



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106604932 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 10

(21) 申请号 201580048027.0

(22) 申请日 2015.07.10

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106604932 A

(43) 申请公布日 2017.04.26

(30) 优先权数据
14176619.6 2014.07.10 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.03.07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2015/055226 2015.07.10

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/005950 EN 2016.01.14

(73) 专利权人 苏黎世大学
地址 瑞士苏黎世市莱米大街71号邮编CH-8006

(72) 发明人 奥努尔·波伊曼

娜塔莉亚·阿瑞纳斯拉米雷斯
邹超

(74) 专利代理机构 北京锤维联合知识产权代理有限公司 11579

专利代理师 罗银燕

(51) Int.Cl.
C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C12R 1/91 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101189265 A, 2008.05.28
CN 101045923 A, 2007.10.03

审查员 张智贤

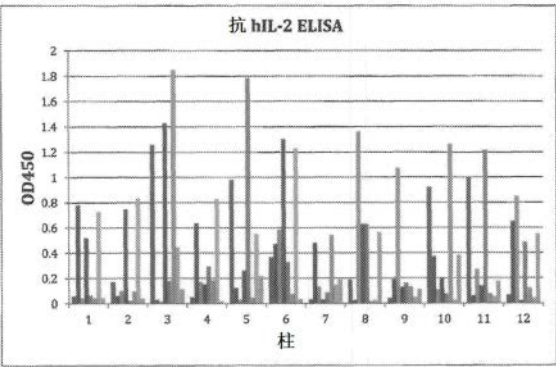
权利要求书2页 说明书23页
序列表20页 附图11页

(54) 发明名称

人白细胞介素-2的免疫刺激单克隆抗体

(57) 摘要

本发明涉及人白细胞介素-2 (hIL-2) 的特定性单克隆抗体 (mAb), 或者其抗原结合片段, 其与 hIL-2 的结合抑制 hIL-2 与 CD25 的结合, 并且通过以下任意参数表征所述抗体: 所述 mAb 的可变链包含 SEQ ID NO 005 或 SEQ ID NO 006 的氨基酸序列; 与 hIL-2 的结合的特征在于解离常数 (K_D) $\leq 7,5 \text{ nmol/L}$; 与 hIL-2 的结合的特征在于解离率 (K_{off}) $\leq 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 和/或所述抗体显示与鼠 IL-2 无可测量的交叉反应性。



1. 人白细胞介素-2 (hIL-2) 的特异性单克隆抗体 (mAb) 或者其抗原结合片段, 其中所述抗体与hIL-2的结合抑制hIL-2与CD25的结合, 并且所述抗体或者其抗原结合片段通过以下参数来表征:

- a. 与hIL-2的结合的特征在于解离常数 (K_D) $\leq 7,5 \text{ nmol/L}$ 、 $\leq 5 \text{ nmol/L}$ 、 $\leq 3 \text{ nmol/L}$ 、 $\leq 2 \text{ nmol/L}$ 或 $\leq 1,5 \text{ nmol/L}$;
- b. 与hIL-2的结合的特征在于解离率 (K_{off}) $\leq 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $\leq 8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $\leq 6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $\leq 4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $\leq 3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 或 $\leq 2,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, 以及
- c. 包含如SEQ ID NO:7所示的HCDR1、如SEQ ID NO:8所示的HCDR2、如SEQ ID NO:9所示的HCDR3、如SEQ ID NO:

10所示的LCDR1、如SEQ ID NO:11所示的LCDR2、如SEQ ID NO:12所示的LCDR3。

2. 如权利要求1所述的人白细胞介素-2 (hIL-2) 的特异性单克隆抗体或者其抗原结合片段, 其中所述抗体或者其抗原结合片段显示对鼠IL-2无可测量的交叉反应性。

3. 核酸分子, 其编码权利要求1或2所述的人白细胞介素-2 (hIL-2) 的特异性单克隆抗体或者其抗原结合片段。

4. 载体, 其包含权利要求3所述的核酸分子。

5. 细胞, 其包含权利要求3所述的核酸分子, 或者表达权利要求3所述的核酸分子。

6. 细胞, 其能够产生权利要求1或2所述的人白细胞介素-2 (hIL-2) 的特异性单克隆抗体 (mAb) 或者其抗原结合片段。

7. 用作用于治疗癌症或病毒性感染的药物的治疗性制剂, 其包含:

- a. 权利要求1或2所述的hIL-2单克隆抗体 (mAb), 或
- b. 权利要求1或2所述的hIL-2单克隆抗体 (mAb) 和人白细胞介素-2。

8. 权利要求1或2所述的抗体或分子在制备用于治疗癌症或病毒感染的药物中的用途。

9. 用作用于治疗癌症或病毒感染的药物的治疗性制剂, 其含有融合蛋白, 所述融合蛋白包含:

a. 权利要求1或2所述的人白细胞介素-2 (hIL-2) 的特异性单克隆抗体 (mAb) 或者其抗原结合片段,

b. 人IL-2, 以及

c. 1至50个氨基酸的氨基酸接头, 所述氨基酸接头将所述人白细胞介素-2 (hIL-2) 的特异性单克隆抗体 (mAb) 或者其抗原结合片段与所述人IL-2连接为一条单多肽链。

10. 如权利要求9所述的用作用于治疗癌症或病毒感染的药物的治疗性制剂, 其中所述氨基酸接头为5至40个氨基酸。

11. 如权利要求9所述的用作用于治疗癌症或病毒感染的药物的治疗性制剂, 其中所述氨基酸接头为10至30个氨基酸。

12. 如权利要求9所述的用作用于治疗癌症或病毒感染的药物的治疗性制剂, 其中所述氨基酸接头为15至25个氨基酸。

13. 权利要求9-12中任一项所述的用作用于治疗癌症或病毒感染的药物的治疗性制剂在制备用于治疗癌症或病毒感染的药物中的用途。

14. 如权利要求1或2所述的人白细胞介素-2 (hIL-2) 的特异性单克隆抗体 (mAb) 或者其

抗原结合片段,其与人白细胞介素-2 (hIL-2) 的表位结合,其中所述表位包含氨基酸K52、P54、K55、T57、R58、T61、F62、K63、Q94和K96。

15. 如权利要求14所述的人白细胞介素-2 (hIL-2) 的特异性单克隆抗体 (mAb) 或者其抗原结合片段,其中所述表位还包含氨基酸N50、N53、N91、L92、A93、N97中的任一个或多个。

16. 如权利要求1或2所述的人白细胞介素-2 (hIL-2) 的特异性单克隆抗体 (mAb) 或者其抗原结合片段,其中所述抗体是人源化的。

人白细胞介素-2的免疫刺激单克隆抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及结合人白细胞介素-2 (hIL-2) 的抗体。本发明更具体地涉及特异性地结合hIL-2的特定表位并且当与该表位结合时能够抑制hIL-2与CD25结合的抗体。此外,本发明涉及所述抗体的体外和体内治疗应用。

[0002] 发明背景

[0003] 恶性黑素瘤是男性和女性中的常见癌症类型。一旦黑素瘤成为转移性的并扩散至远处,5年的存活率非常差,计算在约15%。转移性黑素瘤的当前可用治疗策略几乎不改善该存活率。

[0004] 白细胞介素-2 (IL-2) 是能够有效地刺激细胞毒性淋巴细胞抵抗转移性肿瘤的细胞因子。然而,IL-2也能够刺激所谓的CD25⁺CD4⁺调节T细胞 (Treg细胞),所述CD25⁺CD4⁺调节T细胞 (Treg细胞) 对自身免疫性疾病的预防是关键的。重要地是,Treg细胞能显著地抑制细胞毒性淋巴细胞的抗肿瘤应答,因此,其有点拮抗IL-2的有益抗肿瘤效果。而且,在实现临床抗肿瘤应答所需的剂量下,IL-2可能发挥毒性副作用。

[0005] 自20世纪80年代初以来,使用标准的IL-2免疫疗法用于转移性黑素瘤和转移性肾细胞癌的免疫治疗,其分别导致FDA在1996和1992对这些适应症的批准。虽然在高剂量下给予的IL-2在约17%的患者中显示客观应答率以及在约6-9%的患者中显示完全消退,所述患者患有这些致命的转移性癌症,但是在这些剂量下给予的IL-2时常导致毒性副作用,如低血压、肺水、肝细胞损伤、胃肠道毒性和全身水肿。而且,如上所述,IL-2能够刺激Treg细胞,所述Treg细胞继而能够抑制抗肿瘤CD8⁺T细胞和NK细胞的活性。

[0006] 已显示IL-2与特定的抗IL-2单克隆抗体 (mAb) 的组合通过

[0007] (1) 使IL-2优选导向细胞毒性淋巴细胞,而不是Treg细胞,并且

[0008] (2) 致使IL-2更有效但毒性小 (Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, and Sprent J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* (2006) 311:1924-1927; Krieg C, Letourneau S, Pantaleo G, and Boyman O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2010) 107:11906-11911) 在癌症免疫疗法的实验鼠模型中改善IL-2疗法。

[0009] 该方法具有以下优点:未突变的天然IL-2经抗IL-2mAb被递送至CD8⁺T细胞和NK细胞,其随后发挥有效的抗肿瘤特性,同时与该类抗IL-2mAb复合的IL-2几乎不激活Treg细胞。而且,在小鼠中,与该类抗IL-2mAb复合的IL-2比标准的IL-2免疫疗法的毒性更小。然而,由于缺乏合适的抗人IL-2mAb,该疗法迄今为止尚未用于患者中。

[0010] 发明概述

[0011] 通过本发明所解决的问题是提供能够识别并结合人IL-2的特异性表位的抗人IL-2单克隆抗体,从而相比于Treg细胞有利于刺激细胞毒性T细胞和NK细胞,用于在体外和体内的治疗应用中使用。该问题通过独立权利要求的主题解决。

[0012] 根据本发明的第一方面,提供人白细胞介素-2(hIL-2)的特异性单克隆抗体(mAb)或者其抗原结合片段,其中所述抗体能够结合hIL-2中的特定表位,从而抑制与CD25的结合,因此调节hIL-2/IL-2R的相互作用的免疫学效果。本发明的抗体还通过以下参数中的至少一项来表征:

[0013] a)mAb的可变链包含具有与SEQ ID NO 005或SEQ ID NO 006相比 $\geq 85\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 或者 $\geq 99\%$ 同一性的氨基酸序列;

[0014] b)所述抗体与hIL-2的结合为即反应 $\text{mAb} + \text{hIL-2} \rightleftharpoons \text{mAb} \cdot \text{hIL-2}$,其中mAb \cdot hIL-2代表抗体和白细胞介素的结合复合物,其特征在于解离常数(K_D) $\leq 7,5\text{nmol/L}$ 、 $\leq 5\text{nmol/L}$ 、 $\leq 3\text{nmol/L}$ 、 $\leq 2\text{nmol/L}$ 或 $\leq 1,5\text{nmol/L}$;

[0015] c)所述抗体与hIL-2的结合的特征在于解离率(K_{off}) $\leq 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $\leq 8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $\leq 6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $\leq 4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $\leq 3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 或 $\leq 2,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$;

[0016] d)当通过表面等离子体共振测量时,基于mAb与hIL-2的结合,得到的mAb \cdot hIL-2复合物不再有效地结合人IL-2受体 α (也被称为CD25),相比于人CD25与游离的(未复合的)hIL-2的结合,有效地使人CD25与mAb \cdot hIL-2的结合回到背景水平;和/或

[0017] e)所述抗体显示与鼠IL-2无可测量的交叉反应性。

[0018] 与鼠IL-2的交叉反应性的缺乏对于临床前研究是有利的,所述临床前研究通常涉及小鼠模型,如使用mAb \cdot hIL-2复合物治疗鼠肿瘤模型,在这里交叉反应的抗IL-2mAb可能结合内源性的鼠IL-2并使其与内源性的鼠Treg细胞隔离,由此增强抗肿瘤应答。

[0019] 与鼠IL-2的交叉反应性的缺乏对于在开发人患者中的候选mAb之前进行的临床前的安全性和功效的研究也是有利的。

[0020] 在某些实施方案中,hIL-2mAb包含至少一个 V_H 和/或 V_L 序列,所述序列具有与SEQ ID NO 019或SEQ ID NO 020相比 $\geq 80\%$ 、 $\geq 85\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 或 $\geq 98\%$ 的同一性。

[0021] 在某些实施方案中,hIL-2mAb的可变链包含具有与SEQ ID NO 003、004、005或006相比 $\geq 85\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 或 $\geq 99\%$ 同一性的氨基酸序列,并且hIL-2mAb的特征在于解离常数 $\leq 7,5\text{nmol/L}$ 、 $\leq 5\text{nmol/L}$ 、 $\leq 3\text{nmol/L}$ 、 $\leq 2\text{nmol/L}$ 或 $\leq 1,5\text{nmol/L}$ 。

[0022] 在某些实施方案中,hIL-2mAb的可变链包含具有与SEQ ID NO 005或006相比 $\geq 85\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 或 $\geq 99\%$ 同一性的氨基酸序列,并且hIL-2mAb的特征在于解离率 $\leq 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $\leq 8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $\leq 6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $\leq 4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $\leq 3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 或 $\leq 2,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 。

[0023] 在某些实施方案中,hIL-2mAb的可变链包含具有与SEQ ID NO 005或006相比 $\geq 85\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 或 $\geq 99\%$ 同一性的氨基酸序列,并且hIL-2mAb显示与鼠IL-2无可测量的交叉反应性。

[0024] 在某些实施方案中,为了向人患者施用,使hIL-2mAb的序列人源化,以防止不良反应。

[0025] 在某些实施方案中,将hIL-2mAb提供为抗原结合片段(Fab)或单链可变片段(scFv)。

[0026] 在某些实施方案中,hIL-2mAb包含至少一个互补决定区(CDR)序列,所述序列具有与SEQ ID NO 007、008、009、010、011或012相比 $\geq 80\%$ 、 $\geq 85\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 \geq

94%、≥95%、≥96%、≥97%或≥98%的同一性。

[0027] 根据本发明的第二方面,提供编码能够结合本发明的第一方面所述的人白细胞介素-2的单克隆抗体或者其抗原结合片段的核酸分子。

[0028] 在某些实施方案中,本发明的第二方面所述的核酸分子具有与SEQ ID NO 003至004相比≥60%、≥70%、≥80%、≥90%、≥95%或者≥99%的序列同一性。

[0029] 根据本发明的第三方面,提供包含本发明所述的核酸分子的载体。

[0030] 根据本发明的第四方面,提供包含或表达本发明所述的核酸分子的细胞。

[0031] 根据本发明的第五方面,提供能够产生本发明的第一方面所述的抗体的细胞。

[0032] 根据本发明的第六方面,提供产单克隆抗体的杂交瘤细胞系,其特征在於所产生的抗体是本发明的第一方面的抗体。

[0033] 根据本发明的第七方面,提供用于治疗癌症或其它受益于免疫刺激疗法的疾病(如病毒感染)的治疗性制剂,其包含向对象同时施用或在不同的时间点施用的

[0034] i. 本发明的第一方面所述的单克隆抗体(mAb),和/或

[0035] ii. 人白细胞介素-2或人IL-2突变体。

[0036] 根据本发明的第八方面,提供融合蛋白。融合蛋白包含:

[0037] a. hIL-2结合肽片段,其中所述多肽通过以下参数中的任一项表征:

[0038] i. hIL-2结合肽片段包含具有与SEQ ID NO 021或SEQ ID NO 022相比≥85%、≥90%、≥92%、≥93%、≥94%、≥95%、≥96%、≥97%或≥98%同一性的氨基酸序列;

[0039] ii. 所述多肽片段与hIL-2的hIL-2结合的特征在于解离常数(KD) ≤7,5nmol/L、≤5nmol/L、≤3nmol/L、≤2nmol/L或≤1,5nmol/L;

[0040] iii. 所述hIL-2结合肽片段与hIL-2结合的特征在于解离率(K_{off}) ≤ $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、≤ $8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、≤ $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、≤ $4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、≤ $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 或≤ $2,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$;

[0041] 和/或

[0042] iv. hIL-2结合肽片段显示与鼠IL-2无可测量的交叉反应性。

[0043] b. 人IL-2多肽片段,其具有与SEQ ID NO 001相比≥85%、≥90%、≥92%、≥93%、≥94%、≥95%、≥96%、≥97%或≥98%的同一性,以及,任选地,

[0044] c. 1至50个氨基酸的氨基酸接头,具体为5至40个氨基酸的氨基酸接头,更具体为10至30个氨基酸的氨基酸接头,甚至更具体为大约15至25个氨基酸的氨基酸接头,其将hIL-2结合肽片段与人IL-2多肽片段连接作为一条单多肽链。

[0045] 换言之,所述融合蛋白保留抗体结合并引导人白细胞介素-2刺激所选择的免疫细胞如CD8⁺T细胞和NK细胞的能力。

[0046] 使用此类融合蛋白的优势是人IL-2将不能与所述抗体分离并且所述疗法将由一种单一产物而非两种组成,其便于制造、给药和法规遵从性的各个方面。

[0047] 根据本发明的第九方面,提供结合特异性表位的分离的抗体或其抗原结合片段。所述表位可以是本发明其它方面所述的分离的抗体或其抗原结合片段结合的表位。在一个实施方案中,分离的抗体或分子与人白细胞介素-2(hIL-2)的表位结合,所述表位包含氨基酸K52、P54、K55、T57、R58、T61、F62、K63、Q94和K96。在另一实施方案中,分离的抗体或分子与还包含氨基酸N50、N53、N91、L92、A93和N97中的任一种或多种的表位结合。还提供这样的分离的抗体或分子,其包含抗原识别表面,所述抗原识别表面具有与其它方面所述的抗体

或其抗原结合片段等同的表位识别特征。

[0048] 在单个可分离特征(如,例如,编码序列或结合表位)的替代物在本文被布置为“实施方案”的情况下,应理解,此类替代物可以自由组合以形成本文所公开的发明的分立实施方案。

[0049] 通过下述实施例和附图进一步阐明本发明,从中可以得到其它的实施方案和优点。这些实施例意在阐明本发明而不是限制其范围。

[0050] 定义

[0051] “人白细胞介素-2”或“hIL-2”意指命名为UniProt ID P60568的蛋白并且以SEQ ID NO:1再现。

[0052] 本说明书的背景中的同一性为代表逐个位置的序列比较结果的单个定量参数。序列比较的方法是本领域已知的;可公开获得的BLAST算法是一个实例。核酸序列比较的一个此种实例是BLASTN算法,其使用缺省设置:期望阈值:10;字长:28;查询范围中的最大匹配:0;匹配/错配得分:1、-2;空位缺失:线性。在不存在其它测量变量的情况下,应根据上述说明测量同一性。

[0053] 在本说明书的背景中,术语抗体以其在细胞生物学和免疫学领域中已知的含义使用;其指完整的抗体,任何的抗原结合片段或其单链以及相关的或衍生的构建体。完整的抗体是包含通过二硫键互相连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由三个结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 组成。每条轻链由轻链可变区(在本文缩写为 V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。 V_H 和 V_L 区可被进一步细分为叫做互补决定区20(CDR)的高变区,散布有更保守的区域,叫做骨架区(FR)。各 V_H 和 V_L 由按下述顺序从氨基端向羧基端排列的三个CDR和四个FR组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分。

[0054] 在本说明书的背景中,术语抗原结合部分或抗原结合片段以其在细胞生物学和免疫学领域中已知的含义使用;其指完整抗体的一个或多个片段,所述片段保留与给定抗原(例如,白细胞介素-2)特异性结合的能力。抗体的抗原结合功能可以通过完整抗体的片段来执行。在术语抗体的抗原结合部分或抗原结合片段内涵盖的结合片段的实例包括Fab片段,由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H 结构域组成的单价片段; $F(ab)_2$ 片段,包含在铰链区通过二硫桥链接的两个Fab片段的二价片段;Fd片段,由 V_H 和 C_H 结构域组成;Fv片段,由抗体的单个臂的 V_L 和 V_H 结构域组成;单域抗体(dAb)片段,其由 V_H 结构域或 V_L 结构域组成;以及分离的互补决定区(CDR)。HCDR意指重链的CDR,以及LCDR意指轻链的CDR。

[0055] 在本说明书的背景中,术语嵌合抗体以其在细胞生物学和免疫学领域中已知的含义使用;其指这样的抗体分子:其中恒定区或者其部分被改变、替代或交换,使得抗原结合位点(可变区)被连接至不同或改变类型的恒定区、效应功能和/或种类、或者赋予嵌合抗体新特性的完全不同的分子,所述分子例如,酶、细胞因子、毒素、激素、生长因子、药物等。例如,可以通过用细胞因子替代抗体的恒定区来修饰所述抗体。由于被细胞因子替代,嵌合抗体可以保留其识别抗原的特异性,同时还具有最初的细胞因子分子的功能或者其部分功能。

[0056] 在本说明书的背景中,术语杂交瘤以其在细胞生物学和生物化学领域中已知的含义使用;其指通过产特异性抗体的B-细胞与骨髓瘤(B细胞癌症)细胞的融合而产生的杂交细胞。杂交瘤细胞可以在组织培养基中生长并产生单特异性的抗体(单克隆抗体)。

[0057] 在本说明书的背景中,术语单链可变片段(scFv)以其在细胞生物学和生物化学领域中已知的含义使用;其指免疫球蛋白的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)用10个至约25个氨基酸的短接头肽连接的融合蛋白。scFv保留原始免疫球蛋白的特异性,尽管移除了恒定区且引入了接头。

[0058] 在本说明书的背景中,术语抗原结合片段(Fab)以其在细胞生物学和免疫学领域中已知的含义使用;其指抗体上的结合抗原的区域。其由免疫球蛋白的重链(V_H)和轻链(V_L)各自的一个恒定区和一个可变结构域组成。这些结构域在单体的氨基末端处形成抗原结合位点。

[0059] 在本说明书的背景中,术语解离常数(K_D)以其在化学和物理学领域中已知的含义使用;其指测量较大对象可逆地解离为较小组分的倾向的平衡常数,如当复合物解离为其组成分子时。 K_D 用摩尔单位[M]表述并且对应于[Ag]的结合位点被结合一半时的[Ab]的浓度。换言之,未结合的[Ab]的浓度等于[AbAg]复合物的浓度。可以根据下式计算解离常数:

$$[0060] \quad K_D = \frac{[Ab] * [Ag]}{[AbAg]}$$

[0061] [Ab]:抗体的浓度;[Ag]:抗原的浓度;[AbAg]:抗体抗原复合物的浓度

[0062] 在本说明书的背景中,术语解离率(Koff;[1/sec])和结合率(Kon;[1/sec*M])以其在化学和物理学领域中已知的含义使用;它们指测量抗体与其靶抗原解离(Koff)或结合(Kon)的速率常数。Koff和Kon可以使用本领域熟练建立的方法实验性地测定。测定抗体的Koff和Kon的方法采用表面等离子体共振。这是诸如Biacore®或ProteOn®系统的生物传感器系统背后的原理。它们还可以用来通过使用下式来测定解离常数KD:

$$[0063] \quad K_D = \frac{[K_{off}]}{[K_{on}]}$$

[0064] 在本说明书的背景中,术语人源化抗体以其在细胞生物学和生物化学领域中已知的含义使用;其指由非人物种的免疫细胞最初产生的抗体,所述蛋白的序列已被修饰以增加其与在人中天然产生的抗体变体的相似性。

[0065] 在本说明书的背景中,术语无可测量的交叉反应性指抗体缺乏识别并结合来自其它物种的直系同源蛋白的能力。例如,如果,在合适的条件下,用足够敏感的方法(如表面等离子体共振)不能检测到针对人白细胞介素-2的抗体与鼠白细胞介素-2的结合,则所述抗体与鼠白细胞介素-2无可测量的交叉反应性。无可测量的交叉反应性的一个此个实例显示于图9下图的抗体(NARA1)。

[0066] 本文使用的“与hIL-2特异性结合”的抗体或蛋白意图指与人IL-2多肽以100nM或更低,10nM或更低,1nM或更低,100pM或更低,或者10pM或更低的 K_D 结合的抗体或蛋白。“与除人IL-2之外的抗原交叉反应”的抗体意图指以10nM或更低,1nM或更低,或者100pM或更低的 K_D 结合所述抗原的抗体。“与特定抗原不交叉反应”的抗体意图指以100nM或更高的 K_D ,或者1μM或更高的 K_D ,或者10μM或更高的 K_D 结合所述抗原的抗体。在某些实施方案中,不与抗原交叉反应的此类抗体在标准的结合分析中针对这些蛋白基本上呈现不可检测的结合。

[0067] 术语“表位”意指能够与抗体特异性结合的蛋白决定区。表位通常由分子的化学活性表面组群如氨基酸或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。构象表位和非构象表位的区别在于在变性溶剂的存在下与前者的结合丧失,但是与后者的结合未丧失。

[0068] 术语“表位结合结构域”或“EBD”指与靶表位上的结合位点特异性相互作用(例如,通过结合、空间位阻、使稳定/使不稳定、空间分布)的结合分子的部分(例如,抗体或者其表位结合片段或衍生物)。EBD也指保留与IL-2表位特异性相互作用(例如,通过结合、空间位阻、使稳定/使不稳定、空间分布)并抑制信号传导能力的抗体的一个或多个片段。抗体片段的实例包括但不限于,scFv,Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)₂片段,包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;Fd片段,由VH和CH1结构域组成;Fv片段,由抗体的单个臂的VL和VH结构域组成;dAb片段(Ward等人,(1989)Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;以及分离的互补决定区(CDR)。

[0069] EBD还包括单域抗体、大抗体、单链抗体、微型抗体、三链抗体、四链抗体、v-NAR和双-scFv(如本领域已知的(参见,例如,Hollinger and Hudson,(2005)Nature Biotechnology 23:1126-1136))、双特异性单链的双链抗体,或者被设计为结合两个不同表位的单链的双链抗体。EBD还包括抗体样分子或抗体模拟物,其包括但不限于特异性结合表位的微型抗体、大抗体、基于Fn3的蛋白骨架、锚蛋白重复(也被称为DARpin)、VASP多肽、禽胰多肽(aPP)、四连接素、Affililin、Knottin、SH3结构域、PDZ结构域、淀粉酶抑肽、新制菌素、蛋白A结构域、脂笼蛋白、运铁蛋白以及Kunitz结构域,其在本发明的范围内。可以将抗体片段移植进基于多肽如III型纤连蛋白(Fn3)的骨架(参见美国专利第6,703,199号,其描述了纤连蛋白多肽单体)。

[0070] 本发明还包括针对人IL-2的抗体,其为分离的抗体。

[0071] 本文使用的短语“分离的抗体”指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如,特异性地结合hIL-2的分离的抗体基本上不含特异性地结合除hIL-2之外的抗原的抗体)。然而,特异性地结合hIL-2的分离的抗体可以与其它抗原(如来自其它物种的IL-2分子)具有交叉反应性。而且,分离的抗体可以基本上不含其它细胞材料和/或化学物质。

[0072] 术语“核酸”和“多核苷酸”或“核苷酸编码序列”可互换使用并且指任意长度的核苷酸的聚合体形式,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或者其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构并且可以执行任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段(例如,探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分枝多核苷酸、质粒、载体、分离的任何序列的DNA、分离的任何序列的RNA、核酸探针、siRNA、shRNA、RNAi物质以及引物。多核苷酸可以在一个或多个碱基、糖和/或磷酸处被修饰或替换,具有本文所描述的或本领域已知的任何各种修饰或替换。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,可以在组装聚合物之前或之后对核苷酸结构进行修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分间隔。在聚合之后,如通过与标记组分缀合可以进一步修饰多核苷酸。该术语也指双链和单链分子。除非另有规定或要求,否则本发明的多核苷酸的任何实施方案包括双链形式和已知或预测组成双链形式的两种互补单链形式中的每种。

[0073] 术语“多肽”可与术语“蛋白”互换使用,并且在其最广义的意义上指两个或更多个亚基氨基酸、氨基酸类似物或模拟肽的化合物。所述亚基可以通过肽键连接。在另一实施方案中,所述亚基可以通过其它键连接,例如,酯键、醚键等。

[0074] 在一个实施方案中,本文使用的术语任何疾病或病症(例如癌症)的“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”指减轻疾病或病症(例如减缓或阻止或减少疾病的发展或者其临床症状的至少一种)。在另一实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”指缓解或减轻至少一种物理参数,包括不可被患者辨别的那些。而在另一实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”指在身体上(例如,可辨别症状的稳定),生理上(例如,物理参数的稳定)或者二者方面调节疾病或病症。除非在本文的下文具体地描述,否则用于评估疾病的治疗和/或预防的方法通常在本领域是已知的。

[0075] 附图简述

[0076] 图1显示抗人IL-2结合者。向先前包被有人IL-2的板添加B细胞杂交瘤融合之后获得的B细胞克隆的上清液。使用生物素化的抗小鼠IgG抗体检测抗人IL-2mAb。

[0077] 图2筛选用于与推测的特异性人IL-2表位结合的抗人IL-2mAb。将板用5344(无本文靶向的超拮抗行为的hIL-2mAb)包被并封闭,随后添加人IL-2以便允许细胞因子与5344的结合,由此覆盖IL-2的特异性表位。然后,添加在第一次筛选中产生阳性信号的上清液(参见图1)。在允许上清液中的mAb与IL-2-5344复合物结合之后,向板添加生物素化MAB602抗体,以便评估上清液中的测试mAb是结合与MAB602相同的区域(所谓的“竞争剂”)还是结合与MAB602不同的区域。竞争剂mAb导致吸光值(OD450)比用单独的MAB602获得的吸光值小两倍(在该情况下,OD=1.1,如H11中所示)。

[0078] 图3显示B细胞杂交瘤的浓度依赖性竞争。在该分析中,扩大第一筛选中的8个竞争剂B细胞杂交瘤克隆的上清液(参见图2),并且在使用前进行浓缩。这些8个竞争剂B细胞杂交瘤克隆的上清液(被标记为1至8)以递增的量添加。竞争性的竞争剂B细胞杂交瘤克隆使OD450与MAB602降低一样多或者甚至更多,这对于克隆1和克隆2是明显的。不同浓度的MAB602(绿色圆圈)作为对照。

[0079] 图4显示CD8+T细胞的体内增殖。将CD45.1-同类系IL-7转基因小鼠的羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)-标记的CD8+T细胞转移至CD45.2-同类系野生型受体小鼠,随后每日注射磷酸缓冲盐(PBS)、IL-2、IL-2加MAB602(IL-2/MAB602)、IL-2加5344(IL-2/5344)、IL-2加杂交瘤1(IL-2/Hyb#1)、或者IL-2加杂交瘤2(IL-2/Hyb#2),持续4天。在第5天,针对供体CD45.1+CD8+T细胞的CFSE特性,分析淋巴结和脾脏。显示用淋巴结获得的结果,在脾脏中获得类似的结果。

[0080] 图5显示在使用IL-2加杂交瘤1和杂交瘤2体内处理后内源性CD8+T细胞和NK细胞的表型特征。如图4处理小鼠,随后通过流式细胞术评估淋巴结和脾脏中的内源性CD8+T细胞亚群和NK细胞。示出(A)总淋巴结细胞的CD8与CD3特性(左图)和CD3+CD8+淋巴结细胞的CD44(活化T细胞或记忆T细胞)与CD122(IL-2受体 β -亚基,存在于活化T细胞或记忆T细胞上)特性,或者(B)接受指示治疗的小鼠的NK1.1与CD3特性。活化/记忆CD8+T细胞对于CD44是高的,对于CD122是中间高的。NK细胞是CD3阴性的,以及NK1.1是阳性的。使用脾细胞获得类似的结果。

[0081] 图6显示淋巴结和脾脏中的活化/记忆CD8+T细胞和NK细胞的总细胞数。如图5处理

动物并进行分析。示出淋巴结(图6A)和脾脏(图6B)中的CD44高的CD8⁺T细胞(所谓的记忆表型,MP CD8⁺)的绝对细胞数和CD3阴性的NK1.1⁺NK细胞的绝对细胞数。

[0082] 图7显示可商购的单克隆抗体MAB602(左图)和单克隆抗体NARA1(右图)(其为本发明的对象)与人IL-2的表面等离子体共振结合曲线。为了该实验,使用胺偶联的GLM芯片。使用1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺氯化物(0.2M EDC)和硫代N-羟基琥珀酰亚胺(0.05M s_NHS)的混合物以30ml/min进行芯片上的羧基基团的活化,持续420秒(s)。将抗体NARA1和MAB602以100mg/ml(在醋酸钠缓冲液(10mM pH 4.5)中)包被在芯片上。以30ml/min,持续300s添加乙醇胺HCl后,进行灭活。最后以100ml/min添加不同浓度的人IL-2(从100nM开始,随后三倍稀释),600s结合,以及240s解离。

[0083] 图8显示结合单克隆抗体NARA1的人IL-2与IL-2受体亚基CD25(在本文作为CD25-Fc的Fc融合使用)、CD122、单克隆抗体MAB602或者结合与NARA1和MAB602不同的人IL-2表位的抗hIL-2抗体的表面等离子体共振结合曲线。重复使用图7中所描述的包被有NARA1和MAB602的芯片。使用10mM甘氨酸,pH 2.5,30ml/min,60s,进行芯片的再生。以100ml/min添加饱和浓度(1mM)的人IL-2,120s结合,以及0s解离。在IL-2与抗体结合之后立即,以100ml/min添加第二分析物,120s结合,以及240s解离。用于交叉结合使用的浓度是:MAB602:50nM;NARA1:50nM;阳性对照:50nM;CD25-Fc:500nM;CD122:138nM。如所期望的,当hIL-2与NARA1结合时,识别不同hIL-2表位的抗hIL-2抗体(这里叫做‘阳性对照’)与hIL-2/NARA1复合物强烈地结合(图8中的绿线)。可选地,当hIL-2已经结合NARA1时,IL-2Ra(CD25-Fc的形式)不能结合hIL-2(粉线,图8),然而,当hIL-2已经结合NARA1时,IL-2R β (CD122)仍然结合hIL-2(橙色线,图8)。

[0084] 图9显示单克隆抗体MAB602(上图)和NARA1(下图)与鼠IL-2的表面等离子体共振结合曲线。重复使用用于产生图7和图8中的数据所使用的同一芯片。以10mM甘氨酸,pH 2.5,30ml/min,60s进行芯片的再生。以100ml/min注射从10nM开始然后三倍稀释的小鼠IL-2(mIL-2)或人IL-2(hIL-2),120s结合,5s和240s解离。在上图中,MAB602通过与小鼠IL-2的结合显示出交叉反应性。特别是,对于较高浓度的鼠白细胞介素-2(>1nM),结合曲线显著不同于背景水平,应答单位10(RU)大大超过10。然而,在所有的测试浓度下,NARA1(下图)显示与鼠IL-2无可测量的交叉反应性。

[0085] 图10提供如实施例1中获得的Proleukin/Fab-NARA1复合物的三维结构的概述。

[0086] 图11提供表位残基的进一步分析。X-轴列出SEQ ID No 1的氨基酸序列和编号。Y-轴的上部显示与来自Proleukin的相应残基在4 Å内的NARA1-Fab的原子的总数,以及Y-轴的下部显示由于与NARA1-Fab结合导致的来自Proleukin的相应残基的还原溶剂可及面积(Å²)。

[0087] 图12示出被NARA1-Fab识别的最关键的表位残基。

[0088] 图13显示Proleukin/NARA1-Fab复合物与IL-2/CD25/CD122/CD132四级复合物的覆盖图。

[0089] 图14展示来自IL-2_C145A(PDB:3INK),Superkine(PDB:3QB1),IL-2/CD25/CD122/CD132(PDB:2B5I)和Proleukin/NARA1-Fab的C螺旋的覆盖图。

[0090] 发明详述

[0091] 直到现在,还没有可适用于所公开的发明的单克隆抗体。发明人公开了它们的抗

人IL-2mAb,其允许针对该技术在临床应用中使用和商业化的以下关键步骤:

[0092] • 对抗人IL-2mAb进一步测序和良好定性。

[0093] • 抗人IL-2mAb的人源化,其对于避免(或使最小化)在患者中的免疫原性是至关重要的。

[0094] • 产生不同形式的抗人IL-2mAb,如IgG、IgG1、IgG4、Fab和单链Fv(scFv)。

[0095] • 产生由人IL-2和抗人IL-2mAb(或者抗人IL-2mAb的片段)组成的融合蛋白:这样的构建体具有以下优点:仅有一种组分而非两种组分组成,如在结合抗人IL-2mAb的IL-2中。

[0096] 发明人产生并表征了能够结合人IL-2,并且当在小鼠中测试时,能够发挥对细胞毒性淋巴细胞(包括CD8⁺T细胞和自然杀伤(NK)细胞)的特异且有效的刺激的特异性抗人IL-2mAb。针对这些目标,必须克服某些困难。

[0097] • 人IL-2显示与小鼠和大鼠IL-2的高度相似性,因此人IL-2能够在体外和体内刺激小鼠的淋巴细胞。而且,IL-2在一级免疫器官(如骨髓)中高浓度存在,这就是IL-2有时是“被禁止的”抗原的原因,这意味着产生导致针对IL-2的中性抗体的B细胞应答是非常困难的。然而,在使用纯化的重组人IL-2加佐剂免疫C57BL/6小鼠后,发明人能够得到多克隆抗人IL-2抗体的应答。

[0098] • 在所产生的抗体应答中,仅有一些mAb有效地结合IL-2(所谓的“结合者”),并且在那些mAb中仅有约0.35%与IL-2的推测活性位点相互作用。

[0099] • 最后,在这些抗人IL-2mAb中,一些显示期望的特异且有效的体内活性,如通过在小鼠中进行的特定体内分析所评估的,所述体内分析不可被体外实验代替。

[0100] 发明人开发了特异性筛选分析,其允许在免疫动物的血清中和在B细胞杂交瘤融合之后获得的B细胞克隆的上清液中检测特异的抗人IL-2抗体(所谓的“结合者”)。在第二步中,可区分标准的结合者和靶向人IL-2分子的推测特异性表位的那些结合者。用不同的B细胞克隆进行的此类体外酶联免疫吸附分析(ELISA)的一个实例显示于图1至图3中。

[0101] 在体外筛选抗人IL-2mAb之后,这些mAb在体内表征。针对该目的以及为了获得足够量的mAb,从杂交瘤的上清液浓缩mAb,使用ELISA估计所述量,并且最后在小鼠中测试抗人IL-2mAb。CD8⁺T细胞和NK细胞的增殖和扩增获得的结果显示于图4至图6中。

[0102] 为了表征抗人IL-2mAb的结合特性,用表面等离子体共振结合分析来测试与人白细胞介素-2的结合。测量可商购的抗人IL-2mAb MAB602作为比较。在图7中,显示MAB602(左图)和NARA1(本发明所述的抗体;右图)与不同浓度的人白细胞介素-2的结合曲线。对于MAB602和NARA1测量的解离常数(K_D)以及速率常数 K_{on} 和 K_{off} 显示于表1中。

[0103] 表1

		$K_{on} (M \cdot s^{-1})$	$K_{off} (s^{-1})$	$K_D (nM)$
[0104]	MAB602	5.8×10^4	4.94×10^{-4}	9.7
	NARA1	1.78×10^4	2.08×10^{-5}	1.2

[0105] 表1:抗人IL-2mAb与人IL-2的结合特性

实施例

[0106] 本发明的抗体包括抗体NARA1,其是推导的,分离的并且通过SEQ ID NO:5所述的其全长重链和SEQ ID NO:6所述的其全长轻链氨基酸序列进行结构表征。

[0107] NARA1的对应可变区V_H和V_L的氨基酸序列是SEQ ID NO:19(可变重链)和SEQ ID NO:20(可变轻链)。

[0108] NARA1的全长轻链和重链的核苷酸编码序列是SEQ ID NO:3(重链编码序列,包括前导序列)和SEQ ID NO:4(轻链编码序列,包括前导序列)。

[0109] NARA1的可变轻链和重链核苷酸编码序列是SEQ ID NO:21(可变重链编码序列)和SEQ ID NO:22(可变轻链编码序列)。

[0110] 使用Kabat系统描述NARA1的CDR区(Kabat,E.A.等人.1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242,还参见Zhao&Lu 2009,Molecular Immunology 47:694-700)。为了便于阅读,当根据Kabat定义描述CDR区时,它们在其后分别称为HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3。NARA1的CDR区是:SEQ ID NO:7所述的HCDR1,SEQ ID NO:8所述的HCDR2,SEQ ID NO:9所述的HCDR3,SEQ ID NO:10所述的LCDR1,SEQ ID NO:11所述的LCDR2,SEQ ID NO:12所述的LCDR3。

[0111] NARA1的CDR区的核苷酸编码序列是:SEQ ID NO:13所述的HCDR1编码序列,SEQ ID NO:14所述的HCDR2编码序列,SEQ ID NO:15所述的HCDR3编码序列,SEQ ID NO:16所述的LCDR1编码序列,SEQ ID NO:17所述的LCDR2编码序列,SEQ ID NO:18所述的LCDR3编码序列。

[0112] 还提供SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所述的融合蛋白。SEQ ID NO:23是包含NARA1的可变重链的融合蛋白,其N端经GxS接头与hIL-2的C端融合。SEQ ID NO:24是包含NARA1的可变轻链的融合蛋白,其N端经GxS接头与hIL-2的C端融合。

[0113] (a) 实施例1.NARA1的结晶结构

[0114] (i) 材料和方法

[0115] 测定与抗体“NARA1”(SEQ ID NO:5和6)的Fab片段结合的人白细胞介素2突变体(SEQ ID NO:2)(叫做“Proleukin”)的复合结构。根据野生型IL-2的编号给出得到的Proleukin的残基编号。

[0116] 如下文详细讨论的,Proleukin和野生型hIL-2之间的序列差异是不相关的,并且Proleukin是用于hIL-2的结构分析的有效模型。

[0117] 为了限定表位,X射线结晶学用来解析上述复合物的原子级分辨率结构。X射线结晶学是已经常规且广泛地用来产生生物分子(包括抗体和它们与抗原的复合物)的结构数据的技术(Adms等人,(2013)Annual Review Biophysics 42:265-287;Garman,(2014)Science343:1102-1108;Joachimiak,(2009)Current Opin Structural Biology19:573-584。)

[0118] 抗原Proleukin是可商购的,含有赋形剂的冻干粉末(每1mg Proleukin混合有大约50mg甘露糖醇,0.18mg十二烷基磺酸钠,0.173mg磷酸二氢钠和0.89mg磷酸氢二钠)。在用于复合形成之前,通过反相HPLC纯化Proleukin以移除赋形剂。

[0119] 通过木瓜蛋白酶切割全长抗体随后进行蛋白A层析产生NARA1的Fab片段(NARA1-

Fab)。简言之,将6.5ml全长NARA1 (9mg/ml,在pH 7.0的含有90mM氯化钠的50mM柠檬酸缓冲液中)与5mM DTT和590ug木瓜蛋白酶(Roche)混合。切割反应在室温下保持16小时并且通过添加15ul 56mM E64溶液来终止(Roche)。然后用25mM Tris,25mM NaCl,pH 8.0将切割溶液稀释10倍,并且将其上样在用5倍体积的25mM Tris,25mM NaCl,pH 8.0平衡过的5ml蛋白A柱(GE Healthcare)上,以及Fab片段在上样通过的级分中,而Fc片段与蛋白A柱结合。

[0120] 为了形成复合物,将HPLC之后的Proleukin粉末溶解在H₂O中,浓度为5.5mg/ml。向11.5mg NARA1 Fab片段溶液逐滴添加过量的6.6mg Proleukin。离心移除在当前条件下沉淀的过量Proleukin。然后通过Superdex 200 10x300(GE Healthcare)的凝胶过滤,用25mM Tris,25mM NaCl,pH 7.4的流动缓冲液纯化复合物。

[0121] 将凝胶过滤后的Proleukin/NARA1-Fab复合物浓缩至14mg/ml,并且通过气相扩散法如悬滴法进行筛选。将蛋白溶液与储液1:1混合至0.4ul的总大小。用Phoenix机械系统(Art Robbins仪器)设置实验,储存在19°C的RockImager室(Formulatrix),并且自动成像。在筛选之后4天,在20%w/v聚乙二醇3350和0.2M硝酸钠的条件下收集晶体。在数据收集之前,晶体用含有10%甘油的储液冷冻保藏并且在液氮中速冻。用Pilatus像素检测器,使用**0.99998 Å**的x射线辐射波长,在束线PX-II处的Swiss光源(Villigen,Switzerland)下,收集衍射数据。

[0122] 用XDS和XSCALE(2010年12月6日的版本)加工数据集,并且通过使用蛋白数据库条目“3INK”作为IL-2的搜索模型和蛋白数据库条目“3TTI”作为Fab片段的搜索模型,用程序PHASER,用分子置换法解析结构。使用程序Coot(Crystallographic Object-Oriented Toolkit)和AUTOBUSTER(Bricogne等人,2011)进行迭代模型的建立和完善。用程序PyMOL(Molecular Graphics System;DeLano Scientific:Palo Alto,CA;<http://www.pymol.org>)产生所有的图。

[0123] 表位残基被限定为与NARA1的Fab片段中的任意原子的距离在**4Å**内且通过CCP4程序CONTACT和AREAIMOL(Collaborative Computational Project,Number 4,6.4.0版)进一步证实的来自Proleukin的那些残基。类似的互补位残基被限定为与Proleukin中的任意原子的距离在**4Å**内的来自NARA1-Fab的那些残基。

[0124] (ii) 结果

[0125] 将Proleukin/NARA1-Fab复合物在空间群C1 2 1中解析至**1.95Å**,单位晶胞大小为**a=201.8Å, b= 36.2Å, c= 88.7Å, $\alpha=90^\circ, \beta=102.9^\circ, \gamma=90^\circ$** 。对于详细的结构分析请参考表2。在各不对称单元中,存在一个复合分子。

[0126] 表2.Proleukin/NARA1-Fab复合物的结果分析

数据收集

空间群	C1 2 1
晶胞大小	
a, b, c (Å)	201.757, 36.233, 88.707
α, β, γ (°)	90, 102.93, 90
分辨率(Å)	58.74-1.95
R 合并	0.066 (0.472)
$I/\sigma I$	14.18 (2.59)
完整性(%)	84.8 (96)
冗余	3.19

[0127] 完善

分辨率(Å)	58.74-1.95
反光编号	34750
R 工作/ R 空闲	0.2052/0.2872

拉氏图

框架的(Outliners)	0.0162
允许的(Allowed)	0.0378
有利的(Favored)	0.9459

R.m.s.偏差

键长(Å)	0.01
键角(°)	1.7

[0128] 1) 表位和互补位分析

[0129] 图10提供如实施例1中获得的Proleukin/Fab-NARA1复合物的三维结构的概述。NARA1的Fab片段的轻链被指定为A,NARA1的Fab片段的重链显示为B,被NARA1-Fab识别的表位残基被指定为D,以及Proleukin被指定为C,将突变C145S高亮。

[0130] 图11提供表位残基的进一步分析。X-轴列出SEQ ID No 1的氨基酸序列和编号。Y-轴的上部表示与来自Proleukin的相应残基在 4 Å 内的NARA1-Fab的原子的总数,以及Y-轴

的下部表示与NARA1-Fab结合后的还原溶剂可及面积(\AA^2)。

[0131] 实施例1中使用的Proleukin含有C145S突变。如在图10中所示,C145S远离表位区域。此外,实施例1中的Proleukin之间的C α 原子与来自复合有CD25、CD122和CD132 (PDB: 2B5I) 的野生hIL-2的C α 原子的叠加显示**0.447 \AA** 的r.m.s.d,这表示突变没有扰乱总结构。因此,C145S突变的Proleukin是用于野生型hIL-2的结构分析的有效模型。

[0132] hIL-2是四螺旋束蛋白,并且所述四螺旋从N-端至C-端分别被命名为A、B、C和D。如图10所示,被NARA1-Fab识别的表位是构象表位并且如图11所示跨越两个区:一个区(N50-K63)包含环和短螺旋并且连接螺旋A和螺旋B,另一个区(N91-N97)包含环并且连接螺旋B和螺旋C。

[0133] 表位残基和来自NARA1-Fab的相互作用的互补位残基总结于表3中。在所有的表位残基中,图11中所示的Arg58是用于与NARA1-Fab结合最关键的表位残基,因为该残基单独具有42个来自NARA1-Fab的相互作用原子,并且由于与NARA1-Fab的结合而占总的还原溶剂可及表面积的17.7%。此外,如图12中所示,Arg58与HCDR1中的Glu35和来自LCDR3的Asp100分别形成两个强的盐桥。Arg58还与来自LCDR3的Try100的芳香环形成 π -相互作用。残基K52、P54、K55、T57、T61、F62、K63、Q94和K96对于与NARA1-Fab的结合也被认为是重要的,因为它们均显示等于/大于5个来自NARA1-Fab的相互作用原子,并且如图11所示大于**30 \AA^2** 还原溶剂可及面积。

[0134] 表3.表位和互补位的总结

[0135]	轻链残基	表位残基	重链残基
	Y31	N50	
	Y31	K52	

[0136]	Y31	N53	
	Y31, Y36, S95, N96	P54	
		K55	W99, G101, G103, Y105
	D98	T57	
	D98, Y100	R58	L33, E35, W47, W99
		T61	N52, S55, N59
		F62	L33, N52
		K63	S55
		N91	G101, D102, G103
		L92	W99, G101
		A93	G101
		Q94	D102, G103, Y104
	D32, D34	K96	Y104
	D32	N97	

[0137] 图12示出了Arg58作为被NARA1-Fab识别的最关键的表位残基。A代表Proleukin, B代表重链, 以及C代表轻链。涉及的残基被显示为条。

[0138] 2) NARA1-Fab结合特性

[0139] 图13显示Proleukin/NARA1-Fab复合物与IL-2/CD25/CD122/CD132四级复合物的覆盖图。

[0140] 如图13中所示的两种复合物的结构覆盖图清楚地表明NARA1-Fab形成与CD25的直接竞争, 但是不形成与CD122/CD132的直接竞争, 这与IL-2/NARA1复合物主要显示促-T效应细胞活性而不显示促-Treg活性的观察一致。

[0141] 3) 与NARA1-Fab复合的Proleukin的C螺旋采用与四级复合物中的螺旋C类似的构象

[0142] 图14显示来自IL-2_C145A (PDB:3INK), Superkine (PDB:3QB1), IL-2/CD25/CD122/CD132 (PDB:2B5I) 和Proleukin/NARA1-Fab的C螺旋的覆盖图。

[0143] IL-2和CD122中的螺旋C之间的极性界面在两部分之间的结合中发挥重要作用 (Wang等人 (2005) Science 310:1159-1163)。在2012年, Levin等人已经证明, superkine (IL-2突变体) 单独具有螺旋C, 其采用与四级复合物中的螺旋C类似的构象, 并且superkine显示对CD122比对野生型IL-2高~215倍的结合亲和性 (Levin et al, (2012) Nature 484: 529-533)。据观察, 螺旋C中的这样的构象变化与构象稳定性相关, 其降低了与CD122结合的能量惩罚。如图14中所示, 来自与NARA1-Fab复合的Proleukin的螺旋C的构象也与在Superkine以及IL-2/CD25/CD122/CD132四级复合物中观察到的螺旋C的构象类似, 因此, 很可能的是, Proleukin/NARA1-Fab复合物可以表现出与CD122的结合亲和性比野生型hIL-2高。

[0144] (b) 实施例2. NARA1和MAB602的线性肽谱

[0145] 为了定位NARA1和MAB602抗体的表位,基于人IL2的序列产生15-mer肽的第一文库。基于3个特异性残基F(62)、Y(65)和L(92)的突变还产生了选择的15-mer肽的第二文库。基于Roche/Glycart IL2突变蛋白质,进行后者的突变,如具有这样的3个突变的W02012/107417A1中所公开的。Boyman实验室中进行的之前工作(未出版)显示,具有与A1类似功能的可商购的小鼠抗人IL2 mAb 602强烈地减少与IL2的F42A突变体(针对CD25的IL2对接位点之一)的结合。

[0146] (i) 材料和方法

[0147] 因此,第一文库中的各肽具有15个氨基酸,并且通过从N-端开始,以3个残基为一步扫描目的序列(参见表4,参照肽1至41)得到所述序列。因此,产生梯形图,并且各肽含有梯形图中的前面肽的12个重叠残基和后面肽的12个重叠残基。总之,41个肽产生自所表达的人IL2序列。

[0148] 通过使在如上所述产生的第一文库中的所有对应肽中的F(62)、Y(65)和L(92)突变为丙氨酸来产生肽的第二文库(参见表4,参照肽编号42至60)。

[0149] 对于两个文库,亲代的半胱氨酸已被丝氨酸(下划线残基)替换以避免非特异性结合。

[0150] 表4. 参照肽的文库

[0151]

参照肽编号	序列
	粗体的残基是替换 特异性残基的丙氨 酸(A)。 残基是替换半胱氨 酸(C)的丝氨酸(S)
1	APTSSSTKKTQLQLE
2	SSSTKKTQLQLEHLL
3	TKKTQLQLEHLLLDL
4	TQLQLEHLLLDLQMI
5	QLEHLLLDLQMILNG
6	HLLDLQMILNGINN
7	LDLQMILNGINNYKN
8	QMILNGINNYKNPKL
9	LNGINNYKNPKLTRM
10	INNYKNPKLTRMLTF
11	YKNPKLTRMLTFKFY
12	PKLTRMLTFKFYMPK
13	TRMLTFKFYMPKKAT
14	LTFKFYMPKKATELK
15	KFYMPKKATELKHLQ
16	MPKKATELKHLQSLE
17	KATELKHLQSLEEEEL
18	ELKHLQSLEEEELKPL
19	HLQSLEEEELKPLEEV
20	SLEEEELKPLEEVLNL
21	EELKPLEEVLNLAQS
22	KPLEEVLNLAQSKNF
23	EEVLNLAQSKNFHLR
24	LNLAQSKNFHLRPRD
25	AQSKNFHLRPRDLIS
26	KNFHLRPRDLISNIN
27	HLRPRDLISNINVIV
28	PRDLISNINVIVLEL
29	LISNINVIVLELKGS
30	NINVIVLELKGETT
31	VIVLELKGETTFMS
32	LELKGETTFMSEYA
33	KGSETTFMSEYADET

[0152]

34	ETTFMSEYADETATI
35	FMSEYADETATIVEF
36	EYADETATIVEFLNR
37	DETATIVEFLNRWIT
38	ATIVEFLNRWITFSQ
39	VEFLNRWITFSQSII
40	LNRWITFSQSIIISTL
41	NRWITFSQSIIISTLT
42	INNYKNPKLTRMLTA
43	YKNPKLTRMLTAKFY
47	YKNPKLTRMLTFKFA
52	YKNPKLTRMLTAKFA
44	PKLTRMLTAKFYMPK
48	PKLTRMLTFKFAMPK
53	PKLTRMLTAKFAMPK
45	TRMLTAKFYMPKKAT
49	TRMLTFKFAMPKKAT
54	TRMLTAKFAMPKKAT
46	LTAKFYMPKKATELK
50	LTFKFAMPKKATELK
55	LTAKFAMPKKATELK
51	KFAMPKKATELKHLQ
56	SLEEEELKPLEEVLNA
57	EELKPLEEVLNAAQS
58	KPLEEVLNAAQSKNF
59	EEVLNAAQSKNFHLR
60	ANLAQSKNFHLRPRD

[0153] 将两组肽一式三份印在微阵列片上,与目的抗体(MAb602和NARA1)和对照抗体孵育。与来自相同同种型的不相关抗体(小鼠对照IgG2a/ λ 和小鼠对照IgG2a/ κ),以及第二抗体(抗小鼠IgG(Thermo84545,标记DL650)或抗小鼠IgG(JIR 115-175-072,标记Cy5))进行另外的孵育以评估由于检测抗体导致的非特异性结合。基本如Maksimov P等人.2012,PLoS One 7:e34212.doi:10.1371/journal.pone.0034212所述进行实验。

[0154] 通过RepliTope分析进行肽-抗体结合的确,其中将肽的微阵列(一式三份)与第一抗体孵育,随后与针对第一抗体的Fc部分的荧光标记的第二抗体孵育。所有步骤在TECAN微阵列处理台上进行,使能够进行高度可靠且可重复的洗涤和孵育步骤。在进行孵育步骤和随后的最终洗涤步骤(以移除未结合的第二抗体)之后,使用氮气流将微阵列干燥,并且在高分辨率微阵列扫描系统中用适当的波长设置进行扫描。用具有相同同种型的不相关抗体进行对照孵育以排除假阳性信号。

[0155] 使用点识别软件GenePix(Molecular Devices)分析并定量得到的图像。对于各个点,提取平均信号强度(0至65535的任意单位)。为了进一步的数据评价,测定MMC2值。MMC2等于微阵列上的所有三个实例的平均值。除变异系数(CV)-标准差除以平均值-大于0.5之外,在该情况下,两个最接近数值(MC2)的平均值被分配至MMC2。

[0156] (ii) 结果

[0157] 数据总结于表5中。

[0158] 抗IL2 (NARA1) 抗体不显示针对固定化肽的任何显著反应性。只有肽10呈现弱应答,然而,该肽也被小鼠对照抗体微弱地识别。

[0159] 商购的抗体MAB602 (mIgG2a) 提供对肽22至26的一些弱信号以及对肽10至13的一些强信号。

[0160] 表5. 线性表位谱的结果

[0161]

参照肽的 编号	序列	减去对照信号 (AU) 后的 MAB602 的信号强 度	减去对照信号 (AU) 后的 NARA1 的信号 强度
10	INNYKNPKLTRMLTF	45954	20883
11	YKNPKLTRMLTFKFY	49726	1189
12	PKLTRMLTFKFYMPK	28849	1127
13	TRMLTFKFYMPKKAT	5250	224
22	KPLEEVLNLAQSKNF	4998	0
23	EEVLNLAQSKNFHLR	13287	32
24	LNLAQSKNFHLRPRD	3289	282
25	AQSKNFHLRPRDLIS	5220	0
26		7509	0
	KNFHLRPRDLISNIN		

[0162]

[0163] 两组肽的重叠序列被认为含有结合靶抗体的氨基酸(表5)。一个延伸是MAB602的强结合者,而另一延伸相当于MAB602的弱结合者:

[0164] 强: (57) TRMLTF (62)

[0165] 较弱: (96) KNF (98)

[0166] 特异性残基F42 (62)、Y45 (65)、L72 (92) 的A1a突变显示,残基F42 (62) 是与抗体MAB602结合的明显重要残基(表6)。

[0167] 表6. 突变发生特征

[0168]

参照肽编号	序列 粗体的残基是丙氨酸(A), 其替换 特异性残基	减去对照信号 (AU) 后 的 MAB602的信号强 度	减去对照信号 (AU) 后 的 NARA1 的信号 强度
10	INNYKNPKLTRMLTF	45954	20883
42	INNYKNPKLTRMLTA	246	162
11	YKNPKLTRMLTFKFY	49726	1189
43	YKNPKLTRMLTAKFY	42784	507
47	YKNPKLTRMLTFKFA	21382	251
52	YKNPKLTRMLTAKFA	13089	238
12	PKLTRMLTFKFYMPK	28849	1127
44	PKLTRMLTAKFYMPK	5027	432
48	PKLTRMLTFKFAMPK	13394	6205
53	PKLTRMLTAKFAMPK	0	24
13	TRMLTFKFYMPKKAT	5250	224
45	TRMLTAKFYMPKKAT	0	0
49	TRMLTFKFAMPKKAT	3018	1492
54	TRMLTAKFAMPKKAT	0	0

[0169] 序列表

[0170] 用于实行本发明的有用的氨基酸和核苷酸序列见于表7。

[0171] 表7. 序列表

[0172]

SEQ ID 编号	Ab 区	序列
SEQ ID NO: 1	人 IL-2	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLE HLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFCQSIISTLT
SEQ ID NO: 2	Proleukin	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
抗体 1		
SEQ ID NO: 3	DNA 重链	ATGGAATGGAGCGGAGTCTTTATCTTTCTCCTG TCAGTAACTGCAGGTGTTCACTCCCAGGTCCAG CTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCT GGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCT GGATACGCCTTCACTAATTACTTGATAGAGTGG GTAAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTG GATTGGAGTGATTAATCCTGGAAGTGGTGGTAC TAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCAA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCT ACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACT CTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATGGAGGGGGG ATGGTTACTACGCGTACTTCGATGTCTGGGGCG CAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCAAA ACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCT GTGTGTGGAGATACAACTGGCTCCTCGGTGACT CTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAG CCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTG TCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTG CAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTG ACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCC ATCACCTGCAATGTGGCCCACCCGGCAAGCAG CACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAG GGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAAT GCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCG TCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTAC TCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTG TGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGAT GTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAA GTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGA GGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGC CCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGG CAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAG

[0173]

		ACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAA AACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTA TATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACT AAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCAC AGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTG GACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACA AGAACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTT CTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGA AGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCC TGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCAC CACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGT AAATGA
SEQ ID NO: 4	DNA 轻链	ATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCT GCTGCTCTGGGTTCAGGCTCCACTGGTGACAT TGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGT GTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAA GGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAG TTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGAC AGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCA ATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTG GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACA TCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT ATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGTACA CGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA CGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC CCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGT GCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTAC CCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGA TGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACA GTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACC TACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAA GGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCT GTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCA TTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG
SEQ ID NO: 5	重链	MEWSGVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPG TSVKVSKASGYAFTNYLIEWVKQRPGGLEWIG VINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQL SSLTSDDSA VYFCARWRGDGYAYFDVWGAGT TVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCL VKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY TLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKI EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVH TAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKE FKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP PEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGK TELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVE RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 6	轻链	METDITLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVS LGQRATISCKASQSDYDGD SYMNWYQQKPGQP PKLLIYAASNLESGIPARFSGSGGTDFTLNIHPVE

[0174]

		EEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGKLEIKRADAAP TVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKW KIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLT KDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVKSFNRECE
SEQ ID NO: 7 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 8 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 9 (Kabat)	HCDR3	WRGDGYAYFDV
SEQ ID NO: 10 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDDYDGDSYMN
SEQ ID NO: 11 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 12 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 13	HCDR1 DNA	AATTACTTGATAGAG
SEQ ID NO: 14	HCDR2 DNA	GTGATTAATCCTGGAAGTGGTGGTACTAACTAC AATGAGAAGTTCAAGGGC
SEQ ID NO: 15	HCDR3 DNA	TGGAGGGGGGATGGTTACTACGCGTACTTCGAT GTC
SEQ ID NO: 16	LCDR1 DNA	AAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGAT AGTTATATGAAC
SEQ ID NO: 17	LCDR2 DNA	GCTGCATCCAATCTAGAATCT
SEQ ID NO: 18	LCDR3 DNA	CAGCAAAGTAATGAGGATCCGTACACG
SEQ ID NO: 19	VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLI EWVKQRPQGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGK ATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWR GDGYAYFDVWGAGTTVTVSS
SEQ ID NO: 20	VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDS YMNWYQQKPGQPPLLIYAASNLESGIPARFSGS GSGTDFLTNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFG GGTKLEIK
SEQ ID NO: 21	DNA VH	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCT GGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTG CAAGGCTTCTGGATACGCCTTCACTAATTACTT GATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAGG GCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTAATCCTGGAA GTGGTGGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAG GGCAAGGCAACACTGACTGCAGACAAATCCTC CAGCACTGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGAC ATCTGATGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAG ATGGAGGGGGGATGGTTACTACGCGTACTTCG ATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCA
SEQ ID NO: 22	DNA VL	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTG GCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCC

[0175]

		TGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGT GATAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACC AGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGC ATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTT TAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTT CAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTG CAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATC CGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAA ATAAAA
SEQ ID NO: 23	重链的融合蛋白	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLE HLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGQVQ LQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFTNYLIEWV KQRPQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLT ADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWRGDGY YAYFDVWGAGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCG DTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGV HTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGP SVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQ ISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI QHGDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGS VRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPE DIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF SRTPGK
SEQ ID NO: 24	轻链的融合蛋白	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLE HLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGDIVL TQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGSYMN WYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGGT DFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTK LEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMF YPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDST YSMSSTLTTLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVK SFNRNEC

序列表

<110> 苏黎世大学

<120> 人白细胞介素-2的免疫刺激单克隆抗体

<140> 201580048027.0

<141> 2015-07-10

<150> 14176619.6

<151> 2014-07-10

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

[0001] Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 2

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<400> 2

[0002] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35 40 45

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65 70 75 80

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85 90 95

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr

100 105 110

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser
115 120 125

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 3
<211> 1413
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 3
atggaatgga gcgaggtctt tatctttctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt tctctcccag 60
gtccagctgc agcagctctgg agctgagctg gtaaggcctg ggacttcagt gaaggtgtcc 120
[0003] tgcaaggctt ctggatacgc cttcactaat tacttgatag agtgggtaaa gcagaggcct 180
ggacaggggcc ttgagtggat tggagtgatt aatcctggaa gtggtggtac taactacaat 240
gagaagtca agggcaaggc aacactgact gcagacaaat cctccagcac tgcctacatg 300
cagctcagca gcctgacatc tgatgactct gcggtctatt tctgtgcaag atggaggggg 360
gatgggtact acgcgtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctcctca 420
gccaaaacaa cagccccatc ggtctatcca ctggcccctg tgtgtggaga tacaactggc 480
tcctcgggtga ctctaggatg cctgggtcaag ggttatttcc ctgagccagt gaccttgacc 540
tggaactctg gatccctgtc cagtgggtgtg cacaccttc cagctgtcct gcagtctgac 600
ctctacaccc tcagcagctc agtgactgta acctcgagca cctggcccag ccagtccatc 660
acctgcaatg tggcccaccc ggcaagcagc accaagggtgg acaagaaaat tgagcccaga 720
gggcccacaa tcaagccctg tcctccatgc aaatgcccag cacctaact cttgggtgga 780
ccatccgtct tcatttccc tcaaagatc aaggatgtac tcatgatctc cctgagcccc 840
atagtcacat gtgtggtggt ggatgtgagc gaggatgacc cagatgtcca gatcagctgg 900

```

tttgtgaaca acgtggaagt acacacagct cagacacaaa cccatagaga ggattacaac   960
agtactctcc ggggtggtcag tgcctcccc atccagcacc aggactggat gagtggcaag   1020
gagttcaaat gcaagggtcaa caacaaagac ctcccagcgc ccatcgagag aaccatctca   1080
aaacccaaag ggtcagtaag agtccacag gtatatgtct tgcctccacc agaagaagag   1140
atgactaaga aacagggtcac tctgacctgc atggtcacag acttcatgcc tgaagacatt   1200
tacgtggagt ggaccaacaa cgggaaaaca gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc   1260
ctggactctg atggttctta cttcatgtac agcaagctga gagtggaaaa gaagaactgg   1320
gtggaaagaa atagctactc ctgttcagtg gtccacgagg gtctgcacaa tcaccacacg   1380
actaagagct tctcccgac tccgggtaaa tga                                     1413

```

```

<210> 4
<211> 717
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

[0004]

```

<220>
<223> synthetic construct

```

```

<400> 4
atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt   60
gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt cttagggca gagggccacc   120
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttatat gaactggtac   180
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ccatctatg ctgcatcaa tctagaatct   240
gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat   300
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac   360
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc   420
atcttccac catccagtga gcagttaaca tctggagggtg cctcagtcgt gtgcttcttg   480
aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa   540
aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc   600

```

agcacctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660

actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag 717

<210> 5

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<400> 5

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

[0005] Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Arg Gly Asp Gly Tyr Tyr Ala Tyr Phe Asp
115 120 125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
130 135 140

Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly
145 150 155 160

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

Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr
180 185 190

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

Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val
210 215 220

Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg
225 230 235 240

[0006]

Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
260 265 270

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

Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
290 295 300

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
305 310 315 320

Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
325 330 335

Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
370 375 380

Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
385 390 395 400

Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
405 410 415

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

[0007]

Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
435 440 445

Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
450 455 460

Ser Arg Thr Pro Gly Lys
465 470

<210> 6

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<400> 6

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

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

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

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

[0008]

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

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

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
165 170 175

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
195 200 205

Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
210 215 220

Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 7

Asn Tyr Leu Ile Glu
1 5

[0009] <210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 8

Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 9

Trp Arg Gly Asp Gly Tyr Tyr Ala Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<400> 10

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

[0010]

<220>

<223> synthetic construct

<400> 11

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<400> 12

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 13

	<211> 15		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> synthetic construct		
	<400> 13		
	aattacttga tagag	15	
	<210> 14		
	<211> 51		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> synthetic construct		
	<400> 14		
	gtgattaatc ctggaagtgg tgggtactaac tacaatgaga agttcaaggg c	51	
[0011]	<210> 15		
	<211> 36		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> synthetic construct		
	<400> 15		
	tggagggggg atggttacta cgcgtacttc gatgtc	36	
	<210> 16		
	<211> 45		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> synthetic construct		
	<400> 16		
	aaggccagcc aaagtgttga ttatgatggt gatagttata tgaac	45	
	<210> 17		
	<211> 21		

	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> synthetic construct	
	<400> 17	
	gctgcatcca atctagaatc t	21
	<210> 18	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> synthetic construct	
	<400> 18	
	cagcaaagta atgaggatcc gtacacg	27
	<210> 19	
	<211> 121	
[0012]	<212> PRT	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> synthetic construct	
	<400> 19	
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr	
	1 5 10 15	
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr	
	20 25 30	
	Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
	35 40 45	
	Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	
	50 55 60	
	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Arg Gly Asp Gly Tyr Tyr Ala Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

[0013] <400> 20

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 21
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 21
 cagggtccagc tgcagcagtc tggagctgag ctggtaaggc ctgggacttc agtgaagggtg 60
 tcctgcaagg ctctggata cgccttcaact aattacttga tagagtgggt aaagcagagg 120
 cctggacagg gccttgagtg gattggagtg attaactctg gaagtgggtg tactaactac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggcaaacactg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgatgac tctgcggtct atttctgtgc aagatggagg 300
 [0014] ggggatgggtt actacgcgta ctctgatgac tggggcgag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 22
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 22
 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatgggtg atagttatat gaactggtac 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatcaa tctagaatct 180
 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 23
<211> 621
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic construct

<400> 23

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60
[0015]

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln
165 170 175

Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys
180 185 190

Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys
195 200 205

Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Gly
210 215 220

Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
225 230 235 240

Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
245 250 255

[0016]

Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Arg Gly Asp
260 265 270

Gly Tyr Tyr Ala Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
275 280 285

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
290 295 300

Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
305 310 315 320

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

Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu
340 345 350

Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser
355 360 365

Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
370 375 380

Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro
385 390 395 400

Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile
405 410 415

Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile
420 425 430

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
435 440 445

[0017]

Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
450 455 460

Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu
465 470 475 480

Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
485 490 495

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

Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro
515 520 525

Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr
530 535 540

Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys
545 550 555 560

Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
565 570 575

Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val
580 585 590

Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn
595 600 605

His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
610 615 620

<210> 24

<211> 388

<212> PRT

[0018]

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<400> 24

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln
165 170 175

[0019]

Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser
180 185 190

Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
195 200 205

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
210 215 220

Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
225 230 235 240

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp
245 250 255

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe
260 265 270

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr
275 280 285

Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala
290 295 300

Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val
305 310 315 320

Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser
325 330 335

[0020]

Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr
340 345 350

Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys
355 360 365

Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn
370 375 380

Arg Asn Glu Cys
385

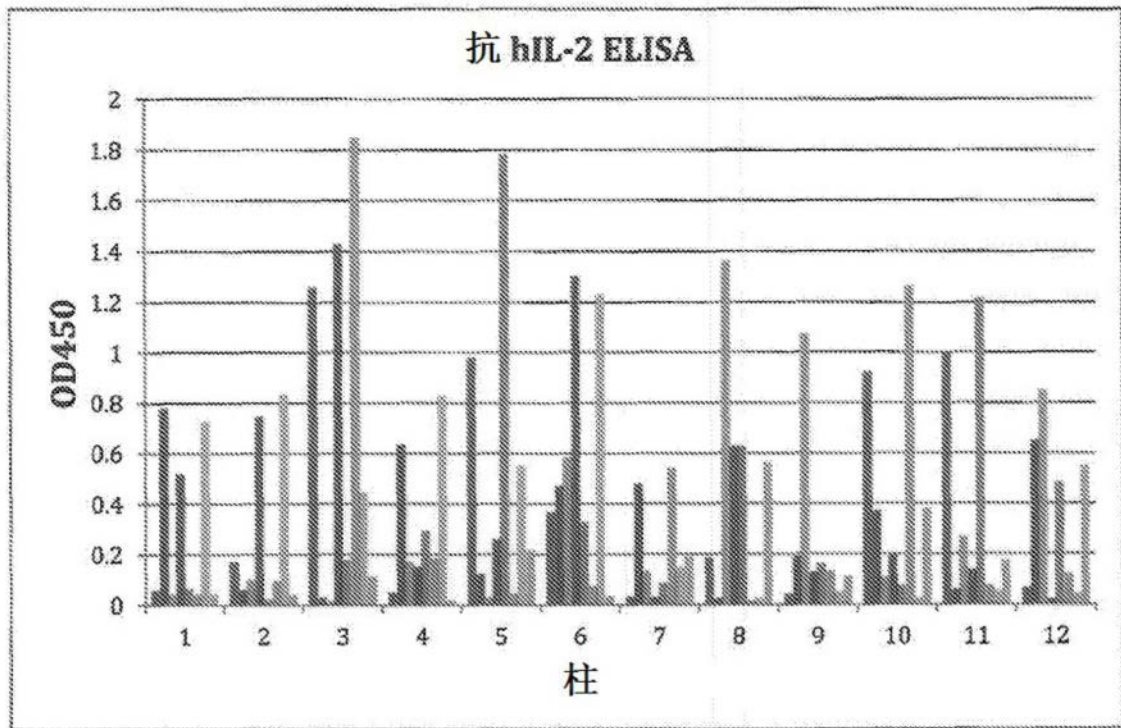


图1

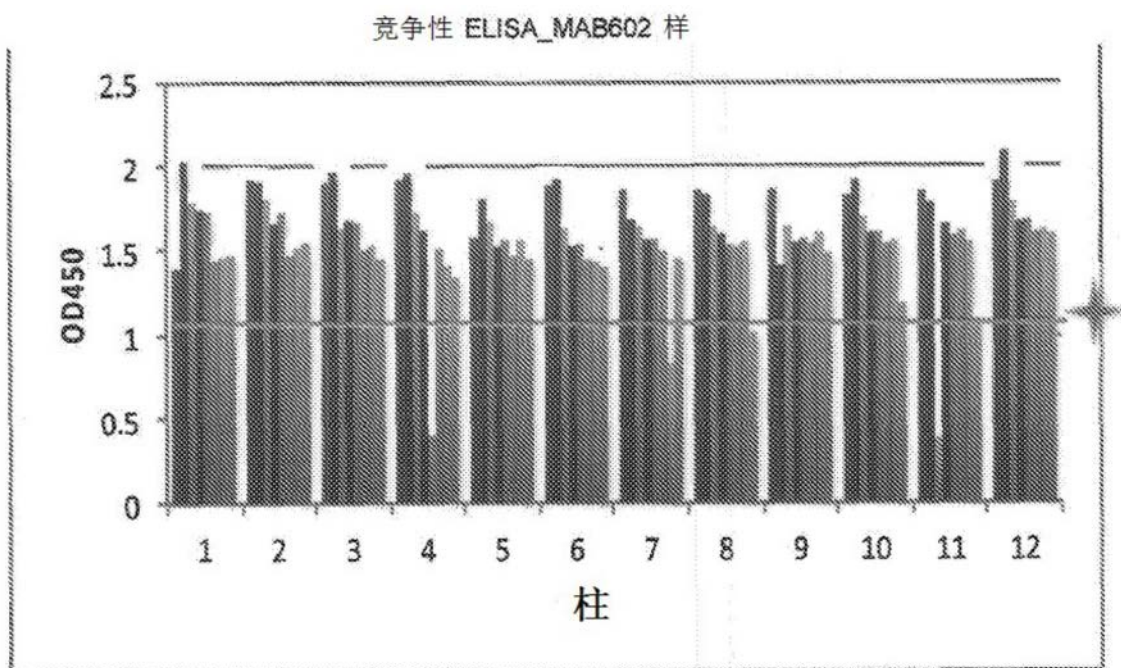


图2

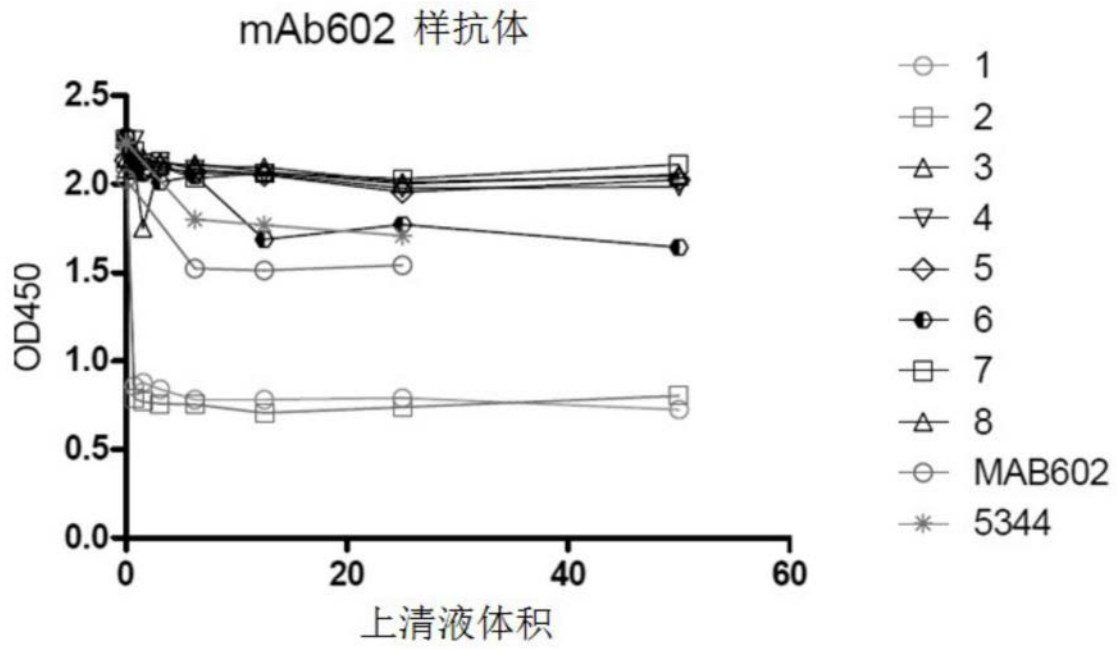


图3

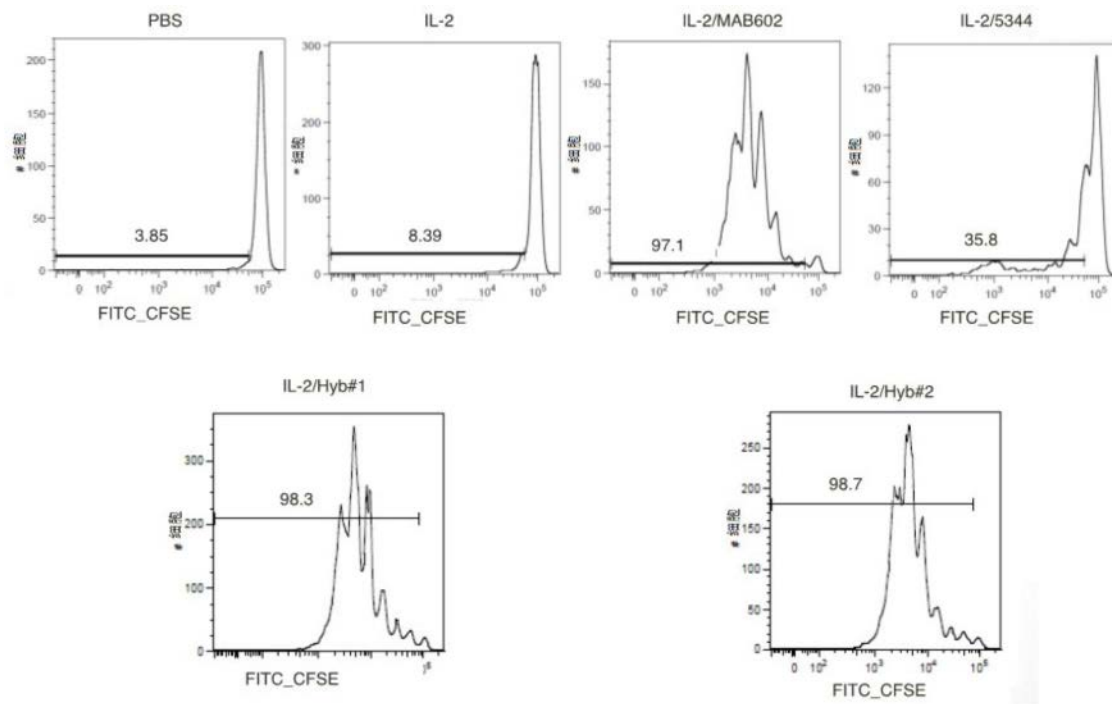


图4

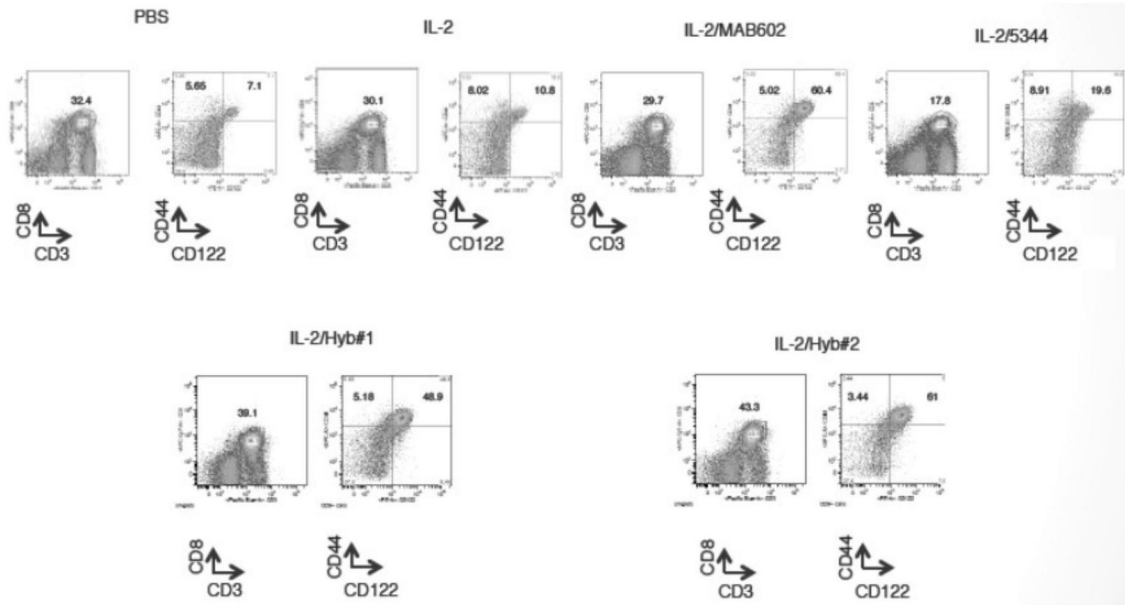


图5A

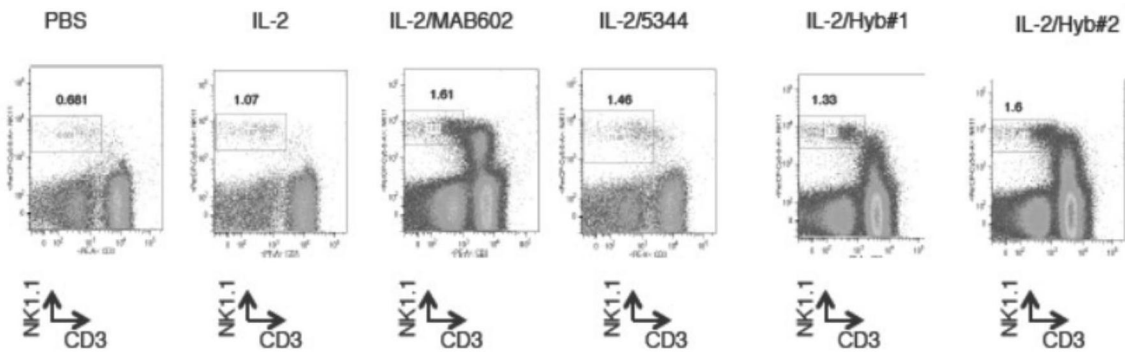


图5B

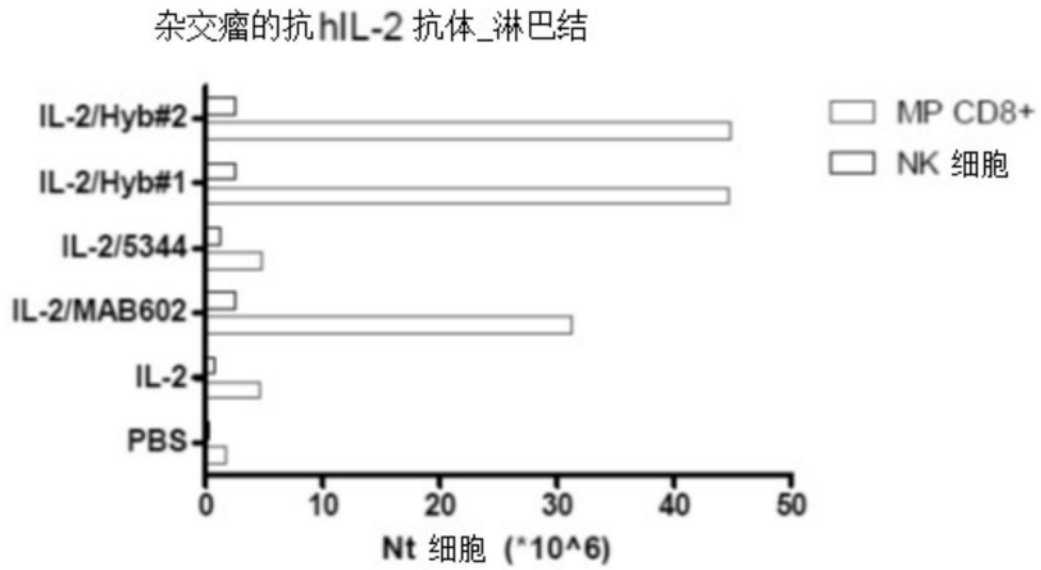


图6A

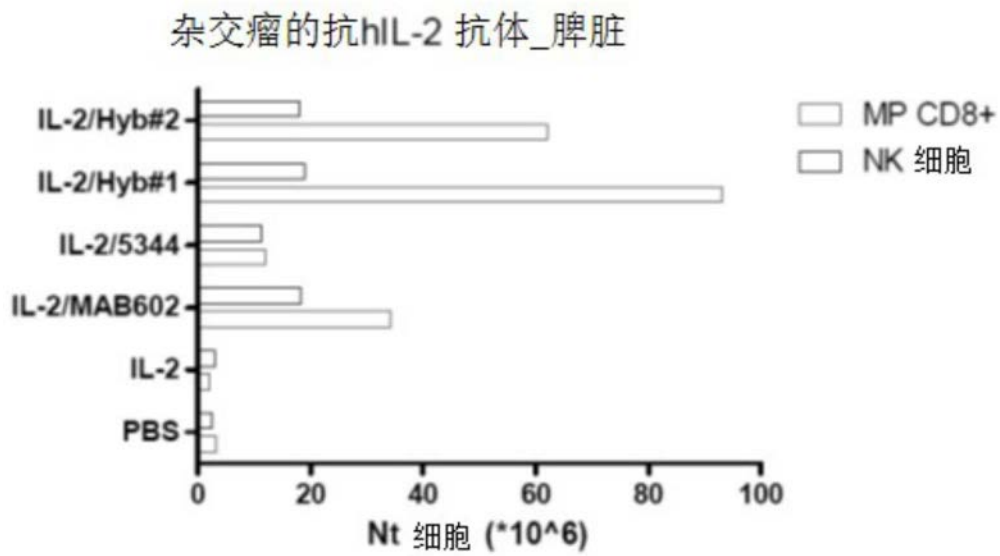


图6B

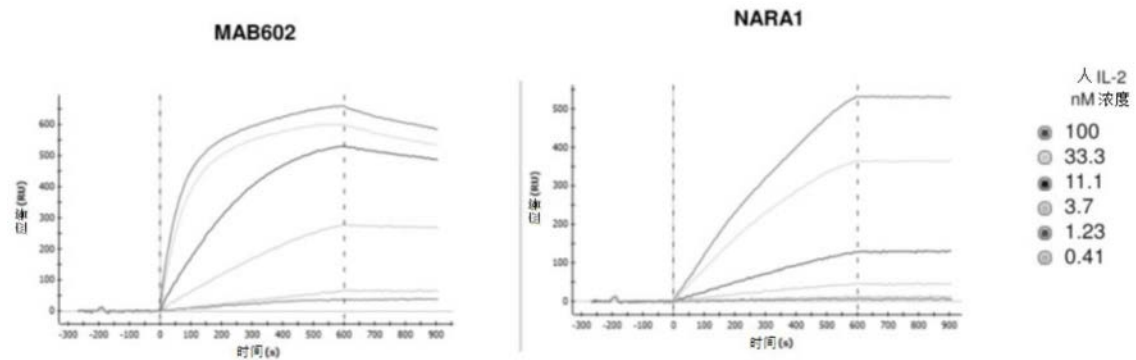


图7

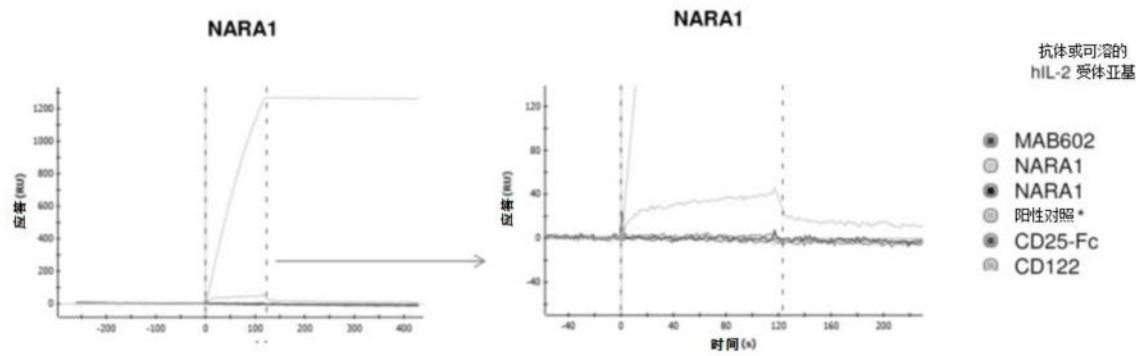


图8

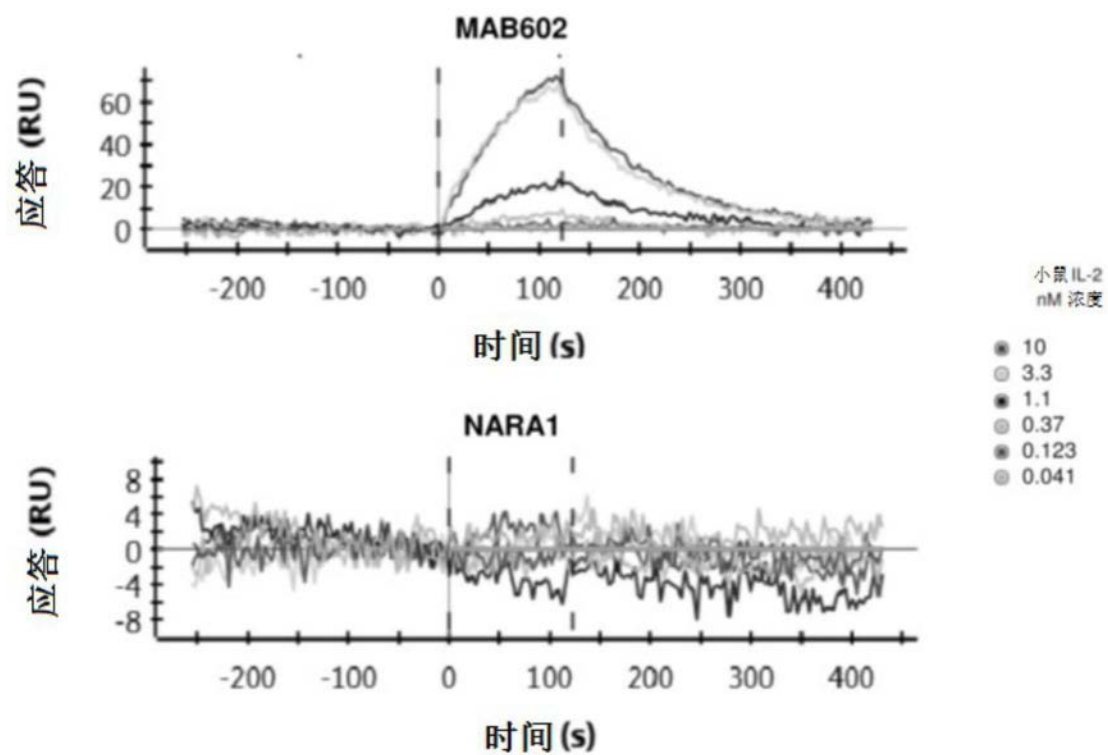


图9

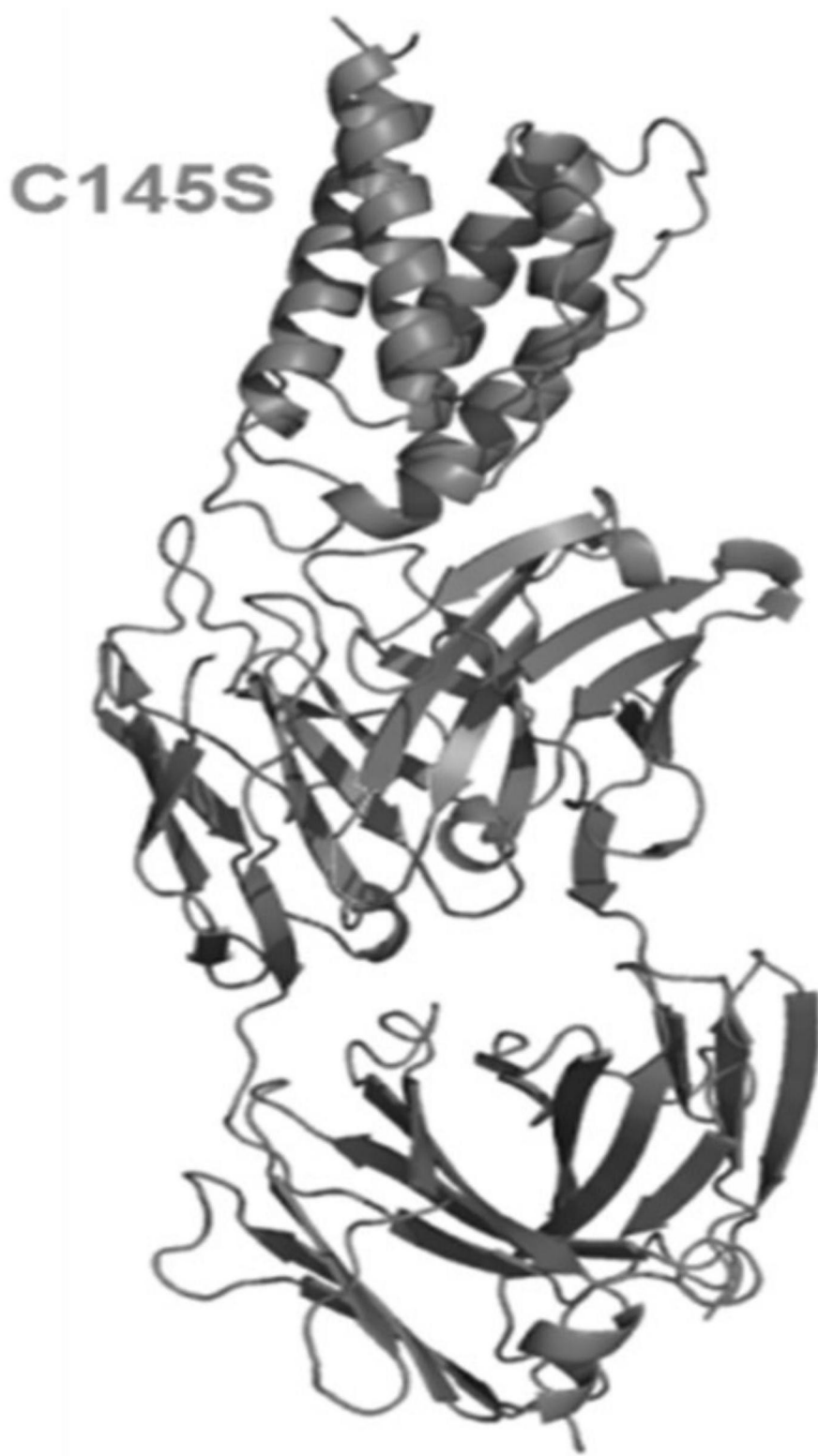


图10

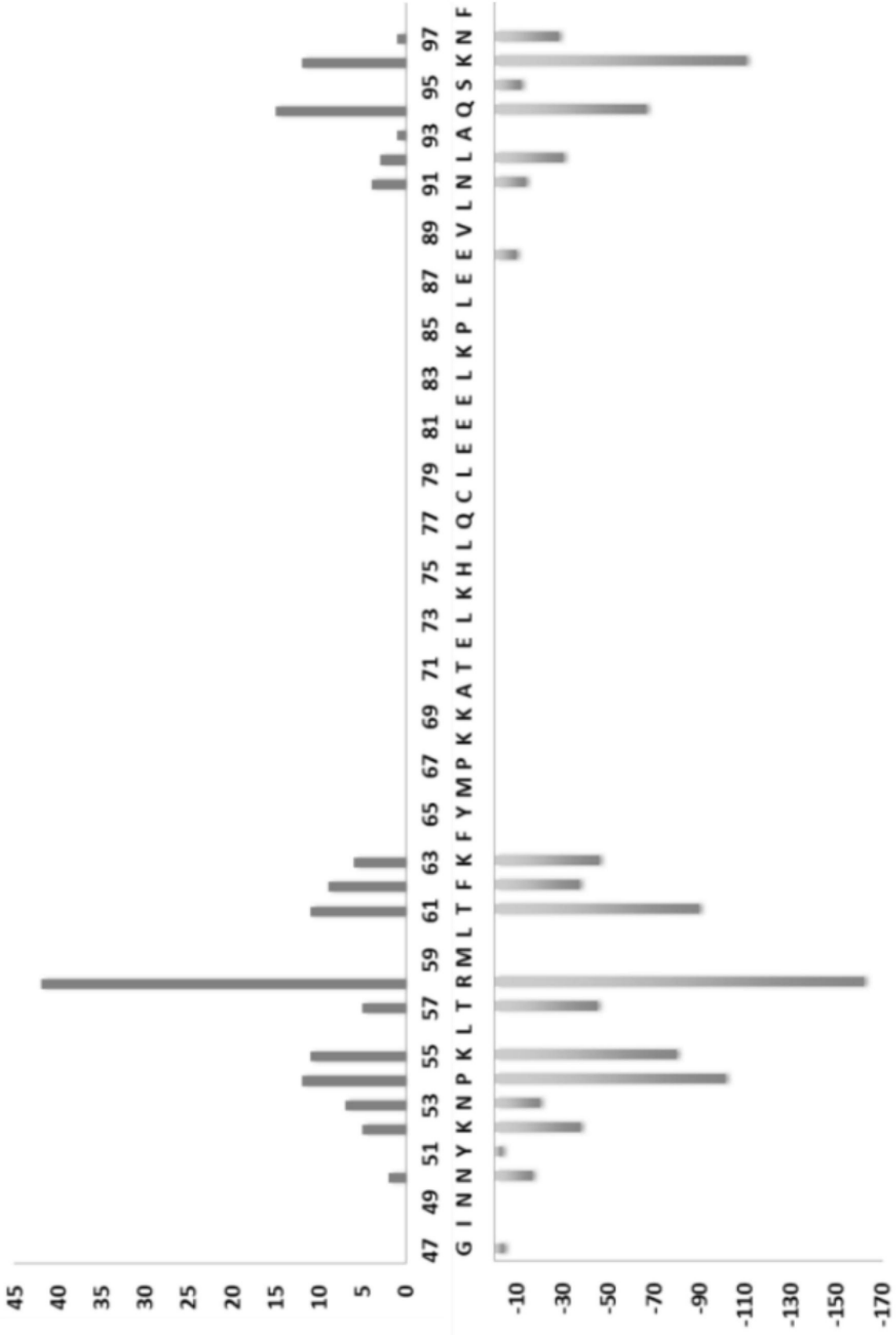


图11

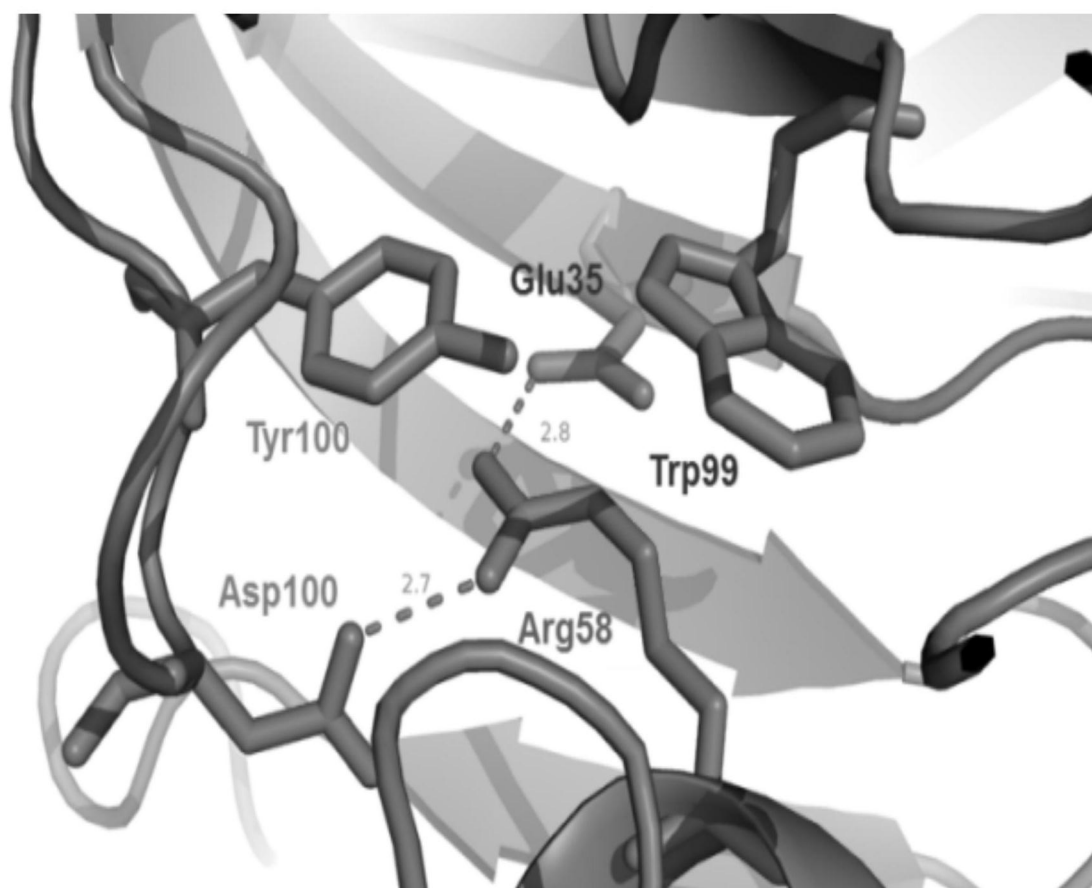


图12

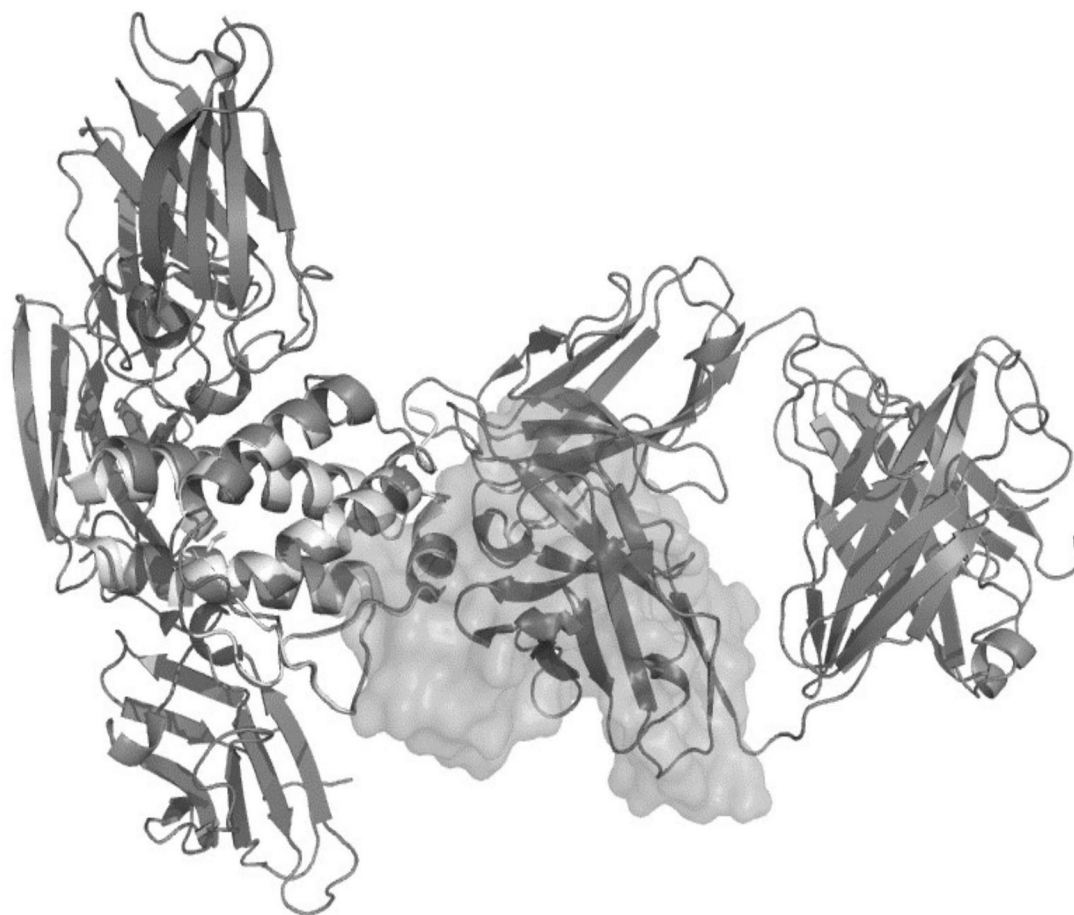


图13



图14