I861302

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I861302 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：109143498 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 12 月 09 日

(51)Int. Cl.： ***C07K16/28 (2006.01)*** ***C07K16/46 (2006.01)***

A61K39/395 (2006.01) *A61P37/00 (2006.01)*

(30)優先權：2019/12/09 美國 62/945,391

2020/01/27 歐洲專利局 20305064.6

(71)申請人：比利時商艾伯霖克斯公司 (比利時) ABLYNX NV (BE)

比利時

法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)

法國

(72)發明人：羅梅拉爾 海蒂 ROMMELAERE, HEIDI (BE)；布里吉 安 BRIGE, ANN (BE)；科尼利斯 西格里德 CORNELIS, SIGRID (BE)；多姆布雷希特 布魯諾 DOMBRECHT, BRUNO (BE)；羅倫特 艾瑞克 LORENT, ERIC (BE)；里格 梅蘭妮 RIEGER, MELANIE (DE)；索斯 提摩西 SOOS, TIMOTHY (US)；帕克 約翰 PARK, JOHN (DE)；威格 伯恩德 WEIGLE, BERND (DE)；鄂伯 克勞斯 ERB, KLAUS (DE)

(74)代理人：陳彥希；何愛文

(56)參考文獻：

期刊 Venkataramani, Sathyadevi, et al. "Design and characterization of Zweimab and Doppelmab, high affinity dual antagonistic anti-TSLP/IL13 bispecific antibodies." Biochemical and biophysical research communications Vol. 504, No. 1, 26 September 2018, pages: 19-24.

審查人員：王顗棣

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：14 共 226 頁

(54)名稱

包含靶向 IL-13 及 TSLP 之免疫球蛋白單可變域的多肽

(57)摘要

本發明技術旨在提供用於治療患有發炎性疾病的個體的新型藥物。具體地，本發明技術提供了包含至少四個免疫球蛋白單可變域（ISVD）的多肽，所述至少四個免疫球蛋白單可變域的特徵在於至少兩個 ISVD 與 IL-13 結合並且至少兩個 ISVD 與 TSLP 結合。本發明技術還提供了核酸、載體和組合物。

The present technology aims at providing a novel type of drug for treating a subject suffering from an inflammatory disease. Specifically, the present technology provides polypeptides comprising at least four immunoglobulin single variable domains (ISVDs), characterized in that at least two ISVDs bind to IL-13 and at least two ISVDs binds to TSLP. The present technology also provides nucleic acids, vectors and compositions.

指定代表圖：

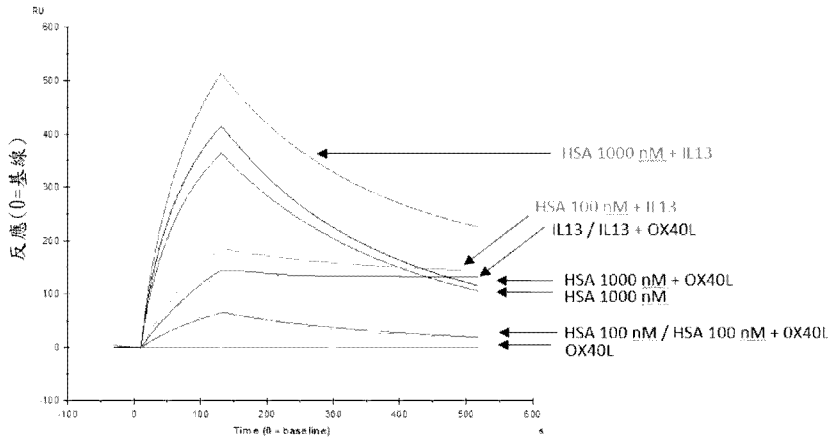

RU
反應(0=基線)
HSA 1000 nM + IL13
HSA 100 nM + IL13
IL13 / IL13 + OX40L
HSA 1000 nM + OX40L
HSA 1000 nM
HSA 100 nM / HSA 100 nM + OX40L
OX40L
Time (0 = baseline)
s

圖1

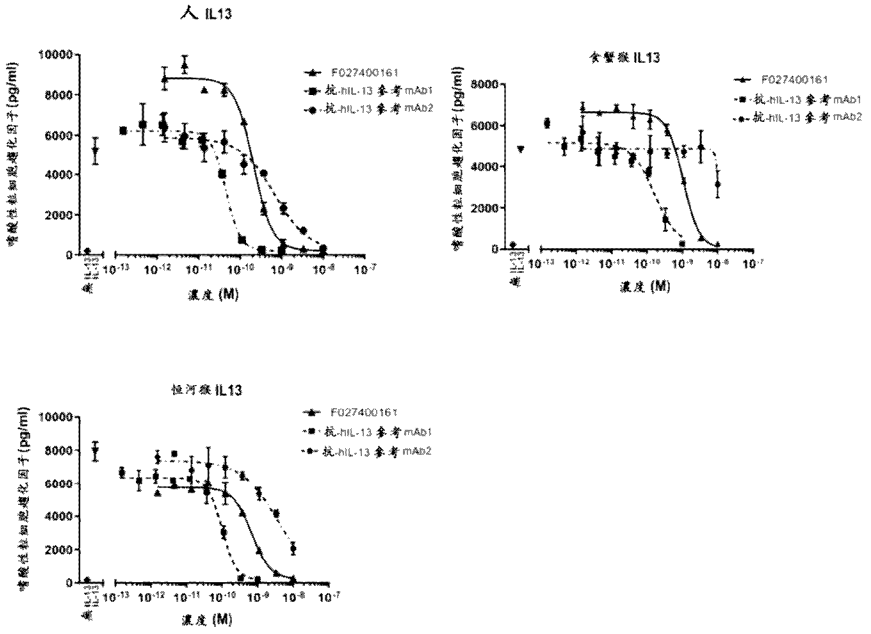

人 IL13
食蟹猴 IL13
恒河猴 IL13
F027400161
抗-hIL-13 參考 mAb1
抗-hIL-13 參考 mAb2
濃度 (M)

圖2

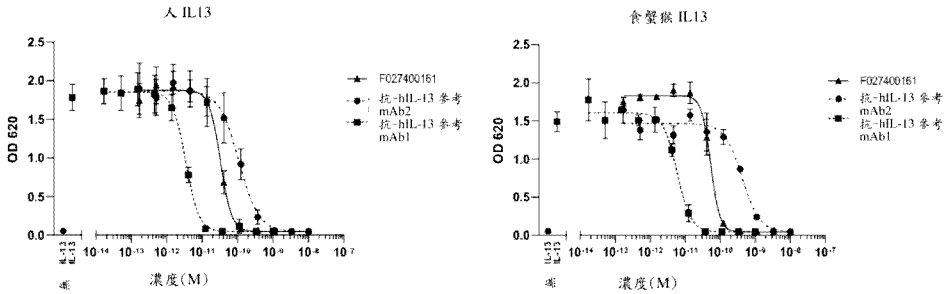

人 IL13
食蟹猴 IL13
OD 620
濃度(M)
F027400161
抗-hIL-13 參考 mAb2
抗-hIL-13 參考 mAb1

圖3

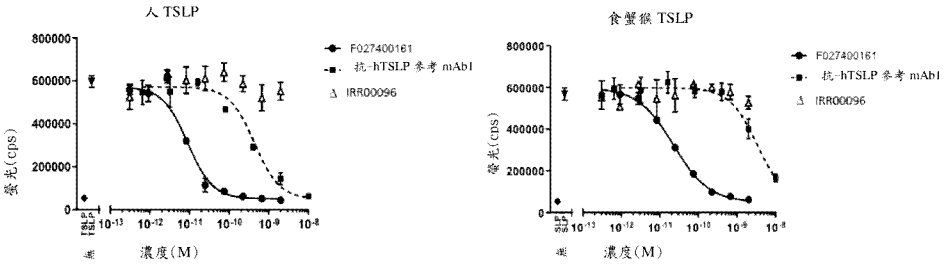

人 TSLP
食蟹猴 TSLP
螢光(cps)
濃度(M)
F027400161
抗-hTSLP 參考 mAb1
IRR00096

圖 4

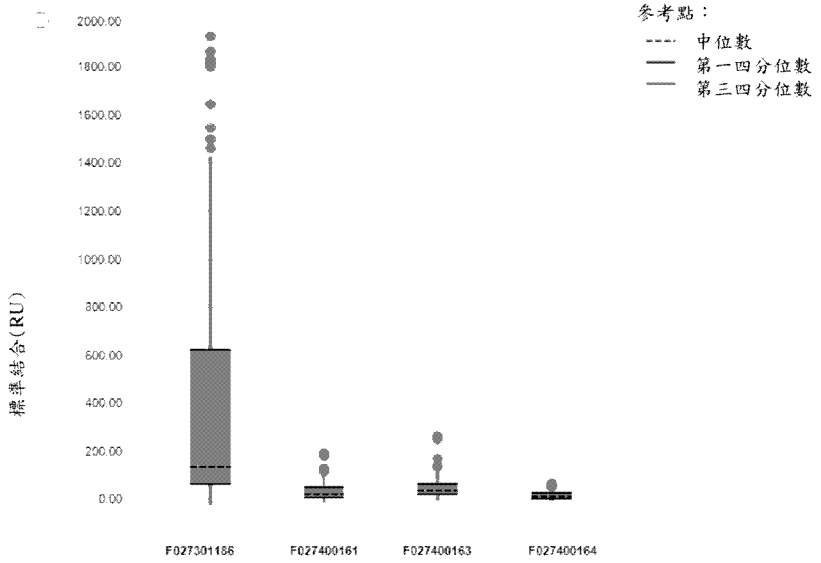
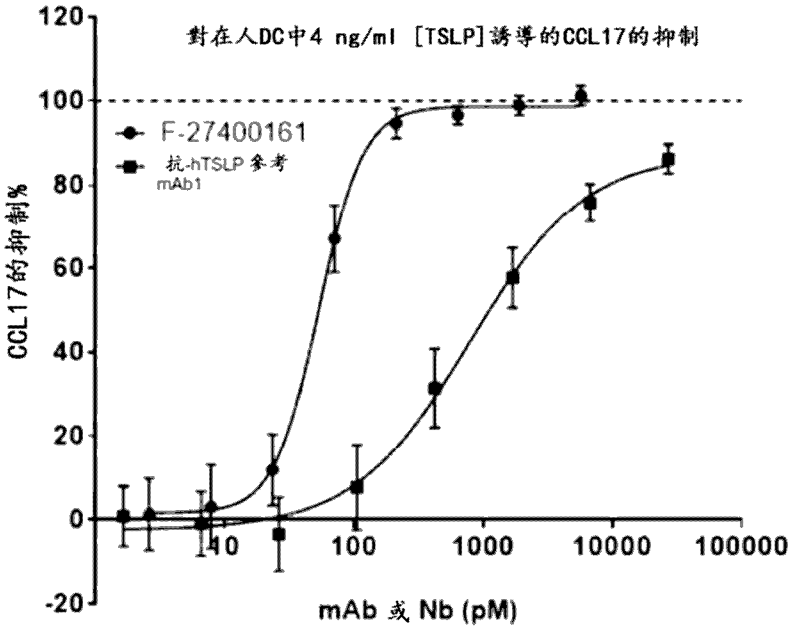
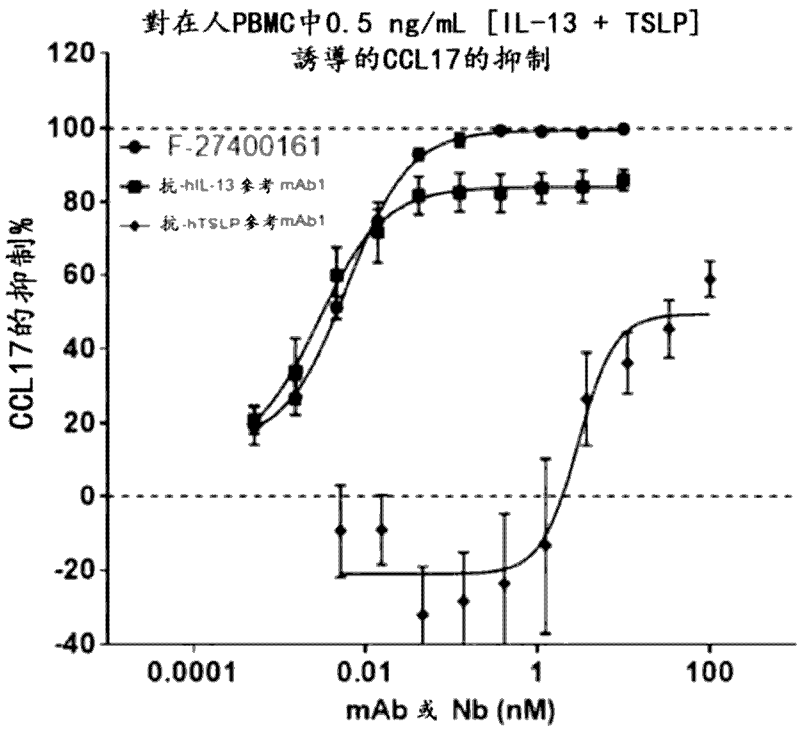

標準結合(RU)
參考點：
中位數
第一四分位數
第三四分位數
F027301186
F027400161
F027400163
F027400164

圖5



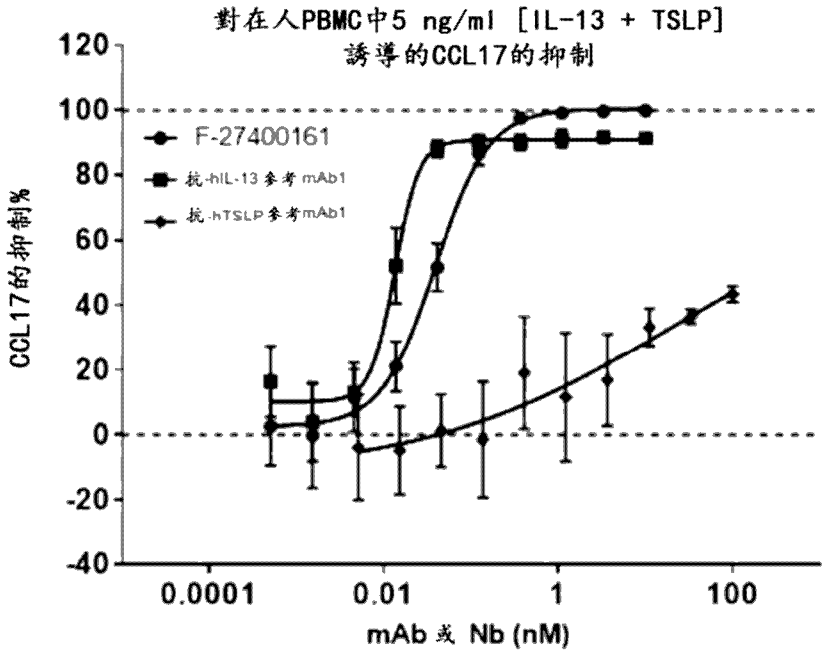
	F-27400161	抗-hTSLP參考 mAb1
最低	1.563	-2.522
最高	98.68	87.67
LogIC50	1.726	2.899
希爾斜率	2.545	0.9674
IC50	53.26	793.4
跨度	97.12	90.2

圖6



	F-27400161	抗-hIL-13參考mAb1	抗-hTSLP參考mAb1
最低	14.65	11.3	-20.99
最高	99.46	84.17	49.42
LogIC50	-2.217	-2.549	0.4672
希爾斜率	1.208	1.134	2.022
IC50	0.006071	0.002826	2.932
跨度	84.81	72.87	70.41

圖7



	F-27400161	抗-hIL-13參考mAb1	抗-hTSLP參考mAb1
最低	2 531	10 23	-11 94
最高	100 6	90 98	77 64
LogIC50	-1 412	-1 873	1 279
希爾斜率	1 414	3 084	0 3043
IC50	0 03874	0 01339	19
跨度	98 04	80 75	89 59

圖8

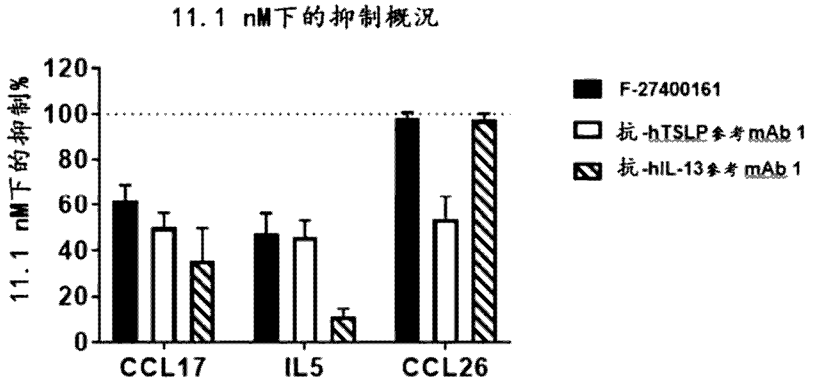


圖9

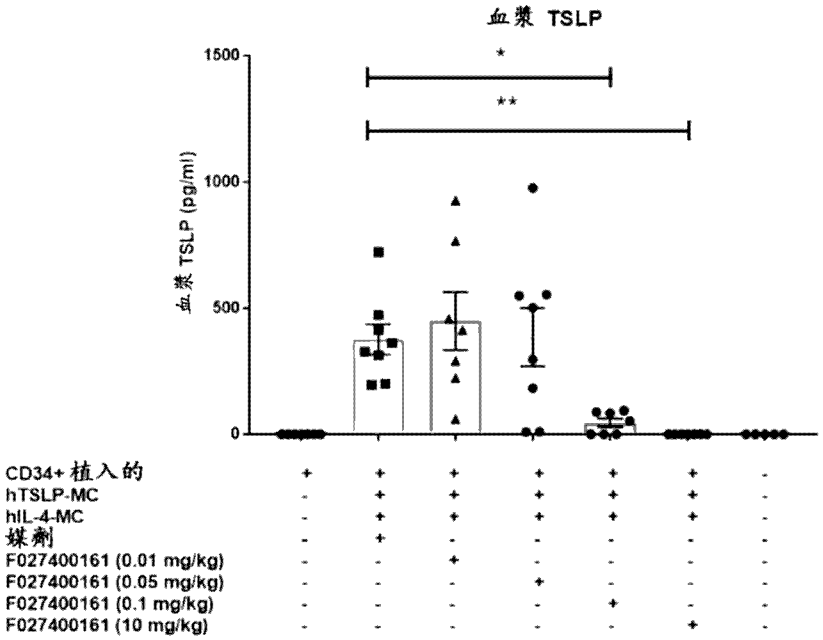

血漿 TSLP
血漿 TSLP (pg/ml)
1500
1000
500
0
*
**
CD34+ 植入的
hTSLP-MC
hIL-4-MC
媒劑
F027400161 (0.01 mg/kg)
F027400161 (0.05 mg/kg)
F027400161 (0.1 mg/kg)
F027400161 (10 mg/kg)

圖10

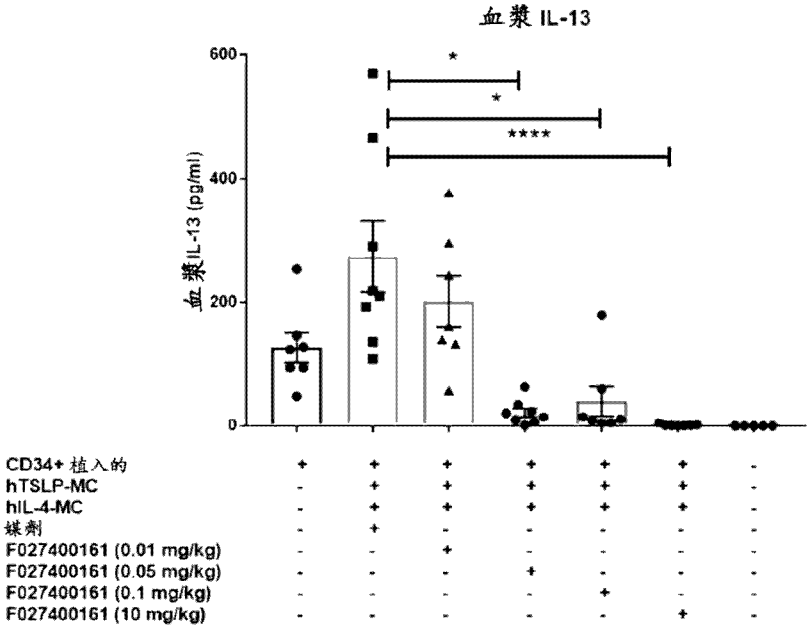

血漿 IL-13
血漿IL-13 (pg/ml)
600
400
200
0
*
*
****
CD34+ 植入的
hTSLP-MC
hIL-4-MC
媒劑
F027400161 (0.01 mg/kg)
F027400161 (0.05 mg/kg)
F027400161 (0.1 mg/kg)
F027400161 (10 mg/kg)

圖11

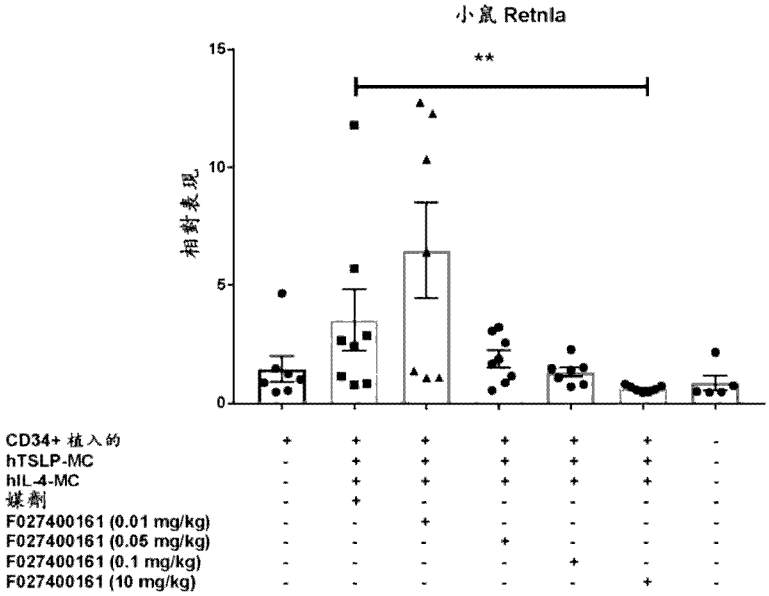

小鼠 Retnla
**
相對表現
15
10
5
0
CD34+ 植入的 + + + + + + -
hTSLP-MC - + + + + + -
hIL-4-MC - + + + + + -
媒劑 - + - - - - -
F027400161 (0.01 mg/kg) - - + - - - -
F027400161 (0.05 mg/kg) - - - + - - -
F027400161 (0.1 mg/kg) - - - - + - -
F027400161 (10 mg/kg) - - - - - + -

圖12

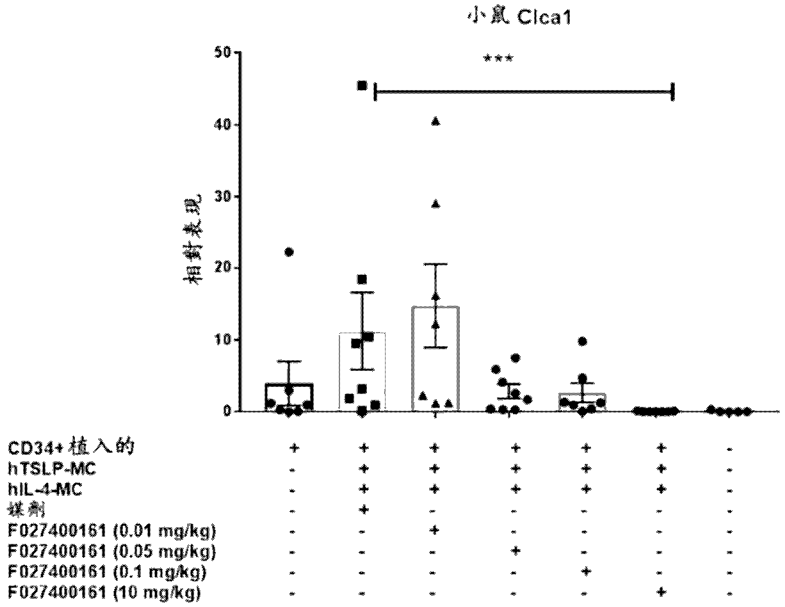

小鼠 Clca1
***
相對表現
50
40
30
20
10
0
CD34+植入的 + + + + + + -
hTSLP-MC - + + + + + -
hIL-4-MC - + + + + + -
媒劑 - + - - - - -
F027400161 (0.01 mg/kg) - - + - - - -
F027400161 (0.05 mg/kg) - - - + - - -
F027400161 (0.1 mg/kg) - - - - + - -
F027400161 (10 mg/kg) - - - - - + -

圖13

F027400161

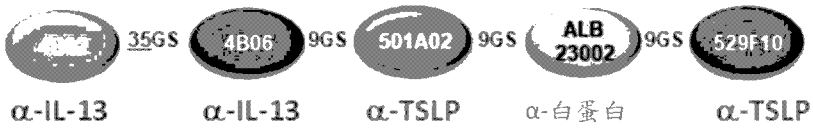


圖14

專利案號：109143498

公告本

I861302

【發明摘要】

【中文發明名稱】 包含靶向IL-13及TSLP之免疫球蛋白單可變域的多肽

【英文發明名稱】 POLYPEPTIDES COMPRISING IMMUNOGLOBULIN SINGLE VARIABLE DOMAINS TARGETING IL-13 AND TSLP

【中文】

本發明技術旨在提供用於治療患有發炎性疾病的個體的新型藥物。具體地，本發明技術提供了包含至少四個免疫球蛋白單可變域（ISVD）的多肽，所述至少四個免疫球蛋白單可變域的特徵在於至少兩個ISVD與IL-13結合並且至少兩個ISVD與TSLP結合。本發明技術還提供了核酸、載體和組合物。

【英文】

The present technology aims at providing a novel type of drug for treating a subject suffering from an inflammatory disease. Specifically, the present technology provides polypeptides comprising at least four immunoglobulin single variable domains (ISVDs), characterized in that at least two ISVDs bind to IL-13 and at least two ISVDs binds to TSLP. The present technology also provides nucleic acids, vectors and compositions.

【指定代表圖】圖1至圖14

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 包含靶向IL-13及TSLP之免疫球蛋白單可變域的多肽

【英文發明名稱】 POLYPEPTIDES COMPRISING IMMUNOGLOBULIN SINGLE VARIABLE DOMAINS TARGETING IL-13 AND TSLP

【技術領域】

【0001】 本發明技術涉及靶向IL-13和TSLP的多肽。它還涉及編碼所述多肽的核酸分子和包含所述核酸的載體，並且涉及包含所述多肽、核酸或載體的組合物。本發明技術還涉及用於治療患有發炎性疾病的個體的方法中的這些產品。此外，本發明技術涉及產生這些產品的方法。

【先前技術】

【0002】 儘管對於宿主防禦來說是必需的，但是不受限制的免疫應答可導致一系列發炎性疾病，如氣喘、異位性皮膚炎和類風濕性關節炎。由免疫系統的先天性和適應性組介導的一連串的免疫應答（例如，抗原識別、抗原加工、抗原呈遞、細胞因子產生、抗體產生、靶細胞殺傷）驅動一系列免疫疾病的啟動和傳播。發炎性疾病通常是慢性的並且可能甚至是危及生命的。過敏性和特應性疾病（如氣喘和異位性皮膚炎）主要由第2型免疫應答驅動，並且特徵在於第2型免疫的突出特徵（如高IgE產生和嗜酸性粒細胞增多症）。

【0003】 胸腺基質淋巴細胞生成素（TSLP）和白細胞介素13（IL-13）是基質和/或免疫細胞產生的可溶性細胞因子靶標（Ziegler和Artis, Nat Rev Immunol (2010) 11:289, Gieseck III等人, Nat Rev Immunol (2018) 18:62）。人TSLP和IL-13驅動第2型免疫、第2型發炎性疾病（如氣喘和異位性皮膚炎）以及多種免疫性疾病的獨特、重疊和協同方面。

【0004】 TSLP的信號傳導通過由胸腺基質淋巴細胞生成素受體（TSLPR）和IL-7Rα鏈（IL-7Rα）構成的異二聚體受體複合物而開始。類似地，IL-13信號傳導通過與由αIL-4受體（IL-4Rα）和α白細胞介素13受體（IL-13R1α）組成的異二聚體受體複合物結合而開始。IL-13對IL-13R1的高親和力導致其複合物形成，這進一步增加了與IL-4Rα的異二聚體形成的可能性。

【0005】 TSLP驅動樹突狀細胞的成熟化、肥大細胞的發育和增殖以及啟動其他免疫細胞（如嗜鹼性粒細胞和先天性淋巴樣細胞（ILC2））。類似地，IL-13對一系列免疫病理學產生影響，如上皮屏障破壞、粘膜-上皮表面產生粘液。氣道重塑以及嗜酸性粒細胞募集趨化因子（如嗜酸性粒細胞趨化因子）的誘導。這些機制對於第2型炎性應答的啟動和傳播是重要的，並且對疾病（如異位性皮膚炎和氣喘）中的一系列免疫病理學發展也是重要的。

【0006】 當前，患有中度/重度氣喘的患者對目前可用的護理標準治療（包括生物製劑如抗IL4Rα單克隆抗體Dupixent（度匹魯單抗；已上市）、抗IL5（已上市）、抗IgE單克隆抗體Xolair（奧馬珠單抗；已上市））反應不佳，特別是在具有低嗜酸性粒細胞表型的氣喘患者中。儘管目前針對TSLP（特折魯單抗）和IL-13（樂瑞吉珠單抗）的拮抗性單克隆抗體正在進行臨床試驗，但尚無針對TSLP和IL-13二者的有效臨床開發程式。用單一藥劑雙重靶向TSLP和IL-13有可能在低第2型和高第2型氣喘以及異位性皮膚炎中賦予功效，其中有可能在這些適應症內的亞群中賦予功效，在所述亞群中單一單特異性藥劑療法可能並不完全有效。因此，對於第2型發炎性疾病（如氣喘和異位性皮膚炎）的治療仍存在未滿足的醫學需求，其不僅更有效而且還方便地適用于患者。

【0007】 這種療法可以包括靶向多種疾病因子，如IL-13和TSLP。

【0008】 靶向多種疾病因子可以例如通過兩種單獨的生物製劑（例如與不同的治療靶標結合的抗體）的共同投予或組合使用來實現。然而，從實用和商業兩個角度來看，共同投予或組合使用單獨的生物製劑可能具有挑戰性。例如，單獨產品的兩次注射給患者帶來了更加不便和更痛苦的治療方案，這可能對依從

性產生負面影響。關於兩種單獨產品的單次注射，提供允許兩種產品在所需濃度下可接受的粘度和合適的穩定性的配製品可能是困難或不可能的。另外，共同投予和共同配製需要產生兩種單獨的藥物，這可能增加總成本。

【0009】已經提出了能夠與兩種不同抗原結合的雙特異性抗體作為解決與單獨生物製劑（如抗體）的共同投予或組合使用相關的此類局限的一種策略。

【0010】已經提出了多種形式的雙特異性抗體構建體。例如，雙特異性抗體形式可能涉及兩種抗體或其片段的化學綴合（Brennan, M, 等人, Science, 1985. 229(4708): 第81-83頁；Glennie, M. J., 等人, J Immunol, 1987. 139(7): 第2367-2375頁）。

【0011】然而，此類雙特異性抗體形式的缺點包括：在高濃度下的高粘度使得例如皮下投予具有挑戰性，並且在於每個結合單元需要兩個可變域相互作用以進行特異性高親和力結合，包括對多肽穩定性和產生效率的影響。此類雙特異性抗體形式也可能潛在地導致與輕鏈錯配或重鏈錯配有關的化學、製造和控制（CMC）問題。

【發明內容】

【0012】在一些實施例中，本發明技術涉及同時特異性靶向IL-13和TSLP的多肽，所述多肽與單特異性抗IL-13或抗TSLP多肽相比在體外導致調節第2型炎性反應的提高的效率。在一些實施例中，所述多肽是高效產生的（例如在微生物宿主中）。此外，在一些實施例中，此類多肽對待治療的個體中預先存在的抗體（即，在第一次用所述抗體構建體治療之前存在於所述個體中的抗體）具有有限的反應性。在其他實施例中，此類多肽在待治療的個體中展現出足夠長的半衰期，使得可以方便地將連續的治療間隔開。

【0013】在一個實施例中，本發明技術提供了一種多肽，所述多肽包含與IL-13特異性地結合的至少一個免疫球蛋白單可變域（ISVD）或由其組成。在另外的實施例中，本發明技術的多肽包含與IL-13特異性地結合的至少兩個ISVD或由其

組成，其中這兩個ISVD視情況經由肽連接子連接。在一個實施例中，所述與IL-13特異性地結合的兩個ISVD是不同的ISVD。此外，在一個實施例中，所述多肽還包含視情況經由一個或多個肽連接子連接的一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元，其中與沒有所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元的相應多肽相比，所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元為所述多肽提供增加的半衰期。例如，所述結合單元可以是與（人）血清蛋白如人血清白蛋白結合的ISVD。

【0014】在另一方面，本發明技術的多肽包含與TSLP特異性地結合的至少一個ISVD或由其組成。在另外的實施例中，本發明技術的多肽包含與TSLP特異性地結合的至少兩個ISVD或由其組成，其中這兩個ISVD視情況經由肽連接子連接。在一個實施例中，所述與TSLP特異性地結合的兩個ISVD是不同的ISVD。此外，在一個實施例中，所述多肽還包含視情況經由一個或多個肽連接子連接的一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元，其中與沒有所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元的相應多肽相比，所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元為所述多肽提供增加的半衰期。例如，所述結合單元可以是與（人）血清蛋白如人血清白蛋白結合的ISVD。

【0015】在另一個實施例中，本發明技術的多肽包含至少四個ISVD或由其組成，其中至少兩個ISVD與IL-13特異性地結合，並且至少兩個ISVD與TSLP特異性地結合。在一個實施例中，所述與IL-13特異性地結合的至少兩個ISVD與人IL-13特異性地結合，並且所述與TSLP特異性地結合的至少兩個ISVD與人TSLP特異性地結合。在一個實施例中，所述與IL-13特異性地結合的至少兩個ISVD是不同的ISVD，並且所述與TSLP結合的至少兩個ISVD是不同的ISVD。在另一個實施例中，包含至少四個ISVD或由其組成的多肽還包含視情況經由一個或多個肽連接子連接的一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元，其中與沒有所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元的相應多肽相比，所述一個或

多個其他基團、殘基、部分或結合單元為所述多肽提供增加的半衰期。例如，所述結合單元可以是與（人）血清蛋白如人血清白蛋白結合的ISVD。

【0016】 還提供了一種能夠表現本發明技術的多肽的核酸分子、包含所述核酸的核酸或載體以及包含所述多肽、所述核酸或所述載體的組合物。在一個實施例中，所述組合物是醫藥組合物。

