



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107454905 B

(45) 授权公告日 2023.04.28

(21) 申请号 201680020014.7  
 (22) 申请日 2016.03.31  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 107454905 A  
 (43) 申请公布日 2017.12.08  
 (30) 优先权数据  
 15162112.5 2015.03.31 EP  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2017.09.29  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/EP2016/057021 2016.03.31  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02016/156465 EN 2016.10.06  
 (73) 专利权人 索里索制药公司  
 地址 美国加利福尼亚州  
 (72) 发明人 S·克罗 M·韦斯特 K·罗伯茨  
 T·卡尔顿 L·马焦雷  
 M·丘比特 K·雷  
 (74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
 11247  
 专利代理师 史文静 黄革生  
 (51) Int. Cl.  
 C07K 16/24 (2006.01)  
 C12N 15/13 (2006.01)  
 C12N 15/81 (2006.01)  
 C12N 15/70 (2006.01)  
 A61K 39/395 (2006.01)  
 A61P 37/04 (2006.01)  
 A61P 17/00 (2006.01)  
 A61P 3/10 (2006.01)  
 (54) 发明名称  
 多肽  
 (57) 摘要  
 提供了包含结合TNF- $\alpha$ 的免疫球蛋白链可

(56) 对比文件  
 WO 2006/122786 A2,2006.11.23  
 WO 2004/041862 A2,2004.05.21  
 CN 102584997 A,2012.07.18  
 CN 101039959 A,2007.09.19  
 WO 2009/021754 A2,2009.02.19  
 WO 2012/055030 A1,2012.05.03  
 Junrong Yan等.Construction of a synthetic phage-displayed nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications.《Journal of Translational Medicine》.2014,第12卷(第1期),  
 Michael A.Kamm 等.Practical application of anti-TNF therapy for luminal Crohn's disease.《Inflammatory Bowel Diseases》.2011,第17卷(第11期),  
 Mengyuan Liu等.Targeting TNF-alpha with a tetravalent mini-antibody TNF-TeAb.《Biochem J.》.2007,第406卷(第2期),  
 常宏等.基于TNF功能表位设计新型人源单链抗体.《中国医药生物技术》.2014,(第4期),  
 Greg Hussack等.Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability.《Plos One》.2011,第6卷(第11期),第1-15页.  
 Christopher J.Bond等.Contributions of CDR3 to VHH domain stability and the design of monobody scaffolds for naive antibody libraries.《J.Mol.Biol.》.2003,第332卷第643-655页.  
 审查员 谭小飞  
 权利要求书3页 说明书73页  
 序列表19页 附图16页  
 变结构域的多肽,等等,其中免疫球蛋白链可变结构域包含三个互补决定区(CDR1-CDR3)和四个框架区(FR1-FR4),其中CDR1-CDR3和FR1-FR4如说明书中所定义。

CN 107454905 B

1. 一种与TNF- $\alpha$ 结合的VHH,其包含三个互补决定区(CDR1-CDR3)和四个框架区(FR1-FR4),其中CDR1由SEQ ID NO:1组成,CDR2由SEQ ID NO:2组成,并且CDR3由SEQ ID NO:3组成。
2. 根据权利要求1的VHH,其中FR1包含与SEQ ID NO:4共有90%或更高的序列同一性的序列。
3. 根据权利要求2的VHH,其中FR1由与SEQ ID NO:4共有90%或更高的序列同一性的序列组成。
4. 根据权利要求2的VHH,其中对应于SEQ ID NO:4的残基编号1的FR1的残基是D或E。
5. 根据权利要求4的VHH,其中对应于SEQ ID NO:4的残基编号1的FR1残基是D。
6. 根据权利要求2的VHH,其中对应于SEQ ID NO:4的残基编号5的FR1残基是V。
7. 根据权利要求2的VHH,其中对应于SEQ ID NO:4的残基编号1至5的FR1的残基是DVQLV。
8. 根据权利要求2的VHH,其中对应于SEQ ID NO:4的残基编号20的FR1的残基是疏水性的氨基酸。
9. 根据权利要求8的VHH,其中对应于SEQ ID NO:4的残基编号20的FR1残基是L。
10. 根据权利要求2的VHH,其中对应于SEQ ID NO:4的残基编号24的FR1的残基是疏水性的氨基酸。
11. 根据权利要求10的VHH,其中对应于SEQ ID NO:4的残基编号24的FR1残基是A。
12. 根据权利要求2的VHH,其中对应于SEQ ID NO:4的残基编号29的FR1残基是F。
13. 根据权利要求2的VHH,其中FR1包含SEQ ID NO:4。
14. 根据权利要求3的VHH,其中FR1由SEQ ID NO:4组成。
15. 根据权利要求1的VHH,其中FR2包含与SEQ ID NO:5共有90%或更高的序列同一性的序列。
16. 根据权利要求15的VHH,其中对应于SEQ ID NO:5的残基编号8至11的FR2残基是KEXE,其中X为R或L。
17. 根据权利要求16的VHH,其中X为L。
18. 根据权利要求16的VHH,其中X是R。
19. 根据权利要求15的VHH,其中对应于SEQ ID NO:5的残基编号9至12的FR2残基是GLEW。
20. 根据权利要求15的VHH,其中FR2包含SEQ ID NO:5。
21. 根据权利要求15的VHH,其中FR2由SEQ ID NO:5组成。
22. 根据权利要求1的VHH,其中FR3包含与SEQ ID NO:6共有90%或更高的序列同一性的序列。
23. 根据权利要求22的VHH,其中对应于SEQ ID NO:6的残基编号26的FR3残基是疏水性的氨基酸。
24. 根据权利要求23的VHH,其中对应于SEQ ID NO:6的残基编号26的FR3残基是A。
25. 根据权利要求22的VHH,其中FR3包含SEQ ID NO:6。
26. 根据权利要求22的VHH,其中FR3由SEQ ID NO:6组成。
27. 根据权利要求1的VHH,其中FR4包含与SEQ ID NO:7共有90%或更高的序列同一性

的序列。

28. 根据权利要求27的VHH,其中FR4包含SEQ ID NO:7。

29. 根据权利要求27的VHH,其中FR4由SEQ ID NO:7组成。

30. 根据权利要求1的VHH,其包含与SEQ ID NO:8共有95%或更高的序列同一性的序列。

31. 根据权利要求30的VHH,其由与SEQ ID NO:8共有95%或更高的序列同一性的序列组成。

32. 根据权利要求1的VHH,其中所述VHH的N-末端为D。

33. 根据权利要求30的VHH,其包含SEQ ID NO:8。

34. 根据权利要求33的VHH,其由SEQ ID NO:8组成。

35. 一种构建体,包含两个或更多个根据权利要求1至34中任一项的相同VHH。

36. 一种构建体,包含至少一个根据权利要求1至34中任一项的VHH和至少一个不同免疫球蛋白链可变结构域,其中所述不同免疫球蛋白链可变结构域与TNF- $\alpha$ 结合。

37. 一种构建体,包含至少一个根据权利要求1至34中任一项的VHH和至少一种不同的VHH,其中所述不同的VHH与TNF- $\alpha$ 以外的靶标结合。

38. 根据权利要求37的构建体,其中所述至少一种不同的VHH与IL-23结合。

39. 根据权利要求37的构建体,其中所述至少一种不同的VHH与IL-7R结合。

40. 根据权利要求37的构建体,其中所述至少一种不同的VHH与IL-6R结合。

41. 根据权利要求1的VHH,其在正常L929测定中,中和人TNF- $\alpha$ 细胞毒性,其EC50为0.4nM或更低。

42. 根据权利要求1的VHH,其在正常L929测定中,中和食蟹猴TNF- $\alpha$ 细胞毒性,其EC50为0.4nM或更低。

43. 一种药物组合物,包含根据权利要求1至34中任一项的VHH和一种或多种药学上可接受的稀释剂或载体。

44. 根据权利要求43的药物组合物,其中所述组合物以肠包衣的形式存在。

45. 根据权利要求43的药物组合物,包含至少一种其它活性剂。

46. 根据权利要求45所述的药物组合物,其中所述至少一种其它活性剂选自:5-氨基水杨酸或其前药;皮质类固醇;免疫抑制剂;抗TNF- $\alpha$ 抗体;抗IL12/IL23抗体;抗IL6R抗体或小分子IL12/IL23抑制剂;抗 $\alpha$ -4- $\beta$ -7抗体;MAdCAM-1阻断剂;针对细胞粘附分子 $\alpha$ -4-整联蛋白的抗体;针对IL2受体 $\alpha$ 亚基的抗体;JAK3抑制剂;Syk抑制剂及其前药物;磷酸二酯酶-4抑制剂;HMPL-004;益生菌;Dersalazine;塞马莫德/CPSI-2364;和蛋白激酶C抑制剂。

47. 根据权利要求46的药物组合物,其中所述至少一种其它活性剂是5-氨基水杨酸。

48. 根据权利要求1至34、41和42中任一项的VHH、根据权利要求43至47中任一项的药物组合物或根据权利要求35至40中任一项的构建体在制备用于治疗自身免疫和/或炎症疾病的药物中的用途,其中所述自身免疫和/或炎症疾病是炎症性肠病。

49. 根据权利要求48的用途,其中所述炎症性肠病是克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

50. 根据权利要求48的用途,其中所述药物是口服施用。

51. 根据权利要求48所述的用途,其中所述药物是局部施用于皮肤。

52. 根据权利要求48所述的用途,其中所述VHH、药物组合物或构建体与至少一种活性

剂顺序地,同时地或分开地施用,所述活性剂选自:5-氨基水杨酸或其前药;皮质类固醇;免疫抑制剂;抗TNF- $\alpha$ 抗体;抗IL12/IL23抗体;抗IL6R抗体或小分子IL12/IL23抑制剂;抗 $\alpha$ -4- $\beta$ -7抗体;MAdCAM-1阻断剂;针对细胞粘附分子 $\alpha$ -4-整联蛋白的抗体;针对IL2受体 $\alpha$ 亚基的抗体;JAK3抑制剂;Syk抑制剂及其前药物;磷酸二酯酶-4抑制剂;HMPL-004;益生菌;Dersalazine;塞马莫德/CPSI-2364;和蛋白激酶C抑制剂。

53. 根据权利要求52的用途,其中所述VHH、药物组合或构建体与英夫利昔单抗、阿达木单抗、certolizumab pegol或戈利木单抗顺序、同时或分开地施用。

54. 一种编码根据权利要求1至34、41和42中任一项的VHH或根据权利要求35至40中任一项的构建体的多核苷酸。

55. 根据权利要求54的多核苷酸,其中所述多核苷酸由SEQ ID NO:83至88中任一个所组成。

56. 一种cDNA,包含根据权利要求54的多核苷酸。

57. 一种载体,包含根据权利要求54的多核苷酸。

58. 一种宿主细胞,转化有根据权利要求57的载体并且能够表达根据权利要求1至34、41和42中任一项的VHH或根据权利要求35至40中任一项的构建体。

59. 根据权利要求58的宿主细胞,其中宿主细胞是酵母细胞。

60. 根据权利要求58的宿主细胞,其中宿主细胞是细菌细胞。

61. 一种制备根据权利要求1至34、41和42中任一项的VHH或根据权利要求35至40中任一项的构建体的方法,包括以下步骤:

i) 将根据权利要求54的多核苷酸克隆到载体中,

ii) 在允许产生根据权利要求1至34、41和42中任一项的VHH或根据权利要求35至40中任一项的构建体的条件下,用所述载体转化能够产生所述VHH或构建体的细胞,

iii) 回收VHH或构建体。

## 多肽

### 发明领域

[0001] 本发明涉及包含结合肿瘤坏死因子- $\alpha$  ('TNF-alpha'、'TNF- $\alpha$ '或'TNF')的免疫球蛋白链可变结构域(或'可变结构域')的多肽以及包含这些多肽的构建体和药物组合物。本发明还涉及编码此类多肽的核酸,制备此类多肽的方法,包含编码此类多肽的核酸的cDNA和载体,表达或能够表达此类多肽的宿主细胞,以及此类多肽、药物组合物或构建体的用途。

### [0002] 发明背景

[0003] 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 是参与全身炎症的同源三聚体促炎细胞因子,其以可溶性和膜结合形式存在。TNF- $\alpha$ 主要由单核细胞和巨噬细胞分泌,但也由肿瘤细胞系以及CD4+和CD8+外周血T淋巴细胞以及一些经培养的T和B细胞系分泌。TNF- $\alpha$ 涉及炎症性疾病,自身免疫疾病,病毒、细菌和寄生虫感染,恶性肿瘤和/或神经变性疾病,并且是自身免疫/自身炎症疾病如类风湿性关节炎和克罗恩氏病中特异性生物学治疗的靶标。

[0004] 克罗恩氏病也称为克罗恩综合征和区域性肠炎,是一种引起各种症状的炎性肠疾病。它主要引起腹痛,腹泻,呕吐和/或体重减轻,但也可能导致胃肠道外的并发症(GIT),如贫血、皮疹、关节炎、眼睛炎症、疲劳和注意力不集中(Baumgart等人2012The Lancet 380(9853):1590-605,通过整体引用并入本文)。克罗恩氏病是目前难以治愈的终生胃肠道疾病,难以用常规疗法控制。以下在“自身免疫疾病”中更详细地讨论克罗恩氏病。

[0005] 对TNF- $\alpha$ 具有足够特异性的TNF- $\alpha$ 抑制剂可能是用于预防或治疗诸如克罗恩氏病的疾病的有效预防或治疗药物,其中TNF- $\alpha$ 被认为是驱动观察到的病理学的关键细胞因子。

[0006] 基于抗体的治疗剂作为对自身免疫疾病的有效治疗具有重要的潜力,因为它们对其靶标具有高特异性和低固有毒性。已经描述了通过施用结合TNF- $\alpha$ 的抗体来治疗自身免疫疾病的方法(Kamm等人2011 Inflamm Bowel Dis 17:2366-91,其通过整体引用并入本文)。

[0007] 临床上使用三种抗TNF- $\alpha$ 抗体英夫利昔单抗(商品名类克(Remicade)),阿达木单抗(商品名Humira)和赛妥珠单抗(或“certolizumab pegol”,商品名均为Cimzia)用于克罗恩氏病的治疗;然而,这些抗体通常被认为不适合作为口服治疗剂施用,因为它们固有的不稳定性和对消化系统、存在于肠道病理部位的炎性蛋白酶和肠道微生物群落的蛋白水解降解的易感性。因此,这些药剂必须通过静脉输注或皮下注射来施用,这需要专家培训才能正确且安全地使用皮下注射器或针头。这些药剂还需要无菌设备,治疗性多肽的液体制剂,所述多肽的无菌和稳定形式的小瓶包装以及为了针头进入而在受试者上的合适位点。受试者通常在接受注射前经受心理压力并在接受注射时经受疼痛。用这些系统性抗TNF- $\alpha$ 抗体进行长期治疗会增加严重感染和癌症的风险。加上高生产成本,这些因素目前限制了这些药剂在具有更严重疾病的患者上的使用。

[0008] 几种小分子抗炎和免疫抑制药物目前正处于克罗恩氏病的临床开发中(Danese 2012Gut 61:918-932和Shealy等人2010mAbs 2:428-439,通过整体引用并入本文)。尽管这

些药物是口服施用的,但许多药物在施用后将被全身吸收,并因此可能具有与对胃肠道损伤的作用无关的全身性免疫抑制作用。此外,由于小分子缺乏抗体的特异性,显著的偏离靶标副作用的风险仍然很高。

[0009] 克罗恩氏病主要是胃肠道的疾病。TNF- $\alpha$ 的产生定位于在粘膜和粘膜下组织中存在的细胞,并且这驱动了肠壁内的慢性炎症过程,以及引发负责疾病免疫病理学发展的额外的炎性细胞的募集(van Deventer 1999 Ann Rheum Dis 58(Suppl I):I114-I120)。递送对TNF- $\alpha$ 具有高选择性但暴露于肠且活性局限于肠的口服治疗剂的能力可提供类似于可注射的抗TNF- $\alpha$ 抗体的功效,以及由于减少的全身暴露导致的安全性的显著改善。

[0010] WO 2004/041862、WO 2006/122786和Coppieters等人2006 Arthritis& Rheumatism 54(6):1856-1866(通过整体引用并入本文)公开了针对TNF- $\alpha$ 和相关方面的单结构域抗体。WO 2006/122786中称为“TNF1”,“PMP1C2”或“SEQ ID NO:52”)的序列在下面进一步表征。

[0011] 在至少一些实施方案中,与现有技术的抗TNF- $\alpha$ 物质相比,本发明的多肽可具有以下优点中的一个或多个:

[0012] (i) 对TNF- $\alpha$ 的亲合力增加;

[0013] (ii) 对TNF- $\alpha$ 的特异性增加;

[0014] (iii) 对TNF- $\alpha$ 的中和能力增加;

[0015] (iv) 与来自不同物种如人和食蟹猴的TNF- $\alpha$ 的交叉反应性增加;

[0016] (v) 与可溶性和膜形式的TNF- $\alpha$ 的交叉反应性增加;

[0017] (vi) 免疫原性降低,例如当施用小鼠、食蟹猴或人时;

[0018] (vii) 在蛋白酶的存在下的稳定性增加,例如(a) 在小肠和/或大肠和/或IBD炎性蛋白酶中发现的蛋白酶例如胰蛋白酶,糜蛋白酶,MMP3,MMP10,MMP12,其它MMP和组织蛋白酶的存在下和/或(b) 在来自肠道共生微生物群落和/或病原菌,通过在小肠和/或大肠中发现的微生物细胞的裂解而主动分泌和/或释放的蛋白酶的存在下;

[0019] (viii) 生产期间蛋白酶降解的稳定性提高(例如对酵母蛋白酶的抗性)

[0020] (ix) 口服施用适应性增加;

[0021] (x) 在口服施用后对局部递送到肠道和固有层的适应性增加;

[0022] (xi) 在异源宿主如细菌如大肠杆菌或属于曲霉属(*Aspergillus*)、酵母属(*Saccharomyces*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)或毕赤酵母属(*Pichia*)的酵母,如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中的表达适应性增加;

[0023] (xii) 对在药物中应用的适应性和改进的性能;

[0024] (xiii) 对在功能性食品中应用的适应性和改进性能;

[0025] (xiv) 改善的组织渗透性,例如发炎的结肠粘膜上皮和粘膜下组织的渗透以进入粘膜下固有层;

[0026] (xv) 在(a) 冷冻和解冻后和/或(b) 以冻干、液体/乳膏形式在例如37或50摄氏度下长期储存之后保持基本上活性的;

[0027] (xvi) 例如由于与人免疫球蛋白的序列相似性增加而在人中降低的免疫原性;

[0028] (xvii) 以多种特异性形式来形式化的适应性增加;

[0029] (xviii) 结合新表位。

[0030] 上述优点 (i) 至 (xviii) 可能潜在地由本发明的多肽以单价形式或多价形式例如双头形式 (例如双头或异双头形式) 实现。

## 发明内容

[0031] 本发明人已经产生了出人意料地有益的多肽, 其包含与 TNF- $\alpha$  结合的免疫球蛋白链可变结构域。这些多肽特别受益于出人意料的高效力。它们还中和可溶性和膜形式的 TNF- $\alpha$ , 能够与食蟹猴 TNF- $\alpha$  交叉反应, 并且在暴露于小肠和大肠胰蛋白酶、糜蛋白酶和/或蛋白酶时保持稳定。在一个实施方案中, 这些多肽已通过改造进一步增强。这些进一步增强的多肽从上述优点中受益, 在通过肠道期间保持其 TNF- $\alpha$  中和活性, 并进一步抵抗被肠道的蛋白酶降解和/或灭活, 例如, 来自例如多种哺乳动物物种 (啮齿动物、猪、非人灵长类和人类) 的消化性、炎性和微生物蛋白酶。

[0032] 可以预期, 这些多肽在预防或治疗自身免疫疾病和或炎性疾病如炎性肠病 (例如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎) 中, 或预防或治疗粘膜炎, 特别是口服施用时具有特别的实用性。

[0033] 本发明提供了包含与 TNF- $\alpha$  结合的免疫球蛋白链可变结构域的多肽, 其中所述免疫球蛋白链可变结构域包含三个互补决定区 (CDR1-CDR3) 和四个框架区 (FR1-FR4), 其中 CDR1 包含与 SEQ ID NO:1 共有 60% 或更高序列同一性的序列, CDR2 包含与 SEQ ID NO:2 共有 50% 或更高序列同一性的序列, 和 (a) CDR3 包含与 SEQ ID NO:3 共有 80% 或更高序列同一性的序列或 (b) CDR3 包含与 SEQ ID NO:3 共有 50% 或更高序列同一性的序列, 并且其中对应于 SEQ ID NO:3 的残基编号 3 的 CDR3 的残基是 R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y 或 V。

[0034] 还提供了包含结合 TNF- $\alpha$  的免疫球蛋白链可变结构域的多肽, 其中免疫球蛋白链可变结构域包含三个互补决定区 (CDR1-CDR3) 和四个框架区 (FR1-FR4), 其中 CDR1 包含与 SEQ ID NO:15 共有 60% 或更高序列同一性的序列, CDR2 包含与 SEQ ID NO:16 共有 50% 或更高序列同一性的序列, 且 CDR3 包含与 SEQ ID NO:17 共有 50% 或更高序列同一性的序列。

[0035] 还提供了包含结合 TNF- $\alpha$  的免疫球蛋白链可变结构域的多肽, 其中免疫球蛋白链可变结构域包含三个互补决定区 (CDR1-CDR3) 和四个框架区 (FR1-FR4), 其中 CDR3 包含与 SEQ ID NO:3 共有 80% 或更高序列同一性的序列。

## 附图说明

[0036] 图1-周质上清液和纯化样品在暴露和未暴露于胰蛋白酶和糜蛋白酶时的 TNF- $\alpha$  中和活性%

[0037] 图2A-在 HEK-Nf-kB-SEAP 报告子测定中 Q65B1、Q65C7、Q62E10 和阿达木单抗的 hs-TNF- $\alpha$  中和

[0038] 图2B-Q65B1 和 Q65D3 的 hs-TNF- $\alpha$  中和

[0039] 图3-小鼠小肠和人粪便消化物中的免疫球蛋白链可变结构域

[0040] 图4A-ID32F、ID34F、Q65B1 和英夫利昔单抗的 hs-TNF- $\alpha$  中和 (第一个实验)

[0041] 图4B-ID32F、ID34F 和 Q65B1 的 hs-TNF- $\alpha$  中和 (第二个实验)

[0042] 图4C-ID3F、ID38F 和类克的 hs-TNF- $\alpha$  中和 (第二个实验)

- [0043] 图5A-ID34F和ID25F在IBD蛋白酶中的稳定性
- [0044] 图5B-依那西普和阿达木单抗在IBD蛋白酶中的稳定性
- [0045] 图5C-英夫利昔单抗在IBD蛋白酶中的稳定性
- [0046] 图6-现有技术的抗TNF- $\alpha$ 多肽对h-TNF- $\alpha$ 的中和
- [0047] 图7-食蟹猴胃肠道切片中计算的腔[抗TNF ICVD]
- [0048] 图8-食蟹猴胃肠道的抗TNF ICVD的总回收率%
- [0049] 图9-Humira竞争ELISA OD450数据
- [0050] 图10-集合的食蟹猴粪便中的抗TNF ICVD浓度
- [0051] 图11-从集合的食蟹猴粪便中回收的计算的抗TNF ICVD
- [0052] 序列说明
- [0053] SEQ ID NO:1-ID38F CDR1的多肽序列
- [0054] SEQ ID NO:2-ID38F CDR2的多肽序列
- [0055] SEQ ID NO:3-ID38F CDR3的多肽序列
- [0056] SEQ ID NO:4-ID38F FR1的多肽序列
- [0057] SEQ ID NO:5-ID38F FR2的多肽序列
- [0058] SEQ ID NO:6-ID38F FR3的多肽序列
- [0059] SEQ ID NO:7-ID38F FR4的多肽序列
- [0060] SEQ ID NO:8-ID38F的多肽序列
- [0061] SEQ ID NO:9-可溶性的人TNF- $\alpha$ (单体)的多肽序列
- [0062] SEQ ID NO:10-膜结合的人TNF- $\alpha$ (单体)的多肽序列
- [0063] SEQ ID NO:11-可溶性的食蟹猴TNF- $\alpha$ (单体)的多肽序列
- [0064] SEQ ID NO:12-膜结合的食蟹猴TNF- $\alpha$ (单体)的多肽序列
- [0065] SEQ ID NO:13-可溶性的小鼠TNF- $\alpha$ (单体)的多肽序列
- [0066] SEQ ID NO:14-膜结合的小鼠TNF- $\alpha$ (单体)的多肽序列
- [0067] SEQ ID NO:15-Q62E10 CDR1的多肽序列
- [0068] SEQ ID NO:16-Q62E10 CDR2的多肽序列
- [0069] SEQ ID NO:17-Q62E10 CDR3的多肽序列
- [0070] SEQ ID NO:18-Q62E10 FR1的多肽序列
- [0071] SEQ ID NO:19-Q62E10 FR2的多肽序列
- [0072] SEQ ID NO:20-Q62E10 FR3的多肽序列
- [0073] SEQ ID NO:21-Q62E10 FR4的多肽序列
- [0074] SEQ ID NO:22-Q62E10的多肽序列
- [0075] SEQ ID NO:23-Q65F2的多肽序列
- [0076] SEQ ID NO:24-Q65F3的多肽序列
- [0077] SEQ ID NO:25-Q62F2的多肽序列
- [0078] SEQ ID NO:26-Q65G1的多肽序列
- [0079] SEQ ID NO:27-Q65H6的多肽序列
- [0080] SEQ ID NO:28-Q65F1的多肽序列
- [0081] SEQ ID NO:29-Q65D1的多肽序列

- [0082] SEQ ID NO:30-Q65C7的多肽序列
- [0083] SEQ ID NO:31-Q65D3的多肽序列
- [0084] SEQ ID NO:32-Q65B1的多肽序列
- [0085] SEQ ID NO:33-Q65F6的多肽序列
- [0086] SEQ ID NO:34-Q65F11的多肽序列
- [0087] SEQ ID NO:35-Q65E12的多肽序列
- [0088] SEQ ID NO:36-Q65C12的多肽序列
- [0089] SEQ ID NO:37-Q65A6的多肽序列
- [0090] SEQ ID NO:38-Q65A3的多肽序列
- [0091] SEQ ID NO:39-Q62F10的多肽序列
- [0092] SEQ ID NO:40-Q62F11的多肽序列
- [0093] SEQ ID NO:41-ID7F-EV的多肽序列
- [0094] SEQ ID NO:42-ID8F-EV的多肽序列
- [0095] SEQ ID NO:43-ID9F-EV的多肽序列
- [0096] SEQ ID NO:44-ID13F-EV的多肽序列
- [0097] SEQ ID NO:45-ID14F-EV的多肽序列
- [0098] SEQ ID NO:46-ID15F-EV的多肽序列
- [0099] SEQ ID NO:47-ID22F的多肽序列
- [0100] SEQ ID NO:48-ID23F的多肽序列
- [0101] SEQ ID NO:49-ID24F的多肽序列
- [0102] SEQ ID NO:50-ID25F的多肽序列
- [0103] SEQ ID NO:51-ID26F的多肽序列
- [0104] SEQ ID NO:52-ID27F的多肽序列
- [0105] SEQ ID NO:53-ID28F的多肽序列
- [0106] SEQ ID NO:54-ID29F的多肽序列
- [0107] SEQ ID NO:55-Q62E10-DVQLV的多肽序列
- [0108] SEQ ID NO:56-ID34F的多肽序列
- [0109] SEQ ID NO:57-ID37F的多肽序列
- [0110] SEQ ID NO:58-具有Spe位点的3'引物的多核苷酸序列
- [0111] SEQ ID NO:59-Q65F1 CDR1的多肽序列
- [0112] SEQ ID NO:60-Q65D1 CDR1的多肽序列
- [0113] SEQ ID NO:61-ID27F CDR2的多肽序列
- [0114] SEQ ID NO:62-ID28F CDR2的多肽序列
- [0115] SEQ ID NO:63-Q65F2 CDR2的多肽序列
- [0116] SEQ ID NO:64-Q65F3 CDR2的多肽序列
- [0117] SEQ ID NO:65-Q62F2 CDR2的多肽序列
- [0118] SEQ ID NO:66-Q65F1 CDR2的多肽序列
- [0119] SEQ ID NO:67-Q65D1 CDR2的多肽序列
- [0120] SEQ ID NO:68-Q65D3 CDR2的多肽序列

- [0121] SEQ ID NO:69-Q65B1 CDR2的多肽序列
- [0122] SEQ ID NO:70-Q65F2 CDR3的多肽序列
- [0123] SEQ ID NO:71-Q65F1 CDR3的多肽序列
- [0124] SEQ ID NO:72-Q65D3 CDR3的多肽序列
- [0125] SEQ ID NO:73-Q65F6 CDR2的多肽序列
- [0126] SEQ ID NO:74-Q65F11 CDR2的多肽序列
- [0127] SEQ ID NO:75-Q65C12 CDR2的多肽序列
- [0128] SEQ ID NO:76-Q65A6 CDR2的多肽序列
- [0129] SEQ ID NO:77-Q65A3 CDR2的多肽序列
- [0130] SEQ ID NO:78-Q65F6 CDR3的多肽序列
- [0131] SEQ ID NO:79-Q65F11 CDR3的多肽序列
- [0132] SEQ ID NO:80-Q62F10 CDR3的多肽序列
- [0133] SEQ ID NO:81-M13.rev的多核苷酸序列
- [0134] SEQ ID NO:82-M13.fw的多核苷酸序列
- [0135] SEQ ID NO:83-对酵母表达进行密码子优化的、ID38F的多核苷酸编码序列
- [0136] SEQ ID NO:84-对酵母表达进行密码子优化的、Q62E10的多核苷酸编码序列,
- [0137] SEQ ID NO:85-对大肠杆菌表达进行密码子优化的、ID38F的多核苷酸编码序列
- [0138] SEQ ID NO:86-对大肠杆菌表达进行密码子优化的、Q62E10的多核苷酸编码序列
- [0139] SEQ ID NO:87-由用于大肠杆菌表达的ID38F开放阅读框组成的多核苷酸(Pe1B前导肽至c-myc-6His标签2×终止密码子)
- [0140] SEQ ID NO:88-由用于大肠杆菌表达的ID38F开放阅读框组成的多核苷酸(Pe1B前导肽至Flag-6His标签2×终止密码子)
- [0141] 发明的详细说明
- [0142] 包括涵盖VH和VHH的抗体和抗体片段的多肽
- [0143] 常规抗体或免疫球蛋白(Ig)是包含四条多肽链的蛋白质:两条重(H)链和两条轻(L)链。每条链分为恒定区和可变结构域。重链可变结构域在本文中缩写为VHC,并且轻(L)链可变结构域在本文中缩写为VLC。这些结构域,与其相关的结构域和由其衍生的结构域在本文中称为免疫球蛋白链可变结构域。VHC和VLC结构域可以进一步细分为被称为“互补决定区”(“CDR”)的高变区域,散布有更保守的区域(称为“框架区”) (“FR”)。已经精确定义了框架区和互补决定区(Kabat等人,1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH出版号91-3242,其通过整体引用并入本文)。在常规抗体中,每个VHC和VLC由以下顺序从氨基末端至羧基末端排列的三个CDR和四个FR组成:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。两个重免疫球蛋白链和两个轻免疫球蛋白链的常规抗体四聚体是由通过例如,二硫键,互相连接的重和轻的免疫球蛋白链,以及相连的重链相似物形成的。重链恒定区包括三个结构域CH1,CH2和CH3。轻链恒定区由一个结构域CL组成。重链的可变结构域和轻链的可变结构域是与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区域通常介导抗体与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞))和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。术语抗体包括IgA、IgG、IgE、IgD、IgM型(以及其亚型)的免疫球蛋白,其中免疫球蛋白的轻链可以是κ或λ型。由两个相同

的重(H)链和两个相同的轻(L)链多肽组装的免疫球蛋白- $\gamma$  (IgG)抗体的整体结构被完全建立并且在哺乳动物中高度保守(Padlan 1994 Mol Immunol 31:169-217)。

[0144] 在骆驼科的血清中发现常规抗体结构的例外。除常规抗体外,这些血清还具有特异的IgG抗体。称为重链抗体(HCAb)的这些IgG抗体缺乏L链多肽,并且缺少第一恒定结构域(CH1)。在其N末端区域,同二聚体蛋白的H链含有专门的免疫球蛋白链可变结构域,称为VHH,其用于与其同源抗原缔合(Muyldermans 2013 Annu Rev Biochem 82:775-797, Hamers-Casterman等人1993Nature 363(6428):446-448, Muyldermans等人1994 Protein Eng 7(9):1129-1135,其通过整体引用并入本文)。

[0145] 本文所用的抗原结合片段(或“抗体片段”或“免疫球蛋白片段”)是指特异性结合TNF- $\alpha$ 的抗体的一部分(例如其中一个或多个免疫球蛋白链不是全长,但其特异性结合TNF- $\alpha$ 的分子)。术语抗原结合片段中包含的结合片段的例子包括:

[0146] (i) Fab片段(由VLC、VHC、CL和CH1结构域组成的单价片段);

[0147] (ii) F(ab')<sub>2</sub>片段(包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段);

[0148] (iii) Fd片段(由VHC和CH1结构域组成);

[0149] (iv) Fv片段(由抗体的单臂的VLC和VHC结构域组成);

[0150] (v) scFv片段(由使用重组方法通过合成接头连接的VLC和VHC结构域组成,使得它们能够制成其中的VLC和VHC区域配对以形成单价分子的单个蛋白质链);

[0151] (vi) VH(由VHC结构域组成的免疫球蛋白链可变结构域(Ward等人Nature 1989 341:544-546));

[0152] (vii) VL(由VLC结构域组成的免疫球蛋白链可变结构域);

[0153] (viii) V-NAR(由来自软骨鱼纲(chondrichthyes) IgNAR的VHC结构域组成的免疫球蛋白链可变结构域(Roux等人,1998 Proc Natl Acad Sci USA 95:11804-11809和Griffiths等人,2013 Antibodies 2:66-81,通过整体引用引入本文)

[0154] (ix) VHH。

[0155] VHH或VH中的氨基酸残基的总数可以在110-130的范围内,适当地为112-120,并且最合适为115。

[0156] 本发明的免疫球蛋白链可变结构域可以例如通过使用核酸合成技术制备编码免疫球蛋白链可变结构域的核酸,然后表达由此获得的核酸来获得。根据具体实施方案,本发明的免疫球蛋白链可变结构域不具有与天然存在的多肽(例如天然存在的抗体的VH或VHH结构域)的氨基酸序列完全相同(即,与其共有100%序列同一性)的氨基酸序列。

[0157] 本文提供的例子涉及结合TNF- $\alpha$ 的免疫球蛋白链可变结构域本身。然而,本文公开的本发明的原理同样适用于包含结合TNF- $\alpha$ 的免疫球蛋白链可变结构域的任何多肽,例如抗体和抗体片段。例如,本文公开的抗TNF- $\alpha$ 免疫球蛋白链可变结构域可以并入多肽,例如全长抗体。McCoy等人“Retrovirology 2014”11:83证实了这种方法,他们提供了抗HIV VHH,其被改造为与人Fc区(包括铰链、CH2和CH3结构域)的融合物,作为二聚体构建体表达。

[0158] 非人类免疫球蛋白可变结构域的框架区中至少一个氨基酸残基被来自人可变结构域的相应残基取代是人源化。可变结构域的人源化可能降低人体免疫原性。

[0159] 适当地,本发明的多肽由免疫球蛋白链可变结构域组成。适当地,本发明的多肽是抗体或抗体片段。适当地,抗体片段是VHH、VH、VL、V-NAR、Fab片段、VL或F(ab')<sub>2</sub>片段(例如

VHH或VH,最适当地是VHH)。

[0160] 特异性、亲和力(affinity)、亲合力(avidity)和交叉反应性

[0161] 特异性是指特定抗原结合多肽可以结合的不同类型的抗原或抗原决定簇的数目。抗原结合多肽的特异性是抗原结合多肽将特定抗原识别为独特的分子实体并将其与另一种区分开来的能力。

[0162] 由抗原与抗原结合多肽解离的平衡常数(Kd)表示的亲和力是抗原决定簇与抗原结合多肽上的抗原结合位点之间的结合强度的量度:Kd值越小,抗原决定簇与抗原结合多肽之间的结合强度越强(或者亲和力也可以表示为亲和常数(Ka),它是1/Kd)。取决于具体的目的抗原,可以通过已知方法测定亲和力。

[0163] 亲合力是抗原结合多肽与相关抗原之间结合强度的量度。亲合力与抗原决定簇与抗原结合多肽上的抗原结合位点之间的亲和力以及存在于抗原结合多肽上的相关结合位点的数量二者有关。

[0164] 适当地,本发明的抗原结合多肽将以 $10^{-6}$ 至 $10^{-12}$ M的解离常数(Kd)结合,更适当地为 $10^{-7}$ 至 $10^{-12}$ M,更适当地为 $10^{-8}$ 至 $10^{-12}$ M,以及更适当地为 $10^{-9}$ 至 $10^{-12}$ M。

[0165] 任何小于 $10^{-6}$ 的Kd值被认为表示结合。抗原结合多肽与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以以任何合适的已知方式测定,包括例如Scatchard分析和/或竞争性结合测定法,例如放射免疫测定法(RIA),酶免疫测定法(EIA)和夹心竞争测定法,以及本领域已知的其不同变型。

[0166] 抗TNF- $\alpha$ 多肽,与TNF- $\alpha$ 相互作用的多肽或针对TNF- $\alpha$ 的多肽都是结合TNF- $\alpha$ 的有效多肽。本发明的多肽可以结合TNF- $\alpha$ 上的线性或构象表位。术语“结合TNF- $\alpha$ ”是指与三聚体TNF- $\alpha$ 结合,与TNF- $\alpha$ 的单体结合和/或与TNF- $\alpha$ 的一部分单体结合。

[0167] 适当地,本发明的多肽将结合可溶性和膜TNF- $\alpha$ 两者。适当地,本发明的多肽将与人TNF- $\alpha$ 结合。更适当地,本发明的多肽将结合人和至少一种其它灵长类动物TNF- $\alpha$ 两者,所述灵长类动物TNF- $\alpha$ 选自由狒狒TNF- $\alpha$ ,绒猴TNF- $\alpha$ ,食蟹猴TNF- $\alpha$ 和恒河猴TNF- $\alpha$ 组成的组。最适当地,本发明的多肽结合人和食蟹猴TNF- $\alpha$ 两者。

[0168] 适当地,本发明的多肽将中和可溶性和膜TNF- $\alpha$ 两者。适当地,本发明的多肽将中和人TNF- $\alpha$ 。更适当地,本发明的多肽将中和人和至少一种其它灵长类动物TNF- $\alpha$ 两者,所述灵长类动物TNF- $\alpha$ 选自由狒狒TNF- $\alpha$ ,绒猴TNF- $\alpha$ ,食蟹猴TNF- $\alpha$ 和恒河猴TNF- $\alpha$ 组成的组。最适当地,本发明的多肽中和人和食蟹猴TNF- $\alpha$ 两者。

[0169] 适当地,TNF- $\alpha$ 是包含SEQ ID NO:9的多肽,更适当地,TNF- $\alpha$ 是由SEQ ID NO:9组成的多肽。适当地,TNF- $\alpha$ 是包含SEQ ID NO:10的多肽,更适当地TNF- $\alpha$ 是由SEQ ID NO:10组成的多肽。适当地,TNF- $\alpha$ 是包含SEQ ID NO:11的多肽,更适当地,TNF- $\alpha$ 是由SEQ ID NO:11组成的多肽。适当地,TNF- $\alpha$ 是包含SEQ ID NO:12的多肽,更适当地,TNF- $\alpha$ 是由SEQ ID NO:12组成的多肽。

