



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111699197 B

(45) 授权公告日 2024.08.23

(21) 申请号 201880085847.0

(72) 发明人 维丽娜·布鲁克拉赫-瓦尔德特

(22) 申请日 2018.11.13

卡罗琳·爱德华兹 詹姆斯·莱格
雅耶·玛吉蒂雅
布莱恩·麦吉尼斯
克里斯蒂娜·罗桑 滕毓敏(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111699197 A

(43) 申请公布日 2020.09.22

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

(30) 优先权数据

1718734.5 2017.11.13 GB

专利代理人 高丽娜 张莹

1718735.2 2017.11.13 GB

(51) Int.CI.

1808589.4 2018.05.24 GB

C07K 16/28 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/30 (2006.01)

2020.07.08

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2017122017 A1, 2017.07.20

PCT/GB2018/053279 2018.11.13

WO 2017123650 A2, 2017.07.20

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 王康

W02019/092451 EN 2019.05.16

(73) 专利权人 克雷森多生物制剂有限公司

权利要求书2页 说明书81页

地址 英国剑桥

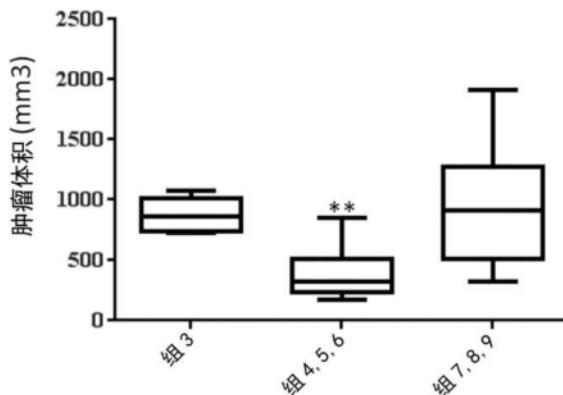
序列表 (电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

结合CD137的单结构域抗体

(57) 摘要

本公开涉及CD137结合剂以及这种结合剂在治疗、预防和检测疾病中的用途。



1. 分离的单可变重链结构域抗体,其与人CD137结合,但当作为单特异性实体结合至CD137时不引发CD137信号传导,

其中所述单可变重链结构域抗体抑制CD137L与CD137的结合,并且包含CDR1、CDR2和CDR3,其中CDR1由SEQ ID NO.873组成,CDR2由SEQ ID NO.874组成,和CDR3由SEQ ID NO.875组成。

2. 根据权利要求1所述的单可变重链结构域抗体,其包含人构架区。

3. 根据权利要求1所述的单可变重链结构域抗体,其由SEQ ID NO.876组成。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的单可变重链结构域抗体,其获得自转基因啮齿动物,所述转基因啮齿动物表达包含人V区、D区和J区的转基因。

5. 根据权利要求4所述的单可变重链结构域抗体,其中所述啮齿动物不产生功能性内源性轻链和重链。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的单可变重链结构域抗体,其中所述单可变重链结构域抗体与选自毒素、酶、聚乙二醇分子、人血清白蛋白或标记物的一个或更多个部分缀合。

7. 根据权利要求6所述的单可变重链结构域抗体,其中所述标记物为放射性同位素。

8. 结合分子,其包含

a) 根据权利要求1至7中任一项所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体,和

b) 结合肿瘤特异性抗原的部分,其中所述肿瘤特异性抗原选自PSMA其中所述结合分子的序列如SEQ ID NO:892或SEQ ID NO:890所示。

9. 根据权利要求8所述的结合分子,其中所述结合分子与选自毒素、酶、聚乙二醇分子、人血清白蛋白、或标记物的一个或更多个部分缀合。

10. 根据权利要求9所述的结合分子,其中所述标记物是放射性同位素。

11. 药物组合物,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的单可变重链结构域抗体或根据权利要求8至10中任一项所述的结合分子和药物载体。

12. 根据权利要求1至7中任一项所述的单可变重链结构域抗体,根据权利要求8至10中任一项所述的结合分子或根据权利要求11所述的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物和/或试剂盒中的用途,其中所述癌症为前列腺癌。

13. 试剂盒,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的单可变重链结构域抗体,或根据权利要求8至10中任一项所述的结合分子,或根据权利要求11所述的药物组合物。

14. 根据权利要求13所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含试剂和/或使用说明书

15. 核酸分子,其编码权利要求1至7中任一项所述的单可变重链结构域抗体。

16. 根据权利要求15所述的核酸分子,其中所述核酸分子的序列由SEQ ID NO.887组成。

17. 载体,其包含根据权利要求15或16中任一项所述的核酸分子。

18. 细菌或酵母宿主细胞,其包含根据权利要求15或16中任一项所述的核酸分子或根据权利要求17所述的载体。

19. 用于产生根据权利要求1至7中任一项所述的单结构域抗体的方法,其包括在宿主细胞中表达编码所述单结构域抗体的核酸并从宿主细胞中分离所述单结构域抗体。

20. 权利要求1至7中任一项所述的单可变重链结构域抗体,或权利要求8至10中任一项

所述的结合分子,或权利要求11所述的药物组合物,其中所述单可变重链结构域抗体产生自转基因啮齿动物。

21. 包含根据权利要求1至7中任一项所述的单可变重链结构域抗体的结合人CD137的仅有重链的抗体,其获得自用CD137免疫后的转基因小鼠,其中所述小鼠表达人V、D和J基因座,并且不产生功能性内源λ和κ轻链和重链。

结合CD137的单结构域抗体

[0001] 引言

[0002] 癌症仍然是世界上主要的死亡原因之一。最近的研究已显示全世界估计有1270万癌症病例。预计到2030年,这一数字将增加到2100万 (Vinay和Kwon 2014)。

[0003] CD137 (4-1BB, TNFRS9) 是属于TNF受体超家族的1型跨膜糖蛋白。它最初是从活化的鼠T细胞的cDNA中克隆的。随后显示其具有在T细胞、B细胞、NK和NK T细胞、树突细胞 (DC)、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞上发现的广泛的免疫细胞表达模式。还已经报道了在非造血细胞,例如上皮细胞、内皮细胞和平滑肌细胞上以及在肿瘤细胞系上的表达。CD137表达主要是激活诱导的,尽管已经在一些细胞类型包括Treg和DC上证明了低水平的组成型表达。

[0004] 255个氨基酸的人CD137蛋白 (Genbank登录号NP_001552) 由17个氨基酸的信号肽序列,含有四个富半胱氨酸结构域的细胞外区域,27个氨基酸的跨膜区域和短的42个氨基酸的细胞内结构域组成。它作为单体和二聚体同时存在于细胞表面。CD137的主要配体是CD137配体 (CD137L, 4-1BB-L, TNFS9),尽管与促进受体聚集的半乳凝素-9 (Madireddi等, 2014) 和诸如纤连蛋白的基质蛋白 (Chalupny等, 1992) 具有相互作用也已经被报道。CD137配体主要在激活的抗原呈递细胞如树突状细胞、B细胞和巨噬细胞上表达。

[0005] 三聚体CD137配体与CD137的相互作用导致受体的多聚化和信号分子 (例如TRAF家族的蛋白质) 的募集,导致激酶调节和Nf-KB途径的激活。因此,CD137的多聚化对于下游信号的启动和调节至关重要。

[0006] 使用激动剂抗CD137单克隆抗体进行的体外和体内研究已经表明,激活后CD137迅速内化到称为“信号小体”的内体区室中,并从中保持信号传导 (综述于Sanchez-Paulete等 2016)。

[0007] 共刺激性TNFR家族成员 (例如CD137、CD27、OX40 (CD134)、HVEM、CD30和GITR) 参与维持初始T细胞激活后的T细胞应答。在CD4+和CD8+T细胞中,CD137充当调节T细胞受体 (TCR) 介导的信号传导的共刺激受体。CD137的连接以及TCR激活可通过诱导抗凋亡超大B细胞淋巴瘤 (anti-apoptotic B-cell lymphoma-extra large) (Bcl-xL) 和B细胞淋巴瘤2 (Bcl-2) 途径来促进增殖、细胞因子产生并抑制细胞凋亡。已显示NK细胞上CD137的交联可刺激IFN- γ 的分泌和增殖 (proliferation)。树突状细胞对CD137刺激的应答包括增强的成熟和抗原呈递以及细胞因子IL-6、IL12-和IL-27以及诸如吲哚胺-2,3-双加氧酶 (IDO) 的酶的分泌,其能够调节T细胞功能。CD137还能够上调肿瘤血管内皮细胞上的细胞间粘附分子1 (ICAM1) 和血管细胞粘附分子1 (VCAM1),从而诱导效应细胞迁移并在肿瘤微环境中保留激活的T细胞。

[0008] 通过抗CD137抗体的CD137的交联已显示在许多模型 (包括肉瘤、肥大细胞瘤、神经胶质瘤、淋巴瘤、骨髓瘤和肝细胞癌) 中,具有有效的体内抗肿瘤作用。CD8+细胞耗竭研究已表明,这种作用主要涉及细胞溶解性T细胞的扩增 (expansion) 和浸润,从而导致肿瘤细胞溶解。然而,在某些肿瘤模型中,已经报道了其他类型的细胞,如DC、NK细胞或CD4+T细胞的贡献。此外,已经显示抗CD137治疗触发免疫记忆应答并抑制自身免疫反应 (综述于Vinay等

2012)。

[0009] 已经显示,现有的激动治疗导致全身性CD137效应,从而导致不良副作用。CD137信号传导的激活与小鼠模型中的严重毒性有关。完全人IgG4抗CD137激动剂抗体(**Urelumab®**,BMS-663513)的临床试验报告了中性粒细胞减少症、升高的肝酶以及高剂量的严重肝毒性,导致试验终止。对于完全人IgG2(PF-05082566)尚未观察到这种严重的毒性,临床试验中无论是作为单一疗法还是联合疗法也是这样。已经显示靶向共刺激性TNFR的激动性抗体需要Fc γ R的接合(Bulliard等,2014)。因此,经由Fc γ R的非靶向簇集可影响激动性抗体作用于这些靶标的机制。

[0010] 鉴于现有疗法观察到的毒性概况,需要基于使用具有降低的毒性的备选的CD137结合分子的备选癌症治疗。特别地,临幊上需要有效地与细胞表面上的CD137接合并具有降低的毒性(包括肝毒性)的靶向CD137激动剂。

[0011] 因此,开发具有最小激动活性和内化活性的CD137结合分子将为产生共靶向CD137和其它分子(例如在肿瘤微环境中表达的肿瘤相关抗原)的双特异性分子提供构建块。在这样的分子中,双重的,两个靶标的同时的接合,可导致CD137激活,从而将作用位点限制在肿瘤微环境中,并可能使CD137治疗的不良作用最小化。

[0012] **发明概述**

[0013] 本发明涉及对CD137具有特异性的新型结合分子。本发明人已经鉴定了单可变重链结构域抗体,其结合CD137,但当以单特异性格式(即不与结合第二靶标的另一部分连接)结合至CD137时不引起CD137信号传导。然而,当与结合肿瘤特异性抗原的部分连接时,所述单可变重链结构域抗体引发激动性应答。因此,尽管结合CD137的单可变重链结构域抗体在没有靶向第二抗原的结合配偶体的情况下结合至CD137时不诱导受体的簇集并且不具有激动活性,但双特异性分子中CD137和肿瘤特异性抗原的双重接合导致CD137激动。

[0014] 在一个方面,提供分离的单可变重链域抗体,其结合人CD137,但当作为单特异性实体结合至CD137时不引发CD137信号传导。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体抑制CD137L与CD137的结合。

[0015] 在一个实施方案中,单可变重链结构域抗体包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1含有选自表1的SEQ ID NO.,所述CDR2含有选自表1的SEQ ID NO.,所述CDR3含有选自表1的SEQ ID NO.。优选地,CDR使用Kabat命名法限定。

[0016] 在一个实施方案中,单可变重链结构域抗体包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:1或与其具有至少40%同源性的序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:2或与其具有至少40%同源性的序列,所述CDR3包含SEQ ID NO:3或与其具有至少40%同源性的序列。优选地,CDR使用Kabat命名法限定。

[0017] 在一个实施方案中,单可变重链结构域抗体包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO:425或与其具有至少40%同源性的序列,所述CDR2包含SEQ ID NO:426或与其具有至少40%同源性的序列,所述CDR3包含SEQ ID NO:427或与其具有至少40%同源性的序列。

[0018] 在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体包含人构架区。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体包含SEQ ID No.4或428或与其具有至少50%同源性的序列。

[0019] 在一个实施方案中,所述单可变重链域抗体选自SEQ ID N0s.4、312、852、856、860、864、868、872、876或880或与其具有至少50%同源性的序列。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体能够以约0.4nM或约3nM的KD的亲和力结合CD137。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体获得自或可获得自表达包含人V、D和J区的转基因的转基因啮齿动物,例如小鼠。

[0020] 在一个实施方案中,所述啮齿动物不产生功能性内源轻链和重链。

[0021] 另一方面还提供结合分子,其包含

[0022] a)结合本文所述的CD137的单可变重链结构域抗体,和

[0023] b)结合肿瘤特异性抗原的部分。

[0024] 在一个实施方案中,结合肿瘤特异性抗原的部分是单可变重链结构域抗体。在结合分子的一个实施方案中,结合CD137的单可变重链结构域抗体通过肽接头与结合肿瘤特异性抗原的单可变重链结构域抗体连接。在一个实施方案中,所述接头选自(G4S)_n接头,其中n为1至10。在一个实施方案中,所述肿瘤特异性抗原选自PSMA、Her2、CD123、CD19、CD20、CD22、CD23、CD74、BCMA、CD30、CD33、CD52、EGFR、CECAM6、CAXII、CD24、CEA、间皮素(Mesothelin)、cMet、TAG72、MUC1、MUC16、STEAP、EphvIII、FAP、GD2、IL-13Ra2、L1-CAM、PSCA、GPC3、Her3、gpA33、5T4和ROR1。在一个实施方案中,分离的单可变重链结构域抗体或结合分子与毒素、酶、放射性同位素、半衰期延长部分、标记物、治疗性分子或其他化学部分缀合。在一个实施方案中,所述半衰期延长的部分选自白蛋白结合部分、转铁蛋白结合部分、聚乙二醇分子、重组聚乙二醇分子、人血清白蛋白、人血清白蛋白的片段和结合人血清白蛋白的白蛋白结合肽或单结构域抗体。

[0025] 还提供药物组合物,其包含本文所述的单可变重链结构域抗体或结合分子和药物载体。

[0026] 在另一个方面,我们提供上述单可变重链结构域抗体结合分子药物组合物,其用于疾病的治疗的用途,例如其中所述疾病选自癌症、免疫病症、神经疾病、炎性病症、变态反应、移植排斥、病毒感染、免疫缺陷或其它免疫系统相关病症。

[0027] 还提供用于治疗癌症、免疫病症、神经疾病、炎性病症、变态反应、移植排斥、病毒感染、免疫缺陷或其它免疫系统相关病症的方法,其包括施用治疗有效量的上述单可变重链结构域抗体、结合分子或药物组合物。

[0028] 在另一个方面,我们提供试剂盒,其包含如本文所述的单可变重链结构域抗体、结合分子或药物组合物。

[0029] 在另一个方面,我们提供核酸分子,其包含编码如本文所述的单可变重链结构域抗体的核酸序列,例如包含SEQ ID NO.629或735的核酸分子或与其具有至少50%同源性的核酸分子。在另一个方面,我们提供包含根据上文的核酸分子的载体或宿主细胞。

[0030] 在另一方面,我们提供用于产生与人CD137结合的单可变重链结构域抗体的方法。我们还提供通过所述方法获得的或可获得的单V_H结构域抗体。在另一个方面,我们提供转基因啮齿动物,例如小鼠,其产生与CD137结合的仅有重链的抗体,所述转基因啮齿动物是用CD137抗原免疫后产生的。我们还提供包含结合人CD137的V_H结构域的仅有重链的抗体,其获自或可获自转基因啮齿动物。

[0031] 在另一方面,我们提供用于促进CD8+T细胞扩增、诱导细胞毒性T淋巴细胞(CTL)激

活和/或细胞因子释放的方法,包括向受试者施用本文所述的单可变重链结构域抗体、结合分子或药物组合物。

[0032] 在另一个方面,我们提供如本文所述的单可变重链结构域抗体在结合分子中的用途,所述结合分子还包含结合肿瘤特异性抗原的单重可变链结构域抗体。

附图说明

[0033] 在以下非限制性附图中进一步描述了本发明。图中所用的单结构域抗体列于表2和3中。

[0034] 图1. 单价、二价和三价**Humobody®V_H**的结合动力学。使用生物层干涉测量法测量(A) 单价、(B) 二价和(C) 三价版本的**Humobody®V_H** 1.1 (SEQ ID No.4) 和(D) 单价、(E) 二价和(F) 三价**Humobody®V_H** 2.1 (SEQ ID NO.428) 结合捕获在蛋白G传感器上的人CD137huFc标记的蛋白的结合和解离动力学。多价格式与单价**Humobody®V_H**相比显示增强的结合。

[0035] 图2:基于双重结合细胞的ELISA。

[0036] 将CHO人PSMA表达细胞接种到平板上,并添加单价V_H或双特异性分子。随后加入CD137huFc,并使用抗人Fc-HRP检测结合。仅双特异性分子显示出增加的结合信号,证实了双靶标结合。

[0037] 图3. Jurkat NF-kB荧光素酶报道基因测定中CD137信号传导的激活。PSMA表达细胞(A和B)或不表达PSMA的亲本细胞(C和D)与Jurkat人CD137NF-kB-荧光素酶报告细胞共培养。(E) CHO PSMA细胞, (F) DU145PSMA细胞或(G) DU145亲本细胞(双特异性试验)/仅培养基(抗体试验)与Jurkat人CD137 NF-kB-荧光素酶报告细胞一起培养。测量相对发光信号(RLU),作为由CD137介导的NF-kB信号传导途径的激活产生的荧光素酶报告基因活性的读数。测试单价、二价、三价和双特异性版本的**Humobody®V_H** 1.1 (SEQ ID No.4) 和单价、二价、三价和双特异性版本的**Humobody®V_H** 2.1 (SEQ ID NO.428) 激动CD137以经由NF-kB产生信号传导的潜力。包括单价PSMA**Humobody®V_{Hs}**作为对照。单价、二价和三价分子在测定中不作为激动剂。在存在PSMA表达细胞的情况下,双特异性分子能够有效刺激CD137信号传导。

[0038] 图4.T细胞中IL-2产生的增强。在平板结合的抗CD3抗体的存在下,将人CD8+T细胞与PSMA表达细胞或不表达PSMA的亲本细胞共培养。以10nM的浓度添加**Humobody®V_H** 1.1 (SEQ ID No.4) 单价和双特异性分子、**Humobody®V_H** 2.1 (SEQ ID No.428) 单价和双特异性分子、抗CD137基准抗体和抗PSMA抗体。48小时后收获上清液,测定IL-2水平。(A) 在PSMA表达细胞存在下,3个不同T细胞供体的IL-2应答的增强。(B) 在亲本细胞存在下测量IL-2水平的代表性数据。单价**Humobody®V_H**在测定中不刺激IL2的产生。(C) 在存在PSMA表达细胞的情况下,双特异性分子能够有效增强IL-2的产生。抗CD137抗体(可溶/非交联)在PSMA非依赖性应答中增强了IL-2的产生。(D和E) IL-2应答的浓度依赖性。(F) 双特异性分子诱导干扰素γ。

[0039] 图5.CD137介导的内化

[0040] 将(A) V_H 1.1 (SEQ ID No.4)、(B) 三价 V_H 和(C) 抗CD137抗体与CHO CD137细胞在4°C温育,以允许它们在37°C结合用于内化。用抗人Ig AF488抗体或抗His/抗小鼠Ig AF488抗体,然后用抗LAMP1/抗兔Ig AF488共染色细胞,用于溶酶体的检测。单价 V_H 显示最小的内化,主要保持细胞表面结合,没有共定位到溶酶体。多价单特异性 V_H 显示增加的内化,如细胞内簇集的存在所指示的,但不共定位到溶酶体。CD137抗体与溶酶体染色共定位,表明该分子被内化。

[0041] 图6. 双特异性分子的作用模式。该图说明了同时结合CD137和肿瘤特异性抗原如PSMA的结合分子的作用模式,导致肿瘤选择性T细胞激动。

[0042] 图7:体内实验。Humabody®在DU145 PSMA/hu PBMC移植的NCG小鼠体内的作用来自植入了DU145 PSMA前列腺细胞系的HuPBMC移植NCG小鼠的合并肿瘤体积数据。组4-6(3只huPBMC供体,n=5只小鼠/供体)在第33-45天处理,组4-6(3只huPBMC供体,每组n=5只小鼠/供体)在第9-32天用PBS (BIW) 处理,在第33-45天用4.1-6GS-1.1- V_H (MSA) (3mg/kg,每天) 处理。组7-9(3只huPBMC供体,n=5只小鼠/供体)在第9-32天用对照抗CD137抗体 (3mg/kg, BIW) 处理。组3(非huPBMC移植组,n=5只小鼠)未处理。在肿瘤植入后第46天测量肿瘤体积统计学显著性 (Mann-Whitney U检验): **=P<0.01, 与组3相比。

[0043] 实施方案的详述

[0044] 现在将进一步描述本发明的实施方案。在以下段落中,描述了不同的实施方案。如此定义的每个方面可以与任何其他一个或更多个方面组合,除非明确地相反地指出。

[0045] T细胞共刺激受体CD137是免疫应答的重要调节剂,因此是癌症治疗中的重要靶标。CD137在激活的T细胞上被诱导并起多种关键作用:防止激活诱导的细胞死亡 (AICD), 促进细胞周期进程,增强1型细胞因子(例如IL-2, IFN- γ 和TNF- α)的细胞毒性和产生,并增加记忆CD8+T细胞。使用激动性抗体的体内CD137触发增强了CD8+T细胞针对肿瘤的应答。CD137介导的抗癌作用是基于其诱导细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 的激活的能力等以及大量IFN- γ 。CD137/CD137L相互作用也被认为是CD8+T细胞针对诸如流感病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 和单纯疱疹病毒 (HSV) 等病毒的应答的正调节剂。CD137参与维持初始T细胞激活后的T细胞应答。

[0046] 重要的是,CD137信号传导需要CD137受体的簇集。这种多聚化由三聚体CD137配体与CD137受体的相互作用介导,导致信号传导分子如TRAF家族蛋白的募集。这进而导致激酶调节和NF- κ B信号传导途径的激活。转录因子NF- κ B家族在炎症和先天免疫中起重要作用。此外,NF- κ B在癌症的起始和发展的许多步骤中被越来越多地认为是至关重要的参与者。

[0047] 发明人已经出乎意料地鉴定了单可变重链结构域抗体,当其以单特异性格式(即不与对第二抗原特异性的另一部分连接)靶向至CD137时,其特异性结合CD137,但不诱导CD137受体的多聚化。因此,单价或单特异性格式的本文所述的单可变重链结构域抗体的结合不激活CD137信号传导,也不会导致CD137信号传导。仅当所述单可变重链结构域抗体与对第二抗原特异性的另一部分一起提供时,例如作为多特异性,例如双特异性融合蛋白提供时,CD137信号传导被激活,其中本文所述的单可变重链结构域抗体与结合肿瘤特异性抗原的部分(例如结合肿瘤特异性抗原的单可变重链结构域抗体)连接。

[0048] 单价分子具有一个抗原结合位点并结合单个靶标。二价分子具有两个抗原结合位点,并结合单个靶标。双特异性分子结合两种不同的靶标(抗原)。三特异性分子结合三种不

同的靶标(抗原)等。

[0049] 当本文所述的单可变重链结构域抗体作为融合蛋白的一部分与第二部分例如特异性结合肿瘤特异性抗原的分子一起提供时,与第二靶部分和CD137的双重结合导致CD137受体和CD137信号传导的多聚化。因此,CD137信号传导的诱导需要两种靶标即CD137和肿瘤特异性抗原的双重接合。这导致肿瘤微环境中的局部CD137信号传导。仅双重的,例如两种靶标通过多特异性分子的同时接合才可导致CD137激活。肿瘤附近的靶标特异性激活避免了导致不可控制的副作用的全身性CD137效应。结合分子通过除结合Fc受体以外的机制有效地在细胞表面上接合CD137,因此也潜在地避免了不希望的肝毒性。

[0050] 通常,与以下有关的术语和以下的技术是本领域众所周知和常用的:本文所述的细胞和组织培养、病理学、肿瘤学、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质以及核酸化学和杂交。除非另有说明,否则本公开的方法和技术通常根据本领域众所周知和如在本说明书全文中引用和讨论的各种通用和更具体的参考文献中所述的常规方法进行。参见,例如,Green和Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第四版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y(2012);Therapeutic Monoclonal Antibodies:From Bench to Clinic,Zhiqiang An(编者),Wiley,(2009);和Antibody Engineering,第二版,卷1和2,Ontermann和Dubel编,Springer-Verlag,Heidelberg(2010)。

[0051] 根据制造商的说明书(如本领域通常完成的或如本文所述)进行酶促反应和纯化技术。与以下有关的术语和以下的实验室程序和技术是本领域中众所周知和常用的:本文所述的分析化学、合成有机化学以及医疗和药物化学。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。实施例中还描述了测量上文列出的性质的合适测定法。

[0052] 特别地,如下所述,本文所述的单结构域抗体可以以多价或多特异性格式使用。因此,本文所述的单结构域抗体可用作多特异性分子的构建块,并且本发明还涉及包含本文所述单结构域抗体的多功能结合剂。

[0053] 如上所述的本发明的单结构域抗体的性质可以在如本文所述的治疗方法和用途以及药物制剂中开发。

[0054] 本文所述的单结构域抗体特异性结合野生型人CD137 (UniProt登录号Q07011, GenBank登录号NM_001561)。针对野生型人CD137的氨基酸序列 (SEQ ID No.786) 和核苷酸序列 (SEQ ID No.787) 如下所示。

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLCDPCSNCAGTFCDDNNRNQICSPCPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID No. 786)
 ATGGGAAACAGCTGTTACAACATAGTAGCCACTCTGTTGCTGGTCCTCAACTTGAGAGGGACAAGATCATTGCAGATTGCAGGATCCTTGAGTAGTAAGTCCCAGCTGGTACATTCTGTGATAATAACAGGAATCAGATTGCAGTCCCTGTCCTCCAAATAGTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCTGTGACATATGCAGGCAGTGTAAGGTGTTTCAGGACCAGGAAGGGAGTGTCCCTCCACAGCAATGCAGAGTGTGACTGCACTCCAGGTTTCACTGCCTGGGGCAGGATGCAGCATGTGTAACAGGATTGTAACAAAGGTCAAGAACTGACA
 AAAAAAGGTTGTAAGACTGTTGCTTGGGACATTTAACGATCAGAAACGTGGCATCTGTCGACCCCTG
 GACAAACTGTTCTTGATGGAAAGTCTGTGCTGTGAATGGGACGAAGGGAGAGGGACGTGGCTGTGGACCATCTCCAGCCGACCTCTCTCCGGAGCATCCTCTGTGACCCCGCCTGCCCCTGCGAGAGAGCCAGGACACTCTCCGCAGATCATCTCCTCTTGCGCTGACGTCGACTGCGTTGCTCTTCCTGCTGTTCTCCTCACGCTCCGTTCTGTGTTAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACGTGTA (SEQ ID No. 787)

[0055] [0056] 除非另有说明,否则本文所用的术语CD137指人CD137。CD137也被称为“4-1BB”,“TNF受体超家族成员9”,“TNFRS9”,“通过淋巴细胞激活诱导的”和“ILA”,这些术语可以互换使用,包括人CD137的变体、同种型。

[0057] 术语“CD137结合分子/蛋白质/多肽/剂/部分”,“CD137抗原结合分子分子/蛋白质/多肽/剂/部分”,“抗CD137单结构域抗体”,“抗CD137单免疫球蛋白可变结构域”,“仅有抗CD137重链的抗体”或“抗CD137抗体”均指能够特异性结合人CD137抗原的分子。结合反应可以通过标准方法来显示,例如参考使用无关特异性的抗体的阴性对照试验。

[0058] 本发明的单结构域抗体或结合分子,包括本文所述的多特异性例如双特异性或三特异性结合剂,“其结合”或“能够结合”目的抗原例如人CD137,是以足够的亲和力结合该抗原的单结构域抗体或结合分子,使得该单结构域抗体用作靶向表达如本文所述的抗原CD137的细胞或组织的治疗剂。结合是结合CD137的细胞外结构域。

[0059] 本发明的结合分子,包括本文所述的单结构域抗体和多特异性结合剂,特异性结合人CD137。换句话说,与CD137抗原的结合以可测定的程度不同于非特异性相互作用。如实例中所证明的,本发明的单结构域抗体不与小鼠CD137交叉反应。优选地,本发明的单结构域抗体结合人CD137,并且还结合猴(例如食蟹猴)CD137。

[0060] 如在本文中使用,对于特定多肽或特定多肽靶标上的表位的术语“特异性结合”或“特异性结合至”或“是特异性的”能够例如通过针对所述靶标具有以下KD的分子来展示:至少约10-6M、备选地至少约10-7M、备选地至少约10-6M、备选地至少约10-9M、备选地至少约10-10M、备选地至少约10-11M、备选地至少约10-12M或更低。在一个实施方案中,术语“特异性结合”指这样的结合:其中分子结合特定多肽或特定多肽上的表位而基本上不与任何其他多肽或多肽表位结合。

[0061] 如本文所使用的,术语“抗体”广泛地指包含四个多肽链(两个重链(H)和两个轻链(L))的任何免疫球蛋白(Ig)分子或其抗原结合部分,或其任何功能片段、突变体、变体或衍生物(其保留了Ig分子的基本表位结合特征)。

[0062] 在全长抗体中,每个重链包含重链可变区或结构域(本文缩写为HCVR)和重链恒定

区。重链恒定区包含三个结构域C_H1、C_H2和C_H3。每条轻链包含轻链可变区或结构域(在本文中缩写为LCVR)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域C_L。

[0063] 重链和轻链可变区能够进一步细分成称为互补决定区(CDR)的高变区,其散布于称为构架区(FR)的更保守的区域。每个重链和轻链可变区含有三个CDR和四个FR,从氨基末端到羧基末端按照以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0064] 免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY),类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0065] 术语“CDR”指抗体可变序列内的互补决定区。重链和轻链的每个可变区中都有三个CDR,针对每个可变区,分别称为CDR1、CDR2和CDR3。术语“CDR组”指出现在能够结合抗原的单可变区中的一组三个CDR。能够根据本领域已知的不同的系统对这些CDR的确切边界进行了不同的限定。

[0066] Kabat互补决定区(CDR)基于序列可变性,是最常用的(Kabat等,(1971)Ann.NY Acad.Sci.190:382-391和Kabat,等,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)。Chothia指的是结构环的位置(Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。当提及可变结构域中的残基时(大约是轻链的残基1-107和重链的残基1-113),通常使用Kabat编号系统。另一个系统是ImMunoGeneTics(IMGT)编号方案。IMGT编号方案描述于Lefranc等,Dev.Comp.Immunol.,29,185-203(2005)。

[0067] 本文使用由Kabat描述的系统。术语“Kabat编号”,“Kabat限定”和“Kabat标记”在此可互换使用。这些术语在本领域中是公认的,是指对氨基酸残基进行编号的系统,该氨基酸残基比抗体或抗原结合部分的重链和轻链可变区中的其他氨基酸残基更可变(即,高变)。

[0068] 嵌合抗体是重组蛋白,其含有可变结构域,该可变结构域包括源于自一种物种的抗体(优选啮齿动物抗体)的互补决定区(CDR),而抗体分子的恒定结构域源自人抗体的恒定结构域。

[0069] 人源化抗体是重组蛋白,其中将来自一个物种(例如啮齿动物的抗体)的抗体的CDR,从啮齿动物抗体的重链和轻链可变链转移到人重链和轻链可变结构域(例如构架区序列)中。抗体分子的恒定结构域源自人抗体的恒定结构域。在某些实施方案中,可以将来自亲本(啮齿动物)抗体的有限数量的构架区氨基酸残基置换到人抗体构架区序列中。

[0070] 术语“抗原结合位点”是指抗体或抗体片段的包含特异性结合抗原的区域的部分。抗原结合位点可以由一个或更多个抗体可变结构域提供。抗原结合位点通常包含在抗体或抗体片段的相关V_H和V_L内。

[0071] 抗体片段是抗体的一部分,例如F(ab')₂、Fab、Fv、scFv,重链,轻链,可变重(V_H),可变轻(V_L)链结构域等。全长抗体的功能片段保留完整抗体的靶特异性。因此,重组功能性抗体片段如Fab(片段,抗体),scFv(单链可变链片段)和单结构域抗体(dAb)已被用于开发治疗剂作为基于mAb的治疗剂的备选方案。

[0072] scFv片段(~25kDa)由两个可变结构域V_H和V_L组成。自然地,V_H和V_L结构域通过疏水相互作用非共价结合并倾向于解离。然而,稳定的片段可以通过将这些结构域与亲水性柔性接头连接以产生单链Fv(scFv而被工程改造)。

[0073] 最小的抗原结合片段是单可变片段,即可变重链(V_H)或可变轻链(V_L)结构域。 V_H 和 V_L 结构域分别能够结合抗原。靶标结合不需要分别与轻链/重链配偶体的结合或实际上完整抗体的其他部分的存在。大小减小到一个单结构域(对应于 V_H 或 V_L 结构域)的抗体的抗原结合实体通常被称为“单结构域抗体”或“免疫球蛋白单可变结构域”。因此,单结构域抗体(~ 12 至 15 kDa)具有 V_H 或 V_L 结构域。已经描述了源自天然缺乏轻链的仅有骆驼重链的抗体的单结构域抗体以及具有人重链结构域的单结构域抗体(Muyldermaans 2001, Holliger 2005)。抗原结合的单 V_H 结构域也已经从例如从免疫小鼠脾脏的基因组DNA扩增的鼠 V_H 基因文库中鉴定,并在E.coli中表达(Ward等人,1989,Nature 341:544-546)。Ward等人将分离的单 V_H 结构域命名为“结构域抗体”的“dAb”。术语“dAb”或“sdAb”(针对单结构域抗体)通常是指特异性结合抗原的单免疫球蛋白可变结构域(V_H 、 V_{HH} 或 V_L)多肽。对于在治疗中的应用,人单结构域抗体比骆驼科来源的 V_{HH} 更优选,主要是因为当施用于患者时,它们不太可能引起免疫应答。

[0074] 术语“单结构域抗体”、“单可变结构域抗体”、“单可变重链结构域抗体”、“单 V_H 结构域抗体”、“免疫球蛋白单可变结构域(ISV)”或“免疫球蛋白单可变结构域抗体”都是本领域公知的,并且描述结合靶抗原的抗体的单可变片段。这些术语在本文中可互换使用。这些术语,例如“单重链结构域抗体”、“单可变重链结构域抗体”、“免疫球蛋白单重链可变结构域”、“单 V_H 单结构域抗体”、“ V_H 单结构域抗体”、“单重链结构域”、“单可变重链结构域”、“单 V_H 单结构域”、“ V_H 单结构域”描述了在不存在轻链或其他抗体片段的情况下保留对抗原的结合特异性的抗体的单重链可变片段。因此,本文所用的单可变“重链结构域抗体、单可变重链结构域、免疫球蛋白单重链可变结构域(ISV)、人 V_H 单结构域”等不包含完整抗体的任何其它部分,而仅包含抗原结合 V_H 结构域;例如,它仅包括 V_H 结构域,并且不包含恒定重链结构域,也不包含轻链。在不存在轻链的情况下,单可变重链结构域抗体能够与抗原结合。

[0075] 在一个方面,本发明涉及结合人CD137的分离的单可变重链结构域抗体。

[0076] 如下所说明的,该实施方案涉及结合CD137抗原的单可变重链结构域抗体/免疫球蛋白单可变重链结构域。因此,单可变重链结构域抗体能够在不存在轻链的情况下结合CD137。人单可变重链结构域抗体(“ V_H 结构域抗体”)是特别优选的。这样的结合分子在本文中也称为Humabody®。Humabody®是Crescendo Biologics Ltd.的注册商标。

[0077] 因此,在一些实施方案中,分离的结合剂/分子包含至少一个单结构域抗体或由至少一个单结构域抗体组成,其中所述结构域是人可变重链结构域;它们缺乏 V_L 结构域和 V_H 恒定结构域,并且与靶抗原结合。在其他实施方案中,分离的结合剂/分子包含两个或更多个单结构域抗体或由两个或更多个单结构域抗体组成。

[0078] 术语“分离的”是指从其天然环境分离的部分。例如,术语“分离的”是指基本上不含其他单结构域抗体、抗体或抗体片段的单结构域抗体。此外,分离的单结构域抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0079] 每个 V_H 结构域抗体包含三个CDR和四个FR,从氨基末端到羧基末端按照以下顺序排列:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。因此,在本发明的一个实施方案中,该结构域是具有式FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的人可变重链(V_H)结构域。

[0080] 可以对本发明的单结构域抗体进行C或N末端 V_H 构架序列的修饰以改善其特性。例如, V_H 结构域可以包含C或N末端延伸。能够将C末端延伸添加至以残基VTVSS (SEQ ID

No. 788) 终止的 V_H 结构域的C末端。例如, C末端延伸可以包含中性、非极性氨基酸, 例如A、L、V、P、M、G、I、F或W, 或中性极性氨基酸, 例如S或T。C末端延伸也可选自肽接头或标签, 例如(G4S) n 接头, 其中 $n=1$ 至15, 例如SEQ ID No. 790-797之一。

[0081] 在一个实施方案中, 本发明的单结构域抗体包含1至50个残基, 例如1至10个, 例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10、1-20、1-30或1-40个额外的氨基酸, 的C末端延伸。在一个实施方案中, 本发明的单结构域抗体包含人 C_H1 结构域的额外的氨基酸, 从而C末端例如通过1至5个氨基酸延伸到 C_H1 结构域中。

[0082] 额外的C或N末端残基可以是例如用于将本发明的单结构域抗体缀合至另一部分或有助于检测分子的标签的肽接头。这样的标签在本领域中是众所周知的, 并且包括例如接头His标签, 例如hexa-His (HHHHHH, SEQ ID No. 789) 或myc标签。

[0083] 如本文所用的, 术语“同源性”或“同一性”通常是指在比对序列后, 序列中与其比较的参照多肽的残基相同的氨基酸残基的百分比且在一些实施方案中, 在引入缺口(如果需要)以获得最大百分比同源性之后, 不考虑任何保守置換作为序列同一性的一部分。因此, 两个氨基酸序列之间的百分比同源性等同于两个序列之间的百分比同一性。N-或C-末端延伸、标签或插入都不应被解释为降低同一性或同源性。用于比对的方法和计算机程序是众所周知的。可以使用众所周知的数学算法确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比。

[0084] 根据本发明的各个方面的一些实施方案, 如本文所述的单结构域抗体的可变结构域是 V_H 结构域、 V_{HH} 结构域、人源化 V_{HH} 结构域、骆驼源化 V_H 结构域或序列修饰的 V_H 或 V_{HH} 结构域。在一个实施方案中, 本文所述单结构域抗体的可变结构域是人可变结构域(V_H)。本文所用的术语单 V_H 结构域抗体指单人可变重链结构域抗体。

[0085] 如本文所用, 人 V_H 结构域包括完全人或基本完全人 V_H 结构域。如本文所用, 术语人 V_H 结构域还包括从仅有重链的抗体分离的 V_H 结构域, 所述抗体由表达完全人免疫球蛋白重链基因座的转基因小鼠(特别是应答于用感兴趣的抗原进行的免疫)(例如如WO 2016/062990和以下实施例中所描述的)而制备。在一个实施方案中, 人 V_H 结构域还可包括源自或基于人 V_H 结构域氨基酸或由人 V_H 种系核酸序列产生的 V_H 结构域。因此, 术语人 V_H 结构域包括源自人种系免疫球蛋白序列或由人种系免疫球蛋白序列编码的可变重链区, 并且例如获得自在表达完全人 V_H 基因的转基因小鼠中产生的仅有重链的抗体。在一些实施方案中, 基本上人 V_H 结构域或源自或基于人 V_H 结构域的 V_H 结构域可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如体外引入的突变, 例如通过随机或位点特异性诱变, 或通过体内体细胞突变引入的)。因此术语“人 V_H 结构域”还包括基本上人 V_H 结构域, 即其中一个或更多个氨基酸残基已被修饰以例如除去序列易感性的 V_H 结构域。例如, 与种系人序列相比, 基本上人 V_H 结构域的 V_H 结构域可以包括多达10个, 例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或多达20个氨基酸修饰。

[0086] 然而, 如本文所使用的, 术语“人 V_H 结构域”或“基本上人 V_H 结构域”不意在包括其中源自另一种哺乳动物物种如小鼠的种系的CDR序列已被移植到人构架序列上的抗体。在一个实施方案中, 如本文所用的, 术语“人 V_H 结构域”也不意在包括骆驼源化 V_H 结构域, 即, 已经例如通过以下在体外被特异性修饰的人 V_H 结构域: 利用常规诱变方法以选择 V_H 结构域序列中的预定位置并在预定位置引入一个或更多个点突变, 以将一个或更多个预定残基改变为可在骆驼 V_{HH} 结构域中发现的特定残基。

[0087] 在一些实施方案中,单结构域抗体是其中结构域是人可变重链(V_H)结构域的单结构域抗体。因此,在优选的实施方案中,本发明提供结合人CD137的分离的单结构域抗体,其中所述结构域是可变重链结构域,优选 V_H 结构域,并且其中所述单结构域抗体结合人CD137。

[0088] 在一个方面,本发明涉及单可变重链结构域抗体(即单价结合分子,其是仅具有一个结合实体的分子),其中所述单结构域抗体表现出以下性质中的一种或更多种:

[0089] (a) 以如实施例中所测量的KD结合人CD137;

[0090] (b) 结合表达CD137的细胞,但不结合不表达CD137的细胞。这可以如实施例6所示进行测量;

[0091] (c) 显示最小的细胞内在化。这可以如实施例中所示进行测量。

[0092] (d) 抑制CD137配体与在细胞表面表达的CD137之间的相互作用。这可以如实施例6所示进行测量;

[0093] (e) 不激活T细胞中的CD137信号传导。这可以如实施例中所示进行测量。

[0094] (f) 不刺激IL-2从CD8+细胞产生。这可以如实施例9所示进行测量;

[0095] (g) 不结合小鼠CD137;

[0096] (h) 如实施例中所示提供良好的稳定性;

[0097] (i) 不增加报告基因的活性,并因此不具有激动性CD137活性。这可以如实施例9所示进行测量;

[0098] (j) 结合食蟹猴CD137和/或

[0099] (k) 当与结合PSMA的 V_H 连接时,抑制体内肿瘤生长。这可以例如如在实施例中,例如在实施例10中所测量的。

[0100] 在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体具有多于一个选自a)至jk的特征,例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个特征的组合。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体抑制CD137配体和在细胞表面表达的CD137之间的相互作用。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体抑制CD137配体和在细胞表面表达的CD137之间的相互作用,并且还显示a、b、c、e至k中所列的一种或更多种特征。

[0101] 示例性序列特征

[0102] 在一个方面,所述单可变重链结构域抗体包含如表1所示的针对单结构域抗体之一所示的CDR1、CDR2和/或CDR3。在一个方面,所述单可变重链结构域抗体包含一组CDR1、CDR2或CDR3,其选自表1所示的单结构域抗体之一的CDR组。在一个实施方案中,CDR1、CDR2、CDR3与表1中的CDR之一具有至少40%、至少75%或至少80%同源性。在一个方面,所述单可变重链结构域抗体包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1包含SEQ ID NO.1或与其具有至少40%、至少75%或至少80%同源性的序列,所述CDR2包含SEQ ID NO.2或与其具有至少40%、至少75%、至少80%或至少90%同源性的序列,所述CDR3包含SEQ ID NO.3或具有至少40%、至少75%、至少80%或至少90%同源性的序列,或者,所述CDR1包含SEQ ID NO.5或与其具有至少40%、至少75%、至少80%或至少90%同源性的序列,所述CDR2包含SEQ ID NO.6或与其具有40%同源性的序列,所述CDR3包含SEQ ID NO.7,等等。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体包含如SEQ ID 309、310和311所示的CDR1、CDR2或CDR3,或与其具有至少75%同源性的序列。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体包含如SEQ

ID 873、874和875所示的CDR1、CDR2或CDR3,或与其具有至少40%、至少75%、至少80%或至少90%同源性的序列。CDR根据Kabat限定。

[0103] 如上文所定义的和一般如本文所定义的序列同源性可以是至少40%、50%、60%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%例如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性。

[0104] 在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体包含人构架区。

[0105] 在一个方面,所述单可变重链结构域抗体包含表1所示的全长序列或与其具有至少50%、60%、70%、80%、90%同源性的序列,或由其组成。例如,包含全长序列的单可变重链结构域抗体,所述全长序列包含选自表1中所列序列即SEQ ID NO.4、8、12、16、20等等的序列或与其具有至少50%同源性的序列,或由其组成。序列同源性可以是70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%例如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体包含如针对V_H单结构域抗体1.1至1.89或1.90至1.106所示的CDR1、2和3,或包含以下或由以下组成:如针对V_H单结构域抗体1.90至1.106所示的全长序列(即SEQ ID NO.364、368、372、376、380、384、388、392、396、400、404、408、412、416、420或424)。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体选自V_H1.78或其变体。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体包含如针对选自V_H 1.107至1.114的V_H单结构域抗体所示的CDR1、2和3或与其具有至少75%同源性(例如90%或95%)的序列。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体选自表1所示的V_H1.107至1.114,即SEQ ID NO.852、856、860、864、868、872、876或880或与其具有至少75%同源性(例如90%或95%)的序列。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体选自表1所示的V_H 1.113,或与其具有至少75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性的序列。

[0106] 表1 V_H单结构域抗体(家族1)的全长序列和CDR序列

名称	CDR1	CDR2	CDR3	全长
[0107]	1.1 SEQ ID NO: 1 SHWMT	SEQ ID NO: 2 HIKEDGSEKY YEDSVEG	SEQ ID NO: 3 GGDGYSDSHF GVDV	SEQ ID NO: 4 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKGL EWVAHIKEDGSEKYEDSVEGRFTVSRDNAKNSVYLOMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVDVWGQGTTVTVSS
	1.2 SEQ ID NO: 5 SYWMT	SEQ ID NO: 6 HIKEDGSEKY YVDSVEG	SEQ ID NO: 7 GGDGYSDSHY GVDV	SEQ ID NO: 8 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWFRQAPGKGL EWVAHIKEDGSEKYVDSVEGRFTISRDNANNNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHYGVWDVWGQGTTVTVSS
	1.3 SEQ ID NO: 9 SYWMT	SEQ ID NO: 10 NINQDGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 11 GGLGYGDSHY GMDV	SEQ ID NO: 12 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWFRQAPGRGL EWVANINQDGSEKYVDSVEGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGLGYGDSHYGMWDVWGQGTTVTVSS
	1.4 SEQ ID NO: 13 NYWMT	SEQ ID NO: 14 NINQDGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 15 GGLGYGDSHY GMDV	SEQ ID NO: 16 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWFRQAPGGG LEWVANINQDGSEKYVDSVEGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARGGLGYGDSHYGMWDVWGQGTTVTVSS
	1.5 SEQ ID NO: 17 NYWMI	SEQ ID NO: 18 NINQDGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 19 GGDGYSGSHH GTDV	SEQ ID NO: 20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMWFRQAPGKGL EWVANINQDGSEKYVDSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSGSHHGTDVWGQGTTVTVSS

[0108]

1.6	SEQ ID NO: 21 SYWMS	SEQ ID NO: 22 NIKQDGSEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 23 GGEGYSTSHYG MDV	SEQ ID NO: 24 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVFRQAPGKL EWVANIKQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM/NSLRAEDT AVYYCARGGEGYSTSHYGM/DVWGQGTTVTVSS
1.7	SEQ ID NO: 25 SYWML	SEQ ID NO: 26 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 27 GGDGYSDSHF GTDV	SEQ ID NO: 28 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGFTFSSYWMWVFRQAPGKL EWVANINQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM/NTLRAEDT AIYYCARGGDGYSDSHFGTDVW/GQGTTVTVSS
1.8	SEQ ID NO: 29 SYWMF	SEQ ID NO: 30 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 31 GGDGYSDSHY GTDV	SEQ ID NO: 32 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGFTFSSYWMWVFRQAPGEGL EWVANINQDGSEKYVDSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AIYYCARGGDGYSDSHYGM/DVWGQGTTVTVSS
1.9	SEQ ID NO: 33 NYWMT	SEQ ID NO: 34 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 35 GGLGYGDSHY GMDV	SEQ ID NO: 36 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMWVFRQAPGGG LEWVANINQDGSEKYVDSVEGRFTISRDNAKNSLDLQM/NSLRAE DTAVYYCARGGLGYGDSHYGM/DVWGQGTTVTVSS
1.10	SEQ ID NO: 37 DYWMN	SEQ ID NO: 38 NIKEDGSEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 39 GGAGYSMSHY GMDV	SEQ ID NO: 40 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMNWARQAPGKG LEWVANIKEDGSEKYVDSVEGRFTISRDNAKNSTYLQMNSLRVEDT AVYYCARGGAGYSMSHYGM/DVWGQGTTVTVSS
1.11	SEQ ID NO: 41 DYWMN	SEQ ID NO: 42 NIKEDGSEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 43 GGAGYSMSHY GMDV	SEQ ID NO: 44 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMNWARQAPGKG LEWVANIKEDGSEKYVDSVEGRFTISRDNAKNSTYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGAGYSMSHYGM/DVWGQGTTVTVSS
1.12	SEQ ID NO: 45 SYWML	SEQ ID NO: 46 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 47 GGDGYNSHF GTDV	SEQ ID NO: 48 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGFTFSSYWMWVFRQAPGKL EWVANINQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM/NTLRAEDT AIYYCARGGDGYNSHFGTDVW/GQGTTVTVSS
1.13	SEQ ID NO: 49 SYWMF	SEQ ID NO: 50 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 51 GGDGYSDSHY GTDV	SEQ ID NO: 52 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGFTFSSYWMWVFRQAPGEGL EWVANINQDGSEKYVDSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AIYYCARGGDGYSDSHYGM/DVWGQGTTVTVSS
1.14	SEQ ID NO: 53 NYWMN	SEQ ID NO: 54 NIKEDGSENY YVDSVKG	SEQ ID NO: 55 GGEGYSTSHYG MDV	SEQ ID NO: 56 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKG LEWVANIKEDGSENYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT TAVYYCARGGEGYSTSHYGM/DVWGQGTTVTVSS
1.15	SEQ ID NO: 57 TYWML	SEQ ID NO: 58 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 59 GGDGYSDSHF GTDV	SEQ ID NO: 60 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGFTFSTYWMWVFRQAPGKL EWVANINQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLSLQMNSLRAEDT ATYYCARGGDGYSDSHFGTDVW/GQGTTVTVSS
1.16	SEQ ID NO: 61 NYWMM	SEQ ID NO: 62 NINQDGSEK YFVDSVKG	SEQ ID NO: 63 GGDGYSSHY GTDV	SEQ ID NO: 64 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSNYWMWVFRQAPGKG LEWVANINQDGSEKYVDSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT TAVYYCARGGDGYSSHYGM/DVWGQGTTVTVSS
1.17	SEQ ID NO: 65 SYWMN	SEQ ID NO: 66 NIKEDGSEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 67 GGDGYGYRDY GMDV	SEQ ID NO: 68 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVFRQAPGKG LEWVANIKEDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYRDYGM/DVWGQGTTVTVSS
1.18	SEQ ID NO: 69 THWMN	SEQ ID NO: 70 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 71 GGVGYGDHF GMDV	SEQ ID NO: 72 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHWWMNWARQAPGKE LEWVANINQDGSEKYVDSVEGRFTISRDNAANNNSLYLQMNSLRAEDT TAVYYCARGGVGVGYGDSHFGMDVW/GLGTTVTVSS
1.19	SEQ ID NO: 73 SYWMI	SEQ ID NO: 74 NINQDGSEK	SEQ ID NO: 75 GGDDYSNSHY GMDV	SEQ ID NO: 76 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVFRQAPGKL EWVANINQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT

[0109]

		YYVDSVKG		AVYYCARGGDDYSNHYGMDVSGQGTTVTVSS
1.20	SEQ ID NO: 77 SYWMN	SEQ ID NO: 78 NINQDGSEK YYVDSVQG	SEQ ID NO: 79 GGFGYGDHY GMDV	SEQ ID NO: 80 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKG LEWVANINQDGSEKYYVDSVQGRTFISRDNAKNNSLYLQMNSLRAED TAIYYCARGGFGYGDHYGMDVWGQGTTVTVSS
1.21	SEQ ID NO: 81 SYWMF	SEQ ID NO: 82 NVNQDGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 83 GGEGBYSDSHY GTDV	SEQ ID NO: 84 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGFTFSSYWMFWFRQAPGKG EWVANVNVQDGSEKYYVDSVEGRFTFISRDNAKNNSLYLQMNSLRAED TAIYYCARGGEGYSDSHYGTDVWGQGTTVTVSS
1.22	SEQ ID NO: 85 NYWMN	SEQ ID NO: 86 NIKEDGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 87 GGEGYGDHY GMDV	SEQ ID NO: 88 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKG LEWVANIKEDGSEKYYVDSVEGRFTFISRDNAKNNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGEGYGDHYGMDVWGQGTTVTVSS
1.23	SEQ ID NO: 89 SYWMN	SEQ ID NO: 90 NIKQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 91 GGEGYGDHY GMDV	SEQ ID NO: 92 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKG LEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNAKNNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGEGYGDHYGMDVWGQGTTVTVSS
1.24	SEQ ID NO: 93 SYWMS	SEQ ID NO: 94 NIKQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 95 GGEGYGDHY GLDV	SEQ ID NO: 96 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMISWVRQAPGKG LEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNAKNNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGEGYGDHYGMDVWGQGTTVTVSS
1.25	SEQ ID NO: 97 SYWMN	SEQ ID NO: 98 NIKQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 99 GGDSYGYRDY GMDV	SEQ ID NO: 100 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKG LEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNAKNNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGDSYGYRDYGMDVWGQGTTVTVSS
1.26	SEQ ID NO: 101 THWMN	SEQ ID NO: 102 NINQDGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 103 GGVGYGDSHF GMDV	SEQ ID NO: 104 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSTHWMNWARQAPGKE LEWVANINQDGSEKYYVDSVEGRFTFISRDNAKNNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGVGVGDSHFGMDVWGQGTTVTVSS
1.27	SEQ ID NO: 105 SYWML	SEQ ID NO: 106 NINQDGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 107 GGEGBYSDSHH GTDV	SEQ ID NO: 108 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGFTFSSYWMILWFRQAPGEGL EWVANINQDGSEKYYVDSVEGRFTISRDNAKNALYLQMNSLRAEDT AIYYCARGGEGYSDSHHGTDVWGQGTTVTVSS
1.28	SEQ ID NO: 109 NYWMN	SEQ ID NO: 110 NIKQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 111 GGDNYAYRDF GMDV	SEQ ID NO: 112 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKG LEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNAKNNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGDNYAYRDFGMDVWGQGTTVTVSS
1.29	SEQ ID NO: 113 NYWMF	SEQ ID NO: 114 NVNQDGSEK YYVDSVQG	SEQ ID NO: 115 GGEGYSDSHY GTDV	SEQ ID NO: 116 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMFWFRQAPGKG EWVANVNVQDGSEKYYVDSVQGRTFISRDNAKNNSLYLQMNSLRAED TAIYYCARGGEGYSDSHYGTDVWGQGTTVTVSS
1.30	SEQ ID NO: 117 SYWMN	SEQ ID NO: 118 NINQDGSEK YYVDSVQG	SEQ ID NO: 119 GGEEYGSSHG MDV	SEQ ID NO: 120 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKG LEWVANINQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNAKNNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGEYGGSSHGMDVWGQGTTVTVSS
1.31	SEQ ID NO: 121 SYWMN	SEQ ID NO: 122 NINQDGSEK YYVDSVQG	SEQ ID NO: 123 GGDSYGYRDY GMDV	SEQ ID NO: 124 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKG LEWVANINQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNAKNNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGDSYGYRDYGMDVWGQGTTVTVSS
1.32	SEQ ID NO: 125 SYWMN	SEQ ID NO: 126 NINQNGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 127 GGFGYGDHY GMDV	SEQ ID NO: 128 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQTPGKG EWVANINQNGSEKYYVDSVEGRFTNISRDNAKNNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGFGYGDHYGMDVWGQGTTVTVSS
1.33	SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 131	SEQ ID NO: 132 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGFTFSNYWMWFRQAPGKG

[0110]

	NYWMT	NINQDEEY YVDSVKG	GGDGYSDSHY GTDV	EWVANINQDEEYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDT AIYYCARGGGDGYSDSHYGTDVWVGQGTTVTVSS
1.34	SEQ ID NO: 133 NYWMN	SEQ ID NO: 134 NIKEDGSENY YVDSVKG	SEQ ID NO: 135 GGEGYSTSHYG MDV	SEQ ID NO: 136 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSNYWMNWVRQAPGKG LEWVANIKEDGSENYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGEGYSTSHYGMDVWVGQGTTVTVSS
1.35	SEQ ID NO: 137 NYWMN	SEQ ID NO: 138 NIKQDGSEKY YVDSVEG	SEQ ID NO: 139 GGEGYGESHY GMDV	SEQ ID NO: 140 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKG LEWVANIKQDGSEKYVDSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGEGYGEHYGMDVSGQGTTVTVSS
1.36	SEQ ID NO: 141 TYWMN	SEQ ID NO: 142 NIKQDGSEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 143 GGDSYGYRDY GMDV	SEQ ID NO: 144 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMNWVRQAPGKG LEWVANIKQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGDSYGYRDYGMDVWVGQGTTVTVSS
1.37	SEQ ID NO: 145 YYWMI	SEQ ID NO: 146 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 147 GGDGYSNSHF GMDV	SEQ ID NO: 148 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYWMIWFRQAPGEEL EWVANINQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGDGYSNSHFMDVWVGQGTTVTVSS
1.38	SEQ ID NO: 149 NYWMI	SEQ ID NO: 150 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 151 GGEGYSDSHY GTDV	SEQ ID NO: 152 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMWIWYRQAPGEEL EWVANINQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AIYYCARGGEGYSDSHYGTDVWVGQGTTVTVSS
1.39	SEQ ID NO: 153 NYWMN	SEQ ID NO: 154 NINQDESEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 155 GGFGYGDHF GMDV	SEQ ID NO: 156 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKE LEWVANINQDESEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED DTAVYYCARGGFYGDHFMDVWVGQGTTVTVSS
1.40	SEQ ID NO: 157 NYWMF	SEQ ID NO: 158 NVNQDGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 159 GGEGYSDSHY GTDV	SEQ ID NO: 160 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGFTFSNYWMFWFRQAPGKE EWVANVNQDGSEKYVDSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAIYYCARGGEGYSDSHYGTDVWVGQGTTVTVSS
1.41	SEQ ID NO: 161 NYWMF	SEQ ID NO: 162 NVNQNGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 163 GGEGYSDSHY GTDV	SEQ ID NO: 164 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCGASGFTFSNYWMFWFRQAPGKE EWVANVNQNGSEKYVDSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAIYYCARGGEGYSDSHYGTDVWVGQGTTVTVSS
1.42	SEQ ID NO: 165 NYWMN	SEQ ID NO: 166 NIKQDGSEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 167 GGFGYGDHF GMDV	SEQ ID NO: 168 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKG LEWVANIKQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAIYYCARGGFYGDHFMDVWVGQGTTVTVSS
1.43	SEQ ID NO: 169 NYWMI	SEQ ID NO: 170 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 171 GGDGYSNSHF GMDV	SEQ ID NO: 172 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMWIWYRQAPGEEL EWVANINQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSNSHYGMDVWVGQGTTVTVSS
1.44	SEQ ID NO: 173 DYWMI	SEQ ID NO: 174 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 175 GGDGYSNSHF GMDV	SEQ ID NO: 176 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMWIWYRQAPGEEL EWVANINQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSNSHYGMDVWVGQGTTVTVSS
1.45	SEQ ID NO: 177 KYWMI	SEQ ID NO: 178 NINQDGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 179 GGDDGYSNSHF GMDV	SEQ ID NO: 180 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYWMWIWVRQAPEKGL EWVANINQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDDGYSNSHYGMDVSGQGTTVTVSS
1.46	SEQ ID NO: 181 NYWMS	SEQ ID NO: 182 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 183 GGEYSSSHYG MDV	SEQ ID NO: 184 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMWSWVRQAPGRG LEWVANINQDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGEYSSSHYGMDVWVGQGTTVTVSS
1.47	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 188

[0111]

	185 NYWMN	186 NIKQDGSEN YYVDSVKG	187 GGEGYSTSHYG MDV	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCIASGFSFSNYWMNWVRQAPGKL EWVANIKQDGSENNYYDSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGEYGYSTSHYGMDVWGQGTTVSS
1.48	SEQ ID NO: 189 SYWMS	SEQ ID NO: 190 NIKQDGSEKY YYVDSVKG	SEQ ID NO: 191 GGEGYGVHDY GLDV	SEQ ID NO: 192 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMMSWVRQAPGKG LEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYFCARGGEYGYGVHDYGLDVSQGQGTTVSS
1.49	SEQ ID NO: 193 SYWML	SEQ ID NO: 194 NINQDGSEN YYVDSVEG	SEQ ID NO: 195 GGEDYGNHF GMDV	SEQ ID NO: 196 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSFTFSSYWMILWFRQAPGKE EWVANVNQDGSENNYYDSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGEDYGNHFGMDVWGQGTMVTVSS
1.50	SEQ ID NO: 197 NYWMI	SEQ ID NO: 198 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 199 GGDGYSNSHY GMDV	SEQ ID NO: 200 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMIWYRQAPGEELE WVANINQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNATNSLFLQMNSLRAEDTA VYYCARGGDGYSNSHYGMDVWGQGTTVSS
1.51	SEQ ID NO: 201 NYWMI	SEQ ID NO: 202 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 203 GGDGYSNSHY GMDV	SEQ ID NO: 204 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMIWYRQAPGEELE WVANINQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNATNSLFLQMNSLRAEDTA VYYCARGGDGYSNSHYGMDVWGQGTTVSS
1.52	SEQ ID NO: 205 KYWMI	SEQ ID NO: 206 NINQDGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 207 GGDDYISHFG MDV	SEQ ID NO: 208 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYWMIWVVRQAPEKGL WVANINQDGSEKYYVDSVEGRFTISRDNANNNSLFLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDDYISHFGMDVSGQGTRTVSS
1.53	SEQ ID NO: 209 KYWMI	SEQ ID NO: 210 NINQDGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 211 GGDDYISHHY GMDV	SEQ ID NO: 212 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCASGFTFSKYWMIWVVRQAPEKGL WVANINQDGSEKYYVDSVEGRFTISRDNANNNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDDYISHHYGMDVSGQGTTVSS
1.54	SEQ ID NO: 213 NYWMN	SEQ ID NO: 214 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 215 GGFGYGDHY GMDV	SEQ ID NO: 216 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNSNYWMNWVRQAPGKE LEWVANINQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDD AVYYCARGGGFGYGDHYGMDVWGQGTTVSS
1.55	SEQ ID NO: 217 SYWLW	SEQ ID NO: 218 NINQDGSEN YYVDSVEG	SEQ ID NO: 219 GGEDYGNHF GMDV	SEQ ID NO: 220 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYWLNWVRQAPGKL EWVANINQDGSENNYYDSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGEDYGNHFGMDVWGQGTTVSS
1.56	SEQ ID NO: 221 SYWMS	SEQ ID NO: 222 NIKQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 223 GGEGYGVHDY GLDV	SEQ ID NO: 224 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMMSWVRQAPGKL EWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYFCARGGEYGYGVHDYGLDVSQGQGTTVSS
1.57	SEQ ID NO: 225 DYWMN	SEQ ID NO: 226 NIKEDGSEKY YYVDSVEG	SEQ ID NO: 227 GGEGYGDNHY GMDV	SEQ ID NO: 228 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASGFTFSYWMNWVRQAPGKG LEWVANIKEDGSEKYYVDSVEGRFTISRDNARNNSLYLQMNTSLREEDT AMYYCARGGEYGDNHYGMDVSGQGTTVSS
1.58	SEQ ID NO: 229 SYWMN	SEQ ID NO: 230 NINQDGSEK YYVDSVEG	SEQ ID NO: 231 GGPDYGDLYH GMDV	SEQ ID NO: 232 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYWMNWVRQAPGKE AEWVANINQDGSEKYYVDSVEGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDD TAVYYCARGGPDYGLDHYGMDVWGQGTTVSS
1.59	SEQ ID NO: 233 RYWMS	SEQ ID NO: 234 NINQDGREK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 235 GGEGYGDYHY GMDV	SEQ ID NO: 236 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMMSWVRQAPGKG LERVANINQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGGEYGDYHYGMDVSGQGTTVSS
1.60	SEQ ID NO: 237 NYWMI	SEQ ID NO: 238 NINQDGSEK YYVDSVKG	SEQ ID NO: 239 GGDGYSNSHY GMDV	SEQ ID NO: 240 EVOLVESGGGLVQPGGSPRLSCAASGFTLSNYWMIWYRQAPGKE EWVANINQDGSEKYYVDSVKGRTFISRDNATNSLFLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSNSHYGMDVWGQGTTVSS

[0112]

1.61	SEQ ID NO: 241 NYWMN	SEQ ID NO: 242 NINQDESEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 243 GGFGYGDHF GMDV	SEQ ID NO: 244 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFSNYWMNWVRQAPGKE LEWVANINQDESEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAADD TAVYYCARGGGFYGDSHFGMDVWVGQGTTTVSS
1.62	SEQ ID NO: 245 NYWMN	SEQ ID NO: 246 NINQDESEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 247 GGFGYGDHF GMDV	SEQ ID NO: 248 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFSNYWMNWVRQAPGKE LEWVANINQDESEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAADD TAVYYCARGGGFYGDSHFGMDVWVGQGTTTVSS
1.63	SEQ ID NO: 249 SFWMN	SEQ ID NO: 250 NINQDGSEK YVDSVKG	SEQ ID NO: 251 GGPDYGDLYH GMDV	SEQ ID NO: 252 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFWMNWVRQAPGKE AEWVANINQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAED TAVYYCARGGGPDYGDLYHGMWVGQGTTTVSS
1.64	SEQ ID NO: 253 SYWMN	SEQ ID NO: 254 NINQDGSEK YVDSVKG	SEQ ID NO: 255 GGPDYGDLYH GMDV	SEQ ID NO: 256 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYWMNWVRQAPGKE AEWVANINQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAED TAVYYCARGGGPDYGDLYHGMWVGQGTTTVSS
1.65	SEQ ID NO: 257 NYWMI	SEQ ID NO: 258 NINQDGSEK YVDSVKG	SEQ ID NO: 259 GGFDYGNSHY GMDV	SEQ ID NO: 260 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMWYRQAPGEEL EWVANINQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMHSLRAEDT AVYYCARGGEDYGNSHYGMWVGQGTTTVSS
1.66	SEQ ID NO: 261 NYWMN	SEQ ID NO: 262 NINQDGSER YVDSVKG	SEQ ID NO: 263 GGEGYGIDHY GLDV	SEQ ID NO: 264 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRAED TAVYFCARGGEGYGYDHYGLDVSQGQGTTTVSS
1.67	SEQ ID NO: 265 SYWMS	SEQ ID NO: 266 NINQDGSER YVDSVKG	SEQ ID NO: 267 GGEGYGVDHY GLDV	SEQ ID NO: 268 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYWMWVRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRAEDT AVYFCARGGEGYGYDHYGLDVSQGQGTTTVSS
1.68	SEQ ID NO: 269 NYWMI	SEQ ID NO: 270 NINQDGSEK YVDSVEG	SEQ ID NO: 271 GGEGYGVDHY GLDV	SEQ ID NO: 272 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMWVRQAPGKG EWVANINQDGSEKYYVDSVEGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRAEDT AVYFCARGGEGYGYDHYGLDVSQGQGTTTVSS
1.69	SEQ ID NO: 273 NYWMN	SEQ ID NO: 274 NINQDGSEK YVDSVKG	SEQ ID NO: 275 GGTGYGSDHY GMDV	SEQ ID NO: 276 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWVRQAPGKG LEWVANINQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAED TAVYYCARGGTGYGSDHYGMWVGQGTTTVSS
1.70	SEQ ID NO: 277 NYWMN	SEQ ID NO: 278 NINQDGSEN YVDSVKG	SEQ ID NO: 279 GGFGYGDHY GMDV	SEQ ID NO: 280 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFSNYWMNWVRQAPGKE LEWVANINQDGSENYVDSVKGRFTISRDNVKNSLFLQMNSLRAED DTAVYYCARGGGFYGDSHGYGMWVGQGTTTVSS
1.71	SEQ ID NO: 281 NYWMI	SEQ ID NO: 282 NINQNGSER YVDSVQG	SEQ ID NO: 283 GGADYSNSHY GMDV	SEQ ID NO: 284 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGNYWMWVRQAPGKE EWLANINQNGSERYYVDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGADYSNSHYGMWVGQGTTTVSS
1.72	SEQ ID NO: 285 SYWMS	SEQ ID NO: 286 NINQDGSER YVDSVKG	SEQ ID NO: 287 GGEGYGVDHY GLDV	SEQ ID NO: 288 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYWMWVRQAPGKG LEWVANINQDGSENYVDSVKGRFTISRDNNNSLHLQMNSLRAED TAVYFCARGGEGYGYDHYGLDVSQGQGTTTVSS
1.73	SEQ ID NO: 289 SYWMN	SEQ ID NO: 290 NINPDGSEKY YVDSVQG	SEQ ID NO: 291 GGPGYGDLYH GMDV	SEQ ID NO: 292 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYWMNWVRQAPGKE AEWVANINPDGSEKYYVDSVQGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDT TALYYCARGGGPGYGDLYHGMWVGQGTTTVSS
1.74	SEQ ID NO: 293 NYWMN	SEQ ID NO: 294 NINQDGSEK YVDSVQG	SEQ ID NO: 295 GGEGYGVDHY	SEQ ID NO: 296 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWVRQAPGKG LEWVANINQDGSEKYYVDSVEGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRAEDT

[0113]

		YYVDSVEG	GLDV	AVYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.75	SEQ ID NO: 297 DYYMS	SEQ ID NO: 298 NINQDGSER YYVDSVKG	SEQ ID NO: 299 GGEGYGVHDHY GLDV	SEQ ID NO: 300 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYMSWIRQAPGKLE W VANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTA VYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.76	SEQ ID NO: 301 NYWMN	SEQ ID NO: 302 NINQDGSER YYVDSVKG	SEQ ID NO: 303 GGEGYGVHDHY GLDV	SEQ ID NO: 304 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTA VYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.77	SEQ ID NO: 305 NYWMN	SEQ ID NO: 306 NINQDGSER YYVDSVKG	SEQ ID NO: 307 GGEGYGVHDHY GLDV	SEQ ID NO: 308 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTA VYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.78	SEQ ID NO: 309 NYWMN	SEQ ID NO: 310 NINQDGSER YYVDSVKG	SEQ ID NO: 311 GGEGYGVHDHY GLDV	SEQ ID NO: 312 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTA VYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.79	SEQ ID NO: 313 NYWMN	SEQ ID NO: 314 NINQDGSER YYVDSVKG	SEQ ID NO: 315 GGEGYGVNHY GLDV	SEQ ID NO: 316 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTA VYFCARGGEGYGVNHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.80	SEQ ID NO: 317 DYYMS	SEQ ID NO: 318 NIKQDGSER YYVDSVKG	SEQ ID NO: 319 GGEGYGVHDHY GLDV	SEQ ID NO: 320 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYYMSWIRQAPGKLE W VANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKSSLYLQMSSLRAEDTA VYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.81	SEQ ID NO: 321 NYWMN	SEQ ID NO: 322 NINQDGSER YYVDSVEG	SEQ ID NO: 323 GGEGYGVHDHY GLDV	SEQ ID NO: 324 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRTFISRDNAKSSLYLQMSSLRAEDTA VYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.82	SEQ ID NO: 325 NYWMN	SEQ ID NO: 326 NINQDGSER YYVDSVKG	SEQ ID NO: 327 GGEGYGVHDHY GLDV	SEQ ID NO: 328 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKSSLYLQMSSLRAEDTA VYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.83	SEQ ID NO: 329 NYWMN	SEQ ID NO: 330 NINQDGSER YYVDSVKG	SEQ ID NO: 331 GGEGYGVHDHY GLDV	SEQ ID NO: 332 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAE DTAVYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.84	SEQ ID NO: 333 NYWMN	SEQ ID NO: 334 NINQDGSER YYVDSVKG	SEQ ID NO: 335 GGEGYGVHDHY GLDV	SEQ ID NO: 336 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTA VYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.85	SEQ ID NO: 337 NYWMN	SEQ ID NO: 338 NINQDGSER YYVDSVKG	SEQ ID NO: 339 GGEGYGVHDHY GLDV	SEQ ID NO: 340 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNANNSHLQMSSLRAEDTA VYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.86	SEQ ID NO: 341 NYWMN	SEQ ID NO: 342 NINQDGSER YYVDSVEG	SEQ ID NO: 343 GGEGYGVHDHY GLDV	SEQ ID NO: 344 QVQLGESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGK LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRTFISRDNAKSSLYLQMSSLRAE DTAVYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.87	SEQ ID NO: 345 NYWMN	SEQ ID NO: 346 NINQDGSER YYVDSVKG	SEQ ID NO: 347 GGEGYGVHDHY GLDV	SEQ ID NO: 348 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKSSLYLQMSSLRAEDTA VYFCARGGEGYGVHDHYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.88	SEQ ID NO: 349	SEQ ID NO: 350 YYVDSVKG	SEQ ID NO: 351	SEQ ID NO: 352 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGK

[0114]

	NYWMN	NINQDGSER YYVDSVKG	GGEGYGVDHY GLDV	GLEWWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRGNAKNSLYLQMSSLRAE DTAVYFCARGGEGYGVDHYGLDVSGQGTTVSS
1.89	SEQ ID NO: 353 DYGMS	SEQ ID NO: 354 NINQDGSER YYVDSVKG	SEQ ID NO: 355 GGEGYGVDHY GLDV	SEQ ID NO: 356 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWSVRQAPGKG LEWWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMSSLRAED TAVYFCARGGEGYGVDHYGLDVSGQGTTVSS
1.90	SEQ ID NO: 357 SHWMT	SEQ ID NO: 358 HIKEDGSEKY YEDSVEG	SEQ ID NO: 359 GGDGYSDSHF GVDV	SEQ ID NO: 360 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWVRQAPGKG EWVAHIKEKGSEKYYEDSVECRFTVSRDNNAKNSVYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVVDVWGQGTTVSS
1.91	SEQ ID NO: 361 SHWMT	SEQ ID NO: 362 HIKEDGSEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 363 GGDGYSDSHF GVDV	SEQ ID NO: 364 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKG EWVAHIKEKGSEKYYEDSVECRFTVSRDNNAKNSVYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVVDVWGQGTTVSS
1.92	SEQ ID NO: 365 SHWMT	SEQ ID NO: 366 HIKEDGSEKY YEDSVEG	SEQ ID NO: 367 GGDGYSDSHF GVDV	SEQ ID NO: 368 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKG EWVAHIKEKGSEKYYEDSVECRFTVSRDNNAKNSVYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVVDVWGQGTTVSS
1.93	SEQ ID NO: 369 SHWMT	SEQ ID NO: 370 HIKEDGSEKY YEDSVEG	SEQ ID NO: 371 GGDGYSDSHF GVDV	SEQ ID NO: 372 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKG EWVAHIKEKGSEKYYEDSVECRFTISRDNNAKNSVYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVVDVWGQGTTVSS
1.94	SEQ ID NO: 373 SHWMT	SEQ ID NO: 374 HIKEDGSEKY YEDSVEG	SEQ ID NO: 375 GGDGYSDSHF GVDV	SEQ ID NO: 376 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKG EWVAHIKEKGSEKYYEDSVECRFTVSRDNNAKNSVYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVVDVWGQGTTVSS
1.95	SEQ ID NO: 377 SHWMT	SEQ ID NO: 378 HIKEDGSEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 379 GGDGYSDSHF GVDV	SEQ ID NO: 380 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWVRQAPGKG EWVAHIKEKGSEKYYEDSVECRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVVDVWGQGTTVSS
1.96	SEQ ID NO: 381 SHWMT	SEQ ID NO: 382 HIKEDGSEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 383 GGDGYSDSHF GVDV	SEQ ID NO: 384 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKG EWVAHIKEKGSEKYYEDSVECRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVVDVWGQGTTVSS
1.97	SEQ ID NO: 385 SHWMT	SEQ ID NO: 386 HIKEDESEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 387 GGVGYSISHFG VVDV	SEQ ID NO: 388 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWVRQAPGKG EWVAHIKEDESEKYYEDSVECRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVVDVWGQGTTVSS
1.98	SEQ ID NO: 389 SHWMT	SEQ ID NO: 390 HIKEDESEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 391 GGEGYISHFG VVDV	SEQ ID NO: 392 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWVRQAPGKG EWVAHIKEDESEKYYEDSVECRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVVDVWGQGTTVSS
1.99	SEQ ID NO: 393 SHWMT	SEQ ID NO: 394 HIKEDESEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 395 GGDGYSDSHF GVDV	SEQ ID NO: 396 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKG EWVAHIKEDESEKYYEDSVECRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVVDVWGQGTTVSS
1.100	SEQ ID NO: 397 SHWMT	SEQ ID NO: 398 HIKEDESEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 399 GGDGYSISHFG VVDV	SEQ ID NO: 400 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKG EWVAHIKEDESEKYYEDSVECRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVVDVWGQGTTVSS
1.101	SEQ ID NO: 401 SHWMT	SEQ ID NO: 402 HIKEGGSEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 403 GGDGYSDSHF GVDV	SEQ ID NO: 404 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKG EWVAHIKEGGSEKYYEDSVECRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGDGYSDSHFGVVDVWGQGTTVSS
1.102	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 408

	405 SHWMT	406 HIKEEGSEKY YVDSVKG	407 GGDGYSDSHF GVDV	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKGL EWAHIKEEGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGDGYSDSHFGVDVWGQGTTVTVSS
1.103	SEQ ID NO: 409 SHWMT	SEQ ID NO: 410 HIKEDGSEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 411 GGEGYSDSHF GVDV	SEQ ID NO: 412 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKGL EWAHIKEDGSEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA AVYYCARGGEGYSDSHFGVDVWGQGTTVTVSS
1.104	SEQ ID NO: 413 SHWMT	SEQ ID NO: 414 HIKEDESEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 415 GGVGYSDSHF GVDV	SEQ ID NO: 416 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKGL EWAHIKEDESEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA AVYYCARGGVGYSISHFGVDVWGQGTTVTVSS
1.105	SEQ ID NO: 417 SHWMT	SEQ ID NO: 418 HIKEDESEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 419 GGVGYSISHFG VVDV	SEQ ID NO: 420 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKGL EWAHIKEDESEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGVGYSISHFGVDVWGQGTTVTVSS
1.106	SEQ ID NO: 421 SHWMT	SEQ ID NO: 422 HIKEDESEKY YVDSVKG	SEQ ID NO: 423 GGEGYSISHFG VVDV	SEQ ID NO: 424 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKGL EWAHIKEDESEKYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGEGYSISHFGVDVWGQGTTVTVSS
1.107	SEQ ID NO: 849 NYWMN	SEQ ID NO: 850 NINQDGSER YVDSVKG	SEQ ID NO: 851 GGEGYGVDHY GLDV	SEQ ID NO: 852 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA TAVYFCARGGEGYGVHDYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.108	SEQ ID NO: 853 NYWMN	SEQ ID NO: 854 NINQDGSER YVDSVKG	SEQ ID NO: 855 GGEGYGVDHY GLDV	SEQ ID NO: 856 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA TAVYFCARGGEGYGVHDYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.109	SEQ ID NO: 857 NYWMN	SEQ ID NO: 858 NINQDGSER YVDSVKG	SEQ ID NO: 859 GGEGYGVDHY GLDV	SEQ ID NO: 860 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA TAVYYCARGGEGYGVHDYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.110	SEQ ID NO: 861 NYWMN	SEQ ID NO: 862 NINQDGSER YVDSVKG	SEQ ID NO: 863 GGEGYGVDHY GLDV	SEQ ID NO: 864 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS NYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA TAVYFCARGGEGYGVHDYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.111	SEQ ID NO: 865 NYWMN	SEQ ID NO: 866 NINQDGSER YVDSVKG	SEQ ID NO: 867 GGEGYGVDHY GLDV	SEQ ID NO: 868 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA TAVYYCARGGEGYGVHDYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.112	SEQ ID NO: 869 NYWMN	SEQ ID NO: 870 NINQDGSER YVDSVKG	SEQ ID NO: 871 GGEGYGVDHY GLDV	SEQ ID NO: 872 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAATGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA TAVYFCARGGEGYGVHDYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.113	SEQ ID NO: 873 NYWMN	SEQ ID NO: 874 NINQDGSER YVDSVKG	SEQ ID NO: 875 GGEGYGVDHY GLDV	SEQ ID NO: 876 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA TAVYYCARGGEGYGVHDYGLDVSQGQGTTVTVSS
1.114	SEQ ID NO: 877 NYWMN	SEQ ID NO: 878 NINQDESERY YVDSVKG	SEQ ID NO: 879 GGEGYGVDHY GLDV	SEQ ID NO: 880 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSNYWMNWRQAPGKG LEWVANINQDESERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA TAVYYCARGGEGYGVHDYGLDVSQGQGTTVTVSS

[0116] 在一个方面,所述单可变重链结构域抗体包含如表2所示的针对单结构域抗体之一的所示的CDR1、CDR2或CDR3或包含与其具有至少40%或75%同源性的CDR1、CDR2、CDR3。例如,所述单可变重链结构域抗体包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1含有SEQ ID NO.425或与其具有至少80%同源性的序列,所述CDR2含有SEQ ID NO.426或与其具有至少75%同源性的序列,所述CDR3含有SEQ ID NO.427或具有至少75%同源性的序列,或所述CDR1含有SEQ ID NO.429或与其具有至少75%同源性的序列,所述CDR2含有SEQ ID NO.430或与其具有75%同源性的序列,所述CDR3含有SEQ ID NO.431的CDR3等等。CDR根据Kabat限定。在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体包含如针对V_H单结构域抗体2.41至2.51所示的CDR1、2和3,或包含以下或由其以下组成:如针对V_H单结构域抗体2.41至2.51所示的全长序列(即SEQ ID NO.588、592、596、600、604、608、612、616或620)。

[0117] 序列同源性可以是至少40%、50%、60%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、

80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%例如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性。

[0118] 在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体包含人构架区。

[0119] 在一个实施方案中,所述单可变重链结构域抗体包含表2中所示的全长序列或与其具有至少70%同源性的序列,或由其组成。例如,所述单可变重链结构域抗体包含全长序列,所述全长序列包含以下或由以下组成:选自表2中所示的全长序列例如SEQ ID NO. 428、432、436、440等的序列或与其具有至少50%同源性的序列。如上所述的序列同源性可以是至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%例如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性。

[0120] 表2 V_H单结构域抗体(家族2)的全长序列和CDR序列

名称	CDR1	CDR2	CDR3	全长
2.1	SEQ ID NO: 425 YISGSGDIIDYADSVKG	SEQ ID NO: 426 YISGSGDIIDYADSVKG	SEQ ID NO: 427 EDSRLTGTDFDN	SEQ ID NO: 428 EVQLVESGGGLVKGPGGLRVSCAASGFTFSQYMSWFRQAPGK GLEWVSYISGSGDIIDYADSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNNLR AEDTAVYHCAKEDSRIPGTTFDNWGQGTLVTVSS
2.2	SEQ ID NO: 429 YISGSGDIIDYADSVKG	SEQ ID NO: 430 YISGSGDIIDYADSVKG	SEQ ID NO: 431 EDSRLP GTTDFDN	SEQ ID NO: 432 EVQLVESGGGLVKGPGGLRVSCAASGFTFSQYMSWFRQAPGK GLEWVSYISGSGDIIDYADSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYHCAKEDSRIPGTTFDNWGQGTLVTVSS
2.3	SEQ ID NO: 433 YISGSGDIIDYADSVKG	SEQ ID NO: 434 YISGSGDIIDYADSVKG	SEQ ID NO: 435 EDSRLP GTTDFDN	SEQ ID NO: 436 EVQLVESGGGLVKGPGGLRVSCAASGFTFSQYMSWFRQAPGK GLEWVSYISGSGDIIDYADSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYHCAKEDSRIPGTTFDNWGQGTLVTVSS
2.4	SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 438	SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 440

[0122]

	437 DYYMS	YISGSGDVVIDYAD SVKG	439 EDSRIPGTTDF DN	EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSYISGSGDVVIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYHCAKEDSRIPGTTDFDNWGQGTLTVSS
2.5	SEQ ID NO: 441 DYYMS	SEQ ID NO: 442 YISGSGDIIIDYADS VKG	SEQ ID NO: 443 EDSRIPGTTDF DN	SEQ ID NO: 444 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSYISGSGDIIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR EDTAVYHCAKEDSRIPGTTDFDNWGQGTLTVSS
2.6	SEQ ID NO: 445 DYYMS	SEQ ID NO: 446 YISGSGDIIIDYADS VKG	SEQ ID NO: 447 EDSRIPGTTDF DS	SEQ ID NO: 448 EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSYISGSGDIIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR EDTAVYHCAKEDSRIPGTTDFDSWGQGTM/TVSS
2.7	SEQ ID NO: 449 DYYMS	SEQ ID NO: 450 YISGSGTTIDYADS VKG	SEQ ID NO: 451 EDIRMTGTTDF DN	SEQ ID NO: 452 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSYISGSGTTIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR EDTAVYYCAREDIRMTGTTDFDNWGQGTLTVSS
2.8	SEQ ID NO: 453 DYYMS	SEQ ID NO: 454 HISGSGTTIDYAD SVKG	SEQ ID NO: 455 EDSRMPGTTD FDN	SEQ ID NO: 456 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISGSGTTIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYHCAREDSRMPGTTDFDNWGQGTLTVSS
2.9	SEQ ID NO: 457 DYYMT	SEQ ID NO: 458 YISGSGDTIDYAES VKG	SEQ ID NO: 459 EDSRAGTTDF DN	SEQ ID NO: 460 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMTWFRQAPGK GLEWISYISGSGDTIDYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR EDTAVYHCAREDSRAGTTDFDNWGQGTLTVSS
2.10	SEQ ID NO: 461 DYYMT	SEQ ID NO: 462 YISSSGSNIDYADS VKG	SEQ ID NO: 463 EDSRLSGTTDF DY	SEQ ID NO: 464 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMTWFRQAPGK GLEWISYISGGSNIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR EDTAVYYCAREDSRLSGTTDFDYWGQGTLTVSS
2.11	SEQ ID NO: 465 DYYMT	SEQ ID NO: 466 YISGSGDTIDYAES VKG	SEQ ID NO: 467 EDSRAGTTDF DN	SEQ ID NO: 468 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMTWFRQAPGK GLEWISYISGSGDTIDYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR EDTAVYHCAREDSRAGTTDFDNWGQGTLTVSS
2.12	SEQ ID NO: 469 DYYMS	SEQ ID NO: 470 HISGSGTTIDYAD SVKG	SEQ ID NO: 471 EDIRMTGTTDF DH	SEQ ID NO: 472 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISGSGTTIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDIRMTGTTDFDHWGQGTLTVSS
2.13	SEQ ID NO: 473 DYYMS	SEQ ID NO: 474 HISSSGNTIDYAD SVKG	SEQ ID NO: 475 EDPRLPGTTDF DY	SEQ ID NO: 476 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISSSGNTIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRLPGTTDFDYWGQGTLTVSS
2.14	SEQ ID NO: 477 DYYMT	SEQ ID NO: 478 YISGSGDTIDYAES VKG	SEQ ID NO: 479 EDIRMPGTTDF DH	SEQ ID NO: 480 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMTWFRQAPGK GLEWISYISGSGDTIDYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR EDTAVYYCAREDIRMPGTTDFDHWGQGTLTVSS
2.15	SEQ ID NO: 481 DYYMS	SEQ ID NO: 482 HISGSGTTIDYAD SVKG	SEQ ID NO: 483 EDIRMPGTTDF DH	SEQ ID NO: 484 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISGSGTTIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDIRMPGTTDFDHWGQGTLTVSS
2.16	SEQ ID NO: 485 DYYMS	SEQ ID NO: 486 HISSSGSTDYADS VKG	SEQ ID NO: 487 EDPRLTGTTDF DY	SEQ ID NO: 488 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWIRQAPGK GLEWVSHISSSGSTDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR EDTAVYYCAREDPRLTGTTDFDYWGQGALTVSS
2.17	SEQ ID NO: 489 DYYMS	SEQ ID NO: 490 YISSSGSTISYADS VKG	SEQ ID NO: 491 EDPRISGTTDF DN	SEQ ID NO: 492 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWIRQAPGK GLEWVSYISSSGSTISYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR EDTAVYYCAREDPRIISGTTDFDNWGQGTLTVSS

[0123]

2.18	SEQ ID NO: 493 DYYMS	SEQ ID NO: 494 HISSGNTIDYAD SVKG	SEQ ID NO: 495 EDPRLPGTTDF DY	SEQ ID NO: 496 QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISSGNTIDYADSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRLPGTTDFDYWGQGTLVTVSS
2.19	SEQ ID NO: 497 DYYMS	SEQ ID NO: 498 YISGTGTTDYADS VKG	SEQ ID NO: 499 EDPRLPGTSEFD DN	SEQ ID NO: 500 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSYISGTGTTDYADSVKGRFTFISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRLPGTSEFDNWGQGTLVTVSS
2.20	SEQ ID NO: 501 DYYMS	SEQ ID NO: 502 HISSGNTIDYADS VKG	SEQ ID NO: 503 EDPRMPGTFD FDN	SEQ ID NO: 504 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISSGNTIDYADSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRMPGTFDNDWGQGTLVTVSS
2.21	SEQ ID NO: 505 DYYMS	SEQ ID NO: 506 HISGSGTTIDYAD SVKG	SEQ ID NO: 507 EDIRMPGTTDF DH	SEQ ID NO: 508 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISGSGTTIDYADSVKGRTFISRDNARNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRMPGTTDFDHWGQGTLVTVSS
2.22	SEQ ID NO: 509 DYYMS	SEQ ID NO: 510 HISGSGTTIDYAD SVKG	SEQ ID NO: 511 EDIRMPGTTDF DH	SEQ ID NO: 512 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISGSGTTIDYADSVKGRTFISRDNARNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRMPGTTDFDHWGQGTLVTVSS
2.23	SEQ ID NO: 513 DYYMS	SEQ ID NO: 514 HISGSGTTIDYAD SVKG	SEQ ID NO: 515 EDIRMPGTTDF DH	SEQ ID NO: 516 EVQLVESGGGLVTPGGSLRLSCAVSGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISGSGTTIDYADSVKGRTFISRDNARNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRMPGTTDFDHWGQGTLVTVSS
2.24	SEQ ID NO: 517 DYYMS	SEQ ID NO: 518 HISGSGTTIDYAD SVKG	SEQ ID NO: 519 EDIRMPGTTDF DH	SEQ ID NO: 520 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISGSGTTIDYADSVKGRTFISRDNARNSLYLQMNSLR AEDTAMYYCAREDPRMPGTTDFDHWGQGTLVTVSS
2.25	SEQ ID NO: 521 DYYMS	SEQ ID NO: 522 HISGSGTTIDYAD SVKD	SEQ ID NO: 523 EDIRMPGTTDF DH	SEQ ID NO: 524 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISGSGTTIDYADSVKDRFTFISRDNARNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRMPGTTDFDHWGQGTLVTVSS
2.26	SEQ ID NO: 525 DYYMS	SEQ ID NO: 526 HISSGNTIDYADS VKG	SEQ ID NO: 527 EDIRMPGTTDF DN	SEQ ID NO: 528 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCASGFTFTDYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISSGNTIDYADSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNSLR DDTAVYYCAREDPRMPGTTDFDNWGQGTLVTVSS
2.27	SEQ ID NO: 529 DYYMT	SEQ ID NO: 530 YISSSGSTITYADS VKG	SEQ ID NO: 531 EDIRMSGTTDF DY	SEQ ID NO: 532 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMTWFRQAPGK GLEWVSYISSSGSTITYADSVKGRFTFISRDNANNNSLYLQMNSLR EDTAVYHCAREDPRMSGTTDFDYWGQGTLVTVSS
2.28	SEQ ID NO: 533 DYYMS	SEQ ID NO: 534 HISSGSSIDYADS VKG	SEQ ID NO: 535 EDPRLSGTIDF DS	SEQ ID NO: 536 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISSGSSIDYADSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNSLR EDTAVYYCAREDPRLSGTTDFDSWGQGTLVTVSS
2.29	SEQ ID NO: 537 DYYMS	SEQ ID NO: 538 HIGGSGTTIDYAD SVKG	SEQ ID NO: 539 EDIRMPGTTDF DH	SEQ ID NO: 540 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHIGGSGTTIDYADSVKGRTFISRDNARNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRMPGTTDFDHWGQGTLVTVSS
2.30	SEQ ID NO: 541 DYYMS	SEQ ID NO: 542 YISSSGSTITYADS VKG	SEQ ID NO: 543 EDPRVPGTTNF DY	SEQ ID NO: 544 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSYISSSGSTITYADSVKGRFTFISRDNAKNSLYLQMNSLR EDTAVYYCAREDPRVPGTTNFDFDYWGQGTLVTVSS
2.31	SEQ ID NO: 545 DYYMT	SEQ ID NO: 546 YISGSGTIDYADS VKG	SEQ ID NO: 547 EDGRIPGTTDF	SEQ ID NO: 548 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMTWFRQAPGK GLEWVSYISGSGSTIDYADSVKGRTFISRDNAKNSLYLQMNSLR

[0124]

			DH	PEDTAVYYCAKEDEGRIPGTTDFDHWGQGTLTVSS
2.32	SEQ ID NO: 549 DYYMS	SEQ ID NO: 550 HISGSGTTIDYAD SVKD	SEQ ID NO: 551 EDIRMPGTTDF DH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISGSGTTIDYADSVKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRMPGTTDFDHWGQGTLTVSS
2.33	SEQ ID NO: 553 DYFMS	SEQ ID NO: 554 HISSGNSIDYAD SVKG	SEQ ID NO: 555 EDPRLPGTTDF DY	SEQ ID NO: 556 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISSGNSIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRMPGTTDFDYWGQGTLTVSS
2.34	SEQ ID NO: 557 DSYMS	SEQ ID NO: 558 HISNSGSTSYADS VKG	SEQ ID NO: 559 EDPRLPGTSDF DY	SEQ ID NO: 560 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSYMSWFRQAPGK GLEWVSHISNSGSTSYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRMPGTTDFDYWGQGTLTVSS
2.35	SEQ ID NO: 561 DYYMS	SEQ ID NO: 562 HISSSGSSIDYADS VKG	SEQ ID NO: 563 EDPRLSGTTDF DQ	SEQ ID NO: 564 QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISSSGSSIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRMPGTTDFQWGQGTLTVSS
2.36	SEQ ID NO: 565 SYWMS	SEQ ID NO: 566 HISSSGSTDIDYAES VKG	SEQ ID NO: 567 EDPRMITGTTD FDY	SEQ ID NO: 568 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK KLEWVSHISSSGSTDIDYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRMTGTTDFDYWGQGTLTVSS
2.37	SEQ ID NO: 569 NYFMS	SEQ ID NO: 570 HISSSGNTIDYAD SVKG	SEQ ID NO: 571 EDPRLPGTTDF DY	SEQ ID NO: 572 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSHISSSGNTIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSL AEDTAVYYCAREDPRLPGTTDFDYWGQGTLTVSS
2.38	SEQ ID NO: 573 DYYMT	SEQ ID NO: 574 YISGGGTTIHYADS VKG	SEQ ID NO: 575 ENPRLPGTMID FDY	SEQ ID NO: 576 EVQLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMTWFRQAPGK GQFWISYIISGGGTTIHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARENPRLPGTMDFDYWGQGTLTVSS
2.39	SEQ ID NO: 577 DHFMS	SEQ ID NO: 578 NIKQDGSEKYYVD SVKG	SEQ ID NO: 579 EDPRLTGTTDF DN	SEQ ID NO: 580 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSDHFMWSWFRQAPGK KLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSL RAEDTAMYCAREDPRLTGTTDFDNWGQGTLTVSS
2.40	SEQ ID NO: 581 NYWMT	SEQ ID NO: 582 HISSTGSTDYADS VKG	SEQ ID NO: 583 EDPRLPGTMID FDY	SEQ ID NO: 584 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK RGLEWVSHISSTGSTDYADSVKGRFTISRDNAENSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDPRLPGTMDFDYWGQGTLTVSS
2.41	SEQ ID NO: 585 DYYMS	SEQ ID NO: 586 YISGSGDIIIDYADS VKG	SEQ ID NO: 587 EDSRLTGTTDF DN	SEQ ID NO: 588 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSYIISGSGDIIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNNLR AEDTAVYHCAREDRLTGTTDFDNWGQGTLTVSS
2.42	SEQ ID NO: 589 DYYMS	SEQ ID NO: 590 YISGSGDIIIDYADS VKG	SEQ ID NO: 591 EDSRLTGTTDF DN	SEQ ID NO: 592 EVQLVESGGGLVQAGGSLRVSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSYIISGSGDIIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNNLR AEDTAVYHCAREDRLTGTTDFDNWGQGTLTVSS
2.43	SEQ ID NO: 593 DYYMS	SEQ ID NO: 594 YISGSGDIIIDYADS VKG	SEQ ID NO: 595 EDSRLTGTTDF DN	SEQ ID NO: 596 EVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSYIISGSGDIIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNNLR AEDTAVYYCAREDRLTGTTDFDNWGQGTLTVSS
2.44	SEQ ID NO: 597 DYYMS	SEQ ID NO: 598 YISGSGDIIIDYADS VKG	SEQ ID NO: 599 EDSRLTGTTDF DN	SEQ ID NO: 600 EVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK GLEWVSYIISGSGDIIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR EDTAVYHCAREDRLTGTTDFDNWGQGTLTVSS
2.45	SEQ ID NO: 601	SEQ ID NO: 602 YISGSGDIIIDYADS	SEQ ID NO: 603	SEQ ID NO: 604 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWFRQAPGK

	DYYMS	VKG	EDSLRTGTTDF DN	GLEWVSYISGSGDIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNNLR AEDTAVYYCAREDSRLTGTIDFDNW/GQGTIVTVSS
[0125]	2.46 SEQ ID NO: 605 DYYMS	SEQ ID NO: 606 YISGSGDIIDYADSVKG	SEQ ID NO: 607 EDSRLTGTTDF DN	SEQ ID NO: 608 EVQLVESGGGLVKGGSRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGK GLEWVSYISGSGDIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREDSRLTGTIDFDNW/GQGTIVTVSS
	2.47 SEQ ID NO: 609 DYYMS	SEQ ID NO: 610 YISGSGDIIDYADSVKG	SEQ ID NO: 611 EDSRLTGTTDF DN	SEQ ID NO: 612 EVQLVESGGGLVKGGSRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGK GLEWVSYISGSGDIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREDSRLTGTIDFDNW/GQGTIVTVSS
	2.48 SEQ ID NO: 613 DYYMS	SEQ ID NO: 614 YISGSGDIIDYADSVKG	SEQ ID NO: 615 EDARLTGTTDF DN	SEQ ID NO: 616 EVQLVESGGGLVKGGSRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGK GLEWVSYISGSGDIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREDARLTGTIDFDNW/GQGTIVTVSS
	2.49 SEQ ID NO: 617 DYYMS	SEQ ID NO: 618 YISGSGDIIDYADSVKG	SEQ ID NO: 619 EDPLRTGTTDF DN	SEQ ID NO: 620 EVQLVESGGGLVKGGSRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGK GLEWVSYISGSGDIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREDPLRTGTIDFDNW/GQGTIVTVSS
	2.50 SEQ ID NO: 621 DYYMS	SEQ ID NO: 622 YISGSGDIIDYADSVKG	SEQ ID NO: 623 EDARLTGTTDF DN	SEQ ID NO: 624 EVQLVESGGGLVKGGSRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGK GLEWVSYISGSGDIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREDARLTGTIDFDNW/GQGTIVTVSS
	2.5 1	SEQ ID NO: 625 DYYMS	SEQ ID NO: 626 YISGSGDIIDYADSVKG	SEQ ID NO: 628 EVQLVESGGGLVKGGSRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGK GLEWVSYISGSGDIIDYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREDPLRTGTIDFDNW/GQGTIVTVSS

[0126] 在一些实施方案中,提供单V_H结构域抗体,所述单V_H结构域抗体是表1或表2中所示的上述单V_H结构域抗体中任何一个的变体,所述变体具有一个或更多个氨基酸置换、缺失、插入或其他修饰,并保留了单结构域抗体的生物学功能,即结合CD137,并且例如阻断CD137L与CD137的结合。因此,变体单V_H结构域抗体能够被序列工程化改造。修饰可包括编码单结构域抗体或多肽的一个或更多个密码子的一个或更多个置换、缺失或插入,与天然序列单V_H结构域抗体或多肽相比,其导致在氨基酸序列中的改变。氨基酸置换可以是用具有相似结构和/或化学特性的另一个氨基酸代替一个氨基酸的结果,例如用丝氨酸代替亮氨酸,即保守氨基酸置换。插入或缺失可以任选地在大约1至25个氨基酸,例如1至5、1至10、1至15、1至20个氨基酸,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的范围内。所允许的变化可以通过在序列中系统地进行氨基酸的插入、缺失或取代并测试所得变体的全长或成熟天然序列所显示的活性来确定。本文所述的V_H单结构域抗体的变体与非变体分子具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性,例如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性。在一个实施方案中,提供选自SEQ ID No. 4、312、428、624、852、856、860、864、868、872、876或880的变体,其中与这些序列之一相比,所述变体具有1至20个,例如1至10个氨基酸置换。

[0127] 在一个实施方案中,修饰是保守序列修饰。如本文所用,术语“保守序列修饰”意指这样的氨基酸修饰,其不显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特征。这种保守修饰包括氨基酸置换、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变和PCR介导的诱变)将修饰引入本发明的sdAb。保守氨基酸置换是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基代替的置换。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括以下氨基酸:具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸,精氨酸,组氨酸),具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸,谷氨酸),具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸,半胱氨酸,色氨酸),具有非极性侧链的氨基酸(例

如丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,甲硫氨酸),具有 β -分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸,缬氨酸,异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸,苯丙氨酸,色氨酸,组氨酸)。因此,本发明的单结构域抗体的CDR区内一个或更多个氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基代替,并且能够使用本文所述的功能测定测试改变的抗体的保留功能(即,CD137结合)。

[0128] 因此,这些氨基酸改变通常能够在不改变多肽的生物学活性、功能或其他所需性质,例如其对抗原的亲和力或特异性的情况下进行。通常,多肽非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不会改变生物学活性。此外,在结构或功能上相似的氨基酸的置换不太可能破坏多肽的生物活性。包含本文描述的多肽和肽的氨基酸残基的缩写,以及这些氨基酸残基的保守置换显示在下表3中。

[0129] 表3.氨基酸残基和保守氨基酸置换的例子

原始残基 三字母代码, 单字母代码	保守置换
丙氨酸, Ala, A	Gly, Ser
精氨酸, Arg, R	Lys, His
天冬酰胺, Asn, N	Gln, His
天冬氨酸 Asp, D	Glu, Asn
半胱氨酸, Cys, C	Ser, Ala
谷氨酰胺, Gln, Q	Asn
谷氨酸, Glu, E	Asp, Gln
甘氨酸, Gly, G	Ala
组氨酸, His, H	Asn, Gln
异亮氨酸, Ile, I	Leu, Val
亮氨酸, Leu, L	Ile, Val
赖氨酸, lys, K	Ar, His
蛋氨酸, Met, M	Leu, Ile, Tyr
苯丙氨酸, Phe, F	Tyr, Met, Leu
脯氨酸, Pro, P	Ala
丝氨酸, Ser, S	Thr
苏氨酸, Thr, T	Ser
色氨酸, Trp, W	Tyr, Phe
酪氨酸, Tyr, Y	Try, Phe
缬氨酸, Val, V	Ile, Leu

[0130]

[0131] 在一些实施方案中,本发明提供 V_H 单结构域抗体,其是选自表1或2中所示的那些

的单结构域抗体的变体,所述变体包含一个或更多个序列修饰并且与未修饰的单结构域抗体相比,具有一种或更多种性质(例如结合亲和力、特异性、热稳定性、表达水平、效应子功能、糖基化、降低的免疫原性或溶解性等)的改善。

[0132] 技术人员将知道,有不同的方式来鉴定、获得和优化如本文所述的抗原结合分子,包括体外和体内表达文库。这在实施例中进一步描述。可以使用本领域已知的优化技术,例如展示(例如,核糖体和/或噬菌体展示)和/或诱变(例如易错诱变(error-prone mutagenesis))。因此本发明还包含本文所述的单结构域抗体的序列优化的变体。

[0133] 在一个实施方案中,能够进行修饰以降低单结构域抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或更多个构架残基恢复到相应的人种系序列。更具体而言,已经历体细胞突变的单结构域抗体可含有不同于单结构域抗体所源自的种系序列的构架残基。这些残基能够通过将单结构域抗体构架序列与单结构域抗体所源自的种系序列进行比较来鉴定。在一个实施方案中,所有构架序列均为种系序列。

[0134] 为了使构架区序列中的一个或更多个氨基酸残基返回到其种系构型,体细胞突变能够通过例如定点诱变或PCR介导的诱变被“回复突变”为种系序列。

[0135] 另一种类型的构架修饰包括在构架区内或甚至一个或更多个CDR区内突变一个或更多个残基,以除去T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。

[0136] 在又另一个实施方案中,糖基化被修饰。例如,能够制备非糖基化抗体(即,抗体缺乏糖基化)。能够改变糖基化以例如增加抗体对抗原的亲和力。此类碳水化合物修饰能够通过例如改变抗体序列内的一个或更多个糖基化位点来完成。例如,能够进行一个或更多个氨基酸置换,其导致一个或更多个可变区构架糖基化位点的消除,从而消除该位点的糖基化。这种糖基化可增加抗体对抗原的亲和力。

[0137] 在一个实施方案中,一个或更多个置换在CDR1、2或3区中。例如,CDR1、2或3中可有1、2、3、4、5或更多个氨基酸置换。在另一个例子中,可有1或2个氨基酸缺失。在一个实施方案中,一个或更多个置换在构架区中。例如,CDR1、2或3中可有1至10个或更多个氨基酸置换。在另一个例子中,可有1至10个或更多个氨基酸缺失。

[0138] 置换的例子

[0139] 在一个实施方案中,变体包含一个或更多个以下关于SEQ ID NO.4(V_H1.1)的置换或其组合:

- [0140] • F37V,
- [0141] • E61V+E65K
- [0142] • E65K
- [0143] • V70I
- [0144] • V79L
- [0145] • F37V+E61V+E65K+V70I+V79L
- [0146] • E61V+E65K+V70I+V79L
- [0147] • F37V+E61V+E65K+V70I+V79L+G55E+D101V+D105I
- [0148] • F37V+E61V+E65K+V70J+V79LFGL+G55E+D101E+D105I
- [0149] • E61V+E65K+V70I+V79L+G55E
- [0150] • E61V+E65K+V70I+V79L+G55E+D105I

- [0151] • E61V+E65K+V70I+V79L+D54G, E61V+E65K+V70I+V79L+D54E,
- [0152] • E61V+E65K+V70I+V79L+D101E
- [0153] • E61V+E65K+V70I+V79L+D101V或
- [0154] • E61V+E65K+V70I+V79L+G55E+D101V+D105I, E61V+E65K+V70I+V79L+G55E+D101E+D105I

[0155] 在一个实施方案中,变体包含一个或更多个以下关于SEQ ID NO.4 (V_H1.1) 的置换或其组合:

- [0156] a) E61V+E65K+V70I+V79L+G55E+D101→选自下列F、L、I、M、V、S、P、T、A、Y、H、Q、K、D、W、R、G的任何氨基酸;
- [0157] b) E61V+E65K+V70I+V79L+G55E+D105→选自下列F、L、M、S、P、T、A、Y、H、Q、N、K、D、E、W、R、G的任何氨基酸或
- [0158] c) E61V+E65K+V70I+V79L+G55E, D101→选自下列F、L、I、M、V、S、P、T、A、Y、H、Q、K、D、W、R、G的任何氨基酸,+D105→选自下列F、L、M、S、P、T、A、Y、H、Q、N、K、D、E、W、R、G的任何氨基酸。

[0159] 在一个实施方案中,变体包含一个或更多个以下关于SEQ ID NO.312 (V_H1.78) 的置换或其组合:

- [0160] • Q1E+T25S
- [0161] • Q1E+S84N
- [0162] • Q1E+F95Y
- [0163] • Q1E+T25S+S84N
- [0164] • Q1E+T25S+F95Y
- [0165] • Q1E+S84N+F95Y
- [0166] • Q1E+T25S+S84N+F95Y或
- [0167] • Q1E+T25S+G55E+S84N+F95Y

[0168] 在一个实施方案中,变体包含一个或更多个以下关于SEQ ID NO.428 (V_H2.1) 的置换或其组合:

- [0169] • V20L,
- [0170] • F37I,
- [0171] • N85S,
- [0172] • N95Y,
- [0173] • V20L+H95Y
- [0174] • V20L+F37I+N85S+H95Y, V20L+N85S+H95Y,
- [0175] • V20L+F37I+N85S+H95Y+S101A,
- [0176] • V20L+F37I+N85S+H95Y+S101P或
- [0177] • V20L+N85S+H95Y+S101A, V20L+N85S+H95Y+S101A。
- [0178] 以下关于SEQ ID NO.624 (V_H2.50) 的置换或其组合:
- [0179] • S35T+V48I+I57T+L103M+T104R+T107I
- [0180] • S35T+A101T+L103V+T104R+T107V
- [0181] • S35T+V48I+I57T+A101E+L103L+T104W+T107V

- [0182] • S35T+V48I+L103T+T104R+T107V
- [0183] • Y32H+S35T+V48I+S52G+S54D+D56A+I58L+A101L+T104P+T107I+N111H
- [0184] • S35T+A101T+L103V+T104R+T107V+N111S
- [0185] • A28T+S30T+Y33W+S35T+V48I+G53S+S54D+D56K+I57T+L103M+T104P+T107I+N111Y
- [0186] • S35T+V48I+L103T+T104R+T107V+N111S
- [0187] • S35T+V48I+I57T+S101E+T104W+T107V+N111S或
- [0188] • S35T+V48I+I57T+L103M+T104R+T107I+N111S
- [0189] 示例性特征

[0190] 本文所述的单 V_H 结构域抗体已显示优异的稳定性。此外，本文所述的 V_H 单结构域抗体表现出对人CD137的特异性。本文所述的 V_H 单结构域抗体也抑制CD137L与CD137的结合。

[0191] 本发明的单 V_H 结构域抗体优选具有如本文进一步描述和如实施例中所示的KD、IC50和/或EC50值。例如，KD可以是至少约0.4nM或约3nM。IC50和/或EC50值可以如实施例中所示。

[0192] 术语“KD”是指“平衡解离常数”并且是指在滴定测量中在平衡时的获得的值，或者通过将解离速率常数(Koff)除以结合速率常数(Kon)获得的值。“KA”是指亲和常数。结合速率常数，解离速率常数和平衡解离常数用于表示抗体对抗原的结合亲和力。用于确定结合和解离速率常数的方法在本领域中是公知的。使用基于荧光的技术提供高灵敏度和检查样品在生理缓冲液中在平衡时下的能力。可以使用其他实验方法和仪器，例如BIAcore®测定法。

[0193] 在一个实施方案中，如本文所述的单价单 V_H 结构域抗体未被内化或基本上未被内化。内化可以如实施例中所述进行测量。

- [0194] 示例性核酸

[0195] 本发明还提供编码本发明的单结构域抗体的分离的核酸。核酸可以包括DNA和/或RNA。在一个方面，本发明提供编码CDR(例如CDR3)、一组两个或三个CDR或如上所示的本发明的全长单 V_H 结构域抗体的核酸。

[0196] 在一个方面，本发明因此还涉及核酸序列，所述核酸序列包含选自表4或表5中所示的那些序列的序列或由其组成。

- [0197] 表4编码 V_H 1.1至1.114的核酸

[0198]

名称	核苷酸序列
1.1	GAGGTGCAGCTGGAGCTGGGAGCTGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTACCTTTAGTAGCCATTGGATGACTTGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACATA AAGGAAGACGGAAGTGAGAAACTATGTAGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCGCTCCAGAGACAACGCCAAGA ACTCGTATCTGCAAATGAACAGCTGAGAGGCCAAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGGGAGGTGATGGC TACAGTGACTCCCACTCGGTGTGGAGCTGGGGCCAAGGGACCGGTCAGTGTCTCTCA SEQ ID NO. 629
1.2	GAGGTGCAGCTGGAGCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTACCTTTAGTAGTTATTGGATGACTTGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACATA AAGGAAGACGGAAGTGAGAAACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCGCTCCAGAGACAACGCCAATAA CTCGCTGTATCTCAAATGAACAGCTGAGAGGCCAAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGGGGAGGTGATGGC ACAGTGACTCCCACTACGGTGTGGACCTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 630
1.3	GAGGTGCAGCTGGAGCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTACCTTTAGTAGTTATTGGATGACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCGCTCCAGAGACAACGCCAAGA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCTGAGAGGCCAAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGGGGAGGTGATGGC ACGGTGACTCCCACTACGGTATGGACCTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCAGTGTCTCTCA SEQ ID NO. 631
1.4	GAGGTGCAGCTGGAGCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTACCTTTAGTAGAACTATTGGATGACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCGCTCCAGAGACAACGCCAAGA CTCACTGTATCTCAAATGAACAGCTGAGAGGCCAAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGGGGAGGTGATGGC ACGGTGACTCCCACTACGGTATGGACCTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCAGTGTCTCTCA SEQ ID NO. 632
1.5	GAGGTGCAGCTGGAGCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTACCTTTAGTAGAACTATTGGATGACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCGCTCCAGAGACAACGCCAAGA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCTGAGAGGCCAAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGGGGAGGTGATGGC ACAGTGACTCCCACTACGGTACGGACCTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 633
1.6	GAGGTGCAGCTGGAGCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACATA AAGCAAGATGGAAGTGAGAAACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCGCTCCAGAGACAACGCCAAGA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCTGAGAGGCCAAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGGGGGAGGC TATAGCACCTGCACTACGGTATGGACCTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 634
1.7	GAGGTGCAGCTGGAGCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGGAGCCTCTG GATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGCTCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCGATCTCCAGAGACAACGCCAAGA CTCACTGTATCTGCAAATGAACACCTGAGAGGCCAAGGACACGGCTATTATTACTGTGCAGAGGGGGGAGGTGATGGC ACAGTGACTCCCACTCGGTACGGACCTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 635
1.8	GAGGTGCAGCTGGAGCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGGAGCCTCTG GATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGTTCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCGATCTCCAGAGACAACGCCAAGA CTCTCTGTATCTGCAAATGAACAGCTGAGAGGCCAAGGACACGGCTATTATTACTGTGCAGAGGGAGGTGATGGC ACAGTGATTCCCACTACGGTACGGACCTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 636
1.9	GAGGTGCAGCTGGAGCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTACCTTTAGTAGAACTATTGGATGACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAAGTACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCGCTCCAGAGACAACGCCAAGA CTCACTGATCTGCAAATGAACAGCTGAGAGGCCAAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGGGGGAGGTGATGGC ACGGTGACTCCCACTACGGTATGGACCTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 637
1.10	GAGGTGCAGCTGGAGCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG

[0199]

	GATTACACCTTAGTGAATGGATGAACGGGCCAGGCTCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCAAACATA AAGGAGGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATATCCAGAGACAACGCCAAGA ACTCAACGATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGACACGGCTGTATTACTGTGAGAGAGGGGCCGG GTATAGCATGTCTCACTACGGTATGGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 638
1.11	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGCTCCTGAGACTCTCTGTGGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTGAATGGATGAACGGGCCAGGCTCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCAAACATA AAGGAGGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATATCCAGAGACAACGCCAAGA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGAGGACACGGCTTATTACTGTGAGAGAGGGGTGATGGCT CAGTAACCTCCACTCGGTACGGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 639
1.12	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGCTCCTGAGACTCTCTGTGGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTGAATGGATGAACGGGCCAGGCTCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCAAACATA AAGGAGGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATATCCAGAGACAACGCCAAGA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGAGGACACGGCTTATTACTGTGAGAGAGGGGTGATGGCT CAGTAACCTCCACTCGGTACGGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 640
1.13	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGGGGCTCCTGAGACTCTCTGTGGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTGAATGGATGTCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAGAGGGGCTGGAGTGGTGGCCAAACATA AAGGAGGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATATCCAGAGACAACGCCAAGA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGAGGACACGGCTTATTACTGTGAGAGAGGGGTGATGGCT ACAGTGTACCTCCACTACGGTACGGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 641
1.14	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGCTCCTGAGACTCTCTGTGGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTGAATGGATGAACGGGCCAGGCTCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCAAACATA AAGGAGGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATATCCAGAGACAACGCCAAGA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGAGGACACGGCTTATTACTGTGAGAGAGGGGGAGGCT ATAGCACCTCGCACTACGGTATGGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 642
1.15	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGCTCCTGAGACTCTCTGTGGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTACCTATTGGATGCTCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCAAACATA AAGGAGGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATATCCAGAGACAACGCCAAGA CTCACTGTCTCTACAAATGAACAGCCTGAGAGGAGGACACGGCACTTATTACTGTGAGAGAGGGAGGTTGATGGCT ACAGTGTACCTCCACTCGGTACGGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 643
1.16	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGCTCCTGAGACTCTCTGTAGCCTCTGG ATTACACCTTAGTAACTATTGGATGATGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCAAACATAA ACCAAGGATGGAAGTGAGAAATACTTTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGAGGACACGGCTGTATTACTGTGAGAGAGGGAGGTTGATGGCTA CAGTAGCTCTCACTACGGTACGGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 644
1.17	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGCTCCTGAGACTCTCTGTGGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTGAATGGATGAACGGGCCAGGCTCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCAAACATA AAGGAGGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGAGGACACGGCTGTATTACTGTGAGAGAGGGGGGAGGCT ATGGTTACGGGACTACGGTATGGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 645
1.18	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGCTCCTGAGACTCTCTGTGGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTACCCATGGATGAACGGGCCAGGCTCAGGGAAAGGGAGCTGAATGGTGGCCAAACATA AAGGAGGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATATCCAGAGACAACGCCAAGAAC CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGAGGACACGGCTGTATTACTGTGAGAGAGGGGGGTTGGCT ACGGTACTCCACTCGGTATGGACGTCTGGGCCCTAGGGACCACGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 646
1.19	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGCTCCTGAGACTCTCTGTGGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTGAATGGATGATCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCAAACATA

[0200]

	AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGATTACTGTGCGAGAGGGAGGTGATGACT ACAGTAACCTCCACTACGGTATGGACGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCCA SEQ ID NO. 647
1.20	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAGTTATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGACTGGAGTGGGTGGCCAATGTTA ACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTATTACTGTGCGAGAGGGAGGTGAGGGCTA CAGTGATCTCCACTACGGTACGGACGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCCA SEQ ID NO. 648
1.21	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAGTTATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAATGTTA ACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTATTACTGTGCGAGAGGGAGGTGAGGGCTA CAGTGATCTCCACTACGGTACGGACGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCCA SEQ ID NO. 649
1.22	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG ATTCACCTTAGTAGTTATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAATATAA AGGAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGATTACTGTGCGAGAGGGGGGGAGGGC TACGGTACCTCCACTACGGTATGGACGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACGTCTCCCA SEQ ID NO. 650
1.23	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG ATTCACCTTAGTAGTTATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAA AGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGATTATTGTGCGAGAGGGGGGGAGGGCTA CGGTGACGACCACTACGGTATGGACGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACGTCTCCCA SEQ ID NO. 651
1.24	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG ATTCACCTTAGTAGTTATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAA AGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGATTACTGTGCGAGAGGGGGGGAGGGCT ACGGTACACTACGGTACGGTATGGACGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCCA SEQ ID NO. 652
1.25	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAGTTATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGATTACTGTGCGAGAGGGGGGGAGGGCT ATGGTTACGGGACTACGGTATGGACGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCCA SEQ ID NO. 653
1.26	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG ATTCACCTTAGTAGTTATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAA ACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAACAAT TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGATTACTGTGCGAGAGGGGGGGAGGGCTA CGGTGACTCCACTTCGGTATGGACGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACGTCTCCCA SEQ ID NO. 654
1.27	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAGTTATTGGATGCTCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGACTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC CGCTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTATTACTGTGCGAGAGGGAGGTGAGGGCT ACAGTGATCTCCACCCACCGGTACGGACGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACGTCTCCCA SEQ ID NO. 655
1.28	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAACATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC

	CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGGACAAC ATGCTTACAGGGACTCGGTATGGACGCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 656
1.29	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAATTGGATGTTCTGGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGGCCAATGTTA ACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGGACTCTGTGAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAACAA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGAGAG TATGGAGCTGCACTACGGTATGGACGCTGGGGCTGGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 657
1.30	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAATTGGATGAACTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAACAA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGAGAG ATGGTACAGGGACTACGGTATGGACGCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 658
1.31	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAATTGGATGAACTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAACAA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGAGAG ATGGTACAGGGACTACGGTATGGACGCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 659
1.32	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCGGGGGGGGCTCCATAAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAATTGGATGAACTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGGCCAACATA AATCAAATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAACAA CTCACTGTATCTACAAATGAGTAGGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGTTGGCT ACGGTGAATCCCACTACGGTATGGACGCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 660
1.33	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCGGGGGGGGCTCCATAAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAATTGGATGAACTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAACAA CTCACTGTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTTATTACTGTGCGAGAGGGGGGAGGCT ACAGTGAATCCCACTACGGTATGGACGCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 661
1.34	CAGGTGCAGCTGCAGGGAGCTGGTCCAGCCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTACAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAATTGGATGAACTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGGCCAACATA AAGGAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAACAA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGAGGCT ATAGCACCTGCACTACGGTATGGACGCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 662
1.35	CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG ATTCACCTTAGTAACTATTGGATGAACTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGGCCAACATTA AGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAACAA CTCACTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGAGGCT ACGGTGAATCCCACTACGGTATGGACGCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 663
1.36	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAATTGGATGAACTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGGCCAACATA AAACAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAACAA CTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGAGGCT ATGGTACAGGGACTACGGTATGGACGCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 664
1.37	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAATTGGATGATCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGTGAGGAGCTGGAGTGGGGCCAACATAA ACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAACAA CTCACTGTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGGAGGCTA

[0202]

	CAGTAATTCCCACCTCGGTATGGACGTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTTC SEQ ID NO. 665
1.38	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAACTATTGGATGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGTGAGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCACTGTATCTGCAAATGAACACGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTATTACTGTGCGAGAGGGAGGTGAGGGCT ACAGTGATTCCCACCTACGGTACGGACGTGGGGCCAAGGGACCACGGTACTGTCTTC SEQ ID NO. 666
1.39	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAACTATTGGATGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGAAAGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAATGTTA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACACGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTATTACTGTGCGAGAGGGAGGTGAGGGCTA CAGTGATTCCCACCTACGGTACGGACGTGGGGCCAAGGGACCACGGTACTGTCTTC SEQ ID NO. 667
1.40	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAATTATTGGATGTTCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGAAAGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAATGTTA ACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACACGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTATTACTGTGCGAGAGGGAGGTGAGGGCTA CAGTGATTCCCACCTACGGTACGGACGTGGGGCCAAGGGACCACGGTACTGTCTTC SEQ ID NO. 668
1.41	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAATTATTGGATGTTCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGAAAGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAATGTTA ACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACACGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTATTACTGTGCGAGAGGGAGGTGAGGGCTA CAGTGATTCCCACCTACGGTACGGACGTGGGGCCAAGGGACCACGGTACTGTCTTC SEQ ID NO. 669
1.42	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG ATTCACCTTAGTAACTATTGGATGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGGAC TCACTGTATCTGCAAATGAACACGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTATTATTACTGTGCGAGAGGGGGGGAGGGTTA CAGTGATTCCCACCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTTC SEQ ID NO. 670
1.43	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAACTATTGGATGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGTGAGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAACGCCACGAA CTCACTGTCTGCAAATGAACACGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTTTATTACTGTGCGAGAGGGAGGTGATGGCT ACAGTAATTCCCACCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACTGTCTTC SEQ ID NO. 671
1.44	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTAGTGAACATTGGATGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGTGAGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAACGCCACGAA CTCACTGTCTGCAAATGAACACGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTTTATTACTGTGCGAGAGGGAGGTGATGGCT ACAGTAATTCCCACCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTTC SEQ ID NO. 672
1.45	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAAATATTGGATGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAATGTCAATAA CTATTGTATCTGCAAATGAACACGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTACTACTGTGCGAGAGGGAGGTGATGACT ACAGTAATTCCCACCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTTC SEQ ID NO. 673
1.46	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGGTCCAGCCTGGGGGGCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTAGTAACTATTGGATGAGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAG TCACTGTATCTGCAAATGAACACGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTTTATTACTGTGCGAGAGGGGGGGAGGAAT ATAGCAGCTCCCACCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTTC SEQ ID NO. 674

[0203]

	SEQ ID NO. 674
1.47	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTATAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAACTATTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGGAGAAATTACTATGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACACACTCACTGTATCTGCAAATGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGAGGGGGGGAGGATAGCACCTCGCACTACGGTATGGACGCTGGGGCAAGGGACCACGGTACCTGTCTCTCA SEQ ID NO. 675
1.48	CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAACTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGGAGAAATTACTATGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACACACTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGAGGGGGGGAGGCTATGGTGCAGGACTACGGGTTGGACGCTCGGGCAAGGGACCACGGTACCTGTCTCTCA SEQ ID NO. 676
1.49	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGGAGGCTCTGGATTCACTTTAGTAACTATTGGATGCTCTGGATGCTCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAATGTTAACCAAGATGGAAGTGGAGAAATTACTATGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACACACTCACTGTATCTGCAAATGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGAGGGAGGAGTGTGACTCGGTAACCTCCACTACGGTATGGACGCTGGGGCAAGGGACCACGGTACCTGTCTCTCA SEQ ID NO. 677
1.50	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGCAGATCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAACTATTGGATGATCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGTGAGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAGAAATTACTATGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACACACTCACTGTATCTGCAAATGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGAGGGAGGAGTGTGACTCGTAATTCCACTACGGTATGGACGCTGGGGCAAGGGACCACGGTACCTGTCTCTCA SEQ ID NO. 678
1.51	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGAGGGCTCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAACTATTGGATGATCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGTGAGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAGAAATTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACGAACTCACTGTATCTGCAAATGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGAGGGAGGTGATGGCTACAGTAATTCCACTACGGTATGGACGCTGGGGCAAGGGACCACGGTACCTGTCTCTCA SEQ ID NO. 679
1.52	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAGATGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCCGGATTCACTTTAGTAATATTGGATGATCTGGTCCGCCAGGCTCCAGAAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAGAAATTACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACATACTCACTGTATCTGCAAATGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTACTACTGTGCAGAGAGGGAGGTGATGACTACAGTATCTCCACTACGGTATGGACGCTCGGGCAAGGGACCACGGTACCTGTCTCTCA SEQ ID NO. 680
1.53	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAGATTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGTAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAATATTGGATGATCTGGTCCGCCAGGCTCCAGAAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAGAAATTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACATACTATTGTATCTGAGATGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTACTACTGTGCAGAGAGGGAGGTGATGACTCAGTCACTCCACTACGGTATGGACGCTCGGGCAAGGGACCACGGTACCTGTCTCTCA SEQ ID NO. 681
1.54	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAGCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAACTATTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAGAAATTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACAACTCACTGTATCTGCAAATGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGAGGGGGTTGGCTACGGTACCTCCACTACGGTATGGACGCTGGGGCAAGGGACCACGGTACCTGTCTCTCA SEQ ID NO. 682
1.55	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTGGTAGTTATTGGCTGAATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGCAGTGGAGAAATTACTATGTGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACAACTCACTGTATCTGCAAATGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCAGAGAGGGAGGTGAGACTACGGTACCTCCACTACGGGATGGACGCTGGGGCAAGGGACCACGGTACCTGTCTCTCA SEQ ID NO. 683

[0204]

1.56	CAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGGAGAAATACTATGGACTCTGTGAAGGGCGATTACCATCTCCAGAGACACGCCAAGAACATCAGTGTATCTGCAAATGAGCAGCTGAGAGAAGAACAGGGCTATGTATTACTGTGCAGAGGGGGGGAGGCTATGGTGCAGCTCGGGCCAAGGGACCACGGTACTGTCTTCA SEQ ID NO. 684
1.57	CAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGGAAGATGGAAGTGGAGAAATACTATGGACTCTGTGAAGGGGCCATTACCATCTCCAGAGACACGCCAGGAACTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCTGAGAGAAGAACAGGGCTATGTATTACTGTGCAGAGGGGGGGAGGCTACGGTGACAACACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACTGTCTTCA SEQ ID NO. 685
1.58	GAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCACCTTAGAGCTATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCGGAATGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAGAAATACTATGGACTCTGTGAAGGGGCCATTACCATCTCCAGAGACACGCCAAGAACCTCACTGTCTGCAAATGAGCAGCTGAGAGAAGAACAGGGCTTTTACTGTGCAGAGGGGGGGAGGCTACGGTGACCTCCACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTTCA SEQ ID NO. 686
1.59	CAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGCAGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAGAAATACTATGGACTCTGTGAAGGGGCCATTACCATCTCCAGAGACACGCCAAGAACATCAGTGTATCTGCAAATGAGCAGCTGAGAGAAGAACAGGGCTGTTTACTGTGCAGAGGGGGGGAGGCTACGGTGACCTCCACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTTCA SEQ ID NO. 687
1.60	GAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCACCTTAGACTATTGGATGAGCTGGTACCGCAGGCTCCAGGTGAGAAGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGGCCATTACCATCTCCAGAGACACGCCACGAACTCACTGTCTGCAAATGAGCAGCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTTTACTGTGCAGAGGGAGGTGATCGCTACGTAATTCCCACCTCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTTCA SEQ ID NO. 688
1.61	GAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACTCAGTAACATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAAAATACTATGTAGACTCTGTGAAGGGGCCATTACCATCTCCAGAGACACGCCAAGAACATCAGTGTCTGCAAATGAGCAGCTGAGAGGCGACGACACGGCTGTGTTACTGTGCAGAGGGGGGGTTGGCTACGGTGACTCCACCTCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTTCA SEQ ID NO. 689
1.62	GAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCAACTTGTAGACTATTGGATGAGCTGGTCCCGTCAGGCTCCAGGGAAAGGAGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAAAATACTATGTAGACTCTGTGAAGGGGCCATTACCATTTCAAGAGACACGCCAAGAACCTCACTGTCTGCAAATGAGCAGCTGAGAGGCGACGACACGGCTGTGTTTACTGTGCAGAGGGGGGGTTGGCTACGGTGACTCCACCTCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTTCA SEQ ID NO. 690
1.63	GAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCAACTTGTAGAGCTGGTCAAGGCTCCAGGGAAAGGAGGGCGGAATGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGGCCATTACCATCTCCAGAGACACGCCAAGAACATCAGTGTCTGCAAATGAGCAGCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTTTACTGTGCAGAGGGGGGGGGGACTACGGTGACCTCCACCGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTTCA SEQ ID NO. 691
1.64	GAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCAACTTGTAGAGCTGGTCAAGGCTCCAGGGAAAGGAGGGCGGAATGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGGCCATTACCATCTCCAGAGACACGCCAAGAACCTCACTGTCTGCAAATGAGCAGCTGAGAGGCGACGACACGGCTGTTTACTGTGCAGAGGGGGGGGGACTACGGTGACCTCCACCTCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTTCA SEQ ID NO. 692
1.65	GAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCAACTTGTAGAGCTGGTCAAGGCTCCAGGGAAAGGAGGGCGGAATGGGTGGCCAACATAAACCAAGATGGAAGTGGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGGCCATTACCATCTCCAGAGACACGCCAAGAACATCAGTGTCTGCAAATGAGCAGCTGAGAGGCGACGACACGGCTGTTTACTGTGCAGAGGGGGGGGGACTACGGTGACCTCCACCTCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTTCA SEQ ID NO. 693

[0205]

	GATTACACCTTAGTAACTATTGGATGATCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGTGAGGAGCTGGAGTGGGTGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACAGAA CTCACTGTATCTGCAAATGCACGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAGAGGGAGGTGAAGACT ACGGTAACCTCCACTACGGCATGGACGCTGGGGCAAGGGACCATGGTACCGTCTTCA SEQ ID NO. 693
1.66	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTAACTATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACAGAG CTCACTGTATCTGCAAATGAACACGGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTCTGTGCGAGAGGGGGGAAGGCTA TGGTGTGACCAACTACGGTTGGACGCTCGGGCAAGGGACACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 694
1.67	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG ATTACACCTTAGTAACTATTGGATGATCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGCCAACATA ATCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACAGAG TCACGTATCTGCAAATGAACACGGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTCTGTGCGAGAGGGGGGAAGGCTA TGGTGTGACCAACTACGGTTGGACGCTCGGGCAAGGGACACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 695
1.68	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG ATTACACCTTAGTAACTATTGGATGATCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGCCAACATA ACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACAGAG TCACGTATCTGCAAATGAACACGGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTCTGTGCGAGAGGGGGGAAGGCTA TGGTGTGACCAACTACGGTATGGACGCTCGGGCAAGGGACACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 696
1.69	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTAACTATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACAGAG CTCACTGTTCTGCAAATGAACACGGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAGAGGGGGGAAGGCTA ATGGTCCGACCAACTACGGTATGGACGCTCGGGCAAGGGACACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 697
1.70	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTAACTATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGTCAAGAG CTCACTGTTCTGCAAATGAACACGGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAGAGGGGGTGGCT ACGGTGAACCTCCACTACGGTATGGACGCTCGGGCAAGGGACACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 698
1.71	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTAACTATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGCCAACATA AACCAAAATGGAAGTGAGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACAGAG CTCACTGTATCTGCAAATGAACACGGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAGAGGGGGTGTGACT ACAGTAACCTCCACTACGGTATGGACGCTAGCGGCCAGGGACACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 699
1.72	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG ATTACACCTTAGTAACTATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGCCAACATA ACCAAGATGGAAGTGAAAGATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAACAC TCACGTATCTGCAAATGAACACGGCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTCTGTGCGAGAGGGGGGGGAAGGCT ATGGTGTGACCAACTACGGTTGGACGCTCGGGCAAGGGACACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 700
1.73	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTAAGGTTATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCGAATGGGTGCCAACATA AACCCAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGACACGGCTCTTATTACTGTGCGAGAGGGGGCCGGCTA CGGTGACCTCCACTACGGTATGGACGCTCGGGCAAGGGACACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 701
1.74	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTG GATTACACCTTAGTAACTATTGGATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGCCAACATA

[0206]

	AATCAAGATGGAAGTAAAAAATCTATGTGACTCTGTGGAGCCGATTCAACCATCTCAGAGACAACGCCAAGAGCTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCTSEQ ID NO. 702
1.75	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTGATTACACCTTAAGTGAACACTATGGATGAACGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGGACTCTGTGAAGGGCGATTCAACATCTCAGAGACAACGCCAAGAACCTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCTATGGTGCAGCAGCTACCGGTTGGACGTCGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTTCASEQ ID NO. 703
1.76	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTGGATTACACCTTAAGTGAACACTATGGATGAACGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGGACTCTGTGAAGGGCGATTCAACATCTCAGAGACAACGCCAAGAACCTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCTATGGTGCAGCAGCTACCGGTTGGACGTCGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTTCASEQ ID NO. 704
1.77	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTGATTACACCTTAAGTGAACACTATGGATGAACGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGGACTCTGTGAAGGGCGATTCAACATCTCAGAGACAACGCCAAGAACCTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCTATGGTGCAGCAGCTACCGGTTGGACGTCGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTTCASEQ ID NO. 705
1.78	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTGGATTACACCTTAAGTGAACACTATGGATGAACGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCGATTCAACATCTCAGAGACAACGCCAAGAACCTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCTATGGTGCAGCAGCTACCGGTTGGACGTCGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTTCASEQ ID NO. 706
1.79	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTGGATTACACCTTAAGTGAACACTATGGATGAACGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCGATTCAACATCTCAGAGACAACGCCAAGAACCTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCTATGGTGCAGCAGCTACCGGTTGGACGTCGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTTCASEQ ID NO. 707
1.80	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTGGATTACACCTTAAGTGAACACTATGGATGAACGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCGATTCAACATCTCAGAGACAACGCCAAGACCTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCTATGGTGCAGCAGCTACCGGTTGGACGTCGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTTCASEQ ID NO. 708
1.81	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTGGATTACACCTTAAGTGAACACTATGGATGAACGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCGATTCAACATCTCAGAGACAACGCCAAGAACCTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCTATGGTGCAGCAGCTACCGGTTGGACGTCGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTTCASEQ ID NO. 709
1.82	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTGGATTACACCTTAAGTGAACACTATGGATGAACGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCGATTCAACATCTCAGAGACAACGCCAAGAACCTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCTATGGTGCAGCAGCTACCGGTTGGACGTCGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTTCASEQ ID NO. 710
1.83	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGAGGCCGGCTGGTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTGGATTACACCTTAAGTGAACACTATGGATGAACGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCGATTCAACATCTCAGAGACAACGCCAAGAACCTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCTATGGTGCAGCAGCTACCGGTTGGACGTCGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTTCASEQ ID NO. 711

[0207]

		CTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCT ATGGTGTGACCCTACGGTTGGACGCTCGGGCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 711
1.84		CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTG GATTACCTTAAGTAACTATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCT ATGGTGTGACCCTACGGTTGGACGCTCGGGCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 712
1.85		CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTG GATTACCTTAAGTAACTATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCT ATGGTGTGACCCTACGGTTGGACGCTCGGGCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 713
1.86		CAGGTGCAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTG GATTACCTTAAGTAACTATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCT ATGGTGTGACCCTACGGTTGGACGCTCGGGCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 714
1.87		CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAAACTCTCTGTGAGCCACTG ATTACCTTAAGTAACTATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGGCT CTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCT ATGGTGTGACCCTACGGTTGGACGCTCGGGCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 715
1.88		CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCACTG GATTACCTTAAGTAACTATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCT ATGGTGTGACCCTACGGTTGGACGCTCGGGCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 716
1.89		CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGAGGCTCCAGACTCTCTGTGAGCCCTG GATTACCTTGATGATTGGATGAACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATA AACCAAGATGGAAGTAAAGATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCACTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTTCTGTGCGAGAGGGGGGGAAAGGCT ATGGTGTGACCCTACGGTTGGACGCTCGGGCAAGGGACCACGGTCACTGTCTTCA SEQ ID NO. 717
1.90		GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCCTG GGATTACCTTAGTACCCATTGGATGACTGGTCCGTCAGGCTCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAC ATAAAGGAAGACGGAAAGTGGAGAAATACTATGAGGACTCTGTGGAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAACGCC AAGAACCTGGTATATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAAGACACGGCTGTATTAAGTGTGCGAGAGGGAGGT GATGGCTACAGTGACTCCACTCGGTGAGCTCGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTTCA SEQ ID NO. 718
1.91		GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCCTG GGATTACCTTAGTACCCATTGGATGACTGGTCCGTCAGGCTCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAC TAAGGAAGACGGAAAGTGGAGAAATACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAACGCC AGAACCTGGTATATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAAGACACGGCTGTATTAAGTGTGCGAGAGGGAGGT ATGGCTACAGTGACTCCACTCGGTGAGCTCGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTTCA SEQ ID NO. 719
1.92		GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCCTG GGATTACCTTAGTACCCATTGGATGACTGGTCCGTCAGGCTCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAC TAAGGAAGACGGAAAGTGGAGAAATACTATGAGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAACGCC AGAACCTGGTATATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAAGACACGGCTGTATTAAGTGTGCGAGAGGGAGGT

[0209]

	SEQ ID NO. 729
1.10 2	GAGGTGAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGCCCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCCTCTGGATTCACTTTAGTAGCCATTGGATGACTGGTTCGGTCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCACATAAAGGAAGAGGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAGAACCTCGTTATATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTGATGGCTACAGTGACTCCCACTTCGGTGTGGACGTCTGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTCCCTCA SEQ ID NO. 730
1.10 3	GAGGTGAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGCCCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCCTCTGGATTCACTTTAGTAGCCATTGGATGACTGGTTCGGTCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCACATAAAGGAAGAGGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAGAACCTCGTTATATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTGAGGGCTACAGTGACTCCCACTTCGGTGTGGACGTCTGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTCCCTCA SEQ ID NO. 731
1.10 4	GAGGTGAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGCCCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCCTCTGGATTCACTTTAGTAGCCATTGGATGACTGGTTCGGTCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCACATAAAGGAAGAGGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAGAACCTCGTTATATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTGTTGGCTACAGTATCTCCCACTTCGGTGTGGACGTCTGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTCCCTCA SEQ ID NO. 732
1.10 5	GAGGTGAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGCCCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCCTCTGGATTCACTTTAGTAGCCATTGGATGACTGGTTCGGTCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCACATAAAGGAAGAGCAGAAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAGAACCTCGTTATATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTGTTGGCTACAGTATCTCCCACTTCGGTGTGGACGTCTGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTCCCTCA SEQ ID NO. 733
1.10 6	GAGGTGAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGCCCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCCTCTGGATTCACTTTAGTAGCCATTGGATGACTGGTTCGGTCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCACATAAAGGAAGAGCAGAAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAGAACCTCGTTATATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTGAGGGCTACAGTATCTCCCACTTCGGTGTGGACGTCTGGGCAAGGGACCACGGTACCGTCTCCCTCA SEQ ID NO. 734
1.1 07	GAGGTGCAATTAGTCGAATCGGGGGGGGACTGGTCAAGCCGGGGAGGTAGCTGGCCTGTCCCTGTGCCGCATCTGGTTTACATTAAGTAACCTTGATGAAATTGGGTTCCTCAAGCGCTGGAAAGGGCTTAGAGTGGGTGGCTAATAATAAACCAAGGACGGGTCAGACGCTCAGTGGATTCAGTAAAGGGCTTCAGTAACTACGCGCTGTTACGAGGATAACAGCTGTGTATTCTGCGCGCTGGAGGGGAGGGTACGGGGTAGACCACTATGGGTTGGATGTCCTGGGACAAGGACACGGTCACTGTCACTAGTC SEQ ID NO. 881
1.1 08	GAGGTGAGCTGGTGTGGAGTCCGGCGGGCTGGTCCAAACCAAGGGGGGCGCTTCGCTTATCTTCGCGCTGCCACAGGGTTACCTGAGCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCAAGGCGCTGGGAAGGGGTTAGAGTGCGCTGCCAACATCAACCAAGACGGGTCAGAACECTACTACGTCGACTCGTCAAAGGCTGTTACGAGCTGTAAGGGCGTTTCACGATCTCCCGGCGATAACGCTAAAGAACCTCCCTGTTATGCAAATGAATAGCCTTCGTCGGGEGAGGAACTCGGGTTTATTCTGTCCTGCGCTGGAGGGATATGGGTTGACCAATTGGGTTGGATGTCCTGGGCAAGGGACAACGGTGACCGTGTCACTCC SEQ ID NO. 882
1.1 09	GAGGTCAACTTGTGAATCGGGTGGCGGATTAGTACAACCCGCCGGCTCGCTGCCTTATCTGTGTCGGCAACCGGATTACTTTATCAAACATTGGATGAAATTGGGTGCGCCAGGCTCAGGGAAAGCTCTGGAAATGGGTAGCGAAATATCAAACCAAGACGGGTCAGAACECTACTACGTCGACTCGTCAAAGGCTGTTACCATCTCTGTGACAATGCTAAAATTCTTGTATTGCAAATGAGGTCACTTCGTCGCTGAGGAACTGCGGTCTATTACTGTGCTCGCGGGGGGGAGGCTACGGAGTAGACCACTACGGGTTGGATGTTCTGAGACGGGAAACGACGGTTACTGTAAGGAGC SEQ ID NO. 883
1.1 10	GAGGTCACTTGTGAGTCCGGGGGGGATTAGTCAACCTGGCGGAAGGCTTCGCTGAGTTGTGCCCGGAGCGGGTACCTGCAAGCTCAGGTAAGGGTTAGAATGGGTGCGCTAACATCAAGGCTATTATGAGACTCGGTAAGGGCTGTTTACAATTCTGCGACAAACGCCAAAGACTCTTGTACCTTCAAATGAATTCTTACGCGCTGAGGACACTGCTGTATTTCTGTCGCGCTGGAGGGGAGGGATACGGAGTAGACCACTATGGGCTGGACGTTTCAAGGACAGGCACTACGGTAACTGTGTCCTCG SEQ ID NO. 884

1.1 11	GAGGTTCA GTT AGTAGAGTCCGGGGGAGGACTGGTACAACCTGGGGTAGTTGCGTCTGTGCAAGCCAGC GGTTTCACTTGTCTA ACT ATTGGATGAATTGGGTCGTCAAGCGCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGGTCAA ATAATCAAGATGGCAGCGAGCGTTATTACGTGAGCTAGTAAAGGGCCTCACGATTAGCCGATAATGCTAA GAACCTCTATATCTGAGATGTCATCTTGTGCGCAGGGACACGGCAGTTACTATTGCGACGTGGTGGCGAG GGATACGGCGTGGATCACTATGGTTGGACGTATCGGCAAGGGACTACCGTGA CTTGTGCTCT SEQ ID NO. 885
1.1 12	GAGGAGGTACGGCTTGTGAGTCTGGGGGGCTTGTCAACCGGGGGGGTCTTACGTTATCCTGTGCC CAGGATTTCAGTTAACGCAACTATTGGATGAACTGGGTCAGTCAGCTCCGGGGAAAGGGGCTGGAA ATATCAATCAGGATGGGTCGAACGCTACTACGTGATTCTGTTAAGGGTCGCTTACTATTCA AAGAACAGTCTTACCTCAATGAACACTCGTACGCCCTGAGGATACTGCTGTACTACTGTGCGCG AGGGATACGGTGTGCGATCATTATGGGCTGACGTAAGCGGGCAGGGTACGACGGTACGGTATCATCA SEQ ID NO. 556
1.1 13	GAGGTGCA GTT AGTAGAGTGGGGGGGGCTGGTCAACCGGGGGGGCTCGCTCGCCTGCGGCC GGATTAC CATTAAACTACTGGATGAATTGGGTCGCCAGGCTCCGGGCAAAGGTCTTGAGTGGTGGCG AAACATAATCAGGACGGGAGCGAGCGTTATTACGTGATTCTGTTAAGGGACGTTACTATCAGTC AAATCTCTGACTTACAGATGAACTACTCGTGTGAGGACACCCAGTGTACTACTGTGCTGCC GAGGATACGGCGTGCATCACTACGGCCTGATGTATCAGGACAGGGACTACAGTTACCGTCTTCC SEQ ID NO. 887
1.1 14	GAGGTGCA GTT AGTAGAGTGGGGGGGGCTGGTCAACCGGGGGGGCTCGCTCGCCTG GGTTACTCTGTCAAAATTATTGGATGAACTGGGTCGCCAGGCTCCGGGCAAAGGGGGTGGAGTGG TAATCAGGACGAATCGAGCGTTACTATGTTGATTCTGAAAAGGGCGCTTCACTATCTCGT GATAATGCTAAGAACAGTTGACCTGAGGACACGGGAGGACACGCCGTGATCACTGTG GAGAGAAGATCCCGTCA ACTGGA ACTACGGACTTTGACAATTGGGGCCAGGGAACCCGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 888

[0210] 表5编码V_H 2.1至2.51的核酸

名称	核苷酸序列
2.1	GAGGTGCA GTT AGTAGAGTGGGGGGGGCTGGTCAACCGGGGGGGCTCGCTCGCCTG GATTCACCTTCAGTGA CACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGGCTGGAGTGG TTTCACTATTA GTGGTAGTGGT GATATCATAGACTACCGCAGACTCTGTAAAGGGCCGATTCA CCATCTCAGGGACAACGCCAAC ACTCTGTATCTGAGATGAA ACAGCCTGAGGACAGCGAGGACACGCCGTGATCACTGTG GAGAGAAGATCCCGTCA ACTGGA ACTACGGACTTTGACAATTGGGGCCAGGGAACCCGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 735
2.2	GAGGTGCA GTT AGTAGAGTGGGGGGGGCTGGTCAACCGGGGGGGCTCGCTCGCCTG GATTCACCTTCAGTGA CACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGGCTGGAGTGG TTTCACTATTA GTGGTAGTGGT GATATCATAGACTACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCAGGGACAACGCCAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGACAGCGAGGACACGCCGTGATCACTGTG GAAAGAAGATCCCGTAT ACCTGGA ACTACGGACTTTGACAATTGGGGCCAGGGAACCCGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 736
2.3	GAGGTGCA GTT AGTAGAGTGGGGGGGGCTGGTCAACCGGGGGGGCTCGCTCGCCTG GATTCACCTTCAGTGA CACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGGCTGGAGTGG TTTCACTATTA GTGGTAGTGGT GATATCATAGACTACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCAGGGACAACGCCAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGACAGCGAGGACACGCCGTGATCACTGTG GAAAGAAGATCCCGTAT ACCTGGA ACTACGGACTTTGACAATTGGGGCCAGGGAACCCGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 737
2.4	GAGGTGCA GTT AGTAGAGTGGGGGGGGCTGGTCAACCGGGGGGGCTCGCTCGCCTG GATTCACCTTCAGTGA CACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGGCTGGAGTGG TTTCACTATTA GTGGTAGTGGT GATGTCACTGACTATGAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCAGGGACAACGCCAAC CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGAGCGAGGACACGCCGTGATCACTGTG GAAAGAAGATCCCGTATA CCTGGA ACTACGGACTTTGACAATTGGGGCCAGGGAACCCGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 738
2.5	GAGGTGCA GTT AGTAGAGTGGGGGGGGCTGGTCAACCGGGGGGGCTCGCTCGCCTG ATTCACCTTCAGTGA CACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGGCTGGAGTGG TTTCACTATTA GTGGTAGTGGT GATATCATAGACTATGAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCAGGGACAACGCCAAC AC

[0213]

	ACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAACCGGCGTGTACTGTGCGAAAGAACATTCCGTATACTGGAACACTACGGACTTGTACAATTGGGCCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 739
2.6	GAGGTGAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTA GTGGTAGTGGTATCATAGACTACGCGACTCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGGGACAACGCCAGAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGGACACGCCGTATCACTGTGCGAAAGAACATTCCGTATACTGGAAACTACGGACTTGTACAACGGGCCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 740
2.7	GAGGTGAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTA GTGGTAGTGGTACTACCATAGACTACGCGACTCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGGGACAACGCCAGAAC TCACTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGGACACGCCGTATCACTGTGCGAGAGAACATTCCGTATACTGGAAACTACGGACTTGTACAACGGGCCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 741
2.8	GAGGTGAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTA GTGGTAGTGGACTACCATAGACTACGCGACTCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGGGACAACGCCAGAAC TCACTATCTACAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGGACACGCCGTATCACTGTGCGAGAGAACATTCCGTATACTGGAAACTACGGACTTGTACAACGGGCCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 742
2.9	GAGGTGAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTATATGACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGACTGGAGTGGGATTTCATACATTA GTGGTAGTGGTATACCATAGACTACGCGAGCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGGGACAACGCCAGAAC TCACTGTATCTGAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGGACACGCCGTATCACTGTGCGAGAGAACATTCCGTATACTGGAAACTACGGACTTGTACAACGGGCCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 743
2.10	GAGGTGAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGACTGGAGTGGGATTTCATACATTA GTAGTAGTGGTAGTAACTAGATTACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCAGGGACAACGCCAGAAC TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGGACACGCCGTATCACTGTGCGAGAGAACATTCCGTATACTGGAAACTACGGACTTGTACAACGGGCCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 744
2.11	GAGGTGAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTATATGACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGACTGGAGTGGGATTTCATACATTA GTGGTAGTGGTATACCATAGACTACGCGAGCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGGGACAACGCCAGAAC TCACTATCTGAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGGACACGCCGTATCACTGTGCGAGAGAACATTCCGTATACTGGAAACTACGGACTTGTACAACGGGCCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 745
2.12	GAGGTGAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTA GTGGTAGTGGACTACCATAGACTACGCGAGCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGGGACAACGCCAGGAAG TCACTATCTGAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGGACACGCCGTATCACTGTGCGAGAGAACATTCCGTATACTGGAAACTACGGACTTGTACAACGGGCCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 746
2.13	CAGGTGAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCACACATTAG TAGTAGTGGTAATACCATAGACTACGCGAGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCAGGGACAACGCCAGAAC ACTTATCTGCAAATGAATAGCTGAGAGCCGAGGGACACGCCGTATTACTGTGCGAGAGAACATTCCGTCTTACCTGGAAACTACAGATTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 747
2.14	GAGGTGAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTATATGACCTGGTCCGCCAGGGAAAGGGACTGGAGTGGGATTTCATACATTAG TGGTAGTGGTATACCATAGACTACGCGAGCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGGGACAACGCCAGAACATT CACTGTATCTGAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGGACACGCCGTATCACTGTGCGAGAGAACATTCCGTCTTAC SEQ ID NO. 748

[0214]

	CCTGGAAC TACGGACTT GACC ACTGGGGCAAGGAACCTGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 748
2.15	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGGCCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCTGG ATT CACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGAGTGAGTTCACACATTAG TGGTAGTGGAACTACCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGCTTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAATT ACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAACCGCCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCTCGTTA CTGGAAC TACGGATTGACC ACTGGGGCAAGGAACCTGGTACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 749
2.16	CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGGCCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCTGG ATT CACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGAGTGAGTTCACACATTAG TAGTAGTGGAGTACCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAAC CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAACCGCCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCTCGTTA ACTGGAAC TACAGATTGACAA TGGGGCAAGGAACCTGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 750
2.17	CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGGCCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCTGG ATT CACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGAGTGAGTTCACACATTAG TAGTAGTGGAGTACCATATCCTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAAC ACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAACCGCCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCTCGTATAA GTGGAACTACAGATTGACAA TGGGGCAAGGAACCTGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 751
2.18	CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGGCCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCTGG GATT CACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGAGTGAGTTCACACATTAG TAGTAGTGGTATTACCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGCTTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAAC CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAACCGCCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCTCGTTAC CTGGAAC TACAGATTGACTACTGGGGCAAGGAACCTGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 752
2.19	CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGGCCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCTGG ATT CACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGAGTGAGTTCACACATTAG TGGTAGTGGTATTACCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGCTTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAAC ACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAACCGCCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCTCGTTAC TGGAAC TCGAATTGACAACTGGGGCAAGGAACCTGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 753
2.20	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGGCCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCTGG GATT CACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGAGTGAGTTCACACATTAG TAGTAGTGGTAGTACCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAAC CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAACCGCCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCTCGTATG CCTGGAAC TTTGACTTGACAACTGGGGCAAGGAACCTGGTACCGTCTCTCA SEQ ID NO. 754
2.21	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGGCCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCTGG GATT CACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGAGTGAGTTCACACATTAG TAGTAGTGGAACTACCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGCTTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAAT TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAACCGCCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATATCAGGAT GCCTGGAAC TACGGACTTGACCACTGGGGCAAGGAACCTGGTACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 755
2.22	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGGCCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCTGG ATT CACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGAGTGAGTTCACACATTAG TGGTAGTGGAACTACCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGCTTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGGATT CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAACCGCCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATATCAGGATG CCTGGAAC TACGGATTGACCACTGGGGCAAGGAACCTGGTACTGTCTCTCA SEQ ID NO. 756
2.23	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTCAAGGCCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCTGG ATT CACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGAGTGAGTTCACACATTAG TGGTAGTGGAACTACCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGCTTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAATT ACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAACCGCCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATATCAGGATG CTGGAAC TACGGATTGACCACTGGGGCAAGGAACCTGGTACTGTCTCTCA

[0215]

	SEQ ID NO. 757
2.24	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCTGGATTCACCTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTGGTAGTGGAACTACCATAGACTACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGCTTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAATTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCCAGAGAAGATATCAGGATGCTGGAACATCGGACTTTGACCACTGGGCCAAGGAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 758
2.25	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTAAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCGCCTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTGGTAGTGGAACTACCATAGACTACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAATTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGACACGGCGTGTATTACTGTGCCAGAGAAGATATCAGGATGCTGGAACATCGGACTTTGACCACTGGGCCAGGGAAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 759
2.26	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATCTACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAATTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCCAGAGAAGATATCAGGATGCTGGAACATCGGACTTTGACCACTGGGCCAGGGAAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 760
2.27	CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCACCTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATAGACTACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAAACAACCTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCCAGAGAAGATATCAGTATGAGTGGGACTACGGACTTTGACCACTGGGCCAGGGAAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 761
2.28	CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCATCTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATAGACTACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAAAGAAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCCAGAGAAGATATCAGGATGTTAAAGTGGAACTATAGATTTGACTCTGGGCCAGGGAAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 762
2.29	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCGCCTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTGGTAGTGGAACTACCATAGACTACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAAATTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCCAGAGAAGATATCAGGATGCCCTGGAACATCGGACTTTGACCACTGGGCCAGGGAAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 763
2.30	CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCGCCAGGCTCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAAAGAAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCCAGAGAAGATCTCGTGTGCTGGAACATCGGACTTTGACCACTGGGCCAGGGAAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 764
2.31	CAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTGGCAGTGGTAGTACCATAGACTACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAAATTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCCAGAGAAGATGGCCGTATACTGGAAACTACGGACTTTGACCACTGGGCCAGGGAAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 765
2.32	GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCGCCTCAGTGACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTAGTAGTGGAACTACCATAGACTACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAGGAAATTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCCAGAGAAGATATCAGGATGCCCTGGAACATCGGACTTTGACCACTGGGCCAGGGAAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 766

[0216]

2.33	CAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCCTCACTGACTACTCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTAGTAGTGGTAAATCCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCAGGGACAACGCCAAGAACACTACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCCTCGTTACCTGGAACATCAGATTTGACTCTGGGGCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 767
2.34	CAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCCTCACTGACTACTCATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTAATCTGGTAGTACCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAAGAACACTACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCCTCGTTACCTGGAACATCAGATTTGACTCTGGGGCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 768
2.35	CAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCCCCCTCACTGACTACTCATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAAGAACACTACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCCTCGTTACCTGGAACATCAGATTTGACTCTGGGGCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 769
2.36	CAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCCTAGTAGTATTGGATGAGCTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAAGAACACTACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCCTCGTTACCTGGAACATCAGATTTGACTCTGGGGCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 770
2.37	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCCCCCTAGTAATACCTCATGAGTTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTAGTAGTGGTAATACCATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGTTACCATCTCAGGGACAACGCCAAGAACACTACTTTATCTGCAAATGGATAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCCTCGTTACCTGGAACATCAGATTTGACTCTGGGGCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 771
2.38	GAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCCCCCTAGTAGTACCATGACCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGACAGGAATGGATTACATACATTAGTAGTGGTAGCACCACATACACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAAGAACACTACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGAAATCCCGTTACCTGGAACATGGACTTTGACTATTGGGGCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 772
2.39	CAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCCCCCTAGTAGTACCATGACCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCAACATAAACAAAGATGGAGAATACTATGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGAGACAACGCCAAGAACACTACTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGGGATCCTCGTTACCTGGAACATCAGATTTGACTATTGGGGCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 773
2.40	GAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGGGGCTTAAGACTCTCTGTGTAGCCTCTGGGATTCCCCCTAGTAGTACCATGACCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAGGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTAGTGGTAGTGGATACATAGACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCGAGAACTCACTATATTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCCCGTTACCTGGAACATGGACTTTGACTATTGGGGCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 774
2.4 1	GAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCCCCCTAGTAGTACCATGACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCATACATTAGTAGTGGTAGTGGATACATAGACTACGCAGACTCTGTAAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAAAGACTCTGTATCTGCAAATGAACACACTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCCCGTCACTGCTAATGGTCAAATGGAACTACGGACTTGACAAATTGGGGCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 775
2.4	GAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGGATTCCCCCTAGTAGTACCATGACCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTTCACACATTAGTAGTGGTAGTGGATACATAGACTACGCAGACTCTGTAAAGGGCCGATTACCATCTCAGGGACAACGCCAAAGACTCTGTATCTGCAAATGAACACACTGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCAGAGAAGATCCCGTCACTGCTAATGGTCAAATGGAACTACGGACTTGACAAATTGGGGCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCTCASEQ ID NO. 776

[0217]

2	GGATTCACCTCAGTGA... SEQ ID NO. 776
2.4 3	GAGGTGCA... SEQ ID NO. 777
2.4 4	GAGGTGCA... SEQ ID NO. 778
2.4 5	GAGGTGCA... SEQ ID NO. 779
2.4 6	GAGGTGCA... SEQ ID NO. 780
2.4 7	GAGGTGCA... SEQ ID NO. 781
2.4 8	GAGGTGCA... SEQ ID NO. 782
2.4 9	GAGGTGCA... SEQ ID NO. 783
2.5 0	GAGGTGCA... SEQ ID NO. 784
2.5 1	GAGGTGCA... SEQ ID NO. 785

TTAGTGGTAGTGGTGA...
GAAC...
CGTCTA...
SEQ ID NO. 785

[0218] 在一个实施方案中,核酸序列与以上选择的序列中的一个具有至少50%的序列同源性。在一个实施方案中,所述序列同源性为至少70%,71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一个实施方案中,该核酸选自SEQ ID No 629,706,881,882,883,884,885,996,887或735中的一个或与其具有至少75%同源性的序列。

[0219] 根据本发明的核酸可以包含DNA或RNA,并且可以是全部或部分合成的或重组产生

的。除非上下文另有要求,否则本文述的核苷酸序列涵盖具有特定序列的DNA分子,并且涵盖具有其中用U置换T的特定序列的RNA分子。

[0220] 此外,本发明涉及包含至少一种如上定义的核酸的核酸构建体。构建体可以是质粒、载体、转录或表达盒的形式。

[0221] 本发明还涉及包含一种或更多种如上所述的核酸构建体的分离的重组宿主细胞。宿主细胞可以是细菌、病毒、植物,哺乳动物或其他合适的宿主细胞。在一个实施方案中,细胞是大肠杆菌细胞。在另一个实施方案中,细胞是酵母细胞。在另一个实施方案中,细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0222] 在一个实施方案中,提供制备如本文所述的抗CD137单结构域抗体的方法,其中该方法包括在适于表达编码该单结构域抗体的多核苷酸的条件下培养宿主细胞,并分离该单结构域抗体。

[0223] 在另一个方面,提供结合分子,例如抗体、抗体片段或抗体模拟物,所述结合分子结合在人CD137上的与本发明的任何CD137单结构域抗体相同的表位处或附近或重叠表位(即具有与本发明的任何单结构域抗体交叉竞争结合CD137的能力的抗体。本发明的单结构域抗体因此可用作参照抗体)。在一些实施方案中,用于交叉竞争研究的参照抗体是单结构域抗体1.1 (SEQ ID No.4)。这样的交叉竞争抗体可以基于它们在标准CD137结合测定中与本文所述的单结构域抗体交叉竞争的能力来鉴定。例如,可以使用BIAcore®分析、ELISA测定或流式细胞术来证明与单结构域抗体的交叉竞争。

[0224] 在一个实施方案中,提供能够结合人CD137的结合剂,其中上述单结构域抗体中的任一种在竞争性测定中替代所述结合剂。在一个实施方案中,所述单结构域抗体是V_H 1.1 (SEQ ID No.4)、V_H 1.78 (SEQ ID No.312)、V_H 1.113 (SEQ ID No.876) 或V_H 2.1 (SEQ ID No.428) 或与其具有至少75%同源性的序列。在一些实施方案中,结合剂是抗体、其功能片段,例如单结构域抗体、抗体模拟蛋白或模拟CD137的天然配体的蛋白。在另一个方面,提供能够结合人CD137的结合剂,其中所述结合剂在竞争性测定中替代上述单结构域抗体中的任一种。在一个实施方案中,所述单结构域抗体是V_H 1.1 (SEQ ID No.4)、V_H 1.78 (SEQ ID No.312)、V_H 1.113 (SEQ ID No.876) 或V_H 2.1 (SEQ ID No.428) 或与其具有至少75%同源性的序列。在另一个方面,本发明提供能够结合人CD137的结合剂,其中所述结合剂结合与本发明的单结构域抗体基本上相同的表位。

[0225] 在另一个方面,我们提供分离的仅有重链的抗体,其包含如本文所述的V_H结构域或与其具有至少70%、80%或90%同源性。仅有重链的抗体可以从本文所述的表达人V、D和J区的转基因哺乳动物中分离。

[0226] 本文所述的单可变重链结构域抗体可以用作多特异性例如双特异性结合剂中的构建块,所述结合剂提供CD137表达细胞和例如表达肿瘤特异性抗原的细胞的双重靶向。因此,我们提供本文所述的单可变重链结构域抗体在结合分子中的用途,用于CD137和第二抗原例如肿瘤特异性抗原的双重接合,例如同时接合。这种结合分子同时结合至少两种不同的靶标。如下所述,在一些实施方案中,提供制备结合剂的方法,所述结合剂提供CD137表达细胞和例如表达肿瘤特异性抗原的细胞的双重靶向。将编码本文所述的(例如上文所列)单可变重链结构域抗体的核酸与编码接头肽的核酸连接,所述接头肽又与编码例如编码肿瘤特异性抗原的单可变重链结构域抗体的核酸连接。核酸构建体可以在宿主细胞中表达,例

如细菌、哺乳动物或酵母细胞。

[0227] 示例性多特异性结合分子

[0228] 在一个方面,提供一种结合分子,其包含本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体和结合第二抗原例如肿瘤特异性抗原的至少第二部分。术语结合剂和结合分子在本文中可互换使用。结合分子可以是融合蛋白。

[0229] 在一个实施方案中,所述至少第二部分是结合分子,所述结合分子例如选自抗体或抗体片段(例如Fab、F(ab')2、Fv、单链Fv片段(scFv)或单结构域抗体,例如V_H或V_{HH}结构域)或抗体模拟蛋白。在一个实施方案中,本发明的单结构域抗体能够连接于抗体Fc区或其片段,所述抗体Fc区或其片段包含C_H2和C_H3结构域中的一个或两个,和任选地铰链区。在一个实施方案中,所述至少第二部分是V_H结构域。

[0230] 结合剂可以是多特异性的,例如双特异性的。在一个实施方案中,所述结合分子包含如本文所述的结合CD137的第一V_H单结构域抗体(V_H(A))和结合另一抗原的第二V_H单结构域抗体(V_H(B)),并因此具有下式:V_H(A)-L-V_H(B)。V_H(A)与V_H(B)缀合,即例如用肽接头与V_H(B)连接。L表示接头。

[0231] 每个V_H包含CDR和FR区。因此,所述结合分子可具有下式:FR1(A)-CDR1(A)-FR2(A)-CDR2(A)-FR3(A)-CDR3(A)-FR4(A)-L-FR1(B)-CDR1(B)-FR2(B)-CDR2(BA)-FR3(B)-CDR3(B)-FR4(B)。单VH结构域A和B的次序没有特别限制,使得在本发明的多肽内,单可变结构域A可位于N末端并且单可变结构域B可以位于C末端,反之亦然。

[0232] 在一个实施方案中,结合分子是双特异性的。因此,在一个方面,本发明涉及双特异性分子,其包含本文所述的单结构域抗体,所述单结构域抗体与具有不同于所述单结构域抗体的结合特异性的第二功能部分连接。

[0233] 术语“肽接头”是指包含一个或更多个氨基酸的肽。肽接头包含1至44个氨基酸,更特别地2至20个氨基酸。肽接头是本领域已知的或在本文中描述的。合适的非免疫原性接头肽是,例如,包括G和/或S残基、(G4S)_n、(SG4)_n或G4(SG4)_n肽接头的接头,其中“n”通常为1和10之间的数字,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一个实施方案中,该肽例如选自由以下各项组成的组:GGGGS(SEQ ID NO:790)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:791)、SGGGGSGGGG(SEQ ID NO:792)、GGGGSGGGGSGGGG(SEQ ID NO:793)、GSGSGSGS(SEQ ID NO:794)、GGSGSGSG(SEQ ID NO:795)、GGSGSG(SEQ ID NO:796)和GGSG(SEQ ID NO:797)。

[0234] 在一个实施方案中,第二部分结合肿瘤特异性抗原。在一个实施方案中,提供包含以下的结合分子

[0235] a) 本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体和

[0236] b) 结合肿瘤特异性抗原的单可变重链结构域抗体。

[0237] 本文所用的肿瘤特异性抗原可以选自包括以下但不限于以下的列表:PSMA、Her2、CD123、CD19、CD20、CD22、CD23、CD74、BCMA、CD30、CD33、CD52、EGFR、CECAM6、CAXII、CD24、CEA、间皮素、cMet、TAG72、MUC1、MUC16、STEAP、EphvIII、FAP、GD2、IL-13Ra2、L1-CAM、PSCA、GPC3、Her3、gpA33、5T4和ROR1。与CD137和PSMA结合的示例性结合分子示于实施例中。

[0238] 在一个方面,本发明涉及结合分子,其包含与结合肿瘤特异性抗原的另一部分连接的如本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体,例如结合肿瘤特异性抗原的单可变重链结构域抗体,其中所述结合分子表现出一种或更多种以下性质:

[0239] (a) 以如实施例中所测量的KD结合人CD137；

[0240] (b) 抑制人CD137配体与在细胞表面表达的人CD137CD137配体之间的相互作用。可以如实施例6中所示进行测量。

[0241] (c) 不结合小鼠CD137；

[0242] (d) 结合表达CD137的细胞,但不结合不表达CD137的细胞。这可以如实施例6所示进行测量；

[0243] (e) 增加报告基因的活性。这可以如实施例9中所示进行测量。

[0244] (f) 如实施例10所示抑制体内肿瘤细胞生长；

[0245] (g) 促进CD8+T细胞扩增；

[0246] (h) 诱导细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的激活；

[0247] (i) 刺激CD8+细胞产生IL-2。这可以如实施例9所示进行测量；

[0248] (j) 诱导肿瘤特异性T细胞激活；

[0249] (k) 激活如实施例中所测量的T细胞中的CD137信号传导；

[0250] (l) 抑制激活诱导的细胞死亡；

[0251] (m) 提高T细胞存活率；

[0252] (n) 限制全身性T细胞激活；

[0253] (o) 增强T细胞的细胞毒效应子功能；

[0254] (p) 促进肿瘤抗原阳性肿瘤中抗肿瘤细胞的局部激活；

[0255] (q) 通过CD137阳性NK细胞激活增强抗体依赖性细胞毒性；

[0256] (r) 当与结合肿瘤特异性抗原的部分连接时,同时结合CD137和这样的肿瘤特异性抗原,例如PSMA；

[0257] (s) 结合食蟹猴CD137；

[0258] (t) 逆转T-reg细胞的调节子功能；

[0259] (u) 激活NK细胞；

[0260] (v) 将T细胞募集到肿瘤细胞。

[0261] 在一个实施方案中,结合分子表现出多于一种的以上性质,例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21种性质的组合或选自以上列表的所有性质,包括性质的任何组合。

[0262] 在一个实施方案中,所述结合分子是融合蛋白,所述融合蛋白包含与CD137结合的单可变重链结构域抗体,该单可变重链结构域抗体与结合肿瘤特异性抗原的单可变重链结构域抗体连接。接头是例如具有GS残基如(Gly4Ser)_n的肽接头,其中n=1至10,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。这种接头的例子如上所示。结合CD137的单可变重链结构域抗体可通过其N或C末端与其他多肽连接。

[0263] 上述融合蛋白能够同时结合效应细胞表面的CD137和肿瘤细胞的细胞表面展示的肿瘤特异性抗原。

[0264] 双重结合,例如同时结合,导致CD137受体多聚化,从而导致CD137信号传导。这导致T细胞激活。在一些实施方案中,两个靶标的共接合,即同时结合至那些靶标,导致肿瘤抗原特异性效应细胞激活并导致肿瘤细胞杀伤。

[0265] 在一些实施方案中,融合蛋白能够以与单价单重链结构域抗体结合CD137的EC50

值至少相似、相当或等同的EC50值结合CD137。在一些实施方案中,如实施例中所示,融合蛋白以EC50值结合CD137。

[0266] 在一些实施方案中,融合蛋白可能基本上如实施例中所述的能够在功能性T细胞激活中共刺激T细胞应答。在一些实施方案中,本文所述的融合蛋白可能能够在功能性T细胞激活中诱导IL-2和/或IFN γ 分泌和T细胞增殖。在一些实施方案中,本文所述的融合多肽还能够在被靶向的肿瘤附近局部诱导IL-2和/或IFN γ 分泌,被靶向的肿瘤附近是对融合蛋白结合的肿瘤抗原呈阳性的细胞。

[0267] 在一些实施方案中,融合蛋白可能能够通过CD137表达细胞和肿瘤抗原表达细胞的双重靶向而产生协同作用。

[0268] 在另一个方面,提供编码本文描述的融合蛋白的核酸。还提供包含此类核酸的载体和表达此类载体的宿主细胞。

[0269] 在一个实施方案中,如本文所述的结合分子以,如根据实施例中所示的方法所测量的,约0.4nM或约3nM的KD结合CD137。结合可以如实施例中所述进行测量。

[0270] 在肿瘤微环境中同时靶向CD137和肿瘤相关抗原可增强抗肿瘤活性并减少肿瘤生长。此外,通过局部引发CD137信号传导,可减少副作用。

[0271] CD137信号传导导致TRAF家族成员的募集和激酶的激活。T细胞介导的信号传导保护CD8+细胞免于激活诱导的死亡。

[0272] 还提供本文所述的融合蛋白在共刺激T细胞中的用途。

[0273] 示例性修饰

[0274] 在一个实施方案中,上述单结构域抗体或结合剂包含另外的结合分子。因此,结合剂可以例如是三特异性的或四特异性的。还设想了额外的特异性。上述分子的任何组合均可以在多特异性结合剂中制备,例如,三特异性结合剂,其包括如本文所述的结合CD137的单结构域抗体以及第二和第三结合特异性。

[0275] 在一个实施方案中,结合分子包含如本文所述的结合CD137的第一V_H单结构域抗体(V_H(A))和各自结合另一抗原的第二、第三、第四、第五等部分。该部分可以是与另一抗原结合的V_H单结构域抗体(V_H(B),V_H(C),V_H(D),V_H(E)(),因此该试剂具有下式:V_H(A)-L-V_H(B)-L-V_H(X)n,其中X表示与除靶标V_H(A)和V_H(B)所结合的靶标之外的靶标结合的V_H,并且其中n是1至10,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。L表示接头,例如肽接头。接头可以是具有GS残基的肽接头,例如如上所述的(Gly4Ser)n。在一个实施方案中,V_H结构域的顺序是相反的。换句话说,结合CD137的单可变重链结构域抗体通过其C或N末端与另一实体连接。

[0276] 在另一个实施方案中,另外的部分可用于延长结合分子的半衰期。另外的部分可以包含结合血清白蛋白例如人血清白蛋白(HSA)或小鼠血清白蛋白(MSA)的蛋白质,例如抗体或其部分。另外的部分可以包含结合血清白蛋白例如人血清白蛋白(HSA)或小鼠血清白蛋白(MSA)的V_H结构域,例如如SEQ ID NO.901所示。

[0277] 所述另外的部分可包含血清白蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)或其变体,例如HSA C34S。进一步提供如本文所述的结合分子,其包含如本文所述的VH结构域和Fc结构域,例如其中所述VH结构域融合至Fc结构域。进一步提供包含特异性结合第二抗原的第二可变结构域的结合分子,其中所述第二抗原是除人CD137之外的抗原。第二抗原可以是分化簇(CD)分子或主要组织相容性复合物(MHC)II类分子。

[0278] 在一个实施方案中,抗CD137单结构域抗体或多价结合剂用可检测的或功能性标记物标记。标记物可以是产生或可被诱导产生信号的任何分子,包括但不限于荧光基团、荧光剂、放射性标记物、酶、化学发光剂、核磁共振活性标记物或光敏剂。因此,可以通过检测荧光或发光、放射性、酶活性或光吸收来检测和/或测量结合。

[0279] 在其它实施方案中,抗CD137单结构域抗体或多价结合剂偶联于至少一种治疗性部分,例如药物、酶或毒素。在一个实施方案中,所述治疗部分是毒素,例如细胞毒性放射性核素、化学毒素或蛋白质毒素。

[0280] 在另一个方面,本发明的抗CD137单结构域抗体或多价结合剂被修饰以增加半衰期,例如通过化学修饰,特别是通过聚乙二醇化,或通过掺入脂质体或使用血清白蛋白蛋白质。增加的半衰期也可以通过将所述分子与抗体片段,例如增加半衰期的V_H结构域缀合而赋予。

[0281] 如本文所用,术语“半衰期”是指例如由于序列或化合物的降解和/或序列或化合物通过自然机制的清除或隔离(sequestration)而在体内使氨基酸序列、化合物或多肽的血清浓度降低50%所花费的时间。半衰期可以比本发明的相应的V_H单结构域抗体的半衰期提高至少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。例如,与本发明的相应的V_H单结构域抗体或融合蛋白相比,增加的半衰期可以大于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。本发明的氨基酸序列、化合物或多肽的体内半衰期可以以本身已知的任何方式,例如通过药代动力学分析,而确定。合适的技术对于本领域技术人员将是清楚的。半衰期例如可以使用诸如t_{1/2-α} t_{1/2-β}和曲线下面积(AUC)的参数表示。

[0282] 为了生成如上所述的多价结合剂和融合蛋白,两个或更多个多肽可以通过接头例如多肽接头连接。合适的接头包括例如具有GS残基(例如(Gly₄Ser)_n)的接头,其中n=1至10,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0283] 用于制备单结构域抗体的示例性方法

[0284] 本文所述的单结构域抗体可以获得自转基因哺乳动物例如啮齿动物,所述动物在用CD137抗原刺激后表达仅有重链的抗体。转基因啮齿动物,例如小鼠,优选具有降低的表达内源性抗体基因的能力。因此,在一个实施方案中,啮齿动物具有降低的表达内源性轻链和/或重链抗体基因的能力。啮齿动物例如小鼠因此可以包含修饰以破坏内源性κ和λ轻链和/或重链抗体基因的表达,从而不产生功能性轻链和/或重链,例如如下文进一步解释的。

[0285] 一方面还涉及用于产生能够结合人CD137的仅有重链的抗体的方法,所述方法包括

[0286] a) 用CD137抗原免疫转基因啮齿动物,例如小鼠,其中所述啮齿动物表达包含未重排的人重链V基因的核酸构建体,并且不能产生功能性内源轻链或重链,

[0287] b) 分离仅有重链的人抗体。

[0288] 进一步的步骤可以包括分离V_H结构域形成所述仅有重链的抗体的V_H结构域,例如通过从所述啮齿动物(例如小鼠)生成包含V_H结构域序列的序列文库,并从所述文库中分离包含V_H结构域序列的序列。

[0289] 另一方面还涉及用于产生能够结合人CD137的单V_H结构域抗体的方法,所述方法包括

[0290] a) 用CD137抗原免疫转基因啮齿动物,其中所述啮齿动物例如小鼠表达包含未重排的人重链V基因的核酸构建体并且不能产生功能性内源轻链或重链,

[0291] b) 生成包含来自所述啮齿动物(例如小鼠)的V_H结构域序列的序列文库,和

[0292] c) 从所述文库分离包含V_H结构域序列的序列。

[0293] 进一步的步骤可以包括鉴定结合人CD137的单V_H结构域抗体或仅有重链的抗体,例如通过使用如实施例中所示的功能测定。

[0294] 使用体外表达文库制备或生成本文所述的多肽、核酸、宿主细胞、产物和组合物的方法可包括以下步骤:

[0295] a) 提供编码氨基酸序列的核酸序列的组、集合或文库;和

[0296] b) 在所述组、集合或文库中筛选能够结合CD137/对CD137具有亲和力的氨基酸序列和

[0297] c) 分离能够结合CD137/对CD137具有亲和力的氨基酸序列。

[0298] 在上述方法中,氨基酸序列的组、集合或文库可展示在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微生物(例如酵母)上,例如以便于筛选。用于展示和筛选氨基酸序列(的组、集合或文库)的合适方法、技术和宿主生物体对于本领域技术人员而言会是清楚的(参见例如 Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Academic Press; 第一版(1996年10月28日) Brian K. Kay, Jill Winter, John McCafferty)。

[0299] 文库,例如噬菌体文库,是通过分离表达抗原特异性的、仅有重链的抗体的细胞或组织,从源自分离的细胞或组织的mRNA克隆编码V_H结构域的序列,并使用文库展示编码的蛋白而生成的。一个或更多个V_H结构域可以在细菌、酵母或其他表达系统中表达。

[0300] 另一方面还涉及包含与CD137结合的V_H结构域的分离的V_H单结构域抗体或分离的仅有重链的抗体,所述V_H结构域包含人V_H种系序列的氨基酸产物或源自人V_H种系序列的氨基酸产物。仅有重链的抗体可以是完全人的或包含小鼠序列。

[0301] 在本文的各个方面和实施方案中,术语啮齿动物可以涉及小鼠或大鼠。在一个实施方案中,啮齿动物是小鼠。小鼠可以包含非功能性内源λ轻链基因座。因此,小鼠不会产生功能性内源λ轻链。在一个实施方案中,通过插入、倒位、重组事件、基因编辑或基因沉默,部分或完全缺失λ轻链基因座或使其没有功能。例如,如上所述,至少恒定区基因C1、C2和C3可以通过插入或其他修饰而缺失或使其没有功能。在一个实施方案中,所述基因座被功能性沉默,使得所述小鼠不产生功能性λ轻链。

[0302] 此外,小鼠可以包含非功能性内源κ轻链基因座。因此,小鼠不产生功能性内源κ轻链。在一个实施方案中,通过插入,倒位,重组事件,基因编辑或基因沉默,部分或完全缺失κ轻链基因座或使其没有功能。在一个实施方案中,所述基因座被功能性沉默,使得所述小鼠不产生功能性κ轻链。

[0303] 例如,可以如WO 2003/000737(其在此通过引用以其整体并入)中所公开的那样制备具有功能沉默的内源λ和κL链基因座的小鼠。

[0304] 此外,小鼠可以包含非功能性内源重链基因座。因此,小鼠不产生功能性内源重链。在一个实施方案中,通过插入,倒位,重组事件,基因编辑或基因沉默,部分或完全缺失重链基因座或使其没有功能。在一个实施方案中,所述基因座被功能性沉默,使得所述小鼠不产生功能性重链。

[0305] 例如,如WO 2004/076618(其在此通过引用以其整体并入)中所述,全部8个内源性重链恒定区免疫球蛋白基因(μ , δ , γ 3, γ 1, γ 2a, γ 2b, ϵ 和 α)在小鼠中不存在或部分不存在达到其没有功能的程度,或者基因 δ , γ 3, γ 1, γ 2a, γ 2b和 ϵ 不存在并且侧翼基因 μ 和 α 部分不存在达到使其没有功能的程度,或者基因 μ , δ , γ 3, γ 1, γ 2a, γ 2b和 ϵ 不存在并且 α 部分不存在达到使其没有功能的程度,或者 δ , γ 3, γ 1, γ 2a, γ 2b, ϵ 和 α 不存在并且 μ 部分不存在达到使其没有功能的程度。部分缺失是指内源基因座基因序列例如通过插入而缺失或破坏,以没有功能性内源基因产物被基因座编码的程度,即没有功能性产物从基因座表达。在另一个实施方案中,所述基因座功能性沉默。

[0306] 在一个实施方案中,小鼠包含非功能性内源重链基因座、非功能性内源 λ 轻链基因座和非功能性内源 κ 轻链基因座。因此小鼠不产生任何功能性内源轻链或重链。因此,该小鼠是三重敲除(TKO)小鼠。

[0307] 转基因小鼠可包含载体,例如用于表达异源的,优选人,重链基因座的酵母人工染色体(YAC)。YAC是能够采用用于在酵母中克隆非常大的DNA插入的载体。除了包含像天然酵母染色体的行为所必需的所有三种顺式作用结构元件(自主复制序列(ARS),着丝粒(CEN)和两个端粒(TEL))外,它们接受大DNA插入的能力使它们达到酵母细胞中染色体样稳定性以及传递的保真度所需的最小尺寸(150kb)。YAC的构建和使用在本领域是公知的(例如,Bruschi,C.V.和Gjuracic,K.Yeast Artificial Chromosomes,Encyclopedia of Life Sciences,2002Macmillan Publishers Ltd,Nature Publishing Group)。

[0308] 例如,YAC可以包含与缺乏C_H1结构域的小鼠免疫球蛋白恒定区基因、小鼠增强子和调控区组合的过量的未重排的人V_H、D和J基因。人V_H、D和J基因是人V_H、D和J基因座,且它们是完全人的未重排基因。

[0309] 本领域已知的备选方法可用于内源小鼠或大鼠免疫球蛋白基因的缺失或失活以及与缺乏C_H1结构域的小鼠免疫球蛋白恒定区基因、小鼠增强子和调控区组合的人V_H、D和J基因的导入。

[0310] 可以根据实施例中所阐明的标准技术来创建转基因小鼠。用于创建转基因小鼠的两种最具特征的途径是通过将遗传物质原核显微注射到新鲜受精的卵母细胞中或通过将稳定转染的胚胎干细胞引入桑椹胚或囊胚期胚胎。不管如何引入遗传物质,被操纵的胚胎都会转移到假妊娠的雌性接受者体内,在那里继续妊娠并生出候选的转基因幼崽。

[0311] 这些广泛的方法之间的主要区别在于ES克隆可以在用于产生转基因动物之前被广泛筛选。相反,原核显微注射依赖于在遗传物质引入后遗传物质整合到宿主基因组,并且一般而言,转基因的成功整合直到幼仔出生后才能被证实。

[0312] 本领域已知许多方法可协助并确定是否发生转基因的成功整合。转基因动物能够通过多种手段生成,包括将构建体随机整合到基因组中,位点特异性整合或同源重组。有多种工具和技术可用于驱动和选择转基因整合和后续修饰,包括使用药物抗性标志物(阳性选择),重组酶,重组介导的盒式交换,阴性选择技术和核酸酶来改善重组效率。大多数这些方法通常用于修饰ES细胞。然而,一些技术可用于增强通过原核注射介导的转基因。

[0313] 能够使用进一步的改进来在所需背景下提供转基因系的更有效地生成。如上所述,在优选的实施方案中,内源性小鼠免疫球蛋白表达被沉默以允许仅使用引入的转基因来表达能够被开发用于药物发现的仅有重链的储库(repertoire)。如上所述,能够使用遗

传操作的小鼠,例如针对所有内源性免疫球蛋白基因座(小鼠重链,小鼠κ链和小鼠λ链)沉默的TKO小鼠。任何引入的转基因转移到这种TKO背景能够通过育种(常规的或将IVF步骤包含在内的育种以提供该过程的有效缩放)来实现。然而,在转基因过程中包括TKO背景也是可能的。例如,对于显微注射,卵母细胞可以源自TKO供体。类似地,可衍生来自TKO胚胎的ES细胞用于转基因。

[0314] 已经导入转基因以表达免疫球蛋白基因座的三重敲除小鼠在本文中称为TKO/Tg。
[0315] 在一个实施方案中,小鼠如W02016/062990中所述。

[0316] 本发明还涉及表达人重链基因座并且已用CD137抗原免疫的啮齿动物,优选小鼠。本发明还涉及如上所述的表达仅有重链的抗体的啮齿动物,优选小鼠,所述仅有重链的抗体包含结合人CD137的人V_H结构域。优选地,所述啮齿动物不能够产生功能性内源κ和λ轻链和/或重链。人重链基因座位于可以如上所述的转基因上。

[0317] 本发明还涉及仅有抗人CD137单V_H结构域抗体或抗人CD137重链的抗体,所述抗体包含人V_H结构域或获自或可获自用人CD137抗原免疫并表达人重链基因座的啮齿动物,优选小鼠。优选地,所述啮齿动物不能够产生功能性内源κ和λ轻链和/或重链。人重链基因座位于可以如上所述的转基因上。

[0318] 示例性治疗性应用

[0319] 在一个方面,我们提供本文所述的单可变重链结构域抗体和本文所述的结合剂,其用作抗癌剂或免疫调节剂。

[0320] 在另一个方面,提供药物组合物,其包含如本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体,或包含含有如本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子,和任选的药学上可接受的载体。包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的单结构域抗体、结合分子或组合物或本发明的药物组合物可通过任何方便的途径施用,包括但不限于口服、局部、肠胃外、舌下、直肠、阴道、眼、鼻内、肺、皮内、玻璃体内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、脑内、透皮、透粘膜(transmucosal)、通过吸入或局部施用,尤其是对耳朵、鼻子、眼睛或皮肤,或通过吸入。

[0321] 肠胃外施用包括例如静脉内、肌内、动脉内、腹膜内、鼻内、直肠、膀胱内、皮内、局部或皮下施用。优选地,所述组合物肠胃外施用。

[0322] 药学上可接受的载体或媒介物(vehicle)可以是颗粒状的,使得该组合物为例如片剂或粉末形式。术语“载体”是指与本发明的药物抗体缀合物一起施用的稀释剂、佐剂或赋形剂。这样的药物载体可以是液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。载体可以是盐水,阿拉伯胶,明胶,淀粉糊,滑石粉,角蛋白,胶体二氧化硅,尿素等。另外,可以使用辅助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。在一个实施方案中,当施用于动物时,本发明的单结构域抗体或组合物和药学上可接受的载体是无菌的。当本发明的药物抗体缀合物静脉内施用时,水是优选的载体。盐水溶液以及葡萄糖水溶液和甘油溶液也可以用作液体载体,特别是用于注射溶液。合适的药物载体还包括赋形剂,例如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,本发明的组合物还可含有少量的湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。

[0323] 本发明的组合物能够是液体形式,例如溶液,乳液或悬浮液。该液体能够用于注

射,输注(例如IV输注)或皮下递送。

[0324] 当打算口服施用时,该组合物优选为固体或液体形式,其中半固体、半液体、悬浮液和凝胶形式包括在本文认为是固体或液体的形式中。

[0325] 作为用于口服施用的固体组合物,可以将所述组合物配制为粉剂、颗粒剂、压制片剂、丸剂、胶囊剂、口香糖、薄片(Wafer)等形式。这样的固体组合物通常包含一种或更多种惰性稀释剂。此外,可以存在以下一种或更多种:粘合剂,例如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素或明胶;赋形剂,例如淀粉、乳糖或糊精,崩解剂,例如海藻酸、海藻酸钠、玉米淀粉等;润滑剂,例如硬脂酸镁;助流剂,例如胶体二氧化硅;甜味剂,如蔗糖或糖精;调味剂,例如薄荷、水杨酸甲酯或橘子调味剂;和着色剂。当该组合物为胶囊(例如明胶胶囊)形式时,除上述类型的材料外,它还可包含液体载体,例如聚乙二醇、环糊精或脂肪油。

[0326] 该组合物可以是液体的形式,例如酏剂、糖浆、溶液、乳液或悬浮液。该液体可用于口服施用或通过注射递送。当打算口服施用时,组合物可包含甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和增味剂中的一种或更多种。在用于注射施用的组合物中,还可以包括表面活性剂,防腐剂、湿润剂、分散剂、悬浮剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂中的一种或更多种。

[0327] 组合物能够采取一个或更多个剂量单位的形式。

[0328] 在具体的实施方案中,可希望的是将组合物局部施用于需要治疗的区域,或通过注射、静脉内注射或输注。在一个实施方案中,组合物是包括注射笔的装置的一部分。组合物可以作为预填充注射器或其它自我施用装置提供。

[0329] 在治疗特定病症或病况中有效/有活性的治疗剂的量将取决于病症或病况的性质,并且能够通过标准临床技术来确定。此外,能够任选地采用体外或体内测定来帮助确定最佳剂量范围。组合物中使用的精确剂量还取决于施用途径和疾病或病症的严重程度,并应根据医师的判断和每位患者的情况来决定。应考虑年龄、体重、性别、饮食、施用时间、排泄率、宿主病况、药物组合、反应敏感性和疾病严重程度等因素。

[0330] 通常,该量为组合物重量的至少约0.01%的本发明的单结构域抗体。当打算口服施用时,该量可以在组合物重量的约0.1%至约80%的范围内变化。优选的口服组合物可以包含组合物重量的约4%至约50%的本发明的单结构域抗体。

[0331] 制备本发明的优选组合物,使得肠胃外剂量单位含有约0.01%至约2%重量的本发明的单结构域抗体。

[0332] 对于注射施用,组合物能够包含约通常约0.1mg/kg至约250mg/kg受试者体重,优选约0.1mg/kg至约20mg/kg动物体重,以及更多优选约1mg/kg至约10mg/kg动物体重。在一个实施方案中,组合物以约1至30mg/kg,例如约5至25mg/kg,约10至20mg/kg,约1至5mg/kg或约3mg的剂量施用。给药时间表可以从例如每周一次到每2、3或4周一次变化。

[0333] 本发明提供治疗哺乳动物例如人类患者中CD137介导的疾病或病症的方法,包括向有需要的哺乳动物施用有效量的本发明抗体。特别地,本发明还涉及用于预防和/或治疗选自癌症、免疫病症、神经疾病、炎性病症、变态反应、移植排斥、病毒感染、免疫缺陷和其它免疫系统相关病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用药物活性量的本发明的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子组合物或药物组合物,或本发明的药物组合物。

[0334] 如本文所用,“治疗(treat)”,“正在治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指

抑制或缓解疾病或病症。例如,治疗可以包括推迟与疾病或病症有关的症状的发生,和/或降低将或预期将随所述疾病发生的这类症状的严重性。这些术语包括改善现有症状,预防额外症状以及改善或预防此类症状的根本原因。因此,该术语表示对至少一些被治疗的哺乳动物,例如人类患者,给予了有益的结果。许多药物治疗对一些但并非全部接受治疗的患者有效。

[0335] 术语“受试者”或“患者”是指作为治疗、观察或实验对象的动物。仅作为示例,受试者包括但不限于哺乳动物,包括但不限于人类或非人类哺乳动物,例如非人类灵长动物、鼠、牛、马、犬、羊或猫。

[0336] 如本文所用,术语“有效量”是指抗CD137抗体的量,当其单独或与额外的治疗剂组合施用于细胞、组织或受试者时,该量在施用的条件下有效实现所需的治疗或预防作用。

[0337] 本发明还涉及本发明的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物,其用于治疗或预防疾病。

[0338] 在另一个方面,本发明涉及本发明的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物,其用于治疗或预防癌症、免疫病症、神经疾病、炎性病症、变态反应、移植排斥、病毒感染、免疫缺陷和其它免疫系统相关病症。

[0339] 在另一个方面,本发明涉及本发明的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物在治疗或预防疾病中的用途。

[0340] 在另一个方面,本发明涉及本发明的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物在制备用于治疗或预防癌症、免疫病症、神经疾病、炎性病症、变态反应、移植排斥、病毒感染、免疫缺陷和其它免疫系统相关病症的药物中的用途。

[0341] 癌症可选自实体瘤或非实体瘤。例如,癌症可以选自骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌症、胃癌、睾丸癌、乳腺癌、脑癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、肾癌、软组织肉瘤、尿道癌、膀胱癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、胸腺瘤、膀胱上皮癌白血病、前列腺癌、间皮瘤、肾上腺皮质癌、淋巴瘤,例如霍奇金病,非霍奇金病,胃癌和多发性骨髓瘤。

[0342] 在一个实施方案中,所述肿瘤是实体瘤。可以相应地治疗的实体瘤的例子包括乳腺癌、肺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、神经胶质瘤和淋巴瘤。此类肿瘤的一些例子包括表皮样肿瘤、鳞状肿瘤,例如头颈部肿瘤、结肠直肠肿瘤、前列腺肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤,包括小细胞和非小细胞肺肿瘤、胰腺肿瘤、甲状腺肿瘤、卵巢肿瘤和肝肿瘤。其它例子包括卡波西肉瘤、CNS、赘生物、成神经细胞瘤、毛细血管成血管细胞瘤、脑膜瘤和脑转移瘤、黑素瘤、胃肠道和肾癌和肉瘤、横纹肌肉瘤、成胶质细胞瘤,优选多形性成胶质细胞瘤和平滑肌肉瘤。本发明的拮抗剂对其有效的血管化皮肤癌的例子包括可以通过抑制恶性角质细胞如人恶性角质细胞的生长来治疗的鳞状细胞癌、基底细胞癌和皮肤癌。

[0343] 在一个实施方案中,所述肿瘤是非实体瘤。非实体瘤的例子包括白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤。

[0344] 在一个方面,所述癌症是局部晚期不可切除的、转移的或复发的癌症。

[0345] 优选的其生长可使用本发明的抗体抑制的癌症包括通常对免疫治疗有应答的癌症。用于治疗的优选癌症的非限制性例子包括黑素瘤(例如转移性恶性黑素瘤)、肾癌(例如透明细胞癌)、前列腺癌(例如激素难治性前列腺癌)、乳腺癌、结肠癌和肺癌(例如非小细胞肺癌)。

[0346] 在一个实施方案中,癌症在另一治疗例如化疗后已经进展。

[0347] 本文所述的竞争性CD137结合物抑制CD137配体与CD137的结合。这导致CD137受体接收的信号受到抑制。这对于治疗炎性和自身免疫性疾病是有利的,因此本文所述的单价结合分子可用于治疗此类疾病。

[0348] 免疫病症可以选自移植植物相对于宿主疾病、关节炎、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性爱迪生氏病、肾上腺自身免疫性疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少症、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多神经病、Churg-Strauss综合征、瘢痕性类天疱疮、CRET综合征、冷凝集素病、克罗恩病、盘状狼疮、原发性混合型冷沉球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、血管球性肾炎、格雷夫斯病、吉兰-巴雷综合征、桥本甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少紫癜(ITP)、IgA神经病变、幼年型关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、梅尼埃病、混合型结缔组织病、多发性硬化症、视神经脊髓炎(NMO)、1型糖尿病或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、寻常型天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎(*polychondritis*)、多腺综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性无丙球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬变、银屑病、银屑病性关节炎、雷诺氏现象、赖特综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、Sjogren氏综合征、全身肌强直综合征、系统性红斑狼疮、红斑狼疮、大动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如疱疹样皮炎血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿病。神经类疾病选自阿尔茨海默病、癫痫、帕金森病、痴呆、多发性硬化、周围神经病变或疱疹后神经痛。

[0349] 与其他试剂的示例性组合

[0350] 本发明的分子或药物组合物,可以作为唯一的活性成分或与一种或更多种其他治疗剂组合施用。治疗剂是可用于治疗疾病的化合物或分子。治疗剂的例子包括抗体、抗体片段、药物、毒素、核酸酶、激素、免疫调节剂、促凋亡剂(*pro-apoptotic agents*)、抗血管生成剂、硼化合物、光敏剂或染料和放射性同位素。抗体分子包括完整抗体或其片段(例如,Fab、F(ab')₂、Fv、单链Fv片段(scFv)或单结构域抗体,例如V_H结构域或抗体模拟蛋白。

[0351] 在一个实施方案中,本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物与现有疗法或治疗剂例如抗癌疗法组合使用。因此,在另一方面,本发明还涉及组合疗法,其包括施用本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物和抗癌疗法。

[0352] 抗癌疗法可包括治疗剂或放射疗法,并且包括基因疗法、病毒疗法、RNA疗法骨髓移植、纳米疗法、靶向抗癌疗法或溶瘤药物。其他治疗剂的例子包括其他检查点抑制剂、抗肿瘤剂、免疫原性试剂、减毒癌细胞、肿瘤抗原、抗原呈递细胞例如用肿瘤衍生抗原或核酸脉冲的树突细胞、免疫刺激细胞因子(例如IL-2, IFN α 2, GM-CSF)、靶向小分子和生物分子(例如信号转导途径的组分例如酪氨酸激酶的调节剂和受体酪氨酸激酶的抑制剂,以及与

肿瘤特异性抗原结合的试剂,包括EGFR拮抗剂)、抗炎剂、细胞毒性剂、放射性毒剂或免疫抑制剂和用编码免疫刺激性细胞因子(例如GM-CSF)的基因转染的细胞,化学疗法。在一个实施方案中,所述单结构域抗体与手术组合使用。

[0353] 在本发明的具体实施方案中,将本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物与化疗剂或与放射治疗同时施用。在另一个具体实施方案中,在施用本发明的组合物之前或之后,优选在施用本发明的组合物之前或之后至少一小时、五小时、12小时、一天、一周、一个月、更优选几个月(例如,多至三个月)施用化疗剂或放射疗法。

[0354] 在一些实施方案中,本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物可以与两种或更多种治疗剂一起施用。在一些实施方案中,本发明的结合剂可以与两种或更多种治疗剂一起施用。

[0355] 本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物可以与其他疗法或治疗性化合物或疗法同时或不同时施用,例如同时、分开或顺序施用。

[0356] 调节免疫应答、抑制肿瘤生长等的示例性方法

[0357] 在又另一个方面,提供调节受试者中的免疫应答的方法,其包括向受试者施用本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物,从而调节受试者中的免疫应答。优选地,所述结合分子增强、刺激或增加受试者的免疫应答。

[0358] 在另外的方面,提供抑制受试者中肿瘤细胞生长的方法,包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物。

[0359] 在另外的方面,提供用于激活CD137的下游信号传导途径的方法,其包括向受试者施用本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物。

[0360] 在另外的方面,提供用于诱导T淋巴细胞激活和/或增殖的方法,其包括向受试者施用本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物。

[0361] 在又一个方面,提供用于双重靶向CD137表达细胞和肿瘤抗原表达细胞的方法,该方法包括向受试者施用包含本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物。

[0362] 在另外的方面,提供包含本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体或药物组合物的结合分子,其用于双重靶向CD137表达细胞和肿瘤抗原表达细胞。

[0363] 免疫缀合物和其它试剂

[0364] 在另一个方面,提供免疫缀合物,其包含与至少一种治疗剂和/或诊断剂缀合的本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体或包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子。

[0365] 本发明还涉及本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体或包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子用作诊断剂的用途。本发明还涉及缀合至标记物的本

文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体或包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子的用途。

[0366] **示例性试剂盒**

[0367] 在另一方面,本发明提供用于治疗或预防例如本文所列疾病或免疫应答和/或用于检测CD137以诊断、预后或监测疾病的试剂盒,所述试剂盒包含本发明的单结构域抗体。这种试剂盒可以含有其它成分、包装、说明书或材料以帮助检测CD137蛋白。所述试剂盒可以包括经标记的结合CD137的单重链可变区抗体或包含结合CD137的单重链可变区抗体的结合分子以及一种或更多种用于检测所述标记物的化合物。

[0368] 本发明在另一个方面中提供以冻干形式包装或包装在水性介质中的本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物。

[0369] **示例性非治疗性应用**

[0370] 在另一个方面,本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体用于非治疗目的,例如诊断测试和测定。用于检测测试样品中人CD137存在的方法,包括使所述样品与本文所述的单结构域抗体和至少一种可检测标记物接触,并检测所述单结构域抗体与人CD137的结合。

[0371] 用于诊断目的抗体的修饰是本领域公知的。例如,抗体可以用配体基团如生物素,或可检测的标志物基团如荧光基团、放射性同位素或酶修饰。本发明的化合物可以用于诊断目的,并且例如使用常规技术标记。合适的可检测标记物包括但不限于荧光团、发色团、放射性原子、电子致密试剂、酶和具有特异性结合配偶体的配体。

[0372] 还参照附图和实施例提供本文所述的结合CD137的单可变重链结构域抗体、包含结合CD137的单可变重链结构域抗体的结合分子或药物组合物。

[0373] 除非在此另外定义,否则与本公开相关使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。虽然前述公开内容提供涵盖在本发明的范围内的主题的一般描述,包括制造和使用本公开的方法及其最佳模式,提供以下实施例以进一步使得本领域技术人员能够实施本公开。然而,本领域技术人员将理解,这些实施例的细节不应被解读为对本发明的限制,其范围应该从本公开所附的权利要求书及其等同物中理解。鉴于本公开,本公开的各种其他方面和实施方案对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

[0374] 本说明书中提及的所有文件均通过引用以其全文并入本文,包括对基因登录号的参考,科学出版物和对专利公开的参考。

[0375] 本文中使用的术语“和/或”被认为是两个特定特征或成分在具有或不具有另一个的情况下每一个的具体公开。例如,“A和/或B”将被视为(i) A, (ii) B和(iii) A和B中的每一个的具体公开内容,就像它们在本文中分别列出一样。除非上下文另有规定,否则上述特征的描述和定义不限于本发明的任何特定方面或实施方案,并且平等地适用于所描述的所有方面和实施方案。

[0376] 现在在非限制性实施例中进一步描述本发明。

实施例

[0377] **实施例1.Tg/TK0小鼠的构建**

[0378] 在沉默内源重链和轻链抗体表达(三重敲除,或TK0)的背景中携带种系构型的人重链抗体转基因基因座的小鼠如先前所述创建(WO2004/076618, WO2003/000737, Ren等, *Genomics*, 84, 686, 2004; Zou等, *J. Immunol.*, 170, 1354, 2003和WO2016/062990)。总之,用酵母人工染色体(YAC)原核显微注射新鲜受精的卵母细胞之后取得转基因小鼠,所述酵母人工染色体包含与缺乏C_H1结构域的小鼠免疫球蛋白恒定区基因、小鼠增强子和调控区组合的过量的人V_H、D和J基因。使用的YAC包括多个人重链V基因、多个人重链D和J基因、鼠C_H1基因和鼠3'增强子基因。它缺少C_H1外显子。

[0379] 将转基因建立者小鼠与缺乏内源性免疫球蛋白表达的动物回交,以创建用于下述免疫研究的Tg/TK0系。

[0380] 实施例2.免疫方案

[0381] 8-12周龄的Tg/TK0小鼠用人CD137-人Fc嵌合蛋白(Acro Biosystems cat no. 41B-H5258),人CD137-His标记的蛋白(R&D Systems,定制产品),过表达人CD137的CHO细胞(使用标准方法自制的细胞系)或重组蛋白与CHO人CD137表达的细胞的组合免疫。

[0382] 实施例3.血清ELISA

[0383] 在免疫之前和之后从小鼠收集血清,并通过ELISA检查应答用CD137抗原的免疫的血清人CD137反应性重链抗体的存在。

[0384] 将全血样品在13000rpm下离心5分钟以将血液与血清分离。在聚丙烯管或板中的3% **Marvel®/PBS**中制备血清的连续稀释液,在室温下预温育至少一小时,然后转移至封闭的ELISA板并温育至少一小时。通过用**PBS/Tween®-20**然后用PBS重复洗涤除去未结合的蛋白质。将在PBS/3% **Marvel®**中制备的生物素缀合的山羊抗小鼠IgG, Fc_{gamma}亚类1特异性抗体(Jackson ImmunoResearch货号115-065-205)的1:10,000溶液加入到每个孔中,并在室温下温育至少一小时。通过使用**PBS/Tween®20**和PBS重复洗涤除去未结合的检测抗体。将3% **Marvel®/PBS**中的中性抗生物素蛋白-HRP溶液(Pierce cat.no.31030)加入ELISA板中,使其结合30分钟,然后如上所述洗涤。使用TMB底物(Sigma货号T0440)进行ELISA,加入50ul 0.5M H₂SO₄溶液(Sigma货号320501)终止反应。使用BMG Pherastar测量450nm处的吸光度。

[0385] 实施例4从免疫小鼠生成文库

[0386] 上述从免疫小鼠生成的文库遵循如下所述的文库生成的标准方案。

[0387] 将来自数个免疫小鼠的组织(包括总的脾脏、腹股沟淋巴结和臂部淋巴结)收集到**RNAlate®**中。从上清液中提取总RNA。使用**Superscript III RT-PCR**高保真试剂盒(Invitrogen目录号12574-035)根据制造商说明书从RNA样品中挖掘(miner) V_H序列。将V_H/噬菌粒PCR产物通过动物来源或V_H种系家族合并,并使用Fermentas PCR纯化试剂盒(目录号K0702)根据生产商的说明进行纯化。使用2500V、25uF、200W脉冲的Bio-Rad GenePulser Xcel11,通过电穿孔将洗脱的DNA转化到TG1大肠杆菌(Lucigen, 目录号60502-2)中。合并电穿孔的细胞。收获文库。

[0388] 实施例5.分离CD137结合V_H分离和优化的选择策略

[0389] 根据公开的方法(Antibody Engineering, Benny Lo编, 第8章, p161-176, 2004)进行文库噬菌体原液的制备和噬菌体展示选择。在大多数情况下,噬菌体展示结合淘选方法用于分离结合性V_H结构域。然而,在本领域中充分描述了多种不同的选择方法,包括可溶性

蛋白选择,基于细胞的选择和在应激(stress)(例如热)下进行的选择。

[0390] 实施例6:筛选周质提取物用于与CHO人CD137细胞的结合和抑制人CD137配体与人CD137的结合

[0391] 选择文库后,通过单点筛选细菌周质提取物鉴定特异性V_H,所述特异性V_H结合表达人CD137的CHO细胞,不结合CHO亲本细胞并且抑制CHO在细胞表面表达的人CD137与重组人CD137配体蛋白之间的相互作用。根据标准技术,从在深孔板中生长的1ml培养物中制备小规模细菌周质提取物。用于确定非CD137特异性结合的上清液中His标记的V_H与CHO人CD137细胞的结合以及上清液中His标记的V_H与CHO亲本细胞的结合使用荧光微体积测定技术(FMAT)评估。在488nm和640nm激发后,在TTP Mirrorball1读板仪上在FL2(502nm-537nm)和FL5(677-800nm)通道中测量荧光发射。数据在FL5周界和峰强度上被门控,使用门控数据的FL2中值平均荧光强度来确定V_H结合。

[0392] 与结合测定平行,以FMAT形式测试周质提取物抑制人CD137配体蛋白与CHO人CD137细胞的相互作用的能力。在每个板上设置含有稀释的周质提取物样品缓冲液的总结合对照和含有过量的非Fc标记的竞争物的非特异性结合对照,用于数据归一化。使用TTP Mirrorball1测量荧光信号,并将门控的FL2中值平均荧光强度用于数据归一化。减去从非特异性结合对照孔中测定的背景信号后,数据表示为总结合对照的%(%对照)。鉴定出结合CHO人CD137细胞、不结合CHO亲本细胞且抑制CD137与CD137配体结合的V_H的家族。

[0393] 实施例7.测序

[0394] 表1显示家族1VH的序列,表2显示家族2VH的序列。

[0395] 如上鉴定的每个单独的V_H克隆从噬菌粒测序,并基于V_H种系和CDR3氨基酸相似性分组。代表性克隆进一步被表征。通过对克隆Humabody®V_H 1.1和Humabody®V_H 2.1分别进行序列优化可以生成另外的克隆,以提高结合活性,将序列恢复到种系或除去生物物理序列倾向,例如异构化或脱酰胺位点。

[0396] 实施例8.纯化的V_H的制备

[0397] a) 纯化的V_H的制备

[0398] 纯化的V_H通过使用用于周质提取物的镍-琼脂糖亲和层析纯化的V_H C末端6xHIS标签根据标准程序而获得。用分光光度法估计纯化的V_H的产量,并使用SDS PAGE评价纯度。备选地,根据标准程序从有pJExpress载体的W3110大肠杆菌上清液中纯化V_H。用分光光度法估计纯化的V_H的产量,并使用SDS PAGE评价纯度。如果需要,使用Vivaspin 20,3kDa MWCO PES,浓缩器(Sartorius, #VS2092)浓缩样品,和使用Etoxiclear树脂(Prometic, #3250-00010)除去内毒素。

[0399] b) 多价构建体的生成

[0400] 通过PCR扩增编码对CD137特异的Humabody®V_H和对PSMA特异的V_H的DNA序列。它们装配成较大的片段,V_H序列的侧翼是编码富含甘氨酸/丝氨酸序列的接头,并通过基于限制酶的方法将其连接到表达载体中。按照标准技术将质粒转化到微生物表达系统中。通过标准菌落PCR技术验证Humabody®V_H序列的存在。然后使用载体特异性和内部引物通过Sanger测序确认插入序列以确保完全的序列覆盖。示例性构建体的序列如下所示。

[0401] 表6a PSMA结合单V_H结构域抗体

名称	CDR1	CDR2	CDR3	SEQ ID 完整的VH
3.1	SEQ ID NO. 812 SYAMS	SEQ ID NO. 813 SIGENDGTTDY ADSVKG	SEQ ID NO. 814 DGVH	SEQ ID NO. 815 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYADSVKGRTFISRDN RQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYADSVKGRTFISRDN SKSMLYLQMNSLRVEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVSS

[0403] 表6b PSMA结合单V_H结构域抗体

克隆编号	V _H 全长序列
3.2	SEQ ID NO. 816 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYADSVKGRTFISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVSS
3.3	SEQ ID NO. 817 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYADNVKGRTFISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVSS
3.4	SEQ ID NO. 818 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYADNVKGRTFISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVSS
3.5	SEQ ID NO. 819
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYADVVKGRTFISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVSS
3.6	SEQ ID NO. 820 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYAAFKGRFTFISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVSS
3.7	SEQ ID NO. 821 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYADTVKGRTFISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVSS
3.8	SEQ ID NO. 822 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYADAVKGRTFISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVSS
3.9	SEQ ID NO. 823 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYAASVKGRFTFISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVSS
3.10	SEQ ID NO. 824 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYAAYVKGRFTFISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVSS
3.11	SEQ ID NO. 825 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYAATVKGRFTFISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVSS

[0406] 表6c PSMA结合单V_H结构域抗体

4.1	SEQ ID NO. 837 GYGMH	SEQ ID NO. 838 YISYDGSN KYYADSVKG	SEQ ID NO. 839 DPAWGLRLGE SSYDFDI	SEQ ID NO. 840 EVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFSFSGYGMHWVRQA PGKGLEWVAYISYDGSNKYYADSVKGRTFISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDPAWGLRLGE SSYDFDIWQGQGT MVTSS
-----	-------------------------	---	---	---

[0408] 表6d示例性核酸

[0409]

3.1 SEQ ID NO. 826
GAGGTGCAGCTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTACGAGCTATGCCATGAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCCTAAGTATTGGTGAGAATGATGGTACACAGACACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAGTATGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTACTGTGAAAGATGGTCCACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCTCTCA
3.2 SEQ ID NO. 827
GAGGTGCAGCTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTACGAGCTATGCCCTAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCCTAAGTATTGGTGAGAATAACGCTACCACAGACACTACGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTACTGTGAAAGATGGTCCACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCTCTCA
3.3 SEQ ID NO. 828
GAGGTGCAGCTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTACGAGCTATGCCCTAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCCTAAGTATTGGTGAGAATGATGGTACACAGACACTACGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTACTGTGAAAGATGGTCCACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCTCTCA
3.4 SEQ ID NO. 829
GAGGTGCAGCTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTACGAGCTATGCCCTAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCCTAAGTATTGGTGAGAATGATGGTACACAGACACTACGCAGCCGACGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTACTGTGAAAGATGGTCCACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCTCTCA

[0410]

TCACCGTCTCTCA
3.5 SEQ ID NO. 830
GAGGTGCAGCTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTACGAGCTATGCCCTAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCCTAAGTATTGGTGAGAATGATGGTACACAGACACTACGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTACTGTGAAAGATGGTCCACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCTCTCA
3.6 SEQ ID NO. 831
GAGGTGCAGCTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTACGAGCTATGCCCTAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCCTAAGTATTGGTGAGAATGATGGTACACAGACACTACGCAGCCCTCGTAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTACTGTGAAAGATGGTCCACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCTCTCA
3.7 SEQ ID NO. 832
GAGGTGCAGCTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTACGAGCTATGCCCTAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCCTAAGTATTGGTGAGAATGATGGTACACAGACACTACGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTACTGTGAAAGATGGTCCACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCTCTCA
3.8 SEQ ID NO. 833
GAGGTGCAGCTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTACGAGCTATGCCCTAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCCTAAGTATTGGTGAGAATGATGGTACACAGACACTACGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTACTGTGAAAGATGGTCCACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCTCTCA
3.9 SEQ ID NO. 834
GAGGTGCAGCTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTACGAGCTATGCCCTAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCCTAAGTATTGGTGAGAATGATGGTACACAGACACTACGCAGCCCTCGTAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTACTGTGAAAGATGGTCCACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCTCTCA
3.10 SEQ ID NO. 835
GAGGTGCAGCTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTACGAGCTATGCCCTAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCCTAAGTATTGGTGAGAATGATGGTACACAGACACTACGCAGCCCTACGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTACTGTGAAAGATGGTCCACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCTCTCA
3.11 SEQ ID NO. 836
GAGGTGCAGCTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTACGAGCTATGCCCTAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCCTAAGTATTGGTGAGAATGATGGTACACAGACACTACGCAGCCACCGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTACTGTGAAAGATGGTCCACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCTCTCA
4.1 SEQ ID NO. 841
GAGGTGCAGCTTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTGGCATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGCAAGGGACTGGAGTGGGGCATATATCATATGATGGAAGTAATAATACGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTTTACTGTGAAAGATGGTCCACTGGGGCCAGGGAAACCTGGATCGCTCATGATTTGATATCTGGGCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTCA

[0411] PSMA结合分子结合至野生型人PSMA (UniProt登录号NO.Q04609)。单体的序列如下

所示 (SEQ ID No.842)。

[0412] 1 MWNLLHETDS AVATARRPRW LCAGAWLAG GFFLLGFLFG WFIKSSNEAT NITPKHNMKA
[0413] 61 FLDELKAENI KKFLYNFTQI PHLAGTEQNF QLAKQIQSQW KEFGLDSVEL AHYDVLLSYP
[0414] 121 NKTHPNYISI INEDGNEIFN TSLFEPPPPG YENVSDIVPP FSAFSPQGMP EGDLVYVNYA
[0415] 181 RTEDFFKLER DMKINCSGKI VIARYGKVFR GNKVKNQLA GAKGVILYSD PADYFAPGVK
[0416] 241 SYPDGVNLPG GGVQRGNILN LNGAGDPLTP GYPANEYAYR RGIAEAVGLP SIPVHPIGY
[0417] 301 DAQKLLEKMG GSAPPDSSWR GSLKVPYNVG PGFTGNFSTQ KVKMHIHSTN EVTRIYNVIG
[0418] 361 TLRGAVEPDR YVILGGHRDS WVFGGIDPQS GAAVVHEIVR SFGTLKKEGW RPRRTILFAS
[0419] 421 WDAEEFGLLG STEWAEENS LLQERGVAYI NADSSIEGNY TLRVDCTPLM YSLVHNLTKE
[0420] 481 LKSPDEGFEG KSLYESWTKK SPSPEFSGMP RISKLGSND FEVFFQRLGI ASGRARYTKN
[0421] 541 WETNKFSGYP LYHSVYETYE LVEKFYDPMF KYHLTVAQVR GGMVFELANS IVLPFDCRDY
[0422] 601 AVVLRKYADK IYSISMKHPQ EMKTYSVSFD SLFSAVKNFT EIASKFSERL QDFDKSNPIV
[0423] 661 LRMMNDQLMF LERAFIGDPLG LPDRPFYRHV IYAPSSHNKY AGESFPGIYD ALFDIESKVD
[0424] 721 PSKAWGEVKR QIYVAAFTVQ AAAETLSEVA
[0425] 表7:示例性多价构建体

SEQ ID NO:798 1.1-6GS-1.1 蛋白质
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKLEWVAHIKEDGSEKYYEDSVEGRFTVSRDNAKNSVYLQMN
SRAEDTAVYYCARGGDSYDSDHFGFVGVWGGQGTTVTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQ
PGGSRLSCAASGFTFSSHWMTWFRQAPGKLEWVAHIKEDGSEKYYEDSVEGRFTVSRDNAKNSVYLQMNLSRAEDTAVYYCAR
GGDGYSDSHFGFVGVWGGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:799 1.1-6GS-1.1 核苷酸
GAGGTGCGAGCTGGTGGAGGCTGGTCCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCA
CTTTAGTAGCCATTGGATGACTTGGTCCGTCAGGCTCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGGCCACATAAGGAAGACGG
AACTGAGAAAATACTATGAGGACTCTGGAGGGCCGATTACCGCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACTCGGTATATCTGCAA
TGAACACTGAGAGCGGAAGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGGTGTGGCTACAGTGTACCTCCACTTGGTGT
GGACGCTGGGGCCAAGGGACACCGCTACTGTCTTCAGGTGGTGGCGGTTCAAGGGAGGGTGGCTCTGGAGGTGGAGG
TTCAGGAGGTGGTGGTCTGGCGGCGGTGGATCGGGTGGAGGTGGTAGTGTAGGTGAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTT
GGTCAGGCCGGGGGGCTCTGGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCCATTGGATGACTTGGTCCGTCA
GGCTCAGGAAAGGGGCTGGAGTGGGGGCCACATAAGGAAGACGCCAAGTGAAGAAATACTATGAGGACTCTGTGGAGG
GCCGATTACCGTCCAGAGACAACGCCAAGAACCTGGTATATCTGCAATGAACAGTGTAGAGGCCAAGAACACGGCTGT
TATTACTGTGCGAGAGGGAGGTGTGGCTACAGTGTACCTCCACTTGGTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGT
CTCTTCA

SEQ ID NO:800 2.1-6GS-2.1 蛋白质
EVQLVESGGGLVKPGGLSRVCAASGFTSDYYMSWFRQAPGKGLEWVSYISGSDIIDYADSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMNNLR
AEDTAVYHCAREDSRLTGTTFDNWGQGTIVTSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGLSR
RVCAASGFTSDYYMSWFRQAPGKGLEWVSYISGSDIIDYADSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMNNLR
AEDTAVYHCAREDSRLTGTTFDNWGQGTIVTSS

SEQ ID NO:801 2.1-6G-2.1 核苷酸
GAGGTGCACTGGTGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGCCCTGAGAGTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCA
CTTCAGTACTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGTTCATACATTAGTGGTAGTGGT
GATATCATAGACTACGCCAGACTCTGTAAGGGCCGATTCACCATCTCAGGGACAACGCCAAGAACCTCTGTATCTGCAGATG
AACAACTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATCACTGTGGAGAGAAAGATCCCGCTCAACTGGAACACTCGGACTTTGACAA
TTGGGGCCAGGGAAACCTCTGGTACCGCTCTCTCAGGTGGTGGCGGTTCAAGGGCAGGGGGTGGCTGGAGGTGGAGGTTCA
AGGTGGTGGTTCTGGCGCGGTGGATCCGGTGGAGGTGGTAGTGGGTGCACTGGTGGAGTCTGGGGAGGGCTGGTCA
AGCCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCTGTGCAGGCCCTGGTAGTACCCCTCAGTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGGCTC
CAGGGAAAGGGCTGGAGTGGTTCATACATTAGTGGTAGTGGTAGTACATGAGACTACGCCAGACTCTGTAAGGGCCGATT
CACCATCTCAGGGACAACGCCAAGAACCTCTGTATCTGCAGATGAAACACCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATCA
GTGCGAGAGAAGATTCCCGTCACTGGAACTACGGACTTTGACAATTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCAACCGTCTCTCA

SEQ ID NO: 802 1.1-6GS-1.1-6GS-1.1 蛋白质

[0426]

[0427]

GAACAGCGCTGAGAGTCGAGGGACCGGCCCTATTACTGTGTAAAGATGGTGTCCACTGGGCCAGGGAACCTGGTACCG
GTCTCTCAGGGTGTGGCGCTCAGGGCAGGGTGGCTCTGGAGGTGGAGGGTCTCAGGGAGGGTGGTGGCTGGCTGGCGCGGGTGG
TCGGGGTGGAGGTGGTAGTGGAGGTGCAAGTTAGTGGAGGGCAGGGTGGTTAGTTCAGGGGGGGCTCGCTCCGCTCGT
GCGCGCCCTGGGGTACATTATCAAACTACTGGATGAATTGGTCGCCAGGCTCGGGCAAGGGTCTGAGTGGGG
AACATTAATCAGGACGGGAGCGCTTACCGTTACCGTGTACCTGTAAGGAGCTTCACTATCAGTGTGACAACGCTAAAAA
TTCCCTGTACTTACAGATGAACTCACTCGTGTAGGGACACCGCAGTGACTACTGTGCTCGCGTGGTAAGGATACCGCGT
CGATCACTACGGCCCTGATGTACAGGACAGGGGACTACAGTTACCGTCTTCCGGCGAGGTGGCTCGAGGAGGGCGA
TCGGGGGGTGGAGGAAGTGGCGCGGTGGTAGTGGAGGGAGGTGGTCTGGAGGGCGTGGCTGAAAGTACAACGGTGA
ATCGGGTGTGGTAGGGTCCAATCTGGAAAGATCATTGGAGGCTTCTCTGGTAGCAGTCTCCGGATTACCTTCTCATACTGTATG
CACTGGGTGAGACAAGGCCCTGGTAAGGGCTGGAAATGGGTGGCGAATCTCTGGAAATGGAACAAAATAACATATGCG
ATTCGGTAAAGGGTAGATTACTATTAGCCGTGATAATGCAAAAAAAAGCTTATACTGCGAGATGAATTCTGGAGGGCTGAGG
ATACAGCTTACTATTGTGCGTAGCTCATCGTTCTGGAGGCCAACCTTCAACATTGGGTAGAGGTACCC
AGTTACGGTAGCTCAGGGAGGGTGGCTGGAGGGAGGCCGATCGGGGGGGTGGAGGAAGTGGCGGGTGGTAGT

SEQ ID NO. 898 蛋白质 3.8-6GS-1.113-6GS- VH (HSA)-4GS

SEQ ID NO.899 4.1-6GS- VH (HSA)-1.113-4GS 核苷酸

SEQ ID NO. 900 4.1-6GS- VH (HSA)-1.113-4GS 蛋白质

SEQ ID NO. 901 结合至USA的用于构建上述蛋白质的vH

EVQLVESGGGLVQPGRLRSCAASGFTFHYYAMHWVRQAPGKLEWVSGISWNGNKITYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS
IRAFTIAVYCVRDSSFLIVGARTEFHWRGRGTIVTVSS

SEQ ID NO: 803 5'-结合至USA的用于构建上述核苷酸的mRNA

GGCTTGTGAGCGGATACAATTATAATGTGAAATTGTGAGCGCTCACAACTTCCACACGGTTCCCTAGAAATAAT
TTGTTAACTTAGGAGGAAAACATATGAAGAAAACGGCAATCGCAATCGCAGTCGCTGGCGGGTTCGCAACTG
TAGCGCAAGCCGAGGTGCAACTGGTCGAGTCGGTTGGTCAACCTGGTAGAGGCTGCGTTGAGTTGCG
GCTTCCGGCTTCACTTCCATCATTATGCTATGCACTGGGTTGTCAGAGCTCCGGAAAGGTTGGAGTGGTTCCGG
AATTCTGGAATGGCAATAAGATTACGTACGCTGATTCACTGAAAGGAAGGTTACAATCAGTAGAGATAATGCTAAA
ACTCTATGTTACAAATGACAGCCTAAGAGCAGAAAGATAACGGCTCTGACTACTGTGTTAGAGATACTGCTGTTATT
ATTGTAGGTGCAACCAACTTTGAAACATTGGGTGCGGGTACTCTGTGACTGTCTCATCCGGCCGCAACCCACATCA
TCACCAACTACGCGCTAATGAAAGCTCCCAAGGGCAGACCCCCAATTAGCCGGGGAAGGCCAGTCT
TCGACTGAGCCTTCGTTTATTTGATGCTGGCAGTTCCACTCTCGCATGGGAGTCCCCACACTACCATCGGCGT
ACGGCGTTCACTCTGAGTTGGCAGTGGCT

〔0433〕

[0434] 实施例9纯化的V_H的测试

[0435] b) 结合测定法

[0436] 测试纯化的Humabody®V_H与人CD137蛋白、恒河猴CD137Fc重组蛋白、小鼠CD137蛋白、肿瘤坏死因子受体家族成员OX40和GITR(糖皮质激素诱导的TNFR相关的)、CHO人

CD137细胞,CHO亲本细胞和人T细胞的结合。

[0437] 与人CD137Fc重组蛋白(Acro Biosystems41B-H5258)、恒河猴CD137Fc重组蛋白(Sino Biologicals cat No.90847-K02H)和小鼠CD137Fc蛋白(Acro Biosystems41B-M5258)的结合是使用HTRF结合测定格式测量的。所有试剂和连续稀释的V_H在含有PBS、0.1% BSA和0.4M氯化钾的测定缓冲液中制备。样品或测定缓冲液(非特异性结合)与0.5nM人、恒河猴或小鼠CD137、1nM抗人-Fc穴状化合物PAb(Cisbio目录号61HFCKLB)和20nM抗His-D2(CisBio目录号61HISDLA)在黑色384浅孔测定板中在室温下温育至少3小时。在BMG PHERASTAR读板仪上在337nm激发后,测量620nm和665nm的时间分辨荧光发射。计算HTRF比((665nm发射/620nm发射)×10000),并对数据进行校正(非特异性结合)以给出具体的结合信号。表8中显示了与人CD137、恒河猴CD137和小鼠CD137蛋白结合的摩尔EC₅₀值。V_H结合人和恒河猴CD137,但不结合小鼠CD137蛋白。

[0438] 表8:V_H与CD137的结合

Humabody® ID	HTRF			ELISA		
	人 CD137	恒河猴 CD137	小鼠 CD137	人 CD137	人 GITR	人 OX40
1.78	2.1E-10	1.4E-10	-	+	-	-
1.1	2.6E-10	1.1E-09	-	+	-	-
1.18	4.5E-10	5.1E-09	-	+	-	-
1.11	5.8E-10	6.8E-09	-	+	-	-
1.52	4.8E-10	4.5E-10	-	+	-	-
2.9	1.3E-09	1.2E-09	-	+	-	-
2.2	9.1E-10	5.6E-10	-	+	-	-
2.1	3.7E-09	4.9E-09	-	+	-	-
2.8	3.1E-09	1.6E-09	-	+	-	-
2.14	1.2E-09	1.3E-09	-	+	-	-
2.26	nd	nd	nd	nd	nd	nd

[0440] 无结合(-),测量的结合(+),未测定(nd)

[0441] 表9

Humabody®	FMAT					流式细胞术	
	CHO huCD137	CHO 亲本	CHO PSMA	DU145 PSMA	DU145 亲本		
[0442]	1.78	3.2E-10	-			6.1E-10	
	1.1	2.2E-10	-			2.2E-10	
	1.18	3.1E-10	-			1.9E-09	
	1.11	2.7E-10	-			8.9E-10	
	1.52	3.7E-10	-			8.8E-10	
	2.9	1.8E-10	-			6.0E-10	
	2.2	1.8E-10	-			7.4E-10	
	2.1	6.5E-10	-			2.4E-09	
	2.8	1.9E-10	-			6.5e-09	
	2.14	3.1E-10	-			6.1E-10	
	2.26	1.8E-10				2.8E-09	
	1.113	9.0E-11				nd	
	4.1	-	-	1.7E-10	1.9E-10	-	nd
	3.8	-	-	2.3E-10	2.9E-10	-	nd
	4.1-6GS-1.1	4.3E-10	-	1.9E-10	2.1E-10	-	7.3E-10
	4.1-6GS-2.1	9.7E-10	-	2.8E-10	3.9E-10	-	3.0E-09
	3.8-6GS-1.1	5.6E-10	-	6.0E-10	6.8E-10	-	1.1E-09
	1.1-6GS-3.8	5.6E-10		6.3E-10	8.1E-10		nd
	4.1-6GS-1.1-VH (MSA)	5.8E-10	-	3.2E-10	3.6E-10	-	nd
	4.1-6GS-1.1-VH (MSA)	1.9E-09	-	3.0E-10	4.2E-10	-	nd
3.8-6GS-1.1-VH (MSA)							
5.9E-10							
-							
5.9E-10							
8.2E-10							
-							
nd							

[0443] 相对于肿瘤坏死因子受体家族成员OX40和GITR(糖皮质激素诱导的TNFR相关的),对CD137结合的特异性是使用ELISA测定法确定的。Nunc Maxisorp板用1ug/ml人CD137-Fc重组蛋白(Acro Biosystems 41B-H5258)、人GITR-Fc(R&D Systems目录号689-GR)、人OX40-Fc(R&D Systems目录号3388-OX)在碳酸钠缓冲液中在4°C包被过夜,然后用PBS洗涤两次。通过在室温下与在PBS/0.1%Tween-20中的1% (w/v) 脱脂奶粉(Marvel®)温育1小时来封闭非特异性蛋白质相互作用。用PBS洗涤板两次,然后加入VH或抗体对照(1ug/ml)在室温下持续1小时。用PBS/0.1%Tween-20洗涤三次后,将1:1000稀释的抗His-HRP(V_H检测)或抗小鼠-HRP(阳性对照小鼠单克隆抗体检测)在1%Marvel/PBS/0.1%Tween-20中加入。使检测抗体在室温下结合1小时,然后将板在PBS/0.1%Tween-20中洗涤两次,在PBS中洗涤一次。使用TMB底物进行ELISA,并通过加入50ul 0.5M H₂SO₄溶液终止反应。使用BMG Phrastar

测量450nm处的吸光度。所有测试的V_H都与CD137结合,但不与GITR或OX40结合(表8)。

[0444] 使用荧光微体积测定技术(FMAT)评估His标记的分子与CHO人CD137、CHO亲本,CHO人PSMA、DU145 PSMA和DU145亲本细胞的结合。所有试剂均在含PBS,0.1%牛血清白蛋白,0.05%叠氮化钠的FMAT测定缓冲液(pH 7.4)中制备。将经连续稀释的样品转移到384孔黑色透明底测定板(Costar cat.no.3655)中,并在室温下与1.5nM Anti-His (Millipore cat.no.05-949)、3nM山羊抗小鼠Alexa Fluor-488 (Jackson ImmunoResearch cat.no.115-545-071)以及用DRAQ5 (Thermo Scientific cat.no.62251)预染的2000个细胞/孔温育至少2小时。在488nm和640nm激发后,在TTP Mirrorball读板仪上在FL2(502nm-537nm)和FL5(677-800nm)通道中测量荧光发射。数据在FL5周界和峰强度上被门控,使用门控数据的FL2中值平均荧光强度来确定V_H结合。表9中显示了结合的示例性的EC₅₀值。单价CD137特异性的Humabody®V_H,具有CD137结合臂的双特异性和三特异性的分子结合CHO CD137表达细胞。单价PSMA特异性的Humabody®V_H,具有PSMA结合臂的双特异性和三特异性的分子结合PSMA表达细胞。

[0445] 使用流式细胞术测量与原代T细胞的结合。通过密度梯度离心从人血中分离出外周血单核细胞(PBMC),然后使用阴性选择分离试剂盒根据制造商的规程(Miltenyi Biotech cat no 130-042-401)纯化CD8+T细胞。在补充了10%FBS,2mM谷氨酰胺,1X Pen/Strep的RPMI培养基中,将T细胞用PMA/罗奴霉素刺激48-72小时。将细胞转移到96孔板中,用染色缓冲液(PBS/1%BSA/0.05%叠氮化钠)封闭10分钟,然后与在染色缓冲液(PBS/1%BSA)中连续稀释的V_H在4°C温育30分钟-1小时。通过离心洗涤细胞,然后使用抗His抗体(Millipore 05-949)和山羊抗小鼠Alexa Fluor-488 (Jackson ImmunoResearch cat no.115-545-071)检测V_H结合。用A Live Dead near IR stain (Molecular Probes cat no.L10119)区分活细胞。进一步洗涤细胞后,将其固定并通过流式细胞术测量荧光。

[0446] 表9显示了结合的平均摩尔EC₅₀值(2-3个供体)。单价CD137特异性Humabody®V_H和带有CD137结合臂的双特异分子结合预刺激的CD8+细胞。

[0447] 在ForteBio Octet RED384仪器上测量纯化的V_H、二价V_H和三价V_H分子的结合动力学。将CD137-Fc标记的蛋白在动力学缓冲液(0.1%BSA,0.02%Tween,1x PBS)中稀释至3μg/ml,并通过Fc标记偶联至蛋白G生物传感器(ForteBio cat No.18-5082)。连续稀释V_H(通常以50nM V_H的最高浓度开始的1:2稀释系列,)并与所测量的CD137-Fc-偶联的蛋白G生物传感器结合。使用1:1结合模型和ForteBio Octet数据分析9.0软件,从(减去空白的)传感器图迹线(sensor gram trace)来确定结合动力学。获得的示例性动力学和结合亲和力数据示于表10(单价V_H)和图1(二价和三价分子)中。在该测定形式中,单体V_H以91pM至5.3nM的亲和力结合CD137-Fc。二价和三价形式与单价V_H相比显示增强的结合。

[0448] 表10:V_H与人CD137的结合动力学

Humabody® ID	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
1.78	7.2E-10	3.04E+05	2.19E-04
1.75	7.5E-10	4.74E+05	3.53E-04

[0450]	1.1	3.4E-10	9.89E+05	3.40E-04
	1.39	9.0E-10	5.59E+05	5.05E-04
	1.18	1.2E-10	5.18E+06	6.25E-04
	1.11	2.5E-09	5.96E+05	1.48E-03
	1.71	9.1E-11	3.13E+05	2.84E-05
	1.16	2.4E-09	6.10E+05	1.45E-03
	1.52	3.2E-09	3.00E+05	9.63E-04
	1.63	2.8E-09	2.17E+05	5.96E-04
	1.81	1.6E-10	1.06E+06	1.71E-04
	2.20	1.2E-09	1.64E+06	2.00E-03
	2.1	2.9E-09	1.35E+06	3.88E-03
	2.8	5.3E-09	1.17E+06	6.16E-03
	2.14	9.6E-10	1.63E+06	1.57E-03
	2.26	4.7E-09	1.80E+06	8.42E-03

[0451] 在ForteBio Octet RED 384仪器上测定单价和双特异性Humobody V_H的动力学。为了研究与抗原的相互作用,将CD137-Fc标签蛋白(Acro Biosystems cat no.41B-H5258)或PSMA-his(R&D Systems cat no.4234-ZN)通过胺偶联固定在AR2G生物传感器(ForteBio catno.18-5082)上。在动力学缓冲液(0.1% BSA, 0.02% Tween, 1x PBS)中连续稀释单价V_H和双特异性分子(通常在最高浓度在12-25nM之间开始以1:2稀释系列),且与固定的蛋白质的结合是在缔合和解离阶段进行研究的。使用180秒缔合和600秒解离阶段测量PSMA结合。在180秒缔合和600秒解离阶段测量CD137结合。使用ForteBio Octet数据分析软件,将减去参照的数据拟合为1:1结合模型。表11中显示获得的示例动力学和结合亲和力数据。

[0452] 表11

Humobody®	人 CD137			人 PSMA		
	KD (M)	Kon (1/Ms)	kdis (1/s)	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
[0453]	1.1	5.2E-10	7.1E+05	3.6E-04	-	-
	2.1	6.7E-09	7.7E+05	5.2E-03	-	-
	4.1	-	-	-	5.3E-10	3.1E+05
	3.8	-	-	-	9.0E-10	3.9E+05
	4.1-6GS-1.1	7.3E-10	4.1E+05	3.1E-04	1.3E-09	4.3E+05
4.1-6GS-2.1		4.8E-09	5.8E+05	2.6E-03	6.6E-10	5.0E+05
3.8-6GS-1.1		5.6E-10	4.9E+05	2.9E-04	5.7E-09	3.0E+05
						1.7E-03

[0454] Biacore T200仪器用于通过表面等离振子共振(SPR)研究VH与人和恒河猴CD137-IgG1Fc标记的蛋白之间的相互作用。单循环动力学测定法用于评价该相互作用的动力学

和亲和力。实验是在25°C在HBS-EP+测定缓冲液中进行的,流速为30μl/分钟。蛋白G芯片用于在7秒钟内将稀释至2μg/ml的Fc标记的重组CD137捕获到其中一个流通池中。没有任何捕获的CD137的第二流通池用作参照池。制备了具有60nM的最高浓度的五点的三倍稀释系列的V_H。按照结合动力学,使这些流经芯片表面。对于恒河猴和人CD137,每个结合步骤的接触时间为180秒,解离步骤分别为1800和3600秒。每次运行后,用甘氨酸pH 1.5除去捕获的CD137来再生传感器。在使用Biacore T200评价软件进行双参照扣除后,将数据拟合为1:1结合模型。表2中sdAb 1.113与人CD137Fc结合的平均动力学常数(±标准偏差)为ka 3.6E+06±1.6E+06(1/Ms),Kdis 3.0E-04±1.1E-04(1/s)和KD 8.5E-11±7.8E-12(M),与恒河猴CD137Fc结合的平均动力学常数(±标准偏差)为ka 1.1E+06±2.2E+05(1/Ms),Kdis 2.8E-04±6.8E-06(1/s)和KD 2.7E-10±5.2E-11。

[0455] sdAb 1.113显示与其它测试分子相比更优异的食蟹猴结合。sdAb 1.113也显示了更好的整体可展性特性(稳定性和/或表达)。

[0456] 使用ELISA形式评估双特异性分子对CD137和PSMA的双重靶标接合。将CHO-PSMA细胞(20000/孔)接种到补充有L-谷氨酰胺+杀稻瘟菌素+四环素的Hams F12中的96孔板(Greiner cat no.353872)中,并与5%CO₂在37°C下温育过夜。所有后续步骤均在室温下进行,并且在每个步骤之间包括用PBS洗涤。将板用PBS/0.1%BSA封闭1小时,然后加入连续稀释的Humabody®V_H并使其结合1小时。除去未结合的V_H后,将1nM CD137huFc (Acro Biosystems cat no.41B-H5258)添加至孔中并温育1小时。随后添加1:3000稀释的抗huFc-HRP (Jackson ImmunoResearch cat no.109-035-098)1小时,并通过添加TMB显色板。加入0.5M硫酸终止反应,并在BMG PheraStar上于450nm吸光度处读板。图2显示了代表性数据,表明双特异性分子能够同时结合人CD137和人PSMA。

[0457] a)CD137配体与CD137结合的抑制

[0458] 在基本如实施例6所述的FMAT配体抑制测定法中测量纯化的Humabody V_H抑制CD137配体与CHO人CD137细胞结合的能力。由连续稀释的V_H测定的IC₅₀值示于表12中。V_H抑制人CD137配体与人CD137的结合。

[0459] 表12:CD137L结合的抑制。所示的值是2-6次测定的平均值

CD137 配体抑制					
Humabody® V _H	IC ₅₀ (M)	Humabody® V _H	IC ₅₀ (M)	Humabody® V _H	IC ₅₀ (M)
1.78	1.5E-09	1.102	1.7E-09	1.125	1.7E-09
1.1	1.1E-09	1.103	1.3E-09	1.126	8.4E-10
1.18	1.2E-09	1.104	1.1E-09	1.128	8.8E-10
1.11	1.6E-09	1.105	2.8E-09	1.129	2.0E-10
1.52	1.2E-09	1.106	2.1E-09	1.130	1.9E-09
2.9	2.0E-09	1.107	5.5E-10	1.131	3.3E-10
2.20	1.7E-09	1.108	5.0E-10	2.41	1.6E-08
2.1	5.7E-09	1.109	9.0E-10	2.42	2.0E-07
2.8	1.9E-08	1.110	8.1E-10	2.43	1.9E-08
2.14	2.0E-09	1.111	7.5E-10	2.44	5.7E-09
2.26	8.5E-09	1.112	4.7E-10	2.45	5.3E-09
1.90	7.8E-09	1.113	7.3E-10	2.46	7.8E-08
1.91	1.9E-09	1.114	2.7E-10	2.47	8.8E-09
1.92	2.9E-09	1.115	3.5E-10	2.48	8.6E-08
1.93	7.0E-10	1.116	2.5E-09	2.49	4.2E-08
1.94	8.0E-10	1.117	1.5E-09	2.50	1.4E-08
1.95	2.4E-08	1.118	3.4E-09	2.51	2.7E-08
1.96	2.7E-09	1.119	1.3E-09	1.1-6GS-1.1	2.8E-10
1.97	3.8E-09	1.120	2.5E-10	2.1-6GS-2.1	4.3E-10
1.98	4.7E-09	1.121	1.4E-09	1.1-6GS-1.1-6GS-1.1	2.0E-10
1.99	1.5E-09	1.122	1.3E-09	2.1-6GS-2.1-6GS-2.1	4.2E-10
1.100	1.4E-09	1.123	7.8E-10	4.1-6GS-1.1	2.5E-09
1.101	7.9E-09	1.124	1.6E-09	4.1-6GS-2.1	1.3E-08
		4.1	-	4.1-6GS-1.78	3.7E-09
		3.8	-	1.78-6GS-4.1	2.8E-09
				3.8-6GS-1.1	1.7E-09
					1.1-6GS-3.8
					1.3E-09

[0461] b) 稳定性

[0462] 对纯化的Humabody®V_H进行尺寸排阻层析。简言之,将纯化的V_H以8.98至9.26mg/ml在PBS缓冲液中在4°C或40°C下储存0-14天,然后在不同的时间点使用包含PDA检测器的Waters H-Class Bio UPLC(在280nm检测)分析,在Waters ACQUITY BEH 125Å SEC柱上分离。将样品以10μl体积注射,并在含有200mM NaCl、100mM磷酸钠、pH 7.4+5%丙-1-醇的流动相中以0.4ml/min的流速运行。收集6分钟的数据,并计算储存后包含单体的样品的百分比(表13为代表性数据)。应注意,这些数据是在非优化的缓冲条件下收集的。

[0463] 表13

		%面积 T0 单体 4°C					%面积 T0 单体 40°C				
[0464]	Humabody® ID	Conc. mg/ml	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 14 天	第 0 天	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 14 天
	1.1	9.02	99.85	99.87	99.84	97.50	99.85	99.66	91.10	99.31	97.20
	1.78	9.63	99.70	99.64	99.45	99.43	99.70	98.86	98.73	98.75	98.66
	2.1	8.98	100.00	98.41	99.89	98.22	100.00	98.91	96.86	98.04	97.17
	2.14	9.26	99.92	99.19	99.92	98.06	99.92	97.88	95.15	95.50	93.69

[0465] c) 血清稳定性

[0466] 通过在小鼠血清 (Sigma M5905) 或人血清 (Sigma H4522) 中温育0、1、3/4或7天后测量其活性来评估Humabody®V_H的血清稳定性。将预温育的样品连续稀释，并在如前实施例6所述的FMAT CHO CD137配体抑制和CHO CD137结合测定中进行测试。在与血清温育后观察到最小活性损失 (表14为代表性数据)。

[0467] 表14

[0468]	Humabody® ID	血清	CD137 配体抑制				CD137 结合			
			第 0 天	第 1 天	第 3/4 天	第 7 天	第 0 天	第 1 天	第 3/4 天	第 7 天
1.1	小鼠	1.2E-9	1.2E-9	1.0E-9	1.1E-9	1.5E-10	1.7E-10	1.6E-10	2.0E-10	
	人	1.7E-9	1.0E-9	1.1E-9	1.1E-9	1.8E-10	1.5E-10	1.8E-10	1.8E-10	
2.1	小鼠	9.4E-9	1.4E-8	7.8E-9	1.1E-8	3.6E-10	5.5E-10	3.1E-10	4.3E-10	
	人	6.9E-9	5.0E-9	5.2E-9	4.0E-9	3.4E-10	2.6E-10	2.6E-10	1.8E-10	

[0469] d) 功能活性

[0470] 在报告基因测定中, 使用表达CD137和NF- κ B荧光素酶报告基因的Jurkat细胞, 评价单价V_H充当CD137激动剂的能力。将它们的活性与具有增加的亲合 (avid) 相互作用潜力的二价和三价分子以及与由与结合肿瘤抗原PSMA的V_H连接CD137 V_H组成的双特异性分子进行了比较。在双特异性分子中, CD137和细胞表达的PSMA共同接合导致CD137激动。

[0471] PSMA表达细胞或亲本(非PSMA)表达细胞(5000个/孔)在培养基(补充有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、1×Pen/Strep的RPMI 1640)中接种到384孔、白色平底组织物培养处理的平板中过夜。在培养基中制备连续稀释的单价V_H、多价V_H和PSMA/CD137靶向双特异性分子, 并加入到孔中, 随后加入Jurkat人CD137 NF- κ B荧光素酶报告基因细胞(Promega)。在CO₂培养箱中于37°C温育5-6小时后, 通过添加BioGlo试剂(Promega G7940)并在BMG Pherastar上测量发光信号来确定荧光素酶报告基因的表达水平。图3显示单价V_H和示例性多价CD137结合分子不增加报告基因活性, 因此在该测定中不具有激动性CD137活性。双特异性分子在PSMA表达细胞存在时激活Jurkat报告细胞(图3A和3BC), 但当与亲本的非PSMA表达细胞共

培养时不激活Jurkat报告细胞(图3A、3B、3E和3F)。这证明PSMA和CD137与单价CD137结合臂的双靶标接合导致激动性CD137活性。

[0472] 在共培养测定中,使用PSMA表达细胞或亲本细胞和人CD8+T细胞,进一步测试Humabody®V_H诱导IL-2释放的能力。将PSMA或亲本细胞重悬于培养基(补充有10%FBS,2mM L-谷氨酰胺,1X Pen/Strep的RPMI1640)中,并以每孔20000的密度接种到已用5ug/ml抗CD3抗体(e-Bioscience cat no.14-0037-82)预包被的96孔平底板上。使细胞在37℃,5%CO₂下粘附过夜。通过密度梯度离心从人血中分离出外周血单核细胞(PBMC),然后使用阴性选择分离试剂盒根据制造商的规程(Miltenyi Biotech cat no 130-042-401)纯化CD8+T细胞。在培养基中制备Humabody®V_H,双特异性抗体和基准抗体,并将其与T细胞(100000细胞/孔)一起添加至测定板。在37℃下,5%CO₂温育48小时后收获上清液,并使用人IL-2测定试剂盒根据制造商的说明对IL-2水平进行定量。(Cisbio Cat no.64IL2PEB)IFN γ水平是使用人IFN γ测定试剂盒根据制造商的说明书(Cisbio Cat no.62HIFNGPEH)定量的。

[0473] 图4A显示靶向VH的单价CD137不刺激IL-2从CD8+T细胞的产生。具有单价CD137和PSMA结合臂的双特异性分子在PSMA表达细胞的存在下增加IL-2从CD8+T细胞的产生。当在与CD8+T细胞的共培养测定中使用亲本细胞时,未观察到这种刺激,这证实了双特异性分子需要CD137和PSMA的双靶标接合(代表性数据示于图4B中)。基准抗CD137抗体刺激PSMA细胞系非依赖性应答中的IL-2产生(图4B和4C)。CD8+T细胞对IL-2产生的刺激是浓度依赖性的(图4D)。最大应答水平针对于抗体和双特异性分子均是T细胞供体依赖性的(图4E)。干扰素γ也响应双特异性分子而产生(图4F)。

[0474] e) 内化

[0475] 将CHO人CD137细胞平铺在聚-L-赖氨酸包被的盖玻片上,并使其粘附过夜。在补充有10%FBS/0.5%无脂肪酸BSA的RPMI中制备单价V_H(500nM)、三价V_H(500nM)和抗CD137基准抗体(100nM),并在4℃下与细胞一起温育30分钟。然后将样品在37℃温育2小时,然后用4%PFA在室温下固定10分钟,并用PBS洗涤三次,或者在4℃温育后立即固定(对照样品)。洗涤步骤后,样品用PBS中的0.5%皂角昔在室温下渗透10分钟,用PBS洗涤三次,用含有1%BSA/10%FBS/0.05%Tween-20的PBS封闭45分钟。通过在含有PBS/0.5%BSA/0.05%Tween-20的染色缓冲液中用抗人Alexa Fluor-488抗体(1:2000稀释)染色1小时来检测抗体。通过用抗His抗体(1:500稀释)染色,然后用抗小鼠Alexa Fluor-488第二抗体(1:2000稀释)染色来检测Humabody®V_H。样品用PBS/0.05% Tween-20(PBS-T)洗涤,然后溶酶体使用抗LAMP-1的第一抗体(在染色缓冲液中1:200稀释)染色1小时。用PBS-T洗涤三次后,用抗兔Alexa Fluor-647(在染色缓冲液中1:500稀释)染色样品,然后再次洗涤。将盖玻片安装于载玻片中,并使用NILON A1R共焦系统,激光线488nm和640nm)用Apo 60x 0.11λS DIC N2物镜成像。

[0476] 图5例示了与多价V_H分子或抗CD137抗体相比,单体V_H内化的潜力降低。单价V_H没有显示出与溶酶体的共定位,并且主要保持细胞表面结合。多价V_H显示增加的内化,如观察到的簇集和抗体与溶酶体染色共定位所示。

[0477] 实施例10. **Humabody®**在DU145 PSMA/hu PBMC移植NCG小鼠中的作用

[0478] 将雄性NCG小鼠(NOD-Prkdcem26Cd52I12rgem26Cd22/NjuCr1,Charles River)在

右肋皮下注射50%基质胶中的1x 10⁷ DU145 PSMA细胞。在第8天,通过尾静脉移植hPBMC (HemaCare BioResearch Products)。未移植的小鼠用作对照组。然后用经腹膜内施用的**Humabody®**或对照CD137激动剂抗体处理小鼠,并记录体重,临床观察和肿瘤体积。该研究是在Charles River Discovery Services North Carolina (CR Discovery Services) 进行的,该研究在约束(restraint),饲养,手术程序,饲料和体液调节以及兽医护理方面具体符合《实验动物的护理和使用指南》的建议,并获得AAALAC的认可。与对照组相比,半衰期延长的双特异性**Humabody®**处理组显示减小的肿瘤体积(图7)。

[0479] 实施例11:超抗原激活的细胞的刺激

[0480] 在治疗前,用10ng/ml SEB(葡萄球菌肠毒素B)刺激来自健康供体的PBMC16小时。将CHO细胞或表达PSMA的CHO细胞以每孔10,000接种到96孔板中。加入**Humabody®**构建体至终浓度50nM和4倍稀释系列。将SEB刺激的PBMC以每孔75,000添加到具有1ng/ml SEB的培养基中。将板在37°C 5%CO₂温育3天。收获上清液用于细胞因子测量。使用Cisbio HTRF试剂盒(62HTNFAPEG)根据制造商的说明测量TNF- α 。在表达PSMA的细胞存在下,TNF- α 以双特异性**Humabody®**依赖性剂量应答方式增加。在不存在PSMA的情况下没有诱导作用。

[0481] 参考文献

[0482] Chalupny NJ, Peach R, Hollenbaugh D, Ledbetter JA, Farr AG, Aruffo A. T-cell activation molecule 4-1BB binds to extracellular matrix proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 1; 89(21):10360-4.

