



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108473561 B

(45) 授权公告日 2022.12.16

(21) 申请号 201680068704.X

彼得·梅尔特斯

(22) 申请日 2016.11.28

玛丽-安格·比斯

(65) 同一申请的已公布的文献号

马尔腾·德维尔德

申请公布号 CN 108473561 A

格拉尔德·贝斯特

(43) 申请公布日 2018.08.31

贾罗米尔·弗拉奇 乔纳森·徐

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

62/260,411 2015.11.27 US

专利代理人 高丽娜 张莹

62/345,967 2016.06.06 US

(51) Int.CI.

C07K 16/18 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/28 (2006.01)

2018.05.24

C07K 16/46 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/EP2016/079048 2016.11.28

CN 102112494 A, 2011.06.29

(87) PCT国际申请的公布数据

US 2012201746 A1, 2012.08.09

W02017/089618 EN 2017.06.01

US 2013018175 A1, 2013.01.17

(73) 专利权人 埃博灵克斯股份有限公司

审查员 吕丽珊

地址 比利时根特-茨维纳德

权利要求书2页 说明书58页

序列表60页 附图4页

(54) 发明名称

抑制CD40L的多肽

(57) 摘要

本发明涉及特异性结合CD40L的免疫球蛋白,更具体地涉及多肽、编码此种多肽的核酸;涉及用于制备此种多肽的方法;涉及组合物并且具体是包含此种多肽的药物组合物,其用于预防、治疗或诊断目的。具体地,本发明的免疫球蛋白抑制CD40L的活性并且是安全的。

1. 包含至少一个特异性结合CD40L的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽,其中与CD40L的结合调节CD40L的活性,其中特异性结合CD40L的所述ISVD由4个框架区FR1至FR4和3个互补决定区CDR1至CDR3组成,其中

CDR1为SEQ ID NO:33,CDR2为SEQ ID NO:35,CDR3为SEQ ID NO:37;

CDR1为SEQ ID NO:61,CDR2为SEQ ID NO:63,CDR3为SEQ ID NO:65;

CDR1为SEQ ID NO:40,CDR2为SEQ ID NO:42,CDR3为SEQ ID NO:44;或

CDR1为SEQ ID NO:68,CDR2为SEQ ID NO:70,CDR3为SEQ ID NO:72。

2. 根据权利要求1所述的多肽,其中所述多肽还包含结合血清白蛋白的ISVD,其中所述结合血清白蛋白的ISVD由4个框架区FR1至FR4和3个互补决定区CDR1至CDR3组成,其中CDR1是SEQ ID NO:74,CDR2是SEQ ID NO:75,CDR3是SEQ ID NO:76。

3. 根据权利要求1所述的多肽,其中所述多肽还包含结合血清白蛋白的ISVD和在所述结合血清白蛋白的ISVD的C端的1个丙氨酸,其中结合血清白蛋白的所述ISVD由4个框架区FR1至FR4和3个互补决定区CDR1至CDR3组成,其中CDR1是SEQ ID NO:74,CDR2是SEQ ID NO:75,CDR3是SEQ ID NO:76。

4. 根据权利要求1所述的多肽,其中

-CDR1是SEQ ID NO:33,CDR2是SEQ ID NO:35并且CDR3是SEQ ID NO:37;或

-CDR1是SEQ ID NO:61,CDR2是SEQ ID NO:63并且CDR3是SEQ ID NO:65。

5. 根据权利要求1所述的多肽,其中所述ISVD是SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:6。

6. 根据权利要求1所述的多肽,其中CDR1是SEQ ID NO:40,CDR2是SEQ ID NO:42并且CDR3是SEQ ID NO:44;或CDR1是SEQ ID NO:68,CDR2是SEQ ID NO:70并且CDR3是SEQ ID NO:72。

7. 根据权利要求6所述的多肽,其中所述ISVD是SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:3。

8. 根据权利要求1所述的多肽,其中通过KinExA所确定的,所述多肽以如下KD结合CD40L:1E<sup>-07</sup>M至1E<sup>-13</sup>M;

通过B细胞增殖测定法或通过B细胞信号传导测定法所确定的,所述多肽以如下IC<sub>50</sub>结合CD40L:1E<sup>-07</sup>M至1E<sup>-12</sup>M;和/或

所述多肽以如下IC<sub>50</sub>结合CD40L:最多1E<sup>-07</sup>M;和/或

通过SPR所确定的,所述多肽以小于5E<sup>-04</sup>(s<sup>-1</sup>)的解离速率结合CD40L。

9. 根据权利要求1所述的多肽,其中所述CD40L是人CD40L。

10. 根据权利要求9所述的多肽,其中所述CD40L是SEQ ID NO:1。

11. 根据权利要求1所述的多肽,其中所述活性的调节是

-拮抗CD40L的活性;

-通过配体竞争、B细胞激活测定、AlphaScreen或竞争性结合测定所确定的,阻断至少20%,至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或甚至更多的CD40L与CD40的结合;

-拮抗CD40介导的T细胞共刺激分子和/或免疫刺激分子的诱导;

-通过TTIgG测定所确定的,抑制B细胞激活;

-不诱导Jurkat T细胞中的JNK磷酸化;

-不诱导由抗CD3抗体共刺激的Jurkat T细胞分泌IFN $\gamma$ ;

-不诱导原代内皮细胞的激活;和/或

-不诱导血小板激活或血小板聚集,其通过血小板激活测定或血小板聚集测定来确定。

12.根据权利要求2所述的多肽,其中所述结合血清白蛋白的ISVD选自ALB135 (SEQ ID NO:15) ,ALB129 (SEQ ID NO:13) ,ALB8 (SEQ ID NO:11) ,ALB23 (SEQ ID NO:12) 和ALB132 (SEQ ID NO:14) 。

13.有效量的根据权利要求1至12中任一项所述的多肽用于制备药物的用途,所述药物用于治疗或预防个体中的疾病或病症,在所述疾病或病症中涉及CD40L/CD40介导的途径的不适当激活,其中所述疾病或病症选自系统性红斑狼疮 (SLE) 、狼疮肾炎、免疫性血小板减少性紫癜 (ITP) 、移植排斥、舍格伦综合征、炎性肠病 (IBD) 、结肠炎、动脉粥样硬化、重症肌无力、多发性硬化、类风湿性关节炎、冠心病、1型糖尿病和肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 。

14.有效量的根据权利要求1至12中任一项所述的多肽用于制备药物的用途,所述药物用于治疗或预防个体中的疾病或病症,在所述疾病或病症中涉及CD40L/CD40介导的途径的不适当激活,其中所述疾病或病症为自身免疫性疾病。

15.有效量的根据权利要求1至12中任一项所述的多肽用于制备药物的用途,所述药物用于治疗或预防个体中的疾病或病症,其中所述疾病或病症为克罗恩氏病。

## 抑制CD40L的多肽

### 1发明领域

[0001] 本发明涉及结合CD40L的免疫球蛋白,更具体地说,涉及包含一种或多种此类免疫球蛋白或基本上由其组成的多肽(在本文中也分别称为“本发明的免疫球蛋白”和“本发明的多肽”)。

[0002] 本发明还涉及编码这样的多肽的核酸(在本文中也称为“本发明的一种或多种核酸”);涉及制备此类多肽的方法;涉及表达或能够表达此类多肽的宿主细胞;涉及组合物,并且特别是包含此类多肽、核酸和/或宿主细胞的药物组合物;以及涉及多肽、核酸、宿主细胞和/或组合物的用途,特别是用于预防目的和/或治疗目的,例如本文提及的预防目的和/或治疗目的。

[0003] 本发明的其它方面、实施例、优点和应用将从本文的进一步描述中变得清楚。

### 2背景技术

[0004] 已显示CD40/CD40配体(CD40L,CD154)相互作用在B细胞和T细胞应答的起始(Grewal&Flavell,1998Annu.Rev.Immunol.16:111-135;Yang&Wilson,1996 Science 273:1862-1864)和维持(Grewal等,1996 Science 273:1864-1867;Buhlmann等,1999 J.Immunol.162:4373-4376)中起关键作用。CD40共刺激分子组成型表达或在体外激活后表达在各种抗原呈递细胞(APC)的表面上,包括树突细胞(DC)、B淋巴细胞、巨噬细胞和CD34<sup>+</sup>细胞祖细胞的亚群(McLellan等,1996 Eur.J.Immunol.26:1204-1210;Rondeelli等,1999 Blood 94:2293-2300)。CD40L在T细胞受体介导的刺激后在CD4<sup>+</sup>和一些CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞表面表达。CD40和CD40L之间的相互作用导致影响APC和T细胞功能的双向信号。一方面,CD40L依赖性刺激CD40诱导DC和巨噬细胞表达T细胞共刺激分子如CD80和CD86,并产生免疫刺激性细胞因子如IL-12,从而增强它们启动辅助细胞和细胞毒性T细胞应答的能力(Kennedy等,1994 Eur.J.Immunol.24:116-123;Caux等,1994 J.Exp.Med.180:1263-1272)。另一方面,CD40依赖性刺激CD40L产生促进T细胞激活(Koppenhoefer等,1997 FEBS Letters 414:444-448;Blotta等,1996 J.Immunol.156:3133-3140)的共刺激信号(Brenner等,1997 FEBS Letters 417:301-306)来自动物模型和人类的证据支持CD40-CD40L相互作用在各种自身免疫疾病中产生致病性自身抗体和组织损伤中的重要作用,这些自身免疫疾病如狼疮肾炎、系统性红斑狼疮(SLE)、特发性血小板减少性紫癜(ITP)和肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、也称为Lou Gehrig病和Charcot病。这些发现促进了破坏CD40-CD40L相互作用的抗体的开发。

[0005] 已显示针对人CD40L(hu5C8或鲁珠单抗,Biogen)的人源化单克隆抗体(mAb)在来自MHC(主要组织相容性复合体)错配供体的肾移植的非人灵长类模型中的大多数接受者中诱导长期移植存活(Kirk等,1999 Nat.Med.5:686-693)。在狼疮肾炎的II期临床试验中也已经检测到相同的抗体。然而,由于血栓栓塞事件(TE)(包括心肌梗塞)(Kawai等,2000 Nat.Med.6:114),该研究不得不早终止。

[0006] IgG1同种型的人源化抗CD40L抗体托利珠单抗(torilizumab)(IDE-131,hu24-

31) 源自鼠抗CD40L杂交瘤24-31。与鲁利单抗(ruplizumab)类似,计划用于托拉珠单抗的多重I期和II期试验也由于人类患者血栓栓塞事件的风险而停止。

[0007] 开发的第三种抗CD40L抗体是ABI793,其是来自HuMAb小鼠(Medarex Inc.)的人IgG1。在这种情况下,已经在恒河猴和食蟹猴肾移植模型中观察到TE,因为ABI793的进一步发展停止了。

[0008] 血栓栓塞事件可以在不同的疾病背景中用针对不同表位的抗体开发,并且涉及不同部位的静脉和动脉区域,包括心肌、肺动脉和外周静脉。然而,抗CD40L诱导的TE的确切机制仍有待阐明。主要假设是:

[0009] (i) 由于IgG单克隆抗体的二价性质,血小板上CD40L的交联;

[0010] (ii) 抗CD40L抗体与血小板Fc受体的相互作用,从而促进血小板聚集和血栓形成。

[0011] 另外,针对治疗性蛋白质产物例如已有抗体(PEA)和/或抗药物抗体(ADA)的免疫应答可能对患者安全性和产品功效两者造成问题。这些基于免疫学的不良事件包括过敏反应、细胞因子释放综合征、“输注反应”和非急性反应(延迟性发热、皮疹、关节痛、肌痛、血尿、蛋白尿、浆膜炎、中枢神经系统并发症和溶血性贫血)以及介导关键功能的内源性蛋白质的交叉反应中和。对治疗性蛋白质产物的不需要的免疫应答还可以中和它们的生物学活性,并且不仅通过抑制治疗性蛋白质产物的功效,而且通过与内源性蛋白质对应物交叉反应而导致不良事件,导致其生理功能的丧失。免疫原性的安全后果可能差异很大,并且在给予治疗性蛋白质产物的患者中通常是不可预测的。如果与治疗性蛋白质产物或相关蛋白质的非冗余内源对应物交叉反应并将其抑制,则PEA和ADA可能具有严重后果(Macdougal等,2012 *Kidney Int.* 2012;81:727-32;Seidl等,2012 *Pharm Res* 29:1454-1467)。

[0012] WO2013/056068涉及二聚体融合蛋白,其由连接至针对CD40L的结构域抗体(dAb)的C末端的IgG1的经修饰的Fc片段构成。WO2013/056068没有报道PEA,但报道在猴中ADA是针对蛋白发展的,导致快速清除(低血浆暴露和低血清T<sub>1/2</sub>)。

[0013] 没有关于足够有效的免疫球蛋白单可变结构域抗体发生的报道。Biogen和UCB目前正在合作重新设计已有抗CD40L抗体作为Fab'-PEG分子(CDP7657),试图克服hu5C8所见的TE事件。为了延长半衰期,Fab'部分与聚乙二醇(PEG)偶联。PEG具有广泛的应用范围,从工业制造到医药,因此它被广泛使用。最近的一项研究结果表明,在健康献血者中抗PEG抗体发生率是22-25%。抗PEG抗体的这种开发可能限制在某些患者中的功效,这与一般假设PEG不具有免疫原性相反。因此,聚乙二醇化的治疗剂对于临床应用具有潜在的影响,特别是在免疫受损的疾病背景下。此外,据报道,Fab'分子的聚乙二醇化使其活性降低4-5倍(US2010/0104573)。Xie等人描述了Fc格式化的必要性,其包括使该分子成为二价的以提高效力(Xie等,2014 *J. Immunol.* 192:4083-4092)。

[0014] 因此,需要安全有效的抗CD40L药物。

[0015] 本发明人假设在没有功能性Fc结构域的情况下靶向CD40L的单价实体可以代表抑制CD40-CD40L T细胞共刺激而不诱导通过血小板聚集和/或激活的不良事件的形式。

### 3发明概述

[0016] 除了其他有利性质(如,例如,改善的制备容易性、良好的稳定性和/或降低的成本)之外,本发明还提供了抗CD40L的多肽,其与现有技术的氨基酸序列和抗体相比具有改

善的预防、治疗和/或药理学性质。

[0017] 基于非常规筛选、表征和组合策略,诸位发明人意外地观察到在体内功效研究和体外安全性实验中异常进行的替代免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)。

[0018] 此外,诸位发明人能够重新设计ISVD以不仅胜过基准CDP7657,而且还在半衰期延长时保持该性能。另一方面,本发明的ISVD也被证明比现有技术的抗体安全得多。

[0019] 因此,本发明涉及针对/和/或可特异性结合(如本文所定义的)CD40L的多肽。

[0020] 特别地,本发明涉及包含至少一个特异性结合CD40L的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)的多肽,其中与CD40L的结合调节CD40L的活性。

[0021] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述特异性结合CD40L的ISVD基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中

[0022] (i) CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:33、61、40和68;和

[0023] 与SEQ ID NO:33、40、61或68具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0024] (ii) CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:35、63、42和70;和

[0025] 与SEQ ID NO:35、42、63或70具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0026] (iii) CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:37、65、44和72;和

[0027] 与SEQ ID NO:37、65、44或72具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0028] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中CDR1选自由以下各项组成的组::

[0029] (a) SEQ ID NO:61和

[0030] (b) 与SEQ ID NO:61具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列其中

[0031] -在第1位,G已被改变为E或R;

[0032] -在第2位,R已被改变为H或G;

[0033] -在第3位,T已被改变为I、A、S或P;

[0034] -在第4位,P已被改变为S;

[0035] -在第5位,L已被改变为P;

[0036] -在第6位,N已被改变为S、D或I;

[0037] -在第7位,Y已被改变为H;

[0038] -在第8位,H已被改变为N;

[0039] -在第9位,M已被改变为K、T或V;和/或

[0040] -在第10位,A已被改变为G、S或T。

[0041] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中CDR2选自由以下各项组成的组::

[0042] (a) SEQ ID NO:63;和

[0043] (b) 与SEQ ID NO:63具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列其中

[0044] -在第1位,A已被改变为G;

[0045] -在第2位,I已被改变为V;

[0046] -在第4位,S已被改变为N、R或G;

[0047] -在第6位,L已被改变为I;

[0048] -在第7位,G已被改变为S或D;

[0049] -在第8位,S已被改变为G、I或F;和/或

[0050] -在第9位,T已被改变为P或S。

[0051] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中CDR3选自由以下各项组成的组::  
(a) SEQ ID NO:65;和  
[0053] (b) 与SEQ ID NO:65具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列其中  
[0054] -在第1位,R已被改变为Q或L;  
[0055] -在第2位,E已被改变为D或K;  
[0056] -在第3位,T已被改变为S、M、A或K;  
[0057] -在第4位,T已被改变为I、S、A或R;  
[0058] -在第5位,H已被改变为Y或N;  
[0059] -在第6位,Y已被改变为I、H或N;  
[0060] -在第7位,S已被改变为T、G、N或I;  
[0061] -在第8位,T已被改变为I或A;  
[0062] -在第9位,S已被改变为N或R;  
[0063] -在第10位,D已被改变为A;  
[0064] -在第11位,R已被改变为S或G;  
[0065] -在第13位,N已被改变为D、Y或S;  
[0066] -在第14位,E已被改变为V、A、D或N;  
[0067] -在第15位,M已被改变为I、V、K或T;  
[0068] -在第16位,R已被改变为K、S、W、M、G或T;  
[0069] -在第17位,H已被改变为N、L、Q、R或D;  
[0070] -在第19位,D已被改变为N;和/或  
[0071] -在第20位,Y已被改变为H、F或N.  
[0072] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中,  
[0073] -CDR1是SEQ ID NO:33,CDR2是SEQ ID NO:35并且CDR3是SEQ ID NO:37;或  
[0074] -CDR1是SEQ ID NO:61,CDR2是SEQ ID NO:63并且CDR3是SEQ ID NO:65。  
[0075] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述ISVD是SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:6。  
[0076] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中CDR1选自由以下各项组成的组::  
(a) SEQ ID NO:40;和  
[0078] (b) 与SEQ ID NO:40具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列其中  
[0079] -在第3位,T已被改变为S、N、A或I;  
[0080] -在第4位,L已被改变为Q、S、M或G;  
[0081] -在第8位,A已被改变为N或V;  
[0082] -在第9位,I已被改变为L或V;和/或  
[0083] -在第10位,G已被改变为A.  
[0084] 本发明还涉及如本文所述的多肽,8,其中CDR2选自由以下各项组成的组::  
(a) SEQ ID NO:42;和  
[0086] (b) 与SEQ ID NO:42具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列其中  
[0087] -在第2位,I已被改变为V;  
[0088] -在第3位,S已被改变为G;  
[0089] -在第5位,E已被改变为G;

[0090] -在第6位,G已被改变为S;

[0091] -在第7位,S已被改变为G、N、T或I;

[0092] -在第8位,T已被改变为A、P、I或S;和/或

[0093] -在第9位,S已被改变为I、R或G.

[0094] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中CDR3选自由以下各项组成的组::

[0095] (a) SEQ ID NO:44;和

[0096] (b) 与SEQ ID NO:44具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0097] -在第4位,R已被改变为S;

[0098] -在第7位,L已被改变为F、M或W;

[0099] -在第8位,G已被改变为D、A或S;

[0100] -在第9位,S已被改变为G、N或R;

[0101] -在第10位,S已被改变为G、N、T或R;

[0102] -在第12位,D已被改变为G、N、E或V;

[0103] -在第13位,T已被改变为N或A;

[0104] -在第14位,Q已被改变为H、K、L或R;

[0105] -在第15位,S已被改变为P或T;

[0106] -在第16位,H已被改变为N或Y;

[0107] -在第17位,Q已被改变为L、R或H;

[0108] -在第18位,Y已被改变为F;

[0109] -在第19位,D已被改变为G;和/或

[0110] -在第20位,Y已被改变为F或N。

[0111] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中CDR1是SEQ ID NO:40,CDR2是SEQ ID NO:42并且CDR3是SEQ ID NO:44。

[0112] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述ISVD是SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:3。

[0113] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽以如下KD结合CD40L:1E<sup>-07</sup>M至1E<sup>-13</sup>M,比如1E<sup>-08</sup>M至1E<sup>-12</sup>M,优选最多1E<sup>-07</sup>M,优选低于1E<sup>-08</sup>M或1E<sup>-09</sup>M,或甚至低于1E<sup>-10</sup>M,比如5E<sup>-11</sup>M、4E<sup>-11</sup>M、3E<sup>-11</sup>M、2E<sup>-11</sup>M、1.7E<sup>-11</sup>M、1E<sup>-11</sup>、或甚至5E<sup>-12</sup>M、4E<sup>-12</sup>M、3E<sup>-12</sup>M、1E<sup>-12</sup>M,例如通过KinExA确定的。

[0114] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽以如下IC<sub>50</sub>结合CD40L:1E<sup>-07</sup>M至1E<sup>-12</sup>M,比如1E<sup>-08</sup>M至1E<sup>-11</sup>M,例如通过B细胞增殖测定法或通过B细胞信号传导测定法确定的。

[0115] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽以如下IC<sub>50</sub>结合CD40L:最多1E<sup>-07</sup>M,优选1E<sup>-08</sup>M、1E<sup>-09</sup>M、或5E<sup>-10</sup>M、4E<sup>-10</sup>M、3E<sup>-10</sup>M、2E<sup>-10</sup>M,比如1E<sup>-10</sup>M。

[0116] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽以小于5E<sup>-04</sup> (s<sup>-1</sup>)的解离速率(off-rate)结合CD40L,例如通过SPR确定的。

[0117] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述CD40L优选为人CD40L,优选SEQ ID NO:18。

[0118] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽拮抗CD40L的活性。

[0119] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽阻断至少20%,例如至少30%、

40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或甚至更多的CD40L与CD40的结合,例如通过配体竞争,B细胞激活测定,AlphaScreen或竞争性结合测定如竞争性ELISA或竞争性FACS确定的。

[0120] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽拮抗CD40介导的T细胞共刺激分子如CD80和CD86和/或免疫刺激分子如IL12的诱导。

[0121] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽抑制B细胞激活。

[0122] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽基本上不诱导Jurkat T细胞中的JNK磷酸化,或基本上不诱导由抗CD3抗体共刺激的Jurkat T细胞分泌IFN $\gamma$ 。

[0123] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽抑制B细胞激活,例如如通过TT IgG测定所确定的。

[0124] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其还包含结合血清白蛋白的ISVD(ALB-纳米抗体)。

[0125] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述结合血清白蛋白的ISVD基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1为SEQ ID NO:74,CDR2是SEQ ID NO:75CDR1是SEQ ID NO:76。

[0126] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述结合血清白蛋白的ISVD选自由以下各项组成的组:ALB135(SEQ ID NO:15),ALB129(SEQ ID NO:13),ALB8(SEQ ID NO:11),ALB23(SEQ ID NO:12)和ALB132(SEQ ID NO:14)。

[0127] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中特异性结合CD40L的所述ISVD和结合血清白蛋白的所述ISVD直接相互连接或通过接头连接。

[0128] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述接头选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:18-29和77,优选SEQ ID NO:21。

[0129] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其还包含C端延伸。

[0130] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述C端延伸是C端延伸(X) $n$ ,其中n是1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5(并且优选1或2,例如1);并且每个X是独立选择的(优选天然存在的)氨基酸残基,并且优选独立地选自由以下各项组成的组:丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)。

[0131] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽还包含本文所述的结合血清白蛋白的ISVD,本文所述的接头和本文所述的C端延伸。

[0132] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽与C010003318(SEQ ID NO:9)或C010003313(SEQ ID NO:78)具有至少80%、90%、95%或100%序列同一性。

[0133] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽基本上不诱导原代内皮细胞的激活。

[0134] 本发明还涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽基本上不诱导血小板激活或血小板聚集,例如如通过血小板激活测定或血小板聚集测定所确定的。

[0135] 本发明还涉及治疗预防个体中的疾病或病症的方法,例如在所述疾病或病症中涉及CD40L/CD40介导的途径的不适当激活,该方法包括将本发明的多肽以有效治疗或预防所述疾病或病症的症状的量施用至所述个体。

[0136] 本发明还涉及如本文所述的方法,其中所述疾病或病症包括系统性红斑狼疮

(SLE)、狼疮肾炎、免疫性血小板减少性紫癜 (ITP)、移植排斥、克罗恩氏病 (Crohn's Disease)、舍格伦综合征 (Sjögren's Syndrome)、炎性肠病 (IBD)、结肠炎、哮喘/变态反应、动脉粥样硬化、重症肌无力、多发性硬化、银屑病、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、冠心病, 1型糖尿病和对重组药物产品例如血友病因子VII的免疫应答。

[0137] 本发明还涉及用作药物的如本文所述的多肽。

[0138] 本发明还涉及如本文所述的多肽, 其用于治疗或预防自身免疫性疾病、系统性红斑狼疮 (SLE)、狼疮肾炎、免疫性血小板减少性紫癜 (ITP)、移植排斥、克罗恩氏病、舍格伦综合征、炎性肠病 (IBD)、结肠炎、哮喘/变态反应、动脉粥样硬化、重症肌无力、多发性硬化、银屑病、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、冠心病, 1型糖尿病和对重组药物产品例如血友病因子VII的免疫应答。

[0139] 本发明还涉及如本文所述的多肽, 其中所述多肽交叉阻断多肽46B03 (SEQ ID NO: 6)、28B02 (SEQ ID NO: 3)、C010003290 (SEQ ID NO: 8) 和 C010003318 (SEQ ID NO: 9) 中的至少一种与CD40L的结合和/或其与CD40L的结合被多肽46B03 (SEQ ID NO: 6)、28B02 (SEQ ID NO: 3)、C010003290 (SEQ ID NO: 8) 和 C010003318 (SEQ ID NO: 9) 中的至少一种交叉阻断。

[0140] 本发明还涉及交叉阻断46B03 (SEQ ID NO: 6)、28B02 (SEQ ID NO: 3) C010003290 (SEQ ID NO: 8) 和 C010003318 (SEQ ID NO: 9) 中的至少一种与CD40L的结合和/或其与CD40L的结合被46B03 (SEQ ID NO: 6)、28B02 (SEQ ID NO: 3) C010003290 (SEQ ID NO: 8) 和 C010003318 (SEQ ID NO: 9) 中的至少一种交叉阻断的多肽, 其中所述多肽包含至少一个特异性结合CD40L的VH、VL、dAb、免疫球蛋白单可变结构域 (ISVD), 其中与CD40L的结合调节CD40L的活性。

#### 4附图

[0141] 图1: 该图显示当与不具有S112K突变的参考纳米抗体 (参考A, SEQ ID NO:16, 如图1中 (1) 所示) 相比较测试96个血清样品与具有S112K突变的代表性纳米抗体 (参考A+S112K+C端丙氨酸, 如图1中 (2) 所示) 结合时, 从实施例6.9.3获得的数据点。

[0142] 图2: 该图显示当与不具有V89T突变的参考纳米抗体 (参考A, SEQ ID NO:16, 如图2中 (1) 所示) 相比较测试129个血清样品与具有V89T突变的代表性纳米抗体 (参考A+L11V+V89T+C端丙氨酸, 如图2中 (2) 所示) 结合时, 从实施例6.9.3获得的数据点。