【0017】 還提供了一種包含編碼根據本發明技術的多肽的核酸或載體的宿主或宿主細胞。

【0018】 還提供了一種產生根據本發明技術的多肽的方法，所述方法至少包括以下步驟：

a. 在合適的宿主細胞或宿主生物中或在另一種合適的表現系統中表現包含編碼本發明技術的多肽的核苷酸序列的核酸；視情況接著是

b. 分離和/或純化根據本發明技術的多肽。

【0019】 此外，本發明技術提供了用作藥物的所述多肽、包含所述多肽的組合物或包含含有編碼所述多肽的核苷酸序列的核酸或載體的組合物。在一個實施例中，所述多肽或組合物用於治療發炎性疾病，如第2型發炎性疾病。在一個實施例中，所述第2型發炎性疾病選自異位性皮膚炎和氣喘。

【0020】 另外，提供了一種治療發炎性疾病如第2型發炎性疾病的方法，其中所述方法包括向有需要的個體投予醫藥活性量的根據本發明技術的多肽或組合物。在一個實施例中，所述第2型發炎性疾病選自異位性皮膚炎和氣喘。在一個實施例中，所述方法還包括投予一種或多種另外的治療劑。

【0021】 還提供了本發明技術的多肽或組合物在製備用於治療發炎性疾病如第2型發炎性疾病的醫藥組合物中的用途。在一個實施例中，所述第2型發炎性疾病選自異位性皮膚炎和氣喘。

【0022】 具體地，本發明技術提供了以下實施例：

【0023】 實施例1. 一種用作藥物的多肽、包含所述多肽的組合物或包含含有編碼所述多肽的核苷酸序列的核酸的組合物，其中所述多肽包含至少一個免疫球

蛋白單可變域（ISVD）或由其組成，其中所述ISVD包含三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3），並且其中所述至少一個ISVD包含：

a) CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

c) CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；或

d) CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0024】 實施例2. 根據實施例1所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述至少一個ISVD包含：

a) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；

b) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；

c) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；或

d) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列。

【0025】 實施例3. 根據實施例1或2中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述至少一個ISVD的胺基酸序列包含：

a) 與SEQ ID NO: 2之超過90%的序列同一性，

b) 與SEQ ID NO: 3之超過90%的序列同一性，

c) 與SEQ ID NO: 4之超過90%同一性的序列同一性，或

d) 與SEQ ID NO: 6之超過90%同一性的序列同一性。

【0026】 實施例4. 根據實施例1至3中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述至少一個ISVD包含：

a) SEQ ID NO: 2的胺基酸序列、

b) SEQ ID NO: 3的胺基酸序列、

c) SEQ ID NO: 4的胺基酸序列或

d) SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。

【0027】實施例5. 根據實施例1所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述多肽包含至少兩個ISVD或由其組成，其中所述ISVD各包含三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3），其中所述至少兩個ISVD視情況經由一個或多個肽連接子連接，並且其中：

a) 第一ISVD和第二ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) 第一ISVD和第二ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

c) 第一ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

第二ISVD包含

iv. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

d) 第一ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

第二ISVD包含

iv. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

e) 第一ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO:

21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

第二ISVD包含

iv. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；或

f) 第一ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和/或

第二ISVD包含

iv. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，

其中所述ISVD的順序表示其從所述多肽的N-端至C-端考慮的彼此相對位置。

【0028】 實施例6. 根據實施例5所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中：

a) 所述第一ISVD和所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1

為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；

b) 所述第一ISVD和所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；

c) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；並且所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；

d) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；並且所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；

e) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列；並且所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；或

f) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；並且所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列。

【0029】實施例7. 根據實施例5或6中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中：

a) 所述第一ISVD和所述第二ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 2之超過90%的序列同一性，

b) 所述第一ISVD和所述第二ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 3之超過90%的序列同一性，

c) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 2之超過90%的序列同一性，並且所述第二ISVD包含與SEQ ID NO: 3之超過90%同一性的序列同一性，

d) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 3之超過90%的序列同一性，並且所述第二ISVD包含與SEQ ID NO: 2之超過90%同一性的序列同一性，

e) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 6之超過90%的序列同一性，並且所述第二ISVD包含與SEQ ID NO: 4之超過90%同一性的序列同一性，

f) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 4之超過90%的序列同一性，並且所述第二ISVD包含與SEQ ID NO: 6之超過90%同一性的序列同一性。

【0030】實施例8. 根據實施例5至7中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中：

a) 所述第一ISVD和所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列，

b) 所述第一ISVD和所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列，

c) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列，並且所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列，

d) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列，並且所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列，

e) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 6的胺基酸序列，並且所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列，或

f) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列，並且所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。

【0031】實施例9. 根據實施例5至8中任一項所述的多肽，其中所述多肽包含以下項或由以下項組成：

a) SEQ ID NO: 148的胺基酸序列、

b) SEQ ID NO: 149的胺基酸序列、

c) SEQ ID NO: 150的胺基酸序列、

d) SEQ ID NO: 151的胺基酸序列、

e) SEQ ID NO: 152的胺基酸序列、

f) SEQ ID NO: 153的胺基酸序列、

g) SEQ ID NO: 154的胺基酸序列、

h) SEQ ID NO: 155的胺基酸序列、

i) SEQ ID NO: 156的胺基酸序列、

j) SEQ ID NO: 157的胺基酸序列、

k) SEQ ID NO: 158的胺基酸序列、或

l) SEQ ID NO: 159的胺基酸序列。

【0032】實施例10.根據實施例1或5中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述多肽包含至少四個ISVD或由其組成，其中所述ISVD各包含三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3），其中所述至少四個ISVD視情況經由一個或多個肽連接子連接，並且其中：

a) 第一ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) 第二ISVD包含

iv. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

c) 第三ISVD包含

vii. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

viii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

ix. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

d) 第四ISVD包含

x. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

xi. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

xii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，

其中所述ISVD的順序表示其從所述多肽的N-端至C-端考慮的彼此相對位置。

【0033】 實施例11.根據實施例1至10中任一項所述的用於所述用途的組合物，所述組合物是醫藥組合物，所述醫藥組合物還包含至少一種醫藥上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑和/或佐劑，並且視情況包含一種或多種另外的藥學活性多肽和/或化合物。

【0034】 實施例12.根據實施例10或11所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中：

a) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；

b) 所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；

c) 所述第三ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；並且

d) 所述第四ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列。

【0035】 實施例13.根據實施例10至12中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中：

a) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 2之超過90%的序列同一性；

b) 所述第二ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 3之超過90%的序列同一性；

c) 所述第三ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 4之超過90%同一性的序列同一性；並且

d) 所述第四ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 6之超過90%同一性的序列同一性。

【0036】 實施例14.根據實施例10至13中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中：

a) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列；

b) 所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；

c) 所述第三ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列；並且

d) 所述第四ISVD包含SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。

【0037】 實施例15.根據實施例1至14中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述多肽還包含視情況經由一個或多個肽連接子連接的一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元，其中與沒有所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元的相應多肽相比，所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元為所述多肽提供增加的半衰期。

【0038】 實施例16.根據實施例15所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中為所述多肽提供增加的半衰期的所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元選自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可與血清蛋白結合的結合單元、Fc部分和可與血清蛋白結合的小蛋白質或肽。

【0039】 實施例17.根據實施例15至16中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中為所述多肽提供增加的半衰期的所述一個或多個其他結合單元選自可與血清白蛋白（如人血清白蛋白）或血清免疫球蛋白（如IgG）結合的結合單元。

【0040】 實施例18.根據實施例17所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中為所述多肽提供增加的半衰期的所述結合單元是可與人血清白蛋白結合的ISVD。

【0041】 實施例19.根據實施例18所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述與人血清白蛋白結合的ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 10具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 15具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 20的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 20具

有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0042】 實施例20.根據實施例18至19中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述與人血清白蛋白結合的ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 20的胺基酸序列。

【0043】 實施例21.根據實施例18至20中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述與人血清白蛋白結合的ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 5之超過90%的序列同一性。

【0044】 實施例22.根據實施例18至21中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述與人血清白蛋白結合的ISVD包含SEQ ID NO: 5的胺基酸序列。

【0045】 實施例23.根據實施例10至22中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述多肽的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 1之超過90%的序列同一性。

【0046】 實施例24.根據實施例10至23中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述多肽包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列或由其組成。

【0047】 實施例25.根據實施例1至24中任一項所述的用於所述用途的多肽或組合物，其用於治療發炎性疾病，如第2型發炎性疾病。

【0048】 實施例26.根據實施例25所述的用於所述用途的多肽或組合物，其中所述第2型發炎性疾病選自氣喘和異位性皮膚炎。

【0049】 實施例27.一種包含至少一個免疫球蛋白單可變域（ISVD）或由其組成的多肽，其中所述ISVD包含三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3）；並且其中所述至少一個ISVD包含：

a) CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

c) CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；或

d) CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0050】 實施例28.根據實施例27所述的多肽，其中所述至少一個ISVD包含：

a) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；

b) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序

列；

c) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；或

d) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列。

【0051】 實施例29.根據實施例27或28中任一項所述的多肽，其中所述至少一個ISVD的胺基酸序列包含：

a) 與SEQ ID NO: 2之超過90%的序列同一性，

b) 與SEQ ID NO: 3之超過90%的序列同一性，

c) 與SEQ ID NO: 4之超過90%同一性的序列同一性，或

d) 與SEQ ID NO: 6之超過90%同一性的序列同一性。

【0052】 實施例30.根據實施例27至29中任一項所述的多肽，其中所述至少一個ISVD包含：

a) SEQ ID NO: 2的胺基酸序列、

b) SEQ ID NO: 3的胺基酸序列、

c) SEQ ID NO: 4的胺基酸序列、或

d) SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。

【0053】 實施例31.根據實施例1或27所述的多肽，其中所述多肽包含至少兩個ISVD或由其組成，其中所述ISVD各包含三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3），其中所述至少兩個ISVD視情況經由一個或多個肽連接子連接，並且其中：

a) 第一ISVD和第二ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) 第一ISVD和第二ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

c) 第一ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

第二ISVD包含

iv. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

d) 第一ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

第二ISVD包含

iv. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

e) 第一ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

第二ISVD包含

iv. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具

有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；或

f) 第一ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

第二ISVD包含

iv. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，

其中所述ISVD的順序表示其從所述多肽的N-端至C-端考慮的彼此相對位置。

【0054】 實施例32.根據實施例31所述的多肽，其中：

a) 所述第一ISVD和所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；

b) 所述第一ISVD和所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；

c) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID

NO: 17的胺基酸序列；並且所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；

d) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；並且所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；

e) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列；並且所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；或

f) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；並且所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列。

【0055】 實施例33.根據實施例31或32中任一項所述的多肽，其中：

a) 所述第一ISVD和所述第二ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 2之超過90%的序列同一性，

b) 所述第一ISVD和所述第二ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 3之超過90%的序列同一性，

c) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 2之超過90%的序列同一性，並且所述第二ISVD包含與SEQ ID NO: 3之超過90%同一性的序列同一性，

d) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 3之超過90%的序列同一

性，並且所述第二ISVD包含與SEQ ID NO: 2之超過90%同一性的序列同一性，

e) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 6之超過90%的序列同一性，並且所述第二ISVD包含與SEQ ID NO: 4之超過90%同一性的序列同一性，

f) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 4之超過90%的序列同一性，並且所述第二ISVD包含與SEQ ID NO: 6之超過90%同一性的序列同一性。

【0056】 實施例34.根據實施例31至33中任一項所述的多肽，其中：

a) 所述第一ISVD和所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列，

b) 所述第一ISVD和所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列，

c) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列，並且所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列，

d) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列，並且所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列，

e) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 6的胺基酸序列，並且所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列，或

f) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列，並且所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。

【0057】 實施例35.根據實施例31至34中任一項所述的多肽，其中所述多肽包含以下項或由以下項組成：

a) SEQ ID NO: 148的胺基酸序列、

b) SEQ ID NO: 149的胺基酸序列、

c) SEQ ID NO: 150的胺基酸序列、

d) SEQ ID NO: 151的胺基酸序列、

e) SEQ ID NO: 152的胺基酸序列、

f) SEQ ID NO: 153的胺基酸序列、

g) SEQ ID NO: 154的胺基酸序列、

h) SEQ ID NO: 155的胺基酸序列、

i) SEQ ID NO: 156的胺基酸序列、

j) SEQ ID NO: 157的胺基酸序列、

k) SEQ ID NO: 158的胺基酸序列、或

l) SEQ ID NO: 159的胺基酸序列。

【0058】 實施例36.根據實施例27或31中任一項所述的多肽，其中所述多肽包含至少四個ISVD或由其組成，其中所述ISVD各包含三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3），其中所述至少四個ISVD視情況經由一個或多個肽連接子連接，並且其中：

a) 第一ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) 第二ISVD包含

iv. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

c) 第三ISVD包含

vii. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

viii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO:

14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

ix. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

d) 第四ISVD包含

x. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

xi. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

xii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，

其中所述ISVD的順序表示其從所述多肽的N-端至C-端考慮的彼此相對位置。

【0059】 實施例37.根據實施例36所述的多肽，其中：

a) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；

b) 所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；

c) 所述第三ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；並且

d) 所述第四ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列。

【0060】 實施例38.根據實施例36或37中任一項所述的多肽，其中：

a) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 2之超過90%的序列同一性；

b) 所述第二ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 3之超過90%的序列同一性；

c) 所述第三ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 4之超過90%同一性的序列同一性；並且

d) 所述第四ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 6之超過90%同一性的序列同一性。

【0061】 實施例39.根據實施例36至38中任一項所述的多肽，其中：

a) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列；

b) 所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；

c) 所述第三ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列；並且

d) 所述第四ISVD包含SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。

【0062】 實施例40.根據實施例27至39中任一項所述的多肽，其中所述多肽還包含視情況經由一個或多個肽連接子連接的一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元，其中與沒有所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元的相應多肽相比，所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元為所述多肽提供增加的半衰期。

【0063】 實施例41.根據實施例40所述的多肽，其中為所述多肽提供增加的半衰期的所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元選自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可與血清蛋白結合的結合單元、Fc部分和可與血清蛋白結合的小蛋白質或肽。

【0064】 實施例42.根據實施例40至41中任一項所述的多肽，其中為所述多肽提供增加的半衰期的所述一個或多個其他結合單元選自可與血清白蛋白（如人血清白蛋白）或血清免疫球蛋白（如IgG）結合的結合單元。

【0065】 實施例43.根據實施例42所述的多肽，其中為所述多肽提供增加的半衰期的所述結合單元是可與人血清白蛋白結合的ISVD。

【0066】 實施例44.根據實施例43所述的多肽，其中所述與人血清白蛋白結合的ISVD包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 10具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 15具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii.CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 20的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 20具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0067】 實施例45.根據實施例43至44中任一項所述的多肽，其中所述與人血清白蛋白結合的ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 20的胺基酸序列。

【0068】 實施例46.根據實施例43至45中任一項所述的多肽，其中所述與人血清白蛋白結合的ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 5之超過90%的序列同一性。

【0069】 實施例47.根據實施例43至46中任一項所述的多肽，其中所述與人血清白蛋白結合的ISVD包含SEQ ID NO: 5的胺基酸序列。

【0070】 實施例48.根據實施例36至47中任一項所述的多肽，其中所述多肽的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 1之超過90%的序列同一性。

【0071】 實施例49.根據實施例36至48中任一項所述的多肽，其中所述多肽包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列或由其組成。

【0072】 實施例50.一種核酸，其包含編碼根據實施例27至49中任一項所述的多肽或根據實施例36至49所述的多肽的核苷酸序列。

【0073】 實施例51.一種包含根據實施例50所述的核酸的宿主或宿主細胞。

【0074】 實施例52.一種產生根據實施例27至49中任一項所述的多肽或根據實施例36至49所述的多肽的方法，所述方法至少包括以下步驟：

a) 在合適的宿主細胞或宿主生物中或在另一種合適的表現系統中表現根據實施例50所述的核酸；視情況接著是：

b) 分離和/或純化根據實施例27至49中任一項所述的多肽或根據實施例36至49所述的多肽。

【0075】 實施例53.一種組合物，其包含至少一種根據實施例27至49中任一項所述的多肽、或至少一種根據實施例36至49所述的多肽、或根據實施例50所述的核酸。

【0076】 實施例54.根據實施例53所述的組合物，所述組合物是醫藥組合物，所述醫藥組合物還包含至少一種醫藥上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑和/或佐劑，並且視情況包含一種或多種另外的藥學活性多肽和/或化合物。

【0077】 實施例55.一種治療發炎性疾病如第2型發炎性疾病的方法，其中所述方法包括向有需要的個體投予醫藥活性量的根據實施例27至49中任一項或根據實施例36至49所述的多肽或者根據實施例53至54中任一項所述的組合物。

【0078】 實施例56.根據實施例55所述的方法，其中所述第2型發炎性疾病選自氣喘和異位性皮膚炎。

【0079】 實施例57.根據實施例27至49中任一項或根據實施例36至49所述的多肽或者根據實施例53至54中任一項所述的組合物在製備用於治療發炎性疾病如第2型發炎性疾病的醫藥組合物中的用途。

【0080】 實施例58.根據實施例57所述的多肽或組合物的用途，其中所述第2型發炎性疾病選自氣喘和異位性皮膚炎。

【圖式簡單說明】

【0081】 **圖1**：顯示了IL13和HSA與經由TSLP捕獲的F027400161的同時結合的傳感圖。

【0082】 **圖2**：V_{HH} F027400161和參考化合物抗hIL-13 mAb1和抗hIL-13 mAb2在嗜酸性粒細胞趨化因子釋放測定中對人、食蟹猴和恒河猴IL13的抑制。

【0083】 **圖3**：F027400161和參考化合物抗hIL-13 mAb1和抗hIL-13 mAb2在SEAP報告物測定中對人和食蟹猴IL13的抑制。

【0084】 **圖4**：F027400161和參考化合物抗hTSLP mAb1對人和食蟹猴TSLP誘導的BaF3增殖的抑制。IRR00096是陰性對照Nb。

【0085】 **圖5**：顯示了與對照F027301186相比，存在於96個人血清樣品中的預先存在的抗體與F027400161、163和164的結合的箱形圖。

【0086】 **圖6**：F-27400161（也稱為F027400161）和比較物抗體抗hTSLP參考mAb1對在人DC中的由TSLP誘導的CCL17反應的劑量反應抑制概況。將富集的人DC用4 ng/mL的TSLP處理，並與8種濃度的ISVD構建體和抗hTSLP參考mAb1培養36小時。通過ELISA測量新鮮收集的上清液中的CCL17濃度。IC_{50}值是在Graphpad Prism 8.0中不受約束地通過非線性回歸（對數抑制劑相對於反應-可變斜率四參數最小二乘法擬合）計算的。資料表示為從8個單獨實驗組合的所有8個供體的平均值 ± 平均值的標準誤差（SEM）。

【0087】 **圖7**：F-27400161（也稱為F027400161）和比較物抗hIL-13參考mAb1和抗hTSLP參考mAb1對在人PBMC中0.5 ng/mL IL-13和TSLP誘導的CCL17協同產生的劑量抑制反應。將健康的供體PBMC用0.5 ng/mL的重組IL-13 + TSLP刺激，並與10個劑量的ISVD構建體（Nb）和比較物培養20小時。通過MSD V-Plex套組測量細胞培養物上清液中的CCL17濃度。IC_{50}值是在Graphpad Prism 8.0中不受約束地通過非線性回歸（對數抑制劑相對於反應-可變斜率四參數最小二乘法擬合）計算的。資料表示為從8個單獨實驗組合的所有供體的平均值 ± 平均值的標準誤差（SEM）。

【0088】 **圖8**：F-27400161（也稱為F027400161）和比較物抗體抗hIL-13參考mAb1和抗hTSLP參考mAb1對在人PBMC中5 ng/mL IL-13和TSLP誘導的CCL17協同產生的劑量抑制反應。將健康的供體PBMC用5 ng/mL的重組IL-13 + TSLP

刺激，並與10個劑量的ISVD構建體（Nb）和比較物抗體培養20小時。通過MSD V-Plex套組測量新鮮收集的上清液中的CCL17濃度。IC_{50}值是在Graphpad Prism 8.0中不受約束地通過非線性回歸（對數抑制劑相對於反應-可變斜率四參數最小二乘法擬合）計算的。資料表示為從8個單獨實驗組合的所有供體的平均值 ± 平均值的標準誤差（SEM）。

【0089】 **圖9**：F-27400161（也稱為F027400161）和比較物抗體抗hIL-13參考mAb1和抗hTSLP參考mAb1在三元培養測定中對過敏原Der P誘導的由人PBMC得到的IL-5、CCL17和CCL26產生的抑制概況。將與MRC5成纖維細胞和A549上皮細胞共培養的正常供體PBMC用3 mg/mL的Der P刺激，並與11.1 nM的ISVD、抗hIL-13參考mAb1或抗hTSLP參考mAb1在24孔板中在37ºC細胞培養箱中培養6天。通過人Magnetic Luminex測定來測量新鮮收集的上清液中的IL-5、CCL17和CCL26濃度。相對於未接受ISVD多肽或抗體的未刺激（min）和刺激的（max）對照樣品計算抑制百分比。所有計算均使用GraphPad Prism 8.0進行。資料表示為從3個獨立實驗組合的所有供體的平均值 ± 平均值的標準誤差（SEM）。

【0090】 **圖10**：F027400161顯著降低了NSG-SGM3小鼠的血漿中人TSLP的可檢測水準。當與媒劑治療的小鼠（376.166 pg/ml）相比時，採用0.1 mg/kg F027400161劑量（45.772 pg/ml）和10 mg/kg F027400161劑量（0.072 pg/ml）降低了人血漿TSLP水準，這證明了F027400161的TSLP組可以與人類化NSG-SGM3小鼠的血漿中的人TSLP結合。

【0091】 **圖11**：F027400161顯著降低了NSG-SGM3小鼠的血漿中人IL-13的可檢測水準。當與媒劑治療的小鼠（274.052 pg/ml）相比時，採用0.01 mg/kg F027400161劑量（201.286 pg/ml）、0.05 mg/kg F027400161劑量（22.028 pg/ml）、0.1 mg/kg F027400161劑量（40.740 pg/ml）和採用10 mg/kg F027400161劑量（1.777 pg/ml）降低了人IL-13水準，這證明了F27400161的IL-13組可以與人類化NSG-SGM3小鼠的血漿中的人IL-13結合。

【0092】 **圖12和圖13：**F027400161在接受了hTSLP和hIL-4的流體動力學遞送的NSG-SGM3小鼠的肺中顯著降低了小鼠Retnla和Clca1轉錄物表現。在NSG-SGM3小鼠中人TSLP和IL-4的過表現誘導從源自前體$CD34^+$的人免疫細胞產生hIL-13。在10 mg/Kg劑量下由F027400161中和人IL-13導致了對小鼠Retnla和Clca1標記基因的抑制。

【0093】 **圖14：**顯示了從N-端到C-端為單價構建塊/ISVD 4B02、4B06、501A02、529F10以及白蛋白結合劑ALB23002的ISVD構建體F027400161的示意圖。4B02和4B06是經由35GS連接子連接的，而其餘的構建塊是經由9GS連接子連接的。

【實施方式】

【0094】 本發明技術旨在提供用於治療發炎性疾病（如異位性皮膚炎和氣喘）的新型藥物。

【0095】 在一些實施例中，本發明技術涉及同時靶向IL-13和TSLP的多肽，所述多肽與單特異性抗IL-13或抗TSLP多肽相比在體外和/或在體內導致調節第2型炎性反應的提高的效率。在一些實施例中，所述多肽是高效產生的（例如在微生物宿主中）。此外，在一些實施例中，此類多肽可能顯示出對待治療的個體中預先存在的抗體（即，在第一次用所述抗體構建體治療之前存在於所述個體中的抗體）具有有限的反應性。在其他實施例中，此類多肽在待治療的個體中展現出足夠長的半衰期，使得可以方便地將連續的治療間隔開。

【0096】 **5.1　本發明技術的多肽**

【0097】 ***單特異性單價多肽***

【0098】 在一個實施例中，本發明技術的多肽是單特異性且單價的。

【0099】 術語“單特異性”是指與一種（特異性）類型的一個或多個靶分子的結合。因此，本發明技術的單特異性多肽與IL-13特異性地結合。本發明技術的另一種單特異性多肽與TSLP特異性地結合。

【0100】 術語“*單價*”表示僅存在（特異性地）靶向分子的一種結合單元/構建塊

（如ISVD）。

【0101】因此，在一方面，本發明技術提供了包含與IL-13特異性地結合的一個ISVD或由其組成的單特異性單價多肽，所述ISVD包含三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3）。所述ISVD可以選自包含以下項的ISVD：

a) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；或

b) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0102】在本發明技術的這一方面的一個實施例中，所述ISVD與人IL-13特異性地結合。

【0103】在另外的實施例中，與IL-13特異性地結合的ISVD選自包含以下項的ISVD：

a) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；或

b) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列。

【0104】在本發明技術的這一方面的另外實施例中，與IL-13特異性地結合的ISVD選自包含以下項的ISVD：

a) 與SEQ ID NO: 2之超過90%的序列同一性；或

b) 與SEQ ID NO: 3之超過90%的序列同一性。

【0105】 在一個實施例中，與IL-13特異性地結合的ISVD選自包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列；或SEQ ID NO: 3的胺基酸序列的ISVD。

【0106】 在本發明技術的另一方面，提供了包含與TSLP特異性地結合的一個ISVD或由其組成的單特異性單價多肽，所述ISVD包含三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3）。所述ISVD可以選自包含以下項的ISVD：

a) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；或

b) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0107】 在本發明技術的這一方面的一個實施例中，所述ISVD與人TSLP特異性地結合。

【0108】 在另外的實施例中，與TSLP特異性地結合的ISVD選自包含以下項的ISVD：

a) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；或

b) CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸

序列。

【0109】在本發明技術的這一方面的另外實施例中，與TSLP特異性地結合的ISVD選自包含以下項的ISVD：

a) 與SEQ ID NO: 4之超過90%的序列同一性；或

b) 與SEQ ID NO: 6之超過90%的序列同一性。

【0110】在一個實施例中，與TSLP特異性地結合的ISVD選自包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列；或SEQ ID NO: 6的胺基酸序列的ISVD。

【0111】***單特異性多價多肽***

【0112】在另一方面，本發明技術的多肽是單特異性的並且至少是二價的，但是也可以是例如三價、四價、五價、六價等。

【0113】術語"*二價*"、"*三價*"、"*四價*"、"*五價*"或"*六價*"全部屬於術語"*多價*"，並且分別表示存在兩個、三個、四個、五個或六個結合單元/構建塊，如ISVD。

【0114】因此，在一方面，本發明技術提供了包含與IL-13特異性地結合的兩個ISVD或由其組成的單特異性二價多肽，其中這兩個ISVD各包含三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3），其中這兩個ISVD視情況經由一個或多個肽連接子連接，並且其中：

a) 第一ISVD和第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) 第一ISVD和第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

c) 第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；或

d) 第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0115】 在本發明技術的這一方面的一個實施例中，所述ISVD經由一個或多個肽連接子連接。在一個實施例中，這兩個ISVD特異性地結合人IL13。

【0116】 在另外的實施例中，所述單特異性二價多肽包含與IL-13特異性地結合的兩個ISVD或由其組成，其中：

a) 所述第一ISVD和所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述

CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；

b) 所述第一ISVD和所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；

c) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；並且所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；或

d) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；並且所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列。

【0117】 在本發明技術的這一方面的另外實施例中，所述單特異性二價多肽包含與IL-13特異性地結合的兩個ISVD或由其組成，其中：

a) 所述第一ISVD和所述第二ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 2之超過90%的序列同一性；

b) 所述第一ISVD和所述第二ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 3之超過90%的序列同一性；

c) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 2之超過90%的序列同一性，並且所述第二ISVD包含與SEQ ID NO: 3之超過90%同一性的序列同一性；或

d) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 3之超過90%的序列同一性，並且所述第二ISVD包含與SEQ ID NO: 2之超過90%同一性的序列同一性。

【0118】 在一個實施例中，所述單特異性二價多肽包含與IL-13特異性地結合的

兩個ISVD或由其組成，其中：

a) 所述第一ISVD和所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列；

b) 所述第一ISVD和所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；

c) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列，並且所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；或

d) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列，並且所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列。

【0119】在另一方面，本發明技術提供了包含與TSLP特異性地結合的兩個ISVD或由其組成的單特異性二價多肽，其中這兩個ISVD各包含三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3），其中這兩個ISVD視情況經由一個或多個肽連接子連接，並且其中：

a) 第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；或

b) 第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0120】 在本發明技術的這一方面的一個實施例中，所述ISVD經由一個或多個肽連接子連接。在一個實施例中，這兩個ISVD特異性地結合人TSLP。

【0121】 在另外的實施例中，所述單特異性二價多肽包含與TSLP特異性地結合的兩個ISVD或由其組成，其中：

a) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列；並且所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；或

b) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；並且所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列。

【0122】 在本發明技術的這一方面的另外實施例中，所述單特異性二價多肽包含與TSLP特異性地結合的兩個ISVD或由其組成，其中：

a) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 6之超過90%的序列同一性，並且所述第二ISVD包含與SEQ ID NO: 4之超過90%同一性的序列同一性；或

b) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 4之超過90%的序列同一性，並且所述第二ISVD包含與SEQ ID NO: 6之超過90%同一性的序列同一性。

【0123】在一個實施例中，所述單特異性二價多肽包含與TSLP特異性地結合的兩個ISVD或由其組成，其中：

a) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 6的胺基酸序列，並且所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列；或

b) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列，並且所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。

【0124】在這方面的術語“第一ISVD”和“第二ISVD”僅表示具體敘述的與IL-13/TSLP結合的ISVD的彼此相對位置，其中所述編號是從本發明技術的多肽的N-端開始的。如此“第一ISVD”比“第二ISVD”更靠近N-端。因此，如此“第二ISVD”比“第一ISVD”更靠近C-端。由於如此所述編號不是絕對的並且僅表示兩個ISVD的相對位置，因此不排除多肽中可能存在分別與IL-13和TSLP結合的另外的結合單元/構建塊，如ISVD。此外，不排除可以在其間放置其他結合單元/構建塊（如ISVD）的可能性。例如，如下文進一步描述的（具體參見，“多特異性多價多肽”章節和5.4“（體內）半衰期延長”），所述多肽還可以包含甚至可被定位在所述“第一ISVD”與“第二ISVD”之間的另一個與人血清白蛋白結合的ISVD（這樣的構建體隨後在後面的章節中稱為多特異性的）。

【0125】在一個實施例中，所述單特異性多價多肽、特別是上述單特異性二價多肽的（至少兩個）ISVD經由肽連接子連接。使用肽連接子連接兩個或更多個（多）肽是本領域熟知的。表A-5中顯示了可與所述單特異性多價多肽、特別是與上述單特異性二價多肽一起使用的示例性肽連接子。一類常用的肽連接子稱為“Gly-Ser”或“GS”連接子。這些是基本上由甘胺酸（G）和絲胺酸（S）殘基組成的連接子，並且通常包含肽基序如GGGGS（SEQ ID NO: 73）基序的一個或多個重複（例如，包含式 $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$，其中n可以是1、2、3、4、5、6、7或更大）。此類GS連接子的一些經常使用的例子是9GS連接子（GGGGSGGGS，SEQ ID NO: 76）、15GS連接子（n = 3）和35GS連接子（n = 7）。參見例如Chen等人, Adv. Drug Deliv. Rev. 2013年10月15日；65(10): 1357–1369；和Klein等人,

Protein Eng. Des. Sel. (2014) 27 (10): 325-330。在本發明技術的一個實施例中，所述單特異性多價多肽的ISVD、特別是本發明技術的單特異性二價多肽的ISVD經由表A-5中所示的連接子連接。在一個實施例中，所述（至少）兩個ISVD經由一個或多個35GS連接子連接。

【0126】 因此，在一個實施例中，所述單特異性二價多肽包含以下項或由以下項組成：

a) SEQ ID NO: 148的胺基酸序列、

b) SEQ ID NO: 149的胺基酸序列、

c) SEQ ID NO: 150的胺基酸序列、

d) SEQ ID NO: 151的胺基酸序列、

e) SEQ ID NO: 152的胺基酸序列、

f) SEQ ID NO: 153的胺基酸序列、

g) SEQ ID NO: 154的胺基酸序列、

h) SEQ ID NO: 155的胺基酸序列、

i) SEQ ID NO: 156的胺基酸序列、

j) SEQ ID NO: 157的胺基酸序列、

k) SEQ ID NO: 158的胺基酸序列、或

l) SEQ ID NO: 159的胺基酸序列。

【0127】 ***多特異性多價多肽***

【0128】 在另外的方面，本發明技術的多肽是至少雙特異性的，但是也可以是例如三特異性、四特異性、五特異性等。此外，所述多肽是至少二價的，但是也可以是例如三價、四價、五價、六價等。

【0129】 術語“*雙特異性*”、“*三特異性*”、“*四特異性*”、“*五特異性*”等全部屬於術語“*多特異性*”，並且是指分別與兩種、三種、四種、五種等不同的靶分子結合。

【0130】 術語“*二價*”、“*三價*”、“*四價*”、“*五價*”、“*六價*”等全部屬於術語“*多價*”，並且分別表示存在兩個、三個、四個、五個、六個等結合單元/構建塊，如ISVD。

【0131】例如，所述多肽可以是雙特異性四價的，如包含至少四個ISVD或由其組成的多肽，其中至少兩個ISVD與IL-13特異性地結合並且至少兩個ISVD與TSLP特異性地結合。在一個實施例中，IL-13和TSLP是人IL-13和人TSLP。在另一個例子中，所述多肽可以是三特異性五價的，如包含五個ISVD或由其組成的多肽，其中兩個ISVD與人IL-13特異性地結合，兩個ISVD與人TSLP特異性地結合，並且一個ISVD與人血清白蛋白結合。例如，如果兩個ISVD結合人IL-13或人TSLP上的兩個不同表位，則這種多肽可以同時是雙互補位的。術語“雙互補位”是指與相同靶分子的兩個不同部分（例如表位）結合。在一個實施例中，本發明技術的三特異性五價多肽是例如ISVD構建體F027400161，其包含兩個與人IL-13特異性地結合的ISVD、兩個與人TSLP特異性地結合的ISVD、一個與人血清白蛋白結合的ISVD，並且其對於與IL-13和TSLP的結合均是雙互補位的。

【0132】在一個實施例中，所述多特異性多價多肽包含至少四個ISVD或由其組成，其中所述ISVD各包含三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3），其中所述至少四個ISVD視情況經由一個或多個肽連接子連接，並且其中：

a) 特異性地結合IL-13的第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) 特異性地結合IL-13的第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

c) 特異性地結合TSLP的第三ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基

酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

d) 特異性地結合TSLP的第四ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR2是SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0133】在一個實施例中，所述多肽所結合的IL-13和TSLP分別是人IL-13和人TSLP。