[0170] 能够与来自人的TNF- $\alpha$ 和来自另一物种的TNF- $\alpha$ (如食蟹猴TNF- $\alpha$ )反应(“交叉反应”)的多肽是有利的,因为它们允许临床前研究以便更容易地在动物模型中进行。

[0171] 适当地,本发明的多肽针对是和/或形成TNF- $\alpha$ 三聚体的受体结合位点的一部分的TNF- $\alpha$ (特别是TNF- $\alpha$ 三聚体)上的表位,使得所述本发明的多肽在结合TNF- $\alpha$ 三聚体时能够抑制或降低由所述TNF- $\alpha$ 三聚体介导的TNF- $\alpha$ 受体交联和/或由这种受体交联介导的信号转

导。

[0172] 本发明的多肽与TNF- $\alpha$ 三聚体上的一个或多个表位结合。在本发明的一个方面,提供了与Q65F2、Q65F3、Q62F2、Q65G1、Q65H6、Q65F1、Q65D1、Q65C7、Q65D3、Q65B1、Q65F6、Q65F11、Q65E12、Q65C12、Q65A6、Q65A3、Q62E10、Q62F10、ID7F-EV、ID8F-EV、ID9F-EV、ID13F-EV、ID14F-EV、ID15F-EV、ID22F、ID23F、ID24F、ID25F、ID26F、ID27F、ID28F、ID29F、ID34F、ID37F或ID38F的TNF- $\alpha$ 三聚体上的相同表位结合的多肽。

[0173] 适当地,本发明的多肽是分离的。“分离的”多肽是从其原始环境中移除的多肽。例如,如果与天然系统中的一些或全部共存材料分离,则本发明的天然存在的多肽是分离的。

[0174] 效力、抑制及中和

[0175] 效力是以产生给定强度的效果所需的量来表示的治疗剂的活性的量度。与在低浓度下引起较小反应的较低效力的活性剂相比,高效活性剂在低浓度下引起更大的反应。效力是亲和力和功效的函数。功效是指治疗剂在与靶配体结合时产生生物反应的能力以及该反应的定量幅度。术语半最大有效浓度(EC50)是指在指定的暴露时间后引起反应到基线和最大值之间的一半时的治疗剂的浓度。治疗剂可引起抑制或刺激。它常常被用作,并且在本文中用作效力的量度。

[0176] 用于本发明目的的中和多肽是结合TNF- $\alpha$ 的多肽,其抑制TNF- $\alpha$ 与一种或两种其同源受体(例如TNFR1、TNFR2)的结合,这通过ELISA测量。可选地,或者另外地,用于本发明目的的中和多肽是通过例如抑制TNF- $\alpha$ 的生物学作用来保护细胞免受TNF- $\alpha$ 作用的多肽。通常,抗TNF- $\alpha$ 治疗性抗体产物已经使用具有细胞死亡终点的L929鼠细胞系作为中和测定法(Humphreys和Wilson 1999 Cytokine 11(10):773-782)。为此目的利用L929鼠细胞系的方法包括下面:

[0177] 固定浓度L929测定法-固定浓度L929测定法可以用于相对快速地指示固定浓度的多肽,例如,包含在周质提取物中以中和TNF- $\alpha$ 细胞毒性作用的能力(详见实施例部分的2.2.3)。

[0178] 正常L929测定法-使用已知浓度的抗TNF- $\alpha$ 多肽,可以进行正常L929测定法(如实施例部分的3.2至3.2.3部分所详述),以通过确定抗TNF- $\alpha$ 多肽的半最大有效浓度(EC50)测定抗TNF- $\alpha$ 多肽中和TNF- $\alpha$ 细胞毒性作用的能力。

[0179] 适当地,本发明的多肽或构建体在正常L929测定法中中和人TNF- $\alpha$ 细胞毒性,其EC50为1nM或更低,例如0.9nM或更低,例如0.8nM或更低,例如0.7nM或更低,例如0.6nM或更低,例如0.5nM或更低,例如0.4nM或更低,例如0.3nM或更低,例如0.2nM或更低,例如0.1nM或更低,例如0.09nM或更低,例如0.08nM或更低,例如0.07nM或更低,例如0.06nM或更低,例如0.05nM或更低,例如0.04nM或更低。

[0180] 适当地,本发明的多肽或构建体在正常L929测定法中中和食蟹猴TNF- $\alpha$ 细胞毒性,其EC50为1nM或更低,例如0.9nM或更低,例如0.8nM或更低,例如0.7nM或更低,例如0.6nM或更低,例如0.5nM或更低,例如0.4nM或更低,例如0.3nM或更低,例如0.2nM或更低,例如0.1nM或更低,例如0.09nM或更低,例如0.08nM或更低,例如0.07nM或更低,例如0.06nM或更低,例如0.05nM或更低,例如0.04nM或更低,例如0.03nM或更低,例如0.02nM或更低,例如0.01nM或更低。

[0181] 适当地,本发明的多肽在ELISA测定法中抑制人TNF- $\alpha$ 与TNFR2的结合,其EC50为

30nM或更低,更适当地为10nM或更低,更适当地为3nM或更低,更适当地为1nM或更低,更适当地为0.6nM或更低,更适当地为0.5nM或更低,更适当地为0.4nM或更低,更适当地为0.3nM或更低。

[0182] 适当地,本发明的多肽在ELISA测定法中抑制食蟹猴TNF- $\alpha$ 与TNFR2的结合,其EC50为110nM或更低,更适当地为30nM或更低,更适当地为10nM或更低,更适当地为3nM或更低,更适当地为1nM或更低,更适当地为0.6nM或更低,更适当地为0.5nM或更低,更适当地为0.4nM或更低,更合适为0.3nM或更低。

[0183] 适当地,本发明的多肽在ELISA测定法中抑制人TNF- $\alpha$ 与TNFR1的结合,其EC50为2nM或更低,更适当地为1nM或更低,更适当地为0.9nM或更低,更适当地为0.8nM或更低,更适当地为0.7nM或更低,更适当地为0.6nM或更低,更适当地为0.5nM或更低,更适当地为0.4nM或更低,更适当地为0.3nM或更低。

[0184] 适当地,本发明的多肽抑制可溶性人TNF- $\alpha$ 诱导的HEK-293-NF- $\kappa$ -B SEAP报告细胞活化,其EC50为3nM或更低,适当地为2nM或更低,适当地为1nM或更低,适当地为0.5nM或更低,适当地为0.4nM或更低,适当地为0.3nM或更低,适当地为0.2nM或更低,适当地为0.1nM或更低,适当地为0.08nM或更低。

[0185] 适当地,本发明的多肽抑制人TNF- $\alpha$ 诱导的HEK-293-NF- $\kappa$ BSEAP报告细胞的活化,其EC 50为300nM或更低,适当地为150nM或更低,适当地为100nM或更低,适当地为80nM或更低,适当地为40nM或更低,适当地为30nM或更低,适当地为25nM或更低,适当地为20nM或更低,适当地为15nM或更低。

[0186] 多肽和多核苷酸序列

[0187] 为了比较两个紧密相关的多肽序列的目的,可以使用NCBI BLAST v2.0,使用多肽序列的标准设置(BLASTP)来计算第一多肽序列和第二多肽序列之间的“%序列同一性”。为了比较两个密切相关的多核苷酸序列的目的,可以使用NCBI BLAST v2.0,使用核苷酸序列的标准设置(BLASTN)来计算第一核苷酸序列和第二核苷酸序列之间的“%序列同一性”。

[0188] 如果多肽或多核苷酸序列在其整个长度上共有100%的序列同一性,则称其与其它多肽或多核苷酸序列相同或同一。序列中的残基从左到右编号,即从多肽的N-至C-末端;从多核苷酸的5'至3'末端编号。

[0189] 序列之间的“差异”是指与第一序列相比,在第二序列的位置上的单个氨基酸残基的插入、缺失或取代。两个多肽序列可以含有一个、两个或更多个这样的氨基酸差异。本来应与第一序列相同(100%序列同一性)的第二序列中的插入、缺失或取代导致序列同一性减小。例如,如果相同序列9个氨基酸残基长,则第二序列中的一个取代导致88.9%的序列同一性。如果相同序列长17个氨基酸残基,则第二序列中的两个取代导致88.2%的序列同一性。如果相同序列长7个氨基酸残基,则第二序列中的三个取代导致57.1%的序列同一性。如果第一和第二多肽序列长9个氨基酸残基且共有6个相同的残基,则第一和第二多肽序列具有大于66%的同一性(第一和第二多肽序列共有66.7%的同一性)。如果第一和第二多肽序列长17个氨基酸残基且共有16个相同的残基,则第一和第二多肽序列共有大于94%的同一性(第一和第二多肽序列共有94.1%的同一性)。如果第一和第二多肽序列长7个氨基酸残基且共有3个相同的残基,则第一和第二多肽序列共有大于42%的同一性(第一和第二多肽序列共有42.9%的同一性)。

[0190] 或者,为了将第一参考多肽序列与第二比较多肽序列进行比较,可以确定为产生第二序列而对第一序列进行添加、取代和/或缺失的数目。添加是将一个氨基酸残基添加到第一多肽的序列中(包括在第一多肽的任一末端添加)。取代是用一个不同氨基酸残基取代第一多肽序列中的一个氨基酸残基。缺失是从第一多肽的序列中删除一个氨基酸残基(包括第一多肽的任一末端的缺失)。

[0191] 为了比较第一参考多核苷酸序列与第二比较多核苷酸序列,可以确定为产生第二序列而对第一个序列进行添加、取代和/或缺失的数目。添加是将一个核苷酸残基添加到第一多核苷酸的序列中(包括在第一多核苷酸的任一末端添加)。取代是用一个不同的核苷酸残基取代第一多核苷酸的序列中的一个核苷酸残基。缺失是从第一多核苷酸的序列中删除一个核苷酸残基(包括第一多核苷酸的任一末端的缺失)。

[0192] “保守”氨基酸取代是这样的氨基酸取代,其中氨基酸残基被具有相似化学结构并且预期其对多肽的功能、活性或其它生物学性质几乎没有影响的另一个氨基酸残基替代。这样的保守取代适当地是下组中的一个氨基酸被来自同一组内的另一个氨基酸残基取代的取代:

[0193]

| 组      | 氨基酸残基 |
|--------|-------|
| 非极性脂肪性 | 甘氨酸   |
|        | 丙氨酸   |
|        | 缬氨酸   |
|        | 亮氨酸   |
|        | 异亮氨酸  |
| 芳香性    | 苯丙氨酸  |
|        | 酪氨酸   |
|        | 色氨酸   |
| 极性不带电荷 | 丝氨酸   |
|        | 苏氨酸   |
|        | 天冬酰胺  |
|        | 谷氨酰胺  |
| 带负电荷   | 天冬氨酸  |
|        | 谷氨酸   |
| 带正电荷   | 赖氨酸   |
|        | 精氨酸   |

[0194] 适当地,疏水性氨基酸残基是非极性氨基酸。更适当地,疏水性氨基酸残基选自V、I、L、M、F、W或C。

[0195] 如本文所用,多肽序列的编号和CDR和FR的定义根据Kabat系统(Kabat等人1991Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition US Department of Health and Human Services,NIH Publication Number 91-3242,其通过整体引用并入本文)来定义。第一和第二多肽序列之间的“相应”氨基酸残基是第一序列中的、根据Kabat系统与第二序列中的氨基酸残基共有相同位置的氨基酸残基,尽管第二序列与第一序列的氨基酸残基的同源性可能不同。如果根据Kabat定义框架和CDR具有相同的长度,则适当地相应的残基将共有相同的数字(和字母)。对准可以手动实现,或者通过使用例如使用标准设置的已知用于序列比对的计算机算法(例如NCBI BLAST v2.0 (BLASTP或BLASTN))来实现。

[0196] 适当地,本发明中使用的多核苷酸是分离的。“分离的”多核苷酸是从其原始环境中被移除的多核苷酸。例如,如果天然存在的多核苷酸与天然系统中的一些或全部共存材料分离,则其是分离的。如果例如多核苷酸被克隆到不是其天然环境的一部分的载体中或者如果其包含在cDNA内,则认为它是分离的。

[0197] 在本发明的一个方面,提供了编码本发明的多肽或构建体的多核苷酸。适当地,该多核苷酸包含与SEQ ID NO:83至88的任一个共有70%或更高,例如80%或更高,例如90%或更高,例如95%或更高,例如99%或更高序列同一性的序列或由其组成。更适当地,多核苷酸包含SEQ ID NO:83至88中的任一个或由其组成。在另一方面,提供了包含所述多核苷酸的cDNA。

[0198] 在本发明的一个方面,提供了包含与SEQ ID NO:83至86中任一个的任一部分共有70%或更高,例如80%或更高,例如90%或更高,例如95%或更高,例如99%或更高的序列同一性的序列或由其组成的多核苷酸序列,所述任一部分编码所编码的免疫球蛋白链可变结构域的CDR1、CDR2或CDR3。

[0199] 适当地,本发明的多肽序列相对于天然序列含有至少一个改变。适当地,本发明的多核苷酸序列相对于天然序列含有至少一个改变。适当地,进行相对于该多肽序列或多核苷酸序列的改变以增加多肽或编码多肽对存在于肠道中的蛋白酶(例如胰蛋白酶和糜蛋白酶)的稳定性。

[0200] 应用于选定的免疫球蛋白链可变结构域序列的Kabat编号系统





或更适当地由其组成。

[0205] 或者,本发明多肽的CDR1包括与SEQ ID NO:1相比具有不超过2个,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的CDR1包括与SEQ ID NO:1相比不超过2个,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的CDR1包括与SEQ ID NO:1相比具有不超过2个,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0206] 适当地,CDR1中与其在SEQ ID NO:1中的相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,CDR1包括SEQ ID NO:1或更适当地由其组成。适当地,CDR1的序列是SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:60。

[0207] 适当地,本发明多肽的CDR2包括与SEQ ID NO:2共有55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或更高序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0208] 或者,本发明多肽的CDR2包括与SEQ ID NO:2相比具有不超过8个,更适当地不超过7个,更适当地不超过6个,更适当地不超过5个,更适当地不超过4个,更适当地不超过3个,更适当地不超过2个,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的CDR2包括与SEQ ID NO:2相比具有不超过8个,更适当地不超过7个,更适当地不超过6个,更适当地不超过5个,更适当地不超过4个,更适当地不超过3个,更适当地不超过2个,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的CDR2包括与SEQ ID NO:2相比具有不超过8个,更适当地不超过7个,更适当地不超过6个,更适当地不超过5个,更适当地不超过4个,更适当地不超过3个,更适当地不超过2个,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0209] 适当地,CDR2中与其在SEQ ID NO:2中的相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,对应于SEQ ID NO:2的残基编号10的CDR2的残基是R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F或I(最适当地是H)。适当地,CDR2包括SEQ ID NO:2或更适当地由其组成。适当地,CDR2的序列是SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69。

[0210] 适当地,本发明多肽的CDR3包括与SEQ ID NO:3共有80%或更高序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0211] 或者,本发明多肽的CDR3包含与SEQ ID NO:3相比具有不超过3个,更适当地不超过2个,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的CDR3包含与SEQ ID NO:3相比具有不超过3个,更适当地不超过2个,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的CDR3包含与SEQ ID NO:3相比具有不超过3个,更适当地不超过2个,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。适当地,任何相对于SEQ ID NO:3中相应的残基的取代是保守的。

[0212] 适当地,CDR3中与其在SEQ ID NO:3中的相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,对应于SEQ ID NO:3的残基编号3的CDR3的残基是R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F或I;或适当地R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、V、L、W、P、M、C、F或I(最适当地是H)。适当地,对应于SEQ ID NO:3的残基编号3的CDR3的残基是H,并且CDR3中与其在SEQ ID NO:3中相应残基不同的任何其它残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,

CDR3包含SEQ ID NO:3或更适当地由其组成。

[0213] 或者,本发明多肽的CDR3包含与SEQ ID NO:3共有50%,例如60%,例如80%或更高序列同一性的序列或更适当地由其组成,并且其中SEQ ID NO:3的残基编号3是R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y或V(适当地是H或H的保守取代;更适当地是H)。或者SEQ ID NO:3的残基编号3为H或H的保守取代(最适当地是H),并且CDR3中与其在SEQ ID NO:3中相应残基不同的任何其它残基是保守取代。适当地,CDR3的序列是SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72。

[0214] 适当地,CDR1的残基1是S、V或N;残基2至4是HWM,残基5是Y或C。适当地,CDR2的残基1至9是EINTNGLIT;残基10是H、K、S或N;残基11是Y,残基12是G、V、I或A;残基13是D;残基14是S或F;残基15是V或T;残基16是H、K、R或G,残基17是G。适当地,CDR3的残基1是N;残基2是Q或E;残基3是H、K、M或R,残基4至6是GLN。

[0215] 一些特别适当的CDR序列在下表中示出。适当地,本发明多肽的CDR1是以下列出的CDR1序列之一。适当地,本发明多肽的CDR2是以下列出的CDR2序列之一。适当地,本发明多肽的CDR3是以下列出的CDR3序列之一。适当地,本发明的多肽包含以下列出的CDR序列中两个或更适当地三个的组合。

[0216] 本发明多肽的具体家族1CDR:

| CDR1                  | CDR2                                 | CDR3                   |
|-----------------------|--------------------------------------|------------------------|
| SHWMY (SEQ ID NO: 1)  | EINTNGLITHYGDSVHG<br>(SEQ ID NO: 61) | NQHGLN (SEQ ID NO: 3)  |
| VHWMY (SEQ ID NO: 59) | EINTNGLITKYGDSVHG<br>(SEQ ID NO: 62) | NQKGLN (SEQ ID NO: 70) |
| NHWMC (SEQ ID NO: 60) | EINTNGLITHYGDSVKG<br>(SEQ ID NO: 2)  | NQMGLN (SEQ ID NO: 71) |
|                       | EINTNGLITSYVDSVKG (SEQ<br>ID NO: 63) | NERGLN (SEQ ID NO: 72) |
| [0217]                | EINTNGLITKYIDSVRG (SEQ<br>ID NO: 64) |                        |
|                       | EINTNGLITNYVDSVKG<br>(SEQ ID NO: 65) |                        |
|                       | EINTNGLITKYIDSVGG (SEQ<br>ID NO: 66) |                        |
|                       | EINTNGLITKYADSVKG (SEQ<br>ID NO: 67) |                        |
|                       | EINTNGLITKYADSTKG (SEQ<br>ID NO: 68) |                        |
|                       | EINTNGLITKYGDSVKG<br>(SEQ ID NO: 69) |                        |

|   |
|---|
| <b>ID38F的CDR与其它家族1成员、TNF1和Q62F11的百分比同一性</b> |
|---|

| 名称           | CDR 1 | CDR 2 | CDR 3 |
|--------------|-------|-------|-------|
| [0218] Q65B1 | 100   | 94.1  | 83.3  |
| Q65F2        | 100   | 88.2  | 83.3  |
| Q65F3        | 100   | 82.4  | 83.3  |
| Q62F2        | 100   | 88.2  | 83.3  |
| Q65G1        | 100   | 82.4  | 83.3  |
| Q65H6        | 100   | 82.4  | 83.3  |
| Q65F1        | 80    | 82.4  | 83.3  |
| Q65D1        | 60    | 82.4  | 83.3  |
| Q65D3        | 100   | 82.4  | 66.7  |
| Q65C7        | 100   | 82.4  | 83.3  |
| [0219] TNF1  | 60    | 88.2  | 33.3  |
| Q62F11       | 20    | 52.9  | 13.3  |

[0220] 适当地,本发明多肽的FR1包含与SEQ ID NO:4共有5%、12%、18%、26%、32%、38%、46%、52%、58%、62%、66%、68%、72%、75%、78%、82%、85%、90%、95%或更高的序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0221] 或者,本发明多肽的FR1包含与SEQ ID NO:4相比具有不超过28,更适当地不超过26,更适当地不超过24,更适当地不超过22,更适当地不超过20,更适当地不超过18,更适当地不超过16,更适当地不超过14,更适当地不超过13,更适当地不超过12,更适当地不超过11,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR1包含与SEQ ID NO:4相比具有不超过28,更适当地不超过26,更适当地不超过24,更适当地不超过22,更适当地不超过20,更适当地不超过18,更适当地不超过16,更适当地不超过14,更适当地不超过13,更适当地不超过12,更适当地不超过11,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适合地,本发明多肽的FR1包含与SEQ ID NO:4相比具有不超过28,更适当地不超过26,更适当地不超过24,更适当地不超过22,更适当地不超过20,更适当地不超过18,更适当地不超过16,更适当地不超过14,更适当地不超过13,更适当地不超过12,更适当地不超过11,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0222] 适当地,FR1中与其在SEQ ID NO:4中的相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,对应于SEQ ID NO:4的残基编号1的FR1的残基是G、A、V、L、I、F、P、

S、T、Y、C、M、K、R、H、W、D、E或N(更适当地是D或E,最适当地是D)。适当地,对应于SEQ ID NO:4的残基编号5的FR1的残基是G、A、V、L、I、F、P、S、T、Y、C、M、K、R、H、W、D、E或N(适当的V)。适当地,对应于SEQ ID NO:4的残基编号1至5的FR1的残基是DVQLV。适当地,对应于SEQ ID NO:4的残基编号20和/或24的FR1的残基是疏水性的氨基酸(最适当地是L或A)。适当地,对应于SEQ ID NO:4的残基编号29的FR1的残基是F。适当地,FR1包含SEQ ID NO:4或更适当地由其组成。

[0223] 适当地,本发明多肽的FR2包含与SEQ ID NO:5共有10%、15%、25%、30%、40%、45%、55%、60%、70%、75%、85%、90%或更高的序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0224] 或者,本发明多肽的FR2包含与SEQ ID NO:5相比具有不超过13,更适当地不超过12,更适当地不超过11,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR2包含与SEQ ID NO:5相比具有不超过13,更适当地不超过12,更适当地不超过11,更适当地不超过10,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR2包含与SEQ ID NO:5相比具有不超过13,更适当地不超过12,更适当地不超过11,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0225] 适当地,FR2中与其在SEQ ID NO:5中相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,对应于SEQ ID NO:5的残基编号8至11的FR2的残基是KEXE,其中X是R或L。或者,对应于SEQ ID NO:5的残基编号9至12的FR2的残基是GLEW。适当地,FR2包含SEQ ID NO:5或更适当地由其组成。

[0226] 适当地,本发明多肽的FR3包含与SEQ ID NO:6共有8%、15%、20%、26%、32%、40%、45%、52%、58%、65%、70%、76%、80%、82%、85%、90%、92%、95%或更高的序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0227] 或者,本发明的多肽的FR3包含与SEQ ID NO:6相比具有不超过29,更适当地不超过27,更适当地不超过25,更适当地不超过23,更适当地不超过21,更适当地不超过19,更适当地不超过17,更适当地不超过15,更适当地不超过13,更适当地不超过11,更适当地不超过9,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR3包含与SEQ ID NO:6相比具有不超过29,更适当地不超过27,更适当地不超过25,更适当地不超过23,更适当地不超过21,更适当地不超过19,更适当地不超过17,更适当地不超过15,更适当地不超过13,更适当地不超过11,更适当地不超过9,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR3包含与SEQ ID NO:6相比具有不超过29,更适当地不超过27,更适当地不超过25,更适当地不超过23,更适当地不超过21,更适当地不超过19,更适当地不超过17,更适当地不超过15,

更适当地不超过13,更适当地不超过11,更适当地不超过9,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不大于3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0228] 适当地,对应于SEQ ID NO:6的残基编号26的FR3的残基是疏水性的氨基酸(适当地是A)。适当地,FR3与其在SEQ ID NO:6中相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,FR3包含SEQ ID NO:6或更适当地由其组成。

[0229] 适当地,本发明多肽的FR4包含与SEQ ID NO:7共有5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高的序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0230] 或者,本发明多肽的FR4包含与SEQ ID NO:7相比具有不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR4包含与SEQ ID NO:7相比具有不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR4包含与SEQ ID NO:7相比具有不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0231] 适当地,FR4中与其在SEQ ID NO:7中相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,FR4包含SEQ ID NO:7或更适当地由其组成。

[0232] 适当地,本发明的多肽包含与SEQ ID NO:8共有50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0233] 或者,本发明的多肽包含与SEQ ID NO:8相比具有不超过20,更适当地不超过15,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明的多肽包含与SEQ ID NO:8相比具有不超过20,更适当地不超过15,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明的多肽包含与SEQ ID NO:8相比具有不超过20,更适当地不超过15,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0234] 适当地,多肽的N末端是D。适当地,多肽包含SEQ ID NO:8或更适当地由其组成。

[0235] 属于家族2的序列

[0236] 本发明多肽的CDR1适当地包括与SEQ ID NO:15<sub>15</sub>共有80%或更高序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0237] 或者,本发明多肽的CDR1包括与SEQ ID NO:15<sub>15</sub>相比具有不超过2个,更适当地不超

过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的CDR1包括与SEQ ID NO:1<sub>5</sub>相比不超过2个,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的CDR1包括与SEQ ID NO:1<sub>5</sub>相比具有不超过2个,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0238] 适当地,CDR1中与其在SEQ ID NO:1<sub>5</sub>中的相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,CDR1包括SEQ ID NO:1<sub>5</sub>或更适当地由其组成。

[0239] 适当地,本发明多肽的CDR2包括与SEQ ID NO:1<sub>6</sub>共有55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或更高序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0240] 或者,本发明的多肽的CDR2包含与SEQ ID NO:16相比具有不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。或者,本发明多肽的CDR2包含与SEQ ID NO:16相比具有不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。或者,本发明多肽的CDR2包含与SEQ ID NO:16相比具有不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0241] 适当地,对应于SEQ ID NO:16的残基10和/或16的CDR2的残基是R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F或I(更适当地是H)。适当地,CDR2中与其在SEQ ID NO:16中的相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,CDR2包含SEQ ID NO:16或更适当地由其组成。适当地,CDR2的序列是SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:16。

[0242] 适当地,本发明多肽的CDR3包含与SEQ ID NO:17共有60%或更高序列同一性,例如80%或更高序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0243] 或者,本发明多肽的CDR3包含与SEQ ID NO:1<sub>7</sub>相比具有不超过3个,更适当地不超过2个,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的CDR3包含与SEQ ID NO:1<sub>7</sub>相比具有不超过3个,更适当地不超过2个,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的CDR3包含与SEQ ID NO:1<sub>7</sub>相比具有不超过3个,更适当地不超过2个,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0244] 适当地,CDR3中与其在SEQ ID NO:17中的相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,CDR3的序列是SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:80。适当地,CDR3包含SEQ ID NO:17或更适当地由其组成。

[0245] 适当地,CDR1的残基1至5是IHWMY。适当地,CDR2的残基1至9是EINTNGLIT;残基10是L、T、H、K或V;残基11为Y;残基12是S、A、T或P;残基13至15为DSV;残基16是R、K或S,残基17是G。适当地,CDR3的残基1是S、A或T;残基2是R或Q;残基3至4是NG;残基5是A或K,并且残基6是A或T。

[0246] 一些特别适当的CDR序列在下表中示出。适当地,本发明多肽的CDR1是以下列出的CDR1序列之一。适当地,本发明多肽的CDR2是以下列出的CDR2序列之一。适当地,本发明多肽的CDR3是以下列出的CDR3序列之一。适当地,本发明的多肽包含以下列出的CDR序列中两个或更适当地三个的组合。

[0247] 本发明多肽的具体家族2CDR:

| CDR1                 | CDR2                             | CDR3                  |
|----------------------|----------------------------------|-----------------------|
| IHWMY (SEQ ID NO:15) | EINTNGLITLYSDSVRG (SEQ ID NO:73) | SRNGAA (SEQ ID NO:78) |
|                      | EINTNGLITLYADSVKG (SEQ ID NO:74) | ARNGAA (SEQ ID NO:79) |
|                      | EINTNALITTYADSVKG (SEQ ID NO:75) | TQNGAA (SEQ ID NO:17) |
|                      | EINTNGLITHYTDSVSG (SEQ ID NO:76) | TQNGKT (SEQ ID NO:80) |
|                      | EINTNALITKYADSVKG (SEQ ID NO:77) |                       |
|                      | EINTNGLITVYPDSVKG (SEQ ID NO:16) |                       |

**62E10 的 CDR 与其它家族 2 成员, TNF1 和 Q62F11 的同一性百分比**

| 名称 | CDR 1 | CDR 2 | CDR 3 |
|----|-------|-------|-------|
|----|-------|-------|-------|

|        |     |      |      |
|--------|-----|------|------|
| Q65F6  | 100 | 76.5 | 66.7 |
| Q65F11 | 100 | 88.2 | 66.7 |
| Q65E12 | 100 | 88.2 | 66.7 |
| Q62C12 | 100 | 94.1 | 66.7 |

|        |     |      |      |
|--------|-----|------|------|
| Q65A6  | 100 | 76.5 | 66.7 |
| Q65A3  | 100 | 100  | 100  |
| Q65F10 | 100 | 82.4 | 66.7 |

[0250]

|        |    |      |      |
|--------|----|------|------|
| TNF1   | 60 | 88.2 | 16.7 |
| Q62F11 | 20 | 52.9 | 13.3 |

[0251] 适当地,本发明多肽的FR1包含与SEQ ID NO: 18 共有5%、12%、18%、26%、32%、38%、46%、52%、58%、62%、66%、68%、72%、75%、78%、82%、85%、90%、95%或更高的序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0252] 或者,本发明多肽的FR1包含与SEQ ID NO: 18 相比具有不超过28,更适当地不超过26,更适当地不超过24,更适当地不超过22,更适当地不超过20,更适当地不超过18,更适当地不超过16,更适当地不超过14,更适当地不超过13,更适当地不超过12,更适当地不超过11,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。或者,本发明多肽的FR1包含与SEQ ID NO: 18 相比具有不超过28,更适当地不超过26,更适当地不超过24,更适当地不超过22,更适当地不超过20,更适当地不超过18,更适当地不超过16,更适当地不超过14,更适当地不超过13,更适当地不超过12,更适当地不超过11,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。或者,本发明多肽的FR1包含与SEQ ID NO: 18 相比具有不超过28,更适当地不超过26,更适当地不超过24,更适当地不超过22,更适当地不超过20,更适当地不超过18,更适当地不超过16,更适当地不超过14,更适当地不超过13,更适当地不超过12,更适当地不超过11,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不

超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0253] 适当地,对应于SEQ ID NO:4的残基编号1的FR1的残基是G、A、V、L、I、F、P、S、T、Y、C、M、K、R、H、W、D、E或N(更适当地是D或E,最适当地是D)。适当地,对应于SEQ ID NO:18的残基编号5的FR1的残基是G、A、V、L、I、F、P、S、T、Y、C、M、K、R、H、W、D、E或N(适当地是V)。适当地,对应于SEQ ID NO:18的残基编号1至5的FR1的残基是DVQLV。适当地,对应于SEQ ID NO:18的残基编号20的FR1的残基是疏水性的氨基酸(适当地是L)。适当地,对应于SEQ ID NO:18的残基编号29的FR1的残基是F。适当地,FR1中与其在SEQ ID NO:18中的相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,FR1包含SEQ ID NO:18或更适当地由其组成。

[0254] 适当地,本发明多肽的FR2包含与SEQ ID NO:19共有10%、15%、25%、30%、40%、45%、55%、60%、70%、75%、85%、90%或更高的序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0255] 或者,本发明多肽的FR2包含与SEQ ID NO:19相比具有不超过13,更适当地不超过12,更适当地不超过11,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR2包含与SEQ ID NO:19相比具有不超过13,更适当地不超过12,更适当地不超过11,更适当地不超过10,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR2包含与SEQ ID NO:19相比具有不超过13,更适当地不超过12,更适当地不超过11,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0256] 适当地,对应于SEQ ID NO:19的残基编号8至11的FR2的残基是KELE。适当地,FR2中与其在SEQ ID NO:19中的相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,FR2包含SEQ ID NO:19或更适当地由其组成。

[0257] 适当地,本发明多肽的FR3包含与SEQ ID NO:20共有8%、15%、20%、26%、32%、40%、45%、52%、58%、65%、70%、76%、80%、82%、85%、90%、92%、95%或更高的序列同一性的序列。

[0258] 或者,本发明多肽的FR3包含与SEQ ID NO:20相比具有不超过29,更适当地27,更适当地25,更适当地23,更适当地21,更适当地19,更适当地17,更适当地15,更适当地13,更适当地11,更适当地9,更适当地7,更适当地6,更适当地5,更适当地4,更适当地3,更适当地2,更适当地1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR3包含与SEQ ID NO:20相比具有不超过29,更适当地27,更适当地25,更适当地23,更适当地21,更适当地19,更适当地17,更适当地15,更适当地13,更适当地11,更适当地9,更适当地7,更适当地6,更适当地5,更适当地4,更适当地3,更适当地2,更适当地1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR3包含与SEQ ID NO:20相比具有不超过29,更适当地27,更适当地25,更适当地23,更适当地21,更适当地19,更适当地17,更适当地15,更适当地13,更适当地11,更适当地9,更适当地7,更适当地6,更适当地5,更适当地4,更适当地3,更适当地2,更适当地1,更

适当地1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0259] 适当地,对应于SEQ ID NO:20的残基编号26的FR3的残基是疏水性的氨基酸(适当地是A)。适当地,FR3中与其在SEQ ID NO:20中的相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,FR3包含SEQ ID NO:20或更适当地由其组成。

[0260] 适当地,本发明的多肽的FR4包含与SEQ ID NO:21共有5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高的序列同一性的序列。

[0261] 或者,本发明多肽的FR4包含与SEQ ID NO:<sub>21</sub>相比具有不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR4包含与SEQ ID NO:<sub>21</sub>相比具有不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明多肽的FR4包含与SEQ ID NO:<sub>21</sub>相比具有不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0262] 适当地,对应于SEQ ID NO:21的残基编号1的CDR2的残基是R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F或I(适当地是H)。适当地,FR4中与其在SEQ ID NO:21中的相应残基不同的任何残基是相对于其相应残基的保守取代。适当地,FR4包含SEQ ID NO:21或更适当地由其组成。

[0263] 适当地,本发明的多肽包含与SEQ ID NO:22共有50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的序列或更适当地由其组成。

[0264] 或者,本发明的多肽包含与SEQ ID NO:22相比具有不超过20,更适当地不超过15,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个添加的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明的多肽包含与SEQ ID NO:22相比具有不超过20,更适当地不超过15,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,本发明的多肽包含与SEQ ID NO:22相比具有不超过20,更适当地不超过15,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适当地不超过1个缺失的序列或更适当地由其组成。

[0265] 适当地,多肽包含SEQ ID NO:22或更适当地由其组成。适当地,多肽的N末端是D。适当地,多肽包含SEQ ID NO:55或更适当地由其组成。

[0266] 适当地,本发明的多肽包含相对于SEQ ID NO:22具有不超过20,更适当地不超过15,更适当地不超过10,更适当地不超过9,更适当地不超过8,更适当地不超过7,更适当地不超过6,更适当地不超过5,更适当地不超过4,更适当地不超过3,更适当地不超过2,更适

当地不超过1个取代的序列或更适当地由其组成。适当地,任何相对于其在SEQ ID NO:22中相应的残基的取代是保守的。

[0267] 接头和多聚体

[0268] 根据本发明的构建体包含多个多肽,并因此可以适当地是多价的。这样的构建体可以包含至少两个根据本发明的相同多肽。由根据本发明的两个相同多肽组成的构建体是“同型双头(homobihead)”。在本发明的一个方面,提供了包含本发明的两个或多个相同多肽的构建体。

[0269] 或者,构建体可以包含至少两个不同的但仍都是根据本发明多肽的多肽(“异型双头”)。

[0270] 或者,这样的构建体可以包含(a)根据本发明的至少一个多肽和(b)不是本发明多肽的至少一个多肽,例如抗体或其抗原结合片段,(也是“异型双头”)。(b)的至少一种多肽可以结合TNF- $\alpha$ (例如通过与(a)不同的表位),或者可以结合除TNF- $\alpha$ 之外的靶标。适当地,不同的多肽(b)结合例如:白介素(例如IL-1、IL-1ra、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18和IL-23),白细胞介素受体(如IL-6R和IL-7R),转录因子(如NF- $\kappa$ B),细胞因子(如TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 和TSLP),跨膜蛋白(如gp130和CD3),表面糖蛋白(如CD4、CD20、CD40),可溶性蛋白(例如CD40L),整联蛋白(例如 $\alpha$ 4 $\beta$ 7和 $\alpha$ E $\beta$ 7),粘附分子(例如MAdCAM),趋化因子(例如IP10和CCL20),趋化因子受体(例如CCR2和CCR9),抑制性蛋白(例如SMAD7),激酶(例如JAK3),G蛋白偶联受体(如鞘氨醇-1-P受体),其它涉及人类病理过程的炎症介质或免疫相关的配体。因此,不同的多肽(b)结合例如IL-6R、IL-6、IL-12、IL-23、IL-1- $\beta$ 、IL-17A或CD3;或其它涉及人类病理过程的炎性介质或免疫相关的配体。

[0271] 构建体可以是多价和/或多特异性的。多价构建体(例如二价构建体)包含两个或更多个结合多肽,因此呈现两个或更多个可以发生与一种或多种抗原附着的位点。多价构建体的例子可以是同型双头或异型双头。多特异性构建体(例如双特异性构建体)包含两个或更多个不同的结合多肽,其呈现两个或更多个位点,在该位点(a)可以发生向两种或更多种不同抗原的附着或(b)可以发生在相同抗原上的两个或更多个不同的表位的附着。多特异性构建体的例子可以是异型双头。多特异性构建体是多价的。

[0272] 适当地,包含在构建体内的多肽是抗体片段。更适当地,构建体中包含的多肽选自由VHH、VH、VL、V-NAR、Fab片段和F(ab')<sub>2</sub>片段组成的列表。更适当地,构建体内包含的多肽是VHH。

[0273] 本发明的多肽可以直接(即不使用接头)或通过接头彼此连接。适当地,接头是蛋白酶不稳定或非蛋白酶不稳定接头。接头适当地是多肽,并且将被选择以允许多肽与其表位的结合。如果用于治疗目的,在施用多肽的受试者中,接头适当地是非免疫原性的。适当地,多肽均通过非蛋白酶不稳定接头连接。适当地,蛋白酶不稳定接头是 $[-(G_4S)_x-BJB'- (G_4S)_y-]_z$ 的形式,其中J是赖氨酸或精氨酸,B是0至5个选自R、H、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、P、M、C、F、K或I的氨基酸残基,B'是0至5个选自R、H、N、Q、S、T、Y、G、A、V、L、W、M、C、F、K或I的氨基酸残基,x是1至10;y是1至10,z是1至10。最适当地,J为赖氨酸,B是0,x是1,y是1,z是1。适当地,非蛋白酶不稳定接头为 $(G_4S)_x$ 形式。最适当地,x是6。

[0274] 载体和宿主

[0275] 本文所用的术语“载体”是指能够转运与其连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”，其是指可以连接额外的DNA区段的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体，其中额外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在其被引入的宿主细胞中自主复制（例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型 (episomal) 哺乳动物和酵母载体）。其它载体（例如非附加型哺乳动物载体）可以在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中，从而与宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够引导与它们有效连接的基因的表达。这些载体在本文中称为“重组表达载体”（或简称为“表达载体”）。通常，用于重组DNA技术的表达载体通常是质粒的形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可以互换使用，因为质粒是最常用的载体形式。然而，本发明旨在包括这样的其它形式的表达载体，例如用于相同功能的病毒载体（例如复制缺陷型逆转录病毒，腺病毒和腺伴随病毒），以及噬菌体和噬菌粒系统。本发明还涉及编码多肽序列或多价和/或多特异性构建体的核苷酸序列。本文所用的术语“重组宿主细胞”（或简称“宿主细胞”）旨在表示引入了重组表达载体的细胞。这些术语旨在不仅指特定的受试细胞，而且指这种细胞的后代。

[0276] 在本发明的一个方面，提供了包含编码本发明多肽或构建体的多核苷酸或包含所述多核苷酸的cDNA的载体。在本发明的另一方面，提供了用所述载体转化的宿主细胞，其能够表达本发明的多肽或构建体。适当地，宿主细胞是诸如大肠杆菌的细菌，属于曲霉属、酵母属、克鲁维酵母属、汉逊酵母属或毕赤酵母属的酵母，如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。

[0277] 稳定性

[0278] 适当地，本发明的多肽或构建体在口服递送时和暴露于肠道后（例如，在暴露于小肠和/或大肠的蛋白酶和/或IBD炎性蛋白酶之后）基本上保持中和能力和/或效力）。这些蛋白酶包括肠肽酶，胰蛋白酶，糜蛋白酶和肠易激疾病炎性蛋白酶（如MMP3、MMP12和组织蛋白酶）。小肠和/或大肠的或其中产生的蛋白酶包括来自肠共生微生物群和/或病原菌的蛋白酶，例如其中蛋白酶是细胞膜附着的蛋白酶，分泌的蛋白酶和细胞裂解释放的蛋白酶）。最适当地，蛋白酶是胰蛋白酶和糜蛋白酶。

[0279] 适当地，肠道是狗、猪、人、食蟹猴或小鼠的肠道。小肠适当地由十二指肠、空肠和回肠组成。大肠适当地由盲肠、结肠、直肠和肛管组成。适当地，本发明的多肽或构建体基本上对一种或多种蛋白酶具有抗性。肠道与胃肠道相反，仅由小肠和大肠组成。

[0280] 本发明的多肽或构建体在暴露于存在于小肠和/或大肠中的蛋白酶和/或IBD炎性蛋白酶之后，基本保持中和能力，适当地10%，更适当地20%，更适当地30%，更适当地40%，更适当地50%，更适当地60%，更适当地70%，更适当地80%，更适当地90%，更适当地95%，更适当地100%的本发明的多肽或构建体的原始中和能力被保持。

[0281] 适当地，本发明的多肽或构建体在暴露于存在于小肠和/或大肠中的蛋白酶和/或IBD炎性蛋白酶之后基本保持中和能力，例如在37摄氏度高达至少2，更适当地高达至少3，更适当地高达至少4，更适当地至高达至少5，更适当地高达至少5.5，更适当地高达至少16，更适当地高达至少21，更适当地高达至少22小时。

[0282] 适当地10%或更高，更适当地20%或更高，更适当地30%或更高，更适当地40%或更高，更适当地50%或更高，更适当地60%或更高，更适当地70%或更高的本发明的多肽或构建体的中和能力在暴露于肠道（更适当地是小肠或大肠，更适当地是人类粪便提取物）的

条件16小时后被保持。

[0283] 适当地10%或更高,更适当地为20%或更高,更适当地30%或更高,更适当地40%或更高,更适当地50%或更高,更适当地60%或更高,更适当地70%或更高的本发明的多肽或构建体的中和能力在适当地暴露于小鼠小肠上清液4、6或16小时后被保持。

[0284] 适当地10%或更高,更适当地为15%或更高,更适当地20%或更高,更适当地25%或更高,更适当地30%或更高,更适当地35%或更高,更适当地40%或更高的本发明的多肽或构建体的中和能力在暴露于小鼠小肠上清液16小时后被保持。

[0285] 适当地50%或更高,更适当地为60%或更高,更适当地为65%或更高,更适当地70%或更高,更适当地75%或更高,更适当地80%或更高,更适当地85%或更高,更适当地85%或更高的本发明多肽或构建体的中和能力在暴露于小鼠小肠上清液16小时后被保持。

[0286] 在暴露于肠道条件1、2、3、4、5、6或7小时之后,适当地10%或更高,更适当地20%或更高,更适当地30%或更高,更适当地40%或更高,更适当地50%或更高,更适当地60%或更高,更适当地70%或更高的本发明多肽或构建体的被施用剂量保留了针对TNF- $\alpha$ 的中和能力,并且保留在小鼠、食蟹猴和/或人的粪便中(适当排泄的粪便或从肠道中除去的粪便)。

[0287] 本发明的多肽或本发明的构建体基本上保持完整,适当地10%,更适当地20%,更适当地30%,更适当地40%,更适当地50%,更适当地60%,更适当地70%,更适当地80%,更适当地90%,更适当地95%,更适当地99%,最适当地100%的本发明多肽或构建体的被施用量在暴露于存在于小肠和/或大肠中的蛋白酶/或IBD炎性蛋白酶后保持完整。

[0288] 适当地,本发明的多肽或本发明的构建体在暴露于食蟹猴的胃、十二指肠、空肠或回肠后5小时内基本保持完整。适当地,本发明的多肽或本发明的构建体在暴露于食蟹猴盲肠或结肠16小时后基本保持完整。

[0289] 适当地,本发明的多肽或构建体基本保持中和能力,适当地10%,更适当地20%,更适当地30%,更适当地40%,更适当地50%,更适当地60%,更适当地70%,更适当地80%,更适当地90%,更适当地95%,更适当地100%的多肽或构建体的原始中和能力在冷冻和解冻之后被保持。

[0290] 治疗用途和递送

[0291] 治疗有效量的本发明的多肽、药物组合物或构建体是在对受试者单剂量或多剂量施用,在受试者中中和TNF- $\alpha$ 至显著程度中有效的量。治疗有效量可以根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重等因素以及多肽、药物组合物或构建体在个体中引起所需反应的能力而变化。治疗有效量还是其中本发明的多肽、药物组合物或构建体的治疗有益效果优于任何毒性或不利影响的量。本发明的多肽或构建体可掺入到适合施用于受试者的药物组合物中。本发明的多肽或构建体可以是药学上可接受的盐的形式。

[0292] 本发明的药物组合物可以适当地配制用于口服、肌肉内、皮下或静脉内递送。本发明的药物组合物可以是各种形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如可注射和不可融合溶液),分散体或悬浮液,片剂,丸剂,散剂,脂质体和栓剂。固体剂型是优选的。本发明的多肽,药物组合物或构建体可以掺入赋形剂并以可摄入片剂,口腔片剂,锭剂,胶囊剂,酞剂,悬浮液,糖浆剂,膜片(wafer)等的形式使用。

[0293] 通常,药物组合物包括本发明的多肽或构建体以及药学上可接受的稀释剂或运载

体。药学上可接受的运载体的例子包括水、盐水、磷酸缓冲盐溶液、右旋糖、甘油、乙醇等中的一种或多种,以及它们的组合。药学上可接受的运载体还可以包含少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂,防腐剂或缓冲剂,其增强本发明多肽或构建体的保质期或有效性。药物组合物可以包括抗粘附剂,粘合剂,包衣,崩解剂,香料,颜料,润滑剂,吸附剂,防腐剂,甜味剂,冷冻干燥赋形剂(包括冻干保护剂)或压缩助剂。

[0294] 最适当地,本发明的多肽、本发明的药物组合物或构建体是口服施用。口服递送的一个关键问题是确保足够的多肽、药物组合物或构建体到达需要的肠道区域。阻止本发明的多肽、药物组合物或构建体到达需要的肠道区域的因素包括在消化分泌物中存在可能降解本发明的多肽、药物组合物或构建体的蛋白酶。适当地,本发明的多肽、药物组合物或构建体由于多肽或构建体本身的固有性质而在一种或多种这些蛋白酶的存在下基本上是稳定的。适当地,本发明的多肽或构建体在掺入到药物组合物之前被冻干。

[0295] 本发明的多肽还可以用肠包衣提供。肠包衣是应用于口服药物的聚合物屏障,其有助于保护多肽免受胃的低pH。用于肠包衣的材料包括脂肪酸、蜡、紫胶、塑料和植物纤维。合适的肠包衣组分包括丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物,乙酸琥珀酸纤维素,邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素,醋酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素(醋酸琥珀酸羟丙基纤维素),聚乙烯醋酸邻苯二甲酸酯(PVAP),甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物,藻酸钠和硬脂酸。合适的肠包衣包括pH依赖性释放聚合物。这些是在胃中发现的高酸性pH下不溶,但是其在较小酸性pH下快速溶解的聚合物。因此,适当地,肠包衣将不会在酸性胃液(pH~3)中溶解,但是将在小肠中(pH高于6)或结肠中(pH高于7.0)存在的较高pH环境下溶解。选择pH依赖性释放聚合物,使得本发明的多肽或构建体大概在剂量达到小肠时被释放。

[0296] 本发明的多肽、构建体或药物组合物可以通过将它们溶解、悬浮或乳化在水性或非水性溶剂如植物油或其它类似的油、合成脂族酸甘油酯、高级脂肪族酸酯或丙二醇中;并且如果需要,使用常规添加剂如增溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂而配制成品。可接受的运载体,赋形剂和/或稳定剂以所使用的剂量和浓度对受体无毒,并且包括缓冲剂如磷酸盐,柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸,谷胱甘肽,半胱氨酸,甲硫氨酸和柠檬酸;防腐剂(如乙醇,苯甲醇,苯酚,间甲酚,对氯-间甲酚,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯,苯扎氯铵或其组合);氨基酸如精氨酸,甘氨酸,鸟氨酸,赖氨酸,组氨酸,谷氨酸,天冬氨酸,异亮氨酸,亮氨酸,丙氨酸,苯丙氨酸,酪氨酸,色氨酸,甲硫氨酸,丝氨酸,脯氨酸及其组合;单糖,二糖和其它碳水化合物;低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如明胶或血清白蛋白;螯合剂如EDTA;糖类如海藻糖,蔗糖,乳糖,葡萄糖,甘露糖,麦芽糖,半乳糖,果糖,山梨糖,棉子糖,葡糖胺,N-甲基葡糖胺,半乳糖胺和神经氨酸;和/或非离子表面活性剂如聚山梨醇酯,POE醚,泊洛沙姆,Triton-X或聚乙二醇。

[0297] 本发明的药物组合物可以局部递送至皮肤(例如用于治疗自身免疫疾病如牛皮癣或湿疹)。这种药物组合物可以适当地为乳膏剂,软膏,洗剂,凝胶剂,泡沫剂,透皮贴剂,散剂,糊剂或酊剂的形式,并且可以适当地包括维生素D3类似物(例如卡泊三醇和马沙骨化醇),类固醇(例如丙酸氟替卡松,戊酸倍他米松和丙酸氯氟美松),维甲类(例如他扎罗汀),煤焦油和地蒽酚。局部药物通常彼此(如维生素D3和类固醇)或与其它活性剂如水杨酸联合使用。如果本发明的药物组合物被局部递送以用于治疗银屑病或湿疹,则合适地,在组合物中可以包括被认为治疗牛皮癣或湿疹有效的其它物质,例如类固醇,特别是4类或5类类固

醇例如氢化可的松(例如1%氢化可的松乳膏);环孢菌素或类似的大环内酯类或维甲类。

[0298] 对于所有递送方式,本发明的多肽、药物组合物或构建体可以在缓冲液中配制,以便将组合物的pH稳定在5-50或更适当地15-40或更适当地25-30g/升的浓度。适当的缓冲组分的例子包括生理盐,例如柠檬酸钠和/或柠檬酸。适当的缓冲液含有100-200,更适当地125-175mM的生理盐如氯化钠。适当地选择缓冲液使pKa接近组合物的pH或患者的生理pH。

[0299] 药物组合物中的示例性多肽或构建体浓度可以为约1mg/mL至约200mg/mL或约50mg/mL至约200mg/mL,或约150mg/mL至约200mg/mL。

[0300] 本发明的多肽、构建体或药物组合物水性制剂可以在pH缓冲溶液中制备,例如pH为约4.0至约7.0,或约5.0至约6.0,或可选地约5.5。适当的缓冲液的例子包括磷酸盐,组氨酸,柠檬酸盐,琥珀酸盐,乙酸盐缓冲液和其它有机酸缓冲液。缓冲液浓度可以为约1mM至约100mM,或约5mM至约50mM,这取决于例如缓冲液和制剂所需的张力。

[0301] 药物组合物的张力可以通过包括张力调节剂来改变。这种张力调节剂可以是带电或不带电的化学物质。典型的不带电张力调节剂包括糖或糖醇或其它多元醇,优选海藻糖,蔗糖,甘露醇,甘油,1,2-丙二醇,棉子糖,山梨糖醇或乳糖醇(特别是海藻糖,甘露醇,甘油或1,2-丙二醇)。典型的带电张力调节剂包括盐,诸如钠、钾或钙离子与氯化物,硫酸盐,碳酸盐,亚硫酸盐,硝酸盐,乳酸盐,琥珀酸盐,乙酸盐或马来酸盐离子的组合(特别是氯化钠或硫酸钠);或氨基酸如精氨酸或组氨酸。适当地,水性制剂是等渗的,尽管高渗或低渗溶液可能是适当的。术语“等渗”表示与其比较的其它溶液(例如生理盐溶液或血清)具有相同张力的溶液。张力剂可以以约5mM至约350mM的量使用,例如以1mM至500nM的量使用。适当地,组合物中包含至少一种等渗剂。

[0302] 还可以向药物组合物中加入表面活性剂以减少配制的多肽或构建体的聚集和/或使制剂中的微粒的形成最小化和/或减少吸附。示例性的表面活性剂包括聚氧乙烯山梨坦-脂肪酸酯(Tween),聚氧乙烯烷基醚(Brij),烷基苯基聚氧乙烯醚(Triton-X),聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(泊洛沙姆,Pluronic)和十二烷基硫酸钠(SDS)。合适的聚氧乙烯山梨坦-脂肪酸酯的例子是聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80。表面活性剂的示例性浓度可以在约0.001%至约10%w/v的范围内。

[0303] 为了保护本发明的多肽或构建体免受冻干过程中的不稳定条件的影响,还可加入冻干保护剂。例如,已知的冻干保护剂包括糖(包括葡萄糖、蔗糖、甘露糖和海藻糖);多元醇(包括甘露醇、山梨醇和甘油);和氨基酸(包括丙氨酸、甘氨酸和谷氨酸)。冻干保护剂可以以约10mM至500mM的量被包括。

[0304] 本发明的多肽、本发明的药物组合物或构建体的施用剂量范围,是产生所需治疗效果的剂量范围。所需的剂量范围取决于本发明的多肽、药物组合物或构建体的准确性质,施途径,制剂的性质,患者的年龄,患者状况的性质、程度或严重程度,禁忌症,如果有的话,以及主治医师的判断。可以使用标准经验程序调整这些剂量水平的变化以进行优化。

[0305] 本发明的多肽、本发明的药物组合物或构建体的合适的日剂量在50ng-50mg/kg,例如50 $\mu$ g-40mg/kg,例如5-30mg/kg体重的范围内。单位剂量可以从小于100mg变化,但通常将在每剂量250-2000mg的范围内,其可以每天或更频繁地施用,例如每天2或3次或4次或更少频率,例如每隔一天或每周一次、每两周一次或每月一次。

[0306] 在本发明的一个方面,提供了本发明的多肽、药物组合物或构建体在制备用于治

疗自身免疫疾病的药物中的用途。在本发明的另一方面,提供了治疗自身免疫疾病的方法,其包括向有需要的人施用治疗有效量的本发明的多肽、药物组合物或构建体。

[0307] 措词“治疗”旨在包括预防和治疗性治疗。疾病的治疗还包括治疗其恶化,以及还包括治疗患者的疾病症状缓解,以预防疾病症状的复发。

[0308] 联合治疗

[0309] 本发明的药物组合物还可以包含一种或多种活性剂(例如适用于治疗本文提及的疾病的活性剂)。将本发明的药物组合物用于治疗自身免疫疾病的治疗方法在本发明的范围内,作为通常用于治疗自身免疫疾病的其它已有疗法的辅助物或与其结合使用。

[0310] 对于IBD(例如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)的治疗,可能的组合包括与例如选自以下列表的一种或多种活性剂的组合:包括:5-氨基水杨酸或其前药(如柳氮磺吡啶、奥沙拉嗪或bisalazide);皮质类固醇(例如泼尼松龙、甲泼尼龙或布地奈德);免疫抑制剂(例如环孢菌素,他克莫司,甲氨蝶呤,硫唑嘌呤或6-巯基嘌呤);抗TNF- $\alpha$ 抗体(例如,英夫利昔单抗,阿达木单抗,certolizumab pegol或戈利木单抗);抗IL12/IL23抗体(例如优特克诺单抗);抗IL6R抗体或小分子IL12/IL23抑制剂(例如阿匹莫德);抗 $\alpha$ -4- $\beta$ -7抗体(例如,vedolizumab);MAdCAM-1阻断剂(例如PF-00547659);针对细胞粘附分子 $\alpha$ -4-整联蛋白的抗体(例如那他珠单抗);针对IL2受体 $\alpha$ 亚基的抗体(例如,达克珠单抗或巴利昔单抗);JAK3抑制剂(例如托法替尼或R348);Syk抑制剂及其前药物(例如,fostamatinib和R-406);磷酸二酯酶-4抑制剂(如替托司特);HMPL-004;益生菌;Dersalazine;塞马莫德/CPSI-2364;和蛋白激酶C抑制剂(例如AEB-071)。最适当的组合剂是英夫利昔单抗、阿达木单抗、certolizumab pegol或戈利木单抗。

[0311] 因此,本发明的另一方面提供了本发明的药物组合物与一种或多种其它活性剂,例如上述一种或多种活性剂的组合。

[0312] 在本发明的另一方面,多肽、药物组合物或构建体与选自上述列表中的至少一种活性剂顺序、同时或分开地施用。

[0313] 类似地,本发明的另一方面提供一种组合产品,包括:

[0314] (A) 本发明的多肽、药物组合物或构建体;和

[0315] (B) 一种或多种其它活性剂,

[0316] 其中组分(A)和(B)中的每一种与药学上可接受的佐剂,稀释剂或运载体混合配制。在本发明的这个方面,组合产品可以是单一(组合)制剂或套盒。因此,本发明的该方面包括与药学上可接受的佐剂、稀释剂或运载体混合的、包括了本发明的多肽、药物组合物或构建体和另一种治疗剂的组合制剂。

[0317] 本发明还包括套盒,包括组分:

[0318] (i) 与药学上可接受的佐剂、稀释剂或运载体混合的本发明的多肽、药物组合物或构建体;和

[0319] (ii) 与药学上可接受的佐剂、稀释剂或运载体混合的、包含一种或多种其它活性剂的制剂,其中组分(i)和(ii)各自以适于与另一种结合的施用的形式提供。

[0320] 因此,套盒的组分(i)是与药学上可接受的佐剂、稀释剂或运载体混合的上述组分(A)。类似地,组分(ii)是与药学上可接受的佐剂、稀释剂或运载体的混合的上述组分(B)。一种或多种其它活性剂(即上述组分(B))可以是例如上述关于治疗自身免疫疾病如IBD(例

如克罗恩氏病和/或溃疡性结肠炎)的任何活性剂。如果组分(B)是多于一种其它活性剂,则这些其它活性剂可以彼此配制或与组分(A)配制,或者它们可以分开配制。在一个实施方案中,组分(B)是另一种治疗剂。在另一个实施方案中,组分(B)是另外两种治疗剂。本发明该方面的组合产品(组合制品或套盒)可用于治疗或预防自身免疫疾病(例如本文提及的自身免疫疾病)。

[0321] 适当地,本发明的多肽、药物组合物或构建体用作药物,并且更适当地用于治疗自身免疫和/或炎性疾病。

[0322] 自身免疫疾病和/或炎性疾病

[0323] 当免疫系统对正常身体组织的反应不利时,自身免疫疾病就会发展。自身免疫疾病可能导致身体组织受损,器官生长异常和/或器官功能变化。该病症可能仅影响一种器官或组织类型,或可影响多种器官和组织。通常受自身免疫病症影响的器官和组织包括血液成分如红血细胞,血管,结缔组织,内分泌腺如甲状腺或胰腺,肌肉,关节和皮肤。炎性疾病是以炎症为特征的疾病。许多炎性疾病是自身免疫疾病,反之亦然。

[0324] GIT的自身免疫疾病和/或炎性疾病

[0325] 慢性炎症性肠病(IBD) 克罗恩氏病和溃疡性结肠炎,其影响儿童和成人,是GIT的自身免疫性和炎性疾病的例子(Hendrickson等人2002 Clin Microbiol Rev 15(1):79-94,通过整体引用引入本文)。溃疡性结肠炎被定义为其中炎症反应和形态变化保持局限于结肠的病症。95%的患者涉及直肠。炎症在很大程度上局限于粘膜,并且包括沿着结肠长度的溃疡、水肿和出血的可变严重程度的连续涉及(Hendrickson等人2002 Clin Microbiol Rev 15(1):79-94,通过整体引用并入本文)。溃疡性结肠炎通常表现为与粪便混合的血液和粘液的存在,以及在肠运动过程期间最严重的下腹部痉挛。临床上,血液和粘液腹泻的存在使溃疡性结肠炎与不存在血液的肠易激综合征区分开来。与溃疡性结肠炎不同,克罗恩氏病的呈现通常是微弱的,这导致了延后诊断。诸如涉及的位置、程度和严重性等因素决定了胃肠道症状的程度。具有回肠结肠涉及的患者通常患有餐后腹痛、右下部压痛和偶发性炎性包块。与胃十二指肠克罗恩氏病相关的症状包括早期饱腹感、恶心、呕吐、心口痛或吞咽困难。肛门周围疾病以及肛门赘(tag)、肛门深部裂缝和瘘是常见的(Hendrickson等人,2002 Clin Microbiol Rev 15(1):79-94,通过整体引用并入本文)。

[0326] 在这些疾病中,TNF- $\alpha$ 在胃肠上皮下的固有层中产生。这种上皮在IBD中被破坏并促进免疫球蛋白链可变结构域转运到固有层-这些疾病中TNF- $\alpha$ 产生和生物学作用的部位(参见实施例8)。GIT的其它疾病包括例如炎性疾病粘膜炎(适当地是药物和辐射诱导的粘膜炎),其中炎性损伤存在于粘膜中,破坏上皮紧密连接,这也允许免疫球蛋白链可变结构域进入TNF- $\alpha$ 产生的部位。在粘膜炎中,病灶可以发生在从嘴到肛门的任何地方,并且对于口和食道病灶,可以使用含有可变结构域的漱口剂或乳膏剂制品。对于肛门和直肠病灶,含有可变结构域的栓剂、乳膏剂或泡沫剂适用于局部应用。免疫球蛋白链可变结构域将通过在炎症部位进入血液流中的吸收或通过淋巴清除并随后进入血液流中而从固有层或其它炎性部位被清除。因此,这些结构域将通过血液流到肝脏,并通过肾脏中的肾小球过滤来清除。因此,有良好的理由认为这些结构域将在诸如自身免疫性肝炎、II型糖尿病和肾小球性肾炎等疾病中起治疗作用。

[0327] 适当地,本发明的多肽、药物组合物或构建体用于治疗GI(胃肠道)的自身免疫和/

或炎性疾病,其中TNF- $\alpha$ 有助于该疾病的病理学。

[0328] 适当地,本发明的多肽、药物组合物或构建体用于治疗胃肠道的GI道的自身免疫性和/或炎性疾病,其选自克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、肠易激综合征、II型糖尿病、肾小球性肾炎、自身免疫性肝炎、干燥综合征、乳糜泻和药物或辐射诱导的粘膜炎(最适当地是克罗恩氏病)。

[0329] 免疫球蛋白链可变结构域的口服递送将理想地治疗其中TNF- $\alpha$ 有助于至少一部分病理学的炎性疾病,并且免疫球蛋白链可变结构域可以进入TNF- $\alpha$ 具有生物活性的组织。

[0330] 皮肤自身免疫疾病和/或炎性疾病

[0331] 牛皮癣是一种虚弱的自身免疫、皮肤病学疾病。斑块性牛皮癣是最常见的疾病形式,其特征是红色皮肤覆盖着银色鳞屑。组织学上图片是在具有炎性细胞浸润的银屑病斑块内角质形成细胞的无序分化和过度增殖之一(Ortonne,1999Brit J Dermatol 140 (suppl 54):1-7)。牛皮癣皮肤损伤是炎性、红色、清晰划分的各种形状的斑块,具有特征性的银色光泽鳞屑。术语牛皮癣包括牛皮癣和牛皮癣的症状,包括红斑、皮肤增厚/增高和鳞屑。

[0332] 用于治疗牛皮癣的生物活性剂包括抗TNF- $\alpha$ 治疗(例如针对TNF的单克隆抗体,例如阿达木单抗和英夫利昔单抗,或TNF- $\alpha$ 受体融合蛋白,如依那西普),CD11a人源化抗体(依法珠单抗)或结合CD2如阿来法塞的活性剂(从而阻断CD2LFA3相互作用)。应注意的是,并不是这里列出的所有生物活性剂都被批准用于治疗牛皮癣。

[0333] 本发明的多肽可以掺入到乳膏剂/软膏或其它局部运载体中,用于施用给其中TNF- $\alpha$ 有助于这种损伤的病理学的炎性皮肤损伤。

[0334] 适当地,本发明的多肽、药物组合物或构建体用于治疗选自由天疱疮、牛皮癣、湿疹和硬皮病组成的列表中的皮肤的自身免疫性和/或炎性疾病。

[0335] 适当地,多肽、药物组合物或构建体用于治疗其中TNF- $\alpha$ 负责观察到的一定比例的病理学的其它自身免疫/炎性疾病。

[0336] 制备方法

[0337] 可以使用例如Green和Sambrook 2012 Molecular Cloning:A Laboratory Manual第四版Cold Spring Harbor Laboratory Press中公开的技术获得并操作本发明的多肽。

[0338] 单克隆抗体可以使用杂交瘤技术通过将特异性产生抗体的B细胞与骨髓瘤(B细胞癌)细胞融合来产生,所述骨髓瘤细胞针对其用于在组织培养中生长的能力以及抗体链合成的缺失进行选择(**Köhler**和Milstein 1975 Nature 256:495-497和Nelson等人 2000Molecular Pathology 53(3):111-117,通过整体引用并入本文)。

[0339] 针对确定的抗原的单克隆抗体可以例如通过以下方式获得:

[0340] a) 用永生细胞,优选骨髓瘤细胞对从早前确定的抗原免疫的动物外周血中获得的淋巴细胞永生,以形成杂交瘤,

[0341] b) 培养形成的永生细胞(杂交瘤)并回收产生具有所需特异性的抗体的细胞。

[0342] 或者,不需要使用杂交瘤细胞。因此,可以通过包括以下步骤的方法获得单克隆抗体:

[0343] a) 将从淋巴细胞,特别是动物的外周血淋巴细胞获得的DNA或cDNA序列克隆到载

体中,特别是噬菌体,特别是丝状噬菌体(适当地早先用确定的抗原免疫)

[0344] b) 在允许产生抗体的条件下用上述载体转化原核细胞,

[0345] c) 通过使抗体进行抗原亲和力选择来选择抗体,

[0346] d) 回收具有所需特异性的抗体。

[0347] 用于免疫骆驼类,克隆在血液中循环的B细胞的VHH谱(Chomezynnski和Sacchi 1987 Anal Biochem 162:156-159),以及使用噬菌体,酵母或核糖体展示的库从免疫(Arbabi-Ghahroudi等人1997 FEBS Lett 414:521-526)和非免疫(Tanha等人2002J Immunol Methods 263:97-109)中分离抗原特异性VHH的方法是已知的(W092/01047, Nguyen等人2001 Adv Immunol 79:261-296和Harmsen等人2007 Appl Microbiol Biotechnol 77(1):13-22)。这些参考文献通过整体引用并入本文。

[0348] 抗体的抗原结合片段如scFv和Fv片段可以分离并在大肠杆菌中表达(Miethe等人,2013 J Biotech 163(2):105-111,Skerra等人,1988 Science 240(4855):1038-1041和Ward等人Nature 1989 341:544-546,其通过整体引用并入本文)。

[0349] 可以对编码多肽的DNA或cDNA进行突变,所述突变对于多肽的氨基酸序列是沉默的,但是为在特定宿主中翻译提供优选的密码子。在例如大肠杆菌和酿酒酵母中翻译核酸的优选密码子是已知的。

[0350] 可以例如通过对编码多肽的核酸的取代、添加或缺失来实现多肽的突变。可以通过许多方法引入对编码多肽的核酸的取代、添加或缺失,包括例如易错PCR,改组,寡核苷酸定向诱变,装配PCR,PCR诱变,体内诱变,盒诱变,递归整体诱变,指数整体诱变,位点特异性诱变(Ling等人1997 Anal Biochem 254(2):157-178,通过整体引用并入本文),基因重装配,基因位点饱和诱变(GSSM),合成连接重装配SLR)或这些方法的组合。还可以通过包括重组,递归序列重组,磷酸硫酸酯修饰的DNA诱变,含有尿嘧啶的模板诱变,间隙双链突变,点错配修复诱变,修复缺陷型宿主菌株诱变,化学诱变,辐射诱变,缺失诱变,限制性选择诱变,限制性纯化诱变,整体诱变,嵌合核酸多聚体产生或其组合的方法引入对核酸的修饰、添加或缺失。

[0351] 特别地,可以使用人造基因合成(Nambiar等人1984Science 223:1299-1301, Sakamar和Khorana 1988 Nucl.Acids Res 14:6361-6372,Wells等人1985Gene 34:315-323和Grundstrom等人1985Nucl.Acids Res 13:3305-3316,通过整体引用并入本文)。编码本发明多肽的基因可以通过例如固相DNA合成来合成产生。整个基因可以从头合成,而不需要前体模板DNA。为了获得所需的寡核苷酸,构建单元按照产物序列所要求的顺序依次偶联到生长的寡核苷酸链上。在链装配完成后,将产物从固相中释放到溶液中,去保护并收集。可以通过高效液相色谱(HPLC)分离产物以获得高纯度的所需寡核苷酸(Verma和Eckstein 1998 Annu Rev Biochem 67:99-134)。

[0352] 免疫球蛋白链可变结构域如VH和VHH的表达可以使用适当的表达载体例如原核细胞如细菌例如大肠杆菌(例如根据W094/04678中公开的方案,其通过整体引用并入本文并在下面进一步详细说明)来实现。免疫球蛋白链可变结构域如VH和VHH的表达也可以使用真核细胞,例如昆虫细胞,CHO细胞,Vero细胞或适当的酵母细胞如属于曲霉属、酵母属、克鲁维酵母属、汉逊酵母属或毕赤酵母属的酵母来实现。适当地使用酿酒酵母(例如根据W094/025591中公开的方案,其通过引用并入本文并在下面进一步详细说明)。

[0353] 具体而言,VHH可以根据W094/04678中公开的方法使用大肠杆菌细胞通过包括以下步骤的方法制备:

[0354] a) 在Bluescript载体 (Agilent Technologies) 中克隆编码VHH的DNA或cDNA序列 (例如从骆驼类的淋巴细胞获得或合成产生), 其任选地包括His标签,

[0355] b) 回收使用对含有XhoI位点的VHH特异的5'引物以及含有SpeI位点的3'引物扩增后的克隆片段, 其具有序列

[0356] TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG (SEQ ID NO:58),

[0357] c) 克隆在用XhoI和SpeI限制酶消化载体后, Immuno PBS载体 (Huse等人1989Science 246 (4935):1275-1281, 通过整体引用并入本文) 的相中的回收片段,

[0358] d) 用步骤c的重组Immuno PBS载体转化宿主细胞, 特别是大肠杆菌,

[0359] e) 如果VHH包括His标签, 例如通过亲和纯化例如通过色谱法在柱上使用蛋白A, 阳离子交换或镍亲和性树脂来回收VHH编码序列的表达产物。

[0360] 或者, 免疫球蛋白链可变结构域例如VH和VHH可通过包括以下步骤的方法获得:

[0361] a) 获得编码具有确定的特异性抗原结合位点的VHH的DNA或cDNA序列,

[0362] b) 使用含有起始密码子和HindIII位点的5'引物和含有具有XhoI位点的终止密码子的3'引物扩增获得的DNA或cDNA,

[0363] c) 将扩增的DNA或cDNA重组到质粒pMM984的HindIII (位置2650) 和XhoI (位置4067) 位点 (Merchinsky等人1983J. Virol. 47:227-232, 通过整体引用并入本文),

[0364] d) 将重组质粒转染许可细胞, 特别是NB-E细胞 (Faisst等人, 1995 J Virol 69:4538-4543, 通过整体引用并入本文)

[0365] e) 回收获得的产品。

[0366] 此外, 根据Frenken等人2000 J Biotech 78:11-21和W099/23221中公开的方法, 可以使用大肠杆菌或酿酒酵母生产免疫球蛋白链可变结构域, 例如VHH或VH (通过整体引用并入本文) 如下:

[0367] 从免疫的美洲驼取血液样品, 并通过Ficoll (一种中和的、高度支化的、大质量的亲水性多糖, 其易溶于水溶液-Pharmacia) 不连续梯度离心, 富集淋巴细胞群体, 通过异硫氰酸胍提取法 (Chomezynski和Sacchi 1987 Anal Biochem 162:156-159) 和第一链cDNA合成 (例如使用cDNA试剂盒如RPN 1266 (Amersham)) 分离总RNA, 通过PCR使用W099/23221的第22和23页中详细描述的特异性引物扩增编码VHH和VH片段的DNA片段和部分短或长铰链区。在用PstI和HindIII或BstEII消化PCR片段时, 通过琼脂糖凝胶电泳纯化长度在约300和450bp之间的DNA片段, 并分别连接到大肠杆菌噬菌粒载体pUR4536或附加型酿酒酵母表达载体pUR4548。pUR4536衍生自pHEN (Hoogenboom等人, 1991 Nucl Acid Res 19:4133-4137, 通过整体引用并入本文), 并且含有lacI<sup>q</sup>基因和独特的限制性位点以允许克隆美洲驼VHH和VH基因。pUR4548衍生自pSY1 (Harmsen等人1993Gene 125:115-123, 通过整体引用并入本文)。从该质粒中, 通过PCR除去leu2基因中的BstEII位点, 并且替换SUC2信号序列和终止子之间的克隆位点, 以促进VH/VHH基因片段的克隆。VH/VHH在C末端具有c-myc标签用于检测。将各个大肠杆菌JM109菌落转移到含有150ml 补充有1%葡萄糖和100mg L<sup>-1</sup>氨苄青霉素的2TY培养基的96孔微量滴定板中。过夜生长 (37°C) 后, 将板重复在含有100mg L<sup>-1</sup>氨苄青霉素和0.1mM IPTG的2TY培养基中。再过夜孵育并任选地冷冻和解冻后, 将细胞离心并造粒, 并

且可以将上清液用于ELISA。将个体酿酒酵母菌落转移到含有选择性基础培养基(包含0.7%酵母氮碱基,2%葡萄糖,补充必需氨基酸和碱基)的试管中,并在30℃下生长48小时。随后,培养物在YPGal培养基(包含1%酵母提取物,2%细菌蛋白胨和5%半乳糖)中稀释10倍。生长24和48h后,将细胞沉淀,并在ELISA中分析培养上清液。任选地测量600nm处的吸光度(OD 600)。

[0368] 此外,可以使用酿酒酵母使用以下程序来产生免疫球蛋白链可变结构域,例如VH/VHH:

[0369] 分离编码VH/VHH的天然存在的DNA序列,或获得编码VH/VHH的合成产生的DNA序列,该合成序列包括5'-UTR,信号序列,终止密码子,并且侧接SacI和HindIII位点(这样的合成序列可以如上所述生产,或者例如可以从诸如Geneart (Life Technologies)的商业供应商订购。

[0370] 如下使用限制性位点将VH/VHH基因转移到多拷贝整合(MCI)载体pUR8569或pUR8542。使用:25 $\mu$ l VHH DNA (Geneart质粒或MCI载体),1 $\mu$ l SacI,1 $\mu$ l HindIII,3 $\mu$ l用于双重消化的合适的缓冲液,例如NEB缓冲液1 (New England Biolabs) 剪切编码VHH的DNA序列,其任选地包含在穿梭载体、盒或其它合成基因构建体和具有SacI和HindIII的MCI载体中,在37℃下过夜。在1xTAE缓冲液的1.5%琼脂糖凝胶上跑25 $\mu$ l经消化的、编码VHH的DNA和25 $\mu$ l经消化的MCI载体然后进行凝胶提取,例如使用QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)。设置经消化的MCI载体和经消化的编码VH/VHH的DNA的连接如下:100ng载体,30ng VHH基因,1.5 $\mu$ l 10 $\times$ 连接酶缓冲液,1 $\mu$ l T4DNA连接酶和ddH<sub>2</sub>O。然后在16摄氏度进行连接过夜。

[0371] 接下来转化大肠杆菌细胞。对于化学感受态XL-1蓝细胞,解冻200 $\mu$ l热感受态XL-1蓝细胞,并在冰上加入5 $\mu$ l连接混合物持续约30分钟,然后在42℃热休克90秒。然后加入800 $\mu$ l补充有2%葡萄糖的Luria-Bertani低盐培养基并在37℃下恢复细胞2小时。将细胞在Luria-Bertani琼脂和氨苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)板上铺板,并在37℃下保持过夜。对于电感受态的TG1大肠杆菌细胞,使用电穿孔试管。在电穿孔试管中:将50 $\mu$ l电感受态TG1细胞和1 $\mu$ l连接混合物在冰上解冻约15分钟。将试管放入支架并脉冲。加入500 $\mu$ l 2TY培养基,并在37℃下恢复细胞30分钟。将100 $\mu$ l细胞在含有氨苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)和2%葡萄糖板的Luria-Bertani琼脂上铺板。将板保持在37摄氏度过夜。

[0372] 如上所述将VH/VHH基因克隆到大肠杆菌中后,可以用线性化MCI载体转化酿酒酵母。在进行转化之前,进行一些步骤:(i)通过消化将DNA从环状变为线性,否则DNA不能整合到酵母基因组中,(ii)经消化的DNA应通过乙醇沉淀清除杂质。此外,在转化过程期间,酵母细胞被制成半渗透性,因此DNA可以通过膜。

[0373] 用于酵母转化的制备:如下进行从选择的表达VH/VHH基因的大肠杆菌菌落制备的中间制备物(midi-prep)的HpaI消化。制备100 $\mu$ l含有20ng的中间制备物,5 $\mu$ l HpaI,10 $\mu$ l适当缓冲液(如NEB4缓冲液(BioLabs))和ddH<sub>2</sub>O的溶液。

[0374] 在室温下用HpaI切割DNA过夜。接下来进行乙醇沉淀(并将5 $\mu$ l来自HpaI消化的样品放入一侧)。向95 $\mu$ l HpaI消化的中间制备物中加入300 $\mu$ l乙醇100%,涡旋,并全速旋转5分钟。当出现沉淀物后小心地倾倒,加入100 $\mu$ l乙醇70%,然后再次全速旋转5分钟。再次倾倒样品,并保持在50-60摄氏度,直到沉淀干燥。将沉淀物在50 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O中重新悬浮。在凝胶