[0143] 图3: 血小板激活数据HV

[0144] 图4: 血小板激活数据SLE

[0145] 图5: 血小板聚集数据HV

[0146] 图6: 血小板聚集数据SLE

[0147] 图7: 抗CD40L纳米抗体损害TT-IgG应答

[0148] 图8: 利用指定浓度的不同化合物的人PBMC刺激后的IL-6诱导。

#### 5详述

[0149] 仍然需要安全有效的抗CD40L药物。这些药物应符合各种的和经常相矛盾的要求。样式应该广泛适用。具体而言, 该样式应该优先用于广泛范围的患者, 并且优先地还针对广泛的CD40L介导的病症。该样式应该优先是安全的, 不要引起任何血栓栓塞事件。此外, 该样

式应该优选是患者友好的。例如,该样式应该具有延长的半衰期,使得通过给药后该样式不会立即被肾清除移除。然而,延长半衰期应该优选不引入脱靶活性和副作用,诱发TE或限制疗效。

[0150] 本发明实现了这些要求中的至少一个。

[0151] 基于非常规筛选、表征和组合策略,本发明人令人惊讶地观察到替代性免疫球蛋白单可变结构域 (ISVD) 在体内功效研究和体外安全性实验中的优越表现。

[0152] 此外,诸位发明人能够重新设计ISVD以不仅胜过基准CDP7657,而且还在半衰期延长时保持该性能。另一方面,本发明的ISVD也被证明比现有技术的抗体安全得多。

[0153] 与现有技术的氨基酸序列和抗体相比,本发明提供了拮抗CD40L的多肽,其具有改善的预防、治疗和/或药理学特性,包括更安全的特征。

[0154] 因此,本发明涉及针对CD40L和/或可特异性结合(如本文所定义)CD40L并调节其活性的多肽,特别是包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域 (ISVD) 的多肽特异性结合CD40L,其中与CD40L结合调节CD40L的活性。

[0155] 除非另有说明或另外定义,否则所使用的所有术语具有其在本领域中的通常含义,这对于本领域技术人员来说是清楚的。例如参考标准手册,如Sambrook等 (Molecular Cloning:A Laboratory Manual (2nd.Ed.) Vols.1-3,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989) ,F.Ausubel等 (Current protocols in molecular biology,Green Publishing and Wiley Interscience,New York,1987) ,Lewin (Genes II,John Wiley& Sons,New York,N.Y.,1985) ,Old等 (Principles of Gene Manipulation:An Introduction to Genetic Engineering (2nd edition)University of California Press,Berkeley,CA,1981) ;Roitt等 (Immunology (6th.Ed.) Mosby/Elsevier,Edinburgh,2001) ,Roitt等 (Roitt's Essential Immunology (10<sup>th</sup> Ed.) Blackwell Publishing,UK,2001) 和Janeway等 (Immunobiology (6th Ed.) Garland Science Publishing/Churchill Livingstone,New York,2005) 以及本文引用的一般背景技术。

[0156] 除非另外指出,否则本领域技术人员将会清楚,没有详细描述的所有方法,步骤,技术和操作都可以以本身已知的方式执行和已经执行。再次参考例如本文提及的标准手册和一般背景技术以及其中引用的其他参考文献;以及例如以下评论Presta (Adv.Drug Deliv.Rev.58 (5-6) :640-56,2006) ,Levin和Weiss (Mol.Biosyst.2 (1) :49-57,2006) ,Irving等 (J.Immunol.Methods 248 (1-2) :31-45,2001) ,Schmitz等 (Placenta 21 Suppl.A:S106-12,2000) ,Gonzales等 (Tumour Biol.26 (1) :31-43,2005) ,其描述了用于蛋白质工程的技术,例如亲和力成熟和用于提高蛋白质例如免疫球蛋白的特异性和其他所需特性的其他技术。

[0157] 必须注意的是,除非上下文另有明确指示,否则如本文所使用的,单数形式“一种”,“一个”和“该”包括复数形式。因此,例如,提及“一种试剂”包括一种或多种这样的不同试剂,并且提及“该方法”包括参考本领域普通技术人员已知的可以修改或替换本文所述方法的等同步骤和方法。

[0158] 除非另有说明,否则术语“至少”在一系列要素之前应理解为指代该系列中的每个要素。本领域技术人员将认识到,或仅仅使用常规实验就能够确定本文描述的本发明的具体实施方案的许多等同物。这样的等同物旨在被本发明所涵盖。

[0159] 术语“和/或”无论在何处使用包括“和”、“或”以及“由所述术语连接的所有或任何其他组合的要素”的含义。

[0160] 本文所使用的术语“约”或“大约”是指给定值或范围的20%以内、优选15%以内、更优选10%以内、最优选5%以内。

[0161] 在整个说明书和随后的权利要求书中,除非上下文另有要求,否则词语“包括”和变化例如“包含”和“包括”将被理解为暗示包括所述的整体或步骤或整体或步骤的组,但不排除任何其他整体或步骤或整体或步骤的组。当在本文中使用时,术语“包含”可以用术语“含有”或“包括”来代替或有时在本文使用时与术语“具有”一起使用。

[0162] 如本文中使用的术语“序列”(例如在术语如“免疫球蛋白序列”、“抗体序列”、“可变结构域序列”、“ $V_{H}$ 序列”或“蛋白质序列”中)通常应该被理解为包括相关氨基酸序列以及编码其的核酸或核苷酸序列,除非上下文需要更有限的解释。

[0163] 氨基酸残基将根据标准的三字母或单字母氨基酸代码表示。参考WO 08/020079第48页上的表A-2。

[0164] 核酸或氨基酸被认为是“(处于) (基本上) 分离的 (形式)”-例如与已经从中获得其的反应介质或培养基相比-此时其已经与至少一种与其通常在所述来源或介质中联系的其它组分(例如另一种核酸,另一种蛋白质/多肽,另一种生物组分或大分子或至少一种污染物、杂质或次要组分)分开。具体而言,当核酸或氨基酸已经纯化至少2倍,特别是至少10倍,更特别是至少100倍和高达1000倍或更高时,认为其是“(基本上) 分离的”。“处于(基本上) 分离的形式”的核酸或氨基酸优选基本上是均相的,如使用合适的技术如合适的色谱技术如聚丙烯酰胺凝胶电泳测定的。

[0165] 当核苷酸序列或氨基酸序列分别被称为“包含”另一核苷酸序列或氨基酸序列或“基本上由另一核苷酸序列或氨基酸序列组成”时,这可能意味着后一核苷酸序列或氨基酸序列已经分别被并入到第一提及的核苷酸序列或氨基酸序列中,但更通常地这通常意味着第一提及的核苷酸序列或氨基酸序列分别在其序列内包含一段核苷酸残基或一段氨基酸残基,其具有与后一序列分别相同的核苷酸序列或氨基酸序列,而不管实际上如何生成或获得第一提及的序列(其可以例如通过本文所述的任何合适的方法)。通过非限制性实例,当说本发明的多肽包含免疫球蛋白单可变结构域时,这可能意味着所述免疫球蛋白单可变结构域序列已被并入本发明多肽的序列中,但更多通常这通常意味着本发明的多肽在其序列内包含免疫球蛋白单可变结构域的序列,而不管所述多肽是如何产生或获得的。而且,当核酸或核苷酸序列被认为包含另一核苷酸序列时,第一提及的核酸或核苷酸序列优选是这样的,即当其表达产物(例如多肽)表达时,由后一核苷酸序列编码的氨基酸序列形成所述表达产物的一部分(换句话说,后一核苷酸序列与第一提及的、更大的核酸或核苷酸序列处于相同的阅读框架中)。

[0166] “基本上由...组成”是指本发明方法中使用的免疫球蛋白单可变结构域或者与本发明的多肽完全相同或者对应于本发明的具有有限数量的氨基酸残基的多肽,例如1-20个氨基酸残基,例如在免疫球蛋白单可变结构域的氨基末端、羧基末端或氨基末端和羧基末端添加的1-10个氨基酸残基,优选1-6个氨基酸残基,例如1、2、3、4、5或6个氨基酸残基。

[0167] 为了比较两个或更多个核苷酸序列的目的,第一核苷酸序列与第二核苷酸序列之间的“序列同一性”百分比可以通过将[第一核苷酸序列中与第二核苷酸序列中的相应位置

的核苷酸相同的核苷酸数目]除以[第一核苷酸序列中核苷酸的总数目]并乘以[100%]来计算,其中第二核苷酸序列中的核苷酸的每个缺失、插入、置换或添加与第一核苷酸序列相比较被认为是在单个核苷酸(位置)处的差异。或者,使用标准设置,可以使用用于序列比对的已知计算机算法如NCBI Blast v2.0来计算两个或更多个核苷酸序列之间的序列同一性程度。例如在W0 04/037999、EP 0967284、EP 1085089、W0 00/55318、W0 00/78972、W0 98/49185和GB 2357768中描述了用于确定序列同一性程度的一些其他技术、计算机算法和设置。通常,为了根据上文概述的计算方法确定两个核苷酸序列之间“序列同一性”的百分比,具有最多核苷酸数目的核苷酸序列将被视为“第一”核苷酸序列,而另一个核苷酸序列将被视为“第二”核苷酸序列。

[0168] 为了比较两个或更多个氨基酸序列,第一氨基酸序列和第二氨基酸序列之间的“序列同一性”(在本文中也称为“氨基酸同一性”)百分比可以通过将[第一氨基酸序列中与第二氨基酸序列中相应位置的氨基酸残基相同的氨基酸残基的数目]除以[第一氨基酸序列中氨基酸残基的总数]并乘以[100%]来计算,其中第二氨基酸序列中的氨基酸残基的每个缺失、插入、置换或添加与第一氨基酸序列相比被认为是在单个氨基酸残基(位置)处的差异,即如本文所定义的“氨基酸差异”。或者,可以使用已知的计算机算法来计算两个氨基酸序列之间的序列同一性程度,所述已知的计算机算法例如上面提到的那些用于确定核苷酸序列的序列同一性程度的算法,同样使用标准设置。通常,为了根据上文概述的计算方法确定两个氨基酸序列之间“序列同一性”的百分比,具有最大数目的氨基酸残基的氨基酸序列将被视为“第一”氨基酸序列,而另一个氨基酸序列将被视为“第二”氨基酸序列。

[0169] 而且,在确定两个氨基酸序列之间的序列同一性程度时,本领域技术人员可以考虑所谓的“保守”氨基酸置换,其通常可以描述为氨基酸置换,其中氨基酸残基被替代为另一种具有相似化学结构的氨基酸残基,并且对多肽的功能、活性或其他生物学特性几乎没有影响。这样的保守氨基酸置换在本领域中是公知的,例如来自W0 04/037999、GB 335768、W0 98/49185、W0 00/46383和W0 01/09300;和这些置换的(优选的)类型和/或组合可以根据W0 04/037999以及W0 98/49185和其中引用的其他参考文献的相关教导来选择。

[0170] 这样的保守置换优选地是下列组(a) - (e)内的一个氨基酸被同一组内的另一个氨基酸残基置换的置换:(a)小的脂肪族、非极性或轻微极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro和Gly;(b)极性带负电的残基及其(不带电的)酰胺:Asp、Asn、Glu和Gln;(c)极性、带正电的残基:His、Arg和Lys;(d)大的脂肪族非极性残基:Met、Leu、Ile、Val和Cys;和(e)芳族残基:Phe、Tyr和Trp。特别优选的保守置换如下:Ala置换为Gly或置换为Ser;Arg置换为Lys;Asn置换为Gln或置换为His;Asp置换为Glu;Cys置换为Ser;Gln置换为Asn;Glu置换为Asp;Gly置换为Ala或置换为Pro;His置换为Asn或置换为Gln;Ile置换为Leu或置换为Val;Leu置换为Ile或置换为Val;Lys置换为Arg,置换为Gln或置换为Glu;Met置换为Leu,置换为Tyr或置换为Ile;Phe置换为Met,置换为Leu或置换为Tyr;Ser置换为Thr;Thr置换为Ser;Trp置换为Tyr;Tyr置换为Trp;和/或Phe置换为Val,置换为Ile或置换为Leu。

[0171] 适用于本文所述多肽的任何氨基酸置换也可以基于以下:Schulz等开发的不同物种的同源蛋白之间氨基酸变异频率的分析。(“Principles of Protein Structure”, Springer-Verlag, 1978),关于Chou和Fasman开发的结构形成潜能的分析(Biochemistry 13:211, 1974; Adv. Enzymol., 47:45-149, 1978)以及Eisenberg等人(Proc. Natl. Acad.

Sci.USA 81:140-144,1984)、Kyte和Doolittle (J.Molec.Biol.157:105-132,1981) 以及 Goldman等人 (Ann.Rev.Biophys.Chem.15:321-353,1986) 开发的蛋白疏水性模式的分析,在此全部引入作为参考。关于纳米抗体的一级、二级和三级结构的信息在本文的说明书和以上引用的一般背景技术中给出。而且,为此目的,来自美洲驼的V<sub>H</sub>结构域的晶体结构例如由以下给出:Desmyter等人 (Nature Structural Biology,3:803,1996) ,Spinelli等人 (Natural Structural Biology,3:752-757,1996) 和Decanniere等人 (Structure,7 (4) :361,1999) 。关于在常规V<sub>H</sub>结构域中形成V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>界面和在这些位置上潜在的骆驼化置换的一些氨基酸残基的进一步信息可以在上面引用的现有技术中找到。

[0172] 如果氨基酸序列和核酸序列在其整个长度上具有100%序列同一性(如本文所定义),则称其为“完全相同”。

[0173] 在一个实施方案中,特异性结合CD40L的本发明的多肽与C010003318 (SEQ ID NO: 9) 或C010003313 (SEQ ID NO:78) 具有80%、90%、95%或100%序列同一性,其中与CD40L的结合调节CD40L的活性。

[0174] 当比较两个氨基酸序列时,术语“氨基酸差异”是指与第二序列相比,第一序列位置上的单个氨基酸残基的插入、缺失或置换;应该理解,两个氨基酸序列可以含有一个、两个或更多个这样的氨基酸差异。更特别地,在本发明的氨基酸序列和/或多肽中,术语“氨基酸差异”是指在CDR1、CDR2和/或CDR3序列的位置上的单个氨基酸残基的插入、缺失或置换;应理解的是与最初的CDR1序列(例如,由特定序列标识符 (SEQ ID NO) 例示的CDR1序列,例如SEQ ID NO:33、61、40和68) 相比,CDR1序列可包含1、2或最多3个这样的氨基酸差异;与最初的CDR2序列(例如,由特定序列标识符 (SEQ ID NO:) 例示的CDR2序列,例如SEQ ID NO: 35、63、42和70) 相比,CDR2可以含有1、2或最多3个这样的氨基酸差异,并且与最初的CDR3序列(例如,由特定序列标识符 (SEQ ID NO:) 例示的CDR3序列,例如SEQ ID NO:37、65、44和72) 相比,CDR3序列可以含有1、2、3或最多4个这样的氨基酸差异。

[0175] “氨基酸差异”可以是改善本发明的ISVD的性质或者至少不会减少太多期望的性质或本发明的ISVD的期望性质的平衡或组合的任何一个、两个、三个或最多四个置换、缺失或插入。在这方面,与包含一个或多个没有一个、两个、三个或最多四个置换、缺失或插入的CDR序列的结合CD40L的ISVD的多肽相比,本发明的所得多肽应当至少以相同,大约相同或优选更高的亲和力或效力结合CD40L。亲和力可以例如通过表面等离子体共振 (SPR) 来测量,例如如实例中所用的K<sub>off</sub>速率所表示的。效力,例如如通过IC<sub>50</sub>所表示的,可以通过本领域已知的任何合适的方法测量,例如在实例中使用的B细胞增殖测定或B细胞信号传导测定。

[0176] 在这方面,CDR的氨基酸序列可以是通过使用一种或多种本身已知的亲和力成熟技术,例如通过如实例部分所用易错PCR,通过亲和力成熟从原始CDR氨基酸序列衍生的氨基酸序列。在实例部分中证明,本发明的ISVD的亲和力和/或效力得到改善,例如,CDR中的单个氨基酸差异导致1.8倍至5.2倍改善的解离速率。氨基酸差异的组合,例如CDR中的一个、两个、三个或最多四个置换、缺失或插入或其任何组合进一步改善解离速率。

[0177] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽分别以优于28B02和46B03的K<sub>off</sub>结合CD40L,诸如好至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或甚至更多,如好10倍,例如通过SPR确定的。

[0178] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽以至多 $5E^{-04}$  (s<sup>-1</sup>),如至多 $4E^{-04}$  (s<sup>-1</sup>)、 $3E^{-04}$  (s<sup>-1</sup>)、 $2E^{-04}$  (s<sup>-1</sup>)、 $1E^{-04}$  (s<sup>-1</sup>)、 $9E^{-05}$  (s<sup>-1</sup>)、 $8E^{-05}$  (s<sup>-1</sup>)、 $7E^{-05}$  (s<sup>-1</sup>)、 $6E^{-05}$  (s<sup>-1</sup>)、 $5E^{-05}$  (s<sup>-1</sup>)、 $4E^{-05}$  (s<sup>-1</sup>)、 $3E^{-05}$  (s<sup>-1</sup>)、 $2E^{-05}$  (s<sup>-1</sup>)、 $10E^{-06}$  (s<sup>-1</sup>)的K<sub>off</sub>结合CD40L,例如由SPR确定的。

[0179] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽以 $1E^{-07}$  M至 $1E^{-12}$  M,比如 $1E^{-08}$  M至 $1E^{-11}$  M,优选至多 $1E^{-07}$  M,优选低于 $1E^{-08}$  M或 $1E^{-09}$  M,或甚至低于 $5E^{-10}$  M、 $4E^{-10}$  M、 $3E^{-10}$  M、 $2E^{-10}$  M,比如 $1E^{-10}$  M的IC<sub>50</sub>结合CD40L,例如如通过B细胞增殖测定或B细胞信号传导测定所测定的。

[0180] 例如,取决于用于表达本发明多肽的宿主生物体,这种插入、缺失和/或置换可以以这样的方式设计:一个或多个用于翻译后修饰的位点(例如一个或多个糖基化位点)被移除,这将在本领域技术人员的能力范围内。

[0181] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中特异性结合CD40L的所述ISVD基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中

[0182] (i) CDR1选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:33、61、40和68;和

[0183] 与SEQ ID NO:33、61、40或68具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列;

[0184] (ii) CDR2选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:35、63、42和70;和

[0185] 与SEQ ID NO:35、63、42或70具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列;和

[0186] (iii) CDR3选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:37、65、44和72;和

[0187] 与SEQ ID NO:37、65、44或72具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0188] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中CDR1选自由以下各项组成的组:(a) SEQ ID NO:40;和(b) 与SEQ ID NO:40具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列

[0189] -在第3位,T已被改变为S、N、A或I;

[0190] -在第4位,L已被改变为Q、S、M或G;

[0191] -在第8位,A已被改变为N或V;

[0192] -在第9位,I已被改变为L或V;和/或

[0193] -在第10位,G已被改变为A.

[0194] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中CDR2选自由以下各项组成的组:(a) SEQ ID NO:42;和(b) 与SEQ ID NO:42具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0195] -在第2位,I已被改变为V;

[0196] -在第3位,S已被改变为G;

[0197] -在第5位,E已被改变为G;

[0198] -在第6位,G已被改变为S;

[0199] -在第7位,S已被改变为G、N、T或I;

[0200] -在第8位,T已被改变为A、P、I或S;和/或

[0201] -在第9位,S已被改变为I、R或G。

[0202] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中CDR3选自由以下各项组成的组:(a) SEQ ID NO:44;和(b) 与SEQ ID NO:44具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0203] -在第4位,R已被改变为S;

[0204] -在第7位,L已被改变为F、M或W;

[0205] -在第8位,G已被改变为D、A或S;

[0206] -在第9位,S已被改变为G、N或R;

- [0207] -在第10位,S已被改变为G、N、T或R;
- [0208] -在第12位,D已被改变为G、N、E或V;
- [0209] -在第13位,T已被改变为N或A;
- [0210] -在第14位,Q已被改变为H、K、L或R;
- [0211] -在第15位,S已被改变为P或T;
- [0212] -在第16位,H已被改变为N或Y;
- [0213] -在第17位,Q已被改变为L、R或H;
- [0214] -在第18位,Y已被改变为F;
- [0215] -在第19位,D已被改变为G;和/或
- [0216] -在第20位,Y已被改变为F或N。

[0217] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中CDR1选自由以下各项组成的组:(a) SEQ ID NO:61;和(b)与SEQ ID NO:61具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

- [0218] -在第1位,G已被改变为E或R;
- [0219] -在第2位,R已被改变为H或G;
- [0220] -在第3位,T已被改变为I、A、S或P;
- [0221] -在第4位,P已被改变为S;
- [0222] -在第5位,L已被改变为P;
- [0223] -在第6位,N已被改变为S、D或I;
- [0224] -在第7位,Y已被改变为H;
- [0225] -在第8位,H已被改变为N;
- [0226] -在第9位,M已被改变为K、T或V;和/或
- [0227] -在第10位,A已被改变为G、S或T。

[0228] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中CDR2选自由以下各项组成的组:(a) SEQ ID NO:63;和(b)与SEQ ID NO:63具有1、2或3个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

- [0229] -在第1位,A已被改变为G;
- [0230] -在第2位,I已被改变为V;
- [0231] -在第4位,S已被改变为N、R或G;
- [0232] -在第6位,L已被改变为I;
- [0233] -在第7位,G已被改变为S或D;
- [0234] -在第8位,S已被改变为G、I或F;和/或
- [0235] -在第9位,T已被改变为P或S。

[0236] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中CDR3选自由以下各项组成的组:(a) SEQ ID NO:65;和(b)与SEQ ID NO:65具有1、2、3或4个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

- [0237] -在第1位,R已被改变为Q或L;
- [0238] -在第2位,E已被改变为D或K;
- [0239] -在第3位,T已被改变为S、M、A或K;
- [0240] -在第4位,T已被改变为I、S、A或R;
- [0241] -在第5位,H已被改变为Y或N;
- [0242] -在第6位,Y已被改变为I、H或N;

- [0243] -在第7位,S已被改变为T、G、N或I;
- [0244] -在第8位,T已被改变为I或A;
- [0245] -在第9位,S已被改变为N或R;
- [0246] -在第10位,D已被改变为A;
- [0247] -在第11位,R已被改变为S或G;
- [0248] -在第13位,N已被改变为D、Y或S;
- [0249] -在第14位,E已被改变为V、A、D或N;
- [0250] -在第15位,M已被改变为I、V、K或T;
- [0251] -在第16位,R已被改变为K、S、W、M、G或T;
- [0252] -在第17位,H已被改变为N、L、Q、R或D;
- [0253] -在第19位,D已被改变为N;和/或
- [0254] -在第20位,Y已被改变为H、F或N。

[0255] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中

[0256] -CDR1是SEQ ID NO:33,CDR2是SEQ ID NO:35并且CDR3是SEQ ID NO:37;或

[0257] -CDR1是SEQ ID NO:61,CDR2是SEQ ID NO:63并且CDR3是SEQ ID NO:65。

[0258] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述ISVD是SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:6。

[0259] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中CDR1是SEQ ID NO:40,CDR2是SEQ ID NO:42并且CDR3是SEQ ID NO:44。

[0260] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述ISVD是SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:3。

[0261] 本说明书中使用的“纳米抗体家族”,“VHH家族”或“家族”是指具有相同长度(即它们在其序列内具有相同数目的氨基酸)的一组纳米抗体和/或VHH序列和其中第8位和第106位(根据Kabat编号)之间的氨基酸序列具有至少80%,例如85%、90%、95%以上(例如99%)的氨基酸序列同一性。

[0262] 可互换使用的术语“表位”和“抗原决定簇”是指大分子的部分,该大分子是例如被抗原结合分子(如本发明的免疫球蛋白、常规抗体、免疫球蛋白单一可变结构域、VHH、纳米抗体和/或多肽)并且更具体地被所述分子的抗原结合位点识别的多肽或蛋白质。表位定义了免疫球蛋白的最小结合位点,并因此代表了免疫球蛋白特异性的目标。

[0263] 识别表位的抗原结合分子(如免疫球蛋白、常规抗体、免疫球蛋白单一可变结构域和/或多肽)的部分称为“互补位”。

[0264] 可以“结合”或“特异性结合”某个表位、抗原或蛋白质(或其至少一部分、片段或表位)的、“对其具有亲和性”和/或“对其具有特异性”的多肽(如免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单一可变结构域、本发明的多肽或通常抗原结合分子或其片段)被称为“针对”或“直接针对”所述表位、抗原或蛋白质,或者是与这样的表位、抗原或蛋白质有关的“结合”分子,或者被称为“抗”表位,“抗”抗原或“抗”蛋白质(例如“抗”-CD40L)。

[0265] 亲和力表示分子相互作用的强度或稳定性。亲和力通常由 $K_D$ 或解离常数给出,其具有摩尔/升(或M)单位。亲和力也可以表示为缔合常数 $K_A$ ,其等于 $1/K_D$ 并且具有 $(\text{mol}/\text{升})^{-1}$ 或 $(\text{M}^{-1})$ 的单位。在本说明书中,两个分子之间相互作用的稳定性将主要以它们相互作用的

$K_D$ 值表示；本领域技术人员清楚的是，鉴于关系  $K_A = 1/K_D$ ，通过其  $K_D$  值指定分子相互作用的强度也可用于计算相应的  $K_A$  值。 $K_D$  值表征了分子间相互作用的强度，这也是热力学意义上的，因为它与通过公知关系  $DG = RT \cdot \ln(K_D)$  (等同地  $DG = -RT \cdot \ln(K_A)$ ) 与结合自由能 ( $DG$ ) 的变化有关，其中  $R$  等于气体常数， $T$  等于绝对温度，并且  $\ln$  表示自然对数。

[0266] 被认为有意义（例如具体）的生物相互作用的  $K_D$  通常在  $10^{-10} M$  (0.1 nM) 至  $10^{-5} M$  (10000 nM) 的范围内。相互作用越强，其  $K_D$  越低。

[0267]  $K_D$  也可表示为复合物的解离速率常数（表示为  $k_{off}$ ）与其缔合速率（表示为  $k_{on}$ ）的比率（使得  $K_D = k_{off}/k_{on}$  且  $K_A = k_{on}/k_{off}$ ）。解离速率  $k_{off}$  的单位是  $s^{-1}$ （其中  $s$  是秒的 SI 单位表示法）。缔合速率  $k_{on}$  的单位是  $M^{-1} s^{-1}$ 。缔合速率可以在  $10^2 M^{-1} s^{-1}$  至约  $10^7 M^{-1} s^{-1}$  之间变化，接近双分子相互作用的扩散限制缔合速率常数。解离速率通过关系  $t_{1/2} = \ln(2)/k_{off}$  与给定分子相互作用的半衰期相关。解离速率可以在  $10^{-6} s^{-1}$ （接近不可逆复合物的多天的  $t_{1/2}$ ）至  $1 s^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.69 s$ ) 之间变化。

[0268] 如果测量过程以某种方式影响暗示的分子的内在结合亲和力，例如通过与一个分子的生物传感器上的涂层有关的人为因素，则所测量的  $K_D$  可以对应于表观  $K_D$ 。此外，如果一个分子针对另一个分子含有一个以上的识别位点，则可以测量表观  $K_D$ 。在这种情况下，测量的亲和力可以受到两个分子相互作用的亲合力的影响。