【0134】在多特異性多價多肽的另外實施例中：

a) 所述第一ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；

b) 所述第二ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；

c) 所述第三ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；並且

d) 所述第四ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列。

【0135】在多特異性多價多肽的另外方面中：

a) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 2之超過90%的序列同一性；

b) 所述第二ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 3之超過90%的序列同一性；

c) 所述第三ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 4之超過90%同一性的序列同一性；並且

d) 所述第四ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 6之超過90%同一性的序列同一性。

【0136】在多特異性多價多肽的一個實施例中：

a) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列；

b) 所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；

c) 所述第三ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列；並且

d) 所述第四ISVD包含SEQ ID NO: 6的胺基酸序列。

【0137】在這方面的術語“第一ISVD”、“第二ISVD”和“第三ISVD”等僅表示ISVD的彼此相對位置，其中所述編號是從本發明技術的多肽的N-端開始的。如此“第一ISVD”比“第二ISVD”更靠近N-端，而“第二ISVD”比“第三ISVD”更靠近N-端。因此，當從C-端考慮時，ISVD佈置是相反的。由於編號不是絕對的並且僅表示所述至少四個ISVD的相對位置，因此不排除多肽中可能存在其他結合單元/構建塊，如與IL-13或TSLP結合的另外的ISVD，或與另一個靶標結合的ISVD。此外，不排除可以在其間放置其他結合單元/構建塊（如ISVD）的可能性。例如，如下文進一步描述的（具體參見，下文第5.4節“（體內）半衰期延長”），所述多肽還可以包含甚至可被定位在例如所述“第一ISVD”與“第四ISVD”之間的另一個與人血清白蛋白結合的ISVD。

【0138】在另一方面，本發明技術提供了一種雙特異性二價多肽，其包含如上文（第5.1節；“單特異性單價多肽”）針對單特異性單價多肽詳細描述的與IL-13或TSLP特異性地結合的ISVD和如下文（第5.4節；“（體內）半衰期延長”）詳細描述的與人血清白蛋白結合的ISVD。

【0139】在另一方面，本發明技術提供了一種雙特異性三價多肽，其包含上文

（第5.1節；“單特異性二價多肽”）的單特異性二價多肽和如下文（第5.4節；“（體內）半衰期延長”）詳細描述的與人血清白蛋白結合的ISVD。

【0140】所述多特異性多價多肽的組分（如ISVD）可以通過一個或多個合適的連接子（如肽連接子）彼此連接。

【0141】使用連接子連接兩個或更多個（多）肽是本領域熟知的。表A-5中顯示了示例性肽連接子。一類常用的肽連接子稱為“Gly-Ser”或“GS”連接子。這些是基本上由甘胺酸（G）和絲胺酸（S）殘基組成的連接子，並且通常包含肽基序如GGGGS（SEQ ID NO: 73）基序的一個或多個重複（例如，包含式$(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$，其中n可以是1、2、3、4、5、6、7或更大）。此類GS連接子的一些經常使用的例子是9GS連接子（GGGGSGGGS，SEQ ID NO: 76）、15GS連接子（n = 3）（SEQ ID NO: 78）和35GS連接子（n = 7）（SEQ ID NO: 83）。參見例如Chen等人, Adv. Drug Deliv. Rev. 2013年10月15日；65(10): 1357–1369；和Klein等人, Protein Eng. Des. Sel. (2014) 27 (10): 325-330。在本發明技術的一種或多種多肽中，使用9GS（SEQ ID NO: 76）和35GS（SEQ ID NO: 83）連接子將多肽的組分彼此連接。

【0142】在本發明技術的多特異性多價多肽的一方面，包含至少四個ISVD或由其組成的多肽包含與IL-13特異性地結合的至少兩個ISVD和與TSLP特異性地結合的至少兩個ISVD。在本發明技術的這一方面，與IL-13結合的至少兩個ISVD經由35GS連接子連接，而與TSLP特異性地結合的至少兩個ISVD經由9GS連接子連接。在一個實施例中，與TSLP特異性地結合的至少兩個ISVD被與白蛋白結合的ISVD（9GS-Alb-9GS）（如下文第5.4節“（體內）半衰期延長”所述）分隔開。諸位發明人令人驚訝地發現，這種構型可以增加多肽的生產產量。

【0143】因此，在一個實施例中，所述多肽按照從所述多肽的N-端開始的順序包含以下項或由以下項組成：與IL-13特異性地結合的第一ISVD、與IL-13特異性地結合的第二ISVD、與TSLP特異性地結合的第一ISVD、如本文所定義的為多肽提供增加的半衰期的任選結合單元、以及與TSLP特異性地結合的第二ISVD。

在一個實施例中，為所述多肽提供增加的半衰期的所述結合單元是ISVD。

【0144】在另外的實施例中，所述多肽按照從所述多肽的N-端開始的順序包含以下項或由以下項組成：與IL-13特異性地結合的ISVD、連接子、與IL-13特異性地結合的第二ISVD、連接子、與TSLP特異性地結合的第一ISVD、連接子、與人血清白蛋白結合的ISVD、連接子、和與TSLP特異性地結合的第二ISVD。在一個特定實施例中，與IL-13結合的兩個ISVD之間的連接子是35GS連接子，而其他連接子是9GS連接子。

【0145】所述多肽的此類構型可以提供增加的生產產量、良好的CMC特徵（如足夠的溶解度和生物物理學穩定性）、關於調節第2型免疫應答的強效力以及與預先存在的抗體的低結合。

【0146】在一個實施例中，本發明技術的多特異性多價多肽展現出與人血清中預先存在的抗體降低的結合。為此，在一個實施例中，所述多肽在至少一個ISVD中包含胺基酸位置11處的擷胺酸（V）和胺基酸位置89處的白胺酸（L）（根據Kabat編號）。在一個實施例中，所述多肽在每個ISVD中包含胺基酸位置11處的擷胺酸（V）和胺基酸位置89處的白胺酸（L）（根據Kabat編號）。在另一個實施例中，所述多肽在C-端ISVD的C-端包含1至5個（天然存在的）胺基酸的延伸，如單個丙胺酸（A）延伸。ISVD的C-端通常是VTVSS（SEQ ID NO: 138）。在另一個實施例中，所述多肽在至少一個ISVD中包含位置110處的離胺酸（K）或麩醯胺酸（Q）（根據Kabat編號）。在另一個實施例中，所述ISVD在至少一個ISVD中包含位置112處的離胺酸（K）或麩醯胺酸（Q）（根據Kabat編號）。在這些實施例中，所述ISVD的C-端是VKVSS（SEQ ID NO: 139）、VQVSS（SEQ ID NO: 140）、VTVKS（SEQ ID NO: 166）、VTVQS（SEQ ID NO: 167）、VKVKS（SEQ ID NO: 168）、VKVQS（SEQ ID NO: 169）、VQVKS（SEQ ID NO: 170）、或VQVQS（SEQ ID NO: 171），使得在添加單個丙胺酸後，所述多肽的C-端例如包含序列VTVSSA（SEQ ID NO: 141）、VKVSSA（SEQ ID NO: 142）、VQVSSA（SEQ ID NO: 143）、VTVKSA（SEQ ID NO: 172）、VTVQSA（SEQ ID NO: 173）、

VKVKSA（SEQ ID NO: 174）、VKVQSA（SEQ ID NO: 175）、VQVKSA（SEQ ID NO: 176）、或VQVQSA（SEQ ID NO: 177）。在一個實施例中，所述C-端包含VTVSSA（SEQ ID NO: 141）。在另一個實施例中，所述多肽在每個ISVD中包含胺基酸位置11處的擷胺酸（V）和胺基酸位置89處的白胺酸（L）（根據Kabat編號），視情況在至少一個ISVD中包含位置110處的離胺酸（K）或麩醯胺酸（Q）（根據Kabat編號），並且在C-端ISVD的C-端處包含1至5個（天然存在的）胺基酸的延伸，如單個丙胺酸（A）延伸（使得所述多肽的C-端具有序列VTVSSA（SEQ ID NO: 141）、VKVSSA（SEQ ID NO: 142）或VQVSSA（SEQ ID NO: 143），如VTVSSA（SEQ ID NO: 141））。參見例如WO 2012/175741和WO 2015/173325，以獲取關於這一方面的更多資訊。

【0147】在一個實施例中，本發明技術的多特異性多價多肽包含與SEQ ID NO: 1具有超過90%（如超過95%或超過99%）的序列同一性的胺基酸序列或由其組成，其中五個ISVD的CDR是如分別在下文的章節“5.2 免疫球蛋白單可變域”和“5.4 （體內）半衰期延長”中所述的項目A至E（或A’至E’，如果使用Kabat定義的話）中所定義的，其中特別地：

- 與IL-13特異性地結合的第一ISVD具有CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；
- 與IL-13特異性地結合的第二ISVD具有CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；
- 與TSLP特異性地結合的第三ISVD具有CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；
- 與TSLP特異性地結合的第四ISVD具有CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16

的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列；並且

- 與人血清白蛋白結合的ISVD具有CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 20的胺基酸序列；

或者可替代地，如果使用Kabat定義：

- 與IL-13特異性地結合的第一ISVD具有CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 37的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 42的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列；
- 與IL-13特異性地結合的第二ISVD具有CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 38的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 43的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列；
- 與TSLP特異性地結合的第三ISVD具有CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 39的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 44的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列；
- 與TSLP特異性地結合的第四ISVD具有CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 41的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 46的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列；並且
- 與人血清白蛋白結合的ISVD具有CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 40的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 45的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 20的胺基酸序列。

【0148】在另一個實施例中，所述多肽包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列或由其組成。在另一個實施例中，所述多肽由SEQ ID NO: 1的胺基酸序列組成。

【0149】在一個實施例中，與由SEQ ID NO: 1的胺基酸組成的多肽相比，本發明技術的多肽對人IL-13和對人TSLP具有至少一半的結合親和力或至少相同的結合親和力，其中所述結合親和力是使用相同的方法如表面等離子體共振（SPR）測量的。

【0150】 **5.2　免疫球蛋白單可變域**

【0151】 術語“免疫球蛋白單可變域”（ISVD）與“單可變域”可互換使用，其定義了這樣的免疫球蛋白分子，在所述免疫球蛋白分子中抗原結合位點存在於單個免疫球蛋白結構域上並且由單個免疫球蛋白結構域形成。這使得ISVD與“常規”免疫球蛋白（例如單克隆抗體）或其片段（如，Fab、Fab’、$F(ab')_2$、scFv、di-scFv）區分開，其中兩個免疫球蛋白結構域、特別是兩個可變域相互作用形成抗原結合位點。通常，在常規的免疫球蛋白中，重鏈可變域（V_H）和輕鏈可變域（V_L）相互作用形成抗原結合位點。在這種情況下，V_H和V_L二者的互補決定區（CDR）將促成抗原結合位點，即總共6個CDR將參與抗原結合位點的形成。

【0152】 鑒於以上定義，常規4鏈抗體（如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE分子；本領域已知的）的抗原結合結構域或者源自這種常規4鏈抗體的Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fv片段（如二硫化物連接的Fv或scFv片段）或雙抗體（本領域中全部已知的）將通常不被視為ISVD，因為在這些情況下，不是一個（單個）免疫球蛋白結構域發生與相應抗原表位的結合，而是一對（締合的）免疫球蛋白結構域（如輕鏈和重鏈可變域）即免疫球蛋白結構域的V_H-V_L對發生與相應抗原表位的結合，其共同地與相應抗原表位結合。

【0153】 相比之下，ISVD能夠在不與另外的免疫球蛋白可變域配對的情況下與抗原表位特異性地結合。ISVD的結合位點由單個V_H、單個V_{HH}或單個V_L結構域形成。

【0154】 因此，單個可變域可以是輕鏈可變域序列（例如，V_L序列）或其合適片段；或重鏈可變域序列（例如，V_H序列或V_{HH}序列）或其合適片段；只要它能夠形成單個抗原結合單元即可（即基本上由單個可變域組成的功能性抗原結合單元，使得單個抗原結合結構域不需要與另一個可變域相互作用即可形成功能性抗原結合單元）。

【0155】 ISVD可以例如是重鏈ISVD（如V_H、V_{HH}），包括駝類化V_H或人類化V_{HH}。在一個實施例中，它是V_{HH}，包括駝類化V_H或人類化V_{HH}。重鏈ISVD可以

源自常規四鏈抗體或重鏈抗體。

【0156】 例如，ISVD可以是單結構域抗體（或適合用作單結構域抗體的胺基酸序列）、“dAb”或dAb（或適合用作dAb的胺基酸序列）或Nanobody®（如本文所定義的，並且包括但不限於V_{HH}）；其他單可變域或其任何一個的任何合適片段。

【0157】 特別地，ISVD可以是Nanobody®（如V_{HH}，包括人類化V_{HH}或駝類化V_H）或其合適片段。Nanobody®、Nanobodies®和Nanoclone®是Ablynx N.V.的注冊商標。

【0158】 “V_{HH}結構域”也稱為V_{HH}、V_{HH}抗體片段和V_{HH}抗體，最初已被描述為“重鏈抗體”的（即“無輕鏈抗體”的；Hamers-Casterman等人 Nature 363: 446-448, 1993）抗原結合免疫球蛋白可變域。已選擇術語“V_{HH}結構域”以將這些可變域與常規4鏈抗體中存在的重鏈可變域（其在本文中稱為“V_H結構域”）以及與常規4鏈抗體中存在的輕鏈可變域（其在本文中稱為“V_L結構域”）區分開來。有關V_{HH}的另外描述請參見Muyldermans的綜述文章（綜述，Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001）。

【0159】 通常，免疫球蛋白的生成涉及對實驗動物的免疫、免疫球蛋白產生細胞的融合以產生雜交瘤、以及篩選所需的特異性。可替代地，可以通過篩選天然或合成文庫（例如通過噬菌體展示）生成免疫球蛋白。

【0160】 免疫球蛋白序列（如Nanobodies®）的生成已經在各種出版物（其中WO 94/04678、Hamers-Casterman等人 1993和Muyldermans等人 2001可以作為例證）中被廣泛地描述。在這些方法中，用靶抗原免疫駱駝科動物以誘導針對所述靶抗原的免疫應答。將從所述免疫獲得的奈米抗體庫針對結合所述靶抗原的奈米抗體進行進一步篩選。

【0161】 在這些情況下，抗體的生成需要純化的抗原用於免疫和/或篩選。可以從天然來源或在重組產生過程中純化抗原。

【0162】 免疫球蛋白序列的免疫和/或篩選可以使用此類抗原的肽片段進行。

【0163】本發明技術可以使用不同來源的免疫球蛋白序列，包括小鼠、大鼠、兔、驢、人和駱駝科動物免疫球蛋白序列。本發明技術還包括完全人、人類化或嵌合序列。例如，本發明技術包括駱駝科動物免疫球蛋白序列和人類化駱駝科動物免疫球蛋白序列或駝類化結構域抗體，例如Ward等人（參見例如WO 94/04678和Davies和Riechmann (1994和1996)）所述的駝類化dAb。此外，本發明技術還使用融合的免疫球蛋白序列，例如從而形成多價和/或多特異性構建體（對於含有一個或多個V_{HH}結構域的多價和多特異性多肽及其製備，還參見Conrath等人, J. Biol. Chem., 第276卷, 10. 7346-7350, 2001，以及參見例如WO 96/34103和WO 99/23221）；以及可從本發明技術的免疫球蛋白序列衍生的包含標記或其他功能性部分（例如毒素、標籤、放射性化學物質等）的免疫球蛋白序列。

【0164】“人類化V_{HH}”包含與天然存在的V_{HH}結構域的胺基酸序列對應但是已經被“人類化”的胺基酸序列，即通過將所述天然存在的V_{HH}序列（並且特別是架構序列）的胺基酸序列中的一個或多個胺基酸殘基用來自人類的常規4鏈抗體（例如，上文所示）的V_H結構域中的一個或多個相應位置處存在的一個或多個胺基酸殘基替代而人類化。這能以本身已知的方式進行，這對於熟習此項技術者來說是清楚的，例如基於本文的進一步描述和現有技術（例如WO 2008/020079）。此外，應注意，可以以任何本身已知的合適方式獲得此類人類化V_{HH}，並因此並不嚴格限於已經使用包含天然存在的VHH結構域作為起始材料的多肽獲得的多肽。

【0165】“駝類化V_H”包含與天然存在的V_H結構域的胺基酸序列對應但是已經被“駝類化”的胺基酸序列，即通過將來自常規4鏈抗體的天然存在的V_H結構域的胺基酸序列中的一個或多個胺基酸殘基用重鏈抗體的V_{HH}結構域中的一個或多個相應位置處存在的一個或多個胺基酸殘基替代而駝類化。這能以本身已知的方式進行，這對於熟習此項技術者來說是清楚的，例如基於本文的進一步描述和現有技術（例如WO 2008/020079）。如本文所定義，此類“駝類化”取代通常在V_H-V_L接合處形成和/或存在的胺基酸位置處插入和/或在所謂的駱駝科動物標

誌殘基處插入，如本文所定義（參見例如WO 94/04678和Davies和Riechmann (1994和1996)，同上）。在一個實施例中，用作用於生成或設計駝類化V_H的起始材料或起點的V_H序列是來自哺乳動物的V_H序列或人類的V_H序列，如V_H3序列。然而應注意，可以以任何本身已知的合適方式獲得此類駝類化V_H，並因此並不嚴格限於已經使用包含天然存在的V_H結構域作為起始材料的多肽獲得的多肽。

【0166】 ISVD序列的結構可以認為是由四個架構區（“FR”）構成，其在本領域和本文中分別稱為“架構區1”（“FR1”）、“架構區2”（“FR2”）、“架構區3”（“FR3”）和“架構區4”（“FR4”），所述構架區被三個互補決定區（“CDR”）打斷，所述三個互補決定區在本領域和本文中分別稱為“互補決定區1”（“CDR1”）、“互補決定區2”（“CDR2”）和“互補決定區3”（“CDR3”）。

【0167】 如在WO 08/020079的第58頁和第59頁的第 q) 段中進一步描述的，ISVD的胺基酸殘基可以根據Kabat等人給出的V_H結構域的通用編號來編號（“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH Bethesda, 馬里蘭州, 出版編號91），如在Riechmann和Muyldermans, 2000（J. Immunol. Methods 240 (1-2): 185-195；參見例如該出版物的圖2）的文章中應用於來自駱駝科動物的V_{HH}結構域。應注意，如本領域中對於V_H結構域和V_{HH}結構域所熟知的，每個CDR中胺基酸殘基的總數可以變化，並且可以不對應於由Kabat編號表示的胺基酸殘基的總數（也就是說，根據Kabat編號的一個或多個位置可能不會在實際序列中被佔用，或者實際序列可能含有比Kabat編號所允許的數量更多的胺基酸殘基）。這意味著，通常，根據Kabat的編號可以對應於或可以不對應於實際序列中胺基酸殘基的實際編號。V_H結構域和V_{HH}結構域中的胺基酸殘基總數通常在110至120，常常在112與115之間的範圍內。然而應注意，較小和較長的序列也可能適合於本文中描述的目的。

【0168】 在本申請中，除非另有說明，否則CDR序列是根據Kontermann和Dübel（編輯 2010, Antibody Engineering, 第2卷, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin，第3章，第33-51頁）中描述的AbM定義來確定的。根據此方法，FR1包

含位置1-25處的胺基酸殘基，CDR1包含位置26-35處的胺基酸殘基，FR2包含位置36-49處的胺基酸，CDR2包含位置50-58處的胺基酸殘基，FR3包含位置59-94處的胺基酸殘基，CDR3包含位置95-102處的胺基酸殘基，並且FR4包含位置103-113處的胺基酸殘基。

【0169】 CDR區的確定也可以根據不同方法進行。在根據Kabat的CDR確定中，ISVD的FR1包含位置1-30處的胺基酸殘基，ISVD的CDR1包含位置31-35處的胺基酸殘基，ISVD的FR2包含位置36-49處的胺基酸，ISVD的CDR2包含位置50-65處的胺基酸殘基，ISVD的FR3包含位置66-94處的胺基酸殘基，ISVD的CDR3包含位置95-102處的胺基酸殘基，並且ISVD的FR4包含位置103-113處的胺基酸殘基。

【0170】 在這種免疫球蛋白序列中，所述架構序列可以是任何合適的架構序列，並且例如基於標準手冊以及本文中提及的另外的披露內容和現有技術，合適的架構序列的例子對於熟習此項技術者將是清楚的。

【0171】 所述架構序列是免疫球蛋白架構序列或已源自免疫球蛋白架構序列（例如，通過人類化或駝類化）的架構序列的合適組合。例如，所述架構序列可以是源自輕鏈可變域（例如V_L序列）和/或重鏈可變域（例如V_H序列或V_{HH}序列）的架構序列。在一方面，所述架構序列是已源自V_{HH}序列的架構序列（其中所述架構序列可以視情況已部分或完全人類化）或已駝類化的常規V_H序列（如本文所定義）。

【0172】 特別地，本發明技術中使用的ISVD序列中存在的架構序列可以含有一個或多個標誌殘基（如本文所定義）以使得ISVD序列是Nanobody®，如V_{HH}，包括人類化V_{HH}或駝類化V_H。此類架構序列（的合適組合）的一些非限制性例子將從本文的進一步公開內容中變得清楚。

【0173】 此外，如本文對於免疫球蛋白序列的一般性描述，也可以使用前述任何一種的合適片段（或片段的組合），如含有適當地側接一個或多個架構序列和/或經由一個或多個架構序列連接的一個或多個CDR序列的片段（例如，按照

與這些CDR和架構序列可能在衍生所述片段的全尺寸免疫球蛋白序列中出現的相同順序）。

【0174】然而應注意，本發明技術在ISVD序列（或用於表現它的核苷酸序列）的來源方面不受限制，在生成或獲得（或已經生成或獲得）ISVD序列或核苷酸序列的方式方面也不受限制。因此，所述ISVD序列可以是天然存在的序列（來自任何合適的物種）或合成或半合成序列。在特定但非限制性的方面，所述ISVD序列是天然存在的序列（來自任何合適的物種）或合成或半合成序列，包括但不限於“人類化”（如本文所定義）免疫球蛋白序列（如部分或完全人類化小鼠或兔免疫球蛋白序列，並且特別是部分或完全人類化V_{HH}序列），“駝類化”（如本文所定義）免疫球蛋白序列，以及已經通過技術（如親和力成熟（例如從合成的、隨機的或天然存在的免疫球蛋白序列開始）、CDR移植、鑲飾、組合源自不同免疫球蛋白序列的片段、使用重疊引物的PCR組裝、以及熟習此項技術者熟知的工程化免疫球蛋白序列的類似技術）獲得的免疫球蛋白序列；或前述任何一種的任何合適組合。

【0175】類似地，核苷酸序列可以是天然存在的核苷酸序列或合成或半合成序列，並且可以例如是通過PCR從合適的天然存在的範本（例如，從細胞分離的DNA或RNA）分離的序列、已經從文庫（並且特別是表現文庫）分離的核苷酸序列、已經通過將突變引入天然存在的核苷酸序列中而製備（使用本身已知的任何合適技術，如錯配PCR）的核苷酸序列、已經使用重疊引物通過PCR製備的核苷酸序列或已經使用本身已知的DNA合成技術製備的核苷酸序列。

【0176】如上所述，ISVD可以是Nanobody®或其合適片段。對於奈米抗體的一般性描述，參見下文的進一步描述以及本文引用的現有技術。然而在這一方面應注意，本說明書和現有技術主要描述了所謂的“V_H3類”的奈米抗體（即與V_H3類（如DP-47、DP-51或DP-29）的人種系序列具有高度序列同源性的奈米抗體）。然而應注意，本發明技術在其最廣泛的意義上通常可以使用任何類型的奈米抗體，並且例如還使用屬於所謂的“V_H4類”的奈米抗體（即與V_H4類（如DP-78）的

人種系序列具有高度序列同源性的奈米抗體），例如像WO 2007/118670中所述的。

【0177】 通常，奈米抗體（特別是V_{HH}序列，包括（部分）人類化V_{HH}序列和駝類化V_H序列）的特徵可以在於一個或多個架構序列（再次如本文進一步所述）中的一個或多個“標誌殘基”（如本文所述）的存在。因此，通常可以將奈米抗體定義為具有以下（一般）結構的免疫球蛋白序列：

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

其中FR1至FR4分別是指架構區1至4，並且其中CDR1至CDR3分別是指互補決定區1至3，並且其中標誌殘基中的一個或多個是如本文進一步所定義的。

【0178】 特別地，奈米抗體可以是具有以下（一般）結構的免疫球蛋白序列：

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

其中FR1至FR4分別是指架構區1至4，並且其中CDR1至CDR3分別是指互補決定區1至3，並且其中所述架構序列是如本文進一步所定義的。

【0179】 更特別地，奈米抗體可以是具有以下（一般）結構的免疫球蛋白序列：

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

其中FR1至FR4分別是指架構區1至4，並且其中CDR1至CDR3分別是指互補決定區1至3，並且其中：

【0180】 根據Kabat編號，在位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108處的胺基酸殘基中的一個或多個選自下表A-0中提及的標誌殘基。

【0181】 表A-0：奈米抗體中的標誌殘基

位置	人V_H3	標誌殘基
11	L、V；主要為L	L、S、V、M、W、F、T、Q、E、A、R、G、K、Y、N、P、I；較佳L
37	V、I、F；通常為V	$F^{(1)}$、Y、V、L、A、H、S、I、W、C、N、G、D、T、P；較佳$F^{(1)}$或Y
$44^{(8)}$	G	$E^{(3)}$、$Q^{(3)}$、$G^{(2)}$、D、A、K、R、L、P、S、V、H、T、N、W、M、I； 較佳$G^{(2)}$、$E^{(3)}$或$Q^{(3)}$；更佳$G^{(2)}$或$Q^{(3)}$。
$45^{(8)}$	L	$L^{(2)}$、$R^{(3)}$、P、H、F、G、Q、S、E、T、Y、C、I、D、V；較佳$L^{(2)}$或$R^{(3)}$

47[8]	W、Y	F[1]、L[1]或W[2]、G、I、S、A、V、M、R、Y、E、P、T、C、H、K、Q、N、D；較佳W[2]、L[1]或F[1]
83	R或K；通常為R	R、K[5]、T、E[5]、Q、N、S、I、V、G、M、L、A、D、Y、H；較佳K或R；最佳K
84	A、T、D；主要為A	P[5]、S、H、L、A、V、I、T、F、D、R、Y、N、Q、G、E；較佳P
103	W	W[4]、R[6]、G、S、K、A、M、Y、L、F、T、N、V、Q、P[6]、E、C；較佳W
104	G	G、A、S、T、D、P、N、E、C、L；較佳G
108	L、M或T；主要為L	Q、L[7]、R、P、E、K、S、T、M、A、H；較佳Q或L[7]

注釋：
(1) 特別地但非唯一地，與位置43-46處的KERE或KQRE組合。
(2) 通常為位置44-47處的GLEW。
(3) 通常為位置43-46處的KERE或KQRE，例如為位置43-47處的KEREL、KEREF、KQREL、KQREF、KEREG、KQREW或KQREG。可替代地，還可以使用序列如TERE(例如TEREL)、TQRE(例如TQREL)、KECE(例如KECEL或KECER)、KQCE(例如KQCEL)、RERE(例如REREG)、RQRE(例如RQREL、RQREF或RQREW)、QERE(例如QEREG)、QQRE,(例如QQREW、QQREL或QQREF)、KGRE(例如KGREG)、KDRE(例如KDREV)。一些其他可能的但較不優選的序列包括例如DECKL和NVCEL。
(4) 具有位置44-47處的GLEW和位置43-46處的KERE或KQRE。
(5) 通常為天然存在的V_{HH}結構域的位置83-84處的KP或EP。
(6) 特別地但非唯一地，與位置44-47處的GLEW組合。
(7) 前提是當位置44-47為GLEW時，(非人類化)V_{HH}序列中的位置108始終為Q，在103處還含有W。
(8) GLEW組還在位置44-47處含有GLEW樣序列，例如像GVEW、EPEW、GLER、DQEW、DLEW、GIEW、ELEW、GPEW、EWLP、GPER、GLER和ELEW。

【0182】本發明技術尤其使用可與IL-13或TSLP結合的ISVD。在本發明技術的情境中，與特定靶分子“結合”在本領域中具有與在抗體及其相應抗原的情境中所理解的通常含義。

【0183】本發明技術的多特異性多價多肽可以包含與IL-13特異性地結合的兩個或更多個ISVD和與TSLP特異性地結合的兩個或更多個ISVD。例如，所述多肽可以包含與IL-13特異性地結合的兩個ISVD和與TSLP特異性地結合的兩個ISVD。

【0184】在一些實施例中，所述至少一個ISVD可以在功能上阻斷其靶分子。例如，靶向部分可以阻斷IL-13與IL-13Rα1（白細胞介素13受體，α1）之間的相互作用和/或IL-13/IL-13Rα1複合物與IL-4Rα(α白細胞介素4受體)之間的相互作用，

或可以阻斷TSLP與TSLPR（TSLP受體）和/或TSLP/TSLPR複合物與IL-7Rα（白細胞介素7受體亞基α）之間的相互作用。因此，在一個實施例中，本發明技術的多肽包含與IL-13特異性地結合並在功能上阻斷其與IL-13Rα1的相互作用和/或IL-13/IL-13Rα1複合物與IL-4Rα之間的相互作用的至少兩個ISVD；和與TSLP特異性地結合並在功能上阻斷其與TSLPR的相互作用和/或TSLP/TSLPR複合物與IL-7Rα之間的相互作用的兩個ISVD。

【0185】本發明技術中使用的ISVD形成本發明技術的多肽的一部分，所述多肽包含至少四個ISVD或由其組成，使得所述多肽可以與IL-13和TSLP特異性地結合。

【0186】因此，在本發明技術的多肽中使用的所述至少四個ISVD的靶分子是IL-13和TSLP。例子是哺乳動物IL-13和TSLP。除了人IL-13（Uniprot登錄號P35225）和人TSLP（Uniprot登錄號Q969D9）之外，來自其他物種的形式（例如來自小鼠、大鼠、兔、貓、狗、山羊、綿羊、馬、豬、非人靈長類動物（如食蟹猴）（在本文中也稱為“*cyno*”）或駱駝科動物（如美洲駝或羊駝）的IL-13和TSLP）也適用于本發明技術。

【0187】可在本發明技術中使用的與IL-13特異性地結合的ISVD的具體例子是如以下項目A和B中所述的：

【0188】A.　如下ISVD，其與人IL-13特異性地結合並且包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0189】在一個實施例中，所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列，所述

CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列。

【0190】 B. 如下ISVD，其與人IL-13特異性地結合並且包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0191】 在一個實施例中，所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列。

【0192】 這種與人IL-13特異性地結合的ISVD的例子具有表A-2中分別針對構建體4B02或4B06所示的一個或多個或所有架構區（以及如在前述項目A和B中分別定義的CDR）。在一個實施例中，它是包含構建體4B02或構建體4B06的完整胺基酸序列（分別為SEQ ID NO: 2和3；參見表A-1和表A-2）或由其組成的ISVD。

【0193】 在另一個實施例中，與人IL-13特異性地結合的所述一個或多個ISVD的胺基酸序列可以與SEQ ID NO: 2或3具有超過90%（如超過95%或超過99%）的序列同一性，其中所述CDR是分別如前述項目A或B所定義的。在一個實施例中，與IL-13特異性地結合的ISVD包含SEQ ID NO: 2或3的胺基酸序列或由其組成。

【0194】 當這種與IL-13結合的ISVD在至少一個CDR中具有相對於相應的參考CDR序列的2或1個胺基酸差異（上述項目A或B）時，分別與SEQ ID NO: 2或3中所示的構建體4B02或4B06相比，所述ISVD對人IL-13具有至少一半的結合親和力或至少相同的結合親和力，其中所述結合親和力是使用相同的方法（如SPR）測量的。

【0195】 可在本發明技術中使用的與TSLP特異性地結合的ISVD的具體例子是如以下項目C和D中所述的：

【0196】C.　如下ISVD，其與人TSLP特異性地結合並且包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0197】在一個實施例中，所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列。

【0198】D．　如下ISVD，其與人TSLP特異性地結合並且包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0199】在一個實施例中，所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列。

【0200】這種與人TSLP特異性地結合的ISVD的例子具有表A-2中分別針對構建體501A02和529F10所示的一個或多個或所有架構區（以及如在前述項目C和D中定義的CDR）。在一個實施例中，它是包含構建體501A02或529F10的完整胺基酸序列（SEQ ID NO: 4或6；參見表A-1和表A-2）或由其組成的ISVD。

【0201】在另一個實施例中，與人TSLP特異性地結合的一個或多個ISVD的胺基酸序列可以與SEQ ID NO: 4或6分別具有超過90%（如超過95%或超過99%）的

序列同一性，其中所述CDR是如前述項目C或D所定義的。在一個實施例中，與人TSLP結合的ISVD包含SEQ ID NO: 4或6的胺基酸序列或由其組成。

【0202】 當這種與人TSLP結合的ISVD在至少一個CDR中具有相對於相應的參考CDR序列的2或1個胺基酸差異（上述項目C或D）時，分別與SEQ ID NO: 4和6中所示的構建體501A02或529F10相比，所述ISVD對人TSLP具有至少一半的結合親和力或至少相同的結合親和力，其中所述結合親和力是使用相同的方法（如SPR）測量的。

【0203】 在一個實施例中，如上述項目A至D所定義的每個ISVD包含在本發明技術的多肽中。

【0204】 與由SEQ ID NO: 1的胺基酸組成的多肽相比，包含上述專案A至D下所定義的每一個ISVD的本發明技術的這種多肽對人IL-13和對人TSLP具有至少一半的結合親和力或至少相同的結合親和力，其中所述結合親和力是使用相同的方法（如SPR）測量的。

【0205】 上述專案A至D和下文項目E（參見第5.4節“（體內）半衰期延長”）中所提及的SEQ ID NO是基於根據AbM定義的CDR定義（參見表A-2）。應注意，根據Kabat定義的定義相同CDR的SEQ ID NO（參見表A-2.1）同樣可以用於上述項目A至D和下文項目E（參見第5.4節“（體內）半衰期延長”）。

【0206】 因此，以上使用AbM定義描述的可在本發明技術中使用的與IL-13或TSLP特異性地結合的ISVD的具體例子也可以如以下項目A’至D’中所示使用Kabat定義來描述：

【0207】 A’. 如下ISVD，其與人IL-13特異性地結合並且包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 37的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 37具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 42的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 42具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或與SEQ ID NO:

17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0208】在一個實施例中，所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 37的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 42的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列。

【0209】B’.　如下ISVD，其與人IL-13特異性地結合並且包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 38的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 38具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 43的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 43具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 18具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0210】在一個實施例中，所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 38的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 43的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 18的胺基酸序列。

【0211】這種與人IL-13特異性地結合的一個或多個ISVD的例子具有表A-2-1中分別針對構建體4B02或4B06所示的一個或多個或所有架構區（以及如在前述項目A’和B’中分別定義的CDR）。在一個實施例中，它是包含構建體4B02或構建體4B06的完整胺基酸序列（分別為SEQ ID NO: 2和3；參見表A-1和表A-2-1）或由其組成的ISVD。

【0212】C’.　如下ISVD，其與人TSLP特異性地結合並且包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 39的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 39具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 44的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 44具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0213】在一個實施例中，所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 39的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 44的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 19的胺基酸序列。

【0214】D'.　如下ISVD，其與人TSLP特異性地結合並且包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 41的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 41具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 46的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 46具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 21具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0215】在一個實施例中，所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 41的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 46的胺基酸序列，所述CDR3為SEQ ID NO: 21的胺基酸序列。

