



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114981300 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 30

(21) 申请号 202080083442.0

申请人 赛诺菲

(22) 申请日 2020.12.03

(72) 发明人 H·罗美莱尔 C·阿斯布兰德

(30) 优先权数据

A·布里格 S·科内利斯

20305056.2 2020.01.23 EP

E·洛朗

20000090.9 2020.02.28 EP

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

20305216.2 2020.03.02 EP

公司 11021

62/944,619 2019.12.06 US

专利代理师 柳春琦

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2022.05.31

C07K 16/18 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 37/06 (2006.01)

PCT/EP2020/084430 2020.12.03

C07K 16/24 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61K 39/395 (2006.01)

W02021/110816 EN 2021.06.10

(71) 申请人 艾伯霖克斯公司

权利要求书3页 说明书48页

地址 比利时兹维纳尔德

序列表47页 附图15页

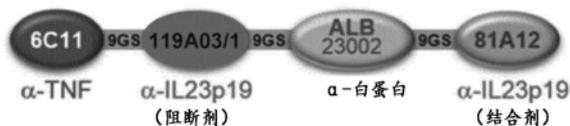
(54) 发明名称

包含靶向TNF  $\alpha$  和IL-23的免疫球蛋白单个可变结构域的多肽

(57) 摘要

本技术旨在提供新型药物。具体地,本技术提供了包含至少三个免疫球蛋白单个可变结构域 (ISVD) 的多肽,其特征在于至少一个ISVD与TNF  $\alpha$  结合,并且至少两个ISVD与IL-23结合。本技术还提供了核酸、载体和组合物。

F027500069



1. 一种多肽、包含所述多肽的组合物,或包含含有编码所述多肽的核苷酸序列的核酸的组合物,所述多肽或组合物用作药物,其中所述多肽特异性结合TNF $\alpha$ 和IL-23的p19亚基,并且其中所述多肽包含至少三个免疫球蛋白单个可变结构域(ISVD)或其组成,其中每个所述ISVD包含任选地经由一个或多个肽接头连接的三个互补决定区(分别为CDR1至CDR3);并且其中:

a) 第一ISVD包含

i. CDR1,其为SEQ ID NO:6的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:6具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

ii. CDR2,其为SEQ ID NO:10的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:10具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

iii. CDR3,其为SEQ ID NO:14的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:14具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

b) 第二ISVD包含

iv. CDR1,其为SEQ ID NO:7的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:7具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

v. CDR2,其为SEQ ID NO:11的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:11具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

vi. CDR3,其为SEQ ID NO:15的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:15具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;并且

c) 第三ISVD包含

vii. CDR1,其为SEQ ID NO:9的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:9具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

viii. CDR2,其为SEQ ID NO:13的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:13具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

ix. CDR3,其为SEQ ID NO:17的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:17具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中:

a) 所述第一ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:2大于90%的序列同一性;

b) 所述第二ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:3大于90%的序列同一性;并且

c) 所述第三ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:5大于90%同一性的序列同一性。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中:

a) 所述第一ISVD由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成;

b) 所述第二ISVD由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成;并且

c) 所述第三ISVD由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中:所述多肽进一步包含与人血清白蛋白结合的ISVD,所述ISVD包含

i. CDR1,其为SEQ ID NO:8的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:8具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

ii. CDR2,其为SEQ ID NO:12的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:12具有2或1个氨基酸差

异的氨基酸序列;和

iii.CDR3,其为SEQ ID NO:16的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:16具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

5.根据权利要求4所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中:与人血清白蛋白结合的所述ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:4大于90%的序列同一性。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中:所述多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者由其组成。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其用于治疗自身免疫性或炎性疾病。

8.根据权利要求7所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中:所述自身免疫性或炎性疾病选自炎性肠病(诸如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)、银屑病、银屑病关节炎和化脓性汗腺炎。

9.一种多肽,所述多肽包含至少三个免疫球蛋白单个可变结构域(ISVD)或者由其组成,其中每个所述ISVD包含任选地经由一个或多个肽接头连接的三个互补决定区(分别为CDR1至CDR3);并且其中:

a) 第一ISVD包含

i.CDR1,其为SEQ ID NO:6的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:6具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

ii.CDR2,其为SEQ ID NO:10的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:10具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

iii.CDR3,其为SEQ ID NO:14的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:14具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

b) 第二ISVD包含

iv.CDR1,其为SEQ ID NO:7的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:7具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

v.CDR2,其为SEQ ID NO:11的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:11具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

vi.CDR3,其为SEQ ID NO:15的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:15具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;并且

c) 第三ISVD包含

vii.CDR1,其为SEQ ID NO:9的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:9具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

viii.CDR2,其为SEQ ID NO:13的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:13具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

ix.CDR3,其为SEQ ID NO:17的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:17具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

10.根据权利要求9所述的多肽,其中:

a) 所述第一ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:2大于90%的序列同一性;

b) 所述第二ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:3大于90%的序列同一性;并且

- c) 所述第三ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:5大于90%同一性的序列同一性。
11. 根据权利要求9至10中任一项所述的多肽, 其中:
- a) 所述第一ISVD由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成;
- b) 所述第二ISVD由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成; 并且
- c) 所述第三ISVD由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成。
12. 根据权利要求9至11中任一项所述的多肽, 其中所述多肽进一步包含与人血清白蛋白结合的ISVD, 所述ISVD包含
- i. CDR1, 其为SEQ ID NO:8的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:8具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;
- ii. CDR2, 其为SEQ ID NO:12的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:12具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列; 和
- iii. CDR3, 其为SEQ ID NO:16的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:16具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。
13. 根据权利要求12所述的多肽, 其中与人血清白蛋白结合的所述ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:4大于90%的序列同一性。
14. 根据权利要求9至13中任一项所述的多肽, 其中所述多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者由其组成。
15. 一种核酸, 所述核酸包含编码根据权利要求9至14中任一项所述的多肽的核苷酸序列。
16. 一种宿主或宿主细胞, 所述宿主或宿主细胞包含根据权利要求15所述的核酸。
17. 一种用于产生根据权利要求9至14中任一项所述的多肽的方法, 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体或另一合适的表达系统中表达根据权利要求15所述的核酸; 任选地随后进行:
- b) 分离和/或纯化根据权利要求9至14中任一项所述的多肽。
18. 一种组合物, 所述组合物包含至少一种根据权利要求9至14中任一项所述的多肽, 或根据权利要求15所述的核酸。

## 包含靶向TNF $\alpha$ 和IL-23的免疫球蛋白单个可变结构域的多肽

[0001] 说明书

### 1技术领域

[0002] 本技术涉及靶向TNF $\alpha$ 和IL-23的p19亚基的多肽。其还涉及编码所述多肽的核酸分子和包含所述核酸的载体,以及包含所述多肽、核酸或载体的组合物。本技术进一步涉及用于治疗患有炎症肠病、银屑病、银屑病关节炎或化脓性汗腺炎的受试者的方法中的这些产品。此外,本技术涉及生产这些产品的方法。

### 2背景技术

[0003] 自身免疫性或炎症性疾病是机体针对自身组织产生免疫应答的结果。自身免疫性或炎症性疾病通常是慢性的,并且甚至可能危及生命。自身免疫性或炎症性疾病尤其包括炎症肠病(诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、银屑病、银屑病关节炎和化脓性汗腺炎。炎症肠病,诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎,是一种涉及肠道炎症并伴有上皮损伤的慢性炎症性疾病。其他慢性自身免疫性疾病,诸如银屑病、银屑病关节炎和化脓性汗腺炎的特征是发红、干燥、发痒或鳞状皮肤斑块,关节疼痛性炎症,或者皮肤上出现炎症和红肿肿块。已经发现,患有银屑病的患者更可能患有某些合并症,包括糖尿病和炎症肠病(诸如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)以及癌症。

[0004] 白细胞介素23(IL-23)是一种细胞因子,其在慢性炎症诱导过程中对各种免疫细胞的激活是重要的。IL-23是细胞因子IL-6、IL-17、GM-CSF和IL-22的上游调节剂,并且是由与p40亚基(所述p40亚基与细胞因子IL-12共有,并且也称为IL-12 $\beta$ 亚基)共价连接的p19亚基(IL-23 $\alpha$ 亚基,在本文中也称为IL-23p19)组成的异二聚体。此外,IL-23在T细胞炎症免疫应答以及先天淋巴样细胞的炎症活性的调节方面起重要作用。IL-23与炎症性疾病(包括炎症肠病和其他自身免疫性疾病)有关。

[0005] 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )是一种同三聚体细胞因子,其主要由单核细胞和巨噬细胞产生,但已知也由CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>外周血T淋巴细胞分泌。TNF $\alpha$ 可以作为可溶形式或作为跨膜蛋白存在。TNF $\alpha$ 的主要作用是调节免疫细胞。TNF $\alpha$ 充当内源性热原,并且其产生的调节异常与多种人类疾病有关,包括炎症肠病和其他自身免疫性疾病,诸如银屑病。

[0006] FDA目前批准的用于炎症肠病的治疗包括抗TNF $\alpha$ 生物制剂(诸如**Simponi**<sup>®</sup>[戈利木单抗]、**Enbrel**<sup>®</sup>[依那西普]、**Remicade**<sup>®</sup>[英夫利昔单抗]和**Humira**<sup>®</sup>[阿达木单抗])。然而,当前用于炎症肠疾病的抗TNF $\alpha$ 治疗面临大量对当前可用治疗无反应的患者,并且大部分患者在治疗12个月后发生对抗TNF $\alpha$ 治疗的反应丧失。

[0007] 对于银屑病和银屑病关节炎,仅少数患者接受了生物制剂治疗(包括**REMICADE**<sup>®</sup>[英夫利昔单抗]和**HUMIRA**<sup>®</sup>[阿达木单抗],以及靶向细胞因子IL-12和IL-23的共有p40亚基的**STELARA**<sup>®</sup>[优特克单抗])。正在进行靶向IL-23的进一步抗体治疗,包括古塞库单抗(guselkumab)(Tremfya;批准用于银屑病以及炎症肠病和银屑病关节炎的3期临床试验)和瑞莎珠单抗(risankizumab)(Skyrizi;批准用于银屑病以及银屑

病关节炎和克罗恩氏病的3期临床试验)。虽然靶向p19的抗IL-23抗体类别可以在银屑病中赋予一些疾病抑制功效,但患有不同和/或另外的自身免疫性疾病的患者不一定同等程度地受益于这些治疗。例如,在银屑病关节炎中,用抗IL23治疗不能改善发炎关节的反应。在炎性肠病中,多于一半的患者对TNF抑制剂无反应或丧失反应。化脓性汗腺炎也是如此,到目前为止,唯一批准的治疗是HUMIRA®[阿达木单抗],但是仅约50%的患者有反应。

[0008] 靶向多种疾病因子可以例如通过两种单独的生物制剂(例如与不同治疗靶标结合的抗体)的共施用或组合使用来实现。然而,从实践和商业角度两者来看,共施用或组合使用单独的生物制剂可能具有挑战性。例如,两次注射单独的产品使治疗方案对于患者更加不便且更痛苦,这可能对依从性造成负面影响。对于两种单独产品的单次注射,提供在两种产品的所需浓度下允许可接受的粘度和合适的稳定性的配制品可能是困难的或不可能的。另外,共施用和共配制需要生产两种单独的药物,这可能会增加总成本。

[0009] 能够结合两种不同抗原的双特异性抗体已被建议作为解决与单独生物制剂(诸如抗体)的共施用或组合使用相关的此类限制的一种策略。

[0010] 已经提出了多种形式的双特异性抗体构建体。例如,双特异性抗体形式可能涉及两种抗体或其片段的化学缀合(Brennan,M等人,Science,1985.229(4708):第81-83页;Glennie,M.J.等人,J Immunol,1987.139(7):第2367-2375页)。在某些形式中,与特定抗原结合的单链Fv(scFv)片段连接到与单独抗原结合的IgG抗体(例如,WO 2016/073406,其描述了抗TNF $\alpha$ /抗IL-23IgG-scFv双特异性抗体)。WO 2019/027780描述了异二聚体IgG抗体,其中一对重链和轻链可变区靶向TNF $\alpha$ ,并且另一对重链和轻链可变区靶向IL-23。

[0011] 然而,此类双特异性抗体形式的缺点包括在高浓度下的高粘度,使得例如皮下施用具有挑战性,并且每个结合单元需要两个可变结构域相互作用以进行特异性和高亲和力结合,这包括对多肽稳定性和生产效率的影响。此类双特异性抗体形式也可能潜在地导致与轻链错配或重链错配有关的化学、制造和控制(CMC)问题。

### 3发明内容

[0012] 在一些实施方案中,本技术涉及特异性靶向TNF $\alpha$ 和IL-23的多肽或构建体。与单特异性抗TNF $\alpha$ 或抗IL-23多肽相比,同时靶向TNF $\alpha$ 和IL-23导致增加的调节炎症反应的效率。

[0013] 所述多肽显示出对TNF $\alpha$ 和IL-23(例如人和食蟹猴TNF $\alpha$ 和IL-23)的高效力,可以有效地产生(例如在微生物宿主(诸如毕赤酵母(*Pichia*),例如巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*))中),并且在高浓度下显示出低粘度,这对于皮下施用是有利和方便的。此外,可以证实此类多肽对待治疗的受试者中预先存在的抗体(即,在第一次用所述抗体构建体治疗之前存在于受试者中的抗体)具有有限的反应性。在其他实施方案中,此类多肽在待治疗的受试者中表现出足够长的半衰期,使得可以方便地将连续的治疗间隔开。

[0014] 本技术的多肽包含至少三个免疫球蛋白单个可变结构域(ISVD)或由其组成,其中至少一个ISVD特异性地结合TNF $\alpha$ ,并且至少两个ISVD特异性地结合IL-23的p19亚基。在一个实施方案中,与TNF $\alpha$ 结合的至少一个ISVD特异性地结合人TNF $\alpha$ ,并且与IL-23结合的至少两个ISVD特异性地结合人IL-23的p19亚基。

[0015] 在一个实施方案中,所述多肽进一步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,其中与没有所述一个或多个其他基团、残基、部

分或结合单元的相应多肽相比,所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元提供具有增加的半衰期的多肽。例如,结合单元可以是与(人)血清蛋白(诸如人血清白蛋白)结合的ISVD。

[0016] 还提供了能够表达本技术的多肽的核酸分子、包含所述核酸的载体,以及包含所述多肽、核酸或载体的组合物。

[0017] 可以使用本技术的多肽、包含所述多肽的组合物,以及包含含有编码所述多肽的核苷酸序列的核酸的组合物作为药物。用作药物的多肽包含至少三个免疫球蛋白单个可变结构域(ISVD)或由其组成,其中每个所述ISVD包含任选地经由一个或多个肽接头连接的三个互补决定区(分别为CDR1至CDR3);并且其中:

[0018] a) 第一ISVD包含

[0019] i. CDR1,其为SEQ ID NO:6的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:6具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0020] ii. CDR2,其为SEQ ID NO:10的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:10具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0021] iii. CDR3,其为SEQ ID NO:14的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:14具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0022] b) 第二ISVD包含

[0023] iv. CDR1,其为SEQ ID NO:7的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:7具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0024] v. CDR2,其为SEQ ID NO:11的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:11具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0025] vi. CDR3,其为SEQ ID NO:15的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:15具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;并且

[0026] c) 第三ISVD包含

[0027] vii. CDR1,其为SEQ ID NO:9的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:9具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0028] viii. CDR2,其为SEQ ID NO:13的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:13具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0029] ix. CDR3,其为SEQ ID NO:17的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:17具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,

[0030] 其中,ISVD的顺序是从N末端开始。

[0031] 本技术的组合物是用作药物。所述组合物可以是药物组合物,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其他药学活性多肽和/或化合物。

[0032] 所述多肽(可能存在于组合物中或可能由核酸编码)因此包含至少三个免疫球蛋白单个可变结构域(ISVD)或由其组成,其中每个所述ISVD包含任选地经由一个或多个肽接头连接的三个互补决定区(分别为CDR1至CDR3);并且其中:

[0033] a) 第一ISVD包含

[0034] i. CDR1,其为SEQ ID NO:6的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:6具有2或1个氨基酸差

异的氨基酸序列；

[0035] ii.CDR2,其为SEQ ID NO:10的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:10具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；和

[0036] iii.CDR3,其为SEQ ID NO:14的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:14具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；

[0037] b) 第二ISVD包含

[0038] iv.CDR1,其为SEQ ID NO:7的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:7具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；

[0039] v.CDR2,其为SEQ ID NO:11的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:11具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；和

[0040] vi.CDR3,其为SEQ ID NO:15的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:15具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；并且

[0041] c) 第三ISVD包含

[0042] vii.CDR1,其为SEQ ID NO:9的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:9具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；

[0043] viii.CDR2,其为SEQ ID NO:13的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:13具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；和

[0044] ix.CDR3,其为SEQ ID NO:17的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:17具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列，

[0045] 其中,ISVD的顺序是从N末端开始。

[0046] 在一个实施方案中,所述多肽特异性地结合TNF $\alpha$ 和IL-23的p19亚基。在一个实施方案中,所述多肽特异性地结合人TNF $\alpha$ 和人IL-23的p19亚基。在一个实施方案中,存在于所述多肽中的第一ISVD特异性地结合TNF $\alpha$ ,并且存在于所述多肽中的第二和第三ISVD特异性地结合IL-23的p19亚基。在一个实施方案中,存在于所述多肽中的第一ISVD特异性地结合人TNF $\alpha$ ,并且存在于所述多肽中的第二和第三ISVD特异性地结合人IL-23的p19亚基。

[0047] 本技术的多肽可以包含：

[0048] a) 第一ISVD,其包含为SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR3；

[0049] b) 第二ISVD,其包含为SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR3；和

[0050] c) 第三ISVD,其包含为SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1；为SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR3。

[0051] 本技术的多肽可以包含：

[0052] a) 第一ISVD,其具有包含与SEQ ID NO:2大于90% (诸如95%) 的序列同一性的氨基酸序列；

[0053] b) 第二ISVD,其具有包含与SEQ ID NO:3大于90% (诸如95%) 的序列同一性的氨基酸序列；和

[0054] c) 第三氨基酸序列,其包含与SEQ ID NO:5大于90% (诸如95%) 同一性的序列同一性。

[0055] 本技术的多肽可以包含：

[0056] a) 第一ISVD,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；

[0057] b) 第二ISVD,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列；和

[0058] c) 第三ISVD,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0059] 本技术的多肽可以进一步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,其中与没有所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元的相应多肽相比,所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元提供具有增加的半衰期的多肽。提供具有增加的半衰期的多肽的所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元可以选自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可以结合血清蛋白的结合单元、Fc部分,以及可以结合血清蛋白的小蛋白或肽。提供具有增加的半衰期的多肽的结合单元可以选自可以结合血清白蛋白(诸如人血清白蛋白)或血清免疫球蛋白(诸如IgG),例如人血清白蛋白的结合单元。

[0060] 本技术的多肽可以包含与人血清白蛋白结合的ISVD,其包含：

[0061] i.CDR1,其为SEQ ID NO:8的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:8具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；

[0062] ii.CDR2,其为SEQ ID NO:12的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:12具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；和

[0063] iii.CDR3,其为SEQ ID NO:16的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:16具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0064] 在一个实施方案中,与人血清白蛋白结合的ISVD包含为SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR3。在一个实施方案中,与人血清白蛋白结合的ISVD包含与SEQ ID NO:4大于90%(诸如95%)的序列同一性。在一个实施方案中,与人血清白蛋白结合的ISVD包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或由其组成。

[0065] 与人血清白蛋白结合的ISVD可以定位于本技术的多肽中的任何位置(即N末端、两个构建块之间、或C末端)。在一个实施方案中,与人血清白蛋白结合的ISVD定位于特异性地结合IL-23的p19亚基的第二和第三ISVD之间。

[0066] 本技术的多肽可以包含含有与SEQ ID NO:1大于90%(诸如95%)的序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,本技术的多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由其组成。

[0067] 还提供了包含编码本技术多肽的核苷酸序列的核酸。

[0068] 还提供了包含这种核酸的宿主或宿主细胞。

[0069] 还提供了用于产生本技术多肽的方法,所述方法至少包括以下步骤：

[0070] a) 在合适的宿主细胞或宿主生物体或另一合适的表达系统中表达编码本技术多肽的核酸；任选地随后进行：

[0071] b) 分离和/或纯化所述多肽。

[0072] 还提供了包含至少一种本技术多肽或编码本技术多肽的核酸的组合物。所述组合物可以是药物组合物,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其他药学活性多肽和/或化合物。

[0073] 本技术的多肽可以用于治疗。更具体地,本技术的多肽可以用于治疗自身免疫性或炎性疾病,诸如选自炎性肠病(诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、银屑病、银屑病关节炎和化脓性汗腺炎的疾病。

[0074] 因此,本技术还涵盖治疗自身免疫性或炎性疾病的方法。在一些实施方案中,本技术涵盖治疗选自炎性肠病(诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、银屑病、银屑病关节炎和化脓性汗腺炎的疾病的方法,其中所述方法包括向有需要的受试者施用药学活性量的本技术多肽、编码本技术多肽的核酸或包含其的组合物。

[0075] 因此,本技术还涵盖本技术多肽在制备用于治疗自身免疫性或炎性疾病的药物组合物方面的用途。在一些实施方案中,本技术还涵盖本技术多肽在制备用于治疗选自炎性肠病(诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、银屑病、银屑病关节炎和化脓性汗腺炎的疾病药物组合物方面的用途。

[0076] 具体地,本技术提供以下实施方案:

[0077] 实施方案1.一种多肽、包含所述多肽的组合物,或包含含有编码所述多肽的核苷酸序列的核酸的组合物,所述多肽或组合物用作药物,其中所述多肽包含至少三个免疫球蛋白单个可变结构域(ISVD)或由其组成,其中每个所述ISVD包含任选地经由一个或多个肽接头连接的三个互补决定区(分别为CDR1至CDR3);并且其中:

[0078] a) 第一ISVD包含

[0079] x.CDR1,其为SEQ ID NO:6的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:6具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0080] xi.CDR2,其为SEQ ID NO:10的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:10具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0081] xii.CDR3,其为SEQ ID NO:14的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:14具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0082] b) 第二ISVD包含

[0083] xiii.CDR1,其为SEQ ID NO:7的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:7具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0084] xiv.CDR2,其为SEQ ID NO:11的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:11具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0085] xv.CDR3,其为SEQ ID NO:15的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:15具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;并且

[0086] c) 第三ISVD包含

[0087] xvi.CDR1,其为SEQ ID NO:9的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:9具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0088] xvii.CDR2,其为SEQ ID NO:13的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:13具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0089] xviii.CDR3,其为SEQ ID NO:17的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:17具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,

[0090] 其中,ISVD的顺序是从N末端开始。

[0091] 实施方案2.根据实施方案1所述的用于所述用途的组合物,其是药物组合物,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其他药学活性多肽和/或化合物。

[0092] 实施方案3.根据实施方案1或2所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中所述多肽特异性地结合TNF $\alpha$ 和IL-23的p19亚基。

[0093] 实施方案4.根据实施方案1至3中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中所述多肽特异性地结合人TNF $\alpha$ 和人IL-23的p19亚基。

[0094] 实施方案5.根据实施方案1至4中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中所述第一ISVD特异性地结合TNF $\alpha$ ,并且所述第二和第三ISVD特异性地结合IL-23的p19亚基。

[0095] 实施方案6.根据实施方案1至5中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中所述第一ISVD特异性地结合人TNF $\alpha$ ,并且所述第二和第三ISVD特异性地结合人IL-23的p19亚基。

[0096] 实施方案7.根据实施方案1至6中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中:

[0097] a) 所述第一ISVD包含为SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR3;

[0098] b) 所述第二ISVD包含为SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR3;并且

[0099] c) 所述第三ISVD包含为SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR3。

[0100] 实施方案8.根据实施方案1至7中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中:

[0101] a) 所述第一ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:2大于90% (诸如95%) 的序列同一性;

[0102] b) 所述第二ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:3大于90% (诸如95%) 的序列同一性;并且

[0103] c) 所述第三ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:5大于90% (诸如95%) 同一性的序列同一性。

[0104] 实施方案9.根据实施方案1至8中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中:

[0105] a) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;

[0106] b) 所述第二ISVD包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;并且

[0107] c) 所述第三ISVD包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0108] 实施方案10.根据实施方案1至9中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中所述多肽进一步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,其中与没有所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元的相应多肽相比,所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元提供具有增加的半衰期的多肽。

[0109] 实施方案11.根据实施方案10所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中提供具

有增加的半衰期的多肽的所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元选自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可以结合血清蛋白的结合单元、Fc部分,以及可以结合血清蛋白的小蛋白或肽。

[0110] 实施方案12.根据实施方案10至11中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中提供具有增加的半衰期的多肽的所述结合单元选自可以结合血清白蛋白(诸如人血清白蛋白)或血清免疫球蛋白(诸如IgG)的结合单元。

[0111] 实施方案13.根据实施方案12所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中提供具有增加的半衰期的多肽的所述结合单元是可以结合人血清白蛋白的ISVD。

[0112] 实施方案14.根据实施方案13所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中与人血清白蛋白结合的ISVD包含

[0113] i.CDR1,其为SEQ ID NO:8的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:8具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0114] ii.CDR2,其为SEQ ID NO:12的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:12具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0115] iii.CDR3,其为SEQ ID NO:16的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:16具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0116] 实施方案15.根据实施方案13至14中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中与人血清白蛋白结合的ISVD包含为SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR3。

[0117] 实施方案16.根据实施方案13至15中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中与人血清白蛋白结合的所述ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:4大于90%(诸如95%)的序列同一性。

[0118] 实施方案17.根据实施方案13至16中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中与人血清白蛋白结合的所述ISVD包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或由其组成。

[0119] 实施方案18.根据实施方案1至17中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中所述多肽的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:1大于90%(诸如95%)的序列同一性。

[0120] 实施方案19.根据实施方案1至18中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其中所述多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由其组成。

[0121] 实施方案20.根据实施方案1至19中任一项所述的用于所述用途的多肽或组合物,其用于治疗自身免疫性或炎性疾病,诸如选自炎症性肠病(诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、银屑病、银屑病关节炎和化脓性汗腺炎的疾病。

[0122] 实施方案21.一种多肽,所述多肽包含至少三个免疫球蛋白单个可变结构域(ISVD)或由其组成,其中每个所述ISVD包含任选地经由一个或多个肽接头连接的三个互补决定区(分别为CDR1至CDR3);并且其中:

[0123] a) 第一ISVD包含

[0124] x.CDR1,其为SEQ ID NO:6的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:6具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0125] xi.CDR2,其为SEQ ID NO:10的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:10具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0126] xii.CDR3,其为SEQ ID NO:14的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:14具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0127] b) 第二ISVD包含

[0128] xiii.CDR1,其为SEQ ID NO:7的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:7具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0129] xiv.CDR2,其为SEQ ID NO:11的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:11具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0130] xv.CDR3,其为SEQ ID NO:15的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:15具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;并且

[0131] c) 第三ISVD包含

[0132] xvi.CDR1,其为SEQ ID NO:9的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:9具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0133] xvii.CDR2,其为SEQ ID NO:13的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:13具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0134] xviii.CDR3,其为SEQ ID NO:17的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:17具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,

[0135] 其中,ISVD的顺序是从N末端开始。

[0136] 实施方案22.根据实施方案21所述的多肽,其中所述多肽特异性地结合TNF $\alpha$ 和IL-23的p19亚基。

[0137] 实施方案23.根据实施方案21或22所述的多肽,其中所述多肽特异性地结合人TNF $\alpha$ 和人IL-23的p19亚基。

[0138] 实施方案24.根据实施方案21至23中任一项所述的多肽,其中所述第一ISVD特异性地结合TNF $\alpha$ ,并且所述第二和第三ISVD特异性地结合IL-23的p19亚基。

[0139] 实施方案25.根据实施方案21至24中任一项所述的多肽,其中所述第一ISVD特异性地结合人TNF $\alpha$ ,并且所述第二和第三ISVD特异性地结合人IL-23的p19亚基。

[0140] 实施方案26.根据实施方案21至25中任一项所述的多肽,其中:

[0141] a) 所述第一ISVD包含为SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR3;

[0142] b) 所述第二ISVD包含为SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR3;并且

[0143] c) 所述第三ISVD包含为SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR3。

[0144] 实施方案27.根据实施方案21至26中任一项所述的多肽,其中:

[0145] a) 所述第一ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:2大于90% (诸如95%) 的序列同一性;

[0146] b) 所述第二ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:3大于90% (诸如95%) 的序列同一性;并且

[0147] c) 所述第三ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:5大于90% (诸如95%) 同一性的序列同一性。

- [0148] 实施方案28.根据实施方案21至27中任一项所述的多肽,其中:
- [0149] a) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;
- [0150] b) 所述第二ISVD包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;并且
- [0151] c) 所述第三ISVD包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。
- [0152] 实施方案29.根据实施方案21至28中任一项所述的多肽,其中所述多肽进一步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,其中与没有所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元的相应多肽相比,所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元提供具有增加的半衰期的多肽。
- [0153] 实施方案30.根据实施方案29所述的多肽,其中提供具有增加的半衰期的多肽的所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元选自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可以结合血清蛋白的结合单元、Fc部分,以及可以结合血清蛋白的小蛋白或肽。
- [0154] 实施方案31.根据实施方案29至30中任一项所述的多肽,其中提供具有增加的半衰期的多肽的所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元选自可以结合血清白蛋白(诸如人血清白蛋白)或血清免疫球蛋白(诸如IgG)的结合单元。
- [0155] 实施方案32.根据实施方案31所述的多肽,其中提供具有增加的半衰期的多肽的所述结合单元是可以结合人血清白蛋白的ISVD。
- [0156] 实施方案33.根据实施方案32所述的多肽,其中与人血清白蛋白结合的ISVD包含:
- [0157] i. CDR1,其为SEQ ID NO:8的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:8具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;
- [0158] ii. CDR2,其为SEQ ID NO:12的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:12具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和
- [0159] iii. CDR3,其为SEQ ID NO:16的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:16具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。
- [0160] 实施方案34.根据实施方案32至33中任一项所述的多肽,其中与人血清白蛋白结合的ISVD包含为SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR3。
- [0161] 实施方案35.根据实施方案32至34中任一项所述的多肽,其中与人血清白蛋白结合的所述ISVD的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:4大于90%(诸如95%)的序列同一性。
- [0162] 实施方案36.根据实施方案32至35中任一项所述的多肽,其中与人血清白蛋白结合的所述ISVD包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或由其组成。
- [0163] 实施方案37.根据实施方案21至36中任一项所述的多肽,其中所述多肽的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:1大于90%(诸如95%)的序列同一性。
- [0164] 实施方案38.根据实施方案21至37中任一项所述的多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由其组成。
- [0165] 实施方案39.一种核酸,所述核酸包含编码根据实施方案21至38中任一项所述的多肽的核苷酸序列。
- [0166] 实施方案40.一种宿主或宿主细胞,所述宿主或宿主细胞包含根据实施方案39所述的核酸。
- [0167] 实施方案41.一种用于产生根据实施方案21至38中任一项所述的多肽的方法,所

述方法至少包括以下步骤:

[0168] a) 在合适的宿主细胞或宿主生物体或另一合适的表达系统中表达根据实施方案39所述的核酸;任选地随后进行:

[0169] b) 分离和/或纯化根据实施方案21至38中任一项所述的多肽。

[0170] 实施方案42.一种组合物,所述组合物包含至少一种根据实施方案21至38中任一项所述的多肽,或根据实施方案39所述的核酸。

[0171] 实施方案43.根据实施方案42所述的组合物,其是药物组合物,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其他药学活性多肽和/或化合物。

[0172] 实施方案44.一种治疗自身免疫性疾病或炎性疾病的方法,其中所述方法包括对有需要的受试者施用药学活性量的根据实施方案21至38中任一项所述的多肽,或根据实施方案42至43中任一项所述的组合物。

[0173] 实施方案45.根据实施方案44所述的方法,其中所述自身免疫性疾病或炎性疾病选自炎性肠病(诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、银屑病、银屑病关节炎和化脓性汗腺炎。

[0174] 实施方案45.根据实施方案21至38中任一项所述的多肽或根据实施方案42至43中任一项所述的组合物在制备用于治疗自身免疫性疾病或炎性疾病的药物组合物方面的用途。

[0175] 实施方案46.根据实施方案45所述的多肽或组合物的用途,其中所述自身免疫性疾病或炎性疾病选自炎性肠病(诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、银屑病、银屑病关节炎和化脓性汗腺炎。

#### 4附图说明

[0176] 图1:显示TNF $\alpha$ 和IL-23与经由人血清白蛋白(HSA)捕获的F027500069同时结合的传感图。

[0177] 图2:F027500069和抗hTNF $\alpha$ 参考mAb在Glo response<sup>TM</sup> HEK293\_NF $\kappa$ B-NLucP报告物测定法中对可溶性人(A)和食蟹猴(B)TNF $\alpha$ 的抑制。IRR00096是阴性对照V<sub>HH</sub>。数据点是全局平均值(n=2),误差棒表示+/-SD。

[0178] 图3:F027500069、抗hIL-23参考mAb1、抗hIL-23参考mAb2在Glo response<sup>TM</sup> HEK293\_人IL-23R/IL-12Rb1-Luc2P报告物测定法中对人(A)和食蟹猴(B)IL-23的抑制。IRR00096是阴性对照V<sub>HH</sub>。数据点是全局平均值(n=2),误差棒表示+/-SD。

[0179] 图4:方框图,示出了与对照F027301099相比,存在于96个人血清样品中的预先存在的抗体与F027500069的结合。

[0180] 图5:方框图,示出了与对照多肽F027301099和F027301186相比,存在于96个人血清样品中的预先存在的抗体与F027500069、F027500093、F027500095和F027500096的结合。

[0181] 图6:在Tg197人TNF转基因小鼠模型中对多关节炎的抑制。绘制了不同治疗组(n=8只小鼠/组)中随时间推移的关节炎得分。从6周龄开始,动物每周两次接受腹膜内注射指定化合物。显示的是平均每周关节炎得分 $\pm$ SEM。统计学是双因素ANOVA和Bonferroni多重比较测试。

[0182] 图7:Tg197小鼠模型中关节炎得分曲线下面积随时间推移的条形图。显示的是单

个值(符号)和平均值±SEM(条形)。统计学是单因素ANOVA和Bonferroni多重比较测试。

[0183] 图8:Tg197小鼠模型的爪的组织学得分的条形图。显示的是单个值(符号)和平均值±SEM(条形)。统计学是单因素ANOVA和Bonferroni多重比较测试。

[0184] 图9:在人IL-23模型中对皮肤炎症的抑制。条形图说明了不同治疗组(n=10只小鼠/组)的耳皮肿胀。从第1天到第4天,动物每天接受皮内注射重组人IL-23或PBS。在第1天和第3天,动物接受腹膜内注射指定化合物。显示的是第5天时耳皮厚度相对于基线的平均变化±SEM。统计学是ANOVA和Bonferroni多重比较测试。

[0185] 图10:在人IL-23诱导的皮肤炎症模型的第5天,形成皮肤活检的组织IL-22浓度的条形图。显示的是单个值(符号)和平均值±SEM(条形)。统计学是ANOVA和Bonferroni多重比较测试。

[0186] 图11:通过腹膜内以及皮下途径两者施用的F027500069对皮肤炎症的抑制。条形图说明了不同治疗组(n=8只小鼠/组)的耳皮肿胀。从第1天到第4天,动物每天接受皮内注射重组人IL-23或PBS。在第1天和第3天施用指定剂量的腹膜内(IP)或皮下(SC)注射。显示的是第5天时耳皮厚度相对于基线的平均变化±SEM。统计学是ANOVA和Bonferroni多重比较测试。

[0187] 图12:在通过腹膜内以及皮下途径两者递送F027500069的情况下,在第5天,形成皮肤活检的组织IL-22浓度的条形图。显示的是单个值(符号)和平均值±SEM(条形)。统计学是ANOVA和Bonferroni多重比较测试。

[0188] 图13:在人TNF $\alpha$ /TNFR1敲入小鼠中的胶原抗体诱导的关节炎(CAIA)模型中对关节炎得分的抑制。显示了不同治疗组(n=8只小鼠/组)中随时间推移的关节炎得分。在第1天,在LPS注射后6小时,动物接受单次腹膜内注射指定化合物。显示的是平均每天关节炎得分±SEM。统计学是双因素ANOVA和Bonferroni多重比较测试。

[0189] 图14:在人TNF $\alpha$ 敲入小鼠中进行的人IL-23皮肤注射模型中对IL-23和TNF $\alpha$ 诱导的炎症的双重抑制(n=4-10只小鼠/组)。从第1天到第4天,动物每天接受皮内注射重组人IL-23或PBS。第1天和第3天,腹膜内注射指定化合物。显示的是第5天时耳皮厚度相对于基线的平均变化±SEM。统计学是ANOVA和Bonferroni多重比较测试。

[0190] 图15:在细胞因子的单特异性或双特异性抑制后,发炎皮肤组织中的差异性皮肤组织基因表达。差异表达基因(DEG,其倍数变化>2,p<0.001)的维恩图。F027500069中总共769个DEG中的199个对这种治疗是特异的。

[0191] 图16:ISVD构建体F027500069的示意图,从N末端到C末端显示经由9GS接头连接的单价构建块/ISVD 6C11、119A03/1、ALB23002和81A12。

## 5具体实施方式

[0192] 本技术旨在提供新型药物,用于治疗炎症肠病(诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、银屑病、银屑病关节炎或化脓性汗腺炎。

[0193] 本发明人令人惊讶地发现,与单特异性抗TNF $\alpha$ 或抗IL-23p19多肽相比,包含至少三个ISVD(其中至少一个ISVD特异性地结合TNF $\alpha$ 并且至少两个ISVD特异性地结合IL-23的p19亚基)的多肽可以用于更有效地治疗自身免疫性或炎症性疾病。

[0194] 在一些实施方案中,本技术的多肽显示对TNF $\alpha$ 和IL-23(例如人或食蟹猴TNF $\alpha$ 和

IL-23)的高效力。在一些实施方案中,本技术的多肽是有效产生的(例如在微生物宿主(诸如毕赤酵母,例如巴斯德毕赤酵母)中)。在一些实施方案中,本技术的多肽在高浓度下具有低粘度,这对于皮下施用是有利和方便的。此外,在一些实施方案中,本技术的多肽对待治疗的受试者中预先存在的抗体(即,在第一次用所述抗体构建体治疗之前存在于受试者中的抗体)具有有限的反应性。在其他实施方案中,此类多肽在待治疗的受试者中表现出足够长的半衰期,使得可以方便地将连续的治疗间隔开。

[0195] 所述多肽是至少双特异性的,但也可以是例如三特异性、四特异性或五特异性的。此外,所述多肽是至少三价的,但也可以是例如四价或五价的。

[0196] 术语“双特异性”、“三特异性”、“四特异性”或“五特异性”均落在术语“多特异性”范围内,并且分别是指与两种、三种、四种或五种不同的靶分子结合。术语“二价”、“三价”、“四价”或“五价”均落在术语“多价”范围内,并且分别表示存在两个、三个、四个或五个结合单元(诸如ISVD)。例如,所述多肽可以是三特异性四价的,诸如包含四个ISVD或由其组成的多肽,其中一个ISVD与人TNF $\alpha$ 结合,两个ISVD与人IL-23结合,并且一个ISVD与人血清白蛋白结合。例如,如果两个ISVD结合IL-23的p19亚基上的两个不同表位,则这种多肽可以同时是双互补位的。术语“双互补位”是指与同一靶分子的两个不同部分(即表位)结合。

[0197] 如本文所用,术语“第一ISVD”、“第二ISVD”、“第三ISVD”等仅表示ISVD彼此的相对位置,其中编号从本技术多肽的N末端开始。因此,“第一ISVD”比“第二ISVD”更靠近N末端,而“第二ISVD”比“第三ISVD”更靠近N末端,等等。因此,当从C末端考虑时,ISVD排列是相反的。由于编号不是绝对的,并且仅指示所述至少三个ISVD的相对位置,因此不排除多肽中可能存在其他结合单元/构建块,诸如与TNF $\alpha$ 或IL-23的p19亚基结合的另外的ISVD,或者与另一个靶标结合的ISVD。此外,不排除可以在其间放置其他结合单元/构建块(诸如ISVD)的可能性。例如,如下文进一步所述(具体参见第5.3节“(体内)半衰期延长”),所述多肽可以进一步包含与人血清白蛋白结合的另一个ISVD,其甚至可以位于例如“第二ISVD”与“第三ISVD”之间。

[0198] 鉴于上述,本技术提供了包含至少三个ISVD或由其组成的多肽,其中至少一个ISVD特异性地结合TNF $\alpha$ ,并且至少两个ISVD特异性地结合IL-23的p19亚基。

[0199] 特异性地结合IL-23的所述至少两个ISVD与IL-23的p19亚基结合。特异性地结合IL-23的所述至少两个ISVD可以与IL-23的p19亚基上的不同表位结合。特异性地结合IL-23的ISVD中的至少一个可能能够阻断IL-23的功能,诸如阻断IL-23与IL-23R之间的相互作用和/或抑制IL-23诱导的IL-22释放。

[0200] 所述多肽的组件例如ISVD可以通过一个或多个合适的接头(诸如肽接头)彼此连接。

[0201] 使用接头连接两个或更多个(多)肽是本领域熟知的。示例性肽接头在表A-5中示出。一类常用肽接头被称为“Gly-Ser”或“GS”接头。这些是基本上由甘氨酸(G)和丝氨酸(S)残基组成的接头,并且通常包含肽基序的一个或多个重复,所述肽基序诸如GGGG(S) (SEQ ID NO:47)基序(例如,具有式(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) $_n$ ,其中 $n$ 可以是1、2、3、4、5、6、7或更大)。此类GS接头的一些常用例子是9GS接头(GGGGSGGG,SEQ ID NO:50)、15GS接头( $n=3$ ;SEQ ID NO:52)和35GS接头( $n=7$ ;SEQ ID NO:57)。例如,参考了Chen等人,Adv. Drug Deliv. Rev. 2013年10月15日;65(10):1357-1369;和Klein等人,Protein Eng. Des. Sel.

(2014) 27 (10) :325-330。在本技术多肽的一个实施方案中,使用9GS接头将所述多肽的组件彼此连接。

[0202] 在一个实施方案中,特异性地结合TNF $\alpha$ 的ISVD位于所述多肽的N末端处。发明人令人惊讶地发现,这种构型可以增加所述多肽的产品产量。

[0203] 同样在一个实施方案中,特异性地结合IL-23的ISVD之一位于所述多肽的C末端处。

[0204] 因此,所述多肽从所述多肽的N末端开始依次包含以下各项或由其组成:特异性地结合TNF $\alpha$ 的ISVD、可以阻断IL-23功能的特异性地结合IL-23的第一ISVD、提供如本文所定义具有增加的半衰期的多肽的任选结合单元,以及特异性地结合IL-23的第二ISVD。在一个实施方案中,提供具有增加的半衰期的多肽的结合单元是ISVD。

[0205] 在一个实施方案中,所述多肽从所述多肽的N末端开始依次包含以下各项或由其组成:特异性地结合TNF $\alpha$ 的ISVD、接头、可以阻断IL-23功能的特异性地结合IL-23的第一ISVD、接头、与人血清白蛋白结合的ISVD、接头,以及特异性地结合IL-23的第二ISVD。一方面,每个接头都是9GS接头。

[0206] 所述多肽的此类构型可以提供增加的产品产量和良好的CMC特征,包括表达产量、粘度和其他生物物理特性。

[0207] 在一个实施方案中,本技术的多肽表现出降低的与人血清中预先存在的抗体的结合。为此,在一个实施方案中,所述多肽在至少一个ISVD中包含氨基酸位置11处的缬氨酸(V)和氨基酸位置89处的亮氨酸(L)(根据Kabat编号)。在一个实施方案中,所述多肽在每个ISVD中包含氨基酸位置11处的缬氨酸(V)和氨基酸位置89处的亮氨酸(L)(根据Kabat编号)。在另一个实施方案中,所述多肽在C末端ISVD的C末端处包含1至5个(天然存在的)氨基酸延伸,诸如单个丙氨酸(A)延伸。ISVD的C末端通常是VTVSS(SEQ ID NO:112)。在另一个实施方案中,所述多肽在至少一个ISVD中包含位置110(根据Kabat编号)处的赖氨酸(K)或谷氨酰胺(Q)。在另一个实施方案中,所述ISVD在至少一个ISVD中包含位置112(根据Kabat编号)处的赖氨酸(K)或谷氨酰胺(Q)。在这些实施方案中,ISVD的C末端是VKVSS(SEQ ID NO:113)、VQVSS(SEQ ID NO:114)、VTVKS(SEQ ID NO:146)、VTVQS(SEQ ID NO:147)、VKVKS(SEQ ID NO:148)、VKVQS(SEQ ID NO:149)、VQVKS(SEQ ID NO:150)或VQVQS(SEQ ID NO:151),使得在添加单个丙氨酸后,所述多肽的C末端例如包含序列VTVSSA(SEQ ID NO:115)、VKVSSA(SEQ ID NO:116)、VQVSSA(SEQ ID NO:117)、VTVKSA(SEQ ID NO:152)、VTVQSA(SEQ ID NO:153)、VKVKSA(SEQ ID NO:154)、VKVQSA(SEQ ID NO:155)、VQVKSA(SEQ ID NO:156)或VQVQSA(SEQ ID NO:157)。在一个实施方案中,C末端包含VKVSSA(SEQ ID NO:116)。在另一个实施方案中,所述多肽在每个ISVD中包含氨基酸位置11处的缬氨酸(V)和氨基酸位置89处的亮氨酸(L)(根据Kabat编号),任选地在至少一个ISVD中包含位置110(根据Kabat编号)处的赖氨酸(K)或谷氨酰胺(Q),并且在C末端ISVD的C末端处包含1至5个(天然存在的)氨基酸延伸,诸如单个丙氨酸(A)延伸,使得所述多肽的C末端例如包含序列VTVSSA(SEQ ID NO:115)、VKVSSA(SEQ ID NO:116)或VQVSSA(SEQ ID NO:117),诸如VKVSSA(SEQ ID NO:116)。关于这方面的更多信息,参见例如WO 2012/175741和WO 2015/173325。

[0208] 在另一个实施方案中,本技术的多肽包含含有与SEQ ID NO:1大于90%,诸如大于95%或大于99%的序列同一性的氨基酸序列或由其组成,其中四个ISVD的CDR分别如以下

章节“5.1免疫球蛋白单个可变结构域”和“5.3(体内)半衰期延长”中示出的项目A至D(或A'至D',如果使用Kabat定义)所定义,其中特别地:

[0209] • 特异性地结合TNF $\alpha$ 的ISVD包含为SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR3;

[0210] • 特异性地结合IL-23的p19亚基的第一ISVD包含为SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR3;

[0211] • 特异性地结合IL-23的p19亚基的第二ISVD包含为SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR3;并且

[0212] • 与人血清白蛋白结合的ISVD包含为SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR3,

[0213] 或者可替代地如果使用Kabat定义:

[0214] • 特异性地结合TNF $\alpha$ 的ISVD包含为SEQ ID NO:122的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:130的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:138的氨基酸序列的CDR3;

[0215] • 特异性地结合IL-23的p19亚基的第一ISVD包含为SEQ ID NO:123的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:131的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:139的氨基酸序列的CDR3;

[0216] • 特异性地结合IL-23的p19亚基的第二ISVD包含为SEQ ID NO:125的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:133的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:141的氨基酸序列的CDR3;并且

[0217] • 与人血清白蛋白结合的ISVD包含为SEQ ID NO:124的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:132的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:140的氨基酸序列的CDR3。

[0218] 在另一个实施方案中,所述多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由其组成。在另一个实施方案中,所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。

[0219] 在一个实施方案中,与由SEQ ID NO:1的氨基酸组成的多肽相比,本技术的多肽对人TNF $\alpha$ 和人IL-23具有至少一半的结合亲和力或至少相同的结合亲和力,其中结合亲和力是使用相同方法,诸如表面等离子体共振 (SPR) 测量的。

[0220] 5.1免疫球蛋白单个可变结构域

[0221] 术语“免疫球蛋白单个可变结构域”(ISVD)可与“单个可变结构域”互换使用,定义了其中抗原结合位点存在于单个免疫球蛋白结构域上并由其形成的免疫球蛋白分子。这使ISVD与“常规”免疫球蛋白(例如单克隆抗体)或其片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、二scFv)区分开来,其中两个免疫球蛋白结构域,尤其是两个可变结构域,相互作用形成抗原结合位点。通常,在常规的免疫球蛋白中,重链可变结构域(V<sub>H</sub>)和轻链可变结构域(V<sub>L</sub>)相互作用形成抗原结合位点。在这种情况下,V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>两者的互补决定区(CDR)将有助于抗原结合位点,即总共6个CDR将参与抗原结合位点形成。

[0222] 鉴于以上定义,常规4链抗体(诸如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE分子;本领域已知)的抗原结合结构域或衍生自这种常规4链抗体的Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fv片段(诸如二硫键连接的Fv或scFv片段)或双抗体(全部都在本领域中已知)的抗原结合结构域通常不会被视为ISVD,因为在这些情况下,与抗原的相应表位结合通常不是通过一个单个免疫球蛋白结构域发生,而是通过一对缔合的免疫球蛋白结构域,诸如轻链和重链可变结构域,即通过共同结合到相应抗原的表位的免疫球蛋白结构域的V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>对发生。

[0223] 相比之下,ISVD能够特异性地结合抗原的表位,而无需与另外的免疫球蛋白可变结构域配对。ISVD的结合位点由单个 $V_H$ 、单个 $V_{HH}$ 或单个 $V_L$ 结构域形成。

[0224] 这样,ISVD可以是轻链可变结构域序列(例如, $V_L$ 序列)或其合适的片段;或重链可变结构域序列(例如, $V_H$ 序列或 $V_{HH}$ 序列)或其合适的片段;只要其能够形成单个抗原结合单元;即,基本上由ISVD组成的功能性抗原结合单元,使得单个抗原结合结构域不需要与另一个可变结构域相互作用以形成功能性抗原结合单元。

[0225] ISVD可以例如是重链ISVD,诸如 $V_H$ 、 $V_{HH}$ ,包括驼源化 $V_H$ 或人源化 $V_{HH}$ 。在一个实施方案中,其是 $V_{HH}$ ,包括驼源化 $V_H$ 或人源化 $V_{HH}$ 。重链ISVD可以衍生自常规的四链抗体或重链抗体。

[0226] 例如,ISVD可以是单个结构域抗体(或适合用作单个结构域抗体的氨基酸序列)、“dAb”或dAb(或适合用作dAb的氨基酸序列)或Nanobody®(如本文所定义,并且包括但不限于 $V_{HH}$ );其他单个可变结构域,或其任一种的任何合适的片段。

[0227] 特别地,ISVD可以是Nanobody®(诸如 $V_{HH}$ ,包括人源化 $V_{HH}$ 或驼源化 $V_H$ )或其合适的片段。Nanobody®、Nanobodies®和Nanoclone®是注册商标。

[0228] “ $V_{HH}$ 结构域”,也称为 $V_{HH}$ 、 $V_{HH}$ 抗体片段和 $V_{HH}$ 抗体,最初被描述为“重链抗体”(即“没有轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白可变结构域,参见Hamers-Casterman等人Nature 363:446-448,1993。选择术语“ $V_{HH}$ 结构域”以便将这些可变结构域与存在于常规4链抗体中的重链可变结构域(在本文中称为“ $V_H$ 结构域”)和存在于常规4链抗体中的轻链可变结构域(在本文中称为“ $V_L$ 结构域”)区分开来。有关 $V_{HH}$ 的进一步描述,参考Muyldermans的评论文章(Reviews in Molecular Biotechnology 74:277-302,2001)。

[0229] 通常,免疫球蛋白的生成涉及对实验动物进行免疫,融合免疫球蛋白产生细胞以产生杂交瘤,并针对所需特异性进行筛选。可替代地,可以通过筛选幼稚的、免疫的或合成的文库,例如通过噬菌体展示来生成免疫球蛋白。

[0230] 免疫球蛋白序列(诸如Nanobodies®)的生成已经在各种出版物中广泛描述,其中,WO 94/04678、Hamers-Casterman等人1993(Nature 363:446-448,1993)和Muyldermans等人2001(Reviews in Molecular Biotechnology 74:277-302,2001)可以作为例子。在这些方法中,用靶抗原对骆驼科动物进行免疫,以便诱导针对所述靶抗原的免疫应答。对从所述免疫获得的Nanobodies®库进一步筛选结合靶抗原的Nanobodies®。