[0269] 可用于评估亲和力的另一种方法是 Friguet 等人 (J. Immunol. Methods, 77, 305-19, 1985) 的两步 ELISA (酶联免疫吸附测定) 程序。该方法建立了溶液相结合平衡测量并且避免了与支持物（例如塑料）上的分子之一的吸附有关的可能的人为因素。

[0270] 然而， $K_D$  的准确测量可能是相当劳动密集型的，因此通常可以确定表观  $K_D$  值来评估两种分子的结合强度。应该注意的是，只要所有的测量都以一致的方式进行（例如保持测定条件不变），则可以使用表观  $K_D$  测量值作为真实  $K_D$  的近似值，因此在本文中  $K_D$  和表观  $K_D$  应当具有同等重要性或相关性地进行处理。

[0271] 最后，应该指出的是，在许多情况下，经验丰富的科学家可以判断它可以方便地确定相对于某些参考分子的结合亲和力。例如，为了评估分子 A 和 B 之间的结合强度，人们可以例如使用已知与 B 结合并且用荧光团或发色团或其他化学部分（如生物素）适当标记的参考分子 C，以便在 ELISA 或 FACS（荧光激活细胞分选）或其他形式（用于荧光检测的荧光团，用于光吸收检测的发色团，用于链霉亲和素介导的 ELISA 检测的生物素）中便于检测。通常，参比分子 C 保持在固定的浓度，并且对于给定的浓度或量的 B, A 的浓度是变化的。结果获得对应于 A 的浓度的  $IC_{50}$  值，在该浓度处在不存在 A 的情况下对 C 测量的信号减半。假设已知  $K_{D_{ref}}$ （参考分子的  $K_D$ ）以及参考分子的总浓度  $c_{ref}$ ，则相互作用 A-B 的表观  $K_D$  可由下式获得： $K_D = IC_{50} / (1 + c_{ref}/K_{D_{ref}})$ 。请注意，如果  $c_{ref} \ll K_{D_{ref}}$ ，则  $K_D \approx IC_{50}$ 。如果对比较的结合物以一致的方式进行  $IC_{50}$  的测量（例如保持  $c_{ref}$  固定），则可以通过  $IC_{50}$  评估分子相互作用的强度或稳定性，并且该测量在本文通篇被判断为等同于  $K_D$  或表观  $K_D$ 。

[0272] 抗原结合蛋白例如 ISVD 与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以以本身已知的任何适当方式确定，包括例如 Scatchard 分析和/或竞争性结合测定，例如放射免疫测定 (RIA)，酶免疫测定 (EIA) 和夹心竞争测定，以及本领域本身已知的其不同变体；以及本文提到的其他技术。

[0273] 两个分子之间的分子相互作用的亲和力可以通过本身已知的不同技术来测量，例

如众所周知的表面等离子体共振 (SPR) 生物传感器技术 (参见例如 Ober 等, 2001, Intern. Immunology 13:1551-1559), 其中一个分子固定在生物传感器芯片上, 另一个分子在流动条件下通过固定化分子, 产生  $k_{on}$ 、 $k_{off}$  测量值, 并且因此产生  $K_D$  (或  $K_A$ ) 值。这可以例如使用众所周知的Biacore仪器 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden) 进行。动力排斥测定 (KinExA) (Drake 等, 2004, Analytical Biochemistry 328:35-43) 测量溶液中的结合事件而不标记结合伴侣, 并基于动力学地排除复合物的解离。

[0274] 已证事实本发明的多肽具有优异的亲和力。因此, 本发明涉及如本文所述的多肽, 其中所述多肽以如下KD结合CD40L:  $1E^{-07}M$  至  $1E^{-13}M$ , 比如  $1E^{-08}M$  至  $1E^{-12}M$ , 优选至多  $1E^{-07}M$ , 优选低于  $1E^{-08}M$  或  $1E^{-09}M$ , 或甚至低于  $1E^{-10}M$ , 比如  $5E^{-11}M$ 、 $4E^{-11}M$ 、 $3E^{-11}M$ 、 $2E^{-11}M$ 、 $1.7E^{-11}M$ 、 $1E^{-11}$ 、或甚至  $5E^{-12}M$ 、 $4E^{-12}M$ 、 $3E^{-12}M$ 、 $1E^{-12}M$ , 例如通过KinExA确定的。

[0275] Gyrolab<sup>TM</sup>免疫分析系统为自动生物分析和快速样品周转提供了一个平台 (Fraley 等, 2013, Bioanalysis 5:1765-74)。

[0276] 技术人员还将清楚, 如果测量过程以某种方式影响暗示的分子的内在结合亲和力, 例如通过与一个分子的生物传感器上的涂层有关的人为因素, 则所测量的  $K_D$  可以对应于表观  $K_D$ 。此外, 如果一个分子对于另一个分子含有一个以上的识别位点, 则可以测量表观  $K_D$ 。在这种情况下, 测量的亲和力可能受到两个分子相互作用的亲合力的影响。

[0277] 术语“特异性”具有WO 08/020079的第53-56页的段落n) 给出的含义; 并且如其中提到的是指特定抗原结合分子或抗原结合蛋白 (诸如本发明的免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽) 可以结合的不同类型的抗原或抗原决定簇的数目。如WO 08/020079 (引入本文作为参考) 的第53-56页所述, 可以基于亲和力和/或亲合力来确定抗原结合蛋白的特异性, 其也描述了用于测量抗原结合分子 (例如本发明的免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽) 和相关抗原之间的结合的一些优选技术。典型地, 抗原结合蛋白 (如本发明的免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽) 将以如下解离常数 ( $K_D$ ) 结合其抗原:  $10^{-5}$  至  $10^{-12}$  摩尔/升或更低, 并且优选  $10^{-7}$  至  $10^{-12}$  摩尔/升或更低并且更优选  $10^{-8}$  至  $10^{-12}$  摩尔/升 (即, 解离常数 ( $K_A$ ) 是  $10^5$  至  $10^{12}$  升/摩尔或更多, 并且优选  $10^7$  至  $10^{12}$  升/摩尔或更多并且更优选  $10^8$  至  $10^{12}$  升/摩尔)。大于  $10^{-4}$  摩尔/升的任何  $K_D$  值 (或低于  $10^4M^{-1}$  的任何  $K_A$  值) 升/摩尔通常被认为表明非特异性结合。优选地, 本发明的单价多肽将以小于 500nM, 优选小于 200nM, 更优选小于 10nM, 例如 10-5nM 或更小的亲和力与所需抗原结合。抗原结合蛋白与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以以本身已知的任何适当方式确定, 包括例如Scatchard分析和/或竞争性结合测定, 例如放射免疫测定 (RIA), 酶免疫测定 (EIA) 和夹心竞争测定, 以及本领域本身已知的其不同变体; 以及本文提到的其他技术。如本领域技术人员将清楚的并且如WO 08/020079的第53-56页所述, 解离常数可以是实际或表观解离常数。确定解离常数的方法对于本领域技术人员将是清楚的, 并且例如包括在WO 08/020079的第53-56页中提及的技术。

[0278] 在以下情况下称免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽对第一靶标或抗原 (例如 CD40L 的表位) 是“特异性的”: 与第二靶标或抗原相比, 其与第一抗原的结合亲和力 (如上所述, 并且被合适地表示为  $K_D$  值,  $K_A$  值,  $K_{off}$  速率和/或  $K_{on}$  速率) 比免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽与第二靶标或抗原 (即不同于第一靶标或抗原, 例如不同于CD40L的所述表位) 的结合亲和力高至少 10 倍, 如至少 100 倍, 优选至少 1000 倍, 并且至多 10000 倍或更多倍。例如, 免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽与第一靶标或抗原的结合的  $K_D$  值比所述免疫球蛋白单可

变结构域和/或多肽与第二靶标或抗原的结合的 $K_d$ 值小至少10倍,例如小至少100倍,优选小至少1000倍,比如小至少10000倍。优选地,当免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽与第二靶标或抗原相比对第一靶标或抗原是“特异性的”时,其直接针对(如本文所定义的)所述第一靶标或抗原,但不直接针对所述第二靶或抗原。

[0279] CD40L也被称为CD154、gp39、TNF相关激活蛋白(TRAP)、5c8抗原或T-BAM。人CD40L的相关结构信息可以在例如UniProt登录号P29965处找到。“人CD40L”指包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CD40L。在一方面,本发明的多肽特异性结合来自智人、小家鼠、家犬、奶牛、猕猴、食蟹猴、豚尾猴、*Aotus tigrinus*、普通狨、*Cercocebus torquatus atys*、褐家鼠、原鸡、家猫和/或野猪的CD40L,它们已被测序,优选人CD40L,优选SEQ ID NO:1。

[0280] 术语“(交叉)阻断”,“(交叉)阻断的”,“(进行交叉)阻断”,“竞争性结合”,“(交叉)竞争”,“进行(交叉)竞争”在本文中可互换使用,表示免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂干扰其他免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或结合剂与给定靶标结合的能力。免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂能够干扰另者与靶标的结合的程度,并且因此根据本发明是否可以说是交叉阻断,这可以是使用竞争结合测定来确定,例如如实例中所述通过在竞争性ELISA中针对噬菌体上展示的ISVD筛选纯化的ISVD。如果与CD40L结合的ISVD完全与另一种与CD40L的ISVD结合竞争(例如竞争ELISA中的纯化的ISVD),则所述ISVD属于相同的表位库(epitope bin)。如果与CD40L结合的ISVD不竞争或仅与结合CD40L的另一ISVD(例如竞争ELISA中纯化的ISVD)部分竞争,则所述ISVD属于不同的表位库。在与CD40L结合的ISVD的先导小组内确定了7个不同的表位库。

[0281] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,如SEQ ID NO:3、4、5、6、7、8、9、78、79、80、81或82,其中所述多肽与一种多肽竞争,例如通过竞争性ELISA确定的。

[0282] 本发明涉及用于测定与如本文所述的多肽竞争的竞争剂(例如多肽)的方法,本文所述的多肽诸如SEQ ID NO:3、4、5、6、7、8、9、78、79、80、81或82,其中如本文所述的多肽与竞争物多肽竞争结合或交叉阻断结合CD40L(例如hCD40L(SEQ ID NO:1)),其中与在不存在本发明的多肽的情况下竞争物与CD40L的结合相比较,在本发明的多肽的存在下竞争物与CD40L的结合降低至少5%,如10%,20%,30%,40%,50%或甚至更多,如80%,90%或甚至100%(即,在给定的测定中实际上不可检测)。竞争和交叉阻断可以通过本领域已知的任何方式来确定,例如竞争性ELISA或FACS测定。在一方面,本发明涉及本发明的多肽,其中所述多肽交叉阻断多肽46B03(SEQ ID NO:6),28B02(SEQ ID NO:3)C010003290(SEQ ID NO:8)和C010003318(SEQ ID NO:9)中的至少一种与CD40L的结合和/或其与CD40L的结合被多肽46B03(SEQ ID NO:6),28B02(SEQ ID NO:3)C010003290(SEQ ID NO:8)和C010003318(SEQ ID NO:9)中的至少一种交叉阻断。

[0283] 本发明还涉及与本文所述多肽(SEQ ID NO:3、4、5、6、7、8、9、78、79、80、81或82)竞争的竞争剂,其中所述竞争剂与本文所述的多肽竞争结合或交叉阻断结合CD40L,其中与在不存在所述竞争物的情况下本发明的多肽与CD40L的结合相比较,在所述竞争剂的存在下本发明的多肽与CD40L的结合降低至少5%,如10%,20%,30%,40%,50%或甚至更多,如80%,或甚至更多比如至少90%或甚至100%(即,在给定的测定中实际上不可检测)。在一个方面,本发明涉及交叉阻断本发明的多肽如46B03(SEQ ID NO:6)、28B02(SEQ ID NO:3)

C010003290 (SEQ ID NO:8) 和C010003318 (SEQ ID NO:9) 中的一种与CD40L的结合和/或其与CD40L的结合被46B03 (SEQ ID NO:6)、28B02 (SEQ ID NO:3) C010003290 (SEQ ID NO:8) 和C010003318 (SEQ ID NO:9) 中的至少一种交叉阻断的多肽,其中所述多肽包含至少一个特异性结合CD40L的VH、VL、dAb、免疫球蛋白单可变结构域 (ISVD),其中与CD40L的结合调节CD40L的活性。

[0284] 下面描述用于确定免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是否根据本发明交叉阻断或能够交叉阻断的合适的FACS测定法。应该理解,该测定可以与本文所述的任何免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂一起使用。FACS仪器(例如FACS Canto;Becton Dickinson)根据制造商的建议进行操作。

[0285] 为了评估用于结合CD40L的两种结合剂(例如两种免疫球蛋白单可变结构域和/或纳米抗体)之间的“(交叉)阻断”或“(交叉)竞争”,可以使用过表达人CD40L的细胞(如例如CHO细胞或HEK293H细胞)和作为背景细胞系的亲本细胞进行FACS竞争实验。可以使用不同的检测试剂,包括例如单克隆 ANTI-FLAG<sup>®</sup>M2抗体 (Sigma-Aldrich, 目录号F1804)、单克隆抗-C-myc抗体 (Sigma-Aldrich, 目录号WH0004609M2)、单克隆抗-HIS TAG抗体 (Sigma-Aldrich, 目录号SAB1305538),各自具有不同标签。

[0286] 本领域技术人员已知,各种荧光团可用作流式细胞术中的标记。荧光团或简单地“荧光物质”通常附着于识别CD40L的抗体(例如免疫球蛋白单可变结构域和/或纳米抗体)或附着于用作检测试剂的抗体。各种缀合的抗体是可用的,例如(不限于)例如与Alexa Fluor<sup>®</sup>、DyLight<sup>®</sup>、罗丹明、PE、FITC、和Cy3缀合的抗体。

[0287] 本文所述的能够确定免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单一可变结构域、多肽或其他结合剂针对靶标是否(交叉)阻断、能够(交叉)阻断、或(交叉)竞争的其他方法描述于例如Xiao-Chi Jia等 (Journal of Immunological Methods 288:91-98, 2004), Miller等 (Journal of Immunological Methods 365:118-125, 2011) 和/或本文所述的方法(参见例如实施例7)。

[0288] 在以下情况下称氨基酸序列对于两种不同抗原或抗原决定簇(例如来自两种不同哺乳动物物种的血清白蛋白,例如人血清白蛋白和食蟹猴(“cyno”)血清白蛋白,例如来自不同物种哺乳动物物种的CD40L,例如人CD40L,食蟹猴CD40L和大鼠CD40L)是“交叉反应的”:它对这些不同的抗原或抗原决定簇具有特异性(如本文所定义的)。应该理解,可以认为氨基酸序列或多肽是交叉反应的,尽管对两种不同抗原的结合亲和力可以不同,例如相差2、5、10、50、100倍或更多,前提是它对这些不同的抗原或抗原决定簇具有特异性(如本文所定义的)。

[0289] 在本发明的上下文中,“调节”或“以调节”通常指改变CD40L的活性,如使用合适的体外、细胞或体内测定(例如本文提及的那些)测量的。具体而言,“调节”或“以调节”可意指与相同条件下但不存在本发明的免疫球蛋白或多肽的同一测定中的CD40L的活性相比,将CD40L的活性降低或抑制或增加(如使用合适的体外、细胞或体内测定法测量的)(例如,诸如提及的那些)至少1%,优选至少5%,例如至少10%或至少25%,例如至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或90%或更多。

[0290] “调节”也可能意味着改变涉及CD40L(或其中涉及其一种或多种底物、一种或多种

配体或一种或多种途径,诸如其信号传导途径或代谢途径及其相关的生物学或生理学效应)的一种或多种生物学或生理学机制、效应、应答、功能、途径或活性。同样,如本领域技术人员将清楚的,可以以任何合适的方式和/或使用本身已知的任何合适的(体外和通常细胞或体内测定)测定来测定此类作用,例如本文描述的测定或在此引用的现有技术中。具体而言,作用可以是与相同条件下但不存在本发明的免疫球蛋白、ISVD或多肽的同一测定中的生物学或生理学活性相比较,使预期的生物学或生理学活性分别增加或减少至少1%,优选至少5%,例如至少10%或至少25%,例如至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或90%或更多。调节可涉及B细胞和/或T细胞激活和/或增殖的减少和/或抑制。调节可涉及(不需要的)免疫应答的减少、抑制和/或阻抑。

[0291] “CD40L活性”和“通过CD40L的活性”(这些术语在本文中可互换使用)包括但不限于与APC上的MHC分子对T细胞受体刺激相关的APC共刺激和激活,在细胞因子存在下分泌所有免疫球蛋白同种型,刺激B细胞增殖,B细胞激活,细胞因子产生,抗体类别转换和亲和力成熟。例如,X连锁性IgM综合征患者在其B细胞上表达功能性CD40,但其活化的T细胞具有缺陷性CD40L蛋白,导致其不能活化B细胞并诱导免疫球蛋白同种型转换(Aruffo等,1993Cell 72:291-300)。

[0292] CD40L活性可以通过与其他分子的相互作用介导。“CD40L活性”包括CD40L与下列分子之间的功能相互作用:CD40(CD40L受体;例如hCD40SEQ ID NO:2), $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白和 $\alpha 1$ 3/ $\beta 3$ 。例如,CD40L结合其在各种APC如B细胞、巨噬细胞和树突细胞以及基质细胞、血管内皮细胞和血小板上表达的受体CD40。因此,CD40L活性包括CD40介导的T细胞共刺激分子如CD80和CD86以及免疫刺激分子如IL12的诱导。

[0293] 如本文所使用的,术语“激活”,“激活了”和“激活的”是指给定的可测量的CD40L活性相对于参照增加至少10%,例如至少10%、25%、50%、75%或甚至100%或更多。在以下情况下称CD40L活性被“拮抗”:相对于不存在拮抗剂时活性降低至少10%,并且在示例性实施方案中降低至少20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,97%或甚至100%(即没有可检测的活性)。例如,本发明的多肽可以拮抗一些或全部CD40L活性。在一个实施方案中,本发明的多肽不激活B细胞增殖。在另一个实施方案中,本发明的多肽不激活T细胞或树突细胞(DC)的细胞因子分泌,其中细胞因子是至少一种选自下组的细胞因子:IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、IL-23、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 。

[0294] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽通过拮抗CD40L的活性来调节CD40L的活性。

[0295] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽将CD40L与CD40的结合阻断,优选至少70%,例如80%,90%,95%或更多,如通过配体竞争测定的/如通过B细胞激活FACS测定的;如通过AlphaScreen测定的,也参见实施例部分)。

[0296] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽拮抗CD40介导的T细胞共刺激分子如CD80和CD86和免疫刺激分子如IL12的诱导。

[0297] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽拮抗B细胞激活。

[0298] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽基本上不诱导Jurkat T细胞中的JNK磷酸化,或基本上不诱导用抗CD3抗体共刺激的Jurkat T细胞分泌IFN- $\gamma$ 。

[0299] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述多肽拮抗B细胞激活,例如如通过

TT IgG测定法在例如小鼠或猴子中所确定的。

[0300] 在一个实施方案中,本发明的多肽基本上不诱导原代内皮细胞的激活。

[0301] 在一个实施方案中,本发明的多肽基本上不诱导血小板激活或血小板聚集,例如如通过血小板激活测定或血小板聚集测定所确定的。

[0302] 如本文所用,本发明多肽的术语“效力”是本发明多肽发生特定作用所需的量的函数。它被简单地测量为该多肽的IC<sub>50</sub>的倒数。它是指本发明所述多肽调节和/或部分或完全抑制CD40L活性的能力。更具体地,它可以指所述多肽降低或甚至完全抑制如本文所定义的CD40L活性的能力。如此,它可以指所述多肽抑制T细胞增殖和/或抑制T细胞激活的能力,从而导致在体内抑制某些免疫应答。

[0303] 效力可以通过本领域已知的或本文描述的任何合适的测定来测量。

[0304] 在饱和多肽浓度时,本发明多肽的“功效”测量效应本身的最大强度。功效表明可从本发明的多肽获得的最大应答。它是指多肽产生所需(治疗)效果的能力。

[0305] 取决于上下文,氨基酸序列被解释为意指单个氨基酸或两个或更多个氨基酸的非分支序列。核苷酸序列被解释为意指3个或更多个核苷酸的非分支序列。

[0306] 氨基酸是天然存在的蛋白质中常见的那些L-氨基酸,并且是本领域中公知的。那些含有D-氨基酸的氨基酸序列不打算包含在该定义中。通过该定义可涵盖可表达为序列修饰的连接、交联和末端帽、非肽键等的任何肽或蛋白质。

[0307] 术语“蛋白质”、“肽”、“蛋白质/肽”和“多肽”在整个公开内容可互换使用,并且为了本公开的目的各自具有相同的含义。每个术语是指由两个或更多个氨基酸的直链构成的有机化合物。该化合物可以具有十个或更多个氨基酸;二十五个或更多个氨基酸;五十个或更多个氨基酸;一百个或更多个氨基酸,两百个或更多个氨基酸,甚至三百个或更多个氨基酸。本领域技术人员将认识到,多肽通常包含比蛋白质更少的氨基酸,尽管没有本领域公认的区分多肽和蛋白质的氨基酸数目的截止点;多肽可以通过化学合成或重组方法制备;并且通常通过本领域已知的重组方法在体外或体内制备蛋白质。

[0308] 按照惯例,多肽一级结构中的酰胺键是按氨基酸编写顺序,其中多肽的酰胺末端(N末端)总是在左侧,而酸末端(C末端)在右边。

[0309] 本发明的多肽包含至少一个结合CD40L的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)并且优选还包含结合血清白蛋白的ISVD。在本发明的多肽中,ISVD可以直接连接或通过接头连接。甚至更优选地,本发明的多肽包含C端延伸。如下文将详述的,C端延伸基本上防止/去除大多数人类受试者/患者样品中已有抗体/因子的结合。C端延伸出现在最后的(最C端的)ISVD的最后一个氨基酸残基(通常是丝氨酸残基)的C端。

[0310] 相对亲和力可以取决于ISVD在多肽中的位置。应该理解,可以根据本领域技术人员的需要来选择本发明多肽中ISVD的顺序(取向)。单个ISVD的顺序以及多肽是否包含接头是设计选择的问题。与其他取向相比,有或没有接头的一些取向可以提供优选的结合特性。例如,本发明多肽中第一ISVD(例如ISVD1)和第二ISVD(例如ISVD2)的顺序可以是(从N末端到C末端):(i) ISVD1(例如纳米抗体1)-[接头]-ISVD2(例如纳米抗体2)-[C端延伸];或(ii) ISVD2(例如纳米抗体2)-[接头]-ISVD1(例如纳米抗体1)-[C端延伸];(其中方括号之间的部分,即接头和C端延伸是任选的)。本发明涵盖所有的取向。含有提供所需结合特征的ISVD取向的多肽可以通过常规筛选容易地鉴定,例如在实施例部分中举例说明的。优选的顺序

是从N末端到C末端:结合CD40L的ISVD-[接头]-结合血清白蛋白的ISVD-[C端延伸],其中方括号之间的部分是任选的。

[0311] 在本发明的多肽中,两种或更多种ISVD例如纳米抗体可彼此直接连接(如例如WO 99/23221中所述)和/或可通过一种或多种合适的接头彼此连接,或其任何组合。适用于本发明多肽的接头对技术人员来说是清楚的,并且通常可以是本领域中用于连接氨基酸序列的任何接头。优选地,所述接头适用于构建打算用于药物的蛋白质或多肽。

[0312] 一些特别优选的接头包括本领域中用于连接抗体片段或抗体结构域的接头。这些包括上面引用的出版物中提及的接头,以及例如本领域用于构建双抗体或ScFv片段的接头(然而,在这方面,应该指出的是,尽管在双抗体和ScFv片段中,所使用的接头序列应该具有允许相关的 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域一起形成完整的抗原结合位点的长度、灵活度和其它性质,但对接头的长度或灵活性没有特别的限制用于本发明的多肽中,因为每个ISVD,例如纳米抗体本身形成完整的抗原结合位点)。

[0313] 例如,接头可以是合适的氨基酸或氨基酸序列,特别是具有1至50,优选1至30,例如1至10个氨基酸残基的氨基酸序列。这样的氨基酸序列的一些优选实例包括gly-ser接头,例如 $(gly_x ser_y)_z$ 型的(例如WO 99/42077所述的 $(gly_4 ser)_3$ 或 $(gly_3 ser_2)_3$ ),以及本文提到的埃博灵克斯申请中描述的GS30、GS15、GS9和GS7接头(参见例如WO 06/040153和WO 06/122825),以及铰链样区域,例如天然存在的重链抗体或类似序列的铰链区(如WO 94/04678中所述)。表1中描述了优选的接头。

[0314] 一些其他特别优选的接头是聚丙氨酸(例如AAA)以及接头GS30(在WO 06/122825中的SEQ ID NO:85)和GS9(在WO 06/122825中的SEQ ID NO:84)。在一个优选的方面,接头选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:18-29和77,优选SEQ ID NO:21。

[0315] 以下包含在本发明范围内:所使用的一种或多种接头的长度、灵活度和/或其他性质(尽管不是关键的,因为它通常用于ScFv片段中使用的接头)可以对本发明的最终多肽的性质具有一些影响,包括但不限于针对趋化因子或一种或多种其他抗原的亲和力、特异性或亲合力。基于本文的公开内容,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽中的最佳接头,任选地在一些有限的常规实验之后。

[0316] 当在本发明的多肽中使用两个或更多个接头时,这些接头可以相同或不同。同样,基于本文的公开内容,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽中的最佳接头,任选地在一些有限的常规实验之后。

[0317] 在本发明的多肽中,ISVD的前面可以有N端延伸。在本发明的背景下,N端延伸由具有至少一个氨基酸残基至最多40个氨基酸残基,优选2至30个氨基酸残基,例如2至20个氨基酸残基例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基的氨基酸序列组成。N端延伸存在于本发明的多肽中的第一个(即,位于最N端的)ISVD的第一个氨基酸残基(即,位于最N端,根据Kabat编号通常由氨基酸1表示)的N端。因此,本发明涉及包含N端延伸的第一多肽和/或所述第二多肽。

[0318] 如下文进一步阐述的,ISVD可以来源于 $V_{HH}$ 、 $V_H$ 或 $V_L$ 结构域,然而ISVD被选择为使得它们不在本发明的多肽中形成 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域的互补对。纳米抗体、 $V_{HH}$ 和人源化 $V_{HH}$ 是不常见的,因为它们来源于不含轻链的天然骆驼抗体,并且实际上这些结构域不能与骆驼轻链缔合以形成互补的 $V_{HH}$ 和 $V_L$ 对。因此,本发明的多肽不包含互补ISVD和/或不形成互补ISVD对,

例如互补V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>对。

[0319] 本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述接头选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:18-29和77。

