



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103232540 A

(43) 申请公布日 2013.08.07

(21) 申请号 201310062565.8 *A61P 37/02* (2006.01)

(22) 申请日 2007.02.01 *A61P 37/08* (2006.01)

(30) 优先权数据 *A61P 27/02* (2006.01)

2006900456 2006.02.01 AU *A61P 37/06* (2006.01)

60/817,507 2006.06.28 US *A61P 35/00* (2006.01)

(62) 分案原申请数据 *A61P 35/02* (2006.01)

200780008370.8 2007.02.01 *A61P 35/04* (2006.01)

(71) 申请人 赛法隆澳大利亚控股有限公司 *A61P 11/00* (2006.01)

地址 澳大利亚新南威尔士 *A61P 1/00* (2006.01)

(72) 发明人 A·G·多伊尔 B·P·伍尔文 *A61P 9/00* (2006.01)

I·M·汤姆林森 J·A·李 *A61P 9/04* (2006.01)

P·A·詹宁斯 *A61P 19/08* (2006.01)

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专 *A61P 25/00* (2006.01)

利商标事务所 11038 *A61P 25/28* (2006.01)

代理人 傅宇昌 *A61P 1/16* (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(51) Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书27页
序列表18页 附图13页

(54) 发明名称
结构域抗体构建体

(57) 摘要

本发明提供了与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体,所述构建体包含:(a) 与人 TNF- α 结合的结构域抗体(dAb);(b) 经修饰的铰链区序列;(c) 人或灵长类重链恒定区序列,其具有不多于20个残基的截短的 C_H1 结构域,其中所述经修饰的铰链区序列包含缺失或者至少一个半胱氨酸残基的单氨基酸置换,所述半胱氨酸残基通常促进重和轻抗体链间二硫键的形成。

1. 与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体,所述构建体包含:
 - (a) 与人 TNF- α 结合的结构域抗体(dAb);
 - (b) 经修饰的铰链区序列;
 - (c) 人或灵长类重链恒定区序列,其具有不多于 20 个残基的截短的 C_H1 结构域,

其中所述经修饰的铰链区序列包含缺失或者至少一个半胱氨酸残基的单氨基酸置换,所述半胱氨酸残基通常促进重和轻抗体链间二硫键的形成。
2. 权利要求 1 的结构域抗体构建体,其中所述具有截短的 C_H1 结构域的人或灵长类重链恒定区序列包含不多于 10 个残基。
3. 权利要求 2 的结构域抗体构建体,其中所述具有截短的 C_H1 结构域的人或灵长类重链恒定区序列包含不多于 5 个残基。
4. 权利要求 3 的结构域抗体构建体,其中所述具有截短的 C_H1 结构域的人或灵长类重链恒定区序列包含不多于单个残基。
5. 权利要求 1 的结构域抗体构建体,其中 C_H1 结构域和铰链区的序列为 XEPKSZDKTHTCPPCPA (SEQ ID No:64),其中 X 为缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸,和 Z 不存在或为除半胱氨酸以外的其他氨基酸。
6. 权利要求 5 的结构域抗体构建体,其中 X 为缬氨酸,和 Z 为丝氨酸。
7. 权利要求 1 至 6 中任一项的结构域抗体构建体,其中所述 dAb 包含免疫球蛋白重链或轻链可变结构域,其中所述可变结构域包含至少一个具有来源于新世界灵长类的序列的互补决定区(CDR),其中所述 CDR 选自 AATKLQS (SEQ ID No:1)、EASSLQS (SEQ ID No:2)、EASKLQS (SEQ ID No:3)和 SASNLET (SEQ ID No:4)。
8. 权利要求 7 的结构域抗体构建体,其中所述 CDR 为 CDR2。
9. 权利要求 1 的结构域抗体构建体,其中所述结构域抗体具有选自下列的序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No:7);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLT I SSLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No:8);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No:9);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No:10);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKPPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No:52);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No:53);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLVPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No:54);和

与这些序列之一至少 95% 同一的序列。
10. 权利要求 1 的结构域抗体构建体,其中用丝氨酸残基置换在铰链区内的半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基通常促进重和轻抗体链间二硫键的形成。

11. 权利要求 1 的结构域抗体构建体,其中所述铰链区包含序列 EPKSSDKTHTCPPCPA (SEQ ID No:12)。

12. 权利要求 1 的结构域抗体,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID No:11 所示序列至少 60% 同一。

13. 与人 TNF- α 结合的二聚结构域抗体构建体,其中该二聚体由两个权利要求 1 至 12 中任一项的结构域抗体构建体组成。

14. 权利要求 13 的二聚结构域抗体构建体,其中所述二聚结构域抗体构建体是同二聚体。

15. 权利要求 14 的二聚结构域抗体构建体,其中组成同二聚体的所述结构域抗体构建体包含与 SEQ ID No:11 所示序列至少 60% 同一的氨基酸序列。

16. 分离的核酸分子,其编码权利要求 1 至 12 中任一项的结构域抗体构建体。

17. 分离的核酸分子,其包含编码与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体的核酸序列,其中所述核酸序列与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示序列至少 60% 同一。

18. 药物组合物,其包含有效量的权利要求 1 至 12 中任一项的结构域抗体构建体,以及药学上可接受的载体或稀释剂。

19. 药物组合物,其包含有效量的权利要求 13 的二聚结构域抗体构建体,以及药学上可接受的载体或稀释剂。

20. 权利要求 1 至 12 中任一项的结构域抗体构建体在制备用于检测样品中的人 TNF- α 的试剂中的用途。

21. 权利要求 20 的用途,其中所述样品为生物样品。

22. 权利要求 18 或权利要求 19 的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于在人受试者中治疗特征在于人 TNF- α 活性的病症。

23. 权利要求 22 的用途,其中所述特征在于人 TNF- α 活性的病症选自炎症,炎性疾病,脓毒症,包括败血症性休克、内毒素性休克、革兰氏阴性脓毒症和中毒性休克综合征;自身免疫性疾病,包括类风湿性关节炎、幼年关节炎、类风湿性脊椎炎、强直性脊椎炎、舍格伦综合征、骨关节炎和痛风性关节炎、过敏症、多发性硬化症、自身免疫性糖尿病、自身免疫性葡萄膜炎、银屑病、类天疱疮以及肾病综合征;眼的炎性病况,包括黄斑变性、葡萄膜炎、贝赫切特病;感染性疾病,包括由于感染和感染后继发的恶病质所引起的发热和肌痛;移植物抗宿主病;肿瘤生长或转移,恶性血液病;肺部病症,包括哮喘、成人呼吸窘迫综合征、休克肺、慢性肺部炎性疾病、肺结节病、肺纤维化和矽肺;炎症性肠病,包括克罗恩病和溃疡性结肠炎;心脏病症,充血性心力衰竭;血管病症,包括韦格纳病、巨细胞动脉炎;炎症性骨病;中枢神经系统病症,例如阿尔茨海默病;周围神经系统病症,例如坐骨神经痛;肝炎,凝血障碍,烧伤,再灌注损伤,子宫内膜异位症,瘢痕瘤形成,和瘢痕组织形成。

24. 权利要求 22 的用途,其中所述特征在于人 TNF- α 活性的病症为血管生成相关的眼病症。

25. 权利要求 24 的用途,其中所述血管生成相关的眼病症为年龄相关性黄斑变性。

结构域抗体构建体

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 2 月 1 日、申请号为 200780008370.8、发明名称为“结构域抗体构建体”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及可用于人类治疗的结构域抗体构建体。更具体而言,本发明涉及与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体以及其在治疗特征在于 TNF- α 活性的病症中的用途。

[0003] 发明背景

[0004] 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是参与介导休克和多种人类疾病和病症的病理生理学的一种细胞因子,所述人类疾病和病症包括脓毒症、感染、自身免疫性疾病例如类风湿性关节炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎和其它肠病况、银屑病、中毒性休克、移植排斥以及移植物抗宿主病。TNF- α 主要由激活的巨噬细胞和 T 淋巴细胞产生,但在急性炎症反应过程中也由嗜中性粒细胞、内皮细胞、角质形成细胞和成纤维细胞产生。

[0005] 由于其在炎症中的作用,在减轻炎症病症的症状的努力中, TNF- α 已作为重要的用于抑制的靶标而显露出来。已追求了多种为了疾病的临床治疗而抑制 TNF- α 的方法,特别是包括可溶性 TNF- α 受体和特异于 TNF- α 的抗体的用途。

[0006] 结构域抗体

[0007] 结构域抗体(dAb)是抗体的最小功能性结合单元,并且相应于抗体的重链可变区(V_H)或轻链可变区(V_L)。结构域抗体具有约 13kDa 的分子量,或小于完整抗体大小的十分之一。

[0008] 与常规抗体不同,结构域抗体在细菌、酵母和哺乳动物系统中良好表达。它们的小尺寸允许更高的摩尔量/克产物,从而提供了效力/毫克剂量的显著增加。此外,dAb 可以用作构建部件,以制备治疗产物例如多重靶向性的包含 dAb 的分子,其中两个或更多个 dAb 结合至两个或更多个不同的分子靶,或者可以将 dAb 合并入为肺或口服施用而设计的结构中。

[0009] 本发明者现在已设计出一种新的包含免疫球蛋白可变结构域的结构域抗体构建体,所述可变结构域连接至包括有截短的 C_H1 结构域的恒定区。推测包含恒定区有助于延长通常具有短的持续时间的 dAb 的体内半衰期。

[0010] 新世界灵长类免疫球蛋白

[0011] 进化上遥远的灵长类,例如新世界灵长类,足够类似于人以具有类似于人抗体的抗体,从而使得当衍生自此类灵长类的抗体被引入人中时,宿主不产生抗抗体免疫应答。新世界灵长类(广鼻猴下目(Platyrrhini))包含至少 53 个种,其通常分成 2 个科:猴科(Callithricidae)和悬猴科(Cebidae)。猴科由猴和狨组成。悬猴科包括松鼠猴、青猴、蜘蛛猴、绒毛猴、悬猴、夜或梟猴和吼猴。

[0012] 先前的研究已表征了表达的普通猴(Callithrix jacchus)的免疫球蛋白重链文库(von Budingen H-C等人,Characterization of the expressed immunoglobulin IGHV repertoire in the New World marmoset Callithrix jacchus.Immunogenetics;53:557-

563(2001))。鉴定了6个IGHV亚群,其显示了与它们的人IGHV对应物的高度序列相似性。当与互补决定区(CDR)相比较时,构架区是更保守的,其中最高程度的可变性位于CDR3中。普通猴与人IGHV序列之间的相似性程度小于旧世界灵长类与人之间的相似性程度。

[0013] 发明概述

[0014] 第一方面,本发明提供了与人TNF- α 结合的结构域抗体构建体,所述构建体包含:

[0015] (a) 与人TNF- α 结合的结构域抗体(dAb);

[0016] (b) 经修饰的铰链区序列;

[0017] (c) 人或灵长类重链恒定区序列,其具有不多于20个残基,更优选地不多于10个残基,更加优选地不多于5个残基和更为优选地单个残基的截短的C_H1结构域,

[0018] 其中所述经修饰的铰链区序列包含缺失或者半胱氨酸残基的单氨基酸置换,所述半胱氨酸残基通常促进重和轻抗体链间二硫键的形成。

[0019] 第二方面,本发明提供了编码本发明第一方面的结构域抗体构建体的核酸序列。

[0020] 第三方面,本发明提供了分离的核酸分子,其包含编码与人TNF- α 结合的结构域抗体构建体的序列,其中所述核酸分子包含与SEQ ID No:50或SEQ ID No:51所示的序列至少60%同一的,优选地至少80%同一的,更优选地至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的核酸序列,和最优选地包含SEQ ID No:50或SEQ ID No:51所示的序列。

[0021] 第四方面,本发明提供了分离的核酸分子,其包含编码与人TNF- α 结合的结构域抗体构建体的序列,其中所述核酸分子包含与SEQ ID No:50或SEQ ID No:51所示核苷酸序列在高严谨度条件下杂交的核酸序列。

[0022] 第五方面,本发明提供了药物组合物,其包含有效量的根据第一方面的结构域抗体构建体,以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0023] 第六方面,本发明提供了根据本发明第一方面的结构域抗体构建体在检测人TNF- α 的诊断应用中的用途。

[0024] 第七方面,本发明提供了用于在人受试者中治疗特征在于人TNF- α 活性的病症的方法,其包括给所述受试者施用根据本发明第二方面的药物组合物。

[0025] 附图简述

[0026] 图1显示了接纳体(acceptor)dAb的氨基酸序列(SEQ ID No:5)和核苷酸序列(SEQ ID No:6)。

[0027] 图2显示了本发明的结构域抗体构建体的优选实施方案的结构,作为(A)单体和(B)二聚体。

[0028] 图3显示了十一个(11)猴和六个(6)猕猴V_K基因区段的核苷酸和氨基酸序列。

[0029] 图4显示了接纳体dAb的氨基酸序列(SEQ ID No:5)和核苷酸序列(两条链)(SEQ ID No:6和SEQ ID No:68)。图中标示了KpnI和SmaI的限制性消化位点,其切出包含CDR2的区域。被除去的CDR2残基以下划线标示。

[0030] 图5显示了化合物170(SEQ ID No:11)在鼠类L929细胞生存力测定法中中和TNF- α 介导的细胞毒性的能力。

[0031] 图6显示了,化合物170(SEQ ID No:11)阻止TNF- α 与人p55或p75TNF受体的相互作用。

[0032] 图 7 显示了,表达跨膜 TNF- α 的 NS027D4 细胞(黑色实线)的化合物 170 (SEQ ID No:11) 染色显现出比不相关特异性同种型-匹配的对照(irrelevant specificity isotype-matched control) (灰色填充) 更高的荧光强度。

[0033] 图 8 显示了在细菌表达系统中产生的化合物 170 (SEQ ID No:11) 在 ELISA 中保持与 TNF- α 的结合。

[0034] 图 9 显示了相对于特异性对照人 IgG₁ 而言,化合物 170 (SEQ ID No:11) 在 TNF 介导的鼠关节炎模型中的功效。以每周一次的间隔对小鼠进行评分(关节炎得分) (A),和称重(B)。

[0035] 图 10 显示了对化合物 112 (SEQ ID No:59) 和化合物 170 (SEQ ID No:11) 的蛋白质表达的影响。

[0036] 图 11 显示了化合物 170 (SEQ ID No:11) 的非还原性 SDS PAGE 分析,所述化合物 170 来自 4 $\times$ 10L 先导细胞系(lead cell line)发酵并经蛋白 A 纯化。泳道 1= 测定法间对照;泳道 2= 分子量标准参照物;泳道 3= 空白;泳道 4= 经蛋白 A 纯化的在 10L 发酵 ID (运行 1) 中的化合物 170 (SEQ ID No:11);泳道 5= 经蛋白 A 纯化的在 10L 发酵 ID (运行 2) 中的化合物 170;泳道 6= 经蛋白 A 纯化的在 10L 发酵 ID (运行 3) 中的化合物 170;泳道 7= 经蛋白 A 纯化的在 10L 发酵 ID (运行 4) 中的化合物 170。

[0037] 图 12 显示了化合物 170 (SEQ ID No:11) 的还原性 SDS PAGE 分析,所述化合物 170 来自 4 $\times$ 10L 先导细胞系(lead cell line)发酵并经蛋白 A 纯化。泳道 1= 测定法间对照;泳道 2= 分子量标准参照物;泳道 3= 空白;泳道 4= 经蛋白 A 纯化的在 10L 发酵 ID (运行 1) 中的化合物 170 (SEQ ID No:11);泳道 5= 经蛋白 A 纯化的在 10L 发酵 ID (运行 2) 中的化合物 170;泳道 6= 经蛋白 A 纯化的在 10L 发酵 ID (运行 3) 中的化合物 170;泳道 7= 经蛋白 A 纯化的在 10L 发酵 ID (运行 4) 中的化合物 170。

[0038] 发明详述

[0039] 本发明者已产生了结构域抗体构建体,其与人 TNF- α 结合并且被推测当给人施用时展现出低免疫原性。该结构域抗体构建体包含相应于免疫球蛋白重链或轻链可变结构域(即结构域抗体(dAb))的部分、铰链区和相应于抗体重链恒定区的部分,但其中所述恒定区具有截短的 C_H1 结构域。

[0040] 推测包含恒定区部分能增加 dAb 的体内半衰期,以及提供效应子功能,所述效应子功能被认为是抗 TNF 抗体的抗炎机制的组成部分。

[0041] 第一方面,本发明提供了与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体,所述构建体包含:

[0042] (a) 与人 TNF- α 结合的结构域抗体(dAb);

[0043] (b) 经修饰的铰链区序列;

[0044] (c) 人或灵长类重链恒定区序列,其具有不多于 20 个残基,更优选地不多于 10 个残基,更加优选地不多于 5 个残基和更为优选地单个残基的截短的 C_H1 结构域,

[0045] 其中所述经修饰的铰链区序列包含缺失或者半胱氨酸残基的单氨基酸置换,所述半胱氨酸残基通常促进重和轻抗体链间二硫键的形成。

[0046] 在一个优选的实施方案中, C_H1 结构域和铰链区为 XEPKSZDKTHTCPPCPA (SEQ ID No:64),其中 X 为缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸,和 Z 不存在或为除半胱氨酸以外的其他氨基

酸。优选地, X 为缬氨酸, 和 Z 为丝氨酸。

[0047] 在本发明的一个优选实施方案中, 所述 dAb 包含免疫球蛋白重链或轻链可变结构域, 其中所述可变结构域包含至少一个具有来源于新世界灵长类的序列的互补决定区(CDR), 其中所述 CDR 选自 AATKLQS (SEQ ID No:1)、EASSLQS (SEQ ID No:2)、EASKLQS (SEQ ID No:3) 和 SASNLET (SEQ ID No:4)。

[0048] 在另一优选的实施方案中, 所述 CDR 为 CDR2。

[0049] 在一个优选的实施方案中, dAb 具有选自下列的序列:

[0050] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITGRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (化合物 145 ;SEQ ID No:7)

[0051] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (化合物 123 ;SEQ ID No:8)

[0052] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (化合物 100 ;SEQ ID No:9)

[0053] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (化合物 196 ;SEQ ID No:10)

[0054] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKPPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (化合物 134 ;SEQ ID No:52)

[0055] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGRSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (化合物 137 ;SEQ ID No:53)

[0056] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLVPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (化合物 121 ;SEQ ID No:54);和

[0057] 与这些序列之一至少 95%, 更优选地至少 96%、97%、98% 或 99% 同一的序列。

[0058] 在进一步的优选实施方案中, 所述恒定区包含 C_H2 和 C_H3 结构域, 其一起具有下列序列:

[0059] PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK ;(SEQ
ID NO :63)

[0060] 或者与其至少 60% 同一的, 优选地至少 80% 同一的, 更优选地至少 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一的氨基酸序列。

[0061] 在另一个优选的实施方案中, 所述结构域抗体构建体包含与 SEQ ID No:11 所示的序列至少 60% 同一的, 优选地至少 80% 同一的, 更优选地至少 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一的氨基酸序列, 和最优选地包含 SEQ ID No:11 所示的序列。

[0062] 此处所用的术语“与……结合”意指抗原被免疫球蛋白可变区以 1 μM 或更低的解离常数(K_d)进行结合, 如使用例如 BIAcore™ 表面等离子体共振系统和 BIAcore™ 动力学评估软件(例如, 2.1 版)通过表面等离子体共振分析所测量的。特异性结合相互作用的亲和力或解离常数(K_d)优选地为约 500nM 或更低, 更优选地约 300nM 或更低, 以及优选地至少 300nM 至 50pM, 200nM 至 50pM, 和更优选地至少 100nM 至 50pM, 75nM 至 50pM, 10nM 至 50pM。此处所用的术语“dAb”指与抗原特异性地结合的抗体单可变结构域(V_H 或 V_L)多肽。

[0063] 在本发明的一个进一步的优选实施方案中,结构域抗体构建体与另一个根据本发明的结构域抗体构建体形成同或异二聚体。二聚化能够增加抗原结合的强度,其中所述结合的强度与多个结合位点的结合亲和力总和有关。为了促进二聚体的形成,结构域抗体构建体的铰链区包含至少一个,和优选地两个半胱氨酸残基。

[0064] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,结构域抗体构建体和一个相同的结构域抗体构建体形成同二聚体。

[0065] 因此,在另一个方面中,本发明提供了与人 TNF- α 结合的二聚结构域抗体构建体,其中所述二聚体由两个根据本发明的结构域抗体构建体组成。

[0066] 优选的是,二聚结构域抗体构建体为同二聚体,并且特别优选的是,组成同二聚体的所述结构域抗体构建体包含与 SEQ ID No:11 所示的序列至少 60% 同一的,优选地至少 80% 同一的,更优选地至少 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一的氨基酸序列,和最优选地包含 SEQ ID No:11 所示的序列。

[0067] 第二方面,本发明提供了编码本发明第一方面的结构域抗体构建体的核酸序列。

[0068] 第三方面,本发明提供了分离的核酸分子,其包含编码与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体的序列,其中所述核酸分子包含与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示的序列至少 60% 同一的,优选地至少 80% 同一的,更优选地至少 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一的核酸序列,和最优选地包含 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示的序列。

[0069] 第四方面,本发明提供了分离的核酸分子,其包含编码与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体的序列,其中所述核酸分子包含与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示核苷酸序列在高严谨度条件下杂交的核酸序列。

[0070] 在确定两个多肽序列是否落在同一性百分比限度内时,本领域技术人员将会意识到必须进行并列比较或者序列的多重比对。在这样的比较或比对中,差异将在不相同的残基的定位中出现,这取决于用来进行比对的算法。在本文本中,提及两个或更多个氨基酸序列之间的“同一性百分比”或者“相似性”应被视为分别指所述序列之间相同的或相似的残基的数目,如用本领域技术人员已知的任何标准算法所测定的。例如,氨基酸序列同一性或相似性可以用 GAP 程序进行计算和 / 或用 PILEUP 程序(Computer Genetics Group, Inc., University Research Park, Madison, Wisconsin, United States of America)(Devereaux 等人,1984)进行比对。GAP 程序使用了 Needleman 和 Wunsch (1970) 的算法来使相同的 / 相似的残基的数目最大化并使在比对中序列缺口的数目和长度最小化。备选地或者另外地,当比较多于两个的氨基酸序列时,可以使用 Thompson 等人(1994) 的 Clustal W 程序。

[0071] 在确定两个核苷酸序列是否落在这些百分比限度内时,本领域技术人员将会意识到必须进行并列比较或者序列的多重比对。在这样的比较或比对中,差异可在不相同的残基的定位中出现,这取决于用来进行比对的算法。在本文本中,提及两个或更多个核苷酸序列之间的“同一性百分比”应被视为指所述序列之间相同的残基的数目,如用本领域技术人员已知的任何标准算法所测定的。例如,可以采用 BESTFIT 程序或者其它合适的程序(Computer Genetics Group, Inc., University Research Park, Madison, Wisconsin, United States of America)(Devereaux 等人, Nucl. Acids Res., 12:387-395, 1984) 来对核苷酸序列进行比对并计算它们的同一性。

[0072] 高严谨度优选涉及在 65℃ 和 $0.1 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC} = 0.15\text{M NaCl}$, 0.015M 柠檬酸钠, $\text{pH}7.0$) 的条件下的杂交。

[0073] 在一个实施方案中, 本发明还基于用于扩增新世界灵长类免疫球蛋白可变区基因的方法, 例如使用对于重链和轻链可变区基因家族特异的引物通过聚合酶链式反应 (PCR) 从提取自新世界灵长类淋巴细胞的核酸中进行扩增。例如, 关于重链和轻链可变结构域基因 (分别为 V_H 和 V_L) 的边界的信息可以用于设计 PCR 引物, 所述引物从经克隆的重链或轻链编码序列中扩增可变结构域, 所述重链或轻链编码序列编码已知与给定抗原相结合的抗体。然后, 将扩增的可变区单独地或者作为与另一本发明的人或灵长类恒定区多肽序列的融合物插入合适的表达载体中, 以产生本发明的结构域抗体构建体。合适的表达载体将是本领域技术人员所熟知的。

[0074] V_H 、 V_L 和恒定区结构域储库可以是天然存在的免疫球蛋白序列储库或合成的储库。天然存在的储库是例如从表达免疫球蛋白的细胞制备的储库, 所述表达免疫球蛋白的细胞从一种或多种灵长类中收获。此类储库可以是原初的 (**naïve**), 即从新生的表达免疫球蛋白的细胞制备, 或者是重排的, 即从例如成年灵长类 B 细胞制备。需要时, 随后对从天然储库或任何储库中鉴定的结合靶抗原的克隆实施诱变并进一步进行筛选, 以产生和选择具有改善的结合特征的变体。

[0075] 单个免疫球蛋白可变结构域的合成储库是通过向经克隆的可变结构域中人工引入多样性来制备的。

[0076] 可以通过例如噬菌体展示, 就所希望的结合特异性和功能行为来筛选 V_H 和 V_L 结构域储库。用于构建噬菌体展示文库和 λ 噬菌体表达文库的方法在本领域中是众所周知的。噬菌体展示技术已在本领域中进行了广泛描述, 以及用于产生和筛选这样的文库以及对它们的产物进行亲和力成熟的方法和化合物的例子可以在例如下列文献中找到: Barbas 等人, (1991) PNAS 88:7978-7982; Clarkson 等人, (1991) Nature 352:624-628; Dower 等人, PCT. 91/17271, 美国专利号 5,427,908, 美国专利号 5,580,717 和 EP527,839; Fuchs 等人, (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Garrard 等人, (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Garrard 等人, PCTW092/09690; Gram 等人, (1992) PNAS 89:3576-3580; Griffiths 等人, (1993) EMBO J 12:725-734; Griffiths 等人, 美国专利号 5,885,793 和 EP589,877; Hawkins 等人, (1992) J Mol Biol 226:889-896; Hay 等人, (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Hoogenboom 等人, (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; Huse 等人, (1989) Science 246:1275-1281; Knappik 等人, (2000) J Mol Biol 296:57-86; Knappik 等人, PCT W097/08320; Ladner 等人, 美国专利号 5,223,409, 5,403,484, 5,571,698, 5,837,500 和 EP436,597; McCafferty 等人, (1990) Nature 348:552-554; McCafferty 等人, PCT. W092/01047, 美国专利号 5,969,108 和 EP589,877; Salfeld 等人, PCT W097/29131, 美国专利申请号 20050004354; 和 Winter 等人, PCT W092/20791 和 EP368,684。

[0077] 表达 V_H 和 V_L 结构域储库的重组文库可以在微生物例如酵母或细菌的表面上进行表达 (参见 PCT 公开 W099/36569 和 98/49286)。

[0078] 本发明的结构域抗体构建体可以通过重组方法来产生, 包括从真核表达系统中产生, 所述真核表达系统包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞, 以及真菌表达系统和病毒编码的表达系统, 如此处所描述的或者本领域已知的。

[0079] 本发明的结构域抗体构建体可以用 S 抗体编码核酸来制备,以便提供转基因植物和培养的植物细胞(例如,但不限于,烟草和玉米),其在植物的某些部位中或者在由其培养出的细胞中产生这样的构建体。作为非限制性的例子,表达重组蛋白质的转基因烟草叶已被成功用于提供大量的重组蛋白质,例如,采用诱导型启动子(参见例如, Cramer 等人, Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 1999)和其中所引用的参考文献。此外,转基因玉米也已经用于以商业生产水平来表达哺乳动物蛋白质,其生物活性等价于在其他重组系统中生产的或者从天然来源中纯化的蛋白质(参见例如, Hood 等人, Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 1999 和其中所引用的参考文献)。也已从转基因植物种子(包括烟草种子和马铃薯块茎)中大量生产抗体,包括抗体片段例如单链抗体(scFv's)(参见例如, Conrad 等人, Plant Mol. Biol. 38:101-109, 1998 和其中所引用的参考文献)。因此,本发明的结构域抗体构建体也可以根据已知的方法用转基因植物来生产(也参见例如, Fischer 等人, Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 October, 1999; Ma & Hein., Trends Biotechnol. 13:522-71 1995; Ma 等人, Plant Physiol. 109:341-61 1995; Whitelam 等人, Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 1994; 和其中所引用的参考文献; 以上每一篇参考文献在此通过提及而整体合并入本文)。

[0080] 本发明的结构域抗体构建体包括天然纯化的产物、化学合成方法的产物和通过重组技术从真核宿主(包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生的产物。取决于在重组生产方法中所采用的宿主,本发明的抗体构建体可以是糖基化的或者非糖基化的,其中优选是糖基化的。这样的方法在许多标准的实验室手册中已有描述, Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor, N. Y. 1989, 第 17.37-17.42 节; Ausubel 等人, 编辑, Current Protocols in Molecular Biology 1987-1993, 第 10, 12, 13, 16, 18 和 20 章; Colligan 等人, Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N. Y. 1997-2001, Protein Science, 第 12-14 章, 所有文献在此通过提及而整体合并入本文。

[0081] 在一种表达系统中,在核糖体上展示重组肽/蛋白质文库(例如参见 Roberts, RW 和 Szostak, J. W. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:12297 - 123202 以及 PCT 公开号 W098/31700)。因此,另一个例子涉及 DNA 文库(例如,优选从经免疫的细胞制备的抗体或衍生物的 DNA 文库,但不限于此)的产生和体外转录,翻译该文库,从而使得蛋白质和“经免疫的”mRNA 停留在核糖体上,亲和力选择(例如通过与 RSP 结合), mRNA 分离,反向翻译和后续扩增(例如通过聚合酶链式反应或相关技术)。必要时可以偶联另外的选择和扩增循环,以通过在这种系统中引入体细胞突变或通过现有技术中已知的其他亲和力成熟方法来进行亲和力成熟。

[0082] 另一个例子考虑应用乳状液区室化技术(emulsion compartmentalisation technology)以产生本发明的结构域抗体。在乳状液区室化中,将体外和光学分选方法与在乳状液的油滴内的水相中翻译的蛋白质及其核苷酸编码序列的共区室化相组合(参见 PCT 公开号 W099/026711 和 W000/40712)。

[0083] CDR 序列可以得自几个来源,例如数据库,如国家生物技术信息中心(National Centre for Biotechnology Information)蛋白质和核苷酸数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov), The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest(www.kabat.org),

kabatdatabase.com),或 IMGT 数据库(www.imgt.cines.fr)。备选地,可以从 V_H 和 V_L 结构域储库预测 CDR 区(参见例如 Kabat EA 和 Wu TT, Attempts to locate complementarity determining residues in the variable positions of light and heavy chains. Ann. NY Acad. Sci. 190:382-393(1971))。CDR 序列可以是基因组 DNA 或 cDNA。

[0084] 存在许多方法可以把替代 CDR 嫁接到可变区序列中,并且这样的方法对于本领域技术人员将会是熟悉的。本发明的优选方法涉及经由引物指导的诱变来替换可变区(或 dAb)中的 CDR2。该方法由下述步骤组成:使编码所需突变的合成寡核苷酸与靶区域退火,其中它充当引物用于起始体外 DNA 合成;通过 DNA 聚合酶延伸寡核苷酸以产生携带所需突变的双链 DNA;和将该序列连接并克隆到合适的表达载体中。

[0085] 在本发明的优选实施方案中,将新世界灵长类的 CDR 序列嫁接到在人中具有低免疫原性的可变区序列中。

[0086] 术语“低免疫原性”是指结构域抗体构建体或其抗原结合部分在人中不产生这样的抗体应答,即所述抗体应答的量级足以减少以达到治疗效果来说足够的时间连续施用所述结构域抗体构建体的功效。

[0087] 优选地,其中嫁接入新世界灵长类 CDR 的可变区序列为图 1 中的“dAb 接纳体序列”(命名为化合物 128)。该 dAb 接纳体序列由 SEQ ID No:5 所示的氨基酸序列组成:

[0088] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASELQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No :5)。

[0089] 该序列由 SEQ ID No:6 所示的核苷酸序列编码:

[0090] GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCT CTG TCT GCA TCT GTA GGAGAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT GAT AGT TATTTA CAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATCTAT AGT GCA TCC GAG TTG CAA AGT CGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGCAC T GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGTCTG CAA CCTGAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG G TT GTG TGGCGT CCT TTTACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG (SEQ ID No :6)。

[0091] 在本发明的一个优选实施方案中,将新世界灵长类 CDR 序列 SASNLET (SEQ ID No:4) 嫁接入该可变区 dAb 接纳体序列中,以便替代该 dAb 接纳体序列的 CDR2 序列 (SASELQS; SEQ ID No:55),从而产生下面的 dAb (命名为化合物 145):

[0092] 化合物 145

[0093] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No :7)。

[0094] 因此,在一个优选的实施方案中,与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体的 dAb 包含 SEQ ID No:7 所示的氨基酸序列。

[0095] 结构域抗体构建体的可变区序列(dAb)可以进一步经历亲和力成熟以便改善其抗原结合特征,这在本发明的范围之内。这可能需要对结构域抗体构建体的 CDR1、CDR3 或构架区中的某些氨基酸残基进行修饰。

[0096] 例如,如“材料和方法”中所述的,对 SEQ ID No:7 进行亲和力成熟,并就 TNF- α 结合进行测试。在进一步的优选实施方案中,与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体的可变区(dAb)包含 SEQ ID No:8 或 SEQ ID No:9 的氨基酸序列。这些被分别命名为化合物 123 和

化合物 100, 并且它们的序列如下所示:

[0097] 化合物 123

[0098] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No :8)

[0099] 化合物 100

[0100] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLTYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No :9)。

[0101] 在一个特别优选的实施方案中, 与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体的可变区 (dAb) 包含 SEQ ID No:10 的氨基酸序列。这被命名为化合物 196, 并且序列提供在下面:

[0102] 化合物 196

[0103] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No :10)。

[0104] 本领域技术人员将会意识到, 结构域抗体构建体的恒定区序列可以来源于人或灵长类序列。灵长类序列可以是新世界灵长类或旧世界灵长类序列。合适的旧世界灵长类包括黑猩猩, 或其他类人猿例如大猩猩或猩猩, 它们由于其与人的紧密的系统发生接近性而与人恒定区序列共享高度的同源性。优选地, 所述恒定区来源于人抗体序列。这样的序列的例子可以在下列中找到: 国家生物技术信息中心蛋白质和核苷酸数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov), The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest (www.kabatdatabase.com), 或 IMGT 数据库 (www.imgt.cines.fr)。

[0105] 在设计本发明的结构域抗体构建体中, 本发明者截短了恒定 (Fc) 区的 C_H1 结构域。保留了最小数目的 C_H1 结构域残基以便为铰链区附近的结构域抗体构建体提供柔韧性。优选地, 保留 C_H1 结构域的至少 20 个 C- 末端氨基酸残基, 更优选地至少 10 个氨基酸, 更加优选地至少 5 个氨基酸, 更为优选地单个氨基酸残基。

[0106] 因此, 在优选的实施方案中, 结构域抗体构建体具有包含下列组分的形式: dAb — C 末端 C_H1 结构域残基 — 铰链区 — C_H2 结构域 — C_H3 结构域, 如图 2 中所示意性地图解说明的。

[0107] 在特别优选的实施方案中, 结构域抗体构建体具有 SEQ ID No:11 所示的氨基酸序列。这被命名为化合物 170。

[0108] 化合物 170

[0109] DIQMYQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKRVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGPP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID No :11)。

[0110] 天然存在的免疫球蛋白的铰链区包含半胱氨酸 (C) 侧链, 其促进重链 C_H1 结构域和轻链恒定区结构域之间二硫键的形成。由于所述构建体只包含单个可变结构域, 从而留下一个潜在具有活性的未配对的半胱氨酸残基, 因此将该半胱氨酸残基用阻止二硫键形成的氨基酸残基置换。具有未配对的半胱氨酸的可能后果可以包括由于构建体的聚集和错误折

叠所导致的降低的蛋白质表达。

[0111] 应当理解,来源于任何抗体类别的任何铰链区序列可适合在本发明中使用。不过,铰链区优选来自抗体亚类 IgG₁。优选地,所述铰链区基于 IgG₁ 铰链区的天然存在的序列,并且包含序列 EPKSSDKTHTCPPCPA (SEQ ID No:12)。在此序列中,通常存在于位置 5 处的 Cys 加下划线的 Ser 残基替代。

[0112] 优选地,C_H1 结构域的 C- 末端氨基酸残基来源于 IgG1。更优选地,C_H1 残基为缬氨酸(V) 残基或保守氨基酸置换例如亮氨酸(L) 或异亮氨酸(I)。该残基紧邻铰链区并且有助于增加铰链区附近构建体的灵柔韧性。

[0113] C_H2 和 C_H3 结构域的序列优选来源于 Swissprot 数据库登录号 P01857 :

[0114] PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID No :63)。

[0115] 所述结构域抗体构建体可以衍生化或与另一种功能分子连接。例如,结构域抗体构建体可以通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其他方式与一种或多种其他分子实体进行功能上连接,所述其他分子实体例如为另一种抗体、可检测的试剂、细胞毒剂、药物试剂和 / 或可以介导所述抗体或抗体结合部分与另一种分子(例如链霉抗生物素蛋白核心区或多组氨酸标签) 结合的蛋白质或肽。

[0116] 结构域抗体构建体可以与之衍生的有用的可检测试剂包括荧光化合物。示例性的荧光可检测试剂包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5- 二甲基胺 -1- 萘磺酰氯、藻红蛋白等。结构域抗体构建体还可以用可检测的酶进行衍生化,例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶等。当结构域抗体构建体用可检测的酶进行衍生化时,它通过添加该酶用于产生可检测的反应产物的另外试剂来检测。结构域抗体构建体还可以用生物素进行衍生化,并通过间接测量抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白结合进行检测。

[0117] 可以根据本发明的结构域抗体构建体与一种或多种分子连接,所述分子能够在体内提供增加的半衰期和针对降解的抗性而无活性(例如,结合亲和力) 的损失。这些分子可以通过连接体而连接至结构域抗体构建体,从而它们不干扰 / 在空间上阻碍抗原结合位点。这些加合分子包括如美国专利申请 20050271663 所述的针对内源分子的 dAb。通常,此类加合分子是体内天然存在并且抵抗经由内源性机制的降解或去除的多肽或多肽片段。增加半衰期的分子可以选自下列:

[0118] (a) 来自细胞外基质的蛋白质,例如,胶原,层粘连蛋白,整联蛋白和纤连蛋白;

[0119] (b) 在血液中发现的蛋白质,例如纤维蛋白,α-2 巨球蛋白,血清白蛋白,纤维蛋白原 A,纤维蛋白原 B,血清淀粉样蛋白 A,庚珠蛋白(heptaglobin),蛋白质,泛蛋白,子宫球蛋白(uteroglobulin),β-2 微球蛋白,纤溶酶原,溶菌酶,半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C,α-1- 抗胰蛋白酶和胰腺胰蛋白酶抑制剂;

[0120] (c) 免疫血清蛋白,例如 IgE, IgG, IgM;

[0121] (d) 转运蛋白,例如视黄醇结合蛋白,α-1 微球蛋白;

[0122] (e) 防卫素,例如 β- 防卫素 1,嗜中性粒细胞防卫素 1、2 和 3;

[0123] (f) 在血脑屏障处或在神经组织中发现的蛋白质,例如黑皮质素受体、髓磷脂、抗

坏血酸转运体；

[0124] (g) 转铁蛋白受体特异性配体 - 神经药物试剂融合蛋白(参见 US5977307); 脑毛细管内皮细胞受体, 转铁蛋白, 转铁蛋白受体, 胰岛素, 胰岛素样生长因子 1 (IGF1) 受体, 胰岛素样生长因子 2 (IGF2) 受体, 胰岛素受体；

[0125] (h) 定位于肾的蛋白质, 例如多囊蛋白, IV 型胶原, 有机阴离子运载体 K1, Heymann's 抗原；

[0126] (i) 定位于肝的蛋白质, 例如乙醇脱氢酶, G250；

[0127] (j) 凝血因子 X；

[0128] (k) α -1 抗胰蛋白酶；

[0129] (l) HNF1 α ；

[0130] (m) 定位于肺的蛋白质, 例如分泌组分(结合 IgA)；

[0131] (n) 定位于心脏的蛋白质, 例如 HSP27；

[0132] (o) 定位于皮肤的蛋白质, 例如角蛋白；

[0133] (p) 骨特异性蛋白质, 例如骨形态发生蛋白(BMPs), 例如 BMP-2、-4、-5、-6、-7 (也称为成骨蛋白(OP-1)) 和 -8 (OP-2)；

[0134] (q) 肿瘤特异性蛋白质, 例如人滋养层抗原, 赫赛汀(herceptin) 受体, 雌激素受体, 组织蛋白酶例如组织蛋白酶 B (在肝和脾中发现)；

[0135] (r) 疾病特异性蛋白质, 例如仅在活化的 T- 细胞上表达的抗原: 包括 LAG-3 (淋巴细胞活化基因); 护骨蛋白配体(OPGL), 参见 Kong YY 等人, Nature(1999) 402, 304-309; OX40 (TNF 受体家族的成员, 在活化的 T 细胞上表达, 以及为已知在产生人 T 细胞白血病病毒 I 型(HTLV-I) 的细胞中特异性地上调的唯一共刺激 T 细胞分子——参见 Pankow R 等人, J. Immunol. (2000) Jul 1; 165(1): 263-70); 金属蛋白酶(与关节炎 / 癌症相关), 包括 CG6512 果蝇, 人截瘫蛋白, 人 FtsH, 人 AFG3L2, 鼠类 ftsH; 血管生成生长因子, 包括酸性成纤维细胞生长因子(FGF-1), 碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2), 血管内皮生长因子 / 血管通透性因子(VEGF/VPF), 转化生长因子- α (TGF- α), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 血管生成素, 白介素-3 (IL-3), 白介素-8 (IL-8), 血小板衍生内皮生长因子(PD-ECGF), 胎盘生长因子(PlGF), 中期因子(midkine) 血小板衍生生长因子-BB (PDGF), CX3C 趋化分子(fractalkine)；

[0136] (s) 应激蛋白质(热休克蛋白); 和

[0137] (t) 参与 Fc 转运的蛋白质。

[0138] 本发明还扩展至聚乙二醇化的结构域抗体构建体, 其相对于非聚乙二醇化的抗体多肽而言提供了增加的半衰期和针对降解的抗性而无活性(例如, 结合亲和力) 的损失。

[0139] 结构域抗体构建体可以使用本领域已知的方法与聚合物分子(优选 PEG) 偶联, 所述聚合物分子对于达到增加的半衰期和降解抗性性质是有用的。可以在本发明中使用的聚合物部分可以是合成的或天然存在的, 并且包括但不限于, 直链或支化的聚亚烷基、聚亚烯基或聚氧化烯聚合物, 或分支或未分支的多糖例如同或杂多糖。可以在本发明中使用的合成聚合物的优选例子包括直链或支化的聚(乙二醇)(PEG)、聚(丙二醇) 或聚(乙醇醇), 及其衍生物或取代的形式。用于与结构域抗体构建体连接的特别优选的取代的聚合物包括取代的 PEG, 包括甲氧基(聚乙二醇)。除 PEG 外可以使用的, 或可以代替 PEG 使用的天然

存在的聚合物部分包括乳糖、直链淀粉、葡聚糖或糖原,以及将由本领域技术人员认可的其衍生物。

[0140] 在本发明中可用的聚合物(PEG)分子可以使用本领域众所周知的方法与结构域抗体构建体连接。在PEG或其他聚合物部分与本发明的结构域抗体构建体连接中的第一个步骤是用包含亲电子体的官能团替换PEG聚合物的羟基末端基团。特别地,将PEG聚合物与结构域抗体构建体单体或多聚体中存在的半胱氨酸或赖氨酸残基连接。所述半胱氨酸和赖氨酸残基可以是天然存在的,或可以被改造到结构域抗体构建体分子中。

[0141] 可以通过多种方法来完成本发明的结构域抗体构建体的PEG化(参见例如Kozlowski-A&Harris-JM(2001)Journal of Controlled Release72:217)。PEG可以直接地或者通过间插性连接体与结构域抗体构建体连接。用于将聚乙二醇连接至蛋白质的无连接体系统已在下列文献中描述:Delgado等人(1992),Crit.Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304;Francis等人,(1998),Intern. J. Hematol. 68:1-18;US4,002,531;US5,349,052;W095/06058;和W098/32466,其中每一篇文献的公开内容通过提及而合并入本文。

[0142] 一种将聚乙二醇直接连接至蛋白质的氨基酸残基而不使用间插性连接体的系统采用了三氟乙磺酸化的(tresylated)MPEG,其是通过用三氟乙磺酰氯(tresylchloride)修饰单甲氧基聚乙二醇(MPEG)而产生的。在氨基酸残基与三氟乙磺酸化的MPEG反应后,将聚乙二醇直接连接至胺基团上。因此,本发明包括通过将本发明的蛋白质与具有2,2,2-三氯乙磺酰基的聚乙二醇分子进行反应而产生的蛋白质-聚乙二醇缀合物。

[0143] 还可以使用许多不同的间插性连接体来将聚乙二醇连接至蛋白质。例如,US5,612,460公开了用于将聚乙二醇连接至蛋白质的氨基甲酸乙酯连接体。蛋白质-聚乙二醇缀合物(其中聚乙二醇通过连接体连接至蛋白质)也可以通过将蛋白质与化合物进行反应来产生,所述化合物例如为MPEG-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯、用1,1'-碳酰二咪唑(1,1'-carbonyldiimidazole)活化的MPEG、MPEG-2,4,5-三氯戊基碳酸酯、MPEG-对硝基苯酚碳酸酯和各种MPEG-琥珀酸酯衍生物。许多用于将聚乙二醇连接至蛋白质的其他聚乙二醇衍生物和反应化学在W098/32466中进行了描述,其全部公开内容通过提及而合并入本文。

[0144] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,结构域抗体构建体通过赖氨酸残基直接偶联至聚乙二醇。在本发明的另一个优选实施方案中,结构域抗体构建体通过半胱氨酸残基直接偶联至PEG。未配对的半胱氨酸残基可以事先存在于序列中,也可以通过在例如结构域抗体构建体的C-末端中掺入半胱氨酸残基而添加。备选地,PEG与结构域抗体构建体的连接可以通过形成二硫键的半胱氨酸残基而得到促进,如在US20060210526中所描述的。

[0145] 聚合物分子的其他衍生形式包括例如这样的衍生物,其中存在另外的部分或反应性基团以允许与本文所述的结构域抗体构建体的氨基酸残基相互作用。此类衍生物包括N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活性酯,琥珀酰亚胺基丙酸酯聚合物,和巯基-选择性反应试剂例如马来酰亚胺,乙烯砜和硫醇。PEG聚合物可以是线性分子,或可以是分支的,其中多个PEG部分存在于单个聚合物中。

[0146] 反应性基团(例如,MAL、NHS、SPA、VS或巯基)可以直接与PEG聚合物连接,或可以经由连接体分子与PEG连接。

[0147] 在本发明中可用的聚合物的大小可以为 500Da — 60kDa, 例如, 1000Da — 60kDa, 10kDa — 60kDa, 20kDa — 60kDa, 30kDa — 60kDa, 40kDa — 60kDa, 以及高达 50kDa — 60kDa。在本发明中使用的聚合物, 特别是 PEG, 可以是直链聚合物或可以具有分支的构象。

[0148] 在进一步的实施方案中, 根据第一方面的结构域抗体构建体可以是多聚化的, 例如异或同二聚体, 异或同三聚体, 异或同四聚体, 或更高次的异或同多聚体。多聚化可以增加抗原结合的强度, 其中结合的强度与多个结合位点的结合亲和力总和有关。

[0149] 第五方面, 本发明提供了药物组合物, 其包含有效量的根据第一方面的结构域抗体构建体, 以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0150] “药学上可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。药学上可接受的载体的例子包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇中的一种或多种及其组合。在许多情况下, 优选地将是在组合物中包括等渗剂, 例如糖, 多元醇例如甘露醇、山梨糖醇, 或氯化钠。药学上可接受的物质例如少量的辅助物质例如湿润或乳化剂、防腐剂或缓冲质。

[0151] 所述组合物可以是各种形式, 包括液体、半固体和固体剂型, 例如液体溶液(例如可吸入的、可注射的和可输注的溶液), 分散液或悬浮液, 片剂, 丸剂, 粉剂, 脂质体或栓剂。优选地, 所述组合物是用于免疫接种的可注射溶液的形式。施用可以是静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内。

[0152] 通常, 治疗组合物必须是无菌的并且在制造和储存条件下是稳定的。组合物可以配制为溶液、微乳液、分散体、脂质体或其他适合于高药物浓度的有序结构。溶液的适当的流动性可以通过例如使用包衣剂如卵磷脂和 / 或表面活性剂来维持。无菌可注射溶液可以通过下列方式来制备: 在具有一种上面所列的成分或其组合的合适溶剂中以所需的量掺入活性化合物(即结构域抗体构建体), 随后过滤灭菌。

[0153] 所述组合物还可以配制用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末。

[0154] 在某些实施方案中, 活性化合物可以用载体来制备, 所述载体将保护化合物不被快速释放, 例如受控释放制剂, 包括植入物, 透皮贴剂和微胶囊化的递送系统。可以使用相容的聚合物, 例如乙烯乙酸乙烯酯, 聚酐, 聚乙醇酸, 胶原, 聚原酸酯或聚乳酸。

[0155] 所述组合物还可以配制用于口服施用。在这个实施方案中, 结构域抗体构建体可以封装在硬或软壳明胶胶囊中, 压缩成片剂, 或直接掺入受试者的饮食内。

[0156] 允许肺、直肠、透皮、鞘内、眼内施用的制剂将是本领域技术人员熟知的。

[0157] 还可以将补充的活性化合物掺入至所述组合物中。结构域抗体构建体可以与一种或多种另外的治疗剂例如可溶性 TNF- α 受体或抑制人 TNF- α 产生的化学试剂, 或者结合其他靶标例如细胞因子或细胞表面分子的抗体一起共配制和 / 或共施用。备选地, 它可以与可溶性免疫化学试剂例如蛋白 A、C、G 或 L 一起共施用。

[0158] 有效量可以包括治疗有效量或预防有效量的本发明的结构域抗体构建体。治疗有效量是指以必需的剂量和时间段, 对于取得所希望的治疗结果而言有效的量。预防有效量是指以必需的剂量和时间段, 对于取得所希望的预防结果而言有效的量。因为预防剂量在发病之前或在疾病的早期阶段施用, 所以预防有效量可以比治疗有效量小。

[0159] 第六方面, 本发明提供了根据本发明第一方面的结构域抗体构建体在检测人 TNF- α 的诊断应用中的用途。

[0160] 例如,根据本发明的抗人 TNF- α 结构域抗体构建体可以用于检测例如生物样品如血清或血浆中的人 TNF- α ,其中使用常规的免疫测定法,例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)或组织免疫组织化学。可以通过竞争免疫测定法在生物学流体中测定根据本发明的抗人 TNF- α 结构域抗体构建体,其中使用用可检测物质标记的重组人 TNF- α 标准和未标记的抗人 TNF- α 抗体。

[0161] 根据本发明的抗人 TNF- α 结构域抗体构建体还可用于检测来自除人类以外的其他物种例如非人灵长类(包括猕猴、黑猩猩、狨、恒河猴)和其他物种例如狗、大鼠、小鼠、兔、猫、猪、牛的 TNF- α 。

[0162] 根据本发明的抗人 TNF- α 结构域抗体构建体还可用于其中希望抑制 TNF- α 活性的细胞培养应用。

[0163] 第七方面,本发明提供了用于在人受试者中治疗特征在于人 TNF- α 活性的病症的方法,其包括给所述受试者施用根据本发明第二方面的药物组合物。

[0164] 特征在于人 TNF- α 活性的病症意欲包括这样的疾病和其他病症,即其中在患有所述病症的受试者中 TNF- α 的存在已显示负责或被怀疑负责所述病症的病理生理学,或者已显示是或被怀疑是促成所述病症恶化的因素。优选地,特征在于人 TNF- α 活性的病症选自炎症,炎症性疾病,脓毒症,包括败血症性休克、内毒素性休克、革兰氏阴性脓毒症和中毒性休克综合征;自身免疫性疾病,包括类风湿性关节炎、幼年关节炎、类风湿性脊椎炎、强直性脊椎炎、舍格伦综合征、骨关节炎和痛风性关节炎、过敏症、多发性硬化症、自身免疫性糖尿病、自身免疫性葡萄膜炎、银屑病、类天疱疮以及肾病综合征;眼的炎性病况,包括黄斑变性、葡萄膜炎、贝赫切特病;感染性疾病,包括由于感染和感染后继发的恶病质所引起的发热和肌痛;移植物抗宿主病;肿瘤生长或转移,恶性血液病(hematologic malignancies);肺部病症,包括哮喘、成人呼吸窘迫综合征、休克肺、慢性肺部炎性疾病、肺结节病、肺纤维化和矽肺;炎症性肠病,包括克罗恩病和溃疡性结肠炎;心脏病症,充血性心力衰竭;血管病症,包括韦格纳病(Wegener's disease)、巨细胞动脉炎;炎症性骨病;中枢神经系统病症,例如阿尔茨海默病;周围神经系统病症,例如坐骨神经痛;肝炎,凝血障碍,烧伤,再灌注损伤,子宫内膜异位症,瘢痕瘤形成,和瘢痕组织形成。

[0165] 在一个特别优选的实施方案中,所述特征在于人 TNF- α 活性的病症是年龄相关性黄斑变性。TNF- α 参与刺激 VEGF 产生和促进眼内的新血管形成(Oh-H 等人,1999 Investigative Ophthalmology & Visual Science 40:1891-98),因此,TNF- α 活性的抑制剂,例如此处所描述的结构域抗体构建体,可用于治疗与血管生成相关的眼病症,包括年龄相关性黄斑变性。

[0166] 在本说明书自始至终,单词“包含”或者变化形式“包括”或“含有”应当理解为暗示包括所述元素、整数或步骤,或者元素、整数或步骤的组,但不排除任何其他元素、整数或步骤,或者元素、整数或步骤的组。