[0231] 在这些情况下,抗体的生成需要纯化的抗原用于免疫和/或筛选。可以从天然来源或在重组生产过程中纯化抗原。

[0232] 免疫球蛋白序列的免疫和/或筛选可以使用此类抗原的肽片段进行。

[0233] 本技术可以使用不同来源的免疫球蛋白序列,包括小鼠、大鼠、兔、驴、人和骆驼科动物免疫球蛋白序列。本技术还包括完全人序列、人源化序列或嵌合序列。例如,本技术包括骆驼科动物免疫球蛋白序列和人源化骆驼科动物免疫球蛋白序列,或驼源化结构域抗体,例如驼源化dAb,如Ward等人所述(Nature 341:544,1989)(参见例如WO 94/04678以及Davies和Riechmann,Febs Lett.,339:285-290,1994和Prot.Eng.,9:531-537,1996)。此外,本技术还使用融合的免疫球蛋白序列,例如形成多价和/或多特异性构建体(对于含有一个或多个 $V_{HH}$ 结构域的多价和多特异性多肽及其制备,也参考Conrath等人,

J. Biol. Chem., 第276卷, 10.7346-7350, 2001, 以及例如WO 96/34103和WO 99/23221), 以及包含标签或其他功能部分(例如毒素、标记、放射化学物质等)的免疫球蛋白序列, 其可由本技术的免疫球蛋白序列衍生而来。

[0234] “人源化 $V_{HH}$ ”包含对应于天然存在的 $V_{HH}$ 结构域的氨基酸序列但已经被“人源化”的氨基酸序列, 即通过用在来自人类的常规4链抗体(例如, 如上所指出)的 $V_H$ 结构域的一个或多个相应位置出现的一个或多个氨基酸残基替代所述天然存在的 $V_{HH}$ 序列的氨基酸序列中(并且特别是在框架序列中)的一个或多个氨基酸残基来进行。这能以本身已知的方式进行, 这对于本领域技术人员来说是清楚的, 例如基于本文的进一步描述和现有技术(例如WO 2008/020079)。同样, 应注意, 此类人源化 $V_{HH}$ 可以以任何本身已知的合适方式来获得, 并且因此并不严格限于已经使用包含天然存在的 $V_{HH}$ 结构域作为起始材料的多肽获得的多肽。

[0235] “驼源化 $V_H$ ”包含对应于天然存在的 $V_H$ 结构域的氨基酸序列但已经被“驼源化”的氨基酸序列, 即通过用在重链抗体的 $V_{HH}$ 结构域的一个或多个相应位置出现的一个或多个氨基酸残基替代来自常规4链抗体的天然存在的 $V_H$ 结构域的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基来进行。这能以本身已知的方式进行, 这对于本领域技术人员来说是清楚的, 例如基于本文的进一步描述和现有技术(例如WO 2008/020079)。如本文所定义, 此类“驼源化”取代通常插入形成和/或存在于 $V_H$ - $V_L$ 界面的氨基酸位置处和/或所谓的骆驼科标志残基处(参见例如WO 94/04678以及Davies和Riechmann, 1994和1996, 同上)。在一个实施方案中, 用作产生或设计驼源化 $V_H$ 的起始材料或起点的 $V_H$ 序列是来自哺乳动物的 $V_H$ 序列, 或人类的 $V_H$ 序列, 诸如 $V_H3$ 序列。然而, 应注意, 可以以任何本身已知的合适方式获得这种驼源化 $V_H$ , 并且因此并不严格限于使用包含天然存在的 $V_H$ 结构域作为起始材料的多肽获得的多肽。

[0236] ISVD序列的结构可以被认为由四个框架区(“FR”)构成, 其在本领域和本文中分别被称为“框架区1”(“FR1”); “框架区2”(“FR2”); “框架区3”(“FR3”); 和“框架区4”(“FR4”); 所述框架区被三个互补决定区(“CDR”)中断, 所述三个互补决定区在本领域和本文中分别被称为“互补决定区1”(“CDR1”); “互补决定区2”(“CDR2”); 和“互补决定区3”(“CDR3”)。

[0237] 如WO 08/020079的第58页和第59页的段落q)中进一步描述的, ISVD的氨基酸残基可以根据由Kabat等人(“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH贝塞斯达, 马里兰州, 出版号91)给出的用于 $V_H$ 结构域的通用编号进行编号, 如在Riechmann和Muyldermans, 2000 (J. Immunol. Methods 240 (1-2): 185-195; 参见例如该出版物的图2)的文章中应用于来自骆驼科动物的 $V_{HH}$ 结构域。应注意, 如本领域中对于 $V_H$ 结构域和 $V_{HH}$ 结构域所熟知的, 每个CDR中氨基酸残基的总数可以变化, 并且可能不对应于由Kabat编号指示的氨基酸残基的总数。即, 根据Kabat编号的一个或多个位置可能在实际序列中不被占据, 或者实际序列可能含有比Kabat编号所允许的数量更多的氨基酸残基。这意味着, 通常, 根据Kabat的编号可以对应于或可以不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。 $V_H$ 结构域和 $V_{HH}$ 结构域中的氨基酸残基的总数通常将在110至120的范围内, 通常在112至115之间。然而, 应注意, 较小和较长的序列也可能适用于本文所述的目的。

[0238] 在本申请中, 除非另有说明, 否则CDR序列是根据如Kontermann和Dübel (编2010, Antibody Engineering, 第2卷, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, 第3章, 第33-51页)中所述的AbM编号确定的。根据此方法, FR1包含位置1-25处的氨基酸残基, CDR1包含位置26-35处的氨基酸残基, FR2包含位置36-49处的氨基酸, CDR2包含位置50-58处的氨

氨基酸残基,FR3包含位置59-94处的氨基酸残基,CDR3包含位置95-102处的氨基酸残基,并且FR4包含位置103-113处的氨基酸残基。

[0239] CDR区的确定也可以根据不同的方法进行。在根据Kabat的CDR确定中,ISVD的FR1包含位置1-30处的氨基酸残基,ISVD的CDR1包含位置31-35处的氨基酸残基,ISVD的FR2包含位置36-49处的氨基酸,ISVD的CDR2包含位置50-65处的氨基酸残基,ISVD的FR3包含位置66-94处的氨基酸残基,ISVD的CDR3包含位置95-102处的氨基酸残基,并且ISVD的FR4包含位置103-113处的氨基酸残基。

[0240] 在这样的免疫球蛋白序列中,框架序列可以是任何合适的框架序列,并且合适的框架序列的例子对于技术人员将是清楚的,例如基于标准手册以及本文中提及的进一步公开和现有技术。

[0241] 框架序列是免疫球蛋白框架序列或者例如通过人源化或驼源化衍生自免疫球蛋白框架序列的框架序列的合适组合。例如,框架序列可以是衍生自轻链可变结构域(例如 $V_L$ 序列)和/或重链可变结构域(例如 $V_H$ 序列或 $V_{HH}$ 序列)的框架序列。一方面,框架序列是衍生自 $V_{HH}$ 序列的框架序列,其中所述框架序列可以任选地被部分或完全人源化;或者是已经驼源化的常规 $V_H$ 序列(如本文所定义)。

[0242] 特别地,本技术中使用的ISVD序列中存在的框架序列可以含有一个或多个标志残基(如本文所定义),使得ISVD序列是Nanobody<sup>®</sup>,诸如 $V_{HH}$ ,包括人源化 $V_{HH}$ 或驼源化 $V_H$ 。此类框架序列的合适组合的一些非限制性例子将从本文的进一步公开中变得清楚。

[0243] 同样,如本文针对免疫球蛋白序列的一般描述,也可以使用任何前述的合适片段或片段的组合,诸如含有一个或多个CDR序列的片段,其适当地侧接一个或多个框架序列和/或经由一个或多个框架序列连接;例如,与这些CDR和框架序列相同的顺序可以出现在衍生所述片段的全尺寸免疫球蛋白序列中。

[0244] 然而,应注意,关于ISVD序列的起源或用于表达所述ISVD序列的核苷酸序列的起源,以及关于产生或获得或者已经产生或获得所述ISVD序列或核苷酸序列的方式,本技术不受限。因此,ISVD序列可以是天然存在的序列(来自任何合适的物种)或者合成的或半合成的序列。在特定但非限制性的方面,ISVD序列是天然存在的序列(来自任何合适的物种)或者合成的或半合成的序列,包括但不限于“人源化”(如本文所定义)免疫球蛋白序列(诸如部分或完全人源化的小鼠或兔免疫球蛋白序列,并且特别是部分或完全人源化的 $V_{HH}$ 序列)、“驼源化”(如本文所定义)免疫球蛋白序列,以及通过诸如以下的技术获得的免疫球蛋白序列:亲和力成熟(例如,从合成的、随机的或天然存在的免疫球蛋白序列开始)、CDR移植、镶面、组合衍生自不同免疫球蛋白序列的片段、使用重叠引物的PCR组装,以及技术人员熟知的工程化免疫球蛋白序列的类似技术;或任何前述的任何适当组合。

[0245] 类似地,核苷酸序列可以是天然存在的核苷酸序列或者合成的或半合成的序列,并且可以是例如通过PCR从合适的天然存在的模板分离的序列,例如从细胞分离的DNA或RNA、已经从文库(并且特别是,表达文库)分离的核苷酸序列、已经通过将突变引入天然存在的核苷酸序列制备的核苷酸序列(使用本身已知的任何合适的技术,诸如错配PCR)、已经通过使用重叠引物的PCR制备的核苷酸序列,或者已经使用本身已知的DNA合成技术制备的核苷酸序列。

[0246] 如上所述, ISVD可以Nanobody®或其合适的片段。对于Nanobodies®的一般描述, 参考以下进一步描述, 以及本文引用的现有技术。然而, 在这方面, 应注意, 此描述和现有技术主要描述了所谓的“V<sub>H</sub>3类”的Nanobodies®, 即与诸如DP-47、DP-51或DP-29的V<sub>H</sub>3类的人种系序列具有高度序列同源性的Nanobodies®。然而, 应注意, 本技术在其最广泛的意义上通常可以使用任何类型的Nanobody®, 并且例如还使用属于所谓的“V<sub>H</sub>4类”的Nanobodies®, 即与诸如DP-78的V<sub>H</sub>4类的人种系序列具有高度序列同源性的Nanobodies®, 如例如WO 2007/118670中所述。

[0247] 通常, Nanobodies® (特别是V<sub>HH</sub>序列, 包括(部分)人源化V<sub>HH</sub>序列和驼源化V<sub>H</sub>序列)的特征可以是在一个或多个框架序列(同样如本文进一步所述)中存在一个或多个“标志残基”(如本文所述)。因此, 通常可以将Nanobody®定义为具有(一般)结构的免疫球蛋白序列

[0248] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0249] 其中FR1至FR4分别是指框架区1至4, 并且其中CDR1至CDR3分别是指互补决定区1至3, 并且其中一个或多个标记残基如本文进一步定义。

[0250] 特别地, Nanobody®可以是具有(一般)结构的免疫球蛋白序列

[0251] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0252] 其中FR1至FR4分别是指框架区1至4, 并且其中CDR1至CDR3分别是指互补决定区1至3, 并且其中框架序列如本文进一步定义。

[0253] 更特别地, Nanobody®可以是具有(一般)结构的免疫球蛋白序列

[0254] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0255] 其中FR1至FR4分别是指框架区1至4, 并且其中CDR1至CDR3分别是指互补决定区1至3, 并且其中:

[0256] 根据Kabat编号的位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108处的一个或多个氨基酸残基选自下表A-6中提及的标志残基。

[0257] 表A-6: 纳米抗体中的标志残基

[0258]

位置	人V <sub>H3</sub>	标志残基
11	L, V; 主要是L	L、S、V、M、W、F、T、Q、E、A、R、G、K、Y、N、P、I; 优选L
37	V、I、F; 通常是V	F <sup>(1)</sup> 、Y、V、L、A、H、S、I、W、C、N、G、D、T、P, 优选F <sup>(1)</sup> 或Y
44 <sup>(8)</sup>	G	E <sup>(3)</sup> 、Q <sup>(3)</sup> 、G <sup>(2)</sup> 、D、A、K、R、L、P、S、V、H、T、N、W、M、I; 优选G <sup>(2)</sup> 、E <sup>(3)</sup> 或Q <sup>(3)</sup> ; 最优选G <sup>(2)</sup> 或Q <sup>(3)</sup> 。
45 <sup>(8)</sup>	L	L <sup>(2)</sup> 、R <sup>(3)</sup> 、P、H、F、G、Q、S、E、T、Y、C、I、D、V; 优选L <sup>(2)</sup> 或R <sup>(3)</sup>
47 <sup>(8)</sup>	W、Y	F <sup>(1)</sup> 、L <sup>(1)</sup> 或W <sup>(2)</sup> G、I、S、A、V、M、R、Y、E、P、T、C、H、K、Q、N、D; 优选W <sup>(2)</sup> 、L <sup>(1)</sup> 或F <sup>(1)</sup>
83	R或K; 通常是R	R、K <sup>(5)</sup> 、T、E <sup>(5)</sup> 、Q、N、S、I、V、G、M、L、A、D、Y、H; 优选K或R; 最优选K

84	A、T、D; 主要是A	P <sup>(5)</sup> 、S、H、L、A、V、I、T、F、D、R、Y、N、Q、G、E; 优选P
103	W	W <sup>(4)</sup> 、R <sup>(6)</sup> 、G、S、K、A、M、Y、L、F、T、N、V、Q、P <sup>(6)</sup> 、E、C; 优选W
104	G	G、A、S、T、D、P、N、E、C、L; 优选G
108	L、M或T; 主要是L	Q、L <sup>(7)</sup> 、R、P、E、K、S、T、M、A、H; 优选Q或L <sup>(7)</sup>

注释:

- [0259]
- (1) 特别但非排他地, 与位置43-46处的KERE或KQRE组合。
  - (2) 通常为位置44-47处的GLEW。
  - (3) 通常为位置43-46处的KERE或KQRE, 例如为位置43-47处的KEREL、KEREF、KQREL、KQREF、KEREG、KQREW或KQREG。可替代地, 诸如以下的序列也是可能的: TERE (例如TEREL)、TQRE (例如TQREL)、KECE (例如KECEL或KECER)、KQCE (例如KQCEL)、RERE (例如REREG)、RQRE (例如RQREL、RQREF或RQREW)、QERE (例如QEREG)、QQRE, (例如QQREW、QQREL或QQREF)、KGRE (例如KGREG)、KDRE (例如KDREV)。一些其他可能但不太优选的序列包括例如DECKL和NVCEL。
  - (4) 具有位置44-47处的两个GLEW, 以及位置43-46处的KERE或KQRE。
  - (5) 常常为天然存在的V<sub>HH</sub>结构域的位置83-84处的KP或EP。
  - (6) 特别但非排他地, 与位置44-47处的GLEW组合。
  - (7) 前提是当位置44-47为GLEW时, (非人源化的) V<sub>HH</sub>序列中的位置108总是为Q, 所述序列还含有103处的W。
  - (8) GLEW基团还含有位置44-47处的GLEW样序列, 如例如GVEW、EPEW、GLER、DQEW、DLEW、GIEW、ELEW、GPEW、EWLP、GPER、GLER和ELEW。

[0260] 本技术尤其使用可以结合TNF $\alpha$ 或IL-23的p19亚基的ISVD。在本技术的上下文中, “与某种靶分子结合”具有本领域中如在抗体及其相应抗原的情境中所理解的常见含义。

[0261] 本技术的多肽可以包含与TNF $\alpha$ 结合的一个或多个ISVD以及与IL-23结合的两个或更多个ISVD。例如, 所述多肽可以包含与TNF $\alpha$ 结合的一个ISVD和与IL-23的p19亚基结合的两个ISVD。

[0262] 在一些实施方案中, 至少一个ISVD可以在功能上阻断其靶分子。例如, ISVD可以阻断TNF $\alpha$ 与TNFR (TNF受体) 之间的相互作用, 或者可以阻断IL-23与IL-23R (IL-23受体) 之间的相互作用。在本技术的多肽中, 至少一个ISVD可以在功能上阻断IL-23, 例如通过阻断IL-23与IL-23R之间的相互作用和/或抑制IL-23诱导的IL-22释放。因此, 在一个实施方案中, 本技术的多肽包括与TNF $\alpha$ 结合并在功能上阻断TNF $\alpha$ 的一个ISVD, 以及与IL-23结合的两个

ISVD,其中之一可以在功能上阻断IL-23。

[0263] 本技术中使用的ISVD形成本技术多肽的一部分,所述多肽包含至少三个ISVD或由其组成,使得所述多肽可以特异性地结合TNF $\alpha$ 和IL-23。

[0264] 因此,用于本技术多肽的所述至少三个ISVD的靶分子是TNF $\alpha$ 和IL-23。例子是哺乳动物TNF $\alpha$ 和IL-23。除了人TNF $\alpha$  (Uniprot登录号P01375) 和人IL-23 (IL-23A, p19亚基的Uniprot登录号:Q9NPF7) 之外,来自其他物种的形式也适用于本技术,例如来自小鼠、大鼠、兔、猫、狗、山羊、绵羊、马、猪、非人灵长类动物(诸如食蟹猴(在本文中也称为“cyno”))、或骆驼科动物(诸如美洲驼或羊驼)的TNF $\alpha$ 和IL-23。

[0265] 可以在本技术中使用的特异性地结合TNF $\alpha$ 或IL-23的p19亚基的ISVD的具体例子如以下项目A至C所述:

[0266] A. 特异性地结合人TNF $\alpha$ 并包含以下各项的ISVD

[0267] i. CDR1,其为SEQ ID NO:6的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:6具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0268] ii. CDR2,其为SEQ ID NO:10的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:10具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0269] iii. CDR3,其为SEQ ID NO:14的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:14具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0270] 在一个实施方案中,所述ISVD包含为SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR3。

[0271] 这种特异性地结合人TNF $\alpha$ 的ISVD的例子具有如表A-2中针对构建体6C11所指示的一个或多个或所有框架区(除了在先前项目A中定义的CDR之外)。在一个实施方案中,其是包含构建体6C11 (SEQ ID NO:2,参见表A-1和A-2) 的完整氨基酸序列或由其组成的ISVD。

[0272] 在另一个实施方案中,特异性地结合人TNF $\alpha$ 的ISVD的氨基酸序列可以具有与SEQ ID NO:2大于90%,诸如大于95%或大于99%的序列同一性,其中CDR如先前项目A所定义。在一个实施方案中,特异性地结合TNF $\alpha$ 的ISVD包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成。

[0273] 当这种特异性地结合TNF $\alpha$ 的ISVD在至少一个CDR中相对于对应参考CDR序列(以上项目A)具有2个或1个氨基酸差异时,与构建体6C11 (SEQ ID NO:2) 相比,ISVD对人TNF $\alpha$ 具有至少一半的结合亲和力,或至少相同的结合亲和力,其中结合亲和力是使用相同的方法(诸如SPR)测量的。

[0274] B. 特异性地结合人IL-23的p19亚基并包含以下各项的ISVD

[0275] i. CDR1,其为SEQ ID NO:7的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:7具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0276] ii. CDR2,其为SEQ ID NO:11的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:11具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0277] iii. CDR3,其为SEQ ID NO:15的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:15具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0278] 在一个实施方案中,所述ISVD包含为SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR3。

[0279] 这种特异性地结合人IL-23的ISVD的例子具有如表A-2中针对构建体119A03/1所

指示的一个或多个或所有框架区(除了在先前项目B中定义的CDR之外)。在一个实施方案中,其是包含构建体119A03/1 (SEQ ID NO:3,参见表A-1和A-2)的完整氨基酸序列或由其组成的ISVD。

[0280] 另外,在另一个实施方案中,特异性地结合人IL-23的ISVD的氨基酸序列可以具有与SEQ ID NO:3大于90%,诸如大于95%或大于99%的序列同一性,其中CDR如先前项目B所定义。在一个实施方案中,与IL-23结合的ISVD包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成。

[0281] 当这种与IL-23结合的ISVD在至少一个CDR中相对于对应参考CDR序列(以上项目B)具有2个或1个氨基酸差异时,与构建体119A03/1 (SEQ ID NO:3)相比,ISVD对人IL-23具有至少一半的结合亲和力,或至少相同的结合亲和力,其中结合亲和力是使用相同的方法(诸如SPR)测量的。

[0282] 在一个实施方案中,包含与SEQ ID NO:11 (TIESGSRTN)具有2个或1个氨基酸差异的CDR2的ISVD,在CDR2序列的氨基酸位置3处不具有E至N取代和/或在CDR2序列的氨基酸位置9处不具有N至Y取代。在另一个实施方案中,这种ISVD在CDR2序列的氨基酸位置3处不具有E至N取代,并且在CDR2序列的氨基酸位置9处不具有N至Y取代。在包含与SEQ ID NO:11 (TIESGSRTN)具有2个或1个氨基酸差异的CDR2的ISVD的此类实施方案中,E被维持为所述CDR2序列的位置3处的氨基酸和/或N被维持为所述CDR2序列的位置9处的氨基酸。在另一个实施方案中,所述CDR2序列的氨基酸位置3处的E和氨基酸位置9处的N两者均被维持。与在所述CDR2序列的氨基酸位置3处不包含N的相同多肽相比,并且特别是与在所述氨基酸位置处包含E的相同多肽相比,使用在所述氨基酸位置处包含N的ISVD可以例如由于脱氨基作用导致在所述多肽的生产过程中氨基酸序列稳定性降低。与在所述CDR2序列的氨基酸位置9处不包含Y的相同多肽相比,并且特别是与在所述氨基酸位置处包含N的相同多肽相比,使用在所述氨基酸位置处包含Y的ISVD可以导致所述多肽的蛋白质聚集增加。

[0283] C.特异性地结合人IL-23的p19亚基并包含以下各项的ISVD

[0284] i.CDR1,其为SEQ ID NO:9的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:9具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0285] ii.CDR2,其为SEQ ID NO:13的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:13具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0286] iii.CDR3,其为SEQ ID NO:17的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:17具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0287] 在一个实施方案中,所述ISVD包含为SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR3。

[0288] 这种特异性地结合人IL-23的ISVD的例子具有如表A-2中针对构建体81A12所指示的一个或多个或所有框架区(除了在先前项目C中定义的CDR之外)。在一个实施方案中,其是包含构建体81A12 (SEQ ID NO:5,参见表A-1和A-2)的完整氨基酸序列或由其组成的ISVD。

[0289] 另外,在另一个实施方案中,特异性地结合人IL-23的ISVD的氨基酸序列可以具有与SEQ ID NO:5大于90%,诸如大于95%或大于99%的序列同一性,其中CDR如先前项目C所定义。在一个实施方案中,与IL-23结合的ISVD包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或由其组成。

[0290] 当这种特异性地结合IL-23的ISVD在至少一个CDR中相对于对应参考CDR序列(以

上项目C)具有2个或1个氨基酸差异时,与构建体81A12(SEQ ID NO:5)相比,ISVD对人IL-23具有至少一半的结合亲和力,或至少相同的结合亲和力,其中结合亲和力是使用相同的方法(诸如SPR)测量的。

[0291] 在一个实施方案中,如以上项目A至C所定义每个ISVD都包含在本技术的多肽中。与由SEQ ID NO:1的氨基酸组成的多肽相比,这种包含如以上项目A至C所定义每个ISVD的本技术多肽对人TNF $\alpha$ 和人IL-23具有至少一半的结合亲和力或至少相同的结合亲和力,其中结合亲和力是使用相同方法(诸如SPR)测量的。

[0292] 以上项目A至C中提及的SEQ ID NO是基于根据AbM定义的CDR定义(参见表A-2)。注意,根据Kabat定义(参见表A-2.1)定义相同CDR的SEQ ID NO同样可以用于以上项目A至C。

[0293] 因此,如上文使用AbM定义所述可以用于本技术中的特异性地结合TNF $\alpha$ 或IL-23的p19亚基的特异性ISVD也可以使用以下项目A'至C'中所阐述的Kabat定义来描述:

[0294] A'.特异性地结合人TNF $\alpha$ 并包含以下各项的ISVD

[0295] i.CDR1,其为SEQ ID NO:122的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:122具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0296] ii.CDR2,其为SEQ ID NO:130的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:130具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0297] iii.CDR3,其为SEQ ID NO:138的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:138具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0298] 在一个实施方案中,所述ISVD包含为SEQ ID NO:122的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:130的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:138的氨基酸序列的CDR3。

[0299] 这种特异性地结合人TNF $\alpha$ 的ISVD的例子具有如表A-2.1中针对构建体6C11所指示的一个或多个或所有框架区(除了在先前项目A中定义的CDR之外)。在一个实施方案中,其是包含构建体6C11(SEQ ID NO:2,参见表A-1和A-2.1)的完整氨基酸序列或由其组成的ISVD。

[0300] 另外,在另一个实施方案中,特异性地结合人TNF $\alpha$ 的ISVD的氨基酸序列可以具有与SEQ ID NO:2大于90%,诸如大于95%或大于99%的序列同一性,其中CDR如先前项目A'所定义。在一个实施方案中,特异性地结合TNF $\alpha$ 的ISVD包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成。

[0301] 当这种特异性地结合TNF $\alpha$ 的ISVD在至少一个CDR中相对于对应参考CDR序列(以上项目A')具有2个或1个氨基酸差异时,与构建体6C11(SEQ ID NO:2)相比,ISVD对人TNF $\alpha$ 具有至少一半的结合亲和力,或至少相同的结合亲和力,其中结合亲和力是使用相同的方法(诸如SPR)测量的。

[0302] B'.特异性地结合人IL-23的p19亚基并包含以下各项的ISVD

[0303] i.CDR1,其为SEQ ID NO:123的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:123具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0304] ii.CDR2,其为SEQ ID NO:131的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:131具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0305] iii.CDR3,其为SEQ ID NO:139的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:139具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0306] 在一个实施方案中,所述ISVD包含为SEQ ID NO:123的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:131的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:139的氨基酸序列的CDR3。

[0307] 这种特异性地结合人IL-23的ISVD的例子具有如表A-2.1中针对构建体119A03/1所指示的一个或多个或所有框架区(除了在先前项目B'中定义的CDR之外)。在一个实施方案中,其是包含构建体119A03/1(SEQ ID NO:3,参见表A-1和A-2.1)的完整氨基酸序列或由其组成的ISVD。

