



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103403028 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201180057703.2

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2011.09.30

C07K 16/18(2006.01)

(30)优先权数据

(56)对比文件

1016494.5 2010.09.30 GB

WO 2009/067820 A1, 2009.06.04,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

George A J T等. Isolating ligands

2013.05.30

specific for human vasculature using in vivo phage selection.《Trends in biotechnology》.2003,第21卷(第5期),第199-203页.

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2011/051854 2011.09.30

Kamperidis P S等. Identification of single-chain antibody fragments specific for human synovial microvascular endothelium by in vivo phage display.《Annals of the rheumatic diseases》.2007,第66卷第A12-A13页.

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/042270 EN 2012.04.05

(73)专利权人 伦敦大学玛丽王后威斯特费尔学院

地址 英国伦敦

(72)发明人 C.皮特扎里斯

审查员 夏颖

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

权利要求书1页 说明书19页

代理人 罗天乐

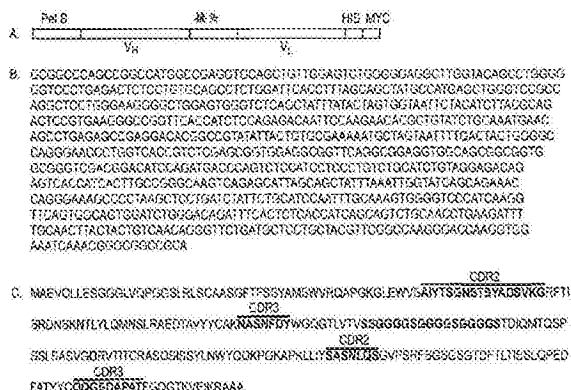
序列表5页 附图10页

(54)发明名称

特异性结合关节炎患者的滑膜微血管系统的抗体

(57)摘要

本发明提供了一种抗原结合性多肽,其特异性靶向关节炎患者的滑膜微血管系统(synovial microvasculature),并包含从SEQ ID No1-4构成的组中选出的一个或多个互补决定区(CDR)。本发明还涉及这种抗原结合性多肽及其缀合物在诊断和治疗关节炎中的用途。



1. 一种抗体或其抗原结合片段,其特异性靶向关节炎患者的滑膜微血管系统,并包含:
 - (i)如SEQ ID No.9所示的VH序列;和
 - (ii)如SEQ ID No.10所示的VL序列。
2. 根据权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其与所述微血管系统的基质区室反应。
3. 根据权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其与周细胞反应。
4. 根据权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其显示血管周围反应性。
5. 根据权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其是scFv。
6. 根据权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其是人抗体。
7. 根据权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其是纯化的抗体或抗原结合片段。
8. 根据权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其特异性靶向骨关节炎和/或类风湿性关节炎患者的滑膜微血管系统。
9. 一种抗体或其抗原结合片段,其包含如SEQ ID No 11所示的氨基酸序列并结合与根据权利要求1的抗体或其抗原结合片段所结合相同的表位。
10. 根据权利要求1-9中任一项的抗体或其抗原结合片段,其与如下的一种或多种缀合:治疗性细胞因子、抗血管生成剂、抗风湿药、光敏剂或磁性纳米颗粒。
11. 根据权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其用于治疗RA。
12. 根据权利要求1的抗体或其抗原结合片段,其用于成像关节的血管系统。
13. 根据权利要求12的抗体或其抗原结合片段,其用于诊断、监测或预后关节炎。
14. 一种缀合物,其包含根据权利要求1的抗体或其抗原结合片段和以下中的一种或多种:治疗性细胞因子、抗血管生成剂、抗风湿药、光敏剂或磁性纳米颗粒。
15. 根据权利要求1-10中任一项的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求14的缀合物在制备用于治疗受试者中的关节炎的药物组合物中的用途。
16. 编码根据权利要求1-10中任一项的抗体或其抗原结合片段的核酸序列。
17. 根据权利要求16的核酸序列,其包含如SEQ ID No 12所示的序列。
18. 一种载体,其包含根据权利要求16或17的核酸序列。
19. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求18的载体。
20. 一种双功能抗体,其包含根据权利要求1-10中任一项的抗体或其抗原结合片段。
21. 根据权利要求20的双功能抗体,其还包含阿达木单抗。

特异性结合关节炎患者的滑膜微血管系统的抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及一种抗原结合性多肽,其特异靶向关节炎患者的滑膜微血管系统。该多肽和其偶联物可用于对关节血管进行成像,用于关节炎的诊断和治疗。

[0002] 发明背景

[0003] 类风湿性关节炎(RA)是最常见的自身免疫性疾病之一,并且是长期疼痛的一种主要原因,仅在欧洲就影响超过300万人。类风湿性关节炎影响1-2%的人口。根据医疗支出调查(MEPS)数据,在美国,2003年用于治疗类风湿性关节炎和相关关节炎的总耗费为1280亿美元;目前每个人的平均耗费是8500美元。每年,关节炎及其相关并发症导致750,000人次住院和3600万门诊病历。多达15%的人口受到各种类型关节炎的困扰,减少其本可以执行的身体活动量。通常,当身体活动减少时,患者会因缺少独立性和自由而产生抑郁。

[0004] 在英国,有大约400,000名成年人患有类风湿性关节炎,并且关节炎是接受伤残生活津贴(DLA)的人群中最常见的病症。超过50万人由于关节炎接受DLA(占全部DLA索取者的超过18%),超过心脏病、中风、胸病和癌症的总和。

[0005] RA是一种滑液关节的炎症性病症,其一般影响身体两侧的手腕、手指、膝盖、双足和足踝。RA导致内衬于并保护关节和腱、同时允许关节平滑、自由活动的滑膜发生炎症。滑膜炎症导致受影响的关节肿胀,最终导致进行性软骨损坏和骨骼磨损,移动范围受限,并导致畸形。

[0006] RA是一种持续的进行性疾病,还影响身体的其它器官,并可导致深度失能和威胁生命的并发症。因此,RA是致失能的主要原因,具有显著的相关发病率和致死率。

[0007] RA的发生年龄不一定,从孩童到90岁以上的成年人均有。RA在西欧和美国人群中的发病率大约为1%,女性对男性的比例为3:1。进一步,在西欧,类风湿性关节炎每年造成的总经济负担估计为大约350亿英镑。

[0008] 在细胞水平,滑膜由高度组织化的含有蛋白多糖聚集物的基质、毛细血管和淋巴管的网络、和驻在的成纤维细胞和巨噬细胞样细胞等构成。然而在RA中,滑膜被T辅助细胞、B细胞、巨噬细胞和浆细胞所浸润。进一步,滑膜增生,并且在软骨与骨之间的界面处局部侵蚀,导致关节软骨、软骨下骨和关节周围软组织损坏,长此以往造成关节损坏、畸形和深度失能(见图1)。

[0009] 现在已经充分证明,滑膜内的血管发生(从现存血管生长出新的血管)对该疾病的病因和进展具有显著贡献。实际上,滑膜血管发生可以在RA的其它病理特征之前出现,因为滑膜增生使得滑膜血管的数量和密度有必要发生代偿性增加。

[0010] 治疗类风湿性关节炎的最终目的是防止关节损坏,防止功能丧失和降低RA相关的疼痛。非甾体抗炎药(NSAID)和缓解疾病的抗风湿药(DMARD)是当前治疗RA的主要形式,但是它们经常带来显著的副作用。NSAID会导致胃刺激、胃肠道溃疡和肾损伤。DMARD的副作用取决于所用药物的类型。硫唑嘌呤会增加感染、肝损伤、脱发和腹泻的风险。环孢菌素导致肾损伤、高血压和牙龈肿大。氯喹类导致胃炎、腹泻和视觉问题。金盐会导致舌肿大、牙龈出血、皮疹和肾损伤。甲氨蝶呤可导致肝损伤和骨髓抑制。柳氮磺吡啶可引起胃肠道不适和变

应性反应。更新的生物应答调节剂抑制免疫系统,并可引起潜伏性感染如结核病的重新活化。

[0011] 通过引入针对多种细胞因子、T细胞和B细胞的重组抗体,RA的治疗在过去十年中已经得到显著改善。

[0012] 自从依那西普(Etanercept)被最先批准以后,很短时间内又批准了英夫利昔单抗(infliximab),另外三种TNF-中和性抗体(阿达木单抗(adalimumab)、Certulizumab pegol和戈利木单抗(golimumab))。而且,FDA还已经批准了靶向T-细胞[和/或树突细胞](阿巴西普)、B-细胞(利妥昔单抗)和细胞因子IL-6受体(托珠单抗)的重组抗体用于治疗RA(Taylor and Feldmann 2009Nat Rev Rheumatol 5(10):578-582),(Isaacs 2009Arthritis Res Ther 11(3):225)。

[0013] 然而,尽管当前的疗法有显著的效力,但是尚未实现长期无需治疗的缓解。少数人达到了持续的和高程度的临床反应(Taylor and Feldmann 2009,见上文),并且大约20-40%的患者对抗细胞因子疗法没有反应(Kremer 2001Annals of Internal Medicine 134(8):695-706)。另外,当前的疗法显示出若干相关副作用,例如感染和恶性肿瘤的风险增加,导致其不宜持久给药。(Taylor and Feldmann 2009,见上文)。

[0014] 因此,在RA中仍然存在主要的没有得到满足的临床需求,并需要以更高的频率诱导缓解、安全性概貌更好、系统毒性更小的替代治疗选择。

[0015] 附图简述

[0016] 图1-正常关节与类风湿性关节炎关节的比较

[0017] 在健康关节中(a),薄滑膜内衬在关节的非承重面。在类风湿性关节炎中(b),滑膜增生并被慢性炎症细胞浸润。最终发展成“血管翳”,其迁移到关节软骨和下方骨上面和内部。

[0018] 图2-scFv A7抗体与滑膜组织体内反应性的免疫组化分析

[0019] 用生物素化的scFv A7检测scFv A7与滑膜部分的反应性。

[0020] 图3-scFv A7在滑膜微血管系统内的细胞反应性特征

[0021] 通过对来自RA患者的冷冻人滑膜组织用内皮细胞特异性标记物von Willerbrand因子(vWF)和CD31和周细胞(pericyte)特异性标记物NG2进行双染色,来检查scFv与滑膜微血管系统细胞组分的反应性。结合的scFv A7用德克萨斯红-亲和素抗体通过其生物素化标签进行检测。vWF、CD31和NG2的结合通过Alexa 488(绿色)或Alexa 594(红色)进行检测。

[0022] 图4-用I¹²⁵scFv A7体内靶向人滑膜组织

[0023] 通过在携带滑膜和皮肤双异种移植物的SCID小鼠内注射碘化scFv,来检测scFv在体内优先靶向滑膜异种移植微血管系统的能力。移植组织在抗体给药后4小时和24小时通过 γ 计数进行检测。结果随后相对组织重量和血液池中的背景辐射活性进行修正,并表示为注射剂量百分比的组织对血液比值。每个条件N=5。使用碘化scFv HEL作为阴性对照。

[0024] 图5-通过免疫组化评估scFv克隆A7与正常人组织的反应性表达谱

[0025] 使用来自各个器官的正常人组织的石蜡包埋组织微阵列检测scFv A7与正常人组织的反应性。通过亲和素HRP(褐色)检测结合的生物素化scFv A7抗体。使用抗von Willerbrand因子检测组织切片中血管的存在。刻度棒=20um。

[0026] 图6-scFv A7重链和轻链的CDR2和CDR3氨基酸序列

[0027] 可变氨基酸结构域用红色显示。文库中存在所有抗体克隆仅在这些位置处改变，在其它位置则相同。

[0028] 图7-scFv A7的序列

[0029] (A)scFv A7的示意图。(B)scFv A7的DNA序列。(C)scFv A7的预测氨基酸序列。肽接头序列(红色)和CDR区序列(褐色)被高亮显示。