【0216】這種與人TSLP特異性地結合的一個或多個ISVD的例子具有表A-2-1中分別針對構建體501A02和529F10所示的一個或多個或所有架構區（以及如在前述項目C'和D'中定義的CDR）。在一個實施例中，它是包含構建體501A02或529F10的完整胺基酸序列（SEQ ID NO: 4或6；參見表A-1和表A-2-1）或由其組成的ISVD。

【0217】第一胺基酸序列與第二胺基酸序列之間的"*序列同一性*"的百分比可以如下進行計算：([*第一胺基酸序列中胺基酸殘基與第二胺基酸序列中相應位置處的胺基酸殘基相同的數量*]/[*第一胺基酸序列中胺基酸殘基的總數量*])×*100%*，其中與第一胺基酸序列相比在第二胺基酸序列中胺基酸殘基的每個缺失、插入、取代或添加被視為單個胺基酸殘基處（即單個位置處）的差異。

【0218】通常，為了根據上文概述的計算方法確定兩個胺基酸序列之間的"序列同一性"的百分比，將具有最大胺基酸殘基數量的胺基酸序列作為"第一"胺基酸序列，並且另一個胺基酸序列作為"第二"胺基酸序列。

【0219】如本文所用，“胺基酸差異”是指單個胺基酸殘基相對於參考序列的缺失、插入或取代。在一個實施例中，“胺基酸差異”是取代。

【0220】在一個實施例中，胺基酸取代是保守取代。此類保守取代是指這樣的取代，其中下組 (a) - (e)中的一個胺基酸被同一組中的另一個胺基酸殘基取代：(a) 小脂肪族、非極性或弱極性殘基：Ala、Ser、Thr、Pro和Gly；(b) 極性、帶負電荷的殘基及其（不帶電荷的）醯胺：Asp、Asn、Glu和Gln；(c) 極性、帶正電荷的殘基：His、Arg和Lys；(d) 大脂肪族、非極性殘基：Met、Leu、Ile、Val和Cys；和 (e) 芳香族殘基：Phe、Tyr和Trp。

【0221】在一個實施例中，保守取代如下：Ala取代為Gly或取代為Ser；Arg取代為Lys；Asn取代為Gln或取代為His；Asp取代為Glu；Cys取代為Ser；Gln取代為Asn；Glu取代為Asp；Gly取代為Ala或取代為Pro；His取代為Asn或取代為Gln；Ile取代為Leu或取代為Val；Leu取代為Ile或取代為Val；Lys取代為Arg、取代為Gln或取代為Glu；Met取代為Leu、取代為Tyr或取代為Ile；Phe取代為Met、取代為Leu或取代為Tyr；Ser取代為Thr；Thr取代為Ser；Trp取代為Tyr；Tyr取代為Trp；和/或Phe取代為Val、取代為Ile或取代為Leu。

【0222】**5.3　特異性**

【0223】術語“*特異性*”、“*特異性地結合*”或“*特異性結合*”是指特定結合單元（如ISVD）可以以足夠高的親和力（參見下文）結合的來自同一生物的不同靶分子（如抗原）的數量。“*特異性*”、“*特異性地結合*”或“*特異性結合*”在本文中與“*選擇性*”、“*選擇性地結合*”或“*選擇性結合*”可互換使用。結合單元（如ISVD）與其指定的靶標特異性地結合。

【0224】可以基於親和力確定結合單元的特異性/選擇性。親和力表示分子相互作用的強度或穩定性。親和力通常由KD或解離常數給出，其單位為mol/L（或M）。親和力也可以表示為締合常數KA，其等於1/KD並且單位為 $(mol/L)^{-1}$（或M^{-1}）。

【0225】親和力是部分與靶分子上的結合位點之間的結合強度的量度：KD值越低，靶分子與靶向部分之間的結合強度越強。

【0226】 通常，本發明技術中使用的結合單元（如ISVD）將以如下解離常數（KD）與其靶標結合：10^{-5}至10^{-12} mol/L或更小、或10^{-7}至10^{-12} mol/L或更小、或10^{-8}至10^{-12} mol/L（即，締合常數（KA）為10^{5}至10^{12} L/mol或更大、或10^{7}至10^{12} L/mol或更大、或10^{8}至10^{12} L/mol）。

【0227】 通常認為任何大於10^{-4} mol/L的KD值（或任何小於10^{4} L/mol的KA值）表示非特異性結合。

【0228】 被認為具有特異性的生物學相互作用（如免疫球蛋白序列與抗原的結合）的KD通常在10^{-5} mol/L（10000 nM或10 μM）至10^{-12} mol/L（0.001 nM或1 pM）或更小的範圍內。

【0229】 因此，特異性/選擇性結合可能意味著，使用相同的測量方法（例如SPR），結合單元（或包含所述結合單元的多肽）以10^{-5}至10^{-12} mol/L或更小的KD值與IL13和/或TSLP結合，並且以大於10^{-4} mol/L的KD值與相關細胞因子結合。IL13相關靶標的例子是人IL4。對於TSLP的相關細胞因子的例子是人IL7。因此，在本發明技術的實施例中，包含在多肽中的至少兩個ISVD以10^{-5}至10^{-12} mol/L或更小的KD值與IL13結合並且以大於10^{-4} mol/L的KD值與相同物種的IL4結合，並且包含在多肽中的至少兩個ISVD以10^{-5}至10^{-12} mol/L或更小的KD值與TSLP結合並且以大於10^{-4} mol/L的KD值與相同物種的人IL7結合。

【0230】 因此，與由SEQ ID NO: 1的胺基酸組成的多肽相比，本發明技術的多肽對人IL13和對人TSLP具有至少一半的結合親和力或至少相同的結合親和力，其中所述結合親和力是使用相同的方法（如SPR）測量的。

【0231】 與來自特定物種的特定靶標的特異性結合並不排除結合單元也可以與來自不同物種的類似靶標特異性地結合。例如，與人IL13的特異結合並不排除結合單元（或包含所述結合單元的多肽）也可以與來自食蟹猴的IL13特異性地結合。同樣地，例如，與人TSLP的特異性結合並不排除結合單元（或包含所述結合單元的多肽）也可以與來自食蟹猴（“cyno”）的TSLP特異性地結合。

【0232】 結合單元與其指定靶標的特異性結合可以通過本身已知的任何合適方

式（包括例如斯卡查德（Scatchard）分析和/或競爭性結合測定（如放射免疫測定（RIA）、酶免疫測定（EIA）和夾心式競爭測定）和本領域本身已知的其不同變體）；以及本文提及的其他技術來確定。

【0233】解離常數可以是實際或表觀解離常數，正如熟習此項技術者所清楚的。確定解離常數的方法對熟習此項技術者是清楚的，並且例如包括以下提及的技術。在這一方面，還將清楚的是，可能無法測量大於10^{-4} mol/L或10^{-3} mol/L（例如為10^{-2} mol/L）的解離常數。視情況，如熟習此項技術者也清楚的，（實際或表觀）解離常數可以基於（實際或表觀）締合常數（KA）通過關係[KD = 1/KA]來計算。

【0234】可以經由本身已知的不同技術（如熟知的表面等離子體共振（SPR）生物感測器技術（參見例如，Ober等人 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559））來測量兩個分子之間的分子相互作用的親和力。如本文所用，術語“表面等離子體共振”是指光學現象，其允許通過檢測生物感測器基質中蛋白質濃度的改變來分析即時生物特異性相互作用，其中一個分子被固定在生物感測器晶片上，並且另一個分子在流動條件下通過所固定的分子，從而產生k_{on}、k_{off}測量值，並因此產生K_D（或K_A）值。例如，這可以使用熟知的BIAcore®系統（BIAcore International AB, GE Healthcare公司, 烏普薩拉, 瑞典和皮斯卡塔韋, 新澤西州）進行。有關進一步描述，參見Jonsson等人（1993, Ann. Biol. Clin. 51: 19-26）、Jonsson等人（1991 Biotechniques 11: 620-627）、Johnsson等人（1995, J. Mol. Recognit. 8: 125-131）和Johnnson等人（1991, Anal. Biochem. 198: 268-277）。

【0235】另一種確定生物分子相互作用的親和力的熟知的生物感測器技術是生物層干涉測量法（BLI）（參見例如，Abdiche等人 2008, Anal. Biochem. 377: 209-217）。如本文所用，術語“生物層干涉測量法”或“BLI”是指無標籤光學技術，其分析從以下兩個表面反射的光的干涉圖案：內部參考層（參考光束）和生物感測器尖端上的固定化蛋白質層（信號光束）。與生物感測器尖端結合的分子的數量變化導致干涉圖案的偏移，報告為波長偏移（nm），其大小是與生物感

測器尖端表面結合的分子的數量的直接量度。由於可以即時測量相互作用，因此可以確定締合和解離速率以及親和力。例如，BLI可以使用熟知的Octet®系統（ForteBio, Pall Life Sciences的部門, 門洛派克, 美國）進行。

【0236】 可替代地，可以在動力學排斥測定（KinExA）（參見例如Drake等人 2004, Anal. Biochem., 328: 35-43）中使用KinExA®平臺（Sapidyne Instruments Inc, 博伊西, 美國）測量親和力。如本文所用，術語“KinExA”是指用於測量未修飾分子的真實平衡結合親和力和動力學的基於溶液的方法。使抗體/抗原複合物的平衡溶液通過具有用抗原（或抗體）預塗覆的珠的柱，以使游離抗體（或抗原）與塗覆的分子結合。如此捕獲的抗體（或抗原）的檢測是使用結合抗體（或抗原）的螢光標記蛋白來完成的。

【0237】 GYROLAB®免疫測定系統為自動化生物分析和快速樣品周轉提供了平臺（Fraley等人 2013, Bioanalysis 5: 1765-74）。

【0238】 **5.4 （體內）半衰期延長**

【0239】 所述多肽還可以包含視情況經由一個或多個肽連接子連接的一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元，其中與沒有所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元的相應多肽相比，所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元為所述多肽提供了增加的（體內）半衰期。體內半衰期延長意指例如所述多肽在投予後在哺乳動物如人個體中具有增加的半衰期。半衰期可以表示為例如t1/2β。

【0240】 基團、殘基、部分或結合單元的類型通常不受限制並且可以例如選自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可與血清蛋白結合的結合單元、Fc部分和可與血清蛋白結合的小蛋白質或肽。

【0241】 更具體地，為所述多肽提供增加的半衰期的所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元可以選自可與血清白蛋白（如人血清白蛋白）或血清免疫球蛋白（如IgG）結合的結合單元。在一個實施例中，為所述多肽提供增加的半衰期的所述一個或多個其他結合單元是可與人血清白蛋白結合的結合單元。

在一個實施例中，所述結合單元是ISVD。

【0242】 例如，WO 04/041865描述了與血清白蛋白結合（並且特別是針對人血清白蛋白）的Nanobodies®，其可以與其他蛋白質（如與所需靶標結合的一種或多種其他奈米抗體）連接以增加所述蛋白質的半衰期。

【0243】 國際申請WO 06/122787描述了許多針對（人）血清白蛋白的Nanobodies®。這些Nanobodies®包括稱為Alb-1（WO 06/122787中的SEQ ID NO: 52）的Nanobody®及其人類化變異體，如Alb-8（WO 06/122787中的SEQ ID NO: 62）。此外，這些可用于延長治療性蛋白質和多肽以及其他治療性實體或部分的半衰期。

【0244】 此外，WO 2012/175400描述了Alb-1的另外的改善形式，稱為Alb-23。

【0245】 在一個實施例中，所述多肽包含選自Alb-1、Alb-3、Alb-4、Alb-5、Alb-6、Alb-7、Alb-8、Alb-9、Alb-10和Alb-23的血清白蛋白結合部分。在一個實施例中，所述血清白蛋白結合部分是Alb-8或Alb-23或其變異體，如WO 2012/175400的第7-9頁中所示，並且白蛋白結合劑描述在WO 2012/175741、WO 2015/173325、WO 2017/080850、WO 2017/085172、WO 2018/104444、WO 2018/134235、WO 2018/134234中。表A-4中也顯示了一些血清白蛋白結合劑。在一個實施例中，本發明技術的多肽的另外的組分是如項目E中所述的：

【0246】 E． 如下ISVD，其與人血清白蛋白結合並且包含

i. CDR1，所述CDR1為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 10具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，所述CDR2為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 15具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，所述CDR3為SEQ ID NO: 20的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 20具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0247】 在一個實施例中，所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列，所述CDR2為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列，所

述CDR3為SEQ ID NO: 20的胺基酸序列。

【0248】 這種與人血清白蛋白結合的ISVD的例子具有表A-2中針對構建體ALB23002所示的一個或多個或所有架構區(以及如在前述項目E中定義的CDR)。在一個實施例中,它是包含構建體ALB23002的完整胺基酸序列(SEQ ID NO: 5;參見表A-1和表A-2)或由其組成的ISVD。

【0249】 也可以使用Kabat定義將項目E描述為:

【0250】 E'. 如下ISVD,其與人血清白蛋白結合並且包含

i. CDR1,所述CDR1為SEQ ID NO: 40的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 40具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列;

ii. CDR2,所述CDR2為SEQ ID NO: 45的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 45具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列;和

iii. CDR3,所述CDR3為SEQ ID NO: 20的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 20具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0251】 在一個實施例中,所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1為SEQ ID NO: 40的胺基酸序列,所述CDR2為SEQ ID NO: 45的胺基酸序列,所述CDR3為SEQ ID NO: 20的胺基酸序列。

【0252】 這種與人血清白蛋白結合的ISVD的例子具有表A-2-1中針對構建體ALB23002所示的一個或多個或所有架構區(以及如在前述項目E'中定義的CDR)。在一個實施例中,它是包含構建體ALB23002的完整胺基酸序列(SEQ ID NO: 5;參見表A-1和表A-2-1)或由其組成的ISVD。

【0253】 在另外的實施例中,與人血清白蛋白結合的ISVD的胺基酸序列可以與SEQ ID NO: 5具有超過90%(如超過95%或超過99%)的序列同一性,其中所述CDR是如前述項目E或E'所定義的。在一個實施例中,與人血清白蛋白結合的ISVD具有SEQ ID NO: 5的胺基酸序列。

【0254】 當這種與人血清白蛋白結合的ISVD在至少一個CDR中具有相對於相應的參考CDR序列的2或1個胺基酸差異(上述項目E)時,與SEQ ID NO: 5中所

示的構建體ALB23002相比，所述ISVD對人血清白蛋白具有至少一半的結合親和力或至少相同的結合親和力，其中所述結合親和力是使用相同的方法（如SPR）測量的。

【0255】 在一個實施例中，當這種與人血清白蛋白結合的ISVD具有C-端位置時，其展現出C-端丙胺酸（A）或甘胺酸（G）延伸。在一個實施例中，這種ISVD選自SEQ ID NO: 59、60、62、64、65、66、67、68、69和71（參見下表A-4）。在一個實施例中，與人血清白蛋白結合的ISVD具有不同於所述C-端位置的另一個位置（即，不是本發明技術的多肽的C-端ISVD）。在一個實施例中，這種ISVD選自SEQ ID NO: 5、57、58、61和63（參見下表A-4）。

【0256】 **5.5　核酸分子**

【0257】 還提供了編碼本發明技術的多肽的核酸分子。

【0258】 “核酸分子”（與“核酸”可互換使用）是經由磷酸骨架彼此連接以形成核苷酸序列的核苷酸單體鏈。核酸可以用於轉化/轉染宿主細胞或宿主生物，例如以表現和/或產生多肽。用於產生目的的合適宿主或宿主細胞對熟習此項技術者將是清楚的，並且可以是例如任何合適的真菌、原核或真核細胞或細胞系或任何合適的真菌、原核或真核生物。包含編碼本發明技術的多肽的核酸的宿主或宿主細胞也被本發明技術涵蓋。

【0259】 核酸可以是例如DNA、RNA或其雜合體，並且還可以包含經（例如化學）修飾的核苷酸，像PNA。它可以是單鏈或雙鏈。在一個實施例中，它是雙鏈DNA的形式。例如，本發明技術的核苷酸序列可以是基因組DNA、cDNA。

【0260】 本發明技術的核酸可以以本身已知的方式製備或獲得，和/或可以從合適的天然來源分離。編碼天然存在的（多）肽的核苷酸序列可以例如經受定點誘變，以提供編碼具有序列變異的多肽的核酸分子。另外，對於熟習此項技術者而言清楚的是，為了製備核酸，還可以將若干種核苷酸序列（如編碼靶向部分的至少一種核苷酸序列）和例如編碼一種或多種連接子的核酸以合適的方式連接在一起。

【0261】生成核酸的技術對於熟習此項技術者將是清楚的，並且可以例如包括但不限於自動化DNA合成；定點誘變；將兩個或更多個天然存在的和/或合成序列（或其兩個或更多個部分）組合，引入可導致截短的表現產物的表現的突變；引入一個或多個限制位點（例如，以使用合適的限制酶產生容易被消化和/或連接的盒和/或區域），和/或使用一種或多種“錯配”引物通過PCR反應引入突變。

【0262】**5.6　載體**

【0263】還提供了包含編碼本發明技術的多肽的核酸分子的載體。如本文所用的載體是適合於將遺傳物質攜帶至細胞中的媒劑。載體包括裸露的核酸（如質粒或mRNA）或嵌入更大結構（如脂質體或病毒載體）中的核酸。

【0264】載體通常包含視情況與一種或多種調節元件（例如像一種或多種合適的啟動子、增強子、終止子等）連接的至少一種核酸。在一個實施例中，所述載體是表現載體，即適合於在合適條件下（例如當所述載體被引入（例如人）細胞中時）表現編碼的多肽或構建體的載體。對於基於DNA的載體，這通常包括用於轉錄（例如啟動子和聚A信號）和翻譯（例如Kozak序列）的元件的存在。

【0265】在一個實施例中，在所述載體中，所述至少一種核酸和所述調節元件彼此“可操作地連接”，這通常意指它們彼此處於功能關係。例如，如果啟動子能夠啟動或以其他方式控制/調節編碼序列的轉錄和/或表現，則所述啟動子被認為與編碼序列“可操作地連接”（其中所述編碼序列應理解為在所述啟動子的“控制下”）。通常，當兩個核苷酸序列可操作地連接時，它們將在相同的方向上並且通常也在相同的閱讀框中。它們通常基本上也是連續的，儘管這也可能不是必需的。

【0266】在一個實施例中，所述載體的任何調節元件使得它們能夠在預期的宿主細胞或宿主生物中提供其預期的生物學功能。

【0267】例如，啟動子、增強子或終止子在預期的宿主細胞或宿主生物中應是“可操作的”，這意味著例如所述啟動子應能夠啟動或以其他方式控制/調節與其可操作地連接的核苷酸序列（例如編碼序列）的轉錄和/或表現。

【0268】 **5.7　組合物**

【0269】 本發明技術還提供了一種組合物，其包含至少一種本發明技術的多肽、編碼本發明技術的多肽的至少一種核酸分子或含有這種核酸分子的至少一種載體。所述組合物可以是醫藥組合物。所述組合物還可以包含至少一種醫藥上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑和/或佐劑，並且視情況包含一種或多種另外的藥學活性多肽和/或化合物。

【0270】 **5.8　宿主生物**

【0271】 本發明技術還涉及宿主細胞或宿主生物，所述宿主細胞或宿主生物包含本發明技術的多肽、編碼本發明技術的多肽的核酸和/或含有編碼本發明技術的多肽的核酸分子的載體。

【0272】 合適的宿主細胞或宿主生物對熟習此項技術者將是清楚的，並且是例如任何合適的真菌、原核或真核細胞或細胞系或任何合適的真菌、原核或真核生物。具體例子包括HEK293細胞、CHO細胞、大腸桿菌（*Escherichia coli*）或巴斯德畢赤酵母（*Pichia pastoris*）。在一個實施例中，所述宿主是巴斯德畢赤酵母。

【0273】 **5.9　多肽的方法和用途**

【0274】 本發明技術還提供了用於產生本發明技術的多肽的方法。所述方法可以包括用編碼所述多肽的核酸轉化/轉染宿主細胞或宿主生物、在所述宿主中表現所述多肽、視情況接著進行一個或多個分離和/或純化步驟。具體地，所述方法可以包括：

a) 在合適的宿主細胞或宿主生物中或在另一種合適的表現系統中表現編碼所述多肽的核酸序列；視情況接著是：

b) 分離和/或純化所述多肽。

【0275】 用於產生目的的合適的宿主細胞或宿主生物對熟習此項技術者將是清楚的，並且可以是例如任何合適的真菌、原核或真核細胞或細胞系或任何合適的真菌、原核或真核生物。具體例子包括HEK293細胞、CHO細胞、大腸桿菌

（*Escherichia coli*）或巴斯德畢赤酵母（*Pichia pastoris*）。在一個實施例中，所述宿主是巴斯德畢赤酵母。

【0276】 本發明技術的多肽、如本文所述的核酸分子或載體或包含本發明技術的多肽、核酸分子或載體的組合物可用作藥物。

【0277】 因此，本發明技術提供了用作藥物的本發明技術的多肽、如本文所述的核酸分子或載體或包含本發明技術的多肽、核酸分子或載體的組合物。

【0278】 還提供了用於（預防性或治療性）治療發炎性疾病的本發明技術的多肽、如本文所述的核酸分子或載體或包含本發明技術的多肽、核酸分子或載體的組合物。

【0279】 還提供了治療發炎性疾病的（預防性和/或治療性）方法，其中所述方法包括向有需要的個體投予醫藥活性量的本發明技術的多肽、如本文所述的核酸分子或載體或包含本發明技術的多肽、核酸分子或載體的組合物。

【0280】 還提供了本發明技術的多肽、如本文所述的核酸分子或載體或包含本發明技術的多肽、核酸分子或載體的組合物在製備醫藥組合物中的用途。在一個實施例中，所製備的醫藥組合物用於治療發炎性疾病。

【0281】 所述發炎性疾病是第2型發炎性疾病，如異位性皮膚炎和氣喘。

【0282】 在本發明技術的情境中提及的“個體”可以是任何動物，並且更具體地是哺乳動物。在哺乳動物中，可以將人和非人哺乳動物區分開。非人動物可以是例如伴侶動物（例如狗、貓）、家畜（例如牛、馬、綿羊、山羊或豬動物）或通常用於研究目的和/或用於產生抗體的動物（例如小鼠、大鼠、兔、貓、狗、山羊、綿羊、馬、豬、非人靈長類動物（如食蟹猴）或駱駝科動物（如美洲駝或羊駝））。

【0283】 在預防性和/或治療性目的的情境下，所述個體可以是任何動物，並且更具體地是任何哺乳動物。在一個實施例中，所述個體是人個體。

【0284】 可以將物質（包括多肽、核酸分子和載體）或組合物通過任何合適的投予途徑投予個體，所述合適的投予途徑例如通過腸內（如口服或直腸）或腸

胃外（如表皮、舌下、頰、鼻、關節內、皮內、肌內、腹膜內、靜脈內、皮下、經皮、或經粘膜）投予。在一個實施例中，將物質通過腸胃外投予（如肌內、皮下或皮內投予）來投予。在一個實施例中，使用皮下投予。

【0285】 可將有效量的多肽、如本文所述的核酸分子或載體或包含所述多肽、核酸分子或載體的組合物投予個體，以提供預期的治療結果。

【0286】 可以投予一個或多個劑量。如果投予多於一個劑量，則可以以合適的間隔投予劑量，以使所述多肽、組合物、核酸分子或載體的作用最大化。

【0287】 表A-1：在五價多肽F027400161中鑒定的不同單價V_{HH}構建塊的胺基酸序列（“ID”是指如本文所用的SEQ ID NO）

名稱	ID	胺基酸序列
4B02	2	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTYT ANSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTLVT VSS
4B06	3	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTDY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTL VTVSS
501A02	4	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSGFGVNILYWYRQAAGIERELIASITSGGITNYVDSV KGRFTISRDNSENTMYLQMNSLRAEDTGLYYCASRNIFDGTTEWGQGTLVTVSS
ALB23002	5	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
529F10	6	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFADYDYDIGWFRQAPGKEREGVSCISNRDGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAVEIHCDDYGVENFDFDPWGQGTL VTVSS

【0288】 表A-2：根據AbM定義的CDR和架構的序列（“ID”是指給出的SEQ ID NO）

ID	V_{HH}	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
2	4B02	22	DVQLVESGG GVVQPGGSL RLSCAAS	7	GRTFSS YRMG	24	WFRQAPG KEREFVA	12	ALSGD GYSTY	29	TANSVKGRFTISRDNS KNTVYLQMNSLRPED TALYYCAA	17	KLQYVSGW SYDYPY	34	WGQGT LVTVSS
3	4B06	23	EVQLVESGG GVVQPGGSL RLSCAAS	8	GFTFNN YAMK	25	WVRQAPG KGLEWVS	13	SITTGG GSTD	30	YADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRPED TALYYCAN	18	VPFGYYSEH FSGLSFDY	35	RGQGT LVTVSS
4	501A02	23	EVQLVESGG GVVQPGGSL RLSCAAS	9	GSGFGV NILY	26	WYRQAAG IERELIA	14	SITSGG ITN	31	YVDSVKGRFTISRDNS ENTMYLQMNSLRAED TGLYYCAS	19	RNIFDGTTE	34	WGQGT LVTVSS
5	ALB23002	23	EVQLVESGG GVVQPGGSL RLSCAAS	10	GFTFRS FGMS	27	WVRQAPG KGPEWVS	15	SISGSG SDTL	32	YADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRPED TALYYCTI	20	GGSLSR	36	SSQGTL VTVSS
6	529F10	23	EVQLVESGG GVVQPGGSL RLSCAAS	11	GFTFAD YDYDIG	28	WFRQAPG KEREGVS	16	CISNR DGSTY	33	YADSVKGRFTISRDNS KNTVYLQMNSLRPED TALYYCAV	21	EIHCDDYGV ENFDFDP	34	WGQGT LVTVSS

【0289】 表A-2.1：根據Kabat定義的CDR和架構的序列（“ID”是指給出的SEQ ID NO）

ID	V_{HH}	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
2	4B02	47	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFS	37	SYRMG	24	WFRQAPGKEREFVA	42	ALSGDGYSTYTANSVKG	52	RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAA	17	KLQYVSGWSYDYPY	34	WGQGTLVTVSS
3	4B06	48	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFN	38	NYAMK	25	WVRQAPGKGLEWVS	43	SITTGGGSTDYADSVKG	53	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAN	18	VPFGYYSEHFSGLSFDY	35	RGQGTLVTVSS
4	501A02	49	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSGFG	39	VNILY	26	WYRQAAGIERELIA	44	SITSGGITNYVDSVKG	54	RFTISRDNSENTMYLQMNSLRAEDTGLYYCAS	19	RNIFDGTTE	34	WGQGTLVTVSS
5	ALB23002	50	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFR	40	SFGMS	27	WVRQAPGKGPEWVS	45	SISGSGSDTLYADSVKG	55	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI	20	GGSLSR	36	SSQGTLVTVSS
6	529F10	51	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFA	41	DYDYDIG	28	WFRQAPGKEREGVS	46	CISNRDGSTYYADSVKG	56	RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAV	21	EIHCDDYGVENFDFDP	34	WGQGTLVTVSS

【0290】 表A-3：選擇的多價多肽的胺基酸序列（“ID”是指給出的SEQ ID NO）

名稱	ID	胺基酸序列
F027400161	1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWV SSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQG TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSGFGVNILYWYRQAAGIERELIASITSGGI TNYVDSVKGRFTISRDNSENTMYLQMNSLRAEDTGLYYCASRNIFDGTTEWGQGTLVTVSSGGGGSGGGS EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSL RLSCAASGFTFADYDYDIGWFRQAPGKEREGVSCISNRDGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLR PEDTALYYCAVEIHCDDYGVENFDFDPWGQGTLVTVSSA

【0291】表A-4：結合血清白蛋白的ISVD序列（“ID”是指如本文所用的SEQ ID NO）

名稱	ID	胺基酸序列
Alb8	57	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb23	58	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb129	59	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb132	60	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAP GKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb11	61	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb11 (S110K)-A	62	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSSA
Alb82	63	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb82-A	64	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb82-AA	65	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSAA
Alb82-AAA	66	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSAAA
Alb82-G	67	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSG
Alb82-GG	68	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGG
Alb82-GGG	69	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG
Alb23002	5	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAP GKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS

Alb223	71	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAP GKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

【0292】 表A-5：連接子序列（“ID”是指如本文所用的SEQ ID NO）

名稱	ID	胺基酸序列
3A連接子	72	AAA
5GS連接子	73	GGGGS
7GS連接子	74	SGGSGGS
8GS連接子	75	GGGGSGGS
9GS連接子	76	GGGGSGGGS
10GS連接子	77	GGGGSGGGGS
15GS連接子	78	GGGGSGGGGSGGGGS
18GS連接子	79	GGGGSGGGGSGGGGSGGS
20GS連接子	80	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
25GS連接子	81	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30GS連接子	82	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
35GS連接子	83	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
40GS連接子	84	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG S
G1鉸鏈	85	EPKSCDKTHTCPPCP
9GS-G1鉸鏈	86	GGGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
美洲駝上部長鉸鏈區	87	EPKTPKPQPAAA
G3鉸鏈	88	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCPEPKSCDTPPPCPRCP

【0293】 表A-6：選擇的單特異性多價多肽的胺基酸序列（“ID”是指給出的SEQ ID NO）

名稱	ID	胺基酸序列
F010700003 [F0107004B06-35 GS-F0107004B02][1]	148	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQ APGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNRKNTL YLQMNSLKPEDTAVYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYRMG WFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVNSRFTISRDNA KNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAKLQYVSGWSYDYPYW GQGTLVTVSS
F010700014 [F0107004B02-35 GS-F0107004B02][1]	149	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQ APGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVNSRFTISRDNAKNTV YLQMNSLKPEDTAIYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWF RQAPGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVNSRFTISRDNAKN TVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQ GTLVTVSS

名稱	ID	胺基酸序列
F010700029 [F0107004B02-35GS-F0107004B06][1]	150	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVNSRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNRKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTLVTVSS
F010700031 [F0107004B06-35GS-F0107004B06][1]	151	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNRKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNRKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTLVTVSS
F010703842 [F0107529F10-35GS-F0107501A02][1]	152	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFADYDYDIGWFRQAPGKEREGVSCISNRDGSTYYTDSVKGRFTISSDNAKNTVSLQMNSLKPEDTAVYYCAVEIHCDDYGVENFDFDPWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSGFGVNILYWYRQAAGIERELIASITSGGITNYVDSVKGRFTISRDNAENTMYLQMNSLKAEDTGVYYCASRNIFDGTTEWGQGTLVTVSS
F027400016 [F0107501A02 (E1D,L11V,A14P,E16G,A41P,I43K,E44Q,A74S,E75K,M78L,K83R,A84P,G88A,V89L)*-35GS-529F10)][1]	153	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSGFGVNILYWYRQAPGKQRELIASITSGGITNYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCASRNIFDGTTEWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFADYDYDIGWFRQAPGKEREGVSCISNRDGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAVEIHCDDYGVENFDFDPWGQGTLVTVSS
F010700003-SO [4B06-35GS-4B02(D1E)*][1]	154	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTLVTVSS
F010700014 -SO [4B02-35GS-4B02(D1E)*][1]	155	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTLVTVSS

名稱	ID	胺基酸序列
F010700029-SO [4B02-35GS-4B06][1]	156	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTLVTVSS
F010700031-SO [4B06-35GS-4B06][1]	157	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTLVTVSS
F010703842-SO [529F10-35GS-501A02][1]	158	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFADYDYDIGWFRQAPGKEREGVSCISNRDGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAVEIHCDDYGVENFDFDPWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSGFGVNILYWYRQAAGIERELIASITSGGITNYVDSVKGRFTISRDNSENTMYLQMNSLRAEDTGLYYCASRNIFDGTTEWGQGTLVTVSS
F027400016-SO [501A02-35GS-529F10][1]	159	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSGFGVNILYWYRQAAGIERELIASITSGGITNYVDSVKGRFTISRDNSENTMYLQMNSLRAEDTGLYYCASRNIFDGTTEWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFADYDYDIGWFRQAPGKEREGVSCISNRDGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAVEIHCDDYGVENFDFDPWGQGTLVTVSSS

[1] []表示用於二價構建體的單價構建塊及其連接。

*() 表示引入（親本）單價構建塊中的胺基酸取代（例如：4B02（D1E）意指單價構建塊4B02（SEQ ID NO: 2）含有D1E取代）。

【0294】 **6 實例**

【0295】 **6.1 分別與IL-13和TSLP特異性地結合的單價ISVD的生成**

【0296】 **6.1.1 實例1：免疫**

【0297】 根據標準方案用重組人IL-13（Peprotech，目錄號200-13，大腸桿菌來源的）免疫三隻美洲駝，目的是誘導重鏈抗體依賴性體液免疫應答。另外，將

這些美洲駝用來自另一種來源的人/食蟹猴IL-13（Sino Biological，目錄號10369-HNAC和11057-CNAH，哺乳動物細胞來源的）加強免疫。

【0298】將另外三隻美洲駝用重組hTSLP-Fc進行免疫。另外，將這些美洲駝用食蟹猴TSLP-Fc加強免疫。將另外兩隻美洲駝用hTSLP和食蟹猴TSLP-Fc交替免疫。

【0299】以規律間隔採集免疫血液(PBL)樣品，並從分離的B細胞製備總RNA。通過比較在開始免疫之前收集的樣品與通常在多次抗原投予後收集的血清樣品的抗原特異性血清滴度，監測免疫過程中的體液免疫應答。簡而言之，將96孔Maxisorp板塗覆人IL-13（Sino Biological，目錄號10369-HNAC）或人TSLP。重組人TSLP是可商購的，如可商購自R&D Systems（目錄號1398-TS）。封閉並添加稀釋的血清樣品後，通過使用HRP（辣根過氧化物酶）綴合的山羊抗美洲駝免疫球蛋白（Bethyl Laboratories Inc.）和隨後在存在底物TMB（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺）的情況下的酶促反應證明了抗IL-13和抗TSLP ISVD的存在。

【0300】**6.1.2 實例2：文庫構建和噬菌體展示選擇**

【0301】根據製造商的說明書使用Ficoll-Hypaque從血液樣品製備外周血單核細胞。從這些細胞和淋巴結提取的總RNA用作RT-PCR的起始材料以擴增編碼ISVD的基因片段。將這些片段克隆至噬菌粒載體pAX212中。根據標準方案（Antibody Phage Display: Methods and Protocols（第一版, 2002, O'Brian和Aitken編輯, Humana Press, 托托瓦, 新澤西州））製備噬菌體，並在4℃下過濾滅菌後儲存直至進一步使用。構建了針對IL13的五個噬菌體文庫，其中文庫大小在$6.1x10^8$與$1.3x10^9$之間並且插入片段的百分比在87%至96%的範圍內。構建了針對TSLP的五個噬菌體文庫，其中文庫大小在$4.2x10^8$與$9.8x10^8$之間並且插入片段的百分比在91%至100%的範圍內。

【0302】為了鑒定識別人和食蟹猴IL-13的ISVD，將噬菌體文庫與50 nM可溶性生物素化hIL13-Fc在存在來自人血清的IgG（Sigma，I4506）的情況下培養。在鏈黴親和素塗覆的磁珠上從溶液捕獲hIL-13-Fc和噬菌體的複合物。用PBS/0.05%

吐溫20大量洗滌後，通過添加胰蛋白酶（1 mg/ml）洗脫結合的噬菌體。將這些第1輪選擇的輸出與0.05 nM、0.5 nM或5 nM可溶性生物素化hIL-13-Fc或食蟹猴IL-13-Fc一起培養。在第3輪中，將來自第2輪選擇的未富集的輸出與0.005 nM、0.05 nM、0.5 nM或5 nM可溶性生物素化人或食蟹猴IL-13-Fc進一步培養。從富集的第2輪和第3輪選擇中挑選單獨克隆。

【0303】 為了鑒定識別人和食蟹猴TSLP的ISVD，將噬菌體文庫與50 nM可溶性生物素化hTSLP-Fc在存在來自人血清的IgG（Sigma，I4506）的情況下、或與500 nM生物素化hTSLP、或與500 nM生物素化食蟹猴TSLP培養。人和食蟹猴TSLP序列是已知的（分別為Uniprot登錄號Uniprot登錄號Q969D9和NCBI RefSeq XP_005557555.1）。使用重組蛋白進行所述測定。在鏈黴親和素塗覆的磁珠上從溶液捕獲TSLP和噬菌體的複合物。用PBS/0.05%吐溫20大量洗滌後，通過添加胰蛋白酶（1 mg/ml）洗脫結合的噬菌體。將這些第1輪選擇的輸出與5 nM可溶性生物素化hILTSLP-Fc或食蟹猴TLSP-Fc或0.5 nM生物素化hTSLP一起培養。將來自第2輪選擇的輸出與0.05 nM、0.5 nM或5 nM可溶性生物素化人TSLP、TSLP-Fc或食蟹猴TSLP-Fc培養。從每一輪中，從富集的輸出挑選單獨克隆。

【0304】 使所有單獨克隆都在96深孔板（1 ml體積）中生長。通過添加IPTG至終濃度1 mM來誘導ISVD表現。通過冷凍細胞沉澱物並將其溶解在100 µl PBS中來製備周質提取物。通過離心去除細胞碎片。

【0305】 作為對照，在ELISA中針對分別與人和食蟹猴IL13-Fc、TSLP-Fc的結合來篩選選擇的周質提取物。評估是在Spectraplate 384-HB（PerkinElmer）中以25 µl的形式進行的。將抗原在4ºC下以在PBS中1 µg/ml塗覆過夜。用酪蛋白溶液（1%）封閉孔。添加周質提取物的5倍稀釋物後，使用小鼠抗Flag-HRP（Sigma）和隨後在存在底物esTMB（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺）的情況下的酶促反應來檢測ISVD結合。

【0306】 6.1.3 實例3：使用人IL13和人TSLP通過AlphaScreen測定篩選周質提取物中的阻斷性ISVD

【0307】 為了測定ISVD的阻斷能力，使用AlphaScreen技術（PerkinElmer，沃爾瑟姆，美國麻塞諸塞州）在不同的基於蛋白質的競爭測定中篩選粗周質提取物。使用EnVision Multilabel讀板儀（PerkinElmer）採用激發波長680 nm和發射波長520 nm來測量螢光。

【0308】 在hIL-13 : hIL-13Rα1二元複合物AlphaScreen中，研究了ISVD是否可以阻斷hIL-13與hIL-13Rα1細胞外結構域之間的相互作用。為此，將周質提取物的稀釋物與生物素化hIL-13（Peprotech目錄號200-13）一起預培養。向此混合物中，添加hIL-13Rα1-hFc（R&D systems；目錄號146-IR）和抗hFc偶聯的受體珠，並在室溫下進一步培養1小時，接著添加鏈黴親和素偶聯的供體珠並另外培養1小時。當形成二元複合物時，受體珠和供體珠接近，並且在鐳射激發時生成可檢測的信號。AlphaScreen信號的減小表明生物素化hIL-13與hIL-13Rα1的結合被周質提取物中存在的ISVD阻斷。在類似的設置中，研究了ISVD是否可以阻斷hTSLP（eBioscience，目錄號10-8499）與hTSLPR細胞外結構域（R&D systems目錄號981-TR）之間的相互作用。

【0309】 在hIL-13 : hIL-13Rα1 : hIL4Rα三元複合物AlphaScreen中，篩選了ISVD是否可以阻斷hIL4Rα向hIL13 : hIL13Rα1二元複合物的募集。hIL-13與hIL-13Rα1結合並且該二元複合物募集hIL4Rα，導致形成三元複合物hIL-13 : hIL-13Rα1 : hIL4Rα。將周質提取物的稀釋物與hIL-13（peprotech目錄號200-13）和生物素化huIL4Rα（R＆D Systems；目錄號230-4R/CF）一起預培養。向此混合物中，添加hIL-13Rα1-hFc（R&D systems；目錄號146-IR）和抗hFc偶聯的受體珠，並在室溫下進一步培養1小時，接著添加鏈黴親和素偶聯的供體珠並另外培養1小時。當形成三元複合物時，受體珠和供體珠接近，並且在鐳射激發時生成可檢測的信號。AlphaScreen信號的減小表明三元複合物的形成被周質提取物中存在的ISVD阻斷。類似地，研究了ISVD是否可以阻斷hTSLP : hTSLPR : hIL7Rα複合物（hIL7Rα來源 = Sino Biological目錄號1095-H08H）的形成。

【0310】 基於Alphascreen分析（表3和表4），選擇了許多阻斷性ISVD並進行測

序（表1和表2）。

【0311】 **表1：功能性抗IL-13 ISVD的胺基酸序列。**

ISVD ID	序列
F0107004B02 (SEQ ID NO：144)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAP GKEREFVAALSGDGYSTYTANSVNSRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAIYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTLVTVS S
F0107004B06 (SEQ ID NO：145)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQA PGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNRKNTLYLQ MNSLKPEDTAVYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTLVT VSS

【0312】 **表2：功能性抗TSLP ISVD的胺基酸序列。**

ISVD ID	序列
F0107501A02 (SEQ ID NO：146)	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSGFGVNILYWYRQAA GIERELIASITSGGITNYVDSVKGRFTISRDNAENTMYLQMNS LKAEDTGVYYCASRNIFDGTTEWGQGTLVTVSS
F0107529F10 (SEQ ID NO：147)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFADYDYDIGWFRQ APGKEREGVSCISNRDGSTYYTDSVKGRFTISSDNAKNTVSL QMNSLKPEDTAVYYCAVEIHCDDYGVENFDFDPWGQGTLV TVSS

【0313】 **6.1.4 實例4：關於IL13和TSLP的對周質提取物的表面等離子體共振分析**

【0314】 使用Proteon XPR36儀器（Bio-Rad Laboratories, Inc.）通過表面等離子體共振（SPR）測量含有抗IL13或抗TSLP ISVD的周質提取物的解離速率。補充有0.005%吐溫20的磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）（pH 7.4）用作運行緩衝液，並在25℃下進行實驗。

【0315】 通過胺偶聯使用EDC和NHS以30 μl/min的流速將hIL13-Fc、食蟹猴IL13-Fc、hTSLP-Fc和食蟹猴TSLP-Fc固定在ProteOn GLC感測器晶片上以進行啟動。將IL13蛋白以10 μg/ml注射到pH 5.0的ProteOn乙酸鹽緩衝液中。將TSLP蛋白以5 μg/mL注射到pH 5.5的ProteOn乙酸鹽緩衝液中。固定後，用乙醇胺使表面失活。

【0316】 將ISVD候選物的周質提取物在PBS-吐溫20（0.1%）中稀釋10倍，並以45 μl/min注射2分鐘，並使之解離900秒。在不同樣品之間，在IL13的情況下通過以45 μl/min注射磷酸（0.425%）2分鐘或在TSLP的情況下通過以45 μL/min注射

pH 3.0的甘胺酸（5 mM）/SDS（0.25%）1分鐘使表面再生。從針對不同周質提取物獲得的傳感圖計算解離速率。

【0317】 表3中顯示了hIL-13-Fc和食蟹猴IL-13-Fc的解離速率分析。

【0318】 **表3：抗IL-13 ISVD F0107004B02和F0107004B06的篩選結果總結。**

ISVD ID	IL-13-IL-13Rα1 AlphaScreen(抑制%)	IL13-IL-13Rα1-IL4Rα AlphaScreen(抑制%)	k_{off} hIL-13-Fc (1/s)	k_{off} 食蟹猴 IL-13-Fc (1/s)
F0107004B02	37	61	1.7E-03	1.1E-03
F0107004B06	21	66	6.3E-03	8.9E-03

【0319】 表4中顯示了hTSLP-Fc和食蟹猴TSLP-Fc的解離速率分析。

【0320】 **表4：抗TSLP ISVD F0107501A02和F0107529F10的篩選結果總結。**

ISVD ID	TSLP-TSLPR AlphaScreen(抑制%)	TSLP-TSLPR-IL7Rα AlphaScreen(抑制%)	k_{off} hTSLP-Fc (1/s)	k_{off} 食蟹猴 TSLP-Fc (1/s)
F0107501A02	92	97	3.6E-05	6.6E-04
F0107529F10	99	99	<5E-05	1.8E-03

【0321】 **6.1.5 實例5：抗IL-13和抗TSLP ISVD的表現和純化**

【0322】 抗IL-13 ISVD和抗TSLP ISVD是基於其在AlphaScreen測定中的阻斷能力和解離速率值而被選擇用於表現和純化。序列示於表1和表2中。

【0323】 ISVD在大腸桿菌TG1細胞中被表現為c-myc、His6標記的蛋白。通過添加1 mM IPTG誘導表現，並使其在37ºC下持續3 h。旋轉細胞培養物後，通過凍融沉澱物並重懸於dPBS中來製備周質提取物。這些提取物用作使用Nickel Sepharose TM 6 FF柱（Atoll）進行固定化金屬親和色譜（IMAC）的起始材料。用250 mM咪唑從柱洗脫ISVD，並隨後針對dPBS進行脫鹽。對於以下所述的基於細胞的測定，在存在50 mM辛基β-D-吡喃葡萄糖苷（OGP，Sigma）的情況下，通過凝膠過濾去除內毒素。使用標準LAL測定來測定內毒素水準。

【0324】 **6.1.6 實例6：在AlphaScreen測定中純化的抗IL13和抗TSLP ISVD的阻斷能力**

【0325】 如實例3中所述，使用二元和三元複合物AlphaScreen測定來測定如實例5中所述純化的抗IL-13和抗TSLP ISVD的IC50值。代替周質提取物的稀釋物，

將每種純化的ISVD的稀釋系列（從500 nM開始低至1.8 pM）與IL-13或TSLP一起預培養。

【0326】 測試的抗IL-13 ISVD抑制三元複合物的形成，並以如表5所示的IC50值部分阻斷二元複合物。

【0327】 表5：如在二元和三元複合物AlphaScreen測定中測定的阻斷性抗IL13 ISVD的IC50值。

	IL-13-IL-13Rα1 AlphaScreen		IL-13-IL-13Rα1-IL4Rα AlphaScreen	
ISVD ID	**IC50 (M)**	**抑制%**	**IC50 (M)**	**抑制%**
F0107004B02	4.0E-09	82	1.7E-09	100
F0107004B06	6.1E-08	55	6.7E-09	100

【0328】 測試的抗TSLP ISVD完全抑制三元複合物的形成並且還抑制二元複合物的形成，其中IC50值如表6中所示。

【0329】 表6：在二元和三元複合物AlphaScreen測定中測定的阻斷性抗TSLP ISVD的IC50值。

	TSLP-TSLPR AlphaScreen		TSLP-TSLPR-IL7Rα AlphaScreen	
ISVD ID	**IC50 (M)**	**抑制%**	**IC50 (M)**	**抑制%**
F0107501A02	3.00E-10	97	3.50E-10	100
F0107529F10	1.30E-11	100	1.80E-10	100

【0330】 6.1.7 實例7：在基於細胞的測定中純化的抗IL-13和抗TSLP ISVD的阻斷能力

【0331】 在監測IL-13介導的TF-1細胞增殖的基於細胞的測定中測定抗IL-13 ISVD的抑制效力。為此，將TF-1細胞在添加了1/5 HEPES、1/500丙酮酸鈉、1/500 Glutamax和2 ng/mL重組人GM-CSF的RPMI 1640培養基中培養。將TF-1細胞以每孔40.000個細胞接種在不含GM-CSF的生長培養基中。添加純化的抗IL-13 ISVD或參考化合物的稀釋系列。在37ºC下培養15 min後，添加200 pM的IL-13（Peprotech目錄號200-13）。96小時後，在EnVision Multilabel讀取器（Perkin Elmer）上用Cell Titer 96 Aqueous One Solution（Promega #G3580）測定TF-1細胞的增殖。

【0332】 表7中所示的ISVD抑制IL-13誘導的TF1增殖。

【0333】 表7：在IL-13誘導的TF-1增殖測定中抗IL-13單價ISVD的IC50值概述。

化合物	IC50 (M)
F0107004B02	2.7E-08
F0107004B06	1.0E-05
抗hIL-13參考mAb2	4.1E-10
抗hIL-13參考mAb3	9.2E-11
抗hIL-13參考mAb1	2.2E-11

【0334】 在監測TSLP介導的用編碼hTSLPR和hIL7Ra的質粒轉染的BaF3細胞的增殖的基於細胞的測定中測定抗TSLP ISVD的阻斷效力。將細胞以20.000個細胞/孔接種在經細胞培養物處理的白色96孔板中的RPMI 1640生長培養基中。添加抗TSLP ISVD的稀釋系列，接著添加50 pM hTLSP-Fc或50 pM食蟹猴TSLP-Fc以刺激細胞。人和食蟹猴TSLP序列是已知的（分別為Uniprot登錄號Uniprot登錄號Q969D9和NCBI RefSeq XP_005557555.1）。使用重組蛋白進行所述測定。

【0335】 培養72小時後，使用CellTiter-Glo®發光細胞活力測定（Promega, G7571/G7572/G7573）監測細胞密度和活力，並在EnVision Multilabel讀取器（Perkin Elmer）上讀出。結果示於表8中。

【0336】 表8：抗TSLP單價ISVD在TSLP誘導的BaF3細胞增殖測定中的效力和功效。ND = 未測定

ISVD ID	IC50 (M) hTSLP-Fc	抑制 hTSLP-Fc%	IC50 (M) 食蟹猴TSLP-Fc	抑制食蟹猴 TSLP-Fc%
F0107501A02	>1.0E-06	46	>1.0E-06	10
F0107529F10	ND	ND	ND	ND

【0337】 6.1.8 實例8：純化的抗IL-13和抗TSLP ISVD與人和食蟹猴IL-13和TSLP的結合親和力

【0338】 通過SPR進行的完全結合動力學研究是在BIAcore T100儀器（GE Healthcare）上進行的。

【0339】 對於IL-13，將約2000 RU的hIL13-Fc或4000 RU的食蟹猴IL13-Fc直接固定在CM5感測器晶片上。然後將ISVD以不同濃度（在3 μM與12 nM之間）注射120 s，並使之解離900 s。使用0.85% H_3PO_4 : MilliQ（1 : 1）注射47 s進行hIL-13-Fc

和食蟹猴IL-13-Fc表面的再生。

【0340】 對於TSLP，將約8000 RU的抗huIgG抗體（GE Healthcare）直接固定在CM5感測器晶片上。hTSLP-Fc（1 μg/mL）或食蟹猴TSLP-Fc（0.75 μg/mL）被散佈在晶片上並被捕獲120 s。然後將ISVD以不同濃度（在0.4 nM與3000 nM之間）注射120 s，並使之解離900 s。

【0341】 使用BIAcore T100評價軟體V2.0.3對結合曲線進行評價。通過擬合1 : 1相互作用模型（朗繆爾結合）（Rmax = 全域的； RI = 常數 = 0，偏移量 = 0）進行動力學分析。使用異質配體擬合模型（RI = 常數 = 0，偏移量 = 0）擬合不符合1 : 1相互作用模型的接受標準的相互作用。

【0342】 對於IL-13 ISVD的動力學資料顯示在表9中並且對於TSLP ISVD的動力學資料顯示在表10中。

【0343】 **表9：經由SPR進行的單價抗IL13 ISVD的KD測定。**

樣品	表面	存在的主要相互作用%	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	用於擬合結合曲線的模型
F0107004B02	hIL13-Fc	80	2.2E+04	2.4E-02	**1.1E-06**	異質配體擬合
	食蟹猴IL13-Fc	81	1.8E+04	3.4E-02	**1.9E-06**	異質配體擬合

【0344】 **表10：經由SPR進行的單價抗TSLP ISVD的KD測定。**

	hTSLP-Fc			食蟹猴TSLP-Fc		
ID	**k_a (1/Ms)**	**k_d (1/s)**	**K_D (M)**	**k_a (1/Ms)**	**k_d (1/s)**	**K_D (M)**
F0107501A02	1.1E+05	5.7E-05	**5.1E-10**	7.3E+04	1.8E-03	**2.5E-08**
F0107529F10	1.2E+07	4.2E-04	**3.5E-11**	8.7E+05	1.5E-03	**1.7E-09**

【0345】 **6.2 分別與IL-13和TSLP結合的單特異性多價多肽的生成**

【0346】 **6.2.1 實例10：野生型抗IL-13二價或雙互補位ISVD構建體的生成和體外表徵**

【0347】 將所選擇的抗IL-13 ISVD（F0107004B02和F0107004B06）格式化為雙互補位和二價ISVD構建體。所述構建體中的構建塊通過柔性35GS（GlySer）連接子進行遺傳連接。ISVD在巴斯德畢赤酵母中被表現為FLAG3-HIS6標記的蛋白

（胺基酸序列示於表14中）。通過逐步添加甲醇發生ISVD構建體表現的誘導。具有分泌的ISVD構建體的澄清培養基用作固定化金屬親和色譜（IMAC）的起始原料，接著脫鹽，從而產生了如通過SDS-PAGE評估的90%純度。

【0348】 在二元和三元複合物阻斷AlphaScreen測定（如實例6中所述）中以及在TF-1增殖測定（如實例7中所述）中表徵了雙互補位和二價IL-13構建體。表11中顯示了在二元和三元AlphaScreen測定中以及在TF-1增殖測定中所生成構建體及其阻斷效力的概述。雙互補位構建體展示出針對hIL-13和cyIL-13的優越效力，類似於抗hIL-13參考mAb1的效力。另外在TF1增殖測定中，二價構建體在效力方面改善，但其程度與雙互補位構建體F010700029不同。另外，二價構建體在IL13-IL13Rα1 Alphascreen中未達到完全抑制。

【0349】 表11：在Alphascreen測定中不同抗IL-13構建體的效力概述以及在TF-1增殖測定中的效力和功效概述。ND = 未測定

ISVD構建體ID	ISVD構建體描述	IL13-IL13Rα1 AlphaScreen		IL13-IL13Rα1-IL4Rα AlphaScreen		TF1增殖測定 IC50(M)	
		IC50 (M)	抑制%	IC50 (M)	抑制%	200 pM hIL13	200 pM食蟹猴IL13
F010700003	F0107004B06-35GS-F0107004B02	1.3E-10	99	3.40E-09	100	1.20E-08	ND
F010700014	F0107004B02-35GS-F0107004B02	2.7E-10	84	4.80E-09	98	9.40E-08	ND
F010700029	F0107004B02-35GS-F0107004B06	3.1E-10	99	3.00E-09	100	2.00E-11	2.50E-10
F010700031	F0107004B06-35GS-F0107004B06	未擬合	部分的	6.60E-10	99	1.00E-07	ND
抗hIL-13參考mAb1		ND	ND	ND	ND	1.50E-11	1.30E-10

【0350】 在IL-13誘導的A549嗜酸性粒細胞趨化因子（eotaxin）釋放測定中測試最有效的抗IL-13雙互補位ISVD構建體。為此，在補充了10% FCS的Ham's F12K培養基中培養A549懸浮細胞。將細胞以200.000個細胞/孔接種至96孔板中。第二

天，添加200 pM hIL-13（Sino Biological目錄號10369-HNAC）或食蟹猴IL-13（Sino Biological目錄號11057-CNAH），接著添加ISVD構建體的稀釋系列。24 h後，使用MSD ELISA（人嗜酸性粒細胞趨化因子-3組織培養套組（Meso Scale，K151ABB-1））在上清中測定嗜酸性粒細胞趨化因子-3。結果示於表12中。

【0351】 表12：F010700029在IL-13介導的Aa549嗜酸性粒細胞趨化因子釋放測定中的效力。抑制為100%。

ISVD構建體ID	**ISVD構建體描述**	**IC50 (M) hIL-13**	**IC50 (M) 食蟹猴IL-13**
F010700029	F0107004B02-35GS-F0107004B06	2.10E-10	1.50E-10
抗hIL-13參考mAb1		8.00E-11	7.00E-11

【0352】競爭ELISA用於測試抗IL-13單價和雙互補位ISVD構建體是否抑制hIL-13與IL13Rα2的結合。將IL13Rα2（SinoBiological目錄號10350-H08H）塗覆在384孔Spectraplate（Perkin Elmer）上。將hIL13-Fc（SinoBiological，目錄號10369-H01H）與ISVD構建體或陽性對照化合物IL-13Rα2的系列稀釋物混合，並培養1小時。洗滌並封閉後，將塗覆的受體與IL13-Fc ISVD/對照混合物一起培養，並培養1小時。洗滌後，使用抗人IgG-過氧化物酶抗體和隨後在存在底物esTMB的情況下的酶促反應檢測結合的IL-13-Fc的存在。在ISVD抑制IL-13-IL-13Rα2相互作用的情況下，檢測到的IL-13-Fc以劑量依賴性方式消失。結果示於表13中。

【0353】 表13：在競爭ELISA中抗IL-13單價和雙互補位ISVD構建體抑制IL-13-IL-13Rα2複合物形成的能力

化合物	**構建體描述**	**IL13-IL13Rα2複合物形成的抑制%**	**IC50 (M)**
F010704B02	-	37	4.9E-08
F010704B06	-	49	未擬合
F027100271	F0107004B02-9GS-ALB23002-9GS-F0107004B06	53	未擬合
IL-13Rα2	-	100	7.9E-09

【0354】 表14：野生型抗IL13雙互補位和二價ISVD構建體的胺基酸序列。

ISVD構建體ID	**ISVD 構 建**	序列

	體描述	
F010700003 (SEQ ID NO: 148)	F0107004B06-35GS-F0107004B02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNRKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVNSRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTLVTVSS
F010700014 (SEQ ID NO: 149)	F0107004B02-35GS-F0107004B02	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVNSRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVNSRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTLVTVSS
F010700029 (SEQ ID NO: 150)	F0107004B02-35GS-F0107004B06	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYRMGWFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTYTANSVNSRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNRKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTLVTVSS
F010700031 (SEQ ID NO: 151)	F0107004B06-35GS-F0107004B06	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNRKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTDYADSVKGRFTISRDNRKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQGTLVTVSS

【0355】 6.2.2 實例11：野生型雙互補位抗TSLP ISVD構建體的生成和表徵

【0356】 將所選擇的TSLPR阻斷劑（F0107501A02和F0107529F10）組合為雙互補位ISVD構建體。所述構建體在巴斯德畢赤酵母中被表現為FLAG3-HIS6標記的蛋白（胺基酸序列示於表16中）。通過逐步添加甲醇發生ISVD構建體表現的誘導。具有分泌的ISVD構建體的澄清培養基用作固定化金屬親和色譜（IMAC）的起始原料，接著脫鹽，從而產生了如通過SDS-PAGE評估的90%純度。

【0357】 在BaF3增殖測定（如實例7中所述）中將雙互補位構建體以純化蛋白

質的形式針對50 pM或5 pM hTSLP和50 pM或5 pM食蟹猴TSLP進行滴定，並與不同的抗TSLP參考化合物（抗hTSLP參考mAb2和抗-hTSLP參考mAb1）進行比較。將資料總結於表15中（hTSLP和食蟹猴TSLP）。雙互補位構建體明顯優於參考mAb。與在C-端具有F0107501A02的構建體相比，在N-端具有F0107501A02的雙互補位構建體顯示出對食蟹猴TSLP的改善的反應性。

【0358】 表15：在分別由人和食蟹猴TSLP介導的BaF3增殖測定中的不同雙互補位抗TSLP形式的IC50值（M）的概述。

ISVD構建體ID	ISVD構建體描述	IC50 (M) hTSP	IC50 (M) 食蟹猴TSLP	用於刺激的TSLP濃度(pM)
F010703842	F0107529F10-35GS-F0107501A02	4.8E-11	3.9E-09	50
F027400016	F0107501A02 (E1D, L11V, A14P, E16G, A41P, I43K, E44Q, A74S, E75K, M78L, K83R, A84P, G88A, V89L)*-35GS-529F10	4.6E-12	6.0E-11	5
抗hTSLP參考mAb2		1.6E-10	>1.0E-07	50
抗hTSLP參考mAb1		5.5E-10	3.8E-09	5

*() 表示引入（親本）單價構建塊中的胺基酸取代。

【0359】 **表16：雙互補位抗TSLP ISVD構建體F010703842和F027400016的胺基酸序列。**

ISVD構建體ID	ISVD構建體描述	序列
F010703842 (SEQ ID NO : 152)	F0107529F10-35GS-F0107501A02	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFADYDYDIGWFRQAPGKEREGVSCISNRDGSTYYTDSVKGRFTISSDNAKNTVSLQMNSLKPEDTAVYYCAVEIHCDDYGVENFDFDPWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSGFGVNILYWYRQAAGIERELIASITSGGITNYVDSVKGRFTISRDNAENTMYLQMNSLKAEDTGVYYCASRNIFDGTTEWGQGTLVTVSS
F027400016 (SEQ ID NO : 153)	F0107501A02 (E1D, L11V, A14P, E16G, A41P, I43K, E44Q, A74S, E75K, M78L, K83R, A84P, G88A, V89L)*-35GS-529F10	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSGFGVNILYWYRQAPGKQRELIASITSGGITNYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCASRNIFDGTTEWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFADYDYDIGWFRQAPGKEREGVSCISNRDGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAVEIHCDDYGVENFDFDPWGQGTLVTVSS

*() 表示引入（親本）單價構建塊中的胺基酸取代。

【0360】 **6.3 抗IL-13和抗TSLP單價ISVD的序列優化**

【0361】 **6.3.1 實例12：抗IL-13和抗TSLP單價ISVD的序列優化**

【0362】 將抗IL-13 ISVD F0107004B02和F0107004B06以及抗TSLP ISVD F0107501A02和F0107529F10進一步優化。

【0363】 序列優化涉及替代所述序列中的一個或多個特定胺基酸殘基，以改善ISVD的一種或多種（所需）特性。

【0364】 這種序列優化的一些例子在本文的進一步描述中提及，並且例如而不限於：

【0365】 1)親本野生型ISVD序列中的取代產生與人VH3-JH種系共有序列更相同的ISVD序列，此過程稱為人類化。為此，將FR中的在ISVD與人VH3-JH種系共有序列之間不同的特定胺基酸（所謂的標誌殘基除外）以使得蛋白質結構、

活性和穩定性保持不變的方式改變為人對應物。

【0366】 2)取代為美洲駝種系以增加ISVD的穩定性，這被定義為**駝類化**。為此，將親本野生型ISVD胺基酸序列與ISVD的美洲駝IGHV種系胺基酸序列進行比對（鑒定為來自ISVD針對美洲駝IGHV種系的BlastP分析的最高命中）。

【0367】 3)改善儲存過程中的長期穩定性或特性的取代，增加在所需宿主細胞或宿主生物中表現水準的取代，和/或同樣取決於所需的宿主細胞或宿主生物而消除或降低一種或多種（不需要的）**翻譯後修飾**（如糖基化或磷酸化）的取代。*為了避免N-端焦麩胺酸形成，通常在不影響效力或穩定性的情況下將E1D突變引入多價Nb的N-端構建塊中。因此，在構建塊的序列優化過程中，不會始終引入E1D突變。*

【0368】 4) 位置11處突變為Val和位置89處突變為Leu，以使得結合任何天然存在的**預先存在的抗體**的活性最小化。

【0369】 **F0107004B02和F0107004B06**

【0370】 抗IL-13 ISVD F0107004B02的序列優化產生了最終序列優化的變異體F027100019，與親本ISVD F107004B02相比，其包含8個胺基酸取代（即E1D、L11V、A14P、N64K、S65G、A74S、K83R、I89L）。抗IL-13 ISVD F0107004B06的序列優化產生了最終序列優化的變異體F027100183，與親本ISVD F107004B06相比，其包含4個胺基酸取代（即L11V、R74S、K83R、V89L）。

【0371】 使用PCR重疊延伸方法從寡核苷酸組裝序列優化的變異體。所述變異體在大腸桿菌中表現並通過IMAC和脫鹽純化。使用來自Peprotech的hIL-13（目錄號200-13），通過表面等離子體共振評價F027100019和F027100183的hIL-13結合能力。另外，在嗜酸性粒細胞趨化因子釋放測定中測試F027100019的中和活性。通過尺寸排阻HPLC（SE-HPLC）監測兩個變異體的單體行為。使用Lightcycler（Roche）在熱位移測定（TSA）中測試變異體的熱穩定性。在該測定中，將親本ISVD及其變異體在存在sypro橙的情況下於不同pH下培養，並施加溫度梯度。當ISVD開始變性時，sypro橙結合並且所測量的螢光突然增加，如此

可以測定針對特定pH的熔解溫度。結果總結於表17和表18中。

【0372】 **表17：抗IL-13 ISVD F0107004B02的序列優化變異體F027100019的分析結果。**nd = 未測定，*關於hIL-13-Fc所測量的

ISVD ID	一個或多個突變	IC50(nM)嗜酸性粒細胞趨化因子釋放測定	Kon hIL-13 (1/Ms)	Koff hIL-13 (1/s)	KD hIL-13 (M)	pH 7下TSA，Tm(ºC)	SE-HPLC，主峰%
F0107004B02	WT	nd	2.20E+04*	2.40E-02*	1.10E-06*	67	94
F027100019	E1D, L11V, A14P, N64K, S65G, A74S, K83R, I89L	47	3.50E+04	1.20 E-03	3.40E-08	70	100

【0373】 F027100019在嗜酸性粒細胞趨化因子釋放測定中展現出良好的效力，並且在SPR中其對hIL-13的親和力測定為34 nM。F027100019的Tm比親本ISVD F0107004B2的高3ºC。基於AbM定義（參見Kontermann和Dübel (編輯) Antibody Engineering, 第2卷, Springer Verlag Heidelberg Berlin, 2010），對於F027100019的架構區中的架構同一性%為85%，並且基於Kabat定義為86%。

【0374】 **表18：抗IL13 ISVD F0107004B06的序列優化變異體的分析結果。**Nd = 未測定

ISVD ID	一個或多個突變	Kon hIL-13 (1/Ms)	Koff hIL-13 (1/s)	KD hIL-13 (M)	pH 7下TSA，Tm(ºC)	SE-HPLC，主峰%
F0107004B06	WT	2.50E+05	3.30E-03	2.60E-08	**nd**	nd
F027100183	L11V, R74S, K83R, V89L	2.80E+05	7.50E-03	2.70E-08	61	100

【0375】 與WT序列相比，F027100183的親和力是相似的，變異體的Tm為61ºC。所述變異體在SE-HPLC上洗脫為100%單體峰。基於AbM定義，對於F027100183的架構區中的架構同一性%為94.4%，並且基於Kabat定義為93.1%。

【0376】 **F0107529F10**

【0377】 抗TSLP ISVD F0107529F10的序列優化產生了最終序列優化的變異體F027400021，與親本ISVD F0107529F10相比，其包含8個胺基酸取代（即L11V、

A14P、T60A、S71R、A74S、S79Y、K83R、V89L）。抗TSLP ISVD F0107501A02的序列優化產生了最終序列優化的變異體F027400160，與親本ISVD F0107501A02相比，其包含6個胺基酸取代（即L11V、A14P、E16G、A74S、K83R、V89L）。

【0378】使用PCR重疊延伸方法從寡核苷酸組裝序列優化的變異體。所述構建體在大腸桿菌中表現並通過IMAC和脫鹽純化。通過表面等離振子共振評價所述變異體與人和食蟹猴TSLP的結合能力。通過尺寸排阻HPLC（SE-HPLC）監測所有變異體的單體行為並在熱位移測定（TSA）中監測熱穩定性。另外，在三元複合物Alphascreen中測試F0107501A02的變異體對hTSLP的阻斷活性。結果總結於表19和表20中。

【0379】**表19：抗TSLP ISVD F0107529F10的序列優化變異體的分析結果**，nd = 未測定

ISVD ID	**突變**	**koff hTSLP (s-1)**	**koff 食蟹猴 TSLP (s-1)**	**K_D hTSLP-hFc (M)**	**K_D食蟹猴 TSLP-hFc (M)**	**pH 7下 TSA，Tm(ºC)**	**SE-HPLC，主峰%**
F0107529F10	WT	6.60E-05	1.80E-03	3.50E-11	1.70E-09	64.0	nd
F010704099	A14P, T60A, S71R, A74S, S79Y, K83R	7.70E-05	1.80E-03	3.80E-11	3.30E-09	75.4	100
F027400021	L11V, A14P, T60A, S71R, A74S, S79Y, K83R, V89L	nd	nd	nd	nd	74.0	100

【0380】與親本ISVD F0107529F10相比，具有突變A14P、T60A、S71R、A74S、S79Y、K83R的中間變異體F010704099對hTSLP展現出相似的親和力，並且對食蟹猴TSLP展現出1/2的親和力。與親本ISVD相比，Tm顯示出總體升高11.4ºC。將另外兩個突變即L11V和V89L引入變異體F010704099中以使得預先存在的抗體結合最小化，從而產生最終的變異體F027400021。基於AbM定義，對於F027400021的架構區中的架構同一性%為89.9%，並且基於Kabat定義為88.5%。

【0381】 **表20：抗TSLP ISVD F0107501A02的序列優化（SO）變異體的分析結果。**

ISVD ID	**一個或多個突變**	**Koff hTSLP (s-1)**	**koff 食蟹猴 TSLP (s-1)**	**三原複合物 AlphaScreen IC50 (M)**	**pH 7 下 TSA，Tm(°C)**	**SE-HPLC，主峰%**
F0107501A02	WT	5.4E-05	1.5E-03	2.8E-10	68.5	100
F010704076	A14P, E16G, A74S, K83R	6.2E-05	1.6E-03	2.7E-10	70.8	99.3
F027400160	L11V, A14P, E16G, A74S, K83R, V89L	1.2E-04	4.3e-03	nd	70.0	100

【0382】 與親本ISVD F0107501A02相比，具有突變A14P、E16G、A74S、K83R的中間變異體F010704076對hTSLP和食蟹猴TSLP顯示出相似的解離速率，以及在三元複合物Alphascreen中相似的效力。與親本ISVD相比，Tm顯示出總體升高12.3°C。將另外兩個突變即L11V和V89L引入變異體F010704076中以使得預先存在的抗體結合最小化，從而產生最終的變異體F027400160。

【0383】 基於AbM定義，對於F027400160的架構區中的架構同一性%為83.1%，並且基於Kabat定義為80.5%。

【0384】 **表21：ISVD F0107004B02、F0107004B06、F0107501A02和F107529F10的SO形式的胺基酸序列。**

ISVD ID	**ISVD描述**	**序列**
F010704076 (SEQ ID NO: 160)	F0107501A02 (A14P, E16G, A74S, K83R)*	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSGFG VNILYWYRQAAGIERELIASITSGGITNYVDS VKGRFTISRDNSENTMYLQMNSLRAEDTGV YYCASRNIFDGTTEWGQGTLVTVSS
F010704099 (SEQ ID NO: 161)	F0107529F10 (A14P, T60A, S71R, A74S, S79Y, K83R)*	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFA DYDYDIGWFRQAPGKEREGVSCISNRDGST YYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRP EDTAVYYCAVEIHCDDYGVENFDFDPWGQ GTLVTVSS
F027100019 (SEQ ID NO : 162)	F0107004B02 (E1D, L11V, A14P, N64K, S65G, A74S, K83R, I89L)*	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFS SYRMGWFRQAPGKEREFVAALSGDGYSTY TANSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPE DTALYYCAAKLQYVSGWSYDYPYWGQGTL VTVSSAAA
F027100183 (SEQ ID NO : 163)	F0107004B06 (L11V, R74S, K83R, V89L)*	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFN NYAMKWVRQAPGKGLEWVSSITTGGGSTD YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPE DTALYYCANVPFGYYSEHFSGLSFDYRGQG

		TLVTVSS
F027400021 (SEQ ID NO : 164)	F0107529F10 (L11V, A14P, T60A, S71R, A74S, S79Y, K83R, V89L)*	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFA DYDYDIGWFRQAPGKEREGVSCISNRDGST YYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRP EDTALYYCAVEIHCDDYGVENFDFDPWGQ GTLVTVSS
F027400160 (SEQ ID NO : 165)	F0107501A02 (L11V, A14P, E16G, A74S, K83R, V89L)*	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSGFG VNILYWYRQAAGIERELIASITSGGITNYVDS VKGRFTISRDNSENTMYLQMNSLRAEDTGL YYCASRNIFDGTTEWGQGTLVTVSS

*() 表示引入（親本）單價構建塊中的胺基酸取代。

【0385】 **6.4　多特異性ISVD構建體F027400161**

【0386】 以上鑒定的優化的ISVD F027100019（F0107004B02的優化變異體）、F027100183（F0107004B06的優化變異體）、F027400021（F0107529F10的優化變異體）和F027400160（F0107501A02的優化形式）用於生成多特異性ISVD構建體F027400161。在F027400161中使用的優化的單價構建塊，根據其ISVD來源在下文中以縮寫形式分別表示為04B02、04B06、529F10和501A02。

【0387】 **6.4.1 實例15：多特異性ISVD構建體生成**

【0388】 與IL-13和TSLP結合的含ISVD的多肽F027400161（SEQ ID NO: 1）的鑒定是由資料驅動的雙特異性工程化和格式化運動導致的，其中包括若干種抗TLSP構建塊、若干種抗IL13構建塊和抗HSA構建塊ALB23002。應用了構建塊的不同位置/方向和不同的連接子長度（9GS相比於35GS），並證明這些對於不同的參數（效力、交叉反應性、表現產量等）是關鍵的。

【0389】 在巴斯德畢赤酵母中轉化了一大組不同的ISVD構建體，以進行小規模生產。通過逐步添加甲醇發生ISVD表現的誘導。將具有分泌的ISVD的澄清培養基用作起始材料以經由蛋白A親和色譜純化，接著進行脫鹽。所純化的樣品用於功能表征和表現評價。

【0390】 一些構建體根據連接子長度和ISVD構建塊的相對位置而顯示出受損的效力。例如：當與短的9GS連接子連接時，抗TSLP雙互補位組合501A02-529F10對於食蟹猴TSLP的效力大大受損。一些構建體根據構建塊的組合和順序而顯示出低表現水準。對於包含4B02-4B06的雙特異性物，在與501A02-529F10組合時

表現最佳。

【0391】 **表22：評價的不同多特異性ISVD形式的選擇。**BB = 構建塊，ALB = ALB23002

ISVD ID	BB1	連接子1	BB2	連接子2	BB3	連接子3	BB4	連接子4	BB5
F027400161	4B02	35GS	4B06	9GS	501A02	9GS	ALB	9GS	529F10
F027400162	4B02	9GS	501A02	9GS	4B06	9GS	529F10	9GS	ALB
F027400163	501A02	9GS	ALB	9GS	529F10	9GS	4B02	35GS	4B06
F027400183	501A02	35GS	529F10	9GS	4B02	9GS	ALB	9GS	4B06
F027400189	4B02	9GS	ALB	9GS	4B06	9GS	501A02	35GS	529F10
F027400283	501A02	9GS	4B02	9GS	529F10	9GS	4B06	35GS	ALB
F027400284	501A02	35GS	4B02	35GS	529F10	35GS	4B06	35GS	ALB
F027400296	4B02	9GS	501A02 (N73Q)*	9GS	4B06	9GS	529F10	9GS	ALB
F027400298	501A02 (N73Q)*	9GS	4B02	9GS	529F10	9GS	4B06	9GS	ALB

*() 表示引入（親本）單價構建塊中的胺基酸取代。

【0392】 表23示出，對於包含相同構建塊但以不同方式排序並以不同連接子長度連接的六個構建體，獲得了範圍從低滴度到高滴度的不同產量。對於包含經由35GS連接子連接的IL-13 ISVD 4B02和4B06的構建體，獲得了最高的表現滴度（F027400161和F027400163）。另外，F027400161和F027400163的溶解度遠高於其各自的對應物F027400296和298，後面兩者的構建塊是用四個9GS連接子連接並且ALB位於C-端。

【0393】 隨後，將大的雙特異性組削減成一組由以下組成的2個雙特異性構建體：基於初步的產量估算被證明對兩個靶標（人和食蟹猴）均有效並且具有高表現水準的潛力的ISVD構建體F027400161和F027400163。

【0394】在巴斯德畢赤酵母中進行了較大規模的2 L和5 L生產以進行表現產量測定以及評估生物物理學特性和預先存在的抗體反應性。

【0395】表24和實例22證明了預先存在的抗體反應性是由構建塊的方向和連接子長度驅動的。

【0396】 表23：處於不同方向和/或具有不同連接子長度的具有4B02、4B06、501A02和529F10的構建塊的6種ISVD構建體的表現水準和溶解度。

ISVD構建體ID	BB1	連接子1	BB2	連接子2	BB3	連接子3	BB4	連接子4	BB5	產量5 ml表現（μg/ml）	產量5 L發酵（g/L）	溶解度（mg/ml）
F027400161	4B02	35GS	4B06	9GS	501A02	9GS	ALB	9GS	529F10	**124**	4.7	**145**
F027400163	501A02	9GS	ALB	9GS	529F10	9GS	4B02	35GS	4B06	**114**	4.4	**>150**
F027400189	4B02	9GS	ALB	9GS	4B06	9GS	501A02	35GS	529F10	77		
F027400183	501A02	35GS	529F10	9GS	4B02	9GS	ALB	9GS	4B06	55		
F027400296	4B02	9GS	501A02 (N73Q)*	9GS	4B06	9GS	529F10	9GS	ALB	80	2.4	Very low
F027400298	501A02 (N73Q)*	9GS	4B02	9GS	529F10	9GS	4B06	9GS	ALB	80	2.4	25

*() 表示引入（親本）單價構建塊中的胺基酸取代。

【0397】 表24：與對照ISVD構建體F027301186相比，存在於96個人血清樣品中的預先存在的抗體與F027400161、F027400163和F027400164的結合。

構建體ID	BB1	連接子1	BB2	連接子2	BB3	連接子3	BB4	連接子4	BB5	25%百分位數	中位數RU水準	75%百分位數
F027301186	1E07	35GS	1E07	35GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02	61	135	622
F027400161	4B02	35GS	4B06	9GS	501A02	9GS	ALB	9GS	529F10-A	8	22	34
F027400163	501A02	9GS	ALB	9GS	529F10	9GS	4B02	35GS	4B06-A	19	34	63
F027400164	501A02	9GS	4B02	9GS	529F10	9GS	4B06	9GS	ALB-A	4	13	24

【0398】 最後，基於效力、與預先存在的抗體的降低的結合以及優越的表現水準和CMC特徵，選擇ISVD構建體F027400161。

【0399】 **6.4.2 實例16：多特異性ISVD構建體對TSLP、IL13和血清白蛋白的結合親和力**

【0400】 F027400161對人和食蟹猴TSLP（人和食蟹猴TSLP序列是已知的（分別為Uniprot登錄號Uniprot登錄號Q969D9和NCBI RefSeq XP_005557555.1））的親和力，表示為平衡解離常數（K_D）。使用重組蛋白進行所述測定，通過在Gyrolab xP Workstation（Gyros）上的溶液中親和力測量來定量人IL-13（Sino Biological目錄號10369-HNAC）、食蟹猴IL-13（Sino Biological目錄號11057-CNAH）和恒河猴IL-13（R&D systems目錄號2674-RM）以及人（Sigma Aldrich, 目錄號A8763）、食蟹猴和小鼠（Albumin Bioscience目錄號N1204H1CM）血清白蛋白。

【0401】 在K_D控制的測量下，將TSLP或IL-13（範圍為1 μM - 0.25 fM）或血清白蛋白（範圍為100 μM - 320 pM）的系列稀釋物和固定量的F027400161（在TSLP和IL13的情況下為5 pM或10 pM，並且在血清白蛋白的情況下為20 nM）混合以允許相互作用，並培養48或72小時（在TSLP和IL13的情況下）或2小時（在血清白蛋白的情況下）以達到平衡。

【0402】 在受體控制的測量下，將TSLP或IL-13（範圍為1 μM - 0.25 fM）或血清白蛋白（範圍為100 μM - 320 pM）的系列稀釋物和固定量的F027400161（在TSLP的情況下為250 pM，在IL-13的情況下為10 nM，並且在血清白蛋白的情況下為1 μM）混合以允許相互作用，並培養48或72小時（在TSLP和IL-13的情況下）或2小時（在血清白蛋白的情況下）以達到平衡。

【0403】 生物素化人TSLP/IL-13/血清白蛋白被捕獲在Gyrolab Bioaffy 1000 CD的微結構中，所述微結構含有珠的柱並用作分子探針以從平衡溶液捕獲游離F027400161。使TLSP/IL-13/血清白蛋白和F027400161的混合物（含有游離TLSP/IL-13/血清白蛋白、游離F027400161和TLSP/IL-13/血清白蛋白-F027400161複合物）流過珠，並捕獲少量百分比的游離F027400161，其與游離ISVD濃度成

比例。然後注射螢光標記的抗V_{HH}抗體ABH0086-Alexa647，以標記任何捕獲的F027400161，並在沖洗掉過量的螢光探針後測定螢光的變化。使用Gyrolab分析軟體進行稀釋系列的擬合，其中分析K_D和受體控制的曲線以測定K_D值。

【0404】結果（表25）證明多特異性ISVD構建體以高親和力結合人/食蟹猴TSLP和人/食蟹猴/恒河猴IL13。

【0405】表25：F027400161對人、恒河猴和食蟹猴TSLP和IL13以及人、食蟹猴和小鼠血清白蛋白的結合親和力（食蟹猴和恒河猴TSLP以及食蟹猴和恒河猴白蛋白的序列是相同的）。

	人		食蟹猴		恒河猴		
抗原	**K_D (pM)**	**95% CI (pM)**	**K_D (pM)**	**95% CI (pM)**	**K_D (pM)**	**95% CI (pM)**	**培養時間 (h)**
TSLP	1.8	1.2 - 2.3	55.9	51 - 61			48
	2.3	1.4 – 3.3	44.0	26 - 62			48
	1.0	0.65 – 1.4	59.0	35 – 83			72
IL13	4.2	3.6 – 4.8	3.8	2.8 – 4.9	6.4	5.3 – 7.4	48
	6.3	5.3 – 7.3	1.5	0.7 – 2.3	1.9	0.6 – 3.1	48
	4.7	3.8 – 5.7	3.5	2.7 – 4.2	1.5	0.5 – 2.4	72
	人		食蟹猴		小鼠		
抗原	**K_D (nM)**	**95% CI (nM)**	**K_D (nM)**	**95% CI (nM)**	**K_D (nM)**	**95% CI (nM)**	**培養時間 (h)**
SA	119	99.4 - 139	198	185 - 211	1800	1700 - 1900	2
	110	56 - 162	133	70 - 196			2
	145	69 - 222	145	78 - 213			2

【0406】6.4.3 實例17：多特異性ISVD構建體與TSLP和IL13選擇性地結合

【0407】經由SPR（Proteon XPR36）分別評估F027400161與作為IL13和TSLP相關細胞因子的IL-4和IL-7結合的不存在。

【0408】利用胺偶聯以25 μg/mL將細胞因子固定在proteon GLC感測器晶片上持

續600 s，其中注射EDC/NHS持續80秒進行啟動，並注射1 M乙醇胺鹽酸鹽持續150秒進行失活（ProteOn胺偶聯套組，目錄號176-2410）。啟動和失活過程中的流速設置為30 µl/min，並且在配體注射過程中的流速設置為25 µl/min。對於IL13和IL4（Peprotech目錄號200-07），10 mM乙酸鹽固定化緩衝液的pH為6.0，並且對於TSLP和IL7（R&D systems目錄號204-IL/CF）為5.5。

【0409】 接下來，將1 µM的F027400161注射2分鐘，並以45 µL/min的流速解離600 s。使用PBS（pH 7.4）+ 0.005%吐溫20作為運行緩衝液。注射100 nM α-hIL4 Ab和100 nM α-IL7 Ab作為陽性對照。F027400161和陽性對照與固定化靶標之間的相互作用通過檢測折射率的增加來測量，所述折射率的增加是由於結合後晶片上的品質變化而發生的。

【0410】 所有陽性對照確實與其各自的靶標結合。沒有檢測到F027400161與人IL4和IL7的結合。

【0411】 另外，還研究了F027400161是否可能與短形式的TSLP結合。為此，如上所述利用胺偶聯將TSLP和短形式的TSLP（如Fornasa, 2015所述）分別以10 µg/mL、5 µg/ml固定在proteon GLC感測器晶片上持續150 s。對於TSLP，10 mM乙酸鹽固定化緩衝液的pH為5.5，並且對於短形式的TSLP，其為4.0。

【0412】 接下來，將500 nM的F027400161注射2分鐘，並以45 µL/min的流速解離600 s。使用PBS（pH 7.4）+ 0.005%吐溫20作為運行緩衝液。注射500 nM抗-hTSLP參考mAb1作為參考化合物，並且500 nM α-hTSLP pAb（Abcam ab47943）作為陽性對照。

【0413】 儘管陽性對照確實與長（正常）和短形式的TSLP均結合，但未檢測到F027400161和抗hTSLP參考mAb1與短形式的TSLP的結合。

【0414】 6.4.4 實例18：多特異性ISVD構建體與IL13、TSLP和HSA的同時結合

【0415】 使用Biacore T200儀器測定F027400161是否可以同時與hTSLP和hIL13結合。為此，將hTSLP（重組人TSLP是可商購的，如可商購自R&D Systems（目錄號1398-TS））經由胺偶聯固定在CM5感測器晶片上。將100 nM的F027400161

以10 μl/min在TSLP表面上注射2 min，以經由TSLP構建塊501A02-529F10捕獲ISVD構建體。隨後以10 μl/min的流速注射100 nM的hIL13（PeproTech，目錄號200-13）、HSA或hOX40L或者1000 nM的HSA，或者100 nM IL13 + 100 nM HSA、100 nM IL13 + 1000 nM HSA、100 nM OX40L + 100 nM HSA、100 nM OX40L + 1000 nM HSA或100 nM IL13 + 100 nM OX40L，持續2 min，接著是隨後的300秒解離步驟。通過將0.5% SDS + 10 mM甘胺酸（pH 3）以45 μl/min注射1分鐘來再生TSLP表面。傳感圖（圖1）顯示F027400161可以同時結合人IL13、人TSLP和HSA，如在TSLP上捕獲後回應單位的增加所示：來自單獨IL13的約130 RU增加、來自單獨100 nM HSA的約60 RU增加和來自單獨1000 nM HSA的約350 RU、對於IL13和100 nM HSA混合物約180 RU增加、以及對於IL13和1000 nM HSA混合物約500 RU。由於F027400161對HSA的親和力較低，因此需要較高的HSA濃度才能觀察到可觀的RU增加水準（參見實例16）。

【0416】 實例19：多特異性ISVD構建體在體外對IL13誘導的嗜酸性粒細胞趨化因子釋放的抑制

【0417】 使用研究A549人肺癌細胞的嗜酸性粒細胞趨化因子釋放的基於細胞的測定來研究來自不同目的物種（人、恒河猴和食蟹猴）的可溶性IL13的功能活性及其被F027400161的抑制。

【0418】 為此，將A549懸浮細胞在補充了10% FCS的Ham's F12K培養基中培養，並以400.000個細胞/孔接種至96孔板中。培養24小時後，添加F027100161或參考化合物（抗hIL-13參考mAb1和抗hIL-13參考mAb2）的稀釋系列。培養20 min後，添加人IL13（Sino Biological目錄號10369-HNAC）、食蟹猴IL13（Sino Biological目錄號11057-CNAH）或恒河猴IL13（R&D Systems，目錄號2674-RM-025）至終濃度為160 pM。在存在30 μM HSA的情況下進一步培養24小時後，以終濃度50 μg/ml添加肝素以增強嗜酸性粒細胞趨化因子的表現。另外培養4小時後，通過使用人CCL26/嗜酸性粒細胞趨化因子-3 DuoSet ELISA（R&D systems，DY346）對細胞上清液中分泌的嗜酸性粒細胞趨化因子-3進行定量。

【0419】 F027400161以濃度依賴性方式抑制人、食蟹猴和恒河猴IL13誘導的嗜酸性粒細胞趨化因子-3釋放，其中IC50為194 pM（對於人IL13）、1040 pM（對於食蟹猴IL13）和713 pM（對於恒河猴IL13），這與參考化合物抗hIL-13參考mAb1是可比較的並優於參考化合物抗hIL-13參考mAb2（表26，圖2）。

【0420】 表26：相比於參考化合物抗hIL-13參考mAb1和抗hIL-13參考mAb2，在嗜酸性粒細胞趨化因子釋放測定中F027400161介導的對人、食蟹猴和恒河猴IL13的中和的IC50值。nd = 未測定

	F027400161			抗hIL-13參考mAb1			抗hIL-13參考mAb2		
抗原	人IL13	食蟹猴IL13	恒河猴IL13	人IL13	食蟹猴IL13	恒河猴IL13	人IL13	食蟹猴IL13	恒河猴IL13
嗜酸性粒細胞趨化因子釋放測定(IC50，pM)	194	1040	713	45	160	99	668	nd	3560

【0421】 6.4.5 實例20：多特異性ISVD構建體抑制HEK-Blue IL4/IL13細胞中IL13誘導的STAT-6啟動

【0422】 HEK-Blue™ IL-4/IL-13細胞是通過用人STAT6基因和STAT6誘導型SEAP報告基因穩定轉染HEK293細胞而生成的。在IL-4和IL-13刺激後，細胞產生通過QUANTI-Blue™定量的分泌於上清液中的由STAT6誘導的SEAP。

【0423】 將HEK-Blue™細胞在補充了10% FBS的DMEM中培養，並以50.000個細胞/孔接種至96孔板中。將F027100161或參考化合物（抗hIL-13參考mAb1和抗hIL-13參考mAb2）的稀釋系列與10 pM hIL13（Sino Biological目錄號10369-HNAC）或食蟹猴IL-13（Sino Biological目錄號11057-CNAH）在室溫下預培養1小時，並添加至細胞中。在存在30 µM HSA的情況下培養22至24小時後，將40 µl細胞上清液與160 µl QUANTI-Blue™混合。通過在Clariostar儀器上測量620 nm處的吸收來定量分泌的SEAP。

【0424】 F027400161以濃度依賴性方式抑制人和食蟹猴IL-13誘導的SEAP分泌，其中IC50為32.8 pM（對於人IL-13）和53.4 pM（對於食蟹猴IL-13），優於參考

化合物抗hIL-13參考mAb2（表27，圖3）。

【0425】 表27：相比於參考化合物抗hIL-13參考mAb1和抗hIL-13參考mAb2，在SEAP報告物測定中F027400161介導的對人和食蟹猴IL-13的中和的IC50值。

構建體ID	IC50 hIL13 (M)	IC50食蟹猴IL13 (M)
F027400161	3.28E-11	5.34E-11
抗hIL-13參考mAb2	1.10E-10	4.26E-10
抗hIL-13參考mAb1	3.45E-12	5.85E-12

【0426】 6.4.6 實例21：多特異性ISVD構建體在體外抑制TSLP誘導的Ba/F3細胞增殖

【0427】 使用研究用編碼hTSLPR和hIL7Ra的質粒轉染的BaF3細胞的增殖的基於細胞的測定來研究來自不同目的物種（人、恒河猴和食蟹猴）的可溶性TSLP的功能活性及其被F027400161的抑制。

【0428】 將細胞以15000個細胞/孔接種在經細胞培養物處理的白色96孔板中的RPMI 1640生長培養基中。添加F027100161或參考化合物（抗hTSLP參考mAb1）的稀釋系列，接著添加5 pM人或食蟹猴TLSP以刺激細胞。人和食蟹猴TSLP序列是已知的（分別為Uniprot登錄號Uniprot登錄號Q969D9和NCBI RefSeq XP_005557555.1）。使用重組蛋白進行所述測定。在存在30 μM HSA的情況下培養48小時後，使用CellTiter-Glo® 發光細胞活力測定（Promega, G7571/G7572/G7573）監測細胞密度和活力，並在EnVision Multilabel讀取器（Perkin Elmer）上讀出。

【0429】 F027400161以濃度依賴性方式抑制Ba/F3細胞的人和食蟹猴TSLP依賴性增殖，其中IC50為7.8 pM（對於人TSP）和24 pM（對於食蟹猴TSLP），因此所述抑制比參考化合物抗hTSLP參考mAb1好得多（表28，圖4）。

【0430】 表28：相比於參考化合物抗hTSLP參考mAb1，F027400161介導的對人和食蟹猴TSLP誘導的BaF3增殖的中和的IC50值。

	F027400161		抗hTSLP參考mAb1	
抗原	人	食蟹猴	人	食蟹猴

	TSLP	TSLP	TSLP	TSLP
BaF3增殖測定（IC50，pM）	7.8	24	356	3180

【0431】 **6.4.7 實例22：與預先存在的抗體結合的多特異性ISVD構建體**

【0432】 使用ProteOn XPR36(Bio-Rad Laboratories, Inc.)在正常人血清(n = 96 ）中評估了ISVD構建體F027400161對預先存在的抗體的反應性。PBS/吐溫（磷酸鹽緩衝鹽水（pH 7.4），0.005%吐溫20）用作運行緩衝液，並且在25ºC下進行實驗。

【0433】 ISVD經由ALB23002構建塊與固定在晶片上的HSA結合而被捕獲在晶片上。為了固定HSA，用EDC/NHS（流速30 μl/min）啟動ProteOn GLC感測器晶片的配體道，並將HSA以100 μl/ml注射在pH 4.5的ProteOn乙酸鹽緩衝液中，以實現大約2900 RU的固定化水準。固定後，用乙醇胺鹽酸鹽（流速30 μl/min）使表面失活。

【0434】 隨後，將ISVD構建體以45 μl/min注射在HSA表面上持續2 min，以實現大約800 RU的ISVD捕獲水準。將含有預先存在的抗體的樣品以14,000 rpm離心2分鐘，並將上清液在PBS-吐溫20（0.005%）中以1：10稀釋，然後以45 μl/min注射2分鐘，接著進行隨後的400秒解離步驟。在每個迴圈後（即在新的ISVD捕獲和血液樣品注射步驟之前），通過將HCl（100 mM）以45 μl/min注射2分鐘來再生HSA表面。在通過減去 1) ISVD-HSA解離和 2) 與參考配體道的非特異性結合的兩次參比後，獲得顯示預先存在的抗體結合的傳感圖。通過將報告點設置為125秒（締合結束後5秒）來測定預先存在的抗體的結合水準。相對於參考ISVD在125秒時的結合水準，計算預先存在的抗體結合的降低百分比。

【0435】 通過在每個構建塊中引入突變L11V和V89L和C-端丙胺酸針對降低預先存在的抗體結合進行優化的五價ISVD構建體F027400161顯示出與對照未優化的五價ISVD構建體F027301186相比顯著更少的與預先存在的抗體的結合（表24和圖5）。

【0436】 預先存在的抗體結合取決於構建塊的方向和多特異性構建體中存在的

連接子長度。表24和圖5顯示，構建體F027400161由於其特定的方向而顯示出比構建體F027400163更低的預先存在的抗體反應性，但是F027400164由於到處都是短連接子而顯示出比F027400161更低的反應性。

【0437】 6.4.8 實例23：F027400161在體外阻斷人樹突狀細胞中TSLP誘導的CCL17

【0438】 第2型發炎級聯反應是由上皮細胞、樹突狀細胞、第2型輔助T細胞（Th2細胞）、肥大細胞和先天淋巴樣細胞的協同作用以環境依賴性方式引發並傳播的。細胞因子胸腺基質淋巴細胞生成素（TSLP）已經通過其啟動樹突狀細胞（DC）的能力而參與了過敏性發炎的引發和發展。通過TSLP啟動後，人DC產生CCL17（一種Th2相關的趨化因子）並驅動Th2細胞從幼稚$CD4^+$ T細胞分化。F027400161靶向TSLP和IL-13二者，可以阻斷TSLP和DC之間的相互作用，並由此降低CCL-17產生並有望在第2型發炎性疾病及其他疾病中產生療效。

【0439】 與參考單特異性抗體抗hTSLP參考mAb1相比，在從8個單獨健康供體分離的人DC中評估了F027400161抑制TSLP誘導的CCL17產生的能力。從血沉棕黃層（人白細胞包）樣品中的健康人PBMC分離並富集人DC（$CD3^-CD14^-CD11c^+HLA\text{-}DR^{高}$）。將總共0.5-0.8x$10^6$個DC/孔與八種3倍系列稀釋濃度的F027400161（400 ng/mL或5.714 nM最高濃度）或八種4倍系列稀釋濃度的抗hTSLP參考mAb1（4000 ng/mL或27 nM最高濃度）在37ºC細胞培養箱中一起培養36小時，然後用4 ng/mL重組人TSLP刺激。重組人TSLP是可商購的，如可商購自R&D Systems（目錄號1398-TS）。通過ELISA測量新鮮收集的細胞培養物上清液中的CCL17產生，並在Graphpad Prism中計算ISVD構建體和基準抗體的IC_{50}值。

【0440】 圖6中顯示了F027400161和抗hTSLP參考mAb1在人DC中的劑量抑制反應的綜合結果。參考單特異性抗體抗hTSLP參考mAb1以793.4 pM的平均IC_{50}濃度抑制TSLP誘導的CCL17產生，而F027400161以53.26 pM的平均IC_{50}抑制TSLP誘導的CCL17產生。

【0441】總之，這些結果證明，與抗hTSLP參考mAb1相比，ISVD構建體F027400161在人DC中抑制TSLP誘導的CCL17反應方面更有效。

【0442】6.4.9 實例24：F027400161在體外阻斷人PBMC中0.5 ng/mL [IL-13+TSLP]誘導的協同CCL17

【0443】第2型細胞因子（如胸腺基質淋巴細胞生成素（TSLP）和白細胞介素13（IL-13））發揮獨特、累加和協同反應，以驅動氣喘和異位性皮膚炎（AD）病理生理學。TSLP作為上皮細胞來源的第2型免疫級聯反應的引發劑和IL-13作為下游效應細胞因子的作用已得到廣泛驗證。F027400161靶向TSLP和IL-13二者，因此有望在第2型介導的發炎性疾病及其他疾病中發揮功效。

【0444】在來自8個單獨的健康供體的人PBMC中評價了F027400161抑制0.5 ng/mL IL-13和TSLP誘導的CCL17（TARC）協同產生的能力。所述研究被設計為評價ISVD構建體相比于單特異性生物製劑、抗hTSLP參考mAb1和抗hIL-13參考mAb1的非劣效性。用0.5 ng/mL的重組人TSLP（重組人TSLP是可商購的，如可商購自R&D Systems（目錄號1398-TS））和IL-13（R&D Systems，目錄號213-ILB-005/CF）刺激每孔一百萬個細胞的人PBMC，並將其與十種3倍系列稀釋濃度的ISVD構建體（最高濃度10 nM）、抗hIL-13參考mAb1（最高濃度10 nM）和抗hTSLP參考mAb1（最高濃度100 nM）在96孔板中在37ºC細胞培養箱中培養20小時。在每個供體中對於F027400161在技術上一式三份地進行所述測定。所使用的細胞因子濃度是在來自正常人、氣喘和異位性皮膚炎患者的血清、BAL液體、痰和皮膚的報告文獻值（Berraïes A等人, Immunol Letter 178: 85-91, 2016；Bellini A等人, Mucosal Immunology 5(2):140-9, 2012；Davoodi P等人, Cytokine 60(2):431-7, 2012；Szegedi K等人, J Eur Acad Dermatol Venereol 29(11):2136-44, 2015）的標準誤差的2倍內。通過Meso Scale Diagnostics（MSD）V-PLEX Human TARC套組測量新鮮收集的細胞培養物上清液中的CCL17產生。

【0445】圖7中顯示了F027400161和基準抗體抗hIL-13參考mAb1和抗hTSLP參考mAb1的劑量抑制反應的綜合結果。F027400161顯示出100%抑制0.5 ng/mL

IL-13 + TSLP誘導的協同CCL17產生，其中平均IC_{50}為0.0061 nM。參考抗體抗hIL-13 mAb1儘管具有0.0028 nM的較低平均IC_{50}，但在等莫耳劑量的F027400161下無法完全阻斷協同CCL17反應，並在大約80%抑制下趨於穩定。另一方面，抗hTSLP參考mAb1僅能阻斷大約50%的CCL17產生，其中平均IC_{50}為2.932 nM。

【0446】總之，這些結果證明，對於阻斷人PBMC中IL-13和TSLP誘導的協同反應的病理生理學相關濃度，F027400161比抗hTSLP參考mAb1更有效並且優於抗hIL-13參考mAb1，這突出了其對於治療第2型發炎性疾病（如氣喘和異位性皮膚炎）的治療潛力。

【0447】6.4.10實例25：F027400161在體外阻斷人PBMC中5 ng/mL [IL-13+TSLP]誘導的協同CCL17

【0448】在來自8個單獨的健康供體的人PBMC中評價了F027400161抑制5 ng/mL IL-13 + TSLP誘導的CCL17產生的能力。所述研究被設計為評價ISVD構建體相比于單特異性生物製劑、抗hTSLP參考mAb1和抗IL-13參考mAb1的非劣效性。所用的細胞因子濃度是在正常人、氣喘和異位性皮膚炎患者中文獻已報告的作為暫態發炎狀態期間的假設濃度的TSLP和IL-13的病理生理學範圍上限的約10倍（Berraïes A等人, Immunol Letter 178: 85-91, 2016；Bellini A等人, Mucosal Immunology 5(2):140-9, 2012；Davoodi P等人, Cytokine 60(2):431-7, 2012；Szegedi K等人, J Eur Acad Dermatol Venereol 29(11):2136-44, 2015）。用5 ng/mL的重組人TSLP和IL-13（R&D Systems，目錄號213-ILB-005/CF）刺激每孔一百萬個細胞的人PBMC，並將其與十種3倍系列稀釋濃度的F-27400161（最高濃度10 nM）、抗hIL-13參考mAb1（最高濃度10 nM）和抗hTSLP參考mAb1（最高劑量100 nM）在96孔板中在37℃細胞培養箱中培養20小時。在每個供體中對於F027400161在技術上一式三份地進行所述測定。通過Meso Scale Diagnostics（MSD）V-PLEX Human TARC套組測量新鮮收集的細胞培養物上清液中的CCL17產生。

【0449】圖8中顯示了F027400161和基準抗體抗hIL-13參考mAb1和抗hTSLP參考mAb1的劑量抑制反應的綜合結果。F027400161顯示出100%抑制5 ng/mL IL-13

+ TSLP誘導的協同CCL17產生，其中平均IC_{50}為0.0387 nM。儘管用等莫耳劑量的比較物抗體抗hIL-13參考mAb1處理的PBMC顯示出0.01339 nM的較低平均IC_{50}，但抑制反應從未達到100%，並在大約90%抑制處趨於穩定。另一方面，抗hTSLP參考mAb1僅部分地阻斷大約40%的CCL17產生，其中平均IC_{50}為19 nM。

【0450】 總之，這些結果證明，在[TSLP + IL-13]濃度為細胞因子的病理生理學範圍的10倍時，F027400161在阻斷人PBMC中IL-13和TSLP誘導的協同CCL17反應方面優於抗hTSLP參考mAb1和抗hIL-13參考mAb1，突出了其對於治療急性或炎性階段中的氣喘和異位性皮膚炎的治療潛力。

【0451】 6.4.11實驗27：T027400161在三元培養測定系統中阻斷過敏原Der P誘導的IL-5、CCL17和CCL26的產生

【0452】 TSLP通過誘導CCL17、IL-5和IL-13產生來驅動第2型免疫應答。隨後，IL-13觸發通過局部上皮細胞的CCL26產生，從而導致第2型免疫應答介導的發炎性疾病及其他疾病的蔓延。

【0453】 在三元培養測定系統中，使用MRC5成纖維細胞和A549上皮細胞與Der P刺激的來自6個單獨的正常供體的人PBMC共培養6天來評價F027400161抑制TSLP誘導的IL-5和CCL17以及IL-13誘導的CCL26產生的能力。所述研究被設計為評價ISVD相比于單特異性生物製劑、抗hTSLP參考mAb1和抗hIL-13參考mAb1的非劣效性。MRC5成纖維細胞組成性地產生了約100 pg/mL內源性TSLP，並且A549上皮細胞回應於通過用Der P和內源TSLP刺激由PBMC產生的IL-13而產生了CCL26。在與人PBMC共培養的前一天，每孔接種7.5萬個MRC5成纖維細胞和A549上皮細胞。將每孔一百萬個細胞的人PBMC添加至鋪板的MRC5成纖維細胞和A549上皮細胞中，用3 μg/mL的Der P刺激，並將其與11.1 nM的ISVD、抗hIL-13參考mAb1或抗hTSLP參考mAb1在24孔板中在37ºC細胞培養箱中培養6天。在每個供體中對於F027400161在技術上一式三份地進行所述測定。通過來自RnD System的Human Magnetic Luminex測定來測量新鮮收集的細胞培養物上清液中的IL-5、CCL17和CCL26的產生。