[0167] 本说明书中提及的所有出版物通过提及而合并入本文。本说明书中包括的文件、行为、材料、装置、物品等的任何讨论仅用于提供本发明的背景的目的。它不应被视为承认任何或所有这些内容构成现有技术基础的一部分或者是在与本发明相关的领域中的公知常识,就好像它在本申请的每项权利要求的优先权日前存在于澳大利亚或其他地方。

[0168] 为了能够更清楚地理解本发明的本质,现在将参考下述非限制性实施例来描述其

优选形式。

[0169] 实施例 1

[0170] 材料和方法

[0171] 新世界灵长类 V_L 基因的分离

[0172] 獭(毛獭属(*Callithrix*),种未知)和梟猴(夜猴(*Aotus trivirgatus*))基因组 DNA 分别以目录编号 85011419 和 90110510 获自欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)。獭 DNA 来源于细胞系 B95-8,而梟猴 DNA 来自细胞系 OMK637-69。

[0173] 基于人 V_k 前导序列和重组信号序列(RSS)的简并引物得自 Walter 和 Tomlinson, *Antibody Engineering: A Practical Approach* (1996)。用于扩增种系 V_k DNA 的引物如下:

[0174] 引物 VK1BL

[0175] AATCKCAGGTCCKAGATG (SEQ ID No:13)

[0176] 引物 VK1BL35a

[0177] GTTYRGGTKKGTAACACT (SEQ ID No:14)

[0178] 引物 VK1BL35b

[0179] ATGMCTTGTWACACTGTG (SEQ ID No:15)。

[0180] 采用引物对 VK1BL x VK1BL35a 或 VK1BL x VK1BL35b,使用 Taq 聚合酶来进行 PCR (30 个循环)。在经克隆的序列和所使用的 2 套引物之间存在重叠。

[0181] 将基因组 PCR 产物克隆入 Invitrogen 的 TOPO TA 克隆试剂盒(目录号 K4500-01)中,并用 M13 正向引物和 pUC 反向引物进行测序。从正和反方向对序列进行确认。为了进一步确认关键序列没有发生 PCR 错误,对于獭序列重复两次 PCR 和克隆过程。核苷酸(SEQ ID No:16 — 26 和 SEQ ID No:38 — 43)和氨基酸(SEQ ID No:27 — 37 和 SEQ ID No:44 — 49)在图 3 中给出。獭序列 1、2 和 3 得到了确认。序列 4、5、6、7 和 8 只在初始 PCR 中进行了查看。序列 9、10 和 11 只在重复(即第二次)PCR 和克隆中进行了查看。

[0182] 合成寡核苷酸并克隆入接纳体序列中

[0183] 四个 CDR 序列,即来自梟猴序列 1 (SEQ ID No:44)的 AATKLQS (SEQ ID No:1)、来自梟猴序列 2 (SEQ ID No:45)的 EASSLQS (SEQ ID No:2)、来自獭序列 1 (SEQ ID No:27)的 EASKLQS (SEQ ID No:3)和来自獭序列 2 (SEQ ID No:28)的 SASNLET (SEQ ID NO:4),选自图 3 中所示的氨基酸序列。发现梟猴序列 5, YASSLQS (SEQ ID No:56),与秘鲁夜猴(*Aotus nancymae*) (Ma's 夜猴)的 cDNA 序列 GI6176295 相同,而所有其他序列是独特的。

[0184] 在该表达载体(Domantis 拥有专利权的载体)中的接纳体可变区(抗 -TNF 的结构域抗体)序列依次用 KpnI 和 SanDI 进行消化(25 μ g), KpnI 和 SanDI 切除大部分的 FR2 以及 CDR2,如限制性消化图谱(图 4)上所示的。然后,凝胶纯化该载体以除去被切除的野生型 FR2 和 CDR2 序列。

[0185] 通过下述方式来进行寡核苷酸的退火:将寡核苷酸对(500pmol,基于在图 3 中所示的序列)在 95°C 下温育 5 分钟,接着在 65°C 下温育 5 分钟,然后让其在热台(hot block)上慢慢达到室温。然后,在 dNTP 存在下在 Klenow 反应中补满重叠部分。使用标准方法完成将合成的双链 DNA (来源于寡核苷酸退火和末端补齐)分子克隆入接纳体可变区序列中。

[0186] 亲和力成熟

[0187] 通过构建 14 个分开的文库来对嫁接了 14 个 CDR 的 dAb 化合物 145 (SEQ ID No:7) 进行亲和力和成熟, 其中每一个文库在单个氨基酸残基处具有 SEQ ID No:7 的序列多样化。所选的残基在下面用阴影显示。

[0188]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ~~EDSY~~HWYQOKPGKA~~PKLL~~YSASN~~I~~ETG
VPSRFS~~SG~~SG~~IT~~FTLT~~ISS~~L~~EP~~EDFATYYCQ~~QV~~WRP~~ET~~FGQGT~~K~~VEIKR

[0189] 所述选择基于已知在成熟的人 Ig 储库中多样化的 CDR1 和 CDR3 中的残基, 以及被观察到在相关 dAb 中进行诱变后产生功能性蛋白质的构架残基。对于每个所选的残基, 以 NKK 简并性设计互补的正向和反向 PCR 引物对, 并且进行两个初始 PCR 反应, 其中每个 PCR 反应采用单诱变引物和侧翼引物。在进行清理之后, 将两个 PCR 产物退火, 随后使用单独的侧翼引物进行扩增 (通过 PCR 的重叠延伸来进行剪接; Lowman H. L. & Clackson T. (编辑), Phage Display: A practical approach, Oxford University Press, Oxford, UK)。使用固相 TNF 通过 ELISA 对克隆进行初次筛选, 并对阳性克隆进行测序。从最好的克隆中纯化出 dAb 蛋白质, 并就在受体结合测定法和 L929 细胞毒性测定法中的效力进行评价。发现化合物 100 (SEQ ID No:9) 和 123 (SEQ ID No:8) 具有相对于亲本 dAb 即化合物 145 (SEQ ID No:7) 而言改善的 TNF 中和作用。

[0190] 化合物 100 和 123 的增强亲和力的置换的组合产生了这样的抗 -TNF dAb (化合物 196; SEQ ID No:10), 其在 L929 细胞毒性测定法中具有进一步改善的效力。

[0191] 细胞培养

[0192] 将 CHO K1SV 细胞 (Lonza Biologics, UK), 即 CHO K1 的悬浮变种, 在补充有 6mM L-谷氨酰胺 (Invitrogen 目录号 10743-029 和 25030-081) 的 CD CHO 培养基中维持在对数生长期。培养物在 36.5°C、10%CO₂ 和于 140rpm 摇动下温育。在转染前 24 小时, 在血细胞计数器上通过台盼蓝排除法 (Sigma 目录号 T8154) 来估定数目和生存力。通过于 200×g 下 5 分钟来使 8×10⁶ 个活细胞形成粒状沉淀, 并重悬浮于 8ml CM25 培养基 (Lonza Biologics, UK) 中, 所述培养基中补充有 10% 热灭活的经透析的胎牛血清 (Invitrogen 目录号 26400-044) 和 6mM L-谷氨酰胺。将细胞以每孔 500 μl 铺于 24 孔板中, 并于 36.5°C、10%CO₂ 下温育。

[0193] 在转染前 3 小时, 给培养基增添 500 μl CM25 培养基的新鲜的等分试样, 所述 CM25 培养基补充有 10% 热灭活的经透析的胎牛血清和 6mM L-谷氨酰胺。

[0194] 表达载体

[0195] 就用于哺乳动物细胞表达对化合物 112 (SEQ ID No:50) 和化合物 170 (SEQ ID No:51) 的基因序列进行优化, 并且进行合成。

[0196] 化合物 112

[0197] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGC
AGAGCCAGCCAGGCCATCGACAGCTACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA
CAGCGCCAGCAATCTGGAGACCGGCGTGCCTAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCA
TCAGCAGCCTGCTGCCTGAGGATTTGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTGGTGTGGAGACCTTTACCTTCGGCCAG
GGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGATAAGACCCACACCTGCCCCCTGCCCTGCCCC
CGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCG

AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAA
CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAG
AACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA
GCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCG
TGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACC
CAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG (SEQ ID NO :50)

[0198] 化合物 170

[0199] GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGC
AGAGCCAGCCAGGCCATCGACAGCTACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA
CAGCGCCAGCAATCTGGAGACCGGCTGCCTAGCAGATTCAGCGGCAGCGCTCCGGCACCAGCTTCACCCTGACCA
TCAGCAGCCTGCTGCCTGAGGATTTCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTGGTGTGGAGACCTTTACCTTCGGCCAG
GGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGTGGAGCCCCAAGAGCAGCGATAAGACCCACACCTGCCCCCTGCCCCTGCCCC
CGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCG
AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAA
CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAG
AACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA
GCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCG
TGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACC
CAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG (SEQ ID No :51)

[0200] 每个序列在 5' 末端侧翼具有一个 Hind III 位点、Kozak 序列(GCCACC;SEQ ID No:57) 和人 IgG κ 前导序列(氨基酸序列 MSVPTQVLGLLLWLTDARC;SEQ ID NO:58)。在 3' 末端,给每个序列添加两个终止密码子和一个 EcoRI 位点。在合成之后,将基因以克隆入 pCRScript 载体(Stratagene) 中的方式提供,并在合适的限制酶缓冲液(分别为 Roche Diagnostics 目录号 10656313001、10703737001 和 11417967001) 中通过 HindIII/EcoRI 消化而释放。类似地,对 GS 表达载体 pEE12.4 (Lonza Biologics, UK) 进行消化,并用牛小肠碱性磷酸酶(Roche Diagnostics 目录号 10713023001) 进行去磷酸化。使用 Promega 的 LigaFast Rapid DNA 连接系统(目录号 M8221) 将每个基因连接入制备好的 pEE12.4 骨架中。然后,将连接产物转化入 One Shot Top 10 经化学方法获得的感受态细胞(Invitrogen 目录号 C4040-03) 中,并通过标准技术来鉴定阳性克隆。使用 QIAfilter 中量制备柱(QIAgen 目录号 12243),通过过夜培养物的中量制备来制备大量的所得载体(pEE12.4-PN0621 和 pEE12.4-PN0521-S114C)。通过在含 1/10 体积的 3M 乙酸钠(pH5.2) 的 100% 乙醇(Sigma 目录号分别为 S2889 和 E7023) 中沉淀 20 μ g 来制备载体以用于转染。在用 70% 乙醇洗涤之后,将载体以 0.5 μ g/ μ l 的工作浓度重悬浮于 40 μ l T.E. pH8.0 (Sigma 目录号 T9285) 中。

[0201] 转染

[0202] 对于每次转染,将 2 μ l Lipofectamine2000 加入至 96 孔平板的一个孔中的 50 μ l Optimem I 培养基(Invitrogen 目录号 11668-027 和 31985-062)中。在第 2 个孔中,将 1.6 μ l 表达载体(0.8 μ g)加入至 50 μ l Optimem I 培养基中。在 5 分钟室温温育后,将所述 2 个孔的内容物混合在一起并进一步进行 20 分钟温育。这该第二次温育后,将全部转染混合物加入至包含 CHOK1SV 细胞的 24 孔平板的孔中。将细胞温育至少 72 小时并收获上清液。使上清液在 4,000xg 下离心 5 分钟以使细胞碎片形成粒状沉淀,并贮存于 -20℃ 直至通过 TNF ELISA 来测定化合物 112 (SEQ ID No:59)和化合物 170 (SEQ ID No:11)的表达。

[0203] 化合物 112

[0204] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLLPEDFATYYCQQVVRPFTFGQGTKVEIKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID No :59)

[0205] TNF ELISA

[0206] 将微量滴定板(例如 Sarstedt82. 9923-148)用 1 μ l/mL 人重组 TNF- α (Peprotech Cat#300-01A)在碳酸盐 / 碳酸氢盐包被缓冲液(pH9.6)中的溶液进行包被,100 μ l/孔。在 4℃ 过夜温育之后,用含 0.05%Tween-20 的 PBS (0.01M, pH7.2)洗涤平板三次,和用 PBS 洗涤三次。每个孔中加入 200 μ l 封闭缓冲液(含 1%BSA[牛血清白蛋白, Sigma Cat# A-9647]的 PBS),并在 25℃ 下温育 1 小时。如上所述洗涤平板,并向每个孔中加入 100 μ l 体积的稀释于抗体稀释剂(含 1%BSA 和 0.05%Tween20 的 PBS)中的样品或化合物 170 标准。在 25℃ 下温育 1 小时之后,如上所述洗涤平板,并向每个孔中加入 100 μ l 体积的以 1:1000 稀释于抗体稀释剂中的二抗(缀合有过氧化物酶的山羊抗人免疫球蛋白, Zymed, Cat#81-7120)。洗涤平板,并向每个孔中加入 100 μ l 体积的 ABTS 底物(2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐, Sigma Cat#A-1888, 0.5mg/mL 于含 0.03% H_2O_2 的柠檬酸盐缓冲液(pH4.4)中)。底物在室温下显色 30 分钟,并于 405nm (参考 620nm)处读取吸光度。相对于标准曲线来确定样品浓度,并表示为相对于表达的化合物 112 的平均浓度。

[0207] 结果

[0208] 包含截短的 C_H1

[0209] 在结构域抗体构建体中包含截短的 C_H1 导致这样的在可变结构域和铰链之间的连接,即相比于缺少截短的 C_H1 的连接(83.3%;以 1 的缺口开放罚分,使用在 Vector NTI (Invitrogen)上的 Align X 计算出的),所述在可变结构域和铰链之间的连接具有更高的与常规 IgG₁ C_H1 -铰链连接的同源性(91.7%)。增高的同源性可能转变为增加的对于常规免疫球蛋白肽序列(对于其,人类患者应当是免疫耐受的)的相像性,从而降低了免疫原性潜力。

[0210] 序列:

[0211] 化合物 170 可变区-截短的 C_H1 -铰链连接:

[0212] TKVEIKR VEPKS (SEQ ID No:65)

[0213] IgG₁ C_H1 -铰链连接(NCBI 登录号 AAG00909):

[0214] TKVDKRV.EPKS (SEQ ID No:66)

[0215] 化合物 170 可变区 – 铰链连接(没有截短的 C_H1) :

[0216] TKVEIKREPKS (SEQ ID No:67)

[0217] C_H1 序列以双下划线标示。

[0218] 获自 NCBI 蛋白质数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 C_H1 结构域(SEQ ID No:60) AAG00909 :

[0219] 1 STKGPSVFPL APSSKSTSGG TLGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP AVLQSSG

[0220] 61 LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP

[0221] 121 SVFLFPKPK DTL MISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS

[0222] 181 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM

[0223] 241 TKNQVSLTCL VKGFYP SDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ

[0224] 301 QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

[0225] C_H1- 铰链连接以下划线标示。

[0226] 中和 TNF- α 诱导的细胞毒性

[0227] 使用鼠类 L929 细胞生存力测定法,对结构域抗体构建体化合物 170 (SEQ ID No:11) 中和 TNF- α 介导的细胞毒性的能力进行了评估。在平底 96 孔板中,以 50 μ L 体积,制备了化合物 170 在含 10% 胎牛血清的 RPMI 培养基(RPMI-FBS) 中的系列稀释物。向这些孔的每一个中以 360pg/mL 的浓度加入 50 μ l 的重组人 TNF- α (Strathmann Biotec, Hamburg, Germany),随后加入在 50 μ L 中的 2.5×10^4 个 L929 细胞和 25 μ L 40 μ g/mL 放线菌素 D,均在 RPMI-FBS 中制备。对照包括没有 TNF (用于确定 100% 生存力) 的孔、无细胞(0% 生存力) 的孔和范围为 2pg/mL 至 4200pg/mL 的 TNF- α 标准曲线的孔。培养板在 5%CO₂ 气氛中于 37 $^{\circ}$ C 温育 20 小时,然后在加入 25 μ l 的 3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基)-5-(3- 羧基甲氧基苯基)-2-(4- 磺基苯基)-2H- 四唑鎓(MTS)/ 吩嗪乙基硫酸盐(phenazineethosulfate, PES) (Promega, CellTiter96AQueous One, Madison USA) 后再温育 3 小时。针对 630nm 的参考波长在 492nm 处测定吸光度,和使用从三次重复的测试孔计算出的平均值来绘制生存力曲线。通过随着化合物 170 浓度增加而细胞生存力增加(图 6),表明了化合物 170 中和 TNF- α 的能力。

[0228] 中和 TNF- α 与人 p55 和 p75TNF 受体的结合

[0229] 结构域抗体构建体化合物 170 (SEQ ID No:11) 抑制 TNF- α 与人 p55 和 p75TNF 受体结合的能力通过受体结合测定法来进行评价。以在碳酸盐包被缓冲液(pH9.2) 中的 0.1 μ g/mL,通过于 4 $^{\circ}$ C 温育过夜,将人 p55 (RnD systems, 目录号 372-RI) 或 p75 (RnD systems, 目录号 762-R2) 包被到 Maxisorb 板(Nunc) 上。在抗体稀释剂(PBS pH7.2, 0.05%Tween-20, 1%BSA) 中制备范围从 100 μ g/mL 降至 3.15ng/mL 的化合物 170 的系列半对数(half-log) 稀释物(和无化合物 170 的“空白”对照),并与等体积的在抗体稀释剂中的 60ng/mL 人 TNF- α 相混合。还制备了不含 PN0621 和不含 TNF- α 的空白以测量背景结合。让所有混合物在温和搅动下于室温温育正好 1 小时。在该温育过程中,经包被的平板用 PBS, 0.05%Tween-20 洗涤 3 次,然后用 PBS 洗三次。然后,于室温用 200 μ l/ 孔的 PBS, 1%BSA 封闭平板 45 分钟。在洗涤平板后,对于每个浓度的受试化合物 170 向三次重复的孔中加入 100 μ l 的化合物 170/TNF- α 混合物,以及加入所有对照。然后,将平板于室温

