	T	405	E
-1.456	T	405	G
-0.661	T	405	N
-1.568	T	405	P
-0.659	T	405	S
-1.621	N	406	D
-1.036	K	407	Q
-0.624	D	408	E
-1.367	S	409	A
-1.017	S	409	D
-1.012	s	409	E
-2.884	s	409	F
-2.887	s	409	G
-3.223	s	409	H
-2.537	s	409	I
-2.811	s	409	K
-1.925	s	409	L
-2.672	s	409	N
-0.58	s	409	Q
-2.919	s	409	R
-2.456	s	409	V
-1.9	s	409	w
-3.769	s	409	Y
-0.703	D	411	I
-0.601	D	411	N
-1.019	D	411	W
-2.19	D	411	Y
-3.008	L	413	I
-0.851	L	413	R
-0.557	L	413	T
-2.019	V	414	F
-1.445	V	414	W
-2.099	V	414	Y
-1.502	s	417	A
-1.726	s	417	L
-1.482	s	417	M
-1.798	s	417	T
-2.722	s	417	V
-2.372	s	417	w
-1.977	s	417	Y
-1.184	L	418	F
-0.84	L	418	Y
-0.759	K	419	E

[0500]

-1.798	K	419	I
-2.514	K	419	L
-1.942	K	419	M
-1.308	K	419	Q
-3.11	H	424	F
-1.633	H	424	L
-1.004	H	424	M
-3.125	H	424	Y
-0.972	A	428	C
-1.093	A	428	I
-1.48	A	428	L
-2.906	A	428	T
-2.715	A	428	V
-2.242	N	434	A
-1.994	N	434	F
-1.556	N	434	G
-1.092	N	434	I
-0.835	N	434	L
-1.969	N	434	Q
-2.092	N	434	R
-1.518	N	434	T
-0.503	N	434	V
-0.931	T	435	I
-1.41	T	435	V
-1.764	Y	443	E
-2.209	Y	450	W
-0.751	S	459	K
-1.234	S	459	L
-1.791	s	459	M
-2.107	s	459	P
-0.934	E	460	D
-3.904	E	460	G
-1.489	E	460	K
-1.046	E	460	Q
-1.919	E	460	R
-0.581	N	463	A
-2.529	N	463	D
-3.986	N	463	E
-4.058	N	463	K
-0.527	N	463	L
-2.682	N	463	Q
-2.561	N	463	R
-0.51	N	463	T
-1.797	N	463	V
-3.545	E	464	A
-3.37	E	464	D

-2.285	E	464	H
-2.454	E	464	I
-5.122	E	464	K
-2.639	E	464	L
-3.909	E	464	M
-2.144	E	464	N
-2.078	E	464	Q
-3.742	E	464	R
-2.292	E	464	S
-2.385	E	464	T
-1.377	E	464	W
-0.612	E	464	Y
-2.49	I	465	L
-1.611	I	465	Y
-1.788	R	468	G
-0.909	R	468	K
-1.169	R	468	L
-4.089	R	468	Q
-0.664	R	468	S
-1.506	R	468	T
-1.095	R	468	W

表 5: 165 个点突变, 预计可改善 MG WT 的稳定性。 δ 得分指的是突变体的得分--WT 残基的得分。该列表考虑了残基 78-468, 但 PDB ID: 4NZR 内抗体界面 5A 内的残基除外。

δ 得分	WT 残基	残基号	突变体残基
-3.9	Q	83	Y
-3.8	G	90	Y
-3.8	A	92	G
-3.6	A	92	Y
-3.0	F	94	T
-4.3	T	137	I
-3.2	A	142	I
-3.2	A	142	V
-5.1	H	147	F
-3.9	H	147	Y
-3.0	S	150	D
-7.4	S	150	E
-4.1	s	156	I

[0501]

-4.3	s	156	K
-3.5	s	156	L
-4.2	s	156	T
-3.8	s	156	V
-4.0	s	156	w
-3.3	N	184	V
-3.2	s	196	Q
-3.5	s	196	R
-3.3	s	196	Y
-3.3	s	198	K
-3.2	s	198	L
-3.7	s	198	P
-3.7	s	198	R
-6.1	s	198	Y
-3.1	A	205	P
-3.2	s	211	K
-3.3	T	215	Y
-3.0	K	225	P
-3.0	D	231	I
-3.3	D	231	T
-5.7	S	232	D
-6.7	S	232	E
-3.5	s	232	F
-3.1	s	232	H
-6.6	S	232	I
-4.1	S	232	K
-6.7	S	232	L
-4.1	S	232	M
-3.0	S	232	N
-6.5	S	232	Q
-5.0	S	232	R
-3.9	S	232	V
-3.3	P	234	D
-3.8	P	234	K
-4.2	P	234	Q
-4.2	P	234	R
-4.0	N	235	W
-4.8	H	236	F
-3.1	H	236	I
-3.9	H	236	M
-5.4	H	236	V
-3.2	H	236	Y
-3.8	F	237	D
-3.1	F	237	E
-3.8	F	237	I
-4.1	F	237	K

-4.5	F	237	R
-3.6	F	237	T
-3.4	F	237	V
-4.0	E	239	F
-3.4	E	239	Y
-3.5	T	243	V
-3.3	A	245	I
-3.9	A	245	L
-6.0	A	245	Q
-4.1	A	245	V
-3.5	D	250	Q
-3.3	D	250	w
-4.3	K	255	c
-4.6	K	255	I
-6.3	K	255	L
-5.0	K	255	M
-4.6	T	256	D
-3.1	T	256	E
-3.7	T	256	W
-3.1	T	256	Y
-4.4	D	259	R
-3.1	T	264	D
-7.5	S	272	G
-6.6	N	274	D
-6.4	G	275	A
-6.7	G	275	C
-3.0	G	275	E
-3.4	G	275	F
-5.8	G	275	L
-5.8	G	275	M
-4.1	G	275	N
-5.1	G	275	S
-6.5	S	276	D
-4.1	S	276	E
-4.3	s	276	F
-3.1	s	276	G
-4.2	s	276	Q
-4.1	s	276	T
-3.7	s	276	Y
-5.2	N	279	Y
-5.1	Q	282	D
-3.2	Q	282	G
-3.4	Q	282	N
-4.3	T	297	D
-5.2	T	297	G
-3.2	T	297	N

-3.3	T	297	Q
-3.3	N	300	A
-4.8	N	300	F
-4.7	N	300	Q
-4.4	N	300	R
-3.2	N	300	W
-4.1	N	300	Y
-3.4	A	302	P
-3.2	V	310	D
-4.3	V	310	E
-3.5	A	320	T
-6.8	N	326	I
-3.0	N	326	L
-4.1	N	326	M
-3.5	N	326	T
-6.1	N	326	V
-7.3	G	331	D
-5.6	G	331	N
-3.8	G	331	Q
-5.2	G	331	s
-6.1	G	331	T
-4.2	S	332	G
-4.3	N	335	Y
-3.6	A	342	L
-5.0	A	342	V
-5.1	S	343	V
-3.4	T	347	L
-3.4	H	348	L
-6.5	T	355	D
-6.2	T	355	G
-4.6	T	355	P
-3.2	T	355	Y
-3.7	Q	357	P
-3.4	Q	357	S
-3.4	Q	357	Y
-3.8	N	361	G
-3.5	N	361	S
-4.1	Q	371	G
-3.3	G	374	Y
-4.3	N	378	I
-5.5	N	378	Y
-6.3	Q	385	Y
-4.4	K	401	G
-3.6	N	402	I
-3.7	N	402	L
-4.1	N	402	Q

-3.2	S	409	H
-3.8	S	409	Y
-3.0	L	413	I
-3.1	H	424	F
-3.1	H	424	Y
-3.9	E	460	G
-4.0	N	463	E
-4.1	N	463	K
-3.5	E	464	A
-3.4	E	464	D
-5.1	E	464	K
-3.9	E	464	M
-3.7	E	464	R
-4.1	R	468	Q

表 6: 128 个点突变, 预计可改善 MG WT 的亲合性。 δ 得分指的是突变体的得分-WT 残基的得分。该列表考虑了在 PDB ID: 4NZR 内的抗体界面的 5A 内的 70 个残基。

δ 得分	WT 残基	残基号	突变体残基
-1.6	R	95	E
-0.6	A	102	I
-0.7	A	102	L
-1.3	N	103	A
-0.9	N	103	C
-1.5	N	103	D
-2.5	N	103	E
-0.8	N	103	F
-0.7	N	103	H
-3.5	N	103	I
-2.6	N	103	K
-0.8	N	103	L
-1.5	N	103	M
-1.8	N	103	Q
-2.5	N	103	R
-1.0	N	103	S
-2.3	N	103	T
-2.1	N	103	V
-1.3	N	103	Y
-0.8	S	106	A

[0502]

[0503]

-0.9	E	107	K
-0.7	E	107	L
-0.7	K	114	F
-0.7	K	114	L
-1.1	K	114	M
-2.1	K	114	T
-1.6	L	116	D
-1.4	L	116	E
-2.4	L	116	K
-3.9	L	116	R
-1.0	L	116	W
-1.3	S	160	A
-1.5	S	160	P
-0.9	T	161	I
-0.9	T	161	L
-2.3	T	161	P
-0.6	E	162	L
-0.5	Y	163	F
-1.0	M	181	F
-0.8	M	181	I
-1.8	M	181	W
-0.6	G	186	A
-0.5	G	186	C
-0.5	G	186	D
-1.6	G	186	F
-2.3	G	186	H
-0.8	G	186	K
-0.5	G	186	L
-0.6	G	186	Q
-2.4	G	186	R
-3.0	G	186	S
-3.0	G	186	T
-1.8	N	321	H
-0.8	N	321	K
-1.9	R	381	F
-1.6	R	381	W
-2.0	R	381	Y
-0.7	R	384	L
-0.5	Y	389	A
-2.3	Y	389	D
-2.5	Y	389	E
-1.7	Y	389	K
-1.1	Y	389	L
-2.4	Y	389	P
-1.2	Y	389	Q
-0.8	Y	389	S

-0.8	F	390	Y
-2.9	A	391	I
-0.8	A	391	T
-2.8	A	391	V
-1.7	D	396	A
-0.9	K	397	I
-0.8	K	397	V
-1.6	E	426	I
-1.0	E	426	L
-0.9	Y	429	E
-0.9	Y	436	L
-1.5	R	438	F
-1.6	R	438	I
-0.6	R	438	Q
-0.7	R	438	V
-3.0	V	439	F

[0504]

-1.2	V	439	L
-1.4	V	439	Y
-1.1	E	441	Q
-1.0	N	442	D
-3.5	N	442	E
-4.0	N	442	F
-0.6	N	442	H
-1.7	N	442	I
-1.2	N	442	L
-1.2	N	442	M
-1.9	N	442	V
-1.6	N	442	w
-4.4	N	442	Y
-1.0	A	447	L
-0.5	A	447	N
-0.8	S	448	Y
-0.7	I	449	K
-2.5	I	449	R
-0.7	N	452	A
-3.5	N	452	F
-1.1	N	452	K
-0.6	N	452	Q
-1.1	E	453	K
-1.3	E	453	L
-2.0	E	453	Q
-1.7	E	453	R
-0.6	A	455	M
-2.0	S	456	A
-3.7	S	456	F
-4.7	s	456	K
-0.6	s	456	L
-1.7	s	456	M
-1.0	s	456	N
-3.2	s	456	R
-1.3	s	456	Y
-0.8	Q	462	A
-0.6	Q	462	F
-1.4	Q	462	K
-1.8	Q	462	L
-2.7	Q	462	R
-1.1	Q	462	Y
-0.5	L	466	D
-1.2	L	466	E
-1.5	L	466	K
-1.3	L	466	R
-0.7	L	466	Y

[0505] 表7:17个点突变,预计可改善MG WT的亲水性。 δ 得分指的是突变体的得分-wt残基的得分。该列表考虑了在PDB ID:4NZR内的抗体界面的5A内的70个残基。

[0506]

δ 得分	WT 残基	残基 号	突变体 残基
-0.7	N	103	H
-2.3	G	186	H
-1.8	N	321	H
-0.6	N	442	H
-1.5	N	103	D
-1.6	L	116	D
-0.5	G	186	D
-2.3	Y	389	D
-1.0	N	442	D
-0.5	L	466	D
-1.6	R	95	E
-2.5	N	103	E
-1.4	L	116	E
-2.5	Y	389	E
-0.9	Y	429	E
-3.5	N	442	E
-1.2	L	466	E

[0507] 序列

[0508] SEQ ID NO:1野生型生殖支原体蛋白M

80

[0510]

```

Ile Phe Ala Asn Val Val Glu Leu Glu Phe Tyr Ser Thr Ser Lys Ala
305                      310                      315                      320

Asn Ser Phe Gly Phe Asn Pro Leu Val Leu Gly Ser Lys Thr Asn Val
                      325                      330                      335

Ile Tyr Asp Leu Phe Ala Ser Lys Pro Phe Thr His Ile Asp Leu Thr
                      340                      345                      350

Gln Val Thr Leu Gln Asn Ser Asp Asn Ser Ala Ile Asp Ala Asn Lys
                      355                      360                      365

Leu Lys Gln Ala Val Gly Asp Ile Tyr Asn Tyr Arg Arg Phe Glu Arg
                      370                      375                      380

Gln Phe Gln Gly Tyr Phe Ala Gly Gly Tyr Ile Asp Lys Tyr Leu Val
385                      390                      395                      400

Lys Asn Val Asn Thr Asn Lys Asp Ser Asp Asp Asp Leu Val Tyr Arg
                      405                      410                      415

Ser Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Leu Glu Glu Ala Tyr Arg Glu Gly
                      420                      425                      430

Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Val Asn Glu Asn Tyr Tyr Pro Gly Ala Ser
                      435                      440                      445

Ile Tyr Glu Asn Glu Arg Ala Ser Arg Asp Ser Glu Phe Gln Asn Glu
450                      455                      460

Ile Leu Lys Arg Ala Glu Gln Asn Gly Val Thr Phe Asp Glu Asn Ile
465                      470                      475                      480

Lys Arg Ile Thr Ala Ser Gly Lys Tyr Ser Val Gln Phe Gln Lys Leu
                      485                      490                      495

Glu Asn Asp Thr Asp Ser Ser Leu Glu Arg Met Thr Lys Ala Val Glu
                      500                      505                      510

Gly Leu Val Thr Val Ile Gly Glu Glu Lys Phe Glu Thr Val Asp Ile
515                      520                      525

Thr Gly Val Ser Ser Asp Thr Asn Glu Val Lys Ser Leu Ala Lys Glu
530                      535                      540

Leu Lys Thr Asn Ala Leu Gly Val Lys Leu Lys Leu
545                      550                      555

```

[0511] SEQ ID NO:2:生殖支原体蛋白M(SEQ ID NO:1的氨基酸残基37-556)的可溶性形式,带有N-末端6-His标签和凝血酶切割位点NO:1)

```

His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His
1                      5                      10                      15

```

[0512]

```

Met Thr Asn Leu Val Asn Gln Ser Gly Tyr Ala Leu Val Ala Ser Gly
                      20                      25                      30

Arg Ser Gly Asn Leu Gly Phe Lys Leu Phe Ser Thr Gln Ser Pro Ser
                      35                      40                      45

```

[0513]