[0320] 还涵盖根据本发明的多肽可以与另外的分子缀合。另外的分子可以直接或通过合适长度的间隔物与多肽缀合。为了治疗目的,与治疗效应物基团例如放射性基团可能是合适的,这些放射性基团即由放射性同位素或放射性核素(例如<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>33</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>90</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>201</sup>Tl、<sup>213</sup>Bi)、毒素或细胞毒性基团例如细胞生长抑制剂组成或包括其的基团。另一方面,本发明的多肽可以与标记基团(标记的多肽)偶联,然后可以使用其例如用于诊断目的。合适的标记基团可以选自放射性同位素(例如上文提到的那些)或含有放射性同位素、放射性核素的基团、荧光基团(例如荧光蛋白例如GFP、RFP等、Alexa-Fluor<sup>®</sup>染料、罗丹明、荧光素及其衍生物例如FITC、花青染料如Cy3<sup>®</sup>和Cy5<sup>®</sup>)、酶基团(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶)、化学发光基团、生物素基团、金属颗粒(例如金颗粒)、磁性颗粒(例如具有含有磁铁矿(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)和/或磁赤铁矿(Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)的核心)、预定的多肽基团等。

[0321] 除非另有说明,否则术语“免疫球蛋白”和“免疫球蛋白序列”-无论在本文中是指重链抗体还是常规的4链抗体-均用作通用术语,以包括全长抗体、其单独的链以及其所有部分、结构域或片段(包括但不限于抗原结合结构域或片段,例如分别为V<sub>HH</sub>结构域或V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>结构域)。

[0322] 如本文所用,术语(多肽或蛋白质的)“结构域”是指折叠蛋白质结构,其能够独立于蛋白质的其余部分保留其三级结构。通常,结构域负责蛋白质的离散功能性质,并且在许多情况下可以添加、去除或转移至其他蛋白质,而不丧失蛋白质和/或结构域的其余部分的功能。

[0323] 如本文所用,术语“免疫球蛋白结构域”是指抗体链的球形区域(例如常规4-链抗体或重链抗体的链),或指基本上由这样的球状区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于它们保留了抗体分子的免疫球蛋白折叠特征,其由排列成两个β折叠的大约七个反向平行β-链的两层夹心组成,任选通过保守的二硫键稳定。

[0324] 如本文所用,术语“免疫球蛋白可变结构域”意指基本上由以下四个“框架区”组成的免疫球蛋白结构域:这些“框架区”在本领域和在下文分别称为“框架区1”或“FR1”;“框架区2”或“FR2”;“框架区3”或“FR3”;“框架区4”或“FR4”;这些框架区被三个“互补决定区”或“CDR”中断,其在本领域和在下文分别称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”;“互补决定区3”或“CDR3”。因此,免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可以如下所示:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。它是通过携带抗原结合位点而赋予抗体针对抗原的特异性的一个或多个免疫球蛋白可变结构域。

[0325] 表A-2中描述了优选的CDR,即CDR1选自SEQ ID NO:40、47、54、61、68和33,CDR2选自SEQ ID NO:42,49,56,63,70和35;并且CDR3选自SEQ ID NO:44、51、58、65、72和37。优选地,CDR1、CDR2和CDR3选自一个克隆,例如,

[0326] -CDR1是SEQ ID NO:33,CDR2是SEQ ID NO:35并且CDR3是SEQ ID NO:37;

[0327] -CDR1是SEQ ID NO:61,CDR2是SEQ ID NO:63并且CDR3是SEQ ID NO:65;

[0328] -CDR1是SEQ ID NO:40,CDR2是SEQ ID NO:42并且CDR3是SEQ ID NO:44;

[0329] -CDR1是SEQ ID NO:68,CDR2是SEQ ID NO:70并且CDR3是SEQ ID NO:72;

[0330] -CDR1是SEQ ID NO:47,CDR2是SEQ ID NO:49并且CDR3是SEQ ID NO:51;或

[0331] -CDR1是SEQ ID NO:54,CDR2是SEQ ID NO:56并且CDR3是SEQ ID NO:58。

[0332] 与“单可变结构域”可互换使用的术语“免疫球蛋白单可变结构域”定义其中抗原结合位点存在于单免疫球蛋白结构域上并由其形成的分子。这设定了除“常规”免疫球蛋白或其片段之外的免疫球蛋白单可变结构域,其中两个免疫球蛋白结构域,特别是两个可变结构域相互作用形成抗原结合位点。通常,在常规免疫球蛋白中,重链可变结构域( $V_H$ )和轻链可变结构域( $V_L$ )相互作用形成抗原结合位点。在这种情况下, $V_H$ 和 $V_L$ 的互补决定区(CDR)都将有助于抗原结合位点,即总共6个CDR将参与抗原结合位点的形成。

[0333] 表A-1中描述了优选的ISVD,即SEQ ID NO:3、4、5、6、7、8、9、78、79、80、81和82,最优选SEQ ID NO:8、6、7和3。

[0334] 鉴于上述定义,常规4链抗体的(如IgG, IgM, IgA, IgD或IgE分子;本领域已知的)或Fab片段的、F(ab')2片段的,Fv片段的如二硫键连接的Fv或scFv片段的,或衍生自此类常规4链抗体的双抗体(本领域所有已知)的抗原结合结构域通常不被认为是免疫球蛋白单可变结构域,因为在这些情况下,通常不会通过一个(单个)免疫球蛋白结构域而是通过一对(缔合)免疫球蛋白结构域例如轻链和重链可变结构域,即通过免疫球蛋白结构域的 $V_H$ - $V_L$ 对(其共同结合各自抗原的表位)而发生与抗原的相应表位的结合。

[0335] 相反,免疫球蛋白单可变结构域能够特异性结合抗原表位而不与另外的免疫球蛋白可变结构域配对。免疫球蛋白单可变结构域的结合位点由单个 $V_{HH}$ 、 $V_H$ 或 $V_L$ 结构域形成。因此,免疫球蛋白单可变结构域的抗原结合位点由不超过三个CDR形成。

[0336] 如此,单个可变结构域可以是轻链可变结构域序列(例如 $V_L$ 序列)或其合适的片段;或重链可变结构域序列(例如, $V_H$ 序列或 $V_{HH}$ 序列)或其合适的片段;只要其能够形成单个抗原结合单位(即基本上由单个可变结构域组成的功能性抗原结合单位,使得单个抗原结合结构域不需要与另一个可变结构域相互作用以形成功能性抗原结合单位)。

[0337] 在本发明的一个实施方案中,免疫球蛋白单可变结构域是重链可变结构域序列(例如 $V_H$ 序列);更具体而言,免疫球蛋白单可变结构域可以是源自重链抗体的常规四链抗体或重链可变结构域序列的重链可变结构域序列。

[0338] 例如,免疫球蛋白单可变结构域可以是(单)结构域抗体(或适合用作(单)结构域抗体的氨基酸),“dAb”或dAb(或适合用作dAb的氨基酸)或纳米抗体(如本文所定义,并且包括但不限于VHH);其他单可变结构域或其任何一个的任何合适的片段。

[0339] 特别地,免疫球蛋白单可变结构域可以是Nanobody<sup>®</sup>(如本文所定义的)或其合适的片段。[注意:Nanobody<sup>®</sup>, Nanobodies<sup>®</sup>和Nanoclone<sup>®</sup>是埃博灵克斯股份有限公司的注册商标]关于纳米抗体的一般描述,参考下文的进一步描述以及本文引用的现有技术,例如,描述于WO 08/020079(第16页)中。

[0340] “ $V_{HH}$ 结构域”,也称为VHH、 $V_H$ H结构域、VHH抗体片段和VHH抗体最初被描述为“重链抗体”(即“没有轻链的抗体”;Hamers-Casterman等1993 Nature 363:446-448)的抗原结合免疫球蛋白(可变)结构域。已经选择了术语“ $V_{HH}$ 结构域”以便将这些可变结构域与存在于常

规4链抗体中的重链可变结构域(其在本文中称为“V<sub>H</sub>结构域”或“VH结构域”)和存在于常规4链抗体中的轻链可变结构域(其在本文称为“V<sub>L</sub>结构域”或“VL结构域”)区分开来。关于VHH和纳米抗体的进一步描述,参考Muyldermaans的综述文章(Reviews in Molecular Biotechnology 74:277-302,2001)以及以下作为一般背景技术提及的专利申请:Vrije Universiteit Brussel的WO 94/04678、WO 95/04079和WO 96/34103;Unilever的WO 94/25591、WO 99/37681、WO 00/40968、WO 00/43507、WO 00/65057、WO 01/40310、WO 01/44301、EP 1134231和WO 02/48193;Vlaams Instituut voor Biotechnologie(VIB)的WO 97/49805、WO 01/21817、WO 03/035694、WO 03/054016和WO 03/055527;Algonomics N.V.和埃博灵克斯股份有限公司的WO 03/050531;加拿大国家研究委员会(National Research Council of Canada)的WO 01/90190;抗体研究所(Institute of Antibodies)的WO 03/025020(=EP 1433793);以及埃博灵克斯股份有限公司的WO 04/041867、WO 04/041862、WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551、WO 05/044858、WO 06/40153、WO 06/079372、WO 06/122786、WO 06/122787和WO 06/122825以及埃博灵克斯股份有限公司的进一步公开的专利申请。还参考了这些申请中提到的另外的现有技术,特别是国际申请WO 06/040153的第41-43页上提及的参考文献列表,该列表和参考文献通过引用并入本文。如在这些参考文献中所描述的,纳米抗体(特别是VHH序列和部分人源化的纳米抗体)特别可以通过在一个或多个框架序列中存在一个或多个“标志残基”来表征。纳米抗体的进一步描述,包括纳米抗体的人源化和/或骆驼化,以及其他修饰,部分或片段,衍生物或“纳米抗体融合物”,多价构建体(包括接头序列的一些非限制性实例)和不同的修饰以增加纳米抗体的半衰期,并且可以找到它们的制备,例如在WO 08/101985和WO 08/142164中。对于纳米抗体的进一步的一般描述,参考本文引用的现有技术,例如,描述于WO 08/020079(第16页)中。

[0341] “结构域抗体”,也称为“Dab”、“结构域抗体”和“dAbs”(术语“结构域抗体”和“dAbs”被GlaxoSmithKline集团公司用作商标)已经描述于例如EP 0368684,Ward等人(Nature 341:544-546,1989),Holt等人(Trends in Biotechnology 21:484-490,2003)和WO 03/002609以及例如WO 04/068820、WO 06/030220、WO 06/003388和Domantis Ltd.的其他公开的专利申请。结构域抗体基本上对应于非骆驼类哺乳动物的VH或VL结构域,特别是人4链抗体。为了将表位作为单抗原结合结构域结合,即分别不与VL或VH结构域配对,需要对这种抗原结合性质进行特异性选择,例如,通过使用人类单VH或VL结构域序列的文库。结构域抗体像VHH一样具有约13kDa至约16kDa的分子量,并且如果源自完全人序列,则不需要对进行人源化用于例如人类的治疗用途。

[0342] 还应该注意的是,尽管在本发明的上下文中较不优选,因为它们不是哺乳动物来源的,单可变结构域可以来自某些鲨鱼物种(例如所谓的“IgNAR结构域”,参见例如WO 05/18629)。

[0343] 因此,在本发明的含义中,术语“免疫球蛋白单可变结构域”或“单可变结构域”包含衍生自非人来源的多肽,优选骆驼科动物,优选骆驼科重链抗体。如前所述,它们可以是人源化的。而且,该术语包括来源于非骆驼科动物来源(例如小鼠或人)的多肽,其已经被骆驼源化,例如描述于Davies和Riechmann(FEBS 339:285-290,1994;Biotechnol.13:475-479,1995;Prot.Eng.9:531-537,1996)和Riechmann和Muyldermaans(J. Immunol. Methods 231:25-38,1999)。

[0344] 根据Kabat等人("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91)给出的 $V_H$ 结构域的通用编号,对VHH结构域的氨基酸残基进行编号,如应用于来自骆驼科动物的VHH结构域,如例如Riechmann和Muyldermans (J. Immunol. Methods 231:25-38, 1999)的图2所示。用于对 $V_H$ 结构域的氨基酸残基编号的替代方法是本领域已知的,所述方法也可以以类似的方式应用于VHH结构域。然而,在本说明书、权利要求书和附图中,除非另有说明,否则将遵循如上所述的应用于VHH结构域的根据Kabat的编号。

[0345] 应该注意的是-正如本领域熟知的 $V_H$ 结构域和VHH结构域一样-每个CDR中的氨基酸残基总数可以变化,并且可以不对应于由Kabat编号指示的氨基酸残基总数(即根据Kabat编号的一个或多个位置可以未被实际序列占据,或者实际序列可以含有比Kabat编号所允许的数量更多的氨基酸残基)。这意味着,通常根据Kabat的编号与实际序列中氨基酸残基的实际编号可以相对应或可以不对应。VH结构域和VHH结构域中的氨基酸残基总数通常在110-120的范围内,通常在112-115之间。然而应该注意的是,更短和更长的序列也可以适用于本文所述的目的。

[0346] CDR区的确定也可以根据不同的方法进行。在根据Kabat的CDR测定中,VHH的FR1包含1-30位的氨基酸残基,VHH的CDR1包含31-35位的氨基酸残基,VHH的FR2包含36-49位的氨基酸,VHH的CDR2包含50-65位的氨基酸残基,VHH的FR3包含66-94位的氨基酸残基,VHH的CDR3包含95-102位的氨基酸残基,并且VHH的FR4包含103-113位的氨基酸残基。

[0347] 然而,在本申请中,根据Kontermann和Dübel (Eds., Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, pp. 33-51, 2010)确定CDR序列。根据该方法,FR1包含1-25位的氨基酸残基,CDR1包含26-35位的氨基酸残基,FR2包含36-49位的氨基酸,CDR2包含位置50-58位的氨基酸残基,FR3包含59-94位的氨基酸残基,CDR3包含95-102位的氨基酸残基,FR4包含103-113位的氨基酸残基。

[0348] 可以对免疫球蛋白单可变结构域如结构域抗体和纳米抗体(包括VHH结构域)进行人源化。具体而言,人源化免疫球蛋白单可变结构域例如纳米抗体(包括VHH结构域)可以是免疫球蛋白单可变结构域,其通常如前段所定义,但其中存在至少一个氨基酸残基(并且特别是,在至少一个框架残基中)是和/或对应于人源化置换(如本文所定义的)。可以通过将天然存在的 $V_{HH}$ 序列的框架区的序列与一个或多个密切相关的人 $V_H$ 序列的相应框架序列进行比较来确定潜在有用的人源化置换,然后将确定的一个或多个潜在有用的人源化置换(或其组合)(以本身已知的任何方式,如本文进一步描述的)引入所述 $V_{HH}$ 序列中,并且可以测试所得人源化 $V_{HH}$ 序列对靶标的亲和力、稳定性、表达容易性和表达水平、以及/或其他期望的属性。以这种方式,通过有限程度的试验和错误,本领域技术人员基于本文的公开内容可以确定其他合适的人源化替代(或其合适的组合)。而且,基于前述,免疫球蛋白单可变结构域(例如纳米抗体(包括VHH结构域))(的框架区)可以部分人源化或完全人源化。

[0349] 也可以通过在一个或多个CDR的氨基酸序列中引入一个或多个改变来使免疫球蛋白单可变结构域如结构域抗体和纳米抗体(包括VHH结构域和人源化VHH结构域)进行亲和力成熟,该改变导致与相应的亲本分子相比,所得免疫球蛋白单可变结构域对其各自抗原的改善的亲和力。本发明的亲和力成熟的免疫球蛋白单可变结构域分子可以通过本领域已知的方法制备,例如,如Marks等人(Biotechnology 10:779-783, 1992), Barbas等人

(Proc.Nat.Acad.Sci,USA 91:3809-3813,1994),Shier等人(Gene 169:147-155,1995),Yelton等人(Immunol.155:1994-2004,1995),Jackson等人(J.Immunol.154:3310-9,1995),Hawkins等人(J.Mol.Biol.226:889-896,1992),Johnson和Hawkins(Affinity maturation of antibodies using phage display,Oxford University Press,1996)。

[0350] 从免疫球蛋白单可变结构域例如 $V_H$ 、 $V_L$ 、 $V_{HH}$ 、结构域抗体或纳米抗体开始,设计/选择和/或制备多肽的过程在本文中也称为“样式化”所述免疫球蛋白单可变结构域;并且构成多肽一部分的免疫球蛋白单可变结构域被称为“被样式化”或被称为“处于所述多肽的样式”。基于本文的公开内容,本领域技术人员将清楚免疫球蛋白单可变结构域可以被样式化的方式的实例以及这种样式的实例;并且这种样式化的免疫球蛋白单可变结构域形成本发明的另一方面。

[0351] 例如但不限于,一种或多种免疫球蛋白单可变结构域可以用作制备多肽的“结合单元”、“结合结构域”或“结构单元”(这些术语在本文中可互换地使用),其可任选含有一个或多个可用作结合单位(即针对CD40L上的相同或另一个表位和/或针对CD40L以外的一种或多种其他抗原、蛋白质或靶标)的其他免疫球蛋白单可变结构域。

[0352] 单价多肽包含或基本上仅由一个结合单元(例如免疫球蛋白单可变结构域)组成。包含两个或更多个结合单元(例如免疫球蛋白单可变结构域)的多肽在本文中也将被称为“多价”多肽,并且存在于这样的多肽中的结合单元/免疫球蛋白单可变结构域在本文中也被称为处于“多价样式”。例如,“二价”多肽可以包含任选通过接头序列连接的两个免疫球蛋白单可变结构域,而“三价”多肽可以包含任选通过两个接头序列连接的三个免疫球蛋白单可变结构域;而“四价”多肽可以包含任选通过三个接头序列连接的四个免疫球蛋白单可变结构域,等等。

[0353] 在多价多肽中,两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域可以相同或不同,并且可以针对相同的抗原或抗原决定簇(例如针对相同的一个或多个部分或一个或多个表位或针对不同的部分或表位),或者可替代地针对不同的抗原或抗原决定簇;或其任何适当的组合。包含至少两个结合单位(例如免疫球蛋白单可变结构域)的多肽(其中至少一个结合单元针对第一抗原(即CD40L),并且至少一个结合单元针对第二抗原(即,不同于CD40L))也将被称为“多特异性”多肽,并且存在于这样的多肽中的结合单元(例如免疫球蛋白单可变结构域)在本文中也被称为处于“多特异性样式”。因此,例如,本发明的“双特异性”多肽是包含至少一个针对第一抗原(即CD40L)的免疫球蛋白单可变结构域和至少一个针对第二抗原(即不同于CD40L)的另外的免疫球蛋白单可变结构域的多肽,而本发明的“三特异性”多肽是包含至少一个针对第一抗原(即CD40L)的免疫球蛋白单可变结构域,至少一个针对第二抗原(即不同于CD40L)另外的免疫球蛋白单可变结构域和至少一个针对第三抗原(即,不同于CD40L和第二抗原)的另外的免疫球蛋白单可变结构域;等等

[0354] 诸如例如“双互补位多肽”或“三互补位多肽”的“多互补位多肽”包含两个或更多个各自具有不同的互补位的结合单元或基本上由其组成。

[0355] 优选地,本发明的多肽是包含第一ISVD(例如结合CD40L的ISVD)和第二ISVD(例如结合血清白蛋白的ISVD)的双特异性多肽。

[0356] 改善治疗性抗体功效的手段是增加其血清持久性,从而允许更高的循环水平,更少频率的给药和减少的剂量。

[0357] 在本领域中,已经描述了延长分子体内半衰期的基团或部分,例如Fc区的PEG基团。

[0358] 然而,抗体的Fc区不仅介导其血清半衰期,而且还介导效应子功能,如补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP),这对安全性有负面影响。

[0359] 然而,如前所述,最近的一项研究结果显示,在健康献血者中的抗PEG抗体发生率是22%-25%。抗PEG抗体的这种开发可能限制在某些患者中的功效,这与一般假设PEG不具有免疫原性相反。因此,聚乙二醇化的治疗剂对于临床应用具有潜在的影响,特别是在免疫受损的疾病背景下。此外,据报道,抗CD40L Fab'分子的聚乙二醇化使其活性降低4-5倍(US2010/0104573)。

[0360] 诸位发明人能够重新设计ISVD以不仅胜过基准CDP7657,而且在半衰期延长时也保持这种性能。在本文将进一步描述的本发明的具体但非限制性方面中,与结合CD40L的免疫球蛋白单可变结构域相比,本发明的多肽具有增加的血清半衰期(如本文进一步描述的)。

[0361] 本发明多肽的“半衰期”通常可以如W0 08/020079第57页段落o)中所述定义,并且如其中所述,是指多肽的血清浓度在体内被降低50%的时间,例如由于多肽的降解和/或通过天然机制对多肽的清除或隔离。本发明多肽的体内半衰期可以以本身已知的任何方式确定,例如通过药代动力学分析。合适的技术对于本领域技术人员将是清楚的,并且可以例如通常如W0 08/020079的第57页的段落o)中所述。也如W0 08/020079的第57页第o)段所述,半衰期可以用诸如 $t_{1/2-\alpha}$ 、 $t_{1/2-\beta}$ 和曲线下面积(AUC)的参数表示。例如参考标准手册,如Kenneth等人(Chemical Stability of Pharmaceuticals:A Handbook for Pharmacists, John Wiley&Sons Inc, 1986)和Gibaldi&Perron("Pharmacokinetics", Marcel Dekker, 2<sup>nd</sup> Rev. Edition, 1982)。术语“半衰期增加”或“增加的半衰期”也如W0 08/020079第57页第o)段中所定义,特别是指 $t_{1/2-\beta}$ 增加而 $t_{1/2-\alpha}$ 和/或AUC或两者增加或没有增加。

[0362] 在本发明的一个具体方面,与缺少结合血清蛋白的ISVD的相应多肽相比,本发明的多肽具有增加的半衰期。基于本文进一步的公开,这些多肽的一些优选但非限制性实例对于本领域技术人员将变得清楚,并且例如包含本发明的多肽,其包含结合血清蛋白(例如血清白蛋白)的免疫球蛋白单可变结构域;或包含本发明的多肽,其包含连接至增加本发明的氨基酸序列的半衰期的至少一个部分(并且特别是至少一个氨基酸序列)的本发明的至少一个氨基酸序列。基于本文的进一步公开内容,包含这种半衰期延长部分或免疫球蛋白单可变结构域的本发明多肽的实例对于本领域技术人员将变得清楚;并且例如包括但不限于以下多肽,在该多肽中本发明的一个或多个免疫球蛋白单可变结构域适当地连接至一种或多种血清蛋白或其片段(例如(人)血清白蛋白或其合适片段)或连接至一种或多种结合血清蛋白(例如ISVD,结构域抗体,单结构域抗体,“dAb”或纳米抗体,其可以结合血清蛋白例如血清白蛋白(例如人血清白蛋白)、血清免疫球蛋白如IgG或转铁蛋白的结合单元;参考本文提到的进一步描述和参考文献;本发明的多肽包含一种或多种可与血清蛋白结合的小蛋白或肽,例如但不限于W0 91/01743、W0 01/45746、W0 02/076489、W02008/068280、W02009/127691和PCT/EP2011/051559中所述的蛋白和肽)。

[0363] 通常,具有增加的半衰期的本发明化合物或多肽优选具有比本发明相应氨基酸序

列(例如,结合CD40L的ISVD本身(无结合血清白蛋白的ISVD))大至少1.5倍、优选至少2倍、如至少5倍、例如至少10倍或大于20倍的半衰期。例如,具有增加的半衰期的本发明的化合物或多肽与本发明的相应氨基酸序列(例如结合CD40L的ISVD本身)相比在例如人中具有的半衰期可以增加大于1小时,优选大于2小时,更优选大于6小时,比如大于12小时,或甚至大于24、48或72小时。

[0364] 在本发明的优选但非限制性的方面中,本发明的这些化合物或多肽与本发明的相应氨基酸序列(例如结合CD40L的ISVD本身)相比在例如人中具有的血清半衰期可以增加大于1小时,优选大于2小时,更优选大于6小时,比如大于12小时,或甚至大于24、48或72小时。

[0365] 在本发明的另一个优选但非限制性方面,本发明的这些化合物或多肽在人中显示出至少约12小时、优选至少24小时、更优选至少48小时、甚至更优选至少72小时或更长的血清半衰期。例如,本发明的化合物或多肽可以具有至少5天(例如约5至10天),优选至少9天(例如约9至14天),更优选至少约10天(如约10至15天)或至少约11天(如约11至16天),更优选至少约12天(如约12至18天或更长)或超过14天(如约14至19天)的半衰期。

[0366] 在优选的方面,本发明还涉及如本文所述的多肽,其中结合血清白蛋白的所述ISVD基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是SEQ ID NO:74,CDR2是SEQ ID NO:75CDR1是SEQ ID NO:76(见表A-3)。

[0367] 在本发明特别优选但非限制性的方面,本发明提供了包含至少一个特异性结合CD40L的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)和至少一个结合血清白蛋白的ISVD的本发明多肽,结合血清白蛋白的ISVD例如选自ALB135(SEQ ID NO:15),ALB129(SEQ ID NO:13),ALB8(SEQ ID NO:11),ALB23(SEQ ID NO:12)和ALB132(SEQ ID NO:14),优选SEQ ID NO:15。

[0368] 对治疗性蛋白质产物的免疫应答可以对患者安全性和产品功效造成问题。血栓栓塞事件也可以是由于针对治疗性蛋白质的已有抗体(PEA)和/或抗药物抗体(ADA)。就此而言,免疫原性是治疗性蛋白质产物对其自身和相关蛋白质产生免疫应答或诱导免疫相关的不利临床事件的倾向性。

[0369] 本发明人能够设计比现有技术抗体显著更安全的多肽。

[0370] 在导致本发明的研究中,在已经证实在C端区域或ISVD末端添加C端延伸(其可以像单个C端丙氨酸残基一样简单,再次参见WO 12/175741,实施例3)基本上防止/去除了大多数人类受试者/患者样品中已有抗体/因子的结合之后,研究了从人类受试者(健康志愿者和/或患有疾病或病症的受试者)获得的样品是否可能含有即使存在C端延伸时可以与纳米抗体(或其他ISVD)的暴露的C端区域结合的(其他)已有抗体或因子。在此过程中,诸位发明人发现,尽管在健康志愿者的血液或血清中或者从患有若干疾病(包括一些炎症性疾病或自身免疫失调-数据未显示)中的一种的患者获得的血液或血清中基本上没有发现与C端延伸的ISVD结合的这种已有抗体,但是已经从患有某些严重(自身)免疫失调(例如SLE)的某些(但不是全部)人类受试者获得的一些血液或血清样品似乎包含一些已有抗体/因子,即使当所述ISVD包含C端延伸时其也可以与ISVD结合。

[0371] 诸位发明人着手提供改进的ISVD,当它们具有暴露的C端区域或末端时,不易与已有抗体/因子结合,例如从患有某些(自身)免疫疾病或严重影响/激活免疫系统的失调(例如SLE)的人类受试者获得的血液或血清样品中发现的那些。

[0372] 发现已有抗体/因子与具有暴露的C末端的ISVD的结合可以通过112位(Kabat编

号)丝氨酸到赖氨酸(K)或谷氨酰胺(Q)的突变来减少。具体而言,已经发现这种S112K或S112Q突变可以(进一步)减少或基本上防止/除去可以结合于包含C端延伸(但不包含S112K或S112Q突变)的ISVD的已有抗体/因子的结合,例如在患有严重自身免疫失调如SLE的人类受试者的血液或血清中发现的那些已有抗体/因子。

