



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102015763 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 24

(21) 申请号 200980116490. 9

A61K 38/17(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 05. 06

A61P 37/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/050, 888 2008. 05. 06 US

61/189, 653 2008. 08. 20 US

(56) 对比文件

WO 2006/042329 A2, 2006. 04. 20, 全文.

WO 2008/036135 A2, 2008. 03. 27, 全文.

Christian Wiesmann et al. Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation. 《Nature》. 2006, 第 444 卷 217 - 220.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 11. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/043020 2009. 05. 06

审查员 苗荻

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/137605 EN 2009. 11. 12

(73) 专利权人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 萨科德夫·S·西多 李冰

曼诺·范卢克伦坎帕格尼

克里斯琴·威斯曼

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 张红春

(51) Int. Cl.

C07K 14/705(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

权利要求书1页 说明书27页

序列表21页 附图17页

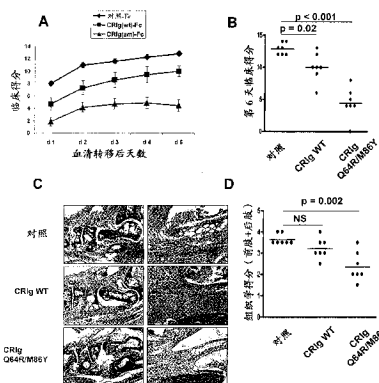
(54) 发明名称

亲和力成熟的 CR1g 变体

(57) 摘要

本发明关注亲和力成熟的 CR1g 变体。具体而言, 本发明关注具有提高的对 C3b 的结合亲和力且保留胜过 C3 的对 C3b 的选择性结合的 CR1g 变体。

CR1g Q64R/M86Y 显示出胜过 CR1g WT 在体内改善的体内功效



1. 一种 CRIg 变体,其在 SEQ ID NO :2 第 20-399 位氨基酸残基所示天然序列 CRIg 中包含选自下组的替代或替代组合 :M86Y ;Q64R/M86Y ;Q60I/Q64R/M86Y ;M86Y/E8Y ;M86Y/G42D/D44H/P45F ;M86Y/P45F ;M86Y/Q99K ;M86Y/Q99R ;M86Y/Q105R ;M86Y/Q105K ;和 M86Y/Q105R/K110N,其中所述替代的位置是以 SEQ ID NO :2 第 20 位氨基酸残基作为 1 开始编号的 ;

该 CRIg 变体具有提高的对 C3b 的结合亲和力,胜过 SEQ ID NO :2 之天然序列人 CRIg 至少 2 倍 ;和 / 或

该 CRIg 变体是比 SEQ ID NO :2 之天然序列人 CRIg 更有力至少 2 倍的旁路补体途径抑制剂。

2. 权利要求 1 的变体,其选择性结合 C3b 胜过 C3。

3. 一种嵌合分子,其包含依照权利要求 1 或 2 的变体。

4. 权利要求 3 的嵌合分子,其是免疫粘附素。

5. 权利要求 4 的嵌合分子,其包含 CRIg 胞外结构域。

6. 一种药物组合物,其包含与药学可接受赋形剂混合的权利要求 1 或 2 的 CRIg 变体或权利要求 4 或 5 的嵌合分子。

7. 权利要求 1 或 2 的 CRIg 变体或权利要求 4 或 5 的嵌合分子在制备预防或治疗受试者选自类风湿性关节炎 (RA) 和黄斑变性病的补体相关疾病或状况的药物中的用途。

8. 权利要求 7 的的用途,其中所述黄斑变性病为年龄相关黄斑变性 (AMD)。

9. 权利要求 8 的用途,其中所述 AMD 是湿性 AMD。

10. 权利要求 8 的用途,其中所述 AMD 是干性或萎缩性 AMD。

11. 权利要求 7 或 8 的用途,其中所述受试者是哺乳动物。

12. 权利要求 11 的用途,其中所述哺乳动物是人。

亲和力成熟的 CR1g 变体

发明领域

[0001] 本发明关注亲和力成熟的 CR1g 变体。具体而言,本发明关注具有提高的对 C3b 的结合亲和力且保留胜过 C3 的对 C3b 的选择性结合的 CR1g 变体。

[0002] 发明背景

[0003] 补体系统

[0004] 补体系统是由正常情况下以无活性的酶原形式存在的一系列血清糖蛋白构成的复杂酶级联。三种主要途径,即经典、旁路和甘露糖结合凝集素途径,能活化补体,它们在 C3 水平合并,其中两种类似的 C3 转化酶将 C3 切割成 C3a 和 C3b。

[0005] 巨噬细胞是已经发展出如下先天能力的专门细胞,即识别细胞表面表达的鉴定标签的结构中的微小差异,所述的鉴定标签即所谓的分子样式 (Taylor 等, Eur J Immunol 33, 2090-1097(2003); Taylor 等, Annu Rev Immunol 23, 901-944(2005))。虽然这些表面结构的直接识别是先天免疫的一个基础方面,但是调理作用容许通用巨噬细胞受体介导吞食,提高效率并使吞噬细胞的识别全集多样化 (Stuart 和 Ezekowitz, Immunity 22, 539-550(2005))。吞食过程涉及多种配体-受体相互作用,而且现在清楚了多种调理素(包括免疫球蛋白、胶原凝集素、和补体成分)经由与巨噬细胞表面受体的相互作用来引导病原体内在化所需要的细胞活性(综述见 Aderem 和 Underhill, Annu Rev Immunol 17, 593-623(1999); Underhill 和 Ozinsky, Annu Rev Immunol 20, 825-852(2002))。虽然由种系基因编码的天然免疫球蛋白能识别极其多种病原体,但是大多数调理性 IgG 是经由适应性免疫生成的,而且因此经由 Fc 受体的高效清除不是立即的 (Carroll, Nat Immunol 5, 981-986(2004))。另一方面,补体快速识别病原体表面分子并使微粒准备好由补体受体来摄取 (Brown, Infect Agents Dis 1, 63-70(1991))。

[0006] 补体由 30 种以上的血清蛋白质组成,它们调理极其多种病原体,用以被补体受体所识别。取决于级联的初始触发,可区别三种途径(综述见 Walport, N Engl J Med 344, 1058-1066(2001))。所有这三种途径共享活化中枢成分 C3 的共同步骤,但是它们依据识别的本质和导致 C3 活化的初始生化步骤而不同。经典途径如下活化,抗体结合至病原体表面,其继而结合 C1q 补体成分,引起一系列蛋白酶级联,最终将 C3 切割成其活性形式 C3b。凝集素途径在碳水化合物基序受到凝集素蛋白质识别后被活化。至今,已经鉴定了此途径的三个成员:结合甘露糖的凝集素 (MBL), SIGN-R1 凝集素家族和 ficolin (Pyz 等, Ann Med 38, 242-251(2006))。MBL 和 ficolin 都与丝氨酸蛋白酶有关,其像经典途径中的 C1 那样起作用,活化成分 C2 和 C4,导致中枢 C3 步骤。旁路条件与经典条件和凝集素途径二者形成对照,即它是由于内部 C3 酯与病原体表面上的识别基序的直接反应而被活化的。经由旁路途径蛋白酶因子 B 和因子 D 的作用,初始 C3 结合活化性表面导致 C3b 沉积的快速扩大。重要的是,经由因子 B 和 D 的作用,通过经典途径或凝集素途径任一所沉积的 C3b 也能导致 C3b 沉积的扩大。在补体活化的所有三种途径中,调理中的关键步骤是成分 C3 转化成 C3b。补体级联的酶对 C3 的切割将硫酯暴露于亲核攻击,容许 C3b 经由硫酯结构域共价附着到抗原表面上。这是补体调理中的初始步骤。对所结合的 C3b 的后续蛋白水解生成 iC3b、C3c 和

C3dg,即受到不同受体识别的片段(Ross和Medof, *Adv Immunol* 37,217-267(1985))。此切割消除了C3b进一步扩大C3b沉积和活化补体级联晚期成分(包括能够指导膜破坏的膜攻击复合物)的能力。然而,巨噬细胞的吞噬细胞受体优先识别C3b及其片段;由于酯键形成的通用性,C3介导的调理对于病原体识别是重要的(Holers等, *Immunol Today* 13,231-236(1992)),而且各种C3降解产物的受体因此在宿主免疫应答中发挥重要作用。

[0007] C3自身是由13个独特结构域组成的复杂的且有柔性的蛋白质。该分子的核心由8个所谓的巨球蛋白(MG)结构域构成,它们构成了C3的紧密压缩的 α 和 β 链。插入此结构的是CUB(C1r/C1s、Uegf和骨形态生成蛋白-1)和TED结构域,后者含有容许C3b与病原体表面共价结合的硫酯键。剩余结构域含有C3a,或者作为核心结构域的接头和间隔物起作用。C3b和C3c结构与C3的比较证明了该分子在每次蛋白水解时经历重大构象重排,不仅暴露TED,而且暴露了该分子的能与细胞受体相互作用的别的新的表面(Janssen和Gros, *Mol Immunol* 44,3-10(2007))。

[0008] 吞噬细胞上的补体C3受体

[0009] 有三个已知的补体受体基因超家族:短共有重复(SCR)模块(其编码CR1和CR2), β -2整联蛋白家族成员CR3和CR4,及免疫球蛋白Ig超家族成员CRIg。

[0010] CR1是由30个短共有重复(SCR)组成的180-210kDa糖蛋白,在免疫复合物清除中发挥主要作用。SCR是约60个氨基酸的模块结构,每个有两对二硫键,提供结构刚性。对C3b和C4b二者的高亲和力结合经由两个独特位点发生,每个由3个SCR构成(综述见Krych-Goldberg和Atkinson, *Immunol Rev* 180,112-122(2001))。CR1的SCR 15-17内所包含的C3b结合位点(位点2)的结构已经通过MRi测定(Smith等, *Cell* 108,769-780(2002)),揭示了三个模块处于延伸的头对尾排列中,在16-17连接处有柔性。结构指导的诱变鉴定了模块15上对C4b结合至关重要的一个带正电荷的表面区域。此片与CR1同一面上暴露的模块16的碱性侧链一起是C3b结合所需要的。CR1的主要功能,首先描述为免疫粘附受体(Rothman等, *J Immunol* 115,1312-1315(1975)),用以捕捉红细胞上的IC,供转运和通过肝的清除(Taylor等, *Clin Immunol Immunopathol* 82,49-59(1997))。嗜中性细胞上的CR1在吞噬中有作用,但是在组织巨噬细胞中不然(Sengelov等, *J Immunol* 153,804-810(1994))。在其在免疫复合物清除中的作用之外,经由其与相应转化酶的相互作用,CR1是经典途径和旁路途径二者活化的有力抑制剂(Krych-Goldberg和Atkinson, 2001,见上文;Krych-Goldberg等, *J Biol Chem* 274,31160-31168(1999))。在小鼠中,CR1和CR2是同一基因通过可变剪接形成的两种产物,主要与B淋巴细胞和滤泡树突细胞有关,且主要在调节B细胞应答中发挥功能(Molina等,1996)。CR1的小鼠功能等效物Crry灭活经典途径和旁路途径酶,并作为补体活化的内在调控物起作用,而不是作为吞噬细胞受体起作用(Molina等, *Proc Natl Acad Sci USA* 93,3357-3361(1992))。

[0011] CR2(CD21)结合iC3b和C3dg,而且是增强B细胞免疫的主要补体受体(Carroll, *Nat Immunol* 5,981-986(2004);Weis等, *Proc Natl Acad Sci USA* 81,881-885(1984))。关联B细胞对C3d包被的抗原的摄取经由B细胞抗原受体导致增强的信号。如此,CD21-CD19-CD81共同受体与B细胞抗原受体的共参与降低了B细胞活化的阈值并提供了重要的存活信号(Matsumoto等, *J Exp Med* 173,55-64(1991))。iC3b上的CR2结合位点已经部分定位在介于TED和MG1结构域之间的界面上(Clemenza和Isenman, *J Immunol* 165,

3839-3848(2000))。

[0012] CR3 和 CR4 是由 α 亚基 (分别为 CD11b 或 α_M 和 CD11c 或 α_X) 和共同 β 链 (CD18 或 β_2) 构成的跨膜异二聚体,而且涉及对胞外基质和对其它细胞的粘附以及 iC3b 识别。它们属于整联蛋白家族,而且不仅在吞噬中,而且在白细胞运输、突触形成和共刺激中实施功能 (综述见 Ross, *Adv Immunol* 37,217-267(2000))。整联蛋白粘性经由称作内向信号传导的过程来调控,将整联蛋白自低亲和力结合状态转化成高亲和力结合状态 (Liddington 和 Ginsberg, *J Cell Biol* 158,833-839(2002))。另外,配体结合将信号自胞外结构域转导至胞质。iC3b 的结合位点已经定位至 CR3 和 CR4 的 α 链上的数个结构域 (Diamond 等, *J Cell Biol* 120,1031-1043(1993); Li 和 Zhang, *J Biol Chem* 278,34395-34402(2003); Xiong 和 Zhang, *J Biol Chem* 278,34395-34402(2001))。CR3 的多种配体 (iC3b、 β -葡聚糖和 ICAM-1) 似乎结合 CD11b 的 I 结构域内所包含的部分交叠位点 (Balsam 等,1998; Diamond 等,1990; Zhang 和 Plow,1996)。基于将 CR3 结合位点定位至在 C3b 中 CUB 结构域解折叠后变成暴露的残基的结构研究,预测了它对蛋白水解灭活形式的 C3b (即 iC3b) 的特异性识别 (Nishida 等, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103,19737-19742(2006)),这发生在补体调控蛋白酶因子 I 的 α' 链切割后。

[0013] CRIg 是一种巨噬细胞相关受体,与 A33 抗原和自血流清除病原体所需要的 JAM1 有同源性。人 CRIg 蛋白是使用识别人 JAM1 的保守 Ig 结构域的简并引物首先自人胎 cDNA 文库克隆的。对数个克隆的测序揭示了 400 个氨基酸的可读框。Blast 搜索证实了与 1 型跨膜蛋白 Z39Ig 的相似性 (Langnaese 等, *Biochim Biophys Acta* 1492(2000)522-525)。发现此分子的胞外区有两个 Ig 样结构域组成,包含 N 端 V-set 结构域和 C 端 C2-set 结构域。这种新的人蛋白质最初称作“单次跨膜 Ig 超家族成员巨噬细胞相关的” (huSTIgMA)。 (huSTIgMA)。随后,使用 3' 和 5' 引物,克隆了 huSTIgMA 的一种剪接变体,它缺少最接近膜的 IgC 结构域,而且短 50 个氨基酸。因而,这种人蛋白质的较短剪接变体称作 huSTIgMA-短。huSTIgMA (称作 PR0362) 的氨基酸序列和编码多核苷酸序列披露于 2002 年 6 月 25 日授权的美国专利 No. 6,410,708。另外,huSTIgMA 和 huSTIgMA-短二者以及鼠 STIgMA (muSTIgMA) 蛋白质和核酸序列披露于 2004 年 4 月 15 日公布的 PCT 公开文本 WO 2004031105。

[0014] 2008 年 2 月 21 日公布的美国申请公开文本 No. 2008/0045697 中披露了 CRIg 和 C3b:CRIg 复合物的晶体结构。

[0015] 驻留在肝血窦的内腔内的 Kupffer 细胞 (KC) 形成身体中最大群的巨噬细胞。虽然 KC 具有与其它组织驻留的巨噬细胞共同的标志物,但是它们实施专门化的功能,连接通向有效清除自消化道的微血管系统排出的门静脉血中存在的、肠衍生的细菌、微生物碎片、细菌内毒素、免疫复合物和死细胞 (Bilzer 等, *Liver Int* 26,1175-1186(2006))。病原体对 KC 表面的有效结合是针对病原体的一线免疫防御中的一个至关重要的步骤 (Benacerraf 等, *J Exp Med* 110,27-48(1959))。消减了 KC 的小鼠中显著升高的死亡率证明了 KC 在自循环中快速清除病原体方面的重要作用 (Hirakata 等, *Infect Immun* 59,289-294(1991))。CRIg 的鉴定进一步强调补体和 KC 在针对循环中的病原体的一线免疫防御中的重要作用。

[0016] 在 小鼠 KC 上鉴定的唯一补体 C3 受体是 CRIg 和 CR3 (Helmy 等, *Cell* 124,915-927(2006)), 而人 KC 显示额外的 CR1 和 CR4 表达 (Hinglais 等,1989)。在体外, KC 上的 CRIg 和 CR3 都有助于对 iC3b 调理的微粒的结合 (Helmy 等, *Lab Invest* 61,

509-514(2006))。在体内, KC 表达的 CR3 在结合 iC3b 包被的病原体中的作用不太清楚。已经提出, CR3 有助于经嗜中性细胞募集和与嗜中性细胞表达的 ICAM1 的相互作用而间接清除病原体 (Conlan 和 North, *Exp Med* 179, 259-268(1994); Ebe 等, *Pathol Int* 49, 519-532(1999); Gregory 等, *J Immunol* 157, 2514-2520(1996); Gregory 和 Wing, *J Leukoc Biol* 72, 239-248(2002); Rogers 和 Unanue, *Infect Immun* 61, 5090-5096(1993))。相反, CRIg 通过捕捉穿过肝血窦内腔的病原体而实施直接作用 (Helmy 等, 2006, 见上文)。CRIg 与 CR3 在结合特征中的差异部分反映了这两种受体在生物学中的差异。在 KC 上表达的 CRIg 组成性地结合单体 C3 片段, 而 CR3 只结合 iC3b 调理的微粒 (Helmy 等, 2006, 见上文)。CRIg 有效捕捉单体 C3b 和 iC3b 以及 C3b/iC3b 包被的微粒的能力反映了通过在巨噬细胞的膜延伸的尖端处集中的 CRIg 分子 (Helmy 等, 2006, 见上文) 与病原体表面上存在的 C3b 和 iC3b 多聚体之间的多价相互作用而创建的升高的亲合力。虽然 CR3 只结合 iC3b 包被的微粒, 但是 CRIg 另外结合 C3b, 即在血清调理的病原体上形成的第一 C3 切割产物 (Croize 等, *Infect Immun* 61, 5134-5139(1993))。既然结合至病原体表面的大量 C3b 分子受到保护免于因子 II 和 I 的切割 (Gordon 等, *J Infect Dis* 157, 697-704(1988)), 那么 CRIg 对 C3b 配体的识别确保了快速结合和清除。如此, 虽然 CRIg 和 CR3 都在 KC 上表达, 但是它们显示不同的配体特异性、独特的结合特性和独特的病原体清除动力学。

[0017] 利用细胞表面受体来实现细胞进入的病原体的例子是病毒, 像人免疫缺陷病毒 (HIV) 和细胞内细菌, 像结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 和单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*), 及寄生虫, 像类前气门 (prostigmatoid) 硕大利什曼原虫 (*Leishmania major*) (Cossart 和 Sansonetti, *Science* 304:242-248(2004); Galan, *Cell* 103:363-366(2000); Hornef 等, *Nat. Immunol.* 3:1033-1040(2002); Stoiber 等, *Mol. Immunol.* 42:153-160(2005))。

[0018] 如上文所讨论的, CRIg 是一种最近发现的在一个驻留组织的巨噬细胞亚群上表达的补体 C3 受体。在发挥 C3 蛋白质的补体受体的功能之外, 通过结合 C3b 及抑制 C3 和 C5 的蛋白水解活化, CRIg 的胞外 IgV 结构域选择性抑制补体的旁途径。然而, CRIg 对转酰胺酶亚基 C3b 的结合亲和力较低 ($IC_{50} > 1 \mu M$), 需要相对较高浓度的蛋白质来达到接近完全补体抑制。因而, 需要具有改善的治疗功效的 CRIg 多肽。本发明提供此类多肽。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明 (至少部分地) 基于具有增强的结合亲和力的 CRIg 变体的构建。带有组合氨基酸替代 Q64R 和 M86Y 的 CRIg-ECD 蛋白显示出比野生型 CRIg 变体提高 30 倍的结合亲和力和改善 7 倍的补体抑制活性。另外, 在鼠关节炎模型中用亲和力改善的 CRIg 融合蛋白处理导致临床得分与用野生型 CRIg 蛋白质处理相比显著降低。

[0021] 因而, 本发明关注 CRIg 变体。

[0022] 一方面, 本发明关注一种 CRIg 变体, 其包含在选自下组的区域中的氨基酸替代: SEQ ID NO:2 之氨基酸序列的 E8-K15, R41-T47, S54-Q64, E85-Q99 和 Q105-K111。

[0023] 在一个实施方案中, 所述变体或其片段选择性结合 C3b 胜过 C3。

[0024] 在另一个实施方案中, 所述变体具有提高的对 C3b 的结合亲和力胜过 SEQ ID NO:

2 之天然序列人 CRIg, 其中所述结合亲和力可以例如提高至少 2 倍, 或至少 3 倍, 或至少 4 倍, 或至少 5 倍, 或至少 6 倍, 或至少 7 倍, 或至少 9 倍, 或至少 10 倍, 或至少 15 倍, 或至少 20 倍, 或至少 30 倍, 或至少 40 倍, 或至少 50 倍, 或至少 70 倍, 或至少 80 倍, 或至少 90 倍, 或至少 100 倍。

[0025] 在还有一个实施方案中, 所述变体是比 SEQ ID NO :2 之天然序列人 CRIg 更有力的旁路补体途径抑制剂。

[0026] 在又一个实施方案中, 所述变体包含在选自下组的一个或多个氨基酸位置处的氨基酸替代: SEQ ID NO :2 之氨基酸序列中的位置 8, 14, 18, 42, 44, 45, 60, 64, 86, 99, 105 和 110。

[0027] 在还有一个实施方案中, 所述变体包含在 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列中的氨基酸位置 60, 64, 86, 99, 105 和 110 中一个或多个位置处的氨基酸替代。

[0028] 在另一个实施方案中, 所述变体包含选自下组的一处或多处替代: E8W, W14F, E84Y/W14F; P45F; G42D/D44H/P45F; Q60I; Q64R; Q60I/Q64R; M86Y; M86W, M86F, M86W/Q9R; M86F/Q99R; K110D, K11N; Q105R/K110N; Q105R/K110Q 和 Q105K/K110D。

[0029] 在另一个实施方案中, 所述变体包含选自下组的一处或多处替代: Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/E8Y; Q60I/Q64R/G42D; Q60I/Q64R/P45F; Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F; Q60I/Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/Q105R; Q60I/Q64R/Q105K; Q60I/Q64R/K110N; Q60I/Q105R/K110N; M86Y/E8Y; M86Y/G42D/D44H/P45F; M86Y/P45F; M86Y/G42D/D44H/P45F 和 M86Y/Q99K/M86Y/Q99R/M86Y/Q105R/M86Y/Q105K/M86Y/Q105R/K110N。

[0030] 在还有一个实施方案中, 所述变体包含选自下组的一处或多处替代: Q60I; Q64R; Q60I/Q64R; M86Y; Q99L; Q105K/K110D; E8W/Q105R/K110N; Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/E8Y; Q60I/Q64R/G42D; Q60I/Q64R/P45F; Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F; Q60I/Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/Q105R; Q60I/Q64R/Q105K; Q60I/Q64R/K110N; M86Y/P45F 和 M86Y/Q105K。