【0454】圖9中顯示了F027400161和基準抗體抗hIL-13參考mAb1和抗hTSLP參考mAb1的抑制反應的綜合結果。F027400161顯示出CCL17的60%抑制、IL-5的50%抑制和95%的CCL26產生抑制。參考抗體抗hTSLP參考mAb1展示出CCL17的50%抑制、IL-5的50%抑制、大約55%的CCL26產生抑制。儘管抗hIL-13參考mAb1顯示出可比較的95%的CCL26產生抑制，但該參考抗體僅能阻斷大約35%的CCL17產生和少於10%的IL-5產生（圖9）。這些測試分子對IL-5和CCL17缺乏完全抑制可能表明Der P刺激觸發PBMC引起除TSLP和IL-13以外的途徑來驅動IL-5和CCL17的產生。

【0455】總之，這些結果證明，抗TSLP/IL-13 ISVD F027400161在包含與組織結構細胞共培養的人PBMC的複合物測定系統中阻斷三種細胞因子和趨化因子（CCL17、IL-5和CCL26）的能力優於抗hTSLP參考mAb1和抗hIL-13參考mAb1，突出了其對於治療第2型發炎性疾病（如氣喘和異位性皮膚炎）以及廣泛範圍的免疫疾病適應症的治療潛力。

【0456】6.4.12實例26：NSG-SGM3小鼠模型用於在體內評價F027400161介導的靶標佔據和藥效動力學

【0457】F027400161靶向人TSLP和IL-13，並且不與鼠直系同源物交叉反應。因此，為了評價F027400161的生物活性，使用異種移植的人類化模型系統。雌性NSG-SGM3（NOD/SCID-IL2Rγ−/−, NOD.Cg-PrkdcscidIl2rγtm1Wjl/SzJ）獲得自美國緬因州巴爾港的傑克遜實驗室。這些小鼠表現人造血細胞因子：幹細胞因子（SCF）、粒細胞/巨噬細胞刺激因子（GM-CSF）和白細胞介素3（IL-3），其全部由人巨細胞病毒啟動子/增強子序列驅動。三重轉基因小鼠組成性地產生上述細胞因子，從而提供細胞增殖和存活信號，支援CD33+髓系和若干種類型的淋巴樣細胞的穩定植入。簡而言之，用於植入的方案如下：

【0458】在研究的第0天，以120 rads/min的速度用150 centiGray輻照小鼠1分15秒。植入後約6小時，通過靜脈內（IV）途徑在200 µl的杜氏磷酸鹽緩衝鹽水（DPBS）中將1x10^5臍帶血CD34+幹/祖細胞植入到小鼠中。一組小鼠以相同的方式輻照，

但未進行植入。這些小鼠被視為經輻照的未植入（naïve）小鼠。植入後第88天，小鼠接受流體動力學（HDD）靜脈內注射生理鹽水（植入的對照小鼠）或50 μg的IL-4微環DNA與50 μg的TSLP微環DNA的組合。在第91天，進行下頜下放血，並從每只小鼠收集100至150 μl血液，並將其置於肝素鋰管中。通過流式細胞術進行植入檢查，並評價IL-4和TSLP的血漿水準。來自植入檢查和/或細胞因子測定的資訊被用於從研究中選擇（分配或消除）小鼠。從研究中去除來自植入的對照組的具有少於25%人CD45+細胞的小鼠。類似地，還從研究中去除接受了微環DNA並顯示出血漿TSLP水準低於平均值1個標準差的植入小鼠。通過HDD靜脈內注射接受微環DNA的小鼠在第95、97、99和101天接受皮下劑量的媒劑（20 mM磷酸鹽、125 mM L-精胺酸鹽酸鹽和0.01%吐溫20（pH 7.0））或F027400161（0.01、0.05、0.1或10 mg/kg）。在第103天，通過異氟烷麻醉將小鼠麻醉。在處於異氟烷麻醉時，通過眼眶後放血收集血液。血液收集後並且仍在處於異氟烷麻醉時，通過頸脫位法將小鼠處死。收穫肺的一部分，並將其置於RNA later中進行基因表現評價。通過MSD套組評價（目錄號K15067-L-2，Meso Scale Diagnostics，羅克維爾，馬里蘭州，美國）測定來自第103天血漿樣品的人TSLP的血漿水準。通過ELISA（目錄號88-7439--88人IL-13 ELISA套組，Invitrogen/Thermo-Fischer，沃爾瑟姆，麻塞諸塞州，美國）測定來自第103天血漿樣品的人IL-13的血漿水準。內部測定驗證實驗證明，人TSLP和IL-13檢測套組二者均不能檢測F027400161結合的hTSLP和hIL-13。

【0459】如圖10和圖11所示的這些實驗的綜合結果證明，F027400161能夠顯著抑制人類化NSG-SGM3小鼠的血漿中人TSLP和IL-13的可檢測水準，從而證明了人TSLP和人IL-13二者的靶標佔據。

【0460】在NSG-SGM3小鼠模型中，TSLP和IL-4 cDNA的流體動力學遞送開啟了人IL-13的表現(圖11)。通過利用人IL-13通過小鼠IL-13受體發出信號的能力，使用源自NSG-SGM3研究（Hershey GK. 2003, J Allergy Clin Immunol.;111(4):677-90）的樣品研究了F027400161的藥效動力學作用。在這些

研究中，研究了F027400161處理對人IL-13調節的小鼠基因轉錄物的影響。來自上述研究的小鼠肺組織用於該分析。

【0461】收穫來自經處理的和對照NSG-SGM3小鼠的肺，並按照所附方案中的詳細說明對其進行加工以製備RNA。加工RNA以通過TaqMan進行定量，並按照方案中所述分析資料。簡而言之，將從小鼠收穫的肺部儲存在RNALater中，根據標準方案進行加工和純化以生成高品質RNA。然後根據製造商的方案，使用Quanta Q-Script 5X主混合物將純化的肺RNA逆轉錄為cDNA。根據製造商的方案，使用TaqMan測定將獲得的肺cDNA用於定量人IL-13反應小鼠靶基因(小鼠Retnla和小鼠Clca1）和內源對照（Rpl37a）的轉錄物表現水準。在Quantstudio 6＆7 flex軟體中進行資料分析。對於每個探針，將C_T值和ΔC_T值（針對Rpl37a）匯出到excel中，並使用以下公式計算每個基因的相對表現值：

歸一化相對表現 = (Power(2, -(ΔCT)))*1000。

【0462】評價的兩個人IL-13調節的小鼠基因是在肺血管重塑中起作用的Retnla（抵抗素樣α）和Clca1（氯離子通道附件1）（Lewis CC, 2009, J Allergy Clin Immunol.;123(4):795-804）。

【0463】如圖12和圖13中所示的這些實驗的綜合結果證明，F027400161能夠顯著抑制小鼠Retnla和小鼠Clca1轉錄物表現，從而證明F027400161對人IL-13驅動的小鼠轉錄物反應的體內藥效動力學作用。

【0464】方法：

【0465】*樣品勻漿製備：*

【0466】從小鼠收穫肺，並儲存在RNA later中。然後將肺葉乾燥，並轉移至含有1 mL RLT + 2-ME的fastprep lysing Matrix A管（用於將肺勻漿化）。使用程式1（兩個40秒迴圈，間隔5分鐘以避免樣品變熱）在MP-Bio勻漿器中將樣品勻漿化。然後將樣品以10,000 g旋轉3分鐘。收集了350 ul的裂解物[在RLT + 2ME中（1% v/v）]。使用多通道多次（約20次）吸移以裂解細胞。

【0467】*RNA製備：*

【0468】 對於RNA純化，使用350 ul勻漿。添加1X體積（350 ul）的70%乙醇，並將勻漿充分混合並轉移至置於洗脫板中的96孔RNeasy旋轉板，並使用具有以下修飾的Qiagen RNA微型組織RNA提取方案製備RNA。用可密封的鋁箔覆蓋96孔板，並以4000 x g離心2分鐘。為了洗滌柱，將400 µl緩衝液RWT添加至RNeasy旋轉柱中，並將旋轉柱板在室溫下以4000 x g的離心2分鐘。通過添加80 ul 1X DNA酶I混合物並在室溫下培養15分鐘來進行DNA酶I消化。通過添加400 ul緩衝液RWT並將板以4000 x g旋轉2分鐘來洗掉DNA酶I。接著，用緩衝液RPE和80%乙醇各500 ul洗滌旋轉板。隨後通過以4000 x g旋轉4分鐘來乾燥柱膜。然後在40 µl Tris HCl（10 mM；pH-8.0）中洗脫RNA。使用Nanodrop定量RNA，並將500 ng RNA用於cDNA製備。

【0469】 *第一鏈合成：*

【0470】 使用Quanta Q-Script 5X主混合物，並使用製造商的方案合成cDNA。cDNA的終濃度為25 ng/ul。將cDNA在-20攝氏度下儲存，直到進行TaqMan測定。

【0471】 *TaqMan測定：*

【0472】 通過按以下順序添加組分，在1.5 ml微量離心管中製備TaqMan多重主混合物。為每個探針組以及內部Rpl37a對照製備了三個單獨的主混合物。每個多重qPCR反應均以10 µl反應體積進行。

組分	*單個Rxn（ul）*	*對於40個Rxn（ul）*
50X RPL37A引物/探針	0.3	10
20X靶基因引物/探針	0.6	24
水	2.8	4
TaqMan Fast Advanced Mastermix；2X	5.0	200
總計	8.7	238

【0473】 對於每個樣品，將總計8.8 ul的主混合物添加至384孔光學板的適當孔中。將30 ng（1.2 ul）cDNA樣品添加至每個孔中。在QuantStudio 7K上設置TaqMan測定。在熱迴圈儀中的條件是：在95ºC下預變性3 min，40個迴圈的在95ºC下變性2 s以及在60ºC下退火並延伸5 s。在延伸步驟中進行螢光測量。

【0474】 *資料分析：*

【0475】 在Quantstudio 6&7 flex軟體中進行資料分析。

【0476】 對於每個探針，將CT值和ΔCT值（針對Rpl37a）匯出到excel中，並使用以下公式計算每個基因的相對表現值：

歸一化相對表現 = (Power(2, -(ΔCT)))*1000

【0477】 參考文獻：

【0478】 Liu, Y.J.2006, J Exp Med.;203(2):269-73. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation.

【0479】 Hershey GK.2003, J Allergy Clin Immunol.;111(4):677-90. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web.

【0480】 Lewis CC, Aronow B, Hutton J, Santeliz J, Dienger K, Herman N, Finkelman FD, Wills-Karp M. 2009, J Allergy Clin Immunol.;123(4):795-804.Unique and overlapping gene expression patterns driven by IL-4 and IL-13 in the mouse lung.

【0481】 **7 工業實用性**

【0482】 本文所述的多肽、編碼所述多肽的核酸分子、包含所述核酸的載體、和組合物可以例如用於治療患有發炎性疾病的個體。

【符號說明】無

序列表

<110> 比利時商艾伯霖克斯公司(Ablynx NV)
<110> 法商賽諾菲公司(Sanofi)

<120> 包含靶向 IL-13 和 TSLP 之免疫球蛋白單可變域的多肽

<130> 228536

<140> TW109143498
<141> 2020-12-09

<150> US 62/945,391
<151> 2019-12-09

<150> EP 20 305 064.6
<151> 2020-01-27

<160> 177

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1
<211> 671
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F027400161

<400> 1

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Lys Leu Gln Tyr Val Ser Gly Trp Ser Tyr Asp Tyr Pro Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
165 170 175
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met
180 185 190
Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
195 200 205
Ile Thr Thr Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
210 215 220
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
225 230 235 240
Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Asn
245 250 255
Val Pro Phe Gly Tyr Tyr Ser Glu His Phe Ser Gly Leu Ser Phe Asp
260 265 270
Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
275 280 285
Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val
290 295 300
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser
305 310 315 320
Gly Phe Gly Val Asn Ile Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Ile
325 330 335
Glu Arg Glu Leu Ile Ala Ser Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asn Tyr
340 345 350
Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu

355 360 365
Asn Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly
370 375 380
Leu Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Asn Ile Phe Asp Gly Thr Thr Glu Trp
385 390 395 400
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
405 410 415
Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
420 425 430
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
435 440 445
Arg Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro
450 455 460
Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala
465 470 475 480
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
485 490 495
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu
500 505 510
Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr
515 520 525
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
530 535 540
Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser
545 550 555 560
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr Asp
565 570 575
Tyr Asp Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly
580 585 590
Val Ser Cys Ile Ser Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
595 600 605
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
610 615 620
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
625 630 635 640
Cys Ala Val Glu Ile His Cys Asp Asp Tyr Gly Val Glu Asn Phe Asp
645 650 655
Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

660 665 670

<210> 2
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B02

<400> 2

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

<210> 3
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B06

<400> 3

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

<210> 4
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 501A02

<400> 4

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

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

<210> 5
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ALB23002

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

<210> 6
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 529F10

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr
20 25 30
Asp Tyr Asp Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
35 40 45
Gly Val Ser Cys Ile Ser Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Val Glu Ile His Cys Asp Asp Tyr Gly Val Glu Asn Phe
100 105 110
Asp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 7
Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Arg Met Gly
1 5 10

<210> 8
<211> 10

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 8
Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met Lys
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 9
Gly Ser Gly Phe Gly Val Asn Ile Leu Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 10
Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser
1 5 10

<210> 11

<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 11
Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr Asp Tyr Asp Ile Gly
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 12
Ala Leu Ser Gly Asp Gly Tyr Ser Thr Tyr
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 13
Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Ser Thr Asp
1 5 10

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 14
Ser Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asn
1 5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 15
Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 16
Cys Ile Ser Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr
1 5 10

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 17
Lys Leu Gln Tyr Val Ser Gly Trp Ser Tyr Asp Tyr Pro Tyr
1 5 10

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 18
Val Pro Phe Gly Tyr Tyr Ser Glu His Phe Ser Gly Leu Ser Phe Asp
1 5 10 15
Tyr

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 19
Arg Asn Ile Phe Asp Gly Thr Thr Glu
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 20
Gly Gly Ser Leu Ser Arg
1 5

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 21
Glu Ile His Cys Asp Asp Tyr Gly Val Glu Asn Phe Asp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 22
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 22
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 23
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 24
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 25

<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 25
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 26
Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Ile Glu Arg Glu Leu Ile Ala
1 5 10

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 27
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 28
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 28
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser
1 5 10

<210> 29
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 29
Thr Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
1 5 10 15
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ala
35

<210> 30
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 30
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
1 5 10 15
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Asn
35

<210> 31
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 31
Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
1 5 10 15
Glu Asn Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
20 25 30
Gly Leu Tyr Tyr Cys Ala Ser
35

<210> 32
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 32
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
1 5 10 15

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile
35

<210> 33
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 33
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
1 5 10 15
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
20 25 30
Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Val
35

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR4

<400> 34
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 35
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> FR4

<400> 35
Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR4

<400> 36
Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 37
Ser Tyr Arg Met Gly
1 5

<210> 38
<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 38
Asn Tyr Ala Met Lys
1 5

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 39
Val Asn Ile Leu Tyr
1 5

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 40
Ser Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 41

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 41
Asp Tyr Asp Tyr Asp Ile Gly
1 5

<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 42
Ala Leu Ser Gly Asp Gly Tyr Ser Thr Tyr Thr Ala Asn Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 43
Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15
Gly

<210> 44
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 44
Ser Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 45
Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 46
Cys Ile Ser Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 47
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 47
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 48
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 49
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 49
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Gly Phe Gly
20 25 30

<210> 50
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 50
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg
20 25 30

<210> 51
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 51
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala
20 25 30

<210> 52
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 52
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 53
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 53
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Asn
20 25 30

<210> 54
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 54
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Met Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys Ala Ser
20 25 30

<210> 55
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 55
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile
20 25 30

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 56
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Val
20 25 30

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

<220>
<223> Alb8

<400> 57
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr

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

<210> 58
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb23

<400> 58
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 116
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> Alb129

<400> 59
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala
115

<210> 60
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb132

<400> 60
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30

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

<210> 61
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb11

<400> 61
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser

115

<210> 62
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb11 (S112K)-A

<400> 62
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Lys
100 105 110
Val Ser Ser Ala
115

<210> 63
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb82

<400> 63

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

<210> 64
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb82-A

<400> 64

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

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

<210> 65
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb82-AA

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

<210> 66
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb82-AAA

<400> 66
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ala Ala
115

<210> 67
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb82-G

<400> 67
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

<210> 68
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb82-GG

<400> 68

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

<210> 69
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb82-GGG

<400> 69
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Gly Gly Gly
115

<210> 70
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb23002

<400> 70

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

<210> 71
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> A1b223

<400> 71
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala
115

<210> 72
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 3A 接頭

<400> 72
Ala Ala Ala
1

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 5GS 接頭

<400> 73
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 7GS 接頭

<400> 74
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 75
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 8GS 接頭

<400> 75
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 9GS 接頭

<400> 76
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 10GS 接頭

<400> 77
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 78
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 15GS 接頭

<400> 78
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 79
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18GS 接頭

<400> 79
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Ser

<210> 80
<211> 20

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 20GS 接頭

<400> 80
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser
20

<210> 81
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 25GS 接頭

<400> 81
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 82
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 30GS 接頭

<400> 82

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 83
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 35GS 接頭

<400> 83
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser
35

<210> 84
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 40GS 接頭

<400> 84
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 85
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G1 鉸鏈

<400> 85
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 86
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 9GS-G1 鉸鏈

<400> 86
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
1 5 10 15
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20

<210> 87
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 美洲駝上部長鉸鏈區

<400> 87
Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro Gln Pro Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 88
<211> 62
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G3 鉸鏈

<400> 88
Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45
Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
50 55 60

<210> 89
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 89
Lys Glu Arg Glu
1

<210> 90
<211> 4

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 90
Lys Gln Arg Glu
1

<210> 91
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 91
Gly Leu Glu Trp
1

<210> 92
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 92
Lys Glu Arg Glu Leu
1 5

<210> 93

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 93
Lys Glu Arg Glu Phe
1 5

<210> 94
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 94
Lys Gln Arg Glu Leu
1 5

<210> 95
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 95
Lys Gln Arg Glu Phe
1 5

<210> 96
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 96
Lys Glu Arg Glu Gly
1 5

<210> 97
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 97
Lys Gln Arg Glu Trp
1 5

<210> 98
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 98
Lys Gln Arg Glu Gly
1 5

<210> 99
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 99
Thr Glu Arg Glu
1

<210> 100
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 100
Thr Glu Arg Glu Leu
1 5

<210> 101
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 101
Thr Gln Arg Glu

1

<210> 102
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 102
Thr Gln Arg Glu Leu
1 5

<210> 103
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 103
Lys Glu Cys Glu
1

<210> 104
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 104

Lys Glu Cys Glu Leu
1 5

<210> 105
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 105
Lys Glu Cys Glu Arg
1 5

<210> 106
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 106
Lys Gln Cys Glu
1

<210> 107
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 107
Lys Gln Cys Glu Leu
1 5

<210> 108
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 108
Arg Glu Arg Glu
1

<210> 109
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 109
Arg Glu Arg Glu Gly
1 5

<210> 110
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 110
Arg Gln Arg Glu
1

<210> 111
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 111
Arg Gln Arg Glu Leu
1 5

<210> 112
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 112
Arg Gln Arg Glu Phe
1 5

<210> 113
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 113
Arg Gln Arg Glu Trp
1 5

<210> 114
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 114
Gln Glu Arg Glu
1

<210> 115
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 115
Gln Glu Arg Glu Gly
1 5

<210> 116
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 116
Gln Gln Arg Glu
1

<210> 117
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 117
Gln Gln Arg Glu Trp
1 5

<210> 118
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 118
Gln Gln Arg Glu Leu
1 5

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 119
Gln Gln Arg Glu Phe
1 5

<210> 120
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 120
Lys Gly Arg Glu
1

<210> 121
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 121
Lys Gly Arg Glu Gly
1 5

<210> 122
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 122
Lys Asp Arg Glu
1

<210> 123
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 123
Lys Asp Arg Glu Val
1 5

<210> 124
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 124
Asp Glu Cys Lys Leu
1 5

<210> 125
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 125
Asn Val Cys Glu Leu
1 5

<210> 126
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 126
Gly Val Glu Trp
1

<210> 127
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 127
Glu Pro Glu Trp
1

<210> 128
<211> 4

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 128
Gly Leu Glu Arg
1

<210> 129
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 129
Asp Gln Glu Trp
1

<210> 130
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 130
Asp Leu Glu Trp
1

<210> 131

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 131
Gly Ile Glu Trp
1

<210> 132
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 132
Glu Leu Glu Trp
1

<210> 133
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 133
Gly Pro Glu Trp
1

<210> 134
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 134
Glu Trp Leu Pro
1

<210> 135
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 135
Gly Pro Glu Arg
1

<210> 136
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 136
Gly Leu Glu Arg
1

<210> 137
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 137
Glu Leu Glu Trp
1

<210> 138
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 138
Val Thr Val Ser Ser
1 5

<210> 139
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 139
Val Lys Val Ser Ser

1 5

<210> 140
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 140
Val Gln Val Ser Ser
1 5

<210> 141
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 141
Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5

<210> 142
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 142

Val Lys Val Ser Ser Ala
1 5

<210> 143
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 143
Val Gln Val Ser Ser Ala
1 5

<210> 144
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F0107004B02

<400> 144
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Arg Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Leu Ser Gly Asp Gly Tyr Ser Thr Tyr Thr Ala Asn Ser Val
50 55 60
Asn Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

<210> 145
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F0107004B06

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

<210> 146
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F0107501A02

<400> 146
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Gly Phe Gly Val Asn
20 25 30
Ile Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Ile Glu Arg Glu Leu Ile
35 40 45
Ala Ser Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Thr Met Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Ser Arg Asn Ile Phe Asp Gly Thr Thr Glu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 147
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F0107529F10

<400> 147
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr
20 25 30
Asp Tyr Asp Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
35 40 45
Gly Val Ser Cys Ile Ser Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Asp

```
    50                  55                  60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asn Thr
65                  70                  75                  80
Val Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Ala Val Glu Ile His Cys Asp Asp Tyr Gly Val Glu Asn Phe
            100                 105                 110
Asp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 148
<211> 284
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F010700003

<400> 148

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
165 170 175
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser
180 185 190
Tyr Arg Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
195 200 205
Val Ala Ala Leu Ser Gly Asp Gly Tyr Ser Thr Tyr Thr Ala Asn Ser
210 215 220
Val Asn Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
225 230 235 240
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
245 250 255
Cys Ala Ala Lys Leu Gln Tyr Val Ser Gly Trp Ser Tyr Asp Tyr Pro
260 265 270
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 149
<211> 281
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F010700014

<400> 149
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Arg Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Leu Ser Gly Asp Gly Tyr Ser Thr Tyr Thr Ala Asn Ser Val
50 55 60
Asn Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr

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

<210> 150
<211> 284
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F010700029

<400> 150

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Arg Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Leu Ser Gly Asp Gly Tyr Ser Thr Tyr Thr Ala Asn Ser Val
50 55 60
Asn Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Lys Leu Gln Tyr Val Ser Gly Trp Ser Tyr Asp Tyr Pro Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
165 170 175
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met
180 185 190
Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
195 200 205
Ile Thr Thr Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
210 215 220
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Arg Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
225 230 235 240
Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asn
245 250 255
Val Pro Phe Gly Tyr Tyr Ser Glu His Phe Ser Gly Leu Ser Phe Asp
260 265 270
Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 151

<211> 287
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F010700031

<400> 151

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

225 230 235 240
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
245 250 255
Cys Ala Asn Val Pro Phe Gly Tyr Tyr Ser Glu His Phe Ser Gly Leu
260 265 270
Ser Phe Asp Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 152
<211> 279
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F010703842

<400> 152
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr
20 25 30
Asp Tyr Asp Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
35 40 45
Gly Val Ser Cys Ile Ser Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80
Val Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Val Glu Ile His Cys Asp Asp Tyr Gly Val Glu Asn Phe
100 105 110
Asp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala
165 170 175
Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Gly Phe Gly
180 185 190
Val Asn Ile Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Ile Glu Arg Glu
195 200 205
Leu Ile Ala Ser Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser
210 215 220
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Thr Met
225 230 235 240
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr
245 250 255
Cys Ala Ser Arg Asn Ile Phe Asp Gly Thr Thr Glu Trp Gly Gln Gly
260 265 270
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 153
<211> 279
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F027400016

<400> 153
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Gly Phe Gly Val Asn
20 25 30
Ile Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Ile
35 40 45
Ala Ser Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala

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

<210> 154
<211> 284
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F010700003-SO

<400> 154
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30
Ala Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Asn Val Pro Phe Gly Tyr Tyr Ser Glu His Phe Ser Gly Leu Ser
100 105 110
Phe Asp Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly
165 170 175
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser
180 185 190
Tyr Arg Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
195 200 205
Val Ala Ala Leu Ser Gly Asp Gly Tyr Ser Thr Tyr Thr Ala Asn Ser
210 215 220
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
225 230 235 240
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
245 250 255
Cys Ala Ala Lys Leu Gln Tyr Val Ser Gly Trp Ser Tyr Asp Tyr Pro
260 265 270
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 155
<211> 281
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> F010700014-SO

<400> 155

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

245 250 255
Lys Leu Gln Tyr Val Ser Gly Trp Ser Tyr Asp Tyr Pro Tyr Trp Gly
260 265 270
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 156
<211> 284
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F010700029-SO

<400> 156
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Arg Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Ala Leu Ser Gly Asp Gly Tyr Ser Thr Tyr Thr Ala Asn Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Lys Leu Gln Tyr Val Ser Gly Trp Ser Tyr Asp Tyr Pro Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145 150 155 160
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met
180 185 190
Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
195 200 205
Ile Thr Thr Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
210 215 220
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
225 230 235 240
Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Asn
245 250 255
Val Pro Phe Gly Tyr Tyr Ser Glu His Phe Ser Gly Leu Ser Phe Asp
260 265 270
Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 157
<211> 287
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F010700031-SO

<400> 157
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30
Ala Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Asn Val Pro Phe Gly Tyr Tyr Ser Glu His Phe Ser Gly Leu Ser

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

<210> 158
<211> 279
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F010703842-SO

<400> 158

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr
            20                  25                  30
```

Asp Tyr Asp Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
35 40 45
Gly Val Ser Cys Ile Ser Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Val Glu Ile His Cys Asp Asp Tyr Gly Val Glu Asn Phe
100 105 110
Asp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro
165 170 175
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Gly Phe Gly
180 185 190
Val Asn Ile Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Ile Glu Arg Glu
195 200 205
Leu Ile Ala Ser Ile Thr Ser Gly Gly Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser
210 215 220
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Met
225 230 235 240
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr
245 250 255
Cys Ala Ser Arg Asn Ile Phe Asp Gly Thr Thr Glu Trp Gly Gln Gly
260 265 270
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 159
<211> 279
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F027400016-SO

<400> 159

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

260 265 270
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 160
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F010704076

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

<210> 161
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> F010704099

<400> 161

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

<210> 162
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F027100019

<400> 162

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

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

<210> 163
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F027100183

<400> 163
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30
Ala Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Asn Val Pro Phe Gly Tyr Tyr Ser Glu His Phe Ser Gly Leu Ser
100 105 110
Phe Asp Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 164
<211> 127

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F027400021

<400> 164
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr
20 25 30
Asp Tyr Asp Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
35 40 45
Gly Val Ser Cys Ile Ser Asn Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Val Glu Ile His Cys Asp Asp Tyr Gly Val Glu Asn Phe
100 105 110
Asp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 165
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F027400160

<400> 165
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Gly Phe Gly Val Asn

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

<210> 166
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 166
Val Thr Val Lys Ser
1 5

<210> 167
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 167
Val Thr Val Gln Ser

1 5

<210> 168
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 168
Val Lys Val Lys Ser
1 5

<210> 169
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 169
Val Lys Val Gln Ser
1 5

<210> 170
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 170

Val Gln Val Lys Ser
1 5

<210> 171
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 171
Val Gln Val Gln Ser
1 5

<210> 172
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 172
Val Thr Val Lys Ser Ala
1 5

<210> 173
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 173
Val Thr Val Gln Ser Ala
1 5

<210> 174
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 174
Val Lys Val Lys Ser Ala
1 5

<210> 175
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 175
Val Lys Val Gln Ser Ala
1 5

<210> 176
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 176
Val Gln Val Lys Ser Ala
1 5

<210> 177
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-末端

<400> 177
Val Gln Val Gln Ser Ala
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項1】　一種多肽，其包含至少四個免疫球蛋白單可變域（immunoglobulin single variable domain，ISVD），其中所述ISVD各包含三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3），並且其中：

a) 第一 ISVD 與 IL-13 特異性地結合並且包含

i. CDR1，其為 SEQ ID NO: 7 的胺基酸序列；

ii. CDR2，其為 SEQ ID NO: 12 的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為 SEQ ID NO: 17 的胺基酸序列；

b) 第二 ISVD 與 IL-13 特異性地結合並且包含

iv. CDR1，其為 SEQ ID NO: 8 的胺基酸序列；

v. CDR2，其為 SEQ ID NO: 13 的胺基酸序列；和

vi. CDR3，其為 SEQ ID NO: 18 的胺基酸序列；

c) 第三 ISVD 與 TSLP 特異性地結合並且包含

vii. CDR1，其為 SEQ ID NO: 9 的胺基酸序列；

viii. CDR2，其為 SEQ ID NO: 14 的胺基酸序列；和

ix. CDR3，其為 SEQ ID NO: 19 的胺基酸序列；並且

d) 第四 ISVD 與 TSLP 特異性地結合並且包含

x. CDR1，其為 SEQ ID NO: 11 的胺基酸序列；

xi. CDR2，其為 SEQ ID NO: 16 的胺基酸序列；和

xii. CDR3，其為 SEQ ID NO: 21 的胺基酸序列，

其中所述 ISVD 的順序表示從所述多肽的 N-端至 C-端的彼此相對位置。

【請求項2】　如請求項1所述的多肽，其中：

a) 所述第一 ISVD 的胺基酸序列包含與 SEQ ID NO: 2 之超過 90%的序列同一性；

b) 所述第二 ISVD 的胺基酸序列包含與 SEQ ID NO: 3 之超過 90%的序列同一性；

c) 所述第三 ISVD 的胺基酸序列包含與 SEQ ID NO: 4 之超過 90%同一性的序列同一性；並且

d) 所述第四 ISVD 的胺基酸序列包含與 SEQ ID NO: 6 之超過 90%同一性的序列同一性。

【請求項3】 如請求項1或2所述的多肽，其中：

a) 所述第一 ISVD 包含 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列；

b) 所述第二 ISVD 包含 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列；

c) 所述第三 ISVD 包含 SEQ ID NO: 4 的胺基酸序列；並且

d) 所述第四 ISVD 包含 SEQ ID NO: 6 的胺基酸序列。

【請求項4】 如請求項1或2所述的多肽，其中所述多肽還包含一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元，其中與沒有所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元的相應多肽相比，所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元為所述多肽提供增加的半衰期。

【請求項5】 如請求項4所述的多肽，其中為所述多肽提供增加的半衰期的所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元選自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可與血清蛋白結合的結合單元、Fc部分和可與血清蛋白結合的小蛋白質或肽所組成之群組。

【請求項6】 如請求項4所述的多肽，其中為所述多肽提供增加的半衰期的所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元選自可與血清白蛋白或血清免疫球蛋白結合的結合單元所組成之群組。

【請求項7】 如請求項6所述的多肽，其中該血清白蛋白係人血清白蛋白以及該血清免疫球蛋白係IgG。

【請求項8】 如請求項6所述的多肽，其中為所述多肽提供增加的半衰期的所述結合單元是可與人血清白蛋白結合的ISVD。

【請求項9】　如請求項8所述的多肽，其中所述與人血清白蛋白結合的ISVD包含

i. CDR1，其為 SEQ ID NO: 10 的胺基酸序列或與 SEQ ID NO: 10 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；
i. CDR2，其為 SEQ ID NO: 15 的胺基酸序列或與 SEQ ID NO: 15 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；和
iii. CDR3，其為 SEQ ID NO: 20 的胺基酸序列或與 SEQ ID NO: 20 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列。

【請求項10】　如請求項8所述的多肽，其中所述與人血清白蛋白結合的ISVD包含為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列的CDR1，為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 20的胺基酸序列的CDR3。

【請求項11】　如請求項8所述的多肽，其中所述與人血清白蛋白結合的ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 5之超過90%的序列同一性。

【請求項12】　如請求項11所述的多肽，其中所述與人血清白蛋白結合的ISVD包含SEQ ID NO: 5的胺基酸序列。

【請求項13】　如請求項1或2所述的多肽，其中所述多肽的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 1之超過90%的序列同一性。

【請求項14】　如請求項1或2所述的多肽，其中所述多肽包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列或由其組成。

【請求項15】　一種核酸，其包含編碼如請求項1至14中任一項所述的多肽的核苷酸序列。

【請求項16】　一種組合物，其包含至少一種如請求項1至14中任一項所述的多肽、或如請求項15所述的核酸。

【請求項17】　如請求項16所述的組合物，其中該組合物係醫藥組合物，所述醫藥組合物還包含至少一種醫藥上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑和/或佐劑。

【請求項18】　如請求項16或17所述的組合物，其包含一種或多種另外的藥學活性多肽和/或化合物。

【請求項19】　一種如請求項1至14中任一項所述的多肽或如請求項16至18中任一項所述的組合物在製備用於治療發炎性疾病的醫藥組合物中的用途。

【請求項20】　如請求項19所述的用途，其中該發炎性疾病係第2型發炎性疾病。

【請求項21】　如請求項20所述的用途，其中所述第2型發炎性疾病選自氣喘和異位性皮膚炎。

【請求項22】　如請求項1或2所述的多肽，其中所述的4個ISVD係經由一或多個肽連接子所連接。

【請求項23】　如請求項4所述的多肽，其中所述一或多個其他基團、殘基、部分或結合單元係經由一或多個肽連接子所連接。

【發明圖式】

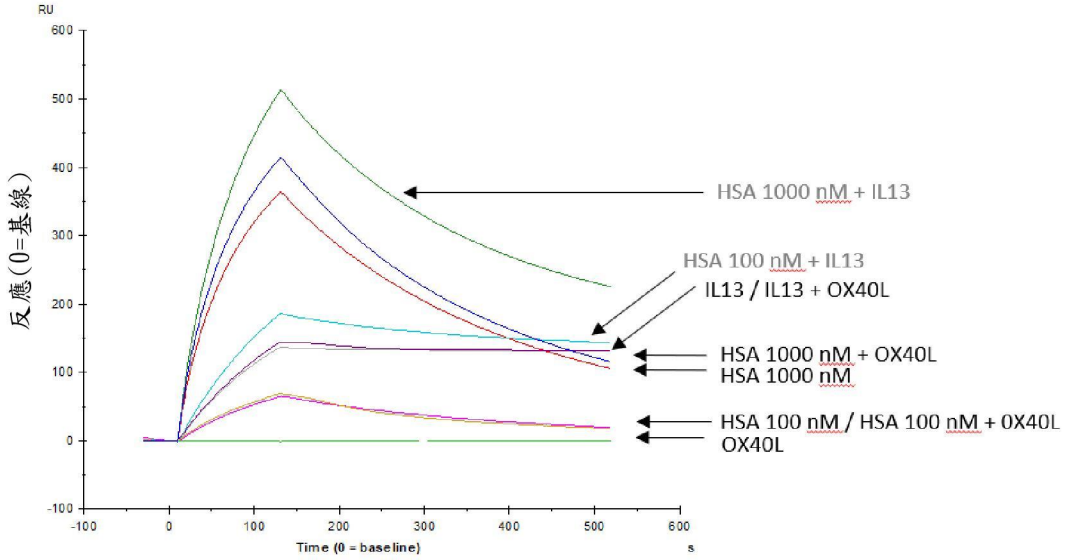

RU
600
500
400
300
200
100
0
-100
反應(0=基線)
-100
0
100
200
300
400
500
600
Time (0 = baseline)
s
HSA 1000 nM + IL13
HSA 100 nM + IL13
IL13 / IL13 + OX40L
HSA 1000 nM + OX40L
HSA 1000 nM
HSA 100 nM / HSA 100 nM + 0X40L
OX40L