[0373] 这一发现是广泛适用的。

[0374] 本发明的免疫球蛋白(并且特别是免疫球蛋白单可变结构域)还可以含有以下共同未决的美国临时申请中描述的特定突变/氨基酸残基,所有这些申请都标题为“改进的免疫球蛋白可变结构域”:2014年5月16日提交的US 61/994552;2014年6月18日提交的US 61/014,015;2014年8月21日提交的US 62/040,167;和2014年9月8日提交的US 62/047,560(均转让给埃博灵克斯股份有限公司)。

[0375] 具体而言,本发明涉及如本文所述的多肽,其包含ISVD,优选C端定位的ISVD,甚至更优选所述C端定位的ISVD是结合血清白蛋白的ISVD,其中:(i)第112位的氨基酸残基是K或Q中的一个;和/或(ii)第89位的氨基酸残基是T;和/或(iii)第89位的氨基酸残基是L,并且第110位的氨基酸残基是K或Q中的一个;(iv)在情况(i)至(iii)中的每个中,第11位的氨基酸优选为V;并且其中所述VH结构域含有C端延伸(X)<sub>n</sub>,其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5(并且优选1或2,例如1);每个X是独立选择的(优选天然存在的)氨基酸残基,并且优选独立地选自由以下各项组成的组:丙氨酸(A),甘氨酸(G),缬氨酸(V),亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)。

[0376] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其包含ISVD,优选C端定位ISVD,甚至更优选所述C端定位ISVD是结合血清白蛋白的ISVD,其中:

[0377] -第11位的氨基酸残基是L、V或K中的一个;并且

[0378] -第14位的氨基酸残基是A或P中的一个;并且

[0379] -第41位的氨基酸残基是A或P中的一个;并且

[0380] -第89位的氨基酸残基是T、V或L中的一个;并且

[0381] -第108位的氨基酸残基是Q或L中的一个;并且

[0382] -第110位的氨基酸残基是T、K或Q中的一个;并且

[0383] -第112位的氨基酸残基是S、K或Q中的一个;

[0384] 其中(i)第112位的氨基酸残基是K或Q中的一个;和/或(ii)第89位的氨基酸残基是T;和/或(iii)第89位的氨基酸残基是L,并且第110位的氨基酸残基是K或Q中的一个;(iv)在情况(i)至(iii)中的每个中,第11位的氨基酸优选为V。

[0385] 如在所述共同未决的美国临时申请中所述,所述突变有效预防或减少所谓的“已有抗体”与本发明的免疫球蛋白和化合物的结合。为此目的,本发明的免疫球蛋白还可以含有(任选地与所述突变组合)C端延伸(X)<sub>n</sub>(其中n是1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5(优选1或2,如1);并且每个X是独立选择的(优选天然存在的)氨基酸残基,并且优选独立地选自由以下各项组成的组:丙氨酸(A),甘氨酸(G),缬氨酸(V),亮氨酸(L)或异亮氨酸(I),其中再次参考所述美国临时申请以及WO 12/175741。具体而言,当本发明的免疫球蛋白形成蛋白质、多肽或包含其的其他化合物或构建体的C末端时,本发明的免疫球蛋白可含有此C端延伸(同样,如所述美国临时申请以及WO 12/175741中进一步描述的)。

[0386] 因此,本发明涉及包含至少一个特异性结合CD40L的ISVD并进一步包含结合血清

白蛋白的ISVD的多肽,其中结合血清白蛋白的所述ISVD选自Alb00129 (Alb11 (L11V, V89T) - A) (SEQ ID NO:13) 和Alb00132 (Alb23 (L5V, L11V, V89T) - A) (SEQ ID NO:14) 和ALB11 (S112K) - A (SEQ ID NO:15)。优选地,本发明的多肽是SEQ ID NO:9。

[0387] 本发明进一步涉及包含本发明多肽的药物组合物。药物组合物还可以包含编码本发明多肽的核酸,含有所述核酸的载体或载体系统和/或优选产生本发明所述多肽的人细胞。任选地,药物组合物包含药学上可接受的赋形剂、佐剂和/或载体。

[0388] 作为示例性赋形剂,可以提及崩解剂,粘合剂,填充剂和润滑剂。崩解剂的实例包括琼脂、褐藻胶、碳酸钙、纤维素、胶体二氧化硅、树胶、硅酸镁铝、甲基纤维素和淀粉。粘合剂的实例包括微晶纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。填充剂的实例包括碳酸钙、磷酸钙、三碱价硫酸钙、羧甲基纤维素钙、纤维素、糊精、葡萄糖、果糖、乳糖醇、乳糖、碳酸镁、氧化镁、麦芽糖醇、麦芽糖糊精、麦芽糖、山梨醇、淀粉、蔗糖、糖和木糖醇。润滑剂的实例包括琼脂、油酸乙酯、月桂酸乙酯、甘油、棕榈酸硬脂酸甘油酯、氢化植物油、氧化镁、硬脂酸盐、甘露糖醇、泊洛沙姆、二醇、苯甲酸钠、月桂基硫酸钠、硬脂酰钠、山梨醇和滑石。考虑作为药物佐剂的是常用稳定剂、防腐剂、润湿剂和乳化剂、稠度改善剂、风味改善剂、用于改变渗透压的盐、缓冲物质、增溶剂、稀释剂、软化剂、着色剂和掩蔽剂和抗氧化剂。

[0389] 合适的载体包括但不限于碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂、水、醇、多元醇、甘油、植物油等。

[0390] 药物组合物还可以包含至少一种其他活性剂,例如,一种或多种其他抗体或其抗原结合片段、肽、蛋白质、核酸、有机分子和无机分子。

[0391] 在本发明的优选实施方案中,包含本发明多肽的药物组合物用于医学或诊断。优选地,药物组合物用于人类医学,但它们也可以用于兽医目的。

[0392] 具体而言,本发明的多肽、本发明的核酸、载体或载体系统、宿主或宿主细胞或包含本发明多肽的药物组合物用于诊断、预防或治疗与CD40L的水平和/或活性升高相关的、由其引起的或与其相伴的失调,以及可通过给予如上所述的本发明的多肽来抑制和/或中和CD40L活性而有利地诊断、预防或治疗的其他疾病或病症。在另一个实施方案中,本发明涉及方法,这些方法用于诊断、预防或治疗与CD40L的水平和/或活性升高相关的、由其引起的或与其相伴的失调,以及可通过抑制和/或中和CD40L活性而有利地诊断、预防或治疗的其他疾病或病症。

[0393] 在一个实施方案中,本发明涉及用作药物的本发明多肽。

[0394] 在另一个实施方案中,本发明涉及本发明的多肽,其用于治疗或预防以下疾病的症状:自身免疫性疾病,系统性红斑狼疮 (SLE),狼疮肾炎,免疫性血小板减少性紫癜 (ITP),移植排斥,克罗恩氏病,舍格伦综合征,炎性肠病 (IBD),结肠炎,哮喘/变态反应,动脉粥样硬化,重症肌无力,多发性硬化,银屑病,类风湿性关节炎,强直性脊柱炎,冠心病,1型糖尿病和/或对重组药物产品(例如血友病因子VII)的免疫应答。

[0395] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗或预防个体疾病或病症的方法,例如其中涉及CD40L/CD40介导的途径的不适当激活,所述方法包括将本发明的多肽以有效治疗或预防所述疾病或病症的症状的量给予所述个体。优选的医学适应症是与CD40L的水平和/或活性升高相关的自身免疫或炎性疾病或病症。疾病或病症可以选自例如系统性红斑狼疮 (SLE),

狼疮肾炎,免疫性血小板减少性紫癜(ITP),移植排斥,克罗恩氏病,炎性肠病(IBD),结肠炎,哮喘/变态反应,动脉粥样硬化,重症肌无力,多发性硬化,银屑病,类风湿性关节炎,强直性脊柱炎,舍格伦综合征,冠心病,1型糖尿病,肌萎缩性侧索硬化症(ALS;也称为Lou Gehrig病和Charcot病)和对重组药物产品例如血友病因子VII的免疫应答。特别优选的适应症是ITP、SLE和狼疮肾炎。

[0396] 本发明的多肽或根据本发明的药物组合物可以有效获得所需治疗或预防效果的量给予有需要的受试者。例如,通过所述给药可以实现的一个希望的效果可以是阻断、抑制和/或中和CD40L的一种或多种生物学功能。在这种情况下,给药可以包括使本发明的多肽与怀疑表达CD40L的细胞或组织在该多肽能够阻断、抑制和/或中和CD40L功能的条件下接触,优选这些细胞或组织以高和/或异常水平表达CD40L。接触可以是体外或体内的。

[0397] 可以以不同的方式给与合适的组合物,例如通过静脉内,腹膜内,皮下,肌内,局部,口服,皮内,鼻内或支气管内给药。也可以直接在靶标位点进行给药。

[0398] 剂量方案将由主治医师和临床因素决定。如在医学领域中众所周知的,任何一个患者的剂量取决于许多因素,包括患者体型大小,体重,体表面积,年龄,待给予的特定化合物,所用多肽(包括抗体)的活性,给药时间和途径,一般健康状况,以及与其他治疗或治疗的组合。蛋白质药物活性物质可以以每剂1g至100mg/kg体重的量存在;然而,也可以设想低于或高于该示例性范围的剂量。如果该方案是连续输注,则其可以在每分钟每千克体重1pg至100mg的范围内。

[0399] 本发明的中和多肽可以以例如0.01、0.1、0.5、1、2、5、10、20或50pg/ml的浓度使用,以将CD40L的生物学功能抑制和/或中和至少约50%,优选75%,更优选90%,95%或高达99%,最优选约100%(基本上完全),如通过本领域众所周知的方法测定。

[0400] 根据本发明的其他方面,本发明的多肽可用于体内和体外的其他应用。例如,本发明的多肽可以用于诊断目的,例如,在设计用于检测和/或量化CD40L的存在和/或纯化CD40L的测定中。多肽也可以在特定疾病的动物模型中进行测试并进行毒理学、安全性和剂量研究。

[0401] 最后,本发明涉及包含至少一种根据本发明的多肽、至少一种编码所述组分的核酸序列、本发明的载体或载体系统和/或根据本发明的宿主细胞的试剂盒。预期该试剂盒可以以不同的形式提供,例如,作为诊断试剂盒。

[0402] 基于下面的实施例可以更好地理解本发明。然而,本领域技术人员将容易理解,所讨论的具体方法和结果仅仅是如本文所述的本发明的说明。

## 6 实施例

[0403] 以下实施例说明了本发明的方法和产品。在本领域技术人员显而易见的分子和细胞生物学领域中通常遇到的所述条件和参数的合适修改和适应在本发明的精神和范围内。

[0404] 6.1 材料和方法

[0405] 6.1.1 流式细胞术(结合)

[0406] 通过FACS分析周质提取物与人CD40L的结合。用在FACS缓冲液(PBS,10%胎牛血清(Sigma,F7524),0.05%叠氮化钠)中的1/10稀释的周质提取物在4°C温育2x 10<sup>5</sup>个细胞(稳定的CHO-K1/人CD40L转染的细胞)30分钟。然后将细胞在FACS缓冲液中洗涤三次,并且最后

重悬于含有Phycolink a-FLAG-RPE (Prozyme, PJ315) 的FACS缓冲液中。该混合物在4°C温育30分钟。在FACS缓冲液中再次洗涤细胞三次，并且死细胞用TOPR03 (分子探针, T3605) 染色。样品在FACSSarray (BD Biosciences) 上分析。

[0407] 6.1.2 AlphaScreen (阻断)

[0408] 为了确定纳米抗体的CD40L/CD40相互作用阻断能力, 使用AlphaScreen技术在基于蛋白质的竞争测定中筛选周质提取物。简而言之, 在供体珠上捕获生物素化的人CD40L (HEK, R&D), 并在抗人Fc纳米抗体包被的受体珠上捕获人CD40-Fc嵌合体。为了评价抗CD40L纳米抗体的阻断能力, 将周质提取物的稀释物与生物素化的CD40L一起预温育。向该混合物中加入CD40-Fc、受体珠和链霉亲和素偶联的供体珠, 并在室温下进一步温育1小时。使用EnVision Multilabel Plate Reader, 使用680nm的激发波长和520nm的发射波长测量荧光。AlphaScreen信号的减少表明生物素化的CD40L与CD40受体的结合被存在于周质提取物中的纳米抗体阻断。

[0409] 6.1.3 SPR (解离速率)

[0410] 在ProteOn XPR36仪器 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 上测定所有解离速率。通过使用EDC (1-乙基-3-[3-二甲基-氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐) 和磺基-NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 的胺偶联, 用10mM乙酸缓冲液pH5.5中的1200-1800RU的重组人CD40L (R&D HEK) 包被ProteOn GLC传感器芯片。在运行缓冲液ProteOn PBS/Tween (磷酸盐缓冲盐水, pH7.4, 含0.005%Tween 20) 中的表达抗CD40L纳米抗体的大肠杆菌克隆的10倍稀释的周质提取物流过传感器芯片。纯化的单价抗CD40L纳米抗体以100nM流过传感器芯片。对于亲和力成熟(见实施例6.8), 实验在37°C下进行, 所有其他实验在25°C下进行。获得的数据通过Interspot减法以及减去空白缓冲液注射而双重引用。处理的曲线用于基于Langmuir解离模型的解离速率分析。

[0411] 6.1.4 报告子测定

[0412] 在该测定中, 纳米抗体对CD40L诱导的CD40信号传导的抑制作用通过NF- $\kappa$ B-SEAP报告系统定量。通过稳定转染HEK293T细胞引入NF- $\kappa$ B诱导型SEAP构建体, 配体诱导触发胚胎碱性磷酸酶的分泌。SEAP构建体由在与5个NF- $\kappa$ B结合位点融合的IFN- $\beta$ 最小启动子 (InvivoGen, TDS HEK-Blue<sup>TM</sup>CD40L Cells, cat. Hkb-cd40) 的控制下的SEAP报告基因组成。

[0413] 将稀释的一系列纳米抗体在37°C和5%CO<sub>2</sub>在潮湿室中与CHO hCD40L 4B11细胞和5x10<sup>4</sup>HEK-Blue细胞的膜提取物一起在测定培养基 (DMEM (Invitrogen, Cat 31966-021) + 10%FBS (Sigma, Cat F7524) + 1%Pen/Step (Invitrogen, Cat 15140-122)) 中温育16h。随后, 将一部分悬浮液加入到底物中并在室温下温育1h。使用Envision (620nm) (Perkin Elmer) 测定SEAP水平。

[0414] 6.1.5 B细胞激活测定

[0415] 将稀释的一系列纳米抗体在37°C和5%CO<sub>2</sub>在潮湿室中与辐射的1x10<sup>4</sup>CHO hCD40L 4B11细胞和5x10<sup>4</sup>B细胞一起在测定培养基 (RPMI-1640 (Invitrogen, Cat 72400-054) + 10%FBS (Sigma, Cat F7524) + 1%Pen/Step (Invitrogen, Cat 15140-122)) 中温育5天。在第五天将平板在4°C以250g离心5分钟。然后将细胞重悬于抗体稀释液 (小鼠抗人CD19-FITC (BD Pharmingen, cat.: 555412) + 小鼠抗人CD86-PE (BD Pharmingen, cat.: 555658)) 并置于4°C 30分钟。之后用MACS缓冲液洗涤细胞3次, 并且然后重悬于含有1/1000稀释的TOPR03

(Molecular Probes T3605)的MACS缓冲液中。样品在FACSCanto II上分析。

[0416] 6.1.6 B细胞增殖测定

[0417] 将稀释的一系列纳米抗体在37°C和5%CO<sub>2</sub>在潮湿室中与CHO hCD40L 4B11细胞和5x10<sup>4</sup>B细胞的膜提取物一起在测定培养基(RPMI-1640 (Invitrogen, Cat 72400-054)+10% FBS (Sigma, Cat F7524)+1%Pen/Step (Invitrogen, Cat 15140-122))中温育4天。第四天,将氚-胸苷(Perkin Elmer, ref:NET027X001MC)加入平板。用氚-胸苷温育24小时后,将平板冷冻。第二天,收集平板并在Top count (Perkin Elmer) (H3胸苷摄取测定)上分析。

[0418] 6.1.7 竞争性ELISA

[0419] 为了评估纳米抗体是否识别CD40L蛋白上的不同表位,将纯化的纳米抗体针对竞争性ELISA中噬菌体上展示的较小组纳米抗体进行分类。将96孔F底板Nunc-Immuno<sup>TM</sup> (NUNC)的每个孔在4°C与50ng hCD40L (在HEK细胞中产生, R&D, cat#: 6420-CL/CF) 蛋白质在PBS中温育过夜。在RT下用4% (w/v) 脱脂乳封闭1小时后,在存在或不存在0.5μM纯化的纳米抗体的情况下加入纳米抗体-噬菌体。用抗-M13-HRP MAb (GE Healthcare; cat#27-9421-01) 检测结合的纳米抗体-噬菌体,并使用可溶性(高灵敏度)四甲基联苯胺底物(es (HS) TMB) (SDT) 作为HRP底物在450nm进行比色检测。使用存在和不存在纯化的纳米抗体时在450nm处的吸光度之间的比率来确定分类的纳米抗体是否识别CD40L分子上的相同或(非)重叠表位。

[0420] 6.2 纳米抗体鉴定

[0421] 鉴于触发针对美洲驼CD40L的免疫应答,跨不同物种的同源性通过计算不同物种的CD40L的比对序列的不同残基的同一性和数量百分比来评估,但仅考虑细胞外结构域。与人类CD40L的同一性百分比范围为猕猴99.5%至美洲驼88%,小鼠和大鼠小于75%。人CD40L (hCD40L) 与美洲驼CD40L的高度同源性使抗体产生混淆。人CD40L与大鼠和小鼠CD40L的低同源性使交叉反应性纳米抗体的发现复杂化。

[0422] 五只远交的美洲驼被免疫。用重组人CD40L (PeproTech, 310-02) 免疫两只美洲驼。用表达hCD40L的Llana细胞免疫三只美洲驼。尽管hCD40L和美洲驼CD40L之间具有高度同源性,但所有美洲驼对hCD40L都显示出强烈的免疫应答。

[0423] 免疫纳米抗体噬菌体展示文库是从使用从所有美洲驼的血样提取的总RNA制备的cDNA产生的。使用重组人CD40L、在人细胞上表达的人CD40L或在轮替选择之间交替的两种抗原形式来探测噬菌体展示文库。

[0424] 根据上述实施例6.1.1和6.1.2针对通过FACS的纳米抗体结合和针对在Alphascreen竞争测定中的阻断来筛选选择输出。

[0425] 经过一轮选择后,约50%的结合纳米抗体也阻断CD40L/CD40相互作用。除了在大肠杆菌中产生的重组hCD40L上选择的纳米抗体外,FACS结合物的数量和阻断纳米抗体的分数随选择轮增加。对于源自用CHO-CD40L细胞免疫的动物的克隆观察到更高的命中率。

[0426] 超过1500种符合FACS和AlphaScreen截断标准的纳米抗体接下来测序,产生了属于210个不同纳米抗体家族的689个独特克隆。这些克隆的解离速率如实施例6.1.3所述确定。

[0427] 选择40种不同的纳米抗体克隆用于进一步表征,即,先导组。仅进一步考虑以下克隆:其阻断AlphaScreen<sup>®</sup>中的CD40/CD40L相互作用,与CD40L的天然构象(FACS)结合并且

具有解离速率 $<4 \times 10^{-3}$ 。

[0428] 6.3 40个纳米抗体的先导组的体外表征

[0429] 将先导组的40个纳米抗体克隆到pAX205中,其在巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)中产生并纯化用于进一步表征。它们的效力通过AlphaScreen和报告子与B细胞激活测定来确定(参见实施例6.1.4和6.1.5)。此外,解离速率也得到了确认。通过在竞争性ELISA中针对展示在噬菌体上的纳米抗体筛选纯化的纳米抗体来确定表位分类(参见实施例6.1.7)。

[0430] 在40个纳米抗体的先导组内确定了7个不同的表位分类。纳米抗体C0100028B02(分类6.2)和C0100046B03(分类2.1)与CDP7657(分类1.1)位于不同的表位分类中。最有效力的克隆属于表位分类6.2。

[0431] 鉴于人类和美洲驼CD40L之间的序列保守性,预期纳米抗体不会被鉴定属于7个不同的表位分类。

[0432] 6.4 15个纳米抗体的先导组的进一步体外筛选

[0433] 由CD40L-CD40相互作用诱导的重要表型是B细胞激活和增殖。B细胞可以将抗原呈给辅助性T细胞。如果激活的T细胞识别由B细胞呈递的肽,则T细胞上的CD40L与B细胞的CD40受体结合,导致静息B细胞激活。T细胞也产生IL-4,直接影响B细胞。由于这些刺激,B细胞可以进行分裂。

[0434] 根据实施例6.1.6在B细胞增殖测定中测试基于序列多样性和它们在B细胞激活测定中的性能而选择的15个纳米抗体。B细胞激活和增殖测定之间的主要差异是读数(分别测定CD86水平和H<sup>3</sup>胸昔摄取)和用于激活B细胞的CD40L来源(分别用UV照射的表达hCD40L的CHO细胞和来自hCD40L细胞的膜提取物)。对于两种测定,B细胞都来源于健康供体。H<sup>3</sup>胸昔摄取是比CD86表达更下游的B细胞激活指标,因此被认为是更相关的功能读数。在B细胞增殖测定中,发现15个克隆中的6个具有与CDP7657Fab相当的效力。

[0435] 6.5 选择4个先导候选者

[0436] 基于如上所述的AlphaScreen、报告子测定、B细胞激活测定和B细胞增殖测定和物理化学稳定性数据(数据未显示),在最终表征阶段将先导组减少至4个先导候选者。从最有效力的表位分类(分类6.2;见上文)中,选择来自不同家族的两个先导候选者:C0100028B02(“28B02”)和C0100044B07(“44B07”)。虽然C0100028B02是B细胞增殖测定中最好的克隆之一,但是C0100044B07是B细胞激活测定中最有效力的克隆,并且是B细胞增殖测定中非常有效力的克隆。两个另外的先导候选者被选中。表位分类4.2的C0100029C10(“29C10”),其也是B细胞增殖测定中的有效力的克隆。尽管有上述标准,表明至少9个克隆在各种测定中表现更好,但诸位发明人决定也选择表位分类2.1的C0100046B03(“46B03”),因为它代表不同的种系。

[0437] 6.6 样式化:半衰期延长(HLE)的效果

[0438] 自身免疫性疾病的治疗通常需要药物对患者具有持续的可用性,即药物应具有长的半衰期。延长药物半衰期的各种方法是可用的,包括Fc融合,聚乙二醇化和与血清白蛋白和白蛋白结合物的融合。

[0439] 据推测,Fc融合是最不优选的选择,因为这将使得能够结合存在于人血小板上的Fc受体,可能导致血小板激活和聚集。此外,聚乙二醇化不是优选的,因为PEG部分在单独的生产步骤中与纳米抗体缀合,导致成本增加和收率降低。而且,聚乙二醇化常常由于药物-

靶标结合相互作用的空间干扰而导致降低的结合亲和力并具有高PEA。鉴于此,选择通过与结合血清白蛋白的ISVD融合来延长半衰期。

[0440] 为了评估白蛋白结合对先导候选物的影响,构建了半衰期延长的(HLE) (NB-35GS-Alb11-FLAG3-HIS6) 和非HLE单价ISVD,并在B细胞增殖测定中在人血清白蛋白(HSA)的缺乏和存在下如IC<sub>50</sub>所示进行测试:

[0441] -C010000006是C01000028B02-Alb11-FLAG3-HIS6;

[0442] -C010000008是C01000029C10-Alb11-FLAG3-HIS6;

[0443] -C010000004是C01000044B07-Alb11-FLAG3-HIS6;并且

[0444] -C010000010是C01000046B03-Alb11-FLAG3-HIS6。

[0445] 结果如表6.6所示。

[0446] 表6.6:ISVD和HSA结合的半衰期延长融合对B细胞增殖测定中先导纳米抗体效力的影响

构建体	IC <sub>50</sub> (M)		倍差异	
	-HSA	+HSA	-HSA	+HSA
[0447]	C010000006	5,97E-10	1,33E-09	1 2.2
	C0100028B02		2,81E-09	
	C010000008	1,26E-09	2,06E-09	1 1.6
	C0100029C10		1,06E-09	
	C010000004	1,18E-09	1,88E-09	1 1.6
	C0100044B07		1,14E-09	
	C010000010	8,52E-10	1,72E-09	1 2
	C0100046B03		2,38E-09	

[0448] 仅观察到效力的小差异,表明半衰期延长对分子效力的影响有限。与通过聚乙二醇化使Fab'部分的半衰期延长使得活性减少4-5倍的CDP7657相比(参见US2010/0104573)。

#### 6.7物种交叉反应性和选择性

##### 6.7.1物种交叉反应性

[0451] 考虑到与人CD40L的不同程度的CD40L序列同源性(恒河猴的99.5%至小鼠和大鼠的小于75%),对小鼠、大鼠、食蟹猴和恒河猴CD40L评估了物种交叉反应性。

[0452] 为了评估与小鼠CD40L的结合(UniProt登录号:P27548),用10mM乙酸缓冲液pH5.5中的3000-4000RU重组小鼠CD40L(R&D NS0)包被ProteOn GLC传感器芯片。在ProteOn运行缓冲液PBS/Tween(磷酸盐缓冲盐水,pH7.4,含有0.005%Tween 20)中的纯化的单价抗CD40L纳米抗体以100nM流过传感器芯片。处理的曲线用于基于Langmuir解离模型的解离速率分析。所有40个先导组克隆都进行了测试。但是,它们都没有显示与小鼠CD40L的结合。

[0453] 在FACS中测试对大鼠CD40L的交叉反应性(UniProt登录号:Q9Z2V2和Q9R254(第二))。在FACS上分析纯化的纳米抗体与大鼠CD40L的结合。将2x10<sup>5</sup>个细胞(瞬时转染的大鼠

CD40L HEK细胞)与纯化的纳米抗体在FACS缓冲液中于4℃温育30分钟。将细胞洗涤3次,重新悬浮并在4℃温育30分钟。再次洗涤细胞3次,并且将死细胞用TOPR03(分子探针,T3605)染色。样品在FACSSarray™(BD Biosciences)上分析。只测试了最终的四个潜在候选物(C0100028B02、C0100029C10、C0100044B07和C0100046B03)。没有观察到任何纳米抗体的结合。

[0454] 在配体竞争测定中测试对食蟹猴CD40L(UniProt登录号:G7PG38)和恒河猴CD40L(UniProt登录号:G7N4M5)的交叉反应性。在FACS上分析纯化的纳米抗体与生物素化的人CD40L结合人/恒河猴/食蟹猴表达CD40的细胞的竞争。使用人CD40L作为人的可溶形式,恒河猴和食蟹猴(食蟹猴)CD40L的序列相同。将 $2 \times 10^5$ 个细胞(瞬时转染的HEK细胞)与稀释系列的纯化的纳米抗体在FACS缓冲液中于4℃温育30分钟。然后将细胞洗涤3次,最后重悬于含有链霉亲合素-PE(BD Pharmingen,#554061)的FACS缓冲液中。该混合物在4℃温育30分钟。如上所述进一步处理细胞。结果如表6.7所示。

[0455] 表6.7:人/食蟹猴/恒河猴交叉反应性(配体竞争)

构建体	人 CD40		食蟹猴 CD40		恒河猴 CD40	
	IC50 (M)	%阻断 <sup>2*</sup>	IC50 (M)	%阻断	IC50 (M)	%阻断
C0100028B02	4,43E-09	71	4,70E-09	75	4,55E-09	72
C0100029C10	1,42E-10*	98	8,07E-09	81	1,24E-08	87
C0100044B07	5,89E-09	82	5,28E-09	79	5,41E-09	83
C0100046B03	1,53E-08	96	2,27E-08	97	2,82E-08	100

[0457] \*次优曲线拟合; <sup>2</sup>\*最大观察效果

[0458] 对于每种纳米抗体,在不同CD40L物种的实验误差内的 $IC_{50}$ 值是相同的。

#### 6.7.2 选择性

[0460] 使用基本局部比对搜索工具(BLAST)来鉴定人蛋白质数据库中的最相关蛋白。最相关蛋白(非CD40L变体)分别是具有27.9%、27.9%和25.4%的序列同一性的TNF $\alpha$ 、HVEM-L(TNF14)和RANKL(TNF11)。为了评估对CD40L的选择性,将MaxiSorp平板(Nunc,430341)用人CD40L(4℃)包被过夜,然后在室温下封闭1小时(PBS,1%酪蛋白)。将固定浓度的纳米抗体与稀释系列竞争物(TNF $\alpha$ 、HVEM-L(TNF14)和hRANKL(TNF11);CD40L用作阳性对照)一起使用,起始于100倍过量。用抗-FLAG-HRP(Sigma(A8592))检测纳米抗体。

[0461] 对于C0100028B02、C0100029C10、C0100044B07和C0100046B03中的任何一个都未观察到对人TNF $\alpha$ 、HVEM-L(TNF14)和hRANKL(TNF11)的结合。

#### 6.8 亲和力成熟

[0463] 如 $IC_{50}$ 所示(参见表6.8),四种选择的纳米抗体(C0100028B02、C0100029C10、C0100044B07和C0100046B03)在B细胞增殖测定中具有纳摩尔范围内的效力。

[0464] 表6.8:B细胞增殖测定中4个先导者的效力数据概述

纳米抗体	平均 IC50 (M)	标准偏差 IC50 (M)
[0465]	C0100028B02	1,15E-09
	C0100029C10	1,26E-09
	C0100044B07	9,71E-10
	C0100046B03	2,18E-09

[0466] 为了进一步增加效力,纳米抗体被亲和力成熟。为了筛选亲本纳米抗体的亲和力成熟变体,确定解离速率。

[0467] 通过筛选从每个亲本纳米抗体克隆产生的易错文库进行亲和力成熟。在这种方法中,氨基酸置换是通过易错PCR在编码纳米抗体的DNA中随机引入突变而产生的。结果,在CDR和框架区(FR)中均发现氨基酸置换。使用递减浓度的重组CD40L(从50nM至0.05pM)在溶液中进行5轮噬菌体展示选择。在噬菌体展示后,对各个纳米抗体进行测序,并通过SPR分析测定解离速率(参见实施例6.1.3)。基于解离速率数据,进一步研究具有有益效果的突变。

[0468] 6.8.1 C0100028B02 (28B02)

[0469] 选择后获得413个序列,其中294个克隆基于测序是非冗余的。在这些独特的克隆中,在ProteOn上测试了271个克隆的解离速率。

[0470] 基本上,散布在整个纳米抗体上的框架突变(一个克隆中多达6个)没有或仅最小程度地影响解离速率(数据未显示)。没有保留FR突变。CDR突变在下表中描述。

[0471] 大约25%的克隆显示比亲本纳米抗体的解离速率提高多达2倍。

28B02	CDR1*										
Kabat 编号	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
[0472]	野生型序列	G	F	T	L	E	Y	Y	A	I	G
	突变			S	Q				N	L	A
	突变			N	S				V	V	
	突变				A	M					
	突变				I	G					

[0473] \*一个克隆中多达2个CDR1突变

28B02	CDR2*								
Kabat 编号	50 51 52 53 54 55 56 57 58								
绝对编号	1 2 3 4 5 6 7 8 9								
[0474]	野生型序列 C I S S E G S T S								
	突变 . V G . G S G A I								
	突变 . . . . N P R								
	突变 . . . . T I G								
	突变 . . . . I S .								