[0308] 另外,在另一个实施方案中,特异性地结合人IL-23的ISVD的氨基酸序列可以具有与SEQ ID NO:3大于90%,诸如大于95%或大于99%的序列同一性,其中CDR如先前项目B'所定义。在一个实施方案中,与IL-23结合的ISVD包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成。

[0309] 当这种与IL-23结合的ISVD在至少一个CDR中相对于对应参考CDR序列(以上项目B')具有2个或1个氨基酸差异时,与构建体119A03/1(SEQ ID NO:3)相比,ISVD对人IL-23具有至少一半的结合亲和力,或至少相同的结合亲和力,其中结合亲和力是使用相同的方法(诸如SPR)测量的。

[0310] 在一个实施方案中,包含CDR2(其包含与SEQ ID NO:131(TIESGSRTNYADSVKG)具有2个或1个氨基酸差异的氨基酸序列或由其组成)的ISVD在所述CDR2序列的氨基酸位置3处不具有E至N取代和/或在所述CDR2序列的氨基酸位置9处不具有N至Y取代。在另一个实施方案中,这种ISVD在CDR2序列的氨基酸位置3处不具有E至N取代,并且在CDR2序列的氨基酸位置9处不具有N至Y取代。在包含CDR2(其包含与SEQ ID NO:131(TIESGSRTNYADSVKG)具有2个或1个氨基酸差异的氨基酸序列或由其组成)的ISVD的此类实施方案中,E被维持为所述CDR2序列的位置3处的氨基酸和/或N被维持为所述CDR2序列的位置9处的氨基酸。在另一个实施方案中,所述CDR2序列的氨基酸位置3处的E和氨基酸位置9处的N两者均被维持。与在所述CDR2序列的氨基酸位置3处不包含N的相同多肽相比,并且特别是与在所述氨基酸位置处包含E的相同多肽相比,使用在所述氨基酸位置处包含N的ISVD可以例如由于脱氨基作用导致在所述多肽的生产过程中氨基酸序列稳定性降低。与在所述CDR2序列的氨基酸位置9处不包含Y的相同多肽相比,并且特别是与在所述氨基酸位置处包含N的相同多肽相比,使用在所述氨基酸位置处包含Y的ISVD可以导致所述多肽的蛋白质聚集增加。

[0311] C'.特异性地结合人IL-23的p19亚基并包含以下各项的ISVD

[0312] i.CDR1,其为SEQ ID NO:125的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:125具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0313] ii.CDR2,其为SEQ ID NO:133的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:133具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0314] iii.CDR3,其为SEQ ID NO:141的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:141具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0315] 在一个实施方案中,所述ISVD包含为SEQ ID NO:125的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:133的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:141的氨基酸序列的CDR3。

[0316] 这种特异性地结合人IL-23的ISVD的例子具有如表A-2.1中针对构建体81A12所指示的一个或多个或所有框架区(除了在先前项目C'中定义的CDR之外)。在一个实施方案中,其是包含构建体81A12(SEQ ID NO:5,参见表A-1和A-2.1)的完整氨基酸序列或由其组成的

ISVD。

[0317] 另外,在另一个实施方案中,特异性地结合人IL-23的ISVD的氨基酸序列可以具有与SEQ ID NO:5大于90%,诸如大于95%或大于99%的序列同一性,其中CDR如先前项目C'所定义。在一个实施方案中,与IL-23结合的ISVD包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或由其组成。

[0318] 当这种特异性地结合IL-23的ISVD在至少一个CDR中相对于对应参考CDR序列(以上项目C')具有2个或1个氨基酸差异时,与构建体81A12(SEQ ID NO:5)相比,ISVD对人IL-23具有至少一半的结合亲和力,或至少相同的结合亲和力,其中结合亲和力是使用相同的方法(诸如SPR)测量的。

[0319] 在一个实施方案中,如以上项目A'至C'所定义的每个ISVD都包含在本技术的多肽中。与由SEQ ID NO:1的氨基酸组成的多肽相比,这种包含如以上项目A'至C'所定义的每个ISVD的本技术多肽对人TNF $\alpha$ 和人IL-23具有至少一半的结合亲和力或至少相同的结合亲和力,其中结合亲和力是使用相同方法(诸如SPR)测量的。

[0320] 第一氨基酸序列与第二氨基酸序列之间的“序列同一性”的百分比可以通过将[第一氨基酸序列中与第二氨基酸序列中相应位置处的氨基酸残基相同的氨基酸残基的数量]除以[第一氨基酸序列中氨基酸残基的总数]并乘以[100%]来计算,其中第二氨基酸序列中氨基酸残基的每个缺失、插入、取代或添加(与第一氨基酸序列相比)被认为是单个氨基酸残基(即单个位置处)的差异。

[0321] 通常,出于根据上文概述的计算方法确定两个氨基酸序列之间“序列同一性”的百分比的目的,将具有最大氨基酸残基数量的氨基酸序列作为“第一”氨基酸序列,并将另一个氨基酸序列作为“第二”氨基酸序列。

[0322] 如本文所用的“氨基酸差异”是指单个氨基酸残基相对于参考序列的缺失、插入或取代。在一个实施方案中,“氨基酸差异”是取代。

[0323] 在一个实施方案中,氨基酸取代是保守取代。此类保守取代是其中以下(a)-(e)组中的一个氨基酸被同一组中的另一个氨基酸残基取代的取代:(a)小的脂族、非极性或微极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro和Gly;(b)极性、带负电荷的残基及其(不带电荷的)酰胺:Asp、Asn、Glu和Gln;(c)极性、带正电荷的残基:His、Arg和Lys;(d)大的脂族、非极性残基:Met、Leu、Ile、Val和Cys;和(e)芳族残基:Phe、Tyr和Trp。

[0324] 在一个实施方案中,保守取代如下;Ala变成Gly或变成Ser;Arg变成Lys;Asn变成Gln或变成His;Asp变成Glu;Cys变成Ser;Gln变成Asn;Glu变成Asp;Gly变成Ala或变成Pro;His变成Asn或变成Gln;Ile变成Leu或变成Val;Leu变成Ile或变成Val;Lys变成Arg,变成Gln或变成Glu;Met变成Leu,变成Tyr或变成Ile;Phe变成Met,变成Leu或变成Tyr;Ser变成Thr;Thr变成Ser;Trp变成Tyr;Tyr变成Trp;和/或Phe变成Val、变成Ile或变成Leu。

[0325] 5.2特异性

[0326] 术语“特异性”、“特异性地结合”或“特异性结合”是指特定结合单元(诸如ISVD)可以以足够高的亲和力结合的来自相同生物体的不同靶分子(诸如抗原)的数量(参见下文)。“特异性”、“特异性地结合”或“特异性结合”在本文中“选择性”、“选择性地结合”或“选择性结合”互换使用。结合单元(诸如ISVD)特异性地结合其指定的靶标。

[0327] 可以基于亲和力确定结合单元的特异性/选择性。亲和力表示分子相互作用的强

度或稳定性。亲和力通常通过KD或解离常数给出,单位为摩尔/升(或M)。亲和力也可以表示为缔合常数KA,其等于1/KD并且具有(摩尔/升)<sup>-1</sup>(或M<sup>-1</sup>)的单位。

[0328] 亲和力是部分与靶分子上结合位点之间的结合强度的量度:KD值越低,靶分子与靶向部分之间的结合强度越强。

[0329] 通常,本技术中使用的结合单元(诸如ISVD)将以10<sup>-5</sup>至10<sup>-12</sup>摩尔/升或更低、10<sup>-7</sup>至10<sup>-12</sup>摩尔/升或更低、或10<sup>-8</sup>至10<sup>-12</sup>摩尔/升的解离常数(KD)(即以10<sup>5</sup>至10<sup>12</sup>升/摩尔或更高、10<sup>7</sup>至10<sup>12</sup>升/摩尔或更高、或10<sup>8</sup>至10<sup>12</sup>升/摩尔的缔合常数(KA))结合到其靶标。

[0330] 大于10<sup>-4</sup>摩尔/升的任何KD值(或小于10<sup>4</sup>升/摩尔的任何KA值)通常被认为指示非特异性结合。

[0331] 被认为具有特异性的生物学相互作用(诸如免疫球蛋白序列与抗原的结合)的KD通常在10<sup>-5</sup>摩尔/升(10000nM或10μM)至10<sup>-12</sup>摩尔/升(0.001nM或1pM)或更低的范围内。

[0332] 因此,特异性/选择性结合可能意味着,使用相同的测量方法,例如SPR,结合单元(或包含其的多肽)以10<sup>-5</sup>至10<sup>-12</sup>摩尔/升或更低的KD值结合到TNFα和/或IL-23,并以大于10<sup>-4</sup>摩尔/升的KD值结合到相关细胞因子。IL-23的相关细胞因子的例子是IL-12,因为它与IL-23共有p40亚基。TNFα的相关细胞因子的例子是TNF超家族成员FASL、TNFβ、LIGHT、TL-1A、RANKL。因此,在本技术的一个实施方案中,包含在所述多肽中的至少一个ISVD以10<sup>-5</sup>至10<sup>-12</sup>摩尔/升或更低的KD值结合到(人)TNFα,并以大于10<sup>-4</sup>摩尔/升的KD值结合到同一物种的FASL、TNFβ、LIGHT、TL-1A、RANKL,并且包含在所述多肽中的至少两个ISVD以10<sup>-5</sup>至10<sup>-12</sup>摩尔/升或更低的KD值结合到IL-23,并以大于10<sup>-4</sup>摩尔/升的KD值结合到同一物种的IL-12。

[0333] 因此,与由SEQ ID NO:1的氨基酸组成的多肽相比,本技术的多肽对人TNFα和人IL-23具有至少一半的结合亲和力或至少相同的结合亲和力,其中结合亲和力是使用相同方法(诸如SPR)测量的。

[0334] 特异性结合来自某个物种的某种靶标并不排除结合单元也可以特异性地结合来自不同物种的类似靶标。例如,特异性结合人TNFα不排除结合单元或包含所述结合单元的多肽也可以特异性地结合来自食蟹猴的TNFα。同样,例如,特异性结合人IL-23不排除结合单元或包含所述结合单元的多肽也可以特异性地结合来自食蟹猴(“cyno”)的IL-23。

[0335] 结合单元与其指定靶标的特异性结合可以以本身已知的任何合适方式来确定,所述方式包括例如Scatchard分析和/或竞争性结合测定,诸如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)和夹层法竞争测定,以及它们在本领域中本身已知的不同变体;以及本文提及的其他技术。

[0336] 如技术人员将清楚的,解离常数可以是实际的或表观的解离常数。用于确定解离常数的方法对技术人员将是清楚的,并且例如包括以下提及的技术。在此方面,还将清楚的是,可能不可以测量大于10<sup>-4</sup>摩尔/升或10<sup>-3</sup>摩尔/升(例如,10<sup>-2</sup>摩尔/升)的解离常数。任选地,技术人员还将清楚的是,可以基于(实际或表观)缔合常数(KA),借助关系式[KD=1/KA]来计算(实际或表观)解离常数。

[0337] 可以经由本身已知的不同技术(诸如熟知的表面等离子体共振(SPR)生物传感器技术)来测量两个分子之间的分子相互作用的亲和力(参见例如Ober等人2001, Intern.Immunology 13:1551-1559)。如本文所用,术语“表面等离子体共振”是指一种光学现象,其允许通过检测生物传感器矩阵内蛋白质浓度的改变来分析实时生物特异性相互作用。

用,其中一个分子固定在生物传感器芯片上,并且另一个分子在流动条件下经过固定的分子,从而得到 $k_{\text{结合}}$ 、 $k_{\text{解离}}$ 测量值,并且因此得到 $K_D$ (或 $K_A$ )值。例如,这可以使用熟知的 **BIAcore®**系统(BIAcore International AB,一家GE Healthcare公司,乌普萨拉,瑞典和皮斯卡塔韦,新泽西州)进行。有关进一步说明,参见Jonsson等人(1993, Ann.Biol.Clin.51:19-26)、Jonsson等人(1991Biotechniques 11:620-627)、Johnsson等人(1995,J.Mol.Recognit.8:125-131)和Johnsson等人(1991,Anal.Biochem.198:268-277)。

[0338] 另一种熟知的确定生物分子相互作用的亲和力的生物传感器技术是生物层干涉法(BLI)(参见例如Abdiche等人2008,Anal.Biochem.377:209-217)。如本文所用,术语“生物层干涉法”或“BLI”是指无标签光学技术,其分析从两个表面反射的光的干涉图案:内部参考层(参考光束)和生物传感器尖端上的固定蛋白质的层(信号光束)。结合到生物传感器尖端的分子数量的变化会导致干涉图案的偏移,报告为波长偏移(nm),其幅度是结合到生物传感器尖端表面的分子数量的直接量度。由于可以实时测量相互作用,因此可以确定缔合和解离速率和亲和力。例如,BLI可以使用熟知的 **Octet®**系统(ForteBio,Pall Life Sciences的分公司,门洛帕克,美国)来进行。

[0339] 可替代地,可以使用 **KinExA®**平台(Sapidyne Instruments Inc,博伊西,美国),在动力学排斥测定法(KinExA)中测量亲和力(参见例如Drake等人2004, Anal.Biochem.,328:35-43)。如本文所用,术语“KinExA”是指测量未修饰分子的真实平衡结合亲和力和动力学的基于溶液的方法。使抗体/抗原复合物的平衡溶液通过具有用抗原(或抗体)预包被的珠的柱,从而允许游离的抗体(或抗原)与被包被的分子结合。用结合抗体(或抗原)的荧光标记的蛋白完成了对如此捕获的抗体(或抗原)的检测。

[0340] **GYROLAB®**免疫测定系统为自动化生物分析和快速样品周转提供了平台(Fraley等人2013,Bioanalysis 5:1765-74)。

[0341] 5.3(体内)半衰期延长

[0342] 所述多肽可以进一步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,其中与没有所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元的相应多肽相比,所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元提供具有增加的(体内)半衰期的多肽。体内半衰期延长意指,例如,所述多肽在施用后在哺乳动物(诸如人受试者)中具有增加的半衰期。半衰期可以表示为例如 $t_{1/2\beta}$ 。

[0343] 基团、残基、部分或结合单元的类型通常不受限制,并且可以例如选自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可以结合血清蛋白的结合单元、Fc部分,以及可以结合血清蛋白的小蛋白或肽。

[0344] 更具体地,提供具有增加的半衰期的多肽的所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元可以选自可以结合血清白蛋白(诸如人血清白蛋白)或血清免疫球蛋白(诸如IgG)的结合单元。在一个实施方案中,提供具有增加的半衰期的多肽的所述一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元是可以结合人血清白蛋白的结合单元。在一个实施方案中,结合单元是ISVD。

[0345] 例如,WO 2004/041865描述了与血清白蛋白(并且特别是针对人血清白蛋白)结合的ISVD,其可以与其他蛋白质(诸如与所需靶标结合的一个或多个其他ISVD)连接,以增加

所述蛋白质的半衰期。

[0346] 国际申请WO 2006/122787描述了针对(人)血清白蛋白的多种ISVD。这些ISVD包括称为A1b-1的ISVD(WO 2006/122787中的SEQ ID NO:52)及其人源化变体,诸如A1b-8(WO 2006/122787中的SEQ ID NO:62)。同样,这些可以用于延长治疗性蛋白质和多肽以及其他治疗性实体或部分的半衰期。

[0347] 此外,WO 2012/175400描述了A1b-1的进一步改进的形式,称为A1b-23。

[0348] 在一个实施方案中,所述多肽包含选自A1b-1、A1b-3、A1b-4、A1b-5、A1b-6、A1b-7、A1b-8、A1b-9、A1b-10(WO 2006/122787)和A1b-23的血清白蛋白结合部分。在一个实施方案中,血清白蛋白结合部分是A1b-8或A1b-23或其变体,如WO 2012/175400的第7-9页所示。在一个实施方案中,血清白蛋白结合部分选自WO 2012/175741、WO 2015/173325、WO 2017/080850、WO 2017/085172、WO 2018/104444、WO 2018/134235和WO 2018/134234中所述的白蛋白结合剂。表A-4也示出了一些血清白蛋白结合剂。在一个实施方案中,本技术多肽的另一组分如以下项目D所述:

[0349] D. 与人血清白蛋白结合并包含以下各项的ISVD

[0350] i. CDR1,其为SEQ ID NO:8的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:8具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0351] ii. CDR2,其为SEQ ID NO:12的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:12具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0352] iii. CDR3,其为SEQ ID NO:16的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:16具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0353] 在一个实施方案中,所述ISVD包含为SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR3。

[0354] 这种与人血清白蛋白结合的ISVD的例子具有如表A-2中针对构建体ALB23002所指示的一个或多个或所有框架区(除了在先前项目D中定义的CDR之外)。在一个实施方案中,其是包含构建体ALB23002(SEQ ID NO:4,参见表A-1和A-2)的完整氨基酸序列或由其组成的ISVD。

[0355] 也可以使用Kabat定义将项目D描述为:

[0356] D'. 与人血清白蛋白结合并包含以下各项的ISVD

[0357] i. CDR1,其为SEQ ID NO:124的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:124具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0358] ii. CDR2,其为SEQ ID NO:132的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:132具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0359] iii. CDR3,其为SEQ ID NO:140的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:140具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0360] 在一个实施方案中,所述ISVD包含为SEQ ID NO:124的氨基酸序列的CDR1、为SEQ ID NO:132的氨基酸序列的CDR2和为SEQ ID NO:140的氨基酸序列的CDR3。

[0361] 这种与人血清白蛋白结合的ISVD的例子具有如表A-2.1中针对构建体ALB23002所指示的一个或多个或所有框架区(除了在先前项目D'中定义的CDR之外)。在一个实施方案中,其是包含构建体ALB23002(SEQ ID NO:4,参见表A-1和A-2.1)的完整氨基酸序列或由其

组成的ISVD。

[0362] 在另一个实施方案中,与人血清白蛋白结合的ISVD的氨基酸序列也可以具有与SEQ ID NO:4大于90%,诸如大于95%或大于99%的序列同一性,其中CDR如先前项目D或D'所定义。在一个实施方案中,与人血清白蛋白结合的ISVD包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或由其组成。

[0363] 当这种与人血清白蛋白结合的ISVD在至少一个CDR中相对于对应参考CDR序列(以上项目D或D')具有2个或1个氨基酸差异时,与构建体ALB23002(SEQ ID NO:4)相比,ISVD对人血清白蛋白具有至少一半的结合亲和力,或至少相同的结合亲和力,其中结合亲和力是使用相同的方法(诸如SPR)测量的。

[0364] 在一个实施方案中,当这种与人血清白蛋白结合的ISVD具有C末端位置时,其表现出C末端延伸,诸如C末端丙氨酸(A)或甘氨酸(G)延伸。在一个实施方案中,这种ISVD选自SEQ ID NO:33、34、36、38、39、40、41、42、43和45(参见下表A-4)。在另一个实施方案中,与人血清白蛋白结合的ISVD具有不同于C末端位置的另一个位置(即不是本技术的多肽的C末端ISVD)。在一个实施方案中,这种ISVD选自SEQ ID NO:4、31、32、35和37(参见下表A-4)。

[0365] 5.4核酸分子

[0366] 还提供了编码本技术的多肽的核酸分子。

[0367] “核酸分子”(可与“核酸”互换使用)是经由磷酸酯主链彼此连接以形成核苷酸序列的核苷酸单体的链。核酸可以用于转化/转染宿主细胞或宿主生物体,例如用于多肽的表达和/或生产。用于生产目的的合适的宿主或宿主细胞对技术人员将是清楚的,并且可以例如是任何合适的真菌、原核或真核细胞或细胞系或任何合适的真菌、原核或真核生物体。包含编码本技术多肽的核酸的宿主或宿主细胞也被本技术涵盖。

[0368] 核酸可以是例如DNA、RNA或其杂合体,并且还可以包含(例如化学地)修饰的核苷酸,如PNA。其可以是单链或双链的。在一个实施方案中,其为双链DNA的形式。例如,本技术的核苷酸序列可以是基因组DNA、cDNA。

[0369] 本技术的核酸可以以本身已知的方式制备或获得,和/或可以从合适的天然来源中分离。编码天然存在的(多)肽的核苷酸序列可以例如进行定点诱变,以便提供编码具有序列变异的多肽的核酸分子。同样,如技术人员将清楚的,为了制备核酸,也可以以合适的方式将数个核苷酸序列,诸如至少一个编码靶向部分的核苷酸序列和例如编码一个或多个接头的核酸连接在一起。

[0370] 用于产生核酸的技术对技术人员将是清楚的,并且可以例如包括但不限于自动化DNA合成;定点诱变;组合两个或更多个天然存在的和/或合成的序列(或其两个或更多个部分),引入导致截短的表达产物表达的突变;引入一个或多个限制性位点(例如,以产生可能易于使用合适的限制性酶消化和/或连接的盒和/或区域),和/或借助使用一个或多个“错配”引物的PCR反应引入突变。

[0371] 5.5载体

[0372] 还提供了包含编码本技术多肽的核酸分子的载体。如本文所用的载体是适用于将遗传物质携带到细胞中的媒介物。载体包括裸核酸,诸如质粒或mRNA,或嵌入到更大结构诸如脂质体或病毒载体中的核酸。

[0373] 在一些实施方案中,载体包含至少一种核酸,其任选地连接到一个或多个调节元

件,例如像一个或多个合适的启动子、增强子、终止子等。在一个实施方案中,载体是表达载体,即适用于在合适的条件下(例如当所述载体被引入(例如人)细胞中时)表达编码的多肽或构建体的载体。基于DNA的载体包括用于转录(例如启动子和多聚腺苷酸信号)和翻译(例如Kozak序列)的元件的存在。

[0374] 在一个实施方案中,在载体中,所述至少一种核酸和所述调节元件彼此“可操作地连接”,这通常意指它们彼此之间具有功能关系。例如,如果启动子能够启动或以其他方式控制/调节编码序列的转录和/或表达,则所述启动子被认为与编码序列“可操作地连接”(其中,所述编码序列应理解为“在所述启动子的控制下”)。通常,当两个核苷酸序列可操作地连接时,它们将取向相同,并且通常也处于同一阅读框中。它们通常也基本上是连续的,尽管这也可能不是必需的。

[0375] 在一个实施方案中,载体的任何调节元件使得它们能够在预期的宿主细胞或宿主生物体中提供其预期的生物学功能。

[0376] 例如,启动子、增强子或终止子在预期的宿主细胞或宿主生物体中应是“可操作的”,这意味着例如所述启动子应能够启动或以其他方式控制/调节与其可操作地连接的核苷酸序列(例如编码序列)的转录和/或表达。

[0377] 5.6组合物

[0378] 本技术还提供了组合物,其包含至少一种本技术的多肽、至少一种编码本技术多肽的核酸分子或至少一种包含这种核酸分子的载体。所述组合物可以是药物组合物。所述组合物可以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其他药学活性多肽和/或化合物。

[0379] 5.7宿主生物体

[0380] 本技术还涉及宿主细胞或宿主生物体,其包含本技术的多肽、编码本技术多肽的核酸,和/或包含编码本技术多肽的核酸分子的载体。

[0381] 合适的宿主细胞或宿主生物体对技术人员是清楚的,并且是例如任何合适的真菌、原核或真核细胞或细胞系或任何合适的真菌、原核或真核生物体。具体例子包括HEK293细胞、CHO细胞、大肠杆菌(*Escherichia coli*)或巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。在一个实施方案中,宿主是巴斯德毕赤酵母。

[0382] 5.8所述多肽的方法和用途

[0383] 本技术还提供了用于产生本技术多肽的方法。所述方法可以包括用编码所述多肽的核酸转化/转染宿主细胞或宿主生物体,在宿主中表达所述多肽,任选地随后进行一个或多个分离和/或纯化步骤。具体地,所述方法可以包括:

[0384] a) 在合适的宿主细胞或宿主生物体或另一合适的表达系统中表达编码所述多肽的核酸序列;任选地随后进行:

[0385] b) 分离和/或纯化所述多肽。

[0386] 用于生产目的的合适的宿主细胞或宿主生物体对技术人员将是清楚的,并且可以例如是任何合适的真菌、原核或真核细胞或细胞系或任何合适的真菌、原核或真核生物体。具体例子包括HEK293细胞、CHO细胞、大肠杆菌或巴斯德毕赤酵母。在一个实施方案中,宿主是巴斯德毕赤酵母。

[0387] 本技术的多肽、如所述的核酸分子或载体,或者包含本技术多肽、核酸分子或载体

的组合物可用作药物。

[0388] 因此,本技术提供了用作药物的本技术的多肽、如所述的核酸分子或载体,或者包含本技术多肽、核酸分子或载体的组合物。

[0389] 还提供了本技术的多肽、如所述的核酸分子或载体,或者包含本技术多肽、核酸分子或载体的组合物,用于(预防性和/或治疗性)治疗。

[0390] 还提供了本技术的多肽、如所述的核酸分子或载体,或者包含本技术的多肽、核酸分子或载体的组合物,用于(预防性和/或治疗性)治疗自身免疫性或炎性疾病。

[0391] 还提供了本技术的多肽、如所述的核酸分子或载体,或者包含本技术的多肽、核酸分子或载体的组合物,用于(预防性和/或治疗性)治疗炎性肠病(诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、银屑病、银屑病关节炎和化脓性汗腺炎。

[0392] 进一步提供了治疗自身免疫性或炎性疾病的(预防性和/或治疗性)方法,其中所述方法包括向有需要的受试者施用药学活性量的本技术的多肽、如所述的核酸分子或载体,或者包含本技术的多肽、核酸分子或载体的组合物。

[0393] 进一步提供了治疗治疗炎性肠病(诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、银屑病、银屑病关节炎和化脓性汗腺炎的(预防性和/或治疗性)方法,其中所述方法包括向有需要的受试者施用药学活性量的本技术的多肽、如所述的核酸分子或载体,或者包含本技术的多肽、核酸分子或载体的组合物。

[0394] 进一步提供了本技术的多肽、如所述的核酸分子或载体,或者包含所述多肽、核酸分子或载体的组合物在制备用于治疗自身免疫性或炎性疾病的药物组合物方面的用途。

[0395] 进一步提供了本技术的多肽、如所述的核酸分子或载体、或者包含所述多肽、核酸分子或载体的组合物在制备用于治疗炎性肠病(诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、银屑病、银屑病关节炎或化脓性汗腺炎的药物组合物方面的用途。

