(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114514243 B
(45)授权公告日 2025.01.24

(21)申请号 202080059154.1
(22)申请日 2020.06.19
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114514243 A
(43)申请公布日 2022.05.17
(30)优先权数据
19181870.7 2019.06.21 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.02.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2020/051495 2020.06.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/254826 EN 2020.12.24
(73)专利权人 索瑞索制药公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 斯科特·克罗 马里恩·丘比特 蒂姆·卡尔顿 卢瓦纳·马焦雷 卢德斯·杜阿尔特 凯文·罗伯茨 迈克·韦斯特
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 徐爱文 武晶晶
(51)Int.Cl.
C07K 16/24(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61P 1/04(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 102090373 A,2011.06.15
CN 102971341 A,2013.03.13
审查员 程静之
权利要求书3页 说明书60页
序列表33页 附图7页

(54)发明名称

多肽

(57)摘要

本发明尤其提供了一种多肽,其包含结合至IL-23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共享60%或更大序列同一性的序列,CDR2包含与SEQ ID NO:2共享50%或更大序列同一性的序列,并且CDR3包含与SEQ ID NO:3共享50%或更大序列同一性的序列。

CN 114514243 B

1.一种多肽,其包含结合至IL-23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由SEQ ID NO:1的序列组成,CDR2由SEQ ID NO:2的序列组成,并且CDR3由SEQ ID NO:3的序列组成。

2.根据权利要求1所述的多肽,其包含SEQ ID NO:8。

3.根据权利要求2所述的多肽,其由SEQ ID NO:8组成。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的多肽,其在评估方法A中以以下EC50中和人IL-23:5nM或更小,4nM或更小,3nM或更小,2nM或更小,1.7nM或更小,1.5nM或更小,1.4nM或更小,1.3nM或更小,1.2nM或更小,1.1nM或更小,1.0nM或更小,0.9nM或更小,0.8nM或更小,0.75nM或更小,0.70nM或更小,0.65nM或更小,0.60nM或更小,0.55nM或更小,0.50nM或更小,0.45nM或更小,0.40nM或更小,0.35nM或更小,0.30nM或更小,0.25nM或更小,或者0.20nM或更小。

5.根据权利要求1至3中任一项所述的多肽,其中所述多肽或构建体以10^{-6}M或更小、10^{-7}M或更小、10^{-8}M或更小、10^{-9}M或更小、10^{-10}M或更小、10^{-11}M或更小、10^{-12}M或更小、或者10^{-13}M或更小的Kd结合至IL-23。

6.根据权利要求1至3中任一项所述的多肽,其中所述多肽或多种多肽耐受胰蛋白酶和糜蛋白酶。

7.根据权利要求1至3中任一项所述的多肽,其中所述多肽是抗体或抗体片段。

8.根据权利要求1至3中任一项所述的多肽,其中所述多肽由免疫球蛋白链可变结构域组成。

9.根据权利要求1至3中任一项所述的多肽,其中所述免疫球蛋白链可变结构域是VHH、VH或VL。

10.根据权利要求9所述的多肽,其中所述免疫球蛋白链可变结构域是VHH或VH。

11.根据权利要求10所述的多肽,其中所述免疫球蛋白链可变结构域是VHH。

12.一种构建体,其包含至少一个根据权利要求1至11中任一项所述的多肽和至少一个不同的多肽,其中所述不同的多肽结合至TNF-α。

13.根据权利要求12所述的构建体,其中所述不同的多肽包含与SEQ ID NO:67共享至少80%或更大序列同一性的序列。

14.根据权利要求12或13所述的构建体,其中所述多肽通过至少一个蛋白酶不稳定接头连接,所述蛋白酶不稳定接头具有下式所示的多肽序列:

$[-(G_aS)_x-B-(G_bS)_y-]_z$

其中

a是1至10;

b是1至10;

x是1至10;

y是1至10;

z是1至10;并且

B是K或R。

15.根据权利要求12或13所述的构建体,其中所述多肽通过至少一个蛋白酶不稳定接头连接,所述蛋白酶不稳定接头具有下式所示的多肽序列:

$[-(G_aS)_x-B-(G_bS)_y-]_z$

其中

a是2至5;

b是2至5;

x是1至3;

y是1至3;

z是1;并且

B是K。

16.根据权利要求12或13所述的构建体,其中所述多肽通过至少一个包含SEQ ID NO:49或由其组成的蛋白酶不稳定接头连接。

17.根据权利要求16所述的构建体,其中所述构建体包含SEQ ID NO:46或由其组成。

18.根据权利要求12或13所述的构建体,其在评估方法A中以以下EC50中和人IL-23:5nM或更小,4nM或更小,3nM或更小,2nM或更小,1.7nM或更小,1.5nM或更小,1.4nM或更小,1.3nM或更小,1.2nM或更小,1.1nM或更小,1.0nM或更小,0.9nM或更小,0.8nM或更小,0.75nM或更小,0.70nM或更小,0.65nM或更小,0.60nM或更小,0.55nM或更小,0.50nM或更小,0.45nM或更小,0.40nM或更小,0.35nM或更小,0.30nM或更小,0.25nM或更小,或者0.20nM或更小。

19.根据权利要求12或13所述的构建体,其中所述多肽或构建体以10^{-6}M或更小、10^{-7}M或更小、10^{-8}M或更小、10^{-9}M或更小、10^{-10}M或更小、10^{-11}M或更小、10^{-12}M或更小、或者10^{-13}M或更小的Kd结合至IL-23。

20.根据权利要求12或13所述的构建体,其中所述多肽或多种多肽耐受胰蛋白酶和糜蛋白酶。

21.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至11中任一项所述的多肽或权利要求12至20中任一项所述的构建体和一种或多种药学上可接受的稀释剂或载剂。

22.根据权利要求21所述的药物组合物,其包含至少一种另外的活性剂。

23.根据权利要求1至11中任一项所述的多肽、权利要求12至20中任一项所述的构建体或权利要求21或22所述的药物组合物,其用作药剂。

24.根据权利要求23所述的多肽、药物组合物或构建体,其用于治疗自身免疫疾病和/或炎性疾病。

25.根据权利要求1至11中任一项所述的多肽、权利要求12至20中任一项所述的构建体或权利要求21或22所述的药物组合物在制造用于治疗自身免疫疾病和/或炎性疾病的药剂中的用途。

26.根据权利要求23至25中任一项所述的用于使用的多肽、药物组合物或构建体或用途,其中所述多肽、药物组合物或构建体口服施用。

27.根据权利要求24至25中任一项所述的用于使用的多肽、药物组合物或构建体或用途,其中所述自身免疫疾病和/或炎性疾病是克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

28.一种多核苷酸,其编码根据权利要求1至11中任一项所述的多肽或权利要求12至20中任一项所述的构建体。

29.根据权利要求28所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸由与SEQ ID NO:10共享70%

或更大、80％或更大、90％或更大、95％或更大、或者99％或更大序列同一性的序列组成。

30.根据权利要求29所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸由SEQ ID NO:10的序列组成。

多肽

技术领域

[0001] 本发明涉及包含结合至白细胞介素-23(IL-23)的免疫球蛋白链可变结构域(或ICVD)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,用于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。

背景技术

[0002] IL-23是参与调节生理学和病理学两者的多效细胞因子。IL-23具有与炎症和免疫调节相关联的功能并且被认为对于自身免疫疾病中的慢性炎症和相关联的病理学的传播是重要的,所述自身免疫疾病包括炎性肠病(IBD,例如克罗恩氏病(CD)和溃疡性结肠炎(UC))(Croxford等人,2012;Teng等人,2015;Furfaro等人,2017))。在患有IBD的患者中,IL-23的产生在肠道炎症的位点处增加。IL-23通过对于致病性T细胞的直接作用导致炎症;IL-23增强IBD上皮内淋巴细胞和NK细胞的活化并且通过先天淋巴样细胞刺激促炎细胞因子产生(Eken等人,2014)。IL-23是IL-12细胞因子家族内的异二聚体细胞因子。IL-23和IL-12共享共同的p40亚基,其与配体特异性IL-23p19亚基(还被称为p19、IL-23A和白细胞介素-23亚基α)二聚化以形成IL-23或与IL-12p35二聚化以形成IL-12。炎性肠病的不同模型中的临床前研究的结果清楚地表明IL-23促进肠道炎症和病理学。虽然在结构上与IL-12相关,但是这些模型中关于IL-23特异性中和抗体的研究揭示了IL-23和IL-12在粘膜和系统性免疫应答中具有不同的作用,并且IL-23的选择性耗尽可以使肠道炎症停止,同时避免系统性免疫应答。

[0003] 抗TNF单克隆抗体改变了克罗恩氏病和溃疡性结肠炎的治疗。通过中和TNF活性,抗体诸如英夫利昔单抗(infliximab)和阿达木单抗(adalimumab)在许多患者中有利于粘膜愈合并且诱导长期缓解。然而,开抗TNF剂的处方的大约三分之一患者是原发性无应答者。在原发性应答者中,随后的应答丧失每年可以在10%与50%之间变化(继发性无应答)(Colombel等人2007;Hanauer等人2002,2006;Sandbom等人2007;Schreiber等人2007)。具有原发性无应答的患者不太可能受益于转换至第二抗TNF剂;因此,需要靶向其他炎性途径的治疗性策略。

[0004] 以上内容表明IL-23可以是用于治疗IBD的治疗性靶,并且还为局部施用而非系统性施用提供基本原理(McGovern和Powrie,2007)。此外,这种剂可以在抗TNF抗体失效的环境中提供IBD的有效治疗。

[0005] WO2007005955和WO2007027714公开了抗IL-23p19抗体。

[0006] 最近,布雷库单抗(AMG-139,选择性结合IL-23的p19亚基的完全人IgG_2单克隆抗体)的有效性和安全性已经在患有活性CD的抗TNFα疗法对其无效或不耐受所述疗法的患者中研究(Sandborn等人2018,Sands等人2017)。本发明的许多多肽相对于布雷库单抗的优异性在以下实施例2和5中证明。

[0007] 现有技术的另一种抗IL-23剂是37D5,其是抗IL-23p19结构域抗体(VHH)

(Desmyter等人2017)。本发明的许多多肽相对于37D5的优异性在以下实施例5中证明。

[0008] 在至少一些实施方案中,与现有技术的抗IL-23物质相比,本发明的多肽具有以下优点中的一种或多种:

[0009] (i)对于IL-23增加的亲和力;

[0010] (ii)对于IL-23增加的特异性;

[0011] (iii)针对IL-23增加的中和能力;

[0012] (iv)相对于IL-12对于IL-23增加的特异性;

[0013] (v)与来自不同物种诸如人和食蟹猴的IL-23的增加的交叉反应性;

[0014] (vi)例如在施用于小鼠、食蟹猴或人时降低的免疫原性;

[0015] (vii)在蛋白酶的存在下,例如(a)在小肠和/或大肠中存在的蛋白酶和/或IBD炎性蛋白酶例如胰蛋白酶、糜蛋白酶、MMP3、MMP10、MMP12、其他MMP和组织蛋白酶的存在下和/或(b)在来自肠道共生微生物菌群和/或病原菌的蛋白酶、由小肠和/或大肠中存在的微生物细胞的裂解主动分泌和/或释放的蛋白酶的存在下增加的稳定性;

[0016] (viii)在生产期间对于蛋白酶降解的增加的稳定性(例如,对于酵母蛋白酶的耐受性)

[0017] (ix)对于口服施用的增加的适用性;

[0018] (x)对于口服施用之后口服递送至肠道和固有层的增加的适用性;

[0019] (xi)对于在异源宿主诸如细菌诸如大肠肝菌(Escherichia coli)或属于曲霉属(Aspergillus)、酵母属(Saccharomyces)、克鲁维酵母属(Kluyveromyces)、汉森酵母属(Hansenula)或毕赤酵母属(Pichia)的酵母诸如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)或毕赤酵母(Pichia pastoris)中表达的增加的适用性:

[0020] (xii)对于在药物中使用的适用性和改善的特性;

[0021] (xiii)对于在功能性食品中使用的适用性和改善的特性;

[0022] (xiv)改善的组织渗透,诸如渗透发炎结肠粘膜上皮和粘膜下组织以到达粘膜下固有层;

[0023] (xv)例如由于与人免疫球蛋白的增加的序列相似性在人中降低的免疫原性;

[0024] (xvi)对于以多特异性形式格式化而言增加的适用性;

[0025] (xvii)结合至新型表位。

[0026] 以上优点(i)至(xvii)可以潜在地通过呈单价形式或呈多价形式诸如双头形式(例如同双头或异双头形式)的本发明的多肽实现。

发明内容

[0027] 发明人已经生产了意外有利的多肽,其包含结合至IL-23的免疫球蛋白链可变结构域。这些多肽是免疫球蛋白链可变结构域ID-L253T、10E2、10G10以及与这些免疫球蛋白链可变结构域中的每一个相关的多肽。

[0028] 已经发现这些多肽具有与现有技术抗IL-23剂布雷库单抗和37D5(具体参见以上背景技术部分和以下实施例2和5)相比意料之外的优点。

[0029] 这些多肽特别受益于意外高的功效。它们还能够与食蟹猴IL-23交叉反应并且在暴露于小肠和大肠的蛋白酶时保持稳定。在一个实施方案中,这些多肽已经通过工程化经

历进一步增强。这些进一步增强的多肽受益于以上优点,在穿过肠道期间保留其IL-23中和活性并且进一步抵抗被肠道的蛋白酶,例如来自例如哺乳动物物种的消化性、炎性和微生物蛋白酶降解和/或失活。

[0030] 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诸如炎性肠病(例如,克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)中或在预防或治疗粘膜炎中、特别是当口服施用时具有特定用途。

[0031] 已经发现本发明的许多多肽具有与布雷库单抗相比更优异的特性,所述布雷库单抗选择性结合IL-23的p19亚基的完全人IgG2单克隆抗体,已经在患有活性CD的抗TNFα疗法对其无效或不耐受所述疗法的患者中研究。本发明的许多多肽相对于布雷库单抗的优异性在以下实施例2和5中证明。

[0032] 已经发现本发明的许多多肽具有与37D5相比更优异的特性,37D5是抗IL-23p19结构域抗体(VHH)(Desmyter等人2017)。本发明的许多多肽相对于37D5的优异性在以下实施例5中证明。

[0033] 在具体实施方案中,本发明人提供了呈'双头'形式的以上多肽以及抗TNF-α多肽。本文提供的数据示出了组合IL-23和TNF-α的胃肠道限制拮抗作用的治疗性方法在比针对单一靶的单一疗法更大比例的患有炎性肠病的患者中实现更大的有效程度,持续更长的时间。

[0034] 在一个方面,本发明提供了一种多肽,其包含结合至IL-23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共享60%或更大序列同一性的序列,CDR2包含与SEQ ID NO:2共享50%或更大序列同一性的序列,并且CDR3包含与SEQ ID NO:3共享50%或更大序列同一性的序列。

[0035] 在另一个方面,本发明提供了一种多肽,其包含结合至IL-23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:14共享60%或更大序列同一性的序列,CDR2包含与SEQ ID NO:15共享50%或更大序列同一性的序列,并且CDR3包含与SEQ ID NO:16共享50%或更大序列同一性的序列。

[0036] 在另一个方面,本发明提供了一种多肽,其包含结合至IL-23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:22共享60%或更大序列同一性的序列,CDR2包含与SEQ ID NO:23共享50%或更大序列同一性的序列,并且CDR3包含与SEQ ID NO:24共享50%或更大序列同一性的序列。

[0037] 在另一个方面,本发明提供了一种构建体,其包含两个或更多个根据本发明的相同多肽。

[0038] 在另一个方面,本发明提供了一种构建体,其包含至少一个根据本发明的多肽和至少一个不同的多肽,其中所述不同的多肽结合至TNF-α。

[0039] 在另一个方面,本发明提供了一种构建体,其包含至少一个根据本发明的多肽和至少一个不同的多肽,其中所述不同的多肽结合至除TNF-α以外的靶。

[0040] 本发明的其他方面在此文献中的其他地方中公开。

附图说明

[0041] 图1-用ID-L210T处理的离体UC发炎结肠粘膜组织的平均磷强度值

[0042] 图2-用ID-L210T处理的离体UC发炎结肠粘膜组织的平均磷强度值(续)

[0043] 图3-FA1K(胰蛋白酶切割之前和之后)针对TNF-α的中和功效

[0044] 图4-FA1K(胰蛋白酶切割之前和之后)针对IL-23的中和功效

[0045] 图5-在人粪便上清液中温育4小时之后FA1K母体单体ID-38F和ID-L253T的稳定性

[0046] 图6-用ID-L210T和ID-38F处理的离体UC发炎结肠粘膜组织的平均磷强度值

[0047] 图7-用ID-L210T和ID-38F处理的离体UC发炎结肠粘膜组织的平均磷强度值(续)

[0048] 序列说明

[0049] SEQ ID NO:1-ID-L253T CDR1的多肽序列

[0050] SEQ ID NO:2-ID-L253T CDR2的多肽序列

[0051] SEQ ID NO:3-ID-L253T CDR3的多肽序列

[0052] SEQ ID NO:4-ID-L253T FR1的多肽序列

[0053] SEQ ID NO:5-ID-L253T FR2的多肽序列

[0054] SEQ ID NO:6-ID-L253T FR3的多肽序列

[0055] SEQ ID NO:7-ID-L253T FR4的多肽序列

[0056] SEQ ID NO:8-ID-L253T的多肽序列

[0057] SEQ ID NO:9-编码ID-L253T的多肽序列(具有终止密码子)

[0058] SEQ ID NO:10-编码ID-L253T的多肽序列(没有终止密码子)

[0059] SEQ ID NO:11-12G1的多肽序列

[0060] SEQ ID NO:12-1E2的多肽序列

[0061] SEQ ID NO:13-10E2的多肽序列

[0062] SEQ ID NO:14-10E2 CDR1的多肽序列

[0063] SEQ ID NO:15-10E2 CDR2的多肽序列

[0064] SEQ ID NO:16-10E2 CDR3的多肽序列

[0065] SEQ ID NO:17-10E2 FR1的多肽序列

[0066] SEQ ID NO:18-10E2 FR2的多肽序列

[0067] SEQ ID NO:19-10E2 FR3的多肽序列

[0068] SEQ ID NO:20-10E2 FR4的多肽序列

[0069] SEQ ID NO:21-10G10的多肽序列

[0070] SEQ ID NO:22-10G10 CDR1的多肽序列

[0071] SEQ ID NO:23-10G10 CDR2的多肽序列

[0072] SEQ ID NO:24-10G10 CDR3的多肽序列

[0073] SEQ ID NO:25-10G10 FR1的多肽序列

[0074] SEQ ID NO:26-10G10 FR2的多肽序列

[0075] SEQ ID NO:27-10G10 FR3的多肽序列

[0076] SEQ ID NO:28-10G10 FR4的多肽序列

[0077] SEQ ID NO:29-ID-L210T的多肽序列

[0078] SEQ ID NO:30-ID-L237T的多肽序列

[0079] SEQ ID NO:31-ID-L238T的多肽序列

[0080] SEQ ID NO:32-ID-L239T的多肽序列

[0081] SEQ ID NO:33-ID-L240T的多肽序列

[0082] SEQ ID NO:34-ID-L241T的多肽序列

[0083] SEQ ID NO:35-ID-L242T的多肽序列

[0084] SEQ ID NO:36-ID-L243T的多肽序列

[0085] SEQ ID NO:37-ID-L244T的多肽序列

[0086] SEQ ID NO:38-ID-L245T的多肽序列

[0087] SEQ ID NO:39-ID-L246T的多肽序列

[0088] SEQ ID NO:40-ID-L247T的多肽序列

[0089] SEQ ID NO:41-ID-L248T的多肽序列

[0090] SEQ ID NO:42-ID-L249T的多肽序列

[0091] SEQ ID NO:43-ID-L250T的多肽序列

[0092] SEQ ID NO:44-ID-L251T的多肽序列

[0093] SEQ ID NO:45-ID-L252T的多肽序列

[0094] SEQ ID NO:46-FA1K的多肽序列

[0095] SEQ ID NO:47-FA1K中ID-38F臂的多肽序列

[0096] SEQ ID NO:48-FA1K中ID-L253T臂的多肽序列

[0097] SEQ ID NO:49-FA1K中不稳定接头的多肽序列

[0098] SEQ ID NO:50-编码ID-L210T的多核苷酸序列

[0099] SEQ ID NO:51-编码ID-L237T的多核苷酸序列

[0100] SEQ ID NO:52-编码ID-L238T的多核苷酸序列

[0101] SEQ ID NO:53-编码ID-L239T的多核苷酸序列

[0102] SEQ ID NO:54-编码ID-L240T的多核苷酸序列

[0103] SEQ ID NO:55-编码ID-L241T的多核苷酸序列

[0104] SEQ ID NO:56-编码ID-L242T的多核苷酸序列

[0105] SEQ ID NO:57-编码ID-L243T的多核苷酸序列

[0106] SEQ ID NO:58-编码ID-L244T的多核苷酸序列

[0107] SEQ ID NO:59-编码ID-L245T的多核苷酸序列

[0108] SEQ ID NO:60-编码ID-L246T的多核苷酸序列

[0109] SEQ ID NO:61-编码ID-L247T的多核苷酸序列

[0110] SEQ ID NO:62-编码ID-L248T的多核苷酸序列

[0111] SEQ ID NO:63-编码ID-L249T的多核苷酸序列

[0112] SEQ ID NO:64-编码ID-L250T的多核苷酸序列

[0113] SEQ ID NO:65-编码ID-L251T的多核苷酸序列

[0114] SEQ ID NO:66-编码ID-L252T的多核苷酸序列

[0115] SEQ ID NO:67-ID-38F的多肽序列

[0116] SEQ ID NO:68-含有SpeI位点的3’引物的多核苷酸序列

[0117] SEQ ID NO:69-37D5的多肽序列

[0118] SEQ ID NO:70-布雷库单抗重链

[0119] SEQ ID NO:71-布雷库单抗轻链

[0120] SEQ ID NO:72-IL-23p19的多肽序列

[0121] SEQ ID NO:73-IL-23p40的多肽序列

[0122] SEQ ID NO:74-蛋白酶不稳定接头式的多肽序列

[0123] SEQ ID NO:75-蛋白酶不稳定接头的多肽序列

[0124] SEQ ID NO:76-非蛋白酶不稳定接头式的多肽序列

[0125] SEQ ID NO:77-非蛋白酶不稳定接头的多肽序列

具体实施方式

[0126] 包含具有VH和VHH的抗体和抗体片段的多肽

[0127] 常规抗体或免疫球蛋白(Ig)是包含四个多肽链的蛋白质:两个重(H)链和两个轻(L)链。每个链被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被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具有高变性的区域,称为“互补决定区”(“CDR”),散布有更保守的区域,称为“框架区”(“FR”)。已经准确定义了框架区和互补决定区(Kabat等人1991)。在常规抗体中,每个VHC和VLC由三个CDR和四个FR构成,自氨基末端至羧基末端按以下顺序排列: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形成有通过例如二硫键内连的重免疫球蛋白链和轻免疫球蛋白链,并且重链类似地连接。重链恒定区包含三个结构域,CH1、CH2和CH3。轻链恒定区包含一个结构域,CL。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。抗体的恒定区通常介导抗体与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括各种免疫系统细胞(例如,效应细胞)或经典补体系统的第一组分(C1q)。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K类型或λ类型。由两个相同重(H)链和两个相同轻(L)链多肽组装的免疫球蛋白-γ(IgG)抗体的总体结构在哺乳动物中良好建立并且是高度保守的(Padlan 1994)。

[0128] 常规抗体结构的一个例外存在于骆驼科的血清中。除常规抗体以外,这些血清拥有特别IgG抗体。这些IgG抗体(被称为重链抗体(HCAb))缺乏L链多肽并且缺少第一恒定结构域(CH1)。在其N末端区域中,同二聚体蛋白的H链含有专用免疫球蛋白链可变结构域(被称为VHH),其用于与其同源抗原缔合(Muyldermans 2013,Hamers-Casterman等人1993,Muyldermans等人1994)。

[0129] 如本文所用,抗原结合片段(或“抗体片段”或“免疫球蛋白片段”)是指抗体的特异性结合至IL-23的一部分(例如,其中一个或多个免疫球蛋白链不是全长但是特异性结合至IL-23的分子)。涵盖在抗原结合片段内的结合片段的实例包括:

[0130] (i)Fab片段(由VLC、VHC、CL和CH1结构域组成的单价片段);

[0131] (ii)F(ab′)2片段(包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段);

[0132] (iii)Fd片段(由VHC和CH1结构域组成);

[0133] (iv)Fy片段(由抗体的单臂的VLC和VHC结构域组成);

[0134] (v)scFv片段(由使用重组方法通过合成接头接合的VLC和VHC结构域组成,所述合成接头使得VLC和VHC结构域能够被制成单一蛋白质链,其中VLC和VHC区配对以形成单价分子);

[0135] (vi)VH(由VHC结构域组成的免疫球蛋白链可变结构域(Ward等人1989);

[0136] (vii)VL(由VLC结构域组成的免疫球蛋白链可变结构域);

[0137] (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和Griffiths等人2013)

[0138] (ix)VHH。

[0139] VHH或VH中的氨基酸残基的总数可以在110-130的区域内,合适地是115-125,并且最合适是121。

[0140] 本发明的免疫球蛋白链可变结构域可以例如通过以下获得:使用核酸合成的技术制备编码免疫球蛋白链可变结构域的核酸,接着表达由此获得的核酸。根据特定实施方案,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的氨基酸序列(诸如天然存在的抗体的VH或VHH结构域)完全相同(即,与其共享100%序列同一性)的氨基酸序列。

[0141] 本文提供的实例涉及本身结合至IL-23的免疫球蛋白链可变结构域。然而,本文公开的本发明的原理同样适用于包含结合至IL-23的免疫球蛋白链可变结构域的任何多肽,诸如抗体和抗体片段。例如,本文公开的抗IL-23免疫球蛋白链可变结构域可以并入多肽诸如全长抗体中。这种方法由McCoy等人2014证明,McCoy等人提供了工程改造为与人Fc区(包含铰链、CH2和CH3结构域)的融合体的抗HIV VHH,作为二聚体构建体表达。

[0142] 用来自人可变结构域的对应残基取代非人免疫球蛋白可变结构域的框架区中的至少一个氨基酸残基是人源化。可变结构域的人源化可以降低人中的免疫原性。

[0143] 合适地,本发明的多肽包含免疫球蛋白链可变结构域。更合适地,本发明的多肽由免疫球蛋白链可变结构域,诸如免疫球蛋白重链可变结构域组成。合适地,本发明的多肽是抗体或抗体片段。更合适地,本发明的多肽是抗体片段。合适地,抗体片段是免疫球蛋白链可变结构域,诸如VHH、VH或VL。合适地,抗体片段是VHH、VH、VL、V-NAR、scFv、Fab片段或F(ab′)2片段。合适地,抗体片段是免疫球蛋白重链可变结构域。更合适地,抗体片段是VHH或VH,并且最合适是VHH。

[0144] 特异性、亲和力、亲合力和交叉反应性

[0145] 特异性是指特定抗原结合多肽可以与其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分子实体并且将其彼此区分的能力。

[0146] 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的值越小,抗原决定簇与抗原结合多肽之间的结合强度就越强(可替代地,亲和力还可以表达为亲和力常数(Ka),其是1/Kd)。亲和力可以根据感兴趣的特定抗原通过已知方法确定。合适地,亲和力使用动态可切换生物表面(例如,“switchSENSE®”,参见Knezevic等人2012)或通过表面等离子体共振确定。

[0147] 亲合力是抗原结合多肽与相关抗原之间的结合的量度。亲合力与抗原决定簇与其在抗原结合多肽上的抗原结合位点之间的亲和力和抗原结合多肽上存在的相关结合位点

的数目两者相关。

[0148] 合适地,本发明的多肽将以10^{-6}M或更小、更合适地10^{-7}M或更小、更合适地10^{-8}M或更小、更合适地10^{-9}M或更小、更合适地10^{-10}M或更小、更合适地10^{-11}M或更小、更合适地10^{-12}M或更小、更合适地10^{-13}M或更小的解离常数(Kd)结合至IL-23。

[0149] 小于10^{-6}M的任何Kd被认为指示结合。抗原结合多肽与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以任何合适的已知方式来确定,包括例如Scatchard分析和/或竞争性结合测定,诸如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)和夹层法竞争测定,以及本领域已知的其不同变体。合适地,多肽的亲和力通过表面等离子体共振确定。

[0150] 在一个实施方案中,多肽的亲和力通过胺将在pH 5中的α-p40捕获抗体、10mM乙酸钠缓冲液偶联至传感器芯片在25℃下建立。然后通过在10μL/min下以2μg/mL或0.5μg/mL流动60秒来将IL-23固定在芯片上。这使得P19亚基自由结合多肽。然后在pH 7.4,0.01M HEPES、0.15M NaCl、0.05％聚山梨醇酯20和3mM EDTA缓冲液中的0.0195与5nM(L253T)或0.8至500nM(布雷库单抗Fab制剂)之间的五个不同浓度下以30μl/min添加测试多肽,进行300秒,并且停止300秒。用pH 2的10mM甘氨酸以10μl/min 60秒在循环之间再生成结合的抗P40。此方法在以下实施例5.2中使用。

[0151] 抗IL-23多肽、与IL-23相互作用的多肽或针对IL-23的多肽全部是结合至IL-23的有效多肽。本发明的多肽可以结合至IL-23上的线性或构象表位。

[0152] 合适地,本发明的多肽结合至人IL-23。更合适地,本发明的多肽结合至人和至少一种另外的灵长类动物IL-23两者,其选自狒狒IL-23、狨猴IL-23、食蟹猴IL-23和恒河猴IL-23。更合适地,本发明的多肽结合至人和食蟹猴IL-23两者。

[0153] 合适地,本发明的多肽中和人IL-23。更合适地,本发明的多肽中和人和至少一种另外的灵长类动物IL-23两者,其选自由狒狒IL-23、狨猴IL-23、食蟹猴IL-23和恒河猴IL-23。更合适地,本发明的多肽中和人和食蟹猴IL-23两者。

[0154] 合适地,IL-23是包含SEQ ID NO:72(p19亚基)和73(p40亚基)的多肽,更合适地,IL-23是由SEQ ID NO:72和73组成的多肽。合适地,IL-23p19是包含SEQ ID NO:72的多肽。更合适地,IL-23p19是由SEQ ID NO:72组成的多肽。以下实施例中使用的p19和p40亚基也各自并入单个C末端6xHis标签。

