



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108659120 A

(43)申请公布日 2018.10.16

(21)申请号 201810379010.9

(22)申请日 2012.06.25

(30)优先权数据

PCT/EP2011/067132 2011.09.30 EP

PCT/EP2012/061304 2012.06.14 EP

61/500,360 2011.06.23 US

61/500,464 2011.06.23 US

61/541,368 2011.09.30 US

13/435,567 2012.03.30 US

(62)分案原申请数据

201280030902.9 2012.06.25

(83)生物保藏信息

LMBP 9680CB 2012.06.04

(71)申请人 埃博灵克斯股份有限公司

地址 比利时根特-茨维纳德

(72)发明人 尤迪特·鲍迈斯特

玛丽-葆拉·吕西安娜·阿曼达·
布什

卡罗·布东 玛丽-安格·比斯

维尔勒·斯诺尔克

斯特凡妮·斯塔埃朗

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 吴小明

(51)Int.Cl.

C07K 16/00(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/42(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书57页

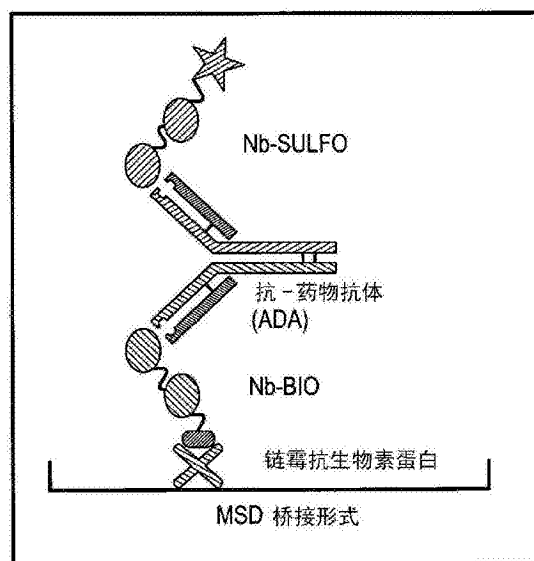
序列表74页 附图16页

(54)发明名称

用于预测、检测和减少涉及免疫球蛋白单可变结构域的测定法中的非特异性蛋白干扰的技术

(57)摘要

本发明提供,并且在某些具体但非限制性的方面中涉及:方法,所述方法用于修饰和/或改进 ISV's从而消除或减少其产生所述蛋白干扰或所述信号的倾向;-可以引入 ISV的修饰,其消除或减少所述 ISV产生所述蛋白干扰或所述信号的倾向;-被特异性选择(例如,使用本文所述的测定法)从而不具有或具有较低/减小的产生所述蛋白干扰或所述信号的倾向的 ISV's;-被修饰和/或改进的 ISV's,其不具有或具有较低/减小的产生所述蛋白干扰或所述信号的倾向。



1. 基于ISV的生物制品,其包含一种或多种ISV并且另外包含一种或多种其它的治疗结构部分和/或一种或多种影响所述基于ISV的生物制品的药物代谢动力学或药效学性质的其它结构部分,其中所述基于ISV的生物制品在其C-末端具有ISV,该ISV在其C-端具有序列VTVSS (X)_n,其中n=1至10并且X表示独立地选自天然存在的氨基酸的氨基酸残基。

2. 根据权利要求1所述的基于ISV的生物制品,其中所述一种或多种其它结构部分影响所述基于ISV的生物制品的半衰期。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的基于ISV的生物制品,其中所述一种或多种其它结构部分增加所述基于ISV的生物制品的半衰期。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其中n=1、2、3、4或5。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其中每个X独立地选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其中

a) n=1、2或3,其中每个X=Ala或Gly;或

b) n=1、2或3,其中每个X=Ala;或

c) n=1、2或3,其中每个X=Gly;或

d) n=2或3,其中至少一个X=Ala或Gly;或

e) n=2或3,其中除了一个X之外所有的X=Ala或Gly。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其中

a) X是Ala,并且n是1、2或3;或

b) X是Gly,并且n是2或3。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其中X是Ala并且n是1。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其中所述ISV已经通过在C-端区引入一个或多个氨基酸取代、添加或缺失进行修饰,所述C-端区包含C-端序列VTVSS (SEQ ID NO:33) 和位置11、13、14、15、82、82a、82b、83、84、107和108处的氨基酸残基。

10. 根据权利要求9所述的基于ISV的生物制品,其中所述ISV在C-末端已经通过在所述C-端区引入一个或多个氨基酸取代进行修饰。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,所述基于ISV的生物制品与相同的但是不具有所述修饰的基于ISV的生物制品相比具有基本减小的产生蛋白干扰的倾向(如至少统计学上相关减小的倾向)。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,所述基于ISV的生物制品与相同的但是不具有所述修饰的基于ISV的生物制品相比,在实施例3所述的测定法中具有基本减小的与实施例2所述的多克隆抗体结合的能力。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,所述基于ISV的生物制品与相同的但是不具有所述修饰的基于ISV的生物制品相比,在实施例5所述的测定法中具有基本减小的与实施例2所述的多克隆抗体结合的能力。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其中每个ISV是VHH、序列优化的VHH、人源化的VHH或骆驼源化的VH,如骆驼源化的人VH。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其中所述一种或多种其它结合部分包含肽或结合单元,所述肽或结合单元可以与血清蛋白如血清白蛋白结合。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其中每个ISV是人源化的VHH或骆驼源化的VH,如骆驼源化的人VH。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其中所述一种或多种其它结构部分包含结合血清-白蛋白的ISV。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其在人受试者中具有至少3天的以 $t_{1/2-\beta}$ 表示的半衰期。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其在治疗方法中使用。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其在治疗方法中使用,其中所述治疗包括治疗人的慢性疾病。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的基于ISV的生物制品,其在治疗方法中使用,其中所述治疗包括治疗人的慢性疾病。

22. 药物组合物,所述药物组合物包含:根据权利要求1至21中任一项所述的基于ISV的生物制品,以及至少一种适合的载体、稀释剂或赋形剂。

用于预测、检测和减少涉及免疫球蛋白单可变结构域的测定法中的非特异性蛋白干扰的技术

[0001] 本申请是申请日为2012年6月25日、发明名称为“用于预测、检测和减少涉及免疫球蛋白单可变结构域的测定法中的非特异性蛋白干扰的技术”的中国专利申请No.201280030902.9的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及免疫球蛋白单可变结构域领域。

背景技术

[0003] 免疫球蛋白单可变结构域或“ISV”在本文中通常定义为这样的氨基酸序列，其

[0004] -包含免疫球蛋白折叠或在适合的条件(如生理条件下)能够形成免疫球蛋白折叠(即通过折叠)，即从而形成免疫球蛋白可变结构域(如，例如，VH，VL或VHH结构域)；

[0005] 和

[0006] -形成(或在这样适合的条件(如生理条件下)能够形成)免疫球蛋白可变结构域，其包含功能性抗原结合位点(在其不需要与另一个免疫球蛋白可变结构域相互作用(如VH-VL相互作用)以形成功能性抗原结合位点的意义上)。

[0007] 本领域目前已知的免疫球蛋白单可变结构域的一些实例是VHH's和/或(其它)纳米抗体，dAb's和(单)结构域抗体。在这些之中，到提交本申请之日时，各种纳米抗体处于I期和II期临床试验中。这使得获得可靠的测定法变得重要，所述测定法用于分析来自用ISV's治疗的人(如临床试验受试者，和在所述ISV's上市后，用所述ISV's治疗的患者)的生物样品。

[0008] 这不仅对于管理目的是重要的，而且对于用生物药物治疗患者也是重要的，因为开出所述治疗处方的临床医生也希望获得监测治疗的各个方面的可靠测定法。

[0009] 例如，在生物药物分子的临床开发中，重要的是评估它们的免疫原潜力，以及具体地它们可以激发所谓“抗-药物抗体”或“ADA's”的程度。这可以使用所谓的“抗-药物抗体”或“ADA's”(免疫测定法)进行测定(见例如Shankar等的综述，Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis(药物和生物医学分析杂志)，48(2008)，1267-1281；以及Mire-Sluis等，J.Immunol.Meth.289(2004)，1-16；Peng等，Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis(药物和生物医学分析杂志)，54，(2011)，629-635；和Loyet等，J.Immunol.Meth.345(2009)，17-28。所述ADA测定法和进行该测定法的方法是药学领域的标准常识并且在生物药物产品的临床开发中常规使用它们(并且也为世界上的各个管理机构所要求)。

[0010] 例如，如在Mire-Sluis的文章第3和第4页上所述，并且如例如也在Peng的文章的图中示意性地举例，已知许多不同的ADA测定法形式，如“ELISA-桥接形式”，“ELISA-直接形式”，“间接形式”，放射免疫沉淀测定法(RIP)，“表面等离子共振”和“电化学发光-桥接形式”。本领域技术人员清楚进行ADA免疫测定法的其它形式。

[0011] 技术人员也熟悉许多不同的商购技术平台,其已经显示适合于建立和进行ADA测定法。这些包括但不限于MSD平台(Mesoscale),Gyrolab(Gyros)和octet平台(Fortebio)。

[0012] ADA测定形式的一些非限制性实例也在图1A-1C中示意性地显示。

[0013] 通常,应该注意在这些用于检测或测量针对ISV的ADA's的ADA测定法中,ISV用作“分析试剂”(即,作为用于检测任何ADA's在测试样品中是否存在的化合物),并且ADA's是“抗原”(即,在测试的样品中待检测的化合物)。因此,在这些测定法中,ISV通常/经常结合于载体(如ELISA板),而ADA's(如果存在)在进行测定法的样品中存在。

[0014] 为了更好地理解本文所述的本发明,也应该注意-作为对比-在本文中用于预测ISV是否产生蛋白干扰的方法中,ISV通常用作“抗原”(即,作为待检测的化合物),并且抗体(其如本文进一步所述)用作“分析试剂”(即作为分别检测给定的ISV是否结合;并且由此分别检测其是否具有产生蛋白干扰的较高或增加的风险的工具)。因此,在根据本发明的这种方法中,用作分析试剂的抗体(其在本文中也称为“分析抗体”)通常结合于载体(即结合于ELISA板),并且ISV(存在)于待测试的样品中。然而,通常应该注意到本发明不限于其中“分析抗体”结合于载体的测定法。例如,在进行根据本发明的测定法的备选方法中(如例如在图1中显示并且在实施例中描述),分析抗体替代性地用作桥接剂(bridging agent),并且因此在溶液中而不是结合于板(尽管其通过包被在板上的ISV间接结合于板)。然而,也在实施例中所述的特异性桥接测定法中(其是竞争性测定法),分析抗体仍旧用作分析试剂(即,分别确定目的ISV是否结合;并且因此分别确定其是否具有产生蛋白干扰的较高风险或增加的风险)。还设想,基于本文进一步的公开内容,技术人员能够设计其他的测定形式,其中分析抗体可以用作分析试剂从而分别确定给定的ISV是否能够结合;并由此确定其是否具有产生蛋白干扰的较高或增加的风险)。

[0015] 作为研究单链Fv's或“ScFv's”(其是包含免疫球蛋白单可变结构域的构建体,并且类似于ISV's,不与恒定结构域缔合)的结果,已经在本领域中描述,免疫球蛋白可变结构域的C端形成疏水补片(hydrophobic patch),其在抗体中被埋在可变结构域和恒定结构域之间的界面中,但是当可变结构域不与恒定结构域缔合时,成为溶剂-暴露的(Nieba等, Protein Engineering, 10, 435-444 (1997))。还描述了暴露的C-端可以形成B-细胞表位,其可以产生抗-药物抗体和/或与(新出现和/或预先存在的)抗-药物抗体相互作用(WO 11/07586),可以接着使用上述提及的ADA测定法来确定它的存在。为此原因,已经提议对形成可变结构域的C-端的部分的一些氨基酸残基进行突变以减少所述疏水性和/或去除所述表位。例如,Nieba等提议突变VH区的位置11,14,41,84,87和/或89(按照Kabat编号),而在WO 11/07586中,提议突变VL结构域的位置99,101和/或148(AHo编号)或VH结构域的位置12,97,98,99,103和/或144(也是AHo编号-这些位置对应于根据Kabat的位置11,83,84,85,89和103)。

[0016] 然而,这些参考文献中都没有意识到在受试者的血液或血清中存在的某些蛋白会干扰涉及ISV's的ADA测定法,并且因为此,这些文献中并不涉及(也没有提供方案给)这样的问题,即在所述ADA测定法中怎样避免非特异性蛋白干扰,从而允许ADA测定法用于确定待测试样品中(新出现或已经存在的)抗-药物抗体的真实存在/程度。

发明内容

[0017] 作为对比,本发明提供这样的方法和测定法,其容易使技术人员预测免疫球蛋白单可变结构域是否具有在ADA测定法中遭受非特异性蛋白干扰的倾向。本文所述的方法和测定法还允许技术人员,在发现可变结构域可能具有在ADA测定法中遭受所述蛋白干扰的倾向或风险时,容易测试可变结构域(提议)的修饰从而预测任何这样(提议)的修饰是否减少或基本上完全避免这样的蛋白干扰。

[0018] 本发明还描述了可以对可变结构域进行许多修饰从而减少或基本避免这样的蛋白干扰。根据一个非限制性的方面,这种修饰包括将有限量(如本文进一步所述)的氨基酸残基(如本文进一步所述)添加到可变结构域的C-末端。令人惊奇的是,已经发现对于许多基于其的不同的可变结构域或构建体,甚至将单氨基酸残基加入C-末端(如单丙氨酸残基)也可以充分地或甚至基本上完全消除ADA测定法中的蛋白干扰问题,即使加入一个这样的氨基酸本身不足以“覆盖”或“包埋”根据Nieba等存在于ISV的C-端的疏水片也是如此。类似地,但是不希望以任何方式限制本发明或限于任何机制或解释,还认为加入一个这样的氨基酸不足以“覆盖”或“包埋”根据W011/07586所述可能存在于可变结构域的C-端的任何B-细胞表位。还应该注意,尽管根据本发明这一具体方面,在可变结构域的C-端加入有限量的氨基酸或甚至单氨基酸(即,在C-端区本身内不进行任何取代,如由Nieba等和W0 11/07586所提议的)可以-并且在许多情形中-明显减少或甚至基本上去除非特异性蛋白干扰的问题,但是在C-端末端的这样的添加与C-端区突变的组合也在本发明这一方面的范围内。然而,在该方面中,还应该注意,本发明不具体受限于进行这些突变背后的基本原理。例如,本领域公知在C-端内对氨基酸残基进行突变(包括由Nieba等和在W0 11/07586中清楚提及的那些位置)从而对可变结构域(包括,但不限于V_H结构域)进行人源化或从而对V_H结构域进行“骆驼源化”(例如参考W0 08/020079和本文提及的Ablinx N.V.的一些其它申请)。

[0019] 认为本文教导的方法,测定法和修饰可以应用于任何这样的可变结构域,其不与恒定结构域(或用功能为“遮蔽”、覆盖或“包埋”可变结构域的C-端区的其他基团或肽结构部分)连接或不以其他方式与恒定结构域(或用功能为“遮蔽”、覆盖或“包埋”可变结构域的C-端区的其他基团或肽结构部分)缔合并更通常,应用于具有溶剂-暴露的C-端区的任何可变结构域。然而,根据本发明一个优选的,但非限制性方面,所述方法,测定法和修饰可以具体地应用于重链可变结构域(V_H结构域),并且根据本发明的一个具体方面,应用于V_H结构域。

[0020] 还认为本文所述的方法,测定法和修饰可以适当地应用于包含一个或多个可变结构域的蛋白构建体,并且具体地应用于其中可变结构域形成所述构建体的C-端部分的构建体,或在本文所述的方法和测定法情形中,具体应用于其中可变结构域的C-端区是溶剂-暴露的构建体。此外,根据本发明的一个优选但非限制性方面,所述方法,测定法和修饰应用于这样的构建体,其中V_H结构域(并且具体地,V_H结构域)形成构建体的C-端部分,或在本发明的方法和测定法情形中,是溶剂-暴露的。

[0021] 所述构建体的一些非限制性实例是多价、多特异性的(如双特异性)或多互补位(如双互补位)构建体,其包含两个以上直接连接的ISV's或通过一个或多个适合接头连接(根据一个具体方面,也用V_H或V_H结构域连接)的ISV's,所述ISV's形成所述构建体的C-端部分。例如,但不限于,所述构建体可以完全包含也是直接连接的或通过一个或多个适合的

接头连接的V_H结构域,具体地纳米抗体(即,V_{HH}结构域,人源化的V_{HH}结构域或骆驼源化的V_H结构域)。对于这些构建体和怎样构建这些构建体(具体地基于纳米抗体)的通常教导的一些非限制性实例,例如参考Conrath等,JBC 276,10(9),7346(2001)以及Muyldermans.Reviews in Mol.Biotechnol.(分子生物技术综述),74:27(2001)的综述文章。

[0022] 然而,例如还认为本发明可应用于具有溶剂-暴露的可变结构域的其他构建体并且具体地在其C-端具有可变结构域的构建体,如例如单链Fv's,具体地在C-端具有它们的重链可变结构域的ScFv's。

[0023] 在本发明的说明书和权利要求中,术语如“ISV”,“分析试剂”和“蛋白干扰”具有如本文进一步定义的含义。

[0024] 具体地,如本文所述的ISV可以具体地是纳米抗体,或(其它)ISV(即,不同于纳米抗体),其是V_H结构域或包含V_H结构域;并且优选地是纳米抗体。

[0025] 此外,包含ISV的任何蛋白或多肽(如基于ISV的药物)优选地在其C-末端端具有所述(或至少一个)这样的ISV。此外,所述的ISV可以具体地是纳米抗体,或(其它)ISV(即,不同于纳米抗体),其是V_H结构域或包含V_H结构域;并且优选地是纳米抗体。

[0026] 本文所述的发明具体地意欲并且适合应用于ISVs,其包含,基于和/或衍生自重链可变结构域,如V_H结构域(包括人V_H结构域)和纳米抗体如V_{HH}结构域(包括人源化的和序列优化的V_{HH}结构域)或骆驼源化的V_H结构域。这些可以是合成的(例如,从合成库起始获得和/或基于固定的构架区),半合成的(例如人源化的,骆驼源化或序列优化的,或从天然V_H或V_{HH}结构域开始,通过亲和力成熟或CDR移植获得)或完全天然存在的V_H或V_{HH}结构域。因此本发明关于作为V_H或V_{HH}结构域,基于V_H或V_{HH}结构域和/或衍生自V_H或V_{HH}结构域的ISV's如本文进一步所述。

[0027] 在产生本发明时,已经发现在一些用于分析生物样品(如血液样品,包括全血、血清和血浆、眼泪、支气管肺泡液/BALF、脑脊髓液或生物流体的其他样品)的测定法(如,例如在ADA免疫测定法中)中,可能存在蛋白干扰,并且这样的蛋白干扰可能在一些这样的测定法和/或在一些这样的样品中产生非特异性信号。已经发现,这样的蛋白干扰不仅在获自用ISV's(和具体地,用纳米抗体;或用包含至少一种所述ISV或纳米抗体的蛋白,多肽或其他生物药物)治疗的受试者和/或已经施用了其的受试者(如患者或临床试验受试者)的样品中存在,而且在从未接受ISV的受试者中也存在(说明所述干扰可能是由于与预先存在的蛋白而不是与任何新出现的ADA's的非特异性蛋白-蛋白相互作用产生的)。

[0028] 尽管已经发现在这些测定法中这样的蛋白干扰和/或所述信号不与ISV's的药物性质(如药物代谢动力学/PK或药效学/PD性质)的任何变化或减少相关,但是还是需要获得这样的技术,其用于预测、检测、减少和/或(如果可能)避免这样的非特异性蛋白干扰。这是本发明的一般目的。

[0029] 具体地,本发明提供,并且在某些具体的但非限制性方面涉及:

[0030] -测定法,其可以用于预测给定的ISV是否在这样的测定法(如例如在ADA免疫测定法中)中遭受这样的蛋白干扰和/或产生这样的(非特异)信号。这样的预测性测定法可以例如用于测试给定的ISV是否具有产生这样的蛋白干扰和/或这样的信号的倾向;用于选择不易产生或较不容易产生这样的蛋白干扰或产生这样的信号的ISV's;作为这样的测定法

或测试,其可以用于测试对ISV的某些修饰是否(完全或部分)减少其产生这样的干扰或这样的信号的倾向;和/或作为这样的测定法或测试,其可以用于指导ISV的修饰或改进从而减少其产生这样的蛋白干扰或信号的倾向;

[0031] -用于修饰和/或改进ISV's从而消除或减少其产生这样的蛋白干扰或这样的信号的倾向;

[0032] -可以被引入ISV从而消除或减少其产生这样的蛋白干扰或这样的信号的倾向的修饰;

[0033] -可以被特异性选择(例如,使用本文所述的测定法)从而不具有或具有较低/减少的产生这样的蛋白干扰或这样的信号的倾向的ISV's;

[0034] -不具有或具有较低/减少的产生这样的蛋白干扰或这样的信号的倾向的修饰和/或改进的ISV's。

[0035] 例如,在第一个非限制性方面中,本发明涉及这样的方法,其可以用于预测给定的ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)是否在免疫测定法中产生(或具有较高或增加的风险产生)蛋白干扰(即,在其施用于受试者后,生物流体的样品获自所述受试者,并且所述样品进行如本文进一步所述的免疫测定法),所述方法包括进行这样的免疫测定法,其至少包括下述步骤:

[0036] (i) 使所述ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)与这样的抗体接触,所述抗体获自人受试者并且已经基于它们识别和/或结合ISV或纳米抗体的C-端末端的能力进行选择,产生和/或分离(“分析抗体”);和

[0037] (ii) 确定所述ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)是否在所述免疫测定法中与所述抗体结合。

[0038] 在这种方法中,当所述ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物与所述分析抗体结合时,可以预期所述ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物将产生(或具有较高或增加的风险产生)这样的蛋白干扰(如本文进一步所述)。基于此,例如,可以修饰或改进所述ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物从而减少或消除其产生这样的蛋白干扰的倾向(其也可以使用上述测定法进行测定),并且可以用于修饰所述ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物的一些策略如本文所述(例如,包括将少量的氨基酸残基连接于C-端末端和/或引入一个或多个具体氨基酸取代)。

[0039] 因此,一般地,本发明使技术人员获得这样的测定法和方法/技术,其可以用于预测ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物产生蛋白干扰的倾向和/或作为改进ISVs,从而减少或避免它们产生蛋白干扰的倾向的工具。这样做的时候,本发明还给技术人员提供选择ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物的手段,该选择是基于它们产生蛋白干扰的较低或减少的能力(或缺乏任何能力)进行的。因此,本发明给技术人员提供重要的测定法和工具,其可以用在优化和开发ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物中。

[0040] 此外,如本文进一步所述,本发明教导技术人员许多这样的方法,其中可以修饰或改进ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物从而减少或避免它们产生蛋白干扰的倾向。因此本发明通常还获得了具有减少的、较低的或不具有任何产生蛋白干扰倾向的修饰和/或改进的ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物。

[0041] 如本文进一步所述,本发明可以具体地用于预测给定的ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)是否在免疫测定法中,和更具体地在ADA测定法中产生蛋白干扰(如本文进一步所述)。所述ADA测定法可以通常例如是用于检测或测量针对ISV's的ADA's的ADA测定法,并且可以具体地是用于检测或测量针对在上述步骤(i)和(ii)中所用的ISV的ADA's的ADA测定法。

[0042] 此外,如本文提及,如本文所述的ISV可以具体的是这样的纳米抗体或(其它)ISV(即,不同于纳米抗体),其是VH结构域或包含VH结构域;并且优选地是纳米抗体。

[0043] 此外,包含ISV的任何蛋白或多肽(如基于ISV的药物)优选地在其C-末端端具有所述(或至少一种)这样的ISV。此外,所述ISV可以具体地是这样的纳米抗体或(其它)ISV(即,不同于纳米抗体),其是VH结构域或包含VH结构域;优选地是纳米抗体。

[0044] 在所述免疫测定法或ADA测定法中测试的样品在本文中也称为“测试样品”或“测定样品”。为避免混淆,诸如“测试样品”或“测定样品”不应该与在本文中用作获得在本发明中使用的(多克隆或单克隆)“分析抗体”的原料的生物样品混淆。

[0045] 在一个特别优选但是非限制性的方面中,本发明可以用于预测给定的ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)是否将在包括使用所述ISV的免疫测定法中(和具体地,在ADA测定法中)产生蛋白干扰(如本文进一步所述)。此外,所述ADA测定法可以通常例如是用于检测或测量针对ISV's的ADA's的ADA测定法,并且可以具体地是用于检测或测量针对在上述步骤(i)和(ii)中所用的ISV的ADA's的ADA测定法。

[0046] 在甚至更具体的但非限制性的方面中,本发明可以用于预测给定的ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)是否将在免疫测定法中(和具体地,在ADA测定法中)产生蛋白干扰(如本文进一步所述),所述免疫测定法意欲确定或测量所述样品是否包含任何针对ISV的ADA's。此外,例如,所述免疫测定法可以是一种已知类型的ADA测定法(关于其例如参考本文引用的关于ADA测定法的现有技术)(进行所述ADA测定法以确定或测量是否在“测试样品”中存在任何针对所述ISV的ADA's),其中所述测试样品是获自己已经施用了所述ISV的受试者(如本文进一步所述)的生物流体的样品(如本文所述)。

[0047] 如本文进一步所述,在所有这些方面(和本文所述的本发明的其他方面)中,本发明还可以用于选择在所述免疫测定法或ADA测定法中不易产生或较不容易产生这样的蛋白干扰的ISV's;作为这样的测定法或测试,其可以用于测试ISV的某些修饰是否(完全或部分)减少其在所述免疫测定法或ADA测定法中产生所述干扰的倾向;和/或作为这样的测定法或测试,其可以用于指导ISV的修饰或改进从而减少其在所述免疫测定法或ADA测定法中产生这样的蛋白干扰的倾向。

[0048] 本发明的其他方面,实施方案,优势和应用将通过本文进一步描述变得清楚。

[0049] 在本发明的说明书中,无论何时使用术语“ISV”,其应该理解为:

[0050] -所述ISV优选地是纳米抗体,其中术语“纳米抗体”通常如在WO 08/020079或WO 09/138519中定义,并且因此在具体的方面中通常指VHH,人源化的VHH或骆驼源化的VH(如骆驼源化的人VH)或通常指序列优化的VHH(如例如关于化学稳定性和/或溶解性、与已知人构架区的最大重叠和最大表达优化的)。注意术语纳米抗体(Nanobody)或纳米抗体(Nanobodies)是Ablynx N.V.的注册商标并且因此也可以称为Nanobody®和/或Nanobodies®);

[0051] 术语“ISV”在其最广泛的意义上还包括“基于ISV的生物制品”，并且当ISV是纳米抗体时，包括“基于纳米抗体的生物制品”。“基于ISV的生物制品”在本文中定义为包含至少一种(如一种，两种或三种) ISV's或基本由其组成的蛋白，多肽或其他生物药物。类似地，“基于纳米抗体的生物制品”定义为包含至少一种(如一种，两种或三种) 纳米抗体或基本由其组成的蛋白，多肽或其他生物药物。关于术语“ISV”，无论何时使用术语“基于ISV的生物制品”，应该理解所述基于ISV的生物制品优选地是基于纳米抗体的生物制品。在本发明的背景中，“基于ISV的生物制品”和基于纳米抗体的生物制品”可以例如分别是单价，二价(或多价)，双特异性(或多特异性) 和双互补位(或多互补位) ISV构建体或纳米抗体构建体。此外，除了一种或多种(如一种，两种或三种) ISV's或纳米抗体之外，任何基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品，任选地还包含一种或多种(如一种或两种) 其他治疗结构部分和/或一种或多种(如一种或两种) 影响基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品的药物代谢动力学或药效学性质(如其半衰期) 的其它结构部分。这些其他治疗剂或其他结构部分的适合的实例对于技术人员是清楚的，并且例如一般可以包括任何治疗活性蛋白，多肽或其他结合结构域或结合单元，以及例如修饰如在WO 09/138159的第149-152页上描述的那些。基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品优选地是治疗剂或意欲用作治疗剂(其包括预防和诊断)，并且为此目的优选地包含至少一种针对治疗相关靶标(如例如RANK-L, vWF, IgE, RSV, CXCR4, IL-23或其他白介素等) 的ISV。对于所述基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品的一些具体的但非限制性的实例，例如参考Ablynx N.V. 的各个申请(如例如但不限于WO 2004/062551、WO 2006/122825、WO 2008/020079和WO 2009/068627)，以及例如(但不限于) 申请如WO 06/038027, WO 06/059108, WO 07/063308, WO 07/063311, WO 07/066016和WO 07/085814。此外，在本申请说明书中，除非另外清楚提及，所有本文提及的术语具有在WO 09/138519(或在WO 09/138519引用的现有技术中) 或WO 08/020079(或在WO 08/020079引用的现有技术) 中给定的含义。此外，如果方法或技术没有具体在本文中描述，其可以如在WO 09/138519(或在WO 09/138519中引用的现有技术) 或WO 08/020079(或在WO 08/020079引用的现有技术) 中所述进行。

[0052] 具体地，下述术语具有与在WO 09/138519的第62-75页上给出的含义相同的含义，和/或如果适用时可以在该页上所述的方式进行确定：“激动剂”，“拮抗剂”，“逆激动剂”，“非极性，不带电荷氨基酸残基”，“极性，不带电荷氨基酸残基”，“极性，带电荷氨基酸残基”，“序列同一性”，“精确相同”和“氨基酸差异”(当提及两个氨基酸序列的比较时)，“(以) 基本分离的(形式)”，“结构域”，“结合结构域”，“抗原决定簇”，“表位”，“针对”或“针对”(抗原)，“特异性”和“半衰期”。此外，术语“调节”和“待调节”，“相互作用位点”，“特异于”，“交叉-阻断(cross-block)”，“交叉阻断的(cross-blocked)”和“交叉阻断(cross-blocking)”和“基本独立于pH”如在申请人的WO 10/130832第74-79页上定义(和/或可以如在该页上所述)。此外，当提及本发明的构建体、化合物、蛋白质或多肽时，术语如“单价”，“二价”(或“多价”)，“双特异性”(或“多特异性”)，和“二互补位”(或“多互补位”)可以具有在WO 09/138.519, WO 10/130832或WO 08/020079中所述的含义。

[0053] 在本文使用时，关于ISV、纳米抗体、基于ISV的生物制品、基于纳米抗体的生物制品或任何其它氨基酸序列、化合物或多肽的术语“半衰期”可以通常如在WO 08/020079的第57页上的段落o)中所述定义，并且如本文提及时，指在体内例如由于通过天然机制降解序

列或化合物和/或清除或螯合序列或化合物而使氨基酸序列、化合物或多肽的血清浓度减少50%所需的时间。本发明的氨基酸序列、化合物或多肽的体内半衰期可以以任何本身已知的方式,如通过药物代谢动力学分析进行确定。适合的技术对于本领域技术人员是显而易见的,并且可以通常例如如在W0 08/020079的第57页上的段落o)中所述。也如在W0 08/020079的第57页上的段落o)中所提及,可以使用参数如 $t_{1/2-\alpha}$ 、 $t_{1/2-\beta}$ 和曲线下面积(AUC)表示半衰期。在该方面,应该注意术语“半衰期”在本文中使用具体指 $t_{1/2-\beta}$ 或终末半衰期(其中 $t_{1/2-\alpha}$ 和/或AUC都可以不用考虑)。参考例如下面的实验部分以及标准手册,如Kenneth, A等:Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists (药物的化学稳定性:药剂师手册)和Peters等, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (药物代谢动力学分析:实践方法) (1996)。还参考“Pharmacokinetics (药物代谢动力学)”, M Gibaldi & D Perron, Marcel Dekker出版, 第2版, (1982)。类似地,术语“半衰期增加”或“增加的半衰期”也如在W0 08/020079的第57页上的段落o)中定义并且具体地指 $t_{1/2-\beta}$ 增加,伴随或不伴随 $t_{1/2-\alpha}$ 和/或AUC或两者的增加。

[0054] 当术语未在本文具体定义时,其具有本领域中为技术人员所知晓的通常含义。例如,参考标准手册如Sambrook等, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆:实验室手册)” (第2版), 第1-3卷, 冷泉港实验室出版(1989); F. Ausubel等编辑, “Current protocols in molecular biology (现代分子生物学手册)”, Green Publishing & Wiley Interscience, New York (1987); Lewin, “Genes II (基因II)”, John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old等, “Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering (基因操作原理:遗传工程介绍)”, 第2版, 加利福尼亚大学出版, Berkeley, CA (1981); Roitt等, “Immunology (免疫学)” (第6版), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt等, Roitt's Essential Immunology (Roitt's基本免疫学), 第10版. Blackwell Publishing, UK (2001); 和Janeway等, “免疫生物学 (Immunobiology)” (第6版), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005), 以及参考本文引用的一般背景技术。

[0055] 此外,在本文中,纳米抗体的氨基酸残基根据Kabat等给出的关于VH结构域的一般编号方式进行编号(“Sequence of proteins of immunological interest (免疫学目的蛋白序列)”, US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, 出版号91), 如在Riechmann和Muyldermans, J. Immunol. Methods (免疫方法杂志) 2000年6月23日; 240 (1-2): 185-195中应用于来自骆驼科动物(Camelids)的VHH结构域;或在本文提及。根据该编号方式,纳米抗体的FR1包含在位置1-30的氨基酸残基,纳米抗体的CDR1包含在位置31-35的氨基酸残基,纳米抗体的FR2包含在位置36-49的氨基酸,纳米抗体的CDR2包含在位置50-65的氨基酸残基,纳米抗体的FR3包含在位置66-94的氨基酸残基,纳米抗体的CDR3包含在位置95-102的氨基酸残基,纳米抗体的FR4包含在位置103-113的氨基酸残基。[在这一方面中,应该注意-如本领域关于VH结构域和VHH结构域所熟知的-在每个CDR's中的氨基酸残基的总数可以变化并且可以不对应于由Kabat编号所指定的氨基酸残基的总数(即,根据Kabat编号方式的一个或多个位置可以不由实际序列占满,或实际序列可以包含多于Kabat编号方式所允许数目的氨基酸残基)。这一般意为,根据Kabat的编号方式可以对应于或可以不对应于实际序列中的氨基酸残基的实际编号。然而,一般认为,根据Kabat的编号方式并且不考虑CDR's中的

氨基酸残基数目,根据Kabat编号方式的位置1对应于FR1的开始并且反之亦然,根据Kabat编号方式的位置36对应于FR2的开始并且反之亦然,根据Kabat编号方式的位置66对应于FR3的开始并且反之亦然,并且根据Kabat编号方式的位置103对应于FR4的开始并且反之亦然]。

[0056] 用于对VH结构域的氨基酸残基进行编号的备选方法(所述方法也可以以类似于来自骆驼科动物的VHH结构域和纳米抗体的方式应用),是Chothia等所述的方法(自然(Nature) 342,877-883(1989)),所谓“AbM定义”和所谓“接触定义”。然而,在本发明的说明书,方面和附图中,将遵循Riechmann和Muyldermans的应用于VHH结构域的根据Kabat的编号方式,除非另外指出。

[0057] 还应该注意提供附图,任何序列表和实验部分/实施例仅是为了进一步举例说明本发明并且不应该以任何方式被解释或阐释为限制本发明的范围和/或后附的权利要求,除非本文另外清楚指出。

[0058] 还应该注意,本发明不具体限于任何关于在本发明中观察到或根据本发明可以被减少的蛋白干扰(和/或在免疫测定法中产生的信号)的任何起因,解释,假说或机制。然而,认为某些个体或个体群体的血液或血清(或其他生物流体,如本文提及的那些)可以包含某些(预先存在)的蛋白,其在某些情形下可以(非特异性地)结合于ISV's,导致在某些测定法(其用于分析 获自所述个体的血液或血清样品)中的干扰信号。这特别基于在产生本发明中所做的观察,即由本发明所解决的非特异性蛋白干扰不仅在测定获自预先施用了ISV的受试者的样品时存在,而且在测定获自预先未接受ISV的受试者中获得的样品时也会存在。

[0059] 具体地,基于在产生本发明时的观察,并且尽管本发明并不限于此,但是认为所述(预先存在)的蛋白可以具体地(能够)结合于该ISV's的C-末端(在全长的常规4-链单克隆抗体中以及在骆驼科动物中发现的“仅重链”抗体中,其与抗体的剩余部分连接-即分别与常规单克隆抗体中的CH1区连接-和与骆驼科动物重链抗体中的铰链区连接-并因此在所述全长抗体中可以免受这样的蛋白干扰)。

[0060] 这通过本发明发明人在形成本发明时的发现(所述发现如本文进一步所述)所证实,即ISV's在其C-末端的某些(简单)修饰可以基本上减少或基本上防止这样的蛋白干扰。因此,用于以这种方式修饰ISV's的方法以及已经以这种方式修饰的ISV's形成本发明的其他方面,如本文进一步所述。

[0061] 本发明具体地可以用于减少或避免由于在免疫测定法中的非特异性结合所导致的蛋白干扰和/或信号,所述免疫测定法在获自受试者的生物样品(如血液或血清样品)上进行,所述受试者已经被施用了(生物制品)药物(再一次,所述样品在本文中也称为“测试样品”或“测定样品”)。其一些实例是用于在向受试者施用生物学药物后表征药物处置和抗体形成的免疫测定法,如在由欧洲药物管理机构(EMA)的人用医药产品委员会(CHMP)(Committee for Medicinal Products for Human Use(CHMP) of the European Medicines Agency(EMA).)所颁发的“Guideline on the Clinical Investigation of the Pharmacokinetics of Therapeutic proteins(治疗蛋白的药物代谢动力学的临床研究指导)”(日期为2007年1月27日的文件CHMP/EWP/89249/2004)中提及的那些。如在该文献的第4和第5页上所指出的:

[0062] “已经鉴定了一些可能的缺陷并且其可能导致药物处置和抗体形成的错误表征。

应该考虑下述问题[...]:

[0063] 免疫测定法

[0064] 药物测定法:

[0065] [...]

[0066] (iii) 内源物质的干扰.

[0067] (iv) 血浆成分或抗-药物抗体与分析物结合并且抑制与捕获抗体的互补性结合的干扰”

[0068] 本发明可以具体地用于预测,减少或避免在用于分析取自受试者的生物流体的测试样品/测定样品中的免疫测定法中的这种类型的干扰,所述受试者已经施用了ISV's (和具体地纳米抗体;或基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品,如本文进一步所述)。

[0069] 本发明可以具体地用于预测,减少或避免免疫测定法中这种类型的(非特异性)蛋白干扰,所述免疫测定法用于表征药物处置和/或用于确定任何ADA's (抗-药物) 抗体的形成。在这一方面,应该注意通常在本发明说明书和后附的权利要求中,当使用短语如“预测,减少或避免蛋白干扰时”,这不仅包括预测,减少或避免这样的蛋白干扰本身,一般还包括预测,减少或避免在免疫测定法(如其中可以存在与蛋白干扰相关(非特异性)信号的那些,如在ADA测定法中)中出现非特异性信号,和具体地在所述免疫测定法中,预测,减少或避免非特异性信号的出现,当所述非特异性信号在该测定法中观察到时,它们通常归因于(非特异性)蛋白干扰,与其相关和/或被视为(非特异性)蛋白干扰的迹象。在这一方面,通常应该注意,如在本文提及,本发明不特别限于任何起因,解释,假说或机制。

[0070] 在一个具体的,但非限制性的方面中,本发明可以用于预测,避免或减少在“抗-药物抗体”或“ADA”测定法中这样的蛋白干扰,所述测定法在取自受试者的生物流体样品(即“测试样品”)上进行,所述受试者已经被施用了ISV's (和具体地纳米抗体;或基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品,如本文进一步定义)。

[0071] 在另一个具体但非限制性的方面中,本发明可以用于预测,避免或减少在“抗-药物抗体”或“ADA”测定法中这样的蛋白干扰(和/或通常与其相关的非特异性信号),所述测定法用于检测、测量和/或表征针对一种或多种ISV's (和具体地针对纳米抗体;或基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品,如本文进一步定义)的(任何)抗-药物抗体的存在。具体地,本发明可以用于预测,避免或减少在所述“抗-药物抗体”或“ADA”测定法中这样的蛋白干扰,所述测定法在生物流体的样品(即,“测试样品”)上进行,更具体地在已经获自受试者的生物流体的样品上进行,所述受试者已经被施用了一种或多种ISV's或纳米抗体(或基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品,如本文进一步定义)。例如,本发明可以用于在所述“抗-药物抗体”或“ADA”测定法中预测,避免或减少这样的蛋白干扰,所述测定法用于检测、测量和/或表征针对ISV或纳米抗体(或基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品,如本文进一步定义)的(任何)抗-药物抗体的存在,所述ISV或纳米抗体已经被施用于受试者(从所述受试者中获得样品)(在临床试验的背景和/或在治疗的背景中)。

[0072] 因此,在一个具体的,但非限制性的方面中,本发明可以用于预测,避免或减少生物样品(即,“测试样品”)中这样的蛋白干扰(和/或通常与其相关的非特异性信号),所述生物样品获自己已经被施用了一种或多种所述ISV's或纳米抗体(或基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品,如本文进一步定义)的受试者,其中所述样品适合于和/或意欲用于

免疫学测定法中,如ADA测定法。如所提及的,所述生物样品可以是血液(包括全血、血清或血浆),眼泪,支气管肺泡液/BALF,脑脊髓液或任何其它适合用于免疫测定法,和具体地ADA测定法的适合的生物流体或样品。

[0073] 在一个具体的,但非限制性的方面中,所述测试样品可以获自这样的受试者,所述受试者已经进行了多次施用(例如,在至少10天,如至少一个月或更长的时期中至少1-3次的单独施用) ISV、纳米抗体、基于ISV的生物制品(如本文进一步定义)或基于纳米抗体的生物制品(如本文进一步定义)和/或用其进行的长期治疗(即在至少10天如至少一个月期间的治疗)。所述ISV、纳米抗体、基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品可以例如在治疗背景或在临床试验的背景背景下施用于所述受试者。

[0074] 在一个具体的,但非限制性的方面中,所述测试样品可以获自这样的受试者,所述受试者已经被施用(和/或已经被提供了)了这样的ISV、纳米抗体、基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品,所述ISV、纳米抗体、基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品在施用了其的受试者中具有增加的半衰期(如本文定义,并且与单价ISV比较),例如至少1天,优选地至少3天,更优选地至少7天,如至少10天的半衰期。

[0075] 例如但不限于,通过官能化和/或通过构建体中包含增加构建体的半衰期的结构部分或结合单元来给所述ISV、纳米抗体、基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品提供增加的半衰期。技术人员知晓所述官能化,结构部分或结合单元的实例,其可以例如如本文所述,并且例如可包括聚乙二醇化,与血清白蛋白融合,或与可以结合于血清蛋白如血清白蛋白的肽或结合单元(binding unit)融合。所述血清-白蛋白结合肽或结合结构域可以是能够增加构建体的半衰期的(与不具有血清白蛋白结合肽或结合结构域的相同构建体比较)任何适合的血清-白蛋白结合肽或结合结构域,并且可以具体地是如在申请人的WO 2008/068280(和具体地都属于申请人的WO 2009/127691和未预先公开的美国申请61/301,819)中所述的血清白蛋白结合肽,或血清-白蛋白结合ISV(如血清白蛋白结合纳米抗体;例如A1b-1或A1b-1的人源化形式如A1b-8,对于其例如参考WO 06/122787)。

[0076] 因此,在一个具体但非限制性的方面中,所述生物样品可以获自已经施用了这样的ISV、纳米抗体、基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品的受试者,所述ISV、纳米抗体、基于ISV的生物制品或基于纳米抗体的生物制品包含(人)血清白蛋白-结合结合肽或结合结构域。

[0077] 如已在上文提及,在一个非限制性的方面中,本发明通常涉及这样的方法,所述方法可以用于预测给定的ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)在免疫测定法中(即在将所述ISV施用于受试者后,生物流体样品获自所述受试者,并且所述生物流体进行如本文进一步所述的免疫测定法)中是否会产生(或具有较高或增加的倾向产生)蛋白干扰(如本文进一步所述),所述方法包括进行至少包括下述步骤的免疫测定法:

[0078] (i) 使所述ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)与获自人受试者并且已经基于其识别和/或结合ISV或纳米抗体的C-末端末端的能力选择、产生和/或分离的抗体(“分析抗体”)接触;和

[0079] (ii) 确定所述ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)在所述免疫测定法中是否与所述抗体结合。

[0080] 此外,如本文提及,如本文所述的ISV可以具体的是这样的纳米抗体或(其它) ISV

(即,不同于纳米抗体),其是VH结构域或包含VH结构域;优选地是纳米抗体。

[0081] 此外,包含ISV的任何蛋白或多肽(如基于ISV的药物)优选地在其C-末端具有所述(或至少一个)这样的ISV。此外,所述ISV可以具体地是这样的纳米抗体或(其它)ISV(即,不同于纳米抗体),其是VH结构域或包含VH结构域;优选地是纳米抗体。

[0082] 在备选实施方案中,其也如本文进一步所述,取代前述获自人受试者的抗体,可以使用在本文称为“21-4-3”(或简称为“21-4”,见关于VH和VL序列的SEQ ID NO's 35和36)的单克隆抗体。使用杂交瘤技术从用在WO 2006/122825中的SEQ ID NO:98的纳米抗体构建体免疫的小鼠开始,如在实施例7中进一步所述产生21-4,并且将表达21-4的杂交瘤细胞系(称为“ABH0015”)在2012年6月4日保藏于BCCM,Ghent,比利时,保藏号为。已经显示单克隆21-4识别WO 2006/122825中SEQ ID NO:98的纳米抗体构建体的C-端,所述C-末端由针对冯维勒布兰德因子(vWF)产生的纳米抗体(人源化的V_{HH})组成。开始产生21-4作为分析试剂是为了用于检测(血清)样品中的蛋白纳米抗体(具体地,在WO 2006/122825中的SEQ ID NO:98的纳米抗体构建体);令人惊奇的是,现在发现也可以使用21-4来预测ISV是否具有遭受非特异性蛋白干扰的倾向(针对WO 2006/122825中的SEQ ID NO:98的纳米抗体构建体或针对其它纳米抗体产生的一些其它相当的(小鼠)单克隆抗体更是如此)。

[0083] 具体地,已经发现,当根据实施例9给出的方案测定时,如果测量21-4与ISV(或与其C-末端包含ISV的蛋白或多肽,或如本文提及的类似蛋白或多肽)的结合产生少于500的RU值(在根据公式 $[\text{测量的RU}]/[\text{蛋白的MW}] \times 10^6$,关于蛋白的分子量调整测量的RU值后),那么所述ISV或蛋白可能不具有遭受蛋白干扰的倾向(在由下述实施例中提出的数据所提供的置信度内)。为了上述公式的目的,可以将MW计算为在ISV中存在的所有氨基酸残基的所有MW's的总和。

[0084] 因此,本文所述的任何ISV、蛋白或多肽与21-4的结合优选地具有这样的少于500的RU值(根据在实施例9中提出的方案测定,并且在根据上述公式关于所用的ISV或蛋白的分子量调整测量的RU值后)。

[0085] 因此,本发明的该方面通常涉及这样的方法,所述方法可以用于预测给定的ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)在免疫测定法中(即在将所述ISV施用于受试者后,生物流体样品获自所述受试者,并且所述生物流体进行如本文进一步所述的免疫测定法)中是否会产生(或具有较高或增加的倾向产生)蛋白干扰(如本文进一步所述),所述方法包括进行至少包括下述步骤的免疫测定法:

[0086] (i) 使所述ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)与单克隆抗体21-4(即,用作“分析抗体”)接触;和

[0087] (ii) 确定所述ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)在所述免疫测定法中是否与单克隆抗体21-4结合。

[0088] 所述方法可以具体地使用BiaCore或类似技术进行,和更具体地使用在实施例9中提出的方案进行。如本文提及,当ISV或基于ISV的药物在该方案中的结合显示少于500的RU值时(在根据公式 $[\text{测量的RU}]/[\text{蛋白的MW}] \times 10^6$,关于蛋白的分子量调整测量的RU值后),所述ISV或基于ISV的蛋白不可能与在人的血液或血清中存在的任何干扰因子结合和/或不可能具有在ADA测定法中遭受非特异性蛋白干扰的倾向(即在下面的实验部分中提出的置信度内)。

[0089] 此外,如本文提及,如本文所述的ISV可以具体地是这样的纳米抗体或(其它) ISV (即,不同于纳米抗体),其是VH结构域或包含VH结构域;优选地是纳米抗体。

[0090] 此外,包含ISV的任何蛋白或多肽(如基于ISV的药物)优选地在其C-末端端具有所述(或至少一个)这样的ISV。此外,所述ISV可以具体地是这样的纳米抗体或(其它) ISV (即,不同于纳米抗体),其是VH结构域或包含VH结构域;优选地是纳米抗体。

[0091] 也如本文提及,上述使用21-4的方法也可以用于确定ISV或包含ISV的蛋白或多肽是否与人血液或血清中存在的干扰因子结合(或具有与其结合的倾向)。

[0092] 此外,如本文提及,认为所述使用21-4的方法也可以用于预测在其C-末端端具有VH结构域的任何蛋白或多肽(如抗体片段或ScFv) 是否与人血液或血清中的干扰因子结合(或具有与其结合的倾向)和/或是否具有在ADA测定法中遭受蛋白干扰的倾向。

[0093] 除了21-4之外,认为包含21-4的重链和轻链可变结构域(分别见SEQ ID NO's:35和36)或甚至仅包含21-4的CDR序列(适当地移植到其它适合的VH和VK构架中)的抗体或抗体片段(如适合的Fab片段)也可以用在本文所述的方法中。

[0094] 如本文进一步所述,本发明可以具体地用于预测给定的ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)是否在免疫测定法中(其是ADA测定法)将产生蛋白干扰(如本文进一步所述)。所述ADA测定法可以通常例如是用于检测或测量针对ISV's的ADA's的ADA测定法,并且可以具体地是用于检测或测量在上述步骤(i)和(ii)中所用的针对ISV的ADA's的ADA测定法。

[0095] 在一个特别优选但非限制性的方面中,本发明可以用于预测给定的ISV或纳米抗体(或基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物)是否将在包括使用所述ISV的免疫测定法中(和具体地,在ADA测定法中)产生蛋白干扰(如本文进一步所述)。此外,所述ADA测定法可以通常例如是用于检测或测量针对ISV's的ADA's的ADA测定法,并且可以具体地是用于检测或测量在上述步骤(i)和(ii)中所用的针对ISV的ADA's的ADA测定法。

[0096] 在甚至更具体但非限制性方面中,本发明可以用于预测给定的ISV或纳米抗体(或基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物)是否在包括使用所述ISV的免疫测定法中(和具体地,在ADA测定法中)将产生蛋白干扰(如本文进一步所述)。例如,所述免疫测定法可以是进行测定或测量任何针对所述ISV的ADA's是否在测试样品中存在的ADA测定法(即包括ISV),其中所述样品是获自施用了所述ISV的受试者(如本文进一步所述)的生物流体样品(如本文所述)。例如,如本文进一步提及,所述样品(即,“测试样品”)可以是血液样品(包括全血,血清或血浆),眼泪,支气管肺泡液/BALF,脑脊髓液或任何其他适合的生物流体,并且可以具体地是适合和/或意欲用于免疫学测定法,如ADA测定法的生物样品。

[0097] 如本文进一步所述,在所有这些方面(和如本文所述的本发明的其它方面)中,本发明也可以用于选择在所述免疫测定法或ADA测定法中不易产生或较不容易产生这样的蛋白干扰的ISV's;作为这样的测定法或测试,其可以用于测试对ISV的某些修饰是否(完全或部分)在所述免疫测定法或ADA测定法中减少其产生这样的干扰的倾向;和/或作为这样的测定法或测试,其可以用于指导ISV的修饰或改进从而减少其在所述免疫测定法或ADA测定法中产生这样的蛋白干扰的倾向。

[0098] 如所提及,本发明的方法的步骤(i)包括使所述ISV或纳米抗体(或基于ISV或基于纳米抗体的药物)与这样的抗体接触,所述抗体获自人受试者并且已经基于其识别和/或结

