(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110997716 B
(45)授权公告日 2024.03.15

(21)申请号 201880048748.5

(22)申请日 2018.06.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110997716 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(30)优先权数据
62/514,180 2017.06.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.01.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/064608 2018.06.04

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/220225 EN 2018.12.06

(73)专利权人 埃博灵克斯股份有限公司
地址 比利时茨维纳德
专利权人 默克专利有限公司

(72)发明人 索伦·斯特芬森
格拉尔德·贝斯特
盖伊·赫尔曼斯 汉斯·古赫里
克里斯托夫·拉德尔
拉尔斯·托莱克斯

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 吴小明 张莹

(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
C07K 16/40(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)

(56)对比文件
CN 101317089 A,2008.12.03
CN 101443043 A,2009.05.27
CN 105849128 A,2016.08.10
WO 2007045661 A1,2007.04.26
Robert SZTROLOVICS 等.“The mechanism of aggrecan release from cartilage differs with tissue origin and the agent used to stimulate catabolism”.《Biochem. J.》.2002,第362卷第465-472页.
John Thomas Siegwart Jr 等.“Selective modulation of scleral proteoglycan mRNA levels during minus lens compensation and recovery”.《Molecular Vision 》.2007,第13卷第1878-1886页.
潘欣 等.“单域抗体研究进展”.《生命科学》.2012,第24卷(第5期),第404-410页.

审查员 彭丹丹

权利要求书1页 说明书92页
序列表76页 附图4页

(54)发明名称

结合聚集蛋白聚糖的免疫球蛋白

(57)摘要

本发明涉及与聚集蛋白聚糖特异性结合的免疫球蛋白,更特别地,涉及多肽,编码这种多肽的核酸;涉及制备此类多肽的方法;用于预防,治疗或诊断目的的组合物,特别是包含此类多肽的药物组合物。特别地,本发明的免疫球蛋白抑制聚集蛋白聚糖的活性。

CN 110997716 B

1.特异性结合聚集蛋白聚糖的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),其由分别为FR1至FR4的4个构架区和分别为CDR1至CDR3的3个互补决定区组成,其中:

-CDR1是SEQ ID NO:24,CDR2是SEQ ID NO:42,并且CDR3是SEQ ID NO:60;

-CDR1是SEQ ID NO:20,CDR2是SEQ ID NO:38,并且CDR3是SEQ ID NO:56;

-CDR1是SEQ ID NO:21,CDR2是SEQ ID NO:39,并且CDR3是SEQ ID NO:57;

-CDR1是SEQ ID NO:25,CDR2是SEQ ID NO:43,并且CDR3是SEQ ID NO:61;

-CDR1是SEQ ID NO:27,CDR2是SEQ ID NO:45,并且CDR3是SEQ ID NO:63;

-CDR1是SEQ ID NO:29,CDR2是SEQ ID NO:47,并且CDR3是SEQ ID NO:65;

-CDR1是SEQ ID NO:31,CDR2是SEQ ID NO:49,并且CDR3是SEQ ID NO:67;

-CDR1是SEQ ID NO:32,CDR2是SEQ ID NO:50,并且CDR3是SEQ ID NO:68;

-CDR1是SEQ ID NO:34,CDR2是SEQ ID NO:50,并且CDR3是SEQ ID NO:71;

-CDR1是SEQ ID NO:35,CDR2是SEQ ID NO:53,并且CDR3是SEQ ID NO:72;

-CDR1是SEQ ID NO:36,CDR2是SEQ ID NO:54,并且CDR3是SEQ ID NO:73;或

-CDR1是SEQ ID NO:37,CDR2是SEQ ID NO:55,并且CDR3是SEQ ID NO:74。

2.根据权利要求1所述的ISV,其中所述聚集蛋白聚糖为如SEQ ID NO:125所示的人聚集蛋白聚糖,如SEQ ID NO:126所示的狗聚集蛋白聚糖,如SEQ ID NO:127所示的牛聚集蛋白聚糖,如SEQ ID NO:128所示的大鼠聚集蛋白聚糖;或如SEQ ID NO:132所示的食蟹猴聚集蛋白聚糖。

3.根据权利要求1至2中任一项所述的ISV,其中所述ISV选自由以下各项组成的组:由SEQ ID NO:5,1,2,6,8,10,12,13,16,17,18和19组成的ISV,以及与SEQ ID NO:5,1,2,6,8,10,12,13,16,17,18和19中的任何一个具有大于90%的序列同一性的ISV。

4.组合物,其包含至少一个根据权利要求1-3中任一项所述的ISV。

5.根据权利要求4所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

6.根据权利要求5所述的组合物,其进一步包含至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

7.根据权利要求5所述的组合物,其进一步包含至少一种药学上可接受的辅剂。

8.根据权利要求5所述的组合物,其包含一种或多种另外的药学上活性的多肽和/或化合物。

9.特异性结合聚集蛋白聚糖的免疫球蛋白单可变结构域(ISV)在制备用于预防或治疗骨关节炎的药物中的应用,其中所述免疫球蛋白单可变结构域由分别为FR1至FR4的4个构架区和分别为CDR1至CDR3的3个互补决定区组成,其中:

CDR1是SEQ ID NO:24,CDR2是SEQ ID NO:42,并且CDR3是SEQ ID NO:60;或

CDR1是SEQ ID NO:32,CDR2是SEQ ID NO:50,并且CDR3是SEQ ID NO:68。

10.根据权利要求9所述的应用,其中所述免疫球蛋白单可变结构域由SEQ ID NO:5或13组成。

结合聚集蛋白聚糖的免疫球蛋白

发明领域

[0001] 本发明涉及结合聚集蛋白聚糖的免疫球蛋白,更特别地涉及包含一种或更多种这样的免疫球蛋白或基本上由其组成的多肽(本文也分别称为“本发明的免疫球蛋白”和“本发明的多肽”)。本发明还涉及包含这样的免疫球蛋白或多肽的构建体,以及编码这样的免疫球蛋白或多肽的核酸(在本文中也称为“本发明的核酸”);涉及制备这样的免疫球蛋白、多肽和构建体的方法;涉及表达或能够表达这样的免疫球蛋白或多肽的宿主细胞;涉及包含这样的免疫球蛋白、多肽、构建体、核酸和/或宿主细胞的组合物,尤其是药物组合物;以及涉及免疫球蛋白、多肽、构建体、核酸、宿主细胞和/或组合物的用途,特别是用于预防和/或治疗目的,诸如本文提到的预防和/或治疗目的。根据本文的进一步描述,本发明的其他方面,实施方式,优点和应用将变得清楚。

背景技术

[0002] 骨关节炎是世界范围内最常见的致残原因之一。它影响了三千万美国人,且是最常见的关节疾病。预计到2025年它将影响超过20%的美国人口。该病可发生在所有关节,最常见的是膝盖,臀部,手和脊柱。骨关节炎(OA)可定义为多组病症,所述病症的特征在于关节症状,源于关节软骨中的缺陷的体征以及包括骨骼,肌腱和肌肉在内的相邻组织的变化的组合。OA的特征是关节软骨(覆盖骨骼的软骨)逐渐侵蚀。最终,该疾病导致关节软骨的完全破坏,下面的骨骼的硬化,骨赘的形成等,所有这些都导致运动的丧失和疼痛。疼痛是OA最显著的症状,这是患者寻求医疗帮助的最常见原因。

[0003] 聚集蛋白聚糖是关节软骨中的主要蛋白聚糖(Kiani等人2002 Cell Research 12:19-32)。此分子在关节软骨的正常功能中很重要,因为它提供了赋予软骨承重性质的水合凝胶结构。聚集蛋白聚糖是由软骨细胞表达的大的多模块分子(2317个氨基酸)。它的核心蛋白由三个球状结构域(G1,G2和G3)和位于G2和G3之间用于糖胺聚糖链附接的大延伸区域组成。该延伸区域包含两个结构域,一个由硫酸角质素链(KS结构域)置换,一个由硫酸软骨素链(CS结构域)置换。CS结构域具有附接至其上的100-150个糖胺聚糖(GAG)链。聚集蛋白聚糖与透明质酸形成大复合物,在该大复合物中50-100个聚集蛋白聚糖分子通过G1结构域和Link Protein与一个透明质酸分子相互作用。摄入水(由于GAG含量)之后,这些复合物形成可逆地可变形的抗压缩凝胶。关节软骨的结构、液体滞留和功能与聚集蛋白聚糖的基质含量以及结合至完整核心蛋白的硫酸软骨素的量相关联。

[0004] OA的特征是:1)聚集蛋白聚糖的降解,其逐渐释放结构域G3和G2(导致软骨的“收缩(deflation)”)并最终释放G1结构域;和2)胶原蛋白的降解,其不可逆地破坏软骨结构。

[0005] 尽管衰老、肥胖和关节损伤已被鉴定为导致骨关节炎的危险因素,但OA的病因尚不明确,目前尚无可阻止疾病进展或治愈关节的药物治疗。对于大关节,可以将药物注射到关节中以帮助限制潜在的副作用,例如疼痛。治疗策略主要旨在减轻疼痛和改善关节功能。Fasinumab,一种非阿片类抗NGF疼痛治疗,在II/III期试验中已显示可改善关键疼痛评分。度洛西汀已被批准用于治疗由于骨关节炎的慢性膝关节疼痛,并已经被美国风湿病学会有

条件地推荐。在有症状的膝骨关节炎患者的一项大型多中心研究中,发现雷奈酸锶(Strontium ranelate)与安慰剂相比可显著降低关节间隙宽度的下降率并改善疼痛评分。然而,目前生物试剂白介素1受体拮抗剂和抗肿瘤坏死因子抗体既没有显示出有效性,也没有显示出改变骨关节炎的病程(Smelter Hochberg 2013 Current Opin.Rheumatol.25:310)。因此,许多这样的疗法是无效的和/或与副作用有关。如果疼痛不能控制,最终患者将接受全膝或髋关节置换治疗。

[0006] 药物治疗始于对乙酰氨基酚与NSAIDS或COX-2抑制剂和弱阿片样物质联合口服施用。药物口服施用的主要缺点是目标部位的有限的生物利用度以及副作用的风险,例如肝损伤,胃肠道(GI)-溃疡,GI-出血和便秘。

[0007] 由于OA具有局部性,因此药物的关节内施用提供了改善治疗的绝佳机会。然而,大多数新开发的疾病改良骨关节炎药物(DMOAD),即使是关节内施用时,在关节中的滞留时间也很短(Edwards 2011 Vet.J.190:15-21;Larsen等人2008J Pham Sci 97:4622-4654)。治疗性蛋白质的关节内(IA)递送受到其从关节间隙快速清除和缺乏软骨内保留的限制。药物在关节中的滑膜保留时间通常少于24小时。由于大多数IA注射药物的快速清除,需要经常注射以维持有效浓度(Owen等人1994 Br.J.Clin Pharmacol.38:349-355)。然而,由于疼痛和不适,频繁的IA注射是不希望的,因为它们可能引起挑战性的患者依从性,以及引入关节感染的风险。

[0008] Loffredo等人测试了通过与肝素结合结构域融合的向软骨的靶向递送是否足以延长胰岛素样生长因子1(IGF-1)的体内功能。肝素存在于肥大细胞中。但是,肝素的天然作用尚不清楚,但被广泛用作血液稀释剂(Loffredo等人2014Arthritis Rheumatol.66:1247-1255)。

[0009] 仍然需要其他的软骨锚定蛋白(CAP)。

[0010] 发明概述

[0011] 发明人假设,通过将治疗药物偶联至会将该药物“锚定”在关节中并因此增加药物的保留但不应该破坏所述治疗药物的效力的部分(本文中也称为“软骨锚定蛋白”或“CAP”),可显著提高治疗药物的效力。通过降低毒性和副作用,此锚定构思不仅可以提高药物的效力,而且可以提高患病关节的操作特异性,从而扩大了可能有用的药物的数量。本发明人进一步假设聚集蛋白聚糖结合物可能潜在地作为这种锚起作用,尽管聚集蛋白聚糖在影响关节软骨的各种疾病中被严重糖基化并降解。而且,考虑到成本和药物进入临床之前所需的各种动物模型的大量的测试,这种聚集蛋白聚糖结合物应优先具有宽的交叉反应性,例如,聚集蛋白聚糖结合物应与各种物种的聚集蛋白聚糖结合。

[0012] 使用各种巧妙的免疫、筛选和表征方法,本发明人能够鉴定具有优异的选择性、稳定性和/或特异性特征的、能够延长在关节中的保留和活性的许多聚集蛋白聚糖结合物。

[0013] 因此,本发明涉及特异性结合聚集蛋白聚糖的免疫球蛋白单可变结构域(ISV),优选地所述ISV特异性结合人聚集蛋白聚糖(SEQ ID NO:125),和/或其中所述ISV特异性结合狗聚集蛋白聚糖(SEQ ID NO:126),牛聚集蛋白聚糖(SEQ ID NO:127),大鼠聚集蛋白聚糖(SEQ ID NO:128),猪(核心)聚集蛋白聚糖(SEQ ID NO:129),小鼠聚集蛋白聚糖(SEQ ID NO:130),兔聚集蛋白聚糖(SEQ ID NO:131),食蟹猴聚集蛋白聚糖(SEQ ID NO:132)和/或恒河猴聚集蛋白聚糖(SEQ ID NO:133),甚至更优选地,其中所述ISV基本上不与神经蛋白

聚糖(SEQ ID NO:134)和/或短小蛋白聚糖(SEQ ID NO:135)结合。

[0014] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV对于聚集蛋白聚糖结合的选择性是对于神经蛋白聚糖和/或短小蛋白聚糖结合的选择性的大于10倍,大于100倍,优选大于1000倍,和/或所述ISV优选结合至软骨组织例如软骨和/或半月板,和/或所述ISV在37℃下在滑液(SF)中具有至少7天,例如14天、21天、1个月、2个月或甚至3个月的稳定性,和/或所述ISV在软骨保留测定中具有至少为2,例如至少3、4、5或6RU的软骨保留,和/或所述ISV渗透到软骨中至少5μm,例如至少10μm、20μm、30μm、40μm、50μm或甚至更多,和/或所述ISV基本上由以下各项组成:结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化VHH序列,骆驼源化VH序列,或通过亲和力成熟获得的VHH序列。

[0015] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其基本上由4个构架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:24,20,21,22,23,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37和109;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:42,38,39,40,41,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55和110;CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:60,56,57,58,59,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74和111。

[0016] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV结合至聚集蛋白聚糖的G1结构域,优选地,所述ISV具有大于8的pI,和/或所述ISV具有小于$2*10^{-2}s^{-1}$的Koff,和/或所述ISV具有小于$1*10^{-6}$M的EC_{50}。

[0017] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其基本上由4个构架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0018] i)CDR1选自由以下各项组成的组:a)SEQ ID NO:24,20或21;或b)与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有5,4,3,2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置2,S已变为R,F,I或T;在位置3,T已变为I;在位置5,I已变为S;在位置6,I已变为S,T或M;在位置7,N已变为Y或R;在位置8,V已变为A,Y,T或G;在位置9,V已变为M;和/或在位置10,R已变为G,K或A;和/或

[0019] ii)CDR2选自由以下各项组成的组:c)SEQ ID NO:42,38或39;或d)与SEQ ID NO:42的氨基酸序列具有5,4,3,2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置1,T已变为A或G;S或N被插入在位置3和位置4之间(位置2a表1.3B);在位置3,S已变为R,W,N或T;在位置4,S已变为T或G;在位置5,G已变为S;在位置6,G已变为S或R;在位置7,N已变为S,T或R;在位置8,A已变为T;和/或在位置9,N已变为D或Y;和/或

[0020] iii)CDR3选自由以下各项组成的组:e)SEQ ID NO:60,56或57;或f)与SEQ ID NO:60的氨基酸序列具有5,4,3,2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置1,P已变为G,R,D或E,或不存在;在位置2,T已变为R,L,P或V,或者不存在;在位置3,T已变为M,S或R,或不存在;在位置4,H已变为D,Y,G或T;在位置5,Y已变为F,V,T或G;在位置6,G已变为L,D,S,Y或W;R,T,Y或V被插入在位置6和位置7之间(位置6a表1.3C);在位置7,G已变为P或S;在位置8,V已变为G,T,H,R,L或Y;在位置9,Y已变为R,A,S,D或G;在位置10,Y已变为N,E,G,W或S;W被插入在位置10和位置11之间(位置10a表1.3C);在位置11,G已变为S,K或Y;在位置12,P已变为E或D,或者不存在;和/或在位置13,Y已变为L,或不存在。

[0021] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV选自ISV的组,其中:CDR1

选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:24,20,21,25,27,29,31,34,35,36,37和109;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:42,38,39,43,45,47,49,50,53,54,55和110;以及CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:60,56,57,61,63,65,67,71,72,73,74和111。

[0022] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV选自ISV的组,其中:

[0023] -CDR1是SEQ ID NO:24,CDR2是SEQ ID NO:42,并且CDR3是SEQ ID NO:60;

[0024] -CDR1是SEQ ID NO:20,CDR2是SEQ ID NO:38,并且CDR3是SEQ ID NO:56;

[0025] -CDR1是SEQ ID NO:21,CDR2是SEQ ID NO:39,并且CDR3是SEQ ID NO:57;

[0026] -CDR1是SEQ ID NO:25,CDR2是SEQ ID NO:43,并且CDR3是SEQ ID NO:61;

[0027] -CDR1是SEQ ID NO:27,CDR2是SEQ ID NO:45,并且CDR3是SEQ ID NO:63;

[0028] -CDR1是SEQ ID NO:29,CDR2是SEQ ID NO:47,并且CDR3是SEQ ID NO:65;

[0029] -CDR1是SEQ ID NO:31,CDR2是SEQ ID NO:49,并且CDR3是SEQ ID NO:67;

[0030] -CDR1是SEQ ID NO:34,CDR2是SEQ ID NO:50,并且CDR3是SEQ ID NO:71;

[0031] -CDR1是SEQ ID NO:35,CDR2是SEQ ID NO:53,并且CDR3是SEQ ID NO:72;

[0032] -CDR1是SEQ ID NO:36,CDR2是SEQ ID NO:54,并且CDR3是SEQ ID NO:73;和

[0033] -CDR1是SEQ ID NO:37,CDR2是SEQ ID NO:55,并且CDR3是SEQ ID NO:74。

[0034] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其基本上由4个构架区(分别为FRI至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0035] i)CDR1选自由以下各项组成的组:a)SEQ ID NO:24和109;或b)与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有2个或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置7,N已变为S;和/或在位置9处,V已变为M;和/或

[0036] ii)CDR2选自由以下各项组成的组:c)SEQ ID NO:42和110;或d)与SEQ ID NO:42的氨基酸序列具有5,4,3,2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置1处T已变为A;在位置3,S已变为R;在位置4,S已变为T;在位置8,A已变为T;和/或在位置9,N已变为D;和/或

[0037] iii)CDR3选自由以下各项组成的组:e)SEQ ID NO:60和111;或f)与SEQ ID NO:60的氨基酸序列具有2个或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置4,H已变为R;和/或在位置8处,V已变为D。

[0038] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV选自ISV的组,其中CDR1选自由SEQ ID NO:24和109组成的组;CDR2选自由SEQ ID NO:42和110组成的组;以及CDR3选自由SEQ ID NO:60和111组成的组。

[0039] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV属于表位箱(epitope bin)1或表位箱4,优选地所述ISV基本上由4个构架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0040] i)CDR1选自由以下各项组成的组:a)SEQ ID NO:36;和b)与SEQ ID NO:36的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置3处,T已变为S;在位置6,T已变为S;在位置8,T已变为A;和/或在位置9,M已变为V;和/或

[0041] ii)CDR2选自由以下各项组成的组:c)SEQ ID NO:54;和d)与SEQ ID NO:54的氨基酸序列具有5,4,3,2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置1处,A已变为I;在位置4,W已变为R;在位置7,G已变为R;和/或在位置8,T已变为S;和/或

[0042] iii)CDR3选自由以下各项组成的组:e)SEQ ID NO:73;和f)与SEQ ID NO:73的氨

基酸序列具有5,4,3,2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置1处R已变为G;在位置2,P已变为R或L;在位置3,R已变为L或S;在位置5,Y已变为R;在位置6,Y已变为S或A;在位置7,Y已变为T,或不存在;在位置8,S已变为P;在位置9,L已变为H或R;在位置10,Y已变为P或A;在位置11,S已变为A或Y;在位置12,Y已变为D;在位置13,D已变为F;在位置14,Y已变为G,或者不存在;和/或在位置14之后插入S。

[0043] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV选自ISV的组,其中:CDR1选自由SEQ ID NO:20,29和36组成的组;CDR2选自由SEQ ID NO:38,47和54组成的组;以及CDR3选自由SEQ ID NO:56,65和73组成的组。

[0044] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV交叉阻断以下各项与聚集蛋白聚糖的G1结构域的结合:结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或通过亲和力成熟而获得的VHH序列。

[0045] 在一个方面,本发明涉及ISV,结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或结合至聚集蛋白聚糖的G1结构域的表位箱1的通过亲和力成熟而获得的VHH序列,且其与如本文所述的ISV竞争结合聚集蛋白聚糖的G1结构域。

[0046] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其基本上由4个构架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:i)CDR1选自由以下各项组成的组:a)SEQ ID NO:24;和b)与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有2个或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置2,S已变为I或F;在位置5,I已变为S;在位置6,I已变为S或M;在位置7,N已变为R或Y;在位置8,V已变为A或Y;在位置9,V已变为M;和/或在位置10处,R已变为K;和/或ii)CDR2选自由以下各项组成的组:c)SEQ ID NO:42;和d)与SEQ ID NO:42的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置1,T已变为A或G;在位置2和位置3之间插入N(位置2a表2.3B);在位置7,N已变为R;在位置8,A已变为T;和/或在位置9,N已变为D;和/或iii)CDR3选自由以下各项组成的组:e)SEQ ID NO:60;和f)与SEQ ID NO:60的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置1,P不存在;在位置2,T已变为R或不存在;在位置3,T已变为M或不存在;在位置4,H已变为D或Y;在位置5,Y已变为F或V;在位置6,G已变为L或D;在位置8,V已变为G或T;在位置9,Y已变为R;在位置10,Y已变为N或E;在位置11,G已变为S或K;在位置12,P已变为E或不存在;和/或在位置13,Y已变为L或不存在;优选地,CDR1选自由SEQ ID NO:24、25和27组成的组;CDR2选自由SEQ ID NO:42、43和45组成的组;CDR3选自由SEQ ID NO:60、61和63组成的组;甚至更优选地,其中所述ISV交叉阻断以下各项与聚集蛋白聚糖的G1结构域的结合:结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适于用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化VHH序列,骆驼源化VH序列,或已通过亲和力成熟而获得的VHH序列。

[0047] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或结合至聚集蛋白聚

糖的G1结构域的表位箱4的通过亲和力成熟而获得的VHH序列,且其与如本文所述的ISV竞争结合聚集蛋白聚糖的G1结构域。

[0048] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV选自由以下各项组成的组:具有SEQ ID NO:5,1,2,6,8,10,12,16,17,18和19的ISV,以及与SEQ ID NO:5,1,2,6,8,10,12,16,17,18和19中的任何一个具有大于80%(诸如90%或95%)的序列同一性的ISV。

[0049] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV结合至聚集蛋白聚糖的G1-IGD-G2结构域,优选地其中所述ISV具有大于8的pI和/或具有小于$2*10^{-2}s^{-1}$的Koff和/或具有小于$1*10^{-6}$M的EC50。

[0050] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中:i)CDR1选自由以下各项组成的组:a)SEQ ID NO:32,30和23;和b)与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有3,2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置2,R已变为L;在位置6,S已变为T;和/或在位置8,T已变为A;和/或ii) CDR2选自由以下各项组成的组:c)SEQ ID NO:50、41、48和51;d)与SEQ ID NO:50的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置7,G已变为S或R;和/或在位置8,R已变为T;和/或iii)CDR3选自由以下各项组成的组:e)SEQ ID NO:68、59、66和69;和f)与SEQ ID NO:68的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置4,R已变为V或P;在位置6,A已变为Y;在位置7,S已变为T;在位置8,S不存在;在位置9,N已变为P;在位置10,R已变为T或L;在位置11,G已变为E;和/或在位置12,L已变为T或V,优选地,其中所述ISV选自ISV的组,其中:CDR1选自由SEQ ID NO:32、30和23组成的组;CDR2选自由SEQ ID NO:50、41、48和51组成的组;且CDR3选自由SEQ ID NO:68、59、66和69组成的组,甚至更优选地,其中所述ISV选自ISV的组,其中:CDR1是SEQ ID NO:32,CDR2是SEQ ID NO:50,且CDR3是SEQ ID NO:68;CDR1是SEQ ID NO:32,CDR2是SEQ ID NO:51,且CDR3是SEQ ID NO:69;CDR1是SEQ ID NO:30,CDR2是SEQ ID NO:48,且CDR3是SEQ ID NO:66;以及CDR1是SEQ ID NO:23,CDR2是SEQ ID NO:41,且CDR3是SEQ ID NO:59。

[0051] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV选自由以下各项组成的组:具有SEQ ID NO:13、4、11和14的ISV,以及与SEQ ID NO:13、4、11和14中的任何一个具有大于80%(诸如90%或95%)的序列同一性的ISV。

[0052] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV交叉阻断以下各项和聚集蛋白聚糖的G1-IGD-G2结构域的结合:结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或通过亲和力成熟而获得的VHH序列。在一个方面,本发明涉及ISV,结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或结合至聚集蛋白聚糖的G1-IGD-G2结构域的通过亲和力成熟而获得的VHH序列,且其与如本文所述的ISV竞争结合聚集蛋白聚糖的G1-IGD-G2结构域。

[0053] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV结合至聚集蛋白聚糖的G2结构域,优选地其中所述ISV具有大于8的pI和/或具有小于$2*10^{-2}s^{-1}$的Koff和/或具有小于$1*10^{-6}$M的EC50。

[0054] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中:i)CDR1选自由以下各项组成的

组:a)SEQ ID NO:28;和b)与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置1处G已变为R;在位置2,P已变为S或R;在位置3,T已变为I;在位置5,S已变为N;在位置6,R已变为N,M或S;在位置7,Y已变为R或不存在;在位置8,A已变为F或不存在;和/或在位置10处,G已变为Y;和/或ii)CDR2选自由以下各项组成的组:c)SEQ ID NO:46;和d)与SEQ ID NO:46的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置1,A已变为S或Y;在位置4,W已变为L;在位置5,S已变为N;在位置6处,S不存在;在位置7,G不存在;在位置8,G已变为A;在位置9,R已变为S,D或T;和/或在位置11,Y已变为N或R;和/或iii)CDR3选自由以下各项组成的组:e)SEQ ID NO:64;和f)与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中在位置1,A已变为R或F;在位置2,R已变为I或L;在位置3,I已变为H或Q;在位置4,P已变为G或N;在位置5,V已变为S;在位置6,R已变为G,N或F;在位置7,T已变为R,W或Y;在位置8,Y已变为R或S,或者不存在;在位置9,T已变为S,或不存在;在位置10,S已变为E,K或不存在;在位置11,E已变为N,A或不存在;在位置12,W已变为D,或不存在;在位置13,N已变为D,或不存在;在位置14处,Y不存在;和/或在SEQ ID NO:64的位置14之后添加D和/或N;优选地,其中所述ISV选自ISV的组,其中:CDR1选自由SEQ ID NO:28、22、26和33组成的组;CDR2选自由SEQ ID NO:46、40、44和52组成的组;以及CDR3选自由SEQ ID NO:64、58、62和70组成的组;甚至更优选地,其中所述ISV选自ISV的组,其中:CDR1是SEQ ID NO:28,CDR2是SEQ ID NO:46,且CDR3是SEQ ID NO:64;CDR1是SEQ ID NO:22,CDR2是SEQ ID NO:40,且CDR3是SEQ ID NO:58;CDR1是SEQ ID NO:26,CDR2是SEQ ID NO:44,且CDR3是SEQ ID NO:62;和CDR1为SEQ ID NO:33,CDR2为SEQ ID NO:52,且CDR3为SEQ ID NO:70。

[0055] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV选自由以下各项组成的组:具有SEQ ID NO:9、3、7和15的ISV,以及与SEQ ID NO:9、3、7和15中的任何一个具有大于80%(诸如90%或95%)的序列同一性的ISV。

[0056] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV交叉阻断以下各项与聚集蛋白聚糖的G2结构域的结合:结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或通过亲和力成熟而获得的VHH序列。在一方面,本发明涉及ISV,结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或结合至聚集蛋白聚糖的G2结构域的通过亲和力成熟而获得的VHH序列,且其与如本文所述的ISV竞争结合聚集蛋白聚糖的G2结构域。

[0057] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV,其中所述ISV选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:1-19和114-118,以及与SEQ ID NO:1-19和114-118中的任何一个具有大于80%(诸如90%或95%)序列同一性的ISV。

[0058] 在一个方面,本发明涉及包含至少一个如本文所述的ISV的多肽,优选地,所述多肽包含至少两个如本文所述的ISV,其中所述至少两个ISV可以相同或不同。优选地,所述至少两个ISV独立地选自由SEQ ID NO:1-19和114-118组成的组,更优选地,其中所述至少两个ISV选自由SEQ ID NO:5、6、8和114-117组成的组,或其中所述至少两个ISV选自由SEQ ID NO:13和118组成的组。

[0059] 优选地,在一个方面,本发明的多肽包含至少一个另外的ISV,例如治疗性ISV。优选地,所述至少一个另外的ISV结合至丝氨酸蛋白酶家族的成员,组织蛋白酶,基质金属蛋白酶(MMP)/基质蛋白酶或具有血小板反应蛋白基序的解联蛋白金属蛋白酶(ADAMTS),优选MMP8,MMP13,MMP19,MMP20,ADAMTS5(聚集蛋白聚糖酶-2),ADAMTS4(聚集蛋白聚糖酶-1)和/或ADAMTS11;其中所述至少一个另外的ISV,例如治疗性ISV,优选保留活性。甚至更优选地,所述至少一个另外的ISV(诸如治疗性ISV)抑制以下各项的活性:丝氨酸蛋白酶家族的成员,组织蛋白酶,基质金属蛋白酶(MMP)/基质蛋白酶或具有血小板反应蛋白基序的解联蛋白金属蛋白酶(ADAMTS),优选MMP8,MMP13,MMP19,MMP20,ADAMTS5(聚集蛋白聚糖酶-2),ADAMTS4(聚集蛋白聚糖酶-1)和/或ADAMTS11。

[0060] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽在37℃下在滑液(SF)中具有至少7天,诸如至少14天,21天,1个月,2个月或甚至3个月的稳定性,和/或在软骨保留测定中具有至少为2,诸如至少3、4、5或6RU的软骨保留,和/或渗透到软骨中至少5μm,诸如至少10μm,20μm,30μm,40μm,50μm或甚至更多。

[0061] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的多肽,所述多肽进一步包含血清蛋白结合部分或血清蛋白,优选地,所述血清蛋白结合部分结合血清白蛋白;甚至更优选地,所述血清蛋白结合部分是结合血清白蛋白的ISV;甚至更优选地,所述结合血清白蛋白的ISV基本上由4个构架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1为SFGMS,CDR2为SISGSGSDTLYADSVKG,以及CDR3为GGSLSR;甚至更优选地,所述结合血清白蛋白的ISV包括Alb8、Alb23、Alb129、Alb132、Alb135、Alb11、Alb11(S112K)-A、Alb82、Alb82-A、Alb82-AA、Alb82-AAA、Alb82-G、Alb82-GG、Alb82-GGG(参见表C)。在一个方面,本发明涉及如本文所述的多肽,所述多肽进一步包含血清蛋白结合部分或血清蛋白,其中所述血清蛋白结合部分是基于非抗体的多肽。在一个方面,本发明涉及如本文所述的多肽,所述的多肽进一步包含PEG。

[0062] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述ISV彼此直接连接或经由接头连接。在一个方面,本发明涉及如本文所述的多肽,其中第一ISV和/或第二ISV和/或可能的第三ISV和/或可能的第四ISV和/或可能的所述结合血清白蛋白的ISV经由接头连接;优选地,所述接头选自由如下各项的接头组成的组:5GS,7GS,9GS,10GS,15GS,18GS,20GS,25GS,30GS和35GS(参见表D)。

[0063] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽选自多肽和/或构建体的组,所述多肽和/或构建体包含分别在表E-1和表E-2中所示的结合靶标的ISV和结合聚集蛋白聚糖的一个或两个ISV。

[0064] 在一个方面,本发明涉及构建体,所述构建体包含如本文所述的ISV或如本文所述的多肽或由其组成,并且所述构建体任选地进一步包含一个或更多个其他基团、残基、部分或结合单元,任选地经由一个或更多个肽接头连接;优选地,所述一个或更多个其他基团、残基、部分或结合单元选自由以下各项组成的组:聚乙二醇分子,血清蛋白或其片段,能够结合至血清蛋白的结合单元,Fc部分和能够结合至血清蛋白的小蛋白或肽。

[0065] 在一个方面,本发明涉及编码如本文所述的ISV、如本文所述的多肽或如本文所述的构建体的核酸。

[0066] 在一个方面,本发明涉及包含如本文所述的核酸的表达载体。

[0067] 在一个方面,本发明涉及包含如本文所述的核酸或如本文所述的表达载体的宿主或宿主细胞。

[0068] 在一个方面,本发明涉及制备如本文所述的ISV或如本文所述的多肽的方法,所述方法至少包括以下步骤:a)在合适的宿主细胞或宿主生物中或另一个合适的表达系统中,表达如本文所述的核酸;任选地接着:b)分离和/或纯化如本文所述的ISV或如本文所述的多肽。

[0069] 在一个方面,本发明涉及组合物,所述组合物包含至少一种如本文所述的ISV,如本文所述的多肽,如本文所述的构建体或如本文所述的核酸;优选地,所述组合物是药物组合物,其优选地进一步包含至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂和/或佐剂,以及任选地包含一种或更多种另外的药学上活性的多肽和/或化合物。

[0070] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的组合物,如本文所述的ISV,如本文所述的多肽或如本文所述的构建体,其用作药物。优选地,如本文所述的组合物、ISV、多肽或构建体用于预防或治疗关节病和软骨营养障碍,关节炎疾病,诸如骨关节炎,类风湿性关节炎,痛风性关节炎,银屑病关节炎,外伤性破裂或脱离,软骨发育不全,肋软骨炎,脊椎干骺端发育不良(Spondyloepimetaphyseal dysplasia),椎间盘突出症(spinal disc herniation),腰椎间盘退变疾病,退行性关节病和复发性多软骨炎。

[0071] 在一个方面,本发明涉及用于预防或治疗关节病和软骨营养障碍,关节炎疾病,诸如骨关节炎,类风湿性关节炎,痛风性关节炎,银屑病关节炎,外伤性破裂或脱离,软骨发育不全,肋软骨炎,脊椎干骺端发育不良,椎间盘突出症,腰椎间盘退变疾病,退行性关节病和复发性多软骨炎的方法,其中所述方法包括,向需要其的受试者,施用药物有效量的至少一种本文所述的组合物、ISV、多肽或构建体至需要其的人。

[0072] 在一个方面,本发明涉及用于减少和/或抑制化合物、多肽或构建体从软骨组织流出的方法,其中所述方法包括施用药学活性量的至少一种本文所述的多肽,本文所述的化合物或构建体,或本文所述的组合物至需要其的人。

[0073] 在一个方面,本发明涉及用于抑制和/或阻断ADAMTS5活性和/或MMP13活性的方法,其中所述方法包括施用药学活性量的至少一种如本文所述的多肽,如本文所述的构建体或如本文所述的组合物至需要其的人。

[0074] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的ISV、如本文所述的多肽,如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制备用于治疗或预防如下疾病的药物组合物中的用途:关节病和软骨营养障碍,关节炎疾病,诸如骨关节炎,类风湿性关节炎,痛风性关节炎,银屑病关节炎,外伤性破裂或脱离,软骨发育不全,肋软骨炎,脊椎干骺端发育不良,椎间盘突出症,腰椎间盘退变疾病,退行性关节病和复发性多软骨炎。

[0075] 根据本文的进一步公开,多肽和组合物的其他方面、优点、应用和用途将变得清楚。在此说明书的全文中引用了一些文件。无论是上文还是下文,本文引用的每个文件(包括所有专利,专利申请,科学出版物,制造商的说明书(specifications),说明书(instructions)等)均通过引用以其全文并入本文。本文中的任何内容均不得解释为承认本发明无权凭借在先发明而早于此类公开。

附图说明

[0076] 图1:注射^{125}I标记的ALB26-CAP构建体后2或4周的大鼠关节切片的放射自显影图像的示例。对于注射后2周结果和注射后4周结果中的每一个:左图:组织学切片;右图:放射自显影。

[0077] 图2:代表性的MARG图片。特异性MARG染色在图像上显示为黑色颗粒,并由箭头指示。

[0078] 图3:使用抗MMP13-CAP纳米抗体(C010100754)或抗ADAMTS5-CAP纳米抗体(C010100954)在大鼠MMT模型中通过纳米抗体抑制软骨降解。手术后3天通过IA注射开始治疗。在术后42天进行组织病理学。确定了中间的和总的实质性软骨退变宽度,以及软骨退变减少的百分比。每组使用20只动物。

[0079] 图4:在接受每关节(右膝盖)单次关节内注射400μg纳米抗体的骨关节炎大鼠和健康大鼠中,多肽的第一次给药(h)后血清浓度(平均浓度,以ng/ml为单位)与时间的关系。点代表健康动物中的个体浓度;三角形代表OA动物中的个体浓度;以及线代表平均浓度。

[0080] 发明详述

[0081] 除非另有说明或定义,否则所使用的所有术语具有其在本领域中的通常含义,这对本领域技术人员将是清楚的。例如参考标准手册,诸如Sambrook等人(Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第二版)第1-3卷,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989),F.Ausubel等人(Current protocols in molecular biology,Green Publishing and Wiley Interscience,New York,1987),Lewin(Genes II,John Wiley& Sons,New York,N.Y.,1985),Old等人(Principles of Gene Manipulation:An Introduction to Genetic Engineering(第二版)University of California Press,Berkeley,CA,1981);Roitt等人(Immunology(第六版)Mosby/Elsevier,Edinburgh,2001),Roitt等人(Roitt's Essential Immunology(第十版)Blackwell Publishing,UK,2001),和Janeway等人(Immunobiology(第六版)Garland Science Publishing/Churchill Livingstone,New York,2005),以及本文引用的一般背景技术。

[0082] 除非另有说明,否则没有具体详细描述的所有方法,步骤,技术和操作均可以执行且以本身已知的方式(如本领域技术人员将显而易见的)来执行。例如,再次参考本文提到的标准手册和一般背景技术,以及其中参考的其他参考文献;以及例如以下综述:Presta(Adv.Drug Deliv.Rev.58(5-6):640-56,2006),Levin和Weiss(Mol.Biosyst.2(1):49-57,2006),Irving等人(J.Immunol.Methods 248(1-2):31-45,2001),Schmitz等人(Placenta 21 Suppl.A:S106-12,2000),Gonzales等人(Tumour Biol.26(1):31-43,2005),他们描述了用于蛋白质工程的技术,例如亲和力成熟和用于改善蛋白质(例如免疫球蛋白)的特异性和其他所需性质的其他技术。

[0083] 本文中使用的术语"序列"(例如,在如"免疫球蛋白序列"、"抗体序列"、"可变结构域序列"、"V_{HH}序列"或"蛋白质序列"的术语中),通常应理解为既包括相关的氨基酸序列也包括编码所述相关的氨基酸序列的核酸或核苷酸序列,除非上下文要求更加限制性的解释。

[0084] 根据上下文,氨基酸序列被解释为意指单个氨基酸或两个或多个氨基酸的无支链序列。核苷酸序列被解释为表示3个或更多个核苷酸的无支链序列。

[0085] 氨基酸是天然存在的蛋白质中常见的那些L-氨基酸。氨基酸残基将根据标准的三字母或一字母的氨基酸代码表示。例如参考WO 08/020079的第48页上的表A-2。那些包含D-氨基酸的氨基酸序列不意在被此定义所涵盖。含有翻译后修饰的氨基酸的任何氨基酸序列都可以描述为使用此表A-2中所示的带有修饰位置的符号最初翻译的氨基酸序列;例如,羟基化或糖基化,但是这些修饰不应在所述氨基酸序列中明确显示。此定义涵盖可表达为序列修饰的键,交联和末端,非肽基键等的任何肽或蛋白质。

[0086] 术语“蛋白质”,“肽”,“蛋白质/肽”和“多肽”在整个本公开中可互换使用,并且各自具有对于本公开的目的相同的含义。每个术语是指由两个或更多个氨基酸的线性链组成的有机化合物。该化合物可以具有十个或更多个氨基酸;二十五个或更多个氨基酸;五十个或更多个氨基酸;一百或更多个氨基酸,两百或更多个氨基酸,甚至三百或更多个氨基酸。尽管不存在本领域公认的区分多肽与蛋白质的氨基酸数量的临界点,但是技术人员会理解多肽通常比蛋白质包含更少的氨基酸;多肽可以通过化学合成或重组方法制备;并且蛋白质通常在体外或体内通过重组方法制备,所有这些都是本领域已知的。

[0087] 当核酸或氨基酸序列在所述来源或介质中与通常与之缔合的至少一种其他组分(诸如另一种核酸、另一种蛋白质/多肽、另一种生物组分或大分子或至少一种污染物、杂质或次要组分)分离时,例如,与从中获得了该核酸或氨基酸序列的反应介质或培养基相比,所示核酸或氨基酸序列被认为是“(以)(基本上)分离的(形式)”。特别地,当核酸或氨基酸序列已经纯化了至少2倍,尤其是至少10倍,更尤其是至少100倍,以及高达1000倍或更多时,所述核酸或氨基酸序列被认为是“(基本上)分离的”。“以(基本上)分离的形式”的核酸或氨基酸优选是基本上均质的,如通过使用合适的技术,诸如合适的色谱技术,诸如聚丙烯酰胺-凝胶电泳所确定。

[0088] 当说核苷酸序列或氨基酸序列分别“包含”另一个核苷酸序列或氨基酸序列,或“基本上由”另一个核苷酸序列或氨基酸序列组成时,这可能意味着后者的核苷酸序列或氨基酸序列已分别并入第一个提及的核苷酸序列或氨基酸序列中,但是更通常地,这一般是指第一个提及的核苷酸序列或氨基酸序列在其序列内分别包含核苷酸段或氨基酸残基段,其分别具有与后面的序列相同的核苷酸序列或氨基酸序列,而不考虑第一个提及的序列实际上如何生成或获得(例如,其可以通过本文所述的任何合适的方法)。通过非限制性实例的手段,当说本发明的多肽包含免疫球蛋白单可变结构域(“ISV”)时,这可能意味着所述免疫球蛋白单可变结构域序列已被并入本发明多肽的序列中,但是更通常地,这通常意味着本发明的多肽在其序列内包含ISV的序列,不考虑本发明的所述多肽如何生成或获得。同样,当说核酸或核苷酸序列包含另一个核苷酸序列时,第一个提及的核酸或核苷酸序列优选是这样的:当其被表达成表达产物(例如多肽)时,由后一个核苷酸序列编码的氨基酸序列形成所述表达产物的一部分(换句话说,后一个核苷酸序列与第一个提到的较大的核酸或核苷酸序列处于同一读码框中)。同样,当说本发明的构建体包含多肽或ISV时,这可能意味着所述构建体至少分别包含所述多肽或ISV,但是更通常地,这意味着所述构建体包含除了所述多肽或ISV之外的基团,残基(例如氨基酸残基)、部分和/或结合单元,不考虑所述多肽或ISV如何与所述基团、残基(例如氨基酸残基),部分和/或结合单元连接,并且不考虑所述构建体如何生成或获得。

[0089] “基本上由...组成”是指在本发明的方法中使用的ISV与本发明的ISV完全相同或

对应于本发明的ISV,其具有有限数目的添加到所述ISV的氨基末端、羧基末端、或氨基末端和羧基末端两者的氨基酸残基,诸如1-20个氨基酸残基,诸如1-10个氨基酸残基,优选1-6个氨基酸残基,诸如1、2、3、4、5或6个氨基酸残基。

[0090] 为了比较两个或更多个核苷酸序列,第一核苷酸序列和第二核苷酸序列之间的"序列同一性"百分比可以通过[第一核苷酸序列中与在第二核苷酸中相应位置处的核苷酸相同的核苷酸数目]除以[第一核苷酸序列中核苷酸的总数],然后乘以[100%]来计算,其中与第一核苷酸序列相比,第二核苷酸序列中核苷酸的每个缺失、插入、置换或添加被认为是单个核苷酸(位置)的差异。备选地,两个或更多个核苷酸序列之间的序列同一性程度可以使用已知的用于序列比对的计算机算法(例如,NCBI Blast v2.0),使用标准设置来计算。用于确定序列同一性程度的一些其他技术、计算机算法和设置描述在例如WO 04/037999,EP 0967284,EP 1085089,WO 00/55318,WO 00/78972,WO 98/49185和GB 2357768中。通常,为了根据上文概述的计算方法确定两个核苷酸序列之间的"序列同一性"的百分比,将具有最大核苷酸数量的核苷酸序列作为"第一"核苷酸序列,将另一个核苷酸序列作为"第二"核苷酸序列。

[0091] 为了比较两个或更多个氨基酸序列,第一氨基酸序列和第二氨基酸序列之间的序列同一性百分比(在本文中也称为氨基酸同一性)可以通过将[第一氨基酸序列中与第二氨基酸序列中相应位置处的氨基酸残基相同的氨基酸残基数目]除以[第一氨基酸序列中氨基酸残基的总数]并乘以[100%]来计算,其中与第一氨基酸序列相比,第二氨基酸序列中氨基酸残基的每个缺失、插入、置换或添加被认为是单个氨基酸残基(位置)的差异,即本文定义的"氨基酸差异"。备选地,两个氨基酸序列之间的序列同一性的程度可以使用已知的计算机算法,例如上述用于确定核苷酸序列的序列同一性的程度的那些,再次使用标准设置来计算。通常,为了根据上文概述的计算方法确定两个氨基酸序列之间的"序列同一性"的百分比,将具有最大氨基酸残基数量的氨基酸序列作为"第一"氨基酸序列,将另一个氨基酸序列作为"第二"氨基酸序列。

[0092] 同样,在确定两个氨基酸序列之间的序列同一性程度时,技术人员可以考虑所谓的"保守"氨基酸置换,其通常可以描述为氨基酸置换,在所述氨基酸置换中,氨基酸残基被另一个相似化学结构的氨基酸残基替换,且所述氨基酸置换对多肽的功能、活性或其他生物学性质具有很少影响或基本没有影响。这样的保守氨基酸置换在本领域中是众所周知的,例如,来自WO 04/037999,GB 335768,WO 98/49185,WO 00/46383和WO 01/09300;和这样的置换的(优选)类型和/或组合可以基于来自例如WO04/037999或例如WO98/49185和从其中引用的其它参考文献的相关教导中选择。

[0093] 此类保守置换优选是以下组(a)-(e)中的一个氨基酸被相同组的另一个氨基酸残基置换的置换:(a)小脂肪族,非极性或弱极性残基:Ala,Ser,Thr,Pro和Gly;(b)极性带负电荷的残基及其(不带电荷的)酰胺:Asp,Asn,Glu和Gln;(c)极性带正电荷的残基:His,Arg和Lys;(d)大的脂族,非极性残基:Met,Leu,Ile,Val和Cys;和(e)芳族残基:Phe,Tyr和Trp。特别优选的保守置换如下:Ala至Gly或至Ser;Arg至Lys;Asn至Gln或至His;Asp至Glu;Cys至Ser;Gln至Asn;Glu至Asp;Gly至Ala或至Pro;His至Asn或至Gln;Ile至Leu或至Val;Leu至Ile或至Val;Lys至Arg,至Gln或至Glu;Met至Leu,至Tyr或至Ile;Phe至Met,至Leu或至Tyr;Ser至Thr;Thr至Ser;Trp至Tyr;Tyr至Trp;和/或Phe至Val,至Ile或至Leu。

[0094] 应用于本文描述的多肽的任何氨基酸置换也可以基于对不同物种的同源蛋白之间的氨基酸变异频率的分析,例如Schulz等人开发的(“Principles of Protein Structure”,Springer-Verlag,1978),基于例如由Chou and Fasman开发的(Biochemistry 13:211,1974;Adv.Enzymol.,47:45-149,1978)结构形成潜能的分析,和基于例如由Eisenberg(Proc.Natl.Acad Sci.USA 81:140-144,1984),Kyte和Doolittle(J.Molec.Biol.157:105-132,1981)或Goldman等人(Ann.Rev.Biophys.Chem.15:321-353,1986)开发的蛋白质中疏水模式的分析,所有这些全部通过引用以其整体并入本文。关于纳米抗体的一级、二级和三级结构的信息在本文的说明书和以上引用的一般背景技术中给出。同样,为此目的,来自美洲驼羊(llama)的V_{HH}结构域的晶体结构例如由Desmyter等人(Nature Structural Biology,3:803,1996),Spinelli等人(Natural Structural Biology,3:752-757,1996)或Decanniere等人(Structure,7(4):361,1999)给出。关于在常规的V_H结构域中形成V_H/V_L界面的一些氨基酸残基和在这些位置上潜在的骆驼源化置换的进一步信息可以在上述引用的现有技术中找到。

[0095] 如果氨基酸序列和核酸序列在其整个长度上具有100%的序列同一性(如本文所定义),则称它们“完全相同”。

[0096] 当比较两个氨基酸序列时,术语“氨基酸差异”是指与第二序列相比,在第一序列的位置上的单个氨基酸残基的插入、缺失或置换;应当理解,两个氨基酸序列可以包含一个、两个或更多个这样的氨基酸差异。更特别地,在本发明的氨基酸序列和/或多肽中,术语“氨基酸差异”是指分别与a)、c)或e)的CDR序列相比,在b)、d)或f)中规定的CDR序列的位置上的单个氨基酸残基的插入、缺失或置换;应当理解,与分别为a),c)或e)的CDR序列相比,b)、d)和f)的CDR序列可包含一个、两个、三个、四个或最多五个这样的氨基酸差异。

[0097] “氨基酸差异”可以是任意一个、两个、三个、四个或最大五个置换、缺失或插入,或任何其组合,所述置换改善本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的多肽)的性质,或至少不太减损本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的多肽)的所需性质或所需性质的平衡或组合。在这方面,与包含一个或更多个不具有所述一个、两个、三个、四个或最大五个置换、缺失或插入的CDR序列的多肽相比,本发明所得的聚集蛋白聚糖结合物(例如本发明的多肽)应至少以相同、大约相同或更高的亲和力结合聚集蛋白聚糖,所述亲和力通过表面等离振子共振(SPR)测量。

[0098] 在这方面,根据b)、d)和/或f)的CDR的氨基酸序列可以是通过亲和力成熟的手段,使用一种或多种本身已知的亲和力成熟技术,分别源自根据a)、c)和/或e)的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0099] 例如,并且取决于用于表达本发明多肽的宿主生物,此样的缺失和/或置换可以以这样的方式设计:移除一个或更多个用于翻译后修饰的位点(诸如一个或更多个糖基化位点),如将在本领域技术人员的能力范围内的。

[0100] 在本说明书中使用的“纳米抗体家族”,“V_{HH}家族”或“家族”是指一组具有相同长度的纳米抗体和/或V_{HH}序列(即它们在其序列内具有相同数目的氨基酸),且其中其位置8和位置106(根据Kabat编号)之间的氨基酸序列具有89%或更多的氨基酸序列同一性。

[0101] 术语“表位”和“抗原决定簇”,其可以互换使用,是指大分子的一部分,诸如被抗原结合分子(诸如免疫球蛋白,常规抗体,ISV和/或本发明的多肽)识别的多肽或蛋白质,特别

是被所述分子的抗原结合位点识别的多肽或蛋白质。表位定义了免疫球蛋白的最小结合位点,因此代表了免疫球蛋白的特异性靶标。

[0102] 识别表位的抗原结合分子(诸如免疫球蛋白,常规抗体,ISV和/或本发明的多肽)的部分称为"互补位"。

[0103] 对某表位、抗原或蛋白质(或其至少一部分,片段或表位)可以"结合"或"特异性结合"、"具有亲和力"和/或"具有特异性"的氨基酸序列(诸如本发明的ISV、抗体、多肽,或通常抗原结合蛋白或多肽或其片段)被称为是"针对(against)"或"针对(directed against)"所述表位、抗原或蛋白质的,或者是关于这样的表位、抗原或蛋白质的"结合"分子,或被称为是"抗"表位,"抗"抗原或"抗"蛋白质(例如"抗"聚集蛋白聚糖)。

[0104] 亲和力表示分子相互作用的强度或稳定性。亲和力通常以K_D或解离常数给出,单位为mol/L(或M)。亲和力也可以表示为缔合常数K_A,其等于$1/K_D$,单位为$(摩尔/L)^{-1}$(或M^{-1})。在本说明书中,两个分子之间的相互作用的稳定性将主要根据其相互作用的K_D值来表示;技术人员清楚,鉴于关系$K_A=1/K_D$的关系,通过其K_D值来规定分子相互作用的强度也可以用于计算相应的K_A值。K_D值也在热力学意义上表征了分子相互作用的强度,因为它通过众所周知的关系$DG=RT.\ln(K_D)$(相当于$DG=-RT.\ln(K_A)$)与结合的自由能(DG)的变化有关,其中R等于气体常数,T等于绝对温度,ln表示自然对数。

[0105] 被认为有意义的(例如特异性的)生物学相互作用的K_D通常在10^{-12}M(0.001nM)至10^{-5}M(10000nM)的范围内。相互作用越强,其K_D越低。

[0106] K_D还可以表示为复合物的解离速率常数(表示为K_{off})对其缔合速率(表示为K_{on})的比率(因此,$K_D=k_{off}/k_{on}$和$K_A=k_{on}/k_{off}$)。解离速率K_{off}的单位为s^{-1}(其中s为秒的SI单位符号)。缔合速率K_{on}的单位为$M^{-1}s^{-1}$。缔合速率可以在$10^2M^{-1}s^{-1}$到大约$10^7M^{-1}s^{-1}$之间变化,接近双分子相互作用的扩散受限缔合速率常数。解离速率与给定分子相互作用的半衰期有关,关系为$t_{1/2}=\ln(2)/k_{off}$。解离速率可在$10^{-6}s^{-1}$(接近不可逆复合物,具有多天的$t_{1/2}$)到$1s^{-1}$($t_{1/2}=0.69s$)之间变化。

[0107] 抗原结合蛋白(例如ISVD)与抗原或抗原决定簇的特异性结合能够以本身已知的任何合适的方式确定,包括例如饱和结合测定法和/或竞争性结合测定法,诸如放射免疫测定法(RIA),酶免疫测定法(EIA)和夹心竞争测定法,以及本领域本身已知的其不同变体;以及本文提到的其他技术。

[0108] 两个分子之间的分子相互作用的亲和力可以通过本身已知的不同技术来测量,诸如众所周知的表面等离振子共振(SPR)生物传感器技术(例如,参见Ober等人2001,Intern.Immunology 13:1551-1559),其中一个分子固定在生物传感器芯片上,另一分子在流动条件下通过固定的分子,产生K_{on}、K_{off}测量值,以及因此产生K_D(或K_A)值。这可以例如使用众所周知的BIACORE®仪器(Pharmacia Biosensor AB,Uppsala,Sweden)来进行。动力学排斥测定法(KINEXA®)(Drake等人2004,Analytical Biochemistry 328:35-43)测量溶液中的结合事件而不标记结合配偶体,并且基于动力学排除复合物的解离。还可以使用GYROLAB®免疫测定系统或ELISA进行溶液中亲和力分析,该系统提供了自动生物分析和快速样品周转的平台(Fraley等人2013,Bioanalysis 5:1765-74)。

[0109] 对于本领域技术人员而言还会清楚的是,如果测量过程以某种方式(例如通过与

一个分子的生物传感器上的涂层有关的假象(artifact))影响隐含分子的固有结合亲和力,则所测量的K_D可以对应于表观K_D。同样,如果一个分子包含针对另一个分子的多于一个的识别位点,则可以测量表观K_D。在这种情况下,两个分子相互作用的亲合力可能会影响所测得的亲和力。特别地,K_D的精确测量可能是相当劳动密集型的,因此,通常确定表观K_D值以评估两个分子的结合强度。应该注意的是,只要所有测量均以一致的方式进行(例如,保持测定条件不变),表观K_D测量值就可以用作真实K_D的近似值,因此在本文件中K_D和表观K_D应同等重要或相关。

[0110] 术语"特异性"是指特定抗原结合分子或抗原结合蛋白(诸如本发明的ISVD或多肽)分子可以结合的不同类型的抗原或抗原决定簇的数目。可以基于亲和力和/或亲合力来确定抗原结合蛋白的特异性,例如,如WO 08/020079(通过引用并入本文)的第53-56页中所描述的,该文献也描述了用于测量抗原结合分子(诸如本发明的多肽或ISVD)和相关抗原之间的结合的一些优选技术。通常,抗原结合蛋白(诸如本发明的ISVD和/或多肽)将以以下解离常数(K_D)与其抗原结合:10^{-5}至10^{-12}mol/L或更低,优选10^{-7}至10^{-12}mol/L或更低,更优选10^{-8}至10^{-12}mol/L(即,具有10^5至10^{12}L/mol或更高,优选10^7至10^{12}L/mol或更高,且更优选地10^8至10^{12}L/mol的缔合常数(K_A))。通常认为大于10^{-4}mol/L的任何K_D值(或小于10^4L/mol的任何K_A值)表示非特异性结合。优选地,本发明的单价ISVD将以小于500nM,优选小于200nM,更优选小于10nM,诸如小于500pM,诸如例如,在10和5pM之间或更小的亲和力结合至所需抗原。还参考WO 08/020079的第53-56页的n)段。

[0111] 当ISV和/或多肽以比ISVD和/或多肽结合至所述第二靶标或抗原所具有的亲和力好10倍,例如至少100倍,优选至少1000倍或更高的亲和力结合至第一抗原时,其被称为与另一个(第二)靶标或抗原相比,对(第一)靶标或抗原是特异性的(如上所述,且适当地表示为K_D值、K_A值、K_{off}速率和/或K_{on}速率)。例如,ISVD和/或多肽可以以比所述ISV和/或多肽与第二靶标或抗原结合所具有的K_D小至少10倍,例如至少100倍,优选至少1000倍或甚至比其小的K_D值结合至第一靶标或抗原。优选地,当ISV和/或多肽与第二靶标或抗原相比对第一靶标或抗原是"特异性的"时,其针对(如本文所定义)所述第一靶标或抗原,而不针对所述第二靶标或抗原。

[0112] 抗原结合蛋白与抗原或抗原决定簇的特异性结合能够以任何本身已知的合适的方式确定,包括例如饱和结合测定法和/或竞争性结合测定法,诸如放射免疫测定法(RIA),酶免疫测定法(EIA),以及本领域本身已知的其不同变体;以及本文提到的其他技术。

[0113] 可以用来评估亲和力的一种优选方法是Friguet等人1985年(J.Immunol.Methods 77:305-19)的两步ELISA(酶联免疫吸附测定法)方案。该方法建立了溶液相结合平衡测量,并避免了与在塑料等载体上的分子之一吸附有关的可能的假象。如本领域技术人员会清楚的,解离常数可以是实际的或表观的解离常数。确定解离常数的方法对技术人员是清楚的,并且例如包括WO 08/020079的第53-56页提到的技术。

[0114] 最后,在许多情况下应注意,有经验的科学家可能会判断确定相对于某些参考分子的结合亲和力很方便。例如,为了评估分子A和B之间的结合强度,可以例如使用参考分子C,所述参考分子C已知与B结合并适当地标记有荧光团或发色团或其他化学部分诸如生物素,以易于在ELISA或FACS(荧光激活细胞分选)或其他形式(荧光团用于荧光检测,生色团用于光吸收检测,生物素用于链霉抗生物素介导的ELISA检测)中检测。通常,参考分子C保