[0031] 在一个更具体的实施方案中, 所述变体包含 Q60I/Q64R/M86Y 或 Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F 替代。

[0032] 另一方面, 本发明关注一种嵌合分子, 其包含上文定义的 CRIg 变体。

[0033] 在一个实施方案中, 所述嵌合分子是免疫粘附素。

[0034] 在另一个实施方案中, 所述免疫粘附素包含比 SEQ ID NO :2 之全长 CRIg 短的 CRIg 变体。

[0035] 在还有一个实施方案中, 所述嵌合分子包含 CRIg 胞外结构域。

[0036] 又一方面, 本发明关注一种药物组合物, 其包含与药学可接受赋形剂混合的本发明 CRIg 变体或嵌合分子, 例如免疫粘附素。

[0037] 还有一方面, 本发明关注一种用于预防或治疗补体相关疾病或状况的方法, 包括对需要此类处理的受试者施用预防或治疗有效量的 CRIg 变体或包含此类变体的嵌合分子, 诸如免疫粘附素。

[0038] 在一个实施方案中, 所述补体相关疾病是炎性疾病或自身免疫性疾病。

[0039] 在另一个实施方案中, 所述补体相关疾病选自下组: 类风湿性关节炎 (RA), 成人呼吸窘迫综合征 (ARDS), 缺血和再灌注后远端组织损伤, 心肺旁路手术期间补体活化, 皮炎, 天疱疮, 狼疮肾炎及所致肾小球肾炎和血管炎, 心肺旁路, 心脏停搏诱导的冠状内皮功

能障碍, II 型膜性增生性肾小球肾炎, IgA 肾病, 急性肾衰竭, 冷球蛋白血症, 抗磷脂综合征, 年龄相关黄斑变性, 葡萄膜炎, 糖尿病视网膜病, 同种异基因移植, 超急性排斥反应, 血液透析, 慢性阻塞性肺窘迫综合征 (COPD), 哮喘, 吸入性肺炎, 荨麻疹, 慢性特发性荨麻疹, 溶血性尿毒症综合征, 子宫内膜异位症, 心源性休克, 缺血再灌注损伤和多发性硬化 (MS)。

[0040] 在还有一个实施方案中, 所述补体相关疾病选自下组: 炎性肠病 (IBD), 系统性红斑狼疮, 类风湿性关节炎, 青少年慢性关节炎, 脊椎关节病, 系统性硬化 (硬皮病), 特发性炎性肌病 (皮肌炎, 多肌炎), 斯耶格伦氏综合征, 系统性血管炎, 结节病, 自身免疫性溶血性贫血 (免疫性全血细胞减少, 阵发性睡眠性血红蛋白尿), 自身免疫性血小板减少 (特发性血小板减少性紫癜, 免疫介导的血小板减少), 甲状腺炎 (格雷夫斯氏病, 桥本氏甲状腺炎, 青少年淋巴细胞性甲状腺炎, 萎缩性甲状腺炎), 糖尿病, 免疫介导的肾病 (肾小球肾炎, 小管间质性肾炎), 中枢和周围神经系统的脱髓鞘病诸如多发性硬化, 特发性多神经病, 肝胆病诸如传染性肝炎 (甲型, 乙型, 丙型, 丁型, 戊型和其它非亲肝性病毒的肝炎), 自身免疫性慢性活动性肝炎, 原发性胆汁性肝硬化, 肉芽肿性肝炎和硬化性胆管炎, 炎性和纤维化肺病 (例如囊性纤维化病), 麸胶敏感性肠病, 惠普尔氏病, 自身免疫或免疫介导皮肤病包括大疱性皮肤病, 多形性红斑和接触性皮炎, 银屑病, 肺的变应性疾病诸如嗜曙红细胞性肺炎, 特发性肺纤维化和超敏感性肺炎, 移植相关疾病包括移植物排斥, 移植物抗宿主病, 阿尔茨海默氏病, 阵发性睡眠性血红蛋白尿, 遗传性血管水肿, 动脉粥样硬化和 II 型膜性增生性肾小球肾炎。

[0041] 在一个优选的实施方案中, 所述补体相关疾病是类风湿性关节炎 (RA)。

[0042] 在另一个优选的实施方案中, 所述补体相关疾病是补体相关眼状况。

[0043] 在又一个实施方案中, 所述补体相关眼状况选自下组: 所有阶段的年龄相关黄斑变性 (AMD), 葡萄膜炎, 糖尿病性和其它缺血相关视网膜病, 眼内炎和其它眼内新血管疾病。

[0044] 在还有一个实施方案中, 所述眼内新血管疾病选自下组: 糖尿病黄斑水肿, 病理性近视, von Hippel-Lindau 病, 眼的组织胞浆菌病, 视网膜中央静脉阻塞 (CRVO), 角膜新生血管形成和视网膜新生血管形成。

[0045] 在还有一个实施方案中, 所述补体相关眼状况选自下组: 年龄相关黄斑变性 (AMD), 脉络膜新生血管形成 (CNV), 糖尿病视网膜病 (DR) 和眼内炎, 其中 AMD 包括湿性和干性或萎缩性 AMD。

[0046] 在一个实施方案中, 所述患者是哺乳动物, 优选人。

[0047] 另一方面, 本发明关注一种用于在哺乳动物中抑制 C3b 变体片段生成的方法, 包括对所述哺乳动物施用有效量的本发明 CRIg 变体或包含此类变体的免疫粘附素。

[0048] 还有一方面, 本发明关注一种用于在哺乳动物中选择性抑制旁路补体途径的方法, 包括对所述哺乳动物施用有效量的本发明 CRIg 变体或包含此类变体的免疫粘附素。

[0049] 附图简述

[0050] 图 1A-1B 显示了 399 个氨基酸的全长形式的天然人 CRIg (huCRIg) 的核苷酸和氨基酸序列 (分别是 SEQ ID NO:1 和 2)。

[0051] 图 2A-2B 显示了 305 个氨基酸的短形式的天然人 CRIg (huCRIg-短) 的核苷酸和氨基酸序列 (分别是 SEQ ID NO:3 和 4)。

[0052] 图 3A-3C 显示了 280 个氨基酸的天然鼠 CRIg (muCRIg) 的核苷酸和氨基酸序列 (分

别是 SEQ ID NO :5 和 6)。

[0053] 图 4 :CRIg 突变体在结合测定法和抑制测定法中的活性。作为 C3b 的竞争性置换测量 CRIg 的结合亲和力 (A), 而通过溶血抑制测定法测量生物学活性。PUR10680 是野生型对照 (红色), RIL 41 (蓝色) 和 RL41 (绿色) 是两种突变体 (B)。(C) CRIg 结合界面的逐步优化。

[0054] 图 5 :竞争性 ELISA 与溶血测定法之间的相关性。

[0055] 图 6 :CRIg 突变体 Q64R/M86Y 通过 Biacore 分析显示出改善的结合亲和力。(A) 通过在包被的 CRIg wt 和 CRIg Q64R M86Y 蛋白质上注射渐增浓度的 C3b 产生的 SPR 传感图。(B) 对结合数据的稳态分析指示 Q64R/M86Y 突变体和野生型 CRIg 的 K_d 为 0.2 微摩尔和 1.1 微摩尔。

[0056] 图 7 :亲和力改善的 CRIg 保留对 C3b 的选择性。对纯化的 C3 和 C3b 利用 α 筛选竞争性测定法。

[0057] 图 8 :CRIg Q64R M86Y 与野生型 CRIg 相比改善的补体抑制效力。(A) 使用家兔红细胞和 C1q 消减的人血清使用旁路途径选择性溶血测定法比较野生型 CRIg 和 CRIg Q46R M86Y 的补体抑制。(B) 用微孔板上包被的 LPS 和 C1q 消减的人血清使用基于 ELISA 的旁路途径测定法比较野生型 CRIg 和 CRIgQ46R M86Y 的补体抑制。

[0058] 图 9 :CRIg Q64R M86Y 在体内显示出胜过 CRIg WT 改善的功效。

[0059] (A) 注射 KRN 血清并用各种浓度和型式的野生型和亲和力成熟的重组人和小鼠 CRIg 蛋白质处理的小鼠的临床得分。数据代表每组 4-7 只小鼠的均值。(B) 来自血清转移后第 6 天的各只小鼠的临床得分的散布图。(C) 血清转移后 6 天用 CRIg wt 或 CRIg Q64R M86Y 处理的小鼠的苏木精和曙红染色切片。(D) 来自血清转移后 6 天用 CRIg wt 或 CRIg Q64R M86Y 处理的小鼠的组织学得分的散布图。

[0060] 表 1 :噬菌体文库。设计了五个软随机化文库来覆盖 CRIg 与 C3b 之间的接触区。

[0061] 表 2 :较高亲和力 CRIg my 噬菌体展示的逐步生成。来自五个软随机化文库的选定 CRIg 抗 C3b 突变体。每组显示基于对 C3b 的结合亲和力自每个文库选出的克隆。序列以单字母氨基酸代码表示。每组比较各突变体与共有和亲本野生型 (WT) 序列。残基相应着色 :蓝色 - 软随机化位置 ;灰色 - 未随机化 ;黄色 - 与野生型 (WT) 不同的选定的残基。表 2 以出现次序分别公开了 SEQ IDNO :21-63 和 63-67。

[0062] 表 3 :选定突变体的结合亲和力 (通过竞争性 ELISA 测定) 和体内溶血抑制的比较。结合亲和力或体内效力提高大于 5 倍的突变体标有黄色阴影。

[0063] 表 4 :第二代突变体的结合亲和力和体内溶血抑制的比较 (亲本序列以灰色显示)。结合亲和力超出亲本突变体提高大于 5 倍的突变体以蓝色突出标示, 结合亲和力提高大于 90 倍的突变体以黄色突出标示。类似地, 体内效力比亲本序列大的突变体以橙色突出标示。

[0064] 发明详述

[0065] I. 定义

[0066] 术语“CRIg”、“PRO362”、“JAM4”、和“STIgMA”可互换使用, 指天然序列和变体 CRIg 多肽。

[0067] “天然序列” CRIg 指与从自然界衍生的 CRIg 多肽具有相同氨基酸序列的多肽, 不

管其制剂形式。如此,天然序列 CRIg 可以从自然界分离,或者可以通过重组和 / 或合成手段生成。术语“天然序列 CRIg”明确涵盖天然存在的截短或分泌形式的 CRIg (例如胞外结构域序列)、CRIg 的天然存在的变体形式 (例如可变剪接形式) 和天然存在的等位变体。天然序列 CRIg 多肽明确包括 SEQ ID NO :2 的全长的长 399 个氨基酸的人 CRIg 多肽 (huCRIg, 图 1A 和 1B 所示), 含或不含 N 端信号序列, 含或不含第 1 位处的起始甲硫氨酸, 及含或不含 SEQ ID NO :2 大约第 277-307 位氨基酸处的任何或所有跨膜结构域。在又一个实施方案中, 天然序列 CRIg 多肽是 305 个氨基酸的短形式的人 CRIg (huCRIg-短 (huCRIg-short), SEQ ID NO :4, 图 2A 和 2B 所示), 含或不含 N 端信号序列, 含或不含第 1 位处的起始甲硫氨酸, 及含或不含 SEQ ID NO :4 大约第 183-213 位处的任何或所有跨膜结构域。在一个不同的实施方案中, 天然序列 CRIg 多肽是 SEQ ID NO :6 的长 280 个氨基酸的全长鼠 CRIg 多肽 (muCRIg, 图 3A-3C 所示), 含或不含 N 端信号序列, 含或不含第 1 位处的起始甲硫氨酸, 及含或不含 SEQ ID NO :6 大约第 181-211 位氨基酸处的任何或所有跨膜结构域。其它非人动物 (包括高等灵长类和哺乳类) 的 CRIg 多肽被明确包括在此定义内。

[0068] CRIg “胞外结构域”或“ECD”指 CRIg 多肽的基本上不含相应全长分子的跨膜和胞质结构域的一种形式。通常, CRIg ECD 具有少于 1% 的此类跨膜和 / 或胞质结构域, 而且优选具有少于 0.5% 的此类结构域。CRIg ECD 可包含 SEQ ID NO :2, 4, 或 6 的氨基酸残基 1 或约 21 至 X, 其中 X 是 SEQ ID NO :2 中约 271 至 281 的任何氨基酸、SEQ ID NO :4 中约 178 至 186 的任何氨基酸、和 SEQ ID NO :6 中约 176 至 184 的任何氨基酸。

[0069] 如本文中所使用的, 术语“CRIg 变体”指如下文所定义的自然 CRIg 多肽, 其与天然序列 CRIg 多肽具有至少约 80% 氨基酸序列同一性, 包括但不限于全长 huCRIg (SEQ ID NO :2)、huCRIg-short (SEQ ID NO :4)、和 muCRIg (SEQ ID NO :6), 各自有或无 N 端起始甲硫氨酸, 有或无 N 端信号序列, 有或无整个或部分跨膜域及有或无胞内域。在一个具体的实施方案中, CRIg 变体与来自序列 SEQ ID NO :2 之序列内的成熟的全长多肽具有至少约 80% 氨基酸序列同源性。在另一个实施方案中, CRIg 变体与来自序列 SEQ ID NO :4 内的成熟的全长多肽具有至少约 80% 氨基酸序列同源性。在还有一个实施方案中, CRIg 变体与来自序列 SEQ ID NO :6 内的成熟的全长多肽具有至少约 80% 氨基酸序列同源性。通常, CRIg 变体会与来自 SEQ ID NO :2, 4, 或 6 内的成熟氨基酸序列具有至少约 80% 氨基酸序列同一性, 或至少约 85% 氨基酸序列同一性, 或至少约 90% 氨基酸序列同一性, 或至少约 95% 氨基酸序列同一性, 或至少约 98% 氨基酸序列同一性, 或至少约 99% 氨基酸序列同一性。贯穿本说明书, 包括实施例, 术语“野生型”或“WT”指人 CRIg 的成熟全长短形式 (CRIg(S)) (SEQ ID NO :4), 而且 CRIg 变体中的氨基酸残基的编号方式指序列 SEQ ID NO :4

[0070] 本发明的 CRIg 变体是 CRIg 激动剂, 如下文所定义的。具体而言, 本文中的 CRIg 变体维持选择性结合 C3b 胜过 C3, 其中“选择性结合”用于指结合 C3b 且不结合 C3。另外, 在一个优选的实施方案中, 本发明的 CRIg 变体具有相对于天然序列 CRIg 多肽, 诸如 CRIg 的人长型 (SEQ ID NO :2) 提高的对 C3b 的结合亲和力。在各种实施方案中, 相对于天然序列人 CRIg 多肽 SEQ ID NO :2, 结合亲和力的提高是至少约 2 倍, 或至少约 3 倍, 或至少约 4 倍, 或至少约 5 倍, 或至少约 6 倍, 或至少约 7 倍, 或至少约 8 倍, 或至少约 9 倍, 或至少约 10 倍, 或至少约 15 倍, 或至少约 20 倍, 或至少约 25 倍, 或至少约 30 倍, 或至少约 35 倍, 或至少约 40 倍, 或至少约 45 倍, 或至少约 50 倍, 或至少约 55 倍, 或至少约 60 倍, 或至少约 65 倍,

或至少约 70 倍,或至少约 75 倍,或至少约 80 倍,或至少约 85 倍,或至少约 90 倍,或至少约 95 倍,或至少约 100 倍。在其它实施方案中,相对于天然序列人 CRIg 多肽 SEQ ID NO :2,对 C3b 的结合亲和力的提高是约 5-10 倍,或约 5-15 倍,或约 5-20 倍,或约 5-25 倍,或约 5-30 倍,或约 5-35 倍,或约 5-40 倍,或约 5-45 倍,或约 5-50 倍,或约 5-55 倍,或约 5-60 倍,或约 5-65 倍,或约 5-70 倍,或约 5-75 倍,或约 5-80 倍,或约 5-85 倍,或约 5-90 倍,或约 5-95 倍,或约 5-100 倍。

[0071] 关于本文中 CRIg 变体的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时,CRIg 变体序列中与它们与之比较的天然 CRIg 序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。对于长度不同的序列,百分比序列同一性是相对于较长的序列,沿着较长序列的全长测定的。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以本领域技术范围内的多种方式进行,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可决定用于测量对比的适宜参数,包括对所比较序列全长获得最大对比所需的任何算法。然后相对于较长的序列计算序列同一性,即,即使较短的序列显示与较长的序列一部分的 100% 序列同一性,整体序列同一性也会小于 100%。

[0072] 关于本文中鉴定的 CRIg 变体编码序列的“百分比(%)核酸序列同一性”定义为分别对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,候选序列中与 CRIg 变体编码序列中的核苷酸相同的核苷酸的百分率。为测定百分比核酸序列同一性目的的对比可以本领域技术范围内的多种方式进行,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可决定用于测量对比的适宜参数,包括对所比较序列全长获得最大对比所需的任何算法。然后相对于较长的序列计算序列同一性,即,即使较短的序列显示与较长的序列一部分的 100% 序列同一性,整体序列同一性也会小于 100%。

[0073] CRIg 变体的定义中包括所有氨基酸序列变体,如上文所定义的,不管它们的鉴定或制备模式。具体而言,本文中包括通过替代、化学的、酶促的、或通过其它适宜手段用天然存在氨基酸以外的模块经过修饰的变体,只要它们保留天然序列 CRIg 的定性生物学特性。例示性的非天然存在氨基酸替代包括下文描述的那些。

[0074] 氨基酸残基归入四大组:

[0075] 酸性的:这种残基在生理 pH 由于丢失 H 离子而具有负电荷,而且当包含这种残基的肽在水溶液中时,该残基受水溶液吸引以寻找该肽的构造中的表面位置。

[0076] 碱性的:这种残基在生理 pH 由于结合 H 离子而具有正电荷,而且当包含这种残基的肽在生理 pH 的水溶液中时,该残基受水溶液吸引以寻找该肽的构造中的表面位置。

[0077] 中性的/非极性的:这种残基在生理 pH 不带电荷,而且当包含这种残基的肽在水性介质中时,该残基受水溶液排斥以寻找该肽的构造中的内部位置。这些残基也称作“疏水性残基”。

[0078] 中性的/极性的:这种残基在生理 pH 不带电荷,但是当包含这种残基的肽在水性介质中时,该残基受水溶液吸引以寻找该肽的构造中的外部位置。

[0079] 氨基酸残基可以关于它们的侧链基团进一步分类为环状的或非环状的,芳香族的

或非芳香族的,这些指派对于熟练技术人员是平常的。

[0080] 常常遇到的氨基酸不是由遗传密码编码的氨基酸,包括用于 Glu 和 Asp 的 2-氨基己二酸 (Aad);用于 Glu 和 Asp 的 2-氨基庚二酸 (Apm);用于 Met, Leu 和其它脂肪族氨基酸的 2-氨基丁酸 (Abu);用于 Met, Leu 和其它脂肪族氨基酸的 2-氨基庚酸 (Ahe);用于 Gly 的 2-氨基异丁酸 (Aib);用于 Val 和 Leu 和 Ile 的环己基丙氨酸 (Cha);用于 Arg 和 Lys 的高精氨酸 (Har);用于 Lys, Arg 和 His 的 2,3-二氨基丙酸 (Dpr);用于 Gly, Pro 和 Ala 的 N-乙基甘氨酸 (EtGly);用于 Gly, Pro 和 Ala 的 N-乙基甘氨酸 (EtGly);用于 Asn 和 Gln 的 N-乙基天冬酰胺 (EtAsn);用于 Lys 的羟赖氨酸 (Hy1);用于 Lys 的别羟赖氨酸 (AHy1);用于 Pro, Ser 和 Thr 的 3(和 4)-羟基脯氨酸 (3Hyp, 4Hyp);用于 Ile, Leu 和 Val 的别异亮氨酸 (AIle);用于 Ala 的 ρ -脒基苯丙氨酸;用于 Gly, Pro 和 Ala 的 N-甲基甘氨酸 (MeGly, 肌氨酸);用于 Ile 的 N-甲基异亮氨酸 (MeIle);用于 Met 和其它脂肪族氨基酸的正缬氨酸 (Nva);用于 Met 和其它脂肪族氨基酸的正亮氨酸 (Nle);用于 Lys, Arg 和 His 的鸟氨酸 (Orn);用于 Thr, Asn 和 Gln 的瓜氨酸 (Cit) 和甲硫氨酸亚砷 (MSO);用于 Phe 的 N-甲基苯丙氨酸 (MePhe), 三甲基苯丙氨酸, 卤代 (F, Cl, Br 和 I) 苯丙氨酸, 三氟苯丙氨酸 (triflourylphenylalanine)。

[0081] 在用于本文时,术语“免疫粘附素”指将异源蛋白质(“粘附素”)的结合特异性与免疫球蛋白恒定域的效应器功能联合起来的抗体样分子。在结构上,免疫粘附素包括不同于抗体的抗原识别和结合位点(即是“异源”的)、具有期望结合特异性的氨基酸序列和免疫球蛋白恒定域序列的融合物。免疫粘附素分子的粘附素部分典型的是至少包含受体或配体的结合位点的连续氨基酸序列。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定域序列可以从任何免疫球蛋白获得,诸如 IgG-1、IgG-2、IgG-3 或 IgG-4 亚型, IgA(包括 IgA-1 和 IgA-2), IgE, IgD 或 IgM。

[0082] “治疗”或“处理”指有意预防病症的发生或改变病症的病理而实施的干预。因而,“治疗”指治疗性处理和预防性或防范性措施二者。需要治疗的受试者包括早就患有病症的受试者以及要预防病症的受试者。

[0083] 如本文中所使用的,“改善”在本文中定义为使得更好或改进。

[0084] 如本文中所使用的,术语“哺乳动物”指归为哺乳类的任何动物,包括但不限于人,非人灵长类,家畜和牲畜,及动物园中的动物、运动用动物或宠物动物,诸如马、猪、牛、犬、猫和雪貂等。在一个优选的实施方案中,哺乳动物指高等灵长类,最优选人。

[0085] 术语“补体相关疾病”在本文中以最广义使用,包括其发病机制涉及补体系统激活异常的所有疾病和病理性状况,诸如例如补体缺陷。该术语明确包括受益于 C3 转变酶抑制的疾病和病理性状况。该术语另外包括受益于补体旁路抑制,包括选择性抑制的疾病和病理性状况。补体相关疾病包括但不限于炎症疾病和自身免疫病,诸如例如类风湿性关节炎 (RA)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、缺血和再灌注后的远端组织损伤 (remote tissue injury)、心肺旁路手术过程中的补体激活、皮炎、天疱疮、狼疮肾炎及由此发生的肾小球肾炎和血管炎、心肺转流术、心脏停搏诱发的冠状内皮功能障碍、II 型膜性增生性肾小球肾炎、IgA 肾病、急性肾衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂综合征、年龄相关黄斑变性、葡萄膜炎、糖尿病性视网膜病变、同种移植、超急性排斥反应、血液透析、慢性阻塞性肺应激 (distress) 综合征 (COPD)、哮喘、和吸入性肺炎。在一个优选的实施方案中,“补体相关疾病”指如下的