[0475] \*一个克隆中多达2个CDR2突变

28B02	CDR3																			
	* Kaba t 编号 95 96 97 98 99 100 100a 100b 100c 100d 100e 100f 100g 100h 100i 100j 100k 100l 101 102																			
	绝对 编号 1 2 3 4 5 6 7 8 9 1 11 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2																			
[0476]	野生型序列 D P D R G F L G S S C D T Q S H Q Y D Y																			
	突变 . . . S . . F D G N . G N H P N L F G F																			
	突变 . . . . M A N G . N A K T Y R . . . N																			
	突变 . . . . W S R R . E . L . . H . . .																			
	突变 . . . . . T . V . R . . . . .																			

[0477] \*一个克隆中最多有3个CDR突变

[0478] 根据该数据集选择CDR3中的3个突变用于进一步研究：

[0479] L100aF: 该突变导致解离速率提高1.3倍(优选与K43R组合)；

[0480] D101G: 该突变导致解离速率提高1.3倍；和

[0481] Y102F: 该突变导致解离速率提高1.8倍。

[0482] 最终变体是C010002366 (SEQ ID NO:7)。

[0483] 6.8.2 C0100046B03 (46B03)

[0484] 获得731个序列, 其中229个克隆是非冗余的。所有229个克隆都在ProteOn上进行测试。

[0485] 实质上, 散布在整个纳米抗体上的框架突变(一个克隆中多达6个)没有或仅最小程度地影响解离速率(数据未显示)。没有保留FR突变。CDR突变在下表中描述。

46B03	CDR1*									
Kabat 编号	26 27 28 29 30 31 32 33 34 35									
绝对编号	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10									
[0486]	野生型序列 G R T P L N Y H M A									
	突变 E H I S F S H N K S									
	突变 R G A . . D . . T G									
	突变 . . S . . I . . V T									
	突变 . . P . . . . . .									

[0487] \*一个克隆中多达2个CDR1突变

46B03	CDR2*									
Kabat 编号	50 51 52 52a 53 54 55 56 57 58									
绝对编号	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10									
[0488]	野生型序列 A I S S L L G S T D									
	突变 G V . N . I S I P .									
	突变 . . . R . . D G S .									
	突变 . . . G . . F . .									

[0489] \*一个克隆中多达2个CDR1突变

46B03	CDR3*																				
Kabat 编号	95 96 97 98 99 100 100a 100b 100c 100d 100e 100f 100g 100h 100i 100j 100k 100l 101 102																				
绝对编号	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 0 11 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0																				
[0490]	野生型序列	R	E	T	T	H	Y	S	T	S	D	R	V	N	E	M	R	H	Y	D	Y
	突变	Q	D	S	I	Y	H	T	I	N	A	S	.	D	V	V	K	N	.	N	H
	突变	L	K	M	S	N	N	G	A	R	.	G	.	Y	A	K	S	L	.	.	F
	突变	.	.	A	A	.	.	N	.	.	.	.	.	S	D	T	W	Q	.	.	N
	突变	.	.	K	R	.	.	I	.	.	.	.	.	N	.	M	R	.	.	.	
	突变	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	D	.	.	.	.	
	突变	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	

[0491] \*一个克隆中多达4个CDR3突变

[0492] 大约25%的克隆显示比亲本纳米抗体提高5.2倍的解离速率。根据此数据集选择6个位置作进一步研究：

- [0493] ●Y100H:对解离速率没有影响
- [0494] ●Y100I:解离速率提高1.5倍
- [0495] ●S100aT:对解离速率没有影响
- [0496] ●N100gD:效果不明显
- [0497] ●E100hV:对解离速率没有影响
- [0498] ●M100iI:对解离速率没有影响
- [0499] ●H100kN:单突变,解离速率提高2.6倍
- [0500] ●H100kA:解离速率提高约2倍
- [0501] ●H100kS:解离速率提高约2倍
- [0502] 最终变体是C010003290 (SEQ ID NO:8)。
- [0503] 6.9 Alb变体

[0504] 在导致本发明的研究中发现,向纳米抗体的C端区添加C端延伸实质地防止了健康人受试者绝大多数血浆/血清样品中已有抗体的结合(参见下文)。然而,即使当所述纳米抗体包含C端延伸时,来自患有某些严重(自身)免疫失调(包括SLE)的许多人类受试者的血液和血清似乎也含有一些可以结合纳米抗体的已有抗体/因子。

[0505] 在以下实施例中,使用ProteOn如下测定所用样品(即来自健康志愿者和SLE患者)中存在的已有抗体与测试的纳米抗体的结合:使用ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 评估在人血清白蛋白(HSA)上捕获的纳米抗体上已有抗体的结合。使用PBS/Tween(磷酸盐缓冲盐水,pH7.4,0.005% Tween20)作为运行缓冲液,并且实验在25°C下进行。使用EDC/NHS(流速30μl/min)活化ProteOn GLC传感器芯片的配体泳道,并且注射在ProteOn乙酸盐缓冲液pH4.5中的10μg/ml的HSA(流速100μl/min)以使固定水平约为3200RU。固定后,用乙醇胺HC1(流速30μl/min)使表面失活。纳米抗体以45μl/分钟在HSA表面上注射2分钟以使得纳米抗体捕获水平为约200RU。将含有已有抗体的样品以14,000rpm离心2分钟,并将上清液在PBS-Tween20 (0.005%) 中以1:10稀释,随后以45μl/min注射2分钟,之后进行400秒的解离步骤。在每个循环后(即在新的纳米抗体捕获和血液样品注射步骤之前),用45μl/min的2分钟HC1 (100mM) 注射再生HSA表面。用ProteOn Manager 3.1.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 进行传感图处理和数据分析。通过减去1) 纳米抗体-HSA解离和2) 与参考配体泳道的非特异性结合,在双重参考之后获得显示已有抗体结合的传感图。通过在125秒(缔合结束后5秒)设定报告点来确定已有抗体的结合水平。相对于参照纳米抗体在125秒时的结合水平计算已有抗体结合的减少百分比。参考A=Alb8 (SEQ ID NO:16);参考B=Alb8+A (SEQ ID NO:17) (见表2)。

[0506] 6.9.1:S112K突变对存在于人SLE样品中的已有抗体的结合的影响

[0507] 参考A和参考B通过从已证实为SLE阳性的患者获得的7个血清样品的已有抗体来测试结合。为了比较,包括来自两名健康人志愿者的血浆样品。

[0508] 根据上面概述的通用方案,在ProteOn上测量所测试样品中已有抗体与纳米抗体的结合。结果如下表6.9.1所示。

[0509] 从比较本发明的参考A和参考B以及纳米抗体的结合数据可以看出,从一些SLE患者获得的样品似乎含有某些已有抗体,即使在C-端丙氨酸残基的存在下这些已有抗体也可以结合纳米抗体(C-端丙氨酸残基确实实质上防止/除去(部分或基本上完全)存在于来自

健康志愿者的血浆样品中的已有抗体的全部结合)。

[0510] 可以进一步看出,来自SLE样品的这些已有抗体的结合可以通过在第11位和112位(和在第112位的情况下,特别是通过S112K)的突变而大大减少。

[0511] 6.9.2:组合的框架突变和C端延伸对存在于人SLE样品中的已有抗体的结合的影响

[0512] 测试了四种不同的纳米抗体(具有特定的框架突变并且具有或不具有C端丙氨酸延伸)与来自证实为SLE阳性的患者的5个血清样品的已有抗体的结合。为了比较,包括来自健康人类志愿者的一个血浆样品。

[0513] 根据上面概述的一般方案,在ProteOn上测量样品中已有抗体与测试的纳米抗体的结合。结果如下表6.9.2(a)和6.9.2(b)所示。

[0514] 从参考A和参考B的结合数据的比较可以看出,从SLE患者获得的样品似乎含有某些已有抗体,即使存在C端丙氨酸残基,这些抗体仍然可以与纳米抗体结合。C端丙氨酸残基实质上防止/除去存在于来自健康志愿者的血浆样品中的已有抗体的所有结合。

[0515] 可以进一步看出,来自SLE样品的这些已有抗体的结合可以通过在第11位和112位(并且在第112位的情况下,特别是通过S112K)的突变而大大减少。

[0516] 6.9.3:V89T突变对SLE患者样品中已有抗体结合的影响。

[0517] 如本文所述,即使存在C端延伸,从某些SLE患者获得的样品似乎也包含可以结合VH结构域的暴露C末端的已有抗体/因子。研究V89T突变是否可在存在或不存在C端延伸情况下减少或防止/除去这种结合。结果也显示在下表6.9.2(b)和6.9.3(a)中。

[0518] 可以看出,V89T突变基本上可以防止/除去从SLE患者获得的样品中存在的已有抗体的结合,其程度与S112K突变相似。然而,从比较表6.9.2(b)和6.9.3(a)中给出的具有V89T突变并且没有C端延伸的纳米抗体与具有S112K突变且没有C端延伸的类似纳米抗体的数据可以看出,在没有C端延伸的纳米抗体中的第112位突变通常减少来自健康志愿者的样品中已有抗体的结合,其程度与V89T突变相比更大(即S112K纳米抗体的100%、85%和64%分别相对于V89T纳米抗体的9%、11%和16%)由于这个原因,使用第112位的突变(特别是S112K或S112Q)通常优于使用第89位的突变(如V89T)。

[0519] 然而,从表6.9.2(b)和6.9.3(a)中的数据还可以看出,向V89T纳米抗体添加C端丙氨酸完全防止/除去了从健康志愿者获得的样品中已有抗体的结合,并且由于这个原因,如果V89T纳米抗体或VH结构域具有或意图具有其将存在的蛋白质或多肽中的暴露的C末端区域(例如,因为它形成了相同的C末端),通常优选本文所述的V89T突变和C端延伸的组合(即相对于使用V89T而不使用C端延伸)。

[0520] 为了证实上表中的结果/发现可广泛适用,针对96(S112K)和129(V89T)人血清样品的测试组测试了具有S112K和/或V89T突变的代表性纳米抗体。使用上述方案在ProteOn上确定结合。

[0521] 结果总结于图1和表6.9.3(b)(具有S112K突变的代表性纳米抗体)中。在图1中,将具有S112K突变的纳米抗体(参考A+S112K+C端丙氨酸-参见以上表6.9.2(b))与参考纳米抗体(参考A;SEQ ID NO:16)相比较。对具有S112K突变的纳米抗体和参考A都针对每种血清样品进行测试,并测定125秒(RU)时的结合水平。然后将数据绘制在图1中,每个点呈现在一个样品中针对参考A(在图1中表示为(1))或针对S112K突变体(在图1中表示为(2))中测量的

结合。虚线表示20RU的测量结合水平。

[0522] 在表6.9.3 (b) 中也用数字表示相同的数据,其提及-分别对于参考A和S112K突变体-在125秒时结合水平高于20RU、低于20RU(即0-20RU) 和低于10RU的测试的样品的总数。

[0523] 从图1绘制的数据和表6.9.3 (b) 显示的数据可以看出,对于参考A,测试的96个样品中超过一半的结合水平高于20RU(在一些情况下,150-200RU),表明样品中存在的已有抗体与参考A结合。相比之下,对于S112K突变体,没有样品产生高于20RU(且大多数低于10RU)的结合水平,表明S122K突变基本上能够减少/防止全部96个测试样品中已有抗体的结合。

[0524] 对于具有V89T突变的代表性纳米抗体(参考A+L11V+V89T+C端丙氨酸;见上表6.9.3 (a)),针对129个血清样品进行测试并再次与参考A比较(由图2中的(1)表示;V89T突变体由图2中的(2)表示),类似的图和类似的数据分别显示在图2和表6.9.3 (c) 中。

[0525] 再次,从图2中的图和表6.9.3 (c) 中的数据可以看出,除少数例外(即小于10%的测试样品,各自在125秒后给出约为100RU或更低的绝对结合值),V89T突变能够减少/防止所测试的129个样品中的大多数中已有抗体的结合,而没有V89T突变的参考在大多数测试样品中被已有抗体结合。

[0526] 表6.9.3 (b):对具有S112K突变的代表性纳米抗体针对96个血清样品进行测试

[0527]	测试的纳米抗体	125 秒时的结合水平< 10 RU	125 秒时的结合水平< 20 RU	125 秒时的结合水平> 20 RU
	参考 A	34	41	55
	参考 A + S112K + C 端丙氨酸	92	96	0

[0528] 表6.9.3 (c):对具有V89L和/或T100K/Q突变的纳米抗体突变体针对129个血清样品进行测试

[0529]	测试的纳米抗体	125 秒时的结合水平< 10 RU	125 秒时的结合水平< 20 RU	125秒时的结合水平> 20 RU
	参考 A	27	40	89
	参考 A + L11V + V89T + C 端丙氨酸	110	119	10

[0530] 6.10 最终样式

[0531] 基于优化Alb-变体以减少已有抗体的结合的数据(参见实施例6.9),将结合CD40L的ISVD与优化的Alb-变体融合,并进一步测试。

[0532] 6.10.1 最终样式的已有抗体的结合。

[0533] 将C0100028B02和C0100046B03分别融合至Alb11-和Alb23-变体两者,即Alb00129(Alb11(L11V,V89T)-A)和Alb00132(Alb23(L5V,L11V,V89T)-A),(见表6.10)。

[0534] 表6.10:HLE延伸先导

Nanobase ID	描述
C010003320	C0100028B02(E1D,T60A,A74S,K83R,Y102F)-20GS-Alb11(L11V,V89T)-A
C010003323	C0100028B02(E1D,T60A,A74S,K83R,Y102F)-20GS-Alb23(L5V,L11V,V89T)-A
C010003326	C0100028B02(E1D,T60A,A74S,K83R,Y102F)-20GS-ALB11(S112K)-A
[0535]	
C010003313	C0100046B03(E1D,A14P,S60A,L63V,D65G,A74S,A76T,R81Q,N82bS,K83R,Y100I,M100iL,H100kN)-9GS-Alb11(L11V,V89T)-A
C010003315	C0100046B03(E1D,A14P,S60A,L63V,D65G,A74S,A76T,R81Q,N82bS,K83R,Y100I,M100iL,H100kN)-9GS-Alb23(L5V,L11V,V89T)-A
C010003318	C0100046B03(E1D,A14P,S60A,L63V,D65G,A74S,A76T,R81Q,N82bS,K83R,Y100I,M100iL,H100kN)-9GS-ALB11(S112K)-A

[0536] 基本上如上述6.9所述评估对于最终样式不存在与已有抗体的结合。

[0537] 在Alb8结构单元中添加C端丙氨酸和工程化L11V和V89T后,已有抗体与HLE延伸先导物的结合显著得意减少/防止。对于C010003313 (“3313”) 和C010003320 (“3320”), 可见类似的已有抗体结合谱。这也表明,已有抗体的结合谱看起来独立于接头。

[0538] 在Alb8结构单元中添加C端丙氨酸和工程化S112K后,已有抗体与HLE延伸先导物的结合显著得意减少/防止。与C010003326 (“3326”) 相比,对于C010003318 (“3318”) 看到类似的已有抗体结合谱。这再次表明,通过添加优化的Alb-变体而减少或防止已有抗体似乎与用于将先导纳米抗体连接到优化的Alb-变体的接头无关。

[0539] 此外,这也表明,在这种情况下,仅需要修饰C端结构单元(在这种情况下是优化的Alb-变体),以获得已有抗体与整个构建体的结合的显着减少/防止。

[0540] 6.11在B细胞激活和增殖测定中的效力

[0541] 在B细胞激活和B细胞增殖测定中评估先导候选物C010003318的效力(参见实施例6.1.6和6.4)。将效力与5C8和非聚乙二醇化的CDP7657进行比较。结果总结在表6.11中。

[0542] 表6.11 B细胞激活和B细胞增殖测定

	IC50 (pM)	5c8	CDP7657*	C010003318
[0543]	B 细胞激活	119	101	212
	B 细胞增殖	51	864	308

[0544] \*非聚乙二醇化的CDP7657

[0545] 基于B细胞增殖数据,证明C010003318具有比非聚乙二醇化的CDP7657更高的效力,尽管与5C8相比,C010003318具有低10-6倍的效力。

[0546] 基于B细胞激活数据,可以看出非聚乙二醇化的CDP7657和5C8似乎比C010003318效力高2倍。

[0547] 总之,在这些体外测定中,5C8比C010003318效力高2-10倍。在更相关的B细胞增殖测定中(参见实施例6.4),C010003318明显比CDP7657更有效力。在B细胞激活测定中,似乎CDP7657比C010003318效力高2倍。然而,如实施例6.6所示,CDP7657的聚乙二醇化使活性降低4-5倍(参见US2010/0104573)。

[0548] 因此,在所有测定中,C010003318似乎比CDP7657更有效力。

[0549] 6.12对CD40L的亲和力

[0550] 为了确定最终双特异性HLE先导纳米抗体对hCD40L的亲和力,在KinExA 3200 (Sapidyne Inc.) 上运行动力排斥测定(KinExA)。

[0551] 然后在KinExA Pro Software v3.2.6中输入应答,并将游离纳米抗体百分比与hCD40L浓度作图。没有异常值被排除在适合的范围之外。漂移或配体相关的非特异性结合的校正不是必需的。观察到低波动。绘制的值使用“Affinity, Standard”分析方法进行拟合。KD结果如表6.12所示。

[0552] 表6.12:在溶液中KinExA测定中C010003318和C010003326的亲和力(pM)

[0553]

	KD (pM) [95%CI]
C010003318	17pM[12-22pM]
C010003326	4pM[3-6pM]

[0554] 6.13在小鼠和食蟹猴中的TT研究证明纳米抗体在体内中和CD40L活性方面是有效的

[0555] 为了在体内评估先导纳米抗体的CD40L中和能力,在人源化小鼠和食蟹猴中进行破伤风类毒素(TT)激发研究。

[0556] 6.13.1纳米抗体在人源化小鼠的TT研究中中和CD40L活性。

[0557] 由于纳米抗体不与小鼠CD40L发生交叉反应(参见实施例6.7.1),人源化小鼠用破伤风毒素(TT)免疫一天,并且在不同时间点评估CD40L中和对TT特异性IgG抗体应答的影响。纳米抗体在TT激发前给予,每3天给予一次,总共10次/个体。TT在第1天和第31天给予。抗CD40L 3318纳米抗体在这些小鼠中损害了TT-IgG应答,并且这种效果是显着的(数据未显示)。免疫抑制作用是剂量依赖性的,但是所有测试的剂量均比对照更好地降低了IgG应答。纳米抗体的免疫抑制作用通过在这些纳米抗体处理的小鼠的脾中缺乏成熟的人B细胞而得以证实。类似地,在小鼠TT研究中,与载体组相比,纳米抗体3313和3320被证明在显着降低TT-IgG应答方面是有效的。此外,这些纳米抗体也损害了TT免疫的人PBMC移植的免疫缺陷小鼠的脾中hu PBL的沉降和生长(数据未显示)。

[0558] 因此,所有测试的纳米抗体在体内中和CD40L活性方面都是有效的。

[0559] 6.13.2纳米抗体在食蟹猴的TT研究中中和CD40L活性。

[0560] 食蟹猴TT研究与实施例6.13.1类似地进行。简而言之,每天用破伤风毒素免疫食蟹猴,并在不同时间点评估CD40L中和对TT特异性IgG抗体应答的影响。在第0天和第31天给予纳米抗体、5C8和载体。在第1天+4h和第31天,给予TT。如图7所示,抗CD40L C010003318纳米抗体损害了这些猴子中的TT-IgG应答,并且这种效果是显着的。免疫抑制作用是剂量依赖性的,但是所有测试的剂量均比对照更好地降低了IgG应答。数据表明在所有纳米抗体剂量下可溶性靶标的饱和。

[0561] 因此,所有测试的纳米抗体在体内中和CD40L活性方面都是有效的。食蟹猴中的数据证实了小鼠中的数据并证明了纳米抗体的广泛适用性,即使在没有功能性Fc区的情况下。值得注意的是,抗CD40L的Fc效应子功能显示出影响对TT的体液应答(Shock等2015 Arthritis Research&Therapy 17:234)。

[0562] 6.14 TE/血栓形成风险的体外评估

[0563] 如前所述,尽管有令人鼓舞的临床效果证据,但由于治疗引发的心血管血栓事件(TE)的发病率增加,hu5C8的进一步研发被终止。另外,在恒河猴5C8的研究中,在给予5C8后

发现了大量TE,包括肺血管血栓和血管病变(Wakefield等2010 *Arthritis Rheum.* 62: 1243)。

[0564] 因此,在临床使用抗CD40L纳米抗体之前,评估其安全性至关重要。在各种体系在体内和体外评估安全性。设计了以下方法和途径来评估体外TE和/或血栓形成的风险。

[0565] 6.14.1体外安全性-血小板分析。

[0566] 正如Roth等人所描述的那样,抗CD40L mAb可通过在血小板上聚簇Fc<sub>g</sub>RIIa的免疫复合物诱导血小板激活和聚集,在血小板激活和聚集测定中测试抗CD40L纳米抗体以研究它们刺激血小板的固有潜力(Roth等,2004 *Transplantation* 78:1238-9)。

[0567] 如前所述,在血小板激活测定和血小板聚集测定中测定C010003313和C010003318。在这些测定中以及ADP中一起取5C8作为阳性对照。对于健康志愿者和SLE患者,观察到5C8的血小板激活。相反,C010003313和C010003318在健康志愿者和SLE患者中表现出不活化的特征(分别为图3和图4)。此外,在健康志愿者和SLE患者血液的血小板聚集测定中测试了这些纳米抗体,并且得出结论,不诱导血小板聚集,而5C8诱导。图5(健康志愿者)和图6(SLE患者)描述了血小板聚集测定的结果。

[0568] 因此,在体外血小板激活和聚集测定中证明纳米抗体不诱导血小板,而5C8诱导。

[0569] 6.14.2体外安全性-内皮细胞激活系统

[0570] 膜CD40L在活化的成熟T细胞上瞬时表达,主要限于CD4<sup>+</sup>T细胞,但不在静息T细胞上表达。除了T淋巴细胞,还检测到了膜CD40L在以下细胞上的表达:即活化的血小板、原代细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞外,而CD40某些条件下在B细胞、自然杀伤细胞、单核细胞/巨噬细胞、树状细胞上表达并且在于非造血细胞包括内皮细胞、成纤维细胞和上皮细胞上广泛表达。由于内皮细胞是次于血小板的关键参与者,在含有原代HUVEC(人脐静脉内皮细胞)的两个系统中评估抗CD40L剂对内皮细胞的影响:刺激的3C系统(模拟心血管疾病/慢性炎症)和未刺激的HNo系统(模拟健康的血管内皮)(Bioseek)。在该系统中以四种不同浓度测试抗CD40L纳米抗体、不相关的对照纳米抗体,5C8和作为阳性对照的吡拉米司特。

[0571] 结果表明纳米抗体谱被认为不表示对内皮细胞有任何影响(数据未显示)。另一方面,吡拉米司特与炎症状态有关,而最显着的结果是用5C8获得的。迄今为止,没有报道5C8对内皮细胞的影响,但是在两种细胞系统中均观察到明显的剂量依赖性应答。特别地,由于5C8,在一个或两个细胞系统中监测的所有标记(炎症、免疫调节、组织重塑和止血)均增加。