下温育 1 小时。在洗涤平板后,以在抗体稀释剂中的 $0.6 \mu\text{g/mL}$,向每个孔中加入生物素化的抗人 TNF- α 抗体(RnD Systems, 目录号 BAF210),并于室温温育 1 小时。在洗涤后,以在抗体稀释剂中的 1:2000,加入链霉抗生物素蛋白-HRP 缀合物(Zymed, 目录号 43-4323),并于室温下温育 45 分钟。使用 TMB 底物(Invitrogen, 目录号 00-2023)进行显色,在 4 分钟后,用 1M HCl 终止反应。然后,使用 620nm 的参照,在 450nm 处测量吸光度读数。通过计算三次重复的平均吸光度来进行分析。从每个吸光度值中减去非特异性结合(无 TNF- α)的平均值。

[0230] 结果如图 7 中所示,并且显示,化合物 170 阻止 TNF- α 与人 p55 或 p75TNF 受体的相互作用。

[0231] 细胞结合型 TNF- α 的结合

[0232] 使用 NS0 细胞系 27D4 对与细胞结合型(跨膜)TNF- α 的结合进行分析,所述细胞系是用编码缺乏 TACE 切割位点的人 TNF- α 蛋白的基因稳定转染的,从而 TNF- α 保持为细胞膜结合的,因为其不能被切割。基于另一种鼠类骨髓瘤(SP2/0)的相似细胞系也已得到描述(Scallion 等人, (1995)Cytokine7251-259)。

[0233] 在每个样品 5×10^5 个活 27D4 细胞上进行流式细胞术分析,其中所有步骤于 4°C 或在冰上进行。以 $100 \mu\text{g/mL}$,将细胞粒状沉淀与受试样品(化合物 170 ;SEQ ID No:11)或不相关特异性同种型-匹配的对照(Sigma, 目录号:15154)一起重悬浮于含 2%FBS 的 PBS 中,并在冰上温育 1 小时。进行两次细胞洗涤循环,每次包括以 $1000 \times g$ 离心 10 分钟和将细胞粒状沉淀重悬浮于 PBS/2%FBS 中。在又一次的离心步骤后,将细胞粒状沉淀重悬浮于 $100 \mu\text{L}$ 的二抗缀合物(抗人 Fc FITC 缀合物, Sigma, 目录号 F9512)中,并温育 30 分钟。然后,如上所述将样品洗两次,并将细胞粒状沉淀重悬浮于 $500 \mu\text{L}$ 含 $5 \mu\text{g/mL}$ 碘化丙锭(Sigma, 目录号 P4864)的 PBS/2%FBS 中。在 Beckman Coulter Cell Lab Quanta 流式细胞仪上对细胞的荧光染色进行分析,和使用 WinMDI 来处理数据。

[0234] 结果显现在图 8 中,并且显示,表达跨膜 TNF- α 的 NS027D4 细胞(黑色实线)的化合物 170 染色显现出比不相关特异性同种型-匹配的对照(灰色填充)更高的荧光强度。

[0235] 高表达化合物 170 的细胞系的建立

[0236] 使用在“材料和方法”部分中所描述的表达载体来建立表达化合物 170 (SEQ ID No:11)的稳定的 CHOK1SV 细胞系。简而言之,在 $40 \mu\text{g}$ 的线性化的质粒 DNA 存在下,在没有谷氨酰胺的 CDCHO 无蛋白质培养基中对 1×10^7 个处于对数生长期的细胞进行电穿孔。转染后 24 小时,施加 $50 \mu\text{M}$ 甲硫氨酸砒亚胺(methionine sulfoximine) (Sigma)的选择压力,并让抗性细胞在 96 孔板中形成集落。当接近汇合时,将单个菌落转移至 24 孔板、T25 瓶和随后 T75 瓶。在 T75 瓶中一旦汇合,就将细胞系进展至在 E125 锥形瓶中的培养,并且经历 6 次传代培养而适应于悬浮生长。一旦适应于悬浮生长,就将细胞系在 92.5%CDCHO 培养基:7.5%DMSO 的冷冻混合物中冷藏。

[0237] 在细胞系通过不同的孔和瓶大小进行扩展的同时,与细胞系进入下一阶段的过程相平行地进行许多生产率(productivity)评估。因此,在 24 孔板和 E125 锥形瓶阶段进行了生产率评估。在每一情况下,让细胞生长 14 天,并且就化合物 170 的水平通过实施例 1 中所描述的 TNF ELISA 方法对上清液进行评价。将细胞系按生产率进行排序,并选择最高的 10 个,以用于在 Lonza Biologics 的拥有专利权的补料-分批生产率评估中进行评价。

所获得的生产率在 700mg/L 和 3371mg/L 之间。选择了生产率为 2724mg/L 的先导细胞系，以用于在 10L 实验室规模的发酵罐中进行评价。

[0238] 运行四个分开的 10L 实验室规模的发酵罐 15 天，其中基于无蛋白质的 CDCHO 培养基，采用先导细胞系和拥有专利权的通用补料分批工艺。4 个发酵的所得的平均生产率是 4851mg/L，其中最高生产率为 4925mg/L（在 15 天的发酵中，对于非克隆细胞系，由 Lonza Biologics 先前报道的最高生产率水平为 3560mg/L）。设计了所使用的 10L 实验室规模的发酵罐以模拟在高达 2000L 的更大规模的发酵罐中所见的发酵条件，因此预期该先导细胞系适合于商业规模的生产。确实，在 200L 发酵罐中观察到了相似的表达水平。

[0239] 通过蛋白 A 亲和层析对从表达化合物 170 (SEQ ID No:11) 的先导细胞系的 4×10L 发酵中收获的产物进行纯化，并且通过在还原和非还原条件下的 SDS PAGE 进行分析。如图 11 中所示的，化合物 170 表达为约 90kDa 的单体。该单体由两个约 40kDa 的亚基组成，它们在图 12 中当在还原条件下运行 SDS PAGE 时可见。由于 SDS PAGE 不适合准确测定蛋白质的大小，因而对化合物 170 单体作了进一步的分析。ESI-MS（电喷雾电离质谱法）将化合物 170 单体大小测定为 78.739kDa。这与 2 个亚基的预测的分子量 ($2 \times 38.058 = 76.116\text{kDa}$) 是一致的，其中每个亚基还携带二天线型 (biantennary) 核心岩藻糖基化的聚糖糖结构。

[0240] 在非人灵长类中的长血清半衰期

[0241] 以 0.5、5 和 50mg/kg 的剂量，给猕猴皮下施用化合物 170 (SEQ ID No:11)，并在 0.5、1、2、6 和 24 小时，随后在 1、2、4、7、10 和 14 天抽取血液样品。使用实施例 1 中所描述的抗-TNF ELISA 方法，就化合物 170 水平的定量对这些样品进行分析。通过分析这些样品中化合物 170 的水平来确定消除半衰期。于 0.5mg/kg，计算出 110.5 ± 13.9 小时的消除半衰期。于 5mg/kg 和 50mg/kg，计算出 110.9 ± 10.4 和 103.5 ± 11.5 小时的消除半衰期。

[0242] 当以 50mg/kg 通过静脉内途径施用化合物 170 时，于 10、30 和 60 分钟，4 和 24 小时，2、4、7、10 和 14 天抽取血液样品。使用实施例 1 中所描述的抗-TNF ELISA 方法，就化合物 170 水平的定量对这些样品进行分析。通过分析这些样品中化合物 170 的水平来确定消除半衰期。在 50mg/kg 静脉内施用后，计算出 109.6 ± 10.7 小时的消除半衰期。

[0243] 有利的安全性特性

[0244] 在动物安全性和毒性研究中对按照 GMP 标准生产的化合物 170 (SEQ ID No:11) 进行评价。

[0245] 单剂量的安全性

[0246] 通过皮下或静脉内施用途径，以 0.5、5 和 50mg/kg 给不同的猴施用单剂量的化合物 170，它们未显示与用化合物 170 进行的其治疗有关的影响。在这些研究中，对一系列器官作了显微镜检查，未观察到任何影响。

[0247] 逐步升高的剂量和重复剂量的安全性

[0248] 从 0.5mg/kg 的剂量（皮下或静脉内施用）开始，每 7 天给猕猴施用逐步升高的剂量直至 50mg/kg。就各种生理学和行为参数对动物进行评估，包括血液学、临床化学、体重和器官重以及尸体剖检后的器官肉眼检查。在这些研究自始至终，对于使用化合物 170 进行的治疗未报告有不良反应。在研究的剂量逐步升高阶段之后，在进一步的 4 周时间内，对那些经皮下接受逐步升高的剂量的动物进一步施用 4 个 50mg/kg 的剂量。在各种参数方面，仍未观察到与使用化合物 170 进行治疗有关的影响。

[0249] 心血管的安全性

[0250] 在安装有无线电遥测监测器的猕猴中,评价 50mg/kg 的化合物 170 的心血管安全性。这些监测器能直接从有意识的猴身上报告一系列呼吸和心血管参数。在给予化合物 170 后,未报道不良的与治疗有关的临床观察结果。

[0251] 细菌表达

[0252] 在哺乳动物表达系统中产生在前述实施例中的化合物 170(SEQ ID No:11)。还用细菌表达系统来产生功能性化合物 170。

[0253] 对减去信号序列的化合物 170 的氨基酸序列进行回译和用 GeneOptimizer™ 进行优化以用于大肠杆菌(E. coli)表达,并且在 GeneArt GmbH 从头合成。将合成的基因通过 NcoI 和 HindIII 限制性位点(Roche)亚克隆入 pBADgIII/His⁻ 标记的表达载体(Invitrogen)中,从而产生准备用于细菌表达的载体。通过热休克法用所述载体转化 TOP10 细胞(Invitrogen),并产生单个菌落的甘油原种。诱导条件是 0.002% 的阿拉伯糖(Sigma;终浓度)和 4 小时的诱导期。化合物 170 蛋白质样品使用在 pBAD 细菌表达系统手册(Invitrogen)中详述的渗透压休克法来产生。使用 BCA 测定法(Pierce)来测定样品的总蛋白质浓度。在如实施例 1 中所述的 ELISA 中,就其与 TNF- α 的结合来检测由细菌表达的化合物 170。

[0254] 图 9 显示了在细菌系统中产生的化合物 170 在 ELISA 测定法中保持与 TNF- α 的结合。

[0255] 用于化合物 170 的细菌表达的 DNA 序列如下:

[0256] ATGGCGAGCACCGATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGATCGTGTG
ACCATTACCTGCCGTGCGAGCCAGGCGATTGATAGCTATCTGCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAA
ACTGCTGATTTATAGCGCGAGCAACCTGGAAACCGGCGTGCGGAGCCGTTTTAGCGGCAGCGGTAGCGGCACCGATT
TTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCTGCCGGAAGATTTTTCGACCTATTATTGCCAGCAGGTGGTGTGGCGTCCGTTT
ACCTTTGGCCAGGGCACCAAGTGGAATTAACCGCGTGGAACCGAAAGCAGCGATAAAACCCACACGTGCCCGCC
GTGTCCGGCGCCGGAAGTCTGGGTGGCCGAGCGTGTTCTGTTCGCCGCGAAACCGAAAGATACCCTGATGATTA
GCCGTACCCCGGAAGTGACCTCCCTGGTGGTGGATGTGAGCCATGAAGATCCGGAAGTGAAATTCAACTGGTATGTG
GATGGCGTGGAAGTGATAACCGGAAAAACCAACCGCGTGAAGAACAGTATAACAGCACCTATCGTGTGGTGAGCGT
GCTGACCGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAATGCAAAGTGTCTAACAAAGCGCTGCCGGCGC
CGATTGAAAAAACCATCAGCAAGCGAAAGGCCAGCCGCGTGAACCGCAGGTGTATACCCTGCCGCCGAGCCGTGAT
GAACTGACCAAAAACAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGCTTTTATCCGAGCGATATTGCGGTGGAATGGGA
AAGCAACGGCCAGCCGGAACCAACTATAAAACCAACCCCGCCGGTGCTGGATAGCGATGGCAGCTTTTTCTGTATA
GCAAACTGACCGTGGATAAAAGCCGTTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCTGCAGCGTGATGCATGAAGCGCTGCAT
AACCATTATACCCAGAAAAGCCTGAGCCTGAGCCCGGGTAAAGCGGCGGCG(SEQ ID No :61)。

[0257] 由 SEQ ID No:61 编码的氨基酸序列如下:

[0258] MASTDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLLPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKRVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAAAVDHHHHHHH(SEQ ID NO :62)。

[0259] 化合物 170 在人 TNF 介导的鼠类关节炎模型中的体内效用

[0260] 人 TNF 转基因小鼠系 Tg197 表现出失调的 TNF 表达,并发展出慢性炎性多关节炎 (Keffer, J. 等人, (1991), Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. EMBO Journal 10:4025-31)。在这些小鼠中化合物 170 (SEQ ID No:11) 的施用防止了关节炎的形成以及相关的体重减轻 (图 10A 和 B)。8 只杂合的 Tg197 的组 (每组包含 4 只雄性和 4 只雌性) 通过每周两次腹膜内注射化合物 170 和不相关特异性对照人 IgG₁ (帕利珠单抗 [Synagis®], MedImmune/Abbott) (在 PBS 中) 进行治疗, 均以 10mg/kg。治疗在小鼠 3 周龄时开始。按一周的间隔, 对小鼠进行称重并基于目测踝关节形态学 (肿胀、变形和活动程度) 进行评分 (关节炎得分)。

[0261] 在化合物 112 中位置 114 处的 Cys 的置换导致增加的蛋白质表达

[0262] 化合物 112 (SEQ ID No:59) 是化合物 170 (SEQ ID No:11) 的修饰产物, 其在位置 114 处包含半胱氨酸残基而不是丝氨酸残基, 后者存在于化合物 170 的这个位置上。通过与化合物 170 进行比较评价了半胱氨酸 114 置换为丝氨酸对于蛋白质表达的影响。通过如“材料和方法”部分所述的使用固相 TNF 的 ELISA, 就蛋白质表达来对用化合物 112 和 170 的基因构建体转染的宿主细胞的多个培养物进行检测。结果显示在图 11 中。

[0263] 本领域技术人员将会意识到, 可以对如具体实施方案中所示的本发明进行众多改变和 / 或修饰, 而不背离如广泛描述的本发明的精神或范围。因此, 这些实施方案在所有方面被视为举例说明性的而非限制性的。

[0264] 本发明的优选实施方案如下:

[0265] 1. 与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体, 所述构建体包含:

[0266] (a) 与人 TNF- α 结合的结构域抗体 (dAb);

[0267] (b) 经修饰的铰链区序列;

[0268] (c) 人或灵长类重链恒定区序列, 其具有不多于 20 个残基的截短的 C_H1 结构域,

[0269] 其中所述经修饰的铰链区序列包含缺失或者至少一个半胱氨酸残基的单氨基酸置换, 所述半胱氨酸残基通常促进重和轻抗体链间二硫键的形成。

[0270] 2. 实施方案 1 的结构域抗体构建体, 其中所述具有截短的 C_H1 结构域的人或灵长类重链恒定区序列包含不多于 10 个残基。

[0271] 3. 实施方案 2 的结构域抗体构建体, 其中所述具有截短的 C_H1 结构域的人或灵长类重链恒定区序列包含不多于 5 个残基。

[0272] 4. 实施方案 3 的结构域抗体构建体, 其中所述具有截短的 C_H1 结构域的人或灵长类重链恒定区序列包含不多于单个残基。

[0273] 5. 实施方案 1 至 4 中任一项的结构域抗体构建体, 其中 C_H1 结构域和铰链区的序列为 XEPKSZDKTHTCPPCPA (SEQ ID No:64), 其中 X 为缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸, 和 Z 不存在或为除半胱氨酸以外的其他氨基酸。

[0274] 6. 实施方案 5 的结构域抗体构建体, 其中 X 为缬氨酸, 和 Z 为丝氨酸。

[0275] 7. 实施方案 1 至 6 中任一项的结构域抗体构建体, 其中所述 dAb 包含免疫球蛋白重链或轻链可变结构域, 其中所述可变结构域包含至少一个具有来源于新世界灵长类的序列的互补决定区 (CDR), 其中所述 CDR 选自 AATKLQS (SEQ ID No:1)、EASSLQS (SEQ ID No:2)、EASKLQS (SEQ ID No:3) 和 SASNLET (SEQ ID No:4)。

[0276] 8. 实施方案 7 的结构域抗体构建体,其中所述 CDR 为 CDR2。

[0277] 9. 实施方案 1 至 8 中任一项的结构域抗体构建体,其中所述结构域抗体具有选自下列的序列:

[0278] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGGQGTKVEIKR (SEQ ID No :7) ;

[0279] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGGQGTKVEIKR (SEQ ID No :8) ;

[0280] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGGQGTKVEIKR (SEQ ID No :9) ;

[0281] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGGQGTKVEIKR (SEQ ID No :10) ;

[0282] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKPPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGGQGTKVEIKR (SEQ ID No :52) ;

[0283] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGRSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGGQGTKVEIKR (SEQ ID No :53) ;

[0284] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLVPEDFATYYCQQVWVRPFTFGGQGTKVEIKR (SEQ ID No :54) ;和

[0285] 与这些序列之一至少 95% 同一的序列。

[0286] 10. 实施方案 1 至 9 中任一项的结构域抗体构建体,其中用丝氨酸残基置换在铰链区内的半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基通常促进重和轻抗体链间二硫键的形成。

[0287] 11. 实施方案 1 至 10 中任一项的结构域抗体构建体,其中所述铰链区包含序列
EPKSSDKTHTCPPCPA (SEQ ID No:12)。

[0288] 12. 实施方案 1 至 11 中任一项的结构域抗体构建体,其中所述恒定区包含与 SEQ
ID No:63 所示序列至少 60% 同一的 C_H2 和 C_H3 结构域。

[0289] 13. 实施方案 12 的结构域抗体构建体,其中所述 C_H2 和 C_H3 结构域与 SEQ ID No:63
所示序列至少 80% 同一。

[0290] 14. 实施方案 13 的结构域抗体构建体,其中所述 C_H2 和 C_H3 结构域与 SEQ ID No:63
所示序列至少 90% 同一。

[0291] 15. 实施方案 14 的结构域抗体构建体,其中所述 C_H2 和 C_H3 结构域与 SEQ ID No:63
所示序列至少 95% 同一。

[0292] 16. 实施方案 15 的结构域抗体构建体,其中所述 C_H2 和 C_H3 结构域与 SEQ ID No:63
所示序列至少 96% 同一。

[0293] 17. 实施方案 16 的结构域抗体构建体,其中所述 C_H2 和 C_H3 结构域与 SEQ ID No:63
所示序列至少 97% 同一。

[0294] 18. 实施方案 17 的结构域抗体构建体,其中所述 C_H2 和 C_H3 结构域与 SEQ ID No:63
所示序列至少 98% 同一。

[0295] 19. 实施方案 18 的结构域抗体构建体,其中所述 C_H2 和 C_H3 结构域与 SEQ ID No:63
所示序列至少 99% 同一。

[0296] 20. 实施方案 1 至 19 中任一项的结构域抗体构建体,其中 CDR1、CDR3 或至少一个

构架区被修饰以改善抗原结合。

[0297] 21. 实施方案 1 至 20 中任一项的结构域抗体构建体,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID No:11 所示序列至少 60% 同一。

[0298] 22. 实施方案 21 的结构域抗体构建体,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID No:11 所示序列至少 80% 同一。

[0299] 23. 实施方案 22 的结构域抗体构建体,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID No:11 所示序列至少 90% 同一。

[0300] 24. 实施方案 23 的结构域抗体构建体,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID No:11 所示序列至少 95% 同一。

[0301] 25. 实施方案 24 的结构域抗体构建体,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID No:11 所示序列至少 96% 同一。

[0302] 26. 实施方案 25 的结构域抗体构建体,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID No:11 所示序列至少 97% 同一。

[0303] 27. 实施方案 26 的结构域抗体构建体,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID No:11 所示序列至少 98% 同一。

[0304] 28. 实施方案 27 的结构域抗体构建体,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID No:11 所示序列至少 99% 同一。

[0305] 29. 实施方案 28 的结构域抗体构建体,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID No:11 所示序列相同。

[0306] 30. 实施方案 1 至 29 中任一项的结构域抗体构建体,其中所述结构域抗体在人中具有低免疫原性。

[0307] 31. 与人 TNF- α 结合的二聚结构域抗体构建体,其中该二聚体由两个实施方案 1 至 30 中任一项的结构域抗体构建体组成。

[0308] 32. 实施方案 31 的二聚结构域抗体构建体,其中所述二聚结构域抗体构建体是同二聚体。

[0309] 33. 实施方案 32 的二聚结构域抗体构建体,其中组成同二聚体的所述结构域抗体构建体包含与 SEQ ID No:11 所示序列至少 60% 同一的氨基酸序列。

[0310] 34. 实施方案 33 的二聚结构域抗体构建体,其中组成同二聚体的所述结构域抗体构建体包含与 SEQ ID No:11 所示序列至少 80% 同一的氨基酸序列。

[0311] 35. 实施方案 34 的二聚结构域抗体构建体,其中组成同二聚体的所述结构域抗体构建体包含与 SEQ ID No:11 所示序列至少 90% 同一的氨基酸序列。

[0312] 36. 实施方案 35 的二聚结构域抗体构建体,其中组成同二聚体的所述结构域抗体构建体包含与 SEQ ID No:11 所示序列至少 95% 同一的氨基酸序列。

[0313] 37. 实施方案 36 的二聚结构域抗体构建体,其中组成同二聚体的所述结构域抗体构建体包含与 SEQ ID No:11 所示序列至少 96% 同一的氨基酸序列。

[0314] 38. 实施方案 37 的二聚结构域抗体构建体,其中组成同二聚体的所述结构域抗体构建体包含与 SEQ ID No:11 所示序列至少 97% 同一的氨基酸序列。

[0315] 39. 实施方案 38 的二聚结构域抗体构建体,其中组成同二聚体的所述结构域抗体构建体包含与 SEQ ID No:11 所示序列至少 98% 同一的氨基酸序列。

[0316] 40. 实施方案 39 的二聚结构域抗体构建体, 其中组成同二聚体的所述结构域抗体构建体包含与 SEQ ID No:11 所示序列至少 99% 同一的氨基酸序列。

[0317] 41. 实施方案 40 的二聚结构域抗体构建体, 其中组成同二聚体的所述结构域抗体构建体包含 SEQ ID No:11 所示的氨基酸序列。

[0318] 42. 分离的核酸分子, 其编码实施方案 1 至 30 中任一项的结构域抗体构建体。

[0319] 43. 分离的核酸分子, 其包含编码与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体的核酸序列, 其中所述核酸序列与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示序列至少 60% 同一。

[0320] 44. 实施方案 43 的分离的核酸分子, 其中所述核酸序列与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示序列至少 80% 同一。

[0321] 45. 实施方案 44 的分离的核酸分子, 其中所述核酸序列与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示序列至少 90% 同一。

[0322] 46. 实施方案 45 的分离的核酸分子, 其中所述核酸序列与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示序列至少 95% 同一。

[0323] 47. 实施方案 46 的分离的核酸分子, 其中所述核酸序列与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示序列至少 96% 同一。

[0324] 48. 实施方案 47 的分离的核酸分子, 其中所述核酸序列与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示序列至少 97% 同一。

[0325] 49. 实施方案 48 的分离的核酸分子, 其中所述核酸序列与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示序列至少 98% 同一。

[0326] 50. 实施方案 49 的分离的核酸分子, 其中所述核酸序列与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示序列至少 99% 同一。

[0327] 51. 实施方案 50 的分离的核酸分子, 其中所述核酸序列与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示序列相同。

[0328] 52. 分离的核酸分子, 其包含编码与人 TNF- α 结合的结构域抗体构建体的核酸序列, 其中所述核酸序列在高严谨度条件下与 SEQ ID No:50 或 SEQ ID No:51 所示的核苷酸杂交。

[0329] 53. 药物组合物, 其包含有效量的实施方案 1 至 30 中任一项的结构域抗体构建体, 以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0330] 54. 药物组合物, 其包含有效量的实施方案 31 至 41 中任一项的二聚结构域抗体构建体, 以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0331] 55. 用于检测样品中的人 TNF- α 的方法, 其包括将样品与有效量的实施方案 1 至 41 中任一项的结构域抗体构建体进行接触, 和检测所结合的结构域抗体构建体的量。

[0332] 56. 实施方案 55 的方法, 其中所述样品为生物样品。

[0333] 57. 用于在人受试者中治疗特征在于人 TNF- α 活性的病症的方法, 其包括给所述受试者施用有效量的实施方案 55 或实施方案 56 的药物组合物。

[0334] 58. 实施方案 57 的方法, 其中所述特征在于人 TNF- α 活性的病症选自炎症, 炎性疾病, 脓毒症, 包括败血症性休克、内毒素性休克、革兰氏阴性脓毒症和中毒性休克综合征; 自身免疫性疾病, 包括类风湿性关节炎、幼年关节炎、类风湿性脊椎炎、强直性脊椎炎、舍格伦综合征、骨关节炎和痛风性关节炎、过敏症、多发性硬化症、自身免疫性糖尿病、自身免疫

性葡萄膜炎、银屑病、类天疱疮以及肾病综合征；眼的炎性病况，包括黄斑变性、葡萄膜炎、贝赫切特病；感染性疾病，包括由于感染和感染后继发的恶病质所引起的发热和肌痛；移植抗宿主病；肿瘤生长或转移，恶性血液病；肺部病症，包括哮喘、成人呼吸窘迫综合征、休克肺、慢性肺部炎性疾病、肺结节病、肺纤维化和矽肺；炎症性肠病，包括克罗恩病和溃疡性结肠炎；心脏病症，充血性心力衰竭；血管病症，包括韦格纳病、巨细胞动脉炎；炎症性骨病；中枢神经系统病症，例如阿尔茨海默病；周围神经系统病症，例如坐骨神经痛；肝炎，凝血障碍，烧伤，再灌注损伤，子宫内膜异位症，瘢痕瘤形成，和瘢痕组织形成。

[0335] 59. 实施方案 57 或实施方案 58 的方法，其中所述特征在于人 TNF- α 活性的病症为血管生成相关的眼病症。

[0336] 60. 实施方案 59 的方法，其中所述血管生成相关的眼病症为年龄相关性黄斑变性。

[0001]

序列表

<110> DOYLE, Anthony G.
 WOOLVEN, Benjamin P.
 TOMLINSON, Ian M.
 LEE, Jennifer A.
 JENNINGS, Philip A.

<120> 结构域抗体构建体

<130> 529282002500

<140> US 11/670,261
 <141> 2007-02-01

<150> US 60/817,507
 <151> 2006-06-28

<160> 68

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 夜猴

<400> 1
 Ala Ala Thr Lys Leu Gln Ser
 1 5

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 夜猴

<400> 2
 Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 毛猴属, 种未知

<400> 3
 Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser
 1 5

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 毛猴属, 种未知

<400> 4
 Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

<210> 5
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 5
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30

[0002]

```

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

```

<210> 6
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

```

<400> 6
gacatccaga tgaccagtc tccatcctct ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcaattgce gggcaagica gagcatigat agttatttac atiggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctect gatctatagt gcatccgagt tgcaaagtgg ggteccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag gttgtgtggc gtccctttac gtteggccaa 300
gggaaccaagg tggaatcaa acgg                                     324

```

<210> 7
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

```

<400> 7
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1              5              10              15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
      20              25              30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35              40              45
Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50              55              60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
      85              90              95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      100              105

```

<210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

```

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

```

[0003]

100 105

<210> 9
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

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

<210> 10
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

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

<210> 11
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 11
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Leu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Val Glu Pro Lys
 100 105 110

[0004]

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 115 120 125
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 130 135 140
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 145 150 155 160
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 165 170 175
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 180 185 190
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 195 200 205
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 210 215 220

 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 225 230 235 240
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 245 250 255
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 260 265 270
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 275 280 285
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 290 295 300
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 305 310 315 320
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 325 330 335
 Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 5
 <223> 在该序列中, 通常出现在位置5处的Cys被Ser残基替代

<400> 12
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 13
 aatckcaggt kccagatg 18

<210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 14
 gtttyrggtkk gtaacact 18

<210> 15

[0005]

<211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 15
 atgmettgw acactgtg 18

<210> 16
 <211> 267
 <212> DNA
 <213> 毛茛属, 种未知

<400> 16
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtc ggacattaac aagtggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggacagtc ctaagccct gatctatgag gcaccaaatt tgcaaaagtg ggccccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgctg caactatata ctgtcaa 267

<210> 17
 <211> 267
 <212> DNA
 <213> 毛茛属, 种未知

<400> 17
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggcaagtc ggggtattag cactggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatagt gcaccaaatt tagaaacagg ggccccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc caggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaa 267

<210> 18
 <211> 267
 <212> DNA
 <213> 毛茛属, 种未知

<400> 18
 gacatccaga tgacccagac tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggcaagtc ggggtattag actggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatagg gcaccaaatt tggaaacagg ggccccatca 180
 aggttcagcg gaagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tetgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaa 267

<210> 19
 <211> 267
 <212> DNA
 <213> 毛茛属, 种未知

<400> 19
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggcaagtc ggggtattag cactggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatagt gcaccaaatt taggaacagg ggccccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc caggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaa 267

<210> 20
 <211> 267
 <212> DNA
 <213> 毛茛属, 种未知

<400> 20
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
 atcacttgcc gggcggtgca ggacattaac aagtggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggacagtc ctaagccct gatctatgag gcaccaaatt tgcaaaagtg ggccccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgctg caactatata ctgtcag 267

[0006]

<210> 21
<211> 267

<212> DNA
<213> 毛猿属, 种未知

<400> 21
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagttacc 60
atcacttgcc gggcgagtc ggacattagt aattatttag cctggatca gcagaaacca 120
gggaaaactc ctaggctect gatctatgct gcattccagtt tacaaactgg gattccctct 180
cggttcagcg gcagtggatc tgggacagac tacactctca ccacagcag cctgcagct 240
gaagatgtg caattatta ctgtcaa 267

<210> 22
<211> 267
<212> DNA
<213> 毛猿属, 种未知

<400> 22
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtc ggacattaac aagtggtag cctggatca gcagaaacca 120
gggacagtc ctaagccct gatctatgag gcaccaaaat tgcaaatgg ggtcccatca 180
aggctcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccacagcag cctgcagct 240
gaagatgtg caattatta ctgtcag 267

<210> 23
<211> 267
<212> DNA
<213> 毛猿属, 种未知

<400> 23
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtc ggacattaac aagtggtag cctggatca gcagaaacca 120
gggacagtc ctaagccct gatctatgag gcaccaaaat tgcaaatgg ggtcccatca 180
aggctcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccacagcag cctgcagct 240
gaagatgtg caattatta ctgtcag 267

<210> 24
<211> 267
<212> DNA
<213> 毛猿属, 种未知

<400> 24
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
gtcacttgcc gggcgagtc ggacattaac aagtggtag cctggatca gcagaaacca 120
gggacagtc ctaagccct gatctatgag gcaccaaaat tgcaaatgg ggtcccatca 180
aggctcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccacagcag cctgcagct 240
gaagatgtg caattatta ctgtcag 267

<210> 25
<211> 267
<212> DNA
<213> 毛猿属, 种未知

<400> 25
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtc ggacattaac aagtggtag cctggatca gcagaaacca 120
gggacagtc ttaagccct gatctatgag gcaccaaaat tgcaaatgg ggtcccatca 180
aggctcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccacagcag cctgcagct 240
gaagatgtg caattatta ctgtcag 267

<210> 26
<211> 267
<212> DNA
<213> 毛猿属, 种未知

<400> 26
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
atcacttgcc gggcgagtc ggacattaac aagtggtag cctggatca gcagaaacca 120
gggacagtc ctaagccct gatctatgag gcaccaaaat tgcaaatgg ggtcccatca 180
aggctcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccacagcag cctgcagct 240

[0007]

gaagatgetg caacttatta ctgtcag

267

<210> 27
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 毛獾属, 种未知

<400> 27
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210> 28
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 毛獾属, 种未知

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

<210> 29
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 毛獾属, 种未知

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

<210> 30
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 毛獾属, 种未知

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

[0008]

```

      50      55      60
Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
      85

```

<210> 31
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 毛猿属, 种未知

```

<400> 31
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Cys Gln Asp Ile Asn Lys Trp
      20      25      30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
      35      40      45
Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
      85

```

<210> 32
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 毛猿属, 种未知

```

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

```

<210> 33
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 毛猿属, 种未知

```

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

```

<210> 34
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 毛猿属, 种未知

```

<400> 34
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp

```

[0009]

```

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

```

<210> 35
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 毛猴属，种未知

```

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

```

<210> 36
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 毛猴属，种未知

```

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

```

<210> 37
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 毛猴属，种未知

```

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

```

<210> 38
 <211> 267
 <212> DNA
 <213> 夜猴

[0010]

<400> 38
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacctgcc aggtgagtc gggatttagc agtgaattac cctggtatca gcagaaacca 120
gggaagccc ctatgctctt gatctatgct gcaaccaaat tgcagtcggg aatcccatct 180
cggttcagtg gccatggatc tgggacagat tttactctca ccacagcag cctgcagcct 240
gatgatcttg ctacttatta ctgtcaa 267

<210> 39
<211> 267
<212> DNA
<213> 夜猴

<400> 39
gacatccaga tgaccagtc tgcattctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
attacttgcc aggcagtc gggcattacc agtgatttag cctggtatca gcaaaagcca 120
gggaagccc ctaagctctt gatctatgag gcatccagtt tacaaagcga ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat tttactctca ccacagcag cctgcagcct 240
gaagattttg taacttatta ctgtcaa 267

<210> 40
<211> 267
<212> DNA
<213> 夜猴

<400> 40
gacatccaga tgaccagac tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcagtc agacatttac aattatttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaagccc ctagctctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaacagg gattccctct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagac tacactctca ccacagcag cctgcagcct 240
gatgatcttg ccacttatta ctgtcaa 267

<210> 41
<211> 267
<212> DNA
<213> 夜猴

<400> 41
gacatccaga tgaccagac tccatcttcc ctgctgcat ctgtaggaga caaagtcacc 60
atcacttgcc gggaagtc gggcatttag agctggttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaagccc ctaagctctt gatccataag gcatcaaat tggaaacagg ggtcccatca 180
aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactctca ccacagcag cctgcagcct 240
gaagatctcg caacatatta ctgtcaa 267

<210> 42
<211> 267
<212> DNA
<213> 夜猴

<400> 42
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggaga caaagtcacc 60
atcacttgcc gggaagtc gggcatttag aataatttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaagccc ctaagcccct gatctattat gcatccagtt tgcaaacagg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat tacactctca ccacagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaa 267

<210> 43
<211> 267
<212> DNA
<213> 夜猴

<400> 43
gacaaaccaga tgatccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gagecagtc agtatttagc agctggttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggacagtc ctaagccctt gatctatgac gcatccaaat tgctaaagtg ggtcccatca 180
aggttcagtg gctgtggatc tgggacagat tttactctca ccacagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaa 267

<210> 44
<211> 89
<212> PRT

[0011]

<213> 夜猴

<400> 44

```

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

```

<210> 45

<211> 89

<212> PRT

<213> 夜猴

<400> 45

```

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

```

<210> 46

<211> 89

<212> PRT

<213> 夜猴

<400> 46

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Asn Tyr
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Arg Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
          85

```

<210> 47

<211> 89

<212> PRT

<213> 夜猴

<400> 47

```

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

```

[0012]

<210> 48
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 夜猴

<400> 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Thr Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210> 49
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> 夜猴

<400> 49
 Asp Asn Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Lys Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Cys Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210> 50
 <211> 1023
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 50
 gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgct ctgtgggca tagagtgacc 60
 ataccctgca gagccagcca ggccatcgac agctacctgc actggtatca gcagaagcct 120
 ggcaaggccc ctaagctget gatctacagc gccagcaatc tggagaccgg cgtgcctagc 180
 agattcagcg gcagcggtc cggeaccgac tteacctga ccacagcag cctgcctgct 240
 gaggatttcg ccacctacta ctgccagcag gtggtgtgga gacctttcac cttcgccag 300
 ggcaccaagg tggagatcaa ggggtggag cccaagagct gcgataagac ccacacctgc 360
 cccccctgcc ctgccccga gctgctgggc ggaccagcg tgttctggt ccccccaag 420
 cctaaggaca cctgatgat cagcagaacc cccaggtga cctgcgtggt ggtggatgtg 480
 agccacgagg accctgaggt gaagtccaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaat 540
 gccaaagcca agcccaggga ggagcagtae aacagcaect accgggtggt gtccgtgctg 600
 accgtgctgc accaggattg gctgaacggc aaggagtaca agtgcagggt gtccaacaag 660
 gccttgcttg cccctatcga gaaaaccatc agcaaggcca agggccagcc cagagagccc 720
 cagggtgaca ccttgccttc tagcagagat gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc 780
 tgcttggtga agggcttcta cccagcgac atgcccgtgg agtgggagag caacggccag 840
 cccgagaaca actacaagac caccctccct gtgctggaca gcgatggcag cttcttctg 900
 tacagcaagc tgaccgtgga caagagcaga tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc 960
 gtgatgcacg aggcctgca caatcactac acccagaaga gcctgagcct gtccctggtg 1020
 aag 1023

<210> 51
 <211> 1023
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

[0013]

<223> 合成的构建体

<400> 51

```

gacatccaga tgaccagag cccacagcag ctgagcgct ctgtggcgga tagagtgage 60
atcacctgca gagecagcca ggecagcagc agetacctgc actgggtatca gcagaagcct 120
ggcaggcccc ctaagctgct gatctacagc gccagcaate tggagaccgg cgtgcctage 180
agattcagcg gcagcgctgc cggcaccgac ttcacctga ccacacagcag cctgctgctt 240
gaggatttgc ccacctacta ctgccagcag gtgggtgtga gacctttcac ctccggccag 300
ggcaccaagg tggagatcaa gcgggtggag cccaagagca gcgataagac ccacacctgc 360
ccccctgcc ctgcceccga gctgctgggc ggaccacagc tgttctgtt ccccccaag 420
cctaaggaca cctgatgat cagcagaacc cccagggtga cctgcgtggt ggtggatgtg 480
agecacgagg acctgaggt gaagttaaac tggtaagtgg acggcggtga ggtgcacaat 540
gccaaagcca agcccaggga ggagcagtac aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg 600
acctgctgc accaggattg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt gtccaaacag 660
gcectgectg cccctatcga gaaaaccatc agcaaggcca agggccagcc cagagagccc 720
caggtgtaca cctgcccc tagcagagat gagetgacca agaaccaggt gtccctgacc 780
tgctgtgtga agggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag 840
cccagaaca actacaagac caccccct gtgctggaca gcgatggcag cttcttctg 900
tacagcaagc tgaccgtga caagagcaga tggcagcagg gcaacgtgtt cagetgcagc 960
gtgatgcacg aggcctgca caatcactac acccagaaga gctgagcct gtccctggc 1020
aag 1023

```

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 52

```

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

```

<210> 53

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 53

```

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

```

<210> 54

<211> 108

<212> PRT

[0014]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 54

```

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

```

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 55

```

Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser
 1           5

```

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> 夜猴

<400> 56

```

Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1           5

```

<210> 57

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 57

```

Gly Cys Cys Ala Cys Cys
 1           5

```

<210> 58

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 58

```

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1           5           10           15
Asp Ala Arg Cys
           20

```

<210> 59

<211> 341

<212> PRT

[0015]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 59

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Asp Ser Tyr
20      25      30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile
35      40      45
Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Leu Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Val Glu Pro Lys
100     105     110
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
115     120     125
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
130     135     140
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
145     150     155     160
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
165     170     175
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
180     185     190
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
195     200     205
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
210     215     220
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
225     230     235     240
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
245     250     255
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
260     265     270
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
275     280     285
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
290     295     300
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
305     310     315     320
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
325     330     335
Leu Ser Pro Gly Lys
340

```

<210> 60

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 60

```

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

```

[0016]

```

      115      120      125
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
      130      135      140
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145      150      155      160
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
      165      170      175
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
      180      185      190
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
      195      200      205
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
      210      215      220
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
225      230      235      240
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
      245      250      255
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
      260      265      270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
      275      280      285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
      290      295      300
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Glu
305      310      315      320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      325

```

<210> 61
 <211> 1044
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

```

<400> 61
atggcgagca cccatattca gatgaccag agcccgagca gccgagcgc gacgtgggt 60
gatcgtgtga ccattaccctg ccgtgcgagc caggcgattg atagctatct gcattgggtat 120
cagcagaaac cgggcaaacg gccgaaactg ctgatttata ggcgagcaaa cctggaaacc 180
ggcgtgcgca gccgttttag cggcagcggg agcggcaccg attttaccct gaccattagc 240
agcctgetgc cggaagattt tgcgacctat tattgccagc aggtgggtgt gcgtccgttt 300
acctttggcc agggcaccaa agtggaaatt aaacgcgtgg aaccgaaaag cagcgataaa 360
accacacagt gcccgccgtg tccggcgccg gaactgctgg gtggcccgag cgtgtttctg 420
tttccgcgca aaccgaaaga taccctgatg attagccgta ccccggaagt gacctgcgtg 480
gtgttgatg tgagccatga agatccgga gtgaaattca actggtatgt ggaatggcgtg 540
gaagtgcata acgcgaaaac caaacgcgtg gaagaacagt ataacagcac ctatcgtgtg 600
gtgagcgtgc tgaccgtgct gcacagcatg tggtgaacg gcaaaagata caaatgcaaa 660
gtgtctaaca aagcgtgcc gccgcgcatg gaaaaaacca tcagcaaacg gaaaggccag 720
ccgcgtgaac cgcaggtgta taccctgccg ccgagccgtg atgaactgac caaaaaccag 780
gtgagcctga cctgcctggt gaaagctttt taccgcgagc atattgcgtt ggaatgggaa 840
agcaacggcc agccgaaaaa caactataaa accaccgcgc cggcgctgga tagcgalgce 900
agctttttcc tgtatagcaa actgaccgtg gataaaagcc gttggcagca ggcaacgtg 960
tttagctgca gcgtgatgca tgaagcgtg cataaccatt ataccagaa aagcctgagc 1020
ctgagcccggt gtaaagcgcc ggccg

```

<210> 62
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

```

<400> 62
Met Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
  1      5      10      15
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala
  20     25     30
Ile Asp Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
  35     40     45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser
  50     55     60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

```

[0017]

```

65          70          75          80
Ser Leu Leu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val
      85          90          95
Trp Arg Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      100          105          110
Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
      115          120          125
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
      130          135          140
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
      145          150          155
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
      165          170          175
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
      180          185          190
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
      195          200          205
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
      210          215          220
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
      225          230          235
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
      245          250          255
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
      260          265          270
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
      275          280          285
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
      290          295          300
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
      305          310          315
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
      325          330          335
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ala Ala Ala Val Asp His His
      340          345          350
His His His His
      355

```

<210> 63

<211> 216

<212> PRT

<213> 来自Swissprot INSERT的CH2/CH3结构域序列

<400> 63

```

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

```

[0018]

<210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 1
 <223> Xaa = X为缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸。优选地，X为缬氨酸。

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 6
 <223> Xaa = X不存在为除半胱氨酸以外的其他氨基酸。优选地，X为丝氨酸。

<400> 64
 Xaa Glu Pro Lys Ser Xaa Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15
 Ala

<210> 65
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 65
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 1 5 10

<210> 66
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 66
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 1 5 10

<210> 67
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 67
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Glu Pro Lys Ser
 1 5 10

<210> 68
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 68
 ctgtaggtct actgggtcag aggtaggaga gacagacgta gacatcctct ggcacagtgg 60
 tagtgaacgg cccgttcagt ctcgtaacta tcaataaatg taacctggt cgtctttggt 120
 ccccttgggg gattcgagga ctagatatca cgtaggctca acgtttcacc ccagggtagt 180
 gcaaagtcac cgtcacctag accctgtcta aagtgagagt ggtagtcgtc agacgttgga 240
 ettctaaaac gatcatgat gacagttgtc caacacaccg caggaaaatg caagccggtt 300
 ccctggttcc acctttagtt tgcc 324

1	GAG ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCT CTG TCT GCA TCT GTA	45
1	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val	15
46	GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT GAT	90
16	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp	30
91	AGT TAT TTA CAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG	135
31	Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	45
136	CTC CTG ATC TAT AGT GCA TCC GAG TTG CAA AGT CGG GTC CCA TCA	180
46	Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser	60
181	CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC	225
61	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	75
226	AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG	270
76	Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	90
271	GTT CTG TGG CGT CCT TTT ACC TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA	315
91	Val Val Trp Arg Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu	105
316	ATC AAA CGG	324
106	Ile Lys Arg	

图 1

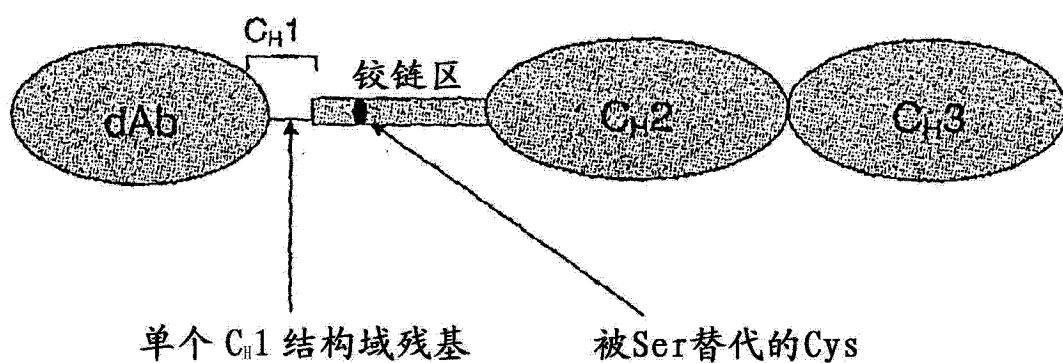


图 2A

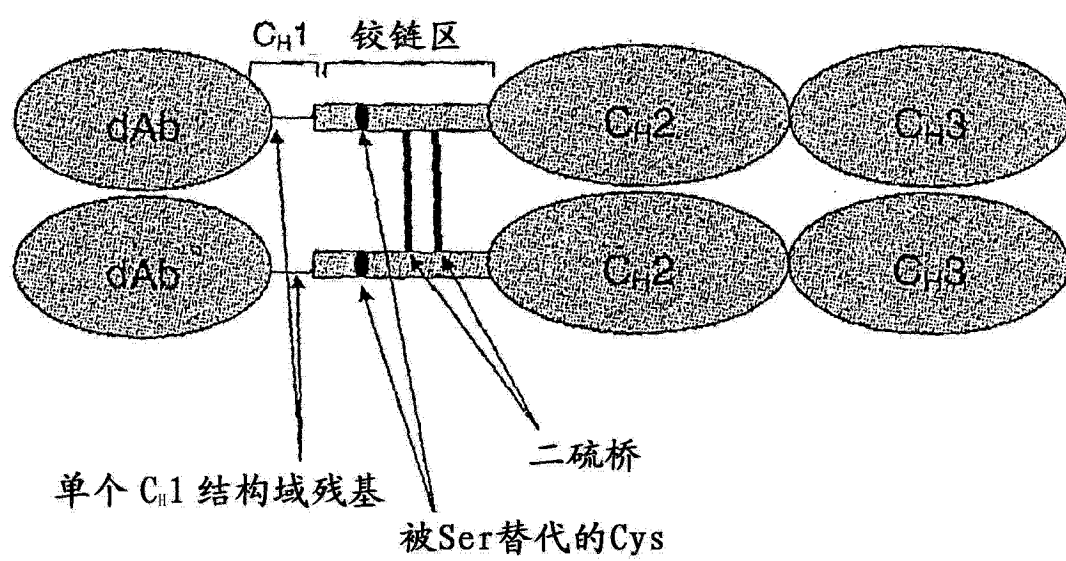


图 2B

猿序列

猿核苷酸序列 1 (SEQ ID No: 16)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTCAG

猿核苷酸序列 2 (SEQ ID No: 17)

GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
ACTTGCTGGGCAAGTCAGGGTATTAGCCACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCTAAGCTCCTGATCTATAGTGCATCAAATTTAGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAGT
GGAAGTGGATCCAGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCA
ACATATTACTGTCAA

猿核苷酸序列 3 (SEQ ID No: 18)

GACATCCAGATGACCCAGACTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCAAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGGGCATCAAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGATTCAGC
GGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATATTGCA
ACATATTACTGTCAA

猿核苷酸序列 4 (SEQ ID No: 19)

GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
ACTTGCTGGGCAAGTCAGGGTATTAGCCACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCTAAGCTCCTGATCTATAGTGCATCAAATTTAGGAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAGT
GGAAGTGGATCCAGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCA
ACATATTACTGTCAA

猿核苷酸序列 5 (SEQ ID No: 20)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGTGTGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GTCCCTAAGCCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTCAG

狢核苷酸序列 6 (SEQ ID No: 21)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTTACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGGCATTAGTAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
ACTCCTAGGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTACAACTGGGATTCCCTCTCGGTTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACAGACTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATGTTGCA
ATTTATTACTGTCAA

狢核苷酸序列 7 (SEQ ID No: 22)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGCTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTTCAG

狢核苷酸序列 8 (SEQ ID No: 23)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTCAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTTCAG

狢核苷酸序列 9 (SEQ ID No: 24)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCGTC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTTCAG

狢核苷酸序列 10 (SEQ ID No: 25)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTTCAG

狢核苷酸序列 11 (SEQ ID No: 26)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATTAAGGTTTCAGC

GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTCAG

狢氨基酸序列 1 (SEQ ID No: 27)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

狢氨基酸序列 2 (SEQ ID No: 28)

DIQMIQSPSSLSASVGDRTTITCWASQGISHWLAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS
GSGSRDFTLTISSLQPEDATYYCQ

狢氨基酸序列 3 (SEQ ID No: 29)

DIQMTQTPSSLSASVGDRTTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDATYYCQ

狢氨基酸序列 4 (SEQ ID No: 30)

DIQMIQSPSSLSASVGDRTTITCWASQGISHWLAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLGTGVPSRFS
GSGSRDFTLTISSLQPEDATYYCQ

狢氨基酸序列 5 (SEQ ID No: 31)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRACQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

狢氨基酸序列 6 (SEQ ID No: 32)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKTPRLLIYAASSLQTGIPSRFS
GSGSGTDYTLTISSLQSEDVAIYYCQ

狢氨基酸序列 7 (SEQ ID No: 33)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

狢氨基酸序列 8 (SEQ ID No: 34)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWSAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

狢氨基酸序列 9 (SEQ ID No: 35)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

狢氨基酸序列 10 (SEQ ID No: 36)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQOKPGTVLKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISLQPEDAATYYCQ

狢氨基酸序列 11 (SEQ ID No: 37)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQOKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPLRFS
GSGSGTYFTLTISLQPEDAATYYCQ

梟猴序列**梟猴核苷酸序列 1 (SEQ ID No: 38)**

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGCAGGAGACAGAGTCACCATC
ACCTGCCAGGTGAGTCAGGGAATTAGCAGTGAATTACTCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCATATGCTCTTGATCTATGCTGCAACCAAATTGCAGTCGGGAATCCCATCTCGGTTTCAGT
GGCCATGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCT
ACTTATTACTGTCAA

梟猴核苷酸序列 2 (SEQ ID No: 39)

GACATCCAGATGACCCAGTCTGCATTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATT
ACTTGCCAGGCGAGTCAGGGCATTACCAGTGATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAGCCAGGGAAC
GCCTCTAAGCTCCTGATCTATGAGGCATCCAGTTTACAAAGCGAGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGAGAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGTA
ACTTATTACTGTCAA

梟猴核苷酸序列 3 (SEQ ID No: 40)

GACATCCAGATGACCCAGACTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAAGACATTTACAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
ACTCCTAGGCTCTTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAACCTGGGATTCCTCTCGGTTTCAGT
GGCAGTGGATCTGGGACAGACTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCC
ACTTATTACTGTCAA

梟猴核苷酸序列 4 (SEQ ID No: 41)

GACATCCAGATGACCCAGACTCCATCCTCCCTGCCTGCATCTGTAGGAGACAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCAAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCAAGCTCCTGATCCATAAGGCATCAAATTTGGAAACAGGGTCCCATCAAGGTTTCAGT
GGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATCGCA
ACATATTACTGTCAA

泉猴核苷酸序列 5 (SEQ ID No: 42)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGACAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAATAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCTAAGCCCCTGATCTATTATGCATCCAGTTTGCAAAGCGGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGGCAGATTACACTCTCACCACCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA
ACTTATTACTGTCAA

泉猴核苷酸序列 6 (SEQ ID No: 43)

GACAACCAGATGATCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
ACTTGCCGAGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCTCTGATCTATGACGCATCCAAATTGCTAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGT
GGCTGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA
ACTTATTACTGTCAA

泉猴氨基酸序列 1 (SEQ ID No: 44)

DIQMTQSPSFLSASAGDRVITTCQVSQGISSELLWYQQKPGKAPMLLIYAATKLQSGIPSRFS
GHGSGTDFTLTISSLQPDFFATYYCQ

泉猴氨基酸序列 2 (SEQ ID No: 45)

DIQMTQSAFSLASVGDRTTITCQASQGITSDLAWYQQKPGNASKLLIYEASSLQSEVPSRFS
GSGSGRDTLTISSLQPEDFVTYYCQ

泉猴氨基酸序列 3 (SEQ ID No: 46)

DIQMTQTPSSLSASVGDRTTITCRASQDIYNYLAWYQQKPGKTPRLLIYAASSLQTGIPSRFS
GSGSGTDYTLTISSLQPDFFATYYCQ

泉猴氨基酸序列 4 (SEQ ID No: 47)

DIQMTQTPSSLPASVGDKVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIHKASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

泉猴氨基酸序列 5 (SEQ ID No: 48)

DIQMTQSPSSLTASVGDKVTITCRASQGISNNLAWYQQKPGKAPKPLIYYASSLQSGVPSRFS
GSGSGADYTLTTSSSLQPEDFATYYCQ

泉猴氨基酸序列 6 (SEQ ID No: 49)

DNQMIQSPSSLTASVGDRVITITCRASQSISSWLAWYQQKPGTVPKPLIYDASKLLSGVPSRFS
GCGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

图 3

	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q	
1	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTGTCGCACTGTAGGAADACGGTCTCACCATCAGTTGCCGGGCAAGTCA	80
1	CTGTACGTCCTACTGGGTCAGAGGTAGGAGACACAGACCTAGACATCCTCTCGGCACTGGTAGTGAACGCCCGTTCCAGT	80
	S I D S Y L H W V Q Q K P G K A P K L L I Y S A S E	
81	GAGCATTTGATAGTTATTTACATTGGTACGAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTATAGTGCATCCAGCT	160
81	CTCGTAACCTTCATTAATGTAACCATGTTGGTCTCTTGGTCCCCTTCGGGGATTGAGGACTAGATATCACTAGGCTCA	160
	RpnI	
	L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P	
161	TGCAAACTGAGGCTCCATCAGCTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCAGCTCTCACCATCACCAGTCTGCAACT	240
161	ACGTTTCACCCGAGGTAAGTGAAGCTCACCCTCAGCTACACCCCTCTCTAAACTGAGACTGGTAGTCGTCAGACGTTGGA	240
	SapDI	
	E D F A T Y Y C Q Q V V W R P P T F G Q G T K V E I R	
241	GAGATTTTGGTACGTAAGTCTGTCACAGGTTGTGTCGGCTCTTTTACGTTTCGGCCAGGGAACCAAGTGCATATCAA	320
241	CTTCTAAACGATGCAATGATGACAGTTGTCAACACACCCGAGGAAAATGCAAGCGGTTCCCTGCTTCCACCTTTAGTT	320
	R	
321	ACGG 324	
321	TCCC 324	

图 4

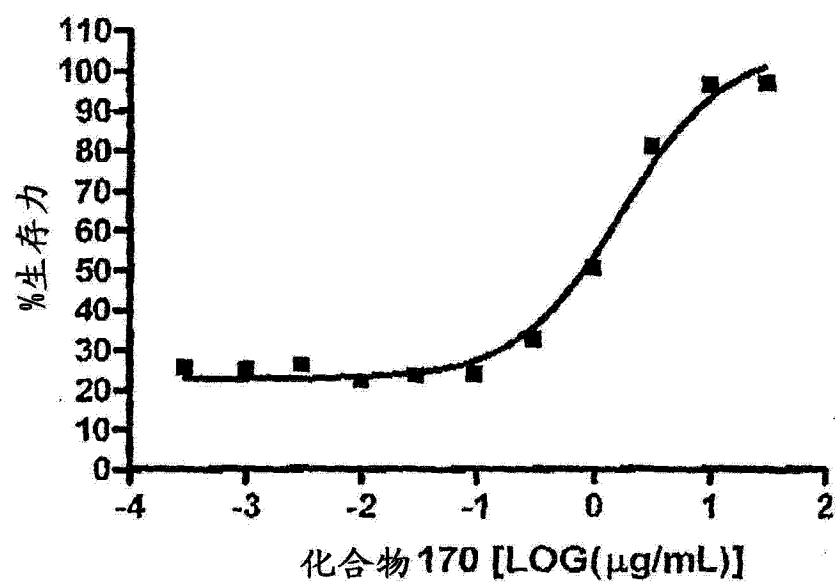


图 5

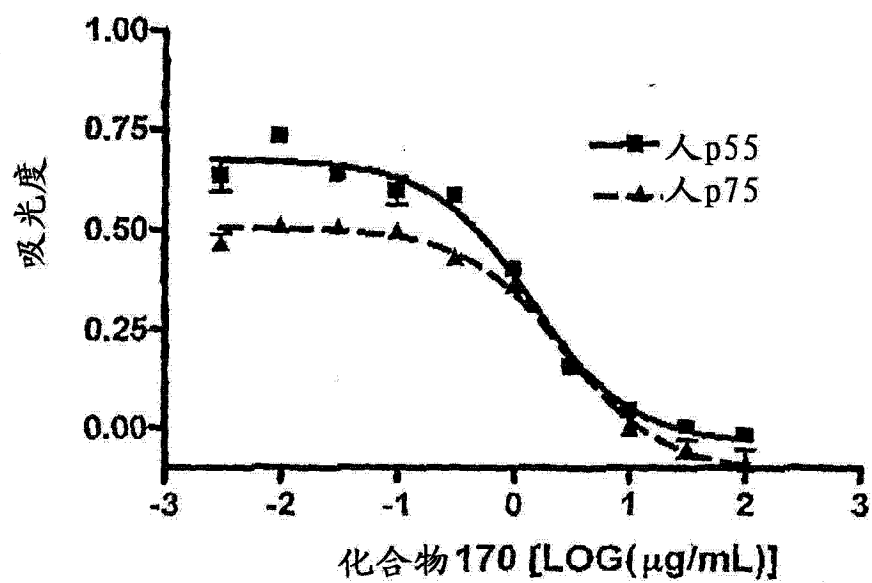


图 6

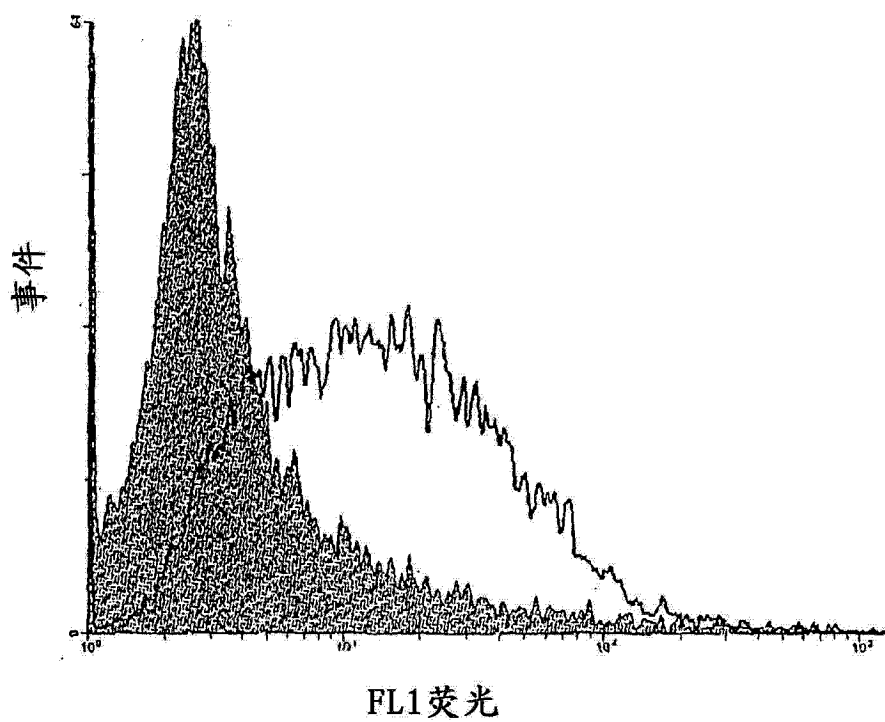


图 7

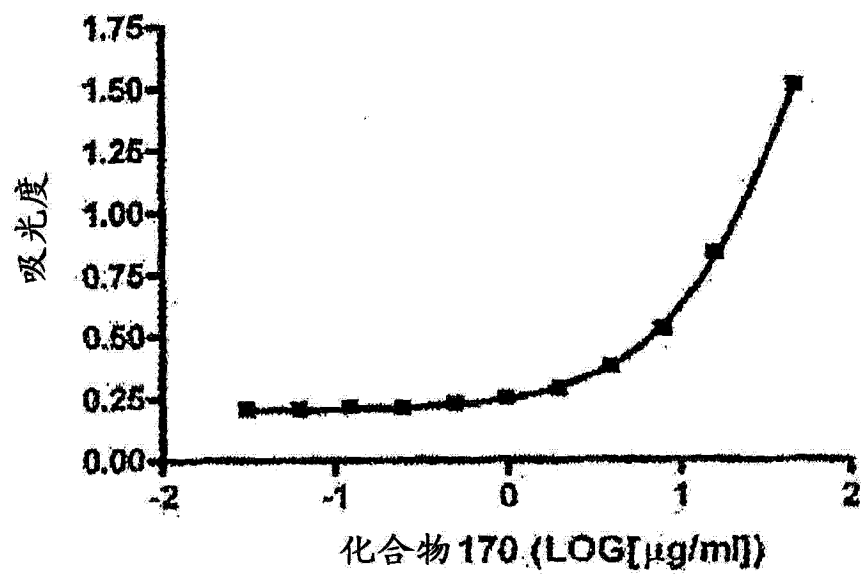


图 8

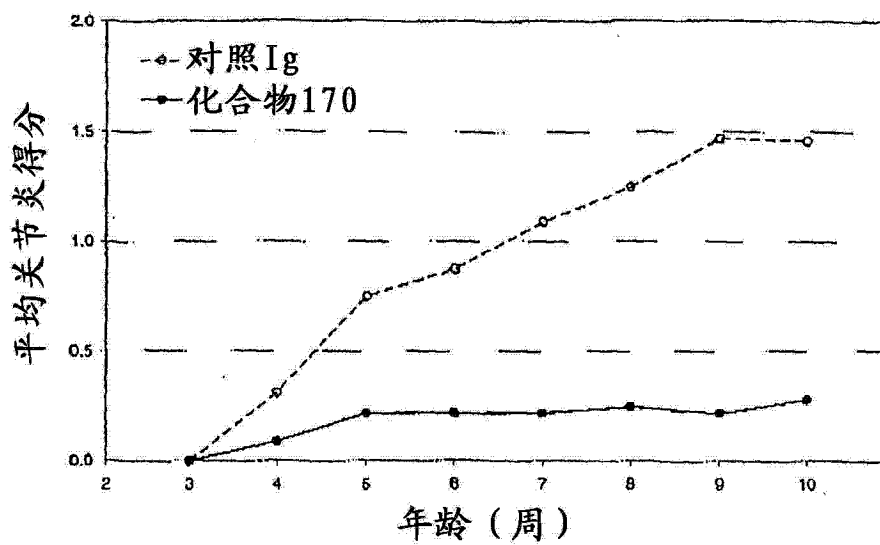


图 9A

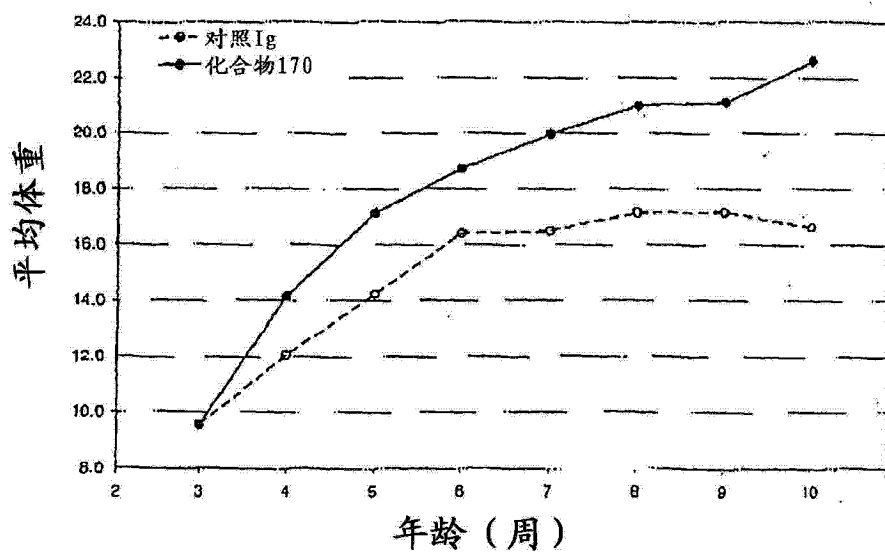


图 9B

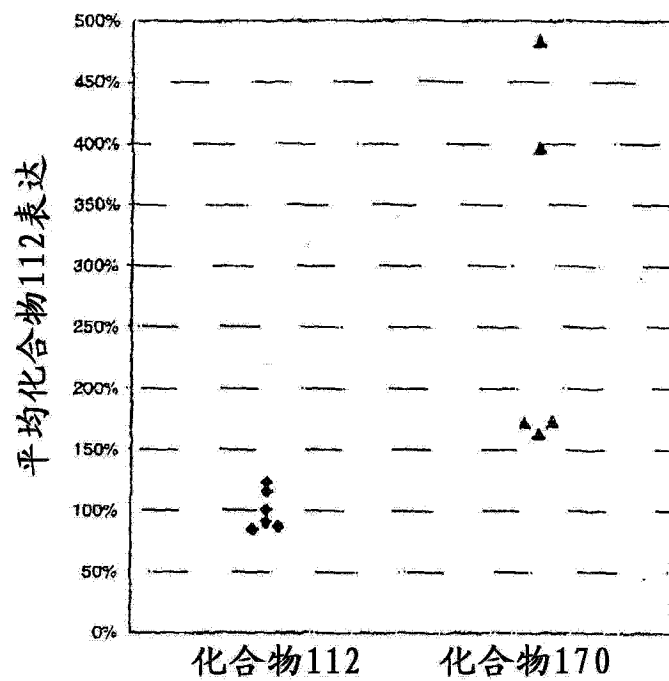


图 10

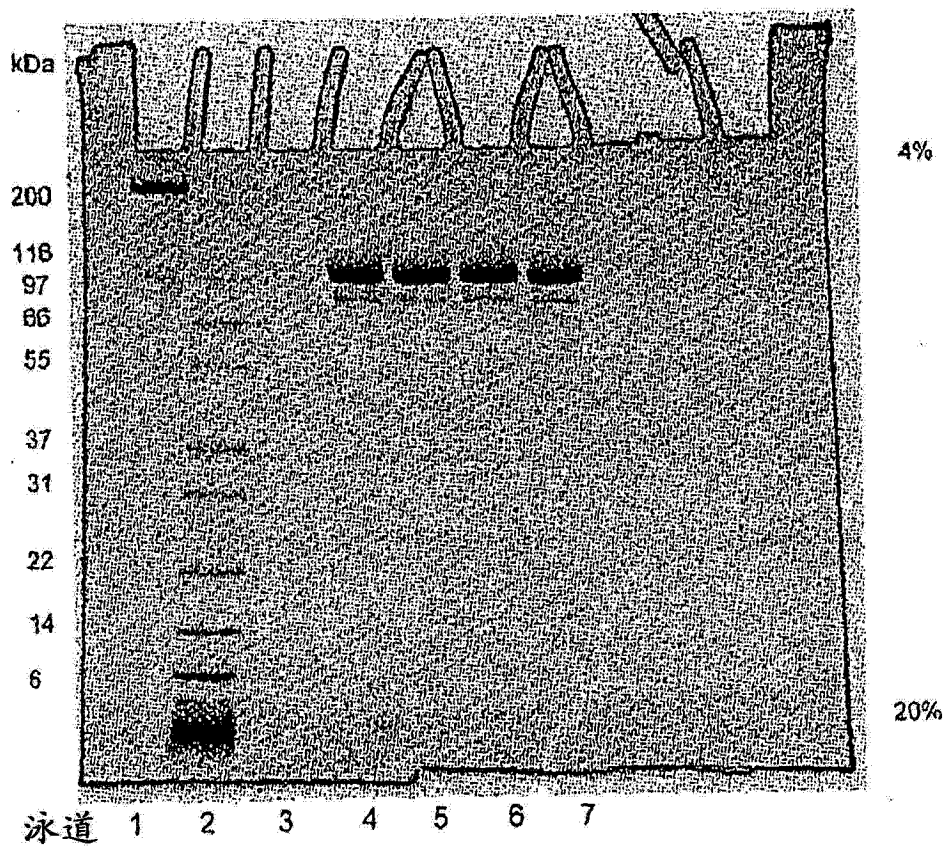


图 11

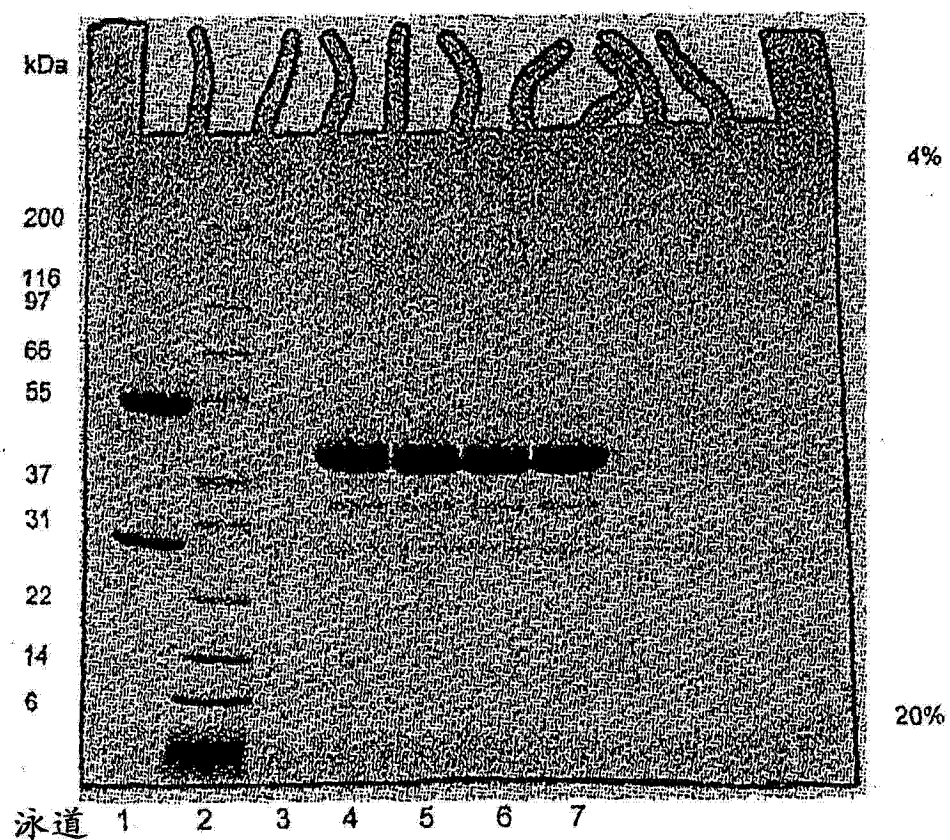


图 12