Ala	Glu	Val	Lys	Leu	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Asn	Asp	Gly	Ser	Tyr	Gln	50	55	60
Ser	Glu	Ile	Asp	Leu	Ser	Gly	Gly	Ala	Asn	Phe	Arg	Glu	Lys	Phe	Arg	65	70	75
Asn	Phe	Ala	Asn	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Ile	Thr	Asn	Ser	Pro	Lys	Gly	85	90	95
Leu	Asp	Arg	Pro	Val	Pro	Lys	Thr	Glu	Ile	Ser	Gly	Leu	Ile	Lys	Thr	100	105	110
Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Thr	Pro	Ser	Phe	Lys	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Asp	His	115	120	125
Val	Ala	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Gln	Ser	Thr	Glu	Tyr	130	135	140
Phe	Asn	Asn	Arg	Val	Leu	Met	Pro	Ile	Leu	Gln	Thr	Thr	Asn	Gly	Thr	145	150	155
Leu	Met	Ala	Asn	Asn	Arg	Gly	Tyr	Asp	Asp	Val	Phe	Arg	Gln	Val	Pro	165	170	175
Ser	Phe	Ser	Gly	Trp	Ser	Asn	Thr	Lys	Ala	Thr	Thr	Val	Ser	Thr	Ser	180	185	190
Asn	Asn	Leu	Thr	Tyr	Asp	Lys	Trp	Thr	Tyr	Phe	Ala	Ala	Lys	Gly	Ser	195	200	205
Pro	Leu	Tyr	Asp	Ser	Tyr	Pro	Asn	His	Phe	Phe	Glu	Asp	Val	Lys	Thr	210	215	220
Leu	Ala	Ile	Asp	Ala	Lys	Asp	Ile	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Ile	Asp	225	230	235
Ser	Glu	Lys	Pro	Thr	Tyr	Leu	Ile	Ile	Arg	Gly	Leu	Ser	Gly	Asn	Gly	245	250	255
Ser	Gln	Leu	Asn	Glu	Leu	Gln	Leu	Pro	Glu	Ser	Val	Lys	Lys	Val	Ser	260	265	270
Leu	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Thr	Gly	Val	Asn	Val	Ala	Lys	Gln	Ile	Phe	Ala	275	280	285
Asn	Val	Val	Glu	Leu	Glu	Phe	Tyr	Ser	Thr	Ser	Lys	Ala	Asn	Ser	Phe	290	295	300
Gly	Phe	Asn	Pro	Leu	Val	Leu	Gly	Ser	Lys	Thr	Asn	Val	Ile	Tyr	Asp	305	310	315
Leu	Phe	Ala	Ser	Lys	Pro	Phe	Thr	His	Ile	Asp	Leu	Thr	Gln	Val	Thr	325	330	335
Leu	Gln	Asn	Ser	Asp	Asn	Ser	Ala	Ile	Asp	Ala	Asn	Lys	Leu	Lys	Gln	340	345	350
Ala	Val	Gly	Asp	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Arg	Phe	Glu	Arg	Gln	Phe	Gln	355	360	365

Gly Tyr Phe Ala Gly Gly Tyr Ile Asp Lys Tyr Leu Val Lys Asn Val
 370 375 380
 Asn Thr Asn Lys Asp Ser Asp Asp Asp Leu Val Tyr Arg Ser Leu Lys
 385 390 395 400
 Glu Leu Asn Leu His Leu Glu Glu Ala Tyr Arg Glu Gly Asp Asn Thr
 405 410 415
 Tyr Tyr Arg Val Asn Glu Asn Tyr Tyr Pro Gly Ala Ser Ile Tyr Glu
 420 425 430
 Asn Glu Arg Ala Ser Arg Asp Ser Glu Phe Gln Asn Glu Ile Leu Lys
 435 440 445
 [0514] Arg Ala Glu Gln Asn Gly Val Thr Phe Asp Glu Asn Ile Lys Arg Ile
 450 455 460
 Thr Ala Ser Gly Lys Tyr Ser Val Gln Phe Gln Lys Leu Glu Asn Asp
 465 470 475 480
 Thr Asp Ser Ser Leu Glu Arg Met Thr Lys Ala Val Glu Gly Leu Val
 485 490 495
 Thr Val Ile Gly Glu Glu Lys Phe Glu Thr Val Asp Ile Thr Gly Val
 500 505 510
 Ser Ser Asp Thr Asn Glu Val Lys Ser Leu Ala Lys Glu Leu Lys Thr
 515 520 525
 Asn Ala Leu Gly Val Lys Leu Lys Leu
 530 535

[0515] SEQ ID NO:3:野生型生殖支原体蛋白M片段74-479

[0516] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSF
 KAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPS F
 SGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYFAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL
 I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI
 NDLFASKPFTHIDLTVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLKKNVNTNKDSDDDL
 VYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0517] SEQ ID NO:4:修饰的生殖支原体蛋白M MG1

[0518] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSF
 KAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPS F
 SGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYFAAKGS PLY DS Y PNHT FEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID S EKPT
 YL I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKT
 NVINDLFASKPFTHIDLTVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLKKNVNTNKDSD
 DDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0519] SEQ ID NO:5:修饰的生殖支原体蛋白M MG8

[0520] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSF
 KAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPS F

SGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYFAAKGS PLY DQY PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI NDLFASKPFTHIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYL VKNVNTNKDSDDDL VYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0521] SEQ ID NO:6:修饰的生殖支原体蛋白M MG13

[0522] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNFITPSFK AGYYDHSVASDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNG TLMANNRGYDDVFRQVPSF SGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYFAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID S EKPT YL I IRGLS GNGS QLNELDLPEVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKT NVINDLFASKPFTHIDLTQVTLQNS DNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYL VKNVNTNKDS DDDL VYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0523] SEQ ID NO:7:修饰的生殖支原体蛋白M MG15

[0524] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSF KAGYYDHVAEDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNG TLMANNRGYDDVFRQVPRF PGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYFAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID S EKPT YL I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKT NVINDLFASKPFTHIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYL VKNVNTNKDS DDL VYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0525] SEQ ID NO:8:修饰的生殖支原体蛋白M MG21

[0526] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF ITPSF KAGYYDHSVASDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNG TLMANNRGYDDVFRQVPSF SGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYFAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID S EKPT YL I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKT NVINDLFASKPFTHIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFE RQFQGY FAGGY IDKYL IKIVNTNP DVDDDIVYRSLKELNLHLEEAYREGDNI YYRVNENYYP P GASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0527] SEQ ID NO:9:修饰的生殖支原体蛋白M MG22

[0528] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF ITPSF KAGYYDHSVASDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNG TLMANNRGYDDVFRQVPSF SGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYFAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID S EKPT YL I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKT NVINDLFASKPFTHIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAIGDIYNYRRFE RQFQGY FAGGY IDKYL IKNVNTN KSDDDL VYRSLKELNLHLEEAYREGDNT YYRVNENYYP P GASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0529] SEQ ID NO:10:修饰的生殖支原体蛋白M MG23

[0530] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSF KAGYYDHSVASDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNG TLMANNRGYDDVFRQVPS F SGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYFAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI NDLFASKPFTHIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFE RQFQGY FAGGY IDKYL VKL VNTNP DVDDDIVYRSLKELNLHLEEAYREGDNT YYRVNENYYP P GASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0531] SEQ ID NO:11:修饰的生殖支原体蛋白M MG24

[0532] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSP
KAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNG TLMANNRGYDDVFRQVPS F
SGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL
I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI
NDLFVSKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYL VKNVNTNKDSDDDL
VYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0533] SEQ ID NO:12:修饰的生殖支原体蛋白M MG27

[0534] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSP
KAGYYDHVAEDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNG TLMANNRGYDDVFRQVPRF
PGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYAAKGS PLY DQY PNHT FEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL
I IRGLS GNGS QLNELDLPELVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI
NDLFVSKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAIGDIYNYRRFE RQFQGY FAGGY IDKYL IKIVNTNP
DVDDDIVYRSLKELNLHLEEAYREGDNI YYRVNENYYP P GASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0535] SEQ ID NO:13:修饰的生殖支原体蛋白M MG28

[0536] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSP
KAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNG TLMANNRGYDDVFRQVPS F
SGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL
I IRGLS GDGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI
NDLFASKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYL VKNVNTNKDSDDDL
VYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0537] SEQ ID NO:14:修饰的生殖支原体蛋白M MG29

[0538] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSP
KAGYYDHVAEDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNG TLMANNRGYDDVFRQVPRF
PGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYAAKGS PLY DQY PNHT FEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL
I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI
NDLFVSKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYL VKNVNTNKDSDDDL
VYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0539] SEQ ID NO:15:修饰的生殖支原体蛋白M MG31

[0540] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSP
KAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNG TLMANNRGYDDVFRQVPS F
SGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL
I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI
NDLFASKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAIGDIYNYRRFE RQFQGY FAGGY IDKYL IKIVNTNP
DVDDDIVYRSLKELNLHLEEAYREGDNI YYRVNENYYP P GASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0541] SEQ ID NO:16:修饰的生殖支原体蛋白M MG33

[0542] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSP
KAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNG TLMANNRGYDDVFRQVPS F
SGWSNTKPTTVSTSNLTYDKWTFYAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL

I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI
NDLFASKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLKKNVNTNKDSDDDL
VYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0543] SEQ ID NO:17:修饰的生殖支原体蛋白M MG38

[0544] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSF
KAGYYDHVASDGSLLSYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNGTLMANNRGYDDVFRQVPS F
SGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL
I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI
NDLFASKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLKKNVNTNKDSDDDL
VYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0545] SEQ ID NO:18:修饰的生殖支原体蛋白M MG40

[0546] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSF
KAGYYDHVASDGSLLSYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNGTLMANNRGYDDVFRQVPS F
SGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL
I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI
NDLFASKPFTHTIDLTQVPLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLKKNVNTNKDSDDDL
VYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0547] SEQ ID NO:19:修饰的生殖支原体蛋白M MG43

[0548] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF TIPSF
KAGYYDHVAEDGSLLSYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNGTLMANNRGYDDVFRQVPRF
PGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYAAKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTT ID SEKPT YL
I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI
NDLFVSKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAIGDIYNYRRFE RQFQGY FAGGY IDKYL IKNVNTNKDS
DDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNT YYRVNENYYP P GASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0549] SEQ ID NO:20:修饰的生殖支原体蛋白M MG44

[0550] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF IT PS
FKAGYYDHVAEDGSLLSYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNGTLMANNRGYDDVFRQVPRF
PGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYAAKGS PLY DQY PNHT FEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL
I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI
NDLFVSKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAIGDIYNYRRFE RQFQGY FAGGY IDKYL IKNVNTNKDS
DDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNT YYRVNENYYP P GASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0551] SEQ ID NO:21:修饰的生殖支原体蛋白M MG45

[0552] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF IT PS
FKAGYYDHVASDGSLLSYQSTEYFNRRVLMPI LQT TNGTLMANNRGYDDVFRQVPS F
SGWCNTKATTVSTSNLTYDKWTFYACKGS PLY DS Y PNHFFEDVKTLAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL
I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI
NDLFASKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLKKNVNTNKDSDDDL
VYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0553] SEQ ID NO:22:修饰的生殖支原体蛋白M MG46

[0554] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNF IT PS FKAGYYDHVAEDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPI LQT TNGTLMANNRGYDDVFRQVPRF PGWCNTKATTVSTSNLTYDKWTFACKGS PLY DQY PNHT FEDVKT LAIDAKDI SALKTT ID SEKPT YL I IRGLS GNGS QLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKAN S FGFNPLVLGSKTNVI NDLFVSKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLKVNVTNKDSDDDL VYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0555] SEQ ID NO:23:野生型肺炎支原体蛋白M

[0556] MKLNFKIKDKKTLKRLKKGFWALGLFGAAINAFSAVL IVNEVLRLQSGETLIASGRSGNLS FQLYSKVNQNAKSKLNS I S LT DGGYRSEIDLGDGSNFREDFRNFANNLSEAT T DAPKDLLRP VPKVEVS GL I KT S S T FIT PNFKAGYYDQVAADGKTLKYYQSTEY FNNRVVMP ILQTTNGTLT ANNRAYDDI FVDQGVKPFPGWFHDVDKAYYAGSNGQS EYL FKEWNYVANGS PLYNVYPNHHFKQIKTIAFDAPRIKQGNID GINLNLKQRNP DYVIINGLIGDGSTLKDLELPESVKKVS I YGDYHS INVAKQIFKNVLELEFYSTNQDNNFGF NPLVLGDHTNI I YDL FASKP FNY IDLTSLEL KDNQDNIDAS KLKRAVSDI Y IRRRFRERQMQGYWAGGY IDRYLVKNTNEKKNVNKDNDTVYAAL KDINLHLEET YTHGGNTMYRVNENYY PGASAYEAERAT RDSEFQKEIVQRAEL IGVVFEYGV KNLRPGLKYTVKFESPQEVALKSTDKFQPVIGSVTDMSKSVIDLIGVLR DNAEILNITNVS KDET VVAELKEKLDRENVFQE I RT

[0557] SEQ ID NO:24:野生型肺炎支原体蛋白M片段

[0558] S I SLT DGGYRSEIDLGDGSNFREDFRNFANNLS EAIT DAPKDLLRPVPKVEVS GL IKTS ST F ITPNFKAGYYDQVAADGKILKYYQSTEYFNNRVVMPILQT TNGTLTANNRAYDDIFVDQGV KFPGWFDVDKAYYAGSNGQSEYL FKEWNYVANGS PLYNVYPNHHFKQIKTIAFDAPRIKQ GNT DGINLNLKQRNP DYVI INGLTGDGSTLKDLELPESVKKVS IYGDYHS INVAKQI FKNVL ELEFYSTNQDNNFGFNPLVLGDHTNI I YDL FAS KP FNY IDLT SLELKDNQDNIDASKLKRAV SDI Y I RRRFRERQMQGYWAGGY IDRYLVKNTNEKKNVNKDNDTVYAALKDINLHLEET YTHGGN TMRVNENYYPGASAYEAE RAT RD S E FQKE IVQRAEL I GVVFE

[0559] SEQ ID NO:25:编码为细菌和人类表达而密码子优化的生殖支原体蛋白M的多核苷酸

[0560] ATGGGCAGC AGC CATCAC CATCATCATCACAGC AGC GGTC TGGTGC C GC GTGGTAGCCA CATGAGCCTGAGCCTGAACGATGGTAGCTACCAGAGCGAGATCGACCTGAGCGGCGGTGCCAACTTCCGTGAAAAA TTCCGCAACTTTGCTAACGAGCTGAGC GAAGCCATTAC CAATAGC C CAAAGGGC C TGGATC GTC C AGTGC C GAAAAC C GAG ATCAGCGGC C TGATTAAGAC C GGTGACAAC TTTATC AC C C C GAGCTTCAAGGC GG GCTACTATGATC AC GTGGC TGAGGAC GG TAGC C TGC TGAGCTACTATCAGAGCAC CGAGTAC TTAAACAAC C GTGTGCTGATGC C GATTCTGC AGAC C AC C AAC GGCAC CCTGATGGC CAACAAC C GTGGTTATGAC GAC GTGTTC C GTCAGGTGC C GC GTTTC C CGGGCTGGAGCAAC AC CAAAGC GAC CAC C GTGAGCAC C AGC AACAAC CTGAC CT ACGACAAGTGGAC CTATTTC GC C GC GAAAGGTAGC C C GCTGTAC GATCAGTATC CGAACCACACCT TTGAGGACGTGAAAACCCTGGCTATCGATGCCAAGGACATTAG C GCGCTGAAAAC C AC C ATC GATAGC GAAAAGC C GAC CTAC C TGATCATT C GGTCTGAGCGGCAACGGTAGCCAGCTGAACGAGCTGCAGCTG CCGGAAAGCGTGAAAGAAAGTGAGCCTGTACGGCGACTATACCGGTGTGAACGTGGCCAAACAGATTTTTCGAACG TGGTGGAGCTGGAATTCTATAGCACCAGCAAGGCGAACAGCTTCGGCTTTAACCCGCTGGTGCTGGGTAGCAAAAC