[0030] 图8-scFv A7在正常人组织中的免疫组化

[0031] scFv A7与正常人滑膜组织的反应性。连续切片显示被vWF和 α -肌动蛋白染色的血管。使用scFv A7抗体没有观察到反应性。显示的图片代表了所检测的11个独立样品。刻度棒=50 μ m。

[0032] A:vWF

[0033] B: α -肌动蛋白

[0034] C:scFv A7

[0035] 图9-scFv A7抗体与炎症组织微血管系统的反应性

[0036] 评估了scFv A7与正常结肠、克罗恩氏病结肠、正常皮肤和银屑病皮肤的反应性。用抗人vWF抗体使微血管系统的存在可视化。生物素化的scFv A7用ABC-HRP检测。所示图片代表了5个正常结肠样品、7个克罗恩氏病结肠样品和5个皮肤样品。刻度棒=100 μ m。

[0037] 图10-scFv A7与PC3细胞的反应性

[0038] 使用免疫组化来检测scFv A7与前列腺癌细胞系PC3的细胞表面的反应性。与细胞表面的反应性使用经甲醛固定但没有渗透化的细胞进行检测。结合的scFv A7通过先后使用抗c-Myc抗体和Alexa 488通过其Myc标签进行检测。

[0039] 发明各方面的概述

[0040] 本发明人鉴定了一种scFv抗体，其与来自RA患者滑膜组织的微血管系统显示血管周围反应性(perivascular reactivity)，而与正常组织显示很少或者没有反应性。

[0041] 在第一个方面中，本发明提供了一种抗原结合性多肽，其特异靶向关节炎患者的滑膜微血管系统，并包含一个或多个选自SEQ ID NO 1-4的互补决定区(CDR)。

[0042] 该抗原结合性多肽可以包含一个或多个选自SEQ ID NO 5-8的互补决定区(CDR)。

[0043] 该抗原结合性多肽可以和微血管系统的基质区室(stromal compartment)和/或与周细胞反应，并显示血管周围反应性。

[0044] 该抗原结合性多肽可以包括如SEQ ID No.9所示的VH序列和/或如SEQ ID No.10所示的VL序列。

[0045] 该抗原结合性多肽可以是scFv。

[0046] 该抗原结合性多肽可以是完全人的。

[0047] 该抗原结合性多肽可以特异靶向骨关节炎和/或类风湿性关节炎患者的滑膜微血管系统。

[0048] 本发明还提供了一种抗原结合性多肽，其与根据本发明第一个方面的抗原结合性多肽结合相同的表位。该抗原结合性多肽可以与包含SEQ ID No 11所示氨基酸序列的抗原结合性多肽结合相同的表位。

[0049] 本发明还涉及一种抗原结合性多肽，其与其他作用剂缔合。该抗原结合性多肽可以，例如，与其他作用剂缀合。该作用剂可是包括如下的一种或多种：治疗性细胞因子、抗血

管发生剂、抗风湿药物；光敏剂或磁性纳米颗粒。

[0050] 本发明还提供了根据本发明第一方面的抗原结合性多肽，或其缀合物：用于治疗RA；用于对关节的血管系统成像；和/或用于关节炎的诊断、监测或预后。

[0051] 在第二个方面中，本发明提供了一种用于治疗受试者中的关节炎的方法，其包括向受试者施用根据本发明第一个方面的抗原结合性多肽或其偶联物的步骤。

[0052] 该方法可以包括如下步骤：

[0053] (i)向受试者施用与光敏剂偶联的根据本发明第一个方面的抗原结合性多肽；

[0054] (ii)将该偶联物靶向到关节的滑膜血管系统；

[0055] (iii)向关节施加光线，以激活滑膜血管系统内的光敏剂。

[0056] 该方法可以包括如下步骤：

[0057] (i)向受试者施用与磁性纳米颗粒偶联的根据本发明第一个方面的抗原结合性多肽；

[0058] (ii)将该偶联物靶向到关节的滑膜血管系统；

[0059] (iii)向关节施加磁场，以激活滑膜血管系统内的磁性纳米颗粒。

[0060] 在这些方法中，所述作用剂的激活导致现有血管的破坏。

[0061] 所述方法可以是一种组合方法，涉及同时、分别或顺序使用其他治疗剂。例如，治疗还可以涉及施加TNF- α 阻断治疗剂。

[0062] 该方法可以用于治疗骨关节炎和/或类风湿性关节炎。

[0063] 在第三个方面中，本发明提供了一种用于将作用剂靶向到滑膜微血管系统的方法，其包括在体外在作用剂与根据本发明第一个方面的抗原结合性多肽之间形成缔合的步骤。该作用剂可以是，例如，与抗原结合性多肽缀合的。该缔合可以使得，在给关节炎患者施用作用剂/抗原结合性多肽时，该作用剂在新生血管部位选择性积累。

[0064] 该作用剂可以是治疗、成像或诊断剂。例如，该作用剂可以是治疗性细胞因子、抗血管发生剂、抗风湿药、光敏剂或磁性纳米颗粒。

[0065] 在第四个方面中，本发明提供了一种核酸序列，其编码根据本发明第一个方面的抗原结合性多肽或其缀合物。

[0066] 该核酸序列可以包括如SEQ ID No 12所示的序列或其变体。

[0067] 在第五个方面中，本发明提供了一种载体，其包含根据本发明第四个方面的核酸序列。

[0068] 在第六个方面中，本发明提供了一种宿主细胞，其包含根据本发明第四个方面的核酸序列或根据本发明第五个方面的载体。

[0069] 本发明的抗原结合性多肽代表了一种独特的工具，其充当一种多功能血管靶向剂，可以在例如治疗类风湿病用的选择性生物药物中使用。

[0070] 本发明的抗原结合性多肽可解决许多与现有的用于治疗关节炎的重组抗体疗法相关的问题。例如，由于多肽在滑膜组织内显示血管周围反应性而与正常组织无明显反应性，其可用于向患病部位输送更高浓度的常规药物或生物药物。

[0071] 详细说明

[0072] 抗原结合性多肽

[0073] 本发明的第一个方面涉及一种抗原结合性多肽。

[0074] 术语“抗原结合性多肽”的意思是一种这样的多肽,其包含一个或多个互补决定区(CDR),并且按照与抗体或类抗体分子相同的方式结合抗原。

[0075] 经典的抗体分子包括四个多肽链:两个重(H)链和两个轻(L)链,之间由二硫键连接。每个重链由重链可变区(VH)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域:CH1,CH2,CH3构成。每个轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。VH和VL区可以进一步分成高变区,称作互补决定区(CDR)1,中间是更保守的区域,称作框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR构成,从氨基端向羧基端按照如下次序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。

[0076] 在经典的抗体分子中,重链和轻链配对使来自每个链的CDR靠在一起,形成一个单一高变表面,其在每个Fab臂的尖端形成抗原结合位点。这总共六个CDR中往往仅有一部分对抗原结合起贡献。例如,当抗体MOPC 603与磷酸胆碱(phosphochlorine)结合时,轻链可变区仅贡献CDR3给结合位点,而来自重链的全部三个CDR均参与。

[0077] 抗原结合性多肽可以包括来自SEQ ID No 1-4所示组中的2、3、或4个CDR。

[0078] 还可能有单个VH或VL链结合抗原,例如在结构域抗体(dAbs-见下文)中。抗原结合性多肽可以包括全部两个VH CDR(SEQ ID No 1和2)和/或全部两个VL CDR(SEQ ID No 3和4)。

[0079] 术语“抗体”包括完整抗体、抗体的片段,例如Fab,F(ab')₂片段,和在其恒定和/或可变区发生突变的完整抗体和片段(例如突变产生嵌合、部分人源化或完全人源化抗体,以及产生具有期望的特征,例如提高的IL 13结合和/或降低的FcR结合,的抗体)。

[0080] 术语“片段”是指抗体或抗体链的一部分,其包含的氨基酸残基比完整或完全抗体或抗体链少。片段可以通过对完整或完全抗体或抗体链进行化学或酶处理获得。片段还能够通过重组方法获得。结合片段包括Fab,Fab',F(ab')₂,Fab₂,Fd,dAb,Fv,单链,单链抗体例如scFv,单结构域抗体(Muldermans et al.,2001J Biotechnol.26:230-5),和分离的互补决定区(CDR)。

[0081] Fab片段是一种单价片段,由VL、VH、CL和CH1结构域构成。F(ab')₂片段是一种双价片段,包括两个Fab片段,它们在铰链区通过一个二硫桥连接。Fd片段由VH和CH1结构域构成,Fv片段由抗体单臂的VL和VH结构域构成。

[0082] dAb片段由单个VH结构域或VL结构域构成,其能够单独结合抗体(WO 90/05144;WO 03/002609)。其它形式的单链抗体,例如双抗体,也包含在内。双抗体是二价的、双特异性抗体,其中VH和VL结构域被表达在单条多肽链上,但是使用过短以致不允许相同链上的两个结构域配对的接头,借此强迫各结构域与另一条链上的互补结构域配对,并产生两个抗原结合位点(见例如Holliger,et al.,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448)。

[0083] 实施例描述的抗原结合性多肽是一种scFv片段。在经典的抗体分子中,Fv片段的两个结构域,VL和VH,由不同基因编码。然而,它们可以用重组方法通过合成的接头连接,使它们能够作为单个蛋白链,称作单链Fv(scFv)而制备,其中VL和VH区配对形成单价分子(Bird et al.,1988,Science 242:423-426)。

[0084] 类抗体分子包括在合成分子中单独地或组合地使用CDR,例如SMIP和小抗体类似物。特异性决定区(SDR)是CDR中直接与抗原相互作用的残基。SDR相应于高变残基。见(Padlan et al.(1995)FASEB J.9:133-139)。CDR还可以用在小抗体模拟物中,其包括两个

CDR区和一个框架区(Qui et al.Nature Biotechnology Vol 25;921-929;August 2007)。

[0085] 抗体或其结合部分还可以是通过抗体或抗体部分与一个或多个蛋白或肽共价或非共价缔合所形成的较大的免疫黏附分子的一部分。这样的免疫黏附分子的实例包括使用链霉亲和素核心区制作四聚体scFv分子(Kipriyanov,S.M.,et al.(1995)Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101),和使用半胱氨酸残基、标志肽和C端多聚组氨酸标签制作二价生物素化scFv分子(Kipriyanov,S.M.,et al.(1994)Mol.Immunol.31:1047-1058)。

[0086] 本发明的抗原结合性多肽包括一个或多个从由SEQ ID No 1-4构成的组中选出的互补决定区(CDR)。

[0087] CDR

[0088] SEQ ID No 1:AXYTSXNSXSXXXXXXX

[0089] SEQ ID No 2:NASNXXX

[0090] SEQ ID No 3:SXXNXXX

[0091] SEQ ID No 4:XXGSDAXAX

[0092] X可以是任何氨基酸。

[0093] 对于给定的CDR,SEQ ID No 1-4中X代表的氨基酸中的一个或多个可以是如SEQ ID No 5-8所示。

[0094] SEQ ID No 5:AIYTSNGNSTSYADSVKG

[0095] SEQ ID No 6:NASNFDY

[0096] SEQ ID No 7:SASNLQS

[0097] SEQ ID No 8:QQGSDAPAT

[0098] 例如,根据SEQ ID No.1的CDR可以是如下的其中之一:

[0099] AIYTSXNSXSXXXXXXX;

[0100] AXYTSGNSXSXXXXXXX;

[0101] AXYTSXNSTSXXXXXXX;

[0102] AXYTSXNSXSXXXXXXX;

[0103] AXYTSXNSXSXXXXXXX;

[0104] AXYTSXNSXSXXXXXXX;

[0105] AXYTSXNSXSXXXXXXX;

[0106] AXYTSXNSXSXXXXVXX;