[0155] 能够与来自人的IL-23和来自另一种物种的IL-23诸如食蟹猴IL-23反应(“交叉反应”)的多肽是有利的,因为它们允许更易于在动物模型中进行临床前研究。

[0156] 合适地,本发明的多肽是针对IL-23上位于IL-23的一个或多个受体结合位点中和/或形成所述一个或多个受体结合位点的一部分的表位,使得本发明的所述多肽在结合至IL-23后能够抑制或减少由所述IL-23介导的IL-23受体交联和/或通过这种受体交联介导的信号转导。

[0157] 本发明的多肽结合至IL-23上的一个或多个表位。在本发明的一个方面,提供了一种多肽,其结合至IL-23上与ID-L253T、12G1、1E2、10E2或10G10,更合适地ID-L253T相同的表位。由于预期本发明的多肽对于IL-23的p19亚基是特异性的,所以在适当的情况下“整个描述中的IL-23”的表述也可以用“p19”替代。

[0158] 合适地,本发明的多肽是分离的。“分离”的多肽是从其原始环境除去的多肽。例如,如果本发明的天然存在的多肽与自然系统中共存的材料中的一些或全部分开,则所述

多肽是分离的。

[0159] 功效、抑制和中和

[0160] 功效是以产生给定强度的作用所需的量表达的治疗剂的活性的量度。与在低浓度下引起更小应答的更低功效的剂相比,高功效剂在低浓度下引起更大的应答。功效与亲和力和有效性相关。有效性是指治疗剂在结合至靶配体后产生生物应答的能力和此应答的定量数级。术语半数最大有效浓度(EC50)是指在指定暴露时间之后引起在基线与最大之间一半的应答的治疗剂的浓度。治疗剂可以导致抑制或刺激。它通常作为功效的量度使用并且在本文中用作功效的量度。

[0161] 用于本发明的目的的中和多肽是结合至IL-23、从而抑制IL-23与其同源受体(IL-23R)的结合的多肽,如通过ELISA测量,诸如实施例,评估方法A中所述的ELISA。

[0162] 合适地,本发明的多肽在IL-23-IL-23R中和ELISA(参见实施例,评估方法A)中以以下EC50中和人IL-23:5nM或更小,诸如4nM或更小,诸如3nM或更小,诸如2nM或更小,诸如1.7nM或更小,诸如1.5nM或更小,诸如1.4nM或更小,诸如1.3nM或更小,诸如1.2nM或更小,诸如1.1nM或更小,诸如1.0nM或更小,诸如0.9nM或更小,诸如0.8nM或更小,诸如0.75nM或更小,诸如0.70nM或更小,诸如0.65nM或更小,诸如0.60nM或更小,诸如0.55nM或更小,诸如0.50nM或更小,诸如0.45nM或更小,诸如0.40nM或更小。

[0163] 多肽和多核苷酸序列

[0164] 出于比较两个紧密相关的多肽序列的目的,第一多肽序列与第二多肽序列之间的“序列同一性%”可以使用多肽序列的标准设定使用NCBI BLAST v2.0(BLASTP)计算。出于比较两个紧密相关的多核苷酸序列的目的,第一核苷酸序列与第二核苷酸序列之间的“序列同一性%”可以使用核苷酸序列的标准设定使用NCBI BLAST v2.0(BLASTN)计算。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用字长(W)11、期望值(E)10、M=5、N=-4和两条链比较作为默认值。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字长3和期望值(E)10以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915(1989))比对(B)50、期望值(E)10、M=5、N=-4和两条链比较作为默认值。BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见例如,Karlin和Altschul,Proc.Nat'1.Acad.Sci.USA 90:5873-5787(1993))。BLAST算法提供的一种相似性量度是最小总和概率(P(N)),它提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果在测试核酸与参考核酸的比较中的最小总和概率小于约0.2,更合适地小于约0.01,并且最合适地小于约0.001,则认为核酸与参考序列相似。

[0165] 如果多肽或多核苷酸序列与其他多肽或多核苷酸序列的整个长度共享100%序列同一性,则称它们为相同的。序列中的残基从左向右,即从多肽的N末端至C末端;从多核苷酸的5'末端至3'末端编号。

[0166] 序列之间的“差异”是指与第一序列相比第二序列的一个位置中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、两个或更多个此类氨基酸差异。在其他方面与第一序列相同(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%降低。例如,如果相同序列的长度是9个氨基酸残基,则第二序列中的一个取代产生88.9%的序列同一性。如果相同序列的长度是17个氨基酸残基,则第二序列中的两个取代产生88.2%的序列同一性。如果相同序列的长度是7个氨基酸残基,则第二序列中的三个取

代产生57.1%的序列同一性。如果第一多肽序列和第二多肽序列的长度是9个氨基酸残基并且共享6个相同的残基,则第一多肽序列和第二多肽序列共享大于66%的同一性(第一多肽序列和第二多肽序列共享66.7%的同一性)。如果第一多肽序列和第二多肽序列的长度是17个氨基酸残基并且共享16个相同的残基,则第一多肽序列和第二多肽序列共享大于94%的同一性(第一多肽序列和第二多肽序列共享94.1%的同一性)。如果第一多肽序列和第二多肽序列的长度是7个氨基酸残基并且共享3个相同的残基,则第一多肽序列和第二多肽序列共享大于42%的同一性(第一多肽序列和第二多肽序列共享42.9%的同一性)。

[0167] 可替代地,出于将第一参考多肽序列与第二比较多肽序列进行比较的目的,可以确定对第一序列进行添加、取代和/或缺失以产生第二序列的数目。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处添加)。取代是用一个不同的氨基酸残基取代第一多肽的序列中的一个氨基酸残基。缺失是将来自第一多肽的序列的一个氨基酸残基缺失(包括在第一多肽的任一末端处缺失)。

[0168] 出于将第一参考多核苷酸序列与第二比较多核苷酸序列进行比较的目的,可以确定对第一序列进行添加、取代和/或缺失以产生第二序列的数目。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处添加)。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缺失一个核苷酸残基(包括在第一多核苷酸的任一末端处缺失)。

[0169] “保守”氨基酸取代是其中氨基酸残基被类似化学结构的另一个氨基酸残基替代并且预期对于多肽的功能、活性或其他生物特性具有微小影响的氨基酸取代。此类保守取代合适地是其中以下组内的一个氨基酸被来自相同组内的另一个氨基酸残基取代的取代:

[0170]

组	氨基酸残基
非极性脂肪族	甘氨酸
	丙氨酸
	缬氨酸
	亮氨酸
	异亮氨酸
芳香族	苯丙氨酸
	酪氨酸
	色氨酸
极性不带电	丝氨酸
	苏氨酸

[0171]

	天冬酰胺
	谷氨酰胺
带负电	天冬氨酸
	谷氨酸
带正电	赖氨酸
	精氨酸

[0172] 合适地,疏水性氨基酸残基是非极性氨基酸。更合适地,疏水性氨基酸残基选自V、I、L、M、F、W或C。

[0173] 如本文所用,多肽序列的编号以及CDR和FR的定义如根据Kabat系统(Kabat等人1991)定义。第一多肽序列与第二多肽序列之间的“对应”氨基酸残基是根据Kabat系统与第二序列中的氨基酸残基共享相同位置的第一序列中的氨基酸残基,同时第二序列中的氨基酸残基与第一序列中的氨基酸残基的身份可以不同。合适地,如果框架和CDR根据Kabat定义是相同长度,则对应残基将共享相同的编号(和字母)。比对可以手动实现或通过使用标准设定使用例如序列比对的已知计算机算法诸如NCBI BLAST v2.0(BLASTP或BLASTN)来实现。

[0174] 优选地,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除去的多核苷酸。例如,如果天然存在的多核苷酸与自然系统中共存的材料中的一些或全部分开,则所述多核苷酸是分离的。如果例如多核苷酸被克隆到不是其自然环境的一部分的载体中或者如果它包含在cDNA内,则所述多核苷酸被认为是分离的。

[0175] 在本发明的一个方面,提供了一种多核苷酸,其编码本发明的多肽。合适地,多核苷酸包含与SEQ ID NO:9、10或50至66共享70%或更大,诸如80%或更大,诸如90%或更大,诸如95%或更大,诸如99%或更大序列同一性的序列或由其组成。更合适地,多核苷酸包含SEQ ID NO:9、10或50至66中的任一个或由其组成。在另一个方面,提供了一种cDNA,其包含所述多核苷酸。

[0176] 在本发明的一个方面,提供了一种多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:9、10或50至66的编码所编码的免疫球蛋白链可变结构域的CDR1、CDR2或CDR3的部分中的任一个共享70%或更大,诸如80%或更大,诸如90%或更大,诸如95%或更大,诸如99%或更大序列同一性的序列或由其组成。

[0177] 合适地,本发明的多肽序列含有相对于天然序列的至少一个改变。合适地,本发明的多核苷酸序列含有相对于天然序列的至少一个改变。合适地,对多肽序列或多核苷酸序列进行改变以增加多肽或所编码的多肽对于肠道中存在的蛋白酶(例如,胰蛋白酶和糜蛋白酶)的稳定性。

[0178] 与本发明的特定多肽的序列相关的实施方案如下概述。

[0179] ID-L253T和相关多肽

[0180] 呈Kabat形式的ID-L253T的多肽序列

[0181] ID-L253T(本发明的特别有利的多肽)的多肽序列以Kabat形式在以下列出。CDR1(SEQ ID NO:1)被标记为‘CDR-H1’,CDR2(SEQ ID NO:2)被标记为‘CDR-H2’并且CDR3(SEQ ID NO:3)被标记为‘CDR-H3’。顶行提供了每个多肽残基的Kabat编号(具有‘H’前缀),中间行提供多肽残基并且底行提供每个多肽残基的序列编号。

[0182]

H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20
D	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	Q	V	Q	P	G	G	S	L	S	L
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

										CDR-H1									
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40
S	C	E	S	S	V	S	I	W	S	F	K	V	M	G	W	F	R	Q	V
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40

									CDR-H2										
H41	H42	H43	H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60
P	G	K	Q	R	E	L	V	A	T	I	T	T	G	G	S	P	D	Y	S
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60

CDR-H2																			
H61	H62	H63	H64	H65	H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80
D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	Y	D	K	R	T	L	Y	L
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80

[0183]

																	CDR-H3		
H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83	H84	H85	H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97
Q	M	N	S	L	K	P	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	G	R	L	W
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

CDR-H3														
H98	H99	H100	H100A	H100B	H100C	H100D	H100E	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H107
A	H	I	T	S	S	G	H	D	V	W	G	Q	G	T
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115

H108	H109	H110	H111	H112	H113
Q	V	T	V	S	S
116	117	118	119	120	121

[0184] ID-L253T和相关多肽的CDR

[0185] 合适地,本发明的多肽的CDR1包含与SEQ ID NO:1共享80%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0186] 可替代地,本发明的多肽的CDR1包含具有与SEQ ID NO:1相比不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR1包含具有与SEQ ID NO:1相比不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR1包含具有与SEQ ID NO:1相比不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0187] 合适地,CDR1的与其在SEQ ID NO:1中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。合适地,CDR1包含SEQ ID NO:1或更合适地由其组成。

[0188] 合适地,本发明的多肽的CDR2包含与SEQ ID NO:2共享55%或更大、更合适地60%

或更大、更合适地70％或更大、更合适地75％或更大、更合适地80％或更大、更合适地85％或更大、更合适地90％或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0189] 可替代地,本发明的多肽的CDR2包含具有与SEQ ID NO:2相比不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR2包含具有与SEQ ID NO:2相比不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR2包含具有与SEQ ID NO:2相比不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0190] 合适地,CDR2的与其在SEQ ID NO:2中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0191] 合适地,CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号9的残基是D或H。合适地,CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号10的残基是Y或D。合适地,CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号11的残基是S、G、R或A(更合适地S、R或A,更合适地S或A)。合适地,CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号14的残基是V或A。

[0192] 合适地,CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号9的残基是D或H;CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号10的残基是Y或D;CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号11的残基是S、G、R或A(更合适地S、R或A,更合适地S或A)并且CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号14的残基是V或A。

[0193] 合适地,CDR2包含SEQ ID NO:2或更合适地由其组成。

[0194] 合适地,本发明的多肽的CDR3包含与SEQ ID NO:3共享60％或更大、更合适地65％或更大、更合适地75％或更大、更合适地80％或更大、更合适地90％或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0195] 可替代地,本发明的多肽的CDR3包含具有与SEQ ID NO:3相比不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR3包含具有与SEQ ID NO:3相比不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR3包含具有与SEQ ID NO:3相比不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。合适地,相对于其在SEQ ID NO:3中的对应残基,任何取代是保守的。

[0196] 合适地,CDR3的与其在SEQ ID NO:3中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0197] 合适地,CDR3的对应于SEQ ID NO:3的残基编号6的残基是I或L。

[0198] 合适地,(a)CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号9的残基是D或H;CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号10的残基是Y或D;CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号11的残基是S、G、R或A(更合适地S、R或A,更合适地S或A)并且CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号14的残基是V或A,并且

[0199] (b)CDR3的对应于SEQ ID NO:3的残基编号6的残基是I或L。

[0200] ID-L253T和相关多肽的FR

[0201] 合适地,本发明的多肽的FR1包含与SEQ ID NO:4共享5%、12%、18%、26%、32%、38%、46%、52%、58%、62%、66%、68%、72%、75%、78%、82%、85%、90%、95%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0202] 可替代地,本发明的多肽的FR1包含具有与SEQ ID NO:4相比不超过28个、更合适地不超过26个、更合适地不超过24个、更合适地不超过22个、更合适地不超过20个、更合适地不超过18个、更合适地不超过16个、更合适地不超过14个、更合适地不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR1包含具有与SEQ ID NO:4相比不超过28个、更合适地不超过26个、更合适地不超过24个、更合适地不超过22个、更合适地不超过20个、更合适地不超过18个、更合适地不超过16个、更合适地不超过14个、更合适地不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR1包含具有与SEQ ID NO:4相比不超过28个、更合适地不超过26个、更合适地不超过24个、更合适地不超过22个、更合适地不超过20个、更合适地不超过18个、更合适地不超过16个、更合适地不超过14个、更合适地不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0203] 合适地,FR1的与其在SEQ ID NO:4中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0204] 合适地,FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号1的残基是D或E。合适地,FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号11的残基是Q或L。合适地,FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号19的残基是S或R。合适地,FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号23的残基是E或A。合适地,FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号24的残基是S或A。

[0205] 合适地,FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号1的残基是D或E;FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号11的残基是Q或L;FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号19的残基是S或R;FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号23的残基是E或A并且FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号24的残基是S或A。

[0206] 合适地,FR1包含SEQ ID NO:4或更合适地由其组成。

[0207] 合适地,本发明的多肽的FR2包含与SEQ ID NO:5共享10%、15%、25%、30%、40%、45%、55%、60%、70%、75%、85%、90%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0208] 可替代地,本发明的多肽的FR2包含具有与SEQ ID NO:5相比不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地

不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR2包含具有与SEQ ID NO:5相比不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR2包含具有与SEQ ID NO:5相比不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0209] 合适地,FR2的与其在SEQ ID NO:5中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0210] 合适地,FR2的对应于SEQ ID NO:5的残基编号2的残基是F或Y。合适地,FR2的对应于SEQ ID NO:5的残基编号5的残基是V或A。合适地,FR2的对应于SEQ ID NO:5的残基编号8的残基是K或H。合适地,FR2的对应于SEQ ID NO:5的残基编号9的残基是Q或E。合适地,FR2的对应于SEQ ID NO:5的残基编号10的残基是R或L。合适地,FR2的对应于SEQ ID NO:5的残基编号12的残基是L或F。

[0211] 合适地,FR2的对应于SEQ ID NO:5的残基编号2的残基是F或Y;FR2的对应于SEQ ID NO:5的残基编号5的残基是V或A;FR2的对应于SEQ ID NO:5的残基编号8的残基是K或H;FR2的对应于SEQ ID NO:5的残基编号9的残基是Q或E;FR2的对应于SEQ ID NO:5的残基编号10的残基是R或L并且FR2的对应于SEQ ID NO:5的残基编号12的残基是L或F。

[0212] 合适地,本发明的多肽的FR3包含与SEQ ID NO:6共享8%、15%、20%、26%、32%、40%、45%、52%、58%、65%、70%、76%、80%、82%、90%、85%、92%、95%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0213] 可替代地,本发明的多肽的FR3包含具有与SEQ ID NO:6相比不超过29个、更合适地不超过27个、更合适地不超过25个、更合适地不超过23个、更合适地不超过21个、更合适地不超过19个、更合适地不超过17个、更合适地不超过15个、更合适地不超过13个、更合适地不超过11个、更合适地不超过9个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR3包含具有与SEQ ID NO:6相比不超过29个、更合适地不超过27个、更合适地不超过25个、更合适地不超过23个、更合适地不超过21个、更合适地不超过19个、更合适地不超过17个、更合适地不超过15个、更合适地不超过13个、更合适地不超过11个、更合适地不超过9个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR3包含具有与SEQ ID NO:6相比不超过29个、更合适地不超过27个、更合适地不超过25个、更合适地不超过23个、更合适地不超过21个、更合适地不超过19个、更合适地不超过17个、更合适地不超过15个、更合适地不超过13个、更合适地不超过11个、更合适地不超过9个、更

合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0214] 合适地,FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号4的残基是I、L或M(更合适地I或M)。合适地,FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号13的残基是L或V。合适地,FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号14的残基是Y或F。合适地,FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号16的残基是Q或E。合适地,FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号18的残基是N或D。合适地,FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号20的残基是L或V。合适地,FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号22的残基是P或S。合适地,FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号25的残基是T或A。合适地,FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号27的残基是V或R。合适地,FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号31的残基是A或N。

[0215] 合适地,FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号4的残基是I、L或M(更合适地I或M);FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号13的残基是L或V;FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号14的残基是Y或F;FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号16的残基是Q或E;FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号18的残基是N或D;FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号20的残基是L或V;FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号22的残基是P或S;FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号25的残基是T或A;FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号27的残基是V或R并且FR3的对应于SEQ ID NO:6的残基编号31的残基是A或N。

[0216] 合适地,FR3的与其在SEQ ID NO:6中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。合适地,FR3包含SEQ ID NO:6或更合适地由其组成。

[0217] 合适地,本发明的多肽的FR4包含与SEQ ID NO:7共享5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0218] 可替代地,本发明的多肽的FR4包含具有与SEQ ID NO:7相比不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR4包含具有与SEQ ID NO:7相比不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR4包含具有与SEQ ID NO:7相比不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0219] 合适地,FR4的与其在SEQ ID NO:7中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。合适地,FR4包含SEQ ID NO:7或更合适地由其组成。

[0220] 合适地,FR4的对应于SEQ ID NO:7的残基编号6的残基是Q或R。

[0221] ID-L253T和相关多肽的全长序列

[0222] 合适地,本发明的多肽包含与SEQ ID NO:8共享50%或更大、更合适地55%或更大、更合适地60%或更大、更合适地65%或更大、更合适地70%或更大、更合适地75%或更大、更合适地80%或更大、更合适地85%或更大、更合适地90%或更大、更合适地95%或更大、更合适地96%或更大、更合适地97%或更大、更合适地98%或更大、更合适地99%或更

大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0223] 可替代地,本发明的多肽包含具有与SEQ ID NO:8相比不超过20个、更合适地不超过15个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽包含具有与SEQ ID NO:8相比不超过20个、更合适地不超过15个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽包含具有与SEQ ID NO:8相比不超过20个、更合适地不超过15个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0224] 合适地,多肽的N末端是D。合适地,多肽包含SEQ ID NO:8或更合适地由其组成。

[0225] 10E2和相关多肽

[0226] 10E2和相关多肽的CDR

[0227] 合适地,本发明的多肽的CDR1包含与SEQ ID NO:14共享80%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0228] 可替代地,本发明的多肽的CDR1包含具有与SEQ ID NO:14相比不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR1包含具有与SEQ ID NO:14相比不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR1包含具有与SEQ ID NO:14相比不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0229] 合适地,CDR1的与其在SEQ ID NO:14中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。合适地,CDR1包含SEQ ID NO:14或更合适地由其组成。

[0230] 合适地,本发明的多肽的CDR2包含与SEQ ID NO:15共享55%或更大、更合适地60%或更大、更合适地70%或更大、更合适地75%或更大、更合适地80%或更大、更合适地85%或更大、更合适地90%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0231] 可替代地,本发明的多肽的CDR2包含具有与SEQ ID NO:15相比不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR2包含具有与SEQ ID NO:15相比不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR2包含具有与SEQ ID NO:15相比不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0232] 合适地,CDR2的与其在SEQ ID NO:15中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0233] 合适地,CDR2包含SEQ ID NO:15或更合适地由其组成。

[0234] 合适地,本发明的多肽的CDR3包含与SEQ ID NO:16共享60%或更大、更合适地65%或更大、更合适地75%或更大、更合适地80%或更大、更合适地90%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0235] 可替代地,本发明的多肽的CDR3包含具有与SEQ ID NO:16相比不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR3包含具有与SEQ ID NO:16相比不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR3包含具有与SEQ ID NO:16相比不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。合适地,相对于其在SEQ ID NO:16中的对应残基,任何取代是保守的。

[0236] 合适地,CDR3的与其在SEQ ID NO:16中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0237] 10E2和相关多肽的FR

[0238] 合适地,本发明的多肽的FR1包含与SEQ ID NO:17共享5%、12%、18%、26%、32%、38%、46%、52%、58%、62%、66%、68%、72%、75%、78%、82%、85%、90%、95%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0239] 可替代地,本发明的多肽的FR1包含具有与SEQ ID NO:17相比不超过28个、更合适地不超过26个、更合适地不超过24个、更合适地不超过22个、更合适地不超过20个、更合适地不超过18个、更合适地不超过16个、更合适地不超过14个、更合适地不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR1包含具有与SEQ ID NO:17相比不超过28个、更合适地不超过26个、更合适地不超过24个、更合适地不超过22个、更合适地不超过20个、更合适地不超过18个、更合适地不超过16个、更合适地不超过14个、更合适地不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR1包含具有与SEQ ID NO:17相比不超过28个、更合适地不超过26个、更合适地不超过24个、更合适地不超过22个、更合适地不超过20个、更合适地不超过18个、更合适地不超过16个、更合适地不超过14个、更合适地不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0240] 合适地,FR1的与其在SEQ ID NO:17中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0241] 合适地,FR1包含SEQ ID NO:17或更合适地由其组成。

[0242] 合适地,本发明的多肽的FR2包含与SEQ ID NO:18共享10%、15%、25%、30%、

40％、45％、55％、60％、70％、75％、85％、90％或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0243] 可替代地,本发明的多肽的FR2包含具有与SEQ ID NO:18相比不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR2包含具有与SEQ ID NO:18相比不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR2包含具有与SEQ ID NO:18相比不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0244] 合适地,FR2的与其在SEQ ID NO:18中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0245] 合适地,本发明的多肽的FR3包含与SEQ ID NO:19共享8％、15％、20％、26％、32％、40％、45％、52％、58％、65％、70％、76％、80％、82％、90％、85％、92％、95％或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0246] 可替代地,本发明的多肽的FR3包含具有与SEQ ID NO:19相比不超过29个、更合适地不超过27个、更合适地不超过25个、更合适地不超过23个、更合适地不超过21个、更合适地不超过19个、更合适地不超过17个、更合适地不超过15个、更合适地不超过13个、更合适地不超过11个、更合适地不超过9个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR3包含具有与SEQ ID NO:19相比不超过29个、更合适地不超过27个、更合适地不超过25个、更合适地不超过23个、更合适地不超过21个、更合适地不超过19个、更合适地不超过17个、更合适地不超过15个、更合适地不超过13个、更合适地不超过11个、更合适地不超过9个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR3包含具有与SEQ ID NO:19相比不超过29个、更合适地不超过27个、更合适地不超过25个、更合适地不超过23个、更合适地不超过21个、更合适地不超过19个、更合适地不超过17个、更合适地不超过15个、更合适地不超过13个、更合适地不超过11个、更合适地不超过9个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0247] 合适地,FR3的与其在SEQ ID NO:19中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。合适地,FR3包含SEQ ID NO:19或更合适地由其组成。

[0248] 合适地,本发明的多肽的FR4包含与SEQ ID NO:20共享5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0249] 可替代地,本发明的多肽的FR4包含具有与SEQ ID NO:20相比不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR4包含具有与SEQ ID NO:20相比不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR4包含具有与SEQ ID NO:20相比不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0250] 合适地,FR4的与其在SEQ ID NO:20中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。合适地,FR4包含SEQ ID NO:20或更合适地由其组成。

[0251] 10E2和相关多肽的全长序列

[0252] 合适地,本发明的多肽包含与SEQ ID NO:13共享50%或更大、更合适地55%或更大、更合适地60%或更大、更合适地65%或更大、更合适地70%或更大、更合适地75%或更大、更合适地80%或更大、更合适地85%或更大、更合适地90%或更大、更合适地95%或更大、更合适地96%或更大、更合适地97%或更大、更合适地98%或更大、更合适地99%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0253] 可替代地,本发明的多肽包含具有与SEQ ID NO:13相比不超过20个、更合适地不超过15个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽包含具有与SEQ ID NO:13相比不超过20个、更合适地不超过15个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽包含具有与SEQ ID NO:13相比不超过20个、更合适地不超过15个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0254] 合适地,多肽的N末端是D。合适地,多肽包含SEQ ID NO:13或更合适地由其组成。

[0255] 10G10和相关多肽

[0256] 10G10和相关多肽的CDR

[0257] 合适地,本发明的多肽的CDR1包含与SEQ ID NO:22共享80%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成

[0258] 可替代地,本发明的多肽的CDR1包含具有与SEQ ID NO:22相比不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR1包含具有与

SEQ ID NO:22相比不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR1包含具有与SEQ ID NO:22相比不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0259] 合适地,CDR1的与其在SEQ ID NO:22中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。合适地,CDR1包含SEQ ID NO:22或更合适地由其组成。

[0260] 合适地,本发明的多肽的CDR2包含与SEQ ID NO:23共享55%或更大、更合适地60%或更大、更合适地70%或更大、更合适地75%或更大、更合适地80%或更大、更合适地85%或更大、更合适地90%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0261] 可替代地,本发明的多肽的CDR2包含具有与SEQ ID NO:23相比不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR2包含具有与SEQ ID NO:23相比不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR2包含具有与SEQ ID NO:23相比不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0262] 合适地,CDR2的与其在SEQ ID NO:23中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0263] 合适地,CDR2包含SEQ ID NO:23或更合适地由其组成。

[0264] 合适地,本发明的多肽的CDR3包含与SEQ ID NO:24共享60%或更大、更合适地65%或更大、更合适地75%或更大、更合适地80%或更大、更合适地90%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0265] 可替代地,本发明的多肽的CDR3包含具有与SEQ ID NO:24相比不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR3包含具有与SEQ ID NO:24相比不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的CDR3包含具有与SEQ ID NO:24相比不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。合适地,相对于其在SEQ ID NO:24中的对应残基,任何取代是保守的。

[0266] 合适地,CDR3的与其在SEQ ID NO:24中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0267] 10G10和相关多肽的FR

[0268] 合适地,本发明的多肽的FR1包含与SEQ ID NO:25共享5%、12%、18%、26%、32%、38%、46%、52%、58%、62%、66%、68%、72%、75%、78%、82%、85%、90%、95%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0269] 可替代地,本发明的多肽的FR1包含具有与SEQ ID NO:25相比不超过28个、更合适地不超过26个、更合适地不超过24个、更合适地不超过22个、更合适地不超过20个、更合适地不超过18个、更合适地不超过16个、更合适地不超过14个、更合适地不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地

不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR1包含具有与SEQ ID NO:25相比不超过28个、更合适地不超过26个、更合适地不超过24个、更合适地不超过22个、更合适地不超过20个、更合适地不超过18个、更合适地不超过16个、更合适地不超过14个、更合适地不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR1包含具有与SEQ ID NO:25相比不超过28个、更合适地不超过26个、更合适地不超过24个、更合适地不超过22个、更合适地不超过20个、更合适地不超过18个、更合适地不超过16个、更合适地不超过14个、更合适地不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0270] 合适地,FR1的与其在SEQ ID NO:25中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0271] 合适地,FR1包含SEQ ID NO:25或更合适地由其组成。

[0272] 合适地,本发明的多肽的FR2包含与SEQ ID NO:26共享10%、15%、25%、30%、40%、45%、55%、60%、70%、75%、85%、90%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0273] 可替代地,本发明的多肽的FR2包含具有与SEQ ID NO:26相比不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR2包含具有与SEQ ID NO:26相比不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR2包含具有与SEQ ID NO:26相比不超过13个、更合适地不超过12个、更合适地不超过11个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0274] 合适地,FR2的与其在SEQ ID NO:26中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0275] 合适地,本发明的多肽的FR3包含与SEQ ID NO:27共享8%、15%、20%、26%、32%、40%、45%、52%、58%、65%、70%、76%、80%、82%、90%、85%、92%、95%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0276] 可替代地,本发明的多肽的FR3包含具有与SEQ ID NO:27相比不超过29个、更合适地不超过27个、更合适地不超过25个、更合适地不超过23个、更合适地不超过21个、更合适地不超过19个、更合适地不超过17个、更合适地不超过15个、更合适地不超过13个、更合适地不超过11个、更合适地不超过9个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR3包含具有与SEQ ID NO:27相比不超过29个、更合适地不超过27个、更合适地不超过25个、更合适地不超过23个、更合适地不超过21个、更合适地不超过19个、更合适地不超过17个、更合适地不超过15个、更合适地不超过13个、更合适地不超过11个、更合适地不超过9个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR3包含具有与SEQ ID NO:27相比不超过29个、更合适地不超过27个、更合适地不超过25个、更合适地不超过23个、更合适地不超过21个、更合适地不超过19个、更合适地不超过17个、更合适地不超过15个、更合适地不超过13个、更合适地不超过11个、更合适地不超过9个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0277] 合适地,FR3的与其在SEQ ID NO:27中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。合适地,FR3包含SEQ ID NO:27或更合适地由其组成。