上在5 $\mu$ l HpaI消化样品旁边跑5 $\mu$ l。

[0375] 酵母转化:制备YNBglu板。使用10g琼脂+425ml水(灭菌),25ml过滤的20 $\times$ YNB(在25ml无菌H<sub>2</sub>O中,3.35g YNB(酵母氮碱基))和50ml无菌20%葡萄糖并倒入培养皿中。从主板中挑取一个酵母菌落,并在30 $^{\circ}$ C下在3ml YPD(酵母提取物胍右旋糖)中生长过夜。第二天制备约600ml YPD,并用于加入275ml、225ml和100ml YPD的3个烧瓶中。将27.5 $\mu$ l酵母YPD培养物加入到第一个烧瓶中并轻轻混合。从第一个烧瓶中取出75毫升,将其放入第二个烧瓶中,轻轻混匀。从第二个烧瓶中取出100ml,并放入第三个烧瓶中,轻轻混匀。生长直到达到1至2之间的OD660。将达到该OD的烧瓶分到4个Falcon管中,每个 $\pm$ 45ml。以4200rpm旋转2分钟。丢弃上清液。使用45ml H<sub>2</sub>O将沉淀溶解在两个Falcon管中(将管的数量从4减少到2)。以4200rpm旋转2分钟。将沉淀溶解在45ml H<sub>2</sub>O中(从2管到1管)。以4200rpm旋转2分钟。在5ml乙酸锂(LiAc)(100mM)中轻轻溶解沉淀,并旋转几秒钟。小心丢弃一些LiAc,但保留超过一半的LiAc在管中。涡旋细胞,将运载体DNA煮沸5分钟,并迅速冷冻在冰水中。加入含有240 $\mu$ l PEG,50 $\mu$ l细胞,36 $\mu$ l LiAc(1M),25 $\mu$ l运载体DNA,45 $\mu$ l乙醇沉淀的VH/VHH的15ml管中。在每个步骤后轻轻混合(相同地处理空白样品,只有没有乙醇沉淀的VH/VHH)。在30摄氏度下孵育30分钟,轻轻颠倒管3-4次,然后在42 $^{\circ}$ C下热休克20-25分钟。旋转至6000rpm持续短时。轻轻取出上清液,并加入250 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O并混匀。将它们全部在YNBglu板上划线直到板干燥并在30 $^{\circ}$ C下生长4-5天。最后,通过将板分成6等份来制备YNBglu板,编号1至6,接种最大的菌落和并划线出1号。从1到6对其它菌落从大到小重复。在30摄氏度下长达3-4天,直到产生菌落。使用葡萄糖作为碳源生长VH/VHH克隆,通过加入0.5%半乳糖来开启半乳糖-7-启动子,从而完成VH/VHH表达的诱导。进行3ml小规模培养以测试菌落,选择哪一种显示出VH或VHH的最佳表达。然后将该菌落用于纯化。

[0376] 纯化:通过用强阴离子树脂(例如Capto S)的阳离子交换色谱法纯化VH/VHH。在第1天,在5ml YPD培养基(YP培养基+2%葡萄糖)中接种表达VH/VHH的经选择的酵母菌落,并在30 $^{\circ}$ C下在25ml密封的无菌管中使细胞生长过夜(以180rpm振荡)。在第2天,在50ml新鲜制备的YP培养基+2%葡萄糖+0.5%半乳糖中稀释5ml过夜培养物,在30 $^{\circ}$ C下将细胞在250ml充气挡板烧瓶中培养两夜(以180rpm振荡)。在第4天,将细胞在离心机中以4200rpm旋转20分钟。阳离子交换纯化步骤使用强阴离子树脂:将含有配体的上清液的pH调节至3.5。用50ml的ddH<sub>2</sub>O洗涤每毫升50ml上清液的0.75ml树脂(+/-0.5ml浆液),然后用结合缓冲液洗涤三次。将经洗涤的树脂加入到上清液中,并将悬浮液在4 $^{\circ}$ C下在振荡器上孵育1.5小时。通过在500g下离心2分钟使树脂结合的VH/VHH沉淀,并用洗涤缓冲液洗涤。倾出上清液并用10ml的结合缓冲液重新悬浮树脂。将过滤器放入PD-10柱中,将树脂倒入柱中,并使树脂沉淀一段时间,然后在树脂上方加入过滤器。等待直到所有结合缓冲液都通过。用6 $\times$ 0.5ml洗脱缓冲液洗脱VH/VHH。收集eppendorf管中的洗脱级分。用Nanodrop测量6个洗脱级分的蛋白质浓度。收集含有VHH的级分,并将溶液转移到3,500Da截留透析膜中。在4 $^{\circ}$ C下将纯化的蛋白质溶液针对3L PBS透析过夜。在第5天,在4 $^{\circ}$ C下将纯化的蛋白质溶液针对2L新鲜PBS透析额外的2小时。最后,通过BCA计算终浓度。

[0377] 尽管是在VH/VHH的语境中讨论,但如果需要,上述技术也可以用于scFv、Fab、Fv和其它抗体片段。

[0378] 多个抗原结合片段(适当地VH/VHH)可以通过使氨基酸残基与有机衍生剂(例如

Blattler等人Biochemistry 24:1517-1524所述的)反应的化学交联来融合(通过整体引用并入本文)。或者,抗原结合片段可以在DNA水平上遗传融合,即形成的多核苷酸构建体,其编码包含一个或多个抗原结合片段的完整多肽构建体。通过遗传途径连接多个抗原结合片段的一种方法是直接或通过肽接头连接抗原结合片段编码序列。例如,第一抗原结合片段的羧基末端可以连接到下一个抗原结合片段的氨基末端。可以扩展这种连接模式,以连接用于构建三、四等等功能构建体的抗原结合片段。WO 96/34103中公开了多价(如二价)VHH多肽构建体的制备方法(通过整体引用并入本文)。

[0379] 适当地,本发明的多肽(特别是本发明的VHH)可以在真菌例如酵母(例如酿酒酵母)中生产,包括根据W002/48382中公开的方法,在包含碳源的培养基上生长真菌,其中50-100wt%的所述碳源是乙醇。在Thomassen等人2002 Enzyme and Micro Tech 30:273-278(通过整体引用并入本文)中描述了VHH片段在酿酒酵母中的大规模生产。

[0380] 在本发明的一个方面,提供了制备本发明多肽或构建体的方法,包括以下步骤:

[0381] i) 将本发明的多核苷酸克隆到载体,如质粒中,

[0382] ii) 在允许产生多肽或构建体的条件下,用所述载体转化能够产生本发明的多肽或构建体的细胞如细菌细胞或酵母细胞,

[0383] iii) 回收多肽或构建体,例如通过亲和层析。

[0384] 现在将通过以下非限制性实施例进一步描述本发明。

## 实施例

[0385] 实施例1:美洲驼免疫,噬菌体展示,免疫球蛋白链可变结构域选择和繁殖

### [0386] 1.1免疫方案1

[0387] 最初,两只美洲驼(美洲驼33和美洲驼35)各接受3次可溶性人重组TNF- $\alpha$ 注射(100  $\mu$ g,肌肉注射,与Stimune佐剂1:1混合),然后通过用细菌脂多糖孵育而预先活化的THP-1细胞注射2次(在第56和70天)以增加膜TNF- $\alpha$ 表达(皮下注射1ml PBS中的 $10^7$ 个THP-1细胞)。在第84天给予可溶性TNF- $\alpha$ 和活化的THP-1细胞两者的最终加强免疫,9天后抽取血液用于分离外周血淋巴细胞并提取用于库构建的RNA。

### [0388] 1.2免疫方案2

[0389] 在休息四个月,相隔一周通过两次注射改造用于表达不可切割的跨膜形式的人TNF- $\alpha$ 的CHO Flp-In细胞来再次免疫美洲驼。两周后抽取血液以分离外周血淋巴细胞以及提取RNA进行库构建。通过使用板ELISA形式测量仅重链抗体与固定化的人TNF- $\alpha$ 的结合,以及用兔多克隆抗可变结构域血清和与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的驴-兔IgG检测,在几个时间点对每个美洲驼评估对免疫的血清免疫应答。获得的滴定曲线显示,每个美洲驼已经对第一轮免疫产生反应,得到了高滴度的TNF- $\alpha$ 结合IgG重链抗体。在第二轮免疫后,也注意到升高的血清抗体滴度,尽管这两种动物的血清抗体滴度都有所降低。

### [0390] 1.3噬菌体库构建

[0391] 使用在每个免疫阶段结束时从每个美洲驼收集的血细胞产生四个分开的噬菌体展示库(#33、#35、#33NEW和#35NEW)。从每个免疫的美洲驼(美洲驼33和35)分离的外周血淋巴细胞提取总RNA。然后将RNA用于使用逆转录酶和引物或随机八聚体寡核苷酸产生cDNA。然后使用适当的引物进行PCR以特异性扩增仅重链的抗体的可变结构域。将编码可变结构

域所有组分的cDNA片段克隆到噬菌粒载体中,并将库导入大肠杆菌。通过在从50ml含有葡萄糖和氨苄青霉素的培养基中从甘油储备液中分别接种40和51 $\mu$ l,从含有库的细菌中营救噬菌体。当培养物处于对数期时,加入辅助噬菌体以感染培养物并产生噬菌体。第二天,使用PEG/NaCl溶液从培养上清液中沉淀生成的噬菌体。通过滴定溶液并用不同的噬菌体稀释液感染对数期大肠杆菌TG1来确定噬菌体的数量。使用仍然产生菌落形成的最高稀释来计算噬菌体滴度。为了在sTNF- $\alpha$ 上进行选择,将无菌96孔(例如Maxisorp)板在4 $^{\circ}$ C下以1000、250或63ng/孔或仅PBS包被过夜。第二天,用PBS中的4%Marvel封闭板的孔,然后将沉淀的、用2%marvel/PBS预培养的噬菌体加入到孔中。用PBS-Tween和PBS充分洗涤后,用碱性pH冲击(0.1M三乙胺)洗脱结合的噬菌体15分钟,并用1M Tris-HCl pH7.5(总洗脱)中和,或者用竞争性洗脱,使用10倍过量的TNF受体,持续2小时。通过滴定来自不同孔的洗脱液,然后感染对数期大肠杆菌TG1来测定洗脱的噬菌体的数量。通过感染对数期TG1并在含有氨苄青霉素和葡萄糖的培养基中选择,大约一半洗脱的噬菌体被营救。

#### [0392] 1.4具有人和食蟹猴TNF- $\alpha$ 结合活性的噬菌体的库选择

[0393] 通过将噬菌体与人TNF- $\alpha$ 结合,然后用过量的可溶性TNFR2-Fc融合蛋白(依那西普)洗脱TNF- $\alpha$ 特异性可变结构域,或通过批量洗脱,从四个噬菌体展示库中分离具有TNF- $\alpha$ 拮抗活性的可变结构域。然后通过洗脱的人TNF- $\alpha$ 特异性噬菌体与食蟹猴TNF- $\alpha$ 的结合进行第二轮选择,从而可以获得具有跨物种TNF- $\alpha$ 结合活性的可变结构域池。

#### [0394] 1.4.1展示具有人TNF- $\alpha$ 结合活性的可变结构域的噬菌体的第一轮库选择

[0395] 针对每个免疫阶段,噬菌体库源于美洲驼33和美洲驼35(第一阶段免疫:库#33和库#35;第二阶段免疫:库#33NEW和库#35NEW)。进行第一轮选择以通过淘选人TNF- $\alpha$ 来分离展示具有TNF- $\alpha$ 结合活性的可变结构域的噬菌体。

[0396] 将可溶性重组人TNF- $\alpha$ (1000、250或63ng/孔)直接包被在亲水化聚丙烯微孔(HPM)板(例如Nunc maxisorp)的孔上,并使噬菌体附着。在大量洗涤后,使用(i)通过碱性pH冲击进行非选择性洗脱或(ii)通过加入TNFR2-Fc(依那西普100、25和6.3 $\mu$ g/ml,2h)选择性置换TNF- $\alpha$ 结合的噬菌体来收集结合的噬菌体。

[0397] 库#33和库#35-从对照孔(无TNF- $\alpha$ 和PBS对照)洗脱的噬菌体数量较少,并且对于这两个库,使用任一种洗脱方法,都有浓度相关的从已经预包被过的孔洗脱的噬菌体富集TNF- $\alpha$ 。总体来说,库#33和#35两者在第一轮选择中实现的TNF-结合噬菌体的富集约为100倍。

[0398] 库#33NEW和库#35NEW-发现从第一轮从重新接种的美洲驼制成的库的选择中回收的克隆数量很低。这可能反映了美洲驼对mTNF- $\alpha$ -CHO细胞的免疫应答较低(总共存在较少数量的TNF- $\alpha$ 反应性克隆),或者反应导致mTNF- $\alpha$ 反应性克隆产生,但只有这些中的有限数量与TNF- $\alpha$ 的可溶形式交叉反应。将在第一轮选择中来自用1000ng/ml人TNF- $\alpha$ 包被的孔的用TNFR2-Fc(依那西普)洗脱的噬菌体扩大,产生约 $2 \times 10^{12}$ 噬菌体/ml滴度的悬浮液。

#### [0399] 1.4.2利用人和食蟹猴TNF- $\alpha$ 结合活性的展示免疫球蛋白链可变结构域的噬菌体的第二轮选择

[0400] 库#33和库#35-第二轮选择是通过将所选择的噬菌体连接到可预先吸附到HPM板的孔表面上的可溶性人或食蟹猴TNF- $\alpha$ (500、125或31ng/孔或PBS)上来进行的。用可溶性TNFR2-Fc(分别为50、12.5和3.1 $\mu$ g/ml)洗脱与人TNF- $\alpha$ 结合的噬菌体,而使用碱性pH冲击洗

脱与食蟹猴TNF- $\alpha$ 结合的噬菌体。来自食蟹猴TNF- $\alpha$ 的选择中的回收率低于人TNF- $\alpha$ 的选择,这可能是由于表达与人和食蟹猴TNF- $\alpha$ 都具有交叉反应性的可变结构域的噬菌体库的频率较低。

[0401] 库#33NEW和库#35NEW-第二轮选择是通过将选定的噬菌体连接到已经预先吸附到HPM板的孔表面上的可溶性食蟹猴TNF- $\alpha$  (1000、250或63ng/孔或PBS)上来进行的。使用碱性pH冲击洗脱结合的噬菌体。

[0402] 实施例2:来自随机选择的免疫球蛋白链可变结构域克隆的周质上清液的初步评估

[0403] 2.1用于初步评估的周质提取物的繁殖和产生

[0404] 使用来自人TNF- $\alpha$ 的第一轮选择和食蟹猴TNF- $\alpha$ 的第二轮选择的洗脱液中存在的噬菌体感染大肠杆菌TG1细胞。随机挑取菌落(来自库#33和#35的186个克隆进入主板M60-M63;来自库#33NEW和库#35NEW的96个克隆进入主板M65),并通过连续离心繁殖,重悬浮于1 $\times$ PBS,将经繁殖的培养物解冻裂解和离心(M60-63和M65也分别称为“MP60-63”和“MP65”;周质上清液也称为周质级分(PF)或提取物),以产生周质上清液。

[0405] 筛选周质提取物以测试其(i)在板ELISA中抑制可溶性人TNF- $\alpha$ 与TNFR2-Fc结合的能力,和(ii)在固定浓度L929测定法中中和TNF- $\alpha$ 诱导的细胞毒性的能力。在L929测定法中,TNF- $\alpha$  (0.5ng/ml)的细胞毒性作用被认为是通过TNFR1介导的,所以在TNF- $\alpha$ -TNFR2结合和L929测定法中都具有抑制活性的可变结构域有望抑制通过任一受体介导的TNF- $\alpha$ -反应。

[0406] 2.2.1 TNF- $\alpha$ 结合和中和活性的评估(主板M60-M63)

[0407] 对从选自库#33和库#35的克隆获得的所有186个周质级分进行L929细胞毒性和ELISA测定法。将克隆排列在4个主板M60、M61、M62和M63上,并从这些主板制备周质级分。M60-61包含从库#33和#35随机挑选的克隆。M62-63包含在两个随后的选择步骤后选自相同库的克隆,所述选择进行如下:(i) 10 $\mu$ g/mL hsTNF- $\alpha$ 和依那西普用于洗脱;(ii) hsTNF- $\alpha$  (5 $\mu$ g/mL和0.3 $\mu$ g/mL)或食蟹猴sTNF- $\alpha$  (5 $\mu$ g/mL和0.3 $\mu$ g/mL),然后用依那西普选择性洗脱或用三乙胺完全洗脱。所有186PF使用刃天青通过浓度依赖性L929细胞毒性测定法分析。

[0408] 2.2.2通过ELISA的周质上清液筛选(主板M60-63)

[0409] 用于筛选的TNF- $\alpha$ 浓度为1.25ng/ml。在1%BSA中以1/20稀释(M60和M61)或1/10稀释(M62和M63)分析周质上清液。TNF- $\alpha$ 和周质上清液以两倍的测定浓度制成,然后1:1混合在一起。对每种上清液进行一式三份的测定。此外,10nM的阿达木单抗用作阳性中和抗体对照。在每个ELISA板上,还掺入有限的TNF- $\alpha$ 剂量反应(0-5ng/ml)。将用于分析周质上清液的ELISA板以0.7 $\mu$ g/ml,50 $\mu$ l/孔依那西普包被过夜。洗涤并封闭后,加入TNF- $\alpha$ 上清液混合物并孵育2小时。使用生物素化的多克隆兔抗人TNF- $\alpha$ 抗体(例如,0.2 $\mu$ g/ml的BAF210 (R&D Systems),然后是mAvidin-HRP,然后TMB)显色ELISA。

[0410] M60或M61上的克隆都没有任何显著的TNF- $\alpha$ 中和活性(所有克隆显示大约或小于10%的TNF- $\alpha$ 中和)。相比之下,阿达木单抗在包含其的所有板上在ELISA中几乎完全抑制。M62上的许多克隆(来自库33)表现出良好的TNF- $\alpha$ 中和(11个克隆达到90%或更高的中和,45个克隆达到50%或更高的中和)。在M63中也发现了一些良好的中和克隆(来自库35),但是数量远低于M62,尽管选择方法是相同的(2个克隆达到90%或更高的中和,7个克隆达到50%或更高的中和)。

[0411] 2.2.3通过固定浓度L929细胞毒性测定法(主板M60-M63)的周质上清液筛选(PS)

[0412] 材料

[0413] -L929细胞(10000细胞/孔)

[0414] -用于测定法的人TNF- $\alpha$ 固定浓度:500pg/ml

[0415] -放线菌素D浓度:0.75 $\mu$ g/mL

[0416] -在测定法中1:10稀释的主板M60-M63的PS

[0417] -纯抗TNF- $\alpha$ VHH作为阳性对照:250nM终浓度

[0418] -人TNF- $\alpha$ 短剂量-反应曲线:500、125、31.25、7.8pg/ml

[0419] -孵育时间:24h

[0420] -刃天青细胞活力试剂

[0421] 方法

[0422] 在第0天将100 $\mu$ l 10000个细胞/孔铺板在96孔微板中的DMEM完全培养基中,并在37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。在第1天,设置稀释板(以每个点足够一式三份的体积),另外每个板包含以下作为对照:

[0423] 1.DMEM完全+0.01%Triton X-100

[0424] 2.DMEM完全+0.75 $\mu$ g/mL放线菌素D

[0425] 3.TNF- $\alpha$ 剂量反应曲线+0.75 $\mu$ g/mL放线菌素D

[0426] 从微板的每个孔中除去培养基,并将细胞用100 $\mu$ l含有hTNF- $\alpha$ 的DMEM完全以500pg/mL+0.75 $\mu$ g/mL放线菌素D+PS(1:10)或用100 $\mu$ l不同的对照进行孵育。在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>孵育24小时后,向每个孔中加入10 $\mu$ l刃天青,并将细胞在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下孵育2小时。随后将50 $\mu$ l的3%SDS加入到每个孔中。然后在激发(Ex) 544nm/发射(Em) 590nm的荧光读板器上读板。

[0427] 结果

[0428] M60-61的周质上清液均没有显示在L929细胞上针对人TNF- $\alpha$ 的保护作用。阳性对照显示出保护而免受TNF- $\alpha$ 的作用,而不相关的VHH没有。来自M62-63的选择的克隆的多个周质上清液显示出在L929细胞上针对TNF- $\alpha$ 的保护作用(107个克隆达到大于或等于50%存活)。阳性对照显示TNF- $\alpha$ 中和(大于或等于100%),而不相关的VHH显示出低于10%的TNF- $\alpha$ 中和。

[0429] 2.3 TNF- $\alpha$ 结合和中和活性的评估(主板M65)

[0430] 除非另有说明,否则以与针对M60-M63所描述的上述方式相同的方式在M65上进行ELISA和L929细胞毒性测定法。

[0431] 2.3.1通过ELISA的周质上清液筛选(主板M65)

[0432] 在37 $^{\circ}$ C下,立即解冻和18小时孵育后,通过ELISA分别分析TNF- $\alpha$ 特异性可变结构域克隆(总共96个)的M65周质上清液对TNFR-2-TNF- $\alpha$ 结合的抑制。

[0433] ELISA板在4 $^{\circ}$ C下用2 $\mu$ g/ml,50 $\mu$ l/孔依那西普包被过夜,洗涤然后封闭,准备以用于与TNF- $\alpha$ 可变结构域混合物孵育。阿达木单抗以10nM作为阳性对照。首先将抗TNF- $\alpha$ 可变结构域周质上清液在1%BSA中1:10稀释,然后与2.5ng/ml TNF- $\alpha$ 1:1混合,并加入到ELISA板中。根据M60-63所述的方案进行ELISA后续处理。

[0434] 二十八种上清液给出大于80%的TNF- $\alpha$ 结合抑制,其中18种在37 $^{\circ}$ C下保留最多或

全部抑制活性。

[0435] 2.3.2通过L929细胞毒性测定法的周质上清液筛选(主板M65)

[0436] 使用从选自2个噬菌体展示库(M65-来自#33NEW和#35NEW)的克隆中获得的总共96个周质上清液(PS)进行L929细胞毒性测定法。在执行(i)hsTNF- $\alpha$ (10 $\mu$ g/mL)依那西普的第一轮选择和TEA洗脱,以及从(ii)食蟹猴sTNF- $\alpha$ (10 $\mu$ g/mL)的第二轮选择,然后用三乙胺完全洗脱后,选取克隆。所有的96PS使用刃天青通过L929细胞毒性测定法进行分析。

[0437] 材料

[0438] -L929细胞(10000细胞/孔)

[0439] -测定的人TNF- $\alpha$ 固定浓度:终浓度为500pg/ml

[0440] -在测定法中1:10稀释PS:

[0441] -纯抗TNF- $\alpha$ VHH作为阳性对照:250nM终浓度

[0442] -M65上清液

[0443] -TNF- $\alpha$ 短剂量-反应曲线:500、125、7.8pg/ml

[0444] -孵育时间:22小时

[0445] -刃天青细胞活力试剂

[0446] 方法

[0447] 在第0天将100 $\mu$ l的10000个细胞/孔铺板在96孔Costar微板中的DMEM完全培养基中,并在37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>下孵育过夜。在第1天,设置稀释板(以每个点足够一式三份的体积),另外每个板包含以下作为对照:

[0448] 1.DMEM完全+0.01%Triton X-100

[0449] 2.DMEM完全+0.75 $\mu$ g/mL放线菌素D

[0450] 3.TNF- $\alpha$ 剂量反应曲线+0.75 $\mu$ g/mL放线菌素D

[0451] 从微板的每个孔中除去培养基,并将细胞用100 $\mu$ l含有hTNF- $\alpha$ 的DMEM完全以500pg/mL+0.75 $\mu$ g/mL放线菌素D+PS(1:10)或用100 $\mu$ l不同的对照进行孵育。在37 $^{\circ}$ C孵育22小时后,向每个孔中加入10 $\mu$ l刃天青,并将细胞在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下孵育2小时。随后将50 $\mu$ l的3%SDS加入到每个孔中。然后使用荧光读板器Ex544nm/Em590nm读板。

[0452] 来自M65的选择的克隆的多个周质上清液显示出在L929细胞上针对h-TNF- $\alpha$ 的保护作用。在9个克隆中,周质级分的处理显示出L929细胞的存活大于120%。96个中共有53个克隆在L929测定法中显示出超过50%的TNF- $\alpha$ 中和活性,其中32个显示出几乎完全中和。

[0453] 2.3.3胰蛋白酶和糜蛋白酶对灭活的抗性

[0454] 基于TNF-TNFR2ELISA中上清液(和纯化样品)TNF结合活性的保留,测试上清液(和纯化样品)的可变结构域克隆对于通过胰蛋白酶和糜蛋白酶灭活的抗性。

[0455] 方法

[0456] 将胰蛋白酶和糜蛋白酶分别溶解在1mM Tris-HCl pH 8.0,20mM CaCl<sub>2</sub>中(最终体积的一半),然后混合在一起,得到每种3mg/mL的终浓度(3倍于测定浓度)。在37 $^{\circ}$ C将20 $\mu$ L各周质提取物与10 $\mu$ LPBS(未消化)或10 $\mu$ L 3mg/mL胰蛋白酶+糜蛋白酶混合物(消化)孵育75分钟。将30 $\mu$ L冰冷的2x蛋白酶终止液(2%BSA,1 $\times$ PBS,5mM NaETDA,4mM AEBSF,0.6 $\mu$ M Aprotinin,260 $\mu$ M Bestatin,2mM EDTA,28 $\mu$ ME-64,2 $\mu$ M Leupeptin,1mM PBSF)加入每个样品中,并且随后将140 $\mu$ L 1xPBS,1%BSA加入到每个样品中以达到周质提取物的最终1:10稀

释。对于每个纯化样品,制备了1%BSA中最高浓度为3 $\mu$ M的浓度范围。将10 $\mu$ L纯化的样品与10 $\mu$ L胰蛋白酶和糜蛋白酶混合物(或用于未消化样品的PBS)和10 $\mu$ L胰蛋白酶/糜蛋白酶缓冲液一起孵育。周质和纯化的样品在-80 $^{\circ}$ C下保存过夜,并在第二天在TNFR-2-TNF- $\alpha$ ELISA测定法中测试。ELISA板用0.7 $\mu$ g/ml,50 $\mu$ l/孔依那西普包被过夜,洗涤,然后封闭,准备与TNF- $\alpha$ 可变结构域样品孵育。将TNF- $\alpha$ 可变结构域样品与5ng/ml h-TNF- $\alpha$ 以1:1混合(以获得2.5ng/mL的TNF- $\alpha$ 测定浓度和1:20稀释的样品),并将50 $\mu$ L每个样品加入到ELISA板。在4 $^{\circ}$ C下孵育后,洗涤ELISA板,并在室温下与0.2 $\mu$ g/mL生物素化的多克隆兔抗h-TNF- $\alpha$ 抗体孵育1小时。然后洗涤ELISA板,与1:1000修饰的抗生物素蛋白-HRP缀合物(mAvidin-HRP)(mAvidin,例如,**ExtrAvidin**<sup>®</sup>(Sigma)是卵白抗生物素蛋白的修饰形式,其保留了抗生物素蛋白对生物素的高亲和性和特异性,但在生理学pH值上没有表现出已经报道的抗生物素蛋白的非特异性结合)在室温下孵育1小时,再次洗涤,并将100 $\mu$ L TMB ELISA底物加入到每个样品中。30min后,用50 $\mu$ L 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,读取ELISA板在450nm的吸光度。

#### [0457] 结果

[0458] 11个可变结构域(Q65B1-Q65F6)来自周质上清液,以及4个可变结构域(Q62F2-Q62F11)来自纯化样品。发现周质上清液的10个可变结构域和2个纯化的可变结构域具有良好或优异的胰蛋白酶和糜蛋白酶抗性。后来发现这些可变结构域中有10个属于同一家族(家族1,见下文第2.4部分),以及后来发现这些可变结构域中有2个属于同一家族(家族2,见下文第2.4部分)。不属于家族1和家族2的Q62F11不是蛋白酶抗性的。Q62F10的结果被认为是由于实验误差(图1)。

#### [0459] 2.4初步评估总结

[0460] M62和M63:在最初选取的186个克隆中,52个周质上清液在L929细胞细胞毒性测定法中显示出大于或等于50%的针对人可溶性TNF- $\alpha$ 中和,以及在ELISA测定中大于或等于50%的TNF- $\alpha$ -TNFR2结合活性抑制。对25个具有最大中和活性的可变结构域克隆进行的序列分析显示,这些可以归组为家族。从不同的家族组中选出代表性的克隆。将可变结构域DNA序列重新克隆用于大肠杆菌中的高水平表达,并产生用于更详细评估研究的纯化的可变结构域。

[0461] M65:在最初选取的96个克隆中,53个周质上清液在L929细胞细胞毒性测定法中显示出超过50%的针对人可溶性TNF- $\alpha$ 的中和活性以及ELISA测定法中大于或等于50%的TNF- $\alpha$ -TNFR2的结合活性抑制,32个在两种测定法中都显示完全中和。为了鉴定最稳定的克隆,分析周质上清液(总共96个)的TNFR-2-TNF- $\alpha$ 结合的抑制,这是通过在37 $^{\circ}$ C下,立即解冻和18小时孵育后的ELISA。18个上清液保留最多或所有的TNFR-2-TNF- $\alpha$ 结合抑制活性。然后选择最具活性的周质上清液(28/96)以测试食蟹猴TNF诱导的L929细胞毒性的抑制。对36个具有最大TNF- $\alpha$ 中和活性及蛋白酶抗性的可变结构域克隆进行的序列分析表明,这些可以与M62和M63衍生的可变结构域分组成家族。从不同的家族组中选择代表性的M65衍生的克隆。将可变结构域DNA序列重新克隆用于在大肠杆菌中表达,并产生纯化的可变结构域用于更详细的评估研究。

#### [0462] 实施例3:纯化的大肠杆菌重组可变结构域的评估

#### [0463] 3.1经选择的可变结构域克隆在大肠杆菌中的产生

[0464] 将选自M62、M63和M65的可变结构域的DNA序列重新克隆以在大肠杆菌中生产,然

后如下纯化所表达的可变结构域。

[0465] 将选择的可变结构域从噬菌粒载体亚克隆到表达质粒pMEK222中 (pMEK222是噬菌粒pUR8100的基因3缺失型,其中克隆的可变结构域之后是c-myc和6His标签,两个终止密码子和M13终止子序列(参见W02013/064701))。用Sfi I和Eco91I消化可变结构域基因,并连接到用相同的限制性内切酶切割的pMEK222中。通过连接转化大肠杆菌菌株BL21DE3,并在补充有氨苄青霉素和2%葡萄糖的LB-琼脂板上铺板。使用菌落PCR筛选转化体。使用引物M13.rev (SEQ ID NO:81)和M13.fw (SEQ ID NO:82)的扩增导致产生含有通过PCR观察到的700bp和~350bp(空质粒)插入片段的质粒。

[0466] 通过在800ml 2X YT,0.1%葡萄糖和100 $\mu$ g/ml氨苄青霉素中以1/100稀释液接种新鲜的过夜生长的培养物,并在37 $^{\circ}$ C下生长2小时,从pMEK222产生可变结构域。随后,加入1mM异丙基 $\beta$ -D-1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG),培养物在37 $^{\circ}$ C下再生长5小时。通过离心收获细菌并重悬浮于30mL PBS中。通过在-20 $^{\circ}$ C孵育过夜使细菌冷冻。细菌在室温下解冻并通过离心分级。向包含可变结构域的可溶性级分中加入Co<sup>2+</sup>琼脂糖珠,例如Talon树脂(Thermo Scientific)以结合His-标记的可变结构域。洗涤珠后,用补充有150mM咪唑的PBS洗脱结合的可变结构域。最后,将含有可变结构域的级分用PBS透析以除去咪唑。

[0467] 在几个体外测定系统中评估纯化的可变结构域的TNF- $\alpha$ 中和活性,以评估对可溶性和膜形式的人TNF- $\alpha$ 和可溶性食蟹猴TNF- $\alpha$ 的效力。

### [0468] 3.2 TNF- $\alpha$ 诱导的L929细胞的细胞毒性抑制

[0469] 使用L929鼠细胞系和基于可溶性人(或食蟹猴)TNF- $\alpha$ 诱导细胞毒性的生物读数进行具有TNF- $\alpha$ 中和活性的可变结构域的测定。在可溶性TNF- $\alpha$ (500pg/ml)和放线菌素(0.75 $\mu$ g/mL)存在下将L929细胞(10000细胞/孔)和纯化的可变结构域的稀释液一起培养24小时。在实验结束时,使用刃天青测定细胞毒性。测试对可溶性人TNF诱导的小鼠L929细胞的细胞毒性的抑制,以测定各大肠杆菌重组Q62、Q63和Q65系列可变结构域对人和食蟹猴TNF的TNF- $\alpha$ 中和活性。

#### [0470] 3.2.1选自M62和M63的纯化的免疫球蛋白链可变结构域

[0471] 材料

[0472] -L929细胞(10000细胞/孔)

[0473] -无菌聚丙烯96孔板

[0474] -用于测定法的h-TNF- $\alpha$ 固定浓度:500pg/ml

[0475] -放线菌素D浓度:0.75 $\mu$ g/mL

[0476] -纯化的可变结构域(来自MP 62-63),包括Q62F2、Q62F11、Q62E10、Q62F10

[0477] -纯化的可变结构域的稀释范围:300nM-5pM(1:3稀释)

[0478] -人TNF- $\alpha$ 剂量-反应曲线:3ng/mL-0.5pg/mL

[0479] -食蟹猴TNF- $\alpha$ 剂量反应曲线:10ng/mL-0.2pg/mL

[0480] -阿达木单抗剂量-反应曲线:10nM-0.5pM

[0481] -孵育时间:22小时

[0482] -刃天青细胞活力试剂

[0483] 方法

[0484] 在第0天将100 $\mu$ l的10000个细胞/孔接种在96孔微板中的DMEM完全培养基中,并在

37°C, 5%CO<sub>2</sub>下储存过夜。在第1天,设置稀释板(以每个点足够一式三份的体积),另外每个板包含以下作为对照:

- [0485] 1. DMEM完全+0.75μg/mL放线菌素D
- [0486] 2. DMEM完全+0.75μg/mL放线菌素D+0.5ng/mL h-TNF-α
- [0487] 3. DMEM完全+0.01% Triton (仅在含有Cyno-TNF-α剂量反应的板中)
- [0488] 4. DMEM完全 (仅在含有Cyno-TNF-α、h-TNF-α和阿达木单抗剂量反应的板中)
- [0489] 从微板的每个孔中除去培养基,并将细胞用100μl各可变结构域稀释液或100μl不同的对照孵育进行孵育。在37°C和5%CO<sub>2</sub>孵育22小时后,向每个孔中加入10μl刃天青,并将细胞在37°C下孵育2小时。随后将50μl的3% SDS加入到每个孔中。然后使用荧光读板器 Ex544nm/Em590nm读板。

### [0490] 3.2.2 选自M65的纯化的免疫球蛋白链可变结构域

#### [0491] 材料

- [0492] -L929细胞(10000细胞/孔)
- [0493] -无菌聚丙烯96孔板
- [0494] -DMEM
- [0495] -人TNF-α浓度:500pg/ml
- [0496] -食蟹猴TNF-α浓度:500pg/ml
- [0497] -放线菌素D浓度:0.75μg/mL
- [0498] -来自M65的纯化的可变结构域,包括Q65D1、Q65D3、Q65B1、Q65C7、Q65A3、Q65E12、Q65F6
- [0499] -纯化的可变结构域的稀释范围:300nM-5pM(1:3稀释)
- [0500] -人TNF-α和食蟹猴TNF-α剂量-反应曲线:10ng/mL-0.5pg/mL
- [0501] -阿达木单抗剂量反应曲线:10nM-0.5pM
- [0502] -孵育时间:22h
- [0503] -刃天青细胞活力试剂
- [0504] 方法

[0505] 在第0天将100μl中的10000个细胞/孔铺板在96孔微板中的DMEM完全培养基中,并在37°C和5%CO<sub>2</sub>下储存过夜。在第1天,从300nM的最高浓度开始,设置每个纯化的可变结构域的系列稀释1:3(DMEM+Act.D+TNF) (以每个点足够一式三份的体积),对于阿达木单抗,使用的最高浓度为10nM。

[0506] 将以下对照添加到板中:

- [0507] 1. DMEM完全+0.75μg/mL放线菌素D
- [0508] 2. DMEM完全+0.75μg/mL放线菌素D+0.5ng/mL的h-TNF-α或cyno-TNF-α
- [0509] 3. DMEM完全+0.01% Triton (仅含有TNF-α剂量反应的板)
- [0510] 4. DMEM完全 (仅含有TNF-α剂量反应的板中)
- [0511] 从微板的每个孔中除去培养基,并将细胞用100μl各可变结构域稀释液或100μl不同的对照孵育进行孵育。在37°C和5%CO<sub>2</sub>孵育22小时后,向每个孔中加入10μl刃天青,并将细胞在37°C下孵育2小时。随后将50μl的3% SDS加入到每个孔中。然后使用荧光读板器 Ex544nm/Em590nm读板。

## [0512] 3.2.3 L929细胞毒性测定的结果

## [0513] 表1 (a)

[0514] 衍生自M62和M63的抗TNF- $\alpha$ 克隆:人和食蟹猴TNF诱导的L929细胞的细胞毒性的抑制

| 克隆 ID        | 家族 | 人和食蟹猴 TNF 诱导的 L929 细胞的细胞毒性 EC50 的抑制(nM) |         |
|--------------|----|---|---------|
|              |    | 人 TNF                                   | 食蟹猴 TNF |
| [0515] Q62F2 | 1  | 1                                       | 0.8     |
| Q62F11       | -  | 6                                       | 1.5     |
| Q62E10       | 2  | 0.2                                     | < 0.1   |
| Q62F10       | 2  | 2                                       | 1.3     |

## [0516] 表1 (b)

[0517] 衍生自M65的抗TNF- $\alpha$ 克隆:人和食蟹猴TNF诱导的L929细胞的细胞毒性的抑制

| 克隆 ID        | 家族 | 人和食蟹猴 TNF 诱导的 L929 细胞的细胞毒性 EC50 的抑制(nM) |         |
|--------------|----|---|---------|
|              |    | 人 TNF                                   | 食蟹猴 TNF |
| [0518] Q65D3 | 1  | 0.15                                    | 0.1     |
| Q65D1        | 1  | 0.1                                     | 0.06    |
| Q65B1        | 1  | 0.04                                    | 0.01    |
| Q65C7        | 1  | 0.15                                    | 0.03    |
| Q65A3        | 2  | 0.15                                    | 0.04    |
| Q65E12       | 2  | 4                                       | 4       |
| Q65F6        | 2  | 1.5                                     | 1       |
| 阿达木单抗        |    | 0.1                                     | 0.04    |

[0519] 可以看出,属于家族1的可变结构域通常显示出非常有效的人和食蟹猴TNF- $\alpha$ 诱导的细胞毒性抑制,属于家族2的可变结构域也通常显示出非常有效的人和食蟹猴TNF- $\alpha$ 诱导细胞毒性抑制。许多可变结构域显示出与阿达木单抗相似的表现。

## [0520] 3.3 TNF-TNFR2结合活性的抑制(选自M65的纯化的免疫球蛋白链可变结构域)

[0521] 用依那西普(50 $\mu$ l/孔,0.7 $\mu$ g/ml)包被Maxisorb板。稀释可变结构域并与人或食蟹猴TNF- $\alpha$ (1.25ng/ml)混合,以在加入ELISA板之前进行结合。用生物素化兔多克隆抗TNF- $\alpha$ 抗体(0.2 $\mu$ g/ml)和mAvidin-HRP随后TMB测定检测结合依那西普的TNF- $\alpha$ ,测定并且可变结构域针对与依那西普结合的TNF- $\alpha$ 的竞争水平。特定的可变结构域能够结合人和食蟹猴TNF- $\alpha$ ,导致TNF- $\alpha$ -TNFR2相互作用的抑制。