[0396] 炎性肠病可以例如是克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

[0397] 在本技术的上下文中提及的“受试者”可以是任何动物。在一个实施方案中,受试者是哺乳动物。在哺乳动物之间,可以区分人与非人哺乳动物。非人动物可以是例如陪伴动物(例如狗、猫)、家畜(例如牛、马、绵羊、山羊或猪动物),或通常用于研究目的和/或用于产生抗体的动物(例如小鼠、大鼠、兔、猫、狗、山羊、绵羊、马、猪、非人灵长类动物(诸如食蟹猴)或骆驼科动物(诸如美洲驼或羊驼)。

[0398] 在预防和/或治疗目的的情况下,受试者可以是任何动物,并且更具体地是任何哺乳动物。在一个实施方案中,受试者是人受试者。

[0399] 包括多肽、核酸分子和载体、或组合物的物质可以通过任何合适的施用途径施用于受试者,例如通过肠内(诸如口服或直肠)或肠胃外(诸如表皮、舌下、颊、鼻、关节内、皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、经皮或经粘膜)施用。在一个实施方案中,物质通过肠胃外施用(诸如肌内、皮下或皮内施用)来施用。在一个实施方案中,使用皮下施用。

[0400] 可以将有效量的多肽、如所述的核酸分子或载体,或者包含所述多肽、核酸分子或载体的组合物施用于受试者,以便提供预期的治疗结果。

[0401] 可以施用一个或多个剂量。如果施用多于一个剂量,则可以以合适的间隔施用所述剂量,以便最大化所述多肽、组合物、核酸分子或载体的作用。

[0402] 表A-1:在四价多肽F027500069内鉴定的不同单价 $V_{HH}$ 构建块的氨基酸序列(“ID”是

指如本文所用的SEQ ID NO)

[0403]

名称	ID	氨基酸序列
6C11	2	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGR EFVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAL YYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLTVTVSS
119A03/1	3	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQ APGKQRELVATIESGSRNTYADSVKGRFTISRDNKKTVYLQMNSLR PEDTALYYCQTSGSGSPNFWGQGLTVTVSS
ALB23002	4	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
81A12	5	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTLSSYAMGWFRQAPGKER EFVARISQGGTAIYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAL YYCAKDPSPIYRGSAYLLSGSYDSWGQGLTVKVSS

[0404]

[0405] 表A-2:根据AbM编号的CDR和框架的序列 (“ID”是指给定的SEQ ID NO)

[0406]

ID	V <sub>HH</sub>	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
2	6C11	18	DVQLVESGG GVVQPGGSL RLSCTAS	6	GFTFST ADMG REFVA	20	WFRQ APGKG REFVA	10	RISGID GTTY NSKNTVYLQMNSL	24	YDEPVKGRFTISR NSKNTVYLQMNSL RPEDTALYYCRS	14	PRYADQ WSAYDY	28	WGQGLT VTVSS
3	119A03/1	19	EVQLVESGG GVVQPGGSL RLSCAAS	7	GRIFSLP ASGNIF NLLTIA	21	WYRQ APGKQ RELVA	11	TIESGS RTN	25	YADSVKGRFTISR NSKKTVYLQMNSL RPEDTALYYCQT	15	SGSGSPN F	28	WGQGLT VTVSS
4	ALB23002	19	EVQLVESGG GVVQPGGSL RLSCAAS	8	GFTFRS FGMS PEWVS	22	WVRQ APGKG PEWVS	12	SISGSG SDTL	26	YADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSL RPEDTALYYCTI	16	GGSLSR	29	SSQGLT VSS
5	81A12	19	EVQLVESGG GVVQPGGSL RLSCAAS	9	GRTLSS YAMG REFVA	23	WFRQ APGKE REFVA	13	RISQG GTAIY	27	YADSVKGRFTISR NSKNTVYLQMNSL RPEDTALYYCAK	17	DPSPIYR GSAYLLS GSYDS	30	WGQGLT VKVSS

[0407] 表A-2.1:根据Kabat编号的CDR和框架的序列 (“ID”是指给定的SEQ ID NO)

[0408]

ID	V <sub>HH</sub>	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
2	6C11	118	DVQLVESG GGVVQPG GSLRLSCTA SGFTFS	122	TADMG	126	WFRQ APGKG REFVA	130	RISGID GTTY DEPVK G	134	RFTISRDN KNTVYLQM NSLRPEDT ALYCRS	138	PRYADQ WSAYDY	142	WGQGT L VTVSS
3	119A03/1	119	EVQLVESG GGVVQPG GSLRLSCAA SGRIFS	123	LPASGNI FNLLTIA	127	WYRQ APGKQ RELVA	131	TIESGS RTNYA DSVKG	135	RFTISRDN KKTVYLQM NSLRPEDT ALYQCQT	139	SGSGSPN F	143	WGQGT L VTVSS
4	ALB23002	120	EVQLVESG GGVVQPG GSLRLSCAA SGFTFR	124	SFGMS	128	WVRQ APGKG PEWVS	132	SISGSG SDTLYA DSVKG	136	RFTISRDN KNTLYLQM NSLRPEDT ALYCTI	140	GGSLSR	144	SSQGT L TVSS
5	81A12	121	EVQLVESG GGVVQPG GSLRLSCAA SGRTL	125	SYAMG	129	WFRQ APGKE REFVA	133	RISQG GTAIY ADSVK G	137	RFTISRDN KNTVYLQM NSLRPEDT ALYCAK	141	DPSPIYR GSAYLLS GSYDS	145	WGQGT L VKVSS

[0409] 表A-3:选定的多价多肽的氨基酸序列 (“ID”是指给定的SEQ ID NO)

[0410]

名称	ID	氨基酸序列
F027500069	1	DVQLVESGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKREFVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTALYCRSPRYADQWSAYDYWGQGT LTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGVVQPGGSL RLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQAPGKQREL VATIESGSRNTYADSVKGRFTISRDN SKKTVYLQMNSLRPEDTALYCYCQTS GSGSPNFWGQGT LTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGVVQPGGSL RLSCAASGRTLS SYAMGWFRQAPGKEREFVARISQGGT AIYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYCAKDPSPYRGSAYLLS GSYDSWGQGT LVKVSSA

[0411] 表A-4:结合血清白蛋白的ISVD序列 (“ID”是指如本文所用的SEQ ID NO)

[0412]

名称	ID	氨基酸序列
Alb8	31	EVQLVESGGGLVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGLTVTVSS
Alb23	32	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGLTVTVSS
Alb129	33	EVQLVESGGGVVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLRS SQGLTVTVSSA
Alb132	34	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSR SSQGLTVTVSSA
Alb11	35	EVQLVESGGGLVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGLTVTVSS
Alb11 (S112K)-A	36	EVQLVESGGGLVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGLTVKVSSA
Alb82	37	EVQLVESGGGVVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS SQGLTVTVSS
Alb82-A	38	EVQLVESGGGVVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS SQGLTVTVSSA
Alb82-AA	39	EVQLVESGGGVVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS SQGLTVTVSSAA
Alb82-AAA	40	EVQLVESGGGVVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS

[0413]

		SQGLTVTVSSAAA
Alb82-G	41	EVQLVESGGGVVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS SQGLTVTVSSG
Alb82-GG	42	EVQLVESGGGVVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS SQGLTVTVSSGG
Alb82-GG G	43	EVQLVESGGGVVQPGNLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRS SQGLTVTVSSGGG
Alb23002	4	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSR SSQGLTVTVSS
Alb223	45	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSR SSQGLTVTVSSA

[0414] 表A-5:接头序列 (“ID”是指如本文所用的SEQ ID NO)

[0415]

名称	ID	氨基酸序列
3A接头	46	AAA
5GS接头	47	GGGGS
7GS接头	48	SGGSGGS
8GS接头	49	GGGSGGS
9GS接头	50	GGGSGGGS
10GS接头	51	GGGSGGGGS
15GS接头	52	GGGSGGGGSGGGGS
18GS接头	53	GGGSGGGGSGGGGSGGS
20GS接头	54	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
25GS接头	55	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30GS接头	56	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
35GS接头	57	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

[0416]	40GS接头	58	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
	G1铰链	59	EPKSCDKTHTCPPCP
	9GS-G1铰链	60	GGGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
	美洲驼上部长铰链区	61	EPKTPKPQAAA
	G3铰链	62	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPK SCDTPPPCPRCP

## [0417] 6实施例

## [0418] 6.1实施例1:多特异性ISVD构建体生成

[0419] 与TNF $\alpha$ 和IL-23结合的含ISVD的多肽F027500069 (SEQ ID NO:1) 的鉴定源于一项数据驱动的多特异性工程化和格式化活动,其中包括基于以下的构建块:抗TNF $\alpha$  V<sub>HH</sub>构建块 (TNF06C11 (WO 2017/081320)、TNF01C02 (WO 2015/173325, SEQ ID NO:327) 和VHH#3E (WO 2004/041862, SEQ ID NO:4))、抗IL-23p19 V<sub>HH</sub>构建块 (23IL37D05、23IL119A03和23IL81A12 (WO 2009/068627)) 和抗HSA V<sub>HH</sub>构建块ALB23002 (WO 2017085172, SEQ ID NO:10)。应用了构建块的不同位置/取向和不同的接头长度 (9GS对35GS), 并证明这些对于不同参数 (效力、交叉反应性、表达等) 是至关重要的。在这种情况下,效力是指如实施例6中测定的对TNF $\alpha$ 诱导的NF $\kappa$ B体外活化的抑制, 和如实施例7和8中测定的对IL-23诱导的mIL-22离体产生的抑制以及对IL-23诱导的SIE启动子体外活化的抑制。

[0420] 在巴斯德毕赤酵母中转化包含38种构建体的组 (表1) 用于小规模生产。通过逐步添加甲醇来诱导ISVD构建体表达。将具有分泌的ISVD构建体的澄清培养基用作起始材料, 用于经由蛋白A亲和色谱法纯化, 随后进行脱盐。纯化的样品用于功能表征和表达评价。

[0421] 一些构建体显示出受损的效力, 这取决于接头长度和ISVD构建块的相对位置。例如: 当与短的9GS接头连接时, 二价VHH#3E对食蟹猴TNF $\alpha$ 的效力显著受损。另一个例子是, 抗IL-23ISVD构建块37D05在多特异性构建体中的位置对于获得最大效力是至关重要的。

[0422] 表1: 所评价38种不同多特异性ISVD格式的列表。BB=构建块, ALB=ALB23002。

[0423]

构建体ID	BB1	接头 1	BB2	接头 2	BB3	接头 3	BB4	接头 4	BB5
F027500001	37D05	35GS	ALB	35GS	6C11				
F027500002	6C11	35GS	ALB	35GS	37D05				
F027500003	37D05	35GS	6C11	35GS	ALB				
F027500004	6C11	35GS	37D05	35GS	ALB				
F027500005	6C11	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12		
F027500006	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	6C11		
F027500007	37D05	35GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02		
F027500008	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02	35GS	37D05		
F027500009	37D05	35GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E		
F027500010	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	35GS	37D05		
F027500011	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	1C02	30GS	1C02
F027500012	1C02	30GS	1C02	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12
F027500013	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	VHH#3E	9GS	VHH#3E
F027500014	VHH#3E	9GS	VHH#3E	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12
F027500063	6C11	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12		
F027500064	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	6C11		
F027500069	6C11	9GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12		
F027500070	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	9GS	6C11		
F027500073	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	1C02	35GS	1C02
F027500074	1C02	35GS	1C02	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12
F027500075	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	VHH#3E	9GS	VHH#3E
F027500076	VHH#3E	9GS	VHH#3E	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12
F027500077	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	9GS	1C02	35GS	1C02
F027500078	1C02	35GS	1C02	9GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12
F027500079	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	9GS	VHH#3E	9GS	VHH#3E
F027500080	VHH#3E	9GS	VHH#3E	9GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12
F027500082	119A03/1	35GS	81A12	9GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02
F027500083	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	9GS	119A03/1	35GS	81A12
F027500084	119A03/1	35GS	81A12	9GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E

[0424]	<b>F027500085</b>	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02	35GS	119A03/1	35GS	81A12
	<b>F027500086</b>	119A03/1	35GS	81A12	35GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02
	<b>F027500087</b>	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	35GS	119A03/1	35GS	81A12
	<b>F027500088</b>	119A03/1	35GS	81A12	35GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E
	<b>F027500093</b>	37D05	9GS	ALB	9GS	6C11				
	<b>F027500094</b>	37D05	9GS	6C11	9GS	ALB				
	<b>F027500095</b>	37D05	9GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02		
	<b>F027500096</b>	37D05	9GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E		

[0425] 随后,将大组缩减成4种多特异性构建体的组,所述组由ISVD构建体F027500069、F027500093、F027500095和F027500096组成,已基于初步产量估计证明所述ISVD构建体对两种靶标(人和食蟹猴)均有效,并具有高表达水平的潜力。

[0426] 在巴斯德毕赤酵母中进行了较大规模的2L生产,以进行表达产量确定并评估生物物理特性和预先存在的抗体反应性。表2显示,为了在巴斯德毕赤酵母中获得高表达水平,需要构建块的特定取向。从5ml培养物中获得的具有相同构建块,但取向不同且接头长度不同的4种格式化ISVD构建体的表达产量清楚地表明,ISVD 6C11需要N末端位置才能良好表达。这在F027500069和F027500070的2L发酵中得到了证实,其中具有N末端6C11的ISVD构建体(F027500069)达到6.4g/L的滴度,这是具有C末端6C11的F027500070的3.2倍。

[0427] 表2:具有取向不同且接头长度不同的构建块6C11、119A03/1和81A12的4种ISVD构建体的表达水平。

构建体ID	BB1	接头1	BB2	接头2	BB3	接头3	BB4	5 ml培养物的产量(μg/ml)	2L发酵的产量(g/L)
[0428] <b>F027500063</b>	6C11	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	129.0	
<b>F027500064</b>	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	6C11	81.7	
<b>F027500069</b>	6C11	9GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	165.2	6.4
<b>F027500070</b>	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	9GS	6C11	104.6	2.0

[0429] 表3和实施例9显示,预先存在的抗体反应性受相应ISVD构建体的组成和效价驱动的。

[0430] 表3:与对照ISVD构建体F027301099和F027301186相比,存在于96个人血清样品中的预先存在的抗体与F027500069、F027500093、F027500095和F027500096的结合

[0431]

构建体 ID	BB1	接头1	BB2	接头2	BB3	接头3	BB4	接头4	BB5	25% 百分位数	中位 RU 水平	75% 百分位数
F02730 1099	1B11	35GS	ALB	35GS	1B11	35GS	6C11			47	92	350
F02730 1186	1E07	35GS	1E07	35GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02	61	135	622
F02750 0069	6C11	9GS	119A0 3/1	9GS	ALB	9GS	81A12- A			-15	-8	5
F02750 0093	37D0 5	9GS	ALB	9GS	6C11- A					-12	-5	22
F02750 0095	37D0 5	9GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02-A			0	7	22
F02750 0096	37D0 5	9GS	VHH# 3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3 E-A			5	14	22

[0432] 最后,基于效力、减少的与预先存在的抗体的结合、较高表达水平和CMC特征来选择ISVD构建体F027500069,其在确定的缓冲液中在100mg/mL浓度下的具有3.3cP的低粘度,并且在146mg/mL下具有6.4cP的低粘度。

[0433] 6.2实施例2:多特异性ISVD构建体对TNF $\alpha$ 、IL-23和血清白蛋白的结合亲和力

[0434] F027500069对人和食蟹猴TNF $\alpha$ 、人和食蟹猴IL-23以及人和食蟹猴血清白蛋白的亲和力(表示为平衡解离常数( $K_D$ ))在Gyrolab xP工作站(Gyros)上借助溶液内亲和力测量来定量。

[0435] 在 $K_D$ 控制的测量下,将连续稀释的TNF $\alpha$ 或IL-23(范围为1 $\mu$ M-0.1pM)或血清白蛋白(范围为10 $\mu$ M-1pM)和固定量的F027500069(在TNF $\alpha$ 的情况下为50pM,在IL-23的情况下为20pM或12.5pM,并且在血清白蛋白的情况下为1nM)混合以进行相互作用,并孵育24或48小时(在IL-23和TNF $\alpha$ 的情况下)或2小时(在血清白蛋白的情况下)以达到平衡。

[0436] 在受体控制的测量下,将连续稀释的TNF $\alpha$ 或IL-23(范围为1 $\mu$ M-0.1pM)或血清白蛋白(范围为10 $\mu$ M-1pM)和固定量的F027500069(在TNF $\alpha$ 的情况下为5nM,在IL-23的情况下为1.25nM,并且在血清白蛋白的情况下为50nM)混合以进行相互作用,并孵育24或48小时(在IL-23和TNF $\alpha$ 的情况下)或2小时(在血清白蛋白的情况下)以达到平衡。

[0437] 生物素化的人TNF $\alpha$ /IL-23/血清白蛋白被捕获在Gyrolab Bioaffy 1000 CD的微结构中,其含有珠的柱,并用作分子探针以从平衡溶液中捕获游离F027500069。使TNF $\alpha$ /IL-23/血清白蛋白和F027500069的混合物(含有游离TNF $\alpha$ /IL-23/血清白蛋白、游离F027500069和TNF $\alpha$ /IL-23/血清白蛋白-F027500069复合物)流过所述珠,并捕获与游离ISVD浓度成正比的小部分游离F027500069。然后注入荧光标记的抗V<sub>HH</sub>抗体以标记任何捕获的F027500069,并在冲洗掉过量的荧光探针后,确定荧光的变化。使用Gyrolab Analysis软

件完成稀释系列的拟合,其中分析 $K_D$ 控制和受体控制的曲线以确定 $K_D$ 值。

[0438] 结果(表4)证明多特异性ISVD构建体以高亲和力结合人/食蟹猴IL-23和人/食蟹猴TNF $\alpha$ 。

[0439] 表4:F027500069与人和食蟹猴IL-23、TNF $\alpha$ 和血清白蛋白的结合亲和力

抗原	人		食蟹猴		孵育时间 (h)
	$K_D$ (pM)	95% CI (pM)	$K_D$ (pM)	95% CI (pM)	
IL-23	14.1	3.2 - 26.4	33.5	4.8 - 62.0	24
	28.1	17.0 - 39.0	51.2	22.1 - 80.1	48
TNF $\alpha$	3.23	2.10 - 4.35	27.5	17.9 - 31.1	24
	3.39	1.53 - 5.26	18.6	12.9 - 24.4	48
SA	5900	5320 - 6480	10800	9010 - 12500	2

[0441] 6.3实施例3:多特异性ISVD构建体与膜结合TNF $\alpha$ 的结合

[0442] 使用流式细胞术在表达膜TNF $\alpha$ 的人HEK293H细胞上以及在从PBMC分离并用PMA和离子霉素刺激的活化CD4<sup>+</sup>细胞上证实了F027500069与膜结合TNF $\alpha$ 的结合(显示了表达TNF $\alpha$ 的HEK293H细胞的数据)。简而言之,将细胞以 $1 \times 10^4$ 个细胞/孔的密度接种,并与从100nM开始直至0.5pM的F027500069稀释系列在4 $^{\circ}$ C下孵育1小时。平行地,将细胞在接种之前用PBS中的4%多聚甲醛和0.1%戊二醛固定(以增加对膜结合TNF $\alpha$ 的检测),并与ISVD稀释系列在4 $^{\circ}$ C下孵育1小时或在室温下孵育24小时。将细胞洗涤3次,并且随后与抗V<sub>H</sub>mAb在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,再次洗涤,并在4 $^{\circ}$ C下与山羊抗小鼠PE标记的抗体孵育30分钟。将样品洗涤并重悬于FACS缓冲液(含10%FBS和0.05%叠氮化钠的D-PBS,补充有5nM TOPRO3)中。然后在iQuescreener上分析细胞悬浮液。使用GraphPad Prism计算EC50值。在1小时孵育后,对于活细胞和固定细胞,F027500069的EC50值在相同范围内,但细胞的固定导致膜上TNF $\alpha$ 的表达水平更高(表5)。在24小时孵育后,达到结合平衡,同时EC50提高6.6倍。

[0443] 表5:在1小时或24小时的孵育时间后,F027500069与膜表达TNF $\alpha$ 的结合亲和力

分析物	T = 1h活细胞	T = 1h固定细胞	T = 24h固定细胞
	EC50 (M)	EC50 (M)	EC50 (M)
F027500069	6.93E-10	8.11E-10	1.22E-10

[0445] 6.4实施例4:多特异性ISVD构建体选择性地结合TNF $\alpha$ 和IL-23

[0446] 经由SPR评估与TNF $\alpha$ 和IL-23相关的人细胞因子结合的缺乏。测试了hIL-12,因为它与IL-23共有p40亚基。TNF超家族成员人FASL、TNF $\beta$ 、LIGHT、TL-1A、RANKL被测试为TNF $\alpha$ 的相关细胞因子。

[0447] 使用胺偶联将靶标以10 $\mu$ g/mL固定600秒,且进行EDC/NHS的420秒注射用于活化,

并且进行1M乙醇胺HCl的420秒注射用于失活(Sierra传感器胺偶联试剂盒II目录号ACK-001-025)。将活化、失活和配体注入过程中的流速设置为10 $\mu$ l/min。通过从每种配体的pI减去约1.5来选择10mM乙酸盐固定缓冲液的pH。

[0448] 接下来,将1 $\mu$ M F027500069注入2分钟,并以45 $\mu$ L/min的流速解离900s。使用1x HBS-EP+pH7.4作为运行缓冲液。作为阳性对照,注射了0.2 $\mu$ M $\alpha$ -huIL-12Ab和0.5 $\mu$ M $\alpha$ -huFASL Ab、0.5 $\mu$ M $\alpha$ -huTNF $\beta$ Ab、0.5 $\mu$ M $\alpha$ -huLIGHT Ab、0.5 $\mu$ M $\alpha$ -huTL-1A Ab和0.5 $\mu$ M $\alpha$ -huRANKL V<sub>HH</sub>。F027500069和阳性对照与固定靶标之间的相互作用通过检测由于结合后芯片质量变化而发生的折射率增加来测量。

[0449] 所有阳性对照均与各自的靶标结合。未检测到F027500069与人IL-12、FASL、TNF $\beta$ 、LIGHT、TL-1A、RANKL的结合。

[0450] 6.5实施例5:多特异性ISVD构建体与hIL-23和hTNF $\alpha$ 的同时结合

[0451] 使用ProteOn XPR36装置来确定F027500069是否可以同时与hTNF $\alpha$ 和hIL-23结合。为此,经由胺偶联将HSA固定在GLC ProteOn传感器芯片上。将100nM F027500069以10 $\mu$ I/min在HSA表面上注射2分钟,以便经由ALB23002构建块捕获ISVD。随后以10 $\mu$ l/min的流速注射100nM hIL-23、hTNF $\alpha$ 或hOX40L或者100nM IL-23+100nM TNF $\alpha$ 、100nM IL-23+100nM OX40L或100nM TNF $\alpha$ +100nM IL-13的混合物2分钟,随后进行后续600秒的解离步骤。通过将HCl(100mM)以45 $\mu$ I/min注射2分钟来使HSA表面再生。传感图(图1)表明,F027500069可以同时结合人IL-23和人TNF $\alpha$ ,如反应单位的增加所示:从仅TNF $\alpha$ 增加约500RU,从仅IL-23增加约880RU,并且对于IL-23和TNF $\alpha$ 混合物增加约1300RU。

[0452] 6.6实施例6:多特异性ISVD构建体对TNF $\alpha$ 诱导的NF $\kappa$ B活化的体外抑制

[0453] HEK293\_NF $\kappa$ B-NLucP细胞是表达TNF受体的细胞,其已用编码在NF $\kappa$ B依赖性启动子控制下的Nano萤光素酶的报告物构建体稳定转染。将细胞与可溶性人和食蟹猴TNF $\alpha$ 一起孵育导致NF $\kappa$ B介导的Nano萤光素酶基因表达。使用添加到细胞上的以1:50比率与裂解缓冲液混合的Nano-Glo萤光素酶底物来测量Nano萤光素酶发光。将样品在振荡器上混合5分钟以获得完全裂解。

[0454] 将Glo response<sup>TM</sup> HEK293\_NF $\kappa$ B-NLucP细胞以20000个细胞/孔接种在白色组织培养(TC)处理的具有透明底部的96孔板中的正常生长培养基中。将F027500069或参考化合物(抗TNF $\alpha$ 参考mAb)的稀释系列添加到25pM人或70pM食蟹猴TNF $\alpha$ 中,并在30 $\mu$ M HSA存在下于37 $^{\circ}$ C下与细胞孵育5小时。

[0455] F027500069以浓度依赖性方式抑制人和食蟹猴TNF $\alpha$ 诱导的NF $\kappa$ B活化,其IC<sub>50</sub>为38.8pM(对于人TNF $\alpha$ )和128pM(对于食蟹猴TNF $\alpha$ ),与抗TNF $\alpha$ 参考mAb相当(表6,图2)。

[0456] 表6:相比于参考化合物抗hTNF $\alpha$ 参考mAb,在Glo response<sup>TM</sup> HEK293\_NF $\kappa$ B-NLucP报告物测定法中,F027500069介导的人和食蟹猴TNF $\alpha$ 中和的IC<sub>50</sub>值

		F02750069		抗hTNF $\alpha$ 参考mAb	
[0457]	抗原	人TNF $\alpha$	食蟹猴 TNF $\alpha$	人TNF $\alpha$	食蟹猴 TNF $\alpha$
	NF $\kappa$ B测定法IC <sub>50</sub> (M)	3.88E-11	1.28E-10	5.74E-11	7.00E-11

[0458] 6.7实施例7:多特异性ISVD构建体对IL-23诱导的mIL-22产生的离体抑制

[0459] 人(和食蟹猴)IL-23刺激小鼠脾细胞分泌mIL-17和mIL-22 (Aggarwal等人2003, J.Biol.Chem.278 (3):1910-4)。已经证明F027500069离体阻断IL-23诱导的mIL-22表达。去除5只C57BL/6小鼠的脾脏,收获脾细胞并制备单细胞悬液。在20ng/ml重组mIL-2的存在下培养细胞,并以400 000个细胞/孔接种在96孔平底板中。将F027500069或参考化合物(抗hIL-23参考mAb1和抗hIL-23参考mAb2)的系列稀释液与重组hIL-23 (36pM) 或来自食蟹猴的重组IL-23 (36pM) 在培养基中于室温下预先孵育30分钟,并且然后在30μM HSA存在下于37℃下与脾细胞再孵育3天。收集上清液并使用ELISA测量mIL-22的水平。