持固定的浓度,并且对于给定的B的浓度或量,A的浓度会变化。结果,获得了IC_{50}值,该值对应于A的浓度,在所述A的浓度下针对C测得的信号在不存在A的情况下折半。假如$K_{D\ ref}$,即参考分子的K_D是已知的,以及参考分子的总浓度c_{ref},则相互作用A-B的表观K_D可从以下公式获得:$K_D = IC_{50}/(1+c_{ref}/K_{Dref})$。请注意,如果$c_{ref} << K_{D\ ref}$,$K_D \approx IC_{50}$。假如以一致的方式(例如,保持$c_{ref}$固定)对所比较的结合物进行$IC_{50}$的测量,则可以通过比较$IC_{50}$来评估分子相互作用的强度或稳定性的差异,并且在本文中将该测量判断为等同于K_D或表观K_D。

[0115] 半数最大抑制浓度(IC_{50})也可以是化合物在抑制生物学或生化功能(例如,药理学作用)中的有效性的量度。此定量测量表明需要多少多肽或ISV(例如,纳米抗体)来抑制给定的生物学过程(或过程的组成部分,即酶,细胞,细胞受体,趋化性,退行发育,转移,侵袭性,等)的一半。换句话说,它是物质的最大抑制浓度(IC)的一半(50%IC或IC_{50})。可以通过确定抑制激动剂的最大生物学反应一半所需的浓度来计算给定拮抗剂(如本发明的多肽或ISV(例如纳米抗体))的IC_{50}值。药物的K_D可以通过构建剂量-反应曲线并检查不同浓度的拮抗剂(例如本发明的多肽或ISV(例如,纳米抗体))对逆转激动剂活性的作用来确定。

[0116] 术语半数最大有效浓度(EC_{50})是指在指定的暴露时间后,诱导在基线和最大值之间一半反应的化合物的浓度。在本文中,它用作多肽,ISV(例如纳米抗体)其效价的量度。分级剂量反应曲线的EC_{50}代表可观察到其最大作用的50%时的化合物的浓度。浓度优选以摩尔单位表示。

[0117] 在生物系统中,配体浓度的小变化通常会导致响应按照sigmoidal函数(sigmoidal function)快速变化。随着配体浓度的升高反应升高开始变慢的拐点是EC_{50}。这可以通过最佳拟合线的推导来数学确定。在大多数情况下,依靠图来进行估计是方便的。如果在实施例章节中提供了EC_{50},则将实验设计为尽可能准确地反映K_D。换句话说,那么EC_{50}值可以视为K_D值。术语"平均K_D"涉及在至少1次,但优选大于1次,例如至少2次实验中获得的平均K_D值。术语"平均"是指数学术语"平均"(数据总和除以数据中项目的数量)。

[0118] 它还与IC_{50}有关,IC_{50}是一种化合物其抑制(50%抑制)的量度。对于竞争性结合测定和功能性拮抗剂测定,IC_{50}是剂量反应曲线的最常见汇总度量。对于激动剂/刺激物测定,最常用的汇总量度是EC_{50}。

[0119] 抑制常数(Ki)表明抑制剂是如何有效力的指证;它是产生半数最大抑制所需要的浓度。不像IC_{50}(其根据实验条件能够发生变化),Ki是绝对值,且通常称为药物的抑制常数。抑制常数K_i可以使用Cheng-Prusoff方程计算:

[0120] $$K_i = \frac{IC50}{\frac{[L]}{K_D} + 1}$$

[0121] 其中[L]是配体的固定浓度。

[0122] 当ISV和/或多肽以比ISV和/或多肽结合至所述第二靶标或抗原所具有的亲和力(如上所述,且适当地表示为K_D值、K_A值、K_{off}速率和/或K_{on}速率)好10倍,例如至少100倍,优选至少1000倍或更高的亲和力结合至第一抗原时,其被称为与另一个(第二)靶标或抗原相比,对(第一)靶标或抗原是"特异性的"。例如,ISV和/或多肽可以以比所述ISV和/或多肽与第二靶标或抗原结合所具有的K_D小至少10倍,例如至少100倍,优选至少1000倍或甚至比其小的K_D值结合至第一靶标或抗原。优选地,当ISV和/或多肽与第二靶标或抗原相比对第一靶标或抗原是"特异性的"时,其针对(如本文所定义)所述第一靶标或抗原,而不针对所述

第二靶标或抗原。

[0123] 术语“(交叉)-阻断”,“被(交叉)-阻断”,“(交叉)-阻断的”,“竞争结合”,“(交叉)-竞争”,“(交叉)-竞争的”和“(交叉)-竞争”在本文中可互换使用,是指免疫球蛋白、抗体、ISV、多肽或其他结合剂干扰其他免疫球蛋白、抗体、ISV、多肽或结合剂与给定靶标结合的能力。免疫球蛋白、抗体、ISV、多肽或其他结合剂能够干扰另一个与靶标结合的程度,以及因此其是否可以称为根据本发明的交叉阻断,可以通过竞争结合测定来确定,这是本领域常见的。特别合适的定量交叉阻断测定法包括ELISA和利用在细胞上表达的聚集蛋白聚糖的荧光激活细胞分选(FACS)结合测定法。在FACS设置中,(交叉)-阻断的程度可以通过(减少的)通道荧光来测量。

[0124] 用于确定针对靶标(交叉)-阻断的免疫球蛋白、抗体、ISV、多肽或其他结合剂是否如本文所定义的能够(交叉)-阻断,竞争性结合或是(交叉)竞争的方法描述于例如Xiao-Chi Jia等人(Journal of Immunological Methods 288:91-98,2004),Miller等人(Journal of Immunological Methods365:118-125,2011)和/或本文描述的方法(参见例如实施例2.3)。

[0125] 氨基酸序列被称为对两个不同的抗原或抗原决定簇(诸如例如,来自不同哺乳动物物种的聚集蛋白聚糖,例如人聚集蛋白聚糖,狗聚集蛋白聚糖,牛聚集蛋白聚糖,大鼠聚集蛋白聚糖,猪聚集蛋白聚糖,小鼠聚集蛋白聚糖,兔聚集蛋白聚糖,食蟹猴聚集蛋白聚糖和/或恒河猴聚集蛋白聚糖)“具有交叉反应性”(如果氨基酸序列对这些不同的抗原或抗原决定簇是特异性的(如本文定义的))。

[0126] 在本发明的上下文中,“调节的”或“调节”通常意指通过本发明的ISV、多肽或构建体降低或抑制丝氨酸蛋白酶家族的成员,组织蛋白酶,基质金属蛋白酶(MMP)/基质蛋白酶或具有血小板反应蛋白基序的解联蛋白金属蛋白酶(ADAMTS)的活性,优选MMP8,MMP13,MMP19,MMP20,ADAMTS5(聚集蛋白聚糖酶-2),ADAMTS4(聚集蛋白聚糖酶-1),ADAMTS11和/或促炎性细胞因子,诸如例如白介素-1α和-β,白介素6和TNF-α的活性(如使用合适的体外的、细胞的、离体的或体内的测定法(诸如本文提到的那些)所测量的)。特别地,“调节的”或“调节”通常可以意指:与在相同的测定中在相同条件下但不存在本发明的免疫球蛋白或多肽的情况下的上述成员的活性相比,使上述成员的活性(如使用合适的体外的、细胞的、离体的或体内的测定法(诸如本文提到的那些)所测量的)降低或抑制至少1%,优选至少5%,诸如至少10%或至少25%,例如至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或90%或更多。

[0127] 在本发明的上下文中,“增强”一般是指增加、增强或刺激本发明的多肽或构建体的活性,如使用合适的体外的、细胞的、离体或体内测定法(例如此处提到的那些)所测量的。特别地,使用合适体外的、细胞的、离体或体内测定法(例如本文中提及的那些)上测定的,增加或增强本发明的多肽或构建体的活性至少5%,优选至少10%,至少15%,至少20%,至少25%,至少30%,至少35%,至少40%,至少45%,至少50%,至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或更多,诸如100%,与在相同测定中在相同条件下但不存在聚集蛋白聚糖结合物(例如本发明的结合聚集蛋白聚糖的ISV)的情况下的构建物或多肽的活性相比。

[0128] 两种化合物的“协同效应”是其中两种药剂的组合的效应大于它们各自效应的总和,并且优选地在统计学上与对照和单一药物不同。

[0129] 如本文所用,术语本发明的ISV或多肽的“效价”是使其特定效果(诸如,例如渗透到软骨中,特异性结合至聚集蛋白聚糖和/或软骨保留的发生)发生所需的本发明的ISV或多肽的量的函数(function)。它可以简单地通过本领域技术人员已知的方法来测量,例如如在实施例部分中所使用的。

[0130] 相反,本发明的ISV或多肽的“效力”测量在饱和ISV或多肽浓度下作用本身的最大强度。效力指示可从本发明的ISV或多肽获得的最大反应。它是指ISV或多肽产生所需(治疗)效果的能力,诸如,例如与聚集蛋白聚糖结合或聚集蛋白聚糖保留,和/或抑制ADAMTS家族成员或MMP家族成员的活性。

[0131] 本发明的多肽或构建体的“半衰期”是指例如由于通过天然机制的构建体或多肽的降解和/或构建体或多肽的清除或隔离(参见例如WO 08/020079第57页的o)段),在体内,构建体或多肽的血清浓度降低50%所花费的时间。本发明的构建体或多肽的体内半衰期可以通过任何本身已知的方式确定,诸如通过药代动力学分析。合适的技术对于本领域技术人员会是清楚的,并且例如可以通常如WO 08/020079的第57页的o)段中所述。如在WO 08/020079的第57页的o)段中所提到的,半衰期可以使用诸如t1/2-α,t1/2-β和曲线下面积(AUC)等的参数来表达。例如参考标准手册,例如Kenneth等人(Chemical Stability of Pharmaceuticals:A Handbook for Pharmacists,John Wiley&Sons Inc,1986)和M Gibaldi和D Perron(″Pharmacokinetics″,Marcel Dekker,2nd Rev.Edition,1982)。术语“半衰期的增加”或“增加的半衰期”是t1/2-β的增加,其具有或不具有t1/2-α和/或AUC或两者的增加,例如,在WO 08/020079的第57页的o)段中所描述的。

[0132] 除非另有说明,否则术语“免疫球蛋白”和“免疫球蛋白序列”,无论在本文中是指重链抗体还是常规的4-链抗体,均用作通用术语来包括全尺寸抗体,其个体链,以及其所有部分,结构域或片段(分别包括但不限于抗原结合结构域或片段,诸如V_{HH}结构域或V_H/V_L结构域)。

[0133] 如本文所用的,术语(多肽或蛋白质的)“结构域”是指折叠的蛋白质结构,其具有独立于蛋白质的其余而保留其三级结构的能力。通常,结构域负责蛋白质的离散功能性质,并且在许多情况下,可以添加,去除或转移至其他蛋白质,而不会损失蛋白质其余部分和/或所述结构域的功能。

[0134] 如本文所用,术语“免疫球蛋白结构域”是指抗体链(例如,常规4-链抗体或重链抗体的链)的球状区域,或指基本上由此种球状区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于,它们保留了抗体分子的免疫球蛋白折叠特征,该免疫球蛋白结构域由任选地被保守的二硫键稳定的排列在两个β折叠中的大约7条反平行β链的两层夹心组成。

[0135] 如本文所用,术语“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由四个“构架区”组成的免疫球蛋白结构域,其在本领域中和下文中分别称为“构架区1”或“FR1”;“构架区2”或“FR2”;“构架区域3”或“FR3”;和“构架区4”或“FR4”;所述构架区间隔以三个“互补决定区”或“CDR”,其在本领域和下文中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”;和“互补决定区3”或“CDR3”。因此,免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可以如下所示:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域通过携带抗原结合位点,特别是CDR1,CDR2和/或CDR3而赋予抗体对抗原的特异性。

[0136] 术语“免疫球蛋白单可变结构域”(“ISV”或“ISVD”),可与“单可变结构域”互换使

用的,定义了其中抗原结合位点存在于单个免疫球蛋白域上并由其形成的分子。这使ISV与“常规”免疫球蛋白或其片段不同,在“常规”免疫球蛋白或其片段中,两个免疫球蛋白结构域,尤其是两个可变结构域相互作用以形成抗原结合位点。通常,在常规的免疫球蛋白中,重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)相互作用以形成抗原结合位点。在这种情况下,VH和VL两者的互补决定区(CDR)将有助于抗原结合位点,即总共6个CDR将参与抗原结合位点的形成。

[0137] 鉴于以上定义,常规4-链抗体(诸如IgG,IgM,IgA,IgD或IgE分子;本领域已知)或源自此类常规4-链抗体的Fab片段、F(ab′)2片段、Fv片段诸如二硫键连接的Fv或scFv片段或双抗体(均是本领域所已知的)的抗原结合结构域,通常不会被视为ISV,因为,在这些情况下,结合至抗原的各个表位通常不会通过一个(单个)免疫球蛋白结构域发生,而是通过一对(相关联的)免疫球蛋白结构域例如轻链和重链可变结构域发生,即,通过共同结合至各自抗原的表位的免疫球蛋白结构域的VH-VL对发生。

[0138] 相反,ISV能够与抗原的表位特异性结合,而无需与另外的免疫球蛋白可变结构域配对。ISV的结合位点由单个VH/VHH或VL结构域形成。因此,ISV的抗原结合位点由不超过三个CDR形成。

[0139] 这样,单可变结构域可以是轻链可变结构域序列(例如,VL-序列)或其合适的片段;或重链可变结构域序列(例如,VH-序列或VHH序列)或其合适的片段;只要它能够形成单个抗原结合单元(即基本上由单可变结构域组成的功能性抗原结合单元,使得单个抗原结合域不需要与另一个可变结构域相互作用以形成功能性抗原结合单元)即可。

[0140] 在本发明的一个实施方案中,ISV是重链可变结构域序列(例如,VH序列);更具体地,ISV可以是源自常规四链抗体的重链可变结构域序列或源自重链抗体的重链可变结构域序列。

[0141] 例如,ISV可以是(单个)结构域抗体,适合用作(单个)结构域抗体的氨基酸,适合用作(单个)结构域抗体的免疫球蛋白,“dAb”或sdAb,或适合用作dAb的氨基酸,或纳米抗体(如本文所定义,包括但不限于VHH);人源化VHH序列,骆驼源化VH序列,通过亲和力成熟获得的VHH序列,其他单可变结构域,免疫球蛋白单个重链可变结构域或其任何一个的任何合适的片段。

[0142] 特别地,ISV可以是Nanobody®(如本文所定义的)或其合适的片段。[注:Nanobody®和Nanobodies®是Ablynx N.V.的注册商标。]对于纳米抗体的一般描述,参考下面的进一步描述,以及本文引用的现有技术,诸如例如在WO 08/020079(第16页)中所描述的。

[0143] “VHH结构域”,也称为VHH,V_HH结构域,VHH抗体片段和VHH抗体,其最初被描述为“重链抗体”(即“缺少轻链的抗体”;Hamers-Casterman等人Nature 363:446-448,1993)的抗原结合免疫球蛋白(可变)结构域。选择术语“VHH结构域”是为了将这些可变结构域与常规4-链抗体中存在的重链可变结构域(其在本文中称为“V_H结构域”或“VH结构域”)和常规4-链抗体中存在的轻链可变结构域(其在本文中称为“V_L结构域”或“VL结构域”)相区别。对于VHH和纳米抗体的进一步描述,参考例如Muyldermans的综述文章(Reviews in Molecular Biotechnology 74:277-302,2001),以及以下专利申请,其被作为一般背景技

术提及:布鲁塞尔自由大学的WO 94/04678,WO 95/04079和WO 96/34103;联合利华的WO 94/25591,WO 99/37681,WO 00/40968,WO 00/43507,WO 00/65057,WO 01/40310,WO 01/44301,EP 1134231和WO 02/48193;Vlaams Instituut voor Biotechnologie(VIB)的WO 97/49805,WO 01/21817,WO 03/035694,WO 03/054016和WO 03/055527;Algonomics N.V.和Ablynx N.V.的WO 03/050531;加拿大国家研究委员会的WO 01/90190;抗体研究所的WO 03/025020(=EP 1433793);以及Ablynx N.V.的WO 04/041867,WO 04/041862,WO 04/041865,WO 04/041863,WO 04/062551,WO 05/044858,WO 06/40153,WO 06/079372,WO 06/122786,WO 06/122787和WO 06/122825,以及Ablynx N.V.的进一步公开的专利申请。还参考了这些申请中提到的其他现有技术,特别是参考了国际申请WO 06/040153的第41-43页上提到的参考文献列表,该列表和参考文献通过引用并入本文。如这些参考文献中所述,ISV,纳米抗体(特别是VHH序列和部分人源化的纳米抗体)尤其可以通过在一个或更多个构架序列中存在一个或更多个“标志残基(Hallmark residues)”来表征。对ISV,纳米抗体(包括纳米抗体的人源化和/或骆驼源化,以及其他修饰),部分或片段,衍生物或“纳米抗体融合体”,多价构建体(包括接头序列的一些非限制性实例)和用于增加ISV,纳米抗体的半衰期的不同的修饰及其制备的进一步描述可以例如在WO 08/101985和WO 08/142164中找到。对于纳米抗体的进一步的一般描述,参考本文引用的现有技术,诸如例如在WO 08/020079(第16页)中所描述的。

[0144] “结构域抗体”,也称为“Dab”,“结构域抗体”和“dAb”(术语”Domain Antibodies”和”dAb”由葛兰素史克集团公司用作商标)已描述在例如,EP 0368684,Ward等人(Nature 341:544-546,1989),Holt等人(Tends in Biotechnology 21:484-490,2003)和WO 03/002609以及例如WO 04/068820、WO 06/030220、WO 06/003388和Domantis Ltd.的其他公开专利申请中。结构域抗体基本上对应于非骆驼类哺乳动物的VH或VL结构域,尤其是人4-链抗体。为了结合作为单个抗原结合结构域的表位,即不分别与VL或VH结构域配对,需要对这种抗原结合性质进行特异性选择,例如通过使用人单个VH或VL结构域序列的库。结构域抗体,像VHH一样,具有约13至约16kDa的分子量,并且如果其完全源自人序列,则不需要人源化以用于例如在人中的治疗用途。

[0145] 还应当注意,尽管在本发明的上下文中由于它们不是哺乳动物起源的而是较不优选的,但是单可变结构域可以源自特定鲨鱼物种(例如,所谓的“IgNAR结构域”,参见例如WO 05/18629)。

[0146] 因此,在本发明的意义上,术语“免疫球蛋白单可变结构域”或“单可变结构域”包含源自非人来源(优选骆驼科)的多肽,优选骆驼科重链抗体。如前所述,它们可以被人源化。此外,该术语包括源自非骆驼科来源的多肽,例如小鼠和人,其已被“骆驼源化”,如例如描述于Davies和Riechmann(FEBS 339:285-290,1994;Biotechnol.13:475-479,1995;Prot.Eng.9:531-537,1996)以及Riechmann和Muyldermans(J.Immunol.Methods 231:25-38,1999)。

[0147] VHH结构域的氨基酸残基根据Kabat等人(″Sequence of proteins of immunological interest″,US Public Health Services,NIH Bethesda,MD,Publication No.91)给出的针对V_H结构域的通用编号而编号,如应用于骆驼科的VHH结构域,如例如在Riechmann和Muyldermans的图2中所示(J.Immunol.Methods 231:25-38,1999)。编号V_H结

构域的氨基酸残基的备选方法是本领域已知的,该方法也可以以类似的方式应用于VHH结构域。但是,在本说明书,权利要求书和附图中,则将遵循如上所述的用于VHH结构域的根据Kabat的编号,除非另有说明。

[0148] 应当注意的是,如本领域对于V_H结构域和VHH结构域所公知的,每个CDR中的氨基酸残基总数可以变化,并且可能不对应于由Kabat编号指示的氨基酸残基总数(即,根据Kabat编号的一个或更多个位置可能不占据在实际序列中,或者实际序列可能包含比Kabat编号允许的数目更多的氨基酸残基)。这意味着,通常,根据Kabat的编号可以或可以不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。VH结构域和VHH结构域中的氨基酸残基总数通常为110至120,通常为112至115的范围内。然而,应注意,较小和较长的序列也可能适用于本文所述的目的。

[0149] CDR区的确定也可以根据不同方法进行。在根据Kabat的CDR确定中,VHH的FRI包含在位置1-30的氨基酸残基,VHH的CDR1包含在位置31-35的氨基酸残基,VHH的FR2包含在位置36-49的氨基酸,VHH的CDR2包含在位置50-65的氨基酸残基,VHH的FR3包含在位置66-94的氨基酸残基,VHH的CDR3包含在位置95-102的氨基酸残基,和VHH的FR4包含在位置103-113的氨基酸残基。

[0150] 然而,在本申请中,根据Kontermann和Dübel(Eds.,Antibody Engineering,第2卷,Springer Verlag Heidelberg Berlin,Martin,第3章,第33-51页,2010)确定CDR序列。根据此方法,FR1包含在位置1-25的氨基酸残基,CDR1包含在位置26-35的氨基酸残基,FR2包含在位置36-49的氨基酸,CDR2包含在位置50-58的氨基酸残基,FR3包含在位置59-94的氨基酸残基,CDR3包含在位置95-102的氨基酸残基,和FR4包含在位置103-113的氨基酸残基(根据Kabat编号)。

[0151] 诸如结构域抗体和纳米抗体(包括VHH结构域)等的ISV可以进行人源化。特别地,人源化免疫球蛋白单可变结构域,诸如纳米抗体(包括VHH结构域)可以是如先前段落中的一般定义的免疫球蛋白单可变结构域,但是其中存在至少一个氨基酸残基(特别是,至少一个构架残基)是和/或对应于人源化置换(如本文所定义的)。潜在有用的人源化置换可以通过将天然存在的V_{HH}序列的构架区域的序列与一个或更多个紧密相关的人V_H序列的相应构架序列进行比较来确定,此后能够将由此确定的一个或更多个潜在有用的人源化置换(或其组合)引入到所述V_{HH}序列(以本身已知的任何形式,如本文进一步描述的),并且可测试所得的人源化V_{HH}序列针对靶标的亲和力,稳定性,表达的容易程度和水平,和/或其他所需的性质。以此方式,通过有限程度的反复试验的手段,技术人员可以基于本文的公开内容确定其他合适的人源化置换(或其合适的组合)。而且,基于前述,免疫球蛋白单可变结构域(的构架区),例如纳米抗体(包括VHH结构域)可以被部分人源化或完全人源化。

[0152] 诸如结构域抗体和纳米抗体(包括VHH结构域和人源化VHH结构域)等的ISV,也可以通过在一个或更多个CDR的氨基酸序列中引入一个或更多个改变来进行亲和力成熟,这种改变导致,与各自的亲本分子相比,所得的免疫球蛋白单可变结构域针对其各自抗原的亲和力提高。本发明的亲和力成熟的免疫球蛋白单可变结构域分子可以通过本领域已知的方法制备,例如,如通过以下描述的:Marks等人(Biotechnology 10:779-783,1992),Barbas,等人(Proc.Nat.Acad.Sci,USA 91:3809-3813,1994),Shier等人(Gene 169:147-155,1995),Yelton等人(Immunol.155:1994-2004,1995),Jackson等人(J.Immunol.154:

3310-9,1995),Hawkins等人(J.MoI.Biol.226:889896,1992),Johnson和Hawkins(Affinity maturation of antibodies using phage display,Oxford University Press,1996)。

[0153] 从诸如结构域抗体或纳米抗体的ISV开始的设计/选择和/或制备多肽的过程,在本文中也被称为“格式化”所述ISV;作为多肽一部分的ISV被称为被“格式化成”所述多肽或处于所述多肽的“格式”。基于本文的公开内容,本领域技术人员会清楚可以格式化ISV的方式的实例和这种格式的实例;且这样的被格式化的ISV构成了本发明的另一方面。

[0154] 例如,但不限于,一种或更多种ISV可用作用于多肽的制备的“结合单元”,“结合结构域”或“结构单元(building block)”(这些术语互换使用),所述多肽可任选地包含一个或更多个另外的ISV,所述ISV可用于作为结合单元(即,针对聚集蛋白聚糖上相同或另一个表位和/或针对聚集蛋白聚糖以外的一种或更多种其他的抗原、蛋白质或靶标)。

[0155] 本发明提供了聚集蛋白聚糖结合物,诸如对聚集蛋白聚糖具有特异性和/或结合聚集蛋白聚糖的ISV(本文也称为“本发明的ISV”)和/或多肽(本文也称为“本发明的多肽”)。

[0156] 聚集蛋白聚糖也被称为聚集蛋白聚糖1,ACAN,AGC1,AGCAN,CSPGCP,MSK16,SEDK,软骨特异性蛋白聚糖核心蛋白(CSPCP)或硫酸软骨素蛋白聚糖1(CSPG1)。聚集蛋白聚糖在人类中由ACAN基因编码,该基因位于染色体Chr 15:q26.1。

[0157] 聚集蛋白聚糖是一个大型的多模块分子(2317个氨基酸)。它的核心蛋白由三个球状结构域(G1,G2和G3)以及一个在G2和G3之间的大延伸区域(CS)组成,在该区域上附接了许多N-连接的寡糖,硫酸软骨素链和硫酸角质素链。聚集蛋白聚糖是关节软骨中的主要蛋白聚糖。它通过与透明质酸和连接蛋白的相互作用提供水合的凝胶结构,从而在关节软骨的正常运作中发挥了重要作用,所述水合凝胶结构赋予了软骨以承重的性质。G1结构域与透明质酸和连接蛋白相互作用,在细胞外基质(ECM)中形成稳定的三元复合物。G2结构域与G1和连接蛋白的串联重复序列同源,并参与产物加工。G3组成核心蛋白的羧基末端,并增强糖胺聚糖修饰和产物分泌。同样,G3结构域将蛋白聚糖聚集体链接到ECM蛋白(纤维蛋白和腱生蛋白)。聚集蛋白聚糖的降解似乎始于C-末端。没有G3结构域的聚集蛋白聚糖分子的群体随着老化而增加。聚集蛋白聚糖与层粘连蛋白,纤连蛋白,腱生蛋白和胶原蛋白相互作用,但它也是各种具有血小板反应蛋白基序的解联蛋白金属蛋白酶(ADAMTS)(诸如ADAMTS4,ADAMTS5和ADAMTS11)和基质金属蛋白酶(MMP)(诸如MMP8,MMP13,MMP19和MMP20)的酶促底物。

[0158] 在一个方面,本发明涉及聚集蛋白聚糖结合物,诸如特异性结合聚集蛋白聚糖的ISV和多肽。

[0159] 本发明的聚集蛋白聚糖结合物最终旨在用作人类的药物。因此,在一个方面,本发明涉及聚集蛋白聚糖结合物,诸如与人聚集蛋白聚糖(SEQ ID NO:125)特异性结合的ISV和多肽。

[0160] 发明人鉴定了具有高度改善的种间交叉反应性和优异的选择性性质的聚集蛋白聚糖结合物。

[0161] 因此,在一个方面,本发明涉及一种聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV或多肽,其中所述聚集蛋白聚糖结合物与人聚集蛋白聚糖(P16112;SEQ ID NO:125),狗聚集蛋白聚糖

(Q28343;SEQ ID NO:126),牛聚集蛋白聚糖(P13608;SEQ ID NO:127),大鼠聚集蛋白聚糖(P07897;SEQ ID NO:128);猪聚集蛋白聚糖(核心;Q29011,SEQ ID NO:129);小鼠聚集蛋白聚糖(Q61282;SEQ ID NO:130),兔聚集蛋白聚糖(G1U677-1;SEQ ID NO:131);食蟹猴聚集蛋白聚糖(XP_005560513.1;SEQ ID NO:132)和/或恒河猴聚集蛋白聚糖(XP_002804990.1;SEQ ID NO:133)(参见表B)特异性结合。

[0162] 本发明人惊讶地观察到,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,具有优于现有技术分子的良好的特性;它们在关节中稳定,可以以延长的时间保留在软骨中,并且对软骨组织具有特异性,例如基本上不与神经蛋白聚糖(O14594,SEQ ID NO:134)和/或短小蛋白聚糖(Q96GW7,SEQ ID NO:135)结合(参见表B)。

[0163] 因此,在一个方面,本发明涉及一种聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV或多肽,其中所述聚集蛋白聚糖结合物基本上不结合神经蛋白聚糖(O14594,SEQ ID NO:134)和/或短小蛋白聚糖(Q96GW7,SEQ ID NO:135),优选地其中所述聚集蛋白聚糖以大于10^{-5}mol/L,例如10^{-4}mol/L的K_D值结合神经蛋白聚糖和/或短小蛋白聚糖。

[0164] 在一个方面,本发明涉及一种聚集蛋白聚糖结合物,例如ISV,其中所述聚集蛋白聚糖结合物对于聚集蛋白聚糖结合的选择性是对于神经蛋白聚糖和/或短小蛋白聚糖结合的选择性的大于10倍,大于100倍,优选大于1000倍。

[0165] 本发明优选的聚集蛋白聚糖结合物包括免疫球蛋白(诸如重链抗体,常规的4-链抗体(诸如IgG,IgM,IgA,IgD或IgE分子),Fab片段,F(ab')2片段,Fv片段诸如二硫键连接的Fv或scFv片段,或衍生自此类常规4-链抗体的双抗体,其单个链,及其所有部分、结构域或片段(包括但不限于抗原结合结构域或片段,诸如免疫球蛋白单可变结构域),本发明的单价多肽或其他结合物)。

[0166] 观察到,本发明的聚集蛋白聚糖结合物的pI超过8,只有一个例外(参见表2.2)。不受理论的束缚,发明人假设聚集蛋白聚糖的高正电荷可能影响整个部分的保留和软骨渗透,即,即使当它与另一种结构单元偶联时,诸如在多特异性多肽中。因此,本发明涉及具有大于8的pI,(诸如8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0或更高,诸如9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8或甚至9.8)的本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV,多肽或构建体,优选本发明的ISV。

[0167] 本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,与聚集蛋白聚糖的结合可以在本领域通常已知的各种结合测定中测量。典型的测定法包括(但不限于)荧光配体结合测定法,荧光激活细胞分选(FACS),放射性配体结合测定法,表面等离振子共振(SPR),等离振子-波导共振(PWR),用于基于亲和力的生物传感器的SPR成像,回音壁腔微谐振器(WGM),共振波导光栅(RWG),生物层干涉生物传感器(BIB)测定法,核磁共振(NMR),X射线晶体学,热变性测定法(TDA),等温滴定量热法(ITC),ELISA和全细胞配体结合测定法,诸如表面声波(SAW)生物传感器和RWG生物传感器测定。用于测量本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的ISV和/或多肽)与聚集蛋白聚糖的结合的优选的测定法是SPR,诸如例如实施例中所述的SPR,其中确定了本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,与聚集蛋白聚糖的结合。通过本文的进一步描述和实施例,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,与聚集蛋白聚糖结合的一些优选的KD值将变得清楚。另一种特别优选的测定法是ELISA,如实施例中所详述的(参见实施例1.2和2.4)。

[0168] 本发明的聚集蛋白聚糖结合物与聚集蛋白聚糖的结合也可以在优选地保留聚集蛋白聚糖靶标的构象的结合测定中进行测量。典型的测定包括(但不限于)其中聚集蛋白聚糖暴露在细胞表面(诸如CHO细胞)上的测定。

[0169] 在本发明的一个实施方案中,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,具有选自由以下各项组成的组的针对结合至所述聚集蛋白聚糖的缔合速率常数(Kon):至少约$10^2M^{-1}s^{-1}$,至少约$10^3M^{-1}s^{-1}$,至少约$10^4M^{-1}s^{-1}$,至少约$10^5M^{-1}s^{-1}$,至少约$10^6M^{-1}s^{-1}$、$10^7M^{-1}s^{-1}$,至少约$10^8M^{-1}s^{-1}$,至少约$10^9M^{-1}s^{-1}$,和至少约$10^{10}M^{-1}s^{-1}$,优选地其通过表面等离振子共振测定。

[0170] 在本发明的一个实施方案中,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,具有选自由以下各项组成的组的针对结合至所述聚集蛋白聚糖的解离速率常数(Koff):至多约$10^{-3}s^{-1}$,最多约$10^{-4}s^{-1}$,最多约$10^{-5}s^{-1}$,最多约$10^{-6}s^{-1}$,最多约$10^{-7}s^{-1}$,最多约$10^{-8}s^{-1}$,最多约$10^{-9}s^{-1}$,和最多约$10^{-10}s^{-1}$,优选地其通过表面等离子体共振测定。

[0171] 在本发明的一个实施方案中,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,以100nM至10pM的平均KD值,诸如以90nM或更小的平均KD值,甚至更优选以80nM或更小,诸如小于70、60、50、40、30、20、10、5nM或更小,诸如小于4、3、2或1nM,诸如小于500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20pM,或更小,诸如小于10pM的平均KD值结合至所述聚集蛋白聚糖。优选地,KD由SPR确定,例如如Proteon所确定的。

[0172] 通过本文的进一步描述和实施例,本发明的免疫球蛋白和/或多肽与聚集蛋白聚糖结合的一些优选的EC50值将变得清楚。

[0173] 在ELISA结合测定中,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,优选结合G1结构域和/或G1-IGD-G2结构域,其在结合人聚集蛋白聚糖中可具有$10^{-8}M$或更低,更优选$10^{-9}M$或更低,甚至$10^{-10}M$或更低的EC50值。例如,在这种ELISA结合测定中,本发明的免疫球蛋白和/或多肽在结合人聚集蛋白聚糖中可具有$10^{-10}M$和$10^{-8}M$之间(诸如$10^{-9}M$和$10^{-8}M$之间或$10^{-10}M$和$10^{-9}M$之间)的EC50值。

[0174] 在这样的ELISA结合测定中,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,优选其结合G1结构域和/或G1-IGD-G2结构域,其在结合食蟹猴(cyno)聚集蛋白聚糖中可具有$10^{-7}M$或更低,优选$10^{-8}M$或更低,更优选$10^{-9}M$或更低,或甚至$10^{-10}M$或更低的EC50值。例如,在这种ELISA结合测定中,本发明的多肽在结合食蟹猴聚集蛋白聚糖中可具有$10^{-10}M$和$10^{-7}M$之间(诸如$10^{-10}M$和$10^{-8}M$之间,$10^{-10}M$和$10^{-9}M$之间)的EC50值。

[0175] 在这样的ELISA结合测定中,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,优选其结合G1结构域和/或G1-IGD-G2结构域,其在结合大鼠聚集蛋白聚糖中可具有$10^{-6}M$或更低,优选$10^{-7}M$或更低,优选$10^{-8}M$或更低,更优选$10^{-9}M$或甚至$10^{-10}M$或更低的EC50值。例如,在这种ELISA结合测定中,本发明的多肽在结合大鼠聚集蛋白聚糖中可具有$10^{-10}M$和$10^{-6}M$之间(诸如$10^{-10}M$和$10^{-7}M$之间,$10^{-10}M$和$10^{-8}M$之间,$10^{-10}M$和$10^{-9}M$之间)的EC50值。

[0176] 在这样的ELISA结合测定中,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,优选其结合G1结构域和/或G1-IGD-G2结构域,其在结合狗聚集蛋白聚糖中可具有$10^{-6}M$或更低,优选$10^{-7}M$或更低,优选$10^{-8}M$或更低,更优选$10^{-9}M$或甚至$10^{-10}M$或更低的EC50值。例如,在这种ELISA结合测定中,本发明的多肽在结合狗聚集蛋白聚糖中可具有$10^{-10}M$和$10^{-6}M$之间(诸如$10^{-10}M$和$10^{-7}M$之间,$10^{-10}M$和$10^{-8}M$之间,$10^{-10}M$和$10^{-9}M$之间)的EC50值。

[0177] 在这样的ELISA结合测定中,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,优选其结合G1结构域和/或G1-IGD-G2结构域,其在结合牛聚集蛋白聚糖中可具有10^{-6}M或更低,优选10^{-7}M或更低,优选10^{-8}M或更低,更优选10^{-9}M或甚至10^{-10}M或更低的EC 50值。例如,在这种ELISA结合测定中,本发明的多肽在结合牛聚集蛋白聚糖中可具有10^{-10}M和10^{-6}M之间(诸如10^{-10}M和10^{-7}M之间,10^{-10}M和10^{-8}M之间,10^{-10}M和10^{9}M之间)的EC50值。

[0178] 如本文所用,术语“软骨组织”是指软骨,包括弹性软骨,透明软骨和纤维软骨,其由细胞(软骨细胞)与细胞间空间的比例以及胶原蛋白和蛋白聚糖的相对量来定义。“关节软骨”是在骨骼的关节表面上发现的软骨,主要是透明软骨。半月板完全由纤维软骨制成。聚集蛋白聚糖是细胞外基质(ECM)中的主要蛋白聚糖,约占总蛋白质含量的ca.50%(其余约ca.50%是胶原蛋白II和一些次要蛋白,诸如,例如胶原蛋白IX)。

[0179] 与非软骨组织诸如滑膜,肌腱和/或肌外膜相比,本发明的聚集蛋白聚糖结合物表现出优先结合至关节中的软骨组织诸如软骨和半月板。因此,本发明涉及聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV或多肽,其中所述聚集蛋白聚糖结合物与非软骨组织相比优选结合软骨组织诸如软骨和/或半月板至少1.5倍,2倍,3倍,4倍,5倍甚至更多倍。

[0180] 可以理解,关节是两个或多个骨骼相遇的区域。大多数关节是可移动的,允许骨骼移动。关节由以下各项组成:软骨,滑膜,韧带,肌腱,囊和滑液。一些关节也有半月板。

[0181] 如在实施例中所证明的,本发明的聚集蛋白聚糖结合物具有各种软骨保留特性,这使得能够根据特定需要定制在关节中的保留(参见实施例2.2)。优选地,在将聚集蛋白聚糖结合物相对短时间暴露于软骨之后,聚集蛋白聚糖结合物具有在软骨中保留延长的时间的能力,其在关节内注射后是可预期的。可以通过实施例部分中所述的离体软骨保留测定法来测量软骨保留。保留程度可以通过目测蛋白质印迹法或通过光密度定量法来测量。用于确定保留程度的标度可以由本领域技术人员定义,例如0至6RU(保留单位)的标度,其中在该测定中0为无保留,而6为完全保留。如果需要,该标度可以通过使用本发明的聚集蛋白聚糖结合物进行定量,其中为每种聚集蛋白聚糖结合物分配得分,例如完全保留和无保留是固定的。在替代方案中,可以通过各种中间得分来设定标度,所述中间得分是通过本发明的聚集蛋白聚糖结合物分配的,例如,包含两个114F08=6Ru的聚集蛋白聚糖结合物和对照剂(dummy)聚集蛋白聚糖结合物,例如ALB26-ALB26=0RU;或包含两个114F08=6的聚集蛋白聚糖结合物;包含608A05=5的聚集蛋白聚糖结合物;聚集蛋白聚糖结合物604G01=4;包含两个601D02=3的聚集蛋白聚糖结合物;包含两个606A07=2的聚集蛋白聚糖结合物;聚集蛋白聚糖结合物112A01=1;和对照剂聚集蛋白聚糖结合物,例如ALB26-ALB26=0(请参阅表2.2)。因此,本发明涉及聚集蛋白聚糖结合物,诸如根据本发明的ISV和/或多肽,其中所述聚集蛋白聚糖结合物在软骨保留测定中具有至少2,诸如至少3、4、5或6RU的软骨保留。

[0182] 本发明的聚集蛋白聚糖结合物应优选是稳定的。作为第一个先决条件,测试了聚集蛋白聚糖结合物的生物物理性能,如实施例3中详述,其中证明了这些聚集蛋白聚糖结合物表现出有利的稳定性特征,如通过高熔融温度和不存在聚集和多聚反应的迹象所示。接下来,通过在37℃在滑液中温育来测试聚集蛋白聚糖结合物在关节中的延长的时间的活性(参见实施例6)。没能检测到任何构建体的降解,指示该构建体在模拟体内情况下是稳定的。

[0183] 在一个方面,本发明涉及聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV,其中所述聚集蛋白聚糖

结合物在37℃在滑液(SF)中具有至少3天,4天,5天,6天,7天,诸如14天,21天,1个月,2个月甚至3个月的稳定性。

[0184] 本发明提供了特别适合结合聚集蛋白聚糖的氨基酸残基段(SEQ ID NO:20-37和109,SEQ ID NO:38-55和110,以及SEQ ID NO:56-74和111;表A-2)。特别地,本发明提供了与人聚集蛋白聚糖结合的氨基酸残基段,并且其中所述片段与所述聚集蛋白聚糖的结合保留了在软骨组织中的存在(如上所述)。这些氨基酸残基段可以存在于,和/或可以掺入本发明的构建体或多肽中,特别是以这样的方式:它们形成本发明的多肽的抗原结合位点(的一部分)。这些氨基酸残基段已经作为针对聚集蛋白聚糖而生成的重链抗体或V_{HH}序列的CDR序列而生成。这些氨基酸残基段在本文中也称为"本发明的CDR序列"(分别是"本发明的CDR1序列","本发明的CDR2序列"和"本发明的CDR3序列")。

[0185] 然而,应注意,本发明在最广泛的意义上不限于这些氨基酸残基段在本发明的多肽中可能具有的特定结构作用或功能,只要这些氨基酸残基段允许本发明的多肽以所需的亲和力和效价结合至聚集蛋白聚糖即可。因此,一般而言,本发明在最广泛的意义上提供多肽(本文也称为"本发明的多肽"),所述多肽能够以特定的亲和力,亲合力,效力和/或效价与聚集蛋白聚糖结合,且所述多肽包含一个或更多个本文所述的CDR序列和,尤其是两个或更多个此类CDR序列的适当组合,所述CDR序列通过一个或更多个另外的氨基酸序列适当地相互连接,从而使整个多肽形成能够与聚集蛋白聚糖结合的结合结构域和/或结合单元。然而,还应该注意的是,在本发明的多肽中仅存在一个这样的CDR序列本身可能已经足以为本发明的多肽提供与聚集蛋白聚糖结合的能力;例如,再次参考WO 03/050531中描述的所谓的"加速片段(Expedite fragments)"。

[0186] 在一个具体但非限制性的方面,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,可以基本上由至少一个氨基酸残基段组成或包含其,所述氨基酸残基段选自以下由以下各项组成的组:

[0187] i)CDR1序列:

[0188] a)SEQ ID NO:24、32、20、21、22、23、25、26、27、28、29、30、31、33、34、35、36、37和109;和

[0189] b)与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0190] 和/或

[0191] ii)CDR2序列:

[0192] c)SEQ ID NO:42、50、38、39、40、41、43、44、45、46、47、48、49、51、52、53、54、55和110;和

[0193] b)与SEQ ID NO:42的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0194] 和/或

[0195] iii)CDR3序列:

[0196] e)SEQ ID NO:60、68、56、57、58、59、61、62、63、64、65、66、67、69、70、71、72、73、74和111;和

[0197] f)与SEQ ID NO:60的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0198] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0199] 在另一个方面,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的多肽和/或ISV,可以包含至少一个氨基酸残基段,所述氨基酸残基段选自由SEQ ID NO:20-74和109-111组成的组。

[0200] 特别地,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的多肽和/或ISV,可以是包含一个抗原结合位点的聚集蛋白聚糖结合物,其中所述抗原结合位点包含至少一个选自由以下各项组成的组的氨基酸残基段:如上所述的CDR1序列,CDR2序列和CDR3序列(或其任何合适的组合)。然而,在一个优选的方面,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的多肽和/或ISV,包含多于一个,诸如两个或更多个选自由以下各项组成的组的氨基酸残基段:本发明的CDR1序列,本发明的CDR2序列和/或本发明的CDR3序列。优选地,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的多肽和/或ISV,包含三个分别选自由以下各项组成的组的氨基酸残基段:本发明的CDR1序列,本发明的CDR2序列和本发明的CDR3序列。表A-2中列出了本文提到的对于本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的多肽和/或ISV)优选的CDR的组合,即优选地在所述表格中单行(row)显示的CDR组合。

[0201] 具有上述CDR的本发明的代表性多肽示于表A-1(SEQ ID NO:1-19和114-118)。

[0202] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,其包含3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3),其中:

[0203] -CDR1选自由SEQ ID NO:24、32、20、21、22、23、25、26、27、28、29、30、31、33、34、35、36、37和109组成的组;

[0204] -CDR2选自由SEQ ID NO:42、50、38、39、40、41、43、44、45、46、47、48、49、51、52、53、54、55和110组成的组;和

[0205] -CDR3选自由SEQ ID NO:60、68、56、57、58、59、61、62、63、64、65、66、67、69、70、71、72、73、74和111组成的组

[0206] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0207] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,其包含3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3),其中:

[0208] -CDR1是SEQ ID NO:24,CDR2是SEQ ID NO:42,并且CDR3是SEQ ID NO:60;

[0209] -CDR1是SEQ ID NO:32,CDR2是SEQ ID NO:50,并且CDR3是SEQ ID NO:68;

[0210] -CDR1是SEQ ID NO:20,CDR2是SEQ ID NO:38,并且CDR3是SEQ ID NO:56;

[0211] -CDR1是SEQ ID NO:21,CDR2是SEQ ID NO:39,并且CDR3是SEQ ID NO:57;

[0212] -CDR1是SEQ ID NO:22,CDR2是SEQ ID NO:40,并且CDR3是SEQ ID NO:58;

[0213] -CDR1是SEQ ID NO:23,CDR2是SEQ ID NO:41,并且CDR3是SEQ ID NO:59;

[0214] -CDR1是SEQ ID NO:25,CDR2是SEQ ID NO:43,并且CDR3是SEQ ID NO:61;

[0215] -CDR1是SEQ ID NO:26,CDR2是SEQ ID NO:44,并且CDR3是SEQ ID NO:62;

[0216] -CDR1是SEQ ID NO:27,CDR2是SEQ ID NO:45,并且CDR3是SEQ ID NO:63;

[0217] -CDR1是SEQ ID NO:28,CDR2是SEQ ID NO:46,并且CDR3是SEQ ID NO:64;

[0218] -CDR1是SEQ ID NO:29,CDR2是SEQ ID NO:47,并且CDR3是SEQ ID NO:65;

[0219] -CDR1是SEQ ID NO:30,CDR2是SEQ ID NO:48,并且CDR3是SEQ ID NO:66;

[0220] -CDR1是SEQ ID NO:31,CDR2是SEQ ID NO:49,并且CDR3是SEQ ID NO:67;

[0221] -CDR1是SEQ ID NO:32,CDR2是SEQ ID NO:51,并且CDR3是SEQ ID NO:69;

[0222] -CDR1是SEQ ID NO:33,CDR2是SEQ ID NO:52,并且CDR3是SEQ ID NO:70;

[0223] -CDR1是SEQ ID NO:34,CDR2是SEQ ID NO:50,并且CDR3是SEQ ID NO:71;

[0224] -CDR1是SEQ ID NO:35,CDR2是SEQ ID NO:53,并且CDR3是SEQ ID NO:72;

[0225] -CDR1是SEQ ID NO:36,CDR2是SEQ ID NO:54,并且CDR3是SEQ ID NO:73;

[0226] -CDR1是SEQ ID NO:37,CDR2是SEQ ID NO:55,并且CDR3是SEQ ID NO:74;或

[0227] -CDR1是SEQ ID NO:109,CDR2是SEQ ID NO:110,并且CDR3是SEQ ID NO:111;

[0228] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0229] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及一种聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV,其中所述ISV已选自由SEQ ID NO:117、5、118、13、114-116、1-4、6-12和14-19组成的组。

[0230] 还应注意,本发明不限于本发明的聚集蛋白聚糖结合物如本发明的ISV和/或多肽的,(或用于表达它的本发明的核酸的)来源,也不限于本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,或本发明的核酸的生成或获得的方式。因此,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,可以是天然存在的ISV(来自任何合适的物种)或合成的或半合成的ISV和/或多肽。

[0231] 此外,本领域技术人员还会清楚的是,将一个或更多个上述CDR“移植”到其他“支架”上,包括但不限于人支架或非免疫球蛋白支架是可能的。用于这种CDR移植的合适的支架和技术对于本领域技术人员会是清楚的,并且是本领域公知的,参见例如US 7,180,370,WO 01/27160,EP 0605522,EP 0460167,US 7,054,297,Nicaise等人(Protein Science 13:1882-1891,2004),Ewert等人(Methods 34:184-199,2004),Kettleborough等人(Protein Eng.4:773-783,1991),O'Brien和Jones(Methods Mol.Biol.207:81-100,2003),Skerra(J.Mol.Recognit.13:167-187,2000)和Saerens等人(J.Mol.Biol.352:597-607,2005)以及其中引用的其他参考文献。例如,可以以类似的方式使用本身已知的用于将小鼠或大鼠CDR移植到人构架和支架上的技术,以提供嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含本文定义的用于本发明单价多肽的一个或更多个CDR序列和一个或更多个人构架区或序列。用于呈递氨基酸序列的合适支架对技术人员来说是清楚的,并且例如包括基于或源自免疫球蛋白(即,不同于本文已经描述的免疫球蛋白序列)的结合支架、源自蛋白A结构域(例如Affbodies™)、淀粉酶抑肽、纤连蛋白、脂质运载蛋白、CTLA-4、T细胞受体、设计的锚蛋白重复序列、avimers和PDZ结构域的蛋白支架(Binz等人Nat Biotech 23:1257,2005),和基于DNA或RNA的结合部分,包括但不限于DNA或RNA适体(Ulrich等人Com Chem High Throughput Screen 9:619-32,2006)。

[0232] 在本发明的聚集蛋白聚糖结合物中,诸如本发明的ISV和/或多肽,所述CDR可以与另外的氨基酸序列连接和/或可以通过氨基酸序列彼此连接,其中所述氨基酸序列优选为构架序列或为充当构架序列的氨基酸序列,或一起形成用于呈递所述CDR的支架。

[0233] 根据一个优选的实施方案,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,包含连接至至少两个构架序列的至少三个CDR序列,其中优选所述三个CDR序列中的至少一个是CDR3序列,另外两个CDR序列是CDR1或CDR2序列,优选是一个CDR1序列和一个CDR2序列。根据一个特别优选但非限制性的实施方案,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如

本发明的ISV和/或多肽,具有结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中CDR1,CDR2和CDR3是如本文中针对本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的ISV和/或多肽)所定义的,并且FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。在本发明的这种聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽中,构架序列可以是任何合适的构架序列,并且合适的构架序列的实例对技术人员是清楚的,例如基于标准手册以及本文提到的其他公开和现有技术。

[0234] 因此,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,包含3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3),其中:

[0235] (i)CDR1选自由以下各项组成的组:

[0236] (a)SEQ ID NO:24、32、20、21、22、23、25、26、27、28、29、30、31、33、34、35、36、37和109;和

[0237] (b)与SEQ ID NO:24或与SEQ ID NO:20-23、25-37和109中任一个的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0238] (ii)CDR2选自由以下各项组成的组:

[0239] (c)SEQ ID NO:42、50、38、39、40、41、43、44、45、46、47、48、49、51、52、53、54、55和110;和

[0240] (d)与SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:38-41、43-55和110中的任一个的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;和/或

[0241] (iii)CDR3选自由以下各项组成的组:

[0242] (e)SEQ ID NO:60、68、56、57、58、59、61、62、63、64、65、66、67、69、70、71、72、73、74和111;和

[0243] (f)与SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:56-59、61-74和111的中任一个的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列

[0244] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0245] 本发明的聚集蛋白聚糖结合物可以被定位(map)到聚集蛋白聚糖的G1区域,G1-IGD-G2区域或G2区域。

[0246] 因此,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如与聚集蛋白聚糖的G2结构域结合的ISV和/或多肽。如实施例所述,本发明的这些聚集蛋白聚糖结合物诸如ISV和/或多肽具有各种优选的特征。优选地,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,具有大于8的pI,和/或具有小于$2*10^{-2}s^{-1}$的Koff,和/或具有小于$1*10^{-6}$M的EC50。

[0247] 对本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的ISV和/或多肽)的CDR的比较,揭示了CDR中许多可允许的氨基变化,同时保留了与聚集蛋白聚糖的G2结构域的结合。所有克隆的CDR相对于601D02的CDR(其用作参照)的序列变异性,描述于表1.5A,1.5B和1.5C中。

[0248] 在一个实施方案中,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,其中:

[0249] i)CDR1选自由以下各项组成的组:

[0250] a) SEQ ID NO:28、22、26和33;和

[0251] b)与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0252] -在位置1,G已变为R;

[0253] -在位置2,P已变为S或R;

[0254] -在位置3,T已变为I;

[0255] -在位置5,S已变为N;

[0256] -在位置6,R已变为N,M或S;

[0257] -在位置7,Y已变为R或不存在;

[0258] -在位置8,A已变为F或不存在;和/或

[0259] -在位置10,G已变为Y;

[0260] 和/或

[0261] ii)CDR2选自由以下各项组成的组:

[0262] c)SEQ ID NO:46、40、44和52;和

[0263] d)与SEQ ID NO:46的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0264] -在位置1,A已变为S或Y;

[0265] -在位置4,W已变为L;

[0266] -在位置5,S已变为N;

[0267] -在位置6,S不存在;

[0268] -在位置7,G不存在;

[0269] -在位置8,G已变为A;

[0270] -在位置9,R已变为S,D或T;和/或

[0271] -在位置11,Y已更改为N或R;

[0272] 和/或

[0273] iii)CDR3选自由以下各项组成的组:

[0274] e)SEQ ID NO:64、58、62和70;和

[0275] f)与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0276] -在位置1,A已变为R或F;

[0277] -在位置2,R已变为I或L;

[0278] -在位置3,I已变为H或Q;

[0279] -在位置4,P已变为G或N;

[0280] -在位置5,V已变为S;

[0281] -在位置6,R已变为G,N或F;

[0282] -在位置7,T已变为R,W或Y;

[0283] -在位置8,Y已变为R或S,或者不存在;

[0284] -在位置9,T已变为S,或不存在;

[0285] -在位置10,S已变为E,K或不存在;

[0286] -在位置11,E已变为N,A或不存在;

[0287] -在位置12,W已变为D,或不存在;

[0288] -在位置13,N已变为D,或不存在;

[0289] -在位置14,Y不存在;和/或

[0290] -在SEQ ID NO:64的位置14之后添加D和N;

[0291] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0292] 在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如选自聚集蛋白聚糖结合物的组的ISV和/或多肽,其中:

[0293] -CDR1选自由SEQ ID NO:28、22、26和33组成的组;

[0294] -CDR2选自由SEQ ID NO:46、40、44和52组成的组;和

[0295] -CDR3选自由SEQ ID NO:64、58、62和70组成的组;

[0296] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0297] 在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如选自聚集蛋白聚糖结合物的组的ISV和/或多肽,其中:

[0298] -CDR1是SEQ ID NO:28,CDR2是SEQ ID NO:46,并且CDR3是SEQ ID NO:64;

[0299] -CDR1是SEQ ID NO:22,CDR2是SEQ ID NO:40,并且CDR3是SEQ ID NO:58;

[0300] -CDR1是SEQ ID NO:26,CDR2是SEQ ID NO:44,并且CDR3是SEQ ID NO:62;和

[0301] -CDR1是SEQ ID NO:33,CDR2是SEQ ID NO:52,并且CDR3是SEQ ID NO:70;

[0302] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FRI,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0303] 在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如选自聚集蛋白聚糖结合物的组的ISV和/或多肽,所述聚集蛋白聚糖结合物的组选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:9、3、7和15,和与SEQ ID NO:9、3、7和15中的任一个具有大于80%,诸如90%或95%序列同一性的聚集蛋白聚糖结合物。

[0304] 在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖,诸如ISV和/或多肽,所述ISV和/或多肽交叉阻断以下各项与聚集蛋白聚糖的G2结构域的结合:结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或通过亲和力成熟而获得的VHH序列。

[0305] 在一方面,本发明涉及结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或结合至聚集蛋白聚糖的G2结构域的通过亲和力成熟而获得的VHH序列,且其与本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的ISV和/或多肽,优选由SEQ ID NO:9、3、7和15中的任何一个表示)竞争结合聚集蛋白聚糖的G2结构域。

[0306] 本发明还涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如与聚集蛋白聚糖的G1-IGD-G2结构域结合的ISV和/或多肽。如实施例所述,本发明的这些聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽具有各种优选的特征。优选地,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽具有大于8的pI,和/或具有小于$2*10^{-2}s^{-1}$的Koff,和/或具有小于$1*10^{-6}$M的EC50。

[0307] 对本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的ISV和/或多肽)的CDR的比较,揭

示了CDR中许多可允许的氨基变化,同时保留了与聚集蛋白聚糖的G1-IGD-G2结构域的结合。所有克隆的CDR相对于604F02的CDR(其用作参照)的序列变异性,描述于表1.4A,1.4B和1.4C中。

[0308] 在一个方面,本发明还涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,其中:

[0309] i)CDR1选自由以下各项组成的组:

[0310] a)SEQ ID NO:32、30和23;和

[0311] b)与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0312] -在位置2,R已变为L;

[0313] -在位置6,S已变为T;和/或

[0314] -在位置8,T已变为A;

[0315] 和/或

[0316] ii)CDR2选自由以下各项组成的组:

[0317] c)SEQ ID NO:50、41、48和51;和

[0318] d)与SEQ ID NO:50的氨基酸序列具有2个或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0319] -在位置7,G已变为S或R;和/或

[0320] -在位置8,R已变为T;

[0321] 和/或

[0322] iii)CDR3选自由以下各项组成的组:

[0323] e)SEQ ID NO:68、59、66和69;和

[0324] f)与SEQ ID NO:68的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0325] -在位置4,R已变为V或P;

[0326] -在位置6,A已变为Y;

[0327] -在位置7,S已变为T;

[0328] -在位置8,S不存在;

[0329] -在位置9,N已变为P;

[0330] -在位置10,R已变为T或L;

[0331] -在位置11,G已变为E;和/或

[0332] -在位置12,L已变为T或V;

[0333] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0334] 在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,其中:

[0335] -CDR1选自由SEQ ID NO:32、30和23组成的组;

[0336] -CDR2选自由SEQ ID NO:50、41、48和51组成的组;和

[0337] -CDR3选自由SEQ ID NO:68、59、66和69组成的组;

[0338] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0339] 在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如选自聚集蛋白聚糖结合物的组的ISV和/或多肽,其中:

[0340] -CDR1是SEQ ID NO:32,CDR2是SEQ ID NO:50,并且CDR3是SEQ ID NO:68;

[0341] -CDR1是SEQ ID NO:32,CDR2是SEQ ID NO:51,并且CDR3是SEQ ID NO:69;

[0342] -CDR1是SEQ ID NO:30,CDR2是SEQ ID NO:48,并且CDR3是SEQ ID NO:66;和

[0343] -CDR1是SEQ ID NO:23,CDR2是SEQ ID NO:41,并且CDR3是SEQ ID NO:59;

[0344] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0345] 在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如选自由以下各项组成的组的ISV和/或多肽:具有SEQ ID NO:118、13、4、11和14的聚集蛋白聚糖结合物组成的组的ISV和/或多肽,和与SEQ ID NO:118、13、4、11和14中的任一个具有大于80%,诸如90%或95%序列同一性的聚集蛋白聚糖结合物。

[0346] 在一个方面,本发明涉及如本发明的聚集蛋白聚糖,诸如ISV和/或多肽,所述ISV和/或多肽交叉阻断以下各项与聚集蛋白聚糖的G1-IGD-G2结构域的结合:结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或通过亲和力成熟而获得的VHH序列。

[0347] 在一方面,本发明涉及结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或结合至聚集蛋白聚糖的G1-IGD-G2结构域的通过亲和力成熟而获得的VHH序列,且其与本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的ISV和/或多肽,优选由SEQ ID NO:118、13、4、11和14中的任何一个表示)竞争结合聚集蛋白聚糖的G1-IGD-G2结构域。

[0348] 在一个特别优选的实施方案中,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,其与聚集蛋白聚糖的G1结构域结合。如实施例所述,本发明的这些聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,具有各种优选的特征。优选地,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽具有大于8的pI,和/或具有小于$2*10^{-2}s^{-1}$的Koff,和/或具有小于$1*10^{-6}$M的EC50。

[0349] 对本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的ISV和/或多肽)的CDR的比较,揭示了CDR中许多可允许的氨基变化,同时保留了与聚集蛋白聚糖的G1结构域的结合。所有克隆的CDR相对于114F08的CDR(其用作参照)的序列变异性,描述于表1.3A,1.3B和1.3C中。

[0350] 在一个优选的方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,其包含3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3),其中:

[0351] i)CDR1选自由以下各项组成的组:

[0352] a)SEQ ID NO:24、20、21、25、27、29、31、34、35、36和37;和

[0353] b)与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0354] -在位置2,S已变为R,F,I或T;

[0355] -在位置3,T已变为I;

[0356] -在位置5,I已变为S;

[0357] -在位置6,I已变为S,T或M;

[0358] -在位置7,N已变为Y或R;

[0359] -在位置8,V已变为A,Y,T或G;

[0360] -在位置9,V已变为M;和/或

[0361] -在位置10,R已变为G,K或A;

[0362] 和/或

[0363] ii)CDR2选自由以下各项组成的组:

[0364] c)SEQ ID NO:42、38、39、43、45、47、49、50、53、54和55;和

[0365] d)与SEQ ID NO:42的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0366] -在位置1,T已变为A或G;

[0367] -在位置3和位置4之间插入S或N(位置2a,表1.3B);

[0368] -在位置3,S已变为R,W,N或T;

[0369] -在位置4,S已变为T或G;

[0370] -在位置5,G已变为S;

[0371] -在位置6,G已变为S或R;

[0372] -在位置7,N已变为S,T或R;

[0373] -在位置8,A已变为T;和/或

[0374] -在位置9,N已变为D或Y;

[0375] 和/或

[0376] iii)CDR3选自由以下各项组成的组:

[0377] e)SEQ ID NO:60、56、57、61、63、65、67、71、72、73和74;和

[0378] f)与SEQ ID NO:60的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0379] -在位置1,P已变为G,R,D或E,或者不存在;

[0380] -在位置2,T已变为R,L,P或V,或者不存在;

[0381] -在位置3,T已变为M,S或R,或者不存在;

[0382] -在位置4,H已变为D,Y,G或T;

[0383] -在位置5,Y已变为F,V,T或G;

[0384] -在位置6,G已变为L,D,S,Y或W;

[0385] -在位置6和位置7之间插入R,T,Y或V(位置6a,表1.3C);

[0386] -在位置7,G已变为P或S;

[0387] -在位置8,V已变为G,T,H,R,L或Y;

[0388] -在位置9,Y已变为R,A,S,D或G;

[0389] -在位置10,Y已变为N,E,G,W或S;

[0390] -在位置10和位置11之间插入W(位置10a,表1.3C);

[0391] -在位置11,G已变为S,K或Y;

[0392] -在位置12,P已变为E或D,或不存在;和/或

[0393] -在位置13,Y已变为L,或不存在;

[0394] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0395] 在优选的方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如选自聚集蛋白聚糖结合物的ISV和/或多肽,其中:CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:24,20,21,25,27,29,31,34,35,36,37和109;CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:42,38,39,43,45,47,49,50,53,54,55和110;以及CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:60,56,57,61,63,65,67,71,72,73,74和111;优选地所述聚集蛋白聚糖结合物,诸如所述ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1、FR2、FR3和FR4是构架序列。

[0396] 在一个优选的方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如选自聚集蛋白聚糖结合物的组的ISV和/或多肽,其中:

[0397] -CDR1是SEQ ID NO:24,CDR2是SEQ ID NO:42,并且CDR3是SEQ ID NO:60;

[0398] -CDR1是SEQ ID NO:20,CDR2是SEQ ID NO:38,并且CDR3是SEQ ID NO:56;

[0399] -CDR1是SEQ ID NO:21,CDR2是SEQ ID NO:39,并且CDR3是SEQ ID NO:57;

[0400] -CDR1是SEQ ID NO:25,CDR2是SEQ ID NO:43,并且CDR3是SEQ ID NO:61;

[0401] -CDR1是SEQ ID NO:27,CDR2是SEQ ID NO:45,并且CDR3是SEQ ID NO:63;

[0402] -CDR1是SEQ ID NO:29,CDR2是SEQ ID NO:47,并且CDR3是SEQ ID NO:65;

[0403] -CDR1是SEQ ID NO:31,CDR2是SEQ ID NO:49,并且CDR3是SEQ ID NO:67;

[0404] -CDR1是SEQ ID NO:34,CDR2是SEQ ID NO:50,并且CDR3是SEQ ID NO:71;

[0405] -CDR1是SEQ ID NO:35,CDR2是SEQ ID NO:53,并且CDR3是SEQ ID NO:72;

[0406] -CDR1是SEQ ID NO:36,CDR2是SEQ ID NO:54,并且CDR3是SEQ ID NO:73;

[0407] -CDR1是SEQ ID NO:37,CDR2是SEQ ID NO:55,并且CDR3是SEQ ID NO:74;和

[0408] -CDR1是SEQ ID NO:109,CDR2是SEQ ID NO:110,并且CDR3是SEQ ID NO:111;

[0409] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0410] 在实施例部分已经证明,示例性克隆114F08具有特别优选的特征。克隆114F08代表克隆的家族或集合,进一步包含克隆114A09(SEQ ID NO:114)和114B04(SEQ ID NO:115),这些克隆已根据CDR中的相似性进行分组(参见表A-2和表3.3A,3.3B和3.3C),其转化为功能特性上的相似性。因此,在另一个特别优选的方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,其包含3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3),其中:

[0411] i)CDR1选自由以下各项组成的组:

[0412] a)SEQ ID NO:24和109;和

[0413] b)与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0414] -在位置7,N已变为S;和/或

[0415] -在位置9,V已变为M;

[0416] 和/或

[0417] ii)CDR2选自由以下各项组成的组：

[0418] c)SEQ ID NO:42和110;和

[0419] d)与SEQ ID NO:42的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下：

[0420] -在位置1,T已变为A;

[0421] -在位置3,S已变为R;

[0422] -在位置4,S已变为T;

[0423] -在位置8,A已变为T;和/或

[0424] -在位置9,N已变为D;

[0425] 和/或

[0426] iii)CDR3选自由以下各项组成的组：

[0427] e)SEQ ID NO:60和111;和

[0428] f)与SEQ ID NO:60的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下：

[0429] -在位置4,H已变为R;和/或

[0430] -在位置8,V已变为D;

[0431] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0432] 在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如选自聚集蛋白聚糖结合物的组的ISV和/或多肽,其中：

[0433] -CDR1选自由SEQ ID NO:24和109组成的组;

[0434] -CDR2选自由SEQ ID NO:42和110组成的组;和

[0435] -CDR3选自由SEQ ID NO:60和111组成的组

[0436] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FRI,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0437] 在实施例部分中进一步证明,结合至聚集蛋白聚糖的G1区域并属于表位箱1或表位箱4的聚集蛋白聚糖结合物在软骨保留测定中特别有效。在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如属于表位箱1或表位箱4的ISV和/或多肽。

[0438] 对属于表位箱1的本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的ISV和/或多肽)的CDR的比较,揭示了CDR中许多可允许的氨基变化,同时保留了与聚集蛋白聚糖的G1结构域的结合。所有克隆的CDR相对于608A05的CDR(其用作参照)的序列变异性,描述于表2.3D,2.3E和2.3F中。

[0439] 在一个优选的方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,其包含3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3),其中：

[0440] i)CDR1选自由以下各项组成的组：

[0441] a)SEQ ID NO:36,20和29;和

[0442] b)与SEQ ID NO:36的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下：

[0443] -在位置3,T已变为S;

[0444] -在位置6,T已变为S;

[0445] -在位置8,T已变为A;和/或

[0446] -在位置9,M已变为V;

[0447] 和/或

[0448] ii)CDR2选自由以下各项组成的组:

[0449] c)SEQ ID NO:54、38和37;和

[0450] d)与SEQ ID NO:54的氨基酸序列具有2个或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0451] -在位置1,A已变为I;

[0452] -在位置4,W已变为R;

[0453] -在位置7,G已变为R;和/或

[0454] -在位置8,T已变为S;

[0455] 和/或

[0456] iii)CDR3选自由以下各项组成的组:

[0457] e)SEQ ID NO:73,56和65;和

[0458] f)与SEQ ID NO:73的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0459] -在位置1,R已变为G;

[0460] -在位置2,P已变为R或L;

[0461] -在位置3,R已变为L或S;

[0462] -在位置5,Y已变为R;

[0463] -在位置6,Y已变为S或A;

[0464] -在位置7,Y已变为T,或不存在;

[0465] -在位置8,S已变为P;

[0466] -在位置9,L已变为H或R;

[0467] -在位置10,Y已变为P或A;

[0468] -在位置11,S已变为A或Y;

[0469] -在位置12,Y已变为D;

[0470] -在位置13,D已变为F;

[0471] -在位置14,Y已变为G,或不存在;和/或

[0472] -在位置14之后插入S;

[0473] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0474] 在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如选自聚集蛋白聚糖结合物的组的ISV和/或多肽,其中:

[0475] -CDR1选自由SEQ ID NO:20、29和36组成的组;

[0476] -CDR2选自由SEQ ID NO:38、47和54组成的组;和

[0477] -CDR3选自由SEQ ID NO:56、65和73组成的组;

[0478] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-

FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0479] 在一个方面,本发明涉及属于表位箱1的本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,其交叉阻断以下各项与聚集蛋白聚糖的G1结构域的结合:结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或通过亲和力成熟而获得的VHH序列。

[0480] 在一方面,本发明涉及结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或结合至聚集蛋白聚糖的G1结构域的表位箱1的通过亲和力成熟而获得的VHH序列,且其与本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如属于表位箱1的ISV和/或多肽,优选诸如例如由SEQ ID NO:1、10和18中的任何一个表示)竞争结合聚集蛋白聚糖的G1结构域。

[0481] 对属于表位箱4的本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的ISV和/或多肽)的CDR的比较,揭示了CDR中许多可允许的氨基变化,同时保留了与聚集蛋白聚糖的G1结构域的结合。所有克隆的CDR相对于114F08的CDR(其用作参照)的序列变异性,描述于表2.3A,2.3B和2.3C中。

[0482] 在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,其包含3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3),其中:

[0483] i)CDR1选自由以下各项组成的组:

[0484] a) SEQ ID NO:24,25和27;和

[0485] b)与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0486] -在位置2,S已变为I或F;

[0487] -在位置5,I已变为S;

[0488] -在位置6,I已变为S或M;

[0489] -在位置7,N已变为R或Y;

[0490] -在位置8,V已变为A或Y;

[0491] -在位置9,V已变为M;和/或

[0492] -在位置10,R已变为K;

[0493] 和/或

[0494] ii)CDR2选自由以下各项组成的组:

[0495] c)SEQ ID NO:42、43和45;和

[0496] d)与SEQ ID NO:42的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0497] -在位置1,T已变为A或G;

[0498] -在位置2和位置3之间插入N(位置2a,表2.3B);

[0499] -在位置7,N已变为R;

[0500] -在位置8,A已变为T;和/或

[0501] -在位置9,N已变为D;

[0502] 和/或

[0503] iii)CDR3选自由以下各项组成的组:

[0504] e)SEQ ID NO:60,61和63;和

[0505] f)与SEQ ID NO:60的氨基酸序列具有5、4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述氨基酸差异定义如下:

[0506] -在位置1,P不存在;

[0507] -在位置2,T已变为R或不存在;

[0508] -在位置3,T已变为M或不存在;

[0509] -在位置4,H已变为D或Y;

[0510] -在位置5,Y已变为F或V;

[0511] -在位置6,G已变为L或D;

[0512] -在位置8,V已变为G或T;

[0513] -在位置9,Y已变为R;

[0514] -在位置10,Y已变为N或E;

[0515] -在位置11,G已变为S或K;

[0516] -在位置12,P已变为E或不存在;和/或

[0517] -在位置13,Y已变为L或不存在;

[0518] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0519] 在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如选自聚集蛋白聚糖结合物的组的ISV和/或多肽,其中:

[0520] -CDR1选自由SEQ ID NO:24、25和27组成的组;

[0521] -CDR2选自由SEQ ID NO:42、43和45组成的组;和

[0522] -CDR3选自由SEQ ID NO:60、61和63组成的组;

[0523] 优选地,聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,包含结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1,FR2,FR3和FR4是构架序列。

[0524] 在一个方面,本发明涉及属于表位箱4的本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV和/或多肽,其交叉阻断以下各项与聚集蛋白聚糖的G1结构域的结合:结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或通过亲和力成熟而获得的VHH序列。

[0525] 在一个方面,本发明涉及结构域抗体,适合用作结构域抗体的免疫球蛋白,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白,dAb,适合用作dAb的免疫球蛋白,纳米抗体,VHH序列,人源化的VHH序列,骆驼源化的VH序列,或结合至聚集蛋白聚糖的G1结构域的表位箱4的通过亲和力成熟而获得的VHH序列,且其与本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如属于表位箱4的ISV和/或多肽,诸如例如由SEQ ID NO:117、114、115、116、5、6和8中的任何一个表示)竞争结合聚集蛋白聚糖的G1结构域。

[0526] 在一个方面,本发明涉及本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如选自由SEQ ID NO:117、118、116、114、115、5、13、1、2、6、8、10、12、16、17、18和19表示的聚集蛋白聚糖结合物组

成的组的ISV和/或多肽,和与SEQ ID NO:117、118、116、114、115、5、13、1、2、6、8、10、12、16、17、18和19中的任一个具有大于80%,诸如90%或95%,或甚至更大的序列同一性的ISV。

[0527] 在一个具体的但非限制性的方面,本发明的聚集蛋白聚糖结合物可以是包含免疫球蛋白折叠的氨基酸残基段或在合适的条件(诸如生理条件)下能够形成免疫球蛋白折叠(即折叠)的聚集蛋白聚糖结合物。特别参考Halaby等人的综述(J.Protein Eng.12:563-71,1999)。优选地,当适当折叠以形成免疫球蛋白折叠时,氨基酸残基段可以能够适当地形成用于结合聚集蛋白聚糖的抗原结合位点。因此,在一个优选的方面,本发明的聚集蛋白聚糖结合物是免疫球蛋白,诸如例如免疫球蛋白单可变结构域。

[0528] 因此,构架序列优选是免疫球蛋白构架序列或(例如,通过序列优化如人源化或骆驼化)已经源自免疫球蛋白构架序列的构架序列(的适当组合)。例如,构架序列可以是源自免疫球蛋白单可变结构域诸如轻链可变结构域(诸如,V_L-序列)和/或重链可变结构域(诸如,V_H-序列)的构架序列。在一个特别优选的方面,构架序列是已经源自V_{HH}序列的构架序列(其中所述构架序列可以任选地被部分或完全人源化)或是已经被骆驼源化(如本文所定义)的常规V_H序列。

[0529] 构架序列可以优选是这样的:本发明的聚集蛋白聚糖结合物是ISV,诸如结构域抗体(或适合用作结构域抗体的氨基酸序列);单结构域抗体(或适合用作单结构域抗体的氨基酸);“dAb”(或适合用作dAb的氨基酸);纳米抗体®;V_{HH}序列;人源化的V_{HH}序列;骆驼源化的V_H序列;或通过亲和力成熟获得的V_{HH}序列。再次,合适的构架序列对于技术人员会是清楚的,例如基于标准手册以及本文提及的其他公开和现有技术。

[0530] 本发明的另一类特别优选的ISV包括具有对应于天然存在的V_H结构域的氨基酸序列但已经被“骆驼源化”的氨基酸序列的ISV,即通过将来自常规4-链抗体的天然存在的V_H结构域的氨基酸序列中的一个或更多个氨基酸残基替换为在重链抗体的V_{HH}结构域中的相应位置上存在的一个或更多个氨基酸残基。这可以以本身已知的方式来进行,这对于本领域技术人员而言会是清楚的,例如基于本文的描述。这种“骆驼源化”置换优选插入在形成和/或存在于V_H-V_L界面的氨基酸位置处,和/或在所谓的骆驼科标志残基处,其是本领域技术人员公知的并且已经在例如WO94/04678和Davies和Riechmann(1994和1996)中定义。优选地,用作生成或设计骆驼源化的ISV的起始材料或起点的V_H序列优选是来自哺乳动物的V_H序列,更优选是人的V_H序列,诸如V_H3序列。然而,应该注意的是,本发明的这种骆驼源化的ISV可以以任何本身已知的方式获得,因此并不严格限于已经使用包含天然存在的V_H结构域的多肽作为起始材料而获得的多肽。

[0531] 例如,又如本文进一步描述的,“人源化”和“骆驼源化”可以通过提供分别编码天然存在的V_{HH}结构域或V_H结构域的核苷酸序列,然后以本身已知的方式,以以下的途径改变所述核苷酸序列中的一个或更多个密码子进行:使得新核苷酸序列分别编码本发明的“人源化”或“骆驼源化”ISV。然后此核酸可以以本身已知的方式表达,以提供本发明的所需的ISV。备选地,分别基于天然存在的V_{HH}结构域或V_H结构域的氨基酸序列,可以使用本身已知的肽合成技术分别设计然后从头合成本发明的所需人源化或骆驼源化ISV的氨基酸序列。而且,分别基于天然存在的V_{HH}结构域或V_H结构域的氨基酸序列或核苷酸序列,可以使用本身已知的核酸合成技术分别设计然后从头合成编码本发明的所需人源化或骆驼源化ISV的核苷酸序列,然后由此获得的核酸可以以本身已知的方式表达,从而提供本发明的所需

ISV。

[0532] 特别地,存在于本发明的聚集蛋白聚糖结合物(诸如本发明的ISV和/或多肽)中的构架序列,可以包含一个或更多个例如WO 08/020079(表A-3至A-8)定义的标志残基,使得本发明的聚集蛋白聚糖结合物是纳米抗体。通过本文的进一步公开(参见例如,表A-2),这些构架序列(的合适组合)的一些优选但非限制性实例将变得清楚。通常,纳米抗体(特别是V_{HH}序列和部分人源化的纳米抗体)可以特别地以在一个或更多个构架序列中存在一个或更多个"标志残基"为特征(如例如,在WO 08/020079,第61页,第24行到第98页,第3行中进一步描述)。如本文所用,在任何SEQ ID NO的上下文中"由...表示"等同于"包含或由所述SEQ ID NO组成",并且优选等同于"由所述SEQ ID NO组成"。

[0533] 更特别地,本发明提供了包含至少一个ISV的聚集蛋白聚糖结合物,该ISV是具有(一般)结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的氨基酸序列,其中FR1至FR4分别是指构架区1至4,且其中CDR1至CDR3分别是指互补决定区1至3,并且其:

[0534] i)与SEQ ID NO:117、116、118、116、115、114和1-19的氨基酸序列的至少一个具有至少80%,更优选90%,甚至更优选95%的氨基酸同一性(参见表A-2),其中出于确定氨基酸同一性程度的目的,忽略了形成CDR序列的氨基酸残基。在这方面,还参考表A-2,其列出了SEQ ID NO:117、118、116、115、114和1-19的免疫球蛋白单可变结构域的构架1序列(SEQ ID NO:119、120和75-84),构架2序列(SEQ ID NO:121和85-93),构架3序列(SEQ ID NO:123、124、122、94-104和112-113)和构架4序列(SEQ ID NO:105-108);或

[0535] ii)如表A-2中所描述的构架序列的组合;

[0536] 并且其中:

[0537] iii)优选地,根据Kabat编号,在位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108的一个或更多个氨基酸残基选自标志残基,诸如例如,在WO 08/020079的表A-3至表A-8中提到的。

[0538] 因此,本发明涉及ISV和/或多肽,其中所述ISV基本上由4个构架区(分别为FR1至FR4)和所述3个互补决定区CDR1至CDR3组成,例如特异性结合聚集蛋白聚糖的ISV由4个构架区(分别为FR1至FR4)和所述3个互补决定区CDR1至CDR3组成,治疗性ISV,例如结合以下各项的ISV:丝氨酸蛋白酶家族成员,组织蛋白酶,基质金属蛋白酶(MMP)/基质蛋白酶或具有血小板反应蛋白基序的解联蛋白金属蛋白酶(ADAMTS),优选MMP8,MMP13,MMP19,MMP20,ADAMTS5(聚集蛋白聚糖酶-2),ADAMTS4(聚集蛋白聚糖酶-1)和/或ADAMTS11,其由4个构架区(分别为FR1至FR4)和所述3个互补决定区CDR1至CDR3组成;结合血清白蛋白的ISV基本上由4个构架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成。

[0539] 本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,还可以包含以下共同待决的美国临时申请中所述的特定突变/氨基酸残基,其名称均为"改进的免疫球蛋白可变结构域":2014年5月16日提交的61/994552;2014年6月18日提交的US 61/014,015;2014年8月21日提交的US 62/040,167;以及2014年9月8日提交的US 62/047,560(均转让给Ablynx N.V.)。

[0540] 特别地,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,可以适当地含有(i)在位置112的K或Q;或(ii)在位置110的K或Q组合在位置11的V;或(iii)在位置89的T;或(iv)在位置89的L和在位置110的K或Q;或(v)在位置11的V和位置89的L;或(i)至(v)的

任何适当组合。

[0541] 也如所述共同待决的美国临时申请中所述,当本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,包含根据上述(i)至(v)之一的突变(或其适当的组合):

[0542] -在位置11的氨基酸残基优选选自L,V或K(最优选为V);和

[0543] -在位置14的氨基酸残基优选选自A或P;和

[0544] -在位置41的氨基酸残基优选选自A或P;和

[0545] -在位置89的氨基酸残基优选选自T,V或L;和

[0546] -在位置108的氨基酸残基优选选自Q或L;和

[0547] -在位置110的氨基酸残基优选选自T,K或Q;和

[0548] -在位置112的氨基酸残基优选选自S,K或Q。

[0549] 如在所述共同待决的美国临时申请中所提到的,所述突变在预防或减少所谓的"预先存在的抗体"与本发明的ISV,多肽和构建体的结合方面是有效的。为此,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,还可包含(任选地与所述突变组合)C端延伸(X)n(其中n为1至10,优选1至5,诸如1、2、3、4或5(并且优选1或2,诸如1);并且每个X是独立选择的(优选天然存在的)氨基酸残基,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,其再次参考所述美国临时申请以及WO 12/175741。特别地,当这样的C-末端延伸形成蛋白质,多肽或其他化合物或包含其的构建体的C-末端时,本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的ISV和/或多肽,可含有这样的C-末端延伸(同样,诸如在所述美国临时申请以及WO 12/175741中进一步描述的)。

[0550] 本发明的聚集蛋白聚糖结合物可以是免疫球蛋白,诸如ISV,其以任何合适的方式并且从任何合适的来源衍生,并且可以例如是天然存在的V_{HH}序列(即,来自骆驼科动物的合适种)或合成或半合成的氨基酸序列,包括但不限于"人源化"(如本文定义)的纳米抗体或VHH序列,"骆驼源化"(如本文定义)的免疫球蛋白序列(特别是骆驼源化的重链可变结构域序列),以及通过诸如亲和力成熟(诸如,从合成的、随机的或天然存在的免疫球蛋白序列开始),CDR移植,贴面(veneering),组合来自不同免疫球蛋白序列的片段,使用重叠引物进行的PCR组装以及技术人员公知的用于改造免疫球蛋白序列的类似的技术获得的纳米抗体;或本文进一步描述的任何前述的任何合适的组合。同样,当免疫球蛋白包含V_{HH}序列时,所述免疫球蛋白可以被适当地人源化,如本文进一步所述,以提供本发明的一种或更多种另外的(部分或完全)人源化免疫球蛋白。类似地,当免疫球蛋白包含合成的或半合成的序列(诸如部分人源化的序列)时,所述免疫球蛋白可以任选地被进一步适当地人源化,再次如本文所述,从而再次提供本发明的一种或更多种另外的(部分或全部)人源化的免疫球蛋白。

[0551] 在一个方面,本发明提供了本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如ISV,其中所述聚集蛋白聚糖结合物选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:117、118、116、115、114和1-19。

[0552] ISV可用作制备多肽的"结构单元",所述多肽可任选包含一个或更多个另外的"结构单元",诸如ISV,所述"结构单元"针对在聚集蛋白聚糖上的相同的或另一个表位和/或针对一个或更多个除了聚集蛋白聚糖之外的其他抗原、蛋白质或靶标,例如具有治疗作用模式的结构单元,诸如治疗性ISV。

[0553] 通常,包含或基本由单个结构单元,单个ISV或单个纳米抗体组成的蛋白质或多肽或构建体在本文中分别称为"单价"蛋白质或多肽或称为"单价构建体"。包含两个或更多个

结构单元或结合单元(诸如例如,ISV)的多肽或构建体在本文中也称为“多价”多肽或构建体,并且在此类多肽或构建体中存在的结构单元/ISV在本文中也将被称为“多价格式”。例如,“二价”多肽可以包含两个ISV,任选地通过接头序列连接,而“三价”多肽可以包含三个ISV,任选地通过两个接头序列连接;而“四价”多肽可包含四个ISV,任选地通过三个接头序列连接,等。

[0554] 在多价多肽或构建体中,两个或多个ISV(诸如纳米抗体)可以相同或不同,并且可以针对相同的抗原或抗原决定簇(例如针对相同的(一个或更多个)部分或(一个或更多个)表位或针对不同的(一个或更多个)部分或(一个或更多个)表位),或者可以任选地针对不同的抗原或抗原决定簇;或其任何合适的组合。包含至少两个结构单元(诸如例如ISV)的多肽或构建体,其中至少一个结构单元针对第一抗原(即聚集蛋白聚糖)以及至少一个结构单元针对第二抗原(即不同于聚集蛋白聚糖,诸如例如治疗性靶标),也分别称为“多特异性”多肽或构建体,并且存在于此类多肽或构建体中的结构单元(诸如例如ISV)在本文中也称为“多特异性格式”。因此,例如,本发明的“双特异性”多肽是包含至少一个针对第一抗原(即聚集蛋白聚糖)的ISV和至少一个针对第二抗原(即不同于聚集蛋白聚糖的,诸如例如治疗性靶标)的另外的ISV的多肽,而本发明的“三特异性”多肽是包含以下各项的多肽:至少一个针对第一抗原(即聚集蛋白聚糖)的ISV,至少一个针对第二抗原(即不同于聚集蛋白聚糖的,诸如例如治疗性靶标)的另外的ISV和至少一个针对第三抗原(即,不同于聚集蛋白聚糖和第二抗原两者的)的另外的ISV;等等。

[0555] “多互补位的(Multiparatopic)”多肽和“多互补位的”构建体,诸如例如“双互补位的”多肽或构建体和“三互补位的”多肽或构建体,包含两个或更多个分别具有不同互补位的结构单元或基本上由其组成。

[0556] 因此,结合聚集蛋白聚糖的本发明的ISV可以是基本分离的形式(如本文所定义),或者它们可以形成构建体或多肽的一部分,所述构建体或多肽可以包含一种或多种结合聚集蛋白聚糖的ISV或基本上由其组成,并且其可以任选地进一步包含一个或更多个另外的氨基酸序列(全部任选地经由一个或更多个合适的接头连接)。本发明涉及多肽或构建体,其包含至少一个根据本发明的ISV,诸如一个或更多个本发明的ISV(或其合适的片段),其与聚集蛋白聚糖结合,或基本上由其组成。

[0557] 本发明的一种或更多种ISV可以用作此类多肽或构建体中的结合单元或结构单元,从而分别提供本发明的单价,多价或多互补位多肽或构建体,均如本文所述。因此,本发明还涉及一种多肽,该多肽是包含本发明的一个单价多肽或ISV或由基本上其组成的单价构建体。因此,本发明还涉及多肽或构建体,其分别是多价多肽或多价构建体,诸如例如,包含本发明的两个或更多个ISV的二价或三价多肽或构建体或基本上由其组成(针对含有一个或更多个VHH结构域的多价或多特异性多肽及其制备,诸如也参考Conrath等人(J.Biol.Chem.276:7346-7350,2001),以及例如WO 96/34103,WO 99/23221和WO 2010/115998。

[0558] 本发明进一步涉及多价多肽(在本文中也称为“本发明的多价多肽”),其包含针对聚集蛋白聚糖(优选人聚集蛋白聚糖)的至少一个ISV,诸如一个或两个ISV(或其合适的片段),和一个额外的ISV,或(基本上)由其组成。

[0559] 在一个方面,以其最简单的形式,本发明的多价多肽或构建体是本发明的二价多

肽或构建体,其包含针对聚集蛋白聚糖的第一ISV(诸如纳米抗体)和相同的针对聚集蛋白聚糖的第二ISV(诸如纳米抗体),其中所述第一和第二ISV,诸如纳米抗体,可以任选地通过接头序列(如本文所定义)连接。在另一种形式中,本发明的多价多肽或构建体可以是本发明的三价多肽或构建体,其包含针对聚集蛋白聚糖的第一ISV(诸如纳米抗体),相同的针对聚集蛋白聚糖的第二ISV(诸如纳米抗体)和针对与聚集蛋白聚糖不同的抗原(诸如例如治疗性靶标)的第三ISV(诸如纳米抗体),其中所述第一,第二和第三ISV(诸如纳米抗体)可以任选地通过一个或更多个,特别是两个接头序列连接。

[0560] 在另一个方面,本发明的多价多肽或构建体可以是本发明的双特异性多肽或构建体,其包含针对聚集蛋白聚糖的第一ISV(诸如纳米抗体)和针对第二抗原(诸如例如治疗性靶标)的第二ISV(诸如纳米抗体),其中所述第一和第二ISV(诸如纳米抗体),可以任选地通过接头序列(如本文所定义)连接;而本发明的多价多肽或构建体也可以是本发明的三特异性多肽或构建体,其包含针对聚集蛋白聚糖的第一ISV(诸如纳米抗体),针对第二抗原(诸如例如治疗靶标)的第二ISV(诸如纳米抗体),和针对第三抗原(诸如例如不同于所述第二抗原的治疗性靶标)的第三ISV(诸如纳米抗体),其中所述第一,第二和第三ISV(诸如纳米抗体)可以任选地通过一个或更多个,特别是两个接头序列连接。

[0561] 在一个优选的方面,本发明的多肽或构建体分别是三价双特异性多肽或构建体。以其最简单形式的本发明的三价双特异性多肽或构建体可以是本发明的三价多肽或构建体(如本文所定义),其包含两个针对聚集蛋白聚糖的相同的ISV(诸如纳米抗体)和针对另一种抗原(诸如治疗性靶标)的第三ISV(诸如纳米抗体),其中所述第一,第二和第三ISV(诸如纳米抗体)可以任选地通过一个或更多个,特别是两个接头序列连接。

[0562] 在一个优选的方面,本发明的多肽或构建体分别是三价双特异性多肽或构建体。本发明的三价双特异性多肽或构建体可以是本发明的三价多肽或构建体(如本文所定义),其包含两个针对聚集蛋白聚糖的ISV(诸如纳米抗体),其中所述针对聚集蛋白聚糖的ISV可以是相同的或不同的,和针对另一种抗原(诸如治疗性靶标)的第三ISV(诸如纳米抗体),其中所述第一,第二和第三ISV(诸如纳米抗体)可以任选地通过一个或更多个,特别是两个接头序列连接。

[0563] 根据本发明的特别优选的三价双特异性多肽或构建体是本文所述的实施例以及表E-1和E-2中所示的那些。

[0564] 在另一个方面,本发明的多肽是双特异性多肽或构建体。以其最简单形式的本发明的双特异性多肽或构建体可以是本发明的二价多肽或构建体(如本文所定义),其包含针对聚集蛋白聚糖的ISV(诸如纳米抗体)和针对另一个抗原(诸如治疗性靶标)的第二ISV(诸如纳米抗体),其中所述第一和第二ISV(诸如纳米抗体)可以任选地通过接头序列连接。

[0565] 在一个优选的方面,本发明的多价多肽或构建体包含两个或更多个针对聚集蛋白聚糖的ISV或基本上由其组成。在一个方面,本发明涉及多肽或构建体,其包含至少两个根据本发明的ISV,诸如2、3或4个ISV(或其合适的片段),或基本上由其组成,其结合聚集蛋白聚糖。两个或更多个ISV可以任选地经由一个或更多个肽接头连接。

[0566] 存在于本发明的多价多肽或构建体中的两个或更多个ISV可以由轻链可变结构域序列(例如,V_L-序列)或重链可变结构域序列(例如,V_H-序列)组成;它们可以由源自常规四-链抗体的重链可变结构域序列或源自重链抗体的重链可变结构域序列组成。在优选的方

面,它们由以下各项组成:结构域抗体(或适合用作结构域抗体的氨基酸),单结构域抗体(或适合用作单结构域抗体的氨基酸),“dAb”(或适合用作dAb的氨基酸),纳米抗体®(包括但不限于V_{HH});人源化的V_{HH}序列;骆驼源化的V_H序列;或通过亲和力成熟获得的V_{HH}序列。两个或更多个ISV可以由部分或完全人源化的纳米抗体或部分或完全人源化的VHH组成。

[0567] 在本发明的一个方面,存在于本发明的多互补位(优选双互补位或三互补位)的多肽或构建体中的第一ISV和第二ISV不相互(交叉)竞争结合聚集蛋白聚糖,并且因此属于不同的家族。因此,本发明涉及包含两个或更多个ISV的多互补位的(优选双多互补位的)多肽或构建体,其中每个ISV属于不同的家族。在一个方面,本发明的该多互补位的(优选双互补位的)多肽或构建体的第一ISV不交叉阻断本发明的该多互补位的(优选双互补位的)多肽或构建体的第二ISV对聚集蛋白聚糖的结合和/或第一ISV对聚集蛋白聚糖的结合不被第二ISV交叉阻断。在另一个方面,本发明的多互补位的(优选双互补位的)多肽或构建体的第一ISV交叉阻断本发明的该多互补位的(优选双互补位的)多肽或构建体的第二ISV对聚集蛋白聚糖的结合和/或第一ISV对聚集蛋白聚糖的结合被第二ISV交叉阻断。

[0568] 在一个优选的方面,本发明的多肽或构建体包含两个或更多个ISV或基本上由其组成,其中的至少一个ISV是针对聚集蛋白聚糖的。在一个特别优选的方面,本发明的多肽或构建体包含三个或更多个ISV或基本上由其组成,其中的至少两个ISV是针对聚集蛋白聚糖的。应当理解,针对聚集蛋白聚糖的所述至少两个ISV可以相同或不同,可以针对聚集蛋白聚糖的相同表位或不同表位,可以属于相同表位箱或不同表位箱,和/或可以结合至聚集蛋白聚糖的相同或不同的结构域。

[0569] 在一个优选的方面,本发明的多肽或构建体包含至少两个ISV或基本上由其组成,其中所述至少两个ISV是相同的或不同的,其独立地选自由SEQ ID NO:117、118、116、115和1-19组成的组,更优选地,所述至少两个ISV选自由SEQ ID NO:117、5、6、8、114-116组成的组,和/或所述至少两个ISV选自由SEQ ID NO:118和13组成的组。

[0570] 在另一个方面,本发明涉及多互补位的(优选双互补位的)多肽或构建体,其包含两个或更多个针对聚集蛋白聚糖的免疫球蛋白单可变结构域,其结合与SEQ ID NO:117、118、114、115、116和1-19中任一个所结合的相同表位。

[0571] 预期用于临床用途的分子的最终格式包括一个或两个结合聚集蛋白聚糖的结构单元(诸如ISV),和具有治疗作用模式的一个或更多个结构单元(诸如ISV),以及可能的另外的部分。在实施例部分中,证明了这种格式既保留了聚集蛋白聚糖结合和保留性质以及治疗效果,例如酶促和/或抑制功能。具有治疗作用模式的一个或更多个结构单元(诸如ISV),可以是在涉及聚集蛋白聚糖的疾病中和/或在其中聚集蛋白聚糖用于在所需部位(诸如在关节中)引导、锚固和/或保留其他(例如治疗性)结构单元的疾病中具有治疗效果的任何结构单元(“治疗性结构单元”或“治疗性ISV”),涉及聚集蛋白聚糖的疾病诸如关节炎疾病,骨关节炎,脊椎干骺端发育不良,腰椎间盘退变疾病,退行性关节病,类风湿性关节炎,聚集蛋白聚糖(aggrecanopathies)。因此,本发明关于根据本发明的多肽或构建体,其中所述一种或更多种另外的结构单元,例如另外的ISV,保留活性。

[0572] 本发明涉及多肽或构建体,其包含以下或基本上由以下组成:结合蛋白聚糖的至少一个根据本发明的ISV,诸如本发明的一个或更多个ISV(或其合适的片段),和至少一个另外的ISV,尤其是治疗性ISV,其中所述至少一个另外的ISV优选结合治疗性靶标,诸如结

合丝氨酸蛋白酶家族的成员,组织蛋白酶,基质金属蛋白酶(MMP)/基质蛋白酶或具有血小板反应蛋白基序的解联蛋白金属蛋白酶(ADAMTS),优选MMP8,MMP13,MMP19,MMP20,ADAMTS5(聚集蛋白聚糖酶-2),ADAMTS4(聚集蛋白聚糖酶-1)和/或ADAMTS11。

[0573] 在一个方面,本发明涉及本发明的多肽或构建体,其基本上由至少一个结合聚集蛋白聚糖的ISV和至少一个具有治疗效果的另外的ISV(例如治疗性结构单元)组成,或包含其。治疗效果可以是改善,治疗或预防如下文将进一步详述的疾病的任何所需的效果。优选地,另外的ISV,例如治疗性ISV,抑制或降低蛋白酶活性,例如抑制或降低治疗靶标的活性,即丝氨酸蛋白酶家族的成员,组织蛋白酶,基质金属蛋白酶(MMP)/基质蛋白酶或具有血小板反应蛋白基序的解联蛋白金属蛋白酶(ADAMTS),优选MMP8,MMP13,MMP19、MMP20、ADAMTS5(聚集蛋白聚糖酶-2)、ADAMTS4(聚集蛋白聚糖酶-1)和/或ADAMTS11。抑制或降低活性可以通过结合至蛋白酶或蛋白水解酶的活性位点或通过修饰蛋白酶或蛋白水解酶的结构实现,从而防止和/或减少蛋白酶或蛋白水解酶的靶蛋白的水解。

[0574] 在一个方面,本发明涉及本发明的多肽或构建体,其选自表E-1和表E-2的多肽或构建体。

[0575] 在一个方面,本发明涉及本发明的ISV,多肽或构建体,其在37℃下在滑液(SF)中具有至少7天,诸如至少14天,21天,1个月,2个月或甚至3个月的稳定性。

[0576] 在一个方面,本发明涉及本发明的ISV,多肽或构建体,其在软骨保留测定中具有至少2,诸如至少3、4、5或6RU的软骨保留。

[0577] 在一个方面,本发明涉及本发明的ISV,多肽或构建体,其渗透到软骨中至少5μm,诸如至少10μm,20μm,30μm,40μm,50μm或甚至更多。

[0578] 本发明的多肽,构建体或ISV的稳定性可以通过本领域技术人员已知的常规测定来测量。典型的测定包括(但不限于)这样的测定:其中,确定所述多肽,构建体或ISV的活性,然后在滑液中温育所需的时间段,此后再次确定活性,例如实施例部分(参见实施例6)中详述的。

[0579] 可以通过本领域技术人员已知的常规测定法来测量本发明的多价多肽或构建物中的治疗性结构单元的所需活性。典型的测定包括在其中测定GAG释放的测定,如实施例部分(参见实施例8)中详述的。

[0580] 相对亲和力可以取决于ISVD在多肽中的位置。应当理解,本发明的多肽中的ISVD的顺序(方向)可以根据本领域技术人员的需要选择。各个ISVD的顺序以及多肽是否包含接头都是设计选择的问题。与其他方向相比,具有或不具有接头的一些方向可以提供优选的结合特性。例如,本发明的多肽中的第一ISV(例如ISV 1)和第二ISV(例如ISV 2)的顺序可以是(从N-末端到C-末端):(i)ISV 1(例如纳米抗体1)-[接头]-ISV 2(例如纳米抗体2)-[C-末端延伸];或(ii)ISV 2(例如,纳米抗体2)-[接头]-ISV 1(例如,纳米抗体1)-[C-末端延伸];(其中,方括号之间的部分,即接头和C-端延伸是任选的)。本发明涵盖所有方向。包含提供期望的结合特性的ISV的方向的多肽可以通过常规筛选(例如在实施例部分中举例说明的)容易地鉴定。优选的顺序是从N-末端到C-末端:治疗性ISV-[接头]-结合聚集蛋白聚糖的ISV-[C-末端延伸],其中方括号之间的部分是任选的。另一个优选的顺序是从N-末端到C-末端:治疗性ISV-[接头]-结合聚集蛋白聚糖的ISV-[接头]-结合聚集蛋白聚糖的ISV-[C-末端延伸],其中方括号之间的部分是任选的。

[0581] 本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如本发明的多肽和/或ISV,可以或可以不进一步包含一个或更多个其他基团、残基(例如氨基酸残基)、部分或结合单元(这些聚集蛋白聚糖结合物,诸如多肽和/或ISV(带有或不带有额外的基团,残基,部分或结合单元)都被称为“本发明的化合物”,“本发明的构建体”和/或“本发明的多肽”)。如果存在的话,此类另外的基团,残基,部分或结合单元可能会或可能不会为聚集蛋白聚糖结合物(诸如多肽和/或ISV)提供其他功能,并且可能会或可能不会修改聚集蛋白聚糖结合物(诸如多肽和/或ISV)的性质。

[0582] 例如,此类另外的基团,残基,部分或结合单元可以是一个或更多个额外的氨基酸序列,使得所得的多肽是(融合)多肽。在优选但非限制性的方面,所述一个或更多个其他基团,残基,部分或结合单元是免疫球蛋白。甚至更优选地,所述一个或更多个其他基团,残基,部分或结合单元是选自由以下各项组成的组的ISV:结构域抗体,适合用作结构域抗体的氨基酸,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的氨基酸,dAb,适合用作dAb的氨基酸,纳米抗体(诸如例如VHH,人源化的VHH或骆驼源化的VH序列)。

[0583] 如上所述,可以将额外的结合单元,诸如具有不同抗原特异性的ISV连接起来以形成多特异性多肽。通过结合具有两种或更多种特异性的ISV,可形成双特异性,三特异性等的多肽或构建体。例如,根据本发明的多肽可以包含一个,两个或多个针对聚集蛋白聚糖的ISV和至少一个针对另一个靶标的ISV结构域。技术人员可以容易地想到的此类构建体及其修饰均涵盖在如本文所用的术语“本发明的化合物,本发明的构建体和/或本发明的多肽”中。

[0584] 在上文描述的化合物,构建体和/或多肽中,所述一个,两个,三个或多个ISV和一个或更多个基团,残基,部分或结合单元可以彼此直接连接和/或通过一个或更多个合适的接头或间隔区连接。例如,当一个或更多个基团,残基,部分或结合单元是氨基酸序列时,接头也可以是氨基酸序列,使得所得多肽是融合(蛋白质)或融合(多肽)。

[0585] 所述一个或更多个另外的基团,残基,部分或结合单元可以是任何合适的和/或所需的氨基酸序列。所述另外的氨基酸序列可以或可以不改变、变更或以其他方式影响本发明的多肽的(生物学)性质,并且可以或可以不向本发明的多肽添加另外的功能。优选地,所述另外的氨基酸序列是使得其赋予本发明的多肽一种或更多种所需的性质或功能的氨基酸序列。

[0586] 此类氨基酸序列的实例对于技术人员将是清楚的,并且通常可以包含基于常规抗体及其片段(包括但不限于ScFv和单结构域抗体)的用于肽融合的所有氨基酸序列。例如参考Holliger和Hudson的综述(Nature Biotechnology 23:1126-1136,2005)。

[0587] 例如,这样的氨基酸序列可以是,与本发明本身的多肽相比,增加半衰期,溶解度或吸收,降低免疫原性或毒性,消除或减轻不希望的副作用和/或赋予其他有利性质,和/或减少本发明的化合物,构建体和/或多肽的不希望的性质的氨基酸序列。此类氨基酸序列的一些非限制性实例是血清蛋白,诸如人血清白蛋白(参见诸如WO 00/27435)或半抗原分子(诸如被循环抗体识别的半抗原,诸如参见WO 98/22141)。

[0588] 在本发明的特定方面,本发明的构建体或多肽可具有赋予增加的半衰期的部分,与没有所述部分的本发明的相应构建体或多肽相比。基于本文的进一步公开,本发明的此类构建体和多肽的一些优选但非限制性的实例对于本领域技术人员将变得清楚,例如包含

已被化学修饰以增加其半衰期(例如,通过聚乙二醇化的手段)的本发明的ISV或多肽;本发明的聚集蛋白聚糖结合物,诸如包含至少一个额外的用于结合血清蛋白(例如血清白蛋白)的结合位点的本发明的ISV和/或多肽;或包含连接至增加本发明氨基酸序列半衰期的至少一个部分(特别是至少一个氨基酸序列)的至少一个本发明氨基酸序列的本发明的多肽。基于本文的进一步公开,包含此类半衰期延长的部分或ISV的本发明的构建体诸如本发明的多肽的实例对于本领域技术人员来说会变得清楚;且诸如包括但不限于多肽,其中本发明的一种或更多种ISV适当连接至一种或更多种血清蛋白或其片段(诸如(人)血清白蛋白或其合适的片段)或适当连接至一种或更多种可以结合血清蛋白的结合单元(诸如,结构域抗体,适合用作结构域抗体的ISV,单结构域抗体,适合用作单结构域抗体的ISV,dAb,适合用作dAb的ISV,或能够结合至血清蛋白诸如血清白蛋白(诸如人血清白蛋白)的纳米抗体,血清免疫球蛋白(诸如IgG)或转铁蛋白;请参见本文中提及的进一步描述和参考文献);其中本发明的氨基酸序列连接至Fc部分(诸如人Fc)或其合适部分或片段的多肽;或其中本发明的一种或更多种ISV适合与能够结合至血清蛋白的一种或更多种小蛋白或肽连接的多肽,诸如,WO 91/01743,WO 01/45746,WO 02/076489,WO2008/068280,WO2009/127691和PCT/EP2011/051559中描述的蛋白质或肽。

[0589] 在一个方面,本发明提供了本发明的构建体,诸如多肽,其中所述多肽进一步包含血清蛋白结合部分或血清蛋白。

[0590] 优选地,所述血清蛋白结合部分结合血清白蛋白,例如人血清白蛋白。

[0591] 通常,具有增加的半衰期的本发明的构建体或多肽优选地具有本发明的相应构建体或多肽本身(即不具有赋予增加的半衰期的部分)的至少1.5倍,优选至少2倍,诸如至少5倍,例如至少10倍或大于20倍大的半衰期。例如,具有增加的半衰期的本发明的构建体或多肽例如在人中可具有相比于本发明相应构建体或多肽本身(即不具有赋予增加的半衰期的部分)增加大于1小时,优选大于2小时,更优选大于6小时,诸如大于12小时,或甚至大于24、48或72小时的半衰期。

[0592] 在本发明的一个优选的但非限制性的方面,本发明的构建体,诸如本发明的多肽,例如在人中,具有与本发明的相应的构建体或多肽本身(即不具有赋予增加的半衰期的部分)相比增加大于1小时,优选大于2小时,更优选大于6小时,诸如超过12小时,或甚至超过24、48或72小时的血清半衰期。

[0593] 在本发明的另一个优选但非限制性方面,本发明的此类构建体,诸如本发明的多肽,表现出至少约12小时,优选至少24小时,更优选至少48小时,甚至更优选至少72小时或更长的在人中的血清半衰期。例如,本发明的化合物或多肽可具有至少5天(诸如约5至10天),优选至少9天(诸如约9至14天),更优选至少约10天(诸如约10至15天)或至少约11天(诸如约11至16天),更优选至少约12天(诸如约12至18天或更多),或多于14天(诸如大约14到19天)的半衰期。

[0594] 在本发明的一个特别优选但非限制性的方面,本发明提供了本发明的构建体,诸如本发明的多肽,其除了一个或更多个结合聚集蛋白聚糖的结构单元和可能地一个或更多个治疗性结构单元之外,还包括至少一个结合血清白蛋白的结构单元,诸如结合血清白蛋白(诸如本文所述的人血清白蛋白)的ISV,其中所述结合血清白蛋白的ISV包含4个构架区(分别为FR1至FR4)和3个互补性决定区(分别为CDR1至CDR3)或基本上由其组成,其中CDR1

为SFGMS,CDR2为SISGSGSDTLYADSVKG,而CDR3为GGSLSR。优选地,所述结合人血清白蛋白的ISV选自由以下各项组成的组:Alb8,Alb23,Alb129,Alb132,Alb135,Alb11,Alb11(S112K)-A,Alb82,Alb82-A,Alb82-AA,Alb82-AAA,Alb82-G,Alb82-GG,Alb82-GGG,Alb92或Alb223(参见表C)。

[0595] 在一个实施方案中,本发明涉及本发明的构建体,诸如包含血清蛋白结合部分的多肽,其中所述血清蛋白结合部分是基于非抗体的多肽。

[0596] 在一个方面,本发明涉及本文所述的化合物或构建体,其包含一个或更多个其他基团,残基,部分或结合单元,其优选地由以下各项组成的组:聚乙二醇分子,血清蛋白或其片段,能够结合血清蛋白的结合单元、Fc部分和能够结合血清蛋白的小蛋白或肽。

[0597] 在一个实施方案中,本发明涉及本发明的构建体,诸如包含赋予半衰期延长的部分的多肽,其中所述部分是PEG。因此,本发明涉及包含PEG的本发明的构建体或多肽。

[0598] 所述另外的氨基酸残基可以或可以不改变,变更或以其他方式影响本发明的多肽的其他(生物学)性质,并且可以或可以不向本发明的多肽添加另外的功能。例如,此类氨基酸残基:

[0599] a)可以包含N-末端Met残基,例如作为在异源宿主细胞或宿主生物中表达的结果。

[0600] b)可以形成信号序列或前导序列,该信号序列或前导序列指导合成后多肽从宿主细胞分泌(例如,根据用于表达本发明的多肽的宿主细胞,提供本发明的多肽的前形式、原形式或前原形式)。合适的分泌前导肽对于技术人员将是清楚的,并且可以如本文进一步描述的。通常,这种前导序列将与多肽的N-末端连接,尽管本发明在最广泛的意义上不限于此。

[0601] c)可以形成“标签”,例如允许或促进多肽纯化的氨基酸序列或残基,例如使用针对所述序列或残基的亲和技术。此后,可以除去所述序列或残基(例如通过化学或酶促切割)以提供多肽(为此目的,标签可以任选地通过可裂解的接头序列连接至氨基酸序列或多肽序列或包含可裂解的基序)。这种残基的一些优选但非限制性实例是多个组氨酸残基,谷胱甘肽残基和myc标签(诸如AAAEQKLISEEDLNGAA);

[0602] d)可以是一个或更多个已经被官能化和/或可以用作官能团的连接位点的氨基酸残基。合适的氨基酸残基和官能团对本领域技术人员来说会是清楚的,并且包括但不限于对于本发明的多肽的衍生物的本文中提及的氨基酸残基和官能团。

[0603] 在本发明的构建体,诸如本发明的多肽中,两个或更多个结构单元(诸如ISV)和任选的一个或更多个其他基团,药物,试剂,残基,部分或结合单元可以彼此直接连接(诸如,如WO 99/23221中所述)和/或可以通过一个或更多个合适的间隔区或接头或其任何组合彼此连接。用于多价和多特异性多肽的合适的间隔区或接头对本领域技术人员来说会是清楚的,并且通常可以是本领域中用于连接氨基酸序列的任何接头或间隔区。优选地,所述接头或间隔区适合用于构建打算用于药物用途的构建体,蛋白质或多肽。

[0604] 例如,本发明的多肽可以是,例如三价的三特异性多肽,所述三价的三特异性多肽包含一个结合聚集蛋白聚糖的结构单元(诸如ISV),一个治疗性结构单元(诸如ISV),和一个结合(人)血清白蛋白的结构单元(诸如ISV),其中所述第一,第二和第三结构单元(诸如ISV)可任选地经由一个或更多个,特别是两个接头序列连接。另外,本发明提供了本发明的构建体或多肽,其包含结合聚集蛋白聚糖的第一ISV和/或第二ISV和/或可能地第三ISV和/

或可能地结合血清白蛋白的ISV,其中所述第一ISV和/或所述第二ISV和/或可能地所述第三ISV和/或可能地结合血清白蛋白的ISV通过接头连接。

[0605] 一些特别优选的间隔区包括本领域中用来连接抗体片段或抗体结构域的间隔区和接头。这些接头包括上文引用的一般背景技术中提及的接头,以及诸如本领域中用于构建双抗体或ScFv片段的接头(然而,在这方面,应注意,尽管在双抗体和ScFv片段中,所用的接头序列应具有允许相关的V_H和V_L结构域结合在一起形成完整的抗原结合位点的一定的长度,一定程度的柔性和其他性质,但对本发明的多肽中使用的接头的长度或柔性没有特别的限制,因为每个ISV(诸如纳米抗体)本身都形成完整的抗原结合位点)。

[0606] 诸如,接头可以是合适的氨基酸序列,特别是1至50个,优选1至30个,诸如1至10个氨基酸残基的氨基酸序列。这样的氨基酸序列的一些优选实例包括gly-ser接头,例如类型$(gly_xser_y)_z$,诸如(例如$(gly_4ser)_3$或$(gly_3ser_2)_3$,如描述在WO 99/42077中的,以及在本文中提及的Ablynx的申请(参见诸如WO 06/040153和WO 06/122825)中描述GS30,GS15,GS9和GS7接头,以及铰链样区域,诸如天然存在的重链抗体的铰链区域或相似序列(诸如WO 94/04678中所述)。优选的接头描述在表D中(SEQ ID NO:154-170)。

[0607] 其他合适的接头通常包含有机化合物或聚合物,特别是适合用于药学用途的蛋白质的那些。例如,聚(乙二醇)部分已用于连接抗体结构域,参见例如WO 04/081026。

[0608] 在本发明的范围内涵盖的是,所用接头的长度、柔性程度和/或其他性质(尽管不是关键性的,因为通常是对于ScFv片段中所用的接头)可能对本发明的最终构建体(诸如本发明的多肽)的性质有一定影响,所述性质包括但不限于对趋化因子或对一种或更多种其他抗原的亲和力、特异性或亲合力。基于本文的公开内容,技术人员将能够任选地在一些有限的常规实验之后,确定用于本发明的特定构建体(诸如本发明的多肽)的最佳接头。

[0609] 例如,在包含针对聚集蛋白聚糖和另一靶标的结构单元,ISV或纳米抗体的本发明的多价多肽中,接头的长度和柔性优选是这样的:其允许存在于多肽中的本发明的每个结构单元(诸如ISV)结合至其同源(cognate)靶标,诸如每个靶标上的抗原决定簇。同样,基于本文的公开内容,技术人员将能够任选地在一些有限的常规实验之后,确定用于本发明的特定构建体(诸如本发明的多肽)的最佳接头。

[0610] 还在本发明的范围内的是,所用的接头赋予本发明的构建体(诸如本发明的多肽)一种或更多种其他有利的性质或功能,和/或提供一个或更多个用于衍生物的形成和/或用于官能团的连接的位点(诸如,如本文所述,用于本发明的ISV的衍生物)。例如,含有一个或更多个带电荷的氨基酸残基的接头可以提供改善的亲水性,而形成或含有小的表位或标签的接头可以用于检测、鉴定和/或纯化的目的。再次,基于本文的公开内容,本领域技术人员将能够任选地在一些有限的常规实验之后确定用于本发明的特定多肽的最佳接头。

[0611] 最后,当在构建体(诸如本发明的多肽)中使用两个或多个接头时,这些接头可以相同或不同。再次,基于本文的公开内容,本领域技术人员将能够任选地在一些有限的常规实验之后确定用于本发明的特定构建体或多肽的最佳接头。

[0612] 通常,为了易于表达和生产,本发明的构建体,诸如本发明的多肽,将是线性多肽。然而,本发明在最广泛的意义上不限于此。诸如,当本发明的构建体,诸如本发明的多肽,包含三个或更多个结构单元,ISV或纳米抗体时,可以通过使用具有三个或更多个“臂”的接头将它们连接起来,每个“臂”连接至结构单元,ISV或纳米抗体,以便提供“星形”构建体。使用

环形构建体是可能的,尽管通常不太优选。

[0613] 因此,本发明涉及本发明的构建体,诸如本发明的多肽,其中所述ISV彼此直接连接或通过接头连接。

[0614] 因此,本发明涉及本发明的构建体,诸如本发明的多肽,其中第一ISV和/或第二ISV和/或可能地结合血清白蛋白的ISV通过接头连接。

[0615] 因此,本发明涉及本发明的构建体,诸如本发明的多肽,其中所述接头选自由以下接头组成的组:5GS,7GS,9GS,10GS,15GS,18GS,20GS,25GS,30GS,35GS,poly-A,8GS,40GS,G1铰链,9GS-G1铰链,美洲驼羊上长铰链区域和G3铰链。

[0616] 因此,本发明涉及本发明的构建体,诸如本发明的多肽,其中所述多肽选自由表E-1和表E-2的多肽组成的组。

[0617] 本发明还涵盖化合物、构建体和/或多肽,其包含本发明的ISV或多肽,并且还包含标签或其他功能性部分,例如毒素,标记,放射化学物质等。

[0618] 其他基团,残基,部分或结合单元可以是例如化学基团,残基,部分,其本身可以或可以不具有生物学和/或药理学活性。例如但不限于,此类基团可与本发明的一种或更多种ISV或多肽连接,以提供本发明的多肽的“衍生物”。

[0619] 因此,本发明在最广泛的意义上还包括作为本发明多肽的衍生物的化合物、构建体和/或多肽。这样的衍生物通常可以通过对本发明的多肽和/或形成本发明的多肽的一个或更多个氨基酸残基进行修饰,特别是化学和/或生物学(例如,酶)修饰而获得。

[0620] 此类修饰的实例,以及多肽序列内可以这种方式(即在蛋白质主链上,但优选在侧链上)修饰的氨基酸残基的实例,可用于引入这种修饰的方法和技术以及这种修饰的潜在用途和优点对技术人员来说会是清楚的(也参见Zangi等人,Nat Biotechnol 31(10):898-907,2013)。

[0621] 例如,这样的修饰可包含将一个或更多个(官能)基团,残基或部分引入(例如,通过共价连接或以任何其他合适的方式)到本发明的多肽之中或之上,尤其是赋予本发明的多肽一种或更多种所需性质或功能的一个或更多个官能团,残基或部分。此类官能团的实例对于技术人员将是清楚的。

[0622] 例如,此类修饰可包括引入(例如,通过共价结合或以任何其他合适的方式)一个或更多个官能团,所述官能团增加本发明多肽的半衰期,溶解度和/或吸收的,降低本发明多肽的免疫原性和/或毒性,消除或减弱本发明多肽的任何不期望的副作用,和/或赋予本发明的多肽其他有利的性质和/或降低其不期望的性质;或上述两个或多个的任意组合。此类官能团和用于引入它们的技术的实例对于本领域技术人员而言会是清楚的,并且通常能够包括上文引用的一般背景技术中提及的所有官能团和技术,以及本身已知的用于药物蛋白修饰的,特别是用于抗体或抗体片段(包括ScFv和单结构域抗体)修饰的官能团和技术,例如可参考Remington(Pharmaceutical Sciences,第16版,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1980)。这样的官能团可以例如直接(例如共价地)连接到本发明的多肽,或任选地通过合适的接头或间隔区连接,这对于本领域技术人员来说也会是清楚的。

[0623] 一个具体实例是衍生的本发明的多肽,其中本发明的多肽已经被化学修饰以增加其半衰期(例如,通过聚乙二醇化的手段)。这是用于增加药物蛋白的半衰期和/或降低其免疫原性的最广泛使用的技术之一,并且包括连接合适的药理学可接受的聚合物,诸如聚(乙

二醇)(PEG)或其衍生物(诸如甲氧基聚(乙二醇)或mPEG)。通常,可以使用任何合适形式的聚乙二醇化,诸如在本领域中用于抗体和抗体片段(诸如例如(单)结构域抗体和ScFv's)的聚乙二醇化;参考诸如Chapman(Nat.Biotechnol.54:531-545,2002),Veronese和Harris(Adv.Drug Deliv.Rev.54:453-456,2003),Harris和Chess(Nat.Rev.Drug.Discov.2:214-221,2003)和WO 04/060965。用于蛋白质的聚乙二醇化的各种试剂也是可商购的,例如购自美国的Nektar Therapeutics。