合ISV或纳米抗体(如本文进一步所述)的C-末端末端的能力进行选择/分离。本文所述的方法的所述步骤(i)中,“所述ISV或纳米抗体(或基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物)”在免疫测定法中用作抗原(即作为待检测的物质)。此外,在所述步骤(i)中,“获自人受试者并且已经基于其识别和/或结合ISV或纳米抗体的C-末端末端的能力进行选择/分离的抗体”用作分析试剂(即以与其他抗体相同的方式用在免疫测定法中来检测它们所针对的抗原的存在)。

[0099] 如已经提及,并且为了更好地理解本文所述的本发明,应该注意,在步骤(i)中,所述ISV通常用作“抗原”,(即,作为待检测的化合物),并且“分析抗体”用作分析试剂(即,作为分别检测给定的ISV是否结合的手段;并且因此作为分别检测给定的ISV是否具有较高或增加的风险产生蛋白干扰的手段)。例如,当步骤(i)以ELISA形式进行时,所述“抗体/分析试剂”通常结合于载体(即,结合于ELISA板),并且ISV(存在于)待测试的样品中。

[0100] 作为对比,应该注意在这些用于检测或测量针对ISV的ADA's的ADA测定法中,ISV用作“分析试剂”(即,作为用于检测任何ADA's是否存在的化合物),并且ADA's是“抗原”(即,待检测的化合物)。因此,在这些测定法中,ISV通常/经常结合于载体(如ELISA板),而ADA's(如果存在)在进行测定法的样品中存在。

[0101] 然而,如已经提及的,通常应该注意到本发明不限于其中“分析抗体”结合于载体的测定法。例如,在进行根据本发明的测定法的备选方法中(如在实施例5中显示),分析抗体替代性地用作桥接剂(bridging agent),并且因此在溶液中而不是结合于板(尽管其通过包被在板上的ISV间接结合于板)。然而,也在实施例5中所述的特异性桥接测定法中(其是竞争性测定法),分析抗体仍旧用作分析试剂(即,分别确定目的ISV是否结合;并且因此分别确定其是否具有产生蛋白干扰的较高风险或增加的风险)。还设想,基于本文进一步的公开内容,技术人员能够设计其他的测定形式,其中分析抗体可以被用作分析试剂从而分别确定给定的ISV是否能够结合;并由此确定其是否具有产生蛋白干扰的较高或增加的风险)。

[0102] 在步骤(i)中所用的“分析抗体”可以是多克隆抗体或单克隆抗体。

[0103] 当所述分析抗体是多克隆抗体时,其可以例如是这样的多克隆抗体(制剂),其由获自人受试者的生物样品(如血液、血浆、B-细胞或其他可以从其中适当地分离多克隆抗体的适合的生物样品或流体)中获得/纯化/分离。这可以例如是获自施用了至少一个ISV的(如在步骤(i)中使用的ISV,但是这不是需要的或必需的)人受试者的适合的生物样品,并且也可以是(并且优选地是)来自从未接受ISV或用ISV治疗的人受试者的适合的生物样品。更重要的是,所述多克隆抗体通过这样的方法获自所述生物样品,所述方法包括使用携带ISV作为亲和结构部分的亲和基质或亲和柱的至少一个亲和步骤(和一个或多个本身已知的用于获得/纯化/分离多克隆抗体的其它步骤)。例如,可以通过使用携带ISV的亲和柱通过亲和层析的方式从所述生物样品获得多克隆抗体,如例如在实施例2中所述。这可以例如使用携带ISV作为抗原的亲和基质,使用关于从生物样品分离抗体的免疫亲和层析的公知技术进行。所述技术是本领域公知的,并且技术人员基于本文公开的内容清楚其适合的实例。

[0104] 所述多克隆抗体(制剂)可以具体地是IgG(或IgG级分(fraction))。

[0105] 例如,其可以是这样的多克隆抗体,所述多克隆抗体使用不含C-端标记(即其中C-

端以氨基酸序列VTVSS (SEQ ID NO:33) 终止) 的ISV (和具体地纳米抗体, 如VHH, 人源化的和/或序列优化VHH或骆驼源化的VH, 如骆驼源化人VH) 作为结合于亲和基质的抗原, 通过在获自人受试者的生物流体的样品上进行的包括(免疫) 亲和层析的方法获得。具体地, 用作结合于亲和基质的抗原的ISV可以是人源化的或序列-优化的VHH (或备选地相应骆驼源化的人VH), 其中C-端以氨基酸序列VTVSS (SEQ ID NO:33) 终止。在一个具体, 但非限制性方面中, 用作结合于亲和基质的抗原的ISV可以是人源化的或序列-优化的VHH, 其作为这样的人源化或序列-优化的结果, 在位置14包括脯氨酸(P) 残基, 其中相应的“幼稚”VHH在位置14包括丙氨酸(A) (换言之, 用作抗原的ISV是VHH的人源化形式, 其天然在位置14包括丙氨酸, 所述丙氨酸残基, 作为人源化和/或序列优化的结果, 已经被脯氨酸(P) 残基取代)。作为这样的人源化或序列优化的结果, 用作抗原的ISV也可以包括一个或多个其它氨基酸取代, 例如通常在WO 08/020079或WO 09/138519中所述。

[0106] 可以用作抗原从而产生/分离在本发明中所用的“分析抗体”的ISVs的一些具体实例在SEQ ID NO's:1和2中给出。

[0107] 此外, 用于获得多克隆抗体的方法, 除了(免疫) 亲和步骤之外, 还可以包括一个或多个用于从生物样品分离/纯化多克隆抗体的其他步骤(在亲和步骤之前或之后进行)。此外, 技术人员清楚用于进行它们的这些步骤和技术。

[0108] 因此, 在一个方面中, 本发明包括如本文进一步所述的方法, 其包括本文所述的步骤(i) 和(ii), 其中使用包括至少一个亲和步骤(如亲和层析, 如免疫亲和层析的步骤) 的方法, “分析抗体”(即获自人受试者并且已经基于其识别和/或结合ISV或纳米抗体的C-末端的能力进行选择/分离的抗体) 获自从人受试者中获得的生物样品(其中所述生物样品是适合用于从所述样品产生/分离抗体的方法的样品), 其中ISV (并且优选地纳米抗体) 用作抗原, 并且优选地, ISV用作包含氨基酸序列VTVSS (SEQ ID NO:33) 作为C-端序列的抗原, 并且更优选地, 人源化的和/或序列优化的纳米抗体用作包含氨基酸序列VTVSS (SEQ ID NO:33) 作为C-端序列的抗原, 并且甚至更优选地, 人源化的和/或序列优化的纳米抗体用作这样的抗原, 其包含氨基酸序列VTVSS (SEQ ID NO:33) 作为C-端序列, 并且在位置14包含脯氨酸残基, 如这样的纳米抗体, 其包含氨基酸序列VTVSS (SEQ ID NO:33) 作为C-端序列并且在位置14包含脯氨酸残基, 所述脯氨酸残基作为所述人源化和/或序列优化的结果被引入纳米抗体(例如, 为了在被人源化和/或序列优化的VHH中取代在所述位置天然存在的丙氨酸残基)。

[0109] 上述ISV's也可以用在分离单克隆抗体的方法中(其也是从获自人的适合生物样品开始), 所述单克隆抗体适合在本发明中用作“分析抗体”。

[0110] 例如, 所述单克隆抗体可以从血液、B-细胞或其它用于分离抗体的合适样品和材料起始获得, 可以基于其识别和/或结合ISV或纳米抗体(C-末端) 的能力进行选择(其中, 再一次, 在筛选和/或选择过程中用作抗原的ISV(s) 优选地如在前述段落中描述, 包括关于所述ISV/抗原所指出的优先选择)。这样的筛选和选择可以以任何适合的方式进行, 例如通过使用B-细胞选择和/或扩增技术进行(所述B-细胞选择和/或扩增技术基本上与在EP 0 488 470, WO 92/02551, EP 1 633 787, WO 01/55216, WO 02/26829, WO 04/051268, WO 04/102198或WO 04/106377中所述的B-细胞选择技术相同或适当地类似), 或通过使用类似于在WO 06/079372中所述的纳米克隆技术的技术进行(但是使用人B-细胞而不是骆驼科动物

B-细胞)。

[0111] 一旦已经鉴定/分离表达适合抗体的一种或多种B-细胞,所述抗体可以以任何适合的方式分离,表达和/或生产。例如,所述B-细胞可以作为杂交瘤无限增殖化,产生需要的一种抗体/多种抗体(使用从选定的B-细胞开始产生杂交瘤的本身熟知的技术),并且所述一种抗体/多种抗体可以接着再次使用本领域中充分建立和在各种书籍和手册中描述的和此外,在前述段落中提及的专利出版物中描述和/或提及的适合技术从所述杂交瘤(培养物上清液)中分离。

[0112] 备选地,所述B-细胞可以使用本身已知的B-细胞扩增技术进行扩增,并且所述一种抗体/多种抗体可以从所述扩增的B-细胞的(培养物上清液)分离。此外,这可以使用本领域中充分建立和在各种书籍和手册中描述的和此外,在前述段落中提及的专利出版物中描述和/或提及的适合技术进行。

[0113] 在另一个备选的实施方案中,可以从所述B-细胞或其他适合的细胞中,直接(例如使用适合的单细胞PCR克隆技术)或在适当地扩增需要的B-细胞后,获得(例如,通过扩增)编码目的一种抗体/多种抗体的DNA。接着,所述DNA可以在适合的宿主细胞或宿主生物中适当地表达以需要提供的一种抗体/多种抗体。此外,这可以使用本领域中充分建立和在各种书籍和手册中描述的和此外,在前述段落中提及的专利出版物中描述和/或提及的适合技术进行。

[0114] 还可以通过这样的方法产生适合用作“分析抗体”的单克隆抗体,所述方法包括所有组成成分(repertoire)克隆(从获自人受试者的适合样品开始)和关于结合用作抗原的ISV的抗体筛选克隆的所有组成成分(repertoire)(其中,再次,在筛选和/或选择过程中用作抗原的ISV(s)优选地如在前述段落中所述,包括关于所述ISV/抗原所指定的优先选择)。用于所有组成成分克隆的方法和用于展示关于选择和筛选的克隆的所有组成成分的各种技术(如噬菌体展示,核糖体展示和酵母展示)是技术人员清楚的,并且例如在EP 0 589877,EP 0 774 511,WO 90/14430和EP 0368 684中以及在关于受试者的各种书籍中描述。

[0115] 通常,用作获得(多克隆或单克隆)分析抗体的起点的生物样品可以是获自任何适合的人受试者的任何适合的样品(即适合分别作为获得多克隆抗体或单克隆抗体的原料)。在一个具体但非限制性的方面中,所述样品可以例如获自女人,并且具体地获自绝经期后的女人。因此,在一个具体但非限制性的方面中,在上述步骤(i)和(ii)中所用的分析抗体从这样的生物样品起始获得,所述生物样品获得/来自绝经期后的女人(或由已经获自/来自绝经期后女人的抗体衍生)。

[0116] 此外,用作获得(多克隆或单克隆)分析抗体的起点的生物样品可以获自己已经预先施用了ISV(例如作为临床试验或治疗的一部分)的受试者,但是优选地获自预先未施用ISV的受试者。

[0117] 然而,应该注意本发明不特别受限于所用的一种分析抗体/多种分析抗体的来源,并且证实在一些情形中,使用本文所述的技术,从其它来源获得(产生,分离)其他适合的分析抗体也是可以的,所述其他来源包括商购人血液或血浆(和甚至来自其他哺乳动物或灵长类动物种类(如来自狒狒或食蟹猴)的血液,血浆或B-细胞)。

[0118] 如上述提及,在步骤(i)和(ii)中所用的(多克隆或单克隆)分析抗体应该是这样

的从而其能够识别或结合ISV或纳米抗体的C-末端端,并且最优选地基于其结合ISV或纳米抗体的C-末端端的能力进行选择 and/或分离。

[0119] 如可以从图2中观察到的,当ISV基于VH或VHH结构域或由其衍生时,ISV的C-末端端包含氨基酸序列VTVSS (SEQ ID NO:33),并且因此分析抗体应该能够识别在其C-末端端具有氨基酸序列VTVSS (SEQ ID NO:33)的任何ISV。如可以进一步从图2中观察到的,在序列VTVSS (SEQ ID NO:33)中的(至少一些氨基酸残基)是在ISV上的推定表位的一部分,并且除了别的残基之外,其还包含在位置14(和在氨基酸序列中与其相邻的氨基酸残基/接近其的氨基酸残基,如位置11,13和15)的氨基酸残基,并且也可以包含在位置83(和在氨基酸序列中与其相邻的氨基酸残基/接近其的氨基酸残基,如位置82,82a,82b和84)的氨基酸残基和/或包含在位置108(和在氨基酸序列中与其相邻的氨基酸残基/接近其的氨基酸残基,如位置107)的氨基酸残基。位置109是C-端VTVSS (SEQ ID NO:33)序列的第一个V,并且已经显示例如位置110也可以对蛋白干扰有影响)。在本文这也统称为“C-端区”,理解该C-端区至少包含C-端序列VTVSS (SEQ ID NO:33),和在位置14的氨基酸残基,并且也可以包含在位置83和108的氨基酸残基,并且可能还包含在位置13,15,82b,83,84和107的氨基酸残基。

[0120] 也如提及,并且也不受限于任何假说或解释,在全长4-链单克隆抗体中,或在仅全长重链抗体如在骆驼科动物中存在的那些中,VH或VHH结构域的C-末端端连接于抗体的剩余部分-即分别连接于常规单克隆抗体中的CH1区或连接于骆驼科动物重链抗体中的铰链区-并因此在所述全长抗体中可以免受这样的蛋白干扰影响和/或被VH/VL相互作用所覆盖(在常规4-链抗体中)从而使该“C-端区”因此通常不是溶剂-暴露的和/或作为对于蛋白的相互作用位点是可及的,所述蛋白存在于已经施用了所述ISV的人的血液,血清或身体中。然而,如果使用ISV或纳米抗体本身(即不与抗体的任何其他部分连接),或如果使用基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物,所述药物在其C-末端端携带ISV或纳米抗体,该C-端表位对于与其它蛋白的(非特异性)相互作用是可获得的,并且也不受限于任何假说或解释,认为这种C-端区可能目前容易遭受与一种或多种预先存在于待测试的“测试样品”中蛋白(例如,一种或多种IgG's)的(非特异性)蛋白相互作用,并且这可在免疫测定法(和具体地在ADA测定法中)导致蛋白干扰和/或非特异性信号。

[0121] 如所提及,本文所述的方法可以用于预测,减少或避免这样的蛋白相互作用,并且还可以用作指导对ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物的修饰的工具从而给其提供(部分或优选地基本上全部地)减少的产生这样的蛋白干扰的倾向。

[0122] 如由前述段落可清楚的,并且也不受限于任何假说和解释,特别预期(并且是本发明教导的部分)“C-端区”的(某些)修饰将改变(并且优选地减少)ISV遭受这样的非特异性蛋白相互作用的倾向,并且这也是通过实验所观察到的(见,例如在下述实施例1C和3中所述的实验结果)。

[0123] 基于此,并且也不受限于任何假说或解释,本发明还教导某些可以为此目的被引入ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物的C-端区的修饰(可以使用本文所述的方法测试其(潜在)的有效性)。此外,基于本文的教导,认为技术人员能够选择,设计或提出可以为此目的被引入的C-端区的其他(候选)修饰(并且也可以使用本文所述的方法测试其(潜在)的有效性)。

[0124] 回到本发明所用的分析抗体,其优选地是这样的(多克隆或单克隆)抗体,其识别

ISV的C-端区(如上定义),并且具体地,但不限于识别纳米抗体的C-端区。

[0125] 例如,在一个具体但非限制性的方面中,所述“分析抗体”可以是这样的多克隆或单克隆抗体,其识别(和/或能够结合于,和具体地特异性结合于) ISV或纳米抗体的C-端区(其中所述序列的C-末端以VTVSS (SEQ ID NO:33) 终止),但是不识别(和/或不能特异性结合于) 这样的ISV或纳米抗体的C-端区(其可以是不同的ISV,但是优选地是相同的ISV),其中存在一个或多个与C-端VTVSS (SEQ ID NO:33) 连接的其他氨基酸残基(如1-5个氨基酸残基,或备选地小肽序列或甚至其他的多肽或蛋白)。

[0126] 在另一个更具体,但仍非限制性的方面中,所述“分析抗体”可以是这样的多克隆或单克隆抗体,其识别(和/或能够结合于,和具体地特异性结合于) ISV或纳米抗体的C-端区(其中所述序列的C-末端以VTVSS (SEQ ID NO:33) 终止,并且其中位置14是非天然存在于位置14的氨基酸和/或与天然存在于位置14的氨基酸相比是被修饰的氨基酸(例如作为人源化、骆驼源化和/或序列优化的结果)),但是不识别(和/或不能特异性结合) 这样的ISV或纳米抗体的C-端区(其可以是不同的ISV但是优选地是相同的ISV),其中存在一个或多个与C-端VTVSS (SEQ ID NO:33) 连接的其他氨基酸残基(如1-5个氨基酸残基,或备选地小肽序列或甚至其他的多肽或蛋白;和/或其中位置14是天然存在于位置14的氨基酸(例如,丙氨酸,或当ISV在位置14天然包含脯氨酸时,是脯氨酸))。

[0127] 例如,“分析抗体”也可以是这样的多克隆抗体或单克隆抗体,其识别(和/或能够结合于,和具体地特异性结合于) ISV或纳米抗体的C-端区(其中所述序列的C-末端以VTVSS (SEQ ID NO:33) 终止,并且其中位置14是脯氨酸(并且具体地,当位置14是例如作为人源化、骆驼源化和/或序列优化的结果被修饰为脯氨酸时)),但是不识别这样的ISV或纳米抗体的C-端区(其可以是不同的ISV但是优选地是相同的ISV),其中存在一个或多个与C-端VTVSS (SEQ ID NO:33) 连接的其他氨基酸残基(如1-5个氨基酸残基,或备选地小肽序列或甚至其他的多肽或蛋白;和/或其中位置14是丙氨酸)。

[0128] “分析抗体”也可以是这样的多克隆抗体或单克隆抗体,其识别(和/或能够结合于,和具体地特异性结合于) ISV或纳米抗体的C-端区(其中所述序列的C-末端以VTVSS (SEQ ID NO:33) 终止,并且其中位置14是脯氨酸(并且具体地,其中脯氨酸残基在所述ISV中在所述位置是天然存在的),但是不识别这样的ISV或纳米抗体的C-端区(其可以是不同的ISV但是优选地是相同的ISV),其中存在一个或多个与C-端VTVSS (SEQ ID NO:33) 连接的其他氨基酸残基(如1-5个氨基酸残基,或备选地小肽序列或甚至其他的多肽或蛋白,其中位置14仍是(天然存在或未修饰的) 脯氨酸)。

[0129] “分析抗体”也可以例如是这样的多克隆抗体或单克隆抗体,其识别在本文被称为“Nb 3.4”的ISV的序列(的C-端区) (SEQ ID NO:5),但是不识别在本文被称为“Nb 3.1”的ISV的序列(的C-端区) (SEQ ID NO:3) 和/或(并且优选地) 不识别在本文被称为“Nb 3.2”的ISV的序列(SEQ ID NO:4)。

[0130] 对于上述目的,可以使用任何适合的结合测定法(如Biacore) 确定“分析抗体”是(否) 识别ISV或纳米抗体(和/或能或不能(特异性) 结合ISV或纳米抗体),但是也可以使用在实施例3中所述的BIACORE测定法或在实施例5中所述的ADA测定法如ADA桥接/竞争测定法确定(还见如图1A到1C和具体地图1B)。

[0131] 基于本文公开的内容,技术人员清楚进行所述测定法的适合的形式/技术,其例如

包括(但不限于):

[0132] -比色测定法,如用直接或间接包被所述板的分析抗体进行ELISA并且用单克隆或多克隆抗-ISV抗体检测结合的ISV。用于这种设置的其它有用的备选技术包括但不限于电致化学发光(MSD平台),荧光(DELTA, GYROS),和依赖于结合的ISV的二次检测的其它方法。

[0133] -表面等离子共振(如BIACORE)或其他实时生物传感器方法(即除了使用SPR之外的方法),所述方法使用直接或间接固定的分析抗体并监测随后注射/施加的ISV的结合。这些方法不需要进一步检测结合的ISV。在实施例3中描述了进行这种类型测定法的代表方法。

[0134] -使用分析抗体取代包含生物流体的ADA在桥接测定法(ADA测定法)中分析ISV的竞争性行为。对于桥接测定法,可以使用不同的技术如ELISA, MSD平台。用于进行这种类型的代表性方法示意性地在图1A到1C中显示,并且还在实施例5中描述这种测定法的一个具体实例。

[0135] -任何层析法,其中分析抗体在层析基质上固定并且ISV从溶液中特异性捕获/分离。

[0136] 一旦使用本文或在一个具体的实例中所述的一种方法(或基本等价于其的方法)获得适合的分析抗体,所述分析抗体可以用于,即通过进行上述步骤(i)和(ii)确定给定的ISV或纳米抗体(或基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物)是否将产生(或具有较高或增加的倾向产生)蛋白干扰(如本文定义)。也如本文已经所述,这通常包括使所述ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物与分析抗体接触并且确定所述ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物是否被所述分析抗体识别(和/或与所述分析抗体结合,和具体地与所述分析抗体特异性结合)(并且具体地确定形成所述基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物的C-端末端的所述ISV或纳米抗体的C-端区或任何ISV或纳米抗体的C-端区是否被所述分析抗体识别)。

[0137] 所述方法可以通常使用任何用于确定抗原(在本发明情形中, ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物)是否与抗体结合的适合技术来进行,并且所述适合的(免疫)测定技术是技术人员清楚的。一些非限制性的实例是适合的ELISA技术(包括例如夹心式ELISA's),其中,取决于所用的ELISA形式(如技术人员所清楚的),分析抗体或ISV可以包被在平板上并且分析抗体或ISV可以被可检测地标记。其它技术可以例如包括使用BIAcore仪器(其中分析抗体或ISV也可以包被在芯片上,见例如实施例3)。另一种备选的方法可以是竞争性桥接测定法(如例如在实施例5中例示),其中测试ISV与其他已知与分析抗体结合的ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物竞争的能力(或反之亦然)。技术人员基于本文公开的内容清楚这些和用于确定给定的ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物是否被分析抗体(特异性)结合或识别的其他适合的技术。

[0138] 基于本文公开的内容,还清楚的是,本发明(和具体地在本发明中所用的分析抗体)可以用于确定给定的ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物是否包含这样的相互作用位点(如在C-端区处或C-端区内存在的相互作用位点,和/或C-端区形成其一部分的相互作用位点),所述相互作用位点能够进行与可存在于生物样品(即,“测试样品”)中的一种或多种蛋白或其他成分的非特异性蛋白相互作用,所述生物样品获自进行免疫测定法如ADA测定法(具体地,用于确定针对ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体

的药物的任何ADA's的存在(ADA测定法)的受试者。因此,当ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物被在本发明中所用的分析抗体识别时,所述ISV,纳米抗体,基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物非常可能包含这样的(可及的或暴露的)相互作用位点,并且因此当其用在这样的用于测试测试样品的免疫测定法或ADA测定法中时,具有产生这样的蛋白干扰(如本文定义)的倾向。如技术人员所清楚的,这是应该优选要避免的问题,如果可能这通过选择/使用另一种ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物,或通过修饰ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物,从而基本减少或基本消除其产生这样的蛋白干扰的倾向(再次,这可以使用本文公开的方法和分析抗体测试)避免。

[0139] 如技术人员基于本文公开的内容清楚的,这样的修饰可以例如包括对在ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体上的相互作用位点进行一种或多种修饰(如氨基酸插入、添加、缺失或取代),从而减少或消除其遭受与可存在于测试样品中的一种或多种蛋白或其他成分的非特异性蛋白相互作用的能力。此外,这可以通过引入一种或多种修饰并且接着也是使用本文公开的方法和分析抗体测试这种能力是否被减少,通过有限的试错法来进行。例如,可以引入一种多种这样的修饰,接着可以将修饰的ISV与所述分析抗体结合的能力与原始/未修饰的ISV与所述分析抗体结合的能力进行比较。备选地,使用竞争性桥接形式(如例如在实施例5中例示),或使用BIAcore(见例如实施例3),可以确定修饰的ISV与原始ISV(仍旧)竞争与分析抗体结合的能力。

[0140] 再一次,并且尽管本发明不限于任何假说或解释,基于在下面的实施例中提出的实验证据,发明人发现这种相互作用位点可能位于C端区上/邻近C端区(如本文定义)或所述相互作用位点形成C-端区的部分(或C-端区形成这种相互作用位点的部分)。这例如至少部分基于这样的观察,即,如果ISV具有产生这样的蛋白干扰的倾向并且具有VTSS (SEQ ID NO:33) 作为在其C端末端的氨基酸残基,则将有限数量的氨基酸残基(如1-10,例如1-5,如1,2,3,4或5个),或备选地,标记肽或其他的肽,蛋白或其他结构部分连接于这种C末端将通常基本减少或基本消除所述倾向。在一些情形中,已经发现甚至将1,2或3个氨基酸残基添加到C-端VTSS (SEQ ID NO:33) (其可以是任何适合的氨基酸或氨基酸的组合,其可以分别独立地选自任何天然存在的氨基酸,如在WO 09/138519的第64页上的表A-2中列举的那些,例如但不限于选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸)也可以基本减少或基本消除所述倾向。这也部分基于这样的观察,即,在一些情形中,如果VHH在位置14天然包含丙氨酸残基(其如提及形成C-端区的部分;见图2),天然存在的VHH通常不具有(或具有较低)产生这样的蛋白干扰的倾向,然而相应的VHH(其中在位置14的所述丙氨酸已经被脯氨酸残基取代)(例如出于人源化或序列-优化的目的)结果可以具有增加的产生这样的蛋白干扰(即,与在位置14处具有丙氨酸的VHH比较)的倾向。

[0141] 在一个方面中,本发明涉及这样的VHH,纳米抗体(如本文定义,和具体地人源化的VHH或骆驼源化的VH,如骆驼源化的人VH)或其他ISV(或在其C-末端具有VHH、纳米抗体或其他ISV的基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物),其进行了修饰(例如,通过引入一个或多个氨基酸取代,添加或缺失),和具体地在C-端区进行了修饰(如通过在C-端区的一个或多个氨基酸取代或添加),从而使(i)其具有基本减少的产生蛋白干扰(如本文定义)的倾向(如至少统计学上相关的减少倾向);和/或使(ii)其在本文所述的本发明的方法(如在实施例3或5所述的具体测试法)中,具有基本减少的与如本文所述的分析抗体(如在实施例2

中所述和在实施例3和5中所用的多克隆抗体)结合的能力,在两种情形中都优选地与相同的但不具有修饰的VHH,纳米抗体或ISV比较。

[0142] 因此,在一个方面中,本发明涉及这样的VHH,纳米抗体(如本文定义,和具体地人源化的VHH或骆驼源化的VH,如骆驼源化的人VH)或其他ISV(或在其C-末端具有VHH、纳米抗体或其他ISV的基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物),其是VHH或VH结构域(即这样的ISV,其是VH结构域或衍生自VH结构域)和/或基于VHH或VH结构域(的氨基酸序列)或衍生自所述VHH或VH结构域(的氨基酸序列),所述VHH,纳米抗体或ISV在其C-末端包含氨基酸序列VTVSS(X)_n(SEQ ID NO:34),其中n是1-10,优选地1-5,如1,2,3,4或5(和优选地1或2,如1),并且其中每个X是(优选地天然存在的)氨基酸残基,其独立地选择(并且优选独立地选自丙氨酸(A),甘氨酸(G),缬氨酸(V),亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)组成的组;然而,如可以从下述数据中观察到的,也可以使用其它(优选地天然存在的)氨基酸残基或前述优选的氨基酸残基与其他氨基酸残基(如丝氨酸、脯氨酸、苏氨酸和/或赖氨酸)的组合)。优选地,所述在其C-末端具有氨基酸序列VTVSS(X)_n(SEQ ID NO:34)的VHH,纳米抗体或ISV是这样的从而使(i)其具有基本减小的(如至少统计学上相关减小的倾向)产生蛋白干扰(如本文定义)的倾向;和/或是这样的从而使(ii)其在本文所述的本发明的方法(如在实施例3或5所述的具体测试法)中,具有基本减少的与如本文所述的分析抗体(如在实施例2中所述的多克隆抗体)结合的能力,在两种情形中都优选地与相同的但在其C-末端具有氨基酸序列VTVSS(SEQ ID NO:33)的VHH,纳米抗体或ISV比较。例如参考在实施例3中列出的测定法和数据。

[0143] 前述VHH's,纳米抗体或(其他)ISVs优选地是这样的从而使它们具有少于500的与21-4结合的RU值(根据在实施例9中提出的方案,并且在关于分子量调整测量的RU值后确定)。还应该注意,无论何时在本文的说明书或权利要求中提及任何C-端序列VTVSS(X)_n(包括根据本发明的一个具体方面的上述方面(a)-(p)中任一个),氨基酸X中没有一个是半胱氨酸残基。

[0144] 例如,在一些优选的方面中,ISV或包含ISV的构建体的C-末端(当该C-末端是VH-衍生的ISV,VHH或纳米抗体时)可以是:

[0145] (a) VTVSS(X)_n,其中n=1并且X=Ala;

[0146] (b) VTVSS(X)_n,其中n=2并且每个X=Ala;

[0147] (c) VTVSS(X)_n,其中n=3并且每个X=Ala;

[0148] (d) VTVSS(X)_n,其中n=2并且至少一个X=Ala(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile);

[0149] (e) VTVSS(X)_n,其中n=3并且至少一个X=Ala(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile);

[0150] (f) VTVSS(X)_n,其中n=3并且至少两个X=Ala(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile);

[0151] (g) VTVSS(X)_n,其中n=1并且X=Gly;

[0152] (h) VTVSS(X)_n,其中n=2并且每个X=Gly;

[0153] (i) VTVSS(X)_n,其中n=3并且每个X=Gly;

[0154] (j) VTVSS(X)_n,其中n=2并且至少一个X=Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任

何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)；

[0155] (k) VTVSS(X)_n, 其中n=3并且至少一个X=Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)；

[0156] (l) VTVSS(X)_n, 其中n=3并且至少两个X=Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)；

[0157] (m) VTVSS(X)_n, 其中n=2并且每个X=Ala或Gly；

[0158] (n) VTVSS(X)_n, 其中n=3并且每个X=Ala或Gly；

[0159] (o) VTVSS(X)_n, 其中n=3并且至少一个X=Ala或Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)；或

[0160] (p) VTVSS(X)_n, 其中n=3并且至少两个X=Ala或Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)；

[0161] 其中方面(a),(b),(c),(g),(h),(i),(m)和(n)是特别优选的,其中n=1或2的方面是优选的和其中n=1的方面是特别优选的。

[0162] 应该注意,无论何时在本文的说明书或权利要求中提及任何C-端序列VTVSS(X)_n(包括根据本发明的一个具体方面的上述方面(a)-(p)中任一个),氨基酸X中没有一个是半胱氨酸残基。

[0163] 因此,在一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=1并且X=Ala(或在其C-末端包含所述ISV(并且优选地所述纳米抗体的)蛋白或多肽)。

[0164] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=2并且每个X=Ala(或在其C-末端包含所述ISV(并且优选地所述纳米抗体的)蛋白或多肽)。

[0165] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=2并且至少一个X=Ala(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体的)蛋白或多肽)。

[0166] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=3并且至少一个X=Ala(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体的)蛋白或多肽)。

[0167] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=3并且至少两个X=Ala(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是 优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体的)蛋白或多肽)。

[0168] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=3并且X=Ala(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽)。

[0169] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=1并且X=Gly(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽)。

[0170] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=2并且每个X=Gly(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽)。

[0171] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=3并且每个X=Gly(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽)。

[0172] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=2并且至少一个X=Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽)。

[0173] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=3并且至少一个X=Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是 优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽)。

[0174] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=3并且至少两个X=Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽)。

[0175] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=2并且每个X=Ala或Gly(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽)。

[0176] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=3并且每个X=Ala或Gly(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽)。

[0177] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=3并且至少一个X=Ala或Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽)。或

[0178] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=3并且至少两个X=Ala或Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile)(或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽)。

[0179] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选所述纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中n=1,2或3,其中每个X=Ala或Gly。

[0180] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选所述纳米抗体),所述VH序列具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中

[0181] -n=1,2或3,其中每个X=Ala或Gly;或

[0182] -n=2或3,其中除了一个之外全部的X=Ala或Gly(其余的氨基酸

[0183] 残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,

[0184] Leu和/或Ile)

[0185] 或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽)。

[0186] 在另一个优选的方面中,本发明涉及这样的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其是纳米抗体或包含VH序列或衍生自VH序列的(其它)ISV(其中优选纳米抗体),具有序列为VTVSS(X)_n的C-末端,其中:

[0187] -n=1,2或3,其中每个X=Ala或Gly;或

[0188] -n=2或3,其中至少一个X=Ala或Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile);

[0189] -n=2或3,其中除了一个之外全部的X=Ala或Gly(其余的氨基酸残基X独立地选自任何天然存在的氨基酸但是优选独立地选自Val,Leu和/或Ile);

[0190] 或在其C-末端包含所述ISV(优选地所述纳米抗体)的蛋白或多肽。

[0191] 在上述方面中,关于“包含VH序列或衍生自VH序列的ISV”的所述(其他)ISV,意为任何这样的包含VH序列或衍生自VH序列的ISV,其不是纳米抗体(即,不是VHH,人源化的VHH或骆驼源化的VH)。例如,这样的(其他)ISV可以例如是基于VH的(单)结构域抗体,基于VH的dAbTM,或基于VH的微体(microbody)(见WO 00/29004)。

[0192] 此外,应该注意,无论何时在本文提及的一个ISV's具有根据本发明的一个具体方面的C-端序列VTVSS(X)_n(包括但不限于在前述方面中提及的ISV's),在序列VTVSS(X)_n中没有氨基酸X是半胱氨酸残基。

[0193] 如本文进一步所述,任何所述蛋白或多肽可以例如是这样的构建体,其包含任选地通过一个或多个适合的接头连接的两个以上的ISV's(如两个以上的纳米抗体)。因此,例

如所述构建体可以是二价、三价、四价或五价构建体(如二价、三价、四价或五价纳米抗体构建体),并且可以例如是二价、三价、四价或五价构建体(如二价,三价,四价或五价纳米抗体构建体),其是双特异性,三特异性或双互补位构建体(包括例如也可以结合血清白蛋白(优选的)或其他血清蛋白以延长半衰期的单特异性,双特异性或双互补位构建体)。

[0194] 此外,根据上述每个方面的纳米抗体,ISVs和蛋白/多肽优选地是这样的从而使它们具有少于500的与21-4结合的RU值(根据在实施例9中提出的方案,并且在根据上述提出的公式关于所用的ISV或蛋白的分子量调整测量的RU值后确定)。

[0195] 如本文提及,还认为本发明还可以用于在其C-末端具有VH-结构域的其他蛋白或多肽(和具体地抗体片段如Fab片段或基于抗体片段的其他蛋白或多肽,如ScFv's)。因此,在另一个方面中,本发明涉及这样的蛋白或多肽(如ScFv),所述蛋白或多肽在其C-末端具有VH结构域,所述VH结构域在其C-末端具有氨基酸序列VTVSS(X)_n(SEQ ID NO:34),其中n是1-10,优选地1-5,如1,2,3,4或5,并且其中每个X是(优选地天然存在)的氨基酸残基,所述氨基酸残基独立地选择(并且优选地独立选自丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)组成的组)。此外,根据一些具体的方面,所述C-末端可以根据上述(a)-(p)中任一项所述,并且优选地根据(a),(b),(c),(g),(h),(i),(m)或(n)之一所述,其中n是1,2或3并且优选地1或2。

[0196] 此外,所述蛋白或多肽优选地是这样的从而使它们具有少于500的与21-4结合的RU值(根据在实施例9中提出的方案,并且在根据上述提出的公式关于所用的ISV或蛋白的分子量调整测量的RU值后确定)。此外,再一次,根据本发明的该方面的一个具体方面,在C-端序列VTVSS(X)_n中的氨基酸X没有一个是半胱氨酸残基。

[0197] 本发明还涉及药物组合物,其包含ISV(并且优选地治疗性ISV)或含有至少一个ISV(并且优选地至少一种治疗性ISV)的蛋白或多肽和至少一种适合的载体、稀释剂或赋形剂(即适合用于药用),和任选地一种或多种其他活性物质,其中所述ISV、蛋白或多肽如本文进一步所述(即根据本文所述的一个或多个方面的ISV、蛋白或多肽,和具体地根据前述页上所述一个或多个方面的ISV、蛋白或多肽;和更具体地具有根据本文所述的一个或多个方面的C-末端/序列的ISV、蛋白或多肽)。所述组合物、载体、稀释剂或赋形剂可以例如如在WO 08/020079中关于包含纳米抗体或含有至少一种纳米抗体的蛋白或多肽的药物组合物所述(并且也如已经提及的,根据本发明,ISV也优选地是纳米抗体)。

[0198] 本发明还涉及用于治疗人(例如需要所述治疗的患者)的疾病的ISV或包含至少一个ISV的蛋白或多肽,其中所述ISV、蛋白或多肽如本文进一步所述(即根据本文所述的一个或多个方面的ISV、蛋白或多肽,和具体地根据在前述页上所述一个或多个方面的ISV、蛋白或多肽;和更具体地具有根据本文所述的一个或多个方面的C-末端/序列的ISV、蛋白或多肽)。

[0199] 本发明还涉及ISV或包含至少一个ISV的蛋白或多肽用于制备药物组合物的用途,其中所述ISV、蛋白或多肽如本文进一步所述(即根据本文所述的一个或多个方面的ISV、蛋白或多肽,和具体地根据在前述页上所述一个或多个方面的ISV、蛋白或多肽;和更具体地具有根据本文所述的一个或多个方面的C-末端/序列的ISV、蛋白或多肽)。

[0200] 本发明还涉及治疗方法,所述方法包括向人受试者(例如需要所述治疗的患者)施用在药物组合物的制剂中的ISV或包含至少一个ISV的蛋白或多肽,其中所述ISV、蛋白或多

肽如本文进一步所述(即根据本文所述的一个或多个方面的ISV、蛋白或多肽,和具体地根据在前述页上所述一个或多个方面的ISV、蛋白或多肽;和更具体地具有根据本文所述的一个或多个方面的C-末端/序列的ISV、蛋白或多肽;或包含至少一种所述ISV、蛋白或多肽的药物组合物(如上所述)。

[0201] 关于上述方面,清楚的是本文所述的ISV's,蛋白和多肽的治疗应用是本发明非常重要的方面,因为所述治疗应用(或用于所述治疗应用的所述ISV's,蛋白和多肽的临床开发)可以包括使用ADA测定法来确定所述ISV、蛋白或多肽是否是免疫原性的(即当施用于人受试者时可以产生ADA's)。在该方面,清楚的是当治疗剂用于更长时期(在数周、数月或数年时期内),和/或在人受试者中具有至少3天,如至少一周,并且至多可达10天以上的半衰期(优选地以 $t_{1/2-\beta}$ 表示)时,关于可能的免疫原性的问题特别需要得到解决。

[0202] 因此,根据本发明的一个具体方面,如本文所述的ISV、蛋白、多肽或药物组合物意欲用于治疗人的慢性疾病,和/或如本文所述的这样的ISV、蛋白、多肽意欲在(即以治疗活性剂量)施用其的受试者的循环中(即以药理学活性水平)存在至少一周,优选地至少两周,如至少一个月的时期;和/或如本文所述的这样的ISV、蛋白、多肽是这样的从而使其在人受试者中具有至少3天,如至少一周,并且最多可达10天以上的半衰期(优选地以 $t_{1/2-\beta}$ 表示);和/或如本文所述的这样的ISV、蛋白、多肽或药物组合物意欲作为两个以上的剂量(dose)施用于人,所述两个以上的剂量在至少3天,如至少1周,例如至少2周或至少一个月,或甚至更长(即至少3个月,至少6个月或至少一年)的时期内施用,或甚至长期施用。

[0203] 本发明还涉及(基本)减少或基本消除ISV,纳米抗体或基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物产生蛋白干扰的倾向的方法,所述方法包括至少下述步骤:

[0204] -使用至少包括如本文提及的步骤(i)和(ii)的方法,任选地确定ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物产生蛋白干扰的倾向;

[0205] -通过下述方式修饰所述ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物:通过在所述ISV或纳米抗体中引入一种或多种、一个或多个氨基酸取代,添加或缺失,或在基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物的C-端ISV或纳米抗体(如果存在)中引入一种或多种、一个或多个氨基酸取代,添加或缺失;和具体地通过在所述ISV或纳米抗体的C-端区引入一种或多种氨基酸取代或添加,或在基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物的C-端ISV或纳米抗体(如果存在)的C-端区引入一种或多种氨基酸取代或添加,例如通过向序列的C-末端添加1-10,如1-5,如1,2,3,4或5个氨基酸残基,所述氨基酸残基每个独立地选自任何天然存在的氨基酸(如在WO 09/138519的第64页的表A-2中列举的那些,例如但不限于丙氨酸,甘氨酸,缬氨酸,亮氨酸或异亮氨酸);

[0206] -使用至少包括如本文提及的步骤(i)和(ii)的方法确定这样修饰的ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物产生蛋白干扰的倾向;任选地以这样的方式进行,即允许这样修饰的ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物产生蛋白干扰的倾向与起始ISV、纳米抗体、基于ISV的药物或基于纳米抗体的药物产生蛋白干扰的倾向进行比较(包括,但不限于,在如本文所述的关于与分析抗体结合的竞争测定法中比较它们)。备选地,可以使用涉及使用21-4的本文所述的方法。

附图说明

[0207] 现在本发明通过下述非限制性优选的方面,实施例和附图进一步描述,其中:

[0208] -图1A-1C示意性显示ADA测定法形式的一些非限制性实例。关于进行这些测定法的一些代表性但非限制性的方法在实施例4中提及。

[0209] -图2示意性显示ISV、诸如纳米抗体的代表性3D结构。

[0210] -图3是显示NB's 3.4-3.9 (SEQ ID NO's 5-10) 与在实施例2中获得的固定化的多克隆抗体结合的结合曲线(使用在实施例3中所述的BIAcore测定法获得)。

[0211] -图4是显示NB's 3.4, 3.11, 3.12和3.13 (SEQ ID NO's: 5, 12, 13和14) 与在实施例2中获得的固定化的多克隆抗体结合的结合曲线(使用在实施例3中所述的BIAcore测定法获得)。

[0212] -图5是显示NB's 3.4, 3.14和3.15 (SEQ ID NO's: 5, 15和16) 与在实施例2中获得的固定化的多克隆抗体结合的结合曲线(使用在实施例3中所述的BIAcore测定法获得)。

[0213] -图6是显示NB's 3.1, 3.2和3.4 (SEQ ID NO's: 3, 4和5) 与在实施例2中获得的固定化的多克隆抗体结合的结合曲线(使用在实施例3中所述的BIAcore测定法获得)。

[0214] -图7是显示NB's 4.1和4.2 (SEQ ID NO's: 17和18) 与在实施例2中获得的固定化的多克隆抗体结合的结合曲线(使用在实施例3中所述的BIAcore测定法获得)。

[0215] -图8是显示NB's 6.1, 6.2, 6.4和6.5 (SEQ ID NO's 19-22) 与在实施例2中获得的固定化的多克隆抗体结合的结合曲线(使用在实施例3中所述的BIAcore测定法获得)。

[0216] -图9提供这样的表,所述表显示在实施例8中所用的序列(SEQ ID NO's: 37-89)并且展示相应的参考序列。

[0217] 在本发明说明书和权利要求中提及的序列在下面的表A中列出(SEQ ID NO's: 1-37)和在图9中列出(SEQ ID NO's: 38-89)。

[0218] 表A

[0219]

名称	SEQ ID NO:	序列
ISV Ex. 1/2-	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSGIKSSQDSTRYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCAKSRVSRGTGLYTYDNRGQGTTLTVTVSSGGGGSG GGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF NNYAMGWFRQAPGKEREFVAAITRSGVRSVSAIYGDSVKDR FTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAASAIGSGALRRFE YDYSQGQGTTLTVTVSS
Alt. ISV	2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMGWFRQAPGK GREFVSSITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR PEDTAVYYCAAYIRPDYLSRDYRKDYDWGQGTTLTVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSPGMSWV RQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVTVSSGGGGSGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMGWFRQAPGK GREFVSSITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR PEDTAVYYCAAYIRPDYLSRDYRKDYDWGQGTTLTVTVSS
>Nb3.1	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGWYRHRTG EPRELVAITITGGSSINYGDFVKGRFTISIDNAKNTVYLQMNNLK PEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTQVTVSS
>Nb3.2	4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGWYRHRTG EPRELVAITITGGSSINYGDFVKGRFTISIDNAKNTVYLQMNNLK PEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTQVTVSSAAAEQKLISEED LNGAAHHHHHH
>Nb3.4	5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGWYRHRPGE PRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQMNSLRPE DTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTTLTVTVSS

[0220] 表A (续)

[0221]

名称	SEQ ID NO:	序列
>Nb3.5	6	HHHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGW YRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTLLTVSSAA
>Nb3.6	7	HHHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGW YRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTLLTVSSA
>Nb3.7	8	HHHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGW YRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTLLTVSSG
>Nb3.8	9	HHHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGW YRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTLLTVSSGG
>Nb3.9	10	HHHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGW YRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTLLTVSSGGG
>Nb3.10	11	HHHHHHHEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGW YRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTLLTVSS
>Nb3.11	12	HHHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGW YRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTLLTVSS
>Nb3.12	13	HHHHHHHEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGW YRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTQVTVSS

[0222] 表A(续)

[0223]

名称	SEQ ID NO:	序列
>Nb3.13	14	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGW YRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTQVTVSS
>Nb3.14	15	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGW YRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTQVTVSS
>Nb3.15	16	HHHHHHEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGW YRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTQVTVSS
>Nb4.1	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMAWYRQAPG KGRELVAGHSGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR PEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGGGTQVTVSS
>Nb4.2	18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMAWYRQAPG KGRELVAGHSGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR PEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGGGTQVTVSSGGGGSGG GSRDWDVDFVGGGTPVGG
>Nb6.1	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCIASGLPFSTKSMGWFRQAPGK EREFVARISPGGTSRYYGDFVKGRFAISRDNKNTTWLQMNSL KAEDTAVYYCASGERSTYIGSNYYRTNEYDYWGTGTQVTVSS AAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH
>Nb6.2	20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCIASGLPFSTKSMGWFRQAPGK EREFVARISPGGTSRYYGDFVKGRFAISRDNKNTTWLQMNSL KAEDTAVYYCASGERSTYIGSNYYRTNEYDYWGTGTQVTVSS
>Nb6.4	21	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLPFSTKSMGWFRQAPGK GREFVSRISPGGTSRYYGDFVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCASGERSTYIGSNYYRTNEYDYWGQGTQVTVSSA AAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH

[0224] 表A (续)

[0225]

名称	SEQ ID NO.	序列
>Nb6.5	22	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGLPFSTKSMGWFRQAPGK GREFVSRISPGGTSRYYGDFVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCASGERSTYIGSNYYRTNEYDYWGQGT LVTVSS
实施例1C: 野生型	23	HHHHHHEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFN NYAMG WFRRAPGKERE FVAAITRSGVRSQVSAIYGDSVKDRFTISRDN A KNTLYLQMNSLKPEDTAVYTCAASAIGSGALRRFEYDYS GQGT QVTVSS
实施例1C: (A14P)	24	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFN NYAMG WFRRAPGKERE FVAAITRSGVRSQVSAIYGDSVKDRFTISRDN A KNTLYLQMNSLKPEDTAVYTCAASAIGSGALRRFEYDYS GQGT QVTVSS
实施例1C: (K83R)	25	HHHHHHEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFN NYAMG WFRRAPGKERE FVAAITRSGVRSQVSAIYGDSVKDRFTISRDN A KNTLYLQMNSLRPEDTAVYTCAASAIGSGALRRFEYDYS GQGT QVTVSS
实施例1C: (Q108L)	26	HHHHHHEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFN NYAMG WFRRAPGKERE FVAAITRSGVRSQVSAIYGDSVKDRFTISRDN A KNTLYLQMNSLKPEDTAVYTCAASAIGSGALRRFEYDYS GQGT LVTVSS
实施例1C: (A14P,K83R, Q108L)	27	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFN NYAMG WFRRAPGKERE FVAAITRSGVRSQVSAIYGDSVKDRFTISRDN A KNTLYLQMNSLRPEDTAVYTCAASAIGSGALRRFEYDYS GQGT LVTVSS
实施例1c: (A14P,R39Q, K83R,T91Y,Q 108L)	28	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFN NYAMG WFRQAPGKERE FVAAITRSGVRSQVSAIYGDSVKDRFTISRDN A KNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAASAIGSGALRRFEYDYS GQGT LVTVSS

[0226] 表A (续)

[0227]

名称	SEQ ID No:	序列
实施例1C: (A14P,R39Q, K83R,T91Y,Q I08L)-1A	29	HHHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNYYAMG WFRQAPGKEREFVAAITRSGVRSQVSAIYGDSVKDRFTISRDN KNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAASAIGSGALRRFEYDYSQGQT LVTVSSA
实施例1C: (A14P,R39Q, K83R,T91Y,Q I08L)-3A	30	HHHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNYYAMG WFRQAPGKEREFVAAITRSGVRSQVSAIYGDSVKDRFTISRDN KNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAASAIGSGALRRFEYDYSQGQT LVTVSSAAA
Nb3.16	31	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGWYRHRPGE PRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTILVTVSSGGGGSGG GSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSSGGGGSGGGSEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASRSIGRLDRMGWYRHRPGE PRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTILVTVSS
Nb3.17	32	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDRMGWYRHRPGE PRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTILVTVSSGGGGSGG GSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTILVTVSSGGGGSGGGSEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASRSIGRLDRMGWYRHRPGE PRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTILVTVSSA

[0228] 表A (续)

名称	SEQ ID NO:	序列
C-末端序列	33	VTVSS
C-末端序列	34	VTVSS(X) _n
[0229] 21-4-3, IGH 共有序列	35	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTAYSMHWVKQAPG KGLKWMGWINTVTGEPAYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQIS SLKNEDTATYFCTRGLIHFYWGQGTTTLTVSSAKTTPPSVYPL APGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTF PAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKK IVPRDC
21-4-3-IGK 共有序列	36	DIQMTQTPSSLSASLGGRVTITCKASQDIHNFISWYQHKPGKV PRLIHDTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSPSITNLEPEDIATYVCL HYDNLRLRSFGGCTKLEIKRADAAPTVSIHPPSSEQLTSGGASV VCFLNFFYPKDIVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDY SMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC

具体实施方式

[0230] 实验部分:

[0231] 实施例1:产生多克隆分析抗体。

[0232] 可以用作“分析抗体”的多克隆抗体(IgG级分)如下产生:

[0233] A. 鉴定用于分离多克隆抗体的适合血浆样品

[0234] 关于可用作本发明的分析抗体的针对ISV的抗体的存在,评估来自健康个体的二十份血浆样品,所述健康个体从未用ISV处理。

[0235] 在该实施例中开始使用的ISV是SEQ ID NO:1。随后,为了证实相互作用不是特异于这种特定ISV,而是可能与许多ISV's发生的非特异性蛋白-蛋白相互作用,用其他ISV's重复下述测定法(见下述段落C)。作为SEQ ID NO:1的备选方案,也可以使用例如SEQ ID NO:2。

[0236] 所用测定法是基于ECL(电致化学发光)的桥接测定法,其使用生物素化的ISV(SEQ ID NO:1的生物素化的变体)进行捕获和使用磺基(sulfo)-标记的ISV检测抗-药物抗体。类似的形式也用于进行ADA测定法。使用磺基-NHS-LC-生物素(Sulfo-NHS-LC-Biotin)(Pierce)和磺基-标记NHS-酯(Sulfo-tag NHS-Ester)(MSD),分别按照生产商的说明书,使用在伯胺上进行的标准偶联化学来进行ISV的生物素化和磺基-标记。将血浆样品在PBS/0.1%酪蛋白中稀释1/5并且在96孔聚丙烯板中在37°C,600RPM温育30分钟。接着,将样品(50μL)在2μg/ml生物素化和2μg/ml磺基-标记的ISV(SEQ ID NO:1)的1:1混合物(100μL)中稀释1/3,并在室温,600RPM温育1小时。在室温将MSD MA[®]96-孔标准链霉抗生物素蛋白板用150μL/孔Superblock[®]T20封闭1小时,接着用PBS/0.05%Tween20(=洗涤缓冲液)洗涤3次。将样品/1:1混合物(生物素化和磺基-标记ISV(SEQ ID NO:1)(50.0μL)从聚丙烯板转移

