



(10) 授权公告号 CN 110177809 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 03

(21) 申请号 201780083681.4

(22) 申请日 2017.11.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110177809 A

(43) 申请公布日 2019.08.27

(30) 优先权数据
62/422,770 2016.11.16 US
62/557,208 2017.09.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.07.16

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/079507 2017.11.16

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/091606 EN 2018.05.24

(73) 专利权人 埃博灵克斯股份有限公司
地址 比利时茨维纳德

(72) 发明人 迪亚娜·范霍里克
安内利斯·罗布鲁克
卡特林恩·斯托特勒斯
若昂·维埃拉 爱德华·麦高恩

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021
专利代理师 吴小明 张莹

(51) Int.Cl.
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 105392887 A, 2016.03.09
WO 2013173820 A2, 2013.11.21
WO 2012066058 A1, 2012.05.24
WO 2016116626 A1, 2016.07.28
Kuo SR等.Engineering a CD123xCD3
bispecific scFv immunofusion for the
treatment of leukemia and elimination of
leukemia stem cells.《Protein Eng Des
Sel》.2012,第25卷(第10期),561-569.

审查员 张华

权利要求书2页 说明书165页
序列表129页 附图58页

(54) 发明名称

能够结合CD123和TCR α / β 的T细胞募集多肽

(57) 摘要

提供了多肽,其结合靶细胞上的CD123和T细胞上的TCR的恒定结构域。所述多肽可用于治疗CD123相关癌症或炎症病症的方法中。

1. 重定向T细胞用于杀伤CD123表达细胞的多肽,包含一个特异性结合T细胞受体(TCR)的恒定结构域的免疫球蛋白单可变结构域(ISV)和一个或多个特异性结合CD123的ISV,

其中所述特异性结合TCR的恒定结构域的ISV由分别为FR1至FR4的4个框架区和分别为CDR1至CDR3的3个互补决定区组成,其中CDR1是SEQ ID NO:181,CDR2是SEQ ID NO:192,和CDR3是SEQ ID NO:218;并且

其中所述一个或多个特异性结合CD123的ISV由分别为FR1至FR4的4个框架区和分别为CDR1至CDR3的3个互补决定区组成,其中CDR1是SEQ ID NO:11,CDR2是SEQ ID NO:17,和CDR3是SEQ ID NO:21。

2. 根据权利要求1所述的多肽,其中所述特异性结合TCR的ISV选自SEQ ID NO:42和与SEQ ID NO:42具有大于90%的序列同一性的ISV。

3. 根据权利要求1所述的多肽,其中所述一个或多个特异性结合CD123的ISV选自SEQ ID NO:1和与SEQ ID NO:1具有大于90%的序列同一性的ISV。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的多肽,其包含另外的由分别为FR1至FR4的4个框架区和分别为CDR1至CDR3的3个互补决定区组成的特异性结合CD123的ISV,其中CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2是SEQ ID NO:18,和CDR3是SEQ ID NO:23。

5. 根据权利要求4所述的多肽,其中所述另外的一个或多个特异性结合CD123的ISV选自SEQ ID NO:7和与SEQ ID NO:7具有大于90%的序列同一性的ISV。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的多肽,其包含两个或多个特异性结合CD123的ISV,其中所述两个或多个特异性结合CD123的ISV是包含第一ISV和第二ISV的双互补位,其中所述第一ISV与CD123上的表位结合,该表位不同于所述第二ISV结合的CD123上的表位。

7. 根据权利要求1至3中任一项所述的多肽,其中所述特异性结合TCR的ISV和所述一个或多个特异性结合CD123的ISV由单结构域抗体、dAb、纳米抗体或VHH。

8. 根据权利要求1至3中任一项所述的多肽,其中所述特异性结合TCR的ISV和所述一个或多个特异性结合CD123的ISV由人源化VHH、骆驼源化VH或通过亲和力成熟获得的VHH组成。

9. 根据权利要求1至3中任一项所述的多肽,其中所述多肽选自由SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61组成的组,或者选自与SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61之一具有大于90%的序列同一性的多肽。

10. 一种构建体,其包含根据权利要求1-9中任一项所述的多肽,并且进一步包含一个或多个的其他基团、残基或结合单元,任选地通过一个或多个肽接头连接,其中与根据权利要求1-9中任一项所述的相应多肽相比,所述一个或多个其他基团、残基或结合单元为所述构建体提供增加的半衰期。

11. 根据权利要求10所述的构建体,其中为所述构建体提供增加的半衰期的所述一个或多个的其他结合单元选自由以下组成的组:可与血清白蛋白或血清免疫球蛋白结合的结合单元。

12. 根据权利要求11所述的构建体,其中所述血清白蛋白是人血清白蛋白。

13. 根据权利要求11所述的构建体,其中所述血清免疫球蛋白是IgG。

14. 一种核酸,其编码根据权利要求1-9中任一项所述的多肽或根据权利要求10或11所

述的构建体,所述多肽或构建体是这样的:它可以通过表达编码其的核酸而获得,其任选地是遗传构建体的形式。

15. 一种宿主或宿主细胞,其包含:根据权利要求14所述的核酸或遗传构建体或包含根据权利要求14所述的核酸和/或遗传构建体的表达载体。

16. 用于产生根据权利要求1-9中任一项所述的多肽或根据权利要求10或11所述的构建体的方法,所述多肽或构建体是这样的:它可以通过表达编码其的核酸而获得,所述方法至少包括以下步骤:

a) 在合适的宿主细胞或宿主生物体或另一个合适的表达系统中,表达根据权利要求14所述的核酸;任选地随后

b) 分离和/或纯化根据权利要求1-9中任一项所述的多肽或根据权利要求10或11所述的构建体。

17. 一种组合物,其包含至少一种根据权利要求1-9中任一项所述的多肽,或根据权利要求10或11所述的构建体,或根据权利要求14所述的核酸。

18. 根据权利要求1-9中任一项所述的多肽、根据权利要求10或11所述的构建体或根据权利要求17所述的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善CD123相关疾病或病症的药物中的应用,其中所述CD123相关疾病或病症为白血病,其包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病。

能够结合CD123和TCR α/β 的T细胞募集多肽

发明领域

[0001] 本发明提供多特异性T细胞募集多肽,其包含一个特异性结合T细胞受体(TCR)的恒定结构域的免疫球蛋白单可变结构域,和一个或多个结合靶细胞上表达的CD123的免疫球蛋白单可变结构域。本发明还涉及用于这些多特异性多肽的单价CD123结合多肽。本发明还提供了编码所述多肽的核酸以及用于产生本发明多肽的载体、宿主和方法。本发明还涉及利用本发明多肽的治疗方法和提供本发明多肽的试剂盒。

背景技术

[0002] CD123(白介素3受体的 α 亚基,IL-3R α)是75kDa糖蛋白,其在用N-糖苷酶消化后变为43kDa(Sato等,1993,Blood 82:752-761)。CD123由三个细胞外结构域、跨膜结构域和短细胞内区域组成。N-端细胞外结构域对于CD123与IL-3的相互作用有显著贡献,而细胞内区域是信号传导所必需的(Barry等,1997,Blood 89:842-852)。CD123以低亲和力特异性结合IL-3。CD123与本身不与IL-3结合的共同 β (β c)亚基的异二聚化导致IL-3R的形成,IL-3R是IL-3的高亲和力受体。 β c亚基在信号转导中起重要作用,并因此触发一系列生物学功能(Hara等,1996Stem cells 14:605-618)。

[0003] 虽然 β c亚基在各种细胞的表面上表达,但CD123表达更受限于IL-3应答细胞,例如造血干/祖细胞、单核细胞、巨核细胞、B淋巴细胞和浆细胞性树突细胞。IL-3的结合刺激造血细胞的增殖和分化。在这些细胞成熟期间,CD123表达逐渐降低,并且在成熟淋巴细胞和粒细胞中不能被检测到。

[0004] 据报道,CD123在白血病干细胞(LSC)上高表达,并且与许多疾病的发生和发展有关,例如急性髓性白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)和毛细胞白血病(HCL)。参考Liu等人的综述(2015Life Sciences 122:59-64)了解有关CD123和在白血病中相关的临床应用的更多细节。鉴于正常造血干细胞和LSC上CD123表达的差异,CD123是血液癌症中令人关注的治疗靶点。

[0005] AML是一种克隆性恶性疾病,来自具有CD123过表达的LSC细胞的小群体。AML的特征在于骨髓和外周血中骨髓祖细胞的增殖,并导致正常造血作用的破坏。尽管多年来对AML患者的治疗方案和支持性护理有所改善,但在过去三十年中,标准治疗选择并没有发生重大变化。参考Medinger等人(2016Leukemia Research Reports 6:39-49)对AML的新方法和治疗选择的概述。目前,只有35-40%的年龄小于60岁的患者可以治愈所述疾病。对于老年患者(>60岁),总体预后仍然不利。目前,同种异体造血干细胞移植提供最佳的治愈机会。因此,仍然需要治疗AML的新疗法。

[0006] 预防AML和治疗复发的可能策略是使用免疫疗法,其是癌症研究的快速发展领域。免疫疗法将身体的免疫监视系统并且特别是T细胞引导至癌细胞。

[0007] 细胞毒性T细胞(CTL)是杀死癌细胞、被感染(特别是被病毒感染)的细胞或以其他方式受损的细胞的T淋巴细胞。T淋巴细胞(或T细胞)在细胞表面上表达T细胞受体或TCR分子和CD3受体。 $\alpha\beta$ TCR-CD3复合物(或“TCR复合物”)由六种不同的I型单跨越(single-

spanning)跨膜蛋白组成:形成负责配体识别的TCR异二聚体的TCR α 和TCR β 链,以及非共价缔合的CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和 ζ 链(它们带有在受体活化时被磷酸化的细胞质序列基序并募集大量信号传导组分)(Call等,2004,Molecular Immunology 40:1295-1305)。

[0008] T细胞受体的 α 链和 β 链均由恒定结构域和可变结构域组成。在生理学上,T细胞受体的 $\alpha\beta$ 链识别载有肽的MHC复合物,并在与CD3链接合时偶联。这些CD3链随后将接合信号转导至细胞内环境。

[0009] 考虑到天然存在的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)介导细胞溶解的潜力,已经探索了各种策略来募集免疫细胞以介导肿瘤细胞杀伤。然而,特异性T细胞应答的引发依赖于癌细胞对MHC分子的表达以及特异性肽抗原的存在、产生、转运和展示。较新的发展已经尝试了备选的方法,其通过经由基于重组抗体的“双特异性抗体”技术以多克隆方式接合患者的所有T细胞来组合免疫疗法与抗体疗法的优点。

[0010] 已经设计了双特异性抗体,其在一个臂(靶标结合臂)上具有肿瘤识别部分,而该分子的另一个臂对T细胞抗原(效应子结合臂)(主要是CD3)具有特异性。通过将两个臂同时结合到它们各自的抗原上,T淋巴细胞被导向肿瘤细胞并在肿瘤细胞处活化,在那里它们可以发挥其细胞溶解功能

[0011] 使用双特异性抗体来活化针对肿瘤细胞的T细胞的概念在20多年前就有描述了,但是制造问题和临床失败使该领域陷入停滞。当开发出由抗体减少为其可变片段而产生的较小形式的双特异性抗体时,取得了进一步的进展。

[0012] 尽管第一种T细胞接合形式,博纳吐单抗(Blinatumomab)(识别CD19和CD3的BiTE分子)于2014年12月被FDA批准用于二线治疗,但仍有许多障碍需要克服。博纳吐单抗的首次临床试验由于以下而被过早地停止:在一方面是神经系统不良事件、细胞因子释放综合征和感染,并且在另一方面是缺少生物活性的客观临床反应或强烈迹象。

[0013] 作为AML的治疗选择,MacroGenics最近开发了MGD006,一种CD3x CD123双特异性DART(双亲和力重靶向分子)。如Hussaini等人(2016Blood 127:122-131)所述,MGD006能够识别CD123阳性白血病细胞并诱导T细胞活化,从而在体外和体内杀死过表达CD123的肿瘤细胞。然而,DART还在与CD123阴性细胞系K562^{GFP}温育时上调T细胞上的T细胞活化标记物CD25(图1D,Hussaini等人2016)。此外,用两种CD123阴性细胞系观察到靶标独立杀伤(图2B,Hussaini等人2016)。因此,使用此DART,可能会出现由这一靶标独立的T细胞活化引起的安全问题。

[0014] 为了使不良事件和全身副作用(如细胞因子风暴)的风险最小化,在选择肿瘤和T细胞抗原臂时务必最大谨慎。T细胞抗原臂必须以单价方式与TCR复合物的恒定结构域结合,并且在不存在靶向癌细胞的情况下可能不会触发T细胞信号传导。只有两臂与其靶标(肿瘤和T细胞抗原)的特异性结合可以触发细胞溶解性突触的形成并随后杀死肿瘤细胞。肿瘤识别臂对其抗原的特异性是避免脱靶结合的必要条件,这将不可避免地导致靶标独立的T细胞活化。

[0015] 除了效力之外,MGD006以及博纳吐单抗的体积非常小并且缺乏Fc结构域。因此,MGD006将需要连续静脉输注,这不会有助于患者的依从性。MacroGenics目前试图通过将Fc结构域融合到其下一代DART上来解决这个问题(WO2015026892),这使得该分子不仅变得更大,而且还可能导致制造问题和其他Fc功能的输入。预计Fc的较大形式具有更好的PK,但重

新引入了脱靶活性的风险。

[0016] 因此,仍然需要具有最小靶标独立的T细胞活化的备选双特异性CD123xT细胞抗原结合多肽,其中可以定制半衰期。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明通过提供多特异性多肽解决了这个问题,所述多特异性多肽包含一个特异性结合T细胞受体(TCR)的恒定结构域的免疫球蛋白单可变结构域(ISV)和一个或多个特异性结合CD123的ISV。在特定的方面,所述多肽将T细胞重定向至CD123表达细胞并诱导T细胞介导的杀伤。

[0019] 已经特别选择结合T细胞受体结合ISV和CD123结合ISV的组合,以便在CD123表达细胞的(位点)处产生有效的T细胞活化,而靶标独立的T细胞活化看起来最小。

[0020] 因此,在第一方面,本发明提供了重定向T细胞用于杀伤CD123表达细胞的多肽,其包含一个特异性结合T细胞受体(TCR)的免疫球蛋白单可变结构域(ISV)和一个或多个特异性结合CD123的ISV,其中所述特异性结合TCR的ISV(基本上)由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0021] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0022] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0023] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0024] 和/或

[0025] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0026] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0027] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0028] 和/或

[0029] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0030] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0031] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0032] 和其中所述一个或多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0033] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0034] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0035] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序

列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0036] 和/或

[0037] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0038] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0039] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0040] 和/或

[0041] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0042] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0043] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0044] 在另外的方面,本发明提供了如本文所述的多肽,其中所述特异性结合TCR的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0045] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0046] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0047] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0048] 和

[0049] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0050] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0051] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0052] 和

[0053] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0054] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0055] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲

和力如通过表面等离子共振所测量的；

[0056] 和其中所述一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0057] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0058] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0059] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0060] 和

[0061] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0062] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0063] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0064] 和

[0065] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0066] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0067] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0068] 在另外的方面,本发明提供了如本文所述的多肽,其中所述特异性结合TCR的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0069] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0070] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0071] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置2、4、5、6、8和/或10处(根据Kabat编号,位置27、29、30、31、33和/或35);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0072] 和

[0073] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0074] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0075] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置1、3、5、7、8和/或9处(根据Kabat编号,位置50、52、54、56、57和/或58);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2

的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0076] 和

[0077] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0078] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0079] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置1、4、5和/或8处(根据Kabat编号,位置95、98、99和/或101);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0080] 和其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所述。

[0081] 在一个方面,包含在特异性结合TCR的ISV中的CDR1可以选自由以下组成的组:

[0082] a) SEQ ID NO:181;或

[0083] b) 与SEQ ID NO:181的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0084] -在位置2处D已经变为A、S、E或G;

[0085] -在位置4处H已经变为Y;

[0086] -在位置5处K已经变为L;

[0087] -在位置6处I已经变为L;

[0088] -在位置8处F已经变为I或V;和/或

[0089] -在位置10处G已经变为S;

[0090] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0091] 除此之外或另外,包含在所述特异性结合TCR的ISV中的CDR2可以选自由以下组成的组:

[0092] a) SEQ ID NO:192;或

[0093] b) 与SEQ ID NO:192的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0094] -在位置1处H已经变为T或R;

[0095] -在位置3处S已经变为T或A;

[0096] -在位置5处G已经变为S或A;

[0097] -在位置7处Q已经变为D、E、T、A或V;

[0098] -在位置8处T已经变为A或V;和/或

[0099] -在位置9处D已经变为A、Q、N、V或S;

[0100] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0101] 除此之外或另外,包含在特异性结合TCR的ISV中的CDR3可以选自由以下组成的

组:

[0102] a) SEQ ID NO:218;或

[0103] b) 与SEQ ID NO:218的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0104] -在位置1处F已经变为Y、L或G;

[0105] -在位置4处I已经变为L;

[0106] -在位置5处Y已经变为W;和/或

[0107] -在位置8处D已变为N或S;

[0108] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0109] 因此,本发明提供了如本文所述的多肽,其中所述特异性结合TCR的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0110] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0111] a) SEQ ID NO:181;或

[0112] b) 与SEQ ID NO:181的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0113] -在位置2处D已经变为A、S、E或G;

[0114] -在位置4处H已经变为Y;

[0115] -在位置5处K已经变为L;

[0116] -在位置6处I已经变为L;

[0117] -在位置8处F已经变为I或V;和/或

[0118] -在位置10处G已经变为S;

[0119] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0120] 和

[0121] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0122] c) SEQ ID NOs:192;或

[0123] d) 与SEQ ID NO:192的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0124] -在位置1处H已经变为T或R;

[0125] -在位置3处S已经改为T或A;

[0126] -在位置5处G已经变为S或A;

[0127] -在位置7处Q已经变为D、E、T、A或V;

[0128] -在位置8处T已经变为A或V;和/或

[0129] -在位置9处D已经变为A、Q、N、V或S;

[0130] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所

述亲和力如通过表面等离子共振所测量的；

[0131] 和

[0132] iii) CDR3选自由以下组成的组：

[0133] e) SEQ ID NO:218；或

[0134] f) 与SEQ ID NO:218的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列，其中

[0135] -在位置1处F已经变为Y、L或G；

[0136] -在位置4处I已经变为L；

[0137] -在位置5处Y已经变为W；和/或

[0138] -在位置8处D已经变为N或S；

[0139] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合，所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的；

[0140] 和其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所述。

[0141] 在优选的方面，特异性结合TCR的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成，其中CDR1选自由SEQ ID NO:181-191组成的组，CDR2选自由SEQ ID NO:192-217组成的组，CDR3选自由SEQ ID NO:218-225组成的组。

[0142] 因此，本发明提供了多肽，其包含特异性结合TCR的ISV，所述ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成，其中CDR1选自由SEQ ID NO:181-191组成的组，CDR2选自由SEQ ID NO:192-217组成的组，CDR3选自由SEQ ID NO:218-225组成的组，并且包含如本文进一步所述的特异性结合CD123的ISV。

[0143] 在另外的方面，本发明提供如本文所述的多肽，其中特异性结合TCR的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成，其中CDR1是SEQ ID NO:181，CDR2是SEQ ID NO:192，CDR3是SEQ ID NO:218，并且其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所述。

[0144] 用于本发明多肽的优选ISV可以选自由SEQ ID NO:42和78-180组成的组，或者选自与SEQ ID NO:42和78-180之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。因此，本发明提供如本文所述的多肽，其中特异性结合TCR的ISV选自由SEQ ID NO:42和78-180组成的组，或者选自与SEQ ID NO:42和78-180之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV，和其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所述。

[0145] 特异性结合TCR的ISV可以存在于本发明多肽中的任何位置。优选地，特异性结合TCR的ISV存在于本发明多肽的N端。因此，在另外的方面，本发明提供如本文所述的多肽，其中特异性结合TCR的ISV位于多肽的N端。

[0146] 本发明的多肽还包括一个或多个ISV。已经特别选择用于本发明多肽的ISV，因为它们对存在于CD123表达靶细胞上的CD123具有高特异性。

[0147] 因此，在另外的方面，本发明提供如本文所述的多肽，其中特异性结合TCR的ISV如本文所述，并且其中一个或多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成，其中：

[0148] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0149] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0150] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置3、6、7和/或8处(根据Kabat编号的位置28、31、32和/或33);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0151] 和

[0152] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0153] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0154] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置3、6和/或10处(根据Kabat编号的位置52、54和/或58);条件是包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0155] 和

[0156] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0157] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0158] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置3、4和/或5处(根据Kabat编号的位置97、98和/或99);条件是包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0159] 本发明已经鉴定了以选择的抗原结合位点或互补位特异性结合CD123的ISV。在一个方面,特异性结合CD123的ISV结合至ISV 56A10结合的表位(即与56A10属于相同家族的ISV或与56A10相关的ISV)。

[0160] 在一个方面,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR1可以选自由以下组成的组:

[0161] a) SEQ ID NO:11;或

[0162] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0163] -在位置3处T已经变为S或P;

[0164] -在位置6处I已经变为S;

[0165] -在位置7处N已经变为D;和/或

[0166] -在位置8处D已经变为V或A;

[0167] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0168] 除此之外或另外,包含在特异性结合TCR的ISV中的CDR2可以是SEQ ID NO:17。

[0169] 除此之外或另外,包含在特异性结合TCR的ISV中的CDR3可以选自由以下组成的组:

[0170] a) SEQ ID NO:21;或

[0171] b) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0172] -在位置3处P已经变为A;

[0173] 条件是包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0174] 因此,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0175] i) CDR1选自自由以下组成的组:

[0176] a) SEQ ID NO:11;或

[0177] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0178] -在位置3处T已经变为S或P;

[0179] -在位置6处I已经变为S;

[0180] -在位置7处N已经变为D;和/或

[0181] -在位置8处D已经变为V或A;

[0182] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0183] 和

[0184] ii) CDR2是SEQ ID NO:17;

[0185] 和

[0186] iii) CDR3选自自由以下组成的组:

[0187] c) SEQ ID NOs:21;或

[0188] d) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0189] -在位置3处P已经变为A;

[0190] 条件是包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0191] 在优选的方面,特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自自由SEQ ID NO:11-15组成的组,CDR2是SEQ ID NO:17,CDR3选自自由SEQ ID NO:21-22组成的组。

[0192] 因此,本发明提供了多肽,其包含如本文所述的特异性结合TCR的ISV,并且包含一个或多个特异性结合CD123的ISV,其中所述特异性结合CD123的一个或多个ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自自由SEQ ID NO:11-15组成的组,CDR2是SEQ ID NO:17,和CDR3选自自由SEQ ID NO:21-22组成的组。

[0193] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中特异性结合CD123的一个或多个ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至

FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是SEQ ID NO:11,CDR2是SEQ ID NO:17,和CDR3是SEQ ID NO:21。

[0194] 用于本发明多肽的优选ISV可以选自由SEQ ID NO:1-6组成的组,或者选自与SEQ ID NO:1-6之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。因此,本发明还提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中特异性结合CD123的一个或更多个ISV选自由SEQ ID NO:1-6组成的组,或者选自与SEQ ID NO:1-6之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。

[0195] 在另一方面,特异性结合CD123的ISV结合至纳米抗体55F03结合的表位(即与55F03属于相同家族的ISV或与55F03相关的ISV)。

[0196] 在一个方面,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR1是SEQ ID NO:16。

[0197] 除此之外或另外,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR2可以选自由以下组成的组:

[0198] a) SEQ ID NO:18;或

[0199] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0200] -在位置3处Y已经变为W;

[0201] -在位置6处N已经变为S;和/或

[0202] -在位置10处Q已经变为E;

[0203] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0204] 除此之外或另外,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR3可以选自由以下组成的组:

[0205] a) SEQ ID NO:23;或

[0206] b) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0207] -在位置4处E已经变为R;和/或

[0208] -在位置5处T已经变为D或Y;

[0209] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0210] 因此,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0211] i) CDR1是SEQ ID NO:16;

[0212] 和

[0213] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0214] a) SEQ ID NO:18;或

[0215] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0216] -在位置3处Y已经变为W;

[0217] -在位置6处N已经变为S;和/或

[0218] -在位置10处Q已经变为E;

[0219] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0220] 和

[0221] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0222] c) SEQ ID NOs:23;或

[0223] d) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0224] -在位置4处E已经变为R;和/或

[0225] -在位置5处T已经变为D或Y;

[0226] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0227] 在优选的方面,特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2选自由SEQ ID NO:18-20组成的组,和CDR3选自由SEQ ID NO:23-25组成的组。

[0228] 因此,本发明提供了多肽,其包含如本文所述的特异性结合TCR的ISV,并且包含一个或更多个特异性结合CD123的ISV,其中所述一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2选自由SEQ ID NO:18-20组成的组,CDR3选自由SEQ ID NO:23-25组成的组。

[0229] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2是SEQ ID NO:18,和CDR3是SEQ ID NO:23。

[0230] 用于本发明多肽的优选ISV可选自由SEQ ID NO:7-10组成的组,或者选自与SEQ ID NO:7-10之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV选自由SEQ ID NO:7-10组成的组,或者选自与SEQ ID NO:7-10之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。

[0231] 本发明的多肽可包括一个特异性结合CD123的ISV或多于一个特异性结合CD123的ISV,如例如两个、三个或甚至更多个。在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其包含如本文所述的特异性结合TCR的ISV,并且包含特异性结合CD123的两个或更多个,优选两个ISV。

[0232] 包含在本发明多肽中的两个或更多个,优选两个ISV可以是如本文所述的特异性结合CD123的任何ISV。包含在本发明多肽中的两个或更多个,优选两个ISV可以是相同的ISV(即具有相同的氨基酸序列),或者它们可以是不同的ISV(即具有不同的氨基酸序列)。

在一个方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中两个或更多个特异性结合CD123的ISV是包含第一ISV和第二ISV的双互补位(biparatopic),其中第一ISV结合至CD123上的表位,该表位与第二ISV结合的CD123上的表位不同。

[0233] 优选地,两个或更多个,优选两个特异性结合CD123的ISV是与56A10相关的ISV和与55F03相关的ISV。因此,在一个方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中第一ISV选自与56A10相关的ISV,第二ISV选自与55F03相关的ISV。

[0234] 两个或更多个,优选两个特异性结合CD123的ISV可以存在于本发明多肽中的任何位置。在一个方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中第二ISV位于第一ISV的N端。在另一方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中第二ISV位于第一ISV的C端。

[0235] 存在于本发明多肽中的ISV可以是本领域已知的和如本文进一步描述的任何ISV。在一个方面,存在于本发明多肽中的ISV选自单结构域抗体、dAb、纳米抗体、VHH、人源化VHH、骆驼源化VH或通过亲和力成熟获得的VHH。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV和一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由单结构域抗体、dAb、纳米抗体、VHH、人源化VHH、骆驼源化VH或通过亲和力成熟获得的VHH组成。

[0236] 本发明优选的多肽选自由SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61组成的组,或者选自与SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。

[0237] 更优选地,所述多肽选自由SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61组成的组。

[0238] 如上所述,本发明的多肽重定向T细胞用于杀伤CD123表达细胞。在一个方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述多肽诱导T细胞活化。

[0239] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化独立于MHC识别。

[0240] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化依赖于将与靶细胞上的CD123结合的所述多肽呈递至T细胞。

[0241] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化引起所述T细胞的一种或更多种细胞应答,其中所述细胞应答选自由以下组成的组:增殖、分化、细胞因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒性活性、活化标记物的表达和重定向的靶细胞溶解。

[0242] 在具体的方面,由本发明多肽诱导的T细胞活化引起CD123表达细胞的杀伤,其平均EC50值在1nM和1pM之间,例如平均EC50值为500pM以下,例如小于400、300、200或100pM或甚至更小,例如小于90、80、70、60、50、40或30pM或甚至更小,所述EC50值优选在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中确定,该测定使用MQLM-13细胞作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比率为10比1。

[0243] 在另一个具体的方面,由本发明多肽诱导的T细胞活化引起CD123表达细胞的溶解,其平均溶解百分比为大于约10%,例如15%、16%、17%、18%、19%或20%或甚至更多,例如大于25%,或甚至大于30%,所述溶解百分比优选在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中确定,该测定使用MOLM-13细胞作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比率为10比1。

[0244] 在另一具体的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中由本发明的多肽诱导的所述T细胞活化引起IFN- γ 分泌,其平均EC50值在100nM和10pM之间,例如平均EC50值为50nM或以下,例如小于40、30、20、10或9nM或甚至更小,例如小于8、7、6、5、4、3、2或1nM或甚至更小,例如小于500pM或甚至更小,例如小于400、300、200或100pM或甚至更小,所述EC50值优选在基于ELISA的测定中确定。

[0245] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化引起所述T细胞的增殖。

[0246] 如上所述,选择本发明的多肽使得靶标独立的T细胞活化应该是最小的。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中在不存在CD123阳性细胞的情况下,所述T细胞活化是最小的。

[0247] 更具体地,本发明多肽的T细胞活化诱导的CD123阴性细胞的溶解不超过约10%,例如9%或更低,例如8、7或6%或甚至更低,所述溶解优选在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中确定为平均溶解百分比,该测定使用U-937细胞作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比率为10比1。

[0248] 本发明还涉及结构单元(building block),即构成本发明多肽的ISV。因此,本发明还提供了一种多肽,其是特异性结合CD123的ISV,并且其包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0249] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0250] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0251] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0252] 和/或

[0253] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0254] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0255] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0256] 和/或

[0257] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0258] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0259] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0260] 更优选地,作为特异性结合CD123的ISV的多肽包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0261] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0262] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0263] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0264] 和/或

[0265] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0266] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0267] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0268] 和/或

[0269] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0270] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0271] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0272] 在另外的方面,本发明还提供如上所述的多肽,其包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0273] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0274] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0275] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置3、6、7和/或8处(根据Kabat编号的位置28、31、32和/或33);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0276] 和/或

[0277] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0278] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0279] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置3、6和/或10处(根据Kabat编号的位置52、54和/或58);条件是包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0280] 和/或

[0281] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0282] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0283] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置3、4和/或5处(根据Kabat编号的位置97、98和/或99);条件是包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0284] 本发明已经鉴定了以选择的抗原结合位点或互补位特异性结合CD123的ISV。在一个方面,特异性结合CD123的ISV结合至ISV 56A10结合的表位(即与56A10属于相同的家族的ISV或与56A10相关的ISV)。

[0285] 因此,在一个方面,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR1可以选自由以下组成的组:

[0286] a) SEQ ID NO:11;或

[0287] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0288] -在位置3处T已经变为S或P;

[0289] -在位置6处I已经变为S;

[0290] -在位置7处N已经变为D;和/或

[0291] -在位置8处D已经变为V或A;

[0292] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0293] 除此之外或另外,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR2是SEQ ID NO:17。

[0294] 除此之外或另外,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR3可以选自由以下组成的组:

[0295] a) SEQ ID NO:21;或

[0296] b) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0297] -在位置3处P已经变为A;

[0298] 条件是包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0299] 因此,本发明还提供如上所述的多肽,其包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0300] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0301] a) SEQ ID NO:11;或

[0302] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0303] -在位置3处T已经变为S或P;

[0304] -在位置6处I已经变为S;

[0305] -在位置7处N已经变为D;和/或

[0306] -在位置8处D已经变为V或A;

[0307] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有

4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合，所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的；

[0308] 和

[0309] ii) CDR2是SEQ ID NO:17；

[0310] 和

[0311] iii) CDR3选自由以下组成的组：

[0312] c) SEQ ID NOs:21；或

[0313] d) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列，其中

[0314] -在位置3处P已经变为A；

[0315] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比，包含具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合，所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0316] 在另外的方面，本发明提供如本文所述的多肽，其中CDR1选自由SEQ ID NO:11-15组成的组，CDR2是SEQ ID NO:17，CDR3选自由SEQ ID NO:21-22组成的组。优选地，CDR1是SEQ ID NO:11，CDR2是SEQ ID NO:17，并且CDR3是SEQ ID NO:21。

[0317] 与56A10相关的本发明优选的ISV可以选自由SEQ ID NO:1-6组成的组，或者选自与SEQ ID NO:1-6之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。因此，在另外的方面，本发明提供如本文所述的多肽，其中所述多肽选自由SEQ ID NO:1-6组成的组，或者选自与SEQ ID NO:1-6之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。优选地，多肽选自由SEQ ID NO:1-6组成的组。

[0318] 在一个方面，本发明的多肽以在10nM和100pM之间的平均EC₅₀值，例如5nM以下，诸如小于4、3、2或1nM或甚至更小的平均EC₅₀值，与在MOLM-13细胞上表达的人CD123结合，优选如通过流式细胞术所测量的。

[0319] 在另一方面，本发明的多肽以在10nM和100pM之间的平均K_D值，例如5nM以下，诸如小于4、3或2nM或甚至更小的平均K_D值与人CD123结合，所述K_D值优选地通过表面等离子共振确定。

[0320] 在另一方面，特异性结合CD123的ISV结合至被ISV 55F03结合的表位（即与55F03属于相同家族的ISV或与55F03相关的ISV）。

[0321] 因此，在一个方面，包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR1是SEQ ID NO:16。

[0322] 除此之外或另外，包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR2可以选自由以下组成的组：

[0323] a) SEQ ID NO:18；或

[0324] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列，其中

[0325] -在位置3处Y已经变为W；

[0326] -在位置6处N已经变为S；和/或

[0327] -在位置10处Q已经变为E；

[0328] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比，包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合，所述

亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0329] 除此之外或另外,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR3可以选自由以下组成的组:

[0330] a) SEQ ID NO:23;或

[0331] b) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0332] -在位置4处E已经变为R;和/或

[0333] -在位置5处T已经变为D或Y;

[0334] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0335] 因此,本发明还提供如上所述的多肽,其包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0336] i) CDR1是SEQ ID NO:16;

[0337] 和

[0338] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0339] a) SEQ ID NO:18;或

[0340] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0341] -在位置3处Y已经变为W;

[0342] -在位置6处N已经变为S;和/或

[0343] -在位置10处Q已经变为E;

[0344] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0345] 和

[0346] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0347] c) SEQ ID NO:23;或

[0348] d) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0349] -在位置4处E已变为R;和/或

[0350] -在位置5处T已经变为D或Y;

[0351] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0352] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2选自由SEQ ID NO:18-20组成的组,和CDR3选自由SEQ ID NO:23-25组成的组。优选地,CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2是SEQ ID NO:18,和CDR3是SEQ ID NO:23。

[0353] 与56A10相关的本发明优选的ISV可选自由SEQ ID NO:7-10组成的组,或者选自与SEQ ID NO:7-10之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述多肽选自由SEQ ID NO:7-10组成的组,或者选自与SEQ ID NO:7-10之一具有大于80%、大于85%、大于

90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。优选地,多肽选自由SEQ ID NO:7-10组成的组。

[0354] 在一个方面,本发明的多肽以在10 μ M和100nM之间的平均EC₅₀值,例如5 μ M以下,诸如小于4、3或2或1 μ M或甚至更小的平均EC₅₀值与在MOLM-13细胞上表达的人CD123结合,优选地如通过流式细胞术所测量的。

[0355] 在另一方面,本发明的多肽以1 μ M和10nM之间的平均KD值,例如500nM以下,诸如小于400、300或200nM或甚至更小的平均KD值与人CD123结合,所述KD值优选地通过表面等离子共振确定。

[0356] 在另外的方面,本发明提供了一种多肽,其交叉阻断如本文所述的至少一种多肽与CD123的结合,或交叉阻断具有SEQ ID NO:1-10的至少一种多肽与CD123的结合。

[0357] 在另外的方面,本发明提供了一种多肽,其被如本文所述的至少一种多肽交叉阻断与CD123的结合,或被具有SEQ ID NO:1-10的至少一种多肽交叉阻断与CD123的结合。

[0358] 如本文所述的特异性结合CD123的多肽优选地(基本上)由单结构域抗体、dAb、纳米抗体、VHH、人源化VHH、骆驼源化的VH或通过亲和力成熟获得的VHH组成。

[0359] 特异性结合CD123的本发明多肽可含有一个或多个特异性结合CD123的ISV。因此,在另外的方面,本发明提供了包含两个或更多个,优选两个特异性结合CD123的ISV的多肽。在优选的方面,所述两个或更多个ISV,优选两个特异性结合CD123的ISV选自与56A10相关的ISV组或选自与55F03相关的ISV组。

[0360] 在另外的方面,本发明提供了特异性结合CD123的多肽,其包含两个特异性结合CD123的ISV,其中所述ISV选自与56A10相关的ISV组或与55F03相关的ISV组。

[0361] 包含特异性结合CD123的两个或更多个ISV,优选两个ISV的本发明多肽优选是包含第一ISV和第二ISV的双互补位,其中第一ISV与CD123上的表位结合,该表位不同于第二ISV结合的CD123上的表位。在优选的方面,第一ISV选自与56A10相关的ISV组,第二ISV选自与55F03相关的ISV组。

[0362] ISV可以存在于与CD123结合的本发明双互补位多肽中的任何位置。在一个方面,第二ISV位于第一ISV的N端。在另一方面,第二ISV位于第一ISV的C-端。

[0363] 存在于本发明多肽中的ISV可以直接地彼此连接,或者它们可以通过一个或更多个接头连接,优选为肽接头。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中ISV直接地彼此连接或通过接头彼此连接。用于本发明多肽的优选接头如表B-3所示(SEQ ID NO:325至336)。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中接头选自由SEQ ID NO:325至336组成的组。

[0364] 本发明进一步包括构建体(在本文中也称为“本发明的构建体”),其包含如本文所述的多肽,并且进一步包含一个或更多个其他基团、残基、结构部分或结合单元,任选地通过一个或更多个肽接头连接。

[0365] 在另外的方面,与不含一个或更多个其他基团、残基、结构部分或结合单元的相应多肽相比,所述一个或更多个其他基团、残基、结构部分或结合单元可以为构建体提供增加的半衰期。为多肽提供增加的半衰期的所述一个或更多个其他基团、残基、结构部分或结合单元可以是任何提供多肽在血清中保留的分子。在一个方面,为多肽提供增加的半衰期的一个或更多个其他基团、残基、结构部分或结合单元选自由以下组成的组:聚乙二醇分子、

血清蛋白或其片段、可与血清蛋白结合的结合单元、Fc部分和可与血清蛋白结合的小蛋白或肽。

[0366] 因此,在一个方面,本发明提供如本文所述的构建体,其中为构建体提供增加的半衰期的所述一个或更多个其他基团、残基,结构部分或结合单元选自由血清白蛋白(例如人血清白蛋白)或血清免疫球蛋白(例如IgG)组成的组。

[0367] 在另一方面,本发明提供如本文所述的构建体,其中为构建体提供增加的半衰期的所述一个或更多个的其他结合单元选自由以下组成的组:可与血清白蛋白(例如人血清白蛋白)或血清免疫球蛋白(如IgG)结合的结合单元。优选地,为多肽提供增加的半衰期的所述一个或更多个的其他结合单元是结合血清白蛋白的ISV。在另外的方面,所述结合血清白蛋白的ISV可(基本上)由单结构域抗体、dAb、纳米抗体、VHH、人源化的VHH或骆驼源化的VH组成。

[0368] 用于本文所述的构建体的优选ISV是这样的ISV,其结合血清白蛋白,并且(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是GFTFSSFGMS(SEQ ID NO:363)或GFTFRSFGMS(SEQ ID NO:364),CDR2是SISGSGSDTL(SEQ ID NO:365),CDR3是GGSLSR(SEQ ID NO:366)。结合血清白蛋白的优选ISV选自由SEQ ID NO:43和351至362组成的组。

[0369] 至于本发明的多肽,所述其他基团、残基、结构部分或结合单元如ISV可以直接地彼此连接或通过接头彼此连接。在另外的方面,本发明提供如本文所述的构建体,其中接头选自由SEQ ID NO:325至336组成的组。

[0370] 本发明的优选构建体可以选自由SEQ ID NO:63-67组成的组,或者与SEQ ID NO:63-67之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的构建体,优选地为SEQ ID NO:63-67。

[0371] 本发明的构建体可以是序列优化的,例如,使构建体更人类化,改善构建体的表达,增加构建体在储存时的稳定性和/或使构建体不易于与血清中预先存在的抗体结合。在一个方面,本发明提供如本文所述的构建体,其进一步包含C端延伸(X)_n,其中n为1至5,例如1、2、3、4或5,并且其中X是天然存在的氨基酸,优选不是半胱氨酸。优选的构建体选自由SEQ ID NO:338-342组成的组。

[0372] 本发明还提供编码如本文所定义的多肽和构建体的核酸(它们是这样的:它们可通过编码其的核酸的表达而被获得)。在一个方面,如本文所述的核酸是遗传构建体的形式。

[0373] 本发明还提供包含如本文所定义的核酸的表达载体。

[0374] 本发明还提供宿主或宿主细胞,其包含如本文所定义的核酸,或如本文所定义的表达载体。

[0375] 在另外的方面,本发明提供了用于产生如本文所定义的多肽或构建体(其是这样的:其可通过表达编码其的核酸而获得)的方法,所述方法至少包含以下步骤:

[0376] a) 在合适的宿主细胞或宿主生物体或另一个合适的表达系统中,表达如本文所定义的核酸;任选地随后:

[0377] b) 分离和/或纯化如本文所定义的多肽或构建体。

[0378] 在另外的方面,本发明提供了一种组合物,其包含至少一种如本文所定义的多肽

或构建体或如本文所定义的核酸。在一个方面,所述组合物是药物组合物。在一个方面,所述组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂和/或佐剂,并且任选地包含一种以上另外的药学活性多肽和/或化合物。

[0379] 本发明还提供了如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物,其用作药物。在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽或如本文所述的组合物在制备药物中的用途。在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物,其用于预防、治疗和/或改善CD123相关的疾病或病症。本发明还提供用于预防、治疗或/或改善CD123相关疾病或病症的方法,包括如下步骤:向有此需要的受试者施用药学活性量的如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物。本发明还提供了如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善CD123相关疾病或病症的药物中的用途。不受限制,CD123相关疾病或病症可以是增殖性疾病或炎性病症。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物,其用于预防、治疗和/或改善增殖性疾病或炎性病症。本发明还提供用于预防、治疗和/或改善增殖性疾病或炎性病症的方法,包括如下步骤:向有此需要的受试者施用药学活性量的如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物。本发明还提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善增殖性疾病或炎性病症的药物中的用途。

[0380] 不受限制,增殖性疾病可能是癌症。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物,其用于预防、治疗和/或改善癌症。本发明还提供了用于预防、治疗和/或改善癌症的方法,包括如下步骤:向有此需要的受试者施用药学活性量的如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物。本发明还提供了如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善癌症的药物中的用途。

[0381] 通过本发明的方法治疗的癌症可以是已知通过CD123靶向细胞杀伤治疗的任何癌症。已知涉及在异常增殖细胞上CD123表达的癌症包括(不限于)淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞样树突细胞瘤(blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm)、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体、如本文所述的组合物,其用于预防、治疗和/或改善选自以下的癌症:淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞样树突细胞瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。本发明还提供了用于预防、治疗和/或改善癌症的方法,所述癌症选自淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞样树突细胞瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤,该方法包括如下步骤:向有此需要的受试者施用药学活性量的如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物。本发明还提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制

备用于预防、治疗和/或改善癌症的药物中的用途,其中所述癌症选自淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞样树突细胞瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。

[0382] 通过本发明的方法治疗的炎性病症可以是已知通过CD123靶向细胞杀伤治疗的任何炎性病症。已知涉及在细胞上CD123表达的炎性病症包括(不限于)自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体、如本文所述的组合物,其用于预防、治疗和/或改善选自以下组成的组的炎性病症:自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎。本发明还提供预防、治疗和/或改善炎性病症的方法,所述炎性病症选自自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎组成的组,该方法包括如下步骤:向有此需要的受试者施用药学活性量的如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物。本发明还提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善炎性病症的药物中的用途,其中所述炎性病症选自以下组成的组:自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎。

[0383] 本发明的多肽、构建体和组合物还可以与另一种治疗药物组合使用。因此,在另外的方面,本发明提供用于组合治疗的如本文所述的多肽、如本文所述的构建体、如本文所述的组合物。

[0384] 本发明还提供如本文所述的方法,其中所述治疗是组合治疗。

[0385] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制备用于如本文所述的预防、治疗和/或改善的药物中的用途,其中治疗是组合治疗。

[0386] 在另外的方面,本发明提供试剂盒,其包含如本文所述的多肽、如本文所述的构建体、如本文所述的核酸、如本文所述的表达载体或如本文所述的宿主或宿主细胞。

附图说明

[0387] 图1:使用100nM抗人TCR α/β 抗体(克隆BW242/412)(黑色)和100nM抗人CD3抗体(克隆OKT-3)(灰色),评价人TCR/CD3和人CD3在转染的CHO、HEK293和L1ana细胞系上的表达。绘制每个细胞系的MCF值(平均通道荧光)。X轴描绘了细胞类型和转染的基因;CD3表示用CD3复合物(ϵ 、 δ 、 γ 和 ζ 链)转染,huTCR表示用TCR α/β 链转染,其中所用的可变结构域在括号之间。

[0388] 图2:使用抗非人灵长类动物/大鼠TCR α/β 抗体克隆R73,抗人TCR α/β 抗体(实心圆圈)和不相关的抗卵溶菌酶纳米抗体(cAbl_{ys})(空心圆圈),可溶性重组食蟹猴TCR α/β 蛋白的质量评价。针对纳米抗体的浓度绘制OD值。

[0389] 图3:单价抗TCR纳米抗体T0170055A02与在CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3(图3A)和与原代人T细胞(图3B)的剂量依赖性结合。单价抗TCR纳米抗体T0170056G05与CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3(图3C)和与原代人T细胞(图3D)的剂量依赖性结合。针对纳米抗体的浓度绘制MCF值(平均通道荧光)。

[0390] 图4:单价抗TCR纳米抗体T0170055A02(图4A)和T0170056G05(图4B)与HEK293H人

TCR(2IAN)/CD3(实心圆圈)、HEK293H人CD3(十字)和与HEK293H参考细胞系(空心圆圈)的剂量依赖性结合。针对纳米抗体的浓度绘制MCF值(平均通道荧光)。

[0391] 图5:单价抗TCR纳米抗体T0170055A02(图4A,实心圆圈)和T0170056G05(图4B,实心圆圈)和无关的纳米抗体(图4A和图4B,空心圆圈)与可溶性重组人TCR α/β (2XN9)拉链蛋白的剂量依赖性结合。针对纳米抗体的浓度绘制450nm处的OD。

[0392] 图6:在Octet RED384仪器上通过BioLayer干涉测量法,对可溶性重组人TCR α/β (2XN9)拉链蛋白相互作用的T01700055A02(图6A)和T01700056G05(图6B)的动力学分析。应用的分析物浓度为:1000、333、111、37、12.3、4.1和1.4nM.Langmuir拟合动力学数据用黑线表示,而传感图用灰线表示。

[0393] 图7:单价抗TCR纳米抗体T0170055A02(图7A,实心圆圈)和T0170056G05(图7B,实心圆圈)和无关的纳米抗体(图7A和图7B,空心圆)与可溶性重组食蟹猴TCR α/β 拉链蛋白的剂量依赖性结合。针对纳米抗体的浓度绘制450nm处的OD。

[0394] 图8:在Octet RED384仪器上通过BioLayer干涉测量法,对可溶性重组食蟹猴TCR α/β 拉链蛋白相互作用的T0170055A02(图8A)和T0170056G05(图8B)的动力学分析。应用的分析物浓度为:1000、333、111、37、12.3、4.1和1.4nM.Langmuir拟合动力学数据用黑线表示,而传感图用灰线表示。

[0395] 图9:珠偶联的单价抗TCR纳米抗体的T细胞活化数据(图9A)。以溶液形式呈现的单价抗TCR纳米抗体的T细胞活化数据(图9B)。通过监测CD69在原代人T细胞上的上调对活化进行测量。绘制每种纳米抗体的MCF值(平均通道荧光)。

[0396] 图10:在流式细胞术中,使用抗CD123抗体(BD Biosciences,商品目录号554527)(黑色)和同种型对照(eBioscience,商品目录号16-4724-85)(灰色)随后通过PE标记的山羊抗小鼠(Jackson Immunoresearch lab.Inc.,商品目录号115-116-071),对HEK293Flp-In上的人CD123表达、HEK293Flp-In cyno CD123、CHO Flp-In和CHO Flp-In人CD123的表达的评价。绘制每个细胞系的MFI值(中值通道荧光强度)。

[0397] 图11:在流式细胞术中,使用APC标记的抗CD123抗体(BDBiosciences,商品目录号560087)(黑色)和APC标记的同种型对照(Biolegend,商品目录号400220)(灰色),人CD123在U-937、MOLM-13、KG1a和NCI-H929细胞上表达的评价。绘制每个细胞系的MFI值(中值通道荧光强度)。

[0398] 图12:单价抗CD123纳米抗体A0110056A10与MOLM-13细胞(图12A)和KG1a细胞(图12C)的剂量依赖性结合。单价抗CD123纳米抗体A0110055F03与MOLM-13细胞(图12B)和KG1a细胞(图12D)的剂量依赖性结合。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0399] 图13:Alexa647标记的A0110056A10与Flp-In亲本CHO细胞(空心符号)和与人CD123转染的CHO细胞(实心符号)的剂量依赖性结合(图13A)。Alexa647标记的A0110056A10与Flp-In亲本HEK细胞(空心符号)和与食蟹猴CD123转染的HEK细胞(实心符号)的剂量依赖性结合(图13B)。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0400] 图14:A0110055F03与Flp-In亲本CHO细胞(空心符号)和与人CD123转染的CHO细胞(实心符号)的剂量依赖性结合(图14A)。A0110055F03与Flp-In亲本HEK细胞(空心符号)和与食蟹猴CD123转染的HEK细胞(实心符号)的剂量依赖性结合(图14B)。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0401] 图15:单价抗CD123纳米抗体A0110056A10-Alexa 647与MOLM-13细胞(图15A)和与人CD123转染的CHO Flp-In细胞(图15B)的剂量依赖性结合。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0402] 图16:单价纳米抗体A0110056A10(正方形)和A0110055F03(圆形)与Alexa 647标记的A0110056A10对于在MOLM-13细胞(图16A)上和在人CD123转染的CHO Flp-In细胞上(图16B)结合人CD123的剂量依赖性竞争。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0403] 图17:APC标记的小鼠抗人CD123(克隆7G3)抗体与人CD123在MOLM-13细胞上(图17A)和在人CD123转染的CHO Flp-In细胞上(图17B)的剂量依赖性结合。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0404] 图18:单价纳米抗体A0110056A10(正方形)和A0110055F03(圆形)与APC标记的小鼠抗人CD123(克隆7G3)抗体对于在MOLM-13细胞上(图18A)和在用huCD123转染的CHO Flp-In细胞(图18B)上表达的CD123的结合的剂量依赖性竞争。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0405] 图19:小鼠抗人CD123(克隆7G3)抗体与内部生物素化的CD123重组蛋白(R&D Systems,商品目录号301-R3/CF)的剂量依赖性结合。针对浓度绘制450nm处的OD。

[0406] 图20:在ELISA中,单价抗CD123纳米抗体A0110056A10(正方形)和A0110055F03(实心圆圈)与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)(BD Biosciences,商品目录号554527)对于与CD123蛋白结合的剂量依赖性竞争(图20A)。将不相关的抗卵溶菌酶纳米抗体cAbLys(空心圆圈)和溶液中的小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)(星形)分别作为阴性和阳性对照(图20B)。针对浓度绘制450nm处的OD。

[0407] 图21:单价抗CD123纳米抗体A0110056A10-Alexa 647与MOLM-13细胞(图21A)、人CD123转染的CHO Flp-In细胞(图21B)和cyno CD123转染的HEK Flp-In细胞(图21C)的剂量依赖性结合。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0408] 图22:多价CD123/TCR结合多肽与Alexa647-A0110056A10在对于在MOLM-13细胞上(图22A)和在huCD123转染的CHO Flp-In细胞上(图22C)或在cyCD123转染HEK Flp-In细胞上(图22B)表达的CD123结合的剂量依赖性竞争。将不相关的多价多肽T017000129作为阴性对照。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0409] 图23:多价CD123/TCR结合多肽与生物素化T0170056G05对于与在CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3结合的剂量依赖性竞争。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0410] 图24:多价CD123/TCR结合多肽与T017000099对于在HSC-F上表达的CD3/TCR结合的剂量依赖性竞争。单价His标记的T017000125作为阳性对照。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0411] 图25:使用效应子与靶标比率为10:1,通过多价CD123/TCR结合多肽,在基于流式细胞术的测定中人CD123表达MOLM-13细胞的剂量依赖性重定向的人效应T细胞杀伤。A0110056A10、T017000132和T017000129作为阴性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0412] 图26:使用效应子与靶标比率为10:1,通过多价CD123/TCR结合多肽,在基于流式细胞术的测定中人CD123表达KG1a细胞的剂量依赖性重定向的人效应T细胞杀伤。A0110056A10、T017000129和T017000132作为阴性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡

(TOPRO阳性细胞的%)。

[0413] 图27:使用效应子与靶标比率为10:1,通过多价CD123/TCR结合多肽,在基于流式细胞术的测定中人CD123阳性MOLM-13细胞的剂量依赖性重定向的食蟹猴效应T细胞杀伤。A0110056A10作为阴性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0414] 图28:使用效应子与靶标比率为8,通过多价CD123/TCR结合多肽,在基于流式细胞术的测定中人CD123阳性KG1a细胞的剂量依赖性重定向的食蟹猴效应T细胞杀伤。将几种不相关的构建体作为阴性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0415] 图29:在培养72小时后,在人CD123阳性MOLM-13细胞的重定向的食蟹猴效应T细胞杀伤期间,在CD4/CD8+门控(gated)T细胞上通过多价CD123/TCR结合多肽的剂量依赖性T细胞活化(CD25上调)。针对构建体的浓度绘制CD4/CD8+门控T细胞内的MFI(平均荧光强度)。

[0416] 图30:使用效应子与靶标比率为15:1,通过T017000139(实心菱形),在基于xCELLigence的测定中人CD123转染的CHO Flp-In细胞的剂量依赖性重定向的人效应T细胞杀伤。将单价纳米抗体A0110056A10、T0170056G05和无关构建体T017000129作为阴性对照。针对多特异性多肽的浓度绘制50小时温育时间之后的细胞指数(CI)。

[0417] 图31:使用效应子与靶标比率为15:1,在基于xCELLigence的测定中,在使用CD123阴性CHO Flp-In参考细胞系的重定向的人效应T细胞杀伤测定中的单价结构单元和多特异性多肽。针对多特异性多肽的浓度绘制50小时温育时间之后的CI。

[0418] 图32:在不存在T细胞的情况下,在CD123转染的细胞系(图32A)和参考细胞系(图32B)生长上的单价结构单元和多特异性CD123/TCR结合多肽。针对多特异性多肽的浓度绘制50小时温育时间后的CI。

[0419] 图33:使用效应子与靶标比率为15:1,通过T017000139(实心菱形),在基于xCELLigence的测定中食蟹猴CD123转染的HEK Flp-In细胞的剂量依赖性重定向的食蟹猴效应T细胞杀伤。将单价纳米抗体T0170056G05和无关构建体T017000129一起作为阴性对照。针对多特异性多肽的浓度绘制80小时温育时间后的CI。

[0420] 图34:使用CD123阴性HEK Flp-In参考细胞系,在重定向的食蟹猴T细胞杀伤测定中的单价结构单元和多特异性多肽。针对多特异性多肽的浓度绘制80小时温育时间之后的CI。

[0421] 图35:在不存在T细胞的情况下,在CD123转染的细胞系(图35A)和参考细胞系(图35B)生长上的单价结构单元和多特异性CD123/TCR结合多肽。针对多特异性多肽的浓度绘制80小时温育时间之后的CI。

[0422] 图36:使用效应子与靶标比率为10:1,在人CD123表达CHO Flp-In靶细胞的多特异性CD123/TCR结合多肽依赖性重定向T细胞杀伤的期间,人效应T细胞(图36A)或食蟹猴效应T细胞(图36B)的剂量依赖性细胞因子产生。72小时后测量INF- γ 的产生。针对浓度绘制OD值。

[0423] 图37:使用效应子与靶标比率为10:1,在人CD123表达CHO Flp-In靶细胞的多特异性CD123/TCR结合多肽依赖性重定向T细胞杀伤的期间,效应T细胞的剂量依赖性细胞因子产生。72小时后测量IL-6的产生。针对浓度绘制pg/ml值。

[0424] 图38:在5小时的温育时间后,在健康人(图38A)和食蟹猴(图38B)PBMC样品中,通过多价CD123/TCR结合多肽对CD123+pDC和嗜碱性粒细胞的重定向自体T细胞介导的消耗。

针对构建体的浓度绘制Lin⁻/CD123⁺细胞(pDC和嗜碱性粒细胞)的百分比。

[0425] 图39:在5小时(图39A)和24小时(图39B)的温育时间后,在健康人PBMC样品中通过多价CD123/TCR结合多肽的重定向自体T细胞单核细胞消耗。针对构建体的浓度绘制单核细胞(CD14⁺细胞)的百分比。

[0426] 图40:在24小时的温育时间后,在自体CD123阳性细胞的重定向T细胞杀伤期间,通过在CD3⁺门控T细胞上的多价CD123/TCR结合多肽的剂量依赖性CD69上调、人T细胞活化。针对构建体的浓度绘制CD3⁺门控T细胞内的MFI(平均荧光强度)。

[0427] 图41:使用效应子与靶标比率为10:1,在基于流式细胞术的测定中,用于重定向人(图41A)或食蟹猴(图41B)效应T细胞杀伤人CD123⁺KG1a细胞的单价纳米抗体和不相关的多价多肽T017000129的剂量依赖性表征。将T017000139(实心菱形)作为阳性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0428] 图42:使用效应子与靶标比率为10:1,在基于流式细胞术的测定中,用于重定向人(图42A)或食蟹猴(图42B和图42C)效应T细胞杀伤人CD123⁺MOLM-13细胞的单价纳米抗体和不相关的多价多肽T017000129的剂量依赖性表征。将T017000139(实心菱形)作为阳性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0429] 图43:使用效应子与靶标比率为10:1,在MOLM-13(图43A和图43C)和KG1a(图43B)靶细胞的多特异性CD123/TCR结合多肽依赖性重定向T细胞杀伤期间,人效应T细胞的剂量依赖性细胞因子产生。72小时后测量人IL-6(图43C)和IFN- γ (图43A和图43B)的产生。针对浓度绘制细胞因子的浓度。

[0430] 图44A和44B:使用CD123阴性NCI-H929细胞系,在基于流式细胞术的测定中,通过多特异性CD123/TCR结合多肽的靶标独立的重定向人效应细胞T细胞杀伤的剂量依赖性表征。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0431] 图45:使用CD123阴性U937细胞系,在基于流式细胞术的测定中,通过多特异性CD123/TCR结合多肽的靶标独立的重定向人(图45A)或食蟹猴(图45B)效应T细胞杀伤的剂量依赖性表征。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0432] 图46:在72小时的温育时间后,在食蟹猴效应T细胞杀伤CD123阴性U-937细胞期间(图46A)和在入效应细胞T细胞杀伤CD123阴性NCI-H929细胞(图46B)期间,在CD4⁺/CD8⁺门控T细胞上经由多价CD123/TCR结合多肽的剂量依赖性T细胞活化读数。针对构建体的浓度绘制CD4⁺/CD8⁺门控T细胞内的MFI(平均荧光强度)。

[0433] 图47:使用效应子与靶标的比率10:1,使用人效应T细胞和NCI-H929靶细胞,多特异性CD123/TCR结合多肽对细胞因子产量的影响。测量人IL-6(图47B)和IFN- γ (图47A)的产量。针对浓度绘制细胞因子量的OD值。

[0434] 图48A和48B:使用效应子与靶标比率为10:1,在重定向MOLM-13靶细胞杀伤设置中,经由多特异性多肽的人效应T细胞的剂量依赖性T细胞增殖。针对浓度绘制CPM(每分钟计数)。

[0435] 图49:在不存在靶细胞的情况下,经由多特异性多肽的人效应T细胞的剂量依赖性T细胞增殖。针对浓度绘制CPM(每分钟计数)。

[0436] 图50:在T017000114和MOLM-13细胞以不同E:T比率存在的情况下,未活化的和预活化的T细胞的溶解潜力。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡。

[0437] 图51:在T017000139和KG1a细胞以不同E:T比率存在的情况下,未活化和预活化的T细胞的溶解潜力。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡。

[0438] 图52:使用效应子与靶标的比率为10:1,通过多价CD123/TCR结合多肽,在基于流式细胞术的测定中,在不存在或存在血清白蛋白的情况下,MOLM-13细胞的剂量依赖性重定向人(图52A和52B)和食蟹猴(图52C和52D) T细胞杀伤。将不相关的多价多肽T017000129和单价结构单元A0110056A10和T0170056G05作为阴性对照。针对多肽的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0439] 图53:使用效应子与靶标的比率为10:1,通过多价CD123/TCR结合多肽,在基于流式细胞术的测定中,在不存在或存在血清白蛋白的情况下,KG1a细胞的剂量依赖性重定向人(图53A、53B和53C)和食蟹猴(图53D、53E和53F) T细胞杀伤。将不相关的多价多肽A022600009(存在或不存在SA)和T017000129,以及单价结构单元A0110056A10和T0170056G05作为阴性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0440] 图54:使用效应子与靶标比率为10:1,在通过HLE多特异性CD123/TCR结合多肽的重定向T细胞杀伤MOLM-13期间,通过人T细胞的剂量依赖性细胞因子产生。测量人IL-6(图54B)和IFN- γ (图54A)的产生。针对浓度绘制细胞因子的量。

[0441] 图55:使用效应子与靶标比率为10:1,在重定向MOLM-13靶细胞杀伤设置中,通过HLE多特异性多肽的人效应T细胞的剂量依赖性T细胞增殖。针对浓度绘制CPM(每分钟计数)。

[0442] 图56:在5小时的温育时间后,在健康人PBMC样品中,通过多价HLE CD123/TCR结合多肽的重定向自体T细胞重定向的CD123⁺pDC和嗜碱性粒细胞的消耗。针对构建体的浓度绘制Lin⁻/CD123⁺细胞(pDC和嗜碱性粒细胞)的百分比。

[0443] 图57:在5h的温育时间后的体外环境中,在健康食蟹猴PBMC样品中,通过多价HLE CD123/TCR结合多肽的重定向自体T细胞重定向的CD123⁺pDC和嗜碱性粒细胞的消耗。针对构建体的浓度绘制Lin⁻/CD123⁺细胞(pDC和嗜碱性粒细胞)的百分比。

[0444] 图58:在24小时的温育时间后,在健康人PBMC样品中,通过多价CD123/TCR结合多肽的重定向自体T细胞重定向的单核细胞的消耗。针对构建体的浓度绘制单核细胞(CD14⁺细胞)的百分比。

[0445] 图59:经处理的食蟹猴外周血中T细胞随时间的计数。每 μ L血液中CD4⁺CD3⁺ T细胞(图59A)和CD8⁺CD3⁺ T细胞(图59B)的绝对数量表示为随时间的变化不同治疗组的平均值 \pm SEM:阳性对照(空心圆,n=2),无关/TCR多肽(十字,n=4),CD123/TCR多肽(黑色三角形,n=4)。灰色条反映了连续输注治疗期。

[0446] 图60:经处理的食蟹猴外周血中CD123⁺ CD14⁻细胞随时间的计数。每 μ L血液中CD123⁺CD14⁻细胞的绝对数量表示为对于不同治疗组的平均值 \pm SEM:阳性对照(空心圆圈,n=2),无关/TCR多肽(十字,n=4),CD123/TCR多肽(黑色三角形,n=4)。灰色条反映了连续输注治疗期。

[0447] 图61:CD4⁺CD3⁺和CD8⁺CD3⁺ T细胞上的PD-1随时间的表达。血液中CD4⁺CD3⁺T细胞(图61A)和CD8⁺CD3⁺ T细胞(图61B)的频率表示为对于不同治疗组的平均值 \pm SEM:阳性对照(空心圆圈,n=2)、无关/TCR多肽(十字,n=4)、CD123/TCR多肽(黑色三角形,n=4)。灰色条反映了连续输注治疗期。

[0448] 图62:经处理的食蟹猴中的血清白细胞介素-6随时间的变化。血清中IL-6的浓度表示为对于不同治疗组的平均值±SEM(pg/mL):阳性对照(空心圆圈,n=2)、无关/TCR多肽(十字,n=4)、CD123/TCR多肽(黑色三角形,n=4)。灰色条反映了连续输注治疗期。

[0449] 发明详述

[0450] 定义

[0451] 除非另有说明或定义,使用的所有术语具有其在本领域中通常的含义,这对本领域技术人员而言是清楚的。例如参考标准手册,诸如Sambrook等人(1989,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版)Vols.1-3,Cold Spring Harbor Laboratory Press)、F.Ausubel等人(1987,Current protocols in molecular biology,Green Publishing and Wiley Interscience,New York)、Lewin(1985,Genes II,John Wiley& Sons,New York,N.Y.)、Old等人(1981,Principles of Gene Manipulation:An Introduction to Genetic Engineering(第2版)University of California Press,Berkeley,CA)、Roitt等人(2001,Immunology(6th Ed.)Mosby/Elsevier,Edinburgh)、Roitt等人(2001,Roitt's Essential Immunology(10th Ed.)Blackwell Publishing,UK)和Janeway等人(2005,Immunobiology(第6版)Garland Science Publishing/Churchill Livingstone,New York),以及本文引用的一般背景技术。

[0452] 除非另有说明,所有没有特别详细描述的方法、步骤,技术和操作可以以本身已知的方式进行并且已经这样进行,这对本领域技术人员而言是清楚的。例如再次参考本文提及的标准手册和一般背景技术以及其中所引用的另外的参考文献;以及例如以下综述:Presta(2006,Adv. Drug Deliv. Rev. 58(5-6):640-56)、Levin和Weiss(2006,Mol. Biosyst. 2(1):49-57)、Irving等人(2001,J. Immunol. Methods 248(1-2):31-45)、Schmitz等人(2000,Placenta 21Suppl. A:S106-12)、Gonzales等人(2005,Tumour Biol. 26(1):31-43),其描述了蛋白质工程技术,例如亲和力成熟和其他用于改善蛋白质如免疫球蛋白的特异性和其他所需特性的技术。

[0453] 本文使用的术语“序列”(例如,如“免疫球蛋白序列”、“抗体序列”、“可变结构域序列”、“V_H序列”或“蛋白质序列”)通常应理解为包括相关的氨基酸序列以及编码其的核酸或核苷酸序列,除非上下文需要更有限的解释。

[0454] 根据上下文,氨基酸序列被解释为指单个氨基酸或两个或更多个氨基酸的无支链序列。核苷酸序列被解释为指3个或更多个核苷酸的无支链序列。

[0455] 氨基酸是天然存在的蛋白质中常见的那些L-氨基酸,并列于以下表B-1中。含有D-氨基酸的那些氨基酸序列不旨在包含于该定义中。含有翻译后修饰的氨基酸的任何氨基酸序列可以描述为使用下表中所示的符号最初翻译的氨基酸序列,具有修饰的位置;例如,羟基化或糖基化,但这些修饰不应在氨基酸序列中明确显示。可以表达为序列修饰的连接、交联和末端帽、非肽键等的任何肽或蛋白质都包含在该定义中。

[0456] 术语“蛋白质”、“肽”、“蛋白质/肽”和“多肽”在整个公开内容中可互换使用,并且用于本公开的目的,每个均具有相同的含义。每个术语是指由两个或更多个氨基酸的线性链构成的有机化合物。该化合物可具有十个或更多个氨基酸;二十五个或更多氨基酸;五十个或更多氨基酸;一百个或更多个氨基酸,两百个或更多个氨基酸,和甚至三百个或更多个氨基酸。本领域技术人员将理解,多肽通常包含比蛋白质更少的氨基酸,尽管没有本领域公

认的区分多肽和蛋白质的氨基酸数量的截止点。多肽可以通过化学合成或重组方法制备；并且蛋白质通常通过本领域已知的重组方法在体外或体内制备。

[0457] 氨基酸残基将根据标准的三字母或单字母氨基酸代码表示。参考WO 08/020079的第48页上的表A-2。

[0458] 表B-1: 常见氨基酸

[0459]

单字母代码	三字母代码	名称
A	Ala	丙氨酸
B	Asx	天冬氨酸或天冬酰胺
C	Cys	半胱氨酸
D	Asp	天冬氨酸
E	Glu	谷氨酸
F	Phe	苯丙氨酸
G	Gly	甘氨酸
H	His	组氨酸
I	Ile	异亮氨酸
J	Xle	异亮氨酸或亮氨酸
K	Lys	赖氨酸
L	Leu	亮氨酸
M	Met	甲硫氨酸
N	Asn	天冬酰胺
O	Pyl	吡咯赖氨酸
P	Pro	脯氨酸
Q	Gln	谷氨酰胺
R	Arg	精氨酸
S	Ser	丝氨酸
T	Thr	苏氨酸
U	Scy	硒代半胱氨酸
V	Val	缬氨酸
W	Trp	色氨酸
X	Xxx	罕见或未指定

[0460]	Y	Tyr	酪氨酸
	Z	Glx	谷氨酸或谷氨酰胺

[0461] 核酸或氨基酸被认为是“(以)(基本上)分离的(形式)”——例如,与已经从其中获得该核酸或氨基酸的反应介质或培养基相比——当它与在所述来源或培养基中通常与其缔合的至少一种其他组分分离时,所述至少一种其他组分诸如另一种核酸、另一种蛋白质/多肽、另一种生物组分或大分子或至少一种污染物、杂质或次要组分。特别地,当核酸或氨基酸被纯化至少2倍,特别是至少10倍,更特别是至少100倍,并且直至1000倍时,则认为核酸或氨基酸是“(基本上)分离的”。“以(基本上)分离的形式”的核酸或氨基酸优选基本上是均质的,如使用合适的技术所测定的,例如合适的色谱技术,如聚丙烯酰胺凝胶电泳。

[0462] 除非上下文另有明确要求,否则在整个说明书和权利要求书中,词语“包含(comprise)”、“包含(comprising)”等将以包含性的意义解释,而不是排他性或穷举性的意义;也就是说,以“包括但不限于”的意义。

[0463] 例如,当称核苷酸序列、氨基酸序列或多肽分别“包含”另一个核苷酸序列、氨基酸序列或多肽,或“基本上由”另一个核苷酸序列、氨基酸序列或多肽组成时,这可以是表示后一核苷酸序列、氨基酸序列或多肽分别掺入到首先提及的核苷酸序列、氨基酸序列或多肽中,但更通常这通常意指首先提及的核苷酸序列、氨基酸序列或多肽分别在其序列内包含核苷酸段或氨基酸残基段,所述核苷酸段或氨基酸残基段分别具有与后者序列相同的核苷酸序列或氨基酸序列,而不管实际上如何产生或获得所述首先提及的序列(例如其可以通过本文描述的任何合适的方法)。通过非限制性实例,当称本发明的多肽包含免疫球蛋白单可变结构域时,这可能意指所述免疫球蛋白单可变结构域序列已掺入本发明多肽的序列中,但更通常,这通常意指本发明的多肽在其序列内含有免疫球蛋白单可变结构域的序列,而不管如何产生或获得所述本发明的多肽。此外,当称核酸或核苷酸序列包含另一个核苷酸序列时,首先提及的核酸或核苷酸序列优选是这样的:当其表达为表达产物(例如多肽)时,由后者核苷酸序列编码的氨基酸序列形成所述表达产物的一部分(换言之,后者核苷酸序列与首先提及的更大的核酸或核苷酸序列在相同的阅读框中)。

[0464] “基本上由.....组成”是指本发明方法中所用的免疫球蛋白单可变结构域与本发明的多肽精确相同或对应于具有添加在免疫球蛋白单可变结构域的氨基末端、羧基末端或在氨基末端和羧基末端二者处的有限数量氨基酸残基的本发明多肽,所述有限数量氨基酸残基为例如1-20个氨基酸残基,如1-10个氨基酸残基和优选地1-6个氨基酸残基,如1、2、3、4、5或6个氨基酸残基。

[0465] “由.....组成”是指本发明方法中所用的免疫球蛋白单可变结构域与本发明的多肽完全相同。

[0466] 为了比较两个或更多个核苷酸序列的目的,第一核苷酸序列和第二核苷酸序列之间的“序列同一性”的百分比可以通过将[第一核苷酸序列中与第二核苷酸序列中相应位置的核苷酸相同的核苷酸的数目]除以[第一核苷酸序列中核苷酸的总数目]并乘以[100%]来计算,其中与第一核苷酸序列相比,第二核苷酸序列中每个核苷酸的缺失、插入、取代或添加被认为是单核苷酸(位置)的差异。备选地,可以使用标准设置,使用用于序列比对的已知计算机算法(例如NCBI Blast v2.0)来计算两个或更多个核苷酸序列之间的序列同一性

程度。用于确定序列同一性程度的一些其他技术、计算机算法和设置例如在WO 04/037999、EP 0967284、EP 1085089、WO 00/55318、WO 00/78972、WO 98/49185和GB 2357768中所述。通常,为了根据上文概述的计算方法确定两个核苷酸序列之间“序列同一性”百分比的目的,具有最大核苷酸数目的核苷酸序列将被视为“第一”核苷酸序列,并且另一个核苷酸序列将被视为“第二”核苷酸序列。

[0467] 为了比较两个或更多个氨基酸序列的目的,第一氨基酸序列和第二氨基酸序列之间的“序列同一性”的百分比(本文中也称为“氨基酸同一性”)可以通过将[第一氨基酸序列中与第二氨基酸序列中相应位置的氨基酸残基相同的氨基酸残基的数目]除以[第一氨基酸序列中氨基酸残基的总数目]并乘以[100%]来计算,其中与第一氨基酸序列相比,第二氨基酸序列中每个氨基酸残基的缺失、插入、取代或添加被认为是单个氨基酸残基(位置)的差异,即本文所定义的“氨基酸差异”。备选地,可以使用已知的计算机算法(例如用于确定核苷酸序列的序列同一性程度的上述提及的那些)来计算两个氨基酸序列之间的序列同一性程度,再次使用标准设置。通常,为了根据上文概述的计算方法确定两个氨基酸序列之间“序列同一性”百分比的目的,具有最大氨基酸残基数目的氨基酸序列将被视为“第一”氨基酸序列,并且另一个氨基酸序列将被视为“第二”氨基酸序列。

[0468] 而且,在确定两个氨基酸序列之间的序列同一性程度时,本领域技术人员可以考虑所谓的“保守”氨基酸取代,其通常可以描述为氨基酸取代,其中氨基酸残基被替换为另一个具有相似化学结构的氨基酸残基,并且其对多肽的功能、活性或其它生物学特性几乎没有影响。这种保守氨基酸取代是本领域熟知的,例如来自WO 04/037999、GB 335768、WO 98/49185、WO 00/46383和WO 01/09300;并且,这种取代的(优选的)类型和/或组合可以基于WO 04/037999以及WO 98/49185和其中引用的另外的参考文献的相关教导进行选择。

[0469] 这种保守取代优选是这样的取代,其中下列组(a)-(e)中的一个氨基酸被相同组内的另一个氨基酸残基取代:(a)小的脂肪族、非极性或轻微极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro和Gly;(b)极性、带负电荷的残基及其(不带电荷的)酰胺:Asp、Asn、Glu和Gln;(c)极性带正电荷的残基:His、Arg和Lys;(d)大的脂肪族非极性残基:Met、Leu、Ile、Val和Cys;和(e)芳香族残基:Phe、Tyr和Trp。特别优选的保守取代如下:Ala替换为Gly或Ser;Arg替换为Lys;Asn替换为Gln或His;Asp替换为Glu;Cys替换为Ser;Gln替换为Asn;Glu替换为Asp;Gly替换为Ala或Pro;His替换为Asn或Gln;Ile替换为Leu或Val;Leu替换为Ile或Val;Lys替换为Arg、Gln或Glu;Met替换为Leu、Tyr或Ile;Phe替换为Met、Leu或Tyr;Ser替换为Thr;Thr替换为Ser;Trp替换为Tyr;Tyr替换为Trp;和/或Phe替换为Val、Ile或Leu。

[0470] 应用于本文所述多肽的任何氨基酸取代也可以基于Schulz等人(1978,蛋白质结构原理, Springer-Verlag)开发的不同物种的同源蛋白质之间氨基酸变异频率的分析,由Chou和Fasman(1974, Biochemistry 13:211;1978, Adv. Enzymol., 47:45-149)开发的结构形成潜力的分析,以及Eisenberg等人(1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:140-144), Kyte和Doolittle(1981, J. Molec. Biol. 157:105-132), 和Goldman等(1986, Ann. Rev. Biophys. Chem. 15:321-353)开发的蛋白质中的疏水性模式分析,这些文献均通过引用整体并入本文。关于纳米抗体的一级,二级和三级结构的信息在本文的描述和上文引用的一般背景技术中给出。此外,为此目的,来自美洲驼的 V_{HH} 结构域的晶体结构例如由Desmyter等人(1996, Nature Structural Biology, 3:803), Spinelli等(1996, Natural

Structural Biology,3:752-757)和Decanniere等(1999,Structure,7(4):361)给出。关于在常规 V_H 结构域中形成 V_H/V_L 界面的一些氨基酸残基和在这些位置上潜在的骆驼化取代的进一步信息可以在上面引用的现有技术中找到。

[0471] 如果氨基酸序列和核酸序列在其整个长度上具有100%的序列同一性(如本文所定义),则称它们是“完全相同的”

[0472] 当比较两个氨基酸序列时,术语“氨基酸差异”是指与第二序列相比,第一序列的位置上的单个氨基酸残基的插入、缺失或取代;应当理解,两个氨基酸序列可含有一个、两个或更多个这种氨基酸差异。更具体地,在本发明的氨基酸序列和/或多肽中,术语“氨基酸差异”是指与分别a)、c)或e)的CDR序列相比,b)、d)或f)中指定的CDR序列的位置上单个氨基酸残基的插入、缺失或取代;应当理解,与分别a)、c)或e)的CDR序列相比,b)、d)和f)的CDR序列可含有一个、两个或最多三个这样的氨基酸差异。

[0473] “氨基酸差异”可以是任何一个、两个、三个或最多四个取代、缺失或插入,或其任何组合,其可以改善本发明多肽的性质,或者至少不会自本发明多肽所期望的性质或自所期望的性质的平衡或组合减损太多。在这方面,与包含不具有一个、两个、三个或最多四个取代、缺失或插入的一个或更多个CDR序列的多肽相比,所得的本发明多肽应至少以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123或T细胞受体结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0474] 在这方面,根据b)、d)和/或f)的氨基酸序列可以通过亲和力成熟,使用本身已知的一种或多种亲和力成熟技术分别自根据a)、c)和/或e)的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0475] 例如且取决于用于表达本发明多肽的宿主生物体,可以以这样的方式设计这种缺失和/或取代:用于翻译后修饰的一个或更多个位点(例如一个或更多个糖基化位点)被移除,如本领域技术人员的能力范围内。

[0476] “亲和力”表示分子相互作用的强度或稳定性。亲和力通常由 K_D 或解离常数给出,其具有摩尔/升(或M)的单位。亲和力还可以表达为结合常数, K_A ,其等于 $1/K_D$ 并且具有(摩尔/升) $^{-1}$ (或 M^{-1})的单位。在本说明书中,两个分子之间的相互作用的稳定性将主要根据它们的相互作用的 K_D 值表达;技术人员将明确,鉴于关系 $K_A=1/K_D$,通过其 K_D 值指定分子相互作用的强度还可以用于计算相应 K_A 值。 K_D 值也在热力学意义上表征分子相互作用的强度,因为通过公知关系 $DG=RT \cdot \ln(K_D)$ (等价地 $DG=-RT \cdot \ln(K_A)$)它与结合的自由能(DG)的变化相关,其中R等于气体常数,T等于绝对温度并且 \ln 表示自然对数。

[0477] 被认为有意义的(例如特异的)的对于生物学相互作用的 K_D 通常在 $10^{-12}M$ (0.001nM)至 $10^{-5}M$ (10000nM)的范围内。相互作用越强,其 K_D 越低。

[0478] K_D 还可以表示为复合物的解离速率常数(表示为 k_{off})与其缔合速率常数(表示为 k_{on})的比率(因此 $K_D=k_{off}/k_{on}$ 且 $K_A=k_{on}/k_{off}$)。解离速率 k_{off} 具有单位 s^{-1} (其中s是秒的SI单位记号)。缔合速率 k_{on} 具有单位 $M^{-1}s^{-1}$ 。缔合速率可在 $10^2M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 之间变化,接近用于双分子相互作用的扩散限制的缔合速率常数。通过关系 $t_{1/2}=\ln(2)/k_{off}$,解离速率与给定分子相互作用的半衰期有关。解离速率可以在 $10^{-6}s^{-1}$ (接近具有多日的 $t_{1/2}$ 的不可逆复合物)至 $1s^{-1}$ ($t_{1/2}=0.69s$)之间变化。

[0479] 抗原结合蛋白(例如ISV)与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以以本身已知的任

何合适的方式确定,包括例如Scatchard分析和/或竞争性结合测定,如放射免疫测定(RIA),酶免疫测定(EIA)和夹心竞争测定,和本领域本身已知的其不同变体;以及本文提及的其他技术。

[0480] 两个分子之间的分子相互作用的亲和力可以通过本身已知的不同技术测量,例如众所周知的表面等离子共振(SPR)生物传感器技术(参见例如Ober等人,2001,Intern.Immunology 13:1551-1559)。如本文所用,术语“表面等离子共振”是指光学现象,所述光学现象允许通过检测生物传感器矩阵内的蛋白浓度的改变来分析实时生物特异相互作用,在生物传感器矩阵中,一个分子被固定在生物传感器芯片上,并且另一个分子在流动条件下经过固定的分子,产生 k_{on} 、 k_{off} 测量值,并因此产生 K_D (或 K_A)值。这可以例如使用众所周知的BIAcore®系统(BIAcore International AB,a GE Healthcare company,Uppsala,Sweden and Piscataway,NJ)进行。对于进一步说明,请参阅Jonsson等人(1993,Ann.Biol.Clin.51:19-26)、Jonsson等人(1991Biotechniques 11:620-627)、Johnsson等人(1995,J.Mol.Recognit.8:125-131)和Johnson等人(1991,Anal.Biochem.198:268-277)。

[0481] 用于确定生物分子相互作用的亲和力的另一种众所周知的生物传感器技术是生物层干涉测量法(BLI)(参见例如Abdiche等人,2008,Anal.Biochem.377:209-217)。如本文所用,术语“生物层干涉测量法”或“BLI”是指无标记光学技术,其分析从两个表面反射的光的干涉图案:内部参考层(参考光束)和生物传感器尖端上的固定蛋白质层(信号光束)。结合到生物传感器尖端的分子数量的变化引起干涉图案的变化,报告为波长偏移(nm),所述波长偏移的大小是与生物传感器尖端表面结合的分子数量的直接测量。由于可以实时测量相互作用,因此可以确定缔合和解离速率和亲和力。BLI可以例如使用众所周知的Octet®系统(ForteBio,a division of Pall Life Sciences,Menlo Park,USA)进行。

[0482] 备选地,亲和力可以使用KinExA®平台(Sapidyne Instruments Inc,Boise,USA)在动力学排除测定(KinExA)中测量(参见例如Drake等,2004,Anal.Biochem.,328:35-43)。如本文中所示,术语“KinExA”是指测量未修饰分子的真实平衡结合亲和力和动力学的基于溶液的方法。将抗体/抗原复合物的平衡溶液经过具有珠子的柱,其中所述珠子预先涂有抗原(或抗体),这允许游离抗体(或抗原)与涂覆的分子结合。由此捕获的抗体(或抗原)的检测是通过荧光标记的蛋白质结合所述抗体(或抗原)完成的。

[0483] GYROLAB®免疫测定系统为自动化生物分析和快速样品周转提供了平台(Fraley等,2013,Bioanalysis 5:1765-74)。

[0484] 本领域技术人员还将清楚,如果测量过程以某种方式影响隐含分子的固有结合亲和力,例如通过与一个分子的生物传感器上的涂层相关的伪影,则测量的 K_D 可以对应于表观 K_D 。此外,如果一个分子含有多于一个用于其他分子的识别位点,则可以测量表观 K_D 。在这种情况下,测量的亲和力可能受到两个分子相互作用的亲合力的影响。如本领域技术人员所清楚的,并且如W0 08/020079的53-56页上所述,解离常数可以是实际或表观解离常数。确定解离常数的方法对于技术人员是清楚的,并且例如包括W0 08/020079的53-56页上提及的技术。

[0485] 可以互换使用的术语“表位”和“抗原决定簇”是指大分子的一部分,例如被诸如免

疫球蛋白、常规抗体、免疫球蛋白单可变结构域和/或本发明多肽的抗原结合分子,更特别地,被所述抗原结合分子的抗原结合位点识别的多肽或蛋白质。表位定义了免疫球蛋白的最小结合位点,并因此代表免疫球蛋白特异性的靶标。

[0486] 识别表位的抗原结合分子(例如免疫球蛋白、常规抗体、免疫球蛋白单可变结构域和/或本发明多肽)的部分称为“互补位”。

[0487] 如果多肽(例如免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、本发明的多肽、或通常地抗原结合分子或其片段)可以“结合(至)”或“特异性结合(至)”和/或“具有亲和力”和/或“特异于”某个表位、抗原或蛋白质(或至少其一部分、片段或表位),那么这样的多肽被称为“针对(against)”或“针对(directed against)”所述表位、抗原或蛋白质,或者是关于这种表位、抗原或蛋白质的“结合”分子,或称为“抗”-表位、“抗”-抗原或“抗”-蛋白质(例如,“抗”-CD123或“抗”-TCR)。

[0488] 术语“特异性”具有WO 08/020079的53-56页上的段落n)中给出的含义;并且如其中所提及的,是指特定的抗原结合分子或抗原结合蛋白(例如本发明的免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽)可结合的不同类型的抗原或抗原决定簇的数目。抗原结合蛋白的特异性可以基于亲和力和/或亲合力来确定,如WO 08/020079(通过引用并入本文)的第53-56页上所述,其还描述了用于测量抗原结合分子(例如本发明的免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽)和相关抗原之间结合的一些优选技术。典型地,抗原结合蛋白(例如本发明的免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽)将与其抗原结合,解离常数(K_D)为 10^{-5} 至 10^{-12} 摩尔/升或更低,优选地 10^{-7} 至 10^{-12} 摩尔/升或更低,更优选 10^{-8} 至 10^{-12} 摩尔/升(即,缔合常数(K_A)为 10^5 至 10^{12} 升/摩尔或更高,优选 10^7 至 10^{12} 升/摩尔或更多,更优选 10^8 至 10^{12} 升/摩尔)。任何大于 10^4 摩尔/升的 K_D 值(或任何低于 $10^4 M^{-1}$ 的 K_A 值)通常被认为表示非特异性结合。优选地,本发明的单特异性多肽将与所需抗原结合,亲和力为小于500nM,优选小于200nM,更优选小于10nM,例如诸如在10和5nM之间,例如小于10nM,小于5nM,小于3nM,小于2nM,例如10nM-1nM,5nM-1nM或甚至更小。抗原结合蛋白与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以以本身已知的任何合适的方式确定,包括例如Scatchard分析和/或竞争性结合测定,例如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)和夹心竞争试验,和本领域中本身已知的其不同变体;以及本文提到的其他技术。如本领域技术人员所清楚的,并且如WO 08/020079的第53-56页所述,解离常数可以是实际或表观解离常数。确定解离常数的方法对于技术人员是清楚的,并且例如包括WO 08/020079的第53-56页上提及的技术。

[0489] 可用于评价亲和力的一种方法是Friguet等人(1985, J. Immunol. Methods 77: 305-19)的2步ELISA(酶联免疫吸附测定)程序。该方法建立溶液相结合平衡测量,并避免与支持物(例如塑料)上的一种分子的吸附有关的可能的伪影。

[0490] 然而, K_D 的准确测量可能是非常劳动密集的,因此,通常确定表观 K_D 值以评价两个分子的结合强度。应该注意的是,只要所有测量都以一致的方式进行(例如保持测定条件不变),则表观 K_D 测量值可以用作真实 K_D 的近似值,并且因此在本文件中, K_D 和表观 K_D 应该被以相等的重要性或相关性对待。

[0491] 最后,应该注意的是,在许多情况下,有经验的科学家可以判断它方便用于确定相对于一些参考分子的结合亲和力。例如,为了评价分子A和B之间的结合强度,可以例如使用参考分子C,其已知结合B并且适当地用荧光团或发色团基团或其他化学结构部分如生物素

标记,以便在ELISA或FACS(荧光激活的细胞分选)或其他形式中容易检测(用于荧光检测的荧光团、用于光吸收检测的发色团、用于链霉亲和素介导的ELISA检测的生物素)。典型地,参考分子C保持在固定浓度,并且对于给定浓度或量的B,A的浓度是变化的。作为结果,获得对应于A的浓度的 IC_{50} 值,在浓度下,在不存在A的情况下对于C测量的信号减半。假如 K_{Dref} (参考分子的 K_D)以及参考分子的总浓度 c_{ref} 是已知的,则相互作用A-B的表观 K_D 可以从下式获得: $K_D = IC_{50} / (1 + c_{ref} / K_{Dref})$ 。注意,如果 $c_{ref} \ll K_{Dref}$,则 $K_D \approx IC_{50}$ 。假如对于比较的结合物的 IC_{50} 的测量以一致的方式进行(例如保持 c_{ref} 固定),则可以通过 IC_{50} 评价分子相互作用的强度或稳定性,并且在本文中将该测量判断为等于 K_D 或表观 K_D 。

[0492] 半数最大抑制浓度(IC_{50})是化合物在抑制生物或生物化学功能例如药理学效果中的有效性的测量。该定量测量指出半数抑制给定生物学过程(或过程的组分,即酶、细胞、细胞受体、趋化作用、间变、转移、侵入等)需要多少ISV(例如纳米抗体)(抑制剂)。换句话说,其是物质的半数最大(50%)抑制浓度(IC)(50% IC,或 IC_{50})。药物的 IC_{50} 可以通过构建剂量响应曲线和检查不同浓度的拮抗剂如本发明的ISVD(例如纳米抗体)对逆转激动剂活性的影响来确定。可以通过确定抑制激动剂的最大生物学响应的一半所需的浓度对给定拮抗剂如本发明的ISVD(例如纳米抗体)计算 IC_{50} 值。

[0493] 术语半数最大有效浓度(EC_{50})是指在指定的暴露时间之后,诱导基线和最大值之间的半数响应的化合物浓度。在本文中其用作多肽的、ISV(例如纳米抗体)的效力的测量值。分级的剂量响应曲线的 EC_{50} 表示观察到其最大效应的50%的情况下化合物的浓度。浓度优选以摩尔单位表达。

[0494] 在生物系统中,配体浓度的小的改变通常导致响应符合S形函数的快速改变。随配体浓度增加而响应增加开始变缓处的拐点是 EC_{50} 。这可以通过对最佳拟合线求导在数学上确定。在多数情况下,依赖于图表来估计是方便的。在实施例部分提供 EC_{50} 的情况下,设计实验以尽可能精确地反映 K_D 。换句话说, EC_{50} 值因此可以被认为是 K_D 值。

[0495] 还涉及 IC_{50} ,其是化合物的抑制(50%抑制)的测量值。对于竞争结合测定和功能性拮抗剂测定, IC_{50} 是剂量响应曲线的最常见概要测量。对于激动剂/刺激剂测定,最常见的概要测量是 EC_{50} 。

[0496] 抑制剂常数 K_i 表示抑制剂的效力;它是产生半数最大抑制所需的浓度。绝对抑制常数 K_i 可以使用Cheng-Prusoff方程计算:

$$[0497] \quad K_i = \frac{IC_{50}}{\frac{[L]}{K_D} + 1}$$

[0498] 其中[L]是配体的固定浓度。

[0499] 当免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽与第一抗原结合的亲和力(如上所述的,适合地表达为 K_D 值、 K_A 值、 K_{off} 速率和/或 K_{on} 速率)是所述免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽与第二靶标或抗原结合的亲和力的至少10倍,如至少100倍,和优选至少1000倍和直至10000倍或更优的亲和力时,将所述免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽称为相比于第二靶标或抗原而言对第一靶标或抗原是“特异的”。例如,免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽可以与第一靶标或抗原以这样的 K_D 值结合:所述 K_D 值是所述免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽与第二靶标或抗原结合的 K_D 的至少10倍小,例如至少100倍小,且优选至少1000倍小,例

如10000倍小或甚至更小。优选地,当与第二靶标或抗原相比,免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽对第一靶标或抗原是“特异的”时,它针对(如本文所定义的)所述的第一靶标或抗原,而不针对所述第二靶标或抗原。

[0500] 氨基酸序列例如根据本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽,被称为对两种不同的抗原或抗原决定簇(例如来自哺乳动物两种不同物种的血清白蛋白,如人血清白蛋白和食蟹猴血清白蛋白,如来自哺乳动物不同物种的CD123,如人CD123和食蟹猴CD123,如来自哺乳动物不同物种的TCR,例如,人TCR和食蟹猴TCR)是“交叉反应的”,假如其对这些不同的抗原或抗原决定簇具有特异性(如本文所定义)的话。

[0501] 术语“交叉阻断(cross-block)”、“被交叉阻断(cross-blocked)”和“交叉阻断的(cross-blocking)”、“交叉竞争((cross)-compete)”、“交叉竞争的((cross)-competing)”和“交叉竞争((cross)-competition)”在本文中可互换使用,指免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂干扰其他免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或结合剂与给定靶标的结合的能力。可使用竞争结合测定来确定免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂能够干扰另一种(结合剂)与靶标结合的程度,以及因此根据本发明是否可被称为交叉阻断。在实施例中描述了一种特别合适的定量交叉阻断测定,包括例如使用在细胞上表达的CD123的荧光激活细胞分选(FACS)结合测定。(交叉)阻断的程度可以通过(减少的)通道荧光来测量。另一种合适的定量交叉阻断测定法使用Biacore仪器,其可以使用表面等离子共振技术测量相互作用的程度。另一种合适的定量交叉阻断测定使用基于ELISA的方法,以测量免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂在它们与靶标结合方面的竞争。

[0502] 以下一般描述了用于确定免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是否交叉阻断或是否能够根据本发明进行交叉阻断的合适的FACS分析。应当理解,该测定可与本文所述的任何免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂一起使用。FACS仪器(例如FACSArray;Becton Dickinson)按照制造商的建议操作。

