



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105722855 B

(45) 授权公告日 2021.04.23

(21) 申请号 201480051238.5

(22) 申请日 2014.09.04

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105722855 A

(43) 申请公布日 2016.06.29

(30) 优先权数据

61/874,277 2013.09.05 US

61/874,284 2013.09.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.03.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/054079 2014.09.04

(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/053887 EN 2015.04.16

(73) 专利权人 IGM生物科学股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 B.基特 F.张 L.G.普雷斯塔
R.约希穆拉

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 杨昀 余颖

(51) Int.Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2013049254 A1, 2013.04.04

Christian Klein等. Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies. 《MABS》. 2012, 第4卷 (第6期), 第653-663页.

Roger Müller等. High-resolution structures of the IgM Fc domains reveal principles of its hexamer formation. 《PNAS》. 2013, 第110卷 (第25期), 10183-10188.

审查员 薛旻

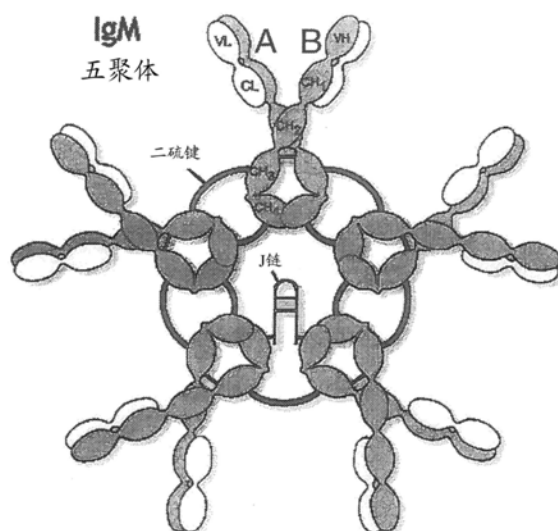
权利要求书2页 说明书30页
序列表38页 附图26页

(54) 发明名称

恒定链经修饰的双特异性五价和六价Ig-M抗体

(57) 摘要

本发明涉及具有五聚或六聚环结构的结合分子, 诸如像具有五个或六个双特异性结合单元的分离的IgM抗体, 以及用于制备和使用所述结合分子的方法和方式。本发明还涉及具有五聚或六聚环结构的多特异性结合分子, 诸如像具有五个或六个双特异性结合单元的分离的IgM抗体, 以及用于制备和使用所述结合分子的方法和方式。



五(A,B)单元, 在天然IgM中A=B

1. 一种具有五聚或六聚环结构的结合分子,其包含五个或六个双特异性结合单元,其中所述双特异性结合单元各自具有相同的两种结合特异性并且包含第一链和第二链,所述第一链至少包含与第一结合靶标的第一结合区缀合的人IgM重链恒定区的C μ 4域、C μ 3域和C μ 2域,所述第二链至少包含人IgM重链恒定区的C μ 4域、C μ 3域和C μ 2域以及第二结合靶标的第二结合区,其中所述第一结合靶标和所述第二结合靶标不同,并且其中所述第一链和所述第二链经过组装以由于它们个别IgM重链恒定区之间所产生的不对称界面而产生双特异性结合单元,其中所述内部不对称界面由以下产生:

通过钮-孔连接,其由以下组成:

钮T350Y, T354E和I397E与孔L352S, T354K, H395V和I397K;并且

其中氨基酸编号对应于SEQ ID NO:33的野生型人IgM重链恒定区。

2. 如权利要求1所述的结合分子,其中所述双特异性结合单元是相同的。

3. 如权利要求1或2所述的结合分子,其中所述第一结合区和所述第二结合区分别是结合至所述第一结合靶标和所述第二结合靶标的两个不同抗体重链可变区。

4. 如权利要求3所述的结合分子,其还包含与所述两个不同抗体重链可变区中的至少一个缔合的至少一个IgM轻链可变区序列。

5. 如权利要求4所述的结合分子,其中所述轻链可变区序列通过在所述轻链与所述重链之间产生不对称界面来偶联至其匹配重链可变区。

6. 如权利要求5所述的结合分子,其中所述不对称界面通过CrossMab技术、钮-孔偶联和/或盐桥偶联来产生。

7. 一种具有五聚或六聚环结构的结合分子,其包含五个或六个双特异性结合单元,其中(i)所述双特异性结合单元各自包含两个IgM重链恒定区,其各自至少包含缀合至结合靶标的结合区的C μ 2、C μ 3和C μ 4域,(ii)至少两个所述双特异性结合单元结合至不同结合靶标,(iii)内部不对称界面在各双特异性结合单元的两个IgM重链恒定区之间产生,并且(iv)外部不对称界面在结合至不同靶标的所述邻近双特异性结合单元的所述重链恒定区之间产生,其中所述内部不对称界面由以下产生:

通过钮-孔连接,其由以下组成:

钮T350Y, T354E和I397E与孔L352S, T354K, H395V和I397K;并且

其中所述外部不对称界面由C μ 3-C μ 3域中至少一个带成对电荷的氨基酸残基开关形成,其中所述带成对电荷的氨基酸残基开关是 K238 $\leftrightarrow$ D293 或 K268 $\leftrightarrow$ D294;并且

其中氨基酸编号对应于SEQ ID NO:33的野生型人IgM重链恒定区。

8. 如权利要求7所述的结合分子,其中所述结合区是抗体重链可变区。

9. 如权利要求8所述的结合分子,其还包含与至少一个所述结合单元中的抗体重链可变区中的至少一个缔合的至少一个IgM轻链可变区序列。

10. 如权利要求9所述的结合分子,其中所述轻链可变区序列通过在所述轻链与所述重链之间产生不对称界面来偶联至其匹配重链可变区。

11. 如权利要求10所述的结合分子,其中所述不对称界面通过CrossMab技术、钮-孔偶联和/或盐桥偶联来产生。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的结合分子,其中所述结合靶标选自肽、糖蛋白和核酸分子。

13. 如权利要求12所述的结合分子,其中所述结合靶标选自可溶性多肽、细胞表面受体、配体、分子转运蛋白、酶和酶底物。

14. 如权利要求7至13中任一项所述的结合分子,其中所述结合至不同靶标的结合单元选自结合至以下的结合单元:相同可溶性靶标上的不同位点、相同细胞表面受体靶标上的不同位点、不同可溶性靶标、不同细胞表面受体靶标、可溶性靶标和细胞表面受体靶标、可溶性靶标或细胞表面受体靶标和长停留时间靶标、可溶性靶标和基质蛋白靶标或底物靶标、可溶性靶标或受体靶标和分子转运蛋白靶标,或不同细胞类型。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的结合分子,所述结合分子还包含IgM J链。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的结合分子,其缀合至毒素或化疗剂。

17. 如权利要求16所述的结合分子,其中缀合是通过融合或通过化学连接子。

18. 如权利要求1至17中任一项所述的结合分子,其是嵌合的或人源化的。

19. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至18中任一项所述的结合分子,和药学上可接受的载剂。

恒定链经修饰的双特异性五价和六价Ig-M抗体

[0001] 本申请是2014年9月4日提交的PCT申请号PCT/US2014/054079根据35USC§371提交的国家阶段申请,其要求2013年9月5日提交的临时申请号61/874,277和2013年9月5日提交的临时申请号61/874,284根据35USC§119(e)的优先权,各申请的全部内容通过引用纳入本文。

[0002] 电子提交的序列表引用

[0003] 本申请含有以ASCII格式电子提交的序列表并通过引用全文纳入本文。于2018年2月5日生成的所述ASCII拷贝名为IGM-0001-2-US_SL_Substitute_ST25.txt并且大小为86,421字节。

发明领域

[0004] 本发明涉及具有五聚或六聚结构的结合分子。

[0005] 具体来说,本发明涉及具有五聚或六聚环结构的结合分子,其包含五个或六个双特异性结合单元。在本发明结合分子中,所述双特异性结合单元各自结合两个不同结合靶标或相同结合靶标上的不同结合区(例如表位),并且所述五个或六个双特异性结合单元各自具有相同结合特异性(结合至相同的两个结合靶标)。在具体实施方案中,本发明涉及具有五聚或六聚结构的双特异性抗体,其包含五个或六个双特异性结合单元。

[0006] 在不同方面中,本发明包括包含五个或六个单特异性结合单位的结合分子,其中(i)所述单特异性结合单元各自包含两个IgM重链恒定区,所述两个IgM重链恒定区各自至少包含缀合至结合靶标的结合区的C_H3和C_H4域,(ii)至少两个所述单特异性结合单元结合至不同结合靶标。本发明还包括包含五个或六个双特异性结合单位的结合分子,其中(i)所述双特异性结合单元各自包含两个IgM重链恒定区,所述两个IgM重链恒定区各自至少包含缀合至结合靶标的结合区的C_H3和C_H4域,并且(ii)至少两个所述双特异性结合单元结合至不同结合靶标。在具体实施方案中,所述结合分子是多特异性IgM抗体。

背景技术

[0007] 由于人源化抗体的出现,诸如Rituxan®(利妥昔单抗(rituximab))、Herceptin®(曲妥珠单抗(trastuzumab))和Avastin®(贝伐单抗(bevacizumab))的抗体的治疗用途已使医学领域发生巨大变化,包括肿瘤学、炎症性病症(诸如类风湿性关节炎)的治疗和许多其他适应症。在美国,超过30种人类或人源化抗体已批准用于临床用途,并且超过600种新抗体或抗体样分子处于发展的不同阶段。一些抗体对诸如血管内皮生长因子(VEGF)或肿瘤坏死因子(TNF)的可溶性靶标分子具有拮抗功能,它们的作用是疾病的病理性过程的一部分。或者,抗体可结合、阻断和/或诱导诸如癌症的某些疾病中病理性细胞的破坏。这些治疗性抗体的主要功能是通过Fab区的结合和经由Fc域的效应子功能的募集(这也介导抗体的长循环半衰期)。抗体相较于小分子药物的主要优点之一可在于它们的强烈的特异性。抗体可非常准确地靶向选择的蛋白抗原(诸如癌基因),排除非常相似的同源物,从而允许良性的安全特性。因此,良好地表征抗体的特异性单一靶向功能。

[0008] 随着领域的进步,抗体功能已得到增强,其通过蛋白质工程的创造性手段诸如提供较高的亲和力、较长的半衰期和/或较好的组织分布,以及组合小分子和大分子技术来实现对经由毒性有效载荷递送破坏细胞的提高的关注(例如抗体-药物缀合物)。改良抗体功能的另一种方法利用免疫球蛋白G(IgG)结构的二价结合,从而允许一个IgG分子结合两个抗原。事实上,在某些应用中存在不对称抗体通过同时结合两个不同靶标抗原来发挥有用功能的良好可能性。为了解决这种需要,已产生多种构建体以得到可结合两个不同抗原的单一分子,从而允许之前从未在自然界中见到的功能。这种双特异性方法的实例是结合分别在T细胞和B细胞上的CD3和CD19受体的“布利莫单抗(blinatumumab)”(MT103)。细胞毒性T细胞对癌性B细胞的这种束缚允许有效治疗B细胞白血病。

[0009] 但是,在双特异性抗体的构建、表达和产生中仍然存在相当大的技术难度。尽管双特异性抗体由于它们同时结合两个不同抗原的能力而被视为有前景的治疗剂,但是它们的实用性由于稳定性和制造复杂性的问题受到限制。

[0010] 各种形式的蛋白质工程改造已用于匹配异源重链,加上重链和轻链的适当成对匹配,以有效得到双特异性IgG。此外,各种双特异性抗体型式,包括四价体瘤、化学异缀合物、使用选择的异二聚化域的重组构建体和由两种最小抗原结合位点组成的最小大小的重组构建体。

[0011] 但是,所有这些努力都存在困难。

[0012] 因此,除了针对开发双特异性治疗性抗体的努力,仍然存在对开发可引起更有效并灵活地产生双特异性和多特异性抗体的更有效平台的极大需要,从而使此类治疗剂的发现与临床引入之间的时间线变短并且实现具有多种特异性和/或化合价的新类型抗体型式的设计和产生。

发明内容

[0013] 本发明涉及具有五聚或六聚环结构的结合分子,诸如像具有五个或六个双特异性结合单元的分离的IgM抗体,以及用于制备和使用所述结合分子的方法和方式。

[0014] 在一个方面中,本发明涉及一种具有五聚或六聚环结构的结合分子,其包含五个或六个双特异性结合单元,其中所述双特异性结合单元各自具有相同的两种结合特异性并且包含第一链和第二链,所述第一链至少包含与第一结合靶标的第一结合区缀合的IgM重链恒定区的C μ 4域,所述第二链至少包含IgM重链恒定区的C μ 4域和第二结合靶标的第二结合区,其中所述第一结合靶标和所述第二结合靶标不同,并且其中所述第一链和所述第二链经过组装以由于它们个别IgM重链恒定区之间所产生的不对称界面而产生双特异性结合单元。

[0015] 在一个实施方案中,所述双特异性结合单元是相同的。

[0016] 在另一实施方案中,所述结合分子还包含IgM J链。

[0017] 在又另一实施方案中,所述结合分子具有五聚环结构。

[0018] 在另一实施方案中,所述结合分子具有六聚环结构。

[0019] 在又另一实施方案中,在所述结合分子中,所述第一链和所述第二链还包含IgM重链恒定区的C μ 3域。

[0020] 在另一实施方案中,所述第一链和所述第二链还包含IgM重链恒定区的C μ 2域。

[0021] 在其他实施方案中,所述第一结合靶标和所述第二结合靶标选自肽、多肽、糖蛋白、核酸分子以及有机小分子和非有机小分子,包括但不限于可溶性多肽、细胞表面受体、配体、分子转运蛋白、酶和酶底物。

[0022] 在又另一实施方案中,所述第一结合靶标和所述第二结合靶标是相同可溶性靶标上的两个位点、相同细胞表面受体靶标上的两个位点、两个不同可溶性靶标、两个细胞表面受体靶标、一个可溶性靶标和一个细胞表面受体靶标、一个可溶性靶标或细胞表面受体靶标和一个长停留时间靶标、一个可溶性靶标和一个基质蛋白靶标或底物靶标、一个可溶性靶标或受体靶标和一个分子转运蛋白靶标,或两个不同细胞类型。

[0023] 将结合区缀合至分子的其余部分可采取融合。因此,例如,第一结合区和第二结合区可分别融合至第一IgM重链恒定区和第二IgM重链恒定区的N末端。

[0024] 在具体实施方案中,所述第一结合区和所述第二结合区是抗体的可变区。

[0025] 在另一实施方案中,所述第一结合靶标和所述第二结合靶标是两个不同抗原。

[0026] 在又另一实施方案中,所述第一结合靶标和所述第二结合靶标是相同抗原上的不同表位。

[0027] 在另外实施方案中,所述第一结合区和所述第二结合区可以是结合至两个结合靶标或相同结合靶标上的不同表位的两个不同抗体重链可变区。

[0028] 在本发明结合分子中,抗体重链可变区可来自IgG、IgA、IgE和/或IgM抗体,优选来自IgM抗体。优选地,本文结合分子是双特异性IgM分子,所述分子可(但不需要)还包含与两个不同IgM重链可变区中的一个缔合的至少一个IgM轻链可变区序列。

[0029] 在具体实施方案中,在本发明结合分子中,在结合单元的两条链的IgM重链恒定区之间,至少一些不对称界面由盐桥产生,所述盐桥由所述结合单元的两条链的C μ 2、C μ 3和/或C μ 4域中的至少一个中带相反电荷的氨基酸残基之间的成对开关形成。

[0030] 因此,盐桥可在结合单元的两条链的C μ 2-C μ 2、C μ 4-C μ 4和C μ 2-C μ 3-C μ 4域中的至少一个之间形成。

[0031] 在一个实施方案中,成对开关选自由以下组成的组:E $\rightarrow$ K、K $\rightarrow$ E;R $\rightarrow$ E、E $\rightarrow$ R;D $\rightarrow$ K、K $\rightarrow$ D;和R $\rightarrow$ D、D $\rightarrow$ R。

[0032] 在另一实施方案中,结合分子可包含C μ 4-C μ 4域中的至少一个带成对电荷的氨基酸残基开关,其中开关可例如选自由以下组成的组:R328E,D $\leftrightarrow$ E339R,K;R344E,D $\leftrightarrow$ S330R,K;K376E,D $\leftrightarrow$ E385R,K;R427E,D $\leftrightarrow$ E339R,K;和T354E,D $\leftrightarrow$ I397R,K,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0033] 在另一实施方案中,C μ 2-C μ 2域之间的至少一个带成对电荷的氨基酸开关并且可例如选自由E167R,K $\leftrightarrow$ K177E,D和K169E,D $\leftrightarrow$ E170R,K组成的组,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0034] 在又另一实施方案中,至少一个带成对电荷的氨基酸残基开关在C μ 2-C μ 3-C μ 4域中,并且可例如选自由以下组成的组:D121K,R $\leftrightarrow$ K315D,E;K150E,D $\leftrightarrow$ E385K,R;和K185D,E $\leftrightarrow$ D360K,R,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0035] 在另一实施方案中,在本发明结合分子中,在结合单元的两条链的IgM重链恒定区之间,至少一些不对称界面通过钮-孔(knobs-into-holes)连接产生,所述钮-孔连接可例如通过选自由以下组成的组的突变产生:钮:T350 $\rightarrow$ Y,F,W;和H395 $\rightarrow$ Y,F;和孔:L352 $\rightarrow$ G,A,

V,I,M,S,T;H395→A,V,I,L,M,F,Y;F393→W,Y;I397→A,V,S,T;T350→S,A,V;和T348→S,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0036] 在特定实施方案中,在本发明结合分子中,轻链可变区序列(若存在)通过在轻链与重链之间产生不对称界面来偶联至它们的匹配重链可变区。

[0037] 在其他实施方案中,不对称界面通过CrossMab技术、钮-孔偶联和/或盐桥偶联来产生。

[0038] 本发明结合分子可包含共同轻链和/或可缀合至毒素或化疗剂。优选地,缀合是通过融合,但通过化学连接子的缀合也包括在本发明范围内。

[0039] 本文结合分子可以是具有五聚或六聚结构的双特异性抗体,所述抗体可以是嵌合的或人源化的。

[0040] 在不同方面中,本发明涉及一种组合物,其包含至少约70%、或至少80%、或至少90%或至少95%、至少98%、或至少99%如上文中定义的结合分子。

[0041] 在具体实施方案中,组合物是药物组合物。

[0042] 本发明进一步涉及一种具有五聚或六聚环结构的多特异性结合分子,其包含五个或六个单特异性结合单元,其中(i)所述单特异性结合单元各自包含两个IgM重链恒定区,其各自至少包含缀合至结合靶标的结合区的C_μ3和C_μ4域,(ii)至少两个所述单特异性结合单元结合至不同结合靶标,并且(iii)外部不对称界面在结合至不同结合靶标的邻近单特异性结合单元的重链恒定区之间产生。

[0043] 在一个实施方案中,至少三个所述单特异性结合单元结合至不同结合靶标。

[0044] 在另一实施方案中,至少四个所述单特异性结合单元结合至不同结合靶标。

[0045] 在又另一实施方案中,结合分子具有五聚环结构并且所有五个单特异性结合单元结合至不同靶标。

[0046] 在另一实施方案中,结合分子具有六聚环结构并且至少五个所述单特异性结合单元结合至不同靶标。

[0047] 在又另一实施方案中,所有六个单特异性结合单元结合至不同靶标。

[0048] 在另一方面中,本发明涉及一种具有五聚或六聚环结构的多特异性结合分子,其包含五个或六个双特异性结合单元,其中(i)所述双特异性结合单元各自包含两个IgM重链恒定区,其各自至少包含缀合至结合靶标的结合区的C_μ3和C_μ4域,(ii)至少两个双特异性结合单元结合至不同结合靶标,(iii)内部不对称界面在各双特异性结合单元的两个IgM重链恒定区之间产生,并且(iv)外部不对称界面在结合至不同靶标的邻近双特异性结合单元的重链恒定区之间产生。

[0049] 在一个实施方案中,至少三个所述双特异性结合单元结合至不同结合靶标。

[0050] 在另一实施方案中,至少四个所述双特异性结合单元结合至不同结合靶标。

[0051] 在又另一实施方案中,结合分子具有五聚环结构并且所有五个双特异性结合单元结合至不同靶标。

[0052] 在另一实施方案中,结合分子具有六聚环结构并且至少五个所述双特异性结合单元结合至不同靶标。

[0053] 在又另一实施方案中,所有六个双特异性结合单元结合至不同靶标。

[0054] 在不同实施方案中,多特异性结合分子还包含IgM J链。

[0055] 在各种实施方案中,多特异性结合分子可具有五聚或六聚环结构。

[0056] 不管本发明多特异性结合分子的结合特异性的数目和性质,以下特定实施方案适用:

[0057] 在一个实施方案中,在至少一个结合单元中,IgM重链恒定区还包含C μ 2域。在又另一实施方案中,在所有结合单元中,IgM重链恒定区还包含C μ 2域。在各种实施方案中,本发明多特异性结合分子可结合至选自以下的结合靶标:肽、多肽、糖蛋白、核酸分子以及有机小分子和无机小分子。

[0058] 在其他实施方案中,本发明多特异性结合分子结合至选自以下的结合靶标:可溶性多肽、细胞表面受体、配体、分子转运蛋白、酶和酶底物。

[0059] 在另外实施方案中,结合至不同靶标的本发明多特异性结合分子选自由结合至以下的结合单元组成的组:相同可溶性靶标上的位点;相同细胞表面受体靶标上的位点;不同可溶性靶标;不同细胞表面受体靶标;可溶性靶标和细胞表面受体靶标;可溶性靶标或细胞表面受体靶标和长停留时间靶标;可溶性靶标和基质蛋白靶标或底物靶标;可溶性靶标或受体靶标和分子转运蛋白靶标,和不同细胞类型。

[0060] 在具体实施方案中,在本发明结合分子内的结合单元中,IgM重链恒定区与结合靶标的结合区之间的缀合是通过融合。因此,例如,结合区可融合至IgM重链恒定区的N末端。

[0061] 在一个实施方案中,至少一个结合区是抗体的可变区。

[0062] 在另一实施方案中,所有结合区是抗体重链可变区。

[0063] 在又另一实施方案中,至少两个结合靶标是不同抗原。

[0064] 在又另一实施方案中,至少两个结合靶标是相同抗原上的不同表位。

[0065] 在所有方面和实施方案中,抗体重链可变区可来自IgG、IgA、IgE或IgM抗体,优选来自IgM抗体。

[0066] 在优选实施方案中,本发明多特异性结合分子是多特异性IgM抗体。

[0067] 在一个实施方案中,本发明多特异性IgM抗体还包含与至少一个结合单元中的IgM重链可变区缔合的至少一个IgM轻链可变区序列。

[0068] 在另一实施方案中,多特异性IgM抗体还包含与IgM重链可变区中的每一个缔合的IgM轻链可变区序列。

[0069] 在所有方面和实施方案中,外部不对称界面通过C μ 3域内的变化产生。在一个实施方案中,变化由盐桥产生,所述盐桥由C μ 3域中带相反电荷的氨基酸残基之间的成对开关形成。