疾病,其中补体旁路途径发挥突出的作用,包括类风湿性关节炎(RA)、补体相关眼状况诸如年龄相关黄斑变性、抗磷脂综合征、肠和肾缺血-再灌注损伤、和 II 型膜性增生性肾小球肾炎。

[0086] 术语“补体相关眼状况”在本文中以最广义使用,包括其病理学涉及补体,包括补体的经典和备选路径,特别是旁路的所有眼状况和疾病。此组明确包括其发生、形成、或发展可通过抑制旁路来控制的所有眼状况和疾病。补体相关眼状况包括但不限于黄斑变性病,诸如所有阶段的年龄相关黄斑变性(AMD),包括干性和湿性(非渗出性和渗出性)形式、脉络膜新血管形成(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病性和其它缺血相关视网膜病变、眼内炎、和其它眼内新血管疾病,诸如糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、冯希-林二氏(von Hippel-Lindau)病、眼的组织胞浆菌病、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、角膜新血管形成、和视网膜新血管形成。优选的一组补体相关眼状况包括年龄相关黄斑变性(AMD),包括非渗出性(湿性)和渗出性(干性或萎缩性)AMD、脉络膜新血管形成(CNV)、糖尿病性视网膜病变(DR)、和眼内炎。

[0087] 术语“炎性疾病”和“炎性病征”可互换使用,指其中哺乳动物免疫系统的成分引起、介导或以其它方式促成炎症应答(其促成该哺乳动物中发病)的疾病和病征。还包括其中炎症应答的降低对疾病的进展具有改善效果的疾病。此定义内包括免疫介导的炎性疾病,包括自身免疫性疾病。

[0088] 术语“T细胞介导的”疾病指其中T细胞直接或间接介导或以其它方式促成哺乳动物发病的疾病。T细胞介导的疾病可能与细胞介导的效应、淋巴因子介导的效应等有关,甚至与B细胞有关的效应,如果B细胞得到刺激的话,例如受到由T细胞分泌的淋巴因子的刺激。

[0089] 免疫相关和炎性疾病的例子,其中有些是T细胞介导的,包括但不限于炎性肠病(IBD)、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、幼年型慢性关节炎、脊椎关节病、系统性硬化(硬皮病)、特发性炎性肌病(皮肌炎、多肌炎)、斯耶格伦氏(Sjogren)综合征、系统性血管炎、结节病、自身免疫性溶血性贫血(免疫性全血细胞减少症、阵发性夜间血红蛋白尿)、自身免疫性血小板减少症(特发性血小板减少性紫癜、免疫介导的血小板减少症)、甲状腺炎(格雷夫斯氏(Graves)病、桥本氏(Hashimoto)甲状腺炎、幼年型淋巴细胞性甲状腺炎、萎缩性甲状腺炎)、糖尿病、免疫介导的肾病(肾小球肾炎、肾小管间质性肾炎)、中枢和周围神经系统的脱髓鞘病诸如多发性硬化、特发性多神经病、肝胆病诸如传染性肝炎(甲型、乙型、丙型、丁型、戊型和其它非嗜肝病毒肝炎)、自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肉芽肿性肝炎、和硬化性胆管炎、炎性和纤维化肺病(例如囊性纤维化病)、麸胶敏感性肠病、惠普尔氏(Whipple)病、自身免疫或免疫介导的皮肤病包括大疱性皮肤病、多形红斑和接触性皮炎、银屑病、肺的变应性疾病诸如嗜曙红细胞性肺炎、特发性肺纤维化和超敏感性肺炎、移植相关疾病包括移植物排斥、移植物抗宿主病、阿尔茨海默氏病、和动脉粥样硬化。

[0090] 与一种或多种其它治疗剂“联合”施用包括同时(共同)施用和任何次序的序贯施用。

[0091] “有活性的”或“活性”在本发明CRIg多肽的变体的语境中指此类多肽保留天然或天然存在本发明多肽的生物学和/或免疫学活性的形式。一种优选的生物学活性指结合

C3b 和 / 或影响补体或补体活化,特别是抑制旁路补体途径和 / 或 C3 转化酶的能力。对 C3 转化酶的抑制可通过例如测量对胶原或抗体诱导的关节炎期间正常血清中 C3 转化的抑制或对关节炎关节中 C3 沉积的抑制来测量。

[0092] “生物学活性”在模拟 CRIg 生物学活性的多肽的语境中部分地指此类分子结合 C3b 和 / 或影响补体或补体活化,特别是抑制旁路补体途径和 / 或 C3 转化酶的能力。

[0093] 术语 CRIg “激动剂”以最广义使用,包括模拟天然序列 CRIg 多肽的定性生物学活性(如上文所定义的)的任何分子。

[0094] “可操作连接”指并置,使得各成分的正常功能能实施。如此,与控制序列“可操作连接”的编码序列指一种配置,其中编码序列能在这些序列的控制下表达且其中相连接的 DNA 序列是毗邻的,而且在分泌前导的情况中是毗邻且处于可读状态的。例如,若前序列(presequence)或分泌前导(secretory leader)的 DNA 表达成参与多肽分泌的前蛋白质(preprotein),则它与该多肽的 DNA 可操作连接;若启动子或增强子影响编码序列的转录,则它与该序列可操作连接;或者,若核糖体结合位点的位置促进翻译,则它与编码序列可操作连接。连接可以通过在方便的限制性位点处的连接反应来实现。若没有此类位点,则依照常规实践使用合成的寡核苷酸接头或接头。

[0095] “控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的 DNA 序列。例如,适于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵基因序列、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号、和增强子。

[0096] “表达系统”指如下的 DNA 序列,其含有可操作连接的期望的编码序列和控制序列,使得用这些序列转化的宿主能够生成所编码的蛋白质。为了实现转化,表达系统可以包括在载体上;然而,然后可以将有关 DNA 整合入宿主染色体中。

[0097] 在用于本文时,“细胞”、“细胞系”、和“细胞培养物”可互换使用,而且所有这类名称都包括后代。如此,“转化子 / 转化体”或“转化细胞”包括原代受试细胞及由其衍生的培养物,不管转移的次数。还应理解,因为可发生有意的或无意的突变,所有后代可能在 DNA 内容上不是精确相同的。在最初转化细胞中筛选的具有相同功能性的突变后代包括在内。若想做出不同的命名,上下文会有清楚的表述。

[0098] “质粒”以居前的小写字母“p”和 / 或跟随的大写字母和 / 或数字指派。本文中的起始质粒是商品化的,是公众可不受限制获得的,或者能依照已发表的规程自此类可得质粒来构建。另外,其它等价的质粒是本领域已知的且对于普通技术人员是显而易见的。

[0099] “噬菌体展示文库”指作为与噬菌体外壳蛋白的融合物表达所克隆的蛋白质序列的集合的蛋白质表达文库。如此,短语“噬菌体展示文库”在本文中指噬菌体(例如丝状噬菌体)集合,其中噬菌体表达外部(通常是异源的)蛋白质。外部蛋白质不与噬菌体所接触的其它模块相互作用(结合)。每个展示外部蛋白质的噬菌体是噬菌体展示文库的一个成员。

[0100] 术语“丝状噬菌体”指能够在其表面上展示异源多肽的病毒颗粒,而且包括但不限于 f1、fd、Pf1、和 M13。丝状噬菌体可包含选择标志,诸如四环素(例如“fd-tet”)。多种丝状噬菌体展示系统对于本领域技术人员是众所周知的(参见例如 Zacher 等, Gene, 9 : 127-140(1980); Smith 等, Science, 228 : 1315-1317(1985); 及 Parmley 和 Smith, Gene, 73 : 305-318(1988))。

[0101] 术语“淘选”用于指鉴定和分离携带如下化合物（诸如抗体）的噬菌体的多轮筛选过程，所述化合物对靶物具有高亲和力和特异性。

[0102] 短语“保守的氨基酸残基”用于指在彼此比对的两种或更多种氨基酸序列之间相同的氨基酸残基。

[0103] II. 详细描述

[0104] 补体是先天性和适应性免疫应答的一种重要成分，但是经由三种补体途径（经典，旁路和凝集素）中每一项的活化生成的补体拆分产物能引起炎症和组织破坏。如此，已经将适宜补体调节缺失所致不受控制的变体活化与多种慢性炎症性疾病联系起来。此炎症级联中占控制权的是补体拆分产物 C3a 和 C5a，它们经 C3a 和 C5a 受体发挥嗜中性粒细胞和炎性巨噬细胞化学引诱物和活化物的功能 (Mollnes, T. E., W. C. Song 和 J. D. Lambris. 2002. Complement in inflammatory tissue damage and disease. Trends Immunol. 23 :61-64)。

[0105] CRIg 是最近发现的一种补体受体，其在驻留组织的一种巨噬细胞亚群上表达。作为功能性受体，CRIg 的细胞外 IgV 结构域是旁路补体途径的选择性抑制剂 (Wiesmann et al., Nature, 444(7116) :217-20, 2006)。通过抑制关节中的旁路补体途径，可溶性形式的 CRIg 在关节炎的实验模型中显示出逆转炎症和骨丢失。还显示了旁路补体途径不仅是疾病诱导所需要的，而且还是疾病进展所需要的。如此，通过 CRIg 来抑制旁路途径构成一种有希望的治疗途径，用于预防和治疗其发病机制涉及旁路补体途径的疾病和病症。进一步的细节参见例如 Helmy et al., Cell, 125(1) :29-32 (2006) 和 Katschke et al., J. Exp Med 204(6) :1319-1325 (2007)。

[0106] 然而，CRIg 对转化酶亚基 C3b 的亲和力较低（微摩尔范围）。为了生成更有力的抑制剂来开发治疗性试剂，使用与 C3b 复合的 CRIg 的晶体结构作为指导，而且我们采用噬菌体展示技术来生成具有改进的对 C3b 的结合亲和力的 CRIg 变体。

[0107] 如此，本发明关注具有改进的特性，诸如改进的对 C3b 的结合亲和力和增强的抑制功效的 CRIg 变体。

[0108] 亲和力成熟的 CRIg 变体的鉴定

[0109] 如实施例 1 中极为详细描述，蛋白质或肽文库的噬菌体展示为选择具有改进的对 C3b 的结合亲和力和 / 或其它改进的特性（诸如增强的生物学活性）的 CRIg 变体提供了一种有用的工具 (Smith, G P., (1991) Curr. Opin. Biotechnol. 2 :668-673)。作为与 M13 基因 III 外壳蛋白的融合物以单价形式展示的高亲和力蛋白质 (Clackson, T., (1994) et al., Trends Biotechnol. 12 :173-183) 可通过多轮结合选择后噬菌体颗粒中包装的相应 DNA 的克隆和测序来鉴定。

[0110] 使用噬菌体展示进行的亲和力成熟已有记载，例如 Lowman et al., Biochemistry 30(45) :10832-10838 (1991)，还可参见 Hawkins et al., J. Mol Biol. 254 :889-896 (1992)，及下文实施例。不严格限于下列描述，这种工艺可简单描述如下：突变预定区域内的数个位点以生成每个位点处所有可能的氨基酸替代。作为与每个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合物以单价形式自丝状噬菌体颗粒展示如此生成的抗体突变体。表达各种突变体的噬菌体可循环经历多轮结合选择，接着对那些展示高亲和力的突变体进行分离和测序。所述方法还记载于 1998 年 5 月 12 日公告的美国专利 No. 5, 750, 373。

[0111] 一种涉及合并亲和力展示的改良规程记载于 Cunningham, B. C. et al, EMBO

J. 13(11), 2508-2515(1994)。所述方法提供了一种用于选择新结合多肽的方法,包括:a) 构建如下的可复制表达载体,其包含编码多肽的第一基因,编码天然或野生型噬菌体外壳蛋白至少一部分的第二基因(其中第一和第二基因是异源的)和与第一和第二基因可操作连接的转录调节元件,由此形成编码融合蛋白的基因融合物;b) 在第一基因内的一个或多个选定位置处突变载体,由此形成一族相关质粒;c) 用质粒转化合适的宿主细胞;d) 用具有编码噬菌体外壳蛋白的基因的辅助噬菌体感染经过转化的宿主细胞;e) 在适合于形成重组噬菌粒颗粒(其含有噬菌粒的至少一部分且能够转化宿主)的条件下培养经过转化,经过感染的宿主细胞,调整条件,使得不超过极小量的噬菌粒颗粒在颗粒表面上展示超过一个拷贝的融合蛋白;f) 使噬菌粒颗粒与靶分子接触,使得噬菌粒颗粒的至少一部分结合靶分子;并g) 将结合的噬菌粒颗粒与不结合的噬菌粒颗粒分开。优选的是,所述方法进一步包括用结合靶分子的重组噬菌粒颗粒转化合适的宿主细胞并重复步骤d)至g)一次或多次。

[0112] 注意,虽然本发明的CRIg变体是使用噬菌体展示鉴定的,但是其它技术和其它展示技术也可用于鉴定具有改进的特性的CRIg变体,包括亲和力成熟的CRIg变体。

[0113] 本发明的亲和力成熟的CRIg变体设计成覆盖CRIg与C3b之间的接触面,这使用美国申请公开号20080045697中披露的CRIg和C3b:CRIg复合物的晶体结构来鉴定。具体而言,如表1所示,文库1-5设计成分别覆盖SEQ ID NO:2之天然序列全长CRIg分子的残基E8-K15, R41-T47, S54-Q64, E85-Q99和Q105-K111。

[0114] 在一个实施方案中,本文中的CRIg变体在选自下组的一个或多个氨基酸位置处含有氨基酸替代:SEQ ID NO:2之氨基酸序列的位置8, 14, 18, 42, 44, 45, 60, 64, 86, 99, 105和110。

[0115] 表3中列出了本文中代表性的CRIg变体。

[0116] 优选的是,替代是在SEQ ID NO:2之全长天然CRIg的氨基酸序列的氨基酸位置60, 64, 86, 99, 105和110中的一或多个位置处。

[0117] 不是限制,亲和力成熟的CRIg变体具体包括SEQ ID NO:2内的一处或多处下列替代:E8W, W14F, E84Y/W14F;P45F;G42D/D44H/P45F;Q60I;Q64R;Q60I/Q64R;M86Y;M86W, M86F, M86W/Q99R;M86F/Q99R;K110D, K11N;Q105R/K110N;Q105R/K110Q;Q105K/K110D。

[0118] 表3中显示了SEQ ID NO:2之天然序列CRIg具有两处或更多处氨基酸替代的其它变体。这组内具体包括Q64R/M86Y;Q60I/Q64R/E8Y;Q60I/Q64R/G42D;Q60I/Q64R/P45F;Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F;Q60I/Q64R/M86Y;Q60I/Q64R/Q105R;Q60I/Q64R/Q105K;Q60I/Q64R/K110N;Q60I/Q105R/K110N;M86Y/E8Y;M86Y/G42D/D44H/P45F;M86Y/P45F;M86Y/G42D/D44H/P45F;M86Y/Q99K/M86Y/Q99R/M86Y/Q105R/M86Y/Q105K/M86Y/Q105R/K110N。

[0119] 本文中优选的CRIg变体包含选自下组的突变:Q60I;Q64R;Q60I/Q64R;M86Y;Q99L;Q105K/K110D;E8W/Q105R/K110N;Q64R/M86Y;Q60I/Q64R/E8Y;Q60I/Q64R/G42D;Q60I/Q64R/P45F;Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F;Q60I/Q64R/M86Y;Q60I/Q64R/Q105R;Q60I/Q64R/Q105K;Q60I/Q64R/K110N;M86Y/P45F;M86Y/Q105K。

[0120] 特别优选的变体包含突变Q60I/Q64R/M86Y或Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F。

[0121] 本文中具体包括含有上文或表3和表4中所列一处或多处突变但其它方面保留

SEQ ID NO :2 之天然 CRIg 序列的变体。此类变体在本文中会通过“CRIg”前面列出具体突变来命名。如此,例如只因突变 E8W 而与 SEQ ID NO :2 之天然序列 CRIg 不同的变体会命名为“E8W CRIg”,只因突变 Q60I/Q64R/M86Y 而与 SEQ ID NO :2 之天然序列 CRIg 不同的变体会命名为“Q60I/Q64R/M86Y CRIg”,等。

[0122] CRIg 变体的制备

[0123] 有多种技术可被采用来生成能编码蛋白质的 DNA,用于重组合成本发明的 CRIg 变体。例如,有可能基于天然存在 DNA 序列来衍生编码所得蛋白质氨基酸序列中变化的 DNA。这些突变的 DNA 可用于获得本发明的 CRIg 变体。简言之,这些技术涵盖获得编码天然 CRIg 多肽的基因,通过重组技术(诸如下文讨论的那些)修改基因,将基因插入适宜的表达载体,将载体插入适宜的宿主细胞,培养宿主细胞以引起期望 CRIg 变体表达,及纯化由此生成的分子。

[0124] 略微更具体的说,通过 DNA 序列的合成构建获得编码本发明 CRIg 变体的 DNA 序列,如标准教科书中所记载的,诸如例如 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning* (第 2 版), Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., (1989)。

[0125] a. 寡核苷酸介导的诱变

[0126] 寡核苷酸介导的诱变是用于制备天然 CRIg 多肽或其片段之替代,删除和插入变体的优选方法。这种技术是本领域公知的,记载于 Zoller et al., *Nucleic Acids Res.* 10 : 6487-6504 (1987)。简言之,编码起始多肽序列的核酸通过将编码期望突变的寡核苷酸与 DNA 模板杂交来改变,其中模板是含有未改变的或天然的编码核酸 DNA 序列的质粒的单链形式。杂交后,使用 DNA 聚合酶来合成完整的第二条模板互补链,这会如此掺入寡核苷酸引物,而且会编码起始核酸的选定改变。

[0127] 通常,使用长度为至少 25 个核苷酸的寡核苷酸。最佳的寡核苷酸会在编码突变的核苷酸的任一侧具有 12 至 15 个与模板完全互补的核苷酸。这确保寡核苷酸会与单链 DNA 模板分子正确杂交。寡核苷酸易于使用本领域已知技术来合成,诸如记载于 Crca et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 :5765 (1978)。

[0128] 如果使用噬菌体展示,只能用自噬菌体 M13 载体(普遍可得的 M13mp18 和 M13mp19 载体是合适的),或含有单链噬菌体复制起点的那些载体(Viera et al., *Meth. Enzymol.* 153 :3 (1987)) 衍生的那些载体来生成 DNA 模板。如此,必须将要突变的 DNA 插入这些载体之一以生成单链模板。单链模板的生成记载于 Sambrook et al., 见上文的 4.21-4.41 节。

[0129] 为了改变天然 DNA 序列,在合适的杂交条件下将寡核苷酸与单链模板杂交。然后添加 DNA 聚合酶(通常是 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段)来合成模板的互补链,使用寡核苷酸作为合成的引物。如此形成异源双链体分子,使得 DNA 的一条链编码突变型 CRIg,而另一条链(原始链)编码天然的,未改变的 CRIg 序列。然后将此异源双链体分子转化入合适的宿主细胞,通常是原核生物,诸如大肠杆菌 JM-101。培养细胞后,将它们涂布在琼脂糖板上并筛选,即使用用 ³² 磷酸根放射性标记的寡核苷酸引物来鉴定含有突变 DNA 的细菌菌落。

[0130] 可以改良上文刚刚描述的方法,使得创建同源双链体分子,其中质粒的两条链都含有突变。改良如下:与上文所述将单链寡核苷酸单链模板退火。将三种脱氧核糖核苷酸即脱氧核糖腺苷(dATP),脱氧核糖尿苷(dGTP)和脱氧核糖胸苷(dTTP)的混合物与称作

dCTP-(aS) 的改良硫代-脱氧核糖胞嘧啶 (Amersham) 组合。将此混合物添加至模板-寡核苷酸复合物。将 DNA 聚合酶添加至此混合物后,生成除了突变的碱基之外与模板相同的一条 DNA 链。另外,这条新的 DNA 链会含有 dCTP-(aS) 来代替 dCTP,这有助于保护它免于限制性内切核酸酶消化。用适宜的限制酶在双链异源双链体的模板链中生成缺刻后,可以用 ExoIII 核酸酶或其它适宜的核酸酶消化模板链经过含有要诱变的位点的区域。然后终止反应以留下仅部分为单链的分子。然后在所有四种脱氧核糖核苷酸三磷酸,ATP 和 DNA 连接酶存在下使用 DNA 聚合酶形成完整的双链 DNA 同源双链体。然后可如上所述将此同源双链体分子转化入合适的宿主细胞,诸如大肠杆菌 JM101。

[0131] 有超过一个氨基酸要替代的突变体可以以数种方式之一来生成。如果所述氨基酸在多肽链中位置靠近在一起,那么可以使用编码所有期望氨基酸替代的一条寡核苷酸同时突变它们。然而,如果所述氨基酸彼此的位置有些距离(相隔超过约 10 个氨基酸),那么生成编码所有期望变化的单一寡核苷酸是更加可能的。改为可采用一种或两种备选方法。

[0132] 在第一种方法中,为每一个要替代的氨基酸生成单独的寡核苷酸。然后同时将寡核苷酸与单链 DNA 退火,而且自模板合成的第二条 DNA 链会编码所有期望氨基酸替代。备选方法涉及两轮或更多轮诱变以生成期望的突变体。第一轮如关于单突变所描述的:使用野生型 DNA 作为模板,并将编码第一处期望氨基酸替代的寡核苷酸与此模板退火,然后生成异源双链体 DNA 分子。第二轮诱变利用第一轮诱变中生成的突变 DNA 产物作为模板。如此,此模板早就含有一处或多处突变。然后将编码别的期望氨基酸替代的寡核苷酸与此模板退火,现在所得 DNA 链编码来自第一轮和第二轮二者诱变的突变。此所得 DNA 可在第三轮诱变中用作模板,以此类推。

[0133] b. 盒式诱变

[0134] 这种方法也是一种用于制备 CRIg 替代,删除和插入变体的优选方法。该方法基于 Wells et al. Gene 34 :315(1985) 所述。起始材料是包含基因 1(即要突变的基因)的质粒(或其它载体)。鉴定编码起始 CRIg 分子的核酸中要突变的密码子。所鉴定的突变位点的每一侧上必须有唯一的限制性内切核酸酶位点。如果没有此类限制性位点存在,那么可以生成它们,即使用上文描述的寡核苷酸介导的诱变方法在基因 1 中适宜位置处引入它们。将限制性位点引入质粒后,在这些位点处切割质粒以使之线性化。使用标准规程合成编码限制性位点之间 DNA 序列但含有期望突变的双链寡核苷酸。分开合成两条链,然后使用标准技术杂交在一起。此双链寡核苷酸称作盒。此盒设计成具有与线性化质粒的末端相容的 3' 和 5' 末端,使得它能与质粒直接连接。此质粒现在含有突变的 CRIg DNA 序列。

[0135] c. CRIg 变体的重组生产

[0136] 然后将编码变体的 DNA 插入适宜的质粒或载体。使用载体来转化宿主细胞。一般而言,含有自与宿主细胞相容的物种衍生的复制和控制序列的质粒载体与那些宿主联合使用。载体通常携带复制位点,以及编码能够在转化细胞中提供表型选择的蛋白质的序列。

[0137] 例如,可以使用 pBR322,一种自大肠杆菌物种衍生的质粒(Mandel, M. et al., (1970) J. Mol. Biol. 53 :154) 来转化大肠杆菌。质粒 pBR322 含有氨苄青霉素和四环素抗性的基因,并因此提供容易的选择手段。其它载体包括不同特征,诸如不同启动子,它们在表达中常常是重要的。例如,质粒 pKK223-3, pDR720 和 pPL- λ 代表当前可得的具有 tac, trp, 或 P_L 启动子的表达载体(Pharmacia Biotechnology)。

[0138] 其它优选的载体可使用标准技术通过组合本文所述载体的有关特性来构建。载体的有关特性包括启动子,核糖体结合位点,变体基因或基因融合物,信号序列,抗生素抗性标志物,拷贝数和适宜的复制起点。

[0139] 适于克隆或表达本文载体中的 DNA 的宿主细胞包括原核生物、酵母或高等真核细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌,诸如革兰氏阴性生物体或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科,诸如埃希氏菌属 (*Escherichia*) 例如大肠埃希氏菌或大肠杆菌 (*E. coli*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形菌属 (*Proteus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 例如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 例如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*)、和志贺氏菌属 (*Shigella*)、以及芽孢杆菌属 (*Bacilli*) 诸如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) (例如 1989 年 4 月 12 日公布的 DD 266,710 中披露的地衣芽孢杆菌 41P)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 诸如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、和链霉菌属 (*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294 (ATCC 31,446),尽管其它菌株诸如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌 W3110 (ATCC27,325) 也是合适的。这些例子是例示性的,而不是限制性的。

[0140] 在原核生物以外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。酿酒糖酵母或酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或常用的面包酵母是最常用的低等真核宿主微生物。然而,通常可获得许多其它属、种和菌株且可用于本发明,诸如粟酒裂殖糖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主,诸如例如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、*K. waltii* (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*);亚罗酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070);假丝酵母属 (*Candida*);瑞氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234);粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*);许旺酵母属 (*Schwanniomyces*),诸如西方许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*) 和丝状真菌,诸如例如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolyocladium*)、和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主诸如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。

[0141] 适于表达糖基化抗体的宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的允许昆虫宿主细胞,它们来自诸如草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 等宿主。公众可获得多种病毒株用于转染,例如苜蓿尺蠖 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕 (*Bombyx mori*) NPV 的 Bm-5 株,而且此类病毒可依照本发明用作本文中的病毒,特别是用于转染草地夜蛾细胞。还可利用棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄和烟草的植物细胞培养物作为宿主。

[0142] 然而,脊椎动物细胞得到最多关注,而且培养(组织培养)中脊椎动物细胞的繁殖已经成为常规流程。有用哺乳动物宿主细胞系的例子是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系

(COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾系 (293 或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的 293 细胞, Graham 等, *J. Gen. Virol.*, 36 :59(1977)); 幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10); 中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR(CHO, Urlaub 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 :4216(1980)); 小鼠塞托利 (sertoli) 细胞 (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23 :243-251(1980)); 猴肾细胞 (CV1, ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34); 牛鼠 (buffalo rat) 肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB8065); 小鼠乳瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 细胞 (Mather 等, *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 383 :44-68(1982)); MRC5 细胞; FS4 细胞和人肝癌系 (Hep G2)。

[0143] 用上文所述用于生产本文中 CRIg 变体的表达或克隆载体转化宿主细胞, 并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当更改的常规营养培养基中进行培养。

[0144] 可以在多种培养基中培养用于生产本发明 CRIg 变体的宿主细胞。商品化培养基诸如 Ham 氏 F10 (Sigma)、极限必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、和 Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基 (DMEM, Sigma) 适于培养宿主细胞。另外, 可以使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基: Ham 等, *Meth. Enz.* 58 :44(1979); Barnes 等, *Anal. Biochem.* 102 :255(1980); 美国专利 No. 4, 767, 704 ;4, 657, 866 ;4, 927, 762 ;4, 560, 655 ;或 5, 122, 469 ;WO90/03430 ;WO 87/00195 ;或再版美国专利 30, 985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和 / 或其它生长因子 (诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐 (诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂 (诸如 HEPES)、核苷酸 (诸如腺苷和胸苷)、抗生素 (诸如 GENTAMYCIN™)、痕量元素 (定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以以本领域技术人员知道的适宜浓度包含任何其它必需补充物。培养条件, 诸如温度、pH 等, 就是先前为表达而选择用于宿主细胞的, 这对于普通技术人员而言是显而易见的。

[0145] 在使用重组技术时, 可以在细胞内、在周质空间中生成 CRIg 变体, 或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成 CRIg 变体, 那么作为第一步, 通过例如离心或超滤除去宿主细胞或裂解细胞的微粒碎片。如果将 CRIg 变体分泌到培养基中, 那么通常首先使用商品化蛋白质浓缩滤器, 例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元浓缩来自此类表达系统的上清液。在任何上述步骤中, 可以包括蛋白酶抑制剂诸如 PMSF 来抑制蛋白水解, 而且可以包括抗生素来防止外来污染物的生长。

[0146] 可以通过已知技术使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和 / 或亲和层析来纯化由细胞制备的 CRIg 变体, 优选的纯化技术是亲和层析。

[0147] CRIg 变体的其它修饰

[0148] 本发明的 CRIg 变体还可以以如下的方式修饰, 以形成包含融合至另一异源多肽或氨基酸序列的 CRIg 变体 (包括其片段) 的嵌合分子。在一个实施方案中, 此类嵌合分子包括带有标签多肽的 CRIg 变体或其片段的融合物, 所述标签多肽提供了抗标签抗体可选择性结合的表位。表位标签通常位于变体 CRIg 多肽的氨基或羧基末端。此类表位标记形式的 CRIg 变体的存在可使用针对所述标签多肽的抗体来检测。而且, 表位标签的提供使 CRIg 多肽易于使用抗标签抗体或另一类结合所述表位标签的亲和基质通过亲和纯化来

纯化。多种标签多肽及其各自抗体是本领域公知的。例子包括多组氨酸 (poly-his) 或多-组氨酸-甘氨酸 (poly-his-gly) 标签;流感 HA 标签多肽及其抗体 12CA5[Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165(1988)];c-myc 标签及其抗体 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 和 9E10 抗体 (Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616(1985));及单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD) 标签及其抗体 (Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553(1990))。其它标签多肽包括 Flag 肽 (Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210(1988));KT3 表位肽 (Martin et al., Science, 255:192-194(1992));quadrature-微管蛋白表位肽 [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166(1991)];及 T7 基因 10 蛋白肽标签 (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397(1990))。

[0149] 在另一个实施方案中,嵌合分子可包括 CRIg 变体或其片段与免疫球蛋白或免疫球蛋白特定区的融合物。对于二价形式的嵌合分子,此类融合可以是对 IgG 分子的 Fc 区。这些融合多肽是将异源蛋白质(“粘附素”)的结合特异性与免疫球蛋白恒定域的效应器功能联合起来的抗体样分子,而且常常称作免疫粘附素。在结构上,免疫粘附素包括不同于抗体的抗原识别和结合位点(即是“异源”的),具有期望结合特异性的氨基酸序列和免疫球蛋白恒定域序列的融合物。免疫粘附素分子的粘附素分子通常是至少包含受体或配体之结合位点的连续氨基酸序列。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定域序列可以从任何免疫球蛋白获得,诸如 IgG-1, IgG-2, IgG-3, 或 IgG-4 亚型, IgA(包括 IgA-1 和 IgA-2), IgE, IgD 或 IgM。

[0150] 最简单且最直接的免疫粘附素设计将“粘附素”蛋白质的结合区与免疫球蛋白重链的铰链和 Fc 区组合在一起。通常,在制备本发明的 CRIg-免疫球蛋白嵌合物时,将编码 CRIg 细胞外结构域的核酸融合在编码免疫球蛋白恒定域序列 N-末端的核酸的 C-末端,然而 N-末端融合也是可能的。

[0151] 通常,在此类融合物中,所编码的嵌合多肽将至少保留有功能活性的免疫球蛋白重链恒定区铰链和 CH2 和 CH3 结构域。还可以对恒定域 Fc 部分的 C-末端进行融合,或者紧挨着重链 CH1 或轻链对应区的 N-末端进行。

[0152] 进行融合的精确定点不是至关重要的;具体位点是众所周知的,而且可以进行选择以优化 CRIg-免疫球蛋白嵌合物的生物学活性,分泌或结合特征。

[0153] 在一些实施方案中,将 CRIg-免疫球蛋白嵌合物装配成单体,或异多聚体或同多聚体,特别是二聚体或四聚体,基本上如 WO 91/08298 中所例示的。

[0154] 在一个优选的实施方案中,将 CRIg 细胞外结构域序列融合至含有免疫球蛋白(例如免疫球蛋白 G. sub. 1(IgG 1))效应器功能的抗体 C 端部分(特别是 Fc 域)的 N-末端。有可能将整个重链恒定区融合至 CRIg 细胞外结构域序列。然而,更优选的是,在融合中使用在铰链区中正好在木瓜蛋白酶切割位点(其在化学上限定 IgG Fc;残基 216,以重链恒定区的第一个残基或其它免疫球蛋白的类似位点为 114)上游起始的序列。在一个特别优选的实施方案中,将 CRIg 氨基酸序列融合至 IgG1, IgG2, 或 IgG3 重链的铰链区和 CH2 和 CH3 或与 CH1, 铰链, CH2 和 CH3 结构域。进行融合的精确定点不是至关重要的,而且可以通过例行实验来确定最佳位点。

[0155] 在一些实施方案中,将 CRIg-免疫球蛋白嵌合物装配成多聚体,特别是同二聚体

或同四聚体。一般而言,这些装配好的免疫球蛋白将具有已知的单元结构。基本的四链结构单元就是 IgG, IgD 和 IgE 存在的形式。四链单元在更高分子量的免疫球蛋白中重复; IgM 一般作为通过二硫键保持在一起的基本四链单元的五聚体存在。IgA 球蛋白及偶尔的 IgG 球蛋白也可以以多聚体的形式存在于血清中。在多聚体的情况中,各个四链单元可以是相同的或不同的。

[0156] 或者,可以将 CRIg 细胞外结构域序列插入免疫球蛋白重链与轻链序列之间,从而得到包含嵌合重链的免疫球蛋白。在该实施方案中,将 CRIg 序列融合在免疫球蛋白每个臂中的免疫球蛋白重链的 3' 端,或是在铰链与 CH2 结构域之间,或是在 CH2 与 CH3 结构域之间。类似的构建物已报道于 Hoogenboom et al., Mol. Immunol., 28:1027-1037 (1991)。

[0157] 尽管本发明的免疫粘附素中不需要存在免疫球蛋白轻链,然而可以存在免疫球蛋白轻链,或是与 CRIg- 免疫球蛋白重链融合多肽共价结合,或是直接与 CRIg 细胞外结构域融合。在前一种情况中,通常将编码免疫球蛋白轻链的 DNA 与编码 CRIg- 免疫球蛋白重链融合蛋白的 DNA 共表达。在分泌后,杂合重链与轻链将共价结合以提供包含两对二硫键相连的免疫球蛋白重链-轻链的免疫球蛋白样结构。适于制备此类结构的方法披露于例如 1989 年 3 月 28 日公告的美国专利 No. 4, 816, 567。

[0158] 药物组合物

[0159] 可施用本发明的 CRIg 变体来治疗其病理涉及旁路补体途径的疾病。

[0160] 以冻干剂型或水溶液的形式,通过将具有期望纯度的活性分子与任选的药学可接受载体、赋形剂或稳定剂(《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第 16 版, Osol, A. 编, 1980) 混合来制备治疗用配制剂,供贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,而且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇和间甲酚);低分子量(少于约 10 个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如 EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐相反离子,诸如钠;金属复合物(例如 Zn-蛋白质复合物)和/或非离子表面活性剂,诸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇(PEG)。

[0161] 还可以用脂转染或脂质体将多肽、抗体、或抗体片段投递到细胞中。在使用抗体片段时,优选特异性结合靶蛋白质的结合结构域的最小片段。例如,根据抗体的可变区序列,可以设计保留与靶蛋白质序列结合能力的肽分子。此类肽可以化学合成和/或通过重组 DNA 技术生成(参见例如 Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993])。

[0162] 本文中的配制剂还可含有超过一种所治疗具体适应症所必需的活性化合物,优选活性互补且彼此没有不利影响的那些。合适的是,此类分子以对于预定目的有效的量组合存在。

[0163] 活性分子还可包载入例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶状药物投递系统(例

如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或粗滴乳状液。此类技术披露于例如《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第16版,Osol, A. 编,1980。

[0164] 用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0165] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质,该基质以定型产品的形式存在,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利 No. 3, 773, 919)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子100天以上,但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当胶囊化抗体在体内长时间维持时,它们可能由于暴露于37°C的潮湿环境而变性或聚集,导致生物学活性损失和免疫原性可能改变。可根据相关机制来设计合理的稳定化策略。例如,如果发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换而形成分子间S-S键,那么可通过修饰巯基、由酸性溶液冻干、控制湿度、采用适宜添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0166] 治疗方法

[0167] 作为它们抑制补体活化,特别是旁路补体途径的能力的结果,本发明的CRIg变体在补体相关疾病和病理状况的预防和/或治疗中找到应用。此类疾病和状况包括但不限于补体相关的,炎性的和自身免疫的疾病。

[0168] 早先已经列出了本文中的CRIg变体所能针对的补体相关的,炎性的和免疫相关的疾病和病症的具体例子。

[0169] 以下非限制性实施例例示了本发明的更多详情。

[0170] 实施例1:亲和力成熟的CRIg变体的制备

[0171] 材料和方法

[0172] 材料:

[0173] 材料-酶和M13-K07辅助噬菌体(New England Biolabs);Maxisorp免疫板(Nunc. Roskilde, Denmark);96孔U底聚丙烯板(COSTAR;产品目录#3365);96孔平底,非结合板(NUNC;产品目录#269620);辣根过氧化物酶/抗M13抗体偶联物(Pharmacia);3,3',5,5'-四甲基-联苯胺,H₂O₂过氧化物酶底物(TEB)(Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc);大肠杆菌XL1-blue和大肠杆菌BL21(DE3)(Stratagene);牛血清清蛋白(BSA)和Tween 20(Sigma);Ni-NTA琼脂糖(Qiagen);家兔RBC(Colorado Serum Company;产品目录#CS1081);明胶Veronal缓冲液(GVB)[100mL Veronal缓冲液(BioWhittaker;产品目录#12-624E);明胶(牛皮肤B型;SIGMA;产品目录#G9391-100G);C1q消滅的血清(CompTech;产品目录#A300);fH蛋白(Complement Technology;产品目录#A137);抗FLAG-HRP, mAb,在50%甘油中, Sigma 产品目录#A-85921. 1mg/mL

[0174] 噬菌体展示CRIg文库的构建

[0175] 将编码CRIg的DNA片段连接入经XhoI和SpeI消化的噬菌粒载体(p3Dv1zPDZ-gD)(Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382(1987)),作为野生型对照和设计CRIg变体的模板。然后,自CJ239大肠杆菌细胞(Kunkel et al., 1987, 见上文)制备在每个靶定

残基处具有 TAA 终止密码子的模板,供随机化用。使用一种软随机化策略来进行 CRIg 变体选择,其中通过使用定位寡核苷酸策略用偏向野生型核苷酸的 70-10-10-10 碱基混合物在选定位置处引入大约 50%的突变率。在文库设计中:5 = 50% A, 10% G, 10% C 和 10% T;6 = 50% G, 10% A, 10% C 和 10% T;7 = 50% C, 10% A, 10% G 和 10% T;8 = 50% T, 10% A, 10% G 和 10% C。

[0176] 设计了 5 个文库。

[0177] 文库 1 中的 BCR1, ATC CTG GAA GTG CAA 656 (SEQ ID NO :7) AGTGTA ACA GGA CCT 866 (SEQ ID NO :8) 555 GGG GAT GTG AAT CTT (SEQ ID NO :9) ;

[0178] 文库 2 中的 BCR2, AAG TGG CTG GTA CAA 768 (SEQ ID NO :10) 668TCA 657 775 688 577 ATC TTT (SEQ ID NO :11) 786 CGT 657 TCT TCT GGAGAC CAT (SEQ ID NO :12) ;

[0179] 文库 3 中的 BCR3, TTT CTA CGT GAC TCT (SEQ ID NO :13) 877 668 657757 588 756 756 678 555 TAC 756 GGC CGC CTG CAT GTVG (SEQ ID NO :14) ;

[0180] 文库 4 中的 BCR4, CAA TTG AGC ACC CTG (SEQ ID NO :15) 656 586657 GAC 768 AGC CAC TAC ACG TGT 656 (SEQ ID NO :16) GTC ACC TGG756 (SEQ ID NO :17) ACT CCT GAT GGC AAC (SEQ ID NO :18) ;

[0181] 文库 5 中的 BCR5, ACT CCT GAT GGC AAC 756 (SEQ ID NO :19) GTC688 768 657 555 ATT ACT GAG CTC CGT (SEQ ID NO :20)。

[0182] 通过使用适宜密码子来引入相应突变,如上所述进行定点诱变以进行点突变,并通过序列来确认正确的克隆。

[0183] 文库分选和筛选以选择 CRIg 变体:

[0184] 将 Maxisorp 免疫板用 C3b (5 μ g/ml) 于 4°C 包被过夜并用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 和 0.05% (w/v) 牛血清清蛋白 (BSA) 于室温封闭 1 小时。将噬菌体文库添加至 C3b 包被的板并于室温温育 3 小时。将板清洗 10 次并用 50mM HCl 洗脱结合的噬菌体并用等体积的 1.0M Tris 碱 (pH7.5) 中和。通过经大肠杆菌 XL1-blue 传代来扩增回收的噬菌体并用于别的结合选择轮次。5 轮后,我们自每个文库选出 12 个克隆并以 96 孔形式在 500 μ l 补充有羧苄青霉素和 M13-K07 辅助噬菌体的 2YT 肉汤中培养它们。按照设计的位置在经 C3b、抗 gD、BSA 和无关蛋白质包被的 384 孔板中直接添加 2 倍连续稀释的培养物上清液。测量结合亲和力以评估给出的噬菌体浓度,比抗 gD 显著更高地结合 C3b 但不结合 BSA 和无关蛋白质。我们将噬菌体浓度固定,以相同的形式自每个文库筛选出约 200 个克隆,并自每个文库选出 24-48 个显示出显著结合 C3b 胜过抗 gD 的克隆,然后对它们测序以进行分析。

[0185] 竞争性噬菌体 ELISA

[0186] 为了评估结合亲和力,使用一种改良的噬菌体 ELISA。将 96 孔微量滴定板用含 2 μ g/ml C3b 的 50mM 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 于 4°C 包被过夜。然后将板用 PBS, 0.5% BSA 于室温封闭 1 小时。将展示 CRIg 变体的噬菌体在 PBT 缓冲液中连续稀释,并测量结合以评估给出饱和时的信号 50% 的噬菌体浓度。固定亚饱和浓度的噬菌体并与 C3b 的连续稀释液一起预温育 2 小时,然后将混合物转移至经 C3b 包被的测定板。温育 15 分钟后,将板用 PBS, 0.05% Tween 20 清洗,并与辣根过氧化物酶 / 抗 M13 抗体偶联物 (在 PBT 缓冲液中 1 : 5000 稀释) 一起温育 30 分钟。将板清洗,用 TMB 底物显色,用 1.0M H₃PO₄ 淬灭,并于 450nm 处以分光光度法读数。作为导致噬菌体结合半最大值的竞争 C3b 的浓度来计算亲和

力 (Ic50)。

[0187] 蛋白质纯化

[0188] 将包含表达质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3) 的单菌落接种入 30mL 补充有 50 μ g/mL 羧苄青霉素的 LB 培养基 (LB/carb 培养基) 并于 37°C 培养过夜。收获细菌, 清洗, 重悬浮, 并接种入 500mL LB/carb 培养基。将培养物于 37°C 培养至对数生长中期 ($A_{600} = 0.8$)。用 0.4mM 异丙基 1-硫--D-吡喃半乳糖甘来诱导蛋白质表达, 并将培养物于 30°C 培养 24 小时。通过以 4000g 离心 15 分钟来沉淀细菌, 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 清洗 2 次, 并于 -80°C 冷冻 8 小时。将沉淀物重悬浮于 50mL PBS, 并通过穿过微流化仪加工或声处理设备来溶解细胞。用 2mL NI-NTA 琼脂糖和凝胶过滤来纯化 CRIg 变体蛋白。

[0189] mutCRIg-huFc 液相竞争性结合 ELISA :

[0190] 将 huCRIg(L)-LFH 在 PBS, pH 7.4 中稀释至 2 μ g/mL, 并通过于 4°C 温育过夜 (16-18 小时) (25 μ l/孔) 来包被到 Maxisorp 384 孔平板 (Nunc, Neptune, NJ) 上。将板在清洗缓冲液 (PBS, pH7.4, 0.05% Tween 20) 中清洗 3 次, 并将 50 μ l/孔封闭缓冲液 (PBS, pH 7.4, 0.5% BSA) 添加至每个孔。让板封闭 1-3 小时; 这次和所有后续温育在定轨摇床上于室温实施。在封闭步骤期间, 将 C3b (在 Genentech 纯化) 在测定缓冲液 (PBS pH7.4, 0.5% BSA, 0.05% Tween-20) 中稀释至 20nM, 并将 mutCRIg-huFc 分子在测定缓冲液中连续稀释, 浓度范围为 20,000-0.34nM。然后将 C3b 与 mutCRIg-huFc 分子 1 : 1 混合并容许预温育 0.5-1 小时。将经过封闭的板清洗 3 次 (如上所述), 并将 C3b:mutCRIg-huFc 复合物添加至反应板 (25 μ l/孔)。温育 1-2 小时后, 将 ELISA 板清洗 3 次 (如上所述), 并通过添加抗人 C3b 抗体 (克隆 5F202, US Biological, Swampscott, MA ;600ng/mL, 25 μ l/孔) 来检测板结合的 C3b。将板温育 1-2 小时并清洗 (如上所述)。然后添加 (25 μ l/孔) 1 : 2,000 稀释的 HRP 偶联的抗鼠 Fc IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), 并将板温育 1-2 小时。最后一次清洗后, 将 25 μ l/孔 TMB 底物 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) 添加至 ELISA 板。大约 8 分钟后通过添加 25 μ l/孔 1.0M 磷酸来终止显色。使用 SpectraMax 250 微量滴定板阅读仪 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 测定 450nm 和 650nm 处的吸光度。

[0191] 补体活化测定法 :

[0192] 使用 WieslabTM 补体系统旁路途径试剂盒 (Alpco Diagnostics, Salem, NH) 来评估 mutCRIg-Fc 抑制补体活化的能力。以想要的终浓度 2 倍制备连续稀释的 mutCRIg-Fc (400 至 0.2nM) 和 C1q 缺陷的人血清 (5%) (Complement Technology, Tylcr, TX), 1 : 1 混合, 并在定轨摇床上以 300RPM 预温育 5 分钟, 之后添加至经 LPS 包被的 ELISA 板 (100 μ l/孔)。测定的其余部分遵循制造商的指令。简言之, 将 ELISA 板中的样品于 37°C 温育 60-70 分钟, 然后在清洗缓冲液 (PBS, pH7.4, 0.05% Tween 20) 中清洗 3 次。将 100 μ l/孔抗 C5b-9 偶联物添加至 ELISA 板。于室温温育 30 分钟后, 如上所述清洗 ELISA 板, 并添加 100 μ l/孔底物, 并将板于室温再温育 30 分钟。通过添加 50 μ l/孔 5mM EDTA 来终止显色。使用 MultiSkán Ascent 微量滴定板阅读仪 (Thermo Fisher Scientific, Milford, MA) 来测定 405nm 处的吸光度。

[0193] 溶血抑制测定法 :

[0194] 将家兔红血球 (Colorado Serum Company, Denver, CO) 用含有 0.1% 牛皮肤明胶

(Sigma) 的 Veronal 缓冲液 (Sigma, St. Louis, MO) (GVB) 清洗 3 次, 每次清洗以 1500rpm, 于 4°C 离心 10 分钟。最后一个离心步骤后, 将细胞以终浓度 2×10^9 个细胞 /mL 重悬浮于 GVB。将在 GVB 中连续稀释的补体抑制剂以 50 μ L/ 孔添加至 96 孔 U 底聚丙烯板 (Costar, Cambridge, MA), 接着是 20 μ L/ 孔在 0.1M MgCl_2 /0.1M EGTA/GVB 中 1 : 2 稀释的家兔红血球。通过添加 30 μ L/ 孔用 GVB 1 : 3 预稀释的 C1q 消滅的血清 (Complement Technology, Tyler, TX) 来触发板中补体级联。将板以温和摇动于室温温育 30 分钟, 之后用 100 μ L/ 孔 10mMEDTA/GVB 终止反应。将板以 1500rpm 离心 5 分钟后, 将上清液转移至透明平底无结合 96 孔板 (Nunc, Neptune, NJ) 并使用微量板阅读仪 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 于 412nm 读取光密度。

[0195] 阿尔法筛选竞争性测定法:

[0196] 使用 AlphaScreen® 组氨酸 (镍螯合物) 检测试剂盒 (PerkinElmer, Waltham, MA) 来评估突变型 CRIg 分子对 C3 的潜在交叉反应性。以想要的终浓度 3 倍制备连续稀释的人 C3 和 C3b (3,000 至 0.7nM), 以及固定浓度的生物素化 iC3b (30nM), 及突变型 CRIg (mutCRIg) 和野生型 CRIg 分子 (15–60nM), 1 : 1 : 1 混合, 并在定轨摇床上以 3000TPM 于环境温度预温育 30 分钟。以想要的终浓度 4 倍制备链霉亲和素供体珠与镍螯合物受体珠 (各 0.1mg/mL) 的 1 : 1 混合物并添加至反应。将反应板在定轨摇床上以 3000rpm 于环境温度避光温育 60 分钟。在 AlphaQuest®-HTS 微量板分析仪 (PerkinElmer, Waltham, MA) 上分析板。

[0197] 表面等离子共振

[0198] 在 Biacore® A100 设备 (GE healthcare) 上使用表面等离子共振测量来测定 C3b 对突变型和野生型 CRIg 的亲和力。采用一种抗 Fc 捕捉形式, 而且自平衡结合测量计算 K_D 。使用抗 μ Fc 捕捉试剂盒 (BR-1008-38) 遵循制造商提供的指令准备传感器芯片。将突变型或野生型 CRIg 在运行缓冲液 (10mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 0.01% Tween-20) 中稀释至 1 μ g/mL 并进行 60 μ L 注射, 使得芯片表面的一个点捕捉约 100RU 的融合蛋白。记录在 CRIg 点上注射 10 分钟不同 C3b 浓度的溶液的传感图, 减去含有捕捉抗体但没有 CRIg 的参照点的信号。为浓度范围 4 μ M 至 15.6nM 的 C3b 2 倍稀释系列获得数据, 流速 10 μ L/ 分, 温度 25°C。在结合循环间通过注射 10mM Gly-HCl pH 1.730 秒来再生表面。使用 Biacore A100 评估软件 v1.1 (Safsten et al. (2006) Anal. Biochem. 353 :181) 的亲和力算法, 使用每次 C3b 注射结束时获得的高台值来计算 K_D 。

[0199] 结果

[0200] 噬菌体文库设计

[0201] 我们使用与 C3b 复合的 CRIg 的晶体结构来设计靶文库。设计了 5 个文库来覆盖 CRIg 与 C3b 之间的接触面 (图 4)。CRIg 文库在单价噬菌体展示载体中构建成与 g3p 次要外壳蛋白的融合物 (Zhang et al., J Biol Chem 281(31) :22299–311(2006))。我们通过诱变将终止密码子噬菌体噬菌粒的 CRIg 编码部分每个要随机化的残基处。然后使用每种含有终止密码子的构建物来生成噬菌体展示文库 (见材料和方法)。使用“软随机化”策略来选择结合物以维持野生型序列偏爱, 使得选定的位置只有 50% 的时间被突变。所有 5 个文库是以 $> 10^{10}$ 种独立序列每个文库的平均多样性获得的 (表 1)。

[0202] 用 CRIg 噬菌体文库选择

[0203] 4 轮结合选择后,我们自这 5 个文库获得了 38 个独特克隆(表 2)。在文库 1 中,第 15 位赖氨酸得到保留。芳香族残基(即酪氨酸和色氨酸)替换第 8 位谷氨酸。第 14 位被亲本的色氨酸或同源的苯丙氨酸占据。在文库 2 中,我们对 24 个克隆测序,而且它们都揭示共有。第 42 位,第 46 位和第 47 位作为野生型得到保留。天冬酰胺,组氨酸和苯丙氨酸替换第 43 位,第 44 位和第 45 位处的野生型序列。在文库 3 中,我们随机化 10 个位置,而且序列在第 54 位,第 55 位,第 56 位,第 57 位,第 58 位,第 61 位,第 62 位和第 63 位处展现完全保守。异亮氨酸或赖氨酸占据第 60 位。在第 64 位,谷氨酰胺被精氨酸替换或得到保留。在文库 4 中,芳香族残基在第 86 位占优,而同源碱性残基,即精氨酸和赖氨酸在第 99 位占优。第 85 位,第 87 位和第 95 位也得到软随机化,但是表现为高度保守的。在文库 5 中,两种显著同源的碱性残基,即赖氨酸和精氨酸在第 105 位是优选的,胜过谷氨酰胺。带负电荷的残基即天冬氨酸或酸性氨基酸即天冬酰胺在第 110 位占优。

[0204] 我们通过竞争性噬菌体 ELISA 评估了一些突变体的亲和力(数据未显示),而且我们发现文库 3 中有如下的克隆,它们是比野生型 CRIg 好大约 8 倍的 C3b 结合物。

[0205] 体外结合亲和力及体内生物学功效的测定

[0206] 为了鉴定提高对 C3b 的结合亲和力和溶血抑制测定法中的功效的关键残基,通过掺入占优的单突变并将其它位置保持为野生型,或自第一代噬菌体文库选出 2-3 个通过噬菌体 ELISA 测定的高亲和力克隆,接着设计第二代 CRIg 变体来进行。为了精确测量我们的突变体的亲和力和功效,我们作为分离的蛋白质表达了所有变体。来自溶血抑制测定法的结果(表 3)显示在溶血测定法中与野生型相比来自文库 1 的 L12,来自文库 3 的 L33 和来自文库 4 的 L41 显著提高功效 4-10 倍。来自文库 3 的 L32 显示与野生型 CRIg 相比改进 10 倍的 IC₅₀。数据还表明结合亲和力与来自基于细胞的测定法中的功效没有关联。

[0207] 突变体的组合

[0208] 基于来自第二代文库的结果,我们设计了第三代突变体以进一步改进在溶血测定法中的功效和结合亲和力。我们选择 3 个最有生物学效力的突变体(L12-8W, L33-Q60I/L32-Q64R 和 L41-M86Y) 和 1 个结合亲和力最高的突变体(L32-Q64R) 作为模板。然后,我们将这些突变体与在第二代文库中获得的其它有生物学效力的克隆组合以测定提高溶血测定法中的功效和结合亲和力的最佳突变集。我们表达和纯化了 CRIg 变体,供详细的分析用。数据显示(表 4)来自 L12 的组合突变体不改进抑制功效,而且甚至展示与亲本突变体相比较低的活性,尽管 WL41 和 WL59 突变体的结合亲和力高 3-6 倍。在来自 L32 的突变体内,RL41 展现比野生型好 1.8 倍的结合亲和力和溶血测定法中好 6 倍的功效。所有来自 L33 组的突变体显示显著提高的结合亲和力;与野生型相比提高 27-226 倍,尽管溶血测定法中的功效没有显著提高。我们还注意到 60I-64R 和 86Y 涉及大多数亲和力改进的组合克隆。

[0209] CRIg Q64R M86Y 突变体改进的结合亲和力和补体抑制活性

[0210] 我们选择了在竞争性 ELISA 中具有最高亲和力的突变体 Q64R M86Y(图 4 和表 3)供进一步分析用。为了测定 CRIg wt 和 CRIg Q64R M86Y 对 C3b 的结合亲和力,对 CRIg wt 和 CRIg Q64R M86Y 实施了 Biacore 分析。CRIg Q64RM86Y 的亲和力相对于野生型 CRIg 改进了 5 倍(图 6)。先前的研究显示 CRIg wt 选择性结合 C3b 但不结合天然 C3(Wiesman et al., Nature, 444(7116):217-20, 2006)。因为诱变可改变这种选择性,所以我们在 α 筛选液相竞争性测定法中比较了 CRIg Q64R M86Y 对 C3b 与 C3 相比的亲和力。CRIg Q64R M86Y

与可溶性 C3b 竞争,但不与可溶性 C3 竞争,指示诱变不改变 CRIg 对活性成分 C3b 的选择性(图 7)。通过分析 C3b 复合的 CRIg Q64R M86Y 的结构中的这些残基(数据未显示),这种选择性得到了进一步确认。

[0211] 为了测试对 C3b 改进的亲合力和保守的选择性是否转化成改进的功效,我们在对补体旁路途径选择性的基于红细胞的溶血测定法中测试了 CRIgQ64R M86Y 对 CRIg wt。CRIg Q64R M86Y 显示出与 CRIg wt 相比改进 4 倍的 IC50(图 8A)。为了进一步证实针对旁路途径补体抑制的改进的功效,我们在对补体旁路途径选择性的基于 LPS 的测定法中比较了 CRIg Q64R M86Y 与 CRIg wt 的抑制活性。在此,CRIg 显示出与野生型重组蛋白相比 180 倍的 IC50 改进。CRIg wt 和 CRIg Q64R M86Y 不影响经由经典途径的补体活化。如此,CRIg-C3b 结合界面中的两处氨基酸替代产生具有改进的结合亲合力和对不同旁路途径具有选择性的两种不同测定法中优良补体抑制活性的分子。

[0212] 为了进一步确定提高的结合亲合力和功效是否转化成改进的治疗功效,我们在血清转移关节炎模型中比较了 wt 和 Q64R M86Y 型式的 CRIg 的保护效果。先前的研究显示了 CRIg 有力抑制胶原和抗体诱导的关节炎中的炎症和骨破坏(Katschke et al., J. Exp Med 204(6):1319-1325(2007))。

[0213] 在此,在免疫复合物介导的关节炎的第三种临床前模型中测试 CRIg 功效。类风湿性关节炎的一种自发性鼠模型(K/BxN)模拟人关节炎疾病的许多临床和组织学特征。第 0 天给小鼠注射自 K/BxN 小鼠获得的 50 微升血清。每天检查动物,并通过目视观察对疾病程度打分。第 6 天处死所有小鼠。

[0214] 自第 -1 天开始在 100ul 无菌盐水中每天给小鼠皮下注射指定量的同种型对照或 hCRIg-mIgG1 或 hCRIg-RL41-mIgG1 重组蛋白。

[0215] 监测和打分:

[0216] 每只爪的得分。

[0217] 0 = 没有红斑和肿胀的证据

[0218] 1 = 限于足中段(跗骨)或踝的红斑和轻度肿胀

[0219] 2 = 自踝延伸至足中部的红斑和轻度肿胀

[0220] 3 = 自踝延伸至距关节的红斑和中度肿胀

[0221] 4 = 涵盖踝,足和趾的红斑和重度肿胀

[0222] 得分均值 = 4 只爪的得分之和。

[0223] 疾病阶段,轻度(得分均值 1-3),中度(得分均值 4-8)和重度疾病(得分均值 9 以上)。得分均值反映累及的关节数目。

[0224] 在第 6 天,通过处死前麻醉下的心内穿刺采集血液样品。使用血清测量 hCRIg-Fc 融合蛋白的量。

[0225] 收集关节供组织学评估用。

[0226] 将来自 KRN 小鼠的血清转移入 Balb/c 接受者导致快速且强力的免疫应答,其特征为对称的关节炎。关节炎诱导是由在关节中形成促炎性免疫复合物的抗葡萄糖-6-磷酸异构酶自身抗体介导的(Kouskoff, V., Korganow, A. S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. Cell 87,811-822)。关节炎的形成完全依赖于完整无缺的旁路补体途径

和 Fc 受体功能,如旁路补体途径成分缺陷的小鼠中和常见 Fc 受体 γ 链缺陷的小鼠中没有疾病所显示的 (Ji, H., Ohmura, K., Mahmood, U., Lee, D. M., Hofhuis, F. M., Boackle, S. A., Takahashi, K., Holers, V. M., Walport, M., Gerard, C., et al. (2002). Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 16,157-168)。由于疾病的快速发作和严重性,用 CRIg wt-Fc 融合蛋白处理只将关节炎得分降低 22% (图 9A, B)。用 CRIg Q64R M86Y 处理显示关节炎得分降低 66%。组织学检查显示,与用 CRIg wt 或对照融合蛋白处理的小鼠相比,用 CRIg Q64R M86Y 处理的小鼠中主要由嗜中性粒细胞和巨噬细胞组成的免疫细胞浸润显著降低 (图 9C, D)。CRIg wt 和 CRIg Q64R M86Y 的血清浓度是相似的,指示关节炎得分的差异不是由于 CRIg wt 与 CRIg Q64R M86Y 蛋白质的半衰期差异。如此,我们显示了 CRIg 对其靶物 C3b 提高的结合亲和力转化成显著改进的治疗功效。

[0227] 在此通过述及明确地完整收录本说明书中所引用的所有专利和参考文献。

[0228] 虽然已经参照具体实施方案描述了本发明,但是要理解,本发明不限于此类实施方案。相反,本发明意图覆盖所附权利要求的精神和范围内所包括的各种修改和等效方案。

[0001]

序列表

<110> 健泰科生物技术公司 (GENENTECH, INC.)

<120> 亲和力成熟的 CR1g 变体

<130> GNE-0322PCT

<140> 未指定

<141> 同此

<150> 61/189,653

<151> 2008-08-20

<150> 61/050,888

<151> 2008-05-06

<160> 67

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1372

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (65).. (1261)

<400> 1

ccaactgcac ctcggttccta tcgataggag gctggaagaa aggacagaag tagctctggc 60

tggtg atg ggg atc tta ctg ggc ctg cta ctc ctg ggg cac cia aca gtg 109
Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val
1 5 10 15

gac act tat ggc cgt ccc atc ctg gaa gtg cca gag agt gta aca gga 157
Asp Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Gly
20 25 30

cct tgg aaa ggg gat gtg aat ctt ccc tgc acc tat gac ccc ctg caa 205
Pro Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu Gln
35 40 45

ggc tac acc caa gtc ttg gtg aag tgg ctg gta caa cgt ggc tca gac 253
Gly Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser Asp
50 55 60

cct gtc acc atc ttt cta cgt gac tct tct gga gac cat atc cag cag 301
Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln
65 70 75

gca aag tac cag ggc cgc ctg cat gtg agc cac aag gtt cca gga gat 349
Ala Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp
80 85 90 95

gta tcc ctc caa ttg agc acc ctg gag atg gat gac cgg agc cac tac 397
Val Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr
100 105 110

acg tgt gaa gtc acc tgg cag act cct gat ggc aac caa gtc gtg aga 445
Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val Arg
115 120 125

gat aag att act gag ctc cgt gtc cag aaa ctc tct gtc tcc aag ccc 493
Asp Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys Leu Ser Val Ser Lys Pro
130 135 140

aca gtg aca act ggc agc ggt tat ggc ttc acg gtg ccc cag gga atg 541
Thr Val Thr Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Phe Thr Val Pro Gln Gly Met
145 150 155

agg att agc ctt caa tgc cag gct egg ggt tct cct ccc atc agt tat 589
Arg Ile Ser Leu Gln Cys Gln Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ile Ser Tyr
160 165 170 175

att tgg tat aag caa cag act aat aac cag gaa ccc atc aaa gta gca 637
Ile Trp Tyr Lys Gln Gln Thr Asn Asn Gln Glu Pro Ile Lys Val Ala

[0002]

序 列 表

	180	185	190	
	acc cta agt acc tta ctc ttc aag cct gcg gtg ata gcc gac tca ggc			685
	Thr Leu Ser Thr Leu Leu Phe Lys Pro Ala Val Ile Ala Asp Ser Gly			
	195	200	205	
	tcc tat ttc tgc act gcc aag ggc cag gtt ggc tct gag cag cac agc			733
	Ser Tyr Phe Cys Thr Ala Lys Gly Gln Val Gly Ser Glu Gln His Ser			
	210	215	220	
	gac att gtg aag ttt gtg gtc aaa gac tcc tca aag cta ctc aag acc			781
	Asp Ile Val Lys Phe Val Val Lys Asp Ser Ser Lys Leu Leu Lys Thr			
	225	230	235	
	aag act gag gca cct aca acc atg aca tac ccc ttg aaa gca aca tct			829
	Lys Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr Ser			
	240	245	250	255
	aca gtg aag cag tcc tgg gac tgg acc act gac atg gat ggc tac ctt			877
	Thr Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr Leu			
	260	265	270	
	gga gag acc agt gct ggg cca gga aag agc ctg cct gtc ttt gcc atc			925
	Gly Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala Ile			
	275	280	285	
	atc ctc atc atc tcc ttg tgc tgt atg gtg gtt ttt acc atg gcc tat			973
	Ile Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala Tyr			
	290	295	300	
	atc atg ctc tgt cgg aag aca tcc caa caa gag cat gtc tac gaa gca			1021
	Ile Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val Tyr Glu Ala			
	305	310	315	
	gcc agg gca cat gcc aga gag gcc aac gac tct gga gaa acc atg agg			1069
	Ala Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu Thr Met Arg			
	320	325	330	335
	gtg gcc atc ttc gca agt ggc tgc tcc agt gat gag cca act tcc cag			1117
	Val Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro Thr Ser Gln			
	340	345	350	
	aat ctg ggc aac aac tac tct gat gag ccc tgc ata gga cag gag tac			1165
	Asn Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly Gln Glu Tyr			
	355	360	365	
	cag atc atc gcc cag atc aat ggc aac tac gcc cgc ctg ctg gac aca			1213
	Gln Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp Thr			
	370	375	380	
	glt cct ctg gat tat gag ttt ctg gcc act gag ggc aaa agt gtc tgt			1261
	Val Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys Ser Val Cys			
	385	390	395	
	taaaaatgcc ccattaggcc aggatctgct gacataatct agagtcgacc tgcagaagct			1321
	tgccgccatt ggcccaactt gtttattgca gcttataatg gttacaata a			1372
	<210> 2			
	<211> 399			
	<212> PRT			
	<213> 人(Homo sapiens)			
	<400> 2			
	Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val Asp			
	1	5	10	15
	Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Gly Pro			
	20	25	30	
	Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu Gln Gly			
	35	40	45	
	Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser Asp Pro			
	50	55	60	

[0003]

Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln Ala
 65 70 75 80
 Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
 85 90 95
 Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr
 100 105 110
 Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val Arg Asp
 115 120 125
 Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys Leu Ser Val Ser Lys Pro Thr
 130 135 140
 Val Thr Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Phe Thr Val Pro Gln Gly Met Arg
 145 150 155 160
 Ile Ser Leu Gln Cys Gln Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ile Ser Tyr Ile
 165 170 175
 Trp Tyr Lys Gln Gln Thr Asn Asn Gln Glu Pro Ile Lys Val Ala Thr
 180 185 190
 Leu Ser Thr Leu Leu Phe Lys Pro Ala Val Ile Ala Asp Ser Gly Ser
 195 200 205
 Tyr Phe Cys Thr Ala Lys Gly Gln Val Gly Ser Glu Gln His Ser Asp
 210 215 220
 Ile Val Lys Phe Val Val Lys Asp Ser Ser Lys Leu Leu Lys Thr Lys
 225 230 235 240
 Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr
 245 250 255
 Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr Leu Gly
 260 265 270
 Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala Ile Ile
 275 280 285
 Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala Tyr Ile
 290 295 300
 Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val Tyr Glu Ala Ala
 305 310 315 320
 Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu Thr Met Arg Val
 325 330 335
 Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro Thr Ser Gln Asn
 340 345 350
 Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly Gln Glu Tyr Gln
 355 360 365
 Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp Thr Val
 370 375 380

[0004]

```

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

<210> 3
<211> 1090
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (67)..(981)

<400> 3
gtccaactgc acctcgggttc tatcgatagg aggctggaag aaaggacaga agtagctctg      60
gctgtg atg ggg atc tta ctg ggc ctg cta ctc ctg ggg cac cta aca      108
Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Gly His Leu Thr
1                               5                               10

gtg gac act tat ggc cgt ccc atc ctg gaa gtg cca gag agt gta aca      156
Val Asp Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr
15                               20                               25                               30

gga cct tgg aaa ggg gat gtg aat ctt ccc tgc acc tat gac ccc ctg      204
Gly Pro Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu
35                               40                               45

caa ggc tac acc caa gtc ttg gtg aag tgg ctg gta caa cgt ggc tca      252
Gln Gly Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser
50                               55                               60

gac cct gtc acc atc ttt cta cgt gac tct tct gga gac cat atc cag      300
Asp Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln
65                               70                               75

cag gca aag tac cag ggc cgc ctg cat gtg agc cac aag gtt cca gga      348
Gln Ala Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly
80                               85                               90

gat gta tcc ctc caa ttg agc acc ctg gag atg gat gac cgg agc cac      396
Asp Val Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His
95                               100                              105                              110

tac acg tgt gaa gtc acc tgg cag act cct gat ggc aac caa gtc gtg      444
Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val
115                              120                              125

aga gat aag att act gag ctc cgt gtc cag aaa cac tcc tca aag cta      492
Arg Asp Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys His Ser Ser Lys Leu
130                              135                              140

ctc aag acc aag act gag gca cct aca acc atg aca tac ccc ttg aaa      540
Leu Lys Thr Lys Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys
145                              150                              155

gca aca tct aca gtg aag cag tcc tgg gac tgg acc act gac atg gat      588
Ala Thr Ser Thr Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp
160                              165                              170

ggc tac ctt gga gag acc agt gct ggg cca gga aag agc ctg cct gtc      636
Gly Tyr Leu Gly Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val
175                              180                              185                              190

ttt gcc atc atc ctc atc atc tcc ttg tgc tgt atg gtg gtt ttt acc      684
Phe Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr
195                              200                              205

atg gcc tat atc atg ctc tgt cgg aag aca tcc caa caa gag cat gtc      732
Met Ala Tyr Ile Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val
210                              215                              220

tac gaa gca gcc agg gca cat gcc aga gag gcc aac gac tct gga gaa      780
Tyr Glu Ala Ala Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu
225                              230                              235

acc atg agg gtg gcc atc ttc gca agt ggc tgc tcc agt gat gag cca      828
Thr Met Arg Val Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro

```

[0005]

240	245	250	
act tcc cag aat ctg	ggc aac aac tac tct	gat gag ccc tgc ata gga	876
Thr Ser Gln Asn Leu	Gly Asn Asn Tyr Ser	Asp Glu Pro Cys Ile Gly	
255	260	265	270
cag gag tac cag atc atc	gcc cag atc aat ggc aac tac gcc cgc ctg		924
Gln Glu Tyr Gln Ile Ile	Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu		
	275	280	285
ctg gac aca gtt cct ctg	gat tat gag ttt ctg gcc act gag ggc aaa		972
Leu Asp Thr Val Pro	Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys		
	290	295	300
agt gtc tgt taaaaatgcc	ccattaggcc aggatctgct	gacataatct	1021
Ser Val Cys			
	305		
agagtcgacc tgcagaagct	tggccgccat ggcccaactt	gittattgca gcttataatg	1081
			1090
gttacaata			
<210> 4			
<211> 305			
<212> PRT			
<213> 人(Homo sapiens)			
<400> 4			
Met Gly Ile Leu Leu	Gly Leu Leu Leu Leu	Gly His Leu Thr Val Asp	
1	5	10	15
Thr Tyr Gly Arg Pro	Ile Leu Glu Val Pro	Glu Ser Val Thr Gly Pro	
	20	25	30
Trp Lys Gly Asp Val	Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp	Pro Leu Gln Gly	
	35	40	45
Tyr Thr Gln Val Leu	Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser Asp Pro		
	50	55	60
Val Thr Ile Phe Leu	Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln Ala		
65	70	75	80
Lys Tyr Gln Gly Arg	Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val		
	85	90	95
Ser Leu Gln Leu Ser	Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr		
	100	105	110
Cys Glu Val Thr Trp	Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val Arg Asp		
	115	120	125
Lys Ile Thr Glu Leu	Arg Val Gln Lys His Ser Ser Lys Leu Leu Lys		
	130	135	140
Thr Lys Thr Glu Ala	Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr		
145	150	155	160
Ser Thr Val Lys Gln	Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr		
	165	170	175
Leu Gly Glu Thr Ser	Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala		
	180	185	190
Ile Ile Leu Ile Ile	Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala		
	195	200	205

[0006]

Tyr Ile Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val Tyr Glu
 210 215 220

Ala Ala Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu Thr Met
 225 230 235 240

Arg Val Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro Thr Ser
 245 250 255

Gln Asn Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly Gln Glu
 260 265 270

Tyr Gln Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp
 275 280 285

Thr Val Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys Ser Val
 290 295 300

Cys
 305

<210> 5
 <211> 1590
 <212> DNA
 <213> 鼠属物种 (Mus sp.)

<220>
 <221> CDS
 <222> (134).. (973)

<400> 5
 gtccaactgc acctcggttc tatcgattcg aattcggcca cactggccgg atcctctaga 60
 gatccctcga cctcgaccca cgcgtccgag cagcaagagg atggaaggat gaatagaagt 120
 agcttcaaat agg atg gag atc tca tca ggc ttg ctg ttc ctg ggc cac 169
 Met Glu Ile Ser Ser Gly Leu Leu Phe Leu Gly His
 1 5 10

cta ata gtg ctc acc tat ggc cac ccc acc cta aaa aca cct gag agt 217
 Leu Ile Val Leu Thr Tyr Gly His Pro Thr Leu Lys Thr Pro Glu Ser
 15 20 25

gtg aca ggg acc tgg aaa gga gat gtg aag att cag tgc atc tat gat 265
 Val Thr Gly Thr Trp Lys Gly Asp Val Lys Ile Gln Cys Ile Tyr Asp
 30 35 40

ccc ctg aga ggc tac agg caa gtt ttg gtg aaa tgg ctg gta aga cac 313
 Pro Leu Arg Gly Tyr Arg Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Arg His
 45 50 55 60

ggc tct gac tcc gtc acc atc ttc cta cgt gac tcc act gga gac cat 361
 Gly Ser Asp Ser Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Thr Gly Asp His
 65 70 75

atc cag cag gca aag tac aga ggc cgc ctg aaa gtg agc cac aaa gtt 409
 Ile Gln Gln Ala Lys Tyr Arg Gly Arg Leu Lys Val Ser His Lys Val
 80 85 90

cca gga gat gtg tcc ctc caa ata aat acc ctg cag atg gat gac agg 457
 Pro Gly Asp Val Ser Leu Gln Ile Asn Thr Leu Gln Met Asp Asp Arg
 95 100 105

aat cac tat aca tgt gag gtc acc tgg cag act cct gat gga aac caa 505
 Asn His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln
 110 115 120

gta ata aga gat aag atc att gag ctc cgt gtt cgg aaa tat aat cca 553
 Val Ile Arg Asp Lys Ile Ile Glu Leu Arg Val Arg Lys Tyr Asn Pro
 125 130 135 140

[0007]

cct aga atc aat act gaa gca cct aca acc ctg cac tcc tct ttg gaa Pro Arg Ile Asn Thr Glu Ala Pro Thr Thr Leu His Ser Ser Leu Glu 145 150 155	601
gca aca act ata atg agt tca acc tct gac ttg acc act aat ggg act Ala Thr Thr Ile Met Ser Ser Thr Ser Asp Leu Thr Thr Asn Gly Thr 160 165 170	649
gga aaa ctt gag gag acc att gct ggt tca ggg agg aac ctg cca atc Gly Lys Leu Glu Glu Thr Ile Ala Gly Ser Gly Arg Asn Leu Pro Ile 175 180 185	697
ttt gcc ata atc ttc atc atc tcc ctt tgc tgc ata gta gct gtc acc Phe Ala Ile Ile Phe Ile Ile Ser Leu Cys Cys Ile Val Ala Val Thr 190 195 200	745
ata cct tat atc ttg ttc cgc tgc agg aca ttc caa caa gag tat gtc Ile Pro Tyr Ile Leu Phe Arg Cys Arg Thr Phe Gln Gln Glu Tyr Val 205 210 215 220	793
tat gga gtg agc agg gtg ttt gcc agg aag aca agc aac tct gaa gaa Tyr Gly Val Ser Arg Val Phe Ala Arg Lys Thr Ser Asn Ser Glu Glu 225 230 235	841
acc aca agg gtg act acc atc gca act gat gaa cca gat tcc cag gct Thr Thr Arg Val Thr Thr Ile Ala Thr Asp Glu Pro Asp Ser Gln Ala 240 245 250	889
ctg att agt gac tac tct gat gat cct tgc ctc agc cag gag tac caa Leu Ile Ser Asp Tyr Ser Asp Asp Pro Cys Leu Ser Gln Glu Tyr Gln 255 260 265	937
ata acc atc aga tca aca atg tct att cct gcc tgc tgaacacagt Ile Thr Ile Arg Ser Thr Met Ser Ile Pro Ala Cys 270 275 280	983
tccagaaac taagaagttc ttgctactga agaaaataac atctgctaaa atgccctac	1043
taagtcaagg tctactggcg taattacctg ttacttattt actacttgcc ttcaacatag	1103
ctttctccct ggcttccctt cttcttagac aacctaaagt atctatctag tctgccaatt	1163
ctggggccat tgagaaatcc tgggtttggc taagaalata ctacatgcac ctcaagaat	1223
ctagctttct ggcttcaccc agaacaattt tcttcttagg gccttcacaa ctcttctcca	1283
aacagcagag aaattccata gcagtagagg ttcttlatca tgctccaga cagcgtgagt	1343
ctcagtccta caaactcaga caagcacatg ggcttaggat tactcctctt tctctagggc	1403
cagatgactt ttaattgata ttactattgc tacattatga atctaatagca catgtattct	1463
tttgttgila ataaatgttt aatcatgaca tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaag ggcgccgcg	1523
actctagagt cgacctgcag tagggataac aggtaataa gcttgccgcg catggcccaa	1583
cttgttt	1590
<210> 6	
<211> 280	
<212> PRT	
<213> 鼠属物种 (Mus sp.)	
<400> 6	
Met Glu Ile Ser Ser Gly Leu Leu Phe Leu Gly His Leu Ile Val Leu 1 5 10 15	
Thr Tyr Gly His Pro Thr Leu Lys Thr Pro Glu Ser Val Thr Gly Thr 20 25 30	
Trp Lys Gly Asp Val Lys Ile Gln Cys Ile Tyr Asp Pro Leu Arg Gly 35 40 45	
Tyr Arg Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Arg His Gly Ser Asp Ser 50 55 60	

[0008]

Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Thr Gly Asp His Ile Gln Gln Ala
 65 70 75 80
 Lys Tyr Arg Gly Arg Leu Lys Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
 85 90 95
 Ser Leu Gln Ile Asn Thr Leu Gln Met Asp Asp Arg Asn His Tyr Thr
 100 105 110
 Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Ile Arg Asp
 115 120 125
 Lys Ile Ile Glu Leu Arg Val Arg Lys Tyr Asn Pro Pro Arg Ile Asn
 130 135 140
 Thr Glu Ala Pro Thr Thr Leu His Ser Ser Leu Glu Ala Thr Thr Ile
 145 150 155 160
 Met Ser Ser Thr Ser Asp Leu Thr Thr Asn Gly Thr Gly Lys Leu Glu
 165 170 175
 Glu Thr Ile Ala Gly Ser Gly Arg Asn Leu Pro Ile Phe Ala Ile Ile
 180 185 190
 Phe Ile Ile Ser Leu Cys Cys Ile Val Ala Val Thr Ile Pro Tyr Ile
 195 200 205
 Leu Phe Arg Cys Arg Thr Phe Gln Gln Glu Tyr Val Tyr Gly Val Ser
 210 215 220
 Arg Val Phe Ala Arg Lys Thr Ser Asn Ser Glu Glu Thr Thr Arg Val
 225 230 235 240
 Thr Thr Ile Ala Thr Asp Glu Pro Asp Ser Gln Ala Leu Ile Ser Asp
 245 250 255
 Tyr Ser Asp Asp Pro Cys Leu Ser Gln Glu Tyr Gln Ile Thr Ile Arg
 260 265 270
 Ser Thr Met Ser Ile Pro Ala Cys
 275 280

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> (16)..(18)
 <223> a, c, g 或 t

<220>
 <223> 替代和优选的实施方案的详细说明参见提交的说明书

<400> 7
 atcctggaag tgcaannn

18

<210> 8
 <211> 18

[0009]

- <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> (16)..(18)
 <223> a, c, g 或 t
- <220>
 <223> 替代和优选的实施方案的详细说明参见提交的说明书
- <400> 8
 agtgtaacag gacctnnn 18
- <210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> (1)..(3)
 <223> a, c, g 或 t
- <220>
 <223> 替代和优选的实施方案的详细说明参见提交的说明书
- <400> 9
 nnngggatg tgaatctt 18
- <210> 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> (16)..(18)
 <223> a, c, g 或 t
- <220>
 <223> 替代和优选的实施方案的详细说明参见提交的说明书
- <400> 10
 aagtggtgg tacaannn 18
- <210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> (1)..(3)
 <223> a, c, g 或 t
- <220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> (7)..(18)
 <223> a, c, g 或 t

[0010]

<220>		
<223>	替代和优选的实施方案的详细说明参见提交的说明书	
<400>	11	
	nnntcannnn nnnnnnnnat cttt	24
<210>	12	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(1)..(3)	
<223>	a, c, g 或 t	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(7)..(9)	
<223>	a, c, g 或 t	
<220>		
<223>	替代和优选的实施方案的详细说明参见提交的说明书	
<400>	12	
	nnnctnnnt ctctggaga ccat	24
<210>	13	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400>	13	
	tttctacgtg actct	15
<210>	14	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(1)..(27)	
<223>	a, c, g 或 t	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(31)..(33)	
<223>	a, c, g 或 t	
<220>		
<223>	替代和优选的实施方案的详细说明参见提交的说明书	
<400>	14	
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnntac nnggccgcc lgcattgvg	49
<210>	15	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400>	15	

[0011]

caattgagca ccctg	15
<210> 16 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 修饰的碱基 <222> (1).. (9) <223> a, c, g 或 t	
<220> <221> 修饰的碱基 <222> (13).. (15) <223> a, c, g 或 t	
<220> <221> 修饰的碱基 <222> (31).. (33) <223> a, c, g 或 t	
<220> <223> 替代和优选的实施方案的详细说明参见提交的说明书	
<400> 16 nnnnnnnnng acnnnagcca ctacacgtgt nnn	33
<210> 17 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 修饰的碱基 <222> (10).. (12) <223> a, c, g 或 t	
<220> <223> 替代和优选的实施方案的详细说明参见提交的说明书	
<400> 17 gtcacctggg nn	12
<210> 18 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 18 actcctgatg gcaac	15
<210> 19 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 修饰的碱基 <222> (16).. (18) <223> a, c, g 或 t	

[0012]

<220>
 <223> 替代和优选的实施方案的详细说明参见提交的说明书

<400> 19
 actcctgatg gcaacnnn 18

<210> 20
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> 修饰的碱基
 <222> (4)..(15)
 <223> a, c, g 或 t

<220>
 <223> 替代和优选的实施方案的详细说明参见提交的说明书

<400> 20
 gtcnnnnnnn nnnnnattac tgagctccgt 30

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> 未知的描述: 未知的野生型序列

<400> 21
 Pro Glu Ser Val Thr Gly Pro Trp Lys Gly
 1 5 10

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 22
 Pro Tyr Ser Val Thr Gly Pro Trp Lys Gly
 1 5 10

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 23
 Pro Trp Ser Val Thr Gly Pro Phe Lys Gly
 1 5 10

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 24
 Pro Tyr Ser Val Thr Gly Pro Phe Lys Gly
 1 5 10

[0013]

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的共有序列

<220>
 <221> MOD-RES
 <222> (8).. (8)
 <223> Trp 或 Phe

<400> 25
 Pro Tyr Ser Val Thr Gly Pro Xaa Lys Gly
 1 5 10

<210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> 未知的描述: 未知的野生型序列

<400> 26
 Gln Arg Gly Ser Asp Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser
 1 5 10

<210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 27
 Gln Arg Asp Ser His Phe Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser
 1 5 10

<210> 28
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的共有序列

<400> 28
 Gln Arg Asp Ser His Phe Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser
 1 5 10

<210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> 未知的描述: 未知的野生型序列

<400> 29
 Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln Ala Lys Tyr Gln Gly
 1 5 10

<210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

[0014]

<400> 30
 Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Ile Ala Lys Tyr Arg Gly
 1 5 10

<210> 31
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 31
 Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Lys Ala Lys Tyr Gln Gly
 1 5 10

<210> 32
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 32
 Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Ile Ala Lys Tyr Gln Gly
 1 5 10

<210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的共有序列

<220>
 <221> MOD.RES
 <222> (12).. (12)
 <223> Arg 或 Gln

<400> 33
 Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Ile Ala Lys Tyr Xaa Gly
 1 5 10

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> 未知的描述: 未知的野生型序列

<400> 34
 Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln
 1 5 10 15

Thr

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 35
 Leu Glu Cys Asp Asp Gln Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Tyr
 1 5 10 15

[0015]

Thr

<210> 36
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 36
 Leu Glu Cys Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Arg
 1 5 10 15

Thr

<210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 37
 Leu Glu Tyr Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Lys
 1 5 10 15

Thr

<210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 38
 Leu Glu Tyr Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Lys
 1 5 10 15

Thr

<210> 39
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 39
 Leu Glu Tyr Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Arg
 1 5 10 15

Thr

<210> 40
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

[0016]

<400> 40
 Leu Glu Tyr Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 41
 Leu Glu Tyr Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln
 1 5 10 15

Thr

<210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 42
 Leu Glu Tyr Asp Asp Lys Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln
 1 5 10 15

Thr

<210> 43
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 43
 Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Phe
 1 5 10 15

Thr

<210> 44
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 44
 Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Tyr
 1 5 10 15

Thr

<210> 45
 <211> 17
 <212> PRT

[0017]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 45

Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Lys
1 5 10 15

Thr

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 46

Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Arg
1 5 10 15

Thr

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 47

Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln
1 5 10 15

Thr

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 48

Leu Glu Phe Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Lys
1 5 10 15

Thr

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 49

Leu Glu Phe Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Arg
1 5 10 15

Thr

[0018]

<210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的共有序列

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Tyr, Trp 或 Phe

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Lys 或 Arg

 <400> 50
 Leu Glu Xaa Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Xaa
 1 5 10 15

 Thr

 <210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 未知

 <220>
 <223> 未知的描述: 未知的野生型序列

 <400> 51
 Asn Gln Val Val Arg Asp Lys Ile
 1 5

 <210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 52
 Asn Arg Val Val Arg Asp Asn Ile
 1 5

 <210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 53
 Asn Arg Val Val Arg Asp Asp Ile
 1 5

 <210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 54
 Asn Arg Val Val Arg Asp Gln Ile
 1 5

[0019]

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 55
Asn Arg Val Ile Arg Asp Gln Ile
1 5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 56
Asn Arg Val Ile Arg Asp His Ile
1 5

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 57
Asn Lys Val Ile Arg Asp Gln Ile
1 5

<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 58
Asn Lys Val Ile Ala Asp Asn Ile
1 5

<210> 59
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 59
Asn Lys Val Ile Ser Asp Asn Ile
1 5

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 60
Asn Gln Val Ile Arg Ser Asp Ile
1 5

[0020]

<210> 61
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 61
 Asn Lys Val Thr Arg Asp Asn Ile
 1 5

 <210> 62
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 62
 Asn Lys Val Val Arg Asp Gln Ile
 1 5

 <210> 63
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 63
 Asn Lys Val Val Arg Asp Asn Ile
 1 5

 <210> 64
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 64
 Asn Lys Val Val Arg Asp Asp Ile
 1 5

 <210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 65
 Asn Lys Val Val Arg Ser Asp Ile
 1 5

 <210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

 <400> 66
 Asn Lys Val Val Ser Asp Asp Ile
 1 5

 <210> 67
 <211> 8

[0021]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的共有
序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Lys 或 Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Val 或 Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Gln, Asp 或 Asn

<400> 67
Asn Xaa Val Xaa Arg Asp Xaa Ile
1 5

```

1  CCAACTGCAC CTGGTTCTA TCGATAGGAG GCTGGAAGAA AGGACAGAAG TABCTCTGSC TGTGATGGG ATCTTACTGG GCCTGCTACT CCTGGGGCAC
  GGTGACGGTG GAGCCCAAGAT AGCTATCCTC CGACCTTCTT TCGTGCTTC ATCGAGACGG ACACTACCCC TAGAATGACC CGGAOCGATGA GGACCCCGTIC
      M G I L L G L L L L G H
      *MET
101  CTACACAGTGG ACACHTATGG CCGTCCCATC CTGGAAGTGC CAGAGAGTGT AACAGGACCT TGGAAAGGGG ATGTGAATCT TCCCTGCACC TATGACCCCCC
  GATTGTACC TGTGAATACC GGCAGGGTAG GACCTTCACG GTCCTCACA TTGTCCTEGA ACCTTTCCCC TACACTAGA AGGGAOGTGG ATACTGGGGG
13  L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P L
201  TGCAAGSCTA CACCCAAGTC TTGGTGAAGT GGCCTGGTACA ACGTGGCTCA GACCTGTICA CCATCTTTCT ACGTGACTCT TCTGGAGACC ATATCCAGCA
  ACGTTCCGAT GTGGGTTTCCAG AACCACTTCA CCGACCATGT TGCACCGAGT CTGGACAGT GGTAGAAGA TGCACCTGAGA AGACCTCTGG TATAGGTCGT
47  Q G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q Q
301  GGCAANGTAC CAGGGCCGCC TGCATGTGAG CCACAAGGT CCACGAGATG TATCCCTCCA ATTGACACC CTGGAGATGG ATGACCGGAG CCACTACACG
  CCGTTTCATG GTCCCGGGGG ACGTACACTC GGTGTTCCAA GGTCTCTTAC ATAGGAGGT TAACTCGTGG GACCTTACC TACTGCCCTC GGTGATGTCC
80  A K Y Q G R L H V S H K V P G D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T
401  TGTGAAGTCA CCTGGCCAGAC TCCTGATGCC AACCAAGTGG TGAGAGATAA GATTACTGAG CTCGCTGTCC AGAACTCTC TGCTCCAAAG CCCACAGTGA
  ACACCTCAG GGACCGTCTG AGGACTACCG TTGGTTCAGC ACTCTCTATT CTAATGACTC GAGGCACAGG TCTTTGAGAG ACAGAGGTTT CCGGTGTCACT
113  C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I T E L R V Q K L S V S K P T V T
501  CAACTGGCCAG CCGTTATGCG TTCAOOGTGC CCGAGGGAAT GAGGATTAGC CTTCAATGCC AGGCTCGGGG TTCTCCTCCC ATCAGTTATA TTTGGTATAA
  GTTGACCGTC GCCAATACCG AAGTGCCACG GGGTCCCTTA CTCCTAATCG GAAGTTACGG TCCGAGCCCC AAGAGGAGGG TAGTCAATAT AAACCATATT
147  T G S G Y G F T V P Q G M R I S L Q C Q A R G S P P I S Y I W Y K

```

图 1A

601 GCAACAGACT AATAACGAGG AACCCATCAA AGTAGCAACC CIAAGTACCT TACTCTTCAA GCCTGGGGTG ATAGCGGACT CAGGCTCCTA TTTCTGCACI
CGTTGTCTGA TTATTGGTCC TTGGGTAGTT TCATCGTGG GATTACATGGA ATGAGAAGTT CCGACCCAC TAICEGTGA GTCGGAGGAT AAAGACGTGA
180 Q Q T N N Q E P I K V A T L S T L L F K P A V I A D S G S Y F C T

701 GCCAAGGGCC AGTTGGCTC TGAGCAGCAC AGGACATTTG TGAAGTTTGT GGTCAAGAC TCCTCAAGC TACTCAAGC CAAGACTGAG GCACCTACAA
CGGTTCCCGG TCCAACCGAG ACTGGTGTG TGCTGTAAAC ACTTCAACA CCAGTTTCTG AGGAGTTTGG ATGAGTTCTG GTTCTGACTC CGTGGATGTT
213 A K G Q V G S E Q H S D I V K F V V K D S S K L L K T K T E A P T T

