



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108473563 A

(43)申请公布日 2018.08.31

(21)申请号 201680076588.6

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

(22)申请日 2016.11.14

代理人 张国梁 张莹

(30)优先权数据

62/254,375 2015.11.12 US

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/24(2006.01)

2018.06.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/077595 2016.11.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/081320 EN 2017.05.18

(71)申请人 埃博灵克斯股份有限公司

地址 比利时茨维纳德

(72)发明人 玛丽-安格·比斯

约阿希姆·布克内奥

彼得·卡斯特尔 吉诺·范黑克

权利要求书4页 说明书53页

序列表51页 附图22页

(54)发明名称

改进的TNF结合剂

(57)摘要

本发明涉及与肿瘤坏死因子α (“TNF”或“TNF-α”)结合的氨基酸序列、化合物和多肽。具体而言,本发明涉及与肿瘤坏死因子α结合的改进的重链免疫球蛋白单可变结构域(本文也称为“ISV”或“ISVD”),以及包含此类ISVD的蛋白质、多肽和其他构建体、化合物、分子或化学实体,统称为TNF结合剂。基于本文的公开,本发明的其他方面、实施方案、特征、用途和优点对于本领域技术人员将是清楚的。

```

              10      20      30      40
-----|-----|-----|-----|
SEQ ID NO: 58  QVDLWESGGGLVQAGGSLRLSCTASSQPSFSAIMGFROP
SEQ ID NO: 1   E.....P.....F.....A
SEQ ID NO: 59  E.....P.....F.....A

              50      60      70      80
-----|-----|-----|-----|
SEQ ID NO: 58  PKGRGFVAREISSTEDAVYDFVKGRETTISRDKAQTIVYL
SEQ ID NO: 1   .....S.....N..K..E..
SEQ ID NO: 59  .....S.....N..K..E..

              90      100     110
--abc--|---|---|abcd-----|---|---|
SEQ ID NO: 58  QMDSLKPEDTAVYYCRSEKRYADQSSAEDYWGQGTQVTVSS-
SEQ ID NO: 1   ..N..R.....L.....
SEQ ID NO: 59  ..N..R.....L.....

```

1. 免疫球蛋白单可变结构域 (ISVD), 其具有:

-CDR1, (根据Abm) 其为氨基酸序列GFTFSTADMG (SEQ ID NO:5); 和

-CDR2, (根据Abm) 其为氨基酸序列RISGIDGTTY (SEQ ID NO:6); 和

-CDR3, (根据Abm) 其为氨基酸序列PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO:4);

并具有:

-与SEQ ID NO:1的氨基酸序列 (其中可以存在的任何C端延伸以及CDR不被考虑用于确定序列同一性程度) 具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性程度;

和/或

-与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有不超过7个、例如不超过5个、优选不超过3个、例如仅有3个、2个或1个“氨基酸差异” (如本文所定义, 并且不考虑可以存在的第11、89、110或112位中一个或多个位置的任何上文列举的突变并且不考虑可以存在的任何C端延伸) (其中所述氨基酸差异如果存在的话可存在于框架和/或CDR中, 但优选仅存在于框架中而不存在于CDR中);

并任选地具有:

-C端延伸(X)_n, 其中n为1至10, 优选1至5, 例如1、2、3、4或5 (并且优选1或2, 比如1); 并且每个X是独立地选择的 (优选天然存在的) 氨基酸残基, 并且优选独立地选自由以下各项组成的组: 丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L) 或异亮氨酸(I);

其中:

-第11位的氨基酸残基优选选自L或V; 并且

-第89位的氨基酸残基优选选自T、V或L; 并且

-第110位的氨基酸残基优选选自T、K或Q; 并且

-第112位的氨基酸残基优选选自S、K或Q;

这样使得 (i) 第89位是T; 或 (ii) 第89位是L并且第11位是V; 或 (iii) 第89位是L并且第110位是K或Q; 或 (iv) 第89位是L并且第112位是K或Q; 或 (v) 第89位是L并且第11位是V并且第110位是K或Q; 或 (vi) 第89位是L并且第11位是V并且第112位是K或Q; 或 (vii) 第11位是V并且第110位是K或Q; 或 (viii) 第11位是V并且第112位是K或Q。

2. 根据权利要求1所述的ISVD, 其中第49位的氨基酸残基是丙氨酸。

3. 根据权利要求1或2所述的ISVD, 其中第74位的氨基酸残基是丝氨酸。

4. 根据权利要求3所述的ISVD, 其中第73位处的氨基酸残基是N并且第75位处的氨基酸残基是K。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的ISVD, 其中所述ISVD选自由以下各项组成的组: SEQ ID NO:40、39、36、37、38、41和61-68, 特别是SEQ ID NO:40、39和36, 最特别是SEQ ID NO:40。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的免疫球蛋白单可变结构域, 其基本上为单价形式。

7. 根据权利要求5所述的免疫球蛋白单可变结构域, 其在第1位处具有D并且具有C端延伸X(n), 所述C端延伸X(n) 优选为C端丙氨酸残基。

8. 包含至少一个根据权利要求1至5中任一项所述的ISVD的化合物。

9. 根据权利要求8所述的化合物, 其包含至少两个根据权利要求1至5中任一项所述的

ISVD。

10. 根据权利要求9所述的化合物,其中所述至少两个ISVD可以相同或不同。

11. 根据权利要求10所述的化合物,其中所述至少两个ISVD独立地选自SEQ ID NO: 8-41、61-66和69组成的组。

12. 根据权利要求8-11中任一项所述的化合物,其中所述化合物还包含血清蛋白结合性部分。

13. 根据权利要求12所述的化合物,其中所述血清蛋白结合性部分结合血清白蛋白。

14. 根据权利要求12或13所述的化合物,其中所述血清蛋白结合性部分是血清白蛋白结合性ISVD。

15. 根据权利要求14所述的化合物,其中所述血清白蛋白结合性ISVD基本上由4个构架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1为SFGMS,CDR2为SISGSGSDTLYADSVKG并且CDR3为GGSLSR。

16. 根据权利要求15所述的化合物,其中所述血清白蛋白结合性ISVD包含A1b8、A1b23、A1b129、A1b132、A1b11、A1b11 (S112K)-A、A1b82、A1b82-A、A1b82-AA、A1b82-AAA、A1b82-G、A1b82-GG、A1b82-GGG、A1b92和A1b223。

17. 根据权利要求12或13所述的化合物,其中所述血清蛋白结合性部分是基于非抗体的多肽。

18. 根据权利要求8-11中任一项所述的化合物,其进一步包含PEG。

19. 根据权利要求8-18中任一项所述的化合物,其中所述ISVD彼此直接连接或通过接头连接。

20. 根据权利要求8-19中任一项所述的化合物,其中第一ISVD和/或第二ISVD和/或可能的第三ISVD和/或可能的血清白蛋白结合性ISVD通过接头连接。

21. 根据权利要求19-20所述的化合物,其中所述接头选自以下接头组成的组:5GS、7GS、9GS、10GS、15GS、18GS、20GS、25GS、30GS和35GS。

22. 构建体,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的ISVD或根据权利要求8至21中任一项所述的化合物或者基本上由其组成,并且所述构建体还包含任选地经由一个或多个肽接头连接的一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元。

23. 根据权利要求22所述的构建体,其中所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元选自以下各项组成的组:聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、能够结合血清蛋白的结合单元、Fc部分、以及能够与血清蛋白结合的小蛋白或肽。

24. 组合物,其包含根据权利要求1-7中任一项所述的ISVD、根据权利要求8-21中任一项所述的化合物和/或根据权利要求22-23中任一项所述的构建体。

25. 根据权利要求24所述的组合物,其是药物组合物。

26. 根据权利要求25所述的组合物,其进一步包含至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂和/或佐剂,并且任选地包含一种或多种另外的药学活性多肽和/或化合物。

27. 根据权利要求24-26中任一项所述的组合物、根据权利要求22-23中任一项所述的构建体、根据权利要求1-7中任一项所述的ISVD、或根据权利要求8-21中任一项所述的化合物,其用作药物。

28. 根据权利要求24-26中任一项所述的组合物、根据权利要求22-23中任一项所述的

构建体、根据权利要求1-7中任一项所述的ISVD、或根据权利要求8-21中任一项所述的化合物,其用于治疗消化道疾病和/或病症。

29. 根据权利要求24-26中任一项所述的组合物、根据权利要求22-23中任一项所述的构建体、根据权利要求1-7中任一项所述的ISVD、或根据权利要求8-21中任一项所述的化合物,其用于治疗炎性肠病(IBD)、肠易激综合征、克罗恩病、溃疡性结肠炎、粘膜炎、口疮性口炎、乳糜泻、消化道创伤和/或消化道癌症。

30. 根据权利要求28-29中任一项所述的组合物、化合物、构建体或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体或ISVD局部施用于消化道。

31. 根据权利要求28-30中任一项所述的组合物、化合物、构建体或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体或ISVD以适合于口服施用于胃肠道(GI)的剂型口服施用。

32. 根据权利要求28-31中任一项所述的组合物、化合物、构建体或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体或ISVD以口服施用于胃肠道的剂型施用,其中所述剂型选自片剂、胶囊剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酏剂。

33. 根据权利要求28-31中任一项所述的组合物、化合物、构建体或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体或ISVD经直肠施用以治疗消化道疾病或病症。

34. 根据权利要求28-33中任一项所述的组合物、化合物、构建体或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体或ISVD以直肠施用剂型优选选自栓剂和灌肠剂经直肠施用。

35. 根据权利要求27-29中任一项所述的组合物、化合物、构建体或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体或ISVD通过皮下注射、皮内注射、静脉内注射、肌肉注射,病灶内注射或输注技术胃肠外施用。

36. 根据权利要求28-35中任一项所述的组合物、化合物、构建体或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体或ISVD到达患者的体循环。

37. 鉴定赋予ISVD对胃降解的稳定性的氨基酸残基的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 利用一种或多种蛋白酶将ISVD降解成片段;并且

b) 通过合适的手段例如LC-MS分析步骤a)的片段;

由此鉴定赋予ISVD对胃降解的稳定性的一个或多个氨基酸残基。

38. 增强ISVD对胃降解的稳定性的方法,所述方法包括权利要求37所述的步骤a)和b),接着:

c) 使赋予ISVD对胃降解的稳定性的所述一个或多个氨基酸残基突变;和

d) 重复权利要求37所述的步骤a)和b);

由此一个或多个片段的不存在表明ISVD对胃降解的稳定性增强。

39. 核酸,其编码根据权利要求1至7中任一项所述的ISVD、根据权利要求8至21中任一项所述的化合物、或根据权利要求22至23中任一项所述的构建体。

40. 表达载体,其包含权利要求39所述的核酸。

41. 宿主或宿主细胞,其包含根据权利要求38所述的核酸或根据权利要求40所述的表达载体。

42. 产生根据权利要求1至7中任一项所述的ISVD或根据权利要求8至21中任一项所述的化合物的方法,所述方法至少包括以下步骤:

a) 在合适的宿主细胞或宿主生物中或在另一合适的表达系统中表达根据权利要求39

所述的核酸序列;任选地接着是:

b) 分离和/或纯化根据权利要求1至7中任一项所述的ISVD或根据权利要求8至21中任一项所述的化合物。

改进的TNF结合剂

[0001] 概述

[0002] 本发明涉及与肿瘤坏死因子 α (“TNF”或“TNF- α ”)结合的氨基酸序列、化合物和多肽。具体而言,本发明涉及与肿瘤坏死因子 α 结合的改进的重链免疫球蛋白单可变结构域(本文也称为“ISV”或“ISVD”),以及包含此类ISVD的蛋白质、多肽和其他构建体、化合物、分子或化学实体,统称为TNF结合剂。基于本文的公开,本发明的其他方面、实施方案、特征、用途和优点对于本领域技术人员将是清楚的。

[0003] 背景

[0004] 在本申请中,免疫球蛋白重链可变结构域中的氨基酸残基/位置将用根据Kabat的编号表示。为了方便起见,图1给出了一张表格,该表格列出了本文将特别提到的一些氨基酸位置以及根据一些替代编号系统的编号。(例如Aho和IMGT,注意:除非明确指出,否则对于本说明书和权利要求书,Kabat编号是决定性的;其他编号系统仅供参考)。

[0005] 关于CDR,如本领域中众所周知的那样,存在多种惯例来定义和描述VH或VHH片段的CDR,例如Kabat定义(其基于序列变异性并且是最常用的)和Chothia定义(其基于结构环区域的位置)。例如参考网站<http://www.bioinf.org.uk/abs/>。为了本说明书和权利要求的目的,即使也可以提及根据Kabat的CDR,但CDR最优选基于Abm定义(其基于Oxford Molecular's AbM抗体建模软件),因为这样被认为是Kabat和Chothia定义之间的最佳折衷方案。再次参考网站<http://www.bioinf.org.uk/abs/>。

[0006] 炎性肠病(IBD),克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)是慢性、致残性和进行性疾病。大多数非生物药物治疗如氨基水杨酸盐、类固醇和免疫调节剂可以改进症状,但无法阻止潜在的炎症进程,也不会改变病程。抗肿瘤坏死因子- α (抗-TNF- α)剂(英夫利昔单抗,阿达木单抗,塞妥珠单抗)的出现通过改变病程(手术次数更少,住院次数更少,生活质量更好,类固醇保留,CD和UC的临床缓解和粘膜愈合率更高)以及患者的生活质量和工作效率(参见Amiot and Peyrin-Biroulet 2015 Ther Adv Gastroenterol 8:66-82)显著改变了IBD的治疗方式。这些治疗性蛋白质最常见的施用途径是注射。由于这些蛋白质中的大多数的血清半衰期短,因此需要频繁或高剂量施用才能有效。全身施用还与感染风险增加有关。这一起导致患者依从性的丧失(参见Singh等.2008 J Pharm Sci 97:2497-2523)。

[0007] 然而,不希望出现的长期副作用和机会性感染,包括结核和非霍奇金氏淋巴瘤是由广泛的免疫抑制引起的,并且是由反复全身注射当前使用的单克隆抗体治疗引起的(Al i等.,2013;Galloway等.,2011;Ford&Peyrin-Biroulet,2013;Kozuch&Hanauer,2008;Schreiber等.,2007;Syed等.,2013)。

[0008] 口服抗TNF- α 抗体应避免一些副作用。

[0009] 但是,这些抗TNF- α 剂是复杂的蛋白质。口服递送导致在胃肠(GI)道的酸性和富含蛋白酶的环境中的降解。

[0010] 在使用诱饵蛋白来保护治疗性抗体时,最近由Avaxia Biologies Inc.在溃疡性结肠炎患者中进行了包含经由口服途径施用针对人TNF α 的多克隆牛初乳抗体(AVX-470)的基于患者的研究。但是,研究已经停止。

[0011] 因此,需要新的IBD药物。

[0012] 可结合TNF的ISVD(特别是纳米抗体)及其用途在本领域中是公知的,例如来自WO 2004/041862和WO 2006/122786,其描述了针对TNF的纳米抗体及其用于预防和/或治疗与TNF- α 或TNF- α 信号传导相关和/或介导的疾病和病症,例如炎症、类风湿性关节炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、炎性肠综合征、多发性硬化、艾迪生病、自身免疫性肝炎、自身免疫性腮腺炎、1型糖尿病、附睾炎、肾小球肾炎、格雷夫斯病、吉兰-巴雷综合征、桥本病、溶血性贫血、系统性红斑狼疮、男性不育症、重症肌无力、天疱疮、银屑病、风湿热、结节病、硬皮病、舍格伦综合征、脊柱关节病、甲状腺炎和血管炎。

[0013] WO 2006/122786公开为SEQ ID NO:125的称为NC55TNF_NC7 (PMP6C11)的特异性抗TNF- α 纳米抗体。该现有技术纳米抗体的序列在下面的表A中作为SEQ ID NO:58给出。表A还给出(作为SEQ ID NO:1)该现有技术TNF结合剂的序列优化形式(本文也称为“参考A”)的序列及其CDR(根据Kabat和Abm惯例)。从图2中的比对可以看出,与SEQ ID NO:58的现有技术序列相比,该序列的优化版本包含以下突变:Q1E、A14P、Q27F、S29F、P40A、A49S、K73N、Q75K、V78L、D82aN、K83R和Q108L(根据Kabat编号)。

[0014] WO 2015/1733256涉及改进的免疫球蛋白结构域,其包含阻止所谓的先前存在的抗体(“PEA”)结合的C端延伸。WO 2015/1733256公开了作为特异性抗TNF- α 纳米抗体的SEQ ID NO:345,其在本文中也称为TNF345(SEQ ID NO:59)。从图2中的比对可以看出,与SEQ ID NO:59的现有技术序列相比,该序列的优化版本参考A包含以下突变:V11L和L89V(根据Kabat编号)。

[0015] 最近已经提出了毒素中和性美洲驼单克隆VHH抗体片段的混合物用于潜在的口服治疗(Hussack等.,2011J Biol Chem 286,8961-76.)。但是,Dumoulin等(2002Protein Sci,11,500-15),Harmsen等(2006Appl Microbiol Biotechnol,72,544-51)和Hussack等(2012Methods Mol Biol,911,417-29)指称单结构域美洲驼抗体片段似乎极易受到人胃肠道系统内蛋白水解破坏的影响。

[0016] WO 2007/025977描述了治疗慢性小肠结肠炎,涉及通过口服给予乳酸乳球菌(*L.lactis*)原位分泌抗mTNF纳米抗体。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明旨在提供改进的TNF结合剂,特别是改进的抗TNF化合物和多肽,更特别是抗-TNF ISVD,甚至更特别是改进的抗TNF纳米抗体。本发明提供的改进的TNF结合剂在本文中也称为“本发明的TNF结合剂”或“TNF结合剂”。

[0019] 更具体而言,本发明旨在提供可用于治疗消化道疾病的TNF-粘合剂,这些疾病是例如炎性肠病(IBD)、肠易激综合征、克罗恩病、溃疡性结肠炎、粘膜炎、口疮性口炎、乳糜泻,消化道创伤和消化道癌症。那些TNF-粘合剂应该优选是稳定的并且适合于口服施用。

[0020] 预计口服施用的TNF结合剂不仅可以中和消化道内腔中的TNF,而且可以进入固有层和粘膜下层,因为消化道的肠屏障可以被总的炎症和/或溃疡破坏或损害,包括但不限于牙周病,口疮性口炎,消化道的细菌、病毒、真菌或寄生虫感染,消化性溃疡,与压力或幽门螺杆菌感染相关的溃疡,由食道反流引起的损伤,炎性肠病,由消化道癌症引起的损伤,食物不耐受,包括乳糜泻,或由NSAID或其他摄入的或系统递送的药物诱导的溃疡。

[0021] 因此,本发明旨在提供改进的TNF结合剂,其是参考A的变体并且具有降低的与存

在于来自健康的人类受试者以及患者的血清中的干扰因子(通常称为“先前存在的抗体”或“PEA”)的结合。参考WO 2012/175741、WO 2013/024059以及例如Holland等(J.Clin.Immunol.2013,33(7):1192-203)以及Ablynx NV于2015年5月13日提交的共同未决公布的PCT申请WO2015/173325(申请号PCT/EP2015/060643),标题为“hnproved immunoglobulin variable domains”(改进的免疫球蛋白可变结构域)。

[0022] 如本文进一步描述的,本发明的TNF结合剂优选具有与参考A中存在的相同的CDR组合(即CDR1/CDR2和CDR3)。

[0023] 本发明的一些优选的但非限制性的TNF结合剂在图3中列为SEQ ID NO:8至41、62、63、64、65、66和69。图4显示序列SEQ ID NO:8-41与SEQ ID NO:1(参考A)和SEQ ID NO:58(PMP6C11)的比对。SEQ ID NO:22至41、62-66和69的结合物是本发明的TNF结合剂的实例,其具有C端丙氨酸延伸,即通常的C端序列VTVSS(如参考A中存在的SEQ ID NO:55)相比较,在ISVD序列的C末端具有丙氨酸残基(有时也有称为“第114位”)。如WO 2012/175741(但也例如在WO 2013/024059和WO2015/173325中)所述,该C端丙氨酸延伸可以阻止所谓的“先前存在的抗体”(假定为IgG)与位于ISVD的C端区域的推定的表位的结合。假设该表位除了其他残基之外还包括C端序列VTVSS的表面暴露的氨基酸残基以及第14位处的氨基酸残基(以及在氨基酸序列中接近/靠近其的氨基酸残基,如第11、13和15位),并且还可以包含第83位处的氨基酸残基(以及在氨基酸序列中接近/靠近其的氨基酸残基,例如第82、82a、82b和84位)和/或第108位处的氨基酸残基(以及在氨基酸序列中接近/靠近其的氨基酸残基,如第107位)。

[0024] 然而,这种C-末端丙氨酸(或一般C-末端延伸)的存在可以大大减少(在很多情况下甚至基本上完全可以预防)在一系列受试者(健康受试者以及患者二者)血清中发现的“先前存在的抗体”的结合,已经发现来自一些受试者(例如来自患有某些免疫疾病如SLE的患者的血清)的血清可以含有先前存在的抗体,即使当ISVD含有这种C端丙氨酸(或更一般地,这种C端延伸)时,也可以结合ISVD的C端区域(当这种区域暴露时)。再次提及受让人于2015年5月13日提交并且名称为“Improved immunoglobulin variable domains(改进的免疫球蛋白可变结构域)”的共同未决公布的PCT申请WO 2015/173325。

[0025] 因此,本发明的一个具体目标是提供TNF结合剂,其是本文称为“参考A”的抗TNF纳米抗体的改进变体,并且通与所谓的“先前存在的抗体”具有降低的结合,特别是WO2015/173325中描述的“先前存在的抗体”种类(即,即使存在C端延伸也可以与ISVD的暴露的C端区域结合的那些先前存在的抗体)。

[0026] 通常,本发明通过提供氨基酸序列来实现该目的,所述氨基酸序列是包含以下氨基酸残基(即与SEQ ID NO:1的序列相比的突变)的SEQ ID NO:1序列的变体:

[0027] -89T;或

[0028] -89L与11V组合;或

[0029] -89L与110K或110Q组合;或

[0030] -89L与112K或112Q组合;或

[0031] -89L与11V和110K或110Q组合;或

[0032] -89L与11V和112K或112Q组合;或

[0033] -11V与110K或110Q组合;或

- [0034] -11V与112K或112Q组合。
- [0035] 特别地,在本发明提供的TNF结合剂中:
- [0036] -第11位的氨基酸残基优选选自L或V;和
- [0037] -第89位的氨基酸残基优选选自T、V或L;和
- [0038] -第110位的氨基酸残基优选选自T、K或Q;和
- [0039] -第112位的氨基酸残基优选选自S、K或Q;
- [0040] 这样使得(i)第89位是T;或(ii)第89位是L并且第11位是V;或(iii)第89位是L并且第110位是K或Q;或(iv)第89位是L并且第112位是K或Q;或(v)第89位是L并且第11位是V并且第110位是K或Q;或(vi)第89位是L并且第11位是V并且第112位是K或Q;或(vii)第11位是V并且第110位是K或Q;或(viii)第11位是V并且第112位是K或Q。
- [0041] 在本发明提供的氨基酸序列中,第89位为T或第11位为V且第89位为L(任选地与110K或110Q突变和/或112K或112Q突变组合,并且特别是与110K或110Q突变组合)的氨基酸序列是特别优选的。甚至更优选的是其中第11位是V且第89位是L的氨基酸序列,任选地具有110K或110Q突变。
- [0042] 在一个特别优选的实施方案中,在本发明提供的TNF结合剂中,第11位的氨基酸残基是V,第89位的氨基酸残基是L,第110位的氨基酸残基是T,并且第112位的氨基酸残基是S。
- [0043] 在特别优选的实施方案中,本发明涉及TNF结合剂,如免疫球蛋白单可变结构域(ISVD),其具有:
- [0044] -作为氨基酸序列GFTFSTADMG (SEQ ID NO:5)的CDR1(根据Abm);和
- [0045] -作为氨基酸序列RISGIDGTTY (SEQ ID NO:6)的CDR2(根据Abm);和
- [0046] -作为氨基酸序列PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO:4)的CDR3(根据Abm);
- [0047] 并具有:
- [0048] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列(其中可以存在的任何C端延伸以及CDR不被考虑用于确定序列同一性程度)具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性程度;
- [0049] 和/或
- [0050] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有不超过7个,例如不超过5个,优选不超过3个,例如仅有3个,2个或1个“氨基酸差异”(如本文所定义,并且不考虑可以存在的第11、89、110或112位中的一个或多个位置的任何上述突变并且不考虑可以存在的任何C端延伸)(其中所述氨基酸差异如果存在的话可存在于框架和/或CDR中,但优选仅存在于框架中而不存在于CDR中);
- [0051] 并且
- [0052] -第11位的氨基酸残基是V;并且
- [0053] -第89位的氨基酸残基是L;并且
- [0054] -第110位的氨基酸残基是T;并且
- [0055] -第112位的氨基酸残基是S;并且
- [0056] -第49位的氨基酸残基是A;并且
- [0057] -第74位处的氨基酸残基是S。

[0058] 如上所述,由本文所述的本发明提供的氨基酸序列可以结合(并且特别是可以特异性结合)TNF。

[0059] 本发明提供的氨基酸序列优选在使用WO 04/041862中的实施例1的3)中所述的KYM细胞的基于细胞的测定中具有好于50nM,更优选地好于25nM,例如小于10nM的EC₅₀值。

[0060] 表B列出了本发明的TNF结合剂中可存在于第11、89、110和112位的氨基酸残基的一些非限制性可能组合。特别优选的组合用粗体表示,最优选的组合用粗体/下划线表示。

[0061] 然而,一方面在最小化或消除先前存在的抗体的结合位点方面和另一方面在人源化方面优化TNF结合剂的序列(“序列优化的”)后,TNF结合剂的各种性质,包括稳定性,受到(显著)负面影响。具体而言,作为物理稳定性的量度的解链温度降低,真核宿主巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*)和原核宿主大肠杆菌(*E.coli*)中的产生减少,并且GI流体中的稳定性降低。

[0062] 没有“突变返回”PEAs的结合位点和人源化突变从而危害序列优化,诸位发明人出人意料地发现氨基酸残基49和/或74可以被改变,使得两个似乎相互排斥的要求得到满足。表B-1和B-2列出了本发明的TNF结合剂中可存在于第11、89、110、112、49和/或74位的氨基酸残基的一些非限制性可能组合。

[0063] 本发明提供的TNF结合剂进一步如本文的说明书,实施例和附图中所述,即它们具有如本文所述的CDR并且与本文描述的SEQ ID NO:1的序列具有总体上的序列同一性程度(如本文所定义)和/或可以与这些参考序列(之一)具有有限数目的“氨基酸差异”(如本文所述)。

[0064] 本发明的TNF结合剂优选包含以下CDR(根据Kabat惯例):

[0065] -作为氨基酸序列TADMG(SEQ ID NO:2)的CDR1(根据Kabat);和

[0066] -作为氨基酸序列RISGIDGTTYDEPVKG(SEQ ID NO:3)的CDR2(根据Kabat);和

[0067] -作为氨基酸序列PRYADQWSAYDY(SEQ ID NO:4)的CDR3(根据Kabat)。

[0068] 或者,当根据Abm惯例给出CDR时,本发明的TNF结合剂优选包含以下CDR:

[0069] -作为氨基酸序列GFTFSTADMG(SEQ ID NO:5)的CDR1(根据Abm);和

[0070] -作为氨基酸序列RISGIDGTTY(SEQ ID NO:6)的CDR2(根据Abm);和

[0071] -作为氨基酸序列PRYADQWSAYDY(SEQ ID NO:4)的CDR3(根据Abm)。

[0072] 本发明的TNF结合剂优选还具有:

[0073] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列(其中可以存在的任何C端延伸以及CDR不被考虑用于确定序列同一性程度)具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性程度;和/或

[0074] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有不超过7个,例如不超过5个,优选不超过3个,例如仅有3个,2个或1个“氨基酸差异”(如本文所定义,并且不考虑可以存在的第11、89、110或112位中的一个或多个位置的任何上述突变并且不考虑可以存在的任何C端延伸)(其中所述氨基酸差异如果存在的话可存在于框架和/或CDR中,但优选仅存在于框架中而不存在于CDR中)。

[0075] 关于本发明提供的本发明的TNF结合剂的各个方面和优选方面,当涉及可能存在于本发明的这种结合物中的与SEQ ID NO:1的序列同一性程度和/或“氨基酸差异”的数目和种类时(即与SEQ ID NO:1的序列相比),应该注意的是,当说到(i)本发明的氨基酸序列

与SEQ ID NO:1的序列具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性程度(其中CDR,可能存在的任何C端延伸,以及对于所涉及的具体方面要求的第11、89、110和/或112位处的突变不被考虑用于确定序列同一性程度);和/或当说到(ii)本发明的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有不超过7个,优选不超过5个,例如仅仅3、2或1个“氨基酸差异”(同样,不考虑任何可能存在的C端延伸并且不考虑所涉及的具体方面要求的第11、89、110和/或112位处的突变)时,那么那么这也包括除了所涉及的具体方面要求的第11、89、110和/或112位处的突变和可能存在的任何C端延伸之外与SEQ ID NO:1的序列没有氨基酸差异的序列。

[0076] 因此,在本发明的一个具体方面,本发明的TNF结合剂可以与SEQ ID NO:1具有100%的序列同一性(包括CDR,但不考虑在此公开的第11、49、74、89、110和/或112位的突变中的一个或多个突变或组合,和/或可能存在的任何C端延伸)和/或可以与SEQ ID NO:1没有氨基酸差异(即除了在此公开的第11、89、110和/或112位的突变中的一个或多个突变或组合以及可能存在的任何C端延伸之外)。

[0077] 当存在任何氨基酸差异时(即,除了任何C端延伸和涉及本发明的特定方面所要求的第11、89、110和/或112位处的突变之外),这些氨基酸差异可以存在于CDR中和/或在框架区中,但它们优选仅存在于框架区中(如由Abm惯例所定义的,即不存在于根据Abm惯例定义的CDR中),即使得本发明的TNF结合剂具有与存在于SEQ ID NO:1中相同的CDR(根据Abm惯例定义)。

[0078] 而且,当根据本发明的任何方面的本发明的TNF结合剂与SEQ ID NO:1的序列具有一个或多个氨基酸差异时(除了涉及本发明的特定方面所要求的第11、89、110和/或112位处的突变之外),那么可能存在的这种突变/氨基酸差异(即与SEQ ID NO:1的序列相比较)的一些具体但非限制性实例是例如E1D、P40A、P40L、P40S(并且特别是P40A)、S49A、A74S、L78V、T87A或其任何合适的组合。此外,本发明的TNF结合剂可适当地包含D60A、E61D和/或P62S突变(合适的组合),特别是作为第60-62位处的ADS基序(对于非限制性实例见SEQ ID NO:39)。其他突变实例是一种或多种合适的“人源化”取代(的适当组合);例如参考WO 2009/138519(或在WO 2009/138519中引用的现有技术)和WO 2008/020079(或在WO 2008/020079中引用的现有技术中),以及来自WO 2008/020079的表A-3至A-8(其列出了可能的人源化取代)。

[0079] 在上述突变中,优选存在S49A、A74S和/或L78V突变(或其任何两种的任何适合的组合,包括其全部三种)(参见SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、41和62-63)。图5显示了SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:36-41的比对。

[0080] 而且,当本发明的TNF结合剂存在于和/或形成其存在的多肽或化合物的N-端部分时,则它们优选在第1位包含D(即与参考A相比的E1D突变)。因此,另一方面,本发明涉及本发明的多肽(其在本文中进一步描述),其在N-末端具有本发明的TNF结合剂(其在本文中进一步描述),其中本发明的所述TNF粘剂在第1位处具有D。

[0081] 类似地,当本发明的TNF结合剂以单价形式使用时,其优选具有如本文所述的C端延伸X(n)和在第1位的D两者。

[0082] SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、41和62-63给出了具有在第1位处的D和C端延伸的单价TNF结合剂的一些优选但非限制性实例,优选SEQ ID NO:36、39和40,最优选SEQ

ID NO:40。在这方面,应该注意的是,SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、41和62-63的TNF结合剂也可以用于本发明的非单价形式的化合物或多肽中。在那种情况下,SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、41和62-63的TNF结合剂优选在其N-末端具有E而不是D(即与SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、41和62-63的序列相比具有D1E突变),它们不存在于本发明的所述多肽或化合物的N-末端(相反,优选地,本发明的所述多肽或化合物的N端ISVD在位置1处具有D;而且,它们优选不包含C端延伸,如存在于SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、41和62-63中的C端丙氨酸),它们不存在于化合物或多肽的C端(相反,优选地,本发明的所述多肽或化合物的C端ISVD将具有C端延伸)。

[0083] 通过优选的但非限制性的实例,SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38和62-63也是本发明的TNF结合剂的实例,其与SEQ ID NO:1具有另外的氨基酸差异,即S49A、A74S和/或L78V。因此,在具体的方面,本发明涉及本发明的TNF结合剂(即,如本文所述在第11、89、110和/或112位处具有突变并且还如本文所述),其至少具有S49A、A74S和/或L78V突变的适当组合,并且优选这些突变中的任意两种的适当组合,例如这些突变的全部三种。

[0084] 当本发明的TNF结合剂以单价形式使用和/或当它们存在于和/或形成它们所存在的蛋白质、多肽或其它化合物或构建体的C端时(或当否则它们在这种蛋白质、多肽或其他化合物或构建体中具有“暴露的”C端时,这通常意味着ISV的C端不与恒定结构域(例如CH1结构域)结合或连接;再次参考WO 2012/175741和WO 2015/1733256),其优选还具有式(X)_n的C端延伸,其中n是1至10,优选1至5,例如作为1、2、3、4或5(并且优选1或2,如1);并且每个X是独立地选自天然存在的氨基酸残基的(优选天然存在的)氨基酸残基(尽管根据优选的一个方面,其不包含任何半胱氨酸残基),并且优选独立地选自由以下各项组成的组:丙氨酸(A),甘氨酸(G),缬氨酸(V),亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)。

[0085] 根据此类C端延伸的一些优选但非限制性实例,X和n可以如下:

[0086] (a) n=1且X=Ala;

[0087] (b) n=2并且每个X=Ala;

[0088] (c) n=3,每个X=Ala;

[0089] (d) n=2且至少一个X=Ala(其余氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸,但优选独立地选自Val,Leu和/或Ile);

[0090] (e) n=3并且至少一个X=Ala(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸,但优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)。

[0091] (f) n=3且至少两个X=Ala(其余氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸,但优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)。

[0092] (g) n=1且X=Gly;

[0093] (h) n=2并且每个X=Gly;

[0094] (i) n=3并且每个X=Gly;

[0095] (j) n=2且至少一个X=Gly(其余氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸,但优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)。

[0096] (k) n=3且至少一个X=Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸,但优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)。

[0097] (l) n=3且至少两个X=Gly(其余氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基

酸,但优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)。

[0098] (m) n=2并且每个X=Ala或Gly;

[0099] (n) n=3并且每个X=Ala或Gly;

[0100] (o) n=3且至少一个X=Ala或Gly(其余氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸,但优选独立地选自Val,Leu和/或Ile);或

[0101] (p) n=3且至少两个X=Ala或Gly(其余氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸,但优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)。

[0102] (a)、(b)、(c)、(g)、(h)、(i)、(m)和(n)是特别优选的,其中n=1或2是优选的方面,其中n=1是特别优选的。

[0103] 还应该注意的,优选地,存在于本发明的TNF结合剂中的任何C端延伸不含有(游离的)半胱氨酸残基(除非所述半胱氨酸残基被用于或预期用于进一步的官能化,例如用于聚乙二醇化)。

[0104] 有用的C端延伸的一些具体但非限制性实例是以下氨基酸序列:A,AA,AAA,G,GG,GGG,AG,GA,AAG,AGG,AGA,GGA,GAA或GAG。

[0105] 当本发明的TNF结合剂在第110位或第112位处含有突变(任选地与如本文所述的第11位和/或第89位处的突变组合)时,框架4的C端氨基酸残基(从第109位开始)可以是如下:(i)如果不存在C端延伸:VTVKS(SEQ ID NO:43),VTVQS(SEQ ID NO:44),VKVSS(SEQ ID NO:45)或VQVSS(SEQ ID NO:46);或(ii)如果存在C端延伸:VTVKSX_(n)(SEQ ID NO:47),VTVQSX_(n)(SEQ ID NO:48),VKVSSX_(n)(SEQ ID NO:49)或VQVSSX_(n)(SEQ ID NO:50),如VTVKSA(SEQ ID NO:51),VTVQSA(SEQ ID NO:52),VKVSSA(SEQ ID NO:53)或VQVSSA(SEQ ID NO:54)。当本发明的TNF结合剂在第110位或第112位处不含突变(仅含如本文所述在第11位和/或第89位处具有突变)时,框架4的C端氨基酸残基(从第109位开始)通常(i)当不存在C端延伸时:VTVSS(SEQ ID NO:55)(如在SEQ ID NO:1的序列中);或(ii)当存在C端延伸时:VTVSSX_(n)(SEQ ID NO:56),如VTVSSA(SEQ ID NO:57)。在这些C端序列中,X和n如本文对C端延伸所定义。

[0106] 从图4以及图3的比对可以看出,SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、41和62-63的TNF结合剂具有E1D突变和C端丙氨酸延伸。如上所述,第1位处的D以及C端延伸的存在使得这些TNF结合剂(和在第1位处具有D并且具有C端延伸的本发明的其他TNF结合剂)特别适用于单价形式(即为了本文所述的目的)。

[0107] 因此,另一方面,本发明涉及本发明的TNF结合剂(其在本文中进一步描述),其在第1位处具有D并且具有C端延伸X_(n)(其优选为单个Ala残基)。所述TNF结合剂优选以单价形式(使用和/或预期使用)。在一个具体方面,所述单价TNF结合剂选自SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、62、63和41。

[0108] 本发明的TNF结合剂的一些优选但非限制性实例在SEQ ID NO:8至41和62-69中给出,并且这些序列中的每一个形成本发明的另一方面(如蛋白质,多肽或包含这些序列之一的其他化合物或构建体)。

[0109] 本发明的一些特别优选的TNF结合剂是SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、41和62-63的序列(或者如本文所述,其变体在第1位具有E和/或不具有C端延伸,取决于它们在本发明的多肽或化合物中的预期用途)。

[0110] 因此,第一方面,本发明涉及免疫球蛋白单可变结构域,其具有:

[0111] -作为氨基酸序列TADMG (SEQ ID NO:2)的CDR1 (根据Kabat);和

[0112] -作为氨基酸序列RISGIDGTTYDEPVKG (SEQ ID NO:3)的CDR2 (根据Kabat);和

[0113] -作为氨基酸序列PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO:4)的CDR3 (根据Kabat)

[0114] 并具有:

[0115] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列 (其中可以存在的任何C端延伸以及CDR不被考虑用于确定序列同一性程度)具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性程度;

[0116] 和/或

[0117] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有不超过7个,例如不超过5个,优选不超过3个,例如仅有3个,2个或1个“氨基酸差异”(如本文所定义,并且不考虑可以存在的第11、89、110或112位中的一个或多个位置的任何上述突变并且不考虑可以存在的任何C端延伸) (其中所述氨基酸差异如果存在的话可存在于框架和/或CDR中,但优选仅存在于框架中而不存在于CDR中);

[0118] 并任选地具有:

[0119] -C端延伸(X)_n,其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5 (并且优选1或2,如1);并且每个X是独立地选择的 (优选天然存在的) 氨基酸残基,并且优选独立地选自以下各项组成的组:丙氨酸(A),甘氨酸(G),缬氨酸(V),亮氨酸(L)或异亮氨酸(I);

[0120] 其中:

[0121] -第11位的氨基酸残基优选选自L或V;和

[0122] -第89位的氨基酸残基优选选自T、V或L;和

[0123] -第110位的氨基酸残基优选选自T、K或Q;和

[0124] -第112位的氨基酸残基优选选自S、K或Q;

[0125] 这样使得(i)第89位是T;或(ii)第89位是L并且第11位是V;或(iii)第89位是L并且第110位是K或Q;或(iv)第89位是L并且第112位是K或Q;或(v)第89位是L并且第11位是V并且第110位是K或Q;或(vi)第89位是L并且第11位是V并且第112位是K或Q;或(vii)第11位是V并且第110位是K或Q;或(viii)第11位是V并且第112位是K或Q。

[0126] 另一方面,本发明涉及一种免疫球蛋白单可变结构域,其具有:

[0127] -作为氨基酸序列TADMG (SEQ ID NO:2)的CDR1 (根据Kabat);和

[0128] -作为氨基酸序列RISGIDGTTYDEPVKG (SEQ ID NO:3)的CDR2 (根据Kabat);和

[0129] -作为氨基酸序列PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO:4)的CDR3 (根据Kabat);

[0130] 并具有:

[0131] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列 (其中可以存在的任何C端延伸以及CDR不被考虑用于确定序列同一性程度)具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性程度;

[0132] 和/或

[0133] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有不超过7个,例如不超过5个,优选不超过3个,例如仅有3个,2个或1个“氨基酸差异”(如本文所定义,并且不考虑可以存在的第11、89、110或112位中的一个或多个位置的任何上述突变并且不考虑可以存在的任何C端延伸) (其中

所述氨基酸差异如果存在的话可存在于框架和/或CDR中,但优选仅存在于框架中而不存在于CDR中);

[0134] 并任选地具有:

[0135] -C端延伸(X)_n,其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5(并且优选1或2,如1);并且每个X是独立地选择的(优选天然存在的)氨基酸残基,并且优选独立地选自以下各项组成的组:丙氨酸(A),甘氨酸(G),缬氨酸(V),亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)。

[0136] 该免疫球蛋白单可变结构域在所提及的位置(根据Kabat编号)包含以下氨基酸残基(即,与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相比的突变):

[0137] -89T;或

[0138] -89L与11V组合;或

[0139] -89L与110K或110Q组合;或

[0140] -89L与112K或112Q组合;或

[0141] -89L与11V和110K或110Q组合;或

[0142] -89L与11V和112K或112Q组合;或

[0143] -11V与110K或110Q组合;或

[0144] -11V与112K或112Q组合。

[0145] 特别地,本发明的TNF结合剂优选与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有不超过7个,例如不超过5个,优选不超过3个,例如仅有3个,2个或1个“氨基酸差异”(如本文所定义,并且不考虑可以存在的第11、89、110或112位中的一个或多个位置的任何上述突变并且不考虑可以存在的任何C端延伸)(其中所述氨基酸差异如果存在的话可存在于框架和/或CDR中,但优选仅存在于框架中而不存在于CDR中)。

[0146] 特别地,在本发明提供的TNF结合剂中,第11位的氨基酸残基是V,第89位的氨基酸残基是L,第110位的氨基酸残基是T,并且第112位的氨基酸残基是S。

[0147] 如本文所述,可能存在的这类突变/氨基酸差异的一些具体但非限制性实例是(例如以合适的组合)例如E1D,P40A,P40L,P40S(特别是P40A),S49A,A74S,L78V,T87A或其任何合适的组合,以及例如D60A,E61D和/或P62S突变(的合适组合)(特别是作为第60-62位的ADS基序)和一个或多个合适的“人源化”取代(的合适的组合,参见例如SEQ ID NO:39)。还提到,优选存在S49A,A74S和/或L78V突变(或其任何两种的任何适合的组合,包括其全部三种)(以及当TNF结合剂存在于和/或形成本发明化合物或多肽的N末端或呈单价形式时在第1位处存在D)。

[0148] 在优选的方面,本发明的TNF结合剂例如ISVD在第49位包含丙氨酸(A49)。

[0149] 在进一步优选的方面,本发明的TNF结合剂例如ISVD在第74位处包含丝氨酸(S74)。

[0150] 在进一步优选的方面,本发明的TNF结合剂例如ISVD在第73位处包含天冬酰胺(N73)和/或第75位处包含赖氨酸(K75)。

[0151] 如在本发明中所述,第89位为T或第11位为V且第89位为L(任选地与110K或110Q突变和/或112K或112Q突变组合,并且特别是与110K或110Q突变组合)的氨基酸序列是特别优选的。甚至更优选的是其中第11位是V且第89位是L的氨基酸序列,任选地具有110K或110Q突变。

- [0152] 因此,在一个优选的方面,本发明涉及免疫球蛋白单可变结构域,其具有:
- [0153] -作为氨基酸序列TADMG (SEQ ID NO:2)的CDR1 (根据Kabat);和
- [0154] -作为氨基酸序列RISGIDGTTYDEPVKG (SEQ ID NO:3)的CDR2 (根据Kabat);和
- [0155] -作为氨基酸序列PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO:4)的CDR3 (根据Kabat)。
- [0156] 并具有:
- [0157] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列 (其中可以存在的任何C端延伸以及CDR不被考虑用于确定序列同一性程度) 具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性程度;
- [0158] 和/或
- [0159] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有不超过7个,例如不超过5个,优选不超过3个,例如仅有3个,2个或1个“氨基酸差异”(如本文所定义,并且不考虑可以存在的第11、89、110或112位中的一个或多个位置的任何上述突变并且不考虑可以存在的任何C端延伸) (其中所述氨基酸差异如果存在的话可存在于框架和/或CDR中,但优选仅存在于框架中而不存在于CDR中);
- [0160] 并任选地具有:
- [0161] -C端延伸(X)_n,其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5 (并且优选1或2,如1); 并且每个X是独立地选择的 (优选天然存在的) 氨基酸残基,并且优选独立地选自以下各项组成的组:丙氨酸(A),甘氨酸(G),缬氨酸(V),亮氨酸(L)或异亮氨酸(I);
- [0162] 其中:
- [0163] -第11位的氨基酸残基优选选自L或V;和
- [0164] -第89位的氨基酸残基是T;并且
- [0165] -第110位的氨基酸残基优选选自T、K或Q (并且优选T); 并且
- [0166] -第112位的氨基酸残基优选选自S、K或Q (并且优选S)。
- [0167] 在另一个优选的方面,本发明涉及免疫球蛋白单可变结构域,其具有:
- [0168] -作为氨基酸序列TADMG (SEQ ID NO:2)的CDR1 (根据Kabat);和
- [0169] -作为氨基酸序列RISGIDGTTYDEPVKG (SEQ ID NO:3)的CDR2 (根据Kabat);和
- [0170] -作为氨基酸序列PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO:4)的CDR3 (根据Kabat);
- [0171] 并具有:
- [0172] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列 (其中可以存在的任何C端延伸以及CDR不被考虑用于确定序列同一性程度) 具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性程度;
- [0173] 和/或
- [0174] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有不超过7个,例如不超过5个,优选不超过3个,例如仅有3个,2个或1个“氨基酸差异”(如本文所定义,并且不考虑可以存在的第11、89、110或112位中的一个或多个位置的任何上述突变并且不考虑可以存在的任何C端延伸) (其中所述氨基酸差异如果存在的话可存在于框架和/或CDR中,但优选仅存在于框架中而不存在于CDR中);
- [0175] 并任选地具有:
- [0176] -C端延伸(X)_n,其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5 (并且优选1或2,如1);

并且每个X是独立地选择的(优选天然存在的)氨基酸残基,并且优选独立地选自以下各项组成的组:丙氨酸(A),甘氨酸(G),缬氨酸(V),亮氨酸(L)或异亮氨酸(I);

[0177] 其中:

[0178] -第11位的氨基酸残基是V;并且

[0179] -第89位的氨基酸残基是L;并且

[0180] -第110位的氨基酸残基优选选自T、K或Q;和

[0181] -第112位的氨基酸残基优选选自S、K或Q。

[0182] 在一个具体但非限制性的方面,本发明的TNF结合剂在所提及的位置(根据Kabat编号)包含以下氨基酸残基(即,与SEQ ID NO:1的序列相比的突变):

[0183] -11V与89L组合;或

[0184] -11V与110K或110Q组合;

[0185] -11V与112K或112Q组合;

[0186] -11V与89L和110K或110Q组合;或

[0187] -11V与89L和112K或112Q组合;

[0188] 并具有CDR(根据Kabat)并且与本文所述的SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有总体程度的序列同一性。

[0189] 在另一个具体但非限制性的方面,本发明的TNF结合剂在所提及的位置(根据Kabat编号)包含以下氨基酸残基(即,与SEQ ID NO:1的序列相比的突变):

[0190] -89L与11V组合;或

[0191] -89L与110K或110Q组合;或

[0192] -89L与112K或112Q组合;或

[0193] -89L与11V和110K或110Q组合;或

[0194] -89L与11V和112K或112Q组合;

[0195] 并具有CDR(根据Kabat)并且与本文所述的SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有总体程度的序列同一性。

[0196] 在另一个具体但非限制性的方面,本发明的TNF结合剂在所提及的位置(根据Kabat编号)包含以下氨基酸残基(即,与SEQ ID NO:1的序列相比的突变):

[0197] -110K或110Q与11V组合;或

[0198] -110K或110Q与89L组合;或

[0199] -110K或110Q与11V和89L组合;

[0200] 并具有CDR(根据Kabat)并且与本文所述的SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有总体程度的序列同一性。

[0201] 在另一个具体但非限制性的方面,本发明的TNF结合剂在所提及的位置(根据Kabat编号)包含以下氨基酸残基(即,与SEQ ID NO:1的序列相比的突变):

[0202] -112K或112Q与11V组合;或

[0203] -112K或112Q与89L组合;或

[0204] -112K或112Q与11V和89L组合;

[0205] 并具有CDR(根据Kabat)并且与本文所述的SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有总体程度的序列同一性。

[0206] 另一方面,本发明的TNF结合剂在第89位包含T,并具有CDR(根据Kabat)并且与本文所述的SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有总体程度的序列同一性。

[0207] 另一方面,本发明的TNF结合剂在第11位处包含V并且在第89位处包含L,并具有CDR(根据Kabat)并且与本文所述的SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有总体程度的序列同一性。

[0208] 如上所述,根据上述方面的本发明的TNF结合剂优选进一步是这样的,使得它们含有S49A,A74S和/或L78V突变的合适组合,并且优选这些突变中任何两种的合适组合,例如这些突变中的全部三种(并且同样,当TNF结合剂是单价的或存在于本发明的化合物或多肽的N末端时,优选也是E1D突变)。

[0209] 另一方面,本发明涉及一种免疫球蛋白单可变结构域,其具有:

[0210] -作为氨基酸序列GFTFSTADMG (SEQ ID NO:5)的CDR1(根据Abm);和

[0211] -作为氨基酸序列RISGIDGTTY (SEQ ID NO:6)的CDR2(根据Abm);和

[0212] -作为氨基酸序列PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO:4)的CDR3(根据Abm);

[0213] 并具有:

[0214] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列(其中可以存在的任何C端延伸以及CDR不被考虑用于确定序列同一性程度)具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性程度;

[0215] 和/或

[0216] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有不超过7个,例如不超过5个,优选不超过3个,例如仅有3个,2个或1个“氨基酸差异”(如本文所定义,并且不考虑可以存在的第11、89、110或112位中的一个或多个位置的任何上述突变并且不考虑可以存在的任何C端延伸)(其中所述氨基酸差异如果存在的话可存在于框架和/或CDR中,但优选仅存在于框架中而不存在于CDR中);

[0217] 并任选地具有:

[0218] -C端延伸(X)_n,其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5(并且优选1或2,如1);并且每个X是独立地选择的(优选天然存在的)氨基酸残基,并且优选独立地选自以下各项组成的组:丙氨酸(A),甘氨酸(G),缬氨酸(V),亮氨酸(L)或异亮氨酸(I);

[0219] 其中:

[0220] -第11位的氨基酸残基优选选自L或V;和

[0221] -第89位的氨基酸残基优选选自T、V或L;和

[0222] -第110位的氨基酸残基优选选自T、K或Q;和

[0223] -第112位的氨基酸残基优选选自S、K或Q;

[0224] 这样使得(i)第89位是T;或(ii)第89位是L并且第11位是V;或(iii)第89位是L并且第110位是K或Q;或(iv)第89位是L并且第112位是K或Q;或(v)第89位是L并且第11位是V并且第110位是K或Q;或(vi)第89位是L并且第11位是V并且第112位是K或Q;或(vii)第11位是V并且第110位是K或Q;或(viii)第11位是V并且第112位是K或Q。

[0225] 另一方面,本发明涉及一种免疫球蛋白单可变结构域,其具有:

[0226] -作为氨基酸序列GFTFSTADMG (SEQ ID NO:5)的CDR1(根据Abm);和

[0227] -作为氨基酸序列RISGIDGTTY (SEQ ID NO:6)的CDR2(根据Abm);和

- [0228] -作为氨基酸序列PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO:4)的CDR3(根据Abm)；
- [0229] 并具有：
- [0230] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列(其中可以存在的任何C端延伸以及CDR不被考虑用于确定序列同一性程度)具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性程度；
- [0231] 和/或
- [0232] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有不超过7个，例如不超过5个，优选不超过3个，例如仅有3个，2个或1个“氨基酸差异”(如本文所定义，并且不考虑可以存在的第11、89、110或112位中的一个或多个位置的任何上述突变并且不考虑可以存在的任何C端延伸)(其中所述氨基酸差异如果存在的话可存在于框架和/或CDR中，但优选仅存在于框架中而不存在于CDR中)；
- [0233] 并任选地具有：
- [0234] -C端延伸(X)_n，其中n为1至10，优选1至5，例如1、2、3、4或5(并且优选1或2，如1)；并且每个X是独立地选择的(优选天然存在的)氨基酸残基，并且优选独立地选自以下各项组成的组：丙氨酸(A)，甘氨酸(G)，缬氨酸(V)，亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)；
- [0235] 该免疫球蛋白单可变结构域在所提及的位置(根据Kabat编号)包含以下氨基酸残基(即，与SEQ ID NO:1的氨基酸序列相比的突变)：
- [0236] -89T；或
- [0237] -89L与11V组合；或
- [0238] -89L与110K或110Q组合；或
- [0239] -89L与112K或112Q组合；或
- [0240] -89L与11V和110K或110Q组合；或
- [0241] -89L与11V和112K或112Q组合；或
- [0242] -11V与110K或110Q组合；或
- [0243] -11V与112K或112Q组合。
- [0244] 如上所述，当本发明的TNF结合剂以单价形式使用和/或存在于本发明化合物(如本文定义的)的C端时，TNF结合剂(以及因此得到的本发明的化合物)优选具有C端延伸X(n)，该C端延伸可以如本文对于本发明的TNF结合剂描述和/或如WO 2012/175741或WO 2015/173325中所述。
- [0245] 如在本发明中所述，第89位为T或第11位为V且第89位为L(任选地与110K或110Q突变和/或112K或112Q突变组合，并且特别是与110K或110Q突变组合)的氨基酸序列是特别优选的。甚至更优选的是其中第11位是V且第89位是L的氨基酸序列，任选地具有110K或110Q突变。
- [0246] 因此，在一个优选的方面，本发明涉及免疫球蛋白单可变结构域，其具有：
- [0247] -作为氨基酸序列GFTFSTADMG (SEQ ID NO:5)的CDR1(根据Abm)；和
- [0248] -作为氨基酸序列RISGIDGTTY (SEQ ID NO:6)的CDR2(根据Abm)；和
- [0249] -作为氨基酸序列PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO:4)的CDR3(根据Abm)；
- [0250] 并具有：
- [0251] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列(其中可以存在的任何C端延伸以及CDR不被考虑用

于确定序列同一性程度) 具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性程度;

[0252] 和/或

[0253] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有不超过7个,例如不超过5个,优选不超过3个,例如仅有3个,2个或1个“氨基酸差异”(如本文所定义,并且不考虑可以存在的第11、89、110或112位中的一个或多个位置的任何上述突变并且不考虑可以存在的任何C端延伸)(其中所述氨基酸差异如果存在的话可存在于框架和/或CDR中,但优选仅存在于框架中而不存在于CDR中);

[0254] 并任选地具有:

[0255] -C端延伸(X)_n,其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5(并且优选1或2,如1);并且每个X是独立地选择的(优选天然存在的)氨基酸残基,并且优选独立地选自由以下各项组成的组:丙氨酸(A),甘氨酸(G),缬氨酸(V),亮氨酸(L)或异亮氨酸(I);

[0256] 其中:

[0257] -第11位的氨基酸残基优选选自L或V;和

[0258] -第89位的氨基酸残基是T;并且

[0259] -第110位的氨基酸残基优选选自T、K或Q(并且优选T);和

[0260] -第112位的氨基酸残基优选选自S、K或Q(并且优选S)。

[0261] 在另一个优选的方面,本发明涉及免疫球蛋白单可变结构域,其具有:

[0262] -作为氨基酸序列GFTFSTADMG (SEQ ID NO:5)的CDR1(根据Abm);和

[0263] -作为氨基酸序列RISGIDGTTY (SEQ ID NO:6)的CDR2(根据Abm);和

[0264] -作为氨基酸序列PRYADQWSAYDY (SEQ ID NO:4)的CDR3(根据Abm);

[0265] 并具有:

[0266] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列(其中可以存在的任何C端延伸以及CDR不被考虑用于确定序列同一性程度)具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性程度;

[0267] 和/或

[0268] -与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有不超过7个,例如不超过5个,优选不超过3个,例如仅有3个,2个或1个“氨基酸差异”(如本文所定义,并且不考虑可以存在的第11、89、110或112位中的一个或多个位置的任何上述突变并且不考虑可以存在的任何C端延伸)(其中所述氨基酸差异如果存在的话可存在于框架和/或CDR中,但优选仅存在于框架中而不存在于CDR中);

[0269] 并任选地具有:

[0270] -C端延伸(X)_n,其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5(并且优选1或2,如1);并且每个X是独立地选择的(优选天然存在的)氨基酸残基,并且优选独立地选自由以下各项组成的组:丙氨酸(A),甘氨酸(G),缬氨酸(V),亮氨酸(L)或异亮氨酸(I);

[0271] 其中:

[0272] -第11位的氨基酸残基是V;和

[0273] -第89位的氨基酸残基是L;并且

[0274] -第110位的氨基酸残基优选选自T、K或Q;和

[0275] -第112位的氨基酸残基优选选自S、K或Q。

[0276] 在一个具体但非限制性的方面,本发明的TNF结合剂在所提及的位置(根据Kabat编号)包含以下氨基酸残基(即,与SEQ ID NO:1的序列相比的突变):

[0277] -11V与89L组合;或

[0278] -11V与110K或110Q组合;

[0279] -11V与112K或112Q组合;

[0280] -11V与89L和110K或110Q组合;或

[0281] -11V与89L和112K或112Q组合;

[0282] 并具有CDR(根据Abm)并且与本文所述的SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有总体程度的序列同一性。

[0283] 在另一个具体但非限制性的方面,本发明的TNF结合剂在所提及的位置(根据Kabat编号)包含以下氨基酸残基(即,与SEQ ID NO:1的序列相比的突变):

[0284] -89L与11V组合;或

[0285] -89L与110K或110Q组合;或

[0286] -89L与112K或112Q组合;或

[0287] -89L与11V和110K或110Q组合;或

[0288] -89L与11V和112K或112Q;

[0289] 并具有CDR(根据Abm)并且与本文所述的SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有总体程度的序列同一性。

[0290] 在另一个具体但非限制性的方面,本发明的TNF结合剂在所提及的位置(根据Kabat编号)包含以下氨基酸残基(即,与SEQ ID NO:1的序列相比的突变):

[0291] -110K或110Q与11V组合;或

[0292] -110K或110Q与89L组合;或

[0293] -110K或110Q与11V和89L组合;

[0294] 并具有CDR(根据Abm)并且与本文所述的SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有总体程度的序列同一性。

[0295] 在另一个具体但非限制性的方面,本发明的TNF结合剂在所提及的位置(根据Kabat编号)包含以下氨基酸残基(即,与SEQ ID NO:1的序列相比的突变):

[0296] -112K或112Q与11V组合;或

[0297] -112K或112Q与89L组合;或

[0298] -112K或112Q与11V和89L组合;

[0299] 并具有CDR(根据Abm)并且与本文所述的SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有总体程度的序列同一性。

[0300] 另一方面,本发明的TNF结合剂在第89位包含T,并具有CDR(根据Abm)并且与本文所述的SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有总体程度的序列同一性。

[0301] 另一方面,本发明的TNF结合剂在第11位处包含V并且在第89位处包含L,并具有CDR(根据Abm)并且与本文所述的SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有总体程度的序列同一性。

[0302] 如上所述,根据上述方面的本发明的TNF结合剂优选进一步是这样的,使得它们含有S49A,A74S和/或L78V突变的合适组合,并且优选这些突变中任何两种的合适组合,例如

这些突变中的全部三种(并且同样,当TNF结合剂是单价的或存在于本发明的化合物或多肽的N末端时,优选也是E1D突变)。

[0303] 在另一个具体但非限制性的方面,本发明涉及如本文所述的单价形式的TNF结合剂,并且特别涉及如本文所述的TNF结合剂,其为单价形式并且在第1位上具有D(和/或E1D突变)并具有如本文所述的C端延伸X(n)(如C端丙氨酸残基)。

[0304] 在另一个具体但非限制性的方面,本发明涉及免疫球蛋白单可变结构域,其是或基本上由选自以下氨基酸序列之一的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO 19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:68。

[0305] 在另一个具体但非限制性的方面,本发明涉及免疫球蛋白单可变结构域,其是或基本上由选自以下氨基酸序列之一的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:68。

[0306] 为了本发明的目的,消化道由口、咽、食道、胃、小肠(十二指肠、空肠、回肠)、大肠(盲肠、结肠、直肠)和肛门组成。

[0307] 为了本发明的目的,“胃肠道”或“GI道”被理解为包括胃、小肠(十二指肠、空肠、回肠)、大肠(盲肠、结肠、直肠)和肛门。术语“胃消化”应理解为描述胃、小肠和/或大肠中的消化。

[0308] 术语“胃降解”指本发明的ISVD、化合物或多肽在胃、小肠、大肠中通过存在于胃、小肠和大肠中的内源性或外源性酶或由于暴露于胃消化过程中的酸性条件而被降解。

[0309] 术语“稳定的ISVD”、“稳定的化合物”和“稳定的多肽”应理解为分别描述了ISVD、化合物或多肽,所述ISVD、化合物或多肽已被工程化以使其在局部施用时在消化道中对于降解更稳定。与未根据本发明加工或工程化的ISVD、化合物或多肽相比,根据本发明工程化的稳定化的ISVD、化合物或多肽通过胃消化(如由存在于胃、小肠和大肠中的内源性或外源性酶和/或胃中存在的酸性条件消化)更缓慢或较小程度地降解。“稳定的ISVD”、“稳定的化合物”和“稳定的多肽”也被称为“对胃肠道中的降解具有增强的稳定性的ISVD”,“对胃肠道降解具有增强的稳定性的化合物”和“对胃肠道中的降解具有增强的稳定性的多肽”。

[0310] 局部施用ISVD、化合物或多肽至消化道是具有挑战性的,因为消化道降解并消化局部应用的ISVD、化合物和多肽。在胃中,低pH和胃蛋白酶降解摄入ISVD、化合物和多肽。在小肠中,除其他之外,胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶等降解摄入的ISVD、化合物和多肽。在大肠中,细菌衍生的蛋白酶降解摄入的ISVD、化合物和多肽。具有改进的胃消化稳定性的ISVD、化合物和多肽对于局部应用于胃肠道将是优选的。

[0311] 稳定的ISVD、化合物和多肽可以通过将对胃降解敏感的一个或多个氨基酸残基突变成耐胃降解的氨基酸残基来产生。稳定的ISVD、化合物和多肽可以通过增加对胃降解的

稳定性的多个氨基酸残基部分的突变而产生。

[0312] 因此,本发明涉及鉴定赋予本发明TNF结合剂稳定性并增强TNF结合剂的稳定性的氨基酸残基。优选地,使得TNF结合剂对一种或多种低pH条件或蛋白酶如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和/或细菌衍生蛋白酶中的一种或多种的活性的胃降解更具抗性。

[0313] 在一个实施方案中,本发明涉及鉴定赋予ISVD、化合物或多肽对胃降解的稳定性的氨基酸残基的方法,其包括以下步骤:(a)通过一种或多种蛋白酶将ISVD、化合物或多肽降解成片段;和(b)通过合适的手段如LC-MS分析分析步骤(a)的片段;由此鉴定赋予ISVD、化合物或多肽对胃降解的稳定性的氨基酸残基。

[0314] 在一个实施方案中,本发明涉及增强ISVD、化合物或多肽对胃降解的稳定性的方法,包括以上步骤(a)和(b),接着:(c)突变赋予ISVD、化合物或多肽对胃降解的稳定性的一个或多个氨基酸残基;和(d)重复上述步骤(a)和(b);由此不存在一个或多个片段表明ISVD、化合物或多肽对胃降解的稳定性增强。

[0315] 在本说明书中:

[0316] -术语“免疫球蛋白单可变结构域”(也称为“ISV”或ISVD)通常用于指可以形成功能性抗原结合位点而不与另一可变结构域相互作用(例如没有常规4-链单克隆抗体的VH和VL结构域之间所需的VH/VL相互作用)的免疫球蛋白可变结构域(其可以是重链或轻链结构域,包括VH、VHH或VL结构域)。技术人员将清楚ISVD的实例并且例如包括纳米抗体(包括VHH,人源化VHH和/或骆驼化VH如骆驼化人VH)、IgNAR、结构域、(单结构域)抗体(例如dAb's™)(其是VH结构域或衍生自VH结构域)和(单结构域)抗体(例如dAb's™)(其是VL结构域或衍生自VL结构域)。除非在本文中另外明确提及,否则通常优选基于和/或衍生自重链可变结构域(例如VH或VHH结构域)的ISVD。最优选地,除非在本文中另外明确指出,ISVD将是纳米抗体。

[0317] -术语“纳米抗体”通常如WO 2008/020079或WO 2009/138519中所定义的,并且因此在此在特定方面通常表示VHH、人源化VHH或骆驼化VH(例如骆驼化人VH)或通常序列优化的VHH(例如针对化学稳定性和/或溶解度进行优化,与已知的人框架区最大重叠和最大表达)。注意到术语纳米抗体或纳米抗体是Ablynx N.V.的注册商标,因此也可以被称为Nanobody®和/或Nanobodies®。

[0318] -通常,除非本文另外指出,否则本文提及的ISVD、纳米抗体、多肽、蛋白质和其他化合物和构建体将预期用于预防或治疗人(和/或任选地也用于温血动物和特别是哺乳动物)的疾病或病症。因此,通常,本文描述的ISVD、纳米抗体、多肽、蛋白质和其他化合物和构建体优选是这样的,使得它们可以用作(生物)药物或其他药学或治疗活性化合物和/或药物产品或组合物或可以适当地作为其一部分。这样的药物、化合物或产品优选适合施用于人,例如用于预防或治疗需要这种预防或治疗的受试者或例如作为临床试验的一部分。如本文进一步描述的,为此目的,除了本发明提供的ISVD之外,这样的药物或化合物可以含有其它部分、实体或结合单元(其也如本文中所述可以例如是一个或多个其它治疗性部分和/或一个或多个影响基于ISVD或纳米抗体的生物制剂的药代动力学或药效学性质(例如其半衰期)的其他部分)。这种进一步的治疗或其他部分的合适实例对技术人员来说是清楚的,例如通常可以包括任何治疗活性蛋白、多肽或其他结合结构域或结合单元,以及例如修饰例如WO 2009/138159的第149至152页描述的那些。基于ISVD的生物制剂或基于纳米抗体的

生物制剂优选是治疗剂或预期用作治疗剂(其包括预防和诊断),并且为此优选含有至少一个针对治疗相关靶的ISVD(例如RANK-L、vWF、IgE、RSV、CXCR4、IL-23或其他白细胞介素等)。对于这种基于ISVD或纳米抗体的生物制剂的一些具体但非限制性的例子,参考实施例8至18,并且还例如Ablynx N.V.的各申请。(例如但不限于WO 2004/062551,WO 2006/122825,WO 2008/020079和WO 2009/068627)以及例如(并且不限于)诸如WO 2006/038027,WO 2006/059108,WO 2007/063308,WO 2007/063311,WO 2007/066016和WO 2007/085814。而且,如本文进一步描述的,所述另外的部分可以是本文所述的针对(人)血清蛋白如(人)血清白蛋白的ISVD或纳米抗体,并且此类ISVD或纳米抗体也可以找到治疗用途,特别是在延长本文所述TNF结合剂的半衰期中使用和/或用于延长本文所述TNF结合剂的半衰期。例如参考WO 2004/041865,WO 2006/122787和WO 2012/175400,其通常描述了血清-白蛋白结合性纳米抗体用于延长半衰期的用途。而且,在本说明书中,除非本文另有明确提及,否则本文提及的所有术语具有在WO 2009/138519(或在WO 2009/138519中引用的现有技术)或WO 2008/020079(或在WO 2008/020079中引用的现有技术中)给出的含义。此外,在本文没有具体描述方法或技术的情况下,其可以如WO 2009/138519(或在WO 2009/138519中引用的现有技术中)或WO 2008/020079(或在WO 2008/020079中引用的现有技术中)进行。而且,如本文所述,包含本发明的任何ISVD或化合物的任何药物产品或组合物还可包含本身已知用于药物产品或组合物中的一种或多种其他组分(即取决于预期的药物形式)和/或例如用于治疗用途的一种或多种其他化合物或活性成分(即提供组合产品)。

[0319] 而且,当在本说明书或权利要求书中使用时,以下术语具有与在WO 2009/138519的第62-75页中描述的方式相同的含义和/或在适用的情况下可以其中描述的方式确定:“激动剂”,“拮抗剂”,“反向激动剂”,“非极性不带电荷的氨基酸残基”,“极性不带电的氨基酸残基”,“极性带电的氨基酸残基”,“序列同一性”,“完全相同”和“氨基酸差异(表示两个氨基酸序列的序列比较时)”,“(以)基本上分离(的形式)”,“结构域”,“结合结构域”,“抗原决定簇”,“表位”,“针对”或“直接针对”(抗原),“特异性”和“半衰期”。另外,术语“进行调节”和“调节”,“相互作用位点”,“特异性”,“交叉阻断”,“交叉阻断的”和“进行交叉阻断”和“基本上不依赖于pH”是如在Ablynx NV的WO 2010/130832的第74-79页上定义的(和/或可以如其描述确定的)。此外,当提及本发明的构建体、化合物、蛋白质或多肽时,诸如“单价”、“二价”(或“多价”),“双特异性”(或“多特异性”)和“双互补位”(或“多互补位”)可以具有在WO 2009/138519,WO 2010/130832或WO 2008/020079中给出的含义。

[0320] 这里涉及的ISVD、纳米抗体、基于ISVD的生物制剂、基于纳米抗体的生物制剂或任何其他氨基酸序列、化合物或多肽的术语“半衰期”通常可以如在WO2008/020079的第57页段落o)中所述定义,并且如其中提到的是指氨基酸序列、化合物或多肽的血清浓度在体内例如由于序列或化合物的降解和/或通过天然机制清除或螯合序列或化合物而降低50%所花费的时间。本发明的氨基酸序列、化合物或多肽的体内半衰期可以以本身已知的任何方式确定,例如通过药代动力学分析。合适的技术对于本领域技术人员将是清楚的,并且可以例如通常如WO 2008/020079的第57页的段落o)中所述。也如WO 2008/020079的第57页段o)段所述,可以使用诸如 $t_{1/2-\alpha}$, $t_{1/2-\beta}$ 和曲线下面积(AUC)的参数来表示半衰期。在这方面,应该注意的是,本文所用的术语“半衰期”特别是指 $t_{1/2-\beta}$ 或终末半衰期(其中 $t_{1/2-\alpha}$ 和/或AUC或二者可以不要考虑)。例如参考下面的实验部分以及标准手册,例如Kenneth, A等:

Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and Peters等, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996)。也参考“Pharmacokinetics”, M Gibaldi & D Perron, published by Marcel Dekker, 2nd Rev. edition (1982)。类似地, 术语“增加半衰期”或“增加的半衰期”也如WO 2008/020079第57页第o)段中所定义, 特别是指 $t_{1/2-\beta}$ 的增加, 或者伴或不伴 $t_{1/2-\alpha}$ 和/或AUC或两者的增加。

[0321] 因此, 一方面, 本发明涉及如本文所述的化合物, 其中所述化合物还包含血清蛋白结合性部分。

[0322] 另一方面, 本发明涉及如本文所述的化合物, 其中所述血清蛋白结合性部分结合血清白蛋白。

[0323] 当术语在本文中沒有具体定义时, 其具有其在本领域中通常的含义, 这对于本领域技术人员来说是显而易见的。例如参考标准手册, 例如 Sambrook等, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (2nd. Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel等., eds., “Current protocols in molecular biology”, Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987); Lewin, “Genes II”, John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old等., “Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering”, 2nd edition, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt等., “Immunology” (6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt等., Roitt’s Essential Immunology, 10th Ed. Blackwell Publishing, UK (2001); and Janeway等., “Immunobiology” (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005), 以及本文引用的一般背景技术。

[0324] 而且, 如本文中已经指出的, 纳米抗体的氨基酸残基根据由Kabat等人 (“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91) 给出的VH的通用编号进行编号, 如在文章 Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000 Jun 23; 240 (1-2): 185-195中应用于来自 Camelids的VHH结构域; 或在此引用。根据该编号, 纳米抗体的FR1包含第1-30位的氨基酸残基, 纳米抗体的CDR1包含第31-35位的氨基酸残基, 纳米抗体的FR2包含第36-49位的氨基酸残基, 纳米抗体的CDR2包含第50-65位的氨基酸残基, 纳米抗体的FR3包含第66-94位的氨基酸残基, 纳米抗体的CDR3包含第95-102位的氨基酸残基, 并且纳米抗体的FR4包含第103-113位的氨基酸残基。[在这方面, 应该注意的是-如本领域熟知的VH结构域和VHH结构域-每个CDR中氨基酸残基的总数可以变化并且可以不对应于由Kabat编号指示的氨基酸残基总数 (即, 根据Kabat编号的一个或多个位置可以不被实际序列占据, 或者实际序列可以含有比Kabat编号所允许的数量更多的氨基酸残基)。这意味着, 通常地, 根据Kabat的编号可以与实际序列中氨基酸残基的实际编号相对应或不对应。然而, 通常地, 根据Kabat的编号并且不考虑CDR中氨基酸残基的数量, 根据Kabat编号的第1位对应于FR1的起始, 反之亦然, 根据Kabat编号的第36位对应于FR2的起始, 反之亦然, 根据Kabat编号的第66位对应于FR3的起始, 反之亦然, 根据Kabat编号的第103位对应于FR4的起始, 反之亦然。]

[0325] 用于对VH结构域的氨基酸残基编号的替代方法, 所述方法也可以以类似的方式应用于来自骆驼科动物的VHH结构域和应用于纳米抗体, 是 Chothia等. (Nature 342, 877-883 (1989)), 所谓的“AbM定义”和所谓的“contact定义”描述的方法。然而, 在本说明书、方面和

附图中,除非另有说明,否则将遵循由Riechmann和Muyldermans适用于VHH结构域的根据Kabat的编号。

[0326] 还应该注意的,附图、任何列表和实验部分/实施例仅用于进一步说明本发明,并且不应被解释或阐释为以任何方式限制本发明和/或所附权利要求的范围,除非另有明确说明。

[0327] 本发明还涉及包含如本文所述的本发明的TNF结合剂或基本上由其组成的蛋白质、多肽和其他构建体、分子或化学实体(即,包含一种或多种此类TNF结合剂或基本上其组成,例如一种、两种或三种这样的TNF结合剂);涉及用于表达/产生本发明的TNF结合剂和/或用于表达/产生包含本发明的TNF结合剂的蛋白质、多肽和其他构建体、分子或化学实体的方法;涉及包括本发明的TNF结合剂和/或包含本发明的TNF结合剂的蛋白质、多肽和其他构建体、分子或化学实体的组合物和产品(例如药物组合物和产品);涉及编码本发明的TNF结合剂和/或编码包含本发明的TNF结合剂的蛋白质或多肽的核苷酸序列和核酸;并且涉及本发明的TNF结合剂和包含本发明的TNF结合剂的蛋白质、多肽和其他构建体、分子或化学实体的用途(并且特别是治疗,预防和诊断用途)。

[0328] 根据本文的进一步描述,本发明的这些和其他方面、实施方案、优点、应用和用途将变得清楚。

[0329] 因此,另一方面,本发明涉及蛋白质(例如融合蛋白)、多肽、构建体、化合物或其他化学实体,其包含至少一种(例如一种、两种或三种)本发明的TNF结合剂或基本上由其组成(本文也统称为“本发明的化合物”,“本发明的多肽”,“本发明的构建体”或“本发明的融合蛋白”)。因此,本发明的化合物可以是多肽。

[0330] 除了本发明的一种或多种TNF结合剂之外,本发明的这些化合物还可以包含一种或多种其他氨基酸序列、化学实体或部分。这些其他氨基酸序列、化学实体或部分可赋予本发明的(所得)化合物一种或多种期望的性质和/或可以以期望的方式改变本发明的(所得)化合物的性质,例如给本发明的(所得)化合物提供所需生物学和/或治疗活性(例如,给本发明所得化合物提供针对另一种治疗相关靶标的亲和力并且优选是效力,使得所得化合物对于TNF和其他治疗相关靶标变成“双特异性”),提供期望的半衰期和/或(以其他方式)修饰或改进药代动力学和/或药效学性质,使本发明的化合物靶向特异细胞、组织或器官(包括癌症和癌症细胞),提供细胞毒性作用和/或用作可检测标签或标记。这些其他氨基酸序列、化学实体或部分的一些非限制性实例是:

[0331] -一种或多种合适的接头(例如9GS、15GS或35GS接头);和/或

[0332] -一种或多种针对除TNF以外的治疗相关靶标的结合结构域或结合单元(即,给本发明化合物提供对TNF和另一种治疗相关靶标双重特异性);和/或

[0333] -提供半衰期增加的一种或多种结合结构域或结合单元(例如,能够结合血清蛋白如血清白蛋白的结合结构域或结合单元);和/或

[0334] -将本发明化合物靶向期望的细胞、组织或器官(例如癌细胞)的一种或多种结合结构域或结合单元;和/或

[0335] -提供增加的针对TNF的特异性的一种或多种结合结构域或结合单元(通常,这些能够结合TNF但通常本身基本上不具有针对TNF的功能);和/或

[0336] -允许本发明的化合物内化到(所需)细胞(例如WO 2005/044858中所述的内化抗

EGFR纳米抗体)中的结合结构域、结合单元或其他化学实体;和/或

[0337] -改进半衰期的部分例如合适的聚乙二醇基团(即聚乙二醇化)或提供增加的半衰期的氨基酸序列,例如人血清白蛋白或其合适片段(即白蛋白融合)或例如WO 2008/068280中所述的血清白蛋白合性肽;和/或

[0338] -有效载荷如细胞毒性有效载荷;和/或

[0339] -可检测的标记或标签,例如放射性标记或荧光标记;和/或

[0340] -可帮助固定、检测和/或纯化本发明化合物的标签(例如HIS或FLAG3标签)和/或

[0341] -可以被功能化的标签,例如C端GGC或GGGC标签;和/或

[0342] -C端延伸X(n),其可以如本文进一步描述用于本发明的TNF结合剂和/或如WO 2012/175741或WO 2015/173325中所述。

[0343] 虽然通常较不优选,但本发明的范围也不排除本发明化合物还可含有(优选人)常规抗体(例如Fc部分或其功能片段或一个或多个恒定结构域)的一个或多个部分或片段和/或仅来自骆驼化抗重链的抗体(例如一个或多个恒定结构域)。

[0344] 在一个具体的方面,本发明涉及包含本文定义的ISVD或本文定义的化合物或基本上由其组成的构建体,并且其还包含一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元,任选地通过一个或多个肽接头连接。

[0345] 在进一步的具体方面,本发明涉及如本文所定义的构建体,其中所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元选自由以下各项组成的组:聚乙二醇分子,血清蛋白或其片段,能够结合血清蛋白的结合单元,Fc部分和能够结合血清蛋白的小蛋白或肽。

[0346] 当本发明化合物含有一种或多种另外的结合结构域或结合单元(例如提供针对TNF的增加的特异性的另一种基本上非功能性的针对TNF的结合结构域或结合单元,针对除TNF以外的治疗靶标的结合结构域或结合单元,针对提供增加的半衰期的靶标例如人血清白蛋白的结合结构域或结合单元,和/或将本发明化合物靶向特异细胞、组织或器官的结合结构域或结合单元,和/或允许本发明的化合物内化到细胞中的结合结构域或结合单元)时,这些其他结合结构域或结合单元优选包含一种或多种ISVD,更优选全部是ISVD。例如但不限于,这些一种或多种另外的结合结构域或结合单元可以是一种或多种纳米抗体(包括VHH,人源化VHH和/或骆驼化VH如骆驼化人VH),作为VH结构域的(单一结构域)抗体或来源于VH结构域的(单一结构域)抗体,作为VH结构域的dAb或基本上由VH结构域组成的dAb或来源于VH结构域的dAb,或者甚至是作为VL结构域的(单一)结构域抗体或基本上由VL结构域组成的dAb。特别地,当存在时,这些一种或多种结合结构域或结合单元可以包含一个种或多种纳米抗体,更特别是全部纳米抗体。

[0347] 当本发明化合物在其C末端具有ISVD(该C端ISVD可以是本发明的TNF结合剂,或者例如如果存在于本发明化合物中则可以是另一种基本上无功能的提供针对TNF的增加的特异性的ISVD,针对除TNF以外的治疗靶标的ISVD,针对靶标例如人血清白蛋白的提供增加的半衰期的ISVD,或使本发明化合物靶向特异细胞、组织或器官的ISVD和/或允许本发明化合物内化到细胞中的ISVD)时,则本发明化合物(即所述C端ISVD)优选具有C端延伸X(n),其C-端延伸可以如本文对于本发明的TNF结合剂描述和/或如WO 2012/175741或WO 2015/173325中所述。

[0348] 当本发明化合物除本发明的一种或多种TNF结合剂之外还含有任何其他ISVD(如

所提及的,一种或多种其他ISVD可以是另一种基本上无功能的提供针对TNF的增加的特异性的ISVD,针对除TNF以外的治疗靶标的ISVD,针对靶标例如人血清白蛋白的提供增加的半衰期的ISVD,和/或使本发明化合物靶向特异细胞、组织或器官的ISVD和/或允许本发明化合物内化到细胞中的ISVD),并且其中此类其他ISVD是纳米抗体或是基本上由VH序列组成和/或源自VH序列的ISVD,则根据对于本发明的优选方面,存在于本发明化合物中的所述一种或多种(并且优选全部)另外的ISVD将在其序列中包含减少其与先前存在的抗体的结合的一个或多个框架突变。具体而言,根据本发明的这一方面,此类其他ISVD可在如WO 2015/173325中所述的和/或基本上如本文对本发明的TNF结合剂所述的第11、89、110和/或112位处包含氨基酸残基/突变(的合适的组合)。在一个具体的方面,当本发明的化合物在其C末端具有这样的ISVD(即,在其C末端不具有本发明的TNF结合剂)时,则存在于和/或形成C-末端的所述ISVD至少具有减少先前存在的抗体的结合的框架突变(并且如本文所述,所述C端ISVD优选还具有C端延伸X(n))。

[0349] 如上所述,当本发明化合物具有增加的半衰期(即与本发明的单价TNF结合剂相比)时,本发明化合物优选含有至少一个(例如一个)提供这种增加的半衰期的ISVD(并且特别是纳米抗体)。这种ISVD通常直接针对合适的血清蛋白如转铁蛋白,特别是针对(人)血清白蛋白。具体而言,这种ISVD或纳米抗体可以是例如EP 2139918、WO 2011/006915、WO 2012/175400、WO 2014/111550中所述的针对人血清白蛋白的(单)结构域抗体或dAb,并且可以特别是如WO 2004/041865、WO 2006/122787、WO 2012/175400或WO2015/173325中所述的血清白蛋白结合性纳米抗体。特别优选的血清白蛋白结合性ISVD是纳米抗体A1b-1(参见WO 2006/122787)或其人源化变体,例如A1b-8(WO 2006/122787,SEQ ID NO:62),A1b-23(WO 2012/175400,SEQ ID NO:1)和A1b-1的其他人源化(并且优选经序列优化)变体和/或A1b-8或A1b-23的变体(或更一般地具有与A1b-1,A1b-8和A1b-23相同的CDR的ISVD)。

[0350] 同样,如上所述,当存在这样的血清白蛋白结合性ISVD时,其序列中可以包含一个或多个与减少先前存在的抗体的结合的框架突变。特别地,当这样的血清白蛋白结合性ISVD是纳米抗体或基本由VH结构域组成和/或来源于VH结构域的(单)结构域抗体时,血清白蛋白结合性ISVD可以如WO 2015/173325中所述的和/或基本上如本文对本发明的TNF结合剂所述的第11、89、110和/或112位处包含氨基酸残基/突变(的合适的组合)。例如,WO 2015/173325描述了A1b-1、A1b-8和A1b-23的许多变体,所述变体在第11、89、110和/或112位包含氨基酸残基/突变,其减少了可以用于本发明的化合物中的先前存在的抗体的结合。

[0351] 在本发明的一个具体但非限制性的方面,本发明提供了本发明的化合物,例如本发明的多肽,除了一个或多个构建块例如结合TNF的ISVD之外,还包至少一个构建块结合性血清白蛋白如血清白蛋白结合性ISVD(优选如本文所述结合人血清白蛋白),其中所述血清白蛋白结合性ISVD基本上由4个构架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1为SFGMS,CDR2为SISGSGSDTLYADSVKG,CDR3为GGGSLSR。优选地,所述结合人血清白蛋白的ISVD选自由以下各项组成的组:A1b8、A1b23、A1b129、A1b132、A1b11、A1b11(S112K)-A、A1b82、A1b82-A、A1b82-AA、A1b82-AAA、A1b82-G、A1b82-GG、A1b82-GGG、A1b92或A1b223(参见表D)。

[0352] 同样,当这种血清白蛋白结合性ISVD存在于本发明化合物的C端时,血清白蛋白结合性ISVD(并且因此本发明化合物)优选具有C端延伸X(n),该C端延伸可以如本文对于本发

明的TNF结合剂描述和/或如WO2012/175741或WO 2015/173325中所述。其还优选具有减少先前存在的抗体的结合的突变,例如WO2015/173325中所述的第11、89、110和/或112位处的氨基酸残基/突变(的合适组合)。

[0353] 然而,如上所述,增加本发明化合物半衰期的其他方法(例如PEG化,与人白蛋白或其合适片段融合或使用合适的血清白蛋白结合性肽)虽然不太优选也包括在本发明的范围内。

[0354] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的化合物,其中所述血清蛋白结合性部分是基于非抗体的多肽。

[0355] 在另一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的化合物,其还包含PEG。

[0356] 通常,当本发明化合物具有增加的半衰期时(例如通过存在增加半衰期的ISVD或增加半衰期的任何其他合适方式)时,所得本发明化合物优选具有半衰期(如本文所定义),其比本发明的单价TNF结合剂的半衰期大至少2倍,优选至少5倍,例如至少10倍或大于20倍(如在人和/或合适的动物模型例如小鼠或食蟹猴中测量的)。特别地,本发明化合物在人受试者中优选具有至少1天,优选至少3天,更优选至少7天,如至少10天的半衰期(如本文所定义)。

[0357] 从本文的公开内容将清楚的是,基于一种或多种ISVD的本发明化合物可以具有不同的“形式”,例如,基本上是单价的,二价的或三价的,可以是单特异性的,双特异性的,三特异性等,并且可以是双互补位的(如本文和例如WO 2009/068625中所定义的)。例如,本发明的化合物可以是:

[0358] -(基本上)单价的,即(基本上)包含本发明的单一TNF结合剂。如上所述,当以单价形式使用时,本发明的TNF结合剂优选具有本文进一步描述的C端延伸X(n)。本发明的这种化合物也可以是半衰期延长的;

[0359] -(基本上)二价或三价和单特异性。本发明的这种化合物将包含两种或更多种针对TNF的ISVD,其可以相同或不同,并且当不同时针对TNF上的相同表位或针对TNF上的不同表位(在后一种情况下,以便提供本发明的双互补位或多互补位化合物)。本发明的这种化合物也可以是半衰期延长的;

[0360] -(基本上)二价,三价(或多价)和双特异性或三特异性(或多特异性)。本发明的这种化合物将针对TNF和至少一种其他靶标。如本文所述,所述其它靶标可以是例如另一种治疗相关靶标(即不同于TNF),以便提供关于TNF和所述其他治疗靶标双特异性的本发明化合物。所述另一种靶标也可以是提供增加的半衰期的靶标(例如人血清白蛋白),从而提供具有增加的半衰期的本发明化合物。如本文中提到的,此类其他靶标也可允许本发明化合物靶向特异细胞、组织或器官,或可允许本发明化合物内化到细胞中。也可以将这些方法/ISVD组合起来,例如提供本发明的化合物,其对TNF和至少一种其他治疗相关的靶标是双特异性的并且是半衰期延长的。

[0361] 同样,优选地,当本发明的这些化合物含有除本发明的至少一种TNF结合剂之外的一种或多种ISVD时,这些其他ISVD中的至少一种并优选全部将在其序列内含有减少与先前存在的抗体的结合的一个或多个框架突变(比如,特别是基本上如本文对本发明的TNF结合剂所述的和/或如WO 2015/173325中所述的第11、89、110和/或112位处的氨基酸残基/突变的组合)。而且,当本发明的这些化合物在其C末端具有本发明的TNF结合剂时,则所述C端

TNF结合剂(并且因此本发明的化合物)将优选具有C端延伸X(n),如本文所述。类似地,当本发明的这些化合物在其C末端具有另一种ISVD(即不是本发明的TNF结合剂,但例如是延长半衰期的ISVD)时,则所述C端ISVD(并且因此本发明的化合物)将优选具有如本文所述的C端延伸X(n)和/或将在其序列内包含减少与先前存在的抗体的结合一个或多个框架突变(同样,如本文进一步描述的和在W02015/173325中描述)。

[0362] 如本领域技术人员将清楚的是,当本发明的化合物旨在用于局部使用(例如在皮肤上或在眼睛中)或例如意指在例如胃肠道(胃肠;例如在口服施用后或通过栓剂施用后)中的某处具有(局部)治疗作用或在肺中(例如在通过吸入施用后)或以其他方式直接应用于其预期作用位置(例如通过直接注射)时,化合物通常不需要半衰期延长。而且,对于某些急性症状或适应症的治疗,可能优选不具有延长的半衰期。在这些情况下,使用本发明的单价化合物或不具有半衰期延长的本发明化合物(包含TNF结合剂)(例如相对于TNF为二价或双互补位的本发明化合物)是优选的。

[0363] 本发明此类化合物的一些优选但非限制性实例在下表C-1中示意性地示出,并且这些中的每一个形成本发明的另一方面。基于本文的公开内容,本领域技术人员将清楚没有半衰期延长的合适的本发明化合物的其它实例。

[0364] 如本领域技术人员将清楚的,当本发明的化合物打算用于全身施用和/或用于预防和/或治疗慢性疾病或病症时,通常优选所述本发明的化合物具有增加的半衰期(如本文所定义),即与存在于本发明化合物中的TNF结合剂相比较。更优选地,本发明的这种化合物将含有延长半衰期的ISVD,例如优选ISVD并且特别是与人血清白蛋白结合的纳米抗体(如本文所述)。

[0365] 本发明此类化合物的一些优选但非限制性实例在下表C-2中示意性地示出,并且这些中的每一个形成本发明的另一方面。基于本文的公开内容,本领域技术人员将清楚具有半衰期延长的合适的本发明化合物的其它实例。通常,对于具有半衰期延长的本发明化合物而言,C端延伸的存在是非常优选的。

[0366] 免疫球蛋白单可变结构域可以用作制备本发明的化合物如本发明的多肽的“构建块”,本发明的化合物如本发明的多肽可以任选地含有一种或多种另外的“构建块”,例如针对TNF上的另一个表位的ISVD和/或针对除TNF外的一种或多种其他抗原、蛋白质或靶标的ISVD,例如具有治疗模式的作用的构建块。

[0367] 通常,包含单一结构单元、单一免疫球蛋白单可变结构域或单一纳米抗体或者基本上由其组成的化合物、多肽或构建体在本文中分别称为“单价”化合物或“单价”多肽或“单价构建体”。包含两个或更多个构建块或结合单元(例如ISVD)的化合物、多肽或构建体在本文中也将被称为“多价”化合物、多肽或构建体,并且存在于这些化合物、多肽或构建体中的构件块/ISVD在本文中也将被称为“多价形式”。例如,“二价”化合物或多肽可包含两个免疫球蛋白单可变结构域,任选通过接头序列连接,而“三价”化合物或多肽可包含三个免疫球蛋白单可变结构域,任选通过两个接头序列连接;而“四价”化合物或多肽可包含四个免疫球蛋白单可变结构域,任选通过三个接头序列连接等等。

[0368] 在多价化合物、多肽或构建体中,两种或更多种ISVD例如纳米抗体可以相同或不同,并且可以针对相同的抗原或抗原决定簇(例如针对相同的一个或多个部分或一个或多个表位或针对不同的部分或表位),或者可替代地针对不同的抗原或抗原决定簇;或其任何

适当的组合。含有至少两个构建块(例如ISVD)的化合物、多肽或构建体(其中至少一个构建块针对第一抗原(即TNF)并且至少一个构建块针对第二抗原(即不同于TNF))也将分别称为“多特异性”化合物、多肽或构建体,并且存在于这样的化合物、多肽或构建体中的构建块(例如ISVD)在本文中也称为采用“多特异性形式”。因此,例如,本发明的“双特异性”化合物或多肽是这样的化合物或多肽,其包含针对第一抗原(即TNF)的至少一个ISVD和针对第二抗原(即,而不同于TNF)的至少一个另外的ISVD,而本发明的“三特异性”化合物或多肽是这样的化合物或多肽,其包含针对第一抗原(即TNF)的至少一个ISVD,针对第二抗原(即,而不同于TNF)的至少一个另外的ISVD和至少一个针对第三抗原(即不同于TNF和第二抗原)的另外的ISVD;等等

[0369] “多互补位”化合物、“多互补位”多肽和“多互补位”构建体,诸如例如“双互补位”化合物、多肽或构建体,或“三互补位”化合物、多肽或构建体包含每个都具有不同的互补位的两种或更多种构建块或基本上由其组成。

[0370] 因此,结合TNF的本发明的ISVD可以是基本上分离的形式(如本文所定义的),或者它们可以形成化合物、多肽或构建体的一部分,其可以包含一个或多个结合TNF的ISVD或基本上其组成和其可以任选地进一步包含一个或多个另外的氨基酸序列(全部任选地通过一个或多个合适的接头连接)。本发明涉及包含本发明的至少一个ISVD如在此描述的本发明的结合TNF的一种或多种ISVD(或其合适的片段)或基本上由其组成的化合物、多肽或构建体。

[0371] 本发明的一种或多种ISVD可以用作这种化合物、多肽或构建体中的结合单元或构建块,从而分别提供本发明的单价、多价或多互补位化合物、多肽或构建体,全部作为在此描述。本发明因此还涉及单价的包含本发明的一种单价多肽或ISVD或基本上由其组成的化合物或多肽。因此,本发明还涉及分别为多价化合物、多价多肽或多价构建体的化合物、多肽或构建体,例如包含本发明的两种或更多种ISVD或基本上由其组成的二价或三价化合物、多肽或构建体(对于含有一个或多个VHH结构域的多价和多特异性化合物或多肽及其制剂,也参考Conrath等(J.Biol.Chem.276:7346-7350,2001),以及例如WO 96/34103,WO 99/23221和WO 2010/115998)。

[0372] 本发明进一步涉及多价化合物或多肽(在本文中分别称为本发明的“多价化合物”和“本发明的多价多肽”),其包含或(基本上)由以下组成:至少一个针对TNF的ISVD(或其合适的片段),优选人TNF和另外一种ISVD。

[0373] 一方面,本发明的多价化合物、多肽或构建体的最简单的形式是本发明的二价化合物、多肽或构建体,其包含针对TNF的第一ISVD,例如纳米抗体,和相同的第二ISVD,如针对TNF的纳米抗体,其中所述第一和所述第二ISVD例如纳米抗体可以任选地通过接头序列(如本文所定义)连接。在其最简单的形式中,本发明的多价化合物、多肽或构建体可以是本发明的三价化合物、多肽或构建体,其包含针对TNF的第一ISVD例如纳米抗体,针对TNF的相同的第二ISVD例如纳米抗体,和针对TNF的相同的第三ISVD如纳米抗体,其中所述第一、第二和第三免疫球蛋白ISVD例如纳米抗体可以任选地通过一个或多个,特别是两个接头序列连接。

[0374] 另一方面,本发明的多价化合物、多肽或构建体可以是本发明的双特异性化合物、多肽或构建体,其包含针对TNF的第一ISVD例如纳米抗体和针对第二抗原第二ISVD例如纳

米抗体,其中所述第一和第二ISVD例如纳米抗体可以任选地通过接头序列(如本文所定义)连接;而本发明的多价化合物、多肽或构建体也可以是本发明的三特异性化合物、多肽或构建体,其包含针对TNF的第一ISVD如纳米抗体,针对第二抗原的第二ISVD如纳米抗体,针对第三抗原的第三ISVD如纳米抗体,其中所述第一、第二和第三ISVD例如纳米抗体可以任选地经由一个或多个,并且特别是两个接头序列连接。

[0375] 在一个特定的方面,本发明的化合物、多肽或构建体分别是三价双特异性化合物、多肽或构建体。其最简单形式的本发明三价双特异性化合物、多肽或构建体可以是本发明的三价化合物、多肽或构建体(如本文所定义),其包含两种相同的ISVD例如抗TNF的纳米抗体和针对另一种抗原的第三ISVD如纳米抗体,其中所述第一、第二和第三ISVD例如纳米抗体可以任选地通过一个或多个,特别是两个接头序列连接。

[0376] 另一方面,本发明的化合物或多肽是双特异性化合物或多肽。最简单形式的本发明的双特异性化合物、多肽或构建体可以是本发明的二价化合物、多肽或构建体(如本文所定义的),其包含针对TNF的ISVD例如纳米抗体和针对另一种抗原的第二ISVD例如纳米抗体,其中所述第一和第二ISVD例如纳米抗体可以任选地通过接头序列连接。

[0377] 在优选的方面,本发明的多价化合物、多肽或构建体包含两个或更多个针对TNF的免疫球蛋白单可变结构域或基本上由其组成。一方面,本发明涉及包含至少两个根据本发明的结合TNF的ISVD例如2、3或4种ISVD(或其合适片段)或基本上由其组成的化合物、多肽或构建体。两种或更多种ISVD可以任选地通过一个或多个肽接头连接。

[0378] 在优选的方面,本发明的化合物、多肽或构建体包含至少两个ISVD或基本上由至少两个ISVD组成,其中所述至少两个ISVD可以相同或不同,但其中至少一个ISVD针对TNF,例如结合TNF。

[0379] 在一个具体的方面,本发明的化合物、多肽或构建体包含至少两个ISVD或基本上由至少两个ISVD组成,其中至少两个ISVD独立地选自自由SEQ ID NO:8-41和61-66和69组成的组。

[0380] 相对亲和力可能取决于本发明所得化合物、多肽或构建体中ISVD的位置。应该理解,可以根据本领域技术人员的需要来选择本发明化合物或多肽中的ISVD的顺序(取向)。各ISVD的顺序以及化合物或多肽是否包含接头是设计选择的问题。与其他取向相比,有或没有接头的一些取向可以提供优选的结合特性。例如,本发明化合物、多肽或构建体中的第一ISVD(例如ISVD1)和第二ISVD(例如ISVD2)的顺序可以是(从N端到C端):(i) ISVD 1(例如纳米抗体1)-[接头]-ISVD 2(例如纳米抗体2);或(ii) ISVD 2(例如纳米抗体2)-[接头]-ISVD 1(例如纳米抗体1);(其中接头是可选的)。本发明涵盖所有的取向。含有提供所需结合特征的ISVD取向的化合物、多肽和构建体可通过常规筛选容易地鉴定。

[0381] 在本发明的化合物或构建体中,例如本发明的多肽中,两种或更多种构建块(例如,ISVD)和任选的一种或多种其他基团、药物、试剂、残基、部分或结合单元可以彼此直接连接(如例如WO 99/23221中所述)和/或可以通过一个或更合适的间隔物或接头或其任何组合进行连接。适用于多价和多特异性化合物或多肽的间隔物或接头对技术人员而言是清楚的,并且通常可以是本领域中用于连接氨基酸序列的任何接头或间隔物。优选地,所述接头或间隔物适用于构建意在用于药物用途的化合物、构建体、蛋白质或多肽。

[0382] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所定义的化合物或多肽,其中所述ISVD彼

此直接连接或通过接头连接。在另一个实施方案中,本发明涉及如本文所定义的化合物或多肽,其中第一ISVD和/或第二ISVD和/或可能的第三ISVD和/或可能的结合血清白蛋白的ISVD通过接头连接。

[0383] 一些特别优选的接头和间隔物包括本领域用于连接抗体片段或抗体结构域的间隔物和接头。这些包括上面引用的一般背景技术中提及的接头,以及例如本领域中用于构建双抗体或ScFv片段的接头(然而,在这方面,应该指出的是,尽管在双抗体和ScFv片段中,所使用的接头序列应该具有允许相关的V_H和V_L结构域一起形成完整的抗原结合位点的长度、一定程度的柔性和其它性质,对于本发明多肽中的接头的长度或柔性没有特别的限制,因为每个ISVD例如纳米抗体本身形成完整的抗原结合位点)。

[0384] 例如,接头可以是合适的氨基酸序列,特别是具有1至50,优选1至30,例如1至10个氨基酸残基的氨基酸序列。这些氨基酸序列的一些优选实例包括gly-ser接头,如WO 99/42077中所述的(gly_xser_y)_z型(例如(gly₄ser)₃或(gly₃ser₂)₃),以及本文提到的Ablynx申请中描述的GS30、GS15、GS9和GS7接头(参见例如WO 06/040153和WO 06/122825),以及铰链样区域,例如天然存在的重链抗体的铰链区或类似序列(如WO 94/04678中所述)。表E中描述了优选的接头,例如SEQ ID NO:85-100。

[0385] 一些其他特别优选的接头是聚丙氨酸(例如AAA)以及接头GS30(WO 06/122825中的SEQ ID NO:85)和GS9(WO 06/122825中的SEQ ID NO:84)。

[0386] 在实施方案中,本发明涉及如本文所定义的化合物,其中所述接头选自有以下接头组成的组:5GS、7GS、9GS、10GS、15GS、18GS、20GS、25GS、30GS、35GS和40GS。

[0387] 其他合适的接头通常包含有机化合物或聚合物,特别是适用于药物用蛋白质的那些。例如,聚(乙二醇)部分已被用于连接抗体结构域,参见例如WO 04/081026。

[0388] 包含在本发明范围内的是:一个或多个接头的长度、柔性和/或其他性质(尽管不是关键的,因为它通常用于ScFv片段中使用的接头)可对本发明的最终化合物或构建体(如本发明的多肽)的性质(包括但不限于对趋化因子或一种或多种其他抗原的亲和力、特异性或亲合力)具有一些影响。基于本文的公开内容,技术人员将能够任选地的一些有限的常规实验之后确定用于本发明的特定化合物或构建体(例如本发明的多肽)中的最佳的一个或多个接头。

[0389] 例如,在包含构建块(例如针对TNF和另一种靶标的ISVD或纳米抗体)的本发明的多价化合物或多肽中,接头的长度和柔性优选使得其允许出现在多肽中的本发明的每个构建块(例如ISVD)结合其同源靶标,例如每个靶标上的抗原决定簇。同样,基于本文的公开内容,技术人员将能够任选地的一些有限的常规实验之后确定用于本发明的特定化合物或构建体(诸如本发明的多肽)中的最佳的一个或多个接头。

[0390] 也在本发明的范围内的是:使用的一个或多个接头还赋予本发明的化合物或构建体(例如本发明的多肽)一个或多个其它有利特性或官能性,和/或提供一个或多个位点用于形成衍生物和/或用于官能团的连接(例如,如本文所述用于本发明的ISVD的衍生物)。例如,含有一个或多个带电荷氨基酸残基的接头可以提供改进的亲水性,而形成或含有小表位或标签的接头可以用于检测、鉴定和/或纯化的目的。同样,基于本文的公开内容,技术人员将能够任选地的一些有限的常规实验之后确定用于本发明的特定化合物、多肽或构建体的最佳接头。

[0391] 最后,当在化合物或构建体如本发明的多肽中使用两个或更多个接头时,这些接头可以相同或不同。同样,基于本文的公开内容,技术人员将能够任选地在一些有限的常规实验之后确定用于本发明的特定化合物或构建体或多肽的最佳接头。

[0392] 对于含有一个或多个纳米抗体及其制剂的多价和多特异性化合物和多肽的一般描述,也参考Conrath等,J.Biol.Chem.,Vol.276,10.7346-7350,2001;Muyldermans, Reviews in Molecular Biotechnology 74(2001),277-302,以及例如WO 1996/34103、WO 1999/23221、WO 2004/041862、WO 2006/122786、WO 2008/020079、WO 2008/142164或WO 2009/068627。

[0393] 本发明还涉及编码本文所述的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物和构建体的核苷酸序列或核酸。本发明还包括遗传构建体,其包括前述核苷酸序列或核酸以及本身已知的用于遗传构建体的一个或多个元件。基因构建体可以是质粒或载体的形式。此外,这样的构建体可以大体上如Ablynx N.V.的公开专利申请中所述,例如WO 2004/041862、WO 2006/122786、WO 2008/020079、WO 2008/142164或WO 2009/068627。

[0394] 在一个方面,本发明涉及编码根据本发明的ISVD、多肽、化合物或构建体的核酸。

[0395] 另一方面,本发明涉及包含根据本发明的核酸的表达载体。

[0396] 本发明还涉及含有此类核苷酸序列或核酸,和/或表达(或能够表达)本文所述的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物和构建体的宿主或宿主细胞。此外,这样的宿主细胞可以大体上如Ablynx N.V.的公开专利申请中所述,例如WO 2004/041862、WO 2006/122786、WO 2008/020079、WO 2008/142164或WO 2009/068627。

[0397] 在一个方面,本发明涉及包含根据本发明的核酸或根据本发明的表达载体的宿主或宿主细胞。

[0398] 本发明还涉及用于制备如本文所述的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体的方法,所述方法包括在一定条件下培养或维持如本文所述的宿主细胞,使得所述宿主细胞产生或表达如本文所述的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体,并且任选地进一步包括分离如此产生的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体。此外,可以如Ablynx N.V.的已公开专利申请(例如WO 2004/041862、WO 2006/122786、WO 2008/020079、WO 2008/142164或WO 2009/068627)中一般性描述的那样进行这些方法。

[0399] 在一个具体的方面,本发明涉及用于产生根据本发明的ISVD或根据本发明的化合物或根据本发明的多肽的方法,所述方法至少包括以下步骤:

[0400] a) 在合适的宿主细胞或宿主生物中或在另一合适的表达系统中表达如本文所定义的核酸序列;任选地接着是:

[0401] b) 分别分离和/或纯化根据本发明的ISVD、根据本发明的化合物或根据本发明的多肽。

[0402] 本发明还涉及包含至少一种如本文所述的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体的组合物。

[0403] 本发明还涉及药物组合物,其包含至少一种如本文所述的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体和任选地至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂和/或佐剂,以及任选地包含一种或多种另外的药学活性多肽和/或化合物。这样的制

剂、载体、赋形剂和稀释剂通常可以大体上如Ablynx N.V.的公开专利申请中所述,例如WO 2004/041862、WO 2006/122786、WO 2008/020079、WO 2008/142164或WO 2009/068627。

[0404] 当本文所述的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体具有增加的半衰期时,优选将它们施用于血循环。这样,它们可以以任何合适的方式施用,这些方式允许氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体进入血循环,如通过注射或输注静脉内施用;或以任何其他合适的方式施用(包括口服施用,皮下施用,肌肉施用,通过皮肤施用,鼻内施用,经由肺施用等),这些方式允许氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体进入血循环。合适的方法和施用途径对于本领域技术人员将是清楚的,同样例如也来自Ablynx NV已公开的专利申请的教导,诸如例如WO 2004/041862、WO 2006/122786、WO 2008/020079、WO 2008/142164或WO 2009/068627。

[0405] 另一方面,本发明涉及用于预防和/或治疗至少一种疾病或病症的方法,所述疾病或病症可通过使用在此描述的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体来预防或治疗;所述方法包括向有需要的受试者施用药学活性量的本发明的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体,和/或包含其的药物组合物。可以通过使用本文所述的多肽、融合蛋白、化合物或构建体来预防或治疗的疾病和病症通常与可以通过使用存在于本发明的多肽、融合蛋白、化合物或构建体中的治疗性部分来预防或治疗的疾病和病症相同。具体而言,本发明涉及用作药物的如本文所述的化合物、组合物、构建体、多肽、TNF结合剂或ISVD。

[0406] 在本发明的上下文中,术语“预防和/或治疗”不仅包括预防和/或治疗疾病,还通常包括预防疾病的发作,减缓或逆转疾病的进展,预防或减缓与疾病相关的一种或多种症状的发作,减少和/或减轻与疾病相关的一种或多种症状,降低疾病和/或与其相关的任何症状的严重程度和/或持续时间和/或预防疾病和/或与其相关的任何症状的严重程度的进一步增加,预防、减少或逆转由疾病引起的任何生理损伤,以及通常对正在治疗的患者有益的任何药理学作用。本发明的组合物形成可行的治疗剂不需要实现完全治愈或根除疾病的任何症状或表现。如在相关领域中所认识到的,用作治疗剂的药物可降低给定疾病状态的严重程度,但不需要消除疾病的每种表现才能被认为是有用治疗剂。类似地,预防性施用的治疗构成可行的预防剂不需要完全有效地预防病症的发作。简单地在受试者中减少疾病的影响(例如,通过减少其症状的数量或严重程度,或通过提高另一种治疗的有效性,或通过产生另一种有益效果),或减少疾病发生或恶化的可能性就足够了。

[0407] 在一个实施方案中,给予患者治疗有效量的组合物的指标是反映特定疾病严重程度的指标超过基线的持续改进。本发明的药物组合物包含与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂一起配制的治疗有效量的本发明的ISVD、化合物或多肽。通过“治疗有效量”的本发明的ISVD、化合物或多肽是指以适用于任何医学治疗的合理的利益/风险比,赋予治疗对象治疗效果的组合物的量。治疗效果足以“治疗”在此使用该术语的患者。

[0408] 在一个实施方案中,本发明涉及用于治疗消化道疾病和/或病症的如本文所述的组合物、构建体、化合物、TNF结合剂、ISVD或多肽。

[0409] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的组合物、构建体、化合物、TNF结合剂、ISVD或多肽,其中所述消化道疾病和/或病症是炎症肠病(IBD)、肠易激综合征、克罗恩病、溃疡性结肠炎、粘膜炎、口疮性口炎、乳糜泻、消化道创伤和消化道癌。

[0410] 肠易激综合征患者肠道通透性改变,尽管在肠内几乎没有可检测到的组织学变化(Dunlop Am J Gastroenterol.2006 Jun;101(6):1288-94)。乳糜泻患者肠道通透性改变,特征性地损害小肠绒毛,与IBD不同。炎症肠病被认为是由微生物-宿主相互作用引起的免疫响应失调导致的。免疫系统响应于产生慢性炎症的非致病共生细菌。类似地,在坏死性小肠结肠炎中,胁迫下的不成熟的免疫系统对正常肠道细菌产生不适当的响应,诱导潜在的致命形式的结肠炎(Jilling等,2006,J Immunol,177,3273-82)。

[0411] 待治疗的受试者可以是任何温血动物,但特别是哺乳动物,更特别是人类。如本领域技术人员将清楚的是,待治疗的受试者将特别是患有本文提及的疾病和病症或处于此风险中的人。

[0412] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于免疫疗法,特别是用于被动免疫疗法的方法,所述方法包括向患有本文提及的疾病和病症或处于其风险中的患者施用药学活性量的本发明的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体和/或包含其的药物组合物。

[0413] 根据适于预防和/或治疗待预防或治疗的疾病或病症的治疗方案,施用氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体和/或包含其的组合物。临床医生通常能够根据诸如以下因素确定合适的治疗方案:待预防或治疗的疾病或病症,待治疗的疾病的严重程度和/或其症状的严重程度,本发明的有待使用的特定氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体,具体施用途径和有待使用的药物配制品或组合物,患者的年龄、性别、体重、饮食、一般状况以及临床医生熟知的类似因素。

[0414] 通常,治疗方案将包括以一种或多种药学有效量或剂量施用一种或多种本发明的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体或一种或多种包含它们的组合物。同样基于上述因素,临床医生可以确定施用的一个或多个具体量或剂量。

[0415] 一般而言,为了预防和/或治疗本文提及的疾病和病症并取决于待治疗的具体疾病或病症,要使用的特定融合蛋白或构建体的效力和/或半衰期,具体施用途径和所用的特定药物配制品或组合物,本发明的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体通常将以每天每千克体重1克至0.01微克的量施用,优选每天每千克体重0.1克至0.1微克,例如每天每千克体重约1、10、100或1000微克,作为单一日剂量连续(例如通过输注),或作为一日内多次分次服用。临床医生通常能够根据本文提到的因素确定合适的日剂量。也将清楚的是,在特定情况下,临床医师可以选择偏离这些量,例如基于上述因素和他的专家判断。一般地,考虑到亲和力/亲合力、功效、生物分布、半衰期和技术人员熟知的类似因素的差异,关于待施用的量的一些指导可以从通过基本上相同的途径通常给予针对相同靶标的可比较的常规抗体或抗体片段的量来获得。

[0416] 通常,在上述方法中,将使用本发明的单一氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体。然而,在本发明的范围内,组合使用本发明的两种或更多种氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体。

[0417] 本发明的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体也可以与一种或多种另外的药学活性化合物或成分组合使用,即作为组合治疗方案,其可以或不导致达到协同效应。同样,基于上述因素和他的专家判断,临床医生将能够选择这样的其他化合物或成分以及合适的组合治疗方案。

[0418] 特别地,本发明的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体可以与其它药学活性化合物或成分组合使用,所述其他药学活性化合物或成分是可以用于预防或治疗用本发明的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体预防或治疗的疾病和病症,并且由此可以或不获得协同效应。

[0419] 正如临床医生所清楚的那样,根据本发明使用的治疗方案的有效性可以以本身已知的任何方式针对涉及的疾病或病症来确定和/或遵循。临床医生也可以在适当的情况下或逐个情况下改变或修改特定的治疗方案,以达到期望的治疗效果,避免、限制或减少不需要的副作用和/或者在一方面实现所需的治疗效果和另一方面避免、限制或减少不希望的副作用之间实现适当的平衡。

[0420] 通常,将遵循治疗方案,直到达到所需的治疗效果和/或所需的治疗效果得以维持足够长时间。再次,这可以由临床医生确定。

[0421] 由于本发明的氨基酸序列、TNF结合剂、多肽、融合蛋白、化合物或构建体能够与TNF结合,它们尤其可以用于预防和/或治疗可以被能够结合TNF和/或调节TNF的其他生物药物(如抗体,例如阿达木单抗/HUMIRA™或英利昔单抗/REMICADE™)治疗的疾病或病症。本领域技术人员将清楚这些疾病和病症。本发明的TNF结合剂尤其可用于预防和/或治疗WO 2004/041862和WO 2006/122786中提及的疾病和病症。

[0422] 如上所述,本发明的一个具体方面涉及单价形式的本发明的TNF结合剂。本发明的这些单价TNF结合剂特别适用于局部应用(包括在皮肤上,胃肠道或肺中的应用)和/或局部施用(例如皮肤施用),口服施用(例如胃肠道施用),通过栓剂施用(同样例如胃肠道施用)和/或肺部施用(例如通过吸入)。因此,它们可以用于预防和/或治疗皮肤、肺或胃肠道的疾病和病症,所述疾病和病症可以通过分别向皮肤、肺或胃肠道施用TNF抑制剂来预防或治疗(例如分别影响皮肤、肺或胃肠道的炎症和/或自身免疫疾病)。

[0423] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的组合物、化合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD局部施用于消化道。

[0424] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的组合物、化合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD以适于口服施用至胃肠道(GI)。

[0425] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的组合物、化合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD以用于口服施用的剂型施用至胃肠道,其中剂型选自片剂、胶囊剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酏剂。

[0426] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的组合物、化合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD经直肠施用于治疗消化道的疾病或病症。

[0427] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所述的组合物、化合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD以用于直肠施用的剂型直肠施用,优选选自栓剂和灌肠剂。

[0428] 在一个实施方案中,本发明还涉及如本文所述的组合物、化合物、构建体、TNF结合

剂、多肽或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD通过皮下注射、皮内注射、静脉内注射、肌内注射、病灶内注射或输注技术胃肠外施用。

[0429] 此类疾病和病症的一些具体但非限制性实例是胃肠道疾病或病症,例如炎性肠病(IBD)、克罗恩病、肠易激综合征、溃疡性结肠炎、粘膜炎、口疮性口炎、乳糜泻、消化道创伤和/或消化道癌症。如上所述,当用于这些目的时,本发明的单价TNF结合剂优选在第1位具有D(或E1D)突变并且具有C端延伸(例如C端丙氨酸),并且SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、41、62-63和65-66(特别是SEQ ID NO:40、39、36、64和69,最特别是SEQ ID NO:40)的TNF结合剂是特别适用于这些目的本发明的TNF结合剂的优选实例。

[0430] 因此,另一方面,本发明涉及本发明的TNF结合剂(如本文所述),其基本上为单价形式(并且其优选地作为在第1位的D或E1D突变和C端延伸比如C端丙氨酸),用于预防和治疗皮肤、肺或胃肠道的疾病和病症,特别是预防和/或治疗影响皮肤、肺或胃肠道的炎症和/或自身免疫疾病。所述TNF结合剂优选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、41、62-63和65-66,特别是SEQ ID NO:40、39、36、64和69,最特别是SEQ ID NO:40。

[0431] 本发明还涉及本发明的TNF结合剂(如本文所述),其基本上为单价形式(并且其优选地作为在第1位的D或E1D突变和C端延伸比如C端丙氨酸),用于预防和治疗胃肠道疾病或病症如炎性肠病(IBD)、克罗恩病、肠易激综合征、溃疡性结肠炎、粘膜炎、口疮性口炎、乳糜泻、消化道创伤和/或消化道癌,特别是IBD和克罗恩病。此外,所述TNF结合剂优选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、41、62-63和65-68,特别是SEQ ID NO:40、39、36、64和69,最特别是SEQ ID NO:40。

[0432] 本发明还涉及打算用于(和/或适合于)局部施用于皮肤,通过吸入或其他施用于肺,和/或口服施用、直肠施用或其他施用于胃肠道的药物组合物,其包含基本上呈单价形式(并且优选作为第1位处的D或E1D突变和C端延伸如C端丙氨酸)的本发明的TNF结合剂。此外,所述TNF结合剂优选自由以下各项组成的组SEQ ID NO:40、39、36、64、69、37、38、41、62-63和65-68,特别是SEQ ID NO:40、39、36、64和69,最特别是SEQ ID NO:40。

[0433] 本发明还涉及用于预防或治疗皮肤疾病或病症的方法,所述方法包括向需要这种治疗的受试者的皮肤施用基本上呈单价形式(并且优选作为第1位处的D或E1D突变和C端延伸如C端丙氨酸)的本发明的TNF结合剂或包含这种单价TNF结合剂的组合物。

[0434] 本发明还涉及用于预防或治疗皮肤疾病或病症的方法,所述方法包括向需要这种治疗的受试者的肺施用(例如通过吸入)基本上呈单价形式(并且优选作为第1位处的D或E1D突变和C端延伸如C端丙氨酸)的本发明的TNF结合剂,或包含这种单价TNF结合剂的组合物。

[0435] 本发明还涉及预防或治疗胃肠道疾病或病症如炎性肠病(IBD)、克罗恩病、肠易激综合征、溃疡性结肠炎、粘膜炎、口疮性口炎、乳糜泻,创伤消化道和/或消化道癌症,特别是IBD或克罗恩病的方法,所述方法包括对需要这种治疗的受试者的胃肠道施用(例如口服或直肠施用)基本上呈单价形式(并且优选作为第1位处的D或E1D突变和C端延伸如C端丙氨酸)的本发明的TNF结合剂或包含这种单价TNF结合剂的组合物。

[0436] 如前所述,在炎症部位,消化道的粘膜屏障常常受到损害,因为口服施用的蛋白质可以进入肠组织和体循环。在一个实施方案中,本发明因此还涉及如本文所述的组合物、化

合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD,其中所述组合物、化合物、构建体、TNF结合剂、多肽或ISVD到达患者的肠组织和体循环。

[0437] 本发明的其它方面、实施方案、优点和应用将从本文的进一步描述中变得清楚。

[0438] 现在将通过以下非限制性优选方面、实施例和附图进一步描述本发明,其中:

[0439] -图1是表格,列出了本文将特别提及的一些氨基酸位置和根据一些替代编号系统(例如Aho和IMGT)的编号;

[0440] -图2显示了SEQ ID NO:1、59和58的比对;

[0441] -图3列出了本文提及的氨基酸序列;

[0442] -图4显示了SEQ ID NO:1、8至41和58的比对;

[0443] -图5显示了SEQ ID NO:1、31和36至41;

[0444] -图6显示了当测试96个血清样品(来自人类健康受试者的66个和来自SLE患者的30个)与下列氨基酸序列的结合时在实施例1中获得的数据点的两个对应的图:SEQ ID NO:58(具有Q108L突变),参考A,参考A(L11V,V89L)-A1a,参考A(L11V,A74S,V89L)-A1a和参考A(L11V,S49A,V89L)-A1a。每个点代表所测试的96个样品中的一个的结合水平。右侧图和左侧图显示的数据点相同;在右侧图中,针对每种测试化合物(即SEQ ID NO:58(Q108L),参考A,参考A(L11V,V89L)-A,参考A(L11V,A74S,V89L)-A和参考A(L11V,S49A,V89L)-A)用每一样品测量的数据点通过一条线连接(结果,该线的下倾给出了当引入本发明的突变和C-末端丙氨酸时先前存在的抗体的结合程度降低的指示);

[0445] -图7是表,列出结合数据(5列给出归一化的PreAb结合水平(125秒处的RU)并且4列给出与图6中编辑的数据点的参考A相比,PreAb结合的降低百分比。

[0446] -图8(A)基于A016600015序列,预测的(“P”)和实验(“E”)测定的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶切割位点。(B)考马斯染色的SDS PAGE凝胶的A016600015分析。(C)通过A016600015序列的RPC LC-MS的胰蛋白酶消化分析的示例性结果。

[0447] -图9SHIME模型的示意图。

[0448] -图10:用Enbrel(EC30=0.02nM;图A)和Enbrel(EC90=0.2nM;图B)处理的HEK293H-mTNF细胞的竞争性FACS。IRR000027=不相关的纳米抗体。

[0449] -图11显示在非还原条件下在12%NuPage Bis-Tris凝胶上的A016600021、A016600039和A016600040的表达结果,应用5 μ l样品。泳道如下:(1)A016600021;(2)A016600039;(3)A016600040;(4)不相关的比较物;(5)不相关的比较物;(6)精确蛋白标准(Precision Plus Protein Standard)(BioRad);(7)标准0.5 μ g;(8)标准1.0 μ g;(9)标准2.5 μ g。

实施例

[0450] 本发明人着手优化TNF结合剂的氨基酸序列(“序列优化”)。在这种情况下,TNF结合剂意图用于口服施用,因为TNF结合剂应该优选是蛋白酶稳定的。而且,在序列优化的过程中,它还意图(1)人源化TNF结合剂;(2)敲除先前存在的抗体的潜在表位;以及(3)敲除翻译后修饰(PTM)位点。同时,应使这些特征符合TNF结合剂的功能特征,即抑制TNF α ,其应优选大约相同或甚至改善。

[0451] 实施例1:在巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中产生纳米抗体并通过蛋白质-A

结合进行纯化

[0452] 在BGCM柠檬酸盐缓冲液在24孔板(24mL)中培养含有抗TNF α 纳米抗体构建体的巴斯德毕赤酵母X33细胞(30℃,250rpm)。两天后,将培养基换成含有甲醇的缓冲液(BMCM柠檬酸盐)以诱导表达。定期加入新鲜甲醇以补偿甲醇消耗和蒸发,两天后收获培养基。根据制造商的说明书,通过在蛋白质-A柱(Poros)或MEP Hypercel(Pa11)上捕获然后在甘氨酸缓冲液中洗脱来纯化纳米抗体。随后使用2mL Zebaspin柱(Pierce)将纳米抗体针对PBS进行脱盐。使用VivaSpin柱(MWCO 5000,PES)浓缩级分。使用Trinean Dropsense测量纳米抗体级分的浓度。浓度基于OD280测量值,并且针对OD340值归一化。使用与ESI-Q-TOF质谱仪(Q-TOF Ultimate(Waters))偶联的反相HPLC系统,通过SDS-PAGE和MS分析验证纳米抗体的纯度和完整性。

[0453] 实施例2:人源化

[0454] 本发明的TNF结合剂的蛋白质序列最终从美洲驼检索取得,并部分不同于人类天然存在的同源抗体。因此,这些TNF结合剂在施用于人类患者时具有潜在的免疫原性。

[0455] 通常,为了人源化目的,纳米抗体序列与人种系共有序列更加同源。除了纳米抗体的“标志”残基,在纳米抗体与人种系共有序列之间不同的框架区中的特定氨基酸被改变为人对应物,使得蛋白质结构、活性和稳定性优选保持完整。

[0456] 在这种情况下,在与人种系V基因数据库比对后,DP51被鉴定为与SEQ ID NO:58具有最高同源性。考虑到改变亲本纳米抗体序列使得更符合人DP51种系共有序列,同时优选保持其他纳米抗体特征完好或甚至改进这些特征,所有可能的排列都被详细阐述。

[0457] 最终将总共12个氨基酸残基引入SEQ ID NO:58:1E、14P、27F、29F、40A、49S、73N、75K、78L、82aN、83R和108L。值得注意的是,Q27F和S29F是CDR1的一部分,但不影响结合(参见SEQ ID NO:1;数据未显示)。

[0458] 实施例3:减少先前存在的抗体的结合

[0459] 3.1实验部分

[0460] 以下实施例3.2中使用的人类样品从商业来源或者从人类志愿者获得(在获得所有必要的同意和批准后)并且根据适用的法律和监管要求(包括但不限于关于医疗秘密和患者隐私)而使用。

[0461] 在下面的实施例3.2中,除非另外明确指出,使用ProteOn测定所用样品(即来自健康志愿者,类风湿性关节炎(RA)患者和SLE患者)中存在的先前存在的抗体与测试的纳米抗体的结合,如下:

[0462] 使用单克隆抗FLAG M2将纳米抗体捕获在血清白蛋白上或通过FLAG3标签捕获。

[0463] 在使用ProteOn XPR36(Bio-Rad Laboratories,Inc.)评估在人血清白蛋白(HSA)上捕获的纳米抗体上的先前存在的抗体的结合。使用PBS/Tween(磷酸盐缓冲盐水,pH7.4、0.005%Tween20)作为运行缓冲液,并且实验在25℃下进行。使用EDC/NHS(流速30 μ l/min)活化具有ProteOn GLC传感器芯片的配体泳道,并且将HSA以10 μ g/ml注射到ProteOn乙酸盐缓冲液pH4.5(流速100 μ l/min)中以使固定水平约为3200RU。固定后,用乙醇胺HCl(流速30 μ l/min)使表面失活。纳米抗体以45 μ l/min在HSA表面上注射2分钟以使得纳米抗体捕获水平为约200RU。含有先前存在抗体的样品以14,000rpm离心2分钟,并且上清液在PBS-Tween20(0.005%)中以1:10稀释,然后以45 μ l/分钟注射2分钟,随后进行400秒解离步骤。在每个循

环后(即在新的纳米抗体捕获和血液样品注射步骤之前),用45 μ l/min的2分钟注射HCl(100mM)再生HSA表面。用ProteOn Manager 3.1.0(Bio-Rad Laboratories, Inc.)进行传感图处理和数据分析。通过减去1) 纳米抗体-HSA解离和2) 与参考配体泳道的非特异性结合,在双重参考之后获得显示先前存在的抗体结合的传感图。通过在125秒(结合结束后5秒)设定报告点来确定先前存在的抗体的结合水平。相对于参考纳米抗体在125秒时的结合水平计算先前存在的抗体结合的减少百分比。

[0464] 使用ProteOn XPR36(Bio-Rad Laboratories, Inc.)评估在单克隆抗FLAG M2(Sigma)上捕获的FLAG标记的纳米抗体上先前存在的抗体的结合情况。使用PBS/吐温(磷酸盐缓冲液, pH7.4、0.005%吐温20)作为运行缓冲液,并且实验在25 $^{\circ}$ C下进行。使用EDC/NHS(流速30 μ l/min)活化具有ProteOn GLC传感器芯片的配体泳道,并且将抗FLAG M2mAb以10 μ g/ml注射到ProteOn乙酸盐缓冲液pH4.5(流速100 μ l/min)中以使固定水平约为4000RU。固定后,用乙醇胺HCl(流速30 μ l/min)使表面失活。纳米抗体以45 μ l/min在抗FLAG M2表面上注射2分钟以使得纳米抗体捕获水平为约100RU。为了减少血液样品与抗FLAG M2表面的非特异性结合,将100nM 3xFLAG肽(Sigma)加入到血液样品中。含有先前存在抗体的样品以14,000rpm离心2分钟,并且上清液在PBS-Tween20(0.005%)中以1:10稀释,然后以45 μ l/分钟注射2分钟,随后进行600秒解离步骤。在每个循环后(即在新的纳米抗体捕获和血液样品注射步骤之前),以150 μ l/分钟用10秒注射甘氨酸pH1.5(10mM)再生抗FLAG M2表面。用ProteOn Manager 3.1.0(Bio-Rad Laboratories, Inc.)进行传感图处理和数据分析。通过减去1) 纳米抗体抗FLAG M2解离和2) 与参考配体泳道的非特异性结合,在双重参考之后获得显示先前存在的抗体结合的传感图。通过在125秒(结合结束后5秒)设定报告点来确定先前存在的抗体的结合水平。相对于参考纳米抗体在125秒时的结合水平计算先前存在的抗体结合的减少百分比。

[0465] 3.2:在参考A(SEQ ID NO:1)中引入本发明的突变导致先前存在的抗体的结合减少。

[0466] 使用下列氨基酸序列:SEQ ID NO:58(具有Q108L突变),参考A,参考A(L11V, V89L)-Ala,参考A(L11V, A74S, V89L)-Ala和参考A(L11V, S49A, V89L)-Ala,均具有N端HIS6-FLAG3标签(SEQ ID NO:42)。通过来自健康人志愿者的96个血清样品的样品中存在的先前存在的抗体测试这些纳米抗体的结合。使用FLAG标签捕获化合物,并根据本实验部分的序言中给出的方案使用ProteOn测量结合。

[0467] 结果如图6所示。图7列出了形成图6中数据点之一的每个样品的结果。

[0468] 可以看出,对于所测试的96个样品中的大多数,引入根据本发明的突变导致先前存在的抗体的结合减少,其中减少的程度通常取决于每个样品中先前存在的抗体能够结合参考A的水平。

[0469] 实施例4:化学稳定性评估

[0470] 通过强制氧化和温度胁迫测试来评估各种人源化和/或优化的纳米抗体的化学稳定性。

[0471] 制备新的参考化合物,即A016600015(SEQ ID NO:61)。这种新的参考化合物更符合推测的临床候选药物,从而可以更好地评估突变的影响。A016600015与参考A(SEQ ID NO:1)相同,除了C端丙氨酸和在氨基酸残基1处的天冬氨酸。根据WO 2012/175741(参见实

施例3),考虑到减少PEA引入C端A1a。在评估焦谷氨酸形成之后,在氨基酸残基1处用N端谷氨酸取代天冬氨酸。新参考A016600015的活性实际上与参考A相同(数据未显示)。除非另有说明,该新化合物A016600015在整个实施例中进一步用作参考化合物。

[0472] 基于实施例3的结果,与新的参考化合物A016600015相比,引入了抗PEA突变L11V和V89L(等等),产生A016600018 (SEQ ID NO:37)和A016600019 (SEQ ID NO:38)。序列如图3所示。

[0473] 4.1强制氧化稳定性

[0474] 将参考化合物A016600015 (1mg/ml)的纳米抗体样品在RT和黑暗条件下经手PBS中10mM H₂O₂四小时,与不含H₂O₂的对照样品平行,接着使用Zeba脱盐旋转柱将缓冲液切换至PBS (0.5ml) (Thermo Scientific)。然后在70°C下通过Zorbax 300SB-C3柱 (Agilent Technologies)在1200或1290型系列机器 (Agilent Technologies)上通过RPC分析受胁迫的样品和对照样品。通过测定与主要蛋白质峰相比由于氧化胁迫而出现的前峰峰面积%来定量纳米抗体的氧化。

[0475] 在参考化合物A016600015的氧化胁迫样品中没有观察到变体(数据未显示)。

[0476] 4.2温度胁迫稳定性

[0477] 将纳米抗体样品 (1-2mg/ml)在-20°C (阴性对照) 25°C和40°C下储存在PBS中4周。在该温育期后,用胰蛋白酶或LysC消化纳米抗体。然后在60°C下通过Acquity UPLC BEH300-C18柱 (Agilent Technologies)在1290系列机器 (Agilent Technologies)上通过RPC分析受胁迫的样品的和对照样品的肽。该柱与Q-TOF质谱仪 (6530Accurate Mass Q-TOF (Agilent))连接。肽图UV 214nm或EIC(提取离子色谱 (Extracted Ion Chromatogram))色谱图的整合允许对给定修饰进行可靠的量化。

[0478] 仅在40°C时观察到一些异构化和焦谷氨酸变体。值得注意的是,氨基酸残基54D位于环境暴露的CDR2中并且潜在地适合于异构化,但实际上没有表现出异构化。如果纳米抗体在25°C或低于25°C保持较长时间,则氨基酸残基1的异构化微不足道。

[0479] 4.3解链温度的热漂移测定 (TSA)

[0480] 纳米抗体的解链温度是其生物物理稳定性的量度。

[0481] 基本上根据Ericsson等2006 (Anals of Biochemistry, 357:289-298)通过热漂移测定 (TSA)评估各种纳米抗体的解链温度。简言之,将5 μ l纯化的单价纳米抗体 (800 μ g/ml)与5 μ L在10 μ L缓冲液 (100mM磷酸盐,100mM硼酸盐,100mM柠檬酸盐,115mM NaCl,在3.5-9的不同pH下缓冲)中的荧光探针Sypro Orange (Invitrogen, S6551) (终浓度10x)温育。将样品在LightCycler 480II机器 (Roche)中以4.4°C/s的速率从37°C加热至99°C,然后以0.03°C/s的速率冷却至37°C。在热诱导展开时,蛋白质的疏水斑暴露于Sypro Orange结合,导致荧光强度增加 (Ex/Em=465/580nm)。荧光强度曲线的一阶导数的拐点用作解链温度 (T_m)的量度。

[0482] 将参考化合物A016600015 (SEQ ID NO:61)与A016600018 (SEQ ID NO:37)和A016600019 (SEQ ID NO:38)进行比较。与A016600015相反,根据实施例3,A016600018和A016600019均包含抗PEA突变L11V和V89L。

[0483] 结果如表4.3所示

[0484] 表4.3

	NB ID	抗 PEA	数量 (μg)	Tm ($^{\circ}\text{C}$) pH7
[0485]	A016600015	-	87	59
	A016600018	L11V V89L	38	59
	A016600019	L11V V89L	16	56

[0486] 从表4.3可以看出,抗PEA突变似乎对Tm没有影响(A016600018)或对Tm有负面影响(A016600019)。值得注意的是,A016600018(“00018”)与A016600019(“00019”)之间的差异分别为78L和78V。总体而言,与导入抗PEA突变相比,氨基酸残基78的这种差异的任何影响都显示出不显著(也参见下文)。

[0487] 当产生时,还看到包含抗PEA突变的这些变体的表达是次优的。这使用实施例1的方法进一步量化。

[0488] 结果如表4.3所示。

[0489] 事实上,从两种包含抗PEA突变的变体中回收的量比从参考纳米抗体低约2倍(A016600018)或甚至低4倍(A016600019)。这对于发明人来说完全是一个惊喜,因为这些抗PEA突变L11V和V89L的引入在任何其他克隆测定之前并未导致纳米抗体回收能力的如此严重下降。

[0490] 4.4蛋白酶稳定性

[0491] 意图是TNF抑制剂最终可以口服施用。然而,由于它们被设计用于酶分解和吸收部分固体食物,因此胃和肠构成天然敌对的环境。一般而言,只有当多肽链中的8-10个氨基酸残基可以结合并适应蛋白酶活性位点的特定立体化学时,蛋白质底物的蛋白水解才能发生(Fontana等.2004Acta Biochim Pol,51,299-321)。因此,对酶切割的敏感性很大程度上取决于底物的物理性质。

[0492] 为了鉴定潜在的蛋白酶降解位点并设计更稳定的变体,诸位发明人着手根据标准方法鉴定胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶切割位点。

[0493] 对于胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶,SEQ ID NO:58和新参考化合物A016600015(“00015”)的预测蛋白酶位点(“P”)在图8A中被描绘为(“X”)。

[0494] 从这个图可以得出结论:

[0495] -CDR3包含9个潜在的蛋白酶切割位点。

[0496] -人源化突变Q75K(VH3-DP51)引入潜在的胰蛋白酶切割位点。

[0497] -人源化突变K73N(VH3-DP51)消除了潜在的胰蛋白酶切割位点。

[0498] -抗PEA突变L11V和V89L在这方面是中性的,即,如预期的那样,这些突变不引入或消除潜在的蛋白酶切割位点。

[0499] 为了在更体内性的环境中评估预测的蛋白酶切割位点,用胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶消化纳米抗体。具体而言,抗TNF α 纳米抗体在10%胰蛋白酶或 α -胰凝乳蛋白酶溶液中温育。将2 μg 纳米抗体在37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行胰蛋白酶消化2小时,4小时和过夜,或者在25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行胰凝乳蛋白酶消化2小时,4小时或过夜。加入TFA(终浓度0.1%)终止蛋白水解反应。通过RPC LC-MS分析反应混合物或在SDS PAGE凝胶上分离并用考马斯蓝染色。使用ImageQuant(GE)

计算完整材料的数量并将其标准化为0h作为参考时间点。

[0500] 在图8B中提供了在考马斯染色的SDS PAGE凝胶上的胰蛋白酶消化的示例性结果。图8C中提供了经由RPC LC-MS的胰蛋白酶消化分析的示例性结果。实验(“E”)证实的切割位点在图8A中描绘为胰蛋白酶(“E”)和胰凝乳蛋白酶(“E”)。

[0501] 从图8A可以看出,实际切割位点的数量减少了。尽管如此,各种胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶识别位点仍然存在。

[0502] 为了优化胰蛋白酶抗性,选择5个位置以设计一个优化的变体:R38,K64,S94,P95和R96,产生变体A016600013;SEQ ID NO:65。

[0503] 然而,突变这些位点导致变体(A016600013;SEQ ID NO:65)的表达水平和细胞内积累的降低。事实上,当氨基酸残基38发生回复突变,表达改进时,得到的变体(A016600014;SEQ ID NO:66)完全违背比参考化合物A016600015更高蛋白酶敏感性的预期(数据未显示)。因此,决定不在研究的参考化合物和纳米抗体即A016600018和A016600019中突变这些位置。

[0504] 表4.4描述了结果的总结。

[0505]

表 4.4

			与蛋白酶温育(小时)后的完整纳米抗原%							
			胰蛋白酶				胰凝乳蛋白酶			
纳米抗体	L11	V89	0h	2h	4h	ON	0h	2h	4h	ON
A016600015	.	.	100	95	99	79	100	16	18	15
A016600019	V	L	100	83	91	78	100	27	39	31

[0506]

A016600018	V	L	100	89	85	63	100	38	31	14
------------	---	---	-----	----	----	----	-----	----	----	----

[0507] 实施例5:来源于SHIME模型的肠液中的稳定性

[0508] 为了研究抗TNF α 纳米抗体在人胃肠道中的稳定性,将纳米抗体在源自代表人类胃肠道(GI)的SHIME(人类肠微生物生态系统的模拟器(Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem))的5种不同流体中温育。SHIME模型是经过科学验证的完整胃肠道动态模型,用于研究受控体外环境下胃肠道的物理化学、酶学和微生物学参数。

[0509] SHIME模型由依次模拟胃(酸性条件和胃蛋白酶消化),小肠(消化过程)和大肠3个区域(即升结肠(“A”),横结肠(“T”;)和降结肠(“D”)(微生物过程)的五个反应器组成。仔细控制这些反应器中的环境参数可以使得存在复杂而稳定的微生物群落,这些群落在结构和功能上与人类结肠不同区域的微生物群落高度相似(见图9)。所有GI流体由ProDigest (Technologiepark 4,9052Zwijnaarde,Belgium)提供。在GI流体中测试抗TNF纳米抗体,最长时间为39小时。在GI流体中温育之后,通过竞争性ELISA中的功能性测试确定纳米抗体的稳定性。在SHIME模型中,在37°C下在5种不同的GI流体中以100 μ g/ml的固定浓度测试纳米抗体。根据表5.1中的时间表,在不同的时间点采集样品并将其储存在-20°C下,添加或不添

加蛋白酶抑制剂。将样品转移至包被的ELISA平板并随后在竞争性ELISA中测试。简而言之，将A016600015以1µg/ml的浓度在PBS中包被。封闭后，加入固定浓度的0.3nMbiot-hTNFα以及不同GI流体中的滴定系列变体。用extravidin-HRP进行检测。

[0510] 表5.1温育时间表

	流体	时间点
[0511]	SI 禁食	0、1、2、4、6、8h*
	SI 喂食	0、1、2、4、6、8h*
	结肠 A	0、1、2、4、8、15、20、24h
[0512]	结肠 T	0、1、2、4、8、15、20、24、39h
	结肠 D	0、1、2、4、8、15、20、24、32h
	PBS	0、1、2、4、6、8、15、20、24、32h

[0513] *温育后加入1mg/ml Pefabloc和1µM胃酶抑制剂(蛋白酶抑制剂)

[0514] 在结肠“T”中的示例性结果在表5.2中提供

[0515] 表5.2

[0516]

		0h	1h	2h	4h	8h	15h	20h	24h	39h
000 15	IC50	7,3E-10	5,0E-10	6,4E-10	6,2E-10	9,7E-10	1,3E-09	1,9E-09	2,8E-09	2,0E-08
	比率	1,00	0,69	0,88	0,85	1,34	1,72	2,56	3,88	27,41
	%	100%	145%	113%	117%	75%	58%	39%	26%	4%
000 18	IC50	5,7E-10	5,5E-10	6,9E-10	1,2E-09	2,8E-09	9,5E-09	3,2E-08	4,2E-08	6,2E-07
	比率	1,00	0,97	1,22	2,19	4,96	16,68	55,58	73,79	1097,18
	%	100%	103%	82%	46%	20%	6%	2%	1%	0%
000 19	IC50	5,0E-10	4,7E-10	4,5E-10	9,1E-10	7,2E-10	1,7E-09	3,0E-09	5,2E-09	4,1E-08
	比率	1,00	0,93	0,89	1,81	1,43	3,36	6,02	10,32	82,22
	%	100%	108%	112%	55%	70%	30%	17%	10%	1%

[0517] 基于源自不同SHIME区室的流体的结果，稳定性评估允许代表所有GI区室中稳定

性的纳米抗体的排序:00015>00019>00018。

[0518] 总的来说,消除蛋白酶切割位点似乎没有正面作用,例如对该纳米抗体家族的稳定性和蛋白酶敏感性。在A16600015中引入抗PEA突变L11V和V89L似乎对该特定纳米抗体的稳定性具有负面影响。

[0519] 实施例6:稳定的变体

[0520] 由于消除蛋白酶切割位点不会产生预期结果,诸位发明人进一步提出了精心制作的抗TNF α 变体,其本身会更稳定,但其中人源化和抗PEA突变优选不被损害。鉴于各种氨基酸残基显示相互排斥的特征,例如人源化与蛋白酶稳定性与亲和力的关系,这需要非常规方法。

[0521] 6.1内部半胱氨酸键和消除CDR3胰凝乳蛋白酶切割位点

[0522] 由于位于CDR3并可能影响结合性质,因此决定构建一种变体,其中作为胰凝乳蛋白酶切割位点的氨基酸残基Y100d通过Y100dL置换(A016600046100dL;SEQ ID NO:62)被消除。变体A016600045(SEQ ID NO:69)被改造以进一步评估酪氨酸对CDR3的第100d位的影响。

[0523] 此外,发明人假设可以通过引入结构域内二硫键对本身稳定的变体进行工程化(参见Wozniak-Knopp等.2012PLoS One.2012;7(1):e30083)。这需要引入两个半胱氨酸残基,然后它们应该配对形成胱氨酸。通过结晶研究解析纳米抗体的蛋白质结构及其与靶TNF- α 的相互作用(数据未显示)后,尽管氨基酸残基S49与CDR2相邻,但诸位发明人决定突变氨基酸S49C和I69C用于引入结构域内二硫键,并且考虑到人源化目的而引入(对应于人种系DP51,参见实施例2)。包含S49C、I69C和Y100dL的新变体注释为A016600052(SEQ ID NO:63)。

[0524] 为了深度评估氨基酸第49位的影响,将该氨基酸残基突变为丙氨酸。值得注意的是,第49位的这种突变会对应于-尽管不同-人种系IgHV3-IgHJ。所有新变体A016600046(SEQ ID NO:62),A016600016(SEQ ID NO:36),A016600020(SEQ ID NO:39)和A016600021(SEQ ID NO:40)包含A49。

[0525] 另外,在变体A016600020(SEQ ID NO:39)中,鉴于物理稳定性评估位置D60A、E61D和P62S。氨基酸残基A60、D61和S62位于实验证实的胰凝乳蛋白酶切割位点Y58附近,并且位于根据Kabat的CDR2内,这意味着高风险的效力丧失。

[0526] 此外,通过人源化突变Q75K意外地引入了蛋白酶切割位点。不受任何理论束缚,发明人假设改变邻近位置的氨基酸残基A74S可能潜在地影响人源化以及蛋白酶敏感性,但仅在一定程度上影响,即希望人源化和蛋白酶敏感性均降低达到可接受的程度。包含S74的变体是A016600016(“00016”),A016600020(“00020”),A016600021(“00021”),A016600046(“00046”)和A016600052(“00052”)(分别是SEQ ID NO:36、39、40、62和63)。比较变体是A016600038(“00038”;SEQ ID NO:64),其与A016600021(SEQ ID NO:40)相同,但是具有74S而不是74A。

[0527] 所得序列在图3中提供。

[0528] 6.2稳定变体的特征

[0529] 接下来,评估这些变体的各种特征,基本上如实施例3和4所述。

[0530] 首先,根据实施例1在巴斯德毕赤酵母中测定变体00016、00020和00021的产生。

[0531] 表6.2A给出了获得结果的总结。

[0532] 表6.2A

[0533]

纳米抗体	L1 1	S4 9	D6 0	E6 1	P6 2	A7 4	L7 8	V8 9	量 (μg)	Tm 在 pH7 (。C)	GI 流体的 稳定性 (排序)
A01660002 1	V	A	.	.	.	S	V	L	332	65	1
A01660001 6	V	A	.	.	.	S	.	L	499	65	2
A01660002 0	V	A	A	D	S	S	V	L	374	75	3

[0534] 从这些结果可以看出,这些突变导致产量增加于参考化合物产量(其产生87 μg (参见实施例4.3))的4-5倍,或甚至比密切相关的变体00018和00019多20-30倍。

[0535] 接下来,根据实施例4.3确定这些变体的热稳定性。表6.2A也给出了获得结果的总结。

[0536] 不仅产量显著增加,而且与参考化合物相比,5-16 $^{\circ}\text{C}$ 的热稳定性意外增加,但与更密切相关的变体00018和00019相比,甚至高达16-19 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0537] 出乎意料地,氨基酸残基A49消除了抗PEA氨基酸残基V11和L89对生产和稳定性的影响。

[0538] 实施例6.1的各种变体一起在源自根据实施例5的SHIME模型的GI流体中评估。

[0539] 在表6.2B中提供了在A016600021,A016600038,A016600046和A016600052的各种条件下在培养期结束时所得活性的总结。PBS中的温育证实了纳米抗体的本身稳定性(数据未显示)。

[0540]

表 6.2B	C/C0 相对于时间 (h)							
	CD 结肠 A	CD 结 肠 D	CD 结 肠 T	SI 禁 食*	SI 喂 食*	UC2 结肠 A	UC2 结肠 D	UC2 结肠 T
A016600021	66	58	76	65	31	86	57	71
A016600038	48	41	47	60	33	77	50	59
A016600046	47	29	62	52	24	92	59	≥100
A016600052	41	49	40	ND	ND	64	43	55
A016600039	38	26	39	23	20	78	20	55
A016600040	38	40	19	67	24	91	83	63
A016600045	85	≥100	49	60	26	68	41	≥100

[0541] *得病的;ND未确定;CD是克罗恩病;UC是溃疡性结肠炎

[0542] 其中去除了蛋白酶切割位点的变体A016600046Y100dL (SEQ ID NO:62) 和通过结构域内半胱氨酸键进一步稳定的变体A016600052 (SEQ ID NO:63) 在这方面没有提供任何改进。值得注意的是,由于CDR3中的突变,变体00046和00052的IC50比00021增加2-5倍(相比0.67nM分别为1.13nM和3.56nM)。

[0543] SHIME结果基本证实并延长了Tm和生产的结果。此外,SHIME模型显示变体00021 (SEQ ID NO:40) 一致地比变体A016600040 (“00040”;SEQ ID NO:67) 和变体00038 (SEQ ID NO:64) 更稳定,其指示了在第74位的丝氨酸的积极贡献。

[0544] 值得注意的是,除了A74S外与变体00040 (SEQ ID NO:67) 相同的变体A016600039 (SEQ ID NO:68) 显示S74在SHIME模型中始终不如A74稳定。

[0545] 基于所有结果,包括基于源自不同SHIME区室的流体的结果,总体稳定性评估允许代表所有GI区室中稳定性的纳米抗体的排序:00021>00016>00020>00040>00015>00019>00018。

[0546] 因此,A16600015中的抗PEA突变L11V和V89L似乎对该特定纳米抗体的稳定性具有负面影响,这可通过49A缓解,但不受49C-69C缓解。此外,在包含抗PEA突变L11V和V89L的纳米抗体中,氨基酸残基74S在SHIME模型中有利于稳定性。

[0547] 6.3A016600021具有良好的特征(相比于A016600039和A016600040)

[0548] 对于口服施用,认为次于稳定性,需要高剂量。为了具有可接受的成本,候选物优选以高量生产,纯化而没有相当大的损失并且以高浓度配制。因此,发明人提出了测试这些参数的实验。

[0549] 首先,发明人着手比较表达水平A016600039和A016600040与A016600021。

[0550] 如图11A中可见,A016600039 (SEQ ID NO:68) 的表达显著低于A01660021 (SEQ ID

NO:40)和A016600040 (SEQ ID NO:67)的表达水平。这些结果也通过AKTAmicro进行量化,其结果如表6.3所示

[0551] 表6.3

克隆	产量 Akta μ (g/L 无细胞培养基)
[0552] A016600021	6.3
A016600039	0.49
A016600040	2.3

[0553] 关于A016600021相对于A016600040的可制造性,两者均在发酵液浓缩期间测试最大溶解度。A016600040在澄清的发酵液中的最大溶解度仅为30g/L(相对于A016600021的>75g/L)。此外,在进一步纯化A016600040期间遇到重大损失。

[0554] 因此,除了稳定性之外,A016600021还相比于A016600039和A016600040具有出乎意料的良好生产和纯化特征。

[0555] 基于有利的稳定性、表达和纯化特征,诸位发明人关注A016600021,确定其溶解度。完全出乎发明人意料的是,A016600021在H₂O中可溶至前所未有的200mg/ml。

[0556] 实施例7:稳定变体的性能优于基准

[0557] 在使用Enbrel(依那西普(基于TNF-R2的抗TNF治疗剂))的竞争测定中评估变体A016600021(SEQ ID NO:40),A016600038(SEQ ID NO:64)和A016600045(SEQ ID NO:69)与膜结合的人TNF(mTNF)的结合。为此,通过用编码人TNF R77T/S78T变体的真核表达载体(称为HEK293H-mTNF)转染HEK293H细胞,产生稳定表达不可切割形式的人TNF的细胞系,如先前所述(Harashima等.,2001J Immunol 166:130-136)。在通过嘌呤霉素抗性基因的共表达进行选择后,在用Remicade(英夫利昔单抗)和次级山羊F(ab')₂抗-人IgG、小鼠ads-PE对细胞染色后,通过FACS(BD FACS Aria)进行各表达mTNF的细胞的分选。通过流式细胞术(BD FACS Array)确认膜结合的TNF在选择的各个克隆上的组成型表达。

[0558] 首先,评估Enbrel与这些细胞上的mTNF的结合。其中将单一HEK293H-mTNF克隆的5.10⁵个细胞接种在圆底96孔板中并且直接与在FACS缓冲液(补充有10%FBS和0.05%叠氮化钠的PBS)中稀释的不同浓度的Enbrel在4℃温育90分钟。用FACS缓冲液洗涤细胞并在4℃下用次级山羊F(ab')₂抗人IgG、小鼠ads-PE抗体染色30分钟。洗涤并在死亡染料TO-PRO-3碘化物存在下将细胞在FACS缓冲液中温育之后,通过在BD FACS阵列读数来测量Enbrel与mTNF在活HEK293H-mTNF细胞上的结合。根据所获得的剂量响应曲线,Enbrel结合mTNF的EC30和EC90值分别定义为0.02nM和0.2nM。随后将这两种浓度用于靶向TNF的纳米抗体的竞争性测定。

[0559] 为了评估A016600021,A016600038和A016600045的mTNF结合,在固定的EC30和EC90浓度下建立了Enbrel竞争性实验。将抗TNF纳米抗体的效力与基准化合物Cimzia(certolizumab pegol)进行比较。另外包括不相关的纳米抗体(IRR00027)作为阴性对照。在该测定中,应用与上文针对Enbrel结合所述相同的条件,除了在该实验中的第一温育步骤涉及用固定浓度的Enbrel(EC30或EC90)与不同浓度的抗TNF纳米抗体或Cimzia(范围从

300nM至12.5pM) 进行共处理。在BD FACS Array上的读数确定了Enbrel在HEK293H-mTNF细胞上的结合,当用增加浓度的纳米抗体和Cimzia共处理后,所述结合明显减少,表明抗TNF剂与Enbrel竞争结合mTNF。如表7所示测定抗TNF剂的IC50值。

表 7	Enbrel (EC30: 0.02nM)	Enbrel (EC90: 0.2nM)
[0560] A016600021	0.43nM	0.65nM
A016600038	0.43nM	0.70nM
A016600045	0.54nM	0.76nM
Cimzia	7.9nM	4.8nM

[0561] 所获得的结果证明A016600021、A016600038和A016600045在EC90下比Cimzia具有6-7倍更高的效力,并且在EC30下比Cimzia具有极好的15-18倍更高的效力。稳定变体具有相当的效力与Enbrel竞争mTNF结合。

[0562] 在竞争性FACS中,证明纳米抗体也可以完全抑制Enbrel与mTNF的结合。这将表明作为口服应用的药物的优越适用性。相反,高浓度的Cimzia仅导致部分阻断Enbrel结合(图10)。

[0563] 本申请通篇引用的所有参考文献(包括参考文献、授权专利、公开的专利申请和共同未决的专利申请)的全部内容在此明确地通过引用并入,特别是对于上文提到的教导。

[0564] 表A:参考A及其CDR和PMP6C11

[0565]

SEQ ID NO	描述	序列
58	NC55TNF-NC7 (PMP6C11) . WO06/122786: SEQ ID NO: 125	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGR EEVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDKAQNIVYLQMDSLKPED TAVYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTQVTVSS
59	WO2015/173325 SEQ ID NO: 345	EVQLVESGGGVVQFGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGR EFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPED TALYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVSS
1	参考A:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGR EFVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPED TAVYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVSS
2	CDR1 (Kabat)	TADMG
3	CDR2 (Kabat)	RISGIDGTTYDEPVKG
4	CDR3 (Kabat/Abm)	PRYADQWSAYDY
5	CDR1 (Abm)	GFTFSTADMG
6	CDR2 (Abm)	RISGIDGTTY
7	CDR3 (Kabat/Abm)	PRYADQWSAYDY
注意: SEQ ID NO: 4与SEQ ID NO: 7相同		

[0566] 表B: 第11、89、110和112位氨基酸的可能组合

[0567]

	位置					位置				
	11	89	110	112		11	89	110	112	
组合	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	组合	V	T	T	S	
	L	T	T	K		V	T	T	K	
	L	T	T	Q		V	T	T	Q	
	L	T	K	S		V	T	K	S	
	L	T	Q	S		V	T	Q	S	
	L	V	T	K		V	V	T	K	
	L	V	T	Q		V	V	T	Q	
	L	V	K	S		V	V	K	S	
	L	V	Q	S		V	V	Q	S	
						<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	
	L	L	T	K		<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	
	L	L	T	Q		<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	
	L	L	K	S		<u>V</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	
	L	L	Q	S		<u>V</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	

[0568]

表B-1: 第11、89、110、112、49和74位氨基酸的可能组合

位置

组合						11	89	110	112	49	74
	L	T	T	S	A	S					
	L	T	T	K	A	S					
	L	T	T	Q	A	S					
	L	T	K	S	A	S					
	L	T	Q	S	A	S					
	L	V	T	K	A	S					
	L	V	T	Q	A	S					
	L	V	K	S	A	S					
	L	V	Q	S	A	S					
	L	L	T	K	A	S					
	L	L	T	Q	A	S					
	L	L	K	S	A	S					
	L	L	Q	S	A	S					

位置

组合						11	89	110	112	49
	L	T	T	S	A					
	L	T	T	K	A					
	L	T	T	Q	A					
	L	T	K	S	A					
	L	T	Q	S	A					
	L	V	T	K	A					
	L	V	T	Q	A					
	L	V	K	S	A					
	L	V	Q	S	A					
	L	L	T	K	A					
	L	L	T	Q	A					
	L	L	K	S	A					
	L	L	Q	S	A					

位置

组合						11	89	110	112	74
	L	T	T	S	S					
	L	T	T	K	S					
	L	T	T	Q	S					
	L	T	K	S	S					
	L	T	Q	S	S					
	L	V	T	K	S					
	L	V	T	Q	S					
	L	V	K	S	S					
	L	V	Q	S	S					
	L	L	T	K	S					
	L	L	T	Q	S					
	L	L	K	S	S					
	L	L	Q	S	S					

[0569]

表B-2: 第11、89、110、112、49和74位氨基酸的可能组合

位置					
11	89	110	112	49	74
V	T	T	S	A	S
V	T	T	K	A	S
V	T	T	Q	A	S
V	T	K	S	A	S
V	V	T	K	A	S
V	V	T	Q	A	S
V	V	K	S	A	S
V	V	Q	S	A	S
V	L	T	S	A	S
V	L	T	K	A	S
V	L	T	Q	A	S
V	L	K	S	A	S
V	L	Q	S	A	S
V	T	Q	S	A	S

位置					
11	89	110	112	74	
V	T	T	S	S	
V	T	T	K	S	
V	T	T	Q	S	
V	T	K	S	S	
V	V	T	K	S	
V	V	T	Q	S	
V	V	K	S	S	
V	V	Q	S	S	
V	L	T	S	S	
V	L	T	K	S	
V	L	T	Q	S	
V	L	K	S	S	
V	L	Q	S	S	
V	T	Q	S	S	

位置

位置					
11	89	110	112	49	
V	T	T	S	A	
V	T	T	K	A	
V	T	T	Q	A	
V	T	K	S	A	
V	V	T	K	A	
V	V	T	Q	A	
V	V	K	S	A	
V	V	Q	S	A	
V	L	T	S	A	
V	L	T	K	A	
V	L	T	Q	A	
V	L	K	S	A	
V	L	Q	S	A	
V	T	Q	S	A	

[0570] 表C-1: 本发明的一些不具有延长半衰期的ISVD的化合物的示意图

[0571]

[本发明的 TNF 结合剂]
[本发明的 TNF 结合剂]-X(n)
[本发明的 TNF 结合剂]-[本发明的 TNF 结合剂]
[本发明的 TNF 结合剂]-[本发明的 TNF 结合剂]-X(n)
[本发明的 TNF 结合剂]-[TNF2]
[本发明的 TNF 结合剂]-[TNF2]-X(n)
[TNF2]-[本发明的 TNF 结合剂]
[TNF2]-[本发明的 TNF 结合剂]-X(n)
[本发明的 TNF 结合剂]-[靶向单元]
[靶向单元]-[本发明的 TNF 结合剂]-
[本发明的 TNF 结合剂]-[靶向单元]-X(n)
[本发明的 TNF 结合剂]-[本发明的 TNF 结合剂]-[靶向单元]-X(n)
说明:
- “[本发明的 TNF 结合剂]” 代表本发明的 TNF 结合剂
- “-” 代表直接共价键或合适的接头，例如 9GS、15GS 或 35GS 接头
- “X(n)” 表示如本文所定义的 C 端延伸，例如单个丙氨酸残基。
- “[TNF2]” 代表与本发明的 TNF 结合剂不同的针对 TNF 的结合结构域或结合单元（并且特别是 ISVD）。
- “[靶向单元]” 表示将本发明化合物靶向特异细胞、组织或器官的结合结构域或结合单元（并且特别是 ISVD）

[0572] 表C-2:本发明的一些具有延长半衰期的ISVD的化合物的示意图

[0573]

[本发明的 TNF 结合剂]-[HLE]
[HLE]-[本发明的 TNF 结合剂]
[本发明的 TNF 结合剂]-[HLE]-X(n)
[HLE]-[本发明的 TNF 结合剂]-X(n)

[0574]

[本发明的 TNF 结合剂]-[本发明的 TNF 结合剂]-[HLE]

[本发明的 TNF 结合剂]-[HLE]-[本发明的 TNF 结合剂]

[HLE]-[本发明的 TNF 结合剂]-[本发明的 TNF 结合剂]

[本发明的 TNF 结合剂]-[本发明的 TNF 结合剂]-[HLE]-X(n)

[本发明的 TNF 结合剂]-[HLE]-[本发明的 TNF 结合剂]-X(n)

[HLE]-[本发明的 TNF 结合剂]-[本发明的 TNF 结合剂]-X(n)

[本发明的 TNF 结合剂]-[TNF2]-[HLE]

[本发明的 TNF 结合剂]-[HLE]-[TNF2]

[HLE]-[本发明的 TNF 结合剂]-[TNF2]

[HLE]-[TNF2]-[本发明的 TNF 结合剂]

[TNF2]-[本发明的 TNF 结合剂]-[HLE]

[TNF2]-[HLE]-[本发明的 TNF 结合剂]

[本发明的 TNF 结合剂]-[TNF2]-[HLE]-X(n)

[本发明的 TNF 结合剂]-[HLE]-[TNF2]-X(n)

[HLE]-[本发明的 TNF 结合剂]-[TNF2]-X(n)

[HLE]-[TNF2]-[本发明的 TNF 结合剂]-X(n)

[TNF2]-[本发明的 TNF 结合剂]-[HLE]-X(n)

[TNF2]-[HLE]-[本发明的 TNF 结合剂]-X(n)

[本发明的 TNF 结合剂]-[靶向单元]-[HLE]

[靶向单元]-[本发明的 TNF 结合剂]-[HLE]

[本发明的 TNF 结合剂]-[靶向单元]-[HLE]-X(n)

[HLE]-[靶向单元]-[本发明的 TNF 结合剂]-[HLE]-X(n)

说明:

- “[本发明的 TNF 结合剂]” 代表本发明的 TNF 结合剂
- “-” 代表直接共价键或合适的接头，例如 9GS、15GS 或 35GS 接头
- “X(n)” 表示如本文所定义的 C 端延伸，例如单个丙氨酸残基。
- “[HLE]” 表示延长半衰期的结合结构域或结合单元（并且特别是延长半衰期的 ISVD），例如针对（人）血清白蛋白的 ISVD（并且特别是纳米抗体）；

[0575]

- “[TNF2]”代表与本发明的 TNF 结合剂不同的针对 TNF 的结合结构域或结合单元（并且特别是 ISVD）。
- “[靶向单元]”表示将本发明化合物靶向特异细胞、组织或器官的结合结构域或结合单元（并且特别是 ISVD）

[0576] 表D:血清白蛋白结合性ISVD序列(“ID”指如本文所用的SEQ ID NO)

[0577]

名称	ID	氨基酸序列
Alb8	70	EVQLVESGGGLVQPGENSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb23	71	EVQLLESGGGLVQPGENSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPFWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb129	72	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb132	73	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPFWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb11	74	EVQLVESGGGLVQPGENSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb11 (S112K)-A	75	EVQLVESGGGLVQPGENSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVKVVSSA
Alb82	76	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb82-A	77	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb82-AA	78	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSAA
Alb82-AAA	79	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSAAA
Alb82-G	80	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSG
Alb82-GG	81	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGG
Alb82-GGG	82	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG
Alb92	83	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPFWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb223	84	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPFWVSSIIGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

[0578] 表E:各种氨基酸序列(“ID”指如本文所用的SEQ ID NO)

[0579]

名称	ID	氨基酸序列
5GS接头	85	GGGGS
7GS接头	86	SGGSGGS
8GS接头	87	GGGGCGGGS
9GS接头	88	GGGGSGGGS
10GS接头	89	GGGGSGGGGS
15GS接头	90	GGGGSGGGGSGGGGS
18GS接头	91	GGGGSGGGGSGGGGGGGS
20GS接头	92	GGGGSGGGGSGGGGS
25GS接头	93	GGGGSGGGGSGGGGS
30GS接头	94	GGGGSGGGGSGGGGS
35GS接头	95	GGGGSGGGGSGGGGS
40GS接头	96	GGGGSGGGGSGGGGS
G1铰链	97	EPKSCDKTHTCPPCP
9GS-G1铰链	98	GGGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
美洲驼上部长铰链 区域	99	EPKTPKPQAAA
G3铰链	100	ELKTPPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPP PCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP

序列表

<110> 埃博灵克斯股份有限公司

<120> 改进的TNF结合剂

<130> 192557

<150> US62/254375

<151> 2015-11-12

<160> 105

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR序列

<400> 1

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

[0001]

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR序列

<400> 2

Thr Ala Asp Met Gly
1 5

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 3

Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 4

[0002] Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 5

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala Asp Met Gly
1 5 10

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 6

Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr
1 5 10

<210> 7

<211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 7

Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr
 1 5 10

<210> 8
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 8

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45

[0003]

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 9

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

	100	105	110
	Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser		
	115	120	
<210>	11		
<211>	121		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	CDR序列		
<400>	11		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala		
	20	25	30
	Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val		
	35	40	45
	Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val		
	50	55	60
[0005]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65	70	75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly		
	100	105	110
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Ser		
	115	120	
<210>	12		
<211>	121		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	CDR序列		
<400>	12		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala		
	20	25	30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gln Ser
115 120

<210> 13
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

[0006]

<400> 13

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser
115 120

<210> 14
 <211> I21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 14

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

[0007]

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Glu Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> I21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 15

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Ser
115 120

<210> 16
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0008]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gln Ser
115 120

<210> 17
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CDR序列

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

[0009]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR序列

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

[0010]

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 20

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

	100	105	110
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gln Ser 115		
	<210> 22		
	<211> 122		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> CDR序列		
	<400> 22		
	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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala 20 25 30		
	Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val 35 40 45		
	Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val 50 55 60		
[0012]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly 100 105 110		
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala 115 120		
	<210> 23		
	<211> 122		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> CDR序列		
	<400> 23		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala 20 25 30		

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 24
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

[0013]

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 25
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

[0014]

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Ser Ala
 115 120

<210> 26
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gln Ser Ala
115 120

<210> 27
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0015]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 28
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CDR序列

<400> 28

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

[0016]

Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 29

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR序列

<400> 29

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Ser Ala
115 120

<210> 30
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 30

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

[0017]

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gln Ser Ala
115 120

<210> 31
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 31

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

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala	20	25	30
Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val	35	40	45
Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr	65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys	85	90	95
Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Glu Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly	100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala	115	120	

[0018]

<210> 32
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> CDR序列

 <400> 32

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

	100	105	110
	Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser Ala 115		
	<210> 33		
	<211> 122		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> CDR序列		
	<400> 33		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala 20 25 30		
	Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val 35 40 45		
	Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val 50 55 60		
[0019]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly 100 105 110		
	Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser Ala 115 120		
	<210> 34		
	<211> 122		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> CDR序列		
	<400> 34		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala 20 25 30		

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Ser Ala
115 120

<210> 35
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

[0020]

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gln Ser Ala
115 120

<210> 36
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 36

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

[0021]

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 37
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 37

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val

50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 38
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 38

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0022]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 39
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CDR序列

<400> 39

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

[0023]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 40

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR序列

<400> 40

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 41
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 41

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

[0024]

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 42
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HIS6-FLAG3标签

<400> 42

His His His His His His Gly Ala Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly

1	5	10	15
Asp Tyr Lys	Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys	Asp Asp Asp	Asp Lys Gly
	20	25	30

Ala Ala

<210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C-末端

<400> 43

Val Thr Val Lys Ser
1 5

<210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C-末端

<400> 44

[0025]

Val Thr Val Gln Ser
1 5

<210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C-末端

<400> 45

Val Lys Val Ser Ser
1 5

<210> 46
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C-末端

<400> 46

Val Gln Val Ser Ser
1 5

[0026]

<210> 47
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C-末端

<220>
 <221> 位点
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa代表(X)_n, 其是指具有n个氨基酸的C端延伸, 其中每个位置独立地选自任何氨基酸

<400> 47

Val Thr Val Lys Ser Xaa
 1 5

<210> 48
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C-末端

<220>
 <221> 位点
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa代表(X)_n, 其是指具有n个氨基酸的C端延伸, 其中每个位置独立地选自任何氨基酸

<400> 48

Val Thr Val Gln Ser Xaa
 1 5

<210> 49
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C-末端

<220>
 <221> 位点
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa代表(X)_n, 其是指具有n个氨基酸的C端延伸, 其中每个位置独立地选自任何氨基酸

<400> 49

Val Lys Val Ser Ser Xaa
 1 5

<210> 50
 <211> 6

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<220>
<221> 位点
<222> (6)..(6)
<223> Xaa代表(X)n, 其是指具有n个氨基酸的C端延伸, 其中每个位置独立地选自任何氨基酸

<400> 50

Val Gln Val Ser Ser Xaa
1 5

<210> 51
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 51

Val Thr Val Lys Ser Ala
1 5

[0027]

<210> 52
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 52

Val Thr Val Gln Ser Ala
1 5

<210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 53

Val Lys Val Ser Ser Ala
1 5

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
 <223> C-末端

 <400> 54

 Val Gln Val Ser Ser Ala
 1 5

<210> 55
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C-末端

 <400> 55

Val Thr Val Ser Ser
 1 5

<210> 56
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C-末端

[0028] <220>
 <221> 位点
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa代表(X)n, 其是指具有n个氨基酸的C端延伸, 其中每个位置独立地选自任何氨基酸

<400> 56

Val Thr Val Ser Ser Xaa
 1 5

<210> 57
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C-末端

<400> 57

Val Thr Val Ser Ser Ala
 1 5

<210> 58
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 58

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Gln Thr Ser Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Gln Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0029]

<210> 59

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR序列

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 60
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 60

Asp 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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45

[0030] Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 61
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 61

Asp 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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 62
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

[0031]

<220>
<223> CDR序列

<400> 62

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 63
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 63

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Cys Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Cys Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

[0032]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 64
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 64

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 65
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 65

[0033]

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Leu Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Arg Pro Ser Gln Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66
<211> 121

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 66

Gln 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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

[0034]

Arg Pro Ser Gln Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> I21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 67

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Gln Thr Ser Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Gln Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Gln Thr Ser Ser Thr Ala
20 25 30

[0035]

Asp Met Gly Trp Phe Arg Glu Pro Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Gln Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 69

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala His Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

[0036]

<210> 70

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR序列

<400> 70

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 71
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 71

Glu Val Gln Leu Leu 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 Arg Ser Phe
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 35 40 45

[0037] Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 72
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 72

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala
115

<210> 73
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

[0038]

<220>
<223> CDR序列

<400> 73

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala
115

<210> 74
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 74

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0039]

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 75
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 75

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Lys
100 105 110

Val Ser Ser Ala
115

<210> 76
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 76

[0040]

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 77
<211> 116

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 77

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0041]

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala
115

<210> 78
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 78

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ala
115

<210> 79
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 79

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

[0042]

Gly Met Ser Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ala Ala
115

<210> 80
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR序列

<400> 80

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly
115

[0043]

<210> 81

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR序列

<400> 81

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly
 115

<210> 82
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

[0044] Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115

<210> 83
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 83

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 84

<211> 116

<212> PRT

[0045]

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR序列

<400> 84

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala
115

<210> 85
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头

<400> 85

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头

<400> 86

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

[0046]

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头

<400> 87

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头

<400> 88

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 89

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 90

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 91

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 91

[0047] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 92

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 93

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 93

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 94

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 94

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 95

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

[0048]

<220>

<223> 接头

<400> 95

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 96

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 96

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 97
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G1铰链
<400> 97

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 98
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 96S-G1铰链
<400> 98

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
1 5 10 15

[0049] Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20

<210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 美洲驼上部长铰链区域
<400> 99

Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro Glu Pro Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 100
<211> 62
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G3铰链
<400> 100

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

20

25

30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
 35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 50 55 60

<210> 101
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 101

Ser Phe Gly Met Ser
 1 5

<210> 102
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

[0050]

<400> 102

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 103
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR序列

<400> 103

Gly Gly Ser Leu Ser Arg
 1 5

<210> 104
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> TNF006C11

<400> 104

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Gln Thr Ser Ser Thr Ala
 20 25 30

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Gln Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

[0051]

Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 105

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 标签

<400> 105

Gly Gly Gly Cys
 1

根据 Kabat 编号 (VH)	根据 Chothia 编号 (VH)	Aho 编号	IMGT
11	11	12	12
14	14	15	15
41	41	48	46
42	42	49	47
87	87	101	99
89	89	103	101
108	108	144	---
110	110	146	---
112	112	148	---

来源: <http://www.bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/Numbering/NumFrame.html>

图1

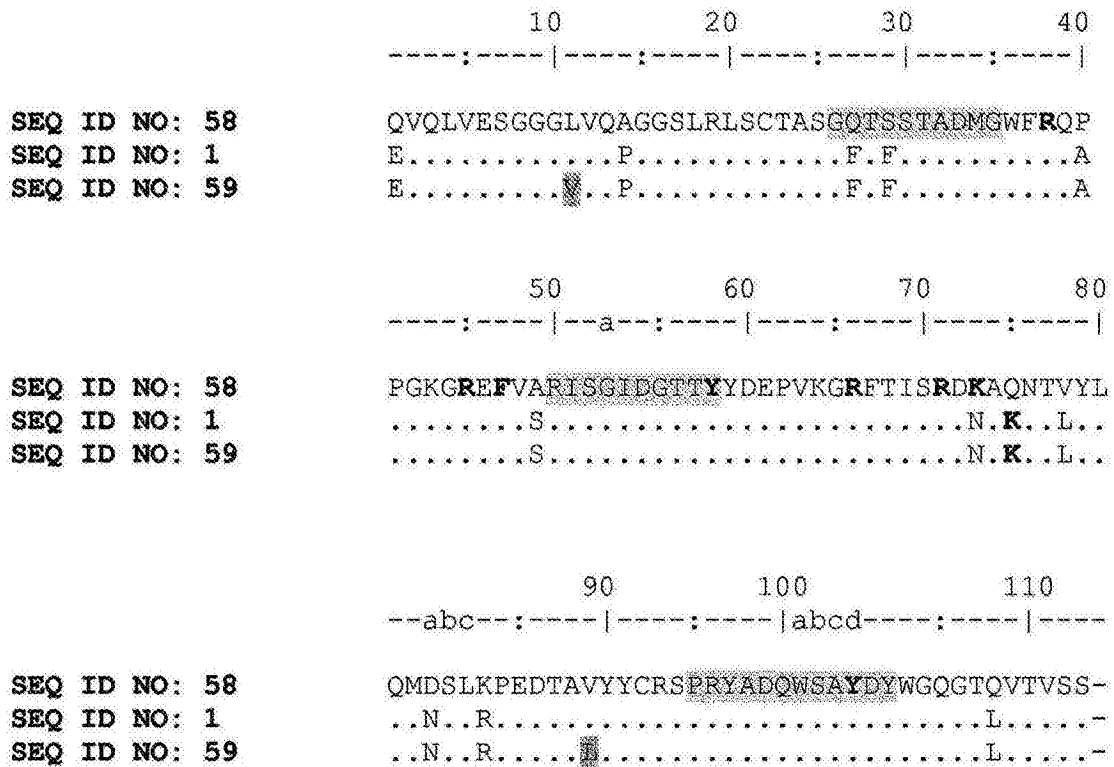


图2

SEQ ID NO	描述	序列
1	参考 A:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVSRI SGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCRSPRYA DQWSAYDYWGQGTLLVTVSS
2	CDR1 (Kabat)	TADMG
3	CDR2 (Kabat)	RISGIDGTTYDEPVKG
4	CDR3 (Kabat/Abm)	PRYADQWSAYDY
5	CDR1 (Abm)	GFTFSTADMG
6	CDR2 (Abm)	RISGIDGTTY
7	CDR3 (Kabat/Abm)	PRYADQWSAYDY
8	参考 A (89T)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVSRI SGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCRSPRYA DQWSAYDYWGQGTLLVTVSS
9	参考 A (11V + 110K)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVSRI SGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCRSPRYA DQWSAYDYWGQGTLLVKVSS
10	参考 A (11V + 110Q)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVSRI SGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCRSPRYA DQWSAYDYWGQGTLLVQVSS
11	参考 A (11V + 110K)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVSRI SGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCRSPRYA DQWSAYDYWGQGTLLVTVKS
12	参考 A (11V + 112Q)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGREFVSRI SGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCRSPRYA DQWSAYDYWGQGTLLVTVQS

图3

SEQ ID NO	描述	序列
13	参考 A (89L + 110K)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLVKVSS
14	参考 A (89L + 110Q)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLVQVSS
15	参考 A (89L + 112K)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLVTVKS
16	参考 A (89L + 112Q)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLVTVQS
17	参考 A (11V + 89L)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLVTVSS
18	参考 A (11V + 89L + 110K)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLVKVSS
19	参考 A (11V + 89L + 110Q)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLVQVSS
20	参考 A (11V + 89L + 112K)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLVTVKS

图3(续)

SEQ ID NO	描述	序列
21	参考 A (11V + 89L + 112Q)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVQS
22	参考 A (89T) + A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA TYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVSSA
23	参考 A (11V + 110K) + A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVKVSSA
24	参考 A (11V + 110Q) + A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVQVSSA
25	参考 A (11V + 112K) + A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVKSA
26	参考 A (11V + 112Q) + A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVQSA
27	参考 A (89L + 110K) + A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVKVSSA
28	参考 A (89L + 110Q) + A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVQVSSA

图3(续)

SEQ ID NO	描述	序列
29	参考 A (89L + 112K)+A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVKSA
30	参考 A (89L + 112Q)+A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVQSA
31	参考 A (11V + 89L)+ A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVSSA
32	参考 A (11V + 89L + 110K)+ A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVKVSSA
33	参考 A (11V + 89L + 110Q)+ A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVQVSSA
34	参考 A (11V + 89L + 112K)+A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVKSA
35	参考 A (11V + 89L + 112Q)+A	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVQSA
36	本发明的 TNF 结合剂 (00016)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVSSA
37	本发明的 TNF 结合剂 (00018)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTLLVTVSSA

图3(续)

SEQ ID NO	描述	序列
38	本发明的 TNF 结合剂 (00019)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
39	本发明的 TNF 结合剂 (00020)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
40	本发明的 TNF 结合剂 (00021)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
41	本发明的 TNF 结合剂 (00030)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLYQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
42	HIS6-FLAG3 标签	HHHHHGAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGA
43	C 末端	VTVKS
44	C 末端	VTVQS
45	C 末端	VKVSS
46	C 末端	VQVSS
47	C 末端	VTVKSX (n)
48	C 末端	VTVQSX (n)
49	C 末端	VKVSSX (n)
50	C 末端	VQVSSX (n)
51	C 末端	VTVKSA
52	C 末端	VTVQSA
53	C 末端	VKVSSA
54	C 末端	VQVSSA
55	C 末端	VTVSS
56	C 末端	VTVSSX (n)
57	C 末端	VTVSSA
58	NC55TNF-NC7 (PMP6C11) WO2006/122786: SEQ ID NO: 125	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGRE FVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDKAQNNTVYLYQMDSLKPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTQVTVSS
59	WO2015/173325 seq id NO: 345	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTLYLYQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSS

图3(续)

60	TNF200	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEFPVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSS
61	A016600015 (TNF200A)	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEFPVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
62	A016600046 100dL (00046)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEFPVKGRFTISRDNKNTVYLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSALDYWGQGLVTVSSA
63	A016600052 (49C-69C + 100dL (00052)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVCRISGIDGTTYDEFPVKGRFTCSRDNKNTVYLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSALDYWGQGLVTVSSA
64	A016600038 (00038)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEFPVKGRFTISRDNANTVYLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSA
65	A016600013 (00013)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFLQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEFPVQGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRPSQYADQWSAYDYWGQGLVTVSS
66	A016600014 (00014)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVSRISGIDGTTYDEFPVQGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTA VYYCRPSQYADQWSAYDYWGQGLVTVSS
67	A016600040 (00040)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGRE FVARISGIDGTTYDEFPVKGRFTISRDKAQNNTVYLYLQMDSLKPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTQVTVSS
68	A016600039 (00039)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGQTSSTADMGWFRQPPGKGRE FVARISGIDGTTYDEFPVKGRFTISRDKSQNTVYLYLQMDSLKPEDTA VYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGTQVTVSS
69	A016600045 (00045)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGRE FVARISGIDGTTYDEFPVKGRFTISRDNKNTVYLYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAHDYWGQGLVTVSSA

图3(续)

	20	40	60	80
SEQIDNO:1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCTASGFTFS	TADQWFRQA
SEQIDNO:8				PGKGRFVSR
SEQIDNO:9	V			ISGIDGTTY
SEQIDNO:11	V			80
SEQIDNO:18	V			80
SEQIDNO:12	V			80
SEQIDNO:13				80
SEQIDNO:14				80
SEQIDNO:15				80
SEQIDNO:16				80
SEQIDNO:17	V			80
SEQIDNO:18	V			80
SEQIDNO:19	V			80
SEQIDNO:20	V			80
SEQIDNO:21	V			80
SEQIDNO:22				80
SEQIDNO:23	V			80
SEQIDNO:24	V			80
SEQIDNO:25	V			80
SEQIDNO:26	V			80
SEQIDNO:27				80
SEQIDNO:28				80
SEQIDNO:29				80
SEQIDNO:30				80
SEQIDNO:31	V			80
SEQIDNO:32	V			80
SEQIDNO:33	V			80
SEQIDNO:34	V			80
SEQIDNO:35	V			80
SEQIDNO:36	D	V		A
SEQIDNO:37	D	V		80
SEQIDNO:38	D	V		80
SEQIDNO:39	D	V		A
SEQIDNO:40	D	V		A
SEQIDNO:41	D	V		80
SEQIDNO:58	Q	A	O S	P A

	80	100	120
SEQIDNO:1	DEPVKGRFTI	SRDNAKNTLY	LQMNSLRPED
SEQIDNO:8			T
SEQIDNO:9			K
SEQIDNO:11			K
SEQIDNO:18			Q
SEQIDNO:12			Q
SEQIDNO:13		L	K
SEQIDNO:14		L	Q
SEQIDNO:15		L	K
SEQIDNO:16		L	Q
SEQIDNO:17		L	120
SEQIDNO:18		L	K
SEQIDNO:19		L	Q
SEQIDNO:20		L	K
SEQIDNO:21		L	Q
SEQIDNO:22		T	120
SEQIDNO:23			K
SEQIDNO:24			Q
SEQIDNO:25			K
SEQIDNO:26			Q
SEQIDNO:27		L	K
SEQIDNO:28		L	Q
SEQIDNO:29		L	K
SEQIDNO:30		L	Q
SEQIDNO:31		L	120
SEQIDNO:32		L	K
SEQIDNO:33		L	Q
SEQIDNO:34		L	K
SEQIDNO:35		L	Q
SEQIDNO:36	S	L	120
SEQIDNO:37	S	L	120
SEQIDNO:38	S V	L	120
SEQIDNO:39	ADS S V	L	120
SEQIDNO:40	S V	L	120
SEQIDNO:41		L	120
SEQIDNO:58	K Q V	O K	Q

图4

SEQIDNO:1	S	-	121
SEQIDNO:8	.	-	121
SEQIDNO:9	.	-	121
SEQIDNO:11	.	-	121
SEQIDNO:10	.	-	121
SEQIDNO:12	.	-	121
SEQIDNO:13	.	-	121
SEQIDNO:14	.	-	121
SEQIDNO:15	.	-	121
SEQIDNO:16	.	-	121
SEQIDNO:17	.	-	121
SEQIDNO:18	.	-	121
SEQIDNO:19	.	-	121
SEQIDNO:20	.	-	121
SEQIDNO:21	.	-	121
SEQIDNO:22	A	122	
SEQIDNO:23	A	122	
SEQIDNO:24	A	122	
SEQIDNO:25	A	122	
SEQIDNO:26	A	122	
SEQIDNO:27	A	122	
SEQIDNO:28	A	122	
SEQIDNO:29	A	122	
SEQIDNO:30	A	122	
SEQIDNO:31	A	122	
SEQIDNO:32	A	122	
SEQIDNO:33	A	122	
SEQIDNO:34	A	122	
SEQIDNO:35	A	122	
SEQIDNO:36	A	122	
SEQIDNO:37	A	122	
SEQIDNO:38	A	122	
SEQIDNO:39	A	122	
SEQIDNO:40	A	122	
SEQIDNO:41	A	122	
SEQIDNO:58	.	-	121

图4(续)

		20 ↓		40 ↓		60 ↓	
SEQIDNO:31	EVQLVESGGG	VVQPGGSLRL	SCTASGFTFS	TADMGWFRQA	PGKGRFVSR	ISGIDGTTY	60
SEQIDNO:36	D				A		60
SEQIDNO:37	D						60
SEQIDNO:38	D						60
SEQIDNO:39	D				A		60
SEQIDNO:40	D				A		60
SEQIDNO:41	D						60
SEQIDNO:1		L					60
		80 ↓		100 ↓		120 ↓	
SEQIDNO:31	DEPVKGRFTI	SRNAKNTLY	LQMNSLRPED	TALYYCRSPR	YADQWSAYDY	WGGGTLVTVS	120
SEQIDNO:36		S					120
SEQIDNO:37		S					120
SEQIDNO:38		S	V				120
SEQIDNO:39	ADS	S	V				120
SEQIDNO:40		S	V				120
SEQIDNO:41							120
SEQIDNO:1				V			120
SEQIDNO:31	SA						122
SEQIDNO:36							122
SEQIDNO:37							122
SEQIDNO:38							122
SEQIDNO:39							122
SEQIDNO:40							122
SEQIDNO:41							122
SEQIDNO:1							121

图5

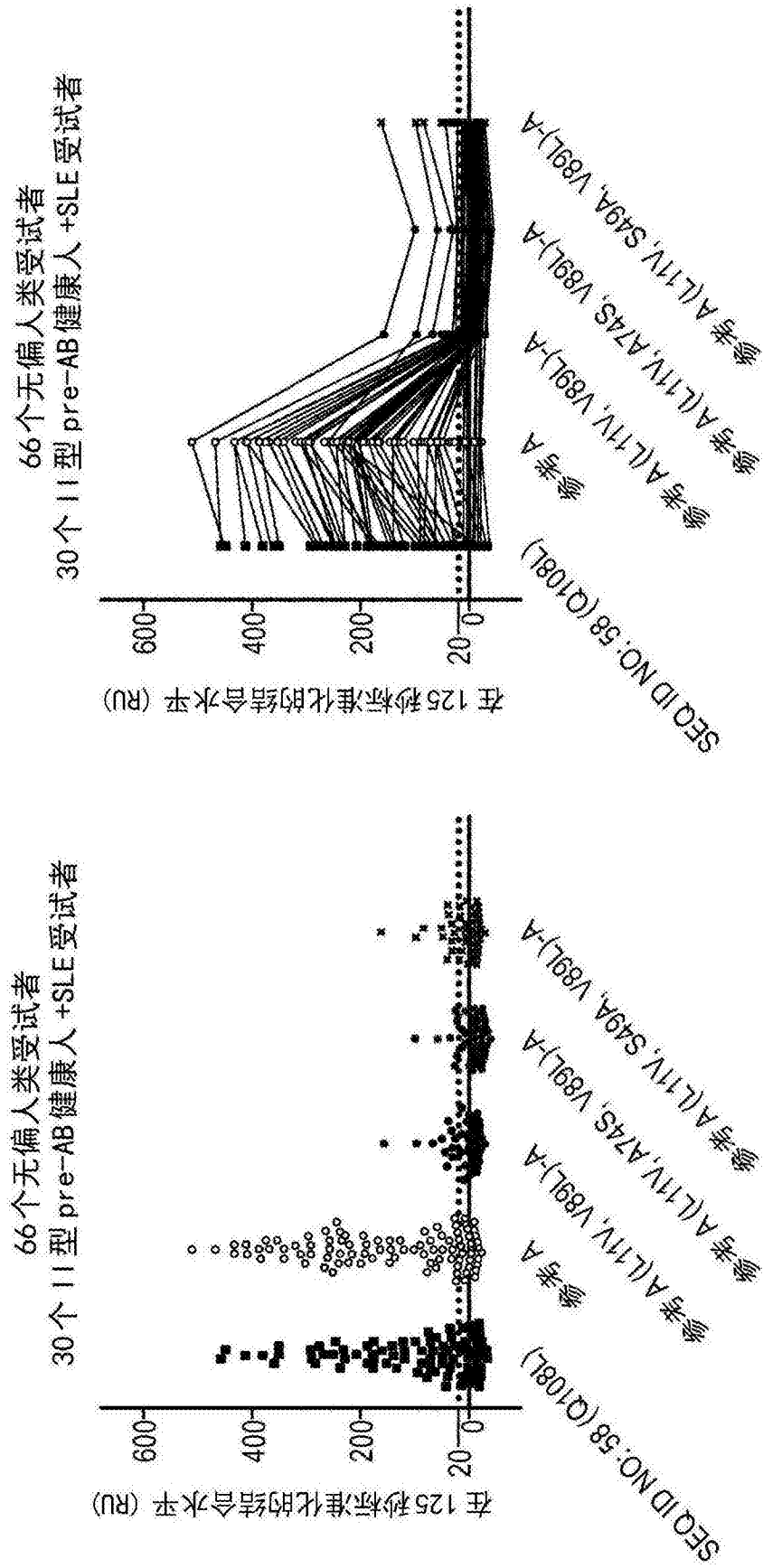


图6

样品	标准化的 PreAb 结合水平 (在 125 s 的 RU)					与参考 A 相比 PreAb 结合的降低 %			
	SEQ ID NO:58 (Q108L)	参考 A	参考 A (L11V, V89L)	参考 A (L11V, A74S, V89L)	参考 A (L11V, S49A, V89L)	SEQ ID NO:58 (Q108L)	参考 A (L11V, V89L)	参考 A (L11V, A74S, V89L)	参考 A (L11V, S49A, V89L)
IHuS#ABL-0042-02	-15	-11	-20	-23	-15				
IHuS#ABL-0088-03	118	200	3	-3	12	41	99	100	94
IHuS#ABL-0137-01	-17	8	-16	-22	-14				
IHuS#ABL-0138-01	-11	19	-14	-17	-17				
IHuS#ABL-0139-01	0	37	-9	-12	-11	100	100	100	100
IHuS#ABL-0141-01	-17	-2	-15	-15	-10				
IHuS#ABL-0149-01	34	121	14	-10	32	71	88	100	73
IHuS#ABL-0150-01	11	17	-20	-19	-13				
IHuS#ABL-0151-01	38	126	-10	-16	-6	70	100	100	100
IHuS#ABL-0152-01	-2	50	-10	-12	-11	100	100	100	100
IHuS#ABL-0153-01	61	145	-16	-23	-15	58	100	100	100
IHuS#ABL-0154-01	-32	-18	-29	-31	-25				
IHuS#ABL-0159-01	-24	-5	-28	-34	-23				
IHuS#ABL-0160-01	-15	-12	-22	-19	-12				
IHuS#ABL-0161-01	-17	-5	-11	-18	-8				
IHuS#ABL-0162-01	-15	-10	-13	-17	-17				
IHuS#ABL-0148-01	290	369	-8	-13	-10	21	100	100	100
IHuS#ABL-0163-01	236	310	4	-6	5	24	99	100	98
IHuS#ABL-0171-01	-17	-8	-21	-24	-18				
IHuS#ABL-0172-01	47	48	-18	-17	-11	0	100	100	100

图7

样品	SEQ ID NO:58 (Q108L)	参考 A	参考 A (L11V, V89L)	参考 A (L11V, A74S, V89L)	参考 A (L11V, S49A, V89L)	SEQ ID NO:58 (Q108L)	参考 A (L11V, V89L)	参考 A (L11V, A74S, V89L)	参考 A (L11V, S49A, V89L)
IHuS#ABL-0218-01	63	72	-12	-15	-9	13	100	100	100
IHuS#ABL-0040-03	284	342	1	-11	-7	17	100	100	100
IHuS#ABL-0090-02	413	433	25	-3	31	5	94	100	93
IHuS#ABL-0173-01	186	229	-14	-16	-13	19	100	100	100
IHuS#ABL-0188-01	-14	-8	-21	-23	-16				
IHuS#ABL-0008-02	458	468	66	34	84	2	86	93	82
IHuS#ABL-0189-01	-12	-1	-10	-13	-6				
IHuS#ABL-0190-01	-11	-3	-11	-13	-18				
IHuS#ABL-0191-01	-21	-13	-17	-19	-20				
IHuS#ABL-0192-01	-14	3	-20	-17	-15				
IHuS#ABL-0198-01	-3	8	-17	-20	-13				
IHuS#ABL-0165-01	208	240	-20	-21	-13	14	100	100	100
IHuS#ABL-0199-01	229	250	15	5	16	8	94	98	94
IHuS#ABL-0200-01	-12	12	-11	-12	-14				
IHuS#ABL-0201-01	11	30	-2	-9	-1	63	100	100	100
IHuS#ABL-0202-01	29	90	-13	-17	-9	67	100	100	100
IHuS#ABL-0044-02	-25	-23	-26	-28	-22				
IHuS#ABL-0209-01	-9	18	-15	-15	-8				
IHuS#ABL-0210-01	-10	3	-11	-13	-8				
IHuS#ABL-0211-01	2	31	-11	-13	-14	92	100	100	100
IHuS#ABL-0212-01	47	137	4	-5	5	66	97	100	97
IHuS#ABL-0213-01	-14	0	-14	-13	-11				

图7(续)

样品	SEQ ID NO:58 (Q108L)	参考 A	参考 A (L11V, V89L)	参考 A (L11V, A74S, V89L)	参考 A (L11V, S49A, V89L)	SEQ ID NO:58 (Q108L)	参考 A (L11V, V89L)	参考 A (L11V, A74S, V89L)	参考 A (L11V, S49A, V89L)
IHuS#ABL-0183-01	290	353	13	-1	17	18	96	100	95
IHuS#ABL-0005-06	-18	-16	-21	-20	-16				
IHuS#ABL-0219-01	-3	7	-12	-14	-8				
IHuS#ABL-0221-01	-2	19	-20	-23	-24				
IHuS#ABL-0222-01	140	144	-11	-13	-12	3	100	100	100
IHuS#ABL-0223-01	177	267	-31	-36	-27	34	100	100	100
IHuS#ABL-0142-01	-2	25	-22	-23	-15	100	100	100	100
IHuS#ABL-0143-01	12	14	-17	-14	-7				
IHuS#ABL-0144-01	1	83	-11	-16	-8	99	100	100	100
IHuS#ABL-0145-01	87	81	-14	-16	-16	-7	100	100	100
IHuS#ABL-0146-01	16	61	-16	-17	-16	74	100	100	100
IHuS#ABL-0147-01	72	163	-24	-29	-20	56	100	100	100
IHuS#ABL-0031-04	-35	24	-16	-26	-17	100	100	100	100
IHuS#ABL-0047-02	-5	24	-27	-26	-18	100	100	100	100
IHuS#ABL-0155-01	49	65	-4	-14	0	24	100	100	100
IHuS#ABL-0156-01	26	59	-7	-11	-10	57	100	100	100
IHuS#ABL-0157-01	98	261	-4	-13	-9	63	100	100	100
IHuS#ABL-0158-01	175	222	-13	-16	-7	21	100	100	100
IHuS#ABL-0164-01	-18	-17	-19	-22	-14				
IHuS#ABL-0166-01	-19	-18	-18	-18	-11				
IHuS#ABL-0167-01	-23	237	-20	-31	-11	100	100	100	100
IHuS#ABL-0168-01	-14	-11	-13	-14	-14				

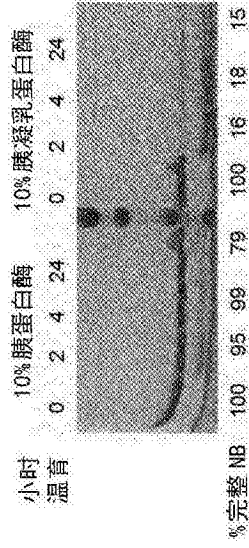
图7(续)

样品	SEQ ID NO:58 (Q108L)	参考 A	参考 A (L11V, V89L)	参考 A (L11V, A74S, V89L)	参考 A (L11V, S49A, V89L)	SEQ ID NO:58 (Q108L)	参考 A (L11V, V89L)	参考 A (L11V, A74S, V89L)	参考 A (L11V, S49A, V89L)
IHuS#ABL-0169-01	-5	21	-10	-12	-11	100	100	100	100
IHuS#ABL-0170-01	86	242	-16	-19	-11	64	100	100	100
ABL-0041-01_C	34	77	-19	-31	-19	55	100	100	100
ABL-0053-01_C	178	302	-11	-10	-3	42	100	100	100
ABL-0054-01_C	249	293	-8	-13	-6	15	100	100	100
ABL-0045-01_C	379	434	43	21	36	13	90	95	92
ABL-0062-01_C	268	375	-7	-18	-8	29	100	100	100
ABL-0039-01_C	361	410	31	11	30	12	92	97	93
HSI#260620081 nd11	450	512	156	100	161	12	70	80	69
IHuS#29Sep201 1Ind14F	151	221	36	22	39	32	84	90	82
IHuS#29Sep201 1Ind39F	7	167	-9	-17	-9	96	100	100	100
IHuS#29Sep201 1Ind43M	32	55	-9	-14	-11	42	100	100	100
IHuS#29Sep201 1Ind44F	276	412	31	12	39	33	92	97	91
IHuS#P6012314 A20	76	102	-10	-12	-8	25	100	100	100
IHuS#P7012314 A06	133	216	-7	-16	-4	38	100	100	100
IHuS#P7012314 A12	121	191	-13	-15	-13	37	100	100	100
IHuS#ABL-0195-01	231	296	-2	-10	1	22	100	100	100
IHuS#ABL-0208-01	351	384	50	26	49	9	87	93	87
IHuS#ABL-0184-01	66	238	-4	-13	-2	72	100	100	100
NB130259-004	39	71	-12	-12	-6	44	100	100	100
IHuS#04APR20 12Ind05m	74	178	0	-14	4	59	100	100	98

图7(续)

+12111Q	1Q	11	参考 A (L11V, V89L)	1	参考 A (L11V, S49A, V89L)	SEQ ID NO:58 (Q108L)	参考 A (L11V, V89L)	参考 A (L11V, A74S, V89L)	参考 A (L11V, S49A, V89L)
IHuS#04APR20 12Ind06m	70	194	-4	-6	3	64	100	100	98
IHuS#04APR20 12Ind07m	41	146	3	-3	4	72	98	100	97
IHuS#04APR20 12Ind09m	70	189	2	-3	-2	63	99	100	100
IHuS#04APR20 12Ind10m	138	234	-2	-5	-2	41	100	100	100
IHuS#04APR20 12Ind03F	245	342	10	6	17	28	97	98	95
IHuS#04APR20 12Ind04F	351	387	-8	-11	-9	9	100	100	100
IHuS#04APR20 12Ind15F	174	293	40	23	47	41	86	92	84
IHuS#04APR20 12Ind27F	160	319	29	7	26	50	91	98	92
IHuS#04APR20 12Ind29F	187	258	-2	-8	-5	27	100	100	100
IHuS#04APR20 12Ind31F	118	265	96	56	97	56	64	79	63
IHuS#04APR20 12Ind40F	95	257	-31	-40	-29	63	100	100	100

图7(续)



在考马斯亮蓝染色的
SDS PAGE 凝胶上的 A01660015 分析

图8B

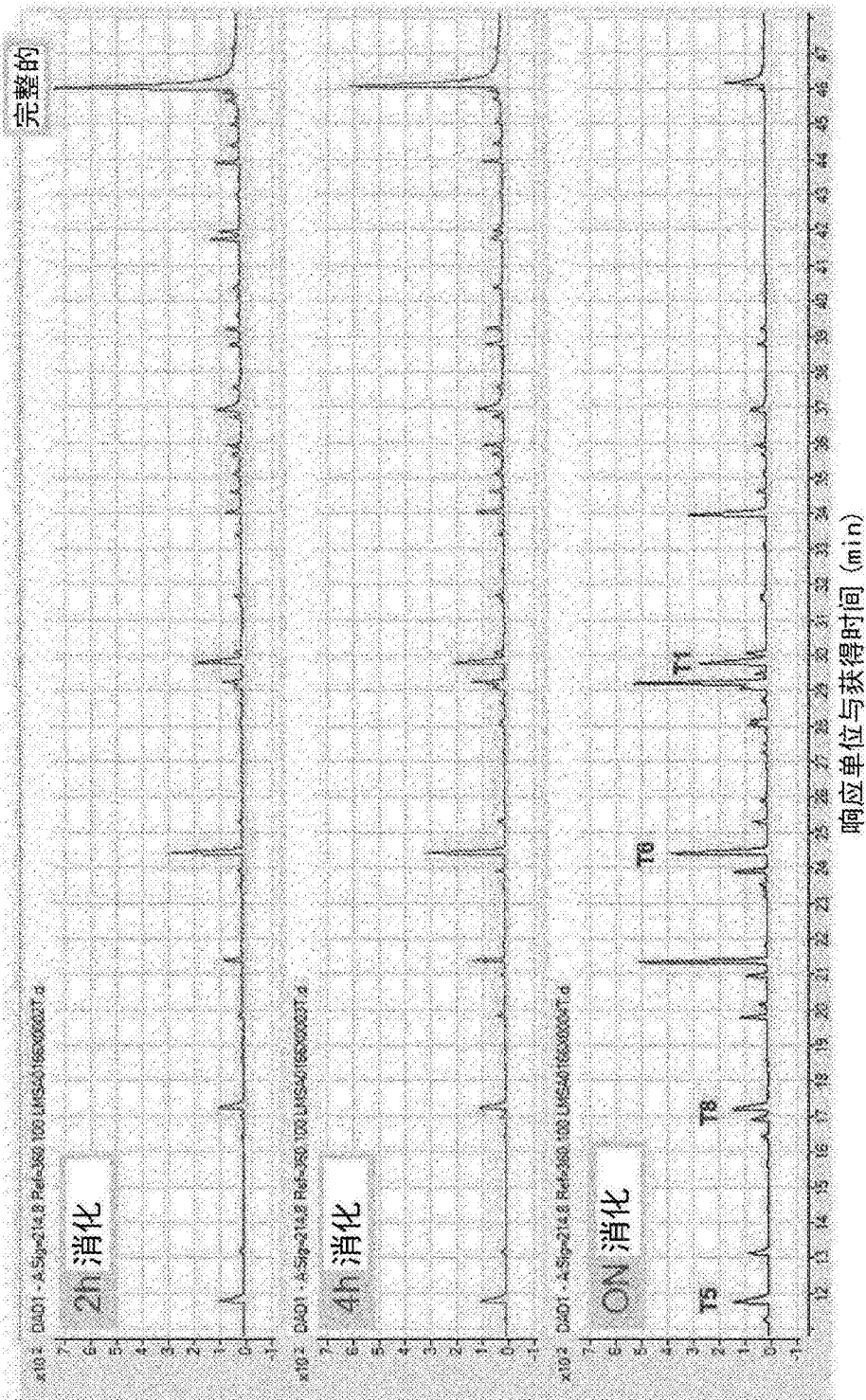


图8C

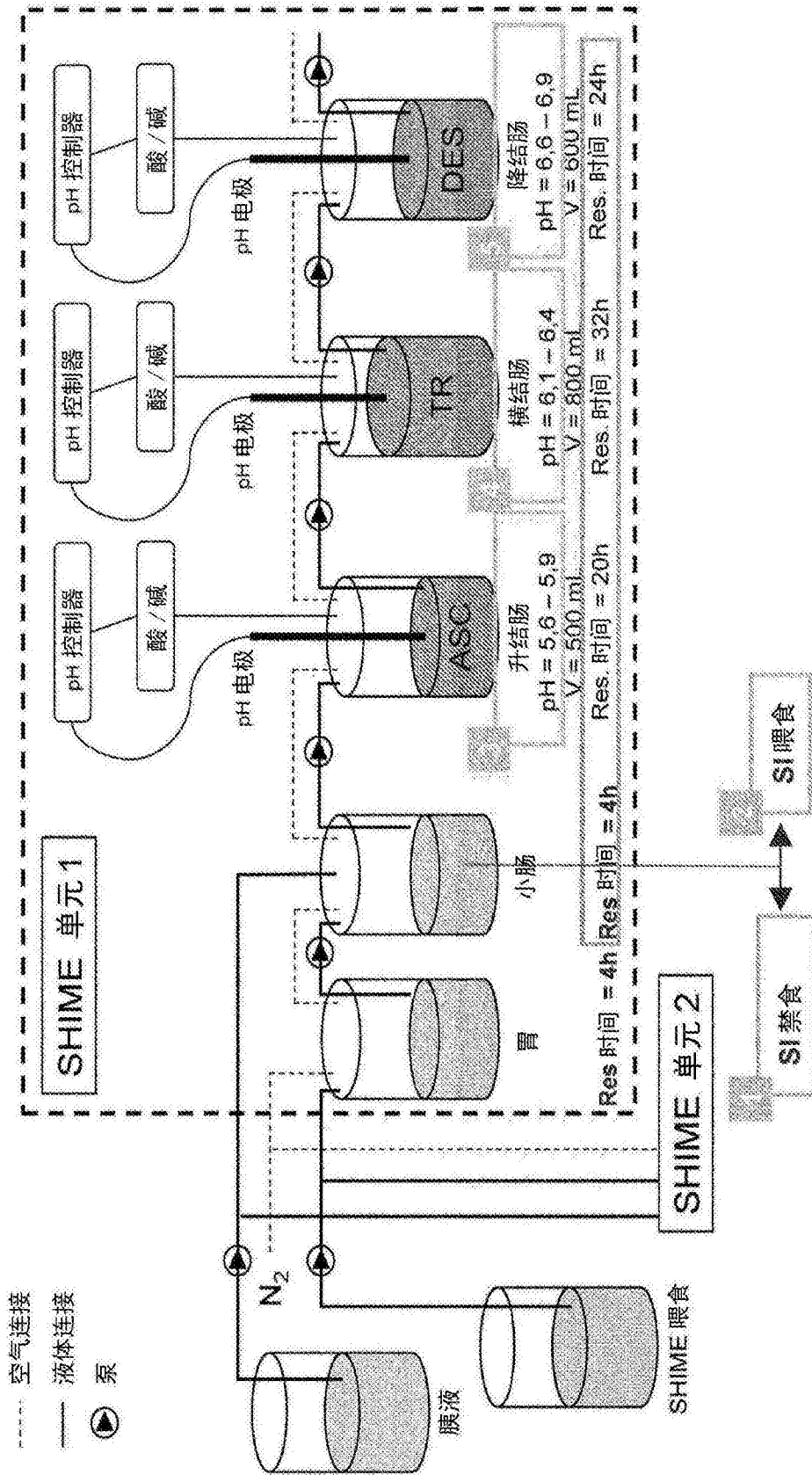
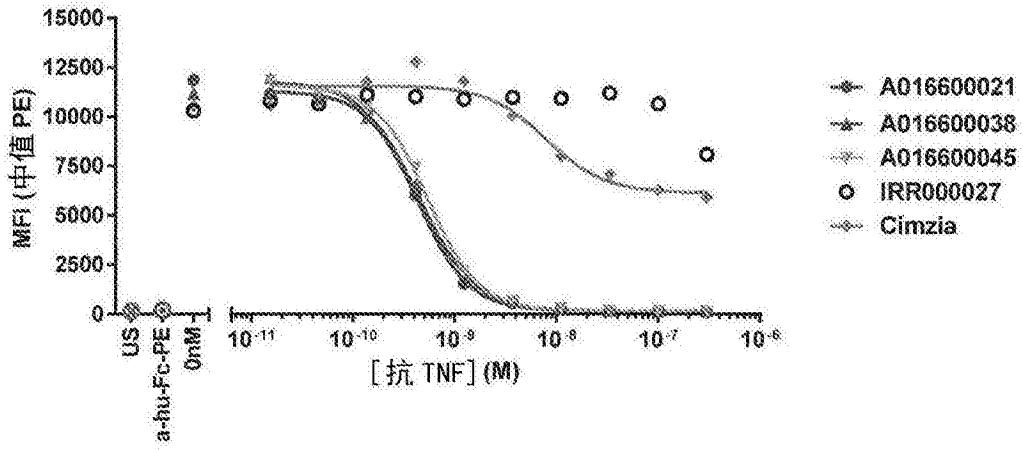


图9

A

用 Enbrel 处理的 HEK293H-mTNF 细胞的竞争性 FACS
(EC₃₀=0.02nM)



B

用 Enbrel 处理的 HEK293H-mTNF 细胞的竞争性 FACS
(EC₉₀=0.2nM)

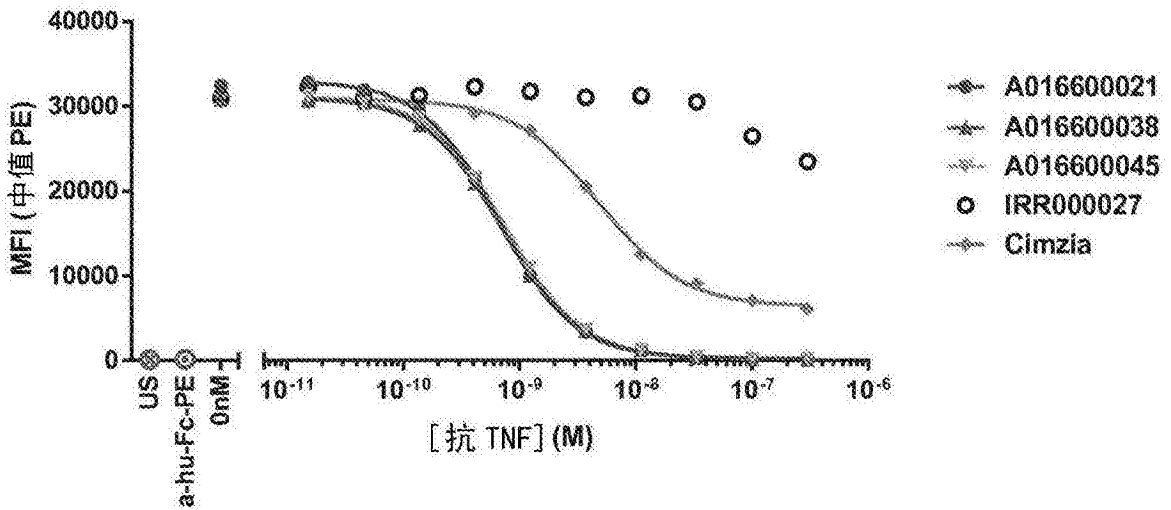


图10

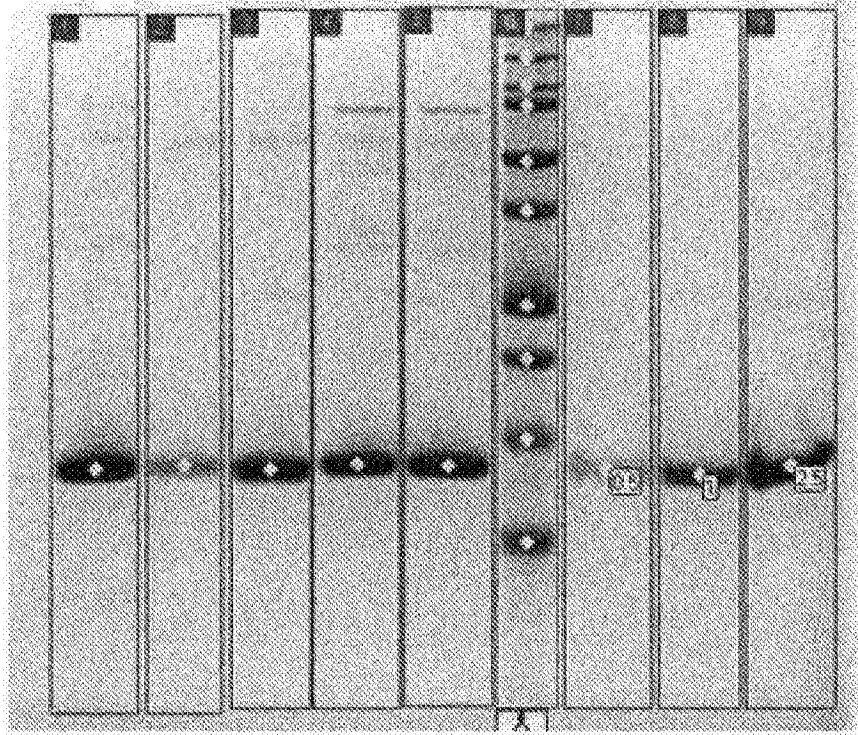


图11