[0278] 合适地,本发明的多肽的FR4包含与SEQ ID NO:28共享5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0279] 可替代地,本发明的多肽的FR4包含具有与SEQ ID NO:28相比不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR4包含具有与SEQ ID NO:28相比不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽的FR4包含具有与SEQ ID NO:28相比不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0280] 合适地,FR4的与其在SEQ ID NO:28中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。合适地,FR4包含SEQ ID NO:28或更合适地由其组成。

[0281] 10G10和相关多肽的全长序列

[0282] 合适地,本发明的多肽包含与SEQ ID NO:21共享50%或更大、更合适地55%或更大、更合适地60%或更大、更合适地65%或更大、更合适地70%或更大、更合适地75%或更大、更合适地80%或更大、更合适地85%或更大、更合适地90%或更大、更合适地95%或更大、更合适地96%或更大、更合适地97%或更大、更合适地98%或更大、更合适地99%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0283] 可替代地,本发明的多肽包含具有与SEQ ID NO:21相比不超过20个、更合适地不超过15个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个添加的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽包含具有与SEQ ID NO:21相比不超过20个、更合适地不超过15个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个取代的序列或更合适地由其组成。合适地,本发明的多肽包含具有与SEQ ID NO:21相比不超过20个、更合适地不超过15个、更合适地不超过10个、更合适地不超过9个、更合适地不超过8个、更合适地不超过7个、更合适地不超过6个、更合适地不超过5个、更合适地不超过4个、更合适地不超过3个、更合适地不超过2个、更合适地不超过1个缺失的序列或更合适地由其组成。

[0284] 合适地,多肽的N末端是D。合适地,多肽包含SEQ ID NO:21或更合适地由其组成。

[0285] 与ID-L253T、10E2、10G10和相关多肽相关的另外的实施方案

[0286] 在一个实施方案中,提供了一种多肽,其包含结合至IL-23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),其中所述互补决定区(并且更合适地框架区)选自本文公开的互补决定区(和框架区)。

[0287] 在一个实施方案中,提供了一种多肽,其包含结合至IL-23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:

[0288] CDR1包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:22的序列;

[0289] CDR2包含选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:23的序列;

[0290] CDR3包含选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:24的序列。

[0291] 合适地,本文公开的多肽包含与SEQ ID No:8、11、12、13、21或29-45中的任一个共享70%或更大、更合适地80%或更大、更合适地90%或更大、更合适地95%或更大、更合适地98%或更大、更合适地99%或更大、更合适地99.5%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0292] 在一个实施方案中,提供了一种多肽,其包含与SEQ ID No:8、11、12、13、21或29-45中的任一个共享70%或更大、更合适地80%或更大、更合适地90%或更大、更合适地95%或更大、更合适地98%或更大、更合适地99%或更大、更合适地99.5%或更大序列同一性的序列或更合适地由其组成。

[0293] 接头和多聚体

[0294] 根据本发明的构建体包含多个多肽并且因此可以合适地是多价的。这种构建体可以包含至少两个根据本发明的相同多肽。由两个根据本发明的相同多肽组成的构建体是“同双头”。在本发明的一个方面,提供了一种构建体,其包含两个或更多个本发明的相同多肽。

[0295] 可替代地,构建体可以包含至少两个多肽,其是不同的但仍然均是根据本发明的多肽(“同双头”)。

[0296] 可替代地,这种构建体可以包含(a)至少一个根据本发明的多肽和(b)至少一个不是本发明的多肽的多肽诸如抗体或其抗原结合片段(也是“异双头”)。(b)的至少一个多肽可以结合IL-23(例如经由与(a)的表位不同的表位),或可替代地可以结合至除IL-23以外的靶。合适地,不同多肽(b)结合至例如:白细胞介素(诸如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和IL-18)、白细胞介素受体(诸如IL-6R和IL-7R)、转录因子(诸如NF-kB)、细胞因子(诸如TNF-α、IFN-γ、TGF-β和TSLP)、跨膜蛋白(诸如gp130和CD3)、表面糖蛋白(诸如CD4、CD20、CD40)、可溶性蛋白(诸如CD40L)、整联蛋白(诸如a4b7和AlphaEbeta7)、粘附分子(诸如MAdCAM)、趋化因子(诸如IP10和CCL20)、趋化因子受体(诸如CCR2和CCR9)、抑制性蛋白(诸如SMAD7)、激酶(诸如JAK3)、G蛋白偶联受体(诸如鞘氨醇-1-P受体)、人病理过程中涉及的其他炎性介质或免疫相关配体。因此,不同多肽(b)结合至例如IL-6R、IL-6、IL-12、IL-1-β、IL-17A、TNF-α或CD3;或人病理过程中涉及的其他炎性介质或免疫相关配体。最合适地,不同多肽(b)结合至TNF-α,更合适地,不同多肽(b)结合至ID-38F。

[0297] 构建体可以是多价的和/或多特异性的。多价构建体(诸如二价构建体)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个或多个抗原的连接的位点。多价构建体的实例可以是同双头或异双头。多价构建体(诸如双特异性构建体)包含两个或更多个不同的结合多肽,其呈现两个或更多个(a)可以发生与两个或更多个不同抗原的连接或(b)可以发生与同一抗原上两个或更多个不同表位的连接的位点。多特异性构建体的实例可以是异双头。多特异性构建体是多价的。

[0298] 合适地,构建体内包含的多肽是抗体片段。更合适地,构建体内包含的多肽选自VHH、VH、VL、V-NAR、scFv、Fab片段或F(ab′)2片段。更合适地,构建体内包含的多肽是VH或VHH,最合适地是VHH。

[0299] 本发明的多肽可以彼此直接(即,不使用接头)或经由接头连接。合适地,接头是蛋白酶不稳定接头(‘不稳定接头’)或非蛋白酶不稳定接头。接头合适地是多肽并且被选择来以便允许多肽与其表位的结合。如果用于治疗性目的,则接头合适地在多肽所施用于的受试者中是非免疫原性的。

[0300] 合适地,蛋白酶不稳定接头具有下式:

[0301] $[-(G_aS)_x-B-(G_bS)_y-]_z$

[0302] 其中

[0303] a是1至10;

[0304] b是1至10;

[0305] x是1至10;

[0306] y是1至10;

[0307] z是1至10并且

[0308] B是K或R(SEQ ID NO:74)。

[0309] 并且更合适地:

[0310] $[-(G_4S)_x-B-(G_4S)_y-]_z$

[0311] 其中

[0312] x是1至10;

[0313] y是1至10

[0314] z是1至10并且

[0315] B是K或R。

[0316] 更合适地,a是2至5,b是2至5,x是1至3,y是1至3,z是1并且B是K。

[0317] 更合适地,蛋白酶不稳定接头具有式-$(G_4S)_2$-K-$(G_4S)_2$-(SEQ ID NO:75)。

[0318] 合适地,多肽全部通过非蛋白酶不稳定接头连接。合适地,非蛋白酶不稳定接头具有式$(G_4S)_x$,其中x是1至10(SEQ ID NO:76)。最合适地,x是6(SEQ ID NO:77)。

[0319] 因此,提供了一种构建体,其包含至少一个根据本发明的多肽和至少一个不同的多肽,其中所述不同的多肽结合至TNF-α。合适地,结合至TNF-α的多肽是ID-38F或其变体,诸如与ID-38F(SEQ ID NO:67)共享至少70%序列同一性、诸如至少80%序列同一性、诸如至少90%序列同一性、诸如至少95%序列同一性、诸如至少99%序列同一性的多肽。更合适地,结合至TNF-α的多肽是ID-38F。在一个实施方案中,此构建体包含非蛋白酶不稳定接头,诸如$(G_4S)_6$。可替代地,此构建体包含蛋白酶不稳定接头,诸如-$(G_4S)_2$-K-$(G_4S)_2$-。合适地,此构建体与FA1K(SEQ ID NO:46)共享至少80%、诸如至少90%、诸如至少95%序列同一性。

[0320] 在其中构建体包含非蛋白酶不稳定接头的实施方案中,则合适地,构建体整体上(即,结合多肽(其可以是免疫球蛋白链可变结构域)和非蛋白酶不稳定接头)基本上耐受蛋白酶诸如胰蛋白酶和糜蛋白酶。在其中构建体包含蛋白酶不稳定接头的实施方案中,则合适地,多肽(即,结合多肽,其可以是免疫球蛋白链可变结构域)基本上耐受蛋白酶诸如胰蛋白酶和糜蛋白酶,但是蛋白酶不稳定接头易受蛋白酶诸如胰蛋白酶和糜蛋白酶的影响。

[0321] 载体和宿主

[0322] 如本文所用,术语“载体”意图是指能够转运其所连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,所述质粒是指可以将另外的DNA区段连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中另外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们被引入到其中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游离型哺乳动物和酵母载体)。其他载体(例如,非游离型哺乳动物载体)可以在引入到宿主细胞中之后整合到宿主细胞的基因组中,并且因此与宿主基因组一起复制。另外,某些载体能够指导与其可操作连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简单地“表达载体”)。通常,在重组DNA技术中有用的表达载体通常呈质粒的形式。在本发明说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常使用的载体形式。然而,本发明旨在包括此类其他形式的表达载体,诸如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),它们具有相同的功能,以及还有噬菌体和噬菌粒系统。本发明还涉及核苷酸序列,其编码多肽序列或多价和/或多特异性构建体。如本文所用,术语“重组宿主细胞”(或简单地“宿主细胞”)意图是指已经将重组表达载体引入其中的细胞。此类术语不仅意图是指特定的受试者细胞,而且是指这种细胞的子代。

[0323] 在本发明的一个方面,提供了一种载体,其包含编码本发明的多肽或构建体的多核苷酸或包含所述多核苷酸的cDNA。在本发明的另一个方面,提供了一种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。合适地,宿主细胞是细菌,诸如大肠杆菌,属于曲霉属、酵母属、克鲁维酵母属、汉森酵母属或毕赤酵母属的酵母诸如酿酒酵母或毕赤酵母。

[0324] 稳定性

[0325] 合适地,本发明的多肽或构建体在口服递送时并且在暴露于肠道之后(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)保留中和能力和/或功效。此类蛋白酶包括肠肽酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶和肠易激病炎性蛋白酶(诸如MMP3、MMP12和组织蛋白酶)。小肠和/或大肠的蛋白酶或在小肠和/或大肠中产生的蛋白酶包括来源于肠道共生微生物菌群和/或病原菌的蛋白酶,例如其中蛋白酶是细胞膜附接的蛋白酶、排泄的蛋白酶和细胞裂解释放的蛋白酶)。最合适地,蛋白酶是胰蛋白酶和糜蛋白酶。

[0326] 合适地,肠道是狗、猪、人、食蟹猴或小鼠的肠道。更合适地,肠道是人、食蟹猴或小鼠,更合适地小鼠或人,最合适地人的肠道。小肠合适地由十二指肠、空肠和回肠组成。大肠合适地由盲肠、结肠、直肠和肛管组成。与胃肠道相反,肠道仅由小肠和大肠组成。

[0327] 在暴露于小肠和/或大肠中存在的蛋白酶和/或IBD炎性蛋白酶之后,当本发明的多肽或构建体的原始中和能力的合适地10%或更多、更合适地20%或更多、更合适地30%或更多、更合适地40%或更多、更合适地50%或更多、更合适地60%或更多、更合适地70%或更多、更合适地80%或更多、更合适地90%或更多、更合适地95%或更多、或最合适地100%被保留时,本发明的多肽或构建体基本上保留中和能力。

[0328] 合适地,在37℃下暴露于小肠和/或大肠中存在的蛋白酶和/或IBD炎性蛋白酶例如至少1小时、更合适地至少2小时、更合适地至少3小时、更合适地至少4小时、更合适地至少7小时、更合适地至少16小时之后,本发明的多肽或构建体基本上保留中和能力。

[0329] '基本上保留中和能力'合适地意指本发明的多肽或构建体保留本发明的多肽或构建体的中和能力的10%或更多、更合适地20%或更多、更合适地30%或更多、更合适地40%或更多、更合适地50%或更多、更合适地60%或更多、更合适地70%或更多、更合适地80%或更多、更合适地90%或更多。

[0330] 在暴露于肠道的条件、更合适地小肠或大肠、更合适地人粪便提取物4小时之后,本发明的多肽或构建体的中和能力的合适地10%或更多、更合适地20%或更多、更合适地30%或更多、更合适地40%或更多、更合适地50%或更多、更合适地60%或更多、更合适地70%或更多被保留。

[0331] 在暴露于肠道的条件、更合适地小肠或大肠、更合适地人粪便提取物7小时之后,本发明的多肽或构建体的中和能力的合适地10%或更多、更合适地20%或更多、更合适地30%或更多、更合适地40%或更多、更合适地50%或更多、更合适地60%或更多、更合适地70%或更多被保留。

[0332] 在暴露于肠道的条件、更合适地小肠或大肠、更合适地人粪便提取物16小时之后,本发明的多肽或构建体的中和能力的合适地10%或更多、更合适地20%或更多、更合适地30%或更多、更合适地40%或更多、更合适地50%或更多、更合适地60%或更多、更合适地70%或更多被保留。

[0333] 在暴露于肠道的条件、更合适地小肠或大肠、更合适地小鼠小肠上清液1小时之后,本发明的多肽或构建体的中和能力的合适地10%或更多、更合适地20%或更多、更合适地30%或更多、更合适地40%或更多、更合适地50%或更多、更合适地60%或更多、更合适地70%或更多被保留。

[0334] 在暴露于肠道的条件、更合适地小肠或大肠、更合适地小鼠小肠上清液4小时之

后,本发明的多肽或构建体的中和能力的合适地10%或更多、更合适地20%或更多、更合适地30%或更多、更合适地40%或更多、更合适地50%或更多、更合适地60%或更多、更合适地70%或更多被保留。

[0335] 在暴露于肠道的条件1、2、3、4、5、6或7小时之后,本发明的多肽或构建体的施用剂量的合适地10%或更多、更合适地20%或更多、更合适地30%或更多、更合适地40%或更多、更合适地50%或更多、更合适地60%或更多、更合适地70%或更多保留针对IL-23的中和能力并且保持在小鼠、食蟹猴和/或人的粪便(合适地排泄粪便或从肠道取出的粪便)中。

[0336] 在暴露于小肠和/或大肠中存在的蛋白酶和/或IBD炎性蛋白酶之后,当本发明的多肽或构建体的施用量的合适地10%或更多、更合适地20%或更多、更合适地30%或更多、更合适地40%或更多、更合适地50%或更多、更合适地60%或更多、更合适地70%或更多、更合适地80%或更多、更合适地90%或更多、更合适地95%或更多、更合适地99%或更多、最合适地100%保持完整时,本发明的多肽或本发明的构建体基本上保持完整。

[0337] 治疗用途和递送

[0338] 本发明的多肽、药物组合物或构建体的治疗有效量是在单一或多个剂量施用于受试者后有效地以显著程度中和受试者中的IL-23的量。治疗有效量可以根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及多肽、药物组合物或构建体在个体中引发所需应答的能力的因素而变化。治疗有效量也是治疗有益效果超过本发明的多肽、药物组合物或构建体的任何毒性或有害作用的量。本发明的多肽或构建体可以并入到适用于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呈药学上可接受的盐的形式。

[0339] 本发明的药物组合物可以合适地配制成用于口服、肌内、皮下或静脉内递送。本发明的药物组合物可以呈各种形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型,诸如液体溶液(例如,可注射和可输注溶液)、分散体或悬浮剂、片剂、丸剂、粉剂、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并入有赋形剂,并且以可摄入的片剂、口含片、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮剂、糖浆、晶片等形式使用。

[0340] 通常,药物组合物包含本发明的多肽或构建体和药学上可接受的稀释剂或载剂。药学上可接受的载剂的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合中的一种或多种。药学上可接受的载剂还可以包含少量增强本发明的多肽或构建体的存放期或有效性的辅助物质,诸如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂。药物组合物可以包含抗粘剂、粘合剂、涂层、崩解剂、风味剂、着色剂、润滑剂、吸附剂、防腐剂、甜味剂、冻干赋形剂(包括冻干保护剂)或压缩助剂。

[0341] 最合适地,本发明的多肽、药物组合物或构建体口服施用。口服递送的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其的肠道的区域。阻止本发明的多肽、药物组合物或构建体到达需要其的肠道的区域的因素包括消化分泌物中存在蛋白酶,其可以降解本发明的多肽、药物组合物或构建体。合适地,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特性在此类蛋白酶中的一种或多种的存在下基本上是稳定的。合适地,本发明的多肽或构建体在并入到药物组合物中之前是冻干的。

[0342] 本发明的多肽也可以提供有肠溶包衣。肠溶包衣是施加在口服药品上的聚合物阻隔物,其帮助防止多肽受胃的低pH的影响。用于肠溶包衣的材料包括脂肪酸、蜡、虫胶、塑料和植物纤维。合适的肠溶包衣组分包括丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物、醋酸琥珀酸酯纤维

素、邻苯二甲酸羟丙基甲基酯纤维素、醋酸羟丙基甲基琥珀酸酯纤维素(醋酸琥珀羟丙甲纤维素)、聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯(PVAP)、甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物、海藻酸钠和硬脂酸。合适的肠溶包衣包括pH依赖性释放聚合物。这些是在胃中存在的高酸性pH下不可溶但是在较低酸性pH下快速溶解的聚合物。因此,合适地,肠溶包衣在胃的酸性胃液(pH~3)中不溶解,但是在小肠中(pH高于6)或在结肠中(pH高于7.0)存在的较高pH环境中溶解。pH依赖性释放聚合物被选择成使得本发明的多肽或构建体大约在剂量到达小肠的时间被释放。

[0343] 本发明的多肽、构建体或药物组合物可以被配制成用于通过将它们溶解、悬浮或乳化在水性或非水性溶剂,诸如植物油或其他类似的油、脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸的酯或丙二醇中进行注射的制剂;并且如果需要的话,具有常规添加剂,诸如增溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。可接受的载剂、赋形剂和/或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对于接受者是无毒的,并且包括缓冲液,诸如磷酸、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、蛋氨酸和柠檬酸;防腐剂(诸如乙醇、苄醇、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,诸如精氨酸、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、蛋氨酸、丝氨酸、脯氨酸及其组合;单糖、二塘和其他碳水化合物;低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如明胶或血清白蛋白;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如海藻糖、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、半乳糖、果糖、山梨糖、棉子糖、氨基葡萄糖、N-甲基氨基葡萄糖、半乳糖胺和神经氨酸;和/或非离子表面活性剂,诸如聚山梨醇酯、POE醚、泊洛沙姆、Triton-X或聚乙二醇。

[0344] 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诸如银屑病或湿疹)。这种药物组合物可以合适地呈霜剂、软膏、洗液、凝胶、泡沫、经皮贴剂、粉剂、膏体或酊剂的形式,并且可以合适地包括维生素D3类似物(例如,钙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倍他索)、维甲酸(例如,他扎罗汀)、煤焦油和地蒽酚。局部药剂经常彼此组合(例如,维生素D3和类固醇)或与其他药剂诸如水杨酸组合使用。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,合适地,被认为有效治疗银屑病或湿疹的另一种物质可以包含在组合物中,诸如类固醇,尤其是第4类或第5类类固醇诸如氢化可的松(例如,1%氢化可的松霜剂);环孢菌素或类似的大环内酯类剂或维甲酸。

[0345] 对于所有的递送模式,本发明的多肽、药物组合物或构建体可以在缓冲液中配制,以便在5-50g/l之间、或更合适地15-40g/l之间或更合适地25-30g/l之间的浓度下使组合物的pH稳定。合适的缓冲液组分的实例包括生理盐,诸如柠檬酸钠和/或柠檬酸。合适地,缓冲液含有100-200mM、更合适地125-175mM的生理盐,诸如氯化钠。合适地,缓冲液被选择成具有接近组合物的pH或患者的生理pH的pKa。

[0346] 药物组合物中的示例性多肽或构建体浓度的范围可以是约1mg/mL至约200mg/ml、或约50mg/mL至约200mg/mL、或约150mg/mL至约200mg/mL。

[0347] 本发明的多肽、构建体或药物组合物的水性配制品可以在pH缓冲溶液中,例如在范围是约4.0至约7.0、或约5.0至约6.0、或可替代地约5.5的pH下制备。合适的缓冲液的实例包括磷酸、组氨酸、柠檬酸、琥珀酸、醋酸缓冲液和其他有机酸缓冲液。根据例如缓冲液和

配制品的所需张力,缓冲液浓度可以是约1mM至约100mM、或约5mM至约50mM。

[0348] 药物组合物的张力可以通过包含张力调节剂来改变。此类张力调节剂可以带电的或不带电的化学物质。典型的不带电的张力调节剂包括糖或糖醇或其他多元醇,优选地海藻糖、蔗糖、甘露醇、甘油、1,2-丙二醇、棉子糖、山梨醇或乳糖醇(尤其是海藻糖、甘露醇、甘油或1,2-丙二醇)。典型的带电的张力调节剂包括盐,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、醋酸盐或马来酸盐离子的组合(尤其是氯化钠或硫酸钠);或氨基酸诸如精氨酸或组氨酸。合适地,水性配制品是等渗,虽然高渗或低渗溶液可以是合适的。术语"等渗"代表具有与它所比较的某一其他溶液相同的张力的溶液,诸如生理盐溶液或血清。张力剂可以约5mM至约350mM的量,例如以1mM至500nM的量使用。合适地,至少一种等渗剂包含在组合物中。

[0349] 表面活性剂也可以添加到药物组合物中,以减少配制的多肽或构建体的聚集和/或使配制品中颗粒的形成最小化和/或减少吸附。示例性表面活性剂包括聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯(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(Poloxamer),普朗尼克(Pluronic))和十二烷基硫酸钠(SDS)。合适的聚氧乙烯山梨醇-脂肪酸酯的实例是聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80。表面活性剂的示例性浓度的范围是约0.001%至约10%w/v。

[0350] 还可以添加冻干保护剂,以便保护本发明的多肽或构建体在冷冻过程期间免受去稳定化条件的影响。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);以及氨基酸(包括丙氨酸、甘氨酸和谷氨酸)。可以包含约10mM至500mM的量的冻干保护剂。

[0351] 用于施用本发明的多肽、本发明的药物组合物或构建体的剂量范围是产生所需治疗效果的那些剂量范围。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、施用途径、配制品的性质、患者的年龄、患者状况的性质、程度或严重性、禁忌症(如果有的话)以及主治医师的判断。这些剂量水平的变化可以使用标准经验惯例来调节以进行优化。

[0352] 合适地,本发明的多肽、本发明的药物组合物或构建体的每日剂量的范围是50ng-50mg/kg,诸如50ug-40mg/kg,诸如5-30mg/kg。单位剂量可以从小于100mg变化,但是通常在250-2000mg/剂量的区域内,其可以每日施用或更频繁地施用,例如2、3或4次/天或更不频繁地施用,例如每两天一次或每周一次、每两周一次或每月一次。

[0353] 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造用于治疗自身免疫疾病的药剂中的用途。在本发明的另一个方面,提供了一种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。

[0354] 词语'治疗'旨在包括预防以及治疗性治疗。疾病的治疗还包括治疗恶化并且还包括治疗从疾病症状缓解的患者以防止疾病症状复发。

[0355] 组合疗法

[0356] 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)。在本发明的范围内的是,在用于治疗自身免疫疾病的治疗性方法中使用本发明的药物组合物作为治疗自身免疫疾病中通常使用的其他建立疗法的附加或与其结合使用。

[0357] 对于IBD(诸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包括以下的列表中的一种或多种活性剂的组合:5-氨基水杨酸或其前药(诸如柳氮磺胺吡啶、奥柳氮或bisalazide);皮质类固醇(例如,泼尼松龙、甲基泼尼松龙或布地奈德);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-α抗体(例如,英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗或戈利木单抗);抗IL12/IL23抗体(例如,乌司奴单抗);抗IL6R抗体或小分子IL12/IL23抑制剂(例如,阿吡莫德);抗α-4-β-7抗体(例如,维多珠单抗);MAdCAM-1阻断剂(例如,PF-00547659);针对细胞粘附分子α-4-整联蛋白的抗体(例如,那他珠单抗);针对IL2受体α亚基的抗体(例如,达利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(例如,福坦替尼和R-406);磷酸二酯酶-4抑制剂(例如,替托司特(tetomilast));HMPL-004;益生菌;德沙拉秦(Dersalazine);塞马莫德/CPSI-2364;以及蛋白激酶C抑制剂(例如,AEB-071)。最合适的组合剂是英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗或戈利木单抗。

[0358] 因此,本发明的另一个方面提供了与一种或多种另外的活性剂,例如以上所述的一种或多种活性剂组合的本发明的药物组合物。

[0359] 在本发明的另一个方面,多肽、药物组合物或构建体与选自以上列表中的至少一种活性剂顺序、同时或单独施用。

[0360] 类似地,本发明的另一个方面提供了一种组合剂,其包含:

[0361] (A)本发明的多肽、药物组合物或构建体;和

[0362] (B)一种或多种其他活性剂,

[0363] 其中组分(A)和(B)中的每一种与药学上可接受的助剂、稀释剂或载剂混合配制。在本发明的此方面中,组合产物可以是单一(组合)配制品或成套试剂盒(kit-of-parts)。因此,本发明的此方面涵盖一种组合配制品,其包含与药学上可接受的助剂、稀释剂或载剂混合的本发明的多肽、药物组合物或构建体和另一种治疗剂。

[0364] 本发明还涵盖一种成套试剂盒,其包括以下组分:

[0365] (i)与药学上可接受的助剂、稀释剂或载剂混合的本发明的多肽、药物组合物或构建体;和

[0366] (ii)包含与药学上可接受的助剂、稀释剂或载剂混合的一种或多种其他活性剂的配制品,所述组分(i)和(ii)各自呈适于彼此组合施用的形式提供。

[0367] 因此,成套试剂盒的组分(i)是与药学上可接受的助剂、稀释剂或载剂混合的以上组分(A)。类似地,组分(ii)是与药学上可接受的助剂、稀释剂或载剂混合的以上组分(B)。一种或多种其他活性剂(即,以上组分(B))可以是以上结合自身免疫疾病诸如IBD(例如,克罗恩氏病和/或溃疡性结肠炎)的治疗提及的剂中的任一种。如果组分(B)是多于一种另外的活性剂,这些另外的活性剂可以彼此配制或与组分(A)配制或者它们可以单独配制。在一个实施方案中,组分(B)是一种其他治疗剂。在另一个实施方案中,组分(B)是两种其他治疗剂。本发明的此方面的组合产物(组合制剂或成套试剂盒)可以用于自身免疫疾病(例如,本文提及的自身免疫疾病)的治疗或预防。

[0368] 合适地,本发明的多肽、药物组合物或构建体用于用作药剂并且更合适地用于治疗自身免疫疾病和/或炎性疾病。

[0369] 自身免疫疾病和/或炎性疾病

[0370] 当免疫系统对正常身体组织有不良应答时,自身免疫疾病发生。自身免疫障碍可以导致对身体组织的损害、异常器官生长和/或器官功能的变化。所述障碍可以仅影响一个器官或组织类型或者可以影响多个器官和组织。通常被自身免疫障碍影响的器官和组织包括血液成分诸如红细胞、血管、结缔组织、内分泌腺诸如甲状腺或胰腺、肌肉、关节和皮肤。炎性疾病是特征在于炎症的疾病。许多炎性疾病是自身免疫疾病并且反之亦然。

[0371] GIT的自身免疫疾病和/或炎性疾病

[0372] 折磨儿童和成年人的慢性炎性肠病(IBD)克罗恩氏病和溃疡性结肠炎是GIT的自身免疫疾病和炎性疾病的实例(Hendrickson等人2002)。溃疡性结肠炎被定义为其中炎性应答和形态变化保持局限于结肠的病状。95%的患者中涉及直肠。炎症在很大程度上限于粘膜并且包括溃疡、水肿和出血的可变严重性以及结肠长度的连续损害(Hendrickson等人2002)。溃疡性结肠炎通常表现为存在粪便中混合血液和粘液以及较低的腹部绞痛,其在排便期间最严重。在临床上,腹泻存在血液和粘膜将溃疡性结肠炎与不存在血液的肠易激综合征区分开。与溃疡性结肠炎不同,克罗恩氏病的呈现通常较不明显,其导致晚期诊断。诸如损害的位置、程度和严重性的因素决定胃肠道症状的程度。具有回肠结肠损害的患者通常具有餐后腹痛以及右下腹压痛和偶发炎性肿块。与胃十二指肠克罗恩氏病相关联的症状包括早饱、恶心、呕吐、上腹部疼痛或吞咽困难。肛周疾病以及肛赘(anal tags)、深度肛裂和瘘是常见的(Hendrickson等人2002)。GIT的其他疾病包括例如炎性疾病粘膜炎(合适地,药物和辐射诱导的粘膜炎)。在粘膜炎中,病灶可以发生在口部至肛门的任何地方,并且对于口部和食管病灶,可以使用含有可变结构域的漱口水或霜制剂。对于肛门和直肠病灶,含有可变结构域的栓剂、霜剂或泡沫将适于局部施加。免疫球蛋白链可变结构域将经由在炎症位点处被吸附到血流中或经由淋巴清除并随后进入血流中来从固有层或其他炎性位点处清除。结构域因此经由血流到达肺并且经由肾中的肾小球滤过来清除。因此结构域在诸如自身免疫疾病、II型糖尿病和肾小球肾炎的疾病中发挥治疗作用存在良好的基本原理。

[0373] 合适地,本发明的多肽、药物组合物或构建体用于治疗其中IL-23促成这种疾病的病理学的GI(胃肠)道自身免疫疾病和/或炎性疾病。

[0374] 合适地,本发明的多肽、药物组合物或构建体用于治疗GI道的自身免疫疾病和/或炎性疾病,所述疾病选自克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、肠易激病、II型糖尿病、肾小球肾炎、自身免疫性肝炎、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、乳糜泻和药物或辐射诱导的粘膜炎(更合适地克罗恩氏病或溃疡性结肠炎,最合适地溃疡性结肠炎)。

[0375] 免疫球蛋白链可变结构域的口服递送将理想地治疗其中IL-23有助于病理学的至少一部分的炎性疾病,并且免疫球蛋白链可变结构域可以达到其中IL-23是生物活性的组织。

[0376] 皮肤的自身免疫疾病和/或炎性疾病

[0377] 银屑病是衰弱性的皮肤学自身免疫疾病。斑块状银屑病(最常见的疾病形式)的特征在于被银色鳞屑覆盖的红色皮肤。在组织学上,所述状况是具有炎性细胞浸润的银屑病斑块内角质细胞的分化紊乱和过度增殖中的一个(Ortonne,1999)。银屑病皮肤病灶是各种形状的炎性红色界限分明的斑块,具有特征性银色光泽鳞片。术语银屑病包括银屑病和包括红斑、皮肤增厚/隆起和鳞片的银屑病症状。

[0378] 用于治疗银屑病的生物剂包括抗TNF-α疗法(诸如针对TNF的单克隆抗体,例如阿

达木单抗和英夫利昔单抗,或TNF-α受体融合蛋白,诸如依那西普)、针对CD11a的人源化抗体(依法利珠单抗)或结合至CD2的剂诸如阿法西普(从而阻断CD2 LFA3相互作用)。应注意,并非所有的在此列出的生物剂已经被批准用于治疗银屑病。

[0379] 本发明的多肽可以并入霜剂/软膏或其他局部载剂中,以用于施用至其中IL-23有助于此类病灶的病理学的炎性皮肤病灶。

[0380] 合适地,本发明的多肽、药物组合物或构建体用于治疗皮肤的自身免疫疾病和/或炎性疾病,所述疾病选自天疱疮、银屑病、湿疹和硬皮病。

[0381] 合适地,多肽、药物组合物或构建体用于治疗其中IL-23是所观察到的病理学的一部分的原因的其他自身免疫疾病/炎性疾病。

[0382] 制备方法

[0383] 本发明的多肽可以使用例如Green和Sambrook 2012 Molecular Cloning:A Laboratory Manual第4版Cold Spring Harbour Laboratory Press中公开的技术来获得并操纵。

[0384] 单克隆抗体可以使用杂交瘤技术,通过将产生特异性抗体的B细胞与由于其在组织培养物中生长的能力并且不存在抗体链合成而被选择的骨髓瘤(B细胞癌)细胞融合来产生(Köhler和Milstein 1975和Nelson等人2000)。

[0385] 针对确定抗原的单克隆抗体可以例如通过以下获得:

[0386] a)将从先前用确定抗原免疫化的动物的外周血获得的淋巴细胞用永生细胞并且优选用骨髓瘤细胞永生化,以便形成杂交瘤,

[0387] b)培养形成的永生化细胞(杂交瘤)并且回收产生具有所需特异性的抗体的细胞。

[0388] 可替代地,不需要使用杂交瘤细胞。因此,单克隆抗体可以通过包括以下步骤的方法获得:

[0389] a)将从动物的淋巴细胞、尤其是外周血淋巴细胞(合适地,先前用确定抗原免疫化)获得的DNA或cDNA序列克隆到载体中,尤其是克隆到噬菌体并且更特别地丝状噬菌体中,

[0390] b)在允许产生抗体的条件下用以上载体转化原核细胞,

[0391] c)通过将抗体经受抗原-亲和力选择来选择抗体,

[0392] d)回收具有所需特异性的抗体。

[0393] 用于对骆驼进行免疫化、克隆在血液中循环的B细胞的VHH谱(Chomezynnski和Sacchi 1987)并且使用噬菌体、酵母或核糖体展示从免疫(Arbabi-Ghahroudi等人1997)和非免疫(Tanha等人2002)文库分离抗原特异性VHH的方法是已知的(WO92/01047,Nguyen等人2001和Harmsen等人2007)。

[0394] 可以分离抗体的抗原结合片段诸如scFv和Fv片段并在大肠杆菌中表达(Miethe等人2013,Skerra等人1988和Ward等人1989)。

[0395] 可以对编码多肽的DNA或eDNA进行突变,所述突变对于多肽的氨基酸序列是沉默的,但是对特定宿主的翻译提供优选密码子。用于核酸在例如大肠杆菌和酿酒酵母中的翻译的优选密码子是已知的。

[0396] 多肽的突变可以例如通过对编码多肽的核酸进行取代、添加或缺失来实现。对编码多肽的核酸进行的取代、添加或缺失可以通过许多方法来引入,包括例如易错PCR、改组、

寡核苷酸定向诱变、组装PCR、PCR诱变、体内诱变、盒式诱变、循环总体诱变、指数整体诱变、位点特异性诱变(Ling等人1997)、基因重组装、基因位点饱和诱变(GSSM)、合成连接重组装(SLR)或这些方法的组合。对核酸进行的修改、添加或缺失也可以通过包括以下的方法引入:重组、循环序列重组、硫代磷酸酯修饰的DNA诱变、含有尿嘧啶的模板诱变、缺口二重诱变(gapped duplex mutagenesis)、点错配修复诱变(point mismatch repair mutagenesis)、修复-缺陷型宿主菌株诱变、化学诱变、放射诱变、缺失诱变、限制-选择诱变、限制-纯化诱变、整体诱变、嵌合核酸多聚体产生或其组合。

[0397] 具体地,可以使用人工基因合成(Nambiar等人1984,Sakamar和Khorana 1988,Wells等人1985和Grundstrom等人1985)。编码本发明的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,将构建嵌段按产物序列所需的顺序依次偶联至生长寡核苷酸链。在完成链组装后,将产物从固相释放至溶液,脱保护并收集。产物可以通过高效液相色谱法(HPLC)分离以获得所需的高纯度寡核苷酸(Verma和Eckstein 1998)

[0398] 免疫球蛋白链可变结构域诸如VH和VHH的表达可以使用合适的表达载体诸如原核细胞诸如细菌,例如大肠杆菌来实现(例如根据WO94/04678中公开的方案,所述文献以引用的方式并入本文并且在下文进一步详细描述)。免疫球蛋白链可变结构域诸如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细胞或合适地酵母细胞,诸如属于曲霉属、酵母属、克鲁维酵母属、汉森酵母属或毕赤酵母属的酵母来实现。合适地,使用酿酒酵母(例如,根据WO94/025591中公开的方案,所述文献以引用的方式并入本文并且在下文进一步详细描述)。

[0399] 具体地,VHH可以根据WO94/04678中公开的方法使用大肠杆菌,通过包括以下步骤的方法来制备:

[0400] a)在Bluescript载体(Agilent Technologies)中克隆编码VHH的DNA或cDNA序列(例如从骆驼的淋巴细胞获得或合成地产生),任选地包含His-标签,

[0401] b)在扩增之后使用对于VHH具有特异性的含有XhoI位点的5'引物和含有SpeI位点的具有序列TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG(SEQ ID NO:68)的3'引物回收克隆的片段,

[0402] c)在用XhoI和SpeI限制性酶消化载体之后在Immuno PBS载体中克隆在相中回收的片段(Huse等人1989),

[0403] d)用步骤c的重组Immuno PBS载体通过转染转化宿主细胞,尤其是大肠杆菌,

[0404] e)例如通过亲和力纯化,诸如通过在使用蛋白质A、阳离子交换或镍-亲和力树脂(如果VHH包含His-标签)的柱上进行色谱法来回收VHH编码序列的表达产物。

[0405] 可替代地,免疫球蛋白链可变结构域诸如VH和VHH可通过包括以下步骤的方法来获得:

[0406] a)获得编码VHH的具有确定的特异性抗原结合位点的DNA或cDNA序列,

[0407] b)使用含有起始密码子和Hindlll位点的5'引物和含有终止密码子的具有XhoI位点的3'引物扩增获得的DNA或cDNA,

[0408] c)将扩增的DNA或cDNA重组到质粒pMM984的Hindlll(位置2650)和XhoI(位置4067)位点中(Merchlinsky等人1983),

[0409] d)用重组质粒转染容纳性细胞,尤其是NB-E细胞(Faisst等人1995),

[0410] e)回收获得的产物。

[0411] 另外,免疫球蛋白链可变结构域诸如VHH或VH可以使用大肠杆菌或酿酒酵母根据Frenken等人2000和WO99/23221(以引用的方式整体并入本文)中公开的方法产生,如下所述:

[0412] 在从免疫化美洲驼取血液样品并且经由Ficoll(中性的高度支化、高质量亲水性多糖,其在水溶液中快速溶解-Pharmacia)不连续梯度离心富集淋巴细胞群体、通过酸性硫氰酸胍萃取分离总RNA(Chomezynnski和Sacchi 1987)、和第一链cDNA合成(例如,使用cDNA试剂盒,诸如RPN 1266(Amersham))之后,使用在WO99/23221的第22页和23页上详细描述的特异性引物通过PCR扩增编码VHH和VH片段和短或长铰链区的一部分的DNA片段。在用PstI和HindIII或BstEII消化PCR片段之后,经由琼脂糖凝胶电泳纯化具有约300与450bp之间的长度的DNA片段,并且分别在大肠杆菌噬菌粒载体pUR4536或游离型酿酒酵母表达载体pUR4548中连接。pUR4536来源于pHEN(Hoogenboom等人1991)并且含有$lacI^q$基因和独特限制性位点以允许美洲驼VHH和VH基因的克隆。pUR4548来源于pSY1(Harmsen等人1993)。经由PCR从此质粒去除leu2基因中的BstEII位点,并且替代SUC2信号序列与终止子之间的克隆位点以便有利于VH/VHH基因片段的克隆。VH/VHH在C末端处具有c-myc标签以用于检测。将各个大肠杆菌JM109菌落转移到含有增补有1%葡萄糖和100mg L^{-1}氨苄西林的150ml 2TY培养基的96孔微量滴定板中。在过夜生长(37℃)之后,在含有100mg L^{-1}氨苄西林和0.1mM IPTG的2TY培养基中重复板。在再次过夜温育并且任选地冷冻和解冻之后,将细胞离心并沉淀,并且可以在ELISA中使用上清液。将各个酿酒酵母菌落转移至含有选择性基本培养基(包含0.7%酵母氮基、2%葡萄糖,增补有必需氨基酸和碱)的测试管中,并且在30℃下生长48h。随后,将培养物在YPGal培养基(包含1%酵母提取物、2%细菌蛋白胨和5%半乳糖)中稀释十次。在生长24h和48h之后,将细胞沉淀并且可以在ELISA中分析培养上清液。任选地测量600nm处的吸光度(OD600)。

[0413] 另外,可以使用如下程序使用酿酒酵母产生免疫球蛋白链可变结构域诸如VH/VHH:

[0414] 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,包含5'UTR、信号序列、终止密码子并且侧接SacI和HindIII位点(这种合成序列可以如上概述产生或者例如可以从商业供应商诸如Geneart(Life Technologies)订购)。

[0415] 使用限制性位点将VH/VHH基因转移至多拷贝整合(MCI)载体pUR8569或pUR8542,如下所述。使用以下,用SacI和HindIII切割编码VHH的任选地包含在穿梭载体、盒或其他合成基因构建体和MCI载体内的DNA序列:25ul VHH DNA(Geneart质粒或MCI载体)、1ul SacI、1ul HindIII、3ul的用于双酶切反应的合适缓冲液诸如NEB缓冲液1(New England Biolabs),在37℃下进行过夜。用1xTAE缓冲液在1.5%琼脂糖凝胶上运行25ul的经消化的编码VHH的DNA和25ul的经消化的MCI载体,并且然后例如使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen)进行凝胶提取。如下设定消化MCI载体和编码VH/VHH的消化DNA的连接:100ng载体,30ng VHH基因,1.5ul 10×连接酶缓冲液,1ul T4 DNA连接酶和ddH_2O。然后在16℃下进行连接过夜。

[0416] 接下来转化大肠杆菌细胞。对于化学感受态XL-1蓝色细胞,将200ul热感受态XL-1

蓝色细胞解冻并且在冰上添加5ul连接混合物,持续约30分钟,接着在42℃下进行热休克,持续90秒。然后添加增补有2%葡萄糖的800ul Luria-Bertani低盐培养基,并且在37℃下恢复细胞,持续2小时。将细胞铺板在Luria-Bertani琼脂和氨苄西林(100ug/ml)板上并且在37℃下保持过夜。对于电感受态TG1大肠杆菌细胞,使用电穿孔杯。在电穿孔杯中:在冰上将50ul电感受态TG1细胞和1ul连接混合物解冻,持续约15分钟。将所述杯置于支撑物中并加脉冲。添加500ul的2TY培养基并且在37℃下恢复细胞,持续30分钟。将100ul细胞铺板在含有氨苄西林(100ug/ml)和2%葡萄糖的Luria-Bertani琼脂板上。将板在37℃下保持过夜。

[0417] 如上详细描述将VH/VHH基因克隆到大肠杆菌中之后,可以用线性化的MCI载体转化酿酒酵母。在进行转化之前,进行一些步骤:(i)应通过消化将DNA从环状改变为线性的,否则DNA不能被整合到酵母基因组中,并且(ii)应通过乙醇沉淀将消化的DNA的杂质清除。另外,在转化过程期间,将酵母细胞制成半透性的,使得DNA可以穿过膜。

[0418] 用于酵母转化进行的准备:对由表达VH/VHH基因的选择的大肠杆菌菌落制备的midi-prep进行HpaI消化,如下所述。制备含有20ng midi-prep、5ul HpaI、10ul适当缓冲液诸如NEB4缓冲液(BioLabs)和ddH_2O的100ul溶液。

[0419] 在室温下用HpaI切割DNA过夜。接下来进行乙醇沉淀(并且将来自HpaI消化的5ul样品置于一侧)。将300ul 100%乙醇添加到95ul HpaI消化的midiprep中,涡旋并在全速下旋转5分钟。当存在团粒时仔细倾析,添加100ul 70%乙醇,然后在全速下再次旋转5分钟。对样品再次进行倾析,并且保持在50-60℃下,直至团粒干燥。将团粒重悬浮在50ul ddH_2O中。在5ul HpaI消化的样品旁边的凝胶上运行5ul。

[0420] 酵母转化:制备YNBglu板。使用10g琼脂+425ml水(杀菌的)、25ml过滤20×YNB(3.35g YNB(酵母氮基),在25ml杀菌H_2O中)和50ml杀菌20%葡萄糖并且倒入皮氏培养皿中。从母板选取一个酵母菌落并在30℃下在3ml YPD(酵母浸出粉胨葡萄糖)中生长过夜。在第二天制备约600ml YPD并且用275ml、225ml和100ml YPD填充3个烧瓶。将27.5ul酵母YPD培养物添加到第一烧瓶中并轻微混合。从第一烧瓶中取75ml并将其置于第二烧瓶中,轻微混合。从第二烧瓶中取100ml并置于第三烧瓶中,轻微混合。生长,直至达到1与2之间的OD660。将达到此OD的烧瓶分配在4个Falcon管中,每个中±45ml。在4200rpm下旋转2分钟。丢弃上清液。将在两个Falcon管中的团粒溶解在45ml H_2O中(将管的数量从4个降低至2个)。在4200rpm下旋转2分钟。将团粒溶解在45ml H_2O中(从2个管至1个管)。在4200rpm下旋转2分钟。将团粒轻微溶解在5ml醋酸锂(LiAc)(100mM)中,并且旋转几秒。仔细丢弃一些LiAc,但是保留管中一半以上的LiAc。对细胞进行涡旋,将载体DNA煮沸5分钟并在冰水中快速冷却。添加到含有以下的15ml管中:240ul PEG、50ul细胞、36uLiAc(1M)、25ul载体DNA、45ul乙醇沉淀的VH/VHH。在每个步骤之后轻微混合(对空白样品进行同样处理,只是没有乙醇沉淀的VH/VHH)。在30℃下温育30分钟,将管轻微倒置3-4次,然后在42℃下热休克20-25分钟。在6000rpm下旋转短暂的时间。轻微取出上清液并且添加250ul ddH_2O并混合。将它们全部在YNBglu板上划线,直至板干燥,并且在30℃下生长4-5天。最后,通过以下来制备YNBglu板:将板分为6个等份,将各份编号为1至6,接种最大菌落并且划出1号。从大到小从1至6对其他菌落重复以上过程。在30℃下生长,持续3-4天,直至产生菌落。使用葡萄糖作为碳源来生长VH/VHH菌落,并且通过添加0.5%半乳糖打开半乳糖-7-启动子来进行VH/VHH诱

导。进行3mL小规模培养以测试菌落,并且选择示出VH或VHH的最佳表达的菌落。然后在纯化中使用此菌落。

[0421] 纯化:通过用强阴离子树脂(诸如Capto S)进行阳离子交换色谱法来纯化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的选择的酵母菌落,并且在30℃下在25mL密封杀菌管中生长细胞(在180rpm下振荡)。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℃下在250ml充气的带挡板烧瓶中生长细胞,持续两个晚上(在180rpm下振荡)。在第4天,在离心机中在4200rpm下旋转沉降细胞,持续20min。使用强阴离子树脂进行阳离子交换色谱法:将含有配体的上清液的pH调节至3.5。用50mL ddH_2O洗涤0.75ml树脂(+/-0.5mL浆液)/50mL上清液,接着用结合缓冲液洗涤三次。将洗涤的树脂添加到上清液中并且在4℃下在振荡器上温育悬浮液1.5小时。通过在500g下离心2分钟将树脂结合的VH/VHH沉淀并且用洗涤缓冲液对其洗涤。倾析上清液并且用10mL结合缓冲液重悬浮树脂。将滤液置于PD-10柱中,将树脂倒入柱中并且使树脂沉淀一会,然后将滤液添加在树脂上。等到所有的结合缓冲液运行通过。用6x0.5ml洗脱缓冲液洗脱VH/VHH。在eppendorf管中收集洗脱级分。用Nanodrop测量6个洗脱级分的蛋白质浓度。汇集含有VHH的级分并且将溶液转移到3,500Da截留透析膜中。在4℃下用3L PBS透析纯化的蛋白质溶液过夜。在第5天,在4℃下用2L新鲜PBS透析纯化的蛋白质溶液,再持续2小时。最后,通过BCA计算最终浓度。

[0422] 虽然在VH/VHH的情况下进行讨论,但是以上所述的技术也可以用于scFv、Fab、Fv和其他抗体片段(如果需要的话)。

[0423] 多个抗原结合片段(合适地VH/VHH)可以通过使氨基酸残基与有机衍生剂反应进行化学交联来融合,诸如由Blattler等人1985所述。可替代地,抗原结合片段可以在DNA水平下在基因上融合,即所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。经由基因途径使多个抗原结合片段接合的一种方式是直接或经由肽接头使抗原结合片段编码序列连接。例如,第一抗原结合片段的羧基末端可以连接至下一个抗原结合片段的氨基末端。此连接模式可以延伸,以便连接抗原结合片段以用于构建三、四等功能构建体。用于产生多价(诸如二价)VHH多肽构建体的方法在WO 96/34103(以引用的方式整体并入本文)中公开。

[0424] 合适地,根据WO02/48382中公开的方法,本发明的多肽(具体地,本发明的VHH)可以在真菌,诸如酵母(例如,酿酒酵母)中产生,其包括在包含碳源的培养基上生长真菌,其中所述碳源的50-100wt%是乙醇。在酿酒酵母中大规模生产VHH片段在Thomassen等人2002中描述。

[0425] 在本发明的一个方面,提供了一种用于制备本发明的多肽或构建体的方法,其包括以下步骤:

[0426] i)将本发明的多核苷酸克隆到载体,诸如质粒中,

[0427] 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,诸如细菌细胞或酵母细胞,

[0428] iii)诸如通过亲和力色谱法回收多肽或构建体。

[0429] 列出本发明的另外的实施方案的条款如下:

[0430] 1.一种多肽,其包含结合至IL-23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共享60%或更大序列同一性的序列,CDR2包含与SEQ ID NO:2共享50%或更大序列同一性的序列,并且CDR3包含与SEQ ID NO:3共享50%或更大序列同一性的序列。

[0431] 2.根据条款1所述的多肽,其中CDR3包含与SEQ ID NO:3共享80%或更大序列同一性的序列。

[0432] 3.根据条款2所述的多肽,其中CDR3由与SEQ ID NO:3共享80%或更大序列同一性的序列组成。

[0433] 4.根据条款2或3所述的多肽,其中CDR3的与其在SEQ ID NO:3中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0434] 5.根据条款2或3所述的多肽,其中CDR3的对应于SEQ ID NO:3的残基编号6的残基是I。

[0435] 6.根据条款2或3所述的多肽,其中CDR3的对应于SEQ ID NO:3的残基编号6的残基是L。

[0436] 7.根据条款4所述的多肽,其中CDR3的对应于SEQ ID NO:3的残基编号6的残基是I或L,并且CDR3的与其在SEQ ID NO:3中的对应残基不同的任何其他残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0437] 8.根据条款2所述的多肽,其中CDR3包含SEQ ID NO:3。

[0438] 9.根据条款3所述的多肽,其中CDR3由SEQ ID NO:3组成。

[0439] 10.根据条款1至9中任一项所述的多肽,其中CDR1包含与SEQ ID NO:1共享80%或更大序列同一性的序列。

[0440] 11.根据条款10所述的多肽,其中CDR1由与SEQ ID NO:1共享80%或更大序列同一性的序列组成。

[0441] 12.根据条款1至9中任一项所述的多肽,其中CDR1的与其在SEQ ID NO:1中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0442] 13.根据条款11所述的多肽,其中CDR1包含SEQ ID NO:1。

[0443] 14.根据条款13所述的多肽,其中CDR1由SEQ ID NO:1组成。

[0444] 15.根据条款1至14中任一项所述的多肽,其中CDR2包含与SEQ ID NO:2共享55%或更大序列同一性、诸如共享60%或更大序列同一性、诸如共享70%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享80%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性的序列。

[0445] 16.根据条款15所述的多肽,其中CDR2由与SEQ ID NO:2共享55%或更大序列同一性、诸如共享60%或更大序列同一性、诸如共享70%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享80%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性的序列组成。

[0446] 17.根据条款1至16中任一项所述的多肽,其中CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号9的残基是D或H,并且/或者CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号10的残基是Y或D,并且/或者CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号11的残基是S、G、R或A(诸如S、R或A,诸如S或A)并且/或者CDR2的对应于SEQ ID NO:2的残基编号14的残基是V或A。

[0447] 18.根据条款1至17中任一项所述的多肽,其中CDR2的与其在SEO ID NO:2中的对

应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0448] 19.根据条款15所述的多肽,其中CDR2包含SEQ ID NO:2。

[0449] 20.根据条款19所述的多肽,其中CDR2由SEQ ID NO:2组成。

[0450] 21.根据条款1至20中任一项所述的多肽,其中FR1包含与SEQID NO:4共享5%或更大序列同一性、诸如共享12%或更大序列同一性、诸如共享18%或更大序列同一性、诸如共享26%或更大序列同一性、诸如共享32%或更大序列同一性、诸如共享38%或更大序列同一性、诸如共享46%或更大序列同一性、诸如共享52%或更大序列同一性、诸如共享58%或更大序列同一性、诸如共享62%或更大序列同一性、诸如共享66%或更大序列同一性、诸如共享68%或更大序列同一性、诸如共享72%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享78%或更大序列同一性、诸如共享82%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性、诸如共享95%或更大序列同一性的序列。

[0451] 22.根据条款21所述的多肽,其中FR1由与SEQ ID NO:4共享5%或更大序列同一性、诸如共享12%或更大序列同一性、诸如共享18%或更大序列同一性、诸如共享26%或更大序列同一性、诸如共享32%或更大序列同一性、诸如共享38%或更大序列同一性、诸如共享46%或更大序列同一性、诸如共享52%或更大序列同一性、诸如共享58%或更大序列同一性、诸如共享62%或更大序列同一性、诸如共享66%或更大序列同一性、诸如共享68%或更大序列同一性、诸如共享72%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享78%或更大序列同一性、诸如共享82%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性、诸如共享95%或更大序列同一性的序列组成。

[0452] 23.根据条款1至22中任一项所述的多肽,其中FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号1的残基是D或E。

[0453] 24.根据条款23所述的多肽,其中FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号1的残基是D。

[0454] 25.根据条款24所述的多肽,其中FR1的对应于SEQ ID NO:4的残基编号1至5的残基是DVQLV。

[0455] 26.根据条款1至25中任一项所述的多肽,其中FR1的与其在SEQ ID NO:4中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0456] 27.根据条款21所述的多肽,其中FR1包含SEQ ID NO:4。

[0457] 28.根据条款27所述的多肽,其中FR1由SEQ ID NO:4组成。

[0458] 29.根据条款1至28中任一项所述的多肽,其中FR2包含与SEQ ID NO:5共享10%或更大序列同一性、诸如共享15%或更大序列同一性、诸如共享25%或更大序列同一性、诸如共享30%或更大序列同一性、诸如共享40%或更大序列同一性、诸如共享45%或更大序列同一性、诸如共享55%或更大序列同一性、诸如共享60%或更大序列同一性、诸如共享70%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性的序列。

[0459] 30.根据条款29所述的多肽,其中FR2由与SEQ ID NO:5共享10%或更大序列同一性、诸如共享15%或更大序列同一性、诸如共享25%或更大序列同一性、诸如共享30%或更大序列同一性、诸如共享40%或更大序列同一性、诸如共享45%或更大序列同一性、诸如共

享55％或更大序列同一性、诸如共享60％或更大序列同一性、诸如共享70％或更大序列同一性、诸如共享75％或更大序列同一性、诸如共享85％或更大序列同一性、诸如共享90％或更大序列同一性的序列组成。

[0460] 31.根据条款1至30中任一项所述的多肽,其中FR2的与其在SEQ ID NO:5中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0461] 32.根据条款29所述的多肽,其中FR2包含SEQ ID NO:5。

[0462] 33.根据条款32所述的多肽,其中FR2由SEQ ID NO:5组成。

[0463] 34.根据条款1至33中任一项所述的多肽,其中FR3包含与SEQ ID NO:6共享8％或更大序列同一性、诸如共享15％或更大序列同一性、诸如共享20％或更大序列同一性、诸如共享26％或更大序列同一性、诸如共享32％或更大序列同一性、诸如共享40％或更大序列同一性、诸如共享45％或更大序列同一性、诸如共享52％或更大序列同一性、诸如共享58％或更大序列同一性、诸如共享65％或更大序列同一性、诸如共享70％或更大序列同一性、诸如共享76％或更大序列同一性、诸如共享80％或更大序列同一性、诸如共享82％或更大序列同一性、诸如共享85％或更大序列同一性、诸如共享90％或更大序列同一性、诸如共享92％或更大序列同一性、诸如共享95％或更大序列同一性的序列。

[0464] 35.根据条款34所述的多肽,其中FR3由与SEQ ID NO:6共享8％或更大序列同一性、诸如共享15％或更大序列同一性、诸如共享20％或更大序列同一性、诸如共享26％或更大序列同一性、诸如共享32％或更大序列同一性、诸如共享40％或更大序列同一性、诸如共享45％或更大序列同一性、诸如共享52％或更大序列同一性、诸如共享58％或更大序列同一性、诸如共享65％或更大序列同一性、诸如共享70％或更大序列同一性、诸如共享76％或更大序列同一性、诸如共享80％或更大序列同一性、诸如共享82％或更大序列同一性、诸如共享85％或更大序列同一性、诸如共享90％或更大序列同一性、诸如共享92％或更大序列同一性、诸如共享95％或更大序列同一性的序列组成。

[0465] 36.根据条款1至35中任一项所述的多肽,其中FR3的与其在SEQ ID NO:6中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0466] 37.根据条款34所述的多肽,其中FR3包含SEQ ID NO:6。

[0467] 38.根据条款37所述的多肽,其中FR3由SEQ ID NO:6组成。

[0468] 39.根据条款1至38中任一项所述的多肽,其中FR4包含与SEQ ID NO:7共享5％或更大序列同一性、诸如共享10％或更大序列同一性、诸如共享20％或更大序列同一性、诸如共享30％或更大序列同一性、诸如共享40％或更大序列同一性、诸如共享50％或更大序列同一性、诸如共享60％或更大序列同一性、诸如共享70％或更大序列同一性、诸如共享80％或更大序列同一性、诸如共享90％或更大序列同一性的序列。

[0469] 40.根据条款39所述的多肽,其中FR4由与SEQ ID NO:7共享5％或更大序列同一性、诸如共享10％或更大序列同一性、诸如共享20％或更大序列同一性、诸如共享30％或更大序列同一性、诸如共享40％或更大序列同一性、诸如共享50％或更大序列同一性、诸如共享60％或更大序列同一性、诸如共享70％或更大序列同一性、诸如共享80％或更大序列同一性、诸如共享90％或更大序列同一性的序列组成。

[0470] 41.根据条款1至40中任一项所述的多肽,其中FR4的与其在SEQ ID NO:7中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0471] 42.根据条款39所述的多肽,其中FR4包含SEQ ID NO:7。

[0472] 43.根据条款42所述的多肽,其中FR4由SEQ ID NO:7组成。

[0473] 44.根据条款1至43中任一项所述的多肽,所述多肽包含与SEQ ID NO:8共享50%或更大序列同一性、诸如共享55%或更大序列同一性、诸如共享60%或更大序列同一性、诸如共享65%或更大序列同一性、诸如共享70%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享80%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性、诸如共享95%或更大序列同一性、诸如共享96%或更大序列同一性、诸如共享97%或更大序列同一性、诸如共享98%或更大序列同一性、诸如共享99%或更大序列同一性的序列。

[0474] 45.根据条款44所述的多肽,其由与SEQ ID NO:8共享50%或更大序列同一性、诸如共享55%或更大序列同一性、诸如共享60%或更大序列同一性、诸如共享65%或更大序列同一性、诸如共享70%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享80%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性、诸如共享95%或更大序列同一性、诸如共享96%或更大序列同一性、诸如共享97%或更大序列同一性、诸如共享98%或更大序列同一性、诸如共享99%或更大序列同一性的序列组成。

[0475] 46.根据条款1至45中任一项所述的多肽,其中所述多肽的N末端是D。

[0476] 47.根据条款44所述的多肽,其包含SEQ ID NO:8。

[0477] 48.根据条款47所述的多肽,其由SEQ ID NO:8组成。

[0478] 49.一种多肽,其包含结合至IL-23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:

[0479] (a)CDR1由与SEQ ID NO:1共享60%或更大序列同一性的序列组成,CDR2由与SEQ ID NO:2共享70%或更大序列同一性的序列组成,并且CDR3由与SEQ ID NO:3共享70%或更大序列同一性的序列组成;

[0480] (b)FR1由与SEQ ID NO:4共享70%或更大序列同一性的序列组成,FR2由与SEQ ID NO:5共享70%或更大序列同一性的序列组成,FR3由与SEQ ID NO:6共享70%或更大序列同一性的序列组成,并且FR4由与SEQ ID NO:7共享70%或更大序列同一性的序列组成;并且

[0481] (c)所述多肽由与SEQ ID NO:8共享70%或更大序列同一性的序列组成。

[0482] 50.一种多肽,其包含结合至IL-23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:14共享60%或更大序列同一性的序列,CDR2包含与SEQ ID NO:15共享50%或更大序列同一性的序列,并且CDR3包含与SEQ ID NO:16共享50%或更大序列同一性的序列。

[0483] 51.根据条款50所述的多肽,其中CDR3包含与SEQ ID NO:16共享60%或更大序列同一性、诸如80%或更大序列同一性的序列。

[0484] 52.根据条款51所述的多肽,其中CDR3由与SEQ ID NO:16共享60%或更大序列同一性、诸如80%或更大序列同一性的序列组成。

[0485] 53.根据条款50至52中任一项所述的多肽,其中CDR3的与其在SEQ ID NO:16中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0486] 54.根据条款51所述的多肽,其中CDR3包含SEQ ID NO:16。

[0487] 55.根据条款54所述的多肽,其中CDR3由SEQ ID NO:16组成。

[0488] 56.根据条款50至55中任一项所述的多肽,其中CDR1包含与SEQ ID NO:14共享80%或更大序列同一性的序列。

[0489] 57.根据条款56所述的多肽,其中CDR1由与SEQ ID NO:14共享80%或更大序列同一性的序列组成。

[0490] 58.根据条款50至57中任一项所述的多肽,其中CDR1的与其在SEQ ID NO:14中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0491] 59.根据条款56所述的多肽,其中CDR1包含SEQ ID NO:14。

[0492] 60.根据条款59所述的多肽,其中CDR1由SEQ ID NO:14组成。

[0493] 61.根据条款50至60中任一项所述的多肽,其中CDR2包含与SEQ ID NO:15共享55%或更大序列同一性、诸如共享60%或更大序列同一性、诸如共享70%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享80%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性的序列。

[0494] 62.根据条款61所述的多肽,其中CDR2由与SEQ ID NO:15共享60%或更大序列同一性、诸如共享70%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享80%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性的序列组成。

[0495] 63.根据条款50至62中任一项所述的多肽,其中CDR2的与其在SEQ ID NO:15中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0496] 64.根据条款61所述的多肽,其中CDR2包含SEQ ID NO:15。

[0497] 65.根据条款64所述的多肽,其中CDR2由SEQ ID NO:15组成。

[0498] 66.根据条款50至65中任一项所述的多肽,其中:

[0499] (a)FR1包含与SEQ ID NO:17共享5%或更大序列同一性、诸如共享12%或更大序列同一性、诸如共享18%或更大序列同一性、诸如共享26%或更大序列同一性、诸如共享32%或更大序列同一性、诸如共享38%或更大序列同一性、诸如共享46%或更大序列同一性、诸如共享52%或更大序列同一性、诸如共享58%或更大序列同一性、诸如共享62%或更大序列同一性、诸如共享66%或更大序列同一性、诸如共享68%或更大序列同一性、诸如共享72%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享78%或更大序列同一性、诸如共享82%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性、诸如共享95%或更大序列同一性的序列;

[0500] (b)FR2包含与SEQ ID NO:18共享10%或更大序列同一性、诸如共享15%或更大序列同一性、诸如共享25%或更大序列同一性、诸如共享30%或更大序列同一性、诸如共享40%或更大序列同一性、诸如共享45%或更大序列同一性、诸如共享55%或更大序列同一性、诸如共享60%或更大序列同一性、诸如共享70%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性的序列;

[0501] (c)FR3包含与SEQ ID NO:19共享8%或更大序列同一性、诸如共享15%或更大序列同一性、诸如共享20%或更大序列同一性、诸如共享26%或更大序列同一性、诸如共享32%或更大序列同一性、诸如共享40%或更大序列同一性、诸如共享45%或更大序列同一

性、诸如共享52％或更大序列同一性、诸如共享58％或更大序列同一性、诸如共享65％或更大序列同一性、诸如共享70％或更大序列同一性、诸如共享76％或更大序列同一性、诸如共享80％或更大序列同一性、诸如共享82％或更大序列同一性、诸如共享85％或更大序列同一性、诸如共享90％或更大序列同一性、诸如共享92％或更大序列同一性、诸如共享95％或更大序列同一性的序列;并且/或者

[0502] (d)FR4包含与SEQ ID NO:20共享5％或更大序列同一性、诸如共享10％或更大序列同一性、诸如共享20％或更大序列同一性、诸如共享30％或更大序列同一性、诸如共享40％或更大序列同一性、诸如共享50％或更大序列同一性、诸如共享60％或更大序列同一性、诸如共享70％或更大序列同一性、诸如共享80％或更大序列同一性、诸如共享90％或更大序列同一性的序列。

[0503] 67.根据条款66所述的多肽,其中FR1包含SEQ ID NO:17,并且/或者FR2包含SEQ ID NO:18,并且/或者FR3包含SEQ ID NO:19,并且/或者FR4包含SEQ ID NO:20。

[0504] 68.根据条款50至67中任一项所述的多肽,所述多肽包含与SEQ ID NO:13共享50％或更大序列同一性、诸如共享55％或更大序列同一性、诸如共享60％或更大序列同一性、诸如共享65％或更大序列同一性、诸如共享70％或更大序列同一性、诸如共享75％或更大序列同一性、诸如共享80％或更大序列同一性、诸如共享85％或更大序列同一性、诸如共享90％或更大序列同一性、诸如共享95％或更大序列同一性、诸如共享96％或更大序列同一性、诸如共享97％或更大序列同一性、诸如共享98％或更大序列同一性、诸如共享99％或更大序列同一性的序列。

[0505] 69.根据条款68所述的多肽,其包含SEQ ID NO:13或由其组成。

[0506] 70.一种多肽,其包含结合至IL-23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:22共享60％或更大序列同一性的序列,CDR2包含与SEQ ID NO:23共享50％或更大序列同一性的序列,并且CDR3包含与SEQ ID NO:24共享50％或更大序列同一性的序列。

[0507] 71.根据条款70所述的多肽,其中CDR3包含与SEQ ID NO:24共享60％或更大序列同一性、诸如80％或更大序列同一性的序列。

[0508] 72.根据条款71所述的多肽,其中CDR3由与SEQ ID NO:24共享60％或更大序列同一性、诸如80％或更大序列同一性的序列组成。

[0509] 73.根据条款70至72中任一项所述的多肽,其中CDR3的与其在SEO ID NO:24中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0510] 74.根据条款71所述的多肽,其中CDR3包含SEQ ID NO:24。

[0511] 75.根据条款74所述的多肽,其中CDR3由SEQ ID NO:24组成。

[0512] 76.根据条款70至75中任一项所述的多肽,其中CDR1包含与SEQ ID NO:22共享80％或更大序列同一性的序列。

[0513] 77.根据条款76所述的多肽,其中CDR1由与SEQ ID NO:22共享80％或更大序列同一性的序列组成。

[0514] 78.根据条款70至77中任一项所述的多肽,其中CDR1的与其在SEQ ID NO:22中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0515] 79.根据条款76所述的多肽,其中CDR1包含SEQ ID NO:22。

[0516] 80.根据条款79所述的多肽,其中CDR1由SEQ ID NO:22组成。

[0517] 81.根据条款70至80中任一项所述的多肽,其中CDR2包含与SEQ ID NO:23共享55%或更大序列同一性、诸如共享60%或更大序列同一性、诸如共享70%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享80%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性的序列。

[0518] 82.根据条款81所述的多肽,其中CDR2由与SEO ID NO:23共享60%或更大序列同一性、诸如共享70%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享80%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性的序列组成。

[0519] 83.根据条款70至82中任一项所述的多肽,其中CDR2的与其在SEQ ID NO:23中的对应残基不同的任何残基是相对于其对应残基的保守取代。

[0520] 84.根据条款81所述的多肽,其中CDR2包含SEQ ID NO:23。

[0521] 85.根据条款84所述的多肽,其中CDR2由SEQ ID NO:23组成。

[0522] 86.根据条款70至85中任一项所述的多肽,其中:

[0523] (a)FR1包含与SEQ ID NO:25共享5%或更大序列同一性、诸如共享12%或更大序列同一性、诸如共享18%或更大序列同一性、诸如共享26%或更大序列同一性、诸如共享32%或更大序列同一性、诸如共享38%或更大序列同一性、诸如共享46%或更大序列同一性、诸如共享52%或更大序列同一性、诸如共享58%或更大序列同一性、诸如共享62%或更大序列同一性、诸如共享66%或更大序列同一性、诸如共享68%或更大序列同一性、诸如共享72%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享78%或更大序列同一性、诸如共享82%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性、诸如共享95%或更大序列同一性的序列;

[0524] (b)FR2包含与SEQ ID NO:26共享10%或更大序列同一性、诸如共享15%或更大序列同一性、诸如共享25%或更大序列同一性、诸如共享30%或更大序列同一性、诸如共享40%或更大序列同一性、诸如共享45%或更大序列同一性、诸如共享55%或更大序列同一性、诸如共享60%或更大序列同一性、诸如共享70%或更大序列同一性、诸如共享75%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性的序列;

[0525] (c)FR3包含与SEQ ID NO:27共享8%或更大序列同一性、诸如共享15%或更大序列同一性、诸如共享20%或更大序列同一性、诸如共享26%或更大序列同一性、诸如共享32%或更大序列同一性、诸如共享40%或更大序列同一性、诸如共享45%或更大序列同一性、诸如共享52%或更大序列同一性、诸如共享58%或更大序列同一性、诸如共享65%或更大序列同一性、诸如共享70%或更大序列同一性、诸如共享76%或更大序列同一性、诸如共享80%或更大序列同一性、诸如共享82%或更大序列同一性、诸如共享85%或更大序列同一性、诸如共享90%或更大序列同一性、诸如共享92%或更大序列同一性、诸如共享95%或更大序列同一性的序列;并且/或者

[0526] (d)FR4包含与SEQ ID NO:28共享5%或更大序列同一性、诸如共享10%或更大序列同一性、诸如共享20%或更大序列同一性、诸如共享30%或更大序列同一性、诸如共享40%或更大序列同一性、诸如共享50%或更大序列同一性、诸如共享60%或更大序列同一

性、诸如共享70％或更大序列同一性、诸如共享80％或更大序列同一性、诸如共享90％或更大序列同一性的序列。

[0527] 87.根据条款86所述的多肽,其中FR1包含SEQ ID NO:25,并且/或者FR2包含SEQ ID NO:26,并且/或者FR3包含SEQ ID NO:27,并且/或者FR4包含SEQ ID NO:28。

[0528] 88.根据条款70至87中任一项所述的多肽,所述多肽包含与SEQ ID NO:21共享50％或更大序列同一性、诸如共享55％或更大序列同一性、诸如共享60％或更大序列同一性、诸如共享65％或更大序列同一性、诸如共享70％或更大序列同一性、诸如共享75％或更大序列同一性、诸如共享80％或更大序列同一性、诸如共享85％或更大序列同一性、诸如共享90％或更大序列同一性、诸如共享95％或更大序列同一性、诸如共享96％或更大序列同一性、诸如共享97％或更大序列同一性、诸如共享98％或更大序列同一性、诸如共享99％或更大序列同一性的序列。

[0529] 89.根据条款88所述的多肽,其包含SEQ ID NO:21或由其组成。

[0530] 90根据条款1至89中任一项所述的多肽,其中所述多肽是抗体。

[0531] 91.根据条款90所述的多肽,其中所述多肽是抗体片段。

[0532] 92.根据条款91所述的多肽,其选自VHH、VH、VL、V-NAR、Fab片段和F(ab′)2片段。

[0533] 93.根据条款92所述的多肽,其中所述多肽是VHH。

[0534] 94.根据条款92所述的多肽,其中所述多肽是VH。

[0535] 95.一种构建体,其包含两个或更多个相同的根据条款1至94中任一项所述的多肽。

[0536] 96.一种构建体,其包含至少一个根据条款1至94中任一项所述的多肽和至少一个不同的多肽,其中所述不同的多肽结合至TNF-α。

[0537] 97.一种构建体,其包含至少一个根据条款1至94中任一项所述的多肽和至少一个不同的多肽,其中所述不同的多肽结合至除TNF-α以外的靶。

[0538] 98.根据条款95至97中任一项所述的构建体,其中所述多肽通过至少一个蛋白酶不稳定接头连接。

[0539] 99.根据条款98所述的构建体,其中所述蛋白酶不稳定接头具有下式:

[0540] $[-(G_aS)_x-B-(G_bS)_y-]_z$

[0541] 其中

[0542] a是1至10;

[0543] b是1至10;

[0544] x是1至10;

[0545] y是1至10;

[0546] z是1至10并且

[0547] B是K或R。

[0548] 100.根据条款99所述的构建体,其中a是2至5,b是2至5,x是1至3,y是1至3,z是1并且B是K。

[0549] 101.根据条款100所述的构建体,其中所述构建体包含SEQ ID NO:46或更合适地由其组成。

[0550] 102.根据条款95至97中任一项所述的构建体,其中所述多肽全部通过非蛋白酶不

稳定接头连接。

[0551] 103.根据条款102所述的构建体,其中所述非蛋白酶不稳定接头具有下式

[0552] $(G_4S)_x$

[0553] 其中

[0554] x是1至10。

[0555] 104.根据条款103所述的构建体,其中x是6。

[0556] 105.根据条款1至104中任一项所述的多肽或构建体,其在IL-23-IL-23R中和ELISA(评估方法A)中以以下EC50中和人IL-23:5nM或更小,诸如4nM或更小,诸如3nM或更小,诸如2nM或更小,诸如1.7nM或更小,诸如1.5nM或更小,诸如1.4nM或更小,诸如1.3nM或更小,诸如1.2nM或更小,诸如1.1nM或更小,诸如1.0nM或更小,诸如0.9nM或更小,诸如0.8nM或更小,诸如0.75nM或更小,诸如0.70nM或更小,诸如0.65nM或更小,诸如0.60nM或更小,诸如0.55nM或更小,诸如0.50nM或更小,诸如0.45nM或更小,诸如0.40nM或更小,诸如0.35nM或更小,诸如0.30nM或更小,诸如0.25nM或更小,诸如0.20nM或更小。

[0557] 106.根据条款1至105中任一项所述的多肽或构建体,其基本上耐受一种或多种蛋白酶。

[0558] 107.根据条款106所述的多肽或构建体,其中所述一种或多种蛋白酶存在于胃或小肠或大肠中。

[0559] 108.根据条款107所述的多肽或构建体,其中所述一种或多种蛋白酶存在于小肠中。

[0560] 109.根据条款106所述的多肽或构建体,其中所述一种或多种蛋白酶选自肠肽酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶和炎性肠病炎性蛋白酶。

[0561] 110.根据条款109所述的多肽或构建体,其中所述一种或多种蛋白酶选自胰蛋白酶、糜蛋白酶和炎性肠病炎性蛋白酶。

[0562] 111.根据条款109或110所述的多肽或构建体,其中所述炎性肠病炎性蛋白酶是选自由MMP3、MMP12和组织蛋白酶的一种或多种蛋白酶。

[0563] 112.根据条款110所述的多肽或构建体,其中所述蛋白酶是胰蛋白酶和糜蛋白酶。

[0564] 113.一种药物组合物,其包含根据条款1至112中任一项所述的多肽或构建体和一种或多种药学上可接受的稀释剂或载剂。

[0565] 114.根据条款113所述的药物组合物,其中所述组合物以肠溶包衣形式呈现。

[0566] 115.根据条款113或114所述的药物组合物,其包含至少一种另外的活性剂。

[0567] 116.根据条款115所述的药物组合物,其中所述至少一种另外的活性剂选自5-氨基水杨酸或其前药(诸如柳氮磺胺吡啶、奥柳氮或bisalazide);皮质类固醇(例如,泼尼松龙、甲基泼尼松龙或布地奈德);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-α抗体(例如,英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗或戈利木单抗);抗IL12/IL23抗体(例如,乌司奴单抗);抗IL6R抗体或小分子IL12/IL23抑制剂(例如,阿吡莫德);抗α-4-β-7抗体(例如,维多珠单抗);MAdCAM-1阻断剂(例如,PF-00547659);针对细胞粘附分子α-4-整联蛋白的抗体(例如,那他珠单抗);针对IL2受体α亚基的抗体(例如,达利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(例如,福坦替尼和R-406);磷酸二酯酶-4抑制剂(例如,替托司特);HMPL-004;益生菌;德沙

拉秦;塞马莫德/CPSI-2364;以及蛋白激酶C抑制剂(例如,AEB-071)。

[0568] 117.根据条款116所述的药物组合物,其中所述至少一种另外的活性剂是5-氨基水杨酸。

[0569] 118.根据条款1至117中任一项所述的多肽、药物组合物或构建体,其用作药剂。

[0570] 119.根据条款118所述的多肽、药物组合物或构建体,其用于治疗自身免疫疾病和/或炎性疾病。

[0571] 120.根据条款119所述的多肽、药物组合物或构建体,其中所述自身免疫疾病和/或炎性疾病选自克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、肠易激病、II型糖尿病、肾小球肾炎、自身免疫性肝炎、干燥综合征、乳糜泻、药物或辐射诱导的粘膜炎、天疱疮、银屑病、湿疹和硬皮病。

[0572] 121.根据条款120所述的用于使用的多肽、药物组合物或构建体,其中所述自身免疫疾病和/或炎性疾病是克罗恩氏病。

[0573] 122.根据条款118至121中任一项所述的用于使用的多肽、药物组合物或构建体,其口服施用。

[0574] 123.根据条款118至119中任一项所述的用于使用的多肽、药物组合物或构建体,其局部施用至皮肤。

[0575] 124.根据条款1至117中任一项所述的多肽、药物组合物或构建体在制造用于治疗自身免疫疾病和/或炎性疾病的药剂中的用途。

[0576] 125.根据条款124所述的多肽、药物组合物或构建体的用途,其中所述自身免疫疾病和/或炎性疾病选自克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、肠易激病、II型糖尿病、肾小球肾炎、自身免疫性肝炎、干燥综合征、乳糜泻、药物或辐射诱导的粘膜炎、天疱疮、银屑病、湿疹和硬皮病。

[0577] 126.根据条款125所述的用途,其中所述自身免疫疾病和/或炎性疾病是克罗恩氏病。

[0578] 127.根据条款124至126中任一项所述的用途,其中所述药剂口服施用。

[0579] 128.根据条款124所述的用途,其中所述药剂局部施用至皮肤。

[0580] 129.一种治疗自身免疫疾病和/或炎性疾病的方法,其包括向有需要的人施用治疗有效量的根据条款1至117中任一项所述的多肽、药物组合物或构建体。

[0581] 130.根据条款129所述的治疗自身免疫疾病和/或炎性疾病的方法,其中所述自身免疫疾病和/或炎性疾病选自克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、肠易激综合征、II型糖尿病、肾小球肾炎、自身免疫性肝炎、干燥综合征、乳糜泻、药物或辐射诱导的粘膜炎、天疱疮、银屑病、湿疹和硬皮病。

[0582] 131.根据条款130所述的治疗自身免疫疾病的方法,其中所述自身免疫疾病是克罗恩氏病。

[0583] 132.根据条款129至131中任一项所述的治疗自身免疫疾病的方法,其中所述多肽、药物组合物或构建体口服施用。

[0584] 133.根据条款129所述的治疗自身免疫疾病的方法,其中所述多肽、药物组合物或构建体局部施用至皮肤。

[0585] 134.根据条款118至133中任一项所述的多肽、药物组合物、构建体、用途或方法,其中所述多肽、药物组合物或构建体与选自以下的至少一种活性剂顺序、同时或单独施用:

5-氨基水杨酸或其前药(诸如柳氮磺胺吡啶、奥柳氮或bisalazide);皮质类固醇(例如,泼尼松龙、甲基泼尼松龙或布地奈德);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-α抗体(例如,英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗或戈利木单抗);抗IL12/IL23抗体(例如,乌司奴单抗);抗IL6R抗体或小分子IL12/IL23抑制剂(例如,阿吡莫德);抗α-4-β-7抗体(例如,维多珠单抗);MAdCAM-1阻断剂(例如,PF-00547659);针对细胞粘附分子α-4-整联蛋白的抗体(例如,那他珠单抗);针对IL2受体α亚基的抗体(例如,达利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(例如,福坦替尼和R-406);磷酸二酯酶-4抑制剂(例如,替托司特);HMPL-004;益生菌;德沙拉秦;塞马莫德/CPSI-2364;以及蛋白激酶C抑制剂(例如,AEB-071)。

[0586] 135.根据条款134所述的多肽、药物组合物、构建体或方法,其中所述多肽、药物组合物或构建体与英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗或戈利木单抗顺序、同时或单独施用。

[0587] 136.一种多核苷酸,其包含与SEQ ID NO:10的编码所编码的免疫球蛋白链可变结构域的CDR1、CDR2或CDR3的部分中的任一个共享70%或更大、诸如80%或更大、诸如90%或更大、诸如95%或更大、诸如99%或更大序列同一性的序列或由其组成。

[0588] 137.一种多核苷酸,其编码根据条款1至135中任一项所述的多肽或构建体。

[0589] 138.根据条款137所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含与SEQ ID NO:10共享70%或更大、诸如80%或更大、诸如90%或更大、诸如95%或更大、诸如99%或更大序列同一性的序列或由其组成。

[0590] 139.根据条款138所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含SEQ ID NO:10或由其组成。

[0591] 140.一种cDNA,其包含根据条款136至139中任一项所述的多核苷酸。

[0592] 141.一种载体,其包含根据条款136至140中任一项所述的多核苷酸或cDNA。

[0593] 142.一种宿主细胞,其用根据条款141所述的载体转化并且能够表达根据条款1至112中任一项所述的多肽或构建体。

[0594] 143.根据条款142所述的用载体转化的宿主细胞,其中所述宿主细胞是酵母细胞,诸如酿酒酵母或毕赤酵母。

[0595] 144.根据条款142所述的用载体转化的宿主细胞,其中所述宿主细胞是细胞细胞,诸如大肠杆菌。

[0596] 145.一种用于制备根据条款1至112中任一项所述的多肽或构建体的方法,其包括以下步骤:

[0597] i)将根据条款136至139中任一项所述的多核苷酸克隆到载体,诸如质粒中

[0598] ii)在允许产生根据条款1至112中任一项所述的多肽或构建体的条件下用所述载体转化能够产生所述多肽或构建体的细胞,诸如细菌细胞或酵母细胞,

[0599] iii)诸如通过亲和力色谱法回收所述多肽或构建体。

[0600] 列出本发明的另外的实施方案的另外的条款如下:

[0601] 1.一种多肽,其包含结合至IL-23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共享60%或更大序列同一性的序列,CDR2包含与SEQ ID NO:2共享50%或更

大序列同一性的序列,并且CDR3包含与SEQ ID NO:3共享50%或更大序列同一性的序列。

[0602] 2.根据条款1所述的多肽,其中CDR1包含与SEQ ID NO:1共享80%或更大序列同一性的序列,CDR2包含与SEQ ID NO:2共享80%或更大序列同一性的序列,并且CDR3包含与SEQ ID NO:3共享80%或更大序列同一性的序列。

[0603] 3.根据条款3所述的多肽,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。

[0604] 4.根据条款1至3中任一项所述的多肽,其中FR1包含与SEQ ID NO:4共享80%或更大序列同一性的序列,FR2包含与SEQ ID NO:5共享80%或更大序列同一性的序列,FR3包含与SEQ ID NO:6共享80%或更大序列同一性的序列,并且FR4包含与SEQ ID NO:7共享80%或更大序列同一性的序列。

[0605] 5.根据条款1至4中任一项所述的多肽,所述多肽包含与SEQ ID NO:8共享70%或更大序列同一性的序列。

[0606] 6.根据条款1至5中任一项所述的多肽,其中所述多肽是抗体或其片段。

[0607] 7.根据条款6所述的多肽,其中所述多肽是VH或VHH。

[0608] 8.一种构建体,其包含至少一个根据条款1至7中任一项所述的多肽和至少一个不同的多肽,其中所述不同的多肽结合至TNF-α。

[0609] 9.根据条款8所述的构建体,其中所述多肽通过至少一个蛋白酶不稳定接头连接。

[0610] 10.根据条款1至9中任一项所述的多肽或构建体,其中所述多肽或构建体在IL-23-IL-23R中和ELISA(评估方法A)中以2nM或更小的EC50中和人IL-23。

[0611] 11.根据条款1至10中任一项所述的多肽或构建体,其中所述多肽或构建体基本上耐受小肠中存在的一种或多种蛋白酶。

[0612] 12.根据条款11所述的多肽或构建体,其中所述蛋白酶是胰蛋白酶和糜蛋白酶。

[0613] 13.根据条款1至12中任一项所述的多肽、药物组合物或构建体,其用于治疗自身免疫疾病和/或炎性疾病。

[0614] 14.根据条款13所述的用于使用的多肽、药物组合物或构建体,其中所述用于使用的多肽、药物组合物或构建体口服施用。

[0615] 15.一种多核苷酸,其编码根据条款1至14中任一项所述的多肽或构建体。

[0616] 现在将通过以下非限制性实施例进一步描述本发明。

[0617] 实施例

[0618] 实施例中使用的评估方法

[0619] 评估方法A:IL-23-IL-23R中和ELISA

[0620] 用50μl/孔0.3μg/ml IL-23R-Fc涂覆Maxisorp 96孔板过夜,然后用4%牛奶、1%BSA封闭。将ICVD在4%牛奶、1%BSA中连续稀释,并且与40ng/ml重组人IL-231:1混合。之后将与IL-23混合的ICVD添加到IL-23R涂覆的板上。用BAF219抗p40生物素化pAb(R&D systems),接着用外抗生物素蛋白-HRP检测结合的IL-23。这允许计算样品中的IL-23中和活性。

[0621] 评估方法B:使用高盐缓冲液进行的IL-23-IL-23R中和ELISA

[0622] 使用高盐IL-23-IL-23R ELISA来测量粪便提取物中的抗IL-23ICVD浓度。此ELISA与以上EILSA(评估方法A)相同,不同的是用于粪便上清液稀释和IL-23制备的缓冲液是在

含有0.6M NaCl、0.05％Tween20和蛋白酶抑制剂的PBS中的1％BSA、4％牛奶。

[0623] 评估方法C:小鼠脾细胞测定

[0624] 从小鼠脾脏分离脾细胞并且以4x10^{5}个细胞/50μL/孔置于96孔圆底微板中的含有20ng/mL小鼠IL-2的培养基(2x测定浓度)中。在含有10ng/mL THP-1来源的nhIL-23的培养基(2x测定浓度)中在300nM(2x)下制备ICVD的最高浓度,并且直接在含有nhIL-23的培养基(2x)中制备随后的2.6倍稀释液。然后将50μL的每个ICVD混合物(2x)转移到细胞(50μL)上,以获得ICVD、hIL-23和mIL-2的最终1x测定浓度。针对培养上清液中的小鼠IL-17刺激和分泌,分别使用‘仅mIL-2’和‘mIL-2+hIL-23’作为阴性对照和阳性对照。在37℃、5％CO_2下温育3天后,将板在2000rpm下旋转2分钟,并且从每个孔回收50μL的培养上清液。使用IL-17结合ELISA测量培养上清液中的mIL-17水平,并且确定hIL-23的中和。

[0625] 实施例1:大肠杆菌中ICVD的免疫化、噬菌体文库选择、母板筛选和产生

[0626] 实施例1.1:免疫化和噬菌体文库构建

[0627] 用可溶性人重组IL-23对美洲驼免疫化,并且在两个动物中获得良好滴度的血清抗体。在IL-23的若干加强免疫化后,从每个美洲驼收集的白细胞分离RNA。

[0628] 使用在每个免疫化阶段结束时从每个美洲驼收集的外周血单核细胞(PBMC)生成七个单独的噬菌体展示文库。使用标准试剂和方案进行ICVD噬菌体展示文库的构建和表达具有IL-23结合活性的ICVD的噬菌体的初级选择。通常,从每个免疫化美洲驼分离的外周血淋巴细胞提取总RNA。然后使用RNA来生成cDNA,并且进行PCR来特异性扩增仅有ICVD重链的抗体的可变区。将编码ICVD谱的cDNA片段克隆到噬菌粒载体中,并且将文库引入大肠杆菌中。通过用辅助噬菌体培养大肠杆菌并且沉淀所得的ICVD展示文库来产生噬菌体文库。每个文库的数目通过滴定并感染具有不同稀释度的对数期大肠杆菌菌株TG1来确定。估计每个文库含有6x10^{7}个与5x10^{8}个之间的ICVD序列。

[0629] 实施例1.2:具有人IL-23结合活性的噬菌体的文库选择:周质提取物的繁殖和生成

[0630] 设定噬菌体文库选择策略以富集特异性结合至IL-23p19亚基的ICVD。通过在可溶性hIL-12的存在下淘选hIL-23或生物素化hIL-23来选择噬菌体。使用不同的方法洗涤结合的ICVD并且使用IL-23R的特异性洗脱或TEA的总洗脱来从板上去除。建立选择和洗脱条件以分离以高亲和力与IL-23的活性可溶性形式上存在的p19的表位结合并且干扰IL-23与IL-23受体(IL-23R)的结合的ICVD。

[0631] 使用来自选择的洗脱液中存在的噬菌体来感染大肠杆菌TG1细胞。随机挑选菌落到十二个96孔母板中并繁殖以生成菌落培养物。通过冷冻-解冻裂解细菌细胞外膜以释放含有ICVD的周质级分(在本文中还被称为“peri”)。通过离心去除细胞碎片并且将上清液转移到新鲜96孔板中以评估ICVD活性。

[0632] 实施例1.3:周质提取物的筛选

[0633] 为了鉴定对于抑制IL-23信号传导具有特异性的ICVD,测试周质提取物破坏三个相互作用的能力:1)IL-23与IL-23R的结合,2)IL-23与IL-12Rβ1的结合,以及3)IL-12与IL-12Rβ1的结合。这些相互作用各自通过ELISA测试。

[0634] 开发三种板-ELISA形式,其中将含有ICVD的周质提取物与适当的细胞因子混合,之后将混合物施加至用适当的细胞因子受体涂覆的Maxisorp板。在不存在通过ICVD干扰细

胞因子-受体结合的情况下,这允许捕获细胞因子,这在所有情况下都可以通过生物素化的抗p40抗体和随后的外抗生物素蛋白-HRP检测。每个ICVD的中和活性测量为相对于“不相关”VHH对照减少细胞因子与其受体的结合的能力。选择有希望的ICVD克隆以用于在大肠杆菌中产生和进一步评估。

