[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03820458.4

[51] Int. Cl[7]
**C07K 16/24**
C07K 16/18
C07K 16/28
A61K 39/395
C07K 16/46
C12N 15/63
C12N 15/62

[43] 公开日 2005 年 10 月 5 日

[11] 公开号 CN 1678634A

[22] 申请日 2003.6.30 [21] 申请号 03820458.4

[30] 优先权

[32] 2002.6.28 [33] GB [31] PCT/GB02/03014

[32] 2002.12.27 [33] GB [31] 0230202.4

[86] 国际申请 PCT/GB2003/002804 2003.6.30

[87] 国际公布 WO2004/003019 英 2004.1.8

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.28

[71] 申请人 多曼蒂斯有限公司

地址 英国剑桥郡

[72] 发明人 格雷格·温特 伊恩·汤姆林森
奥尔加·伊格内托维奇
露西·霍尔特 埃琳娜·德安杰利斯

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

C12N 15/13

权利要求书 9 页 说明书 106 页 序列表 92 页
附图 17 页

[54] 发明名称 免疫球蛋白单个变体抗原结合区及其特异性构建体

[57] 摘要

本发明提供了一种双特异性配体，包括一个具有第一结合特异性的免疫球蛋白可变区和一个具有第二结合特异性的互补或非互补的免疫球蛋白可变区。

ISSN1008-4274

1. 一种双特异性配体，其包括特异性结合第一表位或抗原的第一免疫球蛋白单个可变区和互补的特异性结合第二表位或抗原的第二免疫球蛋白单个可变区，其中与上述的一种或两种抗原或表位的结合发挥延长配体体内半衰期的作用，且其中所述的第一和第二可变区缺乏具有相同特异性的共同互补区，条件是所述双特异性配体不是由抗-HSA $V_H$ 区和抗-β半乳糖苷酶 Vκ 区组成。

2. 权利要求 1 的双特异性配体，至少包含一个单个的抗体重链可变区和一个互补的单个的抗体轻链可变区，以便这两个区域能结合形成互补的 $V_H/V_L$ 对。

3. 权利要求 2 的双特异性配体，其中的 $V_H$ 和 $V_L$ 由抗体 scFv 片段提供。

4. 权利要求 2 的双特异性配体，其中的 $V_H$ 和 $V_L$ 由抗体 Fab 区提供。

5. 一种四链 IgG 免疫球蛋白配体，其包含权利要求 2 中的双特异性配体。

6. 权利要求 5 的四链 IgG 免疫球蛋白配体，其中所述的 IgG 包含两个双特异性配体，所述双特异性配体在它们的可变区是相同的。

7. 权利要求 5 的四链 IgG 免疫球蛋白配体，其中所述的 IgG 包含两个双特异性配体，所述双特异性配体在它们的可变区是不同的。

8. 一种配体，其包含具有第一抗原或表位结合特异性的第一免疫球蛋白可变区和具有第二抗原或表位结合特异性的第二免疫球蛋白可变区，其中所述的第一和第二可变区之一或两者与延长配体体内半衰期的抗原结合，且所述可变区彼此不互补。

9. 权利要求 8 中的配体，其中第一和第二免疫球蛋白可变区是重链可变区($V_H$)。

10. 权利要求 8 中的配体，其中第一和第二免疫球蛋白可变区是轻链可变区($V_L$)。

11. 前述任一项权利要求的配体，其中第一和第二表位独立结合，致使双特异性配体可以同时结合第一和第二表位或抗原。

12. 权利要求 11 中的配体，其中双特异性配体包含在溶液中均衡存在的第一种形式和第二种形式，而表位或抗原都独立地结合第一种形式，但

竞争结合第二种形式。

13. 前述任一项权利要求的配体，其中可变区来自直接针对所述表位或抗原的免疫球蛋白。

14. 前述任一项权利要求的配体，其中所述第一和第二表位存在于分开的抗原上。

15. 权利要求 1-11 中的任何一项权利要求的配体，其中所述第一和第二表位存在于相同抗原上。

16. 前述任一项权利要求的配体，其包含来自单个抗体功能域库的可变区。

17. 权利要求 16 中的配体，其中所述库展示于丝状噬菌体表面，并且其中单个抗体功能域是通过噬菌体库与抗原的结合而选出。

18. 前述任一项权利要求的配体，其中至少一个可变区的序列经突变或 DNA 改组修饰过。

19. 前述任一项权利要求的双特异性配体，其中所述可变区是非共价结合的。

20. 权利要求 1-18 中的任何一项权利要求的双特异性配体，其中可变区是共价结合的。

21. 权利要求 20 中的双特异性配体，其中的共价结合是通过二硫键介导的。

22. TNFα特异性的 dAb 单体配体，其分离自人 TNFα，解离常数(Kd)为 50nM-20pM，$K_{off}$率常数为 $5 \times 10^{-1}$-$1 \times 10^{-7} S^{-1}$，这是通过表面等离子体共振确定的。

23. 权利要求 22 中的 TNFα特异性的 dAb 单体配体，其中 dAb 是 Vκ。

24. TNF 受体 1(p55)特异性的 dAb 单体配体，分离自人 TNF 受体 1，解离常数($K_d$)为 50nM-20pM，$K_{off}$率常数为 $5 \times 10^{-1}$-$1 \times 10^{-7} S^{-1}$，这通过表面等离子体共振测定得出。

25. 权利要求 22-24 任一项的 dAb 单体配体，其中单体中和人 TNFα或 TNF 受体 1 的标准细胞分析测得 ND50 为 500nM-50pM。

26. TNF 受体 1(p55)特异性的 dAb 单体配体，其中在标准细胞分析中 dAb 拮抗 TNF 受体 1 的活性，ND50≤100nM，并且在该实验中浓度≤10μM

的 dAb 刺激≤5%的 TNF 受体 1 活性。

27. 血清白蛋白(SA)特异性的 dAb 单体配体，分离自 SA，解离常数(Kd)为 1nM-500μM，这通过表面等离子体共振测定得出。

28. 权利要求 27 中的 dAb 单体配体，其中所述单体结合 SA，用标准配体结合分析测得 IC50 为 1nM-500μM。

29. TNFα特异性的 dAb 单体配体，其中 dAb 包含 TAR1-5-19 的氨基酸序列或与其至少 80%同源的序列。

30. TNFα特异性的 dAb 单体配体，其中 dAb 包含 TAR1-5 的氨基酸序列或与其至少 80%同源的序列。

31. TNFα特异性的 dAb 单体配体，其中 dAb 包含 TAR1-27 的氨基酸序列或与其至少 80%同源的序列。

32. TNF 受体 1 特异性的 dAb 单体配体，其中 dAb 包含 TAR2-10 的氨基酸序列或与其至少 80%同源的序列。

33. TNF 受体 1 特异性的 dAb 单体配体，其中 dAb 包含 TAR2-10 的氨基酸序列或与其至少 90%同源的序列。

34. TNF 受体 1 特异性的 dAb 单体配体，其中 dAb 包含 TAR2-5 的氨基酸序列或与其至少 80%同源的序列。

35. TNF 受体 1 特异性的 dAb 单体配体，其中 dAb 包含 TAR2-5 的氨基酸序列或与其至少 90%同源的序列。

36. SA 特异性的 dAb 单体配体，其中 dAb 包含 MSA-16 的氨基酸序列或与其至少 80%同源的序列。

37. SA 特异性的 dAb 单体配体，其中 dAb 包含 MSA-26 的氨基酸序列或与其至少 80%同源的序列。

38. 权利要求 29 至 37 任一项的 dAb 单体配体，其中 TNFα、TNF 受体 1 或 SA 是人源的形式。

39. 一种 dAb 单体，其还包含末端 Cys 残基。

40. 权利要求 29-38 中的任何一项权利要求的 dAb 单体，其还包含末端 Cys 残基。

41. 包含权利要求 22-40 中任一项权利要求的至少一种 dAb 单体的双特异性配体。

42. 权利要求 41 的双特异性配体，其是二聚体。

43. 权利要求 42 的双特异性配体，其中的二聚体包含权利要求 22、23 和 28-30 中任何一项权利要求的抗人 TNF α dAb 和权利要求 26、27 和 34-36 中任何一项权利要求的抗 SA dAb。

44. 权利要求 42 中的双特异性配体，其中的二聚体是一种同或异二聚体，包含第一和第二抗人 TNF α dAb，每个 dAb 是权利要求 22、23 和 28-30 中的任何一项权利要求的 dAb。

45. 权利要求 41 中的双特异性配体，其是三聚体。

46. 权利要求 45 中的双特异性配体，是同三聚体，包含 3 个拷贝的权利要求 22、23 和 29-31 中的任何一项权利要求的抗人 TNF α dAb。

47. 前述任一项权利要求的配体，其包含通用框架。

48. 权利要求 47 中的配体，其中通用框架包含选自 DP47、DP45 和 DP38 组中的 $V_H$ 框架；和/或 DPK9 的 $V_L$ 框架。

49. 前述任一项权利要求的配体，其包含属类配体的结合位点。

50. 权利要求 49 中的配体，其中属类配体结合位点选自蛋白 A、蛋白 L 或蛋白 G。

51. 前述任一项权利要求的配体，其中配体包含具有一个或多个框架区的可变区，所述框架区包含与人胚系抗体基因片段编码的相应骨架区一样的氨基酸序列，或者所述一个或多个框架区的氨基酸序列整体包含多至 5 个不同于人胚系抗体基因片段编码的相应骨架区的氨基酸序列的氨基酸。

52. 权利要求 1-51 中的任何一项权利要求的配体，该配体包含可变区，其中 FW1、FW2、FW3 和 FW4 的氨基酸序列与人胚系抗体基因片段编码的相应骨架区的氨基酸序列相同，或者 FW1、FW2、FW3 和 FW4 的氨基酸序列整体包含多至 10 个不同于人胚系抗体基因片段编码的相应骨架区的氨基酸序列的氨基酸。

53. 权利要求 51 或 52 的配体，包含含有 FW1、FW2 和 FW3 区域的抗体可变区，所述的 FW1、FW2 和 FW3 的氨基酸序列与人胚系抗体基因片段编码的相应骨架区的氨基酸序列相同。

54. 权利要求 51-53 任一项的配体，其中所述的人胚系抗体基因片段选自 DP47、DP45、DP48 或 DPK9。

55. 前述任一项权利要求的配体，包含 $V_H$ 区，该区不是 Camelid 免疫球蛋白可变区。

56. 权利要求 55 中的配体，包含 $V_{H}$ 区，该区不包含与人 $V_{H}$ 区相比对 Camelid 免疫球蛋白可变区而言是特异性的一个或多个氨基酸。

57. 一种制备配体的方法，该配体包括具有第一结合特异性的第一免疫球蛋单个可变区和具有第二结合特异性的第二单个免疫球蛋白的单个可变区，所述结合特异性之一或两者是特异性针对一种能延长配体体内半衰期的蛋白的，该方法包括如下步骤：(a)根据能与第一表位结合的能力选择第一可变区，(b)根据能与第二表位结合的能力选择第二可变区，(c)组合这些可变区，并且(d)根据能与上述第一和第二表位结合的能力选择配体，其中，当所述可变区互补时，所述区域都不是特异针对 HSA 的 $V_{H}$ 区。

58. 权利要求 57 中的方法，其中所述的第一可变区是根据互补可变区不存在时结合所述第一表位而选择的。

59. 权利要求 57 中的方法，其中所述的第一可变区是根据第三互补可变区存在时结合所述第一表位而选择的，所述的第三可变区不同于所述的第二可变区。

60. 编码权利要求 1-56 中的任何一项权利要求的双特异性配体的核酸。

61. 权利要求 60 中的核酸，其是 TNFα特异性的，包含 TAR1-5-19 的核苷酸序列或与其至少 70%同源的序列。

62. 权利要求 60 中的核酸，其是 TNFα特异性的，包含 TAR1-5 的核苷酸序列或与其至少 70%同源的序列。

63. 权利要求 60 中的核酸，其是 TNFα特异性的，包含 TAR1-27 的核苷酸序列或与其至少 70%同源的序列。

64. 权利要求 60 中的核酸，其是 TNF 受体 1 特异性的，包含 TAR2-10 的核苷酸序列或与其至少 70%同源的序列。

65. 权利要求 60 中的核酸，其是 TNF 受体 1 特异性的，包含 TAR2-10 的核苷酸序列或与其至少 80%同源的序列。

66. 权利要求 60 中的核酸，其是 TNF 受体 1 特异性的，包含 TAR2h-5 的核苷酸序列或与其至少 70%同源的序列。

67. 权利要求 60 中的核酸，其是 TNF 受体 1 特异性的，包含 TAR2h-5 的核苷酸序列或与其至少 80%同源的序列。

68. 权利要求 60 中的核酸，其是 SA 特异性的，包含 MSA-16 的核苷

酸序列或与其至少 70%同源的序列。

69. 权利要求 60 中的核酸，其是 SA 特异性的，包含 MSA-26 的核苷酸序列或与其至少 70%同源的序列。

70. 一种载体，其包含权利要求 60-69 中的任何一项权利要求的核酸。

71. 权利要求 70 中的载体，其还包含表达双特异性配体所需的成分。

72. 一种转染有权利要求 71 的载体的宿主细胞。

73. 一种制备闭合构象多特异性配体的方法，该配体包含具有第一表位结合特异性的第一单个表位结合区和具有第二表位结合特异性的非互补的第二表位结合区，其中第一和第二结合特异性能竞争结合表位，因此闭合构象的多特异性配体不能同时结合这两个表位，所述方法包括以下步骤：a)根据能与第一表位结合的能力选择第一表位结合区，b)根据能与第二表位结合的能力选择第二表位结合区，c)组合这些表位结合区以便使所述区域处在闭合构象中，并且 d)根据与上述第一和第二表位结合的能力而不是与上述两表位同时结合的能力筛选闭合构象的多特异性配体。

74. 权利要求 73 中的方法，其中第一和第二表位结合区是免疫球蛋白重链可变区($V_H$)。

75. 权利要求 73 中的方法，其中第一和第二免疫球蛋白可变区是免疫球蛋白轻链可变区($V_L$)。

76. 权利要求 73-75 中的任何一项权利要求的方法，其中所述的免疫球蛋白可变区来自直接针对所述表位的免疫球蛋白。

77. 权利要求 73-76 中的任何一项权利要求的方法，其中所述第一和第二表位存在于分开的抗原上。

78. 权利要求 73-76 中的任何一项权利要求的方法，其中第一和第二表位存在于相同的抗原上。

79. 权利要求 73-78 中的任何一项权利要求的方法，其中所述可变区来自单个抗体功能域库中。

80. 权利要求 79 的方法，其中所述库展示在丝状噬菌体表面，并且其中单个抗体功能域是通过噬菌体库与抗原的结合而选出的。

81. 权利要求 73-80 中的任何一项权利要求的方法，其中至少一个免疫球蛋白可变区序列是经突变或 DNA 改组修饰过的。

82. 一种闭合构象多特异性配体，其包含具有第一表位结合特性的第一

表位结合区和具有第二表位结合特性的非互补的第二表位结合区，其中第一和第二结合特异性能竞争结合表位，致使闭合构象的多特异性配体不能同时结合这两个表位。

83. 权利要求 82 中的闭合构象多特异性配体，其可通过权利要求 73-80 中的任何一项权利要求的方法而获得。

84. 权利要求 82 或 83 中的闭合构象多特异性配体，其包含抗体的一个以上的单个重链可变区，或抗体的一个以上的轻链可变区。

85. 权利要求 84 中的闭合构象多特异性配体，其中 $V_H$ 和 $V_L$ 是通过肽连接子相连。

86. 权利要求 84 中的闭合构象多特异性配体，其中 $V_H$ 或 $V_L$ 是由抗体 Fab 样区域提供。

87. 权利要求 82-84 中的任何一项权利要求中的闭合构象多特异性配体，其中可变区是非共价结合的。

88. 权利要求 82-84 中的任何一项权利要求中的闭合构象多特异性配体，其中可变区是共价结合的。

89. 权利要求 87 中的闭合构象多特异性配体，其中共价结合是由二硫键介导的。

90. 权利要求 82-89 中的任何一项权利要求中的闭合构象多特异性配体，包含一个通用框架。

91. 权利要求 82-89 中的任何一项权利要求中的闭合构象多特异性配体，包含一个属类配体结合点。

92. 权利要求 91 中的闭合构象多特异性配体，其中属类配体结合点选自蛋白 A、蛋白 L 或蛋白 G。

93. 权利要求 82-92 中的任何一项权利要求中的闭合构象多特异性配体，其中配体包含具有一个或多个框架区的可变区，所述的框架区包含与人胚系抗体基因片段编码的相应骨架区一样的氨基酸序列，或者所述一个或多个框架区氨基酸序列整体包含多至 5 个不同于人胚系抗体基因片段编码的相应骨架区的氨基酸序列的氨基酸。

94. 权利要求 93 的闭合构象配体，其中的配体包含可变区，其中 FW1、FW2、FW3 和 FW4 的氨基酸序列与人胚系抗体基因片段编码的相应骨架区的氨基酸序列相同，或者 FW1、FW2、FW3 和 FW4 的氨基酸序列整体包含

多至 10 个不同于所述人胚系抗体基因片段编码的相应骨架区的氨基酸序列的氨基酸。

95. 权利要求 93 或 94 的闭合构象配体，其包含含有 FW1、FW2 和 FW3 区域的抗体可变区，所述的 FW1、FW2 和 FW3 的氨基酸序列与人胚系抗体基因片段编码的相应骨架区的氨基酸序列相同。

96. 权利要求 92-95 中的任何一项权利要求中的闭合构象配体，其中所述的人胚系抗体基因片段选自 DP47、DP45、DP48 或 DPK9。

97. 权利要求 92-96 中的任何一项权利要求中的闭合构象配体，包含 $V_H$ 区，该区不是 Camelid 免疫球蛋白可变区。

98. 权利要求 97 中的闭合构象配体，其中的 $V_H$ 区不包括与人 $V_H$ 区相比对 Camelid 免疫球蛋白可变区而言是特异性的一个或多个氨基酸。

99. 权利要求 82-98 中的任何一项权利要求中的闭合构象多特异性配体，其中所述的一个特异性是针对某种制剂的，该制剂可有效延长所述配体的半衰期。

100. 一种试剂盒，其包含权利要求 82-99 中的任何一项权利要求中的闭合构象多特异性配体。

101. 一种核酸，其编码至少一种权利要求 82-99 中的任何一项权利要求中的闭合构象多特异性配体。

102. 一种包含权利要求 101 中核酸的载体。

103. 权利要求 102 中的载体，其还包含表达闭合构象多特异性配体所必需的成分。

104. 一种转染有权利要求 103 中载体的宿主细胞。

105. 一种检测靶分子存在的方法，包括：(a)提供一种结合在某种制剂上的闭合构象多特异性配体，所述配体是特异性针对所述靶分子和所述制剂的，其中结合所述配体的所述制剂从该配体置换出来时产生可检测信号；(b)将所述靶分子暴露于所述闭合构象多特异性配体；并(c)检测所述制剂置换所产生的信号。

106. 权利要求 105 中的方法，其中所述制剂是一种酶，当被闭合构象多特异性配体结合时是无活性的。

107. 权利要求 105 中的方法，其中的制剂是一种酶的底物。

108. 权利要求 107 中的方法，其中的制剂是一种荧光剂、发光剂或显

色剂，当被配体结合时是无活性的或被淬灭。

109. 一种实施权利要求 105-108 中的任何一项权利要求的方法的试剂盒，包括一种能结合靶分子的闭合构象多特异性配体，任选和一种制剂及其适用的缓冲液。

110. 一种综合了权利要求 105-108 中的任何一项权利要求中方法的均相免疫分析法。

111. 权利要求 1-56 中的任何一项权利要求的配体，其用于治疗。

112. 一种药物组合物，包含权利要求 1-56 中的任何一项权利要求中的配体和药学上可接受的赋形剂、载体或溶剂。

113. 一种制备螯合多聚体配体的方法，包括以下步骤：(a)提供含有核苷酸序列的载体，该核苷酸序列编码特异性针对靶分子上第一表位的单个结合区；(b)提供一种编码库的载体，所述库含有特异性针对所述靶上第二表位的第二结合区，该表位可以与第一表位相同或不同，所述第二表位与所述第一表位相邻；(c)表达所述第一和第二表位；和(d)分离所述第一和第二结合区结合在一起生成的靶结合二聚体结合物。

114. 权利要求 113 中的方法，其中第一和第二结合区通过连接子共价结合。

115. 权利要求 113 中的方法，其中第一和第二结合区非共价结合。

116. 权利要求 113 中的方法，其中第一和第二结合区通过所述区的天然连接而结合。

117. 权利要求 116 中的方法，其中结合区包括 $V_H$ 区和 V κ 区。

# 免疫球蛋白单个变体抗原结合区及其特异性构建体

## 相关申请

该申请是 2002 年 6 月 28 日提交、并指定美国的国际申请 PCT/GB02/03014 的部分继续申请，该申请还要求了 2002 年 12 月 27 日提交的英国申请 GB 0230202.4 的优先权。

本发明涉及双特异性配体。该发明特别提供一种制备双特异性配体的方法，该配体包括结合第一种抗原/表位的第一免疫球蛋白单个可变区，结合第二抗原或表位的第二免疫球蛋白单个可变区。更具体地，本发明涉及的双特异性配体至少结合一种第一和第二抗原或表位，从而增强该配体的体内半衰期。本发明描述包含一个以上结合特异性的开放和闭合构象配体。

## 背景技术

抗体中的抗原结合区包括两个分开的区域：重链可变区($V_H$)和轻链可变区($V_L$：$V_\kappa$或$V_\lambda$)。抗原结合位点本身由 6 个多肽环组成：3 个来自 $V_H$ 区(HI，H2 和 H3)，3 个来自 $V_L$ 区(LI，L2 和 L3)。基因片段的组合重排造成编码 $V_H$ 和 $V_L$ 的 V 区基因的多种多样的初始功能库。$V_H$ 基因是由 3 个基因片段即 $V_H$、D 和 $J_H$ 重组而成。根据独特型，人类大约有 51 种功能性 $V_H$ 基因片段(Cook 等，Immunol Today 16: 237(1995))，25 种功能性 D 基因片段(Corbett 等，分子生物学杂志 268: 69(1969))和 6 种功能性 $J_H$ 基因片段(Ravetch 等，细胞 27: 583(1981))。$V_H$ 基因片段编码 $V_H$ 区中形成第一和第二抗原结合环(HI 和 H2)的多肽链的区域，而 $V_H$、D 和 $J_H$ 基因片段共同编码 $V_H$ 区中第三抗原结合环(H3)多肽链。$V_L$ 基因只由 2 个基因片段即 $V_L$ 和 $J_L$ 重组而成，根据独特型，人类大约有 40 种功能性 Vκ 基因片段(Schable 等，生物化学 Hoppe-Seyler 374: 1001(1993))，31 种功能性 Vλ 基因片段(williams 等，分子生物学杂 264: 220(1996)和 Kawasaki 等，基因组研究 Genome Res 7: 250(1997))，5 种功能性 Jκ 基因片段(Hieter 等，生物化学杂志 257: 1516(1982))和 4 种功能性 Jλ 基因片段(Vasicek 等，实验医学杂志 172: 609(1993))。$V_L$ 基因片段编码 $V_L$ 区中形成第一和第二抗原结合区(LI 和 L2)的多肽链区域，而 $V_L$ 和 $J_L$ 基因片段共同编码 $V_L$ 区中形成第三抗原结

合环(L3)的多肽链。一般认为，从这些初始功能库中可以充分选择出至少能以中等亲和力与几乎所有抗原结合的不同种类的抗体。经过基因重排的“亲和力成熟”可产生高亲和力抗体，在此过程中，发生点突变，并根据结合能力的增强由免疫系统进行选择。

分析抗体的结构和序列表明 6 个抗原结合环中的 5 个(H1、H2、L1、L2 和 L3)具有数目受限的主链构象和规范结构(Chothia 等，分子生物学杂志 196: 901(1987)和 Chothia 等，自然 342: 877(1989))。主链构象取决于(i)抗原结合环的长度，和(ii)特殊残基或抗原结合环和抗体骨架中特定关键部位残基的种类。分析抗原结合环的长度和关键残基可以推测由大多数人类抗体序列编码的 H1、H2、L1、L2 和 L3 主链构象。(Chothia 等，分子生物学杂志 227: 799(1992); Tomlinson 等，EMBO J 14: 4628(1995); Williams 等，分子生物学杂志 264: 220(1996))。虽然 H3 区在序列、长度和结构方面变化较大(由于 D 片段的作用)，但其长度、特殊残基的存在或抗原结合环和抗体骨架中关键部位残基的种类决定该区也形成一个数目受限的主链短环。(Martin 等，分子生物学杂志 J. Mol. Biol., 263: 800(1996); Shirai 等，FEBS Letters, 399: 1(1996))。

本领域已知双特异性抗体包含 $V_H$ 区和 $V_L$ 区互补对。这些双特异性抗体必须包含两对 $V_H$ 区和 $V_L$ 区，每对 $V_H/V_L$ 结合单个抗原或表位。曾经描述的方法包括杂交瘤技术(Milstein 等，自然 305: 537-40)，微体(Hu 等，Cancer Res 56: 3055-3061(1996))双抗体(Holliger 等，美国科学院院报 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444- 6448(1993); WO 94/13804)，螯合重组抗体(CRAbs)(Neri 等，分子生物学杂志 246, 367-373(1995))，双链 Fv 抗体(biscFv)(Atwell 等，分子免疫学 Mol. Immunol. 33, 1301- 1312(1996))，“凸凹吻合(knobs into holes)”稳定抗体(Carter 等，蛋白质科学 Protein Sci. 6, 781-788(1997))。每种情况下每种抗体包括两个抗原结合位点，每个抗体的特点为 $V_H$ 区和 $V_L$ 区的互补对。因此，通过一个 $V_H$ 区和它的互补区 $V_L$ 区结合每个抗原或表位，使得每种抗体能同时结合两种不同的抗原或表位。这些技术的每一种均有其特有的缺点，例如：杂交瘤技术中无活性的 $V_H/V_L$ 对可大大减少双特异性 IgG 的级分(fraction)。此外，大多数双特异性方法依赖于不同 $V_H/V_L$ 对的结合或 $V_H$ 和 $V_L$ 链的结合而重新产生两种不同的 $V_H/V_L$ 结合位点。因此，在组装分子中不可能控制对每种抗原或表位的结合位点

比率，所以许多组装分子只结合一种抗原或表位，而不结合其它表位。在一些情况下已可以设计亚单位界面上的重链或轻链，(Carter 等., 1997)以增加具有结合上述两种的抗原或表位的位点的分子的数目，但这样不能使所有的分子都具有结合所述两种抗原或表位的能力。

有些证据表明两种不同抗体结合特异性可以共同结合同一结合位点，但通常这些抗体表现出对结构相关的抗原或表位或广泛交叉反应性抗体的两种以上特异性。例如：描述过的交叉反应性抗体，通常见于两种在序列或结构上相关的抗原如：鸡卵白溶菌酶和火鸡溶菌酶(McCafferty 等，WO 92/01047)或游离半抗原和与载体交联的半抗原(Griffiths AD 等，EMBO J 13: 14 3245-60(1994))。另一例见 WO02/02773(Abbott 实验室)描述的具有“双特异性”的抗体分子。这里所涉及的抗体分子是针对多样性抗原的，也就是说它们的特异性范围多于一种抗原。在 WO 02/02773 描述的抗体中，每对互补 $V_H/V_L$ 具有针对两种或两种以上结构相关抗原的单一结合特异性，这些互补对中的 $V_H$ 区和 $V_L$ 区不具有单独的特异性。因此，所述抗体具有对结构上相关的两种抗原的广泛的单一（broad single）特异性，此外，已描述过的天然自身抗体是多反应性的(Casali 等，免疫评论 Rev. Immunol. 7, 515-531)，可与至少两种(通常更多)结构上无关的不同的抗原或表位反应。已表明采用基于单克隆抗体的噬菌体展示技术选择的随机肽库将能确定一系列与抗原结合位点匹配的肽序列。某些序列非常相关，适合于一致的序列，而其它序列十分不同被命名为单一体(mimotope)(Lane 和 Stephen, 免疫学新观点 Current Opinion in Immunology, 1993, 5, 268-271)。因此，很显然含有相关和互补 $V_H$ 区和 $V_L$ 区的天然四肽链抗体能够结合无数已知抗原中的许多不同抗原。不明确的是如何在同一抗体中制备出与两种给定抗原结合的结合位点，特别是一些结构上未必相关的抗原。

蛋白工程技术方法提示其可在这方面有所帮助。例如：有人建议制备一种催化抗体，该抗体可通过一个可变区与金属离子结合，通过金属离子和一个互补可变区接触而与半抗原(底物)结合(Barbas 等，美国科学院通报 Proc. Natl. Acad. Sci USA 90, 6385-6389(1993))。然而这种情况下，结合和催化底物(第一抗原)需要与金属离子的结合(第二抗原)。因此，与 $V_H/V_L$ 对的结合与单一但多成分的抗原相关。

