



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116113401 A

(43) 申请公布日 2023.05.12

(21) 申请号 202180057539.9

(22) 申请日 2021.06.07

(30) 优先权数据

63/036,062 2020.06.08 US

63/085,351 2020.09.30 US

63/088,576 2020.10.07 US

63/088,586 2020.10.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.02.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/036117 2021.06.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/252327 EN 2021.12.16

(71) 申请人 华盛顿大学

地址 美国华盛顿州西雅图市

(72) 发明人 乔治·上田 詹姆斯·拉扎罗维特

豪尔赫·法拉斯 大卫·贝克

汉内莱·若霍拉·贝克

罗伯特·狄文 燕布莱尔·婷·赵

朱莉·马蒂厄 尼尔·P·金

马蒂·瑞伊·图利

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 黄明光

(51) Int.Cl.

A61K 9/51 (2006.01)

(54) 发明名称

抗体结合的纳米颗粒

(57) 摘要

本申请公开了包含多肽的抗体颗粒,所述多肽包含(Fc)结合结构域、螺旋多肽单体和低聚物结构域、Tie2抗体或二聚体或肿瘤坏死因子受体超家族抗体及其用途。

权利要求书8页 说明书62页

序列表80页 附图8页

1. 一种颗粒, 包含:

(a) 多个多肽聚合物, 其中:

(i) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(ii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(iii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(iv) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(v) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(vi) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(vii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(viii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;或

(ix) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

其中括号中的残基是任选的(即, 在百分比同一性要求中不予考虑); 以及

(b) 多个(i)包含Fc结构域的Tie2受体抗体, 和/或(ii)融合到Fc结构域的、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域的二聚体;

其中,

(i) 每个Tie2抗体或二聚体包含第一Fc结构域和第二Fc结构域;

(ii) 多个Tie2抗体或二聚体中的每一个(a)通过第一Fc结构域非共价结合到第一聚合物的一条多肽单体链上, (b)通过第二Fc结构域非共价结合到第二聚合物的一个多肽单体上; 且

(iii) 每个聚合物的每条多肽单体链非共价结合到一个Fc结构域;

其中所述颗粒包含二面体、四面体、八面体或二十面体对称性。

2. 根据权利要求1所述的颗粒,其中所述聚合物包含具有一些氨基酸差异的单体。
3. 根据权利要求1或2所述的颗粒,其中所述颗粒包含不是同源低聚物的聚合物。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的颗粒,其中所述颗粒中的每个聚合物是相同的。
5. 根据权利要求1所述的颗粒,其中每个聚合物中的每个单体是相同的且每个聚合物是同源聚合物。
6. 根据权利要求5所述的颗粒,其中所述颗粒中的每个同源聚合物是相同的。
7. 根据权利要求1-6任一项所述的颗粒,其中所述多个聚合物包含多肽的二聚体,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1-3的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。
8. 根据权利要求1-6任一项所述的颗粒,其中所述多个聚合物包含多肽的三聚体,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:4-6的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。
9. 根据权利要求1-6任一项所述的颗粒,其中所述多个聚合物包含多肽的四聚体,所述多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。
10. 根据权利要求1-6任一项所述的颗粒,其中所述多个聚合物包含多肽的五聚体,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:8-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。
11. 根据权利要求1-10任一项所述的颗粒,其中,存在于如表2所定义的SEQ ID NO:1-9的任何一个多肽的聚合物中聚合物界面的残基是保守的。
12. 根据权利要求1-11任一项所述的颗粒,其中存在于表3中定义的SEQ ID NO:1-9的任何一个的Fc结合界面上的残基是保守的。
13. 根据权利要求1-12任一项所述的颗粒,其中相对于SEQ ID NO:1-9中任一条的参比序列的置换包含参比多肽中极性残基处的置换或、基本上由或由该置换组成。
14. 根据权利要求1-13任一项所述的颗粒,其中相对于SEQ ID NO:1-9中任一条的参比序列的置换包含参比多肽的环位置中如表4所示的非Gly/Pro残基处的极性残基置换,基本上由或由该置换组成的组成。
15. 根据权利要求1-14任一项所述的颗粒,其中,来自SEQ ID NO:1-9任一条参比多肽的氨基酸变化是保守的氨基酸置换。
16. 根据权利要求1-15任一项所述的颗粒,其中,所述Tie2抗体或二聚体包含Tie2抗体,所述Tie2抗体包含与选自以下重链和轻链对的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列:
SEQ ID NO:11-12,
SEQ ID NO:13-14和
SEQ ID NO:15-16。

17. 根据权利要求1-15任一项所述的颗粒, 其中, 所述Tie2抗体或二聚体包含二聚体, 其中所述二聚体包含单体, 所述单体包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列, 其中(X)是任选的, 且当存在时, 包含任何合适长度和氨基酸含量的氨基酸接头。

18. 根据权利要求17所述的颗粒, 其中, 所述二聚体包含单体, 所述单体包含与SEQ ID NO:17或18的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列, 其中括号中的残基是任选的。

19. 根据权利要求16-18任一项所述的颗粒, 其中所述多个同源聚合物包含多肽的同源四聚体, 所述多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

20. 根据权利要求16-18任一项所述的颗粒, 其中所述多个同源聚合物包含多肽的同源三聚体, 所述多肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

21. 一种组合物, 包含多个权利要求1-20任一项所述的颗粒。

22. 根据权利要求21所述的组合物, 其中所述组合物中的所有抗体或二聚体都是相同的。

23. 根据权利要求17所述的组合物, 其中所述组合物中的抗体或二聚体都是不相同的。

24. 一种药物组合物, 包含: (a) 权利要求1-23任一项所述的颗粒或组合物, 以及 (b) 药物上可接受的载体。

25. 所述组合物或药物组合物用于任何适当的用途, 包括但不限于实施例所述的用途。

26. 一种用于治疗细菌或病毒感染的并发症, 或用于治疗或限制血管功能障碍引起的疾病或综合征的发展的方法, 包括对患有细菌或病毒感染或由血管功能障碍引起的疾病或综合征的受试者给予有效量的治疗细菌或病毒感染、或治疗或限制由血管功能障碍引起的疾病或综合征的发展的、本文任何实施方案或实施方案的组合所述的颗粒、组合物或药物组合物。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述治疗包括治疗或限制由血管功能障碍引起的疾病或综合征的发展, 所述疾病或综合征包括但不限于败血症、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤、急性肾损伤、湿性年龄黄斑变性、开角型青光眼、糖尿病视网膜病变和糖尿病肾病。

28. 一种多肽, 包含氨基酸序列, 所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:17-18和47中的任一条氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。

29. 一种核酸, 其编码权利要求28所述的多肽。

30. 一种表达载体, 其包含权利要求29所述的核酸, 所述核酸可操作连接至控制序列。

31. 一种宿主细胞, 其包含权利要求28-30任一项所述的多肽、核酸和/或表达载体。

32. 一种试剂盒, 包括:

(a) 多肽, 所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、

65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列,其中,括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中不予考虑);其中,所述多肽能够(a)组装成同源聚合物,和(b)结合至IgG抗体的恒定区;任选地如权利要求2-15任一项中进一步限定的多肽;以及

(b) Tie2抗体,其包含与SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:13-14以及SEQ ID NO:15-16重链和轻链对的氨基到序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,和/或融合到Fc结构域、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域,所述纤维蛋白原样结构域任选地包含选自SEQ ID NO:17-18和47的氨基酸序列。

33. 一种试剂盒,包括:

(a) 宿主细胞,其能够表达一个或多个多肽,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列,其中,括号中的残基是任选的(即,在在百分比同一性要求中不予考虑);其中,所述多肽能够(a)组装成同源聚合物,和(b)结合至IgG抗体的恒定区;任选地表达如在权利要求2-15任一项中进一步限定的多肽;以及

(b) 宿主细胞,其能够表达Tie2抗体,所述Tie2抗体包含与选自SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:13-14和SEQ ID NO:15-16重链和轻链对的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,和/或表达融合到Fc结构域、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域,所述纤维蛋白原样结构域任选地包含选自SEQ ID NO:17-18和47的氨基酸序列。

34. 一种颗粒,包含:

(a) 多个多肽聚合物,其中:

(i) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(ii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(iii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(iv) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(v) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(vi) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(vii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

(viii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;或

(ix) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

其中括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中不予考虑);以及

(b) 多个 α -TNFRSF(肿瘤坏死因子受体超级家族)抗体,所述 α -TNFRSF抗体包含Fc结构域;

其中,

(i) 多个抗体中的每个 α -TNFRSF抗体包含第一Fc结构域和第二Fc结构域;

(ii) 多个抗体中的每个 α -TNFRSF抗体(a)通过第一Fc结构域非共价结合到第一聚合物的一个多肽单体链上,(b)通过第二Fc结构域非共价结合到第二聚合物的一个多肽单体上;

并且

(iii) 每个聚合物的每条多肽单体链非共价结合到一个Fc结构域;

其中所述颗粒包含二面体、四面体、八面体或二十面体对称性。

35. 根据权利要求34所述的颗粒,其中聚合物包括具有一些氨基酸差异的单体。

36. 根据权利要求34或35所述的颗粒,其中所述颗粒包含不是同源低聚物的聚合物。

37. 根据权利要求34-36任一项所述的颗粒,其中所述颗粒中的每个聚合物是相同的。

38. 根据权利要求34所述的颗粒,其中每个单体在每个聚合物是相同的,每个聚合物是同源聚合物。

39. 根据权利要求38所述的颗粒,其中所述颗粒中的每个同源聚合物是相同的。

40. 根据权利要求34-39任一项所述的颗粒,其中所述多个聚合物包含多肽的二聚体,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1-3的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、94%、93%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

41. 根据权利要求34-39任一项所述的颗粒,其中所述多个聚合物包含多肽的三聚体,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:4-6的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

42. 根据权利要求34-39任一项所述的颗粒,其中所述多个聚合物包含多肽的四聚体,所述多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序

列。

43. 根据权利要求34-39任一项所述的颗粒,其中所述多个聚合物包含多肽的五聚体,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:8-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

44. 根据权利要求34-43任一项所述的颗粒,其中,存在于如表2所定义的SEQ ID NO:1-9的任何一个的多肽聚合物中聚合物界面的残基是保守的。

45. 根据权利要求34-44任一项所述的颗粒,其中存在于表3中定义的SEQ ID NO:1-9的任何一个的Fc结合界面上的残基是保守的。

46. 根据权利要求34-45任一项所述的颗粒,其中相对于SEQ ID NO:1-9中任一条的参比序列的置换包含参比多肽中极性残基处的置换或、基本上由或由该置换组成。

47. 根据权利要求34-46任一项所述的颗粒,其中相对于SEQ ID NO:1-9中任一条的参比序列的置换包含参比多肽的环位置中如表4所示的非Gly/Pro残基处的极性残基置换,基本上由或由该置换组成在的组成。

48. 根据权利要求34-47任一项所述的颗粒,其中,来自SEQ ID no.1-9任一条参比多肽的氨基酸变化是保守的氨基酸置换。

49. 根据根据权利要求34到48中任一权利要求所述的颗粒,其中 α -TNFRSF抗体靶向DR5/TRAIL-R2/TNFRSF10B/CD262、CD40、4-1BB和TWEAKR (肿瘤坏死因子样凋亡受体弱诱导因子)/TNFRSF12A/CD266中的一个或多个。

50. 根据权利要求34-48任一项所述的颗粒,其中所述 α -TNFRSF抗体包含与选自以下重链和轻链对(当同时需要重链和轻链时)的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列:

SEQ ID NO:19和20;

SEQ ID NO:21和22;

SEQ ID NO:23和24;

SEQ ID NO:25和26;

SEQ ID NO:27和28;

SEQ ID NO:29;

SEQ ID NO:30;

SEQ ID NO:31和32;

SEQ ID NO:33;

SEQ ID NO:34和35;

SEQ ID NO:36和37;

SEQ ID NO:38和39;

SEQ ID NO:40和41;

SEQ ID NO:42和43;

SEQ ID NO:44和45;

SEQ ID NO:44和46;

SEQ ID NO:48和49;

SEQ ID NO:50和51;

SEQ ID NO:52和53

SEQ ID NO:54和55;

SEQ ID NO:56;

美国专利申请公布文本US20090074711所披露的Lob 7/6重链和轻链;以及在2018094300中所披露的重链和轻链对。

51. 根据权利要求34-50中的任一项所述的颗粒,其中所述多个聚合物包含所述多肽的四聚体,所述多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

52. 根据权利要求34-50任一项所述的颗粒,其中所述多个聚合物包含多肽,所述聚合物包含多肽的三聚体,所述多肽与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

53. 一种组合物,包含多个权利要求34-52任一项所述的颗粒。

54. 根据权利要求53所述的组合物,其中所述组合物中的所有抗体都是相同的。

55. 根据权利要求53中所述的组合物,其中所述组合物中的抗体都是不相同的。

56. 一种药物组合物,包含(a)权利要求34-55任一项所述的颗粒或组合物,以及(b)药学上可接受的载体。

57. 权利要求34-57任一项所述的颗粒、组合物或药物组合物用于任何适当的用途,包括但不限于实施例中描述的用途。

58. 一种治疗肿瘤的方法,包括向患具有肿瘤的受试者施用有效诱导肿瘤细胞凋亡的量的权利要求34-56任一项所述的颗粒、组合物或药物组合物。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中所述肿瘤相对于对照肿瘤或DR5阈值表达水平过表达DR5。

60. 一种试剂盒,包括:

(a) 一个或多个多肽,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列,其中,括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中不予考虑);其中,所述多肽能够(a)组装成同源聚合物,和(b)结合至IgG抗体的恒定区;任选地如权利要求44-48任一项进一步限定的多肽;以及

(b) α -TNFRSF抗体,所述 α -TNFRSF抗体包含选自以下的抗体:Lob7/6、卢卡木单抗(Lucatumumab)、达西组单抗(Dacetuzumab)、塞鲁单抗(Selicrelumab)、布来鲁(Bleselumab)、乌瑞芦单抗(Urelumab)、乌托鲁单抗(Utomilumab)、曲齐妥单抗(Drozitumab)、scTRAIL-Fc、KMTR2、16E2和可那木单抗(Conatumumab,也称为AMG 655);任选地,如权利要求50进一步限定的。

61. 一种试剂盒,包括:

(a) 宿主细胞,其能够表达一个或多个多肽,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1-9的氨

氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列,其中,括号中的残基是任选的(即,在在百分比同一性要求中不予考虑);其中,所述多肽能够(a)组装成同源聚合物,和(b)结合至IgG抗体的恒定区;任选地表达如在权利要求44-48中进一步限定的多肽;以及

(b) 宿主细胞,能够表达 α -TNFRSF抗体的,所述 α -TNFRSF抗体包含选自以下的抗体:Lob 7/6、卢卡木单抗(Lucatumumab)、达西组单抗(Dacetuzumab)、塞鲁单抗(Selicrelumab)、布来鲁(Bleselumab)、乌瑞芦单抗(Urelumab)、乌托鲁单抗(Utomilumab)、曲齐妥单抗(Drozitumab)、scTRAIL-Fc、KMTR2、16E2和可那木单抗(Conatumumab,也称为AMG 655);任选地,表达如权利要求50进一步限定的。

62. 根据前述任一项权利要求所述的颗粒,其中,

(a) 所述颗粒、多肽聚合物、单体、抗体和/或二聚体可与其他化合物连接,以促进体内半衰期的延长,或促进血液中或注射部位的稳定性或活性的提高,其中这样的连接可以是共价或非共价的,非限制性举例,如通过包括但不限于化学交联、聚乙二醇化、HES化、PAS化和/或糖基化的方法来完成;和/或

(b) 多肽聚合物中的一或多个单体可共价连接至抗体或二聚体,以增加体内半衰期或促进血液中或注射部位的稳定性或活性的提高。

抗体结合的纳米颗粒

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2020年6月8日提交的序列号为63/036,062、2020年9月30日提交的序列号为63/085,351、2020年10月7日提交的序列号为63/088,586和2020年10月7日提交的序列号为63/088,576的美国临时专利申请的优先权,它们均通过引用全部并入本申请中。

[0003] 序列表声明

[0004] 通过电子提交的计算机可读形式的序列表与本申请一起提交,并通过引用全部并入本申请中。序列表包含在2021年6月3日创建的文件名为-20-1330-W0-SeqList_ST25.txt||的文件中,大小为178kb。

背景技术

[0005] 抗体在治疗和诊断中应用广泛。虽然已经做出了一些努力来使抗体寡聚化以增强亲和力和使受体聚集,但目前还没有方法精确地形成有序且结构均一的抗体结合的纳米结构。

发明内容

[0006] 在第一方面,本申请提供了一种颗粒,包含:

[0007] (a) 多个多肽聚合物,其中:

[0008] (i) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0009] (ii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0010] (iii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0011] (iv) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0012] (v) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0013] (vi) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0014] (vii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、

55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；

[0015] (viii)所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

[0016] (ix)所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；

[0017] 其中括号中的残基是任选的(即：在百分比同一性要求中不予考虑)；以及

[0018] (b)多个(i)包含Fc结构域的Tie2受体抗体，和/或(ii)融合到Fc结构域的、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域的二聚体；

[0019] 其中，

[0020] (i)每个Tie2抗体或二聚体包含第一Fc结构域和第二Fc结构域；

[0021] (ii)多个Tie2抗体或二聚体中的每一个：(A)通过第一Fc结构域非共价结合到第一聚合物的一条多肽单体链上，(B)通过第二Fc结构域非共价结合到第二聚合物的一个多肽单体上；且

[0022] (iii)每个聚合物的每条多肽单体链非共价结合到一个Fc结构域上；

[0023] 其中所述颗粒包含二面体、四面体、八面体或二十面体对称性。

[0024] 在一个实施方案中，Tie2抗体或二聚体包含Tie2抗体，其中Tie2抗体包含与选自以下重链和轻链对的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列：

[0025] SEQ ID NO:11-12，

[0026] SEQ ID NO:13-14，以及

[0027] SEQ ID NO:15-16。

[0028] 在另一个实施方案中，二聚体包含与SEQ ID No:17或18的氨基酸序列的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，其中括号内的残基是任选的。

[0029] 在另一个实施方案中，所述颗粒或其组合物用于治疗，包括治疗或限制由血管功能障碍引起的疾病或综合征的发展，包括但不限于细菌或病毒感染、败血症、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤、急性肾损伤、湿性年龄相关黄斑变性、开角型青光眼、糖尿病视网膜病变和糖尿病肾病。

[0030] 在另一个实施方案中，本申请包含多肽，所述多肽包含SEQ ID NO:17-18和47任一条氨基酸序列或由该氨基酸序列组成；编码这种多肽的核酸；包含与控制序列可操作连接的这种核酸的表达载体；以及包含这种多肽、核酸和/或表达载体的宿主细胞。

[0031] 在其他实施方案中，本申请提供了试剂盒，所述试剂盒包括：

[0032] (a)多肽，所述多肽与选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列，括号中的残基是任选的(即，在百分比同一性要求中不予考虑)，其中，所述多肽能够(a)的能够组装成同源聚合物中，以及以(b)结合至IgG抗体的恒定区；

任选地,本申请公开的实施方案中进一步限定的多肽;以及

[0033] (b) Tie2抗体,其包含与SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:13-14以及SEQ ID NO:15-16的重链和轻链对的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,和/或融合到Fc结构域、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域,所述纤维蛋白原样结构域任选地包含选自SEQ ID NO:17-18和47的氨基酸序列。

[0034] 在进一步实施方案中,本申请提供了试剂盒,所述试剂盒包含:

[0035] (a) 宿主细胞,其能够表达多肽,所述多肽包含选SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%与相同的氨基酸序列,其中括号内的残基是任选的(即,在百分比同一性中未予考虑),其中,所述多肽能够(a)组装成同源聚合物中,(b)与IgG抗体的恒定区结合;任选地,表达本申请公开的实施方案中进一步限定的多肽;以及

[0036] (b) 宿主细胞,其能够表达Tie2抗体,所述Tie2抗体包含与选自SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:13-14和SEQ ID NO:15-16重链和轻链对的氨基酸序列50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,和/或表达融合到Fc结构域、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域,所述纤维蛋白原样结构域任选地包含选自SEQ ID NO:17-18和47的氨基酸序列。

[0037] 在另一方面,本申请提供了一种颗粒,所述颗粒包含:

[0038] (a) 多个多肽聚合物,其中:

[0039] (i) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0040] (ii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0041] (iii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0042] (iv) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0043] (v) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0044] (vi) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0045] (vii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、

55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；

[0046] (viii)所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

[0047] (ix)所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；

[0048] 其中括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中不予考虑);以及

[0049] (b)多个 α -TNFRSF(肿瘤坏死因子受体超级家族)抗体,所述 α -TNFRSF抗体包含Fc结构域;其中,

[0050] (i)多个抗体中的每个 α -TNFRSF抗体包含第一Fc结构域和第二Fc结构域;

[0051] (ii)多个抗体中的每个 α -TNFRSF抗体(a)通过第一Fc结构域非共价结合到第一聚合物的一个多肽单体链上,(b)通过第二Fc结构域非共价结合到第二聚合物的一个多肽单体上;并且

[0052] (iii)每个聚合物的每条多肽单体链非共价结合到一个Fc结构域;

[0053] 其中所述颗粒包含二面体、四面体、八面体或二十面体对称性。

[0054] 在一个实施方案中, α -TNFRSF抗体靶向DR5/TRAIL-R2/TNFRSF10B/CD262、CD40、4-1BB和TWEAKR(肿瘤坏死因子样弱凋亡受体诱导物)/TNFRSF12A/CD266中的一个或多个。在另一个实施方案中, α -TNFRSF抗体包含与选自以下轻重链和轻链对(当同时需要重链和轻链时)的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列:

[0055] SEQ ID NO:19和20;

[0056] SEQ ID NO:21和22;

[0057] SEQ ID NO:23和24;

[0058] SEQ ID NO:25和26;

[0059] SEQ ID NO:27和28;

[0060] SEQ ID NO:29;

[0061] SEQ ID NO:30;

[0062] SEQ ID NO:31和32;

[0063] SEQ ID NO:33;

[0064] SEQ ID NO:34和35;

[0065] SEQ ID NO:36和37;

[0066] SEQ ID NO:38和39;

[0067] SEQ ID NO:40和41;

[0068] SEQ ID NO:42和43;

[0069] SEQ ID NO:44和45;

[0070] SEQ ID NO:44和46;

[0071] SEQ ID NO:48和49;

- [0072] SEQ ID NO:50和51;
- [0073] SEQ ID NO:52和53
- [0074] SEQ ID NO:54和55;
- [0075] SEQ ID NO:56;
- [0076] 美国专利申请公布文本US20090074711所披露的Lob 7/6重链和轻链;以及
- [0077] 在2018094300中所披露的重链和轻链对。
- [0078] 本申请还提供了使用这种颗粒治疗肿瘤的方法。
- [0079] 在另一个实施方案中,本申请提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括:
- [0080] (a) 一个或多个多肽,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列,其中括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中不予考虑),其中,所述多肽能够(a)能够组装成同源聚合物,以及(b)结合至IgG抗体的恒定区;任选地,如本实施方案中进一步限定的多肽;以及
- [0081] (b) α -TNFRSF抗体,所述 α -TNFRSF抗体包含选自以下的抗体:
- [0082] Lob 7/6、卢卡木单抗(Lucatumumab)、达西组单抗(Dacetuzumab)、塞鲁单抗(Selicrelumab)、布来鲁(Bleselumab)、乌瑞芦单抗(Urelumab)、乌托鲁单抗(Utomilumab)、曲齐妥单抗(Drozitumab)、scTRAIL-Fc、KMTR2、16E2和可那木单抗(Conatumumab,也称为AMG 655);任选地,如本文进一步所限定的。
- [0083] 在另一个实施方案中,本申请提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括:
- [0084] (a) 宿主细胞,其能够表达一个或多个多肽,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中未予考虑),其中所述多肽能够(a)组装成同源聚合物中,
- [0085] (b) 结合至IgG抗体的恒定区;任选地,表达本申请的任一实施方案中进一步限定的多肽;以及
- [0086] (b) 宿主细胞,其能够表达 α -TNFRSF抗体,所述 α -TNFRSF抗体包含选自以下的抗体:Lob 7/6、卢卡木单抗(Lucatumumab)、达西组单抗(Dacetuzumab)、塞鲁单抗(Selicrelumab)、布来鲁(Bleselumab)、乌瑞芦单抗(Urelumab)、乌托鲁单抗(Utomilumab)、曲齐妥单抗(Drozitumab)、scTRAIL-Fc、KMTR2、16E2和可那木单抗(Conatumumab,也称为AMG 655);任选地,表达如本文进一步限定的。

附图说明

[0087] 图1(A-F). 抗体纳米笼(AbC)的设计。A,指定多面体几何。B,将来自hIgG1的抗体Fc模型对准C2轴中的一个轴(在这种情况下,示出D2二面体)。C,将抗体Fc结合域融合到螺旋重复蛋白质上,然后将螺旋重复蛋白质融合到螺旋环状低聚物的单体亚基上。对构建块和构建块结合点的所有组合进行采样(下方小图)。D-E,将成功地将环状寡聚体轴置于所需多面体几何结构(D)所需方向的三元融合体向前推进,进行侧链重新设计(E)。F,将所设计的形成抗体纳米笼低聚物(AbC-forming oligomer)通过细菌表达,纯化,并与抗体Fc或IgG进行组装。

[0088] 图2(A-F) 抗体纳米笼的结构表征。A,采用抗体Fc和所设计的形成抗体纳米笼低聚物来设计模型。B,通过将设计和Fc与单个组分形成的组装体的尺寸排除色谱 (SEC) 痕迹的叠加。C,插图中带有二维平均值的电镜图像;除o42.1和i52.3设计(冷冻电镜)外,所有数据均来自负染色电镜。D-E,装配有完整人IgG1(2个完整的Fab区)的相同设计的抗体笼的尺寸排除色谱(D)和具有2D类平均值的负染色电镜(NS-EM)代表性显微照片(E)。

[0089] 图3. 与Fc形成的抗体纳米笼的三维重建。每个抗体纳米笼的计算型设计模型(卡通表示)拟合至经实验确定的来自电镜的3D密度。每个纳米笼沿着一个未被占据的对称轴(左)进行观察,旋转后向下看被Fc占据的C2对称轴之一(右)。来自o42.1和i52.3的三维重建来自冷冻电镜分析;其他的,都来自负染色电镜。

[0090] 图4(A-K). 抗体纳米笼激活细胞凋亡和血管生成信号通路。(A和B)在RCC4肾癌细胞中,Caspase-3/7由与 α -DR5抗体形成的抗体纳米笼(A)而不是由游离抗体(B)激活。(C和D) α -DR5抗体纳米笼(C),而不是Fc抗体纳米笼对照(D),在治疗后4天降低细胞活力。(E) α -DR5抗体纳米笼在治疗后6天降低活力。(F和G)o42.1、 α -DR5抗体纳米笼增强凋亡信号传导标志物PARP的裂解;(G)是(F)相对于PBS对照的量化。(H)来自血管生成素-1的F-结构域被融合到Fc(A1F-Fc)上并被组装成八面体(o42.1)和二十面体(i52.3)抗体纳米笼。(I)代表性的Western blot结果显示,A1F-Fc抗体纳米笼,而不是对照,增加pAKT和pERK1/2信号。(J)(I)的量化:pAKT量化被归一化为o42.1A1F-Fc信号(PBS对照中无pAKT信号);pERK1/2被归一化为PBS。(K)A1F-Fc抗体纳米笼在72小时后增加血管稳定性。(左)与PBS比较的血管稳定性定量。(右)代表性图像;比例尺,100nm。所有误差条表示平均值 $\pm$ SEM;采用方差分析和Dunnett事后检验来比较平均值(表11和表12)。 $*P\leq 0.05$; $**P\leq 0.01$; $***P\leq 0.001$; $****P\leq 0.0001$ 。

[0091] 图5(A-E). α -CD40抗体纳米笼在未在笼内的IgG上激活CD40信号。A-D,用 α -CD40(A)产生的八面体抗体纳米笼根据尺寸排除色谱(B)、动态光散射(DLS)(C)和负染色电镜(D)形成预期大小和形状的抗体纳米笼。E,CD40通路被LOB7/6 α -CD40八面体纳米笼激活,而不被游离的LOB7/6激活。比例尺表示平均值 $\pm$ SD, $n=3$;EC50记载在表7中。

[0092] 图6(A-C)。设计的Fc结合,设计的螺旋重复。A,螺旋重复蛋白DHR79与抗体Fc对接的模型(PDB ID:1DEE)。来自蛋白A的残基(PDB ID:1L6X)接枝在Fc和螺旋重复蛋白之间的界面上。B,Fc的结合螺旋重复单体的SEC痕迹。C,采用汇总统计(下图)对具有Fc(左)或具有hIgG1(右)进行的生物膜干涉测量(BLI)。

[0093] 图7(A-F). 额外的 α -DR5抗体纳米笼实验。A, α -DR5 ABC和TRAIL激活Colo205结直肠癌细胞系中的caspase-3,7。B-C,与来自hIgG1的Fc形成的抗体纳米笼不激活caspase-3,7(B)或降低RCC4细胞的活力(C)。D,2天后,在原代肾小管细胞系(RAM009)中, α -DR5抗体纳米笼不会显著激活caspase-3,7(D)或降低活力(E)。F,在RCC4细胞中,裂解的PARP由 α -DR5激活,而不由TRAIL、 α -DR5或Fc抗体纳米笼激活。

[0094] 图8(A-E). 额外的A1F-Fc抗体纳米笼实验。A-B,根据在Superose 6色谱柱(A)和动态光散射(B)上进行的尺寸排除色谱,与A1F-Fc形成的o42.1和i52.3抗体纳米笼均为单分散的,且均为预期的大小。SEC显示组装体轨迹为黑色,相关抗体纳米笼设计组分为浅灰色,A1F-Fc为深灰色。C,显示8个A1F配体的对照组组装体(—H8-A1F||)产生了与A1F-Fc抗体纳米笼相似水平的pAKT和pERK1/2激活,血管稳定性的增加大体相当;为了方便起见,由图4i-k

对除H8-A1F之外的所有其他条件的数据进行重新绘图。D,血管稳定性测定中与Fc形成的o42.1、i52.3抗体纳米笼和H8-A1F的代表性图像;比例尺为100 μ m。E,o42.1A1F-Fc抗体纳米笼与100%人血清(HS)在4℃或37℃下孵育24小时,并以150nM施加于HUVEC细胞。从与血清一起孵育的o42.1 A1F-Fc颗粒未见pAKT信号减弱。统计分析记载在表12中。

具体实施方式

[0095] 所有参考文献均通过引用全部并入本申请中。在本申请中,除非另有说明,使用的技术可以在以下几篇众所周知的参考文献中找到,例如:Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Sambrook等人,1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press),Gene Expression Technology(Methods in Enzymology,Vol.185,edited by D.Goeddel,1991.Academic Press,San Diego,CA),—Guide to Protein Purification||in Methods in Enzymology(M.P.Deutschcer,ed.,(1990)Academic Press,Inc.);PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications(Innis等人.1990.Academic Press,San Diego,CA),Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,2nd Ed.(R.I.Freshney.1987.Liss,Inc.New York,NY),Gene Transfer and Expression Protocols,pp.109-128,ed.E.J.Murray,The Humana Press Inc.,Clifton,N.J.),和the Ambion 1998Catalog(Ambion,Austin,TX)。

[0096] 如本文所使用,单数形式—一个(a) ||、—一个(an) ||和—所述(the) ||包括复数指代,除非上下文另有明确规定。

[0097] 如本文所使用,氨基酸残基缩写如下:丙氨酸(Ala;A)、天冬酰胺(Asn;N)、天冬氨酸(Asp;D)、精氨酸(Arg;R)、半胱氨酸(Cys;C)、谷氨酸(Glu;E)、谷氨酰胺(Gln;Q)、甘氨酸(Gly;G)、组氨酸(His;H)、异亮氨酸(Ile;I)、亮氨酸(Leu;L)、赖氨酸(Lys;K)、蛋氨酸(Met;M)、苯丙氨酸(Phe;F)、脯氨酸(Pro;P)、丝氨酸(Ser;S)、苏氨酸(Thr;T)、色氨酸(Trp;W)、酪氨酸(Tyr;Y)和缬氨酸(Val;V)。

[0098] 在本文公开的所有多肽实施方案中,任何N端蛋氨酸残基都是任选的(即,N端蛋氨酸残基可以存在或不存在)。

[0099] 本申请的任何方面的所有实施方案都可以组合使用,除非上下文明确另有规定。

[0100] 除非上下文明确另有要求,在整个说明书和权利要求中,—包含(comprise) ||、—包含(comprising) ||等词应以包含意义而不是排他或穷尽的意义进行解释。也就是说,以—包括但不限于||的意义。使用单数或复数的词也分别包括复数和单数。此外,在本申请中使用的一本文||、—上文||和—下文||以及类似含义的词语,应指本申请的整体,而非申请的任何特定部分。

[0101] 在第一方面,本申请提供了一种颗粒,包含:

[0102] (a) 多个多肽聚合物,其中:

[0103] (i) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0104] (ii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的氨基酸序列;

[0105] (iii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0106] (iv) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0107] (v) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0108] (vi) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0109] (vii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0110] (viii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;或

[0111] (ix) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0112] 其中括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中不予考虑);以及

[0113] (b) 多个(i) 包含Fc结构域的Tie2受体抗体,和/或(ii) 融合到Fc结构域、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域的二聚体;

[0114] 其中,

[0115] (i) 每个Tie2抗体或二聚体包含第一Fc结构域和第二Fc结构域;

[0116] (ii) 多个Tie2抗体或二聚体中的每一个(A)通过第一Fc结构域非共价结合到第一聚合物的一条多肽单体链上,(B)通过第二Fc结构域非共价结合到第二聚合物的一个多肽单体上;且

[0117] (iii) 每个聚合物的每条多肽单体链非共价结合到一个Fc结构域;

[0118] 其中所述颗粒包含二面体、四面体、八面体或二十面体对称性。

[0119] 如下实施例所示,本申请的颗粒和组合物Tie2受体抗体包含Fc结构域,和/或融合到Fc结构域、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域二聚体显著将AKT和ERK1/2磷酸化增加到基线上方并增强细胞迁移和血管稳定性,因此有助于治疗由细菌和病毒感染引起的病理症状。例如,诱导AKT和ERK磷酸化的能力可以促进细胞迁移和管形成(tube formation),改善损伤后的伤口愈合,因此有助于治疗感染(如细菌和病毒感染),以及由血管功能障碍引起的疾病或综合征,包括但不限于败血症、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤、急性肾损伤,湿性年龄黄斑变性、开角型青光眼、糖尿病视网膜病变、

糖尿病肾病。

[0120] 多肽聚合物包含与选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中未被考虑),其中多肽能够(a)组装成聚合物,包括但不限于同源聚合物,以及(b)与IgG抗体的恒定区域结合。

[0121] 表1.用于所有设计的序列和原始构建块。

[0122]

名称	Fc 结合域 (下划线)	单体 (标准字体)	低聚物 (黑体)	序列
d2.3 SEQ ID NO:1	DHR79	EXT6- DHR6 2	bex2c2_G2	(M)SDEEERNELIKRIREAAQRAREAAERTGDPRVRELARELARI AQIAFYLVLDPSSEVNEALKAVVKAIELAVRALEEEAEKTGD PEVRELAREVVRLAVEVATATAAGENDTLRKVAERALRLAKE AAKRGDAKAAKQAAKIAKLAAANAGDEDVLKKVELVRLAIE LVEIVVENAKRKGGDDKEAAEAALAAFRIVLAAAQLAGIAS LEVLELALRLIKEVVENAQREGYDIAVAIAAAVAFVAVVAV AAAAADITSSEVLELAIRLIKEVVENAQREGYVILLAALAAA AAFVVVAAAAKCRAGITSSETLKRAIEEIRKRVEEAQREGNDI SEAAARQAAEEFRKKADELK(GSLEHHHHHH)
d2.4 SEQ ID	DHR79	EXT6- DHR6	bex2c2_G2	(M)SDEEERNELIKRIREAAQRAREAAERTGDPRVRELARELARI AQIAFYLVLDPSSEVNEALKAVVKAIELAVRALEEEAEKTGD

[0123]

NO:2		2		PRVRELAREVVKA AVDVAEAAQAGLNDKLREVAEKALRLAK EALKEGDSTAAELAAE IARLAAKLAGDEDVLKVKLVLEAIKL VKIVVENAKRK GDDSK EAAEAAVA AF LIVLAAKLAGIASE EVLELAARLIKEVVENA QREGYDIAVAAIAAAVAFVAV A AAAADITSSEVLELAIRLIKEVVENA QREGYVILLAALAAAA AFVVVAAAAAKRAGITSSETLKRAIEEIRKRV EAAQREGNDIS EAA RQAAEEFRKKA EELK(GSLEHHHHHH)
d2.7 SEQ ID NO:3	DHR79	DHR7 6	bex2c2_G3	(M)SDEEERNELIKRI EAAQRAREAAERTGDPRVRELARELAK LAQIAFYLV LHDP SAKEVNLAL ELIVKAIELAVRALEEAEKTGD PHARELAREIVRLA VELARAVAEAAEEAKKQGNSELAEQVAR AAQVALEVIKAAITAAKQ GDRKAFRAALELVLEVIKAI EEAVK QGNPKKVAEVALKAELIRIVVQNAANKGDDADEAVEAARA AFEIVLAAQLAGIDSEE VLELAARLIKEVVENAQREGYDIA VAAIAAAVAFVAVVAAAAADITSSEVLELAIRLIKEVVENA VREGYVILLAALAAAAAFVVVAAAAAKRAGITSSETLKRAIE EIRKRV EAAQREGNDISEAARQAAEEFRKKA EELK(GSLEHH HHHH)
t32.4_o ld SEQ ID NO:4	蛋白 A	EXT6- DHR7 0	tj04c3_int5 v2	(M)FNKSQQSAFYLILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPAKSEVVA GEAAIEAARNASKGSPETAREAVRLALELVQEAARVARKTGS TELLIAAAKLAIEVARVALKVGSP EAAAREAVRAALELVQELIRA ARKTGSKEVLEEAAKLAL VALVAAVGSSEAAKAVATAV EALKEAGASEDEIAEIVARVISEVIRILKENGSEYKVICVSA KIVAEIVEALKRSGTSEDEIAEIVARVISEVIRTLKESGSDYLI ICVCVAIIVAEIVEALKRSGTSEDEIAEIVARVISEVIRTLKES GSSYEVIKECVQHIVLAILALMKSGTEVEEILLILLRVKTEV RRTLKESGS(GSLEHHHHHH)
t32.4 (aka t.4_r1) SEQ ID NO:5	蛋白 A	EXT6- DHR7 0	tj04c3_int5 v2	(M)FNKSQQSAFYLILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSKSEVVA GEAAIEAARNALKGSPETAREAVRLALELVQEAERQARKTGS TERLIAAAKLAIEVARVALKVGSPETAREAVRTALELVQELIRQ ARKTGSKEVLEEAAKLAL EVAKVAAEVGSPETAARAVATAVE ALKEAGASEDEIAEIVARVISEVIRILKESGSEYKVICRAVAR IVAEIVEALKRSGTSEDEIAEIVARVISEVIRTLKESGSDYLI CVCVAIIVAEIVEALKRSGTSEDEIAEIVARVISEVIRTLKESG SSYEVIKECVQHIVLAILALMKSGTEVEEILLILLRVKTEVR RTLKES(GSLEHHHHHH)
t32.8 SEQ ID NO:6	蛋白 A	EXT6- DHR3 9	tj04C3_int 5v2	(M)FNKDQQSAFYEV LNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSLKIL IKAAAGGDSELEEVAKRIVKELAEQGRSEKEAAKEAAELIERIT RAAGGNSDLIELAVRIVKILEEQGRSPSEAAKEAVEAIEAIVRA AGGDSEAIKVA AEIAKTHITQKESGSEYKEICRTVARIVAEIV EKLKRN GASEDEIAEIVAAHAAVILTLKLSGSDYLIHCVCVAI IVAEIVEALKRSGTSEDEIAEIVARVISAVIRVLKESGSSYEVI KECVQHIVLAILALMKSGTEVEEILLILLRVKTEVRRTLKES (GSLEHHHHHH)
o42.1 SEQ ID NO:7	蛋白 A	EXT6- DHR9	tj10C4_G1	(M)FNKDQQSAFYEILNMPNLNEALRNGFIQLLKDDPSKSTVILT AAKVA AELSEKIRTLKESGSSYEQIAETVAKAVAKLVEKLKRN GVSEDEIALAVALIISAVIQTLKESGSSYEIVAEIVARIVAEIVEA LKRSGTSEDEIAEIVARVISEVIRTLKESGSSYEIVAEIVARIVAEI VEALKRSGTSEDEIAKIVARVIAEVLRTLKESGSSEEV IKEIVARI ITEIKEALKRSGTSEDEIELITLMIEAALEIAKLKSSGSEYEEICE DVARRIAELVEKLKRDGTS AVEIAKIVAAIISAVIAMLKASG SSYEVICECVARIVAEIVEALKRSGTSA AIHALIVALVISEVIR TLKESGSSFEVILECVIRIVLEIIEALKRSGTSEQDVMLIVMA VLLVVLATLQLS(GSLEHHHHHH)

[0124]	i52.3				(M)SDEEERNELIKRIREAAQRAREAAERTGDPRVRELARELAR LAQRAFYLVLDHPSSSDVNEALKLIVEAIEAAVRALEAAERAG DPELREDAREAVRLAVEAAEEVQRNPSSSTANLLLKAIVALAE ALAAAANGDKEKFKKAAESALEIAKRVVEVASKEGDPEAVLE AAKVALRVAELAANKNGDKEVFKKAAESALEVAKRLVEVASK EGDPELVLEAAKVALRVAELAANKNGDKEVFQKAAASAVEVA LRLTEVASKEGDSELETEAAKVITRVRELASKQGDAAVAILAE TAEVKLEIEESKKRPQSES AKNLILIMQLLINQIRLLVLQIR MLDEQRQE (GSLEHHHHHH)
	SEQ ID NO:8	DHR79	EXT6- DHR7 1	5H2LD- 10_5	
[0124]	i52.6				(M)SDEEERNELIKRIREAAQRAREAAERTGDPRVRELARELAR LAQRAFYLVLDHPSSSDVNEALKLIVEAIEAAVRALEAAERTG DPKVREEARELVRRAVEAAEEVQRNPSSSEVNEKLKAIVVEIE VKVASLEAKEVTPDPKALKIAKKVIELALEAVKENPSTEALRA VLEAVRLASEVAKRVTPDPKALKIAKLVELALEAVKEDPSTD ALRAVLEAVRLASEVAKRVTPDPKALKIAKLVELAAEAVKE DPSTDALRAAKEAERLATEVAKRVTPDKKAREIEMLVKLQM EAILAETEEVKKEIEESKKRPQSES AKNLILIMQLLINQIRLL ALQIRMLALQLQE (GSLEHHHHHH)
	SEQ ID NO:9	DHR79	EXT6- DHR5 7	5H2LD- 10_5	

[0125] 如下面的实施方案详细说明,所述单体包含3个结构域(如表1中的各列所示):

[0126] (1) (Fc) 结合结构域;

[0127] (2) 螺旋多肽(单体),其有助于将Fc-结合结构域和低聚物结构域定位在正确的方向上,以促进更高阶的结构(有时被称为笼或纳米颗粒);以及

[0128] (3) 可以通过非共价相互作用缔合以形成聚合物(包括但不限于同源聚合物)的低聚物结构域,如二聚体、三聚体、四聚体或五聚体(分别为C2、C3、C4或C5循环对称)。

[0129] 在一些实施方案中,低聚物结构域可以通过非共价相互作用自缔合,以形成具有相同多肽的同源聚合物。在另一个实施方案中,低聚物结构域可以通过非共价相互作用与具有某些氨基酸序列差异的相似多肽结合形成伪聚合物,只要每个单体相对于参比多肽具有所需的氨基酸序列同一性。

[0130] 多肽单体以寡聚形式与IgG结合时的方向融合这些结构域,形成如本文所述的所需高阶结构。

[0131] 每个多肽单体有两个界面:(1) Fc结合界面(针对表3中的每个多肽进行限定);和(2)寡聚结构域界面(针对表2中的每个多肽进行限定)。本申请的多肽,当被表达时,将通过寡聚结构域形成具有C2、C3、C4或C5对称性的环状低聚物。当与抗体或二聚体结合时,通过抗体与Fc结合界面的相互作用,可以自发地组装成一个高阶的笼状多面体结构。所得到的高阶结构在Fc位置具有C2循环对称,在每个寡聚域界面具有环状的2-、3-、4-或5-对称。所产生的颗粒形成精确有序和结构均匀的抗体结合纳米颗粒结构。

[0132] 如本文所用,Tie-2抗体-抗体II是指包括Fc结构域的全长抗体和任何功能性抗体片段(即,选择性结合到Tie-2受体的片段)。在一些实施方案中,所述抗体包括重链和轻链。在其他实施方案中,所述抗体可包含融合蛋白,该融合蛋白包含选择性结合到Tie 2受体的蛋白质以及Fc结构域,所述Fc结构域发生二聚,因为Fc结构域自然发生二聚。在其他实施方案中,所述抗体可包含Fc片段,该Fc片段经化学修饰为选择性结合到Tie 2受体的蛋白质,该Fc片段发生二聚,因为Fc结构域自然发生二聚。

[0133] Tie-2二聚体包括融合到Fc结构域的、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域的两个单体。这两个单体发生二聚因为Fc结构域自然二聚。每个单体中存在的F结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列:

KAELASEKPFRCADVYQAGFNKSGIYTIYINNMPEPKKVFCNMDV
NGGGWTVIQHREDGSLDFQRGWKEYKMGFGNPSGEYWLGNEFIF
 [0134] **AITSRQYMLRIELMDWEGNRAYSQYDRFHIGNEKQNYRLYLKGH**
TGTAGKQSSLILHGADFSTKDADNDNCMCKCALMLTGGWWFDAC
GPSNLNGMFYTAGQNHGKLNGIKWHYFKGPSYSLRSTTMMIRPLD

[0135] **F** (SEQ ID NO: 10), 或由其组成。

[0136] 当与Tie2抗体或二聚体结合时,通过抗体或二聚体与Fc结合界面的相互作用,可以自发地组装一个高阶的笼状多面体结构。所得到的高阶结构在每个Fc结合界面和每个寡聚域界面上具有循环对称。例如,Tie2抗体重链和轻链可以在细胞中被共表达以产生Tie2抗体,然后将Tie2抗体与聚合物混合以形成本发明的颗粒。或者,融合到Fc结构域的Tie2结合的结构域可以在细胞中表达,Fc结构域缔合形成二聚体,然后二聚体可以与聚合物混合形成本发明所述的颗粒

[0137] 在一个实施方案中,存在于SEQ ID NO:1-9任何一个多肽单体的聚合物中的聚合界面的氨基酸(如表2所定义)残基是保守的(即,与参比多肽中相同位置的氨基酸残基相同)。

[0138] 表2:通过残基位置预测的低聚物界面(即不是Fc/Fc结合剂界面)的界面残基

名称	界面残基位置
d2.3 SEQ ID NO: 1	122, 185, 188, 189, 192, 195, 196, 199, 200, 202, 203, 204, 234, 235, 238, 239, 242, 245, 246, 249, 250, 252, 253, 280, 281, 282, 284, 285, 288, 292, 295, 296, 299, 303, 338
d2.4 SEQ ID NO: 2	185, 188, 189, 192, 195, 196, 199, 200, 202, 203, 235, 238, 239, 242, 245, 246, 249, 250, 252, 253, 280, 281, 282, 284, 285, 288, 292, 295, 296, 299, 303, 338
d2.7 SEQ ID NO: 3	202, 205, 206, 209, 213, 216, 217, 219, 220, 221, 251, 252, 255, 256, 259, 262, 263, 266, 267, 269, 270, 297, 298, 299, 301, 302, 305, 309, 312, 313, 316, 320, 355
t32.4 old SEQ ID NO: 4	202, 203, 204, 207, 208, 252, 254, 255, 258, 261, 262, 265, 266, 269, 278, 308, 312, 315, 316, 318, 319, 320, 322, 323, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 335, 336, 337, 339, 340, 343
[0139] t32.4 (aka t.4_r1) SEQ ID NO: 5	202, 203, 204, 207, 208, 252, 254, 255, 258, 261, 262, 265, 266, 269, 278, 308, 312, 315, 316, 318, 319, 320, 322, 323, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 335, 336, 337, 339, 340, 343
t32.8 SEQ ID NO: 6	155, 156, 157, 160, 161, 205, 207, 208, 211, 214, 215, 218, 219, 222, 231, 232, 261, 265, 268, 269, 271, 272, 273, 275, 276, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 289, 290, 292, 293, 296
o42.1 SEQ ID NO: 7	288, 289, 290, 294, 338, 339, 340, 341, 343, 344, 348, 364, 368, 369, 372, 373, 375, 376, 379, 383, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 400, 401, 402, 404, 405, 408, 409, 412
i52.3 SEQ ID NO: 8	201, 205, 209, 236, 248, 252, 255, 277, 281, 282, 284, 286, 287, 289, 290, 293, 294, 297, 300, 301, 304, 305, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 343
i52.6 SEQ ID NO: 9	203, 206, 276, 282, 285, 288, 289, 292, 293, 295, 296, 299, 302, 303, 306, 309, 310, 313, 314, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352

[0140] 在另一个实施方案中,在表3中定义的Fc结合界面上存在的单体中的氨基酸残基是保守的。

[0141] 表3

[0152] ○疏水氨基酸(Ala、Cys、Gly、Pro、Met、Sce、Sme、Val、Ile、Leu)只能用其他疏水氨基酸置换;

[0153] ○具有较大侧链的疏水氨基酸(Phe、Tyr、Trp)只能用其他具有大体积侧链的疏水氨基酸取代;

[0154] ○带正电荷侧链的氨基酸(Arg、His、Lys)只能用其他带正电荷侧链的氨基酸置换;

[0155] ○带负电荷侧链的氨基酸(Asp、Glu)只能用其他带负电荷侧链的氨基酸置换;以及

[0156] ○具有极性不带电荷侧链的氨基酸(Ser、Thr、Asn、Gln)只能用其他具有极性不带电荷侧链的氨基酸置换。

[0157] 在本文公开的所有实施方案中,多肽可以包含被认为适合于预期用途的一个或多个额外的官能团或残基。本申请的多肽可以包括位于N端或C端或其组合的额外残基。这些额外的残基不包括在确定本申请的多肽相对于参比多肽的百分比同一性中未予考虑。这样的残基可以是适合于预期用途的任何残基,包括但不限于可检测的蛋白质或其片段(也称为一标签II)。如本文所使用的,一标签II包括通常的可检测部分(即,荧光蛋白、抗体表位标签等)、治疗剂、纯化标签(His标签等)、接头序列、适用于纯化目的配体、驱动多肽定位的配体、为多肽添加功能的肽结构域。在非限制性实施方案中,这样的官能团可以包含一个或多个多肽抗原、多肽治疗剂、酶、可检测结构域(例如,荧光蛋白或其片段)、DNA结合蛋白、转录因子等。在一个实施方案中,多肽可以进一步包含共价连接到氨基端和/或羧基端的功能多肽。在其他实施方案中,功能多肽可以包括但不限于可检测多肽,例如荧光多肽或发光多肽、受体结合结构域等。

[0158] 在一个实施方案中,多个同源聚合物包含多肽的同源二聚体,该多肽包含与选自SEQ ID NO:1-3的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在这些实施方案中,添加具有Tie2抗体或二聚体的所述多肽与导致自组装成每个颗粒含有两个抗体的D2二面体结构。

[0159] 在另一个实施方案中,多个同源聚合物包含多肽的同源三聚体,该多肽包含与选自SEQ ID NO:4-6的氨基酸至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在这些实施方案中,添加具有Tie2抗体或二聚体的所述多肽导致自组装成每个颗粒含有六个抗体的T32四面体结构。

[0160] 在进一步实施方案中,多个同源聚合物包含多肽的同源四聚体,该多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在这些实施方案中,添加具有Tie2抗体或二聚体的所述多肽导致自组装成每个颗粒含有十二个抗体的042八面体结构。

[0161] 在进一步实施方案中,多个同源聚合物包含多肽的同源五聚体,该多肽包含与选自SEQ ID NO:8-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在这些实

施方案中,添加具有Tie2抗体或二聚体的所述多肽导致自组装成每个颗粒含有三十个抗体的I52二十面体结构。

[0162] 在所有这些实施方案的一个实施方案中,Tie2抗体或二聚体包含Tie2抗体,其中Tie2抗体包含与选自以下重链和轻链对的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列:

[0163] SEQ ID NO:11-12,

[0164] SEQ ID NO:13-14,和

[0165] SEQ ID NO:15-16。

[0166] 12H8

[0167] 重链(Fc域加下划线)

[0168] EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEWVAYINSGSSTITYADTVKGRF
TISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCARGYYGPYYFDYWGGQTALTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:11)

[0169] 轻链

[0170] DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSFTCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASSRHTGVPDRFTGSGSG
TDFTLTITNVQSEDLADYFCQEQYSSYPLTFGVGKLELKRVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:12)

[0171] 13H10

[0172] 重链(Fc域加下划线)

[0173] QVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDFSIHWVKQAPGKGLKWMGWINTETGETTYAEDFKGRF
AFSLETSASTAYLQINNKNEDTATYFCRRYDYDTWFAYWGGTLTVTSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:13)

[0174] 轻链

[0175] DIVMTQAALSVPVTPGESVSISCRSSSSLLHRNGNTYLYWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLASGVDRFS
GSGSGTAFTLRISRVEAEDGVVYCMQRLEYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:14)

[0176] 15B8

[0177] 重链(Fc域加下划线)

[0178] QVQLQQPGVVLVMPGASVKLSCKASGYTFASYWMHWVKQRPGQGLEWIGEIDPSDSYRNYNQKFKGKA
TLTVDKSSSTVNMQLSSLTSEDSAVYYCAKTSIGRAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:15)

[0179] 轻链

[0180] DIQMIQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSFVTWYQQKQKGKSPQLLVFNAKNLVEGVPSSFSGSGSG
TQFSLKIDSLQPEDFGTYTCQHHYSIPYTFGGGTKLEMRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:16)

[0181] 在所有这些实施方案的另一个实施方案中,Tie2抗体或二聚体包含二聚体,其中二聚体包含单体,所述单体包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列其中(X)是任选的,当存在时,包含任何合适长度和氨基酸含量的氨基酸接头。如上所述,Tie-2二聚体包括融合到Fc结构域的、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域的两个单体。这两个单体自Fc结构域自然二聚时发生二聚。每个单体中存在的F结构域氨基酸序列包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由其组成:

[0182] 人Ang1 F结构域(Tie2受体结合结构域;SEQ ID NO:10):加粗字体人IgG1 Fc:下划线

KAELASEKPFRCADVYQAGFNKSGIYTIYINNMPEPKKVFNCMDVNGGGWTVIQHREDGS
LDFQRGWKEYKMGFGNPSGEYWLGNFIFAITSQRQYMLRIELMDWEGNRAYSQYDRFHI
[0183] **GNEKQNYRLYLKGHTGTAGKQSSILHGADEFSTKDADNDNCMCKCALMLTGGWWFDACG**
PSNLNGMFYTAGQNHGKLNGIKWHYFKGPSYSLRSTTMMIRPLDF(X)
EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
[0184] PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 47)

[0185] 在一个实施方案中,二聚体包含单体,所述单体包含与SEQ ID NO:17或18的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中括号中的残基是任选的。括号中的残基可以是氨基酸接头(在这些例子中,是富含GS的接头)、His-标签或分泌信号(斜体-这些可能不存在、存在或被任何其他分泌信号取代)。

(METDTLLLWVLLLWVPGSTG)

(HHHHHH)(GGS)KAELASEKPF~~RDCADVYQAGFNKSGIYTIYINNMPEPKKVFCNMDVNGGG~~
WTVIQHREDGSLDFQRGWKEYKMGFGNPSGEYWLGNFIFAITSQRQYMLRIELMDWEGN
RAYSQYDRFHIGNEKQNYRLYLKGHTGTAGKQSSLILHGADFSTKDADNDNCMCKCALML
TGGWWFDACGPSNLNGMFYTAGQNHGKLNIGIKWHYFKGPSYSLRSTTMMIRPLDF(GGSG
GS)EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)

[0186]

(METDTLLLWVLLLWVPGSTG)KAELASEKPF~~RDCADVYQAGFNKSGIYTIYINNMPEPKKVFCN~~
MDVNGGGWTVIQHREDGSLDFQRGWKEYKMGFGNPSGEYWLGNFIFAITSQRQYMLRIE
LMDWEGNRAYSQYDRFHIGNEKQNYRLYLKGHTGTAGKQSSLILHGADFSTKDADNDNCM
CKCALMLTGGWWFDACGPSNLNGMFYTAGQNHGKLNIGIKWHYFKGPSYSLRSTTMMIRP
LDF(GGSGGS)EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(GGSHHHHHH) (SEQ ID
NO: 18)

[0187] 在上述实施方案任一个的一个特定实施方案中,多个同源聚合物包含多肽的同位四聚体,该多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在上述实施方案任一个的另一个具体实施方案中,多个同源聚合物包含多肽的同源三聚体,该多肽的同源三聚体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0188] 在另一个实施方案中,本申请提供了一种组合物,所述组合物包含多个本文任一实施方案所述的颗粒,所述颗粒包含包含Fc结构域的Tie2受体抗体,和/或融合到Fc结构域、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域的二聚体。所述组合物可用在,例如,本申请的方法和用途中。在一个实施方案中,组合物中的所有抗体或二聚体是相同的。在另一个实施方案中,组合物中的抗体或二聚体总的来说是不相同的。例如,组合物可以包含包含Tie2抗体的颗粒和包含F结构域二聚体的颗粒。在另一个实施方案中,组合物可以包含包含不同Tie2抗体和/或具有不同氨基酸序列的F结构域二聚体的颗粒。

[0189] 在另一个实施方案中,本申请包括包含Tie2颗粒或本申请任一实施方案所述组合物的药物组合物,以及药学上可接受的载体。所述药物组合物可用在,例如,本申请的方法和用途中。

[0190] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于任何适当用途的Tie 2颗粒、组合物或药物组合物的用途,包括但不限于所述实施方案中所述的用途。在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗由细菌或病毒感染引起的并发症或由血管功能障碍引起的任何疾病或综合征的方法,包括向患有细菌或病毒感染或由血管功能障碍引起的任何疾病或综合征的受试

者施用治疗细菌或病毒感染的有效量的本文所述的任何实施方案或实施方案的组合所述的颗粒、组合物或药物组合物。该方法可用于治疗任何细菌或病毒感染,或主治医师人员认为适当的由血管功能障碍引起的任何疾病或综合征。在一个实施方案中,所述治疗包括治疗或限制由血管功能障碍引起的疾病或综合征的发展,包括但不限于败血症、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤、急性肾损伤、湿性年龄黄斑变性、开角型青光眼、糖尿病视网膜病变和糖尿病肾病。

[0191] 在另一个实施方案中,本申请提供用于生成本申请的颗粒的试剂盒。在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0192] (a) 多肽,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列,其中,括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中不予考虑);其中,所述多肽能够(a)组装成同源聚合物,以及(b)结合至IgG抗体的恒定区;任选地,其中所述多肽如在本文公开的任何实施方案中所述;以及

[0193] (b) Tie2抗体,所述Tie2抗体包含与SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:13-14和SEQ ID NO:15-16重链和轻链对的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,和/或融合到Fc结构域、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域,所述纤维蛋白原样结构域任选地包含选自SEQ ID NO:17-18和47的氨基酸序列。

[0194] 在本实施方案中,当两种组分结合时,颗粒通过具有Fc结合界面的抗体或二聚体的相互作用发生自组装。

[0195] 在另一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0196] (a) 宿主细胞,其能够表达多肽,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列,其中,括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中不予考虑),其中,所述多肽能够(a)组装成同源聚合物,以及(b)结合至IgG抗体的恒定区;任选地表达本文任一个实施方案公开的多肽;以及

[0197] (b) 宿主细胞,其能够表达Tie2抗体,所述Tie2抗体包含与SEQ ID NO:11-12、SEQ ID NO:13-14和SEQ ID NO:15-16重链和轻链对的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,和/或表达融合到Fc结构域、衍生自血管生成素(F结构域)的纤维蛋白原样结构域的氨基酸序列,所述纤维蛋白原样结构域任选地包含选自SEQ ID NO:17-18和47的氨基酸序列。

[0198] 在该实施方案中,所述两种组分可由宿主细胞产生,然后结合,使得颗粒通过抗体或二聚体与Fc结合界面的相互作用进行自组装。

[0199] 在另一个实施方案中,本申请提供了多肽,所述多肽包含SEQ ID NO:17-18和47中的任一条氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。所述多肽可用于生产本文所公开的Tie 2颗粒。

[0200] 在另一方面,本申请提供了核酸,所述核酸编码多肽,所述多肽包含SEQ ID NO:17-18和47中的任一条氨基酸序列或由该氨基酸序列组成。该核酸序列可包括基因组或

cDNA形式的单链或双链RNA或DNA,或DNA-RNA杂交体,每种杂交体可包括化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基。该核酸序列可包括用于促进编码多肽表达和/或纯化的额外序列,包括但不限于polyA序列、修饰的Kozak序列、以及编码表位标签、输出信号、分泌信号、核定位信号和质膜定位信号的序列。对于本领域技术人员而言,基于本文的教导,哪些核酸序列将编码本申请的多肽是显而易见的。

[0201] 在另一方面,本申请提供了一种表达载体,所述表达载体包含可操作连接连接至控制序列的、本申请所述的核酸。一表达载体包括将核酸编码区或基因可操作地连接到能够影响基因产物表达的任何控制序列的载体。与本申请的核酸序列可操作连接的一控制序列是能够影响核酸分子表达的核酸序列。控制序列不需要与核酸序列相邻,只要它们起着指导其表达的作用。因此,例如,在启动子序列和核酸序列之间可以存在插入的未翻译但已转录的序列,并且启动子序列仍然可以被认为与编码序列可操作地连接。其他这样的控制序列包括但不限于多聚腺苷酸信号、终止信号和核糖体结合位点。这样的表达载体可以是任何类型,包括但不限于质粒和基于病毒的表达载体。用于在哺乳动物系统中驱动所公开的核酸序列表达的控制序列可以是组成型的(由多种启动子中的任何一种驱动,包括但不限于CMV、SV40、RSV、肌动蛋白、EF)或诱导型的(由包括但不限于四环素、蜕皮素、激素反应性的许多诱导型启动子中的任何一种驱动)。表达载体在宿主生物中必须是可复制的,或作为一个附加体(episome)或被整合到宿主染色体DNA中。在各种实施方案中,表达载体可以包括质粒、基于病毒的载体或任何其他合适的表达载体。

[0202] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含本文所公开的任何实施方案的多肽、核酸和/或表达载体的宿主细胞。在各种实施方案中,宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。

[0203] 在另一方面,本申请提供了一种颗粒,所述颗粒包含:

[0204] (a) 多个多肽聚合物,其中:

[0205] (i) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0206] (ii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0207] (iii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0208] (iv) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0209] (v) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0210] (vi) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的氨基酸序列;

[0211] (vii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0212] (viii) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;或

[0213] (ix) 所述聚合物中的每个单体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;

[0214] 其中括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中不予考虑);以及

[0215] (b) 多个包含Fc结构域的 α -TNFRSF(肿瘤坏死因子受体超级家族)抗体;

[0216] 其中,

[0217] (i) 多个抗体中的每个 α -TNFRSF抗体包含第一Fc结构域和第二Fc结构域;

[0218] (ii) 多个抗体中的每个 α -TNFRSF抗体(a)通过第一Fc结构域非共价结合到第一聚合物的一个多肽单体链上,(b)通过第二Fc结构域非共价结合到第二聚合物的一个多肽单体上;并且

[0219] (iii) 每个聚合物的每条多肽单体链非共价结合到一个Fc结构域;

[0220] 其中所述颗粒包含二面体、四面体、八面体或二十面体对称性。

[0221] 如下实施方案所示,与游离抗体或Fc-融合相比,本发明的靶向细胞表面TNFRSF受体的颗粒增强了DR5介导的凋亡信号转导,并被证明可诱导肿瘤细胞凋亡。因此,所述组合可用于治疗肿瘤。

[0222] 在这方面,一抗体||包括指代选择性结合至包含Fc结构域的TNFRSF的全长抗体片段和任何功能性抗体片段;融合蛋白,包括结合TNFRSF和Fc结构域的蛋白质,所述Fc结构域发生二聚因为其自然发生二聚;以及Fc片段被化学修饰成与TNFRSF结合的蛋白质,所述Fc片段发生二聚因为Fc结构域自然发生二聚。

[0223] 当与 α -TNFRSF抗体结合时,通过抗体与Fc结合界面的相互作用,自组装成一个高阶的笼状多面体结构。所得到的高阶结构在Fc位置具有C2循环对称,在每个同源寡聚结构域界面具有环形2-、3-、4-或5-对称。本文公开的多肽单体的所有实施方案同样适用于本申请的这一方面。因此,在各种非限制性实施方案中,在SEQ ID NO:1-9的任何一种多肽的聚合物中,存在于聚合物界面(如表2所定义)的残基可以是保守的;如表3所定义的任何一個SEQ ID NO:1-9的Fc结合界面上的残基可以是保守的;相对于SEQ ID NO:1-9中的任何一个的参比序列的置换可以包含参比多肽中极性残基上的置换,基本上由或由该置换组成;相对于SEQ ID NO:1-9中的任何一个的参比序列的置换可以包含参比多肽中在环位置的非gly/Pro残基的极性残基(如表4所定义),基本上由或由该置换组成;和/或来自SEQ ID NO:1-9中的任何一种参比多肽的氨基酸变化可能是保守的氨基酸置换。在所有实施方案中,多肽单体可以进一步包含共价连接到氨基端和/或羧基端的功能多肽。在各种非限制性实施方案中,功能多肽可以包括但不限于可检测多肽,例如荧光多肽或发光多肽、受体结合结构域等。

[0224] 在一个实施方案中,可以在细胞中共同表达的 α -TNFRSF抗体重链和轻链以产生 α -TNFRSF抗体,然后可以将其与聚合物混合以形成本发明的颗粒。

[0225] 在一些实施方案中,每种聚合物中的多肽单体是100%相同的,并且所述聚合物是同源低聚物。在其他实施方案中,所述聚合物可包含具有一些氨基酸差异的单体,只要每个单体具有所需的相对于参比多肽的氨基酸序列同一性。在这些实施方案中,聚合物不一定是同源低聚物。鉴于此,本领域技术人员将理解,给定颗粒中的多个聚合物可以包含所有同源低聚物,该颗粒可以包含非同源低聚物的聚合物或它们的组合。类似地,所述颗粒可包含所有同源低聚物,且每个同源低聚物可以相同,或所述多个同源低聚物可以包含2个或更多不同的同源低聚物。

[0226] 在一个实施方案中,多个聚合物包括多肽的二聚体,该多肽包含与选自SEQ ID NO:1-3的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在这些实施方案中,添加具有 α -TNFRSF抗体的多肽导致自组装成每个颗粒包含两个抗体的D2二面体结构。

[0227] 在另一个实施方案中,多个聚合物包括多肽的三聚体,该多肽包含与选自SEQ ID NO:4-6的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在这些实施方案中,添加具有 α -TNFRSF抗体的所述多肽导致自组装成每个颗粒包含六个抗体的T32四面体结构。

[0228] 在进一步实施方案中,多个聚合物包括多肽的四聚体,该多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列相同的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列。在这些实施方案中,添加具有 α -TNFRSF抗体的所述多肽导致自组装成每个颗粒含有十二个抗体的O42八面体结构。

[0229] 在一个实施方案中,多个聚合物包括多肽的五聚体,该多肽包含与SEQ ID NO:8-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在这些实施方案中,添加具有 α -TNFRSF的所述多肽导致自组装成每个颗粒含有三十个抗体的I52二十面体结构。

[0230] 只要适当于颗粒及其组合物的预期用途,任何TNFRSF可以作为靶标在各种实施方案中, α -TNFRSF抗体靶向DR5/TRAIL-R2/TNFRSF10B/CD262、CD40、4-1BB和TWEAKR(肿瘤坏死因子样弱凋亡诱导物)/TNFRSF12A/CD266中的一个或多个。在各种进一步的实施方案中, α -TNFRSF抗体包含与选自以下轻重链和轻链对(当同时需要重链和轻链时)的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列:

[0231] SEQ ID NO:19和20;

[0232] SEQ ID NO:21和22;

[0233] SEQ ID NO:23和24;

[0234] SEQ ID NO:25和26;

[0235] SEQ ID NO:27和28;

[0236] SEQ ID NO:29;

[0237] SEQ ID NO:30;

[0238] SEQ ID NO:31和32;

- [0239] SEQ ID NO:33;
[0240] SEQ ID NO:34和35;
[0241] SEQ ID NO:36和37;
[0242] SEQ ID NO:38和39;
[0243] SEQ ID NO:40和41;
[0244] SEQ ID NO:42和43;
[0245] SEQ ID NO:44和45;
[0246] SEQ ID NO:44和46;
[0247] SEQ ID NO:48和49;
[0248] SEQ ID NO:50和51;
[0249] SEQ ID NO:52和53
[0250] SEQ ID NO:54和55;
[0251] SEQ ID NO:56;
[0252] 在美国专利申请US US20090074711中公开的Lob 7/6重链和轻链(在此通过引用全文并入本申请);以及2018094300(在此通过引用全文并入本申请)中公开的重链和轻链对。

[0253] 表5.抗体序列

[0254] CD40靶向抗体

[0255] 塞鲁单抗

[0256] (重链)

[0257] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYYMHWVRQA PGQGLEWMGW
INPDSSGNTYAQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELNRLRSDD TAVYYCARDQ PLGYCTNGVC SYFDYWGQGT
LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS
LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR
TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTRFVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN
KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP GK(SEQ ID NO:19)

[0258] (轻链)

[0259] DIQMTQSPSS VSASVGDRVT ITCRASQGIY SWLAWYQQKP GKAPNLLIYT ASTLQSGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ ANIFPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA
SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC(SEQ ID NO:20)

[0260] 布来鲁单抗

[0261] (重链)

[0262] QLQLQESGPG LLKPSETLSL TCTVSGGSIS SPGYGGWIR QPPGKLEWI GSIYKSGSTY
HNPSLKSRTV ISVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCTRP VVRYFGWFDW WGQGTLLTVS SASTKGPSVF
PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTW SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTK
TYTCNVDPKPT SNTKVDKRV SKYGPCCPPC PAPEFEGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE
DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDQLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA

KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSR
LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO:21)

[0263] (轻链)

[0264] AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD ASNLESGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS
VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL
SSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:22)

[0265] 4-1BB靶向抗体

[0266] 乌瑞芦单抗

[0267] (重链)

[0268] QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFY GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN
PSLESRTVIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF
PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTW SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGK
TYTCNVDPKPT SNTKVDKRV SKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE
DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA
KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSR
LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO:23)

[0269] (轻链)

[0270] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA
RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGKTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH
QGLSSPVTKS FNRGEC (SEQ ID NO:24)

[0271] 乌托鲁单抗

[0272] (重链)

[0273] EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTN
SPSFQGGVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LTVSSASTK GPSVFPLAPC
SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVTVTPSS NFGTQTYTCN
VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PMLDSGGSFF LYSKLTVDKS
RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP GK (SEQ ID NO:25)

[0274] (轻链)

[0275] SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER
FSGNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN
KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE
GSTVEKTVAP TECS (SEQ ID NO:26)

[0276] DR5/TRAILR2靶向抗体

[0277] 曲齐妥单抗

[0278] (重链, Fc区域加下划线)

[0279] EVQLVQSGGG VERPGGSLRL SCAASGFTFD DYAMSWVRQA PGKGLEWVSG INWQGGSTGY ADSVKGRVTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAKIL GAGRGWYFDY WGKGTTVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKT ISKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K (SEQ ID NO:27)

[0280] (轻链)

[0281] SELTQDPAVS VALGQTVRIT CSGDSLRSYY ASWYQQKPGQ APVLVIYGAN NRPSGIPDRF SGSSSGNTAS LTITGAQAED EADYYCNSAD SSGNHVVFGG GTKLTVLGQP KAAPSVTLFP PSSEELQANK ATLVLCLISDF YPGAVTVAWK ADSSPVKAGV ETTTPSKQSN NKYAASSYLS LTPEQWKSHK SYSCQVTHEG STVEKTVAPT ECS (SEQ ID NO:28)

[0282] scTRAIL-Fc

[0283] 只需要重链, Fc区域加下划线

[0284] QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIEHKGfYIYSQ TYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNE HLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLR NGELVIEHKGfYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGG IFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINS WESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIEHKGfYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNS CWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKTHTCPPCA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 29)

[0285] KMTR2

[0286] H1scFv重链(不需要轻链, Fc区域加下划线)

[0287] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSTTVAWDWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNEYAVSVK SRITINVDTSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAREPDAGRGAFDIWGQGTTVTSPLRWGRFGWRGLGRGWLRSPVTQ SPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSHLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSELEPE DFAVYYCQQRSNWPPRAVFGQGRLEIKGGSGGSEPKSSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:30)

[0288] H1 Heavy chain(与L1成对, Fc区域加下划线)

[0289] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSTTVAWDWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNEYAVSVK SRITINVDTSKNQISLQLNSVTPEDTAVYYCAREPDAGRGAFDIWGQGTTVTSPLRWGRFGWRGLGRGWLRSPVTQ AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP

REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:31)

[0290] L1轻链(与H1成对)

[0291] LRSPVTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSHLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS

[0292] GSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPRAVFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA

[0293] SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH

QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:32)

[0294] H6scFv重链(不需要轻链,Fc区域加下划线)

[0295] QVQLQQSGPGRVQPSQTLSTCAISGDSVSNNAAWYWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNDY

[0296] AVSVKSRITISPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARRGDGNSYFDYWGGQGLTVTVSSGILRWG

[0297] RFGWRGLGRGWLEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSGYVSWYRQKPGQAPRLLIYGAS

[0298] TRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGSSPNTYGGTKVGIKGGSGGSEPKSSD

[0299] KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN

[0300] AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT

[0301] LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

QGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:33)

[0302] H6重链(与L6成对,Fc区域加下划线)

[0303] QVQLQQSGPGRVQPSQTLSTCAISGDSVSNNAAWYWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNDY

[0304] AVSVKSRITISPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARRGDGNSYFDYWGGQGLTVTVSSASTKGP

[0305] SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP

[0306] SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT

[0307] PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

[0308] YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

[0309] GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:34)

[0310] L6轻链(与H6成对)

[0311] LEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSGYVSWYRQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGS

[0312] GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGSSPNTYGGTKVGIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV

[0313] VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG

LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:35)

[0314] 1E62

[0315] 重链,Fc区域加下划线

[0316] EVQLVQSGGVERPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADS

[0317] VKGRVTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKILGAGRGWYFDLWGKGTITVTVSSASTKG

[0318] PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP

[0319] PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR

[0320] TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

[0321] YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

[0322] GQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:36)

[0323] 轻链, Fc区域加下划线

[0324] SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSG

[0325] NTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFVGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA

[0326] TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHE
GSTVEKTVAPTEC (SEQ ID NO:37)

[0327] 可那木单抗/AMG 655

[0328] 可那木单抗//AMG 655重链 (Fc区域加下划线)

[0329] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYNP SLK

[0330] SRVT

[0331] ISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGDYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLA

[0332] PSSKSTSGGTAALGCLVDKYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDLRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:38)

[0333] 可那木单抗/AMG 655轻链

[0334] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS
GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:39)

[0335] TWEAKR靶向抗体

[0336] 依那妥组单抗

[0337] (重链, Fc区域加下划线)

[0338] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMSWVRQA PGKGLEWVAE IRLKSDNYAT
HYAESVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNLSRA EDTAVYYCTG YYADAMDYWG QGTLTVVSSA STKGPSVFPL
APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TPAVLQSSG LYSLSVTV PSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO:40)

[0339] (轻链)

[0340] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSVS TSSYSYMHYQ QKPGKAPKL LIKYASNLES
GVPSRFSGSG SGTDFLTIS SLQPEDFATY YCQHSWEIPY TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:41)

[0341] 达西组单抗 (W02016069919)

[0342] hS2C6重链 (SEQ ID NO:42)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 [0343] 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 [0344] 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 [0345] hS2C6轻链 (SEQ ID NO:43)

- Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
[0346] Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
85 90 95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
[0347] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
[0348] 卢卡木单抗:W02012075111)
[0349] HCD122人抗CD40抗体的轻链(SEQ ID NO:44)

Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr
20 25 30
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45
Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala
65 70 75 80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110
[0350] Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
115 120 125
Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235
[0351] HCD122人抗CD40抗体的重链 (SEQ ID NO:45)
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly
1 5 10 15
[0352] Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
85 90 95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
115 120 125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
210 215 220
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
225 230 235 240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245 250 255
[0353] Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
260 265 270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275 280 285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290 295 300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305 310 315 320
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
370 375 380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460
Leu Ser Pro Gly Lys
465

[0354] HCD122人抗CD40抗体的重链的变体 (SEQ ID NO:46)

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 [0355] Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

- 420 425 430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445
[0356] Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460
Leu Ser Pro Gly Lys
465
- [0357] GITR靶向抗体
- [0358] AMG228重链 (Fc区域加下划线)
- [0359] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTSSYGMHWIRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYAESVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRLGLDYSGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK (SEQ ID NO: 48)
- [0360] AMG228轻链
- [0361] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGI RNDLGWYQQKPGKAPKRLIYATSSLQSGVPSRFSGSGSG
TEFTLT ISSLPEDFATYYCLQHNTYPWTFGQGTKEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 49)
- [0362] TRX518重链 (Fc区域加下划线)
- [0363] QVTLKESGP GILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWDDDKYYNPSLKSQ
LTISKDTSRNQVFLKITSVDTADAATYYCARTRRYFPFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK
SSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 50)
- [0364] TRX518轻链
- [0365] DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYS GVPDRFTGSGSG
TDFTLT INN VHSEDLAEYFCQQYNTDPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 51)
- [0366] MK-4166重链 (Fc区域加下划线)
- [0367] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASISSGGTTYYPDSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGYYDSMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:52)

[0368] MK-4166轻链

[0369] EIVLTQSPGTL^SSLSPGERATL^SSCRASESVDNYGV^SSFMN^{WY}QQKPGQAPRLLIYAASNQGS^GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTK^EVTWTFGQGTKEIKRTVAAPS^{VF}IFPPSDEQLKSGTASV^VCLLN^{NF}YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK^DSTYSL^SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT^KSFNRGEC

(SEQ ID NO:53)

[0370] BMS-986156重链(Fc区域加下划线)

[0371] QVTLKESGPGILKPSQ^TLSLTCSFSGFSL^STSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWDDDKYYNPSL^KSQLTISKDTSRNQVFLKITSVD^TADAATYYCAR^{RRY}FPFAYWGQGL^TVTVSSASTKGPSV^FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT^SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV^{TV}PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK^KVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV^TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK^PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD^WLNKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY^TLP^SSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:54)

[0372] BMS-986156轻链

[0373] DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSV^TCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYS^GVPDRFTGSGSGTDFTLTINN^VHSEDLAEYFCQQYNTDPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS^{VF}IFPPSDEQLKSGTASV^VCLLN^{NF}YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK^DSTYSL^SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT^KSFNRGEC (SEQ ID NO:55)

[0374] scGITRL-Fc(只需要重链,Fc区域加下划线)

[0375] E^TAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYK^NKDMIQTLTNKSKI^QNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFISGSGSGNGSETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYK^NKDMIQTLTNKSKI^QNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFISGSGSGNGSETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYK^NKDMIQTLTNKSKI^QNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFISGSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV^TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK^PREEQYSSTYRVVSVLTVLHQD^WLNKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY^TLP^SSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:56)

[0376] 在上述实施方案任一个的一个特定实施方案中,多个同源聚合物包含多肽的同位四聚体,该多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在上述实施方案任一个的另一个具体实施方案中,多个同源聚合物包含多肽的同源三聚体,该多肽的同源三聚体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0377] 在另一个实施方案中,本申请提供了包含的多个本申请任何实施方案所述的颗粒的组合物,所述颗粒包含 α -TNFRSF抗体。所述组合物可用在,例如,本申请的方法和用途中。在一个实施方案中,组合物中的所有抗体是相同的。在另一实施方案中,所述抗体都不相

同。

[0378] 在另一个实施方案中,本申请包含包含 α -TNFRSF抗体颗粒的药物组合物或本文任何实施方案所述组合物的药物组合物,以及药学上可接受的载体。所述药物组合物可用在,例如,本申请的方法和用途中。

[0379] 在另一个实施方案中,本申请提供了用作任何适合用途的 α -TNFRSF抗体颗粒、组合物或药物组合物,包括但不限于实施方案中描述的那些。在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗肿瘤的治疗方法,包括对具有肿瘤的受试者施用一定数量的颗粒、组合物或药物组合物或本文所述的有效诱导肿瘤细胞凋亡的任何实施方案或实施方案的组合。在一个实施方案中,肿瘤相对于对照肿瘤或阈值DR5表达水平过表达DR5。如下实施方案所示,与游离抗体或Fc-融合相比,本发明的靶向细胞表面TNFRSF受体的颗粒增强了DR5介导的凋亡信号转导,并被证明可诱导肿瘤细胞凋亡。因此,所述组合物可用于治疗肿瘤。

[0380] 在另一个实施方案中,本申请提供用于生成 α -TNFRSF抗体颗粒的和本发明的组合物的试剂盒。在一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0381] (a) 一个或多个多肽,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的氨基酸序列,其中括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中不予考虑),其中,所述多肽能够(a)能够组装成同源聚合物,以及(b)结合至IgG抗体的恒定区;任选地,如本实施方案中进一步限定的多肽;以及

[0382] (b) α -TNFRSF抗体,所述 α -TNFRSF抗体包含选自以下的抗体:Lob7/6、卢卡木单抗(Lucatumumab)、达西组单抗(Dacetuzumab)、塞鲁单抗(Selicrelumab)、布来鲁(Bleselumab)、乌瑞芦单抗(Urelumab)、乌托鲁单抗(Utomilumab)、曲齐妥单抗(Drozitumab)、scTRAIL-Fc、KMTR2、16E2和可那木单抗(Conatumumab,也称为AMG 655);任选地,如上述重链和轻链氨基酸序列进一步指定的。

[0383] 在本实施方案中,当两种组分结合时,颗粒通过具有Fc结合界面的抗体或二聚体的相互作用发生自组装。

[0384] 在另一个实施方案中,所述试剂盒包括:

[0385] (a) 宿主细胞,其能够表达一个或多个多肽,所述多肽包含与选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,其中括号中的残基是任选的(即,在百分比同一性要求中未予考虑),其中所述多肽能够(a)组装成同源聚合物中,(b)结合至IgG抗体的恒定区;任选地,表达本申请的任一实施方案中进一步限定的多肽;以及

[0386] (b) 能够表达 α -TNFRSF抗体的宿主细胞,所述 α -TNFRSF抗体包含选自以下的抗体:Lob 7/6、卢卡木单抗(Lucatumumab)、达西组单抗(Dacetuzumab)、塞鲁单抗(Selicrelumab)、布来鲁(Bleselumab)、乌瑞芦单抗(Urelumab)、乌托鲁单抗(Utomilumab)、曲齐妥单抗(Drozitumab)、scTRAIL-Fc、KMTR2、16E2和可那木单抗(Conatumumab,也称为AMG 655);任选地,如上述重链和轻链氨基酸序列进一步指定的。

[0387] 在该实施方案中,所述两种组分可由宿主细胞产生,然后结合,使得颗粒通过抗体或二聚体与Fc结合界面的相互作用进行自组装。

[0388] 如实施方案中所述,所述颗粒具有可用于包装核酸或蛋白质物质的大量内部体

积。因此,在可以与任何其他实施方案组合的另一个实施方案中,所述颗粒包含在所述颗粒内部体积内的配载。任何合适的配载均可以被包装在颗粒内,包括但不限于用于预定目的核酸或多肽。

[0389] 本文所述多肽可以通过化学合成或通过重组表达。颗粒、多肽聚合物、单体、抗体和/或二聚体可与其他化合物连接以促进体内半衰期的延长或促进血液中的或注射部位稳定性或活性的提高。如本领域技术人员所理解,这种连接可以是共价的或非共价的,并且可以通过非限制性示例,通过包括但不限于化学交联、聚乙二醇化、HES化、PAS化和/或糖基化的方法来实现。

[0390] 在另一个实施方案中,多肽聚合物中的一个或多个单体可以共价连接到抗体或二聚体,以延长在体内的半衰期或促进血液中或注射部位的稳定性或活性的提升。

[0391] 本申请的药物组合物可以包含:(a) 本文任何实施方案或实施方案组合所述的颗粒,或组合物;以及(b) 药学上可接受的载体。所述药物组合物还可以包含:(a) 冻干保护剂;(b) 表面活性剂;(c) 填充剂;(d) 张力调节剂;(e) 稳定剂;(f) 防腐剂和/或(g) 缓冲液。在一些实施方案中,所述药物组合物中的缓冲物是Tris缓冲物、组氨酸缓冲物、磷酸盐缓冲物、柠檬酸盐缓冲物或醋酸盐缓冲物。所述组合物还可以包含冻干保护剂,例如蔗糖、山梨醇或海藻糖。在某些实施方案中,所述组合物包括防腐剂,例如苯扎氯铵、苄索铵、氯己定、苯酚、间甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯丁醇、邻甲酚、对甲酚、氯甲酚、硝酸苯汞、硫柳汞、苯甲酸以及它们的各种混合物。在其他实施方案中,所述组合物包括填充剂,如甘氨酸。在其他实施方案中,所述组合物包括表面活性剂,例如聚山梨酸酯-20、聚山梨酸酯-40、聚山梨酸酯-60、聚山梨酸酯-65、聚山梨酸酯-80、聚山梨酸酯-85、泊洛沙姆-188、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、脱水山梨糖醇单棕榈酸酯、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、脱水山梨糖醇单油酸酯、脱水山梨糖醇三月桂酸酯、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯、脱水山梨糖醇三油酸酯、或它们的组合。所述组合物还可以包括张力调节剂,例如,使所述制剂与人血基本上等张或等渗的化合物。示例性的张力调节剂包括蔗糖、山梨糖醇、甘氨酸、蛋氨酸、甘露醇、葡萄糖、肌醇、氯化钠、精氨酸和精氨酸盐酸盐。在其他实施方案中,所述组合物还包括稳定剂,例如,以冻干或液体形式的、基本上防止或减少纳米结构的化学和/或物理不稳定性的分子。示例性的稳定剂包括蔗糖、山梨糖醇、甘氨酸、肌醇、氯化钠、蛋氨酸、精氨酸和精氨酸盐酸盐。

[0392] 颗粒或组合物可以是组合物中的唯一活性剂,或者组合物可以进一步包含适合于预期用途的一种或多种其他化学剂。

[0393] 如本文所使用,一治疗(treat)或一治疗(treating)是指完成下列一项或多项:(a) 减轻受试者病症的严重程度;(b) 限制受试者症状的增加;(c) 提高活力;(d) 缩短症状持续时间;(e) 限制或防止症状的发展;(f) 减少住院治疗的需求和/或住院治疗的时间。

[0394] 如本文所使用的,一限制是指限制有这种病症风险的受试者的病症发展。

[0395] 如本文所使用的,一有效量是指对治疗和/或限制疾病发展有效的颗粒、组合物或药物组合物的量。本文任何实施方案的颗粒、组合物或药物组合物通常被配制为如上述所披露的药物组合物,并且可以通过任何合适的途径给药,包括口服、肠道外给药、吸入喷雾、直肠给药或局部给药,剂量单位配方中含有常规药学上可接受的载体、佐剂和运输载体(vehicle)。此处使用的术语一肠道外包括皮下、静脉、动脉内、肌肉内、胸骨内、腱内、椎管

内、颅内、胸内、输注技术或腹膜内。多肽组合物也可以通过微球、脂质体、免疫刺激复合物 (ISCOM) 或其他微颗粒给药系统或缓释制剂引入合适的组织 (如血液) 来完成给药。剂量方案可以调整, 以提供最佳的期望的反应 (例如, 治疗或预防反应)。例如, 合适的剂量范围可以是 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ - $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重的颗粒、组合物或其药物组合物。该组合物可单次给药, 也可由主治医师人员确定给予一次以上 (例如, 2、3、4、5 或多次)。

[0396] 实施例

[0397] 我们着手设计蛋白质, 这种蛋白质促使任意抗体组装成具有明确结构的对称组装体。我们推断, 对称蛋白质组装体可以由 IgG 抗体 (这是一种双重对称蛋白质) 构建, 方法是将抗体的对称轴放在目标结构的双重轴上, 并设计第二种蛋白质将抗体保持在正确的方向上。由于我们的目标是一种适用于许多不同抗体的模式, 我们选择了 IgG 的恒定可结晶片段 (Fc) 结构域和 Fc 结合的螺旋束蛋白 A 之间的相互作用作为纳米颗粒界面。

[0398] 抗体笼设计的一般计算方法

[0399] 为了设计具有 Fc 结合界面的同源低聚物, 该界面具有正确的几何形状, 以将 IgG 保持在所需结构的正确相对方向上, 我们通过计算将三种蛋白质构建块融合在一起: Fc 结合域、单体和同源低聚物。Fc 结合域在抗体和纳米笼形成设计之间形成第一个纳米笼界面, 同源低聚物在设计的蛋白质链之间形成第二个纳米笼界面, 然后单体将两个界面以正确的方向连接在一起以生成所需的纳米材料。

[0400] 为了在蛋白 A 本身之外生成可用的 Fc 结合构建块, 我们通过将蛋白 A 界面残基嫁接到所设计的螺旋重复蛋白上来设计第二个 Fc 结合构建块 (图 6)。为了创建预测形成抗体纳米笼 (以下简称抗体纳米笼, 抗体笼) 的设计, 我们使用了由这 2 个 Fc 结合蛋白, 42 个从头设计的螺旋重复蛋白单体, 以及 1-3 个同源低聚物 (2 个 C2, 3 个 C3, 1 个 C4 和 1 个 C5) 组成的文库。每个蛋白质构建块平均大约有 150 个残基可用于融合, 避免所有位置包含到任何蛋白质-蛋白质界面中, 得到大约 107 个可能的三方 (Fc-结合域/单体/同源低聚物) 融合。对于这些三方融合中的每一个, 内部同源低聚物界面和 Fc 结合界面之间的刚性体转换是由其每一个构建块的形状以及将它们连接成单个亚基的一连接 II 的位置和几何形状决定的。

[0401] 我们使用了一种最近描述的计算协议 (WORMS), 它可以从我们的构建块库中快速对所有可能的融合进行采样, 以识别那些具有生成二面体、四面体、八面体和二十面体抗体纳米笼 (20, 21) 所需的净刚性体变换。为了描述最终的纳米笼架构, 我们遵循一个命名惯例, 它总结了点群对称和构建块的循环对称。例如, T32 组装体具有四面体点群对称, 由 C3 循环对称抗体结合设计的低聚物和 C2 循环对称抗体 Fc 构建。虽然抗体二聚体在所有结构中都沿两重轴排列, 但所设计的成分是 D2 二面体结构中的第二个同型二聚体; T32 四面体结构、O32 八面体结构和 I32 二十面体结构中的同三聚体; O42 八面体结构中的同四聚体; 以及 I52 二十面体结构中的同五聚体。

[0402] 为了进行融合, 该方案首先将 Fc 和 Fc 结合蛋白的模型沿指定结构的 C2 轴对齐 (图 1a-b)。然后将 Fc 结合域融合成单体, 单体再融合成同源低聚物。刚性螺旋融合是由每个构建块的 α 螺旋二级结构中的残基叠加而成; 在由此产生的融合结构中, 一条构建块链结束, 另一条在融合点开始, 形成一个新的连续的 α 螺旋 (图 1c)。为了实现正确的纳米笼组装, 需要进行融合, 以便抗体双重轴和同源低聚物的对称轴在结构中心以精确的角度相交 (图 1d)。为了生成 D2 二面体、T32 四面体、O32 或 O42 八面体、I32 或 I52 二十面体纳米笼, 所需的各

个交叉角分别为 90.0° 、 54.7° 、 35.3° 、 45.0° 、 20.9° 和 31.7° 。我们允许的与理想结构的角度和距离偏差分别为 5.7° 和 $0.5 \text{ \AA}$ (参见一方法||部分)。候选融合模型进一步基于在融合结周围的接触点数量 (以测量结构刚度) 和骨干原子之间的碰撞点进行筛选。接着, 使用Rosetta™中的SymPackRotamersMover对新形成的构建块结点周围的氨基酸特征和构像进行优化, 以保持组装所需的刚性融合几何结构 (图1e)。在序列设计之后, 我们选择了六个D2二面体、十一个T32四面体、四个O32八面体、两个O42八面体、十四个I32二十面体和十一个I52二十面体设计进行实验表征, 预测形成抗体纳米笼 (图1f)。

[0403] 结构表征

[0404] 附加有C-端 $6 \times$ 组氨酸标签的、编码所设计的蛋白序列的合成基因在大肠杆菌中表达。使用固定化金属亲和层析 (IMAC) 从澄清的裂解液中纯化各个设计, 并使用尺寸排除层析 (SEC) 作为最后的纯化步骤。在所有几何图形中, 48个抗体纳米笼形成设计中的34个在SEC上有一个峰, 该峰大致对应于设计模型的预期尺寸。然后将各项设计与人IgG1 Fc结合, 并通过SEC重新纯化组装体。这些抗体纳米笼形成设计中的八种设计与Fc组装成一个物质, 该物质在与目标纳米颗粒分子量一致的体积上洗脱为单分散峰 (图2a-b; 3个D2二面体, 2个T32四面体, 1个O42八面体, 2个I52二十面体抗体纳米笼)。对于i52.6设计, 在组装体缓冲液中加入100mM L-精氨酸, 可以防止与Fc结合后的聚合。所有其他设计都可以容易地在Tris缓冲盐水中自组装。大多数其他设计仍然结合Fc, 如SEC、天然凝胶或与通过Fc结合后明显沉淀所证明的, 但通过SEC没有形成单分散纳米颗粒 (表6), 可能是因为与目标融合几何形状的偏差。

[0405] 表6. 所设计的抗体结合的笼状低聚物的成功率。

几何形状	排序	可溶性成分	良好的SEC成分	与Fc形成笼型
D2二面体	6	5	4	3
T32四面体	11	8	7	2
O32八面体	4	3	3	0
O42八面体	2	1	1	1
I32二十面体	14	14	10	0
I52二十面体	11	11	10	2
共计	48	42	35	8

[0407] 溶解度 (第2列) 是指通过SDS凝胶读出的裂解后、离心后、前IMAC可溶性部分中蛋白质的存在。良好的SEC成分 (第3列) 是指具有某个峰的SEC痕迹, 该峰值对应于纳米笼形成设计模型的近似预测尺寸。使用Fc的笼形成的数据如图2和图3所示。

[0408] 负染色电镜显微照片和二维类别平均值显示了与设计模型相对应的形状和尺寸的纳米笼 (图2c)。当与完整的抗体 (具有Fc和Fab结构域的IgG) 组装时, 也形成了抗体纳米笼, 再次生成单分散的纳米笼, 如图SEC和负染色电镜所示 (图2d-e)。正如所预期的Fc-Fab铰链的柔性, 在电子显微照片更能证明IgG-抗体纳米笼相对于Fc-抗体纳米笼的柔性。在所有情况下, 用完整IgG制备的抗体纳米笼的负染色电镜数据收集的2D类平均值仍然能够解析与装配体非柔性部分对应的密度 (图2e)。

[0409] 单颗粒负染色电镜 (Negative-stain EM) 和冷冻电镜 (Cryo-EM) 重建的与Fc形成的抗体纳米笼的三维图与计算设计模型非常吻合 (图3)。二面体 (d2.3, d2.4, d2.7)、四面体

(t32.4, t32.8) 和其中一个二十面体 (i52.6) 纳米笼的负染色电镜重建清楚地显示了二聚体—U形的Fc和较长的设计蛋白区域, 它们像计算预测的那样匹配在一起。o42.1设计的单颗粒冷冻电镜重建具有位于C4顶点的六个所设计的四聚体的清晰密度, 它们沿着八面体结构的边缘扭曲, 从而结合十二个二聚的Fc, 留下八个C3面未被占用。含有Fc的i52.3的Cryo-EM密度同样再现了规则二十面体的20面形状, 在C5顶点有12个设计的五聚体向外突出 (由于C5构建块与单体或Fc结合域相比长度更长), 结合到边缘中心的30个二聚Fc上, 其中有20个未被占用的C3面。在所有情况下, 通过计算设计的模型明确地符合电镜密度。

[0410] 使用抗体纳米笼增强细胞信号

[0411] 所设计的抗体纳米笼提供了一个通用平台, 用于研究将细胞表面受体联结成簇对信号通路激活的影响。将抗体结合至细胞表面受体可以引发信号的拮抗, 因为天然配体的接合被阻断 (25)。虽然在某些情况下, 受体成簇已被证明会导致激活 (11, 26, 27), 但还没有用于改变受体参与的价态和几何形状、能够容易地应用于许多不同的信号通路的系统的方法。我们利用了几乎任何受体结合抗体 (有很多) 都可以很容易地组装成各种不同的结构, 使用我们的抗体纳米笼形成设计来研究受体成簇对信号传导的影响。我们将靶向多种信号通路的抗体和Fc组装成纳米颗粒中, 并研究了它们的效果, 如以下段落所述。

[0412] 所设计Tie2激动剂用于治疗脓毒症和急性呼吸窘迫综合征

[0413] 这项工作的重点是利用抗体可结晶 (Fc) 片段融合到血管生成素-1F结构域来增强血管生成信号。

[0414] Fc-血管生成素1纳米笼激活Tie-2通路

[0415] 某些受体酪氨酸激酶 (RTK), 如血管生成素-1受体 (Tie2), 在聚集时激活下游信号级联 (31, 32)。将血管生成素-1 (A1F) 的F结构域搭建到纳米颗粒上可诱导AKT和ERK的磷酸化, 增强体外细胞迁移和管的形成, 并促进体内损伤后的伤口愈合 (32)。具有这些活性的疗法可用于治疗以细胞死亡和炎症为特征性疾病, 如败血症和急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。为了确定抗体纳米笼平台是否可以用于生成这种激动剂, 我们将具有Fc融合的o42.1和i52.3抗体纳米笼组装到A1F上 (图4g, 图4a-b)。八面体和二十面体A1F-抗体纳米笼 (而非仅Fc对照或游离Fc-Ang1F) 将AKT和ERK1/2磷酸化显著提高 to 基线以上 (图4h-i), 增强细胞迁移和血管稳定性 (图4j-k, 图8c-d)。这些结果表明, 抗体纳米笼是比游离A1F-Fc更具强效的血管生成诱导物, 并且由于其成分易于大量生产, 它们是有希望的治疗候选物。

[0416] 由抗体笼引发的TNFR超级家族激动作用

[0417] 所设计的抗体纳米笼提供了一个通用平台, 用于研究将细胞表面受体联结成簇对信号通路激活的影响。抗体与细胞表面受体的结合可导致信号的拮抗, 因为天然配体的接合被阻断 (6)。目前还没有可以很容易地应用于许多不同的信号通路的系统的方法来改变受体接合的价态和几何形状。我们利用了几乎任何受体结合抗体 (有很多) 都可以很容易地组装成各种不同的结构, 使用我们的抗体纳米笼形成设计来研究受体成簇对信号传导的影响。这项工作的重点是靶向肿瘤坏死因子受体超级家族两个成员死亡受体5 (DR5) 和CD40的抗体。

[0418] 由 α -DR5纳米笼诱导的肿瘤细胞凋亡

[0419] 死亡受体5 (DR5) 是一种肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超级家族细胞表面蛋白, 当其被三聚的天然配体、TNF相关凋亡诱导配体 (TRAIL) (9, 10, 27-30) 交联时, 即启动caspase介导

的凋亡信号级联(终止于细胞死亡)。与家族的其他成员一样,DR5也可以形成替代信号复合物,这些复合物在配体结合时,激活非凋亡信号通路,如NF- κ B促炎通路和促进增殖和迁移的通路(29)。由于DR5在某些肿瘤中过表达,因此,已经开发了多种候选治疗物来激活DR5,如 α -DR5单克隆抗体和重组TRAIL,但由于疗效低和肿瘤细胞群中TRAIL耐药的发展,这些治疗物在临床试验中都失败了(29,30)。将三聚的TRAIL与二价 α -DR5 IgG的组合带来比单独使用任何一种成分更强的凋亡反应,这可能是由于通过在细胞表面形成二维阵列来诱导更大规模的DR5成簇(27)。

[0420] 我们研究了用相同的IgG(可那木单抗)形成的 α -DR5抗体纳米笼是否可以在不形成无限的阵列的情况下具有类似的抗肿瘤作用。选择了覆盖四种几何形状的五种设计(d2.4,t32.4,t32.8,o42.1和i52.3)来表示价态和形状的范围(图4a)。所有 α -DR5抗体纳米笼都在SEC上形成了单峰,并产生了相应的负染色电镜显微照片,与组装颗粒的形成相符(图2d-图2e)。

[0421] 在结直肠肿瘤细胞系中,所有五个 α -DR5抗体纳米笼均在与TRAIL相似的水平上引起caspase-3/7介导的凋亡,而单独的抗体或与裸Fc形成的抗体纳米笼即使在最高浓度的测试下也不会导致caspase 3/7活性或细胞死亡(图4a,图7a-b)。在TRAIL耐药肾细胞癌系RCC4上,我们发现所有 α -DR5抗体纳米笼诱导caspase-3,7活性(图4b),而t32.4、t32.8和o42.1设计极大地降低了在150nM浓度下的细胞活力(图4c)。设计t32.4和o42.1在低100倍浓度(1.5nM)下激活caspase,并在150nM下使用 α -DR5抗体纳米笼t32.4和o42.1延长RCC4的治疗,导致六天后几乎所有细胞被杀死,表明RCC4细胞没有获得针对纳米笼的抗性(图4e)。游离的 α -DR5抗体、TRAIL(图4b-图4c)或仅Fc的抗体纳米笼(图4d,图7c)在RCC4肿瘤细胞系中不会激活caspase或导致细胞死亡。

[0422] 接着,我们通过分析 α -DR5抗体纳米笼对裂解的PARP(凋亡活性的衡量指标)以及NF- κ B靶点cFLIP的影响,研究了由 α -DR5抗体纳米笼激活的下游通路。与caspase和细胞活力数据一致,o42.1 α -DR5抗体纳米笼增加了裂解的PARP,而游离 α -DR5抗体、TRAIL或o42.1 Fc抗体纳米笼不会导致裂解PARP的增加高于基线水平(图4f-g)。还发现,所有其他 α -DR5抗体纳米笼可增加裂解的PARP(图7f)。这些结果表明 α -DR5抗体纳米笼可能通过抑制抗凋亡途径来克服TRAIL耐药,从而增强DR5超级成簇诱导的凋亡级联。最后, α -DR5抗体纳米笼在健康的原代肾小管细胞中未诱导凋亡(图7d-e)。

[0423] α -CD40纳米笼激活表达cd40的CHO细胞

[0424] CD40是在抗原呈递的树突状细胞和B细胞上表达的TNFR超级家族成员,与T细胞上的三聚的CD40配体(CD40L或CD154)交联,导致信号通路和细胞增殖(33、34)。我们研究了将非激动剂 α -CD40抗体(L0B7/6)组装成纳米笼中是否可以替代细胞表面呈现的需要。八面体抗体纳米笼与L0B7/6IgG一起组装;SEC、动态光散射(DLS)和负染色电镜(图5a-d)表征表明,它们是单分散的,具有预期的八面体形状。发现在比激活 α -CD40抗体(Promega)的对照低百倍的浓度下,八面体 α -CD40 L0B7/6抗体纳米笼在表达CD40的报告细胞CHO(J215A, Promega)中诱导CD40的强烈激活,而对游离的L0B7/6抗体或与非CD40结合IgG形成的八面体抗体纳米笼,未观察到激活(图5e,表7)。这表明纳米笼组装将非激动剂 α -CD40单克隆抗体转化为CD40通路激动剂。

[0425] 表7. 来自CD40激活实验的EC50。

[0426]		EC50 log (μM)	95%置信区间log (μM)
	o42.1 IgG对照	-1.422	未找到
	α-CD40	1.466	1.247 to 1.833
	LOB7/6	-1.471	未找到
	o42.1 LOB7/6	0.1134	-0.001058 to 0.2037

[0427] EC50值由使用log (激动剂) 与使用Graphpad Prism™ Software拟合的响应曲线确定。

[0428] 表8.经最小尺寸排除层析验证形成笼状的抗体清单。

	抗体活性	抗体子类	设计 (至少由 SEC 验证)	备注
	α-CD4	mIgG2b	o42.1	OKT4
	α-CD40	mIgG2a or mIgG2b	o42.1	LOB7/6 或 82111 (分别)
	α-DR5 (人类)	hIgG1	d2.3, d2.4, d2.7, t32.4, t32.8, o42.1, i52.3, i52.6	科那妥单抗
[0429]	α-DR5 (小鼠)	亚美尼亚仓鼠 IgG	t32.4, o42.1	MD5-1
	α-EGFR	hIgG1	mIgG2b	西安普单抗
	α-LRP6	hIgG1	t32.4, o42.1	YW210.09
	α-RSV F	hIgG1	d2.3, d2.4, d2.7, t32.4, t32.8, o42.1, i52.3, i52.6	mpe8
	非特异性	兔 IgG	d2.4, o42.1	兔血清 IgG

[0430] 成功形成的笼子 (由SEC) 列出的抗体目标反应性, 抗体种类和同型, 和使用的的设计。

[0431] 表9.经最小尺寸排除层析法验证的形成笼的Fc融合物列表。

	Fc-融合配体	Fc 子类	设计 (至少由 SEC 验证)	备注
[0432]	检验-1 F-域	hIgG1	d2.4, t32.4, t32.8, o42.1, i52.3	
	血管紧张素-转换酶 2 (ACE2)	hIgG1	o42.1	
	CD80	hIgG1	o42.1	
[0433]	mRuby2	hIgG1	d2.4, t32.4, t32.8, o42.1, i52.3	
	sfGFP	hIgG1	d2.4, t32.4, t32.8, o42.1, i52.3	
	VEGF-a	hIgG1	t32.4, o42.1	
	VEGF-c	hIgG1	t32.4, o42.1	

[0434] 按照整合至Fc的配体、Fc序列的种类和同种型以及所使用的设计列出的成功形成的笼 (按照SEC) ,

[0435] 讨论

[0436] 我们的方法超越了以前的计算型设计的努力,通过整合形式和功能来创造功能性纳米材料。我们的抗体纳米笼采用抗体作为结构和功能成分。通过刚性螺旋融合塑造所设计的抗体结合、笼形成低聚物,可以实现多种几何形状和取向。这种设计策略可以推广,以将其他感兴趣的同源低聚物纳入笼状结构中。例如,纳米笼可以与病毒糖蛋白抗原使用终止于螺旋抗原结合蛋白的组件进行组装,或由具有可用于融合的、暴露螺旋的对称酶组装,以最大限度地接近连续反应的活性位点。与以前的功能结构域途径进行融合相比,抗体纳米笼在模块化方面提供了相当大的优势。已知的数千种抗体中,任何一种与足够的蛋白A结合的抗体都可以简单地与适当的设计混合,以驱动所需的对称性组装体的形成,我们已经使用多种不同的IgG和Fc融合物证明了这一原理(表8-9)。EM和SEC证明了单分散性与IgM相似,并且(据我们所知)任何其他抗体-蛋白质纳米颗粒配方都无法获得。

[0437] 抗体纳米笼作为信号通路激动剂显示出很光明的前景。将抗RTK和抗TNFR家族细胞表面受体的抗体组装成抗体纳米笼中可以激活参与细胞死亡、增殖和分化的多种下游信号通路。虽然先前发现抗体介导的成簇可以激活信号通路(11,27,33),但我们的方法具有更高的结构均一性的优势,可以更精确地调整表型效应和更可控的配方。抗体纳米笼还增强了抗体介导的病毒中和作用。在靶向递送方面有令人兴奋的应用,因为二十面体抗体纳米笼具有相当大的内部体积(约 $15,000\text{nm}^3$,基于估计的内部半径为 15.5nm),可用于包装核酸或蛋白质配载,实现不同的靶向特异性,大体上就像用一个抗体交换另一个抗体那样简单。我们预计,在这里开发的抗体纳米笼,再加上现有的非常大的抗体库,将在生物医学的诸多应用中广泛使用。

[0438] 参考文献及备注:

[0439] 1.R.-M.Lu,Y.-C.Hwang,I.-J.Liu,C.-C.Lee,H.-Z.Tsai,H.-J.Li,H.-C.Wu, Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases.J.Biomed.Sci.27,1(2020) .

[0440] 2.H.J.Kang,Y.J.Kang,Y.-M.Lee,H.-H.Shin,S.J.Chung,S.Kang,Developing an antibody-binding protein cage as a molecular recognition drug modularnanoplatform.Biomaterials.33,5423-5430(2012) .

[0441] 3.H.Kim,Y.J.Kang,J.Min,H.Choi,S.Kang,Development of an antibody-binding modular nanoplatform for antibody-guided targeted cell imaging and delivery.RSC Advances.6(2016) ,pp.19208-19213.

[0442] 4.A.M.Cuesta,N.Sainz-Pastor,J.Bonet,B.Oliva,L.Alvarez-Vallina, Multivalent antibodies:when design surpasses evolution.Trends Biotechnol.28, 355-362(2010) .

[0443] 5.N. Nuñez-Prado,M.Compte,S.Harwood,A. Álvarez-Méndez,S.Lykkemark, L.Sanz,L. Álvarez-Vallina,The coming of age of engineered multivalent antibodies.Drug Discovery Today.20(2015) ,pp.588-594.

[0444] 6.A.Miller,S.Carr,T.Rabbitts,H.Ali,Multimeric antibodies with increased valency surpassing functional affinity and potency thresholds using novel formats.MAbs.12,1752529(2020) .

[0445] 7.M.Klement,J.Zheng,C.Liu,H.-L.Tan,V.V.T.Wong,A.B.-H.Choo,D.-Y.Lee,

D.S.-W.Ow, Antibody engineering of a cytotoxic monoclonal antibody 84 against human embryonic stem cells: Investigating the effects of multivalency on cytotoxicity. *Journal of Biotechnology*. 243 (2017), pp. 29-37.

[0446] 8. N.S. Laursen, R.H.E. Friesen, X. Zhu, M. Jongeneelen, S. Blokland, J. Vermond, A. van Eijgen, C. Tang, H. van Diepen, G. Obmolova, M. van der Neut Kolfshoten, D. Zuijdgeest, R. Straetemans, R.M.B. Hoffman, T. Nieusma, J. Pallesen, H.L. Turner, S.M. Bernard, A.B. Ward, J. Luo, L.L.M. Poon, A.P. Tretiakova, J.M. Wilson, M.P. Limberis, R. Vogels, B. Brandenburg, J.A. Kolkman, I.A. Wilson, Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science*. 362, 598-602 (2018).

[0447] 9. O. Seifert, A. Plappert, S. Fellermeier, M. Siegemund, K. Pfizenmaier, R.E. Kontermann, Tetravalent Antibody-scTRAIL Fusion Proteins with Improved Properties. *Molecular Cancer Therapeutics*. 13 (2014), pp. 101-111.

[0448] 10. M. Siegemund, F. Schneider, M. Hutt, O. Seifert, I. Müller, D. Kulms, K. Pfizenmaier, R.E. Kontermann, IgG-single-chain TRAIL fusion proteins for tumour therapy. *Sci. Rep.* 8, 7808 (2018).

[0449] 11. R.S. Riley, E.S. Day, Frizzled7 Antibody-Functionalized Nanoshells Enable Multivalent Binding for Wnt Signaling Inhibition in Triple Negative Breast Cancer Cells. *小*. 13 (2017), doi:10.1002/sml.201700544.

[0450] 12. E. Hiramoto, A. Tsutsumi, R. Suzuki, S. Matsuoka, S. Arai, M. Kikkawa, T. Miyazaki, The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein. *Sci Adv*. 4, eaau1199 (2018).

[0451] 13. N.P. King, W. Sheffler, M.R. Sawaya, B.S. Vollmar, J.P. Sumida, I. André, T. Gonen, T.O. Yeates, D. Baker, Computational design of self-assembling protein nanomaterials with atomic level accuracy. *Science*. 336, 1171-1174 (2012).

[0452] 14. J.B. Bale, S. Gonen, Y. Liu, W. Sheffler, D. Ellis, C. Thomas, D. Cascio, T.O. Yeates, T. Gonen, N.P. King, D. Baker, Accurate design of megadalton-scale two-component icosahedral protein complexes. *Science*. 353, 389-394 (2016).

[0453] 15. G. Ueda, A. Antanasijevic, J.A. Fallas, W. Sheffler, J. Copps, D. Ellis, G. Hutchinson, A. Moyer, A. Yasmeen, Y. Tsybovsky, Y.-J. Park, M.J. Bick, B. Sankaran, R.A. Gillespie, P.J.M. Brouwer, P.H. Zwart, D. Veisler, M. Kanekiyo, B.S. Graham, R. Sanders, J.P. Moore, P.J. Klasse, A.B. Ward, N. King, D. Baker, Tailored Design of Protein Nanoparticle Scaffolds for Multivalent Presentation of Viral Glycoprotein Antigens,,

[0454] doi:10.1101/2020.01.29.923862.

[0455] 16. M. Graille, E.A. Stura, A.L. Corper, B.J. Sutton, M.J. Taussig, J.-B. Charbonnier, G.J. Silverman, Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen

activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97 (2000), pp. 5399-5404.

[0456] 17. T. J. Brunette, F. Parmeggiani, P. -S. Huang, G. Bhabha, D. C. Ekiert, S. E. Tsutakawa, G. L. Hura, J. A. Tainer, D. Baker, Exploring the repeat protein universe through computational protein design. *Nature*. 528, 580-584 (2015).

[0457] 18. J. A. Fallas, G. Ueda, W. Sheffler, V. Nguyen, D. E. McNamara, B. Sankaran, J. H. Pereira, F. Parmeggiani, T. J. Brunette, D. Cascio, T. R. Yeates, P. Zwart, D. Baker, Computational design of self-assembling cyclic protein homooligomers. *Nat. Chem.* 9, 353-360 (2017).

[0458] 19. P. -S. Huang, G. Oberdorfer, C. Xu, X. Y. Pei, B. L. Nannenga, J. M. Rogers, F. DiMaio, T. Gonen, B. Luisi, D. Baker, High thermodynamic stability of parametrically designed helical bundles. *Science*. 346, 481-485 (2014).

[0459] 20. I. Vulovic, Q. Yao, Y. -J. Park, A. Courbet, A. Norris, F. Busch, A. Sahasrabudhe, H. Merten, D. D. Sahtoe, G. Ueda, J. A. Fallas, S. J. Weaver, Y. Hsia, R. A. Langan, A. Plückthun, V. H. Wysocki, D. Veessler, G. J. Jensen, D. Baker, Generation of ordered protein assemblies using rigid three-body fusion, doi:10.1101/2020.07.18.210294.

[0460] 21. Y. Hsia, R. Mout, W. Sheffler, N. I. Edman, I. Vulovic, Y. -J. Park, R. L. Redler, M. J. Bick, A. K. Bera, A. Courbet, A. Kang, T. J. Brunette, U. Nattermann, E. Tsai, A. Saleem, C. M. Chow, D. Ekiert, G. Bhabha, D. Veessler, D. Baker, Hierarchical design of multiscale protein complexes by combinatorial assembly of oligomeric helical bundle and repeat protein building blocks (2020).

[0461] 22. T. O. Yeates, Y. Liu, J. Laniado, The design of symmetric protein nanomaterials comes of age in theory and practice. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 39, 134-143 (2016).

[0462] 23. B. M. Baynes, D. I. C. Wang, B. L. Trout, Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry*. 44, 4919-4925 (2005).

[0463] 24. D. Schneidman-Duhovny, M. Hammel, J. A. Tainer, A. Sali, Accurate SAXS profile computation and its assessment by contrast variation experiments. *Biophys. J.* 105, 962-974 (2013).

[0464] 25. J. L. Taupin, P. Legembre, J. Bitard, S. Daburon, V. Pitard, F. Blanchard, L. Duplomb, A. Godard, Y. Jacques, J. F. Moreau, Identification of agonistic and antagonistic antibodies against gp190, the leukemia inhibitory factor receptor, reveals distinct roles for its two cytokine-binding domains. *J. Biol. Chem.* 276, 47975-47981 (2001).

[0465] 26. K. Mohan, G. Ueda, A. R. Kim, K. M. Jude, J. A. Fallas, Y. Guo, M. Hafer, Y. Miao, R. A. Saxton, J. Piehler, V. G. Sankaran, D. Baker, K. C. Garcia, Topological control of cytokine receptor signaling induces differential effects in

hematopoiesis.Science.364(2019),doi:10.1126/science.aav7532.

[0466] 27.J.D.Graves,J.J.Kordich,T.-H.Huang,J.Piasecki,T.L.Bush,T.Sullivan,I.N.Foltz,W.Chang,H.Douangpanya,T.Dang,J.W.O'Neill,R.Mallari,X.Zhao,D.G.Branstetter,J.M.Rossi,A.M.Long,X.Huang,P.M.Holland,Apo2L/TRAIL and the death receptor 5 agonist antibody AMG 655 cooperate to promote receptor clustering and antitumor activity.Cancer Cell.26,177-189(2014) .

[0467] 28.J.Naval,D.de Miguel,A.Gallego-Lleyda,A.Anel,L.Martinez-Lostao,Importance of TRAIL Molecular Anatomy in Receptor Oligomerization and Signaling.Implications for Cancer Therapy.Cancers.11(2019),doi:10.3390/cancers11040444.

[0468] 29.D.de Miguel,J.Lemke,A.Anel,H.Walczak,L.Martinez-Lostao,Onto better TRAILs for cancer treatment.Cell Death Differ.23,733-747(2016) .

[0469] 30.M.H.Tuthill,A.Montinaro,J.Zinngrebe,K.Prieske,P.Draber,S.Prieske,T.Newsom-Davis,S.von Karstedt,J.Graves,H.Walczak,TRAIL-R2-specific antibodies and recombinant TRAIL can synergise to kill cancer cells.Oncogene.34,2138-2144(2015) .

[0470] 31.V.-M. Leppänen,P.Saharinen,K.Alitalo,Structural basis of Tie2 activation and Tie2/Tie1 heterodimerization.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.114,4376-4381(2017) .

[0471] 32.Y.-T.Zhao,J.A.Fallas,S.Saini,G.Ueda,L.Somasundaram,Z.Zhou,I.Xavier,D.Ehnes,C.Xu,L.Carter,S.Wrenn,J.Mathieu,D.L.Sellers,D.Baker,H.Ruohola-Baker,F-domain valency determines outcome of signaling through the Angiopoietin pathway(2020) .

[0472] 33.R.S.Kornbluth,M.Stempniak,G.W.Stone,Design of CD40 agonists and their use in growing B cells for cancer immunotherapy.Int.Rev.Immunol.31,279-288(2012) .

[0473] 34.R.H.Vonderheide,M.J.Glennie,Agonistic CD40 Antibodies and Cancer Therapy.Clinical Cancer Research.19(2013),pp.1035-1043.

[0474] 35.E.R.Steenblock,S.H.Wrzesinski,R.A.Flavell,T.M.Fahmy,Antigen presentation on artificial acellular substrates:modular systems for flexible, adaptable immunotherapy.Expert Opin.Biol.Ther.9,451-464(2009) .

[0475] 36.J.V.Kim,J.-B.Latouche,I.Rivière,M.Sadelain,The ABCs of artificial antigen presentation.Nat.Biotechnol.22,403-410(2004) .

[0476] 39.E.E.Idusogie,L.G.Presta,H.Gazzano-Santoro,K.Totpal,P.Y.Wong,M.Ultsch,Y.G.Meng,M.G.Mulkerrin,Mapping of the Clq binding site on rituxan,a chimeric antibody with a human IgG1 Fc.J.Immunol.164,4178-4184(2000) .

[0477] 40.F.DiMaio,N.Echols,J.J.Headd,T.C.Terwilliger,P.D.Adams,D.Baker,Improved low-resolution crystallographic refinement with Phenix and Rosetta.Nature Methods.10(2013),pp.1102-1104.

[0478] 41.F.W.Studier,F.William Studier,Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures.Protein Expression and Purification.41 (2005) ,pp.207-234.

[0479] 42.J.K.Leman,B.D.Weitzner,S.M.Lewis,J.Adolf-Bryfogle,N.Alam,R.F.Alford,M.Aprahamian,D.Baker,K.A.Barlow,P.Barth,B.Basanta,B.J.Bender,K.Blacklock,J.Bonet,S.E.Boyken,P.Bradley,C.Bystroff,P.Conway,S.Cooper,B.E.Correia,B.Coventry,R.Das,R.M.De Jong,F.DiMaio,L.Dsilva,R.Dunbrack,A.S.Ford,B.Frenz,D.Y.Fu,C.Geniesse,L.Goldschmidt,R.Gowthaman,J.J.Gray,D.Gront,S.Guffy,S.Horowitz,P.-S.Huang,T.Huber,T.M.Jacobs,J.R.Jeliazkov,D.K.Johnson,K.Kappel,J.Karanicolas,H.Khakzad,K.R.Khar,S.D.Khare,F.Khatib,A.Khramushin,I.C.King,R.Kleffner,B.Koepnick,T.Kortemme,G.Kuenze,B.Kuhlman,D.Kuroda,J.W.Labonte,J.K.Lai,G.Lapidoth,A.Leaver-Fay,S.Lindert,T.Linsky,N.London,J.H.Lubin,S.Lyskov,J.Maguire,L.Malmström,E.Marcos,O.Marcu,N.A.Marze,J.Meiler,R.Moretti,V.K.Mulligan,S.Nerli,C.Norn,S.Ó'Conchúir,N.Ollikainen,S.Ovchinnikov,M.S.Pacella,X.Pan,H.Park,R.E.Pavlovicz,M.Pethe,B.G.Pierce,K.B.Pilla,B.Raveh,P.DouglasRenfrew,S.S.Roy Burman,A.Rubenstein,M.F.Sauer,A.Scheck,W.Schief,O.Schueler-Furman,Y.Sedan,A.M.Sevy,N.G.Sgourakis,L.Shi,J.B.Siegel,D.-A.Silva,S.Smith,Y.Song,A.Stein,M.Szegedy,F.D.Teets,S.B.Thyme,R.Y.-R.Wang,A.Watkins,L.Zimmerman,R.Bonneau,Macromolecular modeling and design in Rosetta:recent methods and frameworks.Nat.Methods.17,665-680(2020) .

[0480] 43.L.Jendeberg,P.Nilsson,A.Larsson,P.Denker,M.Uhlén,B.Nilsson,P.-Å.Nygren,Engineering of Fc1 and Fc3 from human immunoglobulin G to analyse subclass specificity for staphylococcal protein A.Journal of Immunological Methods.201(1997) ,pp.25-34.

[0481] 44.D.Corti,S.Bianchi,F.Vanzetta,A.Minola,L.Perez,G.Agatic,B.Guarino,C.Silacci,J.Marcandalli,B.J.Marsland,A.Piralla,E.Percivalle,F.Sallusto,F.Baldanti,A.Lanzavecchia,Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody.Nature.501,439-443(2013) .

[0482] 45.K.N.Dyer,M.Hammel,R.P.Rambo,S.E.Tsutakawa,I.Rodic,S.Classen,J.A.Tainer,G.L.Hura,High-throughput SAXS for the characterization of biomolecules in solution:a practical approach.Methods Mol.Biol.1091,245-258 (2014) .

[0483] 材料与方法

[0484] Fc结合域螺旋重复蛋白(DHR79-FcB)的计算型设计与测试

[0485] 来自金黄色葡萄球菌的、与Fc片段(PDB ID:1L6X)复合的蛋白A的结构域晶体结构利用Phenix RosettaTM(39,40)松弛结构因子。简单地说,使用RosettaScriptsTM MotifGraft mover来评估合适解决方案,以将从1L6X提取的蛋白A结合基序插入先前报道的螺旋重复蛋白(DHR79)中(17)。具体而言,手动确定和提取一个最小的蛋白质A结合基序,并将其作为DHR79全骨架比对的模板,同时保留用户指定的热点残基,这些热点残基在Fc/

DHR界面的晶体结构中Fc域相互作用,并保留所有其他位置的天然DHR残基。MotifGraft比对之后进行5次FastDesign迭代和5次FastRelax迭代,其中允许DHR侧链和骨干旋转体移动,而Fc环境完全固定。根据启发式过滤值的列表选择最佳的设计。有关设计期间使用的完整XML文件,请参阅补充资料。图61a示出了DHR79-FcB的设计模型。

[0486] 多项设计最初通过酵母表面展示结合生物素化Fc蛋白进行评估。在定性结合信号确认后,将设计封闭在带有C端His标签的pET29b表达载体中。蛋白在BL21 DE3自诱导培养基(10mL 50×M,10mL 50×5052,480mL即用TB培养基,1×氯霉素,1×卡那霉素)中表达,27℃,225rpm,20小时(41)。细胞在裂解缓冲液(20mM Tris,300mM NaCl,30mM咪唑,1mM PMSF,5%甘油(v/v),pH 8.0)中重悬,并在18000PSI下使用微流态器进行裂解。可溶性部分通过24,000×g离心分离。IMAC与Ni-NTA批次树脂进行初始纯化;简单地说,用结合缓冲液(20mM Tris,300mM NaCl,30mM咪唑,pH 8.0)平衡硝化三乙酸镍(Ni-NTA)树脂,将可溶性裂解液倒在色谱柱上,用20柱体积(CV)的结合缓冲液洗涤色谱柱,用5CV洗脱缓冲液(20mM Tris,300mM NaCl,500mM咪唑,pH 8.0)洗脱。使用Superdex 200色谱柱的尺寸排除色谱(SEC)作为精细纯化步骤(图6b)。SEC缓冲液为20mM Tris/HCl pH 7.4,150mM NaCl。

[0487] 采用Octet™生物层干涉法(BLI)评价DHR79-FcB对生物素化IgG1和生物素化Fc蛋白的亲和力。DHR79-FcB对IgG1(全抗体)具有71.7nM的亲和力,对IgG1 Fc蛋白具有113nM的亲和力(图6c)。

[0488] 抗体纳米笼的计算设计

[0489] 输入pdb文件被编译以用作生成抗体笼的构建块。对于蛋白A结合域模型,来自金黄色葡萄球菌蛋白A的结构域D(PDB ID 1DEE)与结合至Fc的蛋白A的B结构域(PDB ID 1L6X)进行比对(16,39)。另一个Fc结合设计结构(其中蛋白A被嫁接到一个螺旋重复蛋白上)也被用于与来自1L6X的Fc进行建模。至少已通过SAXS验证的单体螺旋重复蛋白接头(42)和环状低聚物(2个C2,3个C3,1个C4和2个C5)的PDB文件模型是根据我们实验室以前的工作进行汇编的(17-19)。对构建块模型进行手动检查,以确定哪些氨基酸适合于实现融合,而不会干扰已有的蛋白-蛋白界面。

[0490] 这些构建块与指定的几何形状和融合定向一起被用作α螺旋融合软件的输入(关于如何操作WORMS的说明的补充文本)(20,21)。融合是通过在所有可能允许的氨基酸位点上重叠螺旋片段来实现的。然后根据几何标准来评估循环对称轴相交的偏差:D2、T32、O32、O42、I32和I52交叉角分别为45.0°、54.7°、35.3°、45.0°、20.9°和31.7°(22),角公差和距离公差分别最大为5.7°和0.5 Å。手动筛选融合后的.pdb文件,确保Fc结构域的N端相对笼子朝向外侧,使IgG的Fab位于笼面外。序列设计采用Rosetta™对称序列设计(RosettaScripts™中的SymPackRotamersMover)对融合结及其周围的残基进行(42),重点是尽可能多地保留天然残基。如果残基与其他残基发生冲突,或者它们的化学环境在融合后发生了改变(例如,以前面向核心的残基现在暴露在溶剂中),那么残基将被重新设计。使用索引残基选择器来防止设计在Fc残基位置。

[0491] 抗体纳米笼的结构表征

[0492] 对每个设计的抗体纳米笼形成低聚物的细菌表达进行密码子优化,添加C端甘氨酸/丝氨酸接头和6×C端组氨酸标签。合成基因被克隆到NdeI位点和XhoI位点之间的pet29b+载体内;质粒含有卡那霉素耐药基因和用于蛋白表达的T7启动子。质粒经制造商

(New England Biolabs)描述的15秒热休克程序转化为具有化学活性的Lemo21 (DE3) 大肠杆菌。将转化后的细胞添加到上述自体诱导表达介质中,在37℃和200rpm摇晃下孵育16小时(41)。通过在4000×g下离心使细胞形成小颗粒,并在裂解缓冲液(150mM NaCl,25mM Tris-HCl,pH 8.0,添加有蛋白酶抑制剂和DNA酶)中重悬。使用超声以85%的振幅将细胞裂解,进行15秒的开/关循环,超声时间共计2分钟。可溶性物质通过在16000×g下离心分离。用IMAC分离出上述可溶性级分中的His标记蛋白。使用10K MWC0旋转浓缩器将IMAC洗脱物浓缩至约1mL,通过0.22μm旋转过滤器过滤,并在SEC上运行作为最后的精细纯化步骤(SEC运行缓冲液:150mM NaCl,25mM Tris-HCl,pH 8.0)。

[0493] 在预期保留体积周围产生单分散SEC峰的设计与来自人IgG1的Fc相结合。Fc通过HEK293T细胞或大肠杆菌的标准表达方法进行重组产生(43)。笼成分在4℃下孵育至少30分钟。在与i52.6设计形成的抗体纳米笼的组装过程中添加100mM L-精氨酸,因为观察到这可以最大限度地形成所设计的抗体纳米笼i52.6,并最大限度地减少可见的一打碎聚集体的形成(23)。通过SEC确认Fc结合和笼形成;保留时间的较早的变化(与单独运行的任何一个成分相比)表明形成了更大的结构。如前所述,使用负染色电镜来确认通过这些步骤的设计的结构。

[0494] 为了确认具有完整IgG的抗体纳米笼结构,将人类IgG1(hIgG1)与抗体纳米笼形成设计相结合,遵循相同的方案制作Fc笼。以下报道的所有IgG或Fc融合抗体纳米笼也遵循此组装程序。图2d-e中的数据显示了使用用于以下设计的α-DR5抗体AMG-655(23)形成的抗体纳米笼:d2.3,d2.4,d2.7,t32.4,o42.1和i52.3。图2d-e所示的t32.8和i52.6设计的数据来自与hIgG1抗体mpe8形成的抗体纳米笼(44)。表8和表9示出了形成抗体纳米笼的IgG和Fc融合物的列表。

[0495] 动态光散射测量(DLS)在UNcle™(Unchained Labs)上使用默认的尺寸和多分散性方法进行。用移液管吸取8.8μL抗体纳米笼转移至所提供的玻璃比色皿中。动态光散射测量在25℃下进行三次,孵育时间为1秒;使用Graphpad棱镜对测试结果进行平均化计算并绘图。估计的流体动力学直径列在下面所示的所有DLS峰旁边。

[0496] Fc和IgG抗体纳米笼的负染色电镜分析

[0497] 对于除o42.1 Fc和i52.3 Fc外的所有样品,在TBS pH 8.0条件下,将0.008-0.014mg/mL之间的每个SEC纯化样品3.0μL应用于400目或200目铜栅辉光放电碳涂层铜栅极上持续20秒,然后施加3.0μL 2% nano-W染料2次。显微照片使用Leginon软件在120kV FEI Tecnai G2 Spirit™上记录,使用Gatan Ultrascan™ 4000 4k×4k CCD相机,在67,000标称放大倍率(像素大小1.6 Å/像素)或52,000标称放大倍率(像素大小2.07 Å)下,离焦范围为1.5-2.5μm。用DoGPicker或cistEM挑选颗粒;两者都是无参比的拾取器。对比传递函数用GCTF或cistEM进行估算。在cryoSPARC或cistEM中生成二维类别平均值。在cryoSPARC或cistEM中对每个数据集中选择的2D类别平均值进行无参比从头算的3D重建(表10)。

[0498] 表10.不同纳米笼样品的数据采集和数据处理详情。

[0499]

样品名	染料	电	放大	像素大小	颗粒挑	CTF 估	二维类别平	三维重建
-----	----	---	----	------	-----	-------	-------	------

[0500]

称		压 (kV)		(Å/像素)	选	算	均值	
d2.3 Fc	UF	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM
d2.4 Fc	UF	120	67,000	1.6	DoG 选择器	GCTF	cryoSPARC	cryoSPARC
d2.7 Fc	nano-W	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM
t32.4 Fc	nano-W	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM
t32.8 Fc	nano-W	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM
o42.1 Fc	cryo	200	36,000	1.16	手动挑选	GCTF	cryoSPARC	cryoSPARC
i52.3 Fc	cryo	200	36,000	1.16	手动挑选	GCTF	cryoSPARC	cryoSPARC
i52.6 Fc	nano-W	120	52,000	2.07	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM
d2.3 hIgG1	UF	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	N/A
d2.4 hIgG1	UF	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	N/A
d2.7 hIgG1	nano-W	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	N/A
t32.4 hIgG1	nano-W	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	N/A
t32.8 hIgG1	nano-W	120	67,000	1.6	cisTEM	cisTEM	cisTEM	N/A
o42.1 hIgG1	UF	120	67,000	1.6	DoG 选择器	GCTF	cryoSPARC	N/A
i52.3 hIgG1	nano-W	120	52,000	2.07	cisTEM	cisTEM	cisTEM	N/A
i52.6 hIgG1	nano-W	120	52,000	2.07	cisTEM	cisTEM	cryoSPARC	N/A
D3-08 Fc	nano-W	120	57,000	2.52	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM
D3-36 Fc	nano-W	120	57,000	2.52	cisTEM	cisTEM	cisTEM	cisTEM

[0501] o42.1和i52.3抗体纳米笼的冷冻电镜分析

[0502] 取3.0μL浓度为0.8mg/mL i52.3 Fc样品在TBS pH 8.0(含100mM精氨酸)中的溶液,涂在C-flat 1.2μm辉光铜网上。然后将铜网投入液态乙烷中冷冻,用液氮和FEI MK4 Vitrobot在6秒的印迹时间和0作用力下冷却。印迹过程在20℃、100%湿度的Vitrobot室内进行。使用Leginon数据采集软件,在200kV的FEI Talos电子显微镜和Gatan K2 Summit相机上进行数据采集。标称放大倍率为36,000×,像素尺寸为1.16Å/像素。剂量率调整为8次/像素/秒。在计数模式下以200ms/帧将影片分割成50帧。使用MotionCorr2进行帧对齐。颗粒是在Appion界面中手动挑选的。用GCTF估算离焦参数。具有cryoSPARC的无参比二维分类法用来选择用于从头开始的cryoSPARC三维重建功能的颗粒子集。

[0503] 表11中提供了数据获取和处理的汇总。

[0504] DR5和A1F-Fc实验

[0505] 细胞培养

[0506] 从ATCC获得结直肠腺癌细胞系colo205和肾癌细胞系RCC4。原代肾小管上皮细胞RAM009由华盛顿大学(University of Washington)Akilesh博士捐赠。Colo205细胞在含有

10%胎牛血清(FBS)和青霉素/链霉素的RPMI1640培养基中生长。RCC4细胞在含有10% FBS和青霉素/链霉素的Dulbecco改良Eagle培养基中生长。RAM009在含有10% FBS,ITS补充剂、青霉素/链霉素和非必需氨基酸(NEAA)的RPMI中生长。将所有细胞系在37℃含5% CO₂的湿化气氛中维持。

[0507] 人脐静脉内皮细胞(HUVEC, Lonza, 德国, 目录号:C2519AS)在0.1%明胶包被的35mm细胞培养皿中的EGM2培养基中生长。简单地说,EGM2由20%的胎牛血清、1%的青霉素-链霉素、1%的谷氨酰胺(Gibco, 目录号:35050061)、1%的内皮细胞生长因子(31)、1mM丙酮酸钠、7.5mM HEPES、0.08mg/mL肝素、0.01%两性霉素B、1×RPMI 1640加和不加葡萄糖且最终体积达到5.6mM葡萄糖浓度的混合物组成。通过0.45微米过滤器过滤培养基。取第7代HUVEC进行Tie2信号通路和细胞迁移实验。取第6代HUVEC进行管形成实验。

[0508] Caspase 3/7 Glo测定

[0509] 用胰蛋白酶进行细胞传代,将20,000个细胞/孔接种于96孔的白色组织培养板,并在适当的培养基中生长。第二天更换培养基(100μL/孔),用未封闭的α-DR5 AMG655抗体(150nM)、重组人TNF相关凋亡诱导配体(rhTRAIL;150nM),仅Fc抗体纳米笼或α-DR5抗体纳米笼(150nM,1.5nM,15pM),并在37℃孵育24小时。次日将100μL/孔caspase GLO™试剂(Promega公司,美国)加到培养基顶部,在37℃下孵育2小时。然后,使用Perkin EnVision酶标仪(Perkin Elmer)记录发光。使用Graphpad Prism™进行了统计学比较(详细信息见表11)。

[0510] 表11.DR5实验的统计信息。

[0511]

实验 (图)	条件	浓度	n	测试	与...相比的 平均值	α	概述	校正的 P 值
Caspase- 3,7 RCC4 (4b)	PBS	15 pM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	N/A	N/A	N/A	N/A
		1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9996
		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9994
	TRAIL	15 pM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9996
		1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9996
		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9668
	α-DR5	15 pM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9997
		1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.2005

[0512]

		d2.4 α -DR5	15 pM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9995
			1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9988
			150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		t32.4 α -DR5	15 pM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9998
			1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
			150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		t32.8 α -DR5	15 pM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.984
			1.5 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.6177
			150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		o42.1 α -DR5	15 pM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9991
			1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
			150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		i52.3 α -DR5	15 pM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9442
			1.5 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.8227
			150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
活性 4d RCC4 (4c)	PBS	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	TRAIL	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.5207	
	α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9996	

[0513]

[0513]		d2.4 α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	*	0.0238
		t32.4 α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	****	<0.0001
		t32.8 α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	****	<0.0001
		o42.1 α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	****	<0.0001
		i52.3 α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	**	0.0079
	4d RCC4 Fc 笼 (4d)	PBS	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	N/A	N/A	N/A	N/A
		d2.4 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.7157
		t32.4 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9976
		t32.8 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.8556
		o42.1 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.2309
		i52.3 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9302
	活性 6d RCC4 (4e)	PBS	150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	N/A	N/A	N/A	N/A
		TRAIL	150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9996
		α -DR5	150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	>0.9999
		t32.4 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9591
		o42.1 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9593
		t32.4 α -DR5	150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	****	<0.0001
		o42.1 α -DR5	150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	***	0.0001

[0514]

c-PARP 量化 (4g)	PBS	150 nM	4	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	N/A	N/A	N/A	N/A
	TRAIL	150 nM	4	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.0845
	α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.4746
	o42.1 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9979
	o42.1 α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	****	<0.0001
Caspase-3,7 Colo205	PBS	15 pM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	N/A	N/A	N/A	N/A
		1.5 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
		150 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
	TRAIL	15 pM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
		1.5 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	0.0006
		150 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
	α -DR5	15 pM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9997
		1.5 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
		150 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9996
	d2.4 α -DR5	15 pM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.9996
		1.5 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		150 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
	t32.4 α -DR5	15 pM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.1074

[0515]

		1.5 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		150 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
	t32.8 α-DR5	15 pM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
		1.5 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		150 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
	o42.1 α-DR5	15 pM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	0.6538
		1.5 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		150 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
	i52.3 α-DR5	15 pM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	ns	>0.9999
		1.5 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
		150 nM	2	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	15 pM PBS	0.05	****	<0.0001
	Caspase-3,7 RCC4 Fc	PBS	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	N/A	N/A	N/A
d2.4 Fc		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	*	0.0129
t32.4 Fc		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	*	0.046
t32.8 Fc		150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9198
o42.1 Fc		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.2112
i52.3 Fc		150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9996
RAM009 Caspase-	PBS	1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	N/A	N/A

[0516]

3,7		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.3848
	TRAIL	1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9726
		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.0525
	α -DR5	1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9566
		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.2752
	d2.4 α -DR5	1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9677
		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	**	0.0076
	t32.4 α -DR5	1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9703
		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	**	0.0028
	t32.8 α -DR5	1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9996
		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	**	0.0067
	o42.1 α -DR5	1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9991
		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	**	0.0038
	i52.3 α -DR5	1.5 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9994
		150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	***	0.0006
	d2.4 Fc	150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9966
	t32.4 Fc	150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9997
	t32.8 Fc	150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9992

[0517]		o42.1 Fc	150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9994
		i52.3 Fc	150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9995
	RAM009 活力	PBS	150 nM	6	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05		
		TRAIL	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9901
		α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9995
		d2.4 α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9996
		t32.4 α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9212
		t32.8 α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.7875
		o42.1 α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.7485
		i52.3 α -DR5	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.1419
		d2.4 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9996
		t32.4 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9718
		t32.8 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.999
		o42.1 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9913
		i52.3 Fc	150 nM	3	采用事后 Dunnett 检验的双向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9837

[0518] Glo细胞活力测定(4天活力)

[0519] 细胞被铺板到96孔板上,每孔20,000个细胞。次日用150nM α -DR5抗体纳米笼、rhTRAIL和 α -DR5抗体处理细胞4天。第4天,将100 μ L CellTiter-Glo试剂(Promega Corp.USA,#G7570)添加到每孔100 μ L培养基中,在37 $^{\circ}$ C 孵育10min,使用Perkin-Elmer Envision平板检测仪测量发光。

[0520] Alamar Blue细胞活力测定(6天活力)

[0521] 将细胞接种到12孔组织培养板上,每孔50,000个细胞。第二天,细胞在150nM浓度下用 α -DR5抗体纳米笼、rhTRAIL或 α -DR5抗体处理。3天后,细胞以30,000细胞/孔传代,用150nM的 α -DR5笼、rhTRAIL和 α -DR5抗体处理3天。在第6天,用450 μ L/孔新鲜培养基替换培养基,然后加入50 μ L AlamarTM blue试剂(Thermofisher Scientific,美国,#DAL1025)。37 $^{\circ}$ C 孵育4小时后,将50 μ L的培养基转移到96孔不透明白色平板上,按照操作说明使用读板仪测量荧光强度。

[0522] 蛋白质分析

[0523] 细胞以40,000个/孔的比例传代到12孔板上,培养至80%的汇合度。治疗前用新鲜培养基500 μ L替换培养基。在DR5实验中,以150nM浓度添加AMG-655抗体和rhTRAIL,并在培养基上以150nM、1.5nM和15pM浓度添加Fc-only纳米笼或 α -DR5纳米笼,37 $^{\circ}$ C孵育24小时后分离蛋白。

[0524] 将含有死亡细胞的培养基转移到1.5ml的Eppendorf管中,用1 $\times$ 磷酸缓冲盐水轻轻冲洗细胞。在细胞中加入1 $\times$ 胰蛋白酶3min。所有细胞收集到含死亡细胞培养基的1.5mL Eppendorf中。在各自的试管中将细胞用1 $\times$ PBS洗涤一次并用70 μ L溶解缓冲液裂解,该缓冲液包括20mM Tris-HCl (pH 7.5)、150mM NaCl、15%甘油、1% Triton、3% SDS、25mM β -甘油磷酸、50mM NaF、10mM焦磷酸钠、0.5%原钒酸盐、1% PMSF (所有化学品均来自Sigma-Aldrich,密苏里州圣路易斯),25U苯丙酮酶核酸酶(EMD chemicals,Gibbstown,新泽西州),蛋白酶抑制剂混合物(PierceTM蛋白酶抑制剂迷你片,Thermo Scientific,美国)和磷酸酶抑制剂混合物2(目录编号:P5726)。然后用1 μ L Benzonase (Novagen,美国)处理总蛋白样品,并在37 $^{\circ}$ C孵育10分钟。将21.6 μ L含10% β -巯基乙醇的4 $\times$ Laemmli样品缓冲液(Bio-Rad,美国)添加到细胞裂解液中,然后在95 $^{\circ}$ C加热10分钟。煮沸的样品有的用于蛋白质印迹分析,有的在-80 $^{\circ}$ C温度下储存。

[0525] 制备A1F-Fc

[0526] 合成的基因优化后用于哺乳动物表达,并亚克隆到CMV/R载体(VRC 8400;PMID:15994776)。采用XbaI和AvrII酶切位点插入A1F-Fc。用Genscript进行基因合成和克隆。使用Expi293表达培养基(Thermo Fisher Scientific)在150RPM、5% CO₂、70%湿度、37 $^{\circ}$ C的条件下悬浮生长Expi 293F细胞。在 $\sim 2.5 \times 10^6$ 细胞/mL汇合时,用PEI MAX (polysciences)作为转染试剂,将编码A1F-Fc的载体(每1L细胞1000 μ g)转染细胞。细胞孵育96h后,通过离心(4,000 $\times$ g,10min,4 $^{\circ}$ C)将细胞快速离心,并通过真空过滤(0.45 μ m,Millipore Sigma)进一步澄清含蛋白的上清液。在制备镍亲和层析步骤中,澄清上清液中加入50mM Tris、350mM NaCl、pH 8.0。对于每升上清液,向上清液中添加4mL Ni SepharoseTM excel树脂(GE),随后在4 $^{\circ}$ C振荡过夜。16~24h后,收集树脂并从混合物中分离,用50mM Tris、500mM NaCl、30mM咪唑、pH 8.0洗涤两次,然后用50mM Tris、500mM NaCl、300mM咪唑、pH 8.0洗脱所需蛋白。通过SEC使用SuperdexTM 200 Increase柱纯化洗脱液。

[0527] Western印迹法

[0528] 将蛋白质样品解冻并在95 $^{\circ}$ C加热10分钟。每孔装入10 μ L蛋白样品,并在4-10% SDS-PAGE凝胶上在250伏特下分离30分钟。然后使用半干式涡轮转移蛋白质印迹装置(Bio-Rad,美国)将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上12分钟。转运后,将膜在5%脱脂奶粉中封闭1小时。1小时后,用各自的抗体进行探测:1:2000稀释裂解的PARP(Cell Signaling,美国);1:1000稀释的cFLIP(R&D systems公司,美国);1:5000稀释的pERK1/2(Cell Signaling公司);1:1000稀释的pFAK(Cell Signaling公司);

[0529] 1:2000稀释的p-AKT(S473)(Cell Signaling公司)和1:10 000稀释肌动蛋白(Cell Signaling公司)。用5% BSA阻断p-AKT(S473)膜3h,然后加入一抗。将具有一抗的膜在4 $^{\circ}$ C的摇床上孵育过夜。次日,用1 $\times$ TBST洗涤膜(3次,间隔10分钟),加入相应的HRP偶联二抗(Bio-Rad,美国)(1:10,000),室温孵育1小时。对于p-AKT(S473),洗涤后,膜在室温5%牛奶中封闭1小时,然后在5%牛奶中制备的相应HRP偶联二抗(1:2000)中孵育2小时。二抗

孵育后,用 $1 \times$ TBST洗涤3次,间隔10min,使用鲁米诺试剂显影,Bio-Rad ChemiDocTM成像仪成像。使用ImageJTM软件对数据进行定量分析。定量通过计算每个波段的峰面积来完成。每个信号都被归一化为来自同一凝胶通道的肌动蛋白定量,以便进行交叉凝胶比较。除了pAKT的A1F-Fc蛋白印迹(没有足够的pAKT信号进行比较,因此使用o42.1 A1F-Fc进行归一化)之外,所有样本与PBS相比的Fold-changes都被计算出来。我们使用Graphpad PrismTM进行了统计学比较(详细信息见表11,12)。

[0530] 细胞迁移(一划线II)实验

[0531] 将第7代HUVECs接种于直径为35mm、质量分数为0.1%的明胶包被板中,在EGM-2培养基中培养。单层细胞建立后,使用200 μ L移液管尖端在细胞层上划痕。培养基改为DMEM低糖补充2%胎牛血清。支架以18nM A1F-Fc浓度添加到培养基中。在徕卡显微镜下,10倍放大,相位对比,分别于0和12小时成像。使用ImageJ软件对图像进行量化,以计算细胞迁移水平作为伤口面积与初始伤口面积变化的比率。细胞迁移水平归一化为PBS。使用Graphpad Prism进行统计比较(详见表12)。

[0532] 表12.A1F-Fc实验的统计信息。

[0533]

实验 (图)	条件	n	检验	与...相比 的平均值	α	汇总	校正的 P 值
pAKT (4j, 9c (H8))	PBS	13	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分 析	N/A	N/A	N/A	N/A
	A1F-Fc	3	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分 析	PBS	0.05	ns	>0.9999
	o42.1 Fc	4	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分 析	PBS	0.05	ns	>0.9999
	i52.3 Fc	3	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分 析	PBS	0.05	ns	>0.9999
	o42.1 A1F-Fc	9	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分 析	PBS	0.05	****	<0.0001
	i52.3 A1F- Fc	8	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分 析	PBS	0.05	****	<0.0001
	H8-A1F	4	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分 析	PBS	0.05	****	<0.0001
pERK1-2 (4j; 9c (H8))	PBS	13	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分 析	N/A	N/A	N/A	N/A
	A1F-Fc	3	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分 析	PBS	0.05	ns	0.9997
	o42.1 Fc	4	采用事后	PBS	0.05	ns	0.9957

[0534]

			Dunnett 检验 的单向方差分析				
	i52.3 Fc	3	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9997
	o42.1 A1F-Fc	9	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	PBS	0.05	**	0.0032
	i52.3 A1F- Fc	8	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	PBS	0.05	*****	<0.0001
	H8-A1F	6	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	PBS	0.05	*	0.0112
血管稳定性 (4k; 9 c (H8))	PBS	7	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	N/A	N/A	N/A	N/A
	A1F-Fc	6	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.9932
	o42.1 Fc	4	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	PBS	0.05	ns	>0.9999
	i52.3 Fc	3	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	PBS	0.05	ns	0.8699
	o42.1 A1F-Fc	6	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	PBS	0.05	***	0.0006
	i52.3 A1F- Fc	5	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	PBS	0.05	*****	<0.0001
	H8-A1F	4	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	PBS	0.05	*	0.0208
pAKT (HS	PBS	3	采用事后	o42.1	0.05	***	<0.0001

[0535]	exp.)		Dunnett 检验 的单向方差分析	A1F-Fc			
	o42.1 A1F-Fc	3	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	o42.1 A1F-Fc	0.05	N/A	N/A
	10% HS	3	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	o42.1 A1F-Fc	0.05	***	0.0002
	o42.1 A1F-Fc 10% HS 4°C	3	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	o42.1 A1F-Fc	0.05	ns	0.9431
	o42.1 A1F-Fc 10% HS	3	采用事后 Dunnett 检验 的单向方差分析	o42.1 A1F-Fc	0.05	ns	0.9998

[0536] 管形成实验(血管稳定性)

[0537] 管形成采用Liang等人2007年提出的改良方案。简单地说,将第6代HUVEC以150,000个/孔的密度接种到预包被有150μL 100%冷Matrigel™(Corning,美国)的24孔板上,同时接种于89nM A1F-Fc浓度的支架或PBS在补充有0.5% FBS的低糖DMEM培养基中24小时。在24小时的时间点,吸出旧的培养基并替换为不含支架的新鲜培养基。细胞继续孵育至72小时。在48小时和72小时的时间点,使用Leica显微镜以10X倍放大在相位对比下对细胞进行成像。然后,使用Image J软件中的Angiogenesis Analyzer插件通过计算节点、网格和管的数量来量化管的形成。血管稳定性的计算方法是将节点、网格和管的数量取平均值,然后归一化为PBS。我们使用Graphpad Prism™进行了统计学比较(详细信息见表12)。

[0538] 免疫细胞活化材料和方法

[0539] CD40发光试验

[0540] 采用上述八面体o42.1抗体纳米笼-形成设计,结合非激动性抗体(克隆LOB7/6,产品代码MCA1590T,BioRad),并用动态光散射和负染色电镜对抗体纳米笼进行表征(图5)。阴性对照o42.1抗体纳米笼使用非CD40结合IgG (mpe8) 制成,该IgG与RSV刺突蛋白结合(45)。这两个抗体纳米笼,连同未被限制在笼内的LOB7/6和阳性对照CD40激活IgG(Promega,目录编号:K118A)被稀释,以制备从1.2μM开始的、用于三次重复技术重复的10点三倍稀释系列。阳性对照CD40激活IgG(K118A)是小鼠IgG1a抗体,因此它与o42.1设计不兼容,可能是由于蛋白A和mIgG1a之间的低结合界面(数据未显示)。

[0541] 为了检测CD40的激活,我们按照制造商的说明进行了基于生物发光细胞的检测,该检测测量了CD40对外界刺激(如IgG)的响应强度(Promega,JA2151)。简单地说,培养CD40效应中国仓鼠卵巢(CHO)细胞并按照实验方案制备试剂。抗体和抗体纳米笼与CD40效应CHO细胞在37°C,5% CO₂下孵育8小时。检测试剂盒中包含的Bio-Glo™荧光素酶检测系统(G7941)用于从平板检测仪的发光读数中可视化CD40的激活。将Bio-Glo™ Reagent施加于细胞,每分钟用Synergy Neo2平板检测仪检测细胞发光情况,持续30min。数据分析通过取多个重复之间的发光的平均值并减去平板背景。CD40结合反应的倍数诱导是通过将样器的

RLU归一为无抗体对照的RLU来确定的。绘制数据曲线,使用GraphPad PrismTM,使用log(激动剂)相对于反应计算EC50——可变斜率(4个参数)。EC50值及95%置信区间值见表7。

序列表

<110> 华盛顿大学
<120> 抗体结合的纳米颗粒
<130> 20-1330-W0
<150> 63/036062
<151> 2020-06-08
<150> 63/085351
<151> 2020-09-30
<150> 63/088586
<151> 2020-10-07
<150> 63/088576
<151> 2020-10-07
<160> 56
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 364
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> 任选地不存在
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (355) .. (364)
<223> 任选地不存在
<400> 1

Met	Ser	Asp	Glu	Glu	Glu	Arg	Asn	Glu	Leu	Ile	Lys	Arg	Ile	Arg	Glu
1				5					10					15	
Ala	Ala	Gln	Arg	Ala	Arg	Glu	Ala	Ala	Glu	Arg	Thr	Gly	Asp	Pro	Arg
			20					25					30		
Val	Arg	Glu	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Ala	Arg	Ile	Ala	Gln	Ile	Ala	Phe
			35					40					45		
Tyr	Leu	Val	Leu	His	Asp	Pro	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Asn	Glu	Ala	Leu
		50					55					60			
Lys	Ala	Val	Val	Lys	Ala	Ile	Glu	Leu	Ala	Val	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu

65	70	75	80
Ala Glu Lys Thr Gly Asp Pro Glu Val Arg Glu Leu Ala Arg Glu Val			
	85	90	95
Val Arg Leu Ala Val Glu Val Ala Thr Ala Thr Ala Ala Gly Glu Asn			
100	105	110	
Asp Thr Leu Arg Lys Val Ala Glu Arg Ala Leu Arg Leu Ala Lys Glu			
115	120	125	
Ala Ala Lys Arg Gly Asp Ala Lys Ala Ala Lys Gln Ala Ala Lys Ile			
130	135	140	
Ala Lys Leu Ala Ala Ala Asn Ala Gly Asp Glu Asp Val Leu Lys Lys			
145	150	155	160
Val Glu Leu Val Arg Leu Ala Ile Glu Leu Val Glu Ile Val Val Glu			
	165	170	175
Asn Ala Lys Arg Lys Gly Asp Asp Asp Lys Glu Ala Ala Glu Ala Ala			
180	185	190	
Leu Ala Ala Phe Arg Ile Val Leu Ala Ala Ala Gln Leu Ala Gly Ile			
195	200	205	
Ala Ser Leu Glu Val Leu Glu Leu Ala Leu Arg Leu Ile Lys Glu Val			
210	215	220	
Val Glu Asn Ala Gln Arg Glu Gly Tyr Asp Ile Ala Val Ala Ala Ile			
225	230	235	240
Ala Ala Ala Val Ala Phe Ala Val Val Ala Val Ala Ala Ala Ala			
	245	250	255
Asp Ile Thr Ser Ser Glu Val Leu Glu Leu Ala Ile Arg Leu Ile Lys			
260	265	270	
Glu Val Val Glu Asn Ala Gln Arg Glu Gly Tyr Val Ile Leu Leu Ala			
275	280	285	
Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Phe Val Val Val Ala Ala Ala Ala Lys			
290	295	300	
Arg Ala Gly Ile Thr Ser Ser Glu Thr Leu Lys Arg Ala Ile Glu Glu			
305	310	315	320
Ile Arg Lys Arg Val Glu Glu Ala Gln Arg Glu Gly Asn Asp Ile Ser			
	325	330	335
Glu Ala Ala Arg Gln Ala Ala Glu Glu Phe Arg Lys Lys Ala Glu Glu			
	340	345	350
Leu Lys Gly Ser Leu Glu His His His His His His			
355	360		
<210> 2			
<211> 364			

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> 任选地不存在
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (355) .. (364)
 <223> 任选地不存在
 <400> 2

Met	Ser	Asp	Glu	Glu	Glu	Arg	Asn	Glu	Leu	Ile	Lys	Arg	Ile	Arg	Glu
1				5					10					15	
Ala	Ala	Gln	Arg	Ala	Arg	Glu	Ala	Ala	Glu	Arg	Thr	Gly	Asp	Pro	Arg
			20					25					30		
Val	Arg	Glu	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Ala	Arg	Ile	Ala	Gln	Ile	Ala	Phe
		35					40					45			
Tyr	Leu	Val	Leu	His	Asp	Pro	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Asn	Glu	Ala	Leu
	50					55					60				
Lys	Ala	Val	Val	Lys	Ala	Ile	Glu	Leu	Ala	Val	Arg	Ala	Leu	Glu	Ala
65				70					75				80		
Ala	Glu	Lys	Thr	Gly	Asp	Pro	Arg	Val	Arg	Glu	Leu	Ala	Arg	Glu	Val
			85					90					95		
Val	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Val	Ala	Glu	Ala	Ala	Gln	Ala	Gly	Leu	Asn
		100					105					110			
Asp	Lys	Leu	Arg	Glu	Val	Ala	Glu	Lys	Ala	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Glu
		115				120					125				
Ala	Leu	Lys	Glu	Gly	Asp	Ser	Thr	Ala	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Glu	Ile
	130					135				140					
Ala	Arg	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	Ala	Gly	Asp	Glu	Asp	Val	Leu	Lys	Lys
145				150						155			160		
Val	Lys	Leu	Val	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	Leu	Val	Lys	Ile	Val	Val	Glu
			165						170				175		
Asn	Ala	Lys	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Ser	Lys	Glu	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala
		180						185				190			
Val	Ala	Ala	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Lys	Leu	Ala	Gly	Ile
		195					200					205			

Ala Ser Glu Glu Val Leu Glu Leu Ala Ala Arg Leu Ile Lys Glu Val
 210 215 220
 Val Glu Asn Ala Gln Arg Glu Gly Tyr Asp Ile Ala Val Ala Ala Ile
 225 230 235 240
 Ala Ala Ala Val Ala Phe Ala Val Val Ala Val Ala Ala Ala Ala
 245 250 255
 Asp Ile Thr Ser Ser Glu Val Leu Glu Leu Ala Ile Arg Leu Ile Lys
 260 265 270
 Glu Val Val Glu Asn Ala Gln Arg Glu Gly Tyr Val Ile Leu Leu Ala
 275 280 285
 Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Phe Val Val Val Ala Ala Ala Ala Lys
 290 295 300
 Arg Ala Gly Ile Thr Ser Ser Glu Thr Leu Lys Arg Ala Ile Glu Glu
 305 310 315 320
 Ile Arg Lys Arg Val Glu Glu Ala Gln Arg Glu Gly Asn Asp Ile Ser
 325 330 335
 Glu Ala Ala Arg Gln Ala Ala Glu Glu Phe Arg Lys Lys Ala Glu Glu
 340 345 350
 Leu Lys Gly Ser Leu Glu His His His His His His
 355 360
 <210> 3
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> 任选地不存在
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (372) .. (381)
 <223> 任选地不存在
 <400> 3
 Met Ser Asp Glu Glu Glu Arg Asn Glu Leu Ile Lys Arg Ile Arg Glu
 1 5 10 15
 Ala Ala Gln Arg Ala Arg Glu Ala Ala Glu Arg Thr Gly Asp Pro Arg
 20 25 30

Val Arg Glu Leu Ala Arg Glu Leu Ala Lys Leu Ala Gln Ile Ala Phe		
35	40	45
Tyr Leu Val Leu His Asp Pro Ser Ala Lys Glu Val Asn Leu Ala Leu		
50	55	60
Glu Leu Ile Val Lys Ala Ile Glu Leu Ala Val Arg Ala Leu Glu Glu		
65	70	75
Ala Glu Lys Thr Gly Asp Pro His Ala Arg Glu Leu Ala Arg Glu Ile		
	85	90
Val Arg Leu Ala Val Glu Leu Ala Arg Ala Val Ala Glu Ala Ala Glu		
	100	105
Glu Ala Lys Lys Gln Gly Asn Ser Glu Leu Ala Glu Gln Val Ala Arg		
	115	120
Ala Ala Gln Val Ala Leu Glu Val Ile Lys Ala Ala Ile Thr Ala Ala		
	130	135
Lys Gln Gly Asp Arg Lys Ala Phe Arg Ala Ala Leu Glu Leu Val Leu		
145	150	155
Glu Val Ile Lys Ala Ile Glu Glu Ala Val Lys Gln Gly Asn Pro Lys		
	165	170
Lys Val Ala Glu Val Ala Leu Lys Ala Glu Leu Ile Arg Ile Val Val		
	180	185
Gln Asn Ala Ala Asn Lys Gly Asp Asp Ala Asp Glu Ala Val Glu Ala		
	195	200
Ala Arg Ala Ala Phe Glu Ile Val Leu Ala Ala Ala Gln Leu Ala Gly		
	210	215
Ile Asp Ser Glu Glu Val Leu Glu Leu Ala Ala Arg Leu Ile Lys Glu		
225	230	235
Val Val Glu Asn Ala Gln Arg Glu Gly Tyr Asp Ile Ala Val Ala Ala		
	245	250
Ile Ala Ala Ala Val Ala Phe Ala Val Val Ala Val Ala Ala Ala		
	260	265
Ala Asp Ile Thr Ser Ser Glu Val Leu Glu Leu Ala Ile Arg Leu Ile		
	275	280
Lys Glu Val Val Glu Asn Ala Val Arg Glu Gly Tyr Val Ile Leu Leu		
	290	295
Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Phe Val Val Val Ala Ala Ala Ala		
305	310	315
Lys Arg Ala Gly Ile Thr Ser Ser Glu Thr Leu Lys Arg Ala Ile Glu		
	325	330
Glu Ile Arg Lys Arg Val Glu Glu Ala Gln Arg Glu Gly Asn Asp Ile		

340	345	350
Ser Glu Ala Ala Arg Gln Ala Ala Glu Glu Phe Arg Lys Lys Ala Glu		
355	360	365
Glu Leu Lys Gly Ser Leu Glu His His His His His His		
370	375	380
<210> 4		
<211> 363		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<222> (1) .. (1)		
<223> 任选地不存在		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<222> (354) .. (363)		
<223> 任选地不存在		
<400> 4		
Met Phe Asn Lys Ser Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Leu Ile Leu Asn Met		
1 5 10 15		
Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys		
20 25 30		
Asp Asp Pro Ala Lys Ser Glu Val Val Ala Gly Glu Ala Ala Ile Glu		
35 40 45		
Ala Ala Arg Asn Ala Ser Lys Lys Gly Ser Pro Glu Thr Ala Arg Glu		
50 55 60		
Ala Val Arg Leu Ala Leu Glu Leu Val Gln Glu Ala Ala Arg Val Ala		
65 70 75 80		
Arg Lys Thr Gly Ser Thr Glu Leu Leu Ile Ala Ala Ala Lys Leu Ala		
85 90 95		
Ile Glu Val Ala Arg Val Ala Leu Lys Val Gly Ser Pro Glu Ala Ala		
100 105 110		
Arg Glu Ala Val Arg Ala Ala Leu Glu Leu Val Gln Glu Leu Ile Arg		
115 120 125		
Ala Ala Arg Lys Thr Gly Ser Lys Glu Val Leu Glu Glu Ala Ala Lys		
130 135 140		
Leu Ala Leu Glu Val Ala Leu Val Ala Ala Ala Val Gly Ser Ser Glu		

145	150	155	160
Ala Ala Ala Lys Ala Val Ala Thr Ala Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala			
	165	170	175
Gly Ala Ser Glu Asp Glu Ile Ala Glu Ile Val Ala Arg Val Ile Ser			
	180	185	190
Glu Val Ile Arg Ile Leu Lys Glu Asn Gly Ser Glu Tyr Lys Val Ile			
	195	200	205
Cys Val Ser Val Ala Lys Ile Val Ala Glu Ile Val Glu Ala Leu Lys			
	210	215	220
Arg Ser Gly Thr Ser Glu Asp Glu Ile Ala Glu Ile Val Ala Arg Val			
225	230	235	240
Ile Ser Glu Val Ile Arg Thr Leu Lys Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Leu			
	245	250	255
Ile Ile Cys Val Cys Val Ala Ile Ile Val Ala Glu Ile Val Glu Ala			
	260	265	270
Leu Lys Arg Ser Gly Thr Ser Glu Asp Glu Ile Ala Glu Ile Val Ala			
	275	280	285
Arg Val Ile Ser Glu Val Ile Arg Thr Leu Lys Glu Ser Gly Ser Ser			
	290	295	300
Tyr Glu Val Ile Lys Glu Cys Val Gln Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile			
305	310	315	320
Leu Ala Leu Met Lys Ser Gly Thr Glu Val Glu Glu Ile Leu Leu Ile			
	325	330	335
Leu Leu Arg Val Lys Thr Glu Val Arg Arg Thr Leu Lys Glu Ser Gly			
	340	345	350
Ser Gly Ser Leu Glu His His His His His His			
	355	360	

<210> 5

<211> 361

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 任选地不存在

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (352) .. (361)

<223> 任选地不存在

<400> 5

Met	Phe	Asn	Lys	Ser	Gln	Gln	Ser	Ala	Phe	Tyr	Leu	Ile	Leu	Asn	Met
1				5					10					15	
Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Ala	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys
			20					25					30		
Asp	Asp	Pro	Ser	Lys	Ser	Glu	Val	Val	Ala	Gly	Glu	Ala	Ala	Ile	Glu
			35				40					45			
Ala	Ala	Arg	Asn	Ala	Leu	Lys	Lys	Gly	Ser	Pro	Glu	Thr	Ala	Arg	Glu
			50				55				60				
Ala	Val	Arg	Leu	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Gln	Glu	Ala	Glu	Arg	Gln	Ala
65					70				75					80	
Arg	Lys	Thr	Gly	Ser	Thr	Glu	Arg	Leu	Ile	Ala	Ala	Ala	Lys	Leu	Ala
				85				90						95	
Ile	Glu	Val	Ala	Arg	Val	Ala	Leu	Lys	Val	Gly	Ser	Pro	Glu	Thr	Ala
			100					105					110		
Arg	Glu	Ala	Val	Arg	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Gln	Glu	Leu	Ile	Arg
			115				120					125			
Gln	Ala	Arg	Lys	Thr	Gly	Ser	Lys	Glu	Val	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys
			130				135				140				
Leu	Ala	Leu	Glu	Val	Ala	Lys	Val	Ala	Ala	Glu	Val	Gly	Ser	Pro	Glu
145					150					155				160	
Thr	Ala	Ala	Arg	Ala	Val	Ala	Thr	Ala	Val	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Ala
			165					170					175		
Gly	Ala	Ser	Glu	Asp	Glu	Ile	Ala	Glu	Ile	Val	Ala	Arg	Val	Ile	Ser
			180					185				190			
Glu	Val	Ile	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Ser	Glu	Tyr	Lys	Val	Ile
			195				200				205				
Cys	Arg	Ala	Val	Ala	Arg	Ile	Val	Ala	Glu	Ile	Val	Glu	Ala	Leu	Lys
			210				215				220				
Arg	Ser	Gly	Thr	Ser	Glu	Asp	Glu	Ile	Ala	Glu	Ile	Val	Ala	Arg	Val
225					230				235					240	
Ile	Ser	Glu	Val	Ile	Arg	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Ser	Asp	Tyr	Leu
			245					250					255		
Ile	Ile	Cys	Val	Cys	Val	Ala	Ile	Ile	Val	Ala	Glu	Ile	Val	Glu	Ala
			260				265				270				
Leu	Lys	Arg	Ser	Gly	Thr	Ser	Glu	Asp	Glu	Ile	Ala	Glu	Ile	Val	Ala
			275				280					285			

Arg Val Ile Ser Glu Val Ile Arg Thr Leu Lys Glu Ser Gly Ser Ser
 290 295 300
 Tyr Glu Val Ile Lys Glu Cys Val Gln Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile
 305 310 315 320
 Leu Ala Leu Met Lys Ser Gly Thr Glu Val Glu Glu Ile Leu Leu Ile
 325 330 335
 Leu Leu Arg Val Lys Thr Glu Val Arg Arg Thr Leu Lys Glu Ser Gly
 340 345 350
 Ser Leu Glu His His His His His His
 355 360

<210> 6
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> 任选地不存在
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (305) .. (314)
 <223> 任选地不存在
 <400> 6

Met Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Val Leu Asn Met
 1 5 10 15
 Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 20 25 30
 Asp Asp Pro Ser Gln Ser Leu Lys Ile Leu Ile Lys Ala Ala Ala Gly
 35 40 45
 Gly Asp Ser Glu Leu Glu Glu Val Ala Lys Arg Ile Val Lys Glu Leu
 50 55 60
 Ala Glu Gln Gly Arg Ser Glu Lys Glu Ala Ala Lys Glu Ala Ala Glu
 65 70 75 80
 Leu Ile Glu Arg Ile Thr Arg Ala Ala Gly Gly Asn Ser Asp Leu Ile
 85 90 95
 Glu Leu Ala Val Arg Ile Val Lys Ile Leu Glu Glu Gln Gly Arg Ser
 100 105 110

Pro Ser Glu Ala Ala Lys Glu Ala Val Glu Ala Ile Glu Ala Ile Val		
115	120	125
Arg Ala Ala Gly Gly Asp Ser Glu Ala Ile Lys Val Ala Ala Glu Ile		
130	135	140
Ala Lys Thr Ile Ile Thr Gln Lys Glu Ser Gly Ser Glu Tyr Lys Glu		
145	150	155
Ile Cys Arg Thr Val Ala Arg Ile Val Ala Glu Ile Val Glu Lys Leu		
165	170	175
Lys Arg Asn Gly Ala Ser Glu Asp Glu Ile Ala Glu Ile Val Ala Ala		
180	185	190
Ile Ile Ala Ala Val Ile Leu Thr Leu Lys Leu Ser Gly Ser Asp Tyr		
195	200	205
Leu Ile Ile Cys Val Cys Val Ala Ile Ile Val Ala Glu Ile Val Glu		
210	215	220
Ala Leu Lys Arg Ser Gly Thr Ser Glu Asp Glu Ile Ala Glu Ile Val		
225	230	235
Ala Arg Val Ile Ser Ala Val Ile Arg Val Leu Lys Glu Ser Gly Ser		
245	250	255
Ser Tyr Glu Val Ile Lys Glu Cys Val Gln Ile Ile Val Leu Ala Ile		
260	265	270
Ile Leu Ala Leu Met Lys Ser Gly Thr Glu Val Glu Glu Ile Leu Leu		
275	280	285
Ile Leu Leu Arg Val Lys Thr Glu Val Arg Arg Thr Leu Lys Glu Ser		
290	295	300
Gly Ser Leu Glu His His His His His His		
305	310	
<210>	7	
<211>	422	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		
<221>	MISC_FEATURE	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	任选地不存在	
<220>		
<221>	MISC_FEATURE	
<222>	(413) .. (422)	

<223> 任选地不存在

<400> 7

Met	Phe	Asn	Lys	Asp	Gln	Gln	Ser	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	Asn	Met
1				5					10					15	
Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Ala	Leu	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Leu	Leu	Lys
			20					25					30		
Asp	Asp	Pro	Ser	Lys	Ser	Thr	Val	Ile	Leu	Thr	Ala	Ala	Lys	Val	Ala
			35				40					45			
Ala	Glu	Leu	Ser	Glu	Lys	Ile	Arg	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Ser	Ser
		50				55					60				
Tyr	Glu	Gln	Ile	Ala	Glu	Thr	Val	Ala	Lys	Ala	Val	Ala	Lys	Leu	Val
65				70					75					80	
Glu	Lys	Leu	Lys	Arg	Asn	Gly	Val	Ser	Glu	Asp	Glu	Ile	Ala	Leu	Ala
			85					90						95	
Val	Ala	Leu	Ile	Ile	Ser	Ala	Val	Ile	Gln	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly
			100					105					110		
Ser	Ser	Tyr	Glu	Val	Ile	Ala	Glu	Ile	Val	Ala	Arg	Ile	Val	Ala	Glu
			115					120					125		
Ile	Val	Glu	Ala	Leu	Lys	Arg	Ser	Gly	Thr	Ser	Glu	Asp	Glu	Ile	Ala
			130					135				140			
Glu	Ile	Val	Ala	Arg	Val	Ile	Ser	Glu	Val	Ile	Arg	Thr	Leu	Lys	Glu
145				150					155					160	
Ser	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Val	Ile	Ala	Glu	Ile	Val	Ala	Arg	Ile	Val
				165					170					175	
Ala	Glu	Ile	Val	Glu	Ala	Leu	Lys	Arg	Ser	Gly	Thr	Ser	Glu	Asp	Glu
			180					185					190		
Ile	Ala	Lys	Ile	Val	Ala	Arg	Val	Ile	Ala	Glu	Val	Leu	Arg	Thr	Leu
			195					200					205		
Lys	Glu	Ser	Gly	Ser	Ser	Glu	Glu	Val	Ile	Lys	Glu	Ile	Val	Ala	Arg
			210				215					220			
Ile	Ile	Thr	Glu	Ile	Lys	Glu	Ala	Leu	Lys	Arg	Ser	Gly	Thr	Ser	Glu
225				230					235					240	
Asp	Glu	Ile	Glu	Leu	Ile	Thr	Leu	Met	Ile	Glu	Ala	Ala	Leu	Glu	Ile
				245					250					255	
Ala	Lys	Leu	Lys	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Tyr	Glu	Glu	Ile	Cys	Glu	Asp
			260					265					270		
Val	Ala	Arg	Arg	Ile	Ala	Glu	Leu	Val	Glu	Lys	Leu	Lys	Arg	Asp	Gly
			275					280					285		
Thr	Ser	Ala	Val	Glu	Ile	Ala	Lys	Ile	Val	Ala	Ala	Ile	Ile	Ser	Ala

290	295	300
Val Ile Ala Met Leu Lys Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Glu Val Ile Cys		
305	310	315
Glu Cys Val Ala Arg Ile Val Ala Glu Ile Val Glu Ala Leu Lys Arg		
325	330	335
Ser Gly Thr Ser Ala Ala Ile Ile Ala Leu Ile Val Ala Leu Val Ile		
340	345	350
Ser Glu Val Ile Arg Thr Leu Lys Glu Ser Gly Ser Ser Phe Glu Val		
355	360	365
Ile Leu Glu Cys Val Ile Arg Ile Val Leu Glu Ile Ile Glu Ala Leu		
370	375	380
Lys Arg Ser Gly Thr Ser Glu Gln Asp Val Met Leu Ile Val Met Ala		
385	390	395
Val Leu Leu Val Val Leu Ala Thr Leu Gln Leu Ser Gly Ser Leu Glu		
405	410	415
His His His His His His		
420		
<210> 8		
<211> 355		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<222> (1) .. (1)		
<223> 任选地不存在		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<222> (346) .. (355)		
<223> 任选地不存在		
<400> 8		
Met Ser Asp Glu Glu Glu Arg Asn Glu Leu Ile Lys Arg Ile Arg Glu		
1	5	10
Ala Ala Gln Arg Ala Arg Glu Ala Ala Glu Arg Thr Gly Asp Pro Arg		
20	25	30
Val Arg Glu Leu Ala Arg Glu Leu Ala Arg Leu Ala Gln Arg Ala Phe		
35	40	45
Tyr Leu Val Leu His Asp Pro Ser Ser Ser Asp Val Asn Glu Ala Leu		

50	55	60
Lys Leu Ile Val Glu Ala	Ile Glu Ala Ala Val Arg Ala Leu Glu Ala	
65	70	75
Ala Glu Arg Ala Gly Asp Pro Glu Leu Arg Glu Asp Ala Arg Glu Ala		80
85	90	95
Val Arg Leu Ala Val Glu Ala Ala Glu Glu Val Gln Arg Asn Pro Ser		
100	105	110
Ser Ser Thr Ala Asn Leu Leu Leu Lys Ala Ile Val Ala Leu Ala Glu		
115	120	125
Ala Leu Ala Ala Ala Ala Asn Gly Asp Lys Glu Lys Phe Lys Lys Ala		
130	135	140
Ala Glu Ser Ala Leu Glu Ile Ala Lys Arg Val Val Glu Val Ala Ser		
145	150	155
Lys Glu Gly Asp Pro Glu Ala Val Leu Glu Ala Ala Lys Val Ala Leu		
165	170	175
Arg Val Ala Glu Leu Ala Ala Lys Asn Gly Asp Lys Glu Val Phe Lys		
180	185	190
Lys Ala Ala Glu Ser Ala Leu Glu Val Ala Lys Arg Leu Val Glu Val		
195	200	205
Ala Ser Lys Glu Gly Asp Pro Glu Leu Val Leu Glu Ala Ala Lys Val		
210	215	220
Ala Leu Arg Val Ala Glu Leu Ala Ala Lys Asn Gly Asp Lys Glu Val		
225	230	235
Phe Gln Lys Ala Ala Ala Ser Ala Val Glu Val Ala Leu Arg Leu Thr		
245	250	255
Glu Val Ala Ser Lys Glu Gly Asp Ser Glu Leu Glu Thr Glu Ala Ala		
260	265	270
Lys Val Ile Thr Arg Val Arg Glu Leu Ala Ser Lys Gln Gly Asp Ala		
275	280	285
Ala Val Ala Ile Leu Ala Glu Thr Ala Glu Val Lys Leu Glu Ile Glu		
290	295	300
Glu Ser Lys Lys Arg Pro Gln Ser Glu Ser Ala Lys Asn Leu Ile Leu		
305	310	315
Ile Met Gln Leu Leu Ile Asn Gln Ile Arg Leu Leu Val Leu Gln Ile		
325	330	335
Arg Met Leu Asp Glu Gln Arg Gln Glu Gly Ser Leu Glu His His His		
340	345	350
His His His		
355		

<210> 9
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> 任选地不存在
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (355) .. (364)
 <223> 任选地不存在
 <400> 9

```

Met Ser Asp Glu Glu Glu Arg Asn Glu Leu Ile Lys Arg Ile Arg Glu
1           5           10           15
Ala Ala Gln Arg Ala Arg Glu Ala Ala Glu Arg Thr Gly Asp Pro Arg
          20           25           30
Val Arg Glu Leu Ala Arg Glu Leu Ala Arg Leu Ala Gln Arg Ala Phe
          35           40           45
Tyr Leu Val Leu His Asp Pro Ser Ser Ser Asp Val Asn Glu Ala Leu
          50           55           60
Lys Leu Ile Val Glu Ala Ile Glu Ala Ala Val Arg Ala Leu Glu Ala
65           70           75           80
Ala Glu Arg Thr Gly Asp Pro Lys Val Arg Glu Glu Ala Arg Glu Leu
          85           90           95
Val Arg Arg Ala Val Glu Ala Ala Glu Glu Val Gln Arg Asn Pro Ser
          100          105          110
Ser Ser Glu Val Asn Glu Lys Leu Lys Ala Ile Val Val Glu Ile Glu
          115          120          125
Val Lys Val Ala Ser Leu Glu Ala Lys Glu Val Thr Asp Pro Asp Lys
          130          135          140
Ala Leu Lys Ile Ala Lys Lys Val Ile Glu Leu Ala Leu Glu Ala Val
145          150          155          160
Lys Glu Asn Pro Ser Thr Glu Ala Leu Arg Ala Val Leu Glu Ala Val
          165          170          175
Arg Leu Ala Ser Glu Val Ala Lys Arg Val Thr Asp Pro Asp Lys Ala
          180          185          190

```

Leu Lys Ile Ala Lys Leu Val Ile Glu Leu Ala Leu Glu Ala Val Lys		
195	200	205
Glu Asp Pro Ser Thr Asp Ala Leu Arg Ala Val Leu Glu Ala Val Arg		
210	215	220
Leu Ala Ser Glu Val Ala Lys Arg Val Thr Asp Pro Asp Lys Ala Leu		
225	230	235
Lys Ile Ala Lys Leu Val Leu Glu Leu Ala Ala Glu Ala Val Lys Glu		
	245	250
Asp Pro Ser Thr Asp Ala Leu Arg Ala Ala Lys Glu Ala Glu Arg Leu		
	260	265
Ala Thr Glu Val Ala Lys Arg Val Thr Asp Pro Lys Lys Ala Arg Glu		
	275	280
Ile Glu Met Leu Val Leu Lys Leu Gln Met Glu Ala Ile Leu Ala Glu		
	290	295
Thr Glu Glu Val Lys Lys Glu Ile Glu Glu Ser Lys Lys Arg Pro Gln		
305	310	315
Ser Glu Ser Ala Lys Asn Leu Ile Leu Ile Met Gln Leu Leu Ile Asn		
	325	330
Gln Ile Arg Leu Leu Ala Leu Gln Ile Arg Met Leu Ala Leu Gln Leu		
	340	345
Gln Glu Gly Ser Leu Glu His His His His His His		
	355	360
<210>	10	
<211>	225	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	10	
Lys Ala Glu Leu Ala Ser Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp Val		
1	5	10
Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile Asn		
	20	25
Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn Gly		
	35	40
Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp Phe		
	50	55
Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly		
65	70	75
		80

Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln Arg
 85 90 95
 Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg Ala
 100 105 110
 Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn Tyr
 115 120 125
 Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser Ser
 130 135 140
 Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn Asp
 145 150 155 160
 Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe
 165 170 175
 Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala Gly
 180 185 190
 Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys Gly
 195 200 205
 Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu Asp
 210 215 220

Phe

225

<210> 11

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Asn Ser Gly Ser Ser Thr Ile Thr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		

	405		410		415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu					
	420		425		430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
	435		440		445
Lys					
<210>	12				
<211>	214				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	合成的				
<400>	12				
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly					
1	5		10		15
Asp Arg Val Ser Phe Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala					
	20		25		30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile					
	35		40		45
Tyr Trp Ala Ser Ser Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly					
	50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser					
65	70		75		80
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Glu Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu					
	85		90		95
Thr Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala					
	100		105		110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly					
	115		120		125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala					
	130		135		140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln					
145	150		155		160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser					
	165		170		175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr					
	180		185		190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser					
	195		200		205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 13

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1

5

10

15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe

20

25

30

Ser Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Glu Asp Phe

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85

90

95

Ser Arg Arg Tyr Asp Tyr Asp Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115

120

125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130

135

140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145

150

155

160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165

170

175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180

185

190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195

200

205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr

210

215

220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225

230

235

240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg															
				245						250				255	
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro				260					265					270	
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala				275					280					285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val				290					295					300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr				305					310					315	
															320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr															
				325						330					335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu				340						345					350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys				355											
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser				370											
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp															
385										390					400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser															
				405						410					415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala															
				420						425					430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys															
				435						440					445
<210>	14														
<211>	219														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成的														
<400>	14														
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Leu Ser Val Pro Val Thr Pro Gly															
1				5						10				15	
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Ser Ser Leu Leu His Arg															
				20						25				30	
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser															
				35						40				45	

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
50						55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile
65				70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Arg
			85					90						95	
Leu	Glu	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105						110	
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
			115					120						125	
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
			130					135						140	
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
145					150					155					160
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
				165					170					175	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
			180					185						190	
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
			195					200						205	
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
			210					215							

<210> 15
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 15

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Val	Val	Leu	Val	Met	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ala	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40					45			
Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Arg	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
			50				55				60				
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Asn
65					70					75					80

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

385	390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	445
Lys			
<210> 16			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 16			
Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe			
	20	25	30
Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val			
	35	40	45
Phe Asn Ala Lys Asn Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Ser Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asp Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ser Ile Pro Tyr			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Arg Arg Thr Val Ala Ala			
	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
	130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
	180	185	190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 17
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (29)
 <223> 任选地不存在
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (255) .. (260)
 <223> 任选地不存在
 <400> 17

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

Gly Ser Thr Gly His His His His His His Gly Gly Ser Lys Ala Glu
 20 25 30

Leu Ala Ser Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp Val Tyr Gln Ala
 35 40 45

Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile Asn Asn Met Pro
 50 55 60

Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn Gly Gly Gly Trp
 65 70 75 80

Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp Phe Gln Arg Gly
 85 90 95

Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp
 100 105 110

Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln Arg Gln Tyr Met
 115 120 125

Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg Ala Tyr Ser Gln
 130 135 140

Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn Tyr Arg Leu Tyr
 145 150 155 160

Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser Ser Leu Ile Leu		
165	170	175
His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn Asp Asn Cys Met		
180	185	190
Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys		
195	200	205
Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala Gly Gln Asn His		
210	215	220
Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys Gly Pro Ser Tyr		
225	230	235
Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu Asp Phe Gly Gly		
245	250	255
Ser Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
260	265	270
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
275	280	285
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
290	295	300
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
305	310	315
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
325	330	335
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
340	345	350
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
355	360	365
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
370	375	380
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
385	390	395
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
405	410	415
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
420	425	430
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
435	440	445
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
450	455	460
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		

465	470	475	480
Tyr Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	485	490	
<210>	18		
<211>	492		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(1) .. (20)		
<223>	任选地不存在		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(246) .. (251)		
<223>	任选地不存在		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(484) .. (492)		
<223>	任选地不存在		
<400>	18		
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro			
1	5	10	15
Gly Ser Thr Gly Lys Ala Glu Leu Ala Ser Glu Lys Pro Phe Arg Asp			
	20	25	30
Cys Ala Asp Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr			
	35	40	45
Ile Tyr Ile Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met			
	50	55	60
Asp Val Asn Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly			
65	70	75	80
Ser Leu Asp Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly			
	85	90	95
Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile			
	100	105	110
Thr Ser Gln Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu			
	115	120	125
Gly Asn Arg Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu			

130	135	140
Lys Gln Asn Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly		
145	150	155
Lys Gln Ser Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp		
165	170	175
Ala Asp Asn Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly		
180	185	190
Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe		
195	200	205
Tyr Thr Ala Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His		
210	215	220
Tyr Phe Lys Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile		
225	230	235
Arg Pro Leu Asp Phe Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser		
245	250	255
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
260	265	270
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
275	280	285
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
290	295	300
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
305	310	315
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
325	330	335
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
340	345	350
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
355	360	365
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
370	375	380
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
385	390	395
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
405	410	415
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
420	425	430
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
435	440	445

Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
450						455						460			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
465					470					475					480
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His				
				485					490						
<210> 19															
<211> 452															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 合成的															
<400> 19															
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
			20					25						30	
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40					45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asp	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
			50				55				60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Asn	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90						95
Ala	Arg	Asp	Gln	Pro	Leu	Gly	Tyr	Cys	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	Ser	Tyr
			100					105					110		
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
			115				120						125		
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr
			130				135					140			
Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
145					150					155					160
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
				165					170					175	
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
			180					185					190		
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr
			195					200					205		

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val		
210	215	220
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val		
225	230	235 240
Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr		
290	295	300
Arg Phe Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro		
325	330	335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
340	345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
355	360	365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395 400
Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
420	425	430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
435	440	445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 20

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 20

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Tyr	Ser	Trp
		20						25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Thr	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	Asn	Ile	Phe	Pro	Leu
				85				90						95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
		100						105					110		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
		115						120					125		
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
		130						135					140		
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155				160	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
		180						185					190		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
		195					200						205		
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
		210													

<210> 21

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 21

Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5				10					15		
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Pro
			20					25					30		

Gly Tyr Tyr Gly Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Lys Ser Gly Ser Thr Tyr His Asn Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Thr Arg Pro Val Val Arg Tyr Phe Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala		
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145	150	155
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His		
195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Gln Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		

340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210> 22		
<211> 213		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 22		
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1 5 10 15		
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala		
20 25 30		
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35 40 45		
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50 55 60		
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65 70 75 80		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Thr		
85 90 95		
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro		
100 105 110		
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr		
115 120 125		
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
130 135 140		
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		

145	150	155	160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser			
	165	170	175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala			
	180	185	190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe			
	195	200	205
Asn Arg Gly Glu Cys			
210			
<210> 23			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 23			
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr			
	20	25	30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu			
	50	55	60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95
Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly			
	100	105	110
Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
	115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala			
	130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
	165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			

180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His		
195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210> 24		
<211> 216		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		

<400> 24

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Ala Leu Thr Phe Cys Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 25

<211> 442

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr

			20				25				30					
Trp	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35				40				45					
Gly	Lys	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
			50				55				60					
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65							70				75				80	
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
			85				90				95					
Ala	Arg	Gly	Tyr	Gly	Ile	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
			100				105				110					
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
			115				120				125					
Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
130							135				140					
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
145			150				155				160					
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
			165				170				175					
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	
			180				185				190					
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
195							200				205					
Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	
210							215				220					
Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
225			230				235				240					
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
			245				250				255					
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	
			260				265				270					
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
275							280				285					
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	
290							295				300					
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
305			310				315				320					
Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	
			325				330				335					

Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
340				345				350							
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
355				360				365							
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
370				375				380							
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
385				390				395				400			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
405				410				415							
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
420				425				430							
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
435				440											
<210> 26															
<211> 214															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 合成的															
<400> 26															
Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1				5				10				15			
Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Asn	Ile	Gly	Asp	Gln	Tyr	Ala
20				25				30							
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
35				40				45							
Gln	Asp	Lys	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
50				55				60							
Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Met
65				70				75				80			
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Tyr	Thr	Gly	Phe	Gly	Ser	Leu
85				90				95							
Ala	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys
100				105				110							
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln
115				120				125							
Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly
130				135				140							

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly			
145	150	155	160
Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala			
	165	170	175
Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser			
	180	185	190
Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val			
	195	200	205
Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
210			
<210> 27			
<211> 451			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的			
<400> 27			
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Glu Arg Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr			
	20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Gly Ile Asn Trp Gln Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Lys Ile Leu Gly Ala Gly Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly			
	100	105	110
Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
	115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
	130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
	165	170	175

Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val		
					180						185						190
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His		
					195						200						205
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys		
					210						215						220
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly		
					225						230						240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met		
					245						250						255
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His		
					260						265						270
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val		
					275						280						285
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr		
					290						295						300
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly		
					305						310						320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile		
					325						330						335
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val		
					340						345						350
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser		
					355						360						365
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu		
					370						375						380
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro		
					385						390						400
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val		
					405						410						415
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met		
					420						425						430
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser		
					435						440						445
Pro	Gly	Lys															
450																	
<210> 28																	
<211> 213																	
<212> PRT																	

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 28

```

Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr
1          5          10          15
Val Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
          20          25          30
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly
          35          40          45
Ala Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser
          50          55          60
Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp
65          70          75          80
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ala Asp Ser Ser Gly Asn His Val
          85          90          95
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala
          100          105          110
Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
          115          120          125
Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
          130          135          140
Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
145          150          155          160
Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
          165          170          175
Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr
          180          185          190
Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
          195          200          205
Pro Thr Glu Cys Ser
          210

```

<210> 29

<211> 740

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 29

Gln	Arg	Val	Ala	Ala	His	Ile	Thr	Gly	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Asn	Thr
1				5					10					15	
Leu	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Lys	Asn	Glu	Lys	Ala	Leu	Gly	Arg	Lys	Ile
			20					25					30		
Asn	Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Arg	Ser	Gly	His	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Leu
		35					40					45			
His	Leu	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Val	Ile	His	Glu	Lys	Gly	Phe	Tyr	Tyr
	50					55					60				
Ile	Tyr	Ser	Gln	Thr	Tyr	Phe	Arg	Phe	Gln	Glu	Glu	Ile	Lys	Glu	Asn
65				70					75					80	
Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met	Val	Gln	Tyr	Ile	Tyr	Lys	Tyr	Thr	Ser
			85					90						95	
Tyr	Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu	Met	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn	Ser	Cys	Trp
			100					105						110	
Ser	Lys	Asp	Ala	Glu	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Ser	Ile	Tyr	Gln	Gly	Gly	Ile
		115					120					125			
Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp	Arg	Ile	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Glu
	130					135					140				
His	Leu	Ile	Asp	Met	Asp	His	Glu	Ala	Ser	Phe	Phe	Gly	Ala	Phe	Leu
145				150					155					160	
Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	Gly	Ser	Arg	Val	Ala	Ala	His	Ile
			165					170						175	
Thr	Gly	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Asn	Thr	Leu	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Lys
		180						185					190		
Asn	Glu	Lys	Ala	Leu	Gly	Arg	Lys	Ile	Asn	Ser	Trp	Glu	Ser	Ser	Arg
		195					200					205			
Ser	Gly	His	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Leu	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu
	210					215					220				
Val	Ile	His	Glu	Lys	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Gln	Thr	Tyr	Phe
225				230					235					240	
Arg	Phe	Gln	Glu	Glu	Ile	Lys	Glu	Asn	Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met
			245					250						255	
Val	Gln	Tyr	Ile	Tyr	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu
		260					265						270		
Met	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn	Ser	Cys	Trp	Ser	Lys	Asp	Ala	Glu	Tyr	Gly
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Ile	Tyr	Gln	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp
	290					295					300				
Arg	Ile	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Glu	His	Leu	Ile	Asp	Met	Asp	His

305	310	315	320
Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly			
	325	330	335
Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser			
	340	345	350
Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg			
	355	360	365
Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser			
	370	375	380
Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe			
385	390	395	400
Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys			
	405	410	415
Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr			
	420	425	430
Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser			
	435	440	445
Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly			
	450	455	460
Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr			
465	470	475	480
Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala			
	485	490	495
Phe Leu Val Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser			
	500	505	510
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu			
	515	520	525
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
	530	535	540
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
545	550	555	560
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
	565	570	575
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ser Ser Thr			
	580	585	590
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
	595	600	605
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro			
610	615	620	

Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
625					630					635					640
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
					645					650					655
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
					660					665					670
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
					675					680					685
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
					690					695					700
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
705					710					715					720
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
					725					730					735
Ser	Pro	Gly	Lys												
					740										
<210>	30														
<211>	486														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成的														
<400>	30														
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Thr
				20					25					30	
Thr	Val	Ala	Trp	Asp	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu
				35				40					45		
Trp	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	Asn	Glu	Tyr	Ala
				50				55				60			
Val	Ser	Val	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ile	Asn	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn
65					70					75					80
Gln	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
				85						90					95
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Pro	Asp	Ala	Gly	Arg	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile
				100					105					110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Ser	Pro	Leu	Arg	Trp	Gly	Arg	Phe
				115					120						125

Gly Trp Arg Gly Leu Gly Arg Gly Trp Leu Arg Ser Pro Val Thr Gln			
130	135	140	
Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser			
145	150	155	160
Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser His Leu Ala Trp Tyr Gln			
	165	170	175
Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser			
	180	185	190
Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr			
	195	200	205
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val			
	210	215	220
Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Arg Ala Val Phe Gly			
225	230	235	240
Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Pro			
	245	250	255
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu			
	260	265	270
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
	275	280	285
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
	290	295	300
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
305	310	315	320
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
	325	330	335
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
	340	345	350
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
	355	360	365
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
	370	375	380
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn			
385	390	395	400
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
	405	410	415
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			
	420	425	430
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys			

435	440	445
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
450	455	460
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
465	470	475
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		480
485		
<210> 31		
<211> 452		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 31		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Thr		
20	25	30
Thr Val Ala Trp Asp Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Glu Tyr Ala		
50	55	60
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Val Asp Thr Ser Lys Asn		
65	70	75
Gln Ile Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val		
85	90	95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Pro Asp Ala Gly Arg Gly Ala Phe Asp Ile		
100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Ser Pro Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145	150	155
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
165	170	175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
180	185	190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		

195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
210	215	220
Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
225	230	235
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
325	330	335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
340	345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
355	360	365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
420	425	430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
435	440	445
Ser Pro Gly Lys		
450		
<210>	32	
<211>	218	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	

<400> 32

Leu Arg Ser Pro Val Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser
 20 25 30
 Ser His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80
 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp
 85 90 95
 Pro Pro Arg Ala Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 33

<211> 486

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 33

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

20	25	30
Asn Ala Ala Trp Tyr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu		
35	40	45
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala		
50	55	60
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Pro Asp Thr Ser Lys Asn		
65	70	75
Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val		
85	90	95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Asp Gly Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ile Leu Arg Trp Gly		
115	120	125
Arg Phe Gly Trp Arg Gly Leu Gly Arg Gly Trp Leu Glu Ile Val Leu		
130	135	140
Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr		
145	150	155
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly Tyr Val Ser Trp		
165	170	175
Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala		
180	185	190
Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser		
195	200	205
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe		
210	215	220
Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Asn Thr Tyr Gly		
225	230	235
Gln Gly Thr Lys Val Gly Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Pro		
245	250	255
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
260	265	270
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
275	280	285
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
290	295	300
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
305	310	315
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
325	330	335

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 340 345 350
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 355 360 365
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 370 375 380
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 385 390 395 400
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 405 410 415
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 420 425 430
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 435 440 445
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 450 455 460
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 465 470 475 480
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485

<210> 34

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 34

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Arg Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Asn Asn
 20 25 30
 Asn Ala Ala Trp Tyr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95

Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Gly	Asp	Gly	Asn	Ser	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp		
100						105					110						
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro		
115						120					125						
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr		
130						135					140						
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr		
145						150					155					160	
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro		
165						170					175						
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr		
180						185					190						
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn		
195						200					205						
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser		
210						215					220						
Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu		
225						230					235					240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu		
245						250					255						
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		
260						265					270						
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu		
275						280					285						
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr		
290						295					300						
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn		
305						310					315					320	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro		
325						330					335						
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln		
340						345					350						
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val		
355						360					365						
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val		
370						375					380						
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro		
385						390					395					400	
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr		

				405					410					415			
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val		
				420					425					430			
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu		
				435					440					445			
Ser	Pro	Gly	Lys														
				450													
<210>	35																
<211>	216																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	合成的																
<400>	35																
Leu	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro		
1				5					10					15			
Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser		
				20					25					30			
Gly	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Arg	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu		
				35					40					45			
Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe		
				50					55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu		
65																	
Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser		
				85					90					95			
Pro	Asn	Thr	Tyr	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Gly	Ile	Lys	Arg	Thr	Val		
				100					105					110			
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys		
				115					120					125			
Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg		
				130					135					140			
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn		
145									150					155			
Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser		
				165										170			
Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys		
				180					185					190			
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr		

195	200	205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210> 36		
<211> 451		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 36		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Glu Arg Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr		
20 25 30		
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val		
50 55 60		
Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65 70 75 80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Lys Ile Leu Gly Ala Gly Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly		
100 105 110		
Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115 120 125		
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
130 135 140		
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145 150 155 160		
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
165 170 175		
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
180 185 190		
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
195 200 205		
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
210 215 220		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		

225	230	235	240
Gly Pro Ser Val Phe	Leu Phe Pro Pro	Lys Pro Lys Asp Thr	Leu Met
	245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro	Glu Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val Ser	His
	260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val	Lys Phe Asn Trp Tyr Val	Asp Gly Val Glu	Val
	275	280	285
His Asn Ala Lys Thr	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	Asn Ser Thr Tyr	
	290	295	300
Arg Val Val Ser Val	Leu Thr Val Leu His Gln Asp	Trp Leu Asn Gly	
305	310	315	320
Lys Glu Tyr Lys Cys	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro	Ala Pro Ile	
	325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val	
	340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro	Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn	Gln Val Ser	
	355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile	Ala Val Glu	
	370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro	
385	390	395	400
Val Leu Asp Ser Asp	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	Val	
	405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val	Met	
	420	425	430
His Glu Ala Leu His	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu	Ser	
	435	440	445
Pro Gly Lys			
450			
<210>	37		
<211>	212		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的		
<400>	37		
Ser Glu Leu Thr Gln	Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr		
1	5	10	15
Val Arg Ile Thr Cys	Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser		

<210>	38
<211>	452
<212>	PRT
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成的
<400>	38

50	55	60															
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Lys	Gln	Phe		
65						70					75				80		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
				85					90					95			
Cys	Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp		
			100					105					110				
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro		
		115					120					125					
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr		
130						135					140						
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Asp	Lys	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr		
145					150				155					160			
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro		
				165					170					175			
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr		
		180						185					190				
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn		
195						200						205					
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser		
210						215					220						
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu		
225					230				235					240			
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu		
				245					250					255			
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		
		260						265					270				
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu		
		275					280					285					
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr		
290						295					300						
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn		
305					310				315					320			
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro		
				325					330					335			
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln		
		340						345					350				
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val		
355							360					365					

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Leu Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 39
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 39
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 40
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 40
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Gly Tyr Tyr Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445

Lys

<210> 41

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 41

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95
 Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 42

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

				20				25				30			
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				35				40				45			
Ala	Arg	Val	Ile	Pro	Asn	Ala	Gly	Gly	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
				50				55				60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
65				70				75				80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90				95			
Ala	Arg	Glu	Gly	Ile	Tyr	Trp	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
				100				105				110			
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser
				115				120				125			
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
130				135				140							
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu
145				150				155				160			
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu
				165				170				175			
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr
				180				185				190			
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val
195				200				205							
Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
210				215				220							
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
225				230				235				240			
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
				245				250				255			
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
				260				265				270			
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
275				280				285							
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
290				295				300							
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
305				310				315				320			
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
				325				330				335			

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg																	
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly																	
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro																	
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser																	
385																	400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln																	
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His																	
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys																	
<210>	43																
<211>	219																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	合成的																
<400>	43																
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly																	
1																	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser																	
Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala																	
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro																	
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile																	
65																	80
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Gln Thr																	
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys																	
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu																	
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe																	
130																	140

Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
145					150				155					160	
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
			165						170					175	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
			180						185					190	
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
		195					200					205			
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
	210					215									
<210>	44														
<211>	239														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成的														
<400>	44														
Met	Ala	Leu	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Trp	Val	Ser
1			5					10						15	
Gly	Ser	Ser	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Thr
			20					25						30	
Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser
			35				40							45	
Leu	Leu	Tyr	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys
	50				55					60					
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Val	Leu	Ile	Ser	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala
65				70					75					80	
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
			85					90						95	
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr
			100					105						110	
Cys	Met	Gln	Ala	Arg	Gln	Thr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys
		115				120					125				
Val	Asp	Ile	Arg	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro
	130					135					140				
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
145				150					155					160	
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp
			165						170					175	

Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp
180				185				190							
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys
195				200				205							
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln
210				215				220							
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	
225				230				235							
<210> 45															
<211> 469															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 合成的															
<400> 45															
Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Arg	Gly
1				5				10				15			
Val	Gln	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln
20				25				30							
Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe
35				40				45							
Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
50				55				60							
Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Ser	Asn	Arg	Tyr	His	Ala
65				70				75				80			
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Ile
85				90				95							
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
100				105				110							
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Pro	Gly	Pro	Asp	Tyr
115				120				125							
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
130				135				140							
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ala	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
145				150				155				160			
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
165				170				175							
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
180				185				190							

Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	195	200	205
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	210	215	220
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	225	230	235
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	245	250	255
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	260	265	270
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	275	280	285
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	290	295	300
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	305	310	315
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	325	330	335
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	340	345	350
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	355	360	365
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	370	375	380
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	385	390	395
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	405	410	415
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	420	425	430
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	435	440	445
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	450	455	460
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												465		
<210>	46																	
<211>	469																	
<212>	PRT																	

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 46

Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Arg	Gly
1				5					10					15	
Val	Gln	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln
			20					25					30		
Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe
			35				40					45			
Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
		50				55					60				
Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Ser	Asn	Arg	Tyr	His	Ala
65					70					75					80
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Ile
				85					90					95	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Pro	Gly	Pro	Asp	Tyr
		115				120						125			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
	130					135					140				
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
145					150					155				160	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
			165					170					175		
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
			180					185					190		
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
		195					200				205				
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
	210					215					220				
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys
225					230					235				240	
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
			245					250					255		
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
			260				265						270		
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val

275	280	285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
290	295	300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
305	310	315
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
325	330	335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
340	345	350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
355	360	365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
370	375	380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
385	390	395
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
405	410	415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
420	425	430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
435	440	445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
450	455	460
Leu Ser Pro Gly Lys		
465		
<210> 47		
<211> 457		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<222> (226) .. (227)		
<223> 任意合适长度和内容的任选氨基酸接头		
<400> 47		
Lys Ala Glu Leu Ala Ser Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp Val		
1	5	10
Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile Asn		

20	25	30
Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn Gly		
35	40	45
Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp Phe		
50	55	60
Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly		
65	70	75
Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln Arg		
85	90	95
Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg Ala		
100	105	110
Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn Tyr		
115	120	125
Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser Ser		
130	135	140
Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn Asp		
145	150	155
Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe		
165	170	175
Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala Gly		
180	185	190
Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys Gly		
195	200	205
Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu Asp		
210	215	220
Phe Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
225	230	235
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
245	250	255
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
260	265	270
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
275	280	285
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
290	295	300
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
305	310	315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
325	330	335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
340	345	350
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu		
355	360	365
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
370	375	380
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
385	390	395
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
405	410	415
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		
420	425	430
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
435	440	445
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
450	455	
<210>	48	
<211>	453	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	48	
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20	25	30
Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Val Ile Trp Tyr Glu Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Glu Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Gly Gly Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Val		
100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
115	120	125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
130	135	140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
145	150	155 160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
165	170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
195	200	205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys		
210	215	220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
225	230	235 240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
260	265	270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
305	310	315 320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
325	330	335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
340	345	350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
355	360	365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
370	375	380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
385	390	395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
405	410	415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
420	425	430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		

435	440	445
Leu Ser Pro Gly Lys		
450		
<210> 49		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 49		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1 5 10 15		
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp		
20 25 30		
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile		
35 40 45		
Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50 55 60		
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65 70 75 80		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Thr Tyr Pro Trp		
85 90 95		
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100 105 110		
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115 120 125		
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130 135 140		
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145 150 155 160		
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165 170 175		
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180 185 190		
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195 200 205		
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 50		

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 50

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445
Lys		
<210> 51		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 51		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn		
20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
50	55	60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val His Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Asp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 52

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 52

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg	Val	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
			115					120					125			
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
			130					135					140			
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
145						150					155				160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
						165				170					175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
						180				185				190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
			195					200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	
						210							220			
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
225						230						235			240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
						245				250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
						260				265				270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
						275							285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
						290							300			
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
305						310						315			320	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
						325				330				335		
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
						340				345				350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
						355				360				365		
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
						370							380			
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
385						390					395				400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	

	405		410		415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala					
	420		425		430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	435		440		445
<210>	53				
<211>	218				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	合成的				
<400>	53				
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
1	5		10		15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr					
	20		25		30
Gly Val Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro					
	35		40		45
Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Ile Pro Asp					
	50		55		60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser					
65	70		75		80
Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys					
	85		90		95
Glu Val Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg					
	100		105		110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln					
	115		120		125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr					
	130		135		140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser					
145	150		155		160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr					
	165		170		175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys					
	180		185		190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro					
	195		200		205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					

210	215
<210> 54	
<211> 449	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 54	
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln	
1 5 10 15	
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser	
20 25 30	
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu	
35 40 45	
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser	
50 55 60	
Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val	
65 70 75 80	
Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr	
85 90 95	
Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe	
115 120 125	
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu	
130 135 140	
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp	
145 150 155 160	
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu	
165 170 175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	
180 185 190	
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro	
195 200 205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys	
210 215 220	
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro	
225 230 235 240	
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser	

	245		250		255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp					
	260		265		270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn					
	275		280		285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val					
	290		295		300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu					
305		310		315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys					
	325		330		335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr					
	340		345		350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr					
	355		360		365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu					
	370		375		380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu					
385		390		395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys					
	405		410		415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu					
	420		425		430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
	435		440		445
Lys					
<210>	55				
<211>	214				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	合成的				
<400>	55				
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly					
1	5		10		15
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn					
	20		25		30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile					
	35		40		45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val His Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Asp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 56

<211> 633

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 56

Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys Met Ala Lys Phe Gly Pro Leu Pro Ser
 1 5 10 15
 Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser Glu Pro Pro Cys Val Asn Lys Val Ser
 20 25 30
 Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Gly
 35 40 45
 Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro Phe Glu Val
 50 55 60
 Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr Asn Lys Ser
 65 70 75 80

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

385	390	395	400
Ser Ser Ser Gly Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	405	410	415
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
	420	425	430
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	435	440	445
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
	450	455	460
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
465	470	475	480
Gln Tyr Ser Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
	485	490	495
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	500	505	510
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
	515	520	525
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met			
	530	535	540
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
545	550	555	560
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	565	570	575
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	580	585	590
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
	595	600	605
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
	610	615	620
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
625	630		

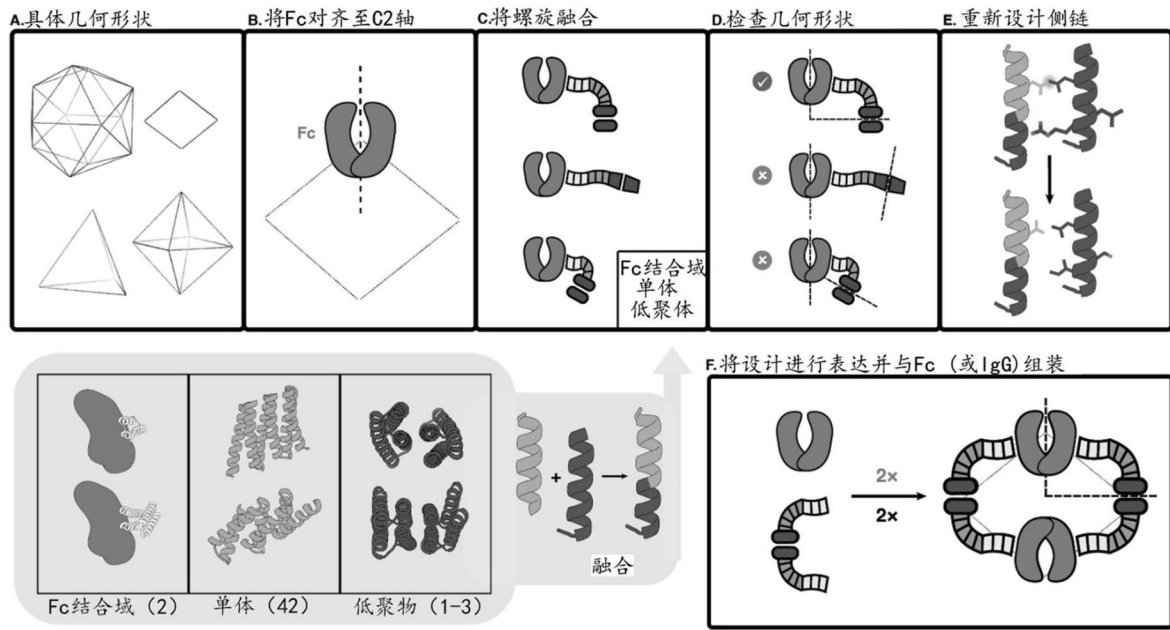


图1

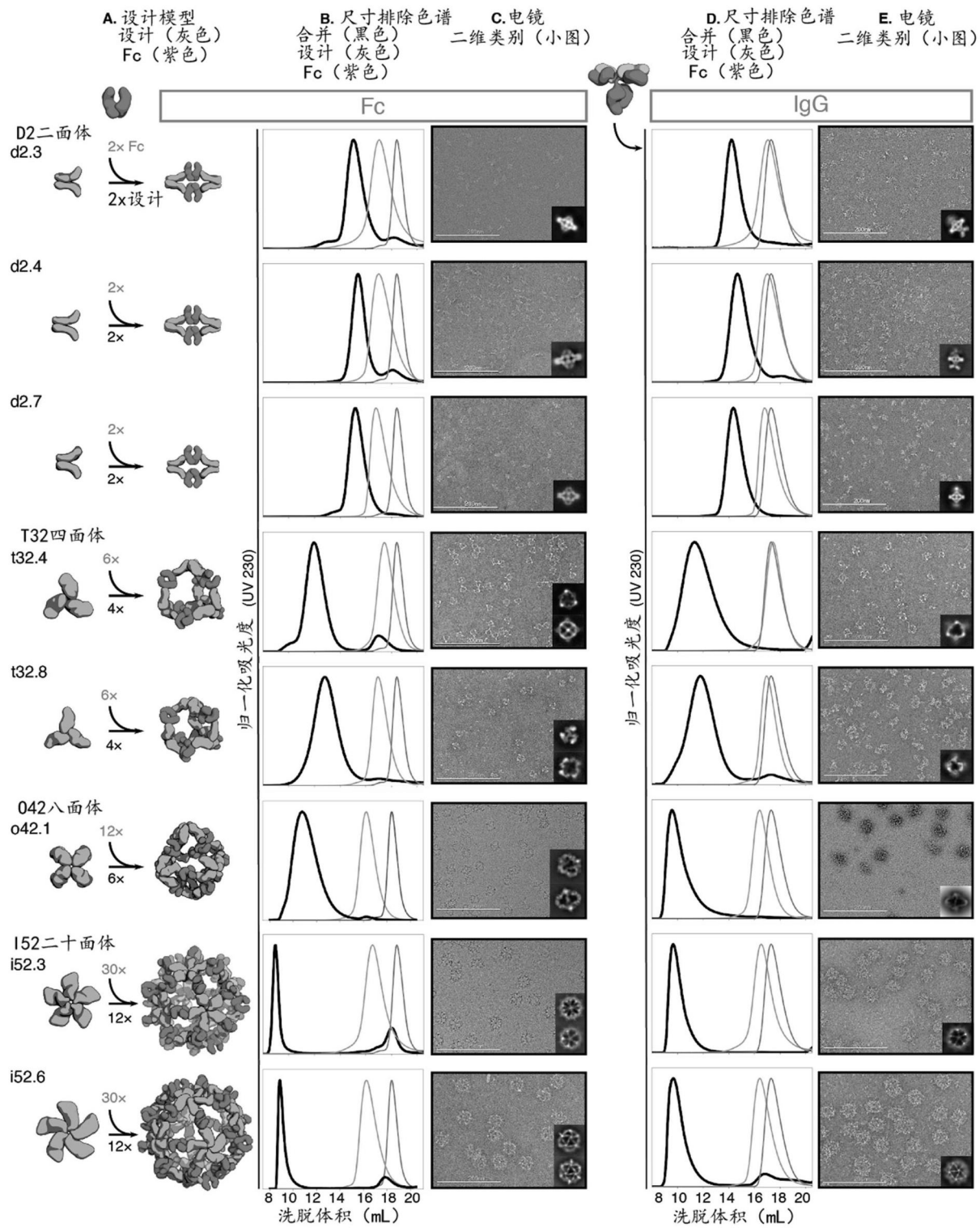


图2

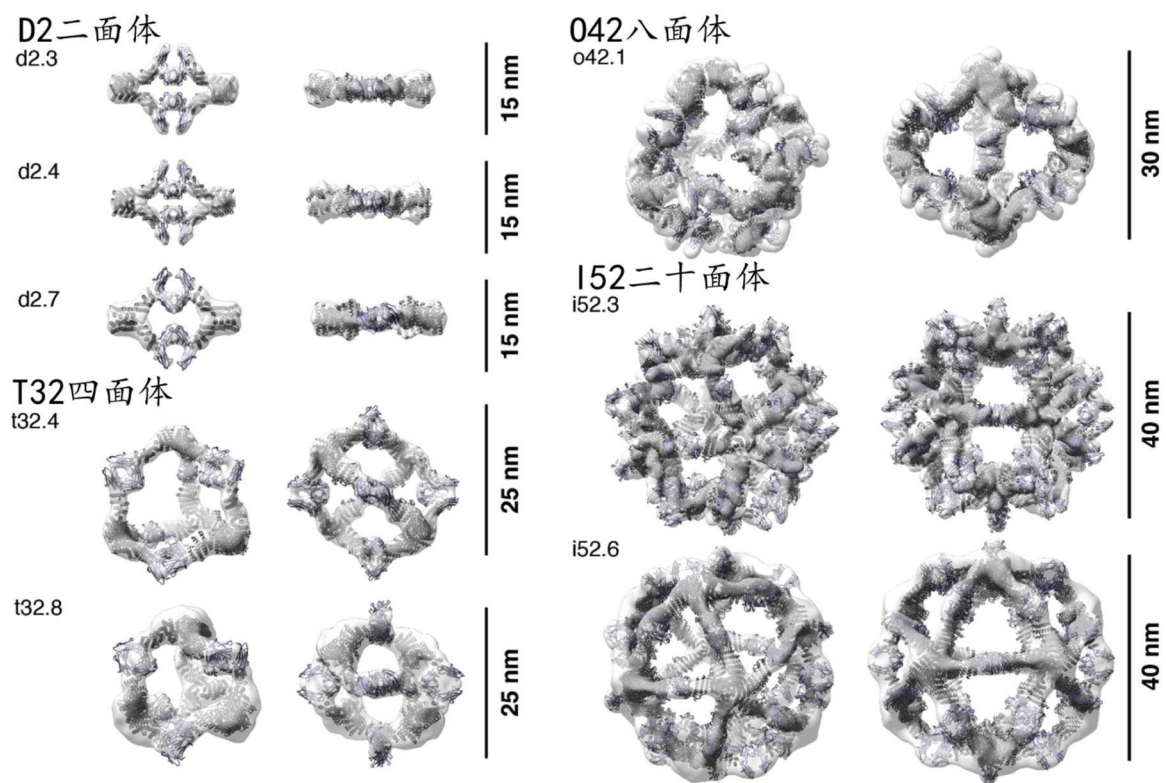


图3

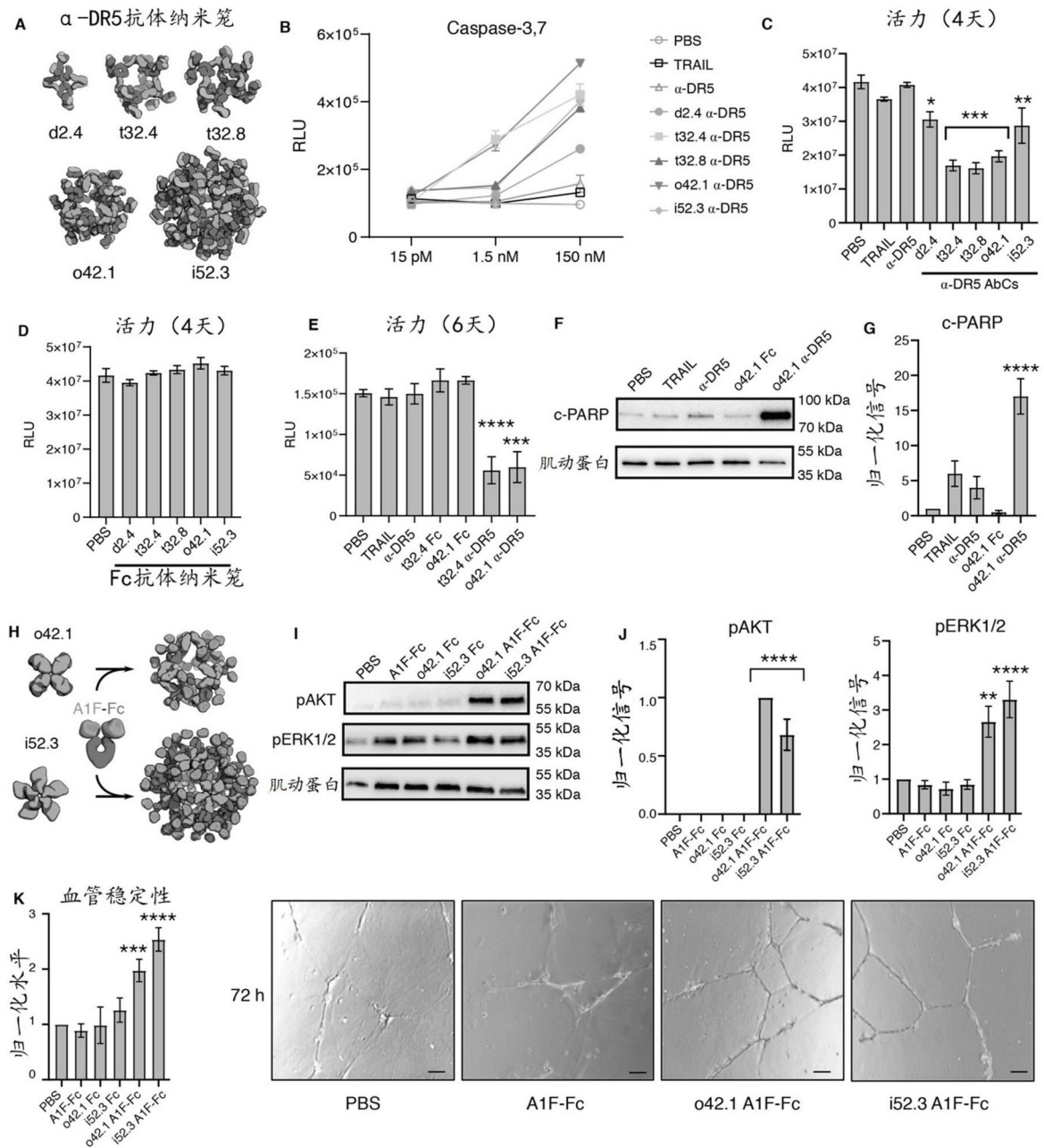


图4

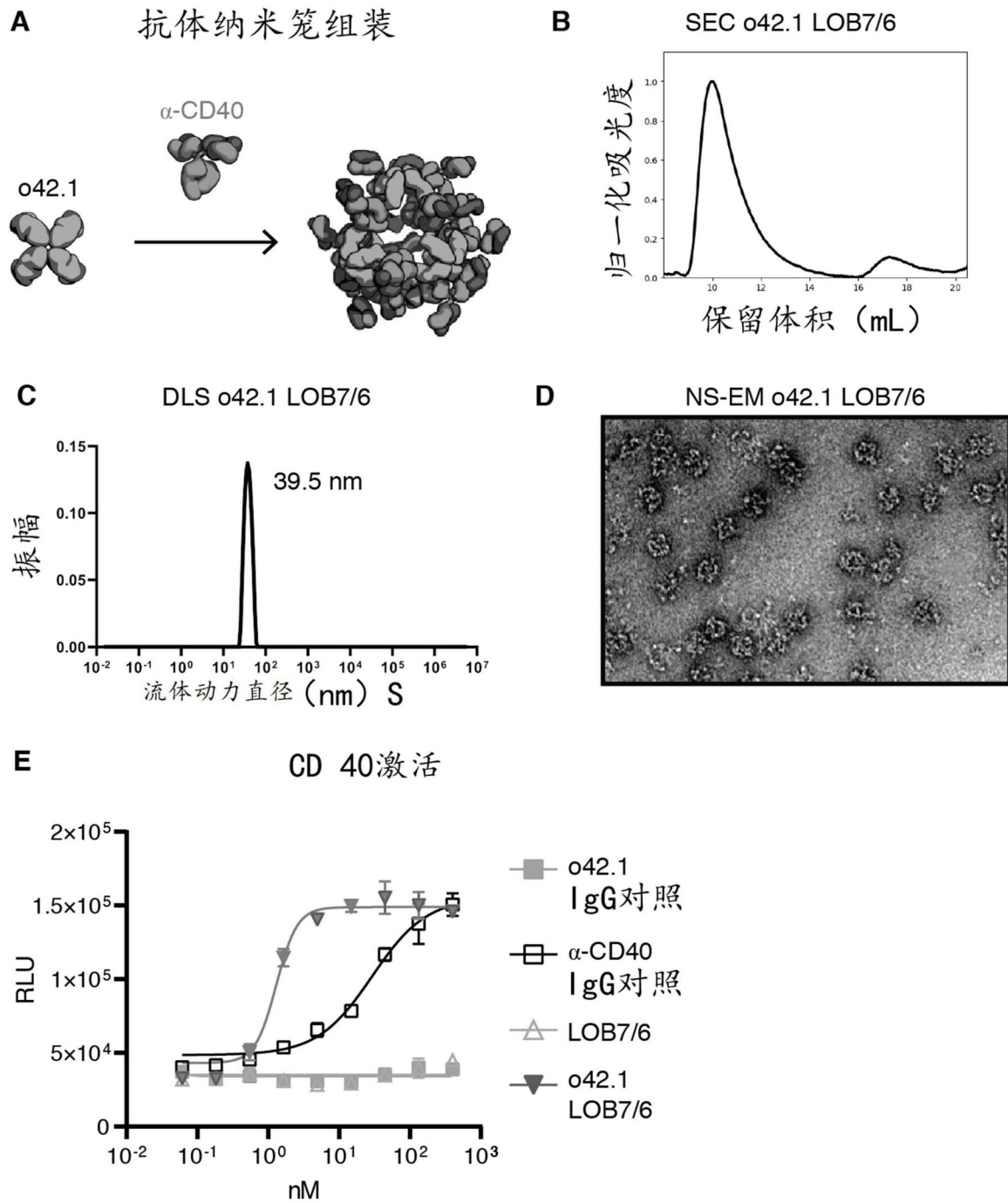


图5

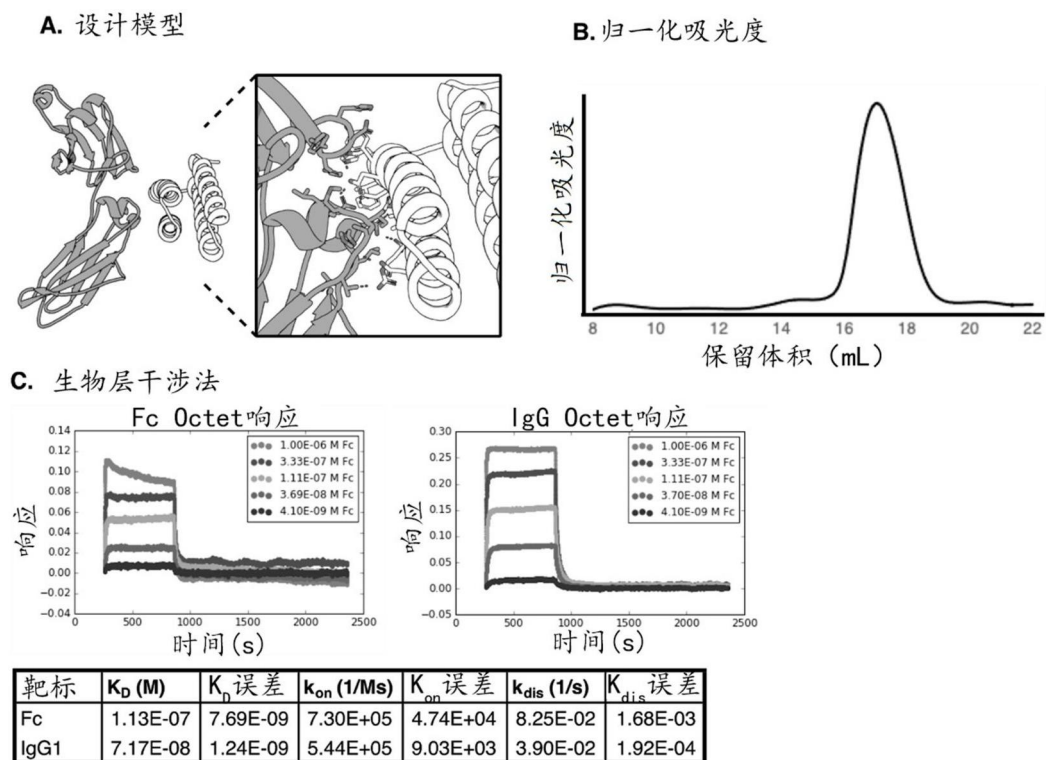


图6

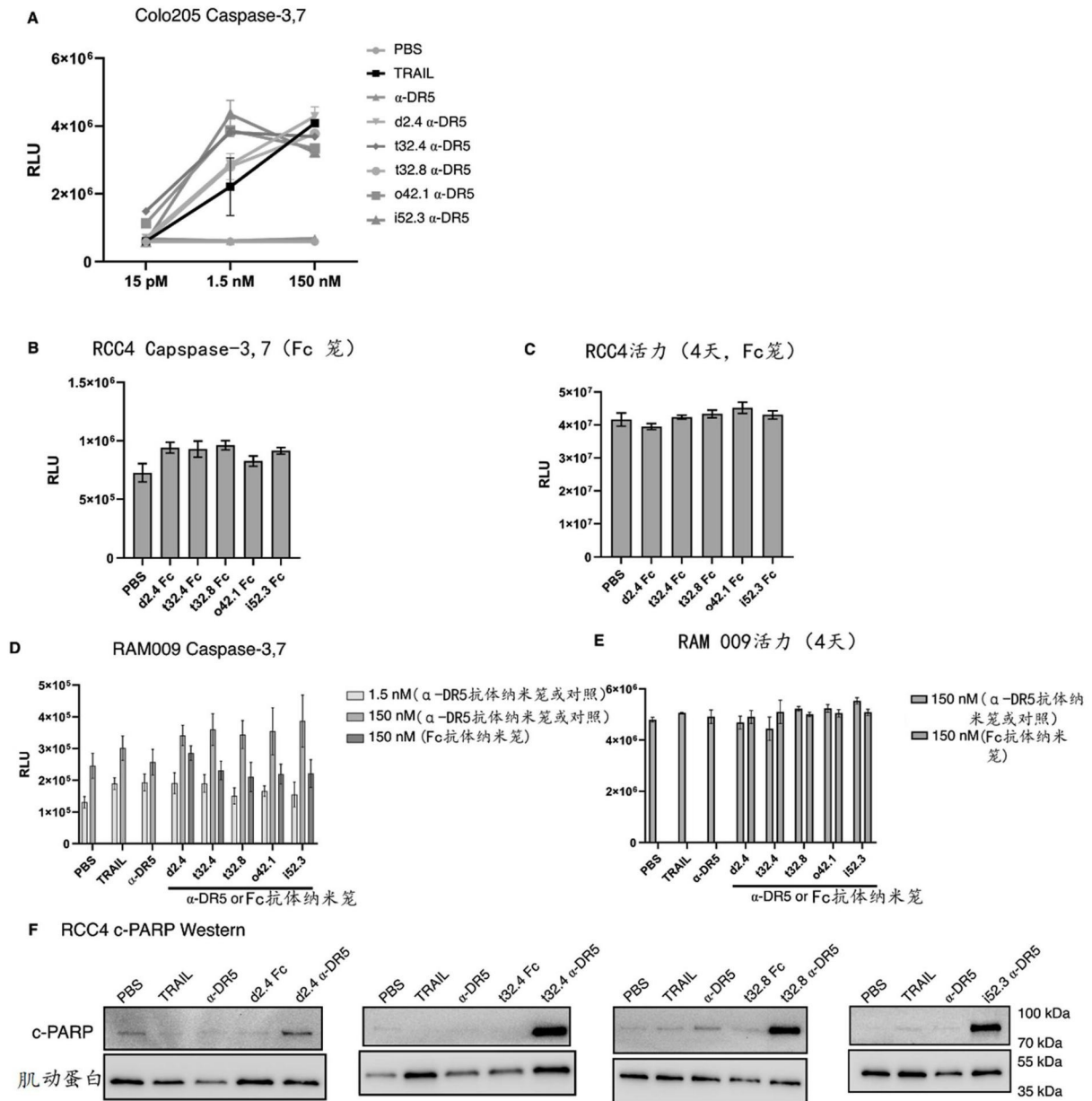


图7

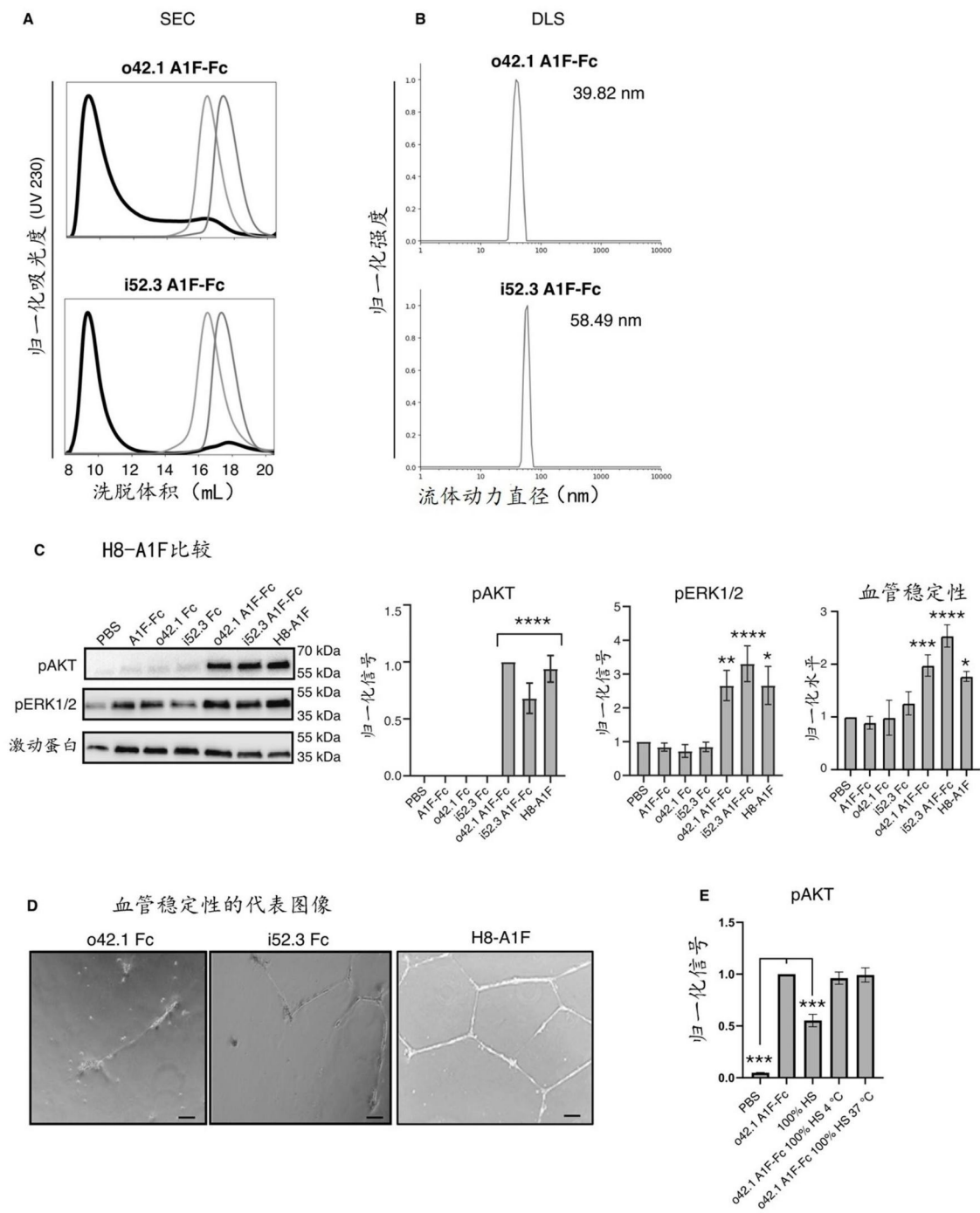


图8