[0503] 为了评价两种结合剂(例如,如两种免疫球蛋白单可变结构域和/或纳米抗体)之间用于结合CD123的“(交叉)阻断”或“(交叉)竞争”,可以使用细胞(例如,内源性表达CD123的细胞系MOLM-13或过表达人CD123的Flp-InTM-CHO细胞)进行FACS竞争实验。可以使用不同的检测试剂,包括例如单克隆 ANTI-FLAG[®]M2抗体(Sigma-Aldrich,目录号F1804)、单克隆抗C-myc抗体(Sigma-Aldrich,目录号WH0004609M2)、单克隆ANTI-HIS TAG抗体(Sigma-Aldrich,目录号SAB1305538),每个标记不同。多种荧光团可用作流式细胞术中的标记物(例如诸如PE(R-藻红蛋白)、7-氨基放线菌素D(7-AAD)、吖啶橙、各种形式的Alexa Fluor(例如诸如Alexa647)、别藻蓝蛋白(APC)、AmCyan、氨基香豆素、APC Cy5、APC Cy7、APC-H7、APC/Alexa Fluor 750、AsRed2、Azami-Green、石青、B ODIPY FL C5-神经酰胺、BCECF-AM、Bis-oxonol DiBAC2(3)、BODIPY-FL、钙黄绿素、钙黄绿素AM、Caroxy-H2DCFDA、Cascade Blue、Cascade Yellow、Cell Tracker Green、Cerulean、CFSE、色霉素A3、CM-H2DCFDA、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy3B、Cy5、Cy5.5、Cy7、CyPet、DAF-FM DAF-FM二乙酸酯、DAPI、DCFH(2'7'二氯二氢荧光素)、DHR、二氢钙黄绿素AM、二氢罗丹明、Dihydrothidium、DiLC1(5)、DiOC6(3)、DiOC7(3)、dKeima-Red、DRAQ5、Dronpa-绿、各种形式的DsRed dTomato、各种形式的DyLight、大肠杆菌BioParticles AF488、E2-Crimson、E2-Orange、EBFP2、ECFP、各种形式的

eFluor、EGFP、EGFP*、祖母绿、eqFP650、eqFP670、ER-Tracker Blue-White DPX、溴化乙锭、Express2、EYFP、Fc OxyBurst绿、Fc OxyBurst绿123、FITC、Fluo-3、Fluo-4、荧光素、Fura-2、Fura-红、GFPuv、H2DCFDA、HcRed1、Hoechst蓝(33258)、Hoechst红(33342)、羟基香豆素、HyPer、Indo-1、Indo-1蓝(低Ca²⁺)、Indo-1Violet(高Ca²⁺)、iRFP、J-Red、JC-1、JC-9、Katushka(TurboFP635)、Katushka2Kusabira-橙、LDS 751、丽丝胺罗丹明B、各种形式的Live/Dead、路西法黄、路西法黄CH、Lyso Tracker蓝、Lyso Tracker绿、Lyso Tracker红、mAmeritrine、Marina Blue、mBanana、mCFP、mCherry、mCitrine、甲氧基香豆素、mHoneyDew、Midoriishi-Cyan、光神霉素、Mito Tracker Deep Red、Mito Tracker Green、Mito Tracker橙、Mito Tracker红、MitoFluor绿、mKate(TagFP635)、mKate2、mKeima、mKeima-Red、mK0、mK0k、mNeptune、Monochlorobimane、mOrange、mOrange2、mRaspberry、mPlum、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTarquoise、mTFP1、mTFP1(Teal)、NBD、OxyBurst Green H2DCFDA、OxyBurst Green H2HFF BSA、Pacific蓝、PE(R-藻红蛋白)、PE Cy5、PE Cy5.5、PE Cy7、PE Texas红、PE-Cy5缀合物、PE-Cy7缀合物、PerCP(Peridinin chlorophyll protein)、PerCP Cy5.5、PhiYFP、PhiYFP-m、碘化丙啶(PI)、各种形式的Qdot、红613、RFP Tomato、Rhod-2、S65A、S65C、S65L、S65T、单线态氧传感器绿、Sirius、SNARF、Superfolder GFP、SYTOX蓝、SYTOX绿、SYTOX橙、T-宝石蓝、TagBFP、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagRFP657、TagYFP、tdTomato、Texas红、噻唑橙、TMRE、TMRM、Topaz、TOTO-1、TO-PRO-1、TRITC、TRITC TruRed、TurboFP602、TurboFP635、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、Venus、Vybrant CycleDye Violet、Wild Type GFP、X-罗丹明、Y66F、Y66H、Y66W、YOYO-1、YPet、ZsGreen1、ZsYellow1、Zymosan A BioParticles AF488(参见更多:<http://www.thefcn.org/flow-fluorochromes>)。荧光团或简称“fluors”通常附着于识别CD123的抗体(例如免疫球蛋白单可变结构域,例如纳米抗体)或附着于用作检测试剂的抗体。可获得各种缀合的抗体,诸如(不限于)例如与AlexaFluor®、DyLight®、Rhodamine、PE、FITC和Cy3缀合的抗体。每个荧光团具有特征峰值激发和发射波长。可以使用的标记组合将取决于用于激发荧光团的灯或激光的波长以及可用的检测器。

[0504] 为了评价两种测试结合剂(称为A和B*)之间对于CD123结合的竞争,将冷(无任何标记)结合剂A的稀释系列与标记的结合剂B*一起加入(例如100000)细胞中。测试混合物中B*的浓度应足够高,以便易于使细胞上表达的CD123上的结合位点饱和。可以用在CD123表达细胞上的B*的滴定系列和用于结合的EC₅₀值的确定,来确定使细胞上表达的CD123上的结合剂的结合位点饱和的结合剂B*的浓度。为了在饱和浓度下工作,结合剂B*可以以100倍EC₅₀浓度使用。

[0505] 在将细胞与A和B*的混合物温育并洗涤细胞后,可以在FACS上进行读出。首先,根据散射特征(profile)确定完整细胞上的门(gate),并记录通道荧光的总量。

[0506] 还制备了结合剂B*的单独溶液。该溶液中的结合剂应与试验混合物(具有结合剂A和B*)中的结合剂处于相同的缓冲液中并处于相同的浓度。这种单独的溶液也被添加到细胞中。温育和细胞洗涤后,可以在FACS上进行读出。首先,根据散射特征确定完整细胞上设置的门,并记录通道荧光的总量。

[0507] 与用B*的单独溶液温育的细胞的荧光相比,用A和B*的混合物温育的细胞的荧光减少表明了结合剂A(交叉)阻断结合剂B*与在细胞上表达的CD123的结合。

[0508] 根据本发明的交叉阻断免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是在上述FACS交叉阻断测定中与CD123结合的结合剂,使得在测定期间和存在第二免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂时,所记录的荧光是(对于单独标记的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂所测量的)最大荧光的80%和0.1%之间(例如80%至4%),具体地是最大荧光的75%和0.1%之间(例如75%至4%),更具体地是(如上刚刚所定义)最大荧光的70%和0.1%之间(例如70%至4%)。

[0509] 两种测试结合剂(称为A*和B*)之间对于结合CD123的竞争也可以通过向CD123表达细胞中添加两种结合剂来评价,每种结合剂用不同的荧光团标记。温育和细胞洗涤后,可以在FACS上进行读出。为每个荧光团设置一个门,记录通道荧光的总量。荧光团之一的荧光的减少和/或缺失表明所述结合剂对于与细胞上表达的CD123结合的(交叉)阻断。

[0510] 以下一般描述了用于确定免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是否根据本发明进行交叉阻断或能够交叉阻断的合适的Biacore测定法。应当理解,该测定可与本文所述的任何免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂一起使用。Biacore仪器(例如Biacore 3000)的操作符合制造商的建议。因此,在一个交叉阻断测定中,使用标准胺偶联化学将靶蛋白(例如CD123)偶联至CM5Biacore芯片,以产生用靶标包被的表面。典型地,靶标的200-800个共振单位将与芯片偶联(该量提供易于测量的结合水平,但是通过所使用的测试试剂的浓度容易饱和)。将待评价彼此交叉阻断能力的两种测试结合剂(称为A*和B*)在合适的缓冲液中以结合位点的一比一摩尔比混合,以产生测试混合物。当基于结合位点计算浓度时,假定结合剂的分子量是结合剂的总分子量除以该结合剂上的靶结合位点数量。测试混合物中每种结合剂的浓度应足够高,以便易于Biacore芯片上捕获的靶分子上的结合剂的结合位点饱和。混合物中的结合剂具有相同的摩尔浓度(基于结合),并且该浓度通常在1.00和1.5微摩尔之间(基于结合位点)。还制备单独含有A*和单独含B*的单独溶液。这些溶液中的A*和B*应该在与测试混合物相同的缓冲液中并且浓度相同。使测试混合物经过靶标包被的Biacore芯片,并记录结合总量。然后以这样的方式处理芯片以便除去结合的结合剂而不损坏与芯片结合的靶标。典型地,这通过用30mM HCl处理芯片60秒来完成。然后将A*单独的溶液通过靶标包被的表面,并记录结合量。再次处理芯片以除去所有结合的结合剂而不损坏与芯片结合的靶标。然后将B*单独的溶液经过靶标包被的表面,并记录结合量。接下来计算A*和B*的混合物的最大理论结合,并且其是当单独通过靶标表面时每种结合剂的结合的总和。如果混合物的实际记录的结合小于该理论最大值,则称两种结合剂彼此交叉阻断。因此,通常,根据本发明的交叉阻断免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是在上述Biacore交叉阻断测定中将靶标结合的结合剂,使得在测定期间和在存在第二免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂的情况下,所述记录的结合是在最大理论结合的80%和0.1%之间(例如80%至4%),具体地是在最大理论结合的75%和0.1%之间(例如75%至4%),和更具体地,是在组合两种免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或结合剂的最大理论结合(如上所定义)的70%至0.1%之间(例如70%至4%)。上述Biacore测定是用于确定免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是否根据本发明彼此交叉阻断的主要测定法。在极少数情况下,特定免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构

域、多肽或其他结合剂可能不会与通过胺化学偶联至CM5Biacore芯片的靶标结合(这通常发生在靶标上的相关结合位点通过耦合到芯片而被掩蔽或破坏时)。在这种情况下,可以使用靶标的标记形式(version)来确定交叉阻断,例如N端His标记的形式。在该特定形式中,抗His抗体将与Biacore芯片偶联,然后His标记的靶标将经过芯片表面并被抗His抗体捕获。交叉阻断分析基本上如上所述进行,除了在每个芯片再生循环后,新的His-标记的靶标将被加载回抗His抗体涂覆的表面上。除了使用N-端His-标记的靶标给出的实例之外,可以备选地使用C-端His-标记的靶标。此外,本领域已知的各种其他标记和标记结合蛋白组合可用于这种交叉阻断分析(例如具有抗HA抗体的HA标记;具有抗FLAG抗体的FLAG标记;具有链霉亲和素的生物素标记)。

[0511] 以下一般描述了用于确定针对靶标(例如CD123)的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是否如本文所定义进行交叉阻断或能够交叉阻断的ELISA测定。应当理解,该测定可与本文所述的任何免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂一起使用。该测定的一般原理是具有免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或结合剂,其针对包被在ELISA板孔上的靶标。将过量的第二(可能交叉阻断的)抗靶标免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂加入到溶液中(即不与ELISA板结合)。然后将有限量的靶标添加到孔中。包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂以及溶液中的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂竞争与有限数目的靶分子的结合。洗涤平板以除去未被包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂结合的过量靶标,并除去第二溶液相免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂,以及在第二溶液相免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂和靶标之间形成的任何复合物。然后使用适于检测靶标的试剂测量结合的靶标的量。相对于在不存在第二溶液相免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂时包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂可以结合的靶分子数量,溶液中能够交叉阻断包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂,将能够导致包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂可以结合的靶分子的数量减少。在第一免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂(例如Ab-X)被选择为固定化免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂的情况下,将其包被到ELISA板的孔上,然后用合适的封闭溶液封闭平板,以使随后添加的试剂的非特异性结合最小化。然后将过量的第二免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂即Ab-Y加入到ELISA板,使得在ELISA板的包被期间,每孔中Ab-Y靶标结合位点的摩尔数是每孔使用的Ab-X靶标结合位点的摩尔数的至少10倍高。然后加入靶标,使得每孔加入的靶标摩尔数是用于包被每孔的Ab-X靶标结合位点摩尔数的至少25倍更低。在合适的温育期后,洗涤ELISA板,并加入用于检测靶标的试剂,以测量被包被的抗靶标免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂(在这种情况下为Ab-X)特异性结合的靶标的量。测定的背景信号定义为在这样的孔中获得的信号:所述孔具有包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂(在这种情况下为Ab-X),第二溶液相免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂(在这种情况下为Ab-Y),仅靶标缓冲液

(即无靶标)和靶标检测试剂。用于测定的阳性对照信号定义为在这样的孔中获得的信号:所述孔具有包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂(在这种情况下为Ab-X),仅第二溶液相免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂缓冲液(即,没有第二溶液相免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂),靶标和靶标检测试剂。可以以这样的方式进行ELISA测定,以使阳性对照信号为背景信号的至少6倍。为了避免由选择哪种免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂用作包被免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂,和选择哪种用作第二(竞争者)免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂所导致的任何伪影(例如Ab-X和Ab-Y之间对靶标的显著不同的亲和力),交叉阻断测定可以以两种形式运行:1)形式1是,Ab-X是包被在ELISA板上的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂,和Ab-Y是溶液中的竞争者免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂;和2)形式2是,Ab-Y是包被在ELISA板上的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂,和Ab-X是溶液中的竞争者免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂。在形式1或形式2中,与在不存在溶液相抗靶标免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂(即阳性对照孔)时获得的靶检测信号相比,如果溶液相抗靶标免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂能够导致靶标检测信号(即,被包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂结合的靶标的量)减少60%和100%之间,具体地70%和100%之间,更具体地80%和100%之间,则Ab-X和Ab-Y被定义为交叉阻断。

[0512] 用于确定针对靶标的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是否如本文所定义地(交叉)阻断、能够(交叉)阻断、竞争性结合或(交叉)竞争的其他方法在例如Xiao-Chi Jia等人(2004,Journal of Immunological Methods288:91-98)、Miller等人(2011,Journal of Immunological Methods365:118-125)和/或本文描述的方法中(参见例如实施例16)进行了描述。

[0513] 本文所用的术语“CD123”是指白细胞介素3受体(IL-3R α)的 α 亚基。

[0514] 本文所用的术语“TCR”是指由TCR α 和TCR β 链组成的T细胞受体。TCR的 α 链和 β 链均由恒定结构域和可变结构域组成。本发明的多肽和免疫球蛋白单可变结构域与TCR的恒定结构域结合。

[0515] 本发明多肽的“半衰期”通常可如W0 08/020079第57页段落o)所述并且如其中所提及的那样定义,指例如由于多肽的降解和/或通过天然机制对多肽的清除或隔离,多肽在体内的血清浓度减少50%所花费的时间。本发明多肽的体内半衰期可以以本身已知的任何方式确定,例如通过药代动力学分析。合适的技术对于本领域技术人员来说是清楚的,并且通常可以例如W0 08/020079第57页段落o)中所述。如W0 08/020079的第57页段落o)中还提及的,半衰期可使用诸如 $t_{1/2-\alpha}$ 、 $t_{1/2-\beta}$ 和曲线下面积(AUC)的参数表示。例如参考标准手册,例如Kenneth等(1986,Chemical Stability of Pharmaceuticals:A Handbook for Pharmacists,John Wiley&Sons Inc),和M Gibaldi和D Perron(1982,Pharmacokinetics,Marcel Dekker,第二修订版,1982)。术语“半衰期的增加”或“增加的半衰期”也如W0 08/020079第57页段落o)中所定义,特别是指 $t_{1/2-\beta}$ 的增加,伴随或不伴随有 $t_{1/2-\alpha}$ 和/或AUC或二者的增加。

[0516] 除非另有说明,术语“免疫球蛋白”和“免疫球蛋白序列”-无论是否在本文中用于指重链抗体或常规的4-链抗体-用作通用术语,以包括全长抗体、其各个链,以及其所有的部分、结构域或片段(包括但不限于抗原结合结构域或片段,例如 V_{HH} 结构域或 V_H/V_L 结构域)。

[0517] 如本文所用的术语(多肽或蛋白质的)“结构域”是指折叠的蛋白质结构,其具有独立于蛋白质其余部分保留其三级结构的能力。通常,结构域负责蛋白质的离散功能特性,并且在许多情况下可以被添加、去除或转移至其他蛋白质而不丧失蛋白质和/或结构域的其余部分的功能。

[0518] 如本文所用的术语“免疫球蛋白结构域”是指抗体链的球状区域(例如,如常规4-链抗体的或重链抗体的链),或基本上由这种球状区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于它们保留抗体分子的免疫球蛋白折叠特性,其由排列在两个 β -折叠中的约7个反平行 β -链的两层夹层组成,任选地通过保守的二硫键稳定化。

[0519] 本文所用的术语“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由四个“框架区”组成的免疫球蛋白结构域,所述四个“框架区”在本领域和下文中被分别称为“框架区1”或“FR1”;“框架区2”或“FR2”;“框架区3”或“FR3”;“框架区4”或“FR4”;所述四个框架区被三个“互补决定区”或“CDR”间隔开,所述三个“互补决定区”或“CDR”在本领域和下文中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”;和“互补决定区3”或“CDR3”。因此,免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可表示如下:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域通过携带抗原结合位点赋予抗体对抗原的特异性。

[0520] 术语“免疫球蛋白单可变结构域”或“ISV”可与“单可变结构域”互换使用,表示其中抗原结合位点存在于单个免疫球蛋白结构域上并由单个免疫球蛋白结构域形成的分子。这将免疫球蛋白单可变结构域与“常规”免疫球蛋白或其片段区分开,其中两个免疫球蛋白结构域、特别是两个可变结构域相互作用以形成抗原结合位点。典型地,在常规免疫球蛋白中,重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)相互作用以形成抗原结合位点。在这种情况下,VH和VL二者的互补决定区(CDR)将有助于抗原结合位点,即总共6个CDR将参与抗原结合位点的形成。

[0521] 鉴于上述定义,常规四链抗体(例如本领域已知的IgG、IgM、IgA、IgD或IgE分子)或Fab片段,F(ab')₂片段,Fv片段如二硫键连接的Fv或scFv片段,或衍生自这种常规四链抗体的双抗体(均为本领域已知)的抗原结合结构域,通常不被视为免疫球蛋白单可变结构域,因为在这些情况下,通常不会通过一个(单个)免疫球蛋白结构域而是通过一对(缔合的)免疫球蛋白结构域如轻链和重链可变结构域(即通过免疫球蛋白结构域的VH-VL对,它们共同结合相应抗原的表位)发生与抗原的相应表位的结合。

[0522] 相反,免疫球蛋白单可变结构域能够特异性结合抗原的表位而不与另外的免疫球蛋白可变结构域配对。免疫球蛋白单可变结构域的结合位点由单个VH/VHH或VL结构域形成。因此,免疫球蛋白单可变结构域的抗原结合位点由不超过三个CDR形成。

[0523] 因此,单可变结构域可以是轻链可变结构域序列(例如,VL序列)或其合适的片段;或重链可变结构域序列(例如,VH序列或VHH序列)或其合适片段;只要它能够形成单抗原结合单元即可(即,基本上由单可变结构域组成的功能性抗原结合单元,使得单抗原结合结构域不需要与另一个可变结构域相互作用以形成功能性抗原结合单元)。

[0524] 在本发明的一个方面,免疫球蛋白单可变结构域是重链可变结构域序列(例如,VH序列);更具体地,免疫球蛋白单可变结构域可以是衍生自常规四链抗体的重链可变结构域序列,或衍生自重链抗体的重链可变结构域序列。

[0525] 例如,免疫球蛋白单可变结构域可以是(单)结构域抗体(或适合于用作(单)结构域抗体的氨基酸)、“dAb”或dAb(或适合于用作dAb的氨基酸)、纳米抗体(如本文所定义,包括但不限于VHH)、其他的单可变结构域、或其任何一种的任何合适片段。

[0526] 特别地,免疫球蛋白单可变结构域可以是纳米抗体(如本文所定义)或其合适的片段。[注意:纳米抗体(Nanobody)、纳米抗体(Nanobodies)和纳米克隆(Nanoclone)是Ablynx N.V.的注册商标]。对于纳米抗体的一般描述,参考如下进一步描述,以及本文引用的现有技术,例如如在WO 08/020079(16页)中所描述。

[0527] “VHH结构域”,也称为VHH、V_HH结构域、VHH抗体片段和VHH抗体,最初被描述为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”;Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-448,1993)的抗原结合免疫球蛋白(可变)结构域。选择术语“VHH结构域”是为了将这些可变结构域与存在于常规四链抗体中的重链可变结构域(本文称为“V_H结构域”或“VH结构域”)和与存在于常规四链抗体中的轻链可变结构域(本文中称为“V_L结构域”或“VL结构域”)区分开。关于VHH和纳米抗体的进一步描述,参考Muyldermans的综述文章(2001,Reviews in Molecular Biotechnology 74:277-302),以及参考作为一般背景技术提及的以下专利申请:布鲁塞尔自由大学的WO 94/04678、WO 95/04079和WO 96/34103;联合利华的WO 94/25591、WO 99/37681、WO 00/40968、WO 00/43507、WO 00/65057、WO 01/40310、WO 01/44301、EP 1134231和WO 02/48193;Vlaams Instituut voor Biotechnologie(VIB)的WO97/49805、WO 01/21817、WO 03/035694、WO 03/054016和WO 03/055527;Algonomics N.V.和Ablynx N.V.的WO 03/050531;加拿大国家研究理事会的WO 01/90190;Institute ofAntibodies的WO 03/025020(=EP 1433793);以及Ablynx N.V.的WO 04/041867、WO 04/041862、WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551、WO 05/044858、WO 06/40153、WO 06/079372、WO 06/122786、WO 06/122787和WO 06/122825,和Ablynx N.V.的进一步公开的专利申请。还参考了这些申请中提及的另外的现有技术,特别是国际申请WO 06/040153第41-43页上提及的参考文献列表,所述列表和参考文献通过引用并入本文。如这些参考文献中所述,纳米抗体(特别是VHH序列和部分人源化的纳米抗体)尤其可以通过在一个或更多个框架序列中存在一个或更多个“特征残基”来表征。可在例如WO 08/101985和WO 08/142164中发现纳米抗体的进一步描述,包括纳米抗体的人源化和/或骆驼源化,以及其他的修饰,部分或片段,衍生物或“纳米抗体融合”,多价构建体(包括接头序列的一些非限制性实例)和增加纳米抗体及其制剂的半衰期的不同修饰。对于纳米抗体的进一步的一般描述,参考本文引用的现有技术,例如WO 08/020079(第16页)中所述。

[0528] “结构域抗体”,也称为“Dab”、“结构域抗体”和“dAbs”(术语“结构域抗体”和“dAbs”被GlaxoSmithKline集团公司用作商标)已在例如EP 0368684、Ward等人(1989,Nature 341:544-546)、Holt等人(2003,Trends in Biotechnology 21:484-490)、WO 03/002609以及例如Domantis Ltd.的WO 04/068820、WO 06/030220、WO 06/003388和其他公开的专利申请中描述。结构域抗体基本上对应于非骆驼科哺乳动物的VH或VL结构域,特别是人四链抗体。为了作为单抗原结合结构域与表位进行结合,即分别不与VL或VH结构域配对,

需要对这种抗原结合特性进行特异性选择,例如,通过使用人单VH或VL结构域序列的文库。与VHH一样,结构域抗体具有约13至约16kDa的分子量,并且如果衍生自完全人序列,则不需要人源化例如用于在人体中治疗用途。

[0529] 还应注意,虽然在本发明的上下文中不太优选,因为它们不是哺乳动物来源,但是单可变结构域可以衍生自某些种类的鲨鱼(例如,所谓的“IgNAR结构域”,参见例如W005/18629)。

[0530] 因此,在本发明的含义中,术语“免疫球蛋白单可变结构域”或“单可变结构域”包括衍生自非人源的多肽,优选骆驼科动物,优选骆驼科动物重链抗体。如前所述,它们可以是人源化的。此外,该术语包括衍生自非骆驼科动物来源的多肽,例如已经“骆驼源化”的小鼠或人,如例如Davies和Riechmann(1994,FEBS 339:285-290;1995,Biotechnol.13:475-479;1996,Prot.Eng.9:531-537)和Riechmann和Muyldermans(1999,J.Immunol.Methods 231:25-38)所描述。

[0531] VHH结构域的氨基酸残基根据Kabat等人(“Sequence of proteins of immunological interest”,US Public Health Services,NIH Bethesda,MD,Publication No.91)给出的用于V_H结构域的一般编号进行编号,如来自骆驼科动物的VHH结构域所应用,如Riechmann和Muyldermans的图2所示(1999,J.Immunol.Methods 231:25-38)。用于编码V_H结构域的氨基酸残基的备选方法是本领域已知的,该方法也可以以类似的方式应用于VHH结构域。然而,在本说明书、权利要求和附图中,除非另有说明,否则将遵循如上所述的应用于VHH结构域的根据Kabat的编号。

[0532] 应该注意,如本领域所熟知的,对于V_H结构域和VHH结构域,每个CDR中的氨基酸残基总数可以变化,并且可以不对应于由Kabat编号表示的氨基酸残基的总数(即,根据Kabat编号的一个或多个位置可以由实际序列占用,或者实际序列可能包含多于Kabat编号所允许数目的氨基酸残基)。这一般意为,根据Kabat的编号可以对应于或可以不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。VH结构域和VHH结构域中氨基酸残基的总数通常在110至120的范围内,通常在112至115之间。但应注意,较小和较长的序列也可适用于本文所述的目的。

[0533] CDR区的确定也可以根据不同的方法进行。在根据Kabat的CDR确定中,VHH的FR1包含在位置1-30的氨基酸残基,VHH的CDR1包含在位置31-35的氨基酸残基,VHH的FR2包含在位置36-49的氨基酸,VHH的CDR2包含在位置50-65的氨基酸残基,VHH的FR3包含在位置66-94的氨基酸残基,VHH的CDR3包含在位置95-102的氨基酸残基,和VHH的FR4包含在位置103-113的氨基酸残基。

[0534] 然而,在本申请中,CDR序列是根据Kontermann和Dübel(2010,Eds.,Antibody Engineering,vol 2,Springer Verlag Heidelberg Berlin,Martin,Chapter 3,pp.33-51)确定的。根据该方法,FR1包含在位置1-25的氨基酸残基,CDR1包含在位置26-35的氨基酸残基,FR2包含在位置36-49的氨基酸,CDR2包含在位置50-58的氨基酸残基,FR3包含在位置59-94的氨基酸残基,CDR3包含在位置95-102的氨基酸残基,FR4包含在位置103-113的氨基酸残基(根据Kabat编号)。

[0535] 免疫球蛋白单可变结构域如结构域抗体和纳米抗体(包括VHH结构域)可以进行人源化。特别地,人源化免疫球蛋白单可变结构域如纳米抗体(包括VHH结构域)可以是如之前

段落中通常所定义的免疫球蛋白单可变结构域,但其中存在(并且特别地,在至少一个框架残基中存在)是和/或对应于人源化取代(如本文所定义)的至少一个氨基酸残基。通过比较天然存在的 V_{HH} 序列的框架区的序列与一个或多个密切相关的人 V_H 序列的相应框架序列,可以确定可能有用的人源化取代,之后由此确定的一个或多个可能有用的人源化取代(或其组合)可以(以本身已知的任何方式,如本文进一步描述的)被引入所述 V_{HH} 序列中,并且可以测试所得的人源化 V_{HH} 序列对靶标的亲和力、稳定性、表达的容易性和水平,和/或其他所需的特性。以这种方式,通过有限程度的试验和错误,技术人员可以基于本文的公开内容确定其他合适的人源化取代(或其合适的组合)。而且,基于前述内容,免疫球蛋白单可变结构域(的框架区),例如纳米抗体(包括VHH结构域)可以是部分人源化的或完全人源化的。

[0536] 免疫球蛋白单可变结构域如结构域抗体和纳米抗体(包括VHH结构域和人源化VHH结构域)也可以通过在一个或多个CDR的氨基酸序列中引入一个或多个改变而进行亲和力成熟,这些改变导致相比于各自的母体分子,所得的免疫球蛋白单可变结构域对其各自抗原的改善的亲和力。本发明的亲和力成熟的免疫球蛋白单可变结构域分子可以通过本领域已知的方法制备,例如,如Marks等人(1992, *Biotechnology* 10:779-783)、Barbas等人(1994, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813)、Shier等人(1995, *Gene* 169:147-155)、Yelton等人(*Immunol.* 155:1994-2004,)、Jackson等人(*J. Immunol.* 154:3310-9, 1995)、Hawkins等人(1995, *J. Mol. Biol.* 226:889-896)、Johnson和Hawkins(1996, *Affinity maturation of antibodies using phage display*, Oxford University Press)所述。

[0537] 由免疫球蛋白单可变结构域如结构域抗体或纳米抗体开始,设计/选择和/或制备多肽的过程在本文中也称为“格式化”所述免疫球蛋白单可变结构域;并且,作为多肽的一部分的免疫球蛋白单可变结构域被称为“格式化的”或“格式的”所述多肽。免疫球蛋白单可变结构域可被格式化方式的实例以及这种格式的实例在本文公开的基础上对本领域技术人员来说是清楚的;这种格式化的免疫球蛋白单可变结构域构成了本发明的另一个方面

[0538] 例如但不限于,一个或多个免疫球蛋白单可变结构域可用作“结合单元”、“结合结构域”或“结构单元”(这些术语可互换使用)用于制备多肽,所述多肽可任选地含有可用作结合单元的一个或多个另外的免疫球蛋白单可变结构域(即,针对CD123上的相同或另一表位,和/或针对除CD123之外的一个或多个其他抗原、蛋白质或靶标,例如TCR)。

[0539] 单价多肽包含仅一个结合单元(例如,诸如一个免疫球蛋白单可变结构域),或基本上由其组成。包含两个或多个结合单元(例如,诸如两个或多个免疫球蛋白单可变结构域)的多肽在本文中也将被称为“多价”多肽,并且存在于这种多肽中的结合单元/免疫球蛋白单可变结构域在本文中也将被称为“多价格式”。例如,“二价”多肽可包含两个免疫球蛋白单可变结构域,任选地通过接头序列连接,而“三价”多肽可包含三个免疫球蛋白单可变结构域,任选地通过两个接头序列连接,而“四价”多肽可以包含四个免疫球蛋白单可变结构域,任选通过三个接头序列连接,等等。

[0540] 在多价多肽中,两个或多个免疫球蛋白单可变结构域可以是相同的或不同的,并且可以针对相同的抗原或抗原决定簇(例如针对相同的部分或表位,或针对不同的部分或表位),或备选地可针对不同的抗原或抗原决定簇;或其任何合适的组合。含有至少两个结合单元(例如,如至少两个免疫球蛋白单可变结构域)的多肽,其中至少一个结合单元针对第一抗原(即CD123)和至少一个结合单元针对第二抗原(即,不同于CD123),也将被称为

“多特异性”多肽,并且存在于这种多肽中的结合单元(例如,如免疫球蛋白单可变结构域)在本文中也将被称为“多特性格式”。因此,例如,本发明的“双特异性”多肽是包含至少一个针对第一抗原(即CD123)的免疫球蛋白单可变结构域和另一个针对第二抗原(即,与CD123不同,例如TCR)的免疫球蛋白单可变结构域的多肽,而本发明的“三特异性”多肽是包含以下的多肽:至少一个针对第一抗原(即CD123)的免疫球蛋白单可变结构域,另一个针对第二抗原(即,不同于CD123,例如TCR)的免疫球蛋白单可变结构域,和至少一个针对第三抗原(即,不同于CD123和第二抗原)的另外的免疫球蛋白单可变结构域;等等。

[0541] 针对一种抗原的多肽也被称为“单特异性”多肽。这种“单特异性”多肽可以是单价多肽,所述单价多肽仅含有一种针对一种抗原(例如TCR或CD123)的结合单元(例如,一种免疫球蛋白单可变结构域)。这种“单特异性”多肽也可以是多价多肽,所述多价多肽含有两个或多个针对相同抗原的免疫球蛋白单可变结构域。这种“单特异性”多价多肽可以针对相同抗原的相同部分或表位,或针对相同抗原的不同部分或表位(例如CD123)。

[0542] 包含针对相同抗原上的不同部分或表位的两个或更多个结合单元的多肽也被称为“双互补位”多肽。因此,“多互补位”多肽如“双互补位”多肽或“三互补位”多肽,包含或基本上组成两个或更多个结合单元,每个结合单元具有不同的互补位(如本文将进一步描述;参见关于本发明单特异性多肽的章节)。

[0543] 本发明的多肽

[0544] 本发明提供了重定向T细胞以杀死CD123表达细胞的多肽。这些多肽发挥这种功能的能力来自于它们的多特性格式。本发明提供的多特异性多肽(称为“本发明的多特异性多肽”)包含一个特异性结合T细胞受体(TCR)的免疫球蛋白单可变结构域(ISV)和一个或多个特异性结合CD123的ISV。

[0545] 本发明还涉及可在本发明的这种多特异性多肽中用作结合单元或结构单元的单价多肽。因此,在一个方面,本发明提供了特异性结合TCR的ISV。另一方面,本发明提供了特异性结合CD123的ISV。这些单价多肽仅与一种抗原结合,因此称为“本发明的单特异性多肽”。

[0546] 特异性结合CD123的ISV可以进一步被格式化以形成多价多肽,其也包括在本发明中。这种多价多肽包含两个或更多个特异性结合CD123的ISV。这些多价多肽仅结合一种抗原(即CD123),因此也称为“本发明的单特异性多肽”。

[0547] 本发明的单特异性多肽和本发明的多特异性多肽在本文中进一步描述,并且通常被称为“本发明的多肽”。

[0548] 1. 本发明的单特异性多肽

[0549] 1.1 结合TCR的单特异性多肽

[0550] 本发明涉及特异性结合TCR的单特异性多肽。优选地,本发明的这种单特异性多肽是单价的。在优选的方面,单特异性多肽是免疫球蛋白单可变结构域,其在本文中称为“本发明的免疫球蛋白单可变结构域”或“本发明的ISV”。

[0551] T细胞受体(在本文中也称为TCR)是由TCR α 和TCR β 链组成的异二聚体。TCR的 α 链和 β 链均由恒定结构域和可变结构域组成。本发明的多肽特异性结合TCR的恒定结构域。

[0552] T细胞受体形成TCR复合物的一部分。如本文所用,术语“TCR复合物”或“TCR $\alpha\beta$ -CD3复合物”是指在T细胞表面上呈递的T细胞受体复合物(参见Kuhns等人2006, *Immunity* 24:

133-139)。TCR复合物由六种不同的I型单跨越跨膜蛋白组成：形成负责配体识别的TCR异二聚体的TCR α 和TCR β 链，以及非共价缔合的CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和 ζ 链，其中所述CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和 ζ 链具有在受体激活时被磷酸化的细胞质序列基序并募集大量信号传导组分。人CD3和人TCR α/β 恒定结构域的序列在表A-8中提供(SEQ ID NOs:70-75；参见UniProt标识符：CD3 δ :P04234,CD3 γ :P09693,CD3 ϵ :P07766,CD3 ζ :P20963,TCR α :P01848和TCR β :与P01850相关)。

[0553] 在一个方面，本发明涉及如本文所述的多肽，其结合T细胞受体 α (TCR α)的恒定结构域(SEQ ID NO:74)和/或T细胞受体 β (TCR β)的恒定结构域(SEQ ID NO:75)，或其多态性变体或同种型。

[0554] 同种型是可以通过单个生物事件或通过生物事件的组合从相同基因产生的备选蛋白质序列，所述生物事件为例如选择性启动子使用、选择性剪切、选择性起始和核糖体移码，全部如本领域中已知的。

[0555] 只有在严格的免疫、筛选和选择方法之后，本发明人才能够鉴定出与TCR恒定结构域结合的ISV。鉴定了包含104个在CDR1、CDR2和CDR3中具有相似性和差异的克隆的序列簇(参见表A-5)。(表A-1)提供了相应的序列比对。

[0556] 因此，本发明涉及多肽，所述多肽是选自由SEQ ID NO:42和78-180(参见表A-5)组成的组的ISV。在另外的方面，所述多肽选自由SEQ ID NO:42和78-180组成的组，或选自与SEQ ID NO:42和78-180之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。

[0557] 因此，本发明涉及结合TCR的多肽，其包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成，其中CDR1具有氨基酸序列GX₁VX₂X₃X₄NX₅LX₆，其中X₁是D、A、S、E或G，X₂是H或Y，X₃是K或L，X₄是I或L，X₅是F、I或V，和X₆是G或S。

[0558] 在另外的方面，本发明涉及结合TCR的多肽，其包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成，其中CDR2具有氨基酸序列X₁IX₂IX₃DX₄X₅X₆，其中X₁是H、T或R，X₂是S、T或A，X₃是G、S或A，X₄是Q、D、E、T、A或V，X₅是T、A或V和X₆是D、A、Q、N、V或S。

[0559] 在另外的方面，本发明涉及结合TCR的多肽，其包含或(基本上)由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成，其中CDR3具有氨基酸序列X₁SRX₂X₃PYX₄Y，其中X₁是F、Y、G、L或K，X₂是I或L，X₃是Y或W，和X₄是D、N或S。

[0560] 用于本发明多肽的优选CDR序列以及CDR序列的优选组合描述于表A-5中。

[0561] 因此，本发明涉及特异性结合TCR并且包含或基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成的多肽，优选为ISV，其中：

[0562] i) CDR1选自由以下组成的组：

[0563] a) SEQ ID NO:181-191；或

[0564] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合，所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的；

[0565] 和/或

[0566] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0567] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0568] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0569] 和/或

[0570] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0571] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0572] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0573] 在另外的方面,本发明涉及多肽,优选ISV,其中:

[0574] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0575] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0576] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0577] 和

[0578] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0579] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0580] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0581] 和

[0582] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0583] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0584] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0585] 特别地,本发明涉及多肽,优选ISV,其中:

[0586] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0587] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0588] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸

序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置2、4、5、6、8和/或10处(根据Kabat编号的位置27、29、30、31、33和/或35);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0589] 和

[0590] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0591] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0592] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置1、3、5、7、8和/或9处(根据Kabat编号,位置50、52、54、56、57和/或58);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0593] 和

[0594] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0595] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0596] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的第1、4、5和/或8处(根据Kabat编号的位置95、98、99和/或101);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0597] 在另外的方面,本发明涉及多肽,优选ISV,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0598] a) SEQ ID NO:181;或

[0599] b) 与SEQ ID NO:181的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0600] -在位置2处D已经变为A、S、E或G;

[0601] -在位置4处H已经变为Y;

[0602] -在位置5处K已经变为L;

[0603] -在位置6处I已经变为L;

[0604] -在位置8处F已经变为I或V;和/或

[0605] -在位置10处G已经变为S;

[0606] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0607] 在另一方面,本发明涉及多肽,优选地ISV,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0608] a) SEQ ID NO:192;或

[0609] b) 与SEQ ID NO:192的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0610] -在位置1处H已经变为T或R;

[0611] -在位置3处S已经变为T或A;

- [0612] -在位置5处G已经变为S或A;
- [0613] -在位置7处Q已经变为D、E、T、A或V;
- [0614] -在位置8处T已经变为A或V;和/或
- [0615] -在位置9处D已经变为A、Q、N、V或S;
- [0616] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。
- [0617] 在另一方面,本发明涉及多肽,优选地ISV,其中CDR3选自由以下组成的组:
- [0618] a) SEQ ID NO:218;或
- [0619] b) 与SEQ ID NO:218的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0620] -在位置1处F已经变为Y、L或G;
- [0621] -在位置4处I已经变为L;
- [0622] -在位置5处Y已经变为W;和/或
- [0623] -在位置8处D已经变为N或S;
- [0624] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。
- [0625] 因此,本发明涉及多肽,优选地ISV,其中:
- [0626] i) CDR1选自由以下组成的组:
- [0627] a) SEQ ID NO:181;或
- [0628] b) 与SEQ ID NO:181的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0629] -在位置2处D已经变为A、S、E或G;
- [0630] -在位置4处H已经变为Y;
- [0631] -在位置5处K已经变为L;
- [0632] -在位置6处I已经变为L;
- [0633] -在位置8处F已经变为I或V;和/或
- [0634] -在位置10处G已经变为S;
- [0635] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;
- [0636] 和
- [0637] ii) CDR2选自由以下组成的组:
- [0638] c) SEQ ID NOs:192;或
- [0639] d) 与SEQ ID NO:192的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0640] -在位置1处H已经变为T或R;
- [0641] -在位置3处S已经变为T或A;

- [0642] -在位置5处G已经变为S或A;
- [0643] -在位置7处Q已经变为D、E、T、A或V;
- [0644] -在位置8处T已经变为A或V;和/或
- [0645] -在位置9处D已经变为A、Q、N、V或S;
- [0646] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;
- [0647] 和
- [0648] iii) CDR3选自由以下组成的组:
- [0649] e) SEQ ID NOs:218;或
- [0650] f) 与SEQ ID NO:218的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0651] -在位置1处F已经变为Y、L或G;
- [0652] -在位置4处I已经变为L;
- [0653] -在位置5处Y已经变为W;和/或
- [0654] -在位置8处D已经变为N或S;
- [0655] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。
- [0656] 在另一方面,本发明涉及多肽,优选地ISV,其中CDR1选自由SEQ ID NO:181-191组成的组,CDR2选自由SEQ ID NO:192-217组成的组,和CDR3选自由SEQ ID NO:218-225组成的组。
- [0657] 因此,在优选的方面,本发明涉及多肽,优选地ISV,其中CDR1是SEQ ID NO:181,CDR2是SEQ ID NO:192,CDR3是SEQ ID NO:218。
- [0658] 通常,表A-5中列出的CDR的组合(即表A-5中在相同的行上提及的那些)是优选的。因此,通常优选的是,当ISV中的CDR是表A-5中提及的CDR序列,或者适当地选自由与表A-5中列出的CDR序列具有4、3、2或仅1个氨基酸差异的CDR序列组成的组时,至少一个优选两个其他的CDR适当地选自属于表A-5中相同组合的(即,在表A-5中相同的行上所提及的)CDR序列,或适当地选自由与属于相同组合的CDR序列具有4、3、2或仅1个氨基酸差异的CDR序列组成的组。
- [0659] 本发明还涉及多肽,优选地ISV,其交叉阻断本文所述的至少一种多肽与TCR的结合和/或被如本文所述的至少一种多肽交叉阻断与TCR的结合。
- [0660] 本发明的多肽特异性结合效应细胞(例如T细胞)表面上的TCR。在“单价”格式中,结合TCR的本发明的单价多肽引起最小的至无T细胞活化。
- [0661] 如本文所用,术语“效应细胞”是包含TCR复合物的细胞,优选免疫细胞例如T细胞,优选CD4⁺ T辅助细胞(也称为CD4细胞、T辅助细胞或T4细胞),更优选细胞毒性T细胞(也称为T_C细胞、CTL或CD8⁺ T细胞)或天然杀伤T细胞(NKT细胞)。在一些方面,细胞是在体内存在的。在一些方面,细胞是在体外存在的。本发明的效应细胞尤其涉及哺乳动物细胞,优选涉及灵长类细胞,并且甚至更优选涉及人细胞。

[0662] 如本文所用,“T细胞活化”是指T细胞(例如细胞毒性T细胞)的一种或更多种细胞应答,例如选自:增殖、分化、细胞因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒活性、活化标记物的表达和重定向的靶细胞溶解。

[0663] 本发明的单特异性多肽以100nM和10pM之间的平均 K_D 值与T细胞受体(TCR)的恒定结构域结合,例如90nM或更小的平均 K_D 值,甚至更优选80nM或更小的平均 K_D 值,例如小于70、60、50、40、30、20、10、5nM或甚至更小,例如小于4、3、2或1nM,例如小于500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20pM或甚至更小,例如小于10pM。优选地, K_D 由Kinexa、BLI或SPR确定,例如如通过Proteon所确定。例如,所述 K_D 如实施例部分中所示的确定。

[0664] 本发明的单特异性多肽以100nM和1pM之间的EC50值与TCR结合,例如100nM或更小的平均EC50值,甚至更优选90nM或更小的平均EC50值,例如小于80、70、60、50、40、30、20、10、5nM或甚至更小,例如小于4、3、2或1nM或甚至更小,例如小于500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5pM或甚至更低,例如小于4pM。所述平均EC50优选通过FACS、Biacore或ELISA确定,例如,所述EC50如实施例部分中所示的确定。

[0665] 在实施例中已经显示 K_D 与EC50良好相关。

[0666] 在另外的方面,如本文所述的单特异性多肽对于(或用于结合)TCR具有选自由以下组成的组的结合速率常数(k_{on}):至少约 $10^2 M^{-1} s^{-1}$ 、至少约 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 、至少约 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、至少约 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、至少约 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、至少约 $10^8 M^{-1} s^{-1}$ 、至少约 $10^9 M^{-1} s^{-1}$ 和至少约 $10^{10} M^{-1} s^{-1}$,优选地如通过表面等离子共振所测量或如在实施例部分中所进行。

[0667] 在另外的方面,如本文所述的单特异性多肽对于(或用于结合)TCR具有选自由以下组成的组的解离速率常数(k_{off}):至多约 $10^{-3} s^{-1}$ 、至多约 $10^{-4} s^{-1}$ 、至多约 $10^{-5} s^{-1}$ 、至多约 $10^{-6} s^{-1}$ 、至多约 $10^{-7} s^{-1}$ 、至多约 $10^{-8} s^{-1}$ 、至多约 $10^{-9} s^{-1}$ 和至多约 $10^{-10} s^{-1}$,优选地如通过表面等离子共振所测量或如在实施例部分中所进行。

[0668] 结合TCR的本发明的单特异性多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域可具有框架序列,所述框架序列优选地是免疫球蛋白框架序列或衍生自免疫球蛋白框架序列的框架序列(例如,通过序列优化如人源化或骆驼源化)(的适当组合)。例如,框架序列可以是衍生自免疫球蛋白单可变结构域的框架序列,例如衍生自轻链可变结构域(例如 V_L 序列)和/或衍生自重链可变结构域(例如 V_H 序列)。在一个特别优选的方面,框架序列是衍生自 V_{HH} 序列的框架序列(其中所述框架序列可任选地已经被部分或完全人源化)或者是已经骆驼源化的常规 V_H 序列。

[0669] 框架序列可以优选使得单特异性多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域是结构域抗体(或适合用作结构域抗体的氨基酸序列);单结构域抗体(或适合用作单结构域抗体的氨基酸);“dAb”(或适合用作dAb的氨基酸);纳米抗体; V_{HH} ;人源化 V_{HH} ;骆驼源化 V_H ;或通过亲和力成熟获得的 V_{HH} 。再次,合适的框架序列对于本领域技术人员而言是清楚的,例如基于标准手册和本文提及的进一步公开内容和现有技术。

[0670] 特别地,存在于本发明的单特异性多肽中的框架序列可含有一个或更多个特征残基(如WO 08/020079(表A-3至A-8)中所定义),使得本发明的单特异性多肽是纳米抗体。根据本文的进一步公开内容(参见例如表A-5),这种框架序列(的合适组合)的一些优选但非限制性的实例将变得清楚。通常,纳米抗体(特别是 V_{HH} 、部分或完全人源化的 V_{HH} 和骆驼源化的 V_H)可以特别地以在一个或更多个框架序列中存在一个或更多个“特征残基”为特征(如

例如在WO 08/020079,第61页第24行至第98页第3行中进一步所描述)。

[0671] 更特别地,本发明提供了包含或(基本上)由至少一个免疫球蛋白单可变结构域组成的多肽,该免疫球蛋白单可变结构域是具有(通用)结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的氨基酸序列,其中FR1至FR4分别指框架区1至4,其中CDR1至CDR3分别指互补决定区1至3,并且所述多肽:

[0672] i) 与SEQ ID NO:42和78-180(参见表A-5)的至少一个氨基酸序列具有至少80%、更优选90%、甚至更优选95%的氨基酸同一性,其中为了确定氨基酸同一性程度的目的,不考虑形成CDR序列的氨基酸残基。在这方面,还参考表A-5,其列出了SEQ ID NO:42和78-180的免疫球蛋白单可变结构域的框架1序列(SEQ ID NO:226-250)、框架2序列(SEQ ID NO:251-276)、框架3序列(SEQ ID NO:277-319)和框架4序列(SEQ ID NO:320-324)(参见表A-5);或

[0673] 和其中:

[0674] ii) 优选地,根据Kabat编号在位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108处的一个或多个氨基酸残基选自WO 08/020079的表A-3至表A-8中提到的特征残基。

[0675] 本发明还提供了许多序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域。

[0676] 特别地,本发明的序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域可以是如前面段落中为免疫球蛋白单可变结构域通常所定义的氨基酸序列,但其中存在(和特别地,在至少一个框架残基中存在)是和/或对应于人源化取代(如本文所定义)的至少一个氨基酸残基。基于本文的公开内容,一些优选但非限制性的人源化取代(及其合适的组合)对于本领域技术人员而言将变得清楚。另外,或备选地,通过比较天然存在的VHH序列的框架区的序列与一个或多个密切相关的人VH序列的相应框架序列,可以确定其他可能有用的人源化取代,之后由此确定的一个或多个可能有用的人源化取代(或其组合)可以(以本身已知的任何方式,如本文进一步描述的)被引入所述VHH序列中,并且可以测试所得的人源化VHH序列对靶标的亲和力、稳定性、表达容易性和水平和/或其他所需的特性。以这种方式,通过有限程度的试验和错误,技术人员可以基于本文的公开内容确定其他合适的人源化取代(或其合适的组合)。而且,基于前述内容,免疫球蛋白单可变结构域(的框架区)可以是部分人源化的或完全人源化的。

[0677] 本发明还涉及序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域,其在稳定性研究期间在储存时可显示出改善的表达和/或增加的稳定性。本发明的序列优化的多肽和/或ISV可显示降低的N-端的焦谷氨酸翻译后修饰,因此具有增加的产物稳定性。此外,本发明的序列优化的多肽和/或ISV可以显示出其他改进的性质,例如,免疫原性较低,对于TCR的结合特性的改善(适当地测量和/或表示为 K_D 值(实际或表观)、 K_A 值(实际或表观)、 k_{on} 速率和/或 k_{off} 速率,或者备选地作为 EC_{50} 值,如本文进一步所描述的),对于TCR的改善的亲和力和/或改善的亲合力。

[0678] 本发明的一些特别优选的序列优化的免疫球蛋白单可变结构域是SEQ ID NO:42和78-180的免疫球蛋白单可变结构域的序列优化变体。

[0679] 因此,本发明的一些其它优选的免疫球蛋白单可变结构域是可以与TCR结合(如本文所定义)的纳米抗体,并且所述纳米抗体:

[0680] i) 是SEQ ID NO:42和78-180的免疫球蛋白单可变结构域之一的序列优化变体;

和/或

[0681] ii) 与SEQ ID NO:42和78-180(参见表A-5)的至少一个免疫球蛋白单可变结构域具有至少80%的氨基酸同一性,其中为了确定氨基酸同一性程度的目的,不考虑形成CDR序列的氨基酸残基;在这一方面,还参考表A-5,其列出了SEQ ID NO:42和78-180的免疫球蛋白单可变结构域的框架1序列(SEQ ID NO:226-250)、框架2序列(SEQ ID NO:251-276)、框架3序列(SEQ ID NOs:277-319)和框架4序列(SEQ ID NO:320-324)(参见表A-5);

[0682] 和其中:

[0683] iii) 优选地,根据Kabat编号在位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108处的一个或多个氨基酸残基选自W0 08/020079的表A-3至表A-8中提到的特征残基。

[0684] 本发明的序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域还可含有以下共同未决的美国临时申请中描述的特定突变/氨基酸残基,所有临时申请均标题为“Improved immunoglobulin variable domains”:2014年5月16日提交的US 61/994552、2014年6月18日提交的US 61/014,015、2014年8月21日提交的US 62/040,167和2014年9月8日提交的US 62/047,560(均转让给Ablynx N.V.),以及基于这些临时申请并于2015年11月19日公布的国际申请W0 2015/173325。

[0685] 特别地,本发明的序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域可适当地含有(i)位置112处的K或Q;或(ii)位置110处的K或Q与位置11处的V组合;或(iii)位置89处的T;或(iv)位置89上的L,伴随有位置110处的K或Q;或(v)位置11处的V及第89位的L;或(i)至(v)的任何合适组合。

[0686] 还如所述共同未决的美国临时申请中所述,当本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域含有根据上述(i)至(v)之一(或其合适的组合)的突变时:

[0687] -位置11的氨基酸残基优选选自L、V或K(最优选V);和

[0688] -位置14的氨基酸残基优选适当地选自A或P;和

[0689] -位置41的氨基酸残基优选适当地选自A或P;和

[0690] -位置89的氨基酸残基优选适当地选自T、V或L;和

[0691] -位置108的氨基酸残基优选适当地选自Q或L;和

[0692] -位置110的氨基酸残基优选适当地选自T、K或Q;和

[0693] -位置112的氨基酸残基优选适当地选自S、K或Q。

[0694] 如所述共同未决的美国临时申请中所述,所述突变可有效预防或减少所谓的“预先存在的抗体”与本发明的多肽、免疫球蛋白单可变结构域和/或构建体的结合。为此目的,本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域还可含有(任选地与所述突变组合)C端延伸(X)_n(其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5(并且优选1或2,例如1);并且每个X是(优选天然存在的)氨基酸残基,该氨基酸残基独立地选自且优选独立地选自丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)组成的组),其再次参考所述美国临时申请以及W0 12/175741。特别地,本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域在形成包含其的蛋白质、多肽或其他构建体的C端末端时可以含有这种C端延伸(再次,如所述美国临时申请以及W0 12/175741进一步所描述的)。

[0695] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其进一步包含C端延伸(X)_n,其中n为1至5,例如1、2、3、4或5,并且其中X为天然存在的氨基酸,优选不是半胱氨酸。

[0696] 本发明的这些多肽,特别是包含本发明CDR序列的免疫球蛋白单可变结构域,特别适用作用于制备多特异性多肽,如本发明的多特异性多肽的结构单元或结合单元。

[0697] 因此,结合TCR的本发明的单特异性多肽可以是基本上分离的形式(如本文所定义),或它们可以形成蛋白质或多肽的部分,该蛋白质或多肽可包含或基本上由结合TCR的一个多肽或ISV组成,并且该蛋白质或多肽可任选地进一步包含一个或更多个另外的氨基酸序列(所有氨基酸序列均任选地通过一个或更多个合适的接头连接)。

[0698] 因此,本发明还涉及蛋白质或多肽,其包含或基本上由一个本发明的单特异性多肽(或其合适的片段)组成。在另外的方面,结合TCR的本发明的单特异性多肽可以形成多特异性多肽的一部分,该多特异性多肽可以包含或基本上由一个结合TCR的ISV组成,并且该多特异性多肽可以任选地进一步包含一个或更多个特异性结合另一种靶标的ISV,例如CD123,并且该多特异性多肽可任选地进一步包含一个或更多个另外的氨基酸序列(全部任选地通过一个或更多个合适的接头连接)。

[0699] 因此,本发明的单特异性多肽用作这种蛋白质或多肽中的结合单元或结构单元,以便提供如本文所述的本发明的多特异性多肽(对于含有一个或更多个VHH结构域的多特异性多肽及其制备,还参考Conrath等人(2001, J. Biol. Chem. 276:7346-7350),以及参考例如WO 96/34103、WO 99/23221和WO 2010/115998)。因此,本发明还涉及多肽,其是包含或基本上由一个结合TCR的单价多肽组成的单价构建体。

[0700] 1.2 CD123结合多肽

[0701] 本发明涉及特异性结合CD123,优选人和/或食蟹猴CD123的单特异性多肽。在优选的方面,单特异性多肽是免疫球蛋白单可变结构域,在本文中也称为“本发明的免疫球蛋白单可变结构域”或“本发明的ISV”。

[0702] CD123也称为白细胞介素3受体的 α 亚基(IL-3R α)。人CD123和食蟹猴CD123的序列在表A-8中提供(SEQ ID NO:68-69;参见人CD123:NCBI RefSeq NP_002174和食蟹猴CD123:NCBI genbank no.EHH61867.1)。

[0703] 在一个方面,本发明涉及与人CD123(SEQ ID NO:68)结合的如本文所述的单特异性多肽。

[0704] 已经仔细选择结合CD123的单特异性多肽对CD123的特异性。本发明的多肽在格式化成本发明的多特性格式时,表现出与CD123的高度特异性结合(即包含一个结合TCR的ISV和一个或更多个结合CD123的ISV的格式)。因此,避免了脱靶结合,并且靶标独立的T细胞活化是最小的,如本文进一步所举例说明的。

[0705] 发明人鉴定了2个纳米抗体簇(实施例12),其表现出与CD123的高度特异性结合。在将簇的代表物格式化为本发明的多特异性多肽(如进一步所描述)后,仅观察到最小的靶标独立的T细胞活化,表明簇代表物的高特异性。提供相应的比对(对于与纳米抗体56A10(的家族成员)相关的纳米抗体(即与纳米抗体56A10属于相同家族的纳米抗体参见表A-2),和对于与纳米抗体55F03(的家族成员)相关的纳米抗体(即与纳米抗体55F03属于相同家族的纳米抗体)参见表A-3)。

[0706] 本说明书中使用的“纳米抗体家族”、“V_HH家族”或“家族”是指纳米抗体和/或V_HH序列的组,该纳米抗体和/或V_HH序列具有相同的长度(即它们在其序列中具有相同数目的氨基酸)并且其中第8位和第106位之间的氨基酸序列(根据Kabat编号)具有89%以上的氨基酸

序列同一性。

[0707] 因此,本发明涉及选自由SEQ ID NO:1-10(参见表A-4)组成的组的多肽,优选ISV。在另外的方面,所述多肽选自由SEQ ID NO:1-10组成的组,或选自与SEQ ID NO:1-10之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。

[0708] 因此,本发明涉及特异性结合CD123并且包含或基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成的多肽,优选ISV,其中:

[0709] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0710] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0711] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0712] 和/或

[0713] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0714] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0715] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0716] 和/或

[0717] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0718] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0719] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0720] 在另外的方面,本发明涉及特异性结合CD123的多肽,优选ISV,其包含或基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0721] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0722] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0723] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0724] 和

[0725] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0726] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0727] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2

或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0728] 和

[0729] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0730] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0731] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0732] 在另外的方面,本发明的多肽,优选ISV,包含或基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0733] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0734] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0735] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置3、6、7和/或8处(根据Kabat编号的位置28、31、32和/或33);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0736] 和/或

[0737] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0738] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0739] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置3、6和/或10处(根据Kabat编号的位置52、54和/或58);条件是包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0740] 和/或

[0741] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0742] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0743] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置3、4和/或5处(根据Kabat编号的位置97、98和/或99);条件是包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0744] 在另外的方面,本发明的多肽,优选ISV,包含或基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0745] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0746] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0747] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序

列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置3、6、7和/或8处(根据Kabat编号的位置28、31、32和/或33);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0748] 和

[0749] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0750] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0751] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置3、6和/或10处(根据Kabat编号的位置52、54和/或58);条件是包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0752] 和

[0753] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0754] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0755] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置3、4和/或5处(根据Kabat编号的位置97、98和/或99);条件是包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0756] 在一个方面,本发明的多肽,优选ISV,与SEQ ID NO:1-6(参见表A-4)之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性。这些多肽在本文中称为“与56A10相关的多肽”或“与56A10相关的ISV”。

[0757] 因此,本发明涉及多肽,优选ISV,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0758] a) SEQ ID NO:11;或

[0759] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0760] -在位置3处T已经变为S或P;

[0761] -在位置6处I已经变为S;

[0762] -在位置7处N已经变为D;和/或

[0763] -在位置8处D已经变为V或A;

[0764] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0765] 在另外的方面,本发明涉及多肽,优选ISV,其中CDR2是SEQ ID NO:17。

[0766] 在另外的方面,本发明涉及多肽,优选ISV,其中CDR3选自由以下组成的组:

[0767] a) SEQ ID NO:21;或

[0768] b) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0769] -在位置3处P已经变为A;

[0770] 条件是包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有1个氨基

酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0771] 因此,本发明涉及多肽,优选ISV,其中:

[0772] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0773] a) SEQ ID NO:11;或

[0774] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0775] -在位置3处T已经变为S或P;

[0776] -在位置6处I已经变为S;

[0777] -在位置7处N已经变为D;和/或

[0778] -在位置8处D已经变为V或A;

[0779] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0780] 和

[0781] ii) CDR2是SEQ ID NO:17;

[0782] 和

[0783] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0784] c) SEQ ID NOs:21;或

[0785] d) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0786] -在位置3处P已经变为A;

[0787] 条件是包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0788] 在另一方面,本发明涉及如本文所述的多肽,优选ISV,其中CDR1选自由SEQ ID NO:11-15组成的组,CDR2为SEQ ID NO:17,并且CDR3选自由SEQ ID NOs:21-22组成的组。

[0789] 因此,在优选的方面,本发明涉及如本文所述的多肽,优选ISV,其中CDR1是SEQ ID NO:11,CDR2是SEQ ID NO:17,CDR3是SEQ ID NO:21。

[0790] 因此,本发明涉及多肽,该多肽是选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的ISV。

[0791] 为了其对CD123的精确特异性,选择与56A10相关的多肽或ISV。可以在合适的结合测定中测量本发明多肽的结合,包括但不限于流式细胞术测定。在这种流式细胞术测定中,可以使用内源性表达CD123的细胞(例如MOLM-13或KG1a细胞)。备选地,可以使用被转染以过表达CD123的细胞(例如CHO-K1huCD123或HEK293cyno CD123)。合适的细胞系将从本文的实施例中变得清楚。

[0792] 本发明的多肽,优选ISV,可以以10nM和100pM之间的平均EC50值与细胞上表达的CD123或表达CD123的细胞结合。

[0793] 更具体地,本发明的多肽,优选ISV,以10nM和100pM之间的平均EC50值与在MOLM-13细胞上表达的人CD123结合,例如5nM以下的平均EC50值,例如小于4、3、2或1nM或甚至更小,优选如通过流式细胞术所测量的。

[0794] 本发明的多肽,优选ISV,以10nM和100pM之间的平均EC50值与在CHO-K1细胞上表

达的人CD123结合,例如5nM或以下的平均EC50值,例如小于4、3、2或1nM或甚至更小,优选如通过流式细胞术所测量的。

[0795] 本发明的多肽,优选ISV,以10nM和100pM之间的平均EC50值与在HEK293细胞上表达的食蟹猴CD123结合,例如5nM或以下的平均EC50值,例如小于4或3nM或甚至更小,优选如通过流式细胞术所测量的。

[0796] 本发明的多肽,优选ISV的结合也可以通过SPR测量。

[0797] 因此,本发明的多肽,优选ISV,可以以10nM和100pM之间的平均 K_D 值与人CD123结合,例如5nM或以下的平均 K_D 值,例如小于4、3或2nM或甚至更低,所述 K_D 值优选如通过表面等离子共振所确定。

[0798] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽或ISV,其中所述平均 K_D 或EC50通过流式细胞术或SPR确定,例如所述 K_D 或EC50如实施例部分中所示的确定。

[0799] 在实施例中已经显示,在SPR中所测量的 K_D 与在流式细胞术中所测量的EC50良好相关。

[0800] 在另一方面,本发明的多肽与SEQ ID NO:7-10(参见表A-4)之一可具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性。这些多肽在本文中称为“与55F03相关的多肽”或“与55F03相关的ISV”。

[0801] 因此,本发明涉及多肽,优选ISV,其中CDR1是SEQ ID NO:16。

[0802] 在另外的方面,本发明涉及多肽,优选ISV,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0803] a) SEQ ID NO:18;或

[0804] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0805] -在位置3处Y已经变为W;

[0806] -在位置6处N已经变为S;和/或

[0807] -在位置10处Q已经变为E;

[0808] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0809] 在另外的方面,本发明涉及多肽,优选ISV,其中CDR3选自由以下组成的组:

[0810] a) SEQ ID NO:23;或

[0811] b) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0812] -在位置4处E已变为R;和/或

[0813] -在位置5处T已变为D或Y;

[0814] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0815] 因此,本发明涉及多肽,优选ISV,其中:

[0816] i) CDR1是SEQ ID NO:16;

[0817] 和

[0818] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0819] a) SEQ ID NO:18;或

- [0820] b)与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0821] -在位置3处Y已经变为W;
- [0822] -在位置6处N已经变为S;和/或
- [0823] -在位置10处Q已经变为E;
- [0824] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;
- [0825] 和
- [0826] iii)CDR3选自由以下组成的组:
- [0827] c)SEQ ID NO:23;或
- [0828] d)与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0829] -在位置4处E已变为R;和/或
- [0830] -在位置5处T已变为D或Y;
- [0831] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。
- [0832] 在另一方面,本发明涉及如本文所述的多肽,优选ISV,其中CDR1是SEQ ID NO:16, CDR2选自由SEQ ID NO:18-20组成的组,并且CDR3选自由SEQ ID NO:23-25组成的组。
- [0833] 因此,在优选的方面,本发明涉及如本文所述的多肽,优选ISV,其中CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2是SEQ ID NO:18,和CDR3是SEQ ID NO:23。
- [0834] 优选的多肽和/或ISV选自由SEQ ID NO:7-10组成的组。
- [0835] 为了其对CD123的精确特异性,选择与55F03相关的多肽或ISV。本发明多肽的结合可以在合适的结合测定中进行测量,包括但不限于如本文所述的流式细胞术测定和SPR。
- [0836] 本发明的多肽,优选ISV,可以以10 μ M和100nM之间的平均EC50值与细胞上表达的CD123或表达CD123的细胞结合。
- [0837] 更具体地,本发明的多肽,优选ISV,以10 μ M和100nM之间的平均EC50值与在MOLM-13细胞上表达的人CD123结合,例如5 μ M或以下,例如小于4、3、2或1 μ M或甚至更小的平均EC50值,优选如通过流式细胞术所测量的。
- [0838] 本发明的多肽,优选ISV,以100nM和1nM之间的平均EC50值与在CHO-K1细胞上表达的人CD123结合,例如50nM或以下,例如小于40、30、20或10nM或甚至更小,例如小于9、8或7nM或甚至更小的平均EC50值,优选如通过流式细胞术所测量的。
- [0839] 本发明的多肽,优选ISV,以10nM和100pM之间的平均EC50值与HEK293细胞上表达的食蟹猴CD123结合,例如5nM或以下,例如小于4或3nM或甚至更小的平均EC50值,优选如通过流式细胞术所测量的。
- [0840] 在另外的方面,本发明涉及多肽或ISV,该多肽或ISV以1 μ M和10nM之间的平均K_D值与人CD123结合,例如500nM或以下,例如小于400、300或200nM或甚至更小的平均K_D值,所述K_D值优选如通过表面等离子共振所确定的。
- [0841] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽或ISV,其中所述平均K_D或EC50通过流式细胞术或SPR测定,例如所述K_D或EC50如实施例部分中所示的确定。

[0842] 在实施例中已经显示,在SPR中所测量的 K_D 与使用MOLM-13细胞的基于流式细胞术的测定中所确定的EC50良好相关。

[0843] 通常,表A-4中列出的CDR的组合(即表A-4中在相同的行上提及的那些)是优选的。因此,通常优选的是,当ISV中的CDR是表A-4中提及的CDR序列,或者适当地选自与表A-4中列出的CDR序列具有4、3、2或仅1个氨基酸差异的CDR序列组成的组时,至少一个并且优选两个其他的CDR适当地选自属于表A-4中相同组合的(即,在表A-4中相同的行上所提及的)CDR序列,或适当地选自与属于相同组合的CDR序列具有4、3、2或仅1个氨基酸差异的CDR序列组成的组。具有上述CDR的本发明的代表性多肽显示在表A-4中。

[0844] 本发明还涉及特异性结合CD123的多肽,优选ISV,其交叉阻断如本文所述的和/或选自SEQ ID NO:1-10的至少一种多肽与CD123的结合,和/或被如本文所述的和/或选自SEQ ID NO:1-10的至少一种多肽交叉阻断与CD123的结合。

[0845] 本发明进一步涉及单特异性多肽,其包含或(基本上)由结合CD123的两个或更多个ISV组成。在这样的多价(单特异性)多肽中(其在本文中也称为“本发明的多价多肽”),结合CD123的两个或更多个ISV可任选地通过一个或更多个肽接头连接,如本文进一步所描述的。

[0846] 因此,本发明涉及包含两个或更多个特异性结合CD123的ISV的多肽,其中ISV选自与56A10相关的ISV的组或选自与55F03相关的ISV的组。

[0847] 在更具体的方面,本发明涉及包含特异性结合CD123的两个ISV的多肽,其中ISV选自与56A10相关的ISV组或与55F03相关的ISV组。

[0848] 在本发明的这种多价单特异性多肽中,两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域可以是相同的或不同的,并且可以针对CD123的相同抗原决定簇(例如针对CD123的相同的部分或表位),或可备选地针对CD123的不同抗原决定簇,或针对CD123的不同部分或表位;或其任何合适的组合。例如,本发明的二价多肽可包含(a)两个相同的免疫球蛋白单可变结构域;(b)针对CD123的第一抗原决定簇的第一免疫球蛋白单可变结构域,和针对CD123的相同抗原决定簇的第二免疫球蛋白单可变结构域,该第二免疫球蛋白单可变结构域与第一免疫球蛋白单可变结构域不同;或(c)针对CD123的第一抗原决定簇的第一免疫球蛋白单可变结构域,和针对CD123的另一抗原决定簇的第二免疫球蛋白单可变结构域。

[0849] 本发明的三价多肽可以是上述任何一种,还包含(a)相同的免疫球蛋白单可变结构域;(b)针对CD123的相同抗原决定簇的不同免疫球蛋白单可变结构域;或(c)针对CD123的另一抗原决定簇的不同免疫球蛋白单可变结构域。

[0850] 因此,在一个方面,本发明的单特异性多肽可以是多互补位多肽,例如诸如双互补位多肽。本文所用的术语“双互补位”(抗原-)结合分子或“双互补位”多肽应意指包含至少两个(即两个或更多个)免疫球蛋白单可变结构域的多肽,其中“第一”免疫球蛋白单可变结构域针对CD123,和“第二”免疫球蛋白单可变结构域针对CD123,并且其中这些“第一”和“第二”免疫球蛋白单可变结构域具有不同的互补位。因此,双互补位多肽包含或由两个或更多个针对CD123的免疫球蛋白单可变结构域组成,其中至少一个“第一”免疫球蛋白单可变结构域针对CD123上的第一表位,和至少一个“第二”免疫球蛋白单可变结构域针对CD123上不同于CD123上第一表位的第二表位。

[0851] 因此,本发明涉及多肽,其中两个或更多个特异性结合CD123的ISV是包含第一ISV

和第二ISV的双互补位,其中第一ISV结合CD123上的表位,该表位不同于第二ISV所结合的CD123上的表位。这种多肽在本文中也称为“本发明的双互补位多肽”。

[0852] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的(双互补位)多肽,其中第一ISV选自与56A10相关的ISV组,第二ISV选自与55F03相关的ISV组。

[0853] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中第二ISV位于第一ISV的N端。这种多肽包含与56A10相关的ISV的N端的与55F03相关的ISV。

[0854] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中第二ISV位于第一ISV的C端。这种多肽包含与56A10相关的ISV的C端的与55F03相关的ISV。

[0855] 由于亲合结合,也称为“亲合力”,相比于相应的单价多肽,本发明的双互补位多肽可以具有改善的与CD123结合的亲和力。

[0856] 亲合力是多肽的亲和力,即配体能够经由两个(或以上)药效团(ISV)结合,其中多个相互作用协同增强“表观”亲和力。亲合力是本发明的多肽和相关抗原或抗原决定簇之间的结合强度的测量值。本发明的多肽能够经由其两个(以上)结构单元如ISV与至少两个靶标或抗原决定簇结合,其中多个相互作用,例如第一结构单元或ISV结合第一靶标或第一抗原决定簇,并且第二结构单元或ISV结合第二靶标或第二抗原决定簇,协同增强“表观”亲和力。亲合力与抗原决定簇和抗原结合分子上的其抗原结合位点之间的亲和力以及抗原结合分子上存在的相关结合位点的数量相关。例如,并且不受限制,含有两个或以上结构单元(如针对细胞上不同靶标或不同抗原决定簇的ISV)的多肽可以(并且通常将)以比包含在本发明中的多肽中的单个单体或单个结构单元,如,例如,单价ISV更高的亲合力结合。

[0857] 本发明的单特异性多肽包含或(基本上)由一个或更多个免疫球蛋白单可变结构域组成。这些ISV的框架序列优选是免疫球蛋白框架序列或衍生自免疫球蛋白框架序列的框架序列(例如,通过序列优化,例如人源化或骆驼源化)(的合适组合)。例如,框架序列可以是衍生自免疫球蛋白单可变结构域的框架序列,例如衍生自轻链可变结构域(例如, V_L -序列)和/或衍生自重链可变结构域(例如, V_H -序列)。在一个特别优选的方面,框架序列是衍生自 V_{HH} 序列的框架序列(其中所述框架序列可任选地已经部分或完全人源化)或者是已经骆驼源化的常规 V_H 序列。

[0858] 框架序列可以优选使得包含在本发明单特异性多肽中的ISV是结构域抗体(或适合用作结构域抗体的氨基酸序列);单结构域抗体(或适合用作单结构域抗体的氨基酸);“dAb”(或适合用作dAb的氨基酸);纳米抗体; V_{HH} ;人源化 V_{HH} ;骆驼源化 V_H ;或通过亲和力成熟获得的 V_{HH} 。再次,合适的框架序列对于本领域技术人员而言是清楚的,例如基于标准手册和本文提及的进一步公开内容和现有技术。

[0859] 特别地,存在于本发明的单特异性多肽中的框架序列可含有一个或更多个特征残基(如WO 08/020079(表A-3至A-8)中所定义),使得本发明的单特异性多肽是纳米抗体。根据本文的进一步公开内容(参见例如表A-4),这种框架序列(的合适组合)的一些优选但非限制性的实例将变得清楚。通常,纳米抗体(特别是 V_{HH} 、部分或完全人源化的 V_{HH} 和骆驼源化的 V_H)可以特别地以在一个或更多个的框架序列中存在一个或更多个的“特征残基”为特征(如例如在WO 08/020079,第61页第24行至第98页第3行中进一步所描述)。

[0860] 更特别地,本发明提供了包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域的多肽,该免疫球蛋白单可变结构域是具有(通用)结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的氨基酸序列,

其中FR1至FR4分别指框架区1至4,其中CDR1至CDR3分别指互补决定区1至3,并且所述多肽:
[0861] i) 与SEQ ID NO:1-10(参见表A-4)的至少一个氨基酸序列具有至少80%、更优选90%、甚至更优选95%的氨基酸同一性,其中为了确定氨基酸同一性程度的目的,不考虑形成CDR序列的氨基酸残基。在这方面,还参考表A-4,其列出了SEQ ID NO:1-10的免疫球蛋白单可变结构域的框架1序列(SEQ ID NO:26-29)、框架2序列(SEQ ID NO:30-33)、框架3序列(SEQ ID NOs:34-39)和框架4序列(SEQ ID NO:40-41)(参见表A-4);或

[0862] 和其中:

[0863] ii) 优选地,根据Kabat编号的位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108处的一个或多个氨基酸残基选自WO 08/020079的表A-3至表A-8中提到的特征残基。

[0864] 本发明还提供了许多序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域。

[0865] 特别地,本发明的序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域可以是如前面段落中为免疫球蛋白单可变结构域通常所定义的氨基酸序列,但其中存在(和特别地,在至少一个框架残基中存在)是和/或对应于人源化取代(如本文所定义)的至少一个氨基酸残基。基于本文的公开内容,一些优选但非限制性的人源化取代(及其合适的组合)对于本领域技术人员而言将变得清楚。另外,或备选地,通过比较天然存在的VHH序列的框架区的序列与一个或多个密切相关的人VH序列的相应框架序列,可以确定其他可能有用的人源化取代,之后由此确定的一个或多个可能有用的人源化取代(或其组合)可以(以本身已知的任何方式,如本文进一步描述的)被引入所述VHH序列中,并且可以测试所得的人源化VHH序列对靶标的亲和力、稳定性、表达的容易性和水平和/或其他所需的特性。以这种方式,通过有限程度的试验和错误,技术人员可以基于本文的公开内容确定其他合适的人源化取代(或其合适的组合)。而且,基于前述内容,免疫球蛋白单可变结构域(的框架区)可以是部分人源化的或完全人源化的。

[0866] 本发明还涉及序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域,其在稳定性研究期间在储存时可显示出改善的表达和/或增加的稳定性。本发明的序列优化的多肽和/或ISV可显示降低的N-端的焦谷氨酸翻译后修饰,因此具有增加的产物稳定性。此外,本发明的序列优化的多肽和/或ISV可以显示出其他改进的性质,例如,免疫原性较低,对于CD123的结合特性的改善(适当地测量和/或表示为 K_D 值(实际或表观)、 K_A 值(实际或表观)、 k_{on} 速率和/或 k_{off} 速率,或者备选地作为 EC_{50} 值,如本文进一步所描述的),对于CD123的改善的亲和力和/或改善的亲合力。

[0867] 本发明的一些特别优选的序列优化的免疫球蛋白单可变结构域是SEQ ID NO:1-10的免疫球蛋白单可变结构域的序列优化的变体。

[0868] 因此,本发明的一些其它优选的免疫球蛋白单可变结构域是可以与CD123结合(如本文所定义)的纳米抗体,并且所述纳米抗体:

[0869] i) 是SEQ ID NO:1-10的免疫球蛋白单可变结构域之一的序列优化变体;和/或

[0870] ii) 与SEQ ID NO:1-10(见表A-4)的至少一个免疫球蛋白单可变结构域具有至少80%的氨基酸同一性,其中为了确定氨基酸同一性程度的目的,不考虑形成CDR序列的氨基酸残基;在这一方面,还参考表A-4,其列出了SEQ ID NO:1-10的免疫球蛋白单可变结构域的框架1序列(SEQ ID NO:26-29)、框架2序列(SEQ ID NO:30-33)、框架3序列(SEQ ID NOs:34-39)、框架4序列(SEQ ID NO:40-41)(参见表A-4);

[0871] 和其中：

[0872] iii) 优选地，根据Kabat编号的位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108处的一个或多个氨基酸残基选自WO 08/020079的表A-3至表A-8中提到的特征残基。

[0873] 本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域还可含有以下共同未决的美国临时申请中描述的特定突变/氨基酸残基，所有临时申请均标题为“Improved immunoglobulin variable domains”：2014年5月16日提交的US 61/994552、2014年6月18日提交的US 61/014,015、2014年8月21日提交的US 62/040,167和2014年9月8日提交的US 62/047,560(均转让给Ablynx N.V.)，以及基于这些临时申请并于2015年11月19日公布的国际申请WO 2015/173325。

[0874] 特别地，本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域可适当地含有(i)位置112处的K或Q；或(ii)位置110处的K或Q与位置11处的V组合；或(iii)位置89处的T；或(iv)位置89上的L与位置110处的K或Q；或(v)位置11处的V及位置89处的L；或(i)至(v)的任何合适组合。

[0875] 还如所述共同未决的美国临时申请中所述，当本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域含有根据上述(i)至(v)之一(或其合适的组合)的突变时：

[0876] -位置11的氨基酸残基优选选自L、V或K(最优选V)；和

[0877] -位置14的氨基酸残基优选适当地选自A或P；和

[0878] -位置41的氨基酸残基优选适当地选自A或P；和

[0879] -位置89的氨基酸残基优选适当地选自T、V或L；和

[0880] -位置108的氨基酸残基优选适当地选自Q或L；和

[0881] -位置110的氨基酸残基优选适当地选自T、K或Q；和

[0882] -位置112的氨基酸残基优选适当地选自S、K或Q。

[0883] 如所述共同未决的美国临时申请中所述，所述突变可有效预防或减少所谓的“预先存在的抗体”与本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域和/或构建体的结合。为此目的，本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域还可含有(任选地与所述突变组合)C端延伸(X)_n(其中n为1至10，优选1至5，例如1、2、3、4或5(并且优选1或2，例如1)；并且每个X是(优选天然存在的)氨基酸残基，该氨基酸残基独立地选自且优选独立地选自丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)组成的组)，其再次参考所述美国临时申请以及WO 12/175741。特别地，本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域在形成包含其的蛋白质、多肽或其他构建体的C末端时可以含有这种C端延伸(再次，如所述美国临时申请以及WO 12/175741进一步所描述的)。

[0884] 因此，本发明涉及如本文所述的多肽，其进一步包含C端延伸(X)_n，其中n为1至5，例如1、2、3、4或5，并且其中X为天然存在的氨基酸，优选不是半胱氨酸。

[0885] 本发明的这些多肽，特别是包含本发明CDR序列的免疫球蛋白单可变结构域，特别适合用于制备多价或多特异性多肽的结构单元或结合单元。

[0886] 因此，结合CD123的本发明的单特异性多肽可以是基本上分离的形式(如本文所定义)，或它们可以形成蛋白质或多肽的部分，该蛋白质或多肽可包含或基本上由结合CD123的一个或多个ISV组成，并且该蛋白质或多肽可任选地进一步包含一个或多个另外的氨基酸序列(所有氨基酸序列均任选地通过一个或多个合适的接头连接)。

[0887] 因此,本发明还涉及蛋白质或多肽,其包含或基本上由一个或多个本发明的单特异性多肽(或其合适的片段)组成。在另外的方面,结合CD123的本发明的单特异性多肽可以形成多特异性多肽的一部分,该多特异性多肽可以包含或基本上由一个或多个结合CD123的ISV组成,并且该多特异性多肽可以任选地进一步包含一个特异性结合另一种靶标的ISV,例如诸如TCR,并且该多特异性多肽可任选地进一步包含一个或更多个另外的氨基酸序列(全部任选地通过一个或更多个合适的接头连接)。

[0888] 因此,本发明的单特异性多肽用作这种蛋白质或多肽中的结合单元或结构单元,以便提供如本文所述的本发明的多特异性多肽(对于含有一个或更多个VHH结构域的多特异性多肽及其制备,还参考Conrath等人(2001,J.Biol.Chem.276:7346-7350),以及参考例如WO 96/34103、WO 99/23221和WO 2010/115998)。

[0889] 2. 多特异性多肽

[0890] 本发明进一步涉及多特异性多肽,其包含或(基本上)由两个或更多个结构单元(例如至少两个本发明的单特异性多肽或ISV)组成,其中至少一个结构单元针对第一抗原(即CD123),和至少一个结构单元针对第二抗原(即TCR)。这些多特异性多肽在本文中也称为“本发明的多特异性多肽”。用于本发明的这些多特异性多肽中的优选免疫球蛋白单可变结构域是本发明的单特异性多肽(如前所述)。

[0891] 如本文进一步所述,具有不同抗原特异性(即不同于CD123和TCR)的附加结合单元,例如免疫球蛋白单可变结构域,可以与本发明的多特异性多肽连接。通过组合三种或更多种特异性的免疫球蛋白单可变结构域,可以形成三特异性,四特异性等构建体。这些多特异性多肽在本文中也称为“本发明的(多特异性)多肽”或“本发明的构建体”。

[0892] 因此,例如,“本发明的双特异性多肽”是包含或(基本上)由至少一个针对第一抗原(即CD123)的免疫球蛋白单可变结构域和至少一个针对第二抗原(即TCR)的另外的免疫球蛋白单可变结构域组成的多肽组成,而“本发明的三特异性多肽”是包含或(基本上)由以下组成的多肽:至少一个针对第一抗原(即CD123)的免疫球蛋白单可变结构域、至少一个针对第二抗原(即TCR)的另外的免疫球蛋白单可变结构域,和至少一个针对第三抗原(即不同于CD123和TCR)的另外的免疫球蛋白单可变结构域等。免疫球蛋白单可变结构域可任选地经由一个或更多个肽接头连接,如本文进一步所描述的。

[0893] 因此,本发明涉及包含或(基本上)由一个特异性结合TCR的免疫球蛋白单可变结构域和一个或更多个特异性结合CD123的ISV组成的多肽。在另外的方面,本发明还提供了包含或(基本上)由一个特异性结合TCR的免疫球蛋白单可变结构域和两个或多个特异性结合CD123的ISV组成的多肽。根据本文的进一步描述,这些多特异性多肽或其构建体的一些非限制性实例将变得清楚。

[0894] 应当理解(还如在实施例部分中所证明的),特异性结合TCR的ISV和特异性结合CD123的一个或更多个ISV可以以任何顺序位于本发明的多肽中。更特别地,在一个方面,结合TCR的ISV位于N端,并且结合CD123的一个或更多个ISV位于C端。在另一个方面,结合CD123的一个或更多个ISV位于N端,和结合TCR的ISV位于C端。在另一个方面,结合CD123的一个或更多个ISV位于N端,结合TCR的ISV位于中央,并且结合CD123的一个或更多个另外的ISV位于C端。在优选的方面,本发明涉及多肽,其中特异性结合TCR的ISV位于多肽的N端。

[0895] 在一些方面,本发明的多特异性多肽包含两个或更多个特异性结合CD123的ISV。

在一个方面,特异性结合CD123的两个或更多个ISV结合CD123上的相同表位。在一个方面,本发明的这种多特异性多肽可包含两个或更多个与56A10相关的ISV。在另一方面,本发明的这种多肽包含两个或更多个与55F03相关的ISV。

[0896] 在更优选的方面,特异性结合CD123的两个或更多个ISV与不同的表位结合。因此,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合CD123的两个或更多个ISV是包含第一ISV和第二ISV的双互补位,其中第一ISV与CD123上的表位结合,该表位与第二ISV所结合的CD123上的表位不同。

[0897] 更具体地,本发明涉及本发明的多特异性多肽,其中结合CD123的第一ISV选自与56A10相关的ISV,结合CD123的第二ISV选自与55F03相关的ISV。如前所述,与本发明的单特异性多肽相比,本发明的这些双互补位多肽由于亲合结合(也称为亲合力)而具有改善的与CD123结合的亲和力。

[0898] 应当理解(还如在实施例部分中所证明的),结合CD123的ISV可以以任何顺序位于本发明的多特异性多肽中。更特别地,在一个方面,第二ISV(即与55F03相关的ISV)位于第一ISV(即与56A10相关的ISV)的N端。在另一方面,第二ISV(即与55F03相关的ISV)位于第一ISV(即与56A10相关的ISV)的C端。根据本文的进一步描述,这种多特异性构建体的一些非限制性实例将变得清楚。

[0899] 典型地,本发明的多特异性多肽将对靶细胞的高亲和力和高特异性抗原识别与T细胞活化相组合,导致独立于T细胞的天然特异性的活化。

[0900] 如本文所提及的“靶细胞”是在其表面上呈递特定抗原(即CD123)的细胞。在一个方面,“靶细胞”是以CD123过表达为特征的细胞。在优选的方面,这种靶细胞与CD123相关的疾病相关。在甚至更优选的方面,靶细胞是(过)表达CD123的癌细胞。术语“癌症”是指哺乳动物中典型地以异常调控的细胞增殖或存活为特征的病理状况。

[0901] 如本文所用,“T细胞活化”是指T细胞(例如细胞毒性T细胞)的一种或更多种细胞应答,例如选自:增殖、分化、细胞因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒活性、活化标记物的表达和重定向的靶细胞溶解。如本文所用的术语“细胞应答”是指在组装TCR复合物时细胞内信号传导引起的细胞的应答。

[0902] 与靶细胞上的细胞表面分子(例如CD123)和与T细胞TCR二者结合的多肽的作用模式是公知的。使T细胞紧邻于靶细胞(例如CD123表达细胞),即,使所述T细胞接合并聚集TCR复合物,导致T细胞活化并随后通过T细胞杀死所述靶细胞。在本发明中,该方法用于对抗CD123相关疾病,如增殖性疾病或炎性病症。通常,T细胞配备有颗粒,该颗粒包含孔道形成蛋白(称为穿孔蛋白)和细胞死亡诱导蛋白酶(称为粒酶)的致死组合。优选地,这些蛋白质经由细胞溶解突触被递送到靶细胞(如CD123表达细胞),如果T细胞紧邻于打算杀死的靶细胞,那么形成所述细胞溶解突触。正常地,T细胞和靶细胞之间的紧邻通过T细胞使用其匹配的T细胞受体与MHC/肽复合物结合而实现。本发明的多肽在缺少T细胞受体/MHC相互作用的情况下使T细胞如此紧邻于靶细胞。

[0903] 因此,本发明涉及如本文所述的多特异性多肽,其中所述多肽将T细胞导向靶细胞。因此,本发明的多肽“重定向T细胞以杀死CD123表达细胞”,这意味着本发明的多肽使T细胞如此紧邻于被杀死的CD123表达细胞。

[0904] 通过一个臂(结合TCR的ISV),本发明的多特异性多肽与TCR亚基的恒定结构域(T

细胞上的T细胞受体的信号转导复合物的蛋白质组分)结合。通过另一个臂(一个或更多个结合CD123的ISV),多特异性多肽与靶细胞上的CD123结合。优选地,仅当多特异性多肽被呈递至T细胞上时,在CD123表达细胞(的位点)处才能看到T细胞活化。对于活化的靶细胞上的抗原依赖性导致有利的安全属性。本发明的多特异性多肽表现出与CD123的高度特异性结合。因此,避免了脱靶结合,并且靶标独立的T细胞活化是最小的,如本文所例示的。在一个方面,多特异性多肽瞬时连接T细胞和靶细胞。优选地,多特异性多肽可以将静息的多克隆T细胞(例如CD4⁺和/或CD8⁺ T细胞)诱导至活化,用于靶细胞(即表达CD123的细胞)的高效重定向溶解。优选地,在第一靶细胞溶解后,T细胞被导向下一个靶细胞。

[0905] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的多特异性多肽,其中所述多特异性多肽诱导T细胞活化。

[0906] 在另外的方面,本发明涉及多特异性多肽,其中所述T细胞活化独立于MHC识别。

[0907] 如本文所用,“独立于MHC识别的T细胞活化”是指独立于靶细胞上的MHC/肽复合物与T细胞上的其匹配的T细胞受体的结合的T细胞活化。通过使T细胞紧邻于靶细胞,靶细胞将被杀死。正常地,T细胞和靶细胞之间的紧邻通过T细胞使用其匹配的T细胞受体与MHC/肽复合物结合而实现。本发明的多特异性多肽在缺少T细胞受体/MHC相互作用的情况下使T细胞如此紧邻于靶细胞。多特异性多肽与靶细胞上的CD123结合,并且因此呈递并与T细胞结合,导致T细胞活化并杀死靶细胞。

[0908] 因此,在另外的方面,本发明涉及多特异性多肽,其中所述T细胞活化依赖于将与靶细胞上的CD123结合的所述多肽呈递给T细胞。

[0909] 在另外的方面,本发明涉及多特异性多肽,其中所述T细胞活化引起所述T细胞的一种或多种细胞应答,其中所述细胞应答选自以下组成的组:增殖、分化、细胞因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒活性、活化标记物的表达和重定向的靶细胞溶解。

[0910] 用于测量T细胞活化的合适测定法是本领域已知的,例如如W0 99/54440或Schlereth等人(2005,Cancer Immunol.Immunother.20:1-12)所述,或如实施例或下文所例示。

[0911] 不受限制,通过本发明多肽的T细胞活化可通过以下进行监测:CD69、D25和多种细胞粘附分子的上调,细胞因子(例如IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-2、IL-4和IL-10)的从头表达和/或释放,粒酶和穿孔蛋白表达的上调,和/或细胞增殖,膜起泡,胱天蛋白酶原(procaspases)3和/或7的活化,核DNA的片段化和/或胱天蛋白酶底物聚(ADP核糖)聚合酶的裂解。优选地,通过多特异性多肽对靶细胞的重定向溶解独立于T细胞受体特异性、I类MHC和/或 β 2微球蛋白的存在、和/或任何共刺激性刺激物。

[0912] 本发明的多肽显示了在体外通过先前未刺激的(即未活化的)外周多克隆CD8⁺-和CD4⁺-阳性T细胞的重定向溶解,如本文所进一步举例说明的。通过本发明的多肽经由T细胞募集的靶细胞重定向溶解涉及细胞溶解突触形成以及穿孔蛋白和粒酶的递送。通过T细胞的细胞溶解已经在例如Atkinson和Bleackley(1995,Crit.Rev.Immunol 15(3-4):359-384)中描述。优选地,本发明的多肽通过在孔形成中(in pore formation)刺激T细胞并递送细胞毒性T细胞颗粒的促细胞凋亡组分来介导靶细胞如癌细胞的杀伤。优选地,接合的T细胞能够进行连续靶细胞溶解。在体外,使用本发明的多肽,重定向溶解在低皮摩尔浓度下可见,这表明极低数量的本发明多肽需要与靶细胞结合来触发T细胞。如实施例中证明的,

低效应细胞与靶细胞比率可以表明连续靶细胞溶解,并证明本发明多肽的高效力。

[0913] 如本文所用,术语“效力”是活性剂(例如单特异性或多特异性多肽、ISV或纳米抗体)的生物活性的测量。效力是其特定效果发生所需的本发明多肽量的函数。它简单地测量为该多肽的 IC_{50} 的倒数。对于本发明的多特异性肽,它指的是本发明的所述多肽诱导T细胞活化的能力。活性剂的效力可以通过本领域已知的任何合适的方法确定,例如如实验部分中所述。基于细胞培养的效力测定通常是用于确定生物学活性的优选形式,因为它们测量由活性剂引发的生理学应答,并且可以在相对短的时期内产生结果。基于产物的作用机制,可以使用基于各种类型的细胞的测定,包括但不限于增殖测定、细胞毒性测定、细胞杀伤测定、报告基因测定、细胞表面受体结合测定和测量对功能上关键的蛋白或其他信号分子(如磷酸化蛋白、酶、细胞因子、cAMP等)的诱导/抑制的测定、T细胞介导的肿瘤细胞杀伤测定(例如如实施例部分所示),全部是本领域中已知的。来自基于细胞的效力测定的结果可以表达为“相对效力”,如通过将本发明的多特异性多肽与对于相应参考单价ISV(例如仅包含一个ISV或一个纳米抗体,任选地进一步包含不相关纳米抗体的多肽(参见实验部分))获得的应答相比较来确定的。

[0914] 在饱和多肽浓度下,(本发明多肽的)“功效”测量效果本身的最大强度。功效表明本发明的多肽可实现的最大应答。它指多肽产生所需(治疗)效果的能力。

[0915] 在一个方面,本发明的多特异性多肽激活T细胞,导致CD123表达细胞(例如MOLM-13或KG1a细胞)的杀伤,其平均 EC_{50} 值在10nM和1pM之间,如在基于流式细胞术的测定中所确定的。(参见例25)

[0916] 更具体地,本发明的多肽诱导T细胞活化,其中所述T细胞活化以1nM和1pM之间的平均 EC_{50} 值引起CD123表达细胞(例如MOLM-13细胞)的杀伤,例如500pM或以下的平均 EC_{50} 值,例如小于400、300、200或100pM或甚至更小,例如小于90、80、70、60、50、40或30pM或甚至更小,所述 EC_{50} 值例如在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中被确定,使用MOLM-13细胞作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比例为10比1。