[0460] 表7中显示的结果表明F027500069以浓度依赖性方式抑制hIL-23和食蟹猴IL-23诱导的mIL-22产生,其IC<sub>50</sub>为43pM(对于人IL-23)和31pM(对于食蟹猴IL-23)。所述抑制作用比参考化合物抗hIL-23参考mAb1和抗hIL-23参考mAb2的抑制作用更强。

[0461] 6.8实施例8:多特异性ISVD构建体对IL-23诱导的SIE启动子活化的体外抑制

[0462] 用含有在SIE反应启动子控制下的萤光素酶基因的报告物构建体稳定转染Glo response™ HEK293\_人IL-23R/IL-12Rb1-Luc2P细胞。另外,这些细胞组成性地过表达人IL-23受体的两个亚基,即IL-12Rb1和IL-23R。当IL-23触发这些细胞时,表达萤光素酶报告蛋白,通过添加底物5'-氟萤光素(Bio-Glo™萤光素酶测定系统)基于其酶促活性进行定量。

[0463] 将细胞在正常生长培养基中培养,并以15000个细胞/孔接种在白色组织培养处理的具有透明底部的96孔板中。将F027500069或参考化合物(抗hIL-23参考mAb1和抗hIL-23参考mAb2)的系列稀释液添加到细胞中,随后添加重组hIL-23 (10pM) 或食蟹猴IL-23 (40pM)。在30μM HSA的存在下,将细胞于37℃下孵育4小时15分钟。随后,将Bio-Glo添加到每个孔中的细胞上,并测量萤光素酶发光。F027500069抑制人和食蟹猴IL-23依赖性信号传导,其IC<sub>50</sub>分别为250pM和323pM(表7和图3)。

[0464] 表7:相比于参考化合物抗hIL-23参考mAb1和抗hIL-23参考mAb2,在小鼠脾细胞测定法和Glo response™ HEK293\_人IL-23R/IL-12Rb1-Luc2P报告物测定法中,F027500069介导的人和食蟹猴IL-23中和的IC<sub>50</sub>值。

	F02750069		抗hIL-23参考mAb1		抗hIL-23参考mAb2	
抗原	人IL-23	食蟹猴IL-23	人IL-23	食蟹猴IL-23	人IL-23	食蟹猴IL-23
[0465] 小鼠脾细胞测定法IC <sub>50</sub> (M)	4.34E-11	3.07E-11	1.55E-10	7.95E-10	6.80E-10	4.95E-09
IL-23报告物测定法IC <sub>50</sub> (M)	2.50E-10	3.23E-10	3.23E-10	5.73E-10	5.41E-10	7.21E-10

[0466] 6.9实施例9:多特异性ISVD构建体与预先存在的抗体的结合

[0467] 使用ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 在正常人血清 (n=96) 中评估了ISVD构建体F027500069的预先存在的抗体反应性。将PBS/Tween (磷酸盐缓冲盐水, pH 7.4, 0.005% Tween20) 用作运行缓冲液,并且在25℃下进行实验。

[0468] 经由ALB23002构建块与固定在芯片上的HSA的结合,在芯片上捕获ISVD。为了固定

HSA,用EDC/NHS (流速30 $\mu$ I/min) 活化ProteOn GLC传感器芯片的配体泳道,并将HSA以100 $\mu$ l/ml注入pH 4.5的ProteOn醋酸盐缓冲液中,以实现大约3200RU的固定水平。在固定后,用乙醇胺HCl (流速30 $\mu$ l/min) 使表面失活。

[0469] 随后,将ISVD构建体以45 $\mu$ I/min在HSA表面上注射2分钟,以实现大约800RU的ISVD捕获水平。将含有预先存在的抗体的样品以14,000rpm离心2分钟,并将上清液在PBS-Tween20 (0.005%) 中以1:10稀释,然后以45 $\mu$ I/min注射2分钟,随后进行后续400秒的解离步骤。在每个循环后(即在新的ISVD捕获和血液样品注射步骤之前),通过将HCl (100mM) 以45 $\mu$ I/min注射2分钟使HSA表面再生。在通过减去1) ISVD-HSA解离和2) 与参考配体泳道的非特异性结合进行双重参考后,获得显示预先存在的抗体结合的传感图。通过将报告点设置在125秒(缔合结束后5秒) 来确定预先存在的抗体的结合水平。相对于参考ISVD在125秒时的结合水平,计算预先存在的抗体结合的减少百分比。

[0470] 与对照的未优化四价ISVD构建体F027301099相比,通过在每个构建块中引入突变L11V和V89L以及C末端丙氨酸针对减少的预先存在的抗体结合进行优化的四价ISVD构建体F027500069显示对预先存在的抗体的结合显著减少(表8和图4)。

[0471] 表8:与对照ISVD构建体F027301099相比,存在于96个人血清样品中的预先存在的抗体与F027500069的结合

ID	简短描述	25% 百分位数	中位 RU 水平	75% 百分位数
[0472] F027301099	1B11-35GS-ALB23000-35GS-1B11-35GS-6C11	47	92	350
F027500069	6C11-9GS-119A03/1-9GS-ALB23002-9GS-81A12-A	-15	-8	5

[0473] 预先存在的抗体结合取决于多特异性构建体的效价和组成。表3和图5证明,构建体F027500069显示出比构建体F027500095和F027500096更低的预先存在的抗体反应性。

[0474] 6.10实施例10:在人TNF $\alpha$ 转基因Tg197多关节炎模型中对F027500069的评价。

[0475] 在TNF驱动的进行性多关节炎的Tg197小鼠模型中分析F027500069 (Kefffer等人, 1991, EMBO J., 10:4025-4031)。在这些小鼠中,将修饰的人TNF $\alpha$ 基因作为转基因插入到小鼠中。以使转录的mRNA更稳定的方式修饰了人基因,并且由此导致TNF $\alpha$ 的过表达以及在所有四只爪子中具有100%外显率的自发性进行性关节炎。如果不治疗,那么体征和症状在约6周龄时变得可见,并且不断增加,直到从约10周龄起导致明显的濒死和死亡。通过评分系统对关节炎的严重程度进行了临床评估,如下详述:

关节炎得分 <sup>1</sup>	特征
[0476] 0/没有疾病	没有关节炎(正常外观,小鼠可以支撑其重量紧贴至倒置或倾斜表面(诸如线栅或笼盖)一段时间,全身柔韧性/逃避性正常,

	抓力最大)
0.5 /轻度疾病	关节炎发作 (轻度关节肿胀, 所有其他参数如上)
1 /轻度至中度疾病	轻度至中度 (关节因肿胀而变形, 爪子发炎, 所有其他参数如上)
1.5 /中度疾病	中度关节炎 (关节-爪肿胀、变形+尾指向内变形, 短暂支撑紧贴至倒置或倾斜表面 (诸如线栅或笼盖), 全身柔韧性降低, 抓力降低)
[0477] 2 /中度至重度疾病	中度至重度关节炎 (重度关节、爪子和手指肿胀, 关节-腿部变形, 无法支撑紧贴至倒置或倾斜表面 (诸如线栅或笼盖), 无全身柔韧性, 无抓力, 攀爬/进食受影响, 尝试移动时开始摇晃, 但能向前移动)
2.5 /重度疾病	重度关节炎 (如上文的2+ 前爪的手指变形, 小鼠运动受损, 摇晃, 不愿意移动)
3 /非常重度疾病	非常重度关节炎 (俯屈时检测到强直, 并且运动严重受损, 小鼠濒死, 不再摇晃, 向一侧倾斜时不能容易地转身/翻转)。

[0478] <sup>1</sup>关节炎得分如图6的y轴所示。

[0479] 关节炎针对人TNF $\alpha$ 的抑制的治疗剂的治疗敏感 (Shealy等人, 2002, Arthritis Res. 4 (5) :R7)。

[0480] 出于建立剂量依赖性功效的目的, 以治疗性方式通过每周两次腹膜内注射, 向患有关节炎的明显体征和症状的6周龄动物施用不同剂量的F027500069 (每组n=8只动物)。将从人骨髓瘤血清纯化的人IgG1 (BioXcell#BE0297) 用作阴性对照, 并将抗hTNF $\alpha$ 参考mAb用作抑制关节炎的阳性对照。分别以1.3mg/kg体重、4mg/kg和13.5mg/kg的三种不同剂量强度施用F027500069。治疗持续直到11周龄。每周一次确定临床关节炎得分。如图6所示, 用F027500069进行治疗导致临床关节炎得分随时间推移的剂量依赖性抑制。

[0481] 到第11周, 用人IgG1阴性对照抗体治疗的动物的平均关节炎得分发展到 $1.099 \pm 0.1071$ 。抗hTNF $\alpha$ 参考mAb完全抑制了关节炎的进展, 平均得分到第11周为 $0.4844 \pm 0.0594$ 。到第11周, F027500069减少关节炎进展, 其平均得分为 $0.8047 \pm 0.0929$  (1.3mg/kg)、 $0.7969 \pm 0.0585$  (4mg/kg) 和 $0.6016 \pm 0.0349$  (13.5mg/kg)。通过曲线下面积 (AUC, 图7) 分析了关节炎的总体抑制。在Tg197关节炎模型中, 所有剂量的F027500069均显著抑制了关节炎进展, 与抗hTNF $\alpha$ 参考mAb相当。

[0482] 在治疗完成后, 对后肢踝关节进行处理以供组织学分析, 并使用以下评分系统评价切片的关节炎结构特征:

对踝关节中的关节炎表型评分的累积组织病理学标准		
得分 <sup>1</sup>	疾病	标准
0	正常	没有可检测的病状
1	轻度	滑膜增生和多形核浸润的存在。可能存在轻度肌腱炎。
2	中度	血管翳和纤维组织形成以及局灶性软骨下骨侵蚀
3	中度 - 重度	软骨破坏和骨侵蚀
4	重度	广泛的软骨破坏和骨侵蚀。骨轮廓结构丢失

[0483] <sup>1</sup>关节炎得分如图8的y轴所示。

[0484] 组织学评分的结果在图8中示出。在较高剂量下，F027500069显著抑制了结构性关节炎和关节破坏。

[0485] 总之，结果表明F027500069对关节炎体征和症状的剂量依赖性抑制，以及对结构进展的抑制作用，其程度与抗TNF $\alpha$ 参考mAb相当。

[0486] 6.11实施例11：在人IL-23诱导的皮肤炎症模型中对F027500069的评价。

[0487] 在小鼠中皮内注射重组IL-23导致急性皮肤炎症，其中在注射部位周围变红和肿胀。在组织学上，银屑病皮肤炎症的标志是可见的，诸如由角化细胞增生引起的表皮增厚、角化病以及如T细胞和巨噬细胞的免疫细胞浸润。在分子水平上，模型中的转录组变化与在人银屑病损伤皮肤中相比于正常皮肤观察到的那些变化在很大程度上重叠 (Gauld等人, 2018, Journal of Dermatological Science 92:45-53)。因此，IL-23皮肤炎症模型类似于银屑病的机械模型。

[0488] 为了研究对IL-23介导的炎症的抑制作用，在自Rizzo等人, 2011, J Immunol; 186: 1495-1502调整的的皮肤炎症模型中测试了F027500069。在第1、2、3和4天，将总体积为20 $\mu$ l的1 $\mu$ g重组人IL-23皮内注射到雌性C57BL/6小鼠的右耳中。将PBS作为对照注射到一组小鼠的耳朵中。每天通过卡尺测量耳皮的增厚。在第1天和第3天，通过腹膜内注射施用F027500069和对照化合物。在第5天，处死小鼠，并进行皮肤打孔活组织检查。在补充有蛋白酶抑制剂混合物的PBS中将活组织检查匀浆化，并确定下游效应细胞因子IL-22的水平。

[0489] 出于建立剂量依赖性功效的目的，以治疗性方式通过每周两次腹膜内注射，向患有有关节炎的明显体征和症状的6周龄动物施用不同剂量的ISVD构建体 (每组n=10只动物)。将从人骨髓瘤血清纯化的人IgG1 (BioXcell#BE0297) 用作阴性对照，并将抗hIL-23参考mAb1用作抑制皮肤炎症的阳性对照。分别以0.13mg/kg体重、0.4mg/kg、1mg/kg和4mg/kg的四种不同剂量强度施用F027500069。如图9所示，用F027500069进行治疗导致对皮肤肿胀的剂量依赖性抑制，将其描绘为耳朵厚度在第5天自基线的变化。

[0490] 在第5天进行皮肤活组织检查，并制备组织匀浆。利用Mesoscale Discovery V-plex小鼠IL-22测定试剂盒 (#K152WVD, 图10) 测量了鼠IL-22水平。IL-23的施用导致可测量的IL-22水平，因为来自注射PBS的皮肤的所有样品均低于所采用测定法的定量下限

(LLOQ)。所有剂量的F027500069以及抗hIL-23参考mAb1均显著抑制了IL-22组织水平(对于1mg/kg剂量组,未确定IL-22水平)。

[0492] 此外,在IL-23诱导的皮肤炎症模型中的另一个实验中评估了皮下施用的可行性。在第1天和第3天以腹膜内或皮下注射方式施用了两个剂量的F027500069(0.1mg/kg和1mg/kg),并获得耳朵厚度的变化(图11)。在此实验中,将1mg/kg剂量的无关V<sub>HH</sub>用作阴性对照(Nab ctrl),并将3mg/kg剂量的抗hIL-23参考mAb1(IP)用作阳性对照。

[0493] 此外,从第5天皮肤活组织检查匀浆测量组织IL-22水平(图12)。

[0494] 总之,结果证明了IL-23诱导的皮肤炎症在皮肤增厚方面以及在组织效应细胞因子水平方面均得到抑制。腹膜内以及皮下两种施用途径都是可行的。

[0495] 6.12实施例12:在人TNF $\alpha$ /TNFR1敲入小鼠中的胶原抗体诱导的关节炎模型中对F027500069的评价。

[0496] 在专有小鼠中的胶原抗体诱导的关节炎(CAIA)模型中分析了F027500069,其中TNF $\alpha$ 和TNF受体1(TNFR1)两者的基因座都被各自的人基因座替代。

[0497] 在第0天,对每组8只动物注射8mg针对软骨胶原2的单克隆抗体的混合物(ArthritoMab,MDbioscience,CIA-MAB-2C)。在第1天,通过注射25 $\mu$ g细菌脂多糖(LPS)触发了关节炎的发展。在LPS注射后6小时,将测试化合物作为单次注射施用一次。基于如下详述的关节炎得分,每天评估关节炎的体征和症状发展直到第7天:

关节炎得分 <sup>1</sup>	特征
0	没有临床体征或症状
1	踝关节和腕骨的轻度肿胀。
2	踝关节和腕骨的中度肿胀;足趾受累。轻度红斑
3	整个爪子(包括足趾)的重度肿胀。重度红斑。
对每个肢体从0至3单独评分,总关节炎得分是所有4个肢体的得分总和,其中最大总分为12。	

[0498] <sup>1</sup>关节炎得分如图13的y轴所示。

[0500] 以1.3mg/kg体重施用了F027500069,以0.5mg/kg施用了抗hTNF $\alpha$ 参考mAb阳性对照。图13示出了关节炎体征和症状随时间推移的发展。F027500069或抗hTNF $\alpha$ 参考mAb两者的单次预防性施用导致完全抑制关节炎的发展。

[0501] 6.13实施例13:在人TNF $\alpha$ 敲入小鼠中的人IL-23诱导的皮肤炎症模型中对F027500069的评价。

[0502] 由于F027500069仅结合并抑制人或灵长类动物靶标(IL-23和TNF $\alpha$ 两者),因此在TNF $\alpha$ 人源化小鼠中重复了人IL-23诱导的皮肤炎症。在这个专有品系中,小鼠的整个基因组TNF $\alpha$ 基因座被人基因座替代。外显子-内含子结构和调控元件在小鼠与人之间是保守的。事先已经评估了人TNF $\alpha$ 在小鼠中的真实表达以及引发反应的功能能力。

[0503] 皮内注射hIL-23导致TNF $\alpha$ 表达的适度增加(自有数据和Gauld等人2018, Journal of Dermatological Science 92:45-53)。在此模型中施用了等摩尔剂量的F027500069和相应的单特异性ISVD构建块F027500101(抗TNF $\alpha$ )和F027500017(抗IL-23),以解决双重靶

向的潜在累加效应。施用的剂量强度为3.6nmol/kg,对应于约0.1mg/kg。选择这一低剂量以允许一些剩余的游离IL-23并因此允许下游TNF $\alpha$ 分泌。此外,施用了高剂量的F027500069以及抗hIL-23参考mAb1作为阳性对照。将耳朵厚度的变化针对高(Nab阴性对照)和低(无IL-23注射)对照进行归一化(样品减去低对照除以高对照减去低对照)。图14示出了结果。3.6nmol/kg F027500101的单特异性TNF $\alpha$ 抑制作用没有抑制皮肤肿胀,而3.6nmol/kg F027500017的单特异性IL-23抑制作用具有中度但显著的作用。3.6nmol/kg F027500069对TNF $\alpha$ 和IL-23两者的双重靶向导致数值上优异的对皮肤肿胀的抑制。

[0504] 在第5天进行皮肤活组织检查,并使用标准方法制备mRNA。在Illumina NovaSeq<sup>TM</sup>6000平台上对mRNA进行了配对末端、基于本体的全转录组测序。分析了相比于NAb对照差异表达的基因(DEG,倍数变化 $>2$ , $p<0.001$ )在治疗组之间的重叠。如图15所示,尽管单特异性治疗组与多特异性治疗组有很大重叠,但769个DEG中仍有199个对F027500069治疗具有特异性。这表明,在此模型中,对TNF $\alpha$ 和IL-23两者的双重靶向导致独特的分子反应,并可能协同改善人类疾病。

[0505] 总之,结果表明,在IL-23诱导的皮肤炎症中对IL-23和TNF $\alpha$ 两者的多特异性抑制导致对皮肤增厚的数值累加效应,并引起独特的转录组学谱。

[0506] 7工业适用性

[0507] 本文所述的多肽、编码所述多肽的核酸分子、包含所述核酸的载体和组合物可以用于例如治疗,诸如患有炎性肠病、银屑病、银屑病关节炎或化脓性汗腺炎的受试者的治疗。

## 序列表

&lt;110&gt; 艾伯霖克斯公司

&lt;110&gt; 赛诺菲

<120> 包含靶向TNF $\alpha$ 和IL-23的免疫球蛋白单个可变结构域的多肽

&lt;130&gt; 228667

&lt;150&gt; US 62/944,619

&lt;151&gt; 2019-12-06

&lt;150&gt; EP 20 305 056.2

&lt;151&gt; 2020-01-23

&lt;150&gt; EP 20 000 090.9

&lt;151&gt; 2020-02-28

&lt;150&gt; EP 20 305 216.2

&lt;151&gt; 2020-03-02

&lt;160&gt; 157

&lt;170&gt; BiSSAP 1.3.6

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 517

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; F027500069

&lt;400&gt; 1

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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

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

435	440	445
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys		
450	455	460
Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala		
465	470	475
Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala		
485	490	495
Tyr Leu Leu Ser Gly Ser Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
500	505	510
Lys Val Ser Ser Ala		
515		
<210> 2		
<211> 121		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 6C11		
<400> 2		
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
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
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> 3		
<211> 125		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

<223> 119A03/1

<400> 3

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	Arg	Ile	Phe	Ser	Leu	Pro
			20					25						30	
Ala	Ser	Gly	Asn	Ile	Phe	Asn	Leu	Leu	Thr	Ile	Ala	Trp	Tyr	Arg	Gln
		35					40					45			
Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val	Ala	Thr	Ile	Glu	Ser	Gly	Ser
		50				55					60				
Arg	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg
65					70					75					80
Asp	Asn	Ser	Lys	Lys	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro
				85					90					95	
Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Pro
			100					105						110	
Asn	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
			115				120						125		

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ALB23002

<400> 4

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> 5

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 81A12

<400> 5

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 Arg Thr Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gln Gly Gly Thr Ala Ile 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

Ala Lys Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala Tyr Leu Leu Ser

100 105 110

Gly Ser Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser

115 120 125

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR1

<400> 6

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala Asp Met Gly

1 5 10

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR1  
 <400> 7  
 Gly Arg Ile Phe Ser Leu Pro Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Thr Ile Ala  
 <210> 8  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CDR1  
 <400> 8  
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser  
 1                   5                   10  
 <210> 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CDR1  
 <400> 9  
 Gly Arg Thr Leu Ser Ser Tyr Ala Met Gly  
 1                   5                   10  
 <210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CDR2  
 <400> 10  
 Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr  
 1                   5                   10  
 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CDR2  
 <400> 11

Thr Ile Glu Ser Gly Ser Arg Thr Asn

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 12

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 13

Arg Ile Ser Gln Gly Gly Thr Ala Ile Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 14

Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr

1 5 10

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 15

Ser Gly Ser Gly Ser Pro Asn Phe

1 5

<210> 16

<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CDR3  
 <400> 16  
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg  
 1                    5  
 <210> 17  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CDR3  
 <400> 17  
 Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Gly Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Tyr Asp Ser  
 <210> 18  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR1  
 <400> 18  
 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  
                   20                    25  
 <210> 19  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR1  
 <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 Ala Ala Ser

	20	25
<210>	20	
<211>	14	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	FR2	
<400>	20	
	Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala	
1	5	10
<210>	21	
<211>	14	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	FR2	
<400>	21	
	Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala	
1	5	10
<210>	22	
<211>	14	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	FR2	
<400>	22	
	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser	
1	5	10
<210>	23	
<211>	14	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	FR2	
<400>	23	
	Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala	
1	5	10
<210>	24	
<211>	39	

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR3  
 <400> 24  
 Tyr Asp Glu Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr  
                   20                   25                   30  
 Ala Leu Tyr Tyr Cys Arg Ser  
                   35  
 <210> 25  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR3  
 <400> 25  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Lys Lys Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr  
                   20                   25                   30  
 Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Thr  
                   35  
 <210> 26  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR3  
 <400> 26  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr  
                   20                   25                   30  
 Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile  
                   35  
 <210> 27  
 <211> 39

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR3  
 <400> 27  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr  
                   20                   25                   30  
 Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys  
                   35  
 <210> 28  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR4  
 <400> 28  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1                   5                   10  
 <210> 29  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR4  
 <400> 29  
 Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1                   5                   10  
 <210> 30  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR4  
 <400> 30  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser  
 1                   5                   10  
 <210> 31



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> 33

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Alb129

<400> 33

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> 34

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Alb132

<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 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>	35																
<211>	115																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	Alb11																
<400>	35																
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>	36																
<211>	116																
<212>	PRT																



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

Val Ser Ser  
 115

<210> 38

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Alb82-A

<400> 38

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  
 115

<210> 39

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Alb82-AA

<400> 39

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

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Alb82-AAA

&lt;400&gt; 40

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	Ala													

115

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> Alb82-G

<400> 41

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												

<210> 42

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Alb82-GG

<400> 42

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> 43

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Alb82-GGG

<400> 43

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 Gly

115

<210> 44

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Alb23002

<400> 44

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>	45																		
<211>	116																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	Alb223																		
<400>	45																		
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>	46																		
<211>	3																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	3A																		
<400>	46																		

Ala Ala Ala

1

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5GS

<400> 47

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 7GS

<400> 48

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1

5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8GS

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1

5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 9GS

<400> 50

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 51

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 10GS  
 <400> 51  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1                   5                   10  
 <210> 52  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 15GS  
 <400> 52  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1                   5                   10                   15  
 <210> 53  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 18GS  
 <400> 53  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Gly Ser  
 <210> 54  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 20GS  
 <400> 54  
 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> 55

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 25GS

<400> 55

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> 56

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 30GS

<400> 56

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> 57

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 35GS

<400> 57

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> 58

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 40GS

<400> 58

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> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> G1铰链

<400> 59

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1                    5                    10                    15

<210> 60

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 9GS-G1铰链

<400> 60

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

1                    5                    10                    15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

                  20

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 美洲驼上部长铰链区

<400> 61

Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro Gln Pro Ala Ala Ala

1                    5                    10

<210> 62

<211> 62

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> G3铰链  
 <400> 62  
 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> 63  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 基序  
 <400> 63  
 Lys Glu Arg Glu  
 1  
 <210> 64  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 基序  
 <400> 64  
 Lys Gln Arg Glu  
 1  
 <210> 65  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 基序  
 <400> 65  
 Gly Leu Glu Trp

1

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 基序

&lt;400&gt; 66

Lys Glu Arg Glu Leu

1 5

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 基序

&lt;400&gt; 67

Lys Glu Arg Glu Phe

1 5

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 基序

&lt;400&gt; 68

Lys Gln Arg Glu Leu

1 5

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 基序

&lt;400&gt; 69

Lys Gln Arg Glu Phe

1 5

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 5

<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 70  
Lys Glu Arg Glu Gly  
1                   5  
<210> 71  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 71  
Lys Gln Arg Glu Trp  
1                   5  
<210> 72  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 72  
Lys Gln Arg Glu Gly  
1                   5  
<210> 73  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 73  
Thr Glu Arg Glu  
1  
<210> 74  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>

<223> 基序  
<400> 74  
Thr Glu Arg Glu Leu  
1                   5  
<210> 75  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 75  
Thr Gln Arg Glu  
1  
<210> 76  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 76  
Thr Gln Arg Glu Leu  
1                   5  
<210> 77  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 77  
Lys Glu Cys Glu  
1  
<210> 78  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 78  
Lys Glu Cys Glu Leu

1 5  
<210> 79  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 79  
Lys Glu Cys Glu Arg  
1 5  
<210> 80  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 80  
Lys Gln Cys Glu  
1  
<210> 81  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 81  
Lys Gln Cys Glu Leu  
1 5  
<210> 82  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 82  
Arg Glu Arg Glu  
1  
<210> 83  
<211> 5

<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 83  
Arg Glu Arg Glu Gly  
1                    5  
<210> 84  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 84  
Arg Gln Arg Glu  
1  
<210> 85  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 85  
Arg Gln Arg Glu Leu  
1                    5  
<210> 86  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 86  
Arg Gln Arg Glu Phe  
1                    5  
<210> 87  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>

<223> 基序  
<400> 87  
Arg Gln Arg Glu Trp  
1                   5  
<210> 88  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 88  
Gln Glu Arg Glu  
1  
<210> 89  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 89  
Gln Glu Arg Glu Gly  
1                   5  
<210> 90  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 90  
Gln Gln Arg Glu  
1  
<210> 91  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 91  
Gln Gln Arg Glu Trp

1 5  
<210> 92  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 92  
Gln Gln Arg Glu Leu  
1 5  
<210> 93  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 93  
Gln Gln Arg Glu Phe  
1 5  
<210> 94  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 94  
Lys Gly Arg Glu  
1  
<210> 95  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 95  
Lys Gly Arg Glu Gly  
1 5  
<210> 96  
<211> 4

<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 96  
Lys Asp Arg Glu  
1  
<210> 97  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 97  
Lys Asp Arg Glu Val  
1                   5  
<210> 98  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 98  
Asp Glu Cys Lys Leu  
1                   5  
<210> 99  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 99  
Asn Val Cys Glu Leu  
1                   5  
<210> 100  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>

<223> 基序  
<400> 100  
Gly Val Glu Trp  
1  
<210> 101  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 101  
Glu Pro Glu Trp  
1  
<210> 102  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 102  
Gly Leu Glu Arg  
1  
<210> 103  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 103  
Asp Gln Glu Trp  
1  
<210> 104  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 104  
Asp Leu Glu Trp

1

<210> 105

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 105

Gly Ile Glu Trp

1

<210> 106

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 106

Glu Leu Glu Trp

1

<210> 107

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 107

Gly Pro Glu Trp

1

<210> 108

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 108

Glu Trp Leu Pro

1

<210> 109

<211> 4

<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 109  
Gly Pro Glu Arg  
1  
<210> 110  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 110  
Gly Leu Glu Arg  
1  
<210> 111  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 基序  
<400> 111  
Glu Leu Glu Trp  
1  
<210> 112  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 112  
Val Thr Val Ser Ser  
1                   5  
<210> 113  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>

<223> C-末端  
<400> 113  
Val Lys Val Ser Ser  
1 5  
<210> 114  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 114  
Val Gln Val Ser Ser  
1 5  
<210> 115  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 115  
Val Thr Val Ser Ser Ala  
1 5  
<210> 116  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 116  
Val Lys Val Ser Ser Ala  
1 5  
<210> 117  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 117  
Val Gln Val Ser Ser Ala



<223> FR1  
 <400> 121  
 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 Arg Thr Leu Ser  
                   20                   25                   30  
 <210> 122  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CDR1  
 <400> 122  
 Thr Ala Asp Met Gly  
 1                   5  
 <210> 123  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CDR1  
 <400> 123  
 Leu Pro Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu Thr Ile Ala  
 1                   5                   10  
 <210> 124  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CDR1  
 <400> 124  
 Ser Phe Gly Met Ser  
 1                   5  
 <210> 125  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CDR1

<400> 125

Ser Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 126

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 126

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala

1 5 10

<210> 127

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 127

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala

1 5 10

<210> 128

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 128

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser

1 5 10

<210> 129

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 129

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala

1 5 10

<210> 130

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 130

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

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 131

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 131

Thr Ile Glu Ser Gly Ser Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1                    5                    10                    15

<210> 132

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 132

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 133

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 133

Arg Ile Ser Gln Gly Gly Thr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 134

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 134

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Arg	Ser
			20					25					30		

<210> 135

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 135

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Lys	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Thr
			20					25					30		

<210> 136

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 136

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile
			20					25					30		

<210> 137

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 137

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 1                   5                   10                   15  
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys  
                   20                   25                   30

<210> 138

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 138

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

<210> 139

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 139

Ser Gly Ser Gly Ser Pro Asn Phe  
 1                   5

<210> 140

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 140

Gly Gly Ser Leu Ser Arg  
 1                   5

<210> 141

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 141

Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Gly Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Tyr Asp Ser  
 <210> 142  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR4  
 <400> 142

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1                   5                   10  
 <210> 143  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR4  
 <400> 143

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1                   5                   10  
 <210> 144  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR4  
 <400> 144

Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1                   5                   10  
 <210> 145  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> FR4  
 <400> 145

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser  
 1                   5                   10

<210> 146  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 146  
Val Thr Val Lys Ser  
1 5  
<210> 147  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 147  
Val Thr Val Gln Ser  
1 5  
<210> 148  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 148  
Val Lys Val Lys Ser  
1 5  
<210> 149  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 149  
Val Lys Val Gln Ser  
1 5  
<210> 150  
<211> 5  
<212> PRT

<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 150  
Val Gln Val Lys Ser  
1                   5  
<210> 151  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 151  
Val Gln Val Gln Ser  
1                   5  
<210> 152  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 152  
Val Thr Val Lys Ser Ala  
1                   5  
<210> 153  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端  
<400> 153  
Val Thr Val Gln Ser Ala  
1                   5  
<210> 154  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> C-末端

<400> 154

Val Lys Val Lys Ser Ala

1                    5

<210> 155

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C-末端

<400> 155

Val Lys Val Gln Ser Ala

1                    5

<210> 156

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C-末端

<400> 156

Val Gln Val Lys Ser Ala

1                    5

<210> 157

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C-末端

<400> 157

Val Gln Val Gln Ser Ala

1                    5

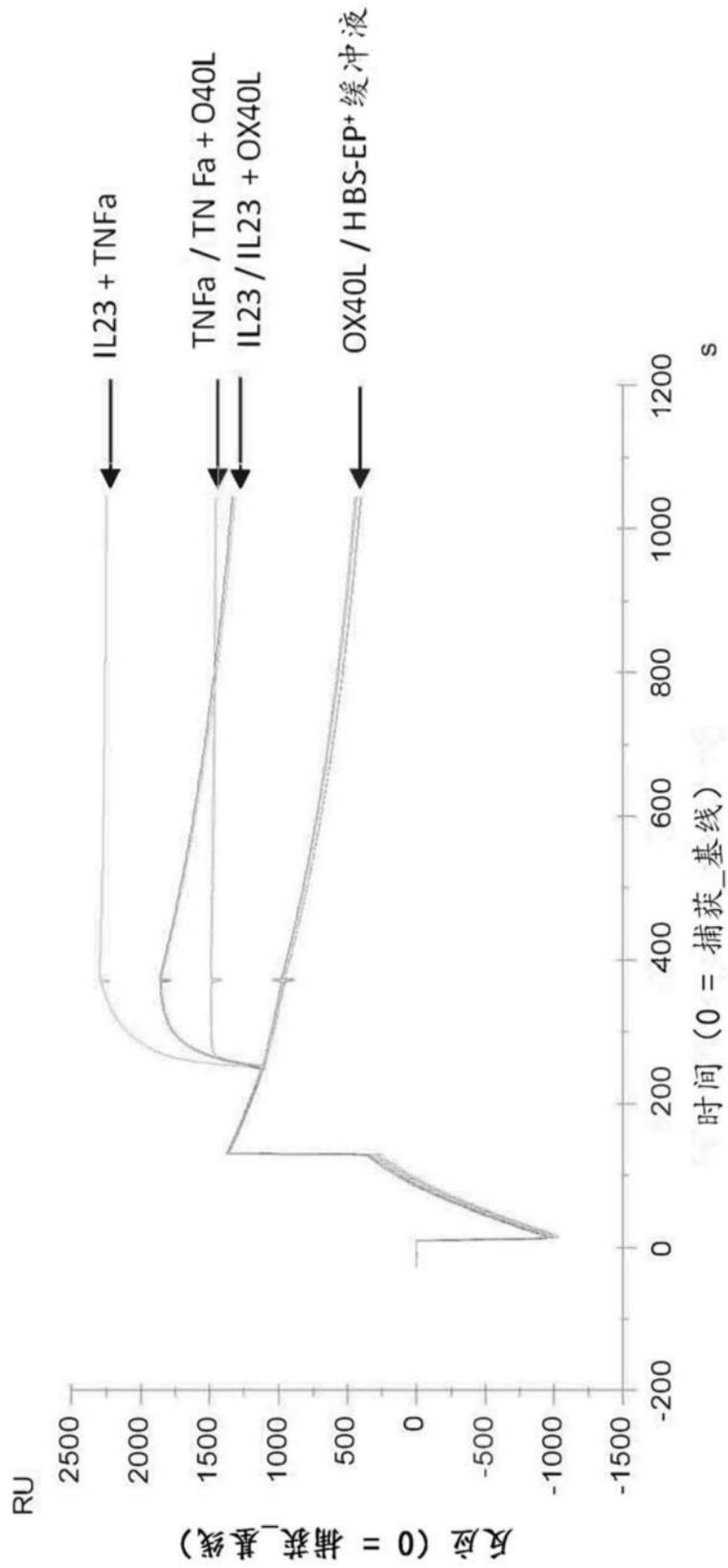


图1

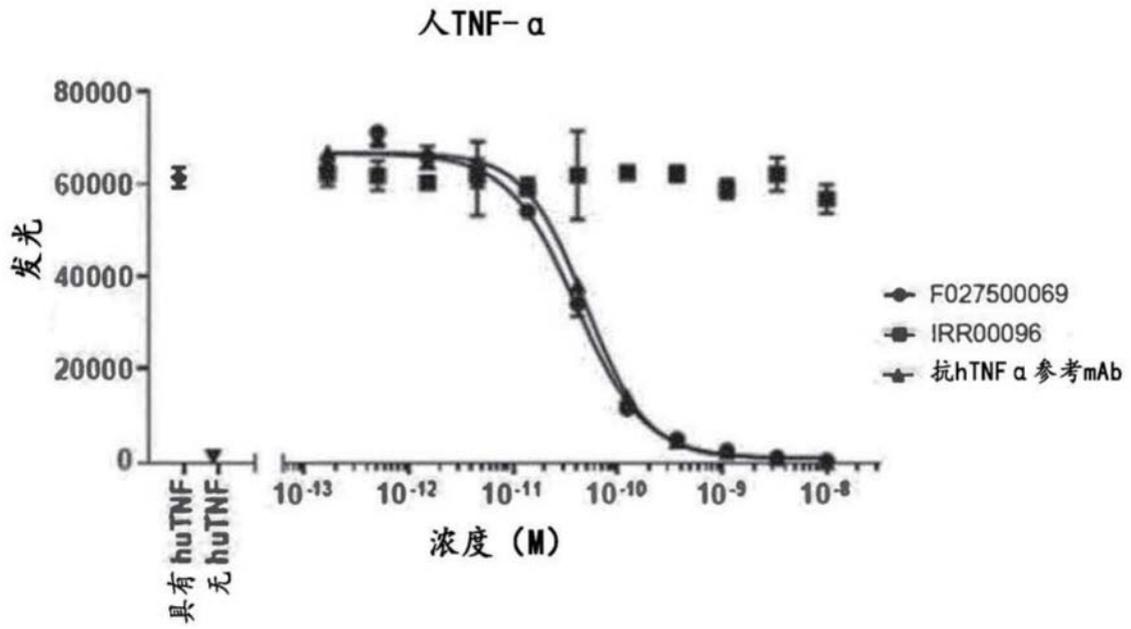


图2A

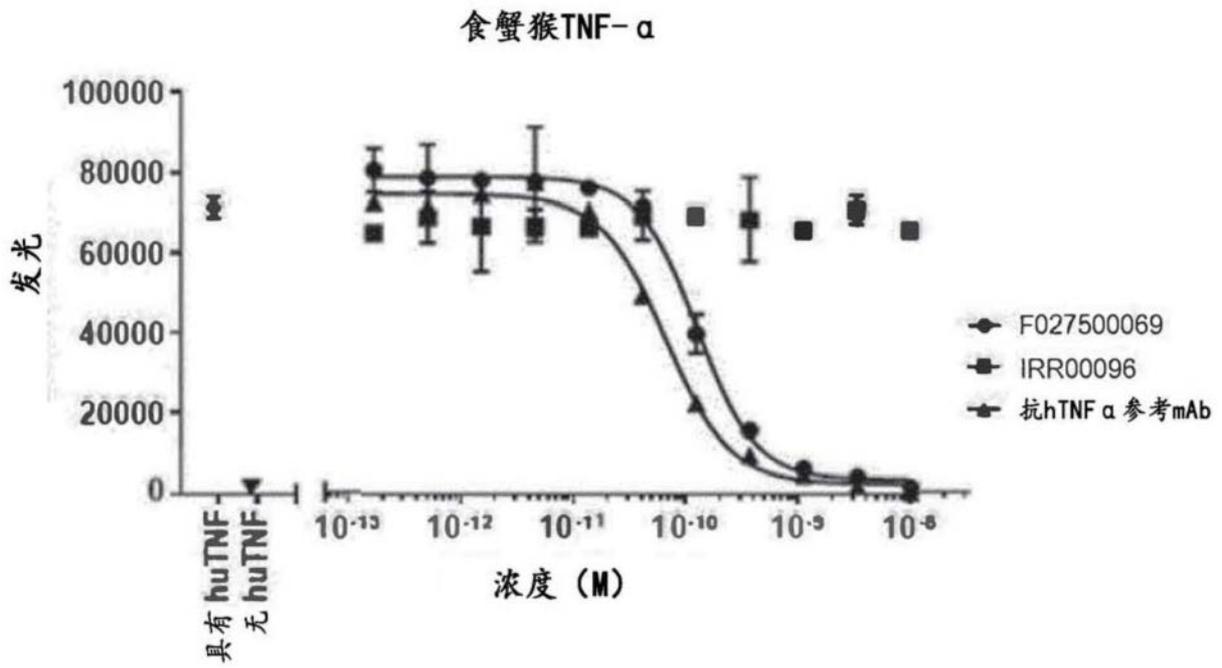


图2B

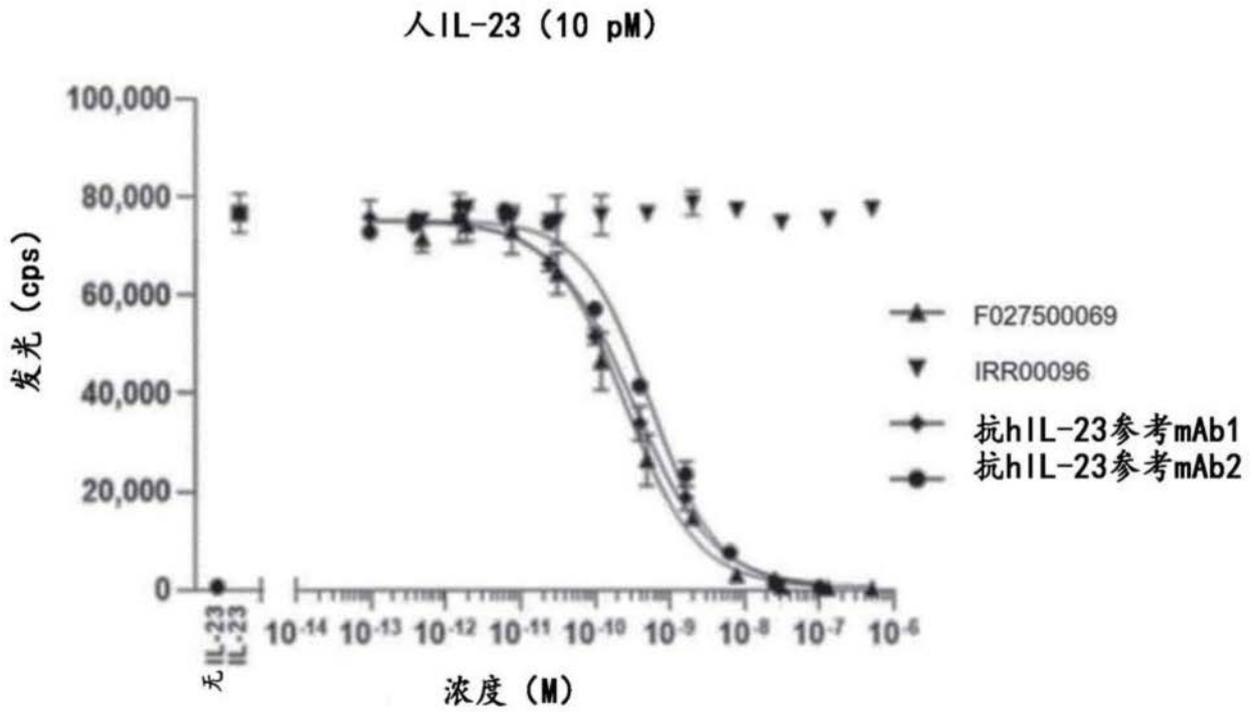


图3A

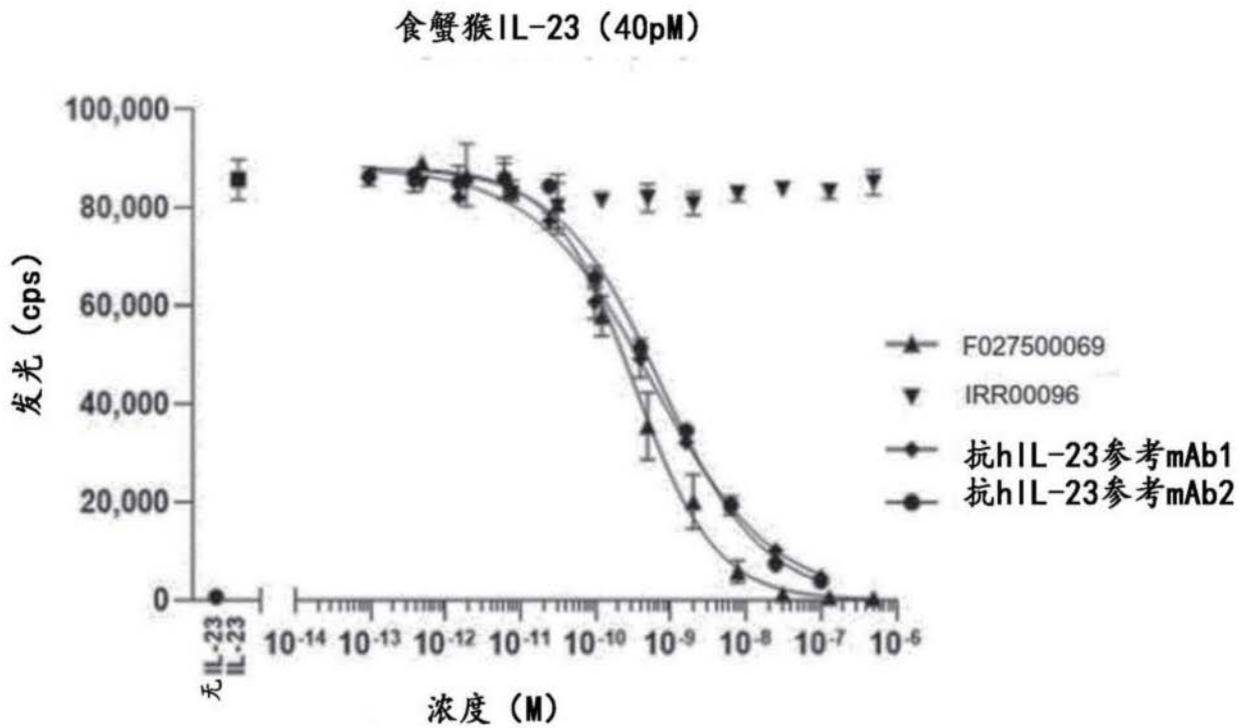


图3B

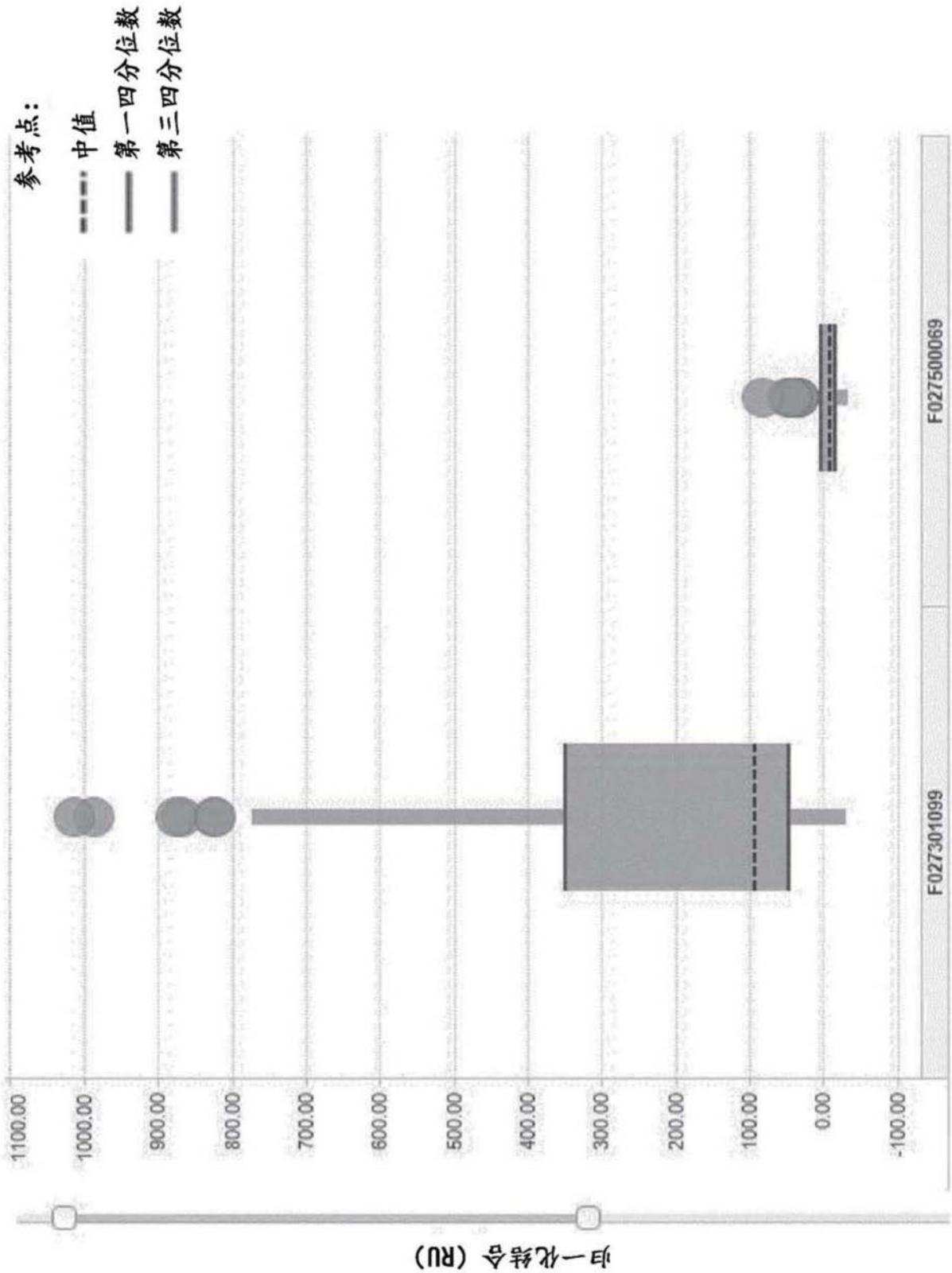


图4

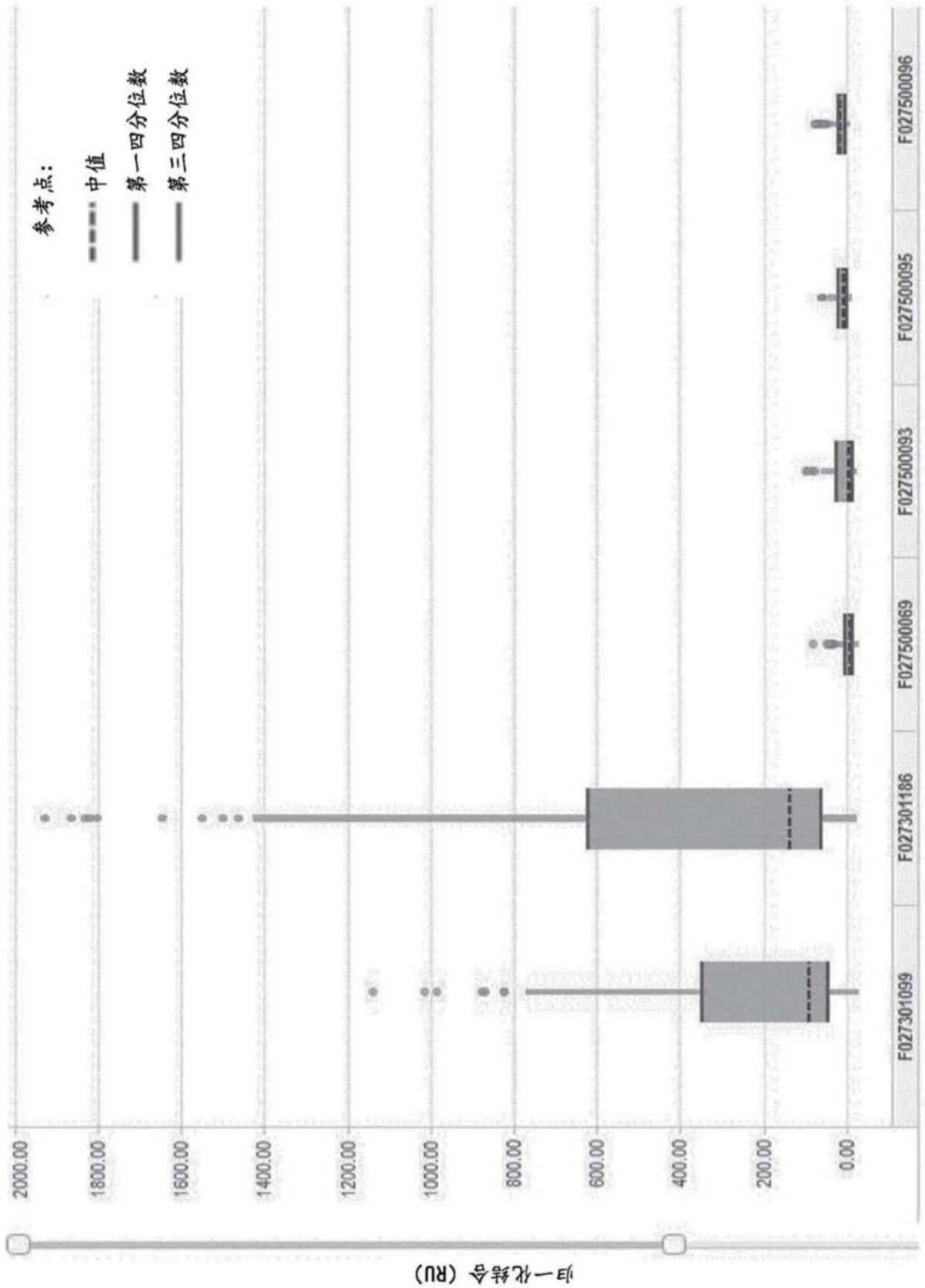
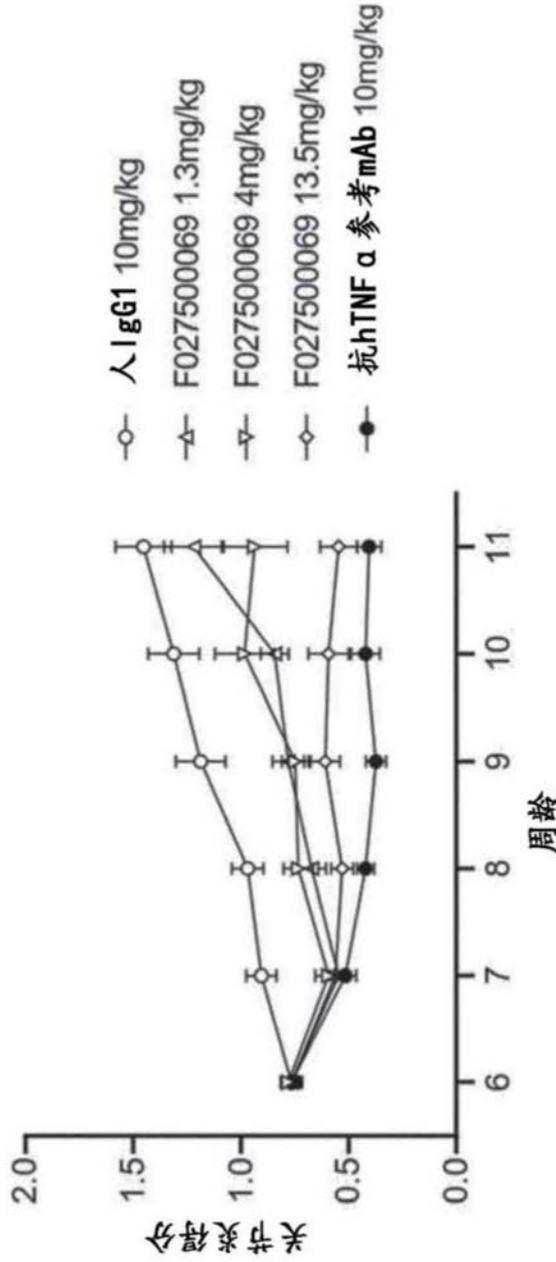


图5

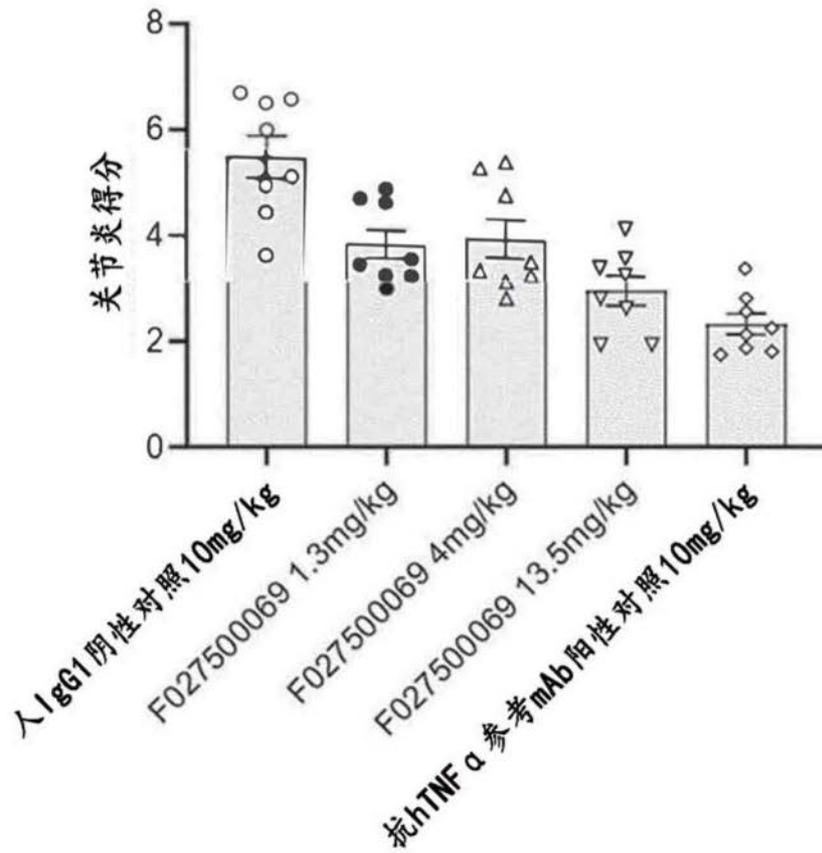
Tg197模型 - 随时间推移的关节炎得分



Bonferroni 多重比较测试		第7周	第8周	第9周	第10周	第11周
人IgG1与F027500069 1.3mg/kg	**	0.0037	* 0.0395	* 0.0481	* 0.0212	ns 0.9646
人IgG1与F027500069 4mg/kg	*	0.0191	ns 0.1424	* 0.0278	ns 0.3645	ns 0.0927
人IgG1与F027500069 13.5mg/kg	**	0.0052	** 0.0014	** 0.0047	** 0.0014	*** 0.0003
人IgG1与抗hTNF α 参考mAb 10mg/kg	**	0.0023	*** 0.0002	*** 0.0004	*** 0.0002	*** 0.0001

图6

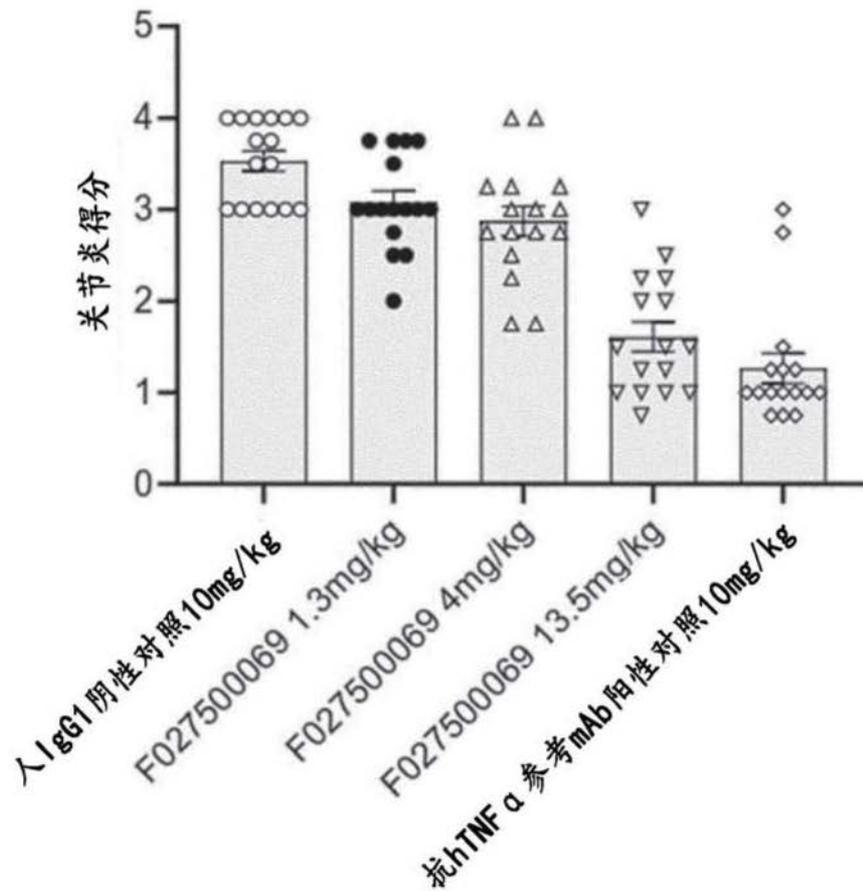
Tg197模型 - 关节炎得分AUC



Bonferroni 多重比较测试	经调整的P值	
人IgG1与F027500069 1.3mg/kg	**	0.0043
人IgG1与F027500069 4mg/kg	**	0.0074
人IgG1与F027500069 13.5mg/kg	****	<0.0001
人IgG1与抗hTNF α 参考mAb 10mg/kg	****	<0.0001

图7

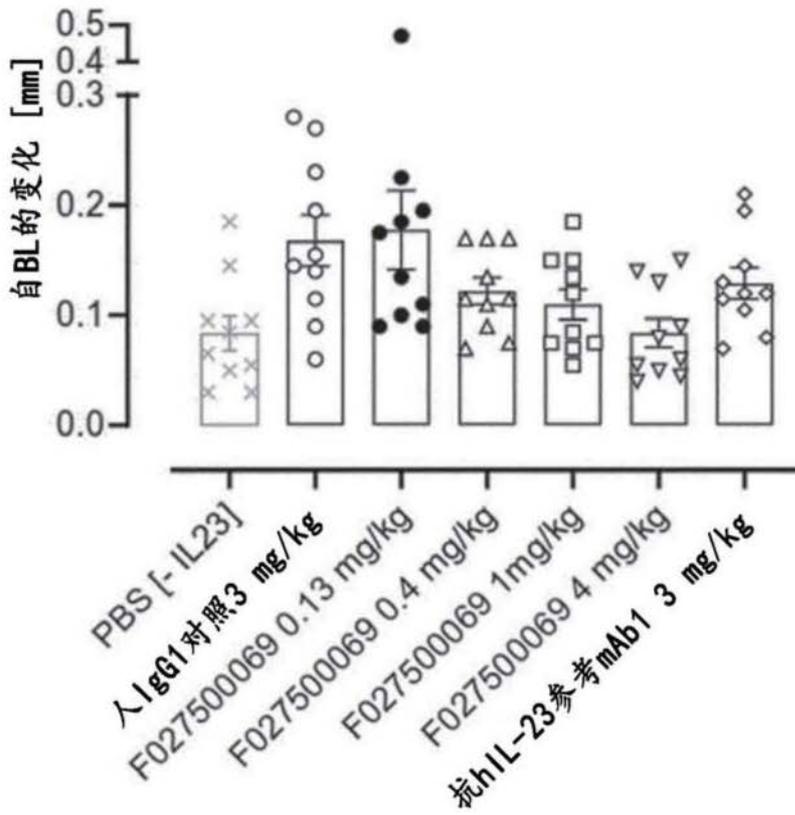
Tg197模型 - 组织学得分



Bonferroni 多重比较测试	经调整的P值	
人IgG1与F027500069 1.3mg/kg	ns	0.1951
人IgG1与F027500069 4mg/kg	*	0.012
人IgG1与F027500069 13.5mg/kg	****	<0.0001
人IgG1与抗hTNF α 参考mAb 10mg/kg	****	<0.0001

图8

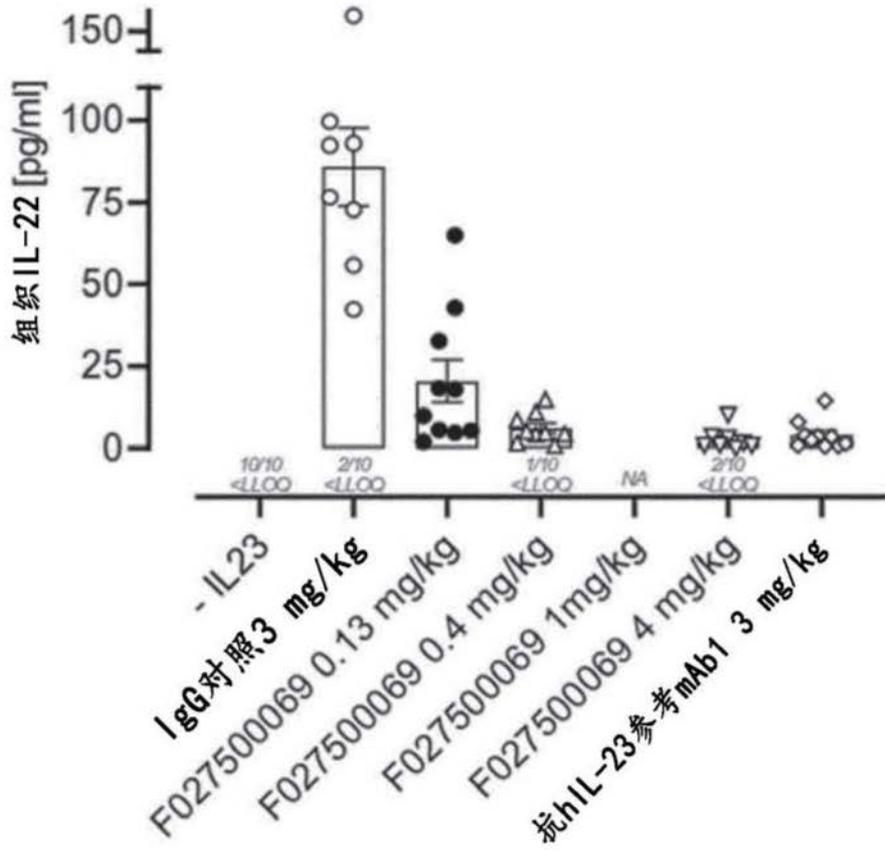
IL23诱导的皮肤炎症 - 耳朵厚度d5



Bonferroni 多重比较测试	经调整的P值	
PBS [-IL23] 与人IgG1对照 3mg/kg	*	0.024
人IgG1与F027500069 0.13mg/kg	ns	>0.9999
人IgG1与F027500069 0.4mg/kg	ns	0.6531
人IgG1与F027500069 1mg/kg	ns	0.2667
人IgG1与F027500069 4mg/kg	*	0.0253
人IgG1与抗hIL-23参考mAb1 3mg/kg	ns	>0.9999

图9

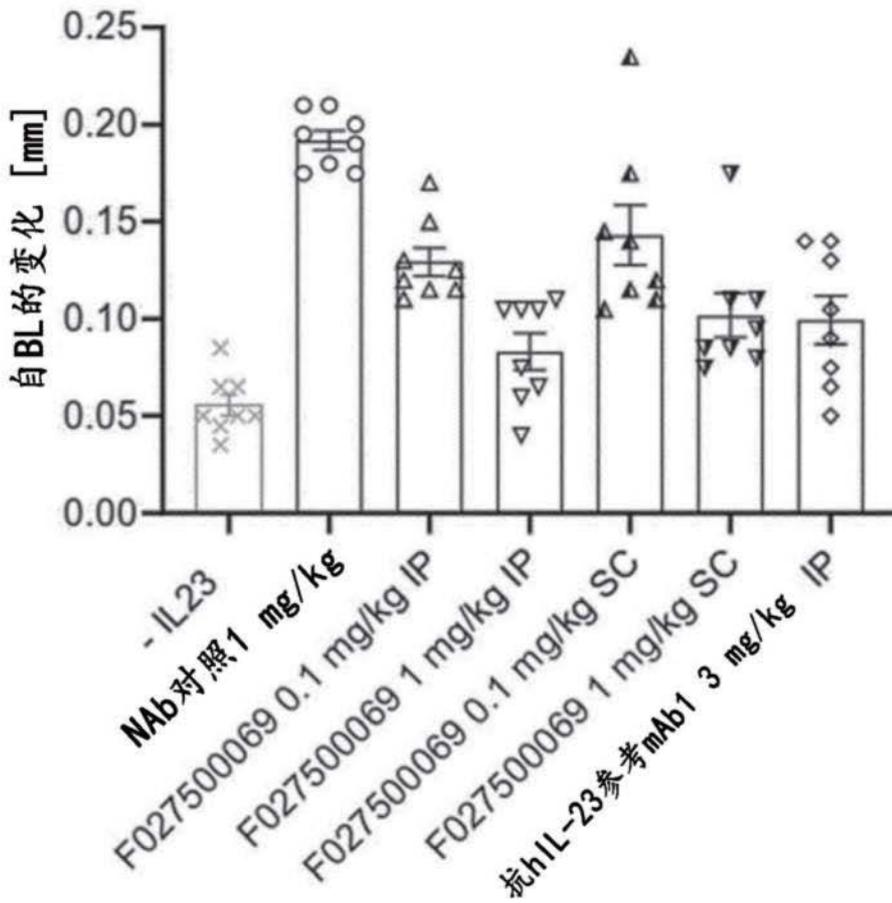
IL23诱导的皮肤炎症 - 组织IL-22



Bonferroni 多重比较测试		经调整的P值	
人IgG1与F027500069 0.13mg/kg	****	<0.0001	
人IgG1与F027500069 0.4mg/kg	****	<0.0001	
人IgG1与F027500069 1mg/kg		未评估	
人IgG1与F027500069 4mg/kg	****	<0.0001	
人IgG1与抗hIL-23参考mAb1 3mg/kg	****	<0.0001	

图10

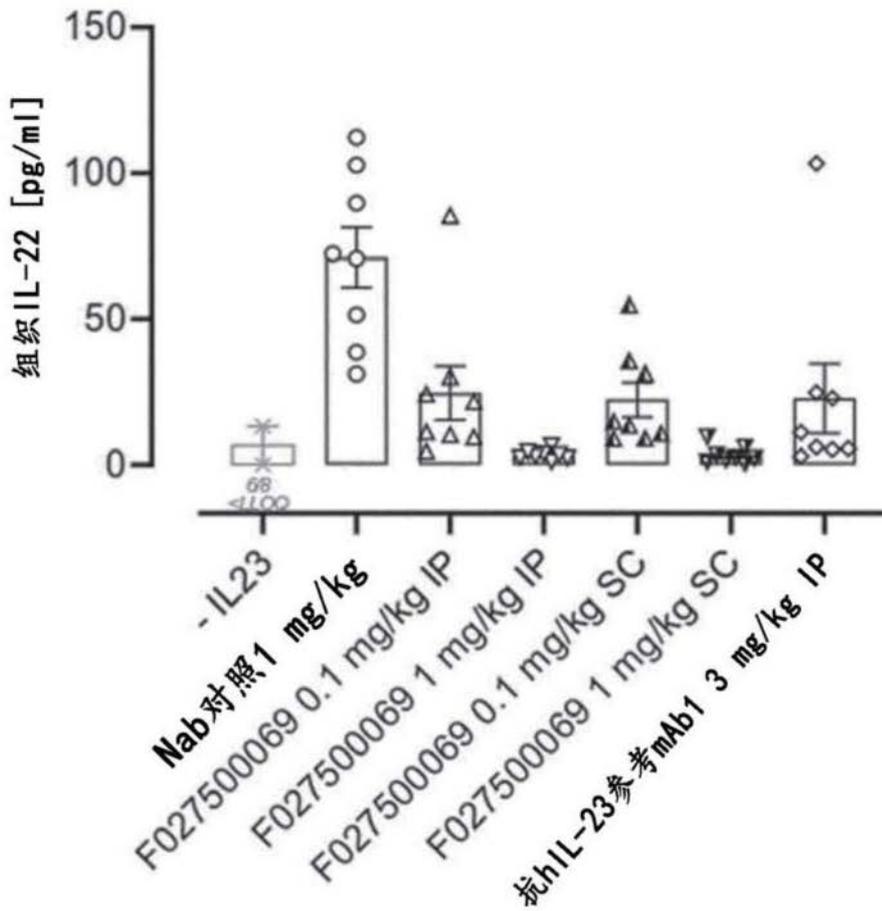
IL23诱导的皮肤炎症 - 耳朵厚度d5



Bonferroni多重比较测试	经调整的P值	
PBS [-IL23]与NAb对照1 mg/kg	****	<0.0001
NAb对照与F027500069 0.1 mg/kg IP	***	0.0005
NAb对照与F027500069 1 mg/kg IP	****	<0.0001
NAb对照与F027500069 0.1 mg/kg SC	*	0.0107
NAb对照与F027500069 1 mg/kg SC	****	<0.0001
NAb 对照与抗hIL-23 参考 mAb1 3mg/kg	****	<0.0001
F027500069 0.1 mg/kg IP与SC	ns	>0.9999
F027500069 1 mg/kg IP与SC	ns	>0.9999

图11

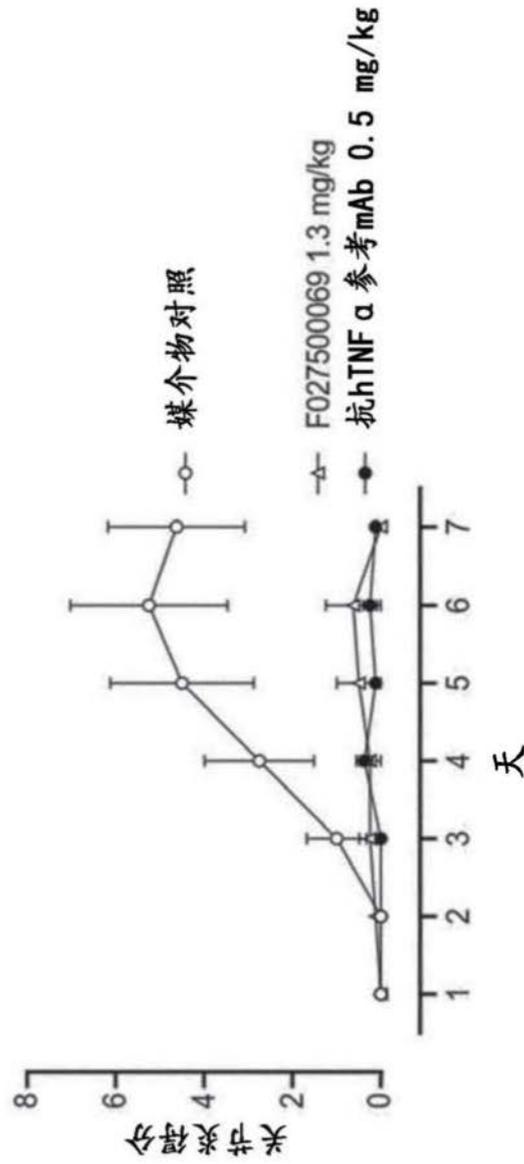
IL23诱导的皮肤炎症 - 组织IL-22



Bonferroni多重比较测试	经调整的P值	
PBS [-IL23]与NAb对照1 mg/kg	**	0.0048
NAb对照与F027500069 0.1 mg/kg IP	***	0.001
NAb对照与F027500069 1 mg/kg IP	****	<0.0001
NAb对照与F027500069 0.1 mg/kg SC	***	0.0005
NAb对照与F027500069 1 mg/kg SC	****	<0.0001
NAb对照与抗hIL-23参考mAb1 3mg/kg	***	0.0006
F027500069 0.1 mg/kg IP与SC	ns	>0.9999
F027500069 1 mg/kg IP与SC	ns	>0.9999

图12

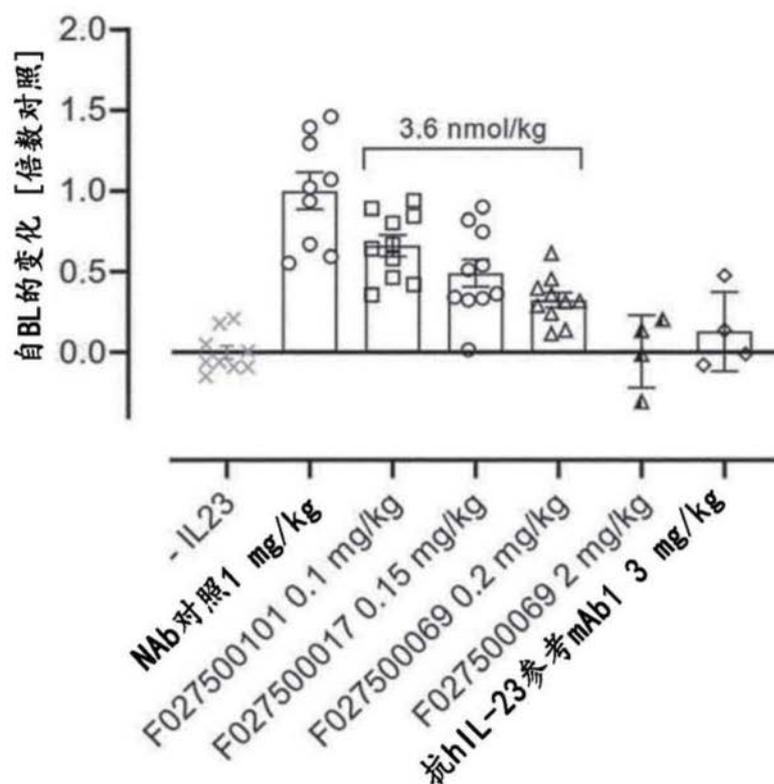
TNF/TNFR1人源化小鼠中的CAIA模型



Bonferroni 多重比较测试		第3天	第4天	第5天	第6天	第7天
媒介物对照与F027500069 1.3mg/kg		ns	0.6577	ns	0.1694	ns
媒介物对照与抗hTNF $\alpha$ 参考mAb 0.5mg/kg		ns	0.3713	ns	0.1945	ns
					0.0751	0.0404
					0.0621	0.0524
						*
						*

图13

## IL23诱导的皮肤炎症- 耳朵厚度d5



Bonferroni 多重比较测试	经调整的P值	
NAb对照1 mg/kg与F027500101	*	0.0115
NAb对照1 mg/kg与F027500017	****	<0.0001
NAb对照1 mg/kg与F027500069	****	<0.0001
F027500101 0.1 mg/kg与F027500069 0.2 mg/kg	**	0.0091
F027500017 0.15 mg/kg与F027500069 0.2 mg/kg	ns	0.557

图14

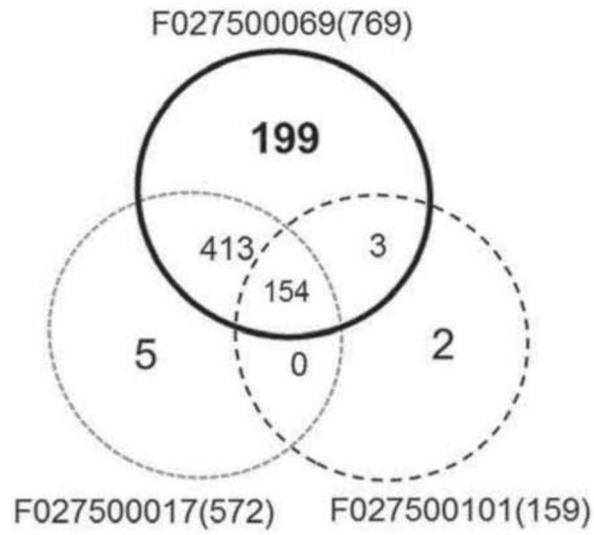


图15



图16