801 CCATGACATA CCCCITGANA GCAACATCTA CAGTGAAGCA GTCCGGGAC TGGACCACTG ACATGGATGG CTACCTTGGG GAGACCACTG CTGGCCAGG
GGTACTGTAT GGGGAACITTT CGTTGTAGAT GTCACTTGGT CAGGACCGTG ACCTGGTGAC TGTACCTACC GATGGAACTT CTCTGGTAC GACCCGGTCC
247 M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G E T S A G P G

901 AAAGAGCCTG CCTGTCTTTG CCATCATCCT CATCATCTCC TTGTGCTGTA TGGTGGTTTT TACCATGGCC TATATCATGC TCCTGTOGAA GACATCCCAA
TTTCTCGSAC GCACAGAAAC GGTAGTAGGA GTAGTAGAGG AACAGACAT ACCACCANA ATGGTACCGG ATATAGTAGS AGACAGCCTT CTGTAGGGTT
280 K S L P V F A I I L I S L C C M V V F T M A Y I M L C R K T S Q

1001 CAAGAGCATG TCTACGAAGC AGCCAGGCA CATGCCAGAG AGGCCAAGA CTCGTGGANA ACCATGAGGG TGGCATCTT CGCAAGTGGC TGCTCCAGTG
GTTCTOGTAC AGATGCTTGG TGGTCCCGT GTAGGCTCTC TCGGTTGCT GAGACCTCTT TGGTACTCC ACCGGTAGAA GGGTTCAOCC ACGAGGTCAC
313 Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T M R V A I F A S G C S S D

1101 ATGAGCCAAC TTCCAGAAI CTGGCCAACA ACTACTCTGA TGAGCCCTGC ATAGCACAGS AGTACCAGAT CATGGCCAG ATCAATGGCA ACTAGCCCGG
TACTGGTTG AAGGCTCTTA GACCGTTGT TGATGAGACT ACTCGGAGS TATCCTGTCC TCATGGTCTA GTAGGGGTC TAGTTACCGT TGATGGGGCC
347 E P T S Q N L G N N Y S D E P C I G Q E Y Q I I A Q I N G N Y A R

1201 CCTGCTGGAC ACAGTTCCTC TGGATTATGA GTTTCGGCC ACTGAGGCA AAAGTGTCTG TTAANAATEC CCCATTAGCC CAEGATCTGC TGACATAATC
GGAGACCTG TGTCAGGAG ACCTAATACT CAAGACCGG TGACTCCCGT TTTCACAGAC AATTTTACG GGGTAATCCG GTCCTAGAGC ACTGTATTAG
380 L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C Q

1301 TAGAGTCGAC CTGCAGAAC TTGGCCGCA TGGCCCACT TGTATTGCG ACCTATAAT GGTACAAAT AA
ATCTCAGCTG GACGTCTTGG AACCCGGGT ACCGGGTGA ACAATAAGS TCGAATATTA CCAATGTTTA TT

图 1B

1 GTCCAACTGC ACCTCGGTTC TATCGATAGG ABGCTGGAAG AAAGGACAGA AGTAGCTGTG GCTGTGATGG GGATCTTACT GGGCCTGCTA CTCTGCGGGC
 CAGGTTGAGG TGGAGCCCAAG ATAGCTATCC TCCGACCTTC TTTCCTGICT TCATCGAGAC CGACACTACC CCTAGAATGA CCGCGACGAT GAGGACCCCG
 M G I L L G L L L L G H
 101 ACCTAACAGT GGACACTTAT GGGCGTCCCA TCTTGAAGT GCCAGAGAGT GTACAGGAC CTTCGAAAGG GGATGTGAAT CTTCCTGCA CCTATGACCC
 TGGATTGTCA CCTGTGAATA CCGGCAGGGT AGGACCTTCA CCGTCTCTCA CATTGCTCTG GAACCTTCC CCTACACTTA GAAGGAGGT GGTACTGCGG
 13 L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P
 201 CCTECAAGC TACACCANG TCTTGGTGA GTGCTGGTA CAAGGTGCT CAGACCCTGT CACCATCTT CTAGGTGACT CTCTGGAGA CCATATCCAG
 GGAGTTCCG ATGTGGTTC AGAACCACTT CACCGACCAT GTTCACCGA GTCTGGACA GTGGTAGAAA GATGCACTCA GAAGACCTCT GGTATAGGTC
 46 L Q G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q
 301 CAGGCAAGT ACCAGGCGG CCTTCATGTG ACCACAAGG TTCGAGGAGA TGTATCCCTC CAATTGASCA CCTGGAGAT GGATGACGG AGCCACTACA
 GTCCGTTTCA TGGTCCCGCC GGAAGTACAC TCGGTGTTCC AAGTCTCT ACATAGGAG GTTAACTGT GGGACCTCTA CCTACTGCCC TCGGTGATGT
 79 Q A K Y Q G R L H V S H K V P G D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T
 401 CGTGTGAAGT CACCTGGCAG ACTCCTGATG GCAACCAAGT CGTGAGAGT AAGATTACTG AGCTCGGTG CCAGAACAC TCCTCAAGC TACTCAAGAC
 GCACACTTCA GTGGACGTC TGAGGACTAC CGTTGGTTCA GCACTCTA TTCTAATGAC TGAGCCACA GGTCTTTGTG AGGAGTTGG ATGAGTTCTG
 113 C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I T E L R V Q K H S S K L L K T
 501 CAAGACTGAG GCACCTACAA CCATGACATA CCGCTTGAAA GCAACATCTA CAGTAGCA GTCTGGAC TGGACACTG ACATGGATGG CTACCTTGA
 GTTCTGACTC CGTGGATGTT GGTACTGTAT GGGCACTT GGGCACTT GTCATTGAT GTCATTGAT GTCATTGAT GTCATTGAT GTCATTGAT GTCATTGAT GTCATTGAT
 146 K T E A P T T M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G

插入物在这里开始

图 2A

```

601 GAGACCAGTG CTGGCCAGG AAGAGCCGTG CCTGCTTTG CCATCATCTT CATCATCTCC TTGTGCTGA TGGTGGTTT TACCATGGCC TATATCATGC
    CTCTGGTCAC GACCCGGTCC TTTCTGGAC GGACAGAAC GGTAGTAGGA GTAGTAGAG AACAGACAT ACCACCAAAA ATGGTACCGG ATATAGTAGC
179 E T S A G P G K S L P V F A I I L I I S L C C M V V F T M A Y I M L

701 TCTGTGGAA GACATCCCAA CAAGAGCATG TCTACGAAGC AGCCAGGCCA CATGCCAGAG AGGCCAADCA CTCGGAGAA ACCATGAGGG TGGCCATCTT
    AGACAGCCTT CTGTAGGTT GTTCTCGTAC AGATGCTTGG TGGTCCGGT GTAAGGTCTC TCCGGTTGCT GAGACCTCTT TGSTACTCCC ACCCGTAGAA
213 C R K T S Q Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T M R V A I F

801 CGCAAAGTGGC TGCTCCAGTG ATGAGCCAAAC TTCCAGAAAT CTGGCCAACA ACTACTCTGA TGAGCCCTGC ATAGGACAGG AGTACCAGAT CATGCCCCAG
    GCGTTACACG ACGAGGTCAC TACTCGGTTG AAGGGTCTTA GACCCGTTGT TGATGAGACT ACTCGGGAAG TATCCTGTCC TCATGCTCTA GTAGCCGGTG
246 A S G C S S D E P T S Q N L G N N Y S D E P C I G Q E Y Q I I A Q

901 ATCAATEGCA ACTAAGCCCG CCTGCTGGAC ACAGTTCTC TGGATTATGA GTTCTGGCC ACTGAGGCCA AAAGTCTCG TTAANAATGC CCCATTAGGC
    TAGTTACCGT TGATGCGGGC GGACGACCTG TGTCAGGAG ACCTAATACT CAAGACCCGG TGACTCCCGT TTTACAGAC AATTTTACG GGGTAATCCG
279 I N G N Y A R L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C O

1001 CAGGATCTGC TGACATAATC TAGAGTGAC CTGCAGAGC TTGGCCGCCA TGGCCCAACT TGTTTATGCG AGCTTATAAT GGTTACAATA
    GTCCTAGACG ACTGTATTAG ATCTCAGCTG GAGGCTTGG AACCCGGGGT ACCCGGGTGA ACAAAATAGG TCGAATATTA CCAATGTTAT
    插入物在这里结束

```

图 2B

```

1  GTCCAACATG ACCTCGGTTC TAICGATTGG AATTCCGCCA CACTGCGCGG ATCCCTCTAGA GATCCCTCGA CCTGACCCCA CCGGTCGGAG CAGCAAGAGG
   CAGGTTGACG TGGAGCCCAAG ATAGCTAAGC TTAGCCGGT GTACCCGCC TAGGAGATCT CTAGGAGCT GGAGCTGGGT GCGGAGGCTC GTCGTTCTCC

101 ATGGAAGGAT GAATAGAAGT ACCTTCAAT AGGATGGAGA TCTCATCAGG CTTCCTGTC CTGCGCCACC TAATAGTCT CACCTATGGC CACCCCAAGC
   TACCTTCCTA CTTATCTTCA TCGAAGTTTA TCCATCTCT ACAGTAGTCC GAAGGACAAG GACCCGGTGG ATTATCACGA GTGGATACCG GTGGGTTGGG

1      M E I S S G L L F L G H L I V L T Y G H P T L
      *MET

201 TAAAAACACC TGAGAGTGTG ACAGGGACCT GSAAGGAGA TGTGAAGATT CAGTGCACT ATGATCCCT GAGAGCTAC AGGCAAGTTT TGGTGAATG
   ATTTTGTGG ACTCTCACAC TGTCCTTGA CCTTCTCT AACTTCTAA GTCAGTAGA TACTAGGGA CTCCTGGATG TCCGTTCAAA ACCACTTTAC

24  K T P E S V T G T W K G D V K I Q C I Y D P L R G Y R Q V L V K W

301 GCTGGTAA GA CAGGCTCTG ACTCCGTCAC CATCTTCTA CGTACTCCA CTGGAGACCA TATCCAGCAG GCAAGTACA GAGCCCGCT GAAAGTGAGC
   GGACCATCT GTCCCGAGC TGAGCCAGTG GTAGAAGGAT GCACCTGGT GACCTCTGT ATAGTGGTG GATTCATGT CTCGGCGGGA CTTTCACTCG

57  L V R H G S D S V T I F L R D S T G D H I Q Q A K Y R G R L K V S

401 CACAAGTTC CAGGAGTGT GTCCCTOC AA ATAAATACC TCCAGATGGA TGACAGGAT CACTATACAT GTGAGGTAC CTGCAGACT CCTGATGGAA
   GTGTTTCAAG GTCTCTACA CAGGAGGTT TATTTATGGG AGGTGACCT ACTGTCTTA GTGATATGTA CACTCCAGTG GACCGTCTGA GCACTACCTT

90  H K V P G D V S L Q I N T L Q M D D R N H Y T C E V T W Q T P D G N

```

图 3A

501 ACCAAGTAAT AAGAGATAAG ATCAATTGAGC TCGGTGTTGG GAAATATAAT CCACCTAGAA TCAACTACTGA AGCACCACAGC ACCCTGCACT CCTCTTTTGGG
TGGTTCAATTA TTCICTAATC TAGTAACCTGG ACGCCACAAGC CTTTATATTA GGTGGATCTT AGTTATGACT TCGTGGATGT TGGGAGGTGA GCGAGAAACCT
124 Q V I R D K I I E L R V R K Y N P P R I N T E A P T T L H S S L E
601 AGCAACAACCT ATAATGAGTT CAACCTCTGA CTTGACCACCT AATGGGACTG GAAACTTGA GGAGACCATT GCTGGTTCAG GGAGGAACCT GCCAATCTTT
TCGTTGTTGA TATTACTCAA GTTGGAGACT GAACTGGTGA TTACCCTGAC CTTTGAACCT CCTCTGGTAA CGACCAAGTC CCTCCTTGGG CCGTTAGAAA
157 A T T I M S S T S D L T T N G T G K L E E T I A G S G R N L P I F
701 GCCATAATCT TCATCATCTC CCTTTGCTGC ATAGTAGCTG TCACCATACC TTATATCTTG TTCGCCITGCA GGACATTCCA ACAAGAGTAT GTCTATGGAG
CGGTATTAGA AGTAGTAGAG GGAACGAGG TATCATCGAC AGTGGTATGG AATATAGAAC AAGGGGAGCT CCTGTAAAGT TGTTCATCATA CAGATACCTC
190 A I I F I I S L C C I V A V T I P Y I L F R C R T F Q Q E Y V Y G V
801 TGAGCAGGGT GTTTCGAGG AAGACAAGCA ACTCTGAAGA AACCAACAGG GTGACTACCA TCGCAACTGA TGAACCAGAT TCCACGCTC TGATTATGTA
ACTCGTCCCA CAAACGGTCC TTCTGTTCGT TGAGACTTCT TGGGTGTTCC CACTGATGTT ACGGTGACT ACTTGGTCTA ACGGTCCGAG ACTAATCACT
224 S R V F A R K T S N S E E T T R V T T I A T D E P D S Q A L I S D
901 C T A C T C T G A T G A T C C T T G C C I C A G C C A G G A G T A C C A A A T A A C C A T C A G A T C A A C A A I G T C T A T T C C T G C C I G C T G A A C A C A G T T T C C A G A A C T A A G A A G
G A T G A G A C T A C T A G G A A C G G A G T C G G T C C T C A T G T T T A T T G G T A G T C A G A T A G G A C G G A C G A C T T G T G T C A A A G G T C T T T G A T T C T T C
257 Y S D D P C L S Q E Y Q I T I R S T M S I P A C O
1001 T T C T T G C T A C T G A G A A A A T A A C A T C T G C T A A A T G C C C C T A C T A A G T C A G G I C T A C T G G I A T T A C C T G G G I A T T A C T A C T I T T T A C T A C T I G C C T T C A C A
A A G A A O G A T G A C T T C T T T T A T T G T A G A C G A T T T T A C G G G G A T G A T T A C C A G T C C C A T T A A T G G A C A A T G A A T A A A T G A T G A A C G G A A G T T G T

图 3B

```

1101 TAGCTTTC TCCTGGCTTC TTTCTTCTTA GACAACCTAA AGTATCTATC TAGTCTGCCA ATTCTGGGC CATTGAGAAA TCC TGGGTTT GGCTAAGAAT
    ATCGAAAGAG GGACCGAAGG AAAGAAGAAT CTGTGGATT TCATAGATAG ATCAGACCGT TAAGACCCCG GTAACITTT AGGACCCAAA CCGATTCTTA

1201 ATACTACATG CACCTCAAGA AATCTAGCTT CTGGGCTTCA CCCAGAACA TTTTCTTCT AGGCCCTTCA CAACITCTCT CCAAACAGCA GAGAAAATTC
    TATGATGTAC GTGGAGTCT TTAGATCGAA GACCCGAAGT GGGCTTGT AAAGAAGGA TCCCGGAAGT GTTGAGAAGA GGTGTGTCT CTTCTTAAGG

1301 ATAGCAGTAG AGTTCCTTIA TCATGGCTCC AGACAGGCTG AGTCTCAGTC CTACAACCTC AGACAAGCAC ATGGCTCTAG GATTACTCTT CTTCTCTIAG
    TATGTCATC TCCAAGNAAT AGTACGGAGG TCTGTGGCAC TCAGAGTCAG GATGTTTGAG TCTGTGTGTG TACCCAGATC CTAATGAGGA GAAAGAGATC

1401 GGGCAGATGA CTTTTAATTG ATATTACTAT TGCTACATTA TGAATCTAAT GCACATGTAT TCCTTTGTTG TTAATAATG TTTAATCATG ACATCAAAAA
    CCGGTCTACT GAAATTAAC TATAATGATA ACGATGTAACT ACTTAGATTA CGGTACATA AGAAAACAAC AATTATTAC AAATTAGTAC TGTAGTTTTT

1501 AAAAAAAAAA AAGGGGGCC GCGACTCTAG AGTGGACCTG CAGTAGGGAT AACAGGTAA TAAGCTTGGC CCGCATGGCC CAACTTGTTT
    TTTTTTTTTT TTCGGGGGG CCGTGAGATC TCAGCTGGAC GTCATCCCTA TTGCCCATT ATTCGAACCG GCGGTACCGG GTTGAACAAA
    pRK5 在这里继续

```

图 3C

基于结构的 CR1g 亲和力和成熟以生成更有力的抑制剂

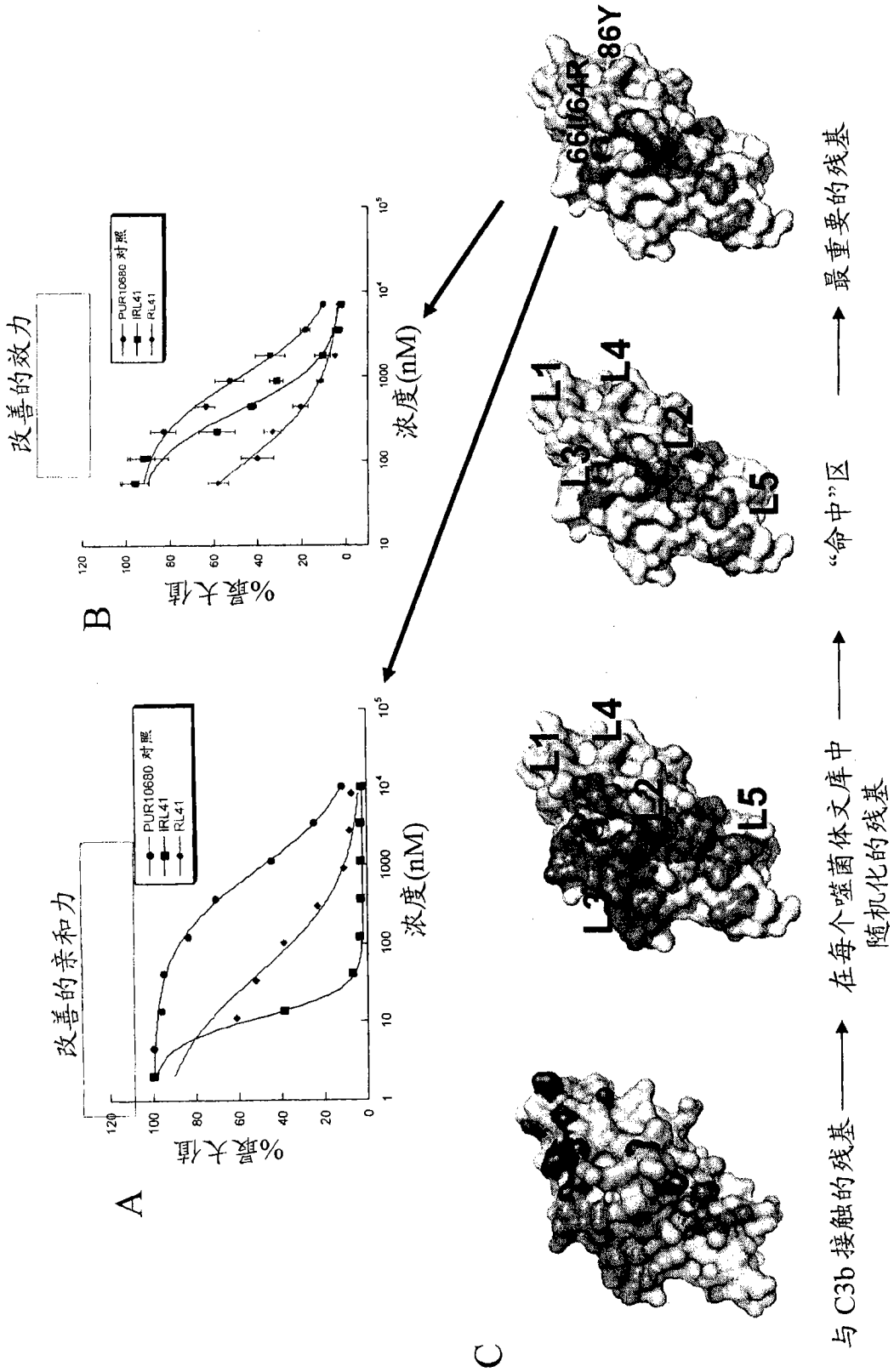


图 4

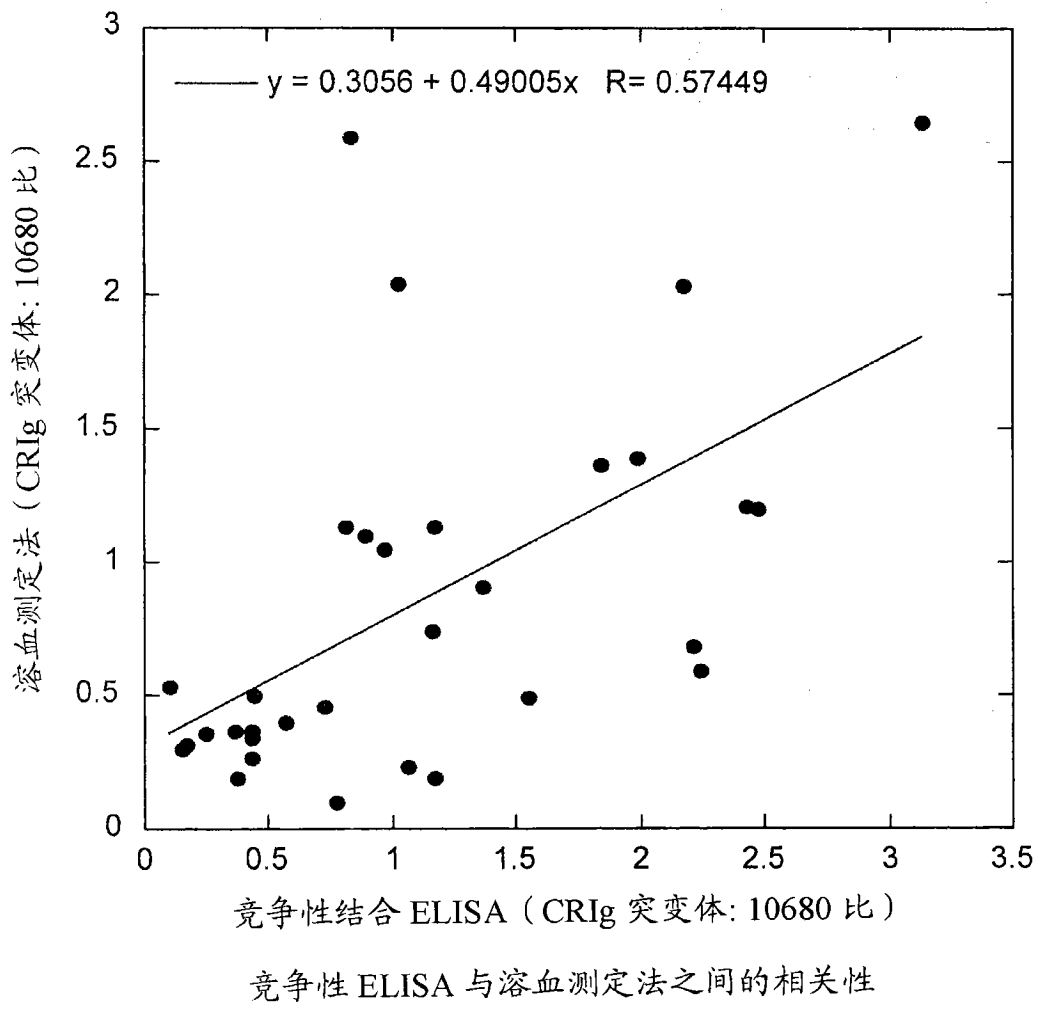
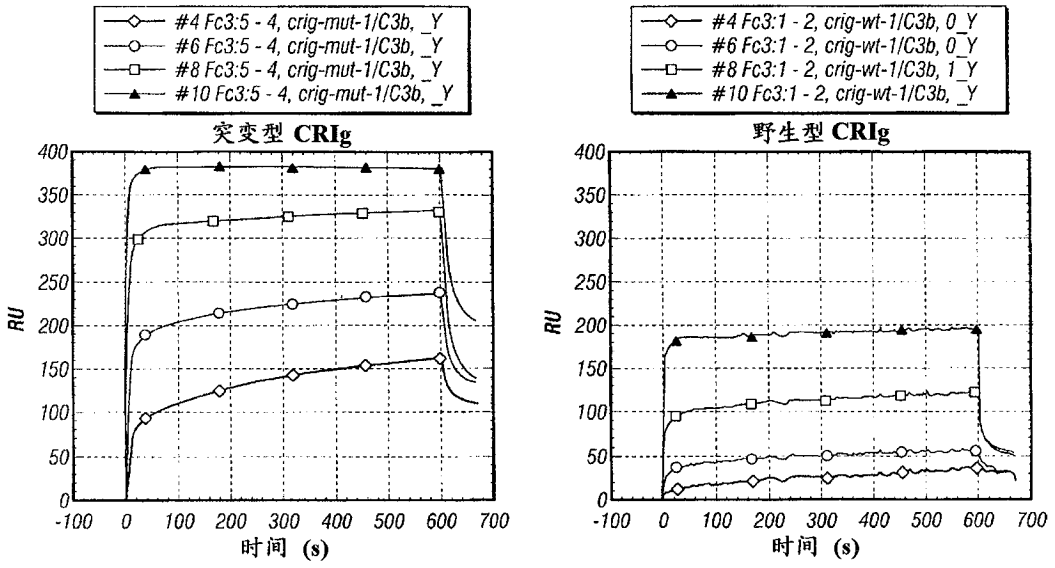