[0917] 更具体地,本发明的多肽诱导T细胞活化,其中所述T细胞活化以大于约10%的平均溶解百分比引起CD123表达细胞(例如MOLM-13细胞)的溶解,例如15%、16%、17%、18%、19%或20%或甚至更大,例如大于25%,或甚至大于30%,所述溶解百分比例如在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中被确定,该测定使用MOLM-13细胞作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比例为10比1。

[0918] 更具体地,本发明的多肽诱导T细胞活化,其中所述T细胞活化以10nM和10pM之间的平均 EC_{50} 值引起CD123表达细胞(例如KG1a细胞)的杀伤,例如5nM或以下的平均 EC_{50} 值,例如小于4、3、2或1nM或甚至更小,例如小于90、80、70或60pM或甚至更小,所述 EC_{50} 值例如在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中确定,该测定使用KG1a细胞作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比例为10比1。

[0919] 更具体地,本发明的多肽诱导T细胞活化,其中所述T细胞活化以大于约10%的平均溶解百分比引起CD123表达细胞(例如KG1a细胞)的溶解,例如15%、16%、17%或18%或甚至更大,例如大于24%,所述溶解百分比例如在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中确定,该测定使用KG1a细胞作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比例为10比1。

[0920] 在另一方面,本发明的多特异性多肽激活T细胞,并因此可诱导细胞因子分泌。因此,多肽以100nM和10pM之间的平均EC50值引起IFN- γ 或IL-6的分泌。(参见例30)

[0921] 更具体地,本发明的多肽诱导T细胞活化,其中所述T细胞活化在以100nM和10pM之间的平均EC50值引起IFN- γ 分泌,例如50nM或以下的平均EC50值,例如小于40、30、20、10或9nM或甚至更小,例如小于8、7、6、5、4、3、2或1nM或甚至更小,例如小于500pM或甚至更小,例如小于400、300、200或100pM或甚至更小,所述EC50值例如在基于ELISA的测定中确定,例如在实施例30中进一步所解释。

[0922] 更具体地,本发明的多肽诱导T细胞活化,其中所述T细胞活化以100nM和10pM之间的平均EC50值引起IL-6分泌,例如50nM或以下的平均EC50值,例如小于40、30、20或10nM或甚至更小,例如小于9、8、7、6、5、4、3、2或1nM或甚至更小,例如小于500pM或甚至更小,例如小于400、300、200或100pM或甚至更小,所述EC50值例如在基于ELISA的测定中确定,例如在实施例30中进一步所解释。

[0923] 在另一方面,本发明的多特异性多肽引起浆细胞样细胞(pDC)和嗜碱性粒细胞的消耗。(参见实施例31)

[0924] 因此,本发明涉及一种多肽,其中所述T细胞活化引起浆细胞样细胞(pDC)和嗜碱性粒细胞的消耗。

[0925] 在另一方面,本发明的多特异性多肽可进一步引起T细胞增殖。(参见例39)

[0926] 因此,本发明涉及一种多肽,其中所述T细胞活化引起所述T细胞的增殖。

[0927] 本发明的多特异性多肽包含一个或更多个特异性结合CD123的ISV,为了它们的特异性,所述ISV已被仔细选择。因此,本发明的多特异性多肽表现出与CD123的高度特异性结合,这使得它们能够杀死表达CD123的靶细胞。相反,在缺失CD123表达细胞的情况下仅观察到最小的杀伤,这强调了本发明多肽的安全性。

[0928] 因此,在另一方面,本发明涉及多肽,其中在缺失CD123阳性细胞的情况下T细胞活化是最小的。(参见实施例36至38)

[0929] 更具体地,本发明涉及一种多肽,其中CD123阴性细胞的T细胞活化诱导的溶解不超过约10%,例如9%以下,例如8、7或6%或甚至更小,所述溶解例如被确定为在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中的平均溶解百分比,该测定使用CD123阴性细胞(例如U-937或NCI-H929细胞)作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比例为10比1。

[0930] 更具体地,本发明涉及一种多肽,其在存在CD123阴性细胞的情况下,不诱导IFN- γ 和IL-6的分泌,所述分泌例如在基于ELISA的测定中确定。

[0931] 发明人观察到本发明的某些多特异性多肽,其包含本发明的TCR结合ISV和一个或更多个本发明的CD123结合ISV,该多特异性多肽特别适于重定向T细胞以杀死CD123表达细胞。通过本发明的这些多特异性多肽,在缺失CD123表达细胞的情况下,T细胞的活化最小。

[0932] 因此,本发明涉及重定向T细胞以杀死CD123表达细胞的多特异性多肽,其包含一个特异性结合T细胞受体(TCR)的免疫球蛋白单可变结构域(ISV)和一个或更多个特异性结合CD123的ISV,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0933] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0934] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0935] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0936] 和/或

[0937] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0938] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0939] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0940] 和/或

[0941] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0942] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0943] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0944] 其中,特异性结合CD123的一个或更多个ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0945] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0946] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0947] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0948] 和/或

[0949] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0950] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0951] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0952] 和/或

[0953] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0954] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0955] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2

或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0956] 在另外的方面,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0957] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0958] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0959] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0960] 和

[0961] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0962] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0963] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0964] 和

[0965] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0966] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0967] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0968] 并且其中,一个或多更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0969] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0970] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0971] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0972] 和

[0973] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0974] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0975] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0976] 和

[0977] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0978] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0979] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0980] 在特别的方面,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0981] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0982] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0983] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置2、4、5、6、8和/或10处(根据Kabat编号的位置27、29、30、31、33和/或35);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0984] 和

[0985] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0986] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0987] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置1、3、5、7、8和/或9处(根据Kabat编号位置50、52、54、56、57和/或58);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0988] 和

[0989] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0990] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0991] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置1、4、5和/或8处(根据Kabat编号的位置95、98、99和/或101);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[0992] 和其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步描述。

[0993] 在另一方面,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0994] a) SEQ ID NO:181;或

[0995] b) 与SEQ ID NO:181的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0996] -在位置2处D已经变为A、S、E或G;

[0997] -在位置4处H已经变为Y;

[0998] -在位置5处K已经变为L;

[0999] -在位置6处I已经变为L;

[1000] -在位置8处F已经变为I或V;和/或

[1001] -在位置10处G已经变为S;

[1002] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1003] 在另一方面,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR2选自由以下组成的组:

[1004] a) SEQ ID NO:192;或

[1005] b) 与SEQ ID NO:192的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1006] -在位置1处H已经变为T或R;

[1007] -在位置3处S已经变为T或A;

[1008] -在位置5处G已经变为S或A;

[1009] -在位置7处Q已经变为D、E、T、A或V;

[1010] -在位置8处T已经变为A或V;和/或

[1011] -在位置9处D已经变为A、Q、N、V或S;

[1012] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1013] 在另一方面,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR3选自由以下组成的组:

[1014] a) SEQ ID NO:218;或

[1015] b) 与SEQ ID NO:218的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1016] -在位置1处F已经变为Y、L或G;

[1017] -在位置4处I已经变为L;

[1018] -在位置5处Y已经变为W;和/或

[1019] -在位置8处D已变为N或S;

[1020] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1021] 因此,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

- [1022] i) CDR1选自由以下组成的组：
- [1023] a) SEQ ID NO:181;或
- [1024] b) 与SEQ ID NO:181的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列，其中
- [1025] -在位置2处D已经变为A、S、E或G；
- [1026] -在位置4处H已经变为Y；
- [1027] -在位置5处K已经变为L；
- [1028] -在位置6处I已经变为L；
- [1029] -在位置8处F已经变为I或V；和/或
- [1030] -在位置10处G已经变为S；
- [1031] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合，所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的；
- [1032] 和
- [1033] ii) CDR2选自由以下组成的组：
- [1034] c) SEQ ID NOs:192;或
- [1035] d) 与SEQ ID NO:192的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列，其中
- [1036] -在位置1处H已经变为T或R；
- [1037] -在位置3处S已经改为T或A；
- [1038] -在位置5处G已经变为S或A；
- [1039] -在位置7处Q已经变为D、E、T、A或V；
- [1040] -在位置8处T已经变为A或V；和/或
- [1041] -在位置9处D已经变为A、Q、N、V或S；
- [1042] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合，所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的；
- [1043] 和
- [1044] iii) CDR3选自由以下组成的组：
- [1045] e) SEQ ID NO:218;或
- [1046] f) 与SEQ ID NO:218的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列，其中
- [1047] -在位置1处F已经变为Y、L或G；
- [1048] -在位置4处I已经变为L；
- [1049] -在位置5处Y已经变为W；和/或
- [1050] -在位置8处D已经变为N或S；
- [1051] 条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合，所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的；

[1052] 其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所描述。

[1053] 在另一方面,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由SEQ ID NO:181-191组成的组,CDR2选自由SEQ ID NO:192-217组成的组,CDR3选自由SEQ ID NO:218-225组成的组,并且其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所描述的。

[1054] 因此,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是SEQ ID NO:181,CDR2是SEQ ID NO:192,和CDR3是SEQ ID NO:218,并且其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所描述的。

[1055] 在优选的方面,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV选自由SEQ ID NO:42和78-180组成的组,或选自与SEQ ID NO:42和78-180之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV,并且其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所描述的。

[1056] 除了如上所述的结合TCR的ISV之外,在本发明的多特异性多肽中,特异性结合CD123的一个或多个ISV与56A10和/或55F03相关。

[1057] 因此,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[1058] i) CDR1选自由以下组成的组:

[1059] a) SEQ ID NO:11-16;或

[1060] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置3、6、7和/或8处(根据Kabat编号的位置28、31、32和/或33);条件是包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[1061] 和

[1062] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[1063] c) SEQ ID NO:17-20;或

[1064] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置3、6和/或10(根据Kabat编号的位置52、54和/或58);条件是包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[1065] 和

[1066] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[1067] e) SEQ ID NO:21-25;或

[1068] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置3、4和/或5处(根据Kabat编号的位置97、98和/或99);条件是包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含

具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1069] 在一个方面,一个或多个特异性结合CD123的ISV可以是与56A10相关的ISV。

[1070] 因此,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中一个或多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由以下组成的组:

[1071] a) SEQ ID NO:11;或

[1072] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1073] -在位置3处T已经变为S或P;

[1074] -在位置6处I已经变为S;

[1075] -在位置7处N已经变为D;和/或

[1076] -在位置8处D已经变为V或A;

[1077] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1078] 在另一方面,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中一个或多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR2是SEQ ID NO:17。

[1079] 在另一方面,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中一个或多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR3选自由以下组成的组:

[1080] a) SEQ ID NO:21;或

[1081] b) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1082] -在位置3处P已经变为A;

[1083] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1084] 因此,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[1085] i) CDR1选自由以下组成的组:

[1086] a) SEQ ID NO:11;或

[1087] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1088] -在位置3处T已经变为S或P;

[1089] -在位置6处I已经变为S;

[1090] -在位置7处N已经变为D;和/或

[1091] -在位置8处D已经变为V或A;

[1092] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲

和力如通过表面等离子共振所测量的；

[1093] 和

[1094] ii) CDR2是SEQ ID NO:17；

[1095] 和

[1096] iii) CDR3选自由以下组成的组：

[1097] c) SEQ ID NO:21；或

[1098] d) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列，其中

[1099] -在位置3处P已经变为A；

[1100] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比，包含具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合，所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1101] 在另一方面，本发明涉及多特异性多肽，其中特异性结合TCR的ISV如本文所述，并且其中一个或多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区（分别为FR1至FR4）和3个互补决定区（分别为CDR1至CDR3）组成，其中CDR1选自由SEQ ID NO:11-15组成的组，CDR2为SEQ ID NO:17，CDR3选自由SEQ ID NO:21-22组成的组。

[1102] 因此，本发明涉及多特异性多肽，其中特异性结合TCR的ISV如本文所述，并且其中一个或多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区（分别为FR1至FR4）和3个互补决定区（分别为CDR1至CDR3）组成，其中CDR1为SEQ ID NO:11，CDR2为SEQ ID NO:17，和CDR3为SEQ ID NO:21。

[1103] 在优选的方面，本发明涉及多特异性多肽，其中特异性结合TCR的ISV如本文所述，并且其中一个或多个特异性结合CD123的ISV选自由SEQ ID NO:1-6组成的组，或选自与SEQ ID NO:1-6之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。

[1104] 除以上之外，或另外，特异性结合CD123的ISV可以是与55F03相关的ISV。

[1105] 因此，本发明还涉及如上所述的多特异性多肽，其中一个或多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区（分别为FR1至FR4）和3个互补决定区（分别为CDR1至CDR3）组成，其中CDR1是SEQ ID NO:16。

[1106] 在另一方面，本发明涉及如上所述的多特异性多肽，其中一个或多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区（分别为FR1至FR4）和3个互补决定区（分别为CDR1至CDR3）组成，其中CDR2选自由以下组成的组：

[1107] a) SEQ ID NO:18；或

[1108] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列，其中

[1109] -在位置3处Y已经变为W；

[1110] -在位置6处N已经变为S；和/或

[1111] -在位置10处Q已经变为E；

[1112] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比，包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合，所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1113] 在另一方面，本发明涉及如上所述的多特异性多肽，其中一个或多个特异性结

合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR3选自由以下组成的组:

[1114] a) SEQ ID NO:23;或

[1115] b) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1116] -在位置4处E已经变为R;和/或

[1117] -在位置5处T已经变为D或Y;

[1118] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1119] 因此,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[1120] i) CDR1是SEQ ID NO:16;

[1121] 和

[1122] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[1123] a) SEQ ID NO:18;或

[1124] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1125] -在位置3处Y已经变为W;

[1126] -在位置6处N已经变为S;和/或

[1127] -在位置10处Q已经变为E;

[1128] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的;

[1129] 和

[1130] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[1131] c) SEQ ID NO:23;或

[1132] d) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1133] -在位置4处E已经变为R;和/或

[1134] -在位置5处T已经变为D或Y;

[1135] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[1136] 在另一方面,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1为SEQ ID NO:16,CDR2选自由SEQ ID NO:18-20组成的组,CDR3选自由SEQ ID NO:23-25组成的组。

[1137] 因此,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1为SEQ ID NO:16,CDR2为SEQ ID NO:18,和CDR3为

SEQ ID NO:23。

[1138] 在优选的方面,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV选自SEQ ID NO:7-10组成的组,或者选自与SEQ ID NO:7-10之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。

[1139] 如对于单特异性多肽所广泛描述的,存在于本发明的多特异性多肽中的免疫球蛋白单可变结构域可以由轻链可变结构域序列(例如 V_L ,序列)或重链可变结构域序列(例如 V_H 序列)组成;它们可以由衍生自常规四链抗体的重链可变结构域序列组成,或由衍生自重链抗体的重链可变结构域序列组成。在优选的方面,它们由以下各项组成:结构域抗体(或适合用作结构域抗体的氨基酸)、单结构域抗体(或适合用作单结构域抗体的氨基酸)、“dAb”(或适合用作dAb的氨基酸)、纳米抗体(包括但不限于 V_{HH})、人源化VHH、骆驼源化VH、或通过亲和力成熟获得的VHH序列。免疫球蛋白单可变结构域可以由部分或完全人源化的纳米抗体,或部分或完全人源化的VHH组成。免疫球蛋白单可变结构域还可含有(如本文所述)的突变,该突变有效预防或减少所谓的“预先存在的抗体”与本发明的免疫球蛋白单可变结构域和构建体的结合。在本发明的优选方面,包含在本发明的多特异性多肽中的免疫球蛋白单可变结构域是本发明的一个或更多个单特异性多肽,如本文所定义的。

[1140] 优选的本发明多肽可选自由SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61(参见表A-7)组成的组。在另外的方面,所述多肽选自SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61组成的组,或选自与SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。

[1141] 如本文进一步所描述的,本发明的多特异性多肽可包含一个或多个其他基团、残基,结构部分或结合单元以形成“本发明的多肽”或“本发明的构建体”。例如,这种结合单元可以是增加多肽的半衰期的氨基酸序列(在本文中也称为“半衰期延长”和“半衰期延长的构建体”)。根据本发明的具体但非限制性的方面,除了一个或更多个针对CD123的免疫球蛋白单可变结构域和一个针对TCR的免疫球蛋白单可变结构域之外,本发明的多肽因此可含有至少一个针对血清白蛋白(例如人血清白蛋白)的免疫球蛋白单可变结构域。因此,本发明涉及如本文所述的构建体,其中向多肽提供增加的半衰期的所述结合单元是结合血清白蛋白的免疫球蛋白单可变结构域。在另外的方面,本发明涉及如本文所述的构建体,其中结合血清白蛋白的所述ISV基本上由单结构域抗体、dAb、纳米抗体、VHH、人源化VHH或骆驼源化VH组成。

[1142] 在优选的方面,结合血清白蛋白的ISV选自SEQ ID NO:43或351至362组成的组。

[1143] 在优选的方面,ISV直接地彼此连接,或经由接头彼此连接。

[1144] 本发明的优选构建体可选自由SEQ ID NO:63-67组成的构建体组,或与SEQ ID NO:63-67之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的构建体。

[1145] 在优选的方面,构建体选自SEQ ID NO:63-67组成的组。

[1146] 在施用后,本发明的半衰期延长的构建体将不会通过肾清除被瞬间去除。因此,半衰期延长将有助于有利的PK特征。因此,不需要连续静脉内输注,从而患者依从性将得到改善。在具体的方面,本发明的构建体不需要连续输注。

[1147] 同样如对于单特异性多肽所广泛描述的,本发明的多特异性多肽或本发明的构建体可进一步包含突变,该突变有效预防或减少所谓的“预先存在的抗体”与本发明的多肽和构建体的结合。为此目的,本发明的多肽和构建体可含有C端延伸(X)_n(其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5(并且优选1或2,例如1);并且每个X是(优选天然存在的)氨基酸残基,该氨基酸残基独立地选自且优选独立地选自丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)组成的组),如本文所描述的。

[1148] 因此,本发明涉及本发明的多肽或构建体,其进一步包含C端延伸(X)_n,其中n为1至5,例如1、2、3、4或5,并且其中X是天然存在的氨基酸,优选不是半胱氨酸。

[1149] 更具体地,本发明涉及多肽或构建体,其中所述多肽或构建体选自由SEQ ID NO: 338-342组成的组。

[1150] 用于制备本发明的多价或多特异性多肽的方法可以包含至少以下步骤:以合适的方式,将本发明的两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽和例如一个或更多个接头连接在一起。本发明的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽(和接头)可通过本领域已知的任何方法和如本文进一步所描述的进行偶联。优选的技术包括将编码本发明的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽(和接头)的核酸序列进行连接,以制备表达多价或多特异性多肽的遗传构建体。用于连接氨基酸或核酸的技术对于技术人员来说是清楚的,并且再次参考标准手册,例如如上所述的Sambrook等人和Ausubel等人,以及下面的实施例。

[1151] 因此,本发明还涉及本发明的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽在制备本发明的多价多肽或多特异性多肽中的用途。用于制备多价或多特异性多肽的方法包括将本发明的一个或更多个免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽与本发明的至少一个另外的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽连接,任选地经由一个或更多个接头连接。然后将本发明的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽用作在提供和/或制备多价或多特异性多肽中的结合结构域或结合单元,该多肽包含两个(例如在二价多肽中)、三个(例如在三价多肽中)或更多个(例如在多价多肽中)结合单元。在这一方面,本发明的免疫球蛋白可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽可用作在提供和/或制备多价或多特异性如双特异性或三特异性多肽中的结合结构域或结合单元,其中该多肽包含两个、三个或更多个结合单元。

[1152] 因此,本发明还涉及本发明的免疫球蛋白单可变结构域和/或特别是单价或单特异性多肽(如本文所述)在制备多价或多特异性多肽中的用途。用于制备多价或多特异性多肽的方法包括将本发明的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽与本发明的至少一个另外的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽连接,任选地经由一个或更多个接头(如本文进一步所描述的)连接。

[1153] 本发明的构建体

[1154] 本发明的单特异性多肽和本发明的多特异性多肽可以进一步包含或不包含一个或更多个其他基团、残基、结构部分或结合单元(这些单价多肽以及多价多肽(具有或不具有另外的基团、残基、结构部分或结合单元)均称为“本发明的构建体”)。如果存在,这些另外的基团、残基、结构部分或结合单元可以或不为免疫球蛋白单可变结构域(和/或其存在于其中的多肽)提供另外的功能,并且可以改变或不改变免疫球蛋白单可变

结构域的性质。

[1155] 例如,这种另外的基团、残基、结构部分或结合单元可以是一个或更多个附加的氨基酸序列,使得多肽是(融合)蛋白质或(融合)多肽。在优选但非限制性的方面,所述一个或更多个其他的基团、残基、结构部分或结合单元是免疫球蛋白。甚至更优选地,所述一个或更多个其他的基团、残基、结构部分或结合单元是选自以下各项组成的组的免疫球蛋白单可变结构域:结构域抗体、适合用作结构域抗体的氨基酸、单结构域抗体、适合用作单结构域抗体的氨基酸、“dAb”、适合用作dAb的氨基酸、或纳米抗体(例如诸如VHH、人源化VHH或骆驼源化VH)。

[1156] 如上所述,可以连接附加的结合单元,例如具有不同抗原特异性的免疫球蛋白单可变结构域,以形成多特异性构建体。通过组合两种或更多种特异性的免疫球蛋白单可变结构域,可以形成双特异性、三特异性等构建体。例如,根据本发明的多肽可包含本发明的单特异性或多特异性多肽,和一个或更多个针对另一靶标(即,不同于CD123或TCR)的免疫球蛋白单可变结构域。这种构建体及其(本领域技术人员可容易想到的)修饰都包括在本文所用的术语“本发明的构建体”中。

[1157] 在上述构建体中,一个、两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域和一个或更多个基团、残基、结构部分或结合单元可以直接地彼此连接和/或经由一个或更多个合适的接头或间隔子连接。例如,当一个或更多个基团、残基、结构部分或结合单元是氨基酸序列时,接头也可以是氨基酸序列,因此所得到的构建体是融合(蛋白质)或融合(多肽)。

[1158] 一个或更多个另外的基团、残基、结构部分或结合单元可以是任何合适的和/或期望的氨基酸序列。另外的氨基酸序列可以或可以不改变、更改或以其他方式影响本发明多肽的(生物学)性质,并且可以或可以不向本发明的多肽添加另外的功能。优选地,所述另外的氨基酸序列使得其赋予本发明的多肽一种或更多种所需的性质或功能。

[1159] 这种氨基酸序列的实例对于本领域技术人员而言是清楚的,并且通常可包含基于常规抗体及其片段(包括但不限于ScFv和单结构域抗体)的肽融合中所使用的所有氨基酸序列。例如,参考Holliger和Hudson的综述(2005,Nature Biotechnology 23:1126-1136)。

[1160] 例如,这种氨基酸序列可以是这样的氨基酸序列:相比于本发明的多肽本身,该氨基酸序列增加本发明构建体的半衰期、溶解度或吸收,降低免疫原性或毒性,消除或减弱不期望的副作用,和/或赋予其他有利性质和/或降低不期望的性质。这种氨基酸序列的一些非限制性实例是血清蛋白,例如人血清白蛋白(参见例如WO 00/27435)或半抗原分子(例如被循环抗体识别的半抗原,参见例如WO 98/22141)。

[1161] 在本发明的具体但非限制性方面中(其将在本文中进一步描述),本发明的构建体与作为其来源的免疫球蛋白单可变结构域或多肽相比可以在血清中具有增加的半衰期(如本文进一步所描述的)。例如,本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽可以与一个或多个延长半衰期的基团或结构部分(例如聚乙二醇分子(PEG))连接(以化学方式或其它方式),以提供具有增加的半衰期的本发明多肽的衍生物。

[1162] 在本发明的一个具体方面,制备了相比于相应的本发明多肽具有增加的半衰期的构建体。包含这种半衰期延长的结构部分的本发明构建体的实例例如包括但不限于,构建体,其中免疫球蛋白单可变结构域适当地与一个或更多个血清蛋白或其片段(例如(人)血清白蛋白或其适当片段)或与一个或更多个能结合血清蛋白(如血清白蛋白(如人血清白蛋

白))、血清免疫球蛋白(如IgG),转铁蛋白或WO 04/003019中所列的其他血清蛋白之一的结合单元(例如,诸如,结构域抗体、适合用作结构域抗体的氨基酸、单结构域抗体、适合用作单结构域抗体的氨基酸、“dAb”、适合用作dAb的氨基酸、纳米抗体、VHH、人源化VHH或骆驼源化VH)连接;多肽,其中免疫球蛋白单可变结构域与Fc部分(例如人Fc)或其合适部分或片段连接;或者构建体,其中一个或更多个免疫球蛋白单可变结构域与一个或更多个能结合血清蛋白的小蛋白质或肽(例如但不限于WO 91/01743、WO 01/45746或WO 02/076489中所描述的蛋白质和肽)适当连接。还参考WO 03/002609和WO 04/003019中描述的dAb,并参考Harmsen等人(2005,Vaccine 23:4926-4942);参考EP 0368684,以及参考Ablynx N.V的WO 08/028977、WO 08/043821、WO 08/043822、WO 08/068280、WO 09/127691和WO 11/095545。

[1163] 根据本发明的具体但非限制性方面,除了一个或更多个针对CD123的免疫球蛋白单可变结构域,和/或一个针对TCR的免疫球蛋白单可变结构域之外,本发明的构建体可含有至少一个结合血清白蛋白(如人血清白蛋白)的免疫球蛋白单可变结构域。因此,本发明涉及如本文所述的构建体,其中为构建体提供增加的半衰期的所述结合单元是结合血清白蛋白的免疫球蛋白单可变结构域。在另外的方面,本发明涉及如本文所述的构建体,其中结合血清白蛋白的所述ISV基本上由单结构域抗体、dAb、纳米抗体、VHH、人源化VHH或骆驼源化VH组成。

[1164] 结合血清白蛋白的ISV可以是本领域中描述的任何ISV。

[1165] 在一个方面,结合人血清白蛋白的免疫球蛋白单可变结构域可以如上文引用的Ablynx N.V.的申请中所一般描述的(参见例如WO 04/062551)。提供增加的半衰期且可用于本发明构建体中的一些优选的纳米抗体包括WO 06/122787中公开的纳米抗体ALB-1至ALB-10(参见表II和III),以及在WO 2012/175400或WO 2015/173325中公开的纳米抗体(例如,WO2012/175400的SEQ ID NO:1-11,WO 2015/173325的SEQ ID NO:19)和来自临时申请US 62/256,841、US 62/335,746、US 62/349,294和相应的国际申请WO 2017/085172的纳米抗体,其中WO 2017/085172要求这三个美国临时申请的优先权且由受让人命名为“Improved serum albumin binders”。

[1166] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的多肽,其中结合血清白蛋白的所述ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是GFTFSSFGMS(SEQ ID NO:363)或GFTFRSFGMS(SEQ ID NO:364),CDR2是SISGSGSDDL(SEQ ID NO:365),CDR3是GGSLSR(SEQ ID NO:366)。

[1167] 提供增加的半衰期且可用于本发明构建体中的一些特别优选的纳米抗体包括也被称为Alb8、Alb23、Alb129、Alb132、Alb11、Alb11(S112K)-A、Alb82、Alb82-A、Alb82-AA、Alb82-AAA、Alb82-G、Alb82-GG、Alb82-GGG(表B-2)的免疫球蛋白单可变结构域。

[1168] 因此,本发明涉及如本文所述的构建体,其中结合血清白蛋白的所述ISV选自由SEQ ID NO:43或351至362组成的组。

[1169] 表B-2:用于本发明的构建体中的结合HSA的免疫球蛋白单可变结构域

[1170]

ISV	SEQ ID NO	序列
Alb8	43	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTLTVSS
Alb23	351	EVQLLES GGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTLTVSS

[1171]

ISV	SEQ ID NO	序列
Alb129	352	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLRSSQGLTVVSSA
Alb132	353	EVQLVESGGGVVQPGGSLRSLCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLRSSQGLTVVSS A
Alb11	354	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVVSS
Alb11 (S112 K)-A	355	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVKVVSSA
Alb82	356	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVVSS
Alb82 -A	357	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVVSSA
Alb82 -AA	358	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVVSSA A
Alb82 -AAA	359	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVVSSA AA
Alb82 -G	360	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVVSSG

ISV	SE Q ID NO	序列
[1172] Alb82 -GG	361	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSG G
Alb82 -GGG	362	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSG GG

[1173] 通常,具有增加的半衰期的本发明的构建体优选具有这样的半衰期:该半衰期是本发明的相应免疫球蛋白单可变结构域或多肽本身的半衰期的至少1.5倍,优选至少2倍,例如至少5倍,例如至少10倍或大于20倍大。

[1174] 通常,具有增加的半衰期的本发明的构建体优选具有比本发明的相应免疫球蛋白单可变结构域或多肽本身的半衰期增加大于1小时,优选大于2小时,更优选大于6小时,例如大于12小时,或甚至大于24、48或72小时的半衰期。

[1175] 在另一个优选但非限制性的方面,本发明的这种构建体表现出在人中至少约12小时,优选至少24小时,更优选至少48小时,甚至更优选至少72小时或更长的血清半衰期。例如,本发明的构建体可具有至少5天(例如约5至10天),优选至少9天(例如约9至14天),更优选至少约10天(例如约10至15天),或至少约11天(例如约11至16天),更优选至少约12天(例如约12至18天或更长),或大于14天(例如约14至19天)的半衰期。

[1176] 在本发明中证实了在构建体本身中包含靶向白蛋白的结合单元对获得的效力或功效不具有重要影响。尽管在HSA存在下观察到功效/效力的轻微损失,但是半衰期延长的TCR结合多特异性多肽在CD123表达细胞杀伤中仍然是有效的。已经证实,基于白蛋白的药物递送对于实现改善的癌症疗法是有用的,这很大程度上归因于其通过增强的渗透性和滞留效应被动靶向肿瘤以及肿瘤细胞对作为能量和氨基酸来源的白蛋白的需求增加。

[1177] 根据一个具体方面,本发明的一个或多个多肽可以(任选地通过合适的接头或铰链区)与以下连接:一个或多个恒定结构域(例如,可以用作Fc部分的一部分/形成Fc部分的2或3个恒定结构域),Fc部分和/或一个或多个抗体部分、片段或结构域,其中该抗体部分、片段或结构域赋予本发明多肽一种或多种效应子功能和/或可赋予与一个或多个Fc受体结合的能力。例如,为此目的,并且不限于此,一个或多个另外的氨基酸序列可以包含抗体的一个或多个C_H2和/或C_H3结构域,例如来自重链抗体(如本文所述)和更优选来自常规的人四链抗体;和/或可以形成Fc区(的部分),例如来自IgG(例如来自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4),来自IgE或来自另一种人Ig如IgA、IgD或IgM。例如,W0 94/04678描述了包含骆驼科V_H结构域或其人源化衍生物(即纳米抗体)的重链抗体,其中骆驼科C_H2和/或C_H3结构域已经被

C_H2和C_H3结构域取代,以便提供由2个重链组成的免疫球蛋白,每个重链包含纳米抗体和人C_H2和C_H3结构域(但没有C_H1结构域),该免疫球蛋白具有由C_H2和C_H3结构域提供的效应子功能,并且该免疫球蛋白可以在没有任何轻链存在的情况下起作用。可以与本发明的多肽适当连接以提供效应子功能的其他氨基酸序列对于技术人员而言是清楚的,并且可以基于期望的效应子功能进行选择。例如,参考WO 04/058820、WO 99/42077、WO 02/056910和WO 05/017148,以及以上Holliger和Hudson的综述;并参考WO 09/068628。与本发明的相应多肽相比,本发明的多肽与Fc部分的偶联也可导致增加的半衰期。对于一些应用,使用赋予增加的半衰期而没有任何生物学上显著的效应子功能的Fc部分和/或恒定结构域(即,C_H2和/或C_H3结构域)也可以是合适的或甚至是优选的。包含一个或多个本发明多肽和一个或多个恒定结构域且具有增加的体内半衰期的其他合适构建体对于技术人员是清楚的,并且其可以例如包含与C_H3结构域连接的多肽,任选地经由接头序列。通常,具有增加的半衰期的任何融合蛋白或衍生物优选具有大于50kDa的分子量,即肾吸收的临界值。

[1178] 在另一个具体但非限制性的方面,本发明的多肽可以(任选地通过合适的接头或铰链区)连接至天然存在的、合成的或半合成的恒定结构域(或类似物、变体、突变体、部分或其片段),该恒定结构域自身缔合成二聚体的趋势降低(或基本上没有)(即,与常规四链抗体中天然存在的恒定结构域相比)。这种单体(即非自身缔合)Fc链变体或其片段对于技术人员来说是清楚的。例如,Helm等人(J.Biol.Chem.271:7494,1996)描述了可用于本发明多肽链的单体Fc链变体。

[1179] 此外,这样的单体Fc链变体优选使得它们仍然能够结合补体或相关的Fc受体(取决于它们来源的Fc部分),和/或使得它们仍然具有一些或者全部的衍生它们的Fc部分的效应子功能(或者仍然适合于预期用途的降低水平)。备选地,在本发明的这种多肽链中,单体Fc链可用于赋予多肽链增加的半衰期,在这种情况下,单体Fc链也可以不具有或基本上不具有效应子功能。

[1180] 另外的氨基酸残基可以或不可以改变、更改或以其他方式影响本发明多肽的其他(生物学)性质,并且可以或不可以向本发明的多肽添加另外的功能。例如,这种氨基酸残基:

[1181] a) 可以包含N端Met残基,例如由于在异源宿主细胞或宿主生物体中表达的结果。

[1182] b) 可以形成信号序列或前导序列,其指导多肽在合成后从宿主细胞分泌(例如,以便提供本发明多肽的前体(pre-),原体(pro-)或前原体(prepro-)形式,取决于用于表达本发明多肽的宿主细胞)。合适的分泌前导肽对于技术人员来说是清楚的,并且可以如本文进一步所描述的。通常,这种前导序列将与多肽的N端连接,尽管本发明在其最广泛的意义上不限于此;

[1183] c) 可以形成“标签”,例如允许或促进多肽纯化的氨基酸序列或残基,例如使用针对所述序列或残基的亲和技术。此后,可以去除所述序列或残基(例如通过化学或酶促切割)以提供多肽(为此目的,标签可任选地经由可切割的接头序列与氨基酸序列或多肽序列连接,或含有可切割的基序)。这些残基的一些优选但非限制性的实例是多个组氨酸残基、谷胱甘肽残基和myc标签,例如AAAEQKLISEEDLN_{GAA}(SEQ ID NO:367);

[1184] d) 可以是已经官能化和/或可以用作官能团连接位点的一个或多个氨基酸残基。合适的氨基酸残基和官能团对于技术人员是清楚的,包括但不限于本文提及的用于本发明

多肽衍生物的氨基酸残基和官能团。

[1185] 在本发明的构建体中,两个或更多个结构单元、ISV或纳米抗体和任选地一个或多个多肽、一个或多个其他基团、药物、活性剂、残基、结构部分或结合单元可以直接地彼此连接(如例如在WO 99/23221中所描述的)和/或可以经由一个或多个合适的间隔子或接头或其任何组合彼此连接。

[1186] 用于本发明构建体的合适的间隔子或接头对于本领域技术人员来说是清楚的,并且通常可以是本领域中用于连接氨基酸序列和/或其他基团、药物、活性剂、残基、结构部分或结合单元的任何接头或间隔子。优选地,所述接头或间隔子适用于构建旨在用于药学用途的多肽和/或构建体。

[1187] 一些特别优选的间隔子包括本领域中用于连接抗体片段或抗体结构域的间隔子和接头。这些包括上文引用的一般背景技术中提到的接头,以及例如本领域中用于构建双抗体或ScFv片段的接头(然而,在这方面,应当注意,在双抗体和ScFv片段中,所使用的接头序列应具有有一定长度、一定程度的柔性和其他性质,该其他性质允许相关的 V_H 和 V_L 结构域聚集在一起以形成完整的抗原结合位点,然而对于本发明多肽中所用的接头的长度或柔性没有特别限制,原因在于每个免疫球蛋白单可变结构域本身形成完整的抗原结合位点)。

[1188] 例如,接头可以是合适的氨基酸序列,并且尤其是1和50个之间,优选1和30个之间,例如1至10个之间的氨基酸残基的氨基酸序列。这种氨基酸序列的一些优选实例包括例如类型 $(gly_x ser_y)_z$ 的gly-ser接头,例如WO 99/42077中所述的 $(gly_4 ser)_3$ 或 $(gly_3 ser_2)_3$,和本文提及的Ablynx的申请(参见例如WO 06/040153和WO 06/122825)中描述的GS30、GS15、GS9和GS7接头,以及铰链样区域如天然存在的重链抗体或类似序列的铰链区(如WO 94/04678中所述)。

[1189] 一些其他特别优选的接头在表B-3中描述,其中35GS(SEQ ID NO:334)是特别优选的。

[1190] 因此,本发明涉及多肽,其中ISV经由选自SEQ ID NO:325至336组成的组的接头彼此连接。

[1191] 表B-3:接头

接头	SEQ ID NO	序列
5GS	325	GGGGS
7GS	326	SGGSGGS
9GS	327	GGGSGGGS
10GS	328	GGGSGGGGS
15GS	329	GGGSGGGGSGGGGS
18GS	330	GGGSGGGGSGGGGGGS
20GS	331	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
25GS	332	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30GS	333	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
35GS	334	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
40GS	335	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
Poly-A	336	AAA

[1193] 其他合适的接头通常包含有机化合物或聚合物,特别是适用于药用蛋白质中的那些。例如,聚(乙二醇)结构部分已被用于连接抗体结构域,参见例如WO 04/081026。

[1194] 包括在本发明的范围内的是,所使用的接头的长度、柔性程度和/或其他性质(尽管不是至关重要,因为其通常用于在ScFv片段中使用的接头)可以对本发明的最终多肽的性质具有一些影响,包括但不限于对CD123和/或TCR或对一种或多种其他抗原的亲和力、特异性或亲合力。基于本文公开的内容,任选地在一些有限的常规实验后,技术人员将能够确

定用于本发明的特定多肽的最佳接头。

[1195] 例如,在包含针对第一和第二靶标的结构单元、ISV或纳米抗体的本发明的多价或多特异性多肽中,接头的长度和柔性优选是这样的:其允许存在于多肽中的本发明各个结构单元、ISV或纳米抗体结合于其同源靶标,例如各个靶标上的抗原决定簇。再次,基于本文的公开内容,任选地在一些有限的常规实验之后,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽的最佳接头。

[1196] 还在本发明的范围内的是,使用的接头赋予本发明的多肽或构建体一种或多种其他有利性质或功能性,和/或提供一个或多个用于形成衍生物和/或用于连接官能团(例如如本文所述用于本发明的多肽的衍生物)的位点。例如,含有一个或多个带电氨基酸残基的接头可以提供改善的亲水性质,而形成或含有小的表位或标签的接头可以用于检测、鉴定和/或纯化的目的。再次,基于本文中的公开内容,任选地在一些有限的常规实验后,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽或构建体的最佳接头。

[1197] 最后,当两个以上接头用于本发明的多肽或构建体中时,这些接头可以相同或不同。再次,基于本文中的公开内容,任选地在一些有限的常规实验后,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽或构建体中的最佳接头。

[1198] 通常,为了易于表达和生产,本发明的多肽或构建体将是线性多肽。然而,在其最广泛的意义上,本发明不限于此。例如,当本发明的多肽包含三个或多个氨基酸序列、ISV或纳米抗体时,可能通过使用具有三个或多个“臂”的接头将它们连接,每个“臂”与氨基酸序列、ISV或纳米抗体连接,从而提供“星形”构建体。尽管通常不太优选,但还可能使用圆形构建体。

[1199] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV和所述第二ISV以及可能的所述第三ISV和/或所述结合血清白蛋白的ISV直接地彼此连接或经由接头连接。

[1200] 本发明还包括构建体,该构建体包含本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽,并且还包含标签或其他的功能结构部分,例如毒素、标记物、放射化学物质等。

[1201] 备选地,附加的基团、残基、结构部分或结合单元可以是例如化学基团、残基、结构部分,其本身可以是或可以不是生物学和/或药理学活性的。例如但不限于,这种基团可以与两个或多个免疫球蛋白单可变结构域或单价多肽连接,以便提供本发明多肽的“衍生物”。

[1202] 因此,在其最广泛的意义上,本发明还包含本发明多肽的衍生物。这些衍生物通常可以通过对本发明多肽和/或形成本发明的多肽的一个或多个氨基酸残基进行修饰,特别是化学和/或生物学(例如,酶促)修饰来获得。

[1203] 这种修饰的实例,以及多肽序列内可以以这种方式(即在蛋白质主链上但优选在侧链上)修饰的氨基酸残基的实例,可用于引入这种修饰的方法和技术,和这些修饰的潜在用途和优点对于技术人员是清楚的(还参见Zangi等人2013,Nat.biotechnol.31:898-907)。

[1204] 例如,这种修饰可以包括将一个或多个官能团、残基或结构部分引入(例如,通过共价连接或以任何其它合适的方式)到本发明的多肽之中或之上,特别是一种或更多种赋予本发明多肽一种或更多种所期望的性质或功能的官能团、残基或结构部分。这种官能团的实例对于技术人员来说是清楚的。

[1205] 例如,这种修饰可以包括引入(例如,通过共价结合或以任何其他合适的方式)一种或更多种官能团,所述官能团增加本发明多肽的半衰期、溶解度和/或吸收,降低本发明多肽的免疫原性和/或毒性,消除或减弱本发明多肽的任何不期望的副作用,和/或赋予其它有利性质和/或降低本发明多肽的不期望的性质;或者前述两种或更多种的任何组合。这种官能团和用于引入它们的技术的实例对于本领域技术人员来说是清楚的,并且通常可以包括上文引用的一般背景技术中提到的所有官能团和技术,以及本身已知的用于药物蛋白质修饰的官能团和技术,特别是用于抗体或抗体片段(包括ScFv和单结构域抗体)修饰,其参考例如Remington(1980,Pharmaceutical Sciences,第16版,Mack Publishing Co., Easton,PA,1980)。这种官能团可以例如直接地(如共价地)与本发明的多肽连接,或任选地经由合适的接头或间隔子连接,再次这对于技术人员来说也是清楚的。

[1206] 一个具体实例是本发明的衍生多肽,其中本发明的多肽已经过化学修饰以增加其半衰期(例如,通过聚乙二醇化)。这是用于增加药物蛋白质的半衰期和/或降低其免疫原性的最广泛使用的技术之一,并且包括连接合适的药理学可接受的聚合物,例如聚(乙二醇)(PEG)或其衍生物(例如甲氧基聚(乙二醇)或mPEG)。通常,可以使用聚乙二醇化的任何合适形式,例如本领域中用于抗体和抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv)的聚乙二醇化;参考例如Chapman(2002,Nat.Biotechnol.54:531-545)、Veronese和Harris(2003,Adv.Drug Deliv.Rev.54:453-456)、Harris和Chess(2003,Nat.Rev.Drug Discov.2:214-221)和WO 04/060965。用于蛋白质聚乙二醇化的各种试剂也可商购获得,例如来自美国的Nektar Therapeutics。

[1207] 优选地,使用定点聚乙二醇化,尤其是通过半胱氨酸残基(参见例如Yang等人(2003,Protein Engineering 16:761-770))。例如,为此目的,PEG可以与天然存在于本发明多肽中的半胱氨酸残基连接,可以修饰本发明的多肽以便适当地引入一个或更多个半胱氨酸残基用于连接PEG,或者包含一个或更多个用于连接PEG的半胱氨酸残基的氨基酸序列可以与本发明多肽的N端和/或C端融合,所有这些都使用技术人员已知的蛋白质工程技术。

[1208] 优选地,对于本发明的多肽,使用分子量大于5000,例如大于10,000且小于200,000,例如小于100,000的PEG;例如,在20,000-80,000的范围内。

[1209] 另一种通常不太优选的修饰包括N-连接或O-连接的糖基化,通常作为共翻译和/或翻译后修饰的一部分,这取决于用于表达本发明多肽的宿主细胞。

[1210] 又另一种修饰可以包括引入一个或更多个可检测标记或其他信号产生基团或结构部分,这取决于本发明标记多肽的预期用途。合适的标记和用于连接、使用和检测它们的技术对于技术人员来说是清楚的,并且例如包括但不限于荧光标记(例如荧光素、异硫氰酸酯、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛、和荧光胺和荧光金属如¹⁵²Eu或其他来自镧系元素的金属),磷光标记,化学发光标记或生物发光标记(如鲁米那、异鲁米诺、芳香吡啶酯、咪唑、吡啶盐、草酸酯、二氧杂环丁烷或GFP及其类似物),放射性同位素(如³H、¹²⁵I、³²P、³⁵S、¹⁴C、⁵¹Cr、³⁶Cl、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe和⁷⁵Se),金属,金属螯合物或金属阳离子(如金属阳离子,如^{99m}Tc、¹²³I、¹¹¹In、¹³¹I、⁹⁷Ru、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga和⁶⁸Ga或特别适用于体内、体外或原位诊断和成像的其他金属或金属阳离子,如(¹⁵⁷Gd、⁵⁵Mn、¹⁶²Dy、⁵²Cr和⁵⁶Fe)),以及发色团和酶(如苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -V-甾体异构酶、酵母醇脱氢酶、d-甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶,生物素亲和素过氧化物酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺

酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-VI-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶)。其他合适的标记对于技术人员来说是清楚的,并且例如包括可以使用NMR或ESR光谱检测的结构部分。

[1211] 本发明的这种标记的多肽可以例如用于体外、体内或原位测定(包括本身已知的免疫测定,例如ELISA、RIA、EIA和其他的“夹心测定”等)以及体内诊断和成像目的,这取决于具体标记的选择。

[1212] 如技术人员所清楚的,另一种修饰可以包括引入螯合基团,例如螯合上面提到的金属或金属阳离子之一。合适的螯合基团例如包括但不限于二亚乙基-三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[1213] 又另一种修饰可以包括引入官能团,该官能团是特异性结合对如生物素-(链霉)亲和素结合对的一部分。这种官能团可用于将本发明的多肽连接至与该结合对的另一半相结合的另一蛋白质、多肽或化学化合物,即通过形成结合对。例如,本发明的多肽可以与生物素缀合,并与缀合至亲和素或链霉亲和素的另一蛋白、多肽、化合物或载体连接。例如,本发明的这种缀合多肽可用作报告子,例如在其中可检测信号产生剂与亲和素或链霉亲和素缀合的诊断系统中。这种结合对也可以例如用于将本发明的多肽与载体结合,该载体包括适合于药学目的的载体。一个非限制性实例是Cao和Suresh(2000, Journal of Drug Targeting 8:257)所描述的脂质体制剂。此类结合对也可用于将治疗活性剂与本发明的多肽连接。

[1214] 其他潜在的化学和酶促修饰对于技术人员来说是清楚的。也可以出于研究目的引入这种修饰(例如,研究功能-活性关系)。例如,参考Lundblad和Bradshaw(1997, Biotechnol. Appl. Biochem. 26:143-151)。

[1215] 优选地,衍生物使得它们以如本文所定义的(即,如对于本发明多肽所定义的)亲和力和(适当地测量和/或表达为 K_D 值(实际或表观)、 K_A 值(实际或表观)、 k_{on} 速率和/或 k_{off} 速率,或备选地为 IC_{50} 值,如本文所进一步描述的)与CD123和/或TCR结合。

[1216] 本发明的此类多肽及其衍生物也可以是基本上分离的形式(如本文所定义)。

[1217] 本发明还涉及用于制备本文所述多肽、核酸、宿主细胞和组合物的方法。

[1218] 本发明的多肽和构建体可以以本身已知的方式制备,如本领域技术人员从本文的进一步描述中所清楚的。例如,本发明的多肽和构建体可以以本身已知的用于制备抗体且尤其用于制备抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段)的任何方式制备。用于制备多肽、构建体和核酸的一些优选但非限制性的方法包括本文所述的方法和技术。

[1219] 用于产生本发明的多肽或构建体(其可通过编码其的核酸的表达而获得)的方法可包括以下步骤:

[1220] -在合适的宿主细胞或宿主生物体(在本文中也称为“本发明的宿主”)中或在另一合适的表达系统中,表达编码本发明的所述多肽或构建体的核酸(在本文中也称为“本发明的核酸”),

[1221] 可选地,随后是:

[1222] -分离和/或纯化由此获得的本发明的多肽或构建体。

[1223] 特别地,这种方法可以包括以下步骤:

[1224] -在使得本发明的所述宿主表达和/或产生至少一种本发明的多肽或构建体(其是

这样的：可通过表达编码其的核酸而获得)的条件下，培养和/或维持本发明的宿主；

[1225] 可选地，随后是：

[1226] -分离和/或纯化由此获得的本发明的多肽或构建体。

[1227] 因此，本发明还涉及编码本发明的多肽或构建体(其使得可通过表达编码其的核酸获得)的核酸或核苷酸序列(也称为“本发明的核酸”)。本发明的核酸可以是单链或双链DNA或RNA的形式，并且优选为双链DNA的形式。例如，本发明的核苷酸序列可以是基因组DNA、cDNA或合成DNA(例如具有特别适于在预期的宿主细胞或宿主生物体中表达的密码子选择的DNA)。

[1228] 根据本发明的一个方面，本发明的核酸是基本上分离的形式，如本文所定义的。本发明的核酸还可以是载体的形式、存在于载体中和/或是载体的一部分，例如诸如质粒、粘粒或YAC，其也可以是基本上分离的形式。

[1229] 基于本文给出的关于本发明的多肽或构建体(它们使得它们可通过表达编码其的核酸而获得)的信息，本发明的核酸可以以本身已知的方式制备或获得，和/或可以从合适的天然来源分离。而且，如本领域技术人员将清楚的，为了制备本发明的核酸，数个核苷酸序列(诸如编码本发明的免疫球蛋白单可变结构域的至少一个核苷酸序列)和例如编码一个或多个接头的核酸还可以以适当的方式连接在一起。

[1230] 用于产生本发明核酸的技术对于技术人员将是清楚的，并且可以例如包括但不限于自动化DNA合成；定点突变；组合两个或更多个天然存在的和/或合成的序列(或其两个或更多个部分)，引入导致表达截短的表达产物的突变；引入一个或多个限制性位点(例如，以产生使用合适的限制酶可以容易地酶切和/或连接的盒和/或区域)，和/或使用一个或多个“错配”引物通过PCR反应引入突变。这些和其他技术对于技术人员将是清楚的，并且再次参考标准手册，例如如上所述的Sambrook等人 and Ausubel等人，以及下面的实施例。

[1231] 如本领域技术人员将清楚的，本发明的核酸还可以是遗传构建体的形式、存在于遗传构建体中和/或是遗传构建体的一部分。所述遗传构建体通常包含本发明的至少一种核酸，该核酸任选地连接至本身已知的遗传构建体的一个或多个元件，诸如例如一个或多个合适的调控元件(诸如合适的启动子、增强子、终止子等)和本文提及的遗传构建体的另外的元件。包含本发明的至少一种核酸的所述遗传构建体也将在本文中称为“本发明的遗传构建体”。

[1232] 本发明的遗传构建体可以是DNA或RNA，并且优选是双链DNA。本发明的遗传构建体还可以是适于转化预期的宿主细胞或宿主生物体的形式，适于整合到预期的宿主细胞的基因组DNA中的形式，或适于在预期的宿主生物体中的独立复制、维持和/或遗传的形式。例如，本发明的遗传构建体可以是载体的形式，诸如例如质粒、粘粒、YAC、病毒载体或转座子。特别地，载体可以是表达载体，即能够提供体外和/或体内(例如在合适的宿主细胞、宿主生物体和/或表达系统中)表达的载体。

[1233] 在优选但非限制性的方面，本发明的遗传构建体包含

[1234] a) 至少一种本发明的核酸；有效连接至

[1235] b) 一个或更多个调控元件，例如启动子和任选地合适的终止子；

[1236] 并且还任选地

[1237] c) 本身已知的遗传构建体的一个或更多个另外的元件；

[1238] 其中术语“调控元件”、“启动子”、“终止子”和“有效连接”具有它们在本领域中的通常含义(如本文进一步描述的);并且其中存在于遗传构建体中的所述“另外的元件”可以是例如3'-或5'-UTR序列、前导序列、选择标记、表达标记/报告基因和/或可以促进或增加转化或整合(的效率)的元件。用于所述遗传构建体的这些和其它合适的元件对技术人员将是清楚的,并且可以例如取决于所使用的构建体的类型;预期的宿主细胞或宿主生物体;感兴趣的本发明的核苷酸序列的表达方式(例如通过组成型、瞬时或诱导表达);和/或要使用的转化技术。例如,本身已知用于抗体和抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段)的表达和生产的调控序列、启动子和终止子可以以基本类似的方式使用。

[1239] 优选地,在本发明的遗传构建体中,所述至少一种本发明的核酸和所述调控元件,以及任选地所述一个或更多个另外的元件彼此“有效连接”,通常这意味着它们彼此具有功能关系。例如,如果所述启动子能够启动或以其他方式控制/调控编码序列的转录和/或表达(其中所述编码序列应理解为“在”所述启动子的“控制下”),则认为启动子与编码序列“有效连接”。通常,当两个核苷酸序列有效连接时,它们将处于相同的取向并且通常也处于相同的阅读框中。它们通常也将是基本上连续的,尽管这也可能不是必需的。

[1240] 优选地,本发明的遗传构建体的调控的和另外的元件是这样的:它们能够在预期的宿主细胞或宿主生物中提供其预期的生物学功能。

[1241] 例如,启动子、增强子或终止子应当在预期的宿主细胞或宿主生物体中“有效”,通过这样,这意味着(例如)所述启动子应当能够启动或以其他方式控制/调节其有效连接(如本文所定义)的核苷酸序列如编码序列的转录和/或表达。

[1242] 一些特别优选的启动子包括但不限于本身已知的用于在本文提及的宿主细胞中表达的启动子;和尤其是用于在细菌或酵母细胞中表达的启动子,例如本文提及的那些和/或实施例中使用的那些。

[1243] 选择标记应该是这样的,它允许(即,在适当的选择条件下)将已用本发明的核苷酸序列(成功)转化的宿主细胞和/或宿主生物体与未被(成功)转化的宿主细胞/生物体区分开。这些标记的一些优选但非限制性的实例是提供抗生素(例如卡那霉素或氨苄青霉素)抗性的基因,提供耐温性的基因,或在培养基中不存在某些因子、化合物和/或(食物)组分的情况下允许宿主细胞或宿主生物体维持的基因,其中所述因子、化合物和/或(食物)组分对于非转化细胞或生物体的存活是必需的。

[1244] 前导序列应该是这样的,在预期的宿主细胞或宿主生物体中,它允许期望的翻译后修饰,和/或是这样的,它将转录的mRNA导向细胞的期望部分或细胞器。前导序列还可以允许从所述细胞分泌表达产物。因此,前导序列可以是在宿主细胞或宿主生物中可操作的任何原(pro-)序列,前(pre-)序列或前原(prepro)序列。在细菌细胞中表达可能不需要前导序列。例如,可以以基本上类似的方式使用本身已知的用于表达和产生抗体和抗体片段(包括但不限于单结构域抗体和ScFv片段)的前导序列。

[1245] 表达标记或报告基因应该是这样的,在宿主细胞或宿主生物体中,它允许检测遗传构建体(上存在的基因或核苷酸序列)的表达。表达标记还可任选地允许表达产物的定位,例如,在细胞的特定部分或细胞器中,和/或在多细胞生物体的特定细胞、组织、器官或部分中。所述报告基因也可以表达为与本发明的ISV、多肽或构建体的蛋白融合体。一些优选但非限制性的实例包括荧光蛋白,例如GFP。

[1246] 合适的启动子、终止子和另外的元件的一些优选但非限制性的实例包括可用于在本文提及的宿主细胞中表达的那些;特别是适合在细菌或酵母细胞中表达的那些,例如本文提及的那些和/或下文实施例中使用的。对于可以在本发明的遗传构建体中存在/使用的启动子、选择标记、前导序列、表达标记和另外元件的一些(进一步)非限制性实例,例如终止子、转录和/或翻译增强子和/或整合因子,参考一般手册例如上述的Sambrook等人和Ausubel等人,以及参考在WO 95/07463、WO 96/23810、WO 95/07463、WO 95/21191、WO 97/11094、WO 97/42320、WO 98/06737、WO 98/21355、US 7,207,410、US 5,693,492和EP 1085089中给出的实施例。其他实施例对技术人员将是清楚的。还参考上文引用的一般背景技术和本文引用的另外的参考文献。

[1247] 本发明的遗传构建体通常可以通过将本发明的核苷酸序列与上述一个或多个另外的元件适当地连接来提供,例如使用在一般手册诸如上述Sambrook等人和Ausubel等人中描述的技术。

[1248] 通常,通过将本发明的核苷酸序列插入本身已知的合适(表达)载体中,可以获得本发明的遗传构建体。合适的表达载体的一些优选但非限制性的实例是在下面的实施例中使用的,以及本文提及的那些。

[1249] 本发明的核酸和/或本发明的遗传构建体可用于转化宿主细胞或宿主生物体,即用于表达和/或生产本发明的多肽或构建体(其是这样的,它可通过表达编码其的核酸而获得)。宿主优选是非人类宿主。合适的宿主或宿主细胞对于技术人员将是清楚的,并且可以是例如任何合适的真菌、原核或真核细胞或细胞系,或任何合适的真菌、原核或(非人)真核生物体,例如:

[1250] -细菌菌株,包括但不限于革兰氏阴性菌株,诸如大肠杆菌(*Escherichia coli*)的菌株;变形杆菌属(*Proteus*)的菌株,例如奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*);假单胞菌属(*Pseudomonas*)的菌株,例如荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*);和革兰氏阳性菌株,诸如芽孢杆菌属(*Bacillus*)的菌株,例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*);链霉菌属(*Streptomyces*)的菌株,例如浅青紫链霉菌(*Streptomyces lividans*);葡萄球菌属(*Staphylococcus*)的菌株,例如肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*);和乳球菌属(*Lactococcus*)的菌株,例如乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*);

[1251] -真菌细胞,包括但不限于来自木霉属(*Trichoderma*)物种的细胞,例如来自里氏木霉(*Trichoderma reesei*);来自链孢霉属(*Neurospora*)物种的细胞,例如来自粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*);来自粪壳属(*Sordaria*)物种的细胞,例如来自大孢粪壳(*Sordaria macrospora*);来自曲霉属(*Aspergillus*)物种的细胞,例如来自黑曲霉(*Aspergillus niger*)或来自酱油曲霉(*Aspergillus sojae*);或来自其它丝状真菌;

[1252] -酵母细胞,包括但不限于来自酵母属(*Saccharomyces*)物种的细胞,例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*);来自裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)物种的细胞,例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);来自毕赤酵母属(*Pichia*)物种的细胞,例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)或甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*);来自汉逊酵母属(*Hansenula*)物种的细胞,例如多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*);来自克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)物种的细胞,例如乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*);来自

Arxula物种的细胞,例如Arxula adenivorans;来自耶氏酵母属(Yarrowia)物种的细胞,例如解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica);

[1253] -两栖动物细胞或细胞系,诸如爪蟾卵母细胞(Xenopus oocytes);

[1254] -来源于昆虫的细胞或细胞系,诸如来源于鳞翅目的细胞/细胞系,包括但不限于斜纹夜蛾属(Spodoptera)SF9和Sf21细胞或来源于果蝇属(Drosophila)的细胞/细胞系,诸如Schneider和Kc细胞;

[1255] -植物或植物细胞,例如在烟草植物中;和/或

[1256] -哺乳动物细胞或细胞系,例如来源于人的细胞或细胞系,来自哺乳动物的细胞或细胞系,包括但不限于CHO-细胞,BHK-细胞(例如BHK-21细胞)和人细胞或细胞系诸如HeLa、COS(例如COS-7)和PER.C6细胞;

[1257] 以及本身已知的用于表达和产生抗体和抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段)的所有其他宿主细胞或(非人类)宿主,这对于技术人员来说将是清楚的。还参考上文引用的一般背景领域,以及参考例如WO 94/29457;WO 96/34103;WO 99/42077;Frenken等人(1998,Res Immunol.149:589-599);Riechmann和Muyldermans(1999),同上;van der Linden(2000,J.Biotechnol.80:261-270);Joosten等人(2003,Microb.Cell Fact.2:1);Joosten等人2005,(Appl.Microbiol.Biotechnol.66:384-392);以及本文引用的其他参考文献。

[1258] 本发明的多肽或构建体也可以表达为所谓的“胞内抗体”,如例如WO 94/02610、WO 95/22618和US 7,004,940;WO 03/014960;Cattaneo和Biocca(1997,Intracellular Antibodies:Development and Applications”Landes and Springer-Verlag);和Kontermann(2004,Methods 34:163-170)中所描述的。

[1259] 本发明的多肽或构建体还可以例如在转基因哺乳动物的乳汁中产生,例如在兔、奶牛、山羊或绵羊的乳汁中(参见例如US 6,741,957、US 6,304,489和US 6,849,992,用于将转基因引入到哺乳动物中的一般技术),在植物或植物的部分中,包括但不限于它们的叶、花、果实、种子、根或块茎(例如在烟草、玉米、大豆或苜蓿中)或在例如家蚕Bombix mori的蛹中。

[1260] 此外,本发明的多肽或构建体也可以在没有细胞表达系统中表达和/或产生,并且这种系统的合适实例对于技术人员将是清楚的。一些优选但非限制性的实例包括在小麦胚芽系统中的表达;在兔网织红细胞裂解物中的表达;或在大肠杆菌Zubay系统中的表达。

[1261] 优选地,在本发明中,使用(体内或体外)表达系统如细菌表达系统,其以适于药学用途的形式提供本发明的多肽或构建体,并且此类表达系统对于技术人员来说将再次是清楚的。如本领域技术人员还清楚的,可以使用肽合成技术制备适于药学用途的本发明的多肽或构建体。

[1262] 对于工业规模的生产,用于(工业)生产免疫球蛋白单可变结构域或含有免疫球蛋白单可变结构域的多肽治疗剂的优选异源宿主,包括适合于大规模表达/生产/发酵,特别是用于大规模药物表达/生产/发酵的大肠杆菌、毕赤酵母、酿酒酵母菌株。这种菌株的合适实例对于技术人员来说将是清楚的。这种菌株和生产/表达系统也可由诸如Biovitrum(Uppsala,Sweden)的公司获得。

[1263] 备选地,哺乳动物细胞系,特别是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,可用于大规模表达/生

产/发酵,特别是用于大规模药物表达/生产/发酵。再次,这些表达/生产系统也可由上面提到的一些公司获得。

[1264] 对特定表达系统的选择将部分地取决于某些翻译后修饰的需要,更具体地说是糖基化。期望或需要糖基化的含有免疫球蛋白单可变结构域的重组蛋白的生产,需要使用具有使表达蛋白糖基化的能力的哺乳动物表达宿主。在这方面,技术人员将清楚,所获得的糖基化模式(即,附着的残基的种类、数量和位置)将取决于用于表达的细胞或细胞系。优选地,使用人细胞或细胞系(即,产生基本上具有人糖基化模式的蛋白质),或使用另一种哺乳动物细胞系,其可以提供与人糖基化基本上相同和/或功能相同的糖基化模式或至少模拟人糖基化。通常,原核宿主例如大肠杆菌不具有使蛋白质糖基化的能力,并且使用低等真核生物例如酵母通常导致与人糖基化不同的糖基化模式。然而,应该理解,所有上述宿主细胞和表达系统均可用于本发明,这取决于待获得的期望多肽或构建体。

[1265] 因此,根据本发明的一个非限制性方面,本发明的多肽或构建体是糖基化的。根据本发明的另一个非限制性方面,本发明的多肽或构建体是非糖基化的。

[1266] 根据本发明的一个优选但非限制性的方面,本发明的多肽或构建体在细菌细胞中产生,特别是适于大规模药物生产的细菌细胞,例如上述菌株的细胞。

[1267] 根据本发明的另一个优选但非限制性的方面,本发明的多肽或构建体在酵母细胞中产生,特别是适于大规模药物生产的酵母细胞,例如上述物种的细胞。

[1268] 根据本发明的又一个优选但非限制性的方面,本发明的多肽或构建体在哺乳动物细胞中产生,特别是在人细胞中或在人细胞系的细胞中产生,更特别是在适用于大规模药物生产的人细胞或人细胞系的细胞中,例如上文提到的细胞系。

[1269] 当在宿主细胞中的表达用于产生本发明的多肽或构建体时,本发明的多肽或构建体可以在细胞内(例如,在胞质溶胶中,在周质中或在包含体中)产生,然后从宿主细胞中分离,并任选地进一步纯化;或者可以在细胞外产生(例如,在培养宿主细胞的培养基中),然后从培养基中分离,并任选地进一步纯化。当使用真核宿主细胞时,通常优选细胞外产生,因为这极大地促进了所获得的多肽或构建体的进一步分离和下游加工。细菌细胞如上述大肠杆菌菌株正常地不会在细胞外分泌蛋白质,除了少数蛋白质种类如毒素和溶血素,并且大肠杆菌中的分泌产生是指蛋白质跨越内膜转运至周质间隙。与胞质生产相比,周质生产提供了若干优势。例如,在通过特异性信号肽酶切割分泌信号序列后,分泌产物的N端氨基酸序列可以与天然基因产物相同。而且,周质中的蛋白酶活性似乎比在细胞质中少得多。此外,由于周质中较少的污染蛋白质,蛋白质纯化更简单。另一个优点是可以形成正确的二硫键,因为周质提供比细胞质更具氧化性的环境。在大肠杆菌中过表达的蛋白质通常存在于不溶性聚集体中,即所谓的包含体。这些包含体可位于胞质溶胶或周质中;从这些包含体中回收生物活性蛋白质需要变性/重折叠过程。许多重组蛋白包括治疗蛋白是从包含体中回收的。备选地,如本领域技术人员所清楚的,可以使用经过遗传修饰以分泌所需蛋白质特别是本发明的多肽或构建体的重组细菌菌株。

[1270] 因此,根据本发明的一个非限制性方面,本发明的多肽或构建体是已经在细胞内产生并且已经从宿主细胞中分离的多肽或构建体,特别是从细菌细胞或从细菌细胞的包含体中分离的多肽或构建体。根据本发明的另一个非限制性方面,本发明的多肽或构建体是已经在细胞外产生并且已经从培养宿主细胞的培养基中分离的多肽或构建体。

[1271] 用于与这些宿主细胞一起使用的一些优选但非限制性的启动子包括:

[1272] -用于在大肠杆菌中表达: lac启动子(及其衍生物,如lacUV5启动子);阿拉伯糖启动子;噬菌体λ的左-(PL)和右(PR)启动子;trp操纵子的启动子;杂合lac/trp启动子(tac和trc);T7-启动子(更具体地,T7-噬菌体基因10的启动子)和其他T-噬菌体启动子;Tn10四环素抗性基因的启动子;上述启动子的工程变体,其包括外来调控操纵子序列的一个或更多个拷贝;

[1273] -用于在酿酒酵母中表达:组成型:ADH1(醇脱氢酶1)、ENO(烯醇酶)、CYC1(细胞色素c iso-1)、GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、PGK1(磷酸甘油酸激酶)、PYK1(丙酮酸激酶);调控的:GAL1,10,7(半乳糖代谢酶)、ADH2(醇脱氢酶2)、PHO5(酸性磷酸酶)、CUP1(铜金属硫蛋白);异源的:CaMV(花椰菜花叶病毒35S启动子);

[1274] -用于在毕赤酵母中表达:AOX1启动子(醇氧化酶I);

[1275] -用于在哺乳动物细胞中表达:人巨细胞病毒(hCMV)即时早期增强子/启动子;人巨细胞病毒(hCMV)即时早期启动子变体,其含有两个四环素操纵基因序列,使得启动子可被Tet阻遏物调控;单纯疱疹病毒胸苷激酶(TK)启动子;劳斯肉瘤病毒长末端重复序列(RSV LTR)增强子/启动子;来自人、黑猩猩、小鼠或大鼠的延伸因子1α(hEF-1α)启动子;SV40早期启动子;HIV-1长末端重复启动子;β-肌动蛋白启动子。

[1276] 用于与这些宿主细胞一起使用的一些优选但非限制性的载体包括:

[1277] -用于在哺乳动物细胞中表达的载体:pMAMneo(Clontech),pcDNA3(Invitrogen)、pMC1neo(Stratagene)、pSG5(Stratagene),EB0-pSV2-neo(ATCC 37593)、pBPV-1(8-2)(ATCC 37110)、pDBPV-MMTneo(342-12)(ATCC 37224)、pRSVgpt(ATCC37199)、pRSVneo(ATCC37198)、pSV2-dhff(ATCC 37146)、pUCTag(ATCC 37460)和1ZD35(ATCC 37565),以及基于病毒的表达系统,例如基于腺病毒的表达系统;

[1278] -用于在细菌细胞中表达的载体:pET载体(Novagen)和pQE载体(Qiagen);

[1279] -用于在酵母或其他真菌细胞中表达的载体:pYES2(Invitrogen)和毕赤酵母表达载体(Invitrogen);

[1280] -用于在昆虫细胞中表达的载体:pBlueBacII(Invitrogen)和其他杆状病毒载体;

[1281] -用于在植物或植物细胞中表达的载体:例如基于花椰菜花叶病毒或烟草花叶病毒的载体,土壤杆菌属(Agrobacterium)的合适菌株或基于Ti质粒的载体。

[1282] 用于与这些宿主细胞一起使用的一些优选但非限制性的分泌序列包括:

[1283] -用于细菌细胞如大肠杆菌中:Pe1B、Bla、OmpA、OmpC、OmpF、OmpT、StII、PhoA、PhoE、MalE、Lpp、LamB等;TAT信号肽,溶血素C端分泌信号;

[1284] -用于酵母中:α-交配因子前原序列、磷酸酶(pho1)、转化酶(Suc)等;

[1285] -用于哺乳动物细胞中:目标蛋白质来源于真核生物时的固有信号;小鼠Igκ-链V-J2-C信号肽;等等。

[1286] 用于转化本发明宿主或宿主细胞的合适技术对于技术人员来说是清楚的,并且可以取决于预期的宿主细胞/宿主生物以及待使用的遗传构建体。再次参考上述手册和专利申请。

[1287] 转化后,可以进行检测和选择已经用本发明的核苷酸序列/遗传构建体成功转化的那些宿主细胞或宿主生物体的步骤。这可以是例如基于存在于本发明遗传构建体中的选

择标记的选择步骤,或涉及检测本发明多肽或构建体的步骤,例如使用特异性抗体。

[1288] 转化的宿主细胞(其可以是稳定细胞系的形式)或宿主生物体(其可以是稳定突变系或菌株的形式)形成本发明的另外方面。

[1289] 优选地,这些宿主细胞或宿主生物体是这样的:它们表达或(至少)能够表达(例如在合适的条件下)本发明的多肽或构建体(并且在宿主生物体的情况下:在其至少一个细胞、部分、组织或器官中)。本发明还包括本发明的宿主细胞或宿主生物体的下一代、后代和/或子代,其可以例如通过细胞分裂或通过有性或无性繁殖获得。

[1290] 因此,在另一方面,本发明涉及表达(或在适当情况下能够表达)本发明的多肽或构建体;和/或含有编码本发明的多肽或构建体的核酸的宿主或宿主细胞。这种宿主或宿主细胞的一些优选但非限制性的实例可如WO 04/041867、WO 04/041865或WO 09/068627中通常描述的。例如,本发明的多肽或构建体可以有利地在酵母菌株如毕赤酵母的菌株中表达、产生或制造。还参考WO 04/25591、WO 10/125187、WO 11/003622和WO 12/056000,其还描述了免疫球蛋白单可变结构域和包含其的多肽在毕赤酵母和其他宿主/宿主细胞中的表达/产生。

[1291] 为了产生/获得本发明的多肽或构建体的表达,转化的宿主细胞或转化的宿主生物体通常可以在使得本发明的(所需)多肽或构建体表达/产生的条件下保持、维持和/或培养。合适的条件对于技术人员将是清楚的,并且通常将取决于所使用的宿主细胞/宿主生物体,以及控制本发明的(相关)核苷酸序列表达的调控元件。再次参考在关于本发明遗传构建体的段落中如上提及的手册和专利申请。

[1292] 通常,合适的条件可以包括使用合适的培养基,存在合适的食物来源和/或合适的营养物质,使用合适的温度,并且任选地存在合适的诱导因子或化合物(例如当本发明的核苷酸序列处于诱导性启动子的控制下时);全部这些可以由技术人员选择。再次,在这样的条件下,本发明的多肽或构建体可以以组成型方式表达,以瞬时方式表达,或者仅当适当诱导时表达。

[1293] 本领域技术人员还将清楚的是,本发明的多肽或构建体可以(首先)以未成熟形式产生(如上所述),然后可以对其进行翻译后修饰,这取决于所使用的宿主细胞/宿主生物体。而且,本发明的多肽或构建体可以是糖基化的,这也取决于所使用的宿主细胞/宿主生物体。

[1294] 然后可以使用本身已知的蛋白质分离和/或纯化技术,诸如(制备)色谱和/或电泳技术、示差沉淀技术、亲和技术(例如,使用与本发明的多肽或构建体融合的特异性可切割氨基酸序列)和/或制备性免疫技术(即,使用针对待分离的多肽或构建体的抗体),从宿主细胞/宿主生物体和/或从培养所述宿主细胞或宿主生物体的培养基分离本发明的多肽或构建体。

[1295] 本发明的组合物

[1296] 本发明进一步涉及产品或组合物,其含有或包含至少一种本发明的多肽或构建体和/或至少一种本发明的核酸,以及任选地本身已知的这种组合物的一种或多种另外的组分,即取决于组合物的预期用途。

[1297] 通常,对于药物用途,本发明的多肽或构建体可以配制成药物制剂或组合物,其包含至少一种本发明的多肽或构建体和至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂和/

或佐剂,以及任选地一种或多种另外的药学活性多肽和/或化合物。通过非限制性实例,这样的制剂可以是适于口服施用、适于肠胃外施用(例如静脉内、腹膜内、皮下、肌内、管腔内、动脉内或鞘内施用)、适于局部施用、适于通过吸入、皮肤贴剂、植入物、栓剂等施用的形式,其中胃肠外施用是优选的。这些合适的施用形式-其可以是固体、半固体或液体,取决于施用方式-以及用于制备其的方法和载体,对于技术人员而言是清楚的,并且在本文中进一步描述。这种药物制剂或组合物在本文中通常称为“药物组合物”。用于非人类生物体中的组合物的药物制剂在本文中通常称为“兽医用组合物”。根据本文的进一步描述,这种组合物的一些优选但非限制性的实例将变得清楚。

[1298] 因此,在另外的方面,本发明涉及药物组合物,其含有至少一种本发明的多肽或构建体和至少一种合适的载体、稀释剂或赋形剂(即,适用于药学用途),和任选地一种以上另外的活性物质。在特定的方面,本发明涉及药物组合物,其含有选自SEQ ID NO:1-10、47、49、52、53、55、56、58-61、63-67和338-342中任一项的本发明的多肽或构建体,和至少一种合适的载体、稀释剂或赋形剂(即适用于药物用途),和任选地一种或以上另外的活性物质。

[1299] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指这样的那些化合物、材料、组合物和/或剂型:在合理的医学判断范围内,其适合用于接触人类和动物的组织,且没有过度的毒性、刺激、变应性应答或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称。

[1300] 本文使用的短语“药学上可接受的载体”是指参与从一个器官或身体的一部分向另一个器官或身体的另一部分运送或运输主题化合物的药学上可接受的材料、组合物或载体,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料。每种载体必须是“可接受的”,其含义是,与制剂的其它成分相容,且对患者无害。

[1301] 通常,本发明的多肽和构建体可以以本身已知的任何合适的方式配制和施用。例如,参考上面引用的一般背景技术(尤其参考WO 04/041862、WO 04/041863、WO 04/041865、WO 04/041867和WO 08/020079)以及标准手册,例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Company,USA(1990)、Remington,the Science and Practice of Pharmacy,第21版,Lippincott Williams and Wilkins(2005);或the Handbook of Therapeutic Antibodies(S.Dubel,Ed.),Wiley,Weinheim,2007(参见例如第252-255页)。

[1302] 例如,本发明的多肽或构建体可以以本身已知的用于常规抗体和抗体片段(包括ScFv和双抗体)和其他药学活性蛋白质的任何方式配制和施用。这些制剂和其制备方法对于技术人员来说是清楚的,例如包括适于肠胃外施用的制剂(例如,静脉内、腹膜内、皮下、肌内、管腔内、动脉内或鞘内施用)。

[1303] 用于肠胃外施用的制剂可以是例如适于输注或注射的无菌溶液、悬浮液、分散液或乳液。用于这种制剂的合适载体或稀释剂例如包括但不限于WO 08/020079的第143页上提及的那些。通常,水溶液或悬浮液是优选的。

[1304] 本发明的多肽或构建体可以通过输注或注射静脉内或腹腔内施用。本发明的多肽或构建体的溶液可以在水中制备,任选地与无毒表面活性剂混合。分散剂也可以在甘油、液体聚乙二醇、三乙酸甘油酯及其混合物和油中制备。在通常的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[1305] 适用于肠胃外施用的药物组合物包含一种或多种免疫球蛋白单可变结构域、多肽

或构建体,其与一种以上药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液或者可以在使用前重构为无菌可注射溶液或分散液的灭菌粉末组合,它们可以含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质或悬浮剂或增稠剂。

[1306] 可以用于药物组合物中的合适的水性和非水性载体的实例包括水,乙醇,多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等),及其合适的混合物,植物油(诸如橄榄油)和可注射的有机酯(诸如油酸乙酯)。例如,通过使用包衣材料(诸如卵磷脂)、通过在分散液的情况下保持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂可以保持适当的流动性。

[1307] 这些组合物还可以含有佐剂,诸如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯(paraben)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等,可以确保防止微生物对主题化合物的作用。将等渗剂(诸如糖、氯化钠等)包含在组合物中也是所期望的。另外,可通过包含延迟吸收的物质(诸如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射药物形式的延长的吸收。

[1308] 在一些情况下,为了延长药物的效果,期望减缓从皮下或肌肉注射的药物吸收。这可以通过使用具有差的水溶性的结晶或无定形材料的液体悬浮液来完成。然后,药物的吸收速率取决于其溶解速率,而溶解速率又可以取决于晶体大小和结晶形式。备选地,肠胃外施用的药物形式的延迟吸收通过将药物溶解或悬浮于油性载体中来完成。

[1309] 通过在生物可降解的聚合物如聚乳酸-聚乙交酯中形成主题化合物的微囊基质来制得可注射的储存形式。取决于药物与聚合物的比例以及使用的特定聚合物的性质,可以控制药物释放的速率。其它生物可降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚-(酸酐)。还通过将药物包裹在与身体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备储存可注射制剂。

[1310] 适于注射或输注的药物剂型可包括无菌水性溶液或分散液或包含活性成分的无菌粉末,该无菌粉末适于临时制备无菌可注射或可输注的溶液或分散液,任选地包封在脂质体中。在所有情况下,最终剂型必须是无菌的、流动的并且在制造和储存条件下是稳定的。

[1311] 通过以下方法制备无菌可注射溶液:根据需要,将本发明的多肽或构建体在适当的溶剂中以所需的量与上面列举的几种其它成分合并,然后过滤灭菌。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其产生活性成分与先前无菌过滤溶液中存在的任何额外所需成分的粉剂。

[1312] 用于治疗所需的本发明多肽或构建体的量不仅随所选择的特定多肽或构建体而变化,而且随施用途径、所治疗病症的性质和患者的年龄和状况而变,并最终将由主治医师或临床医生自行决定。此外,本发明的多肽或构建体的剂量也会变化。

[1313] 所需剂量可方便地以单剂量或作为以适当间隔施用的分份剂量存在,例如以每天二、三、四或更多个子剂量。子剂量本身可以进一步被分成例如许多离散的松散间隔施用。

[1314] 施用方案可包括长期的日常治疗。“长期”是指至少两周,优选数周、数月或数年的持续时间。本领域普通技术人员仅使用本文教导的常规实验可确定该剂量范围内的必要修改。参见Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA。在任何并发症的情况下,剂量也可以由个体医师调整。

[1315] 在另一个方面,提供了药盒,其包含本发明的多肽或构建体、本发明的核酸、本发明的表达载体或本发明的宿主或宿主细胞。药盒还可包含一个或更多个含有所述多肽或构

建体的小瓶和使用说明书。药盒还可以含有用于施用本发明的多肽或构建体的工具,例如注射器、注入器等。

[1316] 本发明的多肽、构建体或组合物的用途

[1317] 本发明进一步涉及本文所述的多肽、构建体、核酸、宿主细胞和组合物的应用和用途,以及用于预防和/或治疗CD123相关疾病或病症的方法。根据本文的进一步描述,一些优选但非限制性的应用和用途将变得清楚。

[1318] 本发明的多肽、构建体和组合物通常可用于在CD123表达细胞(的位点)处激活T细胞;例如以溶解CD123表达细胞。本发明的多肽和构建体同时与T细胞上的TCR和肿瘤细胞上的CD123结合,诱导细胞活化和随后CD123表达细胞的溶解(杀伤)。当不与CD123表达细胞结合时,本发明的多肽和构建体几乎不显示任何T细胞活化。因此,本发明的多肽和构建体的靶标独立的溶解(即,没有CD123表达的细胞溶解)是最小的。

[1319] 因此,在一个方面,与在相同条件下但不存在本发明多肽或构建体的CD123表达细胞的数量相比,本发明的多肽、构建体和组合物引起CD123表达细胞的溶解,其平均溶解百分比为至少10%,优选至少15%,例如至少16%、17%、18%、19%或20%或更多,例如30%或更多,其以本身已知的任何合适方式进行测量,例如,使用本文所述的测定法之一(例如重定向的人T细胞介导的杀伤基于流式细胞术的测定法,如实施例部分中所述)。

[1320] 除此之外或同时,通过本发明多肽、构建体和组合物的T细胞活化诱导的CD123阴性细胞溶解是在相同条件下但不存在本发明多肽或构建体的情况下CD123阴性细胞数量的约10%以下,例如9%或更低,例如8、7或6%或甚至更低,其以本身已知的任何合适方式进行测量,例如使用本文所述的测定法之一(例如重定向的人T细胞介导的杀伤基于流式细胞术的测定法,如实施例部分中所述)。

[1321] 所述CD123表达细胞的杀伤在这样的疾病或病症中是有利的:其中这种CD123表达细胞的存在是充足的和/或是不期望的。

[1322] 因此,在一个方面,本发明提供用作药物的多肽、构建体或组合物。

[1323] 在另外的方面,本发明提供了本发明的多肽或构建体或包含本发明的多肽或构建体的组合物,用于预防、治疗和/或改善CD123相关的疾病或病症。

[1324] 更特别地,本发明提供了本发明的多肽或构建体或包含本发明的多肽或构建体的组合物,用于预防、治疗和/或改善CD123相关的疾病或病症,其中CD123相关的疾病或病症是增殖性疾病或炎性病征。

[1325] 本发明还涉及用于预防、治疗和/或改善CD123相关的疾病或病症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用药学活性量的本发明的多肽或构建体,和/或包含其的组合物。

[1326] 特别地,本发明涉及如上所述的方法,其中CD123相关疾病或病症是增殖性疾病或炎性病征。

[1327] 炎性病征可以是通过杀死CD123表达细胞来预防、治疗和/或改善的任何炎性病征。

[1328] 在一个方面,炎性病征选自自由自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎组成的组。

[1329] 因此,本发明涉及用于预防、治疗和/或改善炎性病征的多肽、构建体或组合物,其

中所述炎性病症选自自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎组成的组。

[1330] 因此,本发明还涉及用于预防、治疗和/或改善炎性病症的方法,其中所述炎性病症选自自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎组成的组,所述方法包括向有此需要的受试者施用药学活性量的至少一种本发明的多肽或构建体或本发明的组合物。

[1331] 增殖性疾病可以通过杀死CD123表达细胞来预防、治疗和/或改善的任何增殖性疾病。

[1332] 在一个方面,所述增殖性疾病是癌症。基于本文的公开内容,技术人员将清楚与CD123过表达相关的癌症的实例,并且例如包括(不限于)以下癌症:淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞浆样树突细胞肿瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。

[1333] 因此,本发明涉及用于预防、治疗和/或改善癌症的多肽、构建体或组合物,其中所述癌症选自淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞浆样树突细胞肿瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。

[1334] 因此,本发明还涉及预防、治疗和/或改善癌症的方法,其中所述癌症选自淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞样树突细胞瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤,所述方法包括向有此需要的受试者施用药学活性量的至少一种本发明的多肽或构建体或本发明的组合物。

[1335] 本发明还涉及本发明的多肽或构建体或本发明的组合物在制备药物中的用途。

[1336] 在另外的方面,本发明涉及本发明的多肽或构建体或包含其的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善CD123相关疾病或病症的药物中的用途。

[1337] 更特别地,本发明涉及本发明的多肽或构建体或包含其的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善CD123相关疾病或病症的药物中的用途,其中CD123相关疾病或病症是增殖性疾病或炎性病症。

[1338] 在一个方面,本发明涉及本发明的多肽或构建体或包含其的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善炎性病症的药物中的用途,其中所述炎性病症选自自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎组成的组。

[1339] 在另一方面,本发明涉及本发明的多肽或构建体或包含其的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善增殖性疾病的药物中的用途,其中所述增殖性疾病是癌症。基于本文的公开内容,技术人员将清楚与CD123过表达相关的癌症的实例,并且例如包括(不限于)以下癌症:淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞浆样树突细胞肿瘤、系统性肥大细胞增多症和多发

性骨髓瘤。

[1340] 因此,本发明还涉及本发明的多肽或构建体或包含其的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善癌症的药物中的用途,其中所述癌症选自由以下组成的组:淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞浆样树突细胞肿瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。

[1341] 在本发明的上下文中,术语“预防、治疗和/或改善”不仅包括预防、治疗和/或改善疾病,还通常包括预防疾病的发作,减缓或逆转疾病的进展,预防或减缓与疾病相关的一种或多种症状的发作,减少和/或减轻与疾病相关的一种或多种症状,降低疾病和/或与其相关的任何症状的严重性和/或持续时间,和/或防止疾病和/或与其相关的任何症状的严重性的进一步增加,预防、减少或逆转由疾病引起的任何生理损伤,以及通常对受治疗的患者有益的任何药理作用。

[1342] 如本文可互换使用的,术语“药学有效量”或“药学活性量”是指在CD123表达细胞存在的情况下,足以激活T细胞的量。在CD123相关疾病的背景下,它指多肽、构建体或药物组合物单独的或与另一种疗法组合的量,其在预防、治疗和/或改善CD123相关疾病中提供治疗益处。在关于本发明多特异性多肽或构建体的量的使用中,该术语可包括改善整体疗法,减少或避免不希望的作用,或增强与另一种疗法的治疗功效或协同作用的量。

[1343] 如本文所用,术语“疗法”是指可用于治疗、预防和/或控制CD123相关疾病(例如炎症性病症或增殖性疾病)的任何方案、方法和/或药剂。在某些实施方案中,术语“疗法(therapies)”和“疗法(therapy)”是指用于治疗、预防和/或控制CD123相关疾病(例如炎症性病症或增殖性疾病)或本领域技术人员(诸如医务人员)已知的其一种或多种症状的生物疗法、支持疗法和/或其它疗法。

[1344] 在另一方面,本发明涉及用于免疫疗法,特别是用于被动免疫疗法的方法,该方法包括向患有CD123相关疾病或具有患CD123相关疾病的风险的受试者施用药学活性量的本发明的多肽或构建体和/或包含其的药物组合物。

[1345] 待治疗的受试者可以是任何温血动物,但特别是哺乳动物,更特别是人。如技术人员所清楚的,待治疗的受试者特别是患有本文提及的疾病和病症或处于所述疾病和病症风险中的人。

[1346] 通常,根据本发明的多肽或构建体和/或包含其的组合物可以以任何合适的方式施用。例如(但不限于此)根据本发明的多肽和包含其的组合物可以口服施用,肠胃外(例如,静脉内、腹膜内、皮下、肌内、管腔内、动脉内或鞘内或通过避开胃肠道的任何其他施途径)施用,鼻内施用,透皮施用,局部施用,通过栓剂施用,通过吸入施用,再次取决于所使用的具体药物制剂或组合物。根据待预防或治疗的疾病或病症以及临床医生熟知的其他因素,临床医生将能够选择合适的施途径和用于这种施用的合适的药物制剂或组合物。

[1347] 在优选的方面,本发明的多肽或构建体或包含其的组合物通过静脉内(例如(但不限于此),通过输注或推注)或皮下施用。

[1348] 根据适于预防、治疗和/或改善CD123相关疾病的治疗方案,施用本发明的多肽或构建体和/或包含其的组合物。临床医生通常能够确定合适的治疗方案,这取决于以下因素:诸如待治疗的疾病类型、疾病的阶段、疾病的严重程度和/或其症状的严重程度、待使用

的本发明的具体多肽和构建体、具体的给药途径和待使用的药物制剂或组合物、患者的年龄、性别、体重、饮食、一般状况,和临床医生熟知的类似因素。

[1349] 通常,治疗方案包括以一种或多种药理学有效量或剂量施用一种或多种本发明的多肽或构建体,或一种或多种包含其的组合物。施用的具体量或剂量可以由临床医生再次基于上面引用的因素来确定。

[1350] 通常,为了预防、治疗和/或改善CD123相关疾病,并且取决于待治疗的CD123相关疾病(例如,增殖性疾病(包括癌症)或炎性疾病)的类型、待治疗的疾病的阶段、待使用本发明的多肽或构建体的效力、具体的给药途径和所用的具体药物制剂或组合物,本发明的多肽通常以每日每千克体重1克和1微克之间的量给药。临床医生通常能够根据本文提及的因素确定合适的日剂量。还将清楚的是,在具体情况下,临床医生可以选择偏离这些量,例如基于上面引用的因素和其专家判断。通常,从对于针对相同靶标的相当的常规抗体或抗体片段通过基本上相同的途径施用的通常的量,可以获得关于施用量的一些指导,然而同时考虑亲和力和/或亲合力、功效、生物分布、半衰期的差异和技术人员熟知的类似因素

[1351] 通常,在上述方法中,将使用本发明的单一多肽或构建体。然而,组合使用两种或多种本发明的多肽或构建体也在本发明的范围内。

[1352] 本发明的多肽或构建体或包含其的组合物还可以与一种或多种另外的药理学活性化合物或成分(principle)组合使用,即作为组合治疗方案,其可以生产或不产生协同效应。再次,临床医生将能够基于上面引用的因素和其专家判断选择这些另外的化合物或成分,以及合适的组合治疗方案。

[1353] 特别地,本发明的多肽、构建体和组合物可以与其他药理学活性化合物或成分组合使用,所述其他药理学活性化合物或成分用于或可用于预防、治疗和/或改善CD123相关疾病(例如,增殖性疾病(包括癌症)或炎性疾病),其结果可以获得或不获得协同效应。所述化合物和成分的实例,以及施用它们的途径、方法和药物制剂或组合物是临床医生所清楚的。

[1354] 这种化合物和成分,以及用于施用它们的途径、方法和药物制剂或组合物的实例是临床医生所清楚的,并且包括(不限于):葱环类药物(柔红霉素、多柔比星、伊达比星、米托蒽醌、柔红霉素苯胺)、阿糖胞苷(AML)、造血生长因子、去甲基化剂(如地西他滨或氮杂胞苷)、全反式维甲酸、三氧化二砷,DNA甲基转移酶抑制剂、美法仑、泼尼松,来那度胺、环磷酰胺、沙利度胺、地塞米松、硼替佐米、氟达拉滨、皮质类固醇、长春新碱、拉布立酶、L-天冬酰胺酶、聚乙二醇化天冬酰胺酶、克拉屈滨、喷司他丁、阿霉素、博来霉素、长春碱、达卡巴嗪;或其任何组合。

[1355] 当两种或更多种物质或成分用作组合的治疗方案的一部分时,它们可以通过相同的施用途径或者通过不同的施用途径在基本上相同的时间或在不同时间(例如,基本上同时地、连续地或者根据备选方案)施用。当所述物质或成分通过相同的施用途径同时施用时,它们可以作为不同的药物制剂或组合物或者作为组合的药物制剂或组合物的一部分进行施用,这是技术人员所清楚的。

[1356] 此外,当两种或更多种活性物质或成分用作组合治疗方案的一部分时,每种物质或成分可以以与当所述化合物或成分独自使用时相同的量或根据相同的方案施用,并且这种组合使用可以导致或不导致协同效应。然而,当两种或更多种活性物质或成分的组合使用导致协同效应时,还可以减少待施用的一种、更多种或所有物质或成分的量,同时仍

然实现期望的治疗作用。例如,这可以用于避免、限制或减少任何不希望的副作用,同时仍然获得所需的药物或治疗效果,其中该副作用与当所述一种或更多种物质或成分以其通常的量使用时,该一种或更多种物质或成分的使用相关。

[1357] 根据本发明所使用的治疗方案的有效性可以以对于所涉及的疾病或病症本身已知的任何方式确定和/或遵循,如临床医生所清楚的。临床医生还能够,在适当的情况下并根据具体情况,改变或修改特定的治疗方案,以达到理想的治疗效果,以避免、限制或减少不必要的副作用,和/或以便在一方面实现期望的治疗效果和另一方面避免、限制或减少不期望的副作用之间实现适当的平衡。

[1358] 通常,遵循治疗方案直至达到所期望的治疗效果和/或只要保持所期望的治疗效果即可。再次,这可以由临床医生确定。

[1359] 基于本文的公开内容,本领域技术人员将清楚本发明的多肽或构建体、核酸、遗传构建体和宿主以及宿主细胞的进一步用途。

[1360] 本说明书中说明和讨论的方面仅意在教导本领域技术人员本发明人已知实现和使用本发明的最佳方式。如本领域技术人员根据上述教导理解的,在不偏离本发明的情况下,本发明的上述方面的改进和变化形式是可能的。因此要理解,在权利要求和其等同方案的范围内,本发明可以以除了如具体描述的之外实施。

[1361] 现在,将通过如下非限制性优选方面、实施例和附图进一步描述本发明。

[1362] 本申请中引用的所有参考文献(包括文献参考文献、公开的专利、公开的专利申请和共同待定的专利申请)的全部内容通过引用明确并入本文,尤其是对于上文参考的教导。

实施例

[1363] 实施例1:与TCR相关的材料和方法

[1364] 1.1 TCR $\alpha\beta$ /CD3转染的细胞系

[1365] 产生瞬时和稳定的CHO-K1(ATCC:CCL-61)、HEK293H(Life technologies,11631-017)、Llana(来自美洲驼脐带细胞的成纤维细胞)细胞系,其具有完整人T细胞受体(TCR)复合物的全部6个链的重组过表达。为此,将TCR α (α)和TCR β (β)链的编码序列克隆到来源于pcDNA3.1的载体中,位于CMV启动子的下游,并将2A样病毒肽序列插入到两个链之间以在多蛋白的翻译期间诱导核糖体跳跃(ribosomal skipping)。在相同的载体中,将CD3复合物的 ϵ 、 δ 、 γ 和 ζ 链的编码序列克隆到另外的CMV启动子的下游,也使用相应链之间的2A样病毒肽序列。另外,使用单一基因载体,如上所述产生具有重组过表达人CD3的4个链的稳定HEK293H克隆。

[1366] 使用的人CD3和人TCR α/β 恒定结构域的序列衍生自UniProtKB(CD3 δ :P04234,CD3 γ :P09693,CD3 ϵ :P07766,CD3 ζ :P20963,TCR α :P01848和TCR β :P01850;分别为SEQ ID NO:70至75)。人TCR α/β 可变结构域的序列衍生自晶体结构序列(PDB编码:2IAN、2XN9和3TOE)(人TCR α 可变结构域衍生自2IAN、2XN9和3TOE,分别具有SEQ ID NO:343、76和345;人TCR β 可变结构域衍生自2IAN、2XN9和3TOE,分别具有SEQ ID NO:344、77和346)。

[1367] 通过流式细胞术,使用功能性小鼠IgG2b抗-人TCR α/β 抗体、克隆BW242/412(Miltenyi,130-098-219)以及功能性小鼠IgG2a抗-CD3PE标记的抗体、克隆OKT-3(eBioscience,12-0037)来确认人T细胞受体复合物的细胞表面表达(图1)。

[1368] 1.2可溶性重组TCR α / β 蛋白

[1369] 在内部产生可溶性人和食蟹猴/猕猴TCR α / β 蛋白。人TCR α / β 恒定结构域的细胞外部分的序列衍生自UniProtKB (TCR α :P01848和TCR β :P01850;分别为SEQ ID NO:74和75)。人TCR α / β 可变结构域衍生自晶体结构序列(PDB编码:2XN9;对于 α 和 β 链分别为SEQ ID NO:76和77)。

[1370] 食蟹猴/猕猴TCR α / β 恒定结构域的细胞外部分的序列分别源自GenBank文件EHH63463和AEA41868 (SEQ ID NO:347和348)。食蟹猴/猕猴TCR α / β 可变结构域的序列来源于AEA41865和AEA41866 (对于 α 和 β 链分别为SEQ ID NO:349和350)。

[1371] 将人TCR α / β (2XN9) 或食蟹猴/猕猴TCR α / β 的细胞外结构域与拉链蛋白编码序列融合(O'Shea等1993Curr. Biol. 3(10):658-667),由CHO K1SV细胞(Lonza)使用Lonza's GS基因表达系统TM产生,并随后纯化。

[1372] 在ELISA结合测定中评价TCR α / β 拉链蛋白的质量。将Maxisorp 96孔ELISA板(Nunc)用2 μ g/mL可溶性重组人TCR α / β (2XN9)-拉链蛋白或可溶性重组食蟹猴TCR α / β -拉链蛋白包被。温育过夜后,洗涤平板并用PBS+1%酪蛋白在室温下封闭1小时。接下来,将平板与功能性标志标记的纳米抗体或功能性小鼠IgG抗非人灵长类/大鼠TCR α / β 抗体,克隆R73 (eBioscience, 16-5960)的系列稀释液在室温下温育1小时,同时摇动,再次洗涤,并将平板分别与单克隆ANTI-FLAG M2-过氧化物酶(HRP) (Sigma, A8592)、过氧化物酶-缀合的兔抗小鼠免疫球蛋白(Dako, P0260)一起温育。1小时后,加入TMB One溶液(Promega, G7431)。用2M H₂SO₄终止反应,并使用Tecan sunrise 4通过测量450nm处的OD来确定剂量依赖性结合(图2)。

[1373] 实施例2:用TCR/CD3免疫美洲驼,仅重链的抗体片段库的克隆和噬菌体的制备

[1374] 2.1免疫

[1375] 提出了在骆驼科(例如美洲驼和羊驼)中产生针对T细胞受体(TCR) α 和/或 β 恒定链的仅有重链的抗体。尽管天然T细胞受体复合物由CD3 (γ 、 δ 、 ϵ 和 ζ)链以及TCR α 和 β 链组成,但假设缺乏CD3链将有助于接近TCR的恒定结构域。特别是因为CD3链横向环绕,并且限制了对TCR α 和 β 链的恒定结构域的接近。与我们对其他靶标的经验相反,获得针对TCR α 或 β 链的免疫应答并不像预期的那样直接。

[1376] 在最终方法中,经伦理委员会批准后(CRIA, LA1400575, 比利时-EC2012#1),发明人尝试了用编码T细胞复合物的DNA的复合免疫方案。简而言之,根据标准方案,用pVAX1-人TCR (2IAN)/CD3 (在实施例1.1中描述的)质粒载体(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)和用pVAX1-人TCR α / β (2XN9)/CD3 (在实施例1.1中描述的)质粒载体(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)对3只额外的美洲驼进行免疫。两只美洲驼另外接受1次原代人T细胞的皮下注射。使用RosetteSep (StemCell Technologies, #15061),从来自健康志愿者的血沉棕黄层(Buffy Coat)血液(根特血库)中收集人T细胞,随后根据生产商的说明书在Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare #17-1440-03)上富集并储存在液氮中。解冻后,将细胞洗涤,并重新悬浮于来自Gibco的D-PBS中,并在注射前保持在冰上。

[1377] 2.2仅重链的抗体片段库的克隆和噬菌体的制备

[1378] 每只动物在注射一种免疫抗原后收集血样。从这些血样中,根据制造商的说明书(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)使用Ficoll-Hypaque制备PBMC。对于每只免

疫的美洲驼,通过汇集从源自免疫方案的某个子集(即,在一种免疫抗原之后)的样品中分离的总RNA来构建文库。

[1379] 简言之,通过特定的限制性位点将PCR扩增的VHH库克隆到经设计用于促进VHH文库的噬菌体展示的载体中。载体来源于pUC119。与VHH编码序列同框,载体编码C端3xFLAG和His6标签。根据标准方案(参见例如WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551、WO 05/044858和其它现有技术和本文引用的Ablynx N.V.递交的申请)制备噬菌体。

[1380] 实施例3:通过噬菌体展示选择TCR/CD3特异性VHH

[1381] 绝大多数所选的VHH针对TCR α 或TCR β 链的可变区。因此,发明人必须设计出不同的选择和反选择策略。

[1382] 简而言之,应用多种选择条件,从所有美洲驼获得并克隆为噬菌体文库的VHH库用于不同的选择策略中。使用具有与免疫过程中所使用的相同可变结构域的人TCR/CD3转染细胞系的选择仅产生可变结构域结合物。因此,在选择期间使用含有不同可变TCR α / β 结构域(转染细胞(在实施例1.1中所述)、可溶性蛋白质(在实施例1.2中所述)或人原代T细胞(如实施例2.1中所述分离))的工具,并证明对于鉴定恒定结构域结合物至关重要。选择期间的其他变量包括:抗原呈递方法(当使用细胞时在溶液中或当蛋白质时包被在平板上)、抗原浓度、使用的直向同源物(人或食蟹猴重组TCR α / β 蛋白)和选择轮次的数量。所有固体包被相选择在Maxisorp 96孔板(Nunc,Wiesbaden,Germany)中进行。

[1383] 选择如下进行:用于固体和溶液相选择形式的TCR α / β -CD3抗原制剂如上所述以多种浓度呈现。与噬菌体文库一起温育2小时后,然后充分洗涤,用胰蛋白酶(1mg/mL)洗脱结合的噬菌体15分钟。通过应用0.8mM蛋白酶抑制剂ABSF立即中和胰蛋白酶蛋白酶活性。作为对照,平行进行无抗原的选择。

[1384] 噬菌体输出用于感染大肠杆菌以分析单个VHH克隆。根据标准方案(参见例如WO 03/035694、WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551和其它现有技术和本文引用的Ablynx N.V.递交的申请)制备周质提取物。

[1385] 实施例4:筛选、序列分析和纯化

[1386] 4.1在流式细胞术测定中筛选结合TCR/CD3的纳米抗体

[1387] 使用人TCR/CD3转染的CHO-K1或HEK293H细胞和相应的CHO-K1或HEK293H参考细胞系,在混合细胞系设置中,对周质提取物筛选表达TCR/CD3结合的细胞。为此,一大批参考细胞系用8 μ M PKH26标记并冷冻。将5 \times 10⁴个PKH标记的参考细胞与5 \times 10⁴个靶细胞混合,并与周质提取物在4 $^{\circ}$ C温育30分钟,并洗涤3次。接下来,将细胞与1 μ g/ml单克隆 ANTI-FLAG[®]M2 抗体(Sigma-Aldrich,F1804)在4 $^{\circ}$ C温育30分钟,再次洗涤,并与5 μ g/ml别藻蓝蛋白(APC) AffiniPure山羊抗-小鼠IgG(Jackson Immunoresearch,115-135-164)在4 $^{\circ}$ C温育30分钟。将样品洗涤,重新悬浮于FACS缓冲液(来自Gibco的D-PBS,具有来自Sigma的10%FBS和来自Merck的0.05%叠氮化钠)中,然后通过BD FACSAArray进行分析。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在收获期间计数20,000个细胞。基于PKH26-SSC分布,选择PKH标记的亲本群体和人类TCR/CD3未标记的靶标群体。对于这2个群体,计算平均APC值。

[1388] 4.2在人T细胞活化测定中筛选结合TCR/CD3的纳米抗体

[1389] 经过多次尝试,结果显示,根据标准方案(即包被到96孔板上),通过抗体或纳米抗

体,纯化的人T细胞的激活是不够灵敏的(数据未显示)。

[1390] 为了评估活性,基于珠偶联的T细胞活化开发了不同的测定法。简言之,用单克隆小鼠抗-FLAG[®]M2抗体(Sigma-Aldrich,F1804)(15 μ g/1E7珠)包被Dynabeads[®]山羊抗-小鼠IgG(ThermoFisher Scientific,11033)。在4 $^{\circ}$ C温育2小时后,将Dynabeads[®]洗涤并与80 μ l周质提取物在4 $^{\circ}$ C温育20分钟,同时震荡。在将珠复合物与可溶性小鼠抗-CD28抗体(Pelicluster CD28-Sanquin,M1650)一起添加至纯化的原代人T细胞(如实施例2.1中所述分离)之前,洗掉非偶联的纳米抗体。作为对照条件,使用未刺激的人T细胞。简言之,将与单克隆小鼠抗-FLAG[®]M2抗体偶联的Dynabeads[®]山羊抗-小鼠IgG(ThermoFisher Scientific,11033)在含有不相关的纳米抗体的80 μ l周质提取物中温育。在洗涤步骤期间去除未偶联的纳米抗体之后,将不相关的纳米抗体-珠复合物加入到纯化的原代人T细胞中。在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂温育24小时后,通过使用单克隆小鼠抗人CD69PE(BD Biosciences, 557050)在流式细胞术中测量CD69表达水平来确定人T细胞的活化状态。

[1391] 4.3所获得的纳米抗体的序列分析

[1392] 将在流式细胞术结合筛选和T细胞活化测定中评分为阳性的纳米抗体进行测序。

[1393] 序列分析导致了纳米抗体T0170056G05及其不同的家族成员的鉴定,代表总共104个不同的克隆(SEQ ID NO:42和78-180)。提供了相应的比对(表A-1)。

[1394] 针对T0170056G05的家族成员的CDR的序列可变性描述于下表中。

[1395] 表B-4

56G05	CDR1									
Kabat 编号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
绝对编号	1	2	3	4	5*	6	7	8	9	10
[1396] 56G05 序列	G	D	V	H	K	I	N	F	L	G
变异		A		Y	L	L		I		S
变异		S						V		
变异		E								
变异		G								

[1397] *在位置5是L的情况下,则位置6也是L。

[1398] 表B-5

56G05	CDR2								
Kabat 编号	50	51	52	53	54	55	56	57	58
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[1399] 56G05 序列	H	I	S	I	G	D	Q	T	D
变异	T		T		S		D	V	A
变异	R		A		A		E	A	Q
变异							T		N
变异							A		V
变异							V		S

[1400] 表B-6

56G05	CDR3								
Kabat 编号	95	96	97	98	99	100	100a	101	102
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[1401] 56G05 序列	F	S	R	I	Y	P	Y	D	Y
变异	Y			L	W			N	
变异	G							S	
变异	L								

[1402] 4.4 单价纳米抗体的纯化

[1403] 选择鉴定的家族的两个代表性的纳米抗体,并在大肠杆菌TG1中表达为三联Flag, His6-标记的蛋白。通过加入1mM IPTG诱导表达,并且让其在37°C继续4小时。在离心细胞培养物后,通过冻融沉淀制备周质提取物。将这些提取物用作起始材料,并且通过IMAC和尺寸排阻层析(SEC)纯化纳米抗体。

[1404] 将纳米抗体纯化至95%纯度,如通过SDS-PAGE评价的(数据未显示)。

[1405] 实施例5:抗TCR纳米抗体与CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3和与纯化的原代人T细胞的结合

[1406] 通过流式细胞术评价纯化的单价抗TCR纳米抗体与CHO-K1细胞上表达的人TCR α / β (2XN9)/CD3和与纯化的原代人T细胞的剂量依赖性结合。简言之,收获细胞并转移至V底96孔板(1×10^5 个细胞/孔),并使纳米抗体的连续稀释液(从1 μ M开始)在4°C在FACS缓冲液中缔合30分钟。通过离心将细胞洗涤三次,并用1 μ g/ml单克隆小鼠 ANTI-FLAG[®] M2抗体(Sigma-Aldrich, F1804)在4°C探测30分钟,再次洗涤,并在4°C与5 μ g/ml R-藻红蛋白 AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG(Jackson Immunoresearch 115-116-071)温育30分钟。温育之后,用FACS缓冲液将细胞洗涤3次。随后,将细胞重悬于补充有5nM TOPRO3(Molecular Probes, T3605)的FACS缓冲液中,以区分活细胞和死细胞,其中死细胞在门控(gating)过程中被除去。使用FACS阵列流式细胞仪(BD Biosciences)和流动软件(Flowing

Software)分析细胞。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在获取期间计数10000个细胞。从该群体中排除TOPRO+细胞(死细胞),并计算中值PE值。

[1407] 结果显示在图3中。从剂量响应曲线获得的EC50值在表C-1中呈现。

[1408] 表C-1:抗TCR单价纳米抗体用于结合CHO-K1人TCR α/β (2XN9) -/CD3细胞和用于结合纯化的原代T细胞的EC50 (M),如在流式细胞术中所测定的。

样品 ID	CHO-K1 TCR α/β (2XN9)/CD3			原代人 T 细胞		
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T0170055A02	8.4E-09	7.2E-09	9.7E-09	9.1E-08	8.1E-08	1.0E-07
T0170056G05	8.9E-09	8.3E-09	9.4E-09	9.1E-08	8.3E-08	9.9E-08

[1410] 纳米抗体明显与CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3结合。纳米抗体也与纯化的原代人T细胞结合,尽管与CHO-K1人TCR α/β (2XN9) /CD3细胞相比具有略低的效力。

[1411] 实施例6:结合表位的确定

[1412] 如实施例5所述,在流式细胞术中,评价纯化的单价抗TCR纳米抗体与表达于HEK293H细胞上的人TCR α/β (2IAN) /CD3的结合,并将其与用人CD3转染的HEK293H细胞的结合进行比较。将开始于1 μ M的T0170055A02和T0170056G05的稀释系列应用于细胞。包括作为TCR/CD3阴性细胞系的亲本HEK293H细胞系。

[1413] 结果显示在图4中。从剂量响应曲线获得的EC50值描述于表C-2中。

[1414] 表C-2:抗-TCR单价纳米抗体用于结合在HEK293H细胞上表达的人TCR α/β (2IAN) /CD3或人CD3的EC50 (M),如在流式细胞术中所测定的。

样品 ID	HEK293H wt		HEK293H CD3		HEK293H TCR/CD3	
	EC50	1 μ M 的 MCF	EC50	1 μ M 的 MCF	EC50	1 μ M 的 MCF
T0170055A02	未拟合	246	未拟合	1194	5.5E-08	91229
T0170056G05	未拟合	299	未拟合	352	8.4E-08	86510

[1416] 纳米抗体明显与在HEK293H上表达的人TCR (2IAN) /CD3结合,但不与仅用人CD3转染的HEK293H细胞结合,也不与HEK293H亲本细胞系结合。总之,2个克隆与人TCR α/β 特异性结合。未观察到与人CD3的结合。

[1417] 实施例7:抗TCR纳米抗体与可溶性重组人TCR α/β 蛋白的结合

[1418] 7.1 ELISA中抗TCR纳米抗体与人T细胞受体蛋白的结合

[1419] 使用2 μ g/ml直接包被的可溶性重组人TCR α/β 蛋白,在ELISA(如实施例1.2中所述)中评估纯化的单价TCR纳米抗体与可溶性重组人TCR α/β 蛋白的结合。

[1420] 结果显示在图5中。从剂量响应曲线获得的EC50值描述于表C-3中。

[1421] 表C-3:抗TCR单价纳米抗体用于结合可溶性重组人TCR α/β (2XN9) 蛋白的EC50 (M),如ELISA中所测定的。

样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI
T0170055A02	1.9E-09	1.7E-09	2.2E-09

T0170056G05	4.0E-09	3.5E-09	4.6E-09
-------------	---------	---------	---------

[1423] 与可溶性重组人TCR α / β 蛋白结合的抗TCR纳米抗体。

[1424] 7.2 BLI中抗TCR纳米抗体与人T细胞受体蛋白的结合

[1425] 在Octet RED384仪器(Pall ForteBio Corp.)上使用Bio-Layer干涉测量法(BLI)测量结合亲和力。通过NHS/EDC偶联化学将重组人可溶性TCR α / β (2XN9) 拉链蛋白共价固定在胺反应性传感器(ForteBio)上。对于动力学分析,首先将传感器浸入运行缓冲液(10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.05% p20, pH7.4, 来自GE Healthcare Life Sciences)中以确定基线设定。随后,将传感器浸入含有不同浓度的纯化纳米抗体(范围在1.4nM和1mM之间)的孔中用于缔合步骤(180s),并转移至含有运行缓冲液的孔中用于解离(15分钟)步骤。使用ForteBio数据分析软件,应用1:1交互模型,计算亲和常数(KD)。

[1426] 结果如图6所示。结合特性列于表C-4中。

[1427] 表C-4:抗TCR单价纳米抗体用于结合可溶性重组人TCR α / β (2XN9) 蛋白的动力学分析,如用Octet RED384仪器所测定的。

样品 ID	人可溶性 TCR α / β (2XN9)拉链蛋白		
	kon(1/Ms)	koff(1/s)	KD (M)
T0170055A02	4.9E+04	8.4E-04	1.7E-08
T0170056G05	5.0E+04	1.2E-03	2.4E-08

[1429] 使用BLI对人可溶性TCR α / β (2XN9) 拉链蛋白确定的结合亲和力显示与在流式细胞术中对CHO-K1人TCR α / β (2XN9) /CD3细胞确定的亲和力的相关性(参见实施例5)。

[1430] 实施例8:抗TCR纳米抗体与重组食蟹猴可溶性TCR α / β 蛋白的结合

[1431] 8.1 ELISA中抗TCR纳米抗体与食蟹猴T细胞受体蛋白的结合

[1432] 使用2 μ g/ml直接包被的重组食蟹猴可溶性TCR α / β 拉链蛋白,在ELISA(如实施例1.2中所述)中评估纯化的单价抗TCR纳米抗体与重组食蟹猴可溶性TCR α / β 蛋白的结合。

[1433] 从剂量响应曲线获得的EC50值描述于表C-5中。示例性结果如图7所示。

[1434] 表C-5:抗TCR单价纳米抗体用于结合重组食蟹猴可溶性TCR α / β 拉链蛋白的EC50 (M),如ELISA中所测定的。

样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI
T0170055A02	1.6E-07	1.5E-07	1.7E-07
T0170056G05	7.7E-08	6.6E-08	9.1E-08

[1436] 结果表明,抗TCR纳米抗体与重组食蟹猴可溶性TCR α / β 拉链蛋白结合。

[1437] 8.2BLI中抗TCR纳米抗体与食蟹猴T细胞受体蛋白的结合

[1438] 在Octet RED384仪器(Pall ForteBio Corp.)上使用Bio-Layer干涉测量法(BLI)测量单价抗TCR纳米抗体的结合亲和力,基本上如实施例7.2中所述,使用重组食蟹猴可溶性TCR α / β 蛋白。

[1439] 结果如图8所示。抗TCR纳米抗体的结合特征列于表C-6中。

[1440] 表C-6:抗TCR单价纳米抗体用于结合重组食蟹猴可溶性TCR α / β 拉链蛋白的动力学分析,如用Octet RED384仪器所测定的。

样品ID	kon(1/Ms)	koff(1/s)	KD (M)
------	-----------	-----------	--------

T0170055A02	1.1E+05	2.4E-02	2.1E-07
T0170056G05	1.1E+05	1.6E-02	1.5E-07

[1442] 与重组人可溶性TCR α/β (2XN9) 拉链蛋白相比, 纳米抗体以10倍低的亲和力与重组食蟹猴可溶性TCR α/β 蛋白结合。

[1443] 实施例9: 纯化的原代人T细胞活化能力的确定

[1444] 在人T细胞活化测定中评价纯化的单价抗TCR纳米抗体的功能性。用单克隆小鼠 ANTI-FLAG[®] M2抗体 (Sigma-Aldrich, F1804, 15 μ g/1E7珠) 包被 Dynabeads[®] 山羊抗小鼠IgG (ThermoFisher Scientific, 11033)。在4 $^{\circ}$ C温育2小时后, 将Dynabeads[®]洗涤并与固定 (1 μ g) 量的纯化的Flag标记的纳米抗体在4 $^{\circ}$ C温育20分钟, 同时震荡。在将珠复合物与可溶性小鼠抗-CD28抗体 (Peliccluster CD28-Sanquin, M1650) 一起添加至从不同健康供体分离的纯化的原代人T细胞 (如实施例2.1中所述分离) 之前, 洗掉未偶联的纳米抗体。另外, 在没有事先捕获到抗小鼠IgG Dynabeads[®]上的情况下和在抗CD28抗体的存在下, 通过将纳米抗体与纯化的原代人T细胞温育来评价纳米抗体的单价TCR结合的效果。在37C和5% CO₂温育24小时后, 通过使用单克隆小鼠抗-人CD69PE (BD Biosciences, 557050) 在流式细胞术中测量CD69表达来监测纯化的原代人T细胞的活化状态。

[1445] 总之, 抗TCR纳米抗体在捕获到抗小鼠IgG Dynabeads[®]上之后显示出明显的CD69上调。无关的纳米抗体未显示任何CD69上调 (图9A)。此外, 溶液中呈现的纳米抗体均不能活化纯化的原代人T细胞, 如通过增加的CD69表达所测量的 (图9B)。

[1446] 实施例10: 用CD123免疫美洲驼、仅重链的抗体片段库的克隆及噬菌体的制备

[1447] 10.1免疫

[1448] 根据标准方案, 使用Stimune作为佐剂 (Cedi Diagnostics, Lelystad, The Netherlands) 通过颈部肌肉注射, 用人CD123的重组His-标记的细胞外结构域 (R&D Systems, 301-R3/CF) 免疫三只美洲驼。

[1449] 通过ELISA, 分析在第35天取得的免疫血清样品对吸附的hCD123的抗原特异性结合。所有美洲驼显示出优异的IgG 1介导的血清应答, 以及良好至中度的重链介导的针对hCD123的应答。

[1450] 10.2仅重链的抗体片段库的克隆及噬菌体的制备

[1451] 每只动物, 在最后一次注射免疫抗原后4和8天收集100mL血液样品。从这些血液样品中, 根据制造商的说明书 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) 使用Ficoll-Hypaque制备PBMC。对于每只免疫的美洲驼, 通过汇集从不同血液样品中分离的总RNA来构建文库。

[1452] 简而言之, 通过特定的限制性位点将PCR扩增的VHH库克隆到经设计用于促进VHH文库的噬菌体展示的噬菌粒载体中。载体来源于pUC119。与VHH编码序列同框, 载体编码C端3xFLAG和HIS6标签。根据标准方案 (参见例如WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551、WO 05/044858和其它现有技术和本文引用的Ablynx N.V. 递交的申请) 制备噬菌体。

[1453] 实施例11: 通过噬菌体展示选择CD123特异性VHH

[1454] 应用多种选择条件, 从所有美洲驼获得并克隆为噬菌粒文库的VHH库用于不同的

选择策略中。变量包括：i) CD123抗原的来源(在人细胞中产生的重组蛋白或在细胞上过表达的全长蛋白)，ii) 抗原呈递(当使用生物素化的重组胞外域时在溶液中，对于非生物素化的Fc融合胞外域直接包被在平板上)，和iii) 抗原浓度。

[1455] 简而言之，将过表达CD123(内部产生)、生物素化的人CD123(R&D Systems, 301-R3/CF, 内部生物素化)和板包被的人CD123-Fc(Sino Biologicals, 10518-H08H)的HEK293T细胞与不同文库的 2×10^6 噬菌体颗粒温育1小时-2小时，然后充分洗涤；用胰蛋白酶(1mg/mL)洗脱结合的噬菌体15分钟，然后通过应用0.8mM蛋白酶抑制剂ABSF立即中和蛋白酶活性。作为对照，平行进行具有亲本细胞系的选择或无抗原的选择。

[1456] 噬菌体输出用于感染大肠杆菌以分析单个VHH克隆。根据标准方案(参见例如WO 03/035694、WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551和其它现有技术和本文引用的Ablynx N.V.递交的申请)制备周质提取物。

[1457] 实施例12: 筛选结合CD123的纳米抗体

[1458] 12.1在结合ELISA中筛选

[1459] 在结合ELISA中，在人CD123(R&D Systems, 301-R3)上筛选周质提取物。为此，用人CD123(1 μ g/ml)包被微量滴定板，并在4 $^{\circ}$ C温育过夜。将平板在室温下用PBS中的4%Marvel封闭1小时。用PBS-Tween洗涤平板。将周质提取物(在具有2%Marvel的PBS中稀释1/10)在室温温育至少1小时。用PBS-Tween洗涤平板，然后用具有1%Marvel的PBS中的单克隆ANTI-FLAG M2-过氧化物酶(HRP)(Sigma, A8592, 1/5000)检测VHH的结合。用底物esTMB(Nalgene)进行染色，并在15分钟后于450nm测量信号。

[1460] 12.2在流式细胞术中筛选

[1461] 在96孔形式中，在流式细胞术测定中，在瞬时转染的HEK293T-hCD123细胞上筛选周质提取物。此外，评价与内源性表达IL-3R的MOLM-13细胞的结合，以确认在异二聚体受体复合物中IL-3R β 配偶体的存在下与IL-3R β 的结合。为此，将细胞(1×10^5 细胞/孔/0.1mL)与周质提取物(1:10稀释)在4 $^{\circ}$ C下在FACS缓冲液(来自Invitrogen的D-PBS, 具有来自Sigma的10%FBS, 和来自Merck的0.05%叠氮化钠)中温育30分钟。将细胞洗涤3次，并与1 μ g/ml单克隆ANTI-FLAG[®]M2抗体(Sigma-Aldrich, F1804)在4 $^{\circ}$ C温育30分钟，再次洗涤，并与山羊抗小鼠RPE标记的抗体(Jackson Immunoresearch, 115-116-071, 1:100)在4 $^{\circ}$ C温育30分钟。洗涤样品，与TOPRO3一起温育，以在FACS缓冲液中染色死细胞，并在FACSArray装置(BD)上评价荧光。

[1462] 12.3纳米抗体的测序分析

[1463] 将在结合ELISA和流式细胞术测定中评分为阳性的纳米抗体进行测序。序列分析导致了纳米抗体A0110056A10和A0110055F03及其不同家族成员的鉴定。分别在表A-2和表A-3中提供了相应的比对。

[1464] 针对A0110056A10的家族成员的CDR的序列可变性描述于下表中。

[1465] 表B-7

56A10	CDR1									
Kabat 编号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
[1466] 绝对编号	1	2	3*	4	5	6**	7	8	9	10
56A10 序列	G	I	T	S	K	I	N	D	M	G
变异			S			S	D	V		
变异			P					A		

[1467] *在位置3是S的情况下,则位置7是D。

[1468] **在位置6是I的情况下,则位置8是D。

[1469] 表B-8

56A10	CDR2								
Kabat 编号	50	51	52	53	54	55	56	57	58
[1470] 绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
56A10 序列	S	I	T	A	T	G	T	T	N
变异									

[1471] 表B-9

56A10	CDR3						
Kabat 编号	95	96	97	98	99	100	101
[1472] 绝对编号	1	2	3	4	5	6	7
56A10 序列	F	P	P	I	S	N	F
变异			A				

[1473] 针对A011005F03的家族成员的CDR的序列可变性描述于下表中。

[1474] 表B-10

55F03	CDR1									
[1475] Kabat 编号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
绝对编号	1	2	3*	4	5	6**	7	8	9	10
[1476] 55F03 序列	G	R	T	F	S	S	Y	V	M	G
变异										

[1477] 表B-11

55F03	CDR2									
Kabat 编号	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58
[1478] 绝对编号	1	2	3	4	5	6*	7	8	9	10
55F03 序列	A	I	Y	W	S	N	G	K	T	Q
变异			W			S				E

[1479] *在位置6是S的情况下,则位置10是E。

[1480] 表B-12

55F03	CDR3															
Kabat 编号	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	100h	101	102
[1481] 绝对编号	1	2	3	4*	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
55F03 序列	D	K	D	E	T	G	F	R	T	L	P	I	A	Y	D	Y
变异				R	D											
变异					Y											

[1482] *在位置4是R的情况下,则位置5是D或Y。

[1483] 12.4 单价纳米抗体的纯化

[1484] 选择每个家族的代表性纳米抗体,并在大肠杆菌TG1中表达为三联FLAG,His6-标记的蛋白。通过加入1mM IPTG诱导表达,并且让其在37℃继续4小时。在离心细胞培养物后,通过冻融沉淀制备周质提取物。将这些提取物用作起始材料,并且通过IMAC和尺寸排阻层析(SEC)纯化纳米抗体。将纳米抗体纯化至95%纯度,如通过SDS-PAGE评价的(数据未显示)。

[1485] 实施例13:用于表征的额外细胞系

[1486] 13.1 CD123转染的细胞系

[1487] 使用Flp-InTM定点重组技术(通过Flp重组酶介导的整合用于产生稳定的哺乳动物表达细胞系的Flp-InTM系统(Invitrogen,K601001,K601002))产生具有重组过表达CD123的稳定的HEK293Flp-In(Invitrogen,R750-07)和CHO Flp-In(Invitrogen,R758-07)细胞系。因此,通过来自于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的Flp重组酶(pOG44),在FRT(Flp重组靶标)位点处的特定基因组位置处发生DNA整合。Flp-InTM宿主细胞系和表达质粒(pcDNA5)都含有该FRT位点,从而允许单个同源DNA重组。人CD123的序列来源于NCBI RefSeq NP_002174,食蟹猴CD123的序列来源于NCBI genbank no.EHH61867.1(分别为SEQ ID NO:68和69)。使用小鼠单克隆抗CD123抗体(BD Biosciences,554527)和小鼠IgG2a同种型对照(BD Bioscience,16-4724-85),通过流式细胞术确认人和食蟹猴CD123的细胞表面表达。简而言之,收获细胞(1×10^5 个细胞/孔)并转移至V-底96孔板(Greiner Bio-one,651180),并在4℃用小鼠单克隆抗CD123抗体(0.25μg/ml)和小鼠IgG2a同种型对照(0.25μg/ml)染色。温育30分钟后,通过离心沉淀细胞,并用FACS缓冲液(来自Gibco的D-PBS,具有10%FBS(Sigma,F7524)和0.05%叠氮化钠(Acros organics,190380050))洗涤3次。接下

来,将细胞与5 μ g/ml R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG(Jackson Immunoresearch,115-116-071)在4 $^{\circ}$ C温育30分钟。温育后,用FACS缓冲液洗涤细胞3次。随后,将细胞重悬于补充有5nM TOPRO3(Molecular Probe,T3605)的FACS缓冲液中,以区分活细胞和死细胞。使用FACS阵列流式细胞仪(BD Biosciences)和流动软件(Flowing Software)分析细胞。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在获取期间计数10000个细胞。从该群体中排除TOPRO+细胞(死细胞),并计算中值PE值。数据如图10所示。

[1488] 13.2U937、MOLM-13、KG1a和NCI-H929细胞系

[1489] 在流式细胞术中,使用APC标记的小鼠单克隆抗CD123抗体(BD Biosciences,560087)和APC标记的同种型对照(Biolegend,400220)来测定MOLM-13(DSMZ,ACC-554)、U-937(ATCC[®],CRL-1593.2TM)、KG1a(ATCC[®],CCL246.1TM)和NCI-H929(DSMZ,ACC-163)上人CD123的表达水平。简言之,收获细胞,并以1 \times 10⁷个细胞/ml的密度悬浮于具有25 μ g人Fc block(BD Biosciences,564220)的FACS缓冲液中,并在室温下温育10分钟。接下来,将细胞稀释至1 \times 10⁶个细胞/ml的细胞浓度,并转移至V底96孔板(1 \times 10⁵个细胞/孔)。细胞在4 $^{\circ}$ C用APC标记的小鼠单克隆抗CD123抗体(稀释10倍)和APC标记的同种型对照(稀释10倍)染色。温育30分钟后,将细胞洗涤3次,并在4 $^{\circ}$ C下在补充有1 μ g/ml碘化丙锭(PI)(Sigma,P4170)的FACS缓冲液中重悬浮30分钟,然后通过BD FACSCanto和流动软件进行分析。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在P1内计数10000个细胞。从该群体中排除PI+细胞(死细胞),并计算中值APC值。数据如图11所示。

[1490] 另外,根据制造商的说明书,使用QIFIKIT(Dako,K0078)确定每个细胞的受体数。数据显示在表C-7中。

[1491] 表C-7:每个细胞的CD123分子数。

[1492]

	MOLM-13	KG1a
CD123分子/细胞	6543	3353

[1493] 实施例14:单价抗CD123纳米抗体与内源性CD123表达细胞系的结合

[1494] 通过流式细胞术,评价纯化的单价抗CD123纳米抗体与内源性CD123表达细胞系MOLM-13和KG1a的剂量依赖性结合。简言之,收获细胞并转移至V-底96孔板(1 \times 10⁵个细胞/孔),并使纳米抗体的连续稀释液(从1 μ M开始)在4 $^{\circ}$ C在FACS缓冲液中缔合30分钟。通过离心将细胞洗涤三次,并用单克隆小鼠ANTI-FLAG[®]M2抗体(Sigma-Aldrich,F1804)在4 $^{\circ}$ C下探测30分钟,再次洗涤,并在4 $^{\circ}$ C与5 μ g/ml R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG(Jackson Immunoresearch 115-116-071)温育30分钟。温育之后,用FACS缓冲液将细胞洗涤3次。随后,将细胞重悬于补充有5nM TOPRO3(Molecular Probe,T3605)的FACS缓冲液中,以区分活细胞和死细胞,其中死细胞在门控过程中被除去。使用FACS阵列流式细胞仪(BD Biosciences)和流动软件分析细胞。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在获取期间计数10000个细胞。从该群体中排除TOPRO+细胞(死细胞),并计算中值PE值

[1495] 纳米抗体与MOLM-13和KG1a的结合显示在图12中。从剂量响应曲线获得的EC50值描述于表C-8中。

[1496] 表C-8:单价抗CD123纳米抗体用于与MOLM-13和KG1a结合的EC50 (M),如在流式细胞术中所测定的。

样品 ID	MOLM-13			KG1a		
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A0110056A10	6.3E-10	3.8E-10	8.8E-10	5.0E-10	2.4E-10	7.6E-10
A0110055F03	>1E-07			>1E-07		

[1498] 两种纳米抗体与CD123内源表达细胞(MOLM-13、KG1a)结合。

[1499] 实施例15:单价抗CD123纳米抗体与转染细胞上CD123的结合

[1500] 通过流式细胞术,评价纯化的单价抗CD123纳米抗体与过表达人CD123的CHO-K1和过表达食蟹猴CD123的HEK293细胞的剂量依赖性结合。

[1501] 为了检测A0110055F03的结合,收获细胞并转移至V底96孔板(1×10^5 个细胞/孔)。将A0110055F03的连续稀释液(从100nM开始)在4°C下在FACS缓冲液中缔合30分钟。通过离心将细胞用FACS缓冲液洗涤3次,并用1 μ g/ml单克隆小鼠ANTI-FLAG[®] M2抗体(Sigma-Aldrich, F1804)在4°C探测30分钟,以检测结合的纳米抗体。用0.5 μ g/ml R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG(Jackson ImmunoResearch, 115-116-071)在4°C下进行30分钟检测。洗涤细胞并与TOPRO3一起温育以染色死细胞,其中死细胞随后在门控过程中被除去。然后通过BDFACSArray分析细胞。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在获取期间计数10000个细胞。从该群体中排除TOPRO+细胞(死细胞),并计算中值PE值。

[1502] 为了检测A0110056A10的结合,收获细胞并转移至V底96孔板(1×10^5 个细胞/孔)。将Alexa647标记的A0110056A10的连续稀释液(从100nM开始)在4°C下在FACS缓冲液中缔合30分钟。温育30分钟后,通过离心沉淀细胞并用FACS缓冲液洗涤3次。随后,将细胞重悬于补充有1 μ g/ml碘化丙锭的FACS缓冲液中,以区分活细胞和死细胞。使用FACS阵列流式细胞仪(BD Biosciences)和流动软件分析细胞。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在获取期间计数10000个细胞。从该群体中排除PI+细胞(死细胞),并计算中值APC值。

[1503] 对于纳米抗体A0110056A10和A0110055F03,纳米抗体与CD123转染的细胞系和参考细胞系的结合分别示于图13和图14中。从剂量响应曲线获得的EC50值描述于表C-9中。

[1504] 表C-9:单价抗CD123纳米抗体用于与huCD123和cyCD123转染的细胞结合的EC50 (M),如在流式细胞术中所测定的。

样品 ID	HEK Flp-In cyCD123 转染的细胞			CHO Flp-In huCD123 转染的细胞		
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A0110056A10	2.48E-09	1.90E-09	3.20E-09	9.74E-10	8.50E-10	1.11E-09
A0110055F03	2.53E-09	2.04E-09	3.14E-09	5.94E-09	1.00E-09	3.52E-08

[1506] 两种纳米抗体均与CD123转染的细胞系结合。两种纳米抗体都是人-食蟹猴CD123交叉反应的。

[1507] 实施例16:在流式细胞术中,纳米抗体竞争结合在细胞上表达的CD123

[1508] 为了研究CD123纳米抗体是否相互竞争,建立了纳米抗体竞争测定。为此,用Alexa647标记大批A0110056A10并冷冻。接下来,收获细胞并转移至V底96孔板(1×10^5 个细

胞/孔),并与纳米抗体的连续稀释液和固定浓度的A0110056A10-Alexa647(对于MOLM-13为0.7nM,对于CHOFlp-In人CD123为0.5nM)混合。测定中使用的A0110056A10-Alexa647浓度低于A0110056A10-Alexa647与各自细胞结合的EC50值(结合曲线描绘于图15中)。在4°C温育90分钟后,在流式细胞术中测定A0110056A10-Alexa647的结合。另外,洗涤细胞3次,并重悬于补充有1 μ g/ml碘化丙锭的FACS缓冲液中,在4°C温育30分钟,然后通过BDFACSArray进行分析。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在P1内计数10000个细胞。从该群体中排除PI+细胞(死细胞),并计算中值APC值。

[1509] 结果显示在图16中。从剂量响应曲线获得的IC₅₀值描述于表C-10中。

[1510] 表C-10:在A0110056A10纳米抗体竞争测定中,单价抗CD123纳米抗体的IC₅₀(M)。

样品 ID	MOLM-13			CHO Flp-In 人 CD123		
	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI
A0110056A10	1.4E-09	1.1E-09	1.8E-09	6.7E-09	5.3E-09	8.5E-09

A0110055F03	>1E-07			/	/	/
-------------	--------	--	--	---	---	---

[1513] 正如预期的那样,未标记的A0110056A10与A0110056A10-Alexa647竞争结合MOLM-13细胞上的CD123和转染的CHO Flp-In细胞上表达的人CD123。纳米抗体A0110055F03不与A0110056A10-Alexa647竞争结合人CD123转染的CHO Flp-In细胞上的CD123。在MOLM-13细胞系上,A0110055F03仅在测试的最高浓度下与A0110056A10-Alexa647竞争。

[1514] 实施例17:流式细胞术中,与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争结合细胞上表达的CD123

[1515] 为了检查抗CD123纳米抗体是否与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争结合细胞上的人CD123,使用如实施例16中所述的基于流式细胞术的方法进行小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争测定。为此,将纳米抗体的连续稀释液和EC30浓度的APC标记的小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)(BD Biosciences,560087)与细胞一起温育90分钟,之后在流式细胞术中确定抗体结合。APC标记的小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)与MOLM-13和人CD123转染的CHO Flp-In细胞的结合曲线描绘于图17中。

[1516] 竞争实验的结果显示在图18中。从剂量响应曲线获得的IC₅₀值描述于表C-11中。

[1517] 表C-11:小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争测定中,单价抗CD123纳米抗体的IC₅₀(M)。

样品 ID	MOLM-13			CHO Flp-In 人 CD123		
	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI
A0110056A10	1.1E-09	1.1E-09	1.2E-09	6.5E-09	6.1E-09	6.9E-09
A0110055F03	4.8E-07	1.8E-07	1.2E-06			

[1519] 在MOLM-13和人CD123转染的CHO Flp-In细胞上,纳米抗体A0110056A10显示与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争;因此,小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)和纳米抗体A0110056A10的表位至少部分重叠。在MOLM-13细胞上,A0110055F03与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争。在人CD123转染的CHO Flp-In细胞系上不存在与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)的竞争,这可能是纳米抗体A0110055F03对人CD123的较低亲和力的结果。

[1520] 实施例18:在ELISA中,与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争结合重组人CD123

[1521] 为了研究抗CD123纳米抗体是否与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争结合重组人CD123蛋白,使用基于ELISA的方法进行竞争测定。简言之,将小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)(BD Biosciences,554527)以1 μ g/ml包被在PBS中。在4 $^{\circ}$ C温育过夜后,在室温下用酪蛋白(在PBS中1%)封闭平板。接下来,加入单价抗CD123纳米抗体和4nM内部生物素化的CD123重组蛋白(R&D Systems,301-R3/CF)的连续稀释液,并在室温下在PBS+0.1%酪蛋白+0.05%Tween中温育1小时。内部生物素化的CD123重组蛋白的浓度基于EC30值,该EC30值是从内部生物素化的CD123重组蛋白与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)的结合获得的(结合曲线描绘于图19)。将未包被的小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)作为阳性对照,不相关的抗卵溶菌酶纳米抗体cAbLys作为阴性对照。使用Tecan Hydrospeed洗涤器,用PBS+0.05%Tween洗涤平板,在PBS+0.1%酪蛋白+0.05%Tween中,通过1 μ g/ml胞外过氧化物酶(extravidine peroxidase)(Sigma,E2886)检测7G3相关的生物素化CD123,然后用esTMB底物显色。用1M HCl终止反应,并使用Tecan Infinite M1000测量OD450nm处的吸收。

[1522] 结果显示在图20中。从剂量响应曲线获得的IC₅₀值描述于表C-12中。

[1523] 表C-12:7G3竞争ELISA中,单价纳米抗体A0110056A10的IC₅₀(M)。

样品ID	IC ₅₀ (M)	95%LCI	95%UCI
A0110056A10	3.1E-09	1.5E-09	6.5E-09

[1525] 在A0110056A10和小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)之间观察到竞争结合重组人CD123蛋白。A0110055F03不与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争结合重组人CD123蛋白。

[1526] 实施例19:单价抗CD123纳米抗体与人CD123蛋白的结合(SPR)

[1527] 在ProteOn XPR36仪器上,通过基于SPR的测定评价纯化的CD123特异性纳米抗体对人CD123的结合亲和力。此外,使用EDC和NHS化学,通过胺偶联将重组CD123(R&D Systems,301-R3-025/CF)固定在CM5芯片上。通过一步动力学方法将纯化的纳米抗体以不同浓度(4.2nM和1000nM之间)注射2分钟用于动力学分析。流速为45 μ l/min,ProteOn运行缓冲液(PBS,pH 7.4,0.005%Tween 20)用作运行缓冲液。1000nM样品的解离时间为15分钟。通过拟合1:1相互作用模型(Langmuir结合模型)进行缔合/解离数据的评价。

[1528] 表C-13:使用直接包被的人CD123蛋白,在Proteon中测定的单价抗CD123纳米抗体的结合特性。

样品ID	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
A0110056A10	5.3E+05	7.9E-04	1.5E-09
A0110055F03	2.5E+04	3.9E-03	1.6E-07

[1530] 单价抗CD123纳米抗体与人CD123结合的KD值与细胞上的结合数据相关。与A0110055F03相比,A0110056A10具有更好的亲和力。

[1531] 实施例20:CD123/TCR多特异性多肽和对照多肽的构建

[1532] 为了获得能够与T细胞接合的多肽,将CD123纳米抗体与抗TCR(T细胞受体)纳米抗体T0170056G05(SEQ ID NO:42)连接。后者是特异性结合TCR α / β 恒定结构域的纳米抗体。(参见由Ablynx N.V于2016年5月13日提交的题为“T cell recruiting polypeptides

based on TCR alpha/beta reactivity”的WO 2016/180969)。

[1533] T细胞接合多肽的治疗活性可以通过同时靶向肿瘤相关抗原上的多个表位来改善。肿瘤细胞不仅可以通过在治疗中下调靶向抗原来产生逃逸机制,而且还可以通过引入(点-)突变来产生逃逸机制。同时靶向抗原上的多个表位可能会降低产生肿瘤逃逸变体的可能性。此外,靶向单个抗原上的多个表位可以增加结合的亲和力(亲合力效应)。对于该多价肿瘤抗原靶向概念,对CD123抗原具有反应性的两个纳米抗体与针对TCR/CD3复合物的纳米抗体T0170056G05连接。

[1534] 各种纳米抗体的特定顺序在格式内变化。效应子和肿瘤纳米抗体与35GS接头遗传连接,随后根据标准方案在酵母菌毕赤酵母中表达(多特异性多肽)。平行地,通过用不相关的抗卵溶菌酶纳米抗体cAbLys或抗RSV纳米抗体RSV007B02(Q108L)替换一种或两种肿瘤反应性纳米抗体来产生无关多肽。

[1535] 产生的多肽列于表C-14中。

[1536] 表C-14:多特异性多肽的样品ID和描述。

[1537]

样品 ID	SEQ ID NO*	描述
T017000113	46	A0110055F03-35GS-cAbLys3(D1E,Q5V,A6E,Q108L)-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000114	47	A0110055F03-35GS-A0110056A10-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000115	48	A0110056A10-35GS-cAbLys3(D1E,Q5V,A6E,Q108L)-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000116	49	A0110056A10-35GS-A0110055F03-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000120	50	cAbLys3(D1E,Q5V,A6E,Q108L)-35GS-A0110055F03-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000121	51	cAbLys3(D1E,Q5V,A6E,Q108L)-35GS-A0110056A10-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000125	42	T0170056G05-HIS6
T017000126	52	A0110055F03(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-T0170056G05-A
T017000128	53	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-A
T017000129	54	T0170056G05(E1D)-35GS-RSV007B02(Q108L)-A
T017000130	55	A0110056A10(E1D)-35GS-A0110055F03-35GS-T0170056G05-A
T017000131	56	A0110056A10(E1D)-35GS-T0170056G05-A
T017000132	57	RSV007B02(E1D,Q108L)-35GS-T0170056G05-A
T017000134	58	A0110056A10(E1D)-35GS-T0170056G05-35GS-A0110055F03-A
T017000135	59	A0110055F03(E1D)-35GS-T0170056G05-35GS-A0110056A10-A
T017000138	60	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-A0110055F03-A
T017000139	61	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110055F03-35GS-A0110056A10-A

[1538] *SEQ ID NO对应于没有C端标签或Ala延伸的多特异性多肽的序列。

[1539] 实施例21:在流式细胞术中,A0110056A10和多特异性CD123/TCR多肽之间竞争结合细胞上表达的CD123

[1540] 如实施例16中所述,在A0110056A10竞争测定中评价CD123/TCR多特异性多肽与人或食蟹猴CD123的结合。在与MOLM-13和CHO Flp-InhuCD123细胞结合之后,评价与食蟹猴CD123转染的HEK Flp-In细胞的结合。

[1541] 为此,一批A0110056A10用Alexa647标记并冷冻。接下来,收获细胞并转移至V底96孔板(1×10^5 个细胞/孔),并与多特异性结合多肽的连续稀释液(从1 μ M开始)和固定浓度的A0110056A10-Alexa647混合。测定中使用的浓度(对于MOLM-13为0.4nM,对于CHO Flp-In人

CD123和HEK Flp-In食蟹猴CD123为0.9nM) 低于A0110056A10-Alexa647与各自细胞结合的EC50值(结合曲线描绘于图21中)。在4℃温育90分钟后,如实施例16所述,在流式细胞术中确定A0110056A10-Alexa647的结合。A0110056A10和T017000129分别作为阳性和阴性对照,。

[1542] 结果显示在图22中。从剂量响应曲线获得的IC₅₀值描述于表C-15和表C-16中。

[1543] 表C-15:在MOLM-13细胞上,A0110056A10纳米抗体竞争测定中CD123/TCR多特异性多肽和对照的IC₅₀(M)。

样品 ID	MOLM-13		
	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI
T017000121	2.6E-08	2.2E-08	3.1E-08
T017000128	3.1E-09	2.6E-09	3.6E-09
T017000138	3.5E-09	3.0E-09	4.1E-09
T017000139	3.7E-09	3.1E-09	4.4E-09
T017000116	1.8E-09	1.5E-09	2.2E-09
A0110056A10	1.1E-09	8.7E-10	1.3E-09

[1545] 表C-16:在CD123转染的细胞上,A0110056A10纳米抗体竞争测定中CD123/TCR多特异性多肽和对照的IC₅₀(M)。

样品 ID	HEK Flp-In cyCD123 转染的细胞			CHO Flp-In huCD123 转染的细胞		
	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI
T017000121	1.1E-07	9.6E-08	1.3E-07	2.3E-08	1.9E-08	2.7E-08
T017000128	3.1E-08	2.6E-08	3.6E-08	5.8E-09	5.4E-09	6.2E-09
T017000138	1.2E-08	1.0E-08	1.4E-08	3.6E-09	2.8E-09	4.6E-09
T017000139	1.1E-08	9.6E-09	1.3E-08	3.3E-09	2.7E-09	4.1E-09
T017000116	5.6E-09	4.8E-09	6.4E-09	1.6E-09	1.4E-09	1.9E-09
A0110056A10	7.0E-09	6.1E-09	8.1E-09	1.9E-09	1.7E-09	2.3E-09

[1547] 所有测试的多特异性多肽显示与人和食蟹猴CD123表达细胞结合,证实人食蟹猴CD123交叉反应。对于A0110056A10不在N端位置的多肽,观察到亲和力的小幅下降。

[1548] 实施例22:在流式细胞术中,T0170056G05和CD123/TCR多特异性多肽之间竞争结合细胞上表达的人TCR/CD3

[1549] 通过流式细胞术在T0170056G05竞争测定中,评价CD123/TCR多特异性多肽与人TCR/CD3的结合。为此,将大批T0170056G05用生物素标记并冷冻。接下来,收获CHO-K1人TCR/CD3表达细胞并转移至V底96孔板(1×10⁵个细胞/孔),并与多特异性结合多肽的连续稀释液(从1μM开始)和固定浓度的生物素化的T0170056G05在FACS缓冲液中混合。测定中使用的生物素化的T0170056G05的浓度(30nM) 低于与细胞结合的EC50值(数据未显示)。在4℃温育90分钟后,在流式细胞术中确定生物素化的T01700056G05纳米抗体的结合。此外,洗涤细胞3次,并在FACS缓冲液中重悬于链霉亲和素-PE(ebioscience,12-4317-87,1000倍稀释)中,并在4℃温育30分钟。然后,将细胞洗涤3次,并在FACS缓冲液+1μg/mlTOPRO(Molecular Probe,T3605)中于4℃重悬浮30分钟,然后通过BDFACSCanto进行分析。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在P1内计数10000个细胞。从该群体中排除TOPRO+细胞(死细胞),并计算中值PE值。将T0170056G05作为阳性对照。

[1550] 结果显示在图23中。从剂量响应曲线获得的 IC_{50} 值描述于表C-17中。

[1551] 表C-17:T0170056G05竞争测定中,CD123/TCR多特异性多肽和对照纳米抗体的 IC_{50} (M)。

[1552]

样品 ID	CHO-K1 huTCR/CD3		
	IC_{50} (M)	95% LCI	95% UCI
T017000138	5.9E-08	5.5E-08	6.4E-08
T017000139	4.9E-08	4.5E-08	5.2E-08
T017000129	1.8E-07	1.7E-07	1.9E-07
T017000128	5.7E-08	5.3E-08	6.1E-08
T017000116	>1E-07		
T0170056G05	5.5E-08	5.2E-08	5.9E-08

[1553] 证实了CD123/TCR多特异性多肽与细胞上表达的人TCR/CD3的结合。由于TCR纳米抗体的C端位置,观察到CD123/TCR多特异性多肽T017000116与单价TCR纳米抗体的亲和力下降。

[1554] 实施例23:流式细胞术中,T017000099和CD123/TCR多特异性多肽之间对在细胞上表达的食蟹猴TCR/CD3的竞争结合

[1555] 在流式细胞术中,在T01700099(二价T0170056G01,SEQ ID NO:337)竞争测定中,评价CD123/TCR多特异性多肽与食蟹猴TCR/CD3的结合。为此,收获HSC-F(JCRB,JCRB1164)食蟹猴TCR/CD3表达细胞并转移至V底96孔板(1×10^5 细胞/孔),并与CD123/TCR多特异性多肽的连续稀释液(从 $1 \mu\text{M}$ 开始)和500nM T01700099在FACS缓冲液中混合。在 4°C 温育90分钟后,通过离心将细胞用FACS缓冲液洗涤3次,并用 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 单克隆小鼠ANTI-FLAG[®]M2抗体(Sigma-Aldrich,F1804)在 4°C 探测30分钟,以检测结合的T01700099。用 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 别藻蓝蛋白(APC)AffiniPure山羊抗小鼠IgG(Jackson Immunoresearch,115-135-164)在 4°C 下进行检测30分钟。洗涤细胞并与碘化丙锭一起温育以染色死细胞,其中死细胞随后在门控过程中被除去。然后通过BD FACSArray分析细胞。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在获取期间计数10000个细胞。从该群体中排除PI+细胞(死细胞),并计算中值APC值。T017000125作为阳性对照。

[1556] 结果显示在图24中。从剂量响应曲线获得的 IC_{50} 值描述于表C-18中。

[1557] 表C-18:T017000099竞争测定中,CD123/TCR多特异性多肽和对照纳米抗体的 IC_{50} (M)。

[1558]

样品 ID	HSC-F		
	IC_{50} (M)	95% LCI	95% UCI
T017000125	3.7E-07	2.5E-07	5.3E-07
T017000128	6.3E-07	4.4E-07	8.8E-07
T017000129	5.2E-07	3.7E-07	7.2E-07
T017000138	4.4E-07	3.2E-07	6.2E-07
T017000139	6.4E-07	4.5E-07	9.2E-07

[1559] 对于在N端具有TCR结合纳米抗体的所有CD123/TCR多特异性多肽,观察到与食蟹猴TCR/CD3的结合。

[1560] 实施例24:单价纳米抗体和多特异性多肽与人CD123蛋白的结合 (SPR)

[1561] 在ProteOn XPR36仪器上,通过基于SPR的亲合力测定评价CD123/TCR多特异性多肽的结合亲和力。此外,使用EDC和NHS化学,通过胺偶联将重组CD123 (R&D Systems, 301-R3-025/CF) 固定在CM5芯片上。通过一步动力学方法将纯化的纳米抗体以不同浓度(在4.2nM和1000nM之间)注射2分钟用于动力学分析。1000nM样品的解离时间为15分钟。流速为45 μ l/min,ProteOn运行缓冲液(PBS, pH 7.4, 0.005% Tween20) 用作运行缓冲液。通过拟合1:1相互作用模型(Langmuir结合模型)进行缔合/解离数据的评价。结合特性列于表C-19中。

[1562] 表C-19:使用直接包被的人CD123蛋白,在Proteon中测定的多特异性多肽的结合特性。

样品 ID	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	
T017000120	1.5E+04	2.5E-03	1.7E-07	由于先前多肽的不完全再生(T017000116), 数值仅作参考
T017000121	4.0E+04	8.6E-04	2.2E-08	-
[1563] T017000113	2.0E+04	3.2E-03	1.6E-07	
T017000115	3.3E+05	5.1E-04	1.5E-09	由于先前多肽的不完全再生(T017000114), 数值仅作参考
T017000114	8.4E+04	1.9E-04	2.3E-09	
T017000116	2.4E+05	2.1E-04	8.8E-10	

[1564] 单价纳米抗体和多特异性多肽对人IL-3R α 的KD与细胞上的结合数据相关。含有两个IL-3R α 结构单元的多肽T017000116具有最佳的KD。

[1565] 实施例25:在基于流式细胞术的测定中,通过CD123/TCR多特异性多肽,重定向人T细胞介导的CD123靶细胞的杀伤

[1566] 为了评价CD123/TCR多特异性多肽是否能够杀死肿瘤细胞,用分离的人T细胞作为效应细胞进行细胞毒性测定。

[1567] 此外,使用RosetteSep (StemCell Technologies, 15061) 从来自健康志愿者的血沉棕黄层 (Buffy Coat) 血液 (根特血库) 中收集人T细胞,然后根据制造商的说明书在Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare #17-1440-03) 上富集。在流式细胞术测定中,用抗CD3 (eBioscience, 12-0037-73)、抗CD8 (BDBiosciences, 555367)、抗CD4 (BD Biosciences, 345771)、抗CD45R0 (BD Biosciences, 555493)、抗CD45RA (BDBiosciences, 550855)、抗CD19 (BDBiosciences, 555413)、抗CD25 (BDBiosciences, 557138) 和抗CD69 (BDBiosciences, 557050) 荧光标记的抗体检查纯化的人T细胞的质量和纯度。将细胞在液氮中冷冻。

[1568] 使用PKH26红色荧光细胞接头试剂盒 (Sigma, PKH26GL-1KT), 根据制造商的说明,将表达人CD123的MOLM-13和KG1a细胞用8 μ M PKH-26膜染料标记,并用作靶细胞。将2.5 \times 10⁵效应细胞(即人原代T细胞)和2.5 \times 10⁴靶细胞(即PKH标记的MOLM-13或KG1a细胞)在96孔V底板中共温育(效应细胞与靶细胞比例为10:1)。为了测量浓度依赖性细胞溶解,将CD123/TCR多特异性多肽的连续稀释液加入细胞中,并在5%CO₂环境中于37 $^{\circ}$ C温育18小时。将纳米抗体A0110056A10和多肽T017000129和T017000132作为阴性对照。温育后,通过离心沉淀细胞并用FACS缓冲液洗涤。随后,将细胞重悬于补充有5nM TOPRO3 (Molecular Probe, T3605) 的FACS缓冲液中,以区分活细胞和死细胞。使用FACS阵列流式细胞仪 (BD Biosciences) 分

析细胞。每个样品,获得80 μ l的总样品体积。在PKH26阳性细胞上设定门控,并在该群体内测定TOPRO3阳性细胞。将T017000129、T017000132和A0110056A10作为阴性对照。

[1569] 对于MOLM-13和KG1a细胞,示例性结果分别显示在图25和图26中。对于MOLM-13和KG1a细胞,EC₅₀值分别描述于表C-20和表C-21中。

[1570] 表C-20:在基于流式细胞术的测定中,重定向的人T细胞介导的MOLM-13细胞杀伤的CD123/TCR多特异性多肽的EC50 (M) 和%溶解。

[1571]

样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI	%溶解
T017000116	2.2E-10	1.1E-10	4.5E-10	17
T017000128	1.5E-10	9.4E-11	2.5E-10	20
T017000135	1.1E-11	8.1E-12	1.5E-11	33
T017000138	2.3E-11	1.5E-11	3.7E-11	22
T017000139	2E-11	1.4E-11	2.9E-11	29
T017000134	3E-10	1E-10	9.2E-10	9

[1572] 表C-21:在基于流式细胞术的测定中,重定向的人T细胞介导的KG1a细胞杀伤的CD123/TCR多特异性多肽的EC50 (M) 和%溶解。

[1573]

样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI	%溶解
T017000114	2.4E-10	1.5E-10	3.6E-10	7
T017000116	4.2E-10	2.4E-10	7.3E-10	5
T017000128	8.7E-10	7.0E-10	1.1E-09	28
T017000135	5.1E-11	4.1E-11	6.5E-11	18
T017000138	2.8E-10	2.2E-10	3.4E-10	24
T017000139	1.1E-10	8.5E-11	1.3E-10	27

[1574] CD123/TCR多特异性多肽诱导人T细胞介导的CD123阳性细胞系的杀伤。显然优选TCR纳米抗体在多特异性多肽中的位置。通常,在N端位置具有抗TCR纳米抗体的多肽显示出最佳的杀伤潜力。与仅具有一个CD123纳米抗体的多肽T017000128相比,具有两个CD123反应性纳米抗体的多肽T017000135、T017000138和T013700139显示出改善的效力。这些结果证明CD123/TCR多特异性多肽可以诱导T细胞介导的肿瘤靶标阳性细胞系的杀伤,并且在单个抗原上靶向多个表位改善了功能性(亲合力效应)。

[1575] 此外,多肽T017000138和T017000139(均是在N端位置具有TCR反应性纳米抗体的三价多肽)的比较显示了CD123纳米抗体的取向对效力和功效有影响。

[1576] 单价CD123结构单元和含有TCR结构单元的无关多肽不诱导任何靶细胞杀伤,证实需要将T细胞和靶细胞与多特异性CD123/TCR多肽交联以诱导杀伤。

[1577] 使用来自不同供体的纯化的T细胞确认结果(数据未显示)。

[1578] 实施例26:在基于流式细胞术的测定中,通过多特异性CD123/TCR多肽,重定向的食蟹猴T细胞介导的CD123靶细胞的杀伤

[1579] 为了证实CD123/TCR多特异性多肽的人-食蟹猴TCR交叉反应性,在食蟹猴T细胞介导的CD123阳性肿瘤细胞杀伤测定中评价多肽。简言之,在 2.5×10^5 效应细胞(即食蟹猴原代T细胞)存在下,将多特异性多肽与 2.5×10^4 PKH标记的靶细胞(即MOLM-13或KG1a细胞)温育,对应于效应细胞与靶细胞的比率(E:T比率)为10:1,如实施例25中所述。使用Pan T细胞分

离试剂盒 (MACS, 130-091-993), 通过 Pharmacology and Toxicology GmbH&Co.KG 的 LPT 实验室将 T 细胞分离。将纳米抗体 A0110056A10 和多肽 T017000129 和 T017000132 作为阴性对照。

[1580] 对于 MOLM-13 和 KG1a 细胞, 示例性结果分别显示在图 27 和图 28 中。对于 MOLM-13 和 KG1a 细胞, EC_{50} 值分别描述于表 C-22 和表 C-23 中。

[1581] 表 C-22: 在基于流式细胞术的测定中, 重定向的食蟹猴 T 细胞介导的 MOLM-13 细胞杀伤的 CD123/TCR 多特异性多肽的 EC_{50} (M) 和 % 溶解。

	样品 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	% 溶解
[1582]	T017000116	3.9E-10	2.4E-10	6.2E-10	15
	T017000128	1.8E-10	1.5E-10	2.3E-10	50
[1583]	T017000138	1.7E-11	1.3E-11	2.2E-11	47
	T017000139	1.1E-11	8.9E-12	1.4E-11	55

[1584] 表 C-23: 在基于流式细胞术的测定中, 重定向的食蟹猴 T 细胞介导的 KG1a 细胞杀伤的 CD123/TCR 多特异性多肽的 EC_{50} (M) 和 % 溶解。

	样品 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	% 溶解
[1585]	T017000114	1.9E-10	1.3E-10	2.8E-10	7
	T017000116	3.7E-10	2.9E-10	4.7E-10	14
	T017000128	3.2E-10	2.7E-10	3.7E-10	38
	T017000135	2.4E-11	2.0E-11	2.9E-11	22
	T017000138	8.8E-11	7.6E-11	1.0E-10	38
	T017000139	2.6E-11	2.3E-11	3.0E-11	42

[1586] 除 T017000134 外, 所有 CD123/TCR 多特异性多肽均诱导食蟹猴 T 细胞介导的 CD123 阳性 MOLM-13 或 KG1a 细胞系的杀伤。在 N 端位置具有 TCR 反应性纳米抗体的多肽是最有效力或功效的。与含有仅一个 CD123 反应性纳米抗体的多肽 T017000128 相比, 多肽 T017000138 和 T017000139 (均为具有两个 CD123 反应性纳米抗体的三价多肽) 均显示出改善的效力。单价抗 CD123 纳米抗体和含有 TCR 结构单元的无关多肽不诱导任何靶细胞杀伤, 证实需要将 T 细胞和靶细胞与多特异性 CD123/TCR 多肽交联以诱导杀伤。

[1587] 使用来自不同食蟹猴的纯化的 T 细胞确认结果 (数据未显示)。

[1588] 实施例 27: 在重定向的食蟹猴 T 细胞介导的 CD123 靶细胞杀伤期间, 通过 CD123/TCR 多特异性多肽的食蟹猴 T 细胞活化

[1589] 为了监测用多特异性 CD123/TCR 多肽处理食蟹猴 T 细胞和 CD123 阳性 MOLM-13 细胞后的 T 细胞活化, 在 2.5×10^5 原代 T 存在的情况下, 将多肽与 2.5×10^4 个靶细胞在 37°C 温育 72 小时 (E:T=10:1), 如实施例 26 中所述。在流式细胞术中, 通过监测 CD4/CD8 T 细胞群上的 CD25 上调来测量食蟹猴 T 细胞活化。

[1590] 另外, 在 72 小时温育后, 通过离心收集效应细胞和靶细胞, 并将其悬浮在含有 $25 \mu\text{g/ml}$ 人 Fc block (BD Bioscience, 564220) 的 FACS 缓冲液中, 并在室温 (RT) 温育 10 分钟。接下来, 在 FACS 缓冲液中, 用单克隆小鼠抗 CD4-APC (Biolegend, 300505) (200 倍稀释)、单克隆小鼠抗 CD8APC (BDBiosciences, 555366) (50 倍稀释) 和单克隆抗 CD25PE (BD Biosciences,

557138) (50倍稀释) 抗体在4℃下将细胞染色30分钟。温育后,通过离心沉淀细胞并用FACS缓冲液洗涤。随后,将细胞重悬于FACS缓冲液中,并使用FACS Canto流式细胞仪(BD Biosciences)进行分析。每个样品,获得30 μ l的总样品体积。基于SSC-APC图对T细胞进行门控。从该群体中计算平均PE值。

[1591] 数据显示在图29中。对于T017000139获得的EC₅₀值描述于表C-24中。

[1592] 表C-24:在基于流式细胞术的测定中,在重定向的食蟹猴T细胞介导的MOLM-13细胞杀伤期间,通过T017000139,食蟹猴T细胞上CD25上调的EC50 (M)。

样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI
T017000139	6.0E-11	5.1E-11	7.1E-11

[1594] 当T细胞与CD123阳性MOLM-13靶细胞和单价TCR或CD123结合结构单元T0170056G05、A0110055F03或A0110056A10或无关多价多肽T017000129一起温育时,未观察到CD25上调。在与CD123阳性MOLM-13靶细胞和T017000139多特异性多肽温育后,数据显示食蟹猴原代T细胞上的CD25上调。

[1595] 以剂量依赖性方式杀死MOLM-13细胞(图25,表C-22),表明了多特异性CD123/TCR结合多肽在重定向杀伤期间诱导T细胞活化。

[1596] 同样地,当与靶细胞和单价结构单元和不相关的多特异性多肽一起温育时,T细胞未被活化,这表明需要将T细胞和靶细胞与TCR/CD123多特异性多肽交联以诱导CD25上调。

[1597] 实施例28:在基于xCELLigence的测定中,通过多特异性CD123/TCR结合多肽,重定向的人T细胞介导的CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤

[1598] 在基于xCELLigence的测定中,表征TCR/CD123结合多肽用于重定向的人T细胞介导的人CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤。在该测定中,测量由靶细胞粘附到电极表面诱导的阻抗的波动。T细胞是非粘附的,因此不会影响阻抗测量。xCELLigence仪器(Roche)定量电阻抗的变化,将它们显示为称为细胞指数的无量纲参数,其与细胞覆盖的组织培养孔的总面积成正比。简言之,将xCELLigence站置于37℃的5%CO₂培养箱中。将50 μ l测定培养基加入到E-平板96(ACEA Biosciences;05232368001)的每个孔中,并在xCELLigence系统上进行空白读数,以测量不存在细胞时的背景阻抗。随后,将2 \times 10⁴人CD123转染的CHO Flp-In或CHO Flp-In参照细胞接种到E-板96上,并加入50 μ l连续稀释的多特异性多肽。在室温下30分钟后,每孔加入50 μ l人T细胞(3 \times 10⁵),以具有15:1的效应细胞与靶细胞比率。将平板置于xCELLigence站中,每15分钟测量阻抗,持续3天。使用结果中指示的固定时间点分析数据。

[1599] 在该测定中获得的IC₅₀值列于表C-25中。结果描绘于图30、图31和图32中。

[1600] 表C-25:在基于xCELLigence的测定中,使用15比1效应细胞比靶细胞比率,在接种后50小时进行分析,用于重定向的人T细胞介导的人CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤的T013700139的IC₅₀ (M)。

样品ID	IC ₅₀ (M)	95%LCI	95%UCI
T017000139	2.4E-10	2.0E-10	2.8E-10

[1602] 获得的数据证实了在基于流式细胞术的杀伤测定中获得的结果,即CD123/TCR多特异性多肽可以诱导人T细胞介导的CD123阳性细胞系的杀伤(图30),并且在不存在T细胞的情况下没有观察到杀伤活性(图32)。此外,仅当存在CD123肿瘤靶抗原时,才观察到T细胞

介导的杀伤(参见图31,用参考细胞系没有杀伤),表明多特异性多肽严重依赖于其用于诱导细胞毒性的靶标。

[1603] 单价纳米抗体A0110056A10和T0170056G05以及无关多肽T017000129不诱导靶细胞杀伤,证实需要将T细胞和靶细胞与多特异性CD123/TCR结合多肽交联以诱导杀伤。

[1604] 使用来自不同供体的纯化的T细胞确认结果(数据未显示)。

[1605] 实施例29:在基于xCELLigence的测定中,通过多特异性CD123/TCR结合多肽,重定向的食蟹猴T细胞介导的CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤

[1606] 为了证实多特异性多肽的交叉反应性,如实施例28中所述,在基于xCELLigence的测定中,在重定向的食蟹猴T细胞介导的食蟹猴CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤中评价所述多肽。

[1607] 在该测定中获得的IC₅₀值列于表C-26中。结果描绘于图33、图34和图35中。

[1608] 表C-26:在基于xCELLigence的测定中,使用15比1的效应细胞比靶细胞比率,在接种后80小时进行分析,用于重定向的食蟹猴T细胞介导的食蟹猴CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤的T013700139的IC₅₀(M)。

样品ID	IC ₅₀ (M)	95%LCI	95%UCI
T017000139	1.1E-11	2.7E-12	4.8E-11

[1610] CD123/TCR多特异性多肽T017000139可诱导食蟹猴T细胞介导的CD123阳性细胞系的杀伤(图33),并且在不存在T细胞时未观察到杀伤活性(图35)。此外,仅当存在食蟹猴CD123肿瘤靶抗原时,才观察到T细胞介导的杀伤(图34),这表明多特异性多肽严重依赖于其用于诱导细胞毒性的靶标。

[1611] 单价纳米抗体A0110056A10和T0170056G05以及无关多肽T017000129不诱导靶细胞杀伤,证实需要将T细胞和靶细胞与多特异性CD123/TCR结合多肽交联以诱导杀伤。

[1612] 在基于xCELLigence的杀伤测定中证实了多特异性多肽T017000139的人-食蟹猴CD123和TCR交叉反应性。

[1613] 使用来自不同供体的纯化的T细胞确认结果(数据未显示)。

[1614] 实施例30:重定向杀伤期间,多特异性CD123/TCR结合多肽对细胞因子产生的影响

[1615] 基于xCELLigence测定,在人和食蟹猴T细胞介导的CD123杀伤期间,监测细胞因子释放的诱导。通过ELISA测量细胞因子IFN- γ 和IL-6的释放。简言之,在存在纯化的人或食蟹猴原代T细胞(3×10^5 细胞/孔)和多特异性TCR/CD123结合多肽连续稀释液(从125nM开始)或固定浓度(125nM)的无关多肽的情况下,将人CD123转染的CHO-K1细胞(2×10^4 细胞/孔)接种在E-平板96中,如实施例28中所述。在将人或食蟹猴原代T细胞/多肽加入平板后72小时,在上清液中测量通过人原代T细胞的人IFN- γ 和人IL-6的产生和通过食蟹猴原代T细胞的食蟹猴IFN- γ 产生。

[1616] 根据制造商的说明书,使用人IL-6Quantikine ELISA试剂盒(R&D systems, D6050)在ELISA中测量人IL-6的释放。如下测定IFN- γ 的释放:Maxisorp 96孔ELISA板(Nunc)分别用抗人IFN- γ 抗体(BDBiosciences, 551221)、抗食蟹猴IFN- γ 抗体(Biolegend, 507502)包被。温育过夜后,洗涤板并用PBS+2%BSA在室温下封闭1小时。接下来,将平板与100 μ l上清液(2倍稀释)和1 μ g/ml生物素化的抗IFN- γ 抗体(BD Biosciences, 554550)温育2小时30分钟,同时摇动,再次洗涤并与链霉亲和素-HRP(Dakocytomation,

P0397)温育。30分钟后,加入TMB One溶液(Promega,G7431)。用2M H_2SO_4 终止反应,并使用Tecan sunrise 4通过测量405nm处的OD来确定IFN- γ 的多肽剂量依赖性产生。

[1617] IFN- γ 的结果显示在图36中。IL-6的结果显示在图37中。在这些测定中获得的EC50值列于表C-27和表C-28中。

[1618] 表C-27:在基于xCELLigence的测定中,在重定向的T细胞介导的CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤期间,用于IFN- γ 分泌的TCR/CD123结合多肽的EC50(M)。

样品 ID	人 T 细胞			食蟹猴 T 细胞		
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000128	8.6E-11	6.6E-11	1.1E-10	1.0E-10	3.7E-11	2.9E-10
T017000135	2.0E-09	1.3E-09	3.1E-09	/	/	/
T017000138	4.0E-10	2.3E-10	7.0E-10	8.7E-10	2.1E-10	3.6E-09
T017000139	1.0E-09	5.9E-10	1.9E-09	2.3E-09	7.8E-10	6.6E-09
T017000116	8.1E-09	4.6E-09	1.4E-08	/	/	/

[1620] 表C-28:在基于xCELLigence的测定中,在重定向的人T细胞介导的CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤期间,用于人IL-6分泌的TCR/CD123结合多肽的EC50(M)。

样品 ID	人 T 细胞		
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000128	6.9E-11	3.8E-11	1.3E-10
T017000135	5.9E-10	3.0E-10	1.2E-09
T017000138	3.8E-11	1.8E-11	8.1E-11
T017000139	4.8E-10	2.6E-10	9.0E-10
T017000116	9.6E-09	5.6E-09	1.6E-08

[1622] 当过表达CD123的CHO Flp-In细胞和原代T细胞与CD123/TCR结合多肽温育时,观察到细胞因子的产生。无关多肽T017000129和T017000132不诱导细胞因子产生。

[1623] 实施例31:在健康PBMC中,通过多特异性CD123/TCR多肽,重定向的自体T细胞浆细胞样树突细胞(pDC)和嗜碱性粒细胞的消耗

[1624] 将冷冻保存的外周血单核细胞(PBMC)解冻并用测定培养基(RMPI1640+10%FBS)洗涤。在96孔V底平板中,将 2×10^5 个PBMC与多特异性多肽的连续稀释液在200 μ L测定培养基中温育,并在37 $^{\circ}$ C在5%CO₂培养箱中温育。在指定的时间点,在4 $^{\circ}$ C将细胞用单克隆小鼠抗CD14-APC(Biolegend,301808)、抗CD16-APC(Biolegend,302012)、抗CD19-APC(Biolegend,302212)、抗CD20-APC(Biolegend,302312)、抗CD56-APC(Biolegend,318310)、抗CD123-PE(Biolegend,306006)和抗HLA-DR-FITC(Biolegend,307603)抗体染色。简而言之,收获细胞并用FACS缓冲液(来自Gibco的D-PBS,具有来自Sigma的10%FBS和来自Merck的0.05%叠氮化钠)洗涤一次,并在室温下重悬于0.5 μ g/ml的25 μ l人BD Fc Block(BD Biosciences,564220,1000倍稀释)中10分钟。接下来,加入25 μ l抗体,并根据制造商的说明在4 $^{\circ}$ C下温育30分钟。将含有PBMC的单独孔重悬于补充有5nM TOPRO3(Molecular Probe, T3605)的FACS缓冲液中,以区分活细胞群和死细胞群。将样品洗涤3次,重悬于FACS缓冲液(来自Gibco的D-PBS,具有来自Sigma的10%FBS和来自Merck的0.05%叠氮化钠)中,然后通过装备有FACS Diva软件的FACS Canto(BD)细胞计数器进行分析。每个样品,获得75 μ l的总样品

体积。使用FACS Diva和流动软件进行数据分析。

[1625] 基于含有TOPRO染色的孔,设定门控以排除死细胞。将人和食蟹猴pDC和嗜碱性粒细胞鉴定为谱系标记物(CD16、CD20、CD19、CD56)阴性/CD123阳性群体。

[1626] 结果描绘于图38中。

[1627] 在5小时的温育时间后,观察到CD123/TCR多特异性多肽分别对人或食蟹猴CD123阳性群体的消耗。当靶向纳米抗体被无关的纳米抗体取代时,未观察到CD123阳性群体的消耗,表明需要将T细胞和靶细胞与TCR/CD123多特异性多肽交联以诱导消耗。

[1628] 使用来自3个不同人供体的PBMC和来自2个不同食蟹猴的PBMC重复测定,证实了TCR/CD123多特异性多肽的功能性。

[1629] 实施例32:在健康人PBMC样品中,通过多特异性CD123/TCR结合多肽,重定向的自体人T细胞单核细胞的消耗

[1630] 为了评估单核细胞的消耗,如上所述进行测定,使用冷冻保存的人PBMC,将其解冻并用测定培养基(RMPI 1640+10%FBS)洗涤,并与多特异性多肽的连续稀释液温育5小时或24小时。如上所述进行细胞染色。单核细胞被鉴定为CD14+群体。

[1631] 结果描绘于图39中。

[1632] 温育5小时后,对于TCR/CD123多特异性多肽和不相关的纳米抗体,未观察到单核细胞消耗。24小时后,对于TCR/CD123多特异性多肽观察到单核细胞消耗,而对于无关多肽未观察到单核细胞消耗。使用来自3个不同供体的PBMC重复测定,证实了TCR/CD123多特异性多肽的功能性。

[1633] 实施例33:在健康人PBMC样品中,在重定向T细胞杀伤自体CD123阳性细胞期间,多特异性CD123/TCR结合多肽对人T细胞的活化。

[1634] 为了表征在TCR/CD123多特异性多肽介导的消耗期间T细胞的活化,如上所述进行自体PBMC测定,并在温育24小时后通过测量CD69的上调来监测人T细胞的活化状态。简言之,在24小时的温育时间后,将细胞用单克隆小鼠抗CD3-FITC抗体(BD Biosciences, 555332)在4℃染色30分钟以鉴定人T细胞,和用单克隆小鼠抗人CD69-PE抗体(BD Biosciences, 557050)在4℃染色30分钟以评估T细胞活化。将细胞洗涤3次,重悬于FACS缓冲液(来自Gibco的D-PBS,具有来自Sigma的10%FBS和来自Merck的0.05%叠氮化钠)中,然后通过装备有FACS Diva软件的FACS Canto(BD)细胞计数器进行分析。每个样品,获得75μl的总样品体积。使用FACS Diva和流动软件进行数据分析。

[1635] 示例性结果显示在图40中。

[1636] 当PBMC与多特异性CD123/TCR结合多肽温育时,数据显示人CD3+T细胞上CD69的剂量依赖性上调。与单价纳米抗体或不相关多肽温育不会导致CD69上调。

[1637] 实施例34:在基于流式细胞术的测定中,用于重定向的T细胞介导的CD123靶细胞杀伤的无关多肽的表征

[1638] 为了评估TCR纳米抗体T0170056G05的安全性,如在实施例25和26中所描述的,使用10:1的E:T比率,在重定向的T细胞介导的靶标杀伤测定中进行无关多肽(单价纳米抗体和多价多肽T017000129)的深入分析。将多肽T017000139作为阳性对照。

[1639] 使用KG1a靶细胞的结果显示在图41中,使用MOLM-13的结果显示在图42中。获得的EC50值列于表C-29和表C-30中。

[1640] 表C-29:在基于流式细胞术的测定中,用于重定向的T细胞介导的CD123阳性KG1a细胞杀伤的T017000139的EC50 (M)。

[1641] 样品 ID	人 T 细胞			食蟹猴 T 细胞		
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	8.1E-11	7.4E-11	8.9E-11	1.7E-11	9.7E-12	3.1E-11

[1642] 表C-30:在基于流式细胞术的测定中,用于重定向的T细胞介导的CD123阳性MOLM-13细胞杀伤的T017000139的EC50 (M)。

[1643] 实验1

[1644] 样品 ID	食蟹猴 T 细胞		
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	6E-11	5.1E-11	7.1E-11

[1645] 实验2

[1646] 样品 ID	人 T 细胞			食蟹猴 T 细胞		
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	3.0E-11	1.9E-11	4.7E-11	3.1E-11	1.9E-11	5.1E-11

[1647] 当使用人和食蟹猴T细胞时,阳性对照T017000139表现如预期。单价结构单元和无关多肽T017000129 (CD123结构单元均被不相关的结构单元替换) 均未诱导CD123阳性细胞的杀伤,证实了TCR/CD123多特异性多肽的特异性。

[1648] 实施例35:在人重定向杀伤期间,多特异性CD123/TCR结合多肽对细胞因子产生的影响

[1649] 基于基于FACS的读数,在人T细胞介导的CD123杀伤测定期间,监测细胞因子释放的诱导。通过ELISA测量人细胞因子IFN- γ 和IL-6的释放。简言之,如实施例25中所述,在存在纯化的人原代T细胞(3×10^5 个细胞/孔)和多特异性TCR/CD123结合多肽或无关多肽的连续稀释液的情况下,将MOLM-13或KG1a接种在V底96孔板(2×10^4 细胞/孔)中。如实施例30中所述,在将人原代T细胞/多肽加入平板中72小时后,测量上清液中人原代T细胞的人IFN- γ 和IL-6的产生。

[1650] 结果显示在图43A、43B和43C中。在该测定中获得的EC50值列于表C-31和表C-32中。

[1651] 表C-31:在基于流式细胞术的测定中,在重定向的人T细胞介导的CD123阳性MOLM-13或KG1a细胞杀伤期间,用于人IFN- γ 分泌的TCR/CD123结合多肽的EC50 (M)。

[1652] 样品 ID	MOLM-13			KG1a		
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	3.4E-10	2.5E-10	4.6E-10	3.2E-11	1.9E-11	5.4E-11

[1653] 表C-32:在基于流式细胞术的测定中,在重定向的人T细胞介导的CD123阳性MOLM-13细胞杀伤期间,用于人IL-6分泌的TCR/CD123结合多肽的EC50 (M)。

[1654] 样品ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	2.3E-11	1.5E-11	3.5E-11

[1655] 当MOLM-13或KG1a细胞和人原代T细胞与CD123/TCR结合多肽一起温育时,观察到细胞因子产生。无关多肽T017000129不诱导细胞因子产生。

[1656] 实施例36:使用CD123阴性细胞系,在基于流式细胞术的测定中,用于多特异性CD123/TCR结合多肽的靶标独立的重定向的人或食蟹猴效应T细胞杀伤的表征

[1657] 为了评价多特异性多肽的CD123独立的重定向杀伤,在基于流式细胞术的杀伤测定中评价CD123阴性U-937和NCI-H929细胞系。根据制造商的说明,使用PKH26红色荧光细胞接头试剂盒(Sigma,PKH26GL-1KT),将U-937和NCI-H929细胞用8 μ M PKH-26膜染料标记,并用作靶细胞。如实施例25和26中所述,使用原代人或食蟹猴T细胞进行测定(E:T=10:1)。

[1658] 对于NCI-H929和U-937细胞,示例性结果分别显示在图44和图45中。

[1659] TCR/CD123多特异性多肽和无关多肽仅显示出最小的T细胞重定向的U-937杀伤活性(小于6%),表明多特异性多肽对于结合CD123具有良好的特异性。

[1660] 实施例37:使用CD123阴性细胞系,在重定向效应T细胞杀伤测定期间,用于多特异性CD123/TCR结合多肽的T细胞活化的表征

[1661] 为了监测在用多特异性CD123/TCR结合多肽处理T细胞和CD123阴性细胞之后的T细胞活化,在 2.5×10^5 个原代T细胞的存在下,将多肽分别与 2.5×10^4 个U-937和NCI-H929靶细胞在37 $^{\circ}$ C温育24小时(E:T=10:1),如实施例25和26中所述。使用单克隆小鼠抗CD4-APC(Biolegend,300505)、单克隆小鼠抗CD8 APC(BD Biosciences,555366)和单克隆抗CD25(BD Biosciences,557138)抗体,如实施例27所述,如在流式细胞术中所测量的,通过监测72小时温育之后CD4/CD8T细胞群上的CD25上调来评价T细胞活化(如前所述)。

[1662] 示例性结果显示在图46中。

[1663] 与多特异性多肽和U-937或NCI-929 CD123阴性细胞系一起温育后对T细胞活化的评价显示,对于任何多特异性多肽,CD25仅有极小的上调。因此,在存在CD123阴性靶细胞的情况下,仅有极少的T细胞活化或被T细胞杀伤。

[1664] 实施例38:在人重定向杀伤期间,用于多特异性CD123/TCR结合多肽的细胞因子产生的表征

[1665] 基于基于FACS的读数,在人T细胞介导的杀伤测定期间,监测细胞因子释放的非特异性诱导。通过ELISA测量细胞因子IFN- γ 和IL-6的释放。简言之,如实施例25所述,在存在纯化的人原代T细胞(3×10^5 细胞/孔)和多特异性TCR/CD123结合多肽或无关多肽的连续稀释液的情况下,将NCI-H929接种在V底96孔板(2×10^4 细胞/孔)中。如实施例30所述,在将人原代T细胞/多肽加入平板中72小时后,在上清液中测量人原代T细胞的IFN- γ 和IL-6的产生。结果如图47所示。

[1666] 当CD123阴性NCI-H929细胞系和人原代T细胞与CD123/TCR结合多肽一起温育时,未观察到细胞因子的产生。

[1667] 实施例39:在重定向杀伤期间,多特异性CD123/TCR结合多肽对T细胞增殖的影响

[1668] 为了研究多特异性CD123/TCR结合多肽对人T细胞增殖的影响,将 γ 辐射的(100Gy)MOLM-13细胞连同多特异性多肽和人原代T细胞(2×10^5 个细胞/孔)一起接种在96孔平底微量滴定板(Greiner bio-one,655180, 2×10^4 细胞/孔)中,并于37 $^{\circ}$ C在空气中5X CO₂的湿润气氛中温育72小时。接下来,用3H-胸苷(3H-Tdr,New England Nuclear,Boston,MA,20Ci/mM比活性)脉冲细胞约18小时,在玻璃纤维滤条上收获细胞,然后通过液体闪烁计数

进行计数。

[1669] 示例性结果显示在图48中。

[1670] CD123/TCR多特异性多肽以剂量依赖性方式诱导T细胞增殖。对于无关多肽T017000129,没有观察到T细胞增殖。

[1671] 平行地,在不存在靶细胞时,评估多特异性CD123/TCR结合多肽对人T细胞增殖的影响。此外,将多特异性多肽和人原代T细胞(2×10^5 个细胞/孔)于37°C在空气中5%CO₂的湿润气氛中温育72小时。如上所述测量增殖。数据如图49所示。

[1672] 实施例40:预活化T细胞与未活化T细胞的溶解性能

[1673] 为了测试T细胞在刺激条件下响应多天温育时间的溶解性能,将原代人T细胞(如实施例25中所述分离)解冻,并使用Dynabeads®人T活化剂CD3/CD28进行预活化(Gibco-Technologies,11132D)(使用2:1的T细胞与珠子比率)。3天后,用新鲜珠替换该珠持续另外三天。接下来,移除珠并在MOLM-13靶标杀伤测定中评价预活化和未活化的T细胞。简而言之,将来自相同供体的未活化或CD3/CD28预活化的原代T细胞与PKH标记的MOLM-13细胞以不同的E:T比例(8:1、2:1、1:2、1:4)混合,和与T017000114的连续稀释液混合,或与PKH标记的KG1A细胞以不同的E:T比例(2:1、1:2、1:4、1:8)混合,和与T017000139的连续稀释液混合。如上文实施例25中所述,在温育24小时后进行细胞毒性读数。

[1674] 对于MOLM-13和KG1a细胞,结果分别显示在图50和图51中。对于MOLM-13和KG1a细胞,在该测定中获得的EC50值分别列于表C-33和表C-34中。

[1675] 表C-33:使用预活化和未活化的T细胞,在基于流式细胞术的测定中,用于重定向的人T细胞介导的MOLM-13细胞杀伤的T017000114的EC50(M)和%溶解。

样品 ID	非活化 T 细胞				预活化 T 细胞			
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	%溶解	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	%溶解
[1676] T017000114 E:T 比率 8:1	1.4E-09	2.4E-10	7.8E-09	12	2.4E-10	1.9E-10	3.2E-10	43
T017000114 E:T 比率 2:1	1.9E-09	6.2E-12	6.0E-07	10	6.8E-10	4.7E-10	9.9E-10	31
T017000114 E:T 比率 1:2					1.0E-09	4.0E-10	2.6E-09	18

[1677] 表C-34:使用预活化和未活化的T细胞,在基于流式细胞术的测定中,用于重定向的人T细胞介导的KG1a细胞杀伤的T017000139的EC50(M)和%溶解。

样品 ID	非活化 T 细胞				预活化 T 细胞			
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	%溶解	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	% 溶解
T017000139 E:T 比率 2:1	1.4E-10	8.1E-11	2.5E-10	19	4.5E-11	2.2E-11	9.1E-11	43
T017000139 E:T 比率 1:2	7.7E-11	3.0E-12	2.0E-09	8	4.9E-11	2.2E-11	1.1E-10	20
T017000139 E:T 比率 1:4	9.2E-11	2.8E-12	3.0E-09	4	5.8E-11	3.1E-11	1.1E-10	13
T017000139 E:T 比率 1:8	3.4E-11	1.9E-13	6.1E-09	3	5.6E-11	2.3E-11	1.4E-10	8

[1678]

[1679] 在所测试的所有E:T比率下,预活化的T细胞比未活化的T细胞更有效地溶解靶细胞。用抗CD3/抗CD28预刺激效应细胞导致更高的溶解速率。

[1680] 实施例41:半衰期延长(HLE)的多特异性CD123/TCR结合多肽和对照多肽的构建

[1681] 将ALB11 (SEQ ID NO:43) (其是与人血清白蛋白(HSA)结合的纳米抗体)与CD123/TCR结合多肽连接,以增加格式化分子的体内半衰期(WO 06/122787)。使用35GS接头可产生在N端具有TCR α / β 募集纳米抗体和在C端具有CD123肿瘤靶向纳米抗体或白蛋白靶向纳米抗体的许多格式,并且所述格式如上所述进行表达。通过用不相关的抗RSV纳米抗体替换结合肿瘤抗原的纳米抗体来产生不相关的多肽。表C-35中显示了所探讨格式的概述。

[1682] 表C-35:HLE构建体的样品ID和描述。

样品 ID	SEQ ID NO*	描述
A022600009	62	T0170056G05-35GS-RSV007B02(Q108L)-35GS-ALB11
T017000142	63	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-ALB11-A
T017000143	64	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-A0110055F03-35GS-ALB11-A
T017000144	65	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-ALB11-35GS-A0110055F03-A
T017000145	66	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110055F03-35GS-A0110056A10-35GS-ALB11-A
T017000146	67	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110055F03-35GS-ALB11-35GS-A0110056A10-A

[1683]

[1684] *SEQ ID NO对应于不具有C端标签或Ala延伸的多特异性多肽的序列

[1685] 实施例42:多特异性募集多肽中ALB11的白蛋白结合性质

[1686] 在Biacore T100仪器上,通过基于SPR的亲和力测定,测量半衰期延长的多特异性多肽分别与人或食蟹猴血清白蛋白(SA)的结合亲和力。此外,使用EDC和NHS化学,通过胺偶联分别将人(Sigma,A3782)或食蟹猴SA(内部产生)固定在CM5芯片上。将TCR/CD123结合多肽以不同浓度(6.2和500nM之间)注射2分钟,并使其以45 μ l/min的流速解离15分钟。在样品注射之间,用10mM甘氨酸-HCl pH1.5使表面再生。HBS-EP+用作运行缓冲液。使用BIAEvaluation软件(该软件具有使用单循环动力学1:1结合模型的算法),从传感图计算动力学常数。由得到的缔合和解离速率常数 k_a 和 k_d 来计算亲和常数 K_D ,并示于表C-36中。

[1687] 表C-36:HLE多特异性多肽中ALB11的白蛋白结合性质。

	人 SA			食蟹猴 SA		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
[1688] T017000142	1.1E+05	7.2E-03	6.9E-08	9.0E+04	7.3E-03	8.1E-08
T017000143	1.6E+05	9.5E-03	5.9E-08	1.2E+05	9.4E-03	7.6E-08
T017000144	9.1E+04	7.8E-03	8.5E-08	7.4E+04	8.1E-03	1.1E-07
T017000145	1.1E+05	8.5E-03	7.6E-08	1.0E+05	9.9E-03	9.8E-08
T017000146	8.4E+04	8.5E-03	1.0E-07	6.8E+04	8.8E-03	1.3E-07
A022600009	1.1E+05	8.0E-03	7.5E-08	8.5E+04	8.0E-03	9.4E-08
ALB11	5.3E+05	1.6E-03	3.0E-09	5.1E+05	1.6E-03	3.2E-09

[1689] 将ALB11结构单元格式化为多特异性募集多肽,导致了与人和食蟹猴血清白蛋白结合的亲和力的可允许的下降。

[1690] 实施例43:在基于流式细胞术的测定中,通过HLE CD123/TCR结合多肽,重定向的T细胞介导的MOLM-13靶细胞的杀伤

[1691] 由于添加ALB11纳米抗体以及与血清白蛋白(SA)的结合可能影响多肽的效力,因此不存在或存在30 μ M SA的情况下,如实施例25和26所述,基于流式细胞术测定,评价HLE CD123/TCR结合多肽用于重定向人和食蟹猴T细胞介导的CD123阳性MOLM-13靶细胞的杀伤。

[1692] 在该测定中获得的EC50值列于表C-37中。结果描绘于图52中。

[1693] 表C-37:在基于流式细胞术的测定中,使用10:1的E:T比率,用于重定向T细胞介导的MOLM-13细胞杀伤的HLE CD123/TCR结合多肽的EC50 (M) 和%溶解。

样品 ID	人 T 细胞				食蟹猴 T 细胞			
	%溶解	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	%溶解	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000138	21	1.1E-10	8.8E-11	1.3E-10	54	1.5E-10	1.1E-10	2.1E-10
T017000144	23	2.7E-11	2.0E-11	3.6E-11	56	2.3E-11	1.7E-11	3.0E-11
[1694] T017000144+SA	24	2.6E-10	1.9E-10	3.5E-10	52	1.1E-10	9.3E-11	1.2E-10
T017000139	20	2.0E-11	9.3E-12	4.4E-11	56	2.9E-11	2.3E-11	3.5E-11
T017000146	21	2.5E-11			57	2.9E-11	2.3E-11	3.7E-11
T017000146 + SA	25	2.3E-10	1.7E-10	2.9E-10	44	1.6E-10	1.3E-10	1.9E-10

[1695] 所有HLE多特异性CD123/TCR结合多肽均显示人和食蟹猴T细胞对MOLM-13细胞的剂量依赖性杀伤。在多肽中包含ALB11不会降低效力。加入HSA或CSA后,观察到效力的小幅下降,而功效不受影响。

[1696] 实施例44:在基于流式细胞术的测定中,通过HLE CD123/TCR结合多肽,重定向的T细胞介导的KG1a靶细胞的杀伤

[1697] 在不存在或存在30 μ M血清白蛋白的情况下,如实施例24和25中所述,基于流式细胞术测定,还评价了半衰期延长的TCR/CD123结合多肽用于重定向的人和食蟹猴T细胞介导的CD123 KG1a靶细胞的杀伤。

[1698] 在该测定中获得的EC50值列于表C-38中。结果描绘于图53中。

[1699] 表C-38:使用10:1的E:T比率,在基于流式细胞术的测定中,用于重定向的T细胞介导的KG1a细胞杀伤的HLE CD123/TCR结合多肽的EC50 (M) 和%溶解。

样品 ID	人 T 细胞				食蟹猴 T 细胞			
	% 溶解	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	% 溶解	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000138	64	1.6E-10	1.3E-10	2.0E-10	21	2.8E-11	2.3E-11	3.4E-11
T017000143	62	1.9E-10	1.6E-10	2.3E-10	25	4.7E-11	2.9E-11	7.5E-11
T017000144	67	4.1E-11	3.4E-11	5.0E-11	28	6.3E-12	9.3E-13	4.3E-11
T017000143+SA	60	1.4E-09	1.0E-09	1.9E-09	25	8.6E-10	7.1E-10	1.0E-09
T017000144+SA	58	2.9E-10	2.4E-10	3.6E-10	29	6.6E-11	3.4E-11	1.3E-10
T017000139	67	8.1E-11	7.4E-11	8.9E-11	34	1.7E-11	9.7E-12	3.1E-11
T017000145	65	7.4E-11	6.4E-11	8.6E-11	35	1.6E-11	1.1E-11	2.4E-11
T017000146	64	6.6E-11	5.9E-11	7.4E-11	34	1.5E-11	7.2E-12	3.0E-11
T017000145+SA	51	5.9E-10	4.9E-10	7.2E-10	32	1.2E-10	7.4E-11	1.9E-10
T017000146+SA	60	6.8E-10	5.8E-10	8.0E-10	36	2.0E-10	1.1E-10	3.5E-10
T017000128	55	3.1E-10	3.0E-10	3.3E-10	32	2.8E-10	1.3E-10	6.1E-10
T017000142	59	6.8E-10	6.2E-10	7.5E-10	29	2.2E-10	1.4E-10	3.6E-10
T017000142+SA	48	3.1E-09	3.0E-09	3.3E-09	20	3.2E-10	2.9E-10	3.5E-10

[1700] [1701] 所有HLE多特异性CD123/TCR结合多肽均显示人和食蟹猴T细胞对KG1a细胞的剂量依赖性杀伤。在多肽中包含ALB11不会降低效力。加入HSA或CSA后,观察到效力的小幅下降,而功效不受影响。

[1702] 实施例45:在重定向杀伤期间,HLE多特异性CD123/TCR结合多肽T017000144对细胞因子产生的影响

[1703] 基于基于FACS的读数,在人T细胞介导的杀伤测定期间,监测细胞因子释放的诱导。通过ELISA测量IFN- γ 和IL-6的释放。简而言之,如实施例35所述,在存在纯化的人原代T细胞(3×10^5 个细胞/孔)和多特异性TCR/CD123结合多肽或无关多肽的连续稀释液的情况下,将MOLM-13(2×10^4 个细胞/孔)接种在V底96孔板中。如实施例30中所述,在将人原代T细胞/多肽加入平板中72小时后,测量上清液中人原代T细胞的IFN- γ 和IL-6的产生。

[1704] 在该测定中获得的EC50值列于表C-39和表C-40中。结果描绘于图54中。

[1705] 表C-39:在基于流式细胞术的测定中,在重定向的人T细胞介导的CD123阳性MOLM-13细胞杀伤期间,用于人IFN- γ 分泌的TCR/CD123结合多肽的EC50(M)。

样品ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	3.4E-10	2.5E-10	4.6E-10
T017000144	1.9E-10	1.3E-10	2.9E-10

[1707] 表C-40:在基于流式细胞术的测定中,在重定向的人T细胞介导的CD123阳性MOLM-13细胞杀伤期间,用于人IL-6分泌的TCR/CD123结合多肽的EC50(M)。

样品ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	2.3E-11	1.5E-11	3.5E-11
T017000144	1.6E-11	9.9E-12	2.7E-11

[1709] 当MOLM-13细胞和人原代T细胞与HLE CD123/TCR结合多肽T017000144一起温育时,观察到细胞因子的产生。无关多肽T017000129不诱导细胞因子产生。

[1710] 实施例46:在重定向杀伤期间,HLE多特异性CD123/TCR结合多肽对T细胞增殖的影响

[1711] 为了研究HLE多特异性CD123/TCR结合多肽对人T细胞增殖的影响,将 γ 辐射的(100Gy)MOLM-13细胞(2×10^4 细胞/孔)连同HLE多特异性多肽T017000144和人原代T细胞(2×10^5 个细胞/孔)一起接种在96孔平底微量滴定板中,并在不存在SA的情况下,于37°C在空气中5X CO₂的湿润气氛中温育72小时。将T017000129作为阴性对照。接下来,用3H-胸苷(3H-Tdr, New England Nuclear, Boston, MA, 20Ci/mM比活性)脉冲细胞约18小时,在玻璃纤维滤条上收获细胞,然后通过液体闪烁计数进行计数。

[1712] 示例性结果显示在图55中。

[1713] HLE CD123/TCR多特异性多肽T017000144以剂量依赖性方式诱导T细胞增殖。对于无关多肽T017000129,没有观察到T细胞增殖。

[1714] 实施例47:在健康人PBMC样品和健康食蟹猴PBMC中,通过HLECD123/TCR多特异性多肽,重定向的自体T细胞浆细胞样树突细胞(pDC)和嗜碱性粒细胞的消耗

[1715] 如实施例31中所述,在不存在SA的情况下,在人和食蟹猴自体PBMC测定中进一步评价HLE构建体。在5小时的温育时间后,评价多特异性多肽对CD123阳性细胞的消耗(pDC:谱系阴性,CD123阳性,HLA-DR阳性;以及嗜碱性粒细胞:谱系阴性,CD123阳性,HLA-DR阴性)。

[1716] 对于人和食蟹猴PBMC,结果分别描绘于图56和图57中。

[1717] HLE CD123/TCR多特异性多肽能够通过重定向的T细胞消耗人和食蟹猴PBMC中的CD123+pDC和嗜碱性粒细胞。T017000144是最有效力的多肽。5小时后在PBMC测定中,由一个TCR结构单元、ALB11和仅一个CD123结构单元组成的多肽T017000142未显示出功能性。在自体设置中证实了HLE CD123/TCR多特异性多肽的人食蟹猴交叉反应性。

[1718] 实施例48:健康人PBMC样品中,通过HLE CD123/TCR多特异性多肽,重定向的自体T细胞单核细胞的消耗

[1719] 在不存在SA的情况下,在24小时温育时间后,评价HLE多特异性多肽在自体人PBMC环境中对单核细胞(CD14+细胞)的消耗。如实施例32中所述的进行测定。

[1720] 结果如图58所示。

[1721] HLE多特异性多肽能够通过重定向的T细胞消耗人PBMC内的CD123+单核细胞。T017000144是最有效力的多肽。24小时后在自体单核细胞消耗测定中,由一个TCR结构单元、ALB11和仅一个CD123结构单元组成的多肽T017000142显示出功能性。

[1722] 实施例49:非人灵长类动物模型中的体内功效和安全性

[1723] 在非人灵长类动物模型中,评价非HLE和HLE多特异性CD123/TCR结合纳米抗体的体内功效和安全性。

[1724] 用参考化合物处理的动物作为阳性对照。将用非HLE IRR/TCR结合多肽的处理用作多特异性多肽的CD123靶向结构部分的特异性对照。在对食蟹猴进行7天NaCl输注“预处理”后,将参考化合物和非HLE多特异性CD123/TCR结合多肽通过连续静脉输注而施用。根据表C-41,以每周剂量递增方案,以与参考化合物的等摩尔剂量将非HLE多特异性CD123/TCR结合多肽施用4周作为4天打开输注/3天关闭输注。根据表C-41,以每周剂量递增方案,在第1、2、3、8、15和22天,通过静脉内推注将HLE多特异性CD123/TCR结合多肽向食蟹猴施用。

[1725] 表C-41:治疗方案。

组	化合物	剂量水平 (ng/kg/天)				施用途径
		测试周 1	测试周 2	测试周 3	测试周 4	
1	参考	D1-5: 100	D8-12: 300	D15-19: 600	D22-26: 1000	连续 24 小时输注
2	不相关/TCR 多肽	D1-5: 49.5	D8-12: 148.4	D15-19: 296.8	D22-26: 494.6	连续 24 小时输注
3	非 HLE CD123/TCR 多肽	D1-5: 74.0	D8-12: 222.1	D15-19: 444.3	D22-26: 740.4	连续 24 小时输注
4	HLE CD123/TCR 多肽	D1: 0.6 D2: 0.4 D3: 0.34	D8: 2.21	D15: 4.42	D22: 7.13	静脉内推注

[1727] 在测试前7天、前4天,第1天(给药前+给药后4小时)、第4天、第8天(给药前+给药后4小时)、第11天、第15天(给药前+给药后4小时)、第18天、第22天(给药前+给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天使用流式细胞术和差异血细胞计数,如表C-42中所述,通过测量T细胞子集来监测来自血液的T细胞再分布。

[1728] 在测试前7天、前4天,第1天(给药前+给药后4小时)、第4天、第8天(给药前+给药后4小时)、第11天、第15天(给药前+给药后4小时)、第18天、第22天(给药前+给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天使用流式细胞术和血液中差异血细胞计数,如表C-43中所详述,通过评估PBMC中CD123+细胞的百分比和数量来评估体内功效。

[1729] 在测试前7天、前4天、第1天(给药后4小时)、第4天、第8天(给药后4小时)、第11天、第15天(给药后4小时)、第18天、第22天(给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天,通过评价血清中的细胞因子(IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12(p70)、TNF- α 、TNF- β 、IFN- γ)来评估安全性。

[1730] 表C-42:用于血液T细胞表型分析的标记组合。

标记	细胞	单元
CD3+CD4+	T 辅助细胞(Th)	PBMC 的百分比和细胞/ μL
CD3+CD8+	细胞毒性 T 细胞 (Tc)	PBMC 的百分比和细胞/ μL
CD25+CD3+CD4+	活化的 Th	CD3+CD4+的百分比和细胞/ μL
CD25+CD3+CD8+	活化的 Tc	CD3+CD8+的百分比和细胞/ μL
PD1+CD3+CD4+	在 Th 上 PD (程序性细胞死亡蛋白)上调	CD3+CD4+的百分比和细胞/ μL
PD1+CD3+CD8+	在 Tc 上 PD 上调	CD3+CD8+的百分比和细胞/ μL
CD25+PD1+CD3+CD4+	在活化的 Th 上, PD 上调	CD3+CD4+CD25+的百分比和细胞/ μL
CD25+PD1+CD3+CD8+	在活化的 Tc 上, PD 上调	CD3+CD8+CD25+的百分比和细胞/ μL

[1732] 表C-43:用于评价CD123+细胞消耗的标记组合。

标记	细胞	单位
CD14 ^{-low} CD123+	基于 CD123 标记的 pDC (浆细胞样树突细胞)和嗜碱性粒细胞和 mDCs (骨髓树突细胞)	PBMC 的百分比和细胞/ μL
CD14 ^{-low} CD303+	基于 CD303 标记的 pDC	PBMC 的百分比和细胞/ μL
CD14 ^{-low} CD123+CD303+	CD123 和 CD303 之间的重叠	PBMC 的百分比和细胞/ μL

标记	细胞	单位
CD14+	单核细胞	PBMC 的百分比和细胞/ μL
CD14+CD123+	CD123+ 单核细胞	CD14+的百分比和细胞/ μL
CD123+	基于 CD123 的靶细胞的绝对数目	PBMC 的百分比和细胞/ μL
CD303+	CD303 细胞的绝对数目	PBMC 的百分比和细胞/ μL

[1735] 在给药前7天、前4天、给药第1天(给药前+给药后4小时)、第4天、第8天(给药前+给药后4小时)、第11天、第15天(给药前+给药后4小时)、第18天、第22天(给药前+给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天,收集用于PK分析的血清样品。

[1736] 在给药前7天、给药第1天(给药前)、第8天(给药前)、第15天(给药前)、第22天(给药前)、第29天和第36天,收集用于ADA分析的血清样品。

[1737] 在第4天和第25天,如实施例25所述,从所有动物分离血液T细胞,并在耗竭(exhaustion)试验中进行测试。

[1738] 在第29天,对第2组动物进行尸检。在第36天,对所有剩余的动物进行尸检。

[1739] 实施例50:非人灵长类动物模型中的体内功效和安全性-多特异性CD123/TCR结合纳米抗体,实验结果

[1740] 在非人灵长类动物模型中,评价多特异性CD123/TCR结合多肽T017000139的体内功效和安全性。

[1741] 用参考化合物(MGD006,Macrogenics)处理的动物作为阳性对照。将用无关/TCR结合多肽T017000129的处理用作多特异性多肽的CD123靶向结构部分的特异性对照。在对食蟹猴进行7天NaCl输注“预处理”后,将参考化合物、无关/TCR结合多肽和多特异性CD123/TCR结合多肽通过连续静脉内输注而施用。根据表C-44,以每周剂量递增方案,以与参考化合物的等摩尔剂量将无关/TCR结合多肽和多特异性CD123/TCR结合多肽施用4周作为4天打开/3天关闭输注。

[1742] 表C-44:治疗方案。

组	化合物	剂量水平(ng/kg/天)				施用途径
		测试周 1 (D1-5)	测试周 2 (D8-12)	测试周 3 (D15-19)	测试周 4 (D22-26)	
1	参考化合物 (MGD006)	100	300	600	1000	连续 24 小时输注
[1743] 2	无关/TCR 多肽 (T017000129)	49.5	148.4	296.8	494.6	连续 24 小时输注
3	CD123/TCR 多肽 (T017000139)	74.0	222.1	444.3	740.4	连续 24 小时输注

[1744] 在测试前7天、前4天,第1天(给药前+给药后4小时)、第4天、第8天(给药前+给药后4小时)、第11天、第15天(给药前+给药后4小时)、第18天、第22天(给药前+给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天,通过使用流式细胞术测量T细胞子集来监测来自血液的T细胞再分布。

[1745] 如图59所示,在用参考化合物处理的阳性对照组中,循环CD4⁺CD3⁺和CD8⁺CD3⁺ T细胞的数量在不同的给药周期期间波动,表明运输和/或靠边化,而不是消耗。相反,用CD123/TCR多肽处理或用无关/TCR多肽处理不会导致CD4⁺CD3⁺或CD8⁺CD3⁺ T细胞数量的强烈波动。

[1746] 在测试前7天、前4天,第1天(给药前+给药后4小时)、第4天、第8天(给药前+给药后4小时)、第11天、第15天(给药前+给药后4小时)、第18天、第22天(给药前+给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天,通过在血液中使用流式细胞术测量PBMC中CD123⁺CD14⁻细胞的数量,来研究循环CD123⁺CD14⁻细胞数作为药效学终点,以便评价体内功效。

[1747] 结果如图60所示。用参考化合物MGD006(阳性对照)处理的动物中CD123⁺CD14⁻细胞被消耗,尽管在第4次给药周期中观察到功效丧失。从第一次给药周期中,用CD123/TCR多肽处理导致血液中CD123⁺CD14⁻细胞的消耗,其持续到第4次和最后的给药周期。在用无关/TCR

多肽处理的动物中,未观察到CD123⁺CD14⁻细胞的显著消耗。

[1748] 接下来,研究PD-1在循环CD4⁺CD3⁺ T细胞和CD8⁺CD3⁺ T细胞上的表达作为替代标记,以评估体内T细胞耗竭。为此,在测试前7天、前4天,第1天(给药前+给药后4小时)、第4天、第8天(给药前+给药后4小时)、第11天、第15天(给药前+给药后4小时)、第18天、第22天(给药前+给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天,在血液中使用流式细胞术,测量PBMC中PD-1的表达。

[1749] 结果如图61所示。用参考化合物MGD006(阳性对照)处理的动物中,大多数CD4⁺CD3⁺ T细胞和CD8⁺CD3⁺ T细胞上的PD-1表达强烈增加,并在给药终止后在大约一半的CD4⁺CD3⁺ T细胞和CD8⁺CD3⁺ T细胞上保持。相反,在整个给药周期中,用CD123/TCR多肽或无关/TCR多肽处理后,PD-1表达保持在基线。

[1750] 在测试前7天、前4天、第1天(给药后4小时)、第4天、第8天(给药后4小时)、第11天、第15天(给药后4小时)、第18天、第22天(给药后4小时)和第25天,通过评价血清中的细胞因子(IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12(p70)、TNF- α 、TNF- β 、IFN- γ)来评估安全性。

[1751] 以下细胞因子的水平仍低于测定法的检测限:IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12(p70)、TNF- α 、TNF- β 和IFN- γ 。在第一次给药周期开始时,在阳性对照组中检测到低浓度的白细胞介素-6。这种增加是短暂的,并仅在一只动物中。在用CD123/TCR多肽处理的组中,一只动物在给药前显示可检测的IL-6浓度,并且一只动物在第二给药周期开始时显示短暂的微小的增加,表明操纵应激(manipulative stress)。在用无关/TCR多肽处理的组中,一只动物在第三次给药周期中显示出IL-6的短暂微小增加,再次表明操纵应激。来自IL-6测量的结果描绘于图62中。

[1752]

表 A-1: TCR A 簇结合物的序列比对-第 1 部分

SEQ ID NO:	Kabat #	1	10	20	30	40	50	60	70	78
42	T0170PMP056G05	:								
85	T0170PMP053D01	:								
136	T0170PMP067D01	:								
124	T0170PMP056F01	:								
152	T0170PMP069A06	:								
141	T0170PMP067F02	:								
142	T0170PMP068C03	:								
103	T0170PMP055E05	:								
96	T0170PMP055C02	:								
137	T0170PMP067D06	:								
105	T0170PMP055F03	:								
130	T0170PMP061A02	:								
122	T0170PMP056D11	:								
153	T0170PMP069B02	:								
172	T0170PMP070G02	:								
79	T0170PMP028B01	:								
81	T0170PMP028G06	:								
106	T0170PMP055F06	:								
78	T0170PMP027A05	:								
83	T0170PMP040C01	:								
80	T0170PMP028F10	:								
82	T0170PMP029F08	:								
90	T0170PMP055A08	:								
109	T0170PMP055G09	:								
145	T0170PMP068D05	:								
151	T0170PMP068F08	:								
171	T0170PMP070F11	:								
163	T0170PMP069E11	:								
175	T0170PMP084B07	:								
87	T0170PMP055A01	:								
88	T0170PMP055A02	:								
99	T0170PMP055D03	:								
101	T0170PMP055D10	:								
147	T0170PMP068E01	:								
177	T0170PMP084E03	:								

[1753]

表 A-1: TCR A 簇结合物的序列比对-第 1 部分续

SEQ ID NO:	Kabat #	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111						
5	T0170PMP056G05	:	Y	L	Q	M	N	S	L	K	P	E	T	A	V	F	C	R	A	F	S	R	I	P	Y	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S			
	T0170PMP053D01	:	T	V	.	G	.	L	.	N				
	T0170PMP067D01	:	T	V	.	G	.	L	.	N			
	T0170PMP056F01	:	T	V	.	G	.	L	.	N		
	T0170PMP069A06	:	T	G	V	.	G	.	L	.	N		
10	T0170PMP067F02	:	T	V	.	G	.	L	.	N		
	T0170PMP068C03	:	T	V	.	G	.	L	.	N	
	T0170PMP055E05	:	T	T	.	V	.	G	.	L	.	N	
	T0170PMP055C02	:	T	T	.	V	.	G	.	L	.	N	
	T0170PMP067D06	:	T	
	T0170PMP055F03	:	
15	T0170PMP061A02	:	
	T0170PMP056D11	:
	T0170PMP069B02	:
	T0170PMP070G02	:
20	T0170PMP028B01	:
	T0170PMP028G06	:
	T0170PMP055F06	:
	T0170PMP027A05	:
	T0170PMP040C01	:
25	T0170PMP028F10	:
	T0170PMP029F08	:
	T0170PMP055A08	:
	T0170PMP055G09	:
	T0170PMP068D05	:
30	T0170PMP068F08	:
	T0170PMP070F11	:
	T0170PMP069E11	:
	T0170PMP084B07	:
	T0170PMP055A01	:
	T0170PMP055A02	:
35	T0170PMP055D03	:
	T0170PMP055D10	:
	T0170PMP068E01	:
	T0170PMP084E03	:

[1754]

表 A-1: TCR A 簇结合物的序列比对-第 2 部分

SEQ ID NO:	Kabat #	1	10	20	30	40	50	60	70	78
42	T0170PMP056G05	:								
178	T0170PMP084E05	:								
107	T0170PMP055F08	:								
114	T0170PMP056C01	:								
126	T0170PMP056G02	:								
133	T0170PMP067A03	:								
135	T0170PMP067C09	:								
150	T0170PMP068F06	:								
158	T0170PMP069D02	:								
169	T0170PMP070D07	:								
176	T0170PMP084C02	:								
131	T0170PMP061B04	:								
159	T0170PMP069D07	:								
113	T0170PMP056B11	:								
180	T0170PMP084F10	:								
116	T0170PMP056C03	:								
156	T0170PMP069C04	:								
121	T0170PMP056D02	:								
132	T0170PMP067A01	:								
134	T0170PMP067B06	:								
164	T0170PMP069F05	:								
179	T0170PMP084E04	:								
98	T0170PMP055C10	:								
86	T0170PMP053E10	:								
92	T0170PMP055B01	:								
155	T0170PMP069C01	:								
138	T0170PMP067D09	:								
139	T0170PMP067E03	:								
120	T0170PMP056D01	:								
140	T0170PMP067E06	:								
162	T0170PMP069E09	:								
157	T0170PMP069C05	:								
166	T0170PMP070B08	:								
89	T0170PMP055A03	:								
118	T0170PMP056C07	:								

[1755]

表 A-1: TCR A 簇结合物的序列比对-第 2 部分续

	SEQ ID NO:	Kabat #	79	80	90	100	110
			abc			a	
	42	T0170PMP056G05	: YLQMN	SLKPEDTAVYFCRA	FSRIYPTDYWGQ	GLTVTVSS	
5	178	T0170PMP084E05	:	Y	N	
	107	T0170PMP055F08	:	Y	N	
	114	T0170PMP056C01	:	Y	N	
	126	T0170PMP056G02	:	Y	N	
10	133	T0170PMP067A03	:	Y	N	
	135	T0170PMP067C09	:	Y	N	
	150	T0170PMP068F06	:	Y	N	
	158	T0170PMP069D02	:	Y	N	
	169	T0170PMP070D07	:	Y	N	
15	176	T0170PMP084C02	:	Y	N	
	131	T0170PMP061B04	:	Y	N	
	159	T0170PMP069D07	:	Y	N	
	113	T0170PMP056B11	:	Y	N	
	180	T0170PMP084F10	:	Y	N	
20	116	T0170PMP056C03	:	Y	N	Q
	156	T0170PMP069C04	:	Y	N	Q
	121	T0170PMP056D02	:	Y	N	R
	132	T0170PMP067A01	:	Y	N	Q
	134	T0170PMP067B06	:	Y	N	Q
25	164	T0170PMP069F05	:	Y	N	Q
	179	T0170PMP084F04	:	Y	N	Q
	98	T0170PMP055C10	: H	Y	N	Q
	86	T0170PMP053E10	:	Y	N	Q
	92	T0170PMP055B01	:	Y	N	Q
30	155	T0170PMP069C01	:	Y	N	Q
	138	T0170PMP067D09	:	Y	N	Q
	139	T0170PMP067E03	:	Y	N	Q
	120	T0170PMP056D01	: H	Y	N	Q
	140	T0170PMP067E06	:	Y	N	Q
35	162	T0170PMP069E09	:	Y	N	Q
	157	T0170PMP069C05	:	Y	N	S
	166	T0170PMP070B08	:	Y	N	Q
	89	T0170PMP055A03	:	Y	N	Q
	118	T0170PMP056C07	:	Y	N	R

[1756]

表 A-1: TCR A 簇结合物的序列比对-第 3 部分

SEQ ID NO:	Kabat #	1	10	20	30	40	50	60	70	78
42	T0170PMP056G05	:								
168	T0170PMP070C09	:								
174	T0170PMP082B04	:								
110	T0170PMP056A02	:								
108	T0170PMP055G05	:								
154	T0170PMP069B08	:								
97	T0170PMP055C06	:								
100	T0170PMP055D06	:								
102	T0170PMP055E01	:								
104	T0170PMP055F02	:								
115	T0170PMP056C02	:								
173	T0170PMP070G06	:								
165	T0170PMP069G08	:								
170	T0170PMP070E07	:								
146	T0170PMP068D07	:								
127	T0170PMP056G11	:								
143	T0170PMP068C07	:								
160	T0170PMP069E02	:								
144	T0170PMP068C11	:								
148	T0170PMP068E08	:								
123	T0170PMP056E02	:								
112	T0170PMP056A10	:								
116	T0170PMP056C10	:								
93	T0170PMP055B02	:								
111	T0170PMP056A08	:								
117	T0170PMP056C04	:								
129	T0170PMP057D06	:								
84	T0170PMP053A03	:								
161	T0170PMP069E07	:								
95	T0170PMP055B11	:								
125	T0170PMP056F08	:								
167	T0170PMP070B09	:								
149	T0170PMP068F04	:								
91	T0170PMP055A10	:								
94	T0170PMP055B03	:								
128	T0170PMP057B02	:								

[1760]

表 A-4: CD123 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。"SEQ" 是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

SEQ ID	纳米抗体	SEQ FR1	SEQ CDR1	SEQ FR2	SEQ CDR2	SEQ FR3	SEQ CDR3	SEQ FR4
1	A0110PMP 056A10	EVQLVKSGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	11 GITSKIN DMG	30 WYRQTPGNY REWVA	17 SITATG 34 TTN	YRDSVKGRFTISRDNKAKSTV YIQMNSLKPEDTTVYYCNT	21 FFPISNF	40 WQGGTL VTVSS
2	A0110PMP 055A10 / A0110PMP 057D11	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAN	12 GLSSKSD AMG	31 WYRQTPGKY REWVA	17 SITATG 35 TTN	YRDSVKGRFTISRDNKAKNTV YIQMNSLKPEDTTVYYCNT	22 FPAISNF	41 WQGGTQ VTVSS
3	A0110PMP 055B11 / A0110PMP 055B12	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAN	13 GITSKSN AMG	31 WYRQTPGKY REWVA	17 SITATG 35 TTN	YRDSVKGRFTISRDNKAKNTV YIQMNSLKPEDTTVYYCNT	22 FPAISNF	41 WQGGTQ VTVSS
4	A0110PMP 056D09	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	14 GIPSKIN DMG	32 WFRQTPGNY REWVA	17 SITATG 35 TTN	YRDSVKGRFTISRDNKAKNTV YIQMNSLKPEDTTVYYCNT	21 FFPISNF	40 WQGGTL VTVSS
5	A0110PMP 056G10	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	11 GITSKIN DMG	30 WYRQTPGNY REWVA	17 SITATG 34 TTN	YRDSVKGRFTISRDNKAKSTV YIQMNSLKPEDTTVYYCNT	21 FFPISNF	40 WQGGTL VTVSS
6	A0110PMP 057B09	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	15 GITSKSN VMG	31 WYRQTPGKY REWVA	17 SITATG 35 TTN	YRDSVKGRFTISRDNKAKNTV YIQMNSLKPEDTTVYYCNT	22 FPAISNF	41 WQGGTQ VTVSS
7	A0110PMP 055F03	EVQLVESGGGLVQ AGGFLRLSCAAS	16 GRTFSSY VMG	33 WFRQAPGKE REFVA	18 AIYWSN 36 GKTQ	YTDSVKGRFTISGDNKAKNTV YIQMNSLNPEPTAVYYCVA	23 DKDETGFRTL PIAYDY	41 WQGGTQ VTVSS
8	A0110PMP 055A04	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	16 GRTFSSY VMG	33 WFRQAPGKE REFVA	19 AIYWSS 37 GKTE	YTDSVKGRFTISGDNKAKNTV YIQMNSLNPEPTAVYYCVA	24 DKDRDGFRTL PIAYDY	41 WQGGTQ VTVSS
9	A0110PMP 056C03	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	16 GRTFSSY VMG	33 WFRQAPGKE REFVA	19 AIYWSS 38 GKTE	YTESVKGRFTISGDNKAKNTV YIQMNSLNPEPTAVYYCVA	25 DKDRYGFRTL PIAYDY	41 WQGGTQ VTVSS
10	A0110PMP 056G01	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	16 GRTFSSY VMG	33 WFRQAPGKE REFVA	20 AIYWSS 39 GKTE	YTDSVKGRFTISGDNKAKNTV YIQMNNLNPEPTAVYYCVA	24 DKDRDGFRTL PIAYDY	41 WQGGTQ VTVSS

[1761]

表 A-5-第 1 部分: TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。 “SEQ” 是指给定的 SEQ ID NO。 第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。 CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

SEQ	纳米抗体	SEQ FR1	SEQ CDR1	SEQ FR2	SEQ CDR2	SEQ FR3	SEQ CDR3	SEQ FR4
42	T0170PMP 056G05	EVQLVESGGGLVQPI181 GGSRLSCVAS	GDVHKIN 251 FLG	WYRQAPGKE 192 REKVA	HISIGD 277 QTD	YADSAKGRFTISRDESKNMV 218 YLQMSLKPEDTAVYFCRA	FSRIYPYDY 320	MGQGT VTVSS
78	T0170PMP 027A05	EVQLVESGGGLVQPI182 GGSRLSACAAS	GSVHKIN 252 FLG	WYRQAPGKE 193 RELVA	TITIGD 278 TTD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV 219 YLQMSLKPEDTAVHFCRA	GSRLYPYNY 321	MGQGT VTVSS
79	T0170PMP 028B01	EVQLVESGGGLVQPI182 GGSRLSACAAS	GSVHKIN 253 FLG	WYRQAPGKE 193 RGLVA	TITIGD 279 TTD	YADYAKGRFTISRDEARNMV 219 YLQMSLKPEDTAVYFCRA	GSRLYPYNY 321	MGQGT VTVSS
80	T0170PMP 028F10	EVQLVESGGGLVQPI182 GRSRLPCAAS	GSVHKIN 254 FLG	WYRQAPGKE 194 REKVA	TITIGD 280 ATD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV 219 YLQMSLKPEDTAVYFCRA	GSRLYPYNY 321	MGQGT VTVSS
81	T0170PMP 028G06	EVQLVESGGGLVQPI182 GGSRLSACAAS	GSVHKIN 252 FLG	WYRQAPGKE 193 RELVA	TITIGD 279 TTD	YADYAKGRFTISRDEARNMV 219 YLQMSLKPEDTAVYFCRA	GSRLYPYNY 320	MGQGT VTVSS
82	T0170PMP 029F08	EVQLVESGGGLVQPI182 GGSRLSACAAS	GSVHKIN 254 FLG	WYRQAPGKE 194 REKVA	TITIGD 280 ATD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV 219 YLQMSLKPEDTAVYFCRA	GSRLYPYNY 320	MGQGT VTVSS
83	T0170PMP 040C01	EVQLVESGGGLVQPI182 GGSRLSACAAS	GSVHKIN 252 FLG	WYRQAPGKE 193 RELVA	TITIGD 280 TTD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV 219 YLQMSLKPEDTAVYFCRA	GSRLYPYNY 321	MGQGT VTVSS
84	T0170PMP 053A03	EVQLVESGGGLVQPI183 GGSRLSCAVS	GSVHLLN 254 FLG	WYRQAPGKE 195 REKVA	HITIGD 281 ATD	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV 220 YLQMSLRPEDTAVYFCRA	GSRIYPYDY 320	MGQGT VTVSS
85	T0170PMP 053D01	EVQLVESGGGLVQPI184 GGSLLSACAAS	GAVHKIN 255 FLG	WYRQTPEKE 196 REKVA	TITIGD 282 DVD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV 219 YLQMSLKPEDTAVYVFCRA	GSRLYPYNY 320	MGQGT VTVSS
86	T0170PMP 053E10	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSCRAS	GDVHKIN 256 ILG	WYRQAPAKE 197 REKVA	HITIGD 283 ATD	YAESAKGRFTISRDEAKNMV 221 YLQMSLKPEDTAVYFCRA	YSRIYPYNY 321	MGQGT VTVSS
87	T0170PMP 055A01	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSACAAS	GDVHKIN 256 ILG	WYRQAPAKE 197 REKVA	HITIGD 280 ATD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV 221 YLQMSLKPEDTAVYFCRA	YSRIYPYNY 320	MGQGT VTVSS
88	T0170PMP 055A02	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSACAAS	GDVHKIN 256 ILG	WYRQAPAKE 197 REKVA	HITIGD 280 ATD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV 221 YLQMSLKPEDTAVYFCRA	YSRIYPYNY 320	MGQGT VTVSS
89	T0170PMP 055A03	EVQLVESGGGLVQPI181 GGSRLSVCAS	GDVHKIN 251 FLG	WYRQAPGKE 198 REKVA	HITIGD 280 QAD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV 220 YLQMSLKPEDTAVYFCRA	GSRIYPYDY 321	MGQGT VTVSS
90	T0170PMP 055A08	EVQLVESGGGSVQPI182 GGSRLSACAAS	GSVHKIN 254 FLG	WYRQAPGKE 194 REKVA	TITIGD 284 ATD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV 219 YLQMSLSPEDTAVYFCRA	GSRLYPYNY 320	MGQGT VTVSS
91	T0170PMP 055A10	EVQLVESGGGLVQPI183 GGSRLSACAAS	GSVHLLN 254 FLG	WYRQAPGKE 199 REKVA	HISIAAD 285 ATD	YAHFAKGRFTISRDEAKNMV 220 YLQMSLRPEDTAVYFCRA	GSRIYPYDY 322	WGRGT VTVSS
92	T0170PMP 055B01	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSCRAS	GDVHKIN 256 ILG	WYRQAPAKE 200 REKVA	HITIGD 283 ATV	YAESAKGRFTISRDEAKNMV 221 YLQMSLKPEDTAVYFCRA	YSRIYPYNY 321	MGQGT VTVSS

[1762]

表 A-5-第 2 部分: TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。 “SEQ” 是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

SEQ	纳米抗体	SEQ FR1	SEQ CDR1	SEQ FR2	SEQ CDR2	SEQ FR3	SEQ CDR3	SEQ FR4
93	T0170PMP 055B02	EVQLVESGGGLVQVP183 GGSLRLSCAAS	GSVHLLN183 FLG	WYRQCPGKE REMYA	195HITIAD ATD	281YSHEFAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	220GSRIYPYDY	320WGQGTL VTVSS
94	T0170PMP 055B03	EVQLVESGGGLVQVP183 GGSLRPSCAAS	GSVHLLN183 FLG	WYRQAPGKE REMYA	195HITIAD ATD	285YAHEFAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	220GSRIYPYDY	321WGQGTQ VTVSS
95	T0170PMP 055B11	EVQLVESGGGLVQVP183 GGSLRLSCAAS	GSVHLLN183 FLG	WYRQAPGKE REMYA	195HITIAD ATD	285YAHEFAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	220GSRIYPYDY	320WGQGTL VTVSS
96	T0170PMP 055C02	EVQLVESGGGLVQVP184 GGSLKLSCAAS	GAVHKIN184 FLG	WYRQTPKE REMYA	201HITIGD EVD	286YADSAGKGRFTISRDEAKNMV YLQMTSLTPEDTAVYVFCRA	219GSRLYPYNY	321WGQGTQ VTVSS
97	T0170PMP 055C06	EVQLVESGGGLVHP181 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN181 FLG	WHRQPPGKE REKVA	202HITIGD VTD	287YADSAGKGRFTISRDEAKNMV YLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	220GSRIYPYDY	321WGQGTQ VTVSS
98	T0170PMP 055C10	EVQLVESGGGLVQVP186 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN186 VLG	WYRQAPAKE REMYA	197HITIGD ATD	288YADSAGKGRFTISRDEAKNMV HLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	221YSRIYPYNY	321WGQGTQ VTVSS
99	T0170PMP 055D03	EVQLVESGGGLVQVP185 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN185 ILG	WYRQAPAKE REMYA	203HITIGD ATN	280YADSAGKGRFTISRDEAKNMV YLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	221YSRIYPYNY	320WGQGTL VTVSS
100	T0170PMP 055D06	EVQLVESGGGLVQVP181 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN181 FLG	WHRQAPGKE REKVA	202HITIGD VTD	289YADSAGKGRFTISRDEAKNMV FLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	220GSRIYPYDY	321WGQGTQ VTVSS
101	T0170PMP 055D10	EVQLVESGGGLVQVP185 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN185 ILG	WYRQAPAKE REMYA	197HITIGD ATD	290YAGSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	221YSRIYPYNY	320WGQGTL VTVSS
102	T0170PMP 055E01	EVQLVESGGGLVQVP187 GGSLRLSCAAS	GEVYKIN187 FLG	WYRQAPGKE REKVA	204HITIAD VAD	291YADFAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	222GSRIWYDY	321WGQGTQ VTVSS
103	T0170PMP 055E05	EVQLVESGGGLVQVP184 GGSLKLSCAAS	GAVHKIN184 FLG	WYRQAPAKE REMYA	205TITIGD EVD	292YADSAGKGRFTISRDEAKNMV YLQMTSLKPEDTAVYVFCRA	219GSRLYPYNY	321WGQGTQ VTVSS
104	T0170PMP 055F02	EVQLVESGGGLVQVP187 GGSLRLSCAAS	GEVYKIN187 FLG	WYRQAPGKE REKVA	204HITIAD VAD	291YADFAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	222GSRIWYDY	320WGQGTL VTVSS
105	T0170PMP 055F03	EVQLVESGGGLVQVP185 GGSLRLSCVAS	GDVHKIN185 ILG	WYRQAPGKE REKVA	206HISIS QTD	293YAESAAGRFTISRDESKNMV YLQMNLSLRPEDTAVYLCRA	218FSRIYPYDY	320WGQGTL VTVSS
106	T0170PMP 055F06	EVQLVESGGGLVQVP182 GGSLRLSCAAS	GSVHKIN182 FLG	WYRQAPGKE RELVA	194TITIGD ATD	279YADYAKGRFTISRDEARNMV YLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	219GSRLYPYNY	320WGQGTL VTVSS
107	T0170PMP 055F08	EVQLVESGGGLVQVP185 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN185 ILG	WYRQAPAKE REMYA	197HITIGD ATD	294YADSAGKRFISRDEAKNMV YLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	221YSRIYPYNY	320WGQGTL VTVSS
108	T0170PMP 055G05	EVQLVESGGGLVQVP181 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN181 FLG	WHRQAPGKE REKVA	197HITIGD ATD	280YADSAGKGRFTISRDEAKNMV YLQMNLSLRPEDTAVYFCRA	220GSRIYPYDY	321WGQGTQ VTVSS

[1763]

表 A-5-第 3 部分: TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

SEQ	纳米抗体	SEQ FR1	SEQ CDR1	SEQ FR2	SEQ CDR2	SEQ FR3	SEQ CDR3	SEQ FR4
109	T0170PMP 055G09	EVQLVESGGGVQVP182 GGSRLRSCAAS	GSVHKIN182 FLG	WYRQAPGKE194 REYVA	TITIGD284 ATD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV219 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	GSRLYPYNY	321 WTGGTQ VTVSS
110	T0170PMP 056A02	EVQLVESGGGLVQVP181 GGSARLSCVAS	GDVHKIN181 FLG	WYRQAPGKE207 REKVA	HITIGD280 QTD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV222 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	GSRIWPYDY	321 WTGGTQ VTVSS
111	T0170PMP 056A08	EVQLVESGGGLVQVP183 GGSRLRSCAAS	GSVHLLN183 FLG	WYRQAPGKE195 REMYA	HITIAD281 ATD	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV220 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	GSRIYPYDY	320 WTGGTQ VTVSS
112	T0170PMP 056A10	EVQLVESGGGLVQVP183 GGSRLRSCAAS	GSVHLLN183 FLG	WYRQAPGKE195 RGVVA	HITIAD281 ATD	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV220 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	GSRIYPYDY	321 WTGGTQ VTVSS
113	T0170PMP 056B11	EVQLVESGGGLVQA185 GGSRLRSCAAS	GDVHKIN185 ILG	WYRQAPAKE197 REMYA	HITIGD280 ATD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV221 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	YSRIYPYNY	320 WTGGTQ VTVSS
114	T0170PMP 056C01	EVQLVESGGGLVQVP188 GGSRLRSCAAS	GGVHKIN188 ILG	WYRQAPAKE197 REMYA	HITIGD280 ATD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV221 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	YSRIYPYNY	320 WTGGTQ VTVSS
115	T0170PMP 056C02	EVQLVESGGGLVQVP187 GGSRLRSCAAS	GEVYKIN187 FLG	WYRQAPGKE204 REKVA	HITIAD295 VAD	YADFAQGRFTISRDEAKNMV222 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	GSRIWPYDY	321 WTGGTQ VTVSS
116	T0170PMP 056C03	EVQLVESGGGLVQVP185 GGSRLRSCAAS	GDVHKIN185 ILG	WYRQAPAKE208 REMYA	HITIGD280 TTD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV221 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	YSRIYPYNY	321 WTGGTQ VTVSS
117	T0170PMP 056C04	EVQLVESGGGLVQVP183 GGSRLRSCAAS	GSVHLLN183 FLG	WYRQAPGKE195 REMYA	HITIAD281 ATD	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV220 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	GSRIYPYDY	323 WGHGTL VTVSS
118	T0170PMP 056C07	EVQLVESGGGLVQVP181 GGSRLRSCVAS	GDVHKIN181 FLG	WYRQAPGKE198 REKVA	HITIGD280 QAD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV220 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	GSRIYPYDY	324 WGRGTL VTVSS
119	T0170PMP 056C10	EVQLVESGGGLVQVP183 GGSRLRSCAAS	GSVHLLN183 FLG	WYRQAPGKE195 REMYT	HITIAD281 ATD	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV220 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	GSRIYPYDY	321 WTGGTQ VTVSS
120	T0170PMP 056D01	EVQLVESGGDLVQVP181 GGSRLRSCAAS	GDVHKIN181 FLG	WYRQAPGKE195 REMYA	HITIAD296 ATD	YAEFAKGRFTISRDEPKNMV223 HLQMSLSLPEDTAVYLCRA	GSRIYPYNY	321 WTGGTQ VTVSS
121	T0170PMP 056D02	EVQLVESGGGLVQVP185 GGSRLRSCAAS	GDVHKIN185 ILG	WYRQAPAKE197 REMYA	HITIGD280 ATD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV221 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	YSRIYPYNY	322 WGRGTQ VTVSS
122	T0170PMP 056D11	EVQLVESGGGLVQVP185 GGSRLRSCVAS	GDVHKIN185 ILG	WYRQAPGKE209 REKVA	RISISD293 QTD	YAESAKGRFTISRDESKNMV218 YLQMSLSLPEDTAVYLCRA	FSRIYPYDY	320 WTGGTQ VTVSS
123	T0170PMP 056E02	EVQLVESGGGLVQVP187 EGSLRSCAAS	GEVYKIN187 FLG	WYRQAPGKE204 REKVA	HITIAD297 VAD	YADFAGKRLTISRDEAKNMV222 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	GSRIWPYDY	320 WTGGTQ VTVSS
124	T0170PMP 056F01	EVQLVESGGGLVQVP184 GGSRLRSCAAS	GAVHKIN184 FLG	WYRQTPKE205 REMYA	TITIGD282 EVD	YADSAKGRFTISRDEAKNMV219 YLQMSLSLPEDTAVYFCRA	GSRLYPYNY	320 WTGGTQ VTVSS

[1764]

表 A-5-第 4 部分: TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。 “SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

SEQ	纳米抗体	SEQ FR1	SEQ CDR1	SEQ FR2	SEQ CDR2	SEQ FR3	SEQ CDR3	SEQ FR4
125	T0170PMP 056F08	EVQLVESGGGLVQPI183 GGSGLSCAAS	GSVHLLN254 FLG	WYRQAPGKE REMV	195 ATD	HITIAD285 YAHFAKGRFTISRDEAKNMV YIQMNSLRPEDTAVYFCRA	220 GSRIPYDY	320 WGQGT VTVSS
126	T0170PMP 056G02	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSCAAS	GDVHKIN256 ILG	WYRQAPAKE REMV	197 ATD	HITIGD280 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	221 YSRIYPNY	320 WGQGT VTVSS
127	T0170PMP 056G11	EVQLVESGGGLVQPI187 GGSRLSCAAS	GEVYKIN251 FLG	WYRQAPGKE REKVA	210 AAD	HITIAD298 YADFAGKRFITSRDGAKNMV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	222 GSRIPYDY	321 WGQGT VTVSS
128	T0170PMP 057B02	EVQLVESGGGWVQPI189 GGSRLSCAAS	GSVYKIN264 FLS	WYRQAPGHE RELVA	211 AAD	TITIGD299 YADSAKGRFTISRDEARNMV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	219 GSRILYPNY	321 WGQGT VTVSS
129	T0170PMP 057D06	EVQLVESGGGLVQPI183 GGSRLSCAAS	GSVHLLN254 FLG	WYRQAPGKE REMV	195 ATD	HITIAD281 YSHFAKGRFTISRDEAKNMV YIQMNSLRPEDTAVYFCRA	220 GSRIPYDY	321 WGQGT VTVSS
130	T0170PMP 061A02	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSCVAS	GDVHKIN251 ILG	WYRQAPGKE REKVA	212 QTD	HIAISD293 YAESAKGRFTISRDESKNMV YIQMNSLKPEDTAVYLCRA	218 FSRIYPDY	320 WGQGT VTVSS
131	T0170PMP 061B04	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSCAAS	GDVHKIN256 ILG	WYRQAPAKE REMV	197 ATD	HITIGD300 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YIQMNSLKPEDTAAVYFCRA	221 YSRIYPNY	320 WGQGT VTVSS
132	T0170PMP 067A01	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSCAAS	GDVHKIN265 ILG	WYRQAPAKE RGMVA	197 ATD	HITIGD280 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	221 YSRIYPNY	321 WGQGT VTVSS
133	T0170PMP 067A03	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSCAAS	GDVHKIN266 ILG	WYRQAPAKE HEMVA	197 ATD	HITIGD280 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	221 YSRIYPNY	320 WGQGT VTVSS
134	T0170PMP 067B06	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSCAAS	GDVHKIN267 ILG	WYRQAPARE REMV	197 ATD	HITIGD280 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	221 YSRIYPNY	321 WGQGT VTVSS
135	T0170PMP 067C09	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSCAAS	GDVHKIN256 ILG	WYRQAPAKE REMV	197 ATD	HITIGD301 YADSAKGRFTISRDEAENMV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	221 YSRIYPNY	320 WGQGT VTVSS
136	T0170PMP 067D01	EVQLVESGGGLVQPI184 GGSRLSCAAS	GAVHKIN255 FLG	WYRQPEKE REMV	205 EVD	TITIGD282 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	219 GSRILYPNY	320 WGQGT VTVSS
137	T0170PMP 067D06	EVQLVESGGGLVQPI184 GGSRLSCAAS	GAVHKIN260 FLG	WYRQAPEKE REMV	205 EVD	TITIGD302 YADSAKGRFTISRDEATNMV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	223 GSRIPYNY	321 WGQGT VTVSS
138	T0170PMP 067D09	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSCAAS	GDVHKIN256 ILG	WYRQAPAKE REMV	213 ATS	HITIGD303 YAGSAKGRFTISRDEAKNMV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	221 YSRIYPNY	320 WGQGT VTVSS
139	T0170PMP 067E03	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSRLSCAAS	GDVHKIN256 ILG	WYRQAPAKE REMV	213 ATS	HITIGD304 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	221 YSRIYPNY	320 WGQGT VTVSS
140	T0170PMP 067E06	EVQLVESGGDLVQPI181 GGSRLSCAAS	GDVHKIN254 FLG	WYRQAPGKE REMV	195 ATD	HITIAD305 YAEFAKGRFTISRDEPKNMV YIQMNSLKPEDTAVYLCRA	223 GSRILYPNY	321 WGQGT VTVSS

[1765]

表 A-5-第 5 部分: TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

SEQ	纳米抗体	SEQ FR1	SEQ CDR1	SEQ FR2	SEQ CDR2	SEQ FR3	SEQ CDR3	SEQ FR4
141	T0170PMP 067F02	EVQLVESGGGLVQPI184 GGSLKLSCAAS	GAVHKIN184 FLG	WYRQTPEKE REKVA	205TITIGD EVD	306YAHSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMTSLKPEDTAVYFCRA	219GSRLYPYNY	321WGQGTQ VTVSS
142	T0170PMP 068C03	EVQLVESGGGLVQPI184 GGSLKLSCAAS	GAVHKIN184 FLG	WYRQTPEKE REKVA	214TITIGD EVA	282YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMTSLKPEDTAVYFCRA	219GSRLYPYNY	321WGQGTQ VTVSS
143	T0170PMP 068C07	EVQLVESGGGLVQPI187 GGSLRLSCAAS	GEVYKIN251 FLG	WYRQAPGKE REKVA	210HITIAD AAD	291YADFAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	222GSRIWYPDY	321WGQGTQ VTVSS
144	T0170PMP 068C11	EVQLVESGGGLVQPI187 GGSLRLSCAAS	GEVYKIN251 FLG	WYRQAPGKE REKVA	210HITIAD AAD	291YADFAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	220GSRIYYPDY	321WGQGTQ VTVSS
145	T0170PMP 068D05	EVQLVESGGGSVQPI182 GGSLRPSCAAS	GSVHKIN254 FLG	WYRQAPGKE REKVA	194TITIGD ATD	284YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLSPEDTAVYFCRA	219GSRLYPYNY	321WGQGTQ VTVSS
146	T0170PMP 068D07	EVQLVESGGGLVQPI187 GGSLRLSCAAS	GEVYKIN251 FLG	WYRQAPGKE REKVA	204HITIAD VAD	307YADFAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	222GSRIWYPDY	320WGQGTQ VTVSS
147	T0170PMP 068E01	EVQLVESGGGLVQPI185 GESLRLSCAAS	GDVHKIN256 ILG	WYRQAPAKE REKVA	197HITIGD ATD	280YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	221YSRIYPYNY	320WGQGTQ VTVSS
148	T0170PMP 068E08	EVQLVESGGGLVQPI187 GGSLRLSCAAS	GEVYKIN251 FLG	WYRQAPGKE REKVA	210HITIAD AAD	308YADFAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLRPEDTAVYFCRA	222GSRIWYPDY	321WGQGTQ VTVSS
149	T0170PMP 068F04	EVQLVESGGGLVQPI183 GGSLRLSCAAS	GSVHLLN254 FLG	WYRQAPGKE REKVA	215HITIAD VTD	309YSYFAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLRPEDTAVYFCRA	220GSRIYYPDY	321WGQGTQ VTVSS
150	T0170PMP 068F06	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN256 ILG	WYRQAPAKE REKVA	197HITIGD ATD	310YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	221YSRIYPYNY	320WGQGTQ VTVSS
151	T0170PMP 068F08	EVQLVESGGGSVQPI182 GGSLRLSCAAS	GSVHKIN268 FLG	WYRQAPGKE RGMVA	194TITIGD ATD	284YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLSPEDTAVYFCRA	219GSRLYPYNY	321WGQGTQ VTVSS
152	T0170PMP 069A06	EVQLVESGGGLVQPI184 GGSLKLSCAAS	GAVHKIN255 FLG	WYRQTPEKE REKVA	205TITIGD EVD	311YEDSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMTGLKPEDTAVYFCRA	219GSRLYPYNY	320WGQGTQ VTVSS
153	T0170PMP 069B02	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSLRLSCVAS	GDVHKIN251 ILG	WYRQAPGKE REKVA	206HISISD QTD	293YAESAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	218FSRIYYPDY	321WGQGTQ VTVSS
154	T0170PMP 069B08	EVQLVESGGGLVQPI190 GGSLRLSCAAS	GDVYKIN259 FLG	WYRQAPGKE REKVA	197HITIGD ATD	280YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	220GSRIYYPDY	320WGQGTQ VTVSS
155	T0170PMP 069C01	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSLRLSCRAS	GDVHKIN269 ILG	WYRQAPAKE REKVA	197HITIGD ATD	283YAESAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	221YSRIYPYNY	321WGQGTQ VTVSS
156	T0170PMP 069C04	EVQLVESGGGLVQPI185 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN270 ILG	WYRQAPAKG REKVA	197HITIGD ATD	280YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	221YSRIYPYNY	321WGQGTQ VTVSS

[1766]

表 A-5-第 6 部分: TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

SEQ	纳米抗体	SEQ FR1	SEQ CDR1	SEQ FR2	SEQ CDR2	SEQ FR3	SEQ CDR3	SEQ FR4
157	T0170PMP 069C05	EVQLVESGGDLVQPP181 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN254 FLG	WYRQAPGKE REMA	195HITIID ATD	305YAEFAKGRFTISRDEPKNNV YIQMNSLKPEDTAVYLCRA	224 GSRIYPYSY	321 WQGGTQ VTVSS
158	T0170PMP 069D02	EVQLVESGGGMVQPP185 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN256 ILG	WYRQAPAKE REMA	197HITIGD ATD	280YADSAKGRFTISRDEAKNNV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	221 YSRIYPYNY	320 WQGGTL VTVSS
159	T0170PMP 069D07	EVQLVESGGGLVQPP185 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN271 ILG	WYRQVPAKE REMA	197HITIGD ATD	300YADSAKGRFTISRDEAKNNV YIQMNSLKPEDTAAVFCRA	221 YSRIYPYNY	320 WQGGTL VTVSS
160	T0170PMP 069E02	EVQLVESGGGLVQPP187 GGSLRLSCAAS	GEVYKIN251 FLG	WYRQAPGKE REKVA	210HITIID AAD	291YADFAKGRFTISRDEAKNNV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	222 GSRIWPYDY	320 WQGGTL VTVSS
161	T0170PMP 069E07	EVQLVESGGGLVQPP183 GGSLRLSCAAS	GSVHLLN254 FLG	WYRQAPGKE REMA	195HITIID ATD	312YSHFAKGRFTISRDEAKNNV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	220 GSRIYPYDY	320 WQGGTL VTVSS
162	T0170PMP 069E09	EVQLVESGGGLVQPP181 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN254 FLG	WYRQAPGKE REMA	195HITIID ATD	305YAEFAKGRFTISRDEPKNNV YIQMNSLKPEDTAVYLCRA	223 GSRIYPYNY	321 WQGGTQ VTVSS
163	T0170PMP 069E11	EVQLVESGGGLVQPP191 GGSLRLSCAAS	GEVHKIN272 ILG	WYRQCPGKE RDMVA	194FITIGD ATD	280YADSAKGRFTISRDEAKNNV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	225 LSRLYPYNY	320 WQGGTL VTVSS
164	T0170PMP 069F05	EVQLVESGGGLVQPP185 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN256 ILG	WYRQAPAKE REMA	197HITIGD ATD	313YADSAKGRFTISRDEAKNNV YIQMNSLKPEDTAVYLCRA	221 YSRIYPYNY	321 WQGGTQ VTVSS
165	T0170PMP 069G08	EVQLVESGGGLVQPP187 GGSLRLSCAAS	GEVYKIN273 FLG	WYRQAPGKE REKVA	204HITIID VAD	291YADFAKGRFTISRDEAKNNV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	222 GSRIWPYDY	320 WQGGTL VTVSS
166	T0170PMP 070B08	EVQLVESGGDLVQPP181 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN254 FLG	WYRQAPGKE REMA	195HITIID ATD	314YAEFAKGRFTISRDEPKNNV YIQMNSLKPEDTAVYLCRA	223 GSRIYPYNY	320 WQGGTL VTVSS
167	T0170PMP 070B09	EVQLVESGGGLVQPP183 GGSLRLSCAAS	GSVHLLN251 FLG	WYRQAPGKE REKVA	195HITIID ATD	315YSHFAKGRFTISRDEAKNNV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	220 GSRIYPYDY	320 WQGGTL VTVSS
168	T0170PMP 070C09	EVQLVESGGGLVQPP181 GGSPRLSCVAS	GDVHKIN251 FLG	WYRQAPGKE REKVA	198HITIGD QAD	280YADSAKGRFTISRDEAKNNV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	220 GSRIYPYDY	320 WQGGTL VTVSS
169	T0170PMP 070D07	EVQLVESGGGLVQPP185 GGSLRLSCAAS	GDVHKIN256 ILG	WYRQAPAKE REMA	197HITIGD ATD	316YADSAKGRFTISRDEAKNNV YIQMNSLKPEDAAVYFCRA	221 YSRIYPYNY	320 WQGGTL VTVSS
170	T0170PMP 070E07	EVQLVESGGGLVQPP187 GGSLRLSCAAS	GEVYKIN251 FLG	WYRQAPGKE REKVA	204HITIID VAD	298YADFAKGRFTISRDEAKNNV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	222 GSRIWPYDY	320 WQGGTL VTVSS
171	T0170PMP 070F11	EVQLVESGGGVQPP182 GGSLRLSCAAS	GSVHKIN274 FLG	WYCOAPGKE REMA	194FITIGD ATD	284YADSAKGRFTISRDEAKNNV YIQMNSLKPEDTAVYFCRA	219 GSRLYPYNY	321 WQGGTQ VTVSS
172	T0170PMP 070G02	EVQLVESGGGLVQPP185 GGSLRLSCVAS	GDVHKIN251 ILG	WYRQAPGKE REKVA	206HISISD QTD	317YAESAKGRFTISRDESKNNV YIQMNSLKPEDAAVYLCRA	218 FSRIYPYDY	321 WQGGTQ VTVSS

[1767]

表 A-5-第 7 部分: TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

SEQ	纳米抗体	SEQ FR1	SEQ	CDR1	SEQ FR2	SEQ	CDR2	SEQ FR3	SEQ	CDR3	SEQ FR4
173	T0170PMP 070G06	EVQLVESGGGLVQPP187 GGSLRPSCAAS	187	GEVYKIN FLG	251 WYRQAPGKE REKVA	204 HITIAD VAD	291 YADFAKGRFTISRDEAKNMV YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	222	GSRIWPYDY	321 WGQGTQ VTVSS	
174	T0170PMP 082B04	EVQLVESGGGLVQPP181 GGSLRPSCVAS	181	GDVHKIN FLG	251 WYRQAPGKE REKVA	216 HITIAD QAD	280 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	220	GSRIYPYDY	320 WGQGTQ VTVSS	
175	T0170PMP 084B07	EVQLVESGGGLVQPP191 GGSLRLSCAAS	191	GEVHKIN ILG	275 WYRQAPGKE RDMVA	217 TITIGD ETQ	280 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	225	LSRLYPYNY	320 WGQGTQ VTVSS	
176	T0170PMP 084C02	EVQLVESGGGLVQPP185 GGSLRLSCAAS	185	GDVHKIN ILG	256 WYRQAPAKE REKVA	197 HITIGD ATD	318 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	320 WGQGTQ VTVSS	
177	T0170PMP 084E03	EVQLVESGGGLVQPP185 GGSLRLSCAAS	185	GDVHKIN ILG	256 WYRQAPAKE REKVA	197 HITIGD ATD	319 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	320 WGQGTQ VTVSS	
178	T0170PMP 084E05	EVQLVESGGGLVQPP185 GGSLRLSCAAS	185	GDVHKIN ILG	276 WHRQAPAKE REKVA	197 HITIGD ATD	280 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	320 WGQGTQ VTVSS	
179	T0170PMP 084F04	EVQLVESGGGLVQPP185 GGSLRLSCAAS	185	GDVHKIN ILG	276 WHRQAPAKE REKVA	197 HITIGD ATD	300 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLOMNSLKPEDTAAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	321 WGQGTQ VTVSS	
180	T0170PMP 084F10	EVQLVESGGGWVQA185 GGSLRLSCAAS	185	GDVHKIN ILG	256 WYRQAPAKE REKVA	197 HITIGD ATD	280 YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	320 WGQGTQ VTVSS	

表 A-6: 对照纳米抗体的序列。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO; “ID”是指识别名称; “序列”表示氨基酸序列。

SEQ	ID	序列
44	RSV7B2 (Q10 8L)	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSDGTTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLOMNSLKPEDTAVYCA ADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGLTVTVSS
45	cAbLys3 D1E, Q5V, A6 E, Q108L)	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLMNSLEPEDTAVYCA ADSTIYASYECGHGLSTGGYGYDSWGQGLTVTVSS

[1769]

SEQ	ID	序列
50	T017000120	EVQLVESGGGVQAGGSLRLSCAASGTTIGPYCMGWERQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEPTAIYYCA ADSTIYASYECGHGLSTGGYGYDSWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RTFSSYVMGWERQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDVSKGRFTISGDNAKNTVYLLMNSLNPEPTAVYYCVADKDETFGRTLPFIADYWGQGLTVTV SSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYA DSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNLSLKPEDTAVYFCRAFSTRIPYDYWGQGLTVTVSS
51	T017000121	EVQLVESGGGVQAGGSLRLSCAASGTTIGPYCMGWERQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEPTAIYYCA ADSTIYASYECGHGLSTGGYGYDSWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG ITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNASTVYLLMNSLKPEDTAVYYCNPFTFPISNFWGQGLTVTVSSGGGSGGGG GSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISR RDESKNMVYLQMNLSLKPEDTAVYFCRAFSTRIPYDYWGQGLTVTVSS
52	T017000126	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYVMGWERQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDVSKGRFTISGDNAKNTVYLLMNSLNPEPTAVYYCV ADKDETFGRTLPFIADYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDM GWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNASTVYLLMNSLKPEDTAVYYCNPFTFPISNFWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGG GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMV YLQMNLSLKPEDTAVYFCRAFSTRIPYDYWGQGLTVTVSS

[1774]

SEQ	ID	序列
68	人 CD123 (NP_002174)	MVLLWLTLLLIAPCLLQTKEDPNPPIITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYSMPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFFSTWILF PENSCKPWAGAENLTCWIHDVDFLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQYECLEHYKTDAGQTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILVRGRSAAFG IPCTDKFVVFQSIEIILTPPNTAKCNKTHSMHWKMRSHFRKFRYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVVEFFLSAWSTP QRFECQEEGANTRAWRTSLIIALGTLALLVCFVICRRYLVQRLFPRI PHMKDPIGDSFQNDKLVVWEAGKAGLECLVTEVQVVQKI
69	食蟹猴 CD123 (EHH61867.1)	MTLLWLTLLLVATPCLLRKEDPNAPIRNLRMKEKAQQLMWDLNRNVTVECIKGTDYMPAMNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVASPPFFSTWILF PENSCTPRAGAENLTCWVHDVDFLSCSWVVGPAAPADVQYDLYLNPNPSHEQYRCLHYKTDARGTQIGCRFDDIAFLSRGSQSSHILVRGRSAAVS IPCTDKFVFFSQIERLTPPNTGECNETHSFMHWKMKSHENRKRFRYELRIQKRMQPVIRTEQVRDTSFQLPNPGTYTVQIRARETVVEFFLSAWSTP QRFECQEEGASSRAWRTSLIIALGTLALLVCFVICRRYLVQRLFPRI PHMKDPIGDTFQDKLVVWEAGKAGLECLVSEVQVVEKT
70	人 CD3 δ (P04234)	MEHSTFLSGLVLA TLLSQVSPFKIPIEELDRVFNCTSI TWVEGTGTLSDITRLDLGKRLLDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSC VELDPATVAGIIVTDVIATLLALGVFCFAGHETGRLSQAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK
71	人 CD3 γ (P09693)	MEQKGLAVLIIAIIILQGLAQS IKNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAAEAKNITWFKDKMIGFLTEDKKWNLGSNAKDRPMYQCKGSQNKSKP LQVYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFLAVGVYFIAGQDGVRSRASKQTLLPNDQLYQPLKDRDDQYSHLQGNQLRRN
72	人 CD3 ε (P07766)	MQSGTHWRVIGLCLLSVGVWGQDNGNEEMGGITQTPYKVISGTTVILTCPOYFSGSEILWQHNDKNI GGDEDDKNIGSDEDLHLSELKEFELEQSGYY VCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICTGGLLLLVYWSKNRKA KAKAPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPVPNPDYEPPIR KGQRDLVSGLNQRRRI
73	人 CD3 ζ (P20963)	MKWKALFTAAI LQAQLPITEAQSGLLDPKLCYLLDGI LFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNLVNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRRKGHDGLYQGLSTAFKDTYDALHMQALPPR
74	人 TCR α 恒定结构域 (P01848)	PNIQNPDEAVYQLRDSKSDKSVCLFTDFDSQTNVQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCC DVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
75	人 TCR β 恒定结构域	EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGTFPHVHLSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQPNRNFRC QVQFYGLSENDEWTDRAKPVTVIVSAEAWGRADCGFTSVSQQGLSATILYEILLGKATLVAVLVSALVLMAMVYKRKDF
76	来源于 2XN9 的人 TCR α 可变结构域	QLLEQSPQLSIQEGENLTVYCNSSVVFSSTIQWYRQEPGEGFVILVTVVTGGEVKKLKRLTTFQFDARKDSSLHITAAQPGDTGLYLCA GAGSQGN LIFGKGTKLSVK

[1775]

表 A-8-第 2 部分: CD123 的序列和 TCR 复合物的组分。 “SEQ”是指给定的 SEQ ID NO; “ID”是指识别名称; “序列”表示氨基酸序列

SEQ	ID	序列
77	衍生自 2XN9 的人 TCR β 可变结构域	DGGITQSPKYLFRKEGQNVVTLSC EQNLNHDAMYWRQDPGGGRLLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKEFPPLTVTSAQKNPTAFYLCASSSR SSYEQYFGPGRLLTVT
343	衍生自 2IAN 的人 TCR α 可变结构域	IQVEQSPDILLQEGANSTLRNCFSDSVNLIQWFHQNPWGQLINLFYIPSGTKQNGRLSATTVATERYSLLIYSSSQTTDSDGVYFCAALIQAQKL VFGQGRLLTN
344	衍生自 2IAN 的人 TCR β 可变结构域	NAGVTQTPKFRILKIQGSMTLQCTQDMNHNMYWYRQDPGMGLKLIYYSVGAGITDKGEVPNGYVSRSTTEFFLRLELAAPQSQTSYVFCASTYH GTGYFGEGSWLTVV
345	衍生自 3TOE 的人 TCR α 可变结构域	GDAKTTQPNMESNEEPPVHLPCNHSTISGTDYIHWRQLPSQGP EYVIHGLFSNVNRMASLAAEDRKSSTLILHRATLRDAAVVYCTVYGGAT NKLIIFGTGTLIAVQ
346	衍生自 3TOE 的人 TCR β 可变结构域	VVSQHPSWVIAKSGTSVKTECRSLDFQATTFWYRQFPKQSLMIMATSNEGSKATYEQGVKDRKFLINHASLITLSTLTVTSAHPEDSSFFYICSARG GSYNSPLHFGNGRLLTVT
347	食蟹猴 TCR α 恒定结构域	PYIQNPDEAVYQLRGSKSNDTSVCLFTDFDSVMNVSQSKDSVHIITDKTVLDMRSMDFKSNQAVAWSNKSDFACTSAFKDSVIPADTFPPSPSSC

表 A-8-第 3 部分: CD123 的序列和 TCR 复合物的组分。 “SEQ”是指给定的 SEQ ID NO; “ID”是指识别名称; “序列”表示氨基酸序列

SEQ	ID	序列

[1776]

348	恒河猴 TCR β 恒定结构域	EDLKKVPPKVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWMVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALEDSRYSLSRRLRVSA TFWHNPRNHFR C QVQFYGLSEDDDEWTEDRDKPTTQKISAEAWGRADC
349	恒河猴 TCR α 可变结构域	QQIMQIPQYQHVGEGEDEF TTYCNSSTTLSNIQWYKQRPGGHPVFLIMLVKSGEVKQKRLIFQFGEAKKNSSLHITATQT TTDVGTFCATTGVNNL FFGTGTRLTVL
350	恒河猴 TCR β 可变结构域	AGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHDYMYWYRQDPGMGLRLIHY SVGEGSTEKGEVDPDGYN VTRSNTEDFPLRLESAA P SQT SVYFCA SSYWTGRS YEQY FGGTRLTVI

序列表

<110> 埃博灵克斯股份有限公司
 <120> 能够结合CD123和TCR α/β 的T细胞募集多肽
 <130> P16-014-PCT-1
 <150> US 62/422, 770
 <151> 2016-11-16
 <150> US62/557, 208
 <151> 2017-09-12
 <160> 370
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Lys Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 [0001] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95
 Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 2
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Asn Gly Ile Ser Ser Lys Ser Asp
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Tyr Arg Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95
 Thr Phe Pro Ala Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 3
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Asn Gly Ile Thr Ser Lys Ser Asn
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Tyr Arg Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95
 Thr Phe Pro Ala Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

[0002]

<210> 4
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Pro Ser Lys Ile Asn
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95
 Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn

```

                20                25                30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val
                35                40                45
Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
                50                55                60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu
65                70                75                80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
                85                90                95
Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
                100                105                110
Val Ser Ser
                115
<210> 6
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1                5                10                15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ser Asn
                20                25                30
Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Tyr Arg Glu Trp Val
                35                40                45
Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
50                55                60
[0003] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65                70                75                80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
                85                90                95
Thr Phe Pro Ala Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
                100                105                110
Val Ser Ser
                115
<210> 7
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1                5                10                15
Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
                20                25                30
Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
                35                40                45
Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val
50                55                60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                70                75                80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                90                95
Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr
                100                105                110

```

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 8
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 8
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Lys Thr Glu Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ala Asp Lys Asp Arg Asp Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 9
 <211> 125
 <212> PRT
 [0004] <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Lys Thr Glu Tyr Thr Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ala Asp Lys Asp Arg Tyr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 10
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 10
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Trp Trp Ser Ser Gly Lys Thr Glu Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ala Asp Lys Asp Arg Asp Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR1

<400> 11

Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly
 1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0005]

<223> CDR1

<400> 12

Gly Ile Ser Ser Lys Ser Asp Ala Met Gly
 1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR1

<400> 13

Gly Ile Thr Ser Lys Ser Asn Ala Met Gly
 1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR1

<400> 14

Gly Ile Pro Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly
 1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR1

<400> 15

Gly Ile Thr Ser Lys Ser Asn Val Met Gly
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 16
 Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 17
 Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn
 1 5
 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 18
 [0006] Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 19
 Ala Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Lys Thr Glu
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 20
 Ala Ile Trp Trp Ser Ser Gly Lys Thr Glu
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 21
 Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe
 1 5
 <210> 22

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 22
 Phe Pro Ala Ile Ser Asn Phe
 1 5
 <210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 23
 Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 24
 Asp Lys Asp Arg Asp Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr
 1 5 10 15
 [0007] <210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 25
 Asp Lys Asp Arg Tyr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 26
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 26
 Glu Val Gln Leu Val Lys Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 27
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 27
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Asn

20 25
 <210> 28
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1

 <400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

 <210> 29
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 29
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

 <210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 [0008] <220>
 <223> FR2
 <400> 30
 Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala
 1 5 10

 <210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 31
 Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Tyr Arg Glu Trp Val Ala
 1 5 10

 <210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 32
 Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala
 1 5 10

 <210> 33
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2

<400> 33
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
 1 5 10
 <210> 34
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 34
 Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 1 5 10 15
 Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr
 35
 <210> 35
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 35
 Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr
 35
 [0009]
 <210> 36
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 36
 Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala
 35
 <210> 37
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 37
 Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Gly Asp Asn Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala
 35
 <210> 38

<211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 38
 Tyr Thr Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Gly Asp Asn Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala
 35
 <210> 39
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 39
 Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Gly Asp Asn Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Asn Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala
 35
 <210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 [0010] <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR4
 <400> 40
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR4
 <400> 41
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 42
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

	50					55					60					
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75					80
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
					85					90					95	
	Ala	Phe	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
	<210>															
	<211>															
	<212>															
	<213>															
	<220>															
	<223>															
	<400>															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe
				20					25					30		
	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				35			40						45			
	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
				50			55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr
	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
[0011]	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
				100					105					110		
	Val	Ser	Ser													
	<210>															
	<211>															
	<212>															
	<213>															
	<220>															
	<223>															
	<400>															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Asp
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val
				35			40						45			
	Ala	Ala	Ile	Ser	Trp	Ser	Asp	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
				50			55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr
	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Ala	Asp	Leu	Thr	Ser	Thr	Asn	Pro	Gly	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Ile	Trp
				100					105					110		
	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
				115					120					125		
	<210>															
	<211>															

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 45
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr
 20 25 30
 Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Asn Met Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Leu Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Ser Thr Ile Tyr Ala Ser Tyr Tyr Glu Cys Gly His Gly
 100 105 110
 Leu Ser Thr Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 115 120 125
 Val Thr Val Ser Ser
 130

<210> 46
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0012]

<220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 46
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 165 170 175
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr
 180 185 190
 Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 195 200 205
 Ala Ala Ile Asn Met Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

210
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 225 230 235 240
 Leu Leu Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 245 250 255
 Ala Ala Asp Ser Thr Ile Tyr Ala Ser Tyr Tyr Glu Cys Gly His Gly
 260 265 270
 Leu Ser Thr Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 275 280 285
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 290 295 300
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 305 310 315 320
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 325 330 335
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala
 340 345 350
 Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala
 355 360 365
 Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln
 370 375 380
 Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 385 390 395 400
 Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
 405 410 415
 Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr
 420 425 430
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 435 440 445
 [0013] <210> 47
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 47
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

					165					170					175
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Lys	Ile	Asn
					180				185				190		
Asp	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Asn	Tyr	Arg	Glu	Trp	Val
		195					200					205			
Ala	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys
		210				215					220				
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu
225					230					235					240
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn
				245					250					255	
Thr	Phe	Pro	Pro	Ile	Ser	Asn	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
			260					265					270		
Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
		275					280					285			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	290					295					300				
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
305					310					315					320
Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Gly
				325				330					335		
Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
			340					345					350		
Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val	Ala	His	Ile	Ser	Ile	Gly	Asp	Gln	Thr	Asp
		355					360					365			
Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ser
	370					375						380			
Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr
385					390					395					400
Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg	Ala	Phe	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr
				405					410					415	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
			420					425							
<210>	48														
<211>	435														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	纳米抗体序列														
<400>	48														
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Lys	Ile	Asn
			20					25					30		
Asp	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Asn	Tyr	Arg	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys
		50				55					60				
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn
				85					90					95	
Thr	Phe	Pro	Pro	Ile	Ser	Asn	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
			100					105					110		
Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
		115					120					125			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly

	130					135					140									
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly				
	145					150					155									160
	Ser	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly				
					165						170									175
	Tyr	Thr	Ile	Gly	Pro	Tyr	Cys	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly				
				180					185					190						
	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val	Ala	Ala	Ile	Asn	Met	Gly	Gly	Gly	Ile	Thr				
			195					200					205							
	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gln	Asp	Asn				
	210					215						220								
	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Leu	Met	Asn	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp				
	225					230					235									240
	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Asp	Ser	Thr	Ile	Tyr	Ala	Ser	Tyr				
					245						250									255
	Tyr	Glu	Cys	Gly	His	Gly	Leu	Ser	Thr	Gly	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Ser				
				260					265						270					
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser				
			275					280						285						
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly				
			290				295					300								
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val					
	305					310					315									320
	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu				
					325						330									335
	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn	Phe	Leu				
				340					345						350					
	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val	Ala	His				
								360						365						
	Ile	Ser	Ile	Gly	Asp	Gln	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys	Gly	Arg				
	370						375						380							
	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Met				
	385					390						395								400
	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg	Ala	Phe				
					405						410									415
	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr				
				420					425					430						
	Val	Ser	Ser																	
			435																	
	<210>	49																		
	<211>	427																		
	<212>	PRT																		
	<213>	人工序列																		
	<220>																			
	<223>	纳米抗体序列																		
	<400>	49																		
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly				
	1				5					10					15					
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Lys	Ile	Asn				
				20					25					30						
	Asp	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Asn	Tyr	Arg	Glu	Trp	Val				
			35					40					45							
	Ala	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys				
							55					60								
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu				
	65					70					75				80					
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn				

				85					90				95				
	Thr	Phe	Pro	Pro	Ile	Ser	Asn	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
				100					105					110			
	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
			115					120					125				
	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
		130					135					140					
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	
		145				150					155						160
	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Pro	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	
				165						170							175
	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Val	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	
				180					185					190			
	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Tyr	Trp	Ser	Asn	Gly	Lys	Thr	
			195					200					205				
	Gln	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gly	Asp	Asn	
		210					215					220					
	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Asn	Pro	Glu	Asp	
						230					235					240	
	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Ala	Asp	Lys	Asp	Glu	Thr	Gly	Phe	Arg	
				245						250						255	
	Thr	Leu	Pro	Ile	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
				260					265					270			
	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
			275					280					285				
	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
		290					295					300					
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	
		305				310					315						320
	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	
				325						330							335
	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	
				340					345					350			
	Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val	Ala	His	Ile	Ser	Ile	Gly	Asp	Gln	Thr	Asp	
			355					360					365				
	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ser	
		370					375					380					
	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	
						390					395					400	
	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg	Ala	Phe	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr	
				405						410						415	
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
				420					425								
	<210>			50													
	<211>			445													
	<212>			PRT													
	<213>			人工序列													
	<220>																
	<223>			纳米抗体序列													
	<400>			50													
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Ile	Gly	Pro	Tyr	
				20					25					30			
	Cys	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val	
			35					40					45				
	Ala	Ala	Ile	Asn	Met	Gly	Gly	Gly	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	

	50					55					60								
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gln	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr			
	65					70					75					80			
	Leu	Leu	Met	Asn	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys			
					85					90					95				
	Ala	Ala	Asp	Ser	Thr	Ile	Tyr	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Cys	Gly	His	Gly			
				100					105					110					
	Leu	Ser	Thr	Gly	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu			
			115						120				125						
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly			
			130						135				140						
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly			
	145								150				155			160			
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly			
					165					170					175				
	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Pro	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala			
				180					185					190					
	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Val	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala			
			195						200				205						
	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Tyr	Trp	Ser	Asn	Gly			
			210						215				220						
	Lys	Thr	Gln	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gly			
	225					230					235				240				
	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Asn	Pro			
					245						250				255				
	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Ala	Asp	Lys	Asp	Glu	Thr	Gly			
				260						265				270					
	Phe	Arg	Thr	Leu	Pro	Ile	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu			
			275						280				285						
[0017]	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly			
			290						295				300						
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly			
	305								310				315			320			
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly			
					325					330					335				
	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala			
				340						345				350					
	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala			
			355						360				365						
	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val	Ala	His	Ile	Ser	Ile	Gly	Asp	Gln			
			370						375				380						
	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp			
	385					390					395				400				
	Glu	Ser	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu			
					405						410				415				
	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg	Ala	Phe	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr			
				420					425					430					
	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
			435						440				445						
	<210>	51																	
	<211>	435																	
	<212>	PRT																	
	<213>	人工序列																	
	<220>																		
	<223>	纳米抗体序列																	
	<400>	51																	
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ala	Gly	Gly			

	1			5					10				15			
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Ile	Gly	Pro	Tyr
				20					25				30			
	Cys	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val
			35					40					45			
	Ala	Ala	Ile	Asn	Met	Gly	Gly	Gly	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
			50				55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gln	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr
	65					70					75				80	
	Leu	Leu	Met	Asn	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Ala	Asp	Ser	Thr	Ile	Tyr	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Cys	Gly	His	Gly
				100					105					110		
	Leu	Ser	Thr	Gly	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			115					120					125			
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			130				135					140				
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
	145					150					155				160	
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly
				165						170					175	
	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala
				180					185					190		
	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Lys	Ile	Asn	Asp	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr
			195					200					205			
	Pro	Gly	Asn	Tyr	Arg	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr
			210				215						220			
	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
[0018]	225					230					235				240	
	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu
				245							250				255	
	Asp	Thr	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Thr	Phe	Pro	Pro	Ile	Ser	Asn	Phe
				260					265					270		
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
			275					280					285			
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			290				295					300				
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val
	305					310					315				320	
	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu
				325						330					335	
	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn	Phe	Leu
				340					345					350		
	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val	Ala	His
				355				360						365		
	Ile	Ser	Ile	Gly	Asp	Gln	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys	Gly	Arg
				370			375					380				
	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Met
	385					390					395				400	
	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg	Ala	Phe
				405						410					415	
	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
				420					425					430		
	Val	Ser	Ser													
			435													
	<210>		52													
	<211>		427													

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 52
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 165 170 175
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn
 180 185 190
 Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val
 195 200 205
 Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
 210 215 220
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu
 225 230 235 240
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
 245 250 255
 Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 260 265 270
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 275 280 285
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 290 295 300
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
 325 330 335
 Asp Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly
 340 345 350
 Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp
 355 360 365
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser
 370 375 380
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 385 390 395 400
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr
 405 410 415

[0019]

	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
				420					425										
	<210>	53																	
	<211>	267																	
	<212>	PRT																	
	<213>	人工序列																	
	<220>																		
	<223>	纳米抗体序列																	
	<400>	53																	
	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
	1				5					10					15				
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn			
				20					25					30					
	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val			
			35					40					45						
	Ala	His	Ile	Ser	Ile	Gly	Asp	Gln	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys			
		50				55						60							
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu			
	65					70					75				80				
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg			
				85						90					95				
	Ala	Phe	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu			
				100					105					110					
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly			
			115					120					125						
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly			
		130				135						140							
[0020]	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly			
	145					150					155			160					
	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala			
				165						170				175					
	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Lys	Ile	Asn	Asp	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr			
				180					185					190					
	Pro	Gly	Asn	Tyr	Arg	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr			
			195					200					205						
	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp			
		210				215						220							
	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu			
	225					230					235				240				
	Asp	Thr	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Thr	Phe	Pro	Pro	Ile	Ser	Asn	Phe			
				245						250				255					
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
				260					265										
	<210>	54																	
	<211>	279																	
	<212>	PRT																	
	<213>	人工序列																	
	<220>																		
	<223>	纳米抗体序列																	
	<400>	54																	
	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
	1				5					10					15				
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn			
				20					25					30					
	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val			
			35					40					45						

Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95
Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
145 150 155 160
Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
165 170 175
Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala
180 185 190
Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Ser Asp Gly
195 200 205
Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
210 215 220
Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro
225 230 235 240
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Leu Thr Ser Thr Asn
245 250 255
Pro Gly Ser Tyr Ile Tyr Ile Trp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270
[0021] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275
<210> 55
<211> 427
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 55
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Pro	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly
					165					170					175	
	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Val	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
				180					185					190		
	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Tyr	Trp	Ser	Asn	Gly	Lys	Thr
			195					200					205			
	Gln	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gly	Asp	Asn
		210					215					220				
	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Asn	Pro	Glu	Asp
	225					230					235				240	
	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Ala	Asp	Lys	Asp	Glu	Thr	Gly	Phe	Arg
				245						250					255	
	Thr	Leu	Pro	Ile	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
				260					265					270		
	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
			275					280					285			
	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	290						295					300				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
	305					310					315					320
	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly
				325						330						335
	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
				340					345					350		
	Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val	Ala	His	Ile	Ser	Ile	Gly	Asp	Gln	Thr	Asp
			355					360					365			
	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ser
			370				375					380				
[0022]	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr
	385					390					395					400
	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg	Ala	Phe	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr
				405						410					415	
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
				420					425							
	<210>	56														
	<211>	267														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	纳米抗体序列														
	<400>	56														
	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Lys	Ile	Asn
				20					25					30		
	Asp	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Asn	Tyr	Arg	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
	Ala	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys
			50				55					60				
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu
	65					70					75					80
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn
				85						90					95	
	Thr	Phe	Pro	Pro	Ile	Ser	Asn	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
			100						105					110		
	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
			115					120						125		

	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	130						135					140				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
	145					150					155					160
	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly
					165					170						175
	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
				180					185					190		
	Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val	Ala	His	Ile	Ser	Ile	Gly	Asp	Gln	Thr	Asp
			195				200						205			
	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ser
			210				215						220			
	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr
	225					230					235					240
	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg	Ala	Phe	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr
					245					250						255
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
				260					265							
	<210>	57														
	<211>	279														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	纳米抗体序列														
	<400>	57														
	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Asp
	1				5					10					15	
[0023]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
	Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val
			35				40						45			
	Ala	Ala	Ile	Ser	Trp	Ser	Asp	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
			50				55						60			
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr
	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Ala	Asp	Leu	Thr	Ser	Thr	Asn	Pro	Gly	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Ile	Trp
				100					105					110		
	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
			115					120					125			
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
							135						140			
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
	145						150						155			160
	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro
					165							170				175
	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys
				180						185				190		
	Ile	Asn	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu
			195					200					205			
	Lys	Val	Ala	His	Ile	Ser	Ile	Gly	Asp	Gln	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser
			210				215						220			
	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn	Met	Val
	225					230					235					240
	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe
					245					250						255

Cys Arg Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 260 265 270
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 275
 <210> 58
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 58
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp
 20 25 30
 Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala
 35 40 45
 Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln
 65 70 75 80
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr
 85 90 95
 Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 [0024] 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 145 150 155 160
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp
 165 170 175
 Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 180 185 190
 Glu Arg Glu Lys Val Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr
 195 200 205
 Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys
 210 215 220
 Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
 225 230 235 240
 Val Tyr Phe Cys Arg Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp
 245 250 255
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 275 280 285
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
 290 295 300
 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Pro Leu Arg
 305 310 315 320
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly
 325 330 335
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile
 340 345 350
 Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg
 355 360 365

Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
 370 375 380
 Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp
 385 390 395 400
 Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp
 405 410 415
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 420 425
 <210> 59
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 59
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 165 170 175
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 180 185 190
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 195 200 205
 Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 210 215 220
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
 225 230 235 240
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 245 250 255
 Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 260 265 270
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 275 280 285
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 290 295 300
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 305 310 315 320
 Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 325 330 335

[0025]

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr
 340 345 350
 Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr
 355 360 365
 Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 370 375 380
 Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
 385 390 395 400
 Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe
 405 410 415
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 420 425
 <210> 60
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 60
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 165 170 175
 Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr
 180 185 190
 Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr
 195 200 205
 Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220
 Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 260 265 270
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 275 280 285
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 290 295 300

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Pro Leu
 305 310 315 320
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met
 325 330 335
 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala
 340 345 350
 Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly
 355 360 365
 Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 370 375 380
 Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala
 385 390 395 400
 Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr
 405 410 415
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 420 425
 <210> 61
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 61
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 165 170 175
 Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala
 180 185 190
 Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly
 195 200 205
 Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly
 210 215 220
 Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro
 225 230 235 240
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly
 245 250 255
 Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

[0027]

225					230					235					240
Glu Asp Thr Ala	Val Tyr Tyr Cys Ala	Ala Asp Leu Thr Ser Thr Asn													
	245								250						255
Pro Gly Ser Tyr	Ile Tyr Ile Trp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly														
	260								265						270
Thr Leu Val Thr	Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Gly Ser													
	275								280						285
Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu														
	290								295						300
Gly Gly Gly Gly	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu														
	305								310						315
Ser Gly Gly Gly	Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys														
	325								330						335
Ala Ala Ser Gly	Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg														
	340								345						350
Gln Ala Pro Gly	Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser														
	355								360						365
Gly Ser Asp Thr	Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile														
	370								375						380
Ser Arg Asp Asn	Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu														
	385								390						395
Arg Pro Glu Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu														
	405								410						415
Ser Arg Ser Ser	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser														
	420								425						
<210>	63														
<211>	417														
<212>	PRT														
[0029] <213>	人工序列														
<220>															
<223>	纳米抗体序列														
<400>	63														
Asp Val Gln Leu	Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly														
	1								5						10
Ser Leu Arg Leu	Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn														
	20								25						30
Phe Leu Gly Trp	Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val														
	35								40						45
Ala His Ile Ser	Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys														
	50								55						60
Gly Arg Phe Thr	Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu														
	65								70						75
Gln Met Asn Ser	Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg														
	85								90						95
Ala Phe Ser Arg	Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu														
	100								105						110
Val Thr Val Ser	Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly														
	115								120						125
Gly Gly Gly Ser	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly														
	130								135						140
Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly														
	145								150						155
Gly Gly Leu Val	Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala														
	165								170						175
Ser Gly Ile Thr	Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr														
	180								185						190
Pro Gly Asn Tyr	Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr														

```

        195                200                205
Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    210                215                220
Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
225                230                235                240
Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe
    245                250                255
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    260                265                270
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    275                280                285
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
    290                295                300
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
305                310                315                320
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
    325                330                335
Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
    340                345                350
Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
    355                360                365
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
    370                375                380
Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
385                390                395                400
Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
    405                410                415
Ser

```

[0030]

```

<210> 64
<211> 577
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 64
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
    20          25          30
Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
    35          40          45
Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
    50          55          60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
65          70          75          80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
    85          90          95
Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
    100         105         110
Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    115         120         125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130         135         140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
    145         150         155         160
Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

```

					165					170					175	
	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Lys	Ile	Asn	Asp	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr
					180					185					190	
	Pro	Gly	Asn	Tyr	Arg	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr
					195					200					205	
	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
					210					215					220	
	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu
	225					230					235				240	
	Asp	Thr	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Thr	Phe	Pro	Pro	Ile	Ser	Asn	Phe
					245					250					255	
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
					260					265					270	
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
					275					280					285	
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val
	290					295					300					
	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Pro	Leu
	305					310					315				320	
	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Val	Met
					325						330				335	
	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala
					340						345				350	
	Ile	Tyr	Trp	Ser	Asn	Gly	Lys	Thr	Gln	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	Lys	Gly
					355						360				365	
	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gly	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln
					370						375				380	
[0031]	Met	Asn	Ser	Leu	Asn	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Ala
	385					390					395				400	
	Asp	Lys	Asp	Glu	Thr	Gly	Phe	Arg	Thr	Leu	Pro	Ile	Ala	Tyr	Asp	Tyr
					405						410				415	
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
					420						425				430	
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
					435						440				445	
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val
	450					455									460	
	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu
	465					470					475				480	
	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met
					485						490				495	
	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser
					500						505				510	
	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly
					515						520				525	
	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
					530						535				540	
	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile
	545					550					555				560	
	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
					565						570				575	
	Ser															
	<210>	65														
	<211>	577														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														

<220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 65
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 165 170 175
 Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr
 180 185 190
 Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr
 195 200 205
 Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220
 Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 260 265 270
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 275 280 285
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
 290 295 300
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
 305 310 315 320
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
 325 330 335
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
 340 345 350
 Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 355 360 365
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
 370 375 380
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 405 410 415
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 420 425 430

[0032]

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 435 440 445
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 450 455 460
 Gln Ala Gly Gly Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
 465 470 475 480
 Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
 485 490 495
 Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr
 500 505 510
 Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys
 515 520 525
 Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala
 530 535 540
 Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu
 545 550 555 560
 Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 565 570 575
 Ser

- <210> 66
- <211> 577
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 纳米抗体序列
- <400> 66

[0033]

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

	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Ala	Asp	Lys	Asp	Glu	Thr	Gly	
					245					250					255		
	Phe	Arg	Thr	Leu	Pro	Ile	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
				260					265					270			
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
			275					280					285				
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
			290				295					300					
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	
	305					310					315				320		
	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	
				325						330				335			
	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Lys	Ile	Asn	Asp	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	
				340					345					350			
	Pro	Gly	Asn	Tyr	Arg	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr	
			355					360					365				
	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	
							375					380					
	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	
	385					390					395				400		
	Asp	Thr	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Thr	Phe	Pro	Pro	Ile	Ser	Asn	Phe	
				405						410					415		
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
				420					425					430			
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
			435					440					445				
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	
			450					455					460				
[0034]	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	
	465					470					475				480		
	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	
				485						490				495			
	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	
				500					505					510			
	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	
			515					520					525				
	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	
			530				535					540					
	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile	
	545					550					555				560		
	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	
				565						570				575			
	Ser																
	<210>	67															
	<211>	577															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	纳米抗体序列															
	<400>	67															
	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn	
				20					25				30				
	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val	
			35					40					45				

Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 165 170 175
 Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala
 180 185 190
 Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly
 195 200 205
 Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly
 210 215 220
 Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro
 225 230 235 240
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly
 245 250 255
 Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 260 265 270
 [0035] Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 275 280 285
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 290 295 300
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 305 310 315 320
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 325 330 335
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala
 340 345 350
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser
 355 360 365
 Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 370 375 380
 Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
 385 390 395 400
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg
 405 410 415
 Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 420 425 430
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 435 440 445
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 450 455 460
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu
 465 470 475 480
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met
 485 490 495
 Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser

				500					505					510				
	Ile	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg		
				515				520					525					
	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met		
				530			535					540						
	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Thr	Phe		
	545					550					555					560		
	Pro	Pro	Ile	Ser	Asn	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser		
					565					570					575			
	Ser																	
	<210>	68																
	<211>	378																
	<212>	PRT																
	<213>	智人																
	<400>	68																
	Met	Val	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Pro	Cys	Leu		
	1				5					10					15			
	Leu	Gln	Thr	Lys	Glu	Asp	Pro	Asn	Pro	Pro	Ile	Thr	Asn	Leu	Arg	Met		
				20					25					30				
	Lys	Ala	Lys	Ala	Gln	Gln	Leu	Thr	Trp	Asp	Leu	Asn	Arg	Asn	Val	Thr		
				35				40					45					
	Asp	Ile	Glu	Cys	Val	Lys	Asp	Ala	Asp	Tyr	Ser	Met	Pro	Ala	Val	Asn		
	50						55					60						
	Asn	Ser	Tyr	Cys	Gln	Phe	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	Cys	Glu	Val	Thr	Asn		
	65					70					75					80		
	Tyr	Thr	Val	Arg	Val	Ala	Asn	Pro	Pro	Phe	Ser	Thr	Trp	Ile	Leu	Phe		
				85						90					95			
[0036]	Pro	Glu	Asn	Ser	Gly	Lys	Pro	Trp	Ala	Gly	Ala	Glu	Asn	Leu	Thr	Cys		
				100					105						110			
	Trp	Ile	His	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Ser	Cys	Ser	Trp	Ala	Val	Gly	Pro		
				115				120					125					
	Gly	Ala	Pro	Ala	Asp	Val	Gln	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Leu	Asn	Val	Ala	Asn		
				130			135						140					
	Arg	Arg	Gln	Gln	Tyr	Glu	Cys	Leu	His	Tyr	Lys	Thr	Asp	Ala	Gln	Gly		
	145					150					155					160		
	Thr	Arg	Ile	Gly	Cys	Arg	Phe	Asp	Asp	Ile	Ser	Arg	Leu	Ser	Ser	Gly		
				165						170					175			
	Ser	Gln	Ser	Ser	His	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Arg	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly		
				180					185						190			
	Ile	Pro	Cys	Thr	Asp	Lys	Phe	Val	Val	Phe	Ser	Gln	Ile	Glu	Ile	Leu		
				195				200						205				
	Thr	Pro	Pro	Asn	Met	Thr	Ala	Lys	Cys	Asn	Lys	Thr	His	Ser	Phe	Met		
				210			215						220					
	His	Trp	Lys	Met	Arg	Ser	His	Phe	Asn	Arg	Lys	Phe	Arg	Tyr	Glu	Leu		
	225					230					235					240		
	Gln	Ile	Gln	Lys	Arg	Met	Gln	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Gln	Val	Arg	Asp		
				245						250					255			
	Arg	Thr	Ser	Phe	Gln	Leu	Leu	Asn	Pro	Gly	Thr	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile		
				260					265						270			
	Arg	Ala	Arg	Glu	Arg	Val	Tyr	Glu	Phe	Leu	Ser	Ala	Trp	Ser	Thr	Pro		
				275				280					285					
	Gln	Arg	Phe	Glu	Cys	Asp	Gln	Glu	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	Arg	Ala	Trp		
				290			295					300						
	Arg	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	Ala	Leu	Val	Cys		
	305					310					315					320		
	Val	Phe	Val	Ile	Cys	Arg	Arg	Tyr	Leu	Val	Met	Gln	Arg	Leu	Phe	Pro		

```

                325                330                335
Arg Ile Pro His Met Lys Asp Pro Ile Gly Asp Ser Phe Gln Asn Asp
                340                345                350
Lys Leu Val Val Trp Glu Ala Gly Lys Ala Gly Leu Glu Glu Cys Leu
                355                360                365
Val Thr Glu Val Gln Val Val Gln Lys Thr
                370                375
<210> 69
<211> 378
<212> PRT
<213> 食蟹猴
<400> 69
Met Thr Leu Leu Trp Leu Thr Leu Leu Leu Val Ala Thr Pro Cys Leu
1      5      10
Leu Arg Thr Lys Glu Asp Pro Asn Ala Pro Ile Arg Asn Leu Arg Met
20
Lys Glu Lys Ala Gln Gln Leu Met Trp Asp Leu Asn Arg Asn Val Thr
35      40
Asp Val Glu Cys Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Ser Met Pro Ala Met Asn
50      55      60
Asn Ser Tyr Cys Gln Phe Gly Ala Ile Ser Leu Cys Glu Val Thr Asn
65      70      75      80
Tyr Thr Val Arg Val Ala Ser Pro Pro Phe Ser Thr Trp Ile Leu Phe
85      90      95
Pro Glu Asn Ser Gly Thr Pro Arg Ala Gly Ala Glu Asn Leu Thr Cys
100     105     110
Trp Val His Asp Val Asp Phe Leu Ser Cys Ser Trp Val Val Gly Pro
115     120     125
[0037] Ala Ala Pro Ala Asp Val Gln Tyr Asp Leu Tyr Leu Asn Asn Pro Asn
130     135     140
Ser His Glu Gln Tyr Arg Cys Leu His Tyr Lys Thr Asp Ala Arg Gly
145     150     155     160
Thr Gln Ile Gly Cys Arg Phe Asp Asp Ile Ala Pro Leu Ser Arg Gly
165     170     175
Ser Gln Ser Ser His Ile Leu Val Arg Gly Arg Ser Ala Ala Val Ser
180     185     190
Ile Pro Cys Thr Asp Lys Phe Val Phe Phe Ser Gln Ile Glu Arg Leu
195     200     205
Thr Pro Pro Asn Met Thr Gly Glu Cys Asn Glu Thr His Ser Phe Met
210     215     220
His Trp Lys Met Lys Ser His Phe Asn Arg Lys Phe Arg Tyr Glu Leu
225     230     235     240
Arg Ile Gln Lys Arg Met Gln Pro Val Arg Thr Glu Gln Val Arg Asp
245     250     255
Thr Thr Ser Phe Gln Leu Pro Asn Pro Gly Thr Tyr Thr Val Gln Ile
260     265     270
Arg Ala Arg Glu Thr Val Tyr Glu Phe Leu Ser Ala Trp Ser Thr Pro
275     280     285
Gln Arg Phe Glu Cys Asp Gln Glu Glu Gly Ala Ser Ser Arg Ala Trp
290     295     300
Arg Thr Ser Leu Leu Ile Ala Leu Gly Thr Leu Leu Ala Leu Leu Cys
305     310     315     320
Val Phe Leu Ile Cys Arg Arg Tyr Leu Val Met Gln Arg Leu Phe Pro
325     330     335
Arg Ile Pro His Met Lys Asp Pro Ile Gly Asp Thr Phe Gln Gln Asp
340     345     350
Lys Leu Val Val Trp Glu Ala Gly Lys Ala Gly Leu Glu Glu Cys Leu

```

			355						360									365
	Val	Ser	Glu	Val	Gln	Val	Val	Glu	Lys	Thr								
			370					375										
	<210>		70															
	<211>		171															
	<212>		PRT															
	<213>		智人															
	<400>		70															
	Met	Glu	His	Ser	Thr	Phe	Leu	Ser	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Leu		
	1				5					10					15			
	Ser	Gln	Val	Ser	Pro	Phe	Lys	Ile	Pro	Ile	Glu	Glu	Leu	Glu	Asp	Arg		
				20					25					30				
	Val	Phe	Val	Asn	Cys	Asn	Thr	Ser	Ile	Thr	Trp	Val	Glu	Gly	Thr	Val		
			35					40					45					
	Gly	Thr	Leu	Leu	Ser	Asp	Ile	Thr	Arg	Leu	Asp	Leu	Gly	Lys	Arg	Ile		
	50					55						60						
	Leu	Asp	Pro	Arg	Gly	Ile	Tyr	Arg	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Ile	Tyr	Lys		
	65					70					75				80			
	Asp	Lys	Glu	Ser	Thr	Val	Gln	Val	His	Tyr	Arg	Met	Cys	Gln	Ser	Cys		
				85						90					95			
	Val	Glu	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr	Val	Ala	Gly	Ile	Ile	Val	Thr	Asp	Val		
				100						105					110			
	Ile	Ala	Thr	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Val	Phe	Cys	Phe	Ala	Gly	His		
			115					120					125					
	Glu	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Gly	Ala	Ala	Asp	Thr	Gln	Ala	Leu	Leu	Arg		
	130						135					140						
	Asn	Asp	Gln	Val	Tyr	Gln	Pro	Leu	Arg	Asp	Arg	Asp	Asp	Ala	Gln	Tyr		
	145					150					155				160			
[0038]	Ser	His	Leu	Gly	Gly	Asn	Trp	Ala	Arg	Asn	Lys							
				165							170							
	<210>		71															
	<211>		182															
	<212>		PRT															
	<213>		智人															
	<400>		71															
	Met	Glu	Gln	Gly	Lys	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Ala	Ile	Ile	Leu		
	1				5					10					15			
	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Ala	Gln	Ser	Ile	Lys	Gly	Asn	His	Leu	Val	Lys		
				20					25					30				
	Val	Tyr	Asp	Tyr	Gln	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	Thr	Cys	Asp	Ala		
			35					40					45					
	Glu	Ala	Lys	Asn	Ile	Thr	Trp	Phe	Lys	Asp	Gly	Lys	Met	Ile	Gly	Phe		
	50						55					60						
	Leu	Thr	Glu	Asp	Lys	Lys	Lys	Trp	Asn	Leu	Gly	Ser	Asn	Ala	Lys	Asp		
	65				70					75					80			
	Pro	Arg	Gly	Met	Tyr	Gln	Cys	Lys	Gly	Ser	Gln	Asn	Lys	Ser	Lys	Pro		
				85						90					95			
	Leu	Gln	Val	Tyr	Tyr	Arg	Met	Cys	Gln	Asn	Cys	Ile	Glu	Leu	Asn	Ala		
				100						105					110			
	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Phe	Leu	Phe	Ala	Glu	Ile	Val	Ser	Ile	Phe	Val		
			115					120					125					
	Leu	Ala	Val	Gly	Val	Tyr	Phe	Ile	Ala	Gly	Gln	Asp	Gly	Val	Arg	Gln		
	130						135					140						
	Ser	Arg	Ala	Ser	Asp	Lys	Gln	Thr	Leu	Leu	Pro	Asn	Asp	Gln	Leu	Tyr		
	145					150					155				160			
	Gln	Pro	Leu	Lys	Asp	Arg	Glu	Asp	Asp	Gln	Tyr	Ser	His	Leu	Gln	Gly		
				165						170					175			

Asn Gln Leu Arg Arg Asn
 180
 <210> 72
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 72
 Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
 20 25 30
 Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45
 Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
 50 55 60
 Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
 65 70 75 80
 His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
 85 90 95
 Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
 100 105 110
 Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
 115 120 125
 Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
 130 135 140
 Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
 165 170 175
 [0039] Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
 180 185 190
 Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195 200 205
 <210> 73
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 73
 Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
 1 5 10 15
 Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
 20 25 30
 Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
 35 40 45
 Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 50 55 60
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 65 70 75 80
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 85 90 95
 Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 100 105 110
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 115 120 125
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 130 135 140
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala

	145		150		155		160
	Leu Pro Pro Arg						
	<210> 74						
	<211> 142						
	<212> PRT						
	<213> 智人						
	<400> 74						
	Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser						
	1 5 10 15						
	Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln						
	20 25 30						
	Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys						
	35 40 45						
	Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val						
	50 55 60						
	Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn						
	65 70 75 80						
	Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys						
	85 90 95						
	Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn						
	100 105 110						
	Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val						
	115 120 125						
	Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser						
	130 135 140						
	<210> 75						
	<211> 177						
[0040]	<212> PRT						
	<213> 智人						
	<400> 75						
	Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro						
	1 5 10 15						
	Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu						
	20 25 30						
	Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn						
	35 40 45						
	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys						
	50 55 60						
	Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu						
	65 70 75 80						
	Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys						
	85 90 95						
	Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp						
	100 105 110						
	Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg						
	115 120 125						
	Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser						
	130 135 140						
	Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala						
	145 150 155 160						
	Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp						
	165 170 175						
	Phe						
	<210> 76						
	<211> 108						

<212> PRT
 <213> 智人
 <400> 76
 Gln Leu Leu Glu Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ser Ile Gln Glu Gly Glu
 1 5 10 15
 Asn Leu Thr Val Tyr Cys Asn Ser Ser Ser Val Phe Ser Ser Leu Gln
 20 25 30
 Trp Tyr Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu Val Thr Val
 35 40 45
 Val Thr Gly Gly Glu Val Lys Lys Leu Lys Arg Leu Thr Phe Gln Phe
 50 55 60
 Gly Asp Ala Arg Lys Asp Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ala Gln Pro
 65 70 75 80
 Gly Asp Thr Gly Leu Tyr Leu Cys Ala Gly Ala Gly Ser Gln Gly Asn
 85 90 95
 Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Lys
 100 105
 <210> 77
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 77
 Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg Lys Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp Ala Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr
 35 40 45
 [0041] Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu Gly Tyr
 50 55 60
 Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Val Thr Ser
 65 70 75 80
 Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Arg
 85 90 95
 Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr
 100 105 110
 <210> 78
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 78
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val His Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 79
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 79
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Gly Leu Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Tyr Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Arg Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110

[0042]

Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 80
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 80
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Pro Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 81
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 81
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

- <210> 82
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 纳米抗体序列
- <400> 82

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

[0043]

- <210> 83
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 纳米抗体序列
- <400> 83

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

	1			5					10				15			
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn
				20					25				30			
	Ile	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Ala	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val
			35				40					45				
	Ala	His	Ile	Thr	Ile	Gly	Asp	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Glu	Ser	Ala	Lys
		50				55					60					
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75				80	
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
				85					90					95		
	Ala	Tyr	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210>			87												
	<211>			117												
	<212>			PRT												
	<213>			人工序列												
	<220>															
	<223>			纳米抗体序列												
	<400>			87												
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Gly
	1				5					10				15		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn
				20					25					30		
	Ile	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Ala	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val
			35				40					45				
[0045]	Ala	His	Ile	Thr	Ile	Gly	Asp	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys
		50				55					60					
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75				80	
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
				85					90					95		
	Ala	Tyr	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210>			88												
	<211>			117												
	<212>			PRT												
	<213>			人工序列												
	<220>															
	<223>			纳米抗体序列												
	<400>			88												
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10				15		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn
				20					25					30		
	Ile	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Ala	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val
			35				40					45				
	Ala	His	Ile	Thr	Ile	Gly	Asp	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys
		50				55					60					
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75				80	
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
				85					90					95		

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 89
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 89
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Gln Ala Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 90
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 90
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Ser Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 91
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 91

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

<210> 92

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 92

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

[0047]

<210> 93

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 93

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

				85						90					95	
	Ala	Gly	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210>	94														
	<211>	117														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	纳米抗体序列														
	<400>	94														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Pro	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	His	Leu	Leu	Asn
				20					25					30		
	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val
			35					40					45			
	Ala	His	Ile	Thr	Ile	Ala	Asp	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	His	Phe	Ala	Lys
		50					55					60				
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75					80
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
					85					90					95	
	Ala	Gly	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
[0048]	<210>	95														
	<211>	117														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	纳米抗体序列														
	<400>	95														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	His	Leu	Leu	Asn
				20					25					30		
	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val
			35					40					45			
	Ala	His	Ile	Thr	Ile	Ala	Asp	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	His	Phe	Ala	Lys
		50					55					60				
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75					80
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
					85					90					95	
	Ala	Gly	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210>	96														
	<211>	117														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	纳米抗体序列														

<400> 96
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Thr Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Val Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 97

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 97

[0049] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp His Arg Gln Pro Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Val Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 98

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 98

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 99
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 99

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

[0050]

<210> 100
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 100
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp His Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Val Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 101
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 101

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

<210> 102

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 102

[0051]

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

<210> 103

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 103

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

65 70 75 80
 Gln Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Val Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 104
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 104
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 [0052] Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 105
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 105
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Ser Ile Ser Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Arg
 85 90 95
 Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 106
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 106
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Tyr Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Arg Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 107

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 107

[0053] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 108

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 108

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 109
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 109
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Val Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Ser Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 110
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 110
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 111
 <211> 117
 <212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 111
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ser His Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 112

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 112

[0055]

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

<210> 113

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 113

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

	50		55		60														
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu			
	65					70					75					80			
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg			
					85					90					95				
	Ala	Tyr	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu			
				100					105					110					
	Val	Thr	Val	Ser	Ser														
				115															
	<210>			114															
	<211>			117															
	<212>			PRT															
	<213>			人工序列															
	<220>																		
	<223>			纳米抗体序列															
	<400>			114															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
	1				5					10					15				
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Val	His	Lys	Ile	Asn			
				20					25					30					
	Ile	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Ala	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val			
			35				40						45						
	Ala	His	Ile	Thr	Ile	Gly	Asp	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys			
		50				55					60								
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu			
	65					70					75					80			
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg			
					85					90					95				
[0056]	Ala	Tyr	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu			
				100					105					110					
	Val	Thr	Val	Ser	Ser														
				115															
	<210>			115															
	<211>			117															
	<212>			PRT															
	<213>			人工序列															
	<220>																		
	<223>			纳米抗体序列															
	<400>			115															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
	1				5					10					15				
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Glu	Val	Tyr	Lys	Ile	Asn			
				20					25					30					
	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val			
			35				40						45						
	Ala	His	Ile	Thr	Ile	Ala	Asp	Val	Ala	Asp	Tyr	Ala	Asp	Phe	Ala	Gln			
		50				55					60								
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu			
	65					70					75					80			
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg			
					85					90					95				
	Ala	Gly	Ser	Arg	Ile	Trp	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln			
				100					105					110					
	Val	Thr	Val	Ser	Ser														
				115															
	<210>			116															
	<211>			117															

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 116
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 117
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 117

[0057] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ser His Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 118
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 118

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Gln Ala Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95
Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 119
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 119
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Val His Leu Asn
20 25 30
Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val
35 40 45
Thr His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ser His Phe Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95
Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 120
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 120
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30
Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val
35 40 45
Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Pro Lys Asn Met Val His Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Arg
85 90 95
Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 121

<211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 121
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 122
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 122

[0059]

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

<210> 123
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 123

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val

35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 124
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 124
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Pro Cys Ala Ala Ser Gly Ala Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 [0060] Gln Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Val Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 125
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 125
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ala His Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 126
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 126
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

[0061]

<210> 127
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 127
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 128
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 128
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Tyr Lys Ile Asn
 20 25 30

115
 <210> 131
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 131
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser

115
 <210> 132
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 132
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Gly Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115
 <210> 133
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 133
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

[0063]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu His Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 134
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 134
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Arg Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 135
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 135
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Glu Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

[0064]

	1			5					10				15			
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn
				20					25				30			
	Ile	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Ala	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val
			35				40					45				
	Ala	His	Ile	Thr	Ile	Gly	Asp	Ala	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ser	Ala	Lys
		50				55					60					
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75				80	
	Gln	Leu	Asn	Asn	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
				85					90					95		
	Ala	Tyr	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210>			139												
	<211>			117												
	<212>			PRT												
	<213>			人工序列												
	<220>															
	<223>			纳米抗体序列												
	<400>			139												
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn
				20					25					30		
	Ile	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Ala	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val
			35				40					45				
[0066]	Ala	His	Ile	Thr	Ile	Gly	Asp	Ala	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys
		50				55					60					
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75				80	
	Gln	Leu	Asn	Asn	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
				85					90					95		
	Ala	Tyr	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210>			140												
	<211>			117												
	<212>			PRT												
	<213>			人工序列												
	<220>															
	<223>			纳米抗体序列												
	<400>			140												
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn
				20					25					30		
	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val
			35				40					45				
	Ala	His	Ile	Thr	Ile	Ala	Asp	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Glu	Phe	Ala	Lys
		50				55					60					
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Pro	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75				80	
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Leu	Cys	Arg
				85					90					95		

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 141
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 141
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Val His Lys Ile Asn
20 25 30
Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val
35 40 45
Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp Tyr Ala His Ser Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Val Cys Arg
85 90 95
Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 142
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 142
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Val His Lys Ile Asn
20 25 30
Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val
35 40 45
Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Ala Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Val Cys Arg
85 90 95
Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 143
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 纳米抗体序列
<400> 143

[0067]

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

<210> 144

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 144

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

[0068]

<210> 145

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 145

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

				85						90					95
Ala	Gly	Ser	Arg	Leu	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln
			100					105							110
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115												
<210>	146														
<211>	117														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	纳米抗体序列														
<400>	146														
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Glu	Val	Tyr	Lys	Ile	Asn
			20					25					30		
Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val
		35					40					45			
Ala	His	Ile	Thr	Ile	Ala	Asp	Val	Ala	Asp	Tyr	Ala	Asp	Phe	Ala	Lys
	50					55					60				
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Val	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
				85					90					95	
Ala	Gly	Ser	Arg	Ile	Trp	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105						110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115												
[0069] <210>	147														
<211>	117														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	纳米抗体序列														
<400>	147														
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn
			20					25					30		
Ile	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Ala	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val
		35					40					45			
Ala	His	Ile	Thr	Ile	Gly	Asp	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys
	50					55					60				
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
				85					90					95	
Ala	Tyr	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105						110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115												
<210>	148														
<211>	117														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	纳米抗体序列														

<400> 148
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80

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

<210> 149
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 149

[0070]

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

<210> 150
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 150

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

	65				70						75				80	
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
					85					90					95	
	Ala	Tyr	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210>			151												
	<211>			117												
	<212>			PRT												
	<213>			人工序列												
	<220>															
	<223>			纳米抗体序列												
	<400>			151												
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	His	Lys	Ile	Asn
				20					25					30		
	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Gly	Met	Val
			35					40					45			
	Ala	Thr	Ile	Thr	Ile	Gly	Asp	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys
			50				55					60				
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75					80
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
					85					90					95	
	Ala	Gly	Ser	Arg	Leu	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln
				100					105					110		
[0071]	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210>			152												
	<211>			117												
	<212>			PRT												
	<213>			人工序列												
	<220>															
	<223>			纳米抗体序列												
	<400>			152												
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ala	Val	His	Lys	Ile	Asn
				20					25					30		
	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val
			35					40					45			
	Ala	Thr	Ile	Thr	Ile	Gly	Asp	Glu	Val	Asp	Tyr	Glu	Asp	Ser	Ala	Lys
			50				55					60				
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75					80
	Gln	Met	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Val	Cys	Arg
					85					90					95	
	Ala	Gly	Ser	Arg	Leu	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210>			153												
	<211>			117												
	<212>			PRT												
	<213>			人工序列												

<220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 153
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Ser Ile Ser Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Arg
 85 90 95
 Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 154

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 154

[0072] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp His Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 155

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 纳米抗体序列

<400> 155

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 156
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 156
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Gly Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 157
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 157
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Pro Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 158
 <211> 117
 <212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 158
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Met Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 159
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 159

[0074]

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

<210> 160
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 160

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

	50					55					60					
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75					80
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
					85					90					95	
	Ala	Gly	Ser	Arg	Ile	Trp	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210>	161														
	<211>	117														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	纳米抗体序列														
	<400>	161														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	His	Leu	Leu	Asn
				20					25					30		
	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val
			35				40						45			
	Ala	His	Ile	Thr	Ile	Ala	Asp	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ser	His	Phe	Ala	Lys
		50					55					60				
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75					80
	Gln	Met	Asn	Gly	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
				85						90				95		
[0075]	Ala	Gly	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210>	162														
	<211>	117														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	纳米抗体序列														
	<400>	162														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn
				20					25					30		
	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Met	Val
			35				40						45			
	Ala	His	Ile	Thr	Ile	Ala	Asp	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Glu	Phe	Ala	Lys
		50					55					60				
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Pro	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75					80
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Leu	Cys	Arg
				85						90				95		
	Ala	Gly	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210>	163														
	<211>	117														

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 163
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Cys Pro Gly Lys Glu Arg Asp Met Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Leu Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 164
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 164

[0076]

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

<210> 165
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 165

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Gln Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val

35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 166
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 166
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Pro Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 [0077] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Val Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 167
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 167
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ser His Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Asn Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 168
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 168
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Pro Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Gln Ala Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

[0078]

<210> 169
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 169
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 170
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 170
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
 20 25 30

Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 171
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 171
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Cys Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Ser Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 172
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 172
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Ser Ile Ser Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Leu Cys Arg
 85 90 95
 Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser

115
 <210> 173
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 173
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Pro Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser

115
 <210> 174
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 174
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Pro Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Gln Ala Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser

115
 <210> 175
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 175
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val His Lys Ile Asn

[0080]

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

<210> 176
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 176

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

[0081]

<210> 177
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 177

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

Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 178
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 178
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp His Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

[0082]

Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 179
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 179
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Ile Leu Gly Trp His Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 180
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 180
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 181
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 181

Gly Asp Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly
 1 5 10

<210> 182
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 182

[0083]

Gly Ser Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly
 1 5 10

<210> 183
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 183

Gly Ser Val His Leu Leu Asn Phe Leu Gly
 1 5 10

<210> 184
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 184

Gly Ala Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly
 1 5 10

<210> 185
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1

<400> 185
 Gly Asp Val His Lys Ile Asn Ile Leu Gly
 1 5 10
 <210> 186
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 186
 Gly Asp Val His Lys Ile Asn Val Leu Gly
 1 5 10
 <210> 187
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 187
 Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn Phe Leu Gly
 1 5 10
 <210> 188
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 188
 [0084] Gly Gly Val His Lys Ile Asn Ile Leu Gly
 1 5 10
 <210> 189
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 189
 Gly Ser Val Tyr Lys Ile Asn Phe Leu Ser
 1 5 10
 <210> 190
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 190
 Gly Asp Val Tyr Lys Ile Asn Phe Leu Gly
 1 5 10
 <210> 191
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 191
 Gly Glu Val His Lys Ile Asn Ile Leu Gly
 1 5 10

<210> 192
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 192
 His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp
 1 5
 <210> 193
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 193
 Thr Ile Thr Ile Gly Asp Thr Thr Asp
 1 5
 <210> 194
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 194
 Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp
 1 5
 [0085] <210> 195
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 195
 His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp
 1 5
 <210> 196
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 196
 Thr Ile Thr Ile Gly Asp Asp Val Asp
 1 5
 <210> 197
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 197
 His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp
 1 5
 <210> 198
 <211> 9
 <212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 198
 His Ile Thr Ile Gly Asp Gln Ala Asp
 1 5
 <210> 199
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 199
 His Ile Ser Ile Ala Asp Ala Thr Asp
 1 5
 <210> 200
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 200
 His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Val
 1 5
 <210> 201
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 [0086] <220>
 <223> CDR2
 <400> 201
 His Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp
 1 5
 <210> 202
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 202
 His Ile Thr Ile Gly Asp Val Thr Asp
 1 5
 <210> 203
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 203
 His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asn
 1 5
 <210> 204
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2

<400> 204
 His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp
 1 5
 <210> 205
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 205
 Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp
 1 5
 <210> 206
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 206
 His Ile Ser Ile Ser Asp Gln Thr Asp
 1 5
 <210> 207
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 207
 [0087] His Ile Thr Ile Gly Asp Gln Thr Asp
 1 5
 <210> 208
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 208
 His Ile Thr Ile Gly Asp Thr Thr Asp
 1 5
 <210> 209
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 209
 Arg Ile Ser Ile Ser Asp Gln Thr Asp
 1 5
 <210> 210
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 210
 His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Ala Asp

1 5
 <210> 211
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 211
 Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Ala Asp
 1 5
 <210> 212
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 212
 His Ile Ala Ile Ser Asp Gln Thr Asp
 1 5
 <210> 213
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 213
 His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Ser
 1 5
 [0088] <210> 214
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 214
 Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Ala
 1 5
 <210> 215
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 215
 His Ile Thr Ile Ala Asp Val Thr Asp
 1 5
 <210> 216
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 216
 His Ile Thr Ile Ala Asp Gln Ala Asp
 1 5
 <210> 217
 <211> 9

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 217
 Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Thr Gln
 1 5
 <210> 218
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 218
 Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr
 1 5
 <210> 219
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 219
 Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr
 1 5
 [0089] <210> 220
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 220
 Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr
 1 5
 <210> 221
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 221
 Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr
 1 5
 <210> 222
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 222
 Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr
 1 5
 <210> 223
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> CDR3
 <400> 223
 Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr
 1 5
 <210> 224
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 224
 Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Ser Tyr
 1 5
 <210> 225
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 225
 Leu Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr
 1 5
 <210> 226
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 [0090] <400> 226
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser
 20 25
 <210> 227
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 227
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 228
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 228
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Pro Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 229
 <211> 25

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 229
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser
 20 25
 <210> 230
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 230
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 231
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 231
 [0091] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 20 25
 <210> 232
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 232
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 233
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 233
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 234
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR1
 <400> 234
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Pro Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 235
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 235
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 236
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 236
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser
 20 25
 [0092]
 <210> 237
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 237
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 238
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 238
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 239
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1

<400> 239
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 240
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 240
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Pro Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 241
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 241
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 242
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 242
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 243
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 243
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 244
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 244
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly

[0093]

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Pro Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 245
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 245
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 246
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 246
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser
 20 25
 <210> 247
 <211> 25
 <212> PRT
 [0094] <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 247
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Met Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 248
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 248
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Pro Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser
 20 25
 <210> 249
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR1
 <400> 249
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Pro Ser Cys Val Ala Ser

<210> 256
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 256
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 257
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 257
 Trp Tyr Arg Gln Cys Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 258
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 258
 Trp His Arg Gln Pro Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala
 1 5 10
 [0096] <210> 259
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 259
 Trp His Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala
 1 5 10
 <210> 260
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 260
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 261
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 261
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Val Val Ala
 1 5 10
 <210> 262
 <211> 14
 <212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 262
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Gly Val Val Ala
 1 5 10
 <210> 263
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 263
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val Thr
 1 5 10
 <210> 264
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 264
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Arg Glu Leu Val Ala
 1 5 10
 <210> 265
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 [0097] <220>
 <223> FR2
 <400> 265
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Gly Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 266
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 266
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu His Glu Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 267
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 267
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Arg Glu Arg Glu Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 268
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2

<400> 268
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Gly Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 269
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 269
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Ile Ala
 1 5 10
 <210> 270
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 270
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 271
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 271
 [0098] Trp Tyr Arg Gln Val Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 272
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 272
 Trp Tyr Arg Gln Cys Pro Gly Lys Glu Arg Asp Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 273
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 273
 Trp Gln Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala
 1 5 10
 <210> 274
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 274
 Trp Tyr Cys Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val Ala
 1 5 10

<210> 275
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 275
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 276
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR2
 <400> 276
 Trp His Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val Ala
 1 5 10
 <210> 277
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 277
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 278
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 278
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val His Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 279
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 279
 Tyr Ala Asp Tyr Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Arg Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35

[0100]

<210> 280
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 280
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 281
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 281
 Tyr Ser His Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 282
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 282
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Val Cys Arg Ala
 35
 <210> 283
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 283
 Tyr Ala Glu Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 284
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> FR3
 <400> 284
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Ser Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 285
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 285
 Tyr Ala His Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 286
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 [0101] <400> 286
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Val Cys Arg Ala
 35
 <210> 287
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 287
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 288
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 288
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15

<211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 293
 Tyr Ala Glu Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Leu Cys Arg Ala
 35
 <210> 294
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 294
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 295
 <211> 39
 <212> PRT
 [0103] <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 295
 Tyr Ala Asp Phe Ala Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 296
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 296
 Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Pro
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val His Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Leu Cys Arg Ala
 35
 <210> 297
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3

<400> 297
 Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 298
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 298
 Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 299
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 299
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Arg Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Leu Tyr Phe Cys His Ala
 35
 <210> 300
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 300
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Ala Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 301
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 301
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Glu Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr

			20					25						30		
	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg	Ala									
			35													
	<210>		302													
	<211>		39													
	<212>		PRT													
	<213>		人工序列													
	<220>															
	<223>		FR3													
	<400>		302													
	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala
	1				5					10				15		
	Thr	Asn	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr
			20						25					30		
	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg	Ala									
			35													
	<210>		303													
	<211>		39													
	<212>		PRT													
	<213>		人工序列													
	<220>															
	<223>		FR3													
	<400>		303													
	Tyr	Ala	Gly	Ser	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala
	1				5					10				15		
	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Leu	Asn	Asn	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr
			20						25					30		
	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg	Ala									
			35													
	<210>		304													
	<211>		39													
	<212>		PRT													
	<213>		人工序列													
	<220>															
	<223>		FR3													
	<400>		304													
	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala
	1				5					10				15		
	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Leu	Asn	Asn	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr
			20						25					30		
	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg	Ala									
			35													
	<210>		305													
	<211>		39													
	<212>		PRT													
	<213>		人工序列													
	<220>															
	<223>		FR3													
	<400>		305													
	Tyr	Ala	Glu	Phe	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Pro
	1				5					10				15		
	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr
			20						25					30		
	Ala	Val	Tyr	Leu	Cys	Arg	Ala									
			35													
	<210>		306													
	<211>		39													

[0105]

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 306
 Tyr Ala His Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Val Cys Arg Ala
 35
 <210> 307
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 307
 Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Val
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 308
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 308
 Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 309
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 309
 Tyr Ser Tyr Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 310
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3

[0106]

<400> 310
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Val Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 311
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 311
 Tyr Glu Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Thr Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Val Cys Arg Ala
 35
 <210> 312
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 312
 Tyr Ser His Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 313
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 313
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Leu Cys Arg Ala
 35
 <210> 314
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 314
 Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Pro
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Val Asp Thr
 20 25 30

[0107]

Ala Val Tyr Leu Cys Arg Ala
 35
 <210> 315
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 315
 Tyr Ser His Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 316
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 316
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 [0108] <210> 317
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 317
 Tyr Ala Glu Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala
 20 25 30
 Ala Val Tyr Leu Cys Arg Ala
 35
 <210> 318
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 318
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 319
 <211> 39
 <212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> FR3
 <400> 319
 Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Gly Asp Thr
 20 25 30
 Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
 35
 <210> 320
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR4
 <400> 320
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 321
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR4
 <400> 321
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 [0109] <210> 322
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR4
 <400> 322
 Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 323
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR4
 <400> 323
 Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 324
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FR4
 <400> 324
 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 325
 <211> 5

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头序列
 <400> 325
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 326
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头序列
 <400> 326
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 327
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头序列
 <400> 327
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 328
 <211> 10
 <212> PRT
 [0110] <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头序列
 <400> 328
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 329
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头序列
 <400> 329
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 330
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头序列
 <400> 330
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser
 <210> 331
 <211> 20
 <212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头序列
 <400> 331
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser
 20
 <210> 332
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头序列
 <400> 332
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25
 <210> 333
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头序列
 <400> 333
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 [0111] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30
 <210> 334
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头序列
 <400> 334
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser
 35
 <210> 335
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头序列
 <400> 335
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40
 <210> 336

<211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头序列
 <400> 336
 Ala Ala Ala
 1
 <210> 337
 <211> 303
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 337

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 [0112] Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala
 165 170 175
 Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala
 180 185 190
 Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln
 195 200 205
 Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220
 Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr
 245 250 255
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ala
 260 265 270
 Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
 275 280 285
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ala Ala His His His His His His
 290 295 300
 <210> 338
 <211> 418
 <212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 338
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 130 135 140 145
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 165 170 175
 Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr
 180 185 190
 [0113] Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr
 195 200 205
 Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220
 Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 260 265 270
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 275 280 285
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
 290 295 300
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
 305 310 315 320
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
 325 330 335
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
 340 345 350
 Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 355 360 365
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
 370 375 380
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 405 410 415
 Ser Ala

<210> 339
 <211> 578
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 339
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
 20 25 30
 Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 35 40 45
 Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
 85 90 95
 Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 [0114] 165 170 175
 Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr
 180 185 190
 Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr
 195 200 205
 Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220
 Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
 260 265 270
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 275 280 285
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
 290 295 300
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Pro Leu
 305 310 315 320
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met
 325 330 335
 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala
 340 345 350
 Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly
 355 360 365
 Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 370 375 380
 Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala

385 390 395 400
 Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr
 405 410 415
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 420 425 430
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 435 440 445
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 450 455 460
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
 465 470 475 480
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
 485 490 495
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
 500 505 510
 Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 515 520 525
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
 530 535 540
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
 545 550 555 560
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 565 570 575
 Ser Ala

<210> 340
 <211> 578
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 340

[0115]

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

			195					200						205					
	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp			
		210						215					220						
	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu			
	225					230					235					240			
	Asp	Thr	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Thr	Phe	Pro	Pro	Ile	Ser	Asn	Phe			
				245						250					255				
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser			
				260					265						270				
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
				275					280						285				
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val			
	290							295							300				
	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu			
	305					310					315					320			
	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met			
				325						330					335				
	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser			
				340						345					350				
	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly			
				355					360						365				
	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln			
				370			375								380				
	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile			
	385					390					395					400			
	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser			
				405						410					415				
[0116]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser			
				420						425					430				
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly			
				435						440					445				
	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val			
				450			455								460				
	Gln	Ala	Gly	Gly	Pro	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr			
	465					470					475					480			
	Phe	Ser	Ser	Tyr	Val	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu			
				485						490					495				
	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Tyr	Trp	Ser	Asn	Gly	Lys	Thr	Gln	Tyr			
				500					505						510				
	Thr	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gly	Asp	Asn	Ala	Lys			
				515					520						525				
	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Asn	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala			
				530			535								540				
	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Ala	Asp	Lys	Asp	Glu	Thr	Gly	Phe	Arg	Thr	Leu			
	545					550						555				560			
	Pro	Ile	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser			
				565						570						575			
	Ser	Ala																	
	<210>																		
		341																	
	<211>																		
		578																	
	<212>																		
		PRT																	
	<213>																		
		人工序列																	
	<220>																		
	<223>																		
		纳米抗体序列																	
	<400>																		
		341																	
	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			

	1			5					10				15			
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	His	Lys	Ile	Asn
				20					25				30			
	Phe	Leu	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Lys	Val
			35					40					45			
	Ala	His	Ile	Ser	Ile	Gly	Asp	Gln	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys
		50				55						60				
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn	Met	Val	Tyr	Leu
	65					70					75				80	
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Arg
				85						90					95	
	Ala	Phe	Ser	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				100					105					110		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			115					120					125			
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	130					135						140				
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	
	145					150				155					160	
	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Pro	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala
				165						170					175	
	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Val	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala
				180					185					190		
	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Tyr	Trp	Ser	Asn	Gly
			195					200					205			
	Lys	Thr	Gln	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gly
		210				215						220				
[0117]	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Asn	Pro
	225					230					235				240	
	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Ala	Asp	Lys	Asp	Glu	Thr	Gly
				245						250					255	
	Phe	Arg	Thr	Leu	Pro	Ile	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				260					265					270		
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			275					280					285			
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	290					295						300				
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	
	305					310				315					320	
	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala
				325						330					335	
	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Lys	Ile	Asn	Asp	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr
				340					345					350		
	Pro	Gly	Asn	Tyr	Arg	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr
			355					360					365			
	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
				370			375					380				
	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu
	385					390					395				400	
	Asp	Thr	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Thr	Phe	Pro	Pro	Ile	Ser	Asn	Phe
				405						410					415	
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
				420					425					430		
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			435					440					445			
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val
	450					455						460				

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
 465 470 475 480
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
 485 490 495
 Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
 500 505 510
 Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 515 520 525
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
 530 535 540
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
 545 550 555 560
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 565 570 575
 Ser Ala

<210> 342
 <211> 578
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 342

[0118]

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

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 275 280 285
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 290 295 300
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 305 310 315 320
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 325 330 335
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala
 340 345 350
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser
 355 360 365
 Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 370 375 380
 Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
 385 390 395 400
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg
 405 410 415
 Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
 420 425 430
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 435 440 445
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
 450 455 460
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu
 465 470 475 480
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met
 485 490 495
 [0119] Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser
 500 505 510
 Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg
 515 520 525
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met
 530 535 540
 Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe
 545 550 555 560
 Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 565 570 575
 Ser Ala
 <210> 343
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 343
 Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala
 1 5 10 15
 Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln
 20 25 30
 Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile
 35 40 45
 Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala
 50 55 60
 Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Ala Leu Ile Gln Gly Ala Gln Lys Leu
 85 90 95

Gly Ser Tyr Asn Ser Pro Leu His Phe Gly Asn Gly Thr Arg Leu Thr
 100 105 110
 Val Thr
 <210> 347
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴
 <400> 347
 Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Gly Ser
 1 5 10 15
 Lys Ser Asn Asp Thr Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Val
 20 25 30
 Met Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val His Ile Thr Asp Lys
 35 40 45
 Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Gly Ala Val
 50 55 60
 Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Thr Ser Ala Phe Lys Asp
 65 70 75 80
 Ser Val Ile Pro Ala Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
 85 90 95
 <210> 348
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 猕猴
 <400> 348
 Glu Asp Leu Lys Lys Val Phe Pro Pro Lys Val Ala Val Phe Glu Pro
 1 5 10 15
 [0121] Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 20 25 30
 Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45
 Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 50 55 60
 Glu Gln Pro Ala Leu Glu Asp Ser Arg Tyr Ser Leu Ser Ser Arg Leu
 65 70 75 80
 Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
 85 90 95
 Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asp Asp Glu Trp Thr Glu Asp
 100 105 110
 Arg Asp Lys Pro Ile Thr Gln Lys Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
 115 120 125
 Ala Asp Cys
 130
 <210> 349
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 猕猴
 <400> 349
 Gln Gln Ile Met Gln Ile Pro Gln Tyr Gln His Val Gln Glu Gly Glu
 1 5 10 15
 Asp Phe Thr Thr Tyr Cys Asn Ser Ser Thr Thr Leu Ser Asn Ile Gln
 20 25 30
 Trp Tyr Lys Gln Arg Pro Gly Gly His Pro Val Phe Leu Ile Met Leu
 35 40 45
 Val Lys Ser Gly Glu Val Lys Lys Gln Lys Arg Leu Ile Phe Gln Phe
 50 55 60

Gly Glu Ala Lys Lys Asn Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Thr Asp Val Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Thr Thr Gly Val Asn Asn Leu
 85 90 95
 Phe Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 350
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 猕猴
 <400> 350

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

Thr Arg Leu Thr Val Ile
 115

[0122]

<210> 351
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 351

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

Val Ser Ser
 115
 <210> 352
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 352

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

<210> 353
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 353

[0123]

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

<210> 354
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 354

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

					85					90					95		
	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
				100					105					110			
	Val	Ser	Ser														
				115													
	<210>		355														
	<211>		116														
	<212>		PRT														
	<213>		人工序列														
	<220>																
	<223>		纳米抗体序列														
	<400>		355														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	
	1				5					10					15		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	
				20					25					30			
	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
				35				40					45				
	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
				50			55					60					
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Lys	
				100					105					110			
	Val	Ser	Ser	Ala													
				115													
[0124]	<210>		356														
	<211>		115														
	<212>		PRT														
	<213>		人工序列														
	<220>																
	<223>		纳米抗体序列														
	<400>		356														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	
	1				5					10					15		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	
				20					25					30			
	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
				35				40					45				
	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
				50			55					60					
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
				100					105					110			
	Val	Ser	Ser														
				115													
	<210>		357														
	<211>		116														
	<212>		PRT														
	<213>		人工序列														
	<220>																
	<223>		纳米抗体序列														

<400> 357
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala
 115
 <210> 358
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 358
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 [0125] Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ala
 115
 <210> 359
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 359
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

<210> 360
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 360

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

[0126]

115
 <210> 361
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 361

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

115
 <210> 362
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 纳米抗体序列
 <400> 362
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ser Gly Gly
 115
 <210> 363
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 363
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser
 1 5 10
 [0127] <210> 364
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR1
 <400> 364
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser
 1 5 10
 <210> 365
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR2
 <400> 365
 Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
 1 5 10
 <210> 366
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <400> 366
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg
 1 5
 <210> 367
 <211> 17

<220>
 <221> 变体
 <222> 5
 <223> G、S或A
 <220>
 <221> 变体
 <222> 7
 <223> Xaa是Q、D、E、T、A或V
 <220>
 <221> 变体
 <222> 8
 <223> Xaa是T、A或V
 <220>
 <221> 变体
 <222> 9
 <223> Xaa是D、A、Q、N、V或S
 <400> 369
 Xaa Ile Xaa Ile Xaa Asp Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 370
 <211> 9
 <212> PRT
 [0129] <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR3
 <220>
 <221> 变体
 <222> 1
 <223> Xaa是F、Y、G、L或K
 <220>
 <221> 变体
 <222> 4
 <223> Xaa是I或L
 <220>
 <221> 变体
 <222> 5
 <223> Xaa是Y或W
 <220>
 <221> 变体
 <222> 8
 <223> Xaa是D、N或S
 <400> 370
 Xaa Ser Arg Xaa Xaa Pro Tyr Xaa Tyr
 1 5

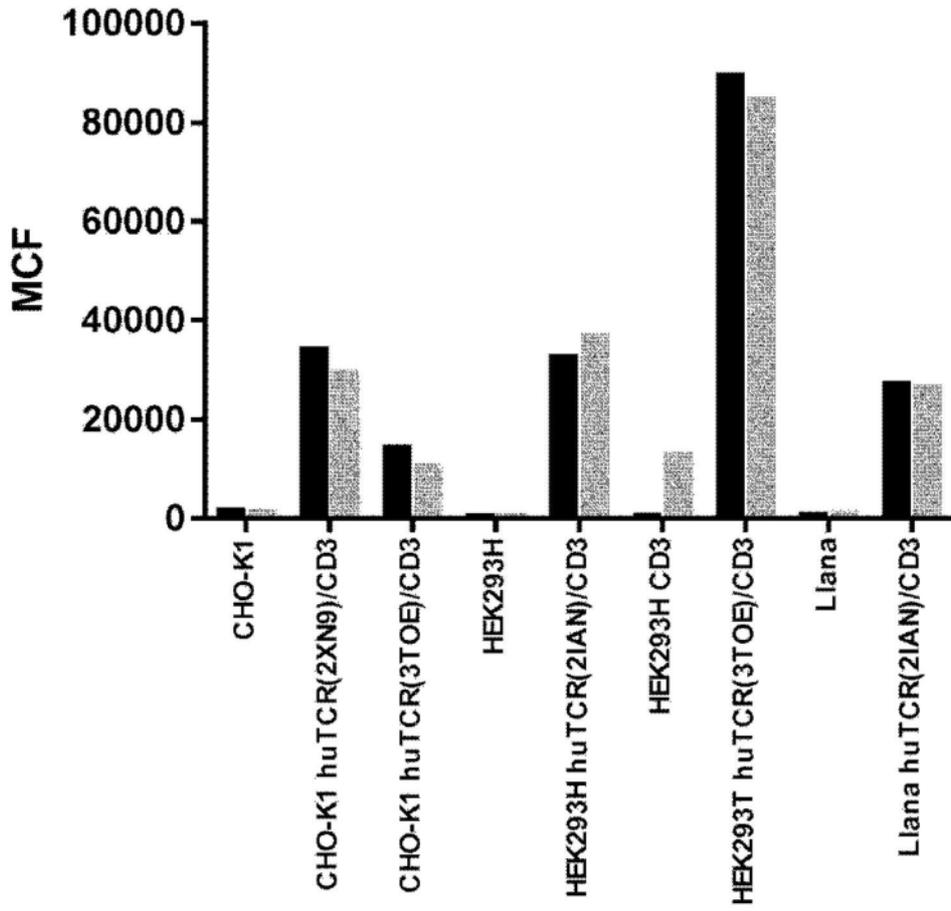


图1

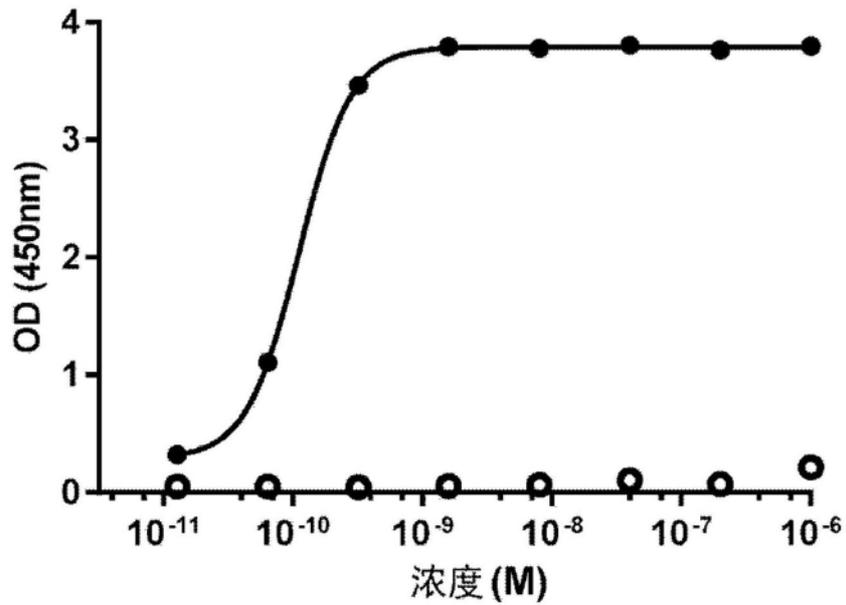
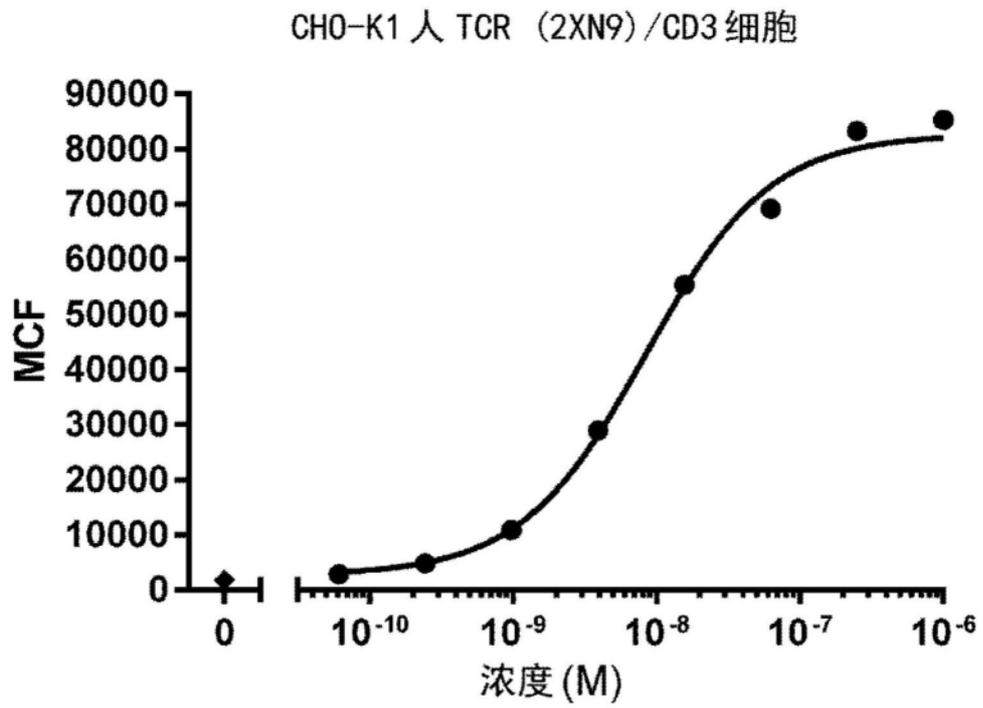


图2

A.



B.

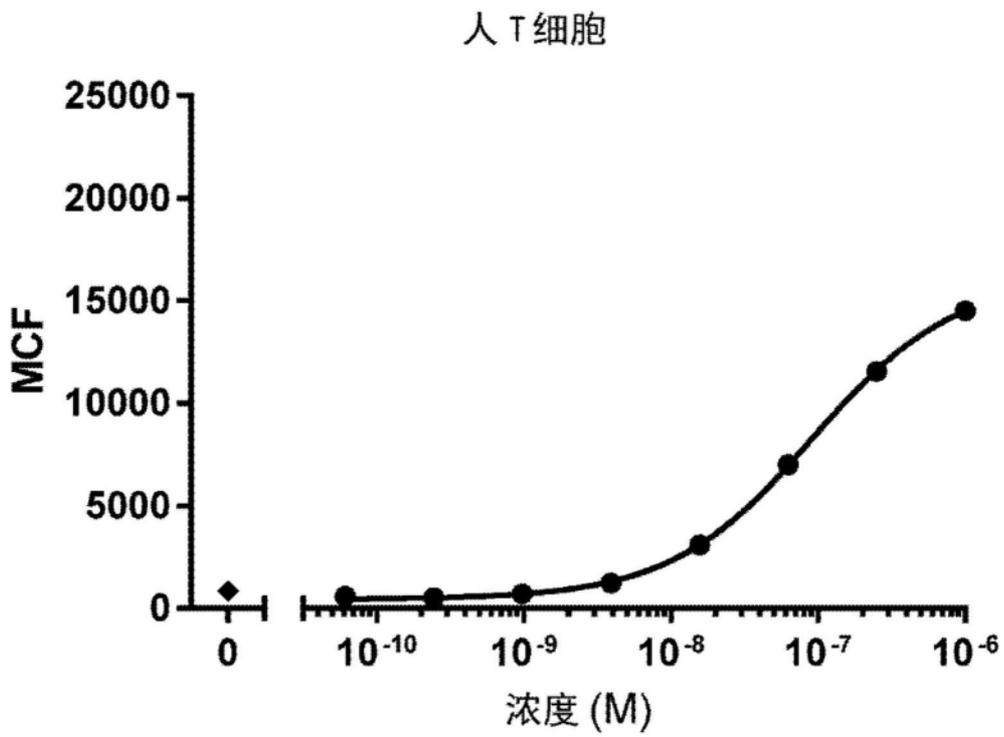
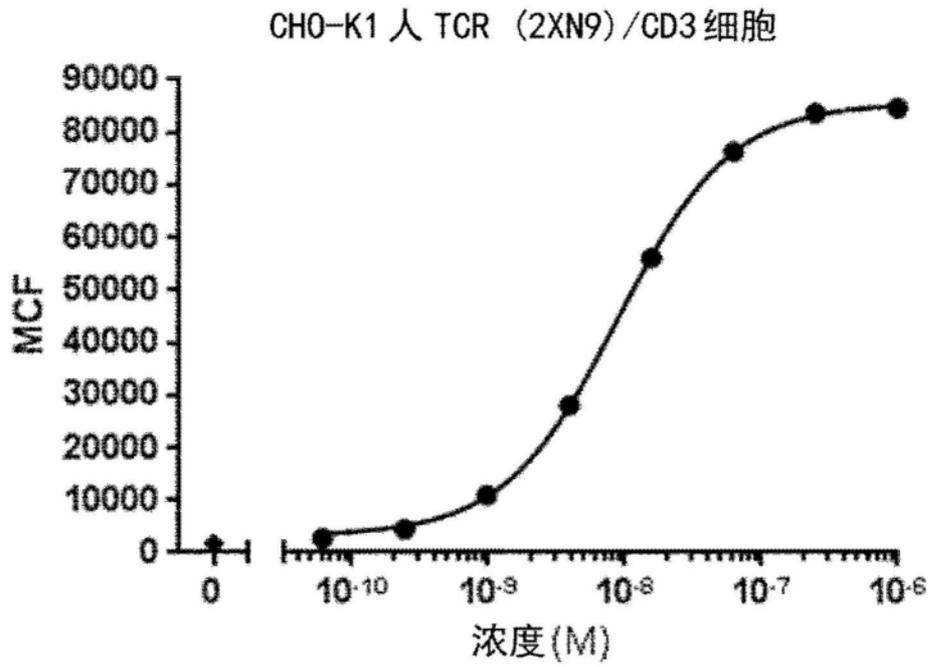


图3

C.



D.

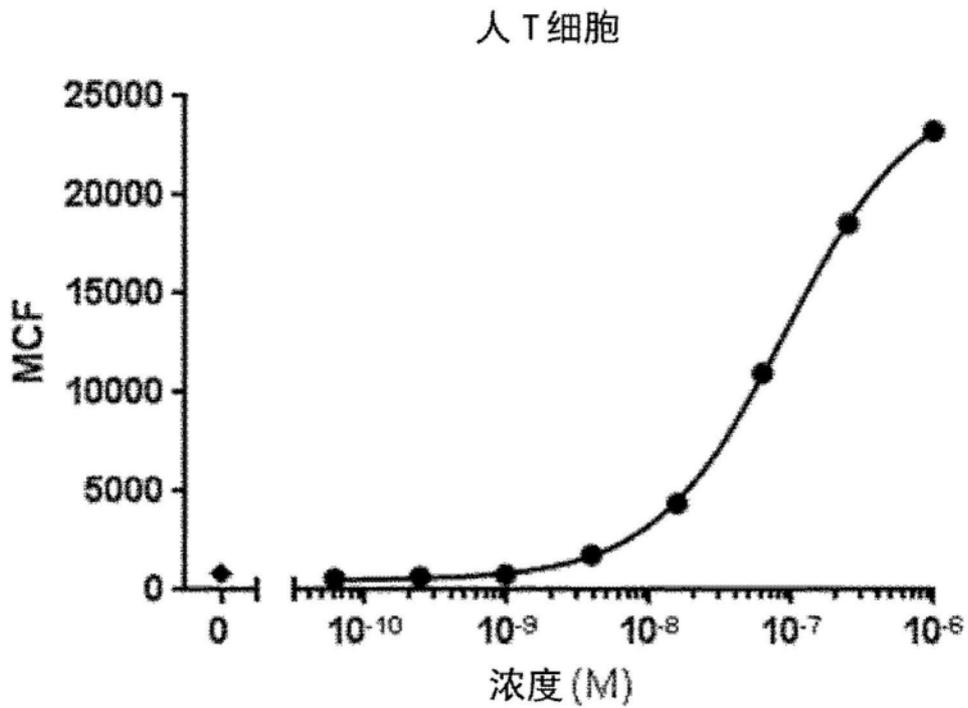
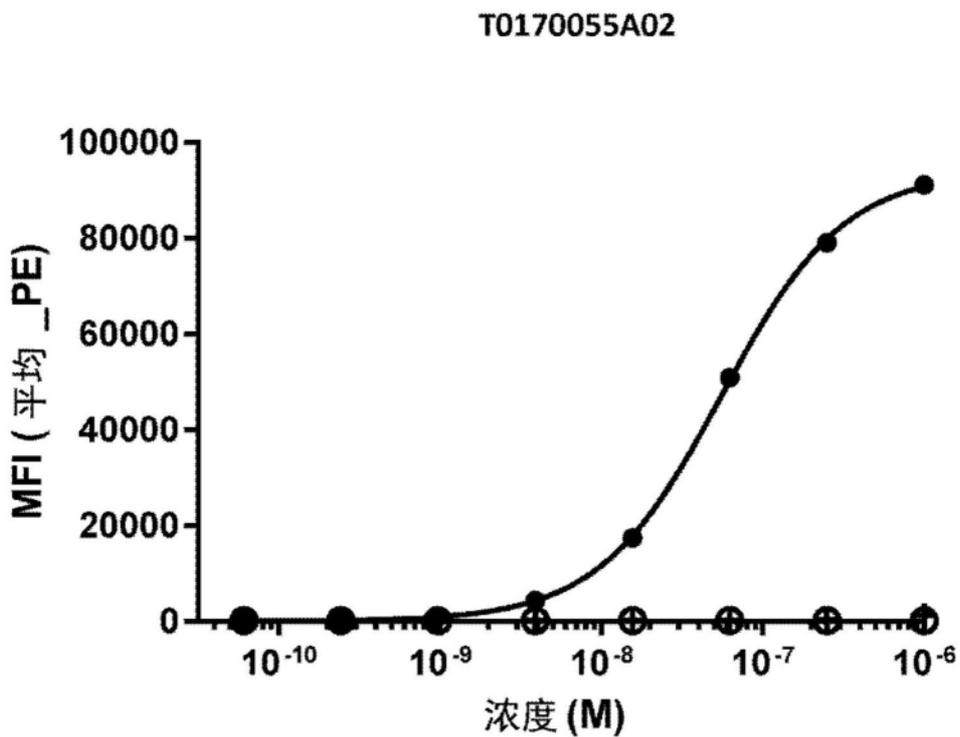


图3(续)

A.



B.

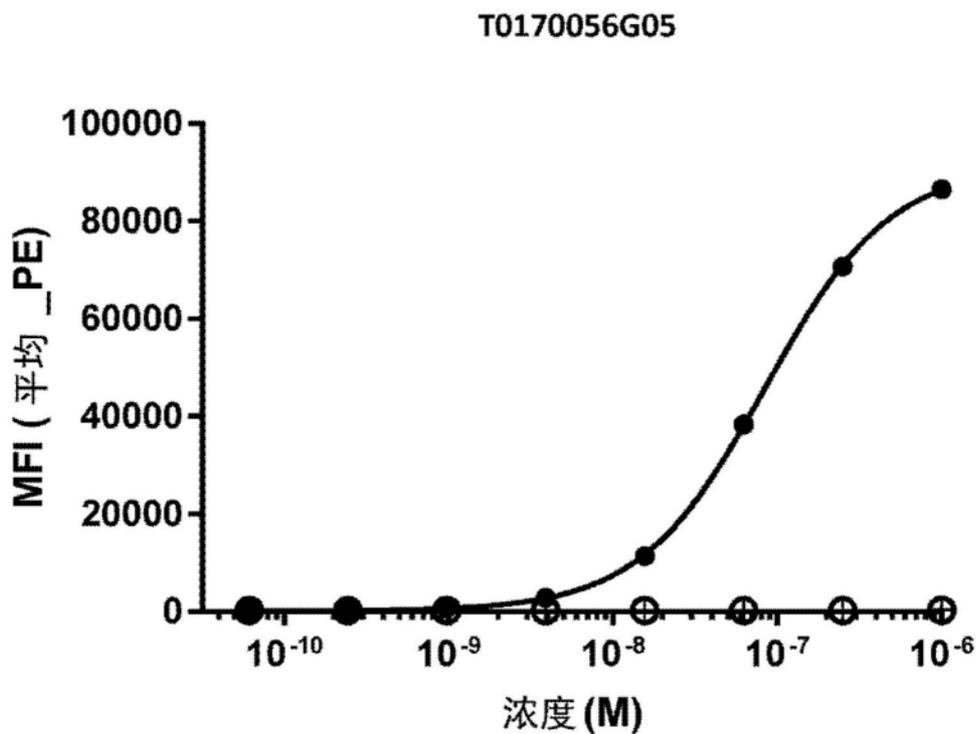
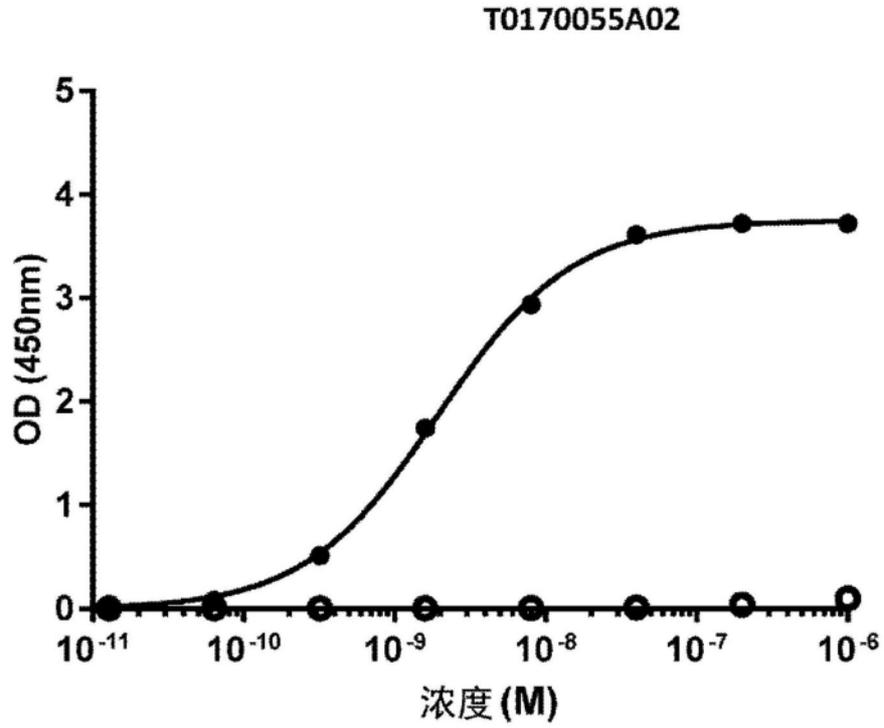


图4

A.



B.

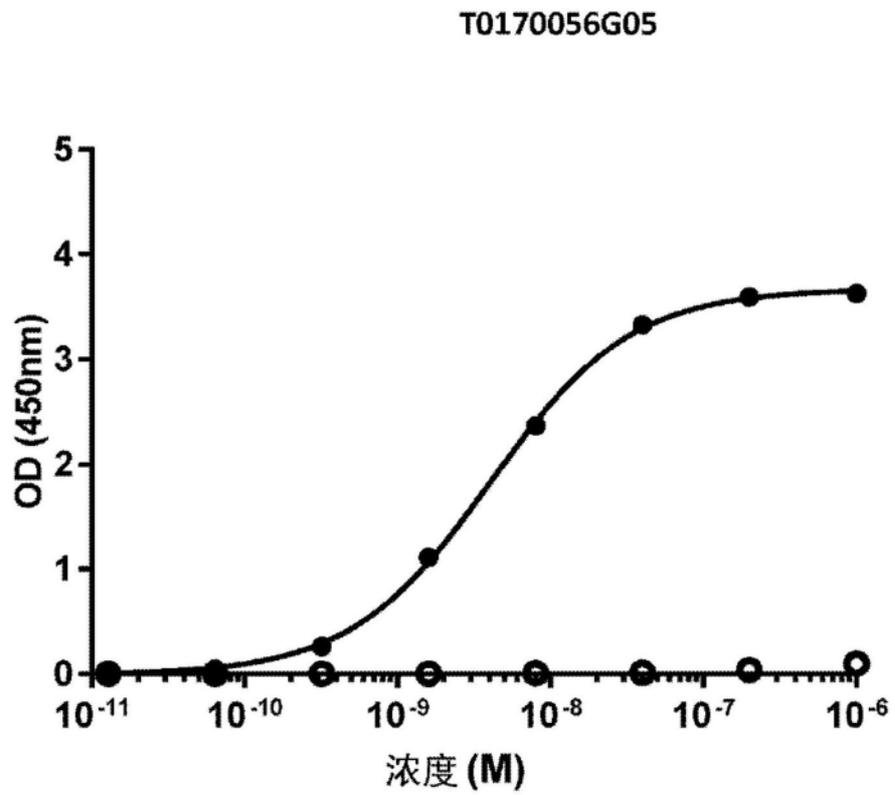
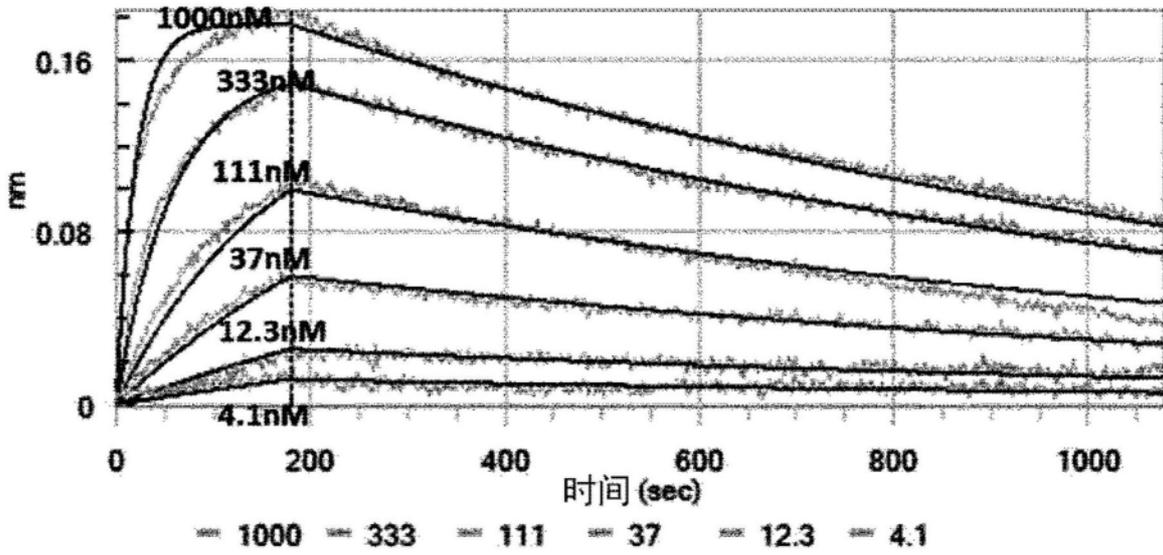


图5

A.



B.

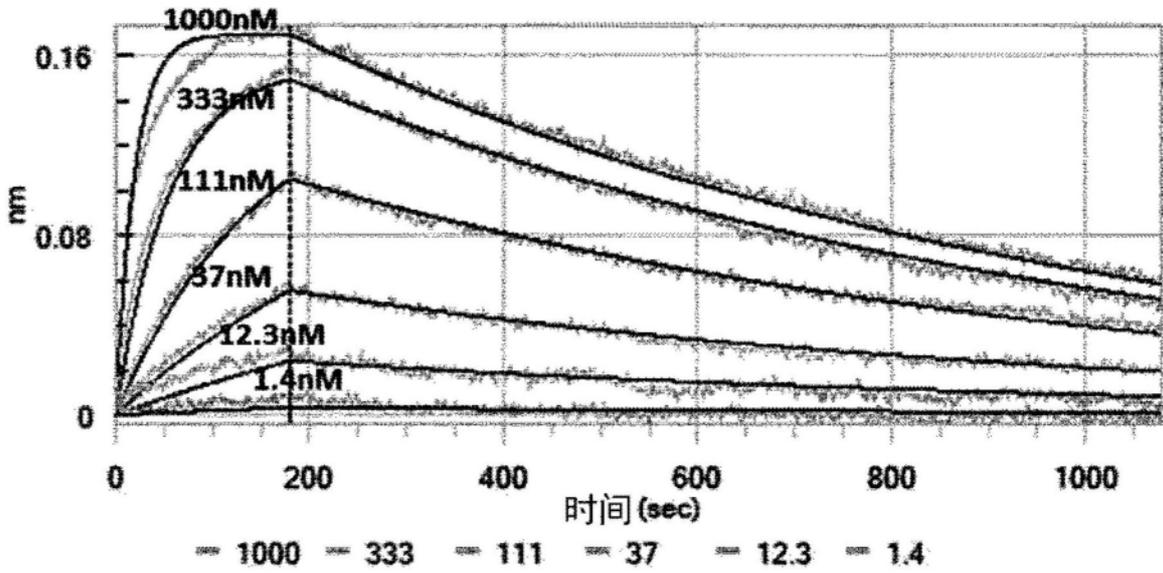
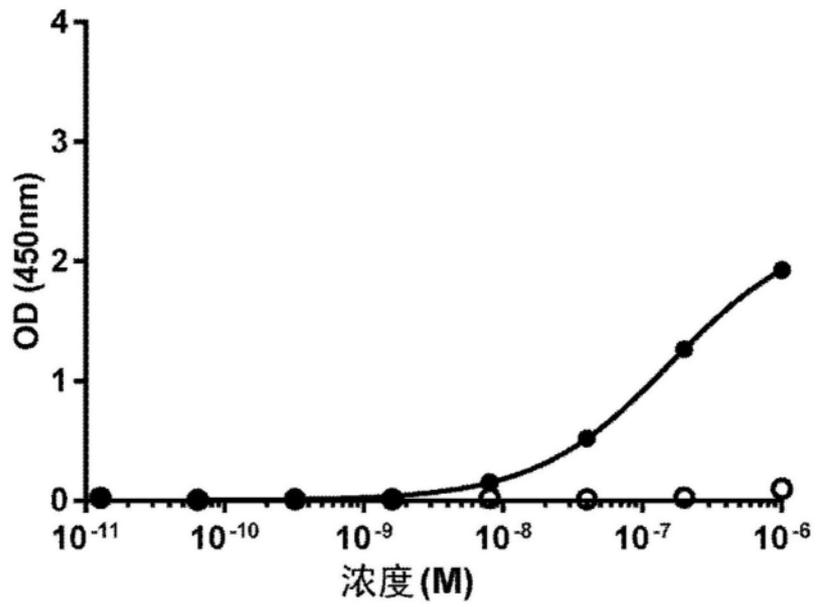


图6

A.

T0170055A02



B.

T0170056G05

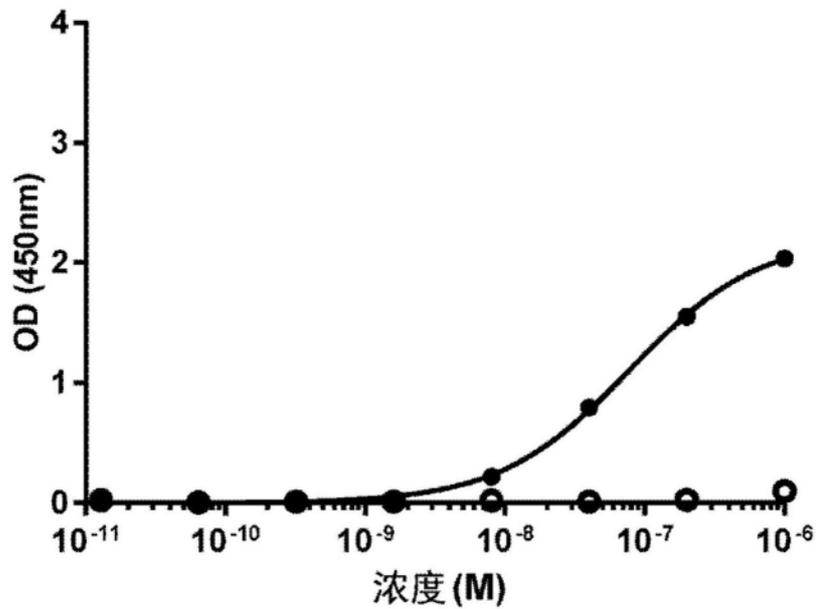
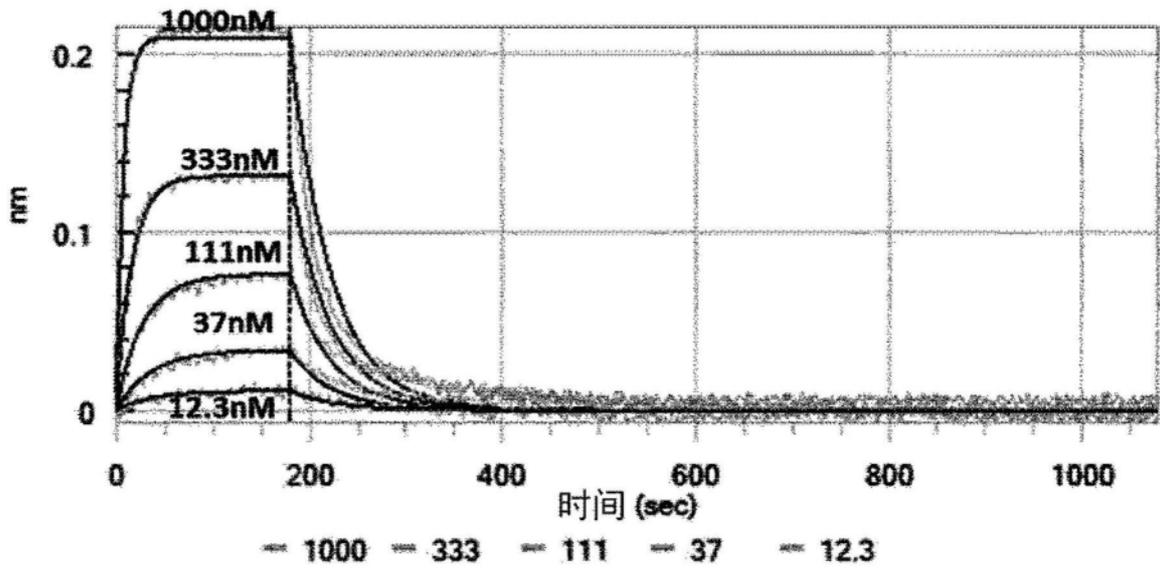


图7

A.



B.

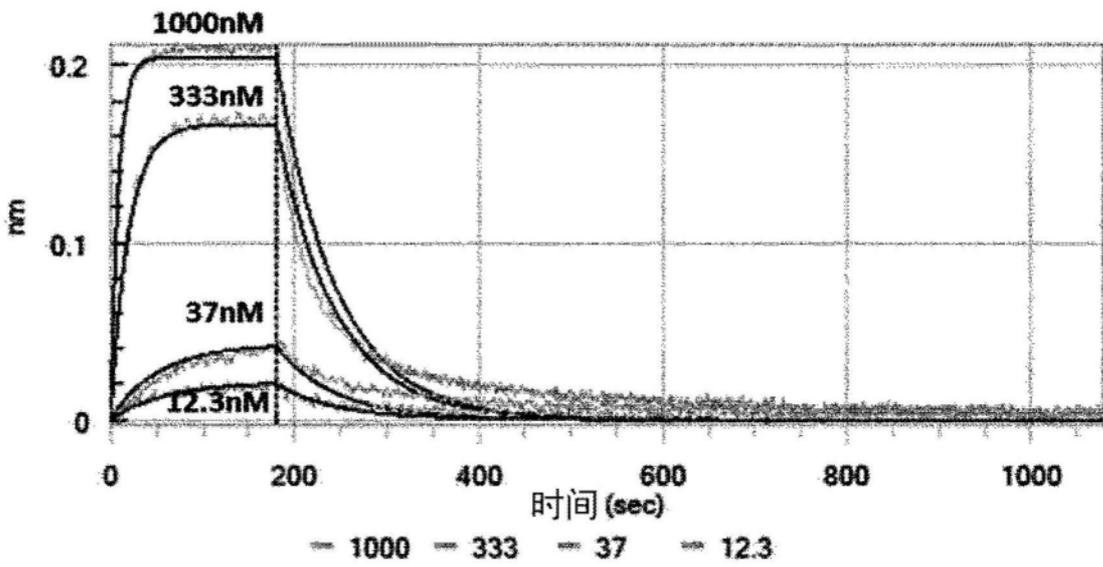
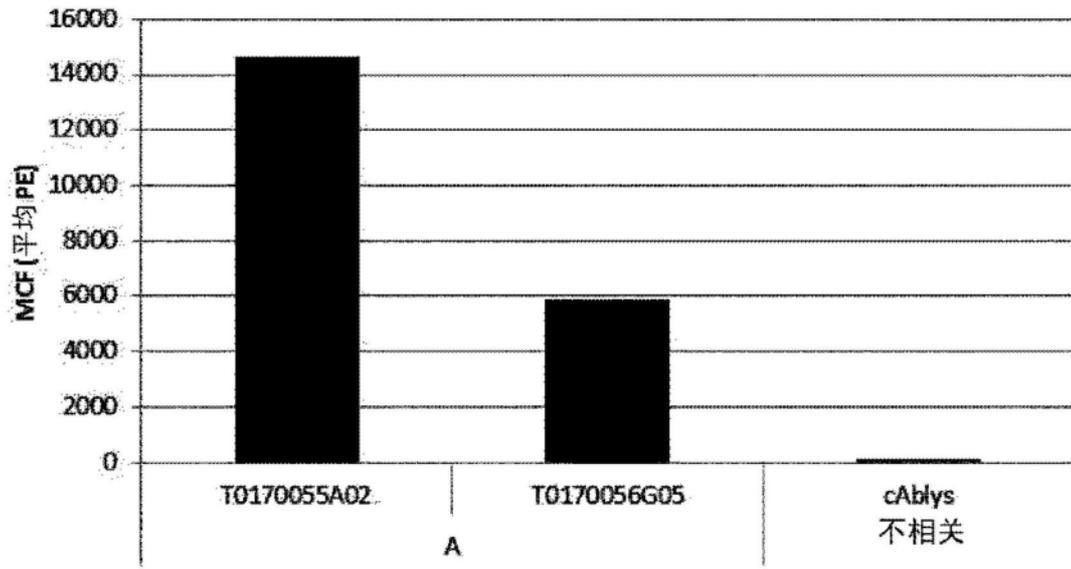


图8

A.



B.

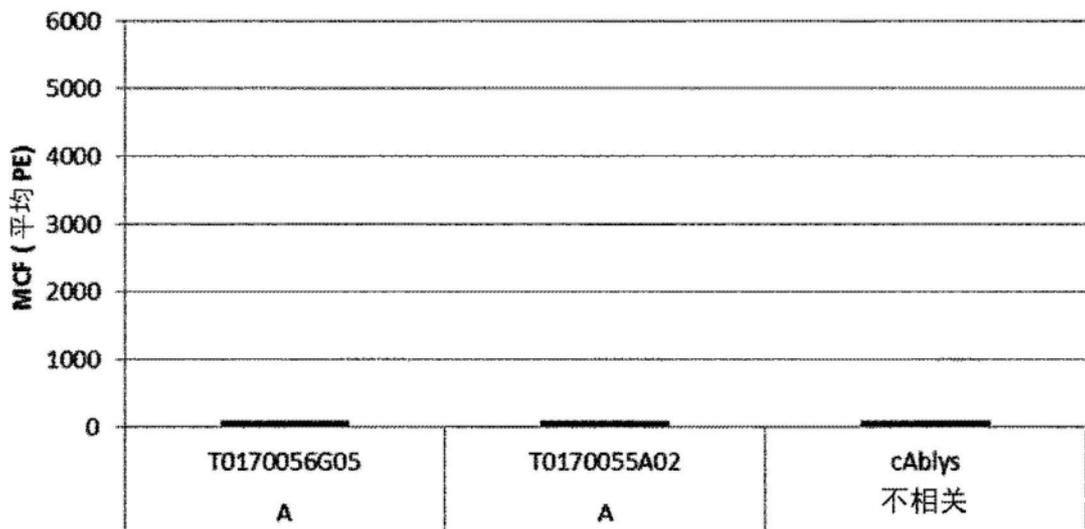


图9

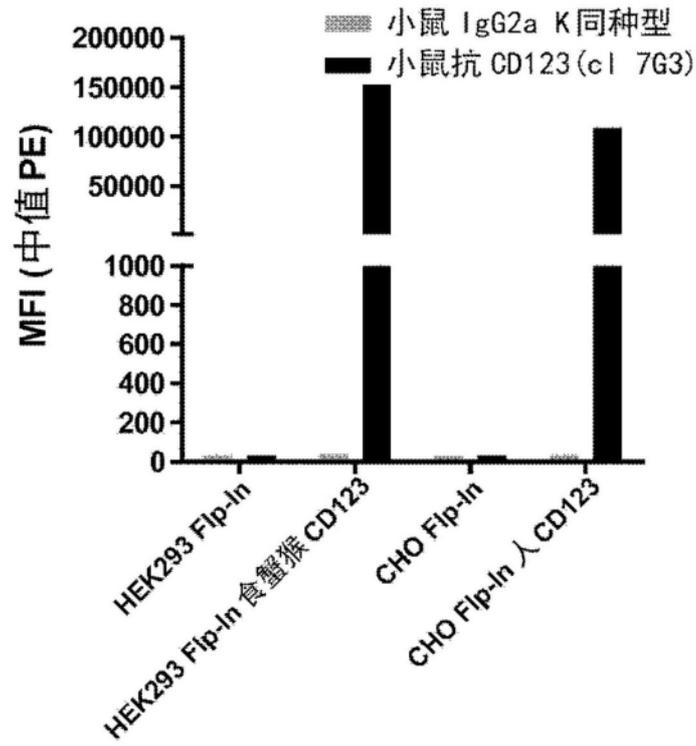


图10

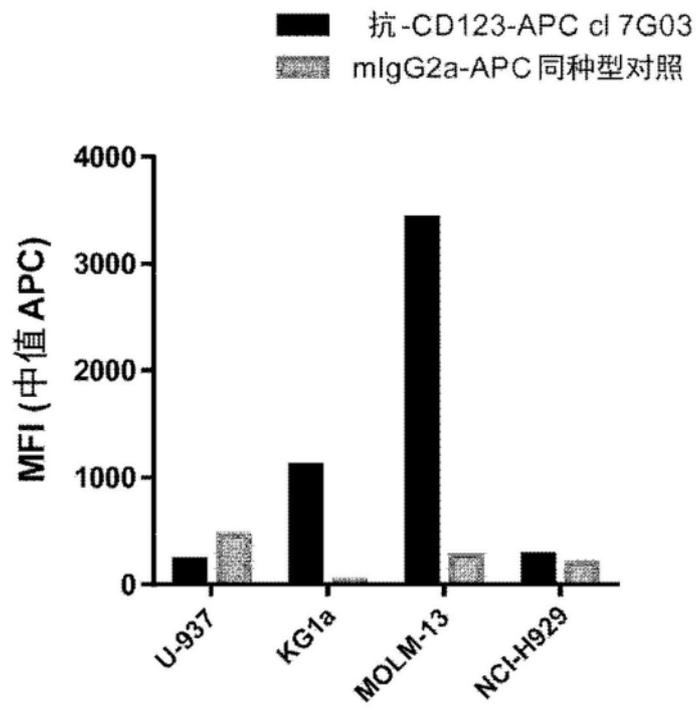
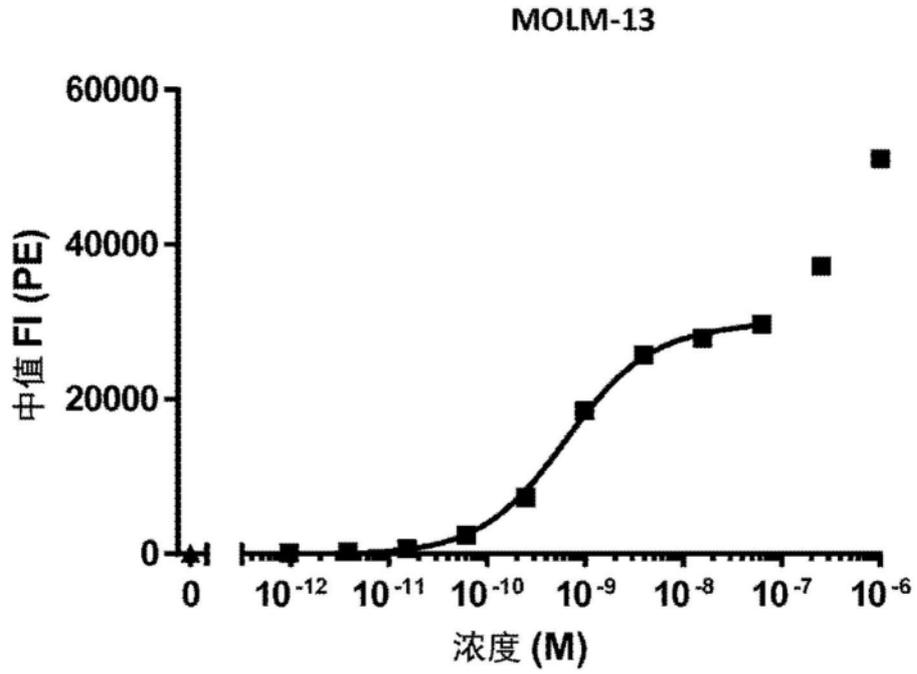


图11

A.



B.

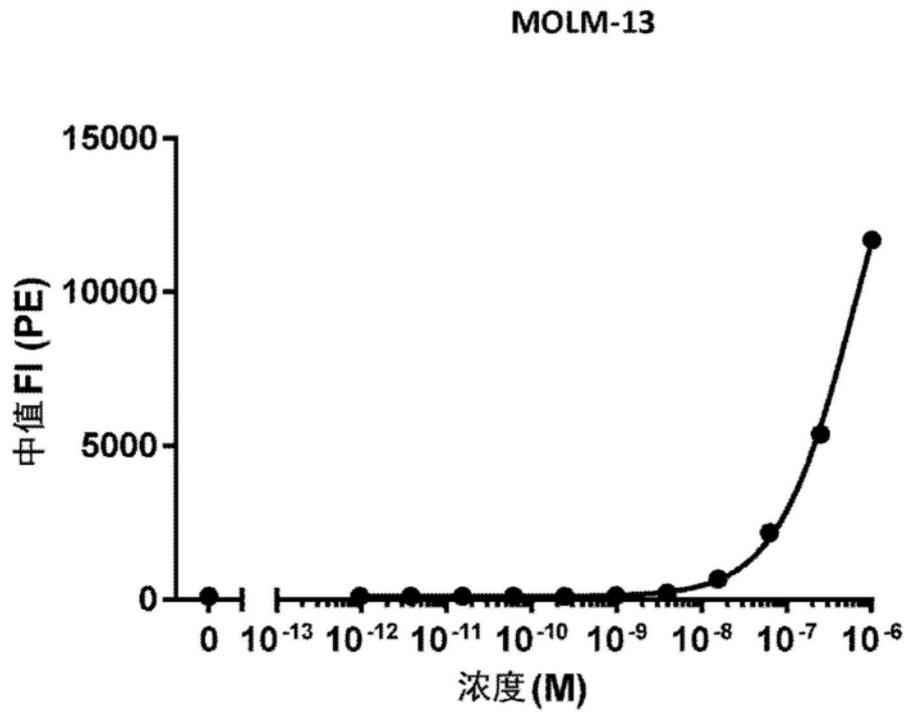
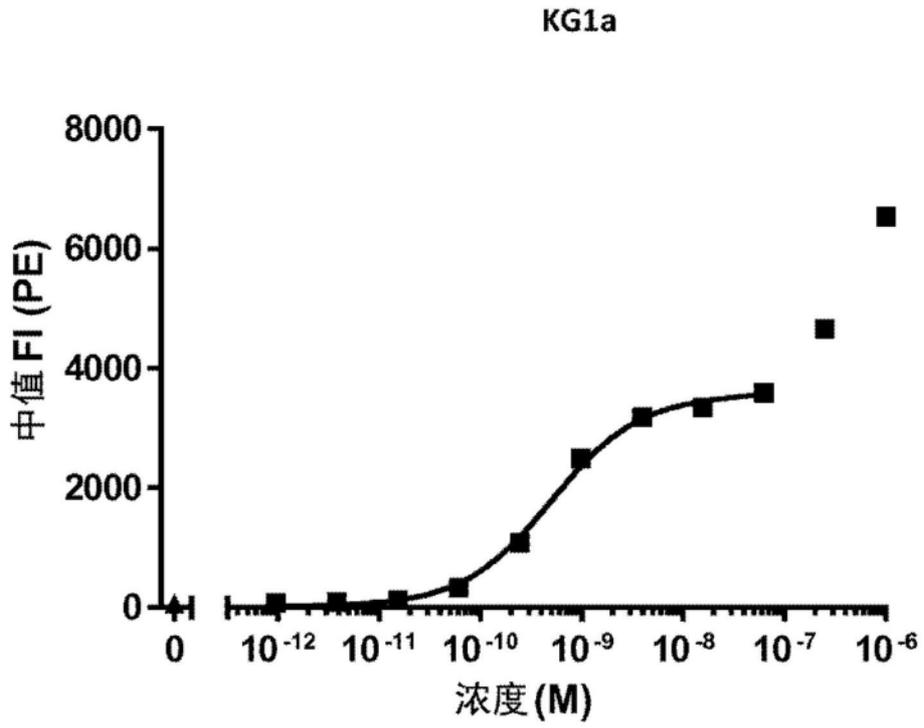


图12

C.



D.

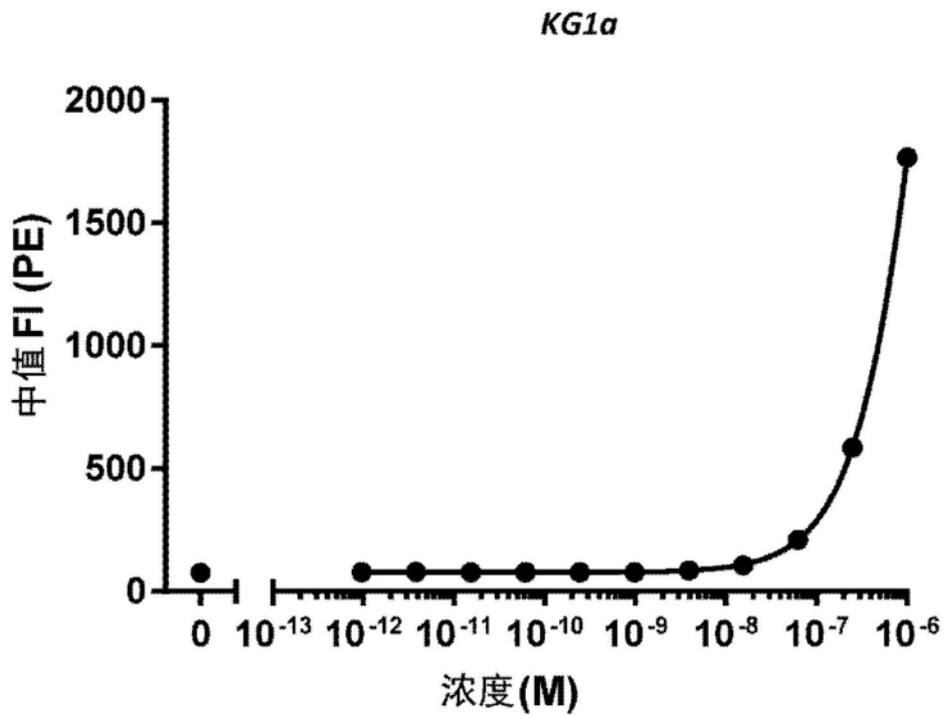
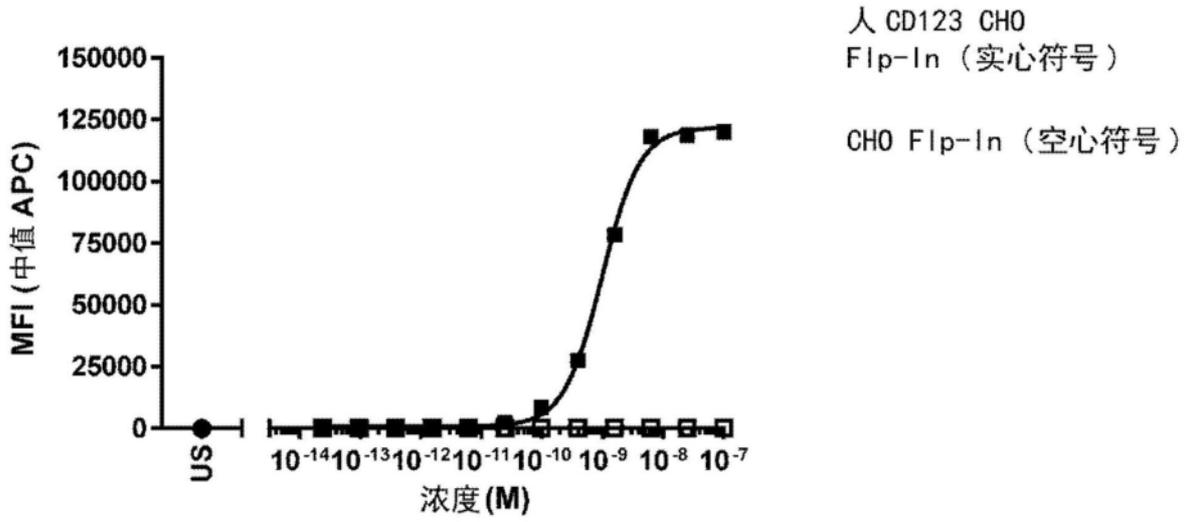


图12(续)

A.



B.

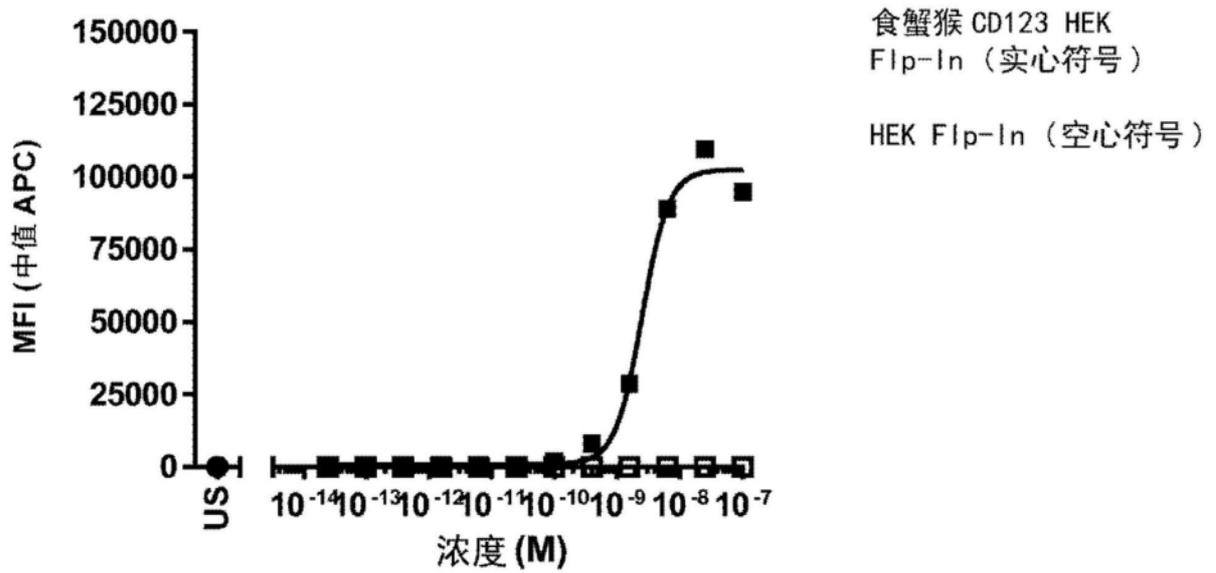
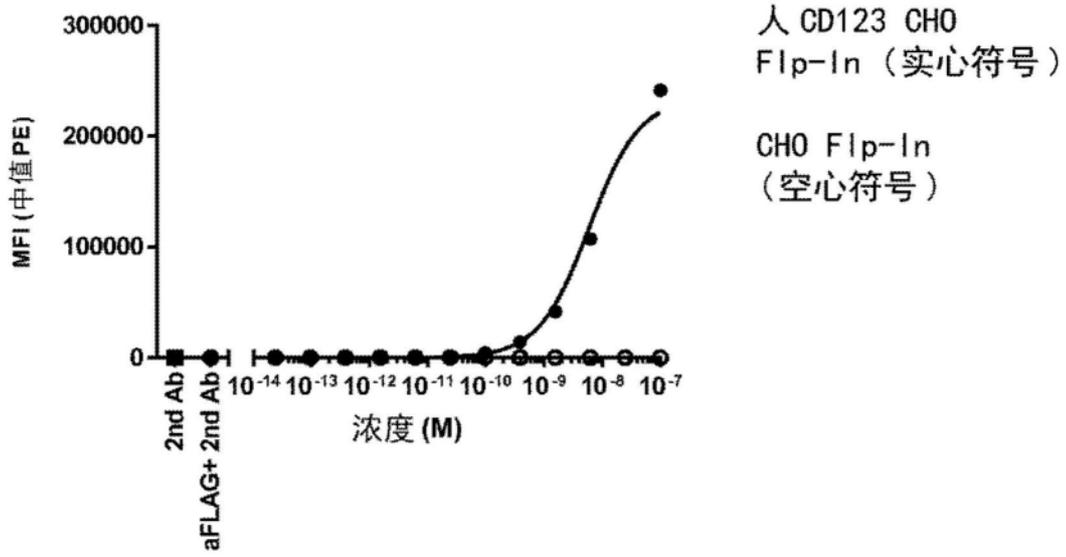


图13

A.



B.

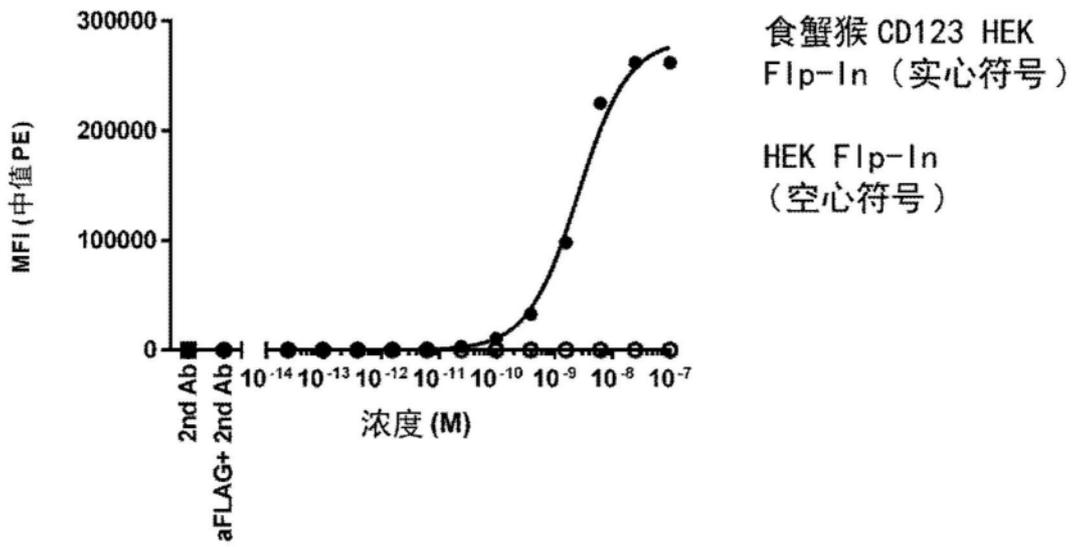
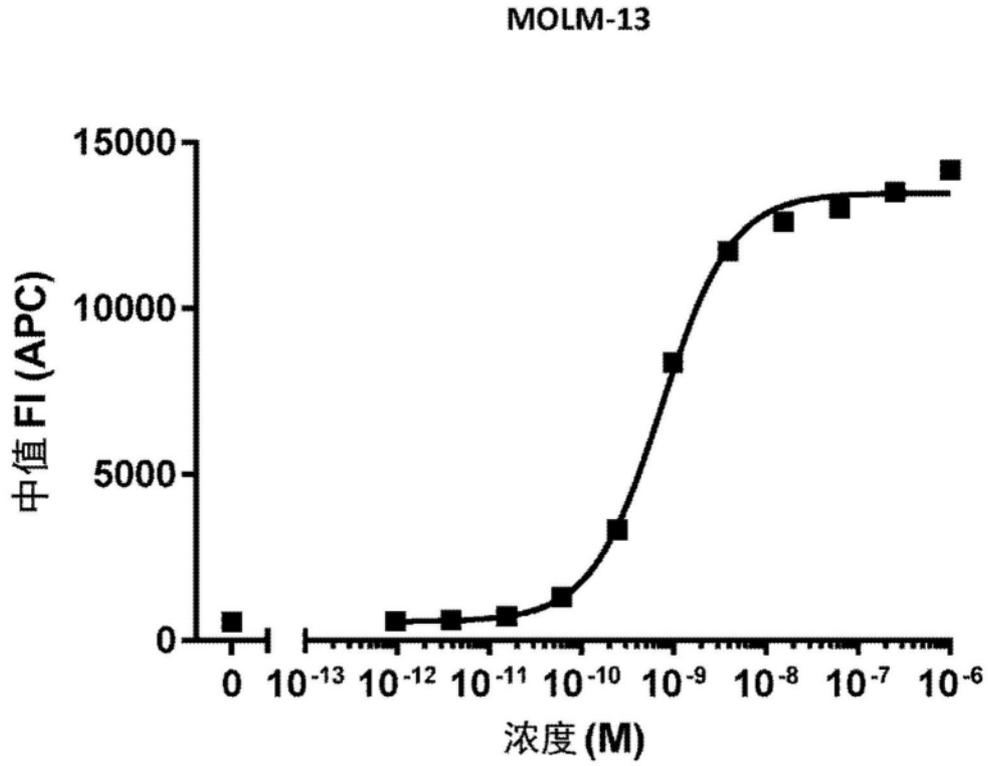


图14

A.



B.

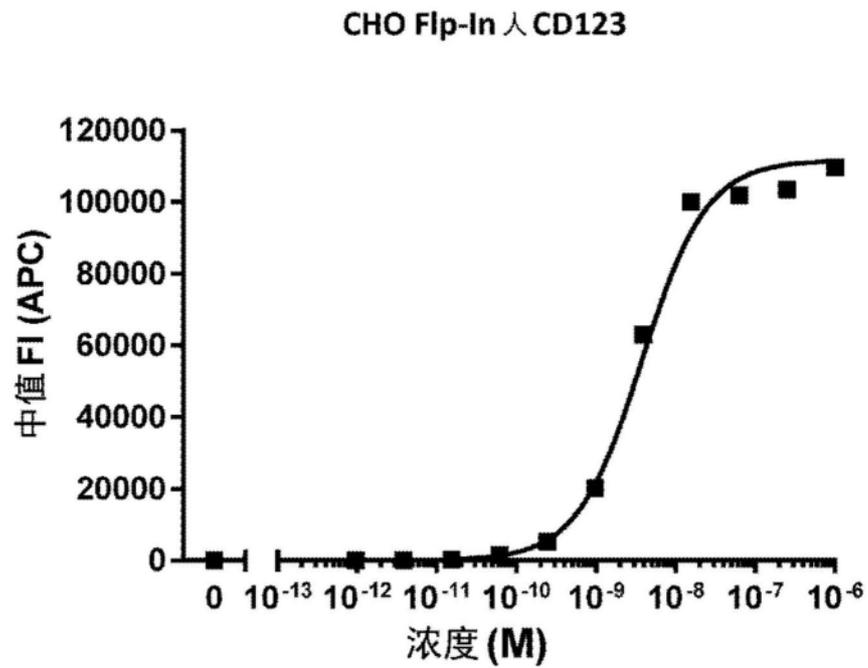
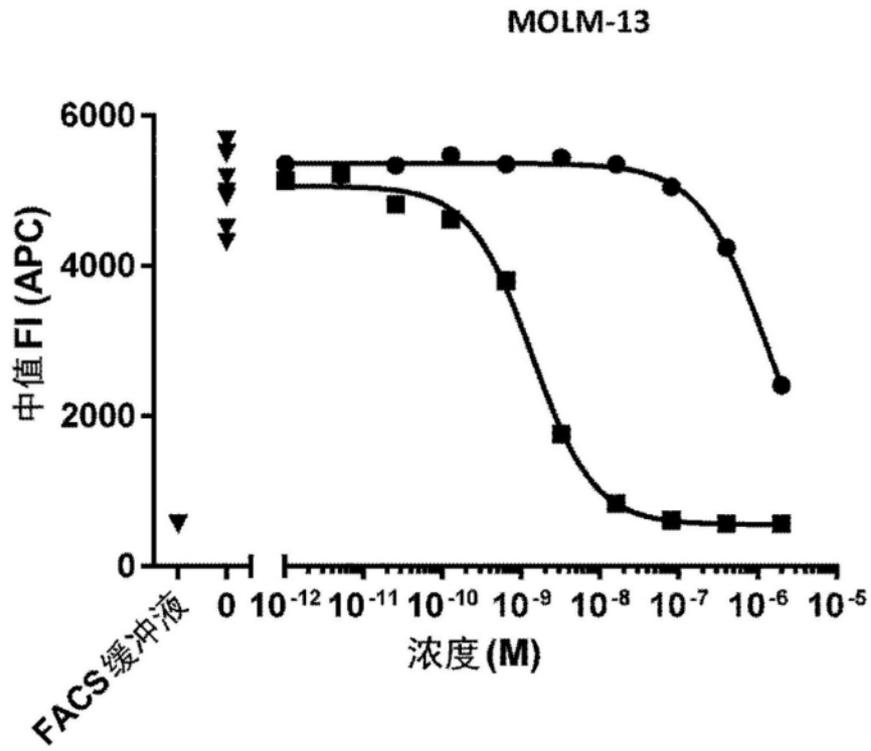


图15

A.



B.

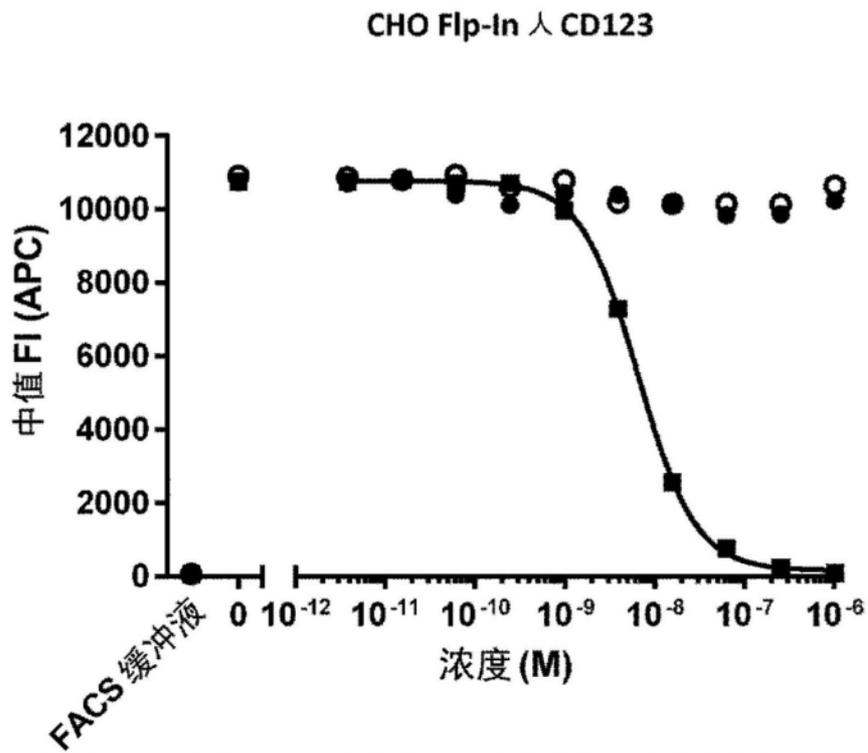
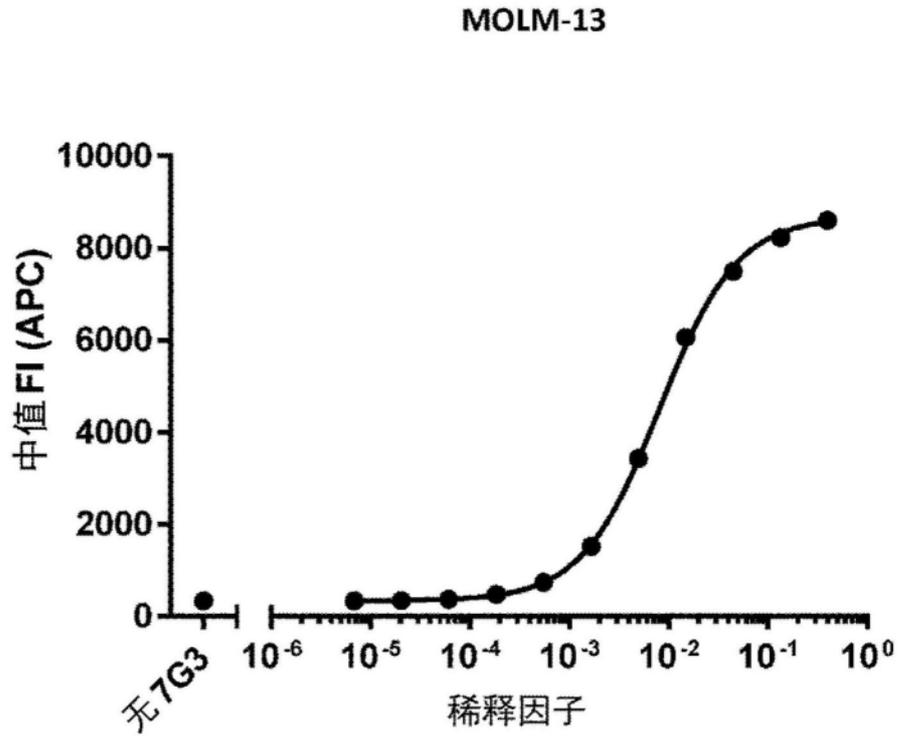


图16

A.



B.

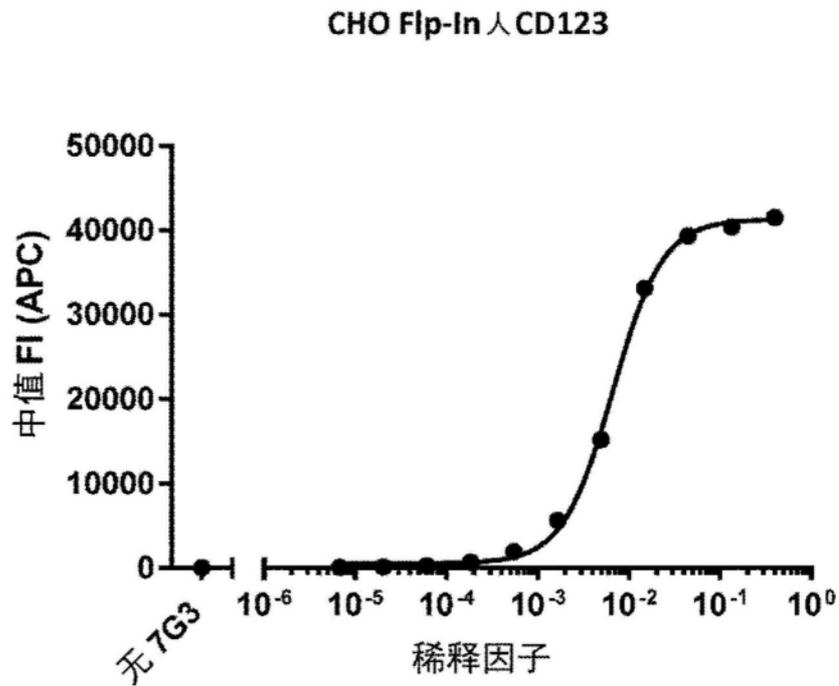
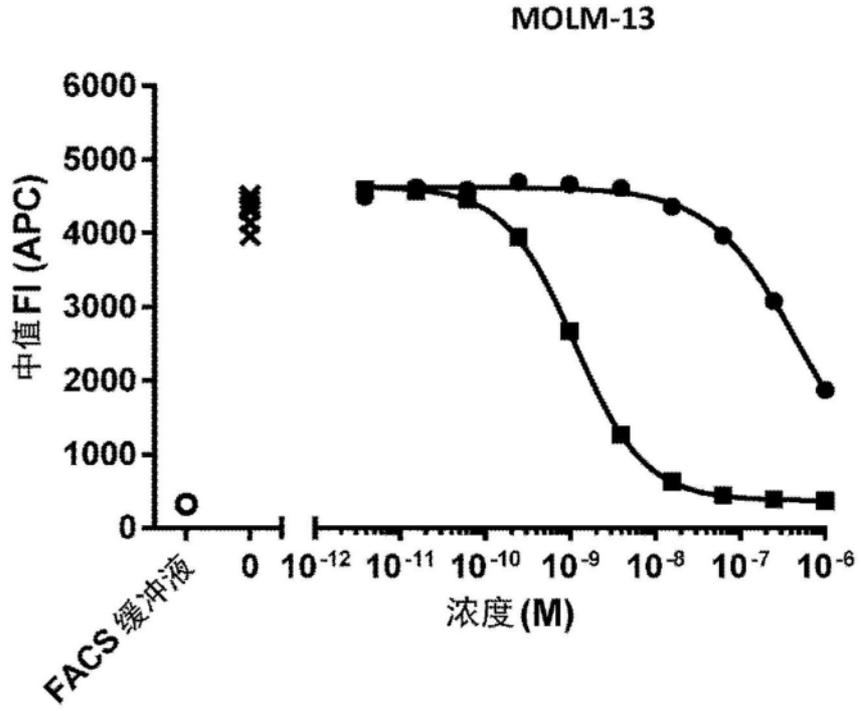


图17

A.



B.

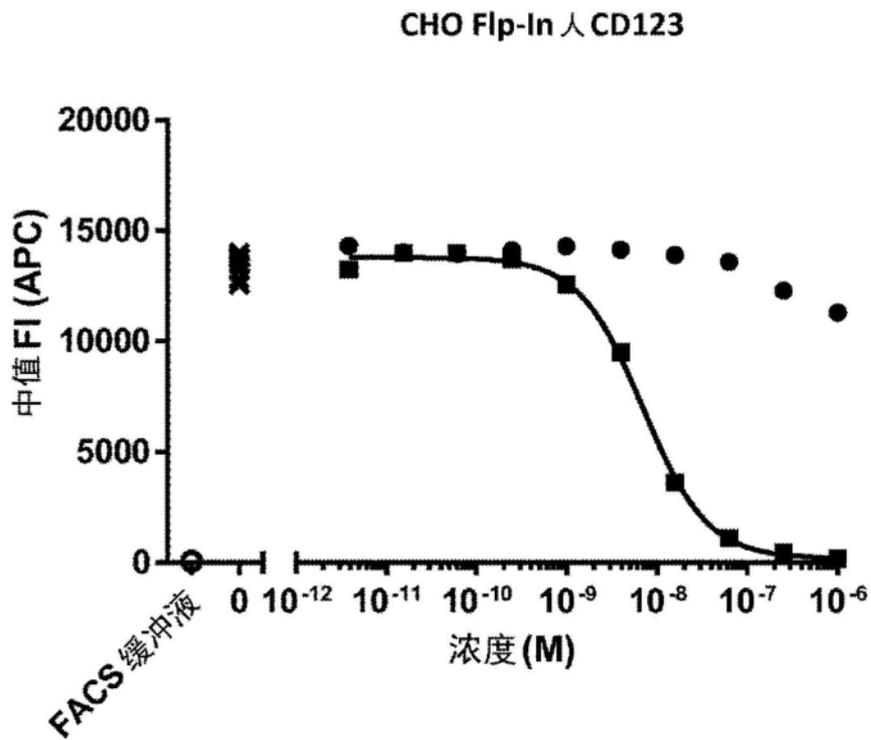


图18

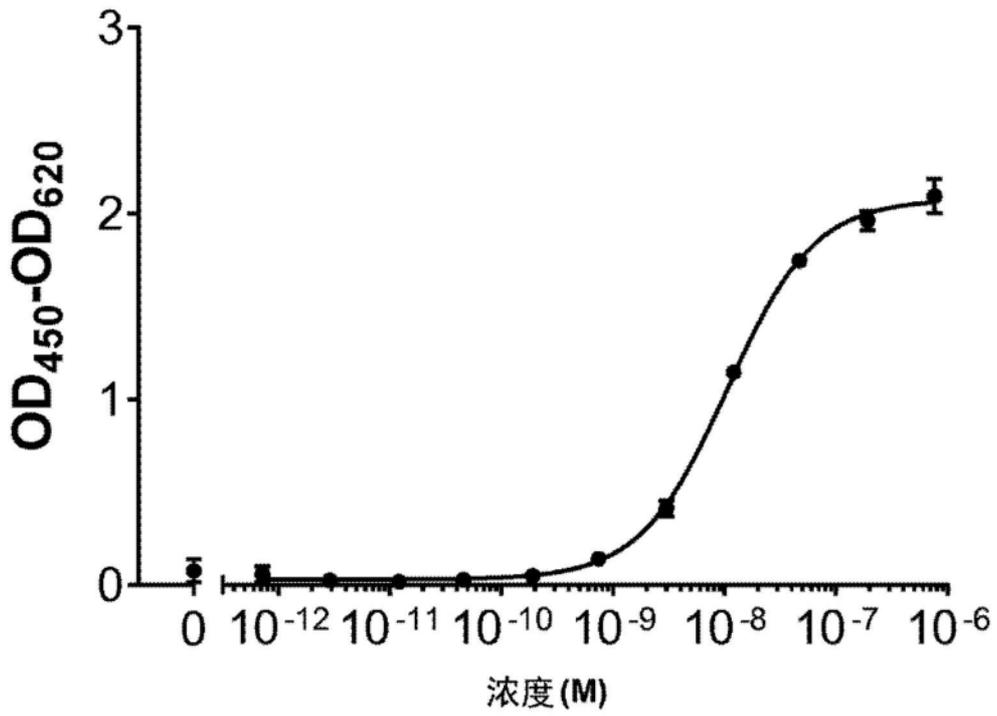
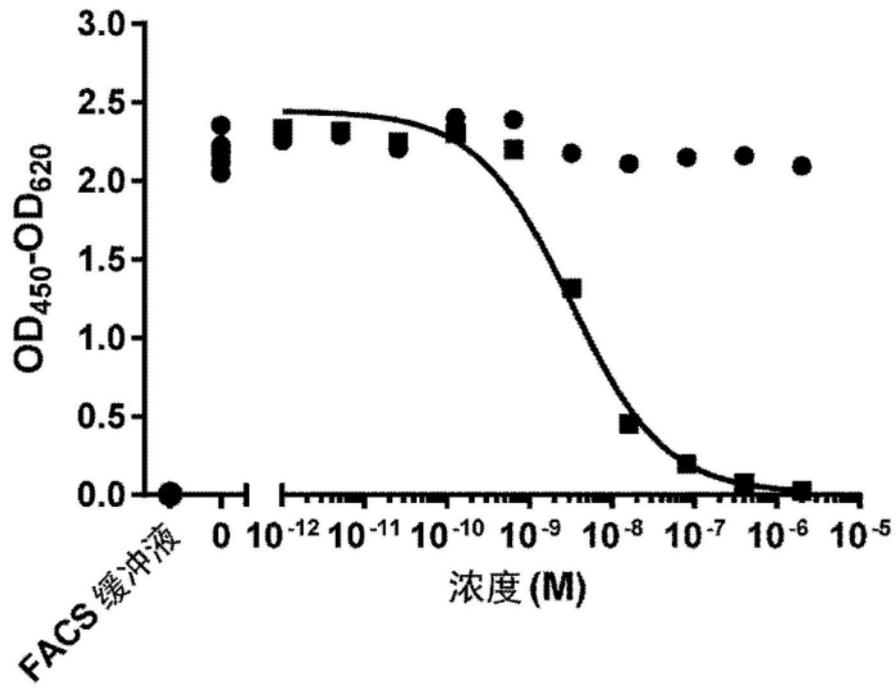


图19

A.



B.

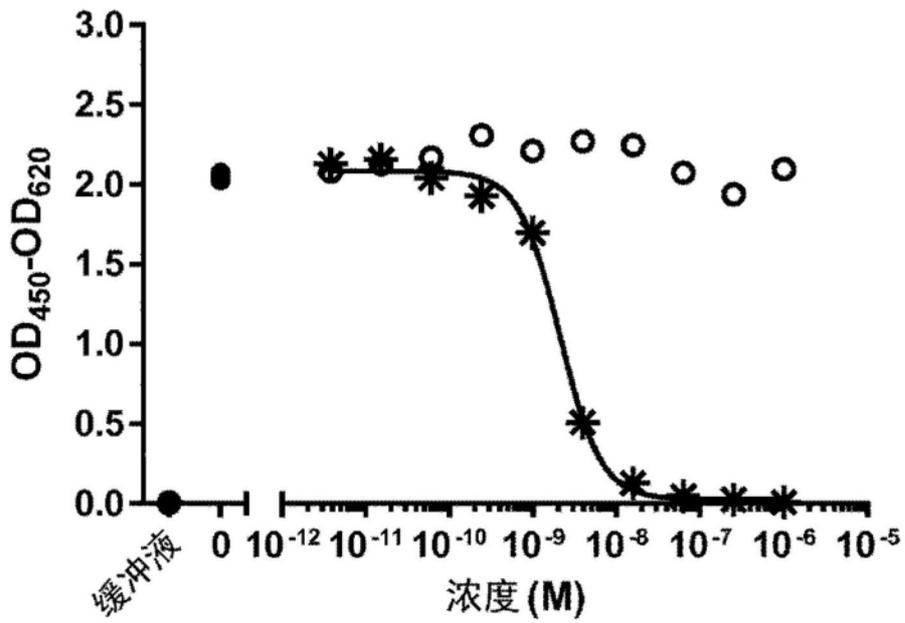
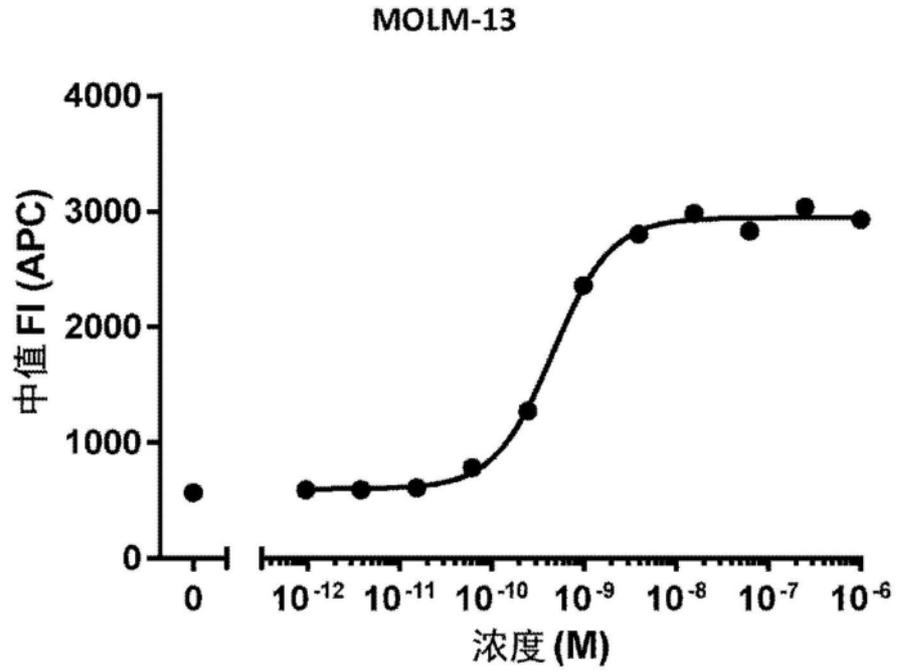


图20

A.



B.

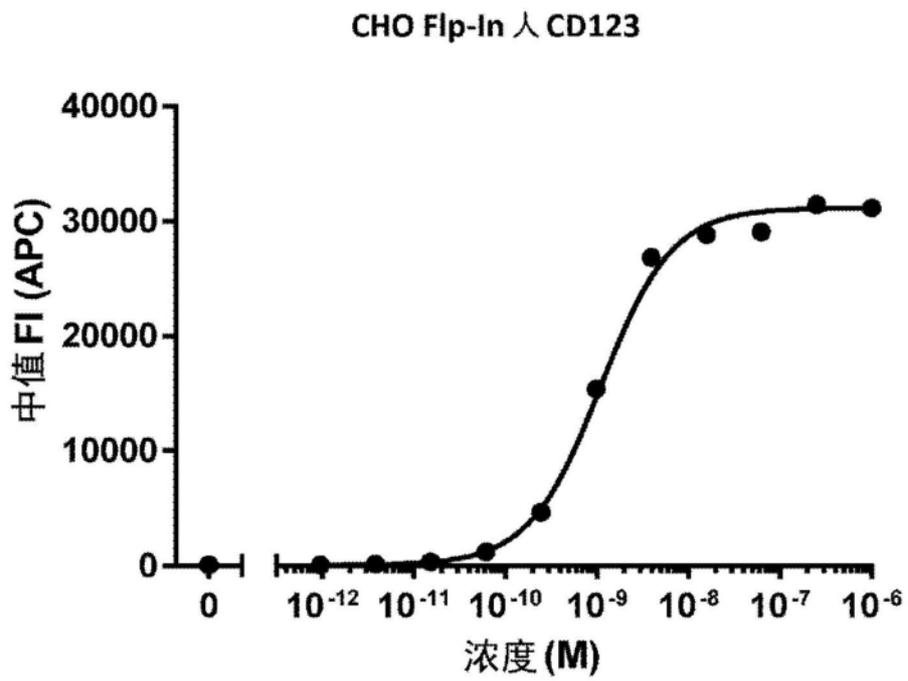


图21

C.

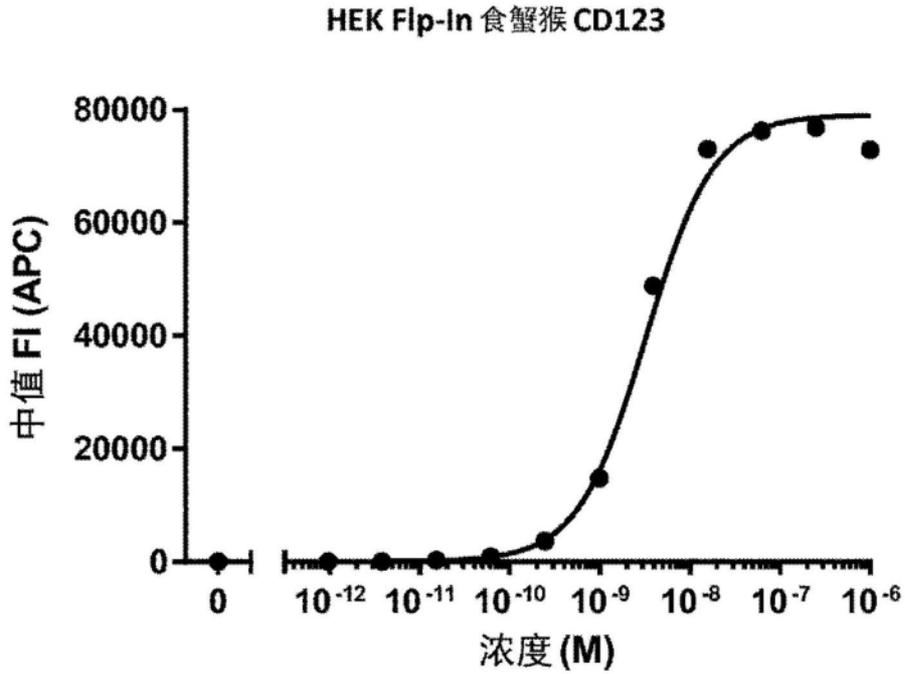


图21(续)

A.

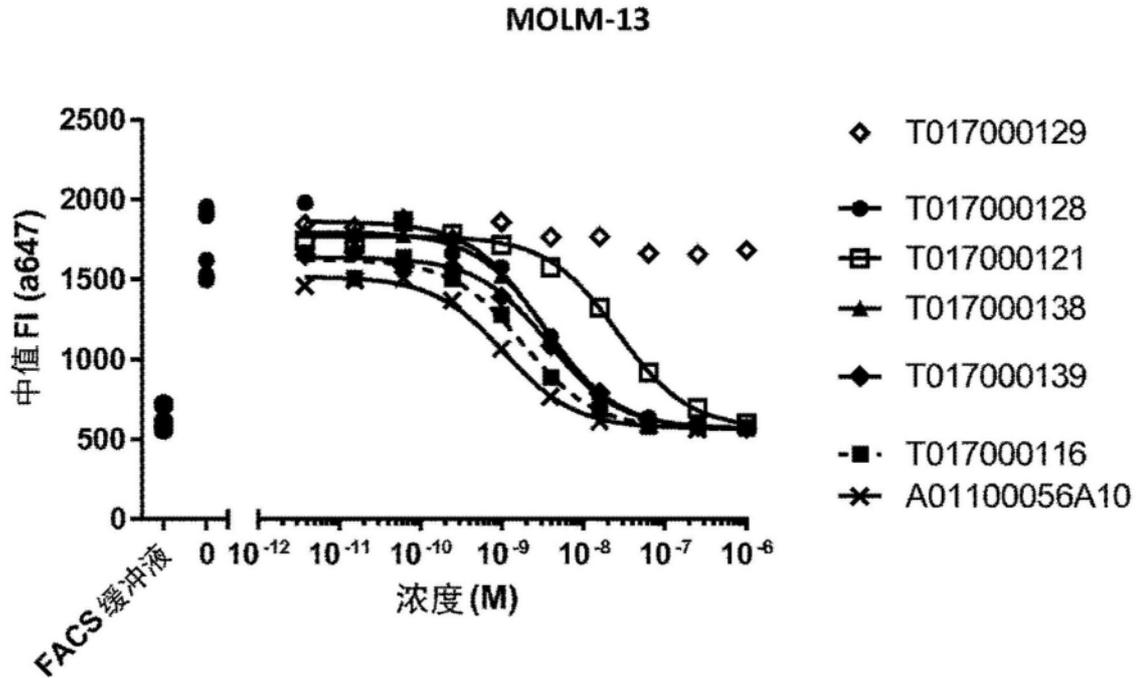
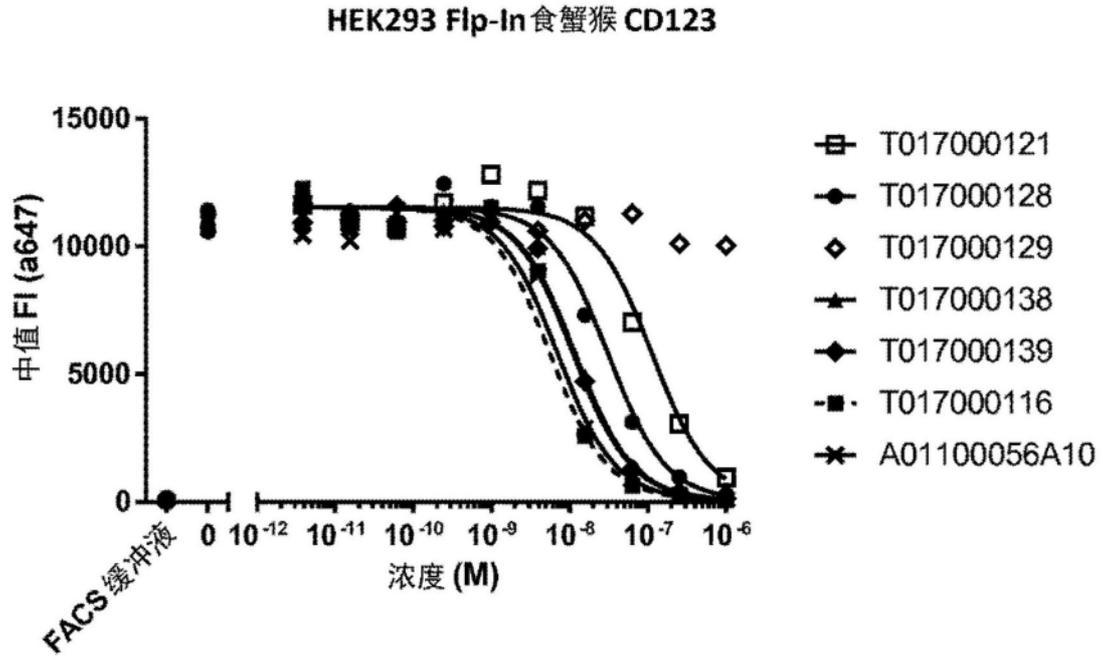


图22

B.



C.

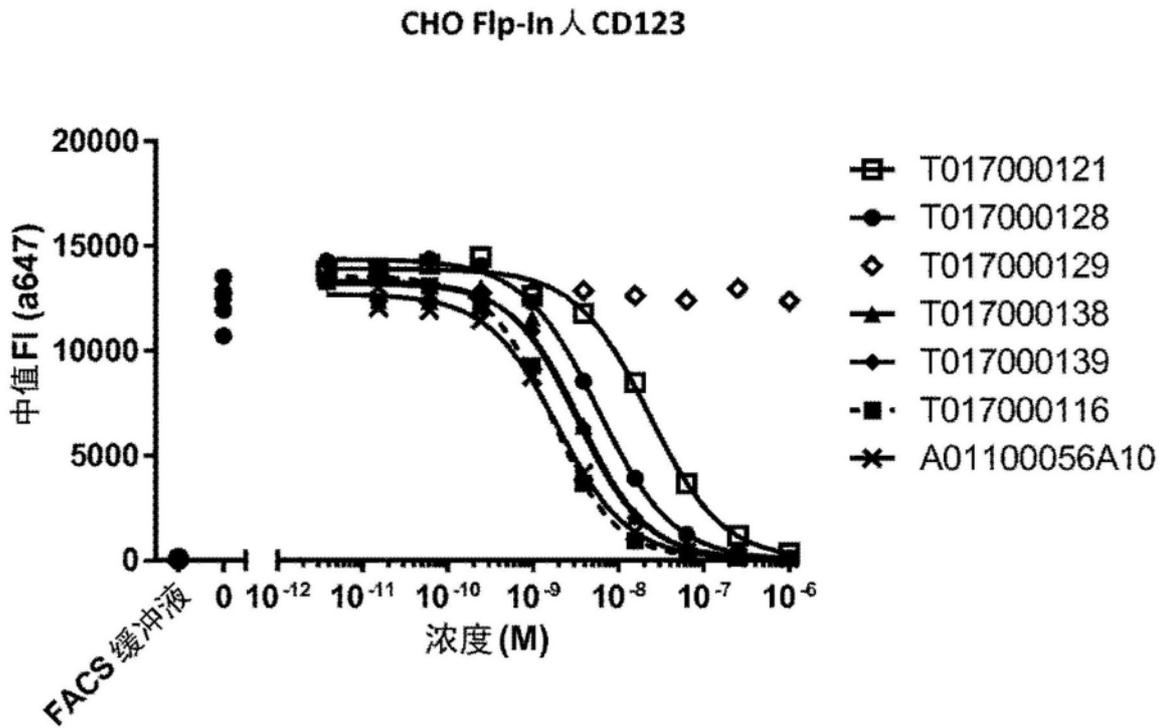


图22(续)

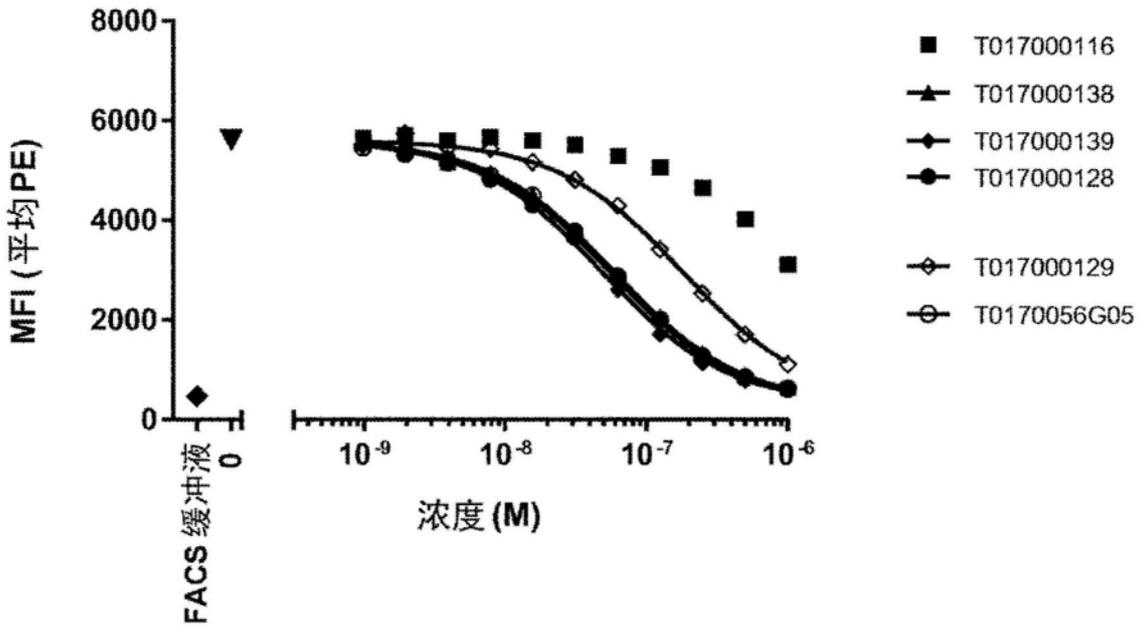


图23

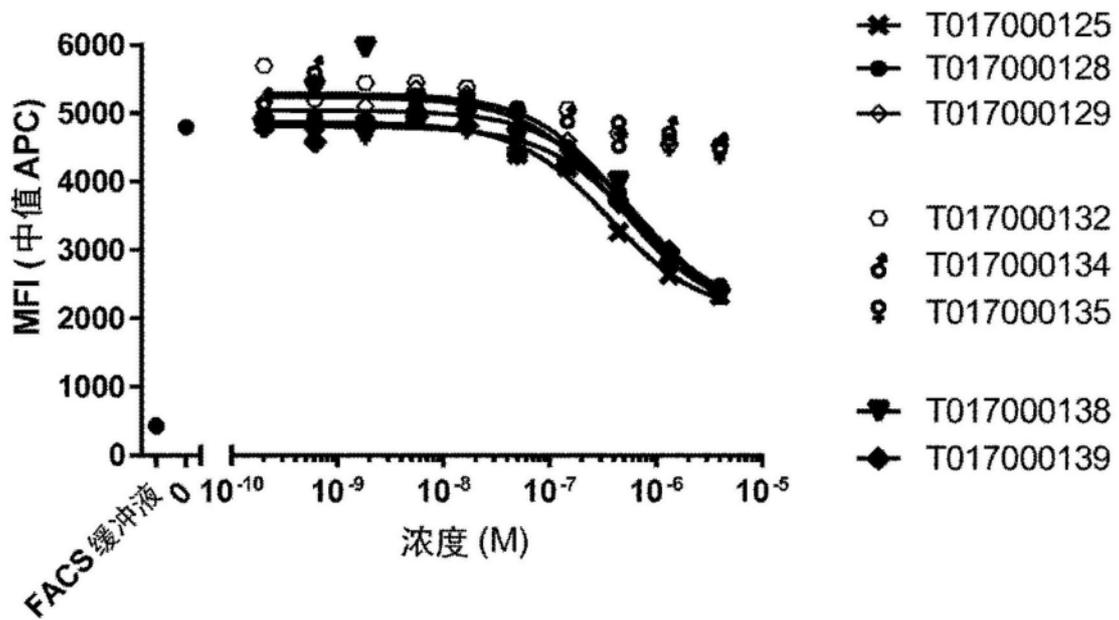


图24

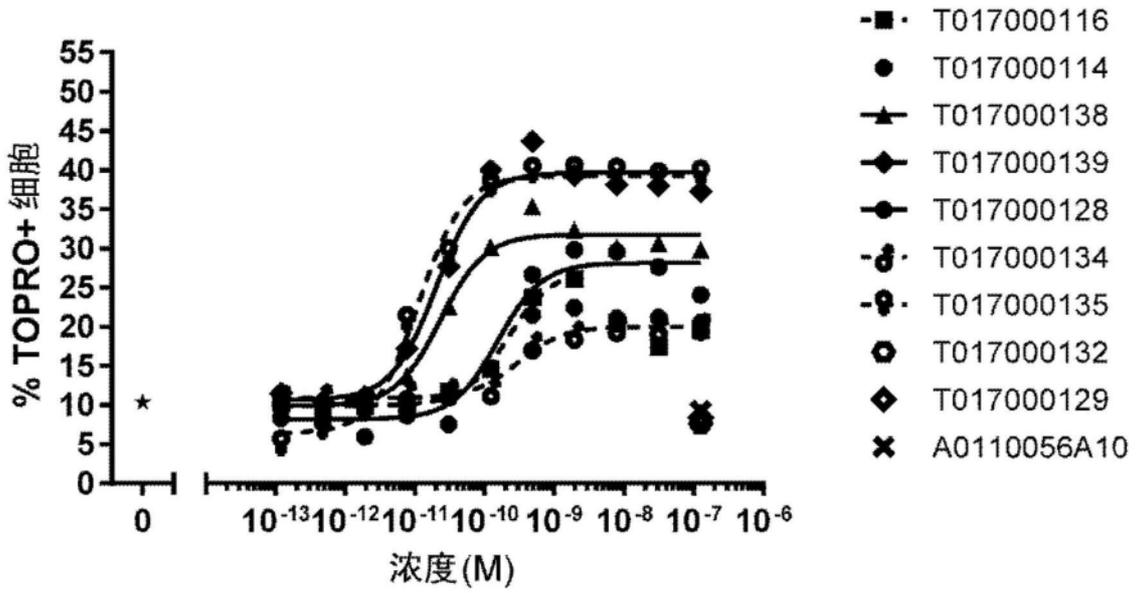


图25

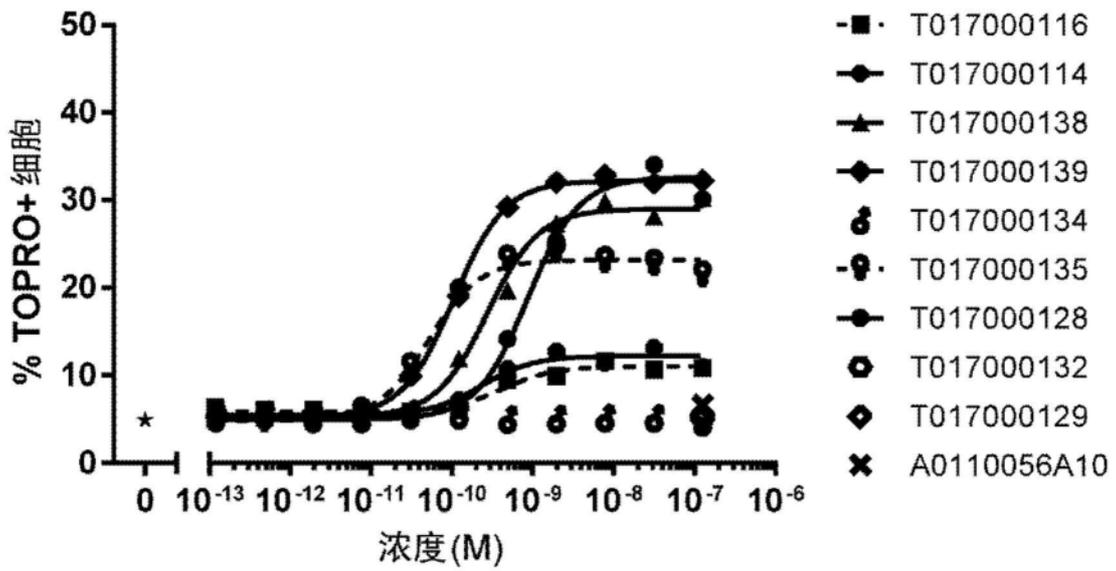


图26

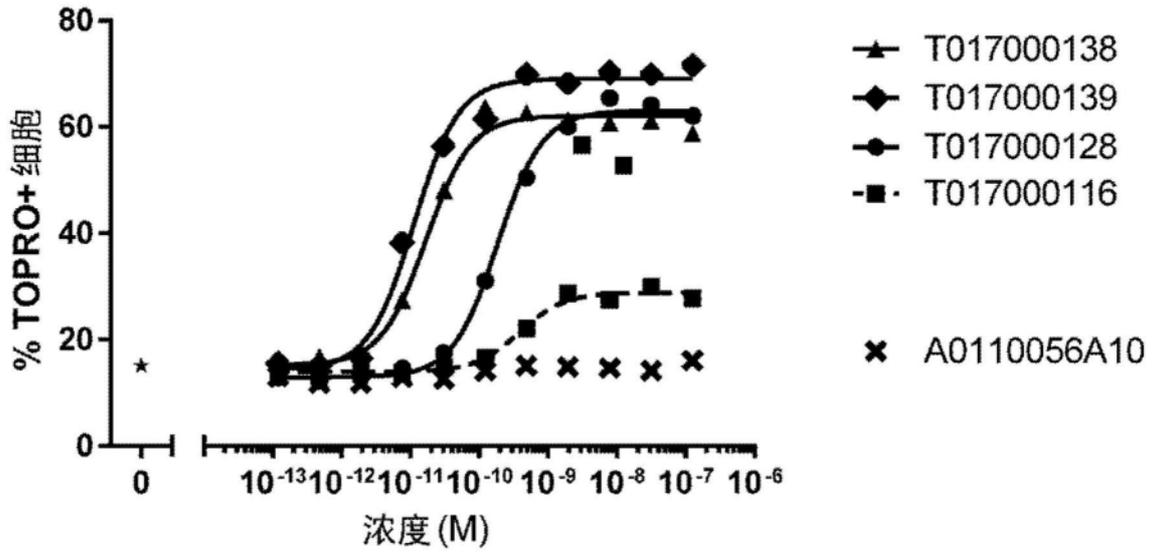


图27

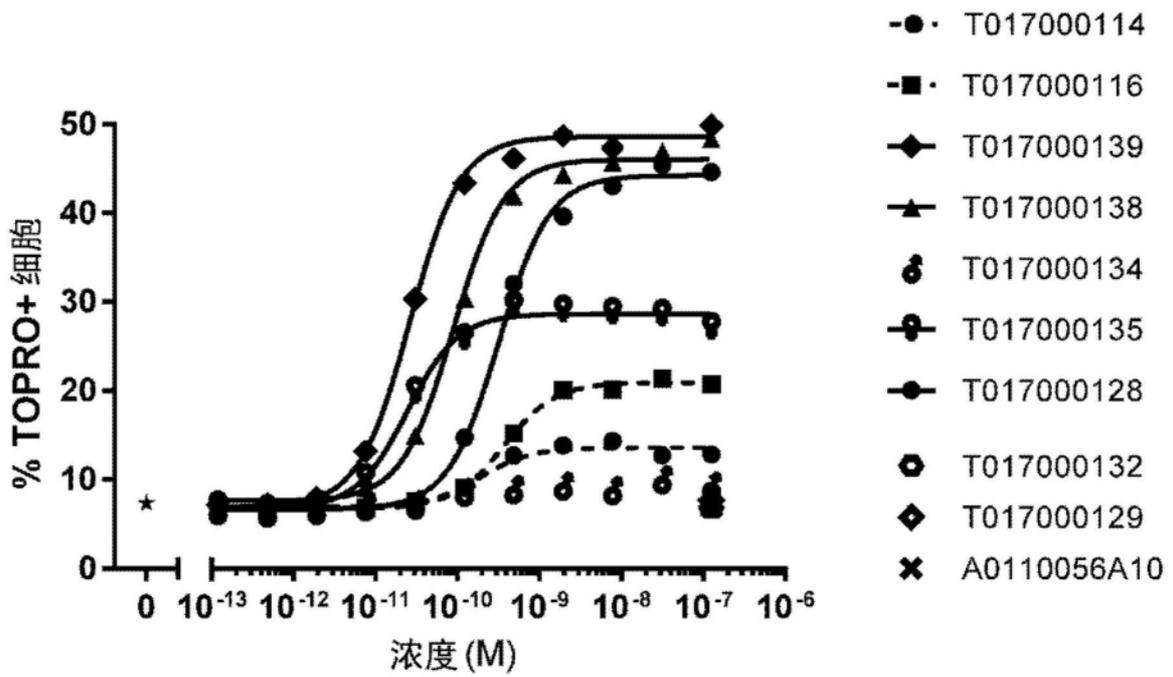


图28

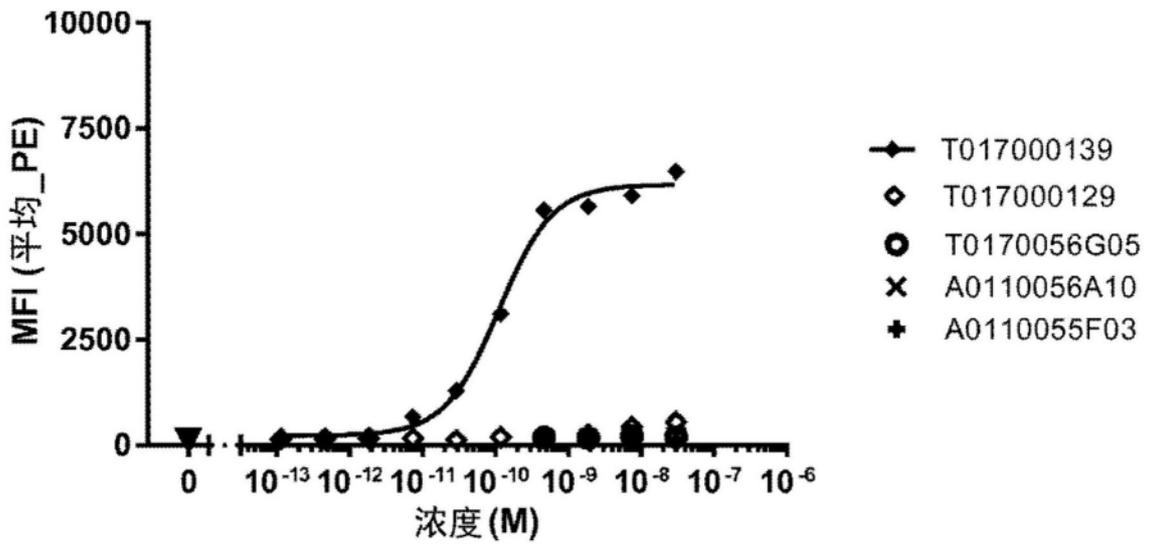


图29

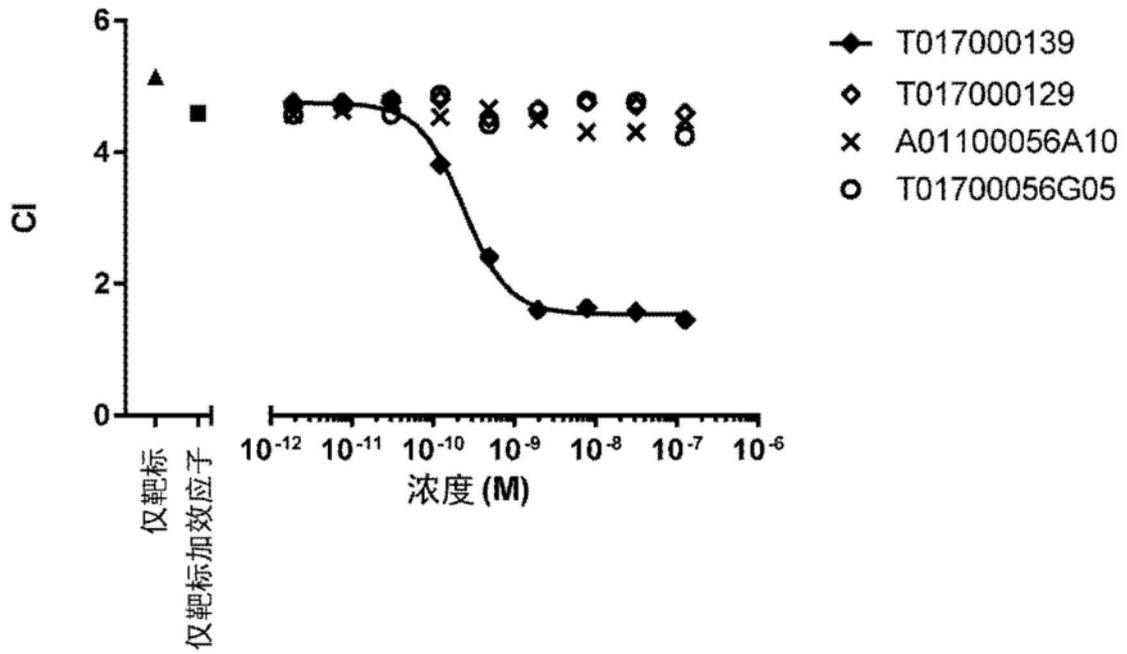


图30

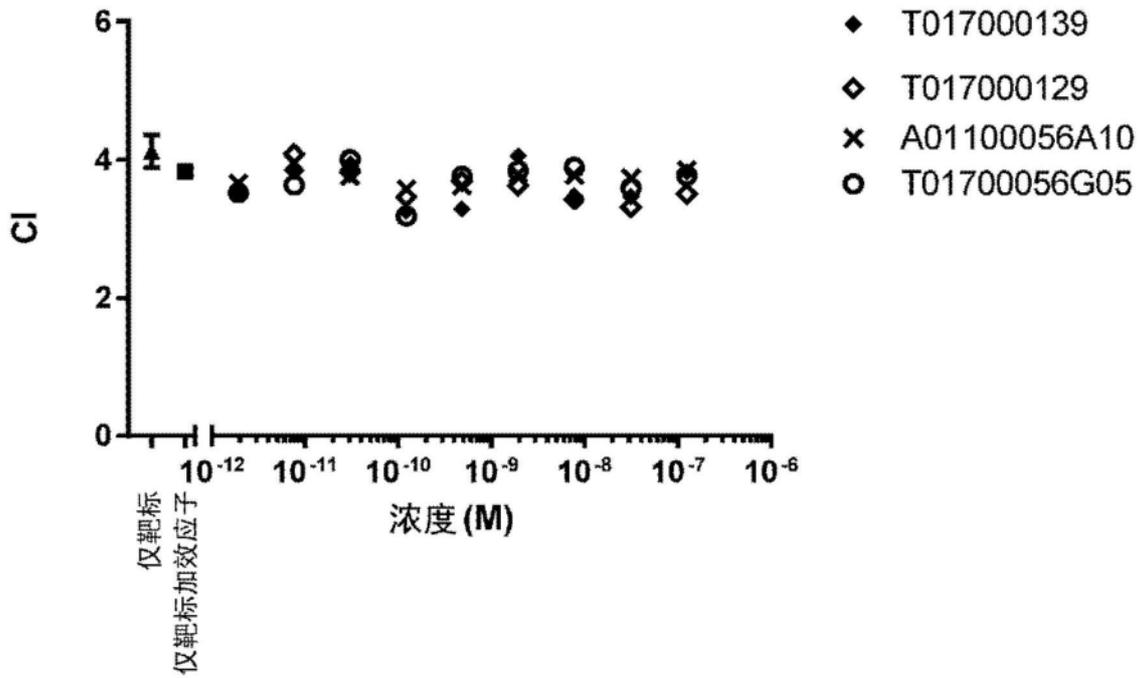


图31

A.

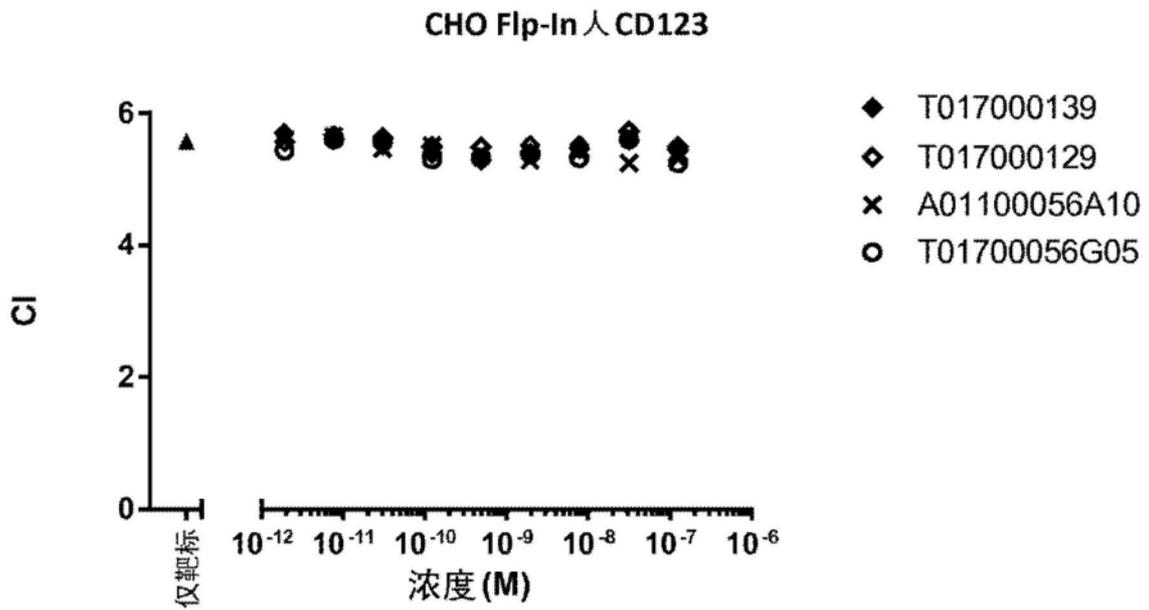


图32

B.

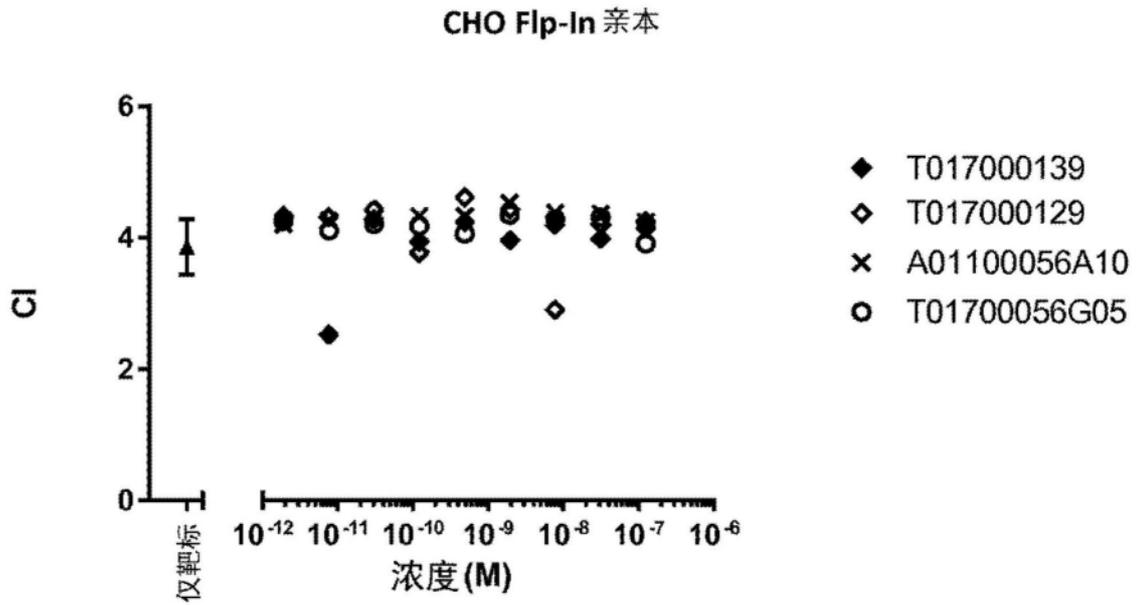


图32(续)

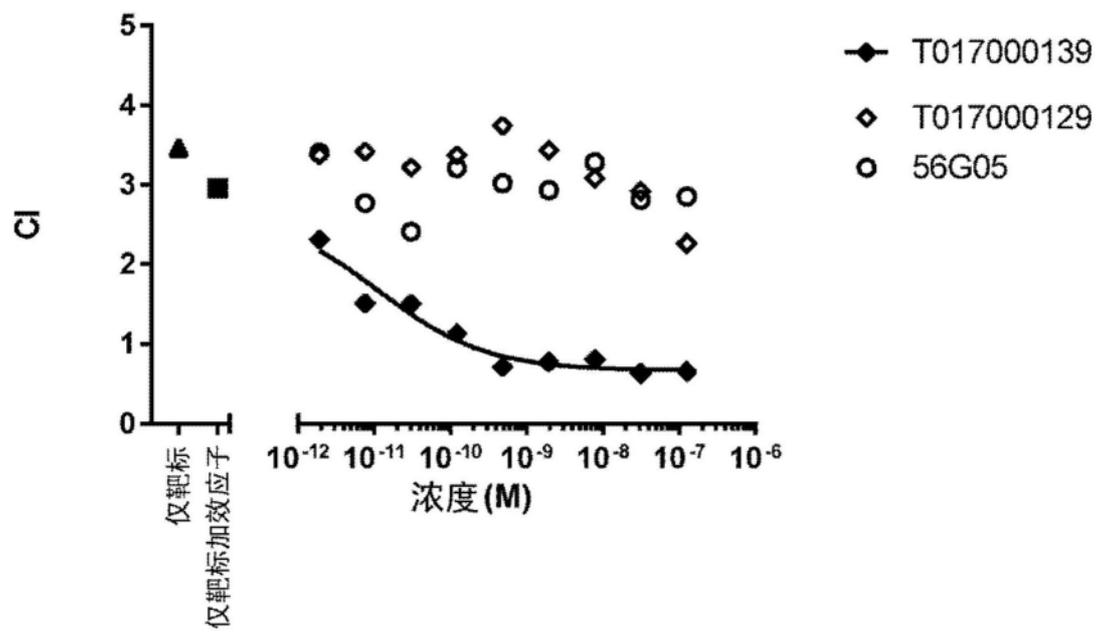


图33

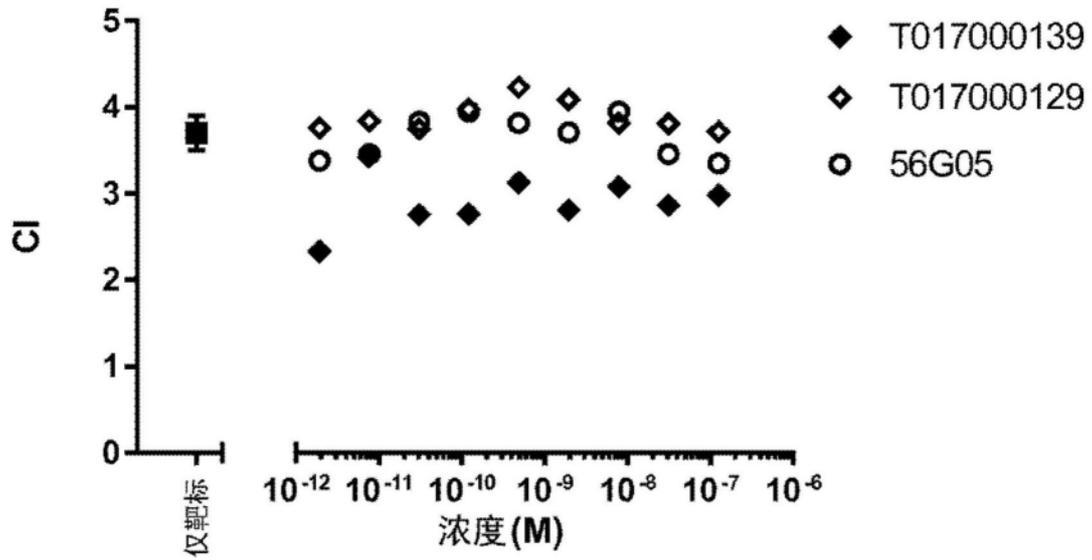


图34

A.

HEK Flp-In 食蟹猴 CD123

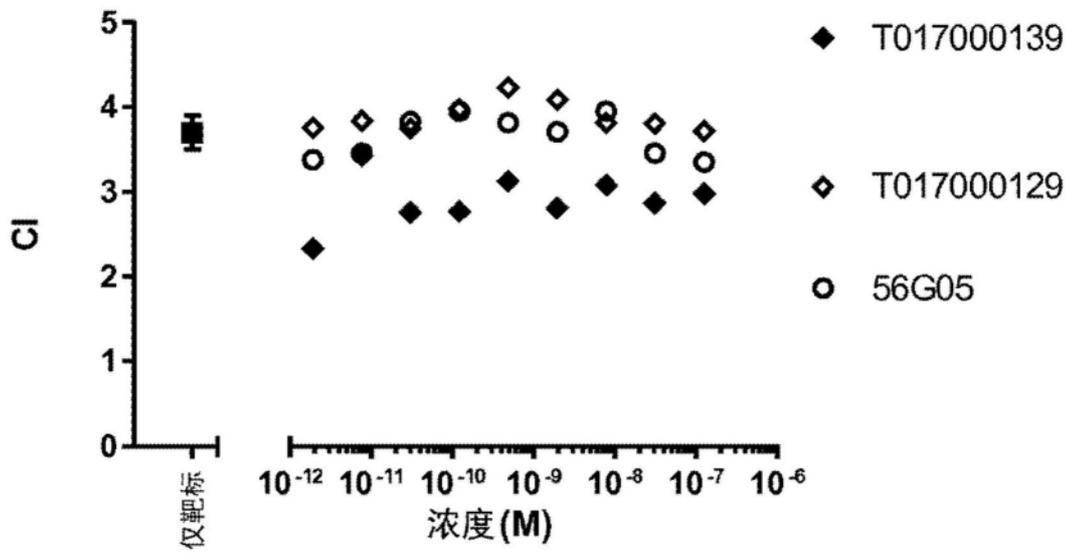


图35

B.

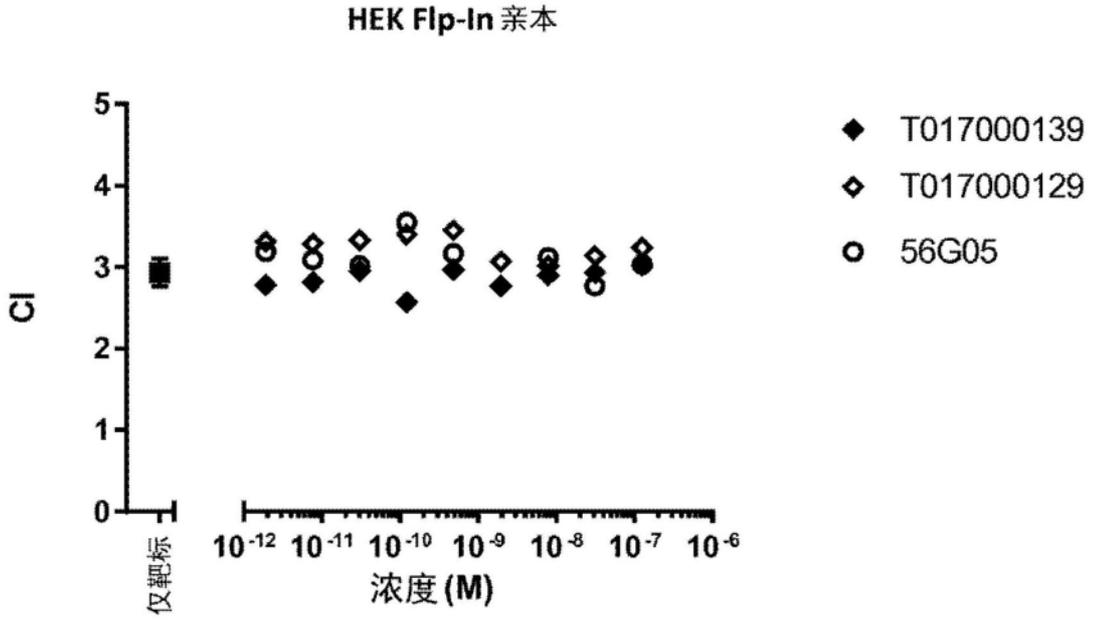


图35(续)

A.

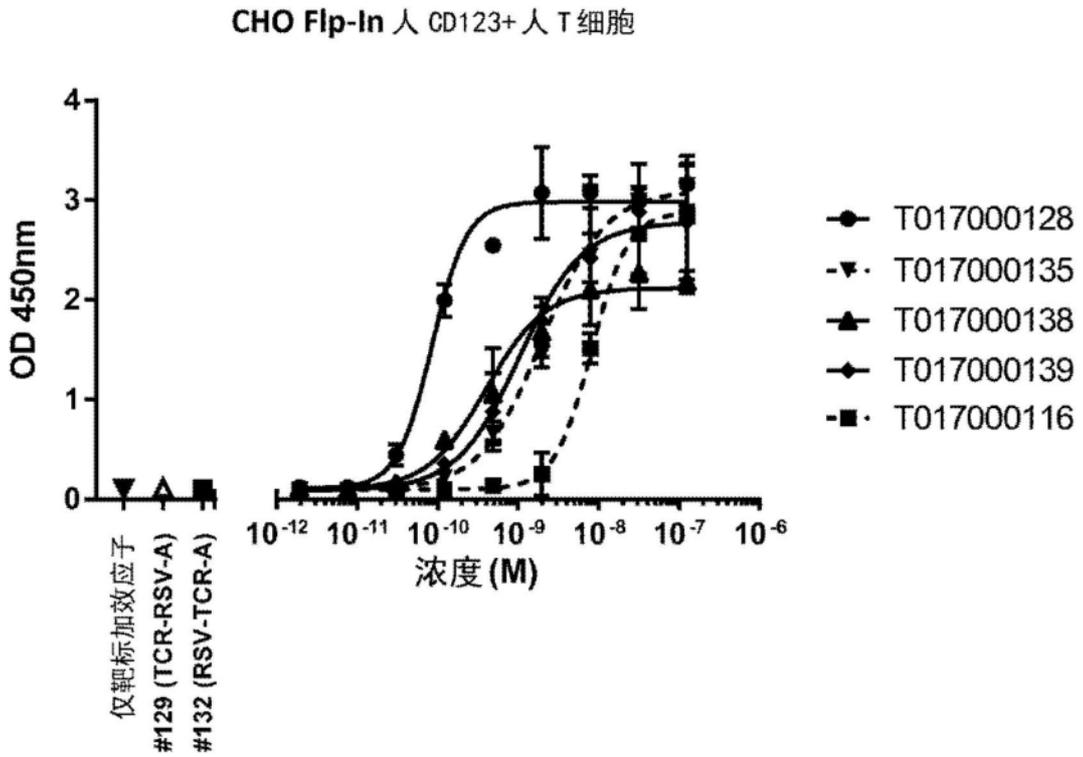


图36

B.

CHO Flp-In 人 CD123+ 食蟹猴 T 细胞

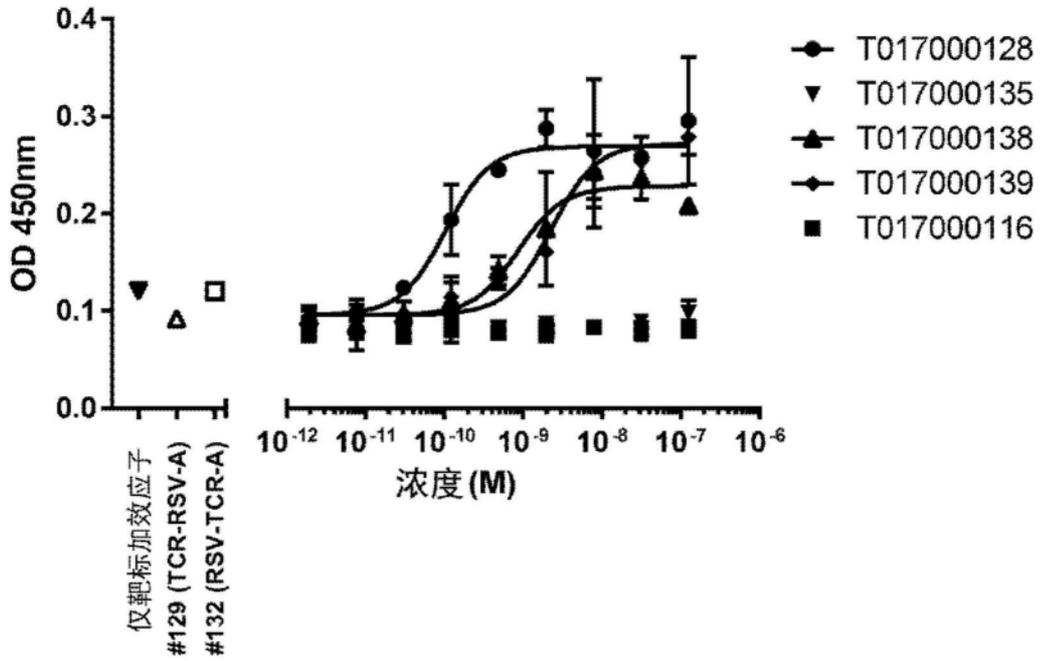


图36(续)

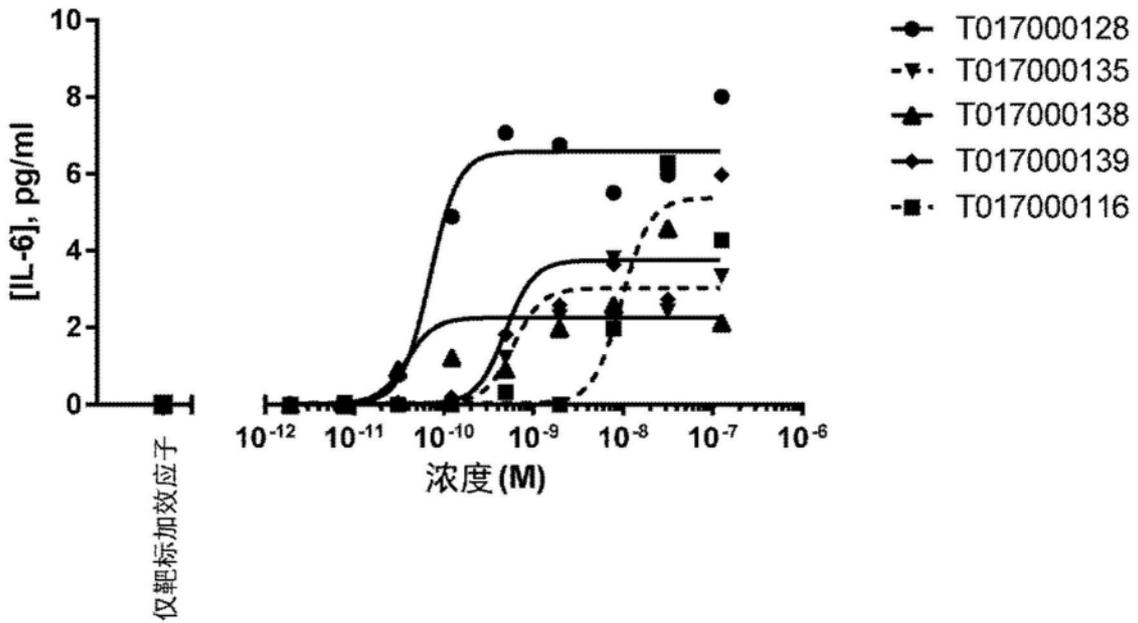
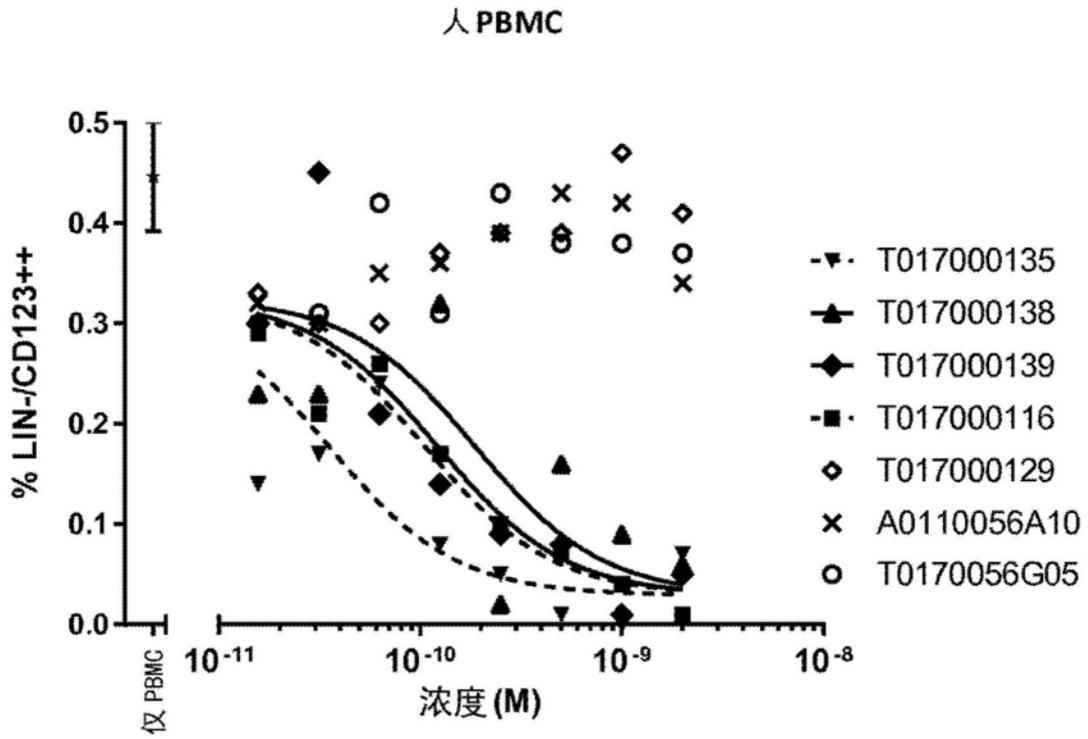


图37

A.



B.

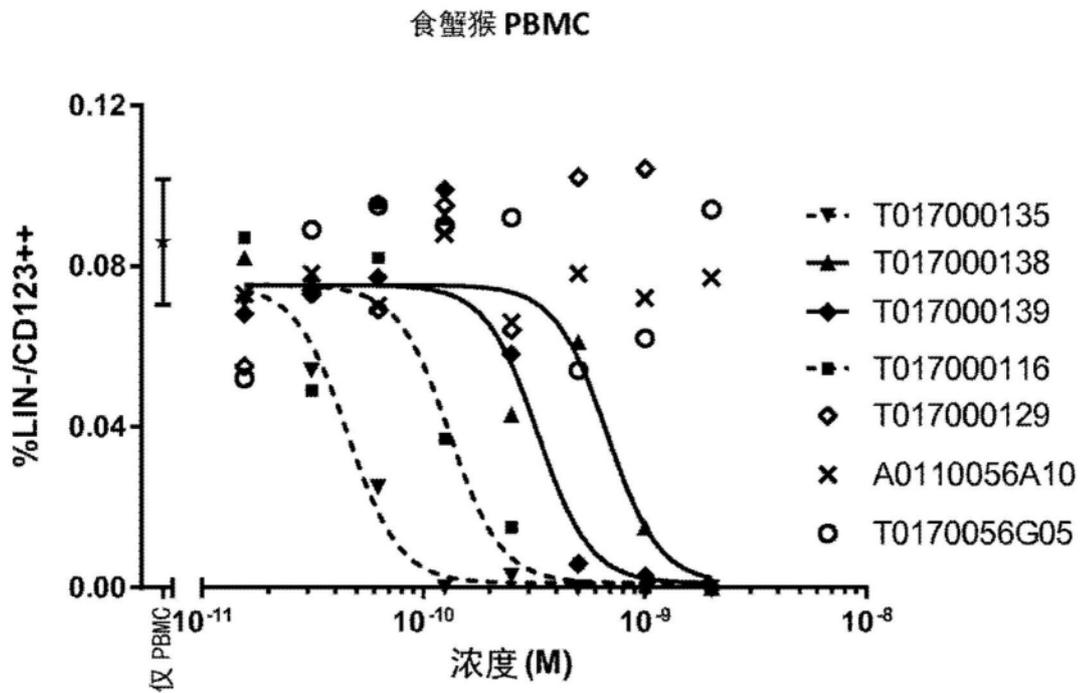
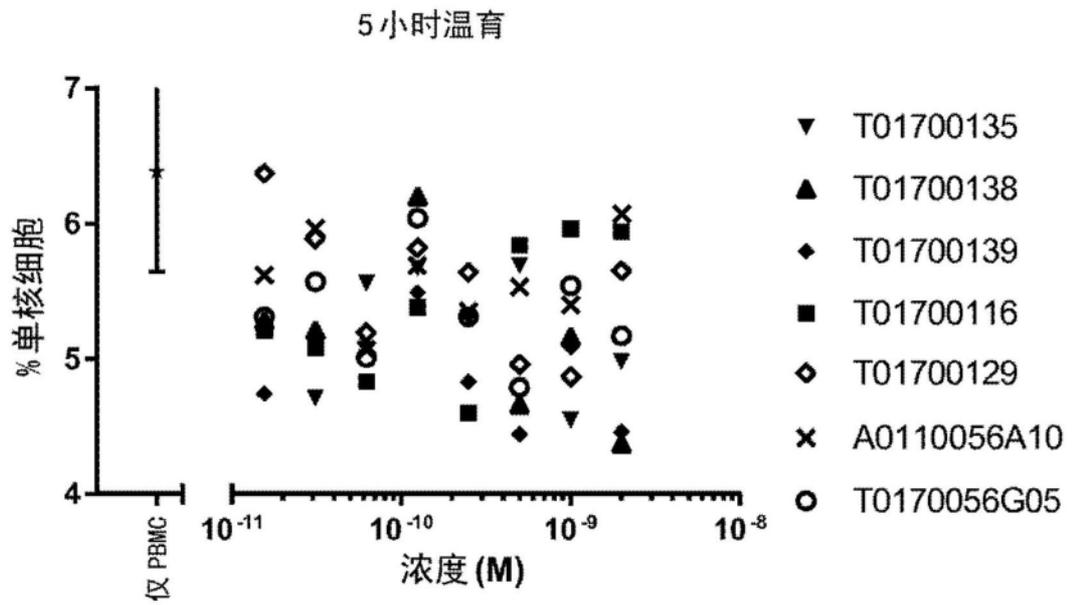


图38

A.



B.

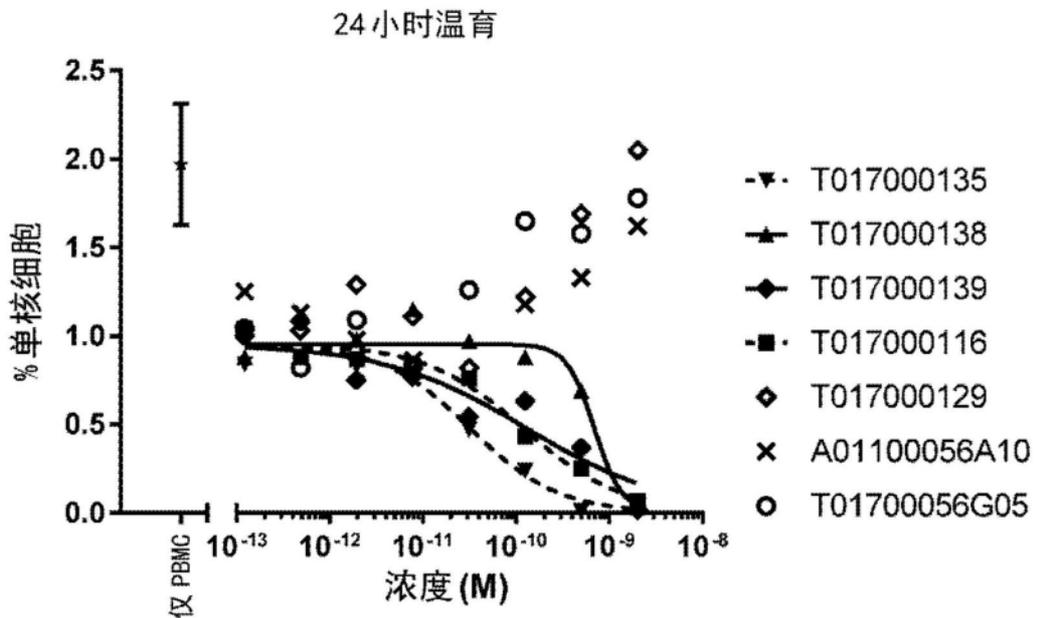


图39

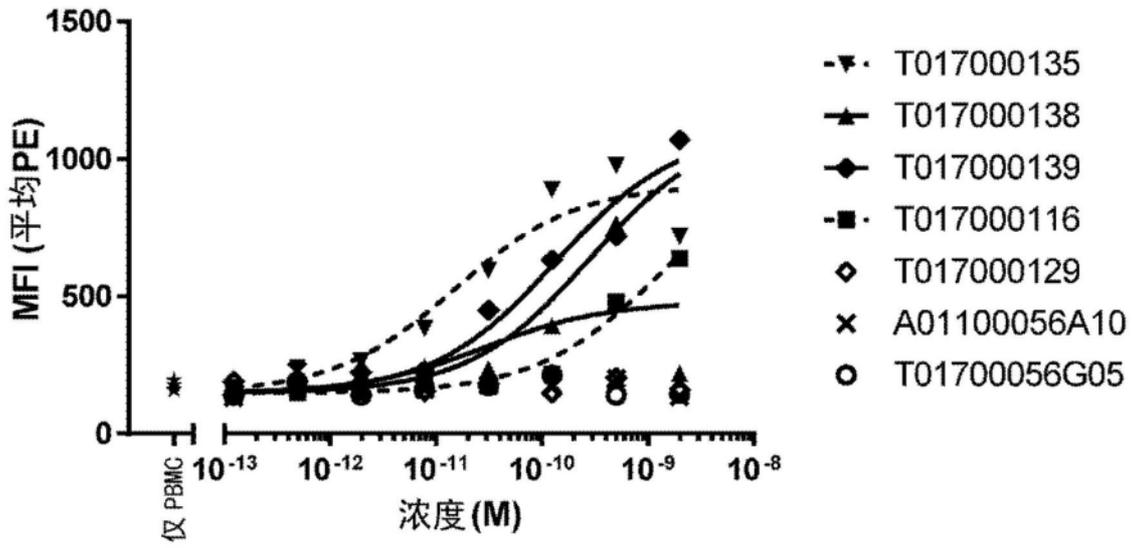
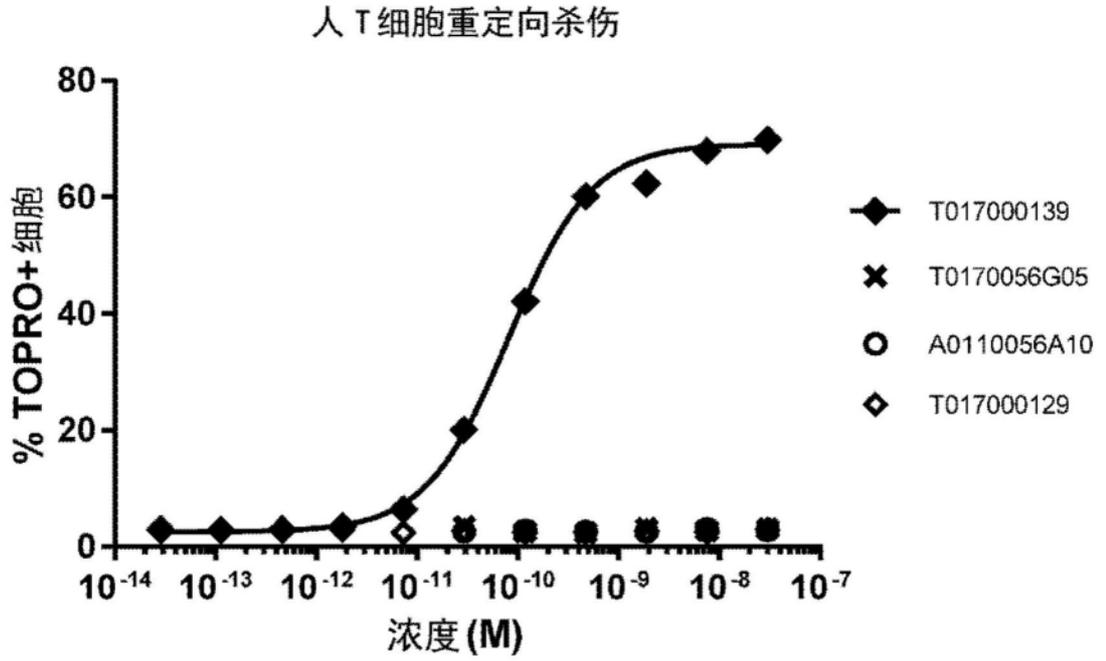


图40

A.



B.

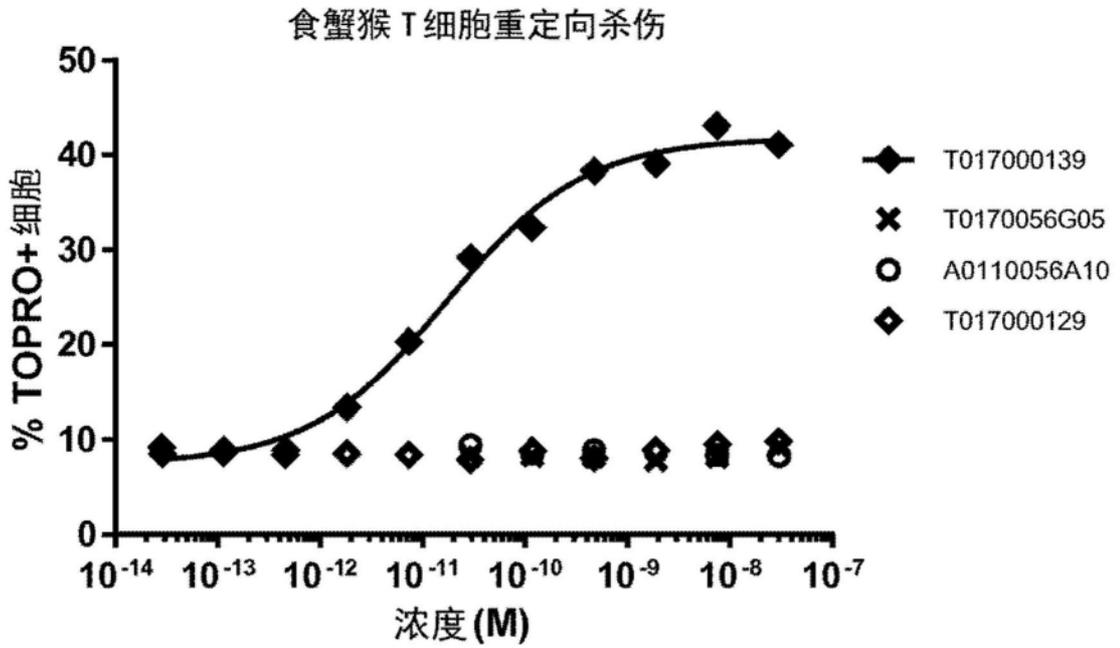
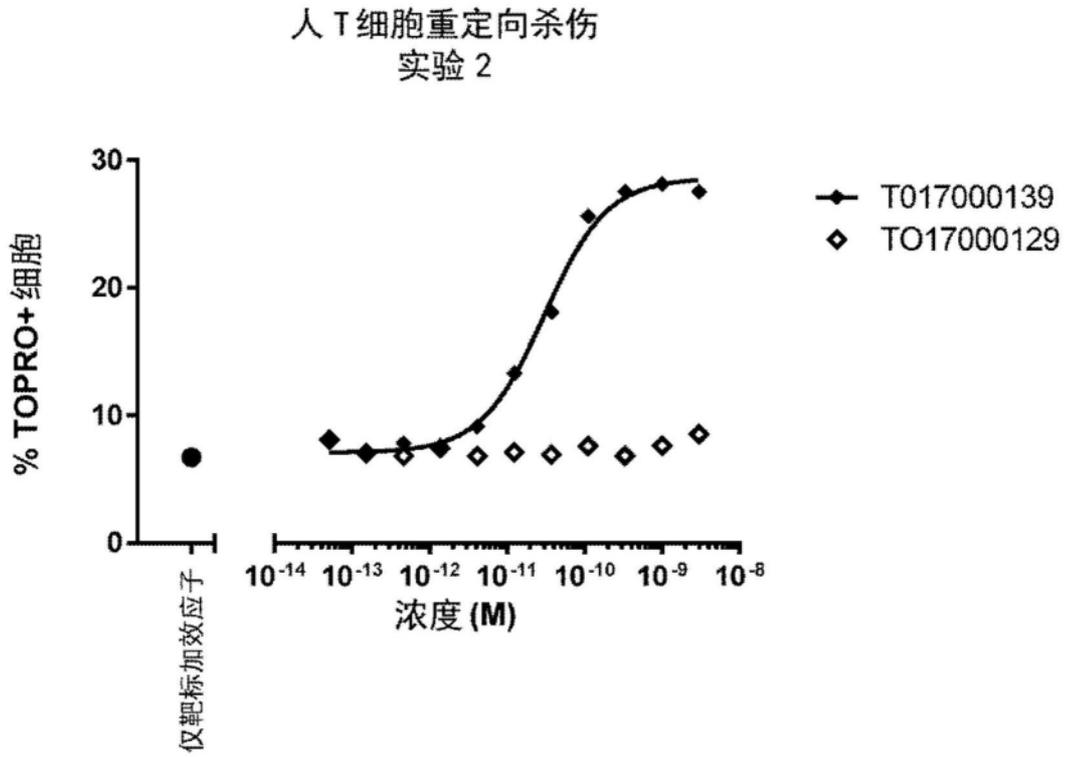


图41

A.



B.

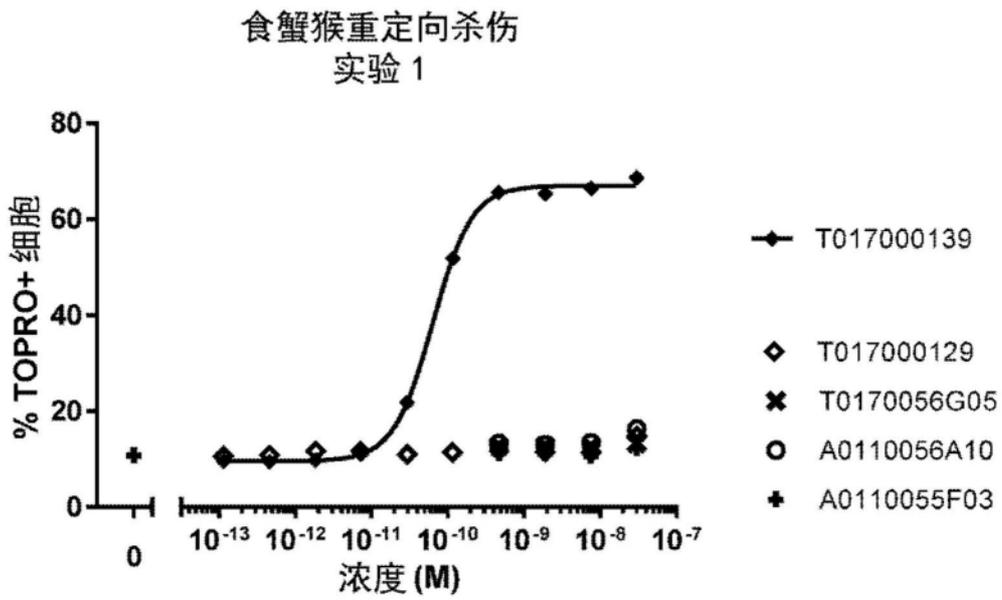


图42

C.

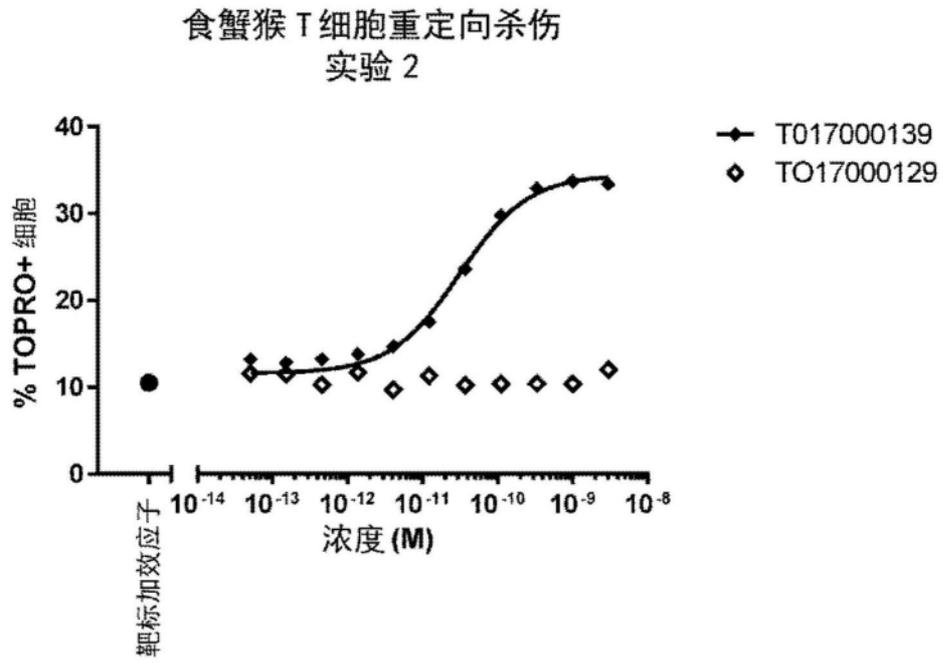


图42(续)

A.

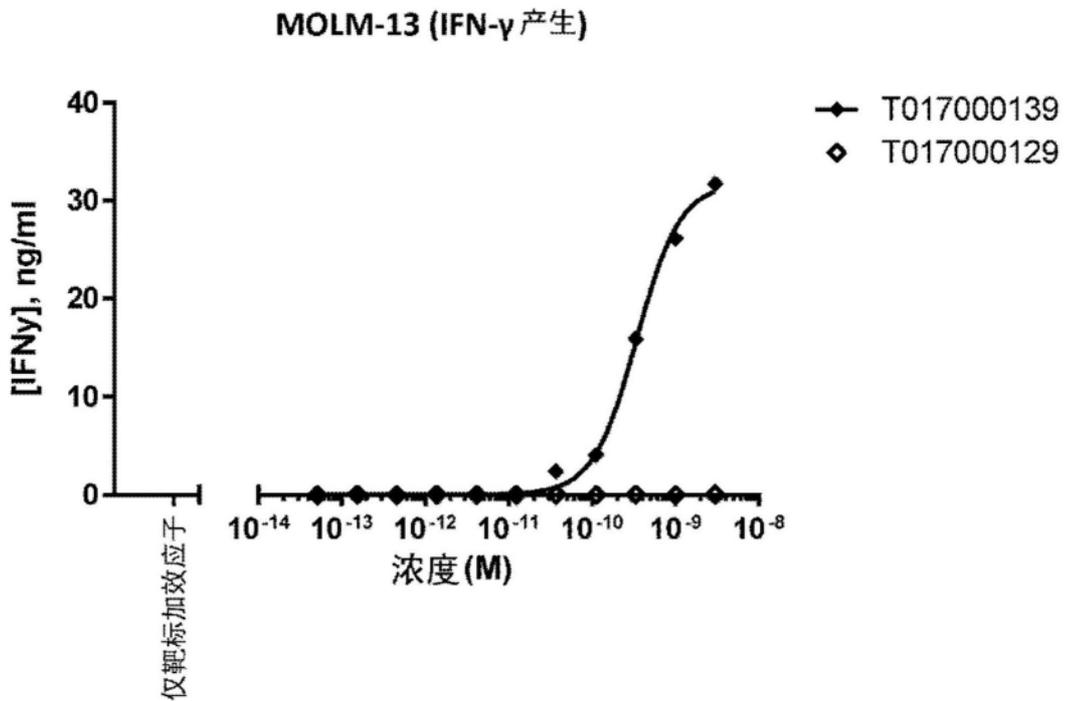
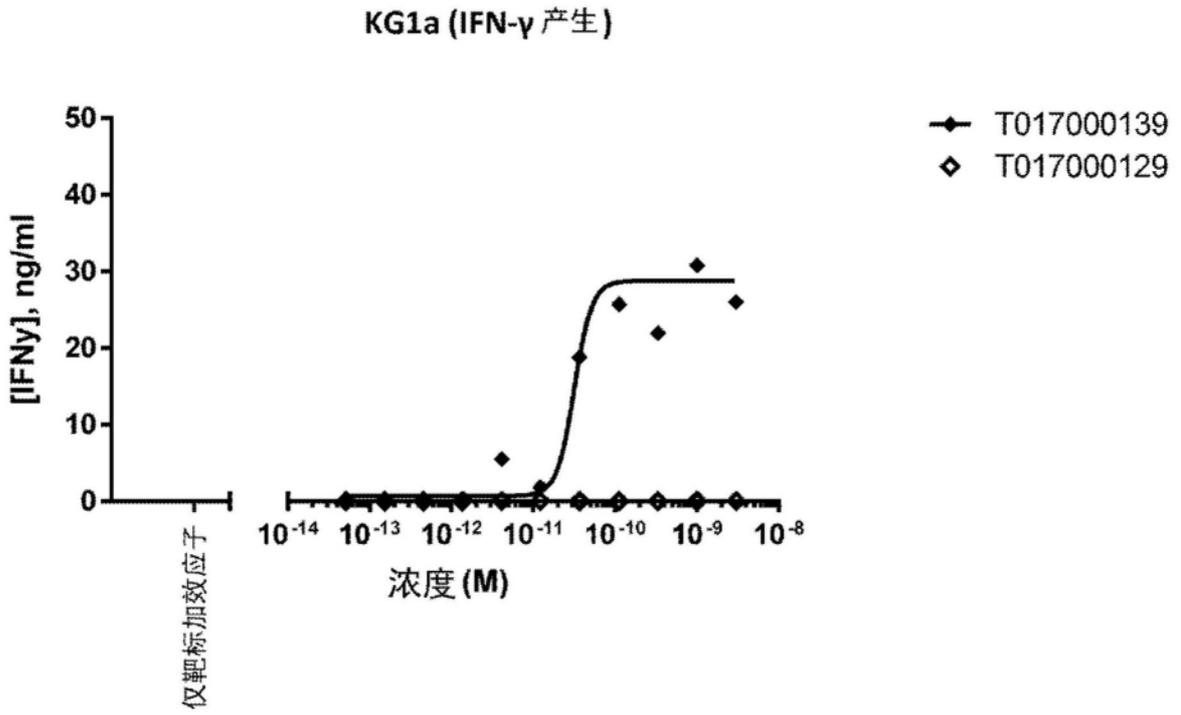


图43

B.



C.

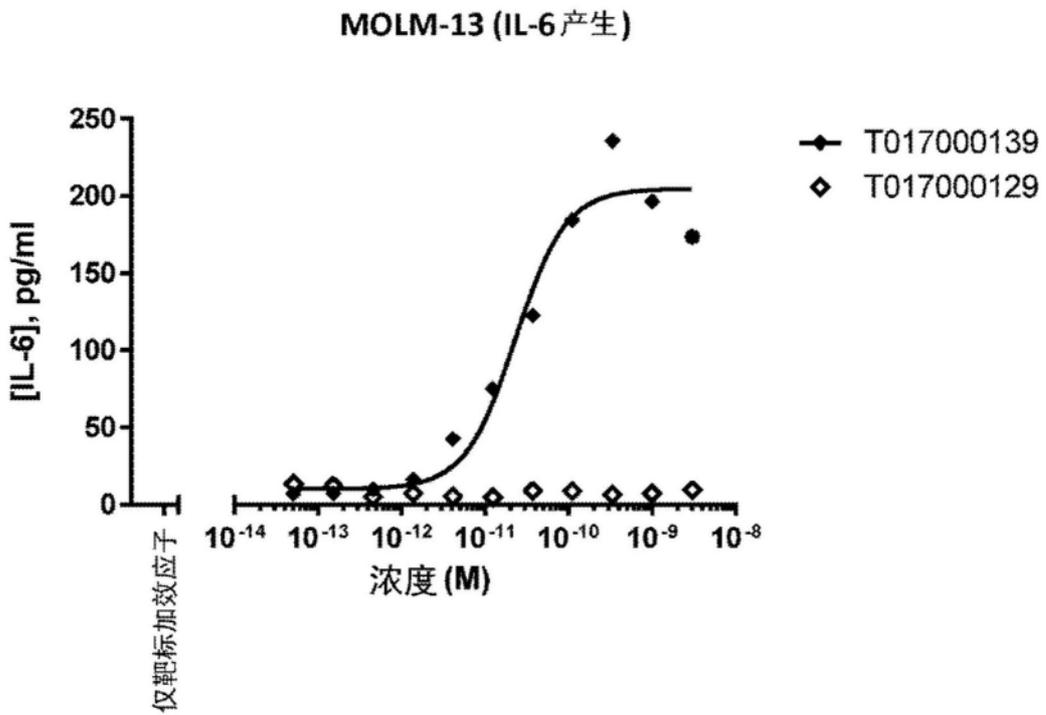
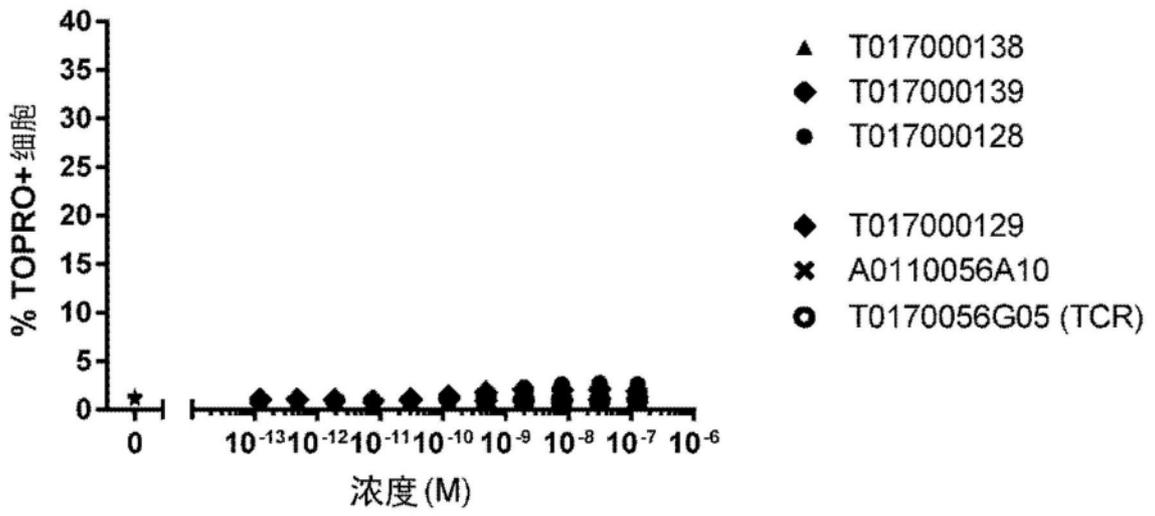


图43(续)

A.



B.

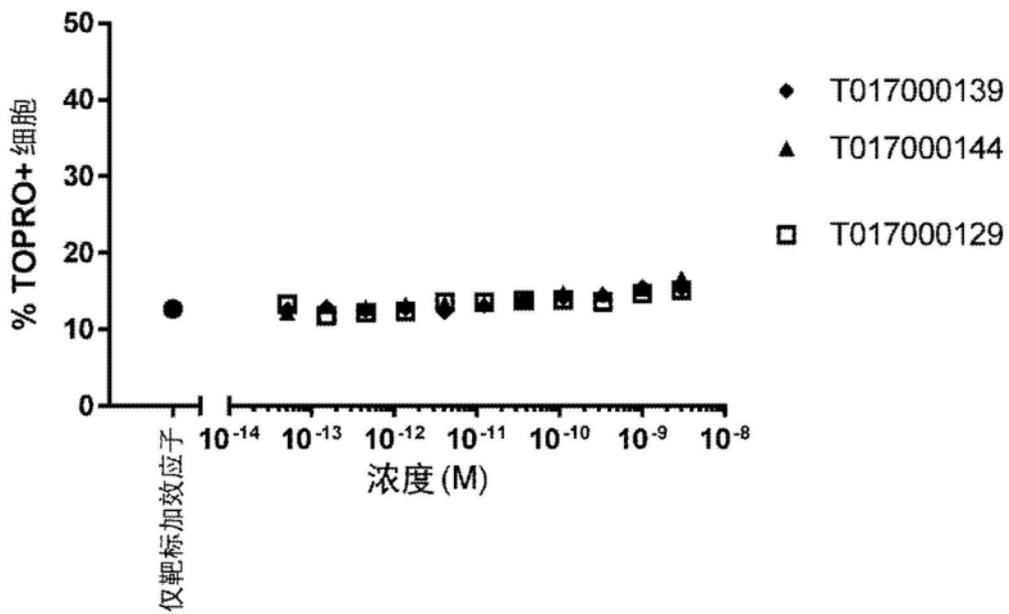
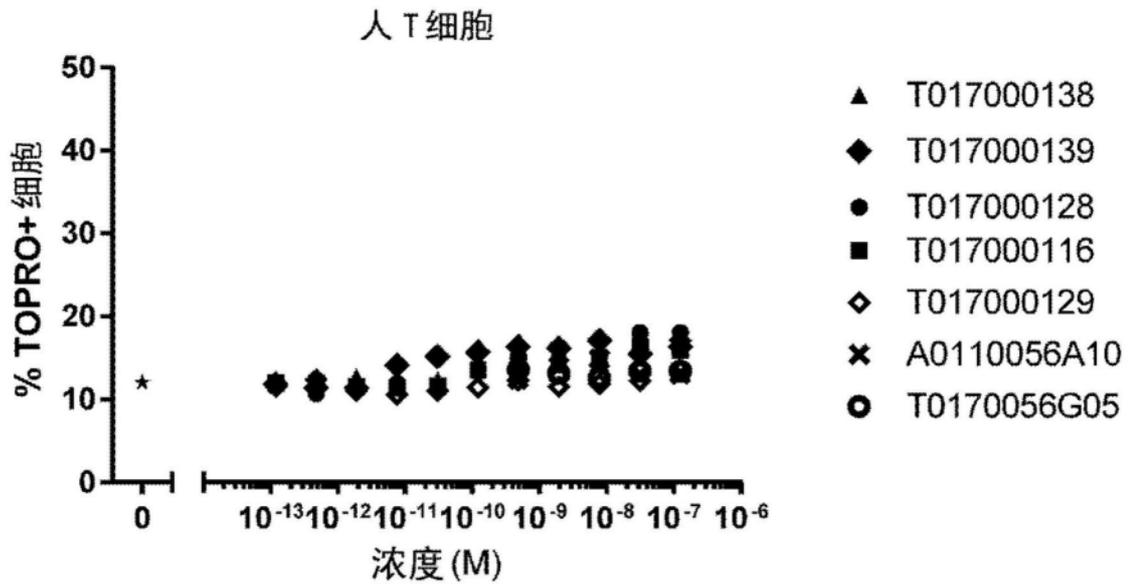


图44

A.



B.

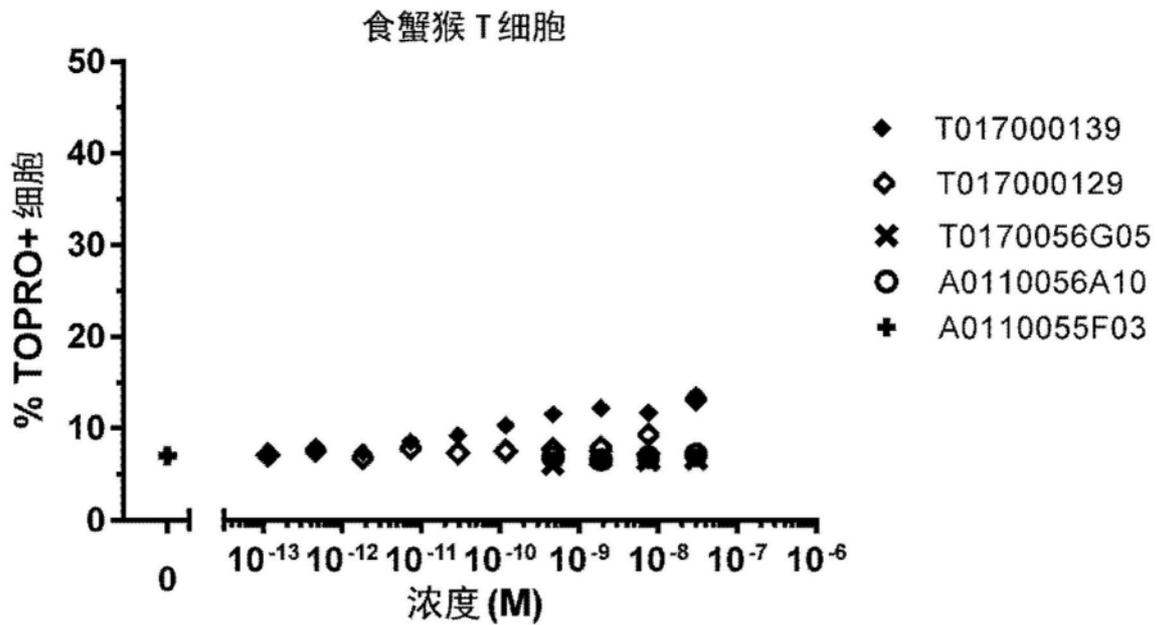
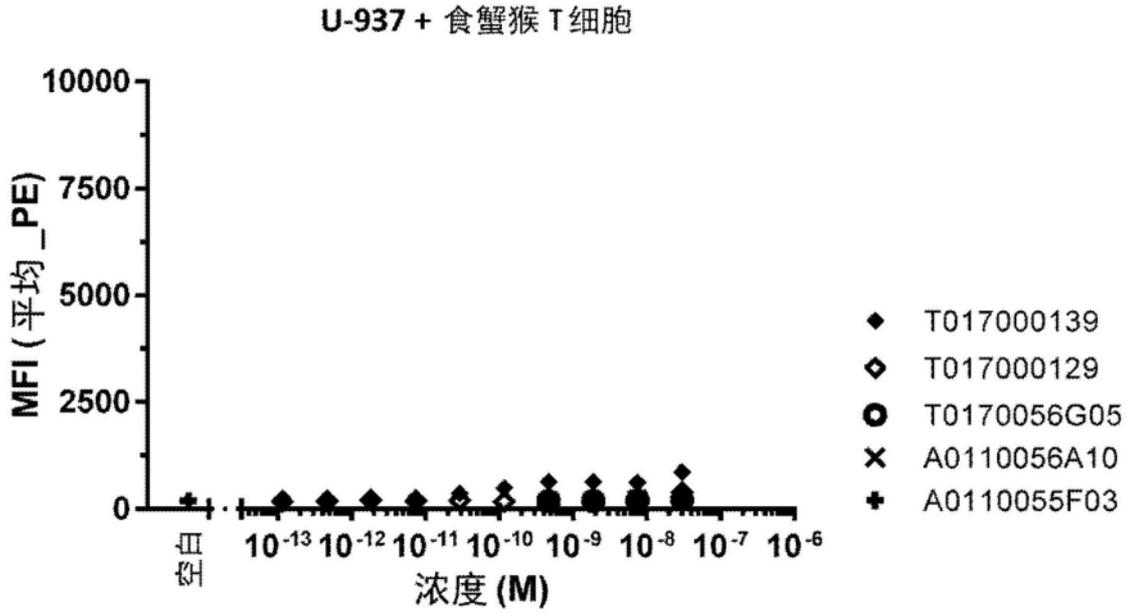


图45

A.



B.

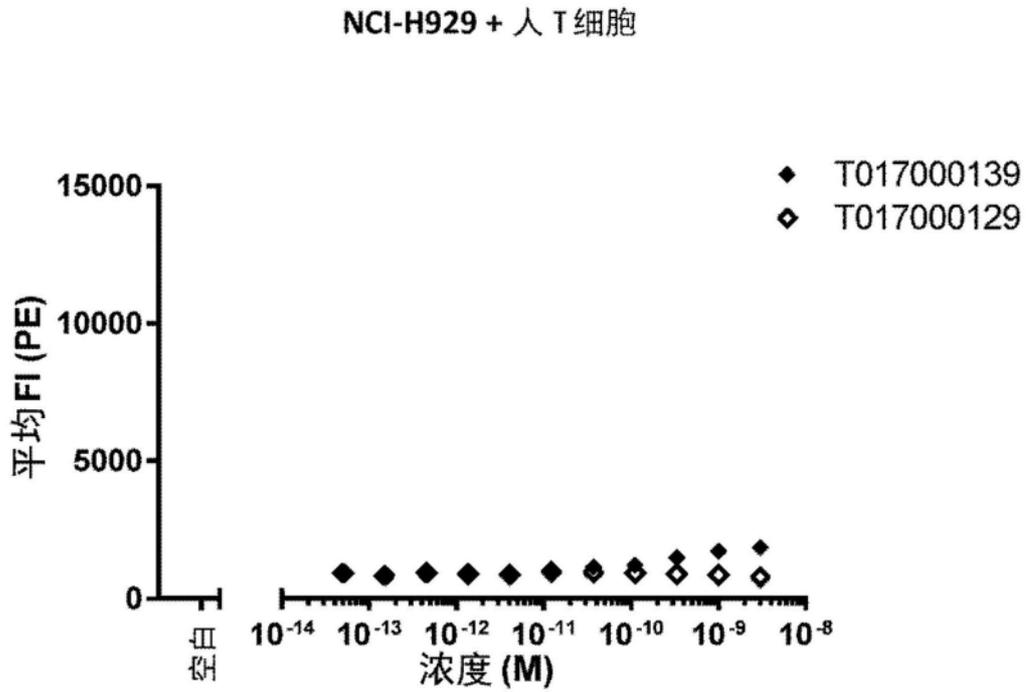
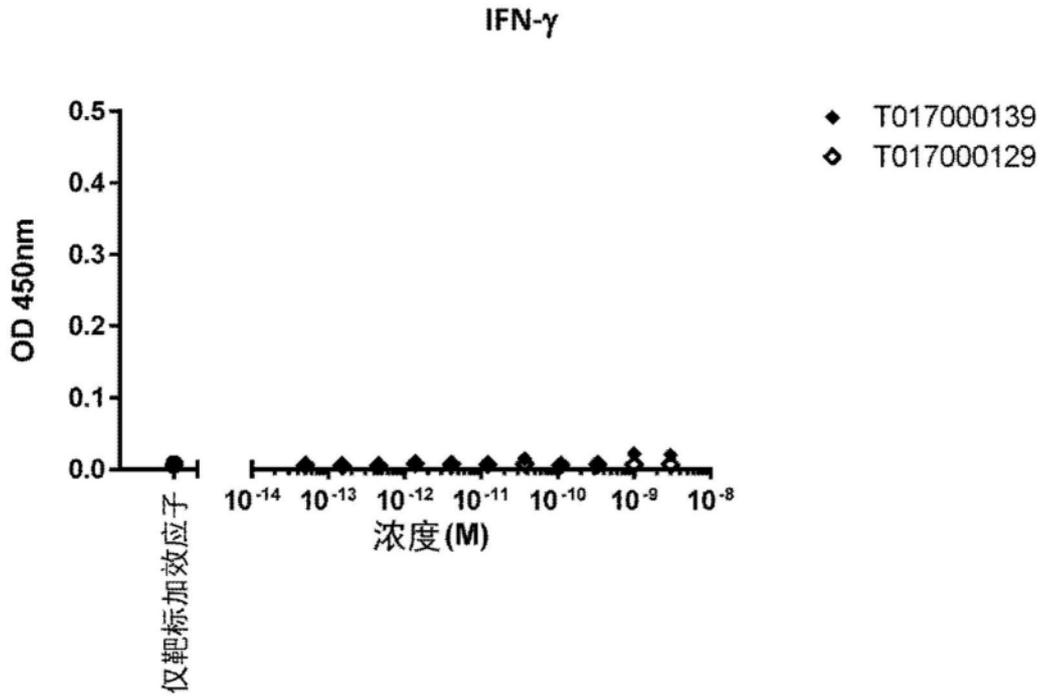


图46

A.



B.

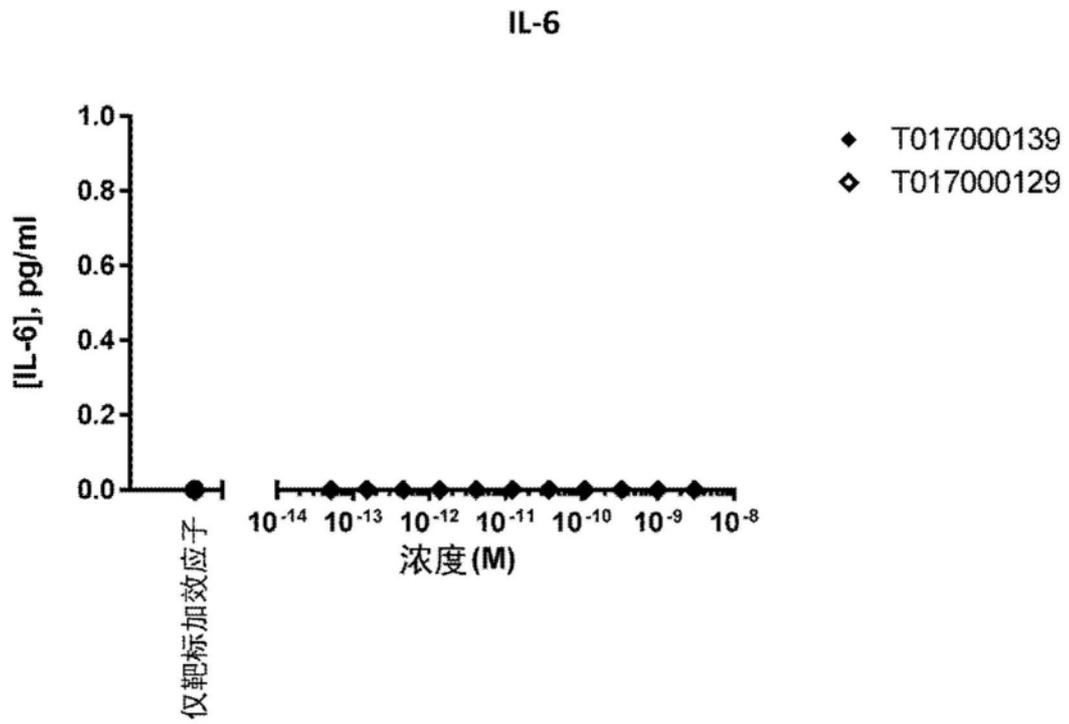
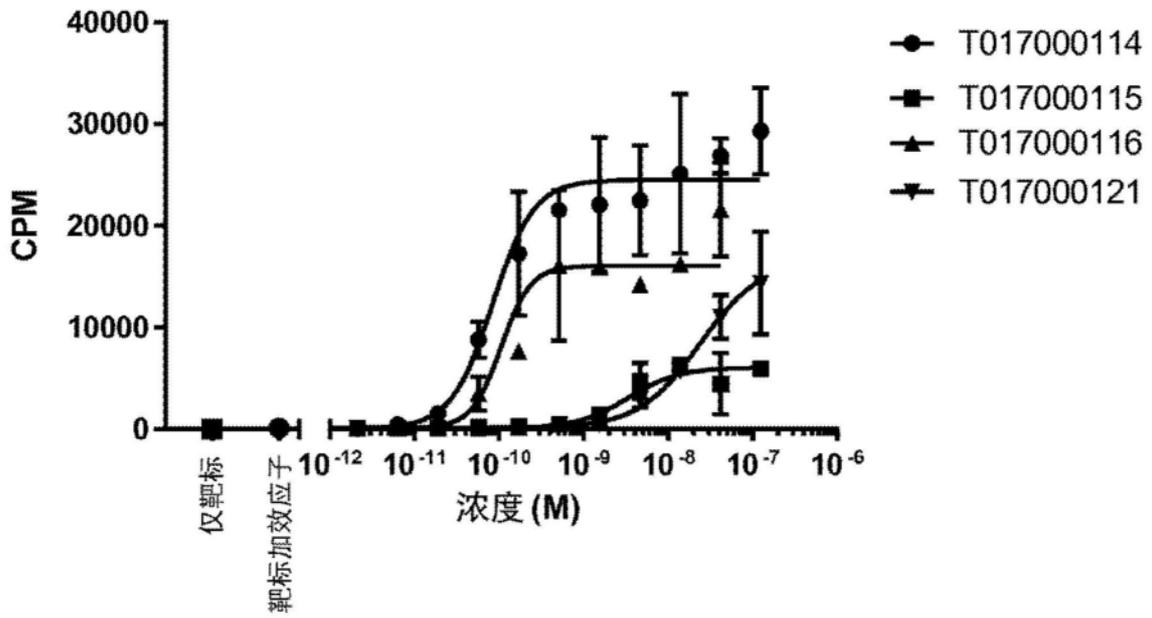


图47

A.



B.

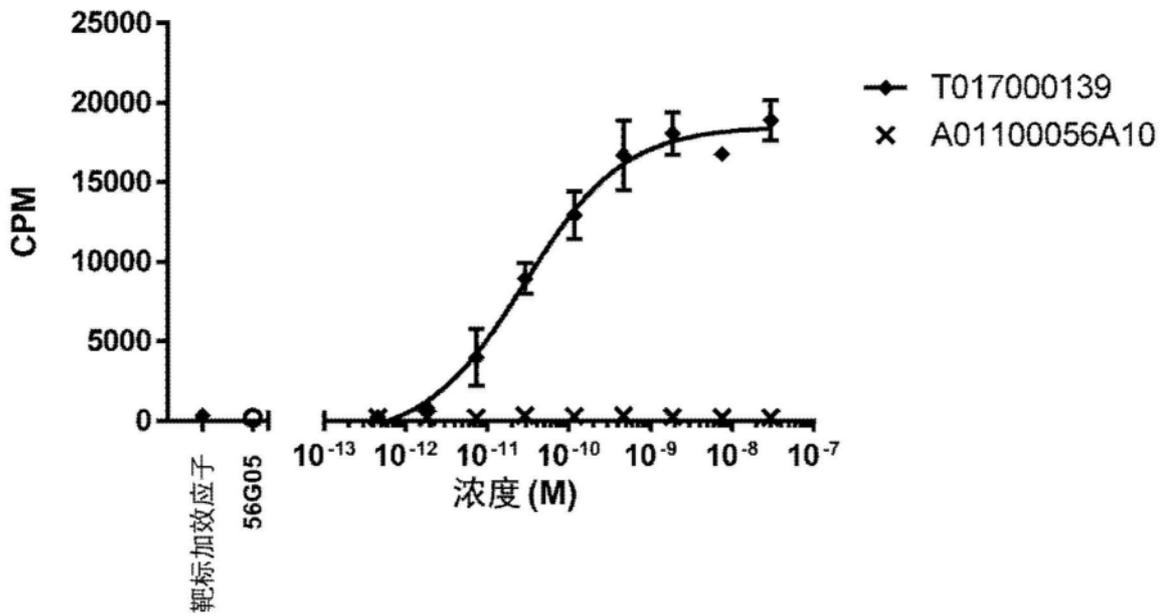


图48

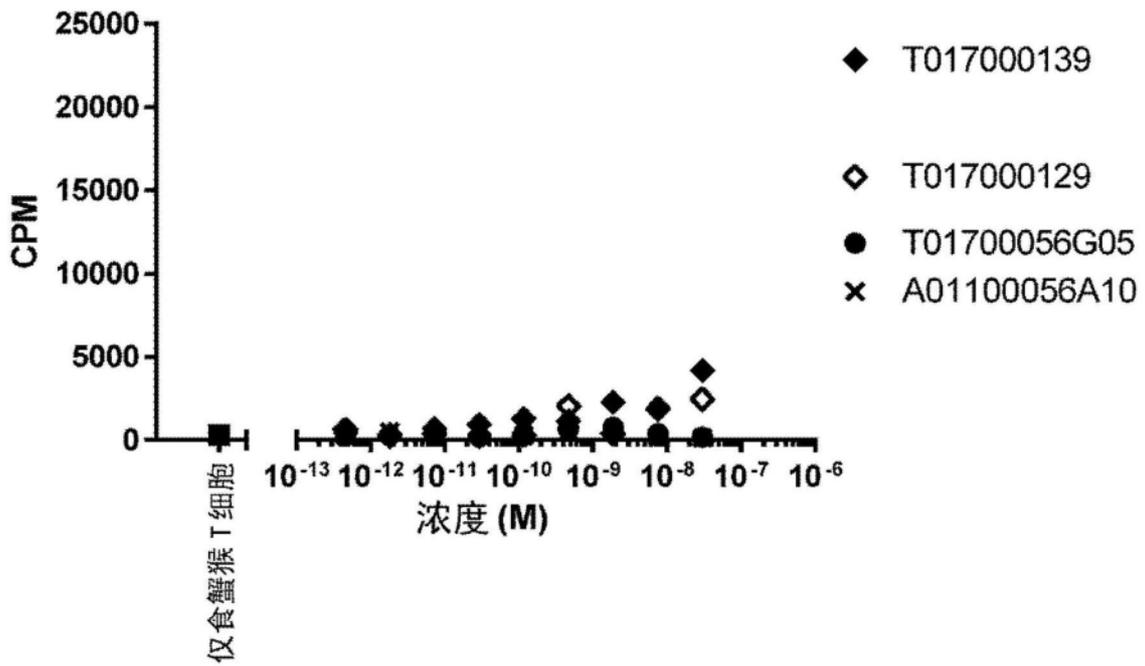


图49

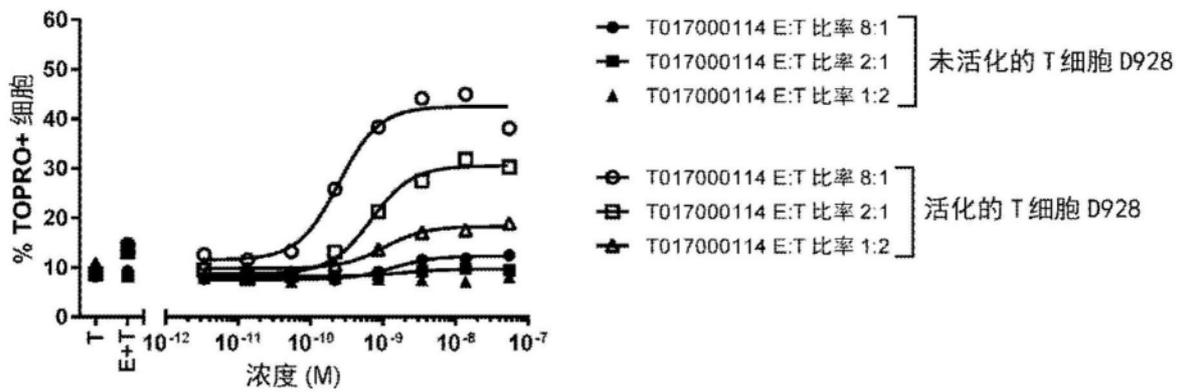


图50

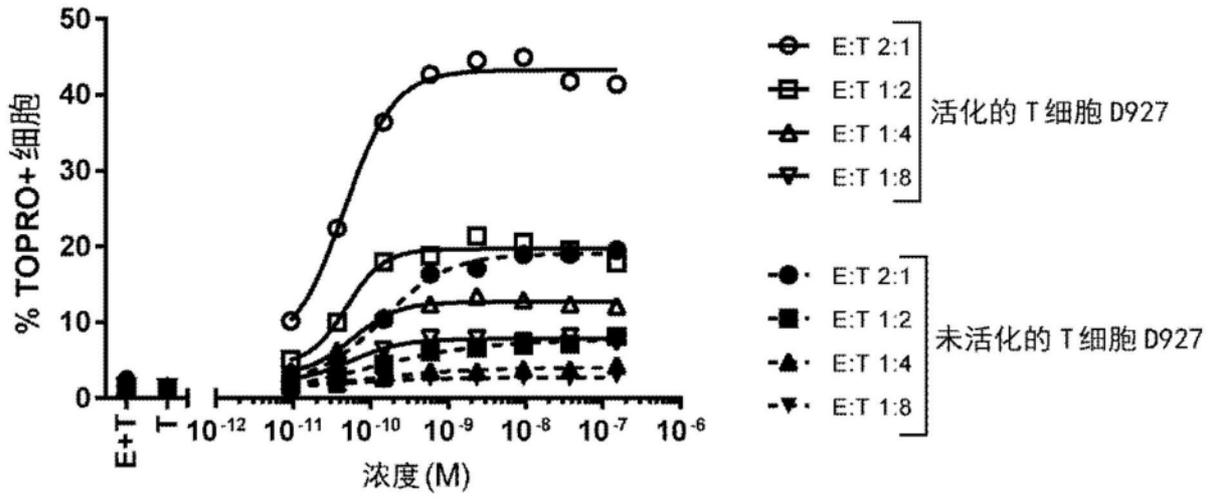
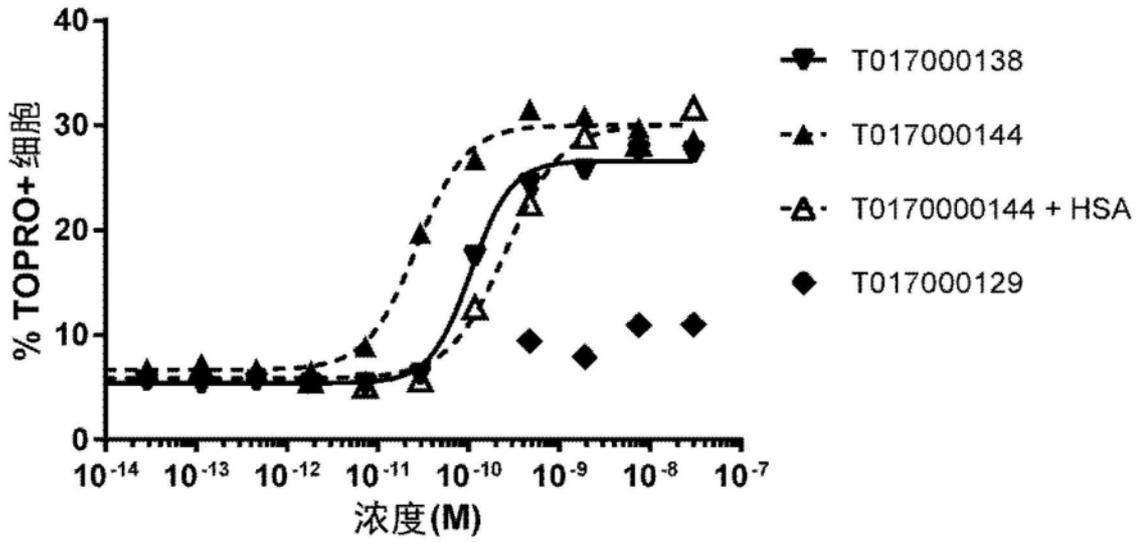


图51

A.

人 T 细胞介导的杀伤



B.

人 T 细胞介导的杀伤

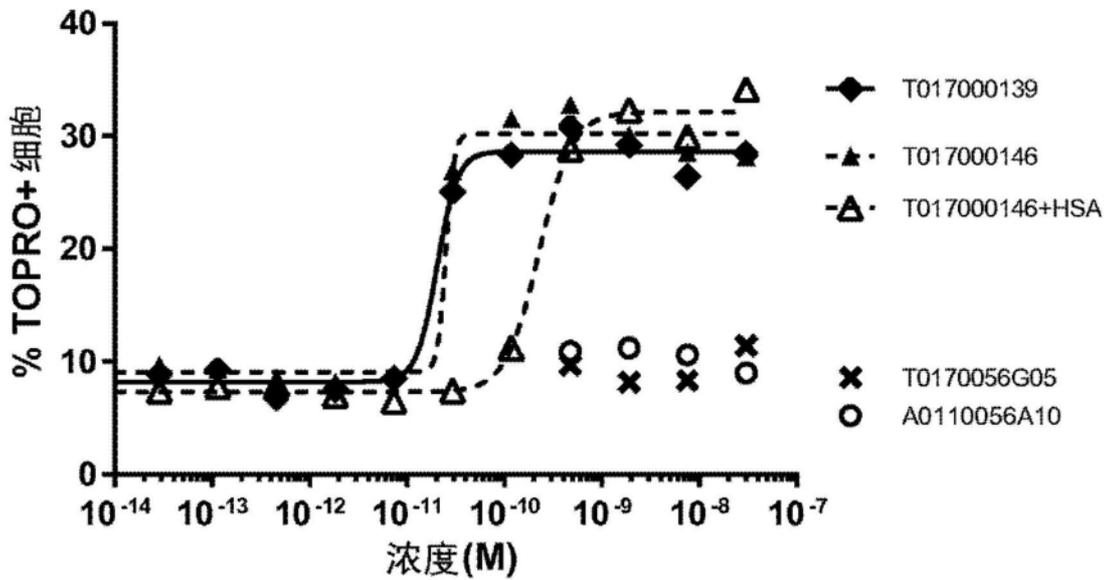
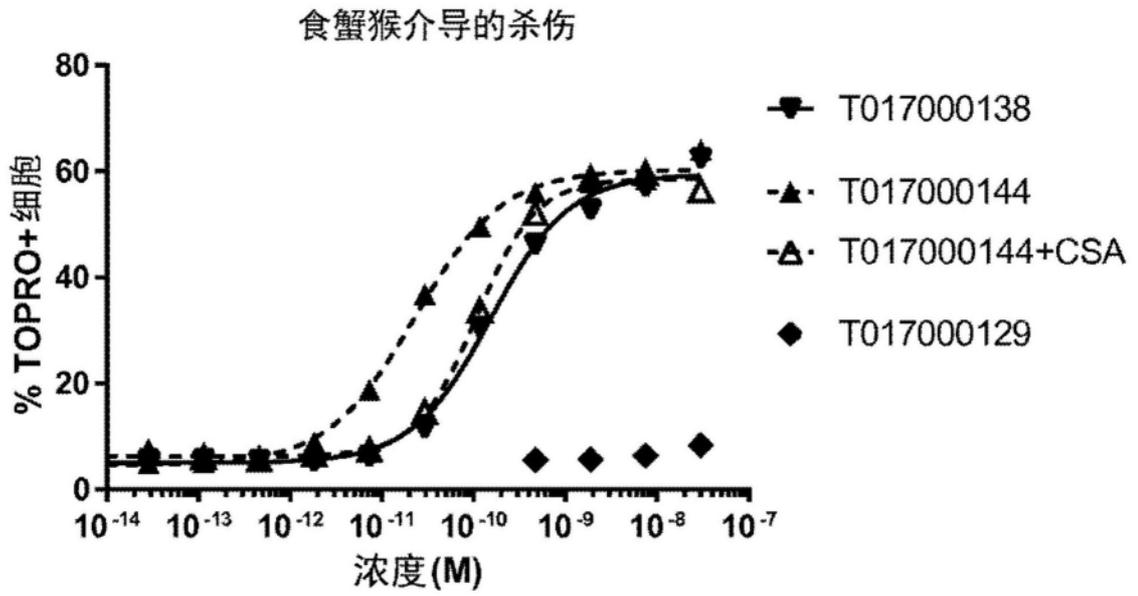


图52

C.



D.

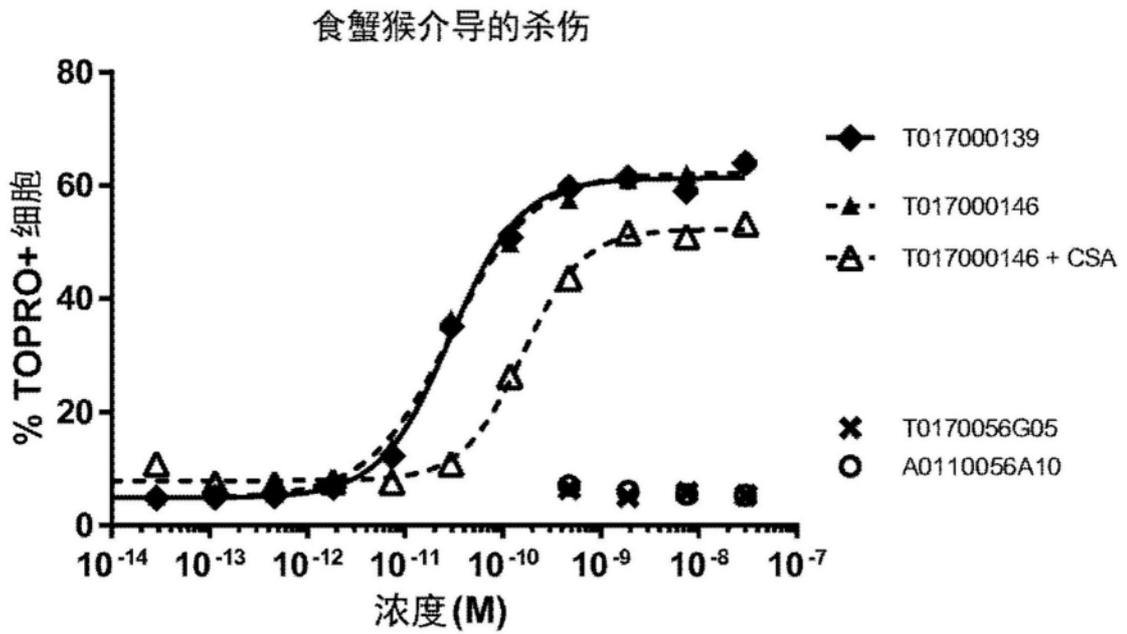
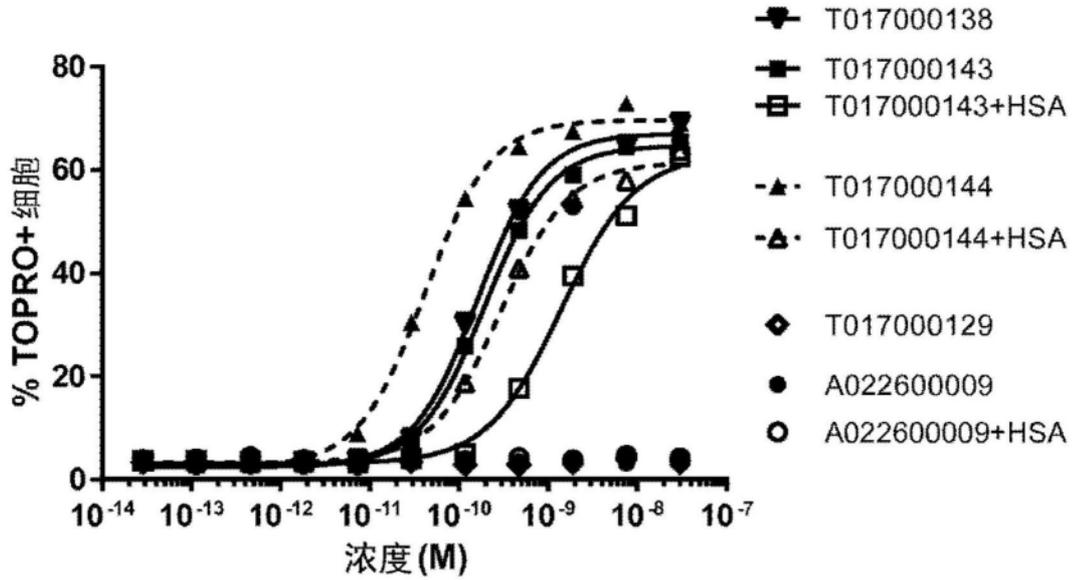


图52(续)

A.

人 T 细胞介导的杀伤



B.

人 T 细胞介导的杀伤

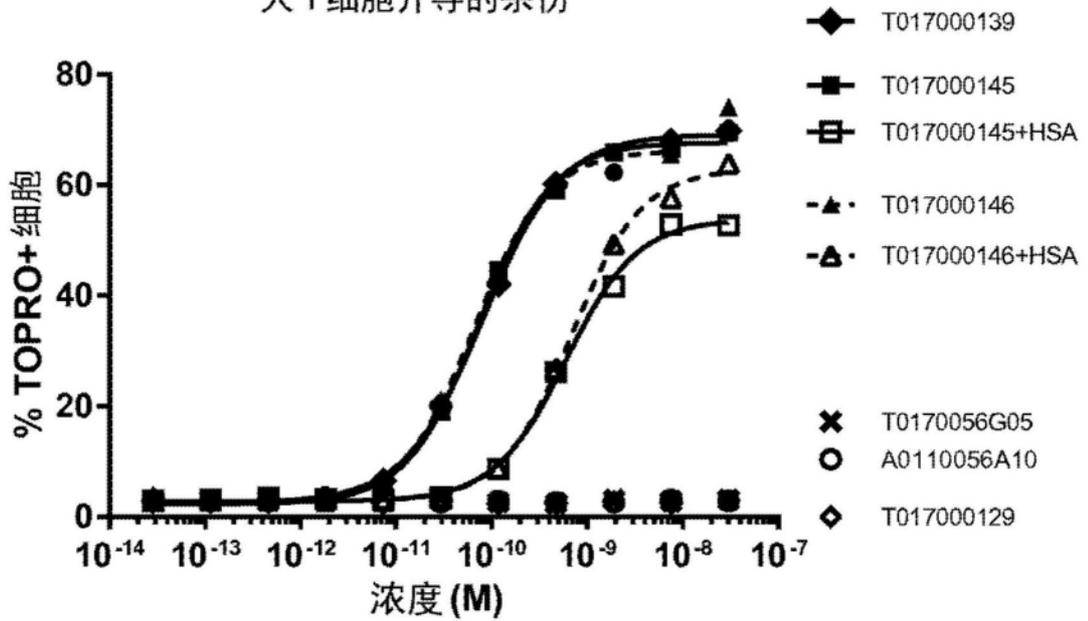
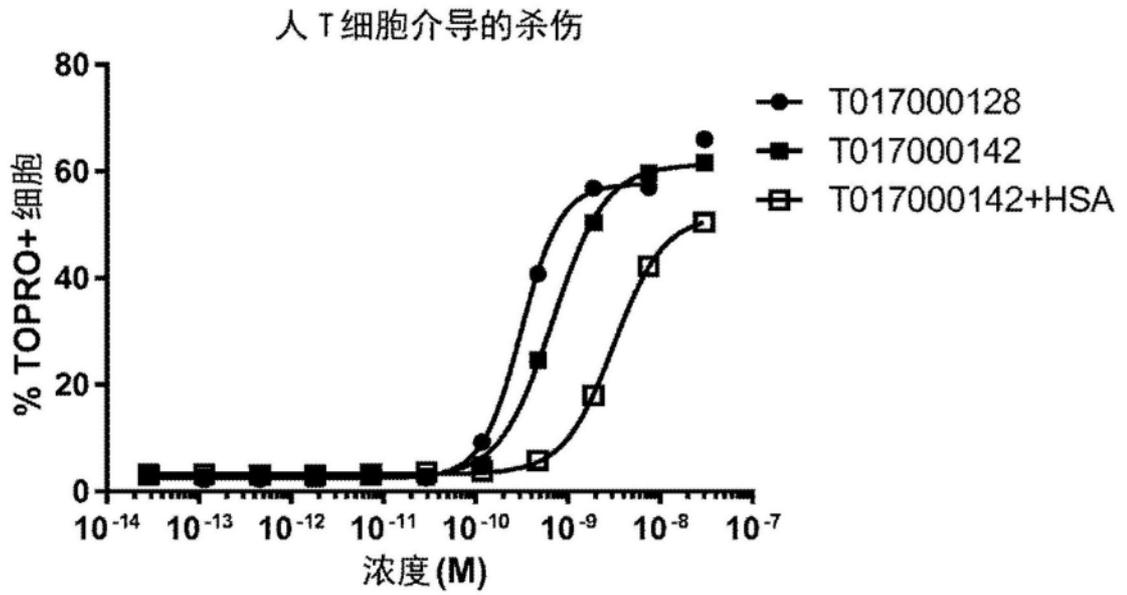


图53

C.



D.

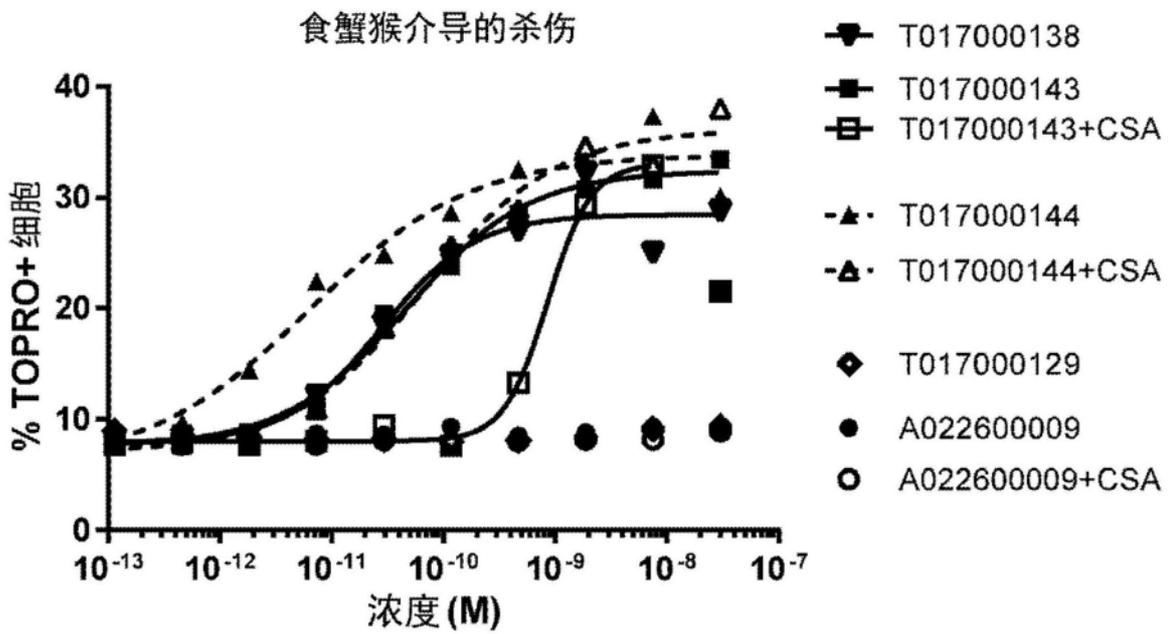
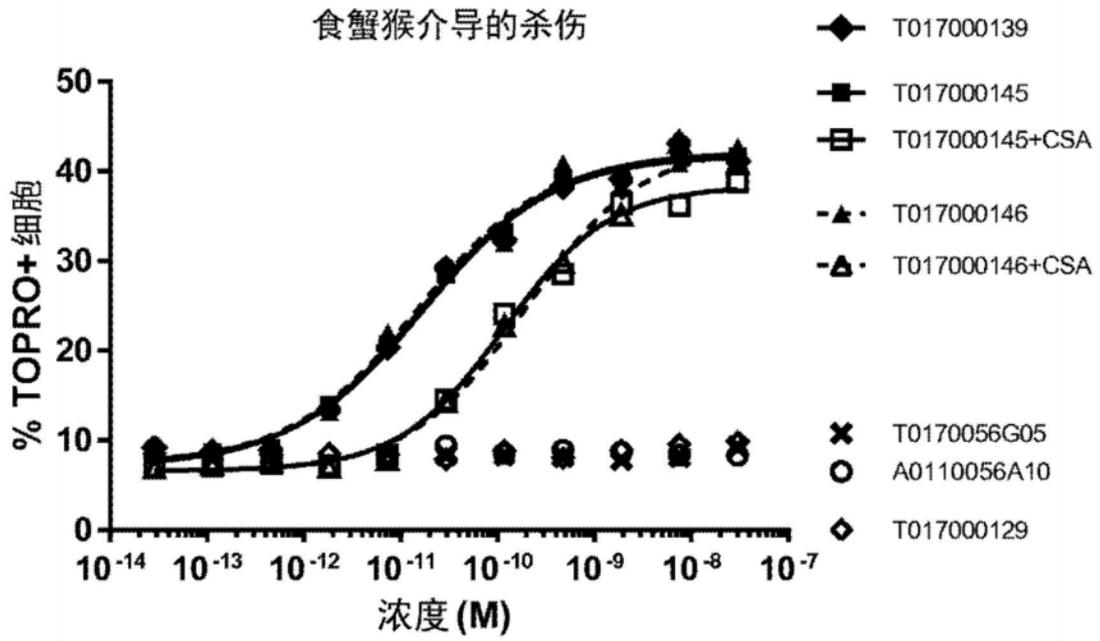


图53(续)

E.



F.

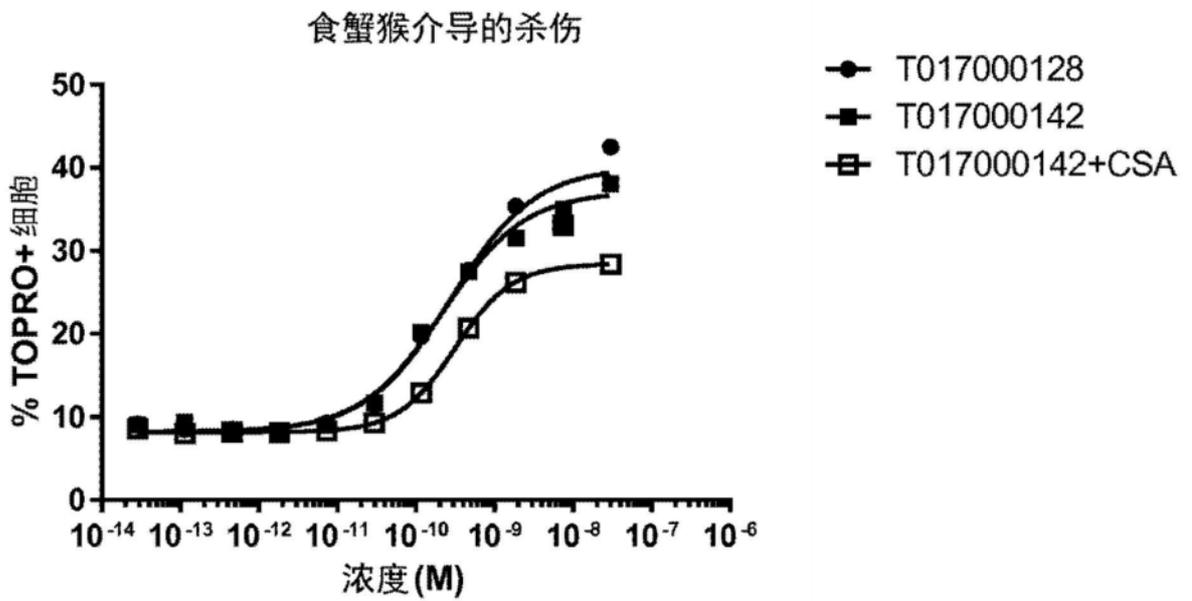
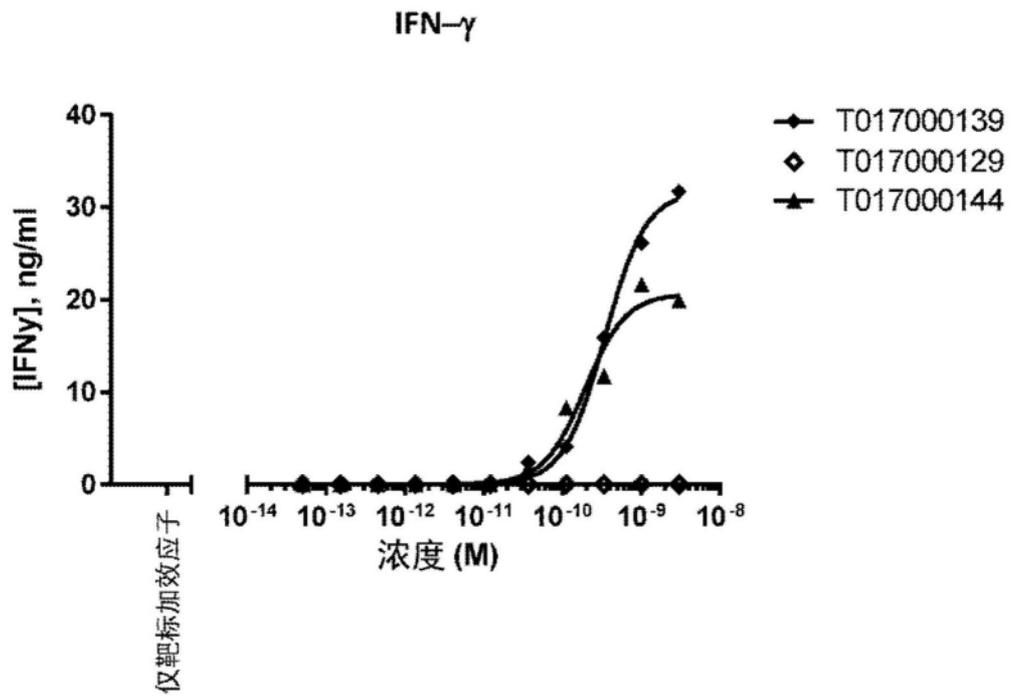


图53(续)

A.



B.

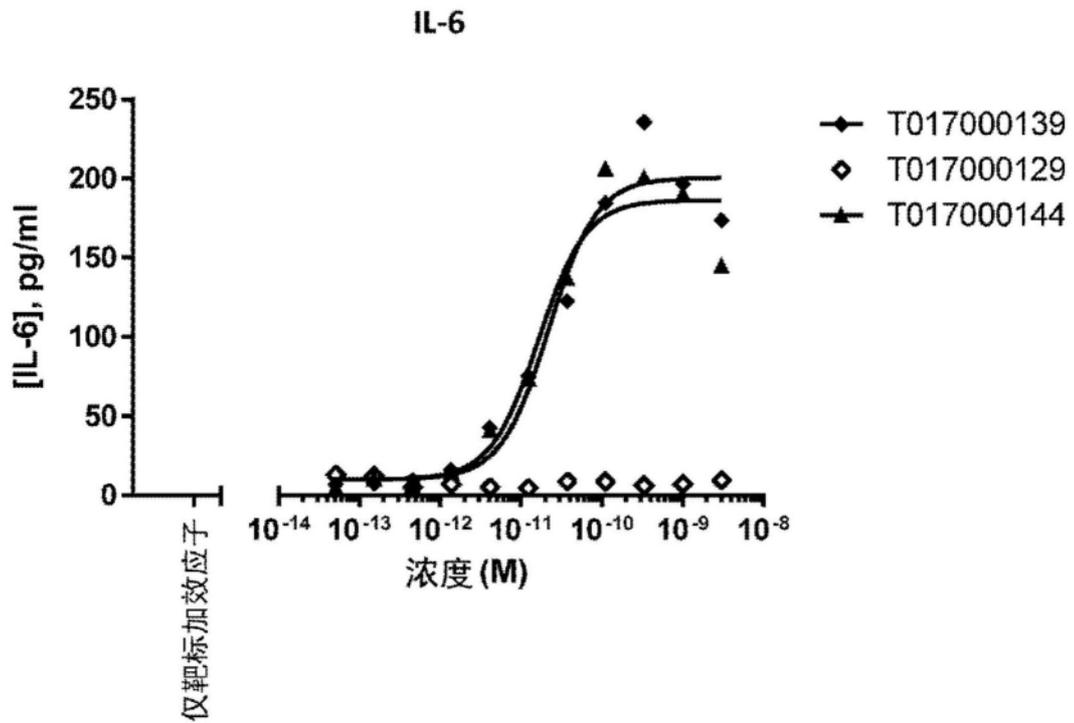


图54

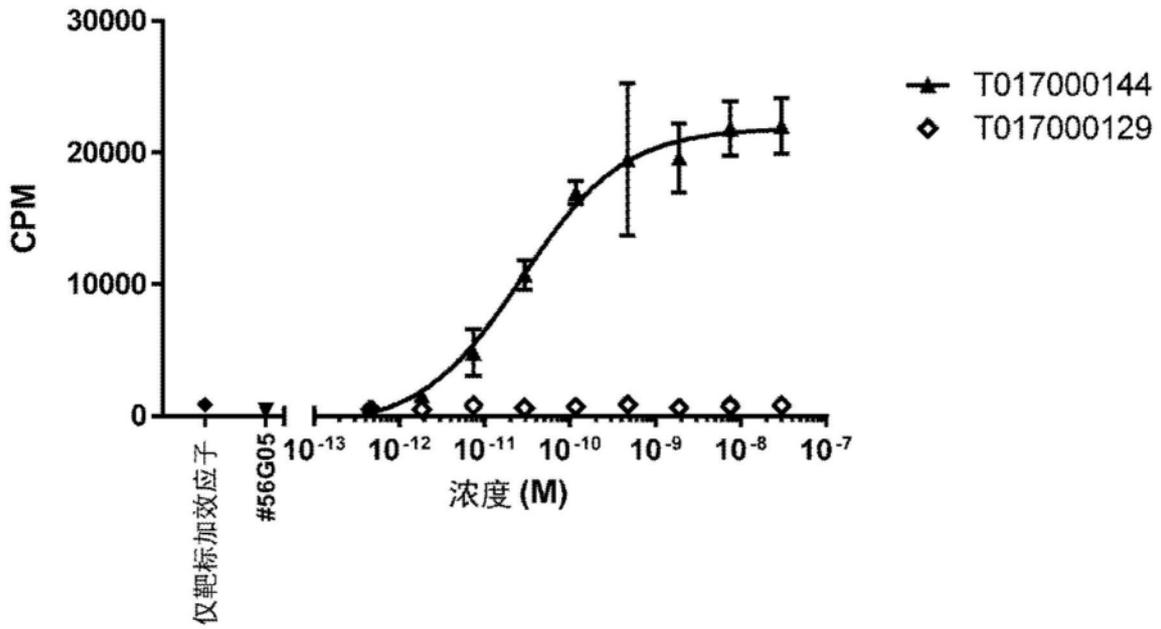


图55

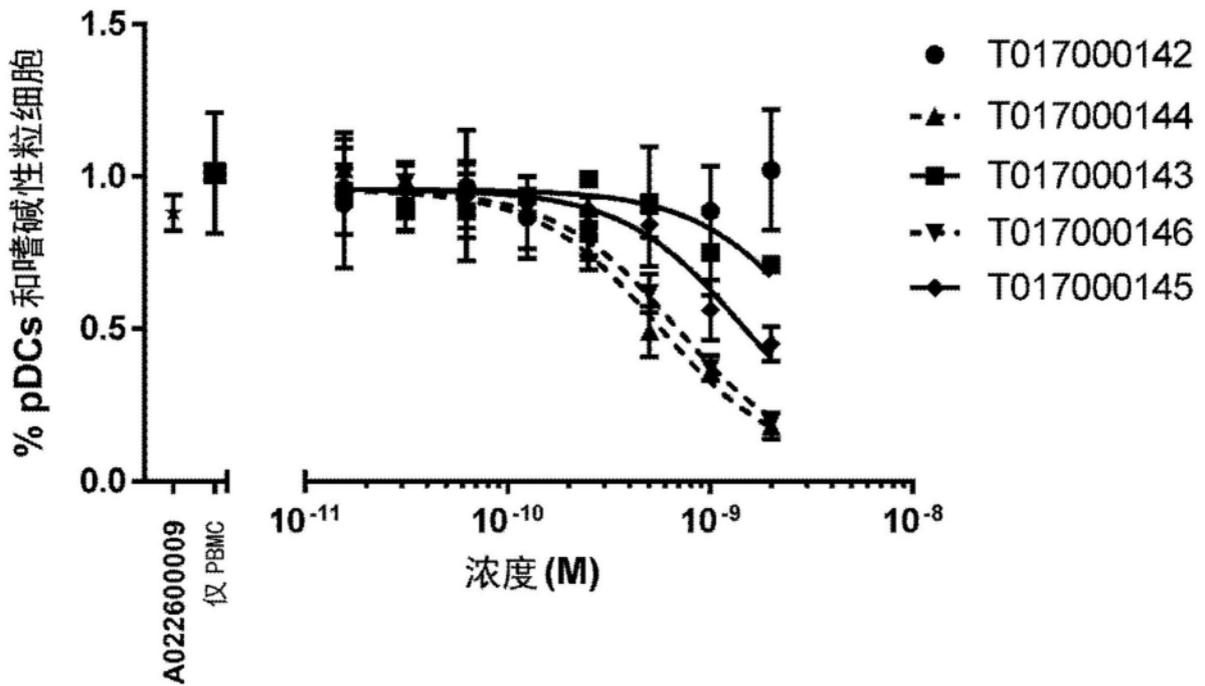


图56

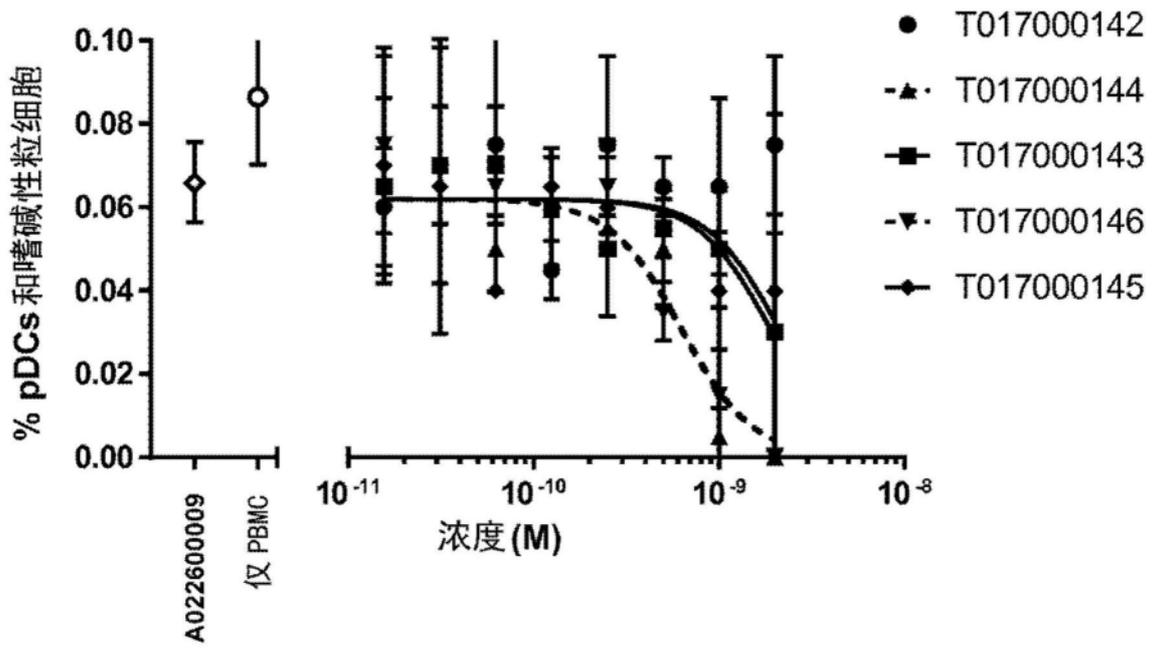


图57

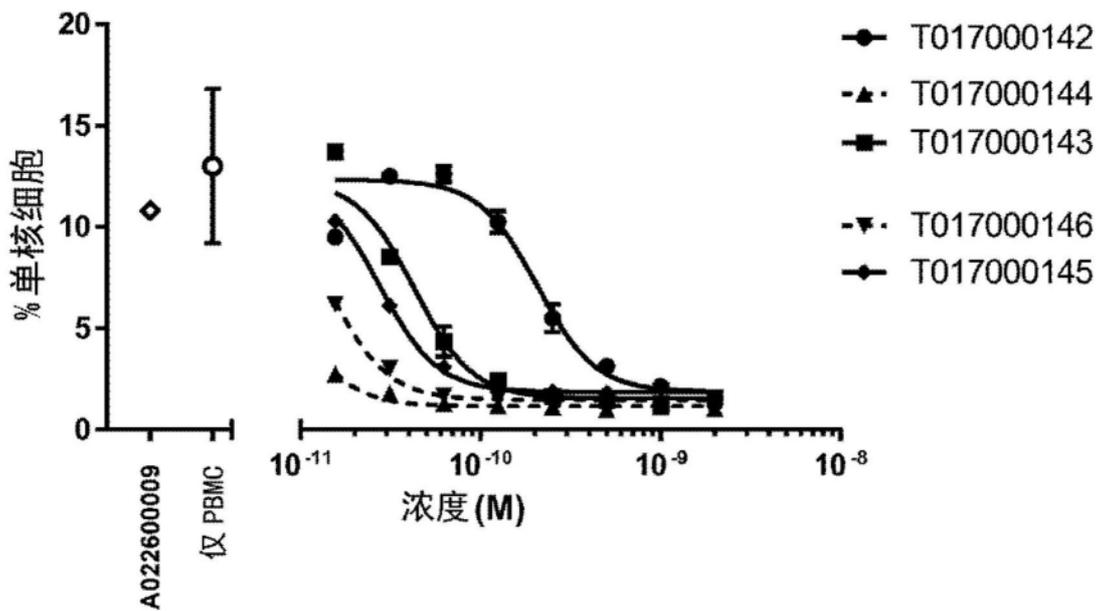
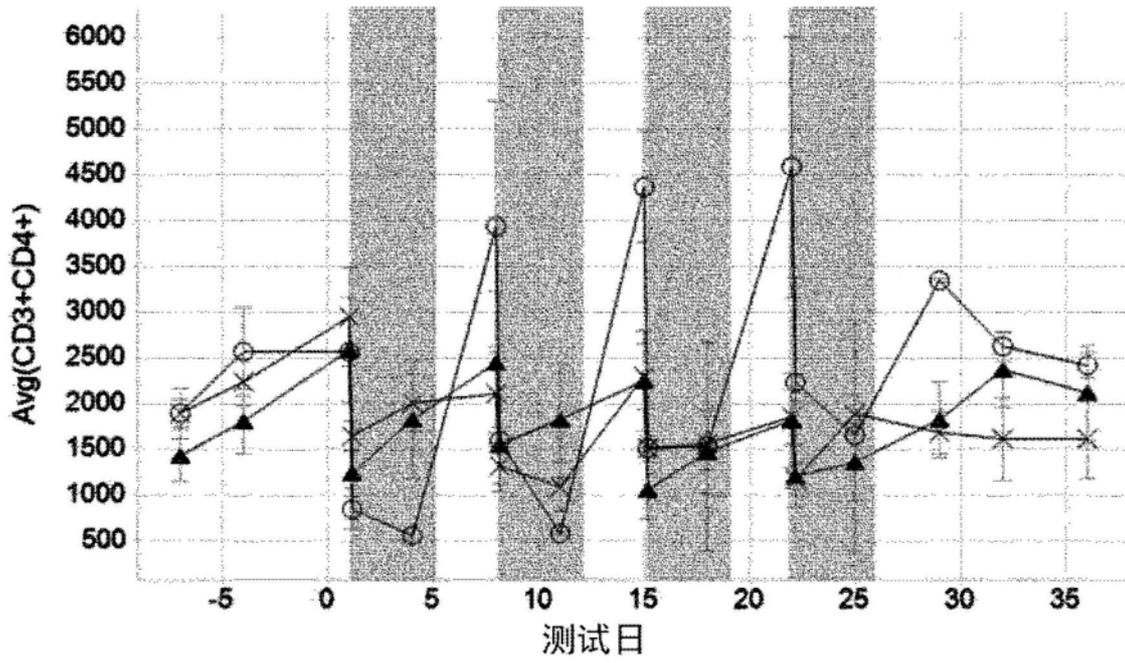


图58

A.



B.

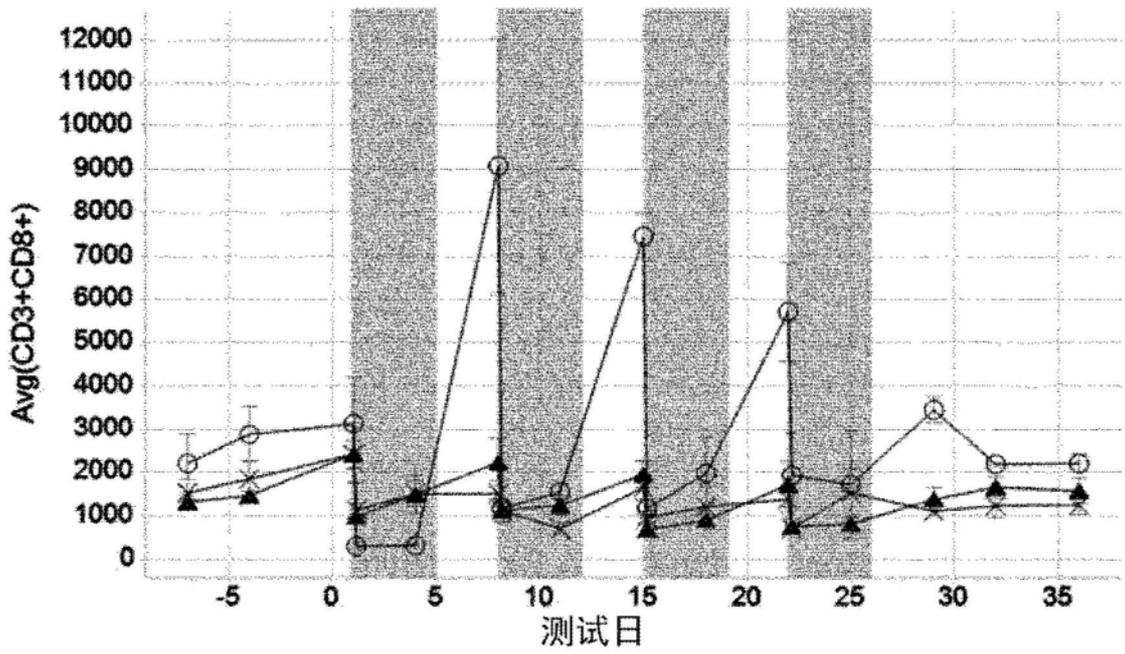


图59

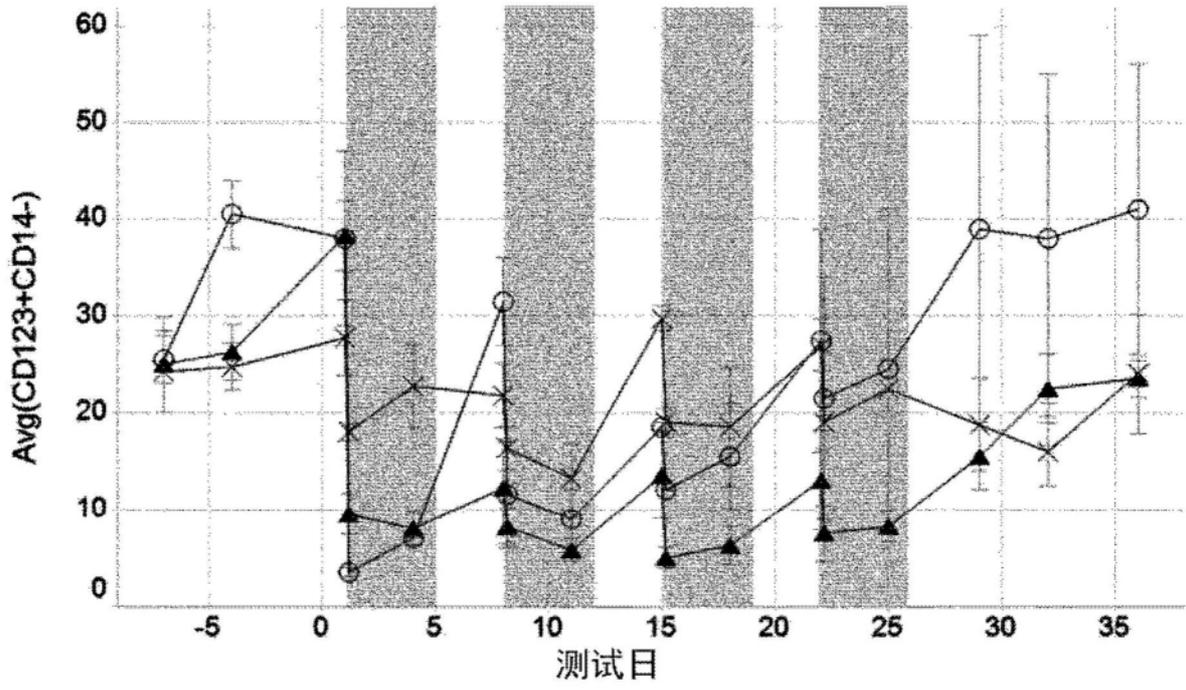
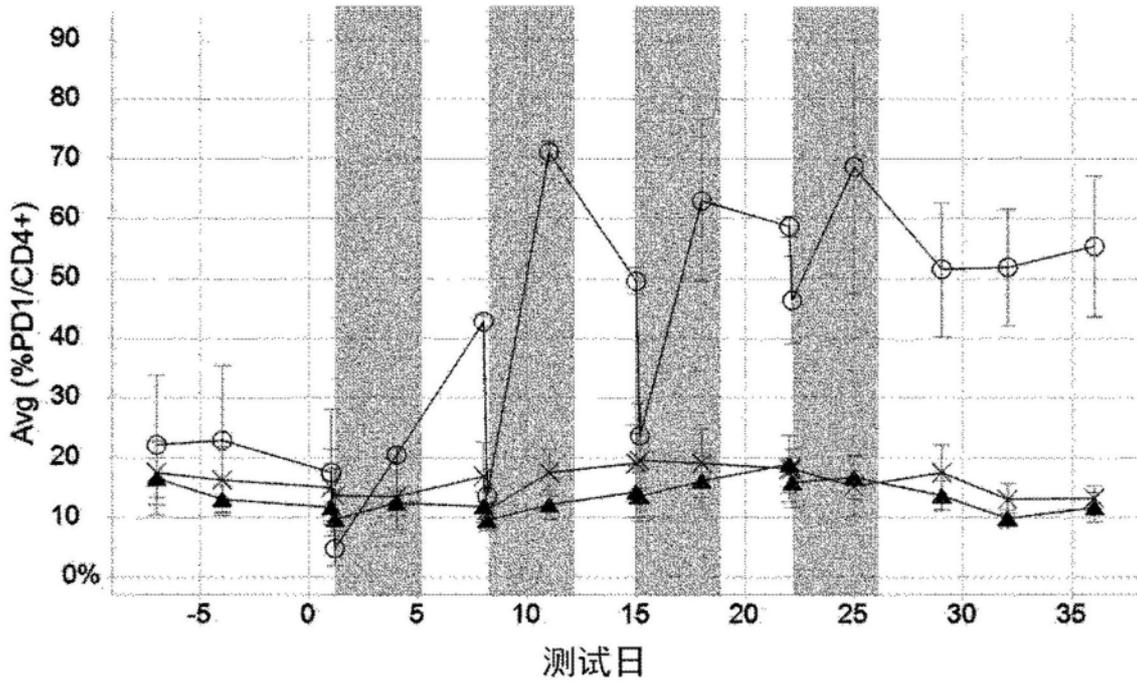


图60

A.



B.

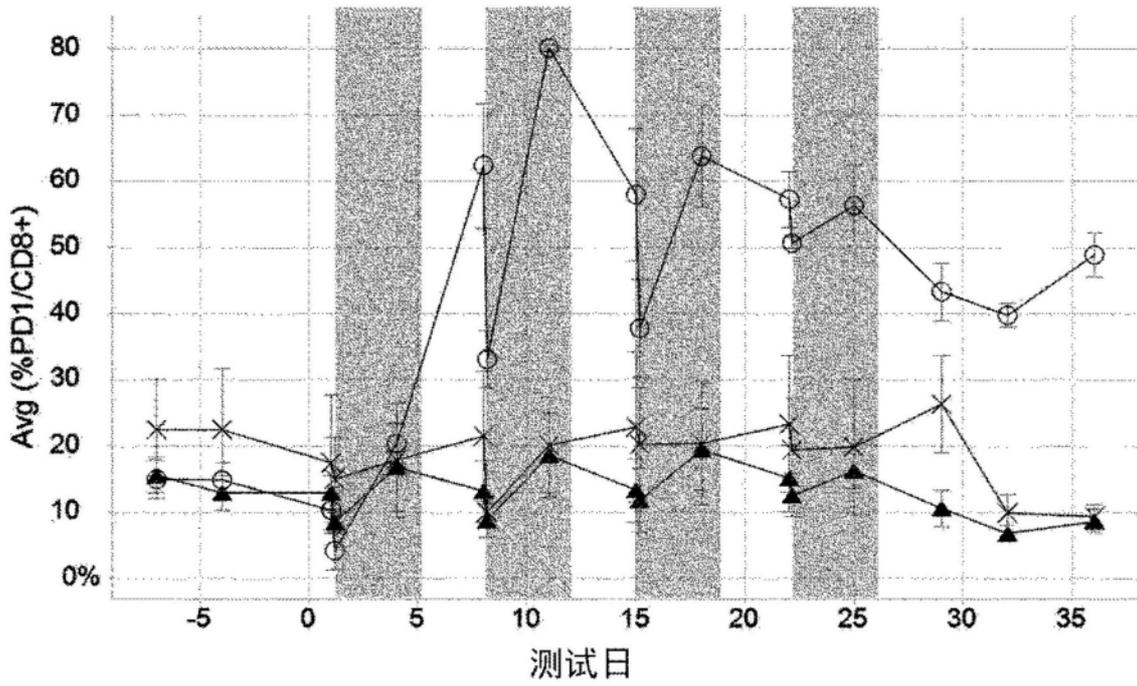


图61

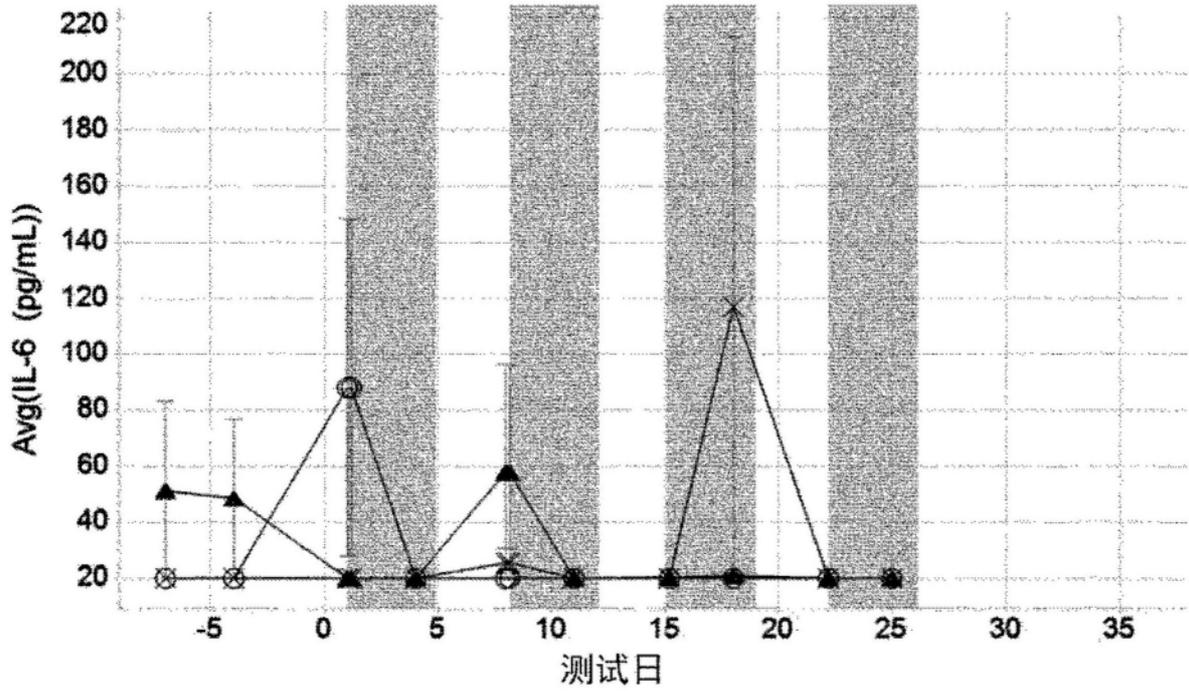


图62