

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880018997.6

[51] Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 3 月 24 日

[11] 公开号 CN 101679511A

[22] 申请日 2008.6.3

[21] 申请号 200880018997.6

[30] 优先权

[32] 2007.6.6 [33] US [31] 60/933,632

[86] 国际申请 PCT/GB2008/050404 2008.6.3

[87] 国际公布 WO2008/149147 英 2008.12.11

[85] 进入国家阶段日期 2009.12.4

[71] 申请人 杜门蒂斯有限公司

地址 英国米德尔塞克斯

[72] 发明人 M·斯图尔德 M·普佩卡

I·汤林森 C·埃内弗

L·耶斯珀斯 T·D·巴图万加拉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 李连涛

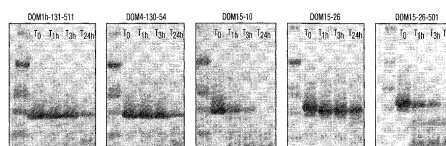
权利要求书 7 页 说明书 123 页 附图 91 页

[54] 发明名称

多肽、抗体可变域和拮抗剂

[57] 摘要

本发明涉及能抵抗蛋白酶降解的抗-VEGF 多肽和抗体单可变域(dAb)，以及含有这些的拮抗剂。多肽、dAb 和拮抗剂可用于肺部给药、口服给药，递送至患者的肺和递送至患者的 GI 道，以及用于治疗癌症和炎症，如关节炎。



1. 抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域, 其含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列(显示于图 5 中)为至少 97%同一性的氨基酸序列。

2. 权利要求 1 的免疫球蛋白单可变域, 其在位置 6 含有缬氨酸, 其中编号根据 Kabat。

3. 权利要求 1 或 2 的免疫球蛋白单可变域, 其在位置 99 含有亮氨酸, 其中编号根据 Kabat。

4. 权利要求 1-3 的免疫球蛋白单可变域, 其在位置 30 含有赖氨酸, 其中编号根据 Kabat。

5. 抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域, 其含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列(显示于图 5 中)相同的氨基酸序列。

6. 抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域, 其由与选自 DOM 15-26-593 的核酸序列(显示于图 20c 中)的序列为至少 80%同一性的核苷酸序列编码。

7. 抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域, 其由与 DOM 15-26-593 的核酸序列(显示于图 20c 中)相同的序列编码。

8. 抗-VEGF 拮抗剂, 其含有根据之前任一项权利要求的抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域。

9. 权利要求 8 的拮抗剂, 其含有第一或第二免疫球蛋白单可变域, 其中每个可变域是根据权利要求 1 至 7 中的任一项。

10. 权利要求 8 或 9 的拮抗剂, 其中所述拮抗剂含有所述单可变域的单体或所述单可变域的同型二聚体。

11. 权利要求 8、9 或 10 的拮抗剂, 其中该单可变域或每个单可变域的氨基酸序列与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列(显示于图 5 中)相同。

12. 抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域, 其含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列(显示于图 5 中)相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50%同一性的 CDR1 序列的氨基酸序列。

13. 抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域, 其含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列(显示于图 5 中)相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50%同一性的 CDR2 序列的氨基酸序列。

14. 抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域, 其含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列 (显示于图 5 中) 相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50% 同一性的 CDR3 序列的氨基酸序列。

15. 抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域, 其含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列 (显示于图 5 中) 相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50% 同一性的 CDR1 序列和具有与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50% 同一性的 CDR2 序列的氨基酸序列。

16. 抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域, 其含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列 (显示于图 5 中) 相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50% 同一性的 CDR1 序列和具有与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50% 同一性的 CDR3 序列的氨基酸序列。

17. 抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域, 其含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列 (显示于图 5 中) 相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50% 同一性的 CDR2 序列和具有与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50% 同一性的 CDR3 序列的氨基酸序列。

18. 抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域, 其含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列 (显示于图 5 中) 相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50% 同一性的 CDR1 序列和具有与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50% 同一性的 CDR2 序列和具有与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50% 同一性的 CDR3 序列的氨基酸序列。

19. 抗-VEGF 拮抗剂, 其具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列 (显示于图 5 中) 为至少 50% 同一性的 CDR1 序列。

20. 抗-VEGF 拮抗剂, 其具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列 (显示于图 5 中) 为至少 50% 同一性的 CDR2 序列。

21. 抗-VEGF 拮抗剂, 其具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列 (显示于图 5 中) 为至少 50% 同一性的 CDR3 序列。

22. 抗-VEGF 拮抗剂, 其具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列 (显

示于图 5 中)为至少 50%同一性的 CDR1 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50%同一性的 CDR2 序列。

23. 抗-VEGF 拮抗剂,其具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列(显示于图 5 中)为至少 50%同一性的 CDR1 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50%同一性的 CDR3 序列。

24. 抗-VEGF 拮抗剂,其具有与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列(显示于图 5 中)为至少 50%同一性的 CDR2 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50%同一性的 CDR3 序列。

25. 抗-VEGF 拮抗剂,其具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列(显示于图 5 中)为至少 50%同一性的 CDR1 序列、与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50%同一性的 CDR2 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50%同一性的 CDR3 序列。

26. 抗-VEGF 拮抗剂,其含有免疫球蛋白单可变域,该单可变域含有 DOM 15-26-593 的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的序列(显示于图 5 中)。

27. 抗-VEGF 拮抗剂,其与 DOM 15-26-593 竞争与 VEGF 的结合。

28. 蛋白酶抗性免疫球蛋白单可变域,其含有 VEGF 结合位点,其中与以下温育时,可变域能抵抗蛋白酶:

(i) 在 37°C 下用浓度(c)为至少 10 微克/ml 的蛋白酶温育至少一小时;或

(ii) 在 30°C 下用浓度(c')为至少 40 微克/ml 的蛋白酶温育至少一小时。

29. 权利要求 28 的可变域,其中浓度(c或c')为至少 100 或 1000 微克/ml 蛋白酶。

30. 权利要求 28 或 29 的可变域,其中时间(t)是一小时、三小时或 24 小时或过夜。

31. 权利要求 28 的可变域,其中可变域在条件(i)下是有抗性的,并且浓度(c)是 10 或 100 微克/ml 蛋白酶,时间(t)是 1 小时。

32. 权利要求 28 的可变域,其中可变域在条件(ii)下是有抗性的,并且浓度(c')是 40 微克/ml 蛋白酶,时间(t)是 3 小时。

33. 权利要求 28 至 32 任一项的可变域,其中蛋白酶选自胰蛋白酶、弹性蛋白酶、leucozyme 和胰酶。

34. 权利要求 28 至 33 任一项的可变域,其中蛋白酶是胰蛋白酶。

35. 权利要求 28 至 34 任一项的可变域, 其中可变域能抵抗胰蛋白酶, 并且至少一种其他的蛋白酶选自弹性蛋白酶、leucozyme 和胰酶。

36. 权利要求 28 至 35 任一项的可变域, 其中在条件 (i) 或 (ii) 下温育后, 可变域特异性地结合 VEGF。

37. 权利要求 36 的可变域, 在条件 (i) 或 (ii) 下温育后, 可变域在 ELISA 中具有至少 0.404 的 OD₄₅₀ 读数。

38. 权利要求 28 至 37 任一项的可变域, 其中在条件 (i) 或 (ii) 下温育后, 可变域特异性地结合蛋白 A 或蛋白 L。

39. 权利要求 28 至 38 任一项的可变域, 其中在条件 (i) 或 (ii) 下温育后, 可变域在凝胶电泳中基本上展示了单条条带。

40. VEGF 拮抗剂, 其含有根据权利要求 1-7、12-18 和 28 至 39 任一项的可变域。

41. 权利要求 40 的 VEGF 拮抗剂, 其用于口服递送。

42. 权利要求 40 或 41 的 VEGF 拮抗剂, 其用于递送至患者的 GI 道。

43. 权利要求 40 的 VEGF 拮抗剂在制造用于口服递送的药物中的用途。

44. 权利要求 40 的 VEGF 拮抗剂在制造用于传动至患者 GI 道的药物中的用途。

45. 权利要求 40、41 或 42 的拮抗剂, 或权利要求 43 或 44 的用途, 其中可变域能抵抗胰蛋白酶、弹性蛋白酶和/或胰酶。

46. 权利要求 40 的 VEGF 拮抗剂, 其用于肺部递送。

47. 权利要求 40 的 VEGF 拮抗剂, 其用于递送至患者的眼睛。

48. 权利要求 40 的 VEGF 拮抗剂在制造用于肺部递送的药物中的用途。

49. 权利要求 40 的 VEGF 拮抗剂在制造用于递送至患者眼睛的药物中的用途。

50. 权利要求 46 或 47 的拮抗剂或权利要求 48 或 49 的用途, 其中可变域能抵抗胰蛋白酶。

51. 将药物口服递送或递送至患者 GI 道或至患者肺或肺部组织或眼睛的方法, 其中该方法包括将药物学上有效量的权利要求 40 的 VEGF 拮抗剂给药于患者。

52. 权利要求 40 的 VEGF 拮抗剂, 其用于治疗 and/or 预防癌症、炎症、自体免疫疾病或 AMD 或 VEGF 介导的病症或疾病、COPD 或肺炎。

53. 权利要求 40 的 VEGF 拮抗剂在制造用于治疗 and/or 预防癌症、炎症、自体免疫疾病或 AMD 或 VEGF 介导的病症或疾病、COPD 或肺炎的药物中的用途。

54. 权利要求 52 的拮抗剂或权利要求 53 的用途, 其中病症选自肺癌、结肠癌、头颈癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌和卵巢癌。

55. 权利要求 53 的拮抗剂或用途, 其中所述病症是 AMD。

56. 权利要求 53 的拮抗剂或用途, 其中所述炎症是炎性肠病并选自克罗恩氏病和溃疡性结肠炎。

57. 权利要求 53 的拮抗剂或用途, 其中所述慢性梗阻性肺病选自慢性支气管炎、慢性梗阻性支气管炎和肺气肿。

58. 权利要求 53 的拮抗剂或用途, 其中所述肺炎是细菌性肺炎。

59. 权利要求 53 的拮抗剂或用途, 其中所述细菌性肺炎是葡萄球菌肺炎。

60. 权利要求 40 的 VEGF 拮抗剂, 其用于治疗 and/or 预防癌症。

61. 权利要求 40 的 VEGF 拮抗剂在制造用于治疗 and/or 预防癌症的药物中的用途。

62. 权利要求 60 的拮抗剂或权利要求 61 的用途, 其中所述癌症是选自肺癌、结肠癌、头颈癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌和卵巢癌的实体肿瘤。

63. 含有权利要求 40、46、47 或 50 的 VEGF 拮抗剂的肺部递送装置。

64. 权利要求 63 的装置, 其中装置是吸入器或鼻内给药装置。

65. 含有权利要求 40 或 41 的 VEGF 拮抗剂的口服制剂。

66. 权利要求 65 的制剂, 其中制剂是片剂、丸剂、胶囊、液体或糖浆。

67. 权利要求 8 至 11 和 40 至 66 任一项的拮抗剂、用途、方法、装置或制剂, 其中拮抗剂含有根据权利要求 1 至 7、12 至 18 和 28 至 39 任一项的可变域。

68. 权利要求 8 至 11 和 40 至 66 任一项的拮抗剂、用途、方法、装置或制剂, 其中拮抗剂含有具有至少 50°C T_m 的可变域。

69. 根据权利要求 1 至 7、12 至 18 和 28 至 39 任一项的可变域，其中拮抗剂含有具有至少 50°C T_m 的可变域。

70. 权利要求 8 至 11 和 40 至 66 任一项的拮抗剂、用途、方法、装置或制剂，其中拮抗剂含有在标准 HUVEC 细胞测试中中和人 VEGF 的可变域，具有 500nM 至 50pM 的 ND50。

71. 根据权利要求 1 至 7、12 至 18 和 28 至 39 任一项的可变域，其中可变域在标准 HUVEC 细胞测试中中和人 VEGF，具有 500nM 至 50pM 的 ND50。

72. 双特异性配体，其含有根据权利要求 1 至 7、12 至 18、28 至 39、69 和 71 任一项的可变域。

73. 分离的或重组的核酸，其编码含有根据权利要求 1 至 7、12 至 18、28 至 39、69 和 71 任一项的免疫球蛋白单可变域的多肽。

74. 载体，其含有权利要求 73 的核酸。

75. 宿主细胞，其含有权利要求 73 的核酸或权利要求 74 的载体。

76. 生产多肽的方法，该多肽含有免疫球蛋白单可变域，该方法包括在适于所述核酸或载体表达的条件下维持权利要求 75 的宿主细胞，由此产生含有免疫球蛋白单可变域的多肽。

77. 权利要求 76 的方法，其进一步包括分离多肽，并且任选产生变体，例如突变的变体，具有比分离的多肽提高的亲亲和性和/或 ND50。

78. 药物组合物，其含有权利要求 1 至 7、12 至 18、28 至 39、69 和 71 任一项的免疫球蛋白单可变域或权利要求 8 至 11、19 至 27、40 至 42、45 至 47、50、52、54 至 60、67、68 和 70 任一项的拮抗剂和药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

79. 多肽，其含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列（显示于图 5 中）为至少 97% 同一性的序列。

80. 多肽，其由与 DOM 15-26-593 的核苷酸序列（显示于图 20C 中）为至少 80% 同一性的核苷酸序列编码。

81. 融合蛋白，其含有权利要求 79 或 80 的多肽。

82. 分离的或重组的核酸，其编码权利要求 79 或 80 的多肽或权利要求 81 的融合多肽。

83. 权利要求 1 至 7、12 至 18、28 至 39、69 和 71 任一项的免疫球蛋白单可变域或权利要求 8 至 11、19 至 27、40 至 42、45 至 47、50、

52、54 至 60、62、67、68 和 70 任一项的拮抗剂或权利要求 79 或 80 的多肽，其含有抗体恒定域。

84. 权利要求 83 的可变域、拮抗剂或多肽，其含有抗体 Fc，任选其中 Fc 的 N-端连接（任选直接连接）可变域的 C-端。

多肽、抗体可变域和拮抗剂

本发明涉及蛋白酶抗性多肽、免疫球蛋白（抗体）单可变域和包含这些的血管内皮生长因子（VEGF）拮抗剂。本发明进一步涉及含有该抗-VEGF 配体的用途、制剂、组合物和装置。

发明背景

多肽和肽日益成为各种应用中的重要制剂，这些应用包括工业应用和用作医学、治疗和诊断试剂。然而，在特定的生理学情况中，如癌症和炎症（例如，COPD）状况中，组织、器官或动物（例如，在肺中，在肿瘤中或邻近肿瘤）中存在的蛋白酶含量将增加。这种蛋白酶的增加会导致内源蛋白质以及给药来治疗疾病的治疗肽、多肽和蛋白质加速的降解和失活。因此，对体内使用（例如，用于治疗、诊断或预防疾病）具有潜能的一些药剂仅仅具有有限的功效，因为它们受到蛋白酶的快速降解和灭活。

蛋白酶抗性多肽提供了若干优势。例如，蛋白酶抗性多肽在体内能比蛋白酶敏感性药剂保持更长时间的活性，因此，能将功能保持足以产生生物效应的时间段。对于选择能抵抗蛋白酶降解并且还具有理想生物活性的多肽的改进方法还存在着需求。

VEGF:

由于其初级转录产物可替换的剪接，VEGF 是以几种可替换形式存在的分泌的、结合肝素的、同型二聚的糖蛋白（Leung 等，1989, Science 246: 1306）。由于其诱导血管渗漏（炎症中的一个重要过程）的能力，VEGF 还称为血管通透因子（VPF）。

促进肿瘤形成、转移和复发的一个重要病理生理学过程是肿瘤血管生成。该过程由肿瘤表达的血管生成因子的精心作用来介导，血管生成因子如 VEGF，其诱导将营养物质输送给肿瘤的血管形成。因此，治疗特定癌症的一种方法是抑制由 VEGF 介导的肿瘤血管生成，因此使肿瘤饿死。阿瓦斯丁（AVASTIN）（bevacizumab; Genetech, Inc.）是已经批准用于治疗结直肠癌的结合人 VEGF 的人源化抗体。报道了称为抗体

2C3 的抗体（ATCC 登录号 No. PTA 1595）能结合 VEGF 并抑制 VEGF 与表皮生长因子受体 2 的结合。

用目前可获得的治疗方法靶向 VEGF 并不是对所有患者或对所有癌症都有效的。因此，对用于治疗由 VEGF 介导的癌症或其他病理状况的改良药剂存在着需求，这些病理状况包括血管增殖性疾病（例如，年龄相关性黄斑变性（AMD））。

VEGF 还涉及炎症和自体免疫疾病。例如，在 RA 患者滑液组织中的 VEGF 鉴定突出了 VEGF 在 RA 病理学中的潜在作用（Fava 等，1994，*J. Exp. Med.* 180: 341: 346; Nagashima 等，1995，*J. Rheumatol.* 22: 1624-1630）。在鼠胶原性关节炎（CIA）模型中给药抗-VEGF 抗体的研究后，VEGF 在 RA 病理学中的作用得到了具体化。在这些研究中，在疾病诱发时，关节中的 VEGF 表达提高，并且抗-VEGF 抗血清的给药阻断了关节炎疾病的发展和改善了已确定的疾病（Sone 等，2001，*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 281: 562-568; Lu 等，2000，*J. Immunol.* 164: 5922-5927）。

因此，靶向 VEGF 在治疗 RA 和其他病症（例如，与炎症和/或自体免疫疾病相关的那些）中也是有益的。

发明概述

在一个方面中，本发明提供了含有与 DOM 15-26-593（显示于图 5 中）的氨基酸序列为至少 97% 同一性的氨基酸序列的多肽。在一个实施方案中，同一性百分比为至少 98 或 99%。在一个实施方案中，多肽是 DOM 15-26-593。本发明进一步提供了（基本上）纯的 DOM 15-26-593 单体。在一个实施方案中，DOM 15-26-593 为至少 98、99、99.5% 纯或 100% 纯的单体。

在一个方面中，本发明提供了一种多肽（例如，是蛋白酶抗性的）并且是由与 DOM 15-26-593（显示于图 5 中）的氨基酸序列为至少 80% 同一性的氨基酸序列编码的。在一个实施方案中，同一性百分比为至少 70、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%。在一个实施方案中，蛋白酶抗性多肽通过在此描述的用于分离蛋白酶抗性多肽的方法可获得。

在一个方面中，本发明提供了由与 DOM 15-26-593 的核苷酸序列的

核苷酸序列为至少 55%同一性的氨基酸序列编码的多肽，并且其中该多肽包含与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列的氨基酸为至少 97%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中，核苷酸序列的同一性百分比为至少 60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%。在一个实施方案中，氨基酸序列的同一性百分比为至少 98 或 99%或 100%。例如，核苷酸序列可以是 DOM 15-26-593 核苷酸序列的密码子优化形式。序列的密码子优化是本领域已知的。在一个实施方案中，对于在细菌（例如，大肠杆菌（*E. coli*）或假单胞菌属（*Pseudomonas*），例如，荧光假单胞菌（*P. fluorescens*））、哺乳动物（例如，CHO）或酵母宿主细胞（例如，毕赤酵母属（*Picchia*）或酵母属（*Saccharomyces*），例如，巴斯德毕赤酵母（*P.pastoris*）或酿酒酵母（*S. cerevisiae*））中的表达，将核苷酸序列优化。

在一个方面中，本发明提供了含有本发明多肽的融合蛋白。

在一个方面中，本发明提供了抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域，其包含与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列为至少 97%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中，同一性百分比为至少 98 或 99%。

在一个实施方案中，免疫球蛋白单可变域在位置 6 包含缬氨酸，其中编号是根据 Kabat（“Sequences of Proteins of Immunological Interest”（免疫学重要性蛋白的序列），US Department of Health and Human Services（美国卫生和人类服务部），1991）。

在一个实施方案中，免疫球蛋白单可变域在位置 99 包含亮氨酸，其中编号是根据 Kabat。

在一个实施方案中，免疫球蛋白单可变域在位置 30 包含赖氨酸，其中编号是根据 Kabat。

在一个方面中，本发明提供了抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域，其包含与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

在一个方面中，本发明提供了由与 DOM 15-26-593 的核苷酸序列为至少 80%同一性的核苷酸序列编码的抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域。在一个实施方案中，同一性百分比为至少 70、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%。

在一个方面中，本发明提供了由与 DOM 15-26-593 的核苷酸序列的核苷酸序列为至少 55%同一性的氨基酸序列编码的抗-VEGF 免疫球蛋

白单可变域,并且其中可变域包含与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列为至少 97%同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,核苷酸序列的同一性百分比为至少 60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%。在一个实施方案中,氨基酸序列的同一性百分比为至少 98 或 99%或 100%。例如,核苷酸序列可以是 DOM 15-26-593 核苷酸序列的密码子优化形式。序列的密码子优化是本领域已知的。在一个实施方案中,对于在细菌(例如,大肠杆菌或假单胞菌属,例如,荧光假单胞菌)、哺乳动物(例如,CHO)或酵母宿主细胞(例如,毕赤酵母属或酵母属,例如,巴斯德毕赤酵母或酿酒酵母)中的表达,将核苷酸序列优化。

在一个方面中,本发明提供了由与 DOM 15-26-593 的核苷酸序列相同的序列编码的抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域。

在一个方面中,本发明提供了含有根据本发明的抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域的抗-VEGF 拮抗剂。在一个实施方案中,拮抗剂包含第一和第二免疫球蛋白单可变域,其中每个可变域是根据本发明的。例如,其中拮抗剂包含所述单可变域的单体或所述单可变域的同型二聚体。在一个实施方案中,那个或每个单可变域的氨基酸序列与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列相同。

在一个方面中,本发明提供了含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50%同一性的 CDR1 序列的氨基酸序列的抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域。在一个实施方案中,差异不超过 13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸位置。在一个实施方案中,CDR 序列同一性为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。

在一个方面中,本发明提供了含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50%同一性的 CDR2 序列的氨基酸序列的抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域。在一个实施方案中,差异不超过 13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸位置。在一个实施方案中,CDR 序列同一性为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。

在一个方面中,本发明提供了含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50%同一性的 CDR3 序列的氨基酸序列的抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域。在一个实施方案中,差异不超过 14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸位置。在一个实施方案中,CDR 序列同一性为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。

在一个方面中,本发明提供了含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50%同一性的 CDR1 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50%同一性的 CDR2 序列的氨基酸序列的抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域。在一个实施方案中,差异不超过 13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸位置。在一个实施方案中,一个或两个 CDR 序列同一性各自为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。

在一个方面中,本发明提供了含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50%同一性的 CDR1 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50%同一性的 CDR3 序列的氨基酸序列的抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域。在一个实施方案中,差异不超过 13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸位置。在一个实施方案中,一个或两个 CDR 序列同一性各自为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。

在一个方面中,本发明提供了含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50%同一性的 CDR2 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50%同一性的 CDR3 序列的氨基酸序列的抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域。在一个实施方案中,差异不超过 13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸位置。在一个实施方案中,一个或两个 CDR 序列同一性各自为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。

在一个方面中,本发明提供了含有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列

相同或在不超过 14 个氨基酸位置与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列不同并具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50%同一性的 CDR1 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50%同一性的 CDR2 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50%同一性的 CDR3 序列的氨基酸序列的抗-VEGF 免疫球蛋白单可变域。在一个实施方案中，差异不超过 13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸位置。在一个实施方案中，一个或两个或每个 CDR 序列同一性为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。

在一个方面中，本发明提供了具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50%同一性的 CDR1 序列的抗-VEGF 拮抗剂。在一个实施方案中，CDR 序列同一性为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。例如，在本文所述的一组条件下，拮抗剂可以抵抗蛋白酶，例如，本文所述的一种或多种蛋白酶。

在一个方面中，本发明提供了具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50%同一性的 CDR2 序列的抗-VEGF 拮抗剂。在一个实施方案中，CDR 序列同一性为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。例如，在本文所述的一组条件下，拮抗剂可以抵抗蛋白酶，例如，本文所述的一种或多种蛋白酶。

在一个方面中，本发明提供了具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50%同一性的 CDR3 序列的抗-VEGF 拮抗剂。在一个实施方案中，CDR 序列同一性为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。例如，在本文所述的一组条件下，拮抗剂可以抵抗蛋白酶，例如，本文所述的一种或多种蛋白酶。

在一个方面中，本发明提供了具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50%同一性的 CDR1 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50%同一性的 CDR2 序列的抗-VEGF 拮抗剂。在一个实施方案中，一个或两个 CDR 的 CDR 序列同一性为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。例如，在本文所述的一组条件下，拮抗剂可以抵抗蛋白酶，例如，本文所述的一种或多种蛋白酶。

在一个方面中，本发明提供了具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50%同一性的 CDR1 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50%同一性的 CDR3 序列的抗-VEGF 拮抗剂。在一个实施方案中，一

个或两个 CDR 的 CDR 序列同一性为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。例如，在本文所述的一组条件下，拮抗剂可以抵抗蛋白酶，例如，本文所述的一种或多种蛋白酶。

在一个方面中，本发明提供了具有与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50%同一性的 CDR2 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50%同一性的 CDR3 序列的抗-VEGF 拮抗剂。在一个实施方案中，一个或两个 CDR 的 CDR 序列同一性为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。例如，在本文所述的一组条件下，拮抗剂可以抵抗蛋白酶，例如，本文所述的一种或多种蛋白酶。

在一个方面中，本发明提供了具有与 DOM 15-26-593 的 CDR1 序列为至少 50%同一性的 CDR1 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR2 序列为至少 50%同一性的 CDR2 序列和与 DOM 15-26-593 的 CDR3 序列为至少 50%同一性的 CDR3 序列的抗-VEGF 拮抗剂。在一个实施方案中，一个或两个或每个 CDR 的 CDR 序列同一性为至少 55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98 或 99%。例如，在本文所述的一组条件下，拮抗剂可以抵抗蛋白酶，例如，本文所述的一种或多种蛋白酶。

在一个方面中，本发明提供了含有免疫球蛋白单可变域的抗-VEGF 拮抗剂，该免疫球蛋白单可变域含有 DOM 15-26-593 的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的序列（例如，CDR1，CDR2，CDR3，CDR1 和 2，CDR1 和 3，CDR2 和 3，或 CDR1、2 和 3）。例如，在本文所述的一组条件下，拮抗剂可以抵抗蛋白酶，例如，本文所述的一种或多种蛋白酶。

在一个方面中，本发明提供了与 DOM 15-26-593 竞争与 VEGF 结合的抗-VEGF 拮抗剂。因此，拮抗剂可以结合与 DOM 15-26-593 相同的表位或重叠的表位。在一个实施方案中，拮抗剂包含具有与 DOM 15-26-593 的氨基酸序列为至少 97%同一性的氨基酸序列的免疫球蛋白单可变域。在一个实施方案中，同一性百分比为至少 98 或 99%。在一个实施方案中，可变域为 DOM 15-26-593。例如，在本文所述的一组条件下，拮抗剂可以抵抗蛋白酶，例如，本文所述的一种或多种蛋白酶。在一个实施方案中，拮抗剂是抗体或其抗原结合片段，如具有 VEGF 结合特异性的单价抗原结合片段（例如，scFv、Fab、Fab'、dAb）。拮抗剂的其他实例是本文所述的结合 VEGF 的配体。配体可以包含具有 VEGF 结合特异性的免疫球蛋白单可变域或结构域抗体（dAb），或以合适形式的该 dAb

的互补性决定区。在一些实施方案中，配体是基本上由具有 VEGF 结合特异性的免疫球蛋白单可变域或 dAb 组成或由具有 VEGF 结合特异性的免疫球蛋白单可变域或 dAb 组成的 dAb 单体。在其他实施方案中，配体是包含合适形式如抗体形式的 dAb（或 dAb 的 CDR）的多肽。

可以通过连接 PEG 基团、血清白蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白受体或至少转铁蛋白结合部分、抗体 Fc 区，或通过缀合至抗体结构域，将这些 VEGF 配体例如 dAb 格式化，以具有较大的流体动力学大小。例如，i) 结合 VEGF，(ii) 拮抗 VEGF 介导的信号转导活动和 (iii) 没有抑制 VEGF 与其受体如 dAb 单体的结合的物质（例如，多肽、可变域或拮抗剂）可以格式化（formatted）成较大的抗体的抗原结合片段（例如，格式化成 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、IgG、scFv）。还可以通过将 VEGF 结合剂（拮抗剂、可变域）缀合或连接结合提高体内半衰期的抗原或表位的结合域（例如，抗体或抗体片段）来提高配体的流体动力学大小及其血清半衰期，如本文所述的（参见，WO2006038027 的附录 1，在此将其整体引入作为参考）。例如，可以将 VEGF 结合剂（例如，多肽，例如，dAb）缀合或连接抗-血清白蛋白或抗-新生儿 Fc 受体抗体或抗体片段，例如，抗-SA 或抗新生儿 Fc 受体 dAb、Fab、Fab' 或 scFv，或抗-SA 亲和体（affibody）或抗-新生儿 Fc 受体亲和体。

用于根据本发明的 VEGF-结合配体中的合适的白蛋白、白蛋白片段或白蛋白变体的实例描述于 WO2005/077042 A2 和 WO2006038027 中，在此将其整体引入作为参考。

在整个说明书中描述的本发明的其他实施方案中，替代本发明的拮抗剂或配体中“dAb”的使用，设想本领域技术人员可以使用含有结合 VEGF 的 dAb 的 CDR 的结构域（例如，嫁接于合适的蛋白质支架或骨架上的 CDR，支架或骨架例如为亲和体、SpA 支架、LDL 受体 A 类结构域或 EGF 结构域）或可以是含有 VEGF 结合位点的蛋白质结构域，例如，其中结构域选自亲和体、SpA 结构域、LDL 受体 A 类结构域或 EGF 结构域。因此认为本文公开内容作为整体提供了使用这样的结构域替代 dAb 的拮抗剂、配体和方法的公开内容。

本发明的多肽、免疫球蛋白单可变域和拮抗剂可以抵抗以下的一种或多种：丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶、基质金属蛋白酶、羧肽酶（例如，羧肽酶 A、羧肽酶 B）、胰蛋白

酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、弹性蛋白酶、leukozyne、胰酶、凝血酶、血纤维蛋白溶酶、组织蛋白酶（例如，组织蛋白酶 G）、蛋白酶（例如，蛋白酶 1、蛋白酶 2、蛋白酶 3）、嗜热菌蛋白酶、凝乳酶、肠肽酶、胱天蛋白酶（caspase）（例如，胱天蛋白酶 1、胱天蛋白酶 2、胱天蛋白酶 4、胱天蛋白酶 5、胱天蛋白酶 9、胱天蛋白酶 12、胱天蛋白酶 13）、钙激活中性蛋白酶、无花果蛋白酶（ficain）、梭菌蛋白酶、奇异果蛋白酶（actinidain）、菠萝蛋白酶和分离酶。在特定的实施方案中，蛋白酶是胰蛋白酶、弹性蛋白酶或 leukozyne。还可以通过生物提取物、生物匀浆或生物制剂来提供蛋白酶。在一个实施方案中，蛋白酶是在痰液、粘液（例如，胃粘液、鼻粘液、支气管粘液）、支气管肺泡灌洗、肺匀浆、肺提取物、胰腺提取物、胃液、唾液中发现的蛋白酶。在一个实施方案中，蛋白酶是在眼睛和/或眼泪中发现的。这样在眼睛中发现的蛋白酶实例包括胱天蛋白酶、钙激活中性蛋白酶、基质金属蛋白酶、disintegrin、金属蛋白酶（ADAM）和具有凝血酶蛋白基序的 ADAM、蛋白体、组织纤溶酶原激活子、分泌酶、组织蛋白酶 B 和 D、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C、丝氨酸蛋白酶 PRSS1、泛素-蛋白酶体途径（UPP）。在一个实施方案中，蛋白酶是非细菌蛋白酶。在一个实施方案中，蛋白酶是动物蛋白酶，例如，哺乳动物蛋白酶，例如，人蛋白酶。在一个实施方案中，蛋白酶是 GI 道蛋白酶或肺组织蛋白酶，例如，在人体中发现的 GI 道蛋白酶或肺组织蛋白酶。在此所列的这些蛋白酶也可以用于本文所述的涉及蛋白酶库组（repertoire）暴露于蛋白酶的方法中。

在一个方面中，本发明提供了包含 VEGF 结合位点的蛋白酶抗性免疫球蛋白单可变域，其中与以下温育时，可变域能抵抗蛋白酶：

(i) 在 37°C 下用浓度 (c) 为至少 10 微克/ml 的蛋白酶温育至少一个小时的时间 (t)；或

(ii) 在 30°C 下用浓度 (c') 为至少 40 微克/ml 的蛋白酶温育至少一个小时的时间 (t)。

在一个实施方案中，蛋白酶例如胰蛋白酶与可变域的比例（以摩尔/摩尔为基础）为 8,000 至 80,000 蛋白酶:可变域，例如，C 为 10 微克/ml 时，比例为 800 至 80,000 蛋白酶:可变域；或 C 或 C' 为 100 微克/ml 时，比例为 8,000 至 80,000 蛋白酶:可变域。在一个实施方案中，蛋白酶（例

如,胰蛋白酶)与可变域的比例(以重量/重量为基础,例如微克/微克)为16,000至160,000蛋白酶:可变域,例如,C为10微克/ml时,比例为1,600至160,000蛋白酶:可变域;或C或C'为100微克/ml时,比例为1,6000至160,000蛋白酶:可变域。在一个实施方案中,浓度(c或c')为至少100或1000微克/ml蛋白酶。在一个实施方案中,浓度(c或c')为至少100或1000微克/ml蛋白酶。参照在此对使用肽或多肽的组或文库工作时适于蛋白酶使用的蛋白水解活性的条件的描述(例如,w/w参数)。这些条件可以用于测定特定免疫球蛋白单可变域的蛋白酶抗性的条件。在一个实施方案中,时间(t)为或约为一、三或24小时或过夜(例如,约12-16小时)。在一个实施方案中,可变域在条件(i)下是有抗性的,并且浓度(c)为或约为10或100微克/ml蛋白酶,而时间(t)为1小时。在一个实施方案中,可变域在条件(ii)下是有抗性的,并且浓度(c')为或约为40微克/ml蛋白酶,而时间(t)为或约为3小时。在一个实施方案中,蛋白酶选自胰蛋白酶、弹性蛋白酶、leucozyme和胰酶。在一个实施方案中,蛋白酶是胰蛋白酶。在一个实施方案中,蛋白酶是在痰液、粘液(例如,胃粘液、鼻粘液、支气管粘液)、支气管肺泡灌洗、肺匀浆、肺提取物、胰腺提取物、胃液、唾液或眼泪或眼睛中发现的蛋白酶。在一个实施方案中,蛋白酶是在眼睛和/或眼泪中发现的。在一个实施方案中,蛋白酶是非细菌蛋白酶。在一个实施方案中,蛋白酶是动物蛋白酶,例如,哺乳动物蛋白酶,例如,人蛋白酶。在一个实施方案中,蛋白酶是GI道蛋白酶或肺组织蛋白酶,例如,在人体中发现的GI道蛋白酶或肺组织蛋白酶。在此所列的这些蛋白酶也可以用于本文所述的涉及蛋白酶库组暴露于蛋白酶的方法中。

在一个实施方案中,可变域能抵抗胰蛋白酶和/或选自弹性蛋白酶、leucozyme和胰酶中的至少一种其他蛋白酶。例如,能抵抗胰蛋白酶和弹性蛋白酶;胰蛋白酶和leucozyme;胰蛋白酶和胰酶;胰蛋白酶、弹性蛋白酶和leucozyme;胰蛋白酶、弹性蛋白酶和胰酶;胰蛋白酶、弹性蛋白酶、胰酶和leucozyme;或胰蛋白酶、胰酶和leucozyme。

在一个实施方案中,在条件(i)或(ii)下温育时,例如,在 10^6 至 10^{13} 的噬菌体文库大小,例如 10^8 至 10^{12} 个复制单位(传染性病毒粒子),在噬菌体上展示可变域。

在一个实施方案中,在条件(i)或(ii)下温育后,可变域特异性

地结合 VEGF, 例如, 使用 BiaCore™ 或 ELISA 来测定, 例如, 噬菌体 ELISA 或单克隆噬菌体 ELISA。

在一个实施方案中, 本发明的可变域特异性地结合蛋白 A 或蛋白 L。在一个实施方案中, 在条件 (i) 或 (ii) 下温育后, 存在与蛋白 A 或 L 的特异性结合。

在一个实施方案中, 例如, 在条件 (i) 或 (ii) 下温育后, 本发明的可变域在 ELISA 中, 例如, 在噬菌体 ELISA 或单克隆噬菌体 ELISA 中, 具有至少 0.404 的 OD₄₅₀ 读数。

在一个实施方案中, 例如, 在条件 (i) 或 (ii) 下温育后, 本发明的可变域在凝胶电泳中 (基本上) 展示出单条条带。

在特定的实施方案中, 本发明提供了为双特异性配体的 VEGF 拮抗剂, 其含有根据本发明的结合 VEGF 的第一 dAb 和具有与第一 dAb 相同或不同结合特异性的第二 dAb。第二 dAb 可以结合选自 ApoE、Apo-SAA、BDNF、心肌营养素-1、CEA、CD40、CD40 配体、CD56、CD38、CD138、EGF、EGF 受体、ENA-78、嗜酸粒细胞趋化蛋白、嗜酸粒细胞趋化蛋白-2、Exodus-2、FAP α 、FGF-酸性、FGF-碱性、成纤维细胞生长因子-10、FLT3 配体、Fractalkine (CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF- β 1、人血清白蛋白、胰岛素、IFN- γ 、IGF-I、IGF-II、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 受体、IL-1 I 型受体、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8 (72a.a.)、IL-8 (77a.a.)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18 (IGIF)、抑制素 α 、抑制素 β 、IP-10、角化细胞生长因子-2 (KGF-2)、KGF、瘦蛋白 (Leptin)、LIF、淋巴细胞趋化因子、缪勒管抑制物质、单核细胞集落抑制因子、单核细胞引诱蛋白、M-CSF、MDC (67a.a.)、MDC (69a.a.)、MCP-1 (MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC (67a.a.)、MDC (69a.a.)、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-3 α 、MIP-3 β 、MIP-4、脊髓源祖细胞抑制剂因子-1 (MPIF-1)、NAP-2、神经营养因子、神经生长因子、 β -NGF、NT-3、NT-4、制瘤素 M、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1 α 、SDF1 β 、SCF、SCGF、干细胞因子 (SCF)、TARC、TGF- α 、TGF- β 、TGF- β 2、TGF- β 3、肿瘤坏死因子 (TNF)、TNF- α 、TNF- β 、TNF 受体 I、TNF 受体 II、TNIL-1、TPO、VEGF、VEGF A、VEGF B、VEGF C、VEGF D、VEGF 受体 1、VEGF 受体 2、VEGF 受体 3、GCP-2、GRO/MGSA、GRO- β 、GRO- γ 、HCC1、

1-309、HER 1、HER 2、HER 3、HER 4、血清白蛋白、vWF、淀粉样蛋白（例如，淀粉样蛋白 α ）、MMP12、PDK1、IgE、IL-13R α 1、IL-13Ra2、IL-15、IL-15R、IL-16、IL-17R、IL-17、IL-18、IL-18R、IL-23、IL-23R、IL-25、CD2、CD4、CD11a、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD56、CD138、ALK5、EGFR、FcER1、TGF β 、CCL2、CCL18、CEA、CR8、CTGF、CXCL12（SDF-1）、糜蛋白酶、FGF、Furin、内皮缩血管肽-1、嗜酸粒细胞趋化蛋白（例如，嗜酸粒细胞趋化蛋白、嗜酸粒细胞趋化蛋白-2、嗜酸粒细胞趋化蛋白-3）、GM-CSF、ICAM-1、ICOS、IgE、IFN α 、I-309、整联蛋白、L-选择蛋白、MIF、MIP4、MDC、MCP-1、MMP、嗜中性弹性蛋白酶、骨桥蛋白、OX-40、PARC、PD-1、RANTES、SCF、SDF-1、siglec8、TARC、TGF β 、凝血酶、Tim-1、TNF、TRANCE、类胰蛋白酶、VEGF、VLA-4、VCAM、 α 4 β 7、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR8、 α v β 6、 α v β 8、cMET、CD8、vWF、淀粉样蛋白（例如，淀粉样蛋白 α ）、MMP12、PDK1 和 IgE 的目标物。

在一个实例中，双特异性配体包含结合 VEGF 上第一表位的第一 dAb 和结合不同目标上表位的第二 dAb。在另一个实例中，第二 dAb 结合血清白蛋白上的表位。

在其他实施方案中，配体是包含具有 VEGF 结合特异性的第一表位结合域和至少一个具有不同于第一表位结合域的结合特异性的其他抗原结合域的多特异性配体。例如，第一表位结合域可以是结合 VEGF 的 dAb 或可以是包含结合 VEGF 的 dAb 的 CDR（例如，嫁接于合适的蛋白质支架或骨架上的 CDR，支架或骨架例如为亲和体、SpA 支架、LDL 受体 A 类结构域或 EGF 结构域）的结构域或可以是结合 VEGF 的结构域，其中结构域选自亲和体、SpA 结构域、LDL 受体 A 类结构域或 EGF 结构域。

在特定的实施方案中，多肽、拮抗剂、配体或抗-VEGF dAb 单体的特征在于以下的一个或多个：1）与人 VEGF 解离，具有 50nM 至 20pM 的解离常数（ K_d ）和 5×10^{-1} 至 $1 \times 10^{-7} s^{-1}$ 的 K_{off} 速度常数；如通过表面等离子共振所测定的；2）抑制 VEGF 与 VEGFR2 的结合，具有 500nM 至 50pM 的 IC₅₀；3）在标准 HUVEC 细胞测试中中和人 VEGF，具有 500nM 至 50pM 的 ND₅₀；4）在标准细胞测试中拮抗 VEGF 的活性，具有 ≤ 100 nM 的 ND₅₀；5）在小鼠异种移植物模型中抑制或降低肿瘤生长；6）抵抗聚

集；7）当在大肠杆菌或毕赤酵母属种（例如，巴斯德毕赤酵母）或哺乳动物细胞表达系统如 CHO 中表达时，以至少约 0.5mg/L 的量分泌；8）可逆地去折叠（unfold）；或 9）在治疗、抑制或预防炎症疾病中具有功效。对于适用于条件（1）至（9）的测定和测试以及参数的详细内容，参考 WO2006038027、WO2006059108 和 WO2007049017，并且在此将这些引入作为参考。

在特定的实施方案中，多肽、拮抗剂、配体或 dAb 单体与人 VEGF 解离，具有 50nM 至 20pM 的解离常数 (K_d) 和 5×10^{-1} 至 $1 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 速度常数，如通过表面等离子共振所测定的；抑制 VEGF 与 VEGFR2（VEGF 受体 2）的结合，具有 500nM 至 50pM 的 IC50；和在标准 HUVEC 细胞测试中中和人 VEGF，具有 500nM 至 50pM 的 ND50。在其他特定实施方案中，多肽、拮抗剂、配体或 dAb 单体与人 VEGF 解离，具有 50nM 至 20pM 的解离常数 (K_d) 和 5×10^{-1} 至 $1 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 速度常数，如通过表面等离子共振所测定的；抑制 VEGF 与 VEGFR2 的结合，具有 500nM 至 50pM 的 IC50。

本发明的蛋白酶抗性多肽、免疫球蛋白单可变域和拮抗剂在哺乳动物例如人的疾病或病症的治疗、预防和诊断中具有实用性。特别地，由于给药于患者如人时药物很可能遇到蛋白酶，因此它们具有实用性。例如，给药于 GI 道（例如，口服、舌下、直肠给药）时，在该情况中，多肽、免疫球蛋白单可变域和拮抗剂可能遇到上 GI 道、下 GI 道、口、胃、小肠和大肠中的一个或多个中的蛋白酶。因此，一个实施方案提供了口服、舌下或直肠给药于患者 GI 道的蛋白酶抗性多肽、免疫球蛋白单可变域或拮抗剂，以治疗和/或预防患者的疾病或病症。例如，口服给药于患者（例如，人患者），用于治疗 and/或预防 VEGF-介导的病症或疾病，如癌症，例如实体肿瘤；炎症和/或自体免疫疾病。

在另一个实例中，给药于（例如，通过吸入或鼻内）肺部组织（例如，肺或气道）时，多肽、可变域或拮抗剂很可能遇到蛋白酶。因此，一个实施方案提供了通过吸入或鼻内将蛋白酶抗性多肽、免疫球蛋白单可变域或拮抗剂给药于患者（例如，人）的肺部组织，以治疗和/或预防患者的疾病或病症。这样的病症可以是哮喘（例如，过敏性哮喘）、COPD、流感或 WO2006038027 中公开的任何其他肺部疾病或病症，在此引入作为参考。在另一个实例中，给药于（例如，通过眼内注射或作为滴眼剂）

患者眼睛时，多肽、可变域或拮抗剂很可能遇到蛋白酶。因此，一个实施方案提供了将蛋白酶抗性多肽、免疫球蛋白单可变域或拮抗剂通过眼睛给药于患者（例如，人），以治疗和/或预防患者的疾病或病症（例如，眼睛的疾病或病症）。给药可以是局部给药于眼睛，以滴眼剂的形式，或通过注入眼睛中，例如进入玻璃体中。

本发明的一个实施方案提供了给药于眼睛的蛋白酶抗性多肽、免疫球蛋白单可变域或拮抗剂，例如，以滴眼剂或凝胶的形式，或例如，在植入体中，例如，用于治疗/或预防眼睛的 VEGF-介导的病症或疾病，如 AMD（年龄相关性黄斑变性）。

在另一个实例中，给药于（例如，通过吸入或鼻内）肺部组织（例如，肺或气道）时，多肽、可变域或拮抗剂很可能遇到蛋白酶。因此，一个实施方案提供了通过吸入或鼻内给药于患者（例如，人）的肺部组织，以治疗和/或预防患者的疾病或病症。这样的病症可以是癌症（例如，实体肿瘤，例如，肺、结直肠、头颈、胰腺、乳房、前列腺或卵巢癌）、哮喘（例如，过敏性哮喘）、COPD，或 WO2006038027 中公开的任何其他肺部疾病或病症，在此引入作为参考。根据本发明的拮抗剂、多肽和免疫球蛋白单可变域可以呈现出提高的或相对高的解链温度（ T_m ），提供提高的稳定性。高亲和性目标结合也是或者可替换地是拮抗剂、多肽和可变域的特征。这些特征中的一个或多个，结合蛋白酶抗性，使得拮抗剂、可变域和多肽可以用作哺乳动物如人的药物，其中特别地，例如对于 GI 道或肺部组织给药或给药于眼睛中，很可能遇到蛋白酶。

因此，在一个方面中，本发明提供了用于口服递送的 VEGF 拮抗剂。在一个方面中，本发明提供了用于递送至患者 GI 道的 VEGF 拮抗剂。在一个方面中，本发明提供了 VEGF 拮抗剂在制造用于口服递送的药物中的用途。在一个方面中，本发明提供了 VEGF 在制造用于递送至患者 GI 道的药物中的用途。在一个实施方案中，可变域能抵抗胰蛋白酶和/或至少一种选自弹性蛋白酶、leucozyme 和胰酶的其他蛋白酶。例如，能抵抗胰蛋白酶和弹性蛋白酶；胰蛋白酶和 leucozyme；胰蛋白酶和胰酶；胰蛋白酶、弹性蛋白酶和 leucozyme；胰蛋白酶、弹性蛋白酶和胰酶；胰蛋白酶、弹性蛋白酶、胰酶和 leucozyme；或胰蛋白酶、胰酶和 leucozyme。

在一个方面中，本发明提供了用于肺部递送的 VEGF 拮抗剂。在一

个方面中，本发明提供了 VEGF 拮抗剂在制造用于肺部递送的药物中的用途。在一个方面中，本发明提供了 VEGF 拮抗剂在制造用于递送至患者肺部的药物中的用途。在一个实施方案中，可变域能抵抗 leucozyme。

在一个方面中，本发明提供了口服递送或递送药物至患者的 GI 道或至患者的肺或肺部组织或眼睛的方法，其中该方法包括将药物学上有效量的本发明的 VEGF 拮抗剂给药于患者。

在一个方面中，本发明提供了本发明的 VEGF 拮抗剂用于治疗和/或预防癌症，例如，实体肿瘤。在一个实施方案中，实体肿瘤选自肺、结直肠、头颈、胰腺、乳房、前列腺或卵巢癌。

在一个方面中，本发明提供了本发明的 VEGF 拮抗剂用于治疗和/或预防血管增殖性疾病，例如，血管生成、动脉粥样硬化和眼睛中的血管增殖性疾病，如 AMD（年龄相关性黄斑变性）。

在一个方面中，本发明提供了本发明的 VEGF 拮抗剂用于治疗和/或预防炎症。在一个方面中，本发明提供了 VEGF 拮抗剂在制造用于治疗和/或预防炎症的药物中的用途。在一个实施方案中，病症选自关节炎、多发性硬化、炎性肠病和慢性梗阻性肺病。例如，在一个方面中，本发明提供了 VEGF 拮抗剂用于治疗和/或预防呼吸道疾病。在一个方面中，本发明提供了 VEGF 拮抗剂在制造用于治疗和/或呼吸道疾病的药物中的用途。例如，所述呼吸道疾病选自肺炎、慢性梗阻性肺病、哮喘、肺炎、超敏性肺炎、嗜酸性粒细胞浸润症、环境性肺病、肺炎、支气管扩张、囊性纤维化、间质性肺炎、原发性肺动脉高压、肺血栓栓塞症、胸膜病症、纵隔病症、横膈膜病症、肺换气不足、换气过度、睡眠窒息、急性呼吸窘迫综合症、间皮瘤、肉瘤、移植排斥、移植对宿主疾病、肺癌、过敏性鼻炎、过敏症、石棉沉着病、曲霉肿、曲霉病、支气管扩张、慢性支气管炎、肺气肿、嗜酸细胞性肺炎、特发性肺纤维化、入侵性肺炎球菌病、流感、非结核性分枝杆菌病、胸腔积液、肺尘症、肺孢子虫病、肺炎、肺放线菌病、肺泡蛋白沉着症、肺炭疽、肺水肿、肺栓子、肺炎、肺组织细胞增生症 X、肺动脉高压、肺诺卡菌病、肺结核、肺静脉闭塞症、类风湿性肺病、结节病和韦格内氏肉芽肿症。例如，疾病是慢性梗阻性肺病（COPD）。例如，疾病是哮喘。

可以使用任何合适的方法将本发明含有抑制 VEGF 的药剂（例如，其中药剂选自抗体片段（例如，Fab 片段、Fab' 片段、Fv 片段（例如，

scFv、二硫化物键合的 Fv)、F(ab')₂ 片段、dAb)、配体以及 dAb 单体和多聚体(例如,同型-或杂二聚体))的拮抗剂局部给药于组织的组织或器官,例如,给药于肺组织(例如,肺)或眼睛。例如,可以通过吸入或鼻内给药将药剂局部给药于肺部组织。对于吸入或鼻内给药,可以使用喷雾器、吸入器、雾化器、烟雾器、弥雾器、干粉吸入器、计量吸入器、计量喷雾器、计量弥雾器、计量雾化器或其他合适的吸入器或鼻内递送装置来给药 VEGF 的拮抗剂。因此,在一个实施方案中,本发明提供了含有 VEGF 拮抗剂的肺递送装置。在一个实施方案中,装置是吸入器或鼻内递送装置。

在一个实施方案中,可以通过可植入的递送装置将药剂局部给药至眼睛。因此,在一个实施方案中,本发明提供了含有 VEGF 拮抗剂的可植入递送装置。

在一个方面中,本发明提供了含有 VEGF 拮抗剂的口服制剂。该制剂可以是片剂、丸剂、胶囊、液体或糖浆。在一个方面中,本发明提供了用于递送至眼睛的含有 VEGF 拮抗剂的眼部制剂,例如,制剂可以是液体滴眼剂或凝胶。

在一个方面中,本发明提供了用于递送至肺的肺制剂,其中制剂含有本发明的拮抗剂、多肽或可变域,粒径范围小于 5 微米,例如,小于 4.5、4、3.5 或 3 微米(例如,在 Britton-Robinson 缓冲液中时,例如,在 6.5 至 8.0 的 pH,例如在 7 至 7.5 的 pH,例如在 pH7 或 pH7.5)。

在一个实施方案中,在 6.5 至 8.0 的 pH 下提供本发明的制剂和组合物,例如 7 至 7.5,例如 7,例如 7.5。

根据本发明任一方面的可变域可以具有至少 50℃的 T_m,或至少 55℃,或至少 60℃,或至少 65℃,或至少 70℃。本发明的拮抗剂、用途、方法、装置或制剂可以含有这样的可变域。

在本发明的一个方面中,本发明的多肽、可变域、拮抗剂、组合物或制剂在 Britton Robinson 或 PBS 缓冲液中在 37 至 50℃下温育 14 天后(在 1mg/ml 的多肽或可变域浓度下)基本上是稳定的。在一个实施方案中,在 37℃下这样的温育后,至少 65、70、75、80、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%的多肽、拮抗剂或可变域保持未聚集。在一个实施方案中,在 37℃下这样的温育后,至少 65、70、75、80、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、96、97、

98、99%的多肽或可变域保持单体。在一个实施方案中，在 50℃ 下这样的温育后，至少 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%的多肽、拮抗剂或可变域保持未聚集。在一个实施方案中，在 50℃ 下这样的温育后，至少 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%的多肽或可变域保持单体。在一个实施方案中，在任一个这样的温育后，未看到多肽、可变域、拮抗剂的聚集。在一个实施方案中，在 37℃ 下在 Britton-Robinson 缓冲液中以 1mg/ml 的多肽或可变域浓度温育后，多肽或可变域的 pI 保持未改变或基本上未改变。

在本发明的一个方面中，本发明的多肽、可变域、拮抗剂、组合物或制剂在 Britton Robinson 缓冲液或 PBS 中在 7 至 7.5 的 pH（例如，在 pH7 或 pH7.5）在 4℃ 下温育 7 天后（在 100mg/ml 的多肽或可变域浓度下）基本上是稳定的。在一个实施方案中，在这样的温育后，至少 95、95.5、96、96.5、97、97.5、98、98.5、99 或 99.5%的多肽、拮抗剂或可变域保持未聚集。在一个实施方案中，在这样的温育后，至少 95、95.5、96、96.5、97、97.5、98、98.5、99 或 99.5%的多肽或可变域保持单体。在一个实施方案中，在任一个这样的温育后，未看到多肽、可变域、拮抗剂的聚集。

在本发明的一个方面中，本发明的多肽、可变域、拮抗剂、组合物或制剂在例如喷射喷雾器，例如在 Pari LC+ 杯中，例如，在室温、20℃ 或 37℃ 下喷雾 1 小时后（在 40mg/ml 的多肽或可变域浓度下）基本上是稳定的。在一个实施方案中，在这样的喷雾后，至少 65、70、75、80、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、95.5、96、96.5、97、97.5、98、98.5、99 或 99.5%的多肽、拮抗剂或可变域保持未聚集。在一个实施方案中，在这样的喷雾后，至少 65、70、75、80、85、86、87、88、90、91、92、93、94、95、95.5、96、96.5、97、97.5、98、98.5、99 或 99.5%的多肽或可变域保持单体。在一个实施方案中，在任一个这样的喷雾后，未看到多肽、可变域、拮抗剂的聚集。

在一个方面中，本发明提供了编码含有根据本发明任一方面的免疫球蛋白单可变域的多肽或编码根据本发明任一方面的多肽、拮抗剂或可变域的分离的或重组的核酸。在一个方面中，本发明提供了含有核酸的

载体。在一个方面中，本发明提供了含有核酸或载体的宿主细胞。在一个方面中，本发明提供了生产含有免疫球蛋白单可变域的多肽的方法，该方法包括在适于所述核酸或载体表达的条件下维持宿主细胞，由此产生含有免疫球蛋白单可变域的多肽。该方法进一步包括分离多肽、可变域或拮抗剂，并任选产生比分离的多肽可变域或拮抗剂具有提高的亲合性和/或 ND50 的变体，例如，突变体。用于提高免疫球蛋白单可变域的结合亲和性的技术是本领域已知的，例如，用于亲和性突变的技术。

在一个方面中，本发明提供了含有本发明任一方面的免疫球蛋白单可变域、多肽或拮抗剂和药物学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物。

在一个实施方案中，本发明任一方面的免疫球蛋白可变域或拮抗剂含有抗体恒定域，例如，抗体 Fc，任选其中 Fc 的 N-端连接（任选直接连接）可变域的 C-端。合适的 Fc 的氨基酸序列显示于图 52b 中。

本发明的多肽或可变域可以是分离的和/或重组的。

在一个方面中，本发明是用于选择蛋白酶抗性肽或多肽（例如，血管内皮生长因子（VEGF）的拮抗剂，例如，抗-VEGF dAb）的方法。该方法包括提供一组肽或多肽，在适于蛋白酶活性的条件下混合组和蛋白酶，并回收具有理想生物活性的肽或多肽，由此选择蛋白酶抗性肽或多肽。

通常将组和蛋白酶温育至少约 30 分钟的时间段。在该方法中可以使用任何所需的蛋白酶，如以下的一种或多种，丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶、基质金属蛋白酶、羧肽酶（例如，羧肽酶 A、羧肽酶 B）、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、弹性蛋白酶、leukozyne、胰酶、凝血酶、血纤维蛋白溶酶、组织蛋白酶（例如，组织蛋白酶 G）、蛋白酶（例如，蛋白酶 1、蛋白酶 2、蛋白酶 3）、嗜热菌蛋白酶、凝乳酶、肠肽酶、胰天蛋白酶（例如，胰天蛋白酶 1、胰天蛋白酶 2、胰天蛋白酶 4、胰天蛋白酶 5、胰天蛋白酶 9、胰天蛋白酶 12、胰天蛋白酶 13）、钙激活中性蛋白酶、无花果蛋白酶（ficain）、梭菌蛋白酶、奇异果蛋白酶（actinidain）、菠萝蛋白酶和分离酶。在特定的实施方案中，蛋白酶是胰蛋白酶、弹性蛋白酶或 leukozyne。还可以通过生物提取物、生物匀浆或生物制剂来提供蛋白酶。如果需要，该方法进一步包括在完成温育后将蛋白酶抑制剂加入

组和蛋白酶的混合物中。

在一些实施方案中,基于结合活性回收具有所需生物活性的肽或多肽。例如,可以基于结合通用配体(如蛋白A、蛋白G或蛋白L)来回收肽或多肽。结合活性还可以是对目标配体的特异性结合。示例性目标配体包括ApoE、Apo-SAA、BDNF、心肌营养素-1、CEA、CD40、CD40配体、CD56、CD38、CD138、EGF、EGF受体、ENA-78、嗜酸粒细胞趋化蛋白、嗜酸粒细胞趋化蛋白-2、Exodus-2、FAP α 、FGF-酸性、FGF-碱性、成纤维细胞生长因子-10、FLT3配体、Fractalkine(CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF- β 1、人血清白蛋白、胰岛素、IFN- γ 、IGF-I、IGF-II、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1受体、IL-1 I型受体、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8(72a.a.)、IL-8(77a.a.)、IL-9、IL-10、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18(IGIF)、抑制素 α 、抑制素 β 、IP-10、角化细胞生长因子-2(KGF-2)、KGF、瘦蛋白、LIF、淋巴细胞趋化因子、缪勒管抑制物质、单核细胞集落抑制因子、单核细胞引诱蛋白、M-CSF、MDC(67a.a.)、MDC(69a.a.)、MCP-1(MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC(67a.a.)、MDC(69a.a.)、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-3 α 、MIP-3 β 、MIP-4、脊髓源祖细胞抑制剂因子-1(MPIF-1)、NAP-2、神经营养因子、神经生长因子、 β -NGF、NT-3、NT-4、制瘤素M、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1 α 、SDF1 β 、SCF、SCGF、干细胞因子(SCF)、TARC、TGF- α 、TGF- β 、TGF- β 2、TGF- β 3、肿瘤坏死因子(TNF)、TNF- α 、TNF- β 、TNF受体I、TNF受体II、TNIL-1、TPO、VEGF、VEGF A、VEGF B、VEGF C、VEGF D、VEGF受体1、VEGF受体2、VEGF受体3、GCP-2、GRO/MGSA、GRO- β 、GRO- γ 、HCC1、1-309、HER 1、HER 2、HER 3、HER 4、血清白蛋白、vWF、淀粉样蛋白(例如,淀粉样蛋白 α)、MMP12、PDK1、IgE、IL-13R α 1、IL-13R α 2、IL-15、IL-15R、IL-16、IL-17R、IL-17、IL-18、IL-18R、IL-23、IL-23R、IL-25、CD2、CD4、CD11a、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD56、CD138、ALK5、EGFR、FcER1、TGF β 、CCL2、CCL18、CEA、CR8、CTGF、CXCL12(SDF-1)、糜蛋白酶、FGF、Furin、内皮缩血管肽-1、嗜酸粒细胞趋化蛋白(例如,嗜酸粒细胞趋化蛋白、嗜酸粒细胞趋化蛋白-2、嗜酸粒细胞趋化蛋白-3)、GM-CSF、ICAM-1、ICOS、IgE、IFN α 、I-309、整联蛋白、L-选择蛋白、MIF、MIP4、MDC、

MCP-1、MMP、嗜中性弹性蛋白酶、骨桥蛋白、OX-40、PARC、PD-1、RANTES、SCF、SDF-1、siglec8、TARC、TGFb、凝血酶、Tim-1、TNF、TRANCE、类胰蛋白酶、VEGF、VLA-4、VCAM、 $\alpha 4\beta 7$ 、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR8、 $\alpha v\beta 6$ 、 $\alpha v\beta 8$ 、cMET、CD8、vWF、淀粉样蛋白（例如，淀粉样蛋白 α ）、MMP12、PDK1 和 IgE。

在特定的实施方案中，通过淘洗来回收肽或多肽。

在一些实施方案中，组包括展示系统。例如，展示系统可以是噬菌体展示、核糖体展示、乳液区室化（emulsion compartmentalization）和展示、酵母展示、嘌呤霉素展示、细菌展示、在质粒上展示或共价展示。示例性展示系统与核酸的编码功能和由核酸编码的肽或多肽的功能性特征相关。在特定的实施方案中，展示系统含有可复制的遗传包。

在一些实施方案中，展示系统包括噬菌体展示。例如，噬菌体可以是 fd、M13、 λ 、MS2 或 T7。在特定的实施方案中，噬菌体展示系统是多价的。在一些实施方案中，作为 pIII 融合蛋白来展示肽或多肽。

在其他实施方案中，该方法进一步包括扩增编码具有所需生物活性的肽或多肽的核酸。在特定的实施方案中，通过噬菌体扩增、细胞生长或聚合酶链式反应来扩增核酸。

在一些实施方案中，组是一组免疫球蛋白单可变域，例如，其结合血管内皮生长因子（VEGF）的拮抗剂和是血管内皮生长因子（VEGF）的拮抗剂。在特定的实施方案中，免疫球蛋白单可变域是重链可变域。在更特别的实施方案中，重链可变域是人重链可变域。在其他实施方案中，免疫球蛋白单可变域是轻链可变域。在特定的实施方案中，轻链可变域是人轻链可变域。

在另一个方面中，本发明是从一组肽或多肽中选择以高亲和性结合目标配体例如 VEGF 的肽或多肽的方法。该方法包括提供一组肽或多肽，在适于蛋白酶活性的条件下混合组和蛋白酶并回收结合目标配体的肽或多肽。

通常将组和蛋白酶温育至少约 30 分钟的时间段。在该方法中可以使用任何所需的蛋白酶，如以下的一种或多种，丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶、基质金属蛋白酶、羧肽酶（例如，羧肽酶 A、羧肽酶 B）、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、弹性蛋白酶、leukozyme、胰酶、凝血酶、血纤维蛋白溶酶、

组织蛋白酶（例如，组织蛋白酶 G）、蛋白酶（例如，蛋白酶 1、蛋白酶 2、蛋白酶 3）、嗜热菌蛋白酶、凝乳酶、肠肽酶、胰天蛋白酶（例如，胰天蛋白酶 1、胰天蛋白酶 2、胰天蛋白酶 4、胰天蛋白酶 5、胰天蛋白酶 9、胰天蛋白酶 12、胰天蛋白酶 13）、钙激活中性蛋白酶、无花果蛋白酶（ficain）、梭菌蛋白酶、奇异果蛋白酶（actinidain）、菠萝蛋白酶和分离酶。在特定的实施方案中，蛋白酶是胰蛋白酶、弹性蛋白酶或 leucozyme。还可以通过生物提取物、生物匀浆或生物制剂来提供蛋白酶。如果需要，该方法进一步包括在完成温育后将蛋白酶抑制剂加入组和蛋白酶的混合物中。

可以基于结合任何所需的目标配体如在此公开的目标配体来回收肽或多肽。在特定的实施方案中，通过淘洗来回收肽或多肽。

在一些实施方案中，组包括展示系统。例如，展示系统可以是噬菌体展示、核糖体展示、乳液区室化（emulsion compartmentalization）和展示、酵母展示、嘌呤霉素展示、细菌展示、在质粒上展示或共价展示。示例性展示系统与核酸的编码功能和由核酸编码的肽或多肽的功能性特征相关。在特定的实施方案中，展示系统含有可复制的遗传包。

在一些实施方案中，展示系统包括噬菌体展示。例如，噬菌体可以是 fd、M13、 λ 、MS2 或 T7。在特定的实施方案中，噬菌体展示系统是多价的。在一些实施方案中，作为 pIII 融合蛋白来展示肽或多肽。

在其他实施方案中，该方法进一步包括扩增编码具有所需生物活性的肽或多肽的核酸。在特定的实施方案中，通过噬菌体扩增、细胞生长或聚合酶链式反应来扩增核酸。

在一些实施方案中，组是一组免疫球蛋白单可变域，例如，其结合 VEGF 的拮抗剂并且是 VEGF 的拮抗剂。在特定的实施方案中，免疫球蛋白单可变域是重链可变域。在更特别的实施方案中，重链可变域是人重链可变域。在其他实施方案中，免疫球蛋白单可变域是轻链可变域。在特定的实施方案中，轻链可变域是人轻链可变域。

在另一个方面中，本发明是生产一组蛋白酶抗性肽或多肽的方法。该方法包括提供一组肽或多肽，在适于蛋白酶活性的条件下混合一组肽或多肽和蛋白酶，并回收多个具有所需生物活性的肽或多肽，由此产生一组蛋白酶抗体肽或多肽。

在一些实施方案中，将组和蛋白酶温育至少约 30 分钟的时间段。

例如,在该方法中所用的蛋白酶可以是以下的一种或多种,丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶、基质金属蛋白酶、羧肽酶(例如,羧肽酶 A、羧肽酶 B)、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、弹性蛋白酶、leukozyne、胰酶、凝血酶、血纤维蛋白溶酶、组织蛋白酶(例如,组织蛋白酶 G)、蛋白酶(例如,蛋白酶 1、蛋白酶 2、蛋白酶 3)、嗜热菌蛋白酶、凝乳酶、肠肽酶、胰天蛋白酶(例如,胰天蛋白酶 1、胰天蛋白酶 2、胰天蛋白酶 4、胰天蛋白酶 5、胰天蛋白酶 9、胰天蛋白酶 12、胰天蛋白酶 13)、钙激活中性蛋白酶、无花果蛋白酶(ficain)、梭菌蛋白酶、奇异果蛋白酶(actinidain)、菠萝蛋白酶和分离酶。在特定的实施方案中,蛋白酶是胰蛋白酶、弹性蛋白酶或 leucozyne。还可以通过生物提取物、生物匀浆或生物制剂来提供蛋白酶。如果需要,该方法进一步包括在完成温育后将蛋白酶抑制剂加入组和蛋白酶的混合物中。

在一些实施方案中,基于结合活性回收多个具有所需生物活性的肽或多肽。例如,可以基于结合通用配体(如蛋白 A、蛋白 G 或蛋白 L)来回收多个肽或多肽。结合活性还可以是对目标配体的特异性结合,如本文所述的目标配体。在特定的实施方案中,通过淘洗回收多个具有所需生物活性的肽或多肽。

在一些实施方案中,组包括展示系统。例如,展示系统可以是噬菌体展示、核糖体展示、乳液区室化(emulsion compartmentalization)和展示、酵母展示、嘌呤霉素展示、细菌展示、在质粒上展示或共价展示。在特定的实施方案中,展示系统与核酸的编码功能和由核酸编码的肽或多肽的功能性特征相关。在特定的实施方案中,展示系统含有可复制的遗传包。

在一些实施方案中,展示系统包括噬菌体展示。例如,噬菌体可以是 fd、M13、 λ 、MS2 或 T7。在特定的实施方案中,噬菌体展示系统是多价的。在一些实施方案中,作为 pIII 融合蛋白来展示肽或多肽。

在其他实施方案中,该方法进一步包括扩增编码多个具有所需生物活性的肽或多肽的核酸。在特定的实施方案中,通过噬菌体扩增、细胞生长或聚合酶链式反应来扩增核酸。

在一些实施方案中,组是一组免疫球蛋白单可变域,例如,其结合 VEGF 的拮抗剂并且是 VEGF 的拮抗剂。在特定的实施方案中,免疫球

蛋白单可变域是重链可变域。在更特别的实施方案中，重链可变域是人重链可变域。在其他实施方案中，免疫球蛋白单可变域是轻链可变域。在特定的实施方案中，轻链可变域是人轻链可变域。

在另一个方面中，本发明是从组中选择蛋白酶抗性多肽的方法，该多肽包括结合目标配体例如 VEGF 的免疫球蛋白单可变域 (dAb)。在一个实施方案中，该方法包括提供含有一组多肽的噬菌体展示系统，该多肽含有免疫球蛋白单可变域，在适于蛋白酶活性的条件下，将噬菌体展示系统和选自弹性蛋白酶、leucozyme 和胰蛋白酶的蛋白酶混合，并回收展示了含有结合目标配体的免疫球蛋白单可变域的多肽的噬菌体。

在一些实施方案中，以 100 μ g/ml 来使用蛋白酶，并将混合的噬菌体展示系统和蛋白酶在约 37 $^{\circ}$ C 下温育过夜。

在一些实施方案中，通过结合所述目标来回收展示了含有结合目标配体的免疫球蛋白单可变域的多肽的噬菌体。在其他实施方案中，通过淘洗来回收展示了含有结合目标配体的免疫球蛋白单可变域的多肽的噬菌体。

本发明还涉及通过本文所述的方法可选择的或已选择的分离的蛋白酶抗性肽或多肽。在特定的实施方案中，本发明涉及通过本文所述的方法可选择的或已选择的分离的蛋白酶 (例如，胰蛋白酶、弹性蛋白酶、leucozyme) 抗性免疫球蛋白单可变域 (例如，人抗体重链可变域，人抗体轻链可变域)。

本发明还涉及编码通过本文所述的方法可选择的或已选择的蛋白酶抗性肽或多肽 (例如，胰蛋白酶-、弹性蛋白酶-或 leucozyme-抗性免疫球蛋白单可变域) 的分离的或重组的核酸，以及含有该核酸的载体 (例如，表达载体) 和宿主细胞。

本发明还涉及制备通过本文所述的方法可选择的或已选择的蛋白酶抗性肽或多肽 (例如，胰蛋白酶-、弹性蛋白酶-或 leucozyme-抗性免疫球蛋白单可变域) 的方法，包括在适于表达的条件下维持含有编码蛋白酶抗性肽或多肽的重组核酸的宿主细胞，由此产生蛋白酶抗性肽或多肽。

本发明还涉及通过本文所述的方法可选择的或已选择的蛋白酶抗性肽或多肽 (例如，胰蛋白酶-、弹性蛋白酶-或 leucozyme-抗性免疫球蛋白单可变域) 用于药物中 (例如，用于治疗或诊断)。本发明还涉及

通过本文所述的方法可选择的或已选择的蛋白酶抗性肽或多肽（例如，胰蛋白酶-、弹性蛋白酶-或 leucozyme-抗性免疫球蛋白单可变域）用于制造治疗疾病的药物的用途。本发明还涉及治疗疾病的方法，包括将有效量的通过本文所述的方法可选择的或已选择的蛋白酶抗性肽或多肽（例如，胰蛋白酶-、弹性蛋白酶-或 leucozyme-抗性免疫球蛋白单可变域）给药于需要的患者。

本发明还涉及用于测定样品中是否存在 VEGF 或样品中存在多少 VEGF 的诊断试剂盒，其含有本发明的多肽、免疫球蛋白可变域（dAb）或拮抗剂和使用说明书（例如，用于测定样品中 VEGF 的存在和/或含量）。在一些实施方案中，试剂盒进一步包括一种或多种助剂，如合适的缓冲剂或合适的检测剂（例如，结合本发明的多肽或 dAb 的可检测标记的抗体或其抗原结合片段或与其连接或缀合的部分）。

本发明还涉及包括固体表面的装置，在该表面上固定了本发明的多肽拮抗剂或 dAb，使得固定的多肽或 dAb 结合 VEGF。可以使用在其上可以固定抗体或其抗原结合片段的任何合适的固体表面，例如，玻璃、塑料、碳水化合物（例如，琼脂糖珠子）。如果需要，支持物可以含有或将其修饰来含有所需的功能基团，以促进固定。装置和或支持物可以具有任何合适的形状，例如，片状、棒状、条状、平板、载玻片、珠子、丸状、圆板、凝胶、管状、球状、芯片、平板或圆盘等。在一些实施方案中，装置是量杆。

附图简述

图 1 是 pDOM 13（aka pDOM33）的多克隆位点的说明，其用来制备噬菌体展示组。

图 2 显示了用来自用 40ug/ml 胰蛋白酶在 30℃ 下温育不同时间点的 dAb 的样品进行的几个 Novex 10-20%Tricene 凝胶电泳。就在加入胰蛋白酶之前，然后在加入胰蛋白酶之后一小时、三小时和 24 小时立即取样。用 1xSureBlue 将蛋白质染色。凝胶说明 DOM 15-10 和 DOM 15-26-501 在用胰蛋白酶温育的头三个小时的过程中都得到了明显消化。DOM 15-26、DOM 4-130-54 和 DOM 1h-131-511 的消化只在用胰蛋白酶温育 24 小时后才变得明显。

图 3 是 DOM 1h-131-511 和 24 个选择的变体的氨基酸序列的说明。

选定克隆中不同于亲本序列的氨基酸是高亮显示的（相同的那些用圆点标记）。用框显示对应于 CDR1、CDR2 和 CDR3 的环。

图 4 是 DOM 4-130-54 和 27 个选择的变体的氨基酸序列的说明。选定克隆中不同于亲本序列的氨基酸是高亮显示的（相同的那些用圆点标记）。用框显示对应于 CDR1、CDR2 和 CDR3 的环。

图 5 是 DOM 15-26-555 和 21 个选择的变体的氨基酸序列的说明。选定克隆中不同于亲本序列的氨基酸是高亮显示的（相同的那些用圆点标记）。用框显示对应于 CDR1、CDR2 和 CDR3 的环。

图 6 是 DOM 15-10 和 16 个选择的变体的氨基酸序列的说明。选定克隆中不同于亲本序列的氨基酸是高亮显示的（相同的那些用圆点标记）。用框显示对应于 CDR1、CDR2 和 CDR3 的环。

图 7A-7D 是显示了用不同浓度的胰蛋白酶（从 0 至 100 μ g/ml）在 37 $^{\circ}$ C 温育过夜后亲本 dAb, DOM 1h-131-511（图 7A）和三个变体 dAb, DOM 1h-131-203（图 7B）、DOM 1h-131-204（图 7C）和 DOM 1h-131-206（图 7D）与固定的 TNFR1 结合的 BIAcore 痕迹。结果表明所有三个变体对高浓度胰蛋白酶（100 μ g/ml）的蛋白水解的抗性比亲本高。

图 8A-8C 是显示了用弹性蛋白酶和 leucozyme 温育过夜后 dAb DOM 1h-131-511（图 8A）、DOM 1h-131-202（图 8B）和 DOM 1h-131-206（图 8C）与固定的 TNFR1 结合的 BIAcore 痕迹。与亲本相比，dAb 显示出对抗弹性蛋白酶和 leucozyme 的蛋白水解提高的抗性。

图 9 显示了用胰蛋白酶温育前 dAb DOM 1h-131-511、DOM 1h-131-203、DOM 1h-131-204、DOM 1h-131-206、DOM 1h-131-54、DOM 1h-131-201 和 DOM 1h-131-202 的样品和用 100 μ g/ml 胰蛋白酶温育 1 小时、3 小时和 24 小时后的样品进行的两个 4-12% Novex Bis-Tris 凝胶电泳。

图 10A-10C 是显示了用不同浓度的胰蛋白酶（从 0 至 100 μ g/ml）在 37 $^{\circ}$ C 温育过夜后 DOM 4-130-54（图 10A）、DOM 4-130-201（图 10B）和 DOM 4-130-202（图 10C）与固定的 IL-1R1 融合蛋白结合的 BIAcore 痕迹。结果显示两种变体对高浓度胰蛋白酶（100 μ g/ml）的蛋白水解的抗性都比它们的亲本高。

图 11A-11C 是显示了用弹性蛋白酶和 leucozyme 温育过夜后 DOM 4-130-54（图 11A）、DOM 4-130-201（图 11B）和 DOM 4-130-202（图

11C)与固定的 IL-1R1 融合蛋白结合的 BIAcore 痕迹。与亲本相比, dAb 显示出对抗所测试的两种蛋白酶的蛋白水解提高的抗性。

图 12 是 DOM 15-26-555 和 6 个变体的氨基酸序列的说明。选定克隆中不同于亲本序列的氨基酸是高亮显示的(相同的那些用圆点标记)。

图 13A 和 13B 是显示了亲本 dAb, DOM 15-26-555 (图 13A) 和蛋白酶抗性最大的变体, DOM 15-26-593 (图 13B) 与固定的 VEGF 结合的 BIAcore 痕迹。在用浓度为 200 μ g/ml 的胰蛋白酶温育后, 在 100nM 的 dAb 浓度下, 比较 BIAcore 上亲本和变体的 hVEGF 结合。将反应在 37 $^{\circ}$ C 下进行三小时或 24 小时。结果表明在胰蛋白酶处理 24 小时后, 变体对蛋白水解的抗性比亲本高。

图 14 是显示了胰蛋白酶处理对 DOM 15-26-555 变体的 hVEGF 结合的影响的图。结果清楚地显示出在胰蛋白酶处理 24 小时后, 所有变体对蛋白水解的抗性比亲本 (DOM 15-26-555) 高。

图 15 显示了装载了 15 μ g 处理过的和未处理过的 DOM 15-26-555 或 DOM 15-26-593 样品的两个 Novex 10-20% Tricine 凝胶。就在加入胰蛋白酶之前, 然后在加入胰蛋白酶之后一小时、三小时和 24 小时立即取样。用 1xSureBlue 将蛋白质染色。凝胶说明 DOM 15-26-593 的胰蛋白酶抗性特征不同于 BIAcore 实验显示的特征。

图 16 是 DOM 15-10 和变体, DOM 15-10-11 的氨基酸序列的说明。变体中不同于亲本序列的氨基酸是高亮显示的(相同的那些用圆点标记)。

图 17A 和 17B 是显示了亲本, DOM 15-10 (图 17A) 和变体, DOM 15-10-11 (图 17B) 与固定的 VEGF 结合的 BIAcore 痕迹。在用浓度为 200 μ g/ml 的胰蛋白酶温育后, 在 100nM 的 dAb 浓度下, 比较 BIAcore 上亲本和变体的 hVEGF 结合。将反应在 37 $^{\circ}$ C 下进行一小时、三小时或 24 小时。结果表明在胰蛋白酶处理 24 小时后, 变体对蛋白水解的抗性比亲本高。

图 18 显示了装载了 15 μ g DOM 15-10 或 DOM 15-10-11 样品的两个 Novex 10-20% Tricine 凝胶。就在加入胰蛋白酶之前, 然后在加入胰蛋白酶之后一小时、三小时和 24 小时立即取样。用 SureBlue (1x) 将蛋白质染色。结果表明 BIAcore 研究中看到的结合活性直接反映出蛋白质的完整性。

图 19A-19L 说明了编码是 DOM 1h-131-511 或 DOM 4-130-54 变体的 dAb 的几个核酸的核苷酸序列。核苷酸序列各自编码图 3 和图 4 中所示的氨基酸序列。

图 20A-20E 说明了编码是 DOM 15-26-555 或 DOM 15-10 变体的 dAb 的几个核酸的核苷酸序列。核苷酸序列各自编码图 5 和图 6 中所示的氨基酸序列。

图 21 显示了 pDOM 38 的载体图谱。

图 22: 显示了 Labchip 上在 30℃ 下在 25:1 dAb:胰蛋白酶比例下用胰蛋白酶处理 DOM 10-53-474 和 DOM 15-26-593 蛋白质不同时间点的凝胶电泳。

图 23: 显示了通过 MMC 色谱接着离子交换的纯化后从每个样品获得的高水平纯度的大小排阻色谱痕迹。在 225nm 下监控 UV, 并将柱子在含有 10%乙醇 (v/v) 的 1xPBS 中运行。通过整合使用基线校准的峰面积来计算单体百分比。

图 24: 显示了 DOM 1h-131-511、DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 的蛋白酶稳定性数据。

图 25: 是 SEC, 其说明了 DOM 1h-131-202、DOM 1h-131-206 和 DOM 1h-131-511 在 37 和 50℃ 下在 Britton-Robinson 中的 14 天稳定性数据。对于所有 dAb, 蛋白质浓度为 1mg/ml。SEC 用来测定蛋白质在热应力过程中是否发生了任何变化和相对于时间=0 (T0) 样品溶液中残余的单体含量。

图 26A 至 I: 显示了 SEC 痕迹, 其显示了热应力 (37 和 50℃) 对 DOM 1h-131-511 (A 至 C), -202 (D 至 F) 和 -206 (G 至 I) 的影响。还显示了在给定时间点时相对于 T=0 溶液中残余的单体含量。

图 27: 显示了 DOM 1h-131-202、DOM 1h-131-206 和 DOM 1h-131-511 在 24hr、48hr 以及 7 和 14 天热应力的 IEF 分析。样品已经在 Britton-Robinson 缓冲液中在 37 或 50℃ 下进行了温育。

图 28: TNFR-1 BRA, 显示了 DOM 1h-131-202、DOM 1h-131-206 和 DOM 1h-131-511 在 50℃ 下温育 14 天的影响。假定蛋白质浓度为 1mg/ml。还显示了没有结合抗原的负对照 dAb (VH 模型 (dummy))。在 280nm 下监控 UV。

图 29: 说明了将 ~100mg/ml 的 A:DOM 1h-131-202、

B:DOM1h-131-206 和 C:DOM 1h-131-511 在 Britton-Robinson 缓冲液中在 +4°C 下存储 7 天的影响。

图 30: 显示了来自 DOM 1h-131-202、DOM 1h-131-206 和 DOM 1h-131-511 在 Pari E-flow 和 LC+ 中的喷雾器测试的数据。在任一 Britton-Robinson 缓冲液中, 蛋白质浓度为 5mg/ml。

图 31: 说明了 Britton-Robinson 缓冲液中 5mg/ml 的 DOM 1h-131-202、DOM 1h-131-206 和 DOM 1h-131-511 在喷雾过程中单体浓度的相对百分比变化。

图 32: 显示了 Britton-Robinson 缓冲液中 DOM 1h-131-206 和 DOM 1h-131-511 从 Pari LC+ 喷雾后的 SEC 痕迹。

图 33: 显示了 PBS 中 40mg/ml 的 DOM 1h-131-206 在 1 小时的喷雾过程中的 SEC 痕迹。喷雾器杯和气雾剂中的蛋白质对于喷雾过程中 dAb 经受到的剪切力和热应力的影响都是高度抗性的。

图 34: 显示了三种主要蛋白质(DOM 1h-131-206 和 DOM 1h-131-511 和 DOM 1h-131-202) 中每一种的沉淀速度曲线。对于 DOM 1h-131-206 较低浓度的样品观察到的双峰是由于该情况中样品从室中泄漏出来造成的假象。

图 35: 显示了缓冲液和装置对 GSK 1995056A (DOM 1h-131-511) 喷雾液滴大小的影响。

图 36: 显示了 GSK 1995056A (DOM 1h-131-511) 在各种装置中喷雾后的稳定性, 通过二聚体形成来测定, 如通过 SEC 来测量。

图 37: 显示了 GSK 1922567A (202)、GSK 1995057A (206) 和 GSK 1995056A (511) 在 Pari E-flow 和 LC+ 中的喷雾器测试。A) 在 Britton-Robinson 缓冲液中测试, B) 在 PEG1000/蔗糖缓冲液中测试。

图 38: 描绘了人 TNFR1 受体结合测试中的 TNF- α 剂量曲线。每个样品重复四次进行测试。

图 39: 显示了 GSK 1922567A (DOM 1h-131-202)、GSK 1995057A (DOM 1h-131-206) 和 GSK 1995056A (DOM 1h-131-511) 在人 TNFR1 受体结合测试中的抑制作用。每个样品重复四次进行测试。

图 40: 说明了 DOM 15-26 和 DOM 15-26-593 dAb 在 VEGF RBA 中的功效。

图 41: 显示了将 5mg/mg DMS1529 (DOM 15-26-593) 和 DMS1545

(DOM 15-26-501) 以单次浓注 (bolus) 剂量 i.v. 给药于大鼠后的药物动力学。

图 42a: 显示了 DMS 1529 Fc 融合体 (DOM 15-26-593 Fc 融合体) 的 SEC-MALL (大小排阻色谱-多角度激光散射) 分析, 证实了单体的特征。显示了两个不同的批次, 对于折射率 (即, 浓度; 虚线) 和光散射 (实线), 证明了相似的特征。用箭头标记的线条表示分子量计算。

图 42b: 显示了 DMS 1529 Fc 融合体 (DOM 15-26-593 Fc 融合体) 的 AUC (分析超速离心) 分析, 证实了单体的特征。在三个不同的浓度下 (PBS 缓冲液中接近 0.2、0.5 & 1.0 mg/ml) 测试一批材料。沉淀速率的分析证实了大约 80 kDa 的分子量。

图 43: 显示了 DMS 1529 (DOM 15-26-593) 和 DOM 15-26-501 的 DSC 痕迹。

图 44: 是对两个不同批次的材料进行 10 次冻-融循环之前和之后, DMS 1529 (DOM 15-26-593) 的 VEGF 结合 ELISA。

图 45: 显示了 10 次冻-融循环之前和之后, DOM 15-26-593 SEC 特征的一致性。

图 46: 说明了 DMS 1529 融合体 (DOM 15-26-593 Fc 融合体) 的加速稳定性研究的结果; 结合 ELISA 证明了在所示温度下温育 7 天后的活性。

图 47A: 显示了在 37°C 温育 14 & 15 天后, 人猕猴中的 DMS 1529 (DOM 15-26-593) 的稳定性。

图 47B: 显示了在 37°C 温育 14 & 15 天后, 人血清中的 DMS 1529 (DOM 15-26-593) 的稳定性。

图 48: 显示了 DOM 15-26 & DOM 15-26-593 dAb 作为 Fc 融合体 (各自为 DOM 1564 & DOM 1529) 在 VEGF RBA 中的功效。

图 49: 说明了 DMS 1529 融合体 (DOM 15-26-593 FC 融合体) 对 HUVEC 细胞增殖的抑制作用。

图 50: pDom33 载体图谱。

图 51a: 描绘了结合血清白蛋白的 dAb 的氨基酸序列。

图 51b: 描绘了结合血清白蛋白的 dAb 的核酸序列。

图 52a: 描绘了 DOM 15-26-593 Fc 融合体的氨基酸序列。

图 52b: 描绘了抗体 Fc 的氨基酸序列。

图 52c: 描绘了 DOM 15-26-593 Fc 融合体的核酸序列。

发明详述

在本说明书中, 已经参照实施方案, 以使得说明书既清楚又简明的撰写方式来描述了本发明。但是打算并且应当理解, 可以对这些实施方案进行各种组合和分开, 而没有脱离本发明。

除非另外限定, 在此所用的所有技术和科学术语都具有本领域(例如, 细胞培养、分子遗传学、核酸化学、杂交技术和生物化学)普通技术人员公知的相同含义。将标准技术用于分子、遗传和生化方法(通常参见, Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆, 实验室手册), 第 2 版 (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 和 Ausubel 等, *Short Protocols in Molecular Biology* (简明分子生物学实验方法) (1999) 第 4 版, John Wiley & Sons, Inc., 在此将其引入作为参考)和化学方法。

如在此所用的, 术语“血管内皮生长因子 (VEGF) 的拮抗剂”或“抗-VEGF 拮抗剂”等指的是结合 VEGF 并可以抑制(即, 一种或多种) VEGF 功能的物质(例如, 分子, 化合物)。

如在此所用的, “肽”指的是通过肽键连接在一起的两个至约 50 个氨基酸。

如在此所用的, “多肽”指的是通过肽键连接在一起的至少约 50 个氨基酸。多肽通常包括三级结构并折叠成功能域。

如在此所用的, “对蛋白酶降解抗性的”肽或多肽(例如, 域抗体 (dAb)) 是在适于蛋白酶活性的条件下用蛋白酶温育时, 基本上不受蛋白酶的降解。在适于蛋白酶活性的温度下用蛋白酶温育一小时后, 不超过约 25%、不超过约 20%、不超过约 15%、不超过约 14%、不超过约 13%、不超过约 12%、不超过约 11%、不超过约 10%、不超过约 9%、不超过约 8%、不超过约 7%、不超过约 6%、不超过约 5%、不超过约 4%、不超过约 3%、不超过约 2%、不超过约 1%或基本上没有蛋白质受蛋白酶降解时, 多肽(例如, dAb)基本上是没有降解的。例如 37 或 50℃。可以使用任何合适的方法来测定蛋白质降解, 例如, 如本文所述的。通过 SDS-PAGE 或通过功能测试(例如, 配体结合)。

如在此所用的, “展示系统”指的是其中基于所需特征(如, 物理、

化学或功能特征)易于选择的多肽或肽的集合的系统。展示系统可以是合适的多肽或肽的组(例如,在溶液中,固定在合适的支持物上)。展示系统还可以是使用细胞表达系统(例如,在转化的、感染的、转染的或转导的细胞中核酸文库的表达和细胞表面上所编码多肽的展示)或非细胞表达系统(例如,乳液区室化和展示)的系统。示例性展示系统与核酸的编码功能以及由核酸编码的多肽或肽的物理、化学和/或功能特征相关。使用这样的展示系统时,可以选择具有所需物理、化学和/或功能特征的多肽或肽,并可以容易地分离或回收编码选定多肽或肽的核酸。与核酸的编码功能以及多肽或肽的物理、化学和/或功能特征相关的各种展示系统是本领域已知的,例如,细菌噬菌体(bacteriophage)展示(噬菌体展示,例如噬粒展示)、核糖体展示、乳液区室化和展示、酵母展示、嘌呤霉素展示、细菌展示、在质粒上展示、共价展示等。(参见,例如,EP 0436597(Dyax)、U.S.专利 No.6,172,197(McCafferty等)、U.S.专利 No.6,489,103(Griffiths等))。

如在此所用的,“组(repertoire)”指的是特征在于氨基酸序列多样性的多肽或肽的集合。组的各个成员可以具有共同的特征,如共同的结构特征(例如,共同的核心结构)和/或共同的功能特征(例如,结合共同配体(例如,通用配体或目标配体)的能力)。

如在此所用的,“功能性”描述了具有生物活性的多肽或肽,如特定的结合活性。例如,术语“功能性多肽”包括通过其抗原-结合位点结合目标抗原的抗体或其抗原-结合片段。

如在此所用的,“通用配体”指的是结合给定组的绝大部分(例如,基本上全部)功能性成员的配体。通用配体(例如,共同的通用配体)可以结合给定组的许多成员,即使成员对于共同的目标配体不具有结合特异性。通常,多肽上功能性通用配体结合位点的存在(如通过结合通用配体的能力来表明)表明多肽是正确折叠和功能性的。通用配体的合适实例包括超抗原、结合在组的绝大部分功能性成员上表达的表位的抗体等。

“超抗原”是指在与这些蛋白的目标配体结合位点不同的位点与免疫球蛋白超家族的成员相互作用的通用配体的术语。葡萄球菌肠毒素是与T-细胞受体相互作用的超抗原的实例。结合抗体的超抗原包括蛋白G,其结合IgG恒定区(Bjorck和Kronvall, *J. Immunol.*, 133:969(1984));

蛋白 A, 其结合 IgG 恒定区和 V_H 结构域 (Forsgren 和 Sjoquist, *J. Immunol.*, 97:822 (1966)); 和蛋白 L, 其结合 V_L 结构域 (Bjorck, *J. Immunol.*, 140:1194 (1988))。

如在此所用的, “目标配体”指的是由多肽或肽特异性或选择性结合的配体。例如, 多肽是抗体或其抗原-结合片段时, 目标配体可以是任何所需的抗原或表位。与目标抗原的结合取决于功能性的多肽或肽。

如在此所用的, 抗体指的是 IgG、IgM、IgA、IgD 或 IgE 或片段 (如 Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv、二硫化物连接的 scFv、闭合构象多特异性抗体、二硫化物连接的 scFv、diabody), 不管是源自天然产生抗体的物种, 或是通过重组 DNA 技术形成的; 不管是分离自血清、B-细胞、杂交瘤、转染瘤、酵母或细菌。

如在此所用的, “抗体形式”指的是其中可以引入一个或多个抗体可变域使得给予结构上抗原结合特异性的任何合适的多肽结构。各种合适的抗体形式是本领域已知的, 如, 嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、单链抗体、双特异性抗体、抗体重链、抗体轻链、抗体重链和/或轻链的同型二聚体和杂二聚体、之前任一项的抗原结合片段 (例如, Fv 片段 (例如, 单链 Fv (scFv)、二硫化物键合的 Fv)、Fab 片段、 Fab' 片段、 $F(ab')_2$ 片段)、单抗体可变域 (例如, dAb、 V_H 、 V_{HH} 、 V_L) 和之前任一项的修饰形式 (例如, 通过聚乙二醇或其他合适聚合物或人源化 V_{HH} 的共价连接修饰的)。

短语“免疫球蛋白单可变域”指的是与其他 V 区或域无关的特异性结合抗原或表位的抗体可变域 (V_H 、 V_{HH} 、 V_L)。免疫球蛋白单可变域可以以带有其他可变区或可变域的形式 (例如, 同型-或杂-多聚体) 存在, 其中其他区或域对于单免疫球蛋白可变域的抗原结合不是所需的 (即, 其中免疫球蛋白单可变域结合抗原与其他可变域无关)。“域抗体”或“dAb”与在此所用的术语“免疫球蛋白单可变域”相同。“单抗体可变域”与在此所用的术语“免疫球蛋白单可变域”相同。在一个实施方案中, 免疫球蛋白单可变域是人抗体可变域, 但还包括来自其他物种的单抗体可变域, 如啮齿动物 (例如, WO00/29004 中公开的, 在此将其内容作为整体引入作为参考)、护士鲨和 Camelid V_{HH} dAb。Camelid V_{HH} 是源自包括骆驼、美洲驼、羊驼、单峰骆驼和原驼的物种的免疫球蛋白单可变域多肽, 其产生天然缺少轻链的重链抗体。可以将

V_{HH}人源化。

“结构域”是经过折叠的蛋白质结构，其具有与蛋白质其余部分无关的蛋白质三级结构。通常，结构域负责蛋白质的分离的功能特征，并且在许多情况下可以添加、去除或转移给其他蛋白质，而不丧失该蛋白质和/或该结构域的其余部分的功能。“单抗体可变域”是指经过折叠的多肽域，包含抗体可变域的特征性序列。因此，其包括完整的抗体可变区和修饰的可变域，例如，其中一个或多个环已经由不是抗体可变区特征性的序列替代，或已被截断或包含 N-端或 C-端延伸的抗体可变域，以及保留全长结构域的至少结合活性和特异性的可变域的折叠片段。

术语“文库”指的是异源多肽或核酸的混合物。文库由成员组成，每个成员具有单个多肽或核酸序列。就这点而言，“文库”和“组”同义。文库成员之间的序列差异造成文库中存在的多样性。文库可以采用多肽或核酸的简单混合物的形式，或者用核酸文库转化的生物体或细胞的形式，例如细菌、病毒、动物或植物细胞等。在一个实施方案中，各个生物体或细胞仅含有一个或数目有限的文库成员。在一个实施方案中，将核酸掺入到表达载体中，以表达该核酸所编码的多肽。因此，在一个方面中，文库可以采用宿主生物体群的形式，每个生物体含有一个或多个拷贝的表达载体，所述载体含有核酸形式的文库的单个成员，所述核酸可以表达而产生其相应的多肽成员。因此，宿主生物体群具有编码一大组不同多肽的潜力。

“通用框架”是单抗体框架序列，对应于序列中的保守抗体区，如 Kabat 限定的（“Sequences of Proteins of Immunological Interest”（免疫学重要性蛋白的序列），US Department of Health and Human Services（美国卫生和人类服务部）），或对应于人种系免疫球蛋白组或结构，如 Chothia 和 Lesk 限定的，（1987）J. Mol. Biol. 196:910-917。文库和组可以使用单个框架，或一组这样的框架，已经发现其允许实质上任何结合特异性的产生，尽管变化仅在超变区内。

如在此所用的，术语“剂量”指的是在一次给药（单位剂量），或在限定时间间隔内两次或多次给药时给药于患者的全部配体量。例如，剂量可以指的是在一天（24 小时）（日剂量）、两天、一周、两周、三周或一个或多个个月（例如，通过单次给药，或通过两次或多次给药）的过程中给药于患者的配体量（例如，含有结合目标抗原的免疫球蛋白单

可变域的配体)。给药之间的间隔可以是任何所需的时间量。

短语“半衰期”是指配体的血清浓度在体内降至 50%所需的时间,例如因为通过天然机制所致的配体降解和/或清除或螯合。本发明的配体在体内是稳定的,其半衰期因结合抗降解和/或清除或螯合的分子而延长。通常,这类分子是天然存在的蛋白质,它们本身在体内具有较长的半衰期。如果配体的功能活性在体内的持续时间比对延长半衰期的分子不具有特异性的类似配体更长的话,则配体半衰期延长。例如,将对人血清白蛋白(HAS)和靶分子具有特异性的配体,与对 HSA 无特异性且不结合 HSA,而结合别的分子的相同配体进行比较。例如,它能结合细胞上的第三目标物。通常,半衰期延长 10%、20%、30%、40%、50%或更多。半衰期延长范围在 2x、3x、4x、5x、10x、20x、30x、40x、50x或以上是不可能的。或者,或另外,半衰期延长范围高达 30x、40x、50x、60x、70x、80x、90x、100x、150x也是可能的。

如在此所用的,“流体动力学大小”指的是基于分子通过水溶液扩散的分子(例如,蛋白质分子,配体)的表观大小。将蛋白质通过溶液的扩散或移动进行处理,以得到蛋白质的表观大小,其中通过蛋白质颗粒的“Stokes 半径”或“流体动力学半径”来给出大小。蛋白质的“流体动力学大小”取决于质量和形状(构象),使得具有相同分子量的两个蛋白质基于蛋白质的整体构象可以具有不同的流体动力学大小。

如在此所用的,术语“竞争”意思是第一目标与其同源目标结合域的结合在所述同源目标特异性的第二结合域的存在下受到抑制。例如,结合可以受到空间抑制,例如,通过结合域的物理阻断或通过改变结合域的结构或环境,使其对目标的亲和性或亲和力降低。对于怎样进行竞争 ELISA 和竞争 BiaCore 实验来测定第一和第二结合域之间的竞争的详细内容参见 WO2006038027。

如下进行两个序列之间的“同源性”或“同一性”或“相似性”(在此可将这些术语互换使用)的计算。为了优化比较目的,将序列比对(例如,为了比较目的,对于最佳比对,可以在第一和第二氨基酸或核酸序列中引入缺口,并且非同源序列可以忽略不计)。在一个实施方案中,为了比较目的,所比对的参考序列的长度占参考序列长度的至少 30%,或至少 40%,或至少 50%,或至少 60%,或至少 70%,80%,90%,100%。然后,将相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸进行比

较。当第一序列中的某个位置由与第二序列相应位置的相同氨基酸残基或核苷酸占据时，那么分子在该位置上是相同的（在此所用的氨基酸或核酸“同源性”等同于氨基酸或核酸“同一性”）。两个序列之间的同一性百分比是考虑了缺口数和每个缺口的长度后序列共有的相同位置数的函数，需要引入这些缺口以进行两个序列的最佳比对。可以使用 BLAST2 Sequences 算法，使用缺省参数，来准备和测定如在此所限定的氨基酸和核苷酸序列比对和同源性、相似性或同一性（Tatusova, T. A. 等, *FEMS Microbiol Lett*, 174:187-188 (1999)）。

选择方法

在一个实施方案中，本发明涉及通过选择蛋白酶抗性肽和多肽的方法选择的具有所需生物活性（例如，结合 VEGF）的多肽和 dAb，例如，抗 VEGF dAb。在方法中使用了两种选择程序来产生有效的方法，用于选择对蛋白酶降解高度稳定和抗性的并具有所需生物活性的多肽。如本文所述的，蛋白酶抗性肽和多肽通常保持生物活性。相反，在本文所述的方法中，蛋白酶敏感性肽和多肽受到蛋白酶的分裂或降解，并因此，失去其生物活性。因此，通常基于其生物活性如结合活性来选择蛋白酶抗性肽或多肽。

本文所述的方法提供了几个优点。例如，如在此公开的和列举的，对能抵抗一种蛋白酶（例如，胰蛋白酶）的蛋白水解降解而选择的可变域、拮抗剂、肽或多肽也能抵抗其他蛋白酶（例如，弹性蛋白酶、leucozyme）的降解。在一个实施方案中，蛋白酶抗性与肽或多肽的较高解链温度（ T_m ）相关。较高的解链温度表示更稳定的可变域、拮抗剂、肽和多肽。在一个实施方案中，对蛋白酶降解的抗性还与对目标配体的高亲和性结合相关。因此，本文所述的方法提供了选择、分离和/或回收具有所需生物活性并且非常适于体内治疗和/或诊断用途（因为这些是蛋白酶抗性和稳定的）的可变域、拮抗剂、肽、多肽的有效途径。在一个实施方案中，蛋白酶抗性与提高的 PK 相关，例如，提高的超过非蛋白酶抗性的可变域、拮抗剂、肽或多肽。提高的 PK 可以是提高的 AUC（曲线下面积）和/或提高的半衰期。在一个实施方案中，蛋白酶抗性与可变域、拮抗剂、肽或多肽对剪切力和/或热应力的提高的稳定性和/或喷雾过程中降低的聚集倾向相关，例如，提高的超过非蛋白酶抗性的可变域、

拮抗剂、肽或多肽。在一个实施方案中，蛋白酶抗性与提高的存储稳定性相关，例如，提高的超过非蛋白酶抗性的可变域、拮抗剂、肽或多肽。在一个方面中，提供了一个、两个、三个、四个或全部优点，优点是对蛋白酶降解的抗性、较高的 T_m 和对目标配体的高亲和性结合。

选择方法

在一个方面中，提供了从肽和多肽的文库或组（例如，展示系统）中选择、分离和/或回收对蛋白酶（例如，一种或多种蛋白酶）降解抗性的肽或多肽的方法。在一个实施方案中，该方法是从肽和多肽的文库或组（例如，展示系统）中选择、分离和/或回收对蛋白酶（例如，一种或多种蛋白酶）降解抗性的多肽的方法。通常，该方法包括提供肽或多肽的文库或组，在适于蛋白酶活性的条件下将文库或组与蛋白酶（例如，胰蛋白酶、弹性蛋白酶、leucozyme、胰酶、痰液）混合，并选择、分离和/或回收对蛋白酶降解抗性的并具有所需生物活性的肽或多肽。由于蛋白酶的活性，蛋白酶降解的肽或多肽通常具有降低的生物活性或失去其生物活性。因此，可以使用基于生物活性的方法来选择、分离和/或回收对蛋白酶降解抗性的肽或多肽，生物活性如结合活性（例如，结合通用配体，结合特异性配体，结合底物）、催化活性或其他生物活性。

在适于蛋白酶的蛋白水解活性的条件下，将肽或多肽的文库或组与蛋白酶（例如，一种或多种蛋白酶）混合。适于蛋白酶的蛋白水解活性的条件以及含有蛋白水解活性的生物制剂或混合物是本领域公知的，并可以通过本领域普通技术人员容易地测定。如果需要，例如，可以通过测定一定范围的 pH 条件、蛋白酶浓度、温度下的蛋白酶活性和/或通过改变文库或组与蛋白酶反应的时间量来鉴定或优化合适的条件。例如，在一些实施方案中，蛋白酶例如胰蛋白酶与肽或多肽（例如，可变域）的比例（以摩尔/摩尔为基础）为 800 至 80,000（例如，8,000 至 80,000）蛋白酶:肽或多肽，例如，使用 10 微克/ml 蛋白酶时，比例为 800 至 80,000 蛋白酶:肽或多肽；或使用 100 微克/ml 蛋白酶时，比例为 8,000 至 80,000 蛋白酶:肽或多肽。在一个实施方案中，蛋白酶（例如，胰蛋白酶）与肽或多肽（例如，可变域）的比例（以重量/重量为基础，例如微克/微克）为 1,600 至 160,000（例如，16,000 至 160,000）蛋白酶:肽或多肽，例如，使用 10 微克/ml 蛋白酶时，比例为 1,600 至 160,000 蛋白酶:肽或多肽；或使用 100 微克/ml 蛋白酶时，比例为 16,000 至 160,000 蛋白酶:肽或多

肽。在一个实施方案中，使用至少 100 或 1000 微克/ml 浓度的蛋白酶，并且蛋白酶例如胰蛋白酶与肽或多肽（例如，可变域）的蛋白酶:肽比例（以摩尔/摩尔为基础）为 8,000 至 80,000 蛋白酶:肽或多肽。在一个实施方案中，使用至少 10 微克/ml 浓度的蛋白酶，并且蛋白酶例如胰蛋白酶与肽或多肽（例如，可变域）的蛋白酶:肽比例（以摩尔/摩尔为基础）为 800 至 80,000 蛋白酶:肽或多肽。在一个实施方案中，例如，C 为 10 微克/ml 时，蛋白酶（例如，胰蛋白酶）与肽或多肽（例如，可变域）的比例（以重量/重量为基础，例如微克/微克）为 1600 至 160,000 蛋白酶:肽或多肽；或 C 或 C' 为 100 微克/ml 时，比例为 16,000 至 160,000 蛋白酶:肽或多肽。在一个实施方案中，浓度（c 或 c'）为至少 100 或 1000 微克/ml 蛋白酶。对于测试单个或分离的肽或多肽（例如，免疫球蛋白可变域），例如，已经从组或文库中分离出来的，可以将蛋白酶加入合适缓冲液（例如，PBS）中的肽或多肽溶液中，以产生肽或多肽/蛋白酶溶液，如至少约 0.01%（w/w）蛋白酶/肽或多肽的溶液，约 0.01%至约 5%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，约 0.05%至约 5%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，约 0.1%至约 5%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，约 0.5%至约 5%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，约 1%至约 5%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.01%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.02%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.03%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.04%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.05%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.06%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.07%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.08%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.09%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.1%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.2%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.3%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.4%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.5%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.6%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.7%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.8%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 0.9%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 1%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 2%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 3%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，至少约 4%（w/w）蛋白酶/肽或多肽，或约 5%（w/w）蛋白酶/肽或多肽。可以在蛋白酶活性合适的温度下（例如，室温，约 37℃）温育混合物，并以（例如，1 小时，2 小时，3 小时等）时间间隔取样。使用任何合适的方法，如 SDS-PAGE 分析或

配体结合，分析样品的蛋白质降解，并且结果可以用来建立降解的时间过程。

在本文所述的方法中，可以使用任何所需的一种或多种蛋白酶。例如，可以使用单种蛋白酶，不同蛋白酶的任何所需组合或含有蛋白水解活性的任何生物制剂、生物提取物或生物匀浆。所用一种或多种蛋白酶的特性不必定是已知的。可以单独或以任何所需组合来使用的蛋白酶的合适实例包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶、基质金属蛋白酶、羧肽酶（例如，羧肽酶 A、羧肽酶 B）、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、弹性蛋白酶、leukozyme、胰酶、凝血酶、血纤维蛋白溶酶、组织蛋白酶（例如，组织蛋白酶 G）、蛋白酶（例如，蛋白酶 1、蛋白酶 2、蛋白酶 3）、嗜热菌蛋白酶、凝乳酶、肠肽酶、胰天蛋白酶（例如，胰天蛋白酶 1、胰天蛋白酶 2、胰天蛋白酶 4、胰天蛋白酶 5、胰天蛋白酶 9、胰天蛋白酶 12、胰天蛋白酶 13）、钙激活中性蛋白酶、无花果蛋白酶（ficain）、梭菌蛋白酶、奇异果蛋白酶（actinidain）、菠萝蛋白酶和分离酶。合适的含有蛋白水解活性的生物提取物、匀浆和制剂包括痰液、粘液（例如，胃粘液、鼻粘液、支气管粘液）、支气管肺泡灌洗、肺匀浆、肺提取物、胰腺提取物、胃液、唾液、眼泪等。以适于发生蛋白水解降解的含量使用蛋白酶。例如，如本文所述的，可以使用约 0.01% 至约 5%（w/w，蛋白酶/肽或多肽）的蛋白酶。将蛋白酶与包括肽或多肽组的展示系统（例如，噬菌体展示系统）混合时，例如，可以使用约 10 μ g/ml 至约 3mg/ml 浓度的蛋白酶，约 10 μ g/ml，约 20 μ g/ml，约 30 μ g/ml，约 40 μ g/ml，约 50 μ g/ml，约 60 μ g/ml，约 70 μ g/ml，约 80 μ g/ml，约 90 μ g/ml，约 100 μ g/ml，约 200 μ g/ml，约 300 μ g/ml，约 400 μ g/ml，约 500 μ g/ml，约 600 μ g/ml，约 700 μ g/ml，约 800 μ g/ml，约 900 μ g/ml，约 1000 μ g/ml，约 1.5mg/ml，约 2mg/ml，约 2.5mg/ml 或约 3mg/ml。

在适于蛋白酶活性的温度下将蛋白酶与肽或多肽的集合（文库或组）一起温育。例如，可以在约 20 $^{\circ}$ C 至约 40 $^{\circ}$ C 的温度下温育蛋白酶和肽或多肽的集合（例如，在室温，约 20 $^{\circ}$ C，约 21 $^{\circ}$ C，约 22 $^{\circ}$ C，约 23 $^{\circ}$ C，约 24 $^{\circ}$ C，约 25 $^{\circ}$ C，约 26 $^{\circ}$ C，约 27 $^{\circ}$ C，约 28 $^{\circ}$ C，约 29 $^{\circ}$ C，约 30 $^{\circ}$ C，约 31 $^{\circ}$ C，约 32 $^{\circ}$ C，约 33 $^{\circ}$ C，约 34 $^{\circ}$ C，约 35 $^{\circ}$ C，约 36 $^{\circ}$ C，约 37 $^{\circ}$ C，约 38 $^{\circ}$ C，约 39 $^{\circ}$ C，约 40 $^{\circ}$ C）。将蛋白酶和肽或多肽的集合一起温育一段足以发

生蛋白水解降解的时间。例如,可以将肽或多肽的集合与蛋白酶温育约30分钟至约24或约48小时。在一些实施例中,将肽或多肽的集合与蛋白酶一起温育过夜,或至少约30分钟,约1小时,约1.5小时,约2小时,约3小时,约4小时,约5小时,约6小时,约7小时,约8小时,约9小时,约10小时,约11小时,约12小时,约13小时,约14小时,约15小时,约16小时,约17小时,约18小时,约19小时,约20小时,约21小时,约22小时,约23小时,约24小时,约48小时,或更长时间。

通常理想的是,至少在较早的选择轮次中(例如,使用展示系统时),与没有包括蛋白酶温育的选择相比,蛋白酶导致选择的具有所需生物活性的克隆数量减少至少一个数量级。在特定的实施例中,方法中所用的蛋白酶含量和条件足以将回收的克隆数量减少至少一个对数(10倍),至少约2个对数(100倍),至少约3个对数(1000倍)或至少约4个对数(10,000倍)。使用常规方法和/或在此提供的指导,可以容易地测定导致所需回收克隆减少的合适的蛋白酶含量和温育条件。

可以使用任何合适的方法(例如,体外、体内或离体(ex vivo))来混合并温育蛋白酶和肽或多肽的集合。例如,可以在合适的容器中将蛋白酶和肽或多肽的集合混合并在适于蛋白酶活性的温度下保持静止、摇晃、振荡、涡旋等。如果需要,可以在体内或离体(ex vivo)系统中混合蛋白酶和肽或多肽的集合,如通过将多肽的集合(例如,噬菌体展示文库或组)引入合适的动物中(例如,小鼠),经过对于蛋白酶活性而言足够的时间后,回收肽或多肽的集合。在另一个实施例中,用多肽的集合(例如,噬菌体展示文库或组)灌注器官或组织,经过对于蛋白酶活性而言足够的时间后,回收多肽的集合。

温育后,可以基于所需生物活性如结合活性来选择蛋白酶抗性肽或多肽。如果需要,可以在选择前加入蛋白酶抑制剂。可以使用基本上不干扰选择方法的任何合适的蛋白酶抑制剂(或两种或多种蛋白酶抑制剂的组合物)。合适的蛋白酶抑制剂的实例包括, α 1-抗-胰蛋白酶、 α 2-巨球蛋白、阿吗他定、抗凝血酶 III、抑肽酶、4-(2-氨基乙基)苯磺酰基氟化物氢氯化物(AEBSF)、(4-脒基-苯基)-甲烷-磺酰氟化物(APMSF)、贝他定、苄脒、抑凝乳蛋白酶素、3,4-二氯异香豆素、二异丙基氟磷酸盐(DIFP)、E-64、乙二胺四乙酸(EDTA)、弹性蛋白酶抑制剂(elastatinal)、

亮肽素、N-乙基马来酰亚胺、苯甲基磺酰氟化物 (PMSF)、抑胃肽、1,10-邻二氮杂菲、磷酸二肽 (phosphoramidon)、丝氨酸蛋白酶抑制剂、N-甲苯磺酰基-L-赖氨酸-氯甲基酮 (TLCK)、Na-甲苯磺酰基-Phe-氯甲基酮 (TPCK) 等。此外, 许多含有几类蛋白酶抑制剂的制剂是可购得的 (例如, Roche Complete Protease Inhibitor Cocktail TabletsTM (Roche Diagnostics Corporation; Indianapolis, IN, USA), 其抑制胰凝乳蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、木瓜蛋白酶、链霉蛋白酶、胰腺提取物和胰蛋白酶)。

可以使用所需的生物活性选择方法来选择蛋白酶抗性肽或多肽, 这种选择方法可以使具有所需生物活性的肽和多肽与不具有所需生物活性的肽和多肽区分开来并进行选择。通常, 已经受到蛋白酶消化或分裂的肽或多肽失去了它们的生物活性, 而蛋白酶抗性肽或多肽仍然保留功能。因此, 对于生物活性合适的测试可以用来选择蛋白酶抗性肽或多肽。例如, 可以使用合适的结合测试 (例如, ELISA、淘选) 来测定共同的结合功能 (例如, 结合通用配体, 结合特异性配体或结合底物)。例如, 可以通过淘选或使用合适的亲和性基质来选择、分离和/或回收结合目标配体或通用配体 (如蛋白 A、蛋白 L 或抗体) 的多肽。可以通过将配体 (例如, 通用配体、目标配体) 溶液加入合适的容器 (例如, 试管、培养皿) 中并使配体沉积或覆盖在容器壁上来完成淘选。将过量的配体洗掉并将多肽 (例如, 噬菌体展示文库) 加入容器中, 并将容器维持在适于多肽结合固定化配体的条件下。将未结合的多肽洗掉, 使用任何合适的方法 (如刮下 (scraping) 或降低 pH) 来回收结合的多肽。

使用噬菌体展示系统时, 可以在噬菌体 ELISA 中测试结合。可以根据任何合适的程序来进行噬菌体 ELISA。在一个实施例中, 通过 ELISA 筛选每一轮选择产生的噬菌体群与选定的目标配体或通用配体的结合, 以鉴定呈现出蛋白酶抗性肽或多肽的噬菌体。如果需要, 可以测试可溶性肽和多肽与目标配体或通用配体的结合, 例如, 通过 ELISA, 例如, 使用对抗 C-或 N-端标记物的试剂 (参见, 例如 Winter 等 (1994), *Ann. Rev. Immunology* 12, 433-55 以及其中引用的参考文献)。还可以通过 PCR 产物的凝胶电泳 (Marks 等, 1991, 上文; Nission 等, 1994, 上文)、探针检测 (Tomlinson 等, 1992, *J. Mol. Biol.* 227, 776) 或通过载体 DNA 的测序来测定选定噬菌体的多样性。

除了对 VEGF 的特异性, 含有抗-VEGF 蛋白酶抗性多肽 (例如, 单

抗体可变域)的拮抗剂或多肽(例如,双特异性配体)可以具有通用配体或任何所需目标配体的结合特异性,目标配体如人或动物蛋白,包括细胞因子、生长因子、细胞因子受体、生长因子受体、酶(例如,蛋白酶)、酶的辅因子、DNA结合蛋白、脂质和碳水化合物。

在一些实施方案中,蛋白酶抗性肽或多肽(例如,dAb)或拮抗剂结合肺组织中的 VEGF。在一个实施方案中,拮抗剂或多肽还结合肺组织中的其他目标物。

在本文所述的方法中使用展示系统时(例如,与核酸的编码功能和该核酸编码的肽或多肽的功能性特征相关的展示系统),常常能有利地扩增或提高编码选定肽或多肽的核酸的拷贝数。这提供了一条获得足量核酸和/或肽或多肽的有效途径,以用于更多轮次的选择,使用本文所述的方法或其他合适的方法,或用于制备其他的组(例如,亲和性突变组)。因此,在一些实施方案中,该方法包括使用展示系统(例如,与核酸的编码功能和该核酸编码的肽或多肽的功能性特征相关的展示系统,如噬菌体展示)并进一步包括扩增或提高编码选定肽或多肽的核酸的拷贝数。可以使用任何合适的方法来扩增核酸,如通过噬菌体扩增、细胞生长或聚合酶链式反应。

本文所述的方法可以用作计划的一部分来分离蛋白酶抗性肽或多肽,例如,dAb,如果需要,可以包括其他合适的选择方法。在这些情况中,可以在计划的任何所需点使用本文所述的方法,如在使用其他选择方法之前或之后。本文所述的方法还可以用来提供两轮或更多轮的选择,如本文所述和举例说明的。

在一个实施例,提供了选择特异性结合 VEGF 并抵抗胰蛋白酶降解的肽或多肽(例如,dAb)的方法,包括提供肽或多肽的文库或组,在适于胰蛋白酶的蛋白水解消化的条件下将文库或组与胰蛋白酶混合,并选择、分离和/或回收能抵抗胰蛋白酶降解并特异性结合 VEGF 的肽或多肽。

在特定的实施方案中,提供了选择能抵抗胰蛋白酶降解并特异性结合 VEGF 的免疫球蛋白单可变域(dAb)的方法。在这些实施方案中,提供了含有 dAb 的文库或组,并在适于胰蛋白酶的蛋白水解消化的条件下与胰蛋白酶(或含有胰蛋白酶的生物制剂、提取物或匀浆)混合。选择结合 VEGF 的胰蛋白酶抗性 dAb。例如,胰蛋白酶抗性 dAb 在 0.04%

(w/w)胰蛋白酶溶液在 37℃ 下持续至少约 2 小时时基本上没有降解。在一个实施方案中，胰蛋白酶抗性 dAb 在 0.04% (w/w) 胰蛋白酶溶液在 37℃ 下持续至少约 3 小时时基本上没有降解。在一个实施方案中，胰蛋白酶抗性 dAb 在 0.04% (w/w) 胰蛋白酶溶液在 37℃ 下持续至少约 4 小时，至少约 5 小时，至少约 6 小时，至少约 7 小时，至少约 8 小时，至少约 9 小时，至少约 10 小时，至少约 11 小时，或至少约 12 小时时基本上没有降解。

在示例性实施方案中，提供了选择能抵抗胰蛋白酶降解并特异性结合 VEGF 的免疫球蛋白单可变域 (dAb) 的方法，该方法包括提供含有一组多肽的噬菌体展示系统，该多肽含有免疫球蛋白单可变域，将噬菌体展示系统与胰蛋白酶 (100µg/ml) 混合并将混合物在约 37℃ 下温育，例如过夜 (例如，约 12-16 小时)，然后选择呈现出特异性结合 VEGF 的 dAb 的噬菌体。

在另一个实施例中，方法用于选择能抵抗弹性蛋白酶降解的肽或多肽，例如 dAb，包括提供肽或多肽的文库或组，在适于弹性蛋白酶的蛋白水解消化的条件下将文库或组与弹性蛋白酶 (或含有弹性蛋白酶的生物制剂、提取物或匀浆) 混合，并选择、分离和/或回收能抵抗弹性蛋白酶降解并具有 VEGF 结合活性的肽或多肽。

在特定的实施方案中，提供了选择能抵抗弹性蛋白酶降解并结合 VEGF 的免疫球蛋白单可变域 (dAb) 的方法。在这些实施方案中，提供了含有 dAb 的文库或组，并在适于弹性蛋白酶的蛋白水解消化的条件下与弹性蛋白酶 (或含有弹性蛋白酶的生物制剂、提取物或匀浆) 混合。选择特异性结合 VEGF 的弹性蛋白酶抗性 dAb。例如，弹性蛋白酶抗性 dAb 在 0.04% (w/w) 弹性蛋白酶溶液在 37℃ 下持续至少约 2 小时时基本上没有降解。在一个实施方案中，弹性蛋白酶抗性 dAb 在 0.04% (w/w) 弹性蛋白酶溶液在 37℃ 下持续至少约 12 小时时基本上没有降解。在一个实施方案中，弹性蛋白酶抗性 dAb 在 0.04% (w/w) 弹性蛋白酶溶液在 37℃ 下持续至少约 24 小时、至少约 36 小时或至少约 48 小时时基本上没有降解。

在一个实施方案中，提供了选择能抵抗弹性蛋白酶降解并结合 VEGF 的免疫球蛋白单可变域 (dAb) 的方法，该方法包括提供含有一组多肽的噬菌体展示系统，该多肽含有免疫球蛋白单可变域，将噬菌体

展示系统与弹性蛋白酶(约 100 μ g/ml)混合并将混合物在约 37 $^{\circ}$ C 下温育,例如过夜(例如,约 12-16 小时),然后选择呈现出特异性结合 VEGF 的 dAb 的噬菌体。

在一个实施例中,提供了选择能抵抗 leucozyme 降解的肽或多肽(例如, dAb)的方法,包括提供肽或多肽的文库或组,在适于 leucozyme 的蛋白水解消化的条件下将文库或组与 leucozyme(或含有 leucozyme 的生物制剂、提取物或匀浆)混合,并选择、分离和/或回收能抵抗 leucozyme 降解并具有特异性 VEGF 结合活性的肽或多肽。

在特定的实施方案中,提供了选择能抵抗 leucozyme 降解并结合 VEGF 的免疫球蛋白单可变域(dAb)的方法。在这些实施方案中,提供了含有 dAb 的文库或组,并在适于 leucozyme 的蛋白水解消化的条件下与 leucozyme(或含有 leucozyme 的生物制剂、提取物或匀浆)混合。选择特异性结合 VEGF 的 leucozyme 抗性 dAb。例如,leucozyme 抗性 dAb 在 0.04%(w/w) leucozyme 溶液中在 37 $^{\circ}$ C 下持续至少约 2 小时时基本上没有降解。在一个实施方案中,leucozyme 抗性 dAb 在 0.04%(w/w) leucozyme 溶液中在 37 $^{\circ}$ C 下持续至少约 12 小时时基本上没有降解。在一个实施方案中,leucozyme 抗性 dAb 在 0.04%(w/w) leucozyme 溶液中在 37 $^{\circ}$ C 下持续至少约 24 小时、至少约 36 小时或至少约 48 小时时基本上没有降解。

在一个实施方案中,提供了选择能抵抗 leucozyme 降解并特异性结合 VEGF 的免疫球蛋白单可变域(dAb)的方法,该方法包括提供含有一组多肽的噬菌体展示系统,该多肽含有免疫球蛋白单可变域,将噬菌体展示系统与 leucozyme(约 100 μ g/ml)混合并将混合物在约 37 $^{\circ}$ C 下温育,例如过夜(例如,约 12-16 小时),然后选择呈现出特异性结合 VEGF 的 dAb 的噬菌体。

在另一个方面中,提供了一组产生蛋白酶抗性肽或多肽(例如, dAb)的方法。该方法包括提供一组肽或多肽;在适于蛋白酶活性的条件下将肽或多肽组与蛋白酶混合;并回收多个特异性结合 VEGF 的肽或多肽,由此产生一组蛋白酶抗性肽或多肽。在此对于其他方法描述了适用于该方法中的蛋白酶、展示系统、用于蛋白酶活性的条件和选择肽或多肽的方法。

在一些实施方案中,使用了含有一组肽或多肽的展示系统(例如,

与核酸的编码功能和该核酸编码的肽或多肽的功能性特征相关的展示系统)，并且该方法进一步包括扩增或提高编码多个选定肽或多肽的核酸的拷贝数。可以使用任何合适的方法来扩增核酸，如通过噬菌体扩增、细胞生长或聚合酶链式反应。

在特定的实施方案中，提供了产生一组包含抗-VEGF dAb 的蛋白酶抗性多肽的方法。该方法包括提供一组包含抗-VEGF dAb 的多肽；在适于蛋白酶活性的条件下将肽或多肽组与蛋白酶（例如，胰蛋白酶、弹性蛋白酶、leucozyme）混合；并回收多个包含具有 VEGF 结合特异性的 dAb 的多肽。该方法可以用于产生天然组，或偏向所需结合活性的组，如基于具有 VEGF 结合特异性的亲本 dAb 的亲性和性突变组。

多肽展示系统

在一个实施方案中，提供用于本文所述方法中的肽或多肽的组或文库包含合适的展示系统。该展示系统可以抵抗蛋白酶的降解（例如，单种蛋白酶或蛋白酶的组，以及含有蛋白水解活性的任何生物提取物、匀浆或制剂（例如，痰液、粘液（例如，胃粘液、鼻粘液、支气管粘液）、支气管灌洗、肺匀浆、肺提取物、胰腺提取物、胃液、唾液、眼泪等））。在一个实施方案中，展示系统以及展示系统与所展示肽之间的联系至少抵抗蛋白酶能与组中最稳定的肽或多肽那样。这使得可以容易地分离和/或扩增编码选定的展示多肽的核酸。

在一个实施例中，可以从溶液中或共价或非共价连接合适表面（如塑料或玻璃（例如，微滴定平板、多肽阵列，如微阵列））的一组肽或多肽中选择、分离和/或回收蛋白酶抗性肽或多肽，例如 dAb。例如，可以使用在表面上的肽阵列，其排列方式使每个不同的文库成员（例如，独特的肽序列）处于阵列中分开的、预定的位置。可以通过阵列中的空间位置来决定该阵列中每个文库成员的身份。可以测定在目标配体与例如反应性文库成员之间发生结合作用的阵列中的位置，因此基于空间位置来鉴定反应性成员的序列。（参见，例如，U.S.专利 No.5,143,854，WO90/15070 和 WO92/10092）。

在一个实施方案中，该方法使用连接核酸的编码功能和该核酸编码的多肽的物理、化学和/或功能性特征的展示系统。这样的展示系统可以包括多个可复制的遗传包，如噬菌体或细胞（细菌）。在一个实施方案

中，展示系统包括文库，如细菌噬菌体展示文库。

已经描述了各种合适的细菌噬菌体展示系统（例如，多价展示和多价展示系统）。（参见，例如，Griffiths 等，U.S.专利 No.6,555,313B1（在此引入作为参考）；Johnson 等，U.S.专利 No.5,733,743（在此引入作为参考）；McCafferty 等，U.S.专利 No.5,969,108（在此引入作为参考）；Mulligan-Kehoe，U.S.专利 No.5,702,892（在此引入作为参考）；Winter，G.等，*Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455（1994）；Soumilion P. 等，*Appl. Biochem. Biotechnol.* 47(2-3): 175-189（1994）；Castagonoli，L.等，*Comb. Chem. High Throughput Screen*, 4(2):121-133（2001））。细菌噬菌体展示系统中展示的肽或多肽可以在任何合适的细菌噬菌体上展示，如丝状噬菌体（例如，fd，M13，F1）、溶菌噬菌体（例如，T4、T7、 λ ）或RNA噬菌体（例如，MS2）。

通常，产生或提供展示一组肽或噬菌体多肽的噬菌体文库，作为与合适的噬菌体外壳蛋白（例如，fd pIII 蛋白）的融合蛋白。融合蛋白可以展示在噬菌体外壳蛋白尖端的肽或多肽，或如果需要，在内部位置。例如，展示的肽或多肽可以存在于 pIII 结构域 1 的氨基端的位置。（pIII 的结构域 1 也称为 N1）。展示的肽可以直接与 pIII 融合（例如，pIII 结构域 1 的 N-端）或使用连接物与 pIII 融合。如果需要，融合体可以进一步包括标记物（例如，myc 表位、His 标记物）。可以使用任何合适的方法来产生包括作为与噬菌体外壳蛋白的融合蛋白展示的一组肽或多肽的文库，如通过将编码展示的肽或多肽的噬菌体载体或噬粒载体的文库引入合适的宿主细胞中，并培养所得到的细菌来产生噬菌体（例如，如果需要，使用合适的辅助噬菌体或补充质粒）。可以使用任何合适的方法从培养物中回收噬菌体文库，如沉淀和离心。

展示系统可以包含一组含有任何所需量多样性的肽或多肽。例如，组可以含有具有对应于由生物体、一组生物体（例如，一组分离自 Camelid 的 V_{HH} dAb 的序列）、所需组织或所需细胞类型表达的天然产生多肽的氨基酸序列的肽或多肽，或可以含有具有随机或随机化氨基酸序列的肽或多肽。如果需要，多肽可以共有共同的核心或支架。该组或文库中的多肽可以包含随机或随机化氨基酸序列的限定片段或共同的氨基酸序列的片段。在特定的实施方案中，组中所有或基本上所有的多肽是所需类型的，如所需的酶（例如，聚合酶）或所需的抗体的抗原结

合片段（例如，人 V_H 或人 V_L）。在实施方案中，多肽展示系统包含一组多肽，其中每个多肽包含抗体可变域。例如，组中的每个多肽可以含有 V_H、V_L 或 Fv（例如，单链 Fv）。

可以使用任何合适的方法将氨基酸序列多样性引入任何所需的肽或多肽或支架的片段中。例如，可以通过使用任何合适的诱变方法（例如，低保真度 PCR、寡核苷酸-介导的或定向突变、使用 NNK 密码子的多样化）或任何其他合适的方法制备编码多样化多肽的核酸，将氨基酸序列多样性引入目标片段中，如抗体可变域的互补性决定区或疏水性结构域。如果需要，可以将待多样化的多肽片段随机化。

构成组的多肽的大小很大程度上是选择的问题，并且不需要统一的多肽大小。在一个实施方案中，组中的多肽至少具有三级结构（形成至少一个结构域）。

选择/分离/回收

可以使用任何合适的方法从组或文库（例如，在展示系统中）中选择、分离和/或回收蛋白酶抗性肽或多肽（例如，一群蛋白酶抗性多肽）。在一个实施方案中，基于可选择特征（例如，物理特征、化学特征、功能性特征）来选择或分离蛋白酶抗性多肽。合适的可选择的功能性特征包括组中肽或多肽的生物活性，例如，结合通用配体（例如，超抗原）、结合目标配体（例如，抗原、表位、底物）、结合抗体（例如，通过肽或多肽上表达的表位）或催化活性。（参见，例如，Tomlinson 等，WO99/20749；WO01/57065；WO99/58655）。在一个实施方案中，选择是基于与 VEGF 的特异性选择。在另一个实施方案中，选择是基于能产生其中成员是蛋白酶抗性的第二组的选定功能性特征，接着从第二组中选择特异性结合 VEGF 的成员。

在一些实施方案中，从其中基本上所有蛋白酶抗性肽或多肽共有共同的可选择特征的文库或组中选择和/或分离蛋白酶抗性肽或多肽。例如，可以从其中基本上所有蛋白酶抗性肽或多肽结合共同的通用配体、结合共同的目标配体、结合共同的抗体（或由其结合）或具有共同的催化活性的文库或组中选择蛋白酶抗性肽或多肽。这种类型的选择对于基于具有所需生物活性的亲本肽或多肽来制备一组蛋白酶抗性肽或多肽特别有用，例如，进行免疫球蛋白单可变域的亲和性突变时。

基于结合共同的通用配体的选择可以产生含有为原始库或组成分的全部或基本上全部蛋白酶抗性肽或多肽的肽或多肽的集合或群体。例如，可以通过淘选或使用合适的亲和性基质来选择、分离和/或回收结合目标配体或通用配体（如，蛋白 A、蛋白 L 或抗体）的肽或多肽。可以通过将配体（例如，通用配体、目标配体）溶液加入合适的容器中（例如，试管、培养皿）并使配体沉积或覆盖在容器壁上来完成淘选。将过量的配体洗掉并将肽或多肽（例如，已经用蛋白酶温育过的组）加入容器中，并将容器维持在适于肽或多肽结合固定化配体的条件下。将未结合的肽或多肽洗掉，使用任何合适的方法（如刮下（scraping）或降低 pH）来回收结合的肽或多肽。

合适的配体亲和性基质通常含有固体支持物或珠子（例如，琼脂糖），配体与其共价或非共价连接。可以使用分批方法、柱方法或任何其他合适的方法，在适于肽或多肽与基质上的配体结合的条件下，将亲和性基质与肽或多肽（例如，已经用蛋白酶温育过的组）混合。可以将没有结合亲和性基质的肽或多肽洗掉，并使用任何合适的方法将结合的肽或多肽洗脱并回收，例如用较低 pH 的缓冲液、用温和的去污剂（例如，脲）或竞争与配体结合的肽来洗脱。在一个实施例中，在适于组中的肽或多肽结合目标配体（VEGF）的条件下，将生物素化的目标配体与组混合。使用固定化的抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素（例如，在珠子上）来回收结合的肽或多肽，

在一些实施方案中，通用配体是抗体或其表位。结合文库或组的肽或多肽中基本上保守的肽或多肽的结构特征的抗体或抗原结合片段作为通用配体是特别有用的。对于分离、选择和/或回收蛋白酶抗性肽或多肽而适宜用作配体的抗体和抗原结合片段可以是单克隆或多克隆的，并可以使用任何合适的方法来制备。

文库/组

在其他方面中，提供了蛋白酶抗性肽和多肽的组、编码蛋白酶抗性肽和多肽的文库以及产生该文库和组的方法。

可以使用任何合适的方法制备或获得编码和/或含有蛋白酶抗性肽和多肽的文库。可以基于目标肽或多肽（例如，选自文库的抗-VEGF 肽或多肽）将文库设计来编码蛋白酶抗性肽或多肽，或可以使用本文所述

的方法选自另一个文库。例如，可以使用合适的多肽展示系统来制备富含蛋白酶抗性多肽的文库。

在一个实施例中，如本文所述的，在适于蛋白酶活性的条件下，将含有一组展示多肽的噬菌体展示文库与蛋白酶混合，该展示多肽含有免疫球蛋白单可变域（例如， V_H 、 V_K 、 V_L ）。基于所需的生物活性，如结合活性（例如，结合通用配体，结合目标配体），来回收蛋白酶抗性多肽，由此产生富含蛋白酶抗性多肽的噬菌体展示文库。在一个实施方案中，回收是基于结合通用配体，以产生富集文库，接着基于与 VEGF 的特异性结合来选择文库的抗-VEGF 成员。

在另一个实施例中，首先筛选包含一组展示肽的噬菌体文库来鉴定对所需目标抗原（例如，VEGF）具有结合特异性的组成员，该展示多肽含有免疫球蛋白单可变域（例如， V_H 、 V_K 、 V_L ）。回收具有所需结合特异性的多肽集合，并如本文所述的，在适于蛋白水解活性的条件下，将集合与蛋白酶混合。回收具有所需目标结合特异性的蛋白酶抗性多肽的集合，产生富含蛋白酶抗性和高亲和性多肽的文库。如本文所述的，在一个实施方案中，该选择方法中的蛋白酶抗性与高亲和性结合相关。

可以使用任何合适的方法容易地产生编码所需类型多肽组的文库。例如，可以获得编码所需类型多肽（例如，聚合酶、免疫球蛋白可变域）的核酸序列，并可以制备每个含有一个或多个突变的核酸的集合，例如通过使用易出错聚合酶链式反应（PCR）系统来扩增核酸，通过化学诱变（Deng 等，*J. Biol. Chem.* 269:9533（1994））或使用细菌突变体菌株（Low 等，*J. Mol. Biol.*，260:359（1996））。

在其他实施方案中，为了多样化，可以靶向核酸的特定片段。突变选定位置的方法也是本领域公知的，并包括，例如，使用错配的寡核苷酸或简并的寡核苷酸，使用或不使用 PCR。例如，已经通过将突变靶向抗原结合环形成了合成的抗体文库。已经将随机或半随机抗体 H3 和 L3 片段添加至种系免疫球蛋白 V 基因片段，以产生具有未突变框架片段的大文库（Hoogenboom 和 Winter（1992）上文；Nissim 等（1994）上文；Griffiths 等（1994）上文；DeKruif 等（1995）上文）。将这样的多样化延伸来包括一些或全部其他抗原结合环（Cramer 等（1996）*Nature Med.* 2:100；Riechmann 等（1995）*Bio/Technology*，13:475；Morphosys，WO97/08320，上文）。在其他实施方案中，对于多样化，可以靶向核

酸的特定片段，例如，通过两步 PCR 策略，使用第一 PCR 的产物作为“mega-引物”。（参见，例如，Landt, O.等, *Gene* 96:125-128 (1990)）。例如，还可以通过 SOE PCR 来完成靶向多样化。（参见，例如，Horton, R. M.等, *Gene* 77:61-68 (1989)）。

可以通过改变编码序列来获得选定位置的序列多样性，编码序列限制了多肽的序列，使得可以在该位置引入各种可能的氨基酸（例如，全部的 20 个或其子集）。使用 IUPAC 命名，最通用的密码子是 NNK，其编码所有氨基酸以及 TAG 终止密码子。可以使用 NNK 密码子，以引入所需的多样性。实现相同目的的其他密码子也是有用的，包括 NNN 密码子，其导致其他终止密码子 TGA 和 TAA 的产生。这样的靶向方法使得可以在目标区域中开发所有的序列空间。

文库可以包含具有已知主链构象的蛋白酶抗性抗体多肽。（参见，例如，Tomlinson 等, WO99/20749）。

可以在合适的质粒或载体中制备文库。如在此所用的，载体指的是用于将异源 DNA 引入用于表达和/或其复制的细胞中的离散序列。可以使用任何合适的载体，包括质粒（例如，细菌质粒）、病毒或细菌噬菌体载体、人造染色体和游离基因载体。这样的载体可以用于简单克隆和诱变，或表达载体可以用于驱动文库的表达。载体和质粒通常含有一个或多个克隆位点（例如，多连接物）、复制起点和至少一个可选择的标记基因。表达载体可以进一步含有用于驱动多肽转录和翻译的元件，如增强子元件、启动子、转录终止细胞、信号序列等。可以以可操作地连接克隆的编码多肽的插入片段的方式来安置这些元件，使得在适于表达的条件下（例如，在合适的宿主细胞中）维持该表达载体时，表达和产生多肽。

克隆和表达载体通常含有能够使载体在一个或多个选定的宿主细胞中复制的核酸序列。通常，在克隆载体中，该序列能够使载体独立于宿主染色体 DNA 而复制，并包括复制起点或自主复制序列。对于各种细菌、酵母和病毒，这样的序列是公知的。来自质粒 pBR322 的复制起点适用于大部分革兰氏阴性细菌，2 微米质粒来源适用于酵母，而各种病毒来源（例如，SV40，腺病毒）适用于在哺乳动物细胞中克隆载体。通常，对于哺乳动物表达载体是不需要复制起点的，除非将这些用于能够复制高水平 DNA 的哺乳动物细胞中，如 COS 细胞。

克隆或表达载体可以含有也称为选择标记的选择基因。这样的标记基因编码在选择性培养基中生长的转化宿主细胞的存活或生长需要的蛋白质。因此，没有用含有选择基因的载体转化的宿主细胞在培养基中将不会存活。通常的选择基因编码给予抗生素和其他毒素（例如，氨苄青霉素、新霉素、氨甲喋呤或四环素）抗性、补充营养缺陷不足或提供生长培养基中不可获得的关键营养素的蛋白质。

合适的表达载体可以含有各种成分，例如，复制起点、可选择标记基因、一种或多种表达控制元件，如转录控制元件（例如，启动子、增强子、终止子）和/或一种或多种翻译信号、信号序列或前导序列等。表达控制元件和信号或前导序列如果存在，可以通过载体或其他来源来提供。例如，克隆的编码抗体链的核酸的转录和/或翻译控制序列可以用来指导表达。

可以提供启动子用于所需宿主细胞中的表达。启动子可以是组成型或诱导型的。例如，启动子可以可操作地连接编码抗体、抗体链或其一部分的核酸，使得其指导核酸的转录。用于原核宿主（例如，用于大肠杆菌的 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸（trp）启动子系统、lac、tac、T3、T7启动子）和真核宿主（例如，猿病毒40早期或晚期启动子、劳斯肉瘤病毒长终止重复启动子、巨细胞病毒启动子、腺病毒晚期启动子、EG-1a启动子）的各种合适的启动子是可获得的。

此外，表达载体通常含有用于选择携带载体的宿主细胞的选择标记，并且在可复制表达载体的情况中，还含有复制起点。编码给予抗生素或药物抗性的产物的基因是常用的选择标记，并可以用于原核细胞（例如， β -内酰胺酶基因（氨苄青霉素抗性）、用于四环素抗性的 *Tet* 基因）和真核细胞（例如，新霉素（G418 或 geneticin）、gpt（霉酚酸）、氨苄青霉素或潮霉素抗性基因）。二氢叶酸还原酶标记基因使得可以用氨甲喋呤在各种细胞中选择。编码宿主营养缺陷标记的基因产物的基因（例如，*LEU2*、*URA3*、*HIS3*）通常用作酵母中的选择标记。还考虑了使用病毒（例如，杆状病毒）或噬菌体载体和能够整合至宿主细胞基因组的载体，如逆转录病毒载体。

用于在原核细胞（例如，细菌细胞，如大肠杆菌）或哺乳动物细胞中表达的合适表达载体包括，例如，pET 载体（例如，pET-12a、pET-36、pET-37、pET-39、pET-40，Novagen 等）、噬菌体载体（例如，pCANTAB

5E, Pharmacia)、pRIT2T(蛋白 A 融合载体, Pharmacia)、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、pEF-1(Invitrogen, Carlsbad, CA)、pCMV-SCRIPT、pFB、pSG5、pXT1(Stratagene, La Jolla, CA)、pCDEF3(Goldman, L. A.等, *Biotechniques*, 21:1013-1015(1996))、pSVSPORT(GibcoBRL, Rockville, MD)、pEF-Bos(Mizushima, S.等, *Nucleic Acids Res.*, 18:5322(1990))等。适用于各种表达宿主如原核细胞(大肠杆菌)、昆虫细胞(果蝇 Schnideer S2 细胞, Sf9)、酵母(*P. methanolica*、巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母(*S.cerevisiae*))和哺乳动物细胞(例如, COS 细胞)中的表达载体是可获得的。

载体的实例是能够表达对应于多肽文库成员的核苷酸序列的表达载体。因此,可以通过分开的繁殖和表达多肽文库成员的单克隆的表达来进行使用通用配体和/或目标配体的选择。如以上所述的,选择展示系统可以是细菌噬菌体展示。因此,可以使用噬菌体或噬粒载体。实例载体是具有大肠杆菌复制起点(用于双链复制)以及噬菌体复制起点(用于生产单链 DNA)的噬粒载体。这些载体的操纵和表达是本领域公知的(Hoogenboom 和 Winter(1992)上文; Nissim 等(1994)上文)。简而言之,载体可以含有给予噬粒上选择性的 β -内酰胺酶基因和表达盒的 lac 启动子上游,该表达盒含有合适前导序列、多克隆位点、一个或多个肽标记物、一个或多个 TAG 终止密码子和噬菌体蛋白 pIII。因此,使用各种抑制剂和大肠杆菌的非抑制剂菌株并添加葡萄糖、异丙基硫- β -D-半乳糖苷(IPTG)或辅助噬菌体如 VCS M13,载体能够作为没有表达的质粒复制,只产生大量多肽文库成员或产物噬菌体,其中一些在其表面上含有多肽-pIII 融合体的至少一个拷贝。

本文所述的文库和组可以含有抗体形式。例如,文库和组内包含的多肽可以是完整的分开的 V_H 或 V_L 结构域,其中任一个是修饰的或未修饰的。可以使用任何合适的方法,容易地产生 scFv 片段,以及其他抗体多肽。各种合适的抗体工程化方法是本领域公知的。例如,可以通过将编码两个可变域的核酸连接合适的编码合适的连接肽的寡核苷酸来形成 scFv,连接肽如(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃或其他合适的连接肽。连接物桥接第一 V 区的 C-端和第二 V 区的 N-端。可以使用相似的技术,用于构建其他抗体形式,如 Fv、Fab 和 F(ab)₂ 片段。为了使 Fab 和 F(ab)₂ 格式化,可以将 V_H 和 V_L 多肽与恒定区片段混合,恒定区片段分离自重排

基因、种系 C 基因或从抗体序列库合成的。本文所述的文库或组可以使 V_H 或 V_L 文库或组。

包含蛋白酶抗性可变域的多肽可以含有目标配体（例如，VEGF）结合位点和通用配体结合位点。在特定的实施方案中，通用配体结合位点是用于超抗原（如蛋白 A、蛋白 L 或蛋白 G）的结合位点。可变域可以基于任何所需的可变域，例如，人 V_H（例如，V_H1a、V_H1b、V_H2、V_H3、V_H4、V_H5、V_H6）、人 V_λ（例如，V_λI、V_λII、V_λIII、V_λIV、V_λV、V_λVI 或 V_κI）或人 V_κ（例如，V_κ2、V_κ3、V_κ4、V_κ5、V_κ6、V_κ7、V_κ8、V_κ9 或 V_κ10）或 Camelid V_{HH}，任选已经人源化。

核酸、宿主细胞和生产蛋白酶抗性多肽的方法

本发明涉及分离的和/或重组的编码蛋白酶抗性肽或多肽的核酸，例如，通过本文所述的方法可选择或已选择的肽或多肽。

在此称为“分离的”核酸是已经与原始环境（例如，在细胞或在核酸混合物如文库中）中的其他物质（例如，其他核酸，如基因组 DNA、cDNA 和/或 RNA）分开的核酸。分离的核酸可以作为载体（例如，质粒）的一部分来分离。

在此称为“重组的”核酸是通过重组 DNA 方法产生的核酸，重组 DNA 方法包括依赖于人工重组的方法，如克隆至载体或染色体中，例如，使用限制酶、同源重组、病毒等，以及使用聚合酶链式反应（PCR）制备的核酸。

本发明还涉及重组宿主细胞，其包括（一个或多个）重组核酸或含有编码蛋白酶抗性肽或多肽的核酸的表达构建体，例如，通过本文所述的方法可选择的或已选择的肽或多肽。还提供了制备蛋白酶抗性肽或多肽的方法，其包括在适于蛋白酶抗性肽或多肽表达的条件下，维持本发明的宿主细胞。如果需要，该方法可以进一步包括分离或回收蛋白酶抗性肽或多肽的步骤。

例如，可以使用任何适于选定宿主细胞的方法（例如，转化、转染、电穿孔、感染），将编码蛋白酶抗性肽或多肽的核酸分子（例如，一个或多个核酸分子），或含有该核酸分子的表达构建体（一个或多个构建体）引入合适的宿主细胞中，以形成重组宿主细胞，使得核酸分子可操作地连接一个或多个表达控制元件（例如，在载体中、在通过细胞中的

加工形成的构建体中、整合至宿主细胞基因组)。在适于表达的条件下(例如,在诱导剂的存在下、在合适的动物中、在补充了适当盐、生长因子、抗生素、营养补充剂的合适培养基中等),维持所得到的重组宿主细胞,由此产生编码的肽或多肽。如果需要,可以分离或回收编码的肽或多肽(例如,从动物、宿主细胞、培养基、乳)。该方法包括在转基因动物的宿主细胞中的表达(参见,例如,WO92/03918, GenPharm International)。

还可以在合适的体外表达系统中,通过化学合成或通过任何其他合适的方法,来产生通过本文所述的方法选择的蛋白酶抗性肽或多肽。

多肽、dAb & 拮抗剂

如本文所述和举例说明的,本发明的蛋白酶抗性 dAb 通常以高亲和性结合它们的目标配体。因此,在另一个方面中,提供了选择、分离和/或回收本发明的以高亲和性结合 VEGF 的多肽或 dAb。通常,该方法包括提供肽或多肽(例如, dAb)的文库或组,在适于蛋白酶活性的条件下,将文库或组与蛋白酶(例如,胰蛋白酶、弹性蛋白酶、leucozyme、胰酶、痰液)混合,并选择、分离和/或回收结合配体(例如,目标配体)的肽或多肽。因为已经在蛋白酶敏感性肽或多肽将得到消化的条件下将文库或组暴露于蛋白酶,因此蛋白酶的活性可以消除具有低结合亲和性的不太稳定的多肽,并因此产生高亲和性结合肽或多肽的集合。

例如,本发明的多肽或 dAb 可以以 300nM 至 1pM (即, 3×10^{-7} 至 5×10^{-12} M) 的亲和性 (K_D , $K_D = K_{\text{off}}(k_d)/K_{\text{on}}(k_a)$, 如通过表面等离子共振所测定的) 来结合 VEGF, 例如 50nM 至 1pM, 例如 5nM 至 1pM, 和例如 1nM 至 1pM; 例如 1×10^{-7} M 或更低的 K_D , 例如 1×10^{-8} M 或更低, 例如 1×10^{-9} M 或更低, 例如 1×10^{-10} M 或更低, 和例如 1×10^{-11} M 或更低; 和/或 $5 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 速度常数, 例如 $1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$, 例如 $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$, 例如 $5 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ 或更低, 例如 $1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 或更低, 例如 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 或更低, 例如 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更低, 例如 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 或更低, 和例如 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 或更低, 如通过表面等离子共振所测定的。

尽管我们没有受到任何特定理论的束缚,认为能抵抗蛋白酶的肽或多肽具有较低的熵和/或较高的稳定能量。因此,蛋白酶抗性具有高亲和性结合之间的关联可能与通过本文所述的方法选择的肽和多肽和 dAb 表

面的紧密性和稳定性相关。

在一个实施方案中，本发明的多肽、dAb 或拮抗剂在约 1 μ M 或更低的 IC₅₀ 浓度 (IC₅₀) 下抑制 VEGF 的结合，约 500nM 或更低，约 100nM 或更低，约 75nM 或更低，约 50nM 或更低，约 10nM 或更低或约 1nM 或更低。

在特定的实施方案中，多肽、dAb 或拮抗剂特异性地结合 VEGF，例如人 VEGF，并与人 VEGF 分离，具有 300nM 至 1pM 的解离常数 (K_D)，或 300nM 至 5pM，或 50nM 至 1pM，或 50nM 至 5pM，或 50nM 至 20pM，或约 10pM，或约 15pM，或约 20pM，如通过表面等离子共振所测定的。在特定的实施方案中，多肽、dAb 或拮抗剂特异性地结合 VEGF，例如人 VEGF，并与人 VEGF 分离，具有 $5 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 速度常数，例如 $1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ ，例如 $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ ，例如 $5 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ 或更低，例如 $1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 或更低，例如 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 或更低，例如 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更低，例如 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 或更低，和例如 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 或更低，如通过表面等离子共振所测定的。

在特定的实施方案中，多肽、dAb 或拮抗剂特异性地结合 VEGF，例如人 VEGF，具有 $1 \times 10^{-3} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-7} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 的 K_{on} ，或 $1 \times 10^{-3} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-6} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ，或约 $1 \times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 或约 $1 \times 10^{-5} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。在一个实施方案中，多肽、dAb 或拮抗剂特异性地结合 VEGF，例如人 VEGF，并与人 VEGF 分离，具有在该段落中限定的解离常数 (K_D) 和 K_{off} 。在一个实施方案中，多肽、dAb 或拮抗剂特异性地结合 VEGF，例如人 VEGF，并与人 VEGF 分离，具有该段落中限定的解离常数 (K_D) 和 K_{on} 。在一些实施方案中，多肽或 dAb 特异性地结合 VEGF (例如人 VEGF)，具有该段落中引用的 K_D 和/或 K_{off} 和/或 K_{on} ，并包括与具有 DOM 15-26-593 的氨基酸序列的 dAb 的氨基酸序列为至少或至少约 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列。

可以在大肠杆菌或毕赤酵母属种 (例如，巴斯德毕赤酵母) 中表达多肽、dAb 或拮抗剂。在一个实施方案中，在大肠杆菌或毕赤酵母属种 (例如，巴斯德毕赤酵母) 中表达时，以至少约 0.5mg/L 的量来分泌配体或 dAb 单体。尽管，在大肠杆菌或毕赤酵母属种 (例如，巴斯德毕赤酵母) 中表达时，本文所述的配体和 dAb 单体是可分泌的，可以使用任何合适的方法来生产，如合成的化学方法或没有使用大肠杆菌或毕赤酵

母属种的生物生产方法。

在一些实施方案中，多肽、dAb 或拮抗剂不含有 *Camelid* 免疫球蛋白可变域，或一个或多个框架氨基酸，这些氨基酸对于由 *Camelid* 种系抗体基因片段编码的免疫球蛋白可变域是独特的，例如，在位置 108、37、44、45 和/或 47。

根据本发明的 VEGF 的拮抗剂可以是单价的或多价的。在一些实施方案中，拮抗剂是单价的并含有一个与 VEGF 相互作用的结合位点，该结合位点是由本发明的多肽或 dAb 提供的。单价拮抗剂结合一个 VEGF 并可以不诱导导致受体和信号转导激活的细胞表面上的 VEGF 的交联或聚集。

在其他实施方案中，VEGF 的拮抗剂是多价的。VEGF 的多价拮抗剂可以含有两个或多个用于 VEGF 的特定结合位点的拷贝或含有两个或多个结合 VEGF 的不同结合位点，至少一个结合位点是由本发明的多肽或 dAb 提供的。例如，如本文所述的，VEGF 的拮抗剂可以是二聚体、三聚体或多聚体，其含有两个或多个本发明的结合 VEGF 的特定多肽或 dAb 的拷贝，或两个或多个本发明的结合 VEGF 的不同多肽或 dAb。在特定的实施方案中，VEGF 的多价拮抗剂含有两个或多个用于 VEGF 所需的表位或结构域的结合位点。

一些配体（和拮抗剂）可以具有作为诊断剂的实用性，因为它们可以用于结合并检测、定量或测量样品中的 VEGF。因此，可以准确地测定样品中是否存在 VEGF 或存在多少 VEGF。

在其他实施方案中，多肽、dAb 或拮抗剂特异性地结合 VEGF，具有本文所述的 K_D ，并抑制了标准小鼠异种移植模型中的肿瘤生长（例如，与合适对照相比，抑制了至少约 10% 的肿瘤生长）。在一个实施方案中，以约 1mg/kg 或更多，例如，约 5 或 10mg/kg 给药时，与标准小鼠异种移植模型中的合适对照相比，多肽、dAb 或拮抗剂抑制至少约 10% 或至少约 25% 或至少约 50% 的肿瘤生长。

在其他实施方案中，多肽、dAb 或拮抗剂结合 VEGF 并在标准细胞测试中拮抗 VEGF 的活性，具有 $\leq 100\text{nM}$ 的 ND_{50} 。

在特定的实施方案中，给予有效量时，本发明的多肽、dAb 或拮抗剂在炎症动物模型中是有效的，如 WO2006038027 和 WO2006059108 和 WO2007049017 中所述的那些炎症。通常，有效量为约 1mg/kg 至约

10mg/kg(例如,约1mg/kg,约2mg/kg,约3mg/kg,约4mg/kg,约5mg/kg,约6mg/kg,约7mg/kg,约8mg/kg,约9mg/kg或约10mg/kg)。本领域技术人员认为慢性炎症的模型预示着在人体中的治疗功效。

通常,本发明的配体(例如,拮抗剂)将以纯化的形式与药物学上合适的载体一起使用。通常,这些载体包括水或醇/水溶液、乳液或悬浮液、任何包括盐和/或缓冲的基质。非肠道载体包括氯化钠溶液、Ringer's 葡萄糖、葡萄糖和氯化钠和乳酸化 Ringer's。如果需要在悬浮液中保持多肽复合物,合适的生理学上可接受的佐剂可以选自增稠剂,如羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、明胶和海藻酸盐。

静脉内载体包括流体和营养补充剂和电解质补充剂,如基于 Ringer's 葡萄糖的那些。防腐剂和其他添加剂,如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体,也可以存在(Mack(1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第16版)。可以使用各种合适的制剂,包括缓释制剂。

本发明的配体(例如,拮抗剂)可以用作分开给药的组合物或结合其他药剂。这些包括各种免疫治疗药物,如环孢霉素、氨甲喋呤、阿霉素或顺铂和免疫毒素。药物组合物可以包括各种细胞毒性或其他药剂与本发明配体结合的“混合物(cocktails)”,或甚至是根据本发明的具有不同特异性的配体的组合物,如使用不同目标抗原或表位选择的配体,不管是否是在给药之前混合。

根据本发明的药物组合物的给药途径可以是本领域技术人员公知的那些。对于治疗,包括但不限于免疫治疗,根据标准技术将本发明选定的配体给药于任何患者。

给药可以是任何合适的模式,包括非肠道、静脉内、肌内、腹膜内、经皮、通过肺的途径,或者其他,合适地,通过用导管直接灌输。给药的剂量和频率将取决于患者的年龄、性别和状况、其他药物的同时给药、禁忌和医师将要考虑的其他参数。如所示的,给药可以是局部(例如,通过肺部给药局部递送至肺,例如,鼻内给药)或全身的。

可以将本发明的配体冻干,用于存储以及在使用前在合适的载体中重建。已经表明该技术对常规的免疫球蛋白是有效的,并可以使用本领域已知的冻干和重建技术。本领域技术人员将认识到冻干和重建可能导致抗体活性不同程度的损耗(例如,使用常规的免疫球蛋白, IgM 抗体

的活性损耗易于比 IgG 抗体高)，可以调节使用水平来补偿。

可以将含有本发明配体（例如，拮抗剂）或其混合物的组合物给药来用于预防和/或治疗处理。在特定的治疗应用中，将实现选定细胞群的至少部分抑制、遏制、调节、杀灭或一些其他可测量参数的适当含量定义为“治疗有效量”。实现该剂量需要的含量将取决于疾病的严重程度和患者自身免疫系统的一般状况，但通常为 0.005 至 5.0mg 配体/kg 体重，配体例如为 dAb 或拮抗剂，更常使用 0.05 至 2.0mg/kg/剂的剂量。对于预防性应用，可以给药相似或略低剂量的含有本发明配体或其混合物的组合物，以预防、抑制或延迟疾病的发作（例如，维持缓解或静止，或防止急性期）。本领域技术人员能够测定治疗、抑制或预防疾病的合适给药间隔。将 VEGF 的配体（例如，拮抗剂）给药来治疗、抑制或预防疾病时，可以给药高达四次/天，每周两次，每周一次，每两周一次，一月一次或每两月一次，例如，剂量为约 10 μ g/kg 至约 80mg/kg，约 100 μ g/kg 至约 80mg/kg，约 1mg/kg 至约 80mg/kg，约 1mg/kg 至约 70mg/kg，约 1mg/kg 至约 60mg/kg，约 1mg/kg 至约 50mg/kg，约 1mg/kg 至约 40mg/kg，约 1mg/kg 至约 30mg/kg，约 1mg/kg 至约 20mg/kg，约 1mg/kg 至约 10mg/kg，约 10 μ g/kg 至约 10mg/kg，约 10 μ g/kg 至约 5mg/kg，约 10 μ g/kg 至约 2.5mg/kg，约 1mg/kg，约 2mg/kg，约 3mg/kg，约 4mg/kg，约 5mg/kg，约 6mg/kg，约 7mg/kg，约 8mg/kg，约 9mg/kg 或约 10mg/kg。在特定的实施方案中，将 VEGF 的配体（例如，拮抗剂）给药来治疗、抑制或防止疾病，每两周一次或一月一次，剂量为约 10 μ g/kg 至约 10mg/kg（例如，约 10 μ g/kg，约 100 μ g/kg，约 1mg/kg，约 2mg/kg，约 3mg/kg，约 4mg/kg，约 5mg/kg，约 6mg/kg，约 7mg/kg，约 8mg/kg，约 9mg/kg 或约 10mg/kg）。

如果相对于治疗前存在的症状，或相对于没有用该组合物治疗的个体（人或模型动物）或其他合适对照中的症状，一种或多种症状得到减轻（例如，至少 10%或临床评价等级的至少一个点），认为使用本文所述的组合物进行的处理或治疗是“有效的”。症状将根据靶向的疾病或病症而明显不同，但可以通过普通医师或技术人员来测量。例如，可以通过监控疾病或病症的一个或多个生化指示剂的水平（例如，酶或与疾病相关的代谢产物的水平、受影响细胞的数目等）、通过监控身体呈现（例如，炎症、肿瘤大小等），或通过公认临床评价等级来测量该症状。

相似地，如果相对于未用组合物治疗的相似个体（人或动物模型）中的症状，一种或多种症状的发作或严重程度得到了延迟、减轻或消除，使用本文所述的组合物进行的预防是“有效的”。

可以在预防或治疗情况中使用含有根据本发明的配体（例如，拮抗剂）或其混合物的组合物，以帮助改变、灭活、杀灭或除去哺乳动物中选定的目标细胞群。此外，本文所述的选定的多肽组可以离体地或在体外选择性地从异源细胞集合中杀灭、耗尽或另外有效地除去目标细胞群。可以根据标准技术，将来自哺乳动物的血液在体外与配体混合，由此杀灭或另外从用于返回至哺乳动物的血液中除去不利的细胞。

可以在预防或治疗情况中使用含有根据本发明的配体（例如，拮抗剂）的组合物，以帮助改变、灭活、杀灭或除去哺乳动物中选定的目标细胞群。

可以将配体（例如，抗-VEGF 拮抗剂、dAb 单体）给药，和或一种或多种其他的治疗剂或活性剂一起配制。配体（dAb）与其他的治疗剂一起给药时，可以在给药其他药剂之前、同时或之后，给药配体。通常，以提供重叠治疗效果的方法来给药配体和其他药剂。

在一个实施方案中，本发明是用于治疗、抑制或预防疾病的方法，疾病选自例如癌症（例如，实体肿瘤）、炎症、自体免疫疾病、血管增殖性疾病（例如，AMD）（年龄相关性黄斑变性），该方法包括将治疗有效剂量或含量的根据本发明的结合 VEGF 的多肽、dAb 或 VEGF 的拮抗剂给药于需要的哺乳动物。

本发明提供了用于治疗、抑制或预防肺病的方法。因此，在另一个实施方案中，本发明是用于治疗、抑制或预防肺病（例如，肺癌）的方法，其包括将治疗有效剂量或含量的根据本发明的多肽、dAb 或 VEGF 的拮抗剂给药于需要的哺乳动物。

在特定的实施方案中，通过肺部递送，如通过吸入（例如，支气管内、鼻内或口腔吸入、鼻内滴剂）或通过全身性递送（例如，非肠道、静脉内、粘膜内、腹膜内、皮下）来给药 VEGF 的拮抗剂。

在本发明进一步的方面中，提供了组合物，其包含根据本发明的多肽、dAb 或 VEGF 的拮抗剂和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

此外，本发明提供了使用根据本发明的多肽、dAb 或 VEGF 的拮抗剂或组合物来治疗疾病的方法。在一个实施方案中，疾病是癌症（例如，

实体肿瘤)或炎症,例如,类风湿性关节炎或自体免疫疾病,或血管增殖性疾病,如AMD(年龄相关性黄斑变性)。

形式

提高的半衰期在免疫球蛋白,特别是抗体,最特别是小尺寸的抗体片段的体内应用中是有用的。这样的片段(Fv、二硫化物键合的Fv、Fab、scFv、dAb)能从体内快速清除;因此,尽管它们能够快速到达身体的大部分部位,并且能快速产生和更容易操作,但它们在体内的应用受到仅在体内短暂持续的限制。本发明的一个实施方案通过提供体内半衰期延长的配体并且随后配体的功能活性在体内持续更长时间来解决该问题。

药物动力学分析的方法和配体半衰期的测定是本领域技术人员熟知的。可以在Kenneth, A等:Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists(药物动力学的化学稳定性:药剂师手册)和Peters等,Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach(药物动力学分析:实践方法)(1996)中找到详细内容。还可以参考“Pharmacokinetics”(药物动力学),M Gibaldi & D Perron, Marcel Dekker 出版,第2次再版(1982),其描述了药物动力学参数,如 t_{α} 和 t_{β} 半衰期和曲线下面积(AUC)。

可以从配体随时间的血清浓度曲线确定半衰期($t^{1/2}_{\alpha}$ 和 $t^{1/2}_{\beta}$)和AUC。例如,可以使用WinNonlin分析包(从Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, USA 获得)来模拟曲线。在第一期中(α 期),配体主要经历在患者中的分布,并有一些清除。第二期(β 期)是配体已经得到分布的末期,血清浓度随着配体从患者体内清除出去而降低。 t_{α} 半衰期是第一期的半衰期,而 t_{β} 半衰期是第二期的半衰期。因此,在一个实施方案中,本发明提供了具有15分钟或更长 t_{α} 半衰期的配体或含有根据本发明的配体的组合物。在一个实施方案中,范围的下限是30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、10小时、11小时或12小时。此外,或可替换地,根据本发明的配体或组合物将具有高达并包括12小时的 t_{α} 半衰期。在一个实施方案中,范围的上限是11、10、9、8、7、6或5小时。合适范围的实例是1至6小时,2至5小时或3至4小时。

在一个实施方案中，本发明提供具有 30 分钟或更长 $t_{1/2}$ 半衰期的配体（多肽、dAb 或拮抗剂）或含有根据本发明的配体的组合物。在一个实施方案中，范围的下限是 45 分钟，1 小时，2 小时，3 小时，4 小时，5 小时，6 小时，7 小时，10 小时，11 小时或 12 小时。此外，或可替换地，根据本发明的配体或组合物将具有高达并包括 21 天的 $t_{1/2}$ 半衰期。在一个实施方案中，范围的上限是 12 小时，24 小时，2 天，3 天，5 天，10 天，15 天或 20 天。在一个实施方案中，根据本发明的配体或组合物将具有 12 至 60 小时的 $t_{1/2}$ 半衰期。在进一步的实施方案中，将是 12 至 48 小时。在仍然进一步的实施方案中，将是 12 至 26 小时。

对于以上标准，另外或可替换地，本发明提供了具有 1mg.min/ml 或更高 AUC 值（曲线下面积）的配体或含有根据本发明的配体的组合物。在一个实施方案中，范围的下限是 5、10、15、20、30、100、200 或 300mg.min/ml。此外，或可替换地，根据本发明的配体或组合物具有高达 600mg.min/ml 的 AUC。在一个实施方案中，范围的上限是 500、400、300、200、150、100、75 或 50mg.min/ml。在一个实施方案中，根据本发明的配体具有选自以下范围的 AUC：15 至 150mg.min/ml，15 至 100mg.min/ml，15 至 75mg.min/ml 和 15 至 50mg.mon/ml。

例如，通过连接 PEG 基团、血清白蛋白、转铁蛋白、转铁蛋白受体或至少转铁蛋白结合部分、抗体 Fc 区，或通过缀合抗体结构域，将本发明的多肽和 dAb 以及含有这些的拮抗剂格式化，以具有较大的流体动力学大小。例如，将多肽 dAb 和拮抗剂格式化成较大的抗体的抗原结合片段或抗体（例如，格式化成 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、IgG、scFv）。

可以使用本领域公知的方法来测定本发明配体（例如，dAb 单体或多聚体）的流体动力学大小。例如，凝胶过滤色谱可以用来测定配体的流体动力学大小。用于测定配体的流体动力学大小的合适的凝胶过滤基质，如交联的琼脂糖基质，是公知的并容易获得。

配体形式的大小（例如，连接 dAb 单体的 PEG 部分的大小）可以根据所需的应用而改变。例如，在打算将配体离开循环并进入外周组织的情况中，希望保持低的配体流体动力学大小，以促进从血流中外渗。或者，在期望配体在全身循环中保持更长时间的情况中，可以提高配体的大小，例如，通过格式化成 Ig 样蛋白。

通过靶向提高体内半衰期的抗原或表位来延长半衰期

如本文所述的, 还可以通过将本发明的 VEGF 结合多肽、dAb 或拮抗剂缀合或连接结合提高体内半衰期的抗原或表位的结合域(例如, 抗体或抗体片段)来提高配体的流体动力学大小及其血清半衰期。例如, 可以将 VEGF 结合剂(例如, 多肽)缀合或连接抗-血清白蛋白或抗-新生儿 Fc 受体抗体或抗体片段, 例如, 抗-SA 或抗新生儿 Fc 受体 dAb、Fab、Fab' 或 scFv, 或抗-SA 亲和体或抗-新生儿 Fc 受体亲和体或抗-SA avimer, 或抗-SA 结合域, 其包含选自但优选不限于 CTLA-4、lipocallin、SpA、亲和体、avimer、GroEl 和纤连蛋白的支架(对于这些结合域的公开内容, 参见, PCT/GB2008/000453, 2008 年 2 月 8 日申请, 在此将结合域及其序列引入作为参考, 并形成本发明文本公开内容的一部分)。缀合指的是将含有本发明的多肽、dAb 或拮抗剂的组合物结合(共价或非共价)结合血清白蛋白的结合域。

提高体内血清半衰期的合适多肽包括, 例如, 转铁蛋白受体特异性配体-神经药剂融合蛋白(参见, U.S. 专利 No.5,977,307, 在此将其教导引入作为参考)、脑毛细管内皮细胞受体、转铁蛋白、转铁蛋白受体(例如, 可溶性转铁蛋白受体)、胰岛素、胰岛素样生长因子(IGF1)受体、胰岛素样生长因子 2(IGF2)受体、胰岛素受体、凝血因子 X、 α 1-抗胰蛋白酶和 HNF1 α 。合适的提高血清半衰期的多肽还包括 α 1-糖蛋白(血清类粘蛋白; AAG)、 α 1-抗凝乳蛋白酶(ACT)、 α 1-微球蛋白(蛋白 HC; AIM)、抗凝血酶 III(AT III)、阿扑脂蛋白 A-1(Apo A-1)、阿扑脂蛋白 B(Apo B)、血浆铜蓝蛋白(Cp)、补体成分 C3(C3)、补体成分 C4(C4)、C1 弹性蛋白酶抑制剂(C1 IHN)、C-反应性蛋白(CRP)、铁蛋白(FER)、血液结合素(HPX)、脂蛋白(a)(Lp(a))、甘露糖-结合蛋白(MBP)、肌红蛋白(Myoglobin)、前清蛋白(甲状腺素运载蛋白(transthyretin); PAL)、视黄醇-结合蛋白(RBP)和类风湿因子(RF)。

来自胞外基质的合适蛋白包括, 例如, 胶原蛋白、昆布氨酸、整联蛋白和纤连蛋白。胶原蛋白是胞外基质主要的蛋白。目前已知约 15 种类型的胶原蛋白, 在身体的不同部位发现, 例如, 在骨、皮肤、腱、韧带、角膜、内脏中发现的 I 型胶原蛋白(占身体胶原蛋白的 90%), 或在软骨、椎间盘、脊索和眼睛的玻璃体中发现的 II 型胶原蛋白。

来自血液的合适蛋白包括,例如,血浆蛋白(例如,纤维蛋白、 α -2巨球蛋白、血清白蛋白、纤维蛋白原(例如,纤维蛋白原A、纤维蛋白原B)、血清淀粉状蛋白A、结合珠蛋白、抑制蛋白、泛素、子宫球蛋白和 β -2-微球蛋白)、酶和酶抑制剂(例如,血纤维蛋白溶酶原、溶菌酶、半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin)C、 α -1-抗胰蛋白酶和胰腺胰蛋白酶抑制剂)、免疫系统的蛋白,如免疫球蛋白(例如,IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、免疫球蛋白轻链(κ/λ))、转运蛋白(例如,视黄醇结合蛋白、 α -1微球蛋白)、防御素(例如, β -防御素1、嗜中性防御素1、嗜中性防御素2和嗜中性防御素3)等。

在血脑屏障或神经组织中发现的合适蛋白包括,例如,黑皮素受体、髓磷脂、抗坏血酸转运子等。

提高体内血清半衰期的合适多肽还包括位于肾脏中的蛋白(例如, polycystin、IV型胶原蛋白、有机阴离子转运子K1、Heymann's抗原)、位于肝脏中的蛋白(例如,醇脱氢酶、G250)、位于肺中的蛋白(例如,分泌成分,其结合IgA)、位于心脏中的蛋白(例如,HSP27,其与扩张型心肌病相关)、位于皮肤中的蛋白(例如,角蛋白)、骨特异性蛋白,如骨形态发生蛋白(BMP),其是证明了骨形成活性的蛋白的转化生长因子 β 超家族的子集(例如,BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8)、肿瘤特异性蛋白(例如,滋养层抗原、herceptin受体、雌激素受体、组织蛋白酶(例如,组织蛋白酶B,其可以在肝脏和脾脏中找到))。

合适的疾病特异性蛋白包括,例如,只在激活的T-细胞上表达的抗原,包括LAG-3(淋巴细胞激活基因)、骨保护素配体(OPGL;参见*Nature* 402, 304-309(1999)),OX40(TNF受体家族的成员,在激活的T细胞上表达并在人I型T细胞白血病病毒(HTLV-I)-产生细胞中特异性地上调;参见*Immunol.* 165(1): 263-70(2000))。合适的疾病特异性蛋白还包括,例如,金属蛋白酶(与关节炎/癌症相关),包括CG6512果蝇、人截瘫蛋白(paraplegin)、人FtsH、人AFG3L2、鼠ftsH;和血管生成生长因子,包括酸性成纤维细胞生长因子(FGF-1)、碱性成纤维细胞生长因子(VEGF/VPF)、转化生长因子- α (TGF α)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管生成素、白细胞间介素-3(IL-3)、白细胞间介素-8(IL-8)、血小板衍生内皮生长因子(PD-ECGF)、胎盘

生长因子(PIGF)、中期因子(midkine)血小板-衍生生长因子-BB(PDGF)和 fractalkine。

提高体内血清半衰期的合适多肽还包括应激蛋白,如热休克蛋白(HSP)。HSP 通常在细胞内发现。在胞外发现时,它是细胞已经死亡并溢出其内含物的指示剂。作为创伤、疾病或损伤的结果时,发生这种非程序化细胞死亡(坏死),胞外 HSP 引发了来自免疫系统的应答。结合胞外 HSP 可以导致将本发明的组合物定位于患病部位。

涉及 Fc 转运的合适蛋白包括,例如,Brmbell 受体(也称为 FcRB)。这种 Fc 受体具有两个功能,对于递送都是潜在有用的。功能是(1)通过胎盘将 IgG 从母体转运至子女,(2)保护 IgG 免受降解,由此延长其血清半衰期。认为受体使来自核内体的 IgG 再循环。(参见, Holliger 等, *Nat Biotechnol* 15(7):632-6 (1997))。

结合血清白蛋白的 dAb

在一个实施方案中,本发明提供了多肽或拮抗剂(例如,双特异性配体),其含有结合 TNFR1 的抗 TNFR1 dAb(第一 dAb)和结合血清白蛋白的第二 dAb(SA),第二 dAb 结合 SA,具有通过表面等离子共振测定的 1nM 至 1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、100、200、300、400 或 500 μ M(即, $\times 10^{-9}$ 至 5×10^{-4})的 K_D ,或 100nM 至 10 μ M,或 1 至 5 μ M,或 3 至 70nM,或 10nM 至 1、2、3、4 或 5 μ M。例如,30 至 70nM,如通过表面等离子共振所测定的。在一个实施方案中,第一 dAb(或 dAb 单体)结合 SA(例如,HAS),具有通过表面等离子共振测定的大约 1、50、70、100、150、200、300nM 或 1、2 或 3 μ M 的 K_D 。在一个实施方案中,对于含有第一抗-SA dAb 和第二对 VEGF 的 dAb 的双特异性抗体,第二 dAb 对其目标的亲和性(例如 K_D 和/或 K_{off} ,如通过表面等离子共振所测量的,例如使用 BiaCore)为 dAb 对 SA 的亲和性的 1 至 100000 倍(例如,100 至 100000,或 1000 至 100000,或 10000 至 100000 倍)。在一个实施方案中,血清白蛋白是人血清白蛋白(HAS)。例如,第一 dAb 以大约 10 μ M 的亲和性结合 SA,而第二 dAb 以 100pM 的亲和性结合其目标。在一个实施方案中,血清白蛋白是人血清白蛋白(HAS)。在一个实施方案中,第一 dAb 以大约 50,例如,70、100、150 或 200nM 的 K_D 结合 SA(例如,HAS)。双特异性配体的详细内容

可以在 WO03002609、WO04003019 和 WO04058821 中找到。

在一个实施方案中，本发明的配体包含结合血清白蛋白（SA）的 dAb，具有通过表面等离子共振测定的 1nM 至 1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、100、200、300、400 或 500 μ M（即， $\times 10^{-9}$ 至 5×10^{-4} ）的 K_D ，或 100nM 至 10 μ M，或 1 至 5 μ M，或 3 至 70nM，或 10nM 至 1、2、3、4 或 5 μ M。例如，30 至 70nM，如通过表面等离子共振所测定的。在一个实施方案中，第一 dAb（或 dAb 单体）结合 SA（例如，HAS），具有通过表面等离子共振测定的大约 1、50、70、100、150、200、300nM 或 1、2 或 3 μ M 的 K_D 。在一个实施方案中，第一和第二 dAb 通过连接物连接，例如，1 至 4 个氨基酸的连接物，或 1 至 3 个氨基酸，或多于 3 个氨基酸，或多于 4、5、6、7、8、9、10、15 或 20 个氨基酸。在一个实施方案中，可以使用较长的连接物（多于 3 个氨基酸）来提高功效（拮抗剂中一个或两个 dAb 的 K_D ）。

在配体和拮抗剂的特定实施方案中，dAb 结合人血清白蛋白并与选自以下的 dAb 竞争与白蛋白的结合：

MSA-16、MSA-26（对于这些序列的公开内容，参见 WO04003019，在此将该序列及其核酸对应物引入作为参考并形成本发明文本公开内容的一部分），

DOM7m-16（SEQ ID NO: 473）、DOM7m-12（SEQ ID NO: 474）、DOM7m-26（SEQ ID NO: 475）、DOM7r-1（SEQ ID NO: 476）、DOM7r-3（SEQ ID NO: 477）、DOM7r-4（SEQ ID NO: 478）、DOM7r-5（SEQ ID NO: 479）、DOM7r-7（SEQ ID NO: 480）、DOM7r-8（SEQ ID NO: 481）、DOM7h-2（SEQ ID NO: 482）、DOM7h-3（SEQ ID NO: 483）、DOM7h-4（SEQ ID NO: 484）、DOM7h-6（SEQ ID NO: 485）、DOM7h-1（SEQ ID NO: 486）、DOM7h-7（SEQ ID NO: 487）、DOM7h-22（SEQ ID NO: 489）、DOM7h-23（SEQ ID NO: 490）、DOM7h-24（SEQ ID NO: 491）、DOM7h-25（SEQ ID NO: 492）、DOM7h-26（SEQ ID NO: 493）、DOM7h-21（SEQ ID NO: 494）、DOM7h-27（SEQ ID NO: 495）、DOM7h-8（SEQ ID NO: 496）、DOM7r-13（SEQ ID NO: 497）、DOM7r-14（SEQ ID NO: 498）、DOM7r-15（SEQ ID NO: 499）、DOM7r-16（SEQ ID NO: 500）、DOM7r-17（SEQ ID NO: 501）、DOM7r-18（SEQ ID NO: 502）、DOM7r-19（SEQ ID NO: 503）、DOM7r-20（SEQ ID NO: 504）、DOM7r-21（SEQ ID NO:

505)、DOM7r-22 (SEQ ID NO: 506)、DOM7r-23 (SEQ ID NO: 507)、DOM7r-24 (SEQ ID NO: 508)、DOM7r-25 (SEQ ID NO: 509)、DOM7r-26 (SEQ ID NO: 510)、DOM7r-27 (SEQ ID NO: 511)、DOM7r-28 (SEQ ID NO: 512)、DOM7r-29 (SEQ ID NO: 513)、DOM7r-30 (SEQ ID NO: 514)、DOM7r-31 (SEQ ID NO: 515)、DOM7r-32 (SEQ ID NO: 516)、DOM7r-33 (SEQ ID NO: 517) (对于这些序列的公开内容, 参见 WO2007080392, 在此将其序列及其核酸对应物引入作为参考并形成本发明文本公开内容的一部分; 该段落中的 SEQ ID NO 是 WO2007080392 公开的那些),

dAb8 (dAb10)、dAb10、dAb36、dAb7r20 (DOM7r20)、dAb7r21 (DOM7r21)、dAb7r22 (DOM7r22)、dAb7r23 (DOM7r23)、dAb7r24 (DOM7r24)、dAb7r25 (DOM7r25)、dAb7r26 (DOM7r26)、dAb7r27 (DOM7r27)、dAb7r28 (DOM7r28)、dAb7r29 (DOM7r29)、dAb7r29 (DOM7r29)、dAb7r31 (DOM7r31)、dAb7r32 (DOM7r32)、dAb7r33 (DOM7r33)、dAb7r33 (DOM7r33)、dAb7h22 (DOM7h22)、dAb7h23 (DOM7h23)、dAb7h24 (DOM7h24)、dAb7h25 (DOM7h25)、dAb7h26 (DOM7h26)、dAb7h27 (DOM7h27)、dAb7h30 (DOM7h30)、dAb7h31 (DOM7h31)、dAb2 (dAbs 4、7、41)、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12 (dAb7m12)、dAb13 (dAb 15)、dAb15、dAb16 (dAb21、dAb7m16)、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25 (dAb26、dAb7m26)、dAb27、dAb30 (dAb35)、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38 (dAb54)、dAb41、dAb46 (dAbs 47、52 和 56)、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1 (DOM 7r1)、dAb7r3 (DOM7r3)、dAb7r4 (DOM7r4)、dAb7r5 (DOM7r5)、dAb7r7 (DOM7r7)、dAb7r8 (DOM7r8)、dAb7r13 (DOM7r13)、dAb7r14 (DOM7r14)、dAb7r15 (DOM7r15)、dAb7r16 (DOM7r16)、dAb7r17 (DOM7r17)、dAb7r18 (DOM7r18)、dAb7r19 (DOM7r19)、dAb7h1 (DOM7h1)、dAb7h2 (DOM7h2)、dAb7h6 (DOM7h6)、dAb7h7 (DOM7h7)、dAb7h8 (DOM7h8)、dAb7h9 (DOM7h9)、dAb7h10 (DOM7h10)、dAb7h11 (DOM7h11)、dAb7h12 (DOM7h12)、dAb7h13 (DOM7h13)、dAb7h14 (DOM7h14)、dAb7p1 (DOM7p1) 和 dAb7p2 (DOM7p2) (对于这些序列的公开内容, 参见 PCT/GB2008/000453,

2008年2月8日申请,在此将其序列及其核酸对应物引入作为参考并形成本发明文本的公开内容的一部分)。dAb后括号中显示了可替换的名称,例如dAb8具有可替换的名称dAb10,即dAb8(dAb10)。还在图51a和b中列出了这些序列。

在特定的实施方案中,dAb结合人血清白蛋白,并包含与选自以下的dAb的氨基酸序列具有至少约80%或至少约85%,或至少约90%,或至少约95%,或至少约96%,或至少约97%,或至少约98%,或至少约99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

MSA-16、MSA-26,

DOM7m-16 (SEQ ID NO: 473)、DOM7m-12 (SEQ ID NO: 474)、DOM7m-26 (SEQ ID NO: 475)、DOM7r-1 (SEQ ID NO: 476)、DOM7r-3 (SEQ ID NO: 477)、DOM7r-4 (SEQ ID NO: 478)、DOM7r-5 (SEQ ID NO: 479)、DOM7r-7 (SEQ ID NO: 480)、DOM7r-8 (SEQ ID NO: 481)、DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482)、DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483)、DOM7h-4 (SEQ ID NO: 484)、DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485)、DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486)、DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487)、DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489)、DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490)、DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491)、DOM7h-25 (SEQ ID NO: 492)、DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493)、DOM7h-21 (SEQ ID NO: 494)、DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495)、DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496)、DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497)、DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498)、DOM7r-15 (SEQ ID NO: 499)、DOM7r-16 (SEQ ID NO: 500)、DOM7r-17 (SEQ ID NO: 501)、DOM7r-18 (SEQ ID NO: 502)、DOM7r-19 (SEQ ID NO: 503)、DOM7r-20 (SEQ ID NO: 504)、DOM7r-21 (SEQ ID NO: 505)、DOM7r-22 (SEQ ID NO: 506)、DOM7r-23 (SEQ ID NO: 507)、DOM7r-24 (SEQ ID NO: 508)、DOM7r-25 (SEQ ID NO: 509)、DOM7r-26 (SEQ ID NO: 510)、DOM7r-27 (SEQ ID NO: 511)、DOM7r-28 (SEQ ID NO: 512)、DOM7r-29 (SEQ ID NO: 513)、DOM7r-30 (SEQ ID NO: 514)、DOM7r-31 (SEQ ID NO: 515)、DOM7r-32 (SEQ ID NO: 516)、DOM7r-33 (SEQ ID NO: 517) (该段落中的SEQ ID NO是WO2007080392中公开的那些),

dAb8、dAb 10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、

dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1 和 dAb7p2。

例如，结合人血清白蛋白的 dAb 可以含有与以下序列具有至少约 90%，或至少约 95%，或至少约 96%，或至少约 97%，或至少约 98%，或至少约 99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：DOM7h-2 (SEQ ID NO:482)、DOM7h-3 (SEQ ID NO:483)、DOM7h-4 (SEQ ID NO:484)、DOM7h-6 (SEQ ID NO:485)、DOM7h-1 (SEQ ID NO:486)、DOM7h-7 (SEQ ID NO:487)、DOM7h-8 (SEQ ID NO:496)、DOM7r-13 (SEQ ID NO:497)、DOM7r-14 (SEQ ID NO:498)、DOM7h-22 (SEQ ID NO:489)、DOM7h-23 (SEQ ID NO:490)、DOM7h-24 (SEQ ID NO:491)、DOM7h-25 (SEQ ID NO:492)、DOM7h-26 (SEQ ID NO:493)、DOM7h-21 (SEQ ID NO:494)、DOM7h-27 (SEQ ID NO:495) (该段落中的 SEQ ID NO 是 WO2007080392 中公开的那些)，

dAb8、dAb 10、dAb36、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13 和 dAb7h14。

在特定的实施方案中，dAb 结合人血清白蛋白并含有与以下序列具有至少约 80%或至少约 85%，或至少约 90%，或至少约 95%，或至少约 96%，或至少约 97%，或至少约 98%，或至少约 99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列：

DOM7h-2 (SEQ ID NO:482)、DOM7h-6 (SEQ ID NO:485)、DOM7h-1

(SEQ ID NO:486)、DOM7h-7 (SEQ ID NO:487)、DOM7h-8 (SEQ ID NO:496)、DOM7h-22 (SEQ ID NO:489)、DOM7h-23 (SEQ ID NO:490)、DOM7h-24 (SEQ ID NO:491)、DOM7h-25 (SEQ ID NO:492)、DOM7h-26 (SEQ ID NO:493)、DOM7h-21 (SEQ ID NO:494)、DOM7h-27 (SEQ ID NO:495) (该段落中的 SEQ ID NO 是 WO2007080392 中公开的那些),

dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb38、dAb41、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13 和 dAb7h14。

在更特别的实施方案中, dAb 是结合人血清白蛋白的 V_K dAb, 并具有选自以下的氨基酸序列:

DOM7h-2 (SEQ ID NO:482)、DOM7h-6 (SEQ ID NO:485)、DOM7h-1 (SEQ ID NO:486)、DOM7h-7 (SEQ ID NO:487)、DOM7h-8 (SEQ ID NO:496) (该段落中的 SEQ ID NO 是 WO2007080392 中公开的那些),

dAb2、dAb4、dAb7、dAb38、dAb41、dAb54、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13 和 dAb7h14。

在更特别的实施方案中, dAb 是结合人血清白蛋白的 V_H dAb, 并具有选自 dAb7h30 和 dAb7h31 的氨基酸序列。

在更特别的实施方案中, dAb 是 dAb7h11 或 dAb7h14。

在其他实施方案中, dAb、配体或拮抗剂结合人血清白蛋白, 并含有之前任一氨基酸序列的一个、两个或三个 CDR, 例如, dAb7h11 或 dAb7h14 的一个、两个或三个 CDR。

合适的结合血清白蛋白的 *Camelid* V_{HH} 包括 WO2004/041862 (Ablynx N.V.) 和 WO2007080392 中公开的那些 (在此将其 V_{HH} 序列及其核酸对应物引入作为参考, 并形成本发明文本公开内容的一部分), 如序列 A (SEQ ID NO:518)、序列 B (SEQ ID NO:519)、序列 C (SEQ ID NO:520)、序列 D (SEQ ID NO:521)、序列 E (SEQ ID NO:522)、序列 F (SEQ ID NO:523)、序列 G (SEQ ID NO:524)、序列 H (SEQ ID NO:525)、序列 I (SEQ ID NO:526)、序列 J (SEQ ID NO:527)、序列 K (SEQ ID NO:528)、序列 L (SEQ ID NO:529)、序列 M (SEQ ID NO:530)、序列 N (SEQ ID NO:531)、序列 O (SEQ ID NO:532)、序

列 P (SEQ ID NO:533)、序列 Q (SEQ ID NO:534), 这些序列编号对应于 WO2007080392 或 WO2004/041862 (Ablynx N.V.) 中引用的那些。在特定的实施方案中, Camelid V_{HH} 结合人血清白蛋白并含有与 WO2007080392 中公开的 ALB1 或 SEQ ID NO:518-534 中任一个具有至少约 80%, 或至少约 85%, 或至少约 90%, 或至少约 95%, 或至少约 96%, 或至少约 97%, 或至少约 98%, 或至少约 99% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 这些序列编号对应于 WO2007080392 或 WO2004/041862 中引用的那些。

在一些实施方案中, 配体或拮抗剂含有与在此公开的任一抗-血清白蛋白 dAb 竞争与血清白蛋白 (例如, 人血清白蛋白) 结合的抗-血清白蛋白 dAb。

在可替换的实施方案中, 拮抗剂或配体含有 VEGF (例如, 人 VEGF) 特异性的结合部分, 其中该部分含有非免疫球蛋白序列, 如 2008 年 2 月 8 日申请的共同未决申请 PCT/GB2008/000453 中所述的, 这些结合部分、它们的生产和选择方法 (例如, 来自不同的文库) 及其序列的公开内容在此引入作为参考, 作为本发明文本的公开内容的一部分。

与半衰期延长部分 (例如, 白蛋白) 的缀合

在一个实施方案中, 将 (一个或多个) 半衰期延长部分 (half-life extending moiety) (例如, 白蛋白、转铁蛋白及其片段和类似物) 缀合或连接本发明的 VEGF-结合多肽、dAb 或拮抗剂。对于 VEGF-结合形式中的合适白蛋白、白蛋白片段或白蛋白变体的实例描述于 WO2005077042 中, 在此将其公开内容引入作为参考, 并形成本发明文本的公开内容的一部分。特别地, 以下的白蛋白、白蛋白片段或白蛋白变体可以用于本发明中:

- SEQ ID NO:1 (如 WO2005077042 中公开的, 在此明确地将该序列引入本发明公开内容中作为参考);

- 含有 WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-387 或由 WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-387 组成的白蛋白片段或变体;

- 白蛋白、或其片段或变体, 含有选自以下的氨基酸序列: (a) WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 54-61; (b) WO2005077042

中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 76 至 89; (c) WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 92 至 100; (d) WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 170 至 176; (e) WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 247 至 252; (f) WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 266 至 277; (g) WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 280 至 288; (h) WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 362 至 368; (i) WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 439 至 447; (j) WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 462 至 475; (k) WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 478 至 486; 和 (l) WO2005077042 中的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 560 至 566。

对用于 VEGF 结合形式中的合适白蛋白、片段或类似物的更多实例描述于 WO03076567 中, 在此将其公开内容引入作为参考, 并形成本发明文本的公开内容的一部分。特别地, 以下的白蛋白、片段或变体可以用于本发明中:

- 如 WO03076567 中所述的人血清白蛋白, 例如, 图 3 中 (在此明确地将该序列信息引入本发明公开内容中作为参考);

- 由具有 66,500 通式分子量的 585 个氨基酸的单非糖基化多肽链组成的人血清白蛋白 (参见, Meloun 等, *FEBS Letters* 58:136 (1975); Behrens 等, *Fed. Proc.* 34:591 (1975); Lawn 等, *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114 (1981); Minghetti 等, *J. Biol. Chem.* 261:6747 (1986));

- 白蛋白的多态变体或类似物或片段, 如 Weitkamp 等, *Ann. Hum. Genet.* 37:219 (1973) 中所述的;

- 如 EP322094 中所述的白蛋白片段或变体, 例如, HA (1-373)、HA (1-388)、HA (1-389)、HA (1-369) 和 HA (1-419) 以及 1-369 和 1-419 之间的片段;

- 如 EP399666 中所述的白蛋白片段或变体, 例如, HA (1-177) 和 HA (1-200) 以及 HA (1-X) 之间的片段, 其中 X 是 178 至 199 的任何数字。

在将 (一个或多个) 半衰期延长部分 (例如, 白蛋白、转铁蛋白及其片段和类似物) 用于格式化本发明的 VEGF-结合多肽、dAb 和拮抗剂的情况下, 可以使用任何合适的方法来缀合, 如通过直接融合 VEGF-结合部分 (例如, 抗-VEGF dAb), 例如, 通过使用编码融合蛋白的单

核苷酸构建体，其中将融合蛋白编码为单多肽链，在位于 VEGF 结合部分的 N-或 C-端具有半衰期延长部分。或者，可以通过在部分之间使用肽连接物来完成缀合，例如，WO03076567 或 WO2004003019 中所述的肽连接物（在此将这些连接物的公开内容引入作为参考，以提供用于本发明中的实例）。通常，提高体内血清半衰期的多肽是在体内天然产生的多肽，并且能抵抗从生物体内（例如，人）除去不利物质的内源机制的降解或去除。例如，提高体内血清半衰期的多肽可以选自胞外基质的蛋白，血液中发现的蛋白，血脑屏障或神经组织中发现的蛋白，位于肾脏、肝脏、肺、心脏、皮肤或骨中的蛋白，应激蛋白，疾病特异性蛋白或涉及 Fc 转运的蛋白。

在整个公开内容中所述的本发明的实施方案中，替代本发明的拮抗剂或配体中的抗-VEGF “dAb” 的使用，考虑了本领域技术人员可以使用含有本发明的结合 VEGF 的 dAb 的一个或多个或全部 3 个 CDR 的多肽或结构域（例如，嫁接在合适蛋白支架或骨架上的 CDR，支架或骨架例如为，亲和体、SpA 支架、LDL 受体 A 类结构域或 EGF 结构域）。因此，认为该公开内容作为整体提供了使用这样的结构域替代 dAb 的拮抗剂的公开内容。在这点上，参见 2008 年 2 月 8 日申请的 PCT/GB2008/000453，在此将其公开内容引入作为参考）。

因此，在一个实施方案中，本发明的拮抗剂包含具有 VEGF 结合特异性的免疫球蛋白单可变域或结构域抗体（dAb）或该 dAb 合适形式的互补性决定区。拮抗剂可以是由该 dAb 组成的多肽，或基本上是由该 dAb 组成的多肽。拮抗剂可以是包含合适形式的 dAb（或 dAb 的 CDR）的多肽，如抗体形式（例如，IgG-样形式，scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂），或含有结合 VEGF 的 dAb 和结合另一个目标蛋白、抗原或表位（例如，血清白蛋白）的第二 dAb 的双特异性配体。

可以根据本发明的多肽、dAb 和拮抗剂格式化成本领域已知的各种合适的抗体形式，如 IgG-样形式、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、单链抗体、双特异性抗体、抗体重链、抗体轻链、抗体重链和/或轻链的同型二聚体和杂二聚体、之前任一项的抗原结合片段（例如，Fv 片段（例如，单链 Fv）（scFv）、二硫化物键合的 Fv）、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段）、单可变域（例如，V_H、V_L）、dAb 和之前任一项的修饰形式（通过共价连接聚烷撑二醇（例如，聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二

醇)或其他合适聚合物的修饰)。

在一些实施方案中,本发明提供了为IgG-样形式的配体(例如,抗-VEGF拮抗剂)。这样的形式具有IgG分子常规的四条链结构(2条重链和两条轻链),其中一个或多个可变区(V_H 和或 V_L)已经由本发明的dAb替代。在一个实施方案中,每个可变区(2个 V_H 区和2个 V_L 区)由dAb或单可变域替代,其中至少一个是根据本发明的抗-VEGF dAb。IgG-样形式中包括的dAb或单可变域可以具有相同的特异性或不同的特异性。在一些实施方案中,IgG-样形式是三价的,并可以具有一种(只抗-VEGF)、两种(例如,抗-VEGF和抗-SA)、三种或四种特异性。例如,IgG样形式可以是单价的,并含有具有相同特异性的4个dAb;是双特异性的并含有3个具有相同特异性的dAb和另一个具有不同特异性的dAb;是双特异性的并含有两个具有相同特异性的dAb和两个具有共同的但不相同特异性的dAb;三特异性的并含有具有相同特异性的第一和第二dAb,具有不同特异性的第三dAb和具有不同于第一、第二和第三dAb的特异性的第四dAb;或四特异性的,并含有四个具有各不相同特异性的dAb。可以制备IgG样形式的抗原结合片段(例如,Fab、 $F(ab')_2$ 、Fab'、Fv、scFv)。在一个实施方案中,IgG样形式或其抗原结合片段不与VEGF交联,例如,形式对于VEGF可以是单价的。如果需要补体激活和/或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)功能,配体可以是IgG1-样形式。如果需要,IgG-样形式可以包含突变的恒定区(变体IgG重链恒定区),以最小化与Fc受体的结合和/或固定补体的能力。(参见,例如,Winter等,GB2,209,757B;Morrison等,WO89/07142;Morgan等,WO94/29351,1994年12月22日)。

本发明的配体(多肽、dAb和拮抗剂)可以格式化成融合蛋白,其含有与第二免疫球蛋白单可变域直接融合的第一免疫球蛋白单可变域。如果需要,该形式可以进一步包含半衰期延长部分。例如,配体可以包含与第二免疫球蛋白单可变域直接融合的第一免疫球蛋白单可变域,而第二免疫球蛋白单可变域与结合血清白蛋白的免疫球蛋白可变域直接融合。

通常,不管配体是否包含连接物,具有对目标有结合特异性的结合位点的多肽结构域的方向是设计选择的问题。然而,一些方向,使用或不使用连接物,可以提供比其他方向更好的结合特征。本发明包括的所

有方向（例如，dAb1-连接物-dAb2；dAb2-连接物-dAb1）是含有提供所需结合特征的方向的配体，该结合特征可以通过筛选容易地识别。

根据本发明的多肽和 dAb，包括 dAb 单体、二聚体和三聚体，可以连接抗体 Fc 区，包含 CH2 和 CH3 结构域中的一个或两个，和任选铰链区。例如，作为单个核苷酸序列连接 Fc 区的载体编码配体可以用来制备这样的多肽。

此外，本发明提供了上述 dAb 单体（例如，抗-VEGF dAb 单体）的二聚体、三聚体和多聚体。

密码子优化序列

如上所述，本发明的实施方案提供了编码本发明的多肽和可变域的密码子优化核苷酸序列。如以下说明中所示的，可以产生编码相同可变域的约 70% 同一性的密码子优化序列（在该情况中，可变域氨基酸序列与 DOM 1h-131-206 相同）。在这种情况下，对于通过巴斯德毕赤酵母（密码子优化序列 1-3）或大肠杆菌（密码子优化序列 4 和 5）的表达，将序列优化。

我们在考虑了遗传密码的简并性之后进行了计算，并将通过 DOM 1h-131-206（如以下显示为 DOM 1h-131-206 WT）的核苷酸序列和理论核苷酸序列编码的每个简并密码子内的核苷酸变化数量最大化，理论核苷酸序列仍然编码与 DOM 1h-131-206 相同的可变域。计算揭示了理论序列与 DOM 1h-131-206 的核苷酸序列只具有 57% 的同一性。

密码子优化序列 1

DNA 序列

```
gaggttcaattggtggaatccggtggtgattggttcaacctggtggttctttgagattgtcctgtgctg
cttccggttttactttcgctcacgagactatggtttgggttagacaggctccaggtaaaggattggaatg
ggtttcccacattccaccagatggtcaagatccattctacgctgactccggttaagggaagattcactatc
tccagagacaactccaagaacactttgtacttgcagatgaactccttgagagctgaggatactgctgttt
accactgtgctttgttgccaaagagaggaccttggtttgattactggggacaggggaactttggttactgt
ttcttcc
```

相应的 AA 序列

```
evqllesggglvqpggsrlrlscaasgftfahetmvwvrrqapgkglewvshippdgqdpfyadsvkgrfti
srdnskntlylqmnsiraedtavyhcallpkrpwwfdywgggtlvtvss
```

· 与 WT 序列 74.1%的核苷酸序列同一性

Dom1h-131-206 密码子优化	(1)	1	50
Dom1h-131-206 WT	(1)	CAAGTGAAGCTCTTGGAGTGTGGGGAGGCTTGGTAAGCC	
共有序列	(1)	GAGGT CA TGTGGA TC GG GG GG TTGGT CA CCTGG GG TC	51 100
Dom1h-131-206 密码子优化	(51)	TTTAAATGGTCTGTTTCTTTCCTTTTATTTTCCTTCACAGCTA	
Dom1h-131-206 WT	(51)	CCTGCTCTCTCTTCTTCAAGCTCCGATTCACCTTCGGATGACGG	
共有序列	(51)	TG G T TCCTGTGC GC TCCGG TT AC TT GC CA GAGAC A	101 150
Dom1h-131-206 密码子优化	(101)	TGTTTGGTATACAGCTTCCAGTTAAAGGATGGAAATGGTTCCAC	
Dom1h-131-206 WT	(101)	TGGGTCTCTCCCTCTTCAAGGAGGATCTCAAGGCTCTCAAGAT	
共有序列	(101)	TGGT TGGGT G CAGGC CCAGG AA GG T GA TGGGT TC CA	151 200
Dom1h-131-206 密码子优化	(151)	ATCCACCAATGCTGACATCTATCTACTTCTTATAGGAAAG	
Dom1h-131-206 WT	(151)	ATTCCTCCGGAATATGAGGAGCTCTTCAAGCAAGCTTGAAGGCC	
共有序列	(151)	ATTCC CC GATGGTCA GATCC TTCTACGC GACTCCGT AAGGG G	201 250
Dom1h-131-206 密码子优化	(201)	ATTCCTCTCTTAAAGACACCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT	
Dom1h-131-206 WT	(201)	GTTCAACCAATCTCTCAACATCTCAAGCAAGCTTCTTCTTCTTCT	
共有序列	(201)	TTCAC ATCTCC G GACAA TCCAGAACAC T TA TGCA ATGA	251 300
Dom1h-131-206 密码子优化	(251)	ATCTCTGAAATCTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	
Dom1h-131-206 WT	(251)	ATAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
共有序列	(251)	AC C TG G GC GAGGA AC GC GT TA CACTGTGC TG T CC	301 350
Dom1h-131-206 密码子优化	(301)	AAGGACCAATCTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	
Dom1h-131-206 WT	(301)	AAGAGGGGCTCTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	
共有序列	(301)	AAGAG GG CCTTGGTTGA TACTGGGG CAGGGAAC TGGT AC GT	351 400
Dom1h-131-206 密码子优化	(351)	TCTTCTTAATGA	
Dom1h-131-206 WT	(351)	CCTGAGT-----	
共有序列	(351)	TC C	

密码子优化序列 2

DNA 序列

gagaaaagagagaggttcaattgcttgaatctggaggaggtttgggtccagccaggaggggtcccttcgactaa
ggtgtgctgccagtggtttacgtttgctcatgaaactatggatgggtccgacaggcacctggtaagg
tcttgaatgggtttcacatatccctccagacggtcaagaccattttacgctgattccgtgaaaggcaga
tttacaatttcacgagataatttctaaaaacaccttgacttacaatgaactcattgagagctgaggaca
ctgcagtttatcactgcgctttactacccaaacgtggaccttggtttgattattggggccaaggtacgtt
agtgactgttagttct

相应的 AA 序列

ekrevqllesggglvqpggsrlrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewvshipdpdgdqpfyadsvkgr
ftisrdnsknltlylqmnsraedtavyhcallpkrgpwwfdywggtltvtss

· 与 WT 序列 71.1%的核苷酸序列同一性

Dom1h-131-206 WT	(1)	1	50
仅毕赤酵母 MFa 206 dAb	(1)	-----GAGGTGAAGCTCTTGGAGTGTGGGGAGGCTTGGTAAGCC	
共有序列	(1)	GAGAAAGAGAGCTTGAATCTTGAATTTGAGGAAGTTTCTCCAGGC	
	(1)	GAGGT CA TG T GA TCTGG GGAGG TTGGT CAGCC	51 100
Dom1h-131-206 WT	(42)	TGGGGGCTCTTGGCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
仅毕赤酵母 MFa 206 dAb	(51)	AGGAGGCTCTTGAATTAAGTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
共有序列	(51)	GG GGGTCCCT CG CT TGTGC GCC GG TT AC TTTC C	101 150
Dom1h-131-206 WT	(92)	ATGAGTGAATCTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
仅毕赤酵母 MFa 206 dAb	(101)	ATGAGCTATCTATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
共有序列	(101)	ATGA AC ATGGT TGGGTCCG CAGGCACC GG AA GGTCT GA TGG	

			151		200
	Dom1h-131-206 WT	(142)	ATCTCAATATTCCTCGATGATAGGATCCCTCTCATGTAACCTCT		
仅毕赤酵母	MFa 206 dAb	(151)	CTTTCATATCTCTCAACCGCTCAGACCAATTAGGTCTCTCT		
	共有序列	(151)	GT TCACATAT CC CC GA GGTCA GA CC TT TACGC GA TCCGT		
			201		250
	Dom1h-131-206 WT	(192)	GAAGGGCGGCTCAGATCCTCCGACATCCAGGAAAGGCTATATC		
仅毕赤酵母	MFa 206 dAb	(201)	GAAGGGCAGATTTCAATTCAGGACATACTCTAAGAAATCTGGTCT		
	共有序列	(201)	GAA GGC G TT AC AT TC CG GA AATTC AA AACAC T TA		
			251		300
	Dom1h-131-206 WT	(242)	TGGTAATGAGCAGCCCTGCTCCGAGGACCAAGGGTATATCACTGTGG		
仅毕赤酵母	MFa 206 dAb	(251)	TACCAATTAATCATTCAGAGTTAAGACACTCAATTTAATTTCTCT		
	共有序列	(251)	T CAAATGAAC TG G GC GAGGACAC GC GT TATCACTG GC		
			301		350
	Dom1h-131-206 WT	(292)	CTGTTCTTAAGAGGGGGCTTGGTTTACTACGGGCTCAGGAAAGCC		
仅毕赤酵母	MFa 206 dAb	(301)	TATTTACAAACACTTGACCTTGGTTTCTTATTTGGGCTCACTTACGTT		
	共有序列	(301)	T CT CC AA G GG CCTTGTTTGA TA TGGGG CA GG AC T		
			351		367
	Dom1h-131-206 WT	(342)	GATCACTCTCCAGT-		
仅毕赤酵母	MFa 206 dAb	(351)	AGGACTCTT-AGTTAT		
	共有序列	(351)	GT AC GT T G C		

密码子优化序列 3

DNA 序列

gaagtgcagcttctttaaagtgggtggagggctagtgcagccaggggatctttaagattatcatgcgctg
ccagtggattttacttttgctcacgagacgatgggtctgggtgagacaagctcctggaaaaggttttagagtg
ggtttctcacattccacctgatgggtcaagatcctttctacgcagattccgtcaaaggaagattttactatc
tccagagataatagtaaaaacactttgtacctacagatgaactcacttagagccgaagataccgctgtgt
accactgcgccttgttgccaaagagaggtccttggttcgattactggggtcagggtactctggttacagt
ctcatct

相应的 AA 序列

evqllesggglvqpggsirlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewvshipdpdggdpfyadsvkgrfti
srdnskntlylqmnsiraedtavyhcallpkrpwpfdywgqgtlvtvss

· 与 WT 序列 72.6%的核苷酸序列同一性

		1	50
Dom1h-131-206 WT	(1)	GAAGTGTAGCTGTGGAGTCGGGACAGGCTTGGTAAGCTGGGGGTC	
仅毕赤酵母 Pre 206 dAb	(1)	GAAGTGTAGCTTCTGAAAGTGTGAGAGCAGTGAGGACAGGGAAC	
共有序列	(1)	GA GTGCAGCT T GA TGG GGAGG T GT CAGCC GGGGG TC	100
		51	100
Dom1h-131-206 WT	(51)	CCGGCTCTCCCTTCAGCTCCGATTCACCTTGTGATGAGACCA	
仅毕赤酵母 Pre 206 dAb	(51)	TTEAAGATATCAACCTGAGTGAATTTCTTGTGATCCAGACCA	
共有序列	(51)	T G T TC TG GC GCC GGATT AC TTTGC CA GAGACGA	150
		101	150
Dom1h-131-206 WT	(101)	TGGGGGCTCCCTAGGTAACAGGAAAGTCTAGAGTGGCTCAAT	
仅毕赤酵母 Pre 206 dAb	(101)	TGGCTGGGAGAGGAGGTCTTGAAGAGGTTAGAGTGGTTTCTAC	
共有序列	(101)	TGGT TGGGT G CA GC CC GG AA GGT TAGAGTGGGT TC CA	200
		151	200
Dom1h-131-206 WT	(151)	ATTCCCGGATGCTAGGATCTCTTAAAGAGACTCTGTGAGGGCCG	
仅毕赤酵母 Pre 206 dAb	(151)	ATTCCAGCTATGAGGAGATCTCTTAAAGAGACTCTGTGAGGGCCG	
共有序列	(151)	ATTCC CC GATGGTCA GATCC TTCTACGCAGA TCCGT AA GG G	250
		201	250
Dom1h-131-206 WT	(201)	GTCACCACTTCCGCTACCAATCCAGAGCAAGCAATATCGAAATCG	
仅毕赤酵母 Pre 206 dAb	(201)	ATTACTATCTCAGAGATATAGTAAAGCACTTGTACCTAAGTGA	
共有序列	(201)	TT AC ATCTCC G GA AAT AA AACAC T TA CT CA ATGA	300
		251	300
Dom1h-131-206 WT	(251)	ATAGCTGCTCTGAGTACATAAGGTAATCACCTGTGCTCTCTCT	
仅毕赤酵母 Pre 206 dAb	(251)	ATCACTTAAAGGCAAGTCTCTGCTGTAAGTCTCTCTCTCTCT	
共有序列	(251)	AC CT G GCCGA GA AC GC GT TA CACTG GC TG T CC	350
		301	350
Dom1h-131-206 WT	(301)	AAAGGGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
仅毕赤酵母 Pre 206 dAb	(301)	AAAGAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	
共有序列	(301)	AAGAG GG CCTTGGTT GA TACTGGGGTCAGGG AC CTGGT AC GT	351
		351	
Dom1h-131-206 WT	(351)	CTCGAGC-	
仅毕赤酵母 Pre 206 dAb	(351)	CTC-CTCT	
共有序列	(351)	CTC A C	

密码子优化序列 4

DNA 序列

gaagtacaactgctggagagcgggtggcggcctggttcaaccgggtggttccctgcgcctgtcctgtgcgg
catctggtttcaccttcgcacacgaaaccatggtgtgggttcgccaagctccgggcaaaggcctggaatg
ggttaagccacattcctccagatggccaggaccattctatgcggtattccgttaaggggtcgctttaccatt
tctcgtgataaactcaaaaacacctgtacctgcagatgaactccctgcgcgcgaggatactgcggtgt
accatttgtgcgctgctgcctaaccgtggcccggtggttcgattactgggggtcagggtactctggtcaccgt
aagcagc

相应的 AA 序列

evqllesggglvqpggslrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewvshippdgqdpfyadsvkgrfti
srdnskntlylqmnsraedtavyhc allpkrgpwwdywgggtltvtvss

· 与 WT 序列 76.5%的核苷酸序列同一性

		1	50
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(1)	GAGTGCAGGTCTTCTGAACTCTGGGCAAGTCTGACAGCTGAGGGT
	Sec 206 dAb	(1)	GAAATACAACTCTGCAAGCGGTGCGGCTGGTTCAAAGGTGCTT
	共有序列	(1)	GA GT CA CTG TGGAG GG GG GGC TGGT CA CC GG GG TC
		51	100
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(51)	CTTCTCTCTCTCTGTAAGCCCTCGATTCACCTTTCGGATTAAGA
	Sec 206 dAb	(51)	CCCTGCGCTCTCTGTAAGCCCTCGATTCACCTTTCGGATTAAGA
	共有序列	(51)	CTTCTCTCTCTCTGTAAGCCCTCGATTCACCTTTCGGATTAAGA
		101	150
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(101)	TGGTGTGGGT CGCCA GC CC GG AA GG CT GA TGGGT CA
	Sec 206 dAb	(101)	TGGTGTGGGT CGCCA GC CC GG AA GG CT GA TGGGT CA
	共有序列	(101)	TGGTGTGGGT CGCCA GC CC GG AA GG CT GA TGGGT CA
		151	200
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(151)	ATTCCCGGATGGTACGATCTCTTACGGACACCTCTGAAAGCGCT
	Sec 206 dAb	(151)	ATTCCCGGATGGTACGATCTCTTACGGACACCTCTGAAAGCGCT
	共有序列	(151)	ATTCC CG GATGG CAGGA CC TTCTA GC GA TCCGT AAGGG CG
		201	250
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(201)	GTTCACTATCTCCGCTACATTCAGGAAAGGTAATTCGAAATTA
	Sec 206 dAb	(201)	CCTTACCTATCTCCGCTACATTCAGGAAAGGTAATTCGAAATTA
	共有序列	(201)	TT ACCAT TC CG GA AA TCCAA AACAC CT TA CTGCA ATGA
		251	300
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(251)	ACAGCTGCTGCTGCAAGACAGGTAATACCTGCTGCTGCTGCT
	Sec 206 dAb	(251)	ACAGCTGCTGCTGCAAGACAGGTAATACCTGCTGCTGCTGCT
	共有序列	(251)	AC CCTGCG GCCGAGGA AC GCGGT TA CA TGTGCGCTGCT CCT
		301	350
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(301)	AAGAAGGGGTCTGCTTACACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
	Sec 206 dAb	(301)	AAGAAGGGGTCTGCTTACACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
	共有序列	(301)	AA G GG CC TGGTT GA TACTGGGGTCAGGG AC CTGGTCACCGT
		351	
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(351)	CTCGAGG
	Sec 206 dAb	(351)	AAGCAGC
	共有序列	(351)	AGC

密码子优化序列 5

DNA 序列

gaggttcaactgctggaatctggtggtggtctggtacaaccgggtggttccctgctgctgagctgtgcag
cctctggtttcaccttcgctcatgagaccatggtttgggtacgccaggctccgggtaaaggcctggagt
ggtaagccatatccctcctgatggtcaggaccggttctatgctgattccgtcaaaggccgttttaccatt
tctcgtgacaacagcaaaaactctgtacctgcaaatgaactccctgctgctgagaagacaaggcggttt
atcactgtgcactgctgcaaaaacgcggcccttggttcgactactggggccagggtactctggtcactgt
atcttct

相应的 AA 序列

evqllesggglvqpggslrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewshipdpdgdpyadsvkgrfti
srnnskntlylqmnsdraedtavyhcallpkrgpwwfdywgqgtlvtvss

· 与 WT 序列 78.4%的核苷酸序列同一性

		1	50
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(1)	GGGTGGAGGTGTTCAGTGTGGGAGGCTTCGTACAGCTGGGGGGT
	IC 206 dAb	(1)	GGGTTCATTCCTGCAATTCAGTGTGTCTCTACAAAGGCTGTCT
	共有序列	(1)	GAGGT CA CTG TGA TCTGG GG GG TGGTACA CC GG GG TC 51 100
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(51)	CTTGGGTCTCTCTCTGAGAGCTTCTCCATTCCTTATSCGATGAGATG
	IC 206 dAb	(51)	CTTGGGTCTGAGATGTGATCTCTTGTTCACCTCTCTCATCAACA
	共有序列	(51)	CCTGCGTCT CTGTGCAGCCTC GG TTCACCTT GC CATGAGAC A 101 150
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(101)	TTCTGTGCTCTCTCTGAGAGCAATTCAGGAGGCTCTAATATGCTCTCAAT
	IC 206 dAb	(101)	TTCTGTGCTCTCTGAGAGCAATTCAGGAGGCTCTAATATGCTCTCAAT
	共有序列	(101)	TGGT TGGGT CGCCAGGC CC GG AA GG CT GAGTGGGT CAT 151 200
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(151)	ATTCCTGCTCTCTCTGAGAGCAATTCAGGAGGCTCTAATATGCTCTCAAT
	IC 206 dAb	(151)	ATTCCTGCTCTCTGAGAGCAATTCAGGAGGCTCTAATATGCTCTCAAT
	共有序列	(151)	AT CC CC GATGGTCAGGA CC TTCTA GC GA TCCGT AA GGCCG 201 250
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(201)	GTCACCAATCTCTCTGAGAGCAATTCAGGAGGCTCTAATATGCTCTCAAT
	IC 206 dAb	(201)	TCTACCAATCTCTCTGAGAGCAATTCAGGAGGCTCTAATATGCTCTCAAT
	共有序列	(201)	TT ACCAT TC CG GACAA CAA AACAC CT TA CTGCAATGA 251 300
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(251)	ACAGGCTCTCTCTGAGAGCAATTCAGGAGGCTCTAATATGCTCTCAAT
	IC 206 dAb	(251)	ATCTCTGCTCTCTCTGAGAGCAATTCAGGAGGCTCTAATATGCTCTCAAT
	共有序列	(251)	AC CCTGCGTGC GA GACAC GCGGT TATCACTGTGC CTGT CC 301 350
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(301)	AGAGGCGGCTCTCTGAGAGCAATTCAGGAGGCTCTAATATGCTCTCAAT
	IC 206 dAb	(301)	AGAGGCGGCTCTCTGAGAGCAATTCAGGAGGCTCTAATATGCTCTCAAT
	共有序列	(301)	AA G GG CCTTGTT GACTACTGGGG CAGGG AC CTGGTACAC GT 351
仅大肠杆菌	Dom1h-131-206 WT	(351)	CTGAGGC
	IC 206 dAb	(351)	ATCTTCT
	共有序列	(351)	TC

例证

实施例 A: 人 TNFR1 的结构域抗体的前导选择 (lead selection) & 表征

结构域抗体从噬菌体文库产生。根据相关标准方法进行被动吸收人 TNFR1 的可溶性选择和淘选。从 R&D systems (Cat No 636-R1-025/CF) 或 Peprotech (Cat no. 310-07) 购买人 TNFR1 作为可溶性重组蛋白, 直接使用 (在被动选择的情况中) 或在生物素化后使用, 使用通过伯胺偶联接着在生物测试中定量控制其活性以及通过质谱分析其 MW 和生物素化程度来生物素化。通常, 利用每下一轮中降低水平的抗原来进行 3 轮选择。

对于抗-TNFR1 结合克隆的存在，通过噬菌体 ELISA 来筛选来自选择的结果。从这些噬菌体选择中分离 DNA 并亚克隆至用于可溶性 dAb 片段表达的表达载体中。在 96-孔平板中表达可溶性 dAb 片段，并将上清液用于筛选抗-TNFR1 结合 dAb 的存在，使用直接结合 ELISA，其使用抗-c-myc 检测，或使用抗生物素蛋白链菌素/生物素化 TNFR1 BIAcore™ 芯片的 BIAcore™，并根据解离率（off-rate）来分级。

以下所述的前导分子 (lead molecule) 源自亲本 dAb, 命名为 DOM

1h-131 (公开于 WO2006038027 中)。使用 60nM 生物素化抗原的 3 轮选择后,从噬菌体展示文库中选择了该分子。将抗生物素蛋白链菌素或中性链亲和素覆盖的 Dyna 珠子替换为每轮选择中的捕获试剂,以防止对抗抗生物素蛋白链菌素或中性链亲和素的粘合剂的选择。该阶段的前导 DOM 1h-131 功效是低微摩尔范围的,如通过 MRC-5 成纤维细胞/IL-8 释放细胞测试所测定的。通过 BIAcore™ 测定的结合动力学通常呈现出快结合快解离速率 (fast-on/fast-off rate)。该 DOM 1h-131 前导分析的大肠杆菌表达水平,作为 C-端 myc 标记的单体,在 8mg/l 的范围中。

前导的亲合性成熟:

促使 DOM 1h-131 亲合性成熟,以产生具有较高功效和改进的生物物理特征的突变体(对于 DOM 1h-131 产生的前导的氨基酸序列,参考图 3)。使用易出错 PCR 聚合酶 (Genemorph II, Stratagene) 产生易出错文库后(1 个氨基酸变化/dAb 序列的平均数,文库大小 8×10^7),利用这些易出错文库进行了七轮选择。该策略导致克隆 DOM 1h-131-8 的分离,这是其中有 4 个氨基酸变化的分子(一个在框架 1 中 (FR1)、一个在 CDR1 中、一个在 CDR3 中和一个在 FR4 中),获得了大约 100 倍的功效提高,如通过 MRC-5 细胞测试所测量的 ($\sim 4\text{nM}$)。在该测试中,用测试样品将 MRC-5 细胞温育一小时,然后加入 TNF- α (200pg/ml)。在过夜温育后,使用 IL-8 ABI 8200 细胞检测测试 (FMAT) 测定 IL-8 释放。在每个实验中包含 TNF- α 剂量曲线。用于与 dAb 竞争与 TNFR1 结合的 TNF- α 浓度 (200pg/ml) 大约为该测试中最大 TNF- α 应答的 70%。

为了进一步提高功效,通过在易出错前导共有序列信息建议的关键位置的寡-定向突变使单个氨基酸位置多样化。在该方法的过程中,通过 BIAcore™ 筛选分离 DOM 1h-131-8 克隆的改进形式,DOM 1h-131-24(在校正之前最初命名为 DOM 1h-131-8-2),其具有单个 K49R 氨基酸突变(氨基酸编号根据 Kabat)和 200-300pM 的 RBA 功效。

产生更多基于该前导的易出错文库和源自其的 NNS 文库,并接受三轮使用热处理的噬菌体选择(对于方法,参见 Jespers L 等, Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation (通过热变性在噬菌体上选择的抗聚集结构域抗体), Nat Biotechnol. 2004 年 9 月; 22(9):1161-5)。在该选择过程中,将文库集

合，并且源自两轮选择的克隆产生了 dAb，如 DOM 1h-131-53，认为其热稳定性更高。推测这些克隆具有更好的生物物理特征。将克隆 DOM 1h-131-53 中的一些框架突变形成种系，以产生克隆 DOM 1h-131-83。该克隆形成了进一步通过寡-定向单个 CDR 突变来多样化的基础，可以使用如上所述的噬菌体展示选择或使用体外区室化技术，该技术使用乳液。噬菌体展示策略产生了前导 DOM 1h-131-117 和 DOM 1h-131-151。体外区室化技术产生了 DOM 1h-131-151。

在该阶段，在生物物理和生物测试中比较了这三个前导，DOM 1h-131-511 是具有最佳特征的分子。此外，测试了这些分子在胰蛋白酶或 leucozyme 的存在下对蛋白水解分裂的抵抗性。Leucozyme 由来自囊性纤维化患者的集合痰液组成，并含有高水平的弹性蛋白酶和其他蛋白酶，并用作肺病体内状况的替代品。该数据表明全部三种前导 DOM 1h-131-117、DOM 1h-131-151 和 DOM 1h-131-511 在胰蛋白酶或 leucozyme 的存在下快速降解。这种发现引起了对 DOM 1h-131-511 在患者中时的体内持久性的关注，并且研发了一种策略来选择对胰蛋白酶提高的抵抗性。推测这种提高的胰蛋白酶抗性对分子的其他生物物理特征具有有益作用。实际上，改进了标准噬菌体选择方法，以允许在对抗原选择之前在蛋白酶的存在下进行选择。因此，工程化了一种新的噬菌体载体，其中检测 c-myc 标记物，以允许在胰蛋白酶存在下的选择而没有分裂展示 dAb 的噬菌体。产生了基于易出错文库的 DOM 1h-131-511，并在 pDOM33 载体中克隆（对于 pDOM33 载体图谱，参见图 50）。用 1mg/ml 或 100µg/ml 胰蛋白酶在 37℃ 下将从该文库产生的噬菌体备料处理 24 小时，随后将 Roche Complete Protease Inhibitors (2x) 的蛋白酶抑制剂加入，以在对相关抗原选择之前阻断胰蛋白酶活性。进行了四轮选择。在胰蛋白酶（100µg/ml 或 1000µg/ml 终胰蛋白酶浓度）的存在或不存在下在 37℃ 下温育一小时或过夜的过程中，使用 BIAcore™ 测定可溶性表达的 TNFR1 结合 dAb，测定其在蛋白酶存在或不存在下结合 TNFR1 的能力。

这导致两种前导分子 DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-13-206 的分离，这证明了提高的蛋白酶抗性，如通过 BIAcore™ 抗原结合实验所显示的。感兴趣的是注意到与 DOM 1h-131-511 相比，DOM 1h-131-202 只在 CDR2 (V53D) 中含有一个突变，所有氨基酸编号根据 Kabat，而 DOM

1h-131-206 只含有两个突变：第一突变与 DOM 1h-131-202 中的相同（CDR2 中的 V53D 突变），第二突变是 FR3 中的 Y91H 突变（参见，图 3）。该 FR3 中的 Y91H 突变在 3-20 人种系基因中没有发生，表明该残基在人抗体中产生。三个克隆 DOM 1h-131-511、DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 具有如图 3 中所示的氨基酸序列。

如下测定分子的活性：

DOM 1H-131-202、DOM 1H-131-511 和 DOM 1H-131-206 与人 TNFR1 结合的 BIAcore™ 结合亲和性测定。

通过 BIAcore™ 分析测定 DOM 1H-131-202、DOM 1H-131-511 和 DOM 1H-13-206 对结合人重组大肠杆菌表达的人 TNFR1 的结合亲和性。使用生物素化的人 TNFR1 进行分析。将 1400RU 生物素化的 TNFR1 覆盖在抗生物素蛋白链菌素（SA）芯片上。使用弱酸洗脱条件将表面再生回基线。使用 50 μ l/min 的流速，将限定浓度的 DOM 1H-131-202、DOM 1H-131-511 和 DOM 1H-131-206 通过该表面。在 BIAcore™ 3000 机器上进行工作，并分析数据和使其适合 1:1 的结合模型。对于所有测试的分子，结合数据充分适合 1:1 模型。从 k_{on} 和 k_{off} 速率计算所有 K_D 值。在 25℃ 下进行 BIAcore™ 运行。

从三个单独的实验产生以下的数据。在每个实验中，通过平均匹配的数量来计算结果，对于 k_d ，使用最高的 dAb 浓度，对于 k_a ，使用较低的浓度。数据作为结果的平均和标准偏差（括号中）来呈现（表 1）。

表 1: DOM 1H-131-202、DOM 1H-131-511 和 DOM 1H-13-206 结合人 TNFR1 的 BIAcore™ 数据

	k_{on}	k_{off}	K_D (nM)
DOM1H-131-511 (511)	5.03E+05 (1.07E+05)	5.06E-04 (1.01E-04)	1.07 (0.44)
DOM1H-131-202 (202)	1.02E+06 (2.69E+05)	5.42E-04 (3.69E-05)	0.55 (0.11)
DOM1H-131-206 (206)	1.55E+06 (3.57E+05)	7.25E-04 (1.95E-04)	0.47 (0.06)

DOM 1H-131-202、DOM 1H-131-511 和 DOM 1H-13-206 相似地结合，并对人 TNFR1 具有高亲和性。DOM 1H-131-202 和 DOM 1H-13-206 各自以 0.55nM 和 0.47nM 的平均亲和性结合。与 DOM 1H-131-511 相比（其具有 1.07nM 的平均亲和性），DOM 1H-131-202 和 DOM 1H-13-206 两者具有略高的亲和性。

受体结合测试：

在受体结合测试中测定 dAb 对抗人 TNFR1 的效力。该测试测量了 TNF- α 与 TNFR1 的结合和可溶性 dAb 阻断这种相互作用的能力。在预先覆盖山羊抗人 IgG（H&L）的珠子上捕获 TNFR1-FC 融合体。在黑边透明圆底 384 孔平板中用 TNF- α （10mg/ml）、dAb、生物素缀合的抗-TNF- α 和抗生物素蛋白链菌素 alexa fluor647 培养受体覆盖的珠子。6 小时后，在 ABI 8200 Cellular Detection 系统上阅读平板，并测定珠子相连的荧光。如果 dAb 阻断 TNF- α 结合 TNFR1，荧光强度将降低。

使用 ABI 8200 分析软件分析数据。使用 GraphPad Prism 和具有可变斜率的 S 形剂量应答曲线测定浓度效应曲线和功效（EC₅₀）值。对三种分开的情况重复测试。在每次实验中包括 TNF- α 剂量曲线（图 38 和 39）。用于与 dAb 竞争结合 TNFR1（10ng/ml）的 TNF- α 浓度大约为该测试中最大 TNF- α 应答的 90%。

代表性的图显示于图 39 中，显示了 dAb 抑制 TNF- α 结合 TNFR1 的能力。在所有三个实验中，阴性对照样品（HEL4，抗-鸡蛋白 lysozyme dAb 和 V_H dummy）在高浓度下微弱地抑制 TNF- α 和 TNFR1 之间的相互作用。对于测试样品和阳性对照（获自 R&D Systems 的抗-TNFR1 mAb，mAb 225）和 EnbrelTM（etanercept；由连接 IgG1 的 Fc 部分的 TNFR2 组成的二聚融合体；得到许可用于治疗类风湿性关节炎）的平均功效（EC₅₀）值显示于表 2 中。

表 2：在三次重复实验的 TNFR1 受体结合测试中对 DOM 1H-131-202、DOM 1H-131-206 和 DOM 1H-13-511 的功效 (EC_{50}) 值。

样品	平均 EC_{50} (nM)	SEM
DOM1H-131-202	0.11	0.008
DOM1H-131-206	0.07	0.01
DOM1H-131-511	0.19	0.01
Enbrel™ (Etanercept)	0.20	0.07
抗-TNFR1 mAb # mAb225	0.08	0.003

在该测试中，DOM 1H-131-206 显示出比其他两个测试的 dAb 功效高，并具有与可购得的抗-TNFR1 mAb，MAB225 (R&D Systems) 相似的功效。

如下进行来自巴斯德毕赤酵母的前导克隆的表达：

将三个前导分子的一级氨基酸序列用来产生用于在巴斯德毕赤酵母中分泌表达的密码子优化基因。在密码子优化和非密码子优化的 DOM 1H-131-206 之间存在 75% 的序列同一性。将三个合成基因克隆至表达载体 pPIC-Z α 中 (来自 Invitrogen)，然后转化至两个毕赤酵母菌株中，X33 和 KM71H。将转化的细胞涂布于递增浓度的 Zeocin (100、300、600 和 900 μ g/ml) 上，来选择具有多个成分的克隆。对于每个细胞系和构建体，选择大约 15 个克隆，用于表达筛选。因为高/低基因拷贝数之间的校正和表达水平在巴斯德毕赤酵母中没有完全理解，从 Zeocin 浓度范围中选择了几个克隆。使用没有对高生产力大范围筛选的克隆来进行 5L 发酵罐运行。这使得生产了大量的材料用于进一步研究。

用于蛋白质表征的材料生产：

基于蛋白 A 的色谱树脂已经广泛用于从微生物培养上清液中纯化 V_H dAb。尽管这使得可以用单步骤纯化方法用于生产高纯度材料，但通常在 >90% 的大部分情况中，对于一些分子，低 pH 洗脱条件会导致聚集物的形成。还存在亲和性树脂对 dAb 能力有限的问题；这意味着需要使用大量树脂来处理来自发酵罐的材料。为了产生高质量的材料用于表征以及进一步的稳定性和喷雾器研究，使用混合模型电荷诱导树脂作为主

要的捕获步骤接着阴离子交换来设计下游纯化方法。没有明显的优化，这使得回收了~70% 纯度为~95%的表达的 dAb。

对于混合模型电荷诱导树脂上(来自 GE Healthcare 的 Capto MMC)的捕获步骤，使用 50mM 磷酸钠 pH6.0 进行柱平衡，并且装载上清液，而不需要稀释或 pH 调节。柱子洗涤后，使用 50mM Tris pH9.0 的洗脱缓冲液通过 pH 梯度洗脱蛋白质。特定的洗涤和梯度条件将根据待洗脱蛋白质的 pI 而略有改变。

然后使用流过步骤进一步纯化洗脱物峰，使用阴离子交换色谱。这除去了残余的 HMW 污染，如醇氧化酶和还原酶内毒素。用 PBS 或不含盐的磷酸盐缓冲液 pH7.4 将树脂平衡。将来自 Capto MMC 的洗脱物装载在阴离子交换树脂上时，dAb 没有结合，并从流过物中回收。内毒素和其他污染物结合树脂。如果使用 PBS 缓冲液，盐的存在将该步骤中的蛋白质回收提高至 91%，而无盐获得了 86%回收。

然而，盐的存在降低内毒素除去的有效性，使得与没有盐存在时获得的水平<1.0EU/ml 相比较，使用盐的该步骤后的 dAb 的通常内毒素水平测量为 58EU/ml。

蛋白质表征:

将产自 5L 发酵罐运行的材料进行表征，使用电喷雾质谱进行同一性分析，氨基端测序和等电子聚焦，以及使用 SDS-PAGE 和 Gelcode 糖蛋白染色试剂盒 (Pierce) 测定纯度。

同一性:

每个蛋白的头五个残基的氨基酸末端序列分析与预期的相同 (EVQLL...)。对蛋白质样品进行了质谱分析，该样品已经使用 C4 Zip-tips (Millipore) 缓冲交换至 50:50 H₂O:含有 10%冰醋酸的乙腈中。允许与内部二硫化物键的形成为-2 的质量差异时，对于三个蛋白各自测量的质量在基于一级氨基酸序列的理论质量的 0.5Da 内 (使用平均质量来计算)。IEF 用来鉴定蛋白质，基于每种蛋白质各不相同的 pI。

纯度:

将三种蛋白质以 1μg 和 10μg 的量装载于非还原 SDS-PAGE 凝胶上，

重复两份。在所有情况中观察到单个条带。还进行了大小排阻色谱来证明了纯度的水平。对于大小排阻色谱 (SEC)，将 100 μ g 的各种蛋白装载于 TOSOH G2000 SWXL 柱上，以 0.5ml/min 流动。移动相为 PBS/10% 乙醇。

对候选物选择的 dAb 稳定性的研究

对于 COPD 的指示，需要将 dAb 递送至肺，例如使用喷雾器装置。这将意味着蛋白质将可能经历各种剪切和热应激，这取决于所用的喷雾器类型，并将接受肺环境中蛋白酶的酶降解。测定了使用这种类型的装置来递送蛋白质，是否形成正确的颗粒大小分布并在喷雾器递送后保持功能性。因此，研究了各个分子对各种物理应力的内在稳定性，来测定基线稳定性和最敏感稳定性指示测试。因为每种蛋白质的稳定性将取决于其溶解的缓冲液，因此需要一些预配制的工作。该信息，如缓冲液、pH，对于理解下游纯化过程和随后的存储过程中的蛋白质稳定性也是有用的。为了表征分子在暴露于各种物理应力过程中的变化，使用了各种分析技术，如分子排阻色谱 (SEC)、SDS-PAGE 和等电点聚焦 (IEF)。

DOM 1H-131-202、DOM 1H-131-511 和 DOM 1H-131-206 的蛋白酶稳定性测定：

通过在过量蛋白酶下预温育限定的时间点后残余结合活性的 BIAcoreTM 分析来测定 DOM 1H-131-202、DOM 1H-131-511 和 DOM 1H-131-206 的蛋白酶稳定性。将大约 1400RU 的生物素化 TNFR1 覆盖抗生物素蛋白链菌素 (SA) 芯片。只用 PBS 或用 100 μ g/ml 胰蛋白酶、弹性蛋白酶或 leucozyme 来温育 250nM 的 DOM 1H-131-202、DOM 1H-131-511 和 DOM 1H-131-206，在 30 $^{\circ}$ C 下持续 1、3 和 24 小时。通过加入蛋白酶抑制剂的混合物来停止反应。然后使用参考细胞减少将 dAb/蛋白酶混合物在 TNFR1 覆盖的芯片上通过。在每个注射循环之间用 10 μ l 0.1M 甘氨酸使芯片表面再生。相对于没有蛋白酶的 dAb 结合，测定用蛋白酶预温育的结合人 TNFR1 (在 10 秒时) 的 DOM 1H-131-202、DOM 1H-131-511 和 DOM 1H-131-206 的部分。在 25 $^{\circ}$ C 下进行 BIAcoreTM 运行。

从三个独立的实验产生数据。条形图表示平均值，而误差棒表示结果的标准偏差 (对于结果，参见图 24)。

发现 DOM 1H-131-202 和 DOM 1H-131-206 与 DOM 1H-131-511 相比, 显示出对胰蛋白酶、弹性蛋白酶或 leucozyme 的蛋白水解降解具有更高的抵抗力。用胰蛋白酶 1hr 后和用弹性蛋白酶或 leucozyme 3hr 后, DOM 1H-131-202 和 DOM 1H-131-206 与 DOM 1H-131-511 相比之间的差异最明显。

使用 DSC 测定的热稳定性:

为了测定分子具有最大稳定性的 pH, 使用差示扫描量热法 (DSC) 来测量 Britton-Robinson 缓冲液中各种 dAb 的解链温度 (T_m)。因为 Britton-Robinson 是由三种成分的缓冲体系 (醋酸盐、磷酸盐和硼酸盐) 制成的, 因此可能在相同的溶液中产生 3-10 的 pH 范围。从蛋白质一级氨基酸序列测定理论 pI。从 DSC, 发现 dAb 具有最高内在热稳定性的 pH, 对于 DOM 1H-131-202 (202) 为 pH7, 对于 DOM 1H-131-206 (206) 为 pH 7-7.5, 和对于 DOM 1H-131-511 (511), 为 pH7.5。对于所有随后的应力和稳定性工作, 对于各种 dAb, 使用以下的 pH; 在 Britton-Robinson 缓冲液中, 对于 DOM 1H-131-202 (202) 和 DOM 1H-131-206 (206) 为 pH 7.0, 而对于 DOM 1H-131-511 (511) 为 pH 7.5。结果概括于以下的表 3 中:

表 3: 在 Britton-Robinson 缓冲液中, 以 1mg/ml 通过 DSC 测定的 DOM 1H-131-202 (202)、DOM 1H-131-206 (206) 和 DOM 1H-131-511 (511) 的 pH 和 T_m 的概括

dAb	获得最大内在热稳定性的 pH	在给定 pH 下的 dAb 的 T_m (°C)
DOM1H-131-202 (202)	7.0	68.6
DOM1H-131-206 (206)	7.0-7.5	65.8
DOM1H-131-511 (511)	7.5	58.0

内在稳定性测试:

在离心 Vivaspin 浓缩器 (5K 截留) 中浓缩所有前导 dAb, 来测定

最大的稳定性和浓缩时的回收水平。在 Britton-Robinson 缓冲液中最稳定的 pH 下进行实验。在整个时间过程中测量样品体积和浓度，记录与预期浓度的偏差以及样品的回收百分比。

发现将所有蛋白在 Britton-Robinson 缓冲液中浓度至超过 100mg/ml。与 DOM 1H-131-511 (511) 相比，DOM 1H-131-202 (202) 和 DOM 1H-131-206 (206) 显示出低于预期的回收，但仍然在可接受的水平内。

前导 dAb 的喷雾器递送:

通过测试不同的喷雾器和配制缓冲剂，证明了使用各种喷雾装置能有效地递送 dAb。更重要地，第一次表明了配制缓冲液中的 dAb 的喷雾产生了有效肺递送所需的粒径分布（使用 $<5\mu\text{m}$ 的液滴的百分比来比较），同时维持了蛋白的功能性。以下将对这进一步描述。

在不同装置中的性能比较:

在六个喷雾器装置中测试了 DOM 1H-131-511 (511)，对于液体制剂的三个主要喷雾器组的每组，包括两个装置，三组喷雾器即超声波喷雾器、喷射喷雾器和振动筛喷雾器。在每个装置中，使用各种 PEG 浓度，测试 5mg/ml 的 dAb。对于每个样品，使用 Malvern Spraytek 装置 (Malvern Instruments Limited, UK) 测量液滴大小 $<5\mu\text{m}$ 的百分比，并且在图 35 中显示了结果。使用 SEC 测定喷雾后每个样品的稳定性，以分析在杯子中剩余的材料中和在收集的气溶胶中已经二聚的样品量。在图 36 中可看到结果。二聚物形成的程度越低，稳定性越高。

大部分装置可以递送 40% 或更多的正确大小范围中的液体制剂，但 eFlow（振动筛喷雾器装置）和 PARI LC（喷射喷雾器）装置进行地较好，缓冲液中包括 PEG 时，PARI LC*（星号）装置递送超过 80%。使用 eFlow 也观察到了这种用 PEG 的递送提高，而使用 PARI LC+，程度较低。

重要地，还发现在喷雾后，保持了 dAb 的活性（参见图 8 中的结果）。

缓冲添加剂的作用:

由于 DOM 1H-131-511 (511) 较低的稳定性，50mM 磷酸盐配制缓

冲剂含有 PEG 1000 和蔗糖, 并且具有限定为约等于含有 1.2% (w/v 蔗糖) 的 50mM 磷酸盐缓冲液中约 2% 至约 10% PEG 1000 溶液粘度的范围内的粘度, 以帮助保护 dAb 免受剪切和热应激。因为 DOM 1H-131-202 (202) 和 DOM 1H-131-206 (206) 都具有较高的 T_m , 并显示出显著提高的对热应力的稳定性, 在最初的配制缓冲液和 Britton-Robinson 缓冲液中 (其具有低于配制缓冲液的粘度) 测试了所有的分子。在 E-flow 和 Pari LC+ 装置中测试了 dAb, 在 5mg/ml 的蛋白质浓度下使用 3.5 分钟的运行时间, 并使用 Malvern Sparmtek 装置测定粒径分布。作为比较, 在其自身的配制缓冲液中测试了使用喷雾器装置递送的用于囊性纤维化的市售药物 (称为标准蛋白 X)。结果显示于图 37 中。对于良好递送和分布至深肺中, 理想的粒径为小于 6 微米, 例如, $<5\mu\text{m}$ 。在 Britton-Robinson 缓冲液和配制缓冲液中 (如之前所述的), 所有 dAb 获得了低于 $5\mu\text{m}$ 的可比较的粒径水平。然而, 配制缓冲液较高的粘度对产生正确大小范围内的颗粒特别有益, 例如, 颗粒 $<5\mu\text{m}$ 。在喷雾之前和之后通过 A_{280} 测量来测定装置杯中的 dAb 浓度。发现了蛋白质浓度没有显著变化, 表明在递送过程中没有优先将蛋白质或载体喷雾。

结论:

如上所述, 已经证明了可以在各种可购得的喷雾器装置中将多肽如 dAb 进行喷雾, 重要的是在喷雾后保持稳定性和生物活性, 并且在喷雾后不存在观察到的明显聚集。将提高粘度的赋形剂如 PEG 加入缓冲液制剂中时, 可以提高粒径分布和液滴大小小于 $5\mu\text{m}$ 的百分比, 因此潜在地提高了将 dAb 递送至深肺。

还可以通过提高 dAb 的浓度和递送时间来提高 dAb 至肺部的递送, 例如, 高达约 40mg/ml 的浓度, 而 dAb 稳定性或活性没有任何降低。

实施例 1

噬菌体载体 pDOM13

使用了丝状噬菌体 (fd) 展示载体, pDOM13。该载体产生具有噬菌体外壳蛋白 III 的融合蛋白。图 1 中说明了 pDOM13 的多个克隆位点。作为 *SalI/NotI* 片段来克隆编码 dAb 的基因。

实施例 2

对噬菌体展示的具有各种胰蛋白酶抗性的结构域抗体 (dAb) 测试 蛋白酶选择

在 pDOM13 中克隆编码 dAb DOM 4-130-54(其结合 IL-1R1)、DOM 1h-131-511(其结合 TNFR1) 以及 DOM 15-10、DOM15-26 和 DOM15-26-501(这些结合 VEGFA) 的基因, 并根据标准技术产生展示这些 dAb 的噬菌体。通过 PEG 沉淀来纯化噬菌体, 并重悬浮于 PBS 中和滴定。

作为分离的蛋白测试时, 以上的 dAb 展示了各种抵抗胰蛋白酶降解的能力。如下测定对降解的抵抗力: 用 40 μ g/ml 的胰蛋白酶在 30 $^{\circ}$ C 下温育 PBS 中的 dAb (1mg/ml), 获得了 25:1 dAb:胰蛋白酶的分子比例。在加入胰蛋白酶之前, 然后在 T=1 小时、3 小时和 24 小时时, 立即取样 (30 μ l)。通过加入 Roche Complete 蛋白酶抑制剂 (2x) 来中和蛋白酶活性, 接着浸入液氮中, 并储存在干冰上。随后通过在 Novex 10-20% Tricine 凝胶上的电泳来分析 15 μ g 的各种 dAb 样品, 并用 SureBlue (1x) 将蛋白质染色。

在头三个小时的过程中, DOM15-10 和 DOM 15-26-501 得到了明显消化。DOM 15-26、DOM 4-130-54 和 DOM 1h-131-511 更稳定, dAb 的消化只在 24 小时后变得明显 (图 2)。

还在胰蛋白酶存在下温育了噬菌体展示的 dAb, 以评价噬菌体展示的 dAb 的胰蛋白酶抗性是否与使用分离的可溶性 dAb 获得的结果相关联。测试了各种浓度的胰蛋白酶和温育时间。在所有情况中, 用 Roche Complete 蛋白酶抑制剂中和胰蛋白酶后, 测试了噬菌体结合通用配体的能力, 通用配体为蛋白 A (其结合所有 V_H 结构域抗体 (例如, DOM 1h-131、DOM 15-26、DOM 15-26-501)) 或蛋白 L (其结合所有 V_k 结构域抗体 (例如, DOM 4-130-54、DOM15-10))。还测试了噬菌体结合目标抗原。在两种情况中, 设想结合与 dAb 通过抵抗蛋白水解保持结构完整性相关。通过 ELISA (使用对抗噬菌体的缀合抗体) 或通过结合的噬菌体的洗脱和按指数生长的大肠杆菌 TG1 细胞感染后的滴定度分析来测量结合活性。

用噬菌体上的 DOM 15-10、DOM15-26 和 DOM 15-26-501 进行测试

在室温下用各种胰蛋白酶浓度（100 μ g/ml、10 μ g/ml 和 0 μ g/ml）处理每种 dAb 一小时。用 Roche Complete 蛋白酶抑制剂（1X）阻断胰蛋白酶活性，然后将噬菌体稀释于 PBS 中的 2% Marvell 中，在室温下用 50nM 生物素化的抗原（重组人 VEGF（R&D systems））温育一小时。加入在室温下用 PBS 中的 2% Marvell 预封闭一小时的抗生物素蛋白链菌素覆盖的珠子（Dynabeads M-280（Invitrogen）），然后将混合物在室温下温育五分钟。使用 Dynabeads 的所有温育步骤在转轮上进行。通过用 1ml PBS 中的 0.1% 吐温-20 将珠子洗涤八次来洗掉未结合的噬菌体。用 0.5ml 的 0.1M 甘氨酸 pH2.2 洗脱结合的噬菌体，并用 100 μ l 1M Tris-HCl pH8.0 中和。使用洗脱的噬菌体来感染按指数生长的 TG1 细胞（在 37 $^{\circ}$ C 下一小时），并涂布于四环素平板上。将平板在 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜，并进行菌落计数（参见表 4）。从用 100 μ g/ml 胰蛋白酶温育的选择观察到最好的结果。与 DOM 15-10 和 DOM 15-26-501 相比较，DOM 15-26 的产量提高约 10 倍。

在更严格的温育条件下进行第二个实验来进一步证实这些结果。伴随搅拌（250rpm）将展示 dAb 的噬菌体在 37 $^{\circ}$ C 下处理 1 小时或 2 小时。从用 100 μ g/ml 胰蛋白酶温育 2 小时的选择观察到最好的结果。DOM15-26 的产量高于 DOM 15-26-501 的产量 200 倍，高于 DOM 15-10 的产量 1000 倍。

在第三个实验中，开始时将展示 DOM 15-26 和 DOM 15-26-501 的噬菌体以 1:1 混合。然后伴随搅拌（250rpm）用胰蛋白酶（1000 μ g/ml）或没用胰蛋白酶在 37 $^{\circ}$ C 下温育 2 小时，然后如上所述选择抗原结合。来自每个选择的十个克隆的测序揭示对于没用胰蛋白酶的预处理的克隆混合群（DOM 15-26: 4/10; DOM 15-26-501: 6/10），而来自用胰蛋白酶选择的编码 DOM 15-26 的所有克隆和预期一样。

这些实验表明通过将蛋白酶加入展示 dAb 的噬菌体中可以获得选择压力，使得（在通用配体或抗原上淘选后）优先选择展示对蛋白水解最稳定 dAb 的噬菌体。

表 4

实验	温育长度	温度	胰蛋白酶浓度	DOM15-26 滴定度	DOM15-26-501 滴定度	1:1 混合 滴定度	DOM15-10 滴定度
1 输入 10^{10}	1hr	室温	100 $\mu\text{g/ml}$	1.6×10^8	6.3×10^7		1.1×10^7
	1hr	室温	10 $\mu\text{g/ml}$	3×10^8	4.4×10^8		2.4×10^8
	1hr	室温	0 $\mu\text{g/ml}$	0.9×10^8	2×10^8		0.7×10^8
2 输入 10^9	1hr, 250rpm	37°C	100 $\mu\text{g/ml}$	2×10^7	1×10^6		1×10^5
	2hr, 250rpm	37°C	100 $\mu\text{g/ml}$	1×10^7	6×10^4		1×10^4
	2hr, 250rpm	37°C	0 $\mu\text{g/ml}$	5.4×10^7	4.1×10^7		3×10^8
3 输入 10^{10}	2h, 250rpm	37°C	100 $\mu\text{g/ml}$	2.3×10^8	8×10^5	6.8×10^7	
	2h, 250rpm	37°C	0 $\mu\text{g/ml}$	3.9×10^8	4.4×10^8	4.8×10^8	

用噬菌体上的 DOM 4-130-54 进行测试

用以上所述的相似实验方案测试了 DOM 4-130-54。改变的参数如下：胰蛋白酶的浓度、温育的温度和长度。对抗 PBS 中 1nM 浓度的 IL-RI-Fc (IL-1R1 和 Fc 的融合体) 来进行生物淘选。只在 37°C 下用 100 $\mu\text{g/ml}$ 胰蛋白酶温育噬菌体后观察到噬菌体滴定度的显著降低 (参见表 5)

表 5

温育长度	温度	胰蛋白酶浓度	滴定度
1hr	室温	100 $\mu\text{g/ml}$	1.8×10^{10}
1hr	室温	10 $\mu\text{g/ml}$	7.2×10^9
1hr	室温	0 $\mu\text{g/ml}$	6.6×10^9
过夜	室温	100 $\mu\text{g/ml}$	2.16×10^9
过夜	室温	10 $\mu\text{g/ml}$	7.2×10^9
过夜	室温	0 $\mu\text{g/ml}$	7.8×10^9
过夜	37°C	100 $\mu\text{g/ml}$	2.04×10^6
过夜	37°C	10 $\mu\text{g/ml}$	3.84×10^8
过夜	37°C	0 $\mu\text{g/ml}$	7.2×10^9

用 DOM 1h-131 噬菌体的测试

在室温下用 0 μ g/ml、10 μ g/ml、100 μ g/ml 和 1000 μ g/ml 胰蛋白酶处理 DOM 1h-131 噬菌体（对于氨基酸序列，与 DOM 1h-131-511 密切相关）一小时。通过加入 25x Complete 蛋白酶抑制剂（Roche）来抑制消化。沿着用 1nM TNFR1 覆盖的 ELISA 平板进行噬菌体的连续 2-倍稀释，并用抗 M13-HRP 检测结合噬菌体。结果显示于以下的表 6 中。

表 6

DOM1h-131				
胰蛋白酶浓度				噬菌体 输入
1 mg/ml	100 μ g/ml	10 μ g/ml	0 μ g/ml	
0.284	0.418	0.784	0.916	4.51E+10
0.229	0.377	0.802	0.944	2.26E+10
0.183	0.284	0.860	0.949	1.13E+10
0.133	0.196	0.695	0.962	5.64E+09
0.114	0.141	0.573	0.946	2.82E+09
0.089	0.115	0.409	0.850	1.41E+09
0.084	0.084	0.286	0.705	7.05E+08
0.080	0.084	0.213	0.577	3.52E+08

这些测试实验清楚地表明了 100 μ g/ml 胰蛋白酶和 37 $^{\circ}$ C 的温度适于将选择压力施加于对胰蛋白酶的蛋白水解有不同程度抵抗性的展示 dAb 的噬菌体。如果需要，对于每种展示 dAb 的噬菌体，优化蛋白酶的温育时间。

实施例 3

展示结构域抗体组的噬菌体的蛋白酶选择

使用以下 dAb 作为母体分子形成了四个组：DOM 4-130-54、DOM 1h-131-511、DOM 15-10 和 DOM 15-26-555。对于 50 μ l 反应，使用 Stratagene Mutazyme II 试剂盒、生物素化的引物和 5-50pg 的模板，通过 PCR 在基因中引入随机突变。用 *Sal*I 和 *Not*I 消化后，用抗生物素蛋白链菌素-覆盖的珠子从未消化的产品中纯化出插入片段，并在相应位点连

接 pDOM13。用纯化的连接混合物转化大肠杆菌 TB1 细胞, 形成四环素抗性克隆的大组: 8.5×10^8 (DOM 4-130-54)、 1.5×10^9 (DOM 1h-131-511)、 6×10^8 (DOM 15-10) 和 3×10^9 (DOM 15-26-555)。

通过用 PEG 双重沉淀来制备噬菌体文库, 并重悬浮于 PBS 中。

对于 DOM 1h-131-511 和 DOM 4-130-54 组, 氨基酸突变的比例各自为 2.3 和 4.4。通过使用蛋白 A 或蛋白 L (以 $1 \mu\text{g/ml}$) 覆盖的孔在噬菌体 ELISA 中测试 96 个克隆来测定功能性。在 DOM 1h-131-511 和 DOM 4-130-54 组中, 各自有 62.5% 和 27% 的克隆呈现出 dAb 的功能性展示。

对于 DOM 15-10 和 DOM 15-26-555 组, 氨基酸突变的比例各自为 2.5 和 4.6。通过使用蛋白 A 或蛋白 L (以 $1 \mu\text{g/ml}$) 覆盖的孔在噬菌体 ELISA 中测试 96 个克隆来测定功能性。在 DOM 15-10 和 DOM 15-26-555 组中, 各自有 31.3% 和 10.4% 的克隆呈现出 dAb 的功能性展示。

DOM 4-130-54 和 DOM 1h-131-511 组

用这些文库进行了四轮选择, 来选择具有提高的蛋白酶抗性的 dAb。

第一轮选择是通过抗原结合 (1 nM 或 10 nM 抗原), 没有使用蛋白酶处理来清理文库, 以除去任何不再以高亲和性结合抗原的克隆。第 1 轮的结果为 10^8 - 10^{10} 范围 (与 10^{11} 噬菌体的输入相比), 表明大部分文库以高亲和性结合抗原。

在第 2 轮中, 引入了使用 $100 \mu\text{g/ml}$ 胰蛋白酶的蛋白酶处理, 并且结果如以下表 7 中所示。

表 7

胰蛋白酶温度 条件	DOM1h-131-511 文库	DOM4-130-54 文库
37°C 过夜	1.86×10^6	2.1×10^6
37°C 2hrs	4.8×10^8	5.1×10^8
2hrs 室温	1.2×10^9	4.62×10^9
无胰蛋白酶	$\sim 1 \times 10^9$	$\sim 4 \times 10^9$
无抗原	1.8×10^4	$< 6 \times 10^3$

用胰蛋白酶在 37°C 下处理 dAb 过夜时, 存在显著的选择。将该结

果带至第3轮,其中用1mg/ml或100 μ g/ml胰蛋白酶在37 $^{\circ}$ C下将噬菌体处理24小时。第3轮的胰蛋白酶处理过的噬菌体的滴定度对于DOM 1h-131-511组为 10^5 - 10^6 ,对于DOM 4-130-154组为 10^7 - 10^8 。

来自第3轮的所有结果(用1mg/ml和100 μ g/ml的DOM 1h-131-511和DOM 4-130-154)经历了对抗1nM抗原的第四轮选择,使用100 μ g/ml胰蛋白酶。滴定度在 10^6 - 10^8 的范围内,与第3轮中看到的相似。对于DOM 1H-131-511组,看到一些富集,但对于DOM 4-130-54组,没有看到富集。

DOM 15-10 和 DOM 15-26-555 组

用2nM生物素化的hVEGF(人血管内皮生长因子)浓缩物进行第一轮选择,并且没有使用蛋白酶处理来清理文库,以除去任何不再以高亲和性结合抗原的克隆。第1轮的结果为 10^8 (对于DOM 15-10,与 10^{11} 噬菌体的输入相比,对于DOM 15-26-555,为 10^{11} 噬菌体),表明大部分文库以高亲和性结合抗原。

用2nM生物素化的hVEGF进行第二轮和第三轮选择。在hVEGF淘选之前,在胰蛋白酶(100 μ g/ml)存在下,在摇床(250rpm)中37 $^{\circ}$ C下培养噬菌体。对于DOM15-10组,培养时间为一小时,对于DOM 15-26-555组,为两小时。

结果如下:对于使用DOM 15-10组的第二轮和第三轮选择,为 1.5×10^6 和 9×10^5 ;对于使用DOM 15-26-555的第二轮和第三轮选择,为 2.2×10^8 和 3.9×10^9 。

实施例 4

选择结果的分析: DOM 4-130-54 和 DOM 1h-131-511 组

将来自第3轮和第4轮的所有结果亚克隆至pDOM5载体中,并转化至JM83细胞中。pDOM5载体是基于pUC119的载体。通过Plac启动子驱动蛋白质的表达。GAS1前导序列(参见WO2005/093074)确保了分离的可溶性dAb分泌至大肠杆菌JM83的周质和培养物上清液中。随机挑选来自第3轮和第4轮的96和72个单独的克隆,用于表达。

将各自来自第3轮和第4轮结果的12-24个克隆测序。在两个选择中都观察到了共有突变,并且选择大约25个带有共有基序的克隆用于

进一步的表征。这些克隆的氨基酸序列显示于图 3 (DOM 1h-131-151 选择的变体) 和图 4 (DOM 4-130-54 选择的变体) 中, 并作为 DNA 序列列于图 19A-19L 中。将不同于选定克隆中亲本序列的氨基酸高亮显示(相同的那些用圆点来标记)。用框显示对应于 CDR1、CDR2 和 CDR3 的环。

这些克隆以较大的量表达, 并在蛋白 L (对于 DOM 4-130-54 变体) 和蛋白 A (对于 DOM 1h-131-511 变体) 上纯化, 在胰蛋白酶 (100 μ g/ml 或 1000 μ g/ml 终浓度) 存在或不存在下在 37 $^{\circ}$ C 下温育一小时或过夜后, 在 BIAcore 上测试抗原结合。

通常, 来自 DOM 4-130-54 选择的结果更稳定, 对于一小时, 大部分克隆保持对胰蛋白酶的抗性, 对于过夜, 最佳克隆保持抗性。相反, 对于一小时, 来自 DOM 1h-131-511 选择的少量克隆能抵抗胰蛋白酶, 对于过夜, 没有一个克隆有抵抗力。

实施例 5

选择结果的分析: DOM 15-10 和 DOM 15-26-555 组

首先在使用或没有使用胰蛋白酶消化的单克隆噬菌体 ELISA 上测试了用胰蛋白酶预处理的选择的有效性。挑选了每个文库第二轮选择的十八个克隆和第三轮选择的 24 个克隆。将克隆 DOM 15-10、DOM 15-26-501 和 DOM 15-26 用作对照。另外的对照包括第二轮和第三轮胰蛋白酶选择后来自每个文库的扩增并纯化的噬菌体溶液。

将每个噬菌体样品分成两个部分, 第一部分用 100 μ g/ml 胰蛋白酶处理, 第二部分没有用胰蛋白酶处理。两个部分的温育在 37 $^{\circ}$ C 下进行一小时, 伴随搅拌 (250rpm), 并通过加入 Roche Complete 蛋白酶抑制剂 (1x) 阻断。

使用胰蛋白酶消化的和未消化的样品进行噬菌体 ELISA。用 0.1M 碳酸氢盐缓冲液中浓度为 1 μ g/ml 的中性链亲和素覆盖 ELISA 孔。用 PBS 的洗涤步骤和用 PBS 中的 1%吐温-20 封闭抗原覆盖的孔之后, 用稀释于 PBS 中 1%吐温-20 中的生物素化 hVEGF 覆盖孔, 浓度为 100ng/ml。接着, 用 PBS 洗涤孔, 并加入用 1%吐温-20/PBS 1:1 稀释的处理过的或未处理过的噬菌体上清液。在 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟后, 用 1%吐温-20/PBS 洗涤孔, 接着在 37 $^{\circ}$ C 下用抗-M13 噬菌体-HRP 缀合物 (在 1%吐温-20/PBS

中 1/5000 稀释) 温育 30 分钟。然后用 PBS 和辣根过氧化物酶洗涤孔。通过加入 SureBlue 试剂启动反应。约十分钟后, 用等体积的 1M HCl 停止反应, 并在 OD450_{nM} 阅读孔。

用胰蛋白酶处理的不稳定对照 DOM 15-10 和 DOM 15-26-501 的 ELISA 读数获得低于 0.404 的 OD₄₅₀, 并且确定该值为不稳定克隆的边缘值。认为产生低于 0.404OD 的所有样品是不稳定的。认为所有超过该值的样品是稳定的。

表 8

文库	胰蛋白酶		无胰蛋白酶	
	第2轮 选择	第3轮 选择	第2轮 选择	第3轮 选择
DOM15-10	33%	89%	100%	100%
DOM15-26-555	94.4%	100%	100%	100%

表 8 显示了每个文库第二轮和第三轮胰蛋白酶选择后稳定克隆的百分比。在第三轮选择后, 可以看到两个文库中胰蛋白酶抗性克隆的富集。在胰蛋白酶消化后的每种情况中, 含有扩增的纯化噬菌体混合物的对照 ELISA 孔的值在每次选择后都远高于 0.404。此外, 将来自第三轮选择的胰蛋白酶处理过的噬菌体与来自第二轮选择的胰蛋白酶处理过的噬菌体相比较时, 观察到信号略有升高。DOM 15-10 噬菌体文库显示出起始值约 14% 的升高。DOM 15-26-555 噬菌体文库显示出表示约 2% 起始值的升高。

所有这些结果表明用胰蛋白酶预处理的选择能有效地从 DOM 15-10 和 DOM15-26-555 组中选择胰蛋白酶抗性噬菌体克隆。

将来自第二和第三轮选择 (DOM 15-26-555) 以及只来自第三轮选择 (DOM 15-10) 的所有结果亚克隆至 pDOM5 载体中, 并转化至 HB2151 电感受态细胞中。pDOM5 载体是基于 pUC199 的载体。通过 Plac 启动子来驱动蛋白质的表达。GAS1 前导序列确保分离的可溶性 dAb 分泌至大肠杆菌 HB2151 的周质和培养物上清液中。从每轮选择 (3 和 4) 随机挑选 184 个单独的克隆, 用于在 1ml 培养物体积中表达。

将细菌上清液稀释于 HBS-EP BIAcore 缓冲液中 (1:1 体积比) 并分

成两份。将 20 μ g/ml 终浓度的胰蛋白酶只加入一个瓶中。伴随搅拌 (250rpm) 在 37 $^{\circ}$ C 下进行温育 40 分钟。用 Roche Complete 蛋白酶抑制剂 (1X) 阻断反应后, 在 BIAcore 3000 上测试胰蛋白酶处理过的或未处理的噬菌体上清液的抗原结合 (SA 传感器芯片上 2,000RU 生物素化的 hVEGF)。

挑选克隆的标准是: 相对于未处理的 dAb, <15% 用胰蛋白酶处理过的 dAb 的抗原结合降低 (基于选定时间点达到的最大 RU), 这通常将反映出 dAb 对蛋白酶处理的稳定性; dAb 从抗原分离的过程中, 两个时间点之间 <40% 的解离率降低。基于这些值, 将来自 DOM 15-26-555 文库的第二和第三轮选择的 60 个克隆以及来自 DOM 15-10 文库的第三轮选择的 17 个克隆测序。在两个文库的结果中观察到共有突变, 从每个带有共有基序的文库中选择 17 个克隆, 用于进一步的表征。这些克隆的氨基酸序列显示于图 5 (DOM 15-26-555 选择的变体) 和图 6 (DOM 15-10 选择的变体) 中, 并且作为 DNA 序列列于图 20A-20E 中。将不同于选定克隆中亲本序列的氨基酸高亮显示 (相同的那些用圆点来标记)。用框显示对应于 CDR1、CDR2 和 CDR3 的环。

在 50ml 表达培养物中表达这些克隆, 在 HBS-EP 缓冲液中稀释至 100nM 浓度的蛋白 A (对于 DOM 15-26-555 变体) 或蛋白 L (对于 DOM 15-10 变体) 上纯化, 并在胰蛋白酶 (20 μ g/ml 终浓度) 存在或不存在下伴随搅拌 (250rpm) 在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1.5 小时后, 在 BIAcore 上测试抗原结合。

还使用实施例 2 中所述的方法测试了这些克隆的胰蛋白酶抗性。将蛋白质缓冲交换至 PBS 中, 并浓缩至 1mg/ml。将 25 μ g 蛋白质与 1 μ g 胰蛋白酶 (Promega) 混合并在 30 $^{\circ}$ C 下温育 0 小时和 24 小时。该时间后, 用 Roche Complete 蛋白酶抑制剂 (1X) 和 DTT 阻断反应, 并加入装载剂。将样品在 100 $^{\circ}$ C 下变性五分钟。然后, 通过在 Novex 10-20% Tricine 凝胶上电泳来分析 15 μ g 每种样品, 并且用 SureBlue (1x) 将蛋白质染色。

通常, 来自 DOM 15-26-555 选择的结果更稳定, 在 BIAcore 上测试时, 大部分克隆保持对胰蛋白酶的抗性持续 1.5 小时, 在 SDS-PAGE 上运行时, 持续过夜。相反, 在 SDS-PAGE 上运行时, 只有少量来自 DOM 15-10 选择的克隆对胰蛋白酶的抗性持续过夜。

实施例 6

DOM 1h-131-511 变体的鉴定

更详细地分析 DOM 1h-131-203、DOM 1h-131-204 和 DOM 1h-131-206。用不同浓度的胰蛋白酶（0 至 100 μ g/ml）在 37 $^{\circ}$ C 下温育过夜后，在 BIAcore 上在 500nM 的 dAb 浓度下比较。BIAcore 痕迹显示于图 7 中。结果清楚地显示了两种变体对高浓度胰蛋白酶（100 μ g/ml）的蛋白水解的抗性比它们的亲本更高。还在上述条件下，与它们的亲本一起，比较了两种 dAb，DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206，对抗各种其他蛋白酶，包括 leucozyme、弹性蛋白酶和胰酶，使用 100 μ g/ml 的蛋白酶浓度。对抗所有测试的蛋白酶，与亲本相比较，dAb 显示了提高的对蛋白水解的抗性。对于弹性蛋白酶和 leucozyme 的 BIAcore 痕迹显示于图 8 中。

用 100 μ g/ml 测序级别的胰蛋白酶处理 5 μ M 的每种 dAb 0、1、3 和 24 小时。用 25X Roche Complete 蛋白酶抑制剂抑制反应，并将反应在 4-12% Novex Bis-Tris 凝胶上运行。凝胶显示于图 9 中。

实施例 7

DOM 4-130-54 变体的鉴定

更详细地分析 DOM 4-130-201 和 DOM 4-130-202。用不同浓度的胰蛋白酶（0 至 100 μ g/ml）在 37 $^{\circ}$ C 下温育过夜后，在 BIAcore 上在 500nM 的 dAb 浓度下比较。BIAcore 痕迹显示于图 10 中。结果清楚地显示了所有三种变体对高浓度胰蛋白酶（100 μ g/ml）的蛋白水解的抗性比它们的亲本更高。还在上述条件下，比较了 DOM 4-130-201 和 DOM 4-130-202 与它们的亲本对抗各种其他蛋白酶，包括 leucozyme、弹性蛋白酶和胰酶，使用 100 μ g/ml 的蛋白酶浓度。尽管结果没有使用胰蛋白酶那么明显，但对抗所有测试的蛋白酶，与亲本相比较，前导 dAb 显示了提高的对蛋白水解的抗性。对于弹性蛋白酶和 leucozyme 的 BIAcore 痕迹显示于图 11 中。

用 100 μ g/ml 测序级别的胰蛋白酶处理 5 μ M 的每种 dAb 0、1、3 和 24 小时。用 25X Roche Complete 蛋白酶抑制剂抑制反应，并将反应在 4-12% Novex Bis-Tris 凝胶上运行。凝胶显示于图 9 中。

实施例 8

DOM 1h-131-511 和 DOM 4-130-54 变体的进一步表征

首先使用差示扫描量热法 (DSC) 分析 dAb, 以确定胰蛋白酶抗性提高是否与解链温度 (T_m) 提高相关。胰蛋白酶稳定性的提高与 T_m 的提高相关 (参见表 9)。

表 9

名称	$T_m, ^\circ\text{C}$
DOM1h-131-511	57.9
DOM1h-131-202	67.5
DOM1h-131-203	65.7
DOM1h-131-204	62.3
DOM1h-131-206	64.9
DOM4-130-54	54.1
DOM4-130-201	64.7
DOM4-130-202	64.5

还在基于 MRC-5 细胞的测试中比较了 DOM 1h-131-511 衍生的 dAb (参见表 10)。在该测试中, 测量了 dAb 中和 $\text{TNF}\alpha$ 刺激的 IL-8 释放的能力, 以确定胰蛋白酶稳定性的提高是否导致功效的降低。然而, 该测试中胰蛋白酶抗性 dAb 的活性没有受到明显影响。

表 10

样品	ND50 nM
DOM1h-131-511	1.98
DOM1h-131-511	1.71
DOM1h-131-511 (230307CE)	1.89
DOM1h-131-203 (230307CE)	2.28
DOM1h-131-204 (230307CE)	1.89
DOM1h-131-511	1.46
DOM1h-131-206 (230307CE)	0.71

在受体结合测试中测试 DOM 4-130-54 衍生的 dAb，以观察它们是否具有相同的抑制 IL-1 与 IL-RI 结合的能力（参见表 11）。在该测试中，胰蛋白酶抗性 dAb 的活性没有受到影响。

表 11

dAb	IC50 (nM)
DOM4-130-54	280pM
DOM4-130-201	257pM
DOM4-130-202	254pM

实施例 9

DOM 15-26-555 变体的鉴定

与它们的亲本和两种另外的 dAb，DOM 15-26-594 和 DOM 15-26-595 一起，更详细地分析了 DOM 15-26-588、DOM 15-26-589 和 DOM 15-26-591，这另外两种 dAb 是通过突变形成的，以组合对功效和稳定性具有最大影响的突变（E6V 和 F100S/I）。序列显示于图 12 中。在用 200µg/ml 浓度的胰蛋白酶温育后，以 100nM 的 dAb 浓度，在 BIAcore 上比较克隆对 hVEGF 的结合。伴随搅拌（250rpm），将反应在 37℃ 下进行三小时和 24 小时。最佳克隆 DOM 15-26-593 和亲本的 BIAcore 痕迹显示于图 13 中。其他结果作为图 14 中的图表来表示。结果清楚地表明了所有变体在 24 小时的胰蛋白酶处理后，对蛋白水解的抵抗性高于亲本。

还通过将处理过的和未处理过的样品在 SDS-PAGE 上跑胶检测了 DOM 15-26-593 和亲本的胰蛋白酶抗性。简而言之，将蛋白质缓冲交换至 PBS 中，并浓缩至 1mg/ml。将 25µg 蛋白质与 1µg 测序级别的胰蛋白酶（Promega）混合，并在 30℃ 下温育 0 小时、1 小时、3 小时和 24 小时。该时间后，用 Roche Complete 蛋白酶抑制剂（1x）和 DTT 阻断反应，并加入装载剂。将样品在 100℃ 下变性五分钟。然后，通过在 Novex 10-20% Tricine 凝胶上电泳来分析 15µg 每种样品，并且用 SureBlue（1x）将蛋白质染色。结果显示于图 15 中。该实验中，DOM 15-26-593 的胰蛋白酶抗性特征不同于 BIAcore 实验显示的特征，表明反应条件的差异

将影响胰蛋白酶分裂的最终结果。尽管如此，DOM 15-26-593 比其他选定的克隆具有更好的生物物理特性，以及亲和性，如下所示。还在以下的表 12 中显示了 DOM 15-26-555 变体的特性概述。

表 12

	属性					
	SEC-MALLS		DSC	RBA	BIAcore	胰蛋白酶稳定性
dAb	% 单体	Est. mw	Tm °C	nM	KD nM	% 结合 @ +24 hrs
15-26	0	37-136	64	10	28.2	30
15-26-501	0-40	18-290	51	1.14	9.1	5
15-26-555	0	28-78	63	11.7	26.1	10
15-26-588	10	33	70	27	59.1	15
15-26-589	90	17	63	1.94	9.6	65
15-26-591	20	21-234	63	16	38	35
15-26-593	80	17	65	0.323	3.2	80
15-26-595	60	17	65	0.828	5	70

实施例 10

DOM 15-10 变体的鉴定

与其亲本 DOM 15-10 一起，更详细地分析了 DOM 15-10-11。序列显示于图 16 中。在用 200 μ g/ml 浓度的胰蛋白酶温育后，以 100nM 的 dAb 浓度，在 BIAcore 上比较克隆对 hVEGF 的结合。伴随搅拌(250rpm)，将反应在 37 $^{\circ}$ C 下进行 1 小时、3 小时和 24 小时。这些 dAb 的 BIAcore 显示于图 17 中。结果清楚地表明了选定的变体在 24 小时的胰蛋白酶处理后，对蛋白水解的抵抗性高于亲本。

还通过将处理过的和未处理过的样品的 SDS-PAGE 跑胶检测了前导和亲本的胰蛋白酶抗性。简而言之，将蛋白质缓冲交换至 PBS 中，并浓缩至 1mg/ml。将 25 μ g 蛋白质与 1 μ g 测序级别的胰蛋白酶 (Promega) 混合，并在 30 $^{\circ}$ C 下温育 0 小时、3 小时和 24 小时。该时间后，用 Roche Complete 蛋白酶抑制剂 (1x) 和 DTT 阻断反应，并加入装载剂。将样

品在 100℃下变性五分钟。然后，通过在 Novex 10-20% Tricine 凝胶上电泳来分析 15μg 每种样品，并且用 SureBlue (1x) 将蛋白质染色。结果显示于图 18 中。在该情况中，胰蛋白酶抗性特征与 BIAcore 胰蛋白酶测试非常相关，显示了结合活性直接反映出蛋白质的完整性。

实施例 11

DOM 15-26-555 和 DOM 15-10 变体的进一步表征

使用差示扫描量热法 (DSC) 分析 dAb，以确定胰蛋白酶抗性提高是否与解链温度 (T_m) 提高相关。结果显示于表 13 中。DOM 15-26-555 变体和解链温度之间存在关联。前导 DOM 15-26-588 和 DOM 15-26-555 显示出提高的 T_m，但其他克隆没有。值得注意的是 DOM 15-26-555 和 DOM 15-10 亲本分子 (63.3-63.7℃) 在开始时具有比 DOM 4-130-54 和 DOM 1h-131-511 亲本分子 (开始时的 T_m: 57.9-54.1℃) 具有高得多的 T_m，但整体上，蛋白酶抗性克隆达到了相似范围的 T_m (对于 DOM 1h-131-511/DOM 4-130-54 变体，平均 T_m 为 65.1℃，而对于 DOM 15-26-55/DOM 15-10 变体，平均 T_m 为 64.9℃)。

表 13

名称	T _m °C
DOM15-26-555	63.3
DOM15-26-588	70.1
DOM15-26-589	63
DOM15-26-591	63
DOM15-26-593	65
DOM15-10	63.7
DOM15-10-11	63.3

还在受体结合测试中比较了 dAb，测量 BIAcore 动力学来测定胰蛋白酶稳定性提高是否导致功效降低。然而，测试中 dAb 的活性基本上没受影响，或甚至提高了。表 14 中呈现了该结果。

表 14

克隆 ID	EC ₅₀ (nM)	K _D (nM)
DOM15-26-555	11.7	26.1
DOM15-26-588	27	59.1
DOM15-26-589	1.94	9.6
DOM15-26-591	16	38
DOM15-26-593	0.323	3.2
DOM15-26-594	4.09	15.1
DOM15-26-595	0.828	5
DOM15-10	10.23	23.6
DOM15-10-11	3.58	14.6

提高的 T_m 的优势

大部分蛋白 - 包括结构域抗体 - 以两种状态存在：折叠状态（这导致生物活性分子）和去折叠状态（其不带有功能性活性）。在所有温度下，这两种状态共存，并且每种状态的相对比例通常由常数 K 来决定，常数 K 是折叠和去折叠的动力学常数的函数。通常将解链温度限定为 K=1 时的温度，即，在该温度下，折叠蛋白的部分等于去折叠蛋白的部分。通过使蛋白的分子内相互作用稳定和失去稳定来确定常数 K，并且因此主要是通过蛋白质的氨基酸序列来决定。外部参数，如温度、pH、缓冲液组成、压力，影响着 K，并因此影响解链温度。

对于降解机制，去折叠的蛋白是容易的目标：（i）二硫键的暴露提高了取决于环境的氧化或还原的风险，（ii）提高的主链灵活性偏好自体蛋白水解反应，（iii）肽片段的暴露将目标提供给体内的蛋白酶、生产过程中的蛋白酶以及下游加工和长期储存过程中的负载蛋白酶，和（iv）易聚集片段的暴露导致分子间聚集和蛋白沉淀。在所有情况中，发生了蛋白完整性、蛋白含量和蛋白活性的丢失，因此妥协了努力来（i）确保批次可再现性，（ii）确保货架期的长期稳定性和（iii）体内功效。

在自然界中，蛋白质通过进化得到了设计，以在体温下足以进行任务，并且通过体内平衡机制容易地替换。通过生物技术方法制造的治疗蛋白面对不同的环境：通常在外源宿主中通过重组 DNA 技术来生产，

在大的容器中以较高的含量表达，在整个下游加工过程中经历非常重要的 pH 或缓冲液组成的变化，并且最终以高浓度存储在非生理学缓冲液中延长的时间段。新的递送技术（例如，吸入、sc 贴剂、缓慢递送的纳米颗粒）还正在增加治疗蛋白经受的应力。最终，蛋白质工程化技术的出现将导致提高的或完全新的治疗蛋白的产生。因为大部分工程化技术是基于体外技术的，目的在于改变或形成新的氨基酸序列，没有产生逐渐提高生物蛋白的进化方法，因此导致对于应激抵抗力次佳性能的蛋白。

本发明的技术目的在于再现达尔文进化过程中蛋白质面对的条件之一。用在组织重塑和蛋白质体内平衡中起主要作用的蛋白酶浸渍肽或多肽，例如免疫球蛋白单可变域。还测试了任何可以形成对其功能具有提高适合度的蛋白质的特定突变，测试了在其执行功能的环境中适合的能力。在本发明的一个实施方案中，再现了该方法：形成一组肽或多肽变体，并暴露于蛋白酶。在第二个步骤中，将该组变体接触特定的目标。只有那些通过蛋白酶持续降解的蛋白质变体能够啮合目标，并因此例如通过称为“生物淘选”的简单亲和性纯化方法来回收。与体内方法相比，该系统给予了各种优势：蛋白质组可以面对多种条件，例如，各种蛋白酶、浓度较高、持续较长时间、在不同的缓冲液和 pH 中以及在不同的温度下。因此，这种体外技术提供了一种设计蛋白质的方式，与产生它们的那些原始蛋白质相比，这些蛋白质可以在更多的环境中执行功能和保持稳定。显然，这对于生物技术工业，并且特别是治疗蛋白领域，提供了多个优势。

实施例 12：对于蛋白酶抗性前导的 PK 关联

在体内进一步评价了四个 dAb 谱系中每个的亲本 dAb 和蛋白酶抗性 dAb（对于列表和详细内容，参见以下的表 15）

表 15

谱系	dAb ID	对胰蛋白酶的抗性	T _m (°C)	活性 (nM)	ID作为Fc融合体
DOM4-130	DOM4-130-54	良好	54	0.128*	DMS1541
	DOM4-130-202	非常高	64	0.160*	DMS1542
DOM1h-131	DOM1h-131-511	良好	57	0.048†	DMS1543
	DOM1h-131-206	非常高	64	0.047†	DMS1544
DOM15-10	DOM15-10	低	64	0.913†	DMS1546
	DOM15-10-11	高	63	0.577†	DMS1531
DOM15-26	DOM15-26-501(*)	低	52	0.330†	DMS1545
	DOM15-26-593	高	65	0.033†	DMS1529

*: 通过 MRC5/IL-a 生物测试测定的; †: 通过 RBA 测试测定的

标注: DOM 15-26-501 是本专利申请中以上举例的 DOM 15-26-555 的亲本形式。DOM 15-26-555 在 CDR1 (134M) 中具有一个种系氨基酸突变。DOM 15-26-501 具有比 DOM 15-26-555 更低的解链温度 (52 °C v 63.3 °C), 和提高的对胰蛋白酶消化的敏感性。对于 PK 研究, 优于 DOM 15-26-555, 选择了 DOM 15-26-501, 因为其与 DOM 15-26-593 相比, 对于差的稳定性, 是更好的代表。

我们翻译了抵抗性, 如下:

- 1 为低
- 2 为中等
- 3 为良好
- 4 为高
- 5 为非常高

然后这表示亲本分子的胰蛋白酶抗性为:

DOM 4-130-54 良好

DOM 1h-131-511 良好

DOM 15-10 低

DOM 15-26-501 低

同样，对于选定的前导为：

DOM 4-130-202 非常高

DOM 1h-131-206 非常高

DOM 15-10-11 高

DOM 15-26-593 高

因为结构域抗体的大小小（12-15kDa），iv 或 sc 注射时，它们从循环中快速清除。实际上，肾小球过滤的截留为高于 50kDa，并且因此小蛋白如 dAb 不能保持在循环中，因为它们能通过肾脏。因此，为了评价在体内对蛋白酶抗性的长期效果，我们用提高全身停留的部分标记了结构域抗体。文献中已经报道了几种针对延长半衰期的方法（例如，PEG、Fc 融合体、白蛋白融合体等）。在本申请中，已经用人 IgG1 抗体的 Fc 部分标记（或格式化）结构域抗体。这种形式提供了两个优点：（i）所得到 dAb-Fc 的分子大小为~75kDa，这已足够大来确保保持在循环中，（ii）抗体 Fc 部分结合 FcRn 受体（也称为“Brambell”受体）。该受体位于上皮细胞、内皮细胞和肝细胞中，并且涉及延长抗体和白蛋白的寿命：实际上，在抗体和其他血清蛋白胞饮作用时，将蛋白质引向酸化内体，其中 FcRn 受体在通过内体之前中途阻止抗体（通过结合 Fc 部分）并将它们返回循环中。因此，通过将 Fc 部分标记在 dAb 上，确保 dAb 将长期暴露于至少两个区室 - 血清和前-内体区室，其中每种含有特定组的蛋白水解酶。此外，FcRn 受体介导转胞吞作用，由此将带有 Fc 的蛋白质转移至血管外空间或从血管外空间转移出来。

通过将编码 VH 和 VK dAb 的基因融合至编码 IgG1 Fc 的基因来完成用 Fc 的格式化，通过短的插入肽连接物（粗体）：

对于 VH dAb（下划线的）：

EVQ.....GQGTLVTVSSASTHTCPPCPAPPELLGGP...(hIgG1Fc)...PGK*

对于 VK dAb（下划线的）：

DIQ.....GQGTKVEIKRTVAAPSTHTCPPCPAPPELLGGP...(hIgG1Fc)...PGK*

根据标准实验方案使用 293-fectin (Invitrogen) 通过 HEK293/6E 的瞬时转染来产生材料。设计这些细胞用于结合 pTT 系列载体使用时的高水平瞬时表达 (Durocher 等, 2002)。因此, 将 dAb 基因克隆至改良的 pTT5 载体 (pDOM38) 中, 以产生 Fc 融合表达载体 (参见图 21)。在转染后 5 天收集来自转染细胞的上清液, 通过离心和通过 0.2 μ m 滤器过滤来澄清。通过在蛋白 A 流线型树脂 (GE Healthcare) 上捕获来纯化 dAb-Fc 融合蛋白。在 10mM 柠檬酸钠 pH3 中从柱洗脱蛋白质, 接着加入 1M 柠檬酸钠 pH6, 来获得 100mM 柠檬酸钠 pH6 的终浓度。

在大鼠中测试 dAb-Fc 分子的体内半衰期, 将 5mg/kg 的目标剂量给予雌性 Sprague-Dawley 大鼠中 (n=3/组)。应当注意到目标剂量大大超过大鼠中的目标浓度, 因此预期亲本 dAb 和胰蛋白酶抗性 dAb 之间的亲和性差异 (参见实施例 11) 将不会影响分子在体内的命运。因此, 预期在抗原-无关性消除方法中反映出 dAb 之间的 pK 特征差异。

在给药后 0.01、1、4、8、24、48、72、96、120 和 168 小时采取血样。血块形成后, 取出血清, 然后在 hIL-1R1、TNFR1 或 VEGF 抗原捕获测试中测试:

hIL-1R1 抗原捕获测试:

用 4 μ g/mL 抗-hIL-1R1 覆盖

封闭

加入 500ng/mL shIL-1R1

加入样品

用抗人 Fc HRP 检测@1:10,000

TNFR1 抗原捕获测试:

用 0.1 μ g/mL sTNFR1 覆盖

封闭

加入样品

用抗人 Fc HRP 检测@1:10,000

VEGF 抗原捕获:

用 0.25 μ g/mL VEGF 覆盖

封闭

加入样品

用抗人 Fc HRP 检测@1:10,000

将来自这些测试的原始数据转化成每种血清样品中的药物浓度。然后使用非区室分析（NCA）在 WinNonLin 中分析每个时间点的平均 $\mu\text{g/mL}$ 。每种 dAb-Fc 对的 PK 特征显示于表 16 中，该表概括了测定的 PK 参数。

表 16:

ID	dAb	Half Life (hr)	AUC/D (0-inf) (hr* $\mu\text{g/mL}$)/(mg/kg)	推断的AUC%
DMS1541	4-130-54	93.2	691.5	22.7
DMS1542	4-130-202	176.8	710.1	49
DMS1543	1h-131-511	140.8	1807.5	40
DMS1544	1h-131-206	158.6	2173.0	43.6
DMS1546	15-10	43.2	324.6	3.8
DMS1531	15-10-11	56.6	770.5	n.d.
DMS1545	15-26-501	12.9	89	5.1
DMS1529	15-26-593	86.2	804.7	21.0

结果清楚地表明 - 尽管 dAb-Fc 对 4-130-54 和 1h-131-206 的 PK 特征几乎是镜像（superimposable）的 - 特征与其他对变化很大。考虑 AUC/D 时，作用大部分是可见的：15-10 的 AUC/D 只是 15-10-11 的 42%。15-26-501 的 AUC/D 只是 15-26-593 的 11%。这些重要的差异还影响了（程度较低）半衰期：对于 15-10 和 15-10-11，各自为 43.2h vs. 56.6h。使用 DOM 15-26 谱系时，看到了更大的差异：对于 15-26-501 和 15-26-593，各自为 12.9h vs. 86.2h。实际上，对于使用非区室分析的良好 PK 分析，应当存在至少 4 个用于适合线性回归斜率的数据点，并且估算半衰期的时间段应当为计算的半衰期的至少 3 倍。

根据在此实施例中所述的生物物理特征，显示出任何给定的 dAb 抵抗胰蛋白酶降解的能力与 dAb-Fc 融合体在大鼠血清中循环较长的时间段的能力相关。实际上，如实施例 10 所示的，如实施例 10，DOM 15-10

和 DOM 15-26-501 是最可能降解的 dAb: 在 1 μ g 胰蛋白酶存在下将 25 μ g dAb 在 30 $^{\circ}$ C 下温育~3h 导致完全降解。在该研究中, 所有其他 dAb (不管它们是否已经用胰蛋白酶选择(即, DOM 15-10-11、DOM 15-26-593、DOM 4-130-202 和 DOM 1h-13-206) 或和亲本分子一样 (DOM 4-130-54 和 DOM 1h-131-511) 已经具有一定的胰蛋白酶抗性) 再次格式化成 dAb-Fc 分子时, 在大鼠中具有相当的 PK 特征。因此, 本发明的 PK 研究表明那些 dAb 具有非常低的蛋白水解抵抗性时, 对蛋白水解的敏感性对 dAb 的体内稳定性具有最大的影响。还表明了 - 超过一定的水平 - 对胰蛋白酶降解的抵抗性进一步增加 (例如, DOM 4-130-206 v DOM 4-130-54) 没有显著增加 dAb-Fc 分子进一步减缓体内消除的能力。

在三种情况中, 在胰蛋白酶存在下的选择形成了具有提高的热稳定性的新分子 (通过解链温度来限定): DOM 4-130-202、DOM 1h-13-206 和 DOM 15-26-593。PK 研究表明 - 在本发明的数据集中 - 解链温度不是适当的参数来合理化观察到的 PK 特征: 实际上, DOM 15-10 具有高于 DOM 15-10-11 的 T_m , 并且也比 DOM 15-10-11 更快地从循环中清除。在别处, DOM 4-130 谱系的两种 dAb 具有明显不同的 T_m (差 10 $^{\circ}$ C), 并且在格式化成 dAb-Fc 分子时显示出几乎相同的体内稳定性。应当注意到没有排除解链温度本身作为关键参数来预测体内稳定性。它只在使用本发明的数据集时发生, 大的 T_m 差异 (从 54 $^{\circ}$ C 及以上) 对 dAb 的体内命运不具有显著的影响。这没有排除在低于 54 $^{\circ}$ C 的解链温度下, dAb 的体内稳定性与热稳定性相关的可能, 或甚至可能与热稳定性和对蛋白酶抗性都相关。

实施例 13

对 DOM 10-53-474 的胰蛋白酶选择

纯化的 DOM 10-53-474 的胰蛋白酶稳定性:

DOM 10-53-474 是结合 IL-13 的结构域抗体, 具有高的功效。为了测定该 dAb 在胰蛋白酶存在下的稳定性, 用胰蛋白酶消化纯化的 dAb, 持续提高的时间点, 并在凝胶上跑胶来检测任何可能的蛋白质降解。用 1 μ l 1mg/ml 测序级别的胰蛋白酶在 30 $^{\circ}$ C 下温育 25 μ l 1mg/ml 纯化的 DOM 10-53-474, 形成 25:1 dAb:胰蛋白酶的分子比例。用胰蛋白酶温育 dAb 1h、4h 和 24h, 并通过加入 40 μ l Roche complete 蛋白酶抑制剂来中

和蛋白酶活性，接着在冰上温育。通过将蛋白酶抑制剂加入没有添加胰蛋白酶的 dAb 中来制备时间 0 样品。随后根据制造商的说明使用 Labchip 通过电泳分析 2 μ l 的样品。

图 22 显示了用胰蛋白酶温育提高时间点的 DOM 10-53-474 的凝胶电泳。为了比较，还如上所述用胰蛋白酶处理了一种胰蛋白酶稳定的 dAb，DOM 15-26-593，并且在旁侧跑胶。如图中所示的，甚至在用胰蛋白酶温育 24h 后，DOM 15-26-593 显示是稳定的。然而，在 24h 后，DOM 10-53-474 降解至一定的程度，但在 1h 和 4h 时间点时显示为稳定的。这些数据表明 DOM 10-53-474 能在一定程度上抵抗胰蛋白酶的降解，但是没有胰蛋白酶最稳定 dAb 之一的 DOM 15-26-593 那样稳定。

噬菌体展示的 DOM 10-53-474 的胰蛋白酶稳定性：

为了测定噬菌体展示的 DOM 10-53-474 的胰蛋白酶稳定性，将编码 DOM 10-53-474 的基因克隆至 pDOM33 的 *Sal/Not* 位点中（图 50），并根据标准技术产生噬菌体。通过 PEG 沉淀纯化噬菌体，重悬浮于 PBS 中并滴定。

用胰蛋白酶温育噬菌体展示的 dAb 不同的时间点，以评价胰蛋白酶抗性。用胰蛋白酶温育后，感染按指数生长的大肠杆菌 TG1 细胞后通过滴定分析来测量稳定性。

在振荡培养器中，在 37 $^{\circ}$ C 下用 100 μ g/ml 胰蛋白酶温育 100 μ l 噬菌体 1h、2h、4h 和过夜。用 Roche complete 蛋白酶抑制剂（x2）阻断胰蛋白酶活性，然后将噬菌体稀释于 PBS 中的 2% marvell 中，在室温下用 10nM 生物素化的 IL-13 温育一小时。加入在室温下用 PBS 中的 2% marvell 预封闭一小时的抗生物素蛋白链菌素覆盖的珠子（Dynabeads M-280(Invitrogen)），然后将混合物在室温下温育 5 分钟。使用 Dynabeads 的所有温育步骤在转轮上进行。通过用 1ml PBS 中的 0.1% 吐温-20 将珠子洗涤八次来洗掉未结合的噬菌体。用 0.5ml 的 0.1M 甘氨酸 pH2.2 洗脱结合的噬菌体，并用 100 μ l 1M Tris-HCl pH8.0 中和。使用洗脱的噬菌体来感染按指数生长的 TG1 细胞（在 37 $^{\circ}$ C 下 1h），并涂布于四环素平板上。将平板在 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜，并进行菌落计数。用胰蛋白酶消化后的噬菌体结果概括于表 17 中。用胰蛋白酶温育提高的时间点时，噬菌体滴定度降低。24h 温育后，所有噬菌体得到消化。

表 17. 对噬菌体展示的 DOM 10-53-474 亲本进行的胰蛋白酶选择的结果滴定

胰蛋白酶温育长度	胰蛋白酶浓度	滴定度
无胰蛋白酶对照	-	3×10^7
1h	100 $\mu\text{g/ml}$	1×10^7
2h	100 $\mu\text{g/ml}$	7×10^6
4h	100 $\mu\text{g/ml}$	5×10^6
过夜	100 $\mu\text{g/ml}$	0

对胰蛋白酶抗性更大的 dAb 的选择:

为了选择对胰蛋白酶降解抗性更大的 dAb, 对于 50 μl 反应, 使用 Stratagene Mutazyme 11 试剂盒、生物素化的引物和 5-50pg 模板, 通过 PCR 将随机突变引入编码 DOM 10-53-474 的基因中。用 *SalI* 和 *NotI* 消化后, 用抗生物素蛋白链菌素覆盖的珠子从未消化的产物中纯化插入片段, 并在相应位点连接 pDOM33。用纯化的连接混合物转化大肠杆菌 TB1 细胞, 形成 DOM 10-53-474 的易出错文库。文库的大小为 1.9×10^9 , 并且氨基酸的突变率为 1.3。

使用该文库来进行三轮选择来选择具有提高的蛋白酶抗性的 dAb。只使用没有用胰蛋白酶处理的抗原进行第一轮选择, 以清除文库, 来除去任何不再以高亲和性结合抗原的克隆。以 10nM IL-13 进行选择。与 6×10^{10} 的输入噬菌体相比, 第一轮的结果为 2×10^9 , 表明大部分克隆以高亲和性结合抗原。

用 1nM 生物素化的 IL-13 进行第二轮和第三轮选择。在对 IL-13 淘选之前, 用 100 $\mu\text{g/ml}$ 胰蛋白酶在摇床 (250rpm) 中在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养噬菌体。对于第二轮选择, 在室温下或在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行胰蛋白酶温育 1h。第 2 轮选择的结果显示于表 18 中。

表 18. 第二轮选择后的结果噬菌体滴定度

胰蛋白酶处理	滴定度
无处理	1×10^8
室温 1h	5×10^7
1 h 37°C	2×10^7

将来自 37°C 下 1h 胰蛋白酶处理的第 2 轮选择的噬菌体结果用作第 3 轮选择的输入。对于第 3 轮选择，用 100 μ g/ml 胰蛋白酶处理噬菌体，但持续了更长的时间点：37°C 2h，37°C 4h，室温下过夜或 37°C 下过夜。第 3 轮选择的结果滴定度概括于表 19 中。

表 19: 第三轮选择后的结果噬菌体滴定度

胰蛋白酶处理	滴定度
无胰蛋白酶	1.3×10^8
37°C 2h	1.9×10^7
37°C 4h	2×10^6
室温下过夜	4×10^7
37°C 下过夜	2.1×10^6

将第 1、2 和 3 轮的每个选择结果的几个克隆测序，以测定序列多样性。第一轮没有使用胰蛋白酶处理后，50%的选择结果具有亲本 DOM 10-53-474 序列。第 2 轮选择后，亲本的百分比提高至 75%。第 3 轮选择后，亲本的百分比提高至 80%。

该数据表明 DOM 10-53-474 已经能抵抗胰蛋白酶的降解，并且从这些胰蛋白酶选择中没有选择出更多新的克隆。图 22 显示了用胰蛋白酶消化纯化的蛋白时，即使在胰蛋白酶处理过夜后，DOM 10-53-474 也没有完全消化。然而，为了观察选择结果中是否存在胰蛋白酶抗性比 DOM 10-53-474 更高的任何新克隆，将其中用胰蛋白酶在 37°C 下处理过夜噬菌体的选择 3 结果亚克隆至 pDOM5 中。然后将一百个克隆测序，以寻找任何胰蛋白酶抗性克隆。在分析的一百个克隆中，只有 26 个克隆具有新的序列，然而，这些克隆中没有一个在胰蛋白酶分裂位点（赖氨酸

或精氨酸)具有突变,表明这些克隆对胰蛋白酶的抗性没有比 DOM 10-53-474 更高。

实施例 14

存储以及在胰蛋白酶存在下通过噬菌体选择将生物物理改进引入前导 DOM 0101 (抗 TNFR1) dAb 中:

为了提高前导分子 DOM 1h-131-511 的蛋白酶抗性,如之前所述的,在胰蛋白酶存在下进行噬菌体选择。该方法产生了多个与亲本 DOM 1h-131-511 分子相比具有提高的胰蛋白酶稳定性的克隆。选择了两个克隆,DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 用于进一步的表征,因为它们显示出对胰蛋白酶的作用最显著的提高。以下所述的更多工作表明对胰蛋白酶的作用具有提高的抵抗力,存在其他有益的作用,主要在于分子对剪切力和热应力的稳定性。这两个参数对提高生物药物产品的存储和货架期稳定性是关键。

在巴斯德毕赤酵母中生产前导 DOM 0101 dAb:

将编码三个前导分子的一级氨基酸序列的基因用于在巴斯德毕赤酵母中生产分泌的蛋白质。将三个合成基因 (DOM 1h-131-511、DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206) 克隆至表达载体 pPIC-Zα 中,然后转化至两个毕赤酵母株中, X33 和 KM71H。将转化的细胞涂布于递增浓度的 Zeocin 上 (100、300、600 和 900 μg/ml), 以选择具有多个组分的克隆。然后在 2L 烧瓶中筛选几个克隆,以鉴定高表达细胞系。然后将最佳表达的克隆用于在发酵罐中在 5L 规模下生产材料。

蛋白质纯化和材料表征:

为了生产用于表征和进一步稳定性研究的高质量材料,使用混合模型电荷诱导树脂 (Capto MMC) 作为主要的捕获步骤接着阴离子交换 (Q Sepharose) 来设计下游纯化过程。没有明显优化,这使得可以回收~70% 纯度为~95%的表达的 dAb。对于同一性,使用电喷雾质谱、氨基端测序和等电点聚焦来表征材料,对于纯度,使用 SDS-PAGE 和 SEC (大小排阻色谱) 来表征材料。

蛋白质同一性:

每种蛋白质的头五个残基的氨基端序列分析与预期一样 (EVQLL...)。对蛋白质样品进行了质谱分析, 该样品已经使用 C4 Zip-tips (Millipore) 缓冲交换至 50:50 H₂O:含有 10%冰醋酸的乙腈中。允许与内部二硫化物键的形成为-2 的质量差异时, 对于三个蛋白各自测量的质量在基于一级氨基酸序列的理论质量的 0.5Da 内 (使用平均质量来计算)。IEF 用来鉴定蛋白质, 基于每种蛋白质各不相同的 pI。

蛋白质纯度:

将三种蛋白质以 1 μ g 和 10 μ g 的量装载于非还原 SDS-PAGE 凝胶上, 重复两份。在所有情况中观察到单个条带。

还进行了大小排阻色谱来证明了纯度的水平。对于大小排阻色谱 (SEC), 将 100 μ g 的各种蛋白装载于 TOSOH G2000 SWXL 柱上, 以 0.5ml/min 流动。移动相为 PBS/10%乙醇。基于曲线下的面积来计算单体的百分比 (参见图 23)。

DOM 1h-131-511、-202 和-206 的稳定性比较

蛋白酶稳定性的测定:

通过在过量蛋白酶下预温育限定的时间点后残余结合活性的 BIAcore™ 分析来测定 DOM 1h-131-511、DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 的蛋白酶稳定性。将大约 1400RU 的生物素化 TNFR1 覆盖抗生物素蛋白链菌素 (SA) 芯片。只用 PBS 或用 100 μ g/ml 胰蛋白酶、弹性蛋白酶或 leucozyme 来温育 250nM 的 DOM 1h-131-511、DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206, 在 30℃ 下持续 1、3 和 24 小时。通过加入蛋白酶抑制剂的混合物来停止反应。然后使用参考细胞减少将 dAb/蛋白酶混合物在 TNFR1 覆盖的芯片上通过。在每个注射循环之间用 10 μ l 0.1M 甘氨酸使芯片表面再生。相对于没有蛋白酶的 dAb 结合, 测定用蛋白酶预温育的结合人 TNFR1 (在 10 秒时) 的 DOM 1h-131-511、DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 的部分。在 25℃ 下进行 BIAcore™ 运行。从三个独立的实验产生以下的数据。条形图表示平均值, 而误差棒表示结果的标准偏差 (图 24)。

发现 DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 与 DOM 1h-131-511 相比,

显示出对胰蛋白酶、弹性蛋白酶或 leucozyme 的蛋白水解降解具有更高的抵抗力。用胰蛋白酶 1hr 后和用弹性蛋白酶或 leucozyme 3hr 后, DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 与 DOM 1h-131-511 相比之间的差异最明显。存在这样一种倾向: 在大部分测试的条件中, DOM 1h-131-206 比 DOM 1h-131-202 略微更稳定些。

使用 DSC 测定的 dAb 热稳定性:

为了测定分子具有最大稳定性的 pH, 使用差示扫描量热法 (DSC) 来测量 Britton-Robinson 缓冲液中各种 dAb 的解链温度 (T_m)。因为 Britton-Robinson 是由三种成分的缓冲体系 (各自 40mM 的醋酸盐、磷酸盐和硼酸盐) 制成的, 因此可能在相同的溶液中产生 3-10 的 pH 范围。从蛋白质一级氨基酸序列测定理论 pI。从 DSC, 发现 dAb 具有最高内在热稳定性的 pH, 对于 DOM 1h-131-202 为 pH7, 对于 DOM 1h-131-206 为 pH 7-7.5, 和对于 DOM 1h-131-511, 为 pH7.5。对于所有随后的应力和稳定性工作, 对于各种 dAb, 使用以下的 pH; 在 Britton-Robinson 缓冲液中, 对于 DOM 1h-131-202 和 GSK 1995057A DOM 1h-131-206 为 pH 7.0, 而对于 DOM 1h-131-511 为 pH 7.5。结果概括于以下的表 20 中:

表 20: 在 Britton-Robinson 缓冲液中, 以 1mg/ml 通过 DSC 测定的 DOM 1h-131-202、DOM 1h-131-206 和 DOM 1h-131-511 的 pH 和 T_m 的概括。温度变化为 180°C/小时。

dAb	获得最大内在热稳定性的 pH	在给定 pH 下的 dAb 的 T_m (°C)
DOM1h-131-202	7.0	68.6
DOM1h-131-206	7.0-7.5	65.8
DOM1h-131-511	7.5	58.0

两周热稳定性测试

蛋白质在升高的温度下能持续延长时间段的能力通常是稳定性的良好表现。在这些条件下, 蛋白质可能经历几个物理过程, 如聚集或化学变化。将 dAb (1mg/ml) 在 Britton-Robinson 缓冲液中在 37 和 50°C 下温育 14 天。使用 SEC 来测定 14 天的时间段中溶液中剩下多少单体 (图 25)。

从图 25, 可以看出 DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 对热应力的稳定性显著高于 DOM 1h-131-511。将蛋白质暴露于升高的温度下, 如 37 和 50°C, 通常用于获得药物长期半衰期的指示。将这些较高的温度用于加速与室温下长期存储相关的正常过程, 如脱酰胺、氧化或聚集。还可以使用 SEC 监控溶液中聚集形成的水平 (图 26A 至 I)。在 37°C 下 14 天后, 溶液中 DOM 1h-131-511 的丢失归因于沉淀和更高级别的聚集物形成, 如通过 SEC 所测定的 (图 26B)。在 37°C 下 14 天后, 还看到了 DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 显著减少的蛋白质丢失, 并且聚集物形成非常少或基本没有增加, 尤其是在 DOM 1h-131-206 的情况中 (图 26H)。在 50°C 下, 分子间的差异甚至更明显, DOM 1h-131-206 在较高温度下 14 天后显示出高于 DOM 1h-131-202 的稳定性, 表明较高分子量聚集物的形成明显减少 (图 26)。相对于 $t=0$, DOM 1h-131-206 在 14 天后只显示了聚集物形成的少量增加 (图 26I), 而 DOM 1h-131-511 全部从溶液中沉淀出来 (图 26C)。

这表明通过胰蛋白酶选择引入 dAb 中的变化, 例如, 提高的热稳定性, 显著提高了在 37 和 50°C 下的蛋白质存储稳定性。DOM 1h-131-202 和更明显的 DOM 1h-131-206, 清楚地在升高的温度下具有提高的溶液稳定性和较低的形成聚集物的趋势, 这可以直接翻译成在更相关的温度下如 +4°C 和室温下提高的长期存储稳定性。

然后通过 IEF 分析从热应激实验的 24hr、48hr、7 天和 14 天时间点取样, 以观察蛋白质是否经历了将影响蛋白质整体电荷的任何生物物理变化 (图 27)。

再次, 与 DOM 1h-131-511 相比, DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 在 37°C 下显示出没有明显变化。使用 DOM 1h-131-511, 在 37°C 下 24hr 后出现了微弱的第二条条带。认为这条额外的条带是由于蛋白质的二聚化引起的, 因此遮掩了变化并产生了两个分子群。在 50°C 下, 分子间的差异更明显, DOM 1h-131-206 清楚地显示出在升高的温度下没有明显变化, 而 DOM 1h-131-202 在 24hr 后显示出一些变化的信号。Britton-Robinson 中的大部分的 DOM 1h-131-511 在 48hr 后由于沉淀而丢失。

通过 TNFR-1 RBA 分析 50°C 下 $T=0$ 、7 和 14 天时间点, 以确定蛋白质在暴露于高温后的功能性 (图 28)。该测试在检测由于应力引起的

分子细微变化中通常没有 SEC 或 IEF 那样灵敏,但可以使用来显示 dAb 可以结合抗原。

对于 DOM 1h-131-511, 曲线转移至左边, 反映出大部分的 dAb 由于沉淀而丢失的事实。溶液中留下的材料仍然能够结合抗原。如图 25 中所示的, 即使在 14 天后, DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 中的大部分能够维持在溶液中。RBA 显示所有可溶性蛋白质仍然是功能性的并能够结合 TNFR1。

在高蛋白浓度下的存储稳定性测试

进行实验来研究在非常高蛋白浓度下在 4℃ 下的存储稳定性, 以观察每种分子在这些条件下怎样进行。将所有前导 dAb 在 Britton-Robinson 缓冲液中在其最稳定的 pH 下在离心 Vivaspin 浓缩器中 (5K 截留) 浓缩至 ~100mg/ml。然后将 ~100mg/ml 的样品在 4℃ 下保持 7 天, 然后通过 SEC 分析来观察样品在高浓度存储过程中是否已经发生了任何其他物理变化 (图 29)。在 1xPBS 10%乙醇 (v/v) 中的 SEC 柱上运行之前, 将样品稀释至 ~1mg/ml。

从 SEC 痕迹, 可以看出 DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 在 7 天后都没有显示出聚集物形成的任何显著增加, 其中对于 DOM 1h-131-511, 存在单体浓度 ~2% 的降低。

前导 dAb 的喷雾器递送:

对于早期毒理学和临床工作, 将 dAb 配制成液体, 并通过喷雾装置来递送。根据装置 (例如, 超声波、喷射或振动筛), dAb 将经历各种程度的剪切力和热应力, 因为将其喷雾来形成限定粒径的气溶胶。因为与 DOM 1h-131-511 相比, DOM 1h-131-202 和 -206 都具有较高的 T_m , 并显示出显著提高的对热应力的稳定性, 在两个喷雾器装置中测试了所有 dAb, 以观察它们怎样应答喷雾过程中诱导的剪切力/热应力。然后通过 SEC 分析来自喷雾气溶胶的蛋白质和装置中 (即, 杯中) 剩余的 dAb, 以确定该处理过程中产生的聚集量。

在其最稳定的 pH 下在 Britton-Robinson 缓冲液中测试所有分子。在 E-flow Rapid (振动筛) 和 Pari LC+ (喷射喷雾器) 装置中测试了 dAb, 在 5mg/ml 的蛋白质浓度下使用 3.5 分钟的运行时间, 并使用 Malvern

Sparytek 装置测定粒径分布。结果显示于图 30 中。对于良好递送和分布至深肺中，理想的粒径为 $<5\mu\text{m}$ 。在 Britton-Robinson 缓冲液和配制缓冲液中，所有 dAb 获得了低于 $5\mu\text{m}$ 的可比较的粒径水平。在喷雾之前和之后通过 A_{280} 测量来测定装置杯中的 dAb 浓度（数据未显示）。发现了蛋白质浓度没有显著变化，表明在递送过程中没有优先将蛋白质或载体喷雾。

将 Britton-Robinson 缓冲液中喷雾的 dAb 样品在 SEC 上运行，以确定在递送蛋白质的过程中是否经历了任何物理变化。图 31 显示了通过 SEC 测定的杯中或气溶胶中的相对百分比变化。可以看到 DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 相对于 DOM 1h-131-511，经历了相对小的单体浓度变化。这证明了具有提高 T_m 的 DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 对喷雾过程中的聚集具有较低的倾向。

图 32 显示了 Britton-Robinson 缓冲液中的 DOM 1h-131-206 和 DOM 1h-131-511 在喷雾后的实际 SEC 痕迹，并证明了单体的相对损耗（图 31）是由于二聚体形成引起的。这再次给以下的理论提供了更多的支持证据：由 DOM 1h-131-202 和 DOM 1h-131-206 显示的更高热稳定性可以防止明显的聚集，即使是在未优化的配制缓冲液中。

对于毒理学和安全性测定工作，需要将明显高于给予患者的治疗剂量的水平的 dAb 递送至动物。这只能通过使用明显较高的蛋白质浓度和/或在延长的时间段内递送 dAb 来实现。因为已经表明 DOM 1h-131-511 以 5mg/ml 在 3.5min 喷雾过程中形成聚集物，在 PBS 中测试了 40mg/ml 的 DOM 1h-131-206，并使用 Pari LC+喷雾高达 1 小时。在整个运行过程中的不同时间点从杯子和气溶胶中取样，以观察延长的喷雾是否导致 dAb 由于通过 SEC 所测定的剪切力或热应力以及蛋白质浓度（ $A_{280\text{nm}}$ 测量）而聚集。表 21 显示了通过 A_{280} 测定的杯子和气溶胶中的 dAb 蛋白质浓度。

表 21: 测量的使用 Pari LC+的~40mg/ml 的 dAb 喷雾过程中杯子和气溶胶中的 DOM 1h-131-206 的蛋白质浓度,通过 A280 吸光值读数测定的。考虑到稀释误差和仪器误差,在 dAb 喷雾 1hr 后,样品浓度没有变化。

时间 (Mins)	杯样品 (mg/ml)	气溶胶样品 (mg/ml)
1	43.8	43.4
29	44.5	43.5
59	44.6	44.1

从表 21 可以看出蛋白质浓度在运行过程中没有明显变化,证明不存在由于聚集引起的蛋白质明显损耗。图 33 显示了在喷雾的 1 小时时间段中,DOM 1h-131-206 没有形成任何更高级别的聚集物,如二聚物,如通过 SEC 测定的。这清楚地证明了提高的生物物理特性,如通过胰蛋白酶选择引入分子中的,显著提高了 dAb 对剪切力和热应力的抗性,并且这与提高的存储货架期以及将蛋白质喷雾的能力直接相关,使得不形成较高级别的聚集物。

前导 dAb 的溶液状态

因为对于所有三种前导 dAb 的主要降解途径,显示出自缔合最初导致二聚化,接着更多的聚集,并且最终沉淀,通过分析性超离心(AUC)研究这三种前导分子,以测定自缔合的程度。通过两种方法,沉降平衡和沉降速度,来研究蛋白质。

对于沉降平衡方法,在 0.5mg/ml 至 5mg/ml 范围的三种不同浓度下运行三种样品,使用三种不同的转子速度而具有离心作用。通过该方法,测定了 DOM 1h-131-511 是稳定的二聚体(26.1-34.3kDa),DOM 1h-131-202 是单体/二聚体平衡(22.7-27.8kDa),在测量的浓度下具有相对稳定的二聚体状态, $K_d=1.3\mu\text{M}$,DOM 1h-131-206 主要是单体的(15.4-17.9kDa),具有 $360\mu\text{M}$ 从单体至二聚体缔合的 K_d 。

通过沉降速度方法,所有样品显示出稀释时一定程度的解离。从所获得的结果,显示于图 34 中,对于 DOM 1h-131-511 观察到的沉降系数表示了较高级别的聚集物,并且稀释时的峰值位移表示了这些聚集物的

解离。蛋白质聚集和解离相互抵偿，这产生了形成稳定的二聚体的印象，如通过沉降平衡所观察到的。对于 DOM 1h-131-202 观察到的沉降系数，表示了快速动态平衡，因此单体和二聚体峰没有相互分开，产生了单峰，具有高于适于样品质量的沉降系数。该结果与通过沉降平衡方法获得的结果相一致，并且测量解离常数为 $1\mu\text{M}$ 。测定 DOM 1h-131-206 比其他两种样品单体更多，具有 1.9s 的沉降系数，与其他两种样品的 2.5s 相比较。该术语与沉降平衡数据非常一致。在测量的浓度下，低于 $360\mu\text{M}$ 的 $K_d \sim 10$ 倍，样品主要是单体。

实施例 15

DOM 15-26-593 dAb 的功效增强：

图 40 中显示了 DOM 15-26-593 dAb 超过 DOM 15-26 亲本的 VEGFR2 受体结合测试中功效增强的实例。在该测试中，在基于平板的测试中测量了潜在抑制剂防止 VEGF 结合 VEGFR2 的能力。在该测试中，将 VEGFR2-Fc 嵌合体覆盖在 96-孔 ELISA 平板上，并且向其加入预定量的已经用连续稀释的测试 dAb 预温育的 VEGF。洗掉未结合的蛋白质后，用抗-VEGF 抗体检测结合受体的 VEGF 的量，按比色滴定来测定其水平。按作为测试底物浓度函数的 VEGF 结合的抑制百分比将剂量应答效果作图。因此，有效的抑制剂是证明了在低浓度下基本上阻断了配体结合的那种。

FC 融合体功效和半衰期：

VEGF 阻断在肿瘤治疗中的治疗潜能已经实现了超过 30 年。癌症的慢性性质决定了生物药物需要长的血清半衰期来介导它们的作用，但这与通过肾过滤从循环中快速清除游离的 dAb 不相一致。为了测定 VEGF dAb 作为抗血管生成药用于癌症治疗的实用性，通过杂交连接物将前导结构域抗体与野生型人 IgG1 Fc 格式化融合体，使得形成二价分子，其通过使用 FcRn 介导的抗体抢救途径延长了血清半衰期。

在该 Fc 融合体格式中，使用之前所述的测试将前导胰蛋白酶选定 dAb DOM 15-26-593 的功效与最初的亲本 dAb (DOM 15-26) & 胰蛋白酶不稳定 dAb (DOM 15-26-501) 相比较。结果显示于以下的表 22 中：

表 22. Fc 融合体形式的 DOM 15-26 前导的功效 (RBA) & 半衰期特征

dAb	Fc	功效 (nM)	T1/2b (hrs)
DOM15-26	hIgG1	0.506	ND
DOM15-26-501	hIgG1	0.323	12.9
DOM15-26-593	hIgG1	0.033	84.6

从这些结果可以看出, 二聚 Fc 融合体形式, 由于活性的作用, 相对于游离 dAb, 提高了亲和性&功效。清楚的是通过胰蛋白酶选择获得的 DOM 15-26-593 功效增强在该 Fc 形式中得到维持, 甚至更明显。此外, 热和蛋白酶稳定性的增强翻译成分子在体内的药物动力学行为的明显变化。DOM 15-26-593 与 DOM 15-26-501 相比较的消除半衰期的提高 (参见图 41) 很可能是 dAb 提高稳定性的直接后果, 使其对内体区室内发生的降解过程的抵抗性更大。因此, 还预期了具有提高蛋白酶稳定性的 dAb 能够在其他生物区室中持续更长的时间, 其他区室如血清、粘膜表面和各种组织区室, 其中蛋白水解是涉及生物分子翻转的活性过程。

药物动力学清除特征:

以 5mg/kg 的浓度将 DOM 15-26-593 和 DOM 15-26-501 i.v. 给药于 3 只大鼠后, 测量 DOM 15-26-593 和 DOM 15-26-501 的药物动力学清除特征。然后使用直接 VEGF 结合标准 ELISA 测试和抗人 Fc 抗体测量了血清中 DOM 15-26-593 和 DOM 15-26-501 的水平, 因此只检测了血清样品中的完整药物。以下的表 23 中显示了完整的药物动力学特征:

表 23. 大鼠中 DOM 15-26&DOM 15-26-593 Fc 融合体的药物动力学参数概述

dAb	半衰期 (hr)	Cmax (μg/ml)	AUC (0-inf) (hr*μg/ml)	清除 (ml/hr/kg)
DOM15-26-501	12.9	91.4	445.1	11.8
DOM15-26-593	84.6	101.8	3810	1.3

从这些结果可以看出 DOM 15-26-593 具有显著提高的药物动力学

特征，具有，例如，延长的半衰期和降低清除率。

DOM 15-26-593 显著提高的功效和药物动力学特征导致化合物用于各种其他生物物理特性的分析。

溶液状态特征：通过 SEC-MALLs&AUC 的分析：

通过大小排阻色谱-多角度激光散射（SEC-MALLS）和分析性超滤（AUC）测定 DOM 15-26-593 在溶液中的状态。以 $0.3\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速在 Dulbecco's PBS 中（Sigma）在 Superdex 200 GF 柱上（琼脂糖基质）运行 SEC-MALLS，使用折射率（在 Wyatt Optilab rEX 上 RI 检测）和 Wyatt TREOS MALLS 检测仪上的 MALLS 检测。使用 ASTRA 软件分析数据。分析了两个分开批次的 DOM 15-26-593，并且在高达 2.5mg/ml 的浓度下在溶液中，行为和单体一样，具有计算的 78-81KDa 的分子量，与计算的大约 76kDa 的完整分子量相一致。

对于 AUC 分析，将 DOM 15-26-593 在 PBS 中稀释至 0.2、0.5 和 1.0mg/ml 的浓度，并且在 Beckman XL-A 分析性超离心中以 40000rpm 进行沉降速度运行。在 20°C 的设定温度下，以 5 分钟的间隔获取数据。使用 SEDFIT 软件分析数据，并使用 c(S)或 ls-g(s*)程序产生沉降系数分布。

该分析的结果表明 DOM15-26-593 在高达 2.5mg/ml 的浓度下在溶液中，行为和单体一样，具有计算的 78-81KDa 的分子量，与计算的大约 76kDa 的完整分子量相一致（图 42a&42b）。

热解链特性：通过 DSC 的分析

如下进行实验，使用 DOM 15-26-593（和 Fc 融合体）：

使用差示扫描量热法来分析 dAb 和 Fc 融合体的热稳定性。简而言之，将 2mg/ml^{-1} 浓度的蛋白质置于 Microcal 量热器中，使用缓冲液参照。将样品在合适的缓冲液中从 20°C 加热至 100°C ，速率为 $180^\circ\text{C/hr}^{-1}$ ，并且使用“Origin”软件分析热变性数据，使用适于待分析蛋白质性质的匹配模型。

在 Fc 融合体（ 64.5°C ，图 43，上图）中维持了胰蛋白酶选择的 dAb 提高的热稳定性（ 65°C ，图 43，中图）。显示了 DOM 15-26-501 dAb（ 52°C ，图 43，下图）的 T_m 曲线，用于比较。

对冻-融、温度应力和血清成分的稳定性

如下进行实验，使用 DOM 15-26-593（和 Fc 融合体）：

DOM 15-26-593 dAb 的稳定性特征意味着可以接受物理和生物应力，而对其结合 VEGF 的能力具有很小的影响（参见图 44-47(a 和 b)）。在所有情况中，通过 ELISA 测定 VEGF dAb-Fc 融合体与 VEGF 的结合。简而言之，用碳酸盐缓冲液中的 250mg/ml VEGF₁₆₅ 覆盖 96-孔 ELISA 平板。然后在加入稀释于相同缓冲液中的测试底物之前，用 PBS 中的 1%BSA 阻断平板。温育 60 分钟后，洗掉未结合的材料，并且检测结合的材料，使用 1:10,000 稀释的 HRP-缀合的抗人 IgG，接着“SureBlue”发色底物，并用 1M HCl 停止。

例如，将分子从液氮（-196℃）反复冻融至体温（37℃），循环 10 次，没有损耗结合活性，如通过 ELISA 所测定的（图 44）。该处理还导致分子聚集状态没有明显变化，如通过常规大小排阻色谱所测定的（图 45）。此外，测试证明了将分子置于从-80℃至 55℃的不同温度范围下，在 168 小时后，只在最高温育温度下，抗原结合活性中才有少量下降（图 46）。此外，用来自人或猕猴的血清在 37℃温育 14 天时，没有引起抗原结合活性的损耗（图 47a 和 47b），如通过 VEGF 结合 ELISA 所测定的。

VEGFR2 受体结合测试&HUVEC 细胞测试中的功效：

将以上所述的受体结合测试用于测定 DOM 15-26-593 dAb-Fc 融合体的功效（图 48）。发现了 DOM 15-26-593 dAb 在该测试中具有提高的功效，这确定了 dAb 在体外阻断了 VEGF 与 VEGFR2 结合的能力。还在 HUVEC（人脐静脉内皮细胞）测试中证明了 DMS1529 的功效，其中测量了 VEGF 拮抗剂阻断 VEGF 刺激的 HUVE 细胞增殖的能力。简而言之，将大约 4e3 HUVE 细胞分散于 96-孔平板的孔中，向其中加入 VEGF 与连续稀释的测试底物的混合物，使得 VEGF 的终浓度为 5ng/ml，或另外地，通过剂量应答滴定所测定的。将细胞在 37℃下再孵育 4 天，在该时间点，通过使用细胞定量试剂如“CellTiter”来测定细胞数量。这使得可以比色测定 4 天实验过程中与标准相比较的细胞增殖。在固定培养期结束时测定细胞数量，使用预定量的 VEGF 和不同含量的测试物质。观察到拮抗剂功效越大，细胞增殖越低（图 49）。

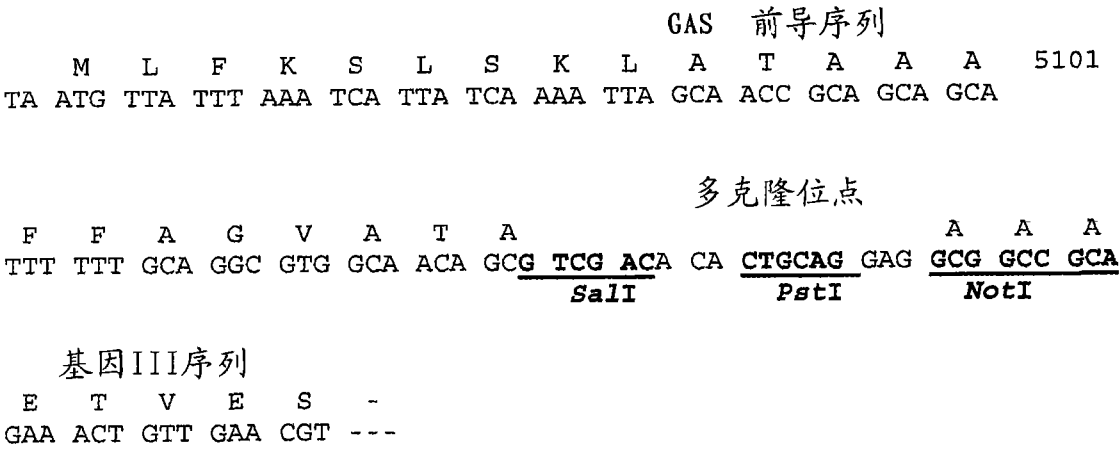


图 1

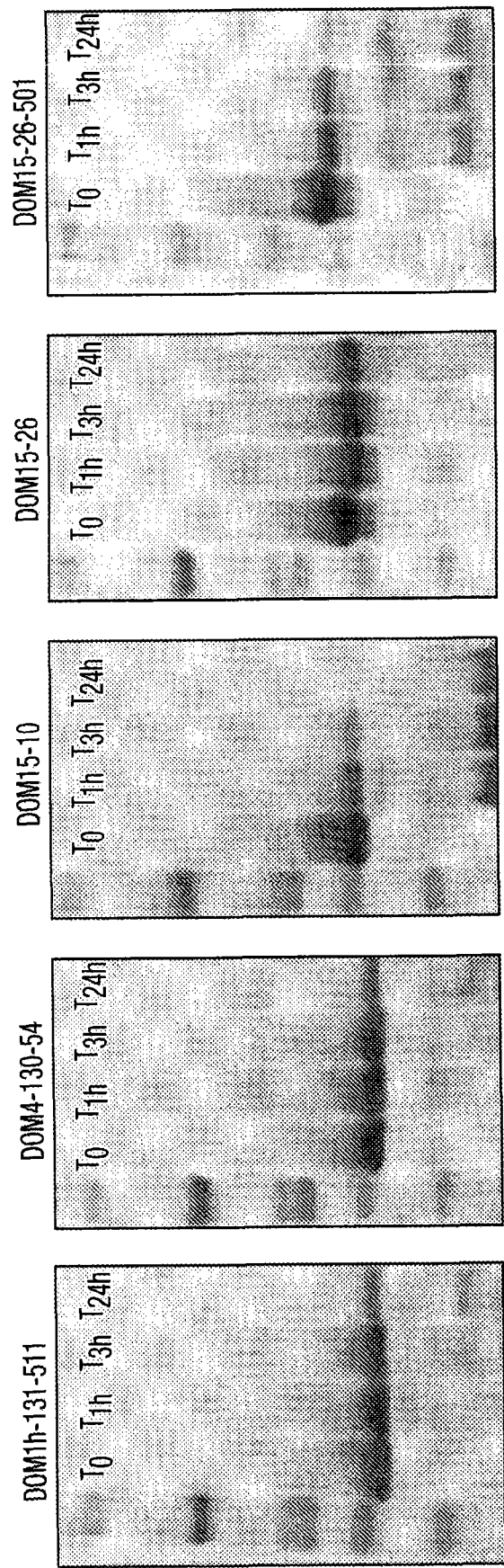


图 2

DOM1h-131-511	EVOLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTT	HEFTWVVRQAPCGLEWYSHIPPVGQDPFY	ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT	FAYYCA	ALLPKRGPWFEDYWGQCTLV	WSS
1-1	M.....					
1-2	A.....					
1-3	N.....					
DOM1h-131-201			D.....			
1-5			N.....			
1-6		A.....	S.....	G.....		
1-7	K.....					
DOM1h-131-202		D.....				
DOM1h-131-203	W.....	D.....			I.....	
DOM1h-131-204	S.....	D.....			N.....	
DOM1h-131-205		D.....			Q.....	
1-12	R.....T.....	D.....S.....				Q.....
1-13	R.....E.....	DS.....			G.....	R.....
1-14		I.....				R.....
1-15					R.....	
DOM1h-131-206		D.....	N.....			
1-18		R.....				
1-19	T.....	D.....				
1-20		R.....				
1-21		SD.....			K.....	
1-22		D.....				
1-23	R.....Q.....				R.....	
1-24					K.....	
1-25		A.....			R.....	

图 3

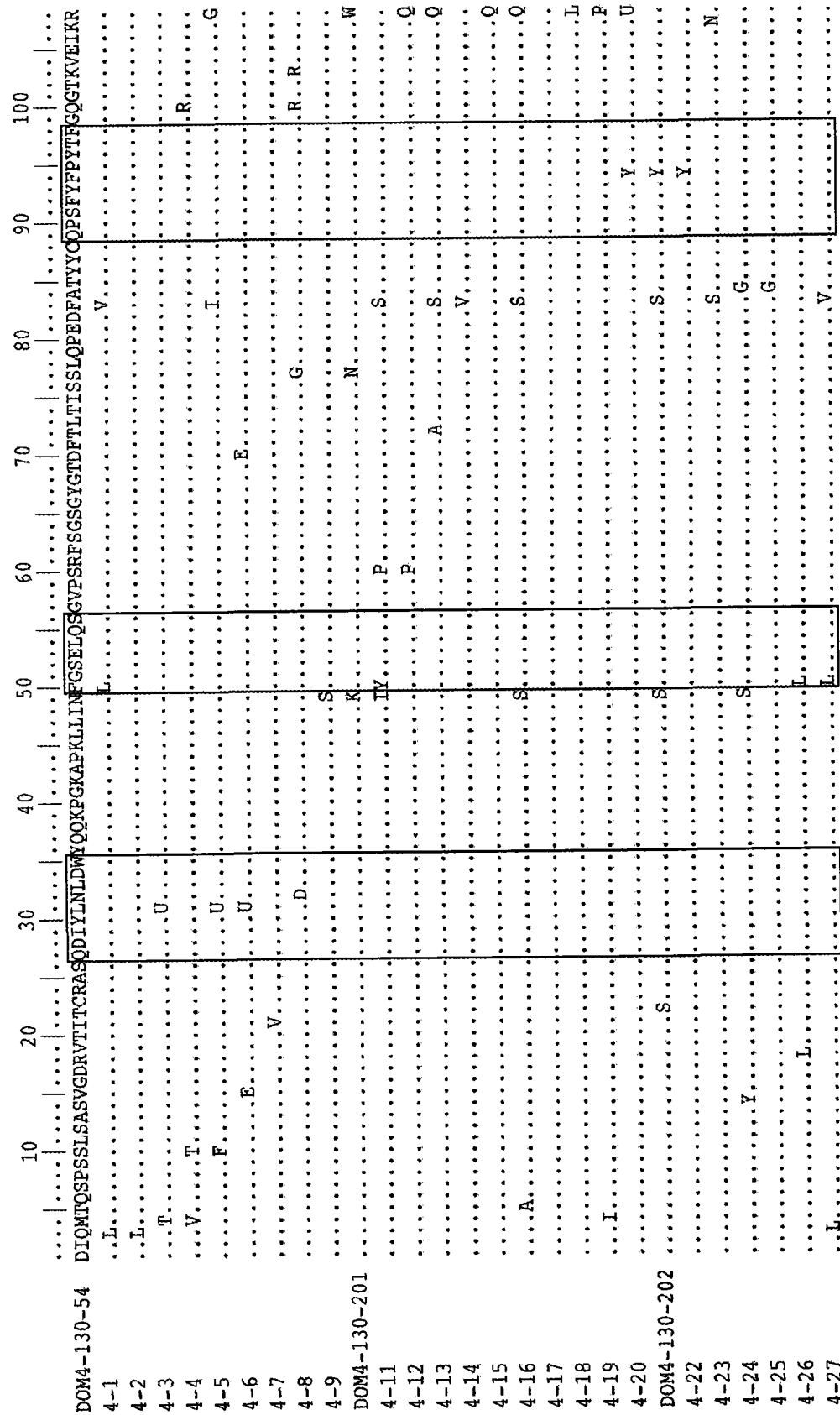


图 4

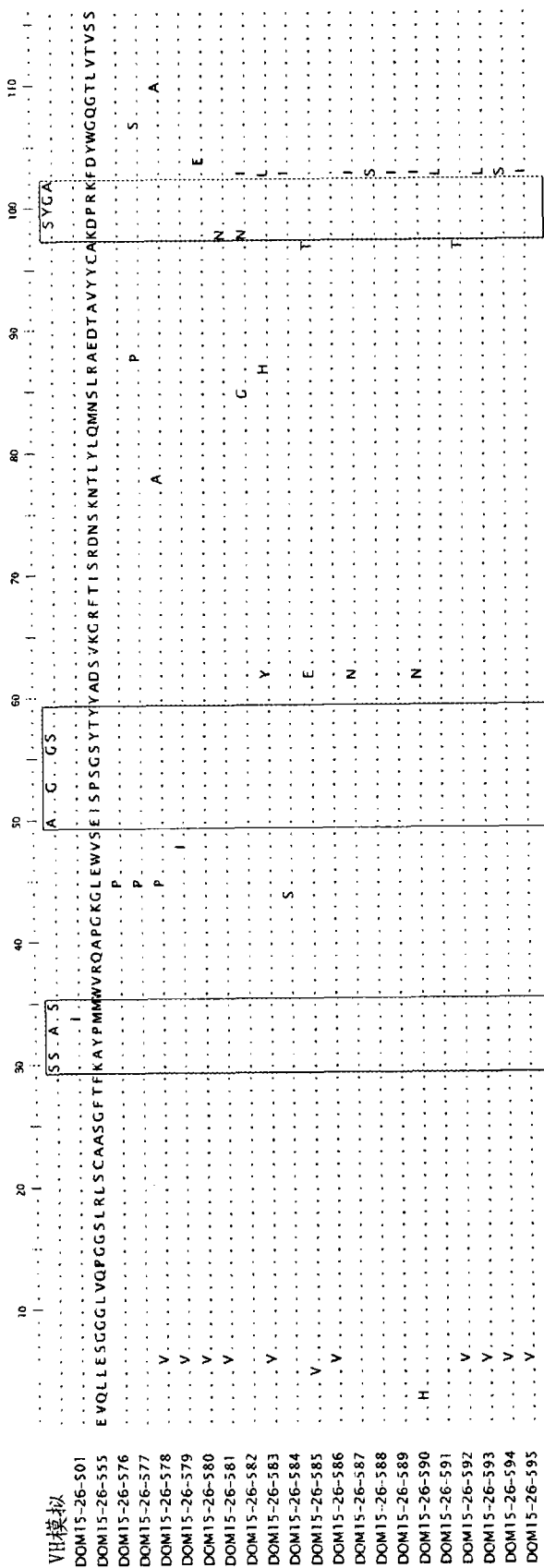


图 5

[illegible]

9

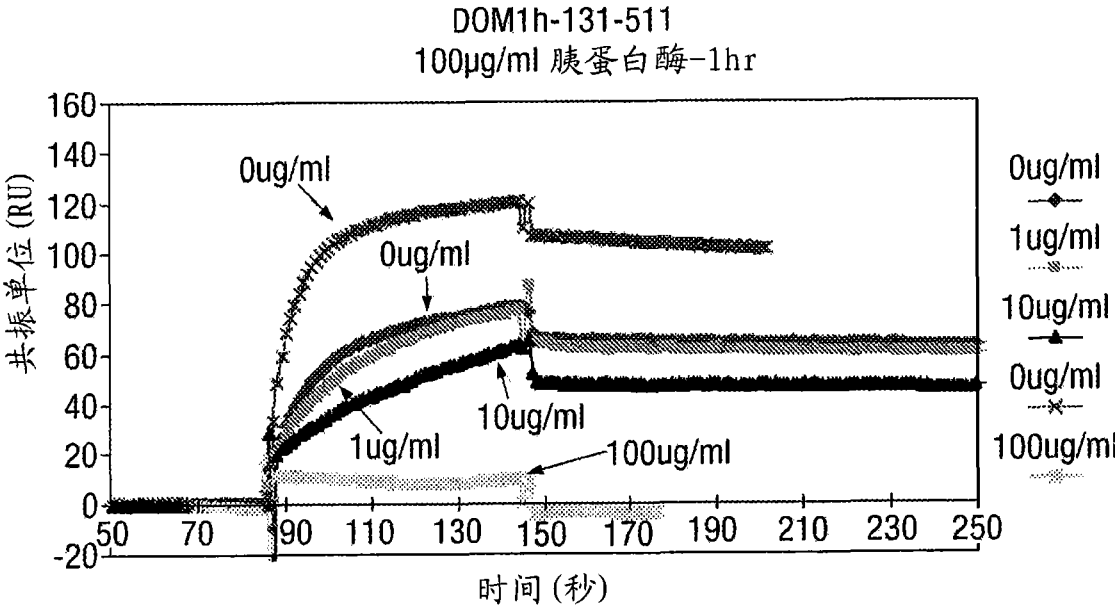


图 7A

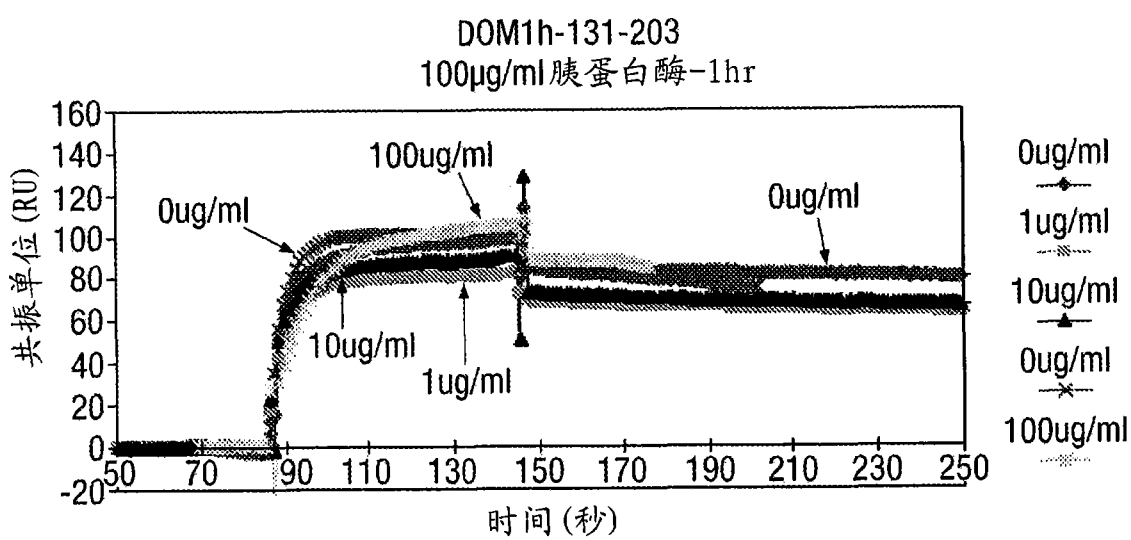


图 7B

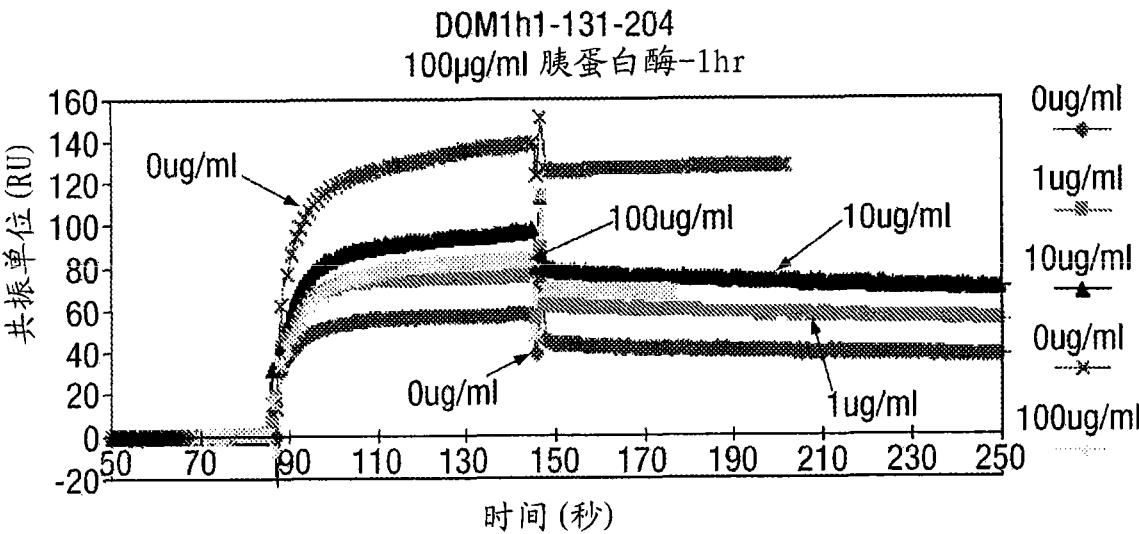


图 7C

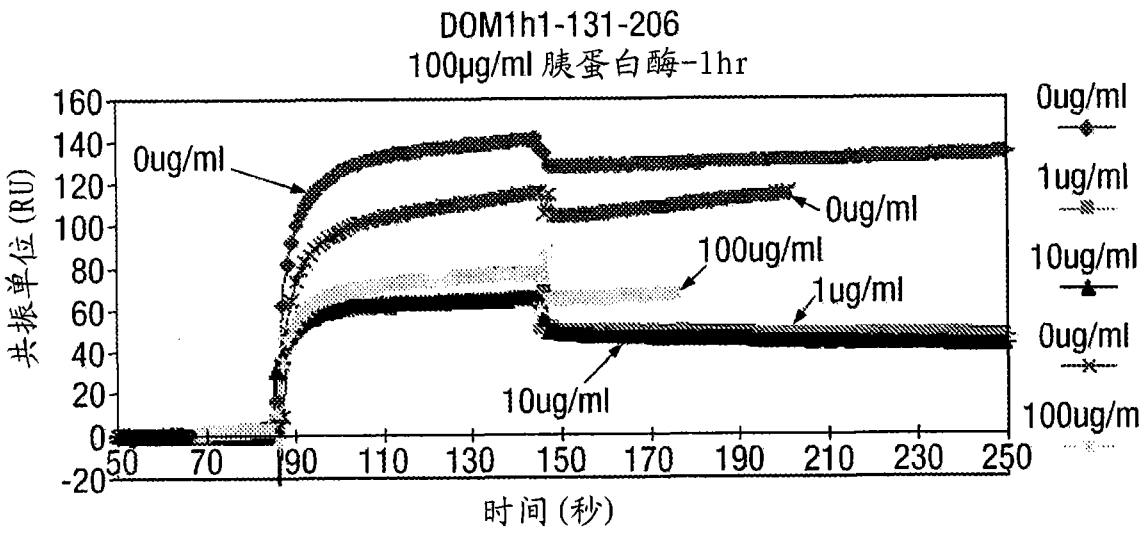


图 7D

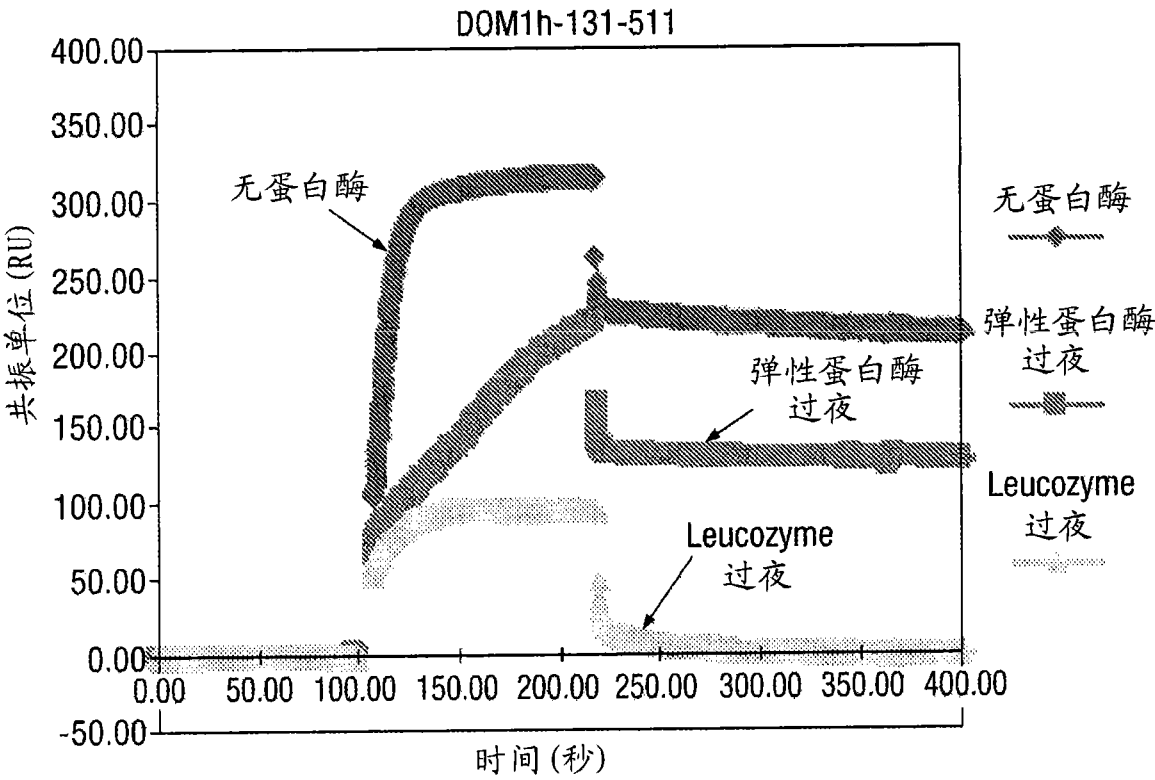


图 8A

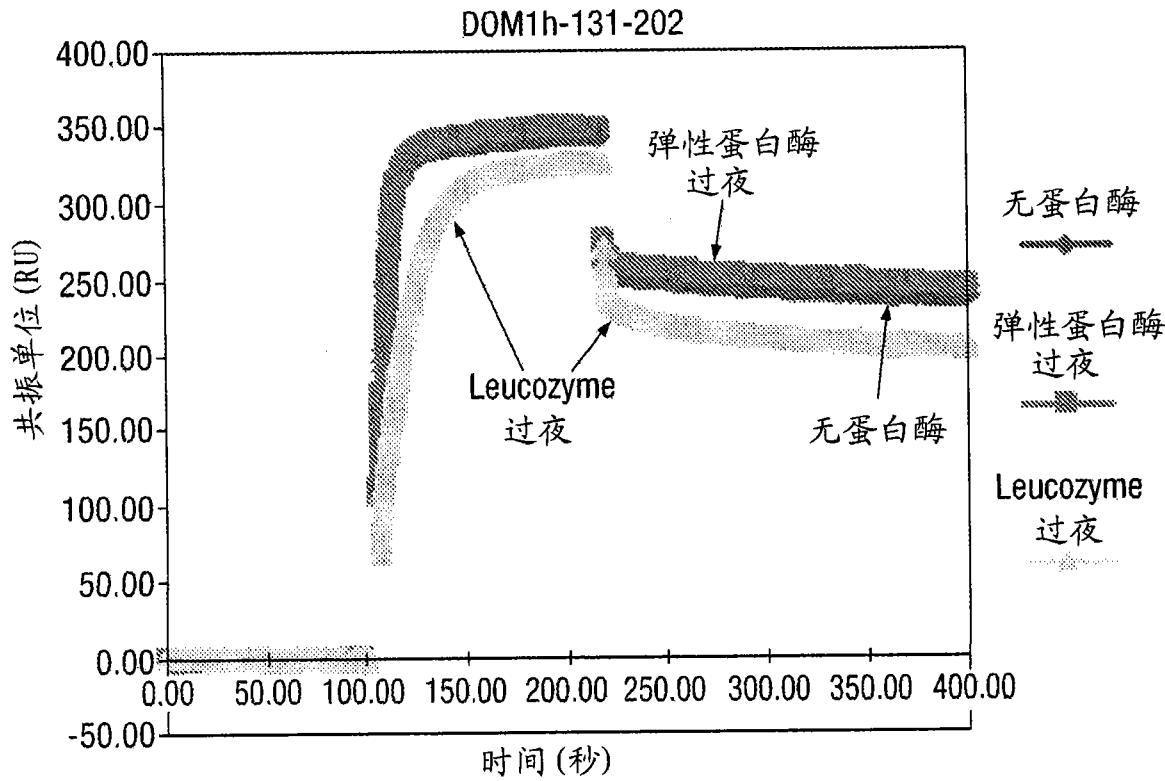


图 8B

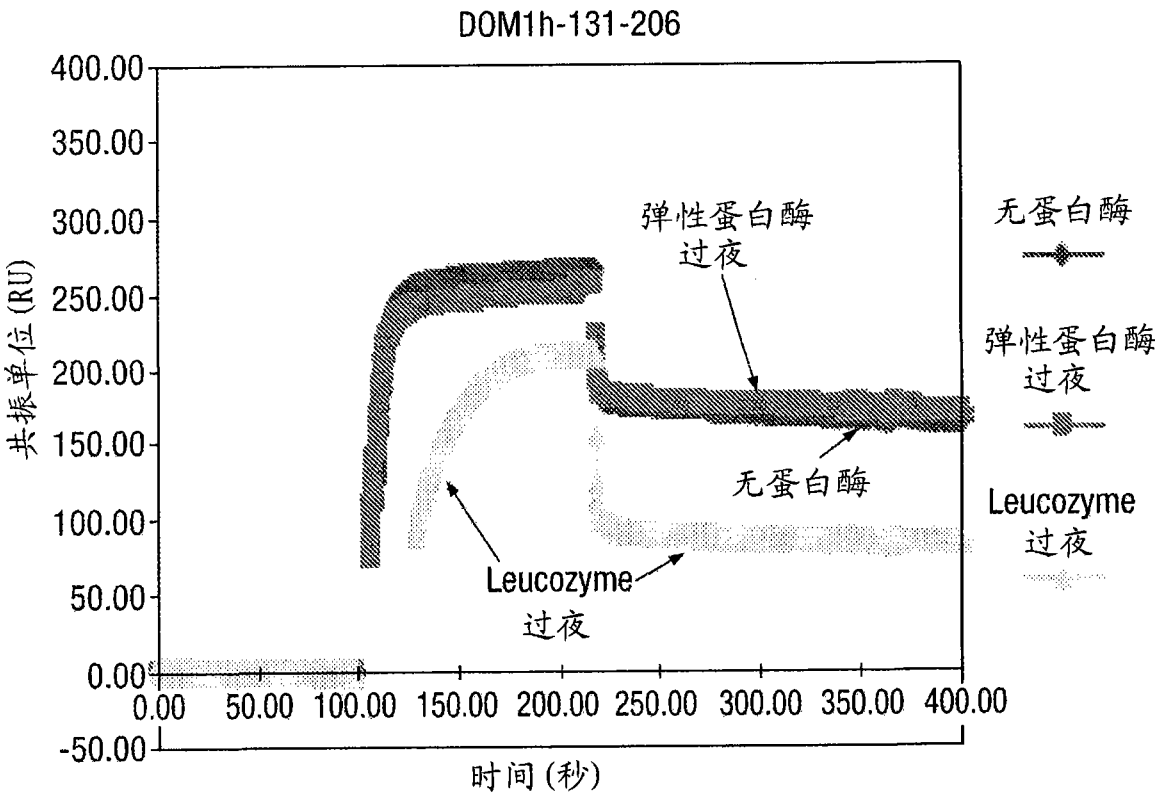


图 8C

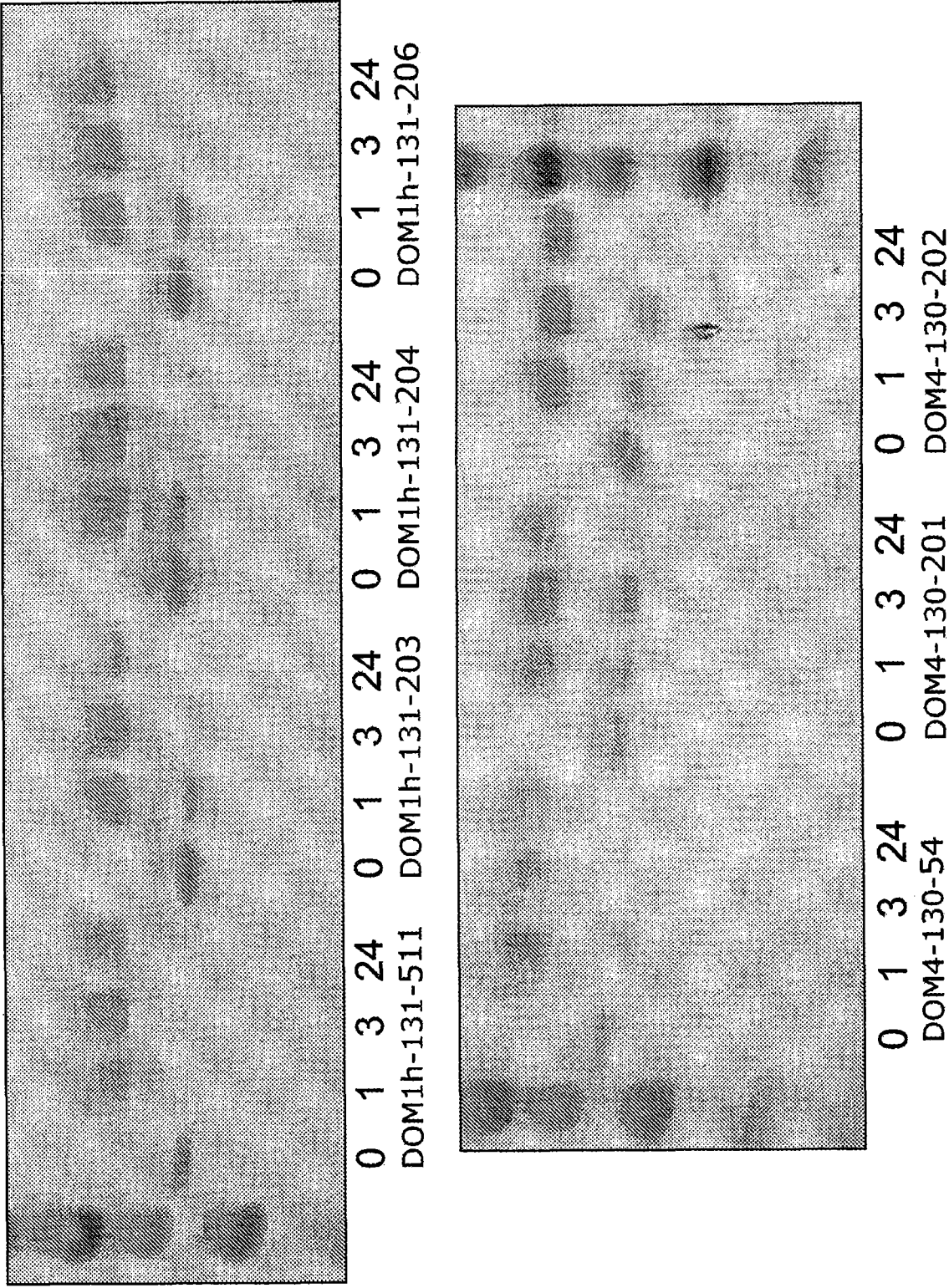


图 9

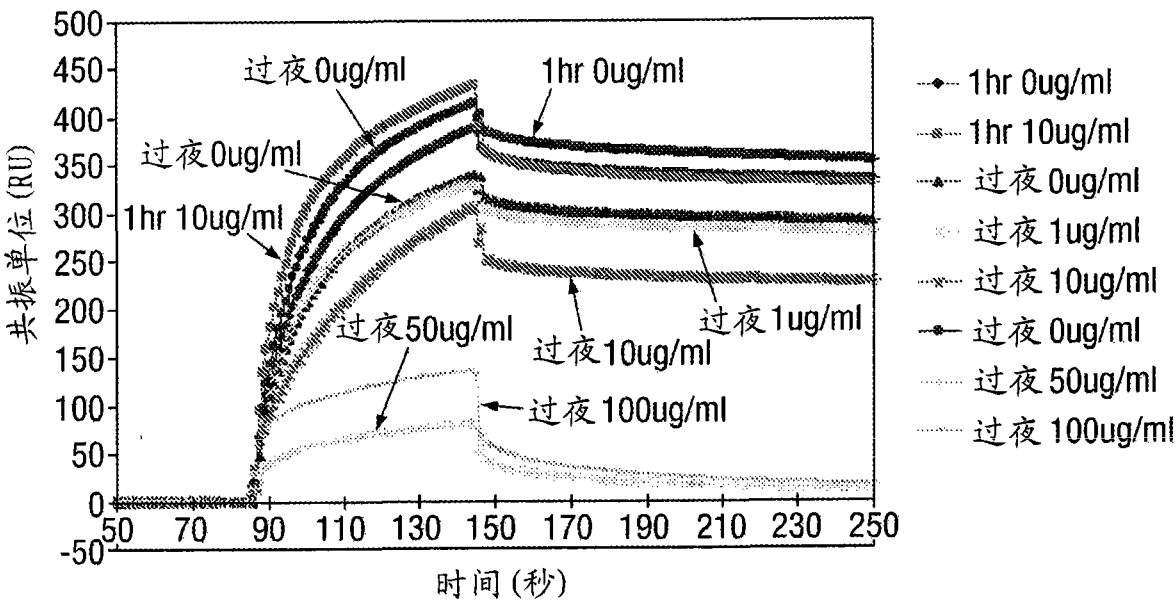


图 10A

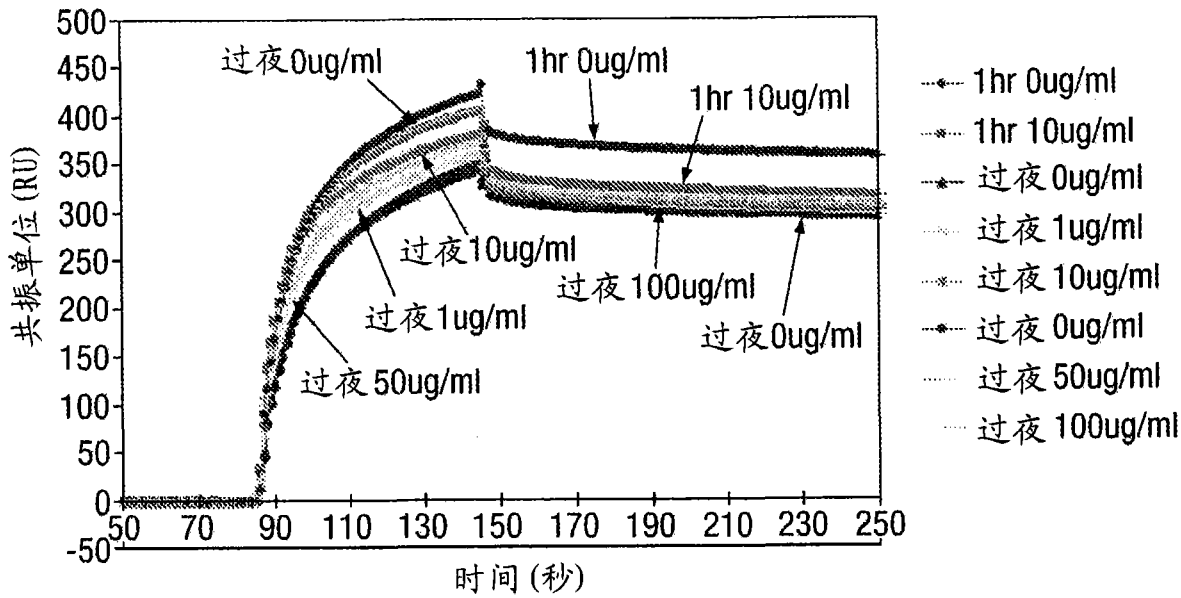


图 10B

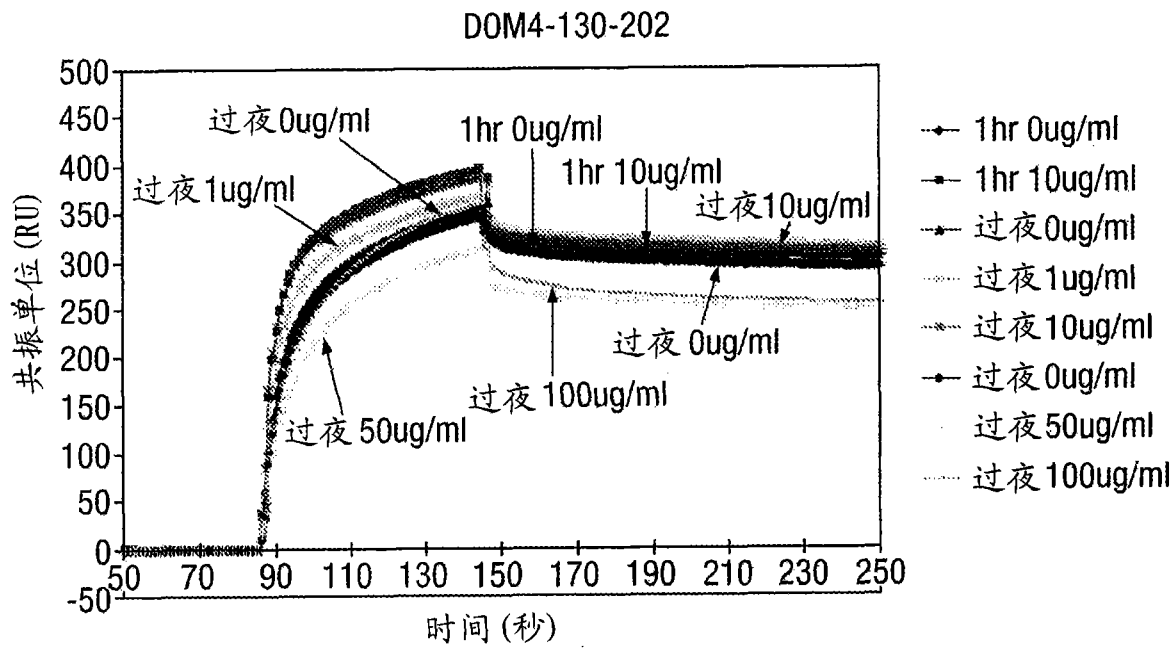


图 10C

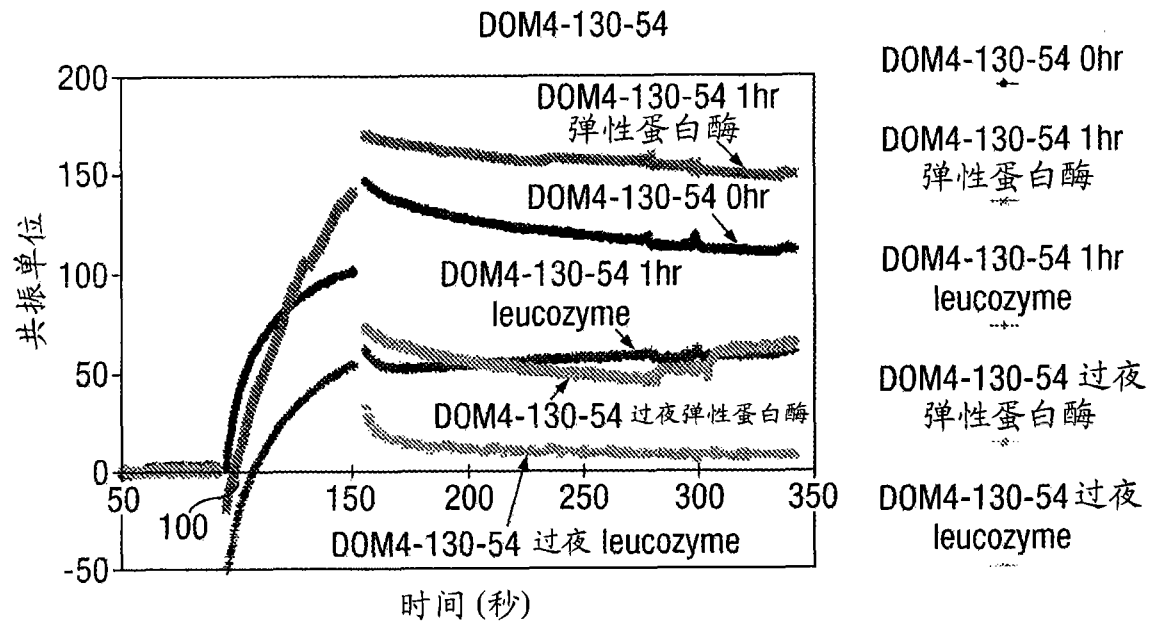


图 11A

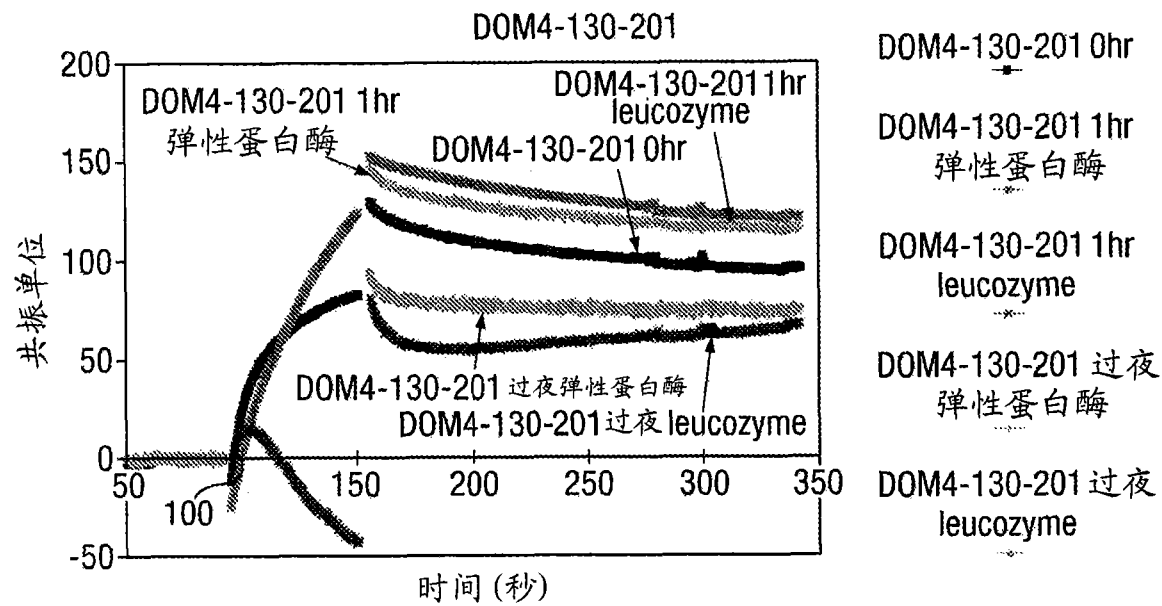


图 11B

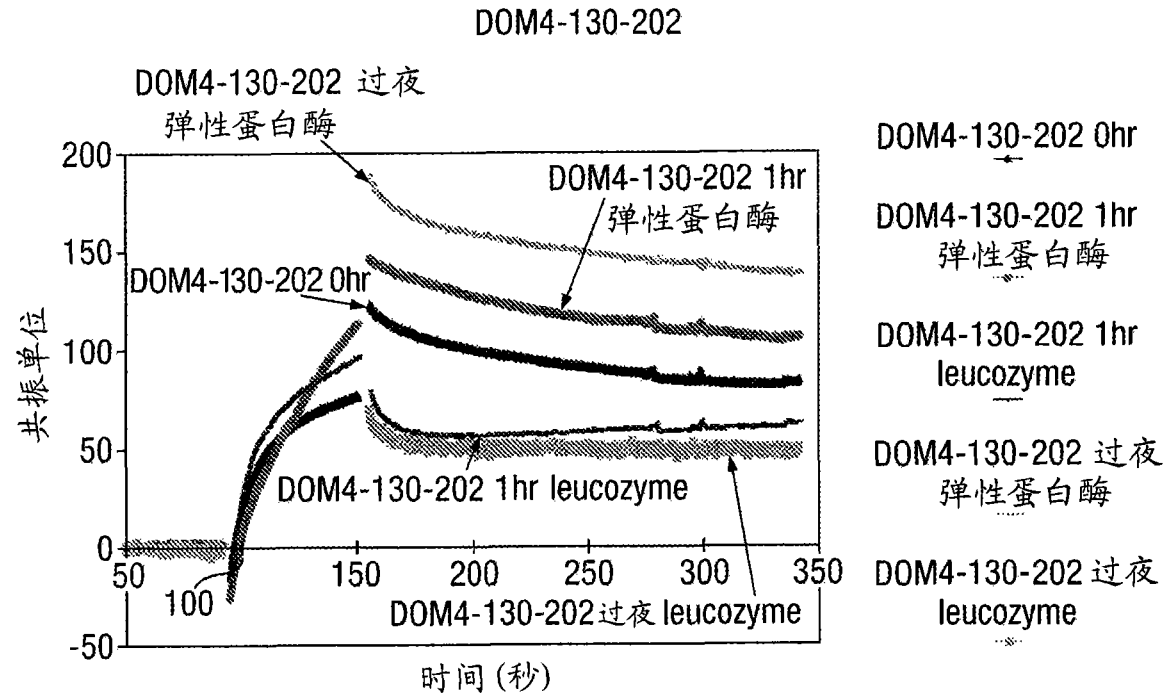


图 11C

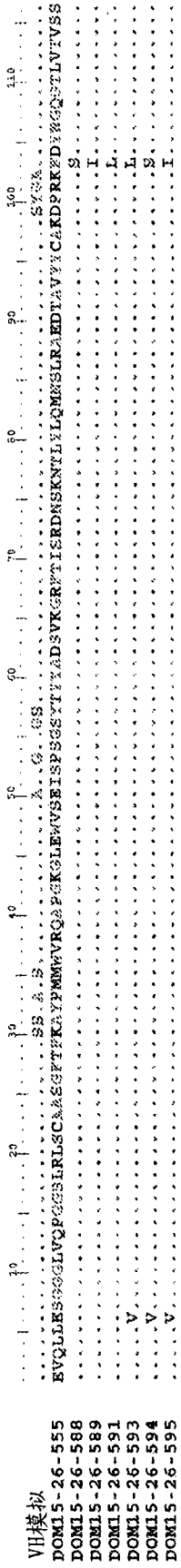


图 12

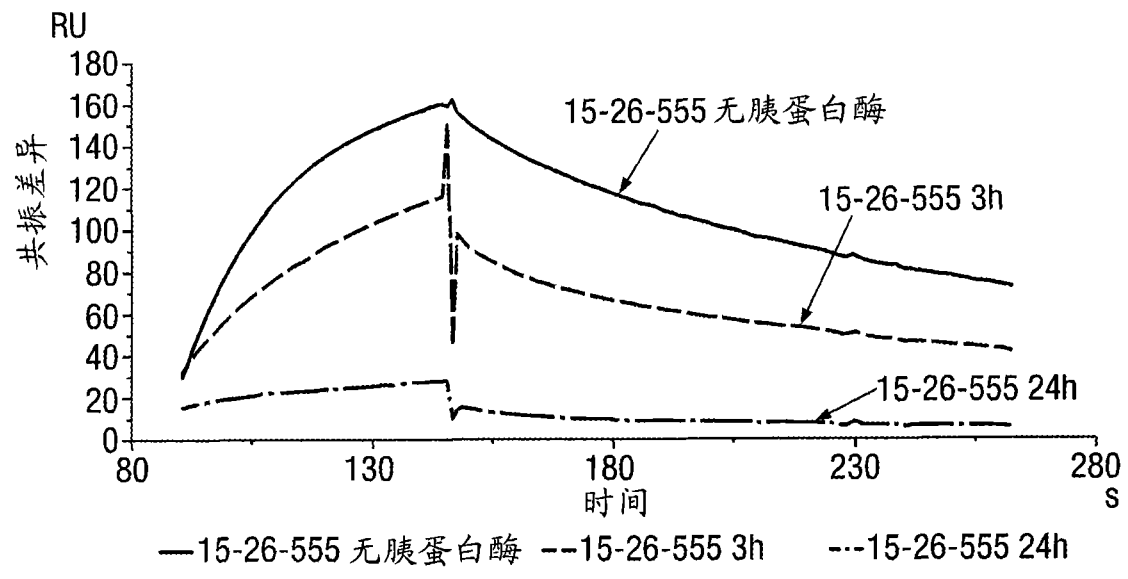


图 13A

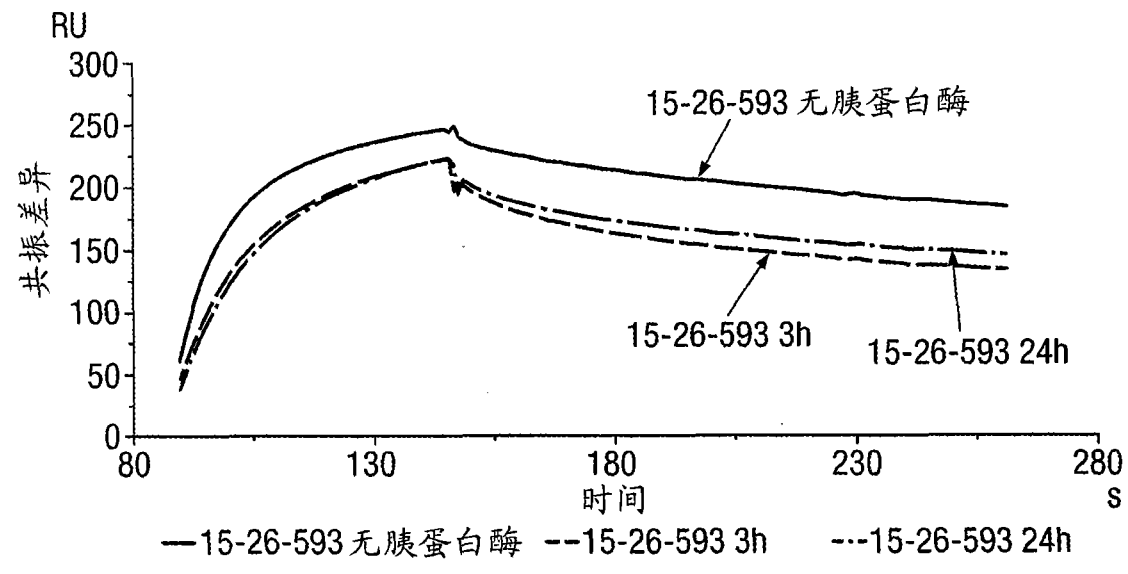


图 13B

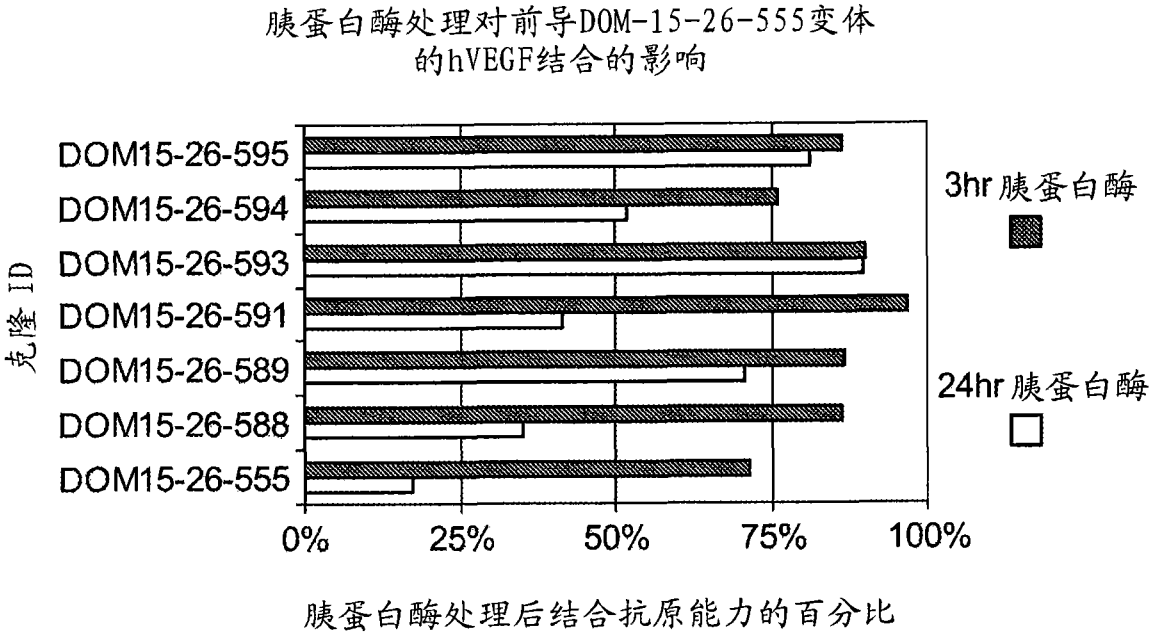


图 14

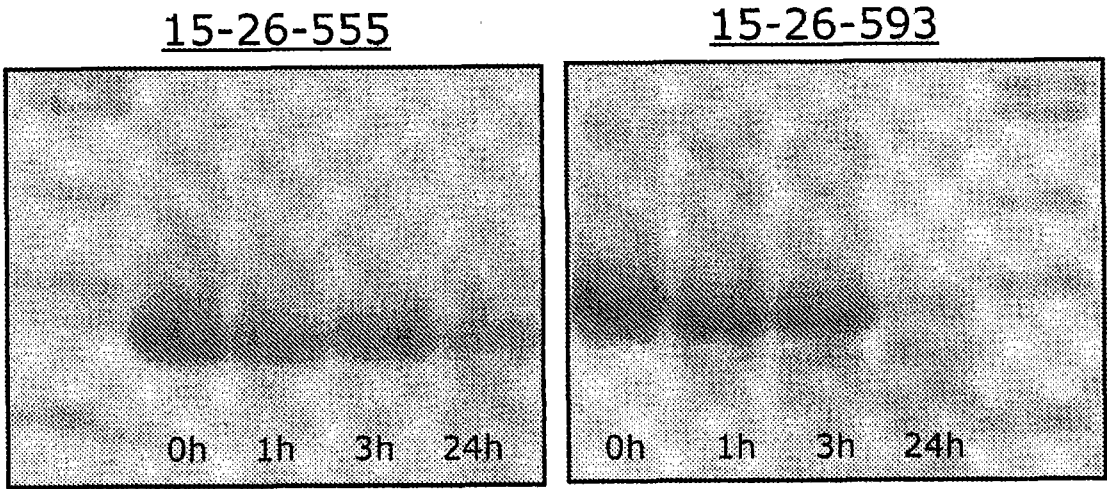


图 15

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
VK模拟										
DOM15-10 4G		S.SSY.N.			AA.S				SYST.N.	
DOM15-10-11		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTCRA	SNQWICPELSWYQOKPQKAPKLLIYHTSI	LOSQVPSRFSSSSCSQTDFTLT	ISSLOPEDFATYYCQYNMFRT	FGQCKVEIR				
DOM15-10-11			R.						M.	

16

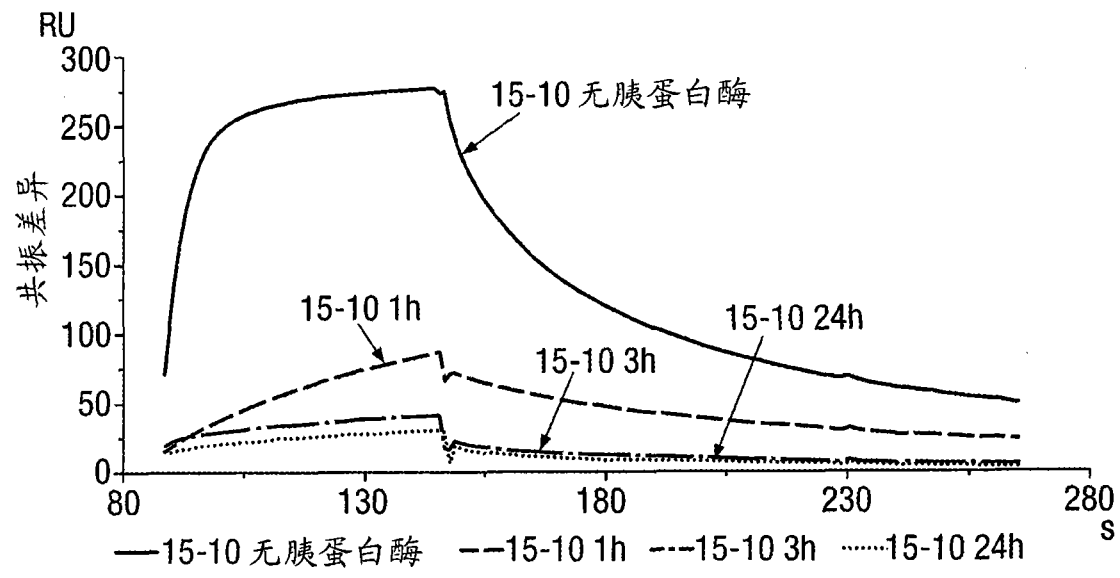


图 17A

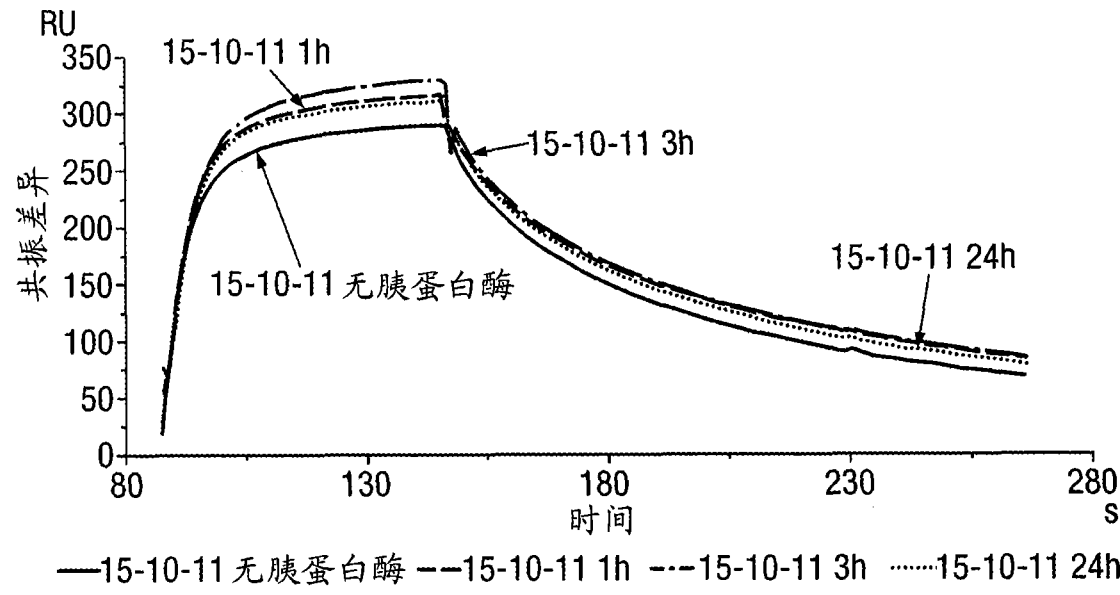


图 17B

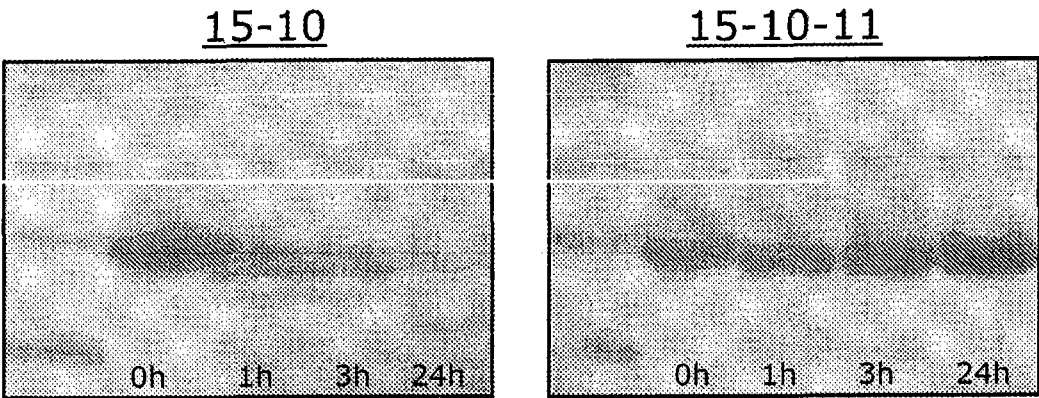


图 18

DOM1h-131-511 衍生的序列

>1-1

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCATGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-2

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTGCCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGAGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-3

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTCAACTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-201

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACGATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

图 19A

>1-5

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTATGCAGACTCCGTG
AAGGGCCCGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAACCT
GCGCGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGAC
TACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-6

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGCTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCCGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAGCACGCTATATCTGCAAATGAACGG
CCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTT
GACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-7

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGCTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCCGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-202

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGACGGTCAAGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCCGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

图 19B

>DOM1h-131-203

GAGGTGCAGCTGTGGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGATTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-204

GAGGTGCAGCTGTGGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCAGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAATAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-205

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-12

GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTACAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGAGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAGATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTGTATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGAGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCGAGCG

图 190

>1-13

GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGAGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGATAGCCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGGGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACAGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-14

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCATTTGCGCATGAAACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACCGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-15

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCTCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCGGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGAC
TACTGGGGTCAGGGAACCTTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-206

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATCACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

图 19D

>1-18

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCGGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-19

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCACCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AGGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-20

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
GGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCTCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTCG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-21

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAAGGGGGCCTTGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

图 19E

>1-22

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCGTGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-23

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCAAGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAAGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCGGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-24

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCTTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCTGCTTCCTAAGAAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-25

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCGGTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGCGGCTTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

图 19F

DOM4-130-54 衍生的序列

>4-1

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCTT
AAGCTCCTGATCAATCTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGA
TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-2

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCTT
AAGCTCCTGATCAATTTTGGCTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGCGGA
TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-3

GACATCCAGACGACCCAGTCTCCGTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-4

GACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAACTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-5

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCTT
AAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGA
TACGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATATGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGGGG

图 19G

>4-6

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGGCATCTGAAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGAATTCACCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-7

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCGTCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-8

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGGATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCTGGCCGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-9

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAGTTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTACACGTTCTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>DOM4-130-201

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAAATTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATCTGCAACCTGAAGATTTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAATGGG

图 19H

>4-11

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTATGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCAACACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-12

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATATACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCAACACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAGG

>4-13

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTTCGCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCATATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAGG

>4-14

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACTATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCT
AAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTCGCTACGTACTACTGT
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-15

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCC
TAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTCGCTACGTACTACTG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCATATACGTTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAGG

图 191

>4-16

GACATCCAAATGGCCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTGGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAGCCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTGCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAG
G

>4-17

GACATCCAGATGACCCAGTCACCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGACATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTGCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG
G

>4-18

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCGTCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTGCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACCTG

>4-19

GACATCCAGATAACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTGCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACCG

>4-20

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTGCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACAG

图 19J

>DOM4-130-202

GACATCCAGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCTC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTTCTTCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>4-22

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>4-23

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGAGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAATCGG

>4-24

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATATGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGGTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>4-25

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGTCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGGTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

图 19K

>4-26

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCGTCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCTTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATTTAGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGT

>4-27

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCAC
TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGGCC
CCTAAGCTCCTGATCAATCTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTCGCTACGTACT
ACTGTCAACCGTCTTTTACTTCCCTTATACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

图 19L

>DOM15-26-555
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTTCCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-576
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTTCCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-578
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTTCCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACGCGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAGCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-579
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGATCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTTCCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-580
GAGGTGCAGCTGCTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTTCATATACATACTAT
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGAATACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-581
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTTCCTTATACATACTAC
GCGGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAATGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-582
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACATTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTTCCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACGGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAACGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

图 20A

>DOM15-26-583
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCATACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCATGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-584
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCTGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGAGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACAATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-585
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCAGAGTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTACGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-586
GAGGTGCAGTTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATTTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-587
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCAAATCCGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-588
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTCTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-589
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATCTGCCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

图 20B

>DOM15-26-590
GAGGTGCATCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAAACCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-591
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-592
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTACGAAAGATCCT
CGGAAGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-593
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTTTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-10
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAAC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCCGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACCG

>DOM15-10-1
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAAC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATCATTTCGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTGAGCCTAGGACGTTCCGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG

>DOM15-10-2
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAAC
ATCACTTGTCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCCGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACCG

图 20C

>DOM15-10-3
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCCTAAGCACCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTAGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAAGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGATGG

>DOM15-10-4
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTTTTACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCCA
GGGACCAAGGTGGAAATTAGACGG

>DOM15-10-5
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCGAAGTGGGGTCCCATCT
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGATGG

>DOM15-10-6
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCCTAAGCGCCTGATCTATCATACGTCCATTTTACAGAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GCAGATTTTGCAACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG

>DOM15-10-7
GACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTTGGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAA

>DOM15-10-8
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACTT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCTGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGAGGG

>DOM15-10-9
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCCTAAGTTCCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGTCTGCAACCT
GGAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG

图 20D

>DOM15-10-10
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTATCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG

>DOM15-10-11
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGAGGG

>DOM15-10-12
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAAGCT
GAAGATTCTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAACCAGACGG

>DOM15-10-13
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGAAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
CGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACGG

>DOM15-10-14
GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTACGTTGGTACCAGCATAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCTCCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGATGG

>DOM15-10-15
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCAAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAGGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAGGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTTGGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAGACAG

>DOM15-10-16
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTACGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTTCGGCCAA

图 20E

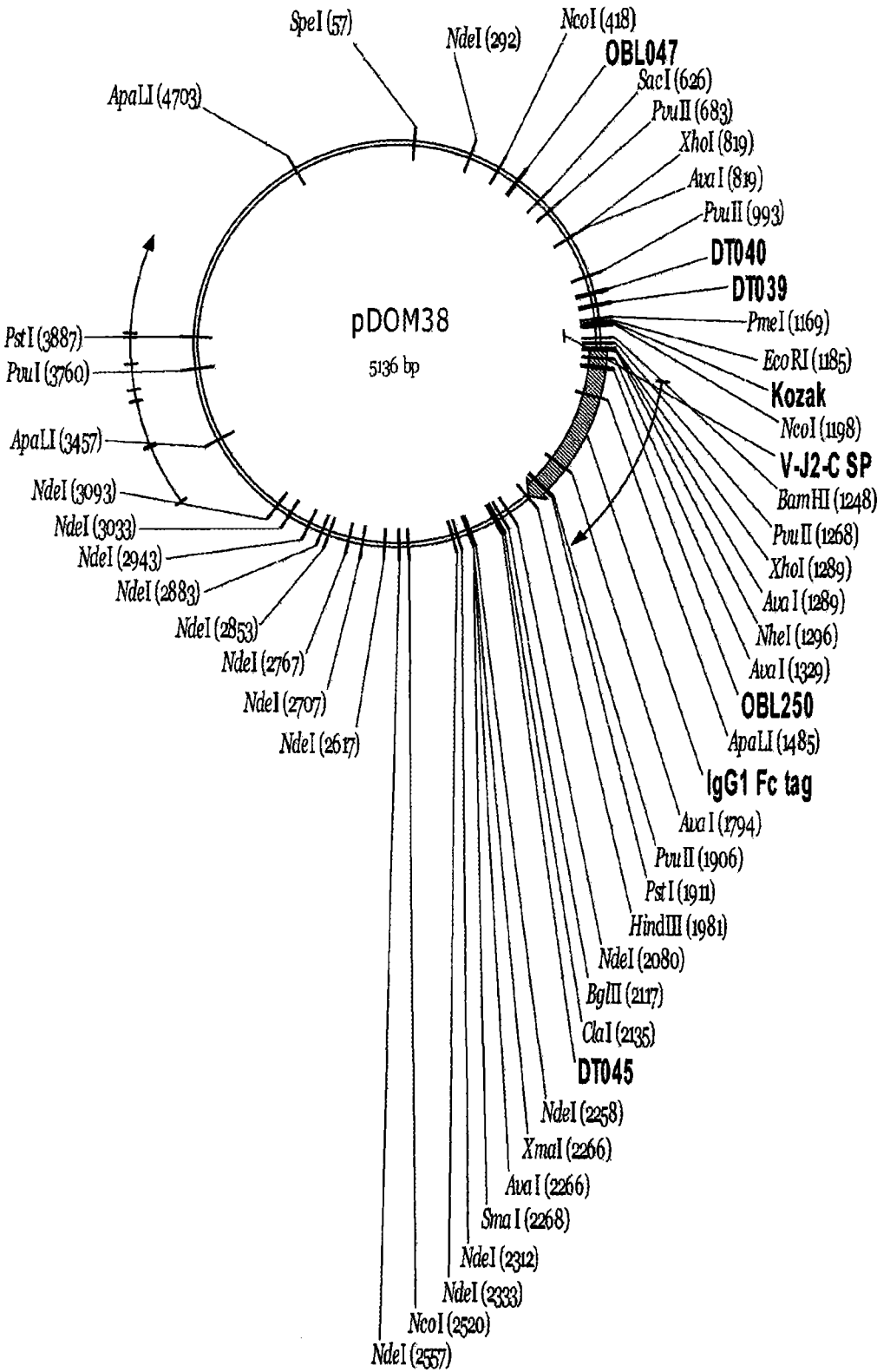


图 21

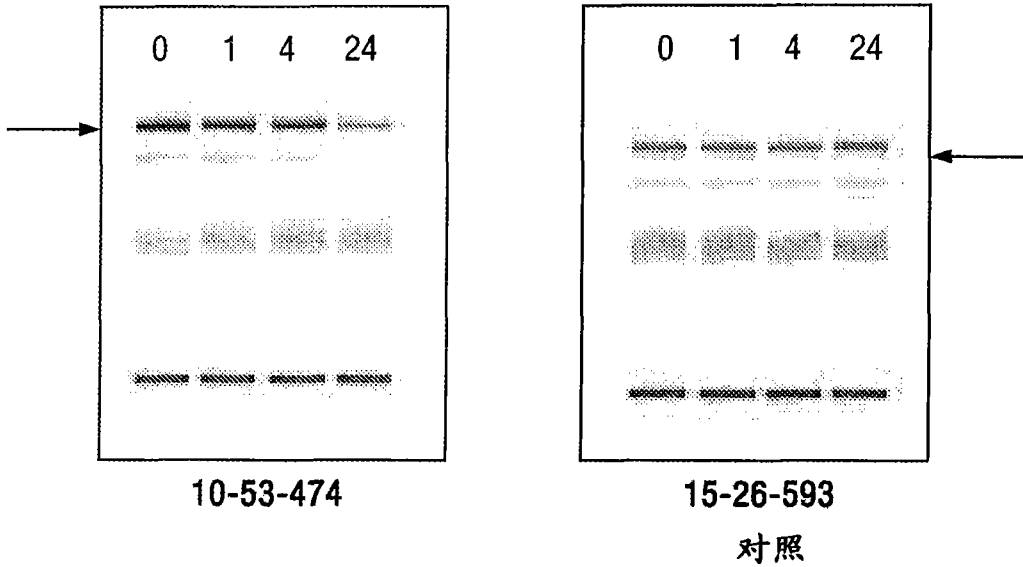


图 22

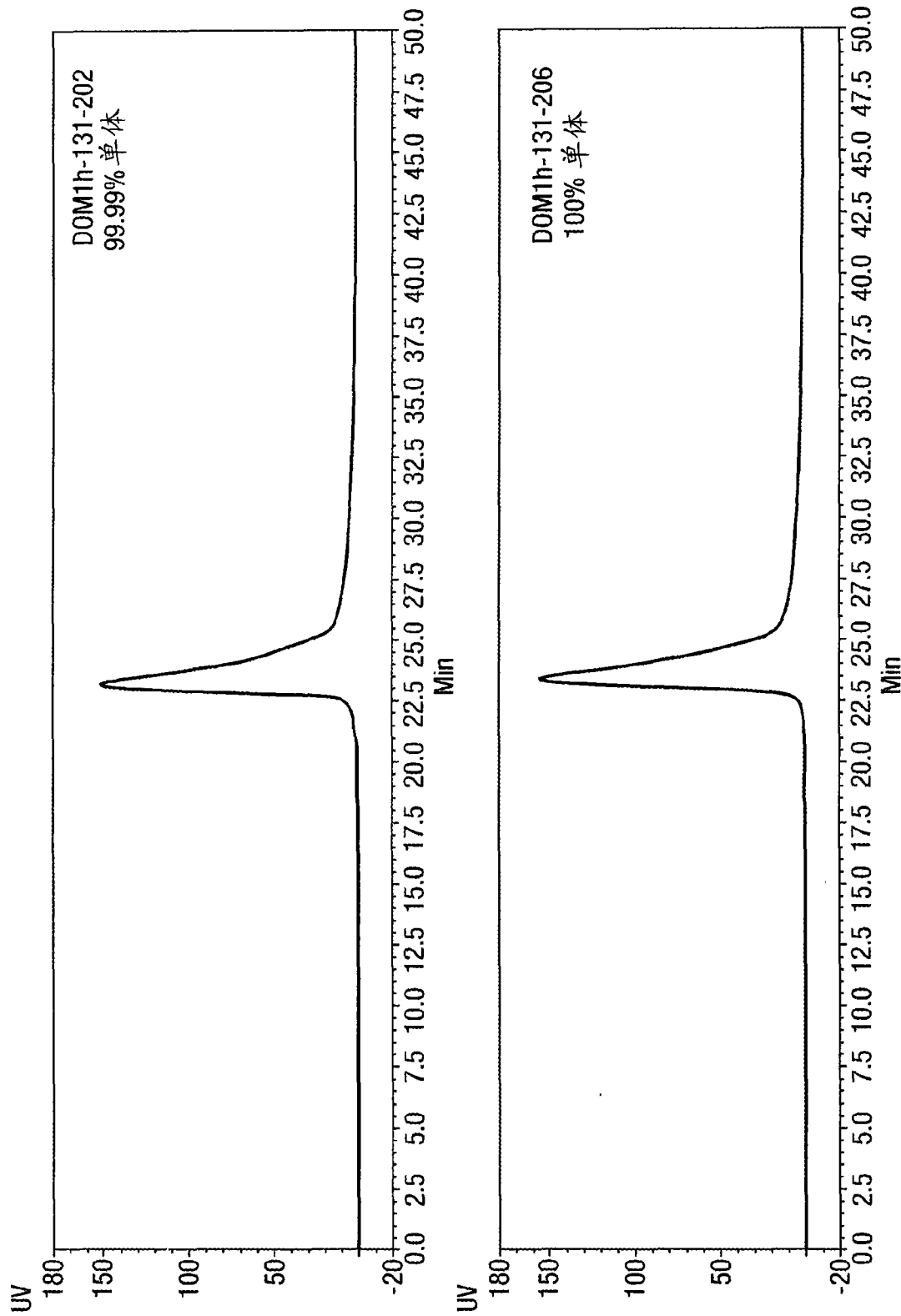


图 23

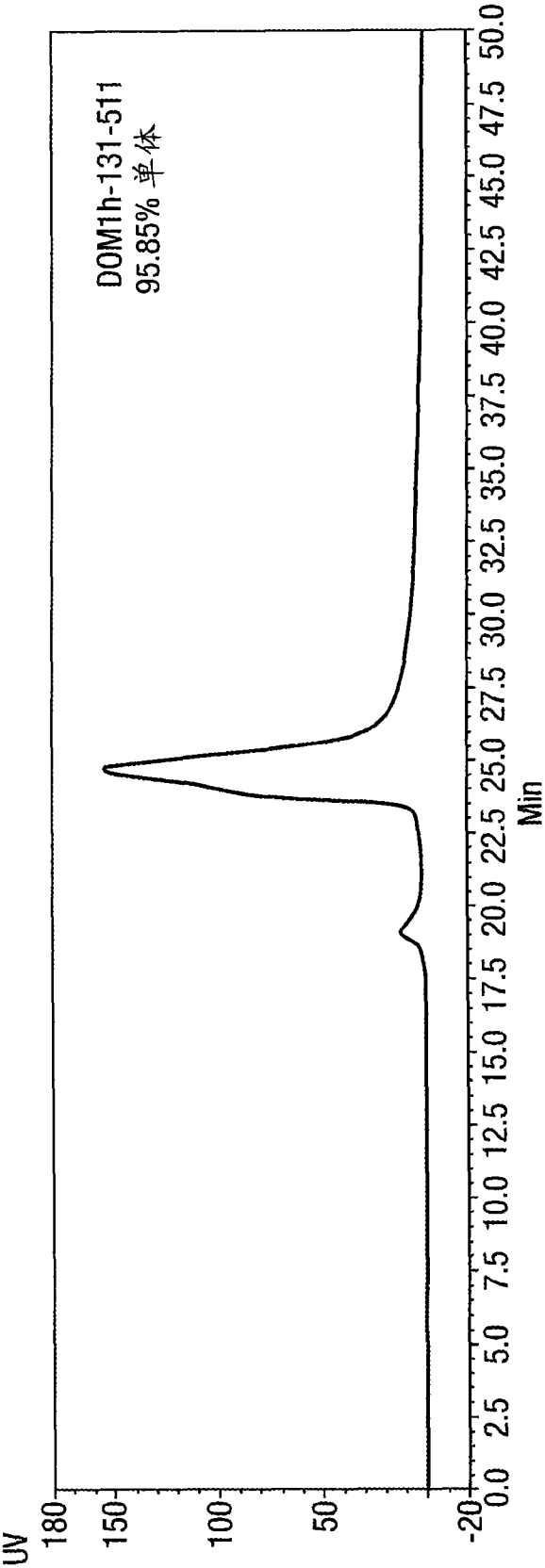


图 23 (续)

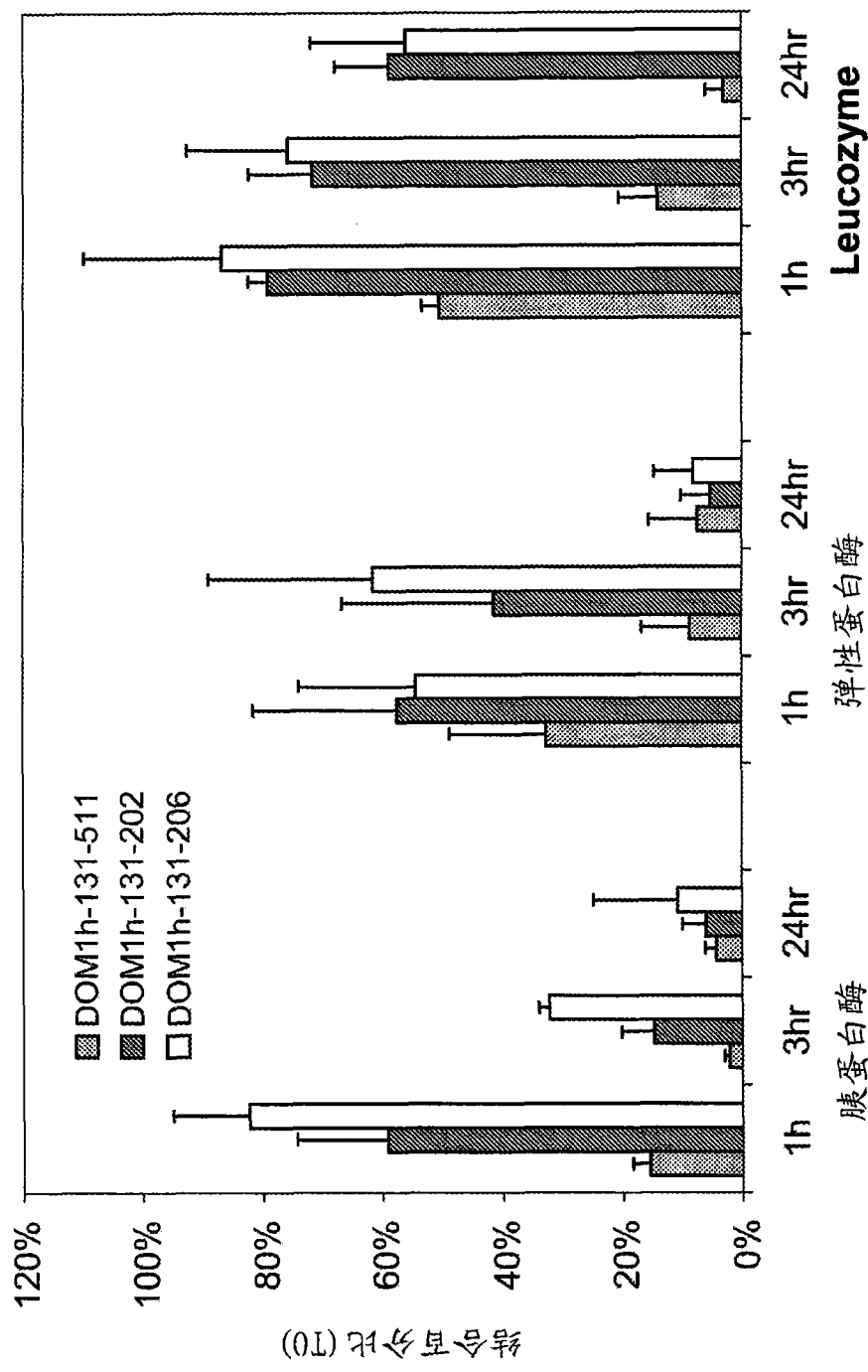


图 24

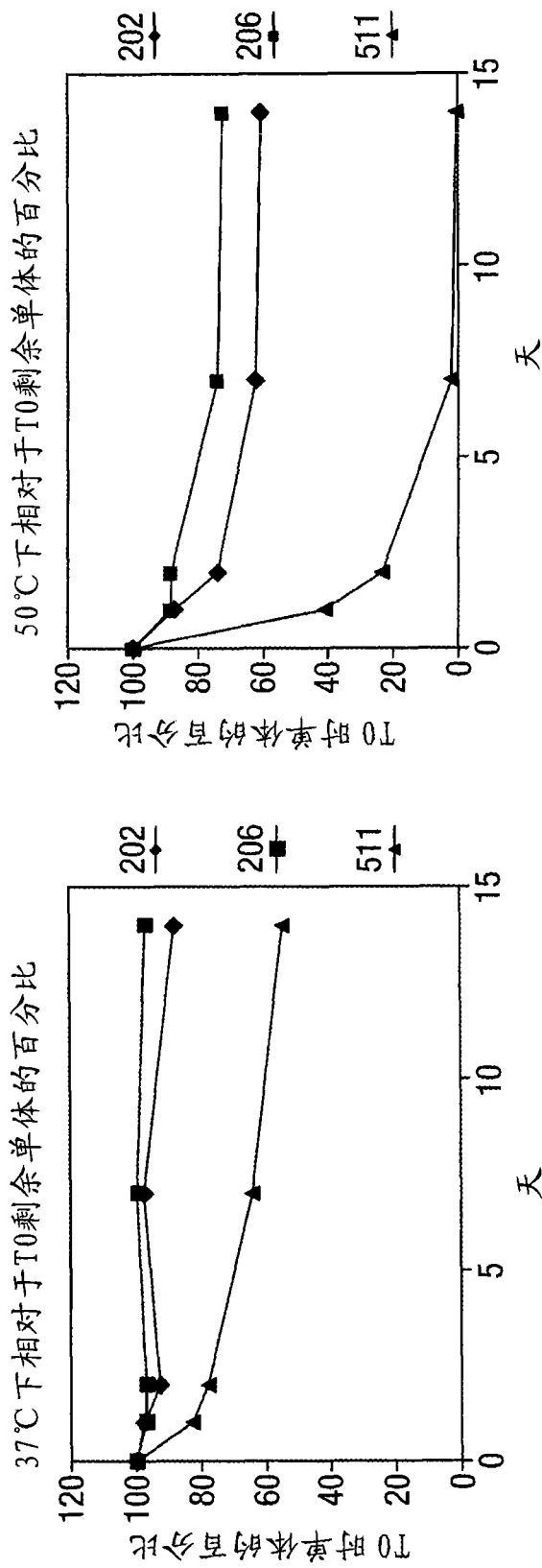


图 25

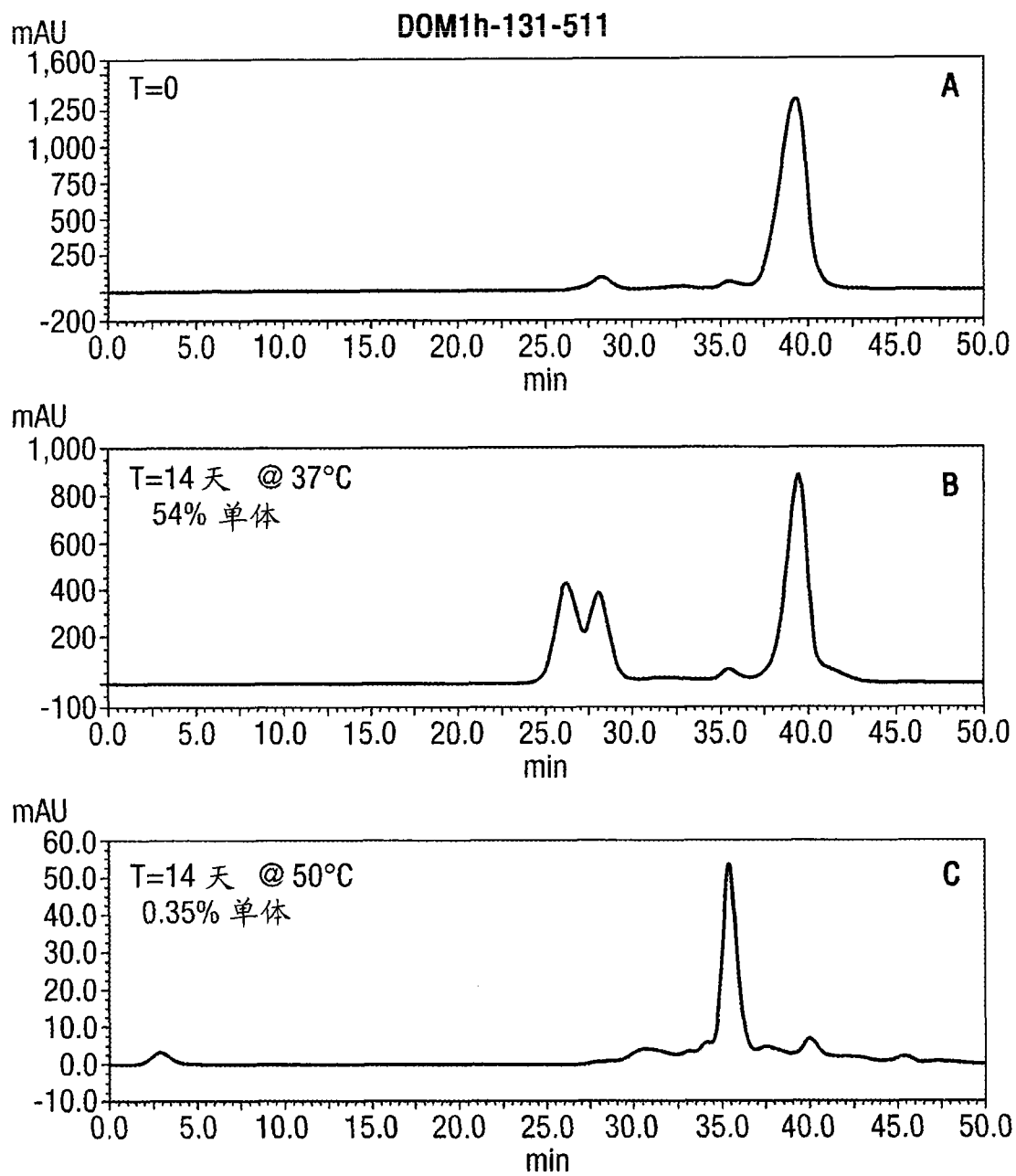


图 26

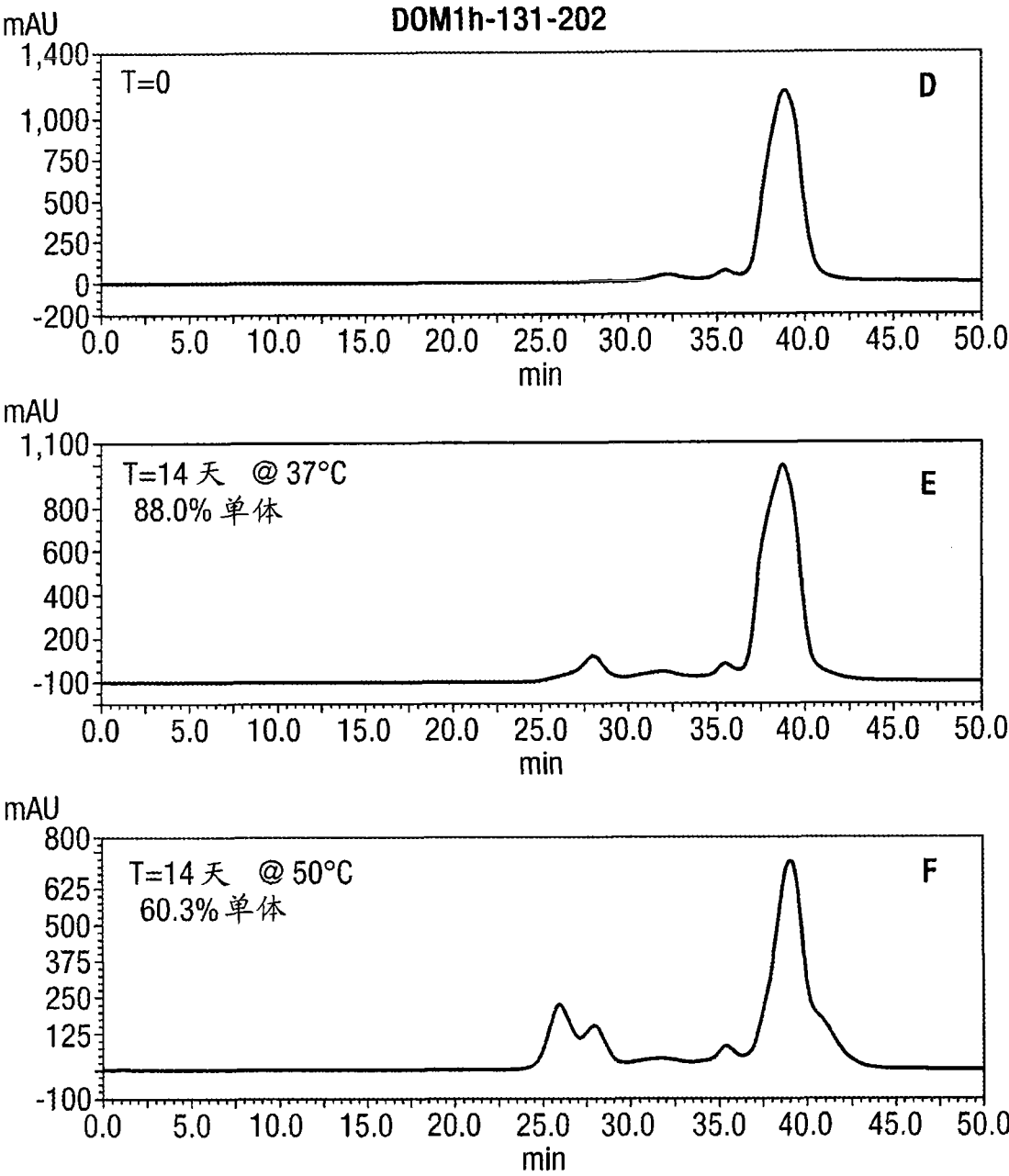


图 26(续 I)

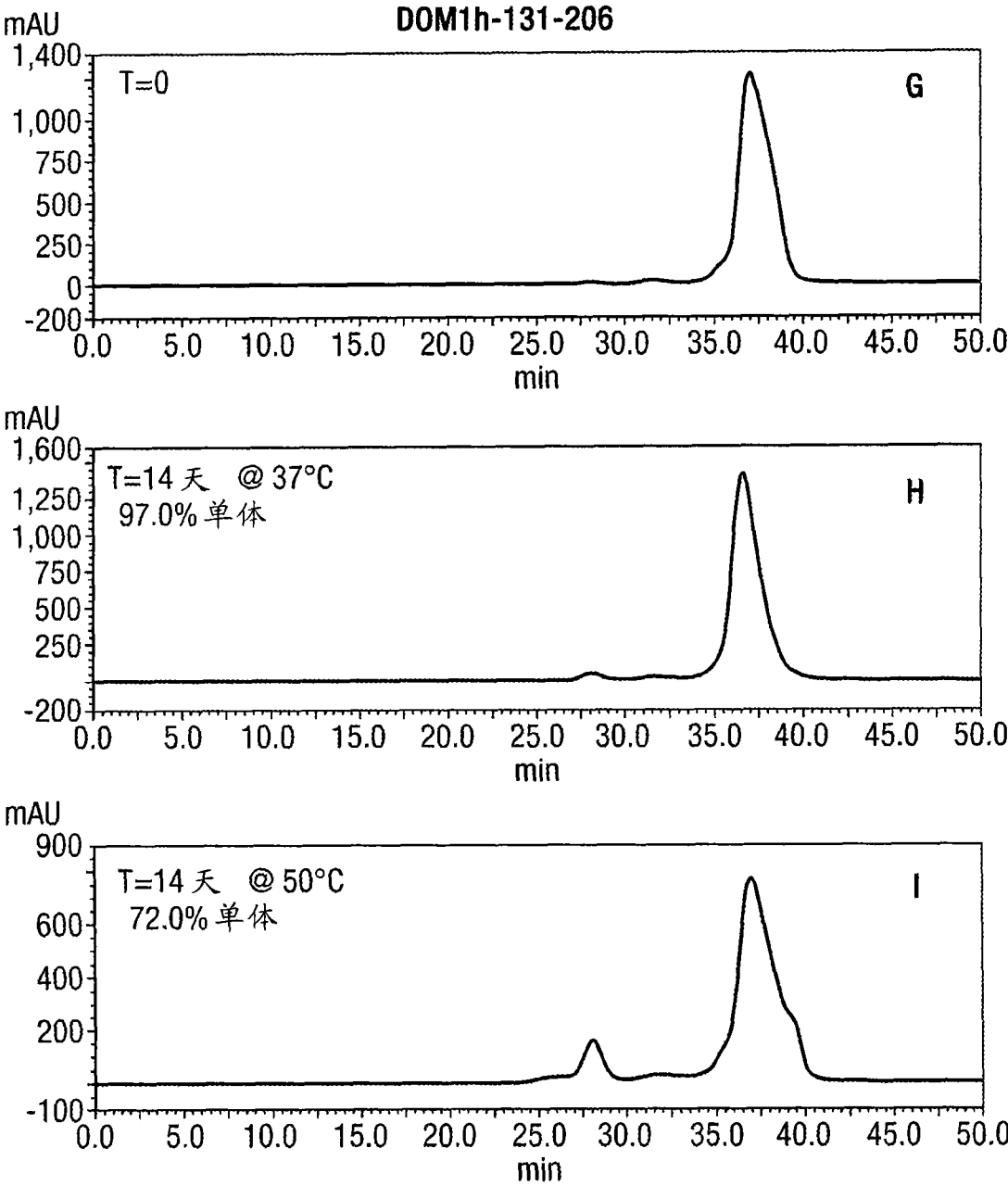


图 26(续 II)

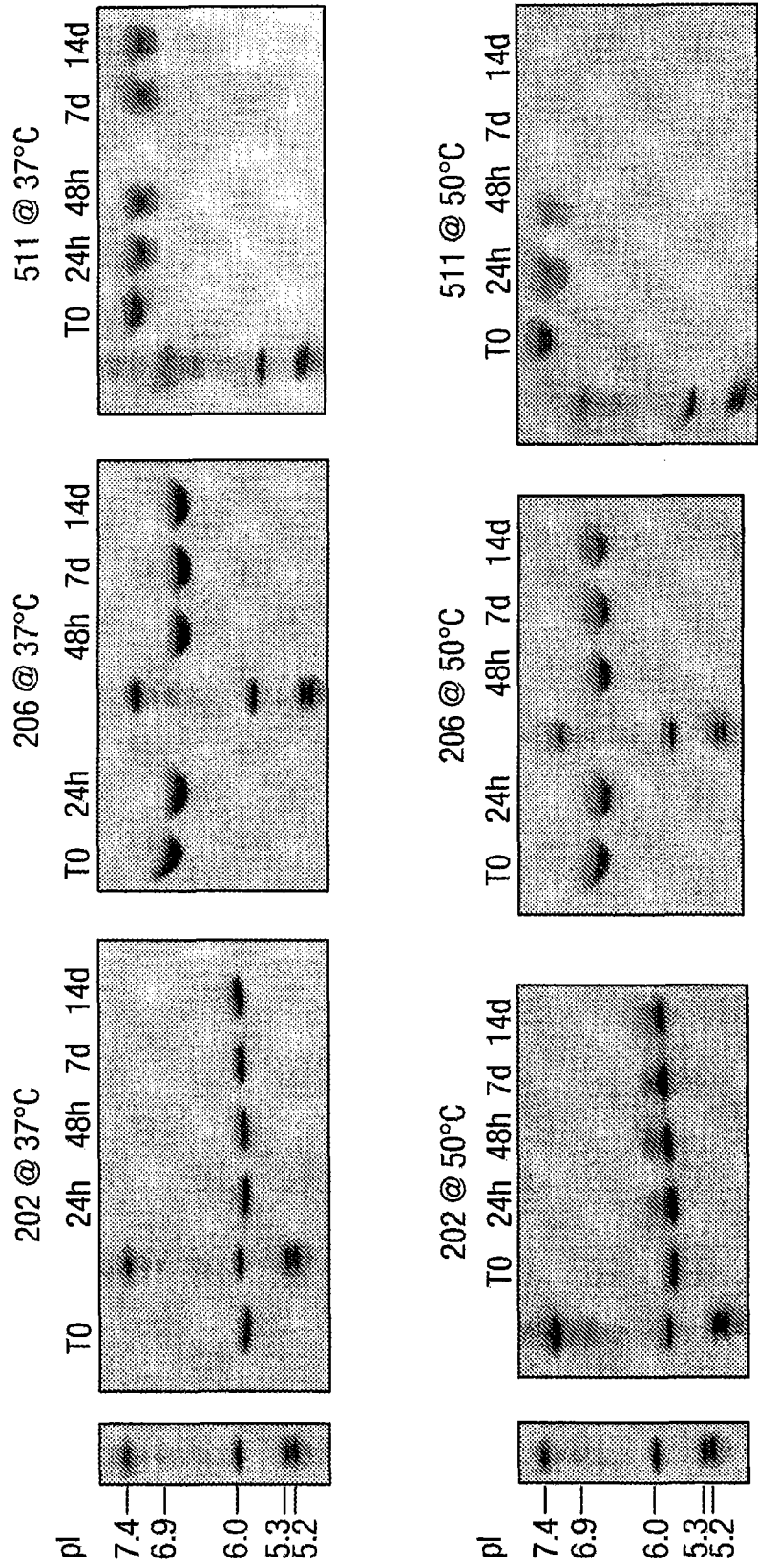


图 27

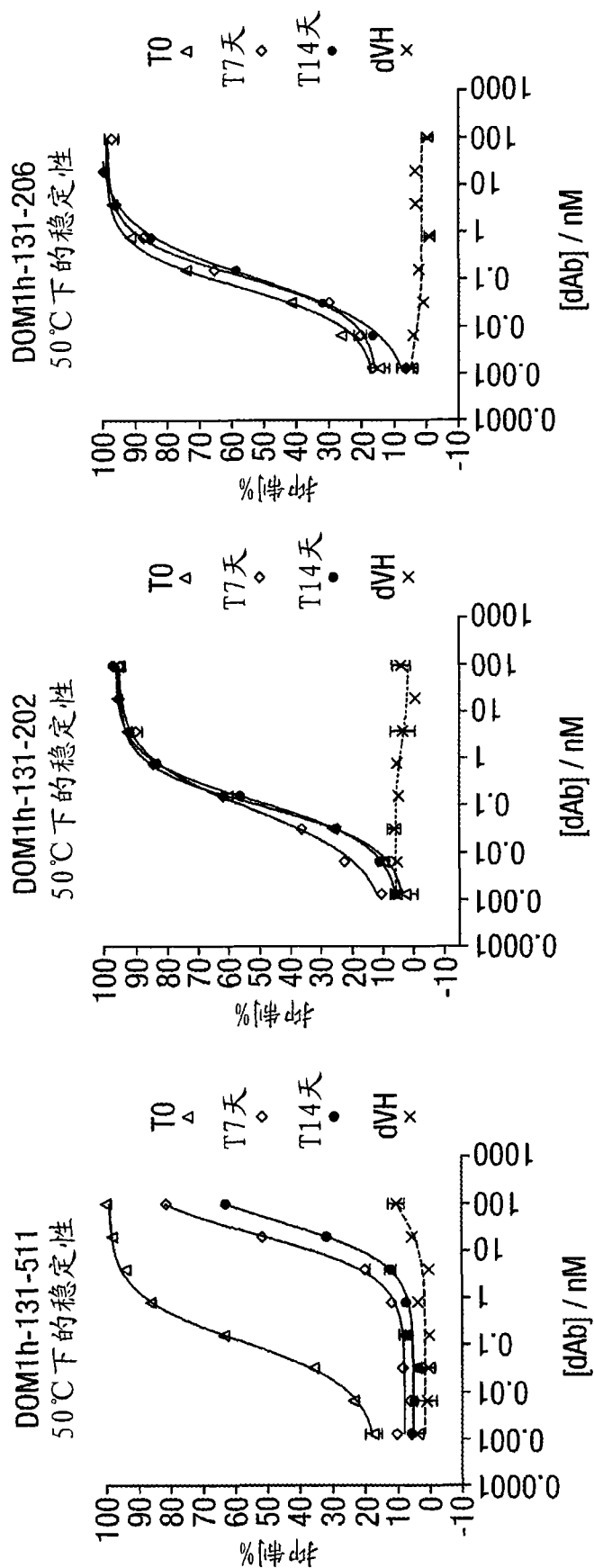


图 28

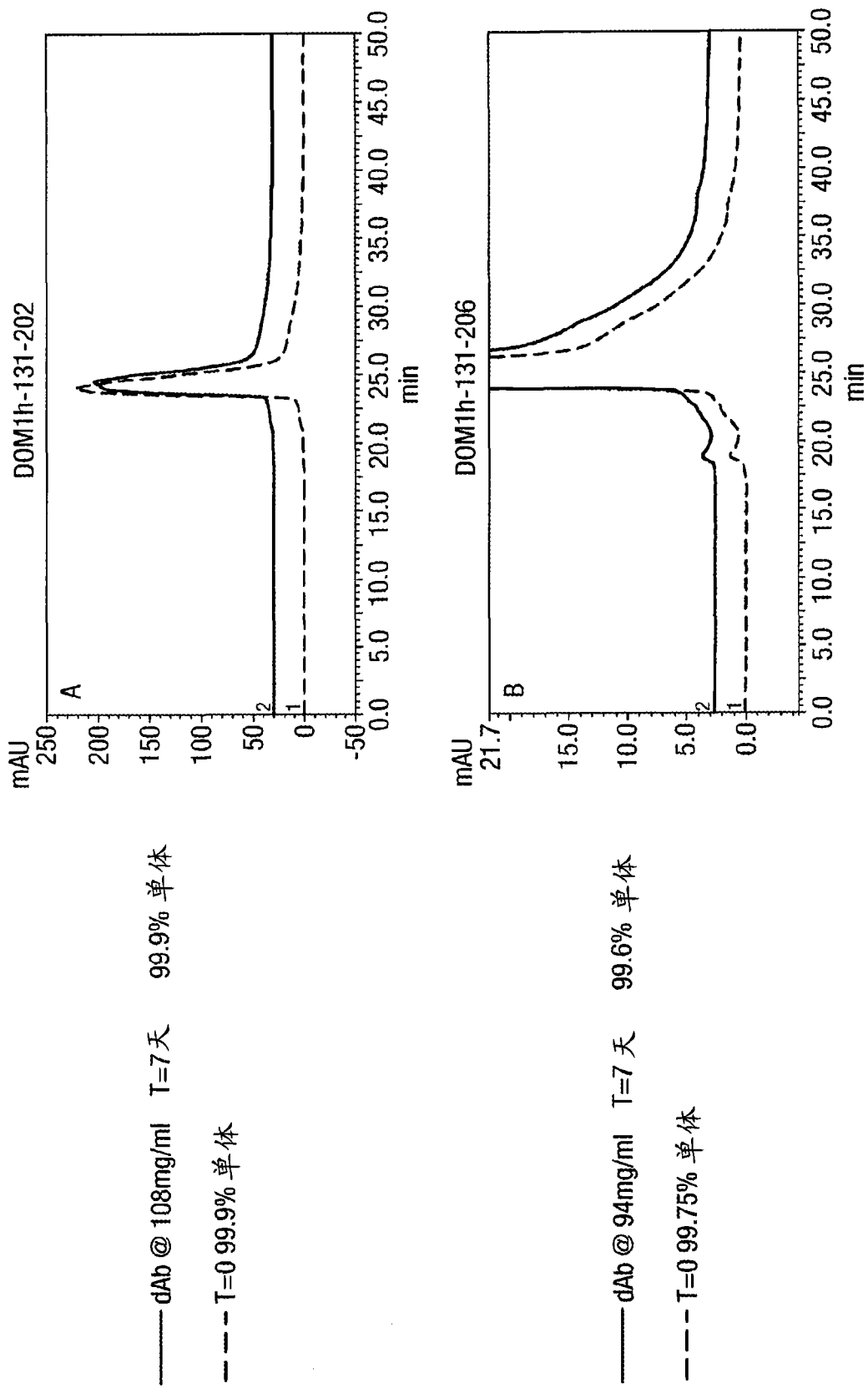


图 29

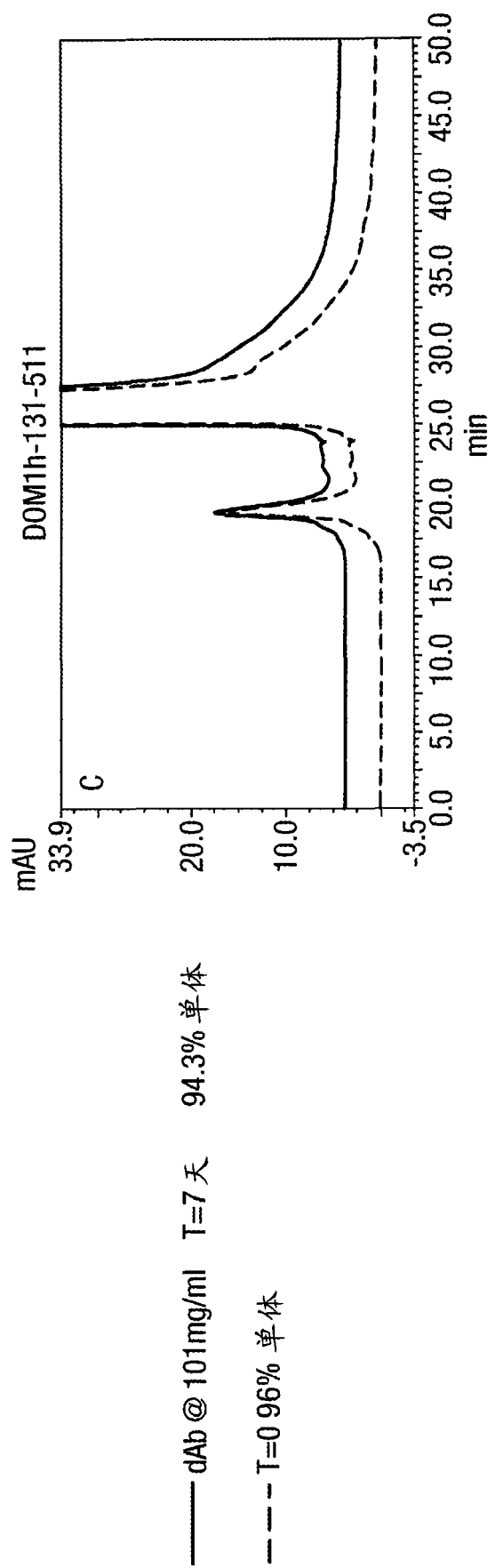


图 29 (续)

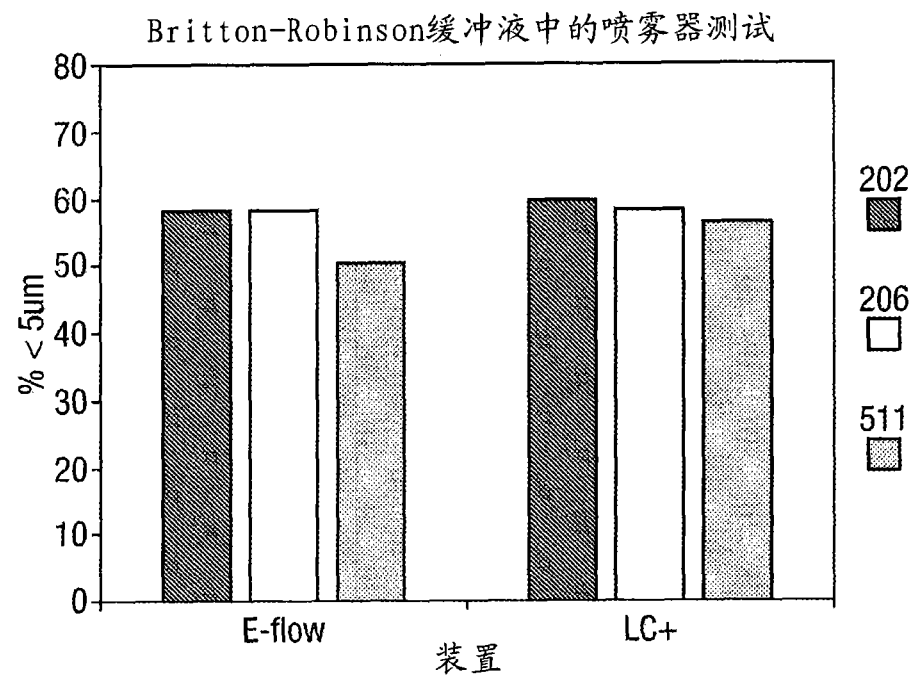


图 30

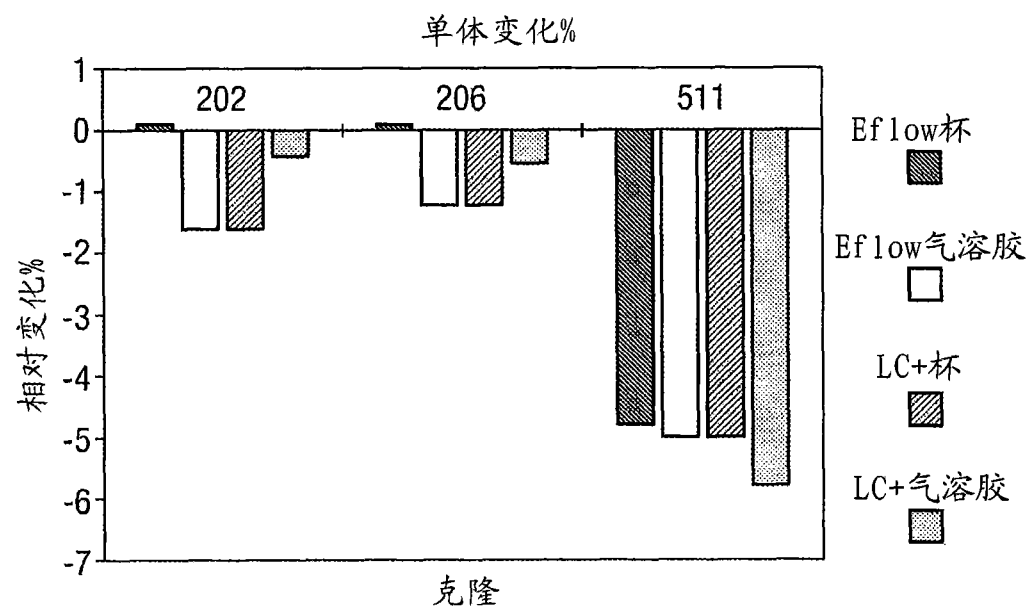


图 31

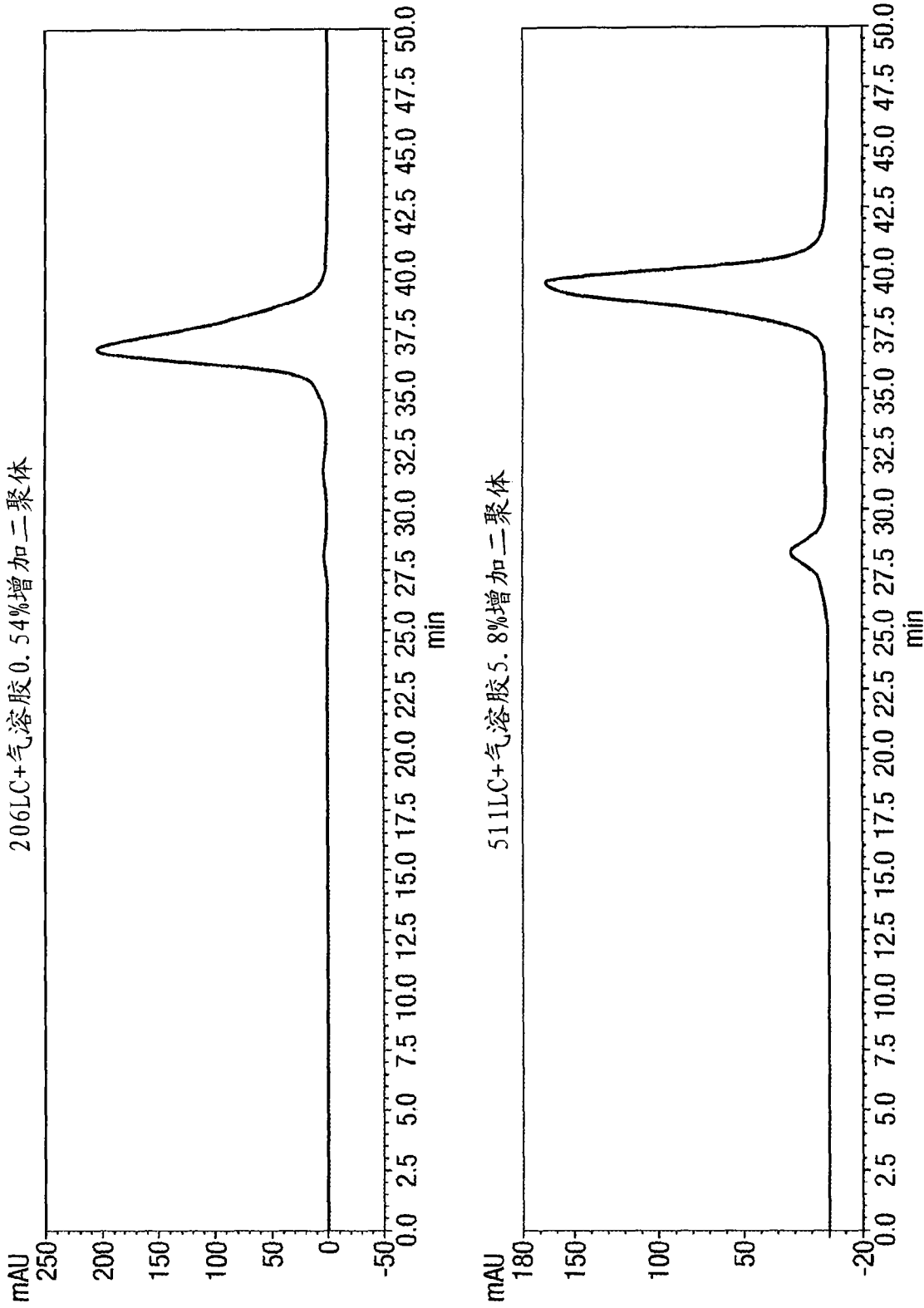


图 32

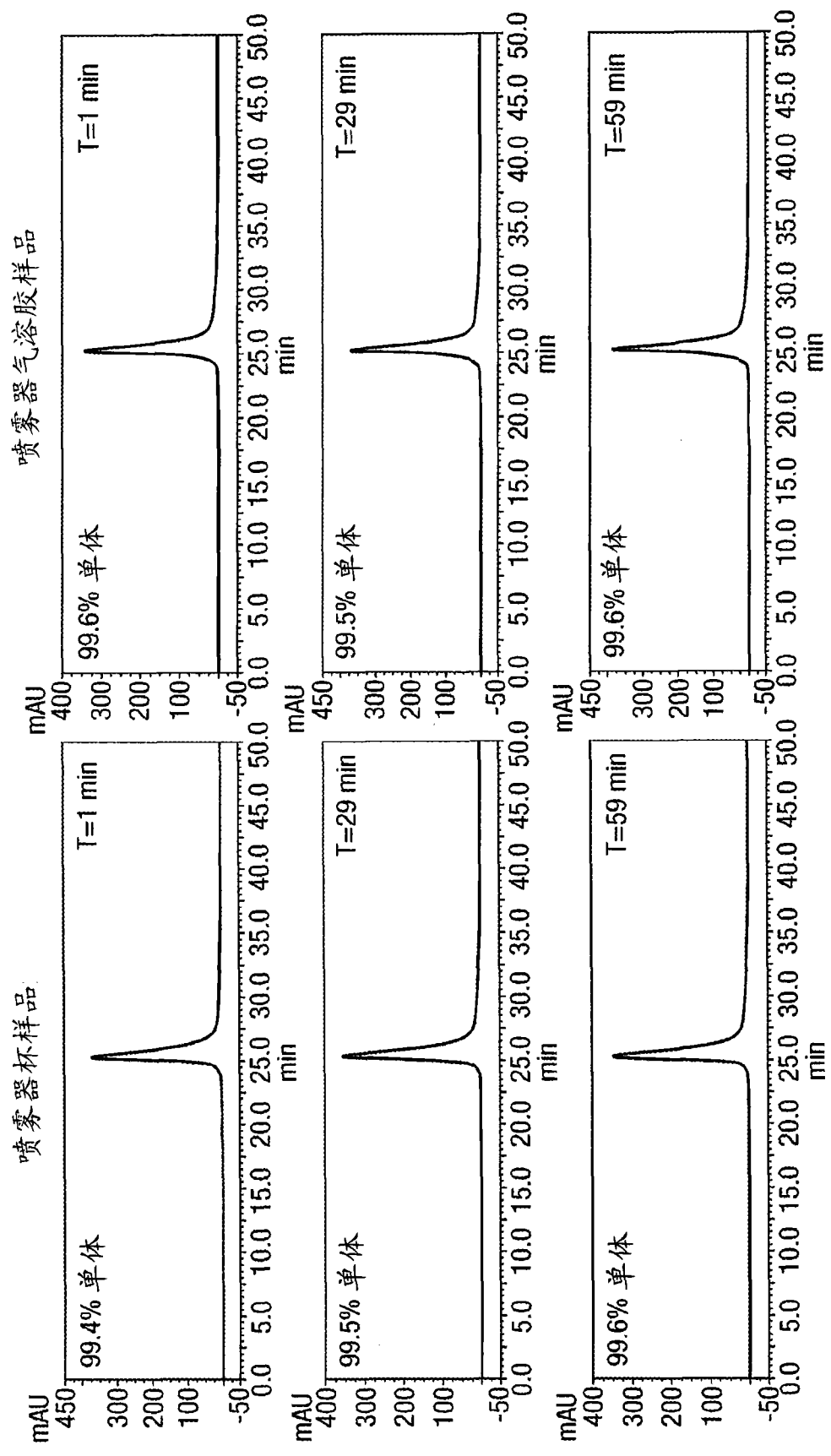


图 33

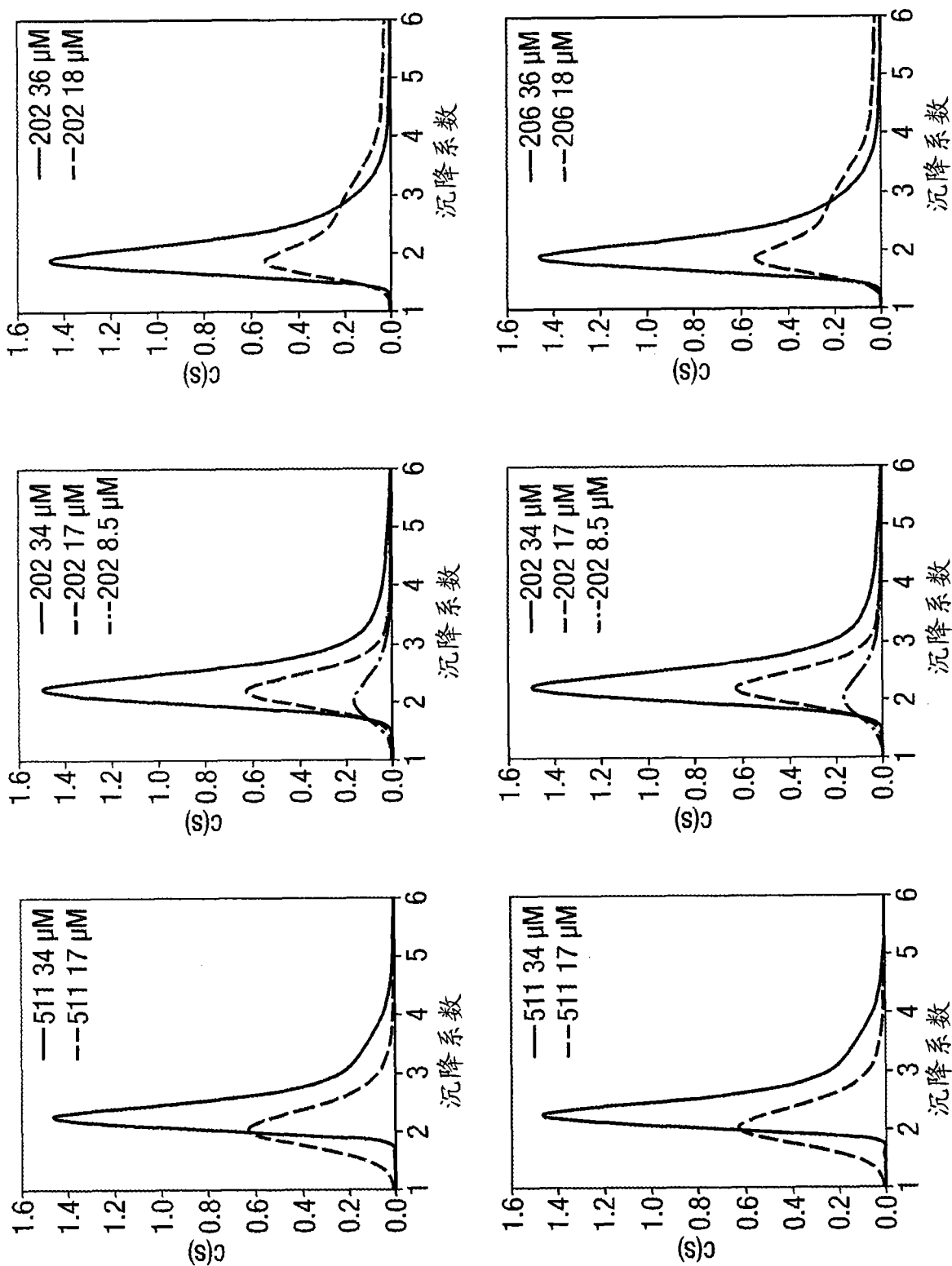


图 34

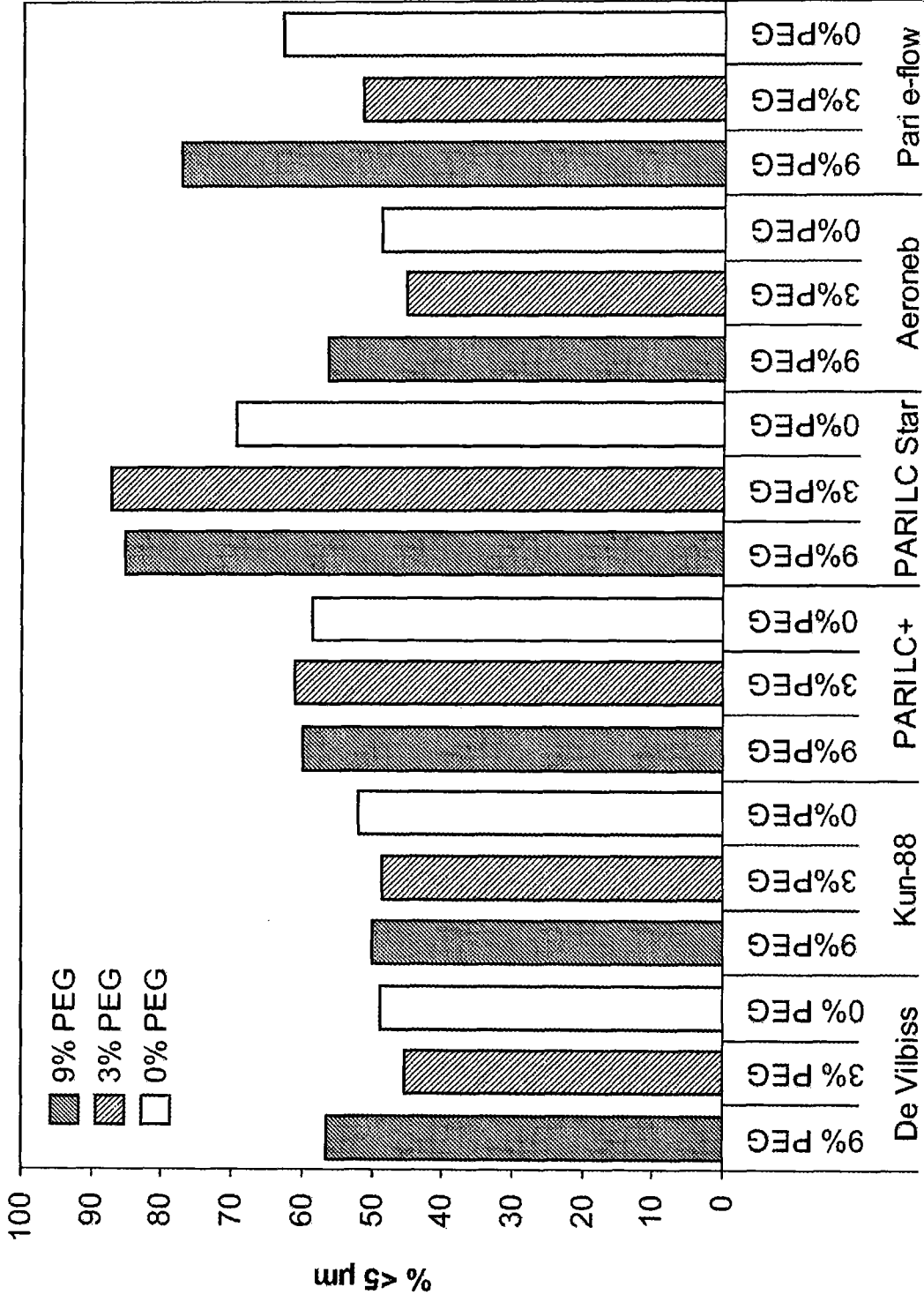


图 35

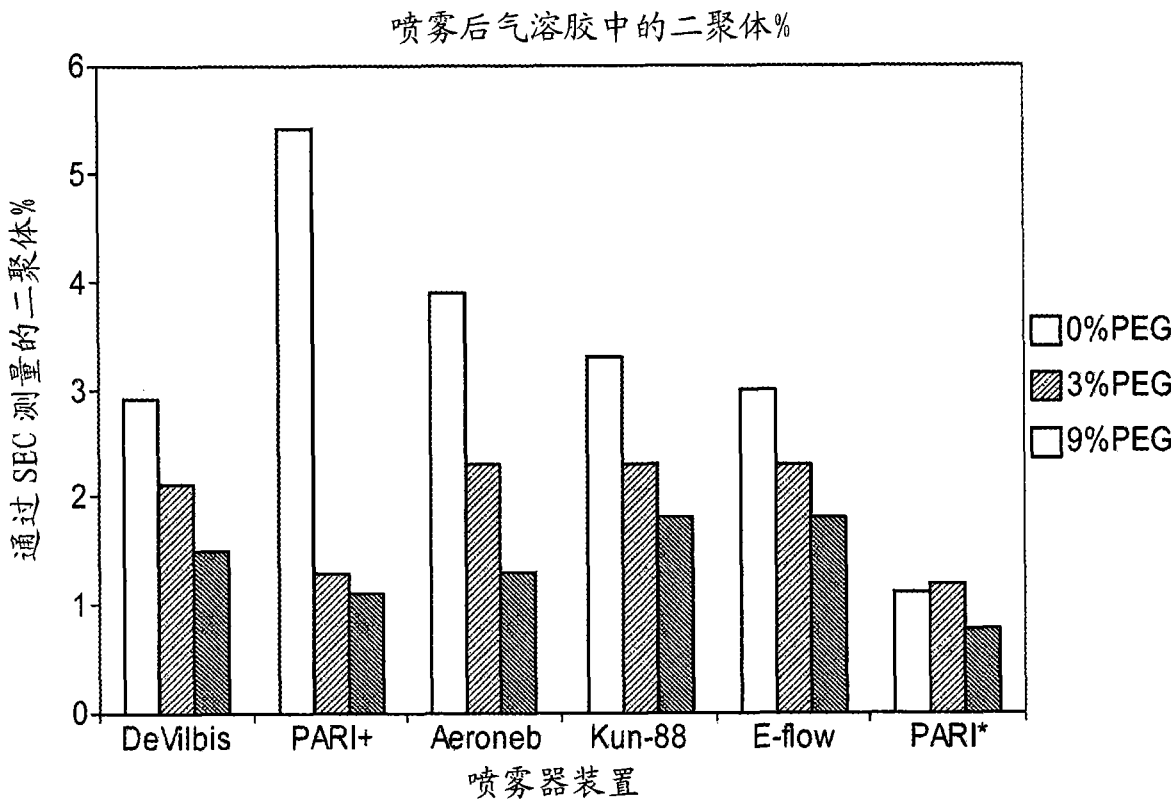
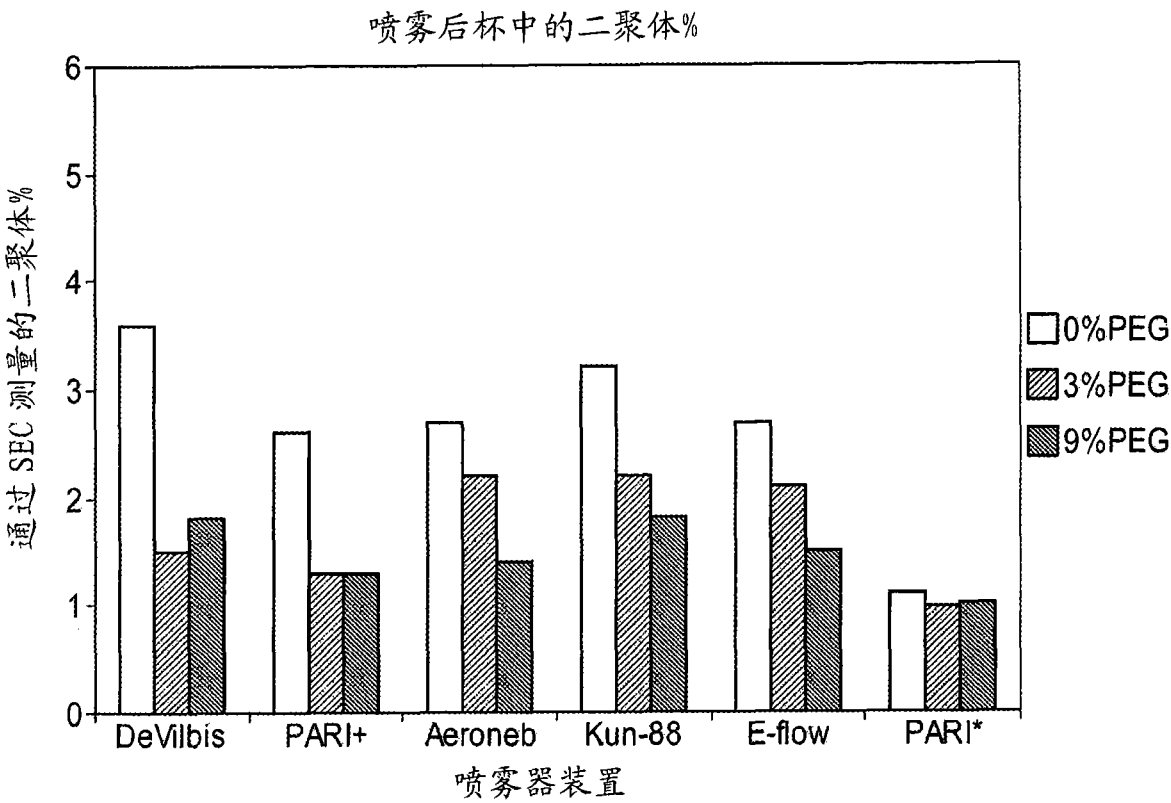


图 36

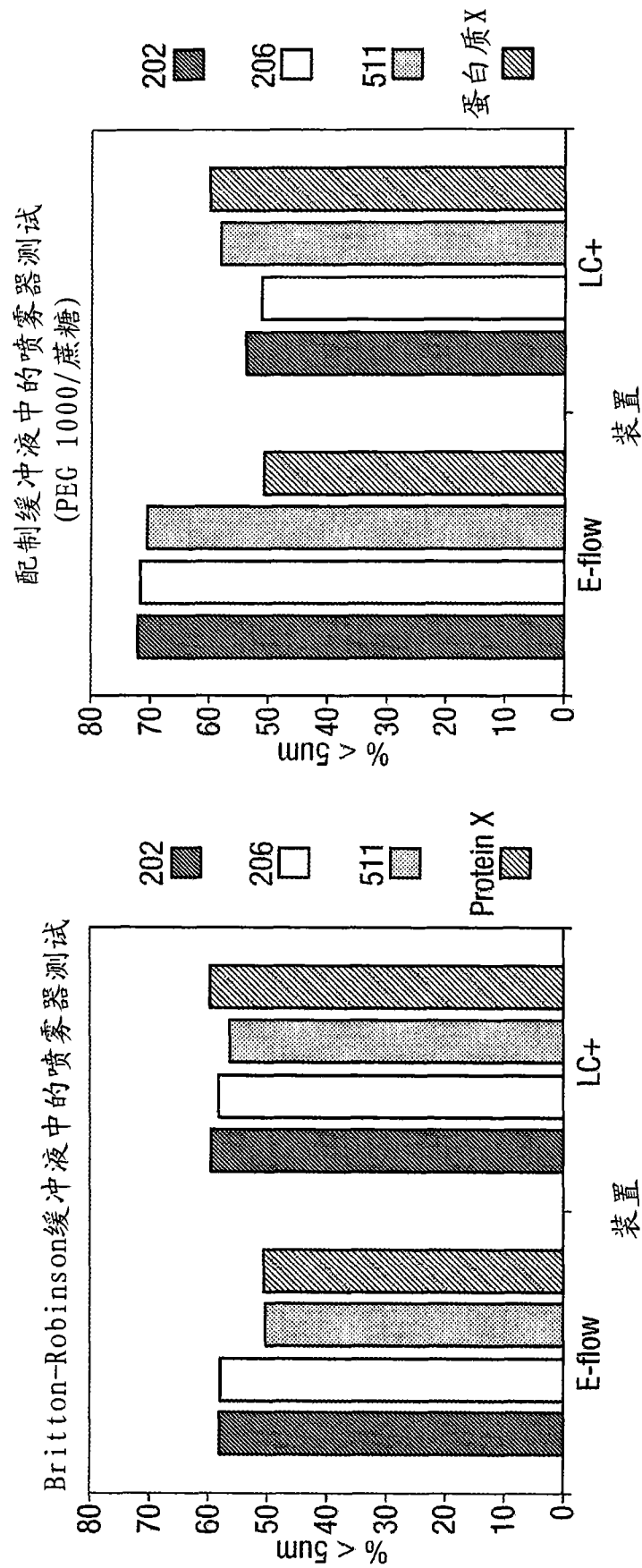


图 37

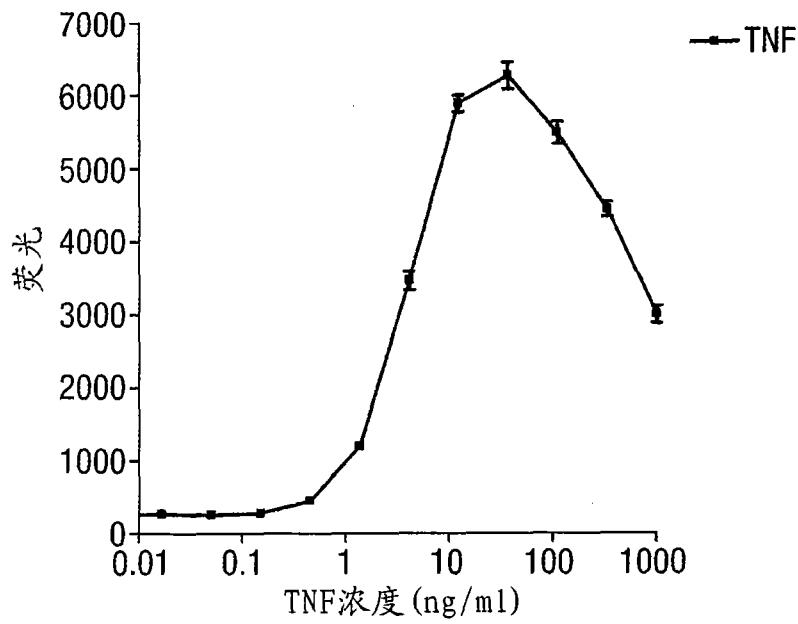


图 38

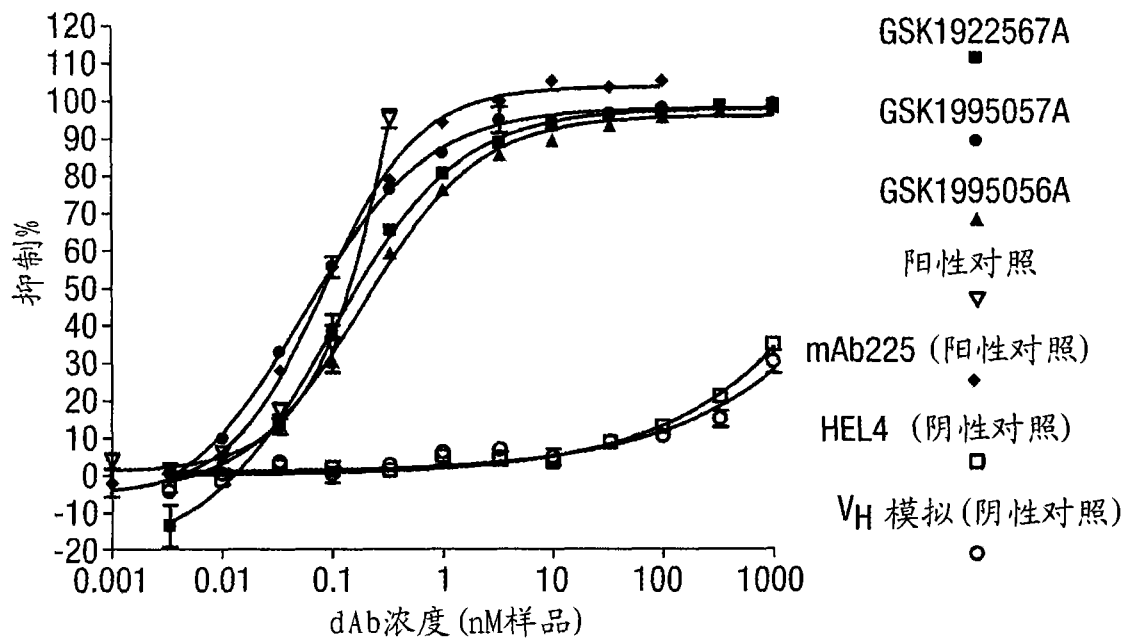


图 39

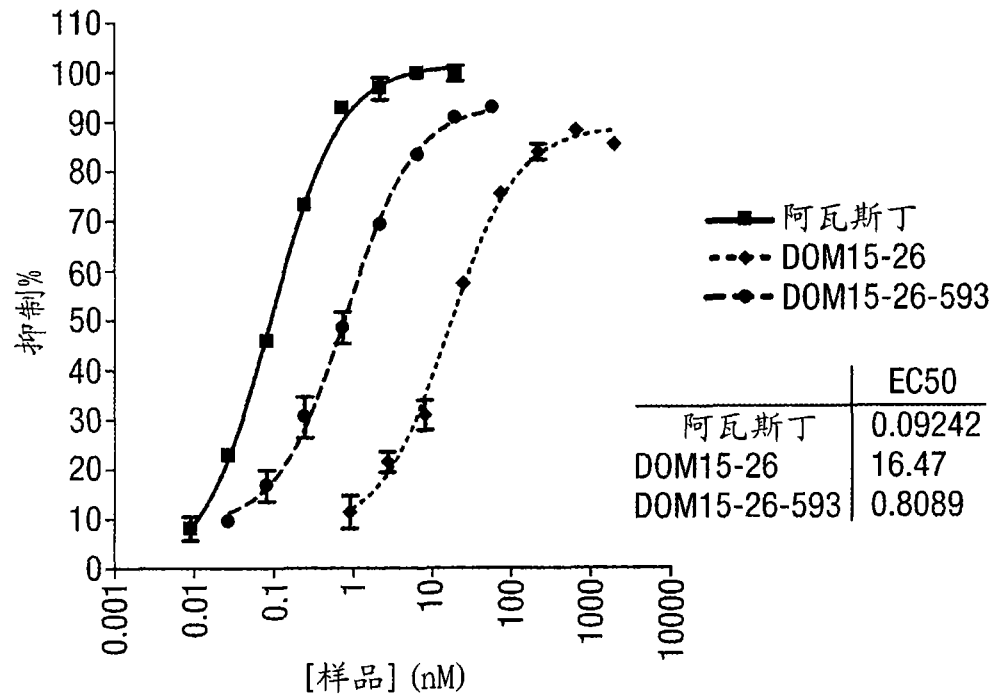


图 40

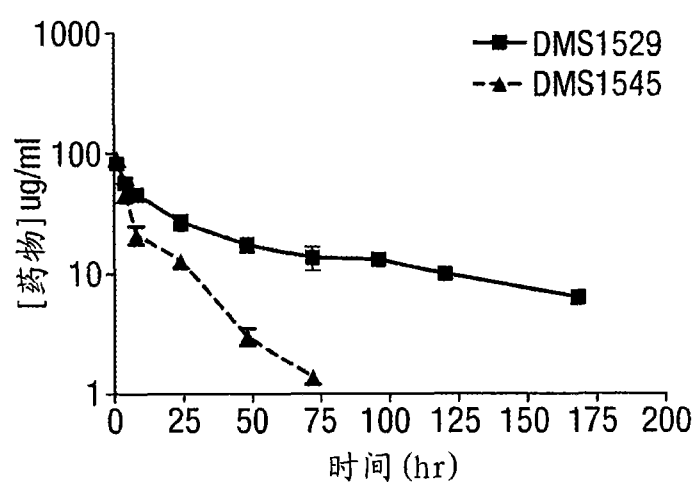


图 41

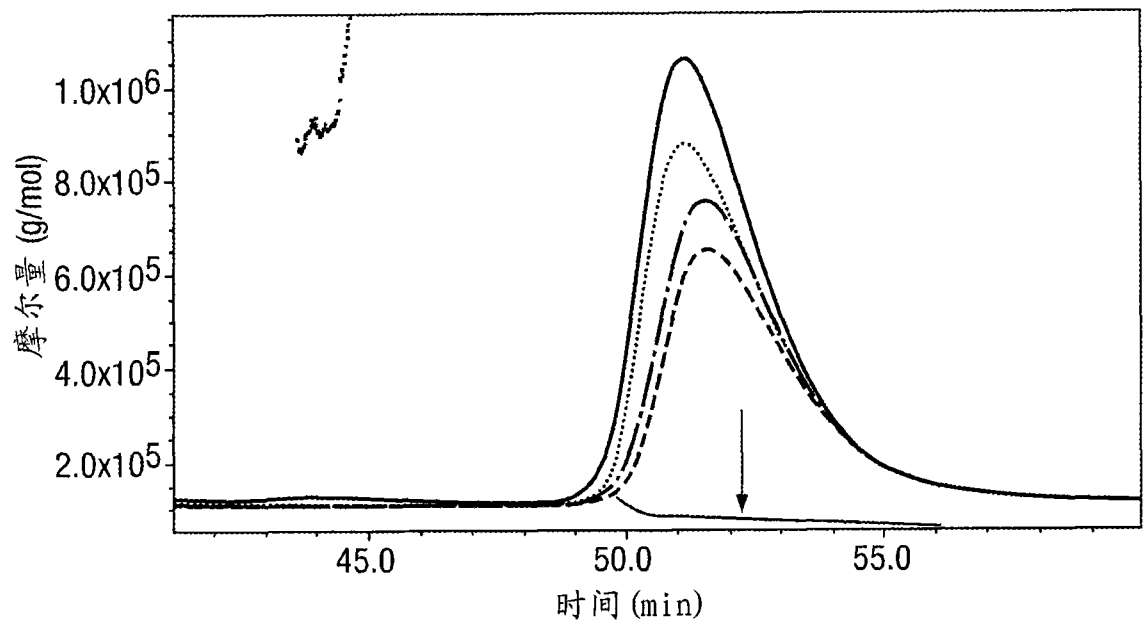


图 42a

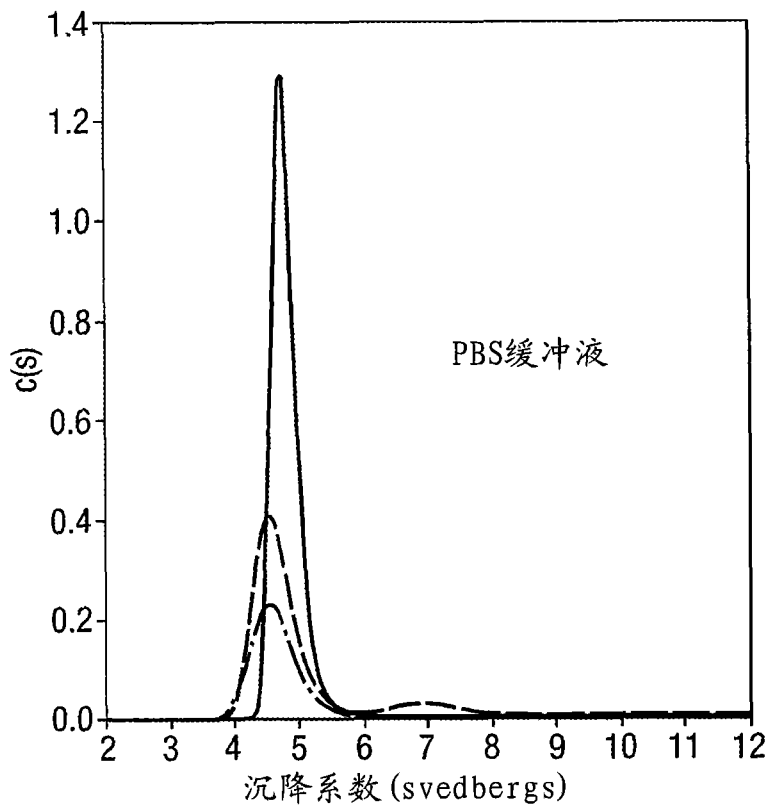


图 42b

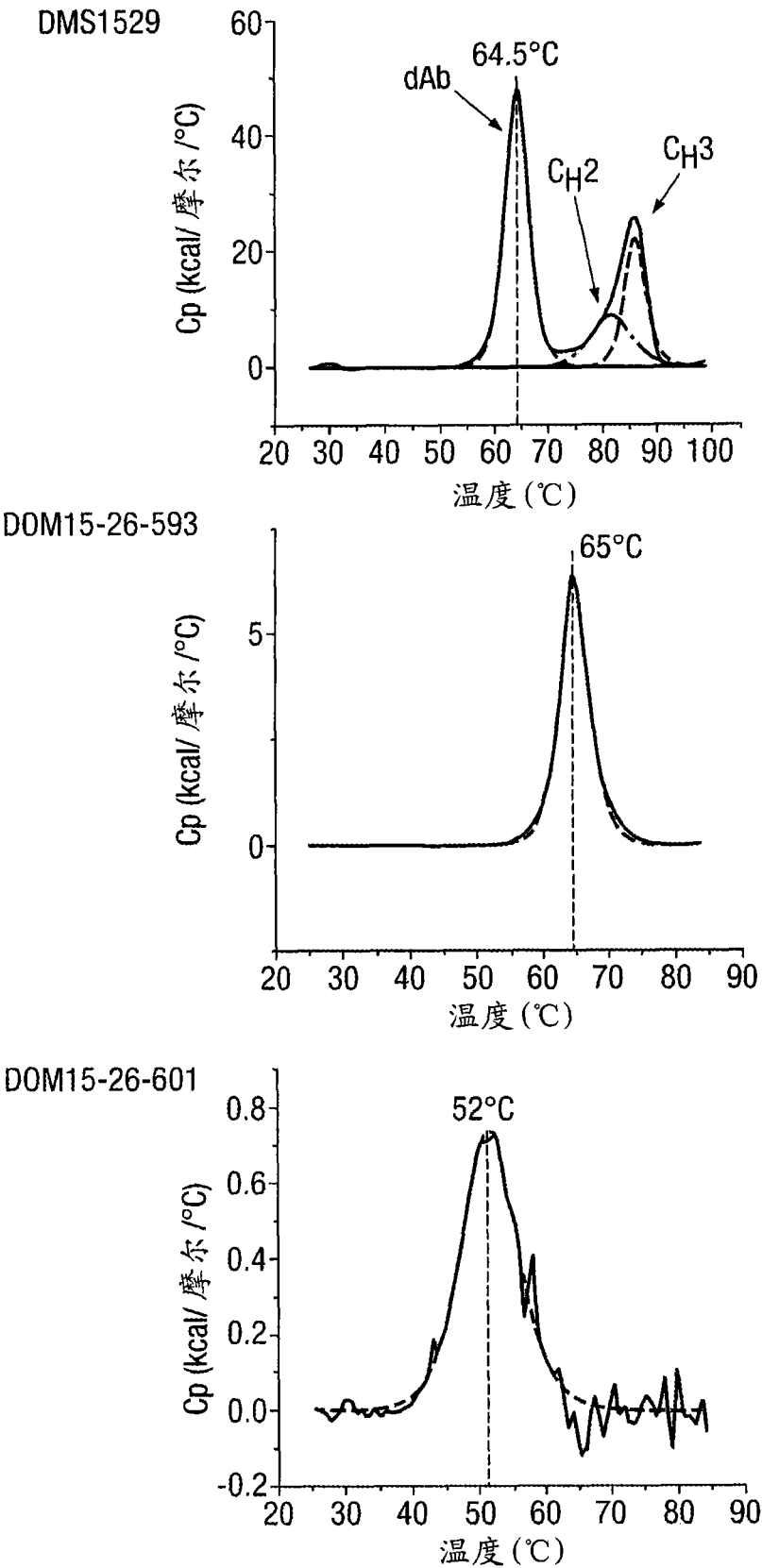


图 43

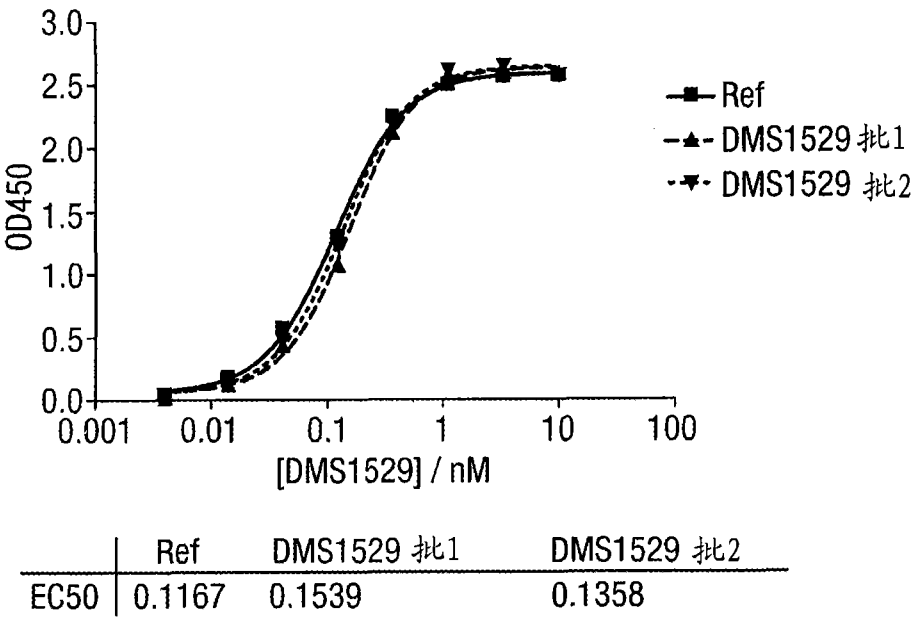


图 44

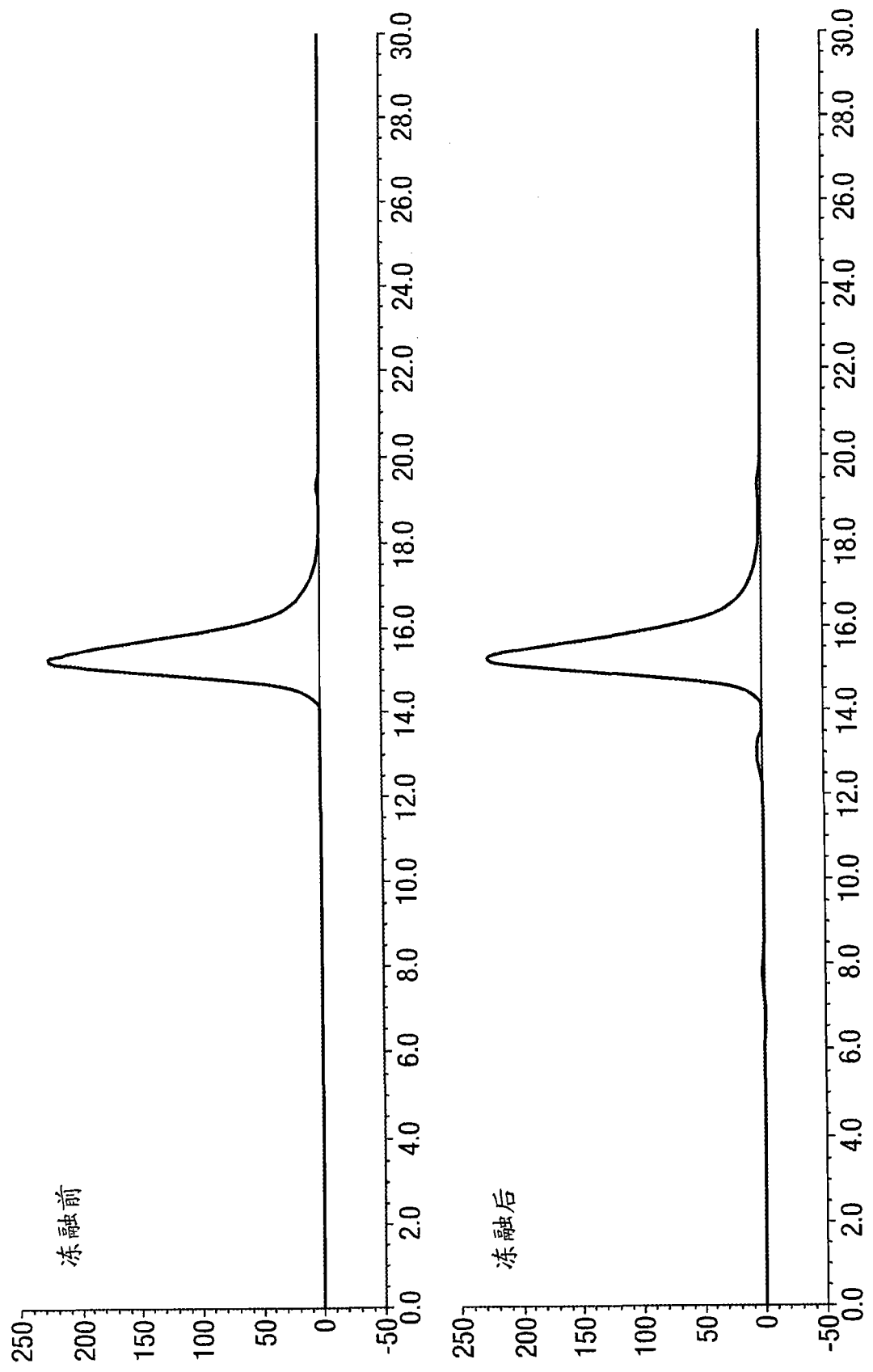
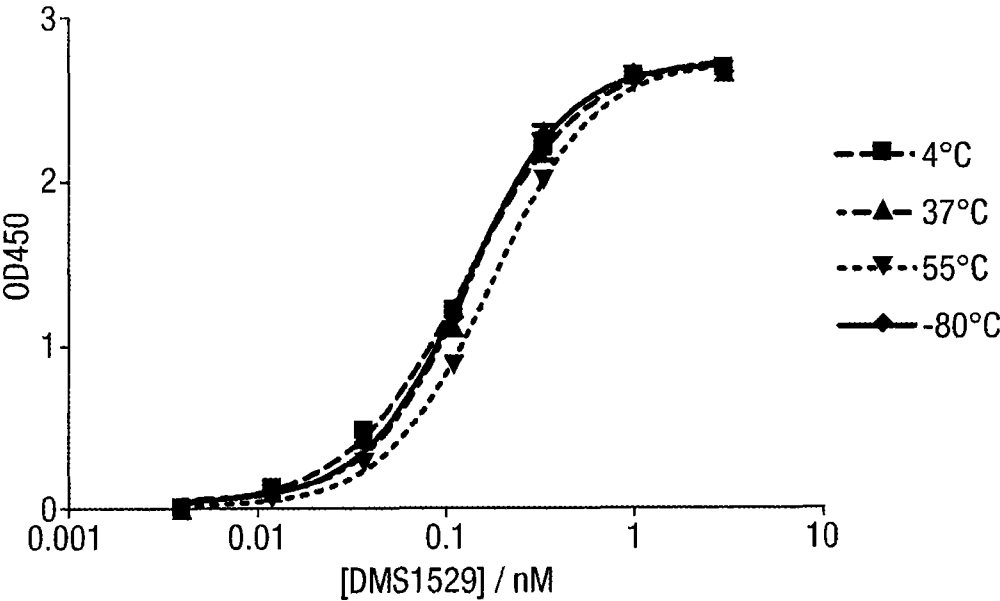


图 45



	4°C	37°C	55°C	-80°C
EC50	0.1269	0.1334	0.1748	0.1288

图 46

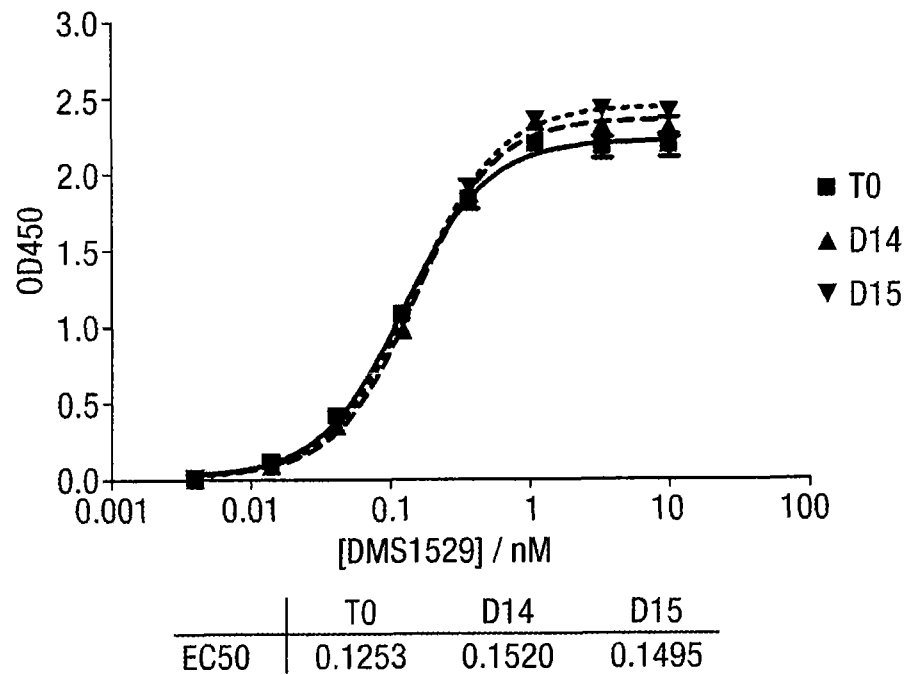


图 47A

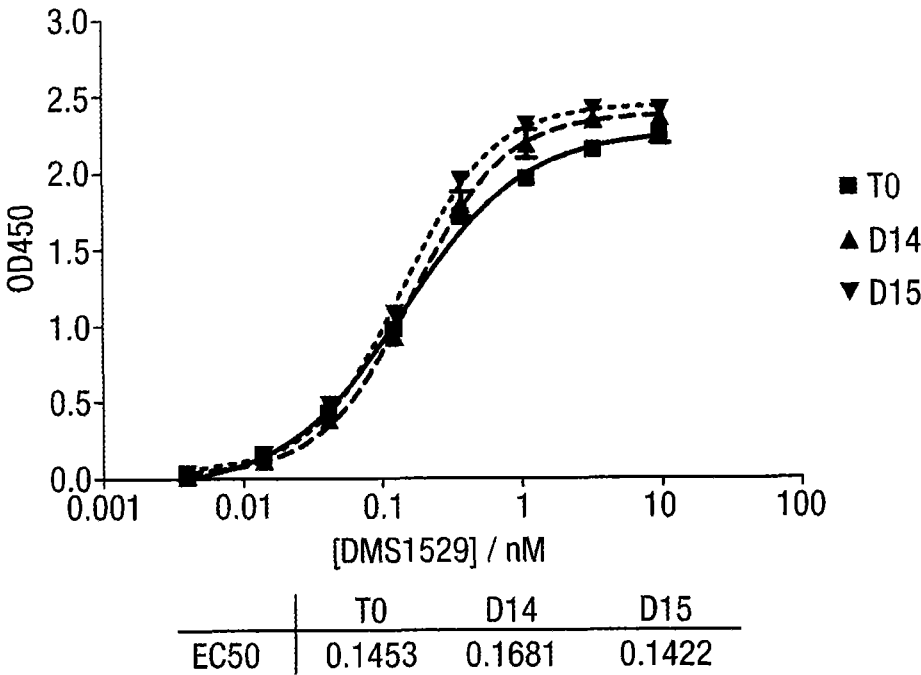


图 47B

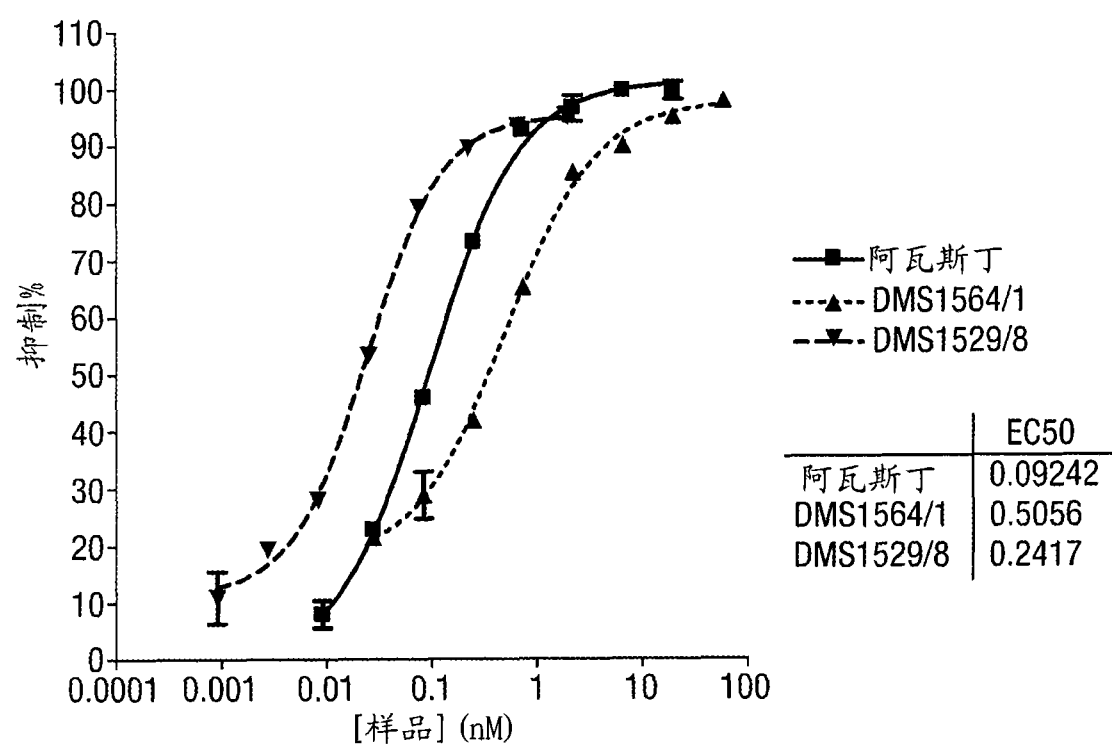


图 48

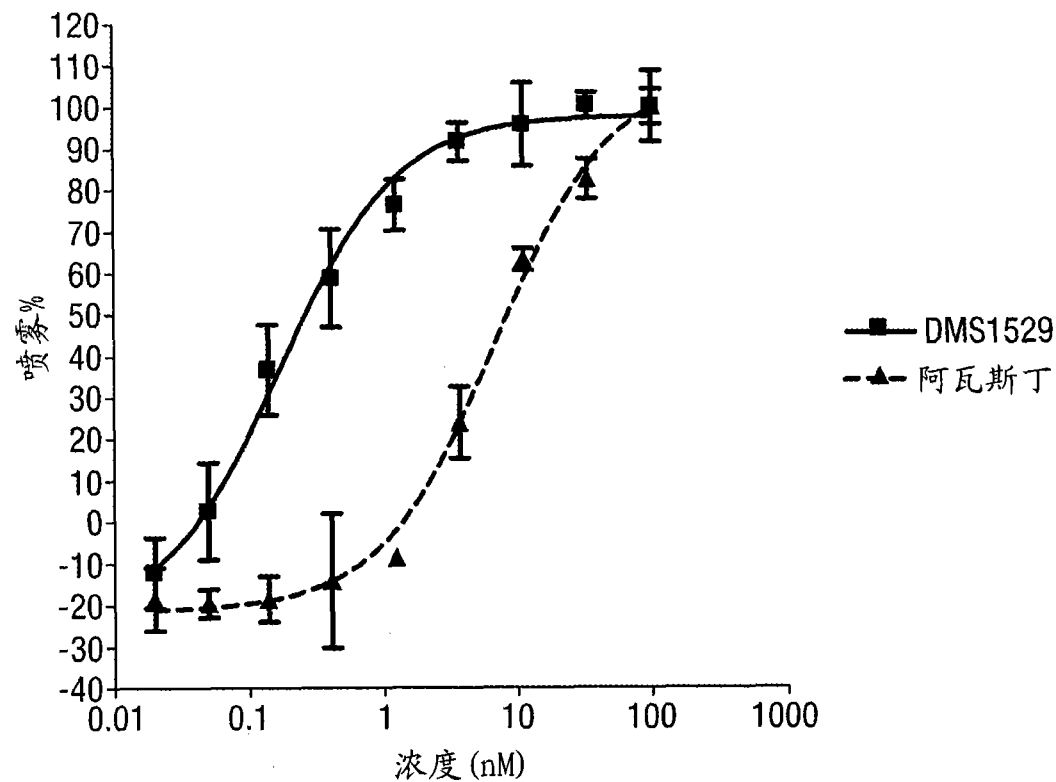


图 49

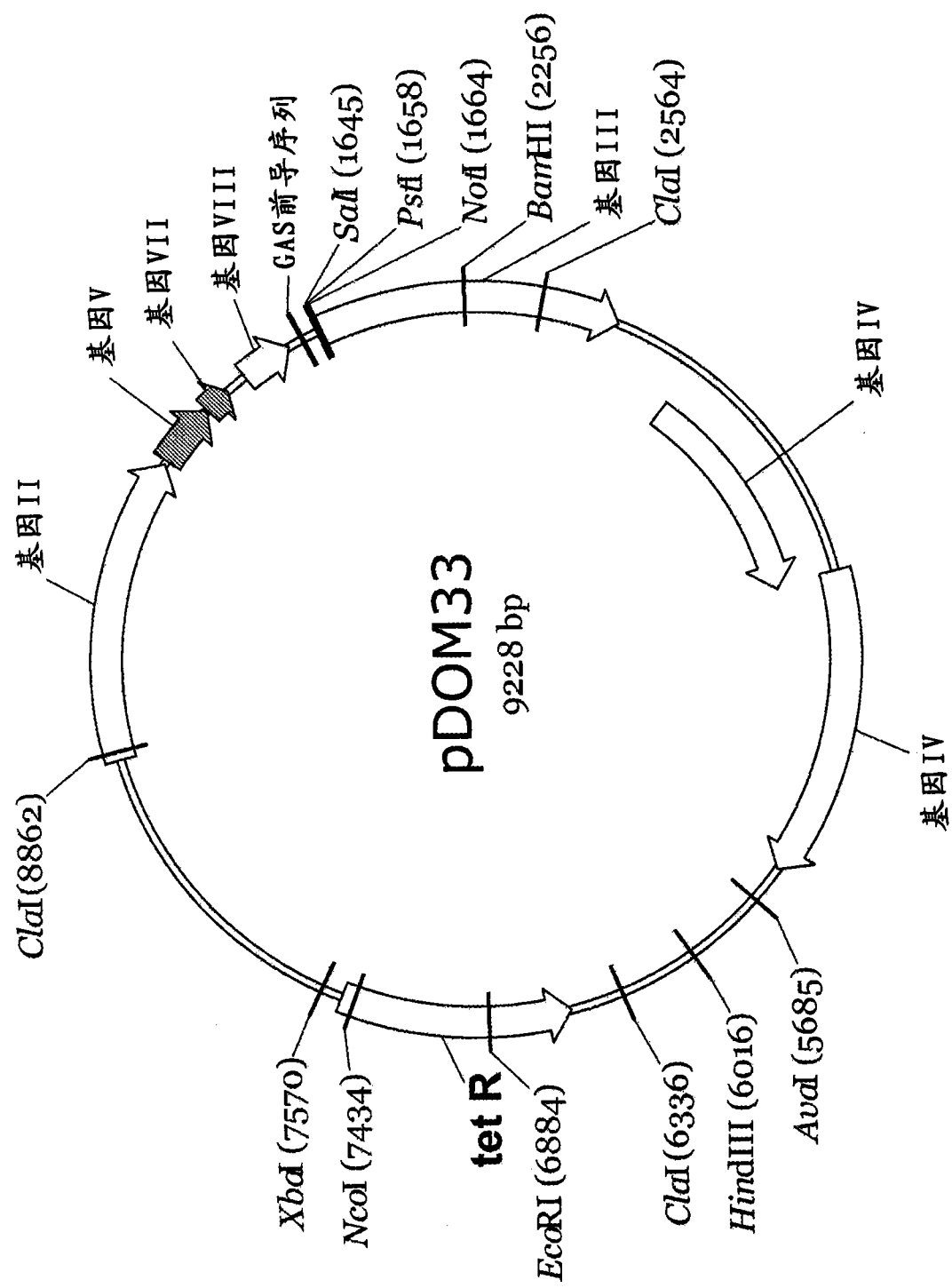


图 50

Kabat_编号	5	10	15	20	25	30	35
DOM7h-1	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-10	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-11	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-12	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-13	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-14	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-2	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-3	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-4	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-5	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-6	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-7	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-8	D	I	S	T	Q	S	F
DOM7h-9	D	I	S	T	Q	S	F
Kabat_编号	40	45	50	55	60	65	70
DOM7h-1	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-10	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-11	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-12	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-13	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-14	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-2	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-3	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-4	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-5	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-6	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-7	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-8	T	Q	S	F	D	I	S
DOM7h-9	T	Q	S	F	D	I	S
Kabat_编号	75	80	85	90	95	100	105
DOM7h-1	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-10	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-11	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-12	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-13	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-14	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-2	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-3	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-4	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-5	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-6	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-7	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-8	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-9	F	T	L	T	I	S	F
Kabat_编号	110	115	120	125	130	135	140
DOM7h-1	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-10	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-11	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-12	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-13	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-14	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-2	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-3	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-4	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-5	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-6	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-7	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-8	F	T	L	T	I	S	F
DOM7h-9	F	T	L	T	I	S	F

图 51a

Kabat_编号	5	10	15	20	25	30	35																												
DOM7m-12	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	T	F	R	H	L	K	W
DOM7m-16	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	T	I	K	H	L	K	W
DOM7m-26	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	T	I	Y	H	L	K	W

Kabat_编号	40	45	50	55	60	65	70																												
DOM7m-12	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	R	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D
DOM7m-16	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	R	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D
DOM7m-26	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D

Kabat_编号	75	80	85	90	95	100	105																												
DOM7m-12	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	V	A	L	Y	P	K	T	F	Q	Q	G	T	K	V	E
DOM7m-16	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	A	R	N	F	Q	T	F	Q	Q	G	T	K	V	E
DOM7m-26	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	V	R	K	V	P	R	T	F	Q	Q	G	T	K	V	E

Kabat_编号							
DOM7m-12	I	K	R				
DOM7m-16	I	K	R				
DOM7m-26	I	K	R				

图 51a(续I)

Kabat_编号	5	10	15	20	25	30	35
DQM7r-1	D	I	G	T	C	A	S
DQM7r-13	G	I	G	T	C	A	S
DQM7r-14	D	I	G	T	C	A	S
DQM7r-15	D	I	G	T	C	A	S
DQM7r-16	D	I	G	T	C	A	S
DQM7r-17	D	I	G	T	C	A	S
DQM7r-18	D	I	G	T	C	A	S
DQM7r-19	D	I	G	T	C	A	S
DQM7r-3	D	I	G	T	C	A	S
DQM7r-4	D	I	G	T	C	A	S
DQM7r-7	D	I	G	T	C	A	S
DQM7r-5	D	I	G	T	C	A	S
DQM7r-6	D	I	G	T	C	A	S
Kabat_编号	40	45	50	55	60	65	70
DQM7r-1	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-13	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-14	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-15	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-16	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-17	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-18	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-19	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-3	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-4	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-7	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-5	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-6	T	C	A	S	D	I	G
Kabat_编号	75	80	85	90	95	100	105
DQM7r-1	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-13	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-14	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-15	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-16	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-17	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-18	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-19	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-3	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-4	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-7	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-5	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-6	T	C	A	S	D	I	G
Kabat_编号	110	115	120	125	130	135	140
DQM7r-1	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-13	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-14	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-15	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-16	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-17	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-18	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-19	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-3	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-4	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-7	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-5	T	C	A	S	D	I	G
DQM7r-6	T	C	A	S	D	I	G

图 51a(续II)

Kabat_编号	5	10	15	20	25	30	35
DOM7h-23	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLELECAASGPTFYDYNN S
DOM7h-21	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLELECAASGPTFDLYDN S
DOM7h-22	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLELECAASGPTFSKYNN S
DOM7h-24	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLELECAASGPTFHRYSM S
DOM7h-25	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLELECAASGPTFMKYNN A
DOM7h-26	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLELECTASGPTFD EYNN S
DOM7h-27	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLELECAASGPTFSDYRN S
DOM7h-30	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLELECAASGPTFR TYTM A
DOM7h-31	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLELECAASGPTFR PTNM S

Kabat_编号	40	45	50	55	59	64	69
DOM7h-23	NVRQ	A	PGKG	L	EWVS	T	ITHTGGVTYYADSVKGRFT I
DOM7h-21	NVRQ	A	PGKG	L	EWVS	S	IVNSGVRTYYADSVKGRFT I
DOM7h-22	NVRQ	A	PGKG	L	EWVS	S	IDFMGPHTYYADSVKGRFT I
DOM7h-24	NVRQ	A	PGKG	L	EWVS	T	ILPGQDVTYYADSVKGRFT I
DOM7h-25	NVRQ	A	PGKG	L	EWVS	T	ILGSGNNTYYADSVKGRFT I
DOM7h-26	NVRQ	A	PGKG	L	EWVS	T	ILPHGDRYYADSVKGRFT I
DOM7h-27	NVRQ	A	PGKG	L	EWVS	T	IIEN GKFTYYADSVKGRFT I
DOM7h-30	NVRQ	A	PGKG	L	EWVS	S	ITSSGSETYYADSVKGRFT I
DOM7h-31	NVRQ	A	PGKG	L	EWVS	T	ITGTGAATYYADSVKGRFT I

Kabat_编号	74	79	82b	86	91	96	100a
DOM7h-23	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKQNPBYQ -
DOM7h-21	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKLNQSYH W
DOM7h-22	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKGRBTSML P
DOM7h-24	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKQTFDYM -
DOM7h-25	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKTM DYK -
DOM7h-26	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKQDPLYR -
DOM7h-27	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKQDWMYM -
DOM7h-30	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKVNGLYK -
DOM7h-31	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYYCAKQNSRYR F

Kabat_编号	100c	105	110
DOM7h-23	- - -	F	DYWGQGTILVTVSS
DOM7h-21	D - -	F	DYWGQGTILVTVSS
DOM7h-22	MKGK	F	DYWGQGTILVTVSS
DOM7h-24	- - -	F	DYWGQGTILVTVSS
DOM7h-25	- - -	F	DYWGQGTILVTVSS
DOM7h-26	- - -	F	DYWGQGTILVTVSS
DOM7h-27	- - -	F	DYWGQGTILVTVSS
DOM7h-30	- - -	F	DYWGQGTILVTVSS
DOM7h-31	- - -	D	YWGQGTILVTVSSK

图 51a(续III)

Kabat_编号	5	10	15	20	25	30	35
DOM7r-20	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGFTFWPYTH
DOM7r-27	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGFTFWPYTH
DOM7r-28	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGFTFWPYTH
DOM7r-21	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGFTFWPYTH
DOM7r-25	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGFTFWPYTH
DOM7r-22	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGFTFWPYTH
DOM7r-23	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGFTFWPYTH
DOM7r-24	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGFTFWPYTH
DOM7r-26	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGFTFWPYTH
DOM7r-29	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAAEGFTFKDYDM

Kabat_编号	40	45	50	55	60	65	69
DOM7r-20	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFT
DOM7r-27	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFT
DOM7r-28	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFT
DOM7r-21	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFT
DOM7r-25	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFT
DOM7r-22	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFT
DOM7r-23	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFT
DOM7r-24	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFT
DOM7r-26	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	T	ISPPGSTTYTADSVKGRFT
DOM7r-29	WVRQ	A	PGKG	L	ENVS	N	ISPPGSTTYTADSVKGRFT

Kabat_编号	74	79	82L	86	91	96	100a
DOM7r-20	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYTCAKGQKDF
DOM7r-27	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYTCAKSDVLT
DOM7r-28	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYTCAKVRSRPP
DOM7r-21	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYTCAKGHLPP
DOM7r-25	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYTCAKKTQPS
DOM7r-22	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYTCAKKLINQ
DOM7r-23	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYTCAKVVKDNT
DOM7r-24	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYTCAKMTGGK
DOM7r-26	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYTCAKKTENRQ
DOM7r-29	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVYTCAKGPRPP

Kabat_编号	100a	105	110
DOM7r-20	----	D	YWGQ
DOM7r-27	LDGF	D	YWGQ
DOM7r-28	KF--	D	YWGQ
DOM7r-21	----	D	YWGQ
DOM7r-25	----	D	YWGQ
DOM7r-22	----	D	YWGQ
DOM7r-23	----	D	YWGQ
DOM7r-24	----	D	YWGQ
DOM7r-26	EF--	D	YWGQ
DOM7r-29	TF--	D	YWGQ

图 51a(续IV)

dAb 2, 4, 7, 41

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASPLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSPPTFGQGTKVEIKR

dAb 38, 54

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRASPLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYRIPPTFGQGTKVEIKR

dAb 46, 47, 52, 56

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIFKSLKWYQQKPGKAPKLLIYNASYLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYWPVPTFGQGTKVEIKR

dAb 13, 15

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIYYHLKWYQQKPGKAPKLLIYKSTLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVRKVPRTFGQGTKVEIKR

dAb 30, 35

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRRYLKWYQQKPGKAPKLLIYQASVLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGLYPPTFGQGTKVEIKR

dAb 19,

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIYNWLKWYQQKPGKAPKLLIYRASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNVVIPRTFGQGTKVEIKR

dAb22

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILWHLRWYQQKPGKAPKLLIYHASLLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSAVYPKTFGQGTKVEIKR

dAb23

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIFRYLAWYQQKPGKAPKLLIYHASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRLLYPKTFGQGTKVEIKR

dAb24

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIFYHLAWYQQKPGKAPKLLIYPASKLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRARWPRTFGQGTKVEIKR

dAb31

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIWHLNWYQQKPGKAPKLLIYRASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVARVPRTFGQGTKVEIKR

dAb33

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIYRYLRWYQQKPGKAPKLLIYKASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYVGYPRTFGQGTKVEIKR

dAb34

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILKYLKWYQQKPGKAPKLLIYNASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTTYYPITFGQGTKVEIKR

dAb53

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILRYLRWYQQKPGKAPKLLIYKASWLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVLYYPQTFGQGTKVEIKR

dAb11

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSILRSLKWYQQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYWPATFGQGTKVEIKR

图 51a(续V)

dAb12

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI~~FR~~HLK~~WY~~Q~~Q~~KPGKAPKLLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLT~~IS~~SLQPEDFATYYCQ~~Q~~VALYPKTFGQGTKVEIKR

dAb17

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI~~RK~~YL~~RW~~YQ~~Q~~KPGKAPKLLIYTASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLT~~IS~~SLQPEDFATYYCQ~~Q~~NLFWPRTFGQGTKVEIKR

dAb18

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI~~RR~~YLN~~WY~~Q~~Q~~KPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLT~~IS~~SLQPEDFATYYCQ~~Q~~MLFY~~PK~~TFGQGTKVEIKR

dAb16, 21

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI~~IK~~HLK~~WY~~Q~~Q~~KPGKAPKLLIYGASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLT~~IS~~SLQPEDFATYYCQ~~Q~~GARWPQTFGQGTKVEIKR

dAb25, 26

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI~~YY~~HLK~~WY~~Q~~Q~~KPGKAPKLLIYKASTLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLT~~IS~~SLQPEDFATYYCQ~~Q~~VRKVPRTFGQGTKVEIKR

dAb27

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI~~YK~~HLK~~WY~~Q~~Q~~KPGKAPKLLIYNASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLT~~IS~~SLQPEDFATYYCQ~~Q~~VGRYPKTFGQGTKVEIKR

dAb55

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI~~FK~~SLK~~WY~~Q~~Q~~KPGKAPKLLIYNASYLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLT~~IS~~SLQPEDFATYYCQ~~Q~~VVYWPVTFGQGTKVEIKR

dAb 8, 10

EVQLLES~~GG~~LVQPGGSLRLS~~CA~~ASGFTFW~~VY~~QMDWVRQAPGKGLEWVSSISAFGAKTL
YADSVKGRFTISRDN~~SK~~NTLYLQMN~~SL~~RAEDTAVYYCAKLSGKFDYWGQGT~~LV~~TVSS

dAb 36

EVQLLES~~GG~~LVQPGGSLRLS~~CA~~ASGFTFW~~SY~~QMTWVRQAPGKGLEWVSSISSFGSSTL
YADSVKGRFTISRDN~~SK~~NTLYLQMN~~SL~~RAEDTAVYYCAKGRDHNYS~~LF~~DYWGQGT~~LV~~TVSS

图 51a(续VI)

>DOM7h-1

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCTTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCC
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATACTG TTCCTCCTAC GTTTGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACAG

>DOM7h-10

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCACCCTCC CTGTCCGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCTTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTATTCGA TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-11

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCG TCCGATTGGG ACGACGTAA GTTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTGGTTT GGTCCCGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCGCAG GCTGGGACGC ATCCTACGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-12

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTAA GTATATTGGT TCGCAGTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCGCTTGG GCGTCCGTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCTCAG GGTGCTGCGT CGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-13

GACATTCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTTTATTTAT CGGTATTTAT CGTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGTCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCGTCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CATGCTCATT TGCCTCGTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

图 51b

>DOM7h-14

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGG TCTCAGTTAT CTTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCATGTGG CGTTCCTCGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT

GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCTCAG GGTGCGGCGT TGCCTAGGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

图 51b(续I)

>DOM7h-2

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTGCT ACTTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG TCTTCCTCTT TGCAAAGCGC GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGTT TTCACACTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATGCTG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-3

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGAT ACTGGGTTAG CGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATAAT GTGTCCAGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTGGGGTA GTCCTACGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-4

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGAGATTTAT TCGTGGTTAG CGTGGTACCA GCAGAGACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCTTCCCATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTGATTGGTG ATCCTGTTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-6

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTACGCTCCT GATCTATCGG TTGTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTATAATG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-7

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATCTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG AATTCCCAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTTTGCGG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGG

图 51b(续II)

>DOM7h-8

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACCC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATCCCCTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATAGGG TGCCTCCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

图 51b(续III)

>DOM7h-9

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTGGG TTGTGGTTAC ATTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG TCTTCCTTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTATAATT TGCCTTATAC GTCCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-12

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTTT CGGCATTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCG GCATCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTGCGCTGT ATCCTAAGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-16

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTATT AAGCATTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGGT GCATCCCGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GGGGCTCGGT GGCCTCAGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-26

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAT TATCATTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAG GCATCCACGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTCGGAAGG TGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-1

GACATCCAGA CGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATCGTA TGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAGGG TAGAAATCAA ACGG

图 51b(续IV)

>DOM7r-13

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACCC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTCAT AGGGAGTTAA GGTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG GCGTCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTATCTGC CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

图 51b(续V)

>DOM7r-14

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTCAT AGGGAGTTAA GGTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG GCGTCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATAGGG TGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-15

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGTATTGGG CGGAGGTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGGCAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATCGT ACGTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTCGCAGT GGCCTCATAAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-16

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTTAT AAGAATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT TCTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATCTGT CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-17

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTTAT AATAATTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT ACTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGATGGCGTG CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-18

GACATTCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTTAT AAGTCGTTAG GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG TCTTCTTTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATCAGA TGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

图 51b (续VI)

>DOM7r-19

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTATCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTAT AGGCATTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GCGTCCAGGT TGCAAAGTGG GGTCCCAACA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTCATAATC CTCCTAAGAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

图 51b (续VII)

>DOM7r-3

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATATGC AGCCTTTTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-4

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCCGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGT CGGTATTTAC GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GGGTCCCAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGGTATCTTC AGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-7

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATTCTT CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA GCGG

>DOM7r-5

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTTTCG CGTCAGTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATGGG GCGTCCGTTT TGCAAAGCGG GATCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATATTA CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAAGTCAA ACGG

>DOM7r-8

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC
ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTTCAT AGGCAGTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTAT GCTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTTTTCTA AGCCTTCTAC GTTCGGCCAA
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

图 51b(续VIII)

>DOM7h-23

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTAT GATTATAATA TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACGCATA CGGGTGGGGT TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGAAT
CCTTCTTATC AGTTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

图 51b(续IX)

>DOM7h-21

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT CTTTATGATA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGTTAATT CGGGTGTTAG GACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACTTAAT
CAGAGTTATC ATTGGGATTT TGACTACTGG GGTGAGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC

>DOM7h-22

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG AAGTATTGGA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTGATTTTA TGGGTCCGCA TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGAGG
ACGTCGATGT TGCCGATGAA GGGGAAGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCACC
GTCTCGAGC

>DOM7h-24

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCAT CGTTATTGGA TGTCCTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTTGCCTG GTGGTGATGT TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGACG
CCTGATTATA TGTTTGAATA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-25

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG AAGTATAATA TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTCTTGGTG AGGGTAATAA TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACGATG
GATTATAAGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG C

>DOM7h-26

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
TCCTGTACAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT GAGTATAATA TGTCCTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTCTGCCGC ATGGTGATCG GACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGGAT
CCTTTGTATA GGTTTGAATA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

图 51b(续X)

>DOM7h-27

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG GATTATCGGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTATTTTCA ATGTAAGTT TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGGAT
TGGATGTATA TGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-30

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG ACGTATACTA TGGCTTGGGT CCGCCAGGCC
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTACTAGTA GTGGTTCTTC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGAAT
TCTTTGTATA AGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-31

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG CCGACTAATA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACTGGTA CTGGTGCTGC GACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGAAT
TCTCGTTATA GGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7r-20

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGGGG
AAGGATTTTG ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGCG

>DOM7r-27

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGTAT
GTTCTTAAGA CGGGTCTGGA TGTTTTGAC TACTGGGGTC AGGGAACCCT GGTCACCGTC
TCGAGCG

图 51b(续X1)

>DOM7r-28

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTATG GCGTATCAGA TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTCATCAGA CGGGTTTTTC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGCGT
TCTATGCGTC CTTATAAGTT TGACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
G

>DOM7r-21

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCGCGT TTGGTTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTAAT
CTTGAGCCGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG CG

图 51b(续XII)

>DOM7r-25

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCGCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGACG
GGTCCGTCGT CGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-22

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGT TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCGCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGCTT
AGTAATGGTT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG CG

>DOM7r-23

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCGCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGGTT
AAGGATAATA CGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-24

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCGCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAATACT
GGGGGTAAGC AGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-26

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCGCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGGACT
GAGAATAGGG GGGTTTCTTT TGA TACTACTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
G

图 51b(续XIII)

>DOM7x-29

GAGGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAG GATTATGATA TGACTTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAATG ATTTCTTCGT CGGGTCTTTG GACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTTTT
AGGCTGTTTC CTCGGACTTT TGACTACTGG GGTGAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC
G

图 51b (续XIV)

Dom 15-26-593-FC 融合体

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTKAYPMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSY
 TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLOMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGTILVTV
 SSASTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 K

图 52A

人 IgG1 Fc

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 52B

Dom 15-26-593-FC 融合体

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGT
 CTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGC
 CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTTTCAGAGATTTCCGCTTCGGGTTCCTAT
 ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
 AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTAC
 TGTGCGAAAGATCCTCGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
 TCGAGCGCTAGCACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGCGGA
 CCTAGCGTGTTCCTGTTCCTCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC
 CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC
 AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAG
 CAGTACAACAGCACCTACCGCGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGG
 CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCTGCCCTATC
 GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCCCAGGTCTACACCCTG
 CCTCCCTCCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG
 GGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAAC
 AACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACTCC
 AAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACCCAGAAGAGTCTGAGCCTGTCCCTGGC
 AAG

图 52C