图 5

A

Q64R/M86Y CRIg 突变体的改善的亲合力



B

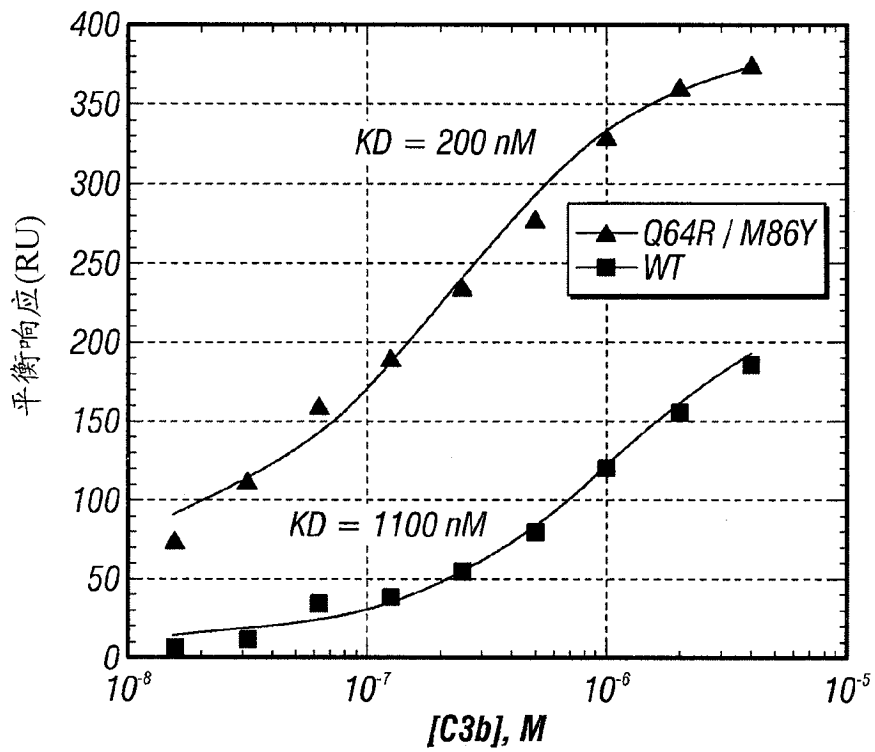


图 6

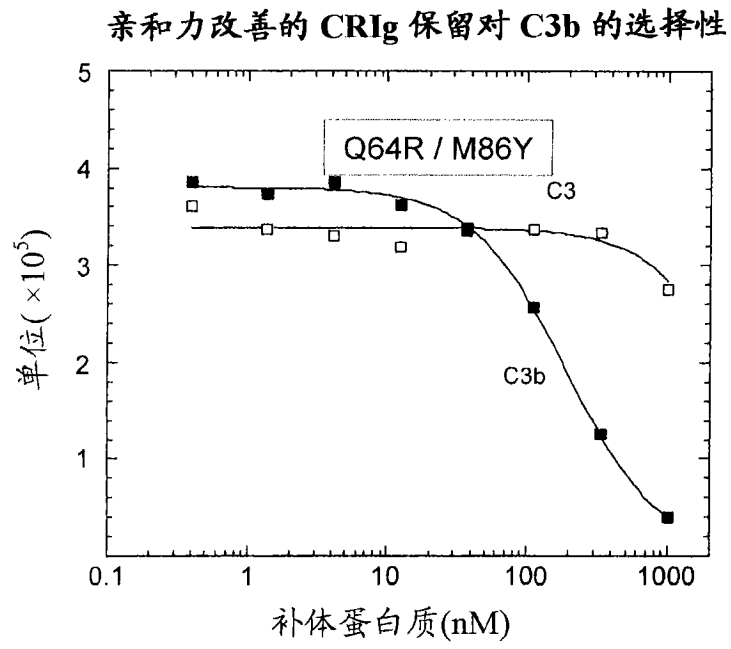


图 7

CRIg Q64R/M86Y 在体外与野生型 CRIg 相比改善的补体抑制效力

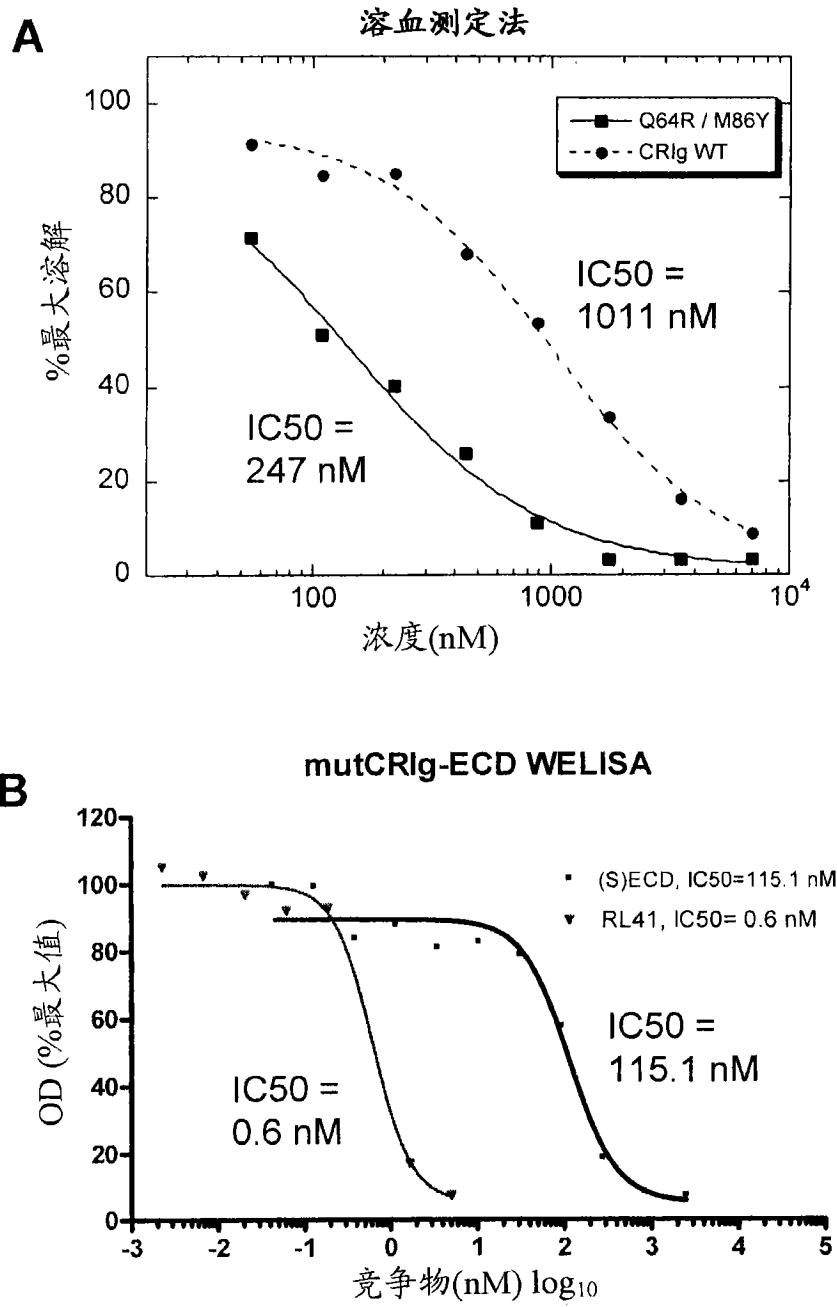


图 8

CRIg Q64R/M86Y 显示出胜过 CRIg WT 在体内改善的体内功效

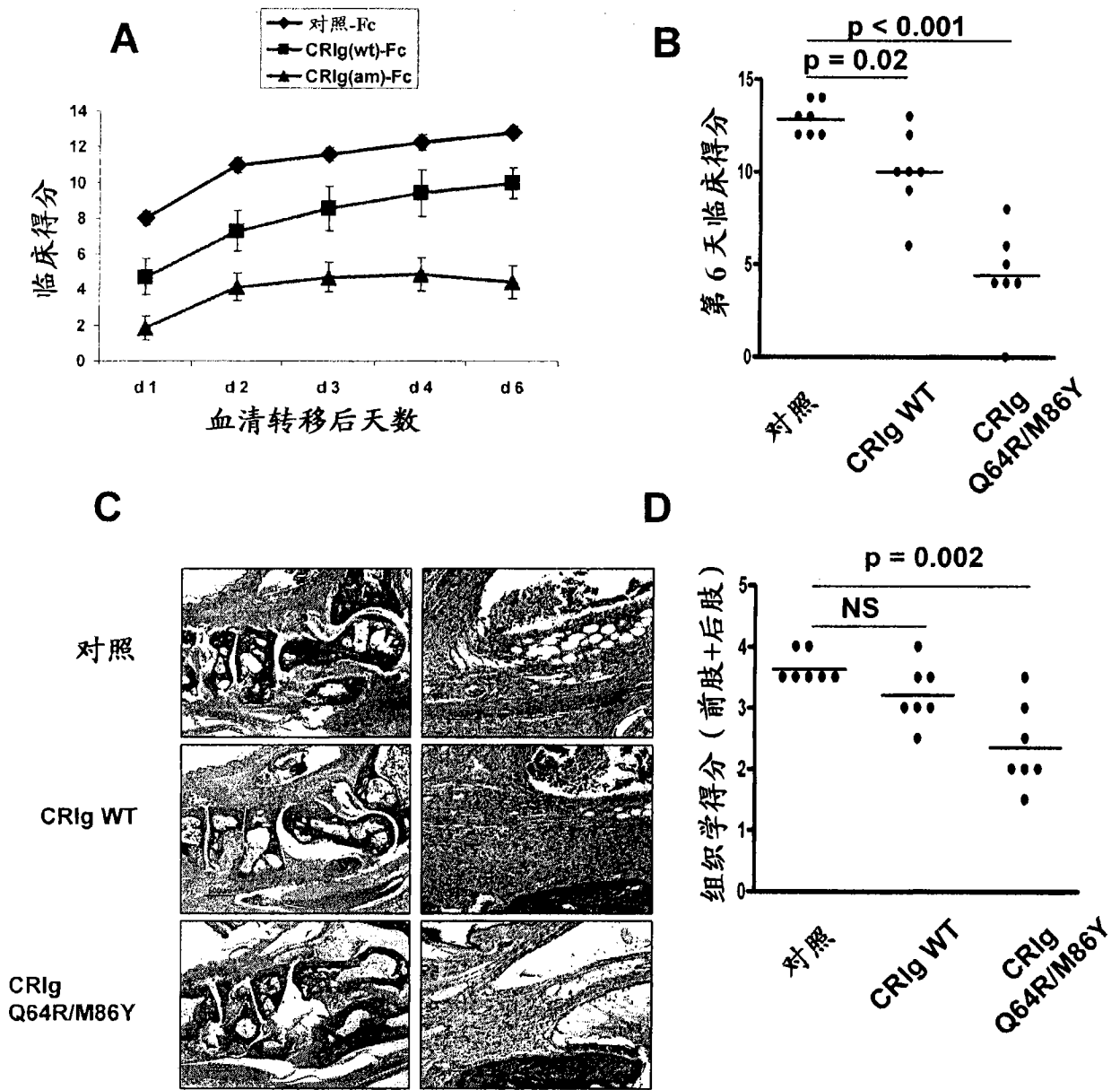


图 9

表 1

表 1: 噬菌体文库

文库	位置	多样性
文库 1	E8-K15	1.2×10^{10}
文库 2	R41-T47	1.4×10^{10}
文库 3	S54-Q64	1.6×10^{10}
文库 4	E85-Q99	1.2×10^{10}
文库 5	Q105-K111	1.9×10^{10}

通过噬菌体展示逐步生成较高亲和力 CR1g

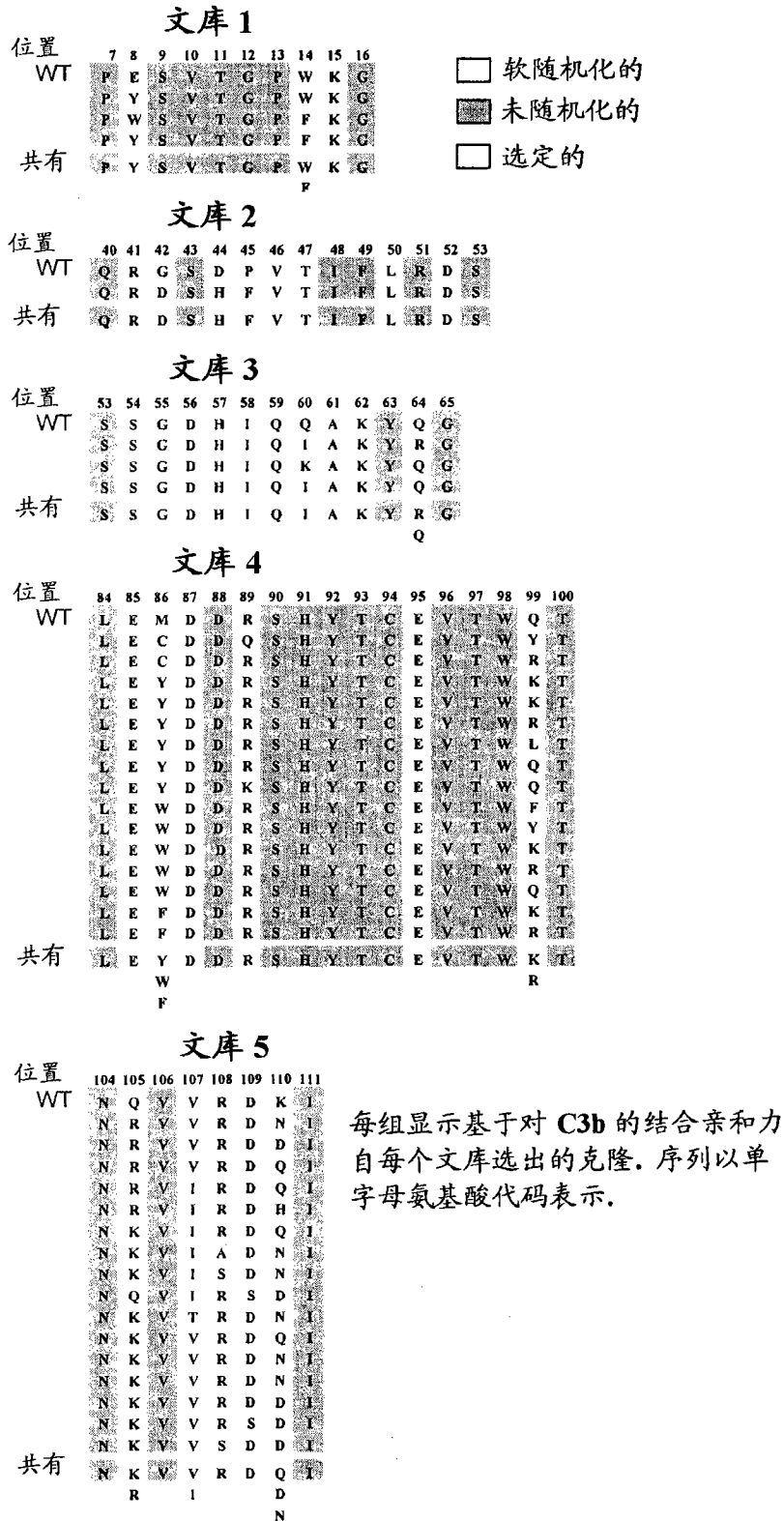


表 2

表 3

	名称	突变体	竞争性 ELISA			溶血抑制		
			Mu Ic50 (nM)	WT-P10680 (nM)	WT/Mu	Mu Ic50	WT-P10680	WT/Mu
文库 1	L11	E8Y	384	332	0.9X	439	591	1X
	L12	E8W	142	332	2X	176	657	4X
	L13	W14F	882	332	0.4X	293	596	2X
	L15	E8Y/W14F	1274	332	0.3X	310	528	2X
	L21	G42D	453	332	0.7X	378	416	1X
文库 2	L22	D44H	338	332	1X	1207	591	0.5X
	L23	P45F	1266	332	0.3X	358	528	1.5X
	L24	G42D/D44H/P45F	238	332	1X	227	498	2X
	L31	Q60I	388	332	0.9X	78	416	5X
	L32	Q64R	34	332	10X	293	549	2X
文库 3	L33	Q60I/Q64R	255	332	1X	51	492	10X
	L41	M86Y	123	332	3X	124	657	5X
	L42	M86W	80	332	4X	226	635	3X
文库 4	L43	M86F	604	332	0.5X	185	794	4X
	L44	Q99K	268	332	1X	588	520	1X
	L45	Q99R	1397	331	0.2X	818	682	0.8X
	L46	Q99Y	468	332	0.7X	1715	663	0.4X
	L47	Q99F	296	332	1X	570	520	0.9X
	L48	Q99L	1376	332	0.2X	828	682	0.8X
	L49	M86W/Q99R	55	332	6X	201	635	3X
	L410	M86F/Q99R	121	332	3X	273	746	3X
	L411	M86W/Q99K	1594	298	0.2X	1980	747	0.4X
	L51	Q105R	599	298	0.5X	901	794	0.9X
	L52	Q105K	491	298	0.6X	696	663	1X
	L55	K110D	128	298	2X	196	525	3X
	L56	K110N	132	298	2X	376	746	1.2X
	L58	K110H	1105	298	0.3X	1393	686	0.5X
L59	Q105R/K110N	127	298	2X	180	525	3X	
L510	Q105R/K110D	1011	298	0.3X	954	686	0.7X	
L511	Q105R/K110Q	166	298	2X	234	592	3X	
L512	Q105K/K110Q	937	298	0.3X	814	596	0.7X	
L514	Q105K/K110D	46	298	6X	167	549	3X	

表 4

名称	突变体	竞争性 ELISA			溶血抑制		
		Mu Ic50 (nM)	WT-P10680 (nM)	WT/Mu	Mu Ic50	WT-P10680	WT/Mu
L12	E8W	142	332	2X	176	657	4X
WL21	E8W/G42D	400	457	1X	1601	506	0.3X
WL23	E8W/P45F	376	457	1X	2063	506	0.2X
WL42	E8W/M86W	71	457	6X	416	506	1X
WL51	E8W/Q105R/K110N	312	457	1X	475	506	1X
WL55	E8W/K110N	374	457	1X	492	506	1X
WL59	E8W/Q105R/K110N	276	457	12X	2340	506	0.2X
L32	Q64R	34	332	10X	293	549	2X
RL11	Q64R/E8Y	303	712	2X	390	506	1X
RL21	Q64R/G42D	490	712	1X	217	506	2X
RL23	Q64R/P45F	293	712	2X	375	506	1X
RL41	Q64R/M86Y	40	712	18X	85	506	6X
RL42	Q64R/M86W	56	712	13X	170	506	3X
RL46	Q64R/Q99Y	682	712	1X	473	506	1X
RL47	Q64R/Q99F	725	712	1X	669	506	0.8X
RL49	Q64R/Q99R	64	712	11X	177	506	3X
RL51	Q64R/Q105R/K110N	286	712	2X	227	506	2X
RL52	Q64R/Q105K	290	712	3X	222	506	2X
RL59	Q64R/Q105R/K110N	65	712	11X	208	506	2X
L33	Q60I/Q64R	255	332	1X	51	492	10X
IRL11	Q60I-Q64R/E8Y	34	903	27X	327	1052	3X
IRL21	Q60I-Q64R/G42D	29	903	31X	386	1052	3X
IRL23	Q60I-Q64R/P45F	31	903	29X	338	1052	3X
IRL24	Q60I-Q64R/G42D/D44H/P45F	4	903	226X	235	1052	4X
IRL41	Q60I-Q64R/M86Y	10	903	90X	358	1052	3X
IRL51	Q60I-Q64R/Q105R	24	903	38X	313	1052	3X
IRL52	Q60I-Q64R/Q105K	22	903	41X	143	1052	7X
IRL55	Q60I-Q64R/K110N	33	903	27X	292	1052	4X
IRL59	Q60I/Q105R/K110N	15	903	60X	277	506	4X
L41	M86Y	123	332	3X	124	657	5X
YL11	M86Y/E8Y	75	457	6X	562	962	2X
YL21	M86Y/G42D/D44H/P45F	71	457	6X	220	962	4X
YL23	M86Y/P45F	7	457	65X	202	962	5X
YL24	M86Y/G42D/D44H/P45F	31	457	15X	248	962	4X
YL44	M86Y/Q99K	91	457	5X	250	962	4X
YL49	M86Y/Q99R	175	457	3X	392	962	2X
YL51	M86Y/Q105R	39	457	12X	417	962	2X
YL52	M86Y/Q105K	49	457	9X	224	962	4X
YL59	M86Y/Q105R/K110N	18	457	25X	515	962	2X