[0107] AXYTSXNSXSXXXXXXKX;或

[0108] AXYTSXNSXSXXXXXXG。

[0109] 对于给定的CDR,X代表的氨基酸中的2、3、4、5或更多个可以如SEQ ID No 5-8所示。

[0110] 本发明的抗原结合性多肽可以包括从由SEQ ID No 5-8构成的组中选出的至少一个CDR。

[0111] V区

[0112] 本发明的抗原结合性多肽可以包含从由SEQ ID No 1,2,5和6构成的组中选出的CDR,作为VH区的一部分。

[0113] 本发明的抗原结合性多肽可以包含从由SEQ ID No 3,4,7和8构成的组中选出的CDR,作为VL区的一部分。

[0114] 本发明的抗原结合性多肽可以包含从由SEQ ID No 1,2,5和6构成的组中选出的CDR,作为VH区的一部分;和从由SEQ ID No 3,4,7和8构成的组中选出的CDR,作为VL区的一部分。

[0115] 本发明的抗原结合性多肽可以包含两个对应于SEQ ID No 1和2(或5和6)的CDR,作为VH区的一部分。

[0116] 本发明的抗原结合性多肽可以包含两个对应于SEQ ID No 3和4(或7和8)的CDR,作为VL区的一部分。

[0117] 本发明的抗原结合性多肽可以包含两个对应于SEQ ID No 1和2(或5和6)的CDR,作为VH区的一部分;和两个对应于SEQ ID No 3和4(或7和8)的CDR,作为VL区的一部分。

[0118] 该抗原结合性多肽可以包含如SEQ ID No.9所示的VH区,或其具有例如至少70,80,90,95或99%序列同一性的变体。

[0119] SEQ ID No 9:

[0120]

MAEVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIYTSNGNSTSYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNASNFYWGQGTLLTV

[0121] 该抗原结合性多肽可以包含如SEQ ID No.10所示的VL区,或其具有例如至少70,80,90,95或99%序列同一性的变体。

[0122] SEQ ID No 10:

[0123]

TDIQTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYSASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQGSDAPATFGQGTKVEIKRAAA

[0124] 对于VH和VL区,序列中的变异可以集中在多肽的框架区(即图7B黑色显示的部分)。CDR(相应于褐色显示的部分)可以包含相对少的氨基酸取代。CDR可能仅在相应于图6中红色显示的位置,即在SEQ ID No 1-4中由X氨基酸代表的那些位置,而非其它CDR位置(图6中黑色所示)含有取代。

[0125] SCFV

[0126] 抗原结合性多肽可以是具有SEQ ID No 11所示序列的scFv,或其具有例如至少70,80,90,95或99%序列同一性的变体。

[0127] SEQ ID No 11:

[0128]

MAEVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIYTSNGNSTSYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNASNFYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTDIQTQSPSSLSASVGDRVT
ITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYSASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGSDAPAT
FGQGTKVEIKRAAA

[0129] 同样,序列中的变异可以集中在多肽的框架区和接头区(即图7B中分别用黑色和红色显示的部分)。CDR(相应于褐色显示的部分)可以包含相对少的氨基酸取代。CDR可能仅在相应于图6中红色显示的位置,即在SEQ ID No1-4中由X氨基酸代表的那些位置含有取

代。

[0130] 序列比较

[0131] 同一性比较可以通过肉眼,或更通常地,用容易获得的序列比较程序进行。这些商业可得的计算程序能够计算两个或更多个序列之间的%同一性。用于实施这种比对的合适计算程序是GCG Wisconsin最佳匹配软件包(University of Wisconsin,U.S.A.;Devereux et al.,1984,Nucleic Acids Research12:387)。能够实施序列比较的其它软件的实例包括,但不仅限于,BLAST软件包(见Ausubel et al.,1999ibid-Chapter 18),FASTA(Atschul et al.,1990,J.Mol.Biol.,403-410)和GENEWORKS比对工具套件。BLAST和FASTA均可用于离线和在线检索(见Ausubel et al.,1999,ibid,第7-58至7-60页)。然而,对于一些应用,优选地使用GCG最佳匹配程序。一种称作BLAST 2Sequences的新工具也可用于比较蛋白和核苷酸序列(见FEMS Microbiol Lett1999174(2):247-50;FEMS Microbiol Lett 1999177(1):187-8和tatiana@ncbi.nlm.nih.gov)。

[0132] 序列可以具有一个或多个氨基酸残基缺失、插入或取代,其造成沉默改变,产生功能等价的分子。可以根据残基极性、电荷、可溶性、疏水性、亲水性和/或两亲性的相似性有意地生成氨基酸取代,只要其保留活性即可。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;具有不带电极性头部基团且具有相似亲水性的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。

[0133] 根据例如下面的表可以生成保守的取代。第二列中相同框中的氨基酸,优选地第三列中相同行的氨基酸,可以彼此取代。

[0134]

脂肪族	非极性	G A P
		I L V
	极性-不带电	C S T M
		N Q
	极性带电	D E
		K R
芳香族		H F W Y

[0135] 人抗体

[0136] 抗原结合性多肽可以是非人的、嵌合的、人源化的或者完全人的抗体。

[0137] 非人抗体包括来自小鼠、大鼠、家兔、绵羊、山羊和其它哺乳动物的多克隆或单克隆抗体制备物。

[0138] 如这里所使用的,术语“单克隆抗体”是指来自在结构和抗原特异性上均一的产抗体细胞(例如B淋巴细胞或B细胞)的克隆群体的抗体。术语“多克隆抗体”是指来自在结构和表位特异性上异质但识别共同抗原的产抗体细胞的不同克隆群体的多种抗体。粗多克隆抗体制备物可以通过用抗原免疫动物加以获得。

[0139] 嵌合抗体包括来自至少两种不同物种的序列。作为一个实例,重组克隆技术可以

用于包含来自非人抗体的可变区,其含有抗原结合位点(即,在用抗原免疫的非人物种中制备的抗体),和来自人免疫球蛋白的恒定区。

[0140] 抗原结合性多肽可以是人源化的。

[0141] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是如下的人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体高变区的残基被来自非人物种(供体抗体),例如小鼠、大鼠、家兔和非人灵长动物,并且具有期望的特异性、亲和力和能力的高变区的残基代替。在一些情况下,人免疫球蛋白的FR残基被相应的非人残基取代。而且,人源化抗体可以包含不在受体抗体或供体抗体中发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。一般地,人源化抗体基本上包含至少一个,通常两个可变结构域的全部,其中全部或者基本上全部的高变区相应于非人免疫球蛋白的高变区,而全部或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白序列的FR区。人源化抗体任意地还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区,的至少一部分。

[0142] 抗原结合性多肽可以是完全人源的,对于实施例中所所述的scFv即是如此。

[0143] 术语“人抗体”包括具有相应于人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体,如Kabat等(见Kabat,et al.(1991)Sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)所述。本发明的人抗体可以包含不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或定点诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR中,特别是在CDR3中。突变的引入可以通过例如使用选择性诱变方法实现。人抗体的至少一个位置可以被不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基,例如可提高活性的氨基酸残基所取代。人抗体在CDR区内可以具有一些氨基酸改变。然而,如这里所使用的,术语“人抗体”并不意图包括如下的抗体,其中来自另一哺乳动物物种(例如小鼠)的CDR序列已经被移植到人框架序列上。

[0144] 在用于治疗时,完全人重组抗体很可能比非人(例如鼠)、嵌合或人源化抗体具有小得多的免疫原性,因为它们实际上不包含外来序列。

[0145] 反应性

[0146] 本发明的抗原结合性多肽特异靶向关节炎患者的微血管系统。例如,抗原结合性多肽可以靶向骨关节炎或类风湿性关节炎(RA)患者的微血管系统。

[0147] 如图1所示,在正常关节中,滑膜内衬在关节的非承重面上。在关节炎中,滑膜被T-辅助细胞、B细胞、巨噬细胞和浆细胞浸润。在滑膜中出现广泛的血管发生,从而显著增加微血管系统。本发明的抗原结合性多肽显示出与该滑膜微血管系统的特异反应性。

[0148] 抗原结合性多肽可以和微血管系统的基质(即结缔组织)区室反应。微血管系统的基质区室对于基于抗体的靶向应用是吸引人的,因为该部分稳定并且大量存在。

[0149] 抗原结合性多肽可以和周细胞反应。周细胞,也称作Rouget细胞或周皮细胞(mural cell),与所有的毛细血管和毛细血管后尾静脉的内室缔合(associated abluminally)。周细胞特异性可以通过用周细胞特异性标志如NG2进行双染色加以研究,如实施例中所述。

[0150] 抗原结合性多肽可以结合在滑膜微血管系统中发现的平滑肌细胞的细胞表面。

[0151] 抗原结合性多肽可以显示周血管反应性,即它可以优先结合滑膜微血管系统内血管周围的部位。

[0152] 本发明的抗原结合性多肽在下述意义上“特异性靶向”关节炎患者的滑膜微血管系统：施用给患者后，与对其它组织（例如皮肤）相比，抗原结合性多肽显示出对滑膜的优先结合能力。与对其它组织相比，抗原结合性多肽对关节滑膜可显示出2、3或4倍的优选结合能力。

[0153] 本发明的抗原结合性多肽不应与重要器官，例如心脏、肝脏、肺、胰腺、大脑皮质和消化系统显示显著的反应性。

[0154] 本发明的抗原结合性多肽不应与正常组织，例如淋巴、胸腺、肾上腺、卵巢和睾丸显示显著的反应性。

[0155] 本发明的抗原结合性多肽不应显著靶向正常的、非关节炎的关节。例如，当向兼具关节炎和正常关节的关节炎患者给药时，抗原结合性多肽应优先靶向关节炎关节。抗原结合性多肽可以优先靶向和/或积累于显示最高量的滑膜血管发生的关节处。

[0156] 如果反应性和/或靶向导致基于抗原结合性多肽的诊断产品由于高背景水平而不适合使用，或者导致基于抗原结合性多肽的治疗产品由于低特异性水平而不安全或者无效，则认为该反应性和/或靶向是“显著的”。

[0157] 复合物/缀合物

[0158] 抗原结合性多肽可以和其他作用剂缔合，用于诊断和/或治疗类风湿疾病或对关节的血管系统成像。

[0159] 该缔合使得当将抗原结合性多肽/作用剂复合物施加给关节炎受试者时，该作用剂通过其与抗原结合性多肽的缔合而被靶向到滑膜微血管系统。

[0160] 作用剂可以是纳米载体（例如纳米颗粒或脂质体）的一部分或位于其内。纳米载体可以和抗原结合性多肽缔合，例如被抗原结合性多肽所包覆（Petros and DeSimone 2010 Nature Reviews Drug Discovery 9, p615-627; Torchilin The AAPS Journal 2007; 9(2) p129-1470）。

[0161] 可选择地，抗原结合性多肽可以和作用剂缀合。用于缀合蛋白的技术是本领域已知的。例如，抗原结合性多肽和作用剂可以通过接头，一般为柔性接头（例如多肽链）或化学连接基团，加以连接。

[0162] 抗原结合性多肽和作用剂可以由单个核酸序列编码，并作为融合蛋白表达。可选择地，抗原结合性多肽和作用剂可以分别表达，随后连接在一起，例如使用化学连接剂。

[0163] 当作用剂本身是抗体或其一部分时，本发明的抗原结合性多肽和作用剂可以缔合成为双特异性配体，例如双功能抗体。作用剂可以例如基于当前用于治疗RA的抗体，例如阿达木单抗、Certulizumab pegol、戈利木单抗、阿贝西普、利妥昔单抗或Tocilizumab。

[0164] 作用剂可以是如下的一种或多种：治疗性细胞因子、抗血管发生剂、抗风湿药；光敏剂或磁性纳米颗粒。

[0165] 作用剂可能能够阻断一种或多种细胞因子。例如，作用剂能够阻断TNF α ，IL-1，IL-6，IL-15，IL-12/23，IL-17，IL-18，IL-27，或IL-32。