[0070] 在各种实施方案中,提供外部不对称界面的盐桥由C μ 3-C μ 3域中至少一个带成对电荷的氨基酸残基开关形成,所述氨基酸残基开关可例如是邻近 μ 链中的K238 $\leftrightarrow$ D293或K268 $\leftrightarrow$ D294,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0071] 在所有方面和实施方案中,在本发明多特异性结合分子(例如多特异性IgM抗体)中,内部不对称界面由盐桥产生,所述盐桥由C μ 2、C μ 3和/或C μ 4域中的至少一个中带相反电荷的氨基酸残基之间的成对开关形成。

[0072] 在一个实施方案中,盐桥在所述结合单元的两条链的C μ 2-C μ 2、C μ 4-C μ 4和C μ 2-C μ 3-C μ 4域中的至少一个之间形成。

[0073] 在另一实施方案中,成对开关选自由以下组成的组:E $\rightarrow$ K、K $\rightarrow$ E;R $\rightarrow$ E、E $\rightarrow$ R;D $\rightarrow$ K、

K→D;和R→D、D→R。

[0074] 在另一实施方案中,多特异性结合分子,例如多特异性IgM抗体,包含C_μ4-C_μ4域中至少一个带成对电荷的氨基酸残基开关,所述开关可例如选自由以下组成的组: R328E,D↔E339R,K; R344E,D↔S330R,K; K376E,D↔E385R,K; R427E,D↔E339R,K;和 T354E,D↔I397R,K,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0075] 在又另一实施方案中,多特异性结合分子,例如多特异性IgM抗体,包含C_μ2-C_μ2域之间至少一个带成对电荷的氨基酸开关,所述开关可例如选自由E167R,K↔K177E,D和 K169E,D↔E170R,K组成的组,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0076] 在另一实施方案中,多特异性结合分子,例如多特异性IgM抗体,包含C_μ2-C_μ3-C_μ4域中至少一个带成对电荷的氨基酸残基开关,所述开关可例如选自由以下组成的组: D121K,R↔K315D,E; K150E,D↔E385K,R;和K185D,E↔D360K,R,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0077] 在所有方面和实施方案中,IgM重链恒定区之间的至少一些外部不对称界面和/或内部不对称界面可通过钮-孔连接产生。例如,至少一个钮-孔连接由选自由以下组成的组的突变产生:钮:T350→Y,F,W;和H395→Y,F;和孔:L352→G,A,V,I,M,S,T;H395→A,V,I,L,M,F,Y;F393→W,Y;I397→A,V,S,T;T350→S,A,V;和T348→S,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0078] 在包含轻链可变区序列的多特异性IgM抗体中,此类轻链可变区序列可通过在轻链与重链之间产生不对称界面来偶联至它们的匹配重链可变区。在各种实施方案中,不对称界面可通过CrossMab技术、钮-孔偶联和/或盐桥偶联来产生。在另一实施方案中,多特异性结合分子的结合单元包含共同轻链。

[0079] 在所有方面和实施方案中,多特异性结合分子可缀合至毒素或化疗剂,其中缀合可例如通过融合和/或通过化学连接子。

[0080] 本发明多特异性IgM抗体可以是嵌合的或人源化的。

[0081] 在另一方面中,本发明涉及一种组合物,其包含至少约70%、或至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约99%本文的多特异性结合分子。所述组合物可例如是包含至少一种药学上可接受的成分的药物组合物。

附图说明

[0082] 图1说明包含J链的IgM五聚体的结构,其中链A和B在天然IgM中是相同的。

[0083] 图2A说明具有两种结合特异性的五元IgM分子,其中指定为A和B的重(μ)链是不同的。

[0084] 图2B说明包含五个或六个单特异性结合单元的多特异性IgM抗体,其中(i)单特异性结合单元各自包含两个IgM重链恒定区,所述两个IgM重链恒定区各自至少包含缀合至结合靶标的结合区的C_μ4域,(ii)至少两个单特异性结合单元结合至不同结合靶标。

[0085] 图2C说明包含五个或六个双特异性结合单元的多特异性IgM抗体,其中(i)双特异性结合单元各自包含两个IgM重链恒定区,所述两个IgM重链恒定区各自至少包含缀合至结合靶标的结合区的C_μ4域,并且(ii)至少两个双特异性结合单元结合至不同结合靶标。

[0086] 图3为如Czajkowsky D.M,Shao Z,PNAS 2009;106:14960-14965中公开的IgM分子

的A重链和B重链的结构模型。

[0087] 图4A示出人类IgG1、IgE和IgM的分别CG1 (SEQ ID NO:20)、GE1 (SEQ ID NO:19) 和CM1 (SEQ ID NO:21) 恒定域的比对。

[0088] 图4B示出人类IgE和IgM的分别CE2 (SEQ ID NO:22) 和CM2 (SEQ ID NO:23) 恒定域的比对。CG-H公开为SEQ ID NO:24。

[0089] 图4C示出人类IgG1、IgE和IgM的分别CG2 (SEQ ID NO:26)、CE3 (SEQ ID NO:25) 和CM3 (SEQ ID NO:27) 恒定域的比对。

[0090] 图4D示出人类IgG、IgE和IgM的分别CG3 (SEQ ID NO:29)、CE4 (SEQ ID NO:28) 和CM4 (SEQ ID NO:30) 恒定域的比对。

[0091] 如图4A-4D中所示的完整依序的IgE恒定区序列 (SEQ ID NO:19,22,25和28) 示于SEQ ID NO:31。如图4A-4D中所示的完整依序的IgG恒定区序列 (SEQ ID NO:20,24,26和29) 示于SEQ ID NO:32。如图4A-4D中所示的完整依序的IgM恒定区序列 (SEQ ID NO:21,23,27和30) 示于SEQ ID NO:33。

[0092] 在图4A至4D中:

[0093] 人类IgE序列 (SEQ ID NO:31) 由GenBank J00222.1编码(替换为AH005273.2);残基编号来自PDB 2WQR;螺旋(h)和折叠(s)分配来自PDB 2WQR;

[0094] 人类IgG1序列 (SEQ ID NO:32) 由GenBank J00228.1编码(替换为AH007035.2);残基编号来自PDB 10Q0;螺旋(h)和折叠(s)分配来自PDB 10Q0;

[0095] 人类IgM序列 (SEQ ID NO:33) 由GenBank X14940.1编码;残基编号从CM1域开始依序;人类IgM序列中的报告变化在GenBank CAB37838.1、CAC20458.1、AFM37312.1、X57331.1和J00260.1的IgM序列下方指出

[0096] 图5示出实施例1中制备的异二聚体的结构。

[0097] 图6示出野生型和工程改造IgM Fc对2a和2b的非还原SDS-PAGE凝胶。

[0098] 泳道1:野生型Rtx:Fc。

[0099] 泳道2:Rtx2a:Fc2b的混合物,其中Rtx2a主要由与具有C291S、T350Y、T354E和I397E突变和尾部段缺失的人类 μ 链的CM1至CM4融合的嵌合Rituxan (抗CD20) Vh区的 μ 链组成;并且Fc2b是人类 μ 链CH2至CH4并且具有C291S、L352S、T354K、H395V和I397K突变和尾部段缺失,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0100] 泳道3:Rtx2b:Fc2a的混合物,其中Rtx2b主要由与具有C291S、L352S、T354K、H395V和I397K突变和尾部段缺失的人类 μ 链的CM1至CM4融合的嵌合Rituxan (抗CD20) Vh区的 μ 链组成;并且Fc2a由具有C291S、T350Y、T354E和I397E突变和尾部段缺失的人类 μ 链CH2至CH4组成,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。箭头指示异二聚体。

[0101] 图7示出野生型和工程改造IgM Fc对1a和2b的还原SDS-PAGE凝胶,其中名称与图6中相同。

[0102] 图8示出野生型和工程改造IgM Fc对的非还原SDS-PAGE凝胶:

[0103] 泳道1:野生型Okt:Fc。Okt,主要由与人类 μ 链的CM2至CM4融合的OKT3 (抗CD3抗体) scFv组成。

[0104] 泳道2:Okt2a:Fc2b的混合物,其中Okt2a主要由与具有C291S、T350Y、T354E和I397E突变和尾部段缺失的人类 μ 链的CM2至CM4融合的OKT3 (抗CD3抗体) scFv组成,其中氨

氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区；

[0105] 泳道3:0kt2b:Fc2a的混合物,其中0kt2b主要由与具有C291S、L352S、T354K、H395V和I397K突变和尾部段缺失的人类 μ 链的CM2至CM4融合的0KT3 (抗CD3抗体) scFv组成,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。箭头指示异二聚体。

[0106] 泳道4-6:野生型0kt:Rtx组合;工程改造0kt2a:Rtx2b组合;和0kt2b:Rtx2a组合,其中Rtx2a主要由与具有C291S、T350Y、T354E和I397E突变和尾部段缺失的人类 μ 链的CM1至CM4融合的嵌合Rituxan (抗CD20) Vh区的 μ 链组成,并且Rtx2b主要由与具有C291S、L352S、T354K、H395V和I397K突变和尾部段缺失的人类 μ 链的CM1至CM4融合的嵌合Rituxan (抗CD20) Vh区的 μ 链组成,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。箭头指示异二聚体。

[0107] 图9示出与图8中所示相同的构建体的293F细胞转染子的SDS-PAGE凝胶上的还原样本。

[0108] 图10说明C μ 3区中的四个盐桥如何稳定本发明多特异性结合分子中二硫桥键周围的两个邻近(A,B) μ 链。

[0109] 图11示出表A,其列举钮-孔位置中和用于潜在的电荷引入的人类IgM CM4域界面残基。氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0110] 图12示出表B,其列举用于潜在的电荷交换的人类IgM CM4域界面残基。氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0111] 图13示出表C,其列举用于潜在的电荷引入的人类IgM CM2域界面残基。氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0112] 图14示出表D,其列举用钮-孔位置中的人类IgM CM2域界面残基。氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0113] 图15示出表E,其列举用于潜在的电荷交换的人类IgM CM2域界面残基。氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0114] 图16示出表F,其列举用于电荷交换的人类IgM CM2、CM3和CM4域界面残基。氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0115] 发明详述

[0116] I. 定义

[0117] 术语“抗体”包括单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、单链分子,以及抗体片段(例如,Fab、F(ab')₂和Fv)。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文可与“抗体”互换使用。基本的4链抗体单元是主要由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成的异四聚糖蛋白。

[0118] 就IgG而言,4链单元一般为约150,000道尔顿。各L链通过一个共价二硫键连接至H链,同时两条H链取决于H链同种型通过一个或多个二硫键彼此连接。各H链和L链还具有规律间隔的链内二硫桥键。各H链在N末端具有一个可变域(V_H),接着 α 和 γ 链各自的三个恒定域(C_H)和 μ 和 s 同种型的四个C_H域。各L链在N末端具有一个可变域(V_L),接着在其另一端具有一个恒定域。将V_L与V_H比对并且将C_L与重链的第一恒定域(C_{H1})比对。据悉,具体的氨基酸残基形成了轻链可变域与重链可变域之间的界面。V_H和V_L的配对一起形成单一抗原结合位点。

[0119] IgM形成多个免疫球蛋白用二硫键共价连接在一起的聚合物。IgM主要以五聚体的

形式存在,但还以六聚体的形式存在,并且因此含有10个或12个抗原结合位点。五聚体形式任选含有额外的多肽,称为J链,但也可在J链不存在的情况下制备。五聚IgM分子具有大致970kDa的分子量。IgM由于它的聚合性质而拥有高亲合力并且在补体活化中是尤其有效的。不同于IgG,IgM单体中的重链主要由一个可变域和四个恒定域组成。IgM恒定域在本文指定为CM1或C μ 1、CM2或C μ 2、CM3或C μ 3、和CM4或C μ 4,其中“CM”和“C μ ”名称可互换使用。

[0120] IgA抗体以单体形式存在但也可聚合。在它们的分泌形式中,IgA包含2-5个由J链和分泌组分连接的基本的4链单元。

[0121] IgE以单体形式存在,并且具有四个恒定域,在本申请中称为CE1、CE2、CE3和CE4。

[0122] 来自任何脊椎动物物种的L链可基于其恒定域的氨基酸序列指定为两种明显不同类型(称为 κ 和 λ)中的一者。

[0123] 一些抗体类型还可分成各种子类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0124] 关于不同类别抗体的结构和性质的进一步细节,参见例如,Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Stites,Abba I.Terr and Tristram G.Parslow(编),Appleton&Lange,Norwalk,Conn.,1994,第71页和第6章。

[0125] 除非上下文说明,否则术语“抗体”明确地包括天然人类和非人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgA、IgD和IgM抗体,包括天然存在的变体。因此,例如,人类IgM序列是可以GenBank登录号X14940.1购得的基因组序列所编码的SEQ ID NO:33(可以GenBank登录号X57331.1和J00260.1(由AH005277.2替换)购得的变体核苷酸序列),同时氨基酸变体已报告为GenBank CAB37838.1、CAC20458.1和AFM37312.1。

[0126] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指自大致上均质抗体的群体获得的抗体,即除可以少量存在的可能天然存在的突变之外,构成所述群体的个别抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原位点。此外,与通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂不同,各单克隆抗体针对抗原上的单一决定子。修饰语“单克隆”指示抗体是从实质上均质的抗体群体获得的特性,且不应解释为需要通过任何特定方法来产生所述抗体。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可通过最初由Kohler等(1975) Nature 256:495描述的杂交瘤方法制备,或可通过重组DNA方法(参见例如,美国专利号4,816,567)制备。还可以使用例如Clackson等(1991) Nature 352:624-628和Marks等(1991) J.Mol.Biol.222:581-597中所描述的技术从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

[0127] 本文中的单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中一部分重链和/或轻链与源于特定物种或属于特定抗体类别或子类的抗体中的相应序列相同或同源,而所述链的剩余部分与源于另一物种或属于另一抗体类别或子类的抗体中的相应序列相同或同源;以及所述抗体的片段,只要其展现所需生物活性即可(美国专利号4,816,567;和Morrison等(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855)。

[0128] “人源化”形式的非人类(例如,鼠类)抗体是含有源于非人类免疫球蛋白的最小序列的抗体。人源化抗体大部分是人类免疫球蛋白(接受者抗体),其中来自接受者的高变区的残基经来自如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物的非人类物种(供体抗体)的高变区的具有所需特异性、亲和力和能力的残基置换。在一些情况下,所述人类免疫球蛋白的Fv构架区(FR)残基也由相应非人类残基置换。另外,人源化抗体可包含在接受者抗体中或在供体抗体中没有见到的残基。进行这些改性以进一步精制抗体性能。通常,所述人源化抗体将包

含至少一个且通常两个可变域的基本全部,其中全部或基本全部的高变环对应于非人免疫球蛋白的那些高变环且全部或基本全部的FR区为人免疫球蛋白序列的那些FR区。所述人源化抗体任选还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常人类免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分。更多细节参见Jones等(1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann等(1988) *Nature* 332:323-329;和Presta(1992) *Curr.Op.Struct.Biol.* 2:593-596。

[0129] “物种依赖性抗体”是对来自第一哺乳动物物种的抗原的结合亲和力比来自第二哺乳动物物种的所述抗原的同源物的结合亲和力强的抗体。通常,物种依赖性抗体“特异性结合”至人类抗原(即具有不超过约 1×10^{-7} M,优选地不超过约 1×10^{-8} M并且最优选地不超过约 1×10^{-9} M的结合亲和力(K_D)值),但是对来自第二哺乳动物物种的所述抗原的同源物具有结合亲和力,所述结合亲和力比其对人类抗原的结合亲和力弱至少约50倍、或至少约500倍、或至少约1000倍。物种依赖性抗体可以是上文所定义的各种类型抗体中的任何一种,但优选地是人源化抗体或人类抗体。

[0130] 如本文所用的“抗体突变体”或“抗体变体”是指参考抗体的氨基酸序列变体,其中参考抗体的一个或多个氨基酸残基被修饰。参考抗体可例如是天然抗体,但还可以是天然抗体的已知变体。所述突变体必然与参考抗体具有小于100%序列同一性或相似性。在优选实施方案中,抗体突变体将具有与参考抗体的重链或轻链可变域的氨基酸序列具有至少75%、更优选地至少80%、更优选地至少85%、更优选地至少90%并且最优选地至少95%氨基酸序列同一性或相似性的氨基酸序列。关于所述序列的同一性或相似性在本文定义为在比对序列并且引入间隙(必要时)以实现最大序列同一性百分比之后,候选序列中的氨基酸残基与参考抗体残基相同(即相同的残基)或相似(即基于共同侧链性质来自相同组的氨基酸残基)的百分比。N末端、C末端、或内部延伸、缺失、或插入到可变区外的抗体序列中都不应被认为影响序列同一性或相似性。

[0131] 本文中“分离的”双特异性或多特异性结合分子,诸如双特异性或多特异性抗体,是已被鉴定且与它在重组宿主细胞中的天然环境的组分分离和/或从所述天然环境的组分回收的抗体。它的天然环境的污染物组分是可干扰分子(例如抗体)的诊断或治疗用途的物质,并且可包括酶、激素和其他蛋白质性或非蛋白质性溶质,以及生产的非所需副产物,诸如像单特异性结合单元(就包含AB结合单元的双特异性分子而言的AA和/或BB)或具有小于五个双特异性结合单元分子。在优选实施方案中,双特异性结合分子,诸如抗体,将(1)被纯化至如通过SDS-PAGE或SEC-HPLC方法所测定,大于95重量%、或大于98重量%、或大于99重量%, (2)被纯化至足以通过使用氨基酸测序仪获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)通过使用考马斯蓝(Coomassie blue)或优选地银染色法,在还原或非还原条件下进行SDS-PAGE被纯化至均质。通常,分离的多特异性(例如双特异性)结合分子(例如抗体)将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0132] 术语“特异性结合”或“特异性结合至”或“特异于”是指结合分子(诸如抗体)对靶标分子(例如具体多肽或具体多肽上的表位、肽或其他靶标(例如糖蛋白靶标))的结合,并且意谓可测量地不同于非特异性相互作用(例如,非特异性相互作用可结合至牛血清白蛋白或酪蛋白)的结合。特异性结合可例如通过相较于抗体对对照分子的结合测定抗体对靶标分子的结合来测量。例如,特异性结合可通过与类似于靶标(例如,过量未标记靶标)的对

照分子的竞争来测定。就此而言,若标记靶标对探针的结合受到过量未标记靶标的竞争抑制,则指示为特异性结合。如本文所使用的术语“特异性结合”或“特异性结合至”或“特异于”具体多肽或具体多肽靶标上的表位可例如由对靶标具有至少约200nM、或者至少约150nM、或者至少约100nM、或者至少约60nM、或者至少约50nM、或者至少约40nM、或者至少约30nM、或者至少约20nM、或者至少约10nM、或者至少约8nM、或者至少约6nM、或者至少约4nM、或者至少约2nM、或者至少约1nM或更大的Kd的分子来展现。在某些情况下,术语“特异性结合”是指分子结合至具体多肽或具体多肽上的表位,而不实质上结合至任一其他多肽或多肽表位的结合。

[0133] “结合亲和力”是指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体与抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力可通常由解离常数(Kd)表示。例如,Kd可以是约200nM、150nM、100nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、8nM、6nM、4nM、2nM、1nM或更强。亲和力可通过本领域中已知的常用方法(包括本文所述的)加以测量。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且倾向于容易解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持结合时间更长。测量结合亲和力的多种方法在本领域是已知的。

[0134] 如本文所用的“Kd”或“Kd值”是指通过适用于抗体和靶标对的技术,例如使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore公司,Piscataway,N.J.),在25℃下,用固定抗原CM5芯片在约10反应单位(RU)下,例如使用表面等离子体共振测定来测量的解离常数。

[0135] 如本文所用的术语“双特异性结合单元”是指包含一对IgM重链恒定区多肽的分子,所述IgM重链恒定区多肽各自至少包含CM4域,并且各自缀合至不同结合靶标的结合区。优选地,缀合通过融合,优选地至IgM重链恒定区多肽序列的N末端。术语“双特异性结合单元”明确地涵盖但不限于“双特异性IgM抗体结合单元”,如在下文中定义。本发明结合分子具有五聚或六聚环结构并且包含五个或六个双特异性结合单元。

[0136] 术语“缀合”是指共价或非共价键的任何和所有形式,且包括但不限于直接基因融合或化学融合、通过连接子或交联剂偶联和非共价缔合。

[0137] 术语“双特异性IgM抗体结合单元”是以最广泛的意义使用并且明确涵盖一对融合至可变域序列(V_H)的IgM抗体重链恒定区多肽(至少包含CM4恒定域),各可变域序列结合至不同靶标,与抗体轻链可变域(V_L)序列缔合或不缔合。在一个实施方案中,双特异性IgM抗体涵盖两个 $V_H V_L$ 抗原结合区,各抗原结合区能够结合至一个抗原上的不同表位或两个不同抗原上的表位。双特异性IgM抗体结合单元可以是单一物种的全长结合单元,或可以被嵌合或人源化。本发明双特异性IgM抗体具有五聚或六聚环结构,其包含五个或六个双特异性IgM结合单元。

[0138] “全长IgM抗体重链”是在N末端向C末端方向上由抗体重链可变域(VH)、抗体恒定重链恒定域1(CM1或C μ 1)、抗体重链恒定域2(CM2或C μ 2)、抗体重链恒定域3(CM3或C μ 3)和抗体重链恒定域4(CM4或C μ 4)组成的多肽。根据本发明的双特异性全长IgM抗体包含五个或六个各自具有两个抗原结合位点的单体(结合单元),所述单体特异性结合至两个不同结合靶标(表位)。全长抗体的重链或轻链的C末端表示重链或轻链的C末端处的最后一个氨基酸。全长抗体的重链或轻链的N末端表示重链或轻链的N末端处的第一个氨基酸。

[0139] 如本文所用的术语“价”表示抗体中存在特定数目的结合位点。因而，术语“二价”、“三价”和“六价”分别表示存在两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点。在根据本发明的双特异性IgM抗体中，各结合位点是二价的。因此，本文双特异性IgM抗体具有10个或12个化合价。所述定义同样适用于作为非抗体的结合分子。

[0140] 术语“表位”包括能够特异结合至抗体的任何分子决定子。在某些实施方案中，表位决定子包括如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基的分子的化学活性表面集合，且在某些实施方案中可具有特定三维结构特征和/或特定电荷特征。表位是抗原中由抗体结合的区域。“结合区”是靶标上由结合分子结合的区域。

[0141] “多表位特异性”是指特异性结合至相同或不同靶标上的两个或更多个不同表位的能力。“单特异性”是指结合仅一个表位的能力。根据一个实施方案，双特异性IgM抗体结合至各表位，其中亲和力为至少 10^{-7} M、或 10^{-8} M或更好。