CAACGTGATCAACGACCTGTTCGTG AGCAAGCCGTTACCCACATTGACCTGACCCAGGTGACCCTGCAGAACAG
CGATAACAGCGC GATC GAC GCTAACAAGCTGAAACAGGC TGTGGGC GATATCTACAAC TATC GTCGCTTC
GAGC GTCAGTTTCAGGGTTAC TTC GC C GGC GGTACATC GATAAGTATCTGGTGAAAAAC GTGAAC AC
CAACAAAGACAGC GAC GATGAC CTGGTGT AC CGCAGC CTGAAGGAACTGAAC CTGC AC C
TGGAGGAAGC TTATC GTGAGGGC G ACAACAC CTAATATC GC GTGAAC GAAAACTACTATC C GGGTGC
C AGCATCTAC G AGAACGAAC GTGC GAGC C GC GATAGC GAGTTTCAGAAC GAAATTCTGAAGC GTG
CGGAGCAGAACGGCGTGACCTTCGACGAAAACTAATAA

[0561] SEQ ID NO:26:编码为人类表达而密码子优化的生殖支原体蛋白M的多核苷酸

[0562] ATGAGCCTGAGCCTGAACGATGGCAGCTACCAGAGCGAGATCGACCTGTCTGGCGGAGCCAACTTCAG
AGAGAAGTTCAGAACTTCGCCAACGAGCTGAGCGAGGCCATCACAACAGCCCCAAAGGCCTGGACAGACCCGTG
CCTAAGACAGAGATCAGCGGCCTGATCAAGACCGGCGACAACCTTCATCACCCCTAGCTTCAAGGCCGGCTACTACG
ATCACGTGGCCTCTGATGGCAGCCTGCTGAGCTACTACCAGTCCACCGAGTACTTCAACAACCGGGTGTGATGCC
CATCCTCCAGACCACCAATGGCACCCTGATGGCCAACAACAGAGGCTACGACGACGTGTTTACAGACAGGTGCCCAGC
TTTAGCGGCTGGTCCAATACCAAGGCCACCACCGTGTCCACCAGCAACAACCTGACCTACGACAAGTGGACCTACT
TCGCCGCCAAGGGCAGCCCTCTGTACGACAGCTACCCCAACCACTTCTTCGAGGACGTGAAAACCCTGGCCATCGA
CGCCAAGGATATCAGCGCCCTGAAAACCACCATCGACAGCGAGAAGCCACCTACCTGATCATCAGAGGACTGAGC
GGCAACGGCAGCCAGCTGAATGAACTCCAGCTGCCTGAGAGCGTGAAGAAGGTGTCCCTGTACGGCGATTACACCG
GCGTGAACGTGGCCAAGCAGATCTTCGCCAATGTGGTGGAACCTGGAATTCTACAGCACCAGCAAGGCCAACAGCTT
CGGCTTCAACCCTCTGGTGCTGGGCAGCAAGACCAACGTGATCAACGACCTGTTCCGCCAGCAAGCCCTTCACACAC
ATCGATCTGACCCAAGTGACCCTCCAGAACAGCGACAACAGC GCCATTGATGCCAACAAGCTGAAACAGGCCGTG
GGCGACATCTACAACTACAGAAGATTTCGAGCGGCAGTTCAGGGCTACTTCGCTGGCGGCTACATCGACAAGTACCT
GGTCAAGAACGTGAACACCAACAAGGACAGCGACGACGACCTGGTGTACAGAAGCCTGAAAGAGCTGAACCTGCACC
TGGAAGAGGCCTACAGAGAGGGCGACAACACCTACTACAGAGTGAACGAGAATACTACCCAGGCGCCAGCATCTAC
GAGAACGAGAGAGCCAGCAGAGACAGCGAGTTCAGAACGAGATCCTGAAGCGGGCCGAGCAGAATGGCGTGACCTT
CGACGAGAACTGATGA

[0563] SEQ ID NO:27:修饰的生殖支原体蛋白M MG47

[0564] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNFITP S
FKAGYYDHVAED GS LL SYQSTEFNNRVLMPIQLTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFPGWSNTKATTVSTNS
NLTYDKWTFYFAAKGSPLYDQYPNHTFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSGNGSQLNELQLPESVK
KVSLEYGDTGVNVAKQIFANVVELEFY S T S KAN S F GFNPLVL GS KTNVINDLFLV S
KPFTHIDLTQVTLQNSD NS AIDANKLKQAV GDIYNYRRFERQFQGYEAGGYIDKYLKKNVNTNKDSDDDLVYR
SLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYKPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0565] SEQ ID NO:28:修饰的生殖支原体蛋白M MG48

[0566] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNFITP S
FKAGYYDHVAED GS LLSYYQSTEFNNRVLMPIQLTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFPGWNCNTKPTTVSTNSN
LTYDKWTFYFACKGSPLYDQYPNHTFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSGDGSQNLNELQLPESVKK
VSLEYGDTGVNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSFGFNPLVLGSKTNVINDLFLVSKPFTHIDLTQVPLQNSDNS
AIDANKLKQAV GDIYNYRRFERQF QGYFAGGYIDKYLKKNVNTNKDSDDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTY
YRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0567] SEQ ID NO:29:修饰的生殖支原体蛋白M MG49

[0568] SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNFITPSFKA
GYYDHVAEDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPILQTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFPGWSNTKATTVSTSNNLTYDKW
TYFAAKGSPLYDQYPNHTFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSGNGSQLNELQLPESVKKVSLYGDY
TGVNNAKQIFANVVELEFYSTSKANSFGFNPLVLGSKTNVINDLFVSKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
GDIYNYRRFERQFQGYFPGGYIDKYLKVNVTNKDSDDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIY
ENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN

[0569] SEQ ID NO:30:修饰的肺炎支原体蛋白M MP29

[0570] SISLTD GGYRS EIDL GD GSNFREDF RNFANL SEAITDAPKDLLRPVPKVEVSGLIKTSSTF
ITPNFKAGYYDQVAEDGKTLKYYQSTEYFNNRVMPILQTTNGTLTANNRAYDDIFVDQGVPRFPGWFHDVDKAYY
AGSNGQSEYLFKEWNYVANGSPLYNQYPNHTFKIQTIAFDAP RIKQ GNTD GINLNLKQRNPDIYIINGLTGD
GS TLKDLELPES VKKV SIYGDYHSINAKQIFKNVLELEFYSTNQDNNFGFNPLVLGDHTNIIYDLFVSKPFN
YID LTS LELKDNQDNIDAS KLKRAV SDIYIRRRFERQMQ GYWAGGYIDRYLVKNTNEKNVNKDNNTVYAAL
KDINLHLEETYTHGGNTMYRVNENYYP GAS AYEAEATRD S EFQKEIVQR

[0571] SEQ ID NO:31:修饰的生殖支原体蛋白M MG64 (分泌肽+来自IgG1的Fc+15xGS接头
+MG29dGly1):

[0572] MYRMQLL SCIAL SLALVTNSAPLEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNVVYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTI S KAKGQPREP QVYTLPP S REEMTKNQV SLTCLVKGFYP SDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPVLD SD GS FFLY S KLTVDKS RWQ QG NVFS CSVMHEALKFHYTQKSL SL SP
GAGGGS GGGG GGGG GGGMSLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGL
IKTGDNFITPSFKAGYYDHVAED GS LL SYYQ S TEYFNNRVLMPIL QTTD GTLMANNRGYDDVFRQVPRFP
GWSNTKATTVSTSNNLYYDKWTFYFAAKGSPLYDQYPNHTFEDVKTLAIDAKDISALKTTID SEKP TYLIIRGL S
GD GS QLNEL QLP ES VKKV S LYGDYTGNNVAKQIFANVVELEFY STS KAN S F GFNPLVL GS
KTNVINDLFV S KPFTHTIDLTQVTL QN SDN S AIDANKLKQAVG DIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLK
NVNTNKDSDDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYP GAS IYENERAS RD S EF
QNEILKRAEQNGVTFDEN**

[0573] SEQ ID NO:32:修饰的生殖支原体蛋白M MG88 (分泌肽+来自IgG2的Fc+15xGS接头
+MG29dGly1):

[0574] MYRMQLL SCIAL SLALVTNSAPLERKS SVECPKPAPPAAAS SVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV
TCVVVDVSAEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWE SNGQPENNYKTTPMLD SD GS FF
LY S KLTVDKS RWQ QGNVF S CSVMHEALHNHYTQKSL SL SP GAGGGS GGGG GGGSGGGMSL SLND
GSYQSEIDL S GGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVAED GS
LL SYYQSTEYFNNRVLMPILQTTDGTLMANNRGYDDVFRQVPRFP GWSNTKATTVSTSNNLYYDKWTFYFAAKGS
PLYDQYPNHTFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSGDGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTGNNVAK
QIFANVVELEFYSTSKANSFGFNPLVLGSKTNVINDLFVSKPFTHTIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNY
RRFERQFQGYFAGGYIDKYLKVNVTNKDSDDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERA
SRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN**

[0575] SEQ ID NO:33:修饰的生殖支原体蛋白M MG118(蛋白A(Z-结构域)+10x GS接头+MG29):

[0576] MKFNKEQQNAFYELHLPNLNEEQRNAFIQ SLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAPG GSGSGSGSGLSLNDGSYQ SEIDL SGGANFREKFRNFANEL SEAITNSPKGLDRPVPK TEIS GLIKTGDNFITP S FKAGYYDHVAED GS LL SYQSTEYFNRLVMPILQTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFPGWSNTKATTVSTSNLT YDKWTFYAAKGSPLYDQYPNHTFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGL SGNQSQLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFY S TS KANS F GFNPLVL GS KTNVINDLFV S KPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYL VKNVNTNKDSDDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN*

[0577] SEQ ID NO:34:修饰的生殖支原体蛋白M MG66(具有以下突变:S150E,S196R,S198P,F237T,S232Q,A342V,N274D,A205P和T355P):

[0578] SLSLNDGSYQSEIDL SGGANFREKFRNFANEL SEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVAEDGSLLSYQSTEYFNRLVMPILQTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFPGWSNTKPTTVSTSNLT YDKWTFYAAKGSPLYDQYPNHTFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSGDGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSFGFNPLVLGSKTNVINDLFVSKPFTHIDL TQVPLQNSDNS AIDANKLKQ AV GDIYNYRRF ERQFQGYFAGGYIDKYL VKNVNTNKDSDDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN*

[0579] SEQ ID NO:35:修饰的生殖支原体蛋白M MG71(蛋白L B1结构域+5xGS接头+具有SLSLND的N-末端缺失的MG29):

[0580] MEEVTIKANLILPGCCTQTAEFKGTFEKATSEAYAYADTLKKDNGEWTVDVADKGYTLNIKFAGGSGS GSYQ SEIDL SGGANFREKFRNFANEL SEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNFITP S F KAGYYDHVAED GS LL SYQSTEYFNRLVMPILQTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFPGWSNTKATTVSTSNLT YDKWTFYAAKGSPLYDQYPNHTFEDVKTLAIDAKDISALKTTID SEKPTYLIIRGL S GNQ SQLNELQLPE SVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSFGFNPLVLGSKTNVINDLFVSKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQF QGYFAGGYIDKYL VKNVNTNKDSDDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDEN*

[0581] SEQ ID NO:36:修饰的生殖支原体蛋白M MG86(含有GCN4螺旋+15×GS+MG66的二聚体)

[0582] GCGGGMKQLEDKIEELLSKIYHLENIARLKKLIGEGGGSGGGSGGGSGGMSLSLNDGSYQSEIDL SGGANFREKFRNFANEL SEAITNSPKGLDRPVPKTEISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVAEDGSLLSYQSTEYFNRLVMPILQTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFPGWSNTKPTTVSTSNLT YDKWTFYAAKGSPLYDQYPNHTFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSGDGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSFGFNPLVLGSKTNVINDLFVSKPFTHIDL TQVPLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYL VKNVNTNKDSDDDLVYRSLKELNLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNGVTFDE N*。

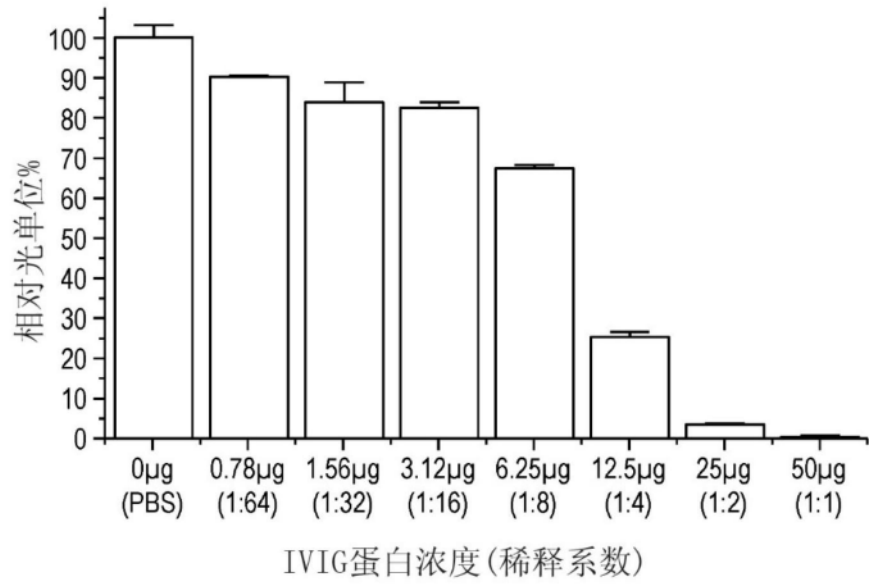


图1

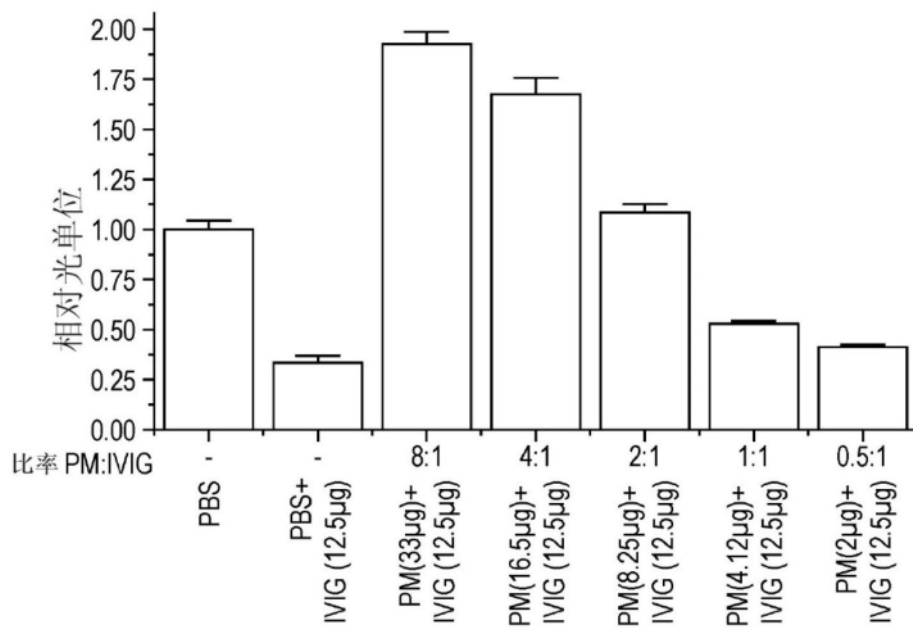


图2

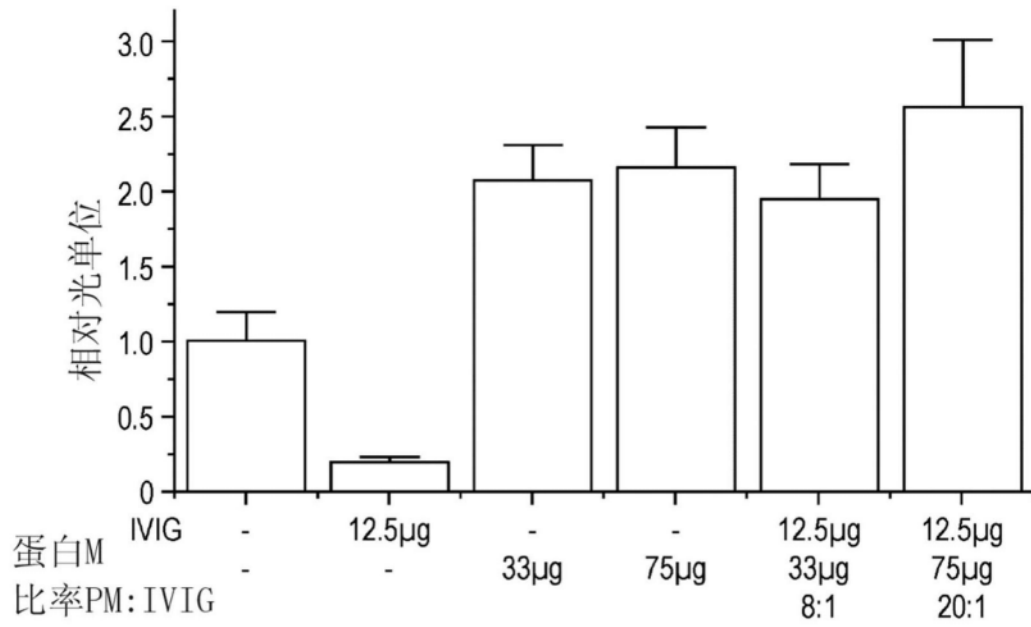


图3

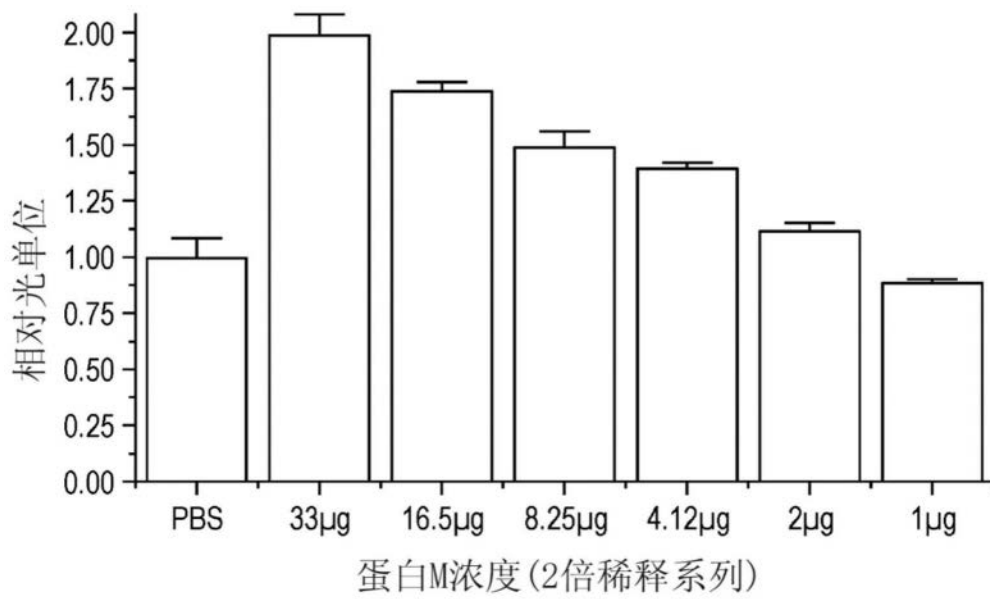


图4

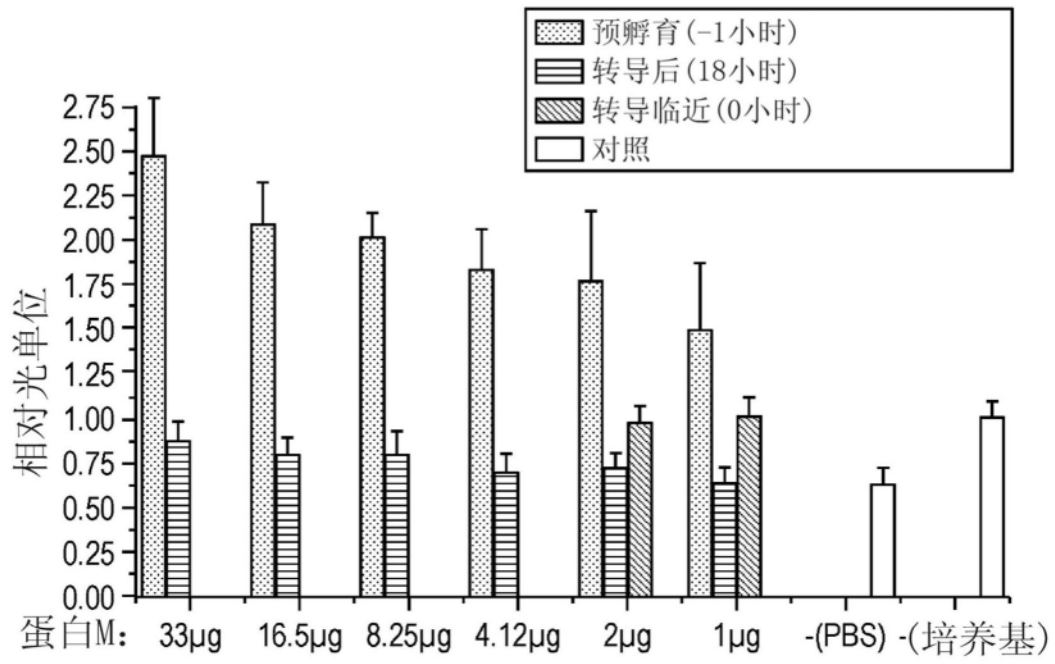


图5

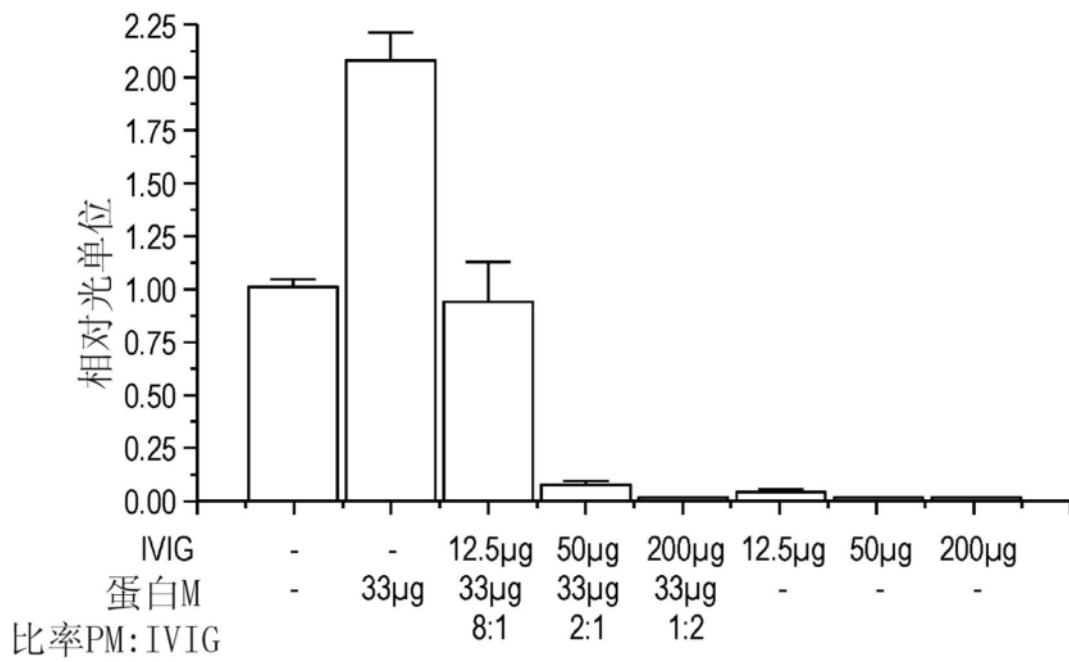


图6

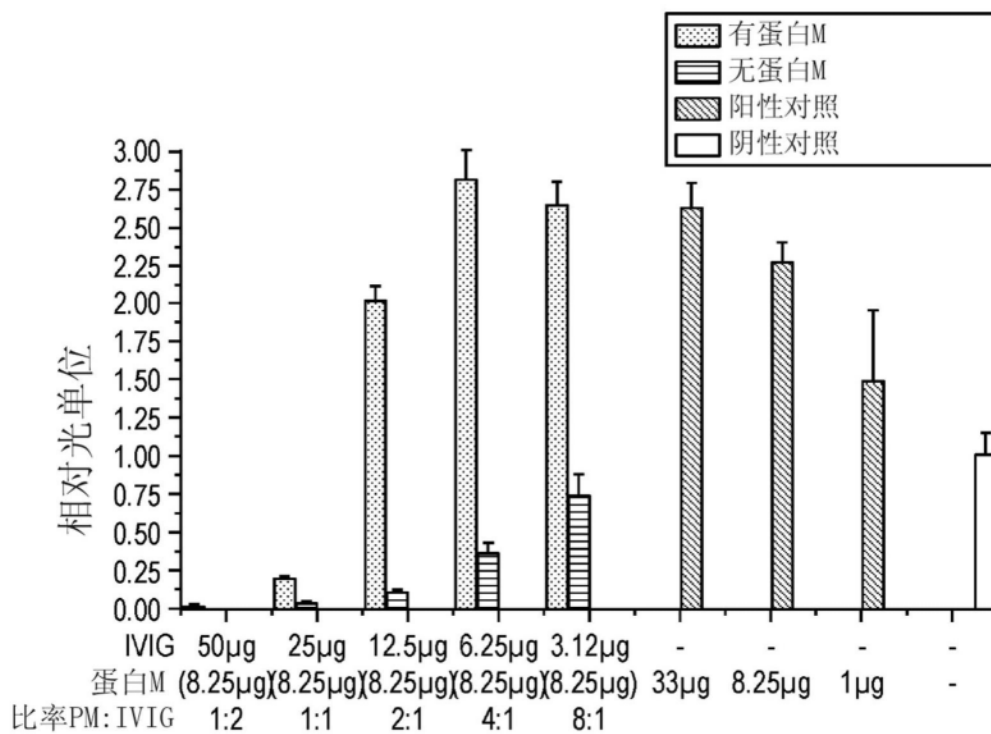


图7

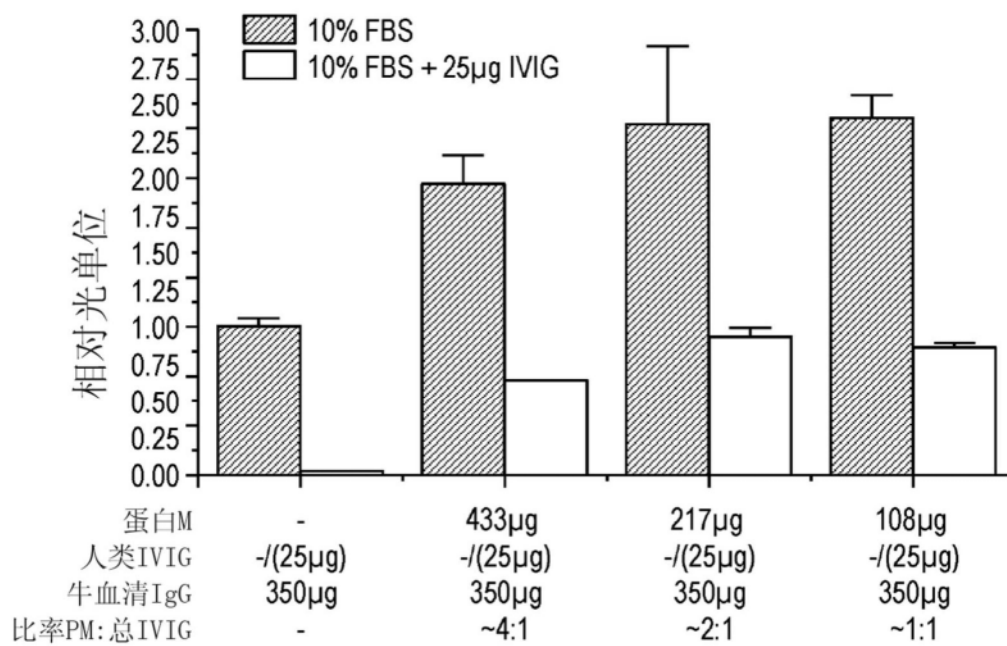


图8

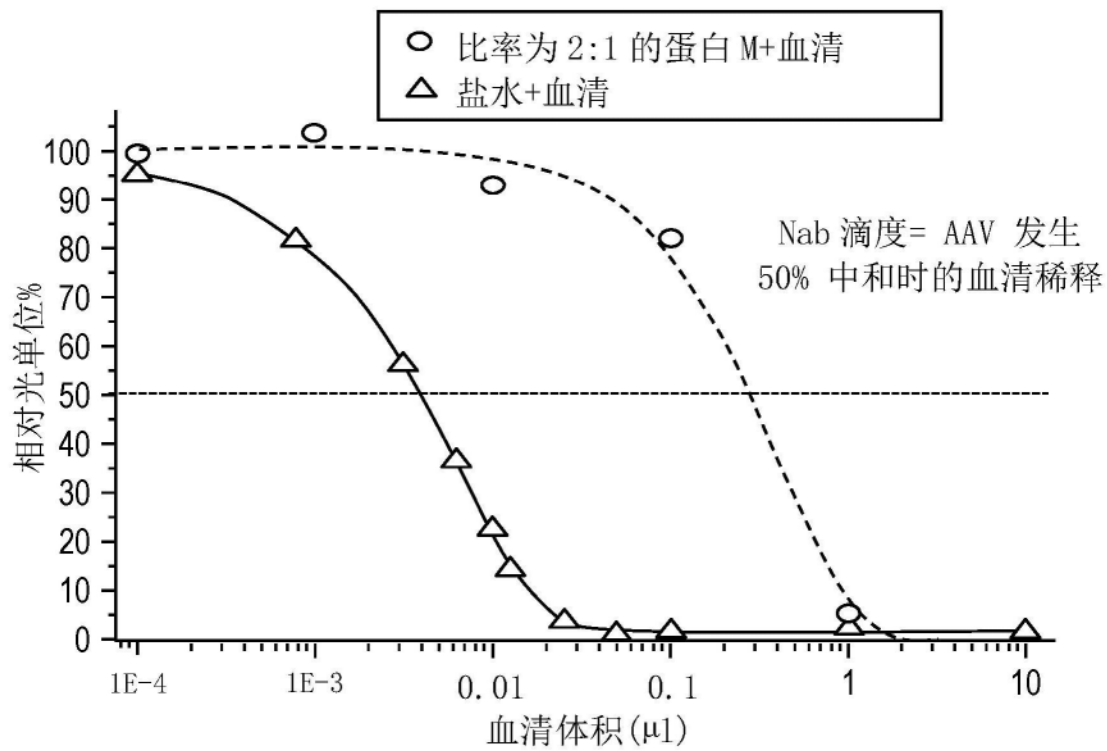


图9

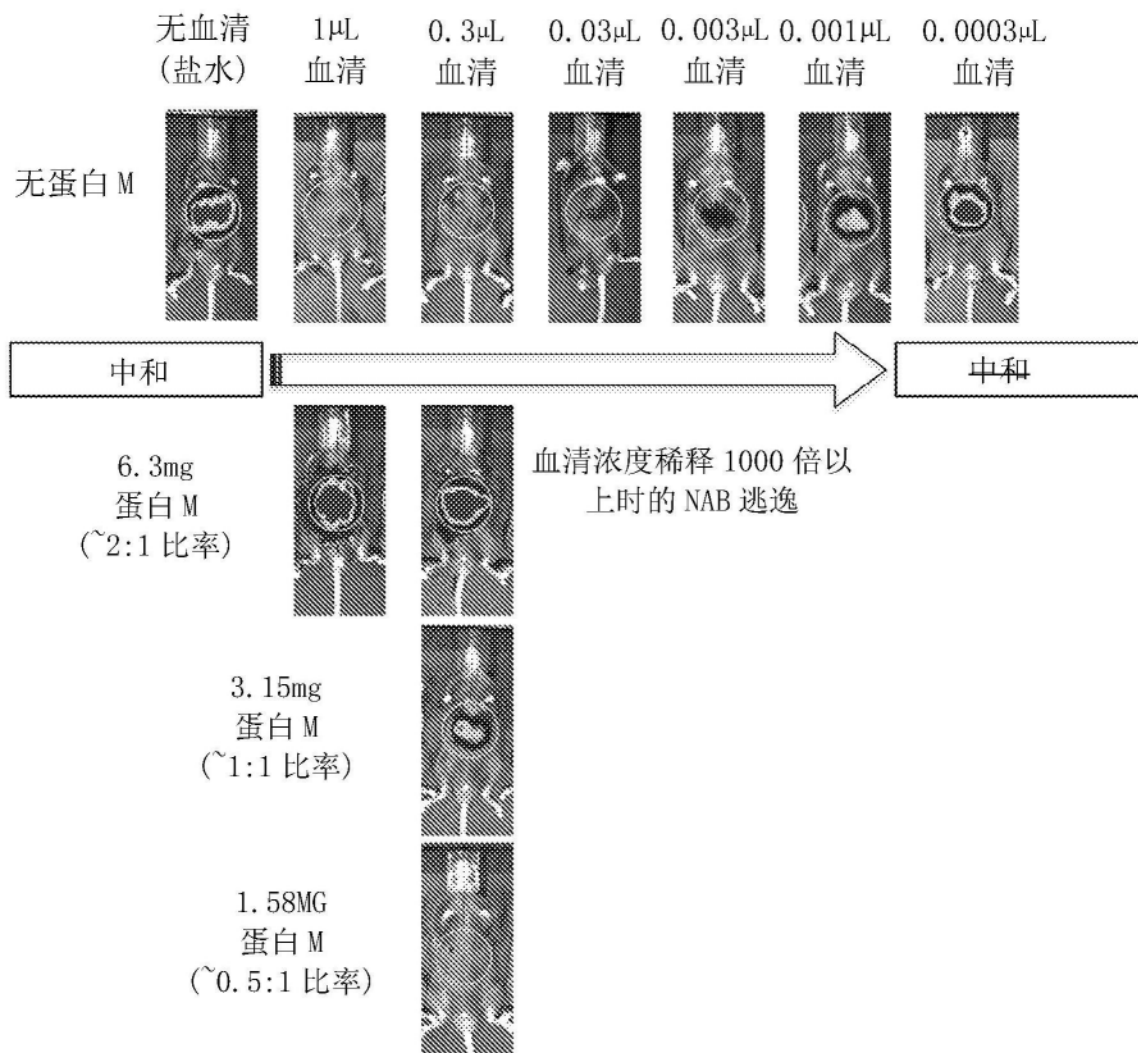


图10

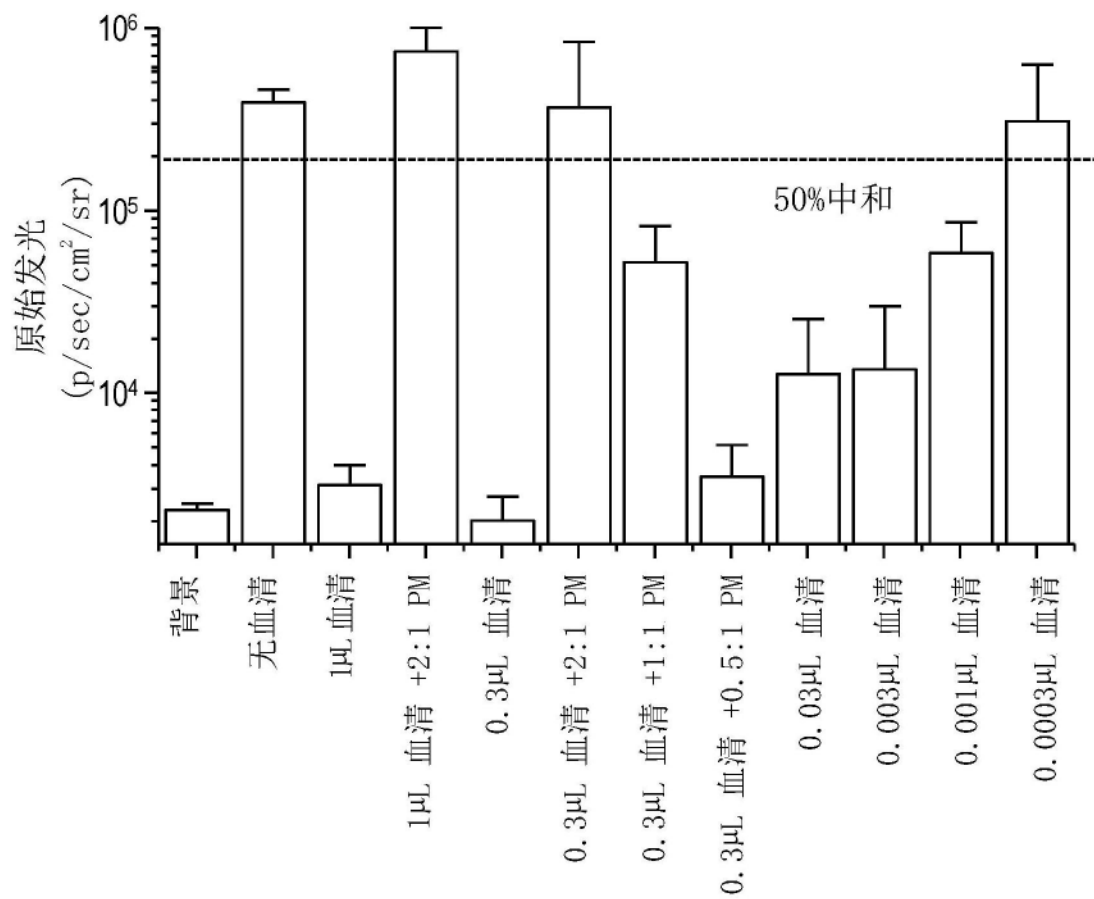


图11

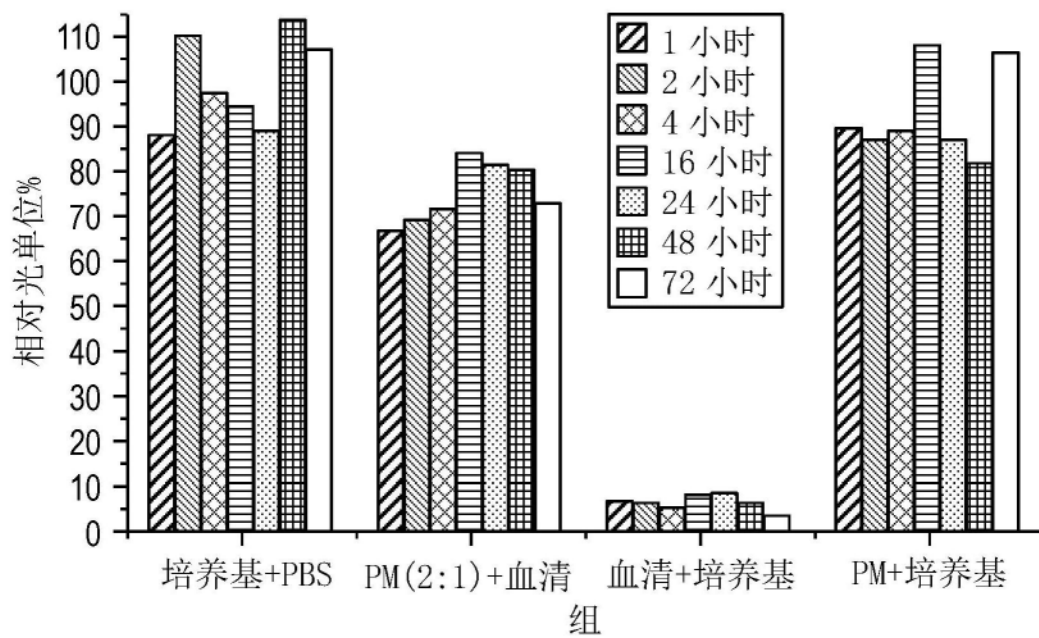


图12

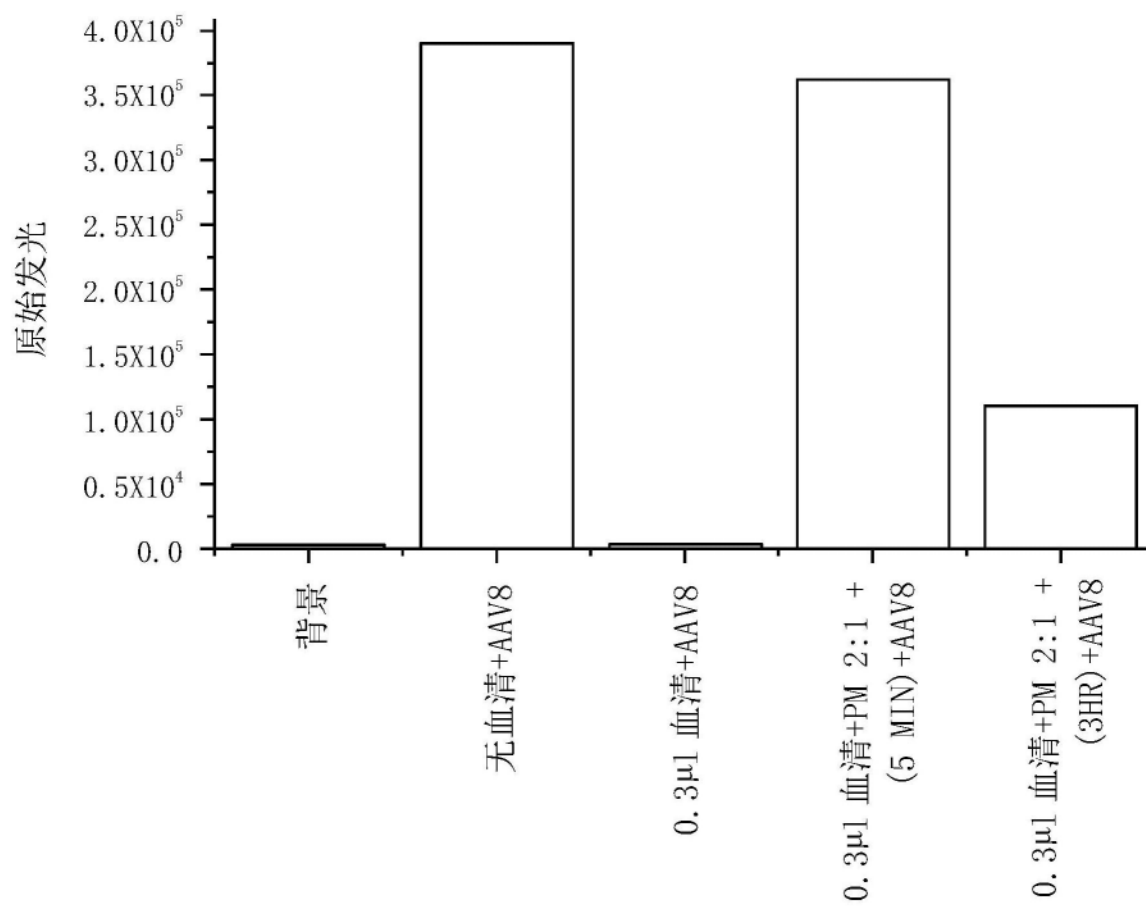


图13

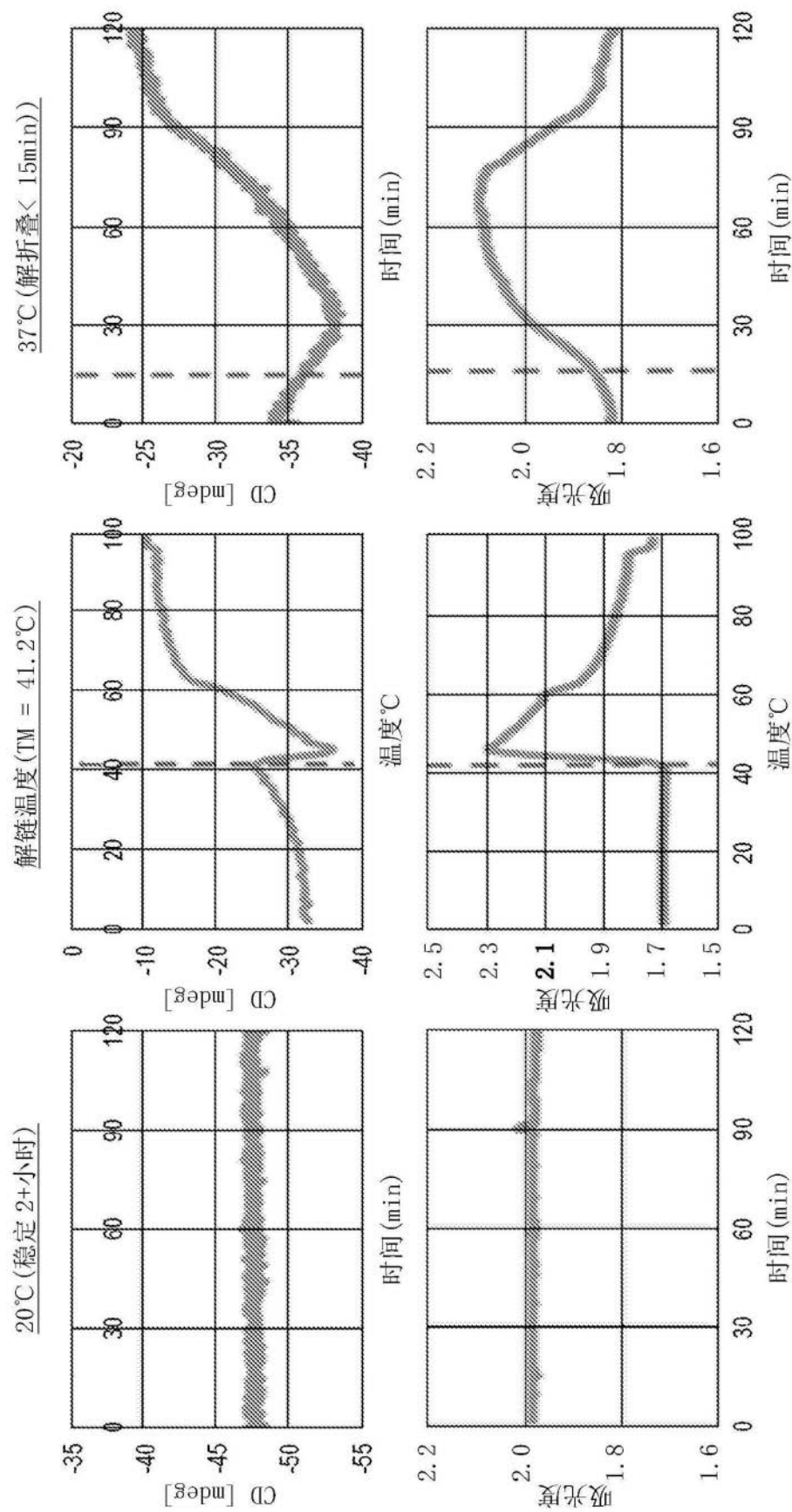


图14

名称	T _m (°C)	突变的数量	突变
MG WT	41.9	--	---
MG 1	43.6	1	F237T
MG 8	44.9	1	S232Q
MG 13	43	1	Q282D
MG 15	49.3	3	S150E, S196R, S198P
MG 21	44.7	6	V400I, N402I, K407P, S409V, L413I, T435I
MG 22	44.1	2	V373I, V400I
MG 23	43.2	4	N402L, K407P, S409V, L413I
MG 24	44.7	1	A342V
MG 27	58.3	14	MG 29+MG 31+MG 13
MG 28	43.9	1	N274D
MG 29	55.2	6	MG 15+MG 8+MG 1+MG 24
MG 31	45.2	7	MG 21+V373I (FROM 22)
MG 33	44.2	1	A205P
MG 38	43.4	1	T355D
MG 40	43	1	T355P
MG 43	51.4	6	MG 15+MG 22+MG 24
MG 44	54.7	8	MG 22+MG 29
MG 45	43.1	2	S201C & A224C
MG 46	58.5	8	MG 29+MG 45
MG 47	56.9	8	MG 29+F390E+Y444K
MG 48	64.9	11	MG 46+MG 28+MG 33+MG 40
MG 49	55.8	7	MG 29+A391P
MP WT	44.1	--	---
MP 29	45.6	5	A77E, K125R, H170T, V165Q, A280V