[0166] 作用剂可以直接与细胞因子相互作用或与其受体相互作用（例如通过作为细胞因子受体拮抗剂）。

[0167] 抗血管发生剂以如下三种方式之一阻断血管生长：(i) 阻断生长因子到达细胞；(ii) 阻断细胞内的信号传导；(iii) 干扰细胞间的信号传导。

[0168] 血管内皮生长因子(VEGF)负责新血管的生长。它通过刺激形成血管壁并向组织输送营养和氧的内皮细胞促进该生长。因此,阻断VEGF可以抑制心血管生长。

[0169] Bevacizumab(Avastin)是一种得到临床批准的单克隆抗体治疗剂,可阻断VEGF。

[0170] 其它的治疗阻断内皮细胞内的本身会导致血管发生的细胞内信号传导。这种类型药物之一是酪氨酸激酶抑制剂(TKI)例如舒尼替尼(Sunitinib)(Sutent)。

[0171] 另一种可影响血管形成的治疗是沙利度胺(thalidomide),其干扰细胞的信号传导。来那度胺(Revlimid)是一种为减小副作用而开发的沙利度胺类药。

[0172] 抗风湿药物的主要类型包括:非甾体抗炎药(NSAIDs);糖皮质激素;缓解疾病的抗风湿药物(DMARDs);慢作用抗风湿药(SAARDs);和免疫抑制细胞毒性药物。

[0173] 非甾体抗炎药(NSAIDs)使炎症和疼痛症状二者缓解,但是对与类风湿性关节炎相关的进行性骨和软骨丧失的效果有限。它们通过减慢身体产生前列腺素而发挥作用。常用的NSAID包括:布洛芬(Motrin、Nuprin或Advil)、萘普生(Naprosyn、Aleve)和吲哚美辛(消炎痛)。

[0174] 糖皮质激素是非常强力的抗炎剂。它们是可的松(其由身体产生)的合成类似物。糖皮质激素用于减轻炎症和抑制免疫系统活性。最常用于处方的是强的松和地塞米松。

[0175] 缓解疾病的抗风湿药物(DMARDs)影响疾病过程本身而非仅仅治疗疾病症状。DMARD也具有抗炎效果,并且大多数来自对其它疾病,例如癌症和疟疾,的治疗。抗疟疾DMARD包括氯喹(Aralen)和羟基氯喹(Plaquenil)。强的DMARD包括:甲氨蝶呤(Rheumatrex)、柳氮磺吡啶、环孢菌素、硫唑嘌呤(Imuran)和环磷酰胺(Cytosan)、硫唑嘌呤、柳氮磺吡啶、青霉胺、和有机金化合物,例如金硫葡萄糖(Solganol)、硫代苹果酸金钠(Aurolate)和金诺芬(Ridaura)。

[0176] 慢作用抗风湿药(SAARDs)是一类特殊的DMARD,这些药物的效果是缓慢起作用,没有像NSAID那样迅速见效。实例包括羟基氯喹和金硫葡萄糖。

[0177] 如果NSAID和SAARD没有效果,则可以使用免疫抑制细胞毒性药物。免疫抑制药物对免疫系统具有稳定作用。因为与慢性关节炎相关的炎症是由于免疫系统功能失常,所以使用这类药物也已显示对类风湿性关节炎有好处。实例包括:甲氨蝶呤、氮芥、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、和硫唑嘌呤。

[0178] 作用剂可以是酶,例如前药活化酶。

[0179] 光敏剂是当在滑膜中存在并被光激活时,可导致现有血管系统破坏的作用剂。这种类型作用剂的实例是本领域已知的,例如在下列文献中所述:Dolmans et al Nature Reviews Cancer 2003,3,380-387;Huang, Technol Cancer Res Treat.2005,4(3):283-293;Hendrich et al Knee Surg,Sports Traumatol,Arthrosc(2000)8:190-194。

[0180] 光增敏剂(photosensitizer)是如下的分子,其在受照射时和氧存在下释放有毒的可扩散作用剂,例如单线态氧或反应性自由基。在眼血管发生的家兔模型中,抗ED-B抗体片段scFv(L19)选择性定位在新形成的血管上。当与光增敏剂化学偶联并用红光照射时,该免疫缀合物介导眼新生血管系统的完全且选择性的堵塞,并促进相应内皮细胞的凋亡。光增敏剂已经在临床上用于某些形式的年龄相关黄斑变性的光动力学治疗。

[0181] 作用剂可以是或者包含磁性纳米颗粒。当被磁场激活时,该作用剂能够导致现有滑膜微血管系统的破坏。合适的磁性纳米颗粒是本领域已知的,例如在Vigor et al

Biomaterials.2010Feb;31(6):1307-15中所述。

[0182] 本发明还提供了一种复合物,例如缀合物,其包含根据本发明第一个方面的抗原结合性多肽和作用剂。

[0183] 该复合物可以用于治疗和/或诊断应用。

[0184] 核酸序列

[0185] 本发明还提供了能够编码根据本发明的抗原结合性多肽或其缀合物的核苷酸序列。

[0186] 该核苷酸序列可以包括如SEQ ID No. 12所示序列的全部或部分,或者其具有至少70、80、90、95或99%序列同一性的变体。

[0187] SEQ ID No.12

[0188]

```
GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAG
ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGGAAGGGGG
TGGAGTGGGTCTCAGCTATTTATACTAGTGGTAATTCTACATCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATC
TCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTG
TGCGAAAAATGCTAGTAATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTCAG
GCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA
GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG
GAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCAATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGTTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTACTACTGTCAACAGGGTTCT
GATGCTCCTGCTACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGCGGCCGCA
```

[0189] 核苷酸序列可以是天然的、合成的或重组的。它可以是双链或单链,可以是DNA或RNA或其组合。它可以是例如cDNA、PCR产物、基因组序列或mRNA。

[0190] 核苷酸序列可以被密码子优化,用于在所选宿主/宿主细胞内进行生产。

[0191] 它可以是分离的,或者作为质粒、载体或宿主细胞的一部分。

[0192] 两条核苷酸序列之间的百分比同一性可以通过比较每条序列内的某个位置加以确定,所述序列可以为比较目的而对准。所谓表示为同一性的百分比,是指被比较的各序列所共享的位置上的相同核苷酸的数目的函数。可以使用各种比对算法和/或程序,包括FASTA, BLAST, 或ENTREZ。FASTA和BLAST可以作为GCG序列分析软件包的一部分(University of Wisconsin, Madison, WIs.)获得,并可以用例如缺省设置加以使用。ENTREZ可以通过国家生物技术信息中心(美国National Center for Biotechnology Information),国家医学图书馆(National Library of Medicine),国立健康研究所(National Institutes of Health), Bethesda, Md获得。两条序列的百分比同一性可以通过GCG软件以缺口权重为1确定,例如把每个缺口当做两条序列之间的一个核苷酸错配来予以加权。

[0193] 变体序列可以包含一个或多个核苷酸取代、插入或缺失。插入和缺失可以使得,总的来说,大部分编码序列仍然相对于SEQ ID No.12是“合框”的。由于遗传密码子的简并性,核苷酸取代可以是“沉默的”,使得密码子仍编码相同的氨基酸。

[0194] 当核苷酸取代导致所编码的氨基酸序列发生改变时,这些可以集中在多肽的框架区和接头区(即图7B中分别用黑色和红色显示的部分)。编码CDR的区域(相应于图7B中褐色

显示的部分)可以包括相对少的突变。编码CDR的区域应当仅含有如下的突变,其影响相应于图6中红色所示位置的氨基酸,即SEQ ID No 1-4中用氨基酸X表示的氨基酸,而非其他CDR残基。

[0195] 载体

[0196] 术语“载体”是指能够转运另一个与之连接的核酸的核酸分子。一种类型的载体是附加体,即能够在染色体外复制的核酸。另一种类型的载体是整合载体,其被设计成与宿主细胞的遗传材料重组。载体可以既是自主复制的又是整合性的,且载体的性能可以根据细胞背景而不同(即载体可以在一种宿主细胞类型中自主复制,而在另一种宿主细胞类型中则是纯整合复制)。能够指导与之可操作连接的可表达核酸的表达的载体称作“表达载体”。

[0197] 质粒是一种染色体外DNA分子,其与染色体DNA分离,并能够独立于染色体DNA进行复制。它们通常是环状的且为双链。

[0198] 质粒可用于在宿主细胞内表达蛋白。例如,细菌宿主细胞可以用能够编码特定蛋白的质粒转染,以便表达该蛋白。该术语还包括酵母人工染色体和细菌人工染色体,它们能够容纳更长的DNA部分。

[0199] 宿主细胞

[0200] 本发明进一步提供了能够产生本发明抗原结合性多肽的细胞和细胞系。代表性的宿主细胞包括细菌、酵母、哺乳动物和人细胞,例如CHO细胞、HEK-293细胞、HeLa细胞、CV-1细胞和COS细胞。通过将异源构建体转化进入宿主细胞后产生稳定细胞系的方法是本领域已知的。代表性的非哺乳动物宿主细胞包括昆虫细胞(Potter et al.(1993) Int.Rev.Immunol.10(2-3):103-112)。抗体还可以在转基因动物(Houdebine(2002) Curr.Opin.Biotechnol.13(6):625-629)和转基因植物(Schillberg et al.(2003) Cell Mol.Life Sci.60(3):433-45)中产生。

[0201] 治疗方法

[0202] 本发明的抗原结合性多肽可用于治疗关节炎或风湿性疾病。

[0203] 关节炎是一般性术语,涉及以一个或多个关节的急性和慢性炎症为特征的疾病,通常伴随疼痛和僵硬,由于感染、创伤、退行性变化、自身免疫疾病或其它原因所导致。

[0204] 骨关节炎,也称作退行性关节炎或退行性关节病,是一组涉及关节(包括关节软骨和软骨下骨)退化的机械异常。症状可以包括关节痛、触痛(tenderness)、僵硬、交锁(locking),有时有积液。多种原因——遗传性、发育性、代谢性和机械性的——可能触发导致软骨损失的过程。

[0205] 类风湿性关节炎(RA)是一种慢性系统性的炎症病症,可能影响许多组织和器官,但主要攻击滑膜关节。该过程产生滑膜炎性反应(滑膜炎),其继发于滑膜细胞增生、滑膜液过多和滑膜中产生血管翳。该疾病过程的病理经常导致关节软骨损坏和关节强直。类风湿性关节炎还会在肺、胸膜、心包和巩膜产生弥漫性炎症,还会产生结节性病变,最通常发生在皮肤下面的皮下组织中。尽管类风湿性关节炎的原因未知,但自身免疫性在其长期性和进程中均起关键作用,并且RA被看做是一种系统性自身免疫性疾病。

[0206] 本发明的抗原结合性多肽可单独用于关节炎治疗中。抗原结合性多肽可具有内在的抗血管发生活性,例如它可能能够阻断血管增殖的关键介导体。当前在临床上使用的这类作用剂的实例是能够中和抗-VEGF抗体的药物,和针对VEGF受体或 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白的抗体。

[0207] 可选择地,抗原结合性多肽可用作与其他作用剂的复合物,例如缀合物,或者与之构成组合疗法使用(见下文)。

[0208] 血管系统的破坏

[0209] 本发明还涉及破坏现存的滑膜微血管系统的方法。

[0210] 该方法可以涉及使用根据本发明的抗原结合性多肽将作用剂靶向滑膜微血管系统,该作用剂能够干扰现存的微血管系统。

[0211] 为了避免对正常组织和血管造成损伤,作用剂可以是可选择性激活的,从而它可以在靶向到滑膜微血管系统之后被原位激活。例如,作用剂可以是光敏的并被光线激活;或者作用剂可以包含磁性纳米颗粒,并被磁场激活。

[0212] 组合治疗

[0213] 本发明的抗原结合性多肽,或其缀合物的复合物,可用于和另一种疗法组合使用。两种治疗剂可以用于分别、顺次或同时施用。

[0214] 该另一种疗法可以包括治疗性细胞因子、抗血管发生剂或抗风湿药物,如上文所述。

[0215] 本发明的抗原结合性多肽可以和用于治疗关节炎的另一种重组抗体组合使用。

[0216] 当前,有数种重组抗体用于治疗类风湿性关节炎,靶向多种细胞因子、T细胞和B细胞。自从最初批准依那西普以来,之后不久又批准了英夫利昔单抗(infliximab),另外三种TNF-中和抗体(阿达木单抗、Certulizumab pegol和戈利木单抗)。而且,FDA还已经批准了靶向T-细胞[和/或树突细胞](阿巴西普)、B-细胞(利妥昔单抗)和细胞因子IL-6受体(托珠单抗)的重组抗体用于治疗RA(Taylor and Feldmann 2009; Isaacs 2009,两者见上文)。

[0217] 该另一种治疗可以涉及阻断肿瘤坏死因子(TNF)途径。TNF促进炎性应答,其进而导致许多与自身免疫性异常(例如类风湿性关节炎)相关的临床问题。

[0218] 抑制TNF可以通过单克隆抗体如英夫利昔单抗(Remicade)、阿达木单抗(Humira)、certolizumab pegol(Cimzia)、和戈利木单抗(Simponi)实现,或者用循环受体融合蛋白如依那西普(Enbrel)实现。

[0219] 尽管大多数临床上有用的TNF抑制剂是单克隆抗体,但有些是简单分子例如黄嘌呤衍生物(例如己酮可可碱)和安非他酮。

[0220] 使用血管靶向治疗与第二代重组TNF- α 阻断治疗剂的组合,可提供比当前的单一免疫治疗剂所可能实现的更有效的RA治疗。

[0221] 试剂盒

[0222] 本发明还提供了试剂盒,其包括根据本发明第一个方面的抗原结合性多肽,或其复合物或缀合物。

[0223] 该试剂盒还包括用于在施用给受试者之前与抗原结合性多肽相缔合的作用剂。缔合的作用剂/抗原结合性多肽可以在随后施加给受试者后靶向滑膜微血管系统。

[0224] 当抗原结合性多肽用于诊断用途时,该试剂盒还可以包含其他成像试剂和/或装置。

[0225] 当试剂盒用于组合疗法中时,该试剂盒还可以包括第二种用于同时、随后或分别施用的治疗剂。

[0226] 成像

[0227] 抗原结合性多肽可以用于成像应用,例如对关节炎关节的血管系统进行成像。

[0228] 迄今为止,已知仅有少数几个质量良好的血管发生标志物,它们或者在内皮细胞上或者在经过修饰的ECM中。许多标记的最大问题是它们缺少足够的特异性表达或者在正在发生血管发生的组织中被显著上调。

[0229] 已经有人提出,一些整联蛋白,特别是 $\alpha v\beta 3$ 和 $\alpha v\beta 5$,同时是肿瘤和眼科新生血管异常中血管发生的标志物和功能调节物。还显示在类风湿性关节炎患者的滑膜血管系统中整合蛋白 $\alpha v\beta 3$ 的表达提高。然而,在最近的免疫组化研究中,明显正常组织的血管系统以及多种血管外细胞类型也显示阳性的 $\alpha v\beta 3$ 染色,尽管比正在经历血管发生的组织中的强度低。

[0230] 新近许多研究描述了转化生长因子- β 受体复合物的一个组分endoglin(CD105)是一种引人注意的新生血管标志物。Endoglin在增殖中的内皮上的表达显著增高,但是在大多数人和小鼠来源的正常、健康成年组织中的内皮细胞中也有微弱的染色。已经表征了数种针对endoglin的单克隆抗体,并且最近作为肿瘤治疗和成像的靶向作用剂进行了测试。出人意料的是,在小鼠中获得的靶向结果相对微弱,尽管抗原在内皮细胞上的位置是可及的。

[0231] 因此需要有用以对关节炎关节的微血管系统进行成像的改进的作用剂。

[0232] 本发明的抗原结合性多肽可以被标记用于成像技术,例如用荧光或放射性标记。

[0233] 使用抗体的体内成像技术是本领域众所周知的,包括生物化学发光(BLI)和生物荧光成像(BFI)。

[0234] 诊断方法

[0235] 本发明还提供了一种使用根据本发明第一个方面的抗原结合性多肽诊断疾病的方法。

[0236] 本发明还提供了使用根据本发明第一个方面的抗原结合性多肽用于监测疾病进程的方法,以及用于评价药物治疗效力的方法。

[0237] 疾病可能与滑膜微血管系统的改变(例如增加)相关。疾病可以是关节炎的一种形式,例如骨关节炎或类风湿性关节炎。

[0238] 如背景部分所解释的,滑膜血管发生很可能发生于RA的其它病理学特征之前,因此本发明的抗原结合性多肽可用于在早期,在其它症状出现之前,诊断RA。

[0239] 该方法可以涉及在一个或多个时间点对患者关节的滑膜微血管系统进行成像。

[0240] 靶向方法

[0241] 本发明还提供了用于将作用剂靶向滑膜微血管系统的方法,其包括在体外使作用剂与根据本发明的抗原结合性多肽缔合的步骤。

[0242] 该缔合可以使得当向关节炎患者施用缔合的作用剂/抗原结合性多肽时,该作用剂被靶向到滑膜微血管系统。然后,该作用剂可以选择性地积累在新生血管部位。

[0243] 所述作用剂可以,例如,与抗原结合性多肽缀合。

[0244] 现在将通过实施例进一步对本发明进行描述,实施例仅作为帮助本领域的普通技术人员实施本发明,不意图以任何方式对本发明的范围构成限制。

实施例

[0245] 实施例1-scFv抗体克隆的体内噬菌体展示筛选

[0246] 本发明人采用滑膜异种移植SCID小鼠模型进行Tomlinson文库的体内噬菌体展示筛选,以产生对异种移植物中包含的人滑膜血管系统具有特异性的scFv抗体克隆。

[0247] 将天然Tomlinson文库噬菌体通过尾静脉注射,并允许其循环15分钟。通过用生理盐水进行心脏灌注从循环中除去非特异性的非结合的噬菌体。然后从动物提取滑膜移植物,并处理以便进行噬菌体回收和滴定。将小鼠同时携带的皮肤组织异种移植物用作筛选的对照组织。然后仅对从滑膜移植物回收的噬菌体在TG1大肠杆菌中进行扩增、拯救、并准备用于后续轮次的体内筛选。该亲和筛选过程再重复三轮,以便富集具有滑膜特异性的抗体。

[0248] 实施例2-scFv A7与人滑膜组织的反应性

[0249] 使用免疫组化分析,本发明人证明,scFv A7与骨关节炎和类风湿性关节炎滑膜组织的微血管系统显示特异性的反应性(图2)。

[0250] 实施例3-滑膜微血管系统内scFv的靶细胞类型的鉴定

[0251] 为了具体确定微血管系统中的哪些细胞类型能够与该抗体反应,本发明人用scFv A7以及内皮特异性标志物Von Willebrand因子(vWF)和CD 31,以及周细胞特异标志物NG2,对RA滑膜组织进行双染色。结果清晰地证明,该组织用scFv A7和周细胞标志物NG2的双染色显示所观察细胞染色的图案完全重叠,证明scFv A7具有与RA滑膜组织微血管系统的周细胞和基质组分的反应性(图3)。微血管系统基质区室的组分对于基于抗体的靶向应用而言是有吸引力的,因为这种区室稳定并且大量存在。

[0252] 实施例4-scFv A7体内靶向滑膜组织

[0253] 为了在体内确认可溶scFv A7的反应性的特异性,检测了碘化scFv A7在体内靶向人滑膜组织异种移植物的能力。数据证明,在SCID小鼠中,在注射后4小时,相对于所移植的人皮肤,放射性标记的scFv A7对人滑膜显示3倍的优先结合能力,保留了其亲本噬菌体克隆的滑膜特异性。进一步,尽管24小时后scFv A7在滑膜的活性下降,但是与皮肤相比,该组织在反应性上仍然保持显著的差异(图4)。

[0254] 实施例5-scFv A7反应性的特异性

[0255] 为了检验scFv A7的反应性的特异性,本发明人使用全身的正常调查组织阵列(normal survey tissue array)检查了该抗体与多种正常人组织的反应性。图5提供的数据证明,scFv A7与重要器官,例如心脏、肺、肝、胰腺、大脑皮质和消化道组分,不显示可检测的反应性。此外,抗体与淋巴、胸腺、肾上腺、卵巢和睾丸不显示反应性,进一步确认了其优秀的滑膜组织特异性。

[0256] 实施例6-scFv A7与正常人滑膜的反应性

[0257] 在已经确认scFv A7与范围全面的正常组织的细胞组分和微血管系统没有反应性的基础上,通过检查该抗体与正常人滑膜组织微血管系统的反应性,进一步扩展scFv A7与正常组织反应性的特异性研究。为此,从因长期原因不明的膝盖疼痛而接受关节镜检查患者的获得正常人滑膜组织,这些患者的疼痛在5年跟踪调查过程中并没有发展为关节炎状况。图8中提供的结果代表了11个样品,证明:正常人滑膜中发现的微血管系统(通过vWF反应性检测到的)含有基质血管组分(通过 α 平滑肌肌动蛋白反应性检测到的)。然而,scFv A7与这些滑膜样品中发现的微血管系统没有反应性。

[0258] 实施例7-scFv A7与来自其它炎症疾病组织的反应性

[0259] 为了确认scFv A7的反应性是否对关节炎滑膜的微血管系统特异,或者是否是炎症存在相关的新生血管形成的一个普遍特征,我们在来自患有克罗恩氏病(n=7)和银屑病(n=5)的患者的组织样品中检查scFv A7染色,其中微血管系统的存在用抗人vWF进行检测。图9提供的结果证明,scFv与在克罗恩氏病或银屑病组织中发现的微血管系统没有可检测的反应性。

[0260] 这些结果证明,scFv A7的靶表位不存在于正常人组织和微血管系统中,也不在炎症状况中见到的新生血管中表达。总之,这些结果进一步支持了如下的结论,即scFv A7特异针对在关节炎滑膜中发现的微血管系统。

[0261] 材料和方法

[0262] ScFv噬菌体文库

[0263] 人单倍scFv文库I+J(Tomlinson I+J)从MRC(医学研究委员会)资源中心(Cambridge, UK)获得,并按照提供者的指导说明(在线:<http://www.lifesciences.sourcebioscience.com/clone-products/proteomic-resources/human-single-fold-scfv-libraries-i-plus-j.aspx>)进行筛选。

[0264] Tomlinson I+J文库是半合成的,并且是基于单一人VH(V3-23/DP-47和JH4b)和Vk(O12/O2/DPK9和Jk1)框架,其编码最常见的人标准结构。重链的CDR3被设计成尽可能短,但仍然能形成抗原结合表面。此外,CDR1区保持恒定,而在CDR3和CDR2区的如下位置引入了侧链多样化:它们与抗原接触,并且在其成熟的天然总库中具有高度多样性。两个文库的大小均为大约 1.4×10^8 ,并且VH种系基因DP47提供与蛋白A的结合。

[0265] 人组织移植到SCID小鼠体内

[0266] 本研究使用4-10周龄的米黄色SCID CD-17小鼠。将人组织(滑膜和皮肤)皮下移植远离肩关节的背部部位(每只动物两个植入物),如前所述(Wahid, Blades et al. 2000 Clin Exp Immunol 122:133-142)。每天对小鼠进行观察,动物实验在项目许可(PPL 70-6109)下实施。

[0267] 从进行关节置换的RA或骨关节炎(OA)患者获得人滑膜组织。人皮肤组织从进行整容手术的患者获得。从每个患者获得了知情同意书。此外,从King's College医院伦理学委员会获得了出于研究目的使用人滑膜和皮肤组织的伦理学批准(LREC n 05/Q0703/198)。

[0268] 滑膜特异噬菌体的体内筛选

[0269] 在携带人关节炎滑膜组织和皮肤组织异种移植物的SCID小鼠中,经过4轮富集分离了滑膜特异性噬菌体,其实验模式与先前关于肽文库所述相似(Lee, Buckley et al. 2002 Arthritis Rheum 46:2109-2120)。简而言之,用人滑膜和皮肤组织移植后4周,用200μl灭菌盐水制备 10^{11} tu(转化单位)Tomlinson噬菌体文库,并注射到SCID小鼠的尾静脉。使噬菌体循环15分钟,之后在麻醉下处死动物。通过用生理盐水对进行动物心脏灌注,从循环中除去非特异性的非结合的噬菌体。然后移出移植体(以及,偶尔情况下,小鼠器官),并处理用于噬菌体回收(使用胰蛋白酶)和滴定。仅对从滑膜移植体回收的噬菌体在TG1大肠杆菌中扩增、拯救和制备用于下一轮体内筛选。通过PCR进行评估由最后一轮筛选得到的噬菌体颗粒表达的scFv片段的完整性。然后回收保持表达完全scFv片段的克隆,用于表达可溶性scFv蛋白。

[0270] scFv A7噬菌体的体内定位

[0271] 移植4周后,将scFv A7噬菌体克隆以 10^{11} tu注射到携带人滑膜和皮肤组织异种移植物的SCID小鼠体内。使噬菌体颗粒循环15分钟,之后对动物进行灌注,并通过对经匀浆的洗出液滴定来确定两个移植物中保留的噬菌体数目。随后定量皮肤和滑膜移植物之间不同的噬菌体定位。

[0272] scFv基因测序

[0273] 对从最后一轮富集选择的克隆进行测序,以确定编码分离噬菌体的scFv插入物的DNA序列。scFv克隆测序用scFv-插入物-特异引物LMB3(CAG GAA ACA GCT ATG AC)和pHEN seq(CTA TGC GGC CCC ATT CA)实施。测序用BigDye® Terminator v3.1循环测序试剂盒(Applied Biosystems)在ABI PRISM 3130Genetic分析仪上实施。

[0274] 可溶scFv抗体片段的产生

[0275] 对于在末轮选择中从噬菌体拯救的scFv片段,将其在HB2151大肠杆菌中表达,用于在上清液中产生可溶性scFv片段。用单克隆ELISA评估每个克隆生产scFv蛋白的效率。随后,通过亲和色谱使用蛋白A琼脂糖凝胶快流树脂(Protein A Sepharose Fast Flow Resin)(GE Healthcare)从培养物上清液纯化scFv蛋白。纯化抗体通过SDS-PAGE和在Superdex 75HR10/30柱(Amersham Biosciences)上的大小排阻色谱进行分析,可溶性scFv A7作为单体蛋白被纯化,产量为0.5-1mg/ml。

[0276] scFv抗体片段的生物素化

[0277] ScFv抗体使用EZ-Link Sulfo-NHS-SS-生物素化试剂盒(Perbio,Cramlington UK)生物素化。简而言之,将待生物素化的期望浓度的scFv稀释于0.5-2ml PBS中,添加于20倍摩尔过量的10mM Sulfo-NHS-SS-生物素中,并在冰上温育1小时。随后用脱盐柱根据制造商的使用说明分离生物素化蛋白。

[0278] scFv抗体片段的碘化

[0279] scFv抗体片段使用Iodogen法用 Na^{125}I 进行放射性标记。根据制造商的使用说明(Perbio,Cramlington UK)使用预涂布有Iodogen的Pierce碘化管。典型地,将溶于150 μl 中的25 μg 纯化scFv放射性标记至特异活性为0.15-0.2MBq/ μg 。通过瞬时薄层色谱检验标记的效率(通常超过90%),而标记scFv的纯度通过反相HPLC加以确定。

[0280] 可溶scFv A7抗体片段的体内定位

[0281] 移植4周后,给两只携带人关节炎滑膜和皮肤组织双异种移植物的SCID小鼠(每只动物两个关节炎滑膜和2个人皮肤移植物)注射6 μg 生物素化scFv A7。使用生物素化抗-鸡卵溶菌酶抗体片段scFv HEL作为抗体阴性对照。通过尾静脉施用生物素化抗体片段(总体积为200 μl),并使之循环15分钟。之后,麻醉处死小鼠,进行灌注。随后一并收集人移植物和鼠组织,并立即速冻,用于组织学检验。利用亲和素-生物素-HRP(ABC-HRP)复合物(Dako Ltd,Ely UK)免疫组化检测组织切片中的生物素化scFv A7,来检查组织特异性定位于关节炎滑膜组织移植物微血管系统的可溶性scFv A7。体外添加的scFv A7的反应性也在这些实验中加以检验。

[0282] 碘化scFv A7抗体片段的体内靶向能力

[0283] 移植4周后,给5只双移植SCID小鼠(每只动物两个关节炎滑膜和两个人皮肤移植物)注射碘化scFv抗体。每只动物的注射剂量为用灭菌盐水制备总体积200 μl ,其中含有总

放射性为0.2Mbpq的1.25 μ g scFv。将经标记的抗体片段通过尾静脉施用。注射后4小时和24小时处死动物,收集移植物以及小鼠器官进行 γ 计数。随后相对于组织重量和血液池中的背景放射性对结果进行校正,并表示为总注射剂量的百分比。使用碘化scFv HEL作为阴性对照抗体。

[0284] 免疫组化分析

[0285] 将组织冷冻切片在冰冷的丙酮中固定,用1 μ g生物素化scFv A7染色。对石蜡包埋组织进行脱蜡,随后用蛋白酶K(Dako Ltd,UK)室温处理4min,用于抗原修复。使用4 μ g的scFv A7,并用亲和素-生物素-HRP(ABC-HRP)复合物(Dako Ltd,UK)通过其生物素标记加以检测。用抗人vWF(Dako),随后用HRP-缀合抗小鼠抗体来展示组织切片中人血管的存在。用抗小鼠CD31检测小鼠组织中的小鼠内皮血管。玻片用苏木精复染,用Depex固封剂(Dako)固封,并用光学显微镜(Olympus, Watford, UK)进行分析。

[0286] 免疫荧光分析

[0287] 组织冷冻切片在抗体染色前用冰冷的丙酮固定。使用德克萨斯红缀合的NeutrAvidin(Invitrogen)检测生物素化scFv A7的反应性。用Alexa 488或Alexa 594(Invitrogen)检测抗人vWF(Dako)、抗人CD31(Sigma)和抗NG2抗体(Millipore)的反应性。随后将切片固封在荧光固封剂Vectashield中,用DAPI(Vector Labs, UK)复染细胞核,并用Axioskop 2显微镜(Carl Zeiss Ltd, UK)进行检查。图像用AxioCam数字彩色照相机捕捉,并用KS300图像分析软件(Zeiss, UK)分析。

[0288] 组织移植物内人血管的评估和定量

[0289] 为了评估人移植物的血管化(vascularisation)程度,用抗人vWF免疫组织学确定人内皮表面。简而言之,用抗vWF抗体染色人滑膜和皮肤移植物切片,并使用如前所述(Lee, Buckley et al. 2002, 如上)的点计数方法在显微镜下确定免疫染色的人血管的体积分数(Vv)。

[0290] 统计

[0291] 结果表示为平均值与标准偏差(SD),或者标准误差(SEM)。参数分析用Graphpad Prism软件(Graphpad Software, San Diego USA)实施,均通过非配对双尾t-检验。

[0292] 这里引用上面说明书中提到的全部出版物作为参考。在不背离本发明精神和范围的前提下,所述本发明方法和系统的各种修改和变化对本领域的技术人员而言是显而易见的。尽管本发明参考具体的优选实施方案进行描述,应当理解,本发明,如权利要求的,不应认为受到这些具体实施方案的限制。实际上,各种用于实施本发明的所述模式的修改对于分子生物学或相关领域的技术人员而言是显而易见的,均意图包含在如下权利要求的范围内。

序列表

<110> 伦敦大学玛丽王后威斯特费尔学院(Queen Mary Innovation Ltd)

<120> 特异性结合关节炎患者的滑膜微血管系统的抗体

<130> P041365W0

<150> GB 1016494.5

<151> 2010-09-30

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区(CDR)

<220>

<221> misc.feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc.feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc.feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0001]

<220>

<221> misc.feature

<222> (11)..(17)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 1

Ala Xaa Tyr Thr Ser Xaa Asn Ser Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区(CDR)

<220>

<221> misc.feature

<222> (5)..(7)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 2

Asn Ala Ser Asn Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 互补决定区 (CDR)

<220>
<221> misc.feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc.feature
<222> (5)..(7)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 3
Ser Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 互补决定区 (CDR)

<220>
<221> misc.feature
<222> (1)..(2)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc.feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

[0002]
<220>
<221> misc.feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 4
Xaa Xaa Gly Ser Asp Ala Xaa Ala Xaa
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 5
Ala Ile Tyr Thr Ser Gly Asn Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 互补决定区 (CDR)

<400> 6
Asn Ala Ser Asn Phe Asp Tyr
1 5

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 互补决定区 (CDR)

<400> 7

Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 互补决定区 (CDR)

<400> 8

Gln Gln Gly Ser Asp Ala Pro Ala Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合性多肽 VL 区

<400> 9

[0003]

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

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

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

Trp Val Ser Ala Ile Tyr Thr Ser Gly Asn Ser Thr Ser Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Lys Asn Ala Ser Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val
 115

<210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗原结合性多肽 VH 区

<400> 10

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

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

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Asp Ala Pro
85 90 95

Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
100 105 110

<210> 11

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗原结合性多肽(scFv)

<400> 11

[0004]

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

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

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

Trp Val Ser Ala Ile Tyr Thr Ser Gly Asn Ser Thr Ser Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Lys Asn Ala Ser Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
130 135 140

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
145 150 155 160

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

	165	170	175
	Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val 180 185 190		
	Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr 195 200 205		
	Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln 210 215 220		
	Gly Ser Asp Ala Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile 225 230 235 240		
	Lys Arg Ala Ala Ala 245		
	<210> 12 <211> 750 <212> DNA <213> 人工序列		
	<220> <223> 能够编码抗原结合性多肽的核苷酸序列		
[0005]	<400> 12 ggggccagc cggccaagc cgaggtcag ctgttgagc ctggggagg ctggtacag 60 ccggggggt ccttgagact ctcttgcca gccctcggat tcaccttag cagctatgcc 120 atgagctggg tccgccaggc tctgggag ggactggagt gggtctcagc tattatact 180 agtggttaatt ctactctta cgcagaccc gtaagggcc ggtaacct cccagagac 240 aatccaaga acagctgta tctgcaantg aacagccga gaggcagga caggccgta 300 tattactgtg cgaanaatgc tagtaattt gactactggg gccagggaac ctgttcacc 360 gtctcagagc gtgaggggg ttccaggcga ggtagcagc gctgtggcg gtccagggac 420 atccagatga cccagctccc atctcccctg tctgcatctg taggagacag agtcaccatc 480 acttgccggg caagtcagag cactagcagc tatttaatt ggtaacagc gaaacaggg 540 aaagccctta agctctggt ctattctgca tccaatttgc aaagtgggtt cccatcaagg 600 ttcagtgga gtggaactgg gacagattc actctacca tcagcagctt gaaacctgaa 660 gatitgcaa ctactacig tcaacagggt tctgatctc ctgtactgt cygccaagg 720 accaagggtg aaatcaaac ggccggccga 750		
	<210> 13 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列		
	<220> <223> 引物		
	<400> 13 caggaaacag ctatgac 17		
	<210> 14 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列		
	<220> <223> 引物		
[0006]	<400> 14 ctatgctggc ccattca 17		