[0142] 术语“靶标”是以最广泛的意义使用并且明确包括多肽、核酸、碳水化合物、脂质和具有当它们在自然界中存在时的生物功能的其他分子。“靶标”可例如是细胞，其中双特异性结合单元靶向两个不同细胞类型、相同细胞类型的不同亚群（例如不同B细胞种群）或单一细胞上的两个不同实体。

[0143] 本发明抗体的“抗原结合位点”或“抗原结合区”通常含有六个互补决定区（CDR），所述互补决定区以不同程度促成结合位点对抗原的亲和力。存在三个重链可变域CDR（CDRH1、CDRH2和CDRH3）和三个轻链可变域CDR（CDRL1、CDRL2和CDRL3）。CDR和构架区（FR）的范围通过比较汇编的氨基酸序列数据库来确定，在所述数据库中所述区已根据序列之间的变化性和/或抗体/抗原复合物的结构信息来定义。本发明范围内还包括由较少CDR组成（即，结合特异性通过三个、四个或五个CDR来确定）的功能抗原结合位点。少于一组完整的6个CDR可足够结合至一些结合靶标。因此，在一些情况下，单独VH或VL域的CDR将是足够的。此外，某些抗体可具有针对抗原的非CDR缔合结合位点。所述结合位点确切地包括在本定义内。

[0144] 如文本所使用，术语“界面”用于指代包含第一IgM重链恒定区中与第二IgM重链恒定区中一个或多个“接触”氨基酸残基（或其他非氨基酸基团）相互作用的那些“接触”氨基酸残基（或其他非氨基酸基团，诸如像碳水化合物基团）的区域。

[0145] 术语“不对称界面”用于指代在两个抗体链诸如第一IgM重链恒定区与第二IgM重链恒定区之间和/或IgM重链恒定区与它的匹配轻链之间形成的界面（如在上文中定义），其中第一链和第二链中的接触残基在设计上不同，其包含互补接触残基。不对称界面可通过钮/孔相互作用和/或盐桥偶联（电荷交换）和/或本领域已知的其他技术，诸如像通过用于将 μ 重链偶联至它的匹配轻链的CrossMab方法来产生。

[0146] “腔”或“孔”是指至少一个从第二多肽的界面凹入并且因此容纳第一多肽的相邻界面上的相应突起（“钮”）的氨基酸侧链。腔（孔）可存在于原始界面中或可经过化学方式引入（例如通过改变编码界面的核酸）。通常，编码第二多肽的界面的核酸经过改变来编码腔。为了实现这一点，将编码第二多肽的界面中的至少一个“原始”氨基酸残基的核酸用编码至少一个“输入”氨基酸残基的DNA置换，所述“输入”氨基酸残基具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积。应理解，可存在超过一个原始残基和相应输入残基。经过置换的原始残基的数目上限是第二多肽的界面中残基的总数。形成腔的优选输入残基通常是天然存在的氨基

酸残基,并且优选地选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、缬氨酸(V)和甘氨酸(G)。最优选的氨基酸残基是丝氨酸、丙氨酸或苏氨酸,最优选的是丙氨酸。在优选实施方案中,形成突起的原始残基具有大的侧链体积,诸如酪氨酸(Y)、精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)或色氨酸(W)。

[0147] “原始”氨基酸残基是由可具有比原始残基更小或更大侧链体积的“输入”残基置换的氨基酸残基。输入氨基酸残基可以是天然存在的或非天然存在的氨基酸残基,但优选的是前者。

[0148] “非天然存在的”氨基酸残基意谓不由遗传密码子编码,但能够共价结合多肽链中的相邻氨基酸残基的残基。非天然存在的氨基酸残基的实例是例如正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸和其它氨基酸残基类似物,诸如Ellman等,Meth.Enzym.202:301-336(1991)中所述的氨基酸。为产生这些非天然存在氨基酸残基,可使用Noren等Science 244:182(1989)和Ellman等(如上)的程序。简言之,所述程序涉及用非天然存在氨基酸残基化学活化抑制因子tRNA,接着体外转录和翻译RNA。在某些实施方案中,本发明方法涉及置换IgM重链中的至少一个原始氨基酸残基,但可置换超过一个原始残基。通常,第一多肽或第二多肽的界面中至多总体残基将包含经过置换的原始氨基酸残基。针对置换优选的原始残基是“包埋的”。“包埋的”意谓残基基本上难以接近溶剂。优选的输入残基不是半胱氨酸以防止可能的氧化或二硫键的错配。

[0149] 突起“可定位”在腔中意谓,分别第一多肽和第二多肽的界面上的突起和腔的空间位置以及突起和腔的大小是这样的,即突起可位于腔中而不显著扰乱界面处第一多肽和第二多肽的正常缔合。因为诸如Tyr、Phe和Trp的突起通常不从界面的轴垂直延伸并且具有优选的构象,所以突起与相应腔的对准依赖于基于三维结构(诸如通过X射线晶体学或核磁共振(NMR)获得的三维结构)建模突起/腔对。这可使用本领域广泛接受的技术,包括分子建模技术来实现。

[0150] “原始核酸”意谓编码所关注多肽的核酸,所述核酸可经过“改变”(即基因工程改造或突变)以编码突起或腔。原始核酸或起始核酸可以是天然存在的核酸或可包含经历之前变化的核酸(例如人源化抗体片段)。“改变”核酸意谓通过插入、缺失或置换至少一个编码所关注氨基酸残基的密码子使原始核酸突变。通常,编码原始残基的密码子由编码输入残基的密码子置换。以这种方式基因修饰DNA的技术已回顾于Mutagenesis:aPractical Approach,M.J.McPherson编,(IRL Press,Oxford,UK.(1991)中,并且包括例如定点诱变、盒式诱变和聚合酶链反应(PCR)诱变。

[0151] 突起或腔可通过合成手段“引入”到第一多肽或第二多肽的界面中,例如通过重组技术、体外肽合成、先前描述的用于引入非天然存在的氨基酸残基的那些技术、通过肽的酶或化学偶联或这些技术的一定组合。因此,“引入”的突起或腔是“非天然存在的”或“非原生的”,这意谓所述突起或腔不存在于自然界中或原始多肽(例如人源化单克隆抗体)中。

[0152] 优选地,形成突起的输入氨基酸残基具有相对少量的“旋转异构体”(例如约3-6个)。“旋转异构体”是氨基酸侧链的在能量上有利的构象。各种氨基酸残基的旋转异构体的数目回顾于Ponders和Richards,J.Mol.Biol.193:775-791(1987)中。

[0153] 如本申请中使用的术语“宿主细胞”表示可被工程改造以产生根据本发明的抗体的任何种类的细胞系统。在一个实施方案中,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞用作宿主细胞。

[0154] 如本文使用,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换地使用,并且全部这些名称均包括子代。因此,词语“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞以及源自其的培养物,而不考虑转移次数。还应理解,由于有意或无意的突变,所有子代的DNA含量可能不完全相同。包括了与经过筛选用于初始转化细胞具有相同功能或生物活性的变体子代。

[0155] 当核酸与另一核酸序列处于功能性关系中时,所述核酸为“可操作地连接”的。举例来说,序列前体或分泌前导序列的DNA在其表达为参与多肽的分泌的蛋白质前体的情况下可操作地连接于多肽的DNA;启动子或强化子在其影响编码序列的转录的情况下可操作地连接于所述编码序列;或核糖体结合位点在其位置促进翻译的情况下可操作地连接于编码序列。一般来说,“可操作地连接”是指所连接的DNA序列是连续的,且在分泌性前导序列的情况下是连续的且在阅读框中。然而,增强子不必是连续的。连接是通过连接于适宜的限制位点处来达成。如果所述位点不存在,那么根据常规实践使用合成的寡核苷酸转接头或接头。

[0156] 详述

[0157] IgM是由B细胞响应于抗原的刺激所产生的第一免疫球蛋白,并且以约1.5mg/ml存在于血清中,其中半衰期是5天。IgM是五聚或六聚分子。正如IgG,IgM单体由两条轻链和两条重链组成。但是,尽管IgG含有三个重链恒定域(CH1、CH2和CH3),但是IgM的重(μ)链额外含有第四恒定域(CH4),与IgE中的s重链相似。这个额外恒定域替代IgG和IgA富含脯氨酸的铰链区来定位,所述铰链区负责抗原结合Fab域相对于IgG和IgA抗体的Fc域的旋转灵活性。

[0158] 五个IgM单体与额外小多肽链(J链)形成复合物以形成天然IgM分子。J链被认为在IgM从抗体产生的细胞分泌之前促进 μ 链的聚合。尽管IgM的结晶已证明是异常具有挑战性的,但是Czajkowsky和Shao(PNAS 106(35):14960-14965,2009)最近基于IgE Fc域的结构和已知的二硫键配对公开了IgM的基于同源性的结构模型。作者报告了人类IgM五聚体是具有弯曲偏差的蘑菇形分子。

[0159] 在自然五聚或六聚IgM抗体分子中,所有重(μ)链是相同的,并且轻链也是相同的。本发明允许两条 μ 链彼此不同的IgM分子的产生。

[0160] 在一个方面中,本发明涉及对两个不同结合区具有结合特异性的双特异结合分子,其具有五聚或六聚结构,其由五个或六个双特异性结合单元形成,其中所述双特异性结合单元各自具有相同的两种结合特异性并且包含第一链和第二链,所述第一链至少包含与第一结合靶标的第一结合区缀合的IgM重链恒定区的CM4域,所述第二链至少包含IgM重链恒定区的CM4域和第二结合靶标的第二结合区,其中所述第一结合靶标和所述第二结合靶标不同,并且其中所述第一链和所述第二链经过组装以由于它们个别IgM重链恒定区之间所产生的不对称界面而产生双特异性结合单元。

[0161] 在各种实施方案中,IgM重链恒定区额外地包含CM2域和CM3域中的一个或两个或其片段,和潜在地其他IgM重链恒定域序列。在一个实施方案中,本发明结合分子含有完整的IgM重(μ)链恒定域,和用来在两条重链之间产生不对称界面的一个或多个修饰。

[0162] 为了产生具有两条不同 μ 重链(链A和B)的IgM分子,必须找到用于将具有两种不同结合特异性的两条匹配 μ 重链(A和B)彼此偶联的解决方案。此外,若需要轻链形成结合区,则必须找到将各重链与其匹配轻链偶联的解决方案以提供所需结合特异性。

[0163] 偶联可通过某些残基之间的盐桥对电荷切换(也称为电荷交换或电荷逆转)和/或

通过在两条链之间产生钮-孔相互作用来实现。重链还可通过使用CrossMab技术来与它们的匹配轻链配对。为了实现最佳结果,还可将不同方法组合。

[0164] 在另一方面中,本发明涉及对两个或更多个不同的结合靶标具有结合特异性的多特异性结合分子,其具有五聚或六聚结构。本发明包括包含五个或六个单特异性结合单元的结合分子,其中(i)所述单特异性结合单元各自包含两个IgM重链恒定区,所述两个IgM重链恒定区各自至少包含缀合至结合靶标的结合区的C μ 3和C μ 4域,(ii)至少两个所述单特异性结合单元结合至不同结合靶标。本发明还包括包含五个或六个双特异性结合单元的结合分子,其中(i)所述双特异性结合单元各自包含两个IgM重链恒定区,所述两个IgM重链恒定区各自至少包含缀合至结合靶标的结合区的C μ 3和C μ 4域,并且(ii)至少两个所述双特异性结合单元结合至不同结合靶标。在具体实施方案中,所述结合分子是多特异性IgM抗体。

[0165] 在各种实施方案中,IgM重链恒定区额外地包含C μ 2域或其片段,和潜在地其他IgM重链恒定域序列。在一个实施方案中,本发明结合分子含有完整的IgM重(μ)链恒定域,和用来在两条重链之间产生不对称界面的一个或多个修饰。

[0166] 在含有至少一个双特异性结合单元的本发明多特异性结合分子中,为了产生具有两条不同 μ 重链(链A和B)的IgM分子,必须找到用于将具有两种不同结合特异性的两条匹配 μ 重链(A和B)经由内部不对称界面彼此偶联的解决方案。此外,若需要轻链形成结合区,则必须找到将各重链与其匹配轻链偶联的解决方案以提供所需结合特异性。

[0167] 此外,必须找到在结合至不同靶标的邻近单特异性结合单元的重链恒定区之间产生外部不对称界面的解决方案。

[0168] 用于产生内部和外部不对称界面的技术包括但不限于某些残基之间的盐桥对电荷切换(也称为电荷交换或电荷逆转)和在两条链之间产生钮-孔相互作用。重链还可通过使用CrossMab技术来与它们的匹配轻链配对。为了实现最佳结果,还可将不同方法组合。

[0169] 1. 钮-孔技术

[0170] 为了改进本发明五聚或六聚双特异性或多特异性结合分子的产率,IgM重链恒定区(例如CM4、CM2和/或CM3域)可通过用例如WO 96/027011,Ridgway,J.,B.等,Protein Eng 9(1996)617-621;和Merchant,A.M.等,Nat Biotechnol 16(1998)677-681中的若干实施例详细描述“钮-孔”技术来改变。在这种方法中,两个IgM重链恒定域的相互作用表面经过改变以提高具有不同结合特异性的两条重链和/或重链与其匹配轻链之间的异二聚化。两个重链域中的每一个,例如CM4-CM4、CM2-CM2和/或CM2-CM3-CM4/CM2-CM3-CM4可以是“钮”,同时另一个是“孔”。二硫桥键的引入使异二聚体稳定(Merchant,A.M.等,Nature Biotech16(1998)677-681;Atwell,S.等,J.Mol.Biol.270(1997)26-35)并且提高产率。同样,匹配重链和轻链可通过这种技术彼此偶联Zhu,Z.;Presta,LG.;Zapata,G;Carter,P.Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation.Prot.Sci.6:781-788(1997)。

[0171] 按照这种方法,就双特异性IgM结合分子而言,在一条重链的CH4、CH2和/或CH3域的原始界面(其与双特异性IgM结合分子(例如抗体)内另一重链的相应域的原始界面相接)内,可将氨基酸残基用具有较大侧链体积的氨基酸残基置换,从而在界面内产生突起,所述突起可定位于另一IgM重(heaving)链恒定区中相应域的界面内的腔中。同样,第二IgM重链可通过将具有第一IgM重链恒定区中相应域的界面内的氨基酸残基用具有较小侧链体积的

氨基酸残基置换来改变,从而在两个重链区之间的界面内产生孔(腔)。

[0172] 在钮-孔位置中的人类IgM CM4和CM2域界面残基示出于表A和D中。表根据图4D和图4B中所示的编号鉴别分别图4D中所示的CM4序列和图4B中所示的CM2序列的IgM重链恒定区(SEQ ID NO:33)指示位置处的天然残基,以及鉴别可用于产生钮-孔对的潜在突变。因此,例如,在CM4域中,SEQ ID NO:33的位置350中的天然苏氨酸(T)残基可突变成酪氨酸(Y)以产生钮,其可与针对天然CM4序列(第1组)的SEQ ID NO:33的残基352、393和395列举的潜在突变的任何组合进行组合。可与第1组任选组合的SEQ ID NO:33的位置254和397处其他突变示出于第2组和第3组中)。同样,第4组举例说明与SEQ ID NO:33的位置352、393、395和397中一个或多个位置处的孔突变组合的SEQ ID NO:33的位置350和395处的钮突变。与第4组组合的其他突变列举于第5组和第6组中。表A的其余部分可以相似方式读取。一些组还包括电荷引入,即从不带电残基改变成带电残基(与以下讨论的表C相似)。

[0173] 应强调,第1-30组中列举的钮-孔突变可如表A中所述用于各种组合中。此外,列举的突变可与表的其余部分中列举的其他钮-孔和/或电荷交换和/或电荷引入突变组合。因此,表A中所述的钮-孔突变中的一个或多个可与表D中所示钮-孔突变中的一个或多个以任何组合进行组合,和/或与表B、C、E和F中列举的电荷交换/电荷引入突变中的一个或多个如下文中讨论进行组合。因此,可选择表A的任何组并且将其以任何顺序或组合,与表B的任何组混合,与表C的任何组混合等。

[0174] 2. 盐桥对电荷切换(电荷交换)

[0175] 相反电荷彼此吸引,并且相似电荷彼此排斥。氨基酸分子的电荷是pH依赖性的并且可以pK值来表征,测定游离氨基酸的 α 氨基(N)、 α 羧基(C)和侧链的pK值。当氨基酸是蛋白质或肽的一部分时,局部环境可改变侧链的 pK_a 。

[0176] 氨基酸分子的电荷性质还可以等电点(pI)来表征,其为分子的总电荷为中性时的pH。因为氨基酸在它们的侧链中彼此不同,所以pI反映出侧链pK的差异。

[0177] 大部分氨基酸(15/20)具有接近于6的pI,所以将它们视为具有中性总电荷。Asp和Glu带负电荷,并且His、Lys、Arg带正电荷。

[0178] 在蘑菇形IgM复合物中的两个结合单元之间的界面中,在连接单体的二硫桥键上方和下方存在四个盐桥。涉及这些相互作用(SEQ ID NO:33的Lys-238、Lys-268、Asp-293和Asp294)的残基在两个单体中是相同的,但是由于IgM Fc结构中CM3域的不对称,它们在这个界面中的相对排列是不同的。

[0179] 电荷交换或电荷引入突变的位置和氨基酸残基列举于表A、B、D、E和F中。如上文所讨论,一个或多个(or more of)这些突变或突变组可与一组或多组钮-孔突变组合以在两条不同IgM重链之间和/或IgM重链与它的匹配轻链之间提供所需不对称界面。

[0180] 优选地,两个不同IgM重链恒定区之间的不对称界面由一条IgM重链中的至多8个,诸如像1-8个、或1-7个、或1-6个、或1-5个、或1-4个、或1-3个、或1-2个突变,或两条IgM重链中的2-10个、或2-9个、或2-8个、或2-7个、或2-6个、或2-5个、或2-4个、或2-3个组合突变产生。

[0181] 对于本文多特异性结合分子,外部不对称界面由C μ 3域中的变化产生。具体来说,为了产生外部不对称界面,盐桥由C μ 3域中带相反电荷的氨基酸残基之间的成对开关形成。在各种实施方案中,提供外部不对称界面的盐桥由C μ 3-C μ 3域中至少一个带成对电荷的氨

氨基酸残基开关形成,所述氨基酸残基开关可例如是邻近 μ 链中的K238 $\leftrightarrow$ D293或K268 $\leftrightarrow$ D294,其中氨基酸坐标参照SEQ ID NO:33的人IgM重链恒定区。

[0182] 3. CrossMab技术

[0183] 如上文所讨论,钮-孔技术或电荷交换实现抗体重链的异二聚化。轻链和它们同源重链的正确缔合可通过将一半双特异性抗体结合单元的抗原结合片段(Fab)内的重链和轻链域进行交换来实现。交叉可以在IgM抗体的一半双特异性结合单元内完整VH-CM和VL-CL域的交叉、仅VH和VL域的交叉或CM和CL域的交叉的形式发生。这种“交叉”保留了抗原结合亲和力,但使两个臂不同,使得轻链错配可不再发生。在IgG抗体方面,更多细节参见例如Schaeffer等,(2011)Proc Natl Acad Sci USA 108(27):11187-11192。

[0184] 4. 双特异性和多特异性IgM结合分子的产生

[0185] 具有所需突变(根据钮-孔、电荷交换和/或Cross-Mab技术)的双特异性IgM抗体结合单元的重链的编码序列可通过将适当核苷酸改变引入到抗体DNA中或通过核苷酸合成来产生。抗体可然后通过重组方式产生。

[0186] 用于重组产生的方法在现有技术状态中广泛已知且包含在原核和真核细胞中进行蛋白质表达,并随后分离抗体且通常纯化至药学上可接受的纯度。为在宿主细胞中表达抗体,通过标准方法将编码个别修饰重链和任选轻链的核酸插入表达载体中。在适当原核或真核宿主细胞(如CHO细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、HEK293细胞、COS细胞、PER.C6细胞、酵母或大肠杆菌(E.coli)细胞)中进行表达,且自细胞(溶解后的上清液或细胞)回收抗体。用于抗体的重组产生的一般方法描述于例如以下综述文章中:Makrides,S.C.,Protein Expr.Purif.17(1999)183-202;Geisse,S.等,Protein Expr.Purif.8(1996)271-282;Kaufman,R.J.,Mol.Biotechnol.16(2000)151-161;Werner,R.G.,Drug Res.48(1998)870-880。

[0187] 双特异性和多特异性抗体可通过常规免疫球蛋白纯化程序,如蛋白质A-SEPHAROSE®、羟磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱与培养基分离。

[0188] 尽管由于其复杂结构,重组IgM的大规模生产是困难的,但是已报告使用非淋巴细胞的IgM的若干重组产生系统,包括C6胶质瘤细胞、CHO细胞和HeLa细胞中IgM重(H)链和轻(L)链的共表达。尽管共表达成功地导致聚合物的形成,但是产率通常是低的(参见例如,W089/01975和Wood等,J.Immunol.145,3011-3016(1990),对于CHO细胞中的表达),并且五聚或六聚分子的精确聚合结构不容易确定。表达腺病毒的E1A和E1B蛋白质的永生化人类视网膜细胞系中IgM的产生描述于美国申请公布号20060063234中。本发明双特异性IgM抗体产生的其他细节提供于以下实施例中。

[0189] 本发明方法将导致一种组合物,其包含双特异性或多特异性IgM结合分子(诸如双特异性或多特异性IgM抗体)作为主要组分,以及制造过程的各种副产物,诸如单特异性抗体、抗体片段、双特异性结合单元的单体、二聚体、三聚体和/或四聚体,而不是所需五聚或六聚结构。产生的组合物一般含有至少约70%、或至少约75%、或至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约92%、或至少约95%所需五聚或六聚双特异性结合分子,例如抗体,其将通过本领域已知的方法进一步纯化以产生具有至少约90%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约99%、或至少约99.5%、或至少约99.9%的纯度的产物。

[0190] 5. 双特异性和多特异性IgM结合分子的应用

[0191] 本发明双特异性和多特异性IgM结合分子,例如抗体,具有广泛的治疗和诊断应用。

[0192] 在一个实施方案中,本文双特异性结合分子结合至相同可溶性靶标(诸如像VEGF、TNF α 或IL6)上的两个位点。目的可例如为拮抗蛋白质上的多个位点和/或提高对给定靶标的亲合力。

[0193] 在另一实施方案中,本文双特异性或多特异性结合分子结合相同细胞表面(受体)靶标(诸如EGFR或HER2 (ErbB2))上的两个或更多个位点。因此,例如,双特异性或多特异性结合分子可靶向HER2分子上的4D5和2C4表位。这种方法可提高对给定靶标的生物效能和/或亲合力。