[0483] Dass S, Vinay and Byoung S, Kwon. 4-1BB (CD137), an inducible coStimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy. BMB Rep. 2014 Mar; 47(3):122-129.

[0484] Gauttier V, Judor J-P., Le Guen V., Cany J., Ferry N., and Conchon S. Agonistic anti-CD 137 antibody treatment leads to antitumor response in mice with liver cancer. Int J Cancer. 2014 Jun; 135(28):2857-2867.

[0485] Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol. Sep; 23(9):1126-36. (2005)

[0486] HoHot R, Goldstein M.J, Kohrt H.E, Myklebust J.H, Alizadeh A.A, Lin J.T, Irish J.M, Torchia J.A, Kolstad A, Chen L., and Ronald Levy R. Therapeutic effect of CD137 immunomodulation in lymphoma and its enhancement by Treg depletion. (2009)

[0487] Madireddi S, Eun SY, Lee SW, Nemčovičová I, Mehta AK, Zajonc DM, Nishi N, Niki T, Hirashima M, Croft M. Galectin-9 controls the therapeutic activity of 4-1BB-targeting antibodies. J Exp Med. 2014 Jun 30; 211(7):1433-48.

[0488] Muyldermans S. Single domain camel antibodies; current status. J Biotechnol. Jun; 74(4):277-302. (2001)

[0489] Sanchez-Paulete A.R, Labiano S., Rodriguez-Ruiz M.E., Azpilikueta A., Etxeberria I., Bolanos E., Lang V., Rodriguez M., Aznar M.A., Jure-Kunkel M. and Melero I. Deciphering CD137 (4-1BB) signaling in T-cell costimulation for

translation into successful cancer. Immunotherapy. Eur. J. Immunol. 2016. 46:513-522

[0490] Vinay D.S. and Kwon B.S. Immunotherapy of Cancer with 4-1BB Mol Cancer Ther; 11(5) May 2012

[0491] Yannick Bulliard, Rose Jolicoeur, Jimin Zhang, Glenn Dranoff, Nicholas S Wilson, and Jennifer L Brogdon OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating Fc γ Rs, leading to antitumor efficacy. Immunology and Cell Biology (2014) 92, 475-480; doi:10.1038/icb.2014.26; published online 15 April 2014

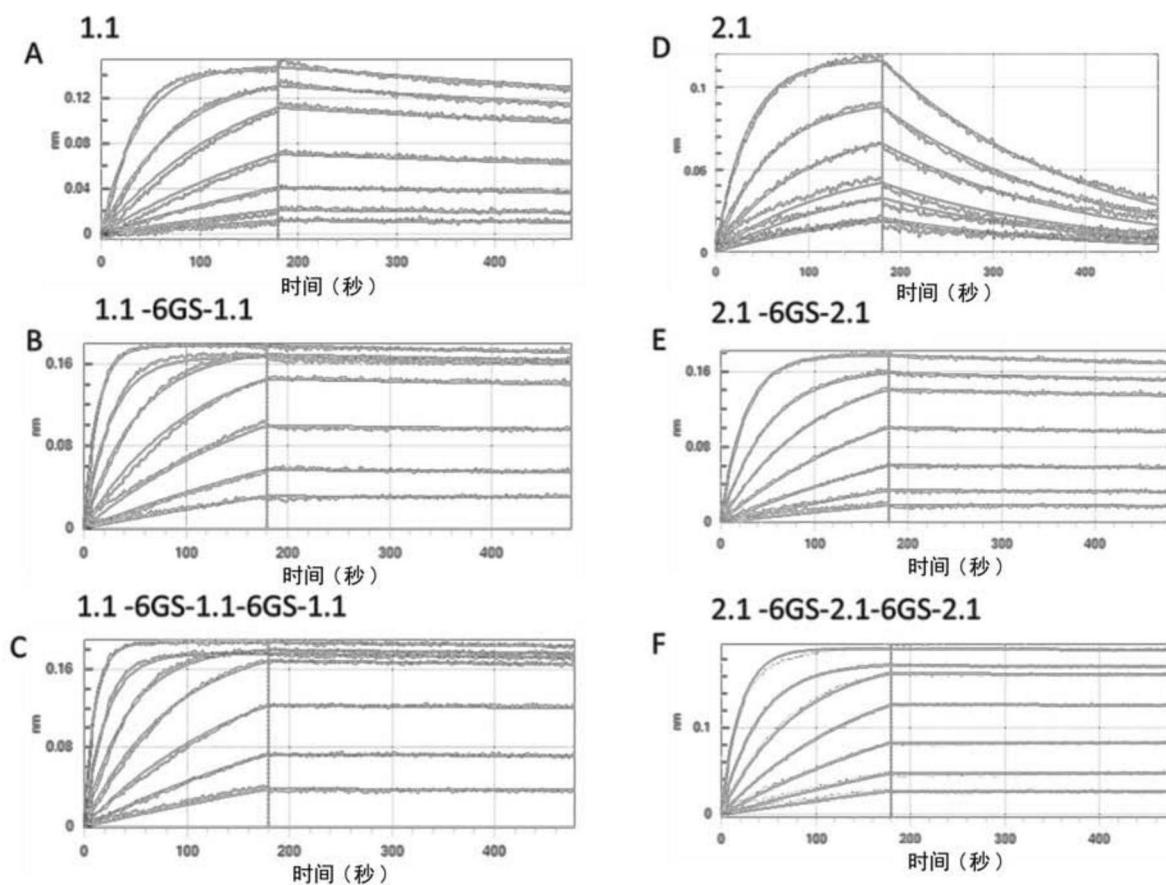


图1

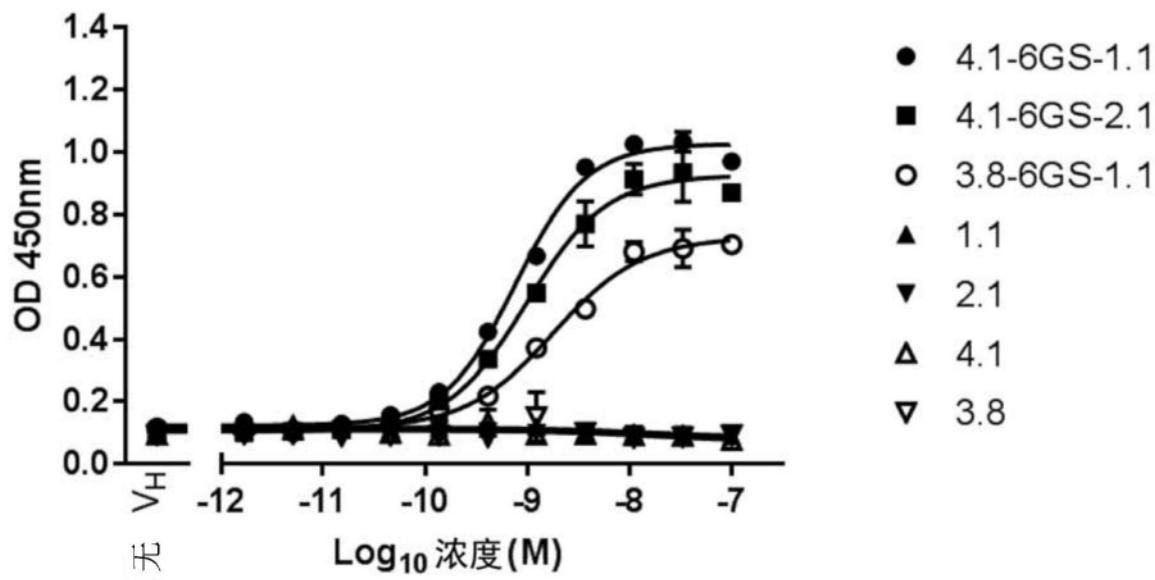
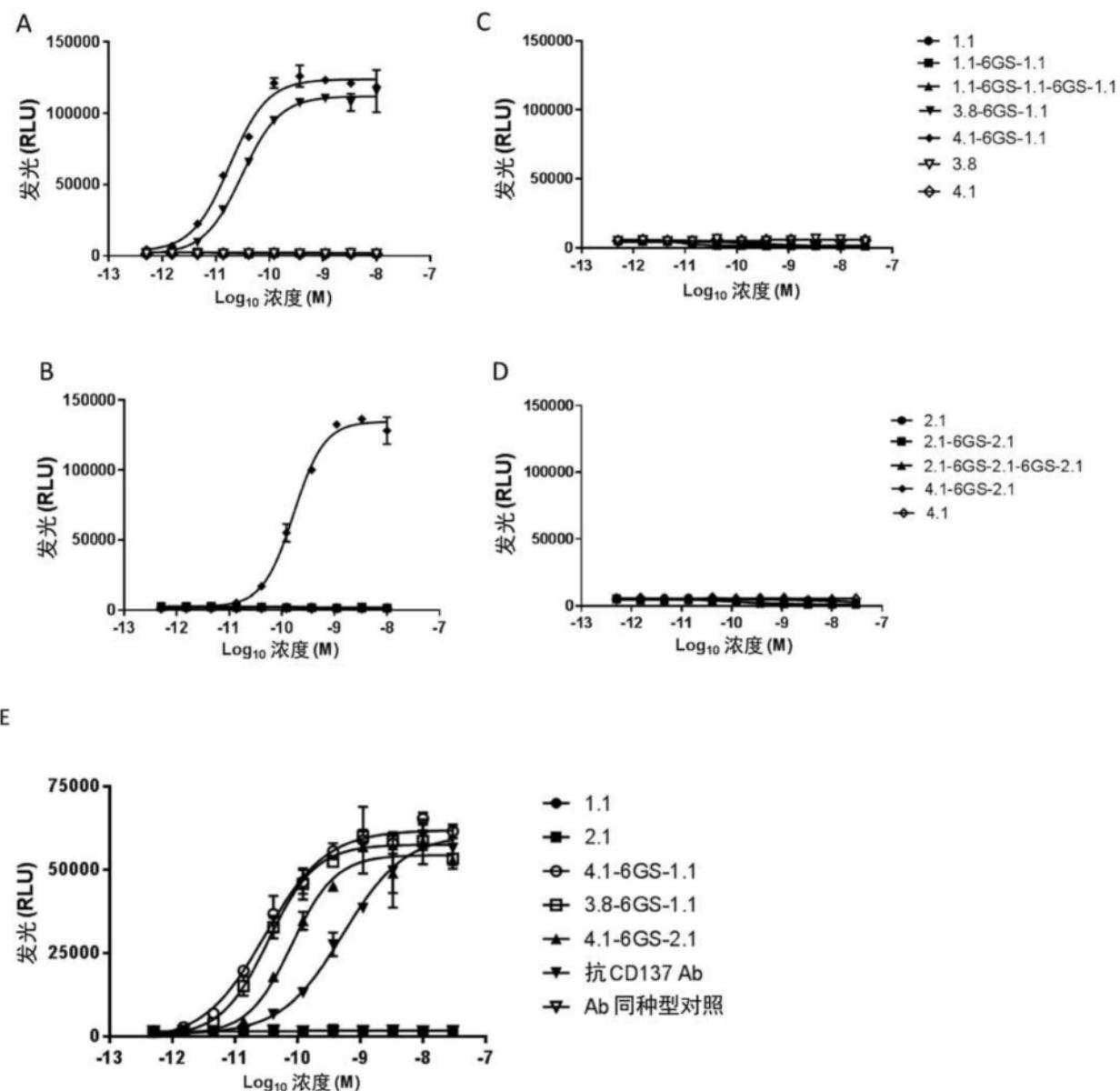
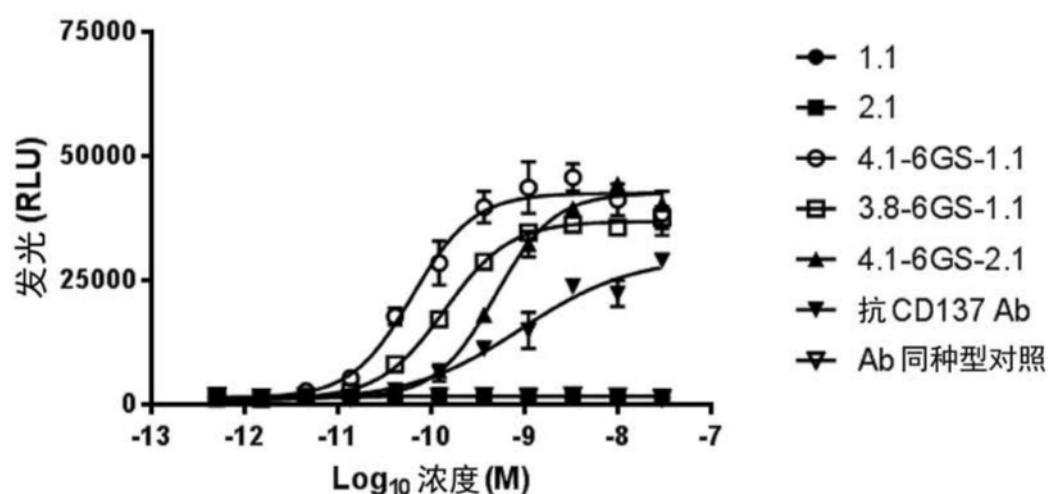


图2



F



G

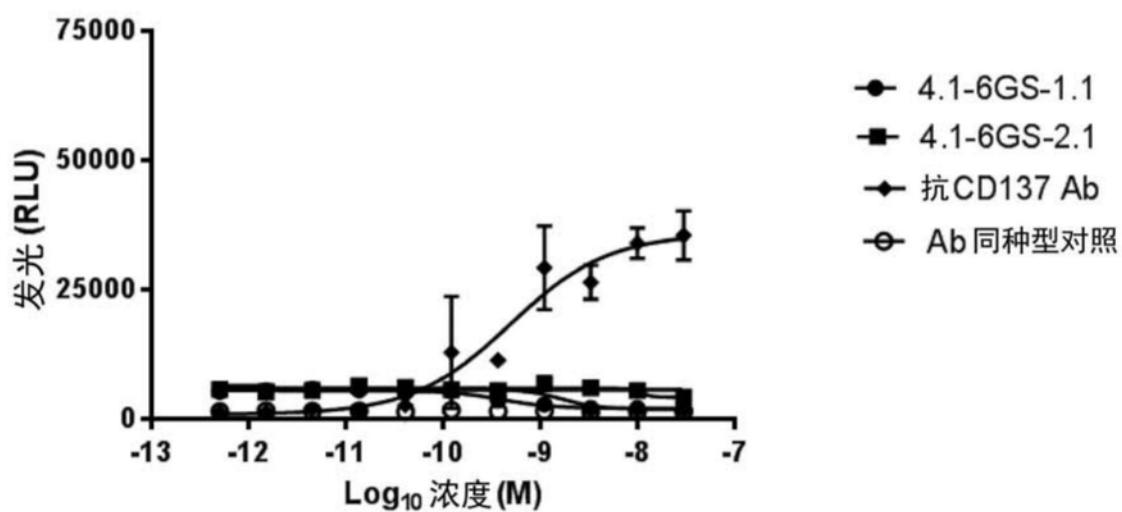


图3 (续)

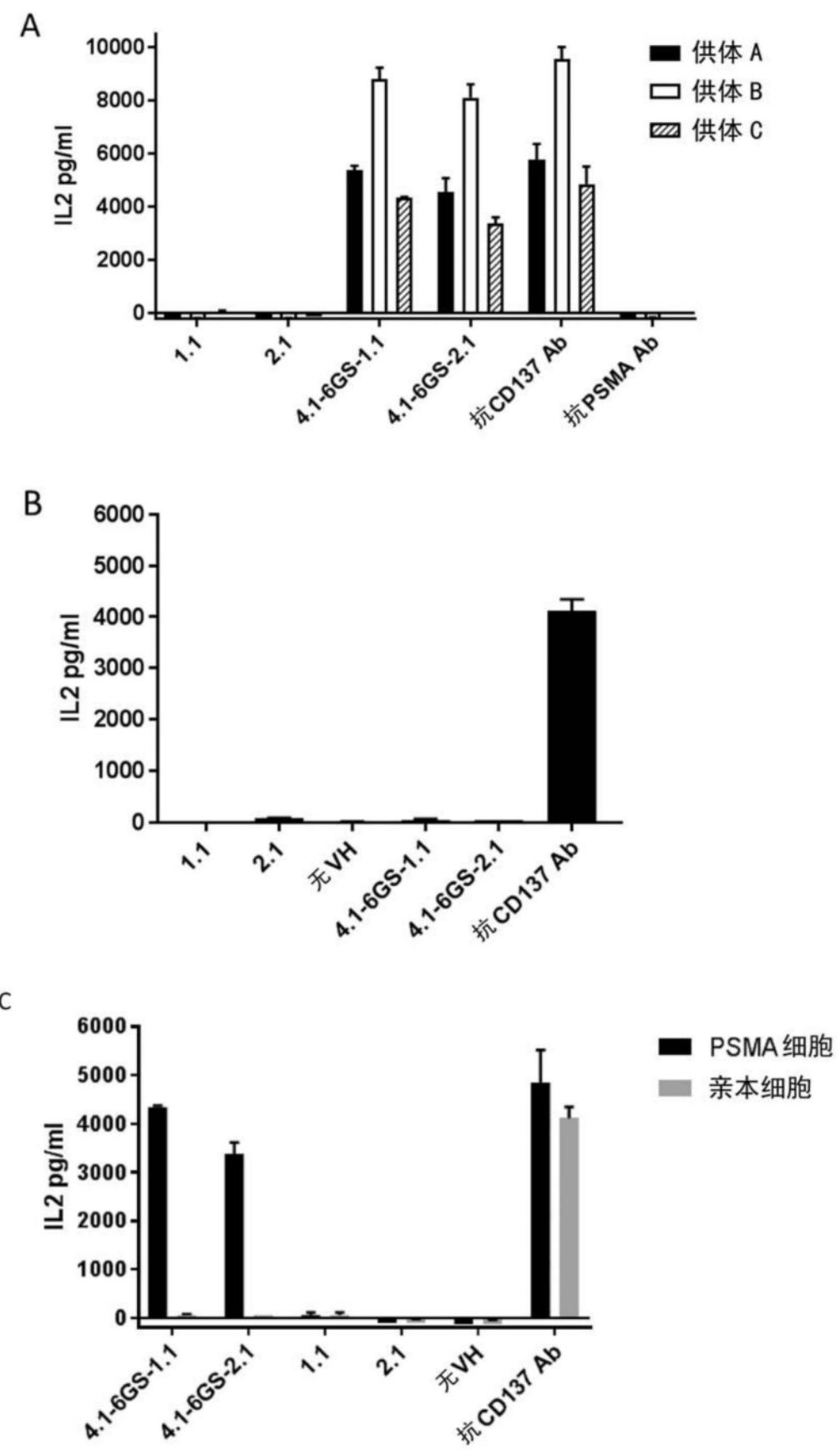
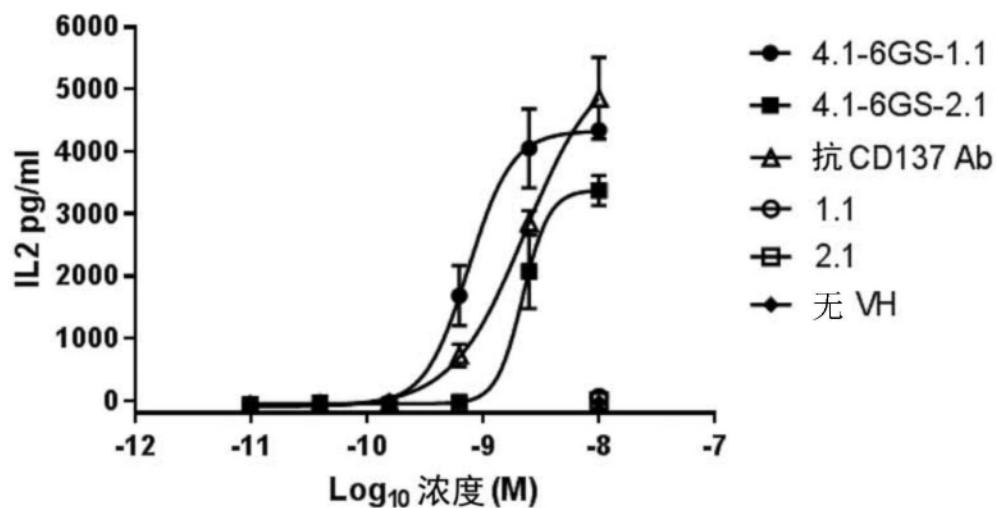


图4

D



E

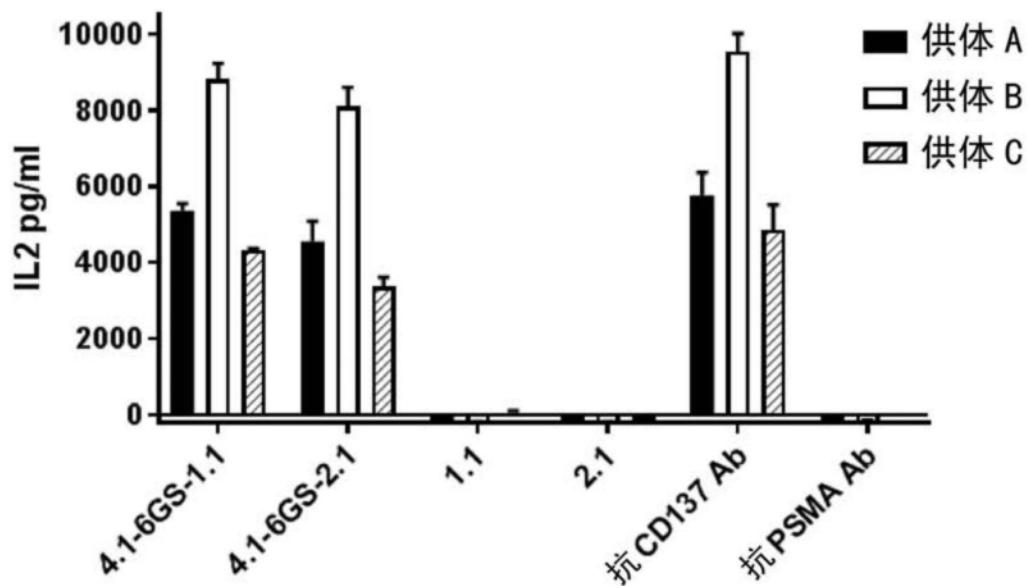


图4(续)

F

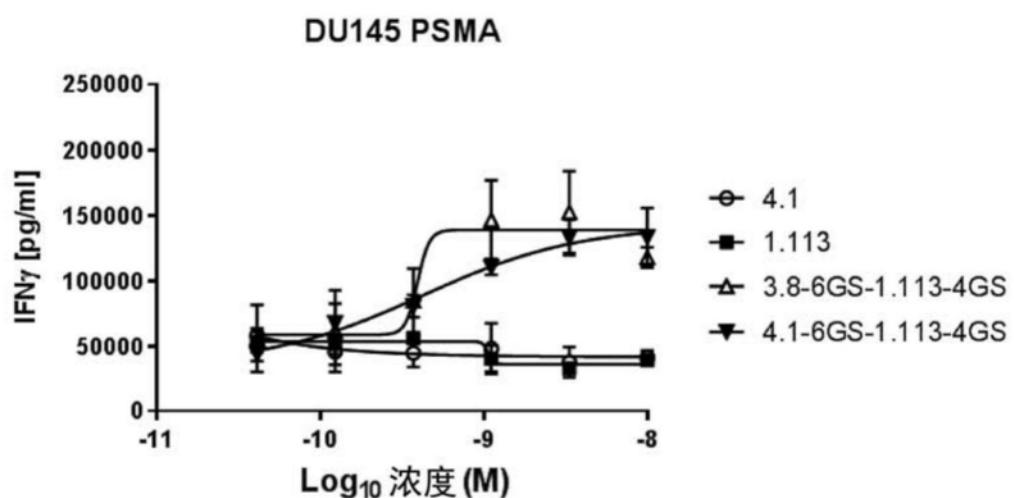


图4(续)

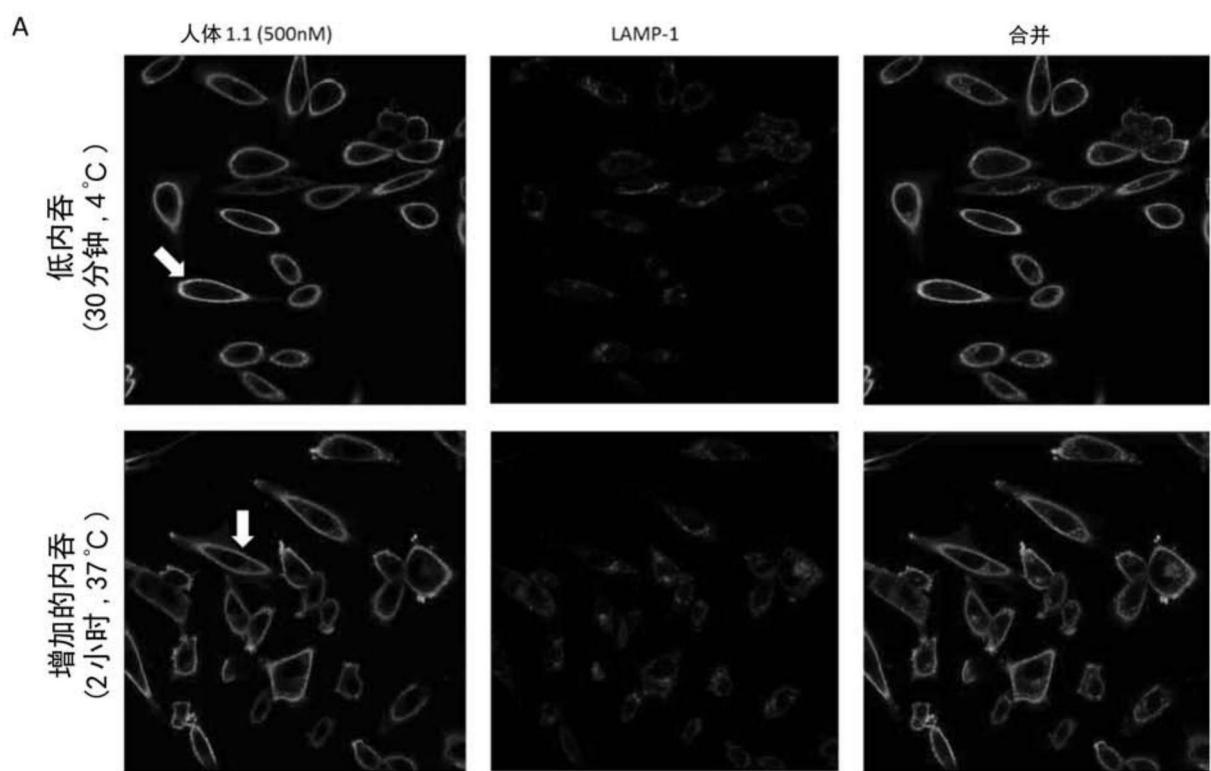


图5

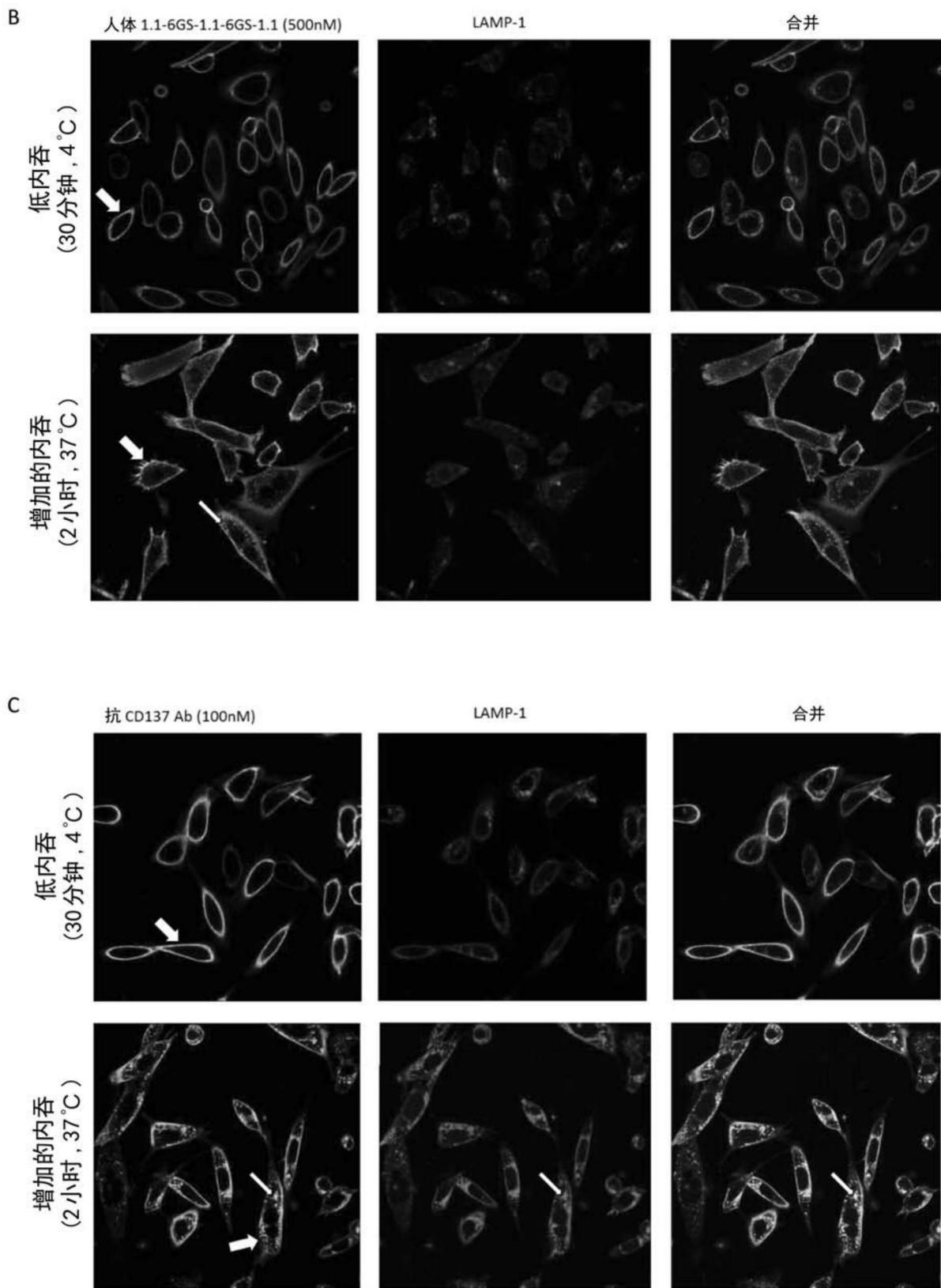


图5(续)

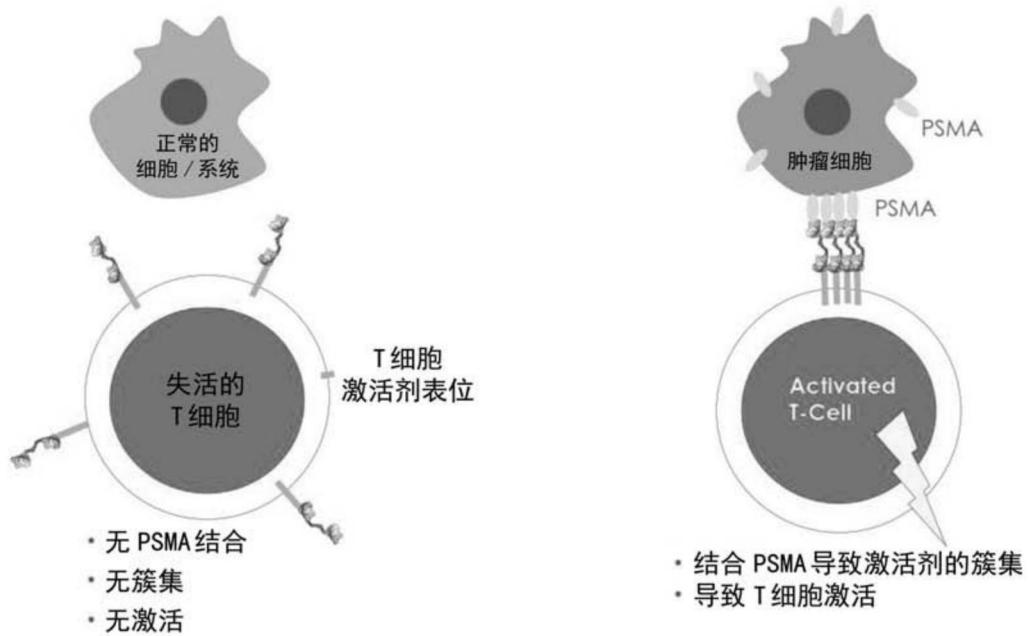


图6

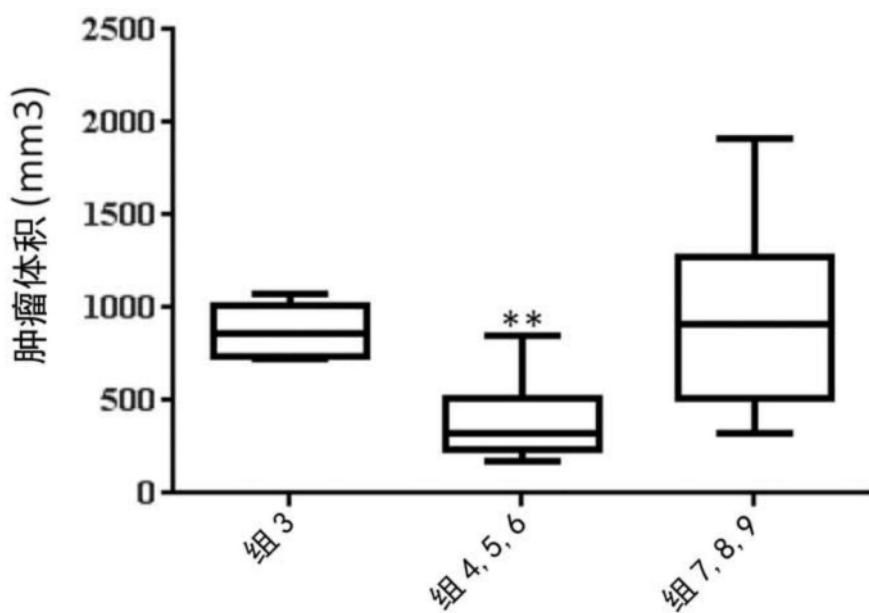


图7