图15A

名称	T _m (°C)	突变的数量	突变
MG 2	42.1	1	R468Q
MG 4	42.7	1	S150E
MG 5	41.0	1	H147F
MG 10	41.5	1	S272G
MG 12	42.1	1	T355G
MG 17	41.6	3	S276E、Q277L、N279R
MG 18	42.3	1	N300Q
MG 20	41.0	1	N378Y
MG 32	42.3	1	S156K
MG 34	42.5	1	S232L
MG 35	41.0	1	A245Q
MG 36	41.7	1	S267D
MG 41	42.6	1	K225P
MG 42	41.2	1	V310E

图15B

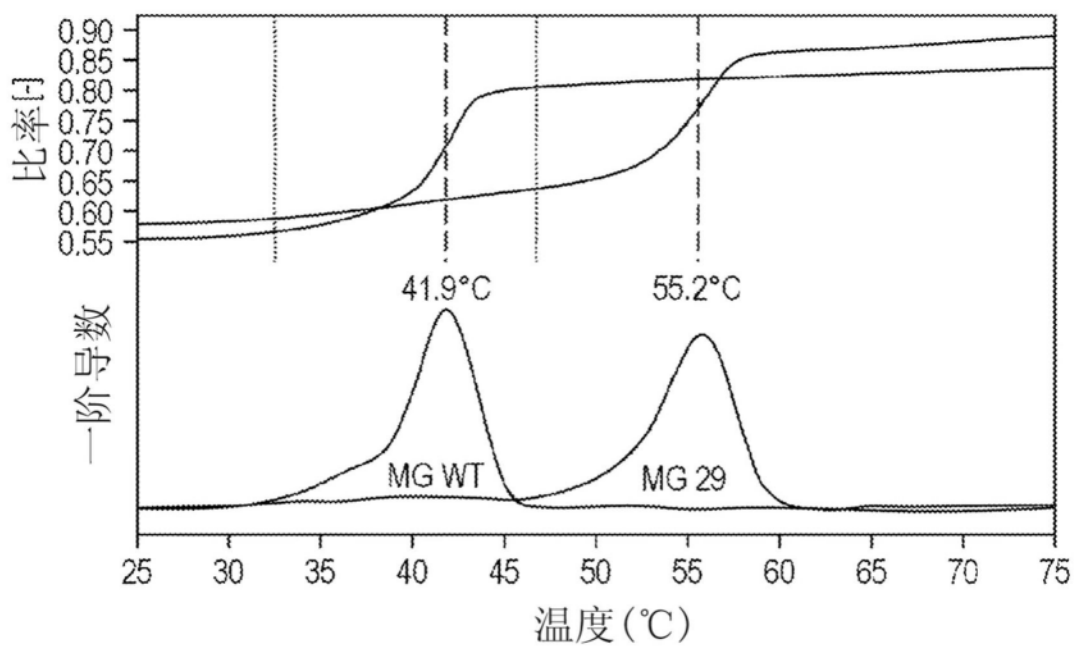


图16

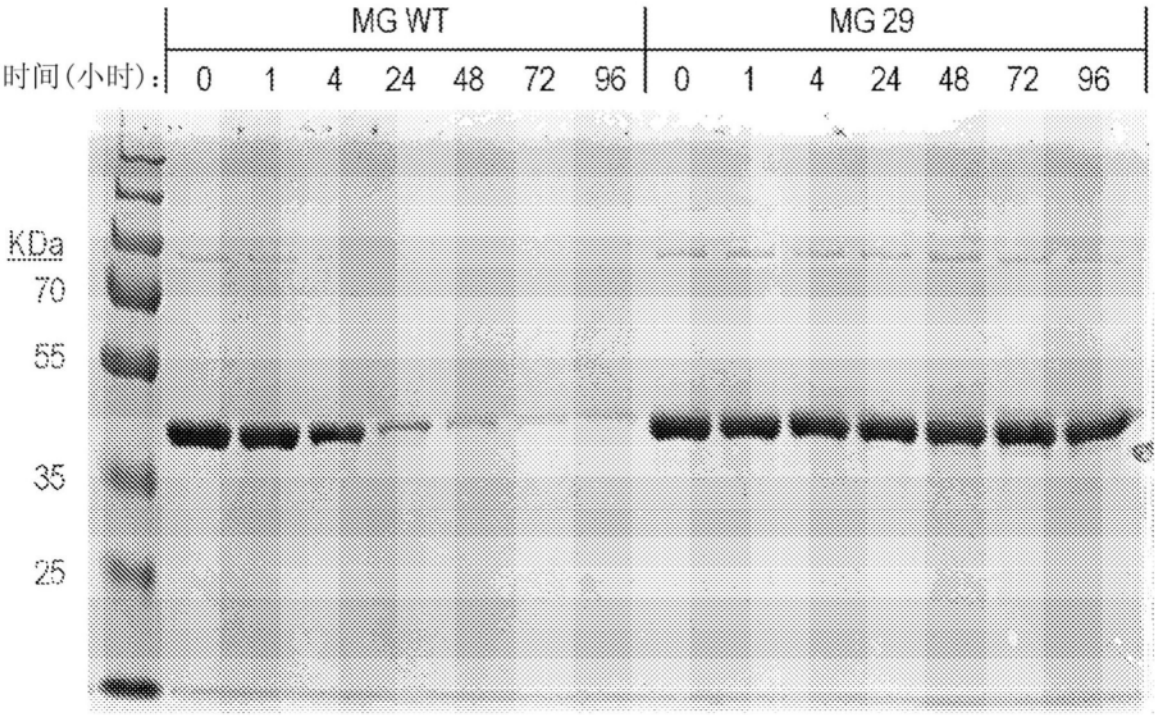


图17A

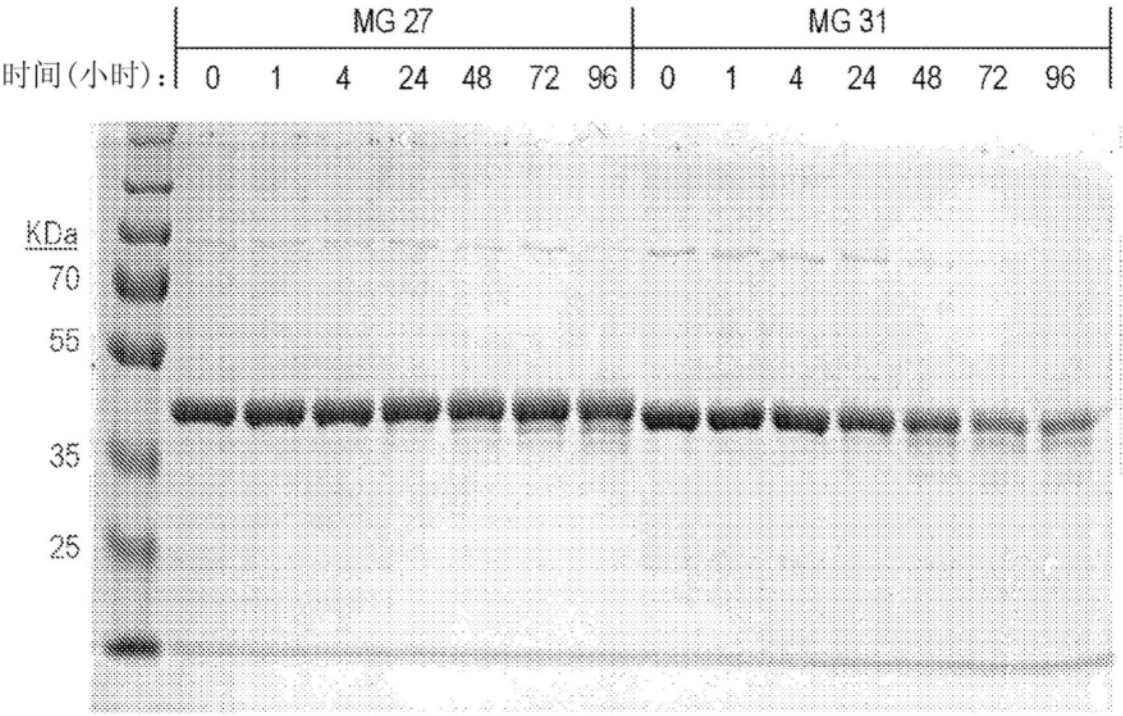


图17B

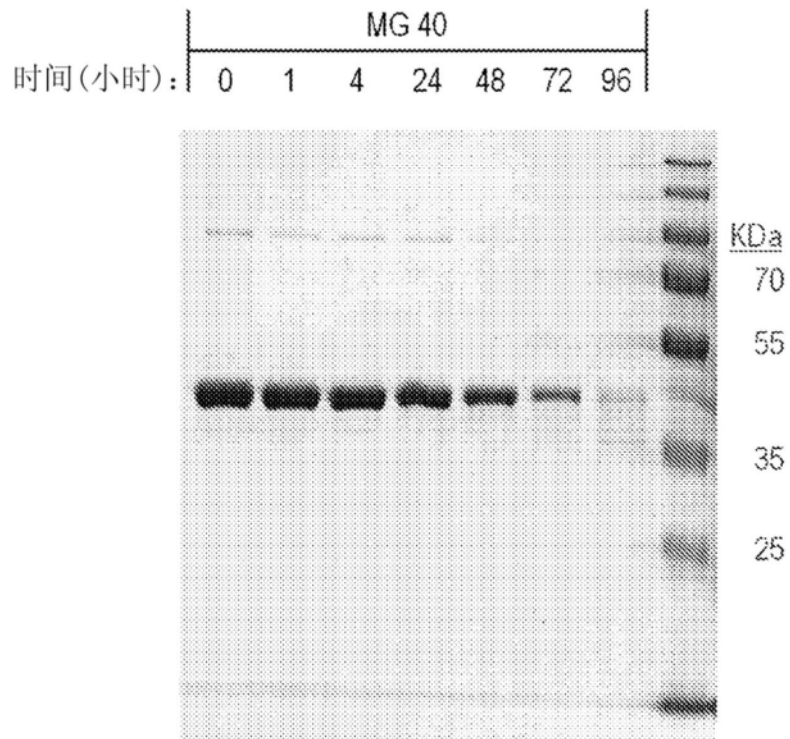


图17C

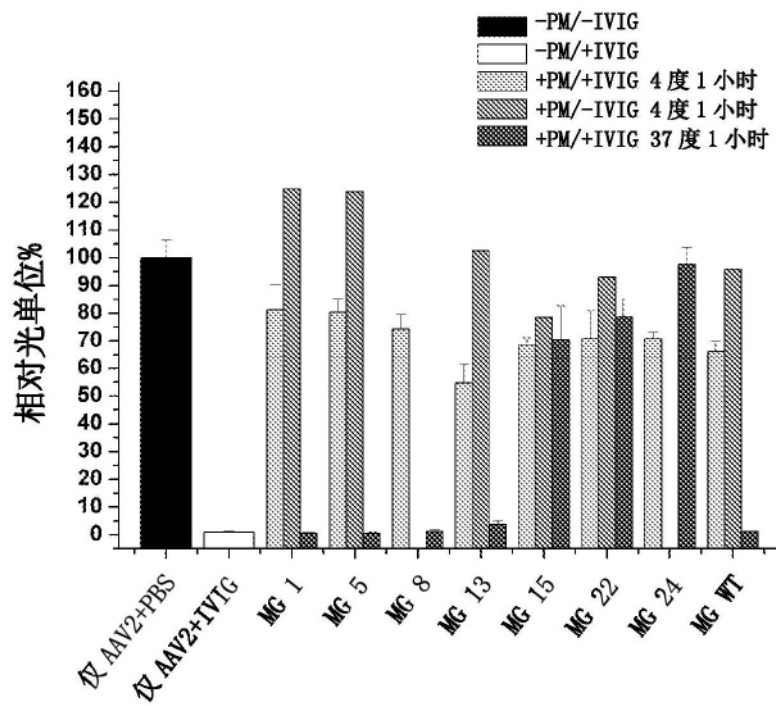


图18A

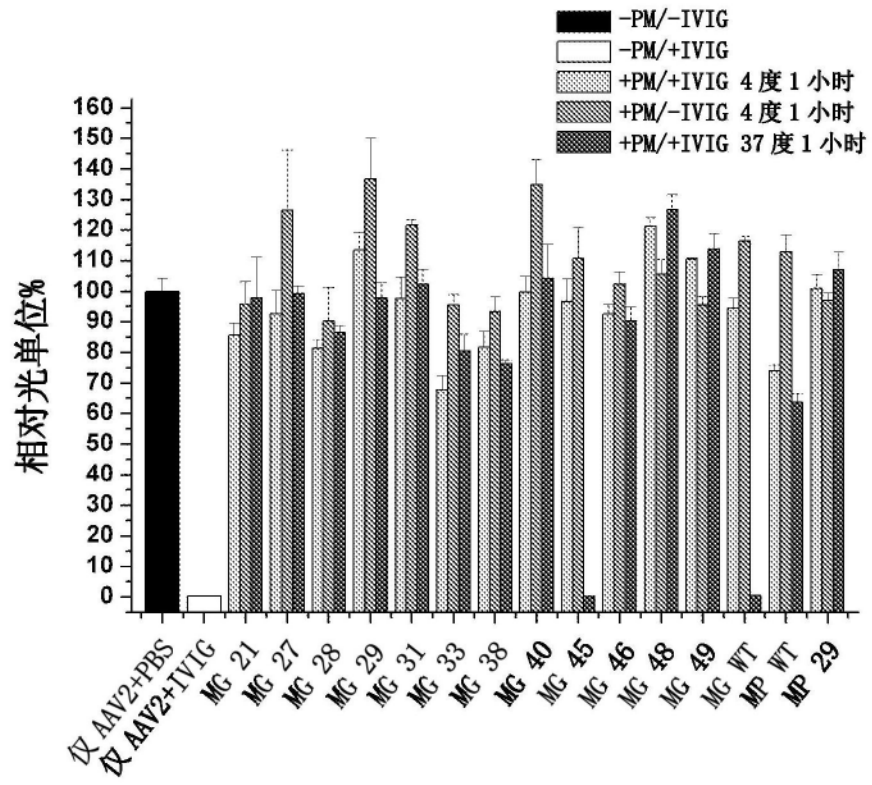