[0194] 在又另一实施方案中,本发明双特异性或多特异性结合分子结合两个或更多个不同可溶性靶标(球状蛋白质或肽),例如TNF α 和IL6、VEGF α 和Ang2,或两个细胞因子。这种方法可导致对特定途径的更完全的阻断;所谓的“细胞因子风暴”的阻断,或协调酶和它的底物,例如因子IXa和因子x。

[0195] 在另一实施方案中,本文双特异性或多特异性结合分子可结合可溶性靶标和细胞表面受体靶标,诸如血管生成因子和非血管特异性受体。这种方法的目的还可在于特定定位点或组织处提高的递送和阻断。

[0196] 在又另一实施方案中,本文双特异性结合分子被设计成结合两个不同细胞表面受体靶标,诸如像HER2 (ErbB2) 和HER3 (ErbB3)。同样,本文多特异性结合分子被设计成结合两个或更多个不同细胞表面受体靶标,诸如像HER1、HER2 (ErbB2) 和HER3 (ErbB3)。这可导致增加的特异性和选择性和/或导致对给定路径的更完全的阻断。

[0197] 本发明双特异性和多特异性结合分子,诸如抗体,还可被设计成结合一个可溶性靶标或细胞表面受体靶标和一个长停留时间靶标,诸如像TNF α 和血清白蛋白,或VEGF和血清白蛋白。预期这些分子具有比不具有白蛋白特异性的结合分子更长的循环半衰期。

[0198] 在另一实施方案中,本文双特异性结合分子可结合一个可溶性靶标和一个基质蛋白或底物,诸如像VEGF α 和透明质酸。同样,本文多特异性结合分子可结合一个或多个可溶性靶标和一个或多个基质蛋白和/或底物,诸如像VEGF α 和透明质酸。所得双特异性或多特异性结合分子由于它们在眼内空间中停留时间增加,可发现例如在眼部病状(诸如年龄相关的黄斑变性(AMD))的抗血管生成治疗中的实用性。

[0199] 双特异性分子,例如结合一个可溶性靶标或受体靶标,加上转运蛋白受体(即转铁蛋白受体)的抗体,例如成胶质细胞瘤中发现并且与抗转铁蛋白特异性组合的抗EGFRvIII(外显子III缺失的突变体形式)可发现在跨血脑屏障的抗体递送中的实用性。

[0200] 同样,多特异性分子,例如结合一个或多个可溶性靶标或受体靶标,加上一个或多个转运蛋白受体(即转铁蛋白受体)的抗体,例如成胶质细胞瘤中发现并且与抗转铁蛋白特异性组合的抗EGFRvIII(外显子III缺失的突变体形式)可发现在跨血脑屏障的抗体递送中的实用性。

[0201] 6. 组合物、药物组合物和治疗方法

[0202] 在一个方面中,本发明涉及包含纯化双特异性或多特异性IgM结合分子,诸如本文双特异性或多特异性IgM抗体的组合物。所述组合物一般含有至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约92%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约99%所需双特异性

或多特异性IgM结合分子,例如抗体。组合物可以是药物组合物,其中双特异性或多特异性结合分子,例如抗体,与至少一种药学上可接受的载剂混合。

[0203] 本发明的药物组合物可以利用本领域中已知的多种方法施用。如本领域技术人员所了解,施药途径和/或模式将视目标疾病或病状和所需结果而变化。为通过某些施用途施用本发明的化合物,可能必需将所述化合物用防止其失活的物质涂布或者所述化合物与防止其失活的物质共同施用。例如,化合物可以在适当载剂(例如脂质体)或稀释剂中施用于受试者。药学上可接受的稀释剂包括生理食盐水和水性缓冲溶液。药学载剂包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。所述介质和试剂用于医药活性物质在本领域中是已知的。

[0204] 所述组合物也可含有佐剂,如防腐剂、湿润剂、乳化剂和/或分散剂。防止存在微生物可通过灭菌程序和通过包括各种抗菌和抗真菌剂(例如对羟苯甲酸、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等)两者来确保。还可合乎需要的是在组合物中包括等渗剂,如糖、氯化钠等。另外,可通过包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射药物形式的延迟吸收。

[0205] 本发明的医药组合物中活性成分的实际剂量浓度可以改变以便获得对于特定患者、组合物和施用模式有效达成所要治疗效果而不会对患者造成毒性的量的活性成分。选择的剂量水平取决于多种药动学因素,包括使用的本发明的具体组合物的活性、施用途、施用时间、使用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与使用的特定组合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料、所治疗患者的年龄、性别、体重、病状、一般健康状态和先前的病史和在医学领域众所周知的类似因素。

[0206] 组合物必须是无菌的,并且流动性达到组合物可利用注射器递送的程度。除了水,载剂优选是等渗缓冲盐水溶液。

[0207] 提供以下实施例、序列列表和图以帮助理解本发明,本发明的真正范围在随附权利要求书中阐述。应理解,可在阐述的程序中进行修改,而不背离本发明的精神。在整个实施例中,其中用下式指代IgM重链中的突变:“X###Y”,“X”指代天然氨基酸(单字母代码),“###”指代参照本文SEQ ID NO:33所示的野生型人IgM恒定区序列的坐标,并且“Y”指代突变的氨基酸(单字母代码)。

[0208] 本公开通篇引用的所有专利和科学参考文献都以引用方式明确地并入本文中。

[0209] 实施例1

[0210] 1. 具有设计突变的DNA构建体的产生

[0211] 材料和方法

[0212] a. DNA构建体合成

[0213] 具有设计突变的所有DNA构建体都由商业供应商(Genewiz公司),使用本领域中熟知的技术,利用在两端处用于亚克隆到个别表现载体中的相容性限制位点来合成。

[0214] b. 表现载体的构建

[0215] 将合成DNA构建体以1μg/ml再悬浮于Tris-EDTA缓冲液中。使DNA(1μg)经历酶消化并且将合成基因通过电泳与载体质粒DNA分离。将消化DNA通过标准分子生物技术连接至预消化质粒DNA(μ链为pFUSEss-CHlg-hM*03;κ链为pFUSE2ss-CLlg-hk,InvivoGen)。将连接DNA转化成胜任细菌并且接种在具有多种选择性抗生素的LB板上。挑选若干细菌菌落,并且通过标准分子生物技术进行DNA制备。所制备的DNA通过测序验证。仅DNA序列与设计

DNA100%匹配的细菌菌落用于质粒DNA制备并且随后用于细胞转染。

[0216] c.不同大小的 μ 链

[0217] 为了证明具有或不具有CM4相互作用界面突变(A和B)的两条不同 μ 链能够彼此偶联,在不同分子量和配体特异性的情况下,构建两组不同大小的 μ 链。

[0218] i.Rtx链由与具有C291S突变和尾部段缺失的人类IgM抗体 μ 链的CM1区融合的嵌合抗CD20抗体Rituxan(利妥昔单抗)Vh区的 μ 链组成:

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYP
GNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFN
VWGAGTTVTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKN
NSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPL
PVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTD
[0219] QVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPDQD
TAIRVFAIPPSFASIFLTSTKLTCLVTDLTITYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNA
TFSAVGEASISEDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPARE
QLNLRESATITCLVTGFSPADVVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSI
LTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTVD

[0220] (SEQ ID NO:1)

[0221] Rtx链具有约60kD(无糖基化)和66kD(具有4个N糖基化位点)的计算分子量并且能够结合至CD20阳性B细胞,诸如Raji细胞。

[0222] ii.Fc链包含人类IgM μ 链CM2至CM4区,携带cMyc标签并且其尾部段由6His标签置换(SEQ ID NO:18)并且具有C291S突变:

GSQSKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTD
QVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPDQD
TAIRVFAIPPSFASIFLTSTKLTCLVTDLTITYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNA
[0223] TFSAVGEASISEDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPARE
QLNLRESATITCLVTGFSPADVVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSI
LTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKSTGKGGGSEQKLISEEDLNSAVD
HHHHHH

[0224] (SEQ ID NO:2)

[0225] Fc链具有约39kD(无糖基化)和43kD(具有3个N糖基化位点)的分子量并且能够结合至抗myc单克隆抗体9E4或其他抗myc抗体。

[0226] iii.0kt链由与具有C291S和尾部段缺失的人类 μ 链的CM2融合的OKT3(抗CD3)的链Fv形式组成:

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINP
 SRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYW
 GQGTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGQIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYM
 NWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQ
 WSSNPFTFGSGTKLEIKGSGSKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWL
 [0227] REGKQVGSGVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTF
 QQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTSTKLTCLVTDLTYYDSVTISWTRQNGEA
 VKTHTNISESHPNATFSAVGEASISEDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQTISRPKGVA
 LHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPM
 PEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTV

[0228] (SEQ ID NO:3)

[0229] κ 链具有约61kD(无糖基化)和67kD(包括4个N糖基化位点)的计算分子量,并且能够结合至CD3阳性T细胞。

[0230] d.轻链偶联

[0231] i.天然嵌合Rituxan κ 链

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWYATSNLASG
 VVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF
 [0232] IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
 SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0233] (SEQ ID NO:4)

[0234] κ 链具有约23kD的计算分子量并且能够连接至Rituxan IgM重链。

[0235] e.界面突变

[0236] 将钮和孔、静电电荷偶联不对称的引入到CM3相互作用界面中以使两条 μ 链的异二聚化最大。产生两对CM3相互作用界面突变体。

[0237] i.Fc1a是具有C291S和T350Y突变和尾部段缺失的人类 μ 链CH2至CH4区:

GSGSKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTDD
 QVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQD
 TAIRVFAIPPSFASIFLTSTKLTCLVTDLTYYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPN
 TFSVGEASISEDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPARE
 QNLNLRESATIYCLVTGFSPADVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSI
 LTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

[0238] (SEQ ID NO:5)

[0239] Fc1a链具有约36kD(无糖基化)和41kD(若包括3个N糖基化位点)的计算分子量。

[0240] ii.Fc1b是人类 μ 链CH2至CH4并且具有C291S、L352S和H395V突变和尾部段缺失:

GS~~G~~SKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTD
QVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQD
TAIRVFAIPPSFASIFLTkSTKLTCLVTDLT~~T~~YDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNA
[0241] TFSAVGEASISEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSP~~L~~KQTISRPKGVALHRPDVYLLPPARE
QLNLRESATITC~~S~~VTGFSPADV~~F~~VQWMQ~~R~~GQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFA~~V~~SI
LTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

[0242] (SEQ ID NO:6)

[0243] Fc1b链具有约36kD(无糖基化)和41kD(包括3个N糖基化位点)的计算分子量。

[0244] iii.Fc2a由具有C291S、T350Y、T354E和I397E突变和尾部段缺失的人类μ链CH2至CH4区组成:

GS~~G~~SKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTD
QVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQD
TAIRVFAIPPSFASIFLTkSTKLTCLVTDLT~~T~~YDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNA
[0245] TFSAVGEASISEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSP~~L~~KQTISRPKGVALHRPDVYLLPPARE
QLNLRESATI~~Y~~CLVEGFSPADV~~F~~VQWMQ~~R~~GQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHS
ELTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

[0246] (SEQ ID NO:7)

[0247] Fc2a链具有约36kD(无糖基化)和41kD(包括3个N糖基化位点)的计算分子量。

[0248] iv.Fc2b是人类μ链CH2至CH4并且具有C291S、L352S、T354K、H395V和I397K突变和尾部段缺失。

GS~~G~~SKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTD
QVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQD
TAIRVFAIPPSFASIFLTkSTKLTCLVTDLT~~T~~YDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNA
[0249] TFSAVGEASISEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSP~~L~~KQTISRPKGVALHRPDVYLLPPARE
QLNLRESATITC~~S~~VKGFSPADV~~F~~VQWMQ~~R~~GQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFA~~V~~SK
LTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

[0250] (SEQ ID NO:8)

[0251] Fc2b链具有约36kD(无糖基化)和41kD(包括3个N糖基化位点)的计算分子量。

[0252] f. 界面突变

[0253] 将具有钮、孔和静电电荷偶联的Fc2a链和Fc2b链通过分子克隆进一步连接至Rituxan和OKT3(抗CD3抗体)scFv两者以实现两条μ链的不对称异二聚化。

[0254] i.Rtx2a由与具有C291S、T350Y、T354E和I397E突变和尾部段缺失的人类μ链的CM1至CM4融合的嵌合Rituxan(抗CD20)Vh区的μ链组成。

[0255] QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYP

GNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFN
VWGAGTTVTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKN
NSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCVKVQHPNGNKEKNVPL
PVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVSGSVTTD
[0256] QVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVDPDQD
TAIRVFAIPPSFASIFLTSTKLTLCLVTDLTYSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPN
TFSAVGEASISEDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPARE
QLNLRESATIYCLVEGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHS
ELTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKSTGK

[0257] (SEQ ID NO:9)

[0258] Rtx2a链具有约61kD (无糖基化) 和67kD (具有4个N糖基化位点) 的计算分子量。

[0259] ii. Rtx2b由与具有C291S、L352S、T354K、H395V和I397K突变和尾部段缺失的人类 μ 链的CM1至CM4融合的嵌合Rituxan (抗CD20) Vh区的 μ 链组成。

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYP
GNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFN
VWGAGTTVTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKN
NSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCVKVQHPNGNKEKNVPL
PVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVSGSVTTD
[0260] QVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVDPDQD
TAIRVFAIPPSFASIFLTSTKLTLCLVTDLTYSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPN
TFSAVGEASISEDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPARE
QLNLRESATITCSVKGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAYSK
LTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTVDKSTGK

[0261] (SEQ ID NO:10)

[0262] Rtx2b链具有约61kD (无糖基化) 和67kD (包括4个N糖基化位点) 的计算分子量。

[0263] iii. 0kt2a由与具有C291S、T350Y、T354E和I397E突变和尾部段缺失的人类 μ 链的CM2至CM4融合的0KT3 (抗CD3抗体) scFv组成。

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINP
SRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYW
GQGTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYM
NWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQ
WSSNPFTFGSGTKLEIKGSGSKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWL
[0264] REGKQVGSGVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTF
QQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTSTKLTCLVTDLTYSVTISWTRQNGEA
VKHTNISESHPNATFSAVGEASISEDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQTISRPKGVA
LHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLV~~E~~GFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAP
MPEPQAPGRYFAHS~~E~~LTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTV DKSTGK

[0265] (SEQ ID NO:11)

[0266] Okt2a链具有约62kD(无糖基化)和68kD(包括4个N糖基化位点)的计算分子量。

[0267] iv.Okt2b由与具有C291S、L352S、T354K、H395V和I397K突变和尾部段缺失的人类 μ 链的CM2至CM4融合的OKT3(抗CD3抗体) scFv组成。

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINP
SRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYW
GQGTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYM
NWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQ
WSSNPFTFGSGTKLEIKGSGSKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWL
[0268] REGKQVGSGVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTF
QQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTSTKLTCLVTDLTYSVTISWTRQNGEA
VKHTNISESHPNATFSAVGEASISEDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQTISRPKGVA
LHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCS~~V~~KGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPM
PEPQAPGRYFA~~V~~SKLTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRV TERTV DKSTGK

[0269] (SEQ ID NO:12)

[0270] Okt2b链具有约62kD(无糖基化)和68kD(包括4个N糖基化位点)的计算分子量。

[0271] 2. 蛋白质表达、纯化和表征

[0272] a. 转染

[0273] 通过将相等摩尔比的若干不同表达载体共转染到哺乳动物细胞(诸如293F细胞(Invitrogen))中来制备IgM。在室温下在2ml Opti-MEM(Invitrogen)中将10 μ g表达载体的混合DNA与20 μ l 293Fectin(Invitrogen)混合30分钟,然后添加到10⁷个293F细胞中。在转染后,在收获上清液之前,将具有293F细胞的转染液孵育72小时。

[0274] b. 通过免疫沉淀的蛋白质纯化.

[0275] i. Capture Select IgM(目录号2890.05, BAC, Thermo Fisher)

[0276] 通过在2,000G下离心10分钟来收获转染上清液。通过免疫沉淀,利用亲和力和Capture Select IgM亲和基质来纯化IgM蛋白。将100 μ l Capture Select IgM浆液添加到15ml收获上清液中。在室温下将上清液和亲和基质混合物在摇座上孵育2小时。然后将亲和基质在300g下离心2分钟,倾析溶液。将亲和基质用PBS加上0.05%Tween进一步洗涤3次。最后,通过在室温下将20 μ l 4x LSD样本装载缓冲液(Invitrogen)孵育5分钟,接着在10,000g下离心来将纯化IgM蛋白从亲和基质中洗出。将亲和基质用60 μ l PBS进一步洗涤并且通过凝胶电泳将上清液集合用于分析。

[0277] c.凝胶电泳

[0278] i.非还原SDS PAGE

[0279] 非还原SDS PAGE用于分离不同分子量的各种突变体IgM蛋白。Novex 4-12%Bis-Tris凝胶(Life Technologies)与Novex MES SDS运行缓冲液(Life Technologies)一起使用。

[0280] ii.还原SDS-PAGE

[0281] 将NuPage LDS样本缓冲液(Life Technologies)和NuPage还原剂二硫苏糖醇(Life Technologies)添加到IgM蛋白样本中并且在装载于NuPage Novex 4-12%Bis-Tris凝胶(Life Technologies,目录号NP0322)上之前加热到80 $^{\circ}$ C持续10分钟。NuPage MES SDS运行缓冲液(Life Technologies,目录号NP0002)用于凝胶电泳。在电泳完成之后,将凝胶从设备除去并且使用胶体蓝染色(Life Technologies,手册#LC6025来进行染色。

[0282] iii.凝胶条带定量

[0283] 将蛋白质凝胶干燥,然后使用图像扫描仪进行数字化。将凝胶图像用图像J程序处理,并且特定条带中蛋白质的量使用凝胶定量功能来确定。

[0284] iv.SDS-PAGE凝胶的分析

[0285] Rtx:Fc包括野生型和工程改造IgM Fc对2a和2b SDS-PAGE凝胶。非还原SDS-PAGE凝胶上的泳道1、2和3(图6)示出针对单独Rtx2a、单独Rtx2b和野生型Rtx,上部条带是同二聚Rtx(H2L2,预期MW 168-180kDa)并且下部条带是半抗体(HL,预期MW 84-90kDa)。非缔合Fc(预期MW 36-41kDa)的条带存在于所有三个泳道中;缔合Fc(预期MW 72-82kDa)也可以是80-90kDa条带的组分。泳道2示出Rtx2a:Fc2b的混合物,并且泳道3示出Rtx2b:Fc2a的混合物。在两个泳道中,异二聚体(预期MW 120-131kDa)用箭头指示。工程改造Rtx2a:Fc2b和Rtx2b:Fc2a组合两者示出显著异二聚体的存在,然而野生型Rtx:Fc组合仅示出少量异二聚体。

[0286] 如图7中所示的还原SDS-PAGE的泳道1-3中所见,Fc确实存在:顶部条带是Rtx重链(预期MW 61-67kDa),中部条带是Fc(预期MW 36-41kDa),并且底部条带是Rtx轻链(预期MW 23kDa)。

[0287] Okt:Fc包括野生型和基因改造IgM Fc对2a和2b,SDS-PAGE,图8,泳道1-3

[0288] 野生型Okt:Fc组合(SDS-PAGE,图8,泳道1)示出上部条带是Okt:Fc异二聚体(预期MW98-107kDa),底部条带是未缔合Fc(预期MW36-41)并且大的中部条带表示缔合Fc(预期MW 72-82)。相反,对于Okt2a:Fc2b和Okt2b:Fc2a组合,图8泳道2中所示的SDS-PAGE凝胶示出显著的条带是异二聚体,并且非常轻的条带是上文缔合Fc2b和Okt2a同二聚体并且与Okt2a:Fc2b异二聚体一致。箭头指示异二聚体。

[0289] Okt2a和Fc2b两者均存在于还原凝胶中(图9泳道2中所示的SDS-PAGE凝胶)。对于Okt2b:Fc2a对,相似结果见于图8和9的凝胶上。

[0290] Okt:Rtx包括野生型和工程改造IgM Fc对2a和2b SDS-PAGE凝胶,示出于图8和图9泳道4-6中

[0291] 野生型Okt:Rtx组合(图8泳道4中所示的SDS-PAGE凝胶)示出wt Rtx同二聚体(H2L2,预期MW 168-180kDa)的条带,wt Rtx半抗体(HL,预期MW 84-90kDa)的条带和可以是Okt同二聚体(预期MW 124-133kDa)的轻条带。相反,工程改造Okt2a:Rtx2b组合(图8泳道5中所示的SDS-PAGE凝胶)示出显著异二聚体(预期MW 146-157)以及Rtx2b同二聚体(预期MW 168-180kDa)和半抗体(预期MW84-90kDa)的存在。当还原(图9泳道5中所示的SDS-PAGE凝胶)时,Rtx2b轻链示出在MW 23kDa下的条带;60-80kDa之间的重条带可能由Rtx2b重链(预期MW 61-67kDa)和Okt2a重链(预期MW 62-67kDa)组成。对于Okt2b:Rtx2a对见到相似结果。

[0292] 结论:

[0293] 对于测试的所有三个系统--Okt:Rtx、Okt:Fc、Rtx:Fc--工程改造IgM Fc变体示出相较于天然(非工程改造)IgM Fc的实质上提高的异二聚体形成。测试单对序列(即,Fcs 2a和2b),并且可评估工程改造Fc界面的额外变体以进一步降低同二聚体形成并且优化异二聚体形成。

[0294] 3. 双特异性功能分析

[0295] a. 两个配体的ELISA分析

[0296] 通过ELISA分析利用可溶性CD3 ϵ 蛋白捕集和抗cMyc (9E10) 检测来测定具有OKT3(链A)和cMyc肽(链B)的IgM。将可溶性CD3 ϵ 蛋白以2mg/ml于150mM NaHCO₃中涂布在ELISA板上,接着用3%BSA的PBS溶液阻断。在25C下将含有转染IgM-OKT3-cMyc的上清液(100 μ l)添加到阻断ELISA板持续4小时。在用PBS洗涤之后,在室温下将9E10抗体添加到ELISA板持续2小时。在用PBS洗涤之后,添加抗小鼠IgG-HRP。在添加HRP底物之后通过在OD 450的情况下读取来检测双特异性IgM的存在。

[0297] 通过ELISA分析利用可溶性CD3 ϵ 蛋白捕集和蛋白质-L-HRP检测来测定具有Okt3(链A)和Rituxan(链B)的IgM。将可溶性CD3 ϵ 蛋白以2mg/ml于150mMNaHCO₃中涂布在ELISA板上,接着用3%BSA的PBS溶液阻断。在25C下将含有转染IgM-Okt2a:Rtxb或Okt2b:Rtxa的上清液(100 μ l)添加到阻断ELISA板持续4小时。在用PBS洗涤之后,在室温下将蛋白质-L-HRP添加到ELISA板持续2小时。在添加HRP底物之后通过在OD 450的情况下读取来检测双特异性IgM的存在。

[0298] b. 靶标结合的FACS分析

[0299] 通过将抗体结合至T细胞系(Peer,阳性细胞系)和B细胞系(Daudi,阴性对照细胞系)来确认IgM-OKT3-cMyc结合至T细胞。在洗涤之后,将罗丹明标记的9E10添加到细胞悬浮液中。通过具有或不具有CD20抗原的阳性和阴性对照细胞的MFI来检测细胞靶标结合。

[0300] c. 双特异性结合的荧光显微术测定

[0301] 通过所设计IgM使两个群体CD3阳性细胞和CD20阳性细胞结合在一起的能力验证其双特异性结合,所述细胞通过在各细胞型上的两种不同活体染料进行预标记。例如:

[0302] i. 绿色荧光胞质液活体染料(CellTrace™钙黄绿素绿AM),其标记CD3阳性细胞系(Peer)

[0303] ii. 红色荧光胞质液活体染料 (CellTrace™ 钙黄绿素红色-橙色, AM), 其标记CD20阳性B细胞系 (Daudi)

[0304] 实施例2

[0305] 1. 具有设计突变的DNA构建体的产生

[0306] 如实施例1中进行DNA构建体合成和表达载体的构建。

[0307] a. 不同大小的 μ 链

[0308] A链由与人类 μ 链的CM1融合的嵌合0KT3 (抗CD3) Vh区的全长 μ 链组成:

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINP
SRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYW
GQGTTTLTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDI
SSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIA
ELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVGSGVTDDQVQ
[0309] AEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDPAIR
VFAIPPSFASIFLTSTKLTCLVTDLTYSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSA
VGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDLPSPKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLN
LRESATITCLVTGFSPADVVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVS
EEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDAGTCY

[0310] (SEQ ID NO:13)

[0311] A链具有约63kD的分子量并且能够结合至CD3的可溶性 ϵ 链 (10977-H08H, Sino Biological) 或T细胞。

[0312] B链具有与人类 μ 链的CH2融合的cMyc标签。

QVQLGGPEQKLISEEDLN SAVLPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQAT
GFSRQIQVSWLREGKQVGSGVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSM
FTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDPAIRVFAIPPSFASIFLTSTKLTCLVTDLTYS
[0313] VTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDLPSP
LKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVVFVQWMQRGQP
LSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTV
DKSTGKPTLYNVSLVMSDAGTCY

[0314] (SEQ ID NO:14)

[0315] B链具有约41kD的分子量并且能够结合至抗myc单克隆抗体9E4或其他抗myc抗体。

[0316] 替代B链具有与人类 μ 链的CH2融合的CrossMab^{M-CL} (V_H+C_L) 利妥昔单抗 (抗CD20) 的全长 μ 链:

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYP
 GNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFN
 VWGAGTTVTVSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GECDKTHLPVIAELPPKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQ
 [0317] VGSGVTDDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNAS
 SMCVPDQDPAIRVFAIPPSFASIFLTSTKLTLCLVTDLTYSVTISWTRQNGEAVKTHT
 NISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQTISRPGVALHRPD
 VYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQA
 PGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMS
 DTAGTCY

[0318] (SEQ ID NO:15)

[0319] B链具有约64kD的分子量并且能够结合至CD20阳性B细胞。

[0320] b. 不同轻链偶联

[0321] 天然嵌合OKT3 κ 链

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAS
 GVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRAVAAPS
 [0322] VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0323] (SEQ ID NO:16)

[0324] 利妥昔单抗的CrossMab^{CM1-CL}

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFFQQKPGSSPKPWYATSNLASG
 VPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKSSASTKGPS
 [0325] VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

[0326] (SEQ ID NO:17)

[0327] c. 不同表达载体的不同选择标记物

[0328] 在用于共转染的不同表达载体上使用不同选择标记物。使用多种药物来选择细胞以适应与IgM产生相关的所有必要的表达载体。使用标准分子生物技术来将特定DNA克隆到这些载体中。

[0329] i. μ 链利用博来霉素选择 (ant-zn-1, Invivogen)。博来霉素以100 μ g/ml的浓度使用。在用含有Sh ble基因的质粒转染之后,然后将细胞以100 μ g/ml孵育在含有博来霉素的Opti-CHO培养基中以选择稳定的转染子。

[0330] ii. κ 链利用杀稻瘟菌素S选择 (ant-bl-1, Invivogen)。杀稻瘟菌素S以10 μ g/ml的浓度使用。在用含有bsr基因的质粒转染之后,然后将细胞以10 μ g/ml孵育在含有杀稻瘟菌

素S的Opti-CHO培养基中以选择稳定的转染子。

[0331] d. 蛋白质表达、纯化和表征

[0332] i. 转染

[0333] 通过将等摩尔比或可变摩尔比 (5至10倍差异) 下的若干不同表达载体共转染到哺乳动物细胞 (诸如293细胞或CHO细胞) 中来制备IgM。将表达载体的DNA与PEI混合, 然后添加到CHO-S细胞中。根据确立的技术来用CHO-S细胞进行PEI转染 (参见“Biotechnology and Bioengineering, 第87卷, 553-545”)。

[0334] ii. 蛋白质纯化

[0335] • Capture Select IgM (目录号2890.05, BAC, Thermo Fisher)

[0336] 根据制造商的方案通过亲和力Capture Select IgM亲和基质来纯化来自转染CHO-S细胞上清液的IgM蛋白。

[0337] • Capto-L (目录号17-5478-01, GE Healthcare)

[0338] 根据制造商的方案通过Capto-L亲和基质来纯化CHO-S细胞上清液中含有κ链的转染IgM蛋白。

[0339] iii. 凝胶电泳

[0340] • 非还原SDS PAGE

[0341] 非还原SDS PAGE根据大小分离天然IgM和它的突变体形式。由同二聚重链 (AA) 组成的五聚IgM产生大致1,000,000分子量的蛋白质条带。由较短型式的同二聚重链 (BB) 组成的五聚IgM产生显著较低分子量的蛋白质条带。由异二聚重链 (嵌合AB) 组成的五聚IgM产生具有大于BB并且小于AA的分子量的多种蛋白质。

[0342] 在装载到凝胶上之前, 在25°C下将NuPage LDS样本缓冲液 (Life Technologies) 添加到IgM蛋白样本中持续30分钟。NativePage Novex 3-12%Bis-Tris凝胶 (Life Technologies) 与Novex Tris-乙酸盐SDS运行缓冲液 (Life Technologies) 一起使用。进行跑胶, 直到前侧染料到达凝胶底部。

[0343] • 还原SDS-PAGE

[0344] 将NuPage LDS样本缓冲液 (Life Technologies) 和NuPage还原剂二硫苏糖醇 (Life Technologies) 添加到IgM蛋白样本中并且在装载于NuPage Novex 4-12%Bis-Tris凝胶 (Life Technologies, 目录号NP0322) 上之前加热到80°C持续10分钟。NuPage MES SDS运行缓冲液 (Life Technologies, 目录号NP0002) 用于凝胶电泳。进行跑胶, 直到前侧染料到达凝胶底部。

[0345] 在电泳完成之后, 从设备除去凝胶并且使用胶体蓝染色 (Life Technologies, 手册#LC6025) 将凝胶染色

[0346] • 凝胶条带定量

[0347] 将蛋白质凝胶干燥, 然后使用图像扫描仪进行数字化。将凝胶图像用图像J程序处理, 并且特定条带中蛋白质的量可使用凝胶定量功能来确定

[0348] iv. 质谱分析, 以鉴别/定量双特异性制剂中的各种mAb。

[0349] v. 使用差示扫描量热法 (DSC) 的稳定性分析

[0350] e. 双特异性功能分析

[0351] i. 两种配体的ELISA分析

[0352] 通过ELISA分析利用可溶性CD3 ϵ 蛋白捕集和抗cMyc (9E10) 检测来测定具有OKT3 (链A) 和cMyc肽 (链B) 的IgM。将可溶性CD3 ϵ 蛋白以2mg/ml于150mM NaHCO₃中涂布在ELISA板上,接着用3%BSA的PBS溶液阻断。在25C下将含有转染IgM-OKT3-cMyc的上清液(100 μ l)添加到阻断ELISA板持续4小时。在用PBS洗涤之后,在室温下将9E10抗体添加到ELISA板持续2小时。在用PBS洗涤之后,添加抗小鼠IgG-HRP。在添加HRP底物之后通过在OD 450的情况下读取来检测双特异性IgM的存在。

[0353] ii. 靶标结合的FACS分析

[0354] 通过将抗体结合至T细胞系 (Peer, 阳性细胞系) 和B细胞系 (Daudi, 阴性对照细胞系) 来确认IgM-OKT3-cMyc结合至T细胞。在洗涤之后,将罗丹明标记的9E10添加到细胞悬浮液中。通过具有或不具有CD20抗原的阳性和阴性对照细胞的MFI来检测细胞靶标结合。

[0355] iii. 双特异性结合的荧光显微术测定

[0356] 通过所设计IgM使两个群体CD3阳性细胞和CD20阳性细胞结合在一起的能力验证其双特异性结合,所述细胞通过在各细胞型上的两种不同活体染料进行预标记。例如:

[0357] • 绿色荧光胞质液活体染料 (CellTrace™钙黄绿素绿AM), 其标记CD3阳性细胞系 (Peer)

[0358] • 红色荧光胞质液活体染料 (CellTrace™钙黄绿素红色-橙色, AM), 其标记CD20阳性B细胞系 (Daudi)

[0359] 可使用本领域中已知的技术 (诸如上文描述的那些技术), 以相似的方式进行多特异性结合和多特异性功能分析。

[0001] 序列表
 [0002] <110> IGM生物科学股份有限公司(IGM BIOSCIENCES, INC.)
 [0003] <120> 恒定链经修饰的双特异性五价和六价Ig-M抗体
 [0004] <130> IGM-0001-2-US
 [0005] <140> US 14/916,166
 [0006] <141> 2016-03-02
 [0007] <150> PCT/US2014/054079
 [0008] <151> 2014-09-04
 [0009] <150> 61/874,277
 [0010] <151> 2013-09-05
 [0011] <150> 61/874,284
 [0012] <151> 2013-09-05
 [0013] <160> 33
 [0014] <170> PatentIn version 3.5
 [0015] <210> 1
 [0016] <211> 551
 [0017] <212> PRT
 [0018] <213> 人工序列
 [0019] <220>
 [0020] <223> 人工序列说明:合成多肽
 [0021] <400> 1
 [0022] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [0023] 1 5 10 15
 [0024] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [0025] 20 25 30
 [0026] Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 [0027] 35 40 45
 [0028] Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0029] 50 55 60
 [0030] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0031] 65 70 75 80
 [0032] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0033] 85 90 95
 [0034] Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 [0035] 100 105 110
 [0036] Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr
 [0037] 115 120 125
 [0038] Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser

[0039]	130	135	140
[0040]	Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr		
[0041]	145	150	155
[0042]	Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly		
[0043]	165	170	175
[0044]	Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val		
[0045]	180	185	190
[0046]	Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val		
[0047]	195	200	205
[0048]	Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu		
[0049]	210	215	220
[0050]	Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro		
[0051]	225	230	235
[0052]	Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln		
[0053]	245	250	255
[0054]	Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu		
[0055]	260	265	270
[0056]	Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu		
[0057]	275	280	285
[0058]	Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr		
[0059]	290	295	300
[0060]	Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val		
[0061]	305	310	315
[0062]	Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val		
[0063]	325	330	335
[0064]	Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe		
[0065]	340	345	350
[0066]	Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr		
[0067]	355	360	365
[0068]	Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn		
[0069]	370	375	380
[0070]	Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn		
[0071]	385	390	395
[0072]	Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp		
[0073]	405	410	415
[0074]	Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro		
[0075]	420	425	430
[0076]	Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His		
[0077]	435	440	445

[0078]	Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu
[0079]	450 455 460
[0080]	Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala
[0081]	465 470 475 480
[0082]	Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu
[0083]	485 490 495
[0084]	Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg
[0085]	500 505 510
[0086]	Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr
[0087]	515 520 525
[0088]	Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg
[0089]	530 535 540
[0090]	Val Thr Glu Arg Thr Val Asp
[0091]	545 550
[0092]	210> 2
[0093]	<211> 353
[0094]	<212> PRT
[0095]	<213> 人工序列
[0096]	<220>
[0097]	<223> 人工序列说明:合成多肽
[0098]	<400> 2
[0099]	Gly Ser Gly Ser Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe
[0100]	1 5 10 15
[0101]	Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe
[0102]	20 25 30
[0103]	Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val
[0104]	35 40 45
[0105]	Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser
[0106]	50 55 60
[0107]	Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser
[0108]	65 70 75 80
[0109]	Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly
[0110]	85 90 95
[0111]	Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp
[0112]	100 105 110
[0113]	Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe
[0114]	115 120 125
[0115]	Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr
[0116]	130 135 140

[0117]	Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val
[0118]	145 150 155 160
[0119]	Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser
[0120]	165 170 175
[0121]	Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu
[0122]	180 185 190
[0123]	Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys
[0124]	195 200 205
[0125]	Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val
[0126]	210 215 220
[0127]	Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala
[0128]	225 230 235 240
[0129]	Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val
[0130]	245 250 255
[0131]	Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr
[0132]	260 265 270
[0133]	Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His
[0134]	275 280 285
[0135]	Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr
[0136]	290 295 300
[0137]	Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg
[0138]	305 310 315 320
[0139]	Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Gly Gly Gly Ser Glu Gln Lys Leu
[0140]	325 330 335
[0141]	Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His
[0142]	340 345 350
[0143]	His
[0144]	<210> 3
[0145]	<211> 563
[0146]	<212> PRT
[0147]	<213> 人工序列
[0148]	<220>
[0149]	<223> 人工序列说明:合成多肽
[0150]	<400> 3
[0151]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
[0152]	1 5 10 15
[0153]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
[0154]	20 25 30
[0155]	Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[0156]	35	40	45
[0157]	Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0158]	50	55	60
[0159]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0160]	65	70	75
[0161]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0162]	85	90	95
[0163]	Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0164]	100	105	110
[0165]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
[0166]	115	120	125
[0167]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile		
[0168]	130	135	140
[0169]	Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser		
[0170]	145	150	155
[0171]	Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser		
[0172]	165	170	175
[0173]	Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro		
[0174]	180	185	190
[0175]	Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile		
[0176]	195	200	205
[0177]	Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp		
[0178]	210	215	220
[0179]	Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0180]	225	230	235
[0181]	Gly Ser Gly Ser Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe		
[0182]	245	250	255
[0183]	Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe		
[0184]	260	265	270
[0185]	Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val		
[0186]	275	280	285
[0187]	Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser		
[0188]	290	295	300
[0189]	Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser		
[0190]	305	310	315
[0191]	Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly		
[0192]	325	330	335
[0193]	Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp		
[0194]	340	345	350

[0195]	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe
[0196]				355					360					365		
[0197]	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr
[0198]			370					375					380			
[0199]	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly	Glu	Ala	Val
[0200]	385					390					395					400
[0201]	Lys	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser
[0202]					405					410					415	
[0203]	Ala	Val	Gly	Glu	Ala	Ser	Ile	Ser	Glu	Asp	Asp	Trp	Asn	Ser	Gly	Glu
[0204]				420					425					430		
[0205]	Arg	Phe	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Lys
[0206]			435					440					445			
[0207]	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	His	Arg	Pro	Asp	Val
[0208]		450					455					460				
[0209]	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Ser	Ala
[0210]	465					470					475					480
[0211]	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Val
[0212]				485					490					495		
[0213]	Gln	Trp	Met	Gln	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Tyr	Val	Thr
[0214]				500					505					510		
[0215]	Ser	Ala	Pro	Met	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Tyr	Phe	Ala	His
[0216]			515					520					525			
[0217]	Ser	Ile	Leu	Thr	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Trp	Asn	Thr	Gly	Glu	Thr	Tyr
[0218]		530					535					540				
[0219]	Thr	Cys	Val	Val	Ala	His	Glu	Ala	Leu	Pro	Asn	Arg	Val	Thr	Glu	Arg
[0220]	545					550					555					560
[0221]	Thr	Val	Asp													
[0222]	<210>	4														
[0223]	<211>	213														
[0224]	<212>	PRT														
[0225]	<213>	人工序列														
[0226]	<220>															
[0227]	<223>	人工序列说明:合成多肽														
[0228]	<400>	4														
[0229]	Gln	Ile	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
[0230]	1			5					10				15			
[0231]	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Ile
[0232]				20				25				30				
[0233]	His	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr

[0234]	35	40	45
[0235]	Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser		
[0236]	50	55	60
[0237]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu		
[0238]	65	70	75
[0239]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr		
[0240]	85	90	95
[0241]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro		
[0242]	100	105	110
[0243]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr		
[0244]	115	120	125
[0245]	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
[0246]	130	135	140
[0247]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
[0248]	145	150	155
[0249]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
[0250]	165	170	175
[0251]	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
[0252]	180	185	190
[0253]	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
[0254]	195	200	205
[0255]	Asn Arg Gly Glu Cys		
[0256]	210		
[0257]	<210> 5		
[0258]	<211> 328		
[0259]	<212> PRT		
[0260]	<213> 人工序列		
[0261]	<220>		
[0262]	<223> 人工序列说明:合成多肽		
[0263]	<400> 5		
[0264]	Gly Ser Gly Ser Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe		
[0265]	1	5	10
[0266]	Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe		
[0267]	20	25	30
[0268]	Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val		
[0269]	35	40	45
[0270]	Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser		
[0271]	50	55	60
[0272]	Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser		

[0273]	65	70	75	80
[0274]	Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly			
[0275]		85	90	95
[0276]	Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp			
[0277]		100	105	110
[0278]	Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe			
[0279]		115	120	125
[0280]	Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr			
[0281]		130	135	140
[0282]	Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val			
[0283]	145	150	155	160
[0284]	Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser			
[0285]		165	170	175
[0286]	Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu			
[0287]		180	185	190
[0288]	Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys			
[0289]		195	200	205
[0290]	Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val			
[0291]		210	215	220
[0292]	Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala			
[0293]	225	230	235	240
[0294]	Thr Ile Tyr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val			
[0295]		245	250	255
[0296]	Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr			
[0297]		260	265	270
[0298]	Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His			
[0299]		275	280	285
[0300]	Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr			
[0301]		290	295	300
[0302]	Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg			
[0303]	305	310	315	320
[0304]	Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys			
[0305]		325		
[0306]	<210> 6			
[0307]	<211> 328			
[0308]	<212> PRT			
[0309]	<213> 人工序列			
[0310]	<220>			
[0311]	<223> 人工序列说明:合成多肽			

[0312]	<400> 6																
[0313]	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Val	Ser	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe	
[0314]	1				5					10					15		
[0315]	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala	Thr	Gly	Phe	
[0316]				20					25					30			
[0317]	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly	Lys	Gln	Val	
[0318]			35					40					45				
[0319]	Gly	Ser	Gly	Val	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser	
[0320]		50					55				60						
[0321]	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser	
[0322]	65					70				75					80		
[0323]	Asp	Trp	Leu	Ser	Gln	Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Asp	His	Arg	Gly	
[0324]				85					90					95			
[0325]	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro	Asp	Gln	Asp	
[0326]			100					105					110				
[0327]	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe	
[0328]			115					120					125				
[0329]	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr	
[0330]		130					135				140						
[0331]	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly	Glu	Ala	Val	
[0332]	145					150				155					160		
[0333]	Lys	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	
[0334]				165					170					175			
[0335]	Ala	Val	Gly	Glu	Ala	Ser	Ile	Ser	Glu	Asp	Asp	Trp	Asn	Ser	Gly	Glu	
[0336]			180						185				190				
[0337]	Arg	Phe	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Lys	
[0338]			195					200					205				
[0339]	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	His	Arg	Pro	Asp	Val	
[0340]		210					215				220						
[0341]	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Ser	Ala	
[0342]	225					230				235					240		
[0343]	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Val	
[0344]				245					250					255			
[0345]	Gln	Trp	Met	Gln	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Tyr	Val	Thr	
[0346]			260					265					270				
[0347]	Ser	Ala	Pro	Met	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Tyr	Phe	Ala	Val	
[0348]			275					280					285				
[0349]	Ser	Ile	Leu	Thr	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Trp	Asn	Thr	Gly	Glu	Thr	Tyr	
[0350]		290					295				300						

[0351]	Thr	Cys	Val	Val	Ala	His	Glu	Ala	Leu	Pro	Asn	Arg	Val	Thr	Glu	Arg
[0352]	305					310					315					320
[0353]	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly	Lys								
[0354]					325											
[0355]	<210>	7														
[0356]	<211>	328														
[0357]	<212>	PRT														
[0358]	<213>	人工序列														
[0359]	<220>															
[0360]	<223>	人工序列说明:合成多肽														
[0361]	<400>	7														
[0362]	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Val	Ser	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe
[0363]	1				5					10					15	
[0364]	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala	Thr	Gly	Phe
[0365]				20					25					30		
[0366]	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly	Lys	Gln	Val
[0367]			35					40					45			
[0368]	Gly	Ser	Gly	Val	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser
[0369]		50					55					60				
[0370]	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser
[0371]	65					70					75					80
[0372]	Asp	Trp	Leu	Ser	Gln	Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Asp	His	Arg	Gly
[0373]					85					90					95	
[0374]	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro	Asp	Gln	Asp
[0375]				100					105					110		
[0376]	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe
[0377]			115					120					125			
[0378]	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr
[0379]		130					135					140				
[0380]	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly	Glu	Ala	Val
[0381]	145					150					155					160
[0382]	Lys	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser
[0383]					165					170					175	
[0384]	Ala	Val	Gly	Glu	Ala	Ser	Ile	Ser	Glu	Asp	Asp	Trp	Asn	Ser	Gly	Glu
[0385]				180					185					190		
[0386]	Arg	Phe	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Lys
[0387]			195					200					205			
[0388]	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	His	Arg	Pro	Asp	Val
[0389]		210					215					220				

[0390]	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Ser	Ala
[0391]	225					230					235					240
[0392]	Thr	Ile	Tyr	Cys	Leu	Val	Glu	Gly	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Val
[0393]					245					250					255	
[0394]	Gln	Trp	Met	Gln	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Tyr	Val	Thr
[0395]				260					265					270		
[0396]	Ser	Ala	Pro	Met	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Tyr	Phe	Ala	His
[0397]			275					280					285			
[0398]	Ser	Glu	Leu	Thr	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Trp	Asn	Thr	Gly	Glu	Thr	Tyr
[0399]	290					295						300				
[0400]	Thr	Cys	Val	Val	Ala	His	Glu	Ala	Leu	Pro	Asn	Arg	Val	Thr	Glu	Arg
[0401]	305					310					315					320
[0402]	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly	Lys								
[0403]				325												
[0404]	<210>	8														
[0405]	<211>	328														
[0406]	<212>	PRT														
[0407]	<213>	人工序列														
[0408]	<220>															
[0409]	<223>	人工序列说明:合成多肽														
[0410]	<400>	8														
[0411]	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Val	Ser	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe
[0412]	1			5					10					15		
[0413]	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala	Thr	Gly	Phe
[0414]				20					25					30		
[0415]	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly	Lys	Gln	Val
[0416]			35					40					45			
[0417]	Gly	Ser	Gly	Val	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser
[0418]		50					55					60				
[0419]	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser
[0420]	65					70					75					80
[0421]	Asp	Trp	Leu	Ser	Gln	Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Asp	His	Arg	Gly
[0422]					85					90					95	
[0423]	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro	Asp	Gln	Asp
[0424]				100					105					110		
[0425]	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe
[0426]				115					120					125		
[0427]	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr
[0428]				130					135					140		

[0429]	Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val		
[0430]	145	150	155 160
[0431]	Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser		
[0432]		165	170 175
[0433]	Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu		
[0434]		180	185 190
[0435]	Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys		
[0436]		195	200 205
[0437]	Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val		
[0438]		210	215 220
[0439]	Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala		
[0440]		225	230 235 240
[0441]	Thr Ile Thr Cys Ser Val Lys Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val		
[0442]		245	250 255
[0443]	Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr		
[0444]		260	265 270
[0445]	Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala Val		
[0446]		275	280 285
[0447]	Ser Lys Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr		
[0448]		290	295 300
[0449]	Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg		
[0450]		305	310 315 320
[0451]	Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys		
[0452]		325	
[0453]	<210> 9		
[0454]	<211> 556		
[0455]	<212> PRT		
[0456]	<213> 人工序列		
[0457]	<220>		
[0458]	<223> 人工序列说明:合成多肽		
[0459]	<400> 9		
[0460]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0461]	1	5	10 15
[0462]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
[0463]		20	25 30
[0464]	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile		
[0465]		35	40 45
[0466]	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0467]		50	55 60

[0468]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0469]	65 70 75 80
[0470]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0471]	85 90 95
[0472]	Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
[0473]	100 105 110
[0474]	Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr
[0475]	115 120 125
[0476]	Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser
[0477]	130 135 140
[0478]	Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr
[0479]	145 150 155 160
[0480]	Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly
[0481]	165 170 175
[0482]	Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val
[0483]	180 185 190
[0484]	Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val
[0485]	195 200 205
[0486]	Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu
[0487]	210 215 220
[0488]	Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro
[0489]	225 230 235 240
[0490]	Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln
[0491]	245 250 255
[0492]	Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu
[0493]	260 265 270
[0494]	Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu
[0495]	275 280 285
[0496]	Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr
[0497]	290 295 300
[0498]	Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val
[0499]	305 310 315 320
[0500]	Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val
[0501]	325 330 335
[0502]	Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe
[0503]	340 345 350
[0504]	Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr
[0505]	355 360 365
[0506]	Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn

[0507]	370	375	380
[0508]	Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn		
[0509]	385	390	395 400
[0510]	Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp		
[0511]	405	410	415
[0512]	Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro		
[0513]	420	425	430
[0514]	Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His		
[0515]	435	440	445
[0516]	Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu		
[0517]	450	455	460
[0518]	Arg Glu Ser Ala Thr Ile Tyr Cys Leu Val Glu Gly Phe Ser Pro Ala		
[0519]	465	470	475 480
[0520]	Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu		
[0521]	485	490	495
[0522]	Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg		
[0523]	500	505	510
[0524]	Tyr Phe Ala His Ser Glu Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr		
[0525]	515	520	525
[0526]	Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg		
[0527]	530	535	540
[0528]	Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys		
[0529]	545	550	555
[0530]	<210> 10		
[0531]	<211> 556		
[0532]	<212> PRT		
[0533]	<213> 人工序列		
[0534]	<220>		
[0535]	<223> 人工序列说明:合成多肽		
[0536]	<400> 10		
[0537]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0538]	1	5	10 15
[0539]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
[0540]	20	25	30
[0541]	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile		
[0542]	35	40	45
[0543]	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0544]	50	55	60
[0545]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		

[0546]	65					70						75				80
[0547]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0548]						85						90				95
[0549]	Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	Val	Trp	Gly
[0550]						100						105				110
[0551]	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr
[0552]						115						120				125
[0553]	Leu	Phe	Pro	Leu	Val	Ser	Cys	Glu	Asn	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser
[0554]						130						135				140
[0555]	Val	Ala	Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr
[0556]	145											150				155
[0557]	Phe	Ser	Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly
[0558]						165						170				175
[0559]	Phe	Pro	Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Val
[0560]						180						185				190
[0561]	Leu	Leu	Pro	Ser	Lys	Asp	Val	Met	Gln	Gly	Thr	Asp	Glu	His	Val	Val
[0562]						195						200				205
[0563]	Cys	Lys	Val	Gln	His	Pro	Asn	Gly	Asn	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Pro	Leu
[0564]						210						215				220
[0565]	Pro	Val	Ile	Ala	Glu	Leu	Pro	Pro	Lys	Val	Ser	Val	Phe	Val	Pro	Pro
[0566]	225											230				235
[0567]	Arg	Asp	Gly	Phe	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Gln
[0568]						245						250				255
[0569]	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu
[0570]						260						265				270
[0571]	Gly	Lys	Gln	Val	Gly	Ser	Gly	Val	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu
[0572]						275						280				285
[0573]	Ala	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr
[0574]						290						295				300
[0575]	Ile	Lys	Glu	Ser	Asp	Trp	Leu	Ser	Gln	Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val
[0576]	305											310				315
[0577]	Asp	His	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val
[0578]						325						330				335
[0579]	Pro	Asp	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe
[0580]						340						345				350
[0581]	Ala	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr
[0582]						355						360				365
[0583]	Asp	Leu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn
[0584]						370						375				380

[0585]	Gly	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asn
[0586]	385								390							400
[0587]	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Glu	Ala	Ser	Ile	Ser	Glu	Asp	Asp	Trp
[0588]																
[0589]	Asn	Ser	Gly	Glu	Arg	Phe	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	His	Thr	Asp	Leu	Pro
[0590]																
[0591]	Ser	Pro	Leu	Lys	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	His
[0592]																
[0593]	Arg	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Asn	Leu
[0594]																
[0595]	Arg	Glu	Ser	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Val	Lys	Gly	Phe	Ser	Pro	Ala
[0596]	465															
[0597]	Asp	Val	Phe	Val	Gln	Trp	Met	Gln	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Ser	Pro	Glu
[0598]																
[0599]	Lys	Tyr	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Met	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg
[0600]																
[0601]	Tyr	Phe	Ala	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Trp	Asn	Thr
[0602]																
[0603]	Gly	Glu	Thr	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Ala	His	Glu	Ala	Leu	Pro	Asn	Arg
[0604]																
[0605]	Val	Thr	Glu	Arg	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly	Lys				
[0606]	545															
[0607]	<210>	11														
[0608]	<211>	568														
[0609]	<212>	PRT														
[0610]	<213>	人工序列														
[0611]	<220>															
[0612]	<223>	人工序列说明:合成多肽														
[0613]	<400>	11														
[0614]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala
[0615]	1															
[0616]	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr
[0617]																
[0618]	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[0619]																
[0620]	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
[0621]																
[0622]	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0623]	65															

[0624]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0625]					85				90					95		
[0626]	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
[0627]				100					105					110		
[0628]	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
[0629]				115					120					125		
[0630]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile
[0631]		130						135					140			
[0632]	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser
[0633]	145					150					155					160
[0634]	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser
[0635]					165					170						175
[0636]	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
[0637]				180					185						190	
[0638]	Ala	His	Phe	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile
[0639]			195						200					205		
[0640]	Ser	Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
[0641]		210						215					220			
[0642]	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
[0643]	225					230					235					240
[0644]	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Val	Ser	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe
[0645]					245					250					255	
[0646]	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala	Thr	Gly	Phe
[0647]				260					265						270	
[0648]	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly	Lys	Gln	Val
[0649]			275						280					285		
[0650]	Gly	Ser	Gly	Val	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser
[0651]		290						295					300			
[0652]	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser
[0653]	305					310					315					320
[0654]	Asp	Trp	Leu	Ser	Gln	Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Asp	His	Arg	Gly
[0655]					325					330					335	
[0656]	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro	Asp	Gln	Asp
[0657]				340					345						350	
[0658]	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe
[0659]			355						360					365		
[0660]	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr
[0661]		370						375					380			
[0662]	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly	Glu	Ala	Val

[0663]	385	390	395	400
[0664]	Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser			
[0665]		405	410	415
[0666]	Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu			
[0667]		420	425	430
[0668]	Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys			
[0669]		435	440	445
[0670]	Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val			
[0671]		450	455	460
[0672]	Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala			
[0673]	465	470	475	480
[0674]	Thr Ile Tyr Cys Leu Val Glu Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val			
[0675]		485	490	495
[0676]	Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr			
[0677]		500	505	510
[0678]	Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His			
[0679]		515	520	525
[0680]	Ser Glu Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr			
[0681]		530	535	540
[0682]	Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg			
[0683]	545	550	555	560
[0684]	Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys			
[0685]		565		
[0686]	<210> 12			
[0687]	<211> 568			
[0688]	<212> PRT			
[0689]	<213> 人工序列			
[0690]	<220>			
[0691]	<223> 人工序列说明:合成多肽			
[0692]	<400> 12			
[0693]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala			
[0694]	1	5	10	15
[0695]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr			
[0696]		20	25	30
[0697]	Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0698]		35	40	45
[0699]	Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe			
[0700]		50	55	60
[0701]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			

[0702]	65					70						75				80
[0703]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0704]						85						90				95
[0705]	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
[0706]						100						105				110
[0707]	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
[0708]						115						120				125
[0709]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile
[0710]						130						135				140
[0711]	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser
[0712]	145					150						155				160
[0713]	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser
[0714]						165						170				175
[0715]	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
[0716]						180						185				190
[0717]	Ala	His	Phe	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile
[0718]						195						200				205
[0719]	Ser	Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
[0720]						210						215				220
[0721]	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
[0722]	225					230						235				240
[0723]	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Val	Ser	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe
[0724]						245						250				255
[0725]	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala	Thr	Gly	Phe
[0726]						260						265				270
[0727]	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly	Lys	Gln	Val
[0728]						275						280				285
[0729]	Gly	Ser	Gly	Val	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser
[0730]						290						295				300
[0731]	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser
[0732]	305					310						315				320
[0733]	Asp	Trp	Leu	Ser	Gln	Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Asp	His	Arg	Gly
[0734]						325						330				335
[0735]	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro	Asp	Gln	Asp
[0736]						340						345				350
[0737]	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe
[0738]						355						360				365
[0739]	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr
[0740]						370						375				380

[0741]	Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val
[0742]	385 390 395 400
[0743]	Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser
[0744]	405 410 415
[0745]	Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu
[0746]	420 425 430
[0747]	Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys
[0748]	435 440 445
[0749]	Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val
[0750]	450 455 460
[0751]	Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala
[0752]	465 470 475 480
[0753]	Thr Ile Thr Cys Ser Val Lys Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val
[0754]	485 490 495
[0755]	Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr
[0756]	500 505 510
[0757]	Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala Val
[0758]	515 520 525
[0759]	Ser Lys Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr
[0760]	530 535 540
[0761]	Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg
[0762]	545 550 555 560
[0763]	Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys
[0764]	565
[0765]	<210> 13
[0766]	<211> 572
[0767]	<212> PRT
[0768]	<213> 人工序列
[0769]	<220>
[0770]	<223> 人工序列说明:合成多肽
[0771]	<400> 13
[0772]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
[0773]	1 5 10 15
[0774]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
[0775]	20 25 30
[0776]	Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0777]	35 40 45
[0778]	Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
[0779]	50 55 60

[0780]	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0781]	65					70				75						80
[0782]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0783]					85					90					95	
[0784]	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
[0785]				100					105					110		
[0786]	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Leu	Phe
[0787]			115					120					125			
[0788]	Pro	Leu	Val	Ser	Cys	Glu	Asn	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser	Val	Ala
[0789]		130					135				140					
[0790]	Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Phe	Ser
[0791]	145					150				155						160
[0792]	Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro
[0793]				165					170					175		
[0794]	Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Val	Leu	Leu
[0795]			180						185				190			
[0796]	Pro	Ser	Lys	Asp	Val	Met	Gln	Gly	Thr	Asp	Glu	His	Val	Val	Cys	Lys
[0797]		195					200					205				
[0798]	Val	Gln	His	Pro	Asn	Gly	Asn	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Pro	Leu	Pro	Val
[0799]		210				215					220					
[0800]	Ile	Ala	Glu	Leu	Pro	Pro	Lys	Val	Ser	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Asp
[0801]	225					230				235						240
[0802]	Gly	Phe	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala	Thr
[0803]				245					250				255			
[0804]	Gly	Phe	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly	Lys
[0805]			260					265				270				
[0806]	Gln	Val	Gly	Ser	Gly	Val	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Lys
[0807]		275					280				285					
[0808]	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys
[0809]		290					295				300					
[0810]	Glu	Ser	Asp	Trp	Leu	Ser	Gln	Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Asp	His
[0811]	305					310				315						320
[0812]	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro	Asp
[0813]				325					330				335			
[0814]	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	Ser
[0815]			340						345				350			
[0816]	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu
[0817]			355					360				365				
[0818]	Thr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly	Glu

[0819]	370	375	380
[0820]	Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr		
[0821]	385	390	395 400
[0822]	Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser		
[0823]	405	410	415
[0824]	Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro		
[0825]	420	425	430
[0826]	Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro		
[0827]	435	440	445
[0828]	Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu		
[0829]	450	455	460
[0830]	Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val		
[0831]	465	470	475 480
[0832]	Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr		
[0833]	485	490	495
[0834]	Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe		
[0835]	500	505	510
[0836]	Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu		
[0837]	515	520	525
[0838]	Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr		
[0839]	530	535	540
[0840]	Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val		
[0841]	545	550	555 560
[0842]	Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr		
[0843]	565	570	
[0844]	<210> 14		
[0845]	<211> 372		
[0846]	<212> PRT		
[0847]	<213> 人工序列		
[0848]	<220>		
[0849]	<223> 人工序列说明:合成多肽		
[0850]	<400> 14		
[0851]	Gln Val Gln Leu Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp		
[0852]	1	5	10 15
[0853]	Leu Asn Ser Ala Val Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val		
[0854]	20	25	30
[0855]	Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys		
[0856]	35	40	45
[0857]	Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln		

[0858]	50	55	60
[0859]	Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr		
[0860]	65	70	75
[0861]	Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys		
[0862]	85	90	95
[0863]	Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser		
[0864]	100	105	110
[0865]	Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn		
[0866]	115	120	125
[0867]	Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe		
[0868]	130	135	140
[0869]	Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys		
[0870]	145	150	155
[0871]	Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile		
[0872]	165	170	175
[0873]	Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile		
[0874]	180	185	190
[0875]	Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser		
[0876]	195	200	205
[0877]	Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val		
[0878]	210	215	220
[0879]	Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro		
[0880]	225	230	235
[0881]	Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala		
[0882]	245	250	255
[0883]	Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val		
[0884]	260	265	270
[0885]	Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly		
[0886]	275	280	285
[0887]	Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu		
[0888]	290	295	300
[0889]	Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser		
[0890]	305	310	315
[0891]	Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His		
[0892]	325	330	335
[0893]	Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr		
[0894]	340	345	350
[0895]	Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala		
[0896]	355	360	365

[0897]	Gly Thr Cys Tyr																
[0898]	370																
[0899]	<210> 15																
[0900]	<211> 582																
[0901]	<212> PRT																
[0902]	<213> 人工序列																
[0903]	<220>																
[0904]	<223> 人工序列说明:合成多肽																
[0905]	<400> 15																
[0906]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
[0907]	1			5			10			15							
[0908]	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
[0909]	20				25				30								
[0910]	Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
[0911]	35			40			45										
[0912]	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
[0913]	50			55			60										
[0914]	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
[0915]	65			70			75			80							
[0916]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[0917]	85				90				95								
[0918]	Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	Val	Trp	Gly	
[0919]	100				105				110								
[0920]	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	
[0921]	115			120			125										
[0922]	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	
[0923]	130			135			140										
[0924]	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	
[0925]	145			150			155			160							
[0926]	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	
[0927]	165				170				175								
[0928]	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	
[0929]	180				185				190								
[0930]	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	
[0931]	195			200			205										
[0932]	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	
[0933]	210			215			220										
[0934]	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Leu	Pro	Val	Ile	Ala	Glu	Leu	Pro	Pro	
[0935]	225			230			235			240							

[0936]	Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro		
[0937]		245	250
[0938]	Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln		255
[0939]		260	265
[0940]	Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val		270
[0941]		275	280
[0942]	Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr		285
[0943]		290	295
[0944]	Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser		300
[0945]	305	310	315
[0946]	Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln		320
[0947]		325	330
[0948]	Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg		335
[0949]		340	345
[0950]	Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser		350
[0951]		355	360
[0952]	Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val		365
[0953]		370	375
[0954]	Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr		380
[0955]	385	390	395
[0956]	Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu		400
[0957]		405	410
[0958]	Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys		415
[0959]		420	425
[0960]	Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser		430
[0961]		435	440
[0962]	Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro		445
[0963]		450	455
[0964]	Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys		460
[0965]	465	470	475
[0966]	Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln		480
[0967]		485	490
[0968]	Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met		495
[0969]		500	505
[0970]	Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr		510
[0971]		515	520
[0972]	Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val		525
[0973]		530	535
[0974]	Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys		540

[0975]	545	550	555	560
[0976]	Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp			
[0977]		565	570	575
[0978]	Thr Ala Gly Thr Cys Tyr			
[0979]		580		
[0980]	<210> 16			
[0981]	<211> 213			
[0982]	<212> PRT			
[0983]	<213> 人工序列			
[0984]	<220>			
[0985]	<223> 人工序列说明:合成多肽			
[0986]	<400> 16			
[0987]	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly			
[0988]	1	5	10	15
[0989]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met			
[0990]		20	25	30
[0991]	Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr			
[0992]		35	40	45
[0993]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser			
[0994]		50	55	60
[0995]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu			
[0996]		65	70	75
[0997]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr			
[0998]		85	90	95
[0999]	Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Val Ala Ala Pro			
[1000]		100	105	110
[1001]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr			
[1002]		115	120	125
[1003]	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys			
[1004]		130	135	140
[1005]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu			
[1006]		145	150	155
[1007]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser			
[1008]		165	170	175
[1009]	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala			
[1010]		180	185	190
[1011]	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe			
[1012]		195	200	205
[1013]	Asn Arg Gly Glu Cys			

[1014]	210
[1015]	<210> 17
[1016]	<211> 211
[1017]	<212> PRT
[1018]	<213> 人工序列
[1019]	<220>
[1020]	<223> 人工序列说明:合成多肽
[1021]	<400> 17
[1022]	Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
[1023]	1 5 10 15
[1024]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
[1025]	20 25 30
[1026]	His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
[1027]	35 40 45
[1028]	Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
[1029]	50 55 60
[1030]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
[1031]	65 70 75 80
[1032]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
[1033]	85 90 95
[1034]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys
[1035]	100 105 110
[1036]	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
[1037]	115 120 125
[1038]	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
[1039]	130 135 140
[1040]	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
[1041]	145 150 155 160
[1042]	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
[1043]	165 170 175
[1044]	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
[1045]	180 185 190
[1046]	Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
[1047]	195 200 205
[1048]	Lys Ser Cys
[1049]	210
[1050]	<210> 18
[1051]	<211> 6
[1052]	<212> PRT

[1053]	<213>	人工序列
[1054]	<220>	
[1055]	<223>	人工序列说明:合成6xHis标签
[1056]	<400>	18
[1057]	His His His His His His	
[1058]	1	5
[1059]	<210>	19
[1060]	<211>	103
[1061]	<212>	PRT
[1062]	<213>	智人(Homo sapiens)
[1063]	<400>	19
[1064]	Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg Cys Cys Lys	
[1065]	1	5 10 15
[1066]	Asn Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Ala Thr	
[1067]		20 25 30
[1068]	Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Cys Asp Thr Gly Ser Leu	
[1069]		35 40 45
[1070]	Asn Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly	
[1071]		50 55 60
[1072]	His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala Trp Ala Lys	
[1073]	65	70 75 80
[1074]	Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp	
[1075]		85 90 95
[1076]	Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser	
[1077]		100
[1078]	<210>	20
[1079]	<211>	98
[1080]	<212>	PRT
[1081]	<213>	智人(Homo sapiens)
[1082]	<400>	20
[1083]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	
[1084]	1	5 10 15
[1085]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
[1086]		20 25 30
[1087]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
[1088]		35 40 45
[1089]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
[1090]		50 55 60
[1091]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	

[1092]	65	70	75	80
[1093]	Tyr Ile Cys Asn Val	Asn His Lys Pro Ser	Asn Thr Lys Val	Asp Lys
[1094]	85	90	95	
[1095]	Lys Val			
[1096]	<210> 21			
[1097]	<211> 104			
[1098]	<212> PRT			
[1099]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[1100]	<220>			
[1101]	<221> MOD_RES			
[1102]	<222> (3) .. (3)			
[1103]	<223> Ala或Leu			
[1104]	<220>			
[1105]	<221> MOD_RES			
[1106]	<222> (65) .. (65)			
[1107]	<223> Tyr或His			
[1108]	<400> 21			
[1109]	Gly Ser Xaa Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn			
[1110]	1	5	10	15
[1111]	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp			
[1112]	20	25	30	
[1113]	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser			
[1114]	35	40	45	
[1115]	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys			
[1116]	50	55	60	
[1117]	Xaa Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln			
[1118]	65	70	75	80
[1119]	Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn			
[1120]	85	90	95	
[1121]	Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro			
[1122]	100			
[1123]	<210> 22			
[1124]	<211> 106			
[1125]	<212> PRT			
[1126]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[1127]	<400> 22			
[1128]	Val Cys Ser Arg Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser			
[1129]	1	5	10	15
[1130]	Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys			

[1131]	20	25	30
[1132]	Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu		
[1133]	35	40	45
[1134]	Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln		
[1135]	50	55	60
[1136]	Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys		
[1137]	65	70	75
[1138]	His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly		
[1139]	85	90	95
[1140]	His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys		
[1141]	100	105	
[1142]	<210> 23		
[1143]	<211> 110		
[1144]	<212> PRT		
[1145]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[1146]	<220>		
[1147]	<221> MOD_RES		
[1148]	<222> (69) .. (69)		
[1149]	<223> Pro或Thr		
[1150]	<220>		
[1151]	<221> MOD_RES		
[1152]	<222> (87) .. (87)		
[1153]	<223> Gly或Ser		
[1154]	<400> 23		
[1155]	Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg		
[1156]	1	5	10
[1157]	Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala		
[1158]	20	25	30
[1159]	Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly		
[1160]	35	40	45
[1161]	Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala		
[1162]	50	55	60
[1163]	Lys Glu Ser Gly Xaa Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile		
[1164]	65	70	75
[1165]	Lys Glu Ser Asp Trp Leu Xaa Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp		
[1166]	85	90	95
[1167]	His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys		
[1168]	100	105	110
[1169]	<210> 24		