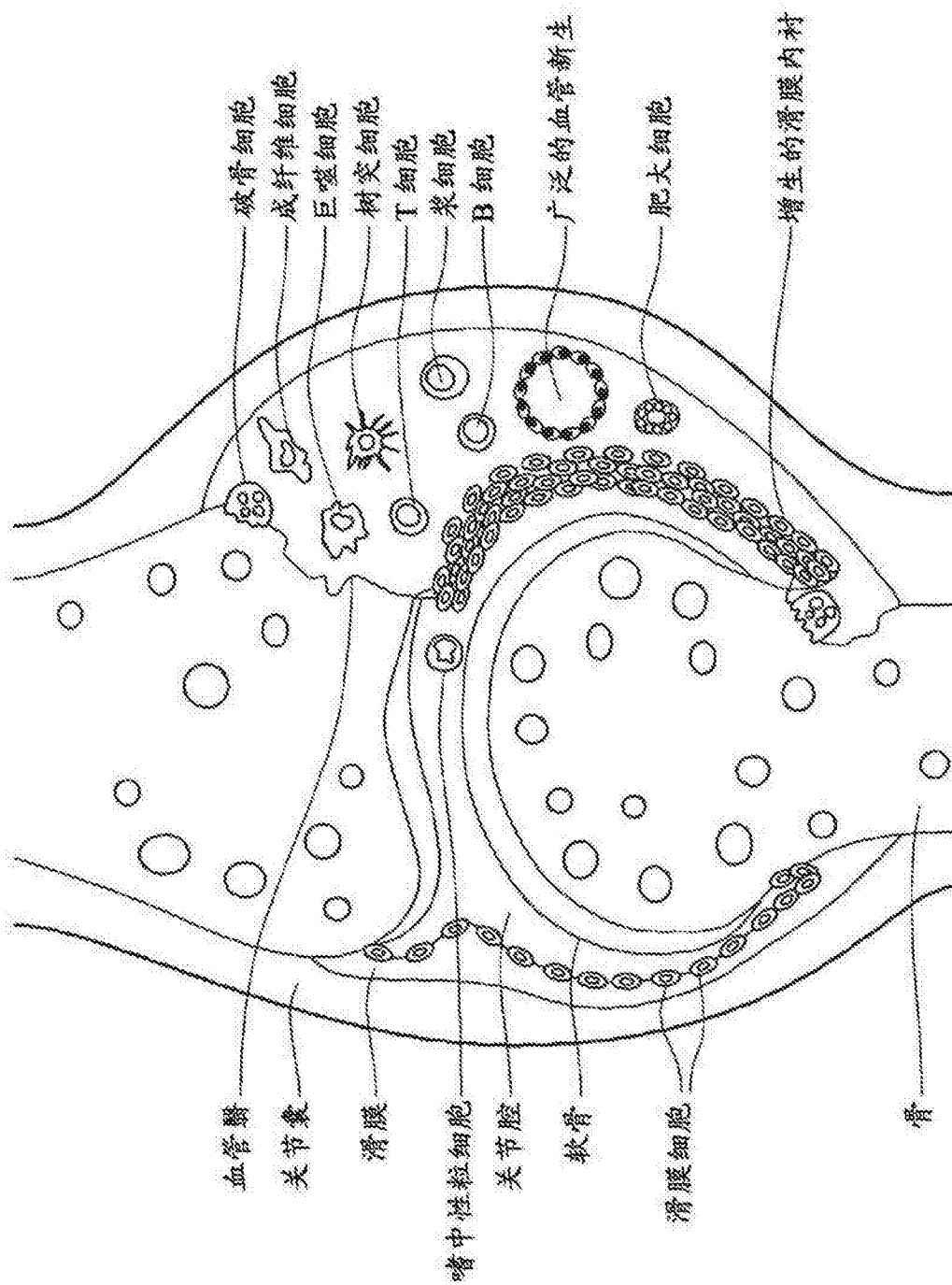


图1



图2

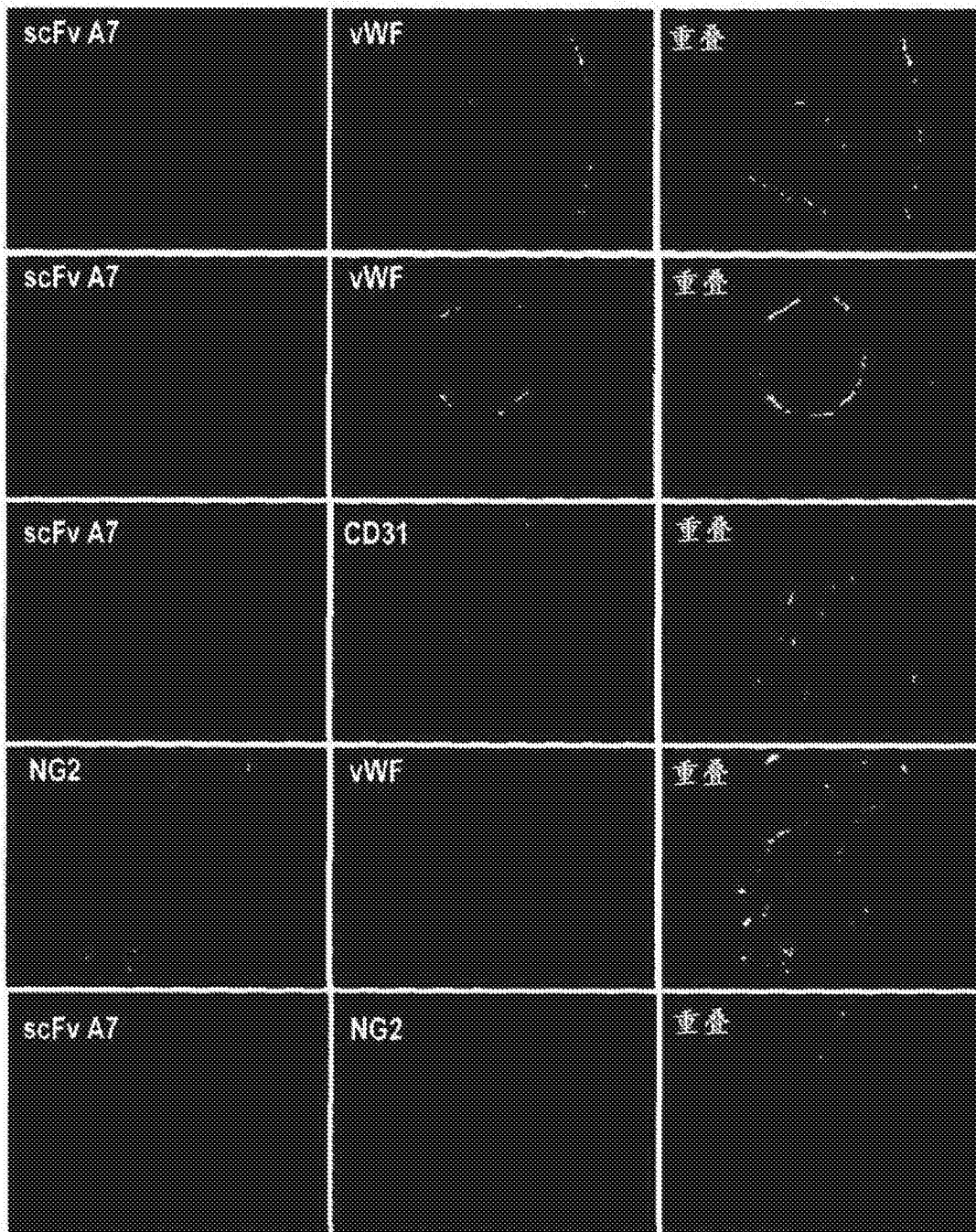


图3

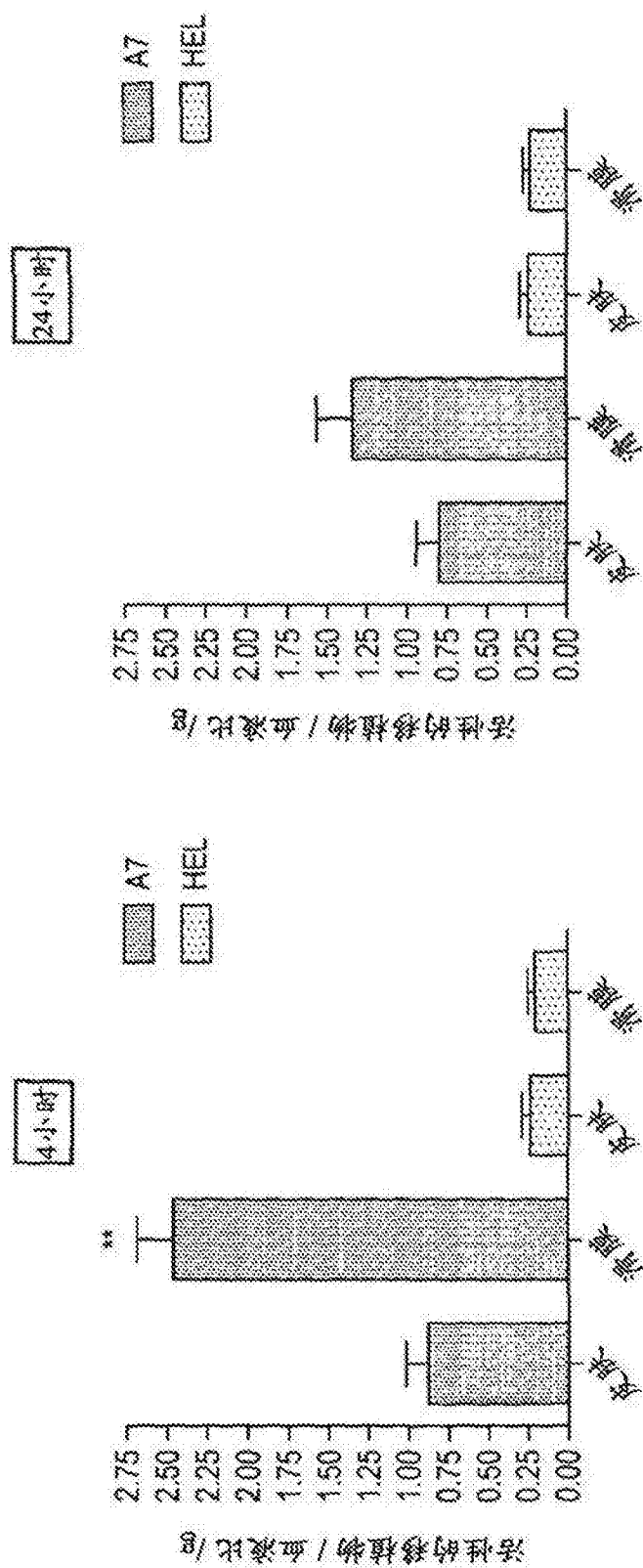


图4

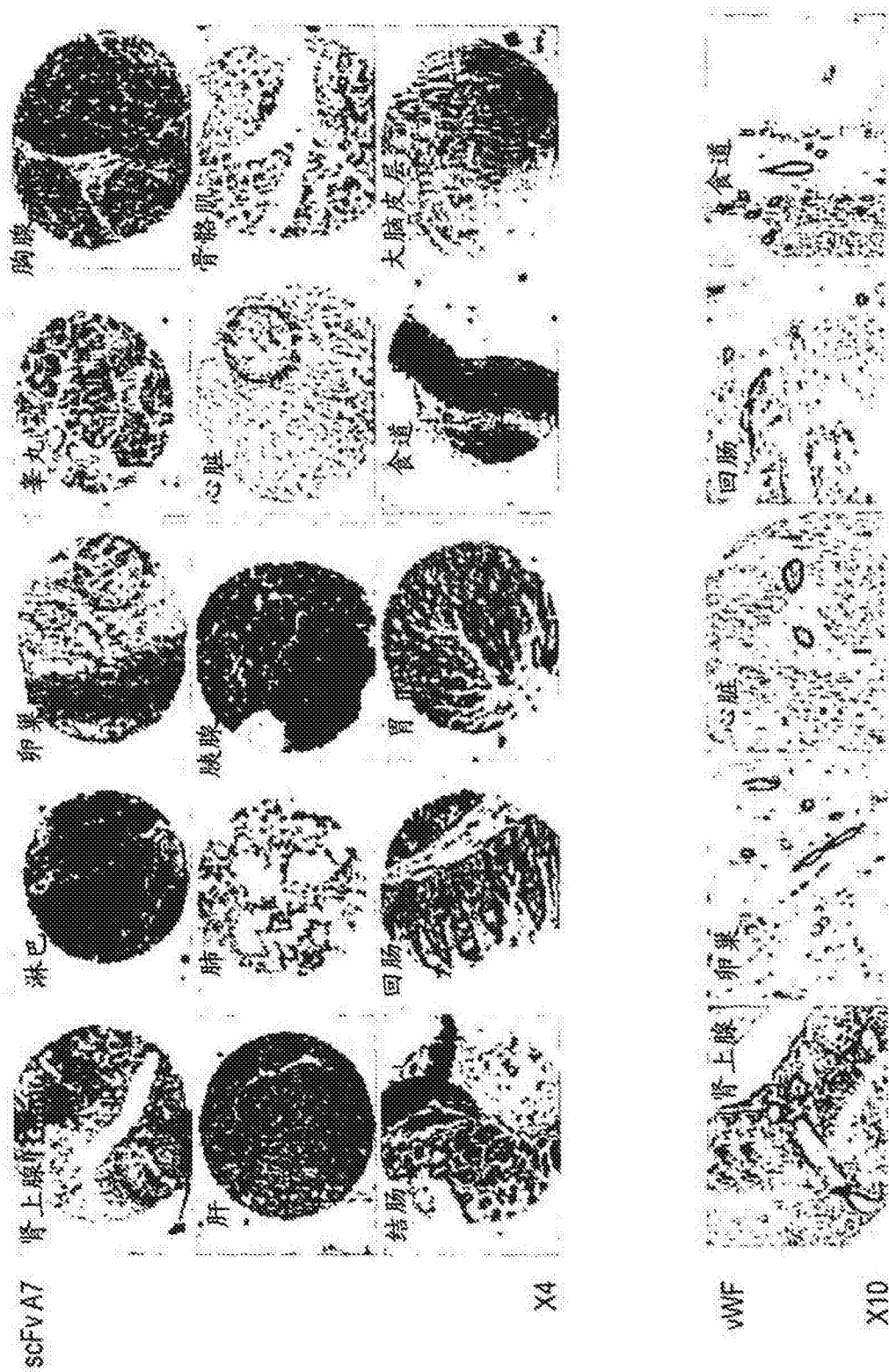


图5

重链		轻链	
CDR2	CDR3	CDR2	CDR3