圖1

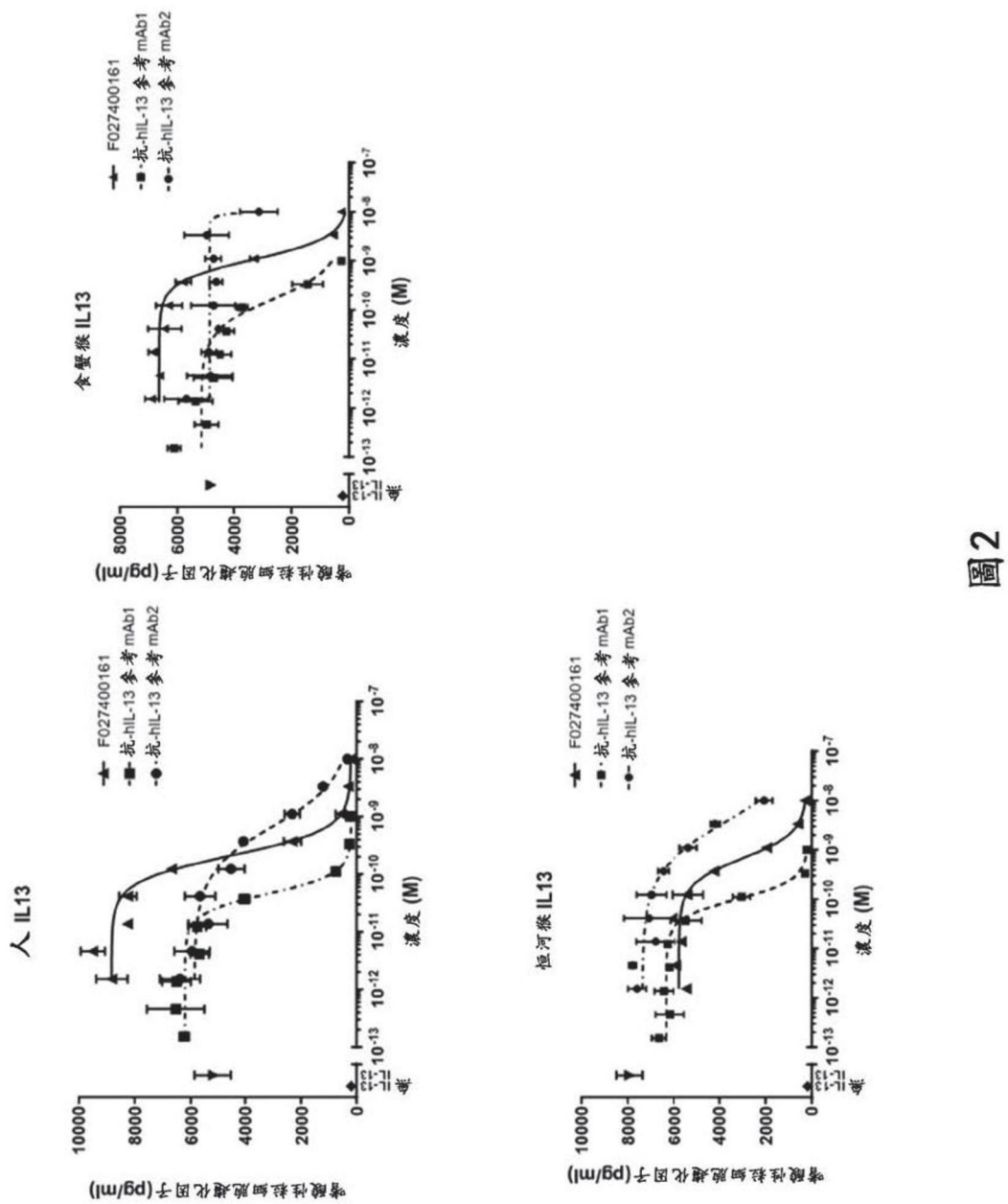

人 IL13
食蟹猴 IL13
恒河猴 IL13
F027400161
抗-hIL-13 參考 mAb1
抗-hIL-13 參考 mAb2
嗜酸性粒細胞趨化因子 (pg/ml)
濃度 (M)
0
2000
4000
6000
8000
10000
10^{-13}
10^{-12}
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}

圖 2

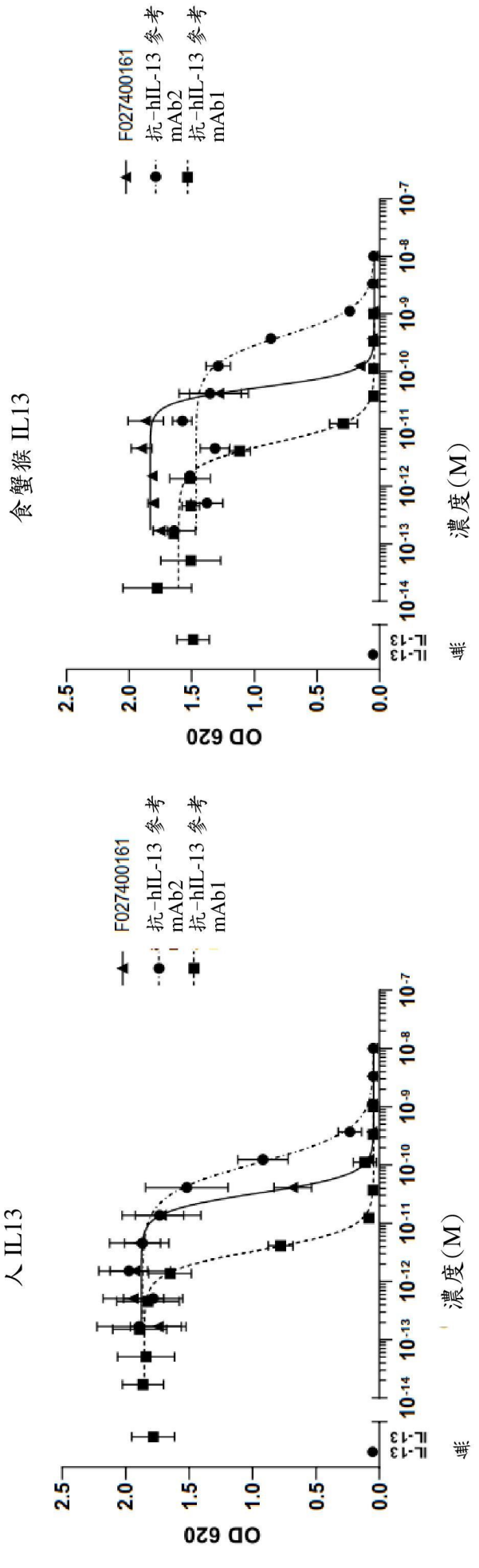

食蟹猴 IL13
OD 620
濃度(M)
無
F-13
F027400161
抗-hIL-13 參考 mAb2
抗-hIL-13 參考 mAb1
人 IL13
OD 620
濃度(M)
無
F-13
F027400161
抗-hIL-13 參考 mAb2
抗-hIL-13 參考 mAb1

圖3

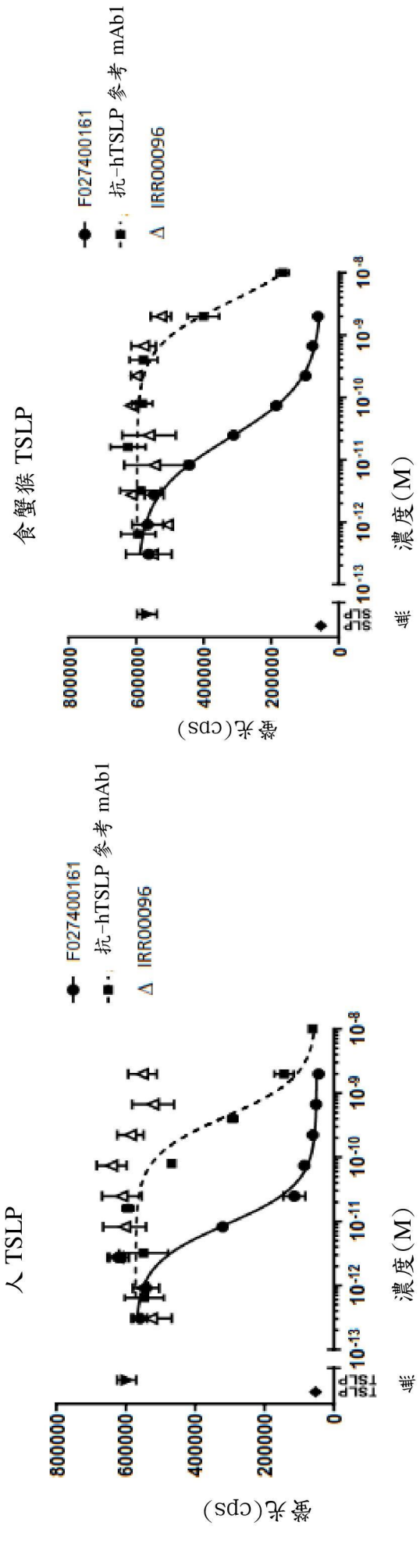

人 TSLP
食蟹猴 TSLP
F027400161
抗-hTSLP 參考 mAb1
IRR00096
螢光(cps)
濃度(M)
0
200000
400000
600000
800000
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8

圖 4

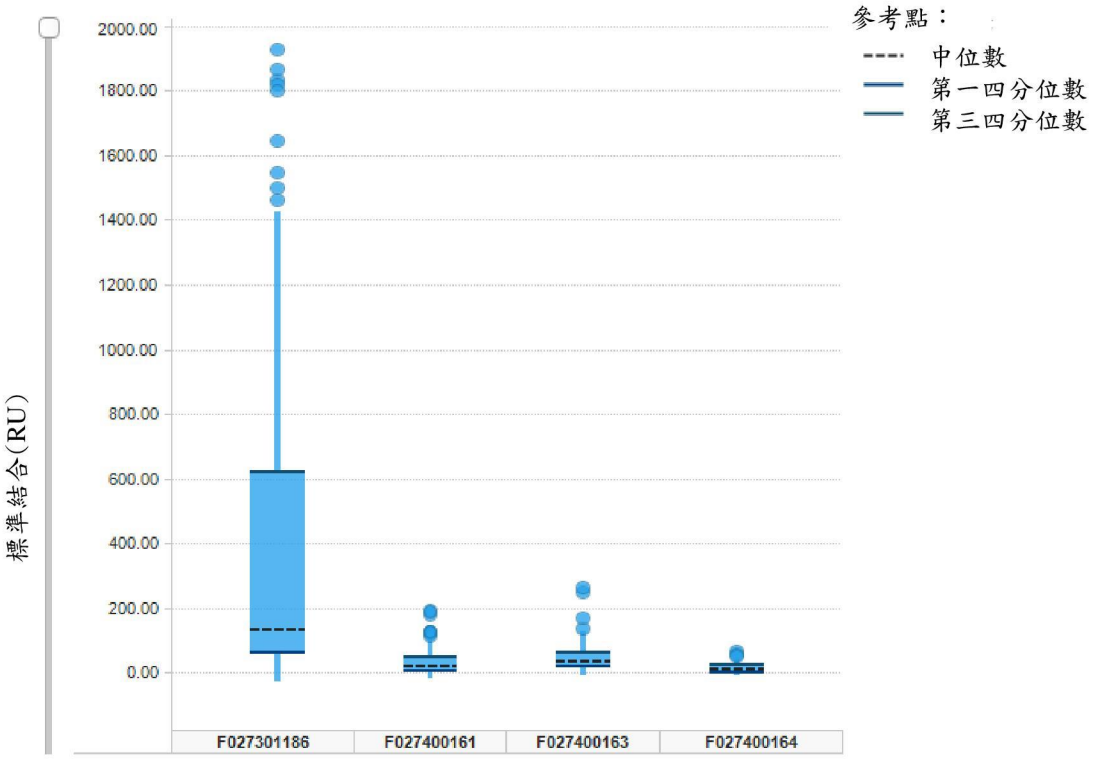
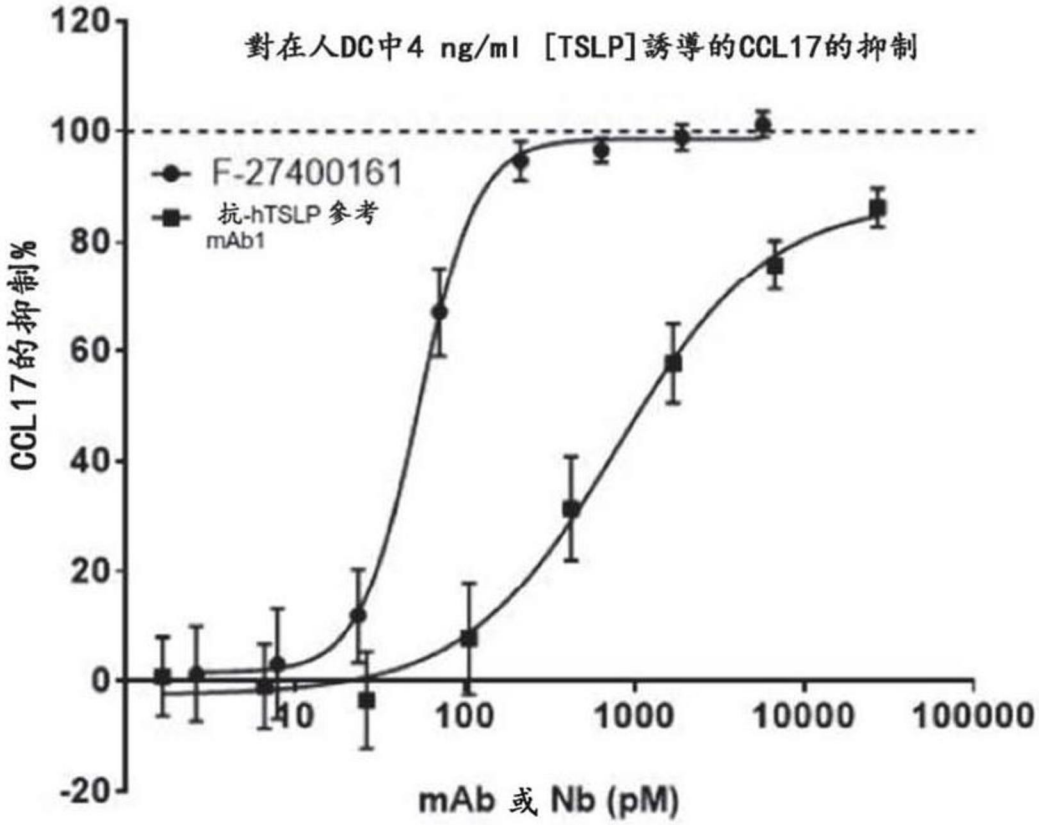
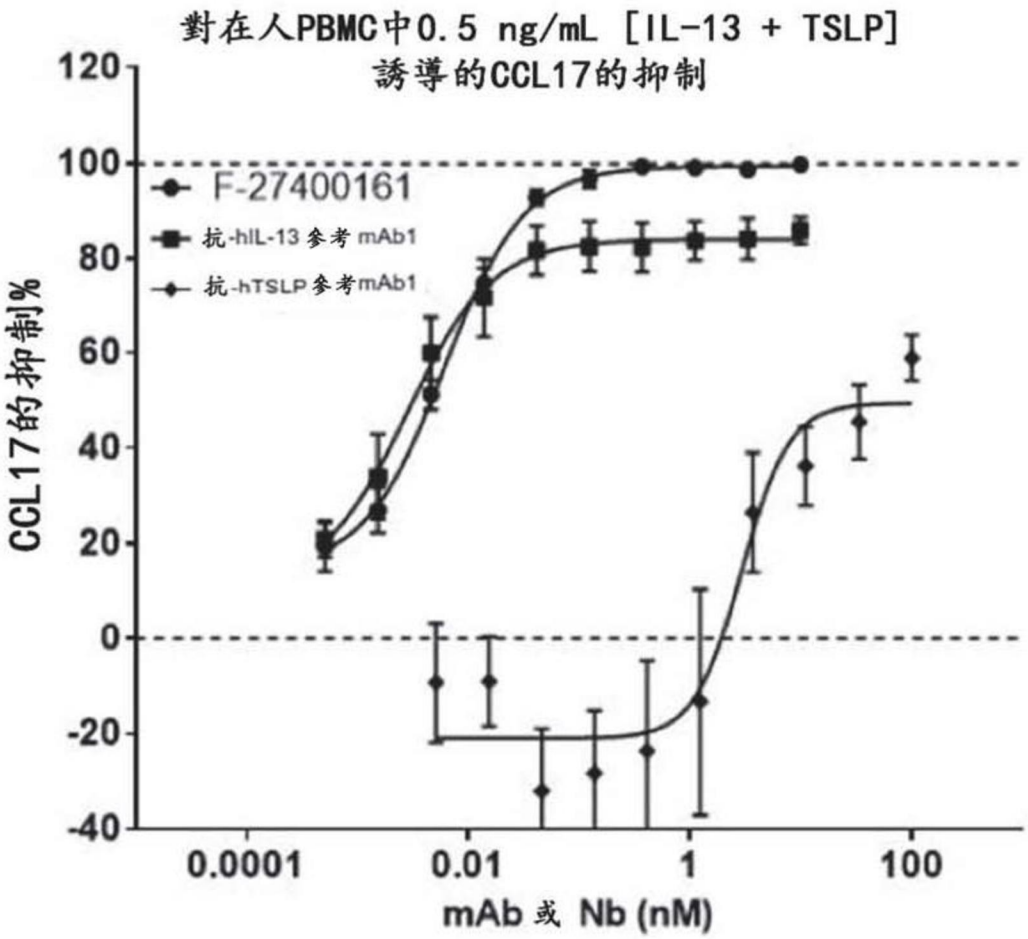

參考點：
中位數
第一四分位數
第三四分位數
標準結合(RU)
2000.00
1800.00
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
F027301186
F027400161
F027400163
F027400164

圖5



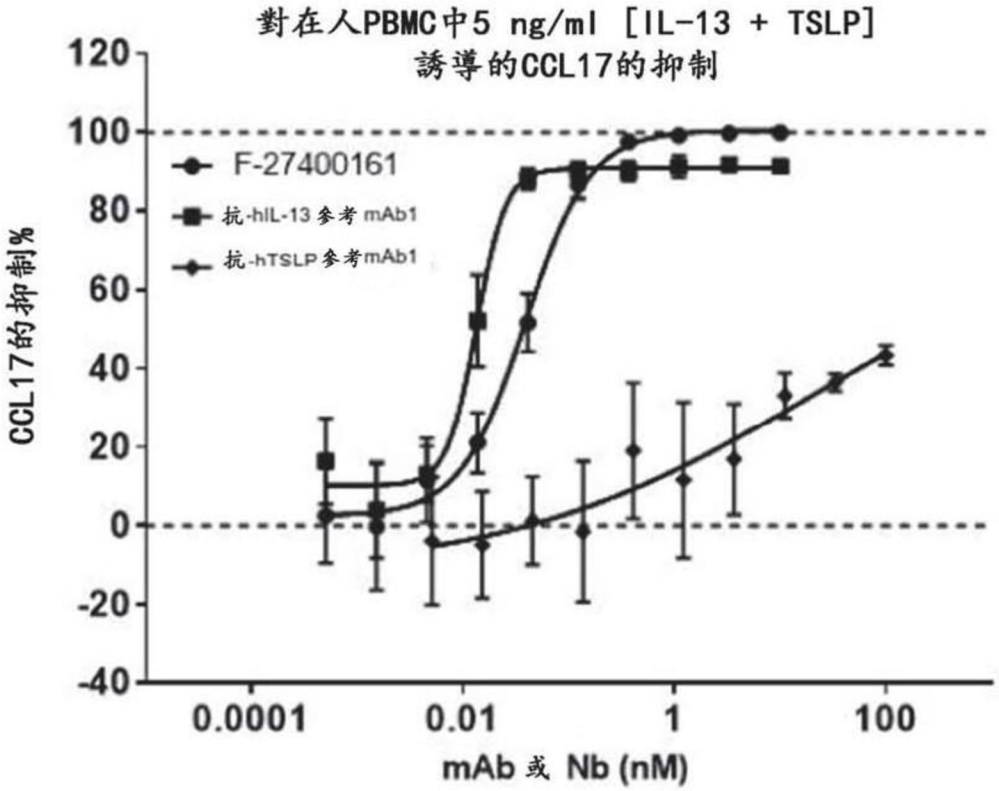
	F-27400161	抗-hTSLP參考 mAb1
最低	1.563	-2.522
最高	98.68	87.67
LogIC50	1.726	2.899
希爾斜率	2.545	0.9674
IC50	53.26	793.4
跨度	97.12	90.2

圖6



	F-27400161	抗-hIL-13 參考 mAb1	抗-hTSLP 參考 mAb1
最低	14.65	11.3	-20.99
最高	99.46	84.17	49.42
LogIC50	-2.217	-2.549	0.4672
希爾斜率	1.208	1.134	2.022
IC50	0.006071	0.002826	2.932
跨度	84.81	72.87	70.41

圖7



	F-27400161	抗-hIL-13 參考 mAb1	抗-hTSLP 參考 mAb1
最低	2.531	10.23	-11.94
最高	100.6	90.98	77.64
LogIC50	-1.412	-1.873	1.279
希爾斜率	1.414	3.084	0.3043
IC50	0.03874	0.01339	19
跨度	98.04	80.75	89.59

圖8

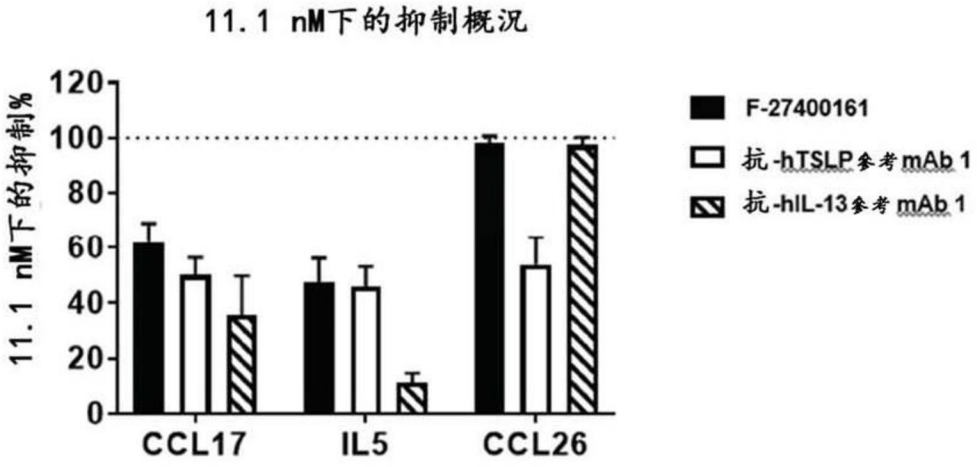

11.1 nM下的抑制概況
11.1 nM下的抑制%
120
100
80
60
40
20
0
CCL17
IL5
CCL26
F-27400161
抗-hTSLP參考mAb 1
抗-hIL-13參考mAb 1

圖9

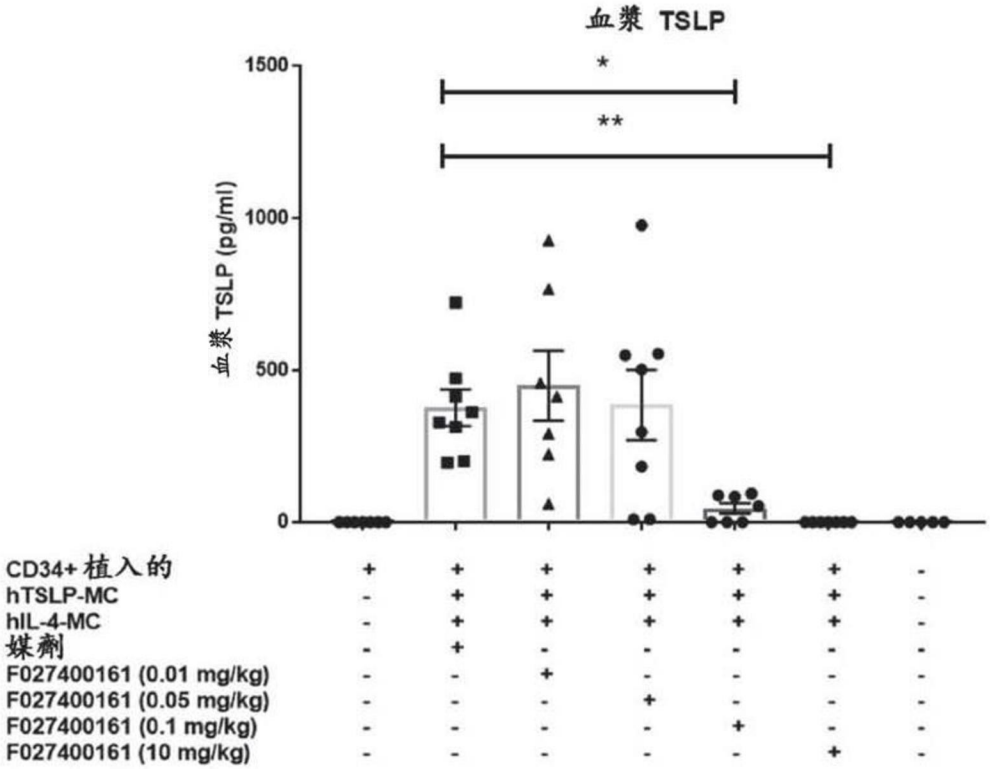

血漿 TSLP
血漿 TSLP (pg/ml)
1500
1000
500
0
*
**
CD34+植入的 + + + + + + -
hTSLP-MC - + + + + + -
hIL-4-MC - + + + + + -
媒劑 - + - - - - -
F027400161 (0.01 mg/kg) - - + - - - -
F027400161 (0.05 mg/kg) - - - + - - -
F027400161 (0.1 mg/kg) - - - - + - -
F027400161 (10 mg/kg) - - - - - + -

圖10

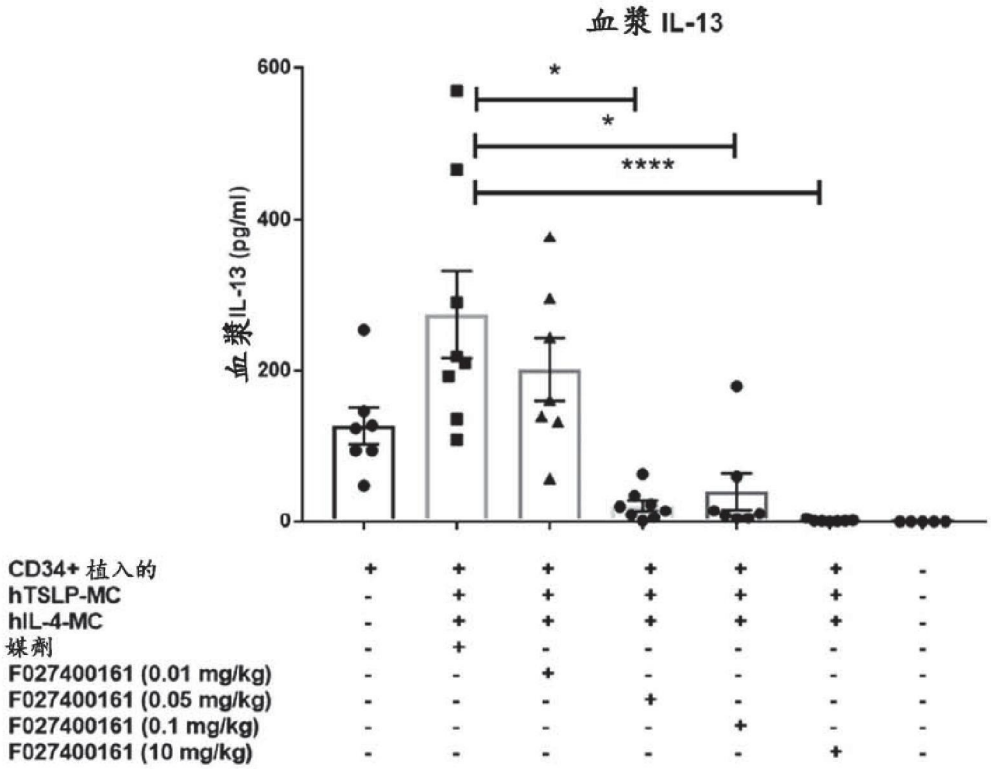

血漿 IL-13
600
400
200
0
血漿IL-13 (pg/ml)
*
*
****
CD34+ 植入的 + + + + + + -
hTSLP-MC - + + + + + -
hIL-4-MC - + + + + + -
媒劑 - + - - - - -
F027400161 (0.01 mg/kg) - - + - - - -
F027400161 (0.05 mg/kg) - - - + - - -
F027400161 (0.1 mg/kg) - - - - + - -
F027400161 (10 mg/kg) - - - - - + -

圖11

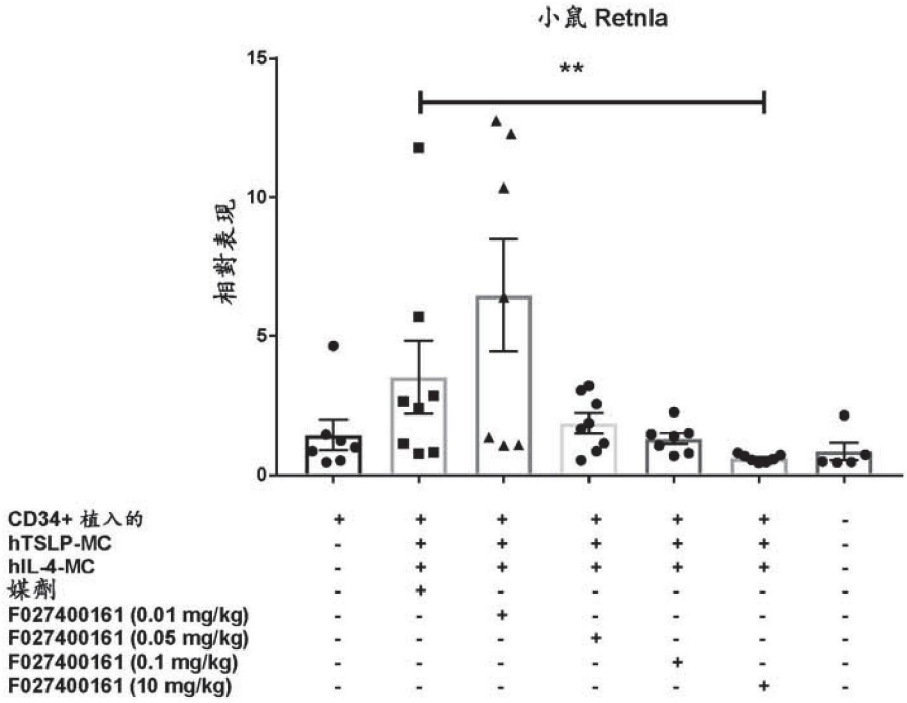

小鼠 Retnla
**
相對表現
15
10
5
0
CD34+ 植入的 + + + + + + -
hTSLP-MC - + + + + + -
hIL-4-MC - + + + + + -
媒劑 - + - - - - -
F027400161 (0.01 mg/kg) - - + - - - -
F027400161 (0.05 mg/kg) - - - + - - -
F027400161 (0.1 mg/kg) - - - - + - -
F027400161 (10 mg/kg) - - - - - + -

圖12

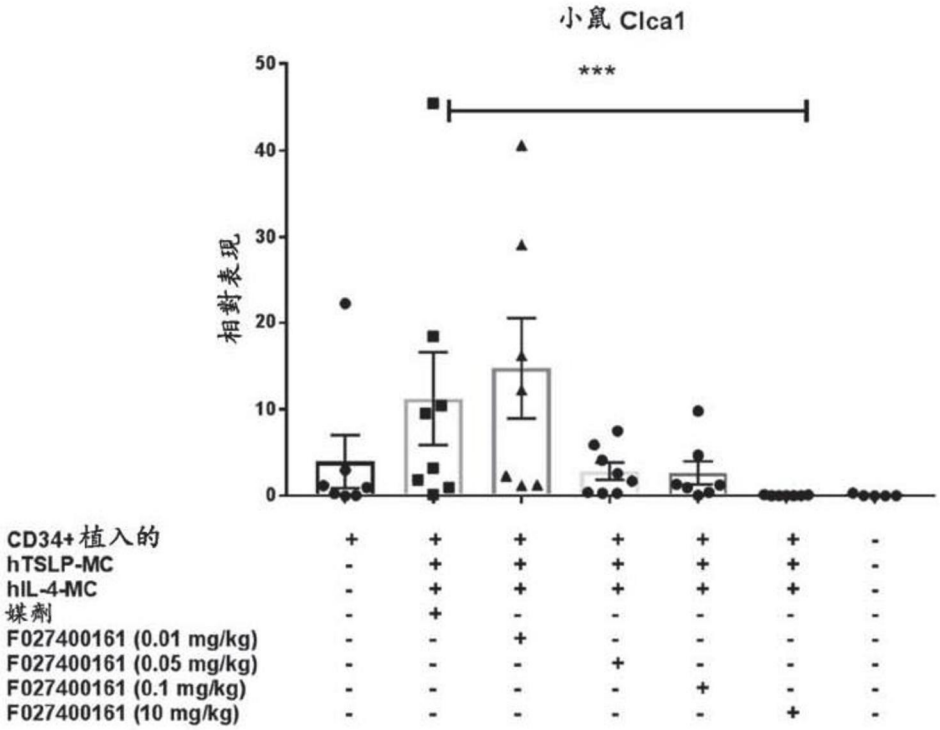

小鼠 Clca1
***
相對表現
50
40
30
20
10
0
CD34+植入的 + + + + + + -
hTSLP-MC - + + + + + -
hIL-4-MC - + + + + + -
媒劑 - + - - - - -
F027400161 (0.01 mg/kg) - - + - - - -
F027400161 (0.05 mg/kg) - - - + - - -
F027400161 (0.1 mg/kg) - - - - + - -
F027400161 (10 mg/kg) - - - - - + -

圖13


F027400161
4B02
35GS
4B06
9GS
501A02
9GS
ALB 23002
9GS
529F10
α-IL-13
α-IL-13
α-TSLP
α-白蛋白
α-TSLP

圖14