到MSD板并且在室温,600rpm温育1小时。将板洗涤3次,之后加入2x读取缓冲液(MSD)(150 μ L/孔)并在MSD仪器(Sector Imager 2400阅读器)上阅读ECL单位(ECLU)。使用在方法验证过程中确定的筛选截点将样品筛选为阳性或阴性。使用如关于ADA测定法开发的指导(Shankar,2008)所推荐的适合统计学分析,基于118个来自从未用ISV处理的健康个体的单个血浆样品的背景值计算筛选截点。使用非参数的评估并且在排除异常值后,基于95th百分数计算截断值。

[0237] 将6个血浆样品明显评估为阳性:IHuP#002-001-ABL-01, IHuP#002-001-ABL-08, IHuP#002-001-ABL-10, IHuP#002-001-ABL-15, IHuP#002-001-ABL-19和IHuP#002-001-ABL-20(表I)。

[0238] 进一步在药物置换设置(证实测定法)中分析这些样品以证实阳性筛选结果的特异性(表II)。因此,在包含12.5 μ g/mL ISV (SEQ ID NO:1)的PBS/0.1%酪蛋白中将样品稀释1/5,并在96孔聚丙烯板中在37 $^{\circ}$ C,600RPM温育30分钟。接着,将样品(50 μ L)在2 μ g/ml生物素化和2 μ g/ml磺基-标记的ISV (SEQ ID NO:1)的1:1混合物(100 μ L)中稀释1/3,并在室温,600RPM温育1小时。随后,将样品1:1/混合物(生物素化和磺基-标记的ISV)(50.0 μ L)从聚丙烯板上转移到如上所述用于筛选测定法的封闭的MSD **MA**[®]96-孔标准链霉抗生物素蛋白板,并在室温,600rpm温育1小时。将板洗涤3次,之后加入2x读取缓冲液(MSD)(150 μ L/孔)并在MSD仪器(Sector Imager 2400阅读器)上测量ECL单位(ECLU)。使用在方法验证过程中确定的证实性截点将样品证实为真阳性,并且使用如关于ADA测定法开发的指导(Shankar,2008)所推荐的适合统计学分析,基于118个来自从未用ISV处理(用50 μ g/ml ISV强化)的健康个体的单个血浆样品的ECL响应计算证实性截点。基于99%的置信区间计算50%的最小信号减少。

[0239] 选择在基于ECL的桥接测定法中为阳性并且在药物置换设置(drug displacement set-up)测定法中被证实为阳性的样品作为使用亲和层析产生多克隆抗体的来源。

[0240] 表I:在ADA ISV测定法中的20个血浆样品的筛选结果

[0241]

样品ID	ECLU筛选测定法
IHuP#002-001-ABL-01	13081
IHuP#002-001-ABL-02	56
IHuP#002-001-ABL-03	272
IHuP#002-001-ABL-04	125
IHuP#002-001-ABL-05	70
IHuP#002-001-ABL-06	99
IHuP#002-001-ABL-07	170
IHuP#002-001-ABL-08	659358
IHuP#002-001-ABL-09	798
IHuP#002-001-ABL-10	1101
IHuP#002-001-ABL-11	83
IHuP#002-001-ABL-12	72
IHuP#002-001-ABL-13	403

IHuP#002-001-ABL-14	62
IHuP#002-001-ABL-15	1141
IHuP#002-001-ABL-16	159
IHuP#002-001-ABL-17	72
IHuP#002-001-ABL-18	170
IHuP#002-001-ABL-19	4503
IHuP#002-001-ABL-20	8243

[0242] 表II:在证实性测定法中证实阳性筛选血浆样品。将50%的证实性截点用于结果评估。一个样品未被证实为真阳性样品。

[0243]

血浆样品 ID	ECLU 筛选测定法: 血浆	ECLU 证实性测定法: 血浆	% 信号抑制
IHuP#002-001-ABL-01	13081	685	95
IHuP#002-001-ABL-08	659358	169410	74
IHuP#002-001-ABL-10	1101	582	47
IHuP#002-001-ABL-15	1141	467	59
IHuP#002-001-ABL-19	4503	1531	66
IHuP#002-001-ABL-20	8243	1450	82

[0244] 还使用上述基于ECL的桥接测定法评估来自未用ISV处理的个体的另外三个血清样品,并且使用药物置换设置测定法证实。

[0245] 在基于ECL的桥接测定法中将两个血清样品明显评估为阳性:IHUS#B09032311A3和IHUS#B09032311A20(表III)。在药物置换设置中进一步分析2个阳性筛选的样品以证实阳性筛选结果的特异性。

[0246] 表III:3个血清样品和相应的IgG纯化级分的筛选和证实性结果

[0247]

血清样品 ID	ECL 信号筛选测定法: 血清	ECL 信号证实测定法: 血清	% 信号抑制	ECL 信号筛选测定法: IgG	ECL 信号证实性测定法: IgG	% 信号抑制
IHUS#B09032311A3	2388	286	88%	3716	370	90%
IHUS#B09032311A20	19272	915	95%	31309	1160	96%
IHUS#B09032311A1	62					

[0248] B.产生纯化的多克隆IgG级分。

[0249] 使用Protein G HP Spin Trap Columns(GE Healthcare)根据生产商的说明,从样品IHUS#B09032311A3和IHUS#B09032311A20(见上)纯化多克隆IgG。简言之,在通过离心

(在100x g 30秒)从柱去除储存溶液后,通过加入结合缓冲液(20mM磷酸钠,pH 7.0)平衡该柱。离心后,加入包含需要的多克隆的溶液(在600 μ l中最多1mg),并将柱温育4分钟,同时轻微混合。接着离心该柱,并通过连续加入结合缓冲液(600 μ l)洗涤2次,并离心。在加入400 μ l洗脱缓冲液(0.1M甘氨酸-HCL,pH 2.7)并通过倒转混合后,通过在30 μ l中和缓冲液(1M Tris-HCL,pH 9.0)中离心,洗脱所述抗体。

[0250] 为了证实由此获得的IgG级分参与与ISV(s)的非特异性结合,在上述基于ECL的桥接测定法中分析纯化的IgG抗体并使用在上述A)下所用的药物置换设置测定法证实。在两个样品(IHUS#B09032311A3和IHUS#B09032311A20)中,证实纯化的IgG抗体参与非特异性结合,导致在测定法的阳性信号(表III)。这证实纯化的多克隆IgG可以用作“分析抗体”,并且将其原样用在实施例3和5的(测定法)中。

[0251] C. 与其他ISV's的非特异性结合

[0252] 为了确定观察到的蛋白干扰是否特异于单一ISV,和/或特异于在ISV's上的特定区、表位或抗原决定簇,和/或特异于对野生型ISV's进行的某些突变(如一个或多个个人源化突变),使用血浆样品IHUS#B09032311A3, IHUS#B09032311A20和IHUS#B09032311A1重复基于ECL的桥接测定法和药物置换设置测定法(都在A节下所述,将SEQ ID NO:1用作磺基-标记的ISV)。因为这些血浆样品包含在上述B)节下分离的多克隆“分析”抗体,所以这还提供关于所述多克隆分析抗体的特异性,选择性和表位识别的信息。

[0253] 测试8种ISV's(分别地SEQ ID NO's 23-30-见上述表A),其中一种是野生型VHH(SEQ ID NO:23),其他7种ISV's是具有不同人源化取代的野生型序列的人源化形式。两种ISV's(SEQ ID NO's:29和30)在C-端还包含其他的氨基酸残基(分别地,1和3个另外的丙氨酸残基)。

[0254] 所述数据在表IV中显示。不限于任何解释或假说,可以观察到C-端区的变化(如本文定义)可以明显地强烈影响所用的血浆样品能够产生蛋白干扰的程度。例如,可以观察到,添加1个或3个氨基酸残基到C-端可以强烈减少蛋白干扰出现的倾向(例如,与关于SEQ ID NO:28的90%减少比较,使用关于SEQ ID NO's:29和30的样品IHUS#B09032311A3在ECLU测定法中仅有18和13%的减少,所述SEQ ID NO:28是未在C-端添加任何氨基酸残基的相应的人源化的变体)。类似地,在野生型序列的位置14引入脯氨酸残基也可以明显地强烈影响所用的血浆样品能够产生蛋白干扰的程度(例如,与关于SEQ ID NO:24的91%减少比较,使用关于SEQ ID NO's:23的野生型序列的样品IHUS#B09032311A3在ECLU测定法中仅有20%减少,所述SEQ ID NO:24是具有A14P取代的野生型序列)。K83R和Q108L,其也是接近C-端区的取代,也导致产生蛋白干扰倾向的一定程度的增加,但是不如A14P取代那么多,并且A14P+K83R+Q108L取代的总的合并效应会被在C-端添加一个或多个氨基酸残基所抵消(再次将关于SEQ ID NO's:29和30的数据与关于其他人源化变体的数据进行比较)。

[0255] 基于该数据,还得出这样的结论,即明显地,多克隆分析抗体通常识别ISV's的C-端区(如本文定义)。如可从图2观察到的,位置14(并且在较低的程度,位置83和108)也形成ISV的C-端区的部分(当考虑到ISV的三维三元结构时)。

[0256] 表IV:使用分析抗体在ISV ADA测定法中评估作为竞争者的不同纳米抗体变体

[0257]

血清样品 ID		IHUS#B09032311 A3		IHUS#B09032311 A20		IHUS#B09032311 A1	
在筛选测定法中的 ECLU (使用 SEQ ID NO: 1)		2217		18494		62	
纳米抗体变体 (右手栏提及与 SEQ ID NO:23 的野生型序列比较进行的人源化取代和 C-端添加)		ECLU 证实测定法	% 减少	ECLU 证实测定法	% 减少	ECLU 证实测定法	% 减少
SEQ ID NO: 23	野生型 VHH	1778	20	8682	53	60	4
SEQ ID NO: 24	野生型 VHH +A14P	205	91	668	96	56	10
SEQ ID NO: 25	野生型 VHH +K83R	1403	37	6912	63	62	1
SEQ ID NO: 26	野生型 VHH +Q108L	1533	31	6991	62	59	5

[0258] 表IV (续)

[0259]

血清样品 ID		IHUS#B09032311		IHUS#B09032311		IHUS#B09032311	
		A3		A20		A1	
在筛选测定法中的 ECLU (使用 SEQ ID NO: 1)		2217		18494		62	
纳米抗体变体 (右手栏提及与 SEQ ID NO:23 的野生型序列比较进行的人源化取代和 C-端添加)		ECLU 证实测定法	% 减少	ECLU 证实测定法	% 减少	ECLU 证实测定法	% 减少
SEQ ID NO: 27	野生型 VHH +A14P+K83R+Q108L	156	93	628	97	57	8
SEQ ID NO: 28	野生型 VHH +A14P + R39Q + K83R + T91Y + Q108L	228	90	570	97	58	6
SEQ ID NO: 29	野生型 VHH +A14P + R39Q + K83R + T91Y + Q108L +在 C- 端的 1 个另外的 A (A114)	1814	18	15087	18	60	3
SEQ ID NO: 30	野生型 VHH +A14P + R39Q + K83R + T91Y + Q108L +在 C- 端的 3 个 A's (A114+A115+A116)	1933	13	15244	18	62	0

[0260] 实施例2:分析抗体的亲和性纯化

[0261] 本实施例描述了两种可以用于从来自人受试者的生物流体中分离能够识别和/或结合 ISV 的 C-末端端的分析抗体的方法。抗体从 4 种不同的血清样品中分离,所述血清样品的特征在于这些在根据实施例 1 所述的测试的 ADA 测定法中诱导阳性信号。

[0262] 从血清样品开始,这些方法中的每一个提供干扰因子的纯化的制剂,所述干扰因子可以用作本文所述方法中的分析抗体。这些方法也可以更通常地为其它目的用于纯化干扰因子(例如,使用下面的方案纯化的干扰因子也在实施例 8 中实验性地使用从而显示 ISV 或 ISV-构建体与单克隆 21-4 的结合预示同一 ISV 或 ISV-构建体与干扰因子的结合,并且因

此预示所述ISV或ISV-构建体在ADA测定法中遭受非特异性蛋白干扰的倾向)。

[0263] 实施例2A:使用蛋白A亲和层析的纯化

[0264] 在第一个步骤中,使用蛋白A亲和层析从血清样品中富集IgG抗体级分。用于这种富集的典型的柱包括HiTrap MabselectSure和MabSelectXtra (GE Healthcare); PorosMabCapture A (Applied Biosystems)。在所有的实验中,以自动和类似的方式从血清样品中纯化IgG抗体。在AKTA纯化系统 (GE Healthcare) 上进行层析方案,并且使用UNICORN蛋白纯化软件 (GE Healthcare) 实时记录。简言之,用D-PBS (Dulbecco's磷酸缓冲盐溶液) 将血清样品1:1稀释,并且0.22 μ m过滤,之后以0.5mL/min的固定流速加载到柱上。使用D-PBS以0.5mL/min的流速洗涤该柱从而在5个柱体积内去除非特异性结合成分。使用100mM甘氨酸pH 2.6缓冲液,以0.5mL/min流速,通过酸性洗脱来洗脱IgG级分。洗脱后,使用1.5M Tris缓冲液pH 8.8来中和级分。进行SDS-PAGE来证实在洗脱液中IgG抗体的分离。

[0265] 在第二个步骤中,通过将来自4种不同血清的蛋白A纯化的IgG级分施加到ISV偶联的亲和柱上来进一步富集干扰IgGs。更具体地,通过结合于包含具有SEQ ID NO:1的序列的ISV的柱来进一步富集干扰IgG。对此,使用根据生产商的方案的CNBr (溴化氰) -偶联方法,将ISV共价连接于Sephacrose 4高流 (fast flow) (GE Healthcare)。在所有的实验中,以自动和类似的方式进行亲和纯化。在AKTA纯化系统上进行层析方案,并且在UNICORN中记录。简言之,将IgG富集样品 (最多可达10ml负载体积) 以0.5mL/min的固定流速加载到柱上。使用D-PBS以0.5mL/min的流速洗涤该柱从而在5个柱体积内去除非特异性结合成分。使用100mM甘氨酸pH 2.6缓冲液,以0.5mL/min流速,通过酸性洗脱来洗脱ISV-结合成分。洗脱后,使用1.5M Tris缓冲液pH 8.8来中和级分。使用SDS-PAGE来分析级分,其证实在洗脱液中IgG抗体的分离 (数据未显示)。

[0266] 合并这些级分,并且将其用于进一步分析,如在实施例3中所述的那些。

[0267] 实施例2B:使用CaptureSelect™层析法的纯化

[0268] 备选地,从血浆中回收干扰因子并使用商购的IgA结合亲和树脂CaptureSelect hIgA™ (BAC BV) (其基于骆驼科动物来源的仅重链可变结构域 (VHH)) 进行纯化。随后,将包含IgA以及干扰IgG的收集的 'IgA级分' 加载到蛋白A柱上从而去除IgA级分。根据一般IgG纯化条件 (运行缓冲液:PBS;洗脱缓冲液:100mM甘氨酸pH=2.7;通过1M Tris洗脱后中和) 处理蛋白A柱。从Prot A洗脱液中回收干扰因子,产率>95%。

[0269] 在该方法的变体中,使用另一种CaptureSelect亲和树脂 (CaptureSelect Alpha-1抗胰蛋白酶树脂,基于VHH的商购亲和树脂,不靶向任何抗体相关蛋白)。这种树脂提供较高的干扰因子结合功效并且允许选择性的2步洗脱:通过使用2.0M MgCl₂的中性pH洗脱液的抗胰蛋白酶洗脱,随后是通过酸性步骤的干扰因子洗脱 (0.1M甘氨酸pH3.0,类似于蛋白A/G洗脱条件;使用1.5M Tris的中和)。这种一步纯化在每mL高干扰血浆中产生最多可达15 μ g干扰IgG1,这是存在的总IgG的约0.3%。任选地,可以对中和的干扰级分进行脱盐并且通过在D-PBS中平衡的大小排阻柱进行进一步纯化。

[0270] 实施例3:不同的ISV取代对ISV产生蛋白干扰的倾向的影响

[0271] 如在上述说明书中提及,本发明获得了某些测定法和技术,其可以对给定的ISV是否具有产生蛋白干扰的倾向进行评估。这些测定法和技术包括在实施例1中所用的基于ECL的桥接测定法和药物置换设置测定法,以及在该实施例3中所述的BIAcore测定法和在下面

的其他实施例中所述的桥接/竞争ADA测定法。

[0272] 如也在上述说明书中所提及的,这些测定法还可以用于确定具体改变(如氨基酸缺失,取代或添加)是否会影响(和优选地减少)给定的ISV产生蛋白干扰的倾向。这些改变中的一些基于本文公开的内容和在实施例1中列出的实验数据以及在本实施例3中列出的实验证据对于技术人员是清楚的或变得清楚。

[0273] 如已经通过在实施例1中产生的数据所指出的,看上去在ISV的C-端区中或接近C-端区(如本文定义)的某些突变可以(强烈)影响其产生蛋白干扰的倾向。例如,将几个氨基酸残基添加到C-端(如1或3个丙氨酸残基)看来强烈减少了ISV产生蛋白干扰的倾向,并且看来甚至能够抵消其他取代的存在(例如,在C-端区中或接近C-端区),所述取代看上去增加产生蛋白干扰的倾向(例如A14P取代)。

[0274] 在该实施例3中,使用在实施例2中产生的分析多克隆抗体,通过比较具有不同取代的相关ISV's来研究其他取代的作用以及添加附加的氨基酸到C-端的作用两者。通过使用来自GE Healthcare的Biacore™T100生物传感器,通过表面等离子共振(SPR)的方式测量在研究的每种ISV's和分析多克隆抗体之间的相互作用的动力学进行分析。在本实施例3中测试的ISV是SEQ ID NO's 3-22中的那些(见上述表A和下面的表V)。

[0275] 在典型的实验中,在10mM NaOAc pH5.0中制备10μg/ml的多克隆抗体溶液。接着,根据生产商的方案,通过EDC/NHS方法(EDC=N-乙基-N'-[3-二乙基氨基-丙基]-碳二亚胺; NHS=N-羟基琥珀酰亚胺),使用胺偶联在CM5传感器芯片上固定该多克隆抗体。固定的量提供约2700响应单位(RU)。接着,以45μl/分钟的流速,将500nM固定浓度的ISV注射到表面上,达120秒。因为不能鉴定出有效的再生缓冲液,所以解离时间延长至2400秒。从通过将ISV注射到多克隆抗体结合的流动池获得的信号中扣除通过将ISV注射到空白流动池中获得的信号。以与关于多克隆抗体的流动池相似的方式使空白流动池激活/失活,但是不加入蛋白。此外,扣除空白注射(HBS-EP+运行缓冲液(HBS=Hepes缓冲盐水:GE Healthcare)以校正可能的基线漂移。

[0276] 为了检查将氨基酸残基添加到C-端的效果,使用如在实施例2中所述产生的分析多克隆抗体,通过比较具有不同添加的ISV的结合来研究添加1或2个丙氨酸和1,2或3个甘氨酸的影响。为此目的产生和测试的ISV's是NB's 3.4-3.9(SEQ ID NO's:5-10)。

[0277] 作为获得的数据种类的代表性实例,图3显示NB's 3.4-3.9与固定化的多克隆抗体的结合。表V总结了获得的结果。

[0278] 表V

[0279]

克隆 ID	序列号	位置 113 ⁽¹⁾	位置 114 ⁽¹⁾	位置 115 ⁽¹⁾	位置 116 ⁽¹⁾	结合** (RU)
NB 3.4	5	S				75
NB 3.5	6	S	A			9
NB 3.6	7	S	A			8
				A		
NB 3.7	8	S	G			31
NB 3.8	9	S	G	G		13
NB 3.9	10	S	G	G	G	13

[0280] **:在注射结束时获得的结合信号(=最大RU信号)

[0281] ⁽¹⁾在这种编号方式中,位置113是C-端VTVSS基序的最后“S”,并且位置114,115和116是所述位置113的(下游)紧接的位置。

[0282] 为了检查在C-端区的(其他)取代的效果,使用与上述相同的分析多克隆抗体,通过比较包含这些取代的相关ISV's来研究不同的取代的影响。如上所述进行分析。

[0283] 测试的包含所述取代的ISVs是NB's 3.1,3.2和3.4(SEQ ID NO's 3,4和5);NB's 3.10-3.15(SEQ ID NO's 11-16),将其与NB 3.4;NB's 4.1和4.2(SEQ ID NO's 17和18)和NB's 6.1,6.2,6.4和6.5(SEQ ID NO's 19-22)进行比较。

[0284] 作为获得的数据种类的代表性实例:

[0285] -图4显示NB's 3.4,3.11,3.12和3.13与固定化的多克隆抗体的结合;

[0286] -图5显示NB's 3.4,3.14和3.15与固定化的多克隆抗体的结合;

[0287] -图6显示NB's 3.1,3.2和3.4与固定化的多克隆抗体的结合;

[0288] -图7显示NB's 4.1和4.2与固定化的多克隆抗体的结合;

[0289] -图8显示NB's 6.1,6.2,6.4和6.5与固定化的多克隆抗体的结合。

[0290] 表VI,VII和VIII总结获得的结果。

[0291] 表VI

[0292]

克隆 ID	序列号	位置 14 ⁽¹⁾	位置 83 ⁽¹⁾	位置 108 ⁽¹⁾	结合** (RU)
NB 3.4	5	P	R	L	75
NB 3.10	11	A	R	L	91
NB 3.11	12	P	K	L	88
NB 3.12	13	A	R	Q	86
NB 3.13	14	P	R	Q	90

[0293] **:在注射结束时获得的结合信号(=最大RU信号)

[0294] ⁽¹⁾ 根据Kabat的编号方式

[0295] 表VII

克隆 ID	序列号	位置 11 ⁽¹⁾	位置 110 ⁽¹⁾	结合** (RU)
NB 3.4	5	L	T	75
NB 3.14	15	L	Q	79
NB 3.15	16	S	T	22

[0297] **:在注射结束时获得的结合信号(=最大RU信号)

[0298] ⁽¹⁾ 按照Kabat的编号方式

[0299] 表VIII

[0300]

克隆 ID	序列号	位置 14	位置 83 ⁽¹⁾	位置 108 ⁽²⁾	标记*	结合** (RU)
NB 3.1	3	A	K	Q	-	2
NB 3.2	4	A	K	Q	+	0
NB 3.4	5	P	R	L	-	59
克隆 ID		位置 14	位置 83 ⁽³⁾	位置 108 ⁽⁴⁾	标记*	结合** (RU)
NB 4.1	17	P	R	L	-	51
NB 4.2	18	P	R	L	+	0
克隆 ID		位置 14	位置 83 ⁽⁵⁾	位置 108 ⁽⁶⁾	标记*	结合** (RU)
NB 6.1	19	P	K	Q	+	0
NB 6.2	20	P	K	Q	-	39
NB 6.4	21	P	R	L	+	0
NB 6.5	22	P	R	L	-	66

[0301] *:如果是“+”,这种ISV在C-端VTSS末端包含其他的氨基酸。

[0302] **:在注射结束时获得的结合信号(=最大RU信号)

[0303] ⁽¹⁾:根据Kabat的编号方式(对应于SEQ ID NO's 3-5的位置87的氨基酸)。

[0304] ⁽²⁾:根据Kabat的编号方式(对应于SEQ ID NO's 3-5的位置123的氨基酸)。

[0305] ⁽³⁾:根据Kabat的编号方式(对应于SEQ ID NO's 17和18的位置86的氨基酸)。

[0306] ⁽⁴⁾:根据Kabat的编号方式(对应于SEQ ID NO's 17和18的位置116的氨基酸)。

[0307] ⁽⁵⁾:根据Kabat的编号方式(对应于SEQ ID NO's 19-22的位置86的氨基酸)。

[0308] ⁽⁶⁾:根据Kabat的编号方式(对应于SEQ ID NO's 19-22的位置112的氨基酸)。

[0309] 此外,不限于任何具体假说或解释,上述数据显示ISV的C-端区(如本文定义)的(各种)取代可以改变/改善其产生蛋白干扰的倾向。

[0310] 实施例4:进行图1的ADA测定法的代表性方法

[0311] 本实施例提供一些代表性但是非限制性的条件,其可以用于进行在图1中示意性显示的竞争/桥接ADA测定法:

[0312] -在溶液中的图1A的ADA测定法:样品100%基质,30',37℃,使用在10基质中的乙酸进行酸处理,5',室温,预先温育/酸中和

[0313] 样品:ISV-磺基(:Tris)1:1:1(1:0,9:0,9:0,1),1h,室温;在板上1h,室温;洗涤3x,读取缓冲液4次

[0314] -在溶液中的图1B的ADA测定法:样品20%基质,30',37℃,预温育

[0315] 样品: ISV--磺基1:1:1, 1h, 室温, 在板上1h, 室温, 洗涤3次, 读取缓冲液2次

[0316] -图1C的连续ADA测定法: 捕获ISV-Bio, 1h, 室温, 洗涤3次, 样品20%基质, 15', 室温, 在板上: 2h, 室温, 洗涤3X, 检测ALX-0141-磺基, 1h, 室温, 洗涤3次, 读取缓冲液4X

[0317] 实施例5: 使用分析抗体预测ISV针对非特异性蛋白干扰的敏感性

[0318] 本实施例描述了使用分析抗体的桥接/竞争ADA测定法, 其可以用于预测ISV针对非特异性蛋白干扰的敏感性。

[0319] 将待测试的ISV以10 μ g/ml的浓度稀释并且用400ng/ml的分析抗体温育, 根据实施例2所述进行纯化, 并且在96孔聚丙烯板中在37 $^{\circ}$ C以600rpm进行温育。接着, 将样品 (50 μ L) 在2 μ g/ml生物素化和2 μ g/ml磺基-标记的ISV的1:1混合物 (100 μ L) 中稀释1/3并在室温, 600RPM温育1小时。将MSD **MA**[®]96-孔标准链霉抗生物素蛋白板用150 μ L/孔 **Superblock**[®] T20在室温封闭1小时, 接着用PBS/0.05% Tween20 (=洗涤缓冲液) 洗涤3次。将样品/1:1混合物 (生物素化的和磺基-标记的ISV) (50.0 μ L) 从聚丙烯板转移到MSD板并且在室温, 600rpm温育1小时。将板洗涤3次, 之后加入2x读取缓冲液 (MSD) (150 μ L/孔) 并在MSD仪器 (Sector Imager 2400阅读器) 上读取ECL单位 (ECLU)。