[0572] 总之,测试的纳米抗体不诱导原代内皮细胞的激活,而5C8则诱导。因此,抗CD40L纳米抗体似乎是安全的。

[0573] 6.14.3体外安全性-抗CD40L纳米抗体不启动反向信号传导

[0574] 取决于细胞的激活状态和细胞上受体的表达水平,CD40L与其受体CD40的结合诱导正向信号。另外,已知配体与TNFR家族成员(例如CD40)的结合可启动反向信号传导,调节细胞增殖、细胞因子分泌、氧化迸发,类别转换和T细胞成熟。然而,TNF<sub>α</sub>家族成员的非调节的或不成比例的反向信号传导可导致细胞因子风暴,其通常称为促炎细胞因子的过度或不受控制的释放(Eissner等,2004 *Cytokine&Growth Factor Reviews* 15:353-366)。

[0575] 为了进一步评估安全性,评估了纳米抗体由于反向信号传导启动细胞因子风暴的潜力。

[0576] 用不同浓度的不同化合物刺激来自10个健康供体的人PBMC:阿瓦斯丁,一种单克隆抗CD3抗体,CDP7657和抗CD40L纳米抗体C010003318。同时还采集SEB和LPS以评估PBMC的响应性。使用阿瓦斯丁(Avastin)作为阴性对照(Min&Kawabata,2009 in EMA Workshop" *in vitro cytokine release assays*")和抗CD3抗体作为阳性对照。

[0577] 使用人PBMC评估体外细胞因子释放的方法由三个连续步骤组成:从血沉棕黄层分离人PBMC并冷冻,解冻人PBMC并用不同化合物刺激,最后定量测定上清液中的细胞因子。样品分析使用Luminex平台(Life Technologies)在Eurofins Panlabs Inc.进行。测定的细胞因子为IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 。在2种不同的Luminex测定中分析细胞因子。第一次测定测量了IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6和IL-10,第二次测定测量了TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 。基于提供者确定的试剂盒的检测限以及在埃博灵克斯进行的实验(其中对每种细胞因子的刺激等级进行了估计),对两种测定均调整样品的稀释度。如试剂盒说明书中所示进行测定,并将每个样品重复分析。对所得结果进行统计数据分析,以将所有化合物与空白(未刺激的PBMC)进行比较。

[0578] 结果表明,阿瓦斯丁和单克隆抗CD3抗体对人PBMC诱导的细胞因子产生高于未受刺激的PBMC。阳性对照化合物SEB和LPS诱导的细胞因子水平也高于空白对照。对于化合物CDP7657,细胞因子IL-2、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 的水平与空白的水平相当,而对于IL-1 $\beta$ 、IL-6和IL-10,依赖于测试浓度观察到一些差异。图8描绘了PBMC刺激后出自IL-6诱导的说明性结果。特别是,与未刺激的样品相比,抗CD3化合物和阿瓦斯丁的整体细胞因子诱导被证明是阳性的。用CDP7657化合物诱导产生的IL-6水平高于空白样品。纳米抗体C010003318诱导的IL-6水平总体上类似于未刺激样品中测量的IL-6水平,除了浓度在20nM以外,其中测量的IL-6水平高于空白,尽管限度最低(认为其是离群值)。与空白对比,阳性对照化合物SEB和LPS显示为阳性。

[0579] 总体而言,示例性纳米抗体C010003318的细胞因子诱导与未刺激的PBMC相当。

[0580] 总之,抗CD40L纳米抗体由于在体外环境中的反向信号传导而不启动细胞因子风暴。这再次证实了纳米抗体的安全性。

[0581] 6.15体内安全性-抗CD40L纳米抗体在恒河猴中是安全的

[0582] 设立进一步的研究评估抗CD40L纳米抗体在体内的安全性。具体而言,确定抗CD40L纳米抗体的皮下给药是否也将在恒河猴中在体内转化为TE的缺乏。

[0583] 将示例性的纳米抗体C010003318以30mg/kg、100mg/kg和300mg/kg的剂量分别给予3只雌性恒河猴,每周一次,持续4周。

[0584] 在本研究中评估以下参数和终点:临床体征、体重、体重变化、体温、临床病理学参数(血液学、凝血、临床化学、尿分析和淋巴细胞表型分析)、免疫原性(抗药物抗体(ADA))、毒代动力学、药效动力学、总体尸检结果、器官重量和组织病理学检查。检查包括以下内容。

[0585] 对所有动物进行以下所列的在生命中的程序、观察和测量。每天早上检查动物一次,每天下午检查一次,以确定一般健康状况、死亡率和发病率。此外,从第2周开始每天观察动物。从第1天开始(在给药日),在给药前观察动物并且在给药后观察动物至少3次。在非给药日,在早上和下午进行检查动物。从第二周开始每周至少一次,所有动物都接受了详细的临床观察。在给药的每一天所有动物在一天中定期检查对治疗作出的反应。记录症状的发作、强度和持续时间;在给药过程中和给药后的第一个小时对动物给予了特别的关注。监

测注射部位对治疗的反应。从第2周开始每周记录体重。定期尸检当天记录体重。所有动物在预处理过程中都记录一次体温(在下午在预计的给药后测量时间)。在给药期间,在每个给药日和尸检前,每周所有动物在给药后约8小时记录体温。

[0586] 将血样(0.5mL)收集到K<sub>2</sub>EDTA管,针对表6.15A中规定的参数进行。

[0587] 表6.15A血液学参数

红细胞计数	平均血小板内容物浓度
血红蛋白	平均血小板体积
血细胞比容	血小板分布宽度
平均细胞体积	白细胞计数
平均细胞血红蛋白	中性粒细胞
平均细胞血红蛋白浓度	淋巴细胞
血红蛋白分布宽度	单核细胞
网织红细胞	嗜酸性粒细胞
网织红细胞计数(绝对)	嗜碱性粒细胞
红细胞分布宽度	大的未染色细胞
血小板计数	红细胞沉降率
血小板比积	

[0588] [0589] 将血液样品(1mL)放入含有3.8%(w/v)柠檬酸三钠的管中,并处理血浆,分析参数活化的部分促凝血酶原激酶时间纤维蛋白原和凝血酶原时间。

[0590] 将血液样品(1.5mL)放入含有肝素锂的管中,并处理血浆,针对表6.15B中规定的参数进行分析

[0591] 表6.15B临床化学参数

尿素	总蛋白
葡萄糖	白蛋白
天冬氨酸转氨酶	球蛋白
丙氨酸转氨酶	蛋白/球蛋白比例
碱性磷酸酶	胆固醇
肌酸磷酸激酶	LDL胆固醇
乳酸脱氢酶	HDL胆固醇
钠	肌酸酐
钾	总胆红素
氯化物	钙
γ谷氨酰转移酶	无机磷酸盐
谷氨酸脱氢酶	甘油三酯
α淀粉酶	总胆汁酸
	免疫球蛋白G, M, A

[0593] 除非另有说明,从所有动物收集表6.15C中鉴定的代表性组织样品并保存在10%中性缓冲福尔马林中。

[0594] 表6.15C组织收集和保存

给药位点	喉
动物鉴定	肝
动脉, 主动脉	肺
骨髓涂片	淋巴结, 下颌骨
骨髓, 股骨	淋巴结, 肠系膜
骨髓, 胸骨	淋巴结, 引流
骨, 股骨	肌肉, 骨骼
骨, 胸骨	神经, 视神经 <sup>a</sup> x 2
骨, 膝关节	神经, 坐骨神经 x 2
脑	食道
宫颈	卵巢 x 2
眼 <sup>a</sup> x 2	输卵管 x 2
[0595]	胆囊
	胰腺
	腺, 肾上腺 x 2
	皮肤
	腺, 泪腺 x 2
	小肠, 十二指肠
	腺, 乳腺 x 2
	小肠, 回肠
	腺, 甲状腺旁腺 x 2
	小肠, 空肠
	腺, 脑垂体
	脊髓
	腺, 垂腺 x 2
	脾
	腺, 甲状腺 x 2
肉眼病变/肿块	胃
肠相关淋巴组织 (含淋巴结)	胸腺
心脏	舌
肾 x 2	气管
大肠, 盲肠	输尿管 x 2
大肠, 结肠	膀胱
大肠, 直肠	子宫
	阴道

[0596] <sup>2</sup>保存在戴维森的固定剂中。

[0597] 将表6.15C中鉴定的组织包埋在石蜡中, 切片(4-6 $\mu$ m), 固定在载玻片上, 并用苏木精和伊红染色。组织病理学评估由具有实验室动物病理学培训和经验的兽医病理学家进行。由测试设施的第二位病理学家进行病理学同行评审。

[0598] 恒河猴的C010003318皮下给药(以30、100或300mg/kg, 每周一次, 持续4周)与以下显微镜检查结果相关: 在所有剂量水平淋巴结(腋窝、腹股沟、下颌骨和肠系膜)中和脾脏中的生发中心的淋巴耗尽以及在30和100mg/kg在脾中生发中心的透明化。这些发现是预期的测试项目的药理学效应, 因此被认为不是不利的。对于器官重量或大体病理学没有与测试项目相关影响。在观察到的临床体征或体重变化中没有与测试项目相关的变化。在临床病理学参数中没有与测试项目相关的影响。

[0599] 总之, 每周一次皮下给予示例性纳米抗体C010003318持续4周在雌性恒河猴中以高达300mg/kg/周的水平耐受良好。目标器官效应(淋巴组织)在30-300mg/kg/周的水平观察到, 但被认为是测试项目的药理活性的结果, 因此不是不利的。基于这些结果, 无观察性不良反应的水平(NOAEL)被认为是最高剂量(测试的)为300mg/kg/周。

[0600] 因此, 即使在长时间高剂量暴露后, 也没有证据表明抗CD40L纳米抗体在体内诱导

TE。

[0601] 6.16 免疫原性(ADA)评估

[0602] 为了评估免疫原性,从所有动物收集血液样品(参见实施例6.15)以确定已有抗体(PEA)(参见实施例6.9)或新出现的抗药物抗体(ADA)的存在。

[0603] 进行ADA样品分析以支持毒代动力学评估和/或安全性评估。使用基于验证的基于电化学发光(ECL)的桥接样式进行ADA样品分析(在MSD平台上),评估血浆样品中抗药物抗体(ADA)的存在。从全部4个动物组收集样品,无论是载体处理( $n=3$ )还是用30、100或300mg/kg纳米抗体处理。在研究开始前(研究前第7天)以及在那天给药之前第15天和第29天从所有动物收集血液样品。

[0604] 来自所有样品的应答低于筛选截切点,因此得出结论,在研究前第7天样品中未检测到预抗体,并且在来自载体处理的或给予纳米抗体的动物的任何样品中未检测到因治疗而出现的ADA。而且,这些结果证实了实施例6.9的发现。

[0605] 因此,使用足够敏感性和耐药性的ADA测定,在整个研究中未检测到已有的或因处理而出现的ADA。

[0606] 本申请通篇引用的所有参考文献(包括参考文献、授权专利、公开的专利申请和共同未决的专利申请)的全部内容在此明确地通过引用并入,特别是对于上文提到的教导。

[0607] 表1本发明优选的接头序列

接头的名称	SEQ ID NO:	氨基酸序列
GS5 (5GS)	18	GGGGS
GS7 (7GS)	19	SGGSGGS
GS8 (8GS)	20	GGGGGGGS
GS9 (9GS)	21	GGGGSGGGS
GS10 (10GS)	22	GGGGSGGGGS
GS15 (15GS)	23	GGGGSGGGGSGGGGS
GS18 (18GS)	24	GGGGSGGGGSGGGGGGGS
GS20 (20GS)	25	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GS25 (25GS)	26	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGS
GS30 (30GS)	27	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GS35 (35GS)	28	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGS
GS40 (40GS)	29	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGS
A3 (3A)	77	AAA

[0609] 表2其他序列

名称	ID	氨基酸序列
[0610]	hCD40L (uniprot P29965-1)	MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSAL FAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSSL LNCEEIKSQFEGFKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNP QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEGYYTMSNNLVTLENGK QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGR FERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVN VTDPSQVSHGTGFTSGLLKL
	hCD40 (uniprot Q6P2H9)	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSL CQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHFHQ HKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACES CVLHRSCSPGFGVKQIDICQPHFPKDRGLNLLM
	参考A	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTSSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVT VSS
	参考B	HHHHHHEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTSSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVT VSSA
	MYC-HIS 标 签	AAAEQKLISEEDLNGAAHHHHHH
	FLAG3-HIS 6标签	AAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAAHHHHHH

[0611]

表 A-1: 扩-CD40L 构建体的氨基酸序列 (“ID”是指如本文所用的 SEQ ID NO)

名称	ID	序列
C01000 28B02	3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYYAIGWFRQAPGKEREQVSCISSEGSTSYTDSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYCATDPDRGFLGSSCDTQSHOYDYGQGTLVTVSS
C01000 29C10	4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYYALGWFRQAPGKEREQVSCISSEGSTSYTDSVKGRFTISRDNASKNN TVYLQMNNSLKPEDTAVYYCATDQTLFGVCRGIAQAPGFWQGQTLVTVSS
C01000 44B07	5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYYALAWFRQAPGKEREQVSCISSEGSTSYTDSVKGRFTISRDNATKNN TVYLQMNNSLKPEDTAVYYCATDETTFFSGSCTLSAATFGSWGQGTLVTVSS
C01000 46B03	6	EVQLVESGGGLVQAGGSSLRLSCAASGRTPLNYHMAWFRQAPGKEREVAAISSLGSTDYSDLKDRFTISRDNAKATLY LRMNNLKPEDTAVYYCAARETTHYSTSDRVNEMRHYDWGQGTLVTVSS
C01000 2366 [28B02]	7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYYAIGWFRQAPGKEREQVSCISSEGSTSYTDSVKGRFTISRDNASKNTVYL QMNSLRPEDTAVYYCATDPDRGFLGSSCDTQSHQYDFWGQGTLVTVSS
C01000 3320 28B02-Alb129	80	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYYAIGWFRQAPGKEREQVSCISSEGSTSYTDSVKGRFTISRDNASKNTVYL QMNSLRPEDTAVYYCATDPDRGFLGSSCDTQSHQYDFWGQGQTLVTVSSGGGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPE DTATYYCTIGGSSLRQQGTLVTVSSA
C01000 3323 28B02-Alb23	81	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYYAIGWFRQAPGKEREQVSCISSEGSTSYTDSVKGRFTISRDNASKNTVYL QMNSLRPEDTAVYYCATDPDRGFLGSSCDTQSHQYDFWGQGQTLVTVSSGGGGGGSGGGSEVQLVESGG GVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSGFMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRPE DTATYYCTIGGSSLRQQGTLVTVSSA
C01000 3326 28B02-Alb11	82	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLEYYAIGWFRQAPGKEREQVSCISSEGSTSYTDSVKGRFTISRDNASKNTVYL QMNSLRPEDTAVYYCATDPDRGFLGSSCDTQSHQYDFWGQGQTLVTVSSGGGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPE DTAVYYCTIGGSSLRQQGTLVTVSSA
C01000 3290 [46B03]	8	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTPLNYHMAWFRQAPGKEREVAAISSLGSTDYADSVKGRFTISRDNASKTTLY LQMNSLRPEDTAVYYCAARETTHISTSDRVNEIRNYDYGQGTLVTVSS

[0612]

C01000 3318 46B03- Alb	9	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTPPLNYHMAWFRQAPGKERE FVAISSLGSTDYADSVKGRFTISRDNSKTTLY LQMNSLRPEDIATYYCAARETTHISTSDRVNEIRNYDYWGQGTLV TSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS DLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRP EDIATYYCTIGGLVTVKSA
C01000 3313 46B03- Alb	78	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTPPLNYHMAWFRQAPGKERE FVAISSLGSTDYADSVKGRFTISRDNSKTTLY LQMNSLRPEDIATYYCAARETTHISTSDRVNEIRNYDYWGQGTLV TSSGGGGSE EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGS DLYADSVKGRFTISRDNSKTTLY LQMNSLRPEDIATYYCTIGGLVTVSSA
C01000 3315 46B03- Alb	79	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTPPLNYHMAWFRQAPGKERE FVAISSLGSTDYADSVKGRFTISRDNSKTTLY LQMNSLRPEDIATYYCAARETTHISTSDRVNEIRNYDYWGQGTLV TSSGGGGSE EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGS DLYADSVKGRFTISRDNSKTTLY LQMNSLRPEDIATYYCTIGGLVTVSSA

表 A-2: CDR 和框架的序列, 加上式 I 中提供的优选组合, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (以下术语:

语: “ID”是指给定的 SEQ ID NO; 第一列是指整个 ISVD 的 ID)

ID 构建体	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
3 C01000 28B02	39	EVQLVESGGG 40 LVQPGGSLRLS CAAS	41	GFTLEY YAIG	42	WFRQAP GKEREGV S	43	CISSEG STS	43	YTDSVKGRFTISR DNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYY CAT	44	DPDRGFL GSSCDTQS HQYDY	45	WGQGTL VTVSS
4 C01000 29C10	46	EVQLVESGGG 47 LVQPGGSLRLS CAAS	48	GFTLDY YALG	49	WFRQAP GKEREGV S	50	CISSTES SDGSTY	50	YADSVKGRFTISR DSAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYY CAT	51	DQTLFGV CRGIATPD PGF	52	WGQGTL VTVSS
5 C01000 44B07	53	EVQLVESGGG 54 LVQPGGRLR SCAAS	55	GFTLDY YALA	56	WFRQAP GKEREGV S	57	CISSE GSTDYA D	57	YADSVKGRFTISR DTAKNTVYLQM NNLKPEDTAVYY CAT	58	DETTFFSG SCTLSAAT FGS	59	WGQGTL VTVSS
6 C01000 46B03	60	EVQLVESGGG 61 LVQAGGSLRL SCAAS	62	GRTPLN YHMA	63	WFRQAP GKEREFV A	64	AISSLL GSTD	64	YSDSLKDRFTISR DNAKATLYLRMN NLKPEDTAVYYC AA	65	RETTHYST SDRVNEM RHYDY	66	WGQGTL VTVSS
7 C01000 2366 (28B02)	67	DVQLVESGGG 68 LVQPGGSLRLS CAAS	69	GFTLEY YAIG	70	WFRQAP GKEREGV S	71	CISSEG STS	71	YADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQM NSLRPEDTAVYY CAT	72	DPDRGFL GSSCDTQS HQYDF	73	WGQGTL VTVSS
8 C01000 3290 (46B03)	32	DVQLVESGGG 33 LVQPGGSLRLS CAAS	34	GRTPLN YHMA	35	WFRQAP GKEREFV A	36	AISSLL GSTD	36	YADSVKGRFTISR DNSKTTLYLQM SLRPEDTAVYYC AA	37	RETTHIST SDRVNER NYDY	38	WGQGTL VTVSS

[0613]

[0614]

表 A-3：结合血清白蛋白的 ISVD 的氨基酸序列 (Alb-纳米抗体；“ID”指如本文所用的 SEQ ID NO)，包括 CDR 序列

名称	ID	序列
ALB8 (Myc-His6)	10	EVQLVESGGGLVQPGNISRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAAKTTLYLQMNSLRLPEDITAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSAAE QKLISEEDLNGAAHHHHHH
Alb8	11	EVQLVESGGGLVQPGNISRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAAKTTLYLQMNSLRLPEDITAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb23	12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRLPEDITAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb129	13	EVQLVESGGGVVQPGNISRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAAKTTLYLQMNSLRLPEDITATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb132	14	EVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRLPEDITATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb11(S112K)-A (ALB135)	15	EVQLVESGGGLVQPGNISRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNASKNTLYLQMNSLRLPEDITAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVKSA
ALB CDR1	74	SFGMS
ALB CDR2	75	SISGGGSDTLYADSVKG
ALB CDR3	76	GGSSLR

表 6.9.1: 关于 SLE 患者血清中存在的已有抗体的结合比较第 11 位和第 112 位突变与 C 端丙氨酸延伸

参考 A 的平均结合 (RU)	从 SLE 患者获得血清样品						从健康志愿者获得血浆样品		
	45	61	38	40	43	20	69	128	171
与参考 A 结合相比的抑制 (%)									
参考 B	20	16	13	45	53	86	101	95	90
参考 A (L11E)	63	88	117	61	87	88	92	68	21
参考 A (L11K)	87	97	107	54	106	79	102	100	61
参考 A (L11V)	68	84	49	56	95	91	21	23	6
参考 A (L11Y)	27	71	111	37	84	74	72	13	3
参考 A (S112E)	13	56	91	77	74	91	94	84	22
参考 A (S112F)	-6	18	26	-13	62	69	117	74	43
参考 A (S112K)	71	77	105	80	116	86	120	87	62
参考 A (S112L)	-36	36	48	-24	123	19	84	91	3

表 6.9.2(a): 不同突变对从 SLE 患者和人类志愿者获得的样品中已有抗体结合的影响  
[916]

		突变		从 SLE 患者获得的样品		从健康志愿者获得的样品	
		L11K	V89T	S112K	I14A	SLF25	SLF37
与参考 A 的平均结合	对于参考 A 的平均结合					SLF39	SLF41
与 HSA 上捕获的参考 A 的平均结合相比的抑制 (%)				38	66	30	41
						45	175
参考 A + V89T, 无 C 端延伸		x	x			100	98
参考 A + V89T + C 端丙氨酸		x	x	x	x	97	98
参考 A + S112K, 无 C 端延伸		x		x		100	100
参考 A + S 112K + C 端丙氨酸	x	x		x	x	100	100

表 6.9.2(b): 不同突变对从 SLE 患者和人类志愿者获得的样品中已有抗体结合的影响

突变		从 SLE 患者获得样品							从健康志愿者获得样品		
		V89L	S112Q	I114A	S112Q	S114A	S114I	S114V	NB13025-14	004-030-AB	L-02
与参考 A 的平均结合											
对于参考 A 的平均结合								ND	71	51	ND
与 HSA 上捕获的参考 A 的平均结合相比的抑制 (%)											
参考 A + V89L + S 112Q + C 端丙氨酸		x	x	x	ND	100	100	ND	100	100	97
参考 A + L11V + S 112Q + C 端丙氨酸	x		x	x	ND	100	100	ND	100	100	99
参考 A + S 112Q + C 端丙氨酸		x	x	x	ND	92	85	ND	94	94	100

[0617]

[0618] 表6.9.3 (a) :不同突变对从SLE患者和人类志愿者获得的样品中已有抗体结合的影响

	突变					从 SLE 患者获得样品				从 健 康 志 愿 者 获 得 的 样 品	
	L11V	V89L	V89T	S112K	114A	SLE25	SLE37	SLE39	SLE41	NB13025-14	
<b>与参考 A 的平均结合</b>											
参考 A						28	44	26	33	30	151
<b>与 HSA 上捕获的参考 A 的平均结合相比的抑制 (%)</b>											
参考 A + V89L, 无 C 端延伸		x				77	64	53	63	41	35
参考 A + V89L + C 端丙氨酸		x			x	35	27	63	42	46	83
参考 A + V89T, 无 C 端延伸			x			68	12	84	100	71	11
参考 A + V89T + C 端丙氨酸			x		x	46	35	71	100	97	99
参考 A + V89T + L11V, 无 C 端延伸	x		x			100	97	100	100	100	16
参考 A + V89T + L11V + C 端丙氨酸	x		x		x	100	100	100	100	100	67
参考 A + S112K + V89L, 无 C 端延伸		x		x		100	100	100	100	100	85
参考 A + S112K + V89L C 端丙氨酸		x		x	x	100	100	100	100	100	100
参考 A + S112K + L11V, 无 C 端延伸	x			x		100	100	100	100	100	64
参考 A + S112K + L11V + C 端丙氨酸	x			x	x	100	100	100	100	100	100

[0619]

## 序列表

<110> 埃博灵克斯股份有限公司

<120> 抑制 CD40L 的多肽

<130> 193661

<150> US 62/260411

<151> 2015-11-27

<150> US 62/345967

<151> 2016-06-06

<160> 82

<170> PatentIn version 3.5

[0001] <210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hCD40L

<400> 1

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu  
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg

35	40	45
----	----	----

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val		
50	55	60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser		
65	70	75
		80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys		
85	90	95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu		
100	105	110

[0002]

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser		
115	120	125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly		
130	135	140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln		
145	150	155
		160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr		
165	170	175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser		
180	185	190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala  
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His  
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn  
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe  
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu  
[0003] 260

<210> 2

<211> 151

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hCD40

<400> 2

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr  
1 5 10 15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu

20	25	30
----	----	----

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val		
35	40	45

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu		
50	55	60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Phe His Gln His		
65	70	75
		80

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr		
85	90	95

[0004]

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr		
100	105	110

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly		
115	120	125

Phe Gly Val Lys Gln Ile Asp Ile Cys Gln Pro His Phe Pro Lys Asp		
130	135	140

Arg Gly Leu Asn Leu Leu Met		
145	150	

<210> 3		
---------	--	--

<211> 128		
-----------	--	--

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 抗-CD40L 构建体

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Tyr Tyr  
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
35 40 45

[0005]

Ser Cys Ile Ser Ser Glu Gly Ser Thr Ser Tyr Thr Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Thr Asp Pro Asp Arg Gly Phe Leu Gly Ser Ser Cys Asp Thr Gln Ser  
100 105 110

His Gln Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 4  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 抗-CD40L 构建体

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

[0006] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr  
 20 25 30

Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Thr Glu Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala  
 50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn  
 65 70 75 80

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val  
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asp Gln Thr Leu Phe Gly Val Cys Arg Gly Ile  
 100 105 110

Ala Thr Pro Asp Pro Gly Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 115 120 125

Ser Ser  
 130

<210> 5  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

[0007] <220>  
 <223> 抗-CD40L 构建体

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Arg Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr  
 20 25 30

Ala Leu Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Ser Glu Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Tyr Ala  
 50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ala Lys Asn  
65 70 75 80

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val  
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asp Glu Thr Thr Phe Phe Ser Gly Ser Cys Thr  
100 105 110

Leu Ser Ala Ala Thr Phe Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115 120 125

Val Ser Ser

[0008] 130

<210> 6

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 抗-CD40L 构建体

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Pro Leu Asn Tyr  
20 25 30

His Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Ser Leu Leu Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Asp Ser Leu  
 50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ala Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Arg Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala Arg Glu Thr Thr His Tyr Ser Thr Ser Asp Arg Val Asn Glu  
 [0009] 100 105 110

Met Arg His Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser

<210> 7

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 抗-CD40L 构建体

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Tyr Tyr  
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Glu Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

[0010] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Thr Asp Pro Asp Arg Gly Phe Leu Gly Ser Ser Cys Asp Thr Gln Ser  
100 105 110

His Gln Tyr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 8

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 抗-CD40L 构建体

<400> 8

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Pro Leu Asn Tyr  
20 25 30

His Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
35 40 45

[0011]

Ala Ala Ile Ser Ser Leu Leu Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Arg Glu Thr Thr His Ile Ser Thr Ser Asp Arg Val Asn Glu  
100 105 110

Ile Arg Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115

120

125

Ser

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 254

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗-CD40L 构建体

&lt;400&gt; 9

[0012]	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1					5						10					15

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Pro	Leu	Asn	Tyr
20								25						30	

His	Met	Ala	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val
35								40					45		

Ala	Ala	Ile	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
50						55						60			

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Arg Glu Thr Thr His Ile Ser Thr Ser Asp Arg Val Asn Glu  
100 105 110

Ile Arg Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu  
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys  
145 150 155 160

[0013]

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg  
165 170 175

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser  
180 185 190

Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile  
195 200 205

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu  
210 215 220

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu

225

230

235

240

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Lys Ser Ala  
 245 250

<210> 10

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 结合血清白蛋白的 ISVD

<400> 10

[0014] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
115 120 125

Asn Gly Ala Ala His His His His His His  
130 135

<210> 11

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 结合血清白蛋白的 ISVD

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

[0016]

<210> 12  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 结合血清白蛋白的 ISVD

<400> 12

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 [0017] 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

<210> 13  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> 结合血清白蛋白的 ISVD

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

[0018]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser Ala  
 115

<210> 14  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> 结合血清白蛋白的 ISVD

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe  
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

[0019]

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ser Ala  
115

<210> 15

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 结合血清白蛋白的 ISVD

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
20 25 30

[0020] Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

Val Lys Ser Ala  
115

<210> 16  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Ref A

<400> 16

His His His His His Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
1 5 10 15

[0021] Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr  
50 55 60

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
65 70 75 80

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp  
85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 17  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Ref B

<400> 17

[0022] His His His His His Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly  
 1 5 10 15

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 20 25 30

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 35 40 45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr  
 50 55 60

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 65 70 75 80

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp  
85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
115 120

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

[0023] <220>

<223> 接头序列

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 接头序列

<400> 19

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser  
1 5

<210> 20  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 接头序列

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

[0024] <210> 21  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 接头序列

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
1 5

<210> 22  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 接头序列

<400> 22

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 接头序列

[0025] <400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 接头序列

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 25  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 接头序列

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

[0026]

Gly Gly Gly Ser  
20

<210> 26  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 接头序列

<400> 26

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
20 25

<210> 27  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 接头序列

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

[0027] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
20 25 30

<210> 28  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 接头序列

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20

25

30

Gly Gly Ser  
35

<210> 29  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 接头序列

<400> 29

[0028] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
35 40

<210> 30  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> MYC-HIS 标签

<400> 30

Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala  
1 5 10 15

Ala His His His His His His  
20

<210> 31

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FLAG3-HIS6 标签

[0029]

<400> 31

Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp  
1 5 10 15

Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ala Ala His His His His  
20 25 30

His His

<210> 32

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR 序列

<400> 32

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
20 25

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

[0030]

<220>

<223> CDR 序列

<400> 33

Gly Arg Thr Pro Leu Asn Tyr His Met Ala  
1 5 10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR 序列

<400> 34

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> CDR 序列

<400> 35

Ala Ile Ser Ser Leu Leu Gly Ser Thr Asp  
 1 5 10

[0031] <210> 36  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> FR 序列

<400> 36

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
 1 5 10 15

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr  
 20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala

35

<210> 37  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> CDR 序列

<400> 37

Arg Glu Thr Thr His Ile Ser Thr Ser Asp Arg Val Asn Glu Ile Arg  
1 5 10 15

Asn Tyr Asp Tyr  
[0032] 20

<210> 38  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FR 序列

<400> 38

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 39  
<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR 序列

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
20 25

<210> 40

<211> 10

[0033] <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR 序列

<400> 40

Gly Phe Thr Leu Glu Tyr Tyr Ala Ile Gly  
1 5 10

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR 序列

<400> 41

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser  
1 5 10

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR 序列

<400> 42

Cys Ile Ser Ser Glu Gly Ser Thr Ser  
[0034] 1 5

<210> 43

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR 序列

<400> 43

Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala  
1 5 10 15

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr  
35

<210> 44  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> CDR 序列

<400> 44

Asp Pro Asp Arg Gly Phe Leu Gly Ser Ser Cys Asp Thr Gln Ser His  
1 5 10 15

[0035]

Gln Tyr Asp Tyr  
20

<210> 45  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FR 序列

<400> 45

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 46  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FR 序列

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
20 25

[0036] <210> 47  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> CDR 序列

<400> 47

Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala Leu Gly  
1 5 10

<210> 48  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR 序列

<400> 48

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser  
1 5 10

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR 序列

[0037] <400> 49

Cys Ile Ser Ser Thr Glu Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr  
1 5 10

<210> 50

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR 序列

<400> 50

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala  
1 5 10 15

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr  
35

<210> 51  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> CDR 序列

<400> 51

[0038]

Asp Gln Thr Leu Phe Gly Val Cys Arg Gly Ile Ala Thr Pro Asp Pro  
1 5 10 15

Gly Phe

<210> 52  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FR 序列

<400> 52

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 53  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FR 序列

<400> 53

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

[0039] Arg Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
20 25

<210> 54  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> CDR 序列

<400> 54

Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala Leu Ala  
1 5 10

<210> 55

<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FR 序列

<400> 55

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser  
1 5 10

<210> 56  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

[0040]  
<220>  
<223> CDR 序列

<400> 56

Cys Ile Ser Ser Ser Glu Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp  
1 5 10

<210> 57  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FR 序列

<400> 57

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ala  
1 5 10 15

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr  
35

<210> 58

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

[0041] <223> CDR 序列

<400> 58

Asp Glu Thr Thr Phe Phe Ser Gly Ser Cys Thr Leu Ser Ala Ala Thr  
1 5 10 15

Phe Gly Ser

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR 序列

<400> 59

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 60

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR 序列

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15  
[0042]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
20 25

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR 序列

<400> 61

Gly Arg Thr Pro Leu Asn Tyr His Met Ala  
1 5 10

<210> 62  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FR 序列

<400> 62

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala  
1 5 10

<210> 63  
<211> 10  
<212> PRT  
[0043] <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> CDR 序列

<400> 63

Ala Ile Ser Ser Leu Leu Gly Ser Thr Asp  
1 5 10

<210> 64  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FR 序列

<400> 64

Tyr Ser Asp Ser Leu Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala  
1 5 10 15

Lys Ala Thr Leu Tyr Leu Arg Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
35

<210> 65

<211> 20

<212> PRT

[0044] <213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR 序列

<400> 65

Arg Glu Thr Thr His Tyr Ser Thr Ser Asp Arg Val Asn Glu Met Arg  
1 5 10 15

His Tyr Asp Tyr  
20

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR 序列

<400> 66

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 67

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR 序列

[0045] <400> 67

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
20 25

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR 序列

<400> 68

Gly Phe Thr Leu Glu Tyr Tyr Ala Ile Gly  
1 5 10

<210> 69  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FR 序列

<400> 69

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser  
1 5 10

[0046] <210> 70  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> CDR 序列

<400> 70

Cys Ile Ser Ser Glu Gly Ser Thr Ser  
1 5

<210> 71  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR 序列

<400> 71

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser  
1 5 10 15

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr  
20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr  
35

[0047]

<210> 72

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR 序列

<400> 72

Asp Pro Asp Arg Gly Phe Leu Gly Ser Ser Cys Asp Thr Gln Ser His  
1 5 10 15

Gln Tyr Asp Phe  
20

<210> 73

<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> FR 序列

<400> 73

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 74  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

[0048]

<220>  
<223> 结合血清白蛋白的 ISVD CDR 序列

<400> 74

Ser Phe Gly Met Ser  
1 5

<210> 75  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 结合血清白蛋白的 ISVD CDR 序列

<400> 75

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 76  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 结合血清白蛋白的 ISVD CDR 序列

<400> 76

[0049] Gly Gly Ser Leu Ser Arg  
1 5

<210> 77  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 接头序列

<400> 77

Ala Ala Ala  
1

<210> 78

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 抗-CD40L 构建体

<400> 78

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Pro Leu Asn Tyr  
20 25 30

[0050] His Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Ser Leu Leu Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Arg Glu Thr Thr His Ile Ser Thr Ser Asp Arg Val Asn Glu  
100 105 110

Ile Arg Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu  
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys  
 145 150 155 160

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg  
 165 170 175

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser  
 180 185 190

[0051]

Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile  
 195 200 205

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu  
 210 215 220

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu  
 225 230 235 240

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
 245 250

<210> 79

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 抗-CD40L 构建体

<400> 79

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Pro Leu Asn Tyr  
20 25 30

[0052] His Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Ser Leu Leu Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Arg Glu Thr Thr His Ile Ser Thr Ser Asp Arg Val Asn Glu  
100 105 110

Ile Arg Asn Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu  
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys  
 145 150 155 160

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg  
 165 170 175

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser  
 180 185 190

[0053]

Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile  
 195 200 205

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu  
 210 215 220

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu  
 225 230 235 240

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
 245 250

<210> 80

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 抗-CD40L 构建体

<400> 80

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Tyr Tyr  
20 25 30

[0054] Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Glu Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Thr Asp Pro Asp Arg Gly Phe Leu Gly Ser Ser Cys Asp Thr Gln Ser  
100 105 110

His Gln Tyr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val  
145 150 155 160

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
165 170 175

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
180 185 190

[0055]

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr  
195 200 205

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys  
210 215 220

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala  
225 230 235 240

Thr Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly  
245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

260

<210> 81  
<211> 264  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 抗-CD40L 构建体

<400> 81

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

[0056] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Tyr Tyr  
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Glu Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Thr Asp Pro Asp Arg Gly Phe Leu Gly Ser Ser Cys Asp Thr Gln Ser  
 100 105 110

His Gln Tyr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val  
 145 150 155 160

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
 165 170 175

[0057]

Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 180 185 190

Pro Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr  
 195 200 205

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys  
 210 215 220

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala  
 225 230 235 240

Thr Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly

245	250	255
-----	-----	-----

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
260

<210> 82  
<211> 264  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 抗-CD40L 构建体

<400> 82

[0058] Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Tyr Tyr  
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Glu Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Thr Asp Pro Asp Arg Gly Phe Leu Gly Ser Ser Cys Asp Thr Gln Ser  
100 105 110

His Gln Tyr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
145 150 155 160

[0059]

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
165 170 175

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
180 185 190

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr  
195 200 205

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys  
210 215 220

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala

225

230

235

240

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly  
[0060] 245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Lys Ser Ala  
260

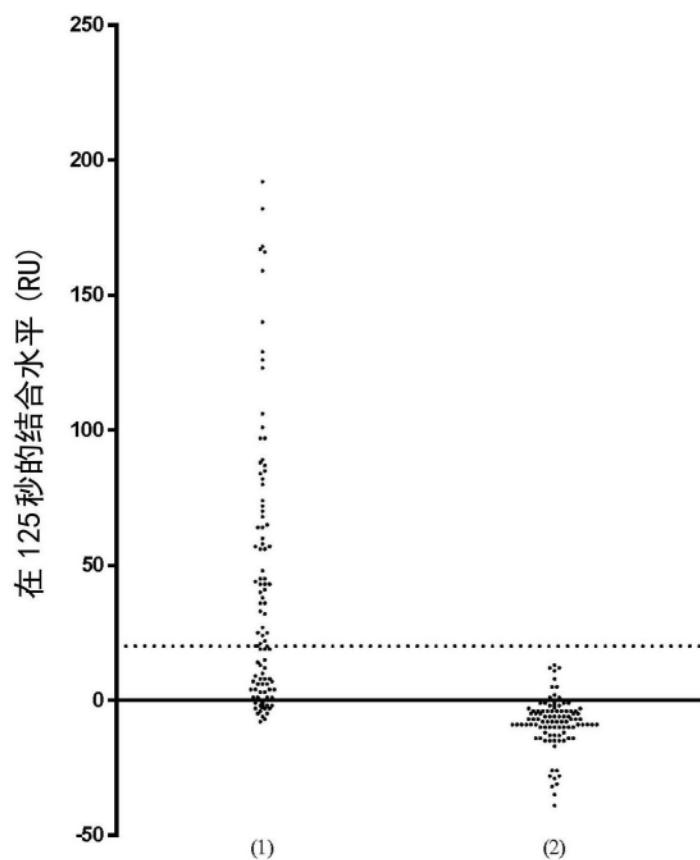


图1

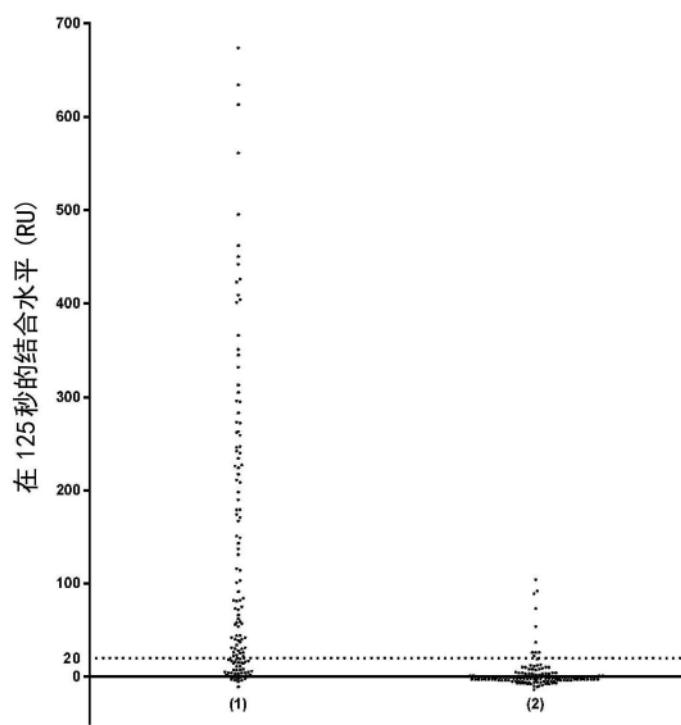


图2

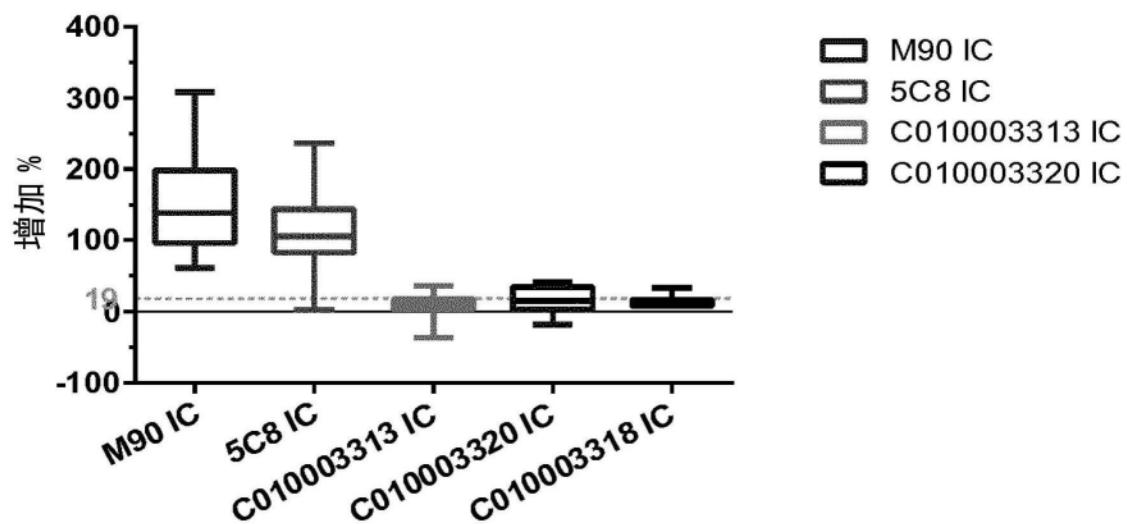


图3

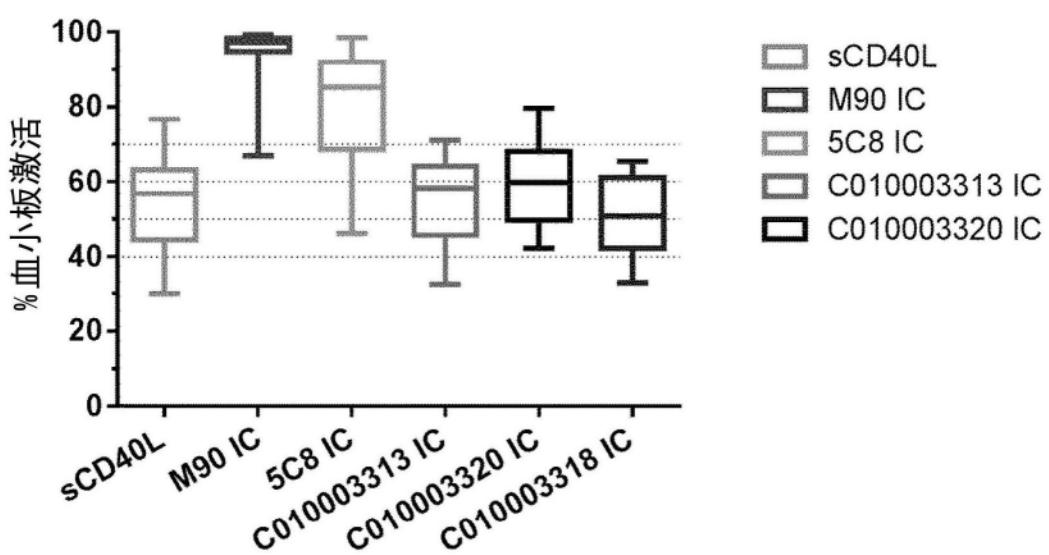


图4

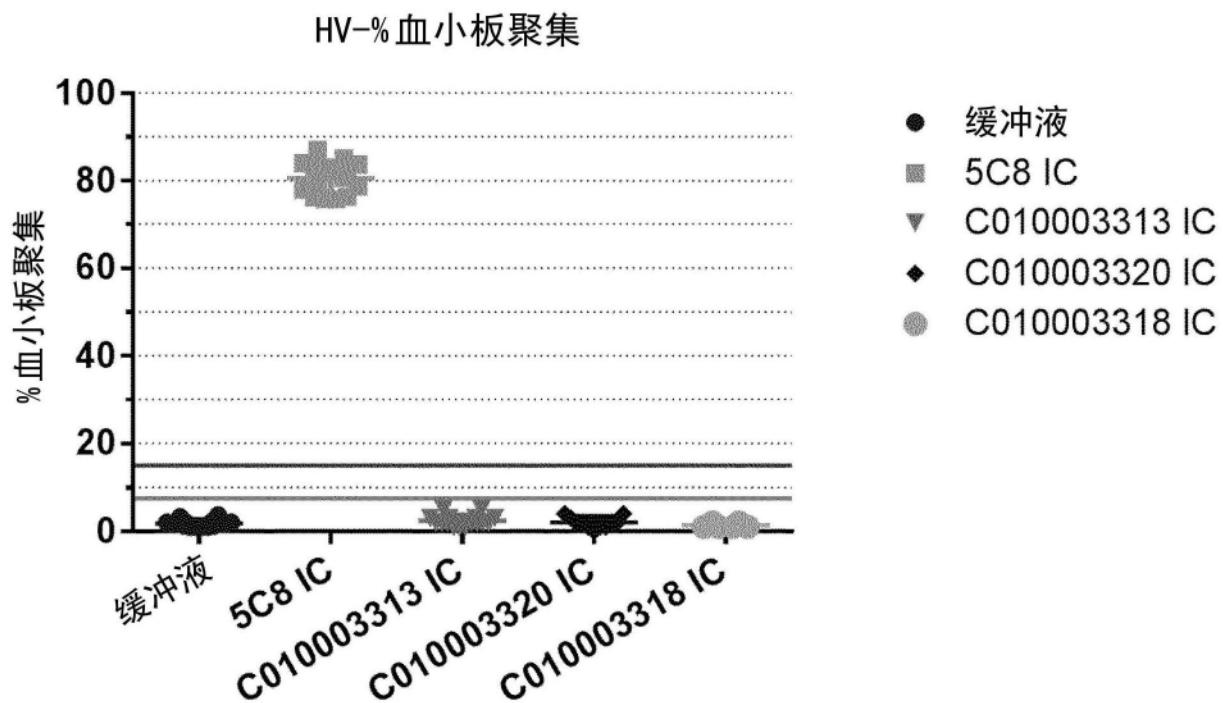


图5

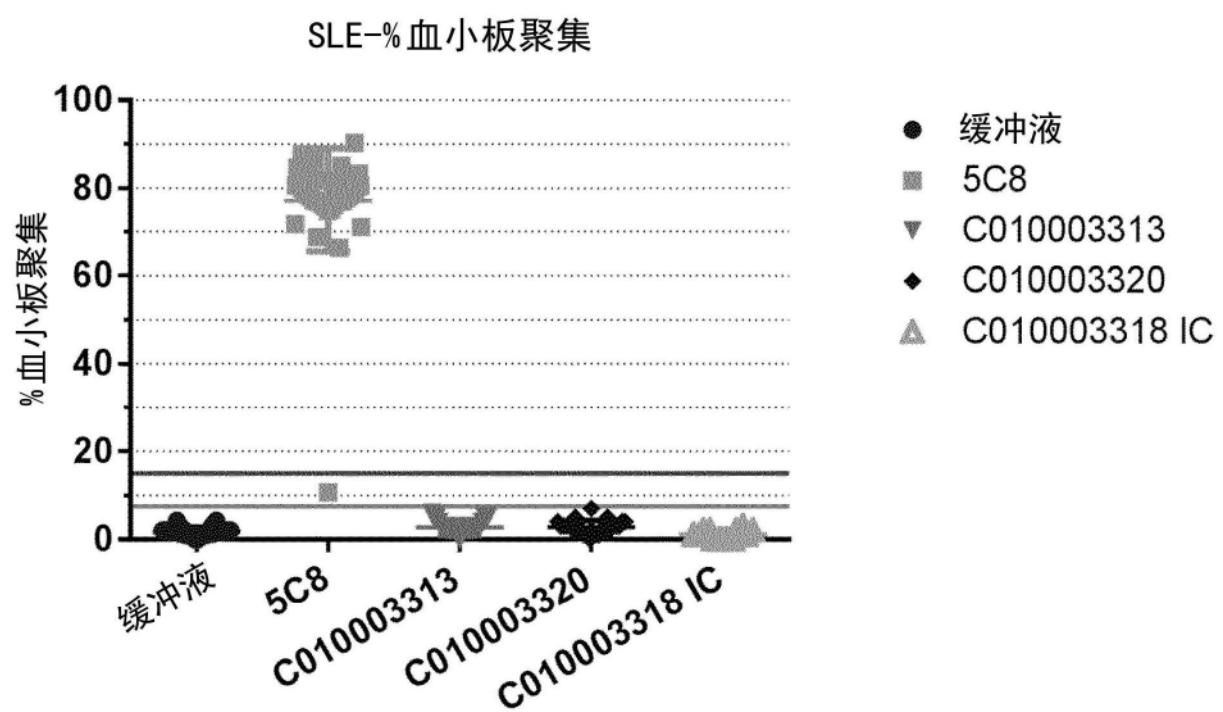


图6

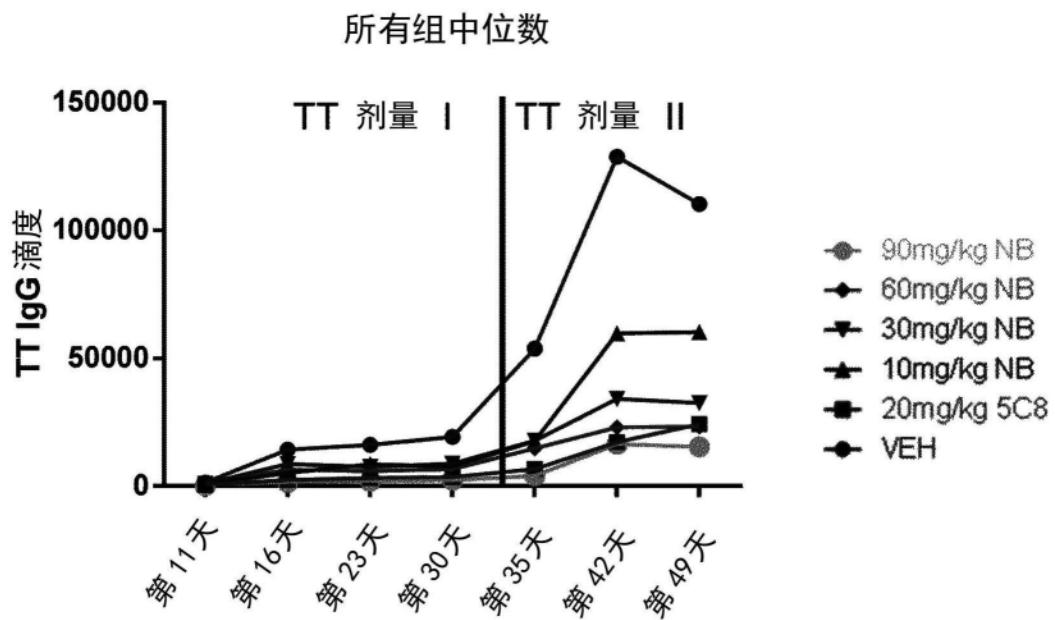


图7

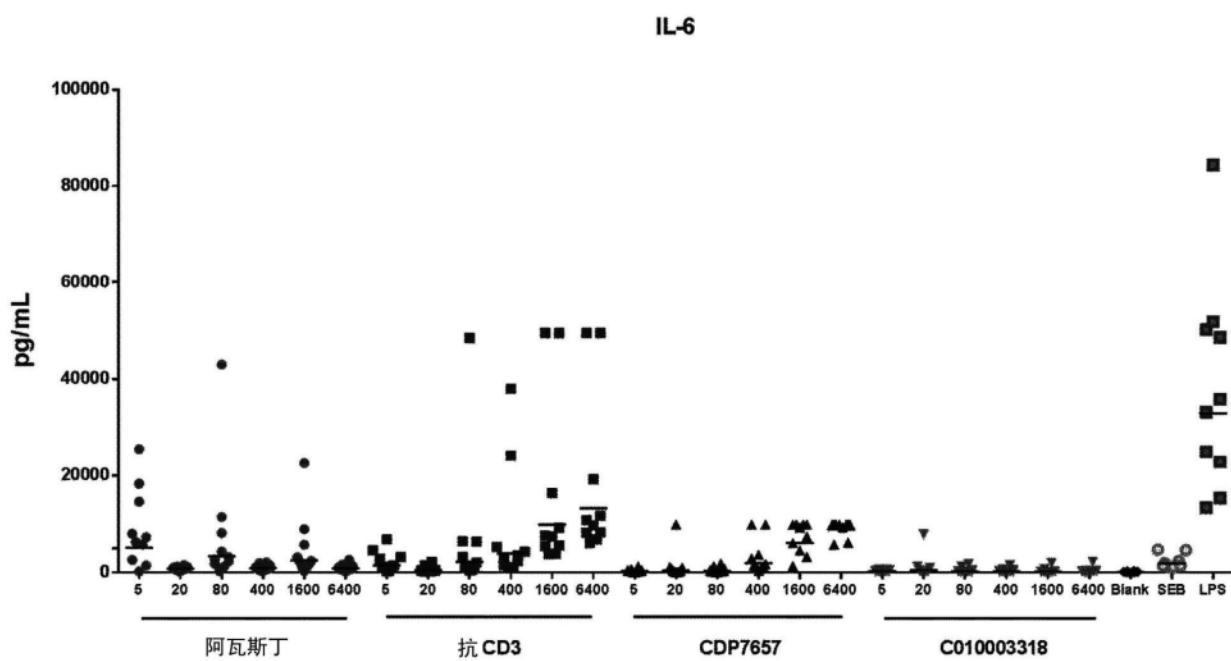


图8