64

[1209]	65	70	75	80
[1210]	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
[1211]	85	90	95	
[1212]	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
[1213]	100	105	110	
[1214]	<210> 27			
[1215]	<211> 108			
[1216]	<212> PRT			
[1217]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[1218]	<220>			
[1219]	<221> MOD_RES			
[1220]	<222> (1) .. (1)			
[1221]	<223> Val或Gly			
[1222]	<220>			
[1223]	<221> MOD_RES			
[1224]	<222> (6) .. (6)			
[1225]	<223> Thr或Ile			
[1226]	<220>			
[1227]	<221> MOD_RES			
[1228]	<222> (12) .. (12)			
[1229]	<223> Ala或Ser			
[1230]	<400> 27			
[1231]	Xaa Pro Asp Gln Asp Xaa Ala Ile Arg Val Phe Xaa Ile Pro Pro Ser			
[1232]	1	5	10	15
[1233]	Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val			
[1234]	20	25	30	
[1235]	Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln			
[1236]	35	40	45	
[1237]	Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro			
[1238]	50	55	60	
[1239]	Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp			
[1240]	65	70	75	80
[1241]	Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu			
[1242]	85	90	95	
[1243]	Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys			
[1244]	100	105		
[1245]	<210> 28			
[1246]	<211> 110			
[1247]	<212> PRT			

[1248] <213> 智人(Homo sapiens)
 [1249] <400> 28
 [1250] Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp
 [1251] 1 5 10 15
 [1252] Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe
 [1253] 20 25 30
 [1254] Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu
 [1255] 35 40 45
 [1256] Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser
 [1257] 50 55 60
 [1258] Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu
 [1259] 65 70 75 80
 [1260] Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro
 [1261] 85 90 95
 [1262] Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
 [1263] 100 105 110
 [1264] <210> 29
 [1265] <211> 107
 [1266] <212> PRT
 [1267] <213> 智人(Homo sapiens)
 [1268] <400> 29
 [1269] Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 [1270] 1 5 10 15
 [1271] Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 [1272] 20 25 30
 [1273] Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 [1274] 35 40 45
 [1275] Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 [1276] 50 55 60
 [1277] Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 [1278] 65 70 75 80
 [1279] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 [1280] 85 90 95
 [1281] Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 [1282] 100 105
 [1283] <210> 30
 [1284] <211> 131
 [1285] <212> PRT
 [1286] <213> 智人(Homo sapiens)

[1287]	<400> 30															
[1288]	Gly	Val	Ala	Leu	His	Arg	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Arg
[1289]	1				5					10					15	
[1290]	Glu	Gln	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Ser	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu	Val	Thr
[1291]				20					25					30		
[1292]	Gly	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Val	Gln	Trp	Met	Gln	Arg	Gly	Gln
[1293]			35				40					45				
[1294]	Pro	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Tyr	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Met	Pro	Glu	Pro
[1295]		50					55				60					
[1296]	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Tyr	Phe	Ala	His	Ser	Ile	Leu	Thr	Val	Ser	Glu
[1297]	65					70					75					80
[1298]	Glu	Glu	Trp	Asn	Thr	Gly	Glu	Thr	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Ala	His	Glu
[1299]				85					90						95	
[1300]	Ala	Leu	Pro	Asn	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly
[1301]				100					105					110		
[1302]	Lys	Pro	Thr	Leu	Tyr	Asn	Val	Ser	Leu	Val	Met	Ser	Asp	Thr	Ala	Gly
[1303]			115					120					125			
[1304]	Thr	Cys	Tyr													
[1305]		130														
[1306]	<210> 31															
[1307]	<211> 428															
[1308]	<212> PRT															
[1309]	<213> 智人(Homo sapiens)															
[1310]	<400> 31															
[1311]	Ala	Ser	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Thr	Arg	Cys	Cys	Lys
[1312]	1				5					10					15	
[1313]	Asn	Ile	Pro	Ser	Asn	Ala	Thr	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Ala	Thr
[1314]				20					25					30		
[1315]	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Met	Val	Thr	Cys	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu
[1316]			35					40				45				
[1317]	Asn	Gly	Thr	Thr	Met	Thr	Leu	Pro	Ala	Thr	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly
[1318]		50					55				60					
[1319]	His	Tyr	Ala	Thr	Ile	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Ala	Trp	Ala	Lys
[1320]	65					70					75					80
[1321]	Gln	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Ala	His	Thr	Pro	Ser	Ser	Thr	Asp	Trp
[1322]				85					90						95	
[1323]	Val	Asp	Asn	Lys	Thr	Phe	Ser	Val	Cys	Ser	Arg	Asp	Phe	Thr	Pro	Pro
[1324]				100					105						110	
[1325]	Thr	Val	Lys	Ile	Leu	Gln	Ser	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	His	Phe	Pro

[1326]	115	120	125
[1327]	Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr		
[1328]	130	135	140
[1329]	Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu		
[1330]	145	150	155
[1331]	Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser		
[1332]	165	170	175
[1333]	Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr		
[1334]	180	185	190
[1335]	Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys		
[1336]	195	200	205
[1337]	Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro		
[1338]	210	215	220
[1339]	Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu		
[1340]	225	230	235
[1341]	Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser		
[1342]	245	250	255
[1343]	Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys		
[1344]	260	265	270
[1345]	Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr		
[1346]	275	280	285
[1347]	Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro		
[1348]	290	295	300
[1349]	His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro		
[1350]	305	310	315
[1351]	Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly		
[1352]	325	330	335
[1353]	Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro		
[1354]	340	345	350
[1355]	Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp		
[1356]	355	360	365
[1357]	Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe		
[1358]	370	375	380
[1359]	Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys		
[1360]	385	390	395
[1361]	Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln		
[1362]	405	410	415
[1363]	Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys		
[1364]	420	425	

[1404]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[1405]	275 280 285
[1406]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[1407]	290 295 300
[1408]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[1409]	305 310 315 320
[1410]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1411]	325 330
[1412]	<210> 33
[1413]	<211> 453
[1414]	<212> PRT
[1415]	<213> 智人(Homo sapiens)
[1416]	<400> 33
[1417]	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
[1418]	1 5 10 15
[1419]	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
[1420]	20 25 30
[1421]	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
[1422]	35 40 45
[1423]	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
[1424]	50 55 60
[1425]	Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
[1426]	65 70 75 80
[1427]	Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
[1428]	85 90 95
[1429]	Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
[1430]	100 105 110
[1431]	Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
[1432]	115 120 125
[1433]	Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
[1434]	130 135 140
[1435]	Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr
[1436]	145 150 155 160
[1437]	Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
[1438]	165 170 175
[1439]	Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln
[1440]	180 185 190
[1441]	Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
[1442]	195 200 205

[1443]	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro	Asp	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg	Val
[1444]	210						215					220				
[1445]	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr
[1446]	225						230					235				240
[1447]	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr
[1448]						245					250				255	
[1449]	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	His	Thr	Asn
[1450]					260					265					270	
[1451]	Ile	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Glu	Ala
[1452]					275					280					285	
[1453]	Ser	Ile	Cys	Glu	Asp	Asp	Trp	Asn	Ser	Gly	Glu	Arg	Phe	Thr	Cys	Thr
[1454]	290							295					300			
[1455]	Val	Thr	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Lys	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg
[1456]	305						310					315				320
[1457]	Pro	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	His	Arg	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro
[1458]						325					330				335	
[1459]	Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Ser	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu
[1460]					340					345					350	
[1461]	Val	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Val	Gln	Trp	Met	Gln	Arg
[1462]					355					360					365	
[1463]	Gly	Gln	Pro	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	Tyr	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Met	Pro
[1464]	370							375					380			
[1465]	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Tyr	Phe	Ala	His	Ser	Ile	Leu	Thr	Val
[1466]	385						390					395				400
[1467]	Ser	Glu	Glu	Glu	Trp	Asn	Thr	Gly	Glu	Thr	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Ala
[1468]						405					410				415	
[1469]	His	Glu	Ala	Leu	Pro	Asn	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
[1470]					420						425				430	
[1471]	Thr	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Tyr	Asn	Val	Ser	Leu	Val	Met	Ser	Asp	Thr
[1472]					435						440				445	
[1473]	Ala	Gly	Thr	Cys	Tyr											
[1474]	450															

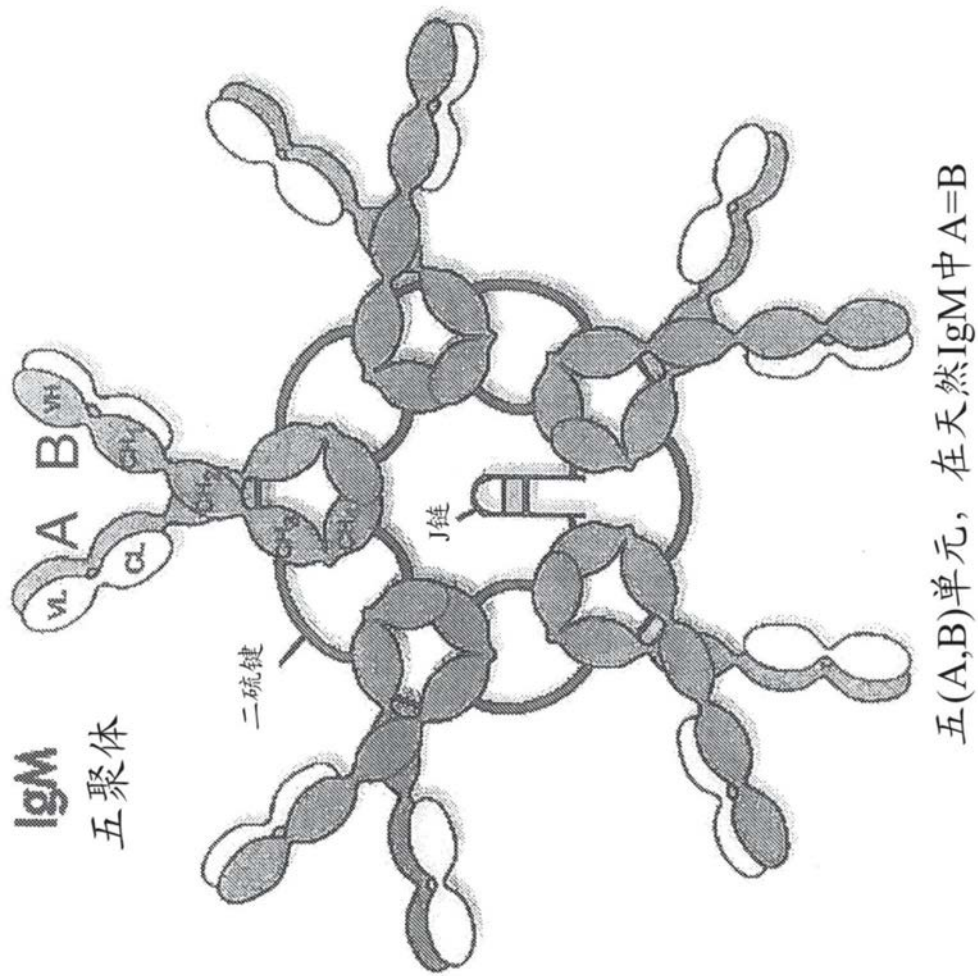


图1

具有(A,B)₅或(A,B)₆的双特异性IgM

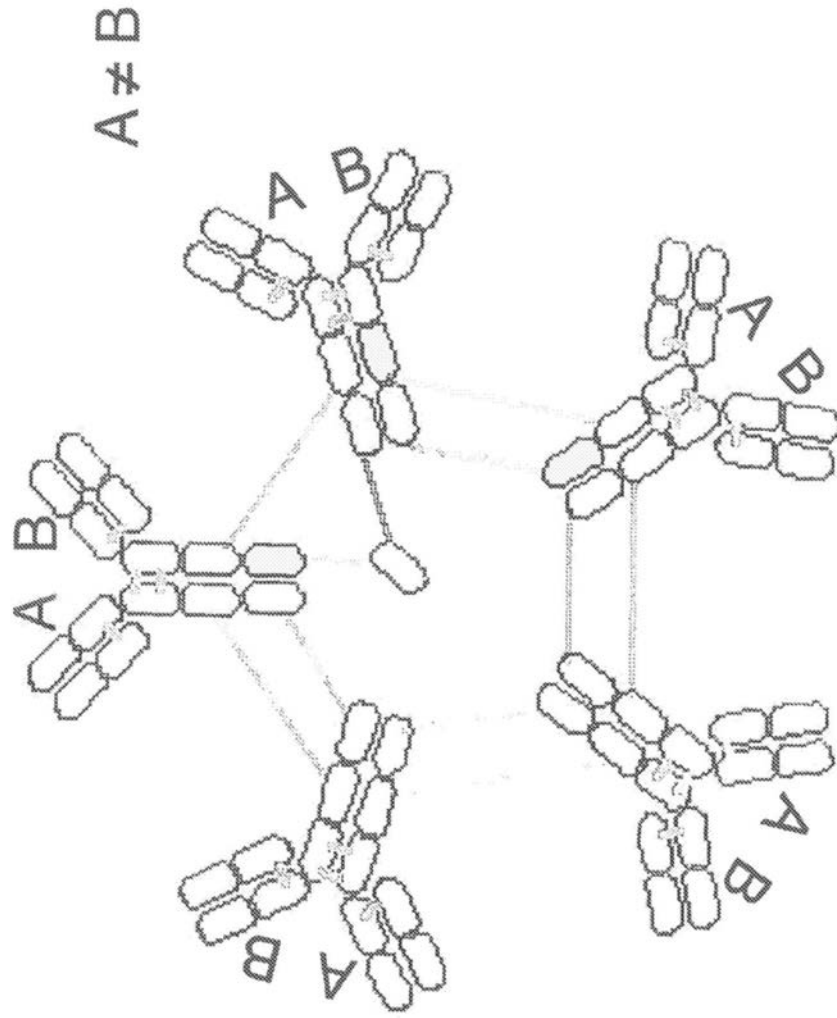


图2A

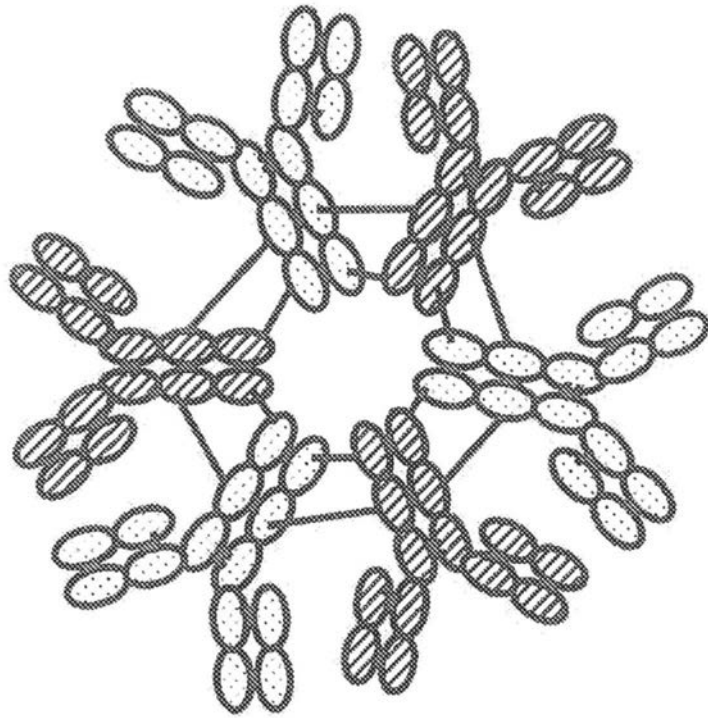


图2B

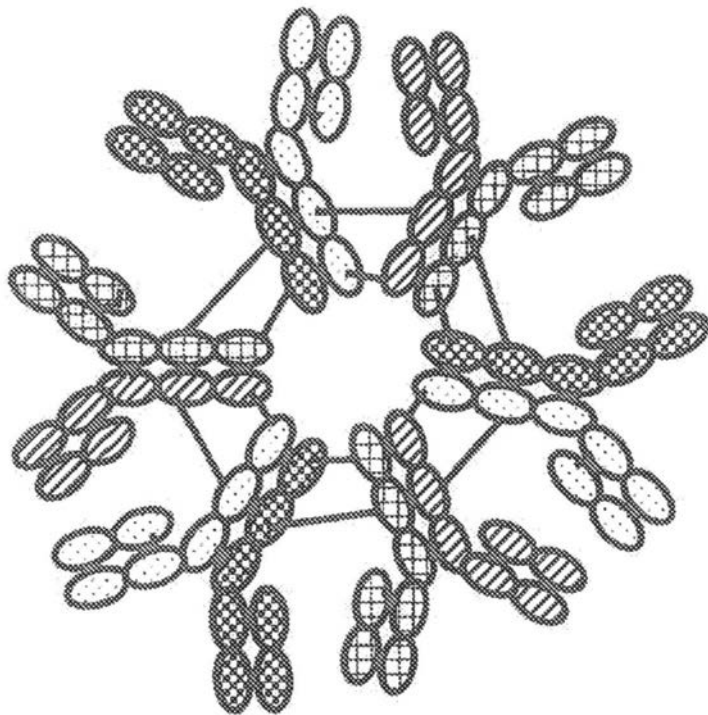
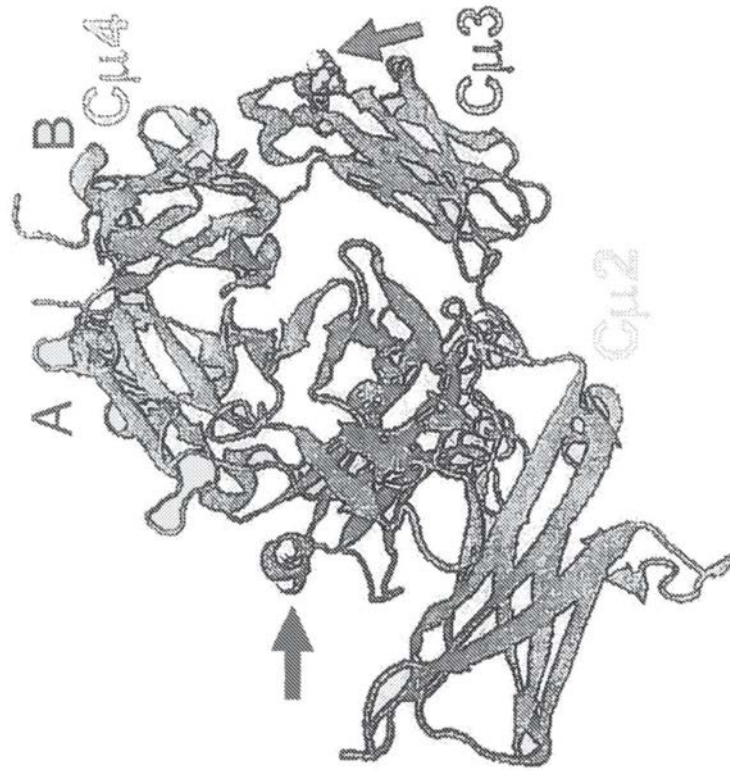


图2C

(A,B)单元结构模型



Czajkowsky D M, Shao Z PNAS 2009;106:14960-14965

图3

恒定域 CG1 / CE1 / CM1									
CE1	ASTQSPSVFPLTRCKKNIPSNATSVTLGCLATGYFPEPVMVYCDTGSINGTT --MTLPATLTLL								
CG1	ASTKGPSPVFPPLAPSSKSTS --GGTAALGCLVVDYFPEPVTVSWNSGALTSGV --HTFPAVLQSS								
	1	10	20	30	40	50	60		
	*	*	*	*	*	*	*		
CM1	GSASAPTLFPLVSCENSPSD -TSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKY								
	L								
CE1	SGHYATISLLTVSGAWAKQMFTCRVAHTPPSSDWDVNKTFPS								
CG1	GLYSLSSVVTVFESS SLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKV								
	70	80	90	100					
	*	*	*	*					
CM1	AATSQVLLPSKDVMMQGTDEHVVCVKVQHHPNGNKKKNVPLP								

图4A

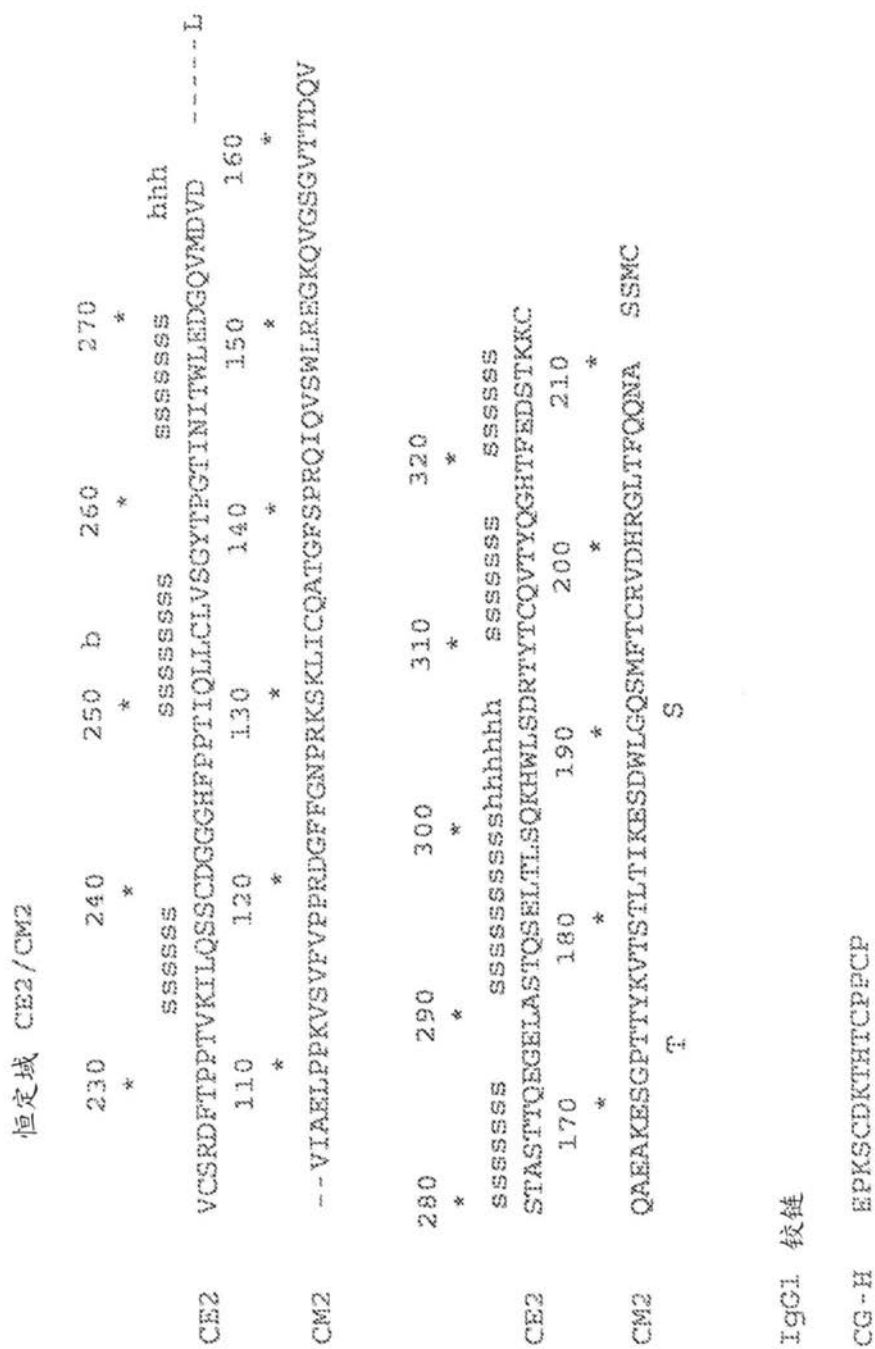


图4B

恒定域 CG2/CE3/CM3									
CG3	330	340	350	360	370	380			
	*	*	*	*	*	*			
	ssss	hhhhhh	ssssssss	ssssss					
CE3	--ADSNPRGVSAVLSRPSFDLFIKSPPTITCLVVDIAPSKGTVNLTWSRASCKEVNHSTR								
	240	250	260	270	280	290			
	*	*	*	*	*	*			
	ssss	hhhhhh	ssssss	ssssss	ssss	sss			
CG2	APELLGGPSVFLFPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK								
	220	230	240	250	260	270			
	*	*	*	*	*	*			
CM3	-VPDQDTAIRVFAIPSPASIFLTSTKLTCLVDTLYD -SVTISWTRQNGEAVKHTN								
	G	I	S						
CG3	390	400	410	420	430				
	*	*	*	*	*				
	ssss	ssss	ssss	ssss	ssss				
CE3	KEEKQRNGTLVTSTLPVGTDRDWEGETTYQCRVTHPHLPALMRSTTKTS								
	300	310	320	330	340				
	*	*	*	*	*				
	ssssss	hhhhhh	ssssss	ssss					
CG2	PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK								
	280	290	300	310	320				
	*	*	*	*	*				
CM3	ISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHDLPSPKQTIISREK								

图4C

恒定域 CG3/ CE4/CM4

```

440      *      450      *      460      *      470      *      480      *      490      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      ssssss      ssssss      ssssss      ssssss      hhh sssss
-GERAAPEVYAFATPEWPGSR -DKRTLACLIQN FNPEDISVQWLHNEVQLPDARHSTTQPRKTK
350      *      360      *      370      *      380      *      390      *      400      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      sssss hhhhh      sssssssssss      ssssss sss      ss
-GQPREPQVYTLPESEDELTK -NQVSLTCLVKCFYPSDIAVEWESNGQPENN --YKTTTPPVLDLS
330      *      340      *      350      *      360      *      370      *      380      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
GVALHRPVDVYLLPPAREQLNLRRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSEPK YVTSAPMEPEF
CM4

500      *      510      *      520      *      530      *      540      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      sssssssssssssssssssss      ssssss      ssssss
--GSGGFVPSRLEVTAEWEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQRAVSVNPCK
410      *      420      *      430      *      440      *
      *      *      *      *      *      *
      sssssssssssssssssssss      ssssss hhhhhssssss
--DGSFFLYSKLTVDXSRWQQNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
390      *      400      *      410      *      420      *      430      *      440      *      450      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *
QAPGRYFANSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY
CM4

```

图4D

异单体

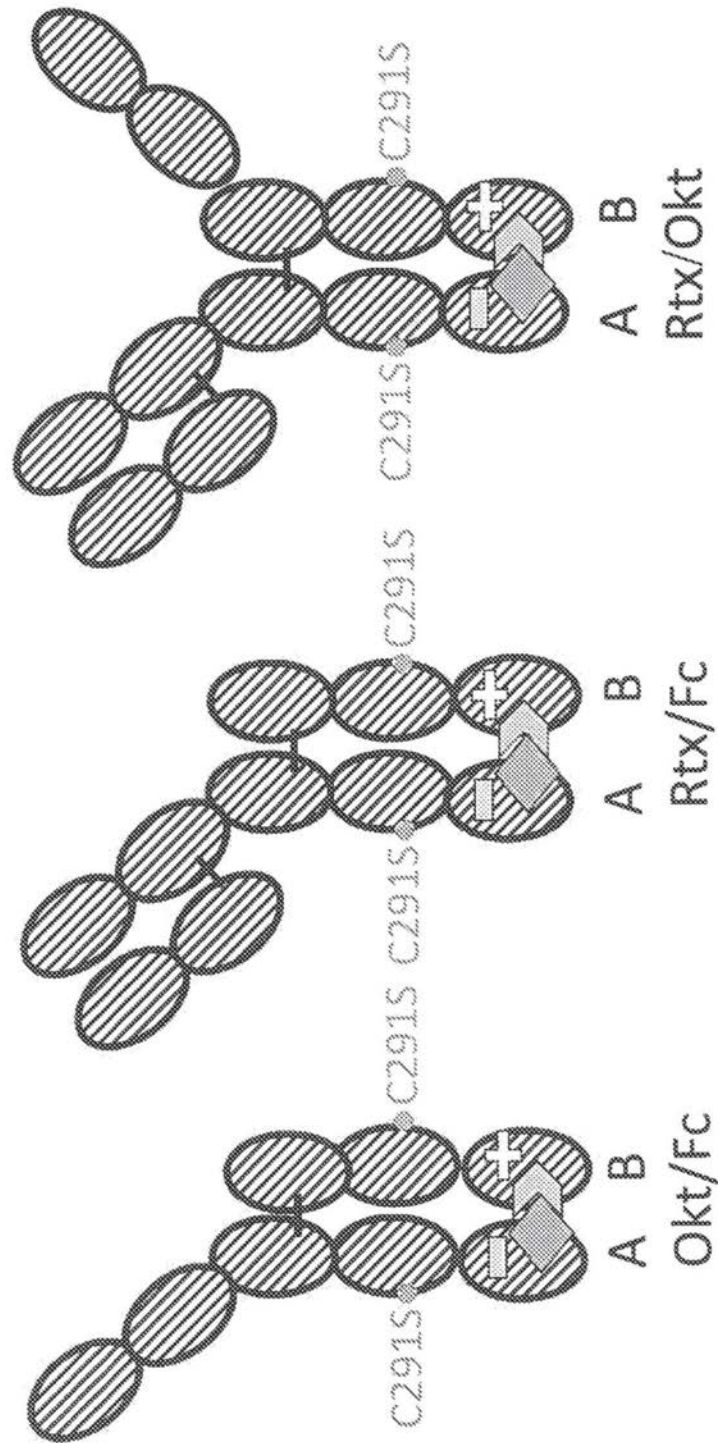


图5

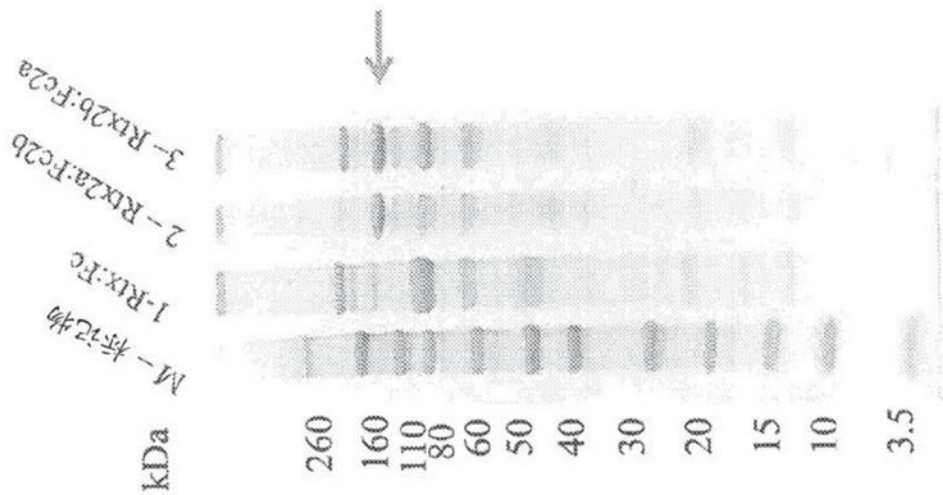


图6

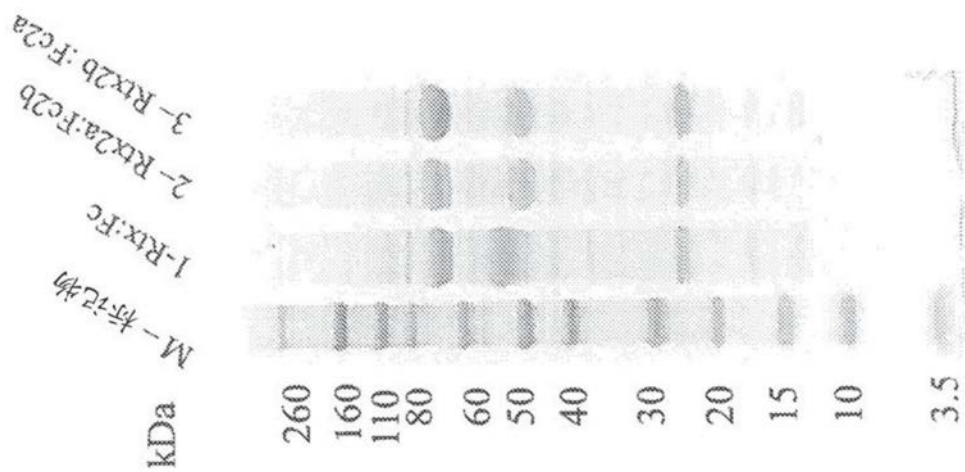


图7

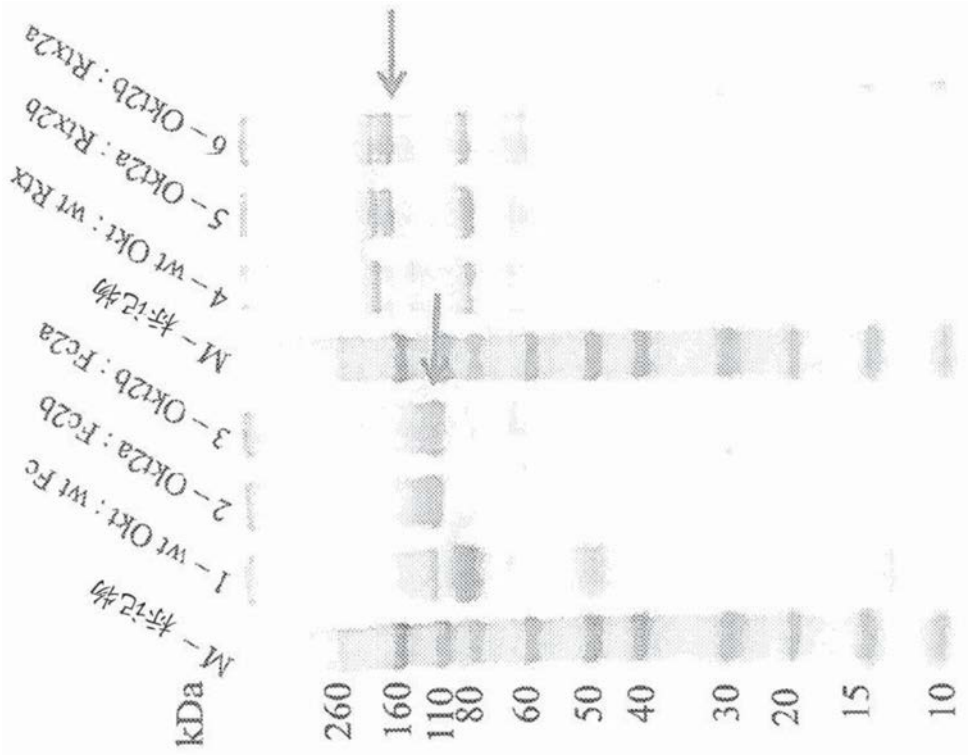


图8

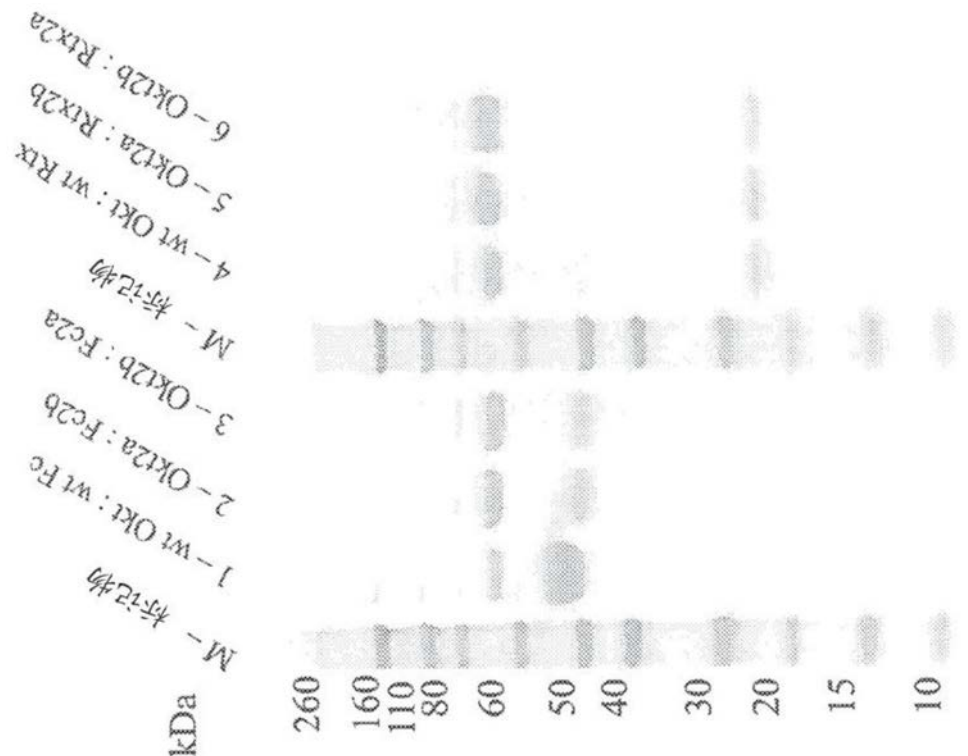


图9

四个CH3盐桥稳定二硫桥键周围的两个
邻近物(A,B)

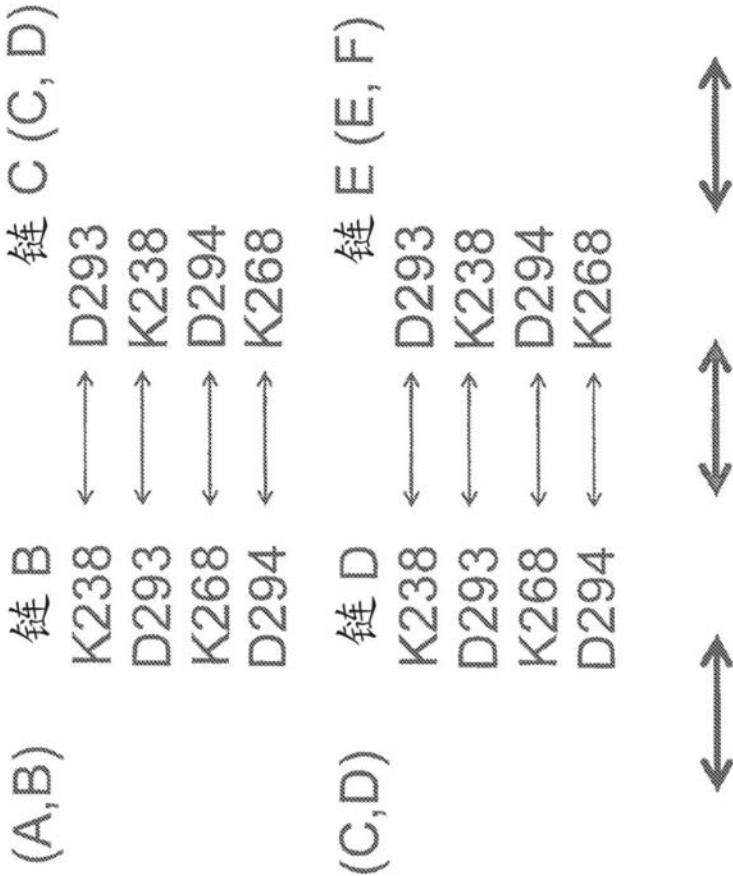


图10

表 A

人类IgM CM4域界面残基
 钮-孔和电荷改变位置

第1组		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
350	T	Y
孔 (CM4 #2): 任何组合		
残基号	天然Seq	潜在突变
352	L	S
393	F	F (W)
395	H	A (V, I, L, S, T)
第2组 (第1组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
第3组 (第1组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
第4组		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
350	T	Y
395	H	Y
孔 (CM4 #2): 任何组合		
残基号	天然Seq	潜在突变
352	L	S

图11

393	F	F (W)
395	H	A (V, I, L)
397	I	T (S)
=====		
第5组 (第4组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
=====		
第6组 (第4组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
=====		
第7组		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
350	T	Y
395	H	F
孔 (CM4 #2): 任何组合		
残基号	天然Seq	潜在突变
350	T	V (A, I, L)
352	L	S
393	F	F (W)
395	H	A (V, I, L)
=====		
第8组 (第7组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变

图11 (续)

354	T	K, R
397	I	K, R
=====		
第9组 (第7组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
=====		
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
=====		
第10组		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
350	T	F
=====		
孔 (CM4 #2): 任何组合		
残基号	天然Seq	潜在突变
352	L	A
393	F	F (W)
395	H	A (V, I, L, S, T)
=====		
第11组 (第10组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
=====		
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
=====		
第12组 (第10组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
=====		
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
=====		

图11(续)

第13组		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
350	T	F
395	H	X
孔 (CM4 #2): 任何组合		
残基号	天然Seq	潜在突变
352	L	A
393	P	F (W)
395	H	A (V, I, L)
397	I	T (S)
=====		
第14组 (第13组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
=====		
第15组 (第13组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
=====		
第16组		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
350	T	F
395	H	F
孔 (CM4 #2): 任何组合		
残基号	天然Seq	潜在突变
350	T	V (A, I, L)
352	L	A
393	P	F (W)
395	H	A (V, I, L)

图11 (续)

第17组 (第16组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
第18组 (第16组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
第19组		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
350	T	W
孔 (CM4 #2): 任何组合		
残基号	天然Seq	潜在突变
352	L	G (A)
393	F	F (W)
395	H	A (V, S, T)
第20组 (第19组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
第21组 (第19组的补充)		
钮 (CM4 #1)		

图11 (续)

残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
=====		
第22组		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
350	T	W
395	H	Y
孔 (CM4 #2): 任何组合		
残基号	天然Seq	潜在突变
352	L	G (A)
393	F	F (W)
395	H	A (V, I, L)
397	I	T (S)
=====		
第23组 (第22组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
=====		
第24组 (第22组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R
孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E
=====		
第25组		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变

图11(续)

350	T	W
395	H	F
孔 (CM4 #2): 任何组合		
残基号	天然Seq	潜在突变
350	T	V (A, I, L)
352	L	G (A)
393	F	F (W)
395	H	A (V, I, L)

第26组 (第25组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E

孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R

第27组 (第25组的补充)		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R

孔 (CM4 #2)		
残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E

第28组		
钮 (CM4 #1)		
残基号	天然Seq	潜在突变
334	L	C
350	T	W (F)
395	H	F

孔 (CM4 #2): 任何组合		
残基号	天然Seq	潜在突变
334	L	C
350	T	M
352	L	A (V)
393	F	F (W)
395	H	M (I)

图11 (续)

第29组 (第28组的补充)

钮 (CM4 #1)

残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E

孔 (CM4 #2)

残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R

第30组 (第28组的补充)

钮 (CM4 #1)

残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	K, R
397	I	K, R

孔 (CM4 #2)

残基号	天然Seq	潜在突变
354	T	D, E
397	I	D, E

图11 (续)

表 B

人类IgM CM4域界面残基
CM4域中的潜在电荷交换

第1组		
CM4第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
328	R	E (D)
CM4第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
339	E	R (K)
第2组		
CM4第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
344	R	E (D)
CM4第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
330	D	R (K)
第3组		
CM4第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
376	K	E (D)
CM4第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
385	E	R (K)
第4组		
CM4第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
427	R	E (D)
CM4第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
339	E	R (K)

图12

表 C

人类IgM CM2域界面残基
电荷引入

第1组		
CM2第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
116	F	E (D)
133	I	E (D)
CM2第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
116	F	R (K)
133	I	R (K)

图13

表 D

人类IgM CM2域界面残基

钮-孔

第1组

钮 (CM2 #1)

残基号	天然Seq	潜在突变
119	P	W

孔 (CM2 #2): 任何组合

残基号	天然Seq	潜在突变
115	V	V (I)
117	V	G (A, S)
132	L	M (A)
189	W	V (I, L, M, F)
210	A	G

第2组

钮 (CM2 #1)

残基号	天然Seq	潜在突变
116	F	E (D)
119	P	W
133	I	E (D)

孔 (CM2 #2): 任何组合

残基号	天然Seq	潜在突变
115	V	V (I)
116	F	R (K)
117	V	G (A, S)
132	L	M (A)
133	I	R (K)
189	W	V (I, L, M, F)
210	A	G

第3组

钮 (CM2 #1)

残基号	天然Seq	潜在突变
116	F	R (K)
119	P	W
133	I	R (K)

孔 (CM2 #2): 任何组合

残基号	天然Seq	潜在突变
115	V	V (I)
116	F	E (D)
117	V	G (A, S)

图14

132	L	M (A)
133	I	E (D)
189	W	V (I, L, M, F)
210	A	G

图14(续)

表 E

人类IgM CM2域界面残基

电荷交换

第1组		
CM2第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
167	E	K (R)
CM2第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
177	K	E (D)

第2组		
CM2第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
169	K	E (D)
CM2第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
170	E	K (R)

第3组		
CM2第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
170	E	K (R)
CM2第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
177	K	E (D)

第4组		
CM2第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
167	E	K (R)
169	K	E (D)
CM2第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
170	E	K (R)
177	K	E (D)

图15

表 F

人类IgM CM2、CM3和CM4域界面残基
电荷引入

第1组		
CM2第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
121	D	K (R)
CM3第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
315	K	D (E)
第2组		
CM2第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
150	K	E (D)
CM4第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
385	E	K (R)
第3组		
CM2第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
185	K	E (D)
CM4第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
360	D	K (R)
第4组		
CM2第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
121	D	K (R)
150	K	E (D)
CM3/CM4第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
315	K	D (E)
385	E	K (R)
第5组		
CM2第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
121	D	K (R)

图16

185	K	E (D)
CM3/CM4第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
315	K	D (E)
360	D	K (R)

第6组		
CM2第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
150	K	E (D)
185	K	E (D)
CM4第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
360	D	K (R)
385	E	K (R)

第7组		
CM2第1号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
121	D	K (R)
150	K	E (D)
185	K	E (D)
CM3/CM4第2号链		
残基号	天然Seq	潜在突变
315	K	D (E)
360	D	K (R)
385	E	K (R)

图16 (续)