AIYTSGNSTSYADSVKG	NASNFDY	SASNLQS	QQGSDAPAT

可变氨基酸域以粗体显示

图6

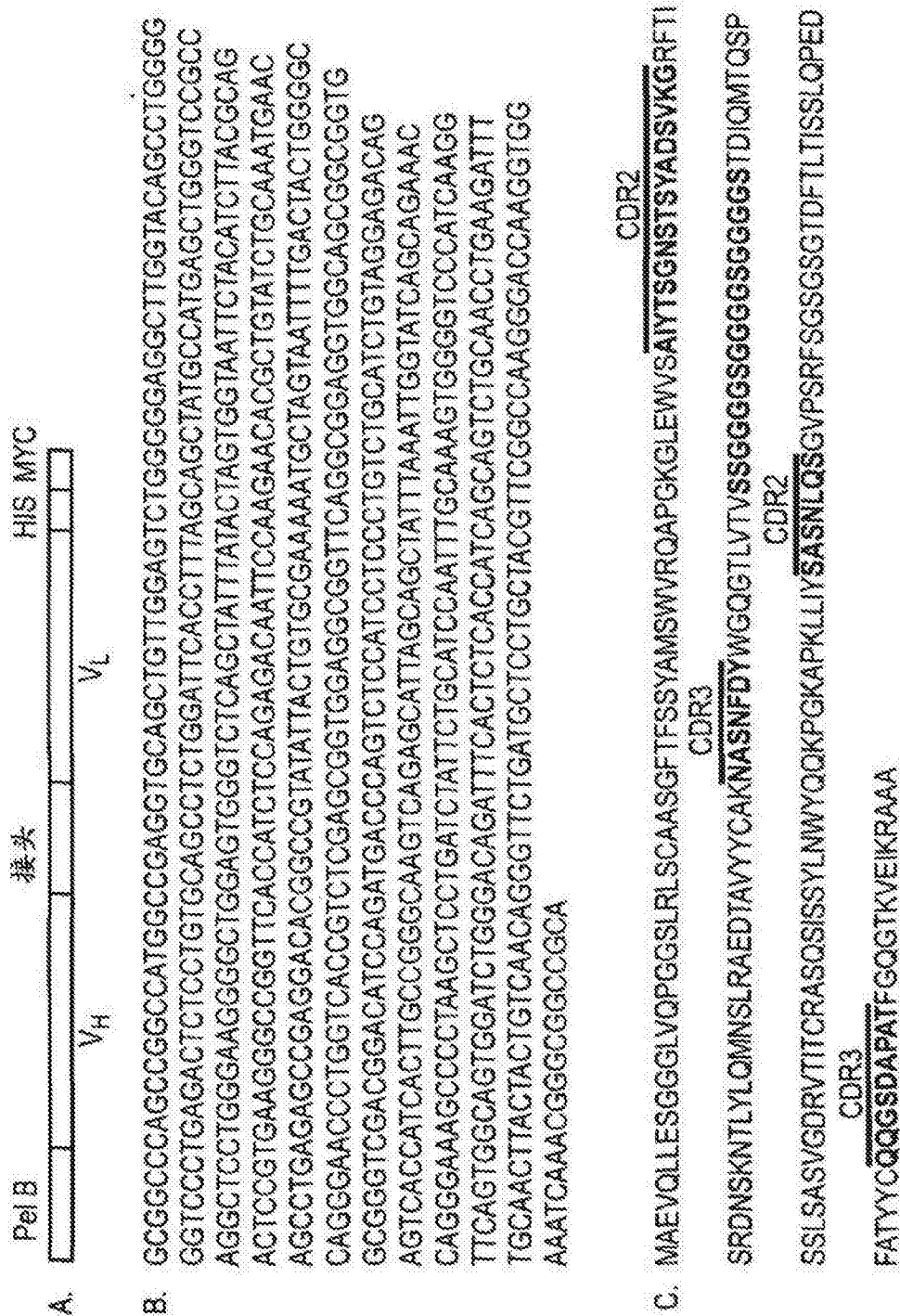


图7

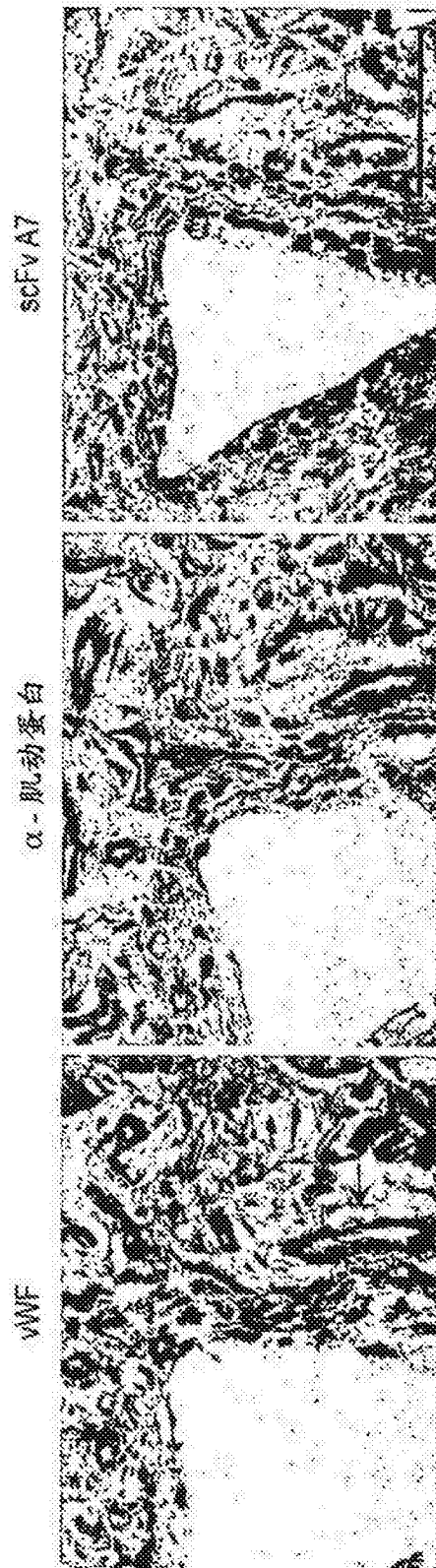


图8

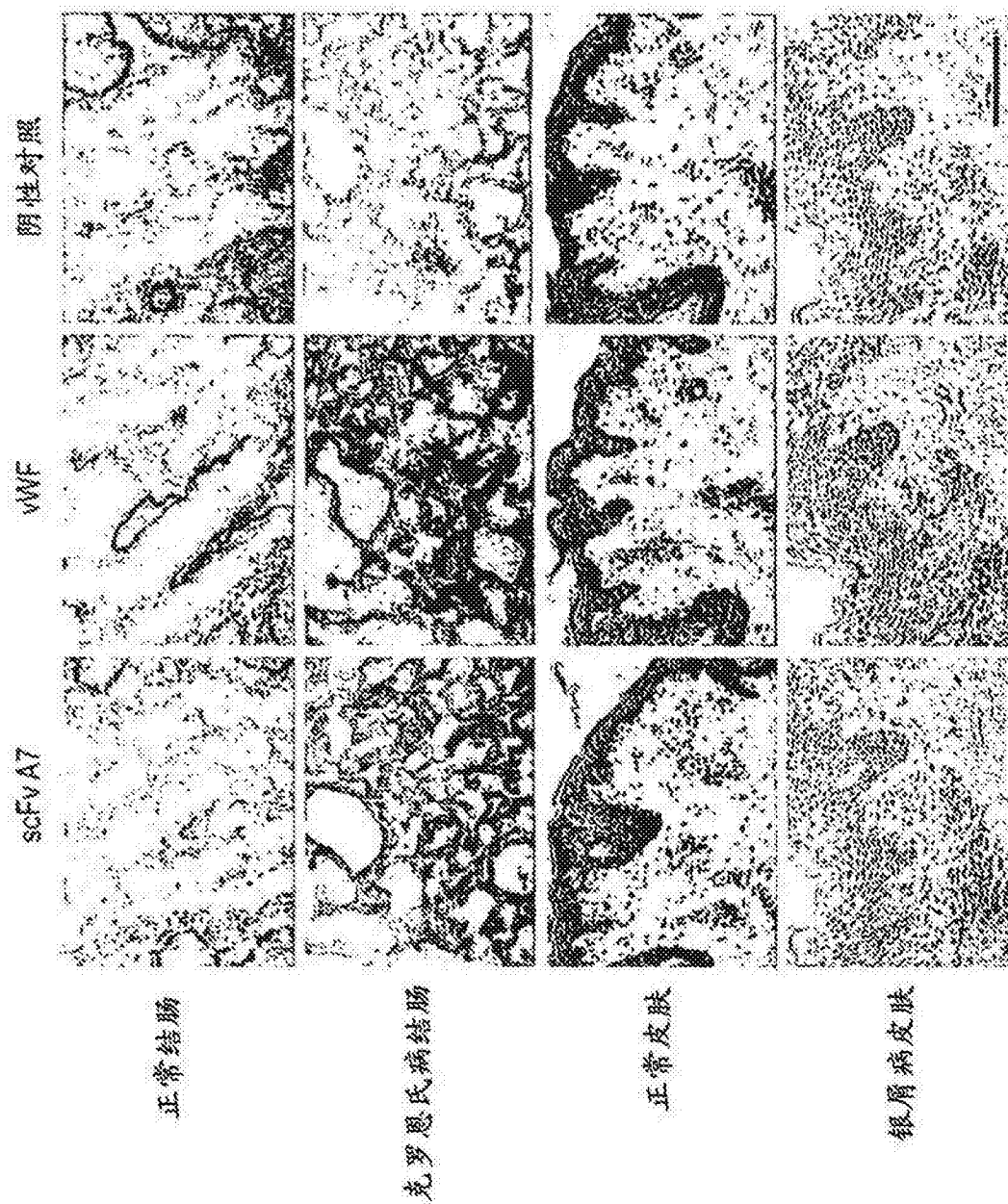


图9



图10