[0635] 实施例1.4:在大肠杆菌产生选择的克隆

[0636] 将选择的ICVD的DNA序列重克隆到载体pMEK222中(由此引入C末端FLAG和6xHis标签)以用于在大肠杆菌中产生,并且经由6xHis标签在Talon树脂上纯化ICVD亲和力以用于更详细的评估研究。从进一步分析中排除无法由大肠杆菌良好表达的ICVD。

[0637] 实施例2:纯化的原代克隆的功效

[0638] 在IL-23-IL-23R中和ELISA(评估方法A)中评估纯化的ICVD的IL-23-IL-23R中和活性,以测定针对人IL-23的功效。发现与对比实例单克隆抗体布雷库单抗(重链SEQ ID NO:70,轻链SEQ ID NO:71)相比具有更高功效的ICVD在下表中列出。

[0639]

克隆#	家族	IL-23:IL-23R ELISA EC50 (nM)
12G1	L	0.387
1E2	L	0.546
10E2	-	1.454
10G10	-	1.466
布雷库单抗(对比实例)	-	2.23

[0640] ELISA结果显示L家族克隆(12G1和1E2)是明显有效力的,不仅与对比实例抗IL-23抗体布雷库单抗相比在IL-23-IL-23R ELISA中展示更高的功效,而且甚至展示亚纳摩尔功效。克隆10E2和10G10还在此测定中显示比布雷库单抗对比实例更高的功效。

[0641] 还在食蟹猴IL-23-IL-23R中和ELISA中测试了10E2、12G1和1E2,并且在此测定中全部显示高中和功效(数据未示出),与标准IL-23-IL-23RELISA中显示的那些类似。还确定了这些克隆不能够中和IL-23与IL-12R或IL-12与IL-12R的相互作用。虽然不希望受理论约束,但是发明人认为这些克隆对于IL-23的p19亚基具有特异性。

[0642] 实施例3:纯化的原代克隆的固有蛋白酶稳定性

[0643] 口服施用的ICVD可能在穿过小肠和大肠期间易受蛋白水解消化的影响。为了进一步研究对于肠蛋白酶的耐受性,在小鼠小肠上清液和由汇集的人粪便样品制备的上清液两者的存在下温育之后测试纯化的ICVD的功效(的保留)。

[0644] 小鼠小肠上清液:将来自七只C57BL/6雄性小鼠的小肠的内容物用0.9%盐水取出,合并,均质化并离心。取出所得的上清液,等分并冷冻。

[0645] 人粪便上清液:通过添加1x PBS将来自五个人的粪便样品转换为浆液。然后汇集浆液,离心并且取出上清液,等分并在-80℃下储存。此过程去除粪便基质,包括任何细胞材料。

[0646] 在37℃下温育ICVD不同时间段后,使用IL-23-IL-23R中和ELISA(评估方法B)测定“消化的”ICVD样品的抗IL-23活性,并且计算从“未消化的”ICVD维持至“消化的”ICVD的活

性的百分比。结果在下表中提供。

[0647]

		蛋白酶稳定性	
克隆#	家族	在小鼠小肠材料中 1 小时消化	在人粪便材料中 4 小时消化
12G1	L	51.2%	5.6%
1E2	L	41.3%	6.1%
10E2	-	19.3%	14.3%

[0648] ICVD显示对于小鼠小肠材料和人粪便材料中存在的蛋白酶的明显固有稳定性。选择L家族ICVD 12G1用于基于其功效和固有蛋白酶耐受性进一步优化。

[0649] 实施例4:12G1的优化变体的产生和表征

[0650] L家族ICVD 12G1经历序列修改以产生多个变体ICVD。在以上详细描述的功效和蛋白酶稳定性测定中测试这些变体ICVD。下表中详细描述了变体ICVD、它们相对于ID-L253T的突变以及它们在这些测定中的性能(其中EC50值以nM提供,'小鼠脾细胞'是指使用以上评估方法C获得的数据,并且与Kabat编号相对,使用N末端至C末端编号对残基进行编号)。

[0651] 应注意,通常变体ICVD中维持高功效和蛋白酶稳定性。因此可以预期ID-L253T的变体通常基本上维持高功效和蛋白酶稳定性。

[0652] 在这些变体ICVD中,最终选择ID-L253T以用于进行进一步表征。12G1通过以下突变从ID-L253T变化:E1D、L11Q、R19S、A23E、A24S、Y37F、A60S、M69I、V78L、F79Y、E81Q、D83N、V85L、A90T、N96A、L103I和R116Q(与Kabat编号相对,使用N末端至C末端编号)。

[0653]

克隆#	相对于ID-L253T的突变	功效(EC50)	蛋白酶稳定性				小鼠脾细胞
			小鼠SI材料		人粪便材料		
			汇集物A	汇集物B			
			4h	4h	7h	16h	
ID-L210T	D1E, S19R, V92R	0.32 ±0.17*	57.4% ±15	53.4% ±23	37% ±13	23.4% ±5.1	5.63 ± 2.1
ID-L237T	D1E, V92R	0.24	58.0%	-	56.0%	26.0%	6.35
ID-L238T	D1E, S19R, V40A, V92R	0.2	71.0%	-	34.7%	26.0%	5.54
ID-L239T	D1E, S19R, R45L, V92R	0.26	95.0%	-	35.5%	24.0%	3.84
ID-L240T	D1E, S19R, D58H, Y59D, S60G, V63A, V92R	未测试	5.0%	-	2.5%	未测试	未测试
ID-L241T	D1E, S19R, D58H, V92R	0.31	89.0%	-	33.9%	28.0%	3.51
ID-L242T	D1E, S19R, S60R, V92R	0.22	80.0%	-	未测试	7.3%	3.01
ID-L243T	D1E, S19R, P87S, V92R	0.27	69.0%	-	46.3%	20.0%	5.00
ID-L244T	D1E, S19R	0.24	84.0%	-	48.0%	23.0%	6.62
ID-L245T	D1E	0.25 ± 0.1	38.7%	56.7%	53% ± 7	28% ± 2	3.99 or 13.67
ID-L246T	D1E, V40A, I69L, L78V	2.15	未测试	-	未测试	未测试	未测试
ID-L247T	D1E, V40A, R45L	0.31	51.8%	-	55% ± 14	28% ± 7	4.52
ID-L248T	D1E, K43H, R45L	0.17	39.3%	-	61% ± 13	27.0%	4.47
ID-L249T	D1E, V40A, R45L, D58H	0.74	55.7%	-	55.3%	27.5%	4.27
ID-L250T	D1E, V40A, R45L, L47F, D58H	6.95	未测试	-	未测试	未测试	未测试
ID-L251T	D1E, S19R, Q44E, L47F, D58H	1.99	23.8%	54.3%	31.9%	13.5%	5.74
ID-L252T	D1E, V40A, Q44E, R45L, I69L, L78V	0.26	38.8%	-	42% ± 5	25% ± 1	5.20
ID-L253T	-	**0.23 ±0.04**	-	**51% ± 16**	-	**29%**	**13.51 ± 4.32**

* 5 个独立实验的平均值，排除其中获得 1.1 nM 的异常值的 1 个实验

** 8 个独立实验的平均值，排除其中获得 1.03 nM 的异常值的 1 个实验

[0654] 实施例5:与对比实例布雷库单抗和37D5相比的ID-L253T功效、结合亲和力和蛋白酶稳定性

[0655] 布雷库单抗是现有技术的选择性结合IL-23的p19亚基的完全人IgG_2单克隆抗体。37D5是现有技术的选择性结合IL-23的p19亚基的结构域抗体(VHH)(Desmyter等人2017,SEQ ID NO:69)。相对于现有技术的这些抗IL-23剂评估ID-L253T的功效、结合亲和力和蛋白酶稳定性。

[0656] 实施例5.1:与布雷库单抗相比ID-L253T的功效

[0657] 在IL-23-IL-23R抑制ELISA(评估方法A)中并列测试ID-L253T和临床对比物布雷库单抗的功效。结果在下表中总结。

[0658]

抗 IL-23 剂	IL-23-IL-23R ELISA (EC_{50}, nM)
ID-L253T	0.202
布雷库单抗 (对比实例)	0.441

[0659] 如所预期,基于以上所述的起源ICVD 12G1和ID-L253T变体的功效,ID-L253T在IL-23-IL-23R ELISA中显示比布雷库单抗更高的功效。

[0660] 实施例5.2:与布雷库单抗Fab相比ID-L253T的亲和力

[0661] 针对布雷库单抗Fab(使用可商购获得的Fab制备试剂盒制备)比较ID-L253T的结合动力学并在Biacore研究中评估。将抗p40mAb固定到Biacore传感器板并负载重组人IL-23。这通过IL-23的p40亚基栓系IL-23允许p19亚基(布雷库单抗和ID-L253T两者均对p19亚基具有特异性)与抗IL-23ID-253T ICVD和布雷库单抗Fab片段相互作用,其随后流过芯片以检测结合。ID-L253T具有32pM的平均K_D,而布雷库单抗Fab制剂具有1200pM的高得多的平均K_D,从而显示布雷库单抗Fab具有比ID-L253T低得多的结合亲和力。这些数据在下表中总结。

[0662]

抗 IL-23 剂	K_D (pM)
ID-L253T	32
布雷库单抗 Fab (对比实例)	1200

[0663] 虽然不希望受理论约束,但是基于以上提供的数据,发明人预期ID-L253T结合至IL-23的p19亚基。

[0664] 实施例5.3:与37D5相比ID-L253T的蛋白酶稳定性

[0665] 测试ID-L253T在小鼠小肠材料中的稳定性并且与对比实例37D5的稳定性比较。使用IL-23-IL-23R中和ELISA(评估方法B)测定“消化的”ICVD样品的抗IL-23活性,并且计算从“未消化的”ICVD维持至“消化的”ICVD的活性的百分比。这些数据在下表中总结。

[0666]

	在小鼠小肠材料中 2 小时消化	在小鼠小肠材料中 4 小时消化
ID-L253T	未测试	51%
37D5	0%	未测试

[0667] 根据这些数据清楚的是,在小鼠小肠材料中2小时消化之后相对于37D5不能建立ELISA信号,而在两倍长的温育时间段之后,ID-L253T实现51％存活。因此ID-L253T在此消化性基质中比对比实例37D5明显更稳定。应注意,在此关于ID-L253T提供的数据对应于与以上实施例4中详细描述的相同测定,并且在此关于37D5提供的数据在不同情况下在单独测定中产生。

[0668] 实施例6:对于人IL-23的ID-L253T特异性

[0669] 实施例6.1:与来自毒理学物种的IL-23的交叉反应性

[0670] 进行食蟹猴IL-23-IL-23R中和ELISA。为此,用50μl/孔0.5μg/ml食蟹猴IL-23R-Fc涂覆Maxisorp 96孔板过夜,然后用4％牛奶、1％BSA封闭。将ICVD在4％牛奶、1％BSA中连续稀释,并且与40ng/ml重组食蟹猴IL-23(cIL-23)1∶1混合,然后温育30分钟以允许结合,之后添加到cIL-23R涂覆的板上。用BAF219抗p40 pAb,并且然后用外抗生物素蛋白-HRP检测结合的cIL-23,并且确定通过ICVD对cIL-23与cIL-23R的结合的中和水平。

[0671] ID-L253T在食蟹猴IL-23-IL-23R中和测定中是活性的(数据未示出),从而使食蟹猴成为用于任何临床前开发研究的合适毒理学物种。

[0672] 实施例6.2:针对非靶细胞因子的特异性

[0673] 在结合或抑制ELISA中测试ID-L253T针对IL-23相关和非相关细胞因子的选择性。IL-12与IL-23共享p40亚基并且因此是人类中最紧密相关的细胞因子。在此测定中测试人和恒河猴IL-12以及IL-12细胞因子家族的另一个成员,IL-27。还测试了另外重要的但非相关的炎性细胞因子TNFα、IL-6和IFNγ。ID-L253T未显示与所测试的细胞因子的相互作用。这指示ID-L253T与脱靶分子的结合在人和非人灵长类动物中非常不可能。

[0674] 实施例7:关于ID-L253T的进一步蛋白酶稳定性研究-对于胃肠道基质金属蛋白酶和小鼠胃肠道传输的耐受性

[0675] 实施例7.1:对于胃肠道基质金属蛋白酶的耐受性

[0676] 活化基质金属蛋白酶(MMP)的水平在患有炎性肠病的患者的发炎粘膜中增加。这些MMP能够消化天然人IgG和含有人IgG支架的治疗剂(Biancheri等人,2015)。在抗TNFα疗法依那西普的情况下,此消化导致TNFα中和功效显著降低。为了确认ID-L253T对于MMP是耐受的,在活化重组人MMP3和MMP12的存在下温育ID-L253T大约20小时。ID-L253T在大约20小时的过程中显示完全存活,而依那西普被相同的酶制剂降解。

[0677] ID-L253T在37℃下在大约20小时的过程中完全耐受由MMP3和MMP12进行的消化。这指示ID-L253T在MMP水平升高的IBD肠道的发炎环境中应保留高稳定性。此发现以及以上关于一般蛋白酶耐受性的发现表明本发明的多肽具有作为用于IBD的口服疗法的巨大潜力。

[0678] 实施例7.2:小鼠胃肠道传输和存活

[0679] 以上所述的体外研究的结果显示ID-L253T耐受通过由小鼠小肠内容物制备的上清液提取物中存在的蛋白酶导致的失活。根据作者的经验,小鼠小肠上清液比从人或猪获得的小肠上清液更具蛋白水解活性。进行研究以研究ID-L253T在穿过小鼠的胃肠道系统期间的稳定性。在牛奶和碳酸氢盐混合物中用抗TNF-αICVD ID-38F配制ID-L253T(参见WO2016156465,SEQ ID NO:8和其中的实施例8)。先前已经确定了ID-38F在小鼠胃肠道传输期间是稳定的并且因此在此充当阳性对照。在通过口服管饲将ICVD共施用至四只小鼠后,

测量在0h-3h与3h-6h之间收集的粪便团粒中ICVD的浓度。

[0680] 在同一只小鼠中与ID-38F的水平相当的水平下给药之后在0-3h和3-6h两者处检测ID-L253T。结果显示ID-L253T在小鼠中与ID-38F一样或比其更好地存活,在来自给药之后3-6h收集的粪便团粒的上清液中达到超过15μM的最高回收浓度。

[0681] 实施例8:人IBD组织中ID-L210T中和活性的评估

[0682] 使用Vossenkämper等人(2014)和Crowe等人(2018)描述的测定系统,在发炎结肠粘膜组织的离体培养物中研究ID-L210T(ID-L253T的仅缺乏E1D、R19S和R92V的变体)的IL-23中和活性。

[0683] 使用此模型测试在病理生理条件下ID-L210T对于IBD疾病中存在的升高水平的信号传导磷蛋白的抑制性作用。使用来自患有活动性UC的四名患者的活检组织样品进行所述研究。在用ID-L210T(在150nM浓度下)或不结合至IL-23的同种型对照ICVD(ID-2A,非相关的抗艰难梭菌毒素ICVD,在225nM浓度下)温育24h后,使用蛋白质组分析器人磷酸激酶阵列技术分析活检外植体的磷蛋白水平。

[0684] 所有患者的关于所测试的各种蛋白质的平均磷强度值在图1-2中示出。阵列上大多数蛋白质的磷酸化水平在用ID-L210T处理后降低。

[0685] 还评估处理对于针对每个活检组织检测的总蛋白磷酸化信号($\Sigma_{n=39}$磷蛋白)的影响。在用ID-L210T处理之后,来自所有UC患者的活检组织中测量的总磷酸化水平被抑制(20%-52%;平均32%n=4)。

[0686] ID-L253T与ID-L210T仅相差三个氨基酸,显示类似的IL-23-IL-23R抑制功效,耐受通过小鼠的体外消化和传输。因此预期关于ID-L210T的这些发现基本上适用于ID-L253T。

[0687] 实施例9:发酵培养中的酵母生产力

[0688] 将表达ID-L253T的酿酒酵母生产菌株接种到5升发酵物中。通过SDS-PAGE用考马斯染色评估生产水平,并且通过IL-23-IL-23R中和ELISA评估生物活性。结果显示在正确分子量下发酵结束(EoF)上清液中的清晰的带,污染物非常少。测量ID-L253T的产率为0.188g/L。

[0689] 还使用标准酵母发酵技术测试ID-L253T在毕赤酵母中的生产力。通过SDS-PAGE用考马斯染色评估生产水平,并且结果显示在正确分子量下EoF上清液中的清晰的带。测量来自此发酵的ID-L253T的产率为1.3g/L。通过IL-23-IL-23R中和ELISA证明了完全中和活性。

[0690] 实施例10:异双头抗IL-23/抗TNF-α构建体FA1K的产生和表征

[0691] 实施例10.1:FA1K的产生

[0692] 产生了包含抗IL-23ICVD ID-L253T和抗TNF-αICVD ID-38F的异双头构建体(WO2016156465,其中的SEQ ID NO:8和此公开中的SEQ ID NO:67)(在本文中被称为'FA1K')。通过具有中心赖氨酸残基的柔性非免疫原性$(G_4S)_4$接头(SEQ ID NO:49)分隔此构建体中的ICVD,以产生WO2016156466中公开的类型的胰蛋白酶可切割位点(ID-38F-$(G_4S)_2$-K-$(G_4S)_2$-ID-L253T)。FA1K中使用的ID-38F臂的多肽序列(SEQ ID NO:47)与以上使用的ID-38F的多肽序列相同,并且FA1K中使用的ID-L253T臂的多肽序列(SEQ ID NO:48)与以上针对ID-L253T使用的多肽序列相同但有D1E取代。

[0693] 在SacI/HindIII片段上将FA1K克隆到载体pUR9013中,以有利于将vwkgal1-表达

菌株稳定多拷贝整合到酿酒酵母的染色体中。使用此整合和表达系统,FA1K在酿酒酵母中处于半乳糖诱导型启动子的控制下,并且经由酵母交配因子α信号序列实现双头分泌。此外,在甲醇诱导型pAOX1启动子的控制下将具有相同信号序列的FA1K克隆到毕赤酵母的染色体中。在50mL诱导培养基中评估来自酿酒酵母的FA1K的表达。

[0694] 纯化来自这些振荡烧瓶的上清液。除非另外说明,否则随后使用FA1K的此纯化制剂用于以下所述的实验。

[0695] 还将FA1K克隆到毕赤酵母中并且在50mL规模下显示优异的表达。

[0696] 实施例10.2:FA1K的体外表征

[0697] 在37℃下用胰蛋白酶温育FA1K导致ID-L253T和ID-38F单体臂的快速分离。因此FA1K被良好地格式化,以用于在暴露于人小肠中的胰蛋白酶时快速释放两种单体臂。

[0698] 研究了FA1K(胰蛋白酶切割之前和之后)针对TNF-α的中和功效(参见图3,其中'FA1K'是指胰蛋白酶处理前的FA1K,并且'FA1K胰蛋白酶'是指胰蛋白酶处理后的FA1K)。

[0699] 进行生物素化修美乐(阿达木单抗)竞争ELISA,其测量对于TNF-α上的表位的竞争。当竞争发生时,表位被未标记的多肽占据,并且更少的生物素化修美乐结合至TNFα,从而导致测定信号降低。将人TNFαELISA板用在磷酸盐缓冲盐水(1x PBS)中的250μg/mL牛血清白蛋白(BSA)中的100ng/mL涂覆,并且用在1x PBS中的1%BSA封闭。对于关于进行胰蛋白酶预处理的多肽的所有实验,使用1%BSA加0.1mM PMSF作为测定稀释液。在其他情况下,使用1%BSA作为测定稀释液。将生物素化阿达木单抗(LGC)与所有的标准物和样品1:1混合,以得到2nM生物素化阿达木单抗的最终浓度,之后将混合物添加到板上。使用外抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶(Sigma E2886)检测结合的生物素化阿达木单抗,并且使用TMB微孔底物(KPL50-76-00)可视化,之后用0.5M H_2SO_4停止并且在450nm处读取,发现FA1K(胰蛋白酶处理之前和之后)在此竞争ELISA中与ID-38F的功效基本上一样。

[0700] 研究了FA1K(胰蛋白酶切割之前和之后)针对IL-23的中和功效(参见图4,其中'FA1K'是指胰蛋白酶处理前的FA1K,'FA1K胰蛋白酶'是指胰蛋白酶处理后的FA1K)。FA1K(胰蛋白酶处理之前和之后)与ID-L253T针对IL-23的功效至少是一样的。

[0701] 在FA1K的C末端位置处包含ID-L253T,使得与游离ID-L253T单体相比所述ID-L253T臂具有N末端延伸,这也似乎为IL-23中和提供益处。

[0702] 还通过ELISA确认由在毕赤酵母中表达产生和纯化的FA1K针对TNF-α和IL-23是完全有功效的(数据未示出)。

[0703] 显示在人粪便上清液中温育4小时后,FA1K的两个单体臂保留母体单体ID-38F和ID-L253T的有利稳定性特征(参见图5,其中从左向右给出(a)ID-38F、(b)呈FA1K单体臂形式的ID-38F、(c)ID-L253T和(d)呈FA1K单体臂形式的ID-L253T的存活%)。

[0704] 综合考虑,以上发现证明FA1K是递送作为双重疗法的这些单体中的每一种的高浓度的合适形式。FA1K保留母体单体的有利功效和蛋白酶稳定性特征。由于不稳定接头形式,FA1K暴露于胰蛋白酶导致两个单体臂的快速释放,从而使得能够独立地结合至它们的相应靶而没有来自另一个臂的干扰。

[0705] 实施例11:抗IL-23(ID-L210T)和抗TNF-α(ID-38F)组合施用至人IBD组织的离体表征

[0706] 以上和其他公布中已经证明了具有TNF-α中和活性(ID-38F)和IL-23中和活性

(ID-L210T)的ICVD可以抑制在取自诊断IBD的患者的发炎肠组织样品中增加的胰蛋白酶激酶受体和信号传导蛋白的磷酸化(参见以上实施例8和WO2016156465,其中的实施例9)。

[0707] 进行新的研究来研究将ID-38F与L210T组合对于从患有UC的患者获得的发炎结肠粘膜组织的离体培养物中的磷酸化生物标记物的水平的影响。ID-L210T与ID-L253T仅相差三个氨基酸,并且显示类似的IL-23-IL-23R抑制功效以及对于体外消化的耐受性。

[0708] 将单种ICVD的作用与两种ICVD的混合物以及与同种型对照ICVD(ID-2A,非相关的抗艰难梭菌毒素ICVD)进行比较,以评估通过将不同的抗细胞因子机制组合可以实现什么作用。

[0709] 将来自四位UC患者中每一位的活检组织与不同的抗体(对照ID-2A、ID-38F、ID-L210T或ID-38F+ID-L210T)温育24小时,并且在处理后,在磷蛋白抗体阵列上分析组织裂解液。在各个阵列(4个阵列/处理)上检测的45个磷蛋白的平均信号强度/患者在图6-7中呈现(其中L210T是指ID-L210T)。通过从用对照ICVD ID2A处理的活检组织的明显高水平磷酸化至用抗TNF-α或抗IL-23ICVD或两者的组合处理的活检组织的相对低磷强度值的转变证明了不同抗体处理的抑制性作用。

[0710] 本文提供的数据示出了将TNF-α和IL-23的GI限制型拮抗作用组合的治疗性方法在比针对单一靶的单一疗法更大比例的患有炎性肠病的患者中实现更大的有效程度,持续更长的时间。

[0711] 其他方面

[0712] 此申请中涉及的所有参考文献,包括专利和专利申请在最大可能程度上以引用的方式并入本文。

[0713] 贯穿本说明书,除非上下文另有要求,否则词语‘包含(comprise)’以及变化形式诸如‘包含(comprises)’和‘包含(comprising)’将理解为隐含包括所陈述的整体、步骤、一组整体或一组步骤,但不排除任何其他整体、步骤、任何其他组整体或任何其他组步骤。

[0714] 此描述和权利要求形成其一部分的申请可以用作关于任何随后申请的优先权的基础。此随后申请的权利要求可以涉及本文所述的任何特征或特征的组合。它们可以呈产物、组合物、方法或用途权利要求的形式,并且可以包括例如但不限于以下权利要求。

[0715] 参考文献

[0716] 以下参考文献均以引用的方式整体并入本文。

[0717] • Arbabi-Ghahroudi et al FEBS Lett 1997 414:521-526

[0718] • Biancheri et al 2015 Gastroenterology 149(6):1564-1574

[0719] • Blattler et al Biochemistry 1985 24:1517-1524

[0720] • Chomezynnski and Sacchi Anal Biochem 1987 162:156-159

[0721] • Colombel et al Gastroenterology 2007132:52-65

[0722] • Crowe et al 2018 Sci.Rep.8:1-13

[0723] • Croxford et al Eur J Immunol.2012 42:2263-2273

[0724] • Desmyter et al.Front Immunol 20178(884):1-10

[0725] • Eken et al Inflamm Bowel Dis.201420:587-595

[0726] • Faisst et al J Virol 1995 69:4538-4543

[0727] • Frenken et al J Biotech 2000 78:11-21

[0728] • Furfaro et al Expert Rev Clin Immunol.2017 13:1-11

[0729] • Green and Sambrook Molecular Cloning:A Laboratory Manual 2012 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press

[0730] • Griffiths et al Antibodies 2013 2:66-81

[0731] • Grundstrom et al Nucl.Acids Res 1985 13:3305-3316

[0732] • Hamers-Casterman et al Nature 1993 363(6428):446-448

[0733] • Hanauer et al Lancet 2002 359:1541-1549

[0734] • Hanauer et al Gastroenterology 2006 130:323-333

[0735] • Harmsen et al Gene 1993 125:115-123

[0736] • Harmsen et al Appl Microbiol Biotechnol 2007 77(1):13-22)

[0737] • Hendrickson et al Clin Microbiol Rev 2002 15(1):79-94

[0738] • Hoogenboom et al Nucl Acid Res 1991 19:4133-4137

[0739] • Huse et al Science 1989 246(4935):1275-1281

[0740] • Kabat et al Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition U.S.Department of Health and Human Services,1991 NIH Publication Number 91-3242

[0741] • Knezevic et al 2012 Journal of the American Chemical Society 134 (37):15225-15228

[0742] • Köhler and Milstein Nature 1975 256:495-497

[0743] • Ling et al Anal Biochem 1997 254(2):157-178

[0744] • McCoy et al Retrovirology 2014 11:83

[0745] • McGovern and Powrie Gut 2007 56:1333-1336

[0746] • Merchlinsky et al J.Virol.1983 47:227-232

[0747] • Miethe et al J Biotech 2013 163(2):105-111

[0748] • Muyldermans et al Protein Eng 1994 7(9):1129-1135

[0749] • Muyldermans Annu Rev Biochem 2013 82:775-797

[0750] • Nambiar et al Science 1984 223:1299-1301

[0751] • Nelson et al Molecular Pathology 2000 53(3):111-117

[0752] • Nguyen et al Adv Immunol 2001 79:261-296

[0753] • Ortonne,Brit J Dermatol 1999 140(suppl 54):1-7

[0754] • Padlan Mol Immunol 1994 31:169-217

[0755] • Roux et al Proc Natl Acad Sci USA 1998 95:11804-11809

[0756] • Sandborn et al N Engl J Med.2007 357:228-238

[0757] • Sakamar and Khorana Nucl.Acids Res 1988 14:6361-6372

[0758] • Schreiber et al N Engl J Med.2007 357:239-250

[0759] • Skerra et al Science 1988 240(4855):1038-1041

[0760] • Tanha et al J Immunol Methods 2002 263:97-109

[0761] • Teng et al Nat Med.2015 21:719-729

[0762] • Thomassen et al Enzyme and Micro Tech 2002 30:273-278

[0763] • Verma and Eckstein Annu Rev Biochem 1998 67:99-134

[0764] • Vossenkämper et al 2014 Gastroenterology 147(1):172-183

[0765] • Ward et al Nature 1989 341:544-546

[0766] • Wells et al Gene 1985 34:315-323

[0001] 序列表

[0002] <110> 韦斯夸尔德有限公司

[0003] <120> 多肽

[0004] <130> VHS-P2140PCT

[0005] <160> 77

[0006] <170> PatentIn版本3.5

[0007] <210> 1

[0008] <211> 5

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 美洲驼

[0011] <400> 1

[0012] Phe Lys Val Met Gly

[0013] 1 5

[0014] <210> 2

[0015] <211> 16

[0016] <212> PRT

[0017] <213> 美洲驼

[0018] <400> 2

[0019] Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly

[0020] 1 5 10 15

[0021] <210> 3

[0022] <211> 13

[0023] <212> PRT

[0024] <213> 美洲驼

[0025] <400> 3

[0026] Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val

[0027] 1 5 10

[0028] <210> 4

[0029] <211> 30

[0030] <212> PRT

[0031] <213> 美洲驼

[0032] <400> 4

[0033] Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly

[0034] 1 5 10 15

[0035] Ser Leu Ser Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser

[0036] 20 25 30

[0037] <210> 5

[0038] <211> 14

[0039] <212> PRT

[0040] <213> 美洲驼

[0041] <400> 5

[0042] Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala

[0043] 1 5 10

[0044] <210> 6

[0045] <211> 32

[0046] <212> PRT

[0047] <213> 美洲驼

[0048] <400> 6

[0049] Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu Gln

[0050] 1 5 10 15

[0051] Met Asn Ser Leu Lys Arg Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly

[0052] 20 25 30

[0053] <210> 7

[0054] <211> 11

[0055] <212> PRT

[0056] <213> 美洲驼

[0057] <400> 7

[0058] Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

[0059] 1 5 10

[0060] <210> 8

[0061] <211> 121

[0062] <212> PRT

[0063] <213> 美洲驼

[0064] <400> 8

[0065] Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly

[0066] 1 5 10 15

[0067] Ser Leu Ser Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys

[0068] 20 25 30

[0069] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

[0070] 35 40 45

[0071] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys

[0072] 50 55 60

[0073] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu

[0074] 65 70 75 80

[0075] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[0076] 85 90 95

[0077] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly

[0078] 100 105 110

[0079] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

[0080] 115 120

[0081] <210> 9

[0082] <211> 369

[0083] <212> DNA

[0084] <213> 美洲驼

[0085] <400> 9

[0086] gatgttcaat tggttgaatc tggtggtggt caagttcaac caggtggttc tttgtcttta 60

[0087] tcttgtgaat cctccgtttc catctggtct tttaaagtta tgggttggtt cagacaagtc 120

[0088] ccaggtaaac aaagagaatt ggttgctact attactaccg gtggttctcc agattattcc 180

[0089] gattctgtta agggtagatt caccatctca agagattacg ataagaggac cttgtacttg 240

[0090] cagatgaatt ctttgaagcc agaagatacc gctgtttatt actgtgctgg tagattgtgg 300

[0091] gctcatatta cttcatctgg tcatgatgtt tggggtcaag gtactcaagt tactgtctct 360

[0092] tcatgataa 369

[0093] <210> 10

[0094] <211> 363

[0095] <212> DNA

[0096] <213> 美洲驼

[0097] <400> 10

[0098] gatgttcaat tggttgaatc tggtggtggt caagttcaac caggtggttc tttgtcttta 60

[0099] tcttgtgaat cctccgtttc catctggtct tttaaagtta tgggttggtt cagacaagtc 120

[0100] ccaggtaaac aaagagaatt ggttgctact attactaccg gtggttctcc agattattcc 180

[0101] gattctgtta agggtagatt caccatctca agagattacg ataagaggac cttgtacttg 240

[0102] cagatgaatt ctttgaagcc agaagatacc gctgtttatt actgtgctgg tagattgtgg 300

[0103] gctcatatta cttcatctgg tcatgatgtt tggggtcaag gtactcaagt tactgtctct 360

[0104] tca 363

[0105] <210> 11

[0106] <211> 121

[0107] <212> PRT

[0108] <213> 美洲驼

[0109] <400> 11

[0110] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0111] 1 5 10 15

[0112] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys

[0113] 20 25 30

[0114] Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

[0115] 35 40 45

[0116] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

[0117] 50 55 60

[0118] Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Val Phe Leu

[0119] 65 70 75 80

[0120] Glu Met Asp Ser Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Asn

[0121] 85 90 95

[0122] Gly Arg Leu Trp Ala His Leu Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly

[0123] 100 105 110

[0124] Gln Gly Thr Arg Val Thr Val Ser Ser

[0125] 115 120

[0126] <210> 12

[0127] <211> 121

[0128] <212> PRT

[0129] <213> 美洲驼

[0130] <400> 12

[0131] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0132] 1 5 10 15

[0133] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys

[0134] 20 25 30

[0135] Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

[0136] 35 40 45

[0137] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

[0138] 50 55 60

[0139] Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Val Phe Leu

[0140] 65 70 75 80

[0141] Glu Met Asp Ser Val Lys Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Asn

[0142] 85 90 95

[0143] Gly Arg Leu Trp Ala His Leu Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly

[0144] 100 105 110

[0145] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

[0146] 115 120

[0147] <210> 13

[0148] <211> 126

[0149] <212> PRT

[0150] <213> 美洲驼

[0151] <400> 13

[0152] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Ala Gly Gly

[0153] 1 5 10 15

[0154] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Pro Ser Gly Arg Ala Phe Ser Gly Ser

[0155] 20 25 30

[0156] Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
[0157] 35 40 45
[0158] Gly Val Ile Ile Trp Thr Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0159] 50 55 60
[0160] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Thr Val Tyr
[0161] 65 70 75 80
[0162] Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0163] 85 90 95
[0164] Ala Ala Arg Thr Pro Asn Ser Ser Trp Phe Pro Thr Thr Leu Tyr Glu
[0165] 100 105 110
[0166] Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0167] 115 120 125
[0168] <210> 14
[0169] <211> 5
[0170] <212> PRT
[0171] <213> 美洲驼
[0172] <400> 14
[0173] Gly Ser Ala Met Gly
[0174] 1 5
[0175] <210> 15
[0176] <211> 17
[0177] <212> PRT
[0178] <213> 美洲驼
[0179] <400> 15
[0180] Val Ile Ile Trp Thr Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[0181] 1 5 10 15
[0182] Gly
[0183] <210> 16
[0184] <211> 17
[0185] <212> PRT
[0186] <213> 美洲驼
[0187] <400> 16
[0188] Arg Thr Pro Asn Ser Ser Trp Phe Pro Thr Thr Leu Tyr Glu Tyr Asp
[0189] 1 5 10 15
[0190] Tyr
[0191] <210> 17
[0192] <211> 30
[0193] <212> PRT
[0194] <213> 美洲驼

[0195] <400> 17

[0196] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Ala Gly Gly

[0197] 1 5 10 15

[0198] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Pro Ser Gly Arg Ala Phe Ser

[0199] 20 25 30

[0200] <210> 18

[0201] <211> 14

[0202] <212> PRT

[0203] <213> 美洲驼

[0204] <400> 18

[0205] Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Gly

[0206] 1 5 10

[0207] <210> 19

[0208] <211> 32

[0209] <212> PRT

[0210] <213> 美洲驼

[0211] <400> 19

[0212] Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln

[0213] 1 5 10 15

[0214] Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala

[0215] 20 25 30

[0216] <210> 20

[0217] <211> 11

[0218] <212> PRT

[0219] <213> 美洲驼

[0220] <400> 20

[0221] Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

[0222] 1 5 10

[0223] <210> 21

[0224] <211> 124

[0225] <212> PRT

[0226] <213> 美洲驼

[0227] <400> 21

[0228] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Thr

[0229] 1 5 10 15

[0230] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr

[0231] 20 25 30

[0232] Ile Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

[0233] 35 40 45

[0234] Ala Ile Ile Thr Ala Asn Gly Val Ala Thr Asp Tyr Arg Asp Ser Val
[0235] 50 55 60
[0236] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Gly Tyr
[0237] 65 70 75 80
[0238] Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[0239] 85 90 95
[0240] Ala Leu Arg Thr Arg Ser Gly Ser Leu Phe Asp Pro Gly Thr Phe Asp
[0241] 100 105 110
[0242] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0243] 115 120
[0244] <210> 22
[0245] <211> 5
[0246] <212> PRT
[0247] <213> 美洲驼
[0248] <400> 22
[0249] Asn Tyr Ile Met Gly
[0250] 1 5
[0251] <210> 23
[0252] <211> 17
[0253] <212> PRT
[0254] <213> 美洲驼
[0255] <400> 23
[0256] Ile Ile Thr Ala Asn Gly Val Ala Thr Asp Tyr Arg Asp Ser Val Lys
[0257] 1 5 10 15
[0258] Gly
[0259] <210> 24
[0260] <211> 15
[0261] <212> PRT
[0262] <213> 美洲驼
[0263] <400> 24
[0264] Arg Thr Arg Ser Gly Ser Leu Phe Asp Pro Gly Thr Phe Asp Tyr
[0265] 1 5 10 15
[0266] <210> 25
[0267] <211> 30
[0268] <212> PRT
[0269] <213> 美洲驼
[0270] <400> 25
[0271] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Thr
[0272] 1 5 10 15

[0273] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser
[0274] 20 25 30
[0275] <210> 26
[0276] <211> 14
[0277] <212> PRT
[0278] <213> 美洲驼
[0279] <400> 26
[0280] Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
[0281] 1 5 10
[0282] <210> 27
[0283] <211> 32
[0284] <212> PRT
[0285] <213> 美洲驼
[0286] <400> 27
[0287] Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Gly Tyr Leu Glu
[0288] 1 5 10 15
[0289] Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu
[0290] 20 25 30
[0291] <210> 28
[0292] <211> 11
[0293] <212> PRT
[0294] <213> 美洲驼
[0295] <400> 28
[0296] Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0297] 1 5 10
[0298] <210> 29
[0299] <211> 121
[0300] <212> PRT
[0301] <213> 美洲驼
[0302] <400> 29
[0303] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0304] 1 5 10 15
[0305] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys
[0306] 20 25 30
[0307] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
[0308] 35 40 45
[0309] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys
[0310] 50 55 60
[0311] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu

[0312] 65 70 75 80
[0313] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
[0314] 85 90 95
[0315] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0316] 100 105 110
[0317] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0318] 115 120
[0319] <210> 30
[0320] <211> 121
[0321] <212> PRT
[0322] <213> 美洲驼
[0323] <400> 30
[0324] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0325] 1 5 10 15
[0326] Ser Leu Ser Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys
[0327] 20 25 30
[0328] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
[0329] 35 40 45
[0330] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys
[0331] 50 55 60
[0332] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu
[0333] 65 70 75 80
[0334] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
[0335] 85 90 95
[0336] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0337] 100 105 110
[0338] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0339] 115 120
[0340] <210> 31
[0341] <211> 121
[0342] <212> PRT
[0343] <213> 美洲驼
[0344] <400> 31
[0345] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0346] 1 5 10 15
[0347] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys
[0348] 20 25 30
[0349] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
[0350] 35 40 45

[0351] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys
[0352] 50 55 60
[0353] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu
[0354] 65 70 75 80
[0355] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
[0356] 85 90 95
[0357] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0358] 100 105 110
[0359] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0360] 115 120
[0361] <210> 32
[0362] <211> 121
[0363] <212> PRT
[0364] <213> 美洲驼
[0365] <400> 32
[0366] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0367] 1 5 10 15
[0368] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys
[0369] 20 25 30
[0370] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Leu Glu Leu Val
[0371] 35 40 45
[0372] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys
[0373] 50 55 60
[0374] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu
[0375] 65 70 75 80
[0376] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
[0377] 85 90 95
[0378] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0379] 100 105 110
[0380] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0381] 115 120
[0382] <210> 33
[0383] <211> 121
[0384] <212> PRT
[0385] <213> 美洲驼
[0386] <400> 33
[0387] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0388] 1 5 10 15
[0389] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys

[0390] 20 25 30

[0391] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

[0392] 35 40 45

[0393] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro His Asp Gly Asp Ser Ala Lys

[0394] 50 55 60

[0395] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu

[0396] 65 70 75 80

[0397] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala

[0398] 85 90 95

[0399] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly

[0400] 100 105 110

[0401] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

[0402] 115 120

[0403] <210> 34

[0404] <211> 121

[0405] <212> PRT

[0406] <213> 美洲驼

[0407] <400> 34

[0408] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly

[0409] 1 5 10 15

[0410] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys

[0411] 20 25 30

[0412] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

[0413] 35 40 45

[0414] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro His Tyr Ser Asp Ser Val Lys

[0415] 50 55 60

[0416] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu

[0417] 65 70 75 80

[0418] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala

[0419] 85 90 95

[0420] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly

[0421] 100 105 110

[0422] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

[0423] 115 120

[0424] <210> 35

[0425] <211> 121

[0426] <212> PRT

[0427] <213> 美洲驼

[0428] <400> 35

[0429] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0430] 1 5 10 15
[0431] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys
[0432] 20 25 30
[0433] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
[0434] 35 40 45
[0435] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Arg Asp Ser Val Lys
[0436] 50 55 60
[0437] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu
[0438] 65 70 75 80
[0439] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
[0440] 85 90 95
[0441] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0442] 100 105 110
[0443] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0444] 115 120
[0445] <210> 36
[0446] <211> 121
[0447] <212> PRT
[0448] <213> 美洲驼
[0449] <400> 36
[0450] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0451] 1 5 10 15
[0452] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys
[0453] 20 25 30
[0454] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
[0455] 35 40 45
[0456] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys
[0457] 50 55 60
[0458] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu
[0459] 65 70 75 80
[0460] Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
[0461] 85 90 95
[0462] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0463] 100 105 110
[0464] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0465] 115 120
[0466] <210> 37
[0467] <211> 121

[0468] <212> PRT

[0469] <213> 美洲驼

[0470] <400> 37

[0471] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly

[0472] 1 5 10 15

[0473] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys

[0474] 20 25 30

[0475] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

[0476] 35 40 45

[0477] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys

[0478] 50 55 60

[0479] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu

[0480] 65 70 75 80

[0481] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[0482] 85 90 95

[0483] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly

[0484] 100 105 110

[0485] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

[0486] 115 120

[0487] <210> 38

[0488] <211> 121

[0489] <212> PRT

[0490] <213> 美洲驼

[0491] <400> 38

[0492] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly

[0493] 1 5 10 15

[0494] Ser Leu Ser Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys

[0495] 20 25 30

[0496] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

[0497] 35 40 45

[0498] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys

[0499] 50 55 60

[0500] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu

[0501] 65 70 75 80

[0502] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[0503] 85 90 95

[0504] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly

[0505] 100 105 110

[0506] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

[0507] 115 120

[0508] <210> 39

[0509] <211> 121

[0510] <212> PRT

[0511] <213> 美洲驼

[0512] <400> 39

[0513] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly

[0514] 1 5 10 15

[0515] Ser Leu Ser Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys

[0516] 20 25 30

[0517] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

[0518] 35 40 45

[0519] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys

[0520] 50 55 60

[0521] Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Val Tyr Leu

[0522] 65 70 75 80

[0523] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[0524] 85 90 95

[0525] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly

[0526] 100 105 110

[0527] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

[0528] 115 120

[0529] <210> 40

[0530] <211> 121

[0531] <212> PRT

[0532] <213> 美洲驼

[0533] <400> 40

[0534] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly

[0535] 1 5 10 15

[0536] Ser Leu Ser Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys

[0537] 20 25 30

[0538] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Leu Glu Leu Val

[0539] 35 40 45

[0540] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys

[0541] 50 55 60

[0542] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu

[0543] 65 70 75 80

[0544] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[0545] 85 90 95

[0546] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0547] 100 105 110
[0548] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0549] 115 120
[0550] <210> 41
[0551] <211> 121
[0552] <212> PRT
[0553] <213> 美洲驼
[0554] <400> 41
[0555] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0556] 1 5 10 15
[0557] Ser Leu Ser Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys
[0558] 20 25 30
[0559] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly His Gln Leu Glu Leu Val
[0560] 35 40 45
[0561] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys
[0562] 50 55 60
[0563] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu
[0564] 65 70 75 80
[0565] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0566] 85 90 95
[0567] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0568] 100 105 110
[0569] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0570] 115 120
[0571] <210> 42
[0572] <211> 121
[0573] <212> PRT
[0574] <213> 美洲驼
[0575] <400> 42
[0576] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0577] 1 5 10 15
[0578] Ser Leu Ser Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys
[0579] 20 25 30
[0580] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Leu Glu Leu Val
[0581] 35 40 45
[0582] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro His Tyr Ser Asp Ser Val Lys
[0583] 50 55 60
[0584] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu

[0585] 65 70 75 80
[0586] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0587] 85 90 95
[0588] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0589] 100 105 110
[0590] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0591] 115 120
[0592] <210> 43
[0593] <211> 121
[0594] <212> PRT
[0595] <213> 美洲驼
[0596] <400> 43
[0597] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0598] 1 5 10 15
[0599] Ser Leu Ser Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys
[0600] 20 25 30
[0601] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Leu Glu Phe Val
[0602] 35 40 45
[0603] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro His Tyr Ser Asp Ser Val Lys
[0604] 50 55 60
[0605] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu
[0606] 65 70 75 80
[0607] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0608] 85 90 95
[0609] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0610] 100 105 110
[0611] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0612] 115 120
[0613] <210> 44
[0614] <211> 121
[0615] <212> PRT
[0616] <213> 美洲驼
[0617] <400> 44
[0618] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0619] 1 5 10 15
[0620] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys
[0621] 20 25 30
[0622] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
[0623] 35 40 45

[0624] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro His Tyr Ser Asp Ser Val Lys
[0625] 50 55 60
[0626] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu
[0627] 65 70 75 80
[0628] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0629] 85 90 95
[0630] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0631] 100 105 110
[0632] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0633] 115 120
[0634] <210> 45
[0635] <211> 121
[0636] <212> PRT
[0637] <213> 美洲驼
[0638] <400> 45
[0639] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0640] 1 5 10 15
[0641] Ser Leu Ser Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys
[0642] 20 25 30
[0643] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Leu Val
[0644] 35 40 45
[0645] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys
[0646] 50 55 60
[0647] Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Val Tyr Leu
[0648] 65 70 75 80
[0649] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0650] 85 90 95
[0651] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0652] 100 105 110
[0653] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0654] 115 120
[0655] <210> 46
[0656] <211> 257
[0657] <212> PRT
[0658] <213> 人工序列
[0659] <220>
[0660] <223> 人工序列
[0661] <400> 46
[0662] Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0663] 1 5 10 15

[0664] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His

[0665] 20 25 30

[0666] Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu

[0667] 35 40 45

[0668] Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val

[0669] 50 55 60

[0670] Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr

[0671] 65 70 75 80

[0672] Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

[0673] 85 90 95

[0674] Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr

[0675] 100 105 110

[0676] Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Gly Gly

[0677] 115 120 125

[0678] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly

[0679] 130 135 140

[0680] Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Glu Ser

[0681] 145 150 155 160

[0682] Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val

[0683] 165 170 175

[0684] Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser

[0685] 180 185 190

[0686] Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

[0687] 195 200 205

[0688] Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

[0689] 210 215 220

[0690] Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr

[0691] 225 230 235 240

[0692] Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser

[0693] 245 250 255

[0694] Ser

[0695] <210> 47

[0696] <211> 115

[0697] <212> PRT

[0698] <213> 美洲驼

[0699] <400> 47

[0700] Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0701] 1 5 10 15

[0702] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His
[0703] 20 25 30
[0704] Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu
[0705] 35 40 45
[0706] Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val
[0707] 50 55 60
[0708] Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr
[0709] 65 70 75 80
[0710] Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
[0711] 85 90 95
[0712] Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
[0713] 100 105 110
[0714] Val Ser Ser
[0715] 115
[0716] <210> 48
[0717] <211> 121
[0718] <212> PRT
[0719] <213> 美洲驼
[0720] <400> 48
[0721] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Gln Val Gln Pro Gly Gly
[0722] 1 5 10 15
[0723] Ser Leu Ser Leu Ser Cys Glu Ser Ser Val Ser Ile Trp Ser Phe Lys
[0724] 20 25 30
[0725] Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
[0726] 35 40 45
[0727] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Ser Asp Ser Val Lys
[0728] 50 55 60
[0729] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Thr Leu Tyr Leu
[0730] 65 70 75 80
[0731] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0732] 85 90 95
[0733] Gly Arg Leu Trp Ala His Ile Thr Ser Ser Gly His Asp Val Trp Gly
[0734] 100 105 110
[0735] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0736] 115 120
[0737] <210> 49
[0738] <211> 21
[0739] <212> PRT
[0740] <213> 人工序列

[0741] <220>

[0742] <223> 人工序列

[0743] <400> 49

[0744] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Gly Gly Gly Gly Ser

[0745] 1 5 10 15

[0746] Gly Gly Gly Gly Ser

[0747] 20

[0748] <210> 50

[0749] <211> 363

[0750] <212> DNA

[0751] <213> 美洲驼

[0752] <400> 50

[0753] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60

[0754] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggtt 120

[0755] ccgggtaaac agcgtgaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc ggattatagc 180

[0756] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240

[0757] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcacgttatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300

[0758] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360

[0759] agc 363

[0760] <210> 51

[0761] <211> 363

[0762] <212> DNA

[0763] <213> 美洲驼

[0764] <400> 51

[0765] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgagcctg 60

[0766] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggtt 120

[0767] ccgggtaaac agcgtgaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc ggattatagc 180

[0768] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240

[0769] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcacgttatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300

[0770] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360

[0771] agc 363

[0772] <210> 52

[0773] <211> 363

[0774] <212> DNA

[0775] <213> 美洲驼

[0776] <400> 52

[0777] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60

[0778] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggca 120

[0779] ccgggtaaac agcgtgaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc ggattatagc 180

[0780] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240
[0781] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcacgttatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300
[0782] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360
[0783] agc 363
[0784] <210> 53
[0785] <211> 363
[0786] <212> DNA
[0787] <213> 美洲驼
[0788] <400> 53
[0789] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60
[0790] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggtt 120
[0791] ccgggtaaac agctggaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc ggattatagc 180
[0792] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240
[0793] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcacgttatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300
[0794] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360
[0795] agc 363
[0796] <210> 54
[0797] <211> 363
[0798] <212> DNA
[0799] <213> 美洲驼
[0800] <400> 54
[0801] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60
[0802] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggtt 120
[0803] ccgggtaaac agcgtgaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc gcatgatggt 180
[0804] gatagcgcaa aaggtcgttt taccattagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240
[0805] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcacgttatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300
[0806] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360
[0807] agc 363
[0808] <210> 55
[0809] <211> 363
[0810] <212> DNA
[0811] <213> 美洲驼
[0812] <400> 55
[0813] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60
[0814] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggtt 120
[0815] ccgggtaaac agcgtgaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc gcattatagc 180
[0816] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240
[0817] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcacgttatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300
[0818] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360

[0819] agc 363

[0820] <210> 56

[0821] <211> 363

[0822] <212> DNA

[0823] <213> 美洲驼

[0824] <400> 56

[0825] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60

[0826] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggtt 120

[0827] ccgggtaaac agcgtgaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc ggattatcgt 180

[0828] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240

[0829] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcacgttatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300

[0830] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360

[0831] agc 363

[0832] <210> 57

[0833] <211> 363

[0834] <212> DNA

[0835] <213> 美洲驼

[0836] <400> 57

[0837] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60

[0838] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggtt 120

[0839] ccgggtaaac agcgtgaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc ggattatagc 180

[0840] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240

[0841] cagatgaata gcctgaaaag cgaagatacc gcacgttatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300

[0842] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360

[0843] agc 363

[0844] <210> 58

[0845] <211> 363

[0846] <212> DNA

[0847] <213> 美洲驼

[0848] <400> 58

[0849] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60

[0850] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggtt 120

[0851] ccgggtaaac agcgtgaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc ggattatagc 180

[0852] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240

[0853] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcagtgtatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300

[0854] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360

[0855] agc 363

[0856] <210> 59

[0857] <211> 363

[0858] <212> DNA

[0859] <213> 美洲驼

[0860] <400> 59

[0861] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgagcctg 60

[0862] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggtt 120

[0863] ccgggtaaac agcgtgaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc ggattatagc 180

[0864] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240

[0865] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcagtgtatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300

[0866] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360

[0867] agc 363

[0868] <210> 60

[0869] <211> 363

[0870] <212> DNA

[0871] <213> 美洲驼

[0872] <400> 60

[0873] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgagcctg 60

[0874] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggca 120

[0875] ccgggtaaac agcgtgaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc ggattatagc 180

[0876] gatagcgtta aaggtcgttt taccctgagc cgtgattatg ataaacgtac cgtttacctg 240

[0877] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcagtgtatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300

[0878] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360

[0879] agc 363

[0880] <210> 61

[0881] <211> 363

[0882] <212> DNA

[0883] <213> 美洲驼

[0884] <400> 61

[0885] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgagcctg 60

[0886] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggca 120

[0887] ccgggtaaac agctggaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc ggattatagc 180

[0888] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240

[0889] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcagtgtatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300

[0890] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360

[0891] agc 363

[0892] <210> 62

[0893] <211> 363

[0894] <212> DNA

[0895] <213> 美洲驼

[0896] <400> 62

[0897] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgagcctg 60
[0898] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggtt 120
[0899] ccgggtcatc agctggaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc ggattatagc 180
[0900] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240
[0901] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcagtgtatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300
[0902] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360
[0903] agc 363
[0904] <210> 63
[0905] <211> 363
[0906] <212> DNA
[0907] <213> 美洲驼
[0908] <400> 63
[0909] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgagcctg 60
[0910] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggca 120
[0911] ccgggtaaac agctggaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc gcattatagc 180
[0912] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240
[0913] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcagtgtatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300
[0914] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360
[0915] agc 363
[0916] <210> 64
[0917] <211> 363
[0918] <212> DNA
[0919] <213> 美洲驼
[0920] <400> 64
[0921] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgagcctg 60
[0922] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggca 120
[0923] ccgggtaaac agctggaatt tgttgcaacc attaccacag gtggtagtcc gcattatagc 180
[0924] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240
[0925] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcagtgtatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300
[0926] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360
[0927] agc 363
[0928] <210> 65
[0929] <211> 363
[0930] <212> DNA
[0931] <213> 美洲驼
[0932] <400> 65
[0933] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60
[0934] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggtt 120
[0935] ccgggtaaag aacgtgaatt tgttgcaacc attaccacag gtggtagtcc gcattatagc 180

[0936] gatagcgtta aaggtcgttt taccatcagc cgtgattatg ataaacgtac cctgtacctg 240
[0937] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcagtgtatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300
[0938] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360
[0939] agc 363
[0940] <210> 66
[0941] <211> 363
[0942] <212> DNA
[0943] <213> 美洲驼
[0944] <400> 66
[0945] gaagttcagc tggttgaaag cggtggtggt caggttcagc ctggtggtag cctgagcctg 60
[0946] agctgtgaaa gcagcgttag catttggagc tttaaagtta tgggttggtt tcgtcaggca 120
[0947] ccgggtaaag aactggaact ggttgccacc attaccacag gtggtagtcc ggattatagc 180
[0948] gatagcgtta aaggtcgttt taccctgagc cgtgattatg ataaacgtac cgtttacctg 240
[0949] cagatgaata gcctgaaacc ggaagatacc gcagtgtatt attgtgcagg tcgtctgtgg 300
[0950] gcacatatta ccagcagcgg tcatgatgtt tggggtcagg gcacccaggt caccgttagc 360
[0951] agc 363
[0952] <210> 67
[0953] <211> 115
[0954] <212> PRT
[0955] <213> 美洲驼
[0956] <400> 67
[0957] Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0958] 1 5 10 15
[0959] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His
[0960] 20 25 30
[0961] Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu
[0962] 35 40 45
[0963] Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val
[0964] 50 55 60
[0965] Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr
[0966] 65 70 75 80
[0967] Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
[0968] 85 90 95
[0969] Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
[0970] 100 105 110
[0971] Val Ser Ser
[0972] 115
[0973] <210> 68
[0974] <211> 28

[0975] <212> DNA

[0976] <213> 人工序列

[0977] <220>

[0978] <223> 人工序列

[0979] <400> 68

[0980] tcttaactag tgaggagacg gtgacctg 28

[0981] <210> 69

[0982] <211> 126

[0983] <212> PRT

[0984] <213> 美洲驼

[0985] <400> 69

[0986] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0987] 1 5 10 15

[0988] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Leu

[0989] 20 25 30

[0990] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

[0991] 35 40 45

[0992] Ser Cys Val Ser Ser Ser Gly Gln Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[0993] 50 55 60

[0994] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Ser Thr Val Tyr

[0995] 65 70 75 80

[0996] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0997] 85 90 95

[0998] Ala Thr Asp Pro Glu Cys Tyr Arg Val Arg Gly Tyr Tyr Asn Gly Glu

[0999] 100 105 110

[1000] Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

[1001] 115 120 125

[1002] <210> 70

[1003] <211> 469

[1004] <212> PRT

[1005] <213> 人工序列

[1006] <220>

[1007] <223> 人工序列

[1008] <400> 70

[1009] Met Gly Trp Thr Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

[1010] 1 5 10 15

[1011] Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

[1012] 20 25 30

[1013] Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

[1014] 35 40 45
[1015] Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[1016] 50 55 60
[1017] Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Ala
[1018] 65 70 75 80
[1019] Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
[1020] 85 90 95
[1021] Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
[1022] 100 105 110
[1023] Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Pro Asp
[1024] 115 120 125
[1025] Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
[1026] 130 135 140
[1027] Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
[1028] 145 150 155 160
[1029] Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
[1030] 165 170 175
[1031] Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
[1032] 180 185 190
[1033] Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
[1034] 195 200 205
[1035] Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr
[1036] 210 215 220
[1037] Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
[1038] 225 230 235 240
[1039] Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
[1040] 245 250 255
[1041] Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
[1042] 260 265 270
[1043] Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
[1044] 275 280 285
[1045] Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
[1046] 290 295 300
[1047] Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
[1048] 305 310 315 320
[1049] Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
[1050] 325 330 335
[1051] Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
[1052] 340 345 350

[1053] Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
[1054] 355 360 365
[1055] Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
[1056] 370 375 380
[1057] Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
[1058] 385 390 395 400
[1059] Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
[1060] 405 410 415
[1061] Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
[1062] 420 425 430
[1063] Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
[1064] 435 440 445
[1065] Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
[1066] 450 455 460
[1067] Leu Ser Pro Gly Lys
[1068] 465
[1069] <210> 71
[1070] <211> 237
[1071] <212> PRT
[1072] <213> 人工序列
[1073] <220>
[1074] <223> 人工序列
[1075] <400> 71
[1076] Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
[1077] 1 5 10 15
[1078] Gly Thr Arg Cys Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly
[1079] 20 25 30
[1080] Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn
[1081] 35 40 45
[1082] Thr Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr
[1083] 50 55 60
[1084] Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ser Gly Asn Arg Pro Ser Gly Val
[1085] 65 70 75 80
[1086] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala
[1087] 85 90 95
[1088] Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser
[1089] 100 105 110
[1090] Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu
[1091] 115 120 125

[1092] Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
[1093] 130 135 140
[1094] Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
[1095] 145 150 155 160
[1096] Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
[1097] 165 170 175
[1098] Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
[1099] 180 185 190
[1100] Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
[1101] 195 200 205
[1102] Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
[1103] 210 215 220
[1104] Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[1105] 225 230 235
[1106] <210> 72
[1107] <211> 189
[1108] <212> PRT
[1109] <213> 智人
[1110] <400> 72
[1111] Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr
[1112] 1 5 10 15
[1113] Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln
[1114] 20 25 30
[1115] Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His
[1116] 35 40 45
[1117] Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr
[1118] 50 55 60
[1119] Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln
[1120] 65 70 75 80
[1121] Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly
[1122] 85 90 95
[1123] Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu
[1124] 100 105 110
[1125] Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu
[1126] 115 120 125
[1127] Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr
[1128] 130 135 140
[1129] Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu
[1130] 145 150 155 160

[1131] Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala
[1132] 165 170 175
[1133] Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
[1134] 180 185
[1135] <210> 73
[1136] <211> 328
[1137] <212> PRT
[1138] <213> 智人
[1139] <400> 73
[1140] Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
[1141] 1 5 10 15
[1142] Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
[1143] 20 25 30
[1144] Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
[1145] 35 40 45
[1146] Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
[1147] 50 55 60
[1148] Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
[1149] 65 70 75 80
[1150] Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
[1151] 85 90 95
[1152] Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
[1153] 100 105 110
[1154] Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
[1155] 115 120 125
[1156] Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
[1157] 130 135 140
[1158] Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
[1159] 145 150 155 160
[1160] Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
[1161] 165 170 175
[1162] Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
[1163] 180 185 190
[1164] Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
[1165] 195 200 205
[1166] Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
[1167] 210 215 220
[1168] Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
[1169] 225 230 235 240