[0320] 使用该测定法, 测试并比较SEQ ID NO's 23-30的ISVs。在表IX中显示数据。这些数据不仅显示在本实施例中描述的测定法可以用于预测ISV产生蛋白干扰的倾向, 而且产生的数据还可以证实从前面实施例发现的在C-端区中取代的效果。如可以观察到的, 在完全人源化的ISV的C-端添加3个 (更低的程度1个) 丙氨酸残基消除其竞争与分析抗体结合的能力。在野生型ISV变体上将位置14由丙氨酸突变为脯氨酸明显增加其在测定法中作为竞争者的能力, (=使ISV变体更易于遭受非特异性蛋白干扰), 而突变位置83和108没有明显影响ISV对非特异性蛋白干扰的敏感性。

[0321] 表IX

[0322]

ID 亲和性纯化抗体		IHuP#002-001-ABL-08	
在筛选测定法中的 ECLU (使用 SEQ ID NO:1)		2919	
纳米抗体变体(右手栏提及与 SEQ ID NO: 23 的野生型序列相比, 进行的人源化取代和 C-端添加)		ECLU 证实性测定法	% 减少
SEQ ID NO: 23	野生型 VHH	2706	7.3
SEQ ID NO: 24	野生型 VHH +A14P	268	90.8
SEQ ID NO: 25	野生型 VHH +K83R	2460	15.71
SEQ ID NO: 26	野生型 VHH +Q108L	2533	13.23
SEQ ID NO: 27	野生型 VHH +A14P+K83R+Q108L	319	89.1
SEQ ID NO: 28	野生型 VHH + A14P + R39Q + K83R + T91Y + Q108L	251	91.4
SEQ ID NO: 29	野生型 VHH + A14P + R39Q + K83R + T91Y + Q108L + 在C-端的1个另外的 A (A114)	1207	58.64
SEQ ID NO: 30	野生型 VHH + A14P + R39Q + K83R + T91Y + Q108L + 在 C-端的 3 个 A's (A114+A115+A116)	3301	-13.09

[0323] 实施例6:在抗-0X40L纳米抗体的C-端添加氨基酸对它们的0X40L阻断潜力的影响

[0324] 本实施例证明C-端延伸对纳米抗体的活性或阻断潜力没有影响。

[0325] 三价双特异性序列优化的抗-0X40L纳米抗体Nb 3.16 (SEQ ID NO:31) 的体外潜力与在其C-端包含一个另外的Ala的相应纳米抗体,Nb 3.17 (SEQ ID NO:32) 的潜力进行比较。

[0326] 如下进行第一个测定法,T-细胞激活测定法。使用Ficoll Paque Plus试剂(GE Healthcare),从来自健康供体的暗黄覆盖层(buffy coats) (Red Cross,Ghent,比利时) 分离PBMCs,并使用RPMI 1640完全培养基(RPMI1640+ GlutaMAX+25mM HEPES+10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素;Invitrogen) 洗涤。用植物凝血素(PHA-L;最终浓度0.6μg/ml) 刺激PBMC's (1x10⁵细胞/孔),之后加入1x10⁴表达h0X40L的CHO细胞(用γ-闪烁计数器以3000RAD照射;UZ Gent,比利时) 和抗-0X40L纳米抗体RPMI 1640完全培养基的稀释系列物并在CO₂培养箱中在37℃温育22小时。在ELISA中测量PBMCs产生的IL2。将Maxisorp板的孔用抗-人IL2单克隆抗体(BD Biosciences) 在4℃包被过夜。在洗涤和封闭所述包被的孔后,加入1/2稀释的细胞上清液。作为标准,包括从2000pg/ml开始的重组人IL2(BD Biosciences) 的1/2系列稀释物。使用生物素化的抗-人IL2单克隆抗体(BD Biosciences) 和HRP缀合的链霉抗

生物素蛋白 (Thermo Scientific) 以及 esTMB (SDT Reagents) 进行检测。用 1N HCl 终止反应, 并且在 450nm 读取 OD。如所预期, 三价双特异性序列优化的纳米抗体 Nb 3.17 的潜力 ($IC_{50}=0.13nM$, $95\%CI=0.098-0.17nM$) 与 Nb 3.16 的潜力 ($IC_{50}=0.10nM$, $95\%CI=0.071-0.15nM$) 相当。

[0327] 在第二个基于 ELISA 的竞争测定法中, 将纳米抗体的稀释系列物 (1.5 μ M-0.083pM) 用在 PBS+0.1%BSA+0.01%Tween-20 中的 100ng/ml 人 OX40/Fc (R&D Systems) 和 10ng/ml 生物素化的人 OX40L (R&D Systems; 如实施例 1 所述的自备 (in house) 生物素化) 在室温预-温育过夜。接下来, 将样品在包被了 10ug/ml 抗-人 Fc 纳米抗体 (自备产生) 并用 PBS+1%BSA+0.1%Tween-20 封闭的 Maxisorp 板上进行温育。使用 HRP 缀合的链霉抗生物素蛋白 (Thermo Scientific) 和 sTMB (SDT Reagents) 检测结合的人 OX40/Fc。用 1N HCl 终止反应并且在 450nm 读取 OD。根据基于细胞的测定法, 三价双特异性序列优化的纳米抗体 Nb 3.17 的潜力 ($IC_{50}=0.178nM$, $95\%CI=0.152-0.200nM$) 与 Nb 3.16 的潜力 ($IC_{50}=0.179nM$, $95\%CI=0.149-0.215nM$) 相当。

[0328] 实施例 7: 产生单克隆抗体 21-4-3。

[0329] 在 39 天时期内, 将两组不同的小鼠品系 (BALB/c 和 NMRI-每组 3 只) 用 W0 2006/122825 中的 SEQ ID NO:98 的纳米抗体构建体进行腹膜内免疫, 所述纳米抗体构建体以等体积的抗原和氟氏完全佐剂或不完全佐剂的油包水乳剂形式存在, 伴随加强直到获得适合的抗血清滴度。

[0330] 在 CO₂ 中使刺激的小鼠窒息后, 在无菌条件下摘除脾并且制备合并的脾的单细胞混悬液。用 DMEM 将脾细胞和骨髓瘤细胞洗涤数次, 并且在存在 1ml 50% (w/v) PEG 3350 时进行融合 (脾细胞与 SP2/0 的比率 3:1)。对于融合, 使用来自德国微生物和细胞培养物保藏中心 (DSMZ GmbH, Braunschweig) 的骨髓瘤细胞系 SP2/0-Ag14。这种细胞系是 BALB/c 脾细胞和骨髓瘤细胞系 P3x63Ag8 之间的杂合体。将这样产生的杂交瘤在包含 20%FCS 和氨喋呤 (HAT 培养基) 的 CGM 中重悬浮, 并且平板接种 (140 μ l/孔) 到 8 个 96-孔组织培养平底板 (Corning-Costar) 中, 所述平底板包含 140 μ l/孔 CGM (20%FCS) 以及作为饲养细胞的腹膜溢泌物细胞 (peritoneal exudate cell)。将所述板在完全生长培养基 (CGM) 中温育 10 天, 所述完全生长培养基包含 DMEM 以及添加物 2-巯基乙醇, L-谷氨酰胺, 稳定的谷氨酰胺, HT 以及非必需氨基酸 (在供应商推荐的浓度) 和不同浓度的 FCS (10%, 15% 或 20%)。在这期间, 将细胞用 HAT 培养基饲养两次。来自杂交瘤细胞的细胞培养物上清液通常包含 1-20 μ g/ml 抗体, 将其在结合 ELISA 中进行测试以证实与 W0 2006/122825 中的 SEQ ID NO:98 的纳米抗体构建体的结合。

[0331] 将来自阳性 IgG 产生孔的细胞转移到 48 孔板的孔中并且培养 2-4 天 (取决于细胞的生长特征)。进行关于 ALX081 和人/食蟹猴 IgG 的结合 ELISA's 从而排除非特异性的结合物。使用有限稀释法将表达特异于 W0 2006/122825 中的 SEQ ID NO:98 的纳米抗体构建体的结合物的杂交瘤细胞克隆两次。融合和再次筛选后, 鉴定产生针对 ALX-081 的抗体的 7 个原代培养物。所有这些原代培养物产生不与人或食蟹猴 IgG 交叉反应的抗体。再次克隆原代培养物 (两次)。

[0332] 将克隆 21-4 (在第二次克隆后, 稳定产生针对 ALX-081 的抗体的克隆之一) 命名为 "ABH0015", 并且在 2012 年 6 月 4 日保藏在比利时, 根特的比利时微生物协调保藏中心

(Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms (BCCM)), 保藏号为LMBP 9680CB。将由ABH0015产生

[0333] 实施例8:21-4与ISV的结合预测ISV遭受非特异性蛋白干扰的倾向

[0334] 本实施例与下述实施例9一起证实单克隆21-4与ISV的结合可用于预测(在本实施例指定的确定性的程度内)给定的ISV是否具有遭受非特异性蛋白干扰的倾向(例如在ADA测定法中)。

[0335] 本实施例8具体显示21-4可以用于预测对于给定的ISV的某些建议的修饰(如将一个或多个氨基酸残基添加到ISV的C-端和/或在ISV的C-端区内取代一个或多个氨基酸取代)是否将导致所述ISV遭受非特异性蛋白干扰的倾向减少。

[0336] 简言之,测试一组53种不同的纳米抗体和纳米抗体构建体(见图9和SEQ ID NO's: 38-89)与单克隆21-4-3的结合。还测试相同的纳米抗体和纳米抗体构建体与获自三个不同的人供体(在本文称为“供体8”,“供体19”和“供体”30)的干扰因子的纯化制备物的结合,从而观察在与21-4的结合和与纯化的干扰因子的结合之间是否存在任何关联。

[0337] 确定ISV与21-4的结合确实可用于预测相同ISV's与干扰因子的结合(在由本文提出的数据提供的总置信度范围之内)。

[0338] 为了证实这个,如由下述提出的实验数据所详述的,使用Biacore T100(根据下述提出的方案)测量53种纳米抗体或纳米抗体构建体(如在图9中列出的;见SEQ ID NO's:38-89)与21-4的结合,并将其与参照纳米抗体或构建体的结合(也在图9中列出)进行比较,如使用相同的Biacore仪器和相同的方案所测量的。在下面的表X中显示结果。

[0339]

表 X

序列 号:	C-端氨基 酸	C-端区的突变	与参照序列的结 合(=100 %)比 较, 21-4-3 的结 合的减少	与参照序列比较 (=100%), 来自供 体 A 的血清中干 扰的减少	与参照序列比较 (=100%), 来自供 体 B 的血清中干 扰的减少	与参照序列比较 (=100%), 来自供 体 C 的血清中干 扰的减少	纳 米 抗 体 与 21-4-3 的结合的 超过 70%的减少 预测纳米抗体与 干扰的结 合 的>50%的减少	纳 米 抗 体 与 21-4-3 的结合的 超过 90%的减少 预测纳米抗体与 干扰的结 合 的>50%的减少
37	A	无	7%	3%	21%	31%	好	好
38	A	无	0%	9%	25%	7%	好	好
39	A	无	0%	10%	43%	35%	好	好
40	A	无	1%	6%	#N/A	#N/A	好	好
41	A	无	7%	6%	9%	#N/A	好	好
42	A	无	0%	1%	4%	#N/A	好	好
43	A	无	3%	3%	20%	#N/A	好	好
44	A	无	1%	5%	#N/A	#N/A	好	好

[0340]

表 X (续 - 见上述表头)

45	无	P14A, P41T, S62F, S74A, S82bN, R83K, L108Q	22%	0%	#N/A	#N/A	好	
46	AAEQKLI SEEDLNG AAHHHH HH	A14P, T41P, F62S, A74S, N82bS, K83R, Q108L	2%	0%	#N/A	#N/A	好	好
47	GGGGSG GGSRDW DFDVFG GGTPVG G	无	4%	1%	#N/A	#N/A	好	好
48	AAEQKLI SEEDLNG AAHHHH HH	无	3%	0%	#N/A	#N/A	好	好

[0341]

表 X (续 - 见上述表头)

49	AAEQKLI SEEDLNG AAHHHH HH	V5L, I23A, E44G, A49S, A68T, A74S, T78L, W79Y, K83R, T110Q, Q108L	4%	0%	#N/A	#N/A	好	好
50	无	L11S	44%	77%	33%	#N/A	(<70% 减少)	(<90%减少)
51	无	T110Q	88%	85%	84%	#N/A	(<70%减少)	(<90%减少)
52	无	S112G	100%	84%	58%	#N/A	(<70%减少)	(<90%减少)
53	无	S113G	13%	85%	88%	#N/A	NOK	(<90%减少)
54	无	L11S, T110Q, S112G, S113G	16%	39%	16%	#N/A	好	好
55	A	无	6%	2%	21%	31%	好	好

[0342]

表 X (续 - 见上述表头)

56	G	SI13G	3%	2%	25%	0%	好	好
57	AS	无	6%	1%	2%	#N/A	好	好
58	AST	无	6%	2%	2%	#N/A	好	好
59	ASTK	无	6%	2%	1%	#N/A	好	好
60	ASP	无	6%	2%	1%	#N/A	好	好
61	AP	无	6%	2%	2%	#N/A	好	好
62	APT	无	6%	2%	1%	#N/A	好	好
63	W	无	3%	4%	8%	#N/A	好	好
64	L	无	6%	3%	4%	#N/A	好	好
65	无	P14A	23%	73%	121%	64%	NOK	(<90%减少)
66	无	L11S	48%	81%	29%	84%	(<70%减少)	(<90%减少)
67	无	R83K	101%	102%	117%	96%	(<70%减少)	(<90%减少)
68	无	P14A, L108Q	26%	38%	115%	49%	NOK	(<90%减少)

[0343]

表 X (续 - 见上述表头)

69	无	L108Q	106%	80%	120%	84%	(<70%减少)	(<90%减少)
70	无	T110Q	106%	90%	105%	98%	(<70%减少)	(<90%减少)
71	无	S113G	44%	88%	105%	87%	(<70%减少)	(<90%减少)
72	无	S112G, S113G	45%	70%	47%	56%	(<70%减少)	(<90%减少)
73	G	S112G, S113G	1%	6%	8%	9%	好	好
74	G	无	1%	4%	41%	33%	好	好
75	AA	无	1%	1%	11%	16%	好	好
76	GGG	无	2%	2%	17%	20%	好	好
77	A	无	1%	2%	12%	13%	好	好
78	无	Q13R	1%	96%	96%	100%	NOK	NOK
79	GG	无	2%	1%	17%	13%	好	好
80	无	T110Q, S112G, S113G	51%	65%	5%	58%	(<70% 减少)	(<90%减少)

[0344]

表 X (续- 见上述表头)

81	无	LIIV	75%	94%	50%	89%	(<70%减少)	(<90%减少)
82	无	P84A	56%	96%	80%	100%	(<70%减少)	(<90%减少)
83	无	T87A	79%	56%	73%	61%	(<70%减少)	(<90%减少)
84	无	S112G	91%	84%	50%	83%	(<70%减少)	(<90%减少)
85	无	L11S, T110Q, S112G, S113G	32%	46%	5%	42%	(<70%减少)	(<90%减少)
86	无	L11S, T110Q	64%	76%	6%	86%	(<70%减少)	(<90%减少)
87	无	L11S, S112G, S113G	41%	51%	5%	39%	(<70%减少)	(<90%减少)
88	A	L11S, T110Q	1%	1%	5%	11%	好	好
89	无	L11S, P14A, T110Q, S112G, S113G	2%	14%	5%	17%	好	好

[0345] 对于测试的53种纳米抗体或纳米抗体构建体的每一种,选择这样的参照从而当与参照比较时,测试的纳米抗体或纳米抗体构建体在C-末端具有一个或多个另外的氨基酸

残基(添加所述氨基酸残基从而测试所述添加对蛋白干扰的影响,并且具体地从而减少所述干扰)和/或在C-端区内的一个或多个突变(例如,与参照比较,人源化的结果)。

[0346] 将结果表示为:与参照的结合(测量为RU单位)比较,关于给定的纳米抗体的结合(也以RU单位测量)的百分比减少-例如,如果参照纳米抗体的测量的结合水平(RU)是276,给定的纳米抗体的结合水平(也以RU表示)是9,那么结合水平的减少是 $[9 \text{ RU}/276\text{RU}] \times 100\% = 3\%$ 的水平,这意味着与参照(100%)比较97%的减少。

[0347] 类似地,使用相同的Biacore仪器测量来自三个供体的每个的纯化的干扰因子与53种纳米抗体或纳米抗体构建体的每种的结合,并将其与纯化的干扰因子和相同的参照纳米抗体或构建体的结合进行比较。将结果类似地表示为与参照比较,干扰因子与给定的纳米抗体或纳米抗体构建体的结合的百分比减少。

[0348] 发现对于基本上所有的纳米抗体或纳米抗体构建体(其中与参照比较,在C-末端添加了一个或多个氨基酸残基),干扰因子的结合被急剧减少。这再次证实了将一个或多个氨基酸残基添加到ISV的C-末端(VTVSS)可以减少在ADA测定法中的非特异性蛋白干扰。还发现在大多数情形中,与参照相比仅在C-端区内进行取代(即不在C-端添加一个或多个氨基酸残基)通常不会对干扰因子的结合造成类似的急剧影响。

[0349] 接着进一步分析数据以确定与参照相比,与21-4结合的减少在任何情况下与和参照比较纯化的干扰因子的三种不同制备物的每一种的结合的减少相关。发现这样的相关。

[0350] 例如,发现在测试的54种纳米抗体或纳米抗体构建体中,有36种显示与它们各自的参照序列比较与21-4的结合的超过70%的减少(关于这36种在C-端具有一个或多个另外的氨基酸残基的纳米抗体或纳米抗体构建体中的大多数,在一些情形中与在C-端区内的取代组合)。在这36种中,有32种也显示与参照相比与干扰因子的结合的超过50%的减少(并且在很多情形中,具体地关于在C-端添加了一个或多个氨基酸残基的纳米抗体或纳米抗体构建体,减少远大于50%,如超过70%或甚至超过90%,见在表X中提供的数据)。这证实了在36种情形中有32种(即89%),与21-4结合的超过70%的减少(与参照=100%比较)预测与干扰因子的结合的超过50%的减少(与相同的参照比较)。为清楚起见,在每种情形中,将减少计算为 $100\% - [\text{在下表中给出的关于测试的纳米抗体获得的减少水平的百分比}]$ 。

[0351] 类似地,发现在测试的53种纳米抗体或纳米抗体构建体中,有33种显示与它们各自的参照序列比较与21-4的结合的超过90%的减少(再一次,关于这33种在C-端具有一个或多个另外的氨基酸残基的纳米抗体或纳米抗体构建体中的大多数,在一些情形中与在C-端区内的取代组合)。在这33种中,有32种也显示与它们各自参照序列相比与干扰因子的结合的超过50%的减少。这证实了在33种情形中有32种(即97%),与21-4结合的超过90%的减少(与参照比较)预测与干扰因子的结合的超过50%的减少(与相同的参照比较)。

[0352] 还应该注意关于干扰因子的结合的所述超过50%的减少(如由与21-4的结合超过70%的减少所证实的)意味着所述干扰因子基本上不再干扰关于目的ISV的ADA测定法:使用ADA测定法的实验证实显示当与干扰因子的结合减少超过45%时,不能观察到干扰因子的存在对于ADA测定法具有明显影响。在这一方面,对于技术人员也清楚的是,当与干扰因子的结合减少到远超过50%的程度(如超过70%或甚至超过90%)时,更是如此,如在一些情形中观察到的(也见在本文列举的数据)。

[0353] 事实上,已经发现与21-4的结合的超过45%的减少指示与干扰因子的结合超过

45%的减少,其如所提及意味着干扰因子不再干扰ADA测定法。

[0354] 而且,本文提出的关于与21-4的结合(的减少)和与干扰因子的结合(的减少)之间的关联的数据也允许本发明人设置关于与21-4的结合的绝对值,在所述绝对值之下,可以预期(在本实施例8中提出的数据所提供的置信度范围内)ISV或基于ISV的构建体将不易于以可以干扰ADA测定法的方式与干扰因子结合。如在下述实施例9中所提出的,该值是500RU(如在实施例9中所提出确定并且计算的)。

[0355] 如下,从在上述实施例7中获得的杂交瘤的培养基纯化单克隆21-4: 在旋转式烧瓶中在100mL或500mL的无血清培养基中(CD杂交瘤,Gibco,补充8mM L-谷氨酰胺(Invitrogen)和1×胆固醇(250×胆固醇脂质浓缩物,Gibco))培养分泌单克隆抗体21-4-3的杂交瘤细胞。过滤澄清的上清液,并以2mL/min的减少流速在蛋白A柱(HiTrap MabSelect SuRe, 5mL, GE Healthcare)上捕获鼠IgG1。在0.1M柠檬酸盐缓冲液pH3.0中洗脱结合的抗体,并且用1mL 1M TRIS pH9直接中和洗脱级分(5mL)。通过还原和非还原SDS-PAGE证实抗体的纯度。

[0356] 来自供体8和19的干扰因子的纯化的制备物通过亲和性纯化的方式从来自所述供体的血清样品获得,基本如在实施例2A中所述。来自供体30的干扰因子获自供体30的血清样品,基本如在实施例2B中所述。

[0357] 为了确定21-4与纳米抗体或纳米抗体构建体的每一种的结合,使用在实施例9中所述的方案。

[0358] 使用直接固定在CM5传感器芯片上的来自供体8,19和30的每种的干扰因子,使用基本如在实施例3中所述的Biacore T100测定来自三个供体的干扰因子与纳米抗体或纳米抗体构建体的每一种的结合。

[0359] 实施例9:预测ISV是否具有遭受非特异性蛋白干扰的方案(使用单克隆21-4)

[0360] 使用CM5T120416传感器芯片使用Biacore T100进行结合测量法,使用运行缓冲液HBS-EP+, 25℃。通过固定化的兔抗-小鼠IgG捕获21-4,因为已经发现直接固定化的mAb 21-4-3表面不能有效地再生。所用的抗-小鼠IgG是与所有的IgG亚类,IgA和IgM反应的多克隆兔抗-小鼠IgG抗体(GE Healthcare; Cat#BR-1008-38; Lot#10056316)。使用用于活化的7分钟注射EDC/NHS和用于失活的7分钟注射1M乙醇胺HCl pH 8.5 (Biacore, 胺偶联试剂盒),使用人工胺偶联进行抗-小鼠IgG的固定化。结合条件列在表XI中。基于蛋白的固定化水平和MW, mAb21-4-3与固定化的抗-小鼠IgG结合的理论 R_{max} 是~13000RU(当一个mAb21-4-3分子与一个抗-小鼠IgG分子结合时)。

[0361] 表XI

蛋白	浓度	接触时间	流速	固定缓冲液	固定水平
	($\mu\text{g/ml}$)	(s)	($\mu\text{l/min}$)		
抗-小鼠 IgG	30	420	5	10mM 乙酸盐 pH5.0	13028
		24	5		13318

[0363] 用于使用以所述方式固定化的21-4的结合实验 (Biacore T100) 的条件在表XII中提供。在捕获mAb21-4-3并且注射所有的样品后可以成功再生抗-小鼠IgG表面 (在每次再生后基线水平有限增加)。

[0364] 表XII

[0365]

捕获	
流程	4
流速 (μl/min)	10
接触时间 (s)	180
浓度(μg/ml)	10
结合和解离	
流程	3,4
流速(μl/min)	45
样品接触时间(s)	120
样品浓度 (nM)	500
解离时间(s)	600
再生 1	
流程	3,4
流速(μl/min)	10
再生接触时间(s)	180
再生缓冲液	10mM 甘氨酸-HCl pH1.7

[0366]

稳定时间 (s)	120
如果 ...那么...否则	如果在 Fc4 上再生后 1>20RU
	否则退出循环
再生 2	
流程	3,4
流速(μl/min)	10
再生接触时间(s)	120
再生缓冲液	10mM 甘氨酸-HCl pH1.7
稳定时间(s)	120

[0367] 上述方案用于产生在表X中提出的21-4结合数据。当考虑关于RU的绝对值时 (在根据公式 ($[\text{测量的RU}] / [\text{蛋白的MW}] \times 10^6$), 关于ISV、蛋白或多肽的分子量调整测量的RU值

后),发现在表X中提及的纳米抗体和纳米抗体构建体(具有添加的丙氨酸残基,并且与21-4以及干扰因子的结合都显示>90%的减少)通常提供30RU-400RU之间的RU值(关于相应的参照纳米抗体或多肽-如在图9中列出的-具有超过1000,通常多于1500,并且通常多于2000的RU值)。

[0368] 基于此,认为在该测定法中少于500的(调整后)的RU值将清楚地指示ISV(或包含至少一个IS的蛋白或多肽,如本文所述)(基本上)不会以干扰ADA测定法的方式被干扰因子结合。

[0369] 在本申请中通篇所引用的所有参考文献(包括文献参考文献,授权的专利,公开的专利申请,和共同-待审的专利申请)的完整内容特此清楚地并入本文作为参考,特别是关于本文所提及的教导。

<110> Ablynx N.V.