[0624] 优选地,使用定点聚乙二醇化,特别是通过半胱氨酸残基(参见例如Yang等人(Protein Engineering 16:761-770,2003)。例如,为此目的,PEG可以与本发明多肽中天然存在的半胱氨酸残基连接,可以对本发明的多肽进行修饰以便适当地引入一个或更多个半胱氨酸残基以用于PEG的连接,或将包含一个或更多个用于连接PEG的半胱氨酸残基的氨基酸序列与本发明的多肽的N-和/或C-末端融合,全部使用本身为本领域技术人员已知的蛋白质工程技术。

[0625] 优选地,对于本发明的多肽,使用分子量大于5000,诸如大于10,000并且小于200,000,诸如小于100,000;例如在20,000-80,000范围内的PEG。

[0626] 另一个通常不太优选的修饰包括N-连接或O-连接的糖基化,通常作为共翻译和/或翻译后修饰的部分,这取决于用于表达本发明多肽的宿主细胞。

[0627] 然而,根据本发明的标记多肽的预期用途,另一种修饰可以包括引入一个或更多个可检测标记或其他信号产生基团或部分。合适的标记和用于连接、使用和检测其的技术对于技术人员会是清楚的,并且诸如包括但不限于荧光标记(诸如荧光素,异硫氰酸盐,罗丹明,藻红蛋白,藻蓝蛋白,别藻蓝蛋白,邻苯二醛,以及荧光胺和荧光金属,诸如^{152}Eu或来自镧系元素的其他金属),磷光标记,化学发光标记或生物发光标记(诸如,鲁米那,异氨基苯二酰肼,热吖啶酯(theromatic acridinium ester),咪唑,吖啶盐,草酸酯,二氧杂环丁烷或GFP及其类似物),放射性同位素(诸如^{3}H,^{125}I,^{32}P,^{35}S,^{14}C,^{51}Cr,^{36}Cl,^{57}Co,^{58}Co,^{59}Fe和^{75}Se),金属,金属螯合物,金属阳离子(例如金属阳离子(诸如^{99m}Tc,^{123}I,^{111}In,^{131}I,^{97}Ru,^{67}Cu,^{67}Ga和^{68}Ga)或其他特别适用于体内,体外或原位诊断和成像的金属或金属阳离子(诸如^{157}Gd,^{55}Mn,^{162}Dy,^{52}Cr和^{56}Fe)),以及生色团和酶(诸如苹果酸脱氢酶,葡萄球菌核酸酶,δ-V-类固醇异构酶,酵母醇脱氢酶,α-甘油磷酸脱氢酶,磷酸丙糖异构酶,生物素抗生物素蛋白过氧化物酶,辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,天冬酰胺酶,葡萄糖氧化酶,β-半乳糖苷酶,核糖核酸酶,脲酶,过氧化氢酶,葡萄糖-VI-磷酸脱氢酶,葡萄糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶)。其他合适的标记对于技术人员会是清楚的,并且例如包括可以使用NMR或ESR光谱法检测的部分。

[0628] 本发明的此类标记的多肽可以例如用于体外、体内或原位测定(包括本身已知的免疫测定,诸如ELISA,RIA,EIA和其他"夹心测定"等)以及体内诊断和成像目的,这取决于具体标记的选择。

[0629] 如本领域技术人员会清楚的,另一种修饰可以包含引入螯合基团,例如以螯合上述金属或金属阳离子中的一种。合适的螯合基团例如包括但不限于二乙三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0630] 而另一种修饰可以包括引入作为特异性结合对(诸如生物素-(链霉)抗生物素蛋白结合对)的一部分的官能团。这样的官能团可用于将本发明的多肽连接至与所述结合对

的另一半结合的另一种蛋白质、多肽或化学化合物,即通过形成结合对。例如,本发明的多肽可以与生物素缀合,并与缀合至抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白的另一种蛋白质、多肽、化合物或载体连接。例如,本发明的这种缀合的多肽可以用作报告物,例如在诊断系统中,其中可检测的信号产生剂与抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白缀合。此类结合对还可例如用于将本发明的多肽与载体结合,所述载体包括适于药学目的的载体。参见,例如,Cao和Suresh(Journal of Drug Targeting 8:257,2000)描述的脂质体制剂。此类结合对还可用于将治疗活性剂连接至本发明的多肽。

[0631] 其他潜在的化学修饰和酶修饰对技术人员将是清楚的。也可以出于研究目的(例如,研究功能-活性关系)引入这样的修饰。例如参考Lundblad和Bradshaw(Biotechnol.Appl.Biochem.26:143-151,1997)。

[0632] 优选地,所述化合物、构建体、多肽和/或衍生物是这样的:使得它们以如本文所定义的(即,如针对本发明的多肽所定义的)亲和力(适当地测量和/或表达为K_D-值(实际的或表观的),K_A-值(实际的或表观的),k_{on}-速率和/或K_{off}速率,或备选地作为IC_{50}值,如本文进一步描述的)结合至聚集蛋白聚糖。

[0633] 本发明的此类化合物、构建体和/或多肽及其衍生物也可以是基本上分离的形式。

[0634] 在一个方面,本发明涉及本发明的构建体,其包含根据本发明的ISV或根据本发明的多肽或基本上由其组成,并且其进一步包含一个或更多个任选地通过一个或更多个肽接头连接的其他基团,残基,部分或结合单元。

[0635] 在一个方面,本发明涉及本发明的构建体,其中一个或更多个其他基团,残基,部分或结合单元选自由以下各项组成的组:聚乙二醇分子,血清蛋白或其片段,能够结合血清蛋白的结合单元,Fc部分和能够结合血清蛋白的小蛋白或肽。

[0636] 本发明进一步涉及制备本文所述的化合物,构建体,多肽,核酸,宿主细胞和组合物的方法。

[0637] 本发明的多价多肽通常可以通过至少包括以下步骤的方法来制备:任选地通过一个或更多个合适的接头,将本发明的ISV和/或单价多肽与一个或更多个另外的ISV合适地连接,从而提供本发明的多价多肽。本发明的多肽还可以通过至少包括以下步骤的方法来制备:提供编码本发明多肽的核酸,以合适的方式表达所述核酸,并回收表达的本发明多肽。这样的方法可以以本身已知的方式进行,这对于技术人员而言是清楚的,例如,基于本文进一步描述的方法和技术。

[0638] 制备本发明的多价多肽的方法可至少包括以下步骤:以合适的方式将两个或更多个本发明的ISV和例如一个或更多个接头连接在一起。本发明的ISV(和接头)可以通过本领域已知的和本文进一步描述的任何方法偶联。优选的技术包括连接编码本发明的ISV的核酸序列(和接头)以制备表达多价多肽的遗传构建体。连接氨基酸或核酸的技术对技术人员而言是清楚的,并且再次参考标准手册,诸如上述Sambrook等人和Ausubel等人,以及下面的实施例。

[0639] 因此,本发明还涉及本发明的ISV在制备本发明的多价多肽中的用途。制备多价多肽的方法包括将本发明的ISV与本发明的至少一个另外的ISV任选地经由一个或更多个接头连接。然后,本发明的ISV用作提供和/或制备包含2个(例如在二价多肽中),3个(例如在三价多肽中),4个(例如在四价)或更多个(例如在多价多肽中)结构单元的多价多肽的结合

结构域或结构单元。在这方面,本发明的ISV可用作提供和/或制备包含2、3、4或更多个结构单元的本发明的多价,诸如二价、三价或四价多肽的结合结构域或结合单元。

[0640] 因此,本发明还涉及本发明的ISV多肽(如本文所述)在制备多价多肽中的用途。制备多价多肽的方法包括将本发明的ISV与本发明的至少一个另外的ISV任选地经由一个或更多个接头连接。

[0641] 如本领域技术人员从本文的进一步描述中可以清楚的,可以以本身已知的方式制备本发明的多肽和核酸。例如,本发明的多肽可以以任何本身已知的用于制备抗体、尤其是用于制备抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段)的方式制备。用于制备多肽和核酸的一些优选但非限制性的方法包括本文所述的方法和技术。

[0642] 本发明的多肽的生产方法可以包括以下步骤:

[0643] -在合适的宿主细胞或宿主生物(在本文中也称为"本发明的宿主")中或在另一种合适的表达系统中,表达编码本发明所述多肽的核酸(在本文中也称为"本发明的核酸"),

[0644] 任选地接着:

[0645] -分离和/或纯化由此获得的本发明的多肽。

[0646] 特别地,这种方法可以包括以下步骤:

[0647] -在使得本发明的所述宿主表达和/或产生至少一种本发明的多肽的条件下

[0648] 培养和/或维持本发明的宿主;任选地接着:

[0649] -分离和/或纯化由此获得的本发明的多肽。

[0650] 因此,本发明还涉及编码本发明的多肽,ISV或构建体(也称为"本发明的核酸")的核酸或核苷酸序列。

[0651] 本发明的核酸可以是单链或双链DNA或RNA的形式。根据本发明的一个实施方案,本发明的核酸处于如本文所定义的基本上分离的形式。本发明的核酸也可以是载体的形式,存在于载体中和/或作为载体的部分,例如表达载体,诸如例如质粒,粘粒或YAC,它们也可以处于基本上分离的形式。因此,本发明还涉及包含本发明的核酸或核苷酸序列的表达载体。

[0652] 基于本文给出的关于本发明的多肽的信息,本发明的核酸可以以本身已知的方式制备或获得,和/或可以从合适的天然来源中分离。同样,如技术人员将清楚的那样,为了制备本发明的核酸,同样可以以合适的方式将若干核苷酸序列,诸如至少两个编码本发明的ISV的核酸和例如编码一个或更多个接头的核酸连接在一起。生成本发明的核酸的技术对于技术人员将是清楚的,并且可以例如包括但不限于,自动化DNA合成;定点诱变;结合两个或更多个天然存在的和/或合成的序列(或其两个或更多个部分),引入导致截短的表达产物表达的突变;引入一个或更多个限制酶切位点(例如,使用合适的限制酶以产生易被消化和/或连接的盒和/或区域),和/或使用一个或更多个"错配"的引物通过PCR反应的手段引入突变。这些和其他技术对于本领域技术人员而言会是清楚的,并且再次参考标准手册,诸如上述Sambrook等人和Ausubel等人,以及下面的实施例。

[0653] 在优选但非限制性的实施方案中,本发明的遗传构建体包括

[0654] a)至少一种本发明的核酸;所述核酸被可操作地连接至

[0655] b)一个或更多个调节元件,诸如启动子和任选地合适的终止子;和任选地还包括

[0656] c)本身已知的遗传构建体的一个或更多个另外的元件;

[0657] 其中术语“调节元件”,“启动子”,“终止子”和“可操作地连接”具有其在本领域中的通常含义。

[0658] 通常可以通过将本发明的核苷酸序列与上述一个或更多个另外的元件适当地连接来提供本发明的遗传构建体,例如使用诸如上文提及的Sambrook等人和Ausubel等人的通用手册中所述的技术。

[0659] 本发明的核酸和/或本发明的遗传构建体可以用于转化宿主细胞或宿主生物,即用于表达和/或产生本发明的多肽。合适的宿主或宿主细胞对技术人员会是清楚的,并且可以是例如任何合适的真菌,原核或真核细胞或细胞系或任何合适的真菌,原核或(非人)真核生物以及本身已知的用于抗体和抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段)的表达和制备的所有其他宿主细胞或(非人)宿主,这对于本领域技术人员会是清楚的。还参考了上文引用的一般背景技术,以及例如WO 94/29457;WO 96/34103;WO 99/42077;Frenken等人(Res Immunol.149:589-99,1998);Riechmann和Muyldermans(1999),同上;van der Linden(J.Biotechnol.80:261-70,2000);Joosten等人(Microb.Cell Fact.2:1,2003);Joosten等人(Appl.Microbiol.Biotechnol.66:384-92,2005);以及本文引用的另外的参考文献。此外,本发明的多肽还能够在无细胞表达系统中表达和/或产生,并且此种系统的合适实例对技术人员是清楚的。用于转化本发明的宿主或宿主细胞的合适技术对技术人员而言将是清楚的,并且可取决于所使用的目标宿主细胞/宿主生物和遗传构建体。再次参考上述手册和专利申请。经转化的宿主细胞(其可以是以稳定的细胞系的形式)或宿主生物(其可以是稳定的突变系或菌株形式)形成了本发明的另外的方面。因此,本发明涉及包含根据本发明的核酸或根据本发明的表达载体的宿主或宿主细胞。优选地,这些宿主细胞或宿主生物是这样的:使得它们表达或(至少)能够表达(例如,在合适的条件下),本发明的多肽(并且在宿主生物的情况下:在至少其一个细胞,部分,组织或器官中)。本发明还包括本发明的宿主细胞或宿主生物的另外的子代,后代和/或后裔,其可以例如通过细胞分裂或通过有性或无性繁殖获得。

[0660] 为了产生/获得本发明的多肽的表达,通常可以在表达/产生本发明的(需要的)多肽的条件下保持,维持和/或培养经转化的宿主细胞或经转化的宿主生物。合适的条件对技术人员会是清楚的,并且通常取决于所用的宿主细胞/宿主生物,以及取决于控制本发明(相关)核苷酸序列表达的调节元件。再次,参考上文关于本发明的遗传构建体的段落中提到的手册和专利申请。

[0661] 然后可以使用本身已知的蛋白质分离和/或纯化技术,诸如(制备型)色谱和/或电泳技术,差异沉淀技术(differential precipitation techniques),亲和力技术(诸如使用与本发明多肽融合的特异性的可切割氨基酸序列)和/或制备型免疫学技术(即使用针对待分离的多肽的抗体),从宿主细胞/宿主生物和/或从培养所述宿主细胞或宿主生物的培养基中分离本发明的多肽。

[0662] 在一个方面,本发明涉及用于产生根据本发明的构建体,多肽或ISV的方法,其至少包括以下步骤:(a)在合适的宿主细胞或宿主生物中或在另一合适的表达系统中表达根据本发明的核酸序列;任选地接着(b)分离和/或纯化根据本发明的构建体,多肽或ISV。

[0663] 在一个方面,本发明涉及包含根据本发明的构建体,多肽,ISV或核酸的组合物。

[0664] 通常,对于药物用途,可以将本发明的构建体,多肽和/或ISVD配制成药物制剂或

组合物,所述药物制剂或组合物包含至少一种本发明的构建体,多肽和/或ISVD和至少一种药学上可接受的载体,稀释剂或赋形剂和/或佐剂,以及任选地一种或更多种药物活性多肽和/或化合物。通过非限制性实例的手段,这种制剂可以是适合用于口服施用,用于肠胃外施用(诸如通过静脉内、肌肉内或皮下注射或静脉内输注),用于局部施用(诸如关节内施用),用于通过吸入、通过皮肤贴、通过植入物、通过栓剂等施用的形式,其中关节内施用是优选的。此类合适的施用形式——其可以是固体、半固体或液体,这取决于施用方式——以及用于制备其的方法和载体,对于技术人员将是清楚的,并且在本文中进一步描述。这种药物制剂或组合物在本文中通常被称为"药物组合物"。

[0665] 因此,在另外的方面,本发明涉及药物组合物,其包含至少至少一种本发明的构建体,至少一种本发明的多肽,至少一种本发明的ISV或至少一种本发明的核酸,和至少一种本发明的合适的载体、稀释剂或赋形剂(即,适合用于药物用途),以及任选地一种或更多种另外的活性物质。在特定的方面,本发明涉及药物组合物,所述药物组合物包含根据本发明的构建体、多肽、ISV或核酸,优选地表E-1或表E-2中的至少一种以及至少一种合适的载体,稀释剂或赋形剂(即,适用于药物用途),以及任选地一种或更多种另外的活性物质。

[0666] 通常,本发明的构建体,多肽和/或ISV可以以本身已知的任何合适方式配制和施用。例如,参考上文引用的一般背景技术(并尤其是参考WO 04/041862,WO 04/041863,WO 04/041865,WO 04/041867和WO 08/020079)以及标准手册,诸如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Company,USA(1990),Remington, the Science and Practice of Pharmacy,第18版,Lippincott Williams and Wilkins (2005);或the Handbook of Therapeutic Antibodies(S.Dubel,Ed.),Wiley,Weinheim, 2007(参见例如第252-255页)。

[0667] 在特定的方面,本发明涉及药物组合物,其包含根据本发明的构建体,多肽,ISV或核酸,并且还包含至少一种药学上可接受的载体,稀释剂或赋形剂和/或佐剂,并且任选地包含一种或更多种另外的药物活性多肽和/或化合物。

[0668] 本发明的构建体,多肽和/或ISV可以以本身已知的用于常规抗体和抗体片段(包括ScFv和双抗体)和其他药学活性蛋白的任何方式配制和施用。这样的制剂和制备它们的方法对于技术人员将是清楚的,并且例如包括适合于肠胃外施用(例如静脉内,腹膜内,皮下,肌内,腔内,动脉内或鞘内施用)或局部施用(例如关节内,经皮或皮内)的制剂。

[0669] 用于肠胃外施用的制剂可以是例如适于输注或注射的无菌溶液,悬浮液,分散液或乳剂。用于这种制剂的合适的载体或稀释剂例如包括WO 08/020079的第143页提到的那些。通常,水溶液或悬浮液将是优选的。

[0670] 本发明的构建体,多肽和/或ISV也可以使用基因疗法中已知的递送方法施用,参见例如,美国专利No.5,399,346,其以其基因疗法递送方法通过引用并入本文。使用递送的基因疗法方法,可以将用编码本发明的构建体,多肽和/或ISV的基因转染的原代细胞额外用组织特异性启动子转染,以靶向特定的器官,组织,移植物,肿瘤,关节或细胞,可以额外地用信号和稳定化序列转染以用于亚细胞定位表达。

[0671] 本发明的构建体,多肽和/或ISV也可以通过输注或注射静脉内、关节内或腹膜内施用。特别的实例进一步描述在WO 08/020079的第144和145页或PCT/EP2010/062975(整个文件)中。

[0672] 本发明的构建体,多肽和/或ISV的有用剂量可通过将其体外活性和在动物模型中的体内活性进行比较来确定。用于将在小鼠和其他动物中的有效剂量外推至人的方法是本领域已知的;例如,参见例如US 4,938,949。

[0673] 用于治疗所需的本发明的构建体,多肽和/或ISV的量不仅会随所选择的特定ISV,多肽,化合物和/或构建体而变化,而且还会随施用途径,正在治疗的病况的性质以及患者的年龄和状况而变化,并最终将由主治医师或临床医生决定。同样,本发明的构建体,多肽和/或ISV的剂量根据靶细胞,肿瘤,关节,组织,移植物或器官而变化。

[0674] 所需剂量可以方便地以单剂量呈递或以适当间隔(例如每天两个,三次,四个或更多个亚剂量)作为分剂量施用。该亚剂量本身可以进一步分为例如多个离散的松散间隔的施用。优选地,所述剂量每周一次或甚至更不频繁地,诸如每两周一次,每三周一次,每月一次或甚至每两个月一次施用。

[0675] 施用方案可包括长期治疗。“长期”是指持续至少两周,优选数周,数月或数年。本领域普通技术人员仅使用本文教导的常规实验就可以确定该用量范围内的必要修改。参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences(Martin,E.W.编第四版),Mack Publishing Co.,Easton,PA。在发生任何并发症的情况下,用量也可以由个别医生进行调整。

[0676] 本领域需要针对影响关节软骨的疾病,诸如骨关节炎的更有效的疗法。即使当关节内施用时,大多数用于治疗受影响的软骨的药物的滞留时间也不足。发明人假设,通过将治疗药物偶联至会将该药物“锚定”在关节中并因此增加药物的保留但不应该破坏所述治疗药物的效力的部分(也称为“软骨锚定蛋白”或“CAP”),可显著提高治疗药物的效力。通过降低毒性和副作用,此锚定构思不仅提高药物的效力,而且可以提高患病关节的操作特异性,从而扩大了可能有用的药物的数量。本发明人进一步假设聚集蛋白聚糖结合物可能潜在地作为这种锚起作用,尽管聚集蛋白聚糖在影响关节软骨的各种疾病中被严重糖基化并降解。而且,考虑到成本和药物进入临床之前所需的各种动物模型的大量的测试,这种聚集蛋白聚糖结合物应优先具有宽的交叉反应性,例如,聚集蛋白聚糖结合物应与各种物种的聚集蛋白聚糖结合。使用各种巧妙的免疫、筛选和表征方法,本发明人能够鉴定具有优异的选择性、稳定性和特异性特征的、能够延长在关节中的保留和活性的各种聚集蛋白聚糖结合物。

[0677] 在一个方面,本发明涉及根据本发明的组合物,根据本发明的ISV,根据本发明的多肽和/或根据本发明的构建体,其用作药物。

[0678] 在一个方面,本发明涉及用于减少和/或抑制组合物、多肽或构建体从关节流出的方法,其中所述方法包括施用药学活性量的至少一种根据本发明的多肽,根据本发明的构建体或根据本发明的组合物至需要其的人。

[0679] 在本发明中,术语“减少和/或抑制流出”意指减少和/或抑制组合物、多肽或构建体从关节内向外流动。优选地,与在相同条件下但不存在本发明的聚集蛋白聚糖结合物(例如结合聚集蛋白聚糖的ISV)的情况下的在关节中的上述组合物、多肽或构建体的流出相比,流出减少和/或抑制至少10%,诸如至少20%,30%,40%或50%,或者甚至更多,诸如至少60%,70%,80%,90%或甚至100%。

[0680] 预期本发明的聚集蛋白聚糖结合物可用于影响软骨的各种疾病,诸如关节病和软骨营养障碍,关节炎疾病,诸如骨关节炎,类风湿性关节炎,痛风性关节炎,银屑病关节炎,

外伤性破裂或脱离,软骨发育不全,肋软骨炎,脊椎干骺端发育不良,椎间盘突出症,腰椎间盘退变疾病,退行性关节病和复发性多软骨炎(在此通常称为“聚集蛋白聚糖相关疾病”)。

[0681] 在一个方面,本发明涉及组合物,ISV,多肽和/或构建体,其用于预防或治疗聚集蛋白聚糖相关疾病,诸如例如,关节病和软骨营养障碍,关节炎疾病,诸如骨关节炎,类风湿性关节炎,痛风性关节炎,银屑病关节炎,外伤性破裂或脱离,软骨发育不全,肋软骨炎,脊椎干骺端发育不良,椎间盘突出症,腰椎间盘退变疾病,退行性关节病和复发性多软骨炎。

[0682] 在一个方面,本发明涉及预防或治疗关节病和软骨营养障碍,关节炎疾病,诸如骨关节炎,类风湿性关节炎,痛风性关节炎,银屑病关节炎,外伤性破裂或脱离,软骨发育不全,肋软骨炎,脊椎干骺端发育不良,椎间盘突出症,腰椎间盘退变疾病,退行性关节病和复发性多软骨炎的方法,其中所述方法包括,向需要其的受试者,施用药学活性量的至少一种根据本发明的组合物、ISV、多肽或构建体至需要其的人。

[0683] 在一个方面,本发明涉及根据本发明所述的ISV、多肽、组合物或构建体在制备用于治疗或预防如下疾病的药物组合物中的用途:关节病和软骨营养障碍,关节炎疾病,诸如骨关节炎,类风湿性关节炎,痛风性关节炎,银屑病关节炎,外伤性破裂或脱离,软骨发育不全,肋软骨炎,脊椎干骺端发育不良,椎间盘突出症,腰椎间盘退变疾病,退行性关节病和复发性多软骨炎。

[0684] 预期通过与聚集蛋白聚糖结合,本发明的聚集蛋白聚糖结合物可以降低或抑制以下各项在降解聚集蛋白聚糖中的活性:丝氨酸蛋白酶家族的成员,组织蛋白酶,基质金属蛋白酶(MMP)/基质蛋白酶或具有血小板反应蛋白基序的解联蛋白金属蛋白酶(ADAMTS),优选MMP8,MMP13,MMP19,MMP20,ADAMTS5(聚集蛋白聚糖酶-2),ADAMTS4(聚集蛋白聚糖酶-1)和/或ADAMTS11。

[0685] 因此,在一个方面,本发明涉及用于降低或抑制以下各项在降解聚集蛋白聚糖中的活性的方法:丝氨酸蛋白酶家族的成员,组织蛋白酶,基质金属蛋白酶(MMP)/基质蛋白酶或具有血小板反应蛋白基序的解联蛋白金属蛋白酶(ADAMTS),优选MMP8,MMP13,MMP19,MMP20,ADAMTS5(聚集蛋白聚糖酶-2),ADAMTS4(聚集蛋白聚糖酶-1)和/或ADAMTS11,其中所述方法包括施用药学活性量的至少根据本发明的ISV、多肽、构建体或组合物至需要其的人。

[0686] 在本发明的上下文中,术语“预防和/或治疗”不仅包括预防和/或治疗疾病,而且通常还包括预防疾病的发作,减慢或逆转疾病的进展,预防或减慢与疾病有关的一种或更多种症状的发作,减少和/或减轻与疾病有关的一种或更多种症状,减少疾病和/或与其有关的任何症状的严重性和/或持续时间和/或预防疾病和/或与其相关的任何症状的严重程度的进一步增加,预防、减少或逆转由疾病引起的任何生理损害,以及通常有益于正在治疗的患者的任何药理作用。

[0687] 待治疗的受试者可以是任何温血动物,但特别是哺乳动物,更特别是人类。如对本领域技术人员而言会是清楚的,待治疗的受试者将特别是患有本文所述的疾病、病症和病况或处于其风险中的人。

[0688] 通常,治疗方案将包括以一个或更多个药学有效量或剂量施用一种或更多种本发明的ISV,多肽,化合物和/或构建体,或包含其的一种或更多种组合物。临床医生可以再次基于上述因素确定要施用的具体量或剂量。

[0689] 通常,取决于待治疗的具体疾病,病症或病况,所使用的本发明的具体的ISV,多肽,化合物和/或构建体的效价,具体的施用途径以及所使用的具体药物制剂或组合物,临床医生将能够确定合适的每日剂量。

[0690] 通常,在以上方法中,将使用本发明的ISV,多肽,化合物和/或构建体。然而,组合使用两个或更多个本发明的ISV,多肽和/或构建体也在本发明的范围内。

[0691] 本发明的ISV,多肽和/或构建体可以与一种或更多种另外的药物活性化合物或成分组合使用,即,作为组合治疗方案,其可以或可以不产生协同作用。

[0692] 同样,临床医生将能够根据上述因素及其专业判断,选择这样的另外的化合物或成分,以及合适的组合治疗方案。

[0693] 特别地,本发明的ISV,多肽和/或构建体可以与其他药物活性化合物或成分组合使用,所述化合物或成分用于或可以用于预防和/或治疗本文所述的疾病,病症和病况,其结果可能会或可能不会获得协同效果。这样的化合物和成分的实例,以及用于施用它们的途径、方法和药物制剂或组合物对于临床医生将是清楚的。

[0694] 当将两种或更多种物质或成分用作组合治疗方案的部分时,他们可以在基本上相同的时间或不同的时间(例如,基本上同时,连续地,或根据交替方案),通过相同的施用途径或通过不同的施用途径施用。当要通过相同的施用途径同时施用物质或成分时,如本领域技术人员将清楚的那样,它们可以作为不同的药物制剂或组合物来施用或作为组合的药物制剂或组合物的一部分来施用。

[0695] 同样,当两种或更多种活性物质或成分用作组合治疗方案的部分时,每种物质或成分可以以与单独使用所述化合物或成分时所使用的相同量并根据相同的方案施用,这种组合使用可能会或可能不会产生协同效应。然而,当两种或更多种活性物质或成分的组合使用产生协同作用时,也可能减少待施用的一种、更多种或所有物质或成分的量,同时仍实现所需治疗作用。这可以例如对于避免、限制或减少当一种或更多种物质或成分以通常量使用时与所述物质或成分的使用相关的任何不需要的副作用,同时仍获得所需的药物或治疗效果是有用的。

[0696] 如临床医生会清楚的,根据本发明使用的治疗方案的有效性可以以用于所涉及的疾病,病症或病况的任何本身已知的方式来确定和/或遵循。临床医生也将能够在适当的情况下并且在逐个病例的基础上改变或修改特定的治疗方案,以便实现期望的治疗效果,以避免、限制或减少不想要的副作用,和/或在一方面实现期望的治疗效果与另一方面避免、限制或减少不想要的副作用之间实现适当的平衡。

[0697] 通常,将遵循治疗方案直到实现期望的治疗效果和/或持续保持期望的治疗效果的时间。同样,这能够由临床医生确定。

[0698] 在另一个方面,本发明涉及本发明的ISV,多肽,化合物和/或构建体在制备用于预防和/或治疗至少一种与聚集蛋白聚糖相关的疾病的药物组合物中的用途;和/或在本文提及的一种或更多种治疗方法中的用途。

[0699] 本发明还涉及本发明的ISV,多肽,化合物和/或构建体在制备用于预防和/或治疗至少一种可通过调节聚集蛋白聚糖(例如抑制聚集蛋白聚糖降解)预防和/或治疗的疾病或病症的药物组合物中的用途。

[0700] 本发明还涉及本发明的ISV,多肽,化合物和/或构建体在制备用于预防和/或治疗

至少一种可通过向患者施用本发明的ISV,多肽,化合物和/或构建体预防和/或治疗的疾病,病症或病况的药物组合物中的用途。

[0701] 本发明进一步涉及本发明的ISV,多肽,化合物和/或构建体或包含其的药物组合物,其用于预防和/或治疗至少一种与聚集蛋白聚糖相关的疾病。

[0702] 待治疗的受试者可以是任何温血动物,但特别是哺乳动物,更特别是人类。在兽医应用中,待治疗的受试者包括为商业目的饲养或作为宠物饲养的任何动物。如对本领域技术人员而言会是清楚的,待治疗的受试者将特别是患有本文所述的疾病、病症和病况或处于其风险中的人。

[0703] 同样,在这种药物组合物中,本发明的一种或更多种ISV、多肽、化合物,和/或构建体或编码它们的核苷酸,和/或包含它们的药物组合物,也可以与一种或更多种其他的活性成分(诸如本文提到的那些)适当地组合。

[0704] 本发明还涉及用于体外(诸如在体外或细胞测定中)或体内(诸如在单细胞中或多细胞生物中,尤其是在哺乳动物中,并且更尤其是在人类中,诸如在处于本发明的疾病,病症或病况的风险中或患有该疾病,病症或病况的人类中)的组合物(诸如但不限于本文进一步描述的药物组合物或制剂)。

[0705] 应当理解,对治疗的提及包括对已建立症状的治疗和预防性治疗,除非另外明确指出。

[0706] 根据WIPO标准ST.25,在说明书的主体和单独的序列表中公开了序列。在说明书的主体和单独的序列表中,使用特定编号指定的SEQ ID应相同。举例来说,SEQ ID NO.:1应该在说明书的主体和单独的序列表中定义相同的序列。如果在本说明书的主体中的序列定义和单独的序列表之间存在差异(如果例如本说明书的主体中的SEQ ID NO.:1错误地对应于单独的序列表中的SEQ ID NO.:2),则在本申请中,特别是在具体实施方案中,对特定序列的引用应被理解为对本申请的主体中的序列的引用,而不是对单独的序列表的引用。换句话说,说明书主体中的序列定义/名称与单独的序列表之间的差异应通过将单独的序列表校正为在本申请的主体中公开的序列及其名称来解决,所述申请的主体包括说明书,实施例,附图和权利要求。

[0707] 现在将通过以下非限制性的优选方面、实施例和附图的手段进一步描述本发明。

[0708] 在本申请全文中引用的所有参考文献的全部内容(包括参考文献,已发布的专利,已公开的专利申请和共同待决的专利申请)在此明确地通过引用并入,特别是对于上文所引用的教导。

实施例

[0709] 实施例1用聚集蛋白聚糖免疫美洲驼羊,克隆仅重链抗体片段库和制备噬菌体

[0710] 本发明人认识到,OA动物模型的目的是可控制地再现关节损害的规模和进展,从而可以确定检测和调节症状和疾病进展的机会,并开发新的疗法。理想的动物模型成本相对较低,并且显示出可重现的疾病进展,其效果大到足以在短时间内检测出差异。如果模型进展太快达到终末期退变,则代表OA病理生理学的中间时间点则无法获得,而没有此信息,则潜在干预的细微作用就可能遗漏。认识到OA是一种终末期表型,是机械和生化过程相互作用的结果,动物模型允许在受控环境中研究这些因素(参见Teeple等人2013 AAPS J.15:

438-446)。

[0711] 动物模型的最终目标是再现人类疾病(参见Cohen-Solal等人2013 Bonekey Rep.2:422)。考虑到人类OA中谱(profiles)的异质性,需要许多模型。它们是自发的或诱发的。它们中的大多数集中在有利于OA发展的一个因素上,诸如衰老,机械应力(手术),化学缺陷(酶)或遗传因素。它们在严重性,损伤的局部化和发病机制方面均不同。但是,没有动物模型能够解决发展OA的所有方面。

[0712] 因此,为了在不同的动物模型中以及最终在人类患者中有用,CAP-结合物优选具有宽的交叉反应性,例如与超过一个物种的聚集蛋白聚糖结合。优选地,聚集蛋白聚糖结合物结合人聚集蛋白聚糖,以及狗聚集蛋白聚糖,牛聚集蛋白聚糖,大鼠聚集蛋白聚糖,猪聚集蛋白聚糖,小鼠聚集蛋白聚糖,兔聚集蛋白聚糖,食蟹猴聚集蛋白聚糖和/或恒河猴聚集蛋白聚糖中的一种或更多种。

[0713] 此外,本发明人意识到聚集蛋白聚糖的降解似乎在C-末端区域内开始。不具有G3结构域的聚集蛋白聚糖分子的群也随着衰老而增加。与关节炎有关的软骨退变的主要特征是由于G1和G2结构域之间的球间区域内的蛋白水解切割而造成的聚集蛋白聚糖的损失。因此,优选地,聚集蛋白聚糖结合物结合至聚集蛋白聚糖的N-末端区域,即除CS或G3结构域之外的区域,诸如G1-IGD-G2区域或G1-结构域,IGD,或G2结构域。最优选地,聚集蛋白聚糖结合物将结合G1结构域,所述G1结构域仍然存在于软骨细胞和ECM中。

[0714] 1.1免疫接种

[0715] 用重组的(rec)人聚集蛋白聚糖(G1-IGD-G2结构域,R&D Systems#1220-PG)免疫五个美洲驼羊(参见实施例1.2)。抗原施用后采集血清样品,并通过ELISA测定针对人重组聚集蛋白聚糖G1-IGD-G2的滴度。所有的美洲驼羊都给出了特定的血清滴度。

[0716] 1.2初步筛选

[0717] 从PBL(原血淋巴细胞)中提取RNA,并将其用作RT-PCR的模板,以扩增ISV编码基因片段。这些片段被克隆到噬菌粒载体pAX212中,从而能够产生展示与His6-和FLAG3-标签融合的ISV的噬菌体颗粒。噬菌体是根据标准方案(参见Phage Display of Peptides and Proteins:A Laboratory Manual第一版,Brian K.Kay,Jill Winter,John McCafferty,Academic Press,1996)制备和储存的。

[0718] 用五个免疫文库和两个合成的ISV文库进行噬菌体展示选择。针对重组人和(生物素-)大鼠聚集蛋白聚糖G1-IGD-G2结构域、全长提取的牛聚集蛋白聚糖或完整的牛软骨的不同组合,对文库进行两到三轮富集。针对人G1-IGD-G2结构域在ELISA中的结合筛选来自选择输出中的个体克隆(使用来自表达ISV的大肠杆菌细胞的周质提取物)。542个ELISA-阳性克隆的测序鉴定了144个独特的ISV序列。评估了ISV的物种交叉反应性,并通过ELISA定位(map)了结合至单个人G1,IGD和G2结构域。仅少数ISV显示出对重组人、大鼠、狗和牛聚集蛋白聚糖G1-IGD-G2相似的结合水平。对于G1域结合物而言,有限的物种交叉反应性特别明显,对于它们,特别是与牛和狗的聚集蛋白聚糖的结合是差的。为了鉴定具有更多物种交叉反应性的G1结构域-结合ISV,针对牛G1-IGD-G2,狗G1-IGD-G2和人G1域进行了噬菌体展示选择。在对于结合至人、食蟹猴、大鼠、狗和牛G1-IGD-G2的ELISA筛选的1245个克隆中,仅鉴定出15个新的物种交叉反应性ISV,其中9个可以定位到G1结构域。

[0719] 总共选择了19个独特的克隆作为“领先小组(lead panel)”用于进一步表征。表

1.2中提供了此领先小组的结构域定位和物种交叉反应性数据的概述。

[0720]

		周质提取物 ELISA。OD 450 nm				
定位 (Mapping)	克隆	人 G1-IGD-G2	食蟹猴 G1-IGD-G2	大鼠 G1-IGD-G2	狗 G1-IGD-G2	牛 G1-IGD-G2
G1	C0101PMP601E08	2.28	1.32	2.49	0.57	1.68
G1	C0101PMP102G11	1.69	0.60	0.16	1.02	0.32
G1	C0101PMP114F08	2.38	2.32	2.05	1.90	1.18
G1	C0101PMP112A01	2.50	2.50	2.03	1.57	2.41
G1	C0101PMP115B08	1.65	1.18	1.85	1.80	0.84
G1	C0101PMP117G09	2.21	2.21	2.29	1.68	0.76
G1	C0101PMP604B05	2.48	2.04	1.98	1.27	1.63
G1	C0101PMP606A05	0.25	1.24	0.93	0.51	0.19
G1	C0101PMP606A07	0.71	2.41	2.31	1.47	0.10
G1	C0101PMP608A05	2.33	2.48	2.39	0.86	2.27
G1	C0101PMP609C09	2.10	1.83	0.97	1.52	1.08
G2	C0101PMP112A03	2.51	2.36	1.69	1.47	0.73
G2	C0101PMP117D05	2.25	2.12	2.35	1.53	1.92
G2	C0101PMP604G09	2.41	1.57	1.40	1.16	1.21
G1-IGD-G2	C0101PMP113A01	2.56	2.57	2.53	2.51	2.54
G1-IGD-G2	C0101PMP601D02	2.58	nd	2.59	2.58	nd
G1-IGD-G2	C0101PMP601E09	2.59	nd	2.61	2.57	nd
G1-IGD-G2	C0101PMP604F02	2.41	1.37	0.78	1.04	0.82
G1-IGD-G2	C0101PMP604G01	2.27	1.25	0.60	1.55	0.68
对照	cAbLys3	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06
对照	cAbLys3	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05

[0721] 表1.2:对于领先小组的基于周质提取物的筛选数据概述。nd:未确定。

[0722] 1.3 G1结合物

[0723] 针对克隆114F08,已经确定了G1-结合物的CDR中的序列可变性。克隆114F08的CDR的氨基酸序列用作参考,针对其比较所有其他克隆(G1结合物)的CDR,并在下面的表1.3A,1.3B和1.3C中进行了描述(CDR1始于Kabat位置26,CDR2始于Kabat位置50,和CDR3始于Kabat位置95)。

[0724] 表1.3A

[0725]

G1	CDR1*									
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
野生型序列	G	S	T	F	I	I	N	V	V	R
突变		R	I		S	S	Y	A	M	G
突变		F				M	R	G		K
突变		I				T		Y		A
突变		T						T		

[0726] *一个克隆中多至2个CDR1突变

[0727] 表1.3B

[0728]

G1	CDR2*									
绝对编号	1	2	2a	3	4	5	6	7	8	9
野生型序列	T	I	-	S	S	G	G	N	A	N
突变	A G		S N	R W T N	T G	S	S R	S T R	T	D Y 10

[0729] *一个克隆中多至5个CDR2突变表

[0730] 表1.3C

[0731]

G1	CDR3*														
绝对编号	1	2	3	4	5	6	6a	7	8	9	10	10a	11	12	13
野生型序列	P	T	T	H	Y	G	-	G	V	Y	Y	-	G	P	Y
突变	- G D R E	- R L P V	- M S R	D Y G T	F V T G	L D S Y W	R T Y V	P S	G T H R L Y	R A S D G	N E G W S	W	S K Y	- E D	- L

[0732] *一个克隆中多至5个CDR3突变

[0733] 1.4 G1-IGD-G2结合物

[0734] 针对克隆604F02,已经确定了G1-IGD-G2(GIG)结合物的CDR中的序列可变性。克隆604F02的CDR的氨基酸序列用作参考,针对其比较所有其他克隆(GIG结合物)的CDR,并在下面的表1.4A,1.4B和1.4C中进行了描述(CDR1始于Kabat位置26,CDR2始于Kabat位置50,和CDR3始于Kabat位置95)。

[0735] 表1.4A

[0736]

GIG	CDR1*									
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
野生型序列	G	R	T	F	S	S	Y	T	M	G
突变		L				T		A		

[0737] *一个克隆中多至2个CDR1突变

[0738] 表1.4B

[0739]

GIG	CDR2*									
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
野生型序列	A	I	S	W	S	G	G	R	T	Y
突变							S R	T		

[0740] *一个克隆中多至2个CDR2突变

[0741] 表1.4C

[0742]

GIG	CDR3*														
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
野生型序列	Y	R	R	R	R	A	S	S	N	R	G	L	W	D	Y
突变				V P		Y	T	-	P	T L	E	T V			

[0743] *一个克隆中多至5个CDR3突变

[0744] 1.5 G2结合物

[0745] 针对克隆601D02,已经确定了G2结合物的CDR中的序列可变性。克隆601D02的CDR的氨基酸序列用作参考,针对其比较所有其他克隆(G2结合物)的CDR,并在下面的表1.5A,1.5B和1.5C中进行了描述(CDR1始于Kabat位置26,CDR2始于Kabat位置50,和CDR3始于Kabat位置95)。

[0746] 表1.5A

[0747]

G2	CDR1*									
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
野生型序列	G	P	T	F	S	R	Y	A	M	G
突变	R	S	I		N	N	R	F		Y
突变		R				M S	-	-		

[0748] *一个克隆中多至5个CDR1突变

[0749] 表1.5B

[0750]

G2	CDR2*										
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
野生型序列	A	I	T	W	S	S	G	G	R	T	Y
突变	S			L	N	-	-	A	S		N
	Y								D		R
									T		

[0751] *一个克隆中多至5个CDR2突变

[0752] 表1.5C

[0753]

G2	CDR3*															
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
野生型序列	A	R	I	P	V	R	T	Y	T	S	E	W	N	Y	-	-
突变	R	I	H	G	S	G	R	R	S	E	N	D	D	-	D	N
	F	L	Q	N		N	W	S	-	K	A	-	-			
						F	Y	-		-	-					

[0754] *一个克隆中多至5个CDR3突变

[0755] 1.6 ISV的序列优化

[0756] 各种ISV经历了序列优化过程。序列优化是其中亲本ISV序列发生突变的过程。该过程涵盖了ISV的人源化(i)和敲除翻译后修饰(ii)以及潜在的预先存在的抗体的表位(iii)。

[0757] (i)出于人源化的目的,将亲本ISV序列突变以产生与人IGHV3-IGHJ种系共有序列更一致的ISV序列。ISV和人IGHV3-IGHJ种系共有之间不同的构架区域中的特定氨基酸(所谓的标志残基除外)被改变为人类对应物,使得蛋白质结构,活性和稳定性保持原样。已知少数标志残基对于ISV的稳定性,活性和亲和力至关重要,因此不会发生突变。

[0758] (ii)CDR中存在的氨基酸以及针对其有实验证据表明它们对翻译后修饰(PTM)敏感的氨基酸被更改,使得PTM位点失活,同时蛋白质结构,活性和稳定性保持原样。

[0759] (iii)在不影响蛋白质结构,活性和稳定性的情况下,优化ISV的序列,以使任何天然存在的现有抗体的结合最小化,并降低引起治疗紧急的免疫原性应答的可能性。

[0760] 为了生成序列优化的格式化ISV,ISV构建(building)作为无标签蛋白在巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)中生产,并通过Protein A亲和色谱法纯化,然后脱盐,所有方法均符合标准方案。

[0761] 表A-1和A-2中显示了各种序列优化的格式化ISV。

[0762] 实施例2领先小组(纯化的ISV)-聚集蛋白聚糖的表征

[0763] 在初步筛选、通过ELISA初步评估结合、确定解离速率和物种交叉反应性之后,对领先小组的ISV进行进一步表征。

[0764] 2.1使用ALB26格式化聚集蛋白聚糖领先小组(n=19)

[0765] 预期用于临床用途的分子的最终格式包括一个或两个结合聚集蛋白聚糖的ISV(“锚”),以及具有治疗作用方式的一个、两个或更多个ISV或其他部分。因此,将19个所选克

隆以单价或二价格式与ALB26(CAP-ALB26或ALB26-CAP-CAP)融合并在巴斯德毕赤酵母(P.pastoris)中表达。ALB26是ALB11(与白蛋白结合的ISV)的变体具有在CDR1中的两个突变,该突变完全消除了与来自不同物种的白蛋白的结合。进行与ALB26的融合以模拟包含聚集蛋白聚糖结合物的最终多肽格式的大小。不受任何理论的束缚,发明人假设pI可影响软骨渗透和保留。使用二价ALB26(C01010030)作为阴性对照或"对照剂"。

[0766] 2.2离体牛软骨保留

[0767] 由于没有建立评估软骨保留的测定方法,因此发明人使用牛软骨开发了可靠且可重复的离体软骨保留测定方法。

[0768] 牛骨通常是从当地的屠宰场收集的。将软骨切成约1毫米厚的条,再用活检刀切成直径3毫米的圆盘。软骨盘优先从新鲜软骨中取出。

[0769] 在纳米抗体相对短时间暴露于软骨之后(在关节内注射后可以预期),确定了ISV在软骨中保留延长的时间的能力。该测定包括将离体软骨(通常是3mm牛盘,湿重约10mg)与10μg/mL纳米抗体(100μL)ON一起温育,然后洗涤长达5天(PBS/0.1%BSA/0.1%NaN_3/100mM NaCl)。此后,将结合的(保留的)纳米抗体从在含SDS的SDS-PAGE样品缓冲液(LDS样品缓冲液Invitrogen)中的软骨中释放出来,并通过Western Blot(WB)分析。该测定通常用每个纳米抗体样品4个软骨盘进行;纳米抗体温育后立即分析2个盘(t_0),以确定结合的纳米抗体的初始量;清洗后(t_{1-5}天)分析2个圆盘。保留程度定义为在t_{1-5}天和t_0检测到的纳米抗体的量的比例。为了增加测定的通量,通过Western印迹的目测进行该比率的确定,Western印迹的目测给出0-6的评分,其中0为无保留,而6为完全保留。

[0770] 结果总结如表2.2所示。

[0771]

靶标	表位箱	C01010#	构建体	pI	软骨保留*
G1	4	118	ALB26-114F08-114F08	9.09	6.00

[0772]

G1	1	131	ALB26-601E08-601E08	9.00	6.00
G1-IGD-G2	8	106	ALB26-604F02-604F02	9.61	6.00
G1-IGD-G2	8	94	604F02-ALB26	9.47	5.33
G1	4	54	114F08-ALB26	9.02	5.00
G1	4	93	117G09-ALB26	9.13	5.00
G1	1	97	608A05-ALB26	9.09	5.00
G1	1	109	ALB26-608A05-608A05	8.95	5.00
G2	7	115	ALB26-117D05-117D05	8.73	5.00
G1-IGD-G2	8	47	601E09-ALB26	9.13	4.83
G2	6	108	ALB26-604G09-604G09	9.13	4.00
G1-IGD-G2	8	95	604G01-ALB26	6.96	4.00
G1-IGD-G2	8	116	ALB26-113A01-113A01	8.73	4.00
G1-IGD-G2	8	88	113A01-ALB26	8.53	3.50
G2	6	45	601D02-ALB26	9.15	3.40
G2	7	99	117D05-ALB26	9.10	3.33
G2	6	96	604G09-ALB26	8.99	3.00
G2	6	130	ALB26-601D02-601D02	9.24	3.00
G1	1	46	601E08-ALB26	8.96	2.60
G1	5	60	606A07-ALB26	9.09	2.25
G1	5	113	ALB26-606A07-606A07	8.62	2.00
G1	4	119	ALB26-115B08-115B08	9.49	2.00
G2	6	117	ALB26-112A03-112A03	9.12	2.00
G2	6	62	112A03-ALB26	9.21	1.66

[0773]

G1	4	104	115B08-ALB26	8.66	1.50
G1	1	40	102G11-ALB26	9.20	1.33
G1	2	53	112A01-ALB26	9.17	1.00
G1	2	111	ALB26-112A01-112A01	8.64	1.00
G1	3	56	604B05-ALB26	9.89	0.66
G1	3	59	606A05-ALB26	9.19	0.33
G1	2	98	609C09-ALB26	9.72	0.33
G1	2	110	ALB26-609C09-609C09	8.13	0.00
G1	3	112	ALB26-604B05-604B05	9.06	0.00
G1	3	114	ALB26-606A05-606A05	9.03	0.00
对照剂		30	ALB26-ALB26	8.75	0.00

[0774] 表2.2:ALB26格式化的聚集蛋白聚糖领先小组的表位分箱和软骨保留。*该表列出了来自(n)个独立的离体牛软骨保留测定的平均得分,其平均得分的范围为0-6,其中0为无保留,6为完全保留。

[0775] 发现9个构建体在软骨中保留得很好(得分5-6)。此“最高的9个”包括用于聚集蛋白聚糖结合部分结合至所有重组G1,G2或G1-IGD-G2结构域的单价和二价构建体。在此测定中,有14个构建体显示了中等保留(评分在<5和2之间),有5个构建体显示了低但可检测的保留(评分在<2和1之间)。值得注意的是,除一个之外,所有聚集蛋白聚糖构建体都具有在8到9以上的pI值。

[0776] 2.3表位分箱(Epitope binning)

[0777] 为了进行表位分箱,在竞争ELISA中针对与FLAG标签融合的同一组纳米抗体筛选纯化的融合ALB26的纳米抗体构建体。

[0778] 简而言之,测定方法如下。单克隆噬菌体ELISA在噬菌体的半饱和稀释液中与1μM纯化的纳米抗体(或5μg/mL mAb)一起或不与其一起温育。在存在和不存在纯化的纳米抗体(或mAb)的情况下,在450nm处的吸光度的比率用于确定纳米抗体是否识别出重叠或不重叠的表位。

[0779] 产生的表位箱显示在表2.2中(上文)。表位箱2和3(在G1-结构域上)的构建体在离体牛软骨保留测定中具有低软骨保留评分(0-1)。然而,如通过ELISA测定的与牛聚集蛋白聚糖G1-IGD-G2的结合和牛软骨保留之间似乎没有直接相关性。不受任何理论的束缚,发明人假设这些表位在天然软骨组织中可能不容易接近。

[0780] 属于箱的克隆的CDR的序列可变性描述在下文和上文中(即,以604F02作为参考化合物的箱8;表1.4A-C)。

[0781] 表位箱4的G1-结合物针对114F08的序列可变性描述在下表2.3A,2.3B和2.3C中。

克隆114F08的CDR的氨基酸序列用作参考,针对其比较所有其他克隆(表位箱4结合物)的CDR(CDR1始于Kabat位置26,CDR2始于Kabat位置50,和CDR3始于Kabat位置95)。

[0782] 表2.3A(114F08)

[0783]

G1 箱 4	CDR1*									
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
野生型序列	G	S	T	F	I	I	N	V	V	R
突变		I			S	S	R	Y	M	K
		F				M	Y	A		

[0784] *一个克隆中多至2个CDR1突变

[0785] 表2.3B(114F08)

[0786]

G1 箱 4	CDR2*									
绝对编号	1	2	2a	3	4	5	6	7	8	9

[0787]

野生型序列	T	I	-	S	S	G	G	N	A	N
突变	A		N					R	T	D
	G									

[0788] *一个克隆中多至2个CDR2突变

[0789] 表2.3C(114F08)

[0790]

G1 箱 4	CDR3*												
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
野生型序列	P	T	T	H	Y	G	G	V	Y	Y	G	P	Y
突变	-	-	-	D	F	L		G	R	N	S	-	-
		R	M	Y	V	D		T		E	K	E	L

[0791] *一个克隆中多至5个CDR3突变

[0792] 表位箱1的G1-结合物针对608A05的序列可变性描述在下表2.3D,2.3E和2.3F中。克隆608A05的CDR的氨基酸序列用作参考,针对其比较所有其他克隆(表位箱1结合物)的CDR(CDR1始于Kabat位置26,CDR2始于Kabat位置50,和CDR3始于Kabat位置95)。

[0793] 表2.3D(608A05)

[0794]

G1 箱 1	CDR1*									
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
野生型序列	G	R	T	F	S	T	Y	T	M	G
突变			S			S		A	V	

[0795] *一个克隆中多至2个CDR1突变

[0796] 表2.3E(608A05)

[0797]

G1 箱 1	CDR2*									
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
野生型序列	A	I	S	W	S	G	G	T	T	Y
突变	I			R			R	S		

[0798] *一个克隆中多至2个CDR2突变

[0799] 表2.3F(608A05)

[0800]

G1 箱 1	CDR3*														
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
野生型序列	R	P	R	Y	Y	Y	Y	S	L	Y	S	Y	D	Y	-
突变	G	L R	L S		R	S A	T -	P	H R	P A	Y A	D	F	G	S

[0801] *一个克隆中多至5个CDR3突变

[0802] 2.4结合特征——ELISA和SPR

[0803] 基于离体牛软骨保留和表位分箱数据,选择来自不同表位箱的一些示例性构建体用于进一步表征。由于先前所述的原因,在此阶段不将G2结构域的结合物进一步表征。

[0804] 在ELISA中,在来自人、食蟹猴、大鼠、狗和牛聚集蛋白聚糖的重组G1-IGD-G2区上对所选构建体进行表征,以确定其物种的交叉反应性,并在重组人神经蛋白聚糖和/或短小蛋白聚糖上对所选构建体进行表征,以确定选择性。确定的EC_{50}值在表2.4A中列出。

[0805] 为了确定解离速率,对“单价”聚集蛋白聚糖-ALB26格式进行了SPR (ProteOn)实验。发现纳米抗体与聚集蛋白聚糖表面的相互作用是异质的。异质性可能是由于重新结合事件、固定化的聚集蛋白聚糖异质群体和/或异质糖基化模式所致。因此,计算出的解离速率仅是指示性的。总之,似乎对于包含聚集蛋白聚糖的纳米抗体,解离动力学是快速的(表2.4B)。

[0806]

表2.4A				EC50 (M)						
靶标	表位箱	C01010#	构建体	人	食蟹猴	大鼠	狗	牛	神经蛋白聚糖	短小蛋白聚糖
G1	4	**54**	114F08-ALB26	6.0E-09	4.4E-09	7.6E-09	3.0E-09	5.6E-09	不结合	不结合
G1	4	**118**	ALB26-114F08-114F08	1.1E-10	7.6E-11	1.9E-10	2.4E-10	3.7E-10	不结合	不结合
G1	1	97	608A05-ALB26	2.4E-10	2.1E-10	3.3E-10	2.5E-08	2.8E-10	不结合	不结合
G1	1	109	ALB26-608A05-608A05	1.0E-10	9.1E-11	9.5E-11	3.3E-10	7.7E-11	不结合	不结合
G1	1	46	601E08-ALB26	5.1E-09	6.8E-09	3.2E-10	6.1E-10	1.2E-09	不结合	不结合
G1	5	60	606A07-ALB26	1.2E-08	5.4E-09	8.4E-09	6.9E-09	不合适	不合适	不结合
G1	5	113	ALB26-606A07-606A07	6.7E-10	3.0E-10	1.2E-10	3.0E-09	不合适	8.7E-10	不结合
G1-IGD-G2	8	**94**	604F02-ALB26	1.2E-09	2.2E-09	5.9E-09	2.6E-09	1.6E-09	不结合	不结合
G1-IGD-G2	8	106	ALB26-604F02-604F02	6.6E-11	6.8E-11	1.0E-10	9.7E-11	不合适	不结合	不结合
对照剂		30	ALB26-ALB26	不结合	不结合	不结合	不结合	不结合	不结合	不结合

[0807] 表2.4A通过ELISA表征ALB26格式化的聚集蛋白聚糖领先小组。

[0808]

			G1-IGD-G2 (kd 1/s)				
靶标	C01010#	构建体	人	食蟹猴	大鼠	狗	牛
G1	54	114F08-ALB26	1.3E-02	6.9E-03	6.5E-01	1.1E-02	4.7E-01
G1	97	608A05-ALB26	2.5E-03	1.8E-03	1.5E-03	8.3E-02	2.7E-03
G1	46	601E08-ALB26	3.4E-03	3.1E-03	2.5E-04	7.1E-03	1.3E-03
G1	60	606A07-ALB26	2.1E-02	2.0E-02	2.1E-02	3.8E-02	2.7E-02
G1-IGD-G2	94	604F02-ALB26	1.7E-01	1.5E-01	2.6E-01	1.2E-01	2.6E-01

[0809] 表2.4B:通过SPR(解离速率)表征单价ALB26格式化的聚集蛋白聚糖领先小组(n＝5)。由于异质结合模式,解离速率仅是指示性的。

[0810] 实施例3单价领先构建体-聚集蛋白聚糖的生物物理表征

[0811] 由于全部所选构建体都表现出各种有利的特征,无论是否组合,ISV114F08和604F02及其相应的ALB26格式(C010100054,-118和094)用作代表领先小组的示例性构建体以进一步表征。

[0812] 3.1在大肠杆菌和巴斯德毕赤酵母中的单价114F08和604F02的表达

[0813] 对于生物物理表征,将单价纳米抗体114F08和604F02与$FLAG_3$-His_6-标签在大肠杆菌和巴斯德毕赤酵母中表达,并根据标准方案进行纯化(例如Maussang等人2013 J Biol Chem 288(41):29562-72)。

[0814] 3.2 114F08和604F02的pI,Tm和分析SEC

[0815] 对于热位移分析(TSA),将5μL经纯化的单价纳米抗体(800μg/ml)与5μL荧光探针Sypro Orange(Invitrogen,S6551)(终浓度10x)在10μL缓冲液(100mM磷酸盐,100mM硼酸盐,100mM柠檬酸盐,115mM NaCl,在3.5至9的不同pH范围内缓冲)中温育。将样品在LightCycler 480 II机器(Roche)中以4.4℃/s的速率从37℃加热至99℃,之后以0.03℃/s的速率将它们冷却至37℃。在热诱导的解折叠时,蛋白质的疏水碎片暴露于Sypro Orange结合的疏水碎片,导致荧光强度的增加(Ex/Em＝465/580nm)。荧光强度曲线一阶导数的拐点用作解链温度(Tm)的量度,基本上根据Ericsson等人2006(Anals of Biochemistry,357:289-298)。

[0816] 分析性尺寸排阻色谱法(分析性SEC)实验是在Ultimate 3000机器(Dionex)上组合Biosep-SEC-3(Agilent)色谱柱,使用10mM磷酸盐,300mM Arg-HCl,pH 6.0作为流动相进

行的。注入8μg纳米抗体样品(在d-PBS中为0.5mg/mL)。

[0817] 两个聚集蛋白聚糖ISV的等电点是相对碱性的。序列如表A-1)所示。解链温度对于114F08确定为61.0℃,对于604F02确定为70.0℃。如分析性SEC所确定的,没有克隆显示出聚集或多聚化(multimerisation)的迹象。

[0818] 因此,除了显示出积极的功能性质外,ISV还显示出有利的生物物理性质。

[0819] 3.3 114F08家族成员

[0820] 下表3.3A,3.3B和3.3C中描述了114F08家族成员的CDR中的序列可变性。克隆114F08的CDR的氨基酸序列用作参考,针对其比较所有其他克隆(114F08家族成员)的CDR(CDR1始于Kabat位置26,CDR2始于Kabat位置50,和CDR3始于Kabat位置95)。

[0821] 表3.3A

[0822]

114F08	CDR1*									
Kabat 编号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
野生型序列	G	S	T	F	I	I	N	V	V	R
突变							S		M	

[0823] *一个克隆中多至2个CDR1突变

[0824] 表3.3B

[0825]

114F08	CDR2*								
Kabat 编号	50	51	52	53	54	55	56	57	58
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
野生型序列	T	I	S	S	G	G	N	A	N
突变	A		R	T				T	D

[0826] *一个克隆中多至5个CDR2突变

[0827] 表3.3C

[0828]

114F08	CDR3*												
Kabat 编号	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
野生型序列	P	T	T	H	Y	G	G	V	Y	Y	G	P	Y
突变	.	.	.	R	.	.	.	D	.	.	.	.	.

[0829] *一个克隆中多至2个CDR3突变

[0830] 实施例4与各种物种的软骨的离体结合

[0831] 在牛离体软骨保留测定中,显示了示例性的包含CAP的多肽(在本文中也称为“包含CAP的构建体”或“构建体”)结合重组/提取的人蛋白质和牛软骨。为了证明这些示例性的包含CAP的构建体也与来自其他物种的软骨结合,基本上用人软骨和大鼠软骨重复了以上用牛软骨的实验。

[0832] 4.1与离体认软骨的结合

[0833] 为了确认示例性的包含CAP的构建体也结合人软骨,使用冷冻的人软骨薄片(chips)在离体软骨结合测定中测试了所选构建体。在30分钟洗涤后,通过蛋白质印迹法的手段测定结合。

[0834] 结果总结在表4.1中。

[0835]

靶标	C010100 #	构建体	T_0
G1	054	**114F08**-ALB26	
G1	**118**	ALB26-**114F08-114F08**	
G1-IGD-G2	094	**604F02**-ALB26	
对照剂	030	ALB26-ALB26	

[0836] 表4.1:人离体软骨结合。通过蛋白质印迹分析30分钟洗涤(T_0)后结合至软骨的构建体的量。

[0837] 发现了所有构建体都比对照剂构建体更好地结合人软骨。

[0838] 4.2与离体大鼠软骨的结合

[0839] 为了促进在大鼠体内模型中测试构建体,评估了与大鼠软骨的结合。因此,使用具有完整软骨的大鼠的股骨建立了测定。将示例性构建体C010100054,-118和-094与大鼠软骨一起温育过夜,然后洗涤30分钟,释放结合的构建体,然后进行蛋白质印迹分析。

[0840] 结果示于表4.2。

[0841] 发现所有测试的构建体与大鼠软骨结合良好。

[0842]

靶标	C010100 #	构建体	完整外观
G1	054	114F08-ALB26	
G1	118	ALB26-114F08-114F08	
G1-IGD-G2	094	60F02-ALB26	
对照剂	030	ALB26-ALB26	

[0843] 表4.2:大鼠软骨结合。将构建体与股骨头一起温育。在纳米抗体构建体温育后,将未结合的构建体洗掉,并通过蛋白质印迹分析结合的构建体。

[0844] 实施例5组织特异性

[0845] 以上证明了本发明的构建体体外和离体都与聚集蛋白聚糖特异性结合。另外,这些构建体还应当优选结合至关节的软骨,而不或很少结合至关节中的其他组织。

[0846] 使用与离体软骨结合测定相同的设置来评估示例性的包含CAP的构建体与滑膜,肌腱,肌外膜和半月板的结合。与构建体一起ON温育后,短暂清洗组织(30分钟)后,进行构建体释放和蛋白质印迹分析。

[0847] 结果总结在表5中。

[0848] 结果表明,与关节中发现的其他组织相比,CAP结合物对包括半月板的软骨组织显示出优先的结合。

[0849]

靶标	C010100#	构建体	软骨	滑膜	肌腱	肌外膜	半月板
G1	054	**114F08**-ALB26	+++++	+/-	+	+/-	nd
G1	118	ALB26-**114F08-114F08**	+++++	+	+	+	nd
G1-IGD-G2	094	**604F02**-ALB26	+++++	+	+	+/-	nd
G1	046	**601E08**-ALB26	++++	+/-	+	nd	+++
对照剂	030	ALB26-ALB26	+/-	+/-	+/-	-	-

[0850] 表5:组织特异性。ALB26格式化的领先小组(n=10)与关节软骨,滑膜,肌腱,肌外膜和半月板的结合。

[0851] 实施例6牛滑液中的纳米抗体稳定性

[0852] 由于各种原因,包括患者的便利性和安全性,优选的是,所述构建体在滑膜中保持较长时间稳定。

[0853] 因此,示例性ALB26融合的CAP构建体在滑液(SF)中的稳定性通过在非关节炎牛SF中将构建体在37℃下孵育多达7天来评估。

[0854] 结果总结在表6中。

[0855]

靶标	C010100#	构建体	在牛SF中的稳定性,37℃
G1	054	114F08-ALB26	>7天
G1	118	ALB26-114F08-114F08	>7天
G1-IGD-G2	094	604F02-ALB26	>7天
对照剂	030	ALB26-ALB26	>7天

[0856] 表6:ALB26格式化的领先小组在牛SF的稳定性。

[0857] 没有检测到任何构建体的降解。

[0858] 实施例7在经IL-1α-刺激的外植软骨中的保留

[0859] 到目前为止,所有涉及包含CAP的纳米抗体的软骨结合和保留的实验均在健康(非关节炎)离体软骨中进行。关节炎软骨的特征在于胶原蛋白和聚集蛋白聚糖的降解。因此,还评价聚集蛋白聚糖-结合物在已经发生这些蛋白质降解的软骨中的结合和保留是相关的。为此,在软骨外植试验中测试了示例性的ALB26融合的CAP构建体,在该软骨外植试验中软骨被刺激以诱导降解。

[0860] 简而言之,将示例性的包含CAP的构建体与牛软骨外植体一起温育过夜(ON),所述牛软骨外植体在有或没有IL-1α和制瘤素M的情况下培养,然后每天更换培养基(洗涤)培养5天。IL-1α和制瘤素M主要在实验的6天内诱导聚集蛋白聚糖降解。通过WB分析软骨外植体的构建体结合和保留。进行了两个独立的实验(实验A和实验B)。

[0861] 蛋白质印迹的结果在表7.1中描述。

[0862]

靶标	G1		G1		G1-IGD-G2		G2		对照剂	
构建体	#54		#118		#94		#45		#30	
刺激	- +	- +	- +	- +	- +	- +	- +	- +	- +	- +
洗涤(天)	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
Exp A										
Exp B										

[0863] 表7.1:ALB26格式化的领先小组在经刺激的牛软骨外植体中的保留。进行了两个独立的实验:A和B。

[0864] 表7.2总结了包含CAP的构建体在经刺激的软骨外植体中保留的结果。

[0865]

靶标	C010100 #	构建体	结合 经刺激的 对比 未经刺激的	保留 第5天
G1	054	114F08-ALB26	减少	部分
G1	118	ALB26-114F08-114F08	相等	完全
G1-IGD-G2	094	604F02-ALB26	减少	部分
G1	045	601D02-ALB26	减少	部分
对照剂	030	ALB26-ALB26	不结合	不结合

[0866] 表7.2:在经刺激的牛软骨外植体测定中CAP结合和保留的总结。

[0867] 结果显示,与未经刺激的软骨相比,在洗涤5天后,构建体C01010054(“054”或“54”)和C01010045(“045”或“45”)在经刺激软骨中的保留减少,而构建体C01010118(“118”)和C01010094(“094”或“94”)对刺激几乎不显示敏感性。

[0868] 进一步显示,与G2聚集蛋白聚糖结构域的结合(如C01010045所示例的)比与其它结构域的结合降低更多,这与聚集蛋白聚糖降解从C-末端进行的假设一致。

[0869] 实施例8 ADAMTS5-CAP GAG释放测定

[0870] 为了解决CAP(软骨锚定部分)对蛋白酶抑制性纳米抗体(protease inhibiting Nanobody)在软骨组织中的效价的可能影响,将示例性CAP构建体融合到阻断ADAMTS5(ATS5)的ISV上,并在GAG(GlycosAminomycan)-释放软骨外植体测定中进行测试。

[0871] 在GAG-释放软骨外植体测定中测试构建体之前,已确认体外软骨结合和ADAMTS5抑制性质。对于后者,进行了酶促肽测定,显示ADAMTS5 ISV的酶阻断功能在任何体外CAP融合构建物中均未受损。

[0872] 在GAG-释放测定中,将牛软骨外植体在IL-1α和制瘤素M(用于诱导ADAMTS5)和一

定剂量范围的构建体存在下培养5天,然后对在培养上清液中释放的GAG含量进行定量。

[0873] 表8总结了经测试的构建体和GAG-释放测定的结果。

[0874]

靶标	ID	构建体	IC50 (nM)	
			肽测定	GAG-释放
ADAMTS-5-G1	C010100270	ATS5-114F08	0,11	4,17
ADAMTS-5-G1	C010100276	ATS5-114F08-114F08	0,06	19,15
ADAMTS-5-G1-IGD-G2	C010100271	ATS5-604F02	0,19	2,15
ADAMTS-5-G1	C011400510	ATS5(标签-少)	0,12	0,87

[0875] 表8:ADAMTS5-CAP GAG释放测定的总结。

[0876] 结果表明,将锚定臂(CAP-ISV构建体)添加到ADAMTS5抑制剂中仍然允许GAG-释放的有效抑制。

[0877] 实施例9 CAP-构建体的体内生物成像

[0878] 与示例性聚集蛋白聚糖CAP构建体的体外和离体表征平行,确定了几种ALB26-融合构建体的体内生物分布,以证实保留性质。

[0879] 9.1 ALB26-CAP构建体的生物分布研究

[0880] 用^{125}I(通过^{125}I-SIB的赖氨酸偶联)标记纳米抗体。将构建体注射到健康大鼠的膝关节中。在注射后直至4周的不同时间点,产生了关节的放射自显影图像。这些图像允许在体内环境中评估构建体的保留和组织(软骨)特异性。

[0881] 代表性图像如图1所示。

[0882] 从结果可以得出结论,所有构建体均显示出与软骨的特异性结合。“单价”和“二价”聚集蛋白聚糖结合物均观察到清晰的染色-甚至在注射后4周。

[0883] 9.2 ALB26-CAP构建体的MARG

[0884] 上述生物分布研究(实施例9.1)证明了ALB26-CAP构建体在软骨中的特异性保留。然而,图像的分辨率不允许调查渗透到软骨中的深度。为了增加成像的分辨率并因此能够评估进入到软骨中的渗透,使用了MARG(Micro-Auto-Radio-Graphy)。

[0885] 表9.2A列出了进入研究的示例性构建体。对于该研究,将纳米抗体用^{3}H标记(通过^{3}H-NSP(N-琥珀酰亚胺丙酸酯)的赖氨酸偶联)并注入健康的和骨关节炎(通过前交叉韧带的横断术诱导)的大鼠关节,每组8只大鼠。注射后7至14天,处死大鼠,将注射的健康的和OA诱导的关节进行处理用于MARG。

[0886] 代表性的MARG图像如图2所示。

[0887]

靶标	C010100#	构建体
聚集糖蛋白聚糖	#54	114F08-ALB26
聚集糖蛋白聚糖	#626	ALB26-114F08-114F08 SO
聚集糖蛋白聚糖	#94	604F02-ALB26
对照剂	#30	ALB26-ALB26

[0888] 表9.2A:测试的示例性纳米抗体构建体

[0889] 所有的聚集蛋白聚糖结合物通常显示渗透到健康的软骨中。构建体626偶尔还会在表面上显示出更强烈的染色。在经手术的膝盖中观察到不同程度的软骨染色和渗透:用单价构建体054没有观察到染色;用单价构建体094缺少染色或轻度染色,而二价构建体626则产生了稍微更一致的染色,尽管具有不同的渗透深度(请参见表9.2B)

[0890]

构建体*	健康的膝关节		经手术过的膝关节	
	银粒评估	渗透深度	银粒评估	渗透深度
030	0%的样本被染色	na	0%的样本被染色	na
054	100%的样品具有最少的染色	C	0%的样本被染色	na
094	83% 样本具有大部分轻度染色	C	60% 样本具有大部分轻度染色	C
626	100% 样本具有大部分轻度染色	B-C	100%样品具有最少的至轻度的染色	A-B-C

[0891] 表9.2B:MARG染色结果总结。*根据银粒评估,显示了8只动物的总体结果。分布评分:A=软骨表面几乎没有更深的染色,B=软骨表面具有一些更深的染色,C=软骨更深层染色,在表面无堆积

[0892] 实施例10体内大鼠MMT DMOAD显示出统计学显著效果

[0893] 为了进一步证明本发明的CAP结合物的体内效力,使用了大鼠手术诱导的内侧半月板撕裂(MMT)模型。简而言之,将本发明的CAP结合物与抗MMP13 ISV(命名为“0754”或“C010100754”)或抗ADAMTS5 ISV(命名为“0954”或“C010100954”)偶联。大鼠在一个膝盖中进行手术以诱发OA样症状。手术后3天通过IA注射开始治疗。在术后42天进行组织病理学。抽取中期和终末血清样本进行探索性生物标志物分析。确定了中间的和总的实质性软骨退变宽度,以及软骨退变减少的百分比。每组使用20只动物。

[0894] 纳米抗体在胫骨内侧对软骨降解的抑制如图3所示。

[0895] 结果表明,与媒介物相比,ADAMTS5-CAP构建体和MMP13-CAP构建体在42天后实质上降低了软骨宽度。这些结果表明,CAP-部分(a)对抗MMP13ISV(0754)或抗ADAMTS5 ISV(0954)的活性没有负面影响;和(b)能够使这些构建体在关节中保留延长的时间。

[0896] 实施例11 CAP结合物在健康和骨关节炎大鼠中的保留在体内是相似的

[0897] 在健康大鼠的软骨保留研究中证明,在关节内(I.A.)注射后直至112天,本发明的多肽在软骨中是可测量的(数据未显示)。由于软骨组合物能够影响全身循环中的软骨结合和吸收,因此通过及时追踪多肽的血清水平,在患病的骨关节炎和健康大鼠中体内比较了本发明的多肽的药代动力学。

[0898] 特别地,如实施例10中所述使用大鼠手术诱导的内侧半月板撕裂(MMT)模型,但是

具有一些修改。简而言之,将本发明的多肽与抗MMP13 ISV和抗ADAMTS5 ISV偶联,得到MMP13-ADAMTS5-CAP-CAP构建体(命名为“0949”或“C010100949”纳米抗体)。大鼠在一个膝盖中进行手术以诱发OA样症状(OA组)。每个治疗组(健康和OA)均包含15只动物,并在第7天(健康)或手术后7天(MMT)接受400μg/30μl纳米抗体的单次I.A.注射。在第0天、第7天(在0h=给药前样品)、第8天(在治疗后不同时间直至24h)、第9天(治疗后48h)、第10天(治疗后3天)、第14天(治疗后7天)、第21天(治疗后14天)和第42天(治疗后35天)从麻醉大鼠收集血清样品。收集的血清样品用于在基于电化学发光(ECL)的总PK测定格式中确定多肽浓度,然后进行非区室分析(non-compartmental analysis)。

[0899] 多肽在健康大鼠和OA大鼠血清中的保留如图4所示。

[0900] 结果表明,在健康大鼠和OA大鼠中,在多肽的血清浓度中没有观察到明显差异。这些结果表明软骨降解对本发明多肽的药代动力学没有影响。

[0901] 表A-1:单价聚集蛋白聚糖结合物的氨基酸序列(“ID”是指本文所用的SEQ ID NO)

[0902]

名称	ID	氨基酸序列
102G11	1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFSSYAMGWFRQAPGKEREFVSIISWSGGSTVYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAGRLYRATPRPADPGSWGQGTQVTVSS
112A01	2	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCVASGRAFSNYIMGWFRQAPGKERDFVAAINWNGVTTHYTDSVKGRFTI SRDNAKSTSYLQMDSLKPDDTAVYFCAARGTVYSRTYGVSEEGYMYWGQGTQVTVSS
112A03	3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSNRFMYWYRQAPGKQRELVASITLSGSTNYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNTFLQNSFYWGQGTQVTVSS
113A01	4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSGSWMFWVRQAPGKDYEWVASINSSGGRTYYDDSVKGRFTI SRDSAKNTLYLEMNNLKPEDTALYFCARSPRVGSWGQGTQVTVSS
114F08	5	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFIINVVRWYRRTPGKQRELVATISSGGNANYVDSVRGRFSIS RDGAKNAVDLQMNGLKPEDTAVYYCNVPTTHYGGVYYGPYWGQGTQVTVSS
115B08	6	KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYAMKWVRQAPGKGLEWVSGINSSGGRTNYAGSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCATDFLGGRNSRGQGTQVTVSS
117D05	7	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASRRTFNMMGWFRQAPGKEREFVAYITWNGGDTRYAESVKGRFTVSR DDVKNTMALQMNRLDPLDTAVYYCGVRIHGSNWSTKADDYDNWGQGTQVTVSS
117G09	8	EVQLVESGGGSALPGGSLRLSCAASGITFSSRYMRWYRQAPGRQRELVAAISSGGRTDYVDSVRGRFTLS INNAKNTVYLQMNDLKPEDTAVYYCYRPRMYVDGTYEKELWGQGTLVTVSS
601D02	9	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPTFSRYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWSSGGRTYYADSVKGRFT ISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAARIPVRTYTSEWNYWGQGTLVTVSS
601E08	10	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGRTFSSYAVGWFRQAPGKEREFVAAISRSGRSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGLSYYSPHAYYDYWGQGTLVTVSS
601E09	11	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSTYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGSRTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAYRRPRYSPTGTWDYWGQGTLVTVSS
604B05	12	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSIYTMAWFRQAPGKEREFVAAISWSSGRTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTAYTGPRSGYDYWGQGTLVTVSS
604F02	13	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGRTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAYRRRRASSNRGLWDYWGQGTLVTVSS
604G01	14	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGRTTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAYRRVRYTNLEVWDYWGQGTLVTVSS
604G09	15	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWSSATTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAARIPVGRRSENWDYWGQGTLVTVSS
606A05	16	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSIYTMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGRTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCTAYTGRSYGSYDYWGQGTLVTVSS
606A07	17	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRTFSIYGMGWFRQAPGKEREFVAAINGGSRTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRSGYGTSLDWWYDYWGQGTLVTVSS
608A05	18	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGTTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPRYYYYSLYSYDYWGQGTLVTVSS
609C09	19	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTIFSINVMGWYRQAPGKEREFVAAITTGGRTNYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEVTTGWVGYSWYDYWGQGTMVTVSS
114A09	114	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFIISVMRWYRQAPGKQRELVAAIRTGGNTDYAGPVRGRFSIS RDGAKNAVDLQMNGLKPEDTAVYYCNVPTTRYGGDYYGPYWGQGTQVTVSS
114B04	115	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFIISVMRWYRQAPGKQRELVAAIRTGGNTDYAGPVRGRFSIS RDGAKDAVDLQMNGLKPEDTAVYYCNVPTTRYGGDYYGPYWGQGTQVTVSS
00269 SO114F08	116	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFIINVVRWYRRAPGKQRELVATISSGGNANYVDSVRGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNVPTTHYGGVYYGPYWGQGTLVTVSS
00745 PEA114F08	117	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSTFIINVVRWYRRAPGKQRELVATISSGGNANYVDSVRGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCNVPTTHYGGVYYGPYWGQGTLVTVSSA
00747 PEA604F02	118	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGRTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAAYRRRRASSNRGLWDYWGQGTLVTVSSA

[0903]

表 A-2：CDR 和构架的序列，加上式 I 中提供的优选组合，即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (以下术语："ID"是指给出的 SEQ ID NO)

ID	纳米抗体	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
1	102G11	75	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	20	GRSFSSYAMG	85	WFRQAPGKEREFVS	38	IISWSGGSTY	94	YADSVKGRFTISRDNAKNTV YLQMNSLKPEDTAIYYCAA	56	GRLYRATFRPADFGS	105	WGQGTQVTV SS
2	112A01	76	EVQLVESGGGLVQ TGGSLRLSCVAS	21	GRAFSNYIMG	86	WFRQAPGKERDFVA	39	AINWNGVTTH	95	YTDSVKGRFTISRDNAKSTS YLQMDSLKPDDTAVYFCAA	57	RGTVYSRTYGVSEEG YMY	105	WGQGTQVTV SS
3	112A03	77	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAAS	22	GSIFSNKPMY	87	WYRQAPGKQRELVA	40	SITLSGSTN	96	YADSVKGRFTISRDNAKNTV YLQMNSLKPEDTAVYYCNT	58	PLQNSFY	105	WGQGTQVTV SS
4	113A01	78	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCSAS	23	GFTFSGSWMF	88	WVRQAPGKDYEWVA	41	SINSSGGRTY	97	YDDSVKGRFTISRDSAKNTL YLEMNNLKPEDTALYFCAR	59	SPRVGS	105	WGQGTQVTV SS
5	114F08	75	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	24	GSTFTINVVR	89	WYRRTPGKQRELVA	42	TISSGGNAN	98	YYDSVRGRFSISRDGAKNAV DLQMNGLKPEDTAVYYCNV	60	PTTHYGGVYYGPY	105	WGQGTQVTV SS
6	115B08	79	KVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAAS	25	GFTFSNYAMK	90	WVRQAPGKGLEWVS	43	GINSSGGRTN	99	YAGSVKGRFTISRDNAKNTL YLQMNSLKPEDTAVYYCAT	61	DFLGGRNS	106	RGQGTQVTV SS
7	117D05	80	KVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	26	RRTFNMMG	91	WFRQAPGKEREFVA	44	YITWNGGDTR	100	YAESVKGRFTVSRDDVKNTM AYQMNRLKPLDTAVYYCGV	62	RIHGSNWRSTKADDYD N	105	WGQGTQVTV SS
8	117G09	81	EVQLVESGGGSAL PGGSLRLSCAAS	27	GITFSSRYMR	92	WYRQAPGKQRELVA	45	AISSGGRTD	101	YYDSVRGRFTISINNAKNTV YLQMNDLKPEDTAVYYCYR	63	PRMYVDGTYEKSL	107	WGQGTLVTV SS
9	601D02	82	DVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAAS	28	GPTFSRYAMG	91	WFRQAPGKEREFVA	46	AITWSSGGRTY	102	YADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCAA	64	ARIPVRTYTSEWNY	107	WGQGTLVTV SS
10	601E08	83	DVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCTAS	29	GRTFSSYAVG	91	WFRQAPGKEREFVA	47	AISRSGRSTY	102	YADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCAA	65	GLSYYSPHAYYDY	107	WGQGTLVTV SS
11	601E09	82	DVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAAS	30	GLTFSTYAMG	91	WFRQAPGKEREFVA	48	AISWSGSRTY	102	YADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCAA	66	YRRPRYSPTGTWDY	107	WGQGTLVTV SS
12	604B05	84	DVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCVAS	31	GRTFSIYTMA	91	WFRQAPGKEREFVA	49	AISWSSGRTY	103	YADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCTA	67	YTGPRSCYDY	107	WGQGTLVTV SS
13	604F02	82	DVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAAS	32	GRTFSSYTMG	91	WFRQAPGKEREFVA	50	AISWSGGKTY	102	YADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCAA	68	YRRRRASSNRGLWDY	107	WGQGTLVTV SS
14	604G01	82	DVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAAS	32	GRTFSSYTMG	91	WFRQAPGKEREFVA	51	AISWSGRTTY	102	YADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCAA	69	YRRVRVTNLEVWDY	107	WGQGTLVTV SS

[0904]

ID	纳米抗体	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
15	604G09	84	DVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCVAS	33	GRTFSSYAMG	91	WFRQAPGKEREFVA	52	AITWSSATTY	102	YADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCAA	70	ARIPVGRRSENWDY	107	WGQGTLVTV SS
16	606A05	84	DVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCVAS	34	GRTFSIYTMG	91	WFRQAPGKEREFVA	50	AISWSGGRTY	103	YADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCTA	71	YTGRSYGSYDY	107	WGQGTLVTV SS
17	606A07	84	DVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCVAS	35	GRTFSIYGMG	91	WFRQAPGKEREFVA	53	AINGGSRTY	102	YADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCAA	72	DRSGYGTSLDWNYDY	107	WGQGTLVTV SS
18	608A05	82	DVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAAS	36	GRTFSTYTMG	91	WFRQAPGKEREFVA	54	AISWSGGTTY	102	YADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCAA	73	RPRYYYYSLYSYDY	107	WGQGTLVTV SS
19	609C09	82	DVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAAS	37	GTIFSINVMG	93	WYRQAPGKEREFVA	55	AITTGGRTN	104	YADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCNA	74	EVTTGWVGYSWYDY	108	WGQGTMVTV SS
114	114A09	75	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	109	GSTFIISVMR	87	WYRQAPGKQRELVA	110	AIRTGGNTD	112	YAGPVRGRFSISRDGAKNAV DLQMNGLKPEDTAVYYCNV	111	PTTRYGGDYYGPY	105	WGQGTQVTV SS
115	114B04	75	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	109	GSTFIISVMR	87	WYRQAPGKQRELVA	110	AIRTGGNTD	113	YAGPVRGRFSISRDGAKDAV DLQMNGLKPEDTAVYYCNV	111	PTTRYGGDYYGPY	105	WGQGTQVTV SS
116	0269	77	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAAS	24	GSTFIINVVR	121	WYRRAPGKQRELVA	42	TISSGGNAN	122	YVDSVRGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCNV	60	PTTHYGGVYYGPY	107	WGQGTLVTV SS
117	0745	119	EVQLVESGGGVVQ PGGSLRLSCAAS	24	GSTFIINVVR	121	WYRRAPGKQRELVA	42	TISSGGNAN	123	YVDSVRGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTALYYCNV	60	PTTHYGGVYYGPY	107	WGQGTLVTV SS
118	0747	120	DVQLVESGGGVVQ PGGSLRLSCAAS	32	GRTFSSYTMG	91	NFRQAPGKEREFVA	50	AISWSGGRTY	124	YADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTALYYCAA	68	YRRRRASSNRGLWDY	107	WGQGTLVTV SS

[0905] 表B:聚集蛋白聚糖序列和来自各种物种的其他序列(“ID”是指本文所用的SEQ ID NO)

[0906]

名称	ID	氨基酸序列
人聚集蛋白聚糖	125	MTTLLWVFVTLRVITAAVTVETSDHDNSLSVSIPQPSPLRVLLGTSLTIPCYFIDPMHPVTTAPSTAPLA PRIKWSRVSKEKEVVLLVATEGRVRVNSAYQDKVSLPNYPAIPSDATLEVQSLRSNDSGVYRCEVMHGIE DSEATLEVVVKGIVFHYRAISTRYTLDFDRAQRACLQNSAIIATPEQLQAAYEDGFHQCDAGWLADQTVR YPIHTPREGCYGDKDEFPGVRTYGIRDTNETYDVYCFAEEMEGEVFYATSPEKFTFQEAANECRRLGARL ATTGHVYLAWQAGMDMCSAGWLADRSVRYPISKARPNCGGNLLGVRTVYVHANQTGYPDPSSRYDAICYT GEDFVDIPENPFGVGGEEDITVQTVTWPDMELPLPRNITEGEARGSVILTVKPIFEVSPSPLEPEEPFTF APEIGATAFAEVENETGEATRPWGFPTPGLGPATAFTSEDLVVQVTAVPGQPHLPGGVVFHYRPGPTRYS LTFEEAQQACPGTGAVIASPEQLQAAYEAGYEQCDAGWLRDQTVRYPIVSPRTPCVGDKDSSPGVRTYGV RPSTETYDVYCFVDRLEGEVFFATRLEQFTFQEALEFCESHNATATTGQLYAAWSRGLDKCYAGWLADGS LRYPIVTPRPACGGDKPGVRTVYLYPNQTGLPDPLSRHHAFCFRGISAVPSPGEEEGGTPTSPSGVEEWI VTQVVPGVAAVPVEEETTAVPSGETTAILEFTTEPENQTEWEPAYTPVGTSPLPGILPTWPPTGAETEES TEGPSATEVPSASEEPSPSEVPFPSREPSPSEEPFPSVRPFPSVELFPSEEPFPSKEPSPSEEPSASEEP YTPSPPEPSWTELPSSGEESGAPDVSGDFTGSGDVSGHLDFSGQLSGDRASGLPSGDLDSSGLTSTVGSG LTVESGLPSGDEERIEWPSTPTVGELPSGAEILEGSASGVGDLSGLPSGEVLETSASGVGDLSGLPSGEV LETTAPGVEDISGLPSGEVLETTAPGVEDISGLPSGEVLETTAPGVEDISGLPSGEVLETTAPGVEDISG LPSGEVLETTAPGVEDISGLPSGEVLETAAPGVEDISGLPSGEVLETAAPGVEDISGLPSGEVLETAAPG VEDISGLPSGEVLETAAPGVEDISGLPSGEVLETAAPGVEDISGLPSGEVLETAAPGVEDISGLPSGEVL ETAAPGVEDISGLPSGEVLETAAPGVEDISGLPSGEVLETAAPGVEDISGLPSGEVLETAAPGVEDISGL PSGEVLETAAPGVEDISGLPSGEVLETTAPGVEEISGLPSGEVLETTAPGVDEISGLPSGEVLETTAPGV EEISGLPSGEVLETSTSAVGDLSGLPSGGEVLEISVSGVEDISGLPSGEVVETSASGIEDVSELPSGEGL ETSASGVEDLSRLPSGEEVLEISASGFGDLSGVPSGGEGLETSASEVGTDLSGLPSGREGLETSASGAED LSGLPSGKEDLVGSASGDLDLGKLPSGTLGSGQAPETSGLPSGFSGEYSGVDLGSGPPSGLPDFSGLPSG FPTVSLVDSTLVEVVTASTASELEGRGTIGISGAGEISGLPSSELDISGRASGLPSGTELSGQASGSPDV SGEIPGLPGVSGQPSGFPDTSGETSGVTELSGLSSGQPGVSGEASGVLYGTSQPFGITDLSGETSGVPDL SGQPSGLPGFSGATSGVPDLVSGTTSGSGESSGITFVDTSLVEVAPTTFKEEEGLGSVELSGLPSGEADL SGKSGMVDVSGQFSGTVDSSGFTSQTPEFSGLPSGIAEVSGESSRAEIGSSLPSGAYYGSGTPSSFPTVS LVDRTLVESVTQAPTAQEAGEGPSGILELSGAHSGAPDMSGEHSGFLDLSGLQSGLIEPSGEPPGTPYFS GDFASTTNVSGESSVAMGTSGEASGLPEVTLITSEFVEGVTEPTISQELGQRPFVTHTPQLPESSGKVST AGDISGATPVLPGSGVEVSSVPESSSETSAYPEAGFGASAAPEASREDSGSPDLSETTSAFHEANLERSS GLGVSGSTLTFQEGEASAAPEVSGESTTTSDVGTEAPGLPSATPTASGDRTEISGDLSGHTSQLGVVIST SIPESEWTQQTQRPAETHLEIESSSLLYSGEETHTVETATSPTDASIPASPEWKRESESTAAAPARSCAE EPCGAGTCKETEGHVICLCPPGYTGEHCNIDQEVCEEGWNKYQGHCYRHFPDRETWVDAERRCREQQSHL SSIVTPEEQEFVNNNAQDYQWIGLNDRTIEGDFRWSDGHPMQFENWRPNQPDNFFAAGEDCVVMIWHEKG EWNDVPCNYHLPFTCKKGTVACGEPPVVEHARTFGQKKDRYEINSLVRYQCTEGFVQRHMPTIRCQPSGH WEEPRITCTDATTYKRRLQKRSSRHPRRSRPSTAH

[0907]

名称	ID	氨基酸序列
狗聚集蛋白聚糖	126	MTTLLWVFVTLRVITAASSEETSDHDNSLSVSIPEPSPMRVLLGSSLTIPCYFIDPMHPVTTAPSTAPLA PRIKWSRITKEKEVVLLVATEGQVRINSAYQDKVSLPNYPAIPSDATLEIQNLRSNDSGIYRCEVMHGIE DSEATLEVVVKGIVFHYRAISTRYTLDFDRAQRACLQNSAIIATPEQLQAAYEDGFHQCDAGWLADQTVR YPIHTPREGCYGDKDEFPGVRTYGIRDTNETYDVYCFAEEMEGEVLYATSPEKFTFQEAANECRRLGARL ATTGQLYLAWQGGMDMCSAGWLADRSVRYPISKARPNCGGNLLGVRTVYLHANQTGYPDPSSRYDAICYT GEDFVDIPENFFGVGGEEDITIQTVTWPDVELPLPRNITEGEARGNVILTVKPIFDLSPTAPEPEEPPTF VPEPEKPFTFATDVGVTAFPEAENRTGEATRPWGVPEESTPGPAFTAFTSEDHVVQVTAVPGAAEVPGQP RLPGGVVFHYRPGSARYSLTFEEAQQACLRTGAVIASPEQLQAAYEAGYEQCDAGWLQDQTVRYPIVSPR TPCVGDKDSSPGVRTYGVRPPSETYDVYCYVDKLEGEVFFITRLEQFTFQEALAFCESHNATLASTGQLY AAWRQGLDKCYAGWLSDGSLRYPIVTPRPSCGGDKPGVRTVYLYPNQTGLPDPLSRHHVFCFRGVSGVPS PGEEEGGTPTPSVVEDWIPTQVGPVVPSVPMGEETTAILDFTIEPENQTEWEPAYSPAGTSPLPGIPPTW PPTSTATEESTEGPSGTEVPSVSEEPSPSEEPFPWEELSTLSPPGPSGTELPGSGEASGVPEVSGDFTGS GEVSGHPDSSGQLSGESASGLPSEDLDSSGLTSAVGSGLASGDEDRITLSSIPKVEGEGLETSASGVEDL SGLPSGREGLETSTSGVGDLSGLPSGEGLEVSASGVEDLSGLPSGEGPETSTSGVGDLSRLPSGEGPEVS ASGVGDLSGLPSGREGLETSTSGVEDLSGLPSGEGPEASTSGVGDLSRLPSGEGPEVSASGVEDLSGLPS GEGLEASASGVGDLSGLPSGEGPEASASGVGDLSRLPSGEGPEVSASGVEDLSGLSSGESPEASASGVGD LSGLPSGREGLETSASGVGDLSGLPSGEGQEASASGVEDLSRLPSGEGPEASASGVGELSGLPSGREGLE TSASGVGDLSGLPSGEGPEAFASGVEDLSILPSGEGPEASASGVGDLSGLPSGREGLETSTSGVGDLSGL PSGREGLETSTSGVGDLSGLPSGEGPEASASGIGDISGLPSGREGLETSSSGVEDHPETSASGVEDLSGL PSGVEGHPETSASGVEDLSDLSSGGEGLETSASGAEDLSGFPSGKEDLIGSASGALDFGRIPSGTLGSGQ APEASSLPSGFSGEYSGVDFGSGPISGLPDFSGLPSGFPTISLVDTTLVEVITTTSASELEGRGTIGISG AGETSGLPVSELDISGAVSGLPSGAELSGQASGSPDMSGETSGFFGVSGQPSGFPDISGGTSGLFEVSGQ PSGFSGETSGVTELSGLYSGQPDVSGEASGVPSGSGQPFGMTDLSGETSGVPDISGQPSGLPEFSGTTSG IPDLVSSTMSGSGESSGITFVDTSLVEVTPTTFKEKKRLGSVELSGLPSGEVDLSGASGTMDISGQSSGA TDSSGLTSHLPKFSGLPSGAAEVSGESSGAEVGSSLPSGTYEGSGNPHPAFPTVFLVDRTLVESVTQAPT AQEAGEGPSGILELSGAHSGAPDVSGDHSGSLDLSGMQSGLVEPSGEPSSTPYFSGDFSGTMDVTGEPST AMSASGEASGLLEVTLITSEFVEGVTEPTVSQELAQRPPVTHTPQLFESSGEASASGEISGATPAFPGSG LEASSVPESSSETSDFPERAVGVSAAPEASGGASGAPDVSEATSTFPEADVEGASGLGVSGGTSAFPEAP REGSATPEVQEEPTTSYDVGREALGWPSATPTASGDRIEVSGDLSGHTSGLDVVISTSVPESEWIQQTQR PAEAHLEIEASSPLHSGEETQTAETATSPTDDASIPTSPSGTDESAPAIPDIDECLSSPCLNGATCVDAI DSFTCLCLPSYRGDLCEIDQELCEEGWTKFQGHCYRYFPDRESWVDAESRCRAQQSHLSSIVTPEEQEFV NNNAQDYQWIGLNDRTIEGDFRWSDGHSLQFENWRPNQPDNFFVSGEDCVVMIWHEKGEWNDVPCNYYLP FTCKKGTVACGDPPVVEHARTFGQKKDRYEINSLVRYQCTEGFVQRHVPTIRCQPSGHWEKPRITCTDPS TYKRRLQKRSSRAPRRSRPSTAH

[0908]

名称	ID	氨基酸序列
牛聚集蛋白聚糖	127	MTTLLLVFVTLRVITAAISVEVSEPDNSLSVSIPEPSPLRVLLGSSLTIPCYFIDPMHPVTTAPSTAPLA PRIKWSRISKEKEVVLLVATEGRVRVNSAYQDKVTLPNYPAIPSDATLEIQNMRSNDSGILRCEVMHGIE DSQATLEVVVKGIVFHYRAISTRYTLDFDRAQRACLQNSAIIATPEQLQAAYEDGFHQCDAGWLADQTVR YPIHTPREGCYGDKDEFPGVRTYGIRDTNETYDVYCFAEEMEGEVFYATSPEKFTFQEAANECRRLGARL ATTGQLYLAWQGGMDMCSAGWLADRSVRYPISKARPNCGGNLLGVRTVYLHANQTGYPDPSSRYDAICYT GEDFVDIPESPFGVGGEEDITIQTVTWPDVELPLPRNITEGEARGSVILTAKPDFEVSPTAPEPEEPFTF VPEVRATAPPEVENRTEEATRPWAFPRESTPGLGAPTAFTSEDLVVQVTLAPGAAEVPGQPRLPGGVVFH YRPGSSRYSLTFEEAKQACLRTGAIIASPEQLQAAYEAGYEQCDAGWLQDQTVRYPIVSPRTPCVGDKDS SPGVRTYGVRPPSETYDVYCYVDRLEGEVFFATRLEQFTFWEAQEFCESQNATLATTGQLYAAWSRGLDK CYAGWLADGSLRYPIVTPRPACGGDKPGVRTVYLYPNQTGLLDPLSRHHAFCFRGVSAAPSPEEEEGSAP TAGPDVEEWMVTQVGPGVAAVPIGEETTAIPGFTVEPENKTEWELAYTPAGTLPLPGIPPTWPPTGEATE EHTEGPSATEVPSASEKPFPSEEPFPPEEPFPSEKPFPPEELFPSEKPFPSEKPFPSEEPFPSEKPFPPE ELFPSEKPIPSEEPFPSEEPFPSEKPFPPEEPFPSEKPIPSEEPFPSEKPFPSEEPFPSEEPSTLSAPVP SRTELPSSGEVSGVPEISGDFTGSGEISGHLDFSGQPSGESASGLPSEDLDSSGLTSTVGSGLPVESGLP SGEEERITWTSAPKVDRLPSGGEGPEVSGVEDISGLPSGGEVHLEISASGVEDISGLPSGGEVHLEISAS GVEDLSRIPSGEGPEISASGVEDISGLPSGEEGHLEISASGVEDLSGIPSGEGPEVSASGVEDLIGLPSG EGPEVSASGVEDLSRLPSGEGPEVSASGVEDLSGLPSGEGPEVSVSGVEDLSRLPSGEGPEVSASGVEDL SRLPSGEGPEISVSGVEDISILPSGEGPEVSASGVEDLSVLPSGEGHLEISTSGVEDLSVLPSGEGHLET SSGVEDISRLPSGEGPEVSASGVEDLSVLPSGEDHLEISASGVEDLGVLPSGEDHLEISASGVEDISRLP SGEGPEVSASGVEDLSVLPSGEGHLEISASGVEDLSRLPSGGEDHLETSASGVGDLSGLPSGREGLEISA SGAGDLSGLTSGKEDLTGSASGALDLGRIPSVTLGSGQAPEASGLPSGFSGEYSGVDLESGPSSGLPDFS GLPSGFPTVSLVDTTLVEVVTATTAGELEGRGTIDISGAGETSGLPFSELDISGGASGLSSGAELSGQAS GSPDISGETSGLFGVSGQPSGFPDISGETSGLLEVSGQPSGFYGEISGVTELSGLASGQPEISGEASGIL SGLGPPFGITDLSGEAPGIPDLSGQPSGLPEFSGTASGIPDLVSSAVSGSGESSGITFVDTSLVEVTPTT FKEEEGLGSVELSGLPSGELGVSGTSGLADVSGLSSGAIDSSGFTSQPPEFSGLPSGVTEVSGEASGAES GSSLPSGAYDSSGLPSGFPTVSFVDRTLVESVTQAPTAQEAGEGPSGILELSGAPSGAPDMSGDHLGSLD QSGLQSGLVEPSGEPASTPYFSGDFSGTTDVSGESSAATSTSGEASGLPEVTLITSELVEGVTEPTVSQE LGQRPPVTYTPQLPESSGEASASGDVPRFPGSGVEVSSVPESSGETSAYPEAEVGASAAPEASGGASGSP NLSETTSTFHEADLEGTSGLGVSGSPSAFPEGPTEGLATPEVSGESTTAFDVSVEASGSPSATPLASGDR TDTSGDLSGHTSGLDIVISTTIPESEWTQQTQRPAEARLEIESSSPVHSGEESQTADTATSPTDASIPAS AGGTDDSEATTTDIDECLSSPCLNGATCVDAIDSFTCLCLPSYQGDVCEIQKLCEEGWTKFQGHCYRHFP DRATWVDAESQCRKQQSHLSSIVTPEEQEFVNNNAQDYQWIGLNDKTIEGDFRWSDGHSLQFENWRPNQP DNFFATGEDCVVMIWHEKGEWNDVPCNYQLPFTCKKGTVACGEPPVVEHARIFGQKKDRYEINALVRYQC TEGFIQGHVPTIRCQPSGHWEEPRITCTDPATYKRRLQKRSSRPLRRSHPSTAH

[0909]

名称	ID	氨基酸序列
大鼠聚集蛋白聚糖	128	MTTLLLVFVTLRVIAAVISEEVPDHDNSLSVSIPQPSPLKALLGTSLTIPCYFIDPMHPVTTAPSTAPLT PRIKWSRVSKEKEVVLLVATEGQVRVNSIYQDKVSLPNYPAIPSDATLEIQNLRSNDSGIYRCEVMHGIE DSEATLEVIVKGIVFHYRAISTRYTLDFDRAQRACLQNSAIIATPEQLQAAYEDGFHQCDAGWLADQTVR YPIHTPREGCYGDKDEFPGVRTYGIRDTNETYDVYCFAEEMEGEVFYATSPEKFTFQEAANECRTVGARL ATTGQLYLAWQGGMDMCSAGWLADRSVRYPISKARPNCGGNLLGVRTVYLHANQTGYPDPSSRYDAICYT GEDFVDIPENFFGVGGEEDITIQTVTWPDLELPLPRNITEGEARGNVILTAKPIFDMSPTVSEPGEALTL APEVGTTVFPEAGERTEKTTRPWGFPEEATRGPDSATAFASEDLVVRVTISPGAVEVPGQPRLPGGVVFH YRPGSTRYSLTFEEAQQACIRTGAAIASPEQLQAAYEAGYEQCDAGWLQDQTVRYPIVSPRTPCVGDKDS SPGVRTYGVRPSSETYDVYCYVDKLEGEVFFATQMEQFTFQEAQAFCAAQNATLASTGQLYAAWSQGLDK CYAGWLADGTLRYPIVNPRPACGGDKPGVRTVYLYPNQTGLPDPLSKHHAFCFRGVSVVPSPGGTPTSPS DIEDWIVTRVEPGVDAVPLEPETTEVPYFTTEPEKQTEWEPAYTPVGTSPLPGIPPTWLPTVPAAEEHTE SPSASQEPSASQVPSTSEEPYTPSLAVPSGTELPSSGDTSGAPDLSGDFTGSTDTSGRLDSSGEPSGGSE SGLPSGDLDSSGLGPTVSSGLPVESGSASGDGEIPWSSTPTVDRLPSGGESLEGSASASGTGDLSGLPSG GEITETSASGTEEISGLPSGGDDLETSTSGIDGASVLPTGRGGLETSASGVEDLSGLPSGEEGSETSTSG IEDISVLPTGESPETSASGVGDLSGLPSGGESLETSASGVEDVTQLPTERGGLETSASGIEDITVLPTGR ENLETSASGVEDVSGLPSGKEGLETSASGIEDISVFPTEAEGLETSASGGYVSGIPSGEDGTETSTSGVE GVSGLPSGGEGLETSASGVEDLGLPTRDSLETSASGVDVTGYPSGREDTETSVPGVGDDLSGLPSGQEGL ETSASGAEDLGGLPSGKEDLVGSASGALDFGKLPSGTLGSGQTPEASGLPSGFSGEYSGVDIGSGPSSGL PDFSGLPSGFPTVSLVDSTLVEVITATTASELEGRGTISVSGSGEESGPPLSELDSSADISGLPSGTELS GQTSGSLDVSGETSGFFDVSGQPFGSSGTGEGTSGIPEVSGQAVRSPDTTEISELSGLSSGQPDVSGEGS GILFGSGQSSGITSVSGETSGISDLSGQPSGFPVLSGTTPGTPDLASGAMSGSGDSSGITFVDTSLIEVT PTTFREEEGLGSVELSGLPSGETDLSGTSGMVDVSGQSSGAIDSSGLISPTPEFSGLPSGVAEVSGEVSG VETGSSLSSGAFDGSGLVSGFPTVSLVDRTLVESITLAPTAQEAGEGPSSILEFSGAHSGTPDISGDLSG SLDQSTWQPGWTEASTEPPSSPYFSGDFSSTTDASGESITAPTGSGETSGLPEVTLITSELVEGVTEPTV SQELGHGPSMTYTPRLFEASGEASASGDLGGPVTIFPGSGVEASVPEGSSDPSAYPEAGVGVSAAPEASS QLSEFPDLHGITSASRETDLEMTTPGTEVSSNPWTFQEGTREGSAAPEVSGESSTTSDIDAGTSGVPFAT PMTSGDRTEISGEWSDHTSEVNVTVSTTVPESRWAQSTQHPTETLQEIGSPNPSYSGEETQTAETAKSLT DTPTLASPEGSGETESTAADQEQCEEGWTKFQGHCYRHFPDRETWVDAERRCREQQSHLSSIVTPEEQEF VNKNAQDYQW1GLNDRTIEGDFRWSDGHSLQFEKWRPNQPDNFFATGEDCVVMIWHERGEWNDVPCNYQL PPTCKKGTVACGEPPAVEHARTLGQKKDRYEISSLVRYQCTEGFVQRHVPTIRCQPSADWEEPRITCTDP NTYKHRLQKRTMRPTRRSRPSMAH
猪聚集蛋白聚糖(核心)	129	AISVEVSEPDNSLSVSIPQPSPLRVLLGGSLTIPCYFIDPMHPVXTAPXTAPLAPRIKWSRVSKEKEVVL LVATEGQVRVNSAYQDRVTLPNYPAIPSDATLEIQNLRSNDSGIYRCEVMHG1EDSEATLEVVVKGIVFH YRAISXRYTLDFDRAQRACLQNSAIIATPEQLQAAYEDGFHQCDAGWLADQTVRYPIHTPREGCYGDKDE FPGVITYGIRDTNETYDVYCFAEEMEGEVFYATSPEKFTFQEAANECRRLGARLATTGQLYLAWRGGMDM CSAGWLADRSVRYPISKARPNCGGNLLGVRTVYLHANQTGYPDPSSRYDAICYTGEDFVDIPENFFGVGG EEDITIQTVTWPDVELPLPRNITEGEARGTVILTVKPVFEFSPTAPEPEEPFTFAPGTGATAFPEAENRT GEATRPWAFPEESTPGLGAPTAFTSEDLVVQVTSAATEEGTEGPSATEAPSTSEEPFPSEKPFPSEEPFP SEEPFPSEKPSASEEPFPSEQPSTLSAPVPSRTELPGSGEVSGAPEV

[0910]

名称	ID	氨基酸序列
小鼠聚集蛋白聚糖	130	MTTLLLVFVTLRVIAAVISEEVPDHDNSLSVSIPQPSPLKVLLGSSLTIPCYFIDPMHPVTTAPSTAPLT PRIKWSRVSKEKEVVLLVATEGQVRVNSIYQDKVSLPNYPAIPSDATLEIQNLRSNDSGIYRCEVMHGIE DSEATLEVIVKGIVFHYRAISTRYTLDFDRAQRACLQNSAIIATPEQLQAAYEDGFHQCDAGWLADQTVR YPIHTPREGCYGDKDEFPGVRTYGIRDTNETYDVYCFAEEMEGEVFYATSPEKFTFQEAANECRRLGARL ATTGQLYLAWQGGMDMCSAGWLADRSVRYPISKARPNCGGNLLGVRTVYLHANQTGYPDPSSRYDAICYT GEDFVDIPENFFGVGGEDDITIQTVTWPDLELPLPRNVTEGEALGSVILTAKPIFDLSPTISEPGEALTL APEVGSTAFPEAEERTGEATRPWGFPAEVTRGPDSATAFASEDLVVRVTISPGAAEVPGQPRLPGGVVFH YRPGSTRYSLTFEEAQQACMHTGAVIASPEQLQAAYEAGYEQCDAGWLQDQTVRYPIVSPRTPCVGDKDS SPGVRTYGVRPSSETYDVYCYVDKLEGEVFFATRLEQFTFQEARAFCAAQNATLASTGQLYAAWSQGLDK CYAGWLADGTLRYPIITPRPACGGDKPGVRTVYLYPNQTGLPDPLSKHHAFCFRGVSVAPSPGEEGGSTP TSPSDIEDWIVTQVGPGVDAVPLEPKTTEVPYFTTEPRKQTEWEPAYTPVGTSPQPGIPPTWLPTLPAAE EHTESPSASEEPSASAVPSTSEEPYTSSFAVPSMTELPGSGEASGAPDLSGDFTGSGDASGRLDSSGQPS GGIESGLPSGDLDSSGLSPTVSSGLPVESGSASGDGEVPWSHTPTVGRLPSGGESPEGSASASGTGDLSG LPSGGEITETSTSGAEETSGLPSGGDGLETSTSGVDDVSGIPTGREGLETSASGVEDLSGLPSGEEGSET STSGIEDISVLPTGGESLETSASGVGDLSGLPSGGESLETSASGAEDVTQLPTERGGLETSASGVEDITV LPTGRESLETSASGVEDVSGLPSGREGLETSASGIEDISVFPTEAEGLDTSASGGYVSGIPSGGDGTETS ASGVEDVSGLPSGGEGLETSASGVEDLGPSTRDSLETSASGVDVTGFPSGRGDPETSVSGVGDDFSGLPS GKEGLETSASGAEDLSGLPSGKEDLVGSASGALDFGKLPPGTLGSGQTPEVNGFPSGFSGEYSGADIGSG PSSGLPDFSGLPSGFPTVSLVDSTLVEVITATTSSELEGRGTIGISGSGEVSGLPLGELDSSADISGLPS GTELSGQASGSPDSSGETSGFFDVSGQPFGSSGVSEETSGIPEISGQPSGTPDTTATSGVTELNELSSGQ PDVSGDGSGILFGSGQSSGITSVSGETSGISDLSGQPSGFPVFSGTATRTPDLASGTISGSGESSGITFV DTSFVEVTPTTFREEEGLGSVELSGFPSGETELSGTSGTVDVSEQSSGAIDSSGLTSPTPEFSGLPSGVA EVSGEFSGVETGSSLPSGAFDGSGLVSGFPTVSLVDRTLVESITQAPTAQEAGEGPSGILEFSGAHSGTP DISGELSGSLDLSTLQSGQMETSTETPSSPYFSGDFSSTTDVSGESIAATTGSGESSGLPEVTLNTSELV EGVTEPTVSQELGHGPSMTYTPRLFEASGDASASGDLGGAVTNFPGSGIEASVPEASSDLSAYPEAGVGV SAAPEASSKLSEFPDLHGITSAFHETDLEMTTPSTEVNSNPWTFQEGTREGSAAPEVSGESSTTSDIDTG TSGVPSATPMASGDRTETSGEWSDHTSEVNVAISSTITESEWAQPTRYPTETLQEIESPNPSYSGEETQT AETTMSLTDAPTLSSSEGSGETESTVADQEQCEEGWTKFQGHCYRHFHDRETWVDAERRCREQQSHLSSI VTPEEQEFVNKNAQDYQWIGLNDRTIEGDFRWSDGHSLQFEKWRPNQPDNFFATGEDCVVMIWHERGEWN DVPCNYQLPFTCKKGTVACGDPPVVEHARTLGQKKDRYEISSLVRYQCTEGFVQRHVPTIRCQPSGHWEE PRITCTDPNTYKHRLQKRSMRPTRRSRPSMAH

[0911]

名称	ID	氨基酸序列
兔聚集蛋白聚糖	131	MTTLLLVLVALRVIAAAISGDVSDLDNALSVSIPQPSPVRALLGTSLTIPCYFIDPVHPVTTAPSTAPLT PRIKWSRISKDKEVVLLVANEGRVRINSAYQDKVSLPNYPAIPSDATLEIQSLRSNDSGIYRCEVMHGLE DSEATLEVVVKGVVFHYRAISTRYTLDFDRAQRACLQNSAIIATPEQLQAAYEDGFHQCDAGWLADQTVR YPIHTPREGCYGDKDEFPGVRTYGIRDTNETYDVYCFAEEMEGEVFYATSPEKFTFQEAASECRRLGARL ATTGQLYLAWQAGMDMCSAGWLADRSVRYPISKARPNCGGNLLGVRTVYVHANQTGYPDPSSRYDAICYT GEDFMDIPENFFGVGGEEDITVQTVTWPDVELPVPRNITEGEARGSVVLTAKPVLDVSPTAPQPEETFAP GVGATAFPGVENGTEEATRPRGFADEATLGPSSATAFTSADLVVQVTAAPGVAEVPGQPRLPGGVVFHYR PGPTRYSLTFEEAQQACLRTGAAMASAEQLQAAYEAGYEQCDAGWLQDQTVRYPIVSPRTPCVGDKDSSP GVRTYGVRPPSETYDVYCYVDRLEGEVFFATRLEQFTFQEALEFCESHNATLASTGQLYAAWSRGLDRCY AGWLADGSLRYPIVTPRPACGGDKPGVRTVYLYPNQTGLPDPLSRHHAFCFRGTSEAPSPGPEEGGTATP ASGLEDWIVTQVGPGVAATPRAEERTAVPSFATEPGNQTGWEAASSPVGTSLLPGIPPTWPPTGTAAEGT TEGLSTAAMPSASEGPYTPSSLVARETELPGLGVTSVPPDISGDLTSSGEASGLFGPTGQPLGGSASGLP SGELDSGSLTPTVGSGLPIGSGLASGDEDRIQWSSSTEVGGVTSGAEIPETSASGVGTDLSGLPSGAEIP ETFASGVGTDLSGLPSGAEIPETFASGVGTDLSGLPSGAEILETSASGVGTDLSGLPSGAEILETSASGV GTDLSGLPSGAEILETSASGVGTDLSGLPSGAEIPETFASGVGTDLSGLPSGAEILETSASGVGTDLSGL PSGAEIPETSASGVGTDLSGLPSGAEILETSASGVGTDLSGLPSGAEILETSASGVGTDLSGLPSGAEIL ETSASGVGTDLSGLPSGAEILETSASGVGTDLSGLPSGAEILETSASGVGTDLSGLPSGGEIPETFASGV GDLSGLPPGREDLETLTSGVGDLSGLSSGKDGLVGSASGALDFGGTLGSGQIPETSGLPSGYSGEYSEVD LGSGPSSGLPDFSGLPSGFPTVSLVDTPLVEVVTATTARELEGRGTIGISGAGEISGLPSSELDVSGGTS GADISGEADVGGEASGLIVRGQPSGPPDTSGEAFGVTEVSGLSSGQPDLSGEASGVLFGSGPPFGITDLS GEPSGQPSGLPEFSGTTHRIPDLVSGATSGSGESSGIAFVDTSVVEVTPTTLREEEGLGSVEFSGFPSGE TGLSGTPETIDVSGQSSGTIDSSGFTSLAPEVSGSPSGVAEVSGEASGTEITSGLPSGVFDSSGLPSGFP TVSLVDRTLVESVTQAPTAQEAEGPSDILELSGVHSGLPDVSGAHSGFLDPSGLQSGLVEPSGEPPRTPY FSGDFPSTPDVSGEASAATSSSGDISGLPEVTLVTSEFMEGVTRPTVSQELGQGPPMTHVPKLFESSGEA LASGDTSGAAPAFPGSGLEASSVPESHGETSAYAEPGTKAAAAPDASGEASGSPDSGEITSVFREAAGEG ASGLEVSSSSLASQQGPREGSASPEVSGESTTSYEIGTETSGLPLATPAASEDRAEVSGDLSGRTPVPVD VVTNVPEAEWIQHSQRPAEMWPETKSSSPSYSGEDTAGTAASPASADTPGEPGPTTAAPRSCAEEPCGPG TCQETEGRVTCLCPPGHTGEYCDIDIDECLSSPCVNGATCVDASDSFTCLCLPSYGGDLCETDQEVCEEG WTKFQGHCYRHFPDRETWVDAEGRCREQQSHLSSIVTPEEQEFVNNNAQDYQWIGLNDRTIEGDFRWSDG HPLQFENWRPNQPDNFFATGEDCVVMIWHEKGEWNDVPCNYHLPFTCKKGTVACGDPPVVEHARTFGQKK DRYEINSLVRYQCAEGFTQRHVPTIRCQPSGHWEEPRITCTHPTTYKRRVQKRSSRTLQRSQASSAP

[0912]

名称	ID	氨基酸序列
食蟹猴聚集蛋白聚糖	132	MTTLLWVPVTLRVIAAAVTVETSDHDNSLSVSIPQPSPLRVLLGTSLTIPCYFIDPMHPVTTAPSTAPLA PRIKWSRVSKEKEVVLLVATEGRVRVNSAYQDKVSLPNYPAIPSDATLEIQSLRSNDSGVYRCEVMHGIE DSEATLEVVVKGIVFHYRAISTRYTLDFDRAQRACLQNSAIIATPEQLQAAYEDGFHQCDAGWLADQTVR YPIHTPREGCYGDKDEFPGVRTYGIRDTNETYDVYCFAEEMEGEVFYATSPEKFTFQEAANECRRLGARL ATTGQLYLAWQAGMDMCSAGWLADRSVRYPISKARPNCGGNLLGVRTVYLHANQTGYPDPSSRYDAICYT GEDFVDIPENFFGVGGEEDITVQTVTWPDMELPLPRNITEGEARGSVILTVKPIFDVSPSPLEPEEPFTF APEIGATAFPEVENETGEATRPWGFPTPGLGPATAFTSEDLVVQVTAVPGQPHLPGGVVFHYRPGSTRYS LTFEEAQQACLRTGAVIASPEQLQAAYEAGYEQCDAGWLRDQTVRYPIVSPRTPCVGDKDSSPGVRTYGV RPSTETYDVYCYVDRLEGEVFFATRLEQFTFQEALEFCESHNATLATTGQLYAAWSRGLDKCYAGWLADG SLRYPIVTPRPACGGDKPGVRTVYLYPNQTGLPDPLSRHHAFCFRGVSAVPSPGEEEGGTPTSPSGVEDW IATQVVPGVAAVPVEEETTAVPLGETTAILEFTTEPENQTEWEPAYTPMGTSPLPGILPTWPPTGTATEE STEGPSATEVLTASKEPSPPEVPFPSEEPSPSEEPFPSVRPFPSVEPSPSEEPFPSVEPSPSEEPSASEE PYTPSPPVPSWTELPGSGEESGAPDVSGDFIGSGDVSGHLDFSGQLSGDRISGLPSGDLDSSGLTSTVGS GLPVDSGLASGDEERIEWSSTPTVGELPSGAEILEGSASEVGDLSGLPSGDVLETSASGVGDLSGLPSGE VLETSASGVGDLSGLPSGEVLETSTSGVGDLSGLPSGEVLETSTSGVGDLSGLPSAGEVLETTASGVEDI SGLPSGEVLETTASGVEDISGFPSGEVLETTASGVEDISGLPSGEVLETTASGVEDISGLPSGEVLETTA SGVGDLGGLPSGEVLETSTSGVGDLSGLPSGEVVETSTSGVEDLSGLPSGGEVLETSTSGVEDISGLPSG EVLETTASGIEDVSELPSGEGLETSASGVEDLSRLPSGEVLETSASGVGDISGLPSGGEVLEISASGVGD LSGLPSGGEGLETSASGVGTDLSGLPSGREGLETSASGAEDLSGLPSGKEDLVGPASGDLDLGKLPSGTL RSGQAPETSGLPSGFSGEYSGVDLGSGPPSGLPDFSGLPSGFPTVSLVDSTLVEVVTASTASELEGRGTI GISGAGEISGLPSSELDISGEASGLPSGTELSGQASGSPDVSRETPGLFDVSGQPSGFPDISGGTSGISE VSGQPSGFPDTSGETSGVTELSGLPSGQPGVSGEASGVPYGSSQPFGITDLSGETSGVPDLSGQPSGLPG FSGATSGVPDLVSGATSGSGESSGITFVDTSLVEVTPTTFKEEEGLGSVELSGLPSGEADLSGRSGMVDV SGQFSGTVDSSGFTSQTPEFSGLPIGIAEVSGESSGAETGSSLPSGAYYGSGLPSGFPTVSLVDRTLVES VTQAPTAQEAGEGPPGILELSGTHSGAPDMSGDHSGFLDVSGLQFGLVEPSGEPPSTPYFSGDFASTTDV SGESSAAMGTSGEASGLPGVTLITSEFMEGVTEPTVSQELGQRPPVTHTPQLFESSGEASAAGDISGATP VLPGSGVEVSSVPESSSETSAYPEAGVGASAAPETSGEDSGSPDLSETTSAFHEADLERSSGLGVSGSTL TFQEGEPSASPEVSGESTTTGDVGTEAPGLPSATPTASGDRTEISGDLSGHTSGLGVVISTSIPESEWTQ QTQRPAEAHLETESSSLLYSGEETHTAETATSPTDASIPASPEWTGESESTVADIDECLSSPCLNGATCV DAIDSFTCLCLPSYGGDLCEIDQEVCEEGWTKYQGHCYRHFPDRETWVDAERRCREQQSHLSSIVTPEEQ EFVNNNAQDYQWIGLNDRTIEGDFRWSDGHPMQFENWRPNQPDNFFAAGEDCVVMIWHEKGEWNDVPCNY HLPFTCKKGTVACGEPPMVQHARTFGQKKDRYEINSLVRYQCTEGFVQRHVPTIRCQPSGHWEEPRITCT DATAYKRRLQKRSSRHPRRSRPSTAH

[0913]

名称	ID	氨基酸序列
恒河猴聚集蛋白聚糖 XM_002804944.1	133	MTTLLWVFVTLRVIAAAVTVETSDHDNSLSVSIPQPSPLRVLLGTSLTIPCYFIDPMHPVTTAPSTAPLA PRIKWSRVSKEKEVVLLVATEGRVRVNSAYQDKVSLPNYPAIPSDATLEIQSLRSNDSGVYRCEVMHGIE DSEATLEVVVKGIVFHYRAISTRYTLDFDRAQRACLQNSAIIATPEQLQAAYEDGFHQCDAGWLADQTVR YPIHTPREGCYGDKDEFPGVRTYGIRDTNETYDVYCFAEEMEGEVFYATSPEKFTFQEAANECRRLGARL ATTGQLYLAWQAGMDMCSAGWLADRSVRYPISKARPNCGGNLLGVRTVYLHANQTGYPDPSSRYDAICYT GEDFVDIPENFFGVGGEEDITVQTVTWPDMELPLPRNITEGEARGSVILTVKPIFDVSPSPLEPEEPFTF APEIGATAFPEVENETGEATRPWGFPTPGLGPATAFTSEDLVVQVTAVPGQPHLPGGVVFHYRPGSTRYS LTFEEAQQACLRTGAVIASPEQLQAAYEAGYEQCDAGWLRDQTVRYPIVSPRTPCVGDKDSSPGVRTYGV RPSTETYDVYCYVDRLEGEVFFATRLEQFTFQEALEFCESHNATLATTGQLYAAWSRGLDKCYAGWLADG SLRYPIVTPRPACGGDKPGVRTVYLYPNQTGLPDPLSRHHAFCFRGVSAVPSPGEEEGGTPTSPSGVEDW IATQVVPGVAAVPVEEETTAVPLGETTAILEFTTEPENQTEWEPAYTPMGTSPLPGILPTWPPTGTATEE STEGPSATEVLTASKEPSPPEVPFPSEEPSPSEEPFPSVRPFPSVEPSPSEEPFPSVEPSPSEEPSASEE PYTPSPPVPSWTELPGSGEESGAPDVSGDFIGSGDVSGHLDFSGQLSGDRISGLPSGDLDSSGLTSTVGS GLPVDSGLASGDEERIEWSSTPTVGELPSGAEILEGSASEVGDLSGLPSGDVLETSASGVGDLSGLPSGE VLETSVSGVGDLSGLPSGEVLETSTSGVGDLSGLPSGEVLETSTSGVGDLSGLPSAGEVLETTASGVEDI SGLPSGEVLETTASGVEDISGFPSGEVLETTASGVEDISGLPSGEVLETTASGVEDISGLPSGEVLETTA SGVGDLGGLPSGEVLETSTSGVGDLSGLPSGEVVETSTSGVEDLSGLPSGGEVLETSTSGVEDISGLPSG EVLETTASGIEDVSELPSGEGLETSASGVEDLSRLPSGEVLETSASGVGDISGLPSGGEVLEISASGVGD LSGLPSGGEGLETSASGVGTDLSGLPSGREGLETSASGAEDLSGLPSGKEDLVGPASGDLDLGKLPSGTL GSGQAPETSGLPSGFSGEYSGVDLGSGPPSGLPDFSGLPSGFPTVSLVDSTLVEVVTASTASELEGRGTI GISGAGEISGLPSSELDISGEASGLPSGTELSGQASGSPDVSRETSGLFDVSGQPSGFPDTSGETSGVTE LSGLPSGQPGVSGEASGVPYGSSQPFGITDLSGETSGVPDLSGQPSGLPGFSGATSGVPDLVSGATSGSG ESSDITFVDTSLVEVTPTTFKEEEGLGSVELSGLPSGEADLSGRSGMVDVSGQFSGTVDSSGFTSQTPEF SGLPIGIAEVSGESSGAETGSSLPSGAYYGSELPSGFPTVSLVDRTLVESVTQAPTAQEAGEGPPGILEL SGTHSGAPDMSGDHSGFLDVSGLQFGLVEPSGEPPSTPYFSGDFASTTDVSGESSAAMGTNGEASGLPEV TLITSEFMEGVTEPTVSQELGQRPPVTHTPQLFESSGEASAAGDISGATPVLPGSGVEVSSVPESSSETS AYPEAGVGASAAPETSGEDSGSPDLSETTSAFHEADLERSSGLGVSGSTLTFQEGEPSASPEVSGESTTT GDVGTEAPGLPSATPTASGXXXXXXPTRSCAEEPCGAGTCKETEGHVICLCPPGYTGEHCNIDQEVCEEG WTKYQGHCYRHFPDRETWVDAERRCREQQSHLSSIVTPEEQEFVNNNAQDYQWIGLNDRTIEGDFRWSDG HPMQFENWRPNQPDNFFAAGEDCVVMIWHEKGEWNDVPCNYHLPFTCKKGTVACGEPPMVQHARTFGQKK DRYEINSLVRYQCTEGFVQRHVPTIRCQPSGHWEEPRITCTDATAYKRRLQKRSSRHPRRSRPSTAH
人神经蛋白聚糖	134	MGAPFVWALGLLMLQMLLFVAGEQGTQDITDASERGLHMQKLGSGSVQAALAELVALPCLFTLQPRPSAA RDAPRIKWTKVRTASGQRQDLPILVAKDNVVRVAKSWQGRVSLPSYPRRRANATLLLGPLRASDSGLYRC QVVRGIEDEQDLVPLEVTGVVFHYRSARDRYALTFAEAQEACRLSSAIIAAPRHLQAAFEDGFDNCDAGW LSDRTVRYPITQSRPGCYGDRSSLPGVRSYGRRNPQELYDVYCFARELGGEVFYVGPARRLTLAGARAQC RRQGAALASVGQLHLAWHEGLDQCDPGWLADGSVRYPIQTPRRRCGGPAPGVRTVYRFANRTGFPSPAER FDAYCFRAHHPTSQHGDLETPSSGDEGEILSAEGPPVRELEPTLEEEEVVTPDFQEPLVSSGEEETLILE EKQESQQTLSPTPGDPMLASWPTGEVWLSTVAPSPSDMGAGTAASSHTEVAPTDPMPRRRGRFKGLNGRY FQQQEPEPGLQGGMEASAQPPTSEAAVNQMEPPLAMAVTEMLGSGQSRSPWADLTNEVDMPGAGSAGGKS SPEPWLWPPTMVPPSISGHSRAPVLELEKAEGPSARPATPDLFWSPLEATVSAPSPAPWEAFPVATSPDL PMMAMLRGPKEWMLPHPTPISTEANRVEAHGEATATAPPSPAAETKVYSLPLSLTPTGQGGEAMPTTPES PRADFRETGETSPAQVNKAEHSSSSPWPSVNRNVAVGFVPTETATEPTGLRGIPGSESGVFDTAESPTSG LQATVDEVQDPWPSVYSKGLDASSPSAPLGSPGVFLVPKVTPNLEPWVATDEGPTVNPMDSTVTPAPSDA SGIWEPGSQVFEEAESTTLSPQVALDTSIVTPLTTLEQGDKVGVPAMSTLGSSSSQPHPEPEDQVRTQGT SGASVPPHQSSPLGKPAVPPGTPTAASVGESASVSSGEPTVPWDPSSTLLPVTLGIEDFELEVLAGSPGV ESFWEEVASGEEPALPGTPMNAGAEEVHSDPCENNPCLHGGTCNANGTMYGCSCDQGFAGENCEIDIDDC LCSPCENGGTCIDEVNGFVCLCLPSYGGSFCEKDTEGCDRGWHKFQGHCYRYFAHRRAWEDAEKDCRRRS GHLTSVHSPEEHSFINSFGHENTWIGLNDRIVERDFQWTDNTGLQFENWRENQPDNFFAGGEDCVVMVAH ESGRWNDVPCNYNLPYVCKKGTVLCGPPPAVENASLIGARKAKYNVHATVRYQCNEGFAQHHVATIRCRS NGKWDRPQIVCTKPRRSHRMRRHHHHHQHHHQHHHHKSRKERRKHKKHPTEDWEKDEGNFC

[0914]

名称	ID	氨基酸序列
人短小蛋白聚糖	135	MAQLFLPLLAALVLAQAPAALADVLEGDSSEDRAFRVRIAGDAPLQGVLGGALTIPCHVHYLRPPPSRRA VLGSPRVKWTFLSRGREAEVLVARGVRVKVNEAYRFRVALPAYPASLTDVSLALSELRPNDSGIYRCEVQ HGIDDSSDAVEVKVKGVVPLYREGSARYAFSPSGAQEACARIGAHIATPEQLYAAYLGGYEQCDAGWLSD QTVRYPIQTPREACYGDMDGFPGVRNYGVVDPDDLYDVYCYAEDLNGELFLGDPPEKLTLEEARAYCQER GAEIATTGQLYAAWDGGLDHCSPGWLADGSVRYPIVTPSQRCGGGLPGVKTLFLFPNQTGFPNKHSRFNV YCFRDSAQPSAIPEASNPASNPASDGLEAIVTVTETLEELQLPQEATESESRGAIYSIPIMEDGGGGSST PEDPAEAPRTLLEFETQSMVPPTGFSEEEGKALEEEEKYEDEEEKEEEEEEEEVEDEALWAWPSELSSPG PEASLPTEPAAQEESLSQAPARAVLQPGASPLPDGESEASRPPRVHGPPTETLPTPRERNLASPSPSTLV EAREVGEATGGPELSGVPRGESEETGSSEGAPSLLPATRAPEGTRELEAPSEDNSGRTAPAGTSVQAQPV LPTDSASRGGVAVVPASGDCVPSPCHNGGTCLEEEEGVRCLCLPGYGGDLCDVGLRFCNPGWDAFQGACY KHFSTRRSWEEAETQCRMYGAHLASISTPEEQDFINNRYREYQWIGLNDRTIEGDFLWSDGVPLLYENWN PGQPDSYFLSGENCVVMVWHDQGQWSDVPCNYHLSYTCKMGLVSCGPPPELPLAQVFGRPRLRYEVDTVL RYRCREGLAQRNLPLIRCQENGRWEAPQISCVPRRPARALHPEEDPEGRQGRLLGRWKALLIPPSSPMPG P

[0915] 表C:结合血清白蛋白的ISV序列(“ID”是指本文所用的SEQ ID NO)

[0916]

名称	ID	氨基酸序列
Alb8	136	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb23	137	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb129	138	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb132	139	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb11	140	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb11 (S112K)-A	141	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSSA
Alb82	142	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb82-A	143	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb82-AA	144	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSAA
Alb82-AAA	145	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSAAA
Alb82-G	146	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSG
Alb82-GG	147	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGG
Alb82-GGG	148	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG
Alb92	149	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb223	150	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
ALB-CDR1	151	SFGMS
ALB-CDR2	152	SISGSGSDTLYADSVKG
ALB-CDR3	153	GGSLSR
Alb135	171	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVKSA

[0917] 表D:接头序列(“ID”是指本文所用的SEQ ID NO)

[0918]

名称	ID	氨基酸序列
3A接头 (Poly-A)	154	AAA
5GS接头	155	GGGGS
7GS接头	156	SGGSGGS
8GS接头	157	GGGGGGGS
9GS接头	158	GGGGSGGGS
10GS接头	159	GGGGSGGGGS
15GS接头	160	GGGGSGGGGSGGGGS
18GS接头	161	GGGGSGGGGSGGGGGGGS
20GS接头	162	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
25GS接头	163	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30GS接头	164	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
35GS接头	165	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
40GS接头	166	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
G1铰链	167	EPKSCDKTHTCPPCP
9GS-G1铰链	168	GGGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
美洲驼羊上部长铰链区域	169	EPKTPKPQPAAA
G3铰链	170	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP

[0919] 表E-1:包含所示的治疗性ISV和所示的结合聚集蛋白聚糖的ISV的多肽/构建体

[0920]

靶标(ISV 结合)	CAP (ISV)
组织蛋白酶 A	604F02
组织蛋白酶 B	604F02
组织蛋白酶 C	604F02
组织蛋白酶 D	604F02
组织蛋白酶 E	604F02
组织蛋白酶 F	604F02
组织蛋白酶 G	604F02
组织蛋白酶 H	604F02
组织蛋白酶 K	604F02
组织蛋白酶 L1	604F02
组织蛋白酶 L2 (或 V)	604F02
组织蛋白酶 O	604F02
组织蛋白酶 S	604F02
组织蛋白酶 W	604F02
组织蛋白酶 Z (或 X)	604F02

靶标(ISV 结合)	CAP (ISV)
ADAMTS1	604F02
ADAMTS2	604F02
ADAMTS3	604F02
ADAMTS4	604F02
ADAMTS5	604F02
ADAMTS6	604F02
ADAMTS7	604F02
ADAMTS8	604F02
ADAMTS9	604F02
ADAMTS10	604F02
ADAMTS11	604F02
ADAMTS12	604F02
ADAMTS13	604F02
ADAMTS14	604F02
ADAMTS15	604F02
ADAMTS16	604F02
ADAMTS17	604F02
ADAMTS18	604F02
ADAMTS19	604F02
ADAMTS20	604F02

靶标(ISV 结合)	CAP (ISV)
MMP1	604F02
MMP2	604F02
MMP3	604F02
MMP7	604F02
MMP8	604F02
MMP9	604F02
MMP10	604F02
MMP11	604F02
MMP12	604F02
MMP13	604F02
MMP14	604F02
MMP15	604F02
MMP16	604F02
MMP17	604F02
MMP18	604F02
MMP19	604F02
MMP20	604F02
MMP21	604F02
MMP23A	604F02
MMP23B	604F02
MMP24	604F02
MMP25	604F02
MMP26	604F02
MMP27	604F02
MMP28	604F02

[0921] 表E-2包含所示的治疗性ISV和所示的与聚集蛋白聚糖结合的两个ISV的多肽/构建体

[0922]

靶标(ISV 结合)	CAP (ISV)
组织蛋白酶 A	114F08-114F08
组织蛋白酶 B	114F08-114F08
组织蛋白酶 C	114F08-114F08
组织蛋白酶 D	114F08-114F08
组织蛋白酶 E	114F08-114F08
组织蛋白酶 F	114F08-114F08
组织蛋白酶 G	114F08-114F08
组织蛋白酶 H	114F08-114F08
组织蛋白酶 K	114F08-114F08
组织蛋白酶 L1	114F08-114F08
组织蛋白酶 L2 (或 V)	114F08-114F08
组织蛋白酶 O	114F08-114F08
组织蛋白酶 S	114F08-114F08
组织蛋白酶 W	114F08-114F08
组织蛋白酶 Z (或 X)	114F08-114F08

靶标(ISV 结合)	CAP (ISV)
ADAMTS1	114F08-114F08
ADAMTS2	114F08-114F08
ADAMTS3	114F08-114F08
ADAMTS4	114F08-114F08
ADAMTS5	114F08-114F08
ADAMTS6	114F08-114F08
ADAMTS7	114F08-114F08
ADAMTS8	114F08-114F08
ADAMTS9	114F08-114F08
ADAMTS10	114F08-114F08
ADAMTS11	114F08-114F08
ADAMTS12	114F08-114F08
ADAMTS13	114F08-114F08
ADAMTS14	114F08-114F08
ADAMTS15	114F08-114F08
ADAMTS16	114F08-114F08
ADAMTS17	114F08-114F08
ADAMTS18	114F08-114F08
ADAMTS19	114F08-114F08
ADAMTS20	114F08-114F08

靶标(ISV 结合)	CAP (ISV)
MMP1	114F08-114F08
MMP2	114F08-114F08
MMP3	114F08-114F08
MMP7	114F08-114F08
MMP8	114F08-114F08
MMP9	114F08-114F08
MMP10	114F08-114F08
MMP11	114F08-114F08
MMP12	114F08-114F08
MMP13	114F08-114F08
MMP14	114F08-114F08
MMP15	114F08-114F08
MMP16	114F08-114F08
MMP17	114F08-114F08
MMP18	114F08-114F08
MMP19	114F08-114F08
MMP20	114F08-114F08
MMP21	114F08-114F08
MMP23A	114F08-114F08
MMP23B	114F08-114F08
MMP24	114F08-114F08
MMP25	114F08-114F08
MMP26	114F08-114F08
MMP27	114F08-114F08
MMP28	114F08-114F08

PA194105序列表

序列表

<110> 埃博灵克斯股份有限公司(Ablynx NV)

<120> 结合聚集蛋白聚糖的免疫球蛋白
<130> 206 379
<150> US 62/514,180
<151> 2017-06-02
<160> 172
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 1

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

[0001]

<210> 2
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ala Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Ile Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Asn Trp Asn Gly Val Thr Thr His Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Ser Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ala Arg Gly Thr Val Tyr Ser Arg Thr Tyr Gly Val Ser Glu Glu
100 105 110
Gly Tyr Met Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 3

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

〈210〉 4
〈211〉 115
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列
〈220〉
〈223〉 纳米抗体序列
〈400〉 4

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 Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
20 25 30
Trp Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Tyr Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Asn Ser Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Asp Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys
85 90 95
[0002] Ala Arg Ser Pro Arg Val Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

〈210〉 5
〈211〉 121
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列
〈220〉
〈223〉 纳米抗体序列

〈400〉 5

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

〈210〉 6
〈211〉 117
〈212〉 PRT
〈213〉 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 6
Lys 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 Met Tyr
20 25 30
Ala Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Asn Ser Ser Gly Gly Arg Thr Asn 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 Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Asp Phe Leu Gly Gly Arg Asn Ser Arg Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 7
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 7
Lys 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 Arg Thr Phe Asn Met Met
20 25 30
Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Tyr
35 40 45
[0003] Ile Thr Trp Asn Gly Gly Asp Thr Arg Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Met Ala Leu Gln
65 70 75 80
Met Asn Arg Leu Asp Pro Leu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Val
85 90 95
Arg Ile His Gly Ser Asn Trp Ser Thr Lys Ala Asp Asp Tyr Asp Asn
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 8
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Ala Leu Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ser Arg
20 25 30
Tyr Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Ser Gly Gly Arg Thr Asp Tyr Val Asp Ser Val Arg
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Leu Ser Ile Asn Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr
85 90 95
Arg Pro Arg Met Tyr Val Asp Gly Thr Tyr Glu Lys Glu Leu Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 9

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

<210> 10
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 10

```
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Arg Ser 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 Ala Gly Leu Ser Tyr Tyr Ser Pro His Ala Tyr Tyr Asp Tyr Trp
            100                 105                 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

[0004]

<210> 11
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 11

```
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 Leu Thr Phe Ser Thr Tyr
            20                  25                  30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Ser Arg 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 Ala Tyr Arg Arg Pro Arg Tyr Ser Pro Thr Gly Thr Trp Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 12

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 Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ile Tyr
20 25 30
Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Trp Ser Ser Gly Arg 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
Thr Ala Tyr Thr Gly Pro Arg Ser Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

[0005] <223> 纳米抗体序列
<400> 13

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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Arg 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 Ala Tyr Arg Arg Arg Arg Ala Ser Ser Asn Arg Gly Leu Trp Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 14

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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Arg Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Tyr Arg Arg Val Arg Tyr Thr Asn Leu Glu Val Trp Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 15

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

<210> 16
[0006] <211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 16

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 Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ile Tyr
20 25 30
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Arg 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
Thr Ala Tyr Thr Gly Arg Ser Tyr Gly Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 17

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 Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ile Tyr
20 25 30

Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Asn Gly Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg 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 Ala
85 90 95
Ala Asp Arg Ser Gly Tyr Gly Thr Ser Leu Asp Trp Trp Tyr Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 18

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

[0007]

Ala Ala Arg Pro Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Leu Tyr Ser Tyr Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 19

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 Thr Ile Phe Ser Ile Asn
20 25 30
Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Thr Thr Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg 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
Ala Glu Val Thr Thr Gly Trp Val Gly Tyr Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1

<400> 20
Gly Arg Ser Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly
1 5 10
<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 21
Gly Arg Ala Phe Ser Asn Tyr Ile Met Gly
1 5 10
<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 22
Gly Ser Ile Phe Ser Asn Arg Phe Met Tyr
1 5 10
<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 23
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Trp Met Phe
1 5 10
<210> 24
<211> 10
[0008] <212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 24
Gly Ser Thr Phe Ile Ile Asn Val Val Arg
1 5 10
<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 25
Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr Ala Met Lys
1 5 10
<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 26
Arg Arg Thr Phe Asn Met Met Gly
1 5
<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 27
Gly Ile Thr Phe Ser Ser Arg Tyr Met Arg

1 5 10
<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 28
Gly Pro Thr Phe Ser Arg Tyr Ala Met Gly
1 5 10
<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 29
Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Val Gly
1 5 10
<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 30
Gly Leu Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Gly
1 5 10
<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
[0009] <220>
<223> CDR1
<400> 31
Gly Arg Thr Phe Ser Ile Tyr Thr Met Ala
1 5 10
<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 32
Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly
1 5 10
<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 33
Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly
1 5 10
<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 34
Gly Arg Thr Phe Ser Ile Tyr Thr Met Gly
1 5 10
<210> 35

<210> 10
<211> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 35
Gly Arg Thr Phe Ser Ile Tyr Gly Met Gly
1 5 10
<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 36
Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr Thr Met Gly
1 5 10
<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 37
Gly Thr Ile Phe Ser Ile Asn Val Met Gly
1 5 10
<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2

[0010]

<400> 38
Ile Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Val
1 5 10
<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 39
Ala Ile Asn Trp Asn Gly Val Thr Thr His
1 5 10
<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 40
Ser Ile Thr Leu Ser Gly Ser Thr Asn
1 5
<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 41
Ser Ile Asn Ser Ser Gly Gly Arg Thr Tyr
1 5 10
<210> 42
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 42
Thr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ala Asn
1 5
<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 43
Gly Ile Asn Ser Ser Gly Gly Arg Thr Asn
1 5 10
<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 44
Tyr Ile Thr Trp Asn Gly Gly Asp Thr Arg
1 5 10
<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 45
Ala Ile Ser Ser Gly Gly Arg Thr Asp
[0011] 1 5
<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 46
Ala Ile Thr Trp Ser Ser Gly Gly Arg Thr Tyr
1 5 10
<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 47
Ala Ile Ser Arg Ser Gly Arg Ser Thr Tyr
1 5 10
<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 48
Ala Ile Ser Trp Ser Gly Ser Arg Thr Tyr
1 5 10
<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> CDR2
<400> 49
Ala Ile Ser Trp Ser Ser Gly Arg Thr Tyr
1 5 10
<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 50
Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Arg Thr Tyr
1 5 10
<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 51
Ala Ile Ser Trp Ser Gly Arg Thr Thr Tyr
1 5 10
<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 52
Ala Ile Thr Trp Ser Ser Ala Thr Thr Tyr
1 5 10
<210> 53

[0012] <211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 53
Ala Ile Asn Gly Gly Ser Arg Thr Tyr
1 5
<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 54
Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Thr Thr Tyr
1 5 10
<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
<400> 55
Ala Ile Thr Thr Gly Gly Arg Thr Asn
1 5
<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 56

Gly Arg Leu Tyr Arg Ala Thr Pro Arg Pro Ala Asp Phe Gly Ser
1 5 10 15
<210> 57
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 57
Arg Gly Thr Val Tyr Ser Arg Thr Tyr Gly Val Ser Glu Glu Gly Tyr
1 5 10 15
Met Tyr

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 58
Phe Leu Gln Asn Ser Phe Tyr
1 5
<210> 59
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 59
Ser Pro Arg Val Gly Ser
1 5
<210> 60
[0013] <211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 60
Pro Thr Thr His Tyr Gly Gly Val Tyr Tyr Gly Pro Tyr
1 5 10
<210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 61
Asp Phe Leu Gly Gly Arg Asn Ser
1 5
<210> 62
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 62
Arg Ile His Gly Ser Asn Trp Ser Thr Lys Ala Asp Asp Tyr Asp Asn
1 5 10 15
<210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 63

Pro Arg Met Tyr Val Asp Gly Thr Tyr Glu Lys Glu Leu
1 5 10
<210> 64
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 64
Ala Arg Ile Pro Val Arg Thr Tyr Thr Ser Glu Trp Asn Tyr
1 5 10
<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 65
Gly Leu Ser Tyr Tyr Ser Pro His Ala Tyr Tyr Asp Tyr
1 5 10
<210> 66
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 66
Tyr Arg Arg Pro Arg Tyr Ser Pro Thr Gly Thr Trp Asp Tyr
1 5 10
<210> 67
<211> 10
<212> PRT

[0014]

<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 67
Tyr Thr Gly Pro Arg Ser Gly Tyr Asp Tyr
1 5 10
<210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 68
Tyr Arg Arg Arg Arg Ala Ser Ser Asn Arg Gly Leu Trp Asp Tyr
1 5 10 15
<210> 69
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 69
Tyr Arg Arg Val Arg Tyr Thr Asn Leu Glu Val Trp Asp Tyr
1 5 10
<210> 70
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 70
Ala Arg Ile Pro Val Gly Arg Arg Ser Glu Asn Trp Asp Tyr
1 5 10

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 71
Tyr Thr Gly Arg Ser Tyr Gly Ser Tyr Asp Tyr
1 5 10
<210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 72
Asp Arg Ser Gly Tyr Gly Thr Ser Leu Asp Trp Trp Tyr Asp Tyr
1 5 10 15
<210> 73
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 73
Arg Pro Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Leu Tyr Ser Tyr Asp Tyr
1 5 10
<210> 74
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

[0015]

<223> CDR3
<400> 74
Glu Val Thr Thr Gly Trp Val Gly Tyr Ser Trp Tyr Asp Tyr
1 5 10
<210> 75
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR1
<400> 75
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
20 25
<210> 76
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR1
<400> 76
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser
20 25
<210> 77
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR1
<400> 77

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
20 25
<210> 78
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR1
<400> 78
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 Ser Ala Ser
20 25
<210> 79
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR1
<400> 79
Lys 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
20 25
<210> 80
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR1

[0016]

<400> 80
Lys 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
20 25
<210> 81
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR1
<400> 81
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Ala Leu Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25
<210> 82
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR1
<400> 82
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
20 25
<210> 83
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR1

<400> 83
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser
20 25
<210> 84
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR1
<400> 84
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 Val Ala Ser
20 25
<210> 85
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR2
<400> 85
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ser
1 5 10
<210> 86
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR2
<400> 86
[0017] Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Phe Val Ala
1 5 10
<210> 87
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR2
<400> 87
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10
<210> 88
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR2
<400> 88
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Tyr Glu Trp Val Ala
1 5 10
<210> 89
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR2
<400> 89
Trp Tyr Arg Arg Thr Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10
<210> 90
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2
<400> 90
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10
<210> 91
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR2
<400> 91
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10
<210> 92
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR2
<400> 92
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10
<210> 93
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR2
<400> 93
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

[0018]

<210> 94
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 94
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
1 5 10 15
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ala
35
<210> 95
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 95
Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
1 5 10 15
Lys Ser Thr Ser Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr
20 25 30
Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala
35
<210> 96
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 96

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
1 5 10 15
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr
35
<210> 97
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 97
Tyr Asp Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala
1 5 10 15
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Glu Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Arg
35
<210> 98
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 98
Tyr Val Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Gly Ala
1 5 10 15
Lys Asn Ala Val Asp Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Val
35

[0019]

<210> 99
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 99
Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
1 5 10 15
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
35
<210> 100
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 100
Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Val
1 5 10 15
Lys Asn Thr Met Ala Leu Gln Met Asn Arg Leu Asp Pro Leu Asp Thr
20 25 30
Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Val
35
<210> 101
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 101

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

Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Arg
35
<210> 102
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 102
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
1 5 10 15
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
35
<210> 103
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 103
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
1 5 10 15
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala
35

[0020]

<210> 104
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 104
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
1 5 10 15
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala
35
<210> 105
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR4
<400> 105
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 106
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR4
<400> 106
Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 107

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR4
<400> 107
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR4
<400> 108
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 109
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR1
<400> 109
Gly Ser Thr Phe Ile Ile Ser Val Met Arg
1 5 10
<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR2
[0021] <400> 110
Ala Ile Arg Thr Gly Gly Asn Thr Asp
1 5
<210> 111
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR3
<400> 111
Pro Thr Thr Arg Tyr Gly Gly Asp Tyr Tyr Gly Pro Tyr
1 5 10
<210> 112
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 112
Tyr Ala Gly Pro Val Arg Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Gly Ala
1 5 10 15
Lys Asn Ala Val Asp Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Val
35
<210> 113
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 113
Tyr Ala Gly Pro Val Arg Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Gly Ala

1 5 10 15
Lys Asp Ala Val Asp Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Val
35
<210> 114
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 114
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 Gly Ser Thr Phe Ile Ile Ser
20 25 30
Val Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Ala Ile Arg Thr Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Gly Pro Val Arg
50 55 60
Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Ala Val Asp Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Val Pro Thr Thr Arg Tyr Gly Gly Asp Tyr Tyr Gly Pro Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 115
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列
[0022] <220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 115
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 Gly Ser Thr Phe Ile Ile Ser
20 25 30
Val Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Ala Ile Arg Thr Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Gly Pro Val Arg
50 55 60
Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asp Ala Val Asp Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Val Pro Thr Thr Arg Tyr Gly Gly Asp Tyr Tyr Gly Pro Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 116
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 116
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 Thr Phe Ile Ile Asn
20 25 30
Val Val Arg Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ala Asn Tyr Val Asp Ser Val Arg

50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg 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
Val Pro Thr Thr His Tyr Gly Gly Val Tyr Tyr Gly Pro Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 117
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 117
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ile Ile Asn
20 25 30
Val Val Arg Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ala Asn Tyr Val Asp Ser Val Arg
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Val Pro Thr Thr His Tyr Gly Gly Val Tyr Tyr Gly Pro Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

[0023]
<210> 118
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 118
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Tyr Arg Arg Arg Arg Ala Ser Ser Asn Arg Gly Leu Trp Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125
<210> 119
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR1
<400> 119
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 120
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR1
<400> 120
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25
<210> 121
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR2
<400> 121
Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10
<210> 122
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 122
Tyr Val Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
1 5 10 15
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
20 25 30
[0024] Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Val
35
<210> 123
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 123
Tyr Val Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
1 5 10 15
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Leu Tyr Tyr Cys Asn Val
35
<210> 124
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FR3
<400> 124
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
1 5 10 15
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ala
35
<210> 125
<211> 2415
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 125

Met Thr Thr Leu Leu Trp Val Phe Val Thr Leu Arg Val Ile Thr Ala
1 5 10 15
Ala Val Thr Val Glu Thr Ser Asp His Asp Asn Ser Leu Ser Val Ser
20 25 30
Ile Pro Gln Pro Ser Pro Leu Arg Val Leu Leu Gly Thr Ser Leu Thr
35 40 45
Ile Pro Cys Tyr Phe Ile Asp Pro Met His Pro Val Thr Thr Ala Pro
50 55 60
Ser Thr Ala Pro Leu Ala Pro Arg Ile Lys Trp Ser Arg Val Ser Lys
65 70 75 80
Glu Lys Glu Val Val Leu Leu Val Ala Thr Glu Gly Arg Val Arg Val
85 90 95
Asn Ser Ala Tyr Gln Asp Lys Val Ser Leu Pro Asn Tyr Pro Ala Ile
100 105 110
Pro Ser Asp Ala Thr Leu Glu Val Gln Ser Leu Arg Ser Asn Asp Ser
115 120 125
Gly Val Tyr Arg Cys Glu Val Met His Gly Ile Glu Asp Ser Glu Ala
130 135 140
Thr Leu Glu Val Val Val Lys Gly Ile Val Phe His Tyr Arg Ala Ile
145 150 155 160
Ser Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Phe Asp Arg Ala Gln Arg Ala Cys Leu
165 170 175
Gln Asn Ser Ala Ile Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr
180 185 190
Glu Asp Gly Phe His Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gln Thr
195 200 205
Val Arg Tyr Pro Ile His Thr Pro Arg Glu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys
210 215 220
Asp Glu Phe Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Ile Arg Asp Thr Asn Glu
225 230 235 240
Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Ala Glu Glu Met Glu Gly Glu Val Phe
245 250 255
[0025] Tyr Ala Thr Ser Pro Glu Lys Phe Thr Phe Gln Glu Ala Ala Asn Glu
260 265 270
Cys Arg Arg Leu Gly Ala Arg Leu Ala Thr Thr Gly His Val Tyr Leu
275 280 285
Ala Trp Gln Ala Gly Met Asp Met Cys Ser Ala Gly Trp Leu Ala Asp
290 295 300
Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly
305 310 315 320
Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Val His Ala Asn Gln Thr Gly
325 330 335
Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu
340 345 350
Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu
355 360 365
Asp Ile Thr Val Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Met Glu Leu Pro Leu
370 375 380
Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val Ile Leu Thr
385 390 395 400
Val Lys Pro Ile Phe Glu Val Ser Pro Ser Pro Leu Glu Pro Glu Glu
405 410 415
Pro Phe Thr Phe Ala Pro Glu Ile Gly Ala Thr Ala Phe Ala Glu Val
420 425 430
Glu Asn Glu Thr Gly Glu Ala Thr Arg Pro Trp Gly Phe Pro Thr Pro
435 440 445
Gly Leu Gly Pro Ala Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu Val Val Gln
450 455 460
Val Thr Ala Val Pro Gly Gln Pro His Leu Pro Gly Gly Val Val Phe
465 470 475 480
His Tyr Arg Pro Gly Pro Thr Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala
485 490 495
Gln Gln Ala Cys Pro Gly Thr Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Glu Gln
500 505 510
Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp

515 520 525
Leu Arg Asp Gln Thr Val Arg Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro
530 535 540
Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val
545 550 555 560
Arg Pro Ser Thr Glu Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Val Asp Arg Leu
565 570 575
Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr Phe Gln
580 585 590
Glu Ala Leu Glu Phe Cys Glu Ser His Asn Ala Thr Ala Thr Thr Gly
595 600 605
Gln Leu Tyr Ala Ala Trp Ser Arg Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala Gly
610 615 620
Trp Leu Ala Asp Gly Ser Leu Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Arg Pro
625 630 635 640
Ala Cys Gly Gly Asp Lys Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr Pro
645 650 655
Asn Gln Thr Gly Leu Pro Asp Pro Leu Ser Arg His His Ala Phe Cys
660 665 670
Phe Arg Gly Ile Ser Ala Val Pro Ser Pro Gly Glu Glu Glu Gly Gly
675 680 685
Thr Pro Thr Ser Pro Ser Gly Val Glu Glu Trp Ile Val Thr Gln Val
690 695 700
Val Pro Gly Val Ala Ala Val Pro Val Glu Glu Glu Thr Thr Ala Val
705 710 715 720
Pro Ser Gly Glu Thr Thr Ala Ile Leu Glu Phe Thr Thr Glu Pro Glu
725 730 735
Asn Gln Thr Glu Trp Glu Pro Ala Tyr Thr Pro Val Gly Thr Ser Pro
740 745 750
Leu Pro Gly Ile Leu Pro Thr Trp Pro Pro Thr Gly Ala Glu Thr Glu
755 760 765
Glu Ser Thr Glu Gly Pro Ser Ala Thr Glu Val Pro Ser Ala Ser Glu
[0026] 770 775 780
Glu Pro Ser Pro Ser Glu Val Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro Ser Pro
785 790 795 800
Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Val Arg Pro Phe Pro Ser Val Glu Leu
805 810 815
Phe Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Lys Glu Pro Ser Pro Ser Glu
820 825 830
Glu Pro Ser Ala Ser Glu Glu Pro Tyr Thr Pro Ser Pro Pro Glu Pro
835 840 845
Ser Trp Thr Glu Leu Pro Ser Ser Gly Glu Glu Ser Gly Ala Pro Asp
850 855 860
Val Ser Gly Asp Phe Thr Gly Ser Gly Asp Val Ser Gly His Leu Asp
865 870 875 880
Phe Ser Gly Gln Leu Ser Gly Asp Arg Ala Ser Gly Leu Pro Ser Gly
885 890 895
Asp Leu Asp Ser Ser Gly Leu Thr Ser Thr Val Gly Ser Gly Leu Thr
900 905 910
Val Glu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Asp Glu Glu Arg Ile Glu Trp Pro
915 920 925
Ser Thr Pro Thr Val Gly Glu Leu Pro Ser Gly Ala Glu Ile Leu Glu
930 935 940
Gly Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu
945 950 955 960
Val Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro
965 970 975
Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala Pro Gly Val Glu Asp Ile Ser
980 985 990
Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala Pro Gly Val Glu
995 1000 1005
Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala
1010 1015 1020
Pro Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu
1025 1030 1035

Glu Thr Thr Ala Pro Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser
1040 1045 1050
Gly Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala Pro Gly Val Glu Asp Ile Ser
1055 1060 1065
Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ala Ala Pro Gly Val
1070 1075 1080
Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ala
1085 1090 1095
Ala Pro Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val
1100 1105 1110
Leu Glu Thr Ala Ala Pro Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro
1115 1120 1125
Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ala Ala Pro Gly Val Glu Asp Ile
1130 1135 1140
Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ala Ala Pro Gly
1145 1150 1155
Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr
1160 1165 1170
Ala Ala Pro Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu
1175 1180 1185
Val Leu Glu Thr Ala Ala Pro Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu
1190 1195 1200
Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ala Ala Pro Gly Val Glu Asp
1205 1210 1215
Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ala Ala Pro
1220 1225 1230
Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu
1235 1240 1245
Thr Ala Ala Pro Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1250 1255 1260
Glu Val Leu Glu Thr Ala Ala Pro Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly
1265 1270 1275

[0027]

Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala Pro Gly Val Glu
1280 1285 1290
Glu Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala
1295 1300 1305
Pro Gly Val Asp Glu Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu
1310 1315 1320
Glu Thr Thr Ala Pro Gly Val Glu Glu Ile Ser Gly Leu Pro Ser
1325 1330 1335
Gly Glu Val Leu Glu Thr Ser Thr Ser Ala Val Gly Asp Leu Ser
1340 1345 1350
Gly Leu Pro Ser Gly Gly Glu Val Leu Glu Ile Ser Val Ser Gly
1355 1360 1365
Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Val Glu Thr
1370 1375 1380
Ser Ala Ser Gly Ile Glu Asp Val Ser Glu Leu Pro Ser Gly Glu
1385 1390 1395
Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Arg Leu
1400 1405 1410
Pro Ser Gly Glu Glu Val Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Phe Gly
1415 1420 1425
Asp Leu Ser Gly Val Pro Ser Gly Gly Glu Gly Leu Glu Thr Ser
1430 1435 1440
Ala Ser Glu Val Gly Thr Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Arg
1445 1450 1455
Glu Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Ala Glu Asp Leu Ser Gly
1460 1465 1470
Leu Pro Ser Gly Lys Glu Asp Leu Val Gly Ser Ala Ser Gly Asp
1475 1480 1485
Leu Asp Leu Gly Lys Leu Pro Ser Gly Thr Leu Gly Ser Gly Gln
1490 1495 1500
Ala Pro Glu Thr Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Ser Gly Glu Tyr
1505 1510 1515
Ser Gly Val Asp Leu Gly Ser Gly Pro Pro Ser Gly Leu Pro Asp

1520 1525 1530
Phe Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro Thr Val Ser Leu Val Asp
1535 1540 1545
Ser Thr Leu Val Glu Val Val Thr Ala Ser Thr Ala Ser Glu Leu
1550 1555 1560
Glu Gly Arg Gly Thr Ile Gly Ile Ser Gly Ala Gly Glu Ile Ser
1565 1570 1575
Gly Leu Pro Ser Ser Glu Leu Asp Ile Ser Gly Arg Ala Ser Gly
1580 1585 1590
Leu Pro Ser Gly Thr Glu Leu Ser Gly Gln Ala Ser Gly Ser Pro
1595 1600 1605
Asp Val Ser Gly Glu Ile Pro Gly Leu Phe Gly Val Ser Gly Gln
1610 1615 1620
Pro Ser Gly Phe Pro Asp Thr Ser Gly Glu Thr Ser Gly Val Thr
1625 1630 1635
Glu Leu Ser Gly Leu Ser Ser Gly Gln Pro Gly Val Ser Gly Glu
1640 1645 1650
Ala Ser Gly Val Leu Tyr Gly Thr Ser Gln Pro Phe Gly Ile Thr
1655 1660 1665
Asp Leu Ser Gly Glu Thr Ser Gly Val Pro Asp Leu Ser Gly Gln
1670 1675 1680
Pro Ser Gly Leu Pro Gly Phe Ser Gly Ala Thr Ser Gly Val Pro
1685 1690 1695
Asp Leu Val Ser Gly Thr Thr Ser Gly Ser Gly Glu Ser Ser Gly
1700 1705 1710
Ile Thr Phe Val Asp Thr Ser Leu Val Glu Val Ala Pro Thr Thr
1715 1720 1725
Phe Lys Glu Glu Glu Gly Leu Gly Ser Val Glu Leu Ser Gly Leu
1730 1735 1740
Pro Ser Gly Glu Ala Asp Leu Ser Gly Lys Ser Gly Met Val Asp
1745 1750 1755
Val Ser Gly Gln Phe Ser Gly Thr Val Asp Ser Ser Gly Phe Thr
[0028] 1760 1765 1770
Ser Gln Thr Pro Glu Phe Ser Gly Leu Pro Ser Gly Ile Ala Glu
1775 1780 1785
Val Ser Gly Glu Ser Ser Arg Ala Glu Ile Gly Ser Ser Leu Pro
1790 1795 1800
Ser Gly Ala Tyr Tyr Gly Ser Gly Thr Pro Ser Ser Phe Pro Thr
1805 1810 1815
Val Ser Leu Val Asp Arg Thr Leu Val Glu Ser Val Thr Gln Ala
1820 1825 1830
Pro Thr Ala Gln Glu Ala Gly Glu Gly Pro Ser Gly Ile Leu Glu
1835 1840 1845
Leu Ser Gly Ala His Ser Gly Ala Pro Asp Met Ser Gly Glu His
1850 1855 1860
Ser Gly Phe Leu Asp Leu Ser Gly Leu Gln Ser Gly Leu Ile Glu
1865 1870 1875
Pro Ser Gly Glu Pro Pro Gly Thr Pro Tyr Phe Ser Gly Asp Phe
1880 1885 1890
Ala Ser Thr Thr Asn Val Ser Gly Glu Ser Ser Val Ala Met Gly
1895 1900 1905
Thr Ser Gly Glu Ala Ser Gly Leu Pro Glu Val Thr Leu Ile Thr
1910 1915 1920
Ser Glu Phe Val Glu Gly Val Thr Glu Pro Thr Ile Ser Gln Glu
1925 1930 1935
Leu Gly Gln Arg Pro Pro Val Thr His Thr Pro Gln Leu Phe Glu
1940 1945 1950
Ser Ser Gly Lys Val Ser Thr Ala Gly Asp Ile Ser Gly Ala Thr
1955 1960 1965
Pro Val Leu Pro Gly Ser Gly Val Glu Val Ser Ser Val Pro Glu
1970 1975 1980
Ser Ser Ser Glu Thr Ser Ala Tyr Pro Glu Ala Gly Phe Gly Ala
1985 1990 1995
Ser Ala Ala Pro Glu Ala Ser Arg Glu Asp Ser Gly Ser Pro Asp
2000 2005 2010

Leu Ser Glu Thr Thr Ser Ala Phe His Glu Ala Asn Leu Glu Arg
2015 2020 2025
Ser Ser Gly Leu Gly Val Ser Gly Ser Thr Leu Thr Phe Gln Glu
2030 2035 2040
Gly Glu Ala Ser Ala Ala Pro Glu Val Ser Gly Glu Ser Thr Thr
2045 2050 2055
Thr Ser Asp Val Gly Thr Glu Ala Pro Gly Leu Pro Ser Ala Thr
2060 2065 2070
Pro Thr Ala Ser Gly Asp Arg Thr Glu Ile Ser Gly Asp Leu Ser
2075 2080 2085
Gly His Thr Ser Gln Leu Gly Val Val Ile Ser Thr Ser Ile Pro
2090 2095 2100
Glu Ser Glu Trp Thr Gln Gln Thr Gln Arg Pro Ala Glu Thr His
2105 2110 2115
Leu Glu Ile Glu Ser Ser Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Glu Glu Thr
2120 2125 2130
His Thr Val Glu Thr Ala Thr Ser Pro Thr Asp Ala Ser Ile Pro
2135 2140 2145
Ala Ser Pro Glu Trp Lys Arg Glu Ser Glu Ser Thr Ala Ala Ala
2150 2155 2160
Pro Ala Arg Ser Cys Ala Glu Glu Pro Cys Gly Ala Gly Thr Cys
2165 2170 2175
Lys Glu Thr Glu Gly His Val Ile Cys Leu Cys Pro Pro Gly Tyr
2180 2185 2190
Thr Gly Glu His Cys Asn Ile Asp Gln Glu Val Cys Glu Glu Gly
2195 2200 2205
Trp Asn Lys Tyr Gln Gly His Cys Tyr Arg His Phe Pro Asp Arg
2210 2215 2220
Glu Thr Trp Val Asp Ala Glu Arg Arg Cys Arg Glu Gln Gln Ser
2225 2230 2235
His Leu Ser Ser Ile Val Thr Pro Glu Glu Gln Glu Phe Val Asn
2240 2245 2250

[0029]

Asn Asn Ala Gln Asp Tyr Gln Trp Ile Gly Leu Asn Asp Arg Thr
2255 2260 2265
Ile Glu Gly Asp Phe Arg Trp Ser Asp Gly His Pro Met Gln Phe
2270 2275 2280
Glu Asn Trp Arg Pro Asn Gln Pro Asp Asn Phe Phe Ala Ala Gly
2285 2290 2295
Glu Asp Cys Val Val Met Ile Trp His Glu Lys Gly Glu Trp Asn
2300 2305 2310
Asp Val Pro Cys Asn Tyr His Leu Pro Phe Thr Cys Lys Lys Gly
2315 2320 2325
Thr Val Ala Cys Gly Glu Pro Pro Val Val Glu His Ala Arg Thr
2330 2335 2340
Phe Gly Gln Lys Lys Asp Arg Tyr Glu Ile Asn Ser Leu Val Arg
2345 2350 2355
Tyr Gln Cys Thr Glu Gly Phe Val Gln Arg His Met Pro Thr Ile
2360 2365 2370
Arg Cys Gln Pro Ser Gly His Trp Glu Glu Pro Arg Ile Thr Cys
2375 2380 2385
Thr Asp Ala Thr Thr Tyr Lys Arg Arg Leu Gln Lys Arg Ser Ser
2390 2395 2400
Arg His Pro Arg Arg Ser Arg Pro Ser Thr Ala His
2405 2410 2415

<210> 126
<211> 2333
<212> PRT
<213> 狼(Canis lupus)
<400> 126

Met Thr Thr Leu Leu Trp Val Phe Val Thr Leu Arg Val Ile Thr Ala
1 5 10 15
Ala Ser Ser Glu Glu Thr Ser Asp His Asp Asn Ser Leu Ser Val Ser
20 25 30
Ile Pro Glu Pro Ser Pro Met Arg Val Leu Leu Gly Ser Ser Leu Thr
35 40 45

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

[0030]

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

[0031]

565 570 575
Gly Val Arg Pro Pro Ser Glu Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp
580 585 590
Lys Leu Glu Gly Glu Val Phe Phe Ile Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr
595 600 605
Phe Gln Glu Ala Leu Ala Phe Cys Glu Ser His Asn Ala Thr Leu Ala
610 615 620
Ser Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp Arg Gln Gly Leu Asp Lys Cys
625 630 635 640
Tyr Ala Gly Trp Leu Ser Asp Gly Ser Leu Arg Tyr Pro Ile Val Thr
645 650 655
Pro Arg Pro Ser Cys Gly Gly Asp Lys Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr
660 665 670
Leu Tyr Pro Asn Gln Thr Gly Leu Pro Asp Pro Leu Ser Arg His His
675 680 685
Val Phe Cys Phe Arg Gly Val Ser Gly Val Pro Ser Pro Gly Glu Glu
690 695 700
Glu Gly Gly Thr Pro Thr Pro Ser Val Val Glu Asp Trp Ile Pro Thr
705 710 715 720
Gln Val Gly Pro Val Val Pro Ser Val Pro Met Gly Glu Glu Thr Thr
725 730 735
Ala Ile Leu Asp Phe Thr Ile Glu Pro Glu Asn Gln Thr Glu Trp Glu
740 745 750
Pro Ala Tyr Ser Pro Ala Gly Thr Ser Pro Leu Pro Gly Ile Pro Pro
755 760 765
Thr Trp Pro Pro Thr Ser Thr Ala Thr Glu Glu Ser Thr Glu Gly Pro
770 775 780
Ser Gly Thr Glu Val Pro Ser Val Ser Glu Glu Pro Ser Pro Ser Glu
785 790 795 800
Glu Pro Phe Pro Trp Glu Glu Leu Ser Thr Leu Ser Pro Pro Gly Pro
805 810 815
Ser Gly Thr Glu Leu Pro Gly Ser Gly Glu Ala Ser Gly Val Pro Glu
820 825 830
Val Ser Gly Asp Phe Thr Gly Ser Gly Glu Val Ser Gly His Pro Asp
835 840 845
Ser Ser Gly Gln Leu Ser Gly Glu Ser Ala Ser Gly Leu Pro Ser Glu
850 855 860
Asp Leu Asp Ser Ser Gly Leu Thr Ser Ala Val Gly Ser Gly Leu Ala
865 870 875 880
Ser Gly Asp Glu Asp Arg Ile Thr Leu Ser Ser Ile Pro Lys Val Glu
885 890 895
Gly Glu Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Gly
900 905 910
Leu Pro Ser Gly Arg Glu Gly Leu Glu Thr Ser Thr Ser Gly Val Gly
915 920 925
Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Gly Leu Glu Val Ser Ala Ser
930 935 940
Gly Val Glu Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Thr
945 950 955 960
Ser Thr Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Gly
965 970 975
Pro Glu Val Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser
980 985 990
Gly Arg Glu Gly Leu Glu Thr Ser Thr Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser
995 1000 1005
Gly Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Ala Ser Thr Ser Gly Val
1010 1015 1020
Gly Asp Leu Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Val Ser
1025 1030 1035
Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Gly
1040 1045 1050
Leu Glu Ala Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro
1055 1060 1065
Ser Gly Glu Gly Pro Glu Ala Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu
1070 1075 1080

Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Val Ser Ala Ser Gly
1085 1090 1095
Val Glu Asp Leu Ser Gly Leu Ser Ser Gly Glu Ser Pro Glu Ala
1100 1105 1110
Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Arg
1115 1120 1125
Glu Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly
1130 1135 1140
Leu Pro Ser Gly Glu Gly Gln Glu Ala Ser Ala Ser Gly Val Glu
1145 1150 1155
Asp Leu Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Ala Ser Ala
1160 1165 1170
Ser Gly Val Gly Glu Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Arg Glu Gly
1175 1180 1185
Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro
1190 1195 1200
Ser Gly Glu Gly Pro Glu Ala Phe Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu
1205 1210 1215
Ser Ile Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Ala Ser Ala Ser Gly
1220 1225 1230
Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Arg Glu Gly Leu Glu
1235 1240 1245
Thr Ser Thr Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1250 1255 1260
Arg Glu Gly Leu Glu Thr Ser Thr Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser
1265 1270 1275
Gly Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Ala Ser Ala Ser Gly Ile
1280 1285 1290
Gly Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Arg Glu Gly Leu Glu Thr
1295 1300 1305
Ser Ser Ser Gly Val Glu Asp His Pro Glu Thr Ser Ala Ser Gly
1310 1315 1320
[0032] Val Glu Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Val Glu Gly His Pro
1325 1330 1335
Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Asp Leu Ser Ser
1340 1345 1350
Gly Gly Glu Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Ala Glu Asp Leu
1355 1360 1365
Ser Gly Phe Pro Ser Gly Lys Glu Asp Leu Ile Gly Ser Ala Ser
1370 1375 1380
Gly Ala Leu Asp Phe Gly Arg Ile Pro Ser Gly Thr Leu Gly Ser
1385 1390 1395
Gly Gln Ala Pro Glu Ala Ser Ser Leu Pro Ser Gly Phe Ser Gly
1400 1405 1410
Glu Tyr Ser Gly Val Asp Phe Gly Ser Gly Pro Ile Ser Gly Leu
1415 1420 1425
Pro Asp Phe Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro Thr Ile Ser Leu
1430 1435 1440
Val Asp Thr Thr Leu Val Glu Val Ile Thr Thr Thr Ser Ala Ser
1445 1450 1455
Glu Leu Glu Gly Arg Gly Thr Ile Gly Ile Ser Gly Ala Gly Glu
1460 1465 1470
Thr Ser Gly Leu Pro Val Ser Glu Leu Asp Ile Ser Gly Ala Val
1475 1480 1485
Ser Gly Leu Pro Ser Gly Ala Glu Leu Ser Gly Gln Ala Ser Gly
1490 1495 1500
Ser Pro Asp Met Ser Gly Glu Thr Ser Gly Phe Phe Gly Val Ser
1505 1510 1515
Gly Gln Pro Ser Gly Phe Pro Asp Ile Ser Gly Gly Thr Ser Gly
1520 1525 1530
Leu Phe Glu Val Ser Gly Gln Pro Ser Gly Phe Ser Gly Glu Thr
1535 1540 1545
Ser Gly Val Thr Glu Leu Ser Gly Leu Tyr Ser Gly Gln Pro Asp
1550 1555 1560
Val Ser Gly Glu Ala Ser Gly Val Pro Ser Gly Ser Gly Gln Pro

1565 1570 1575
Phe Gly Met Thr Asp Leu Ser Gly Glu Thr Ser Gly Val Pro Asp
1580 1585 1590
Ile Ser Gly Gln Pro Ser Gly Leu Pro Glu Phe Ser Gly Thr Thr
1595 1600 1605
Ser Gly Ile Pro Asp Leu Val Ser Ser Thr Met Ser Gly Ser Gly
1610 1615 1620
Glu Ser Ser Gly Ile Thr Phe Val Asp Thr Ser Leu Val Glu Val
1625 1630 1635
Thr Pro Thr Thr Phe Lys Glu Lys Lys Arg Leu Gly Ser Val Glu
1640 1645 1650
Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Asp Leu Ser Gly Ala Ser
1655 1660 1665
Gly Thr Met Asp Ile Ser Gly Gln Ser Ser Gly Ala Thr Asp Ser
1670 1675 1680
Ser Gly Leu Thr Ser His Leu Pro Lys Phe Ser Gly Leu Pro Ser
1685 1690 1695
Gly Ala Ala Glu Val Ser Gly Glu Ser Ser Gly Ala Glu Val Gly
1700 1705 1710
Ser Ser Leu Pro Ser Gly Thr Tyr Glu Gly Ser Gly Asn Phe His
1715 1720 1725
Pro Ala Phe Pro Thr Val Phe Leu Val Asp Arg Thr Leu Val Glu
1730 1735 1740
Ser Val Thr Gln Ala Pro Thr Ala Gln Glu Ala Gly Glu Gly Pro
1745 1750 1755
Ser Gly Ile Leu Glu Leu Ser Gly Ala His Ser Gly Ala Pro Asp
1760 1765 1770
Val Ser Gly Asp His Ser Gly Ser Leu Asp Leu Ser Gly Met Gln
1775 1780 1785
Ser Gly Leu Val Glu Pro Ser Gly Glu Pro Ser Ser Thr Pro Tyr
1790 1795 1800
Phe Ser Gly Asp Phe Ser Gly Thr Met Asp Val Thr Gly Glu Pro
[0033] 1805 1810 1815
Ser Thr Ala Met Ser Ala Ser Gly Glu Ala Ser Gly Leu Leu Glu
1820 1825 1830
Val Thr Leu Ile Thr Ser Glu Phe Val Glu Gly Val Thr Glu Pro
1835 1840 1845
Thr Val Ser Gln Glu Leu Ala Gln Arg Pro Pro Val Thr His Thr
1850 1855 1860
Pro Gln Leu Phe Glu Ser Ser Gly Glu Ala Ser Ala Ser Gly Glu
1865 1870 1875
Ile Ser Gly Ala Thr Pro Ala Phe Pro Gly Ser Gly Leu Glu Ala
1880 1885 1890
Ser Ser Val Pro Glu Ser Ser Ser Glu Thr Ser Asp Phe Pro Glu
1895 1900 1905
Arg Ala Val Gly Val Ser Ala Ala Pro Glu Ala Ser Gly Gly Ala
1910 1915 1920
Ser Gly Ala Pro Asp Val Ser Glu Ala Thr Ser Thr Phe Pro Glu
1925 1930 1935
Ala Asp Val Glu Gly Ala Ser Gly Leu Gly Val Ser Gly Gly Thr
1940 1945 1950
Ser Ala Phe Pro Glu Ala Pro Arg Glu Gly Ser Ala Thr Pro Glu
1955 1960 1965
Val Gln Glu Glu Pro Thr Thr Ser Tyr Asp Val Gly Arg Glu Ala
1970 1975 1980
Leu Gly Trp Pro Ser Ala Thr Pro Thr Ala Ser Gly Asp Arg Ile
1985 1990 1995
Glu Val Ser Gly Asp Leu Ser Gly His Thr Ser Gly Leu Asp Val
2000 2005 2010
Val Ile Ser Thr Ser Val Pro Glu Ser Glu Trp Ile Gln Gln Thr
2015 2020 2025
Gln Arg Pro Ala Glu Ala His Leu Glu Ile Glu Ala Ser Ser Pro
2030 2035 2040
Leu His Ser Gly Glu Glu Thr Gln Thr Ala Glu Thr Ala Thr Ser
2045 2050 2055

Pro Thr Asp Asp Ala Ser Ile Pro Thr Ser Pro Ser Gly Thr Asp
2060 2065 2070
Glu Ser Ala Pro Ala Ile Pro Asp Ile Asp Glu Cys Leu Ser Ser
2075 2080 2085
Pro Cys Leu Asn Gly Ala Thr Cys Val Asp Ala Ile Asp Ser Phe
2090 2095 2100
Thr Cys Leu Cys Leu Pro Ser Tyr Arg Gly Asp Leu Cys Glu Ile
2105 2110 2115
Asp Gln Glu Leu Cys Glu Glu Gly Trp Thr Lys Phe Gln Gly His
2120 2125 2130
Cys Tyr Arg Tyr Phe Pro Asp Arg Glu Ser Trp Val Asp Ala Glu
2135 2140 2145
Ser Arg Cys Arg Ala Gln Gln Ser His Leu Ser Ser Ile Val Thr
2150 2155 2160
Pro Glu Glu Gln Glu Phe Val Asn Asn Asn Ala Gln Asp Tyr Gln
2165 2170 2175
Trp Ile Gly Leu Asn Asp Arg Thr Ile Glu Gly Asp Phe Arg Trp
2180 2185 2190
Ser Asp Gly His Ser Leu Gln Phe Glu Asn Trp Arg Pro Asn Gln
2195 2200 2205
Pro Asp Asn Phe Phe Val Ser Gly Glu Asp Cys Val Val Met Ile
2210 2215 2220
Trp His Glu Lys Gly Glu Trp Asn Asp Val Pro Cys Asn Tyr Tyr
2225 2230 2235
Leu Pro Phe Thr Cys Lys Lys Gly Thr Val Ala Cys Gly Asp Pro
2240 2245 2250
Pro Val Val Glu His Ala Arg Thr Phe Gly Gln Lys Lys Asp Arg
2255 2260 2265
Tyr Glu Ile Asn Ser Leu Val Arg Tyr Gln Cys Thr Glu Gly Phe
2270 2275 2280
Val Gln Arg His Val Pro Thr Ile Arg Cys Gln Pro Ser Gly His
2285 2290 2295

[0034] Trp Glu Lys Pro Arg Ile Thr Cys Thr Asp Pro Ser Thr Tyr Lys
2300 2305 2310
Arg Arg Leu Gln Lys Arg Ser Ser Arg Ala Pro Arg Arg Ser Arg
2315 2320 2325
Pro Ser Thr Ala His
2330

<210> 127
<211> 2364
<212> PRT
<213> 牛(Bos taurus)
<400> 127

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

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

[0035]

Glu Asn Arg Thr Glu Glu Ala Thr Arg Pro Trp Ala Phe Pro Arg Glu
435 440 445
Ser Thr Pro Gly Leu Gly Ala Pro Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu
450 455 460
Val Val Gln Val Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ala Glu Val Pro Gly Gln
465 470 475 480
Pro Arg Leu Pro Gly Gly Val Val Phe His Tyr Arg Pro Gly Ser Ser
485 490 495
Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala Lys Gln Ala Cys Leu Arg Thr
500 505 510
Gly Ala Ile Ile Ala Ser Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala
515 520 525
Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Gln Asp Gln Thr Val Arg
530 535 540
Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser
545 550 555 560
Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val Arg Pro Pro Ser Glu Thr Tyr
565 570 575
Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp Arg Leu Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala
580 585 590
Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr Phe Trp Glu Ala Gln Glu Phe Cys Glu
595 600 605
Ser Gln Asn Ala Thr Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp
610 615 620
Ser Arg Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser
625 630 635 640
Leu Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Arg Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys
645 650 655
Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr Pro Asn Gln Thr Gly Leu Leu
660 665 670
Asp Pro Leu Ser Arg His His Ala Phe Cys Phe Arg Gly Val Ser Ala
675 680 685
Ala Pro Ser Pro Glu Glu Glu Glu Gly Ser Ala Pro Thr Ala Gly Pro

690 695 700
Asp Val Glu Glu Trp Met Val Thr Gln Val Gly Pro Gly Val Ala Ala
705 710 715 720
Val Pro Ile Gly Glu Glu Thr Thr Ala Ile Pro Gly Phe Thr Val Glu
725 730 735
Pro Glu Asn Lys Thr Glu Trp Glu Leu Ala Tyr Thr Pro Ala Gly Thr
740 745 750
Leu Pro Leu Pro Gly Ile Pro Pro Thr Trp Pro Pro Thr Gly Glu Ala
755 760 765
Thr Glu Glu His Thr Glu Gly Pro Ser Ala Thr Glu Val Pro Ser Ala
770 775 780
Ser Glu Lys Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Pro Glu Glu Pro
785 790 795 800
Phe Pro Ser Glu Lys Pro Phe Pro Pro Glu Glu Leu Phe Pro Ser Glu
805 810 815
Lys Pro Phe Pro Ser Glu Lys Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro
820 825 830
Ser Glu Lys Pro Phe Pro Pro Glu Glu Leu Phe Pro Ser Glu Lys Pro
835 840 845
Ile Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Glu
850 855 860
Lys Pro Phe Pro Pro Glu Glu Pro Phe Pro Ser Glu Lys Pro Ile Pro
865 870 875 880
Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Glu Lys Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro
885 890 895
Phe Pro Ser Glu Glu Pro Ser Thr Leu Ser Ala Pro Val Pro Ser Arg
900 905 910
Thr Glu Leu Pro Ser Ser Gly Glu Val Ser Gly Val Pro Glu Ile Ser
915 920 925
Gly Asp Phe Thr Gly Ser Gly Glu Ile Ser Gly His Leu Asp Phe Ser
930 935 940
Gly Gln Pro Ser Gly Glu Ser Ala Ser Gly Leu Pro Ser Glu Asp Leu
[0036] 945 950 955 960
Asp Ser Ser Gly Leu Thr Ser Thr Val Gly Ser Gly Leu Pro Val Glu
965 970 975
Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Glu Glu Arg Ile Thr Trp Thr Ser Ala
980 985 990
Pro Lys Val Asp Arg Leu Pro Ser Gly Gly Glu Gly Pro Glu Val Ser
995 1000 1005
Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Gly Glu Val His
1010 1015 1020
Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro
1025 1030 1035
Ser Gly Gly Glu Val His Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val Glu
1040 1045 1050
Asp Leu Ser Arg Ile Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Ile Ser Ala
1055 1060 1065
Ser Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Glu Gly
1070 1075 1080
His Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Gly Ile
1085 1090 1095
Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Val Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp
1100 1105 1110
Leu Ile Gly Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Val Ser Ala Ser
1115 1120 1125
Gly Val Glu Asp Leu Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu
1130 1135 1140
Val Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1145 1150 1155
Glu Gly Pro Glu Val Ser Val Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Arg
1160 1165 1170
Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Val Ser Ala Ser Gly Val Glu
1175 1180 1185
Asp Leu Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Ile Ser Val
1190 1195 1200

Ser Gly Val Glu Asp Ile Ser Ile Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro
1205 1210 1215
Glu Val Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Val Leu Pro Ser
1220 1225 1230
Gly Glu Gly His Leu Glu Ile Ser Thr Ser Gly Val Glu Asp Leu
1235 1240 1245
Ser Val Leu Pro Ser Gly Glu Gly His Leu Glu Thr Ser Ser Gly
1250 1255 1260
Val Glu Asp Ile Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Val
1265 1270 1275
Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Val Leu Pro Ser Gly Glu
1280 1285 1290
Asp His Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Gly Val
1295 1300 1305
Leu Pro Ser Gly Glu Asp His Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val
1310 1315 1320
Glu Asp Ile Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Val Ser
1325 1330 1335
Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Val Leu Pro Ser Gly Glu Gly
1340 1345 1350
His Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Arg Leu
1355 1360 1365
Pro Ser Gly Gly Glu Asp His Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val
1370 1375 1380
Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Arg Glu Gly Leu Glu Ile
1385 1390 1395
Ser Ala Ser Gly Ala Gly Asp Leu Ser Gly Leu Thr Ser Gly Lys
1400 1405 1410
Glu Asp Leu Thr Gly Ser Ala Ser Gly Ala Leu Asp Leu Gly Arg
1415 1420 1425
Ile Pro Ser Val Thr Leu Gly Ser Gly Gln Ala Pro Glu Ala Ser
1430 1435 1440

[0037]

Gly Leu Pro Ser Gly Phe Ser Gly Glu Tyr Ser Gly Val Asp Leu
1445 1450 1455
Glu Ser Gly Pro Ser Ser Gly Leu Pro Asp Phe Ser Gly Leu Pro
1460 1465 1470

Ser Gly Phe Pro Thr Val Ser Leu Val Asp Thr Thr Leu Val Glu
1475 1480 1485
Val Val Thr Ala Thr Thr Ala Gly Glu Leu Glu Gly Arg Gly Thr
1490 1495 1500
Ile Asp Ile Ser Gly Ala Gly Glu Thr Ser Gly Leu Pro Phe Ser
1505 1510 1515
Glu Leu Asp Ile Ser Gly Gly Ala Ser Gly Leu Ser Ser Gly Ala
1520 1525 1530
Glu Leu Ser Gly Gln Ala Ser Gly Ser Pro Asp Ile Ser Gly Glu
1535 1540 1545
Thr Ser Gly Leu Phe Gly Val Ser Gly Gln Pro Ser Gly Phe Pro
1550 1555 1560
Asp Ile Ser Gly Glu Thr Ser Gly Leu Leu Glu Val Ser Gly Gln
1565 1570 1575
Pro Ser Gly Phe Tyr Gly Glu Ile Ser Gly Val Thr Glu Leu Ser
1580 1585 1590
Gly Leu Ala Ser Gly Gln Pro Glu Ile Ser Gly Glu Ala Ser Gly
1595 1600 1605
Ile Leu Ser Gly Leu Gly Pro Pro Phe Gly Ile Thr Asp Leu Ser
1610 1615 1620
Gly Glu Ala Pro Gly Ile Pro Asp Leu Ser Gly Gln Pro Ser Gly
1625 1630 1635
Leu Pro Glu Phe Ser Gly Thr Ala Ser Gly Ile Pro Asp Leu Val
1640 1645 1650
Ser Ser Ala Val Ser Gly Ser Gly Glu Ser Ser Gly Ile Thr Phe
1655 1660 1665
Val Asp Thr Ser Leu Val Glu Val Thr Pro Thr Thr Phe Lys Glu
1670 1675 1680

Glu Glu Gly Leu Gly Ser Val Glu Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1685 1690 1695
Glu Leu Gly Val Ser Gly Thr Ser Gly Leu Ala Asp Val Ser Gly
1700 1705 1710
Leu Ser Ser Gly Ala Ile Asp Ser Ser Gly Phe Thr Ser Gln Pro
1715 1720 1725
Pro Glu Phe Ser Gly Leu Pro Ser Gly Val Thr Glu Val Ser Gly
1730 1735 1740
Glu Ala Ser Gly Ala Glu Ser Gly Ser Ser Leu Pro Ser Gly Ala
1745 1750 1755
Tyr Asp Ser Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro Thr Val Ser Phe
1760 1765 1770
Val Asp Arg Thr Leu Val Glu Ser Val Thr Gln Ala Pro Thr Ala
1775 1780 1785
Gln Glu Ala Gly Glu Gly Pro Ser Gly Ile Leu Glu Leu Ser Gly
1790 1795 1800
Ala Pro Ser Gly Ala Pro Asp Met Ser Gly Asp His Leu Gly Ser
1805 1810 1815
Leu Asp Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gly Leu Val Glu Pro Ser Gly
1820 1825 1830
Glu Pro Ala Ser Thr Pro Tyr Phe Ser Gly Asp Phe Ser Gly Thr
1835 1840 1845
Thr Asp Val Ser Gly Glu Ser Ser Ala Ala Thr Ser Thr Ser Gly
1850 1855 1860
Glu Ala Ser Gly Leu Pro Glu Val Thr Leu Ile Thr Ser Glu Leu
1865 1870 1875
Val Glu Gly Val Thr Glu Pro Thr Val Ser Gln Glu Leu Gly Gln
1880 1885 1890
Arg Pro Pro Val Thr Tyr Thr Pro Gln Leu Phe Glu Ser Ser Gly
1895 1900 1905
Glu Ala Ser Ala Ser Gly Asp Val Pro Arg Phe Pro Gly Ser Gly
1910 1915 1920

[0038]

Val Glu Val Ser Ser Val Pro Glu Ser Ser Gly Glu Thr Ser Ala
1925 1930 1935
Tyr Pro Glu Ala Glu Val Gly Ala Ser Ala Ala Pro Glu Ala Ser
1940 1945 1950
Gly Gly Ala Ser Gly Ser Pro Asn Leu Ser Glu Thr Thr Ser Thr
1955 1960 1965
Phe His Glu Ala Asp Leu Glu Gly Thr Ser Gly Leu Gly Val Ser
1970 1975 1980
Gly Ser Pro Ser Ala Phe Pro Glu Gly Pro Thr Glu Gly Leu Ala
1985 1990 1995
Thr Pro Glu Val Ser Gly Glu Ser Thr Thr Ala Phe Asp Val Ser
2000 2005 2010
Val Glu Ala Ser Gly Ser Pro Ser Ala Thr Pro Leu Ala Ser Gly
2015 2020 2025
Asp Arg Thr Asp Thr Ser Gly Asp Leu Ser Gly His Thr Ser Gly
2030 2035 2040
Leu Asp Ile Val Ile Ser Thr Thr Ile Pro Glu Ser Glu Trp Thr
2045 2050 2055
Gln Gln Thr Gln Arg Pro Ala Glu Ala Arg Leu Glu Ile Glu Ser
2060 2065 2070
Ser Ser Pro Val His Ser Gly Glu Glu Ser Gln Thr Ala Asp Thr
2075 2080 2085
Ala Thr Ser Pro Thr Asp Ala Ser Ile Pro Ala Ser Ala Gly Gly
2090 2095 2100
Thr Asp Asp Ser Glu Ala Thr Thr Thr Asp Ile Asp Glu Cys Leu
2105 2110 2115
Ser Ser Pro Cys Leu Asn Gly Ala Thr Cys Val Asp Ala Ile Asp
2120 2125 2130
Ser Phe Thr Cys Leu Cys Leu Pro Ser Tyr Gln Gly Asp Val Cys
2135 2140 2145
Glu Ile Gln Lys Leu Cys Glu Glu Gly Trp Thr Lys Phe Gln Gly
2150 2155 2160
His Cys Tyr Arg His Phe Pro Asp Arg Ala Thr Trp Val Asp Ala

2165 2170 2175
Glu Ser Gln Cys Arg Lys Gln Gln Ser His Leu Ser Ser Ile Val
2180 2185 2190
Thr Pro Glu Glu Gln Glu Phe Val Asn Asn Asn Ala Gln Asp Tyr
2195 2200 2205
Gln Trp Ile Gly Leu Asn Asp Lys Thr Ile Glu Gly Asp Phe Arg
2210 2215 2220
Trp Ser Asp Gly His Ser Leu Gln Phe Glu Asn Trp Arg Pro Asn
2225 2230 2235
Gln Pro Asp Asn Phe Phe Ala Thr Gly Glu Asp Cys Val Val Met
2240 2245 2250
Ile Trp His Glu Lys Gly Glu Trp Asn Asp Val Pro Cys Asn Tyr
2255 2260 2265
Gln Leu Pro Phe Thr Cys Lys Lys Gly Thr Val Ala Cys Gly Glu
2270 2275 2280
Pro Pro Val Val Glu His Ala Arg Ile Phe Gly Gln Lys Lys Asp
2285 2290 2295
Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Leu Val Arg Tyr Gln Cys Thr Glu Gly
2300 2305 2310
Phe Ile Gln Gly His Val Pro Thr Ile Arg Cys Gln Pro Ser Gly
2315 2320 2325
His Trp Glu Glu Pro Arg Ile Thr Cys Thr Asp Pro Ala Thr Tyr
2330 2335 2340
Lys Arg Arg Leu Gln Lys Arg Ser Ser Arg Pro Leu Arg Arg Ser
2345 2350 2355
His Pro Ser Thr Ala His
2360

<210> 128
<211> 2124
<212> PRT
<213> 褐家鼠(Rattus norvegicus)
<400> 128

[0039]
Met Thr Thr Leu Leu Leu Val Phe Val Thr Leu Arg Val Ile Ala Ala
1 5 10 15
Val Ile Ser Glu Glu Val Pro Asp His Asp Asn Ser Leu Ser Val Ser
20 25 30
Ile Pro Gln Pro Ser Pro Leu Lys Ala Leu Leu Gly Thr Ser Leu Thr
35 40 45
Ile Pro Cys Tyr Phe Ile Asp Pro Met His Pro Val Thr Thr Ala Pro
50 55 60
Ser Thr Ala Pro Leu Thr Pro Arg Ile Lys Trp Ser Arg Val Ser Lys
65 70 75 80
Glu Lys Glu Val Val Leu Leu Val Ala Thr Glu Gly Gln Val Arg Val
85 90 95
Asn Ser Ile Tyr Gln Asp Lys Val Ser Leu Pro Asn Tyr Pro Ala Ile
100 105 110
Pro Ser Asp Ala Thr Leu Glu Ile Gln Asn Leu Arg Ser Asn Asp Ser
115 120 125
Gly Ile Tyr Arg Cys Glu Val Met His Gly Ile Glu Asp Ser Glu Ala
130 135 140
Thr Leu Glu Val Ile Val Lys Gly Ile Val Phe His Tyr Arg Ala Ile
145 150 155 160
Ser Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Phe Asp Arg Ala Gln Arg Ala Cys Leu
165 170 175
Gln Asn Ser Ala Ile Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr
180 185 190
Glu Asp Gly Phe His Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gln Thr
195 200 205
Val Arg Tyr Pro Ile His Thr Pro Arg Glu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys
210 215 220
Asp Glu Phe Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Ile Arg Asp Thr Asn Glu
225 230 235 240
Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Ala Glu Glu Met Glu Gly Glu Val Phe
245 250 255
Tyr Ala Thr Ser Pro Glu Lys Phe Thr Phe Gln Glu Ala Ala Asn Glu

[0040]

```
                260                 265                 270
Cys Arg Thr Val Gly Ala Arg Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Leu
            275                 280                 285
Ala Trp Gln Gly Gly Met Asp Met Cys Ser Ala Gly Trp Leu Ala Asp
    290                 295                 300
Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly
305                 310                 315                 320
Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu His Ala Asn Gln Thr Gly
                325                 330                 335
Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu
            340                 345                 350
Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu
        355                 360                 365
Asp Ile Thr Ile Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Leu Glu Leu Pro Leu
    370                 375                 380
Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Asn Val Ile Leu Thr
385                 390                 395                 400
Ala Lys Pro Ile Phe Asp Met Ser Pro Thr Val Ser Glu Pro Gly Glu
                405                 410                 415
Ala Leu Thr Leu Ala Pro Glu Val Gly Thr Thr Val Phe Pro Glu Ala
            420                 425                 430
Gly Glu Arg Thr Glu Lys Thr Thr Arg Pro Trp Gly Phe Pro Glu Glu
        435                 440                 445
Ala Thr Arg Gly Pro Asp Ser Ala Thr Ala Phe Ala Ser Glu Asp Leu
    450                 455                 460
Val Val Arg Val Thr Ile Ser Pro Gly Ala Val Glu Val Pro Gly Gln
465                 470                 475                 480
Pro Arg Leu Pro Gly Gly Val Val Phe His Tyr Arg Pro Gly Ser Thr
                485                 490                 495
Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala Gln Gln Ala Cys Ile Arg Thr
            500                 505                 510
Gly Ala Ala Ile Ala Ser Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala
        515                 520                 525
Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Gln Asp Gln Thr Val Arg
    530                 535                 540
Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser
545                 550                 555                 560
Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val Arg Pro Ser Ser Glu Thr Tyr
                565                 570                 575
Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp Lys Leu Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala
            580                 585                 590
Thr Gln Met Glu Gln Phe Thr Phe Gln Glu Ala Gln Ala Phe Cys Ala
        595                 600                 605
Ala Gln Asn Ala Thr Leu Ala Ser Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp
    610                 615                 620
Ser Gln Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gly Thr
625                 630                 635                 640
Leu Arg Tyr Pro Ile Val Asn Pro Arg Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys
                645                 650                 655
Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr Pro Asn Gln Thr Gly Leu Pro
            660                 665                 670
Asp Pro Leu Ser Lys His His Ala Phe Cys Phe Arg Gly Val Ser Val
        675                 680                 685
Val Pro Ser Pro Gly Gly Thr Pro Thr Ser Pro Ser Asp Ile Glu Asp
    690                 695                 700
Trp Ile Val Thr Arg Val Glu Pro Gly Val Asp Ala Val Pro Leu Glu
705                 710                 715                 720
Pro Glu Thr Thr Glu Val Pro Tyr Phe Thr Thr Glu Pro Glu Lys Gln
                725                 730                 735
Thr Glu Trp Glu Pro Ala Tyr Thr Pro Val Gly Thr Ser Pro Leu Pro
            740                 745                 750
Gly Ile Pro Pro Thr Trp Leu Pro Thr Val Pro Ala Ala Glu Glu His
        755                 760                 765
Thr Glu Ser Pro Ser Ala Ser Gln Glu Pro Ser Ala Ser Gln Val Pro
    770                 775                 780
```

```
Ser Thr Ser Glu Glu Pro Tyr Thr Pro Ser Leu Ala Val Pro Ser Gly
785                 790                 795                 800
Thr Glu Leu Pro Ser Ser Gly Asp Thr Ser Gly Ala Pro Asp Leu Ser
                805                 810                 815
Gly Asp Phe Thr Gly Ser Thr Asp Thr Ser Gly Arg Leu Asp Ser Ser
            820                 825                 830
Gly Glu Pro Ser Gly Gly Ser Glu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Asp Leu
        835                 840                 845
Asp Ser Ser Gly Leu Gly Pro Thr Val Ser Ser Gly Leu Pro Val Glu
    850                 855                 860
Ser Gly Ser Ala Ser Gly Asp Gly Glu Ile Pro Trp Ser Ser Thr Pro
865                 870                 875                 880
Thr Val Asp Arg Leu Pro Ser Gly Gly Glu Ser Leu Glu Gly Ser Ala
                885                 890                 895
Ser Ala Ser Gly Thr Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Gly Glu
            900                 905                 910
Ile Thr Glu Thr Ser Ala Ser Gly Thr Glu Glu Ile Ser Gly Leu Pro
        915                 920                 925
Ser Gly Gly Asp Asp Leu Glu Thr Ser Thr Ser Gly Ile Asp Gly Ala
    930                 935                 940
Ser Val Leu Pro Thr Gly Arg Gly Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly
945                 950                 955                 960
Val Glu Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Glu Gly Ser Glu Thr
                965                 970                 975
Ser Thr Ser Gly Ile Glu Asp Ile Ser Val Leu Pro Thr Gly Glu Ser
            980                 985                 990
Pro Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val  Gly Asp Leu Ser Gly  Leu Pro Ser
        995                 1000                1005
Gly Gly  Glu Ser Leu Glu Thr  Ser Ala Ser Gly Val  Glu Asp Val
    1010                1015                1020
Thr Gln  Leu Pro Thr Glu Arg  Gly Gly Leu Glu Thr  Ser Ala Ser
    1025                1030                1035
Gly Ile  Glu Asp Ile Thr Val  Leu Pro Thr Gly Arg  Glu Asn Leu
    1040                1045                1050
Glu Thr  Ser Ala Ser Gly Val  Glu Asp Val Ser Gly  Leu Pro Ser
    1055                1060                1065
Gly Lys  Glu Gly Leu Glu Thr  Ser Ala Ser Gly Ile  Glu Asp Ile
    1070                1075                1080
Ser Val  Phe Pro Thr Glu Ala  Glu Gly Leu Glu Thr  Ser Ala Ser
    1085                1090                1095
Gly Gly  Tyr Val Ser Gly Ile  Pro Ser Gly Glu Asp  Gly Thr Glu
    1100                1105                1110
Thr Ser  Thr Ser Gly Val Glu  Gly Val Ser Gly Leu  Pro Ser Gly
    1115                1120                1125
Gly Glu  Gly Leu Glu Thr Ser  Ala Ser Gly Val Glu  Asp Leu Gly
    1130                1135                1140
Leu Pro  Thr Arg Asp Ser Leu  Glu Thr Ser Ala Ser  Gly Val Asp
    1145                1150                1155
Val Thr  Gly Tyr Pro Ser Gly  Arg Glu Asp Thr Glu  Thr Ser Val
    1160                1165                1170
Pro Gly  Val Gly Asp Asp Leu  Ser Gly Leu Pro Ser  Gly Gln Glu
    1175                1180                1185
Gly Leu  Glu Thr Ser Ala Ser  Gly Ala Glu Asp Leu  Gly Gly Leu
    1190                1195                1200
Pro Ser  Gly Lys Glu Asp Leu  Val Gly Ser Ala Ser  Gly Ala Leu
    1205                1210                1215
Asp Phe  Gly Lys Leu Pro Ser  Gly Thr Leu Gly Ser  Gly Gln Thr
    1220                1225                1230
Pro Glu  Ala Ser Gly Leu Pro  Ser Gly Phe Ser Gly  Glu Tyr Ser
    1235                1240                1245
Gly Val  Asp Ile Gly Ser Gly  Pro Ser Ser Gly Leu  Pro Asp Phe
    1250                1255                1260
Ser Gly  Leu Pro Ser Gly Phe  Pro Thr Val Ser Leu  Val Asp Ser
    1265                1270                1275
Thr Leu  Val Glu Val Ile Thr  Ala Thr Thr Ala Ser  Glu Leu Glu
```

[0041]

[0042]

1280 1285 1290
Gly Arg Gly Thr Ile Ser Val Ser Gly Ser Gly Glu Glu Ser Gly
1295 1300 1305
Pro Pro Leu Ser Glu Leu Asp Ser Ser Ala Asp Ile Ser Gly Leu
1310 1315 1320
Pro Ser Gly Thr Glu Leu Ser Gly Gln Thr Ser Gly Ser Leu Asp
1325 1330 1335
Val Ser Gly Glu Thr Ser Gly Phe Phe Asp Val Ser Gly Gln Pro
1340 1345 1350
Phe Gly Ser Ser Gly Thr Gly Glu Gly Thr Ser Gly Ile Pro Glu
1355 1360 1365
Val Ser Gly Gln Ala Val Arg Ser Pro Asp Thr Thr Glu Ile Ser
1370 1375 1380
Glu Leu Ser Gly Leu Ser Ser Gly Gln Pro Asp Val Ser Gly Glu
1385 1390 1395
Gly Ser Gly Ile Leu Phe Gly Ser Gly Gln Ser Ser Gly Ile Thr
1400 1405 1410
Ser Val Ser Gly Glu Thr Ser Gly Ile Ser Asp Leu Ser Gly Gln
1415 1420 1425
Pro Ser Gly Phe Pro Val Leu Ser Gly Thr Thr Pro Gly Thr Pro
1430 1435 1440
Asp Leu Ala Ser Gly Ala Met Ser Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gly
1445 1450 1455
Ile Thr Phe Val Asp Thr Ser Leu Ile Glu Val Thr Pro Thr Thr
1460 1465 1470
Phe Arg Glu Glu Glu Gly Leu Gly Ser Val Glu Leu Ser Gly Leu
1475 1480 1485
Pro Ser Gly Glu Thr Asp Leu Ser Gly Thr Ser Gly Met Val Asp
1490 1495 1500
Val Ser Gly Gln Ser Ser Gly Ala Ile Asp Ser Ser Gly Leu Ile
1505 1510 1515
Ser Pro Thr Pro Glu Phe Ser Gly Leu Pro Ser Gly Val Ala Glu
1520 1525 1530
Val Ser Gly Glu Val Ser Gly Val Glu Thr Gly Ser Ser Leu Ser
1535 1540 1545
Ser Gly Ala Phe Asp Gly Ser Gly Leu Val Ser Gly Phe Pro Thr
1550 1555 1560
Val Ser Leu Val Asp Arg Thr Leu Val Glu Ser Ile Thr Leu Ala
1565 1570 1575
Pro Thr Ala Gln Glu Ala Gly Glu Gly Pro Ser Ser Ile Leu Glu
1580 1585 1590
Phe Ser Gly Ala His Ser Gly Thr Pro Asp Ile Ser Gly Asp Leu
1595 1600 1605
Ser Gly Ser Leu Asp Gln Ser Thr Trp Gln Pro Gly Trp Thr Glu
1610 1615 1620
Ala Ser Thr Glu Pro Pro Ser Ser Pro Tyr Phe Ser Gly Asp Phe
1625 1630 1635
Ser Ser Thr Thr Asp Ala Ser Gly Glu Ser Ile Thr Ala Pro Thr
1640 1645 1650
Gly Ser Gly Glu Thr Ser Gly Leu Pro Glu Val Thr Leu Ile Thr
1655 1660 1665
Ser Glu Leu Val Glu Gly Val Thr Glu Pro Thr Val Ser Gln Glu
1670 1675 1680
Leu Gly His Gly Pro Ser Met Thr Tyr Thr Pro Arg Leu Phe Glu
1685 1690 1695
Ala Ser Gly Glu Ala Ser Ala Ser Gly Asp Leu Gly Gly Pro Val
1700 1705 1710
Thr Ile Phe Pro Gly Ser Gly Val Glu Ala Ser Val Pro Glu Gly
1715 1720 1725
Ser Ser Asp Pro Ser Ala Tyr Pro Glu Ala Gly Val Gly Val Ser
1730 1735 1740
Ala Ala Pro Glu Ala Ser Ser Gln Leu Ser Glu Phe Pro Asp Leu
1745 1750 1755
His Gly Ile Thr Ser Ala Ser Arg Glu Thr Asp Leu Glu Met Thr
1760 1765 1770

Thr Pro Gly Thr Glu Val Ser Ser Asn Pro Trp Thr Phe Gln Glu
1775 1780 1785
Gly Thr Arg Glu Gly Ser Ala Ala Pro Glu Val Ser Gly Glu Ser
1790 1795 1800
Ser Thr Thr Ser Asp Ile Asp Ala Gly Thr Ser Gly Val Pro Phe
1805 1810 1815
Ala Thr Pro Met Thr Ser Gly Asp Arg Thr Glu Ile Ser Gly Glu
1820 1825 1830
Trp Ser Asp His Thr Ser Glu Val Asn Val Thr Val Ser Thr Thr
1835 1840 1845
Val Pro Glu Ser Arg Trp Ala Gln Ser Thr Gln His Pro Thr Glu
1850 1855 1860
Thr Leu Gln Glu Ile Gly Ser Pro Asn Pro Ser Tyr Ser Gly Glu
1865 1870 1875
Glu Thr Gln Thr Ala Glu Thr Ala Lys Ser Leu Thr Asp Thr Pro
1880 1885 1890
Thr Leu Ala Ser Pro Glu Gly Ser Gly Glu Thr Glu Ser Thr Ala
1895 1900 1905
Ala Asp Gln Glu Gln Cys Glu Glu Gly Trp Thr Lys Phe Gln Gly
1910 1915 1920
His Cys Tyr Arg His Phe Pro Asp Arg Glu Thr Trp Val Asp Ala
1925 1930 1935
Glu Arg Arg Cys Arg Glu Gln Gln Ser His Leu Ser Ser Ile Val
1940 1945 1950
Thr Pro Glu Glu Gln Glu Phe Val Asn Lys Asn Ala Gln Asp Tyr
1955 1960 1965
Gln Trp Ile Gly Leu Asn Asp Arg Thr Ile Glu Gly Asp Phe Arg
1970 1975 1980
Trp Ser Asp Gly His Ser Leu Gln Phe Glu Lys Trp Arg Pro Asn
1985 1990 1995
Gln Pro Asp Asn Phe Phe Ala Thr Gly Glu Asp Cys Val Val Met
2000 2005 2010

[0043] Ile Trp His Glu Arg Gly Glu Trp Asn Asp Val Pro Cys Asn Tyr
2015 2020 2025
Gln Leu Pro Phe Thr Cys Lys Lys Gly Thr Val Ala Cys Gly Glu
2030 2035 2040
Pro Pro Ala Val Glu His Ala Arg Thr Leu Gly Gln Lys Lys Asp
2045 2050 2055
Arg Tyr Glu Ile Ser Ser Leu Val Arg Tyr Gln Cys Thr Glu Gly
2060 2065 2070
Phe Val Gln Arg His Val Pro Thr Ile Arg Cys Gln Pro Ser Ala
2075 2080 2085
Asp Trp Glu Glu Pro Arg Ile Thr Cys Thr Asp Pro Asn Thr Tyr
2090 2095 2100
Lys His Arg Leu Gln Lys Arg Thr Met Arg Pro Thr Arg Arg Ser
2105 2110 2115
Arg Pro Ser Met Ala His
2120

<210> 129
<211> 537
<212> PRT
<213> 野猪(Sus scrofa)
<220>
<221> VARIANT
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> VARIANT
<222> (49)..(49)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<220>
<221> VARIANT
<222> (146)..(146)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<400> 129

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

[0044] Cys Arg Arg Leu Gly Ala Arg Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Leu
260 265 270
Ala Trp Arg Gly Gly Met Asp Met Cys Ser Ala Gly Trp Leu Ala Asp
275 280 285
Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly
290 295 300
Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu His Ala Asn Gln Thr Gly
305 310 315 320
Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu
325 330 335
Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu
340 345 350
Asp Ile Thr Ile Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Val Glu Leu Pro Leu
355 360 365
Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Thr Val Ile Leu Thr
370 375 380
Val Lys Pro Val Phe Glu Phe Ser Pro Thr Ala Pro Glu Pro Glu Glu
385 390 395 400
Pro Phe Thr Phe Ala Pro Gly Thr Gly Ala Thr Ala Phe Pro Glu Ala
405 410 415
Glu Asn Arg Thr Gly Glu Ala Thr Arg Pro Trp Ala Phe Pro Glu Glu
420 425 430
Ser Thr Pro Gly Leu Gly Ala Pro Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu
435 440 445
Val Val Gln Val Thr Ser Ala Ala Thr Glu Glu Gly Thr Glu Gly Pro
450 455 460
Ser Ala Thr Glu Ala Pro Ser Thr Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Glu
465 470 475 480
Lys Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro
485 490 495
Ser Glu Lys Pro Ser Ala Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Glu Gln Pro
500 505 510
Ser Thr Leu Ser Ala Pro Val Pro Ser Arg Thr Glu Leu Pro Gly Ser

515 520 525

Gly Glu Val Ser Gly Ala Pro Glu Val
530 535

<210> 130
<211> 2132
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 130

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

[0045] Glu Asp Gly Phe His Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gln Thr
195 200 205
Val Arg Tyr Pro Ile His Thr Pro Arg Glu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys
210 215 220
Asp Glu Phe Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Ile Arg Asp Thr Asn Glu
225 230 235 240
Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Ala Glu Glu Met Glu Gly Glu Val Phe
245 250 255
Tyr Ala Thr Ser Pro Glu Lys Phe Thr Phe Gln Glu Ala Ala Asn Glu
260 265 270
Cys Arg Arg Leu Gly Ala Arg Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Leu
275 280 285

Ala Trp Gln Gly Gly Met Asp Met Cys Ser Ala Gly Trp Leu Ala Asp
290 295 300
Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly
305 310 315 320
Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu His Ala Asn Gln Thr Gly
325 330 335
Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu
340 345 350
Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Asp
355 360 365
Asp Ile Thr Ile Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Leu Glu Leu Pro Leu
370 375 380
Pro Arg Asn Val Thr Glu Gly Glu Ala Leu Gly Ser Val Ile Leu Thr
385 390 395 400
Ala Lys Pro Ile Phe Asp Leu Ser Pro Thr Ile Ser Glu Pro Gly Glu
405 410 415
Ala Leu Thr Leu Ala Pro Glu Val Gly Ser Thr Ala Phe Pro Glu Ala
420 425 430
Glu Glu Arg Thr Gly Glu Ala Thr Arg Pro Trp Gly Phe Pro Ala Glu
435 440 445

Val Thr Arg Gly Pro Asp Ser Ala Thr Ala Phe Ala Ser Glu Asp Leu
450 455 460
Val Val Arg Val Thr Ile Ser Pro Gly Ala Ala Glu Val Pro Gly Gln
465 470 475 480
Pro Arg Leu Pro Gly Gly Val Val Phe His Tyr Arg Pro Gly Ser Thr
485 490 495
Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala Gln Gln Ala Cys Met His Thr
500 505 510
Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala
515 520 525
Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Gln Asp Gln Thr Val Arg
530 535 540
Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser
545 550 555 560
Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val Arg Pro Ser Ser Glu Thr Tyr
565 570 575
Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp Lys Leu Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala
580 585 590
Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr Phe Gln Glu Ala Arg Ala Phe Cys Ala
595 600 605
Ala Gln Asn Ala Thr Leu Ala Ser Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp
610 615 620
Ser Gln Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gly Thr
625 630 635 640
Leu Arg Tyr Pro Ile Ile Thr Pro Arg Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys
645 650 655
Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr Pro Asn Gln Thr Gly Leu Pro
660 665 670
Asp Pro Leu Ser Lys His His Ala Phe Cys Phe Arg Gly Val Ser Val
675 680 685
Ala Pro Ser Pro Gly Glu Glu Gly Gly Ser Thr Pro Thr Ser Pro Ser
690 695 700

[0046]

Asp Ile Glu Asp Trp Ile Val Thr Gln Val Gly Pro Gly Val Asp Ala
705 710 715 720
Val Pro Leu Glu Pro Lys Thr Thr Glu Val Pro Tyr Phe Thr Thr Glu
725 730 735
Pro Arg Lys Gln Thr Glu Trp Glu Pro Ala Tyr Thr Pro Val Gly Thr
740 745 750
Ser Pro Gln Pro Gly Ile Pro Pro Thr Trp Leu Pro Thr Leu Pro Ala
755 760 765
Ala Glu Glu His Thr Glu Ser Pro Ser Ala Ser Glu Glu Pro Ser Ala
770 775 780
Ser Ala Val Pro Ser Thr Ser Glu Glu Pro Tyr Thr Ser Ser Phe Ala
785 790 795 800

Val Pro Ser Met Thr Glu Leu Pro Gly Ser Gly Glu Ala Ser Gly Ala
805 810 815
Pro Asp Leu Ser Gly Asp Phe Thr Gly Ser Gly Asp Ala Ser Gly Arg
820 825 830
Leu Asp Ser Ser Gly Gln Pro Ser Gly Gly Ile Glu Ser Gly Leu Pro
835 840 845
Ser Gly Asp Leu Asp Ser Ser Gly Leu Ser Pro Thr Val Ser Ser Gly
850 855 860
Leu Pro Val Glu Ser Gly Ser Ala Ser Gly Asp Gly Glu Val Pro Trp
865 870 875 880
Ser His Thr Pro Thr Val Gly Arg Leu Pro Ser Gly Gly Glu Ser Pro
885 890 895
Glu Gly Ser Ala Ser Ala Ser Gly Thr Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro
900 905 910
Ser Gly Gly Glu Ile Thr Glu Thr Ser Thr Ser Gly Ala Glu Glu Thr
915 920 925
Ser Gly Leu Pro Ser Gly Gly Asp Gly Leu Glu Thr Ser Thr Ser Gly
930 935 940
Val Asp Asp Val Ser Gly Ile Pro Thr Gly Arg Glu Gly Leu Glu Thr
945 950 955 960

Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Glu
965 970 975
Gly Ser Glu Thr Ser Thr Ser Gly Ile Glu Asp Ile Ser Val Leu Pro
980 985 990
Thr Gly Gly Glu Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu
995 1000 1005
Ser Gly Leu Pro Ser Gly Gly Glu Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
1010 1015 1020
Gly Ala Glu Asp Val Thr Gln Leu Pro Thr Glu Arg Gly Gly Leu
1025 1030 1035
Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Ile Thr Val Leu Pro Thr
1040 1045 1050
Gly Arg Glu Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Val
1055 1060 1065
Ser Gly Leu Pro Ser Gly Arg Glu Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser
1070 1075 1080
Gly Ile Glu Asp Ile Ser Val Phe Pro Thr Glu Ala Glu Gly Leu
1085 1090 1095
Asp Thr Ser Ala Ser Gly Gly Tyr Val Ser Gly Ile Pro Ser Gly
1100 1105 1110
Gly Asp Gly Thr Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Val Ser
1115 1120 1125
Gly Leu Pro Ser Gly Gly Glu Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly
1130 1135 1140
Val Glu Asp Leu Gly Pro Ser Thr Arg Asp Ser Leu Glu Thr Ser
1145 1150 1155
Ala Ser Gly Val Asp Val Thr Gly Phe Pro Ser Gly Arg Gly Asp
1160 1165 1170
Pro Glu Thr Ser Val Ser Gly Val Gly Asp Asp Phe Ser Gly Leu
1175 1180 1185
Pro Ser Gly Lys Glu Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Ala Glu
1190 1195 1200
[0047] Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Lys Glu Asp Leu Val Gly Ser
1205 1210 1215
Ala Ser Gly Ala Leu Asp Phe Gly Lys Leu Pro Pro Gly Thr Leu
1220 1225 1230
Gly Ser Gly Gln Thr Pro Glu Val Asn Gly Phe Pro Ser Gly Phe
1235 1240 1245
Ser Gly Glu Tyr Ser Gly Ala Asp Ile Gly Ser Gly Pro Ser Ser
1250 1255 1260
Gly Leu Pro Asp Phe Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro Thr Val
1265 1270 1275
Ser Leu Val Asp Ser Thr Leu Val Glu Val Ile Thr Ala Thr Thr
1280 1285 1290
Ser Ser Glu Leu Glu Gly Arg Gly Thr Ile Gly Ile Ser Gly Ser
1295 1300 1305
Gly Glu Val Ser Gly Leu Pro Leu Gly Glu Leu Asp Ser Ser Ala
1310 1315 1320
Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Thr Glu Leu Ser Gly Gln Ala
1325 1330 1335
Ser Gly Ser Pro Asp Ser Ser Gly Glu Thr Ser Gly Phe Phe Asp
1340 1345 1350
Val Ser Gly Gln Pro Phe Gly Ser Ser Gly Val Ser Glu Glu Thr
1355 1360 1365
Ser Gly Ile Pro Glu Ile Ser Gly Gln Pro Ser Gly Thr Pro Asp
1370 1375 1380
Thr Thr Ala Thr Ser Gly Val Thr Glu Leu Asn Glu Leu Ser Ser
1385 1390 1395
Gly Gln Pro Asp Val Ser Gly Asp Gly Ser Gly Ile Leu Phe Gly
1400 1405 1410
Ser Gly Gln Ser Ser Gly Ile Thr Ser Val Ser Gly Glu Thr Ser
1415 1420 1425
Gly Ile Ser Asp Leu Ser Gly Gln Pro Ser Gly Phe Pro Val Phe
1430 1435 1440
Ser Gly Thr Ala Thr Arg Thr Pro Asp Leu Ala Ser Gly Thr Ile

1445 1450 1455
Ser Gly Ser Gly Glu Ser Ser Gly Ile Thr Phe Val Asp Thr Ser
1460 1465 1470
Phe Val Glu Val Thr Pro Thr Thr Phe Arg Glu Glu Glu Gly Leu
1475 1480 1485
Gly Ser Val Glu Leu Ser Gly Phe Pro Ser Gly Glu Thr Glu Leu
1490 1495 1500
Ser Gly Thr Ser Gly Thr Val Asp Val Ser Glu Gln Ser Ser Gly
1505 1510 1515
Ala Ile Asp Ser Ser Gly Leu Thr Ser Pro Thr Pro Glu Phe Ser
1520 1525 1530
Gly Leu Pro Ser Gly Val Ala Glu Val Ser Gly Glu Phe Ser Gly
1535 1540 1545
Val Glu Thr Gly Ser Ser Leu Pro Ser Gly Ala Phe Asp Gly Ser
1550 1555 1560
Gly Leu Val Ser Gly Phe Pro Thr Val Ser Leu Val Asp Arg Thr
1565 1570 1575
Leu Val Glu Ser Ile Thr Gln Ala Pro Thr Ala Gln Glu Ala Gly
1580 1585 1590
Glu Gly Pro Ser Gly Ile Leu Glu Phe Ser Gly Ala His Ser Gly
1595 1600 1605
Thr Pro Asp Ile Ser Gly Glu Leu Ser Gly Ser Leu Asp Leu Ser
1610 1615 1620
Thr Leu Gln Ser Gly Gln Met Glu Thr Ser Thr Glu Thr Pro Ser
1625 1630 1635
Ser Pro Tyr Phe Ser Gly Asp Phe Ser Ser Thr Thr Asp Val Ser
1640 1645 1650
Gly Glu Ser Ile Ala Ala Thr Thr Gly Ser Gly Glu Ser Ser Gly
1655 1660 1665
Leu Pro Glu Val Thr Leu Asn Thr Ser Glu Leu Val Glu Gly Val
1670 1675 1680
Thr Glu Pro Thr Val Ser Gln Glu Leu Gly His Gly Pro Ser Met
[0048] 1685 1690 1695

Thr Tyr Thr Pro Arg Leu Phe Glu Ala Ser Gly Asp Ala Ser Ala
1700 1705 1710
Ser Gly Asp Leu Gly Gly Ala Val Thr Asn Phe Pro Gly Ser Gly
1715 1720 1725
Ile Glu Ala Ser Val Pro Glu Ala Ser Ser Asp Leu Ser Ala Tyr
1730 1735 1740
Pro Glu Ala Gly Val Gly Val Ser Ala Ala Pro Glu Ala Ser Ser
1745 1750 1755
Lys Leu Ser Glu Phe Pro Asp Leu His Gly Ile Thr Ser Ala Phe
1760 1765 1770
His Glu Thr Asp Leu Glu Met Thr Thr Pro Ser Thr Glu Val Asn
1775 1780 1785
Ser Asn Pro Trp Thr Phe Gln Glu Gly Thr Arg Glu Gly Ser Ala
1790 1795 1800
Ala Pro Glu Val Ser Gly Glu Ser Ser Thr Thr Ser Asp Ile Asp
1805 1810 1815
Thr Gly Thr Ser Gly Val Pro Ser Ala Thr Pro Met Ala Ser Gly
1820 1825 1830
Asp Arg Thr Glu Ile Ser Gly Glu Trp Ser Asp His Thr Ser Glu
1835 1840 1845
Val Asn Val Ala Ile Ser Ser Thr Ile Thr Glu Ser Glu Trp Ala
1850 1855 1860
Gln Pro Thr Arg Tyr Pro Thr Glu Thr Leu Gln Glu Ile Glu Ser
1865 1870 1875
Pro Asn Pro Ser Tyr Ser Gly Glu Glu Thr Gln Thr Ala Glu Thr
1880 1885 1890
Thr Met Ser Leu Thr Asp Ala Pro Thr Leu Ser Ser Ser Glu Gly
1895 1900 1905
Ser Gly Glu Thr Glu Ser Thr Val Ala Asp Gln Glu Gln Cys Glu
1910 1915 1920
Glu Gly Trp Thr Lys Phe Gln Gly His Cys Tyr Arg His Phe His

1925 1930 1935
Asp Arg Glu Thr Trp Val Asp Ala Glu Arg Arg Cys Arg Glu Gln
1940 1945 1950
Gln Ser His Leu Ser Ser Ile Val Thr Pro Glu Glu Gln Glu Phe
1955 1960 1965
Val Asn Lys Asn Ala Gln Asp Tyr Gln Trp Ile Gly Leu Asn Asp
1970 1975 1980
Arg Thr Ile Glu Gly Asp Phe Arg Trp Ser Asp Gly His Ser Leu
1985 1990 1995
Gln Phe Glu Lys Trp Arg Pro Asn Gln Pro Asp Asn Phe Phe Ala
2000 2005 2010
Thr Gly Glu Asp Cys Val Val Met Ile Trp His Glu Arg Gly Glu
2015 2020 2025
Trp Asn Asp Val Pro Cys Asn Tyr Gln Leu Pro Phe Thr Cys Lys
2030 2035 2040
Lys Gly Thr Val Ala Cys Gly Asp Pro Pro Val Val Glu His Ala
2045 2050 2055
Arg Thr Leu Gly Gln Lys Lys Asp Arg Tyr Glu Ile Ser Ser Leu
2060 2065 2070
Val Arg Tyr Gln Cys Thr Glu Gly Phe Val Gln Arg His Val Pro
2075 2080 2085
Thr Ile Arg Cys Gln Pro Ser Gly His Trp Glu Glu Pro Arg Ile
2090 2095 2100
Thr Cys Thr Asp Pro Asn Thr Tyr Lys His Arg Leu Gln Lys Arg
2105 2110 2115
Ser Met Arg Pro Thr Arg Arg Ser Arg Pro Ser Met Ala His
2120 2125 2130

<210> 131
<211> 2167
<212> PRT
<213> 家兔(Oryctolagus cuniculus)
<400> 131

[0049]
Met Thr Thr Leu Leu Leu Val Leu Val Ala Leu Arg Val Ile Ala Ala
1 5 10 15
Ala Ile Ser Gly Asp Val Ser Asp Leu Asp Asn Ala Leu Ser Val Ser
20 25 30
Ile Pro Gln Pro Ser Pro Val Arg Ala Leu Leu Gly Thr Ser Leu Thr
35 40 45
Ile Pro Cys Tyr Phe Ile Asp Pro Val His Pro Val Thr Thr Ala Pro
50 55 60
Ser Thr Ala Pro Leu Thr Pro Arg Ile Lys Trp Ser Arg Ile Ser Lys
65 70 75 80
Asp Lys Glu Val Val Leu Leu Val Ala Asn Glu Gly Arg Val Arg Ile
85 90 95
Asn Ser Ala Tyr Gln Asp Lys Val Ser Leu Pro Asn Tyr Pro Ala Ile
100 105 110
Pro Ser Asp Ala Thr Leu Glu Ile Gln Ser Leu Arg Ser Asn Asp Ser
115 120 125
Gly Ile Tyr Arg Cys Glu Val Met His Gly Leu Glu Asp Ser Glu Ala
130 135 140
Thr Leu Glu Val Val Val Lys Gly Val Val Phe His Tyr Arg Ala Ile
145 150 155 160
Ser Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Phe Asp Arg Ala Gln Arg Ala Cys Leu
165 170 175
Gln Asn Ser Ala Ile Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr
180 185 190
Glu Asp Gly Phe His Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gln Thr
195 200 205
Val Arg Tyr Pro Ile His Thr Pro Arg Glu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys
210 215 220
Asp Glu Phe Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Ile Arg Asp Thr Asn Glu
225 230 235 240
Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Ala Glu Glu Met Glu Gly Glu Val Phe
245 250 255
Tyr Ala Thr Ser Pro Glu Lys Phe Thr Phe Gln Glu Ala Ala Ser Glu

[0050]

```
                260                 265                 270
Cys Arg Arg Leu Gly Ala Arg Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Leu
            275                 280                 285
Ala Trp Gln Ala Gly Met Asp Met Cys Ser Ala Gly Trp Leu Ala Asp
        290                 295                 300
Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly
305                 310                 315                 320
Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Val His Ala Asn Gln Thr Gly
                325                 330                 335
Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu
            340                 345                 350
Asp Phe Met Asp Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu
        355                 360                 365
Asp Ile Thr Val Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Val Glu Leu Pro Val
    370                 375                 380
Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val Val Leu Thr
385                 390                 395                 400
Ala Lys Pro Val Leu Asp Val Ser Pro Thr Ala Pro Gln Pro Glu Glu
                405                 410                 415
Thr Phe Ala Pro Gly Val Gly Ala Thr Ala Phe Pro Gly Val Glu Asn
            420                 425                 430
Gly Thr Glu Glu Ala Thr Arg Pro Arg Gly Phe Ala Asp Glu Ala Thr
        435                 440                 445
Leu Gly Pro Ser Ser Ala Thr Ala Phe Thr Ser Ala Asp Leu Val Val
    450                 455                 460
Gln Val Thr Ala Ala Pro Gly Val Ala Glu Val Pro Gly Gln Pro Arg
465                 470                 475                 480
Leu Pro Gly Gly Val Val Phe His Tyr Arg Pro Gly Pro Thr Arg Tyr
                485                 490                 495
Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala Gln Gln Ala Cys Leu Arg Thr Gly Ala
            500                 505                 510
Ala Met Ala Ser Ala Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala Gly Tyr
        515                 520                 525
Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Gln Asp Gln Thr Val Arg Tyr Pro
    530                 535                 540
Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser Ser Pro
545                 550                 555                 560
Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val Arg Pro Pro Ser Glu Thr Tyr Asp Val
                565                 570                 575
Tyr Cys Tyr Val Asp Arg Leu Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala Thr Arg
            580                 585                 590
Leu Glu Gln Phe Thr Phe Gln Glu Ala Leu Glu Phe Cys Glu Ser His
        595                 600                 605
Asn Ala Thr Leu Ala Ser Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp Ser Arg
    610                 615                 620
Gly Leu Asp Arg Cys Tyr Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser Leu Arg
625                 630                 635                 640
Tyr Pro Ile Val Thr Pro Arg Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys Pro Gly
                645                 650                 655
Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr Pro Asn Gln Thr Gly Leu Pro Asp Pro
            660                 665                 670
Leu Ser Arg His His Ala Phe Cys Phe Arg Gly Thr Ser Glu Ala Pro
        675                 680                 685
Ser Pro Gly Pro Glu Glu Gly Gly Thr Ala Thr Pro Ala Ser Gly Leu
    690                 695                 700
Glu Asp Trp Ile Val Thr Gln Val Gly Pro Gly Val Ala Ala Thr Pro
705                 710                 715                 720
Arg Ala Glu Glu Arg Thr Ala Val Pro Ser Phe Ala Thr Glu Pro Gly
                725                 730                 735
Asn Gln Thr Gly Trp Glu Ala Ala Ser Ser Pro Val Gly Thr Ser Leu
            740                 745                 750
Leu Pro Gly Ile Pro Pro Thr Trp Pro Pro Thr Gly Thr Ala Ala Glu
        755                 760                 765
Gly Thr Thr Glu Gly Leu Ser Thr Ala Ala Met Pro Ser Ala Ser Glu
    770                 775                 780
```

Gly Pro Tyr Thr Pro Ser Ser Leu Val Ala Arg Glu Thr Glu Leu Pro
785 790 795 800
Gly Leu Gly Val Thr Ser Val Pro Pro Asp Ile Ser Gly Asp Leu Thr
805 810 815
Ser Ser Gly Glu Ala Ser Gly Leu Phe Gly Pro Thr Gly Gln Pro Leu
820 825 830
Gly Gly Ser Ala Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Leu Asp Ser Gly Ser
835 840 845
Leu Thr Pro Thr Val Gly Ser Gly Leu Pro Ile Gly Ser Gly Leu Ala
850 855 860
Ser Gly Asp Glu Asp Arg Ile Gln Trp Ser Ser Ser Thr Glu Val Gly
865 870 875 880
Gly Val Thr Ser Gly Ala Glu Ile Pro Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val
885 890 895
Gly Thr Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Ala Glu Ile Pro Glu Thr
900 905 910
Phe Ala Ser Gly Val Gly Thr Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Ala
915 920 925
Glu Ile Pro Glu Thr Phe Ala Ser Gly Val Gly Thr Asp Leu Ser Gly
930 935 940
Leu Pro Ser Gly Ala Glu Ile Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly
945 950 955 960
Thr Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Ala Glu Ile Leu Glu Thr Ser
965 970 975
Ala Ser Gly Val Gly Thr Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Ala Glu
980 985 990
Ile Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly Thr Asp Leu Ser Gly Leu
995 1000 1005
Pro Ser Gly Ala Glu Ile Pro Glu Thr Phe Ala Ser Gly Val Gly
1010 1015 1020
Thr Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Ala Glu Ile Leu Glu Thr
1025 1030 1035

[0051]

Ser Ala Ser Gly Val Gly Thr Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1040 1045 1050
Ala Glu Ile Pro Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly Thr Asp Leu
1055 1060 1065
Ser Gly Leu Pro Ser Gly Ala Glu Ile Leu Glu Thr Ser Ala Ser
1070 1075 1080
Gly Val Gly Thr Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Ala Glu Ile
1085 1090 1095
Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly Thr Asp Leu Ser Gly Leu
1100 1105 1110
Pro Ser Gly Ala Glu Ile Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly
1115 1120 1125
Thr Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Ala Glu Ile Leu Glu Thr
1130 1135 1140
Ser Ala Ser Gly Val Gly Thr Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1145 1150 1155
Ala Glu Ile Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly Thr Asp Leu
1160 1165 1170
Ser Gly Leu Pro Ser Gly Gly Glu Ile Pro Glu Thr Phe Ala Ser
1175 1180 1185
Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Pro Gly Arg Glu Asp Leu
1190 1195 1200
Glu Thr Leu Thr Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Ser Ser
1205 1210 1215
Gly Lys Asp Gly Leu Val Gly Ser Ala Ser Gly Ala Leu Asp Phe
1220 1225 1230
Gly Gly Thr Leu Gly Ser Gly Gln Ile Pro Glu Thr Ser Gly Leu
1235 1240 1245
Pro Ser Gly Tyr Ser Gly Glu Tyr Ser Glu Val Asp Leu Gly Ser
1250 1255 1260
Gly Pro Ser Ser Gly Leu Pro Asp Phe Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1265 1270 1275
Phe Pro Thr Val Ser Leu Val Asp Thr Pro Leu Val Glu Val Val

1280 1285 1290
Thr Ala Thr Thr Ala Arg Glu Leu Glu Gly Arg Gly Thr Ile Gly
1295 1300 1305
Ile Ser Gly Ala Gly Glu Ile Ser Gly Leu Pro Ser Ser Glu Leu
1310 1315 1320
Asp Val Ser Gly Gly Thr Ser Gly Ala Asp Ile Ser Gly Glu Ala
1325 1330 1335
Asp Val Gly Gly Glu Ala Ser Gly Leu Ile Val Arg Gly Gln Pro
1340 1345 1350
Ser Gly Phe Pro Asp Thr Ser Gly Glu Ala Phe Gly Val Thr Glu
1355 1360 1365
Val Ser Gly Leu Ser Ser Gly Gln Pro Asp Leu Ser Gly Glu Ala
1370 1375 1380
Ser Gly Val Leu Phe Gly Ser Gly Pro Pro Phe Gly Ile Thr Asp
1385 1390 1395
Leu Ser Gly Glu Pro Ser Gly Gln Pro Ser Gly Leu Pro Glu Phe
1400 1405 1410
Ser Gly Thr Thr His Arg Ile Pro Asp Leu Val Ser Gly Ala Thr
1415 1420 1425
Ser Gly Ser Gly Glu Ser Ser Gly Ile Ala Phe Val Asp Thr Ser
1430 1435 1440
Val Val Glu Val Thr Pro Thr Thr Leu Arg Glu Glu Glu Gly Leu
1445 1450 1455
Gly Ser Val Glu Phe Ser Gly Phe Pro Ser Gly Glu Thr Gly Leu
1460 1465 1470
Ser Gly Thr Pro Glu Thr Ile Asp Val Ser Gly Gln Ser Ser Gly
1475 1480 1485
Thr Ile Asp Ser Ser Gly Phe Thr Ser Leu Ala Pro Glu Val Ser
1490 1495 1500
Gly Ser Pro Ser Gly Val Ala Glu Val Ser Gly Glu Ala Ser Gly
1505 1510 1515
Thr Glu Ile Thr Ser Gly Leu Pro Ser Gly Val Phe Asp Ser Ser
[0052] 1520 1525 1530
Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro Thr Val Ser Leu Val Asp Arg Thr
1535 1540 1545
Leu Val Glu Ser Val Thr Gln Ala Pro Thr Ala Gln Glu Ala Glu
1550 1555 1560
Gly Pro Ser Asp Ile Leu Glu Leu Ser Gly Val His Ser Gly Leu
1565 1570 1575
Pro Asp Val Ser Gly Ala His Ser Gly Phe Leu Asp Pro Ser Gly
1580 1585 1590
Leu Gln Ser Gly Leu Val Glu Pro Ser Gly Glu Pro Pro Arg Thr
1595 1600 1605
Pro Tyr Phe Ser Gly Asp Phe Pro Ser Thr Pro Asp Val Ser Gly
1610 1615 1620
Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ser Ser Ser Gly Asp Ile Ser Gly Leu
1625 1630 1635
Pro Glu Val Thr Leu Val Thr Ser Glu Phe Met Glu Gly Val Thr
1640 1645 1650
Arg Pro Thr Val Ser Gln Glu Leu Gly Gln Gly Pro Pro Met Thr
1655 1660 1665
His Val Pro Lys Leu Phe Glu Ser Ser Gly Glu Ala Leu Ala Ser
1670 1675 1680
Gly Asp Thr Ser Gly Ala Ala Pro Ala Phe Pro Gly Ser Gly Leu
1685 1690 1695
Glu Ala Ser Ser Val Pro Glu Ser His Gly Glu Thr Ser Ala Tyr
1700 1705 1710
Ala Glu Pro Gly Thr Lys Ala Ala Ala Ala Pro Asp Ala Ser Gly
1715 1720 1725
Glu Ala Ser Gly Ser Pro Asp Ser Gly Glu Ile Thr Ser Val Phe
1730 1735 1740
Arg Glu Ala Ala Gly Glu Gly Ala Ser Gly Leu Glu Val Ser Ser
1745 1750 1755
Ser Ser Leu Ala Ser Gln Gln Gly Pro Arg Glu Gly Ser Ala Ser
1760 1765 1770