图18B

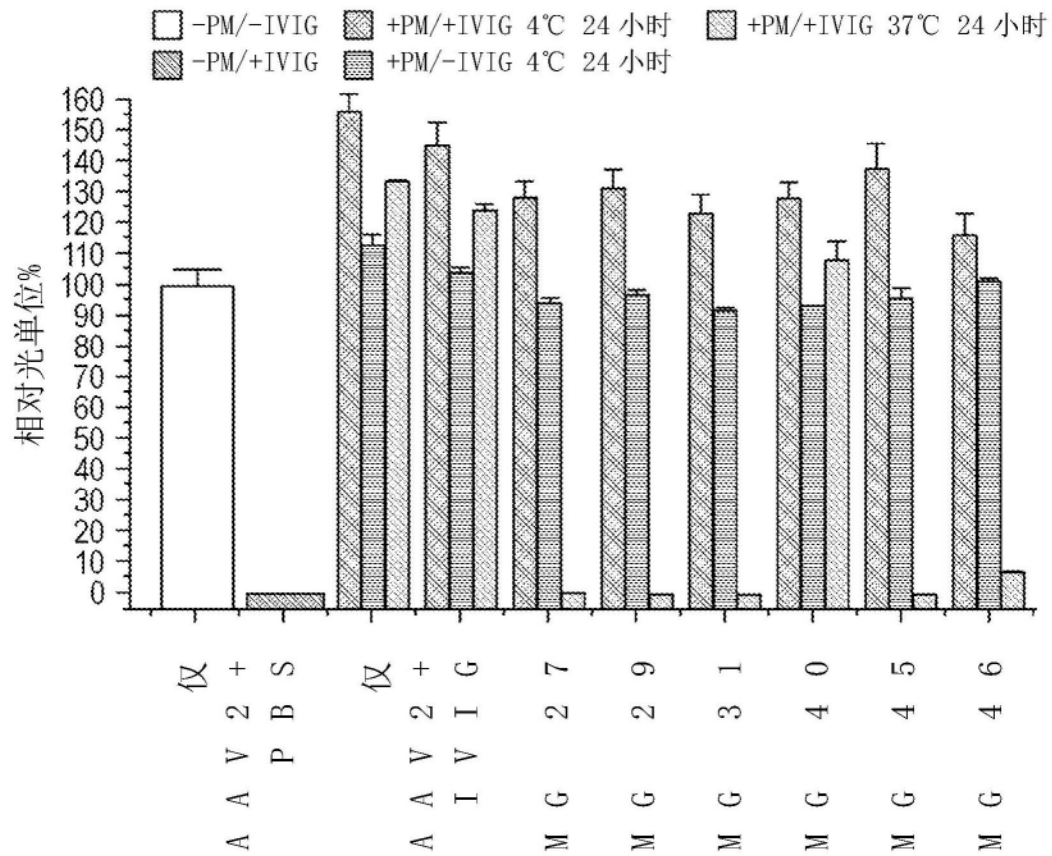


图18C

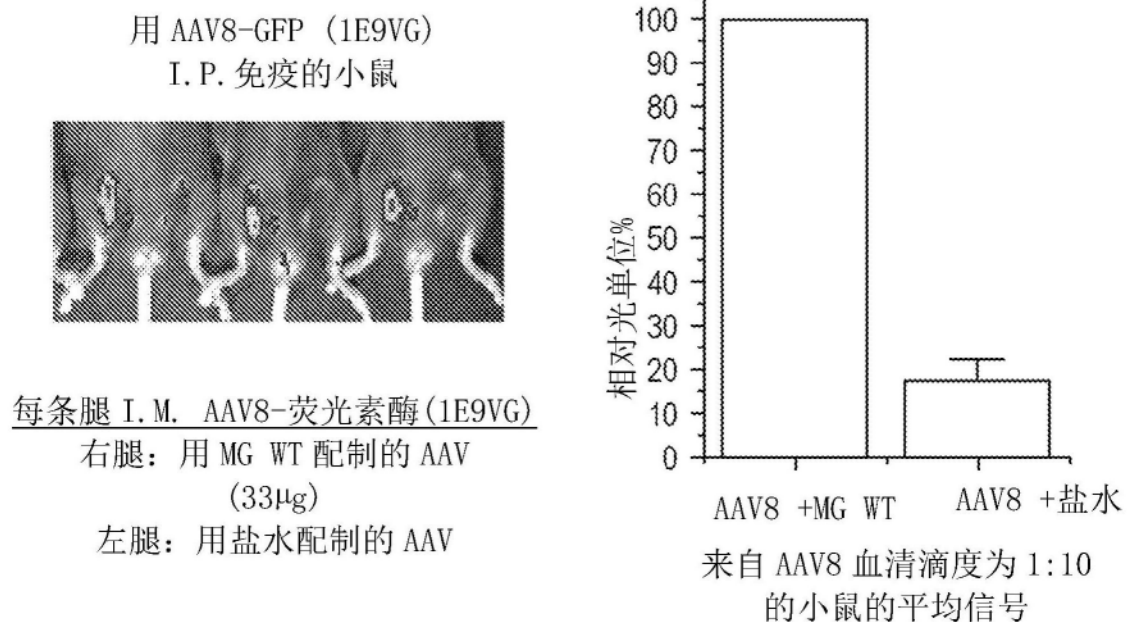


图19

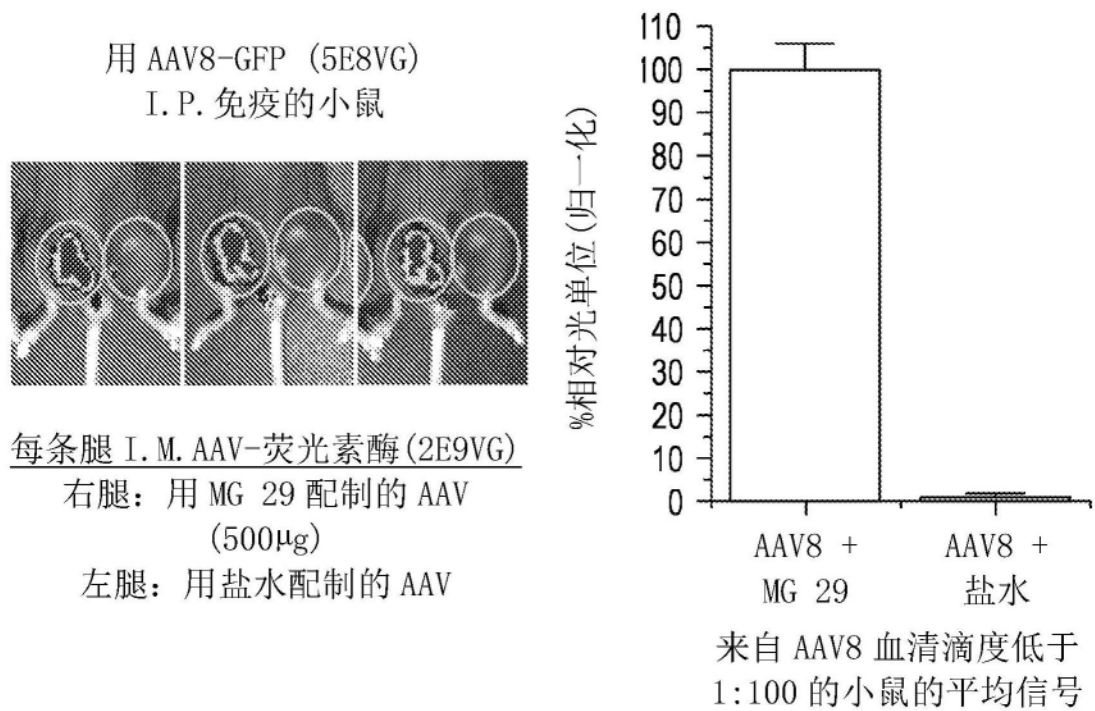


图20

名称	K_D (nM)	K_D 误差 (nM)	$K_{开}$ (1/MS)	$K_{关}$ (1/s)	X^2	R^2
MG WT	11.9	0.2	2.8E+0.4	3.3E-0.4	2.5	1.00
MG 27	16.3	0.5	2.6E+0.4	4.3E-0.4	1.8	0.99
MG 29	7.9	0.1	4.3E+0.4	3.4E-0.4	1.7	1.00
MG 31	15.5	0.5	3.0E+0.4	4.7E-0.4	2.4	0.99
MG 40	10.1	0.2	3.1E+0.4	3.1E-0.4	1.9	1.00

图21

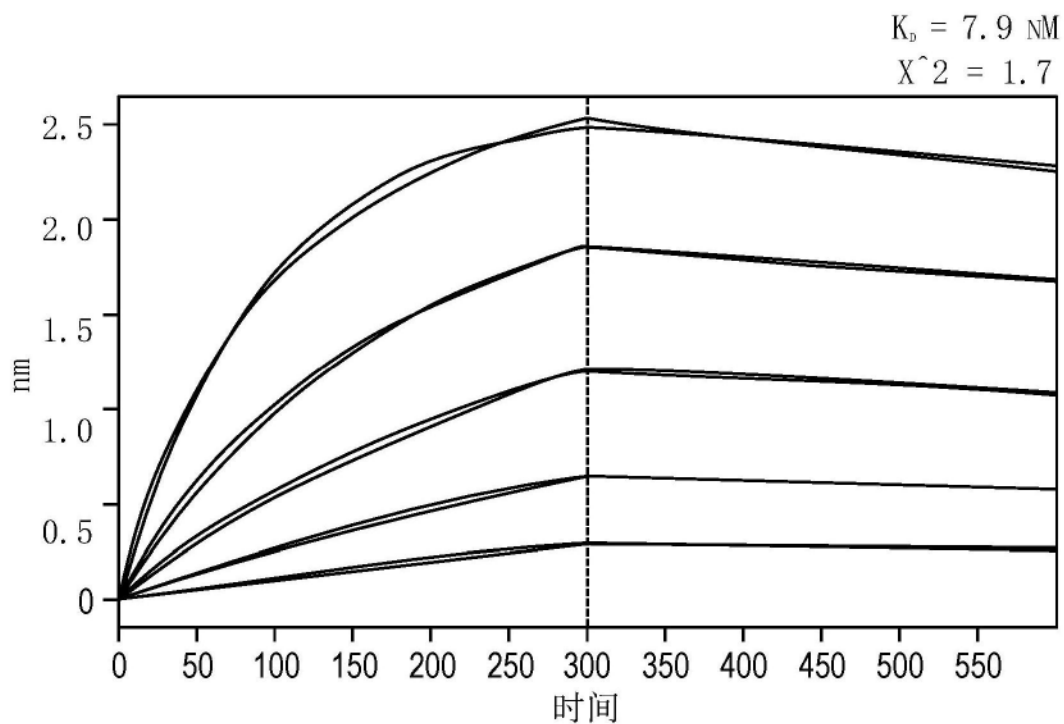


图22

	稳定	无倾向	稳定减少
点突变 (N=28)	29%	50%	21%
多突变 (N=8)	63%	25%	13%
组合突变 (N=6)	100%	0%	0%
总数 (N=42)	45%	38%	17%