[1170] Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
[1171] 245 250 255
[1172] Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
[1173] 260 265 270
[1174] Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
[1175] 275 280 285
[1176] Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
[1177] 290 295 300
[1178] Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
[1179] 305 310 315 320
[1180] Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
[1181] 325
[1182] <210> 74
[1183] <211> 23
[1184] <212> PRT
[1185] <213> 人工序列
[1186] <220>
[1187] <223> 蛋白酶不稳定接头形式
[1188] <220>
[1189] <221> 变体
[1190] <222> (1)..(23)
[1191] <223> 所述特征可出现 1 至 10 次
[1192] <220>
[1193] <221> 变体
[1194] <222> (1)..(11)
[1195] <223> 所述特征可出现 1 至 10 次
[1196] <220>
[1197] <221> 变体
[1198] <222> (2)..(10)
[1199] <223> 可以不存在所述Gly残基,或可以存在所述Gly残基中的一些或全部
[1200] <220>
[1201] <221> MISC_FEATURE
[1202] <222> (12)..(12)
[1203] <223> Xaa是Lys或Arg
[1204] <220>
[1205] <221> 变体
[1206] <222> (13)..(23)
[1207] <223> 所述残基可出现 1 至 10 次
[1208] <220>

[1209] <221> 变体

[1210] <222> (14)..(22)

[1211] <223> 可以不存在所述Gly残基,或可以存在所述Gly残基中的一些或全部

[1212] <400> 74

[1213] Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Gly

[1214] 1 5 10 15

[1215] Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser

[1216] 20

[1217] <210> 75

[1218] <211> 21

[1219] <212> PRT

[1220] <213> 人工序列

[1221] <220>

[1222] <223> 蛋白酶不稳定接头序列

[1223] <400> 75

[1224] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Gly Gly Gly Gly Ser

[1225] 1 5 10 15

[1226] Gly Gly Gly Gly Ser

[1227] 20

[1228] <210> 76

[1229] <211> 5

[1230] <212> PRT

[1231] <213> 人工序列

[1232] <220>

[1233] <223> 非蛋白酶不稳定接头形式

[1234] <220>

[1235] <221> 变体

[1236] <222> (1)..(5)

[1237] <223> 所述残基可出现 1 至 10 次

[1238] <400> 76

[1239] Gly Gly Gly Gly Ser

[1240] 1 5

[1241] <210> 77

[1242] <211> 30

[1243] <212> PRT

[1244] <213> 人工序列

[1245] <220>

[1246] <223> 非蛋白酶不稳定接头序列

[1247] <400> 77

[1248] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

[1249] 1 5 10 15

[1250] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

[1251] 20 25 30

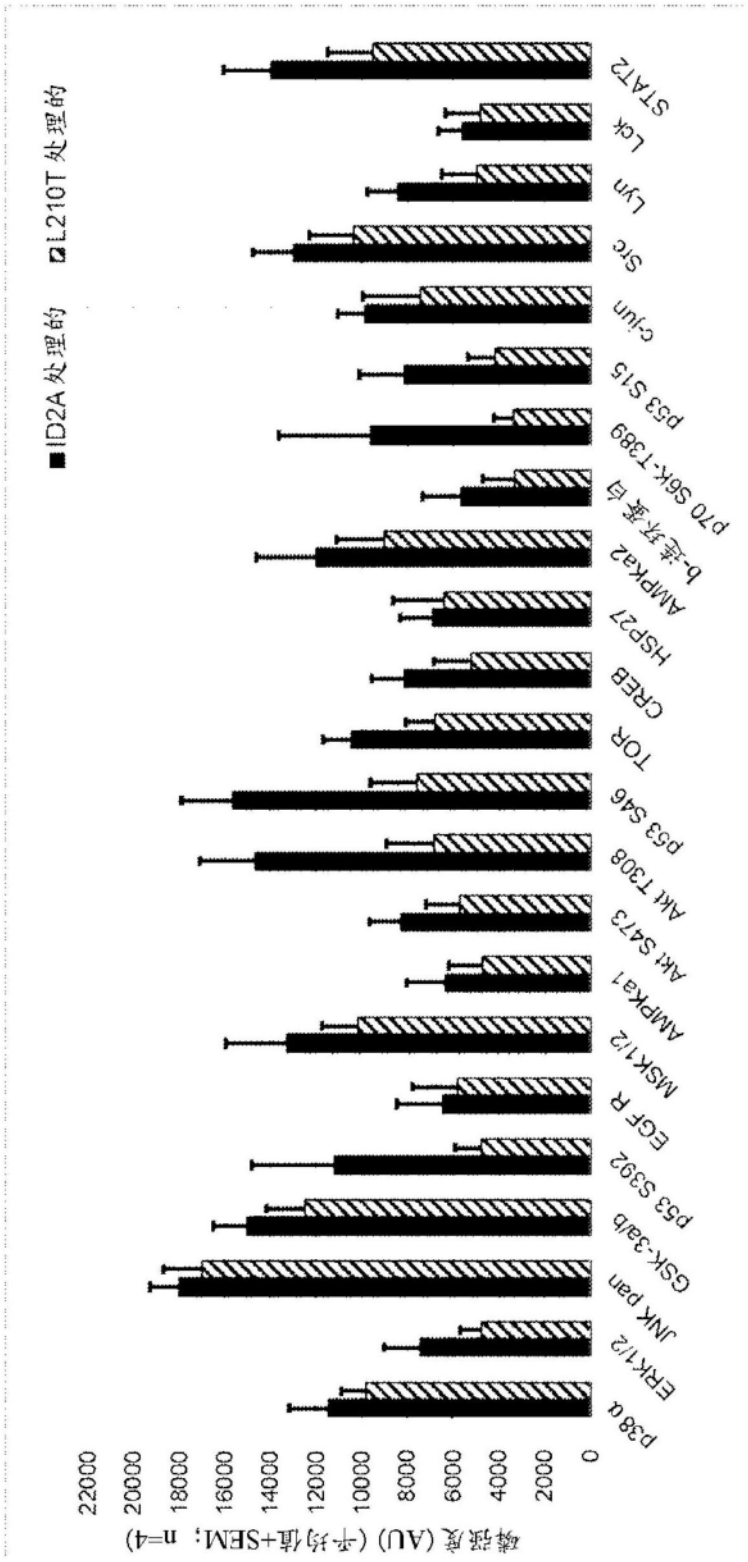

■ID2A 处理的
□L210T 处理的
磷强度 (AU) (平均值+SEM; n=4)
22000
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
p38α
ERK1/2
JNK pan
GSK-3a/b
p53 S392
EGF R
MSK1/2
AMPKa1
Akt S473
Akt T308
p53 S46
TOR
CREB
HSP27
AMPKa2
b-连环蛋白
p70 S6K-T389
p53 S15
c-jun
Src
Lyn
Lck
STAT2

图1

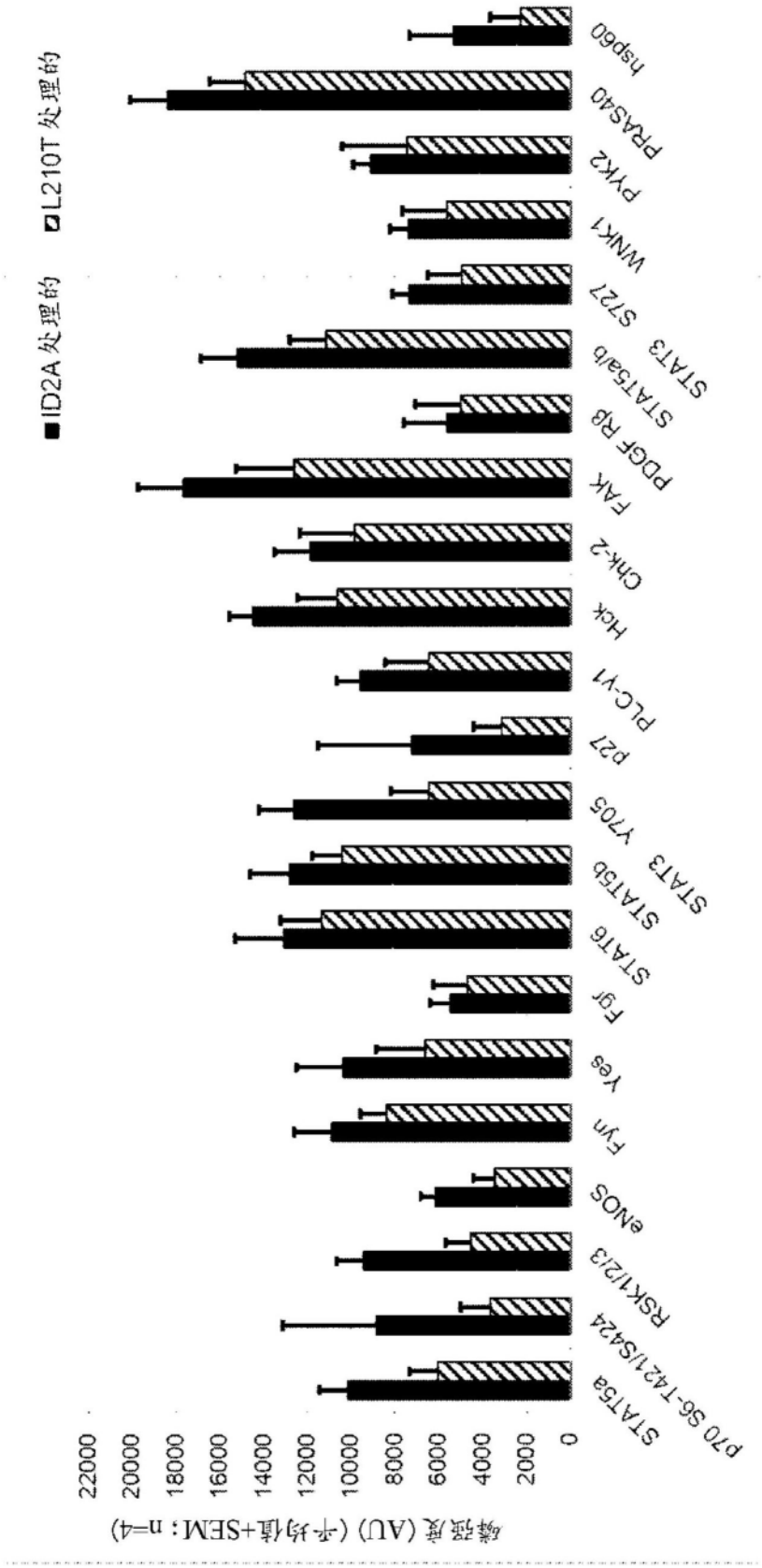

■ID2A 处理的
□L210T 处理的
磷强度 (AU) (平均值+SEM；n=4)
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000
20000
22000
STAT5a
p70 S6-T421/S424
RSK1/2/3
eNOS
Fyn
Yes
Fgr
STAT6
STAT5b
STAT3 Y705
p27
PLC-γ1
Hck
Chk-2
FAK
PDGF Rβ
STAT5a/b
STAT3 S727
WNK1
PYK2
PRAS40
hsp60

图2

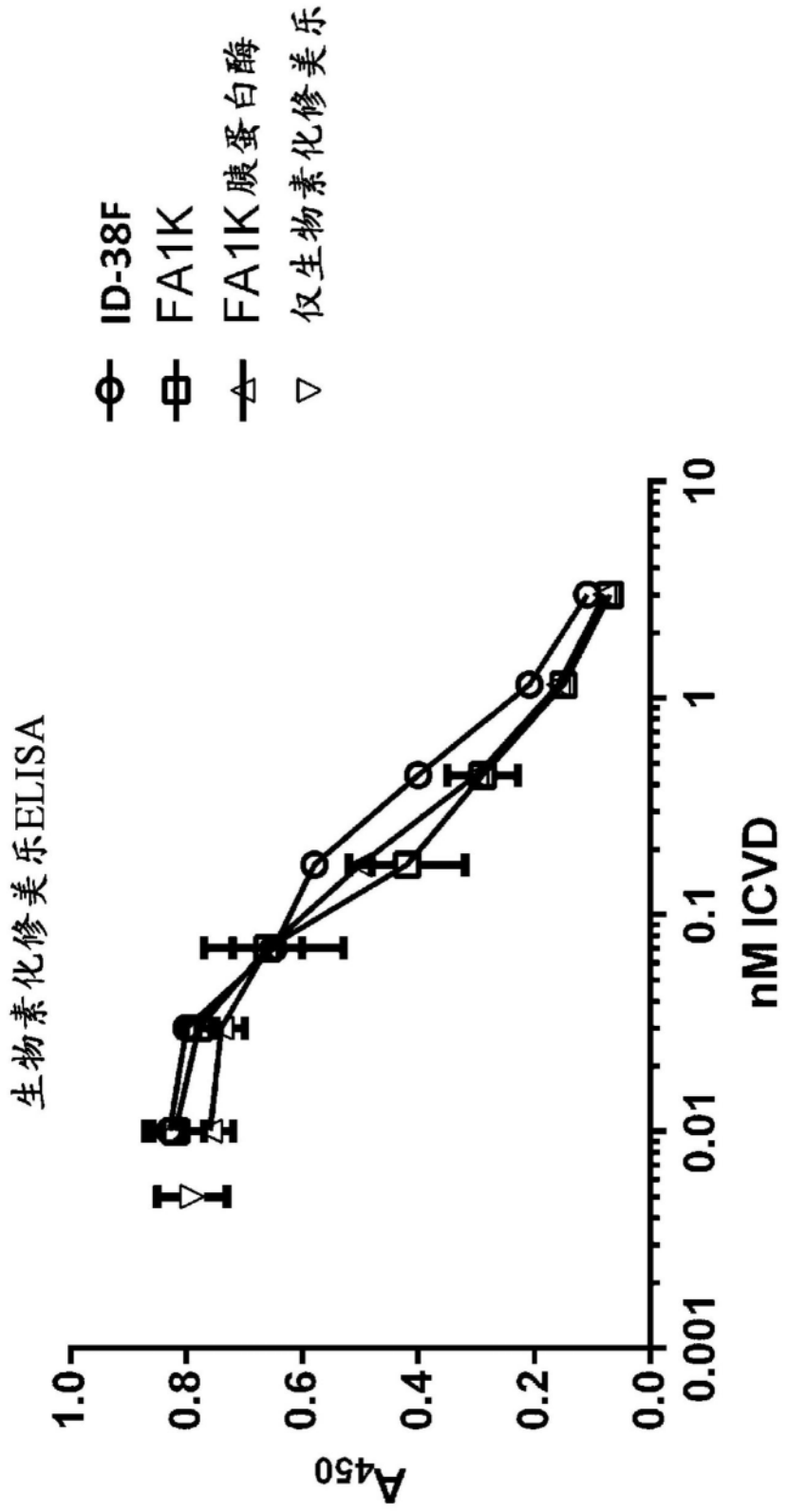

ID-38F
FA1K
FA1K胰蛋白酶
仅生物素化修美乐
生物素化修美乐ELISA
A450
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
nM ICVD

图3

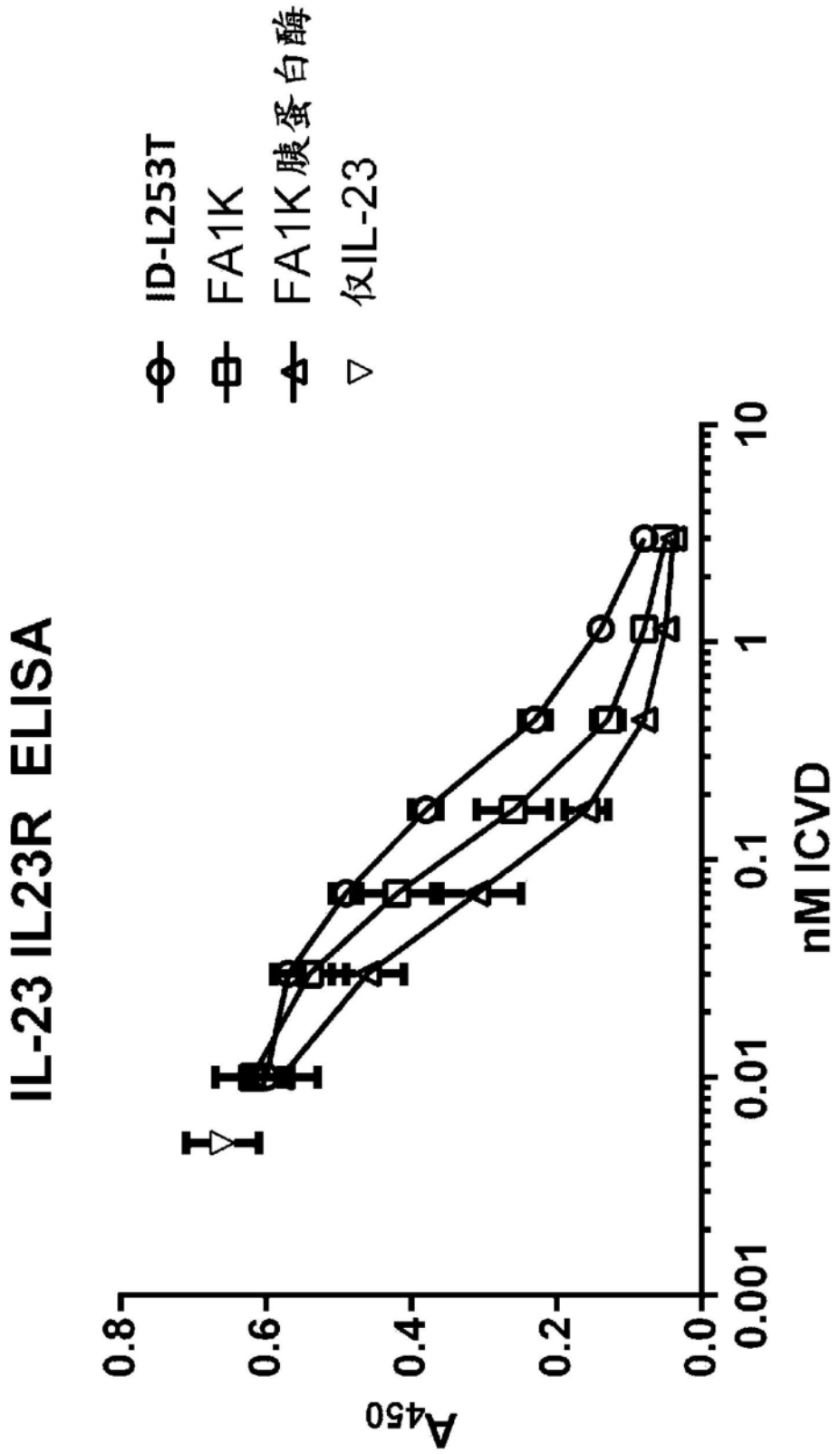

IL-23 IL23R ELISA
ID-L253T
FA1K
FA1K 胰蛋白酶
仅IL-23
A450
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
0.001
0.01
0.1
1
10
nM ICVD

图4

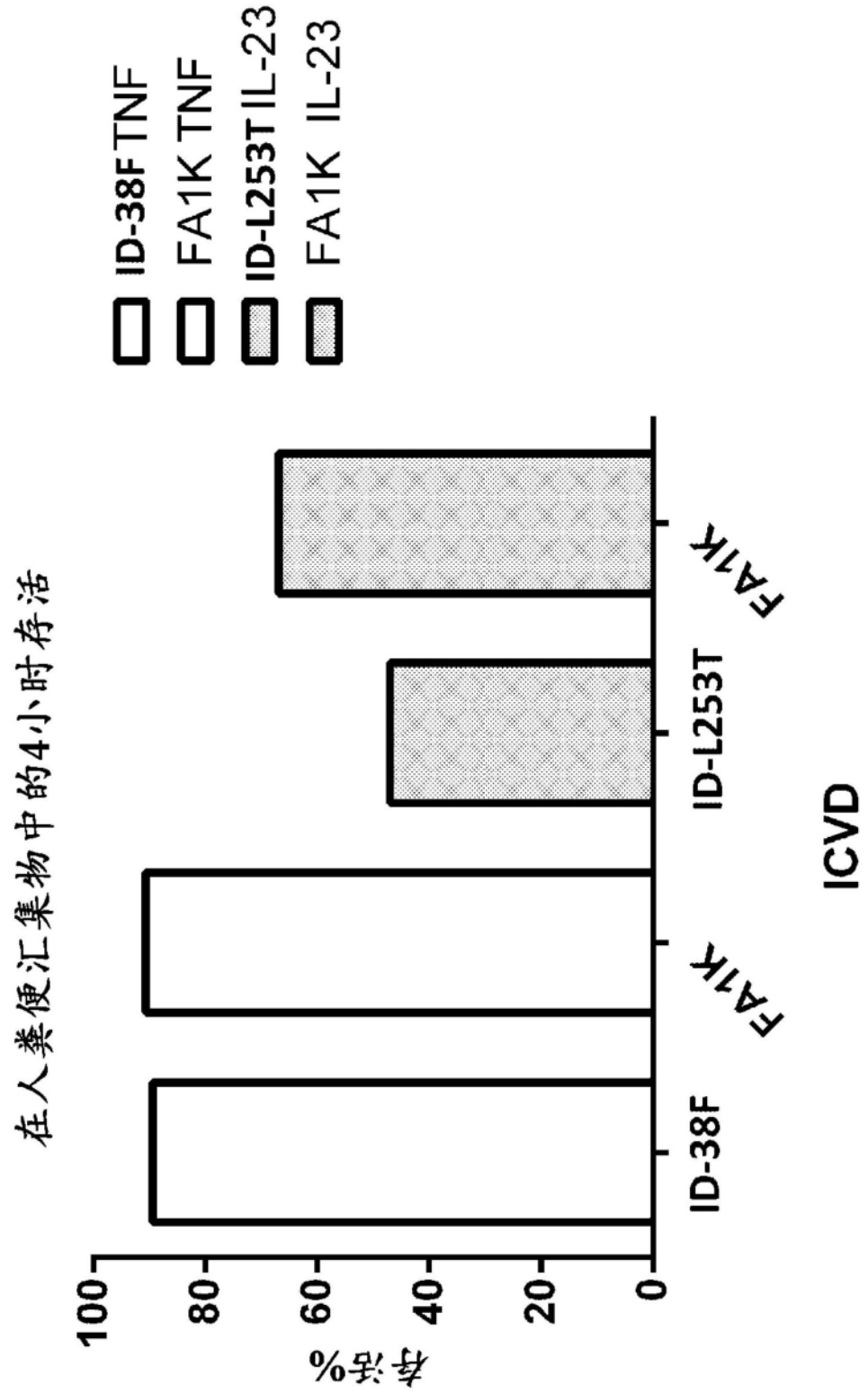

ID-38F TNF
FA1K TNF
ID-L253T IL-23
FA1K IL-23
在人粪便汇集物中的4小时存活
存活%
100
80
60
40
20
0
ID-38F
FA1K
ID-L253T
FA1K
ICVD

图5

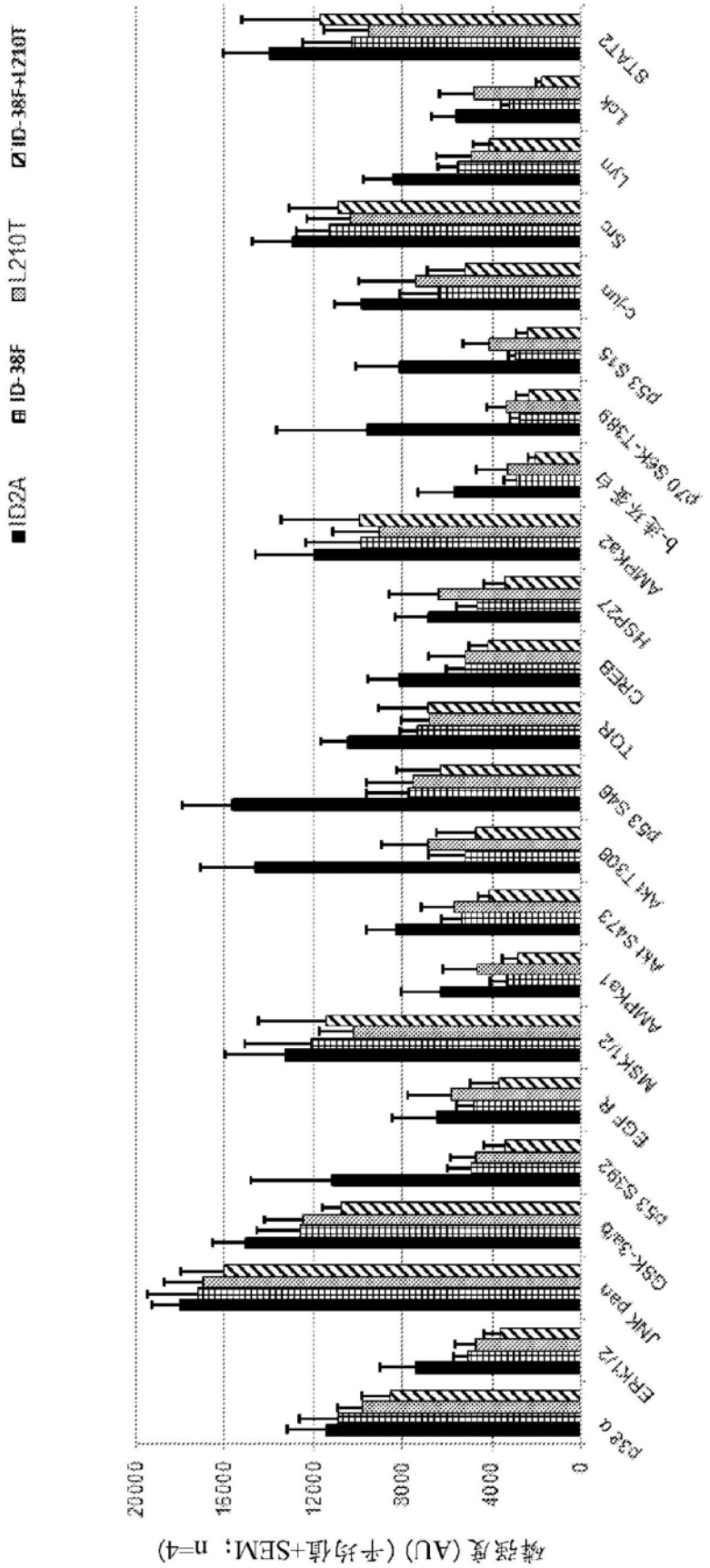

IB2A
ID-38F
L210T
ID-38F+L210T
磷强度 (AU) (平均值+SEM; n=4)
20000
15000
12000
3000
4000
0
P38 α
ERK1/2
JNK pan
GSK-3αβ
p53 S392
EGF R
MSK1/2
AMPKα1
Akt S473
Akt T308
p53 S46
TOR
CREB
HSP27
AMPKα2
b-走开蛋白
p70 S6K-T389
p53 S15
c-Jun
Src
Lyn
Lck
STAT2

图6

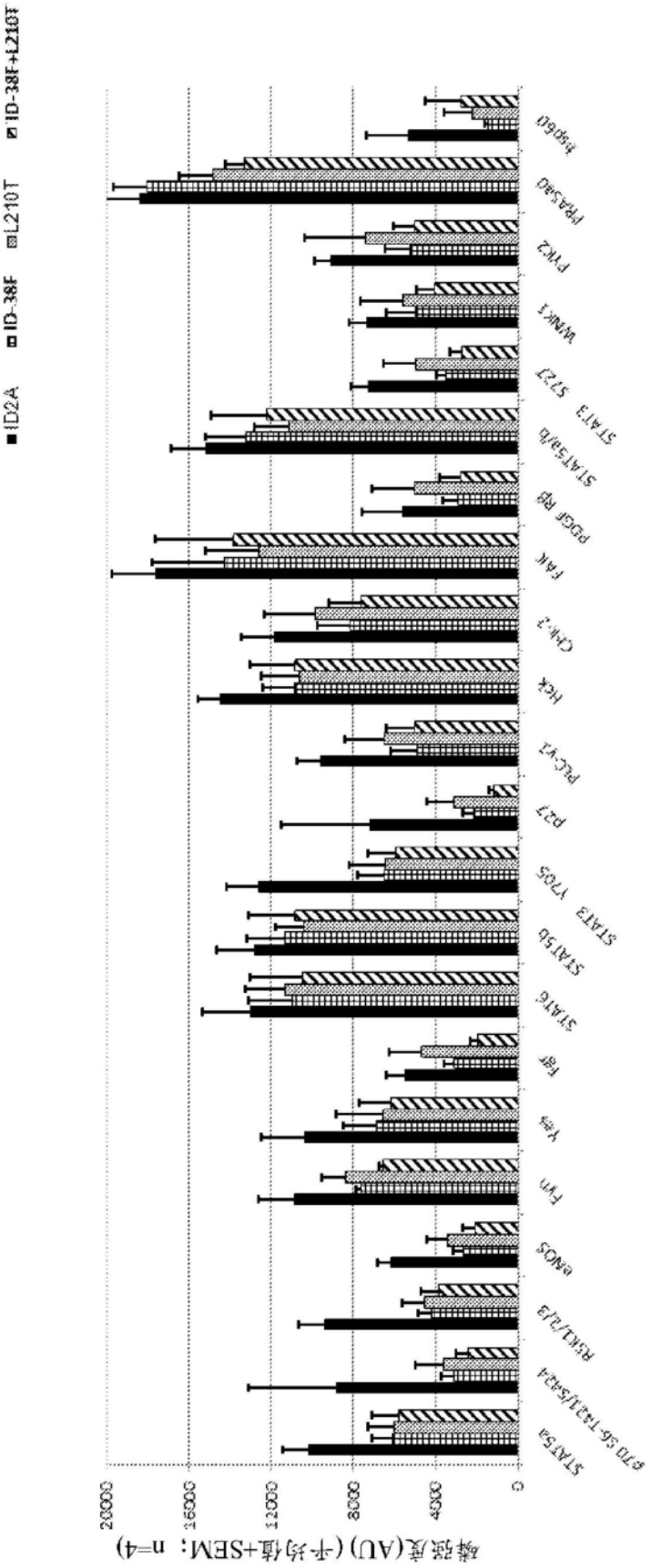

ID2A
ID-38F
L210T
ID-38F+L210T
磷强度(AU)(平均值+SEM; n=4)
0
40000
80000
120000
160000
200000
STAT5a
FAK
PDGF Rβ
STAT3
Src
Fyn
eNOS
Akt
STAT6
STAT5b
PLC-γ2
HCK
Cbl-2
PYK2
PRAS40
WNK1
S727
Hsp60

图7