<120> 用于预测、检测和减少涉及免疫球蛋白单可变结构域的测定法中的非特异性蛋白干扰的技术

<130> P011-08-PCT

<160> 89

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 270

<212> PRT

<213> -

<400> 1

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

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

[0001]

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

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

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

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

Ala Lys Ser Arg Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Thr Tyr Asp Asn Arg
100 105 110

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
130 135 140

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
145 150 155 160

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met
165 170 175

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala
180 185 190

Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser Gly Val Ser Ala Ile Tyr Gly Asp
195 200 205

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
210 215 220

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu
245 250 255

[0002]

Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

<210> 2

<211> 385

<212> PRT

<213> -

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Tyr Ile Arg Pro Asp Thr Tyr Leu Ser Arg Asp Tyr Arg Lys
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
145 150 155 160

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
165 170 175

[0003]

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp
180 185 190

Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
195 200 205

Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
210 215 220

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
225 230 235 240

Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
260 265 270

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
275 280 285

Ser Ser Tyr Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
290 295 300

Glu Phe Val Ser Ser Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
305 310 315 320

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
325 330 335

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
340 345 350

Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Ile Arg Pro Asp Thr Tyr Leu Ser Arg Asp
355 360 365

Tyr Arg Lys Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
370 375 380

Ser
385

[0004]

<210> 3
<211> 117
<212> PRT
<213> -

<400> 3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp
20 25 30

Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Thr Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val
35 40 45

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

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

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn

	85	90	95
	Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Gln 100 105 110		
	Val Thr Val Ser Ser 115		
	<210> 4 <211> 140 <212> PRT <213> -		
	<400> 4		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly 1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp 20 25 30		
	Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Thr Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val 35 40 45		
[0005]	Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Val Lys 50 55 60		
	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ile Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu 65 70 75 80		
	Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn 85 90 95		
	Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Gln 100 105 110		
	Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu 115 120 125		
	Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His 130 135 140		
	<210> 5 <211> 117		

<212> PRT

<213> -

<400> 5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp
20 25 30

Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val
35 40 45

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

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

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

[0006]

Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 125

<212> PRT

<213> -

<400> 6

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala
115 120 125

<210> 7
<211> 124
<212> PRT
<213> -

<400> 7

[0007] His His His His His His Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115

120

<210> 8
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> -

<400> 8

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
 20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
 35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
 50 55 60

[0008]

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
 100 105 110

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

<210> 9
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> -

<400> 9

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
 20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

[0009] <210> 10
<211> 126
<212> PRT
<213> -

<400> 10

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

<210> 11
<211> 123
<212> PRT
<213> -

<400> 11

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

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

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

[0010] Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

<210> 12
<211> 123
<212> PRT
<213> -

<400> 12

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

[0011]

<210> 13

<211> 123

<212> PRT

<213> -

<400> 13

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

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

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14

<211> 123

<212> PRT

<213> -

<400> 14

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

[0012] Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> -

<400> 15

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

[0013]

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

<210> 16

<211> 123

<212> PRT

<213> -

<400> 16

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

Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

<210> 17

<211> 121

<212> PRT

<213> -

<400> 17

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

[0014]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Lys Ile Asn
20 25 30

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

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

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

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

Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> -

<400> 18

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Lys Ile Asn
 20 25 30

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

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

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

[0015] Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg 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 Arg Asp Trp Asp Phe Asp Val Phe Gly Gly Gly Thr Pro Val
 130 135 140

Gly Gly
 145

<210> 19
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> -

<400> 19

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

	1		5					10						15				
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ile	Ala	Ser	Gly	Leu	Pro	Phe	Ser	Thr	Lys		
				20					25					30				
	Ser	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val		
			35					40					45					
	Ala	Arg	Ile	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Phe	Val		
			50				55					60						
	Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Thr	Trp		
	65					70				75						80		
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85						90					95			
	Ala	Ser	Gly	Glu	Arg	Ser	Thr	Tyr	Ile	Gly	Ser	Asn	Tyr	Tyr	Arg	Thr		
				100					105					110				
[0016]	Asn	Glu	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Thr	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
			115					120					125					
	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala		
			130				135					140						
	Ala	His	His	His	His	His	His											
	145					150												
	<210>		20															
	<211>		128															
	<212>		PRT															
	<213>		-															
	<400>		20															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
	1				5					10					15			
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ile	Ala	Ser	Gly	Leu	Pro	Phe	Ser	Thr	Lys		
				20					25					30				
	Ser	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val		
			35					40					45					

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

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

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

Ala Ser Gly Glu Arg Ser Thr Tyr Ile Gly Ser Asn Tyr Tyr Arg Thr
100 105 110

Asn Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Thr Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 21

<211> 151

<212> PRT

<213> -

<400> 21

[0017]

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Pro Gly Gly Thr Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Phe 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Glu Arg Ser Thr Tyr Ile Gly Ser Asn Tyr Tyr Arg Thr
100 105 110

Asn Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
130 135 140

Ala His His His His His His
145 150

<210> 22

<211> 128

<212> PRT

<213> -

<400> 22

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

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

[0018] Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Pro Gly Gly Thr Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Phe 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Glu Arg Ser Thr Tyr Ile Gly Ser Asn Tyr Tyr Arg Thr
100 105 110

Asn Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 23

<211> 134

<212> PRT

<213> -

<400> 23

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

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

Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser
50 55 60

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

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

[0019]

Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly
100 105 110

Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Gln Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 24

<211> 134

<212> PRT

<213> -

<400> 24

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser
50 55 60

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

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

Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly
100 105 110

Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Gln Val Thr Val Ser Ser
130

[0020] <210> 25
<211> 134
<212> PRT
<213> -

<400> 25

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

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

Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser
50 55 60

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

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

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly
100 105 110

Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Gln Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 26

<211> 134

<212> PRT

<213> -

<400> 26

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

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

[0021]

Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser
50 55 60

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

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

Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly
100 105 110

Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 27
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> -

<400> 27

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25 30

Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly
 35 40 45

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser
 50 55 60

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

[0022] Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 85 90 95

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly
 100 105 110

Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser
 130

<210> 28
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> -

<400> 28

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25 30

Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser
50 55 60

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

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

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly
100 105 110

Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser
130

[0023]

<210> 29
<211> 137
<212> PRT
<213> -

<400> 29

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser
50 55 60

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

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

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly
100 105 110

Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala
130 135

<210> 30

<211> 137

<212> PRT

<213> -

<400> 30

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

[0024]

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser
50 55 60

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

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

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly
100 105 110

Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr
115 120 125

	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala										
	130						135												
	<210>	31																	
	<211>	367																	
	<212>	PRT																	
	<213>	-																	
	<400>	31																	
	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
	1				5					10					15				
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Ile	Gly	Arg	Leu	Asp			
				20					25					30					
	Arg	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	His	Arg	Pro	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Leu	Val			
			35					40						45					
	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Gly	Ser	Ser	Ile	Asn	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val	Lys			
			50				55					60							
[0025]	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ile	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu			
	65					70					75					80			
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn			
					85					90					95				
	Phe	Asn	Lys	Tyr	Val	Thr	Ser	Arg	Asp	Thr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu			
				100					105					110					
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val			
			115					120					125						
	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu			
			130				135						140						
	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met			
	145					150					155					160			
	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser			
					165					170					175				
	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly			

	180	185	190
	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln 195 200 205		
	Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile 210 215 220		
	Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser 225 230 235 240		
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu 245 250 255		
	Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys 260 265 270		
	Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg 275 280 285		
[0026]	His Arg Pro Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly 290 295 300		
	Ser Ser Ile Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser 305 310 315 320		
	Ile Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg 325 330 335		
	Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr 340 345 350		
	Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 355 360 365		
	<210> 32		
	<211> 368		
	<212> PRT		
	<213> -		
	<400> 32		
	Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp
20 25 30

Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val
35 40 45

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

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

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

Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
115 120 125

[0027]

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
130 135 140

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
145 150 155 160

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
165 170 175

Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
180 185 190

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
195 200 205

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
210 215 220

Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
245 250 255

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
260 265 270

Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg
275 280 285

His Arg Pro Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly
290 295 300

Ser Ser Ile Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
305 310 315 320

Ile Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
325 330 335

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr
340 345 350

[0028]

Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
355 360 365

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> -

<400> 33

Val Thr Val Ser Ser
1 5

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> -

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X = 基团 (X)_n, 其中N = 1-10, 优选1-5并且X是任何氨基酸。

<400> 34

Val Thr Val Ser Ser Xaa
1 5

<210> 35

<211> 218

<212> PRT

<213> -

<400> 35

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Val Thr Gly Glu Pro Ala Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

[0029]

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Leu Ile His Phe Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp
165 170 175

Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro
180 185 190

Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
210 215

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> -

<400> 36

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Asn Phe
20 25 30

[0030]

Ile Ser Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Ile Ile
35 40 45

His Asp Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu His Tyr Asp Asn Leu Leu Arg
85 90 95

Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 37
<211> 122
<212> PRT
<213> -

<400> 37

[0031] His His His His His His Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
50 55 60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

	115	120
<210>	38	
<211>	271	
<212>	PRT	
<213>	—	
<400>	38	
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
	1 5 10 15	
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
	20 25 30	
	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
	Ser Gly Ile Lys Ser Ser Gly Asp Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Ser Val	
	50 55 60	
[0032]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr	
	65 70 75 80	
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	Ala Lys Ser Arg Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Thr Tyr Asp Asn Arg	
	100 105 110	
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	
	115 120 125	
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val	
	130 135 140	
	Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu	
	145 150 155 160	
	Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met	
	165 170 175	
	Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala	
	180 185 190	

Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser Gly Val Ser Ala Ile Tyr Gly Asp
195 200 205

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
210 215 220

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu
245 250 255

Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
260 265 270

<210> 39

<211> 386

<212> PRT

<213> 人工序列

[0033]

<220>

<223> 纳米抗体或纳米构建体

<400> 39

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Tyr Ile Arg Pro Asp Thr Tyr Leu Ser Arg Asp Tyr Arg Lys
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
145 150 155 160

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
165 170 175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp
180 185 190

Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
195 200 205

[0034]

Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
210 215 220

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
225 230 235 240

Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
260 265 270

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
275 280 285

Ser Ser Tyr Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
290 295 300

Glu Phe Val Ser Ser Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
305 310 315 320

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
325 330 335

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
340 345 350

Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Ile Arg Pro Asp Thr Tyr Leu Ser Arg Asp
355 360 365

Tyr Arg Lys Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
370 375 380

Ser Ala
385

<210> 40
<211> 364
<212> PRT
<213> -

<400> 40

[0035] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

	115	120	125	
	Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu 130	135	140	
	Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp 145	150	155	160
	Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser 165	170		175
	Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe 180	185		190
	Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn 195	200		205
	Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly 210	215	220	
[0036]	Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly 225	230	235	240
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 245	250		255
	Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala 260	265		270
	Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala 275	280		285
	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu 290	295	300	
	Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg 305	310	315	320
	Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro 325	330		335
	Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn			

	340	345	350
	Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
	355	360	
<210>	41		
<211>	246		
<212>	PRT		
<213>	-		
<400>	41		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Lys Ile Asn		
	20	25	30
	Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val		
	35	40	45
[0037]	Ala Gly Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
	50	55	60
	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu		
	65	70	75 80
	Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
	85	90	95
	Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg 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 Leu Val Gln Pro		
	130	135	140
	Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser		
	145	150	155 160
	Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
	165	170	175

Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
180 185 190

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
195 200 205

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Ala
245

<210> 42
<211> 260
<212> PRT
<213> -

<400> 42

[0038]

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
165 170 175

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

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

[0039]

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser Ala
260

<210> 43

<211> 250

<212> PRT

<213> -

<400> 43

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Leu Asp Tyr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Pro Ile Gly Leu Ser Ser Ser Cys Leu Leu Glu Tyr Asp Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

[0040]

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
180 185 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
245 250

	195	200	205	
	Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile 210	215	220	
	Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser 225	230	235	240
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu 245	250	255	
	Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys 260	265	270	
	Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg 275	280	285	
	His Arg Pro Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly 290	295	300	
[0042]	Ser Ser Ile Asn Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser 305	310	315	320
	Ile Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg 325	330	335	
	Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr 340	345	350	
	Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala 355	360	365	
	<210> 45			
	<211> 117			
	<212> PRT			
	<213> -			
	<400> 45			
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly 1	5	10	15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp 20	25	30	

Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Thr Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val
35 40 45

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

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

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

Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

[0043] <210> 46
<211> 143
<212> PRT
<213> -

<400> 46

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser Ile Gly Arg Leu Asp
20 25 30

Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Thr Gly Glu Pro Arg Glu Leu Val
35 40 45

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

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

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

Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala His His His His His His Gly Ala
115 120 125

Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
130 135 140

<210> 47

<211> 146

<212> PRT

<213> -

<400> 47

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Lys Ile Asn
20 25 30

[0044]

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

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

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

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

Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg 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 Arg Asp Trp Asp Phe Asp Val Phe Gly Gly Gly Thr Pro Val
130 135 140

Gly Gly
145

<210> 48
<211> 151
<212> PRT
<213> -

<400> 48

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ile Ala Ser Gly Leu Pro Phe Ser Thr Lys
20 25 30

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

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

[0045] Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Thr Trp
65 70 75 80

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

Ala Ser Gly Glu Arg Ser Thr Tyr Ile Gly Ser Asn Tyr Tyr Arg Thr
100 105 110

Asn Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Thr Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
130 135 140

Ala His His His His His His
145 150

<210> 49
<211> 151
<212> PRT
<213> -

<400> 49

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

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

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

Ser Arg Ile Ser Pro Gly Gly Thr Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Phe 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0046]

Ala Ser Gly Glu Arg Ser Thr Tyr Ile Gly Ser Asn Tyr Tyr Arg Thr
100 105 110

Asn Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
130 135 140

Ala His His His His His His
145 150

<210> 50

<211> 121

<212> PRT

<213> -

<400> 50

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

Ser Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
50 55 60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0047] <210> 51
<211> 121
<212> PRT
<213> -

<400> 51

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
50 55 60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Ser Ser
115 120

<210> 52
<211> 121
<212> PRT
<213> -

<400> 52

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

[0048] Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
50 55 60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gly Ser
115 120

<210> 53
<211> 121
<212> PRT
<213> -

<400> 53

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
50 55 60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Gly
115 120

[0049]

<210> 54
<211> 121
<212> PRT
<213> -

<400> 54

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

Ser Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
50 55 60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Gly Gly
115 120

<210> 55

<211> 122

<212> PRT

<213> -

<400> 55

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

[0050] Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
50 55 60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
100 105 110

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

<210> 56

<211> 123

<212> PRT

<213> -

<400> 56

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
 50 55 60

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

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

[0051] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
 100 105 110

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

<210> 57

<211> 123

<212> PRT

<213> -

<400> 57

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
 50 55 60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
100 105 110

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

<210> 58

<211> 124

<212> PRT

<213> -

<400> 58

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

[0052]

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
50 55 60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
100 105 110

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

<210> 59
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> -

<400> 59

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
 50 55 60

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

[0053] Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
 85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125

<210> 60
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> -

<400> 60

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

	35	40	45
	Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr 50 55 60		
	Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn 65 70 75 80		
	Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp 85 90 95		
	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser 100 105 110		
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Pro 115 120		
	<210> 61 <211> 123 <212> PRT <213> -		
[0054]	<400> 61		
	His His His His His His Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly 1 5 10 15		
	Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly 20 25 30		
	Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly 35 40 45		
	Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr 50 55 60		
	Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn 65 70 75 80		
	Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp 85 90 95		
	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser 100 105 110		

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

<210> 62

<211> 124

<212> PRT

<213> -

<400> 62

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
50 55 60

[0055]

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
100 105 110

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

<210> 63

<211> 122

<212> PRT

<213> -

<400> 63

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
50 55 60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
100 105 110

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

[0056]

<210> 64
<211> 122
<212> PRT
<213> -

<400> 64

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
50 55 60

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

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp

	85	90	95
	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser 100 105 110		
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu 115 120		
	<210> 65 <211> 123 <212> PRT <213> -		
	<400> 65		
	His His His His His His Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly 1 5 10 15		
	Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg 20 25 30		
[0057]	Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly 35 40 45		
	Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn 50 55 60		
	Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ile Asp Asn Ser 65 70 75 80		
	Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr 85 90 95		
	Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr 100 105 110		
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120		
	<210> 66 <211> 123 <212> PRT <213> -		
	<400> 66		

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

Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

[0058]

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

<210> 67

<211> 123

<212> PRT

<213> -

<400> 67

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

<210> 68

<211> 123

<212> PRT

<213> -

<400> 68

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

[0059]

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

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69

<211> 123
 <212> PRT
 <213> -

<400> 69

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
 20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
 35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
 50 55 60

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

[0060]

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 70
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> -

<400> 70

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
 20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
 35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

<210> 71
<211> 123
<212> PRT
<213> -

<400> 71

[0061]

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

<210> 72
<211> 123
<212> PRT
<213> -

<400> 72

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

[0062] Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ile Asp Asn Ser
65 70 75 80

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gly Gly
115 120

<210> 73
<211> 124
<212> PRT
<213> -

<400> 73

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gly Gly Gly
115 120

<210> 74

<211> 124

[0063] <212> PRT

<213> -

<400> 74

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

<210> 75
<211> 125
<212> PRT
<213> -

<400> 75

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

[0064] Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala
115 120 125

<210> 76
<211> 126
<212> PRT
<213> -

<400> 76

His His His His His His Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly

	1				5					10						15
	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Arg
				20					25						30	
	Ser	Ile	Gly	Arg	Leu	Asp	Arg	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	His	Arg	Pro	Gly
			35					40					45			
	Glu	Pro	Arg	Glu	Leu	Val	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Gly	Ser	Ser	Ile	Asn
		50					55					60				
	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ile	Asp	Asn	Ser
	65					70					75				80	
	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr
					85					90					95	
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Phe	Asn	Lys	Tyr	Val	Thr	Ser	Arg	Asp	Thr
				100					105					110		
[0065]	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly		
			115					120					125			
	<210>	77														
	<211>	124														
	<212>	PRT														
	<213>	-														
	<400>	77														
	His	His	His	His	His	His	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Arg
				20					25						30	
	Ser	Ile	Gly	Arg	Leu	Asp	Arg	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	His	Arg	Pro	Gly
			35					40					45			
	Glu	Pro	Arg	Glu	Leu	Val	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Gly	Ser	Ser	Ile	Asn
		50					55					60				
	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ile	Asp	Asn	Ser
	65					70					75				80	

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

<210> 78

<211> 123

<212> PRT

<213> -

<400> 78

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

Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

[0066]

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

<210> 79

<211> 124

<212> PRT

<213> -

<400> 79

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

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ser
20 25 30

Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly Glu
35 40 45

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

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

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

[0067]

Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr Trp
100 105 110

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

<210> 80

<211> 123

<212> PRT

<213> -

<400> 80

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn

	50		55		60
	Tyr Gly Asp Ser Val	Lys Gly Arg Phe Thr	Ile Ser Ile Asp Asn Ser		
	65	70	75	80	
	Lys Asn Thr Val Tyr	Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Pro Glu Asp Thr		
		85	90	95	
	Ala Val Tyr Tyr	Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr	Ser Arg Asp Thr		
		100	105	110	
	Trp Gly Gln Gly Thr	Leu Val Gln Val Gly Gly			
		115	120		
	<210>	81			
	<211>	123			
	<212>	PRT			
	<213>	-			
	<400>	81			
[0068]	His His His His His His	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly			
	1	5	10	15	
	Val Val Gln Pro Gly Gly	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg			
		20	25	30	
	Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg	Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly			
		35	40	45	
	Glu Pro Arg Glu Leu Val	Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn			
		50	55	60	
	Tyr Gly Asp Ser Val	Lys Gly Arg Phe Thr	Ile Ser Ile Asp Asn Ser		
	65	70	75	80	
	Lys Asn Thr Val Tyr	Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Pro Glu Asp Thr		
		85	90	95	
	Ala Val Tyr Tyr	Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr	Ser Arg Asp Thr		
		100	105	110	
	Trp Gly Gln Gly Thr	Leu Val Thr Val Ser Ser			
		115	120		

<210> 82
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> -

<400> 82

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
 20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
 35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
 50 55 60

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

[0069]

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
 100 105 110

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

<210> 83
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> -

<400> 83

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
 20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

<210> 84

<211> 123

<212> PRT

<213> -

[0070]

<400> 84

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

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr

	100	105	110
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gly Ser 115	120	
<210>	85		
<211>	123		
<212>	PRT		
<213>	—		
<400>	85		
	His His His His His His Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly 1 5 10 15		
	Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg 20 25 30		
	Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly 35 40 45		
[0071]	Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn 50 55 60		
	Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ile Asp Asn Ser 65 70 75 80		
	Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr 85 90 95		
	Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr 100 105 110		
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Gly Gly 115 120		
<210>	86		
<211>	123		
<212>	PRT		
<213>	—		
<400>	86		
	His His His His His His Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly 1 5 10 15		

Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

[0072]

<210> 87

<211> 123

<212> PRT

<213> -

<400> 87

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

Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Gly Gly
115 120

<210> 88

<211> 124

<212> PRT

<213> -

<400> 88

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

Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg
20 25 30

[0073] Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
35 40 45

Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
100 105 110

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

<210> 89

<211> 123

<212> PRT

<213> -

<400> 89

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

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

Ser Ile Gly Arg Leu Asp Arg Met Gly Trp Tyr Arg His Arg Pro Gly
 35 40 45

[0074] Glu Pro Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ile Asn
 50 55 60

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

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Asn Lys Tyr Val Thr Ser Arg Asp Thr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Gln Val Gly Gly
 115 120

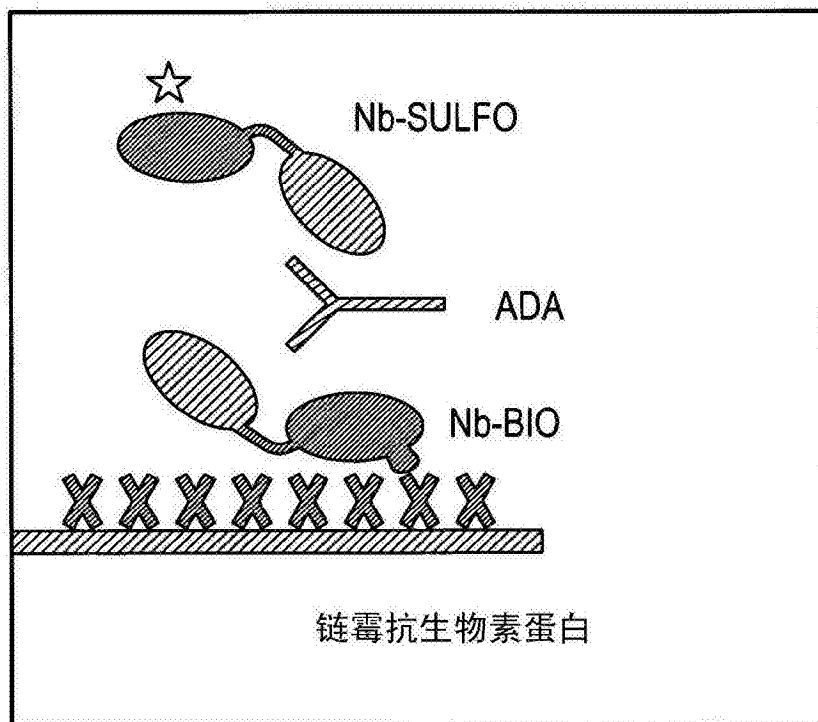


图1A

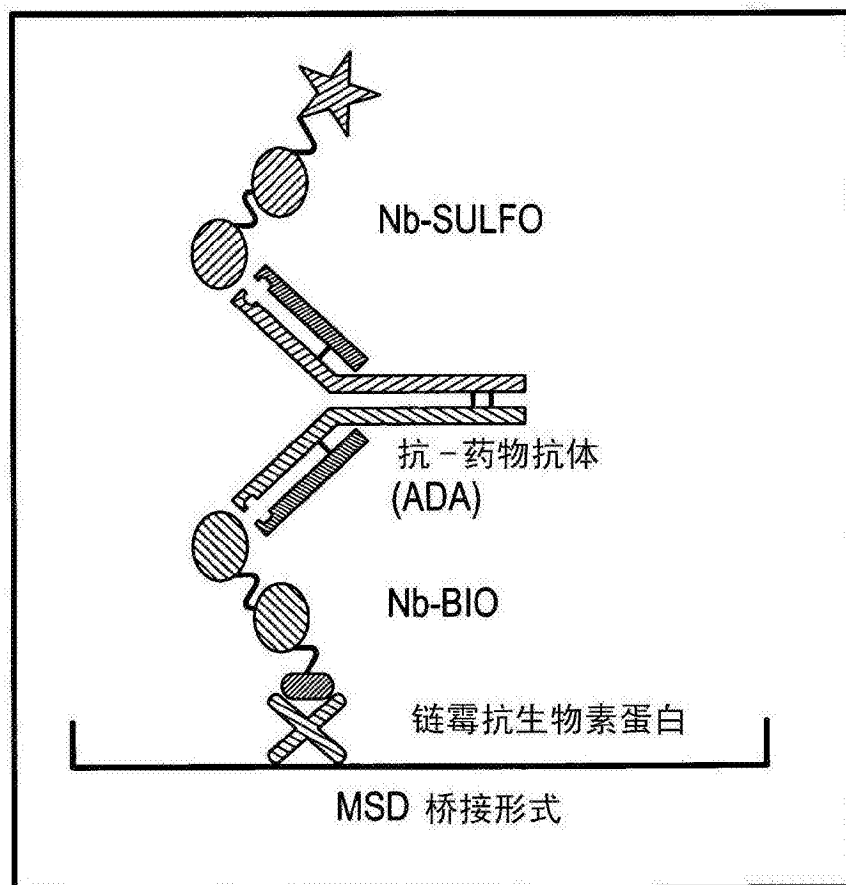


图1B

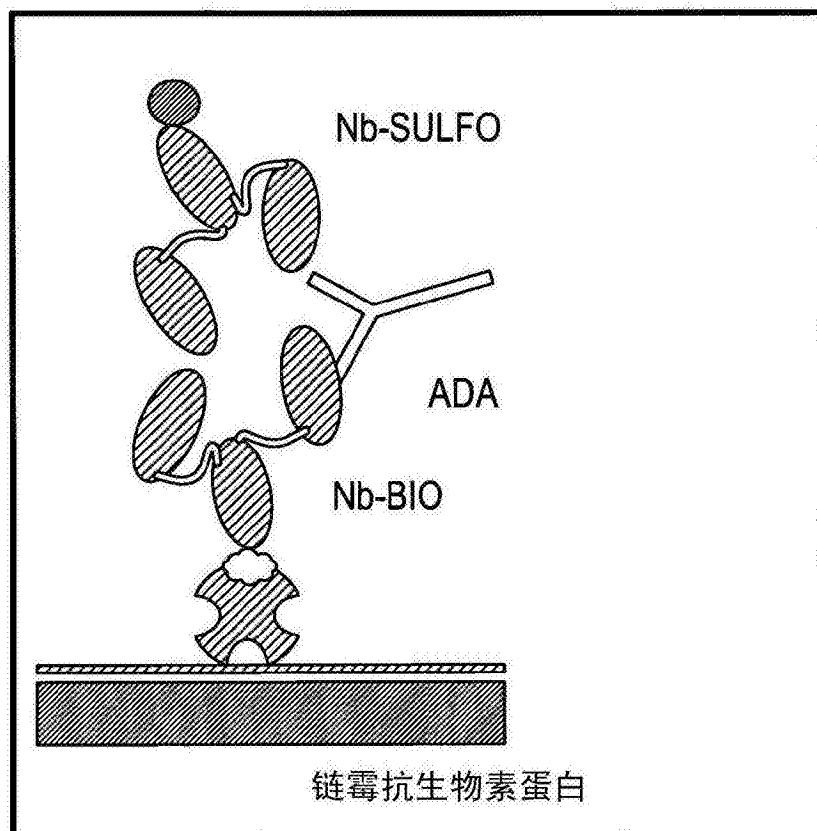


图1C

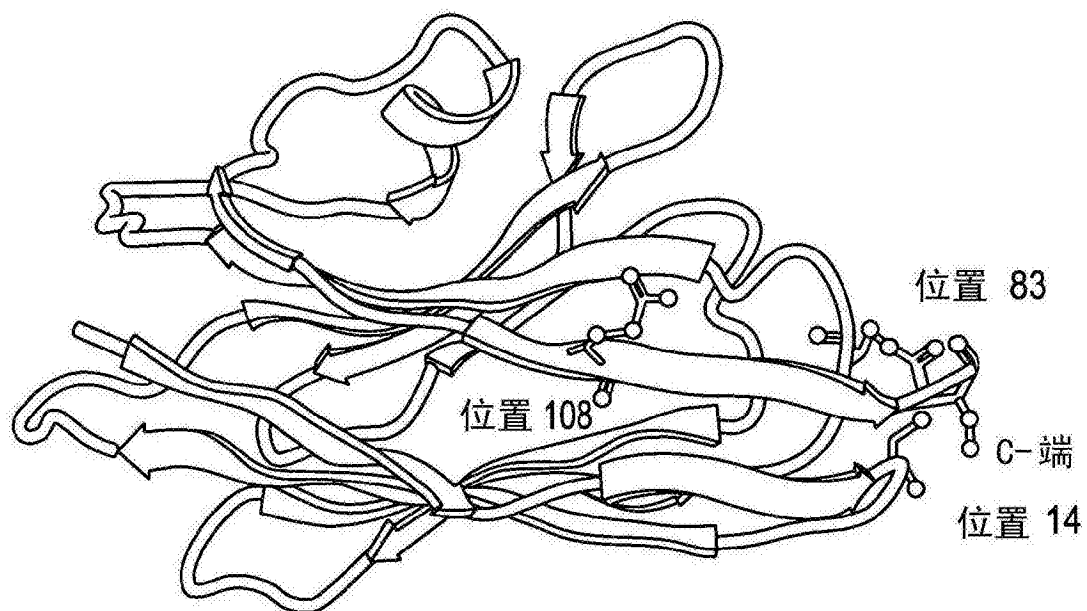


图2

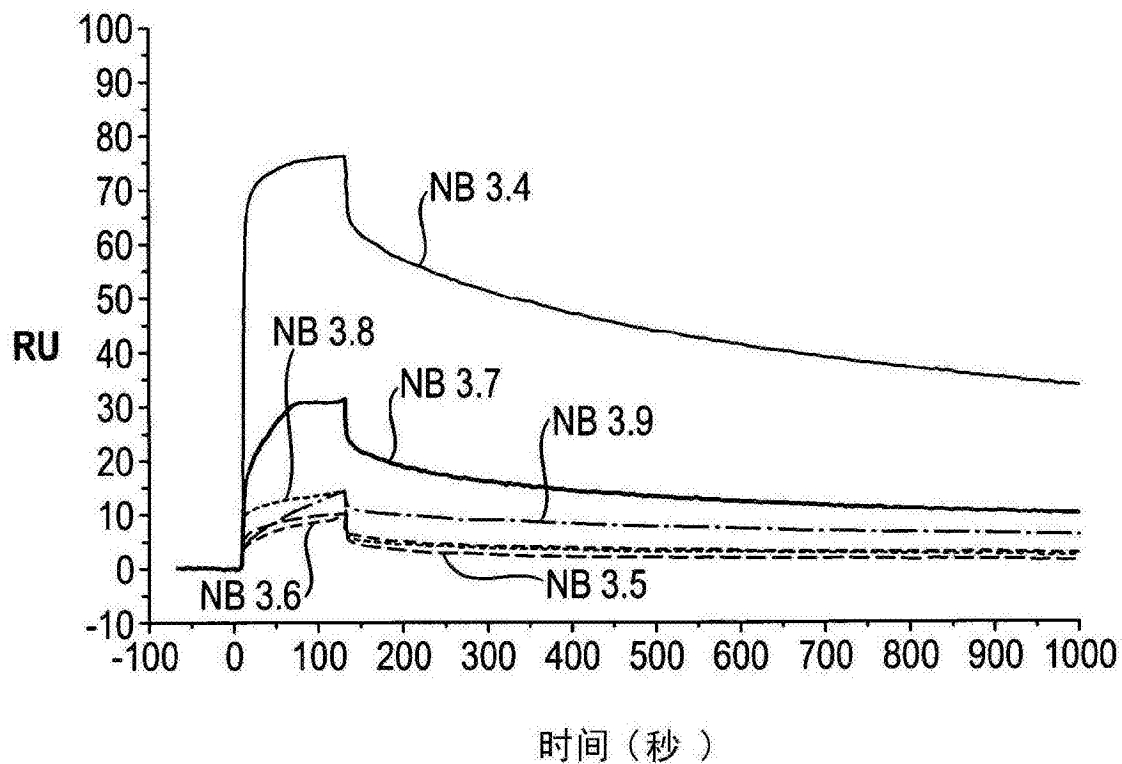


图3

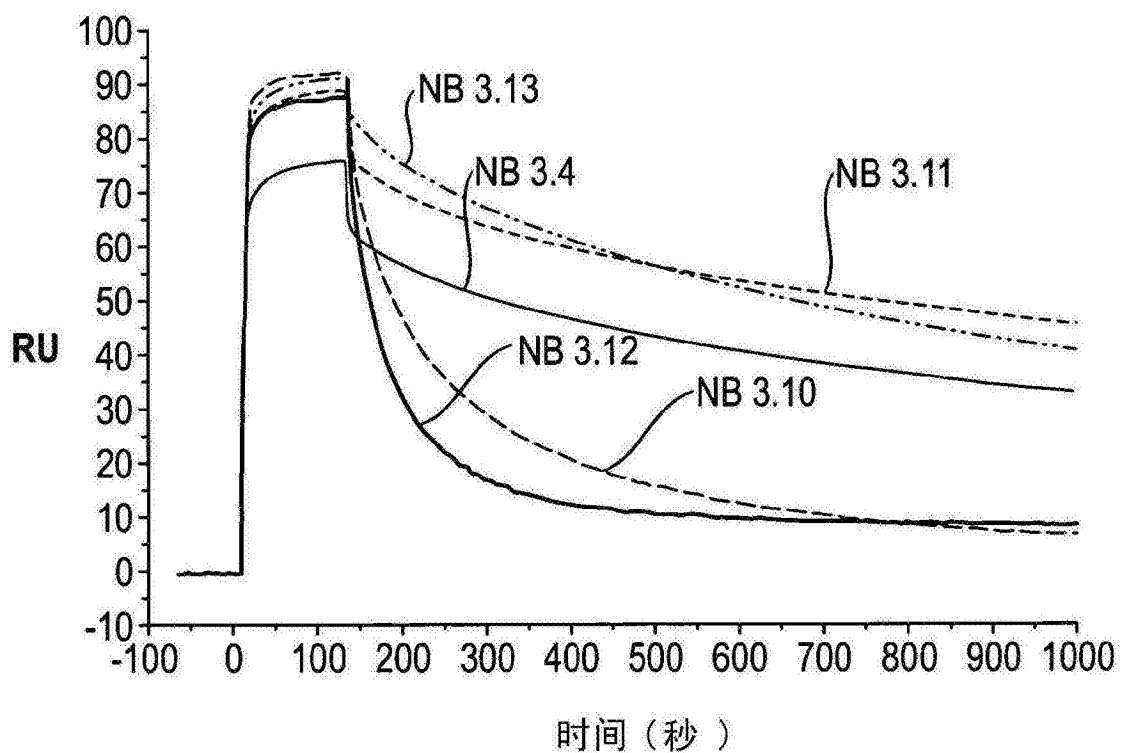


图4

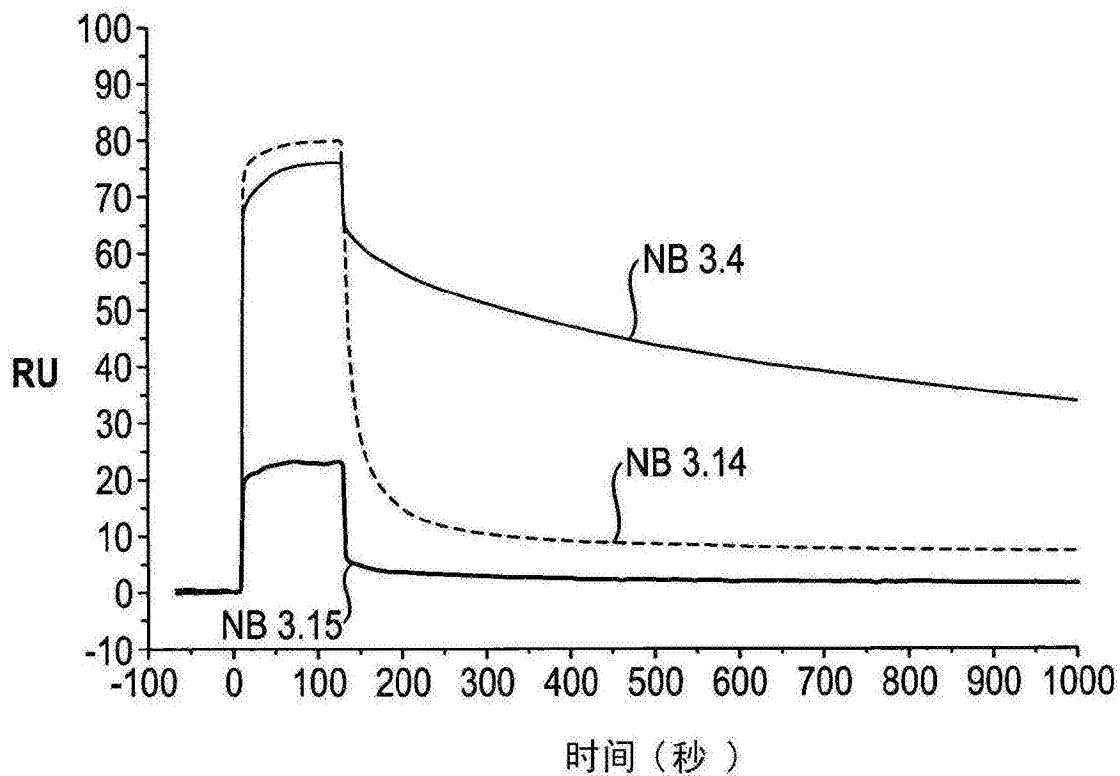


图5

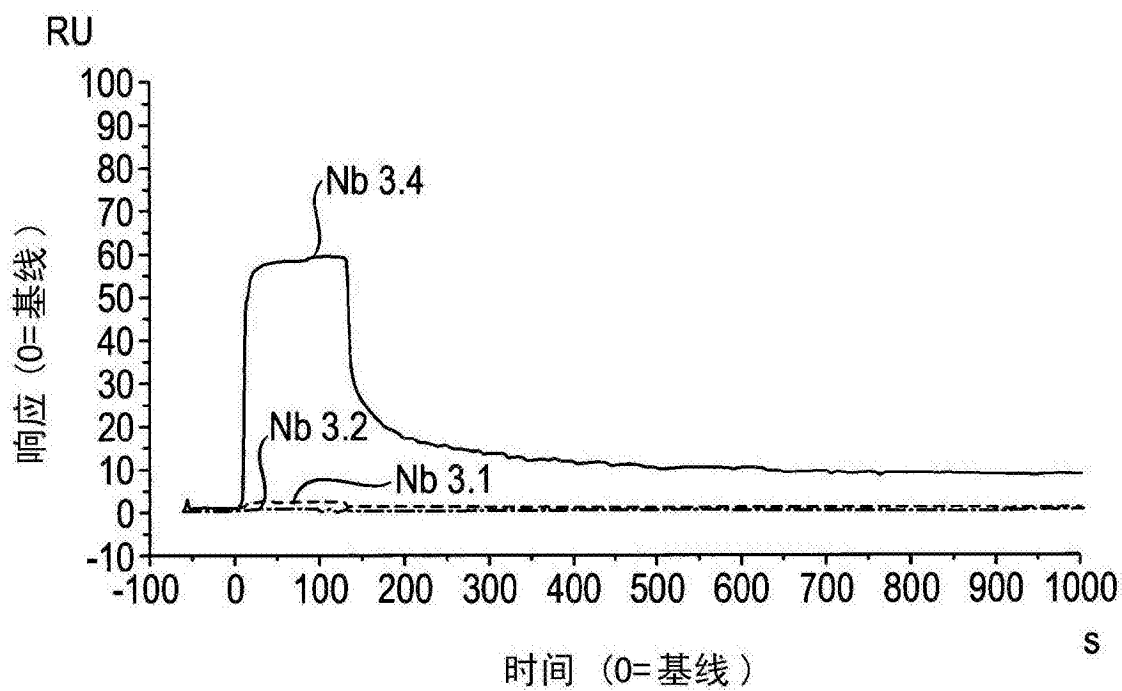


图6

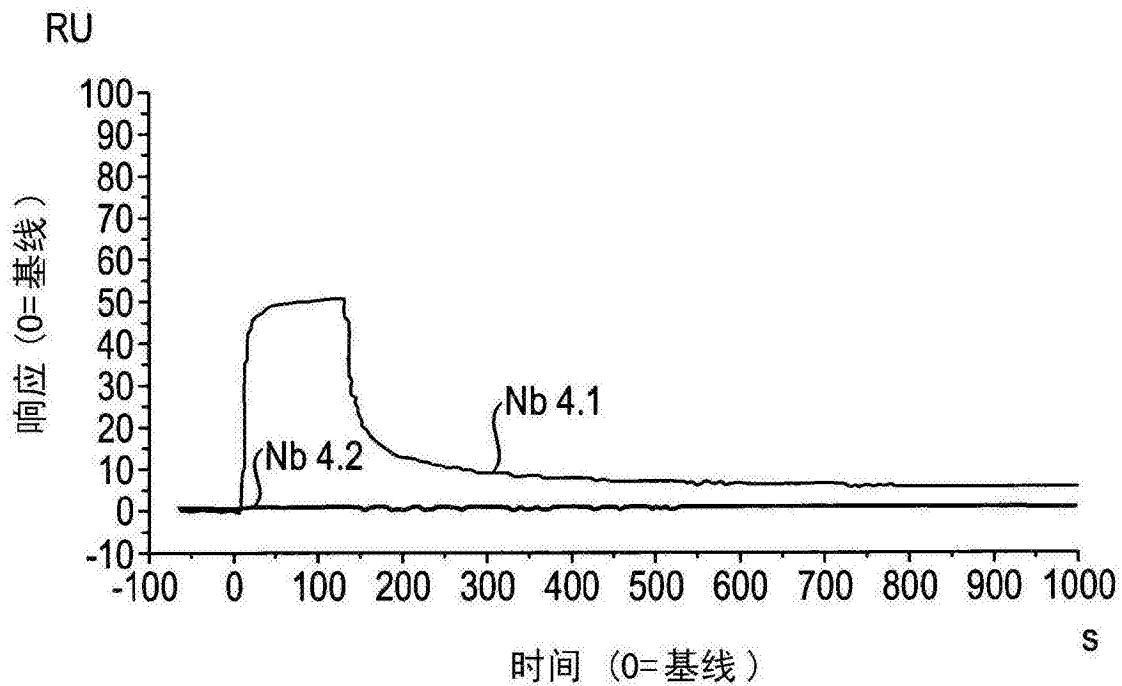


图7

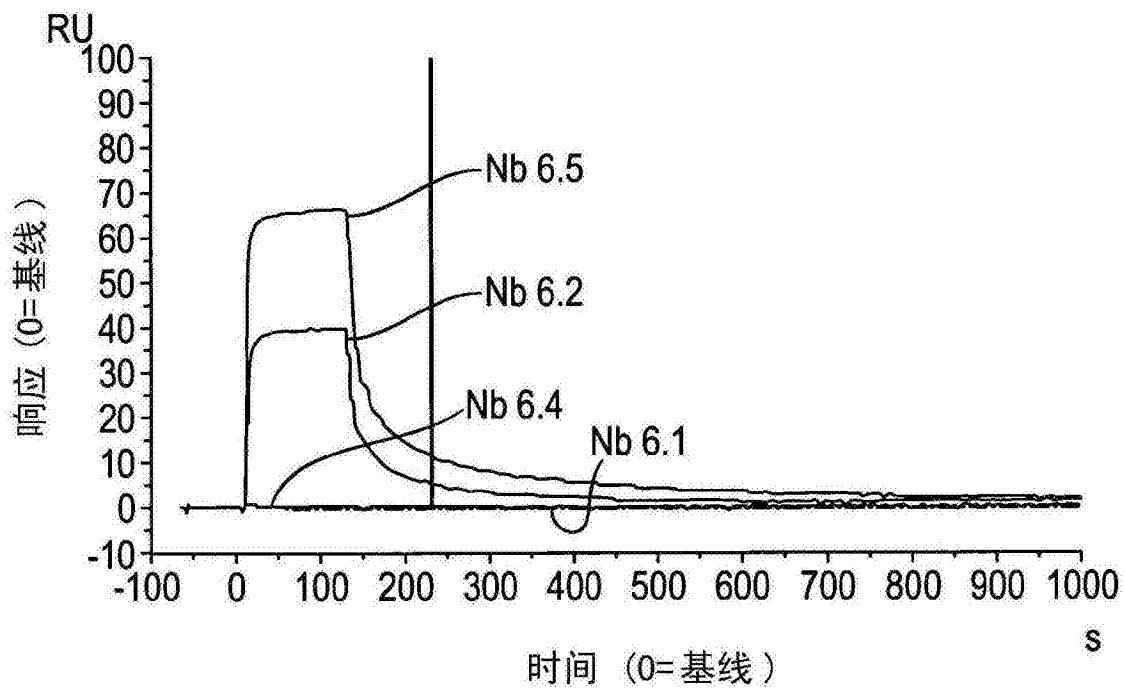


图8

序列号	N-端氨基酸	在C-端区中的突变	序列	参照序列
37	A	无	HHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGDSTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSSA	没有添加的C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 37
38	A	无	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSYAMSWVR QAPGKGLEWVSGIKSSGSDSTRYAGSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAKSRVSRRTGLTYDNRGQ GTLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG VQPGNSLRSLSCAASGRTFNMYAMGWFRQAPGKEREFVA AITRSGVRSVSAIYGDVSKDRFTISRDNKNTLYLQMN SLRPEDTAVYYCAASAIGSGALRRFEYDYSGGGTLTVTS SA	没有添加的C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 38
39	A	无	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSYPMGWFR QAPGKGRFVSSITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAYIRPDYLSRDYRKYDY WGQGTLLTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG RLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYY CTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGG LVQPGNSLRSLSCAASGFTFSYPMGWFRQAPGKEREFVS SITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRP EDTAVYYCAAYIRPDYLSRDYRKYDYWGQGTLLTVTS A	没有添加的C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 39

40	A	无	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYVW RQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGLTVTS SGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSCAASGFTF SSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLVADSVKGR FTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQ GTLVTVSSGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDYWMYVVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITK YPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCA RSPSGFNRGQGLTVTVSSA	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 40
41	A	无	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMAYR QAPGKGRELVAGHSGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRYYWGQGT LVTVSSGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSCA ASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLVAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSRSSQGLTVTVSSA	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 41
42	A	无	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFR QAPGKGRELVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNKR MVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPS YTFWGQGTQTVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAAISRTGGSTY YPDSVEGRFTISRDNKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCA AAGVRAEDGRVRTLPSYTFWGQGTQTVTVSSA	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 42

43	A	无	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLDYAIGWFRQ APGKEREGVLCIDASDDITYADSVKGRFTISRDNSKNT VYLQMNSLRPEDTAVYYCATPIGLSSCLLEYDYDWG QGTLVTSSGGGSGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTERSFGMSWVRQAPGKPEWVSSISGSGSDTLY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLRSSQGTLVTVSSA	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 43
44	A	无	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRISGRDRMGWYR HRPGEPRELVAITGGSSINYGDSVKGRFTISIDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQTLVTV SSGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFT FSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGSLRSS QGTLVTSSGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASRISGRDRMGWYRHRPGEPRELVAITGGSSIN YADSVKGRFTISIDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNFN KYVTSRDTWGQTLVTVSSA	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 44
45	无	P14A, P41T, S62F, S74A, S82bN, R83K, L108Q	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRISGRDRMGWYR HRTGEPRELVAITGGSSINYGDFVKGRFTISIDNAKNTV YLQMNNLKPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTQVTV SS	没有添加的 C-端氨基酸 残基 并且在 C-端区 没有提及的突变的 SEQ ID NO: 45
46	AAEQKLIS EEDLNGA AHHHHH H	A14P, T41P, F62S, A74S, N82bS, K83R, Q108L	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRISGRDRMGWYR HRTGEPRELVAITGGSSINYGDFVKGRFTISIDNAKNTV YLQMNNLKPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQGTQVTV SSAAAHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA	没有添加的 C-端氨基酸 残基 并且在 C-端区 没有提及的突变的 SEQ ID NO: 46

47	GGGSGG GSRDWDF DVFGGGT PVG	无	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSFKINVMAYR QAPGKGRELVAGIISGGSTSYADSVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGT LTVSSGGGGSGGSRDWDFDVFGGGTPVG	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 47
48	AAEQKLIS EEDLNGA AHHHHH H	无	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCIASGLPFSTKSMGWFRQ APGKEREFVARISPGGTSRYGDFVKGRFAISRDNAKNT TWLQMNSLKAEDTAVYYCASGERSTYIGSNYYRTNEYD YWGTTQVTVSSAAAEQKLISEEDLNGAAHHHHH	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 48
49	AAEQKLIS EEDLNGA AHHHHH H	V5L, I23A, E44G, A49S, A68T, A74S, T78L, W79Y, K83R, T110Q, Q108L	EVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCAASGLPFSTKSMGWFR QAPGKGRELVSRISPGGTSRYGDFVKGRFTISRDNASKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGERSTYIGSNYYRTNEY DYWGQGTTLVTVSSAAAEQKLISEEDLNGAAHHHHH	没有添加的 C-端氨基酸 残基 并且在 C-端区 没有提及的突变的 SEQ ID NO: 49
50	无	L11S	HHHHHHEVQLVESGGGSVQPGNSLRLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLY TVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO: 50
51	无	T110Q	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLY QVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO: 51

52	无	S112G	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSTRSSQGTLLV TVGS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO: 52
53	无	S113G	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSTRSSQGTLLV TVSG	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO: 53
54	无	L11S, T110Q, S112G, S113G	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSTRSSQGTLLV QVGG	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO: 54
55	A	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSTRSSQGTLLV TVSSA	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 55
56	G	S113G	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSTRSSQGTLLV TVSSGG	没有添加的 C-端氨基酸 残基 并且在 C-端区 没有提及的突变的 SEQ ID NO: 56
57	AS	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSTRSSQGTLLV TVSSAS	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 57
58	AST	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSTRSSQGTLLV TVSSAST	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 58

59	ASTK	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSSASTK	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 59
60	ASP	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSSASP	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 60
61	AP	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSSAP	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 61
62	APT	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSSAPT	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 62
63	W	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSSW	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 63
64	L	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLV TVSSL	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 64
65	无	P14A	HHHHHHEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLLQMNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQ GTLVTVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO: 65

66	无	L11S	HHHHHEVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDR MGWYRHRPGEPRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISIDN SKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQG TLVTVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:66
67	无	R83K	HHHHHEVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVTVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:67
68	无	P14A, L108Q	HHHHHEVQLVESGGGVQAGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTQVTVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:68
69	无	L108Q	HHHHHEVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTQVTVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:69
70	无	T110Q	HHHHHEVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVQVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:70
71	无	S113G	HHHHHEVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVTVSG	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:71
72	无	S112G, S113G	HHHHHEVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVATITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVTVGG	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:72

73	G	S112G, S113G	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVTVSSGG	没有添加的 C-端氨基酸 残基 并且在 C-端区 没有提及的突变的 SEQ ID NO: 73
74	G	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVTVSSG	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 74
75	AA	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVTVSSAA	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 75
76	GGG	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVTVSSGGG	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 76
77	A	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVTVSSA	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 S EQ ID NO: 77
78	无	Q13R	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDR MGWYRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDN SKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQG TLVTVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO: 78
79	GG	无	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDR MGWYRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDN SKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQG TLVTVSSGG	没有添加的 C-端氨基酸 残基的 SEQ ID NO: 79

80	无	T110Q, S112G, S113G	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVAITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVQVGG	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:80
81	无	L11V	HHHHHHEVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVAITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVTVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:81
82	无	P84A	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVAITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVTVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:82
83	无	T87A	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVAITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDAAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVTVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:83
84	无	S112G	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVAITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQ GTLVTVGS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:84
85	无	L11S, T110Q, S112G, S113G	HHHHHHEVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDR MGWYRHRPGEPRELVAITGGSSINYGDSVKGRFTISIDN SKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQG TLVQVGG	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:85
86	无	L11S, T110Q	HHHHHHEVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDR MGWYRHRPGEPRELVAITGGSSINYGDSVKGRFTISIDN SKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYYVTSRDTWGQG TLVQVSS	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO:86

87	无	L11S, S112G, S113G	HHHHHEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDR MGWYRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQG TLVTVGG	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO: 87
88	A	L11S, T110Q	HHHHHEVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASRSIGRLDR MGWYRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISIDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQG TLVQVSSA	没有添加的 C-端氨基酸 残基 并且在 C-端区 没有提及的突变的 SEQ ID NO: 88
89	无	L11S, P14A, T110Q, S112G, S113G	HHHHHEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASRSIGRLD RMGWYRHRPGEPRELVAITITGGSSINYGDSVKGRFTISID NSKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCNFNKYVTSRDTWGQ GTLVQVGG	在 C-端区没有提及的 突变的 SEQ ID NO: 89

图9