图23

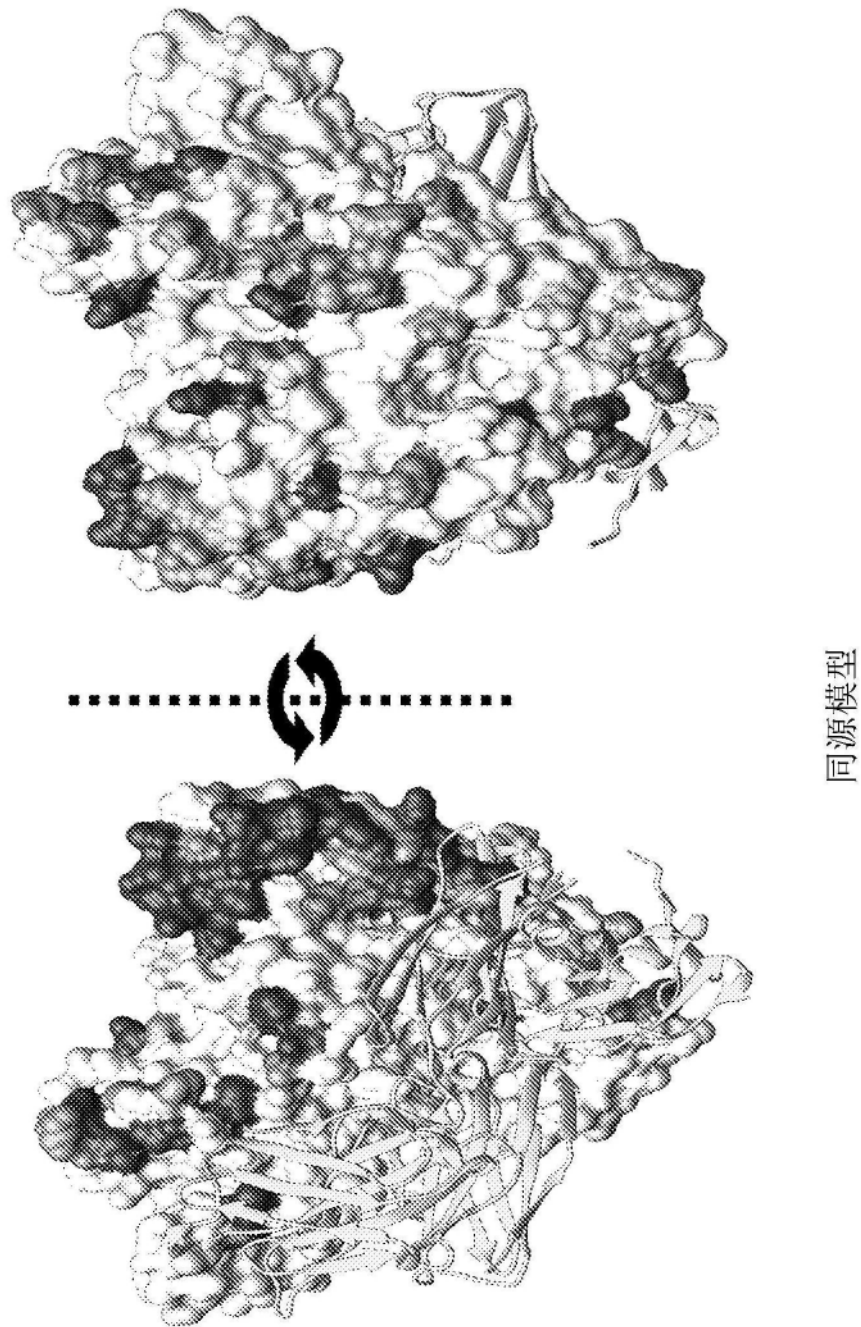


图24

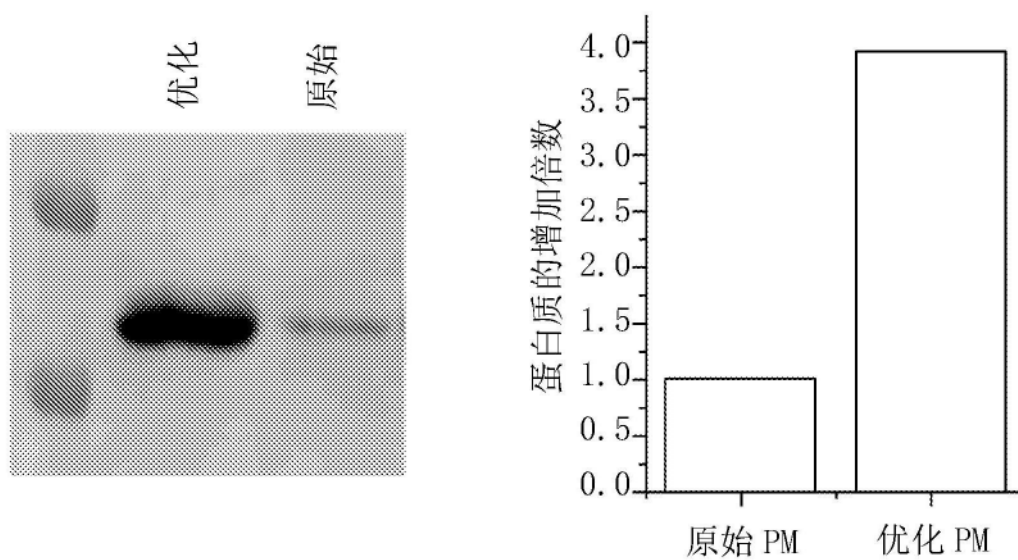


图25

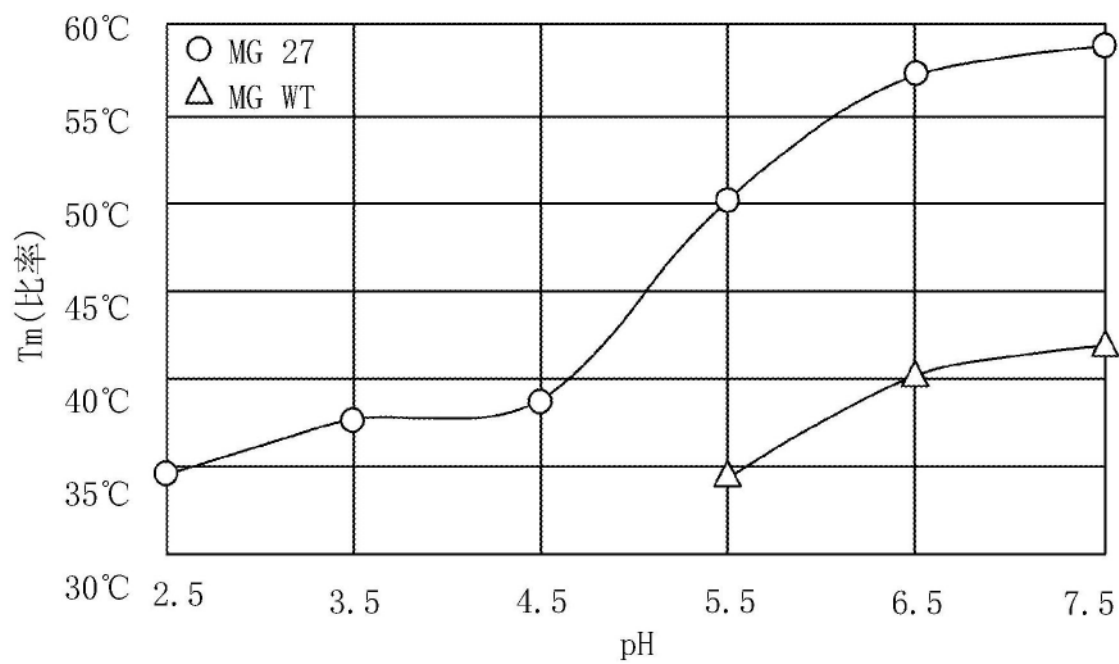


图26

	74	123
MG WT:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG1:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG8:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG13:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG15:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG21:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG22:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG23:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG24:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG27:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG28:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG29:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG31:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG33:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG38:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG40:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG43:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG44:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG45:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
MG46:	SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSPKGLDRPVPKT	
	124	173
MG WT:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG1:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG8:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG13:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG15:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVAEEDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG21:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG22:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG23:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG24:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG27:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVAEEDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG28:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG29:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVAEEDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG31:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG33:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG38:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG40:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG43:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVAEEDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG44:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVAEEDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG45:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	
MG46:	EISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVAEEDGSLLSYYQSTEYFNNRVLMPIL	

图27A

174 223

MG WT: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG1: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG8: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG13: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG15: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFEGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG21: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG22: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG23: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG24: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG27: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFEGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG28: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG29: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFEGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG31: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG33: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG38: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG40: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG43: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFEGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG44: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFEGWSNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG45: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPSFSGWNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA
MG46: QTTNGTLMANNRGYDDVFRQVPRFEGWNTKATTVSTSNLTYDKWTFYA

224 273

MG WT: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG1: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG8: AKGSPLYDYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG13: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG15: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG21: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG22: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG23: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG24: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG27: AKGSPLYDYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG28: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG29: AKGSPLYDYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG31: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG33: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG38: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG40: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG43: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG44: AKGSPLYDYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG45: AKGSPLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG
MG46: AKGSPLYDYPNHFFEDVKTLAIDAKDISALKTTIDSEKPTYLIIRGLSG

图27B

274 323

MG WT: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG1: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG8: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG13: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG15: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG21: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG22: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG23: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG24: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG27: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG28: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG29: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG31: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG33: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG38: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG40: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG43: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG44: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG45: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF
MG46: NGSQNLNELQLPESVKKVSLYGDYTG VNVAKQIFANVVELEFYSTSKANSF

324 373

MG WT: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG1: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG8: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG13: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG15: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG21: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG22: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG23: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG24: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG27: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG28: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG29: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG31: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG33: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG38: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG40: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG43: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG44: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG45: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV
MG46: GFNPLVLGSKTNVINDLFASKPFTHIDL TQVTLQNSDNSAIDANKLKQAV

图27C

374 423

MG WT: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG1: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG8: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG13: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG15: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG21: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLTKIVNTNPDVDDDIIVYRSLKELNL
MG22: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLTKIVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG23: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLTKIVNTNPDVDDDIIVYRSLKELNL
MG24: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG27: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLTKIVNTNPDVDDDIIVYRSLKELNL
MG28: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG29: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG31: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLTKIVNTNPDVDDDIIVYRSLKELNL
MG33: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG38: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG40: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG43: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLTKIVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG44: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLTKIVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG45: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL
MG46: GDIYNYRRFERQFQGYFAGGYIDKYLVKNVNTNKSDDDLVYRSLKELNL

424 473

MG WT: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG1: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG8: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG13: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG15: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG21: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG22: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG23: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG24: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG27: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG28: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG29: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG31: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG33: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG38: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG40: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG43: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG44: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG45: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG
MG46: HLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEFQNEILKRAEQNG

图27D

474 480

MG WT: VTFDEN
MG1: VTFDEN
MG8: VTFDEN
MG13: VTFDEN
MG15: VTFDEN
MG21: VTFDEN
MG22: VTFDEN
MG23: VTFDEN
MG24: VTFDEN
MG27: VTFDEN
MG28: VTFDEN
MG29: VTFDEN
MG31: VTFDEN
MG33: VTFDEN
MG38: VTFDEN
MG40: VTFDEN
MG43: VTFDEN
MG44: VTFDEN
MG45: VTFDEN
MG46: VTFDEN

图27E

MG WT-1 SLSLNDGSYQSEIDLSSGGANFREKFRNFANELSEAITNSP
 MP WT-1 S[]SL[]DGGYR[]SEIDL[]GDGS[]NFREDFRNFAN[]LSEAIT[]DAP

MG WT-1 KGLDRPVPKTEISGLIKTGDNFITPSFKAGYYDHVASDGS
 MP WT-1 K[]L[]R[]P[]V[]P[]K[]T[]E[]I[]S[]G[]L[]I[]K[]T[]G[]D[]N[]F[]I[]T[]P[]S[]F[]K[]A[]G[]Y[]Y[]D[]H[]V[]A[]S[]D[]G[]S[]

MG WT-1 LLSYYQSTEYFNNRVLMPILOTTNGTLMANNRGYDDVFR-
 MP WT-1 []L[]K[]Y[]Y[]Q[]S[]T[]E[]Y[]F[]N[]N[]R[]V[]L[]M[]P[]I[]L[]O[]T[]T[]N[]G[]T[]L[]M[]A[]N[]N[]R[]G[]Y[]D[]D[]V[]F[]R[]-

MG WT-1 -QVPSFSGWSNTKATTV----STSNNLTYDKWTFYFAAKGS
 MP WT-1 Q[]G[]V[]P[]S[]F[]S[]G[]W[]S[]N[]T[]K[]A[]T[]T[]V[]- - - -S[]T[]S[]N[]N[]L[]T[]Y[]D[]K[]W[]T[]F[]Y[]F[]A[]A[]K[]G[]S[]

MG WT-1 PLYDSYPNHFFEDVKTLAIDAKDIS-----ALKTTIDSEK
 MP WT-1 P[]L[]Y[]D[]S[]Y[]P[]N[]H[]F[]F[]E[]D[]V[]K[]T[]L[]A[]I[]D[]A[]K[]D[]I[]S[]- - - - -A[]L[]K[]T[]T[]I[]D[]S[]E[]K[]

MG WT-1 PTYLIIRGLSGNGSQLNELQLPESVKKVSLYGDYTGVNVA
 MP WT-1 P[]T[]Y[]L[]I[]I[]R[]G[]L[]S[]G[]N[]G[]S[]Q[]L[]N[]E[]L[]Q[]L[]P[]E[]S[]V[]K[]K[]V[]S[]L[]Y[]G[]D[]Y[]T[]G[]V[]N[]V[]A[]

MG WT-1 KQIFANVVELEFYSTSKANSFGFNPLVLGSKTNVINDLFA
 MP WT-1 K[]Q[]I[]F[]A[]N[]V[]V[]E[]L[]E[]F[]Y[]S[]T[]S[]K[]A[]N[]S[]F[]G[]F[]N[]P[]L[]V[]L[]G[]S[]K[]T[]N[]V[]I[]N[]D[]L[]F[]A[]

MG WT-1 SKPFTHIDLTQVTLQNSDNSAIDANKLKQAVGDIYNYRRF
 MP WT-1 S[]K[]P[]F[]T[]H[]I[]D[]L[]T[]Q[]V[]T[]L[]Q[]N[]S[]D[]N[]S[]A[]I[]D[]A[]N[]K[]L[]K[]Q[]A[]V[]G[]D[]I[]Y[]N[]Y[]R[]R[]F[]

MG WT-1 ERQFQGYFAGGYIDKYLKVNVTN-KDSDDDLVYRSLKEL
 MP WT-1 E[]R[]Q[]F[]Q[]G[]Y[]F[]A[]G[]G[]Y[]I[]D[]K[]Y[]L[]V[]K[]N[]V[]T[]N[]-K[]D[]S[]D[]D[]D[]L[]V[]Y[]R[]S[]L[]K[]E[]L[]

MG WT-1 NLHLEEAYREGDNTYYRVNENYYPGASIYENERASRDSEF
 MP WT-1 N[]L[]H[]L[]E[]E[]A[]Y[]R[]E[]G[]D[]N[]T[]Y[]Y[]R[]V[]N[]E[]N[]Y[]Y[]P[]G[]A[]S[]I[]Y[]E[]N[]E[]R[]A[]S[]R[]D[]S[]E[]F[]

MG WT-1 QNEILKRAEQNGVTFDEN
 MP WT-1 Q[]N[]E[]I[]L[]K[]R[]A[]E[]Q[]N[]G[]V[]T[]F[]D[]E[]N[]

图28

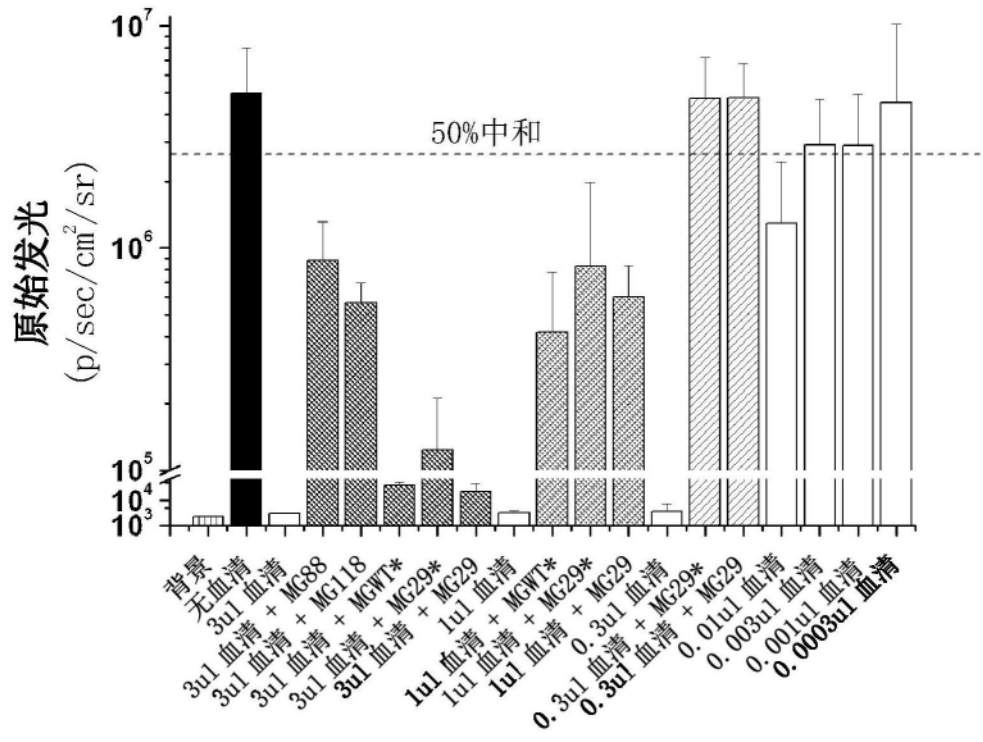


图29

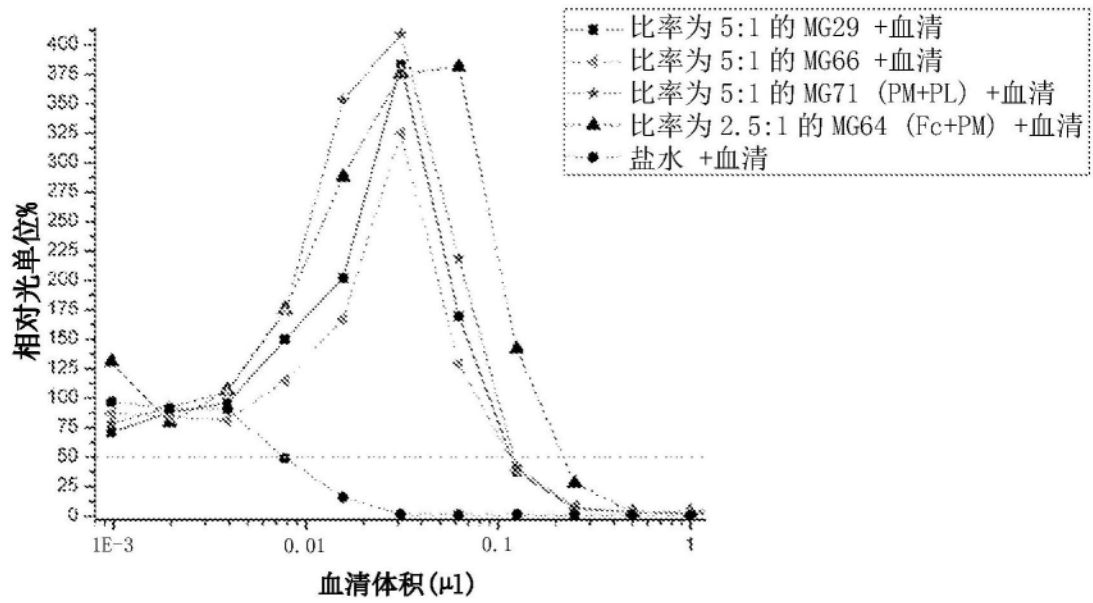


图30