## [0522] 3.3.1 TNF-TNFR2结合活性测定的结果

## [0523] 表2 (a)

[0524] 衍生自M62和M63的抗TNF- $\alpha$ 克隆-结合TNFR2的人和食蟹猴TNF- $\alpha$ 的抑制

| 克隆 ID        | 家族 | TNF- $\alpha$ -TNFR2 结合的抑制(ELISA) EC50 (nM) |         |
|--------------|----|---|---------|
|              |    | 人 TNF                                       | 食蟹猴 TNF |
| [0525] Q62F2 | 1  | 0.7   | 1.3     |

|        |        |   |     |     |
|--------|--------|---|-----|-----|
| [0526] | Q62F11 | - | 2.3 | 1.4 |
|        | Q62E10 | 2 | 0.8 | 1.2 |
|        | Q62F10 | 2 | 30  | 108 |
|        | 阿达木单抗  | - | 0.3 |     |

[0527] 表2 (b)

[0528] 衍生自M65的抗TNF- $\alpha$ 克隆-与TNFR2结合的人和食蟹猴TNF- $\alpha$ 的抑制

|        | 克隆 ID  | 家族 | 人和食蟹猴 TNF- $\alpha$ -TNFR2 结合 EC50 的抑制 (nM) |         |
|--------|--------|----|---|---------|
|        |        |    | 人 TNF                                       | 食蟹猴 TNF |
| [0529] | Q65D3  | 1  | 0.33  | 0.45    |
|        | Q65D1  | 1  | 0.37  | 0.32    |
|        | Q65B1  | 1  | 0.29  | 0.45    |
|        | Q65C7  | 1  | 0.35  | 0.32    |
|        | Q65A3  | 2  | 1.3   | 1.1     |
|        | Q65E12 | 2  | 47  | 65      |
|        | Q65F6  | 2  | 13  | 24      |

[0530] 可以看出,属于家族1的可变结构域通常显示出对人和食蟹猴TNF- $\alpha$ -TNFR2结合的非常有效的抑制,属于家族2的可变结构域也通常显示出对人和食蟹猴TNF- $\alpha$ -TNFR2结合的非常有效的抑制。许多可变结构域对阿达木单抗显示出相似或更好的表现。

[0531] 3.4可溶性TNF- $\alpha$ 诱导的NF- $\kappa$ B/SEAP HEK-293报告细胞的活化的抑制

[0532] 基于对可溶性TNF- $\alpha$ 对鼠L929细胞的细胞毒性的抑制,首先测量了所选可变结构域的效力。为了证实这些可变结构域在使用人细胞的测定法中也是有效和有效力的,使用HEK-293-NF- $\kappa$ B-SEAP报告细胞进行实验。NF- $\kappa$ B/SEAP HEK-293细胞在NF- $\kappa$ B反应元件的转录控制下用SEAP(分泌的碱性磷酸酶)报告基因稳定转染。证实了通过可溶性人TNF- $\alpha$ 诱导报告基因,并证明了通过TNF- $\alpha$ 中和抗体抑制该反应的能力。在这些细胞中,SEAP报告基因的活化依赖于NF- $\kappa$ B途径,其通过细胞膜TNFR1受体被可溶性TNF- $\alpha$ 活化。

[0533] 在第一实验中,测试了Q65B1(家族1),Q65C7(家族1),Q62E10(家族2)和阿达木单抗。在第二实验中,将Q65D3与Q65B1进行比较。

[0534] 3.4.1 Q65B1、Q65C7、Q62E10和阿达木单抗的抑制

[0535] 材料

[0536] -HEK-293NF- $\kappa$ B/SEAP细胞(Imgenex): $3.5 \times 10^4$ 个细胞/孔, $2 \times 10^4$ 个细胞/孔(ii), $10^4$ 个细胞/孔(ii)

[0537] -灭菌的96孔板

[0538] -补充有10%FBS, Pen/Strep和500 $\mu$ g/mL遗传霉素抗生素(G418, Invitrogen, 10131027)的DMEM(Sigma, D6429)

[0539] -人TNF- $\alpha$ (Invitrogen, PHC3015)浓度:2ng/ml

[0540] -纯化的免疫球蛋白链可变结构域Q65B1, Q65C7, Q65D3, Q65E5, Q65E6和Q62E10

[0541] -免疫球蛋白链可变结构域和阿达木单抗的稀释范围:500nM-2pM; 150nM-1pM; (3.5倍稀释)

[0542] -人TNF- $\alpha$ 剂量反应曲线:10ng/mL-0.01ng/mL

[0543] -板中的对照:

[0544] -细胞培养基(CM)

[0545] -人可溶性TNF- $\alpha$  (“hs-TNF- $\alpha$ ”),浓度为2ng/ml

[0546] -0.01% Triton X-100 (用于TNF剂量反应)

[0547] -孵育时间:22.5h

[0548] -QuantiBlue培养基(InvivoGen):200 $\mu$ l

[0549] -测试的上清液体积:(i) 10 $\mu$ L, (ii) 10 $\mu$ L和20 $\mu$ L

[0550] -时间点读数:2h 45min

[0551] -BioRad读板器(620nm)

[0552] 方法

[0553] 在第0天将 $3.5 \times 10^4$ 个细胞/孔的NF- $\kappa$ B/SEAP HEK-293细胞以100 $\mu$ l在96孔无菌平底微板中铺板,并在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下储存过夜。在第1天,在含有2ng/mL hs-TNF- $\alpha$ 的100 $\mu$ l HEK培养基中,建立每个纯化的免疫球蛋白链可变结构域的系列稀释(3.5倍)(具有足够一式三份的体积)。从测定板中除去培养基,并用100 $\mu$ L的每个样品稀释液代替。在37 $^{\circ}$ C和5% CO<sub>2</sub>下22.5h后,将10 $\mu$ L或20 $\mu$ L的每个上清液与200 $\mu$ L预热的Quanti Blue培养基(InvivoGen)在96孔平底NUNC板中混合。在37 $^{\circ}$ C下在暗处振荡孵育2小时45分钟后,用BioRad读板器在620nm测量SEAP产生。

[0554] 结果表明,Q65B1(家族1),Q65C7(家族1)和Q62E10(家族2)对可溶性人TNF- $\alpha$ 诱导的诱导细胞活化具有最大抑制。结果显示,这些免疫球蛋白链可变结构域有力地且有效地抑制了通过在人细胞上表达的TNFR介导的可溶性TNF- $\alpha$ 的反应(图2A)。

[0555] 3.4.2 Q65D3和Q65B1(都是家族1)的抑制

[0556] 材料和方法如上面小点3.4.1所述,除了不同数量的细胞/孔( $3.5 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ 和 $1 \times 10^4$ )和用TNF(10 $\mu$ L和20 $\mu$ L)刺激后的细胞上清液的体积。

[0557] 结果

[0558] Q65B1和Q65D3都能够完全中和HEK-293NF- $\kappa$ B/SEAP报告细胞上的人可溶性TNF- $\alpha$ 的活性,对于Q65B1,EC50值约为0.2nM,对于Q65D3,EC50值为0.6nM(图2B)。

[0559] 3.5膜TNF- $\alpha$ 诱导的细胞活化的抑制

[0560] 可溶性和膜结合的TNF- $\alpha$ 都可以诱导表达TNF- $\alpha$ 受体的细胞的活化,并且两种形式都被认为有助于克罗恩氏病的炎症和病理学。能够结合并中和可溶性和膜结合的TNF- $\alpha$ 活性的可变结构域可能是最有效的。

[0561] 开发了细胞接触报告基因测定法,以确保可以鉴定具有抑制膜TNF- $\alpha$ 诱导的细胞活化的能力的可变结构域。创建CHO细胞系,其组成型表达不可切割的跨膜形式的人TNF- $\alpha$ (mTNF- $\alpha$ -CHO)。在与NF- $\kappa$ B/SEAP HEK-293细胞共培养中,mTNF- $\alpha$ -CHO细胞诱导报告基因的活化。因此,可以确定不同可变结构域抑制mTNF- $\alpha$ 诱导的细胞活化的能力。

[0562] 3.5.1膜TNF- $\alpha$ 诱导的细胞活化测定的结果

[0563] 表3(a)

[0564] 衍生自M62和M63的抗TNF- $\alpha$ 克隆-mTNF- $\alpha$ 诱导的NF- $\kappa$ B/SEAP HEK-293报告细胞活化的抑制

|        |        |    |  |
|--------|--------|----|--|
| [0565] | 克隆ID   | 家族 | mTNF- $\alpha$ 诱导的HEK-NF-kB SEAP报告子的抑制 (EC50=nM) |
|        | Q62F2  | 1  | 34   |
|        | Q62F11 | -  | 40   |
|        | Q62E10 | 2  | 80   |
|        | Q62F10 | 2  | -  |
|        | 阿达木单抗  |    | 1-3  |

[0566] 表3 (b)

[0567] 衍生自M65的克隆-mTNF- $\alpha$ 诱导的HEK-NF-kB SEAP报告细胞活化的抑制

|        |        |    |  |
|--------|--------|----|--|
| [0568] | 克隆ID   | 家族 | mTNF- $\alpha$ 诱导的HEK-NF-kB SEAP报告子的抑制 (EC50=nM) |
|        | Q65D3  | 1  | 16.0   |
|        | Q65D1  | 1  | 15.3   |
|        | Q65B1  | 1  | 10.9   |
|        | Q65C7  | 1  | 14.1   |
|        | Q65A3  | 2  | 23.9   |
|        | Q65E12 | 2  | 173.8  |
|        | Q65F6  | 2  | 109.6  |
|        | 阿达木单抗  |    | 1.2  |

[0569] 可以看出,属于家族1的可变结构域通常显示出有效的mTNF- $\alpha$ 抑制,属于家族2的可变结构域也通常显示出对mTNF- $\alpha$ 的抑制。

[0570] 实施例4:与阿达木单抗的交叉反应

[0571] 将1 $\mu$ g/ml阿达木单抗包被在HPM板上,然后在不存在或存在不同的可变结构域的情况下与人TNF- $\alpha$ 孵育。洗涤后除去游离的TNF- $\alpha$ 可变结构域复合物,通过与生物素化的兔多克隆抗hTNF- $\alpha$ 抗体孵育,检测到与固定的mAb保持结合的TNF- $\alpha$ ;然后加入mAvidin-HRP,随后TMB进行ELISA显色。

[0572] 结果

[0573] Q62E10 (家族2), Q62F2 (家族1), Q62F10 (家族2), Q65A3 (家族2), Q65B1 (家族1), Q65C7 (家族1), Q65D1 (家族1), Q65D3 (家族1), Q65E12 (家族2), Q65F6 (家族2) 和Q62F11 (既不是家族1和也不是家族2) 显示出完全抑制TNF- $\alpha$ 与阿达木单抗的结合。

[0574] 实施例5:在来自小鼠小肠的上清液中的纯化的大肠杆菌重组抗TNF- $\alpha$ 免疫球蛋白链可变结构域的稳定性

[0575] 在从几个小鼠的合并的小肠内容物制备的上清液提取物的存在下测试纯化的可变结构域。在肠提取物存在下孵育可变结构域不同时间段之后,使用h-TNF- $\alpha$ -TNFR2ELISA测定“消化的”可变结构域样品的TNF- $\alpha$ 结合活性。

[0576] 小鼠小肠上清液

[0577] 切下小鼠小肠,取出固体内容物,用1ml 0.9%盐水漂洗肠。将固体和液体部分在1.5ml微量离心管中合并,涡旋匀浆并在4 $^{\circ}$ C下以16k xrcf离心10分钟。取出上清液,并在使用前储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0578] 板和抗原

[0579] 在4度,在用1 $\mu$ g/ml依那西普 (50 $\mu$ L/孔) 包被的HPM板上测定抗TNF- $\alpha$ 可变结构域。

在测定法中,使用前将板用1%BSA封闭至少1小时。

#### [0580] 蛋白酶终止液

[0581] 将蛋白酶抑制剂混合物片溶解在5mL蛋白酶终止缓冲液(2%BSA, 1xPBS, 5mM NaEDTA)中以制备20x蛋白酶抑制剂储备溶液。通过用蛋白酶终止缓冲液中1/100稀释的PMSF以1/10稀释20x蛋白酶抑制剂溶液,制备2x蛋白酶终止液(如2.3.3节所述)。

#### [0582] 方法

#### [0583] 消化

[0584] 在0.4%BSA中制备250 $\mu$ g/mL可变结构域储备溶液。向在冰上的55.2 $\mu$ L的SI上清液中加入4.8 $\mu$ L可变结构域并通过涡旋混合。立即取出25 $\mu$ L并与25 $\mu$ L冰冷的蛋白酶终止液(未消化对照)混合,并在-80 $^{\circ}$ C下冷冻。将25 $\mu$ L的第二等分试样移至聚碳酸酯薄壁PCR板的单孔中并在37 $^{\circ}$ C孵育1至24小时(消化的可变结构域)。孵育后,将消化的可变结构域样品置于冰上,并向每个管中加入25 $\mu$ L冰冷的蛋白酶终止液。样品在测定前在-80摄氏度冷冻。

#### [0585] ELISA

[0586] 将可变结构域在1%BSA+1x蛋白酶抑制剂溶液中稀释并与5ng/mL h-TNF- $\alpha$ 以1:1混合,该蛋白酶抑制剂溶液是通过在1%BSA中稀释20x蛋白酶抑制剂储备溶液制成的。将TNF- $\alpha$ 混合物转移到用1 $\mu$ g/mL依那西普包被的封闭的HPM ELISA板。将板孵育2小时,用PBS 0.5%PEG20 (PBST)洗涤4次,干燥,然后与生物素化的兔多克隆抗人TNF- $\alpha$ 抗体(50 $\mu$ L/孔, 0.27 $\mu$ g/mL)一起室温振荡孵育1小时。1小时后,将板用PBST洗涤4次,通过轻敲干燥,然后与mAvidin-HRP(50 $\mu$ L/孔, 1/1000稀释)室温下振荡孵育30min。然后将板用PBST 4x洗涤,通过轻敲干燥并使用100 $\mu$ L的TMB显影。可变结构域(在PBS中)的标准曲线与消化/未消化的样品一起运行。在标准曲线和测试样品中使用的可变结构域的最高浓度分别为300ng/mL和200ng/mL。

#### [0587] 数据分析

[0588] 通过从仅含TNF的对照(最大信号)中减去消化和未消化的对照可变结构域中的信号来计算可变结构域所达到的抑制水平。这给出每个可变结构域的信号减少,其与样品中可变结构域的量成比例。通过将消化的可变结构域的信号减少除以单次稀释的未消化的可变结构域的信号减少来计算存活%。

#### [0589] 结果

[0590] 62F2和65B1(都是家族1)显示大于80%的存活,62E10显示大于70%的存活(家族2),65D1和65C7(家族1)显示约50%的存活。

[0591] 然后进行时间过程研究,以在1h、3h和7h测量性能。结果广泛符合之前的小肠上清液工作。

#### [0592] 实施例6:所选择的抗TNF- $\alpha$ 免疫球蛋白链可变结构域的优化

[0593] 到目前为止调查的可变结构域尚未被突变,并且纯化的可变结构域全部包括C-末端标签(c-myc-6His或Flag-6His)。设计突变体是为了研究当与Q65B1突变相组合时,是N末端氨基酸的修饰还是不存在C-末端标签,会导致稳定性进一步提高。

#### [0594] 6.1构建体和突变

[0595] (i)设计一组Q65B1单体突变体(ID7F-EV、ID8F-EV ID9F-EV、ID13F-EV、ID14F-EV和ID15F-EV;全部包括His标签),以调查特定突变对蛋白酶抗性。





[0603] 天然小鼠小肠上清液：用0.9%盐水将七只C57BL/6雄性小鼠的小肠内容物去除，合并，匀浆并离心。将所得上清液除去，等分并冷冻。

[0604] 人粪便上清液池：通过加入1ml PBS将粪便样品变成浆液。然后将浆液合并，离心并除去上清液，等分并储存在-80℃。该方法除去粪便基质，包括任何细胞材料。

[0605] 在用1μg/mL依那西普(50μL/孔)过夜包被的HPM板上测定抗TNF-α可变结构域。在测定法中，使用前将板用1%BSA封闭至少1小时。如实施例5所述制备2×蛋白酶终止溶液。

[0606] 消化

[0607] 在0.34% (3400μg/mL) BSA中制备250μg/mL的可变结构域储备溶液。在冰上向55.2 μL粪便或小肠上清液中加入4.8μl可变结构域并通过涡旋混合。立即取出25μl，并与25μl冰冷的蛋白酶终止液(未消化对照)混合，并在-80℃冷冻。将25μl的等分试样置于聚碳酸酯薄壁PCR板的孔中并在37摄氏度分别孵育17h或7h。孵育后，将消化的可变结构域样品置于冰上，并向每个管中加入25μl冰冷的蛋白酶终止液。样品在测定前在-80摄氏度冷冻。

[0608] ELISA

[0609] 如实施例5所述，将可变结构域在1%BSA+1x蛋白酶抑制溶液中稀释，与5ng/mL h-TNF-α1:1混合，并在室温下孵育1小时。然后将可变结构域TNF-α混合物加载到用1μg/mL依那西普包被的封闭ELISA板上，并在室温下振荡孵育2小时。将板用PBST洗涤4次，通过敲打干燥，并与生物素化的兔抗人TNF-α多克隆抗体(50μL/孔, 0.3μg/mL)在室温下振荡孵育1小时。1小时后，将板洗涤并如前所述，并在室温下与mAvidin-HRP(50μl/孔, 1/1000稀释)一起振荡孵育30min。然后将板洗涤并如前所述进行干燥，并使用100μL的TMB显影。可变结构域(在PBS中)的标准曲线与消化/未消化的样品一起运行。在标准曲线和测试样品中使用的可变结构域的最高浓度为100ng/mL。

[0610] 数据分析

[0611] 消化后，使用TNFR2干扰ELISA测量可变结构域浓度。在该测定中，将可变结构域与TNF-α混合。然后测量剩余的TNF-α水平。从与ELISA板结合的TNFR2受体结合抑制的TNF-α的量推断可变结构域的浓度。原始OD450值用从仅含有1%BSA的孔的空白读数进行调整。使用Graphpad Prism使用非线性回归绘制标准曲线以拟合四参数曲线。使用标准曲线在Graphpad棱镜中计算测试样品中的可变结构域浓度。通过将0-时间点的平均可变结构域浓度除以单个时间点的平均可变结构域浓度来计算存活%。计算两种方法的比的标准误差。

[0612] 结果

[0613] 对Q65B1可变结构域单体的评估显示，包含这些突变令人惊讶地没有显著影响修饰的可变结构域的TNF-α中和效力(TNF-α-TNFR2ELISA)。

[0614] ID8F-EV和ID13F-EV显示改善的对小鼠肠和人粪便上清液中存在的蛋白酶的失活的抗性(图3)。

[0615] (ii) 构建体ID22F-ID29F

[0616] 材料

[0617] -HEK-293NF-kB/SEAP细胞:10<sup>4</sup>个细胞/孔, 50μL

[0618] -96孔板

[0619] -补充有10%FBS, Pen/Strep和500μg/mL遗传霉素抗生素(G418)的DMEM

- [0620] -人TNF- $\alpha$ 浓度:2ng/ml
- [0621] -纯化的同型双头可变结构域:ID22F-ID29F
- [0622] -可变结构域稀释:20nM-2.1pM;2.5倍稀释
- [0623] -孵育时间:23h
- [0624] -SEAP色度底物培养基:200 $\mu$ L;测试的上清液体积:20 $\mu$ L;时间点读数:2h
- [0625] -板读卡器(620nm)
- [0626] 方法
- [0627] 将50 $\mu$ L的 $10^4$ 个细胞/孔的NF-kB/SEAP HEK-293细胞在96孔平底微板中铺板,并在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下过夜孵育。在50 $\mu$ L含有4ng/mL hs-TNF- $\alpha$ 的HEK培养基中,将每个纯化的可变结构域的第二天连续稀释(2.5倍)设定为测定浓度的两倍(具有足够三个重复的体积)。将可变结构域和TNF- $\alpha$ 在室温下孵育1小时并振荡,然后将50 $\mu$ L的每种稀释液加入到测定板中。在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下23小时后,将20 $\mu$ L每个上清液与200 $\mu$ L预热的SEAP培养基在96孔平底板中混合。在37 $^{\circ}$ C下,在黑暗中振荡孵育2小时后,在吸收620nm以读板器测量SEAP产生。
- [0628] 结果
- [0629] 在可溶性TNF诱导的HEK293-NF-kB-SEAP报告子测定法中,Q65B1同型双头衍生物(包括具有变化K59H,K65H,K78S,K101H的那些)是同样有效力和有效的,EC50值在0.02nM-0.03nM之间。相对于单体,Q65B1同型双头的效力增加约10倍。
- [0630] (iii) ID32F、ID34F、ID37F、ID38F
- [0631] 为了避免产生具有环化N-末端谷氨酸的产物(如果在酵母中表达)的可能性,调查将基于Q65B1的可变结构域的N-末端氨基酸从谷氨酸改变为天冬氨酸残基(其不是易于环化)的影响。产生Q65B1的突变体以产生具有N末端D残基的相应Q65B1以及将这些中每个与有利的蛋白酶抗性突变结合的变体。
- [0632] 使用NF-kB/SEAP HEK-293细胞报告子测定法的ID-32F, ID-34F, ID-37F和ID-38F的sTNF- $\alpha$ 中和能力
- [0633] 为了证实ID-38F和ID-34F中和可溶性人TNF- $\alpha$ ,与商品化抗TNF- $\alpha$ 抗体英夫利昔单抗(Remicade)相比,在NF-kB/SEAP HEK-293细胞报告子测定法中测试这些可变结构域。从不同日期进行的两个独立实验获得结果。
- [0634] 材料
- [0635] -HEK-293NF-kB/SEAP细胞(Imgenex): $10^4$ 个细胞/孔,50 $\mu$ L
- [0636] -灭菌的96孔板
- [0637] -补充有10%FBS, Pen/Strep和500 $\mu$ g/mL遗传霉素抗生素(G418, Invitrogen, 10131027)的DMEM(Sigma, D6429)
- [0638] -人TNF- $\alpha$ (Invitrogen, PHC3015)浓度:2ng/ml
- [0639] -5个纯化的可变结构域:ID-32F, ID-34F, ID-37F, ID-38F和Q65B1
- [0640] -英夫利昔单抗稀释:10nM-1pM(第1次实验);2nM-1pM(第2次实验)
- [0641] -可变结构域稀释:10nM-1pM(第1次实验);5nM-1pM(第2次实验)
- [0642] -孵育时间:22h
- [0643] -QuantiBlue培养基(InvivoGen):200 $\mu$ L;测试的上清液体积:20 $\mu$ L;时间点读数:2h

[0644] -BioRad读卡器 (620nm)

[0645] 方法

[0646] 将50 $\mu$ L的10<sup>4</sup>细胞/孔的NF-kB/SEAP HEK-293细胞在96孔灭菌的平底微板中铺板,并在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下过夜孵育。在含有4ng/mL hs-TNF- $\alpha$  (用于实验1)的HEK培养基中,将可变结构域和英夫利昔单抗(2.5倍)的第二天连续稀释设定为测定浓度的两倍。在第二个实验中,在120 $\mu$ L的HEK培养基中,将连续稀释(可变结构域为1.9倍,阿达木单抗为2.2倍)设定为4x测定浓度。然后用100 $\mu$ L含有8ng/mL hsTNF- $\alpha$  (4x)的HEK培养基以1:1稀释100 $\mu$ L每种稀释物以具有两倍于测定浓度的可变结构域和TNF- $\alpha$ 。将可变结构域和TNF在RT下振荡孵育1小时,然后将50 $\mu$ L每种稀释液加入到测定板中。在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>孵育22小时后,将20 $\mu$ L各上清液与200 $\mu$ L预热的Quanti Blue培养基在96孔平底NUNC板中混合。在37 $^{\circ}$ C下在暗条件下振荡孵育2小时后,用BioRad板阅读器在620nm测量SEAP产生。

[0647] 结果

[0648] 实验1的结果示于图4A,并且实验2的结果示于图4B和4C。所有可变结构域显示完全的sTNF- $\alpha$ 中和和类似效力,EC50值在0.3nM和0.5nM之间。很明显,在这些可变结构域中添加突变不影响这些可变结构域中和sTNF- $\alpha$ 的效力。在任何一个实验中,英夫利昔单抗都不会产生完全的sTNF- $\alpha$ 中和,显示近似平稳的剂量-反应曲线,~80%的最大中和在约2nM。

[0649] 使用NF-kB/SEAP HEK-293细胞报告子测定法的ID-34F、ID-38F、Q65B1、ID-8FEV、阿达木单抗和英夫利昔单抗的mTNF- $\alpha$ 中和活性

[0650] 为了证实ID-38F和ID-34F中和膜结合的TNF- $\alpha$ ,与2个祖细胞(Q65B1和ID8F-EV)相比,在NF-kB/SEAP HEK-293细胞报告子测定法中测试这些可变结构域。在相同的测定法中测试了2种商品化抗TNF- $\alpha$ 抗体(阿达木单抗和英夫利昔单抗)作为参照。

[0651] 材料:

[0652] -NF-kB/SEAP HEK-293细胞(Imgenex)浓度:3.5 $\times$ 10<sup>4</sup>个细胞/孔

[0653] -表达Flp-In CHO细胞系的稳定的TNF- $\alpha$ \_DEL (Invitrogen&GeneArt, Life Technologies):25 $\times$ 10<sup>3</sup>个细胞/孔

[0654] -2个纯化的抗TNF- $\alpha$ 突变体可变结构域:ID-34F和ID-38F

[0655] -2个纯化的抗TNF- $\alpha$ 可变结构域:Q65B1和ID8F-EV

[0656] -2个抗体:阿达木单抗和英夫利昔单抗

[0657] -可变结构域/Ab稀释:300nM-0.11nM(2.2倍稀释)

[0658] -孵育时间:24小时

[0659] -QuantiBlue培养基(InvivoGen):200 $\mu$ L;测试的上清液体积:10 $\mu$ L;时间点读数:2h

[0660] -BioRad读卡器 (620nm)

[0661] 方法:

[0662] 第0天,将50 $\mu$ L的3.5 $\times$ 10<sup>4</sup>个细胞/孔的NF-kB/SEAP HEK-293细胞在96孔平底微板上铺板,并在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下储存过夜。在第1天,将每个纯化的可变结构域的系列稀释(足够三个重复的体积)设置在50 $\mu$ LHEK培养基中的测定浓度的三倍。将50 $\mu$ L各可变结构域稀释(3x)加入到测定板中,然后将板在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下保存 $\leq$ 1小时。将50 $\mu$ L在HEK培养基中制备的m-TNF- $\alpha$ CHO细胞(25000个细胞/50 $\mu$ L)加入到HEK-测定板中以具有最终的可变结构域

测定浓度 (1x)。细胞在37°C和5%CO<sub>2</sub>下孵育24小时。在第2天,将10μL每种上清液与200μL预热的Quanti Blue培养基 (InvivoGen) 混合。在37°C在暗处振荡孵育2小时后,使用BioRad板阅读器在620nm测量SEAP产生。通过GraphPad Prism软件分析所得的剂量反应曲线。

[0663] 结果

[0664] 表4

[0665] 抗TNF-α可变结构域和商品化抗TNF-α抗体的mTNF-α中和

| 可变结构域/抗体 | EC50 (nM) |
|----------|-----------|
| ID-34F   | 4.71      |
| ID-38F   | 5.16      |
| Q65B1    | 8.72      |
| ID8F-EV  | 7.69      |
| 阿达木单抗    | 3.14      |
| 英夫利昔单抗   | 3.79      |

[0667] ID-34F和ID-38F在中和膜结合的TNF-α时显示出类似的效力,表明将可变结构域的N-末端氨基酸从E改变为D不影响可变结构域的效力。ID-34F和ID-38F针对mTNF似乎比亲本单体Q65B1和ID-8FEV稍微更有效力。ID-34F和ID-38F在中和mTNF-α中仅比商品化抗体阿达木单抗和英夫利昔单抗的效力略低。

[0668] ID38F的TNFR1ELISA比较

[0669] 由于TNFR1也被认为在TNF-α病理学中发挥作用,因此进行ELISA以测试ID38F和阿达木单抗在预防TNF与TNFR1的结合中的能力。

[0670] 方法

[0671] 在4°C将无菌96孔微量滴定板用50μl每孔0.5μg/ml hTNFR1 (R&D Systems) 包被过夜。使用洗板机在PBST中洗涤板,并在200μl每孔1%BSA中封闭1小时。将每个抗体以30nM开始的三倍稀释系列与2.5ng/ml TNF-α一起孵育1小时,然后将其以50μl/孔加入洗涤后的板中并孵育5小时。将板洗涤并与50μl/孔的1/1000稀释的生物素化兔α-hTNF (Peprotech P31AB7) 在1%BSA中孵育,并在4°C下过夜孵育。将板洗涤并用50μl/孔的1/1000稀释的mAvidin HRP在1%BSA中孵育1小时,之后最后洗涤并与100μl/孔TMB底物一起孵育。用50μl/孔的0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>在20分钟后终止反应,并在450nm处读取吸光度。通过GraphPad Prism中的ELISA数据计算EC50值。

[0672] 结果

[0673] 表5

| 抗TNF剂 | EC50 (pM) |
|-------|-----------|
| ID38F | 610.0     |
| 阿达木单抗 | 200.5     |

[0675] ID38F能够在亚纳摩尔EC50下中和TNF-α与TNFR1的结合。该测定中阿达木单抗的较高效力可能反映了该分子是二价的,而ID38F是单价的事实。

[0676] TNFR2 ELISA和稳定性测定

[0677] TNFR2 ELISA中可变结构域单体的TNF-α结合活性的评估显示,将可变结构域的N-末端氨基酸从E变为D没有显著影响。

[0678] 如先前通过测量可变结构域单体对存在于小鼠小肠和人粪便上清液中的蛋白酶的失活的抗性来测试它们的稳定性。将可变结构域的N-末端氨基酸从E改变为D对蛋白酶稳定性的影响非常小。

#### [0679] 6.2.2总结

[0680] 这些结果表明,具有N-末端序列DVQLV和氨基酸改变K59H和K101H(“ID38F”)的、与Q65B1相关的单体特别地具有有效力的TNF- $\alpha$ 中和活性,对小肠和粪便蛋白酶失活的优异抗性,以及如果要在酵母中表达,则产生不容易发生焦谷氨酸化的产品的潜力。

[0681] 实施例7:对肠和IBD炎性蛋白酶的稳定性

#### [0682] 7.1在发炎的IBD组织中蛋白酶的稳定性证据

[0683] 会导致治疗性抗体快速降解的蛋白酶活性在克罗恩氏病中被上调(MMP3, MMP12, 组织蛋白酶)(Biancheri等人ECCO, Dublin 2011 Abstract P007, 通过整体引用并入本文)。因此,在纯化的炎性蛋白酶和更复杂的IBD粘膜组织裂解物的存在下,调查抗TNF- $\alpha$ 可变结构域的稳定性是重要的。

[0684] 从商业供应商例如R&D系统获得重组人MMP-3和重组人MMP-12, (分别为513-MP-010和917-MP-010)。在TCNB测定缓冲液:50mM Tris, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 150mM NaCl, 0.05% (w/v) 聚氧乙烯(23)月桂基醚, 例如Brij-35, pH7.5中进行酶活化和22小时孵育。在主要测定中使用之前,通过预孵育来活化MMP。为了活化rhMMP-3,将酶在含有5 $\mu$ g/mL糜蛋白酶的TCNB中稀释至20 $\mu$ g/mL,并在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。活化后,通过加入PMSF至2mM的终浓度来抑制糜蛋白酶活性。PMSF不应该不利地影响rhMMP-3活性。通过在TCNB中稀释至50 $\mu$ g/mL并在37 $^{\circ}$ C下孵育30小时来活化rhMMP-12。没有其它添加剂或抑制剂用于活化rhMMP-12。

[0685] 材料

[0686] 单体ID34F, 双头ID25F, 依那西普, 阿达木单抗和英夫利昔单抗。

[0687] 方法

[0688] 将在TCNB缓冲液中制备的测试化合物与活化的rhMMP-3和rhMMP-12在冰上混合。测试化合物在测定开始时以30 $\mu$ g/mL的浓度存在。rhMMP-3以12 $\mu$ g/mL的起始测定浓度存在。rh-MMP-12以30 $\mu$ g/mL的起始测定浓度存在。在两种酶和仅有对照的TCNB缓冲液的存在下测试每种化合物,以检测在测定过程中不依赖于酶的降解。酶也与仅TCNB一起孵育以提供“无化合物”对照。在t=0小时的所有反应的最终体积=30 $\mu$ L。在t=0小时,取出10 $\mu$ L起始测定体积,并加入到在冰上的蛋白酶终止缓冲液(1 $\times$ PBS 2%BSA, 5mM EDTA, 如实施例5所述)中的10 $\mu$ L 2x蛋白酶抑制剂溶液中,以停止反应。将T=0样品在-80 $^{\circ}$ C下冷冻。将剩余的20 $\mu$ L反应体积密封在PCR测定板中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育22小时。

[0689] 孵育22小时后,发现大部分反应为 $\sim$ 20 $\mu$ L。加入蛋白酶终止缓冲液(1 $\times$ PBS 2%BSA, 5mM EDTA)中的20 $\mu$ L 2x蛋白酶抑制剂溶液以停止反应。T=22hr样品在-80 $^{\circ}$ C冷冻。通过Western印迹分析测定样品。将样品在负载染料中稀释至相当于6.6ng/ $\mu$ L的测试化合物,并将15 $\mu$ L(假设测试化合物浓度在实验过程中没有变化,每个试验化合物/泳道100ng)上样到10%Bis-Tris凝胶。还加载了相当体积的“无测试化合物”对照。以5 $\mu$ L/泳道为标准添加化学发光的MW蛋白梯度,例如Super信号(Pierce)。将样品在SDS-MES缓冲液中电泳,并使用半干印迹机(例如iBlot)上的7分钟转移程序转移到硝酸纤维素膜上。于4 $^{\circ}$ C将膜在封闭溶液(1%BSA, 2%脱脂奶粉, 0.05%PEG20, 1XPBS pH7.4)中过夜封闭。使用1)一抗兔多克隆抗

Q65B1 (-Flag-6His) (末端出血血清):以1/1000在封闭溶液中,2) 二抗:HRP缀合的多克隆猪抗兔IgG抗体,以1/1000加1%正常山羊血清在封闭溶液中,检测可变结构域。使用以1/1000在封闭溶液(未使用二抗)中的过氧化物酶缀合的Gamma链特异性抗人IgG (Dako, P0214),检测依那西普、阿达木单抗和英夫利昔单抗。在每个孵育步骤之间,在25mL PBST (1xPBS, 0.1%PEG20) 中洗涤印迹6×5分钟以除去非特异性结合的抗体。Pierce超信号ECL (34087) 用于印迹显色,其使用ImageQuant (LAS4000) 可视化,必要时改变曝光时间。

[0690] 结果

[0691] ID34F (Q65B1K59H和K101H变体) 和ID25F (同型双头ID34F) 在22小时孵育后在体外对rh-MMP3和rh-MMP12显示完全抗性(图5A)。相比之下,每种临床生物剂依那西普、阿达木单抗和英夫利昔单抗经历全长分子的或部分或全部裂解以产生较低MW片段(图5B和5C)。分析显示在处理不变、与单体(15kDa)和双头(30kDa)相对应的条带。

[0692] 7.2来自猪和猴的肠液和粪便提取物的稳定性证据

[0693] ID32F, ID34F, ID8F-EV和Q65B1各自在(a)猪十二指肠上清液存在下孵育5个半小时,(b)小鼠小肠上清液存在下孵育5个半小时,(c)人粪便上清液存在下孵育21小时。测试的可变结构域显示来自不同GI区域的这些提取物的良好稳定性。每个可变结构域的相应近似存活%如下:

[0694] 表6

| [0695]  | 猪十二指肠 | 小鼠小肠 | 人粪便 |
|---------|-------|------|-----|
| ID32F   | 80    | 55   | 40  |
| ID34F   | 90    | 70   | 70  |
| ID8F-EV | 120   | 80   | 60  |
| Q65B1   | 90    | 60   | 60  |

[0696] 7.3 ID8F-EV在从猴胃肠道不同区域的腔内容物制备的提取物中的稳定性

[0697] 将ID8F-EV在胃、十二指肠、空肠和回肠上清液中孵育5小时,并在盲肠和结肠上清液中孵育16小时。孵育后,ID8F-EV的存活%约为60%-90%。

[0698] 实施例8:在口服施用后,将免疫球蛋白链可变结构域局部递送至肠道并进入固有层

[0699] 本发明的可变结构域不太可能结合鼠TNF- $\alpha$ ,然而,在小鼠IBD模型中口服施用后局部递送至肠道和固有层渗透的证据表明TNF- $\alpha$ 的中和可能在肠道炎症部位实现。

[0700] 8.1 65B1在从正常和DSS结肠炎小鼠取出的结肠段腔内离体孵育后的结肠上皮渗透

[0701] 方法

[0702] 使用标准方案在两只小鼠中诱导DSS结肠炎。在饮用水中施用2%硫酸右旋糖(MP 生物学)7天,之后将小鼠再保持3天,以使疾病发生高峰。然后将小鼠以及2只正常小鼠一起处死,并取出结肠。用PBS轻轻洗出结肠腔内容物,然后将区段用线连接并按如下所示处理。结肠区段在含有2%FCS和15mM HEPES的RPMI中装载3 $\mu$ g/ml 65B1,然后将开放区段末端连接,并在RT下将区段在培养瓶中在RPMI+2%FCS+15mM HEPES中轻轻摇摆孵育1.75h。然后切下结肠区段,简单洗涤,并或者固定在多聚甲醛中,或者在最佳切割温度化合物(OCT)中包埋并快速冷冻。从近端结肠组织收集组织切片。切下6 $\mu$ m切片,并在冰冷的丙酮中固定90

秒。将切片空气干燥并储存在-20℃直到测定。每只小鼠的两个连续切片用于染色每个抗体集。

#### [0703] 免疫组化

[0704] 将载玻片解冻,并在室温下将切片用3%不含脂肪酸的BSA在PBS中封闭30分钟。在加湿室中在4℃下进行初级抗体过夜孵育(兔多克隆抗可变结构域或兔对照多克隆抗体)(~18小时)。每个结肠组织块的一组三个载玻片染色如下(每次处理一个载玻片):

[0705] -介载体(如上所述在PBS中的3%FAF-BSA)

[0706] -10μg/ml亲和纯化的兔多克隆对照抗体

[0707] -10μg/ml抗可变结构域亲和纯化的兔多克隆抗体(AB1219)。

[0708] 孵育后每个切片用冰冷的PBS洗涤三次,三分钟。将所有切片在介载体中用20μg/ml山羊抗兔IgG Alexa Fluor 594抗体(Molecular Probes A11037)和1μg/ml Hoescht 33342(鉴定细胞核)在室温下黑暗中染色6小时。用二抗孵育后,如前所述洗涤切片,随后用Milli Q水进行最终洗涤。切片在黑暗中空气干燥,装有防腐介质(Citifluor,AF1),并用玻璃盖玻片覆盖。载玻片在黑暗中保持在4摄氏度,直到观察。使用Olympus AX70显微镜观察载玻片,并使用Image Pro-Plus(v7.0,Media Cyber netics)对每个荧光(Alexa Fluor 488和UV)顺序捕获图像。使用来自对照兔抗体多克隆处理的对照或DSS小鼠的切片设定暴露水平,并从每只动物的每张载玻片上捕获至少两个随机视场。

#### [0709] 结果

[0710] 与正常小鼠结肠的图像相反,来自DSS结肠炎小鼠的结肠切片中的65B1相关荧光显著增加。苏木精和曙红(H&E)切片显示出广泛的炎症,这可能严重损害了上皮屏障功能,允许65B1准备进入底层固有层。尽管正常小鼠的结肠区段中几乎没有或没有65B1跨上皮渗透,但是在DSS结肠炎小鼠结肠段中发生广泛的渗透。结果表明,疾病诱导的上皮屏障功能改变使得可变结构域进入粘膜下组织。

#### [0711] 8.2口服管饲后检查65B1对正常和DSS结肠炎小鼠结肠粘膜的渗透

##### [0712] 材料和方法

[0713] -Q65B1(3.35mg/ml=222.3uM)

[0714] -1M碳酸氢钠溶液

[0715] -奶粉(Marvel),

[0716] -兔抗可变结构域抗体,pAB 1219

[0717] -对照兔pAb

[0718] -山羊抗兔Alexa 594nm(Molecular Probes,A11037)

[0719] 在3只C57BL/6小鼠中通过在饮用水中施用2%硫酸右旋糖(MP生物学)7天来诱导DSS结肠炎,然后将小鼠再保持3天以使疾病发生高峰。给药当天,所有DSS结肠炎小鼠和3只正常小鼠均给予100μl的0.1M NaHCO<sub>3</sub>,450mg/ml奶粉,然后~10分钟后给予两只正常小鼠和两只具有最严重疾病的DSS结肠炎小鼠(如通过体重测量来判断)150μl含有65B1,33.6uM终浓度(相当于76μg)和450mg/ml奶粉的0.1M NaHCO<sub>3</sub>,而另外两只小鼠(一只正常和一只DSS结肠炎)仅接受介载体。将小鼠在65B1给药后3.25-3.5小时处死,取出胃肠道。分离出结肠,将腔内容物轻轻挤出,然后在含有2%胎牛血清的RPMI培养基中简单洗涤,然后按照附件方案所述进行快速冷冻。

### [0720] 结果

[0721] 没有接受65B1的小鼠的结肠提供了建立背景荧光材料,可以针对它判断65B1特异性荧光。VHH相关荧光是红色的,而使用Hoechst 33342标记的细胞核是蓝色的。仅接受介载体小鼠1显示出结肠背景荧光,而小鼠2和3被给予65B1。来自三只小鼠的结肠中的红色荧光差异很小(如果有任何差异),表明正常小鼠结肠的65B1渗透可以忽略不计,如预期的那样。H&E染色切片显示无明显炎症的典型结肠结构。与正常小鼠相反,存在广泛的炎症区域,并且在一些地方已发生显著的上皮损伤。与仅接受介载体的DSS结肠炎小鼠相比,接受可变结构域的DSS结肠炎小鼠中65B1相关荧光明显增加,表明跨上皮渗透至固有层。

[0722] 该结果表明口服给定的可变结构域可以进入具有诱导性结肠炎小鼠的结肠粘膜下层。在IBD患者中进入该区室是治疗功效的必要前提。

[0723] 实施例9:ID38F和英夫利昔单抗对IBD活检组织的离体培养物中存在的信号蛋白的磷酸化的影响

[0724] 由于基于抗体的抗TNF- $\alpha$ 治疗剂通常与例如鼠TNF- $\alpha$ 缺乏交叉反应性,不可能评估本发明的免疫球蛋白链可变结构域在基于小鼠的IBD中的临床前模型的功效。然而,已经显示,局部肠递送分泌抗鼠TNF- $\alpha$ 抗体结构域的乳酸杆菌足以抑制在IBD的小鼠模型中的结肠炎症(Vandenbroucke等人,2010Mucosal Immunology 3(1):49-56,通过整体引用并入本文)。这些研究的结果提供了口服施用的基于抗人TNF结构域抗体的方法用于预防或治疗IBD的理念的临床前验证。

[0725] 英夫利昔单抗对于IBD治疗有效。英夫利昔单抗被认为是主要通过中和TNF的生物活性,导致细胞因子的下游促炎作用的抑制来起作用。通过TNF和继发性炎症介质对存在于患病组织中的许多不同细胞类型的活化涉及多种受体信号转导通路,导致受体、蛋白激酶和转录因子的磷酸化。实验表明,(i)蛋白磷酸化的模式在IBD中相比于正常肠组织中发生改变,(ii)磷酸化模式对特异性促炎机制的抑制剂敏感。

[0726] 调查(i)是否可以基于组织蛋白磷酸化模式的变化,在IBD组织的离体培养物中证实ID38F的TNF中和活性以及(ii)比较ID38F与临床有效的抗TNF mAb英夫利昔单抗的作用。

### [0727] 器官培养物

[0728] 在300 $\mu$ l补充有100U/ml青霉素和100 $\mu$ g/ml链霉素的无血清的HL-1培养基(Cambrex BioScience,Wokingham,UK)中的24孔板(VWR International,Lutterworth,UK)中放置来自具有活性IBD的患者的内窥镜结肠活检或手术回肠粘膜样本(每孔一个活检),并在37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>下,用以下刺激培养:

[0729] -IgG1 10 $\mu$ g/ml

[0730] -英夫利昔单抗10 $\mu$ g/ml

[0731] -ID38F 4 $\mu$ g/ml

[0732] -对照非抗TNF- $\alpha$ 免疫球蛋白链可变结构域) 4 $\mu$ g/ml

[0733] 48小时培养后,将活检和上清液快速冷冻并储存在-70 $^{\circ}$ C。

### [0734] 磷光阵列分析程序

[0735] 为了分析磷酸蛋白含量,将IBD组织样品解冻,在补充有均为1%的磷酸酶抑制剂混合物2(Sigma-Aldrich)和蛋白酶抑制剂混合物(Sigma-Aldrich)的RIPA缓冲液(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)中裂解。通过Bio-Rad Protein测定(Bio-Rad Laboratories,Hemel

Hempstead,UK) 以及在Array Diluent Buffer中稀释至1.0mg/ml的样品测定裂解物的蛋白质浓度。使用PathScan RTK Signalling Antibody Array Kits(Cell Signaling Technology, 化学发光读数#7982) 进行磷酸蛋白谱图的分析。复合阵列是基于夹心免疫测定原理的基于载玻片的抗体阵列。当酪氨酸或其它残基磷酸化时,阵列试剂盒允许同时检测28种受体酪氨酸激酶和11个重要信号转导节点(见表7A)。将靶标特异性捕获抗体、生物素化蛋白(阳性对照)和非特异性IgG(阴性对照)一式两份地点样在硝化纤维素涂覆的载玻片上。根据制造商的说明书使用提供的试剂进行组织裂解物的分析。简言之,将每种稀释的裂解物在载玻片上孵育,随后是生物素化检测抗体混合物。然后使用链霉亲和素缀合的HRP和LumiGLO®试剂通过化学发光观察结合的检测抗体。在标准化学发光敏感膜上捕获载玻片的图像。通过在HP LaserJet Pro 100彩色扫描仪上进行扫描并使用ImageJ软件量化斑点强度来获得胶片的图像。

[0736] 表7A

[0737] 包括在阵列上的目标激酶和信号蛋白

| [0738] | 受体酪氨酸激酶            | 信号转导节点                |
|--------|--------------------|-----------------------|
|        | EGFR/ErbB1 pan-Tyr | PDGFR pan-Tyr         |
|        | HER2/ErbB2 pan-Tyr | Akt/PKB/Rac Thr308    |
|        | HER3/ErbB3 pan-Tyr | c-Kit/SCFR pan-Tyr    |
|        | FGFR1 pan-Tyr      | FLT3/Flk2 pan-Tyr     |
|        | FGFR3 pan-Tyr      | FLT3/Flk2 pan-Tyr     |
|        | FGFR4 pan-Tyr      | M-CSFR/CSF-1R pan-Tyr |
|        | InsR pan-Tyr       | S6 核糖体蛋白 Ser235/236   |
|        | IGF-1R pan-Tyr     | EphA1 pan-Tyr         |
|        | TrkA/NTRK1 pan-Tyr | EphA2 pan-Tyr         |
|        | TrkB/NTRK2 pan-Tyr | EphA3 pan-Tyr         |
|        | Met/HGFR pan-Tyr   | EphB1 pan-Tyr         |
|        | Ron/MST1R pan-Tyr  | EphB3 pan-Tyr         |
|        | Ret pan-Tyr        | EphB4 pan-Tyr         |
|        | ALK pan-Tyr        | Tyro3/Dtk pan-Tyr     |
|        |                    | Stat1 Tyr701          |
|        |                    | Stat3 Tyr705          |
|        |                    | Lck pan-Tyr           |
|        |                    | Src pan-Tyr           |
|        |                    | Zap-70 pan-Tyr        |

[0740] 数据分析

[0741] 对每个印迹测量“背景”信号,并将其从未校正的磷酸蛋白信号中减去。注意到对一些“背景扣除的”磷酸蛋白值获得了阴性值。这可能是由于用于读取涉及暴露于X射线胶片和扫描阴性图像而不是直接测量光输出的阵列的方法。在ID38F(或英夫利昔单抗)处理的裂解物中测量的磷酸蛋白信号在背景校正后给出阴性值,但是相应对照非抗TNF- $\alpha$ 免疫球蛋白链可变结构域(或IgG)处理的校正值为阳性,抑制水平评分为>50%。

[0742] 阵列数据的视觉评估表明, ID38F和英夫利昔单抗都对一些组织中的一些磷酸蛋白产生抑制作用。为了寻找对每种不同磷酸蛋白质的抗TNF处理效果,将从ID38F和英夫利昔单抗阵列取得的信号直接与来自相应对照可变结构域和IgG阵列的信号进行比较,并计算信号比(ID38F/对照可变结构域和英夫利昔单抗/IgG)。为了评估来自不同患者的组织中抗TNF抗体是否存在一致的抑制模式,在4个CD患者中的至少3个的组织中被抑制 $\geq 50\%$ 的那些磷酸蛋白被突出显示(参见表7B)。

[0743] 表7B

[0744] 由ID38F或英夫利昔单抗抑制的磷酸蛋白(4种CD活组织检查中的3种&gt;50%)

| 生物功能                                       | 抑制的磷酸蛋白<br>(4例IBD活组织检查中3例>50%) |  |
|--|--------------------------------|--|
| <b>ID38F vs 对照可变 英夫利昔单抗 vs IgG<br/>结构域</b> |                                |  |
| 巨噬细胞凋亡细胞清除                                 | AXL<br>TYRO3                   | AXL<br>-   |
| T 细胞信号转导/粘附                                | EphA3<br>Lck                   | EphA3<br>ZAP70                                   |
| 血管生成                                       | VEGFR2<br>TIE2<br>EphB4        | VEGFR2<br>TIE2<br>-                              |
| 疼痛/神经元调节                                   | EphB1                          |  |
| 细胞活化/存活/信号转导                               | AKT<br>ERK1/2<br>S6 核糖体蛋白<br>- | AKT<br>ERK1/2<br>S6 核糖体蛋白<br>SRC<br>ALK<br>PDGFR |
| 造血   |                                | FLT3   |
| 上皮细胞调节                                     | EphA1<br>-                     | EphA1<br>EphA2                                   |

[0746] 基于这些标准,对原始阵列数据的分析表明,ID38F治疗持续抑制12/39磷酸蛋白,而英夫利昔单抗抑制14/39磷酸蛋白,其中8个与ID38F共有。这些蛋白质的功能与IBD炎症和/或病理学中可能重要的信号转导途径和免疫学过程都是相关的。当比较使用“未校正”和“对照归一化”数据的分析结果时,ID38F抑制的12个磷酸蛋白的集合在两种情况下是相同的;对于英夫利昔单抗,12种磷酸化蛋白被鉴定为两种分析所共同的。

[0747] 为了进一步分析阵列数据,将从ID38F和英夫利昔单抗阵列获得的“对照归一化”值直接与来自相应的对照可变结构域和IgG阵列的“对照归一化”值以及如前所述计算的比率进行比较。基于在4个IBD患者中至少3个的组织中被抑制 $\geq 50\%$ 的磷酸蛋白,再次注意到抗TNF抗体的一致的抑制模式(参见表7C)。

[0748] 表7C

[0749] 通过计算阵列数据的比率来鉴定磷酸蛋白,其归一化为每个阵列上的平均阳性对照信号

|             |  |
|-------------|--|
| <b>生物功能</b> | <b>抑制的磷酸蛋白<br/>(4例 CD 活组织检查中 3例&gt; 50%)</b> |
|-------------|--|

**ID38F vs 对照可  
变结构域**

**英夫利昔单抗 vs IgG**

|        |                     |                                |   |
|--------|---------------------|--------------------------------|---|
| [0750] | <b>巨噬细胞凋亡细胞清除</b>   | AXL<br>TYRO3                   | AXL<br>-                                  |
|        | <b>T 细胞信号转导/粘附</b>  | EphA3<br>Lck                   | EphA3<br>-                                |
|        | <b>血管生成</b>         | VEGFR2<br>TIE2<br>EphB4        | VEGFR2<br>TIE2<br>-                       |
|        | <b>疼痛/神经元调节</b>     | EphB1                          | RET                                       |
|        | <b>细胞活化/存活/信号转导</b> | AKT<br>ERK1/2<br>S6 核糖体蛋白<br>- | AKT<br>ERK1/2<br>S6 核糖体蛋白<br>SRC<br>PDGFR |
|        | <b>造血</b>           |                                | FLT3<br>cKit                              |
|        | <b>上皮细胞调节</b>       | EphA1<br>-                     | EphA1<br>EphA2                            |

[0751] ID38F处理抑制12/39磷酸蛋白,而英夫利昔单抗抑制14/39磷酸蛋白,其中8个与ID38F共有。当比较使用“未校正”和“对照归一化”数据的分析结果时,ID38F抑制的12个磷酸蛋白的组合在两种情况下是相同的;对于英夫利昔单抗,12种磷酸化蛋白被鉴定为两种分析所共同的。

[0752] 结论

[0753] 在患有活性疾病的人类患者的发炎IBD组织的培养物中,用ID38F离体处理或用临床有效的单克隆抗体英夫利昔单抗治疗可以抑制一组包括受体酪氨酸激酶和参与细胞信号转导的靶标的蛋白质的磷酸化。用结构不同的抗体治疗抑制4个组织中的3个中几乎相同的8个蛋白质的集合的磷酸化证据强烈地表明两种抗体的作用是由于内源性TNF驱动过程的中和。在取自4位IBD患者中至少3个的组织活检中观察到ID38F或英夫利昔单抗对磷酸蛋白的集合的抑制。在IBD组织之一中缺乏特定磷酸蛋白的抑制可能反映了患者的疾病差异和/或从不同炎症部位取得的活检的细胞差异。

[0754] 这项研究提供了通过ID38F抑制的组织磷酸蛋白的模式与由临床相关的英夫利昔单抗浓度实现的几乎相同的证据。

[0755] 实施例10:ID38F(根据本发明的多肽)和现有技术的抗TNF- $\alpha$ 多肽的中和效力比较

[0756] 在同一测定中比较ID38F的中和效力与现有技术的以下抗TNF- $\alpha$ 多肽的中和效力:

[0757] TNF1 (WO2006122786中公开的VHH,其中SEQ ID NO:52)

[0758] TNF3 (WO2006122786中公开的VHH,其中SEQ ID NO:60)

[0759] TNF30 (WO2006122786中公开的VHH,其中SEQ ID NO:96)

[0760] VHH#3E (WO2004041862中公开的VHH,其中SEQ ID NO:4)

[0761] 阿达木单抗(市售人单克隆抗体)

## [0762] 材料

[0763] L929细胞 (10<sup>4</sup>个细胞/孔)

[0764] 96孔板 (Costar)

[0765] 补充有Pen/Strep+2mM L-谷氨酰胺的DMEM (Invitrogen)

[0766] 人TNF- $\alpha$  (Invitrogen) 浓度:500pg/ml[0767] 放线菌素D浓度 (Sigma) :0.75 $\mu$ g/mL

[0768] 从酿酒酵母中纯化的ID38F

[0769] 具有Flag-His标签的从大肠杆菌纯化的ID38F

[0770] 阿达木单抗

[0771] 具有Flag-His标签的从大肠杆菌中纯化的TNF1, TNF3, TNF30, VHH#4E

[0772] 稀释范围:5pM-30nM (1:3稀释)

[0773] 孵育时间:23h

[0774] Alamar Blue细胞活力试剂 (Invitrogen, DAL1100) :10 $\mu$ L/孔

[0775] 3%SDS

[0776] 微板读数器 (Fluostar Optima) (OD590nm)

## [0777] 方法

[0778] 在第0天将100 $\mu$ L以10<sup>4</sup>L929细胞/孔铺板在96孔微板 (Costar) 的DMEM完全培养基中,并在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下储存过夜。在第1天,对于每个纯化的VHH/Ab,将连续稀释1:3 (在DMEM+Act.D中) 设定为从60nM的最高浓度开始的测定浓度 (具有足够一式三份的体积) 的双倍。然后将165 $\mu$ L每种稀释液用在DMEM+Act.D中制备的hTNF- $\alpha$ 2x (1ng/mL) 以1:1稀释。将0.9m的TNF 2x用0.9mL的CM+Act.D稀释以在测定中具有仅TNF对照。从测定微板的每孔中取出培养基,并将细胞用100 $\mu$ L的各TNF+VHH稀释液、CM+act.D或仅TNF对照孵育。在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>孵育23h后,向每个孔中加入10 $\mu$ l的Alamar Blue,将细胞在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>孵育2h,随后将50 $\mu$ l的3%SDS加入到每个孔中。然后在590nm处读板。

## [0779] 结果

[0780] 所得到的中和曲线 (用GraphPad Prism,使用4参数非线性回归曲线产生) 示于图6中。EC50值示于表8中。

## [0781] 表8

[0782]

| 抗TNF- $\alpha$ 多肽         | EC50 (nM) |
|---------------------------|-----------|
| TNF1                      | 0.751     |
| TNF3                      | 0.631     |
| TNF30                     | 0.420     |
| VHH#3E                    | 1.110     |
| ID38F-Flag-His (大肠杆菌-产生的) | 0.102     |
| ID38F (酿酒酵母-产生的)          | 0.127     |
| 阿达木单抗                     | 0.091     |

[0783] 从图6和表8可以看出,VHH#3E是在L929细胞中中和人可溶性TNF- $\alpha$ 诱导的细胞毒性中最低有效力的抗TNF- $\alpha$ 多肽。ID38F (大肠杆菌和酿酒酵母产生的) 具有比现有技术的抗TNF- $\alpha$ VHHs低约4倍-1log的EC 50。

[0784] 实施例11:将本发明的抗TNF- $\alpha$ ICVD制成药物组合物

[0785] 通过干法制粒和压片以微型片剂形式制备包含本文公开的本发明抗TNF- $\alpha$ ICVD之一的固体药物组合物。该抗TNF- $\alpha$ ICVD是115个氨基酸,12.6kDa多肽,pI为6.8,并且水溶解度大于30mg/mL。ICVD以高亲和力结合人和食蟹猴TNF- $\alpha$ ,并且对人和食蟹猴TNF- $\alpha$ 具有有效力的中和活性。

[0786] 微型片剂以不同的展示呈现,其中每个展示包含不同胶囊尺寸的不同数量的微型片剂。下面详细描述的实施例中使用的主要展示是尺寸为00的HPMC胶囊,含有15个肠包衣微型片剂(总共185mg的药物活性结合多肽)。微型片剂芯具有3mm直径(不包括包衣厚度)。包含在每个微型片剂中的组分,以及因此包含在胶囊中的15个微型片剂中的组分列于下表9中。

[0787] 表9

| 微型片剂组分的名称       | 功能              | 组合物中的<br>w/w | 质量<br>(mg/胶囊)<br>185mg 剂量<br>(15 微型片剂) | 质量 (mg) 12mg 剂<br>量<br>(1 微型片剂) |
|-----------------|-----------------|--------------|--|---------------------------------|
| <b>微型片剂芯</b>    |                 |              |  |                                 |
| 总多肽             | 活性药物成分<br>(API) | 45.7         | 225                                    | 15                              |
| 甘露醇             | 压缩助剂            | 12.0         | 59.25                                  | 3.95                            |
| 微晶纤维素           | 压缩助剂            | 14.6         | 72                                     | 4.8                             |
| 交联羧甲基纤维素钠       | 超级崩解剂           | 3.1          | 15                                     | 1                               |
| 硬脂酸镁            | 润滑剂             | 0.8          | 3.75                                   | 0.25                            |
| <b>次涂层</b>      |                 |              |  |                                 |
| 羟丙基甲基纤维素        | 聚合物涂层           | 3.8          | 18.75                                  | 1.25                            |
| <b>pH 敏感肠包衣</b> |                 |              |  |                                 |
| Eudragit® L100  | 肠溶性聚合物<br>包衣    | 11.7         | 57.76                                  | 3.85                            |
| 柠檬酸三乙酯          | 增塑剂             | 2.3          | 11.51                                  | 0.77                            |
| 滑石              | 抗粘着剂            | 5.9          | 28.93                                  | 1.93                            |
| 月桂基硫酸钠          | 表面活性剂           | 0.04         | 0.20                                   | 0.01                            |

[0788] 组合物中的总多肽具有约70-90%的纯度,使得225mg多肽含有185mg药物活性结合多肽。

[0789] 微型片剂是通过以下方法生产的。

[0790] 将冻干的多肽与甘露醇以及一部分硬脂酸镁混合并干燥,以增加其密度。然后将该材料通过筛网,与其它微型片剂赋形剂(微晶纤维素、交联羧甲基纤维素钠和剩余的硬脂酸镁)混合并压缩以生产微型片剂。然后将微型片剂用在乙醇:水80:20中的5%的羟丙基甲基纤维素溶液包被,干燥并除去溶剂以产生底涂层和更光滑的表面。然后将微型片剂用**Eudragit®**L100聚合物,以及柠檬酸三乙酯,滑石和十二烷基硫酸钠一起作为在异丙醇和水中的有机溶液进行包被,并干燥以产生pH敏感肠包衣。然后将得到的约3mm直径的微型

片剂以上面给出的剂量装入胶囊中。pH敏感肠包衣具有100-170um的厚度。在该制剂中使用的本发明的抗TNF- $\alpha$ ICVD在下文中也称为“药物活性结合多肽”、“ICVD”和“多肽”。

[0792] 实施例12:对食蟹猴的施用:不同肠道区室和粪便中的多肽浓度

[0793] 12.1在不同肠道区室中的多肽浓度

[0794] 进行研究以评估与实施例11类似的组合物通过口腔施用雌性食蟹猴时的肠道区域的释放曲线。通过分析不同肠道区室中的多肽浓度来评估释放曲线。

[0795] 向三只食蟹猴中的每一只口服施用含有11个微型片剂的单个胶囊(猴被称为M234、M236和M238)。微型片剂组合物与实施例11的不同之处在于每个微型片剂含有额外的1mg亚甲基蓝(染料)和141mg的ICVD剂量。8个微型片剂中也含有0.7mg异丙肾上腺素。亚甲基蓝染料用于可视分析通过胃肠(GI)道(本文未讨论)的溶解微型片剂的分布,并且异丙肾上腺素被用于监测心率的研究(本文未讨论)。

[0796] 口服给药4小时后,将动物杀死(cull)。仔细取出胃肠道,连接不同的GI区室,然后切开,并且收集腔内容物并洗涤收集物。注意到未溶解和部分溶解的微型片剂的数量,并且除去这些微型片剂。然后将样品均质化并冷冻直到分析。在10°C下以5000rpm对浆液初始离心5分钟后,从每个样品中取出1ml上清液,并在相同温度下在微量离心机中以13300rpm离心5min。然后将上清液在相同条件下再次离心20min,此后使用标准Humira竞争ELISA进行分析。在含有1%BSA,0.6M NaCl,1%人AB血清,0.05%Tween 20和2x蛋白酶抑制剂的PBS中制备样品和Humira和ICVD标准品的所有稀释。使用GraphPad Prism中的4参数,非线性曲线拟合方程,从标准曲线内插ICVD浓度。未经稀释的胃肠道样品中的ICVD浓度通过采用最佳内插数据乘以上清液稀释因子的方法得出。

[0797] 在M236或M238的胃、十二指肠、空肠或回肠中都没有发现完整的微型片剂。在M234中,在胃中发现4个完整的微型片剂,十二指肠中有1个,在空肠中有1个。在任何猴的任何胃肠道区域都没有发现部分溶解的微型片剂。

[0798] 浆液上清液的制备需要加入大量缓冲液,不可避免地稀释了ICVD。在图7中,给出了ICVD的预期腔内浓度。假设腔胃肠道内含物具有比重为1,通过在加入缓冲液后将上清液ICVD浓度乘以倍数稀释,计算这些。如图所示,在一些猴胃肠道区室的腔内可能发生非常高的ICVD浓度(0.1- $>$ 1mM)。

[0799] 仅在一只食蟹猴胃的内容物中检测到ICVD(M234)。在所有猴的回肠、盲肠和上结肠的内容物中,也发现高浓度ICVD。此外,在空肠内容物中检测到高浓度M234和M238(参见图7)。

[0800] 最后,计算回收的%ICVD,假设4小时的实际剂量仅通过溶解的微型片剂递送。如图8所示,解释了在51.5%和74.9%之间的ICVD剂量。

[0801] 该研究已经表明,本发明的抗TNF- $\alpha$ ICVD可以以高浓度递送到食蟹猴的下GI道。一些微型片剂在给药后4小时保持完好的发现表明剂量将在一段时间内递送,提供延长暴露的潜力。如果在使用抗TNF- $\alpha$ 结合多肽时将这些发现反映在IBD患者的治疗中,则可以合理地预期暴露于下GI道的抗TNF- $\alpha$ 多肽的浓度将足够有效的TNF- $\alpha$ 中和。

[0802] 12.2粪便中的多肽浓度

[0803] 三只食蟹猴中每只都口服施用含有11个微型片剂的单个胶囊。微型片剂组合物与实施例11的不同之处在于,每个微型片剂还含有1mg亚甲基蓝(染料)并且8个微型片剂还含

有0.7mg的异丙肾上腺素。亚甲基蓝染料用于视觉分析微型片剂在粪便中的溶解,并且异丙肾上腺素被用于监测心率的研究(本文未讨论)。

[0804] 在8、12、20、24和36h收集来自猴的集合粪便(16小时未收集样品)。在任何粪便样品中都没有发现微型片剂。将其与提取缓冲液(PBS中的0.1%BSA,0.6M NaCl,0.05%Tween 20,1x蛋白酶抑制剂,5mM EDTA)以1g粪便/4ml缓冲液混合,然后均质化,并将浆液在-80℃下冷冻储存,然后分析。目视检查显示12h、20h、24h和36h浆液的蓝色着色。之前的体外实验(未示出)已经证明,微型片剂溶解时的亚甲基蓝浓度增加与ICVD浓度密切相关。

[0805] 将浆液解冻并以4,000rpm(3200g)离心5min以除去大量的颗粒物质。将大约1ml的每种上清液转移到Eppendorf管中,并在10℃以13.5K在离心机中离心5min,此后将上清液置于新管中,并在10℃下离心20min。然后使用阿达木单抗竞争ELISA,立即使用上清液进行ICVD测量。

[0806] 不同粪便上清液的ELISA OD450读数显示在图9中。数据清楚地显示,ICVD在所有时间点都存在于粪便上清液样品中,可能除去36h上清液(尽管可能在最低稀释可见轻微活性)。

[0807] 使用GraphPad Prism将这些数据针对ICVD的标准曲线进行插值,并乘以加入的缓冲液的稀释倍数,得到每个粪便样品中的ICVD浓度,使用1g粪便等于1mL液体体积并且多肽均匀分布在粪便的假设。这些如图10所示。

[0808] 使用浆液体积(基于1g粪便=1ml,+用于提取缓冲液的体积)测定每个样品中的ICVD的 $\mu\text{g}$ 量(图11)。

[0809] 总之,实现了持续的药物活性结合多肽的实质浓度通过食蟹猴肠道大于8小时。

[0810] 实施例13:施用人类:在回肠-盲肠汇合处和粪便中的多肽浓度

[0811] 13.1在回肠-盲肠汇合处的多巴胺浓度

[0812] 本研究的目的是证明,掺入实施例11的组合物中的本发明的抗TNF- $\alpha$ ICVD以高浓度递送到人类的回肠盲肠汇合处(克罗恩氏病的主要部位)和克罗恩氏病病灶在许多患者的肠道的近端部位。

[0813] 装配了终末回肠造口袋的四名人类志愿者均接受单次1665mg ICVD口服剂量,配制成大小为00胶囊(总共9个胶囊)的微型片。在这些本来健康的个体中,终末回肠的整个内容物排入可拆卸的外袋中。在给药后的每个小时时间点,将包含总回肠流出物的装配袋取出,冷冻并安装新的袋子。每小时以这种方式收集回肠造口术样品,持续至给药后12小时。此后,在给药后24小时内每四小时收集回肠造口术样品。也采用给药前(第-1天)作为对照。在分析之前除去在袋中观察到的任何部分溶解的微型片剂,使得仅分析完全可溶的ICVD。从回肠液中提取ICVD,并通过功能性ELISA测定活性ICVD的浓度,假设1g回流液相当于1mL液体体积。

[0814] 数据揭示在回肠造口袋中存在高浓度的活性ICVD,范围为200nM高至1mM。此外,在每个受试者的袋变化的几个小时内观察到高浓度(参见表10)。

[0815] 表10

| 受试者   | 给药后的<br>小时 | 在回肠液中的ICVD浓度<br>(nM) |
|-------|------------|----------------------|
| 31001 | 2          | 406350               |
| 31001 | 3          | 305560               |
| 31001 | 4          | 791                  |
| 31002 | 2          | 32780                |
| 31002 | 3          | 1130000              |
| 31002 | 4          | 792060               |
| 31002 | 5          | 81750                |
| 31002 | 6          | 12780                |
| 31002 | 7          | 1300                 |
| 31002 | 8          | 422                  |
| 31002 | 9          | 1410                 |
| 31002 | 10         | 7520                 |
| 31002 | 11         | 10080                |
| 31002 | 12         | 9210                 |
| 31002 | 16         | 6980                 |
| 31003 | 3          | 1060000              |
| 31003 | 4          | 496030               |
| 31003 | 5          | 7080                 |
| 31003 | 8          | 46110                |
| 31003 | 9          | 75480                |
| 31003 | 10         | 16030                |
| 31003 | 11         | 72940                |
| 31003 | 12         | 15870                |
| 31003 | 16         | 881                  |
| 31004 | 2          | 126190               |
| 31004 | 3          | 235                  |
| 31004 | 4          | 11110                |
| 31004 | 5          | 3770                 |
| 31004 | 6          | 6730                 |

[0816]

[0817]

[0818] 在任何受试者的任何给药前(第-1天)样品中未检测到ICVD。

[0819] 总之,在这些志愿者志愿者的回肠-盲肠接合处实现了持续且高浓度的药物活性结合多肽。

### [0820] 13.2粪便中的多肽浓度

[0821] 使用实施例11中详述的组合物,以62、555、1665或4995mg的ICVD的单一剂量口服给药18-45岁的健康男性受试者。在第1天,每位受试者的每一单一剂量在8:30至12:00之间施用。在给药前(在第-1天或第1天给药之前)以及在给药后至第4天早晨(研究结束)的所有可用时间收集粪便样品。从粪便中提取ICVD,并通过功能性ELISA测定活性ICVD的浓度,假设1g粪便相当于1mL液体体积,并且多肽均匀分布在粪便中。

[0822] 在受试者的粪便中获得180nM至724 $\mu$ M范围内的高浓度(见表11)。

[0823] 表11

[0824]

| 受试者 ID | mg 剂量<br>ICVD | 粪便样品收<br>集日 | 给药前或给药后 | 粪便中的[ICVD] (nM) |
|--------|---------------|-------------|---------|-----------------|
| 11001  | 62            | -1          | 给药前     | 0               |
| 11001  |               | 1           | 给药后     | 1013            |
| 13001  | 555           | -1          | 给药前     | 0               |
| 13001  |               | 2           | 给药后     | 1052            |
| 13003  | 555           | -1          | 给药前     | 0               |
| 13003  |               | 1           | 给药后     | 1938            |
| 13003  |               | 2           | 给药后     | 1511            |
| 14002  | 1665          | -1          | 给药前     | 0               |
| 14002  |               | 1           | 给药后     | 5491            |
| 14002  |               | 2           | 给药后     | 558             |
| 14004  | 1665          | -1          | 给药前     | 0               |
| 14004  |               | 2           | 给药后     | 27532           |
| 14006  | 1665          | -1          | 给药前     | 0               |
| 14006  |               | 2           | 给药后     | 62579           |
| 15001  | 4995          | -1          | 给药前     | 0               |
| 15001  |               | 1           | 给药后     | 10047           |
| 15001  |               | 2           | 给药后     | 135285          |
| 15001  |               | 3           | 给药后     | 330             |

|        |       |      |    |     |        |
|--------|-------|------|----|-----|--------|
| [0825] | 15004 | 4995 | -1 | 给药前 | 0      |
|        | 15004 |      | 3  | 给药后 | 273    |
|        | 15005 | 4995 | 1  | 给药前 | 0      |
|        | 15005 |      | 1  | 给药后 | 724684 |
|        | 15005 |      | 2  | 给药后 | 258703 |
|        | 15005 |      | 3  | 给药后 | 3536   |
|        | 15006 | 4995 | -1 | 给药前 | 0      |
|        | 15006 |      | 1  | 给药后 | 57120  |
|        | 15006 |      | 2  | 给药后 | 358    |
|        | 15006 |      | 2  | 给药后 | 186    |

[0826] 临床上用于治疗克罗恩氏病的抗TNF试剂,如阿达木单抗 (Humira) 和英夫利昔单抗 (类克), 均通过静脉输注或皮下注射给药。Ungar等人 (2016) Clin Gastroenterol Hepatol. 14 (4) :550-557指出, 需要对于阿达木单抗为56-83nM (8-12 $\mu$ g/mL) 和对于英夫利昔单抗为42-70nM (6-10 $\mu$ g/mL) 的低谷血清水平以达到80%-90%的IBD患者的粘膜愈合, 并且这可以被认为是“治疗窗口”。针对上面小节12.1中建立的食蟹猴胃肠道切片中的计算的腔抗TNF- $\alpha$ ICVD浓度, 这些低谷血清水平也在在图7中示出。

[0827] 在本节临床工作期间, 递送到回肠-盲肠接合处 (上面13.1节) 并在人类志愿者的粪便中回收的抗TNF- $\alpha$ ICVD的浓度显著高于这些水平, 并因此被预测为治疗克罗恩氏病有效的。这假定相对于肠粘膜和亚粘膜的进入/渗透, 抗TNF- $\alpha$ ICVD的肠道腔浓度与市售的抗-TNF活性剂的血清浓度是可比较的。然而, 在进一步的实验工作 (未示出) 中已经证明, 本发明的抗TNF- $\alpha$ ICVD在DSS结肠炎小鼠中口服给药能够渗透到固有层中, 其中其停留几个小时, 尽管缺乏小鼠中的靶标 (TNF) 参与。

[0828] 结合上面13.1呈现的数据, 这些结果表明, 从回肠-盲肠汇合处到肛门的治疗水平的ICVD的成功递送。

[0829] 实施例14: 施用给人: 免疫原性研究

[0830] 蛋白质药物, 包括治疗性抗体, 可能在患者中引发抗体反应。在识别蛋白质药物表位的患者中产生的抗体 (多个Ig类别) 被称为抗药物抗体 (ADA)。ADA的存在可以导致药物功效/效力的丧失或患者不良影响 (van Schie等人, Ann Rheum Dis 2015 74:311-314)。

[0831] 进行研究以评估在人中持续口服给药实施例11的组合物是否引发ADA反应。向年龄18-45岁的健康男性受试者口服给药含有1665mg (每天共4995mg) ICVD或安慰剂 (配制成根据实施例11的微型片的胶囊), 每天3次, 共14天。在给药前、给药后第7天和第14天以及最后在28天 (治疗停止后14天) 从受试者取血清样品。通过三明治ELISA分析这些样品是否存在ICVD抗药物抗体 (ADA)。该分析显示尽管低滴度的来自4名志愿者的ADA阳性血清, 其中两名接受安慰剂。在所有这些个体中, ADA在ICVD给药 (预先存在的ADAs) 之前以某一水平存在。

[0832] 在TNF-TNFR2ELISA中ICVD效力的分析显示, 所有ADA阳性人血清样品在5%的存在不影响针对TNF- $\alpha$ 的ICVD活性。因此, 任何志愿者在任何时间点的血清中都没有发现ICVD中和ADA的证据 (见表12)。

[0833] 表12

[0834]

| 受试者 ID | 活性或安慰剂 | 样品     | ADA 夹心 ELISA 筛选 | ADA 滴度/血清稀释 | ICVD 中和 |
|--------|--------|--------|-----------------|-------------|---------|
| 21001  | 活性     | 给药前    | 阴性              |             |         |
| 21001  | 活性     | 第 7 天  | 阴性              |             |         |
| 21001  | 活性     | 第 14 天 | 阴性              |             |         |
| 21001  | 活性     | 第 28 天 | 阴性              |             |         |
| 21002  | 活性     | 给药前    | 阴性              |             |         |
| 21002  | 活性     | 第 7 天  | 阴性              |             |         |
| 21002  | 活性     | 第 14 天 | 阴性              |             |         |
| 21002  | 活性     | 第 28 天 | 阴性              |             |         |
| 21003  | 活性     | 给药前    | 阴性              |             |         |
| 21003  | 活性     | 第 7 天  | 阴性              |             |         |
| 21003  | 活性     | 第 14 天 | 阴性              |             |         |
| 21003  | 活性     | 第 28 天 | 阴性              |             |         |
| 21004  | 安慰剂    | 给药前    | 阳性              | 64          | 否       |
| 21004  | 安慰剂    | 第 7 天  | 阳性              | 64          | 否       |
| 21004  | 安慰剂    | 第 14 天 | 阳性              | 64          | 否       |
| 21004  | 安慰剂    | 第 28 天 | 阳性              | 64          | 否       |
| 21005  | 活性     | 给药前    | 阳性              | 64          | 否       |
| 21005  | 活性     | 第 7 天  | 阳性              | 32          | 否       |

[0835]

|       |     |        |    |     |   |
|-------|-----|--------|----|-----|---|
| 21005 | 活性  | 第 14 天 | 阳性 | 32  | 否 |
| 21005 | 活性  | 第 28 天 | 阳性 | 32  | 否 |
| 21006 | 活性  | 给药前    | 阴性 |     |   |
| 21006 | 活性  | 第 7 天  | 阴性 |     |   |
| 21006 | 活性  | 第 14 天 | 阴性 |     |   |
| 21006 | 活性  | 第 28 天 | 阴性 |     |   |
| 21007 | 活性  | 给药前    | 阴性 |     |   |
| 21007 | 活性  | 第 7 天  | 阴性 |     |   |
| 21007 | 活性  | 第 14 天 | 阴性 |     |   |
| 21007 | 活性  | 第 28 天 | 阴性 |     |   |
| 21008 | 活性  | 给药前    | 阳性 | 4   | 否 |
| 21008 | 活性  | 第 7 天  | 阳性 | 4   | 否 |
| 21008 | 活性  | 第 14 天 | 阳性 | 8   | 否 |
| 21008 | 活性  | 第 28 天 | 阳性 | 128 | 否 |
| 21009 | 安慰剂 | 给药前    | 阳性 | 8   | 否 |
| 21009 | 安慰剂 | 第 7 天  | 阳性 | 8   | 否 |
| 21009 | 安慰剂 | 第 14 天 | 阳性 | 16  | 否 |
| 21009 | 安慰剂 | 第 28 天 | 阳性 | 8   | 否 |
| 21010 | 活性  | 给药前    | 阴性 |     |   |
| 21010 | 活性  | 第 7 天  | 阴性 |     |   |
| 21010 | 活性  | 第 14 天 | 阴性 |     |   |
| 21010 | 活性  | 第 28 天 | 阴性 |     |   |

[0836] 条款

[0837] 定义本发明及其优选方面的一组条款如下：

[0838] 1. 一种多肽, 包含与TNF- $\alpha$ 结合的免疫球蛋白链可变结构域, 其中所述免疫球蛋白链可变结构域包含三个互补决定区(CDR1-CDR3)和四个框架区(FR1-FR4), 其中CDR1包含与SEQ ID NO:1共有60%或更高的序列同一性的序列, CDR2包含与SEQ ID NO:2共有50%或更高序列同一性的序列, 以及

[0839] (a) CDR3包含与SEQ ID NO:3共有80%或更高序列同一性的序列

[0840] 或

[0841] (b) CDR3包含与SEQ ID NO:3共有50%或更高序列同一性的序列, 其中对应于SEQ ID NO:3的残基编号3的CDR3的残基是R、D、N、C、E、Q、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y或V。

[0842] 2. 根据条款1的多肽, 其中对应于SEQ ID NO:3的残基编号3的CDR3的残基是R、H、D、E、N、Q、S、T、Y、G、V、L、W、P、M、C、F或I。

[0843] 3. 根据条款2的多肽, 其中对应于SEQ ID NO:3的残基编号3的CDR3的残基是H。

[0844] 4. 根据条款3的多肽, 其中CDR3包含SEQ ID NO:3。

[0845] 5. 根据条款1的多肽, 其中CDR3的序列是SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72。

[0846] 6. 根据条款1至5中任一项的多肽, 其中CDR1包含与SEQ ID NO:1共有80%或更高序列同一性的序列。

[0847] 7. 根据条款6的多肽, 其中CDR1包含SEQ ID NO:1。

[0848] 8. 根据条款6的多肽, 其中CDR1的序列是SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:60。

[0849] 9. 根据条款1至8中任一项的多肽, 其中CDR2包含与SEQ ID NO:2共有55%或更高序列同一性, 例如共有60%或更高的序列同一性, 例如共有70%或更高的序列同一性, 例如共有75%或更高的序列同一性, 例如共有80%或更高的序列同一性, 例如共有85%或更高的序列同一性, 例如共有90%或更高的序列同一性的序列。

[0850] 10. 根据条款9的多肽, 其中CDR2包含SEQ ID NO:2。

[0851] 11. 根据条款9的多肽, 其中CDR2的序列是SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69。

[0852] 12. 根据条款1至11中任一项的多肽, 其包含与SEQ ID NO:8共有50%或更高序列同一性, 例如共有55%或更高序列同一性, 例如共有60%或更高序列同一性, 例如共有65%或更高的序列同一性, 例如共有70%或更高的序列同一性, 例如共有75%或更高的序列同一性, 例如共有80%或更高的序列同一性, 例如共有85%或更高的序列同一性, 例如共有90%或更高的序列同一性, 例如共有95%或更高的序列同一性, 例如共有96%或更高的序列同一性, 例如共有97%或更高的序列同一性, 例如共有98%或更高的序列同一性, 例如共有99%或更高的序列同一性的序列。

[0853] 13. 根据条款12的多肽, 其包含SEQ ID NO:8。

[0854] 14. 根据条款1至13中任一项的多肽, 其选自VHH、VH、VL、V-NAR、Fab片段和F(ab')<sub>2</sub>片段。

[0855] 15. 编码根据条款1至14中任一项的多肽的多核苷酸, 特别是其中多核苷酸包含与SEQ ID NO:83至88中任一个序列共有70%或更高, 例如80%或更高, 例如90%或更高, 例如

95%或更高,例如99%或更高的序列同一性的序列或由其组成,或更特别是其中多核苷酸包含SEQ ID NO:83至88中任一个序列或由其组成。

[0856] 其他

[0857] 本申请中提及的所有参考文献,包括专利和专利申请,都将通过引用至其最可能完全的程度而并入本文。

[0858] 在整个说明书和后附权利要求中,除非上下文另有要求,措词“包括”和诸如“包含”和“包含了”之类的变体将被理解为暗示包括所指定的整数、步骤、整数组、或步骤组,但不排除任何其它整数、步骤、整数组或步骤组。

[0859] 本说明书和权利要求书形成其部分的申请可以用作关于任何后续申请的优先权的基础。这样的后续应用的权利要求可以针对本文所述的任何特征或特征的组合。它们可以采取产品、组合物、方法或用途权利要求的形式,并且可以通过举例而非限制的方式包括以下权利要求。

[0860]

序列

| 名称<br>(SEQ ID NO) | FR1                            | CDR1  | FR2             | CDR2               | FR3                                | CDR3   | FR4          |
|-------------------|--------------------------------|-------|-----------------|--------------------|------------------------------------|--------|--------------|
| <b>家族1序列</b>      |                                |       |                 |                    |                                    |        |              |
| Q65F2<br>(23)     | EVQLVESGGGLVQPGSSLRLSCTASGFDPS | SHWYI | WYRQAFGKGLIEWIS | EINTNGLITRYIVDSVRG | RFTVSRUNAAANTIYLEMTSLSEPEPTALYYCAR | NQKGLN | KGQGTQVTYVSS |
| Q65F3<br>(24)     | EVQLVESGGGLVQPGSSLRLSCTASGFDPS | SHWYI | WYRQAFGKGLIEWIS | EINTNGLITRYIVDSVRG | RFTVSRUNAAANTIYLEMTSLSEPEPTALYYCAR | NQKGLN | KGQGTQVTYVSS |
| Q65P2<br>(25)     | EVQLVESGGGLVQPGSSLRLSCTASGFDPS | SHWYI | WYRQAFGKGLIEWIS | EINTNGLITRYIVDSVRG | RFTVSRUNAAANTIYLEMTSLSEPEPTALYYCAR | NQKGLN | KGQGTQVTYVSS |
| Q65G1<br>(26)     | EVQLVESGGGLVQPGSSLRLSCTASGFDPS | SHWYI | WYRQAFGKGLIEWIS | EINTNGLITRYIVDSVRG | RFTVSRUNAAANTIYLEMTSLSEPEPTALYYCAR | NQKGLN | KGQGTQVTYVSS |
| Q65H6<br>(27)     | EVQLVESGGGLVQPGSSLRLSCTASGFDPS | SHWYI | WYRQAFGKGLIEWIS | EINTNGLITRYIVDSVRG | RFTVSRUNAAANTIYLEMTSLSEPEPTALYYCAR | NQKGLN | KGQGTQVTYVSS |
| Q65F1<br>(28)     | EVQLVESGGGLVQPGSSLRLSCTASGFDPS | VHWYI | WYRQAFGKGLIEWIS | EINTNGLITRYIVDSVRG | RFTVSRUNAAANTIYLEMTSLSEPEPTALYYCAR | NQKGLN | KGQGTQVTYVSS |
| Q65D1<br>(29)     | EVQLVESGGGLVQPGSSLRLSCTASGFDPS | NHWYC | WYRQAFGKGLIEWIS | EINTNGLITRYIVDSVRG | RFTVSRUNAAANTIYLEMTSLSEPEPTALYYCAR | NQKGLN | KGQGTQVTYVSS |
| Q65C7<br>(30)     | EVQLVESGGGLVQPGSSLRLSCTASGFDPS | SHWYI | WYRQAFGKGLIEWIS | EINTNGLITRYIVDSVRG | RFTVSRUNAAANTIYLEMTSLSEPEPTALYYCAR | NQKGLN | KGQGTQVTYVSS |
| Q65D3<br>(31)     | EVQLVESGGGLVQPGSSLRLSCTASGFDPS | SHWYI | WYRQAFGKGLIEWIS | EINTNGLITRYIVDSVRG | RFTVSRUNAAANTIYLEMTSLSEPEPTALYYCAR | NERGLN | KGQGTQVTYVSS |
| Q65B1<br>(32)     | EVQLVESGGGLVQPGSSLRLSCTASGFDPS | SHWYI | WYRQAFGKGLIEWIS | EINTNGLITRYIVDSVRG | RFTVSRUNAAANTIYLEMTSLSEPEPTALYYCAR | NQKGLN | KGQGTQVTYVSS |
| <b>家族2序列</b>      |                                |       |                 |                    |                                    |        |              |
| Q65F6<br>(33)     | EVQLVESGGGLVQPGSSLRLSCTASGFDPS | IHWYI | WYRQAFGKGLIEWIA | EINTNGLITRYIVDSVRG | RFTVSRUNAAANTIYLEMTSLSEPEPTALYYCAR | SRNGAA | KGQGTQVTYVSS |





## 序列表

<110> 韦斯夸尔德有限公司 (VH squared Limited)  
 <120> 多肽  
 <130> VHS-P1859PC  
 <160> 88  
 <170> BiSSAP 1.3  
 <210> 1  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> ID38F CDR1  
 <400> 1  
 Ser His Trp Met Tyr  
 1 5  
 <210> 2  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> ID38F CDR2  
 <400> 2  
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 <210> 3  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> ID38F CDR3  
 <400> 3  
 Asn Gln His Gly Leu Asn  
 1 5  
 <210> 4  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> ID38F FR1  
 <400> 4  
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser  
 20 25 30  
 <210> 5  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> ID38F FR2  
 <400> 5  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu Ser  
 1 5 10  
 <210> 6  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> ID38F FR3  
 <400> 6  
 Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30  
 <210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> ID38F FR4  
 <400> 7  
 Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10  
 <210> 8  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0001]

<220>  
 <223> ID38F  
 <400> 8  
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 9  
 <211> 157  
 <212> PRT  
 <213> 人(Homo sapiens)

<220>  
 <223> 可溶性的人TNF- $\alpha$

<400> 9  
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val  
 1 5 10 15  
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg  
 20 25 30  
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu  
 35 40 45  
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala  
 85 90 95  
 Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys  
 100 105 110  
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys  
 115 120 125  
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe  
 130 135 140  
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu  
 145 150 155

<210> 10  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> 人

[0002]

<220>  
 <223> 膜结合的人TNF- $\alpha$

<400> 10  
 Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe  
 20 25 30  
 Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe  
 35 40 45  
 Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro  
 50 55 60  
 Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro  
 85 90 95  
 Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu  
 100 105 110  
 Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser  
 115 120 125  
 Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly  
 130 135 140  
 Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro  
 165 170 175  
 Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu  
 180 185 190  
 Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu  
 195 200 205  
 Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly  
 210 215 220  
 Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu  
 225 230

<210> 11  
 <211> 157  
 <212> PRT  
 <213> 食蟹猴(Macaca fascicularis)

<220>  
 <223> 可溶性的食蟹猴TNF- $\alpha$

<400> 11  
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val  
 1 5 10 15  
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg  
 20 25 30  
 Ala Asn Ala Leu Val Ala Asn Gly Val Glu Leu Thr Asp Asn Gln Leu  
 35 40 45  
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Asn His Val Leu Leu Thr His Thr Ile

65 70 75 80  
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala  
 85 90 95  
 Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys  
 100 105 110  
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys  
 115 120 125  
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Leu Pro Asp Tyr Leu Asp Phe  
 130 135 140  
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu  
 145 150 155

<210> 12  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> 食蟹猴

<220>  
 <223> 膜结合的食蟹猴TNF-α

<400> 12  
 Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Gln Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Arg Lys Thr Ala Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Trp Phe  
 20 25 30  
 Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Leu Val Ala Gly Ala Ala Thr Leu Phe  
 35 40 45  
 Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro  
 50 55 60  
 Lys Asp Pro Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro  
 85 90 95  
 Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu  
 100 105 110  
 Val Ala Asn Gly Val Glu Leu Thr Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser  
 115 120 125  
 Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly  
 130 135 140  
 Cys Pro Ser Asn His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro  
 165 170 175  
 Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu  
 180 185 190  
 Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu  
 195 200 205  
 Ser Ala Glu Ile Asn Leu Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly  
 210 215 220  
 Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu  
 225 230

[0003]

<210> 13  
 <211> 156  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<220>  
 <223> 可溶性的小鼠TNF-α

<400> 13  
 Leu Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val  
 1 5 10 15  
 Val Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg  
 20 25 30  
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu  
 35 40 45  
 Val Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser  
 65 70 75 80  
 Arg Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val  
 85 90 95  
 Lys Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro  
 100 105 110  
 Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly  
 115 120 125  
 Asp Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala  
 130 135 140  
 Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu  
 145 150 155

<210> 14  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<220>  
 <223> 膜结合的小鼠TNF-α

<400> 14  
 Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Gln Lys Met Gly Gly Phe Gln Asn Ser Arg Arg Cys Leu Cys  
 20 25 30  
 Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Leu Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe  
 35 40 45  
 Cys Leu Leu Asn Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Asp Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Pro Asn Gly Leu Pro Leu Ile Ser Ser Met Ala Gln Thr Leu Thr Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val  
 85 90 95  
 Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg Ala  
 100 105 110  
 Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu Val  
 115 120 125  
 Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys  
 130 135 140

Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser Arg  
 145 150 155 160  
 Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val Lys  
 165 170 175  
 Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro Trp  
 180 185 190  
 Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp  
 195 200 205  
 Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala Glu  
 210 215 220  
 Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu  
 225 230 235

<210> 15  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q62E10 CDR1

<400> 15  
 Ile His Trp Met Tyr  
 1 5

<210> 16  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q62E10 CDR2

<400> 16  
 Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 17  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q62E10 CDR3

<400> 17  
 Thr Gln Asn Gly Ala Ala  
 1 5

<210> 18  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q62E10 FR1

<400> 18  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Leu Asp Phe Gly  
 20 25 30

<210> 19  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q62E10 FR2

<400> 19  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val Ala  
 1 5 10

<210> 20  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q62E10 FR3

<400> 20  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Met Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Asn  
 20 25 30

<210> 21  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q62E10 FR4

<400> 21  
 Lys Gly Gln Gly Val Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 22  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0004]

<220>  
 <223> Q62E10  
 <400> 22  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Leu Asp Phe Gly Ile His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Asn Thr Gln Asn Gly Ala Ala Lys Gly Gln Gly Val Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 23  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65F2  
 <400> 23  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Ser Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Met Thr Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 24  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0005]

<220>  
 <223> Q65F3  
 <400> 24  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ile Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Arg Gly Arg Phe Thr Ala Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Met Thr Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 25  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q62F2  
 <400> 25  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Asn Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 26  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65G1  
 <400> 26

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

<210> 27  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65H6

<400> 27  
 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 Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Tyr Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ile Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Arg Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Met Thr Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 28  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65F1

[0006]

<400> 28  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Gly Val His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ile Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Gly Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Arg Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Met Thr Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Met Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 29  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65D1

<400> 29  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Phe Asp Asn His  
 20 25 30  
 Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Phe Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Ile Thr Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 30  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65C7

<400> 30  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

<210> 31  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65D3

<400> 31  
 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 Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Thr  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Met Leu Asn  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Met Thr Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Arg Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 32  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65B1

<400> 32  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 33  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65F6

<400> 33  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Phe Gly Ile His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Leu Tyr Ser Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Arg Gly Arg Phe Thr Ala Ser Arg Asp Asn Ala Asn Ala Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Ser Arg Asn Gly Ala Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 34  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65F11

<400> 34  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Phe Gly Ile His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Leu Tyr Ser Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Arg Gly Arg Phe Thr Ala Ser Arg Asp Asn Ala Asn Ala Leu Phe  
 65 70 75 80

[0007]

Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Ser Arg Asn Gly Ala Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 35  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65E12

<400> 35  
 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 Asp Phe Ser Ile His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ala Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Ser Arg Asn Gly Ala Ala Gly Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 36  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65C12

<400> 36  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asp Ile His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr His Ser Arg Asn Gly Ala Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

[0008]

<210> 37  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65A6

<400> 37  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asp Phe Gly Ile His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Thr Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Ser Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ala Cys  
 85 90 95  
 Ala Thr Ser Arg Asn Gly Ala Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 38  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q65A3

<400> 38  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Pro Ser Cys Thr Thr Ser Gly Leu Asp Phe Gly Ile His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Asn Thr Gln Asn Gly Ala Ala Lys Gly Gln Gly Val Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser

115  
 <210> 39  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Q62F10  
 <400> 39  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Asn Ile His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Val Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Asn Thr Gln Asn Gly Lys Thr Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 40  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Q62F11  
 <400> 40  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45  
 Gly Phe Ile Arg Trp Asp Gly Leu Val Thr Arg Tyr Ala Asp Ala Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Thr Ile Gly Leu Leu Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Ser Gly Gly Ser Gly Pro Val Asn Ala Gly Ser Tyr Glu  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

[0009]

<210> 41  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> ID7F-EV  
 <400> 41  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 42  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> ID8F-EV  
 <400> 42  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 43  
 <211> 115  
 <212> PRT

<213> 人工序列  
 <220>  
 <223> ID9F-EV  
 <400> 43  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 His Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 44  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ID13F-EV  
 <400> 44  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 45  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0010]

<220>  
 <223> ID14F-EV  
 <400> 45  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn His Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 46  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ID15F-EV  
 <400> 46  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn His Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 47  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ID22F

<400> 47  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser  
 165 170 175  
 His Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp  
 180 185 190  
 Leu Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser  
 195 200 205  
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met  
 210 215 220  
 Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val  
 245 250 255  
 Thr Val Ser Ser  
 260

<210> 48  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ID23F

[0011]

<400> 48  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser  
 165 170 175  
 His Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp  
 180 185 190  
 Leu Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser  
 195 200 205  
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met  
 210 215 220  
 Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val  
 245 250 255  
 Thr Val Ser Ser  
 260

<210> 49  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ID24F

<400> 49  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Ser Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser  
 165 170 175  
 His Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp  
 180 185 190  
 Leu Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser  
 195 200 205  
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Ser Met  
 210 215 220  
 Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val  
 245 250 255  
 Thr Val Ser Ser  
 260

<210> 50  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ID25F

<400> 50  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser  
 165 170 175  
 His Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp  
 180 185 190  
 Leu Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser  
 195 200 205  
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met  
 210 215 220  
 Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val  
 245 250 255  
 Thr Val Ser Ser  
 260

[0012]

<210> 51  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ID26F

<400> 51  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Ser Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser  
 165 170 175  
 His Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp  
 180 185 190  
 Leu Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser  
 195 200 205  
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Ser Met  
 210 215 220  
 Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val  
 245 250 255  
 Thr Val Ser Ser  
 260

<210> 52  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> ID27F  
 <400> 52  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 His Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser  
 165 170 175  
 His Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp  
 180 185 190  
 Leu Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser  
 195 200 205  
 Val His Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met  
 210 215 220  
 Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 245 250 255  
 Thr Val Ser Ser  
 260

<210> 53  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ID28F  
 <400> 53  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 His Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser  
 165 170 175  
 His Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp  
 180 185 190  
 Leu Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser  
 195 200 205  
 Val His Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met  
 210 215 220  
 Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val  
 245 250 255  
 Thr Val Ser Ser  
 260

<210> 54  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ID29F  
 <400> 54  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 His Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 130 135 140

[0013]

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser  
 165 170 175  
 His Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp  
 180 185 190  
 Leu Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser  
 195 200 205  
 Val His Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met  
 210 215 220  
 Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val  
 245 250 255  
 Thr Val Ser Ser  
 260

<210> 55  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Q62E10-DVQLV

<400> 55  
 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 Thr Ser Gly Leu Asp Phe Gly Ile His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Asn Thr Gln Asn Gly Ala Ala Lys Gly Gln Gly Val Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 56  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ID34F

<400> 56  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 57  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ID37F

<400> 57  
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

<210> 58  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 3' Primer with Spe site

<400> 58  
 tcttaactag tgaggagacg gtgacctg

28

<210> 59  
 <211> 5

[0014]

[0015]

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> Q65F1 CDR1  
  
 <400> 59  
 Val His Trp Met Tyr  
 1 5  
  
 <210> 60  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> Q65D1 CDR1  
  
 <400> 60  
 Asn His Trp Met Cys  
 1 5  
  
 <210> 61  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> ID27F CDR2  
  
 <400> 61  
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val His  
 1 5 10 15  
 Gly  
  
 <210> 62  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> ID28F CDR2  
  
 <400> 62  
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val His  
 1 5 10 15  
 Gly  
  
 <210> 63  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> Q65F2 CDR2  
  
 <400> 63  
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Ser Tyr Val Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
  
 <210> 64  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> Q65F3 CDR2  
  
 <400> 64  
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ile Asp Ser Val Arg  
 1 5 10 15  
 Gly  
  
 <210> 65  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> Q62F2 CDR2  
  
 <400> 65  
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
  
 <210> 66  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> Q65F1 CDR2  
  
 <400> 66  
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ile Asp Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Gly  
  
 <210> 67  
 <211> 17  
 <212> PRT

[0016]

<213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Q65D1 CDR2  
 <400> 67  
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Phe Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 68  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Q65D3 CDR2  
 <400> 68  
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Thr Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 69  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Q65B1 CDR2  
 <400> 69  
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 70  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Q65F2 CDR3  
 <400> 70  
 Asn Gln Lys Gly Leu Asn  
 1 5

<210> 71  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Q65F1 CDR3  
 <400> 71  
 Asn Gln Met Gly Leu Asn  
 1 5

<210> 72  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Q65D3 CDR3  
 <400> 72  
 Asn Glu Arg Gly Leu Asn  
 1 5

<210> 73  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Q65F6 CDR2  
 <400> 73  
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Leu Tyr Ser Asp Ser Val Arg  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 74  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> Q65F11 CDR2  
 <400> 74  
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 75  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>

[0017]

```

<223> Q65C12 CDR2
<400> 75
Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1           5           10           15
Gly

<210> 76
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q65A6 CDR2
<400> 76
Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Thr Asp Ser Val Ser
1           5           10           15
Gly

<210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q65A3 CDR2
<400> 77
Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1           5           10           15
Gly

<210> 78
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q65F6 CDR3
<400> 78
Ser Arg Asn Gly Ala Ala
1           5

<210> 79
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q65F11 CDR3
<400> 79
Ala Arg Asn Gly Ala Ala
1           5

<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Q62F10 CDR3
<400> 80
Thr Gln Asn Gly Lys Thr
1           5

<210> 81
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> M13.rev
<400> 81
caggaaacag ctatgac
17

<210> 82
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> M13.fw
<400> 82
gtaaacgac ggccag
16

<210> 83
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对酵母表达进行密码子优化的、ID38F的多核苷酸编码序列
<400> 83
gatgtcaat tggatgaatc tgggtgggt ttggttcaac caggtgggtc ttgaaattg
1           5           10           15           20           25           30           35           40           45           50           55           60
tcttctgtc cttctggttt cgatttctct tctcattgga tgtactgggt tagacaagct
100          105          110          115          120          125          130          135          140          145          150          155          160          165          170          175          180          185          190          195          200
120
    
```

ccaggtaaag aattggaatg gttgtctgaa atcaacacca acggtttgat taccattat 180  
 ggtgattctg tcaaggtag attcactgtc tctagaaaca atgctgctaa caagatgtac 240  
 ttggaatiga ccagattgga accagaagat actgccttgt attactgcgc tagaaatcaa 300  
 catggttiga acaaaggatca aggtactcaa gttaccgttt cctca 345

<210> 84  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 对酵母表达进行密码子优化的、Q62E10的多核苷酸编码序列

<400> 84  
 caagtccaat tgcaagaatc tgggtggtggt ttggttcaac caggtggttc ttgagattg 60  
 tcttgtacta cttctggttt ggatttcggt atccattgga tgtactggtt tagacaagct 120  
 ccaggtaaag aattggaatg ggttgcctgaa atcaacacca atgctttgat taccagatc 180  
 gccgattctg ttaaggtag attcaccatt tctagagata acgctaagaa caccctgttc 240  
 ttgcaaatga acgacttgaa gctgaaagat accgctgttt actactgttc taactactcaa 300  
 aatggigtctg ctaaaggatca aggtgtacaa gttactgttt cctcc 345

<210> 85  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 对大肠杆菌表达进行密码子优化的、ID38F的多核苷酸编码序列

<400> 85  
 gatgttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt ctggttcagc ctggtggtag cctgaaactg 60  
 agctgtgcag caagcggttt tgatttttagc agccattgga tgtattgggt tctcaggcca 120  
 ccgggtaaag aactggaaatg gctgagcgaataacacca atggtctgat taccattat 180  
 gccgatagcg ttaaaggctg ttttaccggt agccgtaata atgcagccaa caaaatgtat 240  
 ctggaactga cccgtctgga accggaagat accgcaactgt attattgtgc acgtaactag 300  
 catggctcga ataaaggatca gggcaccag gttaccgtga gcagc 345

[0018]

<210> 86  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 对大肠杆菌表达进行密码子优化的、Q62E10的多核苷酸编码序列

<400> 86  
 caggttcagc tgcaagaag cgggtggtggt ctggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60  
 agctgtacca ccagtggtct ggattttggt atccattgga tgtattgggt tctcaggcca 120  
 ccgggtaaag aactggaaatg ggttcagaa atcaacacca atgcactgat taccaaat 180  
 gccgatagcg tgaaggctg ttttaccatt agccgtgata atgcaaaaa taccctgttt 240  
 ctgcagaiga acgatctgaa aagcgaagat accgcagtgt attattgtag caataccag 300  
 aatgggtcag caaaaggatca ggggtttcag gttaccgtta gcagc 345

<210> 87  
 <211> 501  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 由用于大肠杆菌表达的ID38F开放阅读框组成的多核苷酸 (PelB前导肽至c-myc-6His标签2×终止密码子)

<400> 87  
 atgaaatc tgctccgac cgcagcagcg ggtctgctgc tctggtcagc acagcctgca 60  
 atggcagatg ttcagctggt tgaagcggg ggtggtctgg ttcagcctgg tggtagcctg 120  
 aaactgagct gtgcagcaag cggttttgat tttagcagcc attgatgta ttgggtcgt 180  
 caggcaccgg gtaaagaact ggaatgctg agcgaatta acaccaatgg tctgattacc 240  
 cttatgtcgc atagcgttaa agtctgtttt accgttagcc gtaataatgc agccaacaaa 300  
 atgtatctgg aactgaccg tctggaaccg gaagataccg cactgtatta ttgtcagct 360  
 aatcagcatg gtctgaataa agtctagggc acccaggtta cctgagcag cgcagcagcc 420  
 agcggtagcc tggaaacagaa actgattagc gaagagatc tgaatggtgc agcatcatc 480  
 catcaccatc atgggtccgc a 501

<210> 88  
 <211> 486  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 由用于大肠杆菌表达的ID38F开放阅读框组成的多核苷酸 (PelB前导肽至Flag-6His标签2×终止密码子)

[0019] <400> 88  
 atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60  
 atggccgatg ttcagctggg tgaagcggg ggtggtctgg ttcagcctgg tgtagcctg 120  
 aaactgagct gtgcagcaag cggttttgat ttagcagcc attggatgta ttgggtcgt 180  
 caggcaccgg gtaaagaact ggaatggctg agcgaataa acaccaatgg tctgattacc 240  
 cattatggcg atagcgtaa aggtcgtttt accgttagcc gtaataatgc agccaacaaa 300  
 atgtatctgg aactgaccg tctggaaccg gaagatacc cactgtatta ttgtcacgt 360  
 aatcagcatg gtctgaataa aggtcagggc acccaggta ccgtctctc agcggccgca 420  
 gactacaaag acgacgacga caaagggct gcacatcacc atcatcacca cgggctgca 480  
 taataa 486

周质上清液和纯化的样品在暴露和未暴露于胰蛋白酶和糜蛋白酶时的TNF-α中和活性%

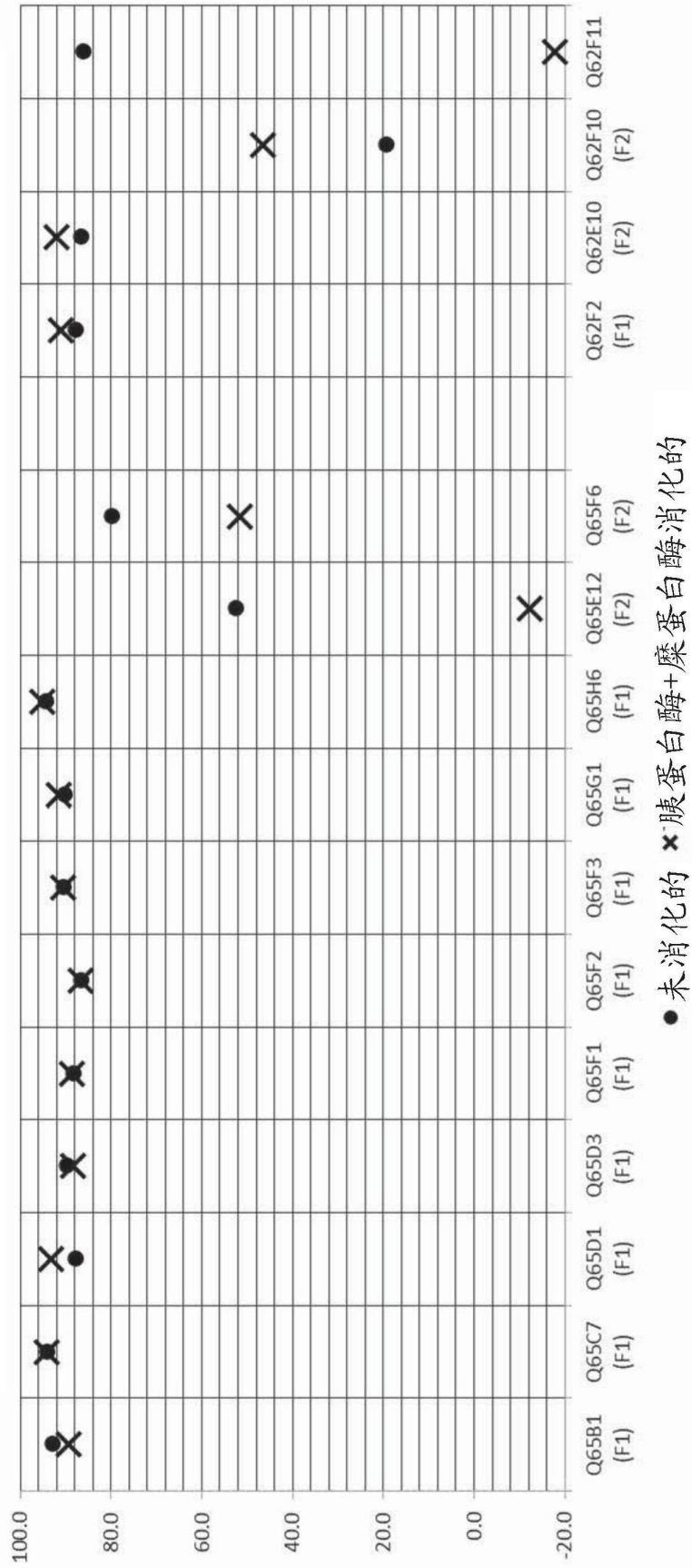


图1

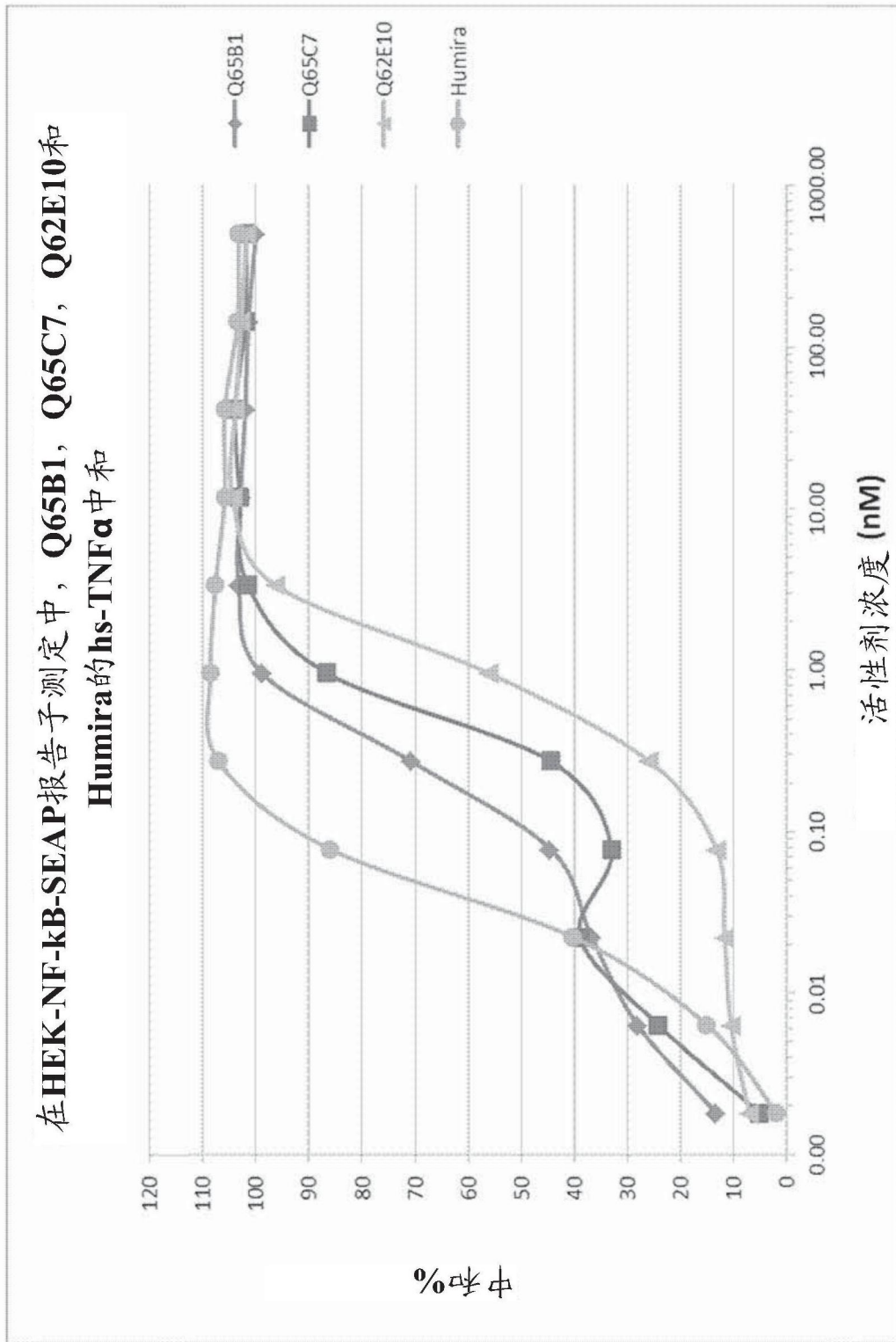


图2A

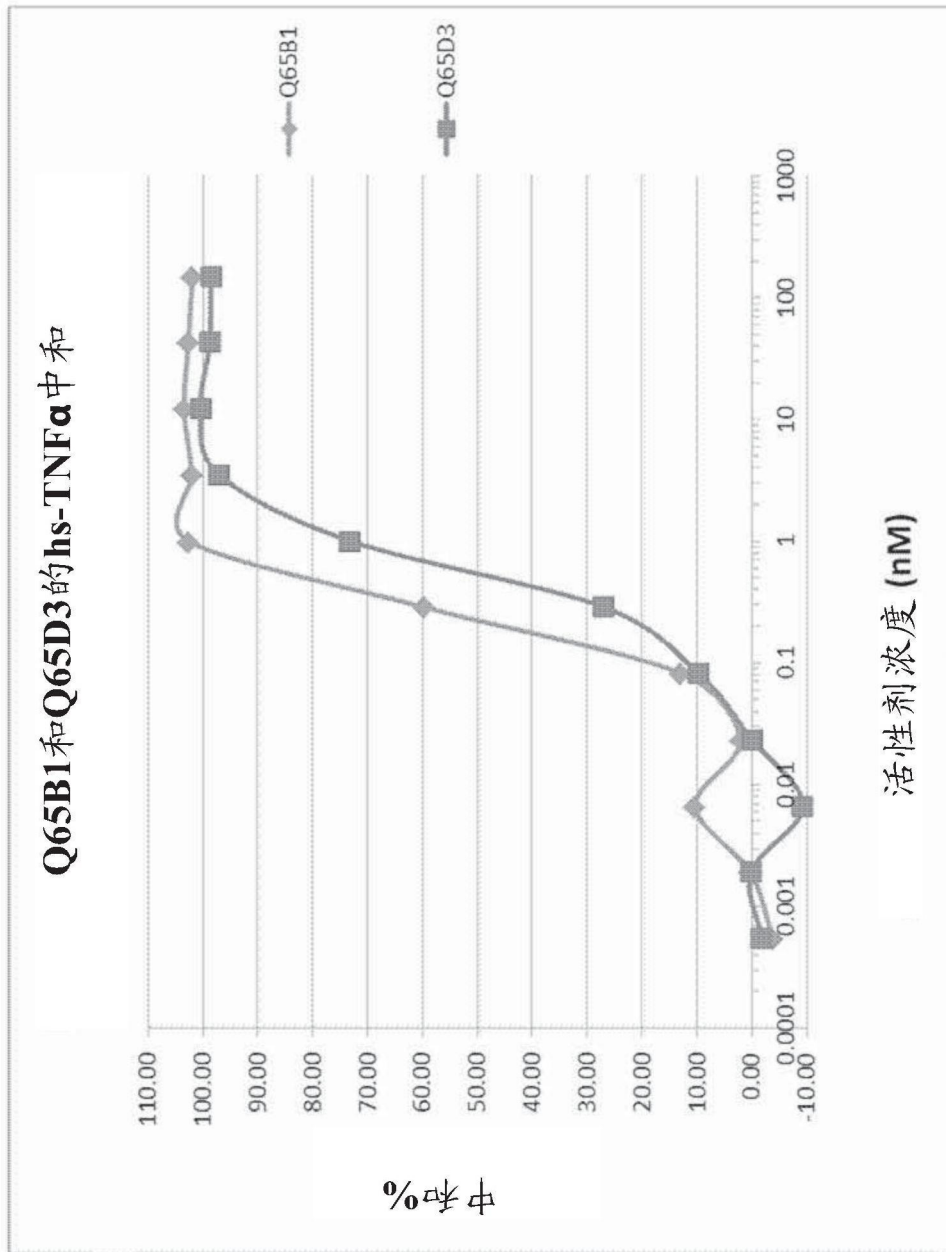


图2B

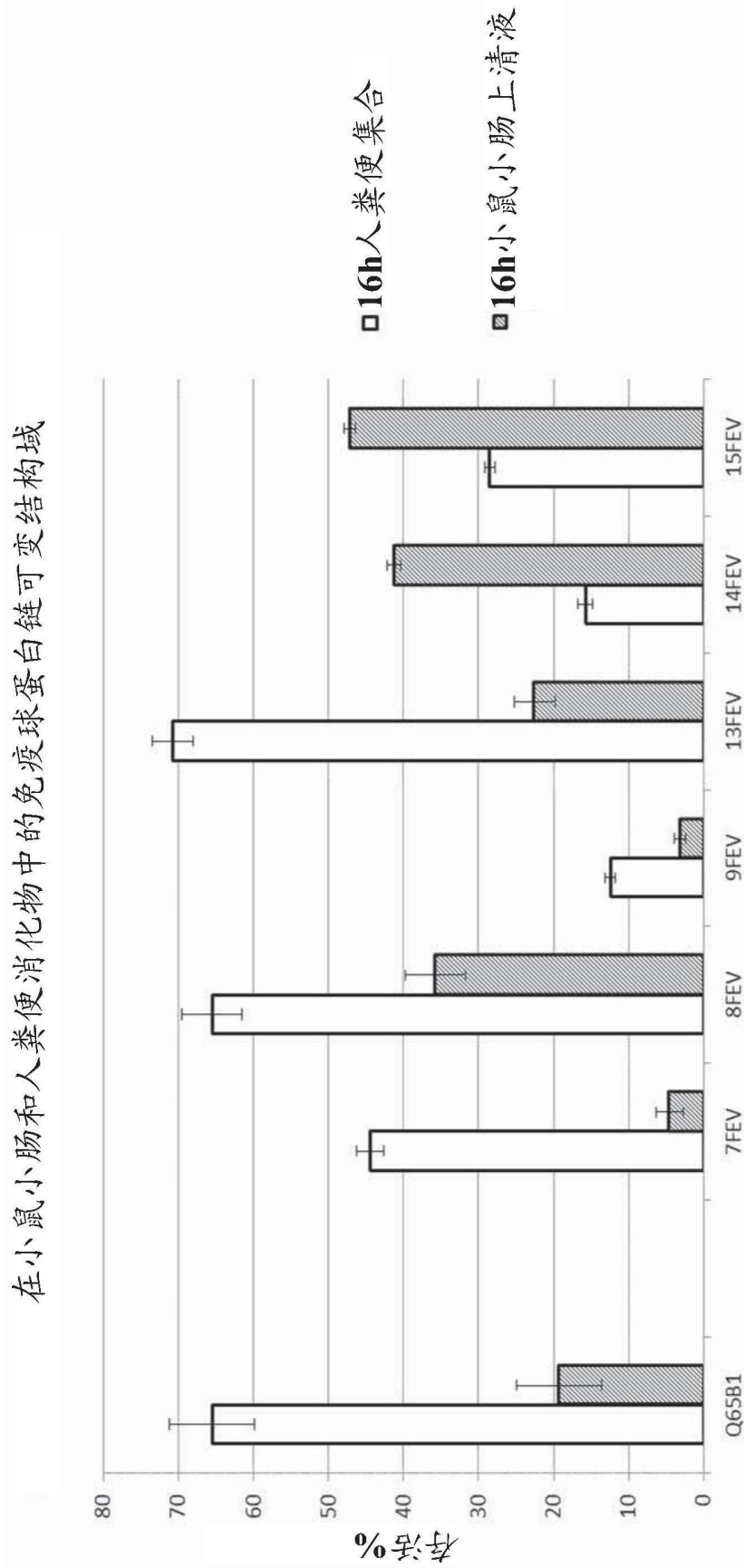


图3

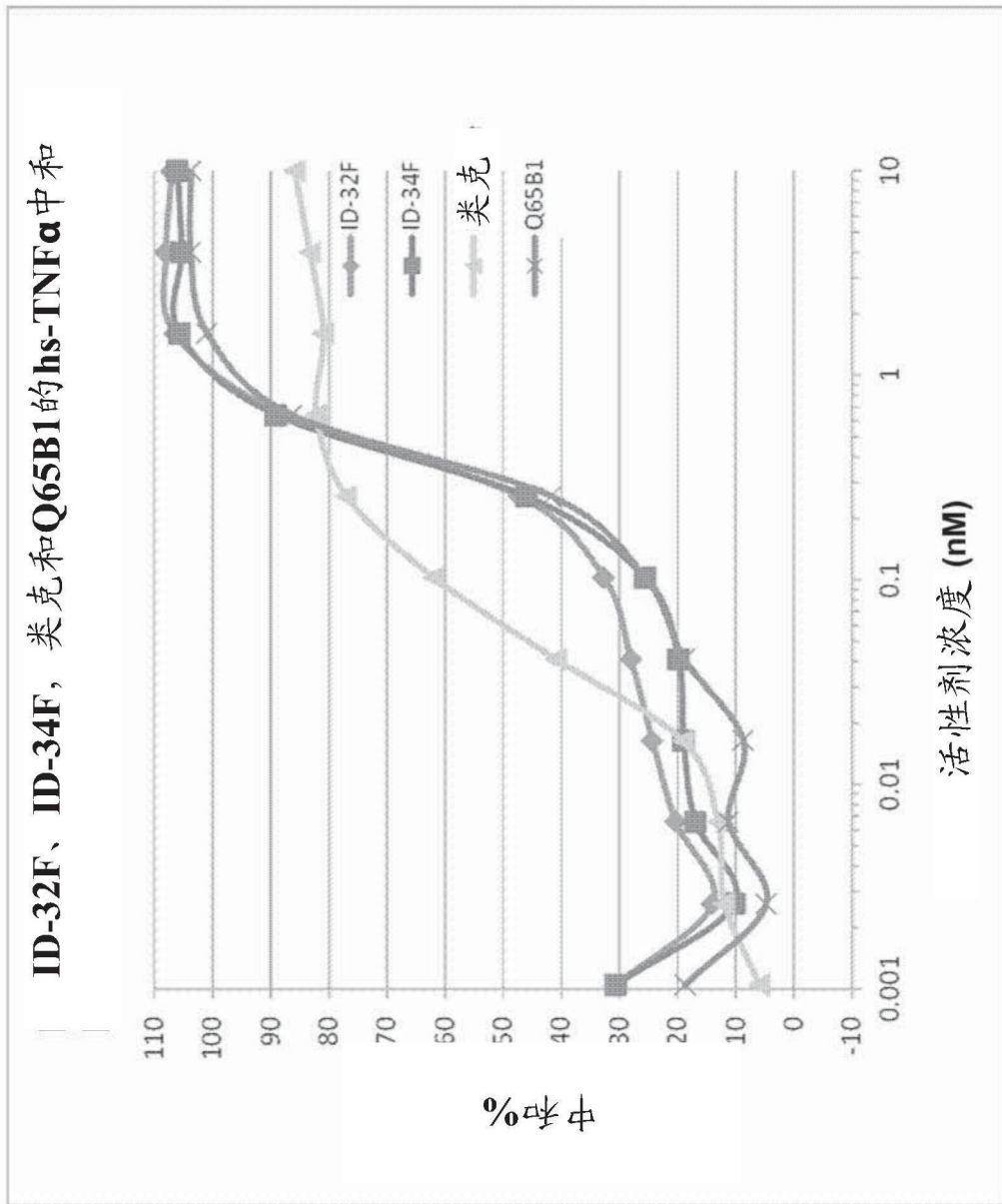


图4A



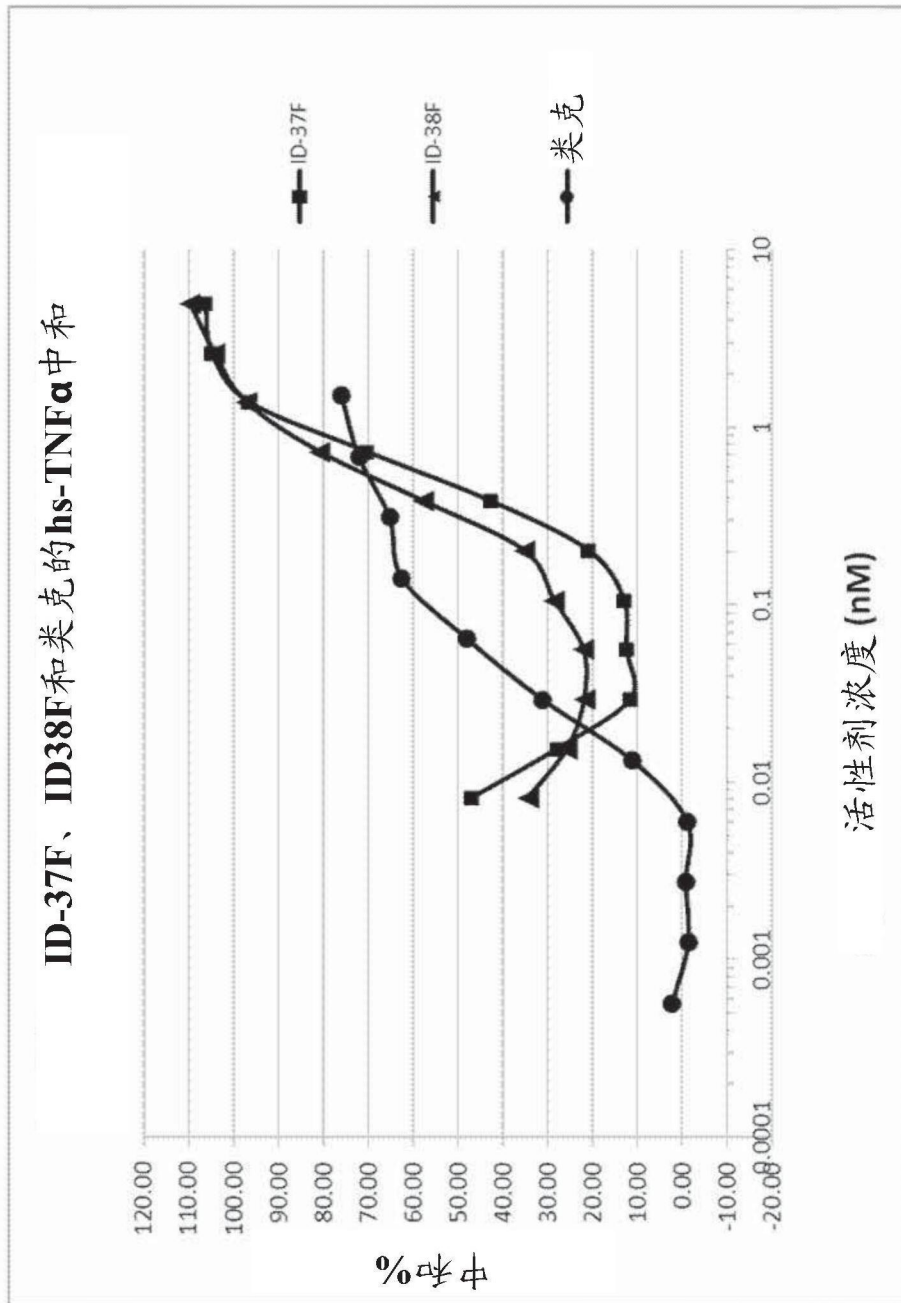


图4C

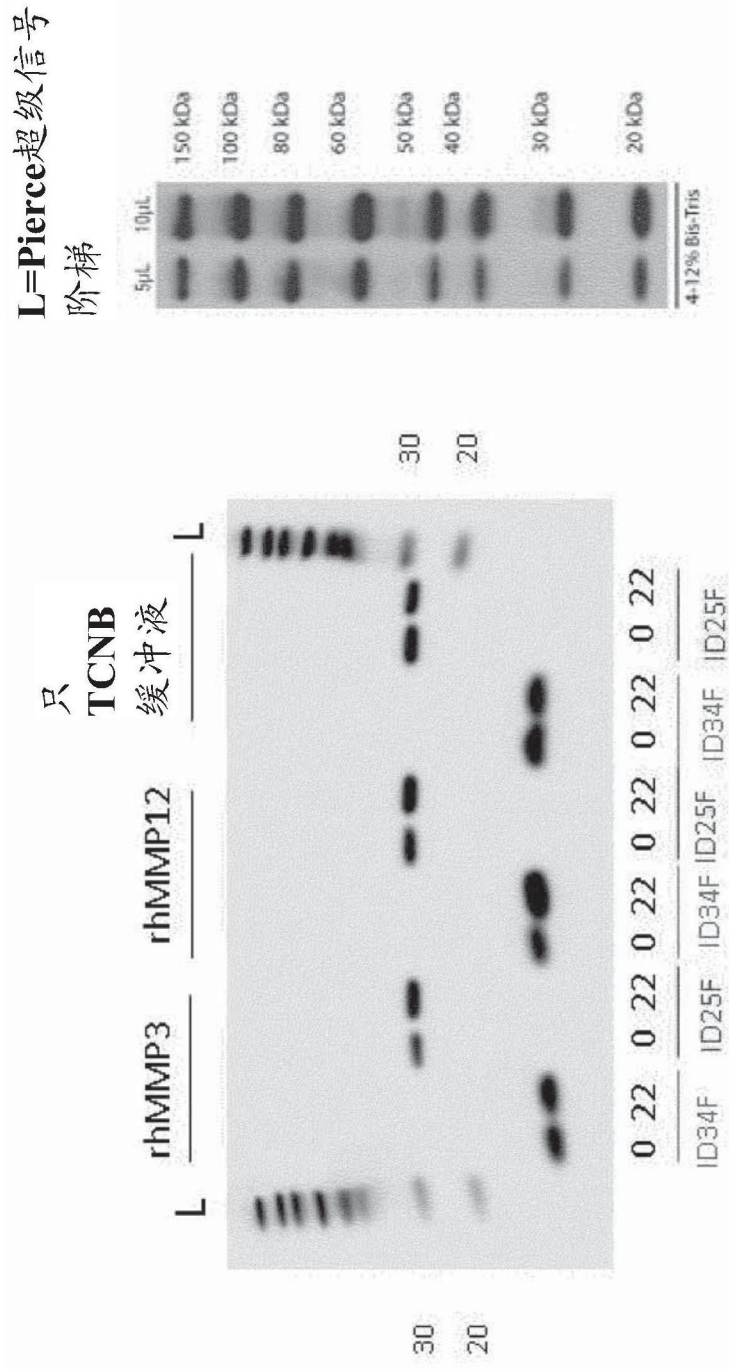


图5A

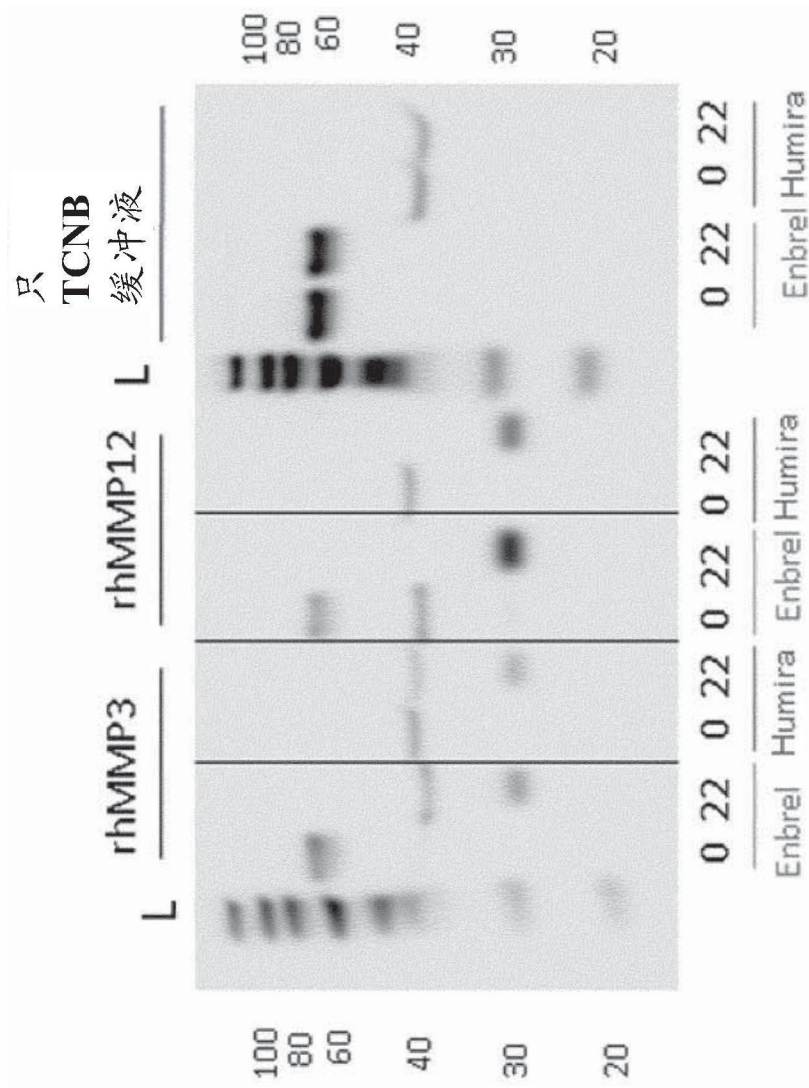


图5B

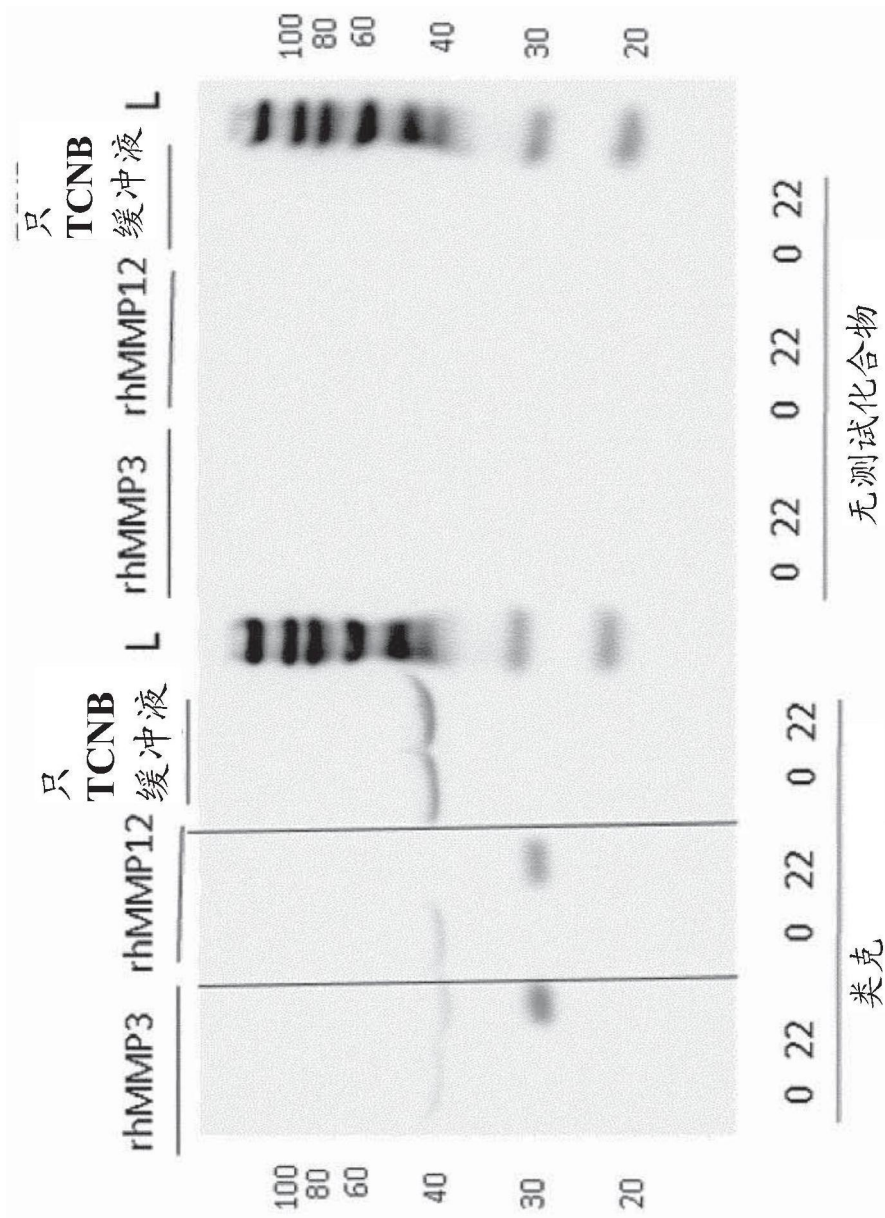


图5C

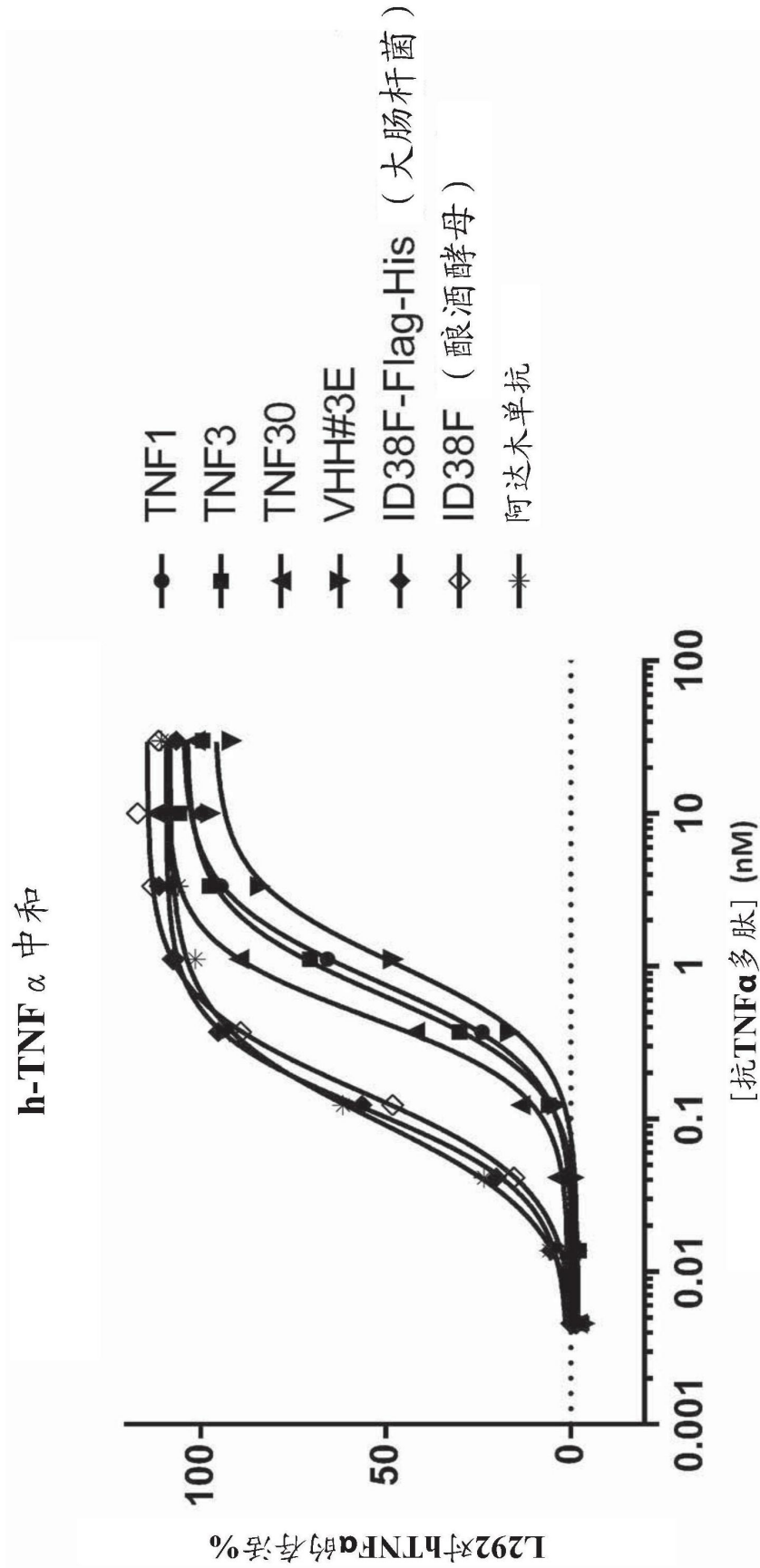


图9

在食蟹猴胃肠道切片中计算的[抗-TNF ICVD]

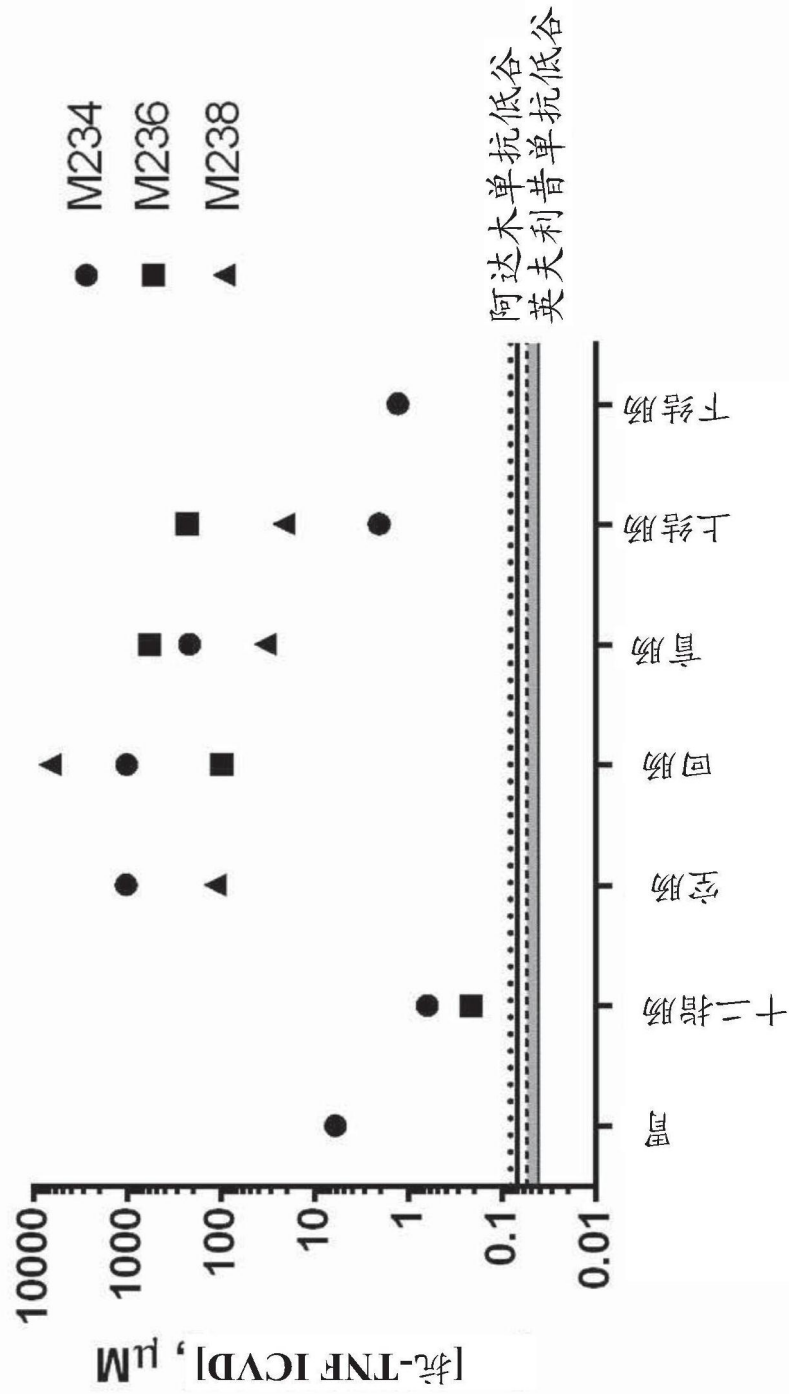


图7

食蟹猴胃肠道的抗TNF ICVD的总回收%

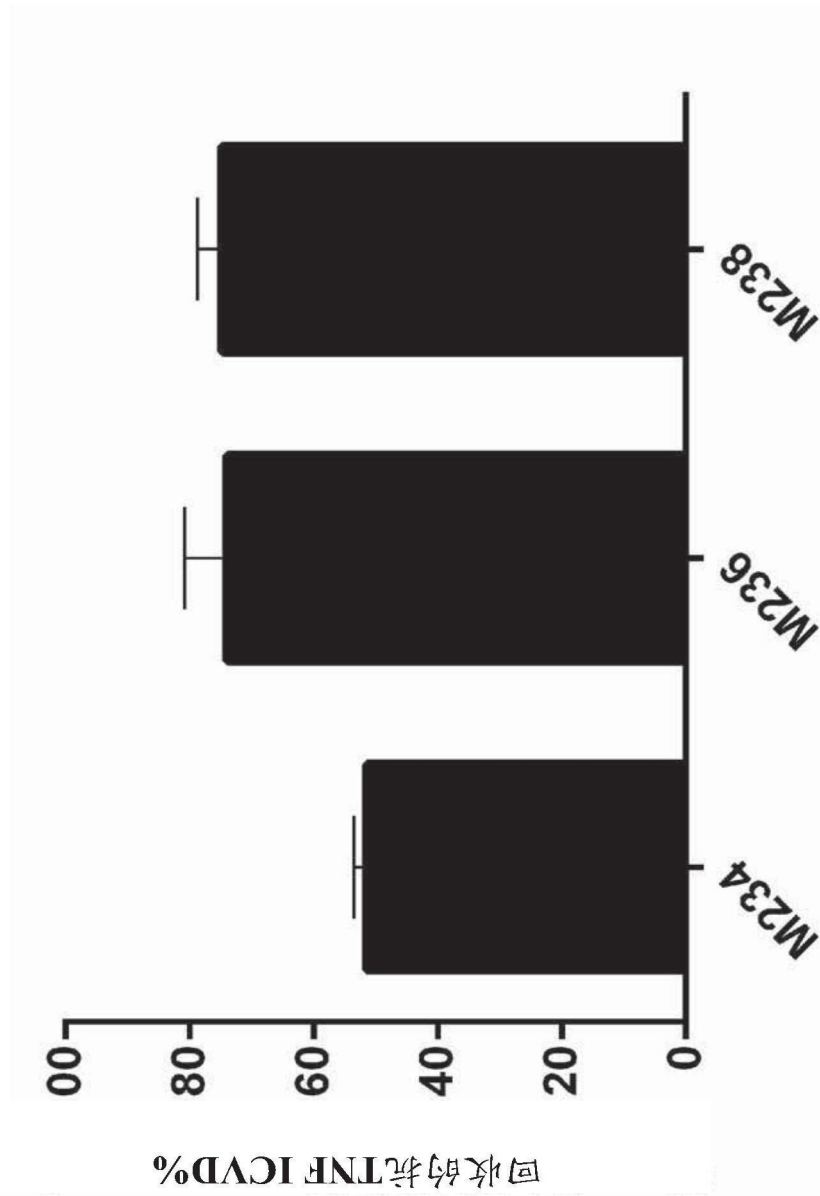
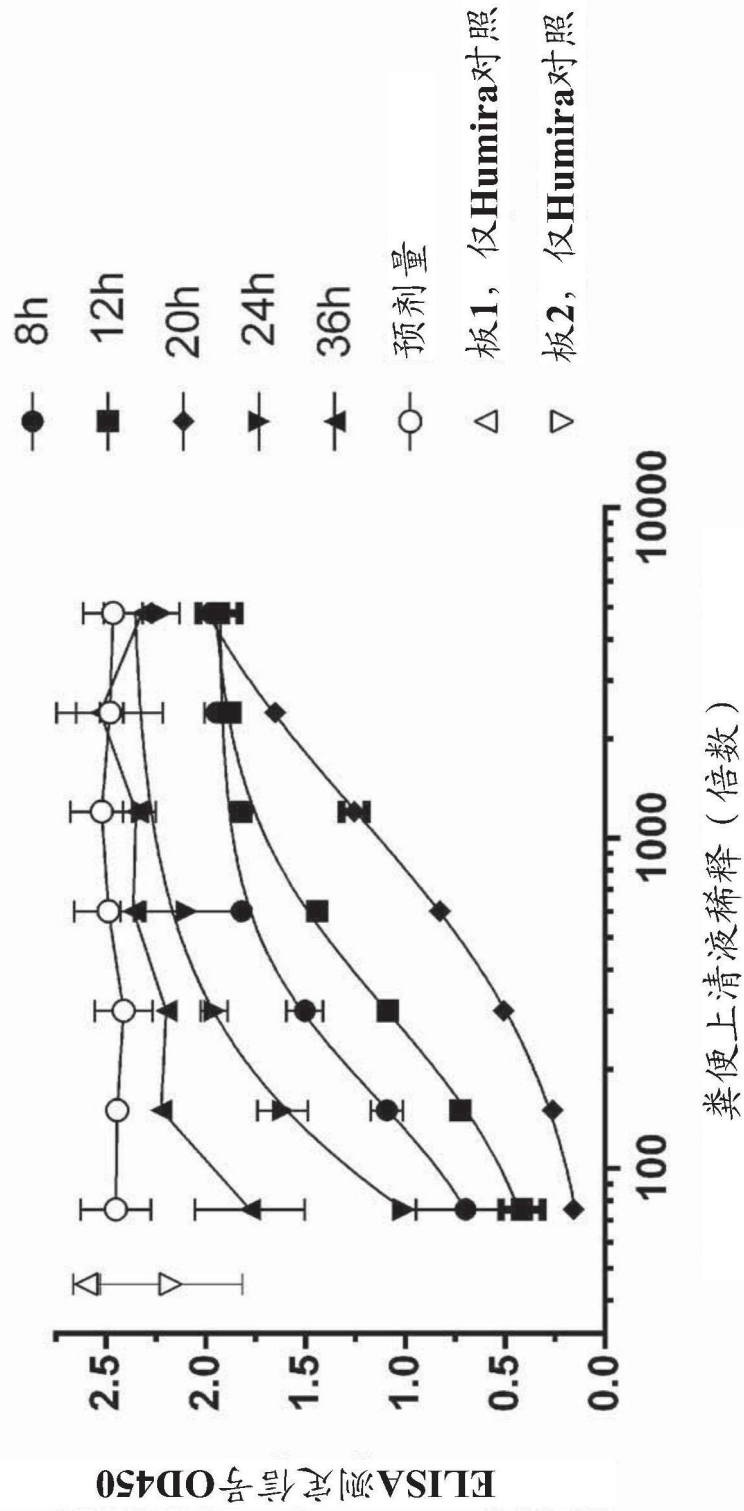


图8

Humira竞争ELISA OD450数据



集合的食蟹猴粪便中的抗TNF ICVD 浓度

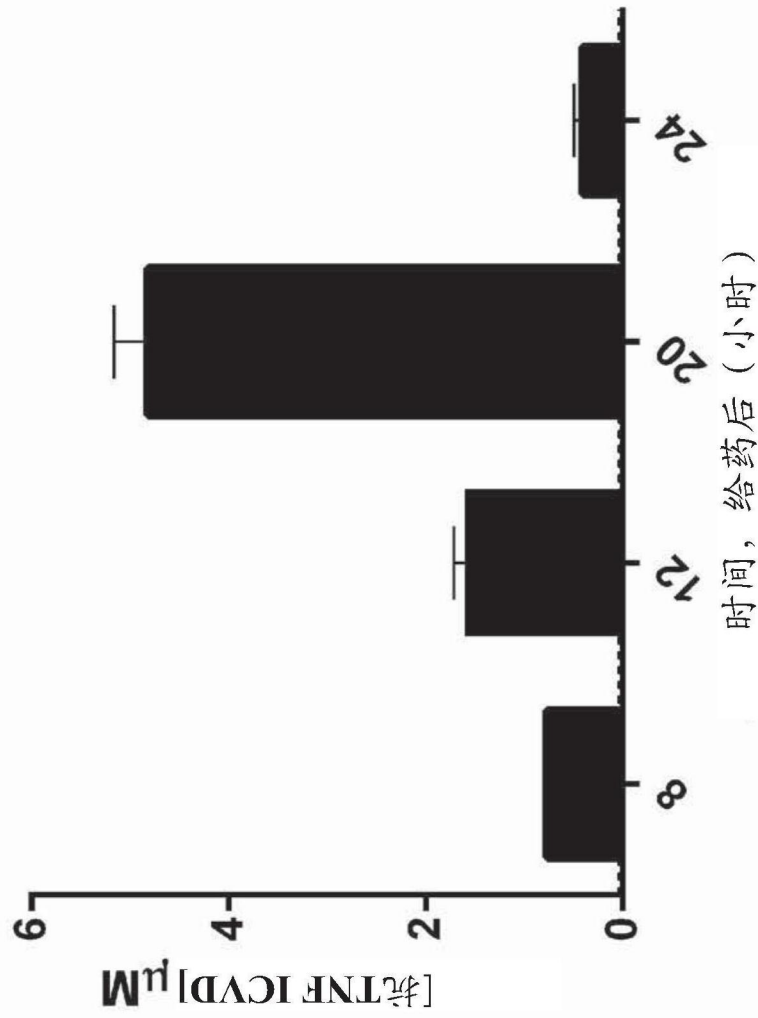


图10

从集合的食蟹猴粪便中回收的抗TNF ICVD

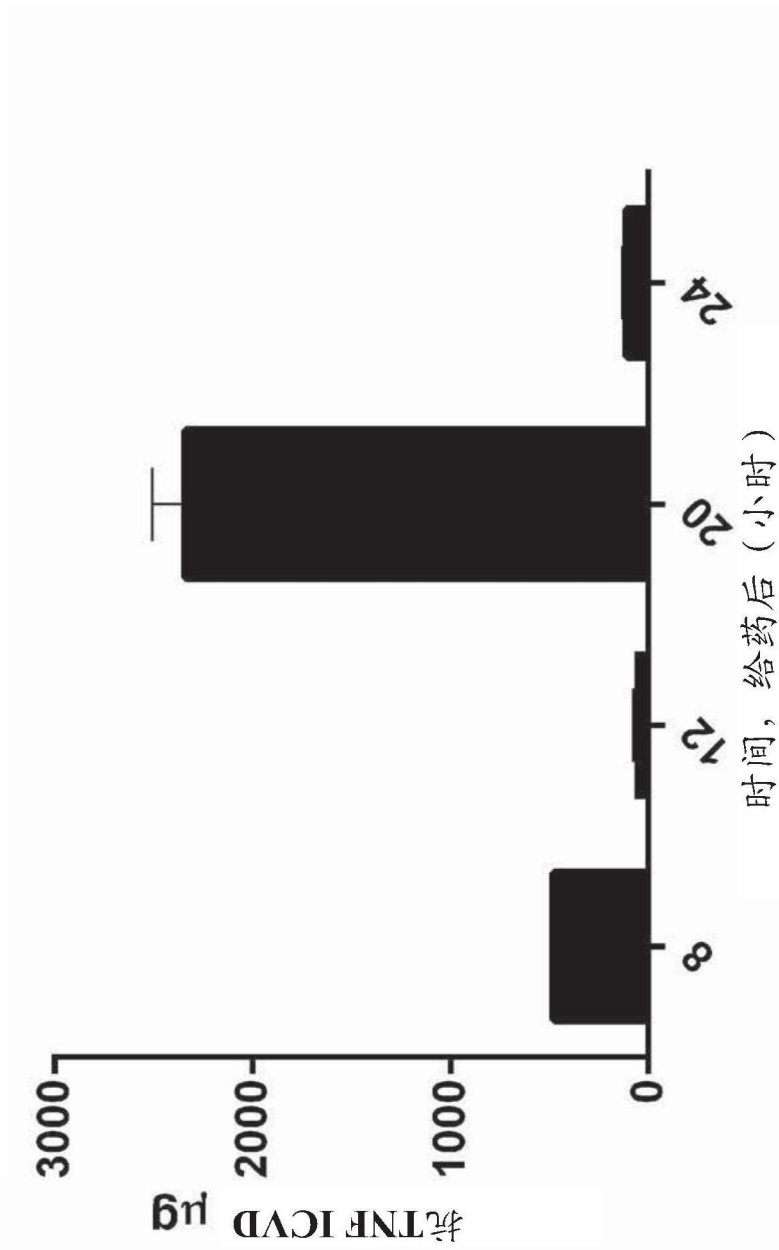


图11