Pro Glu Val Ser Gly Glu Ser Thr Thr Ser Tyr Glu Ile Gly Thr
1775 1780 1785
Glu Thr Ser Gly Leu Pro Leu Ala Thr Pro Ala Ala Ser Glu Asp
1790 1795 1800
Arg Ala Glu Val Ser Gly Asp Leu Ser Gly Arg Thr Pro Val Pro
1805 1810 1815
Val Asp Val Val Thr Asn Val Pro Glu Ala Glu Trp Ile Gln His
1820 1825 1830
Ser Gln Arg Pro Ala Glu Met Trp Pro Glu Thr Lys Ser Ser Ser
1835 1840 1845
Pro Ser Tyr Ser Gly Glu Asp Thr Ala Gly Thr Ala Ala Ser Pro
1850 1855 1860
Ala Ser Ala Asp Thr Pro Gly Glu Pro Gly Pro Thr Thr Ala Ala
1865 1870 1875
Pro Arg Ser Cys Ala Glu Glu Pro Cys Gly Pro Gly Thr Cys Gln
1880 1885 1890
Glu Thr Glu Gly Arg Val Thr Cys Leu Cys Pro Pro Gly His Thr
1895 1900 1905
Gly Glu Tyr Cys Asp Ile Asp Ile Asp Glu Cys Leu Ser Ser Pro
1910 1915 1920
Cys Val Asn Gly Ala Thr Cys Val Asp Ala Ser Asp Ser Phe Thr
1925 1930 1935
Cys Leu Cys Leu Pro Ser Tyr Gly Gly Asp Leu Cys Glu Thr Asp
1940 1945 1950
Gln Glu Val Cys Glu Glu Gly Trp Thr Lys Phe Gln Gly His Cys
1955 1960 1965
Tyr Arg His Phe Pro Asp Arg Glu Thr Trp Val Asp Ala Glu Gly
1970 1975 1980
Arg Cys Arg Glu Gln Gln Ser His Leu Ser Ser Ile Val Thr Pro
1985 1990 1995
Glu Glu Gln Glu Phe Val Asn Asn Asn Ala Gln Asp Tyr Gln Trp
2000 2005 2010

[0053]

Ile Gly Leu Asn Asp Arg Thr Ile Glu Gly Asp Phe Arg Trp Ser
2015 2020 2025
Asp Gly His Pro Leu Gln Phe Glu Asn Trp Arg Pro Asn Gln Pro
2030 2035 2040
Asp Asn Phe Phe Ala Thr Gly Glu Asp Cys Val Val Met Ile Trp
2045 2050 2055
His Glu Lys Gly Glu Trp Asn Asp Val Pro Cys Asn Tyr His Leu
2060 2065 2070
Pro Phe Thr Cys Lys Lys Gly Thr Val Ala Cys Gly Asp Pro Pro
2075 2080 2085
Val Val Glu His Ala Arg Thr Phe Gly Gln Lys Lys Asp Arg Tyr
2090 2095 2100
Glu Ile Asn Ser Leu Val Arg Tyr Gln Cys Ala Glu Gly Phe Thr
2105 2110 2115
Gln Arg His Val Pro Thr Ile Arg Cys Gln Pro Ser Gly His Trp
2120 2125 2130
Glu Glu Pro Arg Ile Thr Cys Thr His Pro Thr Thr Tyr Lys Arg
2135 2140 2145
Arg Val Gln Lys Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gln Arg Ser Gln Ala
2150 2155 2160
Ser Ser Ala Pro
2165

<210> 132
<211> 2266
<212> PRT
<213> 食蟹猴(Macaca fascicularis)
<400> 132

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

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

[0054]
Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly
305 310 315 320
Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu His Ala Asn Gln Thr Gly
325 330 335
Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu
340 345 350
Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu
355 360 365
Asp Ile Thr Val Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Met Glu Leu Pro Leu
370 375 380
Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val Ile Leu Thr
385 390 395 400
Val Lys Pro Ile Phe Asp Val Ser Pro Ser Pro Leu Glu Pro Glu Glu
405 410 415
Pro Phe Thr Phe Ala Pro Glu Ile Gly Ala Thr Ala Phe Pro Glu Val
420 425 430
Glu Asn Glu Thr Gly Glu Ala Thr Arg Pro Trp Gly Phe Pro Thr Pro
435 440 445
Gly Leu Gly Pro Ala Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu Val Val Gln
450 455 460
Val Thr Ala Val Pro Gly Gln Pro His Leu Pro Gly Gly Val Val Phe
465 470 475 480
His Tyr Arg Pro Gly Ser Thr Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala
485 490 495
Gln Gln Ala Cys Leu Arg Thr Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Glu Gln
500 505 510
Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp
515 520 525
Leu Arg Asp Gln Thr Val Arg Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro
530 535 540
Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val
545 550 555 560
Arg Pro Ser Thr Glu Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp Arg Leu

565 570 575
Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr Phe Gln
580 585 590
Glu Ala Leu Glu Phe Cys Glu Ser His Asn Ala Thr Leu Ala Thr Thr
595 600 605
Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp Ser Arg Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala
610 615 620
Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser Leu Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Arg
625 630 635 640
Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr
645 650 655
Pro Asn Gln Thr Gly Leu Pro Asp Pro Leu Ser Arg His His Ala Phe
660 665 670
Cys Phe Arg Gly Val Ser Ala Val Pro Ser Pro Gly Glu Glu Glu Gly
675 680 685
Gly Thr Pro Thr Ser Pro Ser Gly Val Glu Asp Trp Ile Ala Thr Gln
690 695 700
Val Val Pro Gly Val Ala Ala Val Pro Val Glu Glu Glu Thr Thr Ala
705 710 715 720
Val Pro Leu Gly Glu Thr Thr Ala Ile Leu Glu Phe Thr Thr Glu Pro
725 730 735
Glu Asn Gln Thr Glu Trp Glu Pro Ala Tyr Thr Pro Met Gly Thr Ser
740 745 750
Pro Leu Pro Gly Ile Leu Pro Thr Trp Pro Pro Thr Gly Thr Ala Thr
755 760 765
Glu Glu Ser Thr Glu Gly Pro Ser Ala Thr Glu Val Leu Thr Ala Ser
770 775 780
Lys Glu Pro Ser Pro Pro Glu Val Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro Ser
785 790 795 800
Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Val Arg Pro Phe Pro Ser Val Glu
805 810 815
Pro Ser Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Val Glu Pro Ser Pro Ser
[0055] 820 825 830
Glu Glu Pro Ser Ala Ser Glu Glu Pro Tyr Thr Pro Ser Pro Pro Val
835 840 845
Pro Ser Trp Thr Glu Leu Pro Gly Ser Gly Glu Glu Ser Gly Ala Pro
850 855 860
Asp Val Ser Gly Asp Phe Ile Gly Ser Gly Asp Val Ser Gly His Leu
865 870 875 880
Asp Phe Ser Gly Gln Leu Ser Gly Asp Arg Ile Ser Gly Leu Pro Ser
885 890 895
Gly Asp Leu Asp Ser Ser Gly Leu Thr Ser Thr Val Gly Ser Gly Leu
900 905 910
Pro Val Asp Ser Gly Leu Ala Ser Gly Asp Glu Glu Arg Ile Glu Trp
915 920 925
Ser Ser Thr Pro Thr Val Gly Glu Leu Pro Ser Gly Ala Glu Ile Leu
930 935 940
Glu Gly Ser Ala Ser Glu Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly
945 950 955 960
Asp Val Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu
965 970 975
Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu
980 985 990
Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ser Thr Ser Gly Val
995 1000 1005
Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ser
1010 1015 1020
Thr Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Ala Gly Glu
1025 1030 1035
Val Leu Glu Thr Thr Ala Ser Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu
1040 1045 1050
Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala Ser Gly Val Glu Asp
1055 1060 1065
Ile Ser Gly Phe Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala Ser
1070 1075 1080

Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu
1085 1090 1095
Thr Thr Ala Ser Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1100 1105 1110
Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Gly Gly
1115 1120 1125
Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ser Thr Ser Gly Val Gly
1130 1135 1140
Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Val Glu Thr Ser Thr
1145 1150 1155
Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Gly Glu Val
1160 1165 1170
Leu Glu Thr Ser Thr Ser Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro
1175 1180 1185
Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala Ser Gly Ile Glu Asp Val
1190 1195 1200
Ser Glu Leu Pro Ser Gly Glu Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly
1205 1210 1215
Val Glu Asp Leu Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr
1220 1225 1230
Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Gly
1235 1240 1245
Glu Val Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly
1250 1255 1260
Leu Pro Ser Gly Gly Glu Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val
1265 1270 1275
Gly Thr Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Arg Glu Gly Leu Glu
1280 1285 1290
Thr Ser Ala Ser Gly Ala Glu Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1295 1300 1305
Lys Glu Asp Leu Val Gly Pro Ala Ser Gly Asp Leu Asp Leu Gly
1310 1315 1320

[0056]

Lys Leu Pro Ser Gly Thr Leu Arg Ser Gly Gln Ala Pro Glu Thr
1325 1330 1335
Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Ser Gly Glu Tyr Ser Gly Val Asp
1340 1345 1350
Leu Gly Ser Gly Pro Pro Ser Gly Leu Pro Asp Phe Ser Gly Leu
1355 1360 1365
Pro Ser Gly Phe Pro Thr Val Ser Leu Val Asp Ser Thr Leu Val
1370 1375 1380
Glu Val Val Thr Ala Ser Thr Ala Ser Glu Leu Glu Gly Arg Gly
1385 1390 1395
Thr Ile Gly Ile Ser Gly Ala Gly Glu Ile Ser Gly Leu Pro Ser
1400 1405 1410
Ser Glu Leu Asp Ile Ser Gly Glu Ala Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1415 1420 1425
Thr Glu Leu Ser Gly Gln Ala Ser Gly Ser Pro Asp Val Ser Arg
1430 1435 1440
Glu Thr Pro Gly Leu Phe Asp Val Ser Gly Gln Pro Ser Gly Phe
1445 1450 1455
Pro Asp Ile Ser Gly Gly Thr Ser Gly Ile Ser Glu Val Ser Gly
1460 1465 1470
Gln Pro Ser Gly Phe Pro Asp Thr Ser Gly Glu Thr Ser Gly Val
1475 1480 1485
Thr Glu Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Gln Pro Gly Val Ser Gly
1490 1495 1500
Glu Ala Ser Gly Val Pro Tyr Gly Ser Ser Gln Pro Phe Gly Ile
1505 1510 1515
Thr Asp Leu Ser Gly Glu Thr Ser Gly Val Pro Asp Leu Ser Gly
1520 1525 1530
Gln Pro Ser Gly Leu Pro Gly Phe Ser Gly Ala Thr Ser Gly Val
1535 1540 1545
Pro Asp Leu Val Ser Gly Ala Thr Ser Gly Ser Gly Glu Ser Ser
1550 1555 1560
Gly Ile Thr Phe Val Asp Thr Ser Leu Val Glu Val Thr Pro Thr

1565 1570 1575
Thr Phe Lys Glu Glu Glu Gly Leu Gly Ser Val Glu Leu Ser Gly
1580 1585 1590
Leu Pro Ser Gly Glu Ala Asp Leu Ser Gly Arg Ser Gly Met Val
1595 1600 1605
Asp Val Ser Gly Gln Phe Ser Gly Thr Val Asp Ser Ser Gly Phe
1610 1615 1620
Thr Ser Gln Thr Pro Glu Phe Ser Gly Leu Pro Ile Gly Ile Ala
1625 1630 1635
Glu Val Ser Gly Glu Ser Ser Gly Ala Glu Thr Gly Ser Ser Leu
1640 1645 1650
Pro Ser Gly Ala Tyr Tyr Gly Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro
1655 1660 1665
Thr Val Ser Leu Val Asp Arg Thr Leu Val Glu Ser Val Thr Gln
1670 1675 1680
Ala Pro Thr Ala Gln Glu Ala Gly Glu Gly Pro Pro Gly Ile Leu
1685 1690 1695
Glu Leu Ser Gly Thr His Ser Gly Ala Pro Asp Met Ser Gly Asp
1700 1705 1710
His Ser Gly Phe Leu Asp Val Ser Gly Leu Gln Phe Gly Leu Val
1715 1720 1725
Glu Pro Ser Gly Glu Pro Pro Ser Thr Pro Tyr Phe Ser Gly Asp
1730 1735 1740
Phe Ala Ser Thr Thr Asp Val Ser Gly Glu Ser Ser Ala Ala Met
1745 1750 1755
Gly Thr Ser Gly Glu Ala Ser Gly Leu Pro Gly Val Thr Leu Ile
1760 1765 1770
Thr Ser Glu Phe Met Glu Gly Val Thr Glu Pro Thr Val Ser Gln
1775 1780 1785
Glu Leu Gly Gln Arg Pro Pro Val Thr His Thr Pro Gln Leu Phe
1790 1795 1800
Glu Ser Ser Gly Glu Ala Ser Ala Ala Gly Asp Ile Ser Gly Ala
[0057] 1805 1810 1815
Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser Gly Val Glu Val Ser Ser Val Pro
1820 1825 1830
Glu Ser Ser Ser Glu Thr Ser Ala Tyr Pro Glu Ala Gly Val Gly
1835 1840 1845
Ala Ser Ala Ala Pro Glu Thr Ser Gly Glu Asp Ser Gly Ser Pro
1850 1855 1860
Asp Leu Ser Glu Thr Thr Ser Ala Phe His Glu Ala Asp Leu Glu
1865 1870 1875
Arg Ser Ser Gly Leu Gly Val Ser Gly Ser Thr Leu Thr Phe Gln
1880 1885 1890
Glu Gly Glu Pro Ser Ala Ser Pro Glu Val Ser Gly Glu Ser Thr
1895 1900 1905
Thr Thr Gly Asp Val Gly Thr Glu Ala Pro Gly Leu Pro Ser Ala
1910 1915 1920
Thr Pro Thr Ala Ser Gly Asp Arg Thr Glu Ile Ser Gly Asp Leu
1925 1930 1935
Ser Gly His Thr Ser Gly Leu Gly Val Val Ile Ser Thr Ser Ile
1940 1945 1950
Pro Glu Ser Glu Trp Thr Gln Gln Thr Gln Arg Pro Ala Glu Ala
1955 1960 1965
His Leu Glu Thr Glu Ser Ser Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Glu Glu
1970 1975 1980
Thr His Thr Ala Glu Thr Ala Thr Ser Pro Thr Asp Ala Ser Ile
1985 1990 1995
Pro Ala Ser Pro Glu Trp Thr Gly Glu Ser Glu Ser Thr Val Ala
2000 2005 2010
Asp Ile Asp Glu Cys Leu Ser Ser Pro Cys Leu Asn Gly Ala Thr
2015 2020 2025
Cys Val Asp Ala Ile Asp Ser Phe Thr Cys Leu Cys Leu Pro Ser
2030 2035 2040
Tyr Gly Gly Asp Leu Cys Glu Ile Asp Gln Glu Val Cys Glu Glu
2045 2050 2055

Gly Trp Thr Lys Tyr Gln Gly His Cys Tyr Arg His Phe Pro Asp
2060 2065 2070
Arg Glu Thr Trp Val Asp Ala Glu Arg Arg Cys Arg Glu Gln Gln
2075 2080 2085
Ser His Leu Ser Ser Ile Val Thr Pro Glu Glu Gln Glu Phe Val
2090 2095 2100
Asn Asn Asn Ala Gln Asp Tyr Gln Trp Ile Gly Leu Asn Asp Arg
2105 2110 2115
Thr Ile Glu Gly Asp Phe Arg Trp Ser Asp Gly His Pro Met Gln
2120 2125 2130
Phe Glu Asn Trp Arg Pro Asn Gln Pro Asp Asn Phe Phe Ala Ala
2135 2140 2145
Gly Glu Asp Cys Val Val Met Ile Trp His Glu Lys Gly Glu Trp
2150 2155 2160
Asn Asp Val Pro Cys Asn Tyr His Leu Pro Phe Thr Cys Lys Lys
2165 2170 2175
Gly Thr Val Ala Cys Gly Glu Pro Pro Met Val Gln His Ala Arg
2180 2185 2190
Thr Phe Gly Gln Lys Lys Asp Arg Tyr Glu Ile Asn Ser Leu Val
2195 2200 2205
Arg Tyr Gln Cys Thr Glu Gly Phe Val Gln Arg His Val Pro Thr
2210 2215 2220
Ile Arg Cys Gln Pro Ser Gly His Trp Glu Glu Pro Arg Ile Thr
2225 2230 2235
Cys Thr Asp Ala Thr Ala Tyr Lys Arg Arg Leu Gln Lys Arg Ser
2240 2245 2250
Ser Arg His Pro Arg Arg Ser Arg Pro Ser Thr Ala His
2255 2260 2265

<210> 133
<211> 2167
<212> PRT
<213> 猕猴(Macaca mulatta)

[0058]
<220>
<221> VARIANT
<222> (1910)..(1915)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<400> 133
Met Thr Thr Leu Leu Trp Val Phe Val Thr Leu Arg Val Ile Ala Ala
1 5 10 15
Ala Val Thr Val Glu Thr Ser Asp His Asp Asn Ser Leu Ser Val Ser
20 25 30
Ile Pro Gln Pro Ser Pro Leu Arg Val Leu Leu Gly Thr Ser Leu Thr
35 40 45
Ile Pro Cys Tyr Phe Ile Asp Pro Met His Pro Val Thr Thr Ala Pro
50 55 60
Ser Thr Ala Pro Leu Ala Pro Arg Ile Lys Trp Ser Arg Val Ser Lys
65 70 75 80
Glu Lys Glu Val Val Leu Leu Val Ala Thr Glu Gly Arg Val Arg Val
85 90 95
Asn Ser Ala Tyr Gln Asp Lys Val Ser Leu Pro Asn Tyr Pro Ala Ile
100 105 110
Pro Ser Asp Ala Thr Leu Glu Ile Gln Ser Leu Arg Ser Asn Asp Ser
115 120 125
Gly Val Tyr Arg Cys Glu Val Met His Gly Ile Glu Asp Ser Glu Ala
130 135 140
Thr Leu Glu Val Val Val Lys Gly Ile Val Phe His Tyr Arg Ala Ile
145 150 155 160
Ser Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Phe Asp Arg Ala Gln Arg Ala Cys Leu
165 170 175
Gln Asn Ser Ala Ile Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr
180 185 190
Glu Asp Gly Phe His Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gln Thr
195 200 205
Val Arg Tyr Pro Ile His Thr Pro Arg Glu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys
210 215 220

Asp Glu Phe Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Ile Arg Asp Thr Asn Glu
225 230 235 240
Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Ala Glu Glu Met Glu Gly Glu Val Phe
245 250 255
Tyr Ala Thr Ser Pro Glu Lys Phe Thr Phe Gln Glu Ala Ala Asn Glu
260 265 270
Cys Arg Arg Leu Gly Ala Arg Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Leu
275 280 285
Ala Trp Gln Ala Gly Met Asp Met Cys Ser Ala Gly Trp Leu Ala Asp
290 295 300
Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly
305 310 315 320
Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu His Ala Asn Gln Thr Gly
325 330 335
Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu
340 345 350
Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Asn Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu
355 360 365
Asp Ile Thr Val Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Met Glu Leu Pro Leu
370 375 380
Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val Ile Leu Thr
385 390 395 400
Val Lys Pro Ile Phe Asp Val Ser Pro Ser Pro Leu Glu Pro Glu Glu
405 410 415
Pro Phe Thr Phe Ala Pro Glu Ile Gly Ala Thr Ala Phe Pro Glu Val
420 425 430
Glu Asn Glu Thr Gly Glu Ala Thr Arg Pro Trp Gly Phe Pro Thr Pro
435 440 445
Gly Leu Gly Pro Ala Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu Val Val Gln
450 455 460
Val Thr Ala Val Pro Gly Gln Pro His Leu Pro Gly Gly Val Val Phe
465 470 475 480

[0059] His Tyr Arg Pro Gly Ser Thr Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala
485 490 495
Gln Gln Ala Cys Leu Arg Thr Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Glu Gln
500 505 510
Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp
515 520 525
Leu Arg Asp Gln Thr Val Arg Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro
530 535 540
Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val
545 550 555 560
Arg Pro Ser Thr Glu Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp Arg Leu
565 570 575
Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr Phe Gln
580 585 590
Glu Ala Leu Glu Phe Cys Glu Ser His Asn Ala Thr Leu Ala Thr Thr
595 600 605
Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp Ser Arg Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala
610 615 620
Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser Leu Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Arg
625 630 635 640
Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr
645 650 655
Pro Asn Gln Thr Gly Leu Pro Asp Pro Leu Ser Arg His His Ala Phe
660 665 670
Cys Phe Arg Gly Val Ser Ala Val Pro Ser Pro Gly Glu Glu Glu Gly
675 680 685
Gly Thr Pro Thr Ser Pro Ser Gly Val Glu Asp Trp Ile Ala Thr Gln
690 695 700
Val Val Pro Gly Val Ala Ala Val Pro Val Glu Glu Glu Thr Thr Ala
705 710 715 720
Val Pro Leu Gly Glu Thr Thr Ala Ile Leu Glu Phe Thr Thr Glu Pro
725 730 735
Glu Asn Gln Thr Glu Trp Glu Pro Ala Tyr Thr Pro Met Gly Thr Ser

740 745 750
Pro Leu Pro Gly Ile Leu Pro Thr Trp Pro Pro Thr Gly Thr Ala Thr
755 760 765
Glu Glu Ser Thr Glu Gly Pro Ser Ala Thr Glu Val Leu Thr Ala Ser
770 775 780
Lys Glu Pro Ser Pro Pro Glu Val Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro Ser
785 790 795 800
Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Val Arg Pro Phe Pro Ser Val Glu
805 810 815
Pro Ser Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Val Glu Pro Ser Pro Ser
820 825 830
Glu Glu Pro Ser Ala Ser Glu Glu Pro Tyr Thr Pro Ser Pro Pro Val
835 840 845
Pro Ser Trp Thr Glu Leu Pro Gly Ser Gly Glu Glu Ser Gly Ala Pro
850 855 860
Asp Val Ser Gly Asp Phe Ile Gly Ser Gly Asp Val Ser Gly His Leu
865 870 875 880
Asp Phe Ser Gly Gln Leu Ser Gly Asp Arg Ile Ser Gly Leu Pro Ser
885 890 895
Gly Asp Leu Asp Ser Ser Gly Leu Thr Ser Thr Val Gly Ser Gly Leu
900 905 910
Pro Val Asp Ser Gly Leu Ala Ser Gly Asp Glu Glu Arg Ile Glu Trp
915 920 925
Ser Ser Thr Pro Thr Val Gly Glu Leu Pro Ser Gly Ala Glu Ile Leu
930 935 940
Glu Gly Ser Ala Ser Glu Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly
945 950 955 960
Asp Val Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu
965 970 975
Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ser Val Ser Gly Val Gly Asp Leu
980 985 990
Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ser Thr Ser Gly Val

[0060]

995 1000 1005
Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ser
1010 1015 1020
Thr Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Ala Gly Glu
1025 1030 1035
Val Leu Glu Thr Thr Ala Ser Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu
1040 1045 1050
Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala Ser Gly Val Glu Asp
1055 1060 1065
Ile Ser Gly Phe Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala Ser
1070 1075 1080
Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu
1085 1090 1095
Thr Thr Ala Ser Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1100 1105 1110
Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Gly Gly
1115 1120 1125
Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Ser Thr Ser Gly Val Gly
1130 1135 1140
Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Val Val Glu Thr Ser Thr
1145 1150 1155
Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Gly Glu Val
1160 1165 1170
Leu Glu Thr Ser Thr Ser Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro
1175 1180 1185
Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr Thr Ala Ser Gly Ile Glu Asp Val
1190 1195 1200
Ser Glu Leu Pro Ser Gly Glu Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly
1205 1210 1215
Val Glu Asp Leu Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Val Leu Glu Thr
1220 1225 1230
Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Gly
1235 1240 1245

Glu Val Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val Gly Asp Leu Ser Gly
1250 1255 1260
Leu Pro Ser Gly Gly Glu Gly Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val
1265 1270 1275
Gly Thr Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Arg Glu Gly Leu Glu
1280 1285 1290
Thr Ser Ala Ser Gly Ala Glu Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1295 1300 1305
Lys Glu Asp Leu Val Gly Pro Ala Ser Gly Asp Leu Asp Leu Gly
1310 1315 1320
Lys Leu Pro Ser Gly Thr Leu Gly Ser Gly Gln Ala Pro Glu Thr
1325 1330 1335
Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Ser Gly Glu Tyr Ser Gly Val Asp
1340 1345 1350
Leu Gly Ser Gly Pro Pro Ser Gly Leu Pro Asp Phe Ser Gly Leu
1355 1360 1365
Pro Ser Gly Phe Pro Thr Val Ser Leu Val Asp Ser Thr Leu Val
1370 1375 1380
Glu Val Val Thr Ala Ser Thr Ala Ser Glu Leu Glu Gly Arg Gly
1385 1390 1395
Thr Ile Gly Ile Ser Gly Ala Gly Glu Ile Ser Gly Leu Pro Ser
1400 1405 1410
Ser Glu Leu Asp Ile Ser Gly Glu Ala Ser Gly Leu Pro Ser Gly
1415 1420 1425
Thr Glu Leu Ser Gly Gln Ala Ser Gly Ser Pro Asp Val Ser Arg
1430 1435 1440
Glu Thr Ser Gly Leu Phe Asp Val Ser Gly Gln Pro Ser Gly Phe
1445 1450 1455
Pro Asp Thr Ser Gly Glu Thr Ser Gly Val Thr Glu Leu Ser Gly
1460 1465 1470
Leu Pro Ser Gly Gln Pro Gly Val Ser Gly Glu Ala Ser Gly Val
1475 1480 1485
[0061] Pro Tyr Gly Ser Ser Gln Pro Phe Gly Ile Thr Asp Leu Ser Gly
1490 1495 1500
Glu Thr Ser Gly Val Pro Asp Leu Ser Gly Gln Pro Ser Gly Leu
1505 1510 1515
Pro Gly Phe Ser Gly Ala Thr Ser Gly Val Pro Asp Leu Val Ser
1520 1525 1530
Gly Ala Thr Ser Gly Ser Gly Glu Ser Ser Asp Ile Thr Phe Val
1535 1540 1545
Asp Thr Ser Leu Val Glu Val Thr Pro Thr Thr Phe Lys Glu Glu
1550 1555 1560
Glu Gly Leu Gly Ser Val Glu Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu
1565 1570 1575
Ala Asp Leu Ser Gly Arg Ser Gly Met Val Asp Val Ser Gly Gln
1580 1585 1590
Phe Ser Gly Thr Val Asp Ser Ser Gly Phe Thr Ser Gln Thr Pro
1595 1600 1605
Glu Phe Ser Gly Leu Pro Ile Gly Ile Ala Glu Val Ser Gly Glu
1610 1615 1620
Ser Ser Gly Ala Glu Thr Gly Ser Ser Leu Pro Ser Gly Ala Tyr
1625 1630 1635
Tyr Gly Ser Glu Leu Pro Ser Gly Phe Pro Thr Val Ser Leu Val
1640 1645 1650
Asp Arg Thr Leu Val Glu Ser Val Thr Gln Ala Pro Thr Ala Gln
1655 1660 1665
Glu Ala Gly Glu Gly Pro Pro Gly Ile Leu Glu Leu Ser Gly Thr
1670 1675 1680
His Ser Gly Ala Pro Asp Met Ser Gly Asp His Ser Gly Phe Leu
1685 1690 1695
Asp Val Ser Gly Leu Gln Phe Gly Leu Val Glu Pro Ser Gly Glu
1700 1705 1710
Pro Pro Ser Thr Pro Tyr Phe Ser Gly Asp Phe Ala Ser Thr Thr
1715 1720 1725
Asp Val Ser Gly Glu Ser Ser Ala Ala Met Gly Thr Asn Gly Glu

1730 1735 1740
Ala Ser Gly Leu Pro Glu Val Thr Leu Ile Thr Ser Glu Phe Met
1745 1750 1755
Glu Gly Val Thr Glu Pro Thr Val Ser Gln Glu Leu Gly Gln Arg
1760 1765 1770
Pro Pro Val Thr His Thr Pro Gln Leu Phe Glu Ser Ser Gly Glu
1775 1780 1785
Ala Ser Ala Ala Gly Asp Ile Ser Gly Ala Thr Pro Val Leu Pro
1790 1795 1800
Gly Ser Gly Val Glu Val Ser Ser Val Pro Glu Ser Ser Ser Glu
1805 1810 1815
Thr Ser Ala Tyr Pro Glu Ala Gly Val Gly Ala Ser Ala Ala Pro
1820 1825 1830
Glu Thr Ser Gly Glu Asp Ser Gly Ser Pro Asp Leu Ser Glu Thr
1835 1840 1845
Thr Ser Ala Phe His Glu Ala Asp Leu Glu Arg Ser Ser Gly Leu
1850 1855 1860
Gly Val Ser Gly Ser Thr Leu Thr Phe Gln Glu Gly Glu Pro Ser
1865 1870 1875
Ala Ser Pro Glu Val Ser Gly Glu Ser Thr Thr Thr Gly Asp Val
1880 1885 1890
Gly Thr Glu Ala Pro Gly Leu Pro Ser Ala Thr Pro Thr Ala Ser
1895 1900 1905
Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Thr Arg Ser Cys Ala Glu Glu
1910 1915 1920
Pro Cys Gly Ala Gly Thr Cys Lys Glu Thr Glu Gly His Val Ile
1925 1930 1935
Cys Leu Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Glu His Cys Asn Ile Asp
1940 1945 1950
Gln Glu Val Cys Glu Glu Gly Trp Thr Lys Tyr Gln Gly His Cys
1955 1960 1965
Tyr Arg His Phe Pro Asp Arg Glu Thr Trp Val Asp Ala Glu Arg
[0062] 1970 1975 1980
Arg Cys Arg Glu Gln Gln Ser His Leu Ser Ser Ile Val Thr Pro
1985 1990 1995
Glu Glu Gln Glu Phe Val Asn Asn Asn Ala Gln Asp Tyr Gln Trp
2000 2005 2010
Ile Gly Leu Asn Asp Arg Thr Ile Glu Gly Asp Phe Arg Trp Ser
2015 2020 2025
Asp Gly His Pro Met Gln Phe Glu Asn Trp Arg Pro Asn Gln Pro
2030 2035 2040
Asp Asn Phe Phe Ala Ala Gly Glu Asp Cys Val Val Met Ile Trp
2045 2050 2055
His Glu Lys Gly Glu Trp Asn Asp Val Pro Cys Asn Tyr His Leu
2060 2065 2070
Pro Phe Thr Cys Lys Lys Gly Thr Val Ala Cys Gly Glu Pro Pro
2075 2080 2085
Met Val Gln His Ala Arg Thr Phe Gly Gln Lys Lys Asp Arg Tyr
2090 2095 2100
Glu Ile Asn Ser Leu Val Arg Tyr Gln Cys Thr Glu Gly Phe Val
2105 2110 2115
Gln Arg His Val Pro Thr Ile Arg Cys Gln Pro Ser Gly His Trp
2120 2125 2130
Glu Glu Pro Arg Ile Thr Cys Thr Asp Ala Thr Ala Tyr Lys Arg
2135 2140 2145
Arg Leu Gln Lys Arg Ser Ser Arg His Pro Arg Arg Ser Arg Pro
2150 2155 2160
Ser Thr Ala His
2165
<210> 134
<211> 1321
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 134
Met Gly Ala Pro Phe Val Trp Ala Leu Gly Leu Leu Met Leu Gln Met

[0063]

```
1               5                   10                  15
Leu Leu Phe Val Ala Gly Glu Gln Gly Thr Gln Asp Ile Thr Asp Ala
            20                  25                  30
Ser Glu Arg Gly Leu His Met Gln Lys Leu Gly Ser Gly Ser Val Gln
        35                  40                  45
Ala Ala Leu Ala Glu Leu Val Ala Leu Pro Cys Leu Phe Thr Leu Gln
    50                  55                  60
Pro Arg Pro Ser Ala Ala Arg Asp Ala Pro Arg Ile Lys Trp Thr Lys
65                  70                  75                  80
Val Arg Thr Ala Ser Gly Gln Arg Gln Asp Leu Pro Ile Leu Val Ala
                85                  90                  95
Lys Asp Asn Val Val Arg Val Ala Lys Ser Trp Gln Gly Arg Val Ser
            100                 105                 110
Leu Pro Ser Tyr Pro Arg Arg Arg Ala Asn Ala Thr Leu Leu Leu Gly
        115                 120                 125
Pro Leu Arg Ala Ser Asp Ser Gly Leu Tyr Arg Cys Gln Val Val Arg
    130                 135                 140
Gly Ile Glu Asp Glu Gln Asp Leu Val Pro Leu Glu Val Thr Gly Val
145                 150                 155                 160
Val Phe His Tyr Arg Ser Ala Arg Asp Arg Tyr Ala Leu Thr Phe Ala
                165                 170                 175
Glu Ala Gln Glu Ala Cys Arg Leu Ser Ser Ala Ile Ile Ala Ala Pro
            180                 185                 190
Arg His Leu Gln Ala Ala Phe Glu Asp Gly Phe Asp Asn Cys Asp Ala
        195                 200                 205
Gly Trp Leu Ser Asp Arg Thr Val Arg Tyr Pro Ile Thr Gln Ser Arg
    210                 215                 220
Pro Gly Cys Tyr Gly Asp Arg Ser Ser Leu Pro Gly Val Arg Ser Tyr
225                 230                 235                 240
Gly Arg Arg Asn Pro Gln Glu Leu Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Ala Arg
                245                 250                 255
Glu Leu Gly Gly Glu Val Phe Tyr Val Gly Pro Ala Arg Arg Leu Thr
            260                 265                 270
Leu Ala Gly Ala Arg Ala Gln Cys Arg Arg Gln Gly Ala Ala Leu Ala
        275                 280                 285
Ser Val Gly Gln Leu His Leu Ala Trp His Glu Gly Leu Asp Gln Cys
    290                 295                 300
Asp Pro Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser Val Arg Tyr Pro Ile Gln Thr
305                 310                 315                 320
Pro Arg Arg Arg Cys Gly Gly Pro Ala Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr
                325                 330                 335
Arg Phe Ala Asn Arg Thr Gly Phe Pro Ser Pro Ala Glu Arg Phe Asp
            340                 345                 350
Ala Tyr Cys Phe Arg Ala His His Pro Thr Ser Gln His Gly Asp Leu
        355                 360                 365
Glu Thr Pro Ser Ser Gly Asp Glu Gly Glu Ile Leu Ser Ala Glu Gly
    370                 375                 380
Pro Pro Val Arg Glu Leu Glu Pro Thr Leu Glu Glu Glu Glu Val Val
385                 390                 395                 400
Thr Pro Asp Phe Gln Glu Pro Leu Val Ser Ser Gly Glu Glu Glu Thr
                405                 410                 415
Leu Ile Leu Glu Glu Lys Gln Glu Ser Gln Gln Thr Leu Ser Pro Thr
            420                 425                 430
Pro Gly Asp Pro Met Leu Ala Ser Trp Pro Thr Gly Glu Val Trp Leu
        435                 440                 445
Ser Thr Val Ala Pro Ser Pro Ser Asp Met Gly Ala Gly Thr Ala Ala
    450                 455                 460
Ser Ser His Thr Glu Val Ala Pro Thr Asp Pro Met Pro Arg Arg Arg
465                 470                 475                 480
Gly Arg Phe Lys Gly Leu Asn Gly Arg Tyr Phe Gln Gln Gln Glu Pro
                485                 490                 495
Glu Pro Gly Leu Gln Gly Gly Met Glu Ala Ser Ala Gln Pro Pro Thr
            500                 505                 510
Ser Glu Ala Ala Val Asn Gln Met Glu Pro Pro Leu Ala Met Ala Val
        515                 520                 525
```

Thr Glu Met Leu Gly Ser Gly Gln Ser Arg Ser Pro Trp Ala Asp Leu
530 535 540
Thr Asn Glu Val Asp Met Pro Gly Ala Gly Ser Ala Gly Gly Lys Ser
545 550 555 560
Ser Pro Glu Pro Trp Leu Trp Pro Pro Thr Met Val Pro Pro Ser Ile
565 570 575
Ser Gly His Ser Arg Ala Pro Val Leu Glu Leu Glu Lys Ala Glu Gly
580 585 590
Pro Ser Ala Arg Pro Ala Thr Pro Asp Leu Phe Trp Ser Pro Leu Glu
595 600 605
Ala Thr Val Ser Ala Pro Ser Pro Ala Pro Trp Glu Ala Phe Pro Val
610 615 620
Ala Thr Ser Pro Asp Leu Pro Met Met Ala Met Leu Arg Gly Pro Lys
625 630 635 640
Glu Trp Met Leu Pro His Pro Thr Pro Ile Ser Thr Glu Ala Asn Arg
645 650 655
Val Glu Ala His Gly Glu Ala Thr Ala Thr Ala Pro Pro Ser Pro Ala
660 665 670
Ala Glu Thr Lys Val Tyr Ser Leu Pro Leu Ser Leu Thr Pro Thr Gly
675 680 685
Gln Gly Gly Glu Ala Met Pro Thr Thr Pro Glu Ser Pro Arg Ala Asp
690 695 700
Phe Arg Glu Thr Gly Glu Thr Ser Pro Ala Gln Val Asn Lys Ala Glu
705 710 715 720
His Ser Ser Ser Ser Pro Trp Pro Ser Val Asn Arg Asn Val Ala Val
725 730 735
Gly Phe Val Pro Thr Glu Thr Ala Thr Glu Pro Thr Gly Leu Arg Gly
740 745 750
Ile Pro Gly Ser Glu Ser Gly Val Phe Asp Thr Ala Glu Ser Pro Thr
755 760 765
Ser Gly Leu Gln Ala Thr Val Asp Glu Val Gln Asp Pro Trp Pro Ser
770 775 780

[0064]

Val Tyr Ser Lys Gly Leu Asp Ala Ser Ser Pro Ser Ala Pro Leu Gly
785 790 795 800
Ser Pro Gly Val Phe Leu Val Pro Lys Val Thr Pro Asn Leu Glu Pro
805 810 815
Trp Val Ala Thr Asp Glu Gly Pro Thr Val Asn Pro Met Asp Ser Thr
820 825 830
Val Thr Pro Ala Pro Ser Asp Ala Ser Gly Ile Trp Glu Pro Gly Ser
835 840 845
Gln Val Phe Glu Glu Ala Glu Ser Thr Thr Leu Ser Pro Gln Val Ala
850 855 860
Leu Asp Thr Ser Ile Val Thr Pro Leu Thr Thr Leu Glu Gln Gly Asp
865 870 875 880
Lys Val Gly Val Pro Ala Met Ser Thr Leu Gly Ser Ser Ser Ser Gln
885 890 895
Pro His Pro Glu Pro Glu Asp Gln Val Glu Thr Gln Gly Thr Ser Gly
900 905 910
Ala Ser Val Pro Pro His Gln Ser Ser Pro Leu Gly Lys Pro Ala Val
915 920 925
Pro Pro Gly Thr Pro Thr Ala Ala Ser Val Gly Glu Ser Ala Ser Val
930 935 940
Ser Ser Gly Glu Pro Thr Val Pro Trp Asp Pro Ser Ser Thr Leu Leu
945 950 955 960
Pro Val Thr Leu Gly Ile Glu Asp Phe Glu Leu Glu Val Leu Ala Gly
965 970 975
Ser Pro Gly Val Glu Ser Phe Trp Glu Glu Val Ala Ser Gly Glu Glu
980 985 990
Pro Ala Leu Pro Gly Thr Pro Met Asn Ala Gly Ala Glu Glu Val His
995 1000 1005
Ser Asp Pro Cys Glu Asn Asn Pro Cys Leu His Gly Gly Thr Cys
1010 1015 1020
Asn Ala Asn Gly Thr Met Tyr Gly Cys Ser Cys Asp Gln Gly Phe
1025 1030 1035
Ala Gly Glu Asn Cys Glu Ile Asp Ile Asp Asp Cys Leu Cys Ser

1040 1045 1050
Pro Cys Glu Asn Gly Gly Thr Cys Ile Asp Glu Val Asn Gly Phe
1055 1060 1065
Val Cys Leu Cys Leu Pro Ser Tyr Gly Gly Ser Phe Cys Glu Lys
1070 1075 1080
Asp Thr Glu Gly Cys Asp Arg Gly Trp His Lys Phe Gln Gly His
1085 1090 1095
Cys Tyr Arg Tyr Phe Ala His Arg Arg Ala Trp Glu Asp Ala Glu
1100 1105 1110
Lys Asp Cys Arg Arg Arg Ser Gly His Leu Thr Ser Val His Ser
1115 1120 1125
Pro Glu Glu His Ser Phe Ile Asn Ser Phe Gly His Glu Asn Thr
1130 1135 1140
Trp Ile Gly Leu Asn Asp Arg Ile Val Glu Arg Asp Phe Gln Trp
1145 1150 1155
Thr Asp Asn Thr Gly Leu Gln Phe Glu Asn Trp Arg Glu Asn Gln
1160 1165 1170
Pro Asp Asn Phe Phe Ala Gly Gly Glu Asp Cys Val Val Met Val
1175 1180 1185
Ala His Glu Ser Gly Arg Trp Asn Asp Val Pro Cys Asn Tyr Asn
1190 1195 1200
Leu Pro Tyr Val Cys Lys Lys Gly Thr Val Leu Cys Gly Pro Pro
1205 1210 1215
Pro Ala Val Glu Asn Ala Ser Leu Ile Gly Ala Arg Lys Ala Lys
1220 1225 1230
Tyr Asn Val His Ala Thr Val Arg Tyr Gln Cys Asn Glu Gly Phe
1235 1240 1245
Ala Gln His His Val Ala Thr Ile Arg Cys Arg Ser Asn Gly Lys
1250 1255 1260
Trp Asp Arg Pro Gln Ile Val Cys Thr Lys Pro Arg Arg Ser His
1265 1270 1275
Arg Met Arg Arg His His His His His Gln His His His Gln His
[0065] 1280 1285 1290
His His His Lys Ser Arg Lys Glu Arg Arg Lys His Lys Lys His
1295 1300 1305
Pro Thr Glu Asp Trp Glu Lys Asp Glu Gly Asn Phe Cys
1310 1315 1320

<210> 135
<211> 911
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 135

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

[0066]

```
                180                 185                 190
Tyr Ala Ala Tyr Leu Gly Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu
        195                 200                 205
Ser Asp Gln Thr Val Arg Tyr Pro Ile Gln Thr Pro Arg Glu Ala Cys
    210                 215                 220
Tyr Gly Asp Met Asp Gly Phe Pro Gly Val Arg Asn Tyr Gly Val Val
225                 230                 235                 240
Asp Pro Asp Asp Leu Tyr Asp Val Tyr Cys Tyr Ala Glu Asp Leu Asn
                245                 250                 255
Gly Glu Leu Phe Leu Gly Asp Pro Pro Glu Lys Leu Thr Leu Glu Glu
            260                 265                 270
Ala Arg Ala Tyr Cys Gln Glu Arg Gly Ala Glu Ile Ala Thr Thr Gly
        275                 280                 285
Gln Leu Tyr Ala Ala Trp Asp Gly Gly Leu Asp His Cys Ser Pro Gly
    290                 295                 300
Trp Leu Ala Asp Gly Ser Val Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Ser Gln
305                 310                 315                 320
Arg Cys Gly Gly Gly Leu Pro Gly Val Lys Thr Leu Phe Leu Phe Pro
                325                 330                 335
Asn Gln Thr Gly Phe Pro Asn Lys His Ser Arg Phe Asn Val Tyr Cys
            340                 345                 350
Phe Arg Asp Ser Ala Gln Pro Ser Ala Ile Pro Glu Ala Ser Asn Pro
        355                 360                 365
Ala Ser Asn Pro Ala Ser Asp Gly Leu Glu Ala Ile Val Thr Val Thr
    370                 375                 380
Glu Thr Leu Glu Glu Leu Gln Leu Pro Gln Glu Ala Thr Glu Ser Glu
385                 390                 395                 400
Ser Arg Gly Ala Ile Tyr Ser Ile Pro Ile Met Glu Asp Gly Gly Gly
                405                 410                 415
Gly Ser Ser Thr Pro Glu Asp Pro Ala Glu Ala Pro Arg Thr Leu Leu
            420                 425                 430
Glu Phe Glu Thr Gln Ser Met Val Pro Pro Thr Gly Phe Ser Glu Glu
        435                 440                 445
Glu Gly Lys Ala Leu Glu Glu Glu Glu Lys Tyr Glu Asp Glu Glu Glu
    450                 455                 460
Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Asp Glu Ala Leu Trp
465                 470                 475                 480
Ala Trp Pro Ser Glu Leu Ser Ser Pro Gly Pro Glu Ala Ser Leu Pro
                485                 490                 495
Thr Glu Pro Ala Ala Gln Glu Glu Ser Leu Ser Gln Ala Pro Ala Arg
            500                 505                 510
Ala Val Leu Gln Pro Gly Ala Ser Pro Leu Pro Asp Gly Glu Ser Glu
        515                 520                 525
Ala Ser Arg Pro Pro Arg Val His Gly Pro Pro Thr Glu Thr Leu Pro
    530                 535                 540
Thr Pro Arg Glu Arg Asn Leu Ala Ser Pro Ser Pro Ser Thr Leu Val
545                 550                 555                 560
Glu Ala Arg Glu Val Gly Glu Ala Thr Gly Gly Pro Glu Leu Ser Gly
                565                 570                 575
Val Pro Arg Gly Glu Ser Glu Glu Thr Gly Ser Ser Glu Gly Ala Pro
            580                 585                 590
Ser Leu Leu Pro Ala Thr Arg Ala Pro Glu Gly Thr Arg Glu Leu Glu
        595                 600                 605
Ala Pro Ser Glu Asp Asn Ser Gly Arg Thr Ala Pro Ala Gly Thr Ser
    610                 615                 620
Val Gln Ala Gln Pro Val Leu Pro Thr Asp Ser Ala Ser Arg Gly Gly
625                 630                 635                 640
Val Ala Val Val Pro Ala Ser Gly Asp Cys Val Pro Ser Pro Cys His
                645                 650                 655
Asn Gly Gly Thr Cys Leu Glu Glu Glu Glu Gly Val Arg Cys Leu Cys
            660                 665                 670
Leu Pro Gly Tyr Gly Gly Asp Leu Cys Asp Val Gly Leu Arg Phe Cys
        675                 680                 685
Asn Pro Gly Trp Asp Ala Phe Gln Gly Ala Cys Tyr Lys His Phe Ser
    690                 695                 700
```

Thr Arg Arg Ser Trp Glu Glu Ala Glu Thr Gln Cys Arg Met Tyr Gly
705 710 715 720
Ala His Leu Ala Ser Ile Ser Thr Pro Glu Glu Gln Asp Phe Ile Asn
725 730 735
Asn Arg Tyr Arg Glu Tyr Gln Trp Ile Gly Leu Asn Asp Arg Thr Ile
740 745 750
Glu Gly Asp Phe Leu Trp Ser Asp Gly Val Pro Leu Leu Tyr Glu Asn
755 760 765
Trp Asn Pro Gly Gln Pro Asp Ser Tyr Phe Leu Ser Gly Glu Asn Cys
770 775 780
Val Val Met Val Trp His Asp Gln Gly Gln Trp Ser Asp Val Pro Cys
785 790 795 800
Asn Tyr His Leu Ser Tyr Thr Cys Lys Met Gly Leu Val Ser Cys Gly
805 810 815
Pro Pro Pro Glu Leu Pro Leu Ala Gln Val Phe Gly Arg Pro Arg Leu
820 825 830
Arg Tyr Glu Val Asp Thr Val Leu Arg Tyr Arg Cys Arg Glu Gly Leu
835 840 845
Ala Gln Arg Asn Leu Pro Leu Ile Arg Cys Gln Glu Asn Gly Arg Trp
850 855 860
Glu Ala Pro Gln Ile Ser Cys Val Pro Arg Arg Pro Ala Arg Ala Leu
865 870 875 880
His Pro Glu Glu Asp Pro Glu Gly Arg Gln Gly Arg Leu Leu Gly Arg
885 890 895
Trp Lys Ala Leu Leu Ile Pro Pro Ser Ser Pro Met Pro Gly Pro
900 905 910

<210> 136
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列

[0067] <400> 136

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 137
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 137

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115
<210> 138
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 138
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala
115
<210> 139
<211> 116
[0068] <212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 139
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala
115
<210> 140
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 140
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

<210> 141
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 141
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Lys
100 105 110

[0069] Val Ser Ser Ala
115

<210> 142
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 142
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 143
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 143
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala
115

<210> 144
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 144

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

[0070]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ala
115

<210> 145
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 145

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ala Ala
115

<210> 146
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 146
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Gly
115
<210> 147
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 147
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
[0071] Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Gly Gly
115
<210> 148
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 148
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Gly Gly Gly
115

<210> 149
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 149
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115
<210> 150
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 150
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
[0072] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala
115
<210> 151
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 151
Ser Phe Gly Met Ser
1 5
<210> 152
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 152
Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

[0073]

<210> 153
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 153
Gly Gly Ser Leu Ser Arg
1 5
<210> 154
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 154
Ala Ala Ala
1
<210> 155
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 155
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 156
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 157
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 157
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 158
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 159
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 159
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10
<210> 160

<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 160
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 161
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 161
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Ser

<210> 162
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 162
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser
20

[0074]

<210> 163
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 163
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25
<210> 164
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 164
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30
<210> 165
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 165
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser
35

<210> 166
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 166
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40
<210> 167
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 167
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15
<210> 168
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 168
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
1 5 10 15
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20

[0075]

<210> 169
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 169
Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro Gln Pro Ala Ala Ala
1 5 10
<210> 170
<211> 62
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头序列
<400> 170
Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45
Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
50 55 60
<210> 171
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 171
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn

[0076]

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Lys Ser Ala
115

<210> 172
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> myc标签
<400> 172

Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
1 5 10 15
Ala

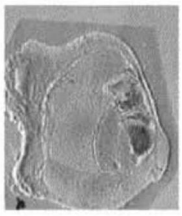
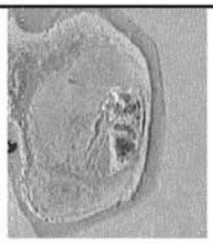
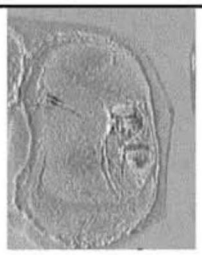
C010100#	构建体	注射后 2 周		注射后 4 周	
054	114F08-ALB26				
118	Alb26-114F08-114F08				
094	604F02-ALB26				

图1

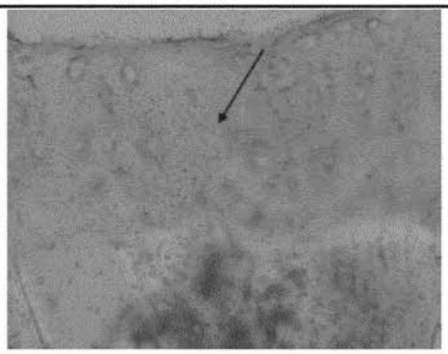
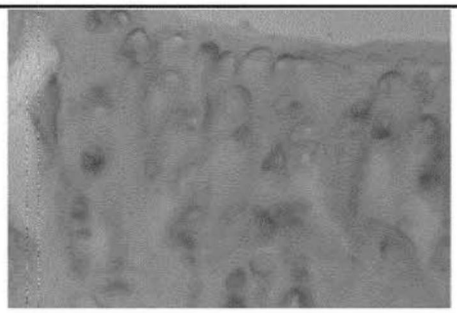
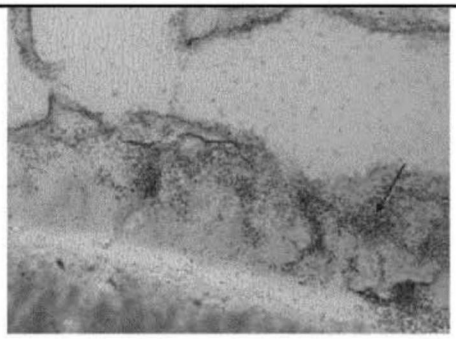
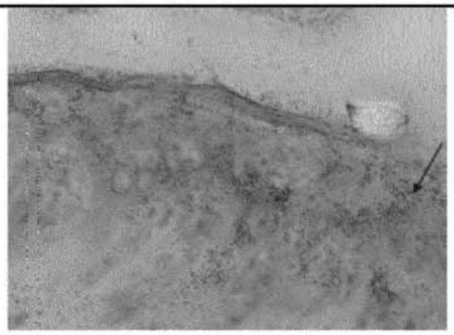
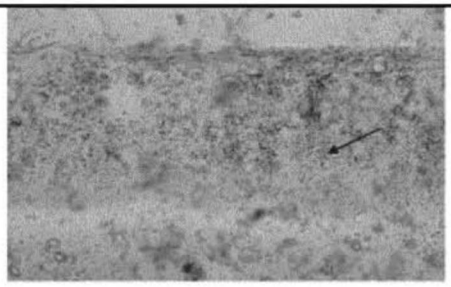
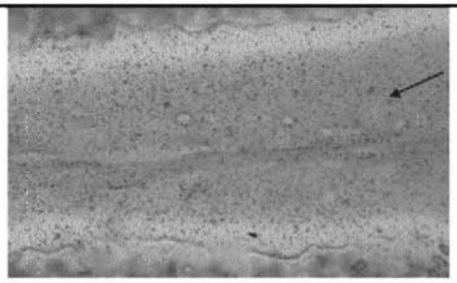
C010100#	健康膝盖	经手术的膝盖
#054		
#626		
#094		

图2

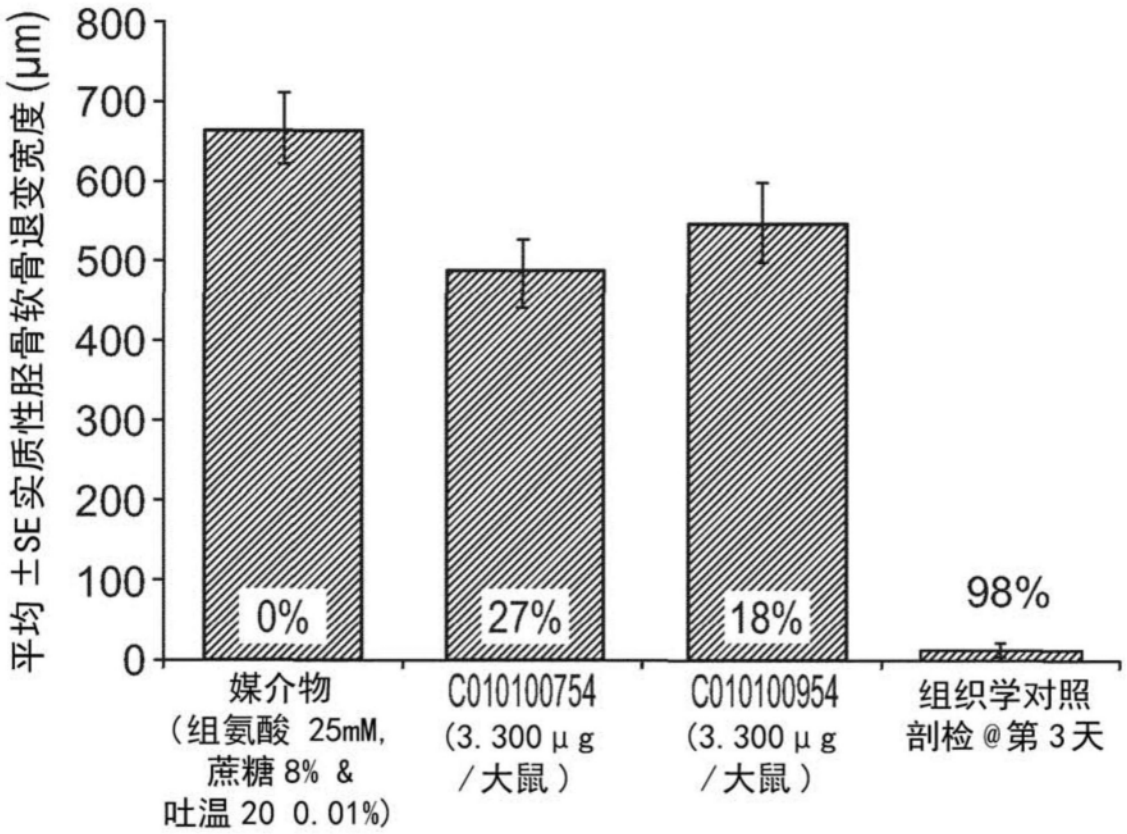

平均 ±SE实质性胫骨软骨退变宽度(μm)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0%
27%
18%
98%
媒介物
（组氨酸 25mM,
蔗糖 8% &
吐温 20 0.01%）
C010100754
(3.300 μg
/大鼠）
C010100954
(3.300 μg
/大鼠）
组织学对照
剖检@第3天

图3

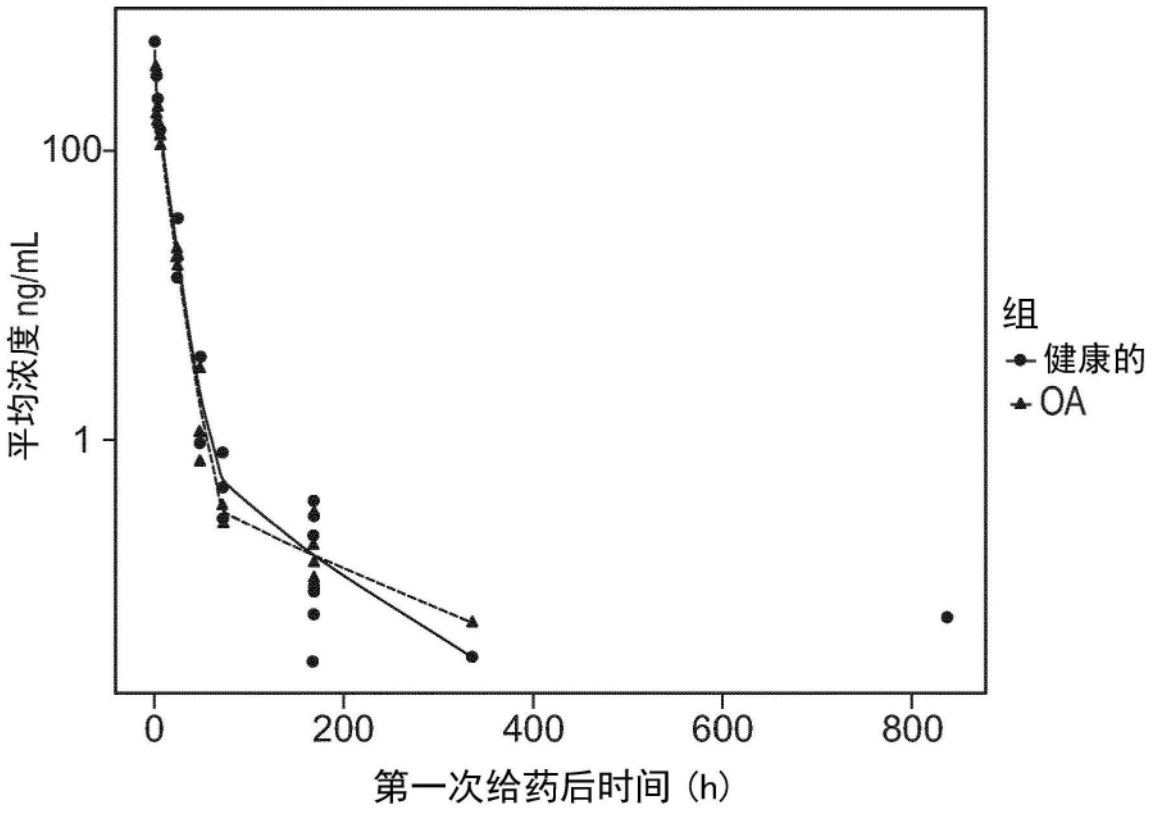


图4