已描述过从 Camelid 抗体重链单区中制备的双特异性抗体，在抗体中通

过一个可变区与一种抗原结合，通过第二个可变区与第二种抗原结合，而且这些可变区不互补。因此，选择第一个重链可变区针对第一种抗原，第二种重链可变区针对第二种抗原，然后将这两个可变区连接在同一链上成为一个双特异性抗体片段。(Conrath 等，生物化学杂志 J. Biol. Chem. 270, 27589-27594). 然而，不同寻常的是 Camelid 重链单个功能区(Single domain)来自无轻链的天然 Camelid 抗体，事实上，Camelid 重链单区不能与 Camelid 轻链结合组成互补的 $V_H/V_L$ 对。

还描述过源于天然抗体的单个重链可变区，该可变区通常与轻链结合(来自单克隆抗体或功能区库；见 EP-A-0368684)。已表明这些重链可变区能特异性结合一种或一种以上的相关抗原，而不能与其它重链或轻链可变区组合成具有两种或两种以上不同抗原特异性的配体。此外，这些单个功能区在体内的半衰期很短，因此其治疗价值受限。

曾有人建议将不同特异性的重链可变区相连在一起制备双特异性抗体片段(如上所述)，但该策略的缺点是：分离的抗体可变区可能有一个通常可与轻链作用的疏水界面，其暴露于溶剂时可以是粘性的，从而允许单个区结合到疏水表面上。此外，缺乏轻链伴侣的两个或两个以上不同重链的组合和可能通过疏水界面的结合，可阻止它们结合一个而不是两个在它们独立时能结合的配体。而且，这种情况下，重链可变区不与互补轻链可变区结合，故稳定定性很差，折叠易打开(Worn 和 Pluckthun, 生物化学 37, 13120-7(1998))。

**发明概述**

本发明人在国际专利申请 WO 03/002609 和未公开的 UK 专利申请 0230203.2 中描述，双特异性免疫球蛋白配体包含免疫球蛋白单个可变区(single variable domains)，每个可变区具有不同特异性。这些区域结合靶分子上的抗原或表位时或相互竞争或互不依赖。

在第一构型中，本发明提供了由发明者发明的对双特异性配体的进一步改进，其中配体的一个特异性是针对有机体体内某种蛋白或多肽的，通过与其结合能增强该配体的半衰期。

因此，首先，本发明提供了一种双特异性配体，该配体包含第一免疫球蛋白单个可变区，该可变区对第一抗原或表位有结合特异性，该配体还

包含互补的第二免疫球蛋白单个可变区，该可变区具有与第二种抗原或表位的结合特异性，其中所述抗原或表位中的一种或两种起延长配体在体内的半衰期的作用，所述的第一或第二免疫球蛋白单个可变区缺乏具有同一特异性的共同互补区域，所述的双特异性配体不是由抗-HSA $V_H$ 区和抗-β半乳糖苷酶 Vκ 区组成。更适合的是第一和第二可变区都不与人血清白蛋白(HSA)结合。

发明中所述的延长配体半衰期的抗原/表位是有机体常见的体内蛋白或多肽。例如：包括胞外基质蛋白、血液蛋白和有机体各种组织蛋白。这些蛋白的作用是降低配体从血中的清除率，例如：可作为增容剂(bulking agent)或将配体锚定在所希望的作用位点上。延长配体体内半衰期的抗原/表位实例在下面附件 1 中给出。

延长半衰期的方法在免疫球蛋白特别是抗体和大多数小分子抗体片段的体内应用中十分有用，这些片段(Fvs, 二硫化物结合的 Fvs, Fabs, scFvs, dAb)易于从体内快速清除，因此，一方面它们能快速到达身体大部分部位并迅速起效而且易于控制，一方面由于其在体内的存在短暂而影响了其在体内的应用。本发明提供了在体内半衰期延长的配体，致使配体的功能性活性在体内持续时间延长，从而解决了上述问题。

配体药代动力学分析和半衰期的测定方法已为本领域技术人员熟知，详细资料见一本药剂师手册-Kennetl 等，药物的化学稳定性，和一本实用方法- Peters 等，药代动力学分析(1996)。还可参考 M Gibaldi 和 D perron 等，《药代动力学》，第 2 版，Marcel Dekker 出版，1982 年，该书描述了 tα 半衰期、tβ 半衰期和曲线下面积(AUC)等药代动力学参数。

α和β相半衰期(t l/2α和 tl/2β)以及 AUC 可从配体的血清浓度与时间的关系曲线中求出，例如可采用 WinNonlin 分析软件包(可从 Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, USA 获得)模拟曲线。第一阶段(α相)主要是配体在患者体内分布并有一些清除，第二阶段(β相)是终末期，开始于配体分布完毕且由于配体在病人体内清除其血浆浓度开始下降时。tα 半衰期(t1/2α)是第一阶段半衰期，tβ 半衰期(t1/2β)是第二阶段半衰期，因而，本发明一方面提供了一种配体或包含配体的组合物，其 tα 半衰期为 15 分钟或 15 分钟以上的范围，在一个实施方案中，所述范围的下限可为 30 分钟，45 分钟，1 小时，2 小时，3 小时，4 小时，5 小时，6 小时，7 小时，10 小

时，11 小时，12 小时。另外，或可选择地，本发明所述的配体或组合物的 tα 半衰期可在高达 12 小时的范围且包括 12 小时。在一个实施方案中，所述范围的上限可为 11, 10, 9, 8, 7, 6 或 5 小时。适当范围的实例是 1-6 小时，2-5 小时或 3-4 小时。

本发明提供了一种配体或包括配体的组合物，其 tβ 半衰期在 2.5 小时或 2.5 小时以上的范围。在一个具体实施方案中，所述范围的下限为 3 小时，4 小时，5 小时，6 小时，7 小时，10 小时，11 小时或 12 小时。另外，或可选择地，本发明所述的配体或组合物的 tβ 半衰期可在高达 21 天的范围且包括21 天。在一个实施方案中，所述范围的上限可为 12 小时，24 小时，2 天，3 天，5 天，10 天，15 天或 20 天。有利的是，本发明的配体或组合物的 tβ 半衰期范围为 12-60 小时，再具体地说，范围为 12 - 48 小时，更具体地说，范围为 12 - 26 小时。

除上述标准之外，或可选择地，依照发明所述本发明提供的配体或包括配体的组合物的曲线下面积(AUC)参数值在 1 mg.min/ml 或以上的范围。在一个实施方案中，所述范围的下限为 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 或 300mg. min/ml。另外，或可选择地，本发明所述的配体或组合物的 AUC 值可在高达 600 mg. min/ml 的范围。在一具体实施方案中，所述范围的上限可为 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 或 50 mg. min/ml。有利的是，本发明的配体或组合物的 AUC 范围值从以下几组中选出：15-150mg. min/ml, 15 - 100 mg. min/ml, 15 -75 mg. min/ml, 和 15-50mg.min/ml。

第一实施方案中，双特异性配体包括两个互补可变区，它们在自然环境中可作为关联对(cognate pair)/组一起发挥作用，即使在本发明中，它们分别结合在它们的同源表位上。例如，互补的可变区可以是免疫球蛋白重链和轻链可变区($V_H$ 和 $V_L$)。$V_H$ 和 $V_L$ 可十分便利地由 scFv 或 Fab 抗体片段提供。可变区可以相连形成多价配体，例如，通过每个 V 区 C 末端的铰链区以及铰链区半胱氨酸间的二硫键连接，或由功能区 C 末端的半胱氨酸经二硫键连在一起的 dAb 提供，或者由 V-CH 和 V-CL 组成的 Fab 形式，或者使用肽连接子(如下所述的 $Gly_4Ser$ 连接子)制备二聚体、三聚体和多聚体。

发明者发现互补可变区的应用使得两个区的表面挤在一起（pack together）并与溶剂隔绝，再者，两个互补区能相互稳定。此外，还使得双特异性 IgG 抗体去除了过去所用的杂交瘤的缺点，或在亚单位界面上改造

重链或轻链的需要。第一，本发明中双特异性抗体具有至少一个 $V_H/V_L$ 对。所以，本发明的双特异性 IgG 可包含两个这样的对，Y 型分子的每个臂上各有一个。因此，不同于常规的双特异性抗体或双抗体(diabodies)，它们制备过程中肽链使用的比率决定抗体制备的成功，因而制备存在着实际困难，而本发明的双特异性配体不存在肽链平衡问题。常规双特异性抗体链不平衡原因是两种不同的 $V_L$ 链和两种不同的 $V_H$ 链的连接，当 $V_L$ 链 1 和 $V_H$ 链 1 在一起时能结合抗原/表位 1，$V_L$ 链 2 和 $V_H$ 链 2 在一起时能结合抗原/表位 2，两个正确匹配对可以某种方式彼此相连。因此，在单个分子中，只有 $V_L$ 链 1 和 $V_H$ 链 1 配对和 $V_L$ 链 2 和 $V_H$ 链 2 配对后才能生成双特异性抗体，有两种不同方式制备该种双特异性抗体。第一种方式是通过连接两个存在的结合不同抗原/表位的 $V_H/V_L$ 对(如双特异性抗体 IgG)，这样 $V_H/V_L$ 对一起出现的比率必须为 1：1，以便合成的所有抗体分子群体为双特异性的。不会出现双特异性抗体和只能与一种抗原/表位结合而不能与另一种结合的抗体分子的混合物(即使当通过凸凹吻合技术增强互补 CH 区时)。第二种方式是通过同时连接两个不同 $V_H$ 链和两个不同的 $V_L$ 链而形成的双特异性抗体(如双特异性双抗体)。这样虽然倾向于 $V_L$ 链 1 与 $V_H$ 链 1 匹配，$V_L$ 链 2 与 $V_H$ 链 2 匹配(这可通过 $V_L$ 区与 $V_H$ 区“凸凹吻合”的改造而增强)，这种匹配决不会在所有分子中出现，会形成混合物形式，使得错配发生导致有些抗体不能结合任一抗原或表位。

根据本发明第一方面的双特异性配体方法构建的双特异性抗体克服了这些问题，原因是与抗原或表位 1 结合的残基位于 $V_H$ 或 $V_L$ 区中，与抗原或表位 2 结合的残基位于互补的 $V_H$ 或 $V_L$ 区中，这两种结合是独立的。由于 $V_H/V_L$ 对是 1：1 的，所以全部 $V_H/V_L$ 对是双特异性的并且应用这些 $V_H/V_L$ 对构建的所有形式(Fv, scFvs, Fabs, 微体(minibody), IgG 等)有 100% 双特异性的活性。

本发明上下文中的第一和第二“表位”可理解为不同的表位并且不被单一单特异性配体结合。在本发明的一个方面，所述表位在不同抗原上，其中之一的作用是增加配体体内半衰期。同样有利之处是第一和第二抗原不相同。

本发明中的双特异性配体不包括 WO02/02773 所述的配体，因此，本发明中的配体不包括通过共同作用(co-operatively)结合任意一个或更多抗原

或表位的互补 $V_H/V_L$ 对。相反，本发明第一方面的配体包含 $V_H/V_L$ 互补对，其中所述 V 区具有不同特异性。

此外，本发明第一方面的配体包括对结构上不相关的表位或抗原具有不同特异性的 $V_H/V_L$ 互补对。结构上相关的表位或抗原与常规 $V_H/V_L$ 互补对结合，它们具有充分的结构相似性，而这些常规互补对是通过共同作用方式结合表位或抗原。这种结构相关的表位在结构上十分相似，这使它们“适合”进入 $V_H/V_L$ 二聚体抗原结合位点上形成的同一结合袋中。

本发明第二方面提供了一种配体，包括具有与第一抗原/表位结合特异性的第一免疫球蛋可变区和具有与第二抗原/表位结合特异性的第二免疫球蛋可变区，其中所述第一和第二可变区之一或二者结合在增加配体在体内的半衰期的抗原上，并且可变区互相之间不互补。

在一个实施方案中，与一个可变区的结合调节配体同第二可变区的结合。

在该实施方案中，可变区可以例如是 $V_H$ 区对或 $V_L$ 区对，与抗原在第一位点的结合有可能调节(增强或抑制)与抗原在第二位点的结合。例如，第一位点的结合至少抑制抗原在第二位点的结合。在这样的实施方案中，配体通过结合在一种可增加配体半衰期的蛋白上而使配体在宿主生物体内持续存在，直到配体与第二靶抗原结合而与延长半衰期的蛋白分离。

上文所述的结合调变可作为抗原结合位点相互间结构邻近的结果，这种结构邻近可通过连接两种或两种以上抗原结合位点的结构成分的本质决定，例如，提供一种容纳了紧邻的抗原结合位点的相对刚性结构的配体。优势在于，这些抗原结合位点之间在物理学上彼此十分接近，因此，通过免疫球蛋白分子中的空间位阻和/或构象变化而使一个位点调变抗原分子在另一个位点的结合。

第一和第二抗原结合区可以以共价或非共价方式结合。以共价方式结合时，结合可通过二硫键或多肽连接子如 $(Gly_4Ser)_n$ 介导，其中 n = 1-8，例如：2, 3, 4, 5 或 7。

本发明中配体可以与非免疫球蛋白多个配基结合组成多价复合物，与具有相同抗原的靶分子结合，因此具有高亲合力，同时至少一个可变区结合一种抗原以增加多聚体的半衰期。例如，天然细菌受体如：SpA 被用作支架结构(Scaffold)，将 CDRs 移植以产生能特异性结合一种或更多表位的配

体。这一过程详细资料在 US 5,831,012 中描述。其它适用的支架结构包括那些以纤连蛋白和亲合体(affibody)为基础的物质。适用方法详细资料在 WO 98/58965 中描述。其它合适的支架结构 lipocallin 和 CTLA4，参见 van den Beuken 等，分子生物学杂志 J. Mol. Biol. 310, 591-601(2001)，在 W00069907(Medical Research Council)中描述的支架是以细菌 GroEL 或其它伴侣多肽的环状结构为基础的。

蛋白支架结构可以是组合的，例如，CDR 可以被嫁接于 CTLA-4 支架结构上，并与免疫球蛋白的 $V_H$ 区或 $V_L$ 区一起应用组成配体。同样，纤连蛋白、lipocallin 和其它支架结构也可以组合。

如果这里描述的可变区是来自采用噬菌体展示技术筛选的 V 区基因库的，那么这些可变区可以包含一个通用骨架区，即可被在此定义的特异性属类配体(specific generic ligand)识别。通用骨架、属类配体（generic ligand）及其类似物在 W099/20749 中描述。本发明中涉及的噬菌体展示包括噬菌体和/或噬菌粒的应用。

在采用 V 基因库时，多肽序列的变异优选于可变区的结构环中。采用 DNA 改组或突变技术，可改变可变区多肽序列，以增强每个可变区与其互补对之间的相互作用。

本发明的优选实施方案中“双特异性配体”是一种单个链(single chain)Fv 片段。本发明中另一实施方案中双特异性配体由抗体分子的 Fab 区组成。术语“Fab 区”包括 Fab 样区，其中应用了两个 $V_H$ 区或两个 $V_L$ 区。

可变区可来自直接针对靶抗原或表位的抗体。或者，可变区也可来自诸如那些表达在丝状细菌噬菌体表面的单个抗体区的库中。选择方法如下所述。

第三方面，本发明提供了一种制备配体的方法，该配体包括具有第一结合特异性的第一免疫球蛋白单个可变区和具有第二(不同)结合特异性的第二单个免疫球蛋单个可变区(Single immunoglobulin single variable domain)，所述结合特异性之一或二者是特异性针对一种能延长配体体内半衰期的抗原分子的，该方法包括以下步骤：(a)根据能与第一个表位结合的能力选择第一个可变区，(b)根据能与第二个表位结合的能力选择第二个可变区，(c)组合这些可变区；和(d)根据能与上述第一和第二表位结合的能力筛选配体。

配体能同时与上述第一和第二表位结合，或者当存在结合区间表位结合的竞争时而出现一个区域的结合排除另一个区域与其关联表位的结合。因此，在一个实施方案中，上述步骤(d)中要求同时结合第一和第二(可能更多)表位。在另一实施方案中，与第一和第二表位的结合不是同时的。

所述表位优选在不同抗原上。

有利的是，配体包括如上所述的免疫球蛋白可变区的 $V_H/V_L$、$V_H/V_H$ 或 $V_L/V_L$ 组合。此外，配体可包括 Camelid $V_{HH}$ 区。只要针对能延长配体体内半衰期的抗原特异性的 $V_{HH}$ 区不能结合如 Conrath 等，JBC 276: 7346-7350(2001)和 W099/23221 中所述的鸡卵白溶菌酶(hen egg white lysozyme)(HEL)、猪胰腺α淀粉酶或 NmC-A、hcg、BSA-连接的 RR6 含氮染料或 S. mutans HG982 细胞，上述文献都未描述针对延长配体体内半衰期的抗原的特异性的应用。

在一个实施方案中，上述第一可变区是根据在缺乏互补可变区的情况下其能与上述第一表位结合而筛选的。在另一实施方案中，上述第一可变区是根据在第三可变区存在的情况下其能与上述第一表位/抗原结合而筛选的，在这里第三可变区不同于上述第二可变区，它与第一可变区互补。同样，第二可变区也可在有/无互补可变区的情况下筛选。

本发明中配体的靶抗原或表位除了是能增加半衰期的蛋白外，也可以是任意抗原或表位，不过最有利的是具有治疗价值的靶抗原或表位。本发明提供的配体，包括特异性针对所述靶，特别是较进步确定的靶的开放/闭合式构象的配体和分离的 dAb 单体配体。这些靶可以或部分是天然或合成的多肽、蛋白或核酸。这样，本发明中的配体可以结合表位或抗原，并可作为拮抗剂(antagonist)或激动剂(agonist)起作用(如：EPO 受体激动剂)。本领域技术人员知道所述靶的选择是广泛多样的。例如，它们可以是人或动物蛋白、细胞因子、细胞因子受体、酶的辅助因子(enzyme co-factor)或 DNA 结合蛋白。适当的细胞因子和生长因子包括但不仅限于 ApoE, Apo-SAA, BDNF, 心脏营养蛋白-1(Cardiotrophin-1), EGF, EGF 受体, ENA-78, Eotaxin, Eotaxin-2, Exodus-2, EpoR, 酸性 FGF, 碱性 FGF, 成纤维细胞生长因子-10, FLT3 配体, CX3C 趋化因子(CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF-β1, 胰岛素, IFN-γ, IGF-I, IGF-II, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8(72a. a.), IL-8(77 a. a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17,

IL-18(IGIF), α抑制素(inhibin), β抑制素, IP-10, 角质形成细胞生长因子-2(KGF-2), KGF, 瘦素（Leptin）, LIF, 淋巴细胞趋化因子, 苗勒抑制物(Mullerian inhibitory substance), 单核细胞克隆抑制因子, 单核细胞趋化蛋白, M-CSF, MDC(67 a. a.), MDC(69 a. a.), MCP-1(MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC(67 a. a.), MDC(69 a. a.), MIG, MIP-1α, MIP-1β, MIP-3α, MIP-3β, MIP-4, 髓样祖细胞抑制因子(myeloid progenitor inhibitor factor)-1(MPIF-1), NAP-2, Neurturin, 神经生长因子, β-NGF, NT-3, NT-4, 制瘤素（Oncostatin）M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1α, SDF1β, SCF, SCGF, 干细胞因子(SCF), TARC, TGF-α, TGF-β, TGF-β2, TGF-β3, 肿瘤坏死因子(TNF), TNF-α, TNF-β, TNF受体I, TNF 受体II, TNIL-1, TPO, VEGF, VEGF 受体 1, VEGF 受体 2, VEGF 受体 3, GCP-2, GRO/MGSA, GRO-β, GRO-γ, HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3 和 HER 4。细胞因子受体包括前述的细胞因子的受体。以上用于举例，并不表示只限于所列物质。

本发明一个实施方案中，可变区来自针对抗原或表位的不同的抗体。在优选实施方案中，可变区来自抗体单个可变区库。

此外，本发明提供一种或更多核酸分子，编码至少一种在此定义的双特异性配体。单个核酸分子可编码双特异性配体;或者每个区可分别由一个独立的核酸分子编码。由单个核酸分子编码的配体，功能区可以融合多肽、scFv 分子形式表达，或者分别表达最后连接在一起，例如用化学连接剂。不同核酸分子表达的配体可以适当的方式连接在一起。

核酸可进一步编码信号肽序列以引导宿主细胞表达的多肽输出，还可在表达时与丝状细菌噬菌体粒表达的表面成分(或筛选展示系统的其它成分)发生融合。

本发明进一步提供了一种载体，包含编码本发明双特异性配体的核酸。

本发明更进一步提供了一种宿主细胞，转染有编码本发明中所指的双特异性配体的载体。

此中载体可以构建为例如在细菌噬菌体粒表面表达可变区的载体。这样采用本发明的方法允许筛选所展示的可变区和双特异性配体。

本发明进一步提供了包含至少一种本发明双特异性配体的试剂盒。

本发明双特异性配体优选包含重链区和轻链区的组合产物

(combination)。例如，双特异性配体可包含 $V_H$ 区和 $V_L$ 区，它们以 scFv 形式连接在一起。此外，配体可包括一个或更多个 $C_H$ 区和 $C_L$ 区。例如，配体可包含 $C_H1$，$C_H2$ 或 $C_H3$ 区，和/或 $C_L$ 区，$C_\mu1$，$C_\mu2$，$C_\mu3$ 或 $C_\mu4$ 区，或它们的任意组合。铰链区也可以包含在内。这些功能区的结合可例如模拟天然抗体如：IgG 或 IgM，或它们的片段如：Fv，scFv，Fab 或 $F(ab')_2$ 分子。其它结构如包含有 $V_H$、$V_L$，$C_H1$ 和 $C_L$ 区的 IgG 分子的单臂也在设想当中。

本发明优选实施方案中，可变区是从单个 V 区基因库中筛选的。通常，单个抗体功能区的库是在丝状噬菌体表面上展示的。本发明优选实施方案中，每一单个抗体区是通过噬菌体库与抗原结合的方式筛选的。

本发明优选实施方案中每一单个可变区是在缺乏互补可变区存在的情况下根据其与靶抗原/表位的结合筛选的。另一个实施方案中，单个可变区是在互补可变区存在的情况下根据其与靶抗原/表位的结合筛选的。因此，第一个可变区可以在第三个互补可变区存在情况下筛选，第二个可变区可以在第四个互补可变区存在情况下筛选。互补的第三或第四可变区可以是具有与受试单个可变区相同特异性的天然同源可变区(natural cognate variable domain)，或者是非同源互补区如：一个“虚拟(dummy)”可变区。

本发明的双特异性配体优选包括仅两个可变区，尽管几个这样的配体可以组合在一起形成同一蛋白，例如两个这样的配体可以被纳入 IgG 或多聚免疫球蛋白如：IgM。或者，在另一实施方案中，多个双特异性配体组合在一起形成一个多聚体。例如，两种不同的双特异性配体组合生成四特异性分子。

本领域技术人员将会理解，依照本发明方法制备的双特异性配体的轻链和重链可变区可以在同一多肽链上，或者不同的多肽链上。如果可变区在在不同多肽链上，那么它们可以通过一个连接子，通常是一个柔韧的连接子如多肽链，化学连接基团，或本领域已知的任意其它方法连接。

另一方面，本发明提供了一种组合物，其包含一种可通过本发明提供的方法获得的双特异性配体和一种可用于药物中的载体、稀释液或赋形剂。

此外，本发明提供了一种采用本发明的双特异性配体或组合物治疗/预防疾病的方法。

在第二种构型中，本发明另一方面提供了包含至少两个非互补可变区的多特异性配体。例如，配体可包含一对 $V_H$ 区或一对 $V_L$ 区。优势之处在

于可变区是非 Camelid 来源的，优选它们是人源的功能区或者包括人源框架区(FWs)以及一种或一种以上的异质 CDRs。CDRs 和框架区是免疫相关蛋白序列 Kabat 数据库中定义的免疫球蛋白可变区。

优选的人源框架区是由胚系基因片段 DP47 和 DPK 9 编码的。优势之处在于 $V_H$ 区或 $V_L$ 区中的 FW1、FW2 和 FW3 具有来自 DP47 或 DPK9 的 FW1, FW2 或 FW3 序列。人源的框架可以任选包含突变，例如，在本发明配体中使用的人源框架中可包含例如大约 5 个或 10 个氨基酸的改变。

本发明中第二构型的多特异性配体可变区可以一种开放或闭合构象排列，也就是说，它们可以同时独立地结合在关联配体上，或者只有一个可变区在任一时刻结合在它的关联配体上。

发明者意识到在一些结构状态下，非互补可变区(如：两个轻链可变区或两个重链可变区)可以出现在一个配体中，以致第一表位与第一可变区的结合抑制第二表位与第二可变区的结合，即使这种非互补区不以同源对方式一起发挥作用。

本发明配体优势是包含两对或两对以上可变区，也就是说，包含至少 4 个可变区；优选这四个可变区含有人源框架。

在优选实施方案中，人源框架与人胚系序列一致。

本发明者认为这种抗体在治疗或其它应用中的配体结合分析中具有特殊用途。

因此，本发明第二种构型的第一方面，提供了制备多特异性配体的方法，包括以下步骤：a) 选择能与第一个表位结合的第一个表位结合区，b)选择能与第二个表位结合的第二个表位结合区，c)组合这些表位结合区，和 d)筛选能与上述第一和第二表位结合的闭合构象的多特异性配体。

本发明第二种构型的另一方面，提供了一种制备闭合构象的多特异性配体的方法，该多特异性配体包括具有结合第一表位特异性的第一表位结合区和具有结合第二表位特异性的非互补的第二表位结合区，其中第一和第二结合特异性竞争结合表位，致使该闭合的多特异性配体可以不同时结合两个表位，上述方法包括以下步骤：a)选择能与第一个表位结合的第一个表位结合区，b)选择能与第二个表位结合的第二个表位结合区，c)组合这些表位结合区以使所述区域处在闭合构象中，和 d)根据与上述第一和第二表位结合的能力而不是同时与上述两表位结合的能力筛选闭合构象的多特异

性配体。

此外，本发明提供了一种闭合构象的多特异性配体，包含具有结合第一表位特异性的第一表位结合区和具有结合第二表位特异性的非互补的第二表位结合区，其中，第一和第二结合特异性竞争表位结合，致使闭合构象的多特异性配体可以不同时结合两个表位。

本发明上述第二构型的另一选择的实施方案可任选包含另外的步骤(bl)，包括筛选第三或进一步的表位结合区。这样，不管是开放或闭合构象，所产生的多特异性配体均含有两个以上表位结合特异性。本发明第二构型的优选方面，当多特异性配体包含两个以上的表位结合区时，所述区中的至少两个区为闭合构象且竞争结合，其它区可以竞争结合也可以独立自由地与其关联的表位结合。

参照本发明，术语“多特异性配体”是指这里定义的具有一种以上的表位结合特异性的配体。

这里定义的术语“闭合构象”(多特异性配体)是指配体的表位结合区相互依附相互连接，任选通过蛋白骨架相连，致使一个表位结合区的表位结合可与另一个表位结合区的表位结合竞争。也就是说，关联的表位被每个表位结合区单独而不是同时结合。配体的闭合构象可通过这里描述的方法获得。

“开放构象”是指配体的表位结合区相互依附相互连接，任选通过蛋白骨架相连，致使一个表位结合区的表位结合不与另一个表位结合区的表位结合竞争。

关于这里的术语“竞争”是指当第二表位与其关联的表位结合区结合时，第一表位与其关联的表位结合区的结合受到抑制。例如，结合可以在空间上被抑制，例如：通过结合区的物理封闭或通过结合区的结构或环境的改变，致使与表位结合的亲和力或亲合力降低。

本发明第二构型的进一步实方案中，表位在结合时可相互转位(displace)。例如，第一表位可存在于抗原上，第一表位与其关联的第一结合区结合时可造成对第二结合区的空间位阻或者构型改变，这样转移了与第二结合区结合的表位。

优选结合能力降低25%或更多，优选40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%或更多，优选高达 100%或近乎 100%，以致结合被完全抑制。表位的结合

可用常规的抗原结合分析如：ELISA，或荧光技术如：FRET，或表面等离子体共振技术(suface plasmon resonance)测量分子质量等方法测定。

本发明提供的方法优选每一个表位结合区具有不同的表位结合特异性。

本发明上下文中的第一和第二“表位”可理解为不相同的表位且不被单一的单特异性配体结合。它们可以分布在不同抗原上，或分布在相同抗原上，但以充分的距离隔开，不形成能被常规抗体中单个单一特异性的 $V_H/V_L$ 结合对结合的单体。实验中，如果单链抗体(功能域抗体(domain antibody)，或 dAb)中独立的两个可变区被一个针对两个表位的单一特异性的 $V_H/V_L$ 配体分别竞争的话，那么认为这两个表位不够远，不能认为是本发明所指的分开的表位。

本发明中闭合构象的多特异性抗体不包括 WO 02/02773 中描述的配体。因此，本发明中配体不包括能通过共同作用结合任一种或多种抗原或表位的互补 $V_H/V_L$ 对。取而代之，本发明中的配体优选包括非互补的 $V_H$-$V_H$ 对或 $V_L$-$V_L$ 对。优选，在每一个 $V_H$-$V_H$ 或 $V_L$-$V_L$ 对中的每一个 $V_H$ 区或 $V_L$ 区具有不同的表位结合特异性。并且表位结合位点如此排列使得一位点上的表位结合竞争抑制另一个位点上的表位结合。

依照本发明，优选每一表位结合区包含免疫球蛋白可变区；更具优势的是每个免疫球蛋白可变区或者是轻链可变区($V_L$)或重链可变区($V_H$)。本发明的第二构型中，存在于本发明配体中的免疫球蛋白的功能区是非互补的，也就是说，它们不相连成 $V_H/V_L$ 抗原结合位点。因此，本发明中第二构型定义的多特异性配体包含同一亚类的免疫球蛋白的功能区，即，轻链可变区($V_L$)或重链可变区($V_H$)。此外，本发明配体是闭合构象时，所述免疫球蛋白的功能区可以是 Camelid $V_{HH}$ 型。

另一实施方案中，本发明的配体不包含 Camelid$V_{HH}$ 区。更具体的是，本发明中的配体不包括相对于人 $V_H$ 区而言是 Camelid$V_{HH}$ 区特有的一个或多个氨基酸残基。

优选单个可变区来自针对不同抗原或表位有结合活性的抗体。例如，通过人工免疫法至少可部分分离出可变区。其它的方法在本领域也是已知的，包括从人抗体库的分离或通过抗体基因的人工合成。

可变区可优选结合超抗原如：蛋白 A 或蛋白 L。能结合超抗原是正确

折叠的抗体可变区的一个特性，使得这些可变区从重组或突变的功能区文库中分离出来。

本发明中表位结合区包含蛋白骨架和表位作用位点(优选存在于蛋白骨架表面)。

表位结合区也可以基于蛋白骨架而不是免疫球蛋白功能区。例如，天然细菌受体如 SpA 等已被用作嫁接 CDRs 的骨架，以生成能与一种或多种表位特异性结合的配体。这一方法的详细资料参见 US 5, 831, 012。其它适宜骨架包括基于纤连蛋白和亲和体的那些骨架。适用方法在 WO 98/58965 中详述。其它适用骨架包括: lipocallin 和 CTLA4，参见 van den Beuken 等，分子生物学杂志 J. Mol. Biol. 310, 591-601(2001)，以及诸如在 W00069907(Medical Research Council)中描述的那些骨架，它们是基于例如细菌 GroEL 或其它伴侣多肽的环状结构。

蛋白骨架可以组合，例如，CDR 可以嫁接于 CTLA-4 骨架上，并与 $IgV_H$ 区或 $V_L$ 区一起组成多价配体。同样，纤连蛋白、lipocallin 和其它骨架也可以组合。

本领域技术人员将会理解，依照本发明方法制备的闭合构象多特异性配体的表位结合区可以在同一多肽链上，或者不同的多肽链上。如果可变区在在不同多肽链上，那么它们可以通过一个连接子，优选通常是一个柔韧的连接子如多肽链，化学连接基团，或本领域已知的任意其它方法。

第一和第二表位结合区可以通过共价或非共价方式结合，如果所述区是共价结合，那么结合可例如由二硫键介导。

在本发明第二构型中，第一和第二表位优选是不同的。它们可以全部或部分是多肽，蛋白或核酸，可以是天然的或合成的。这样，本发明中的配体可以结合表位或抗原，并作为拮抗剂或激动剂起作用(如: EPO 受体激动剂)。在一个实施方案中配体的表位结合区具有相同的表位特异性，可以例如同时结合其相应表位(当多个表位拷贝出现在同一种抗原上时)。在另一个实施方案中这些表位由不同的抗原提供，因此配体能结合表位并桥联所述抗原。本领域技术人员会理解对表位和抗原的选择是广泛而且多样的，例如，它们可以是人或动物蛋白、细胞因子、细胞因子受体、酶辅助因子或 DNA 结合蛋白。适当的细胞因子和生长因子包括但不仅限于 ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrophin-1, EGF, EGF 受体, ENA-78, Eotaxin,

Eotaxin-2, Exodus-2, EpoR, 酸性 FGF, 碱性 FGF, 成纤维细胞生长因子-10, FLT3 配体, CX3C 趋化因子(CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF-β1, 胰岛素, IFN-γ, IGF-I, IGF-II, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8(72a. a.), IL-8(77 a. a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18(IGIF), α抑制素, β抑制素, IP-10, 角质形成细胞生长因子-2(KGF-2), KGF, Leptin, LIF, 淋巴细胞趋化因子, 苗勒抑制物, 单核细胞克隆抑制因子, 单核细胞趋化蛋白, M-CSF, MDC(67 a. a.), MDC(69 a. a.), MCP-1(MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP- 4, MDC(67 a. a.), MDC(69 a. a.), MIG, MIP-1α, MIP-1β, MIP-3α, MIP-3β, MIP-4, 髓样祖细胞抑制因子-1(MPIF-1), NAP-2, Neurturin, 神经生长因子, β-NGF, NT-3, NT-4, 制瘤素 M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1α, SDF1β, SCF, SCGF, 干细胞因子(SCF), TARC, TGF-α, TGF-β, TGF-β2, TGF-β3, 肿瘤坏死因子(TNF), TNF-α, TNF-β, TNF 受体 I, TNF 受体 II, TNIL-1, TPO, VEGF, VEGF 受体 1, VEGF 受体 2, VEGF 受体 3, GCP-2, GRO/MGSA, GRO-β, GRO-γ, HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3, HER 4, TACE 识别位点, TNF BP-I 和 TNF BP-II, 以及在本文附件 2 和附件 3 中公开的任何靶物质, 附件中阐述的物质可以是以不同的组合方式组合的物质或独立存在的物质。

细胞因子受体包括以下细胞因子的受体如: IL-1 RI ; IL-6R;IL-10R ; IL-18R, 以及附件 2 和 3 中阐明和公开的细胞因子的受体。可以理解, 所列举的实例并不是穷尽性的。当多特异性配体结合两个表位(相同或不同抗原上的两个表位)时, 所述抗原可以从此列表中选择。

双特异性配体优选可用于靶向作用于细胞因子和其它在生物体治疗情形下起协同作用的分子。因此, 本发明提供了增加两种或两种以上细胞因子活性的方法, 包括: 给予一种能结合上述两种或两种以上细胞因子的双特异性配体。在这一发明中, 双特异性配体可以是任何双特异性配体, 包括: 含有互补和/或非互补区的配体, 开放构象的配体和闭合构象的配体。例如, 本发明这方面涉及 $V_H$ 区和 $V_H$ 区的组配物(combinations), 只有 $V_H$ 区组配物和只有 $V_L$ 区组配物。

治疗环境中的协同作用可通过多种途径获得。例如, 如果在两个靶位被配体瞄准的条件下, 目的组配物才具有治疗活性, 而只瞄准一个靶位无治疗活性。在另一实施方案中, 一个靶单独可提供少许或极小治疗效果,

不过，与第二靶位结合在一起可提供一种协同治疗效应。

优选本发明这方面的双特异性配体结合的细胞因子是从附件 2 列表中选出的。

另外，双特异性配体可用于肿瘤学应用中，其中一个特异性靶是表达在细胞毒细胞上的 CD89，另一个是肿瘤特异性的。作为靶的肿瘤抗原的例子在附件 3 中给出。

本发明第二构型的实施方案中，可变区来自直接针对第一/第二抗原或表位的抗体中。优选实施方案中，可变区来自单个可变抗体区的库中，在一个实例中，该库不是在动物体内产生的或人工合成的，在另一实例中，单个可变区不是通过动物免疫分离(至少部分)的。因此单个区域可以从初始文库(naive library)中分离。

本发明第二种构型的另一方面，提供了一种多特异性配体，包括具有结合第一表位特异性的第一表位结合区和具有结合第二表位特异性的非互补第二表位结合区。所述第一和第二结合特异性可以相同或不同。

此外，本发明进一步提供了一种闭合构象的多特异性配体，包含具有结合第一表位特异性的第一表位结合区和具有结合第二表位特异性的非互补的第二表位结合区，其中，第一和第二结合特异性能竞争结合表位，致使闭合构象的多特异性配体不能同时结合两个表位。

本发明更进一步提供了开放构象的配体，包含非互补结合区，其中，结合区是特异性针对同一抗原的不同表位。这种配体以增强的亲合力结合靶。同样，本发明提供了多价配体，包含特异性针对相同表位的非互补结合区，指向包含多拷贝所述表位的靶，如：IL-5, PDGF-AA, PDGF-BB, TGF-β, TGF-β2, TGF-β3 和 TNFα，例如：人 TNF 受体 1 和人 TNFα。

同一方面，本发明的配体可构建为低亲和力结合独立表位的配体，致使结合独立表位无治疗意义；但是，结合两个表位可增加亲合力可提供治疗益处。在一实例中，正常细胞上独立存在的而在异常病变细胞如：肿瘤细胞上合并存在的表位可被靶向结合。这种情况下，只有异常病变细胞才能被本发明中的双特异性配体有效结合。

特异性针对相同靶上的多拷贝同一表位或相邻表位的配体(称为螯合dAb)可以是三聚体或多聚体(四聚体或更多)配体，包含 3 个，4 个或更多非互补结合区。例如，配体可以构建成含有 3 个 $V_H$ 区或 $V_L$ 区。

另外，还提供了结合多个亚单位靶的配体，在这里，每个结合区特异性针对上述靶的亚单位。配体可以是二聚体、三聚体或多聚体。

优选的是根据本发明上述方面多特异性配体可通过本发明的方法获得。

根据发明的第二构型的上述方面，优选第一表位结合区和第二表位结合区是非互补免疫球蛋白可变区，正如这里定义的一样。即：既可以是 $V_H$-$V_H$ 或 $V_L$-$V_L$ 可变区。

具体的是，螯合 dAb 可根据本发明的方法来制备即，采用锚定 dAb 制备。在此，采用一个载体构建了二聚、三聚或多聚 dAb 文库，该载体包含恒定的 dAb，位于连接子序列上游或下游，并在连接子的另一端插入第二、第三或其它 dAb 库。例如，锚定或引导 dAb 可以是 TAR1-5(V κ), TAR1-27(V κ), TAR2h-5($V_H$)或 TAR2h-6(V κ)。

用不同的方法，可以避免连接子的应用，例如，可采用非共价键或结合区如：$V_H$ 和 $V_K$ 之间的天然亲和力。因此本发明提供了一种制备螯合多价配体的方法，包含如下步骤：(a)提供一种载体，含有编码特异性针对靶的第一表位的单个结合区的核苷酸序列；(b)提供一种载体，编码包含特异针对上述靶上第二表位的第二结合区的库，第二表位和第一表位可以相同或不同，所述第二表位和所述第一表位邻近；并且(c)表达第一和第二结合区；并且(d)分离那些第一和第二结合区结合在一起的组配物，制备成靶结合二聚体。

第一和第二表位是邻近的，故多聚配体能同时结合在这些表位上。这样提供的配体具有结合时亲合力增强的优势。当表位相同时，增强的亲合力是通过靶上存在多拷贝表位而获得的，为了获得亲合力增强的效果，允许至少同时有两个拷贝的表位被结合。

结合区可通过几种方法连接，和连接子的应用一样好。例如，结合区可包括 cys 残基、生物素和链霉亲和素或其它方式以在合成后非共价结合。有效结合靶的那些组配物将被分离。或者，连接子可出现在第一和第二结合区之间，这些结合区可从单个载体中以单个多肽形式表达，该多肽包括第一结合区、连接子和第二结合区库，如上所述。

在一个优选方面，结合抗原时，第一和第二结合区是自然相连的，例如，$V_H$ 区和 V κ 区在结合相邻表位时将自然地以三种相互作用方式连接成

稳定二聚体，这种结合的蛋白能通过靶结合实验分离出来。这一方法优势在于，只有结合相近邻的表位的结合区才能以正确构型连接，因此由于其对靶的高亲合力而被分离。

上述发明中第二构型的另一个实例中，至少一个表位结合区包含非免疫球蛋白“蛋白骨架”或“蛋白支架”，正如这里定义的。适用的非免疫球蛋白骨架包括但不仅限于从 SpA, 纤连蛋白, GroEL 和其它伴侣分子, lipocallin, CTLA-4 和亲和体以及上面提到的物质中选出的任一种。

根据本发明第二构型的上述方面，优选表位结合区连接在一个蛋白骨架上，优选，本发明蛋白骨架是免疫球蛋白骨架。

本发明中术语“免疫球蛋白骨架”是指包括至少一个免疫球蛋白折叠的蛋白，并且可作为一种或多种表位结合区的核。正如这里所定义的。

这里定义的优选免疫球蛋白骨架包括从以下选出的任一种或多种：一种免疫球蛋白分子，包含至少(i)抗体的 $C_L$(κ或λ亚型)区；或(ii)抗体重链 $C_H1$ 区；一种免疫球蛋白分子，含有抗体重链 $C_H1$ 区和 $C_H2$ 区；一种免疫球蛋白分子，含有抗体重链 $C_H1$ 区、$C_H2$ 区和 $C_H3$ 区；或(ii)中任一亚类与抗体 $C_L$(κ或λ亚型)区的结合物。铰链区也可包含在内。这些区的结合物可以例如模拟自然抗体，如 IgG 或 IgM 或其片段如: Fv, scFv, Fab 或 $F(ab')_2$ 分子。本领域技术人员会理解该举例不是穷尽性的。

骨架和表位结合区之间的连接，正如这里定义的一样，可以在多肽水平获得，即在编码骨架和/或表位结合区的核苷酸表达之后。或者，连接步骤可以在核酸水平上进行。依照本发明连接蛋白骨架和一种或多种表位结合区的方法包括采用蛋白化学和/或分子生物学技术，这些方法在本领域是常规的并在本文有描述。

优选闭合构象的多特异性配体可包含能结合靶分子的第一区和能结合延长配体半衰期的分子或基团的第二区，例如，所述分子或基团可以是增容剂如: HSA 或细胞基质蛋白。正如这里应用的短语“延长配体半衰期的分子或基团”是指被本文描述的双特异性配体结合后，增加这些双特异性配体在动物体内应用时的体内半衰期的分子或基团。在下文中描述了能延长配体半衰期的分子和基团的例子。在一个优选实施方案中，闭合构象多特异性配体只有在半衰期增强分子或基团置换时才能结合靶分子，因此，例如，一个闭合构象多特异性配体可借助大分子如: HAS 使其在宿主血循

环中维持。当遇到靶分子时，闭合构象多特异性配体结合区之间竞争导致HSA 置换并结合靶。

本发明任一方面的配体，以及构建此抗体中所用的 dAb 单体优选它们能与其关联的靶(cognate target)解离，解离常数($K_d$)为 300nM-5pM(即，$3 \times 10^{-7}$-$5 \times 10^{-12}$M)，优选 50nM-20pM，或 5nM-200pM 或 1nM-100pM，$1 \times 10^{-7}$ M 或更小，$1x10^{-8}$ M 或更小，$1 \times 10^{-9}$ M 或更小，$1 \times 10^{-10}$ M 或以下，$1 \times 10^{-11}$ M 或以下；和/或 $K_{off}$ 率常数（$K_{off}$ rate contant）为 $5 \times 10^{-1}$ -$1 \times 10^{-7}S^{-1}$，优选 $1 \times 10^{-2}$ -$1 \times 10^{-6}S^{-1}$，或 $5 \times 10^{-3}$ -$1 \times 10^{-5}S^{-1}$，或 $5 \times 10^{-1}S^{-1}$ 或以下，或 $1 \times 10^{-2}S^{-1}$1 或以下，或 $1 \times 10^{-3}S^{-1}$ 或以下，或 $1 \times 10^{-4}S^{-1}$ 或以下，或 $1 \times 10^{-5}S^{-1}$ 或以下，或 $1 \times 10^{-6}S^{-1}$ 或以下，这通过表面等离子体共振(surface plasmon resonance)测定得出。解离常数($K_d$)定义为 $K_{off}/K_{on}$。

特别是本发明提供了一种抗 TNFα dAb 单体(或包含该 dAb 的双特异性配体)，同二聚体，异二聚体或同三聚体配体，在这里每个 dAb 结合 TNFα。配体与 TNFα 的结合解离常数(Kd)为 300nM-5pM(即：$3 \times 10^{-7}$ to $5 \times 10^{-12}$M)，优选 50nM-20pM,，更优选 5nM -200pM，并且更优选 1 nM-100pM；若以另一种方式表达，$K_d$ 为 $1 \times 10^{-7}$ M 或以下，优选 $1 \times 10^{-8}$ M 或以下，更优选 $1 \times 10^{-9}$ M 或以下，再优选 $1 \times 10^{-10}$ M 或以下，且更优选 $1 \times 10^{-11}$ M 或以下；和/或 $K_{off}$ 率常数为 $5 \times 10^{-1}$ -$1 \times 10^{-7}S^{-1}$，优选 $1 \times 10^{-2}$-$1 \times 10^{-6}S^{-1}$，更优选 $5 \times 10^{-3}$-$1 \times 10^{-5}S^{-1}$，例如$5 \times 10^{-1}S^{-1}$或以下，优选$1 \times 10^{-2}S^{-1}$1或以下，更优选 $1 \times 10^{-3}S^{-1}$ 或以下，更优选的是 $1 \times 10^{-4}S^{-1}$ 或以下，更优选的是 $1 \times 10^{-5}S^{-1}$ 或以下，最优选为 $1 \times 10^{-6}S^{-1}$ 或以下，由表面等离子体共振测定得出。

更适宜的是，采用标准 L929 分析得出配体中和 TNFα 的 ND50 为 500nM-50pM，优选 100nM-50pM，更优选 10nM-100pM，进一步优选 1nM-100pM ；例如：50nM 或以下，优选 5nM 或以下，500pM 或以下更有利，更优选 200pM 或以下，最优选 100pM 或以下。

更加适宜的是，配体抑制 TNFα 和 TNFαR I(p55 受体)的结合，IC50 为 500nM-50pM，优选 100nM-50pM，更优选 10nM-100pM，优选 1nM~100pM；例如：50nM 或以下，优选 5nM 或以下，更优选 500pM 或以下，200pM 或以下更有利，且最优选 100pM 或以下。优选的是 TNFα 是人 TNFα。

本发明进一步提供了一种抗 TNF 受体 I 的 dAb 单体；或包含这种 dAb

的双特异性配体，其与 TNF 受体 I 结合的 Kd 为 300nM-5pM(即，$3 \times 10^{-7}$-$5 \times 10^{-12}$M)，优选 50nM-20pM，更优选 5nM-200pM 且最优选为 1nM-100pM，例如：$1 \times 10^{-7}$ M 或以下，优选 $1 \times 10^{-8}$ M 或以下，更优选 $1 \times 10^{-9}$ M 或以下，再优选 $1 \times 10^{-10}$ M 或以下，且更优选 $1 \times 10^{-11}$ M 或以下；和/或 $K_{off}$ 率常数为 $5 \times 10^{-1}$-$1 \times 10^{-7}S^{-1}$，优选 $1 \times 10^{-2}$-$1 \times 10^{-6}S^{-1}$，更优选 $5 \times 10^{-3}$-$1 \times 10^{-5}S^{-1}$，例如 $5 \times 10^{-1}S^{-1}$ 或以下，优选 $1 \times 10^{-2}S^{-1}$1 或以下，更优选 $1 \times 10^{-3}S^{-1}$ 或以下，更优选的是 $1 \times 10^{-4}S^{-1}$ 或以下，更优选的是 $1 \times 10^{-5}S^{-1}$ 或以下，最优选为 $1 \times 10^{-6}S^{-1}$ 或以下，由表面等离子体共振测定得出。

优选的是，dAb 单体或配体中和 TNFα的标准实验(如，这里描述的 L929 或 HeLa 实验法)测得 ND50 为 500nM-50pM，优选 100nM-50pM，更优选 10nM-100pM，1nM-100pM 更有利；例如：50nM 或以下，优选 5nM 或以下，更优选 500pM 或以下，200pM 或以下更有利且最优选 100pM 或以下。

优选的是，dAb 单体或配体抑制 TNFα和 TNFαR I(p55 受体)的结合，IC50 为 500nM-50pM，优选 100nM-50pM，更优选 10nM -100pM，1nM-100pM 更有利；例如：50nM 或以下，优选 5nM 或以下，更优选 500pM 或以下，200pM 或以下更有利，且最优选 100pM 或以下。优选的是 TNF 受体 I 靶是人 TNFα。

更进一步，本发明提供了一种结合血清蛋白(SA)的 dAb 单体(或包含该 dAb 的双特异性配体)，解离常数(Kd)为 1nM-500μM(即，$1 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-4}$)，优选 100nM -10μM。优选的是，对于包括第一个抗-SA 的 dAb 和第二个抗另一靶的 dAb 的双特异性配体，第二 dAb 结合它的靶的亲和力(如：通过表面等离子体共振测得 Kd 和/或 Koff 值，例如采用 BiaCore)为第一 dAb 结合 SA 的亲和力的 1-100000 倍(优选 100-100000，更优选 1000-100000，或 10000-100000 倍)。例如，第一 dAb 结合 SA 的亲和力大约为 10μM，而第二 dAb 结合它的靶的亲和力为 100pM。优选的是，血清白蛋白为人血清白蛋白(HSA)。

在一个实施方案中，第一 dAb(或 dAb 单体)结合 SA(如，HSA)的 $K_d$ 值约为 50，优选 70，更优选 100，150 或 200nM。

本发明还提供了前述 dAb 单体的二聚体，三聚体和多聚体，这与本发明前述方面相一致。

依照本发明的含有 dAb 单体、二聚体和三聚体的配体可与抗体 Fc 区相连，Fc 区包括 CH2 和 CH3 区或其中之一，还可任选包含铰链区。例如，编码作为一种单核苷酸序列与 一个 Fc 区连接的配体的载体可用来制备这种多肽。

本发明第二构型另一方面，提供了一种或一种以上编码本文定义的至少一种多特异性配体的核苷酸分子。在一个实施方案中，配体是一种闭合构象配体。在另一个实施方案中配体是一种开放构象。多特异性配体可由单个核苷酸分子编码；或者，每个表位结合区可由独立的核苷酸分子编码。由单个核苷酸分子编码配体时，所述功能区可以表达为一种融合多肽，或者分开表达然后连在一起，例如采用化学连接剂。由独立的核苷酸分子编码的配体可通过适当的方式连在一起。

核苷酸可进一步编码信号序列，辅助表达的多肽从宿主细胞中输出，并且表达时可与丝状噬菌粒表面成分(或筛展示系统的其它成分)融合。可用于细菌表达和/或噬菌体或噬菌粒展示中的引导序列包括 pelB, stII, ompA, phoA, bla 和 pelA。

本发明第二构型的另一方面，提供了一种包含本发明核酸的载体。

本发明更进一步提供了一种转染有本发明载体的宿主细胞。

这种载体例如在噬菌体噬粒表面表达可产生用于筛选的肽结合区。因此，采用本发明的方法可选择所展示的功能区以及多特异性配体。

本发明第二构型的一个优选实施方案中，肽结合区是免疫球蛋白可变区并且从单个区域 V 基因库中选出。通常单个抗体的功能区的库是在丝状噬菌粒表面展示的。在优选实施方案中，每一单个抗体的功能区(domain)是通过噬菌体库与抗原结合的方式选出的。

本发明还提供了一种试剂盒，至少包括本发明中的一种多特异性配体，可以是开放构象配体或闭合构象配体。本发明试剂盒可以是例如：诊断试剂盒、治疗试剂盒或化学或生物种系(biological species)检测试剂盒等等。

本发明第二构型的另一方面，提供了一种利用本发明配体的均相免疫测定法(homogenous immunoassay)

本发明第二构型另一方面，提供了一种组合物，包含可通过本发明方法获得的闭合构象多特异性配体，和药物学上可应用的载体、稀释液或赋形剂。

此外，本发明提供了采用本发明中的闭合构象多特异性配体或其组合物治疗疾病的方法。

本发明一个优选实施方案中的疾病是癌症或炎症性疾病如：类风湿关节炎、哮喘或克罗恩氏病(Crohn's disease)。

本发明第二构型的另一方面，提供了一种诊断方法，包括采用本发明中的闭合构象多特异性配体或其组合物诊断疾病。因此，通常一种分析物(analyte)与闭合构象多特异性配体的结合可用作置换一种试剂，导致置换过程中信号产生。例如：分析物的结合(第二抗原)能置换与提供免疫测定基础的抗体分子结合的酶(第一抗原)，特别是通过活性位点与抗体结合的酶。

因此，本发明第二构型最后一方面提供了一种检测靶分子存在的方法，包括：(a)提供一种结合在一种试剂上的闭合构象多特异性配体，上述配体特异性针对所述靶分子和所述试剂，其中，结合在配体上的所述试剂从配体分离时导致一种可测信号的产生；(b)使闭合构象多特异性配体暴露于所述靶分子；并且(c)检测作为试剂置换结果所产生的信号。

根据本发明第二构型上述方面，优势在于，试剂是酶，该酶与闭合构象多特异性配体结合时无活性。或者，试剂可以是选自以下组中的一种或多种：酶底物、荧光分子、发光分子或发色分子，其与配体结合时无活性或淬灭。

与这里公开的序列类似或同源(如，至少约 70%序列一致)的序列也是发明的一部分。在某些实施方案中，在氨基酸水平上，序列一致性可能约为 80%、85%、90%、91%、92%,、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高。核苷酸水平上的序列一致可能约为 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%和 99% 或更高。或者，当核酸片段在选择杂交条件下(如：极严格杂交条件下)与其互补链杂交时，存在实质性一致(substantial identity)。核酸可存在于整个细胞或细胞裂解物中，或以部分纯化或充分纯化形式存在。

两个序列的同源性或序列一致性(此处术语可交替使用)的计算按下法进行。为了最佳比较目的，对序列进行排列(如：为了最佳排列，可在第一和/或第二个氨基酸或核酸序列中引入间隔缺口)。在一个优选实施方案中，用于比较目的的所比对的参考序列的长度为至少 30%，优选至少 40%，更优选至少 50%，甚至更优选至少 60%，并且甚至更优选至少 70%、80%、

90%、100% 的参考序列的长度。然后，比较相应氨基酸位置或核酸序列位置上的氨基酸残基或核酸残基。当第一序列中一个位置被第二序列相应位置上的相同氨基酸残基或核苷占据时，那么所述分子在这个位置上是相同的。(此处使用的氨基酸或核酸“同源”等于氨基酸或核酸“一致”)。两个序列一致的百分比是所述序列共有相同位置的数目的函数，考虑间隔缺口数目和每个间隔缺口的长度，间隔缺口的引入是两个序列达到最佳排列所需。

有利的是，有默认值参数的 BLAST 运算法则(version 2.0)可用来排列序列。在美国国立(“.gov”)卫生研究院(“NIH”)的生物技术信息中心(“.NCBI”)网址(“www”)中详细叙述 BLAST 运算法则，在“/Blast/”地址录中的“blast help. html”文件中。搜索参数定义如下，并且方便地设置了定义的默认值。

BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)启发式搜索法则，被 blastp、blastn、blastx、tblastn 和 tblastx 等程序所应用；这些程序的重要意义归因于 Karlin 和 Altschul 于 1990 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6): 2264-8 中发现和应用的标准方法，(参见上述“blast help. html”文件)，有少数改进。BLAST 程序经改造用于序列一致性搜索，例如：确定可疑序列同源性。该程序通常不适用于基序－模式搜索。有关一致性搜索序列数据库中基本问题参见 Altschul 等(1994)。

在 NCBT 网址中可以找到 5 种 BLAST 程序，它们执行以下任务：

“blastp”将氨基酸未知序列与蛋白序列数据库比较；

“blastn”将核苷酸未知序列与核苷酸序列数据库比较；

“blastx”将核苷酸未知序列(双链)六读框(six-frame)的推测翻译产物与蛋白序列数据库比较；

“tblastn”将蛋白未知序列与核苷序列数据库的动态六阅读框(双链)的翻译比较；

“tblastx”将核苷未知序列六读框翻译产物与核苷序列数据库的六读框翻译产物比较。

BLAST 采用以下搜索参数：

HISTOGRAM 显示每次搜索得分的柱状图；默认值是“yes”(见 BLAST 菜单中参数 H)。

DESCRIPTIONS 限定所报告指定数目的匹配序列简短描述的数目；

默认值是 100。

(见菜单页参数 V)也可参照 EXPECT 和 CUTOFF。

ALIGNMENTS 限制指定数目数据库序列以便报告高分值片段对(HSPs); 默认值是 50。如果大于此值的数据库序列偶然符合报告的统计学显著性差异阈值(见以下 EXPECT 和 CUTOFF), 那么只有最大统计学差异的匹配才被报告。(见 BLAST 菜单中参数 B)。

EXPECT 显著性差异用来报告与数据库序列的匹配; 默认值是 10, 这样根据 Karlin and Altschul(1990)的随机样本 10 个匹配只能被偶然发现。如果一个 的显著性差异大于 EXPECT 阈值, 匹配将不被报告。EXPECT 下限阈值十分严格, 导致报告匹配的机会较少。分数值也可接受。(见 BLAST 菜单中参数 E)。

CUTOFF Cutoff 分值报告高分值片段对。默认值可从 EXPECT 值中计算出(见上)。只有在 HSPs 的统计学显著性差异至少与等于 CUTOFF 值的单个 HSP 显著性差异一样高时, HSPs 用作数据库序列报告。CUTOFF 值上限十分严格, 导致报告匹配的机会较少。(见 BLAST 菜单中参数 S)。通常采用 EXPECT, 显著性阈值可以被更直观地控制。

MATRIX 详细说明 BLASTP、BLASTX、TBLASTN 和 TBLASTX 的可选择的分分值矩阵。默认值是 BLOSUM62(Henikoff & Henikoff, 1992, Proc. Natl. Aacad. Sci. USA 89(22): 10915-9)。有效备选包括: PAM40、PAM120、PAM250 和 IDENTITY。非变量分值矩阵可用于 BLASTN; 详细说明 BLASTN 请求中 MATRIX 指示回复误差反应。

STRAND 限定 TBLASTN 搜索, 调节数据库上下线; 或限制 BLASTN、BLASTX 或 TBLASTX 搜索, 未知序列上下线的阅读框。

FILTER 屏蔽结构简单的未知序列, 如: Wootton & Federhen(1993)Computers and Chemistry 17: 149-163 中 SEG 程序测定的序列; 或屏蔽内部的短周期重复子, 如: Claverie & States, 1993, Computers and Chemistry 17: 191-201 中 XNU 程序测定的重复子, 或者, 用在 Tatusov 和 Lipman(见 NCBI 网址)DUST 程序中的 BLASTN。过滤能去除波输出中的有显著性差异但无生物学意义的报告(例如, 普通的酸、碱或富含脯氨酸区的发现), 剩余未知序列中有生物学意义的区域可用作与数据库特异性匹配。

由滤过程序发现的低复杂性序列, 在核苷序列中用字母 “N” (如: N

重复 13 次)取代和在蛋白序列中用字母“X”(如：X 重复 9 次)取代。

滤过只用于未知序列(或其翻译产物)，不用于数据库序列。BLASTN 中默认滤过是 DUST，其它程序默认滤过是 SEG。通常根本无可被 SEG 和 XNU 中一个或二者所屏蔽的，当应用在 SWISS-PROT 中的序列时，所以滤过通常不会产生效果。此外，在某些情况下，序列被完全屏蔽，表明所报告的对未滤过的未知序列的任何匹配是不可信的。

NCBI-gi 使 NCBI gi 标式符显示在输出中，其中还包括进入和/或定位名称(the accession and/or locus name)。

最优选的是序列的比较是采用 BLAST 搜索简单算法进行的，在上述 NCBI 网址中“/BLAST”目录描述。

## 附图简述

图 1: 显示在 $V_H$/HAS 的多样性，分布于 $V_H$/HAS 抗原结合部位中 H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H96、H97、H98(分别编码的 DVT 或 NNK)位点上。V κ 序列在 L50 和 L53 位点上有多样性。

图 2: 显示以噬菌体展示/ ScFv 形式存在的:

库 1 V κ /DVT$V_H$ 种系;

库 2 V κ /NNK$V_H$ 种系;

库 3 $V_H$/DVT V κ 种系;

库 4 $V_H$/NNKV κ 种系;

这些库是通过与属类配体(generic ligand)蛋白 A 和蛋白 L 结合后预先筛选的，所以绝大多数克隆和筛选库都是功能性的。这些库通过 HSA(第一轮)和 β -gal(第二轮)或 HSA β -gal 选择过程或通过 β -gal(第一轮)和 HSA(第二轮) β -gal HSA 选择过程选择的。来自这些 PCR 克隆的可溶性 scFv 序列被扩增。选择编码双特异性抗体 K8 的一个克隆以备下一步工作。

图 3: 显示 $V_H$ 链和 V κ 链的对比。

图 4: 显示 K8 抗体结合特性的描述，通过单克隆噬菌体 ELISA 法定性的 K8 抗体的结合特性，双特异性 K8 抗体因能与 HSA 和 β -gal 结合并能在噬菌体表面展示，吸收信号大于 1。未测出其它蛋白的交叉反应。

图 5: 显示用已知浓度的 K8 抗体片段进行的可溶性 scFv ELISA。用浓度为 10μg/ml 的 100μg 的 HSA、BSA 和浓度为 1μg/ml 的 100μg 的 Protein

A 包被 96 孔板。应用 50μg 的 K8 scFv 连续稀释液，并且用 Protein L-HRP 检测所结合的抗体片段。ELISA 结果证实 K8 抗体的双特异性本质。

图 6：显示采用可溶性 scFv ELISA 分析 K8 Vκ/ 模拟 $V_H$ 克隆的结合特性。如 Harrison 等, Methods Enzymol. 1996; 267: 83-109 描述的经 IPTG 诱导产生的产物可溶性 scFv 片段，直接测定上清中 scFv 的含量。可溶性 scFv ELISA 分析的操作如实施例 1 描述，结合的 scFvs 用 Protein L-HRP 检测。ELISA 结果表明该克隆仍能结合 β-gal 而不能结合 BSA。

图 7：显示可变区载体 1 和载体 2 的序列。

图 8：是用于构建 $V_{H1}/V_{H2}$ 多特异性配体的 $C_H$ 载体图。

图 9：是用于构建 $V\kappa_1/V\kappa_2$ 多特异性配体的 Vκ 载体图。

图 10：TNF 受体分析比较 TAR1-5 二聚体 4、TAR1-5-19 二聚体 4 和 TAR1-5-19 单体。

图 11：TNF 受体分析比较 TAR1-5 二聚体 1-6。所有二聚体经过 FPLC 纯化，并显示了最佳二聚物的种类。

图 12：不同形式的 TAR1-5 19 同型二聚体的 TNF 受体分析：带有 3U、5U 或 7U 连接子的 dAb-连接子-dAb 形式，Fab 形式和半胱氨酸铰链连接子形式。

图 13：库 1 中模拟(dummy)$V_H$ 序列。$V_H$ 框架序列基于 DP47-JH4b 种系序列。库 1 中并入了随机化(randomisation)的 NNK(N=A 或 T 或 C 或 G 核苷酸; K = G 或 T 核苷酸)用粗体下划线标出。

图 14：库 2 中模拟 $V_H$ 序列。$V_H$ 框架序列基于 DP47-JH4b 种系序列。库 2 中并入了随机化的 NNK(N=A 或 T 或 C 或 G 核苷酸; K = G 或 T 核苷酸)用粗体下划线标出。

图 15: 库 3 中模拟 Vκ 序列。Vκ 框架序列基于 DPκ9-Jκ1 种系序列。库 3 中并入随机化的 NNK(N=A 或 T 或 C 或 G 核苷酸; K = G 或 T 核苷酸)用粗体下划线标出。

图 16：抗 MSA dAb MSA 16 和 MSA26 的核苷酸和氨基酸序列。

图 17：MSA 16 和 MSA 26 抑制性生物大分子互相作用分析仪(biacore)检测。采用抑制性生物大分子互相作用分析仪方法测定纯化的 dAb MSA16 和 MSA26 的 $K_d$ 值。简言之，检测能在包被高浓度 MSA 的生物大分子互相作用分析仪 CM5 芯片上获得 200RUs 反应所需 dAb 的浓度。一旦所需 dAb

浓度确定，将浓度在预期Kd值左右的MSA抗原与dAb预先混合并孵育过夜。然后，在30μl/分的高流速(flow-rate)测定dAb与包被biacore芯片的MSA的结合。

图18：注射后MSA16血清水平。测定小鼠体内dAb MSA16的血清半衰期。给CD1小鼠一次静脉注射MSA16，剂量大约为1.5mg/kg。2区室模型(2 compartment model)显示 MSA16的 tl/2α为0.98hr，t l/2β为36.5hr，AUC为913hr. mg/ml。与HEL4(抗鸡卵白溶菌酶 dAb)相比，MSA16具有相对延长的半衰期，HEL4的tl/2α为0.06hr 和t l/2β为0.34hr。

图19: ELISA(a)和TNF受体分析(c)显示TNF与一个含有MSA26Ck 和TAR1-5-19CH的 Fab 样片段的结合抑制。含有Fab样片段的MSA的添加能降低抑制水平。用双特异性 $V_K C_H$ 和 $V_K C_K$ Fab 样片段探查包被有lug/ml TNFa 的ELISA 板，同时用TNFa 结合dAb作对照，其浓度根据ELISA中能产生相同信号的浓度来计算。双特异性抗体和对照抗体用来探查有/无2mg/ml MSA的ELISA板。双特异孔中的信号减少超过50%，而dAb孔中信号丝毫未降低(图 19a)。相同的双特异性蛋白也用于有/无MSA的受体分析中，MSA的竞争也在图中显示(见图 19c)。这表明MSA和双特异性分子的结合可被与TNFa结合所竞争。

图20：TNF受体分析显示TNF结合TAR1-5-19 dAb和 MSA16 dAb经二硫键连成的异质二聚体的抑制。带有二聚体的MSA的增加能以剂量依赖方式降低抑制水平。TNF受体分析(图 19(b))操作中，采用恒定浓度(18nM)的异质二聚体和一系列稀释浓度的MSA和HSA。浓度范围高达2 mg/ml 的HSA不能使二聚体抑制TNFa 的能力降低。然后，MSA的增加以剂量依赖方式引起二聚体抑制 TNFa 的能力降低。(图 19a)。这表明MSA 和 TNFa竞争结合cys连接的TARl-5-19, MSA16二聚体。分析中MSA和HSA 单独无影响TNF结合水平的作用。

## 发明详述

### 定义

**互补的**(Complementary)：当两个免疫球蛋白功能区属于组成同源对或组的结构家族或者它们来自这些家族并保留其特性时，那么这两个免疫球蛋白区是“互补的”。例如，抗体的 $V_H$ 区和 $V_L$ 区是互补的，两个 $V_H$ 区不

是互补的，两个 $V_L$ 区不是互补的。互补区也可在免疫球蛋白超家族其它成员中发现，如：T 细胞受体的 Va 和 Vβ(或γ和δ)区。本发明第二构型的上下文中，非互补区不能共同作用结合一个靶分子，但能独立地作用于相同或不同分子上的不同靶表位。人工合成区如：不能结合表位的基于蛋白支架的区域，是不互补的，除非设计其能结合表位。同样，(例如)基于免疫球蛋白区和纤连蛋白区的两个区域不是互补的。

**免疫球蛋白**：指保留抗体分子的免疫球蛋白折叠特性的多肽家族，通常包括两个β片层和一个保守的二硫键。免疫球蛋白超家族成员之间参与体内细胞和非细胞相互作用的多个方面，包括在免疫系统的广泛作用(例如，抗体、T 细胞受体分子及类似物)，参与细胞粘附(如：ICAM 分子)和细胞内信号(例如：受体分子，如 PDGF 受体)。本发明适用于所有具有结合区的免疫球蛋白超家族分子。优选的是本发明涉及抗体。

**结合(combining)**：本发明中结合的可变区组成一系列组合区域；例如：互补区可以结合如 $V_L$ 区和 $V_H$ 区可以结合。非互补区也可结合。所述区域可通过多种方式结合，包括通过共价和非共价方式连接。

**功能区**(区，区域（domain）)：功能区是一种折叠蛋白结构，不依赖于蛋白的其它部分而保持其三级结构。通常，功能区具有蛋白的部分功能特性，并且在很多情况下，所述功能区可被添加、去除或转移给其它蛋白而不降低蛋白和/或区域剩余部分的功能。单个抗体可变区是指包含抗体可变区序列特征的一个折叠多肽区域。因此，它包括完全抗体可变区和经修饰的可变区，例如，其中一个或多个环被不具有抗体可变区特征的序列取代的可变区，或者被删减的抗体可变区或包含 N-或 C 末端延伸的抗体可变区，以及保留全长区域至少部分活性和特异性的可变区折叠片段。

**库**(Repertoire)：不同变异体的集合。例如，初级序列(primary sequence)不同的多肽变异体。本发明中应用的库包含至少 1000 个成员的多肽集合。

**文库**(Library)：术语“文库”指异源多肽或核酸的混合物。文库由多个成员组成，每个成员具有单一多肽或核酸序列。在这层意义上，文库和库相同。文库的成员中序列之间的不同是文库中多样性的成因。文库可以是一种简单的多肽或核酸混合物形式，或者可以是被核酸文库转化的生物或细胞形式，例如：细菌、病毒、动物或植物细胞及其类似物。优选的是，每个微生物或细胞单体包含只一个或有限数目的文库成员。有利的是，核酸

整合入表达载体中，以便表达核酸编码的多肽。因此，在一个优选方面，文库可以是宿主生物群的形式，每一生物包含表达载体的一个或多个拷贝，载体包含核酸文库单一成员，从所述核酸能表达产生相应的多肽成员。这样，宿主生物群具有编码遗传多样性多肽变异体大库的潜能。

**闭合构象多特异性配体(closed conformation multi-specific ligand)**：描述一种多特异性配体，这里定义的配体包含至少两个这里定义的表位结合区。术语闭合构象(多特异性配体)是指配体表位结合区的排列使得一个表位结合区的表位结合竞争另一个表位结合区的表位结合。即：同类表位可被每个表位结合区单独而非同时结合。闭合构象配体可用本文描述的方法制备。

**抗体**：抗体(如：IgG、IgM、IgA、IgD 或 IgE)或片段(如：Fab、$F(ab')_2$、Fv、二硫键连接的 Fv、scFv、闭合构象多特异性抗体、二硫键连接的 scFv，双抗体)不管是来自自然产生抗体的任何种系或通过重组 DNA 技术产生，或者从血清、B 细胞、杂交瘤、转染体、酵母或细菌中分离得来)。

**双特异性配体**：这里定义的配体包含第一免疫球蛋白单个可变区和第二免疫球蛋白单个可变区，在这里可变区能结合两个不同抗原或同一抗原上的两个表位，所述抗原或表位通常不被单特异性免疫球蛋白结合。例如，两个表位可存在于同一半抗原上，但不是相同表位或充分接近而被单特异性免疫球蛋白结合。本发明双特异性配体由不同特异性的可变区组成，并且不包括具有相同特异性的彼此互补的可变区对。

**抗原**：一种被本发明配体结合的分子。通常抗原被抗体配体结合并且能提高体内抗体反应。它可以是多肽、蛋白、核酸或其它分子。一般来说，本发明中的双特异性配体是通过针对特定抗原的靶特异性而选出的。对于常规抗体和其片段，由可变区环(L1, L2, L3 和 H1, H2, H3)定义的抗体结合位点能结合抗原。

**表位**：常规被免疫球蛋白 $V_H/V_L$ 对结合的结构单位。表位定义抗体的最小结合位点，因此代表抗体的特异性靶。针对单区抗体来说，表位代表被可变区独立结合的结构单位。

**属类配体**(Generic ligand)：结合库中所有成员的配体。通常，不通过上述抗原结合位点结合。非限制性例子包括蛋白 A、蛋白 L 和蛋白 G。

**选择**：通过筛选或达尔文选择方法衍化而来，在选择过程中，结合作

用发生在区与抗原或表位之间或者抗体与抗原或表位之间。因此，第一可变区的选择是通过结合抗原或表位选择的，互补可变区可有可无。

**通用框架**(Universal framework)：对应于序列保守抗体区域的单个抗体框架序列如 Kabat 所定义的。(“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, US Department of Health and Human Services)或对应于人胚系免疫球蛋白库或结构，如 Chothia and Lesk,(1987)J. Mol. Biol. 196: 910-917 所定义的。本发明提供了单个框架的用途或一系列这样的框架，发现通过高变区单独变异可引起实质上任何结合特异性的衍生。

**半衰期**：配体体内血清浓度降低到 50%所需时间，例如，由于配体降解和/或通过自然机制引起的配体清除或隔离。本发明配体在体内能被稳定化，而且通过结合能抵抗降解和/或清除或隔离的分子而延长其半衰期。通常这些分子是天然蛋白，它们本身具有较长的体内半衰期。如果配体在体内的功能活性持续的时间比无半衰期增加分子特异性的类似配体延长，那么该配体的半衰期即得到了延长。因此，比较针对 HSA 和靶分子的特异性配体和不存在 HSA 特异性的类似配体，后者不结合 HSA 但结合另一分子。例如，它可以结合靶分子的第二表位。通常，半衰期可增加 10%、20%、30%、40%、50%或更多。增加的范围可能是所述半衰期的 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍或以上。或者或此外，增加的范围可能是所述半衰期的 30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍、150 倍。

**均相免疫分析**(Homogeneous immunoassay)：一种免疫分析方法，分析物的检测不需要分离结合和非结合试剂。

**基本相同**(或基本同源)(substantially identical)：第一个氨基酸或核苷酸序列与第二个氨基酸或核苷酸序列含有足够数目的相同或相等(如具有相同侧链，氨基酸置换保守)的氨基酸残基和核苷酸，因此，第一和第二氨基酸或核苷酸序列具有相同活性。对于抗体来说，第二抗体有相同结合特异性并且至少有 50%的相同亲和力。

这里用的术语“低严格度”、“中等严格度”、“高严格度” 或“非常高严格度”描述核酸杂交和冲洗的条件。杂交反应操作指南见于 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y.(1989), 6.3. 1-6.3. 6, 在这里全部引入作参考。水法和非水法在文献中都有描述，两法兼可用。

这里涉及的特异杂交条件如下所述：(1)低严格度杂交条件是在约 45℃的 6 × 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中孵育，接着用至少 50℃的 0.2 × SSC 和 0.1% SDS 洗涤两次(低严格度条件洗涤温度可升至 55℃)。(2)中等严格度杂交条件是在约 45℃的 6 × SSC 中孵育，接着 60℃用 0.2 × SSC 和 0.1% SDS 洗涤一次或一次以上；(3)高严格度杂交条件是在约 45℃的 6 × SSC 中孵育，接着 65℃用 0.2 × SSC 和 0.1% SDS 洗涤一次或多次；优选的(4)非常高严格度杂交条件是在 65℃0.5M 磷酸钠和 7% SDS 中孵育，接着在 65℃用 0.2 × SSC 和 1% SDS 洗涤一次或多次。非常高严格度条件(4)是优选条件，是无其它指定方法时应采用的条件。

**发明详述**

所有这里应用的科技术语除非定义为其它的，通常与本领域(例如，细胞培养、分子遗传学、核酸化学、杂交技术和生物化学)一般技术人员常规理解的意思相同。应用于分子、遗传和生化方法的标准技术通常参见 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 和 Ausubel 等, Short Protocols in Molecular Biology 第四版(1999), John Wiley & Sons, Inc. 均为这里所引参考文献。

**基于免疫球蛋白的多特异性配体的制备**

本发明的双特异性配体无论是根据发明预想构型中的开放式或闭合式构象均可以根据以前建立应用于抗体工程中的技术而制备。如制备 scFv、噬菌体抗体和其它工程抗体分子。抗体特别是双特异性抗体的制备技术实例在下列综述和引用文献中描述：.Winter & Milstein,(1991)Nature 349: 293-299; Plueckthun(1992)Immunological Reviews 130: 151-188; Wright etal.,(1992)Crti. Rev. Immunol. 12 : 125-168; Holliger, P. & Winter, G.(1993)Curr. Op. Biotechn. 4, 446-449 ; Carter, etal.(1995)J. Hematother. 4, 463-470; Chester, K. A. & Hawkins, R. E.(1995)Trends Biotechn. 13, 294-300 ; Hoogenboom, H. R.(1997)Nature Biotechnol. 15, 125-126 ; Fearon, D.(1997)Nature Biotechnol. 15, 618-619 ; Pliickthun, A. & Pack, P.(1997)Immunotechnology 3, 83-105 ; Carter, P. & Merchant, A. M.(1997)Curr. Opin. Biotechnol. 8, 449-454 ; Holliger, P. & Winter, G.(1997)Cancer

Immunol.Immunother. 45, 128-130。

本发明提供了针对两个不同抗原或表位的可变区的选择以及这些可变区的后续组合。

选择可变区的技术采用本领域中众所周知的库和筛选程序。自然库(Marks et al.(1991)J. Mol.Biol., 222: 581; Vaughan etal.(1996)Nature Biotech., 14: 309)是从人B细胞中获得的重排V基因，这是本领域技术人员所熟知的。合成库(Hoogenboom & Winter(1992)J. Mol. Biol., 227: 381; Barbas et al.(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457; Nissim et al.(1994)EMBO J., 13: 692; Griffiths etal.(1994)EMBOJ, 13: 3245; De Kruif et al.(1995)J. Mol.Biol., 248: 97)是通过克隆免疫球蛋白V基因制备的，通常采用PCR法。PCR中的误差能导致高度随机性。$V_H$ 和/或 $V_L$ 库可以针对靶抗原或表位分别或一起选择，在前一种情况下，单区结合直接选择。

根据本发明中制备双特异性配体的优选方法包括应用一种选择系统，在这个系统中，一个可变区库是通过结合第一抗原或表位而选择的，一个可变区库是通过结合第二抗原或表位而选择的。然后，选择出的可变的第一和第二可变区结合在一起，并且选择出能同时结合第一和第二抗原或表位的双特异性配体。闭合构象配体的选择是根据能分别而不是同时结合第一和第二抗原或表位选择出的。

**A. 文库载体系统**

技术上已知的多种选择系统适用于本发明。下面举例描述这些系统。

λ噬菌体表达系统可作为噬菌体斑或溶源性克隆直接筛选，二者先前已述。(Huse etal.(1989)Science, 246: 1275; Caton and Koprowski(1990)Proc. Natl. Acad. Sci.US. A., 87; Mullinax etal.(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87: 8095; Persson etal.(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88: 2432)并在本发明中应用。同时这些表达系统能用以筛选高达$10^6$种不同的库成员，它们不适用于大量成员(大于$10^6$成员)的筛选。

文库构建的特殊用途是展示系统的筛选，展示系统能使核酸连接到它所表达的多肽中。正如本文应用的一样，筛选展示系统是采用适当展示方法通过结合通用和/或靶配体筛选文库中的独立成员的系统。

技术上已知分离大文库中目的成员的筛选程序，噬菌体展示技术可作为代表。在这些系统中不同肽序列展示在丝状噬菌体表面上。已证明这些

系统在制造抗体片段库中(以及编码它们的核苷酸序列)(Scott 和 Smith(1990)Science, 249: 386)和体外筛选和扩增结合靶抗原的特异性抗体片段中是有用的(McCafferty et al., WO 92/01047)是有用的。编码 $V_H$ 和 $V_L$ 区的核苷酸序列连接在编码引导信号的基因片段上，引导信号指导 $V_H$ 和 $V_L$ 区到达大肠杆菌周质空间，结果合成的抗体片段展示在噬菌体表位，典型例子是与噬菌体表面蛋白(如, pIII 或 pVIII)的融合物。或者，抗体片段可向外展示在λ噬菌体衣壳上(phagebodies)。基于噬菌体的展示系统优点是选择的库成员能通过简单的在细菌细胞中扩增包含所选库成员的噬菌体而扩增，因为它们是生物系统。此外，由于编码多肽库成员的核酸序列包含在噬菌体或噬粒载体中，测序、表达和后序的基因操作是相当直接简单的。

构建噬菌体抗体展示文库和λ噬菌体表达文库的方法已在技术上熟知(McCafferty et al.(1990)Nature, 348: 552; Kang et al.(1991)Broc. Natl. Acad. Sci. U. S.A., 88: 4363; Clackson et al.(1991)Nature, 352: 624;Lowman et al.(1991)Biochemistry, 30: 10832; Burton et al.(1991)Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A., 88: 10134; Hoogenboom et al.(1991)Nucleic Acids Res., 19: 4133; Chang et al.(1991)J. Immunol., 147: 3610; Breitling et al.(1991)Gene, 104: 147; Marks etal.(1991)supra; Barbas et al.(1992)supra; Hawkins and Winter(1992)J. Immunol., 22: 867; Marks et al., 1992, J.Biol. Chem., 267: 16007; Lerner et al.(1992)Science, 258:1313, 纳入本文作参考)。

一个特殊优势方法是 scFv 噬菌体文库的应用(Huston etal., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A., 85: 5879-5883; Chaudhary etal.(1990)Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A., 87: 1066-1070; McCafferty et al.(1990)supra; Clackson et al.(1991)Nature, 352: 624; Marks etal.(1991)J. Mol. Biol., 222: 581; Chiswell etal.(1992)Trends Biotech., 10: 80; Marks et al.(1992)J. Biol. Chem., 267)。展示在噬菌体衣壳蛋白上的 scFv 文库的多种实施方案已描述过。已知噬菌体展示方法的精确细节，正如在 W096/06213 和 W092/01047(Medical Research Council et al.)和 W097/08320(Morphosys)描述的一样，这些均引入本文作参考。

产生多肽文库的其它系统包括在体外合成库成员的无细胞酶设备。一个方法中，通过针对靶配体的不同轮的筛选和 PCR 扩增筛选 RNA 分子(Tuerk and Gold(1990)Science, 249: 505; Ellington and Szostak(1990)Nature,

346: 818)。同样方法可以用于鉴定结合预定人转录因子的 DNA 序列(Thiesen and Bach(1990)Nucleic Acids Res., 18: 3203; Beaudry and Joyce(1992)Science, 257: 635; W092/05258 andW092/14843)。同样，体外翻译能用于合成多肽，可作为一种产生大文库的方法。通常包含稳定的多核糖体复合体的方法在 W088/08453, W090/05785, W090/07003, W091/02076, W091/05058, 和 W092/02536 中进一步描述。其它非噬菌体展示系统如：在 W095/22625 和 W095/11922(Affymax)公开的方法是采用多核糖体展示多肽用于筛选。

又一种技术包括在人造区室中筛选库，使基因与其产物连接，如一种筛选系统中编码目的基因产物的核酸可以在油包水乳剂组成的微囊中筛选，这在 W099/02671, WO00/40712 和 Tawfik & Griffiths(1998)Nature Biotechnol 16(7), 652-6 中描述。编码具有目的活性的基因产物的基因元件定位于微囊中，然后在微囊中转录和/或翻译成它们相应的基因产物(RNA 或蛋白)。然后将产生具有目的活性基因产物的基因元件进行分选。该法通过多种手段检测目的活性而选择感兴趣的基因产物。

**B. 文库的构建**

目的选择库的构建可采用本领域已知的技术，例如上述方法或通过商业渠道购买。例如本发明应用的库在例如 W099/20749 中被描述。一旦选择了载体系统，那么一种或多种编码感兴趣多肽的核苷酸序列克隆入该载体中，通过表达前突变可产生克隆分子中的多样性；或者，如上所述，在突变和其它选择循环发生之前，编码蛋白可以表达和选择。编码结构上优化的多肽的核苷酸序列的突变是通过标准分子方法进行的。典型用法是聚合酶链反应或 PCR,(Mullis and Faloona(1987)Methods Enzymol., 155: 335, 本文引用作参考) PCR 是技术上熟知的方法，是通过采用一种热稳定性 DNA 依赖的 DNA 聚合酶催化 DNA 复制的多个循环来扩增感兴趣的靶序列。多种抗体库的构建已在 Winter 等，(1994)Ann. Rev. Immunology 12, 433-55 以及所引用文献中讨论过。

PCR 过程采用 DNA 模板(至少 1fg ;较常用 1-1000 ng)和至少 25 pmol 的寡核苷酸引物；当引物组严重异质时，使用大量引物可能是有利的，因为每个序列只代表所述组的分子中的一小部分，并且在较后的扩增循环中引物的量变得有限。典型的反应混合物包括：2μl DNA、25 pmol 的寡核苷酸引物、2.5μl 的 10X PCR 缓冲液 1(Perkin-Elmer, Foster City, CA)、0.4μl 的

1. 25 μMdNTP, 0.15μl(或 2.5 单位)的 Taq DNA 聚合酶(Perkin Elmer, Foster City, CA)和去离子水，总体积为 25μl。用矿物油覆盖反应体系，用程序化热循环仪进行 PCR。PCR 循环的每一步的长度和温度以及循环数可根据效果需要严格调节。退火温度和时间均根据引物退火至模板的效率和能允许的错配度来决定的。显然，当核苷酸分子同时扩增和突变时，错配至少在合成的第一循环是必需的。优化引物退火条件的严格度是本领域普通技术人员具备的能力。采用的退火温度在 30℃-72℃。模板分子最初变性是在 92℃-99℃之间变性 4 分钟，接着发生 20-40 个循环，包括：变性(94℃-99℃，15 秒—1 分钟)、退火(根据上述讨论决定的温度，1-2 分钟)、延伸(72℃，1-5 分钟，根据扩增产物的长度)。最后延伸通常是 72℃、4 分钟，且可以接着一个不限定的步骤(0-24 小时，4℃)。

**C. 单个可变区的结合**

本发明所用的区，一旦被选出就可以通过技术中已知的多种方法，包括共价和非共价方法连接起来。

优选方法包括使用多肽连接子，正如在 scFv 分子中所描述过的(Bird 等.,(1988)Science 242: 423-426)。适用的连接子的讨论在 Bird et al. Science 242, 423-426 ; Hudson et al, Journal Immunol Methods 231(1999)177-189; Hudson etal, Proc Nat Acad Sci USA 85, 5879- 5883 中提供。连接子最好是能变形的、允许两个单一区域相互作用。一个连接子例子是$(Gly_4Ser)n$ 连接子，其中 n=l—8，如 2、3、4、5 或 7。在双抗体中应用的连接子虽柔韧性较差也可以应用。(Holliger 等,(1993)PNAS(USA)90: 6444-6448)。

在一个实施方案中，所用连接子不是免疫球蛋白铰链区。

可变区也可用连接子以外的方法结合，例如，二硫键的使用，通过自然发生或设计的半胱氨酸残基可以开发稳定的 $V_H$-$V_H$、$V_L$-$V_L$ 或 $V_H$-$V_L$ 二聚体(Reiter 等,(1994)Protein Eng. 7: 697-704)或通过重新改造可变区之间相互作用以促进吻合和作用的稳定(Ridgeway 等.,(1996)Protein Eng. 7: 617-621; Zhu 等.,(1997)Protein Science 6: 781-788)。

其它连接或稳定免疫球蛋白可变区特别是抗体 $V_H$ 区的方法也可以适当应用。

根据本发明，双特异性配体可能是溶液中的闭合构象。闭合构象是两个区(如 $V_H$ 和 $V_L$)以结合形式存在，如结合的 $V_H$-$V_L$ 对组合成抗体结合位

点。例如，scFv 可以呈现闭合构象，取决于连接 $V_H$ 区和 $V_L$ 区连接子的排列。如果连接子足以柔韧，允许区域间结合或严格将区域固定在结合部位，所述区域有可能呈现闭合构象。

同样，$V_H$ 区对和 $V_L$ 区对也可以闭合构象存在。通常，这将是区域闭合结合的一种功能，如由配体分子中的刚性连接子连接的结合。闭合构象配体不能既结合配体半衰期增加分子又结合第二靶分子。因此，配体通常只结合与配体半衰期增加分子分离的第二靶分子。

此外，无连接子的 $V_H/V_H$、$V_L/V_L$ 或 $V_H/V_L$ 二聚体的构建提供了区域之间的竞争。

此外，本发明中配体可以是开放式构象。这种构象的配体将能同时结合配体半衰期增加分子和第二靶分子。代表性地，开放式构象的可变区(就 $V_H$-$V_L$ 对而言)保持足够远的距离以便区域之间不能相互作用，不能组成一个抗体结合位点，并且不竞争结合各自的表位。就 $V_H/V_H$ 或 $V_L/V_L$ 二聚体而言，区域未被刚性连接子连在一起。自然情况下，这些区域对将不竞争结合抗原也不组成抗体结合位点。

虽然可以理解的是开放和闭合式双特异性配体很可能在不同情况下以均衡多样性存在，Fab 片段和整个抗体将主要以闭合构象存在。配体与靶的结合有可能将所述平衡向开放式构象转换。因此，本发明的某些配体在溶液中能以两种构象存在，其中之一(开放形式)能独立地结合两个抗原或表位，而另一种构型(闭合构象)只能结合一个抗原或表位；因此，抗原或表位竞争结合这种构型的配体。

虽然双特异性配体的开放构象在溶液中可与闭合构象平衡存在，可以设想的是平衡趋向于闭合构象；然而，通过靶位结合，开放构象能隐变为闭合构象。因此，优选的是本发明的某些双特异性配体是呈现两种构象(开放和闭合)共存的平衡形式存在。

本发明的双特异性配体可以改进以便有利于开放式构象或闭合式构象的形成。例如，$V_H$-$V_L$ 与二硫键的相互作用的稳定性能稳定闭合构象。此外，可以构建用于连接区域(包括 $V_H$ 区和 $V_L$ 区对)的连接子以便有利于开放式构象的形成；例如，连接子可在空间阻挡所述区域的结合，如在适宜部位并入大的氨基酸残基或设计一个适当的刚性结构以保持区域间物理空间的分开。

**D. 双特异性配体的特点**

双特异性配体与其特异性抗原或表位的结合能通过本领域中技术人员所熟知的包括 ELISA 的方法进行检测。本发明一个优选实施方案中，结合是采用单克隆噬菌体 ELISA 方法进行检测的。

噬菌体 ELISA 方法可根据任一适用程序进行操作：下面提供了这种方法的一个实例。

每一轮选择产生的噬菌体群能通过 ELISA 方法测定其与所选抗原或表位的结合而得到筛选，以鉴别“多克隆”噬菌体抗体。那么，这些群体中的单个感染细菌克隆中的噬菌体能通过 ELISA 方法筛选以确定“单克隆”噬菌体抗体。同样有希望筛选出结合抗原或表位的可溶性抗体片段，并且也可通过 ELISA 方法采用诸如针对 C-或 N-末端标记的试剂而进行。(参见 Winter etal.(1994)Ann. Rev. Immunology 12, 433-55 以及所引文献)。

选出的噬菌体单克隆抗体多样性也可采用 PCR 产物的凝胶电泳来评价 (Marks etal. 1991, supra ; Nissim etal. 1994 supra)，或通过载体 DNA 测序来探查(Tomlinson etal.,(1992)J. Mol. Biol. 227, 776)。

**E. 双特异性配体的结构**

如上所述，本文的抗体定义为抗体(如 IgG, IgM, IgA, IgA, IgE)或片段 (Fab, Fv, 二硫键连接的 Fv, scFv, 双抗体)。所述片段含有至少一个重链和轻链可变区、至少两个重链可变区或至少两个轻链可变区。抗体可以是至少部分源于某些种属自然产生的抗体或通过 DNA 重组技术产生的；或是从血清、B 细胞、杂交瘤、转染体、酵母或细菌中分离的。

本发明优选实施方案中的双特异性配体至少包含抗体的一个单一的重链可变区和一个单一的轻链可变区，或者两个单一的重链或轻链可变区。例如，配体可包含 $V_H/V_L$ 对或一对 $V_H$ 区或一对 $V_L$ 区。

这种配体的第一和第二可变区可在相同多肽链上、或者，它们也可在不同的多肽链上。在相同多肽链的情况下，它们可由连接子连接，连接子优选肽序列，如上所述。

第一和第二可变区可以共价或非共价结合，如果是共价结合，共价键可以是二硫键。

如果可变区是从 V 基因库中选出，例如采用这里描述的噬菌体展示技术，那么这些可变区包含通用框架区，这样它们可被本文定义的特定通用

配体所识别。通用框架、通用配体及其类似物在 W099/20749 中描述。

V 基因库在多肽序列上的变异优选分布于可变区的结构环中。每个可变区的多肽序列可通过DNA改组或突变方法改变以增加每个可变区与它互补对之间的相互作用。DNA 改组在技术上已知，如由 Stemmer 讲授的，Stemmer，1994, Nature 370: 389-391 和 美国专利 6, 297, 053, 二者均引入本文作参考。突变的其它方法对本领域技术人员而言是熟知的。

在本发明的一个优选实施方案中，双特异性配体是一个单链 Fv 片段。

在本发明的另一个优选实施方案中，双特异性配体由 Fab 形式组成。

在另一方面，本发明提供了核苷酸，编码至少一种这里定义的双特异性配体。

本领域技术人员依照本发明将理解两个抗原或表位可以同时结合相同抗体分子。或者，它们可以竞争结合同一抗体分子。例如，在两个表位同时被结合时，双特异性配体中两个可变区能独立地结合它们的靶表位。当功能区竞争时，一个可变区能结合它的靶，而另一个可变区不是同时与其关联靶结合；或者说，第一可变区能结合它的靶，而第二可变区不是同时结合其关联靶。

可变区可来自直接针对靶抗原或表位的抗体。另外，它们可以来自如表达在丝状噬菌体表面的单个抗体区域库，选择方法如下。

通常，本发明实施中需要的核酸分子和载体构建可以依照标准实验室手册构建和操作，如 Sambrook 等.(1989)Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, USA.

本发明中所用核酸分子操作通常在重组载体中实现。

因此，本发明进一步提供了一种包括编码至少一种本发明定义的双特异性配体的核酸分子的载体。

这里所用载体是指用于将异质 DNA 引入细胞以便后续表达和/或复制的一种不连续的元件。选择或构建以及后续应用这些载体为本领域一般技术人员熟知。多种载体已公开并可利用，包括细菌质粒、噬菌体和人工染色体和附加体载体。这些载体可用于简单克隆和突变；或者基因表达载体也采用。本发明所用载体可被选择以适应目的多肽编码序列的大小，通常大小为 0.25—40 kb 或更长。一种适当宿主细胞可被经体外克隆操作后的载体所转化。每个载体包括多种功能成分，通常包括克隆(或“多连接子”)

位点，复制起始点和至少一个选择标志基因。如果已知载体是一种表达载体，它另外具有一个或更多如下成分：增强子元件、启动子、转录终止子和信号序列，每一种结构位于克隆位点附近，以便与编码本发明的配体的基因可操作地相连。

克隆和表达载体通常含有能使载体在一种或多种选择的宿主细胞中复制的核苷酸序列。在典型克隆载体中，这段序列是一种能使载体独立于宿主染色体 DNA 外复制，且包含复制起始位点或自主复制序列。这些序列对多种细菌、真菌和病毒而言是已知的。

质粒 pBR322 的复制起始位点适用于绝大多数的 G-菌，2μ质粒起始位点适用于酵母，不同的病毒起始位点(如，SV40，腺病毒)在哺乳动物细胞克隆载体中有用。通常，哺乳动物表达载体不需要复制起始位点，除非它们用于能高水平复制 DNA 的哺乳动物细胞中，如 COS 细胞。

有利的是，克隆或表达载体包含选择基因，也称为筛选标志。该基因编码一种必需蛋白以供转化的宿主细胞在选择培养基中存活和生长。未被包含筛选基因的载体转化的宿主细胞将不能在培养基中存活。代表性的筛选基因编码的蛋白能对抗生素和其它毒素如：氨苄青霉素、新霉素、氨甲喋呤或四环素产生抵抗，补充营养缺陷性不足或供给生长介质中不含的关键营养物。

由于编码本发明配体的载体复制可十分方便地在大肠杆菌中完成，采用大肠杆菌选择标志，如内酰胺酶基因能使大肠杆菌对氨苄青霉素产生抵抗。这些标志能从大肠杆菌质粒如：pBR322 或 pUC 质粒如：pUC18 或 pUC19 中获得。

表达载体通常包含启动子，可被宿主生物体识别并与目的编码序列毗邻相连。该种启动子可以是诱导型的或组成型的。术语“可操作地连接”是指位置并列(juxtaposition)，其中所述成分之间的关系允许它们以既定方式发挥作用。可操作地连接于编码序列的控制序列以这种方式连接，以便使编码系列在与控制序列一致的条件下获得表达。

适用于原核宿主的启动子包括：如 β-内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统和杂合启动子如：tac 启动子。细菌系统所用启动子也通常包括可操作连接于编码序列的 Shine-Delgarno 序列。

优选载体是能使多肽库成员对应的核苷酸序列表达的表达载体。因此，

筛选第一和/或第二抗原或表位可通过表达肽文库成员的单个克隆分开的繁殖和表达或应用任意的选择展示系统来完成。如上所述，优选选择展示系统是噬菌体展示技术，因此，可采用噬菌体或噬菌粒载体，如：pITl 或 pIT2。发明中应用的引导序列包括 pelB、stII、ompA、phoA、bla 和 pelA。一个例子是噬粒载体，包含大肠杆菌复制起始点(适于双链 DNA 复制)，也可以是噬菌体复制起始点(适于单链 DNA 复制)。这些载体的操作和表达是本领域技术人员所熟知的(Hoogenboom 和 Winter(1992)supra; Nissim et al.(1994)supra)。简言之，载体包含β-内酰胺酶基因以赋予噬粒的选择性，位于表达盒上游的乳糖启动子，表达盒从 N 至 C 末端由 pelB 引导序列(指导表达多肽到达周质空间)、多克隆位点(为了克隆文库成员的核苷酸片段)、任选一个或多个肽标记(用于筛选)、任选一个或多个 TAG 终止密码子和噬菌体蛋白 pIII 所组成。因此，采用不同的抑制或非抑制大肠杆菌菌株，另加葡萄糖、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)或辅助噬菌体如：VCSM13，所述载体能作为质粒复制而不表达，只产生大量的多肽文库成员或产生噬菌体，其中某些噬菌体表面至少含有一拷贝的多肽-pIII 融合物。

编码本发明配体的载体构建采用常规的连接技术。分离的载体或 DNA 片段被剪裁重新连接组成所需载体的形式。如果需要，可用已知方式分析鉴定构建载体序列中的正确序列。构建表达载体、准备体外转录、将 DNA 引入宿主细胞和分析评价表达和功能等适用方法为本领域技术人员所熟知。样本中基因序列的存在检测、扩增和/或表达的定量可通过常规方法进行，如：Southern 或 Northern 分析、Western 杂交、DNA、RNA 或蛋白斑点杂交、原位杂交、免疫细胞化学或核酸或蛋白分子序列分析。如果需要，本领域的那些技术人员将很容易地想到如何修改这些方法。

闭合构象多特异性配体的结构：

依照本发明第二构型的一方面，两个或两个以上的非互补表位结合区连接在一起以便形成一种本文定义的闭合构象。有利的是，它们可进一步与一个骨架相连，骨架也可用本文描述的连接子进行添加或取代，以促进表位结合位点之间的闭合构象的形成和/或维持。

(I) 骨架

骨架可基于免疫球蛋白分子或来自上述的非免疫球蛋白中。这里定义的优选免疫球蛋白骨架包括从以下选出的一种或多种：免疫球蛋白分子，

其至少包含(i)抗体CL 区(κ或λ亚类); 或(ii)抗体重链的CH1区; 免疫球蛋白分子, 其包含抗体重链的CHI和CH2区; 免疫球蛋白分子, 包含抗体重链的 CH1, CH2 或 CH3 区; 或与抗体 CL(κ或λ亚类)区相连的任何亚型(subset)(ii)。铰链区也可包括在内。这种区域结合物例如可模拟抗体分子如 IgG 或 IgM, 或其片段, 如 Fv, scFv, Fab 或 $F(ab')_2$ 分子。本领域技术人员知道所列物质并不是穷尽性的, 旨在举例说明。

(II) 蛋白支架

每个表位结合区包括蛋白支架和一个或多个 CDR 区,CDR 区参与区域与一个或多个表位间的特异性相互作用。本发明表位结合区优势在于包含 3 个 CDRs。适用的蛋白支架包括从下列选出的任意一种:基于免疫球蛋白区域的、基于纤连蛋白的, 基于亲和体(affibody)的, 基于 CTLA4 的, 基于伴侣分子如 GroEL 的、基于 lipocallin 的和基于细菌上的 Fc 受体 SpA 和 SpD 的那些蛋白支架。本领域技术人员知道这些举例并不是穷尽性的。

**F: 用于双特异性配体构建的骨架**

i. 主链构象的选择

免疫球蛋白超家族成员的多肽链均具有相似折叠。例如, 虽然抗体在原始序列上高度不同, 比较其序列和晶体结构结果显示与预期相反, 抗体分子中 6 个抗原结合环中的 5 个(H1, H2, Ll, L2, L3)采用有限数目的主链构象或规范结构(Chothia and Lesk(1987)J. Mol. Biol., 196: 901; Chothia etal.(1989)Nature, 342: 877)。因此, 分析环长度和关键残基能推测大多数人类抗体中的 Hl、H2、L1、L2 和 L3 的主链构象。(Chothia etal.(1992)J. Mol.Biol., 227: 799; Tomlinson etal.(1995)EMBO J., 14: 4628; Williams etal.(1996)J. Mol. Biol., 264: 220)。虽然 H3 区在序列、长度和结构上(由于 D 片段的应用)变化非常大, 它也由于短环长度组成少数主链构象, 所述短环长度取决于环和抗体骨架上关键部位的特殊残基的出现和长度或残基的种类(Martin et al.(1996)J. Mol. Biol., 263: 800; Shirai et al.(1996)FEBS Letter, 399:1)。

本发明双特异性抗体优势在于它们是区域文库组装而成, 如 $V_H$ 区文库和/或 $V_L$ 区文库。此外, 本发明双特异性配体本身以文库的形式被提供。本发明的一方面, 双特异性配体和/或区域文库设计为在特定环长度和关键残基的选择上能保证成员的主链构象是已知的。优选它们是天然免疫球蛋白

超家族分子的真正构象，以减少它们无功能的几率，如上所述。胚系 V 基因片段可作为构建抗体或 T 细胞受体库的一种适用基础框架；其它序列也可应用。变异可低频发生，以便少数功能成员可以具有变化的主链构象，而不影响其功能。

规范结构理论(canonical structure theory)也用于评估配体编码的不同主链构象的数目，用于推测基于配体序列的主链构象，用于选择为了多样化而不影响其规范结构的残基。已知人 $V_\kappa$ 区中的 LI 环能采用 4 个规范结构中的一种，L2 环有一单独规范结构，并且 90%的 $V_\kappa$ 区的 L3 环采用 4 或 5 个规范结构中的 1 个(Tomlinson 等(1995)，同上)；因此，在单独的 $V_\kappa$ 区中，不同规范结构能结合组成一系列不同的主链结构。假设 $V_\lambda$ 区为 L1、L2 和 L3 环编码不同范围的规范结构，$V_\kappa$ 区和 $V_\lambda$ 区能与编码 H1 和 H2 环几种规范结构的任意 $V_H$ 区配对，那么观察到的这 5 个环的规范结构的数目很大。这意味着主链构象多样性的产生在广谱结合特异性的产生中可能是必要的。然而，通过构建基于单一已知的主链构象的抗体库，结果发现与预期的相反，在针对所有实际抗原靶的充分多样性产生中主链构象多样性不是必需的。更令人惊讶的是，单个主链构象不需要一致的结构--一个自然形成的构象可用作整个库的基础。因此，优选方面是本发明的双特异性配体具有单一已知的主链构象。

选出的单个主链构象优选在被讨论的免疫球蛋白超家族类型分子中是常见的。观察大量自然发生的分子采用某种构象是平常的事。因此，依照本发明的一个优选方面，分别考虑每个免疫球蛋白区域结合环的自然发生的不同主链构象，那么可选择自然发生的可变区，它们具有针对不同环的主链构象的所需结合。如无适合的，最接近的相等物也可选。可取的是针对不同环的主链构象的所需结合是通过编码目的主链构象的胚系基因的选择而产生。更可取的是，所选胚系基因片段其本质上是频繁表达的，更可取的是它们是所有胚系基因片段表达最频繁的。

在设计双特异性配体及其库时，6 个抗原结合环的每一个的不同主链构象的出现几率可分别考虑。对于 H1、H2、LI、L2 和 L3，选择一个特定构象是采用自然产生分子的 20%-100%的抗原结合环。通常是它测得的出现几率大于 35%(即：介于 35%～100%之间)，理想时大于 50%或甚至大于 65%。由于绝大多数 H3 环无规范结构，最好是选择呈现规范结构的环中普通的主

链构象。对于每个环，在自然库中经常观测的构象因此被选。在人抗体中每个环最常用的规范结构(CS)如下: H1-CS 1(表达库的 79%), H2-CS 3(46%), Vκ 的 L1-CS 2(39%), L2-CS 1(100%), Vκ 的 L3-CS 1(36%)(计算假设 κ： λ 比率为 70: 30, Hood et al.(1967)Cold SpringHarbor Symp. Quant. Biol, 48: 133)。对于具有规范结构的 H3 环，7 个残基长度的 CDR3(Kabat et al.(1991)Sequences of proteins of immunological interest, U. S. Department of Health and Human Services)最常见，在第 94 到 101 残基之间含有一个盐桥。在 EMBL 数据库至少有 15 种人类抗体序列具有必需的 H3 长度和关键残基以组成这种构象，且在蛋白数据库中至少有两种晶体结构能用作抗体模型的基础(2cgr 和 ltet)。最常表达的胚系基因片段即规范结构间的结合是 $V_H$ 片段 3-23(DP-47)、JH 片段 JH4b、Vκ 片段 O2/O12(DPK9)和 Jκ 片段 Jκ1。$V_H$ 片段 DP45 和 DP38 也适用。因此这些片段结合可作为基础以构建有单个目的主链构象的库。

另外，基于每个独立结合环的自然发生的不同主链构象而选择的单个主链构象，取而代之的是自然发生的主链构象结合物用作选择单个主链构象的基础。例如，就抗体而言，能确定出任意 2 个、3 个、4 个、5 个或所有 6 个抗原结合环的规范结构结合物的自然出现。这里，优选选择的构象在自然发生抗体中常见，更可取的是在自然库中最经常观测到。因此，例如在人类抗体中，当考虑 5 个抗原结合环 H1、H2、L1、L2 和 L3 的自然结合物时，决定最常见的规范结构结合物并与 H3 环最通用的构造结合，作为选择单个主链构象的基础。

**ii. 规范序列的多样化**

已经选择了几个已知的主链构象或更适宜的单个已知主链构象，本发明的双特异性配体或本发明所用库能通过改变分子结合位点而构建，以产生具有结构和/或功能多样性的库。这意味变体的产生使得它们在结构和/或功能上具有充分多样性，以便能提供一系列活性。

目的多样性主要通过在一或多个部位改变所选分子而产生。这些改变的部位可随机选择或优先选择。那么变异的获得既可通过随机化即常规氨基酸被任意氨基酸或其自然或合成类似物取代以产生大量变异体，或可通过用一种或多种限定氨基酸子集(subset)取代常规氨基酸以产生有限数目的变异体。

已报道多种方法引入这种多样性。易错 PCR(Hawkins et al.(1992)J. Mol. Biol., 226: 889), 化学突变法(Deng et al.(1994)J. Biol.Chem., 269: 9533)或细菌变异株(Low et al.(1996)J. Mol. Biol., 260: 359)能用于将随机突变引入编码分子的基因中。选择部位的突变方法也在技术上熟知，并且包括错配寡核苷酸或兼并寡核苷酸的应用，其中伴有或无 PCR 的应用。例如，通过靶向突变抗原结合环已制备出几种合成抗体库。人破伤风类毒素结合的 Fab 的 H3 区已随机化生成一系列新的结合特性(Barbas et al.(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457). 随机或半随机 H3 和 L3 区域已附加入胚系 V 基因片段中生成具有突变框架区的大文库(Hoogenboom & Winter(1992)J Mol. Biol., 227:381 ; Barbas et al.(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457; Nissim et al.(1994)EMBO J., 13:692; Griffiths et al.(1994)EMBO J., 13: 3245; De Kruif et al.(1995)J. Mol. Biol., 248: 97)。这种多样化已延伸到某些或所有其它抗原结合环。(Crameri et al.(1996) Nature Med., 2:100; Riechmann et al.(1995) BioTechnology, 13: 475; Morphosys, W097/08320, 同上)。

由于环随机化具有产生大约超过 $10^{15}$ 种单独 H3 结构以及类似数目的其它 5 个环的变异体的能力，采用现行的转化技术或采用无细胞系统生产代表所有可能结合物的库是不可行的。例如，在一种目前构建的最大库中，产生 $6 \times 10^{10}$ 不同抗体，只是所设计库中潜在多样性的一部分(Griffiths 等(1994)，同上)。

在一个优选实施方案中，只有那些直接涉及分子的目的功能的产生或修饰的残基是多样化的。对于许多分子来说，所述功能将是结合某靶，因此多样化应该集中于靶结合位点，同时避免分子完整包装中或维持选择主链构象中的关键残基的变化。

**(iii). 用于抗体区域的规范序列的多样化**

至于抗体双特异性配体的情况，靶结合位点通常是抗原结合点。因此，在本发明优选的方面，本发明提供了用于抗体双特异性配体组装的库，其中只有那些抗原结合位点上的残基是变化的。这些残基在人抗体库中非常多样化，并已知在高分辨(high-resolution)抗体/抗原复合物中产生接触。例如，已知在自然发生抗体的 L2 中第 50 和 53 的位置上残基是多样的，并且观察到它们与抗原接触。相对而言，常规方法将使相应互补决定区(CDR1)，Kabat 等(1991, 同上)定义的，所有残基发生多样化，而相比之下本发明所

用库中两个多样化部位大约 7 个残基。这说明功能多样化的重大改进需要创造一系列抗原结合特异性。

抗体多样性的自然形成是两个过程的结果：胚系基因 V、D、J 基因片段的体细胞重组以产生初始初级库(naive primary repertoire)(也称为胚系和连接多样性)，和由 V 基因重排造成的体细胞高频突变。人类抗体序列分析表明初始库中的多样性集中在抗原结合位点中心，而体细胞高频突变将多样性扩散到抗原结合位点周围即初始库中高度保守的部位。(Tomlinson et al. (1996)J. Mol. Biol., 256: 813). 这一补充有可能发展为搜索序列空间的有效策略，虽然主要针对抗体，但也能易于用在其它多肽库。变化的残基是组成靶结合点的子集。在靶结合点残基的不同(包括重叠)子集，如果需要，则在选择过程的不同阶段具有多样性。

对于抗体库来说，起始的“初始(naive)”库产生在某些而不是全部的抗原结合位点残基多样性之处。正如本文在此引用的术语“初始”是指未预先决定靶的抗体分子。这些分子类似那些未经免疫多样化个体的免疫球蛋白基因编码分子，如胎儿和新生儿的免疫系统未受广泛大量的抗原刺激过。那么针对一系列抗原或表位的库即被选出。如果需要，可在初始库多样化区域之外引入更多的多样性。这种成熟的库能根据改进的功能、特性或亲和力而得到选择。

本发明提供了构建双特异性配体结合区的两种不同初始库，或双特异性配体初始库，其中抗原结合位点的某些或全部残基被改变。初始库模拟了自然发生的初始库，多样性局限在抗原结合位点中心的残基上，这些部位在胚系 V 基因片段(胚系多样性)上具有多样性或在重组过程中被多样化(连接多样性)。那些多样化残基包括但不只限于 H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98, L50, L53, L91, L92, L93, L94 和 L96。在“体细胞”库中，多样性局限在重组过程中发生多样化(连接多样性)的残基上或体细胞高频突变时。发生多样化的残基包括但不只限于 H31, H33, H35, H95, H96, H97, H98, L30, L31, L32, L34 和 L96。上述所列的适于这些库发生多样化的所有残基，已知在一种或多种抗体-抗原复合物中产生接触。

由于在两种库中不是所有抗原结合位点的残基是多样化的，所以，如果需要，可在选择过程中可通过改变剩余残基的方法引入其它多样性。本领域技术人员很清楚任何这些残基的任何亚集(或包含在抗原结合位点中的其

它残基)能用作抗原结合点的最初和/或后续多样化。

在构建本发明所用库中，选择部位的多样化主要在核酸水平上获得，通过改变多肽特异性序列的编码序列以便使一定数目的氨基酸(全部 20 或其子集)能整合在那个部位上。采用国际理论与应用化学联合会(IUPAC)命名法，最通用密码子是 NNK，它编码所有氨基酸以及 TAG 终止密码子。NNK 密码子优选采用目的是引入所需多样性。其它获得相同目的的密码子也可采用，包括 NNN 密码子，它可导致额外终止密码子 TGA 和 TAA 的产生。

人类抗体的抗原结合位点的侧链多样化特征是对某些氨基酸残基有明显的偏爱。如果计算每个 $V_H$、Vκ、Vλ 区域的 10 个常见多样化位置的氨基酸组成的总和，大于 76%的侧链多样性只来自 7 个不同的残基，它们是丝氨酸(24%)、酪氨酸(14%)，天门冬酰胺(11%)，甘氨酸(9%)，丙氨酸(7%)，天门冬氨酸(6%)和苏氨酸(6%)。这种对能提供主链的适应性的亲水残基和小残基的偏爱或许反映了倾向于结合广泛抗原或表位的表面的进化过程，也可以有助于解释在初始库中抗体所需的混杂。

因为优选的是模仿这种氨基酸分布，被改变部位的氨基酸分布优选模拟抗体的抗原结合位点。这种氨基酸置换的偏爱，允许选择某些针对一系列靶抗原的多肽(不只是抗体多肽)，易于用在任意多肽库中。有多种方法用于偏置改变部位的氨基酸分布(包括采用 三核苷酸突变法(tri-nucleotide mutagenesis)见 W097/08320)，由于其易于合成，最优选方法是采用常规兼并密码子。通过比较由所有兼并密码结合物(单、双、三和四兼并比率在每个位置上是相同的)编码的具有天然氨基酸作用的氨基酸分布图，能计算出最有代表性的密码子。密码子(AGT)(AGC)T、(AGT)(AGC)C 和(AGT)(AGC)(CT)，也可分别用 IUPAC 命名为 DVT、DVC 和 DVY，它们十分接近目的氨基酸的分布图：它们编码 22% 丝氨酸和 11%酪氨酸、天门冬酰胺、甘氨酸、丙氨酸、天门冬氨酸、苏氨酸和半胱氨酸。因此，可取的是在每个多样化部位既可采用 DVT、DVC 又可用 DVY 密码子构建文库。

**G:能增加配体半衰期的抗原**

本发明的双特异性配体一方面能与一种或多种能增加配体体内半衰期的分子结合。通常所述分子是体内自然发生的多肽，能抵抗机体内部排除非必要物质内源机制的降解和移除。例如，增加有机体半衰期的分子可从以下筛选：细胞外基质蛋白；例如胶原蛋白，层粘连蛋白，整合素和纤连蛋

白。胶原蛋白是细胞外基质主要蛋白。目前大约知道位于机体不同部位的15种胶原分子，如I型胶原(占机体胶原 90%)分布于骨、皮肤、肌腱、韧带、角膜和内脏中，II型胶原分布于软骨，脊椎盘、脊索、眼玻璃体中。

血液中蛋白包括：血浆蛋白如纤维蛋白、α2巨球蛋白、血清白蛋白和纤维蛋白原A、纤维蛋白原B、血清淀粉样蛋白A、七珠蛋白、抑制蛋白，遍在蛋白质，子宫珠蛋白(uteroglobulin)和β2微球蛋白；酶和抑制物如纤溶酶原、溶菌酶、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C、α-1 抗胰蛋白酶和胰腺胰蛋白酶抑制物。纤溶酶原是胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶纤溶酶的无活性前体。通常在血流循环中发现。当纤溶酶原激活后转变纤溶酶，显露出有效酶区以溶解凝结血细胞的纤维蛋白原纤维。这称为纤维蛋白溶解。

免疫系统蛋白如：IgE、IgG、IgM。运输蛋白如：视黄醇结合蛋白、α1微球蛋白、防卫素如：β防卫素1、神经防卫素1、2和3。

血脑屏障或神经组织上发现的蛋白如：黑色素受体、髓磷脂、抗坏血酸转移物。

转铁蛋白受体特异性配体- 神经药剂融合蛋白(见US5977307);

脑毛细血管内皮细胞受体、转铁蛋白、转铁蛋白受体、胰岛素、胰岛素样生长因子1(IGF 1)受体、胰岛素样生长因子2(IGF 2)受体、胰岛素受体。

位于肾脏的蛋白如：多聚胱氨酸(polycystin)、IV 型胶原、有机阴离子转移子Kl, Heymann's 抗原。

位于肝脏的蛋白如：乙醇脱氢酶、G250。

凝血因子X。

α1抗胰蛋白酶。

HNF 1 α。

位于肺脏的蛋白如：分泌成分(结合IgA)。位于心脏的蛋白如：HSP 27。这与扩张性心肌病相关。位于皮肤的蛋质白如：角质蛋白。

骨特异性蛋白如：骨成型蛋白(BMPs)是转化生长因子β超家族的一个亚类，具有生骨活性。例如：BMP-2, -4, -5, -6, -7(也称为生骨蛋白(OP-1))以及BMP- 8(OP-2)。

肿瘤特异蛋白包括：人滋养层抗原、herceptin 受体、雌激素受体、组织蛋白酶如组蛋白酶B(见于肝脾中)。

疾病特异性蛋白，如只表达在活化T细胞上的抗原：包括LAG-3(淋巴

细胞活化基因)、护骨蛋白(osteoprotegerin)配体(OPGL)参见 Nature 402, 304-309；1999, OX40(一组 TNF 受体家族成员，表达在活化 T 细胞上，并且是唯一已知在 I 型 T 细胞白血病病毒(HTLV-I)产生细胞上被特异性上调表达的共刺激 T 细胞分子)见 J Immunol.2000 Jul 1；165(1): 263-70；金属蛋白酶(与关节炎/癌症关联)，包括 CG6512 果蝇、人截瘫蛋白(human paraplegin)、人 FtsH、人 AFG3L2、小鼠 FtsH；血管生成生长因子包括：酸性成纤维生长因子(FGF-1)、碱性成纤维生长因子(FGF-2)、血管内皮生长因子/血管渗透因子(VEGF/VPF)、转化生长因子-α(TGF a)、肿瘤坏死因子α(TNF-a)、血管生成素、白细胞介素-3(IL-3)、白细胞介素-8(IL-8)、血小板衍生内皮生长因子(PD-ECGF)、胎盘生长因子(P1GF)、中期因子(midkine)、血小板衍生的生长因子-BB(PDGF)、$CX_3C$ 趋化因子(fractalkine)。

应激蛋白(热休克蛋白，HSP)。HSPs 一般在细胞内发现。当在胞外发现 HSPs 提示细胞死亡并将内容物溢出。这种非程序性细胞死亡(坏死)只在外伤、疾病或损伤的情况下导致的体内损伤时出现，胞外 HSPs 引发免疫系统应答从而抗感染和疾病。结合胞外 HSP 的双特异配体可被定位于疾病部位。

涉及 Fc 转运的蛋白。

Brambell 受体(也称为 FcRB)，这种 Fc 受体有两种功能，二者在转运中有潜在的用途。所述功能是(1)通过胎盘将 IgG 从母体转运给胎儿(2)防止 IgG 降解以延长其血清半衰期。据认为受体使 IgG 在内质网中发生再循环。见 Holliger 等, Nat Biotechnol 1997 Jul; 15(7): 632-6。

本发明中配体可设计成上述靶特异性而不需要任何增加或不增加体内半衰期。例如：本发明中的配体能特异性地针对从前述组织筛选的靶，从而能使双特异性配体具有组织特异性靶向，或者 dAb 单体结合组织特异性治疗相关靶，不考虑半衰期的增加，尽管该结果也可达到。此外，当配体或 dAb 单体靶向作用于肾或肝，这可以改变配体或 dAb 单体的体内清除途径(例如，配体可从肝清除途径改为肾清除途径)。

**H: 依照本发明第二构型的多特异性配体的应用**

依照本发明第二构型方法的多特异性配体可应用于体内治疗和预防、体内外诊断、体外分析和反应试剂用途等等。例如，抗体分子可用于抗体分析技术，如 ELISA 技术，这些方法为技术人员熟知。

如上所间接提到的，本发明多特异性配体可用于诊断、预防和治疗。本发明中多特异性配体在诊断上的用途是采用标准免疫组化手段进行Western分析和原位蛋白检测；在这些应用中，配体根据技术常用手段而标记。此外，当与亲和层析支持物如：树脂复合时，这种抗体多肽可备用于亲和层析程序。所有这些方法为本领域技术人员熟知。

本发明闭合构象的多特异性配体的诊断用途包括对分析物的均相分析，应用的是闭合构象的多特异性配体能竞争结合两个靶位的能力，从而两个靶不能同时结合(闭合构象)，或应用它们能同时结合两个靶的能力(开放构象)。

药物开发应用的诊断和研究分析系统的制造商已十分热切地寻求真正的均相免疫分析形式。主要诊断市场包括：医院、诊所和门诊、涉及商业的实验室、血库和家庭中，不用于人的诊断(例如：食品检测、水检测、环境检测、生物防护和兽医检测)，以及最终研究(包括：药物开发、基础研究和学术研究)。

目前，所有这些市场应用的免疫分析系统都围绕化学发光、ELISA、荧光或有时采用的放免技术而建立。每一种分析形式需要分离步骤(从非结合试剂中分离结合的试剂)。在某些情况下，需要几步分离的步骤。增加这些附加步骤增加了试剂和自动化操作、需要时间、影响最终分析结果。在人类诊断中，分离步骤是自动化的，掩饰了问题，但不能解决问题。机器人技术、添加试剂、添加孵育时间等增加了相当成本和复杂性。在药物开发中如：高通量筛选中，用非常低水平测试分子马上逐个测试数百万样本，添加附加分离步骤可使执行筛选的能力丧失。此外，不进行分离会在读数中产生太多的噪音。所以，需要一个真正的均相形式以提供目前分析形式可得到的范围之内的灵敏度。优选的是一种具有高灵敏性和较大动态范围的完全定量读数分析方法。灵敏度是一个非常重要的条件，这样降低所需样品量。这些特征都是均相系统提供的特征。这在健康检测中和在药物开发中样品很珍贵时非常重要。异相系统，其是当前通用的技术，需要大量样本和昂贵的试剂。

均相分析用途包括：肿瘤检测，最大分析是用来筛选前列腺癌患者中的前列腺特异性抗原。其它用途包括生育力检查，给打算怀孕的妇女提供一系列检测，包括妊娠的β-HCG。感染性疾病的实验包括：肝炎、HIV、

风疹和其它病毒和微生物以及性传播疾病。实验可用于血库检测，特别是检测 HIV, A 型、B 型、C 型和非 A 非 B 型肝炎。治疗性药物监测实验包括跟踪监测在患者体内显效的处方药水平以避免毒性，例如：心率失常所用地高辛、精神病患者的镇静安眠剂水平、哮喘所用的氨茶碱。诊断实验还可用于滥用药物检测，如可卡因、大麻及类似物的检测。代谢实验用于测定甲状腺功能、贫血和其它生理功能紊乱。

均相免疫分析形式还可用于标准临床化验。集免疫分析和化验于同一仪器上在诊断实验中十分占优势。适当的化学分析包括测定葡萄糖、胆固醇和钾等等。

均相免疫分析另一个主要用途是发现药物和药物开发：高通量筛选包括测定针对超高容量靶的组合化学文库。信号检测和阳性群体后来分成更小组，最终在细胞和动物体中检测。均相免疫分析可用于所有这些类型的检测。在药物开发中，特别是动物研究和临床试验大量采用免疫分析。均相分析大大的促进和简化了这些操作。其它用途包括食物和饮料检测：测定肉和其它食物中的大肠杆菌、沙门氏菌等；水检测包括水培养物的所有污染物包括大肠杆菌的检测；和兽医检测。

在一个主要实施方案中，本发明提供了一种结合分析法，包括一种结合在发明中的闭合构象多特异性配体的可检测的试剂，且通过分析物与所述闭合构象多特异性配体的结合改变可检测特性。这种检测可设定成多种不同形式，每一种均利用上述闭合构象多特异性配体的特性。

分析依赖于分析物直接或间接置换制剂，导致所述制剂的可检测特性发生改变。例如当所述制剂是能催化一个具有可检测终点的反应的一种酶时，所述酶能被配体结合从而阻断其活性位点，因此使酶失活。能被闭合构象多特异性配体结合的分析物可置换酶，通过释放活性位点而使酶具有活性。那么该酶与底物反应产生一种可检测事件。在另一实施方案中，配体可以结合在酶活性位点之外，影响酶的构象从而改变其活性。例如：活性位点的结构可被结合的配体局限，或活性必需的辅因子的结合被阻止。

所述分析的物理实施条件可采用本领域已知的任一种形式。例如：闭合构象多特异性配体/酶复合物可以测试条形式提供；底物可在测试条不同区域提供，包含分析物的溶剂允许通过配体/酶复合物迁移，置换酶，并且将它带到底物区域产生信号。或者，配体/酶复合物可以测试棒或其它固相

提供，浸在一种分析物/底物溶液中，将酶释放到溶液中以应答分析物的存在。

由于每个分析物分子潜在释放一个酶分子，所以所述分析是定量的，规定时间内产生的信号强度依赖溶液中分析物的浓度。

采用闭合构象的分析物有更多可能的构型。例如，闭合构象的多特异性配体可以设计成结合酶非变构部位的形式，从而激活酶。在这一实施方案中，无分析物存在时酶是有活性的。加入分析物可置换酶并且消除变构激活，因此使酶失活。

在上述实施方案的上下文利用酶活性衡量分析物的浓度，酶活化或失活是指酶活性的增加和减少，通过测量酶催化信号生成反应的能力测量。例如，酶可以催化不可测底物转化为它的可测形式。例如，辣根过氧化物酶以及发色剂和化学发光剂底物在本领域被广泛应用，所述酶和发色剂或化学发光剂底物可方便买到。酶活性的增加和下降介于 10%-100%，例如 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90%；如果是活性增加，所述增加可大于 100%，即：200%、300%、500% 或更多，如果被抑制的酶基线活性测不出，百分比不能检测到。

在更多构型中，闭合构象多特异性配体可以结合酶/底物对中的底物而不是酶。因此底物难以接触到酶，直到通过结合分析物酶从闭合构象多特异性配体中释放出来。这种构型的实施涉及结合酶的构型。

此外，分析可以设定为结合一种荧光分子，如荧光素或另一种荧光团，当结合配体时荧光就淬灭。这种情况下，分析物与配体结合将置换荧光分子，因此产生一个信号。本发明所用的选择的荧光分子包括发光剂如：荧光素/荧光素酶，和发色剂包括常用于免疫分析的制剂如 HRP。

本发明制备的多特异性配体的防治用途涉及给哺乳动物受试者如：人应用配体。多特异性能允许抗体以高亲合力结合多价抗原。多特异性配体能使两个抗原交叉连接，例如在募集细胞毒性 T 细胞介导肿瘤细胞系的杀伤过程中。

基本纯的配体或其结合蛋白例如：至少 90 -95% 同质性的 dAb 单体优选给药于哺乳动物，98-99%或更多同质性最优选用于药用。特别是当哺乳动物是人时。一旦纯化，部分或完全达到所需同质性的配体可用于诊断或治疗(包括体外应用)或开发应用分析方法、免疫荧光染色等(Lefkovite 和

Pernis,(1979和1981)Immunological Methods, Volumes I and II, Academic Press, NY)。

配体或其结合蛋白如：本发明中的dAb单体将通常用于预防、抑制或治疗炎症状态、过敏(超敏)反应、肿瘤、细菌和病毒感染和自身免疫病(包括但不只限于I型糖尿病、哮喘、多发性硬化、系统性红斑狼疮、Crohn's病和重症肌无力)。

在即时应用中，术语“预防”包括在诱导疾病前给予保护性组合物。“抑制”是指诱导事件后但在疾病临床表现前给予组合物。“治疗”包括疾病症状明显后给予保护性组合物。

可利用动物模型系统，用于筛选抗体及其组合物在保护或治疗疾病中的有效性。在敏感小鼠中检测系统性红斑狼疮(SLE)的方法在技术上已知。(Knight et al.(1978)J. Exp.Med., 147: 1653; Reinersten et al.(1978)NewEng J. Med., 299: 515)。重症肌无力(MG)在SJL/J雌性小鼠中测得，通过用另一种系的可溶性乙酰胆碱AchR受体蛋白诱导该病(Lindstrom et al.(1988)Adv. Immunol., 42: 233)。通过注射II型胶原给易感种系小鼠诱导关节炎(Stuart et al.(1984)Ann. Rev. Immunol., 42:233)。已经描述了通过注射分支杆菌热休克蛋白诱导易感大鼠发生佐剂型关节炎的模型(Van Eden et al.(1988)Nature, 331: 171)。小鼠甲状腺炎的诱导是通过给予甲状腺球蛋白(Maron et al.(1980)J. Exp.Med., 152: 1115)。胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)自然发生或在某些种系小鼠中诱导，如Kanasawa et al.(1984)Diabetologia, 27: 113所描述的。EAE小鼠和大鼠作为人多发性硬化(MS)的模型。在这种模型中，神经脱髓鞘病变通过给予髓磷脂碱性蛋白诱导(见Paterson(1986)Textbook of Immunopathology, Mischer et al., eds., Grune and Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin et al.(1973)Science, 179: 478: and Satoh et al.(1987)J. Immunol., 138: 179)。

通常，本发明的配体将以纯化形式加适当药物载体而应用。典型的说，这些载体包括水质的、醇/水溶液、乳剂或悬浮剂、包含盐和/或缓冲介质的任何载体。注射用媒介包括氯化钠溶液、Ringer's葡萄糖、葡萄糖和氯化钠和乳酸盐Ringer's液。如果必须保持多肽复合物呈悬浮态，适当的生理上能接受的佐剂可以选自增稠剂如：羧甲基纤维素、多聚乙烯吡咯酮烷、凝胶和藻酸盐。

静脉注射用载体包括液态营养补充物和电解质补充物如：那些基于Ringer's 葡萄糖的物质。防腐剂和其它添加剂如：抗菌剂和抗氧化剂、螯合剂和惰性气体也可存在(Mack(1982)Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition)。

本发明的配体可用作独立给药的组合物或和与其它制剂联合使用。这些包括各种免疫治疗药如：环孢菌素、氨甲喋呤、阿霉素或顺铂、和免疫毒素。药物组合物可能包括各种细胞毒制剂的“混合物”或其它与本发明配体联合应用的制剂，或者甚至具有不同特异性的配体结合物如：用不同靶抗原或表位选择的配体，不管它们是否在使用前汇聚。

本发明药物组合物的给药途径可以是那些本领域任何的一般技术人员知道的。用于治疗，非限制地包括免疫治疗，用标准方法将本发明所选配体给予任一病人。用药能通过任何适当模式包括：非肠道的、静脉内的、肌肉内的、皮内和皮下、经肺途径或也可适当地通过导管直接灌注。用药的剂量和频率将根据年龄、性别和病人条件、是否与其它药物同时给予、临床医生必须考虑的副作用和其它参数来决定。

本发明的配体能冻干保存并且在使用前能在适宜载体中重构(reconstitute)。这种技术已显示对于常规免疫球蛋白是有效的，并且已知的冻干和再生技术能被应用。本领域那些技术人员知道冻干和再生能导致不同程度的抗体活性的丢失(例如：对于常规免疫球蛋白，IgM 抗体比 IgG 抗体倾向于具有更大的活性损失)并且应用水平可以被调节以给予补偿。

包含本发明配体的组合物或本发明配体的混合物能给药用于预防和/或治疗。在一些治疗应用中，达到至少部分阻止、抑制、调节、杀伤所选择细胞群的适当剂量，或达到某些其它可测参数的适当剂量被定义为“治疗有效量”。需要达到这个剂量的量将依赖于疾病的严重程度和病人本身免疫系统的一般状态，不过通常的剂量范围是每千克体重 0.005-5.0 mg 配体，例如：抗体、受体(例如：T 细胞受体)或其结合蛋白。0.05-2.0 mg/kg/剂量较常用。预防用药时，包含本发明配体的组合物或本发明配体的混合物给药时可以用相同的或略低的剂量。

与治疗前出现的症状或与未用该制剂治疗个体(人或动物模型)的症状相比，如果一种或一种以上的症状减轻(如：至少减轻 10%或至少减轻临床评价标准的一个分点)，那么用这里描述的组合物进行的治疗认为是“有效

的”。根据所治疗的疾病或紊乱的不同，症状将明显不同，但可由普通技术熟练的临床医师或技师测得。例如，这些症状能通过跟踪检测疾病或紊乱的一种或多种生化指标的水平而测量(例如，与疾病相关的酶或代谢物的水平，受侵袭的细胞数目等)，通过监测身体表现(如，炎症、肿瘤大小等)，或通过公认的临床评价标准，例如：伸展无力状况等级(用于肌无力)、Irvine 肠炎调查问卷(32 个分点评价涉及肠功能、全身症状、社会功能和情感状况的生活质量的得分，范围 32-224，高分表示生活质量较好)，类风湿性关节炎生活质量评分或其它公认的临床评分等级在领域中已知。疾病或紊乱的症状的持续减轻(例如，一天或一天以上或优选更长时间)至少 10%或临床给出等级的一个或一个以上分点则表明是“有效”治疗。同样，与未经组合物治疗的相同个体(人或动物模型)的相应症状相比，如果一种或多种症状的发病或严重性被推迟、降低或消除，那么本发明所述的组合物用于预防的作用是“有效的”。

本发明的组合物包含配体或其混合物，可用于预防和治疗背景以帮助改变、灭活、杀伤或消除哺乳动物中选择的靶细胞群。另外，这里描述的多肽选择库可用于体外选择性地杀伤、耗尽或者有效消除异质细胞集合中的靶细胞群。哺乳动物血液能在体外结合配体，例如：抗体、细胞表面受体或其结合蛋白，藉此血液中不想要的细胞被杀死或者从血液中移除，然后按照标准方法将血液回输给哺乳动物。

**I：本发明中半衰期增加的双特异性配体的应用**

本发明中方法制备的双特异性配体可以用于体内治疗和预防、体内诊断等。本发明中制备的双特异性配体的治疗和预防用途包括将本发明的配体给药于哺乳动物受者如：人。本发明的双特异性抗体包含至少一种针对半衰期增强分子的特异性；一种或更多特异性可定向针对靶分子。例如：双特异性 IgG 可以特异性针对 4 个表位，其中之一是在半衰期增强分子上。双特异性能允许抗体以高亲合力结合多聚抗原。双特异性抗体能使两个抗原交叉连接，例如在募集细胞毒性 T 细胞介导肿瘤细胞系的杀伤过程中所发生的。

基本纯的配体或其结合蛋白如：至少 90 -95% 同质性的 dAb 单体优选给药于哺乳动物，98-99%或更多同质性最优选用于药用。特别是当所述哺乳动物是人时。一旦纯化，部分或完全达到所需同质性的配体可用于诊断

或治疗(包括体外)或开发应用分析方法、免疫荧光染色等(Lefkovite 和 Pernis,(1979 和 1981)Immunological Methods, Volumes I and II, Academic Press, NY)。

本发明中的配体将典型地用于预防、抑制或治疗炎症状态、过敏(超敏)反应、肿瘤、细菌和病毒感染和自身免疫病(包括但不只限于 I 型糖尿病、哮喘、多发性硬化、系统性红斑狼疮、Crohn's 病和重症肌无力)。

在即时应用中，术语“预防”包括在诱导疾病前给予保护性组合物。“抑制”是指诱导疾病后先于疾病临床表现出现时给予组合物。“治疗”包括疾病症状明显后给予保护性组合物。

可利用动物模型系统，用于筛选抗体及其组合物在保护或治疗疾病中的有效性。在敏感小鼠中检测系统性红斑狼疮(SLE)的方法在技术上已知。(Knight et al.(1978)J. Exp.Med., 147: 1653; Reinersten etal.(1978)NewEng J. Med., 299: 515)。重症肌无力(MG)在 SJL/J 雌性小鼠中测得. 通过用另一种系的可溶性乙酰胆碱 AchR 受体蛋白诱导该病(Lindstrom et al.(1988)Adv. Immunol., 42: 233)。通过注射 II 型胶原给易感种系小鼠诱导关节炎(Stuart et al.(1984)Ann. Rev. Immunol., 42:233)。已经描述了通过注射分支杆菌热休克蛋白诱导易感大鼠发生佐剂型关节炎的模型(Van Eden et al.(1988)Nature, 331: 171)。小鼠甲状腺炎的诱导是通过给予甲状腺球蛋白(Maron et al.(1980)J. Exp.Med., 152: 1115)。胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)自然发生或在某些种系小鼠中诱导如 Kanasawa et al.(1984)Diabetologia, 27: 113 所描述的。EAE 小鼠和大鼠作为人多发性硬化(MS)的模型。在这种模型中，神经脱髓鞘病变通过给予髓磷脂碱性蛋白诱导(见 Paterson(1986)Textbook ofImmunopathology, Mischer et al., eds., Grune and Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin et al.(1973)Science, 179: 478: and Satoh etal.(1987)J. Immunol., 138: 179)。

本发明的双特异性配体和 dAb 单体能结合涉及内吞作用(如 Clathrin)的胞外靶，能使双特异性配体被内吞，使另一种能结合细胞内靶的特异性被释放到细胞内环境。这一策略需要双特异性配体具有在胞内保持功能的物理特征。或者，如果配体的最终细胞内区室定位是氧化性的，一种适当折叠的配体不可能要求是无二硫键的。

通常，本配体将以纯化形式加适当药物载体而应用。通常，这些载体包

括水性的或醇/水溶液、乳剂或悬浮剂、包含盐和/或缓冲介质的任意载体。注射用载体包括氯化钠溶液、Ringer's 葡萄糖、葡萄糖和氯化钠和乳酸盐 Ringer's 液。如果必须保持多肽复合物呈悬浮态，适当的生理上能接受的佐剂可以选自增稠剂如：羧甲基纤维素、多聚乙烯吡咯酮烷、凝胶和藻酸盐。

静脉注射用载体包括液态营养补充物和电解质补充物如：那些基于 Ringer's 葡萄糖的物质。防腐剂和其它添加剂如：抗菌剂和抗氧化剂、螯合剂和惰性气体也可存在(Mack(1982)Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition)。

本发明的配体可用作独立给药的组合物或和其它制剂联合使用。这些包括各种免疫治疗药如：环孢菌素、氨甲喋呤、阿霉素或顺铂和免疫毒素。药物组合物可以包括各种细胞毒制剂的“混合物”或其它与本发明配体偶联的制剂。

本发明药物组合物的给药途径可以是那些本领域任何普通技术人员知道的。用于治疗，包括非限制性的免疫治疗，用标准方法将本发明所选配体给予任一病人。用药能通过任何适当模式包括：非肠道的、静脉内的、肌肉内的、皮内和皮下、经肺途径或也可适当地通过导管直接灌注。用药的剂量和频率将根据年龄、性别和病人状况、是否与其它药物同时给予、临床医生必须考虑的副作用和其它参数来决定。

本发明的配体能冻干保存并且在使用前能在适宜载体中再生。这种技术已显示对于常规免疫球蛋白是有效的，并且已知方法的冻干和再生技术能被应用。本领域那些技术人员知道冻干和再生能导致不同程度的抗体活性的丢失(例如：对于常规免疫球蛋白，IgM 抗体比 IgG 抗体倾向于具有更大的活性损失)并且应用水平可以被调节得以补偿。

包含本发明配体或其混合物的组合物能给药用于预防和/或治疗。在一些治疗应用中，达到至少部分阻止、抑制、调节、杀伤所选择细胞群的适当剂量，或达到某些其它可测参数的适当的剂量被定义为“治疗有效量”。需要达到这个剂量的量将依赖于疾病的严重程度和病人本身免疫系统的一般状态，不过配体的通常剂量范围是每千克体重 0.005-5.0 mg。剂量范围为 0.05 -2.0 mg/kg/剂量较常用。预防用药时，包含本发明配体或其混合物的组合物的给药可以用相同的或略低的剂量。

一种包含本发明配体的组合物可用于预防和治疗背景以帮助改变、灭

活、杀伤或移除哺乳动物中选择的靶细胞群。

此外，这里描述的多肽选择库可用于体外选择性杀伤、耗尽或者有效消除异质细胞集合中的靶细胞群体。哺乳动物血液能在体外结合配体，例如：抗体、细胞表面受体或其结合蛋白，藉此血液中不想要的细胞被杀死或者从血液中移除，然后按照标准方法将血液回输给哺乳动物。

为了进一步描述本发明，列举了以下实施例。为了命名 dAb，这里所用的人 TNFα称作 TAR1，人 TNFα受体 1(p55 受体)称作 TAR2。

## 实施例 1. 特异性针对人血清白蛋白(HSA)和β-半乳糖苷酶(β-gal)的双特异性 scFv 抗体(K8)的筛选

本实施例解释了制备特异性针对β-gal 和 HSA 的双特异性抗体的方法，根据能结合β-gal 而选择出与模拟(dummy)$V_H$ 区连接的 Vκ可变区库，根据能结合 HSA 而选择出与模拟 Vκ区连接的 $V_H$ 可变区库。然后组合选出的可变的 $V_H$ HSA 和 Vκ β-gal 区，并且根据能结合β-gal 和 HAS 而选择出抗体。HSA 是在人血液中发现的半衰期增强蛋白。

四种用在本实验中的人噬菌体抗体库。

| | | |
|---|---|---|
| 抗体库 1 | 胚系 Vκ/DVT $V_H$ | $8.46 \times 10^7$ |
| 抗体库 2 | 胚系 Vκ/NNK $V_H$ | $9.64 \times 10^7$ |
| 抗体库 3 | 胚系 $V_H$/DVTV κ | $1.47 \times 10^8$ |
| 抗体库 4 | 胚系 $V_H$/NNKV κ | $1.45 \times 10^8$ |

所有抗体库基于单一的人 $V_H$(V3-23/DP47 和 $J_H$4b)和 Vκ(O12/O2/DPK9 和 Jκ1)的骨架，其具有的侧链多样性组成互补决定区(CDR2 和 CDR3)。

抗体库 1 和抗体库 2 包含模拟 Vκ序列，而 $V_H$ 序列在 H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H96、H97 和 H98(分别编码 DVT 或 NNK)位置上多样化(图 1)。抗体库 3 和抗体库 4 包括模拟 $V_H$ 序列，而 Vκ序列在 L50、L53、L91、L92、L93、L94 和 L96(分别编码 DVT 或 NNK)位置上多样化(图 1)。这些库是噬菌粒 pIT2/ScFv 形式(图 2)，并且已经根据结合属类配体、蛋白 A 和蛋白 L 而预先选择，所以未筛选库中的绝大多数克隆是有功能的。上面所显示库的大小相当于预筛选后的大小。抗体库 1 和抗体库 2 在用抗原筛选前混合生成单个的 $V_H$/胚系 Vκ库，抗体库 3 和

抗体库 4 混合形成单个 Vκ/胚系 $V_H$ 库。

对 β-gal 应用 Vκ/胚系 $V_H$ 库执行 3 个选择循环，对 HSA 应用 $V_H$/胚系 Vκ 库执行 3 个选择循环。就 β-gal 来说，噬菌体滴度从第一循环的 $1.1 \times 10^6$ 上升到第三循环的 $2.0 \times 10^8$。就 HSA 来说，噬菌体滴度从第一循环的 $2 \times 10^4$ 上升到第三循环的 $1.4 \times 10^9$。该选择的执行如 Griffith 等(1993)所描述的，除了采用 KM13 辅助噬菌体(其包含一种 pIII 蛋白，在 D2 和 D3 区之间具有蛋白酶裂解位点，且用含 1mg/ml 胰蛋白酶的 PBS 洗提噬菌体。胰蛋白酶的添加是裂解来自辅助噬菌体的 pIII 蛋白(但不是那些来自噬粒的)并且通过在 c-myc 标记处切割来洗提结合的 scFv-噬菌体融合物(图 2)，因此进一步丰富了表达功能性 scFvs 的噬菌体而背景相应地减少。(Kristensen 和 Winter, Folding 和 Design 3: 321-328, Jul 9, 1998)。选择是采用包被有 100μg/ml 浓度的 HSA 或 β-gal 的免疫试管。

为了检测结合，每次选择的第三个循环来源的 24 个克隆可通过单克隆噬菌体 ELISA 法筛选。噬菌体微粒按 Harrison 等，Methods Enzymol. 1996; 267: 83-109 所描述制备。用 100μl 的 HSA 或浓度为 10μg/ml 的 β-gal PBS 液包被 96 孔 ELISA 板，在 4℃条件下过夜。然后进行标准 ELISA 操作步骤(Hoogenboom 等, 1991)，采用具有抗-M13-HRP 偶联物的结合噬菌体的检测方法。克隆选择释放 ELISA 信号在 50μl 上清中大于 1.0。

接着，采用 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒(Qiagen)，对 HSA 筛选的 $V_H$/胚系 Vκ 库和对 β-gal 筛选的 Vκ/胚系 $V_H$ 库中制备 DNA 预产物(preps)。为获得更大多样性，DNA 预产物可从选择过程 3 个循环的每个循环中制备，然后一起收集对每一种抗原的 DNA 预产物。然后用 SalI/NotI37℃过夜消化 DNA 预产物。得到的片段经胶纯化后，在 β-gal 上筛选的来自 Vκ/胚系 $V_H$ 库的 Vκ 链被连接，替代对 HSA 筛选的 $V_H$/胚系 Vκ 库中的胚系 Vκ 链，生成 $3.3 \times 10^9$ 个克隆。

那么这个库既可以是 HSA/β-gal 选择即：第一轮关于 HSA 的选择，第二轮关于 β-gal 的选择；也可以是 β-gal/HSA 选择即：第一轮关于 β-gal 的选择，第二轮关于 HAS 的选择。选择过程如上所述。每当第二轮选择之后，采用单克隆噬菌体 ELISA 方法(如上所述)和可溶性 scFv 片段的 ELISA 法检测结合 HSA 和 β-gal 的 48 个克隆。可溶性抗体片段的制备如 Harrison 等(1996)描述的一样，标准 ELISA 程序按照 Hoogenboom 等(1991)Nucleic

Acids Res., 19: 4133 所述的方法，除了采用 2% Tween/PBS 作为封闭缓冲液且结合的 scFvs 用蛋白 L-HRP 检测。HSA/β-gal 选择中的 3 个克隆(E4、E5 和 E8)和 β-gal/HSA 选择中的 2 个克隆(K8 和 K10)能结合两种抗原。PCR 扩增这些克隆中的 scFvs 并进行测序，所用引物是 LMB3 和 pHENseq，如 Ignatovich 等(1999)J Mol Biol 1999 Nov 26; 294(2): 457-65 所描述的方法一样。测序分析显示所有克隆是同样的。因此，只选择一个编码双特异性抗体的克隆(K8)用于进一步工作中(图 3)。

**实施例 2. K8 抗体结合性能的特点**

首先，用单克隆噬菌体 ELISA 法描述 K8 抗体的结合特性。用含 HSA、携带碱性磷酸酶(APS)的 β-gal、牛血清白蛋白(BSA)、花生凝集素(peanut agglufinin)、溶菌酶和细胞色素 C 的，浓度为 10μg/ml 的(阻止交叉反应)100μl PBS 4℃过夜包被 96 孔板。用 KM13 拯救来自 K8 克隆的噬菌粒，方法如 Harrison 等,(1996)所描述的，直接分析含噬菌体的上清(50μl)。然后进行标准 ELISA 程序(Hoogenboom 等, 1991)，采用具有抗-M13-HRP 偶联物的结合噬菌体的检测方法。当展示于噬菌体表面的吸收信号大于 1 时，发现双特异性 K8 抗体能结合 HAS 和 β-gal(图 4)。对 BSA 强的结合也可以观察到(图 4)。由于 HSA 和 BSA 在氨基酸水平上有 76%是同源的，所以 K8 抗体能识别两种结构相关蛋白是不足为奇的，未观察到与其它蛋白的交叉反应(图 4)。

其次，K8 抗体的结合特性可用可溶性 scFv ELISA 法检测。

可溶性 scFv 片段的产生通过 IPTG 诱导，正如 Harrison 等(1996)描述的。为确定 K8 scFv 表达水平，用蛋白 A 琼脂糖柱纯化 50ml 诱导上清中的可溶性抗体片段，正如 Harlow 和 Lane，Antibodies: a Laboratory Manual,(1988)Cold Spring Harbor。描述的方法一样。然后采用 Sambrook 等(1989)描述的方法测定 OD280 和计算蛋白浓度。上清中 K8 scFv 产物浓度为 19mg/l。

接着用已知浓度的 K8 抗体片段进行可溶性 scFv ELISA 检测。用 100μl 含 HSA、BSA 和 β-gal 的，浓度为 10μg/ml 溶液和 100μl 浓度为 1μg/ml 的蛋白 A 包被 96 孔板，加入连续稀释的 K8 scFv 溶液 50μl，用蛋白 L-HRP 检测结合抗体片段。ELISA 结果证实了 K8 抗体的双特异性本质(图 5)。

为确定结合β-gal 是由Vκ区决定以及结合HSA/BSA是由K8 scFv抗体$V_H$区决定，用 SalI/NotI 消化 K8scFv DNA 将Vκ区从中切下，连接到包含胚系 $V_H$ 链的经 SalI/NotI 消化过的 pIT2 载体上(图 1 和 2)。产生的克隆 K8Vκ/胚系 $V_H$ 的结合特性通过可溶性 scFv ELISA 法分析。可溶性 scFv 片段的产生通过 IPTG 诱导，正如 Harrison 等(1996)描述的一样，直接分析含有 scFvs 的上清(50μl)。可溶性 scFv ELISA 法按实施例 1 中操作，结合的 scFvs 用蛋白 L-HRP 检测。ELISA 结果显示该克隆还能结合β-gal，而与 BSA 的结合被消除(图 6)。

**实施例 3. 针对抗原 A 和抗原 B 的单个 $V_H$ 区抗体和针对抗原 C 和抗原 D 的单个 Vκ 区抗体的筛选**

本实例描述了一种制备针对抗原 A 和抗原 B 的单个 $V_H$ 区抗体和针对抗原 C 和抗原 D 的单个 Vκ 区抗体的方法，通过筛选无互补可变区存在时结合这些抗原的初始(virgin)单个抗体可变区库。

结合克隆的筛选和定性通过前述方法进行(见实例 5, PCT/GB 02/003014)。选择出 4 个用于进一步研究的克隆:

$V_H$1-抗 A $V_H$

$V_H$2-抗 B $V_H$

VK1-抗 C Vκ

VK2-抗 D Vκ

可以采用上述实施例 1-3 描述的程序，用所描述的相同方式制备包含 $V_H$ 区结合物(combination)(即 $V_H$-$V_H$ 配体)和 $V_L$ 区结合物(即 $V_L$-$V_L$ 配体)的二聚体分子。

**实施例 4. 双特异性 ScFv 抗体的制备和定性(针对抗原 A 和抗原 B 的 VH1/ VH2 和针对抗原 C 和抗原 D 的 VK1/ VK2)**

该实施例证实了双特异性 ScFv 抗体(针对抗原 A 和抗原 B 的 VH1/ VH2 和针对抗原 C 和抗原 D 的 VK1/ VK2)能通过针对 ScFv 载体中的相应抗原筛选的Vκ和 $V_H$ 单个区域的结合而制备。

为制备双特异性抗体 VH1/ VH2，用 NcoI/XhoI 酶切来自可变区载体 1(图 7)中的 VH1 单个区域，将其连接于 NcoI/XhoI 酶切后的可变区载体 2

中(图 7)以产生 VH1/可变区载体 2。VH2 单个区是从可变区载体 1 中经 PCR 扩增的，用引物在 5'端引入 SalI 限制酶位点，在 3'端引入 NotI 限制酶位点。然后 PCR 产物用 SalI/NotI 消化并将其连接于 SalI/NotI 酶切后的 VH1/可变区载体 2 中以生成(图 7)以产生 VH1/ VH2/可变区载体 2。

VK1/ VK2/可变区载体 2 用同样方式生成。制备的 VH1/ VH2 ScFv 和 VK1/ VK2 ScFv 的双特异性本质是通过前述的可溶性 scFv ELISA 法证实(见实施例 6, PCT/GB 02/003014)。竞争 ELISA 按前述方法进行(见实例 8, PCT/GB 02/003014)。

可能的结果:

- VH1/VH2 ScFv 能同时结合抗原 A 和抗原 B
- VK1/VK2 ScFv 能同时结合抗原 C 和抗原 D
- VH1/VH2 ScFv 的结合是竞争性的(当与抗原 A 结合时，VH1/VH2 ScFv 不能结合抗原 B)
- VK1/VK2 ScFv 的结合是竞争性的(当与抗原 C 结合时，VK1/VK2 ScFv 不能结合抗原 D)

**实施例 5. 双特异性 VH1/ VH2 Fab 和 VK1/ VK2 Fab 的构建及其结合特性的分析**

为制备 VH1/ VH2 Fab, 将 VH1 单个区域连接入 NcoI/lXhoI 消化的 CH 载体中(图 8)，以生成 VH1/CH; 将 VH2 单个区域连入 SalI/NotI 消化的 CK 载体中(图 9)，以生成 VH2/CK。将来自 VH1/CH 和 VH2/CK 的质粒共转染感受态大肠杆菌细胞，方法如前述。(见实施例 8, PCT/GB02/003014)。

用 IPTG 诱导包含 VH1/CH 和 VH2/CK 质粒的克隆以制备可溶性 VH1/ VH2 Fab，方法如前述。(见实施例 8, PCT/GB02/003014)

VK1/ VK2 Fab 用同样方法制备。

通过前述的竞争性 ELISA 法(见实施例 8, PCT/GB 02/003014)验证制备的 Fab。

可能的结果:

- VH1/ VH2 Fab 能同时结合抗原 A 和抗原 B
- VK1/ VK2 Fab 能同时结合抗原 C 和抗原 D
- VH1/ VH2 Fab 的结合是竞争性的(当与抗原 A 结合时，VH1/ VH2

Fab 不能结合抗原 B)

VK1/ VK2 Fab 的结合是竞争性的(当与抗原 C 结合时、Vk1/ Vk2 Fab 不能结合抗原 D)

**实例 6 整合 dAb 二聚体**

**概述**

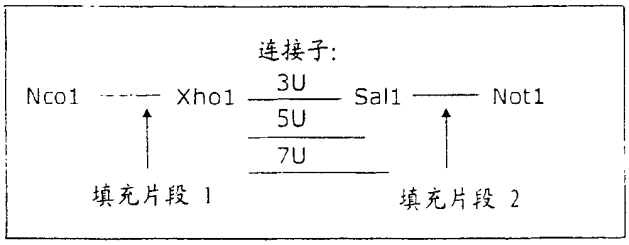
VH 和 VK 同二聚体是用能变形的多肽连接子连成 dAb-连接子-dAb 形式。载体的构建是 dAb-linker-dAb 形式，含有不同长度的甘氨酸-丝氨酸连接子 3U:$(Gly_4Ser)_3$、5U :$(Gly_4Ser)_5$、7U:$(Gly_4Ser)_7$。二聚体库的构建采用将 dAb 导向连接子上游： TAR1-5(VK)、TAR1-27(VK)、TAR2-5(VH)或 TAR2-6(VK)和在连接子下游的第二 dAb 的对应库。采用该法，选出新的二聚体 dAb。二聚化对抗原结合的效应能通过 ELISA、BIAcore 研究、细胞中和和受体结合分析测定。TAR 1-5 和 TAR1- 27 的二聚化大大改善了结合亲和力和中和水平。

**1.0 方法**

**1.1 库生成**

**1. 1.1 载体**

设计 pEDA3U、pEDA5U 和 pEDA7U 载体以导入与 dAb-连接子-dAb 形式兼容的不同长度的连接子。对于 pEDA3U，正链和反义链 73 个碱基对寡核苷酸连接子通过在缓冲液中的缓慢退火机制退火(95℃-5 分钟，80℃-10 分钟，70℃-15 分钟，56℃-15 分钟，42℃直到应用)，所述缓冲液包含 0.1MNaCl、10mMTris-HCl pH7.4；并克隆在 XhoI 和 NotI 限制性位点上。连接子包含 3 个$(Gly_4Ser)$单位和一个位于 SalI 和 NotI 克隆位点之间的填充区域(图解 1)。为了减少噬菌体展示技术选出单体 dAb 的可能性，填充区域设计成包含 3 个终止密码子、一个 SacI 限制位点和一个框移突变，目的是当无第二个 dAb 存在时，将所述区域置于读框外。对于 pEDA5U 和 7U，由于连接子长度的需要，每个载体设计了重叠的寡核苷酸连接子，用 Klenow 酶进行退火和延伸。然后，在克隆前纯化片段并用适当的酶消化，采用的限制性位点是 XhoI 和 NotI。




图解 1

### 1.1.2 库制备

对应于引导 dAb 的 N 末端 V 基因克隆于连接子的上游，限制性克隆位点是 NcoI 和 XhoI。$V_H$基因存在相应位点，然而克隆 VK 基因需要引入适当的限制性位点。这可以采用修饰后的 PCR 引物(VK-DLIBF: 5'cggccatggcgtcaacggacat ;VKXholR :5'atgtgcgctcgagcgtttgattt 3')和 2: 1 的 SuperTaq 酶(HTBiotechnology Ltd)和 pfu turbo 酶(Stratagene)混合物经 30 个循环的 PCR 扩增而获得。这维持了 5'末端的 NcoI 位点而破坏了相邻的 SalI 位点并在 3'末端引入了 XhoI 位点。5 个引导 dAb 被克隆入 3 个二聚体载体的每一个载体中：TAR1-5(VK)、TAR1-27(VK)、TAR2-5(VH)、TAR2-6(VK)和 TAR2-7(VK)。所有构建物均经测序分析鉴定。

在每个载体中(pEDA3U、5U 和 7U)的连接子上游克隆了引导 dAb: TAR1-5(VK)、TAR1-27(VK)、TAR2-5(VH)或 TAR2-6 (VK)后，相应的第二个 dAb 库被克隆在连接子下游。为达到这一目的，免费 dAb 库是来自第一轮筛选获得的噬菌体的 PCR 扩增产物，筛选既可以是当 TAR1-5 或 TAR1-27 是引导 dAb 时针对人 TNFα的 VK 库筛选(第一轮循环后大约 $1 \times 10^6$ 的多样性)，也可以是当 TAR2-5 或 TAR2-6 分别是引导 dAb 时针对人 p55 TNF 受体的 VH 或 Vk 库筛选(第一轮循环后二者均大约有 $1 \times 10^5$ 的多样性)。对于 VK 库 的 PCR 扩增是通过采用引物和 2: 1 的 SuperTaq 酶和 pfu turbo 酶混合物经 30 个循环的 PCR 扩增而获得。$V_H$库是采用能在基因 5'端引入一个 SalI 限制性位点的引物经 PCR 扩增而获得。用适当的限制酶消化 dAb 库的 PCRs 产物，并用 SalI/NotI 限制性位点将其连入相应载体中的连接子下游，并经电穿孔进入新鲜制备的感受态 TG1 细胞中。

获得的各个库的滴度如下：

TAR1-5 : pEDA3U =$4 \times 10^8$, pEDA5U =$8 \times 10^7$, pEDA7U = $1 \times 10^8$

TAR1-27 : pEDA3U = $6.2 \times 10^8$, pEDA5U= $1 \times 10^8$, pEDA7U =$1 \times 10^9$

TAR2h-5: pEDA3U =$4 \times 10^7$, pEDA5U = $2 \times 10^8$, pEDA7U = $8 \times 10^7$

TAR2h-6: pEDA3U = $7.4 \times 10^8$, pEDA5U = $1.2 \times 10^8$, pEDA7U = $2.2 \times 10^8$

**1.2 筛选**

**1.2.1 TNFa**

采用包被有人 TNFα 的免疫管进行筛选。简言之，用 1-4 ml 所需抗原过夜包被免疫管。然后用 PBS 洗包被免疫管 3 次，并用含 2%牛奶的 PBS 封闭 1-2 小时，再用 PBS 洗 3 次。用含 2%牛奶的 PBS 稀释噬菌体溶液并在室温下孵育 2 小时。然后用 PBS 洗管，用含 lmg/ml 胰蛋白酶的 PBS 洗脱噬菌体。研究了三种选择 TAR1-5 二聚体库的策略。第一轮筛选是在用 1μg/ml 或 20μg/ml 人 TNFα 包被的免疫管中进行，用含 0.1% Tween 的 PBS 洗 20 次。用洗提的噬菌体感染 TG1 细胞并测定其滴度。(例如, Marks et al J Mol Biol. 1991 Dec 5; 222(3): 581-97, Richmann et al Biochemistry. 1993 Aug 31 ; 32(34): 8848-55).

收获滴度为:

pEDA3U = $2.8 \times 10^7$(1μg/ml TNF)， $1.5 \times 10^8$(20μg/mlTNF),

pEDA5U = $1.8 \times 10^7$(1μg/ml TNF)， $1.6 \times 10^8$(20μg/mlTNF),

pEDA7U = $8 \times 10^6$(1μg/ml TNF)， $7 \times 10^7$(20μg/mlTNF)

采用三种不同的方法进行第二轮选择。

1. 在免疫管中，洗涤 20 次后过夜孵育再洗 10 次。

2. 在免疫管中，洗涤 20 次后在含有 1μg/ml TNFα 的洗涤缓冲液中室温孵育 1 小时，再洗 10 次。

3. 在链霉亲和素珠上筛选，采用 33pM 生物素化的人 TNFα (Henderikx etal., 2002, Selection of antibodies against biotinylated antigens.Antibody Phage Display: Methods and protocols, Ed. O'Brien and Atkin, Humana Press)。将第二轮筛选的单个克隆挑入到 96 孔板中，在 96 孔板中制备粗制上清预产物 2ml。

| | 第一轮人TNFα免疫管包被浓度 | 第二轮筛选方法 1 | 第二轮筛选方法 2 | 第二轮筛选方法 3 |
|---|---|---|---|---|
| pEDA3U | 1μg/ml | $1 \times 10^9$ | $1.8 \times 10^9$ | $2.4 \times 10^{10}$ |
| pEDA3U | 20μg/ml | $6 \times 10^9$ | $1.8 \times 10^{10}$ | $8.5 \times 10^{10}$ |
| pEDA5U | 1μg/ml | $9 \times 10^8$ | $1.4 \times 10^9$ | $2.8 \times 10^{10}$ |
| pEDA5U | 20μg/ml | $9.5 \times 10^9$ | $8.5 \times 10^9$ | $2.8 \times 10^{10}$ |
| pEDA7U | 1μg/ml | $7.8 \times 10^8$ | $1.6 \times 10^8$ | $4 \times 10^{10}$ |
| pEDA7U | 20μg/ml | $1 \times 10^{10}$ | $8 \times 10^9$ | $1.5 \times 10^{10}$ |

关于 TAR1-27 的选择按前述方法进行，并作以下修改。第一轮筛选是在用 1μg/ml 或 20μg/ml 人 TNFα 包被的免疫管中进行，用含 0.1% Tween 的 PBS 洗 20 次。第二轮筛选是洗涤 20 次后过夜孵育再洗 20 次。将来自第二轮筛选的单个克隆挑入到 96 孔板中，在 96 孔板中制备粗制上清预产物 2ml。

TAR1-27 滴度如下：

| | 人TNFα免疫管包被浓度 | 第一轮 | 第二轮 |
|---|---|---|---|
| pEDA3U | 1μg/ml | $4 \times 10^9$ | $6 \times 10^9$ |
| pEDA3U | 20μg/ml | $5 \times 10^9$ | $4.4 \times 10^{10}$ |
| pEDA5U | 1μg/ml | $1.5 \times 10^9$ | $1.9 \times 10^{10}$ |
| pEDA5U | 20μg/ml | $3.4 \times 10^9$ | $3.5 \times 10^{10}$ |
| pEDA7U | 1μg/ml | $2.6 \times 10^9$ | $5 \times 10^9$ |
| pEDA7U | 20μg/ml | $7 \times 10^9$ | $1.4 \times 10^{10}$ |

**1.2.2 TNF 受体 1(p55 受体; TAR2)**

如前述方法筛选 TAR2h-5 库。3 轮筛选是用 1μg/ml 或 20μg/ml 人 p55 TNF 受体包被的免疫管中进行，用含 0.1% Tween 的 PBS 洗 20 次后过夜孵育再洗 20 次。从第 2、3 轮筛选的单个克隆挑入到 96 孔板中，在 96 孔板中制备粗制上清预产物 2ml。

TAR2h-5 滴度如下：

| | 第一轮人$P^{55}$TNF受体免疫管包被浓度 | 第一轮 | 第二轮 | 第三轮 |
|---|---|---|---|---|
| pEDA3U | 1μg/ml | $2.4 \times 10^6$ | $1.2 \times 10^7$ | $1.9 \times 10^9$ |
| pEDA3U | 10μg/ml | $3.1 \times 10^7$ | $7 \times 10^7$ | $1 \times 10^9$ |
| pEDA5U | 1μg/ml | $2.5 \times 10^6$ | $1.1 \times 10^7$ | $5.7 \times 10^8$ |
| pEDA5U | 10μg/ml | $3.7 \times 10^7$ | $2.3 \times 10^8$ | $2.9 \times 10^9$ |
| pEDA7U | 1μg/ml | $1.3 \times 10^6$ | $1.3 \times 10^7$ | $1.4 \times 10^9$ |
| pEDA7U | 10μg/ml | $1.6 \times 10^7$ | $1.9 \times 10^7$ | $3 \times 10^{10}$ |

**1.3 筛选**

单个克隆是从不同筛选方法适当筛选的每个 3U、5U 和 7U 库的第 2 或 3 轮筛选中挑选出的。克隆在含有 100μg/ml 氨苄青霉素和 1% 葡萄糖的 2 × TY 中 37℃孵育过夜。将这种培养物的 1/100 稀释液接种于 2ml 的含 100μg/ml 氨苄青霉素和 0.1% 葡萄糖的 2 × TY 的 96 孔板中，37℃震荡培养直到 OD600 约为 0.9。然后培养物经 1mM IPTG 诱导在 30℃诱导过夜。上清在 sorval 平板离心机中 4000rpm 离心 15 分钟。上清预产物用于最初筛选。

**1.3. 1 ELISA**

采用蛋白 A/L ELISA 或抗原 ELISA 法比较单体和二聚体重组蛋白的结合活性。简言之，用抗原或蛋白 A/L 4℃过夜包被 96 孔板。用含 0.05% Tween 的 PBS 洗板，用 2% Tween-PBS 封闭 2 小时。样品加入板中室温孵育 1 小时，洗板并用第二(secondary)试剂室温孵育 1 小时。洗板并用 TMB 底物显色。蛋白 A/L HRP 或 India-HRP 用作第二试剂。对于抗原 ELISAs 来说，所用抗原浓度是 PBS 中 1μg/ml 的人 TNFα和人 TNF 受体 1。由于引导 dAb 的存在，在大多数情况下二聚体释放阳性 ELISA 信号，因此可通过 BIAcore 检测发出信号率测定值(offrate datermination)。

**1.3. 2 BIAcore**

对 TAR1-5 和 TAR2h-5 进行 BIAcore 分析。为了筛选，高密度(大约 10000 RUs)的人 TNFα与 CM5 芯片偶连。50μl 的人 TNFα(50μg/ml)偶连到 PH5.5 醋酸缓冲液中的芯片上(5μl/min)。用标准方法再生分析后的芯片是不可能的，因为人 TNFα不稳定，因此每个样本分析之后，芯片用缓冲液洗 10 分钟。

对于 TAR1-5，第二轮选择的克隆上清用 BIAcore 筛选。48 个克隆是用以下筛选方法获得的每一个 3U、5U 和 7U 库中筛选的。

R1: 1μg/ml 人 TNFα免疫管，R2: 1μg/ml 人 TNFα免疫管，过夜洗涤。R1: 20μg/ml 人 TNFα免疫管，R2: 20μg/ml 人 TNFα免疫管，过夜洗涤。

R1: 1μg/ml 人 TNFα免疫管，R2: 331 pM 生物素化的人 TNFα珠子。

R1: 20μg/ml 人 TNFα免疫管，R2: 331 pM 生物素化的人 TNFα珠子。

为了筛选，高密度(大约 4000 RUs)的人 TNFα受体与 CM5 芯片偶连。100μl 的人 TNFα(10μg/ml)连接到 PH5.5 醋酸缓冲液中的芯片上(5μl/min)。检测标准再生条件(pH2 或 pH3 的甘氨酸)但在每种情况下抗原从芯片表面移出如携带 TNFα的情况，因此每次分析样本后，芯片用缓冲液洗 10 分钟。

对 TAR2-5，筛选第二轮选择的克隆上清。

48 个克隆是用以下筛选方法从每一个 3U、5U 和 7U 库中筛选的。

R1: 1μg/ml 人 p55 TNFα受体免疫管，R2: 1μg/ml 人 p55 TNFα受体免疫管，过夜洗涤。

RI: 10μg/ml 人 p55 TNFα受体免疫管，R2: 10μg/ml 人 p55 TNFα受体免疫管，过夜洗涤。

**1.3.3 受体和细胞分析**

在受体分析中二聚体的中和能力如下进行:

***受体结合***

测试抗-TNF dAb 对 TNF 与重组 TNF 受体 1 结合的抑制能力。简言之，用 30mg/ml 的抗人 Fc 小鼠单克隆抗体(Zymed, San Francisco, USA)过夜孵育 Maxisorp 板。用含 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗孔，然后在与 100ng//ml TNF 受体 1 Fc 融合蛋白(R & D Systems, Minneapolis, USA)孵育前，用含 1% BSA 的 PBS 封闭孔。抗-TNF dAb 与 TNF 混合后加入洗好的孔中，终浓度为 10ng/ml。检测 TNF 结合是用 0. 2mg/ml 生物素化的抗 TNF 抗体、(HyCult biotechnology, Uben, Netherlands)、1:500 稀释的 HRP 标记的链霉亲和素(Amersham Biosciences, UK)，接着与 TMB 底物(KPL, Gaithersburg, USA)孵育。加入 HCl 终止反应，读出 450nm 处的吸光度。抗-TNF dAb 活性导致 TNF 结合的减少，所以与 TNF 对照组相比吸光度下降。

***L929 细胞毒分析***

可以检测抗-TNF dAb对TNF杀伤小鼠L929纤维细胞作用的中和能力。

(Evans, T.(2000)Molecular Biotechnology 15, 243-248)。简言之，将 L929 细胞装入微孔板中与抗-TNF dAb 和 100pg/ml TNF 以及 lmg/ml 放线菌素 D(Sigma, Poole, UK)共同孵育过夜。与[3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-碳氧甲氧苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑 ([3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carbboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)(Promega, Madison, USA)孵育后通过读取 490nm 处的吸光度测定细胞活力。抗-TNF dAb 活性导致 TNF 细胞毒活性下降，所以与 TNF 对照组相比吸光度增加。

在最初的筛选中，上述备用于 BIAcore 分析的上清也可用于受体分析中。所选二聚体的进一步分析也可采用纯化的蛋白的受体和细胞分析来进行。

*HeLa IL-8 分析*

抗-TNFRl 或抗-TNFαdAb 的测试可根据其对 TNF 诱导 Hela 细胞分泌 IL-8 的中和能力来进行。(采用根据 Akeson, L.等的方法改造的方法(1996)Journal of Biological Chemistry 271, 30517-30523, 描述了 IL-1 诱导 HUVEC 产生 IL-8; 这里我们观察了人 TNFα的诱导作用，并且 我们采用 HeLa 细胞取代 HUVEC 细胞系)。简言之，将 HeLa 细胞装入微孔板中与 dAb 和 300pg/ml TNF 共同孵育过夜。孵育后将上清吸走，用夹心 ELISA(R & D Systems)测定 IL-8 浓度。与 TNF 对照组相比，抗-TNFRl dAb 活性导致分泌入上清中的 IL-8 下降。

L929 分析广泛用于下列实验; 然而，HeLa IL-8 分析优选用来测定抗-TNF 受体 1(p55)配体; L929 分析中小鼠 p55 的存在造成其用途中的某些限制。

**1.4 序列分析**

测定在 BIAcore 和受体分析筛选中被证明具有有意义特性的二聚体的序列。所述序列在序列表中详细记载。

**1.5 格式化**(formatting)

1.5.1 TAR1-5-19 二聚体

显示具有良好中和特性的 TAR1-5 二聚体在细胞和受体分析中被重定格式(re-formatted)和分析。TAR1-5 引导 dAb(TAR1-5guiding dAb)被亲和力成熟的克隆 TARl-5-19 取代。为实现这一目的，从单独二聚体对中克隆出

TAR1-5 并用 PCR 扩增的 TAR1-5-19 取代。此外，TAR1-5-19 同二聚体(homodimer)也在 3U、5U 和 7U 载体中构建。基因 N -末端拷贝经 PCR 扩增并用上述方法克隆，且 C-末端基因片段利用存在的 SalI 和 NotI 限制位点克隆。

**1.5.2 突变**

琥珀终止密码子出现在 dAb2 中，通过定点突变将 TAR1-5 二聚体对中的一个 C-末端 dAb 突变成谷氨酰胺。

**1.5.3 Fabs**

包含 TAR1-5 或 TAR1-5-19 的二聚体重定格式进入 Fab 表达载体中，用 SfiI 和 NotI 限制性位点将 dAb 克隆入含有 CK 或 CH 基因的表达载体中，并对其进行测序分析。CK 载体衍生自一种基于耐氨苄青霉素的 pUC 载体，CH 载体衍生自一种耐氯霉素的 pACYC 载体。为了表达 Fab，将 dAb-CH 和 dAb-CK 构建体共同转染进 HB2151 细胞中，在含有 0.1% 葡萄糖、100μg/ml 氨苄青霉素和 10μg/ml 氯霉素的 2×TY 中生长培养。

**1.5.4 铰链二聚作用**

测定借助胱氨酸键构成的二聚体 dAb。一段修改后的人 IgGC1 铰链区氨基酸短序列 EPKSGDKTHTCPPCP 通过基因工程加入到 dAb 的 C 末端区。按前述方法对编码此序列的寡核苷酸连接子进行合成和退火。用 XhoI 和 NotI 限制酶位点将连接子克隆入含有 TAR1-5-19 的 pEDA 载体中。二聚作用原位发生于外周胞质。

**1.6 表达和纯化**

**1.6.1 表达**

如前所述，96 孔板中制备的 2ml 上清用于初始筛选。初筛后进一步分析筛选的二聚体。二聚体构建体表达在 TOP10F'或 HB2151 细胞的上清中。简要地说，新鲜划线平板上的单个菌落在含有 100μg/ml 氨苄青霉素和 1% 葡萄糖的 2×TY 中 37℃孵育过夜。将这种培养物的 1/100 稀释液接种于含 100μg/ml 氨苄青霉素和 0.1% 葡萄糖的 2×TY 中 37℃震荡培养直到 $OD_{600}$ 约为 0.9。然后培养物经 1mM IPTG 在 30℃诱导过夜。通过离心去除细胞并用蛋白 A 或 L 琼脂糖纯化上清。

Fab 和半胱氨酸铰链二聚体在 HB2152 细胞中表达为周质蛋白。过夜培养物 1: 100 稀释后加入到含有 0.1% 葡萄糖和适当的抗生素的 2×TY 中生

长，30℃震荡培养直到 $OD_{600}$ 约为 0.9。然后，培养物用 1mM IPTG 诱导 3-4 小时，温度 25℃。通过离心收集细胞，沉淀重悬于周质制备缓冲液中(30mMTris-HCl pH8.0, 1mM EDTA, 20%蔗糖)。保留离心后上清，沉淀重悬于 5mM $MgSO_4$ 中。再次离心收集上清、汇集并纯化。

**1.6.2 蛋白 A/L 的纯化**

对来自蛋白 L 琼脂糖(Affitech, Norway)或蛋白 A 琼脂糖(Sigma, UK)的二聚体蛋白的纯化的优化进行检测。用蠕动泵分批或柱洗脱蛋白。测试三种缓冲液 0.1M 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液 pH2.6、0.2M 甘氨酸 pH2.5 和 0.1M 甘氨酸 pH2.5。最优化条件确定为在蠕动泵条件下采用 0.1M 甘氨酸 pH2.5 洗脱 10 个柱体积。从蛋白 A 中的纯化是在蠕动泵条件下采用 0.1M 甘氨酸 pH2.5 进行的。

**1.6.3 FPLC 纯化**

进一步纯化是采用 AKTA Explorer 100 系统(Amersham Biosciences Ltd)通过 FPLC 分析进行的。通过离子交换层析(lml Resource S-Amersham Biosciences Ltd)分级分离 TAR1-5 和 TAR1-5-19 二聚体，用 50mM 醋酸盐缓冲液(pH4)中 0-1M 浓度梯度的 NaCl 洗脱。铰链二聚体通过离子交换纯化(lml Resource Q Amersham Biosciences Ltd)用 25mMTris HCl pH 8.0 中 0-1M NaCl 浓度梯度洗脱。通过大小排阻层析法纯化 Fabs，采用 superose 12 柱(Amersham Biosciences Ltd)进行，含 0.05% tween 的 PBS 流速为 0.5ml/min。接下来用 vivaspin 5K 截留(cut off)浓缩器(Vivascience Ltd)浓缩纯化的样品。

**2.0 结果**

**2.1 TAR1-5 二聚体**

6×96 个克隆是从包括所有库和所有筛选条件的第二轮选择中挑选的。上清预产物的制备和分析是采用抗原和蛋白 L ELISA、BIAcore 和受体分析进行的。在 ELISAs 中，每种选择方法获得的阳性结合克隆被鉴定并且被分布于 3U、5U 和 7U 库之间。然而，由于引导 dAb 一直存在，所以此法不能区别结合子(binder)亲和力的高低，故采用 BIAcore 分析。

BIAcore 分析采用 2ml 上清液。BIAcore 分析显示：与单体 TAR1-5 相比二聚体的 Koff 率大大改进。单体 Koff 率范围是 $10^{-1}$M，二聚体 Koff 率范围是 $10^{-3}$-$10^{-4}$M。从 3U、5U 和 7U 库中选择出 Koff 率很低的 16 个克隆，并进行测序。此外，上清用于受体分析中中和人 TNFα 能力的分析。

对这些分析中有中和作用的 6 个引导克隆(下称 dl-d6)进行测序分析，结果显示：所得 6 个克隆中只有 3 个不同的第二 dAb(dAbl、dAb2 和 dAb3)，但是在第二个 dAb 出现一次以上的地方，它们通过不同长度的连接子连接。

TAR1-5dl : 3U 连接子 $2^{nd}$ dAb=dAbl-lμg/ml 抗原免疫管过夜洗涤

TAR1-5d2 : 3U 连接子 $2^{nd}$ dAb=dAb2-lμg/ml 抗原免疫管过夜洗涤

TARl-5d3 : 5U 连接子 $2^{nd}$ dAb=dAb2-lμg/ml 抗原免疫管过夜洗涤

TAR1-5d4 :5U 连接子 $2^{nd}$ dAb=dAb3-20μg/ml 抗原免疫管过夜洗涤

TARl-5d5 : 5U 连接子 $2^{nd}$ dAb=dAbl-20μg/ml 抗原免疫管过夜洗涤

TARl-5d6 : 7U 连接子 $2^{nd}$ dAb=dAbl-R1:lμg/ml 抗原免疫管过夜洗涤，R2:珠子。

进一步测定 6 个引导克隆(lead clone)。用蛋白 L 琼脂糖纯化外周胞质和上清液中的蛋白并用细胞和受体分析测定。中和作用水平是变化的(表 1)。确定蛋白制备的优化条件。从 HB2151 细胞中制备的蛋白产量最高(大约是培养物的 10mgs/L)。室温条件下将上清与蛋白 L 共同孵育 2 小时后 4℃过夜。用 PBS/NaCl 清洗珠子并用蠕动泵上柱于 FPLC 柱上。用 10 倍体积的 PBS/NaCl 洗柱，再用 0.1M 甘氨酸 pH2.5 洗脱。一般情况下，二聚体在单体后洗脱下来。

用 FPLC 纯化 TARl-5dl-6 二聚体。获得 3 个种类，用 FPLC 纯化并用 SDS-PAGE 鉴定。一类相当于单体，另两类相当于不同大小的二聚体。两类中较大的可能由于 C 末端标记的存在。用受体分析检测这些蛋白。表 1 中给出的数据代表从两个二聚体种类中获得的最优结果(图 11)。

二聚体对(即, dAbl, dAb2 和 dAb3)中的 3 个第二个 dAb 作为单体被克隆并用 ELISA 和细胞和受体分析检测。所有 3 种 dAb 在抗原 ELISA 中能特异性结合 TNF，不与塑料和 BSA 发生交叉反应。作为单体，在细胞或受体分析中无一种 dAb 具有中和作用。

**2.1.2 TAR1-5-19 二聚体**

用 TARl-5-19 取代 6 个引导克隆中的 TAR1-5。用细胞和受体分析法分析所有 TAR1-5-19 二聚体，采用的是完整蛋白(只蛋白 L 纯化)，除非另有说明(表 2)。在细胞分析中，TARl-5-19d4 和 TARl-5-19d3 具有最好的 $ND_{50}$(约 5nM)，这与受体分析结果一致，并且比 TAR1-5-19 单体($ND_{50}$ 约 30nM)有改进。虽然纯化的 TAR1-5 二聚体在受体和细胞分析中结果是变化的，而

TAR1-5-19 二聚体的结果比较一致。变化表现在蛋白纯化中使用不同洗脱缓冲液时。用 0.1M 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液 pH2.6 或 0.2M 甘氨酸 pH2.5 缓冲液尽管能从蛋白 L 琼脂糖中洗脱所有蛋白，但在多数情况下使蛋白功能大大降低。

在发酵罐中表达 TARl-5-19d4 并用离子交换 FPLC 法纯化获得完全纯化的二聚体。用 FPLC 纯化获得 3 种 TARl-5d4，相当于一种单体和两种二聚体。对二聚体进行氨基酸测序。用受体分析 TARI-5-19 单体和 TARl-5-19d4，结果是单体 IC50 为 30nM，二聚体 IC50 为 8nM。TARl-5-19d4 和 TARl-5d4 与 TARl-5-19 单体比较的受体分析结果如图 10 显示。

制备表达 3U、5U 和 7U 载体中的 TAR1-5-19 同型二聚体，并用蛋白 L 纯化。用细胞和受体分析法测定蛋白，测定值 $IC_{50}$(受体分析用)和 $ND_{50}$(细胞分析用)见表 3 和图 12。

**2.2 Fabs**

TAR1-5 和 TARl-5-19 二聚体也克隆进 Fab 形式(Fab format)中，表达和用蛋白 L 琼脂糖纯化。用受体分析评估 Fabs(表 4)。结果显示：TARl-5-19 和 TAR1-5 二聚体的中和作用水平与其起源的初始 $Gly_4Ser$ 连接子连接的二聚体相同。表达展示在 CH 和 CK 上的 TARl-5-19 的 TARl-5-19 Fab，用蛋白 L 纯化并用受体分析评估。IC50 结果约为 1nM。

**2.3 TAR1-27 二聚体**

3 × 96 个克隆是从包括所有库和所有筛选条件的第二轮选择中挑选的。制备 2ml 上清预产物以使用 ELISA 和生物分析法分析。抗原 ELISA 分析得到 71 个阳性克隆。粗制上清的受体分析得到 42 个具有抑制活性的克隆(TNF 结合 0-60%)。多数情况下抑制特性与强的 ELISA 信号相关。测定 42 个克隆的序列，其中 39 个有独特的第二 dAb 序列。进一步分析具有最好抑制活性的 12 种二聚体。

12 个中和作用的克隆表达在 200ml 上清预产物中，用蛋白 L 纯化。用蛋白 L 和抗原 ELISA、BIAcore 和受体分析评价。在所有情况下获得强阳性 ELISA 信号。BIAcore 分析提示所有克隆具有快速 $K_{on}$ 和 $K_{off}$ 率(fast on and off rate)。与单体 TAR1-27 相比 $K_{off}$ 率有所改进。而且 TAR1-27 二聚体的 $K_{off}$ 率($K_{off}$ 率范围大约是 $10^{-1}$-$10^{-2}$M)比先前测得的 TAR1-5 二聚体快($K_{off}$ 率范围大约是 $10^{-3}$-$10^{-4}$M)。纯化二聚体的稳定性令人怀疑，因此为了增加其

稳定性，在两种 TAR1-27 二聚体(d2 和 dl6)的纯化过程中添加 5% 甘油、0.5% Triton X100 或 0.5% NP40(Sigma)。NP40 或 Triton X 100™ 的加入能使纯化物产量提高约 2 倍。用受体分析评价所述两种二聚体。在所有纯化条件下，TARl-27d2 的 $IC_{50}$ 为约 30nM。TARl-27dl6 在不用稳定剂时纯化后无中和作用，但在稳定条件下纯化时，其 $IC_{50}$ 为约 50nM。

**2.4 TAR2-5 二聚体**

3 × 96 个克隆是从包括所有库和所有筛选条件的第二轮选择中挑选的。制备 2ml 上清预产物用于分析。对每块板进行蛋白 A 和抗原 ELISAs 分析。采用 BIAcore 分析确定了 30 个感兴趣的克隆具有好的 $K_{off}$ 率($K_{off}$ 率范围介于 $10^{-2}$-$10^{-3}$M 之间)。对克隆测序分析确定了 13 个独特的二聚体。

**表 1:TAR1-5 二聚体**

| 二聚体 | 细胞类型 | 纯化 | 蛋白级分 | 洗脱条件 | 受体细胞分析 |
|---|---|---|---|---|---|
| TAR1-5d1 | HB2151 | 蛋白 L + FPLC | 小的二聚体 | 0.1M 甘氨酸 pH2.5 | RA~30nM |
| TAR1-5d2 | HB2151 | 蛋白 L + FPLC | 小的二聚体 | 0.1M 甘氨酸 pH2.5 | RA~50nM |
| TAR1-5d3 | HB2151 | 蛋白 L + FPLC | 大的二聚体 | 0.1M 甘氨酸 pH2.5 | RA~300 nM |
| TAR1-5d4 | HB2151 | 蛋白 L + FPLC | 小的二聚体 | 0.1M 甘氨酸 pH2.5 | RA~3n M |
| TAR1-5d5 | HB2151 | 蛋白 L + FPLC | 大的二聚体 | 0.1M 甘氨酸 pH2.5 | RA~200 nM |
| TAR1-5d6 | HB2151 | 蛋白 L + FPLC | 大的二聚体 | 0.1M 甘氨酸 pH2.5 | RA~100 nM |

*注意二聚体 2 和二聚体 3 具有相同的第二 dAb(称为 dAb2)，但具有不同长度的连接子(d2 =$(Gly_4Ser)_3$，d3 =$(Gly_4Ser)_3$)。dAbl 是二聚体 1、5 和 6 中的伴侣 dAb。dAb3 是二聚体 4 中的伴侣 dAb。伴侣 dAb 单独无中和作用。除非另外说明，FPLC 纯化是通过阳离子交换。经 FPLC 获得的每一二聚体的最佳二聚体种类通过这些分析决定。

**表 2: TAR1-5-19 二聚体**

| 二聚体 | 细胞类型 | 纯化 | 蛋白级分 | 洗脱条件 | 受体/细胞分析 |
|---|---|---|---|---|---|
| TAR1-5-19 d1 | TOP10F' | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 甘氨酸 pH 2.0 | RA~15 nM |
| TAR1-5-19 d2 (无终止密码子) | TOP10F' | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 甘氨酸 pH 2.0 + 0.05%NP40 | RA~2n M |
| TAR1-5-19d3 (无终止密码子) | TOP10F' | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 甘氨酸 pH 2.5 + 0.05%NP40 | RA~8n M |
| TAR1-5-19 d4 | TOP10F' | 蛋白 L + FPLC | FPLC纯化的级分 | 0.1M 甘氨酸 pH2.0 | RA~2-5nM CA~12 nM |
| TAR1-5-19 d5 | TOP10F' | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 甘氨酸 pH2.0 + NP40 | RA~8n iM CA~10 nM |
| TAR1-5-19 d6 | TOP10F' | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 甘氨酸 pH 2.0 | RA~10 nM |

## 表 3: TAR1-5-19 同二聚体

| 二聚体 | 细胞类型 | 纯化 | 蛋白级分 | 洗脱条件 | 受体/细胞分析 |
|---|---|---|---|---|---|
| 同二聚体 | | | | | nM CA~30 nM |
| TAR1-5-19 5U 同二聚体 | HB2151 | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 甘氨酸 pH2.5 | RA~2n M CA~3n M |
| TAR1-5-19 7U 同二聚体 | HB2151 | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 甘氨酸 pH2.5 | RA~10 nM CA~15 nM |
| TAR1-5-19 cys 铰链 | HB2151 | 蛋白 L +FPLC | FPLC 纯化的二聚体级分 | 0.1M 甘氨酸 pH2.5 | RA~2n M |
| TAR1-5-19CH/ TAR1-5-19 CK | HB2151 | 蛋白 | 总蛋白 | 0.1M 甘氨酸 pH2.5 | RA~1n M |

## 表 4: TAR1-5/TAR1-5-19 Fabs

| 二聚体 | 细胞类型 | 纯化 | 蛋白级分 | 洗脱条件 | 受体/细胞分析 |
|---|---|---|---|---|---|
| TAR1-5CH/ dAb1 CK | HB2151 | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 柠檬酸盐 pH2.6 | RA~90 nM |
| TAR1-5CH/ dAb2 CK | HB2151 | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 甘氨酸 pH2.5 | RA~30 nM CA~60 nM |
| dAb3CH/ TAR1-5CK | HB2151 | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 柠檬酸盐 pH2.6 | RA~100nM |
| TAR1-5-19CH/ dAb1 CK | HB2151 | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 甘氨酸 pH2.0 | RA~6nM |
| dAb1 CH/ TAR1-5-19CK | HB2151 | 蛋白 L | 0.1M 甘氨酸 pH2.0 | Myc/标记 | RA~6nM |
| TAR1-5-19CH/ dAb2 CK | HB2151 | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 甘氨酸 pH2.0 | RA~8nM CA~12 nM |
| TAR1-5-19CH/ dAb3CK | HB2151 | 蛋白 L | 总蛋白 | 0.1M 甘氨酸 pH2.0 | RA~3nM |

**TARI-5-19CYS 二聚体的 PCR 构建**

见实施例 8 描述的 dAb 三聚体。三聚体的制备方法产生单体、二聚体和三聚体的混合物。

**TARI-5-19CYS 二聚体的的表达和纯化**

用蛋白 L 琼脂糖捕获法从培养上清中纯化二聚体，如实施例 8 所述。

**从 TARI-5-19CYS 二聚体中分离 TARI-5-19CYS 单体**

按照厂商指南操作，阳离子交换之前，采用 PD-10 柱(Amersham Pharmacia)将混合的单体/二聚体样品缓冲交换入 50 mM 醋酸钠缓冲液 pH 4.0 中。然后将样品应用于已用 50 mM 醋酸钠溶液 pH 4.0 平衡过的 1mL Resource S 阳离子交换柱中(AmershamPharmacia)。采用以下的 50 mM 乙酸钠 pH 4.0 中的盐浓度梯度分离单体和二聚体:

15 个柱体积以上的 150-200mM 氯化钠

10 个柱体积以上的 200-450mM 氯化钠

15 个柱体积以上的 450-1000mM 氯化钠

用 SDS-PAGE 鉴定只含有二聚体的级分，然后汇集，最后加入 1/5 柱体积的 1M Tris pH 8.0 将 pH 增加到 8.0。

**体外的功能结合分析: TNF 受体分析和细胞分析**

采用 TNF 受体和细胞分析法确定人 TNFa 二聚体的亲和力。受体分析中 $IC_{50}$ 大约为 0.3-0.8 nM; 细胞分析中的 $ND_{50}$ 大约为 3-8 nM。

**其它可能的 TAR1-5-19CYS 二聚体形式**

PEG 二聚体和常规合成的马来酰亚胺二聚体

Nektar(Shearwater)提供一系列双马来酰亚胺 PEG[mPEG2-(MAL)2 或 mPEG-(MAL)2]，其能使单体形成二聚体，二聚体具有一个小连接子将 dAb 分开，两个 dAb 均连接在大小为 5-40 kDa 的 PEG 上。在 TNF 受体分析中，已显示 5kDa 的 mPEG-(MAL)2(即：[TAR1-5-19]-Cys-马来酰亚胺-PEG × 2，其中马来酰亚胺在二聚体中被连接在一起)的亲和力为 1-3 nM。同样也可采用 TMEA(Tris[2-马来酰亚胺乙基]胺)(Pierce Biotechnology)和其它双功能连接子制备二聚体。

化学偶连方法用 2, 2'-二硫二吡啶(Sigma Aldrich)制备二硫化物二聚体和还原的单体也是可能的。

**在 dAb C-末端加入多肽连接子或铰链**

小连接子可以是$(Gly_4Ser)n$ 这里 n=l-10，如，1, 2, 3, 4, 5, 6 或 7，也可以是一种免疫球蛋白(如，IgG 铰链区或随机肽序列(如，从随机肽序列库中筛选的)，能重组在 dAb 和末端半胱氨酸之间。这可用于制备上述二聚体。

**实施例 8**

**dAb 三聚作用**

**概要**

为了 dAb 三聚化，在蛋白 C 末端需要游离的半胱氨酸。半胱氨酸残基一旦还原释放出游离硫醇，那么能用于特异性地偶连蛋白形成三聚的马来酰亚胺分子，例如：TMEA(Tris[2-马来酰亚胺乙基]胺)(Tris [2- maleimidoethyl] amine)。

**PCR 构建 TAR1-5-19CYS**

下列寡核苷酸用于特异性用 SalI 和 BamHI 位点 PCR TAR1-5-19 克隆和引入末端半胱氨酸残基。

```
                SalI
               --------
    Trp Ser Ala Ser Thr Asp* Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1   TGG AGC GCG TCG ACG GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCT CTG TCT GCA TCT GTA
    ACC TCG CGC AGC TGC CTG TAG GTC TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGA GAC AGA CGT AGA CAT

    Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr Leu His Trp
```

```
 61  GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT GAT AGT TAT TTA CAT TGG
     CCT CTG GCA CAG TGG TAG TGA ACG GCC CGT TCA GTC TCG TAA CTA TCA ATA AAT GTA ACC

     Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln
121  TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AGT GCA TCC GAG TTG CAA
     ATG GTC GTC TTT GGT CCC TTT CGG GGA TTC GAG GAC TAG ATA TCA CGT AGG CTC AAC GTT

     Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
181  AGT GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC
     TCA CCC CAG GGT AGT GCA AAG TCA CCG TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG

     Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro
241  AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT GTG TGG CGT CCT
     TCG TCA GAC GTT GGA CTT CTA AAA CGA TGC ATG ATG ACA GTT GTC CAA CAC ACC GCA GGA
                                                                 BamHI
                                                                 --------
     Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Cys *** *** Gly Ser Gly
301  TTT ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG TGC TAA TAA GGA TCC GGC
     AAA TGC AAG CCG GTT CCC TGG TTC CAC CTT TAG TTT GCC ACG ATT ATT CCT AGG CCG
```

(* TARl-5-19CYS 序列起始点)

正向引物:

5'-TGGAGCGCGTCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCA-3'

反向引物:

5'-TTAGCAGCCGGATCCTTATTAGCACCGTTTGATTTCCAC-3'

PCR 反应(50μl 体积)如下建立: 200μM dNTPs, 0.4μM 的各种引物, 5μL 的 10 × PfuTurbo 缓冲液(Stratagene), 100 ng 的模板质粒(编码 TAR1-5-19), 1μL 的 PfuTurbo 酶(Stratagene), 用无菌水调节反应体积为 50μL。应用下列 PCR 条件: 初始变性步骤 94℃2 分钟, 然后进行以下 25 个循环: 94℃ 30 秒, 64℃ 30 秒和 72℃30 秒, 同时包括最后一步延伸 72℃ 5 分钟。纯化 PCR 产物并用 SalI 和 BamHI 消化后连接到经同样限制酶消化的载体上。采用 DNA 测序证实正确克隆。

**TARl-5-19CYS 的表达和纯化**

按照操作指南将 TAR1-5-19CYS 载体转化入 BL21(DE3)pLysS 化学处理的感受态细胞(Novagen)。采用筛选携带 dAb 质粒的细胞。培养建立在一个含有 500ml 极好肉汤(Sigma-Aldrich)100μg/ml 羧苄青霉素和 37μg/ml 氯霉素的 2L 带滤膜板的锥型瓶(baffled flask)中。30℃ 200rpm 振荡培养直到 $OD_{600}$ 为 1-1.5, 然后用 1mM IPTG 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷, Melford 实验

室提供)诱导培养。允许 dAb 在 30℃条件下表达 12-16 小时。发现绝大多数 dAb 存在于培养基中。因此，离心(8, 000 × g，30 分钟)分离培养基中的细胞，上清用于纯化 dAb。在每升上清中加入 30 mL 的蛋白 L 琼脂糖(Affitech)，允许 dAb 间歇搅拌结合 2 小时。然后，在吸出上清前允许树脂借重力沉淀 1 小时。然后将琼脂糖装入一个 XK 50 的柱(Amersham Phamacia)中，用 10 倍体积的 PBS 洗柱。用含 100 mM 甘氨酸 pH 2.0 的 PBS 洗脱结合的 dAb，然后加入 1/5 体积的 1 M Tris pH8.0 中和蛋白所在级分。每升培养上清中分离出 20mg 纯蛋白，其中单体和二聚体的比例为 50:50。

**TAR1-5-19CYS 的三聚化**

用 5 mM 二硫苏糖醇(DTT)还原 2.5 ml 的 100 μM TAR1-5-19CYS，室温放置 20 分钟。然后用 PD-10 柱(AmershamPharmacia)缓冲交换。柱子已预先用 5 mM EDTA, 50 mM 磷酸钠 pH 6.5 平衡过，按照操作说明进行样品处理和洗脱。样品置于冰上备用。TMEA(Tris [2-马来酰亚胺乙基]胺)购自 Pierce Biotechnology。20 mM TMEA 的储存液在 100% DMSO(二甲基亚砜)中制备。研究发现 TMEA 浓度大于 3: 1(dAb : TMEA 的摩尔比)时导致蛋白的快速沉淀和交联。同时随着 PH 的增加，沉淀和交联率也升高。因此，用 100μM 还原的 TAR1-5-19CYS, 加入 25μM TMEA 使蛋白三聚化，反应在室温下进行 2 小时。发现在偶联反应进行时加入添加剂如甘油或乙二醇至 20%(v/v)能明显降低三聚体的沉淀。偶联反应后用 SDS-PAGE 分析显示在溶液中存在单体、二聚体和三聚体。

**TAR1-5-19CYS 的三聚体的纯化**

每毫升 TMEA-TAR1-5-19cys 反应物中加入 40μL 40% 冰醋酸以使 pH 值降到约 4.0。然后将样品应用于已用 50 mM 醋酸钠液 pH 4.0 平衡过的 1mL Resource S 阳离子交换柱中(AmershamPharmacia)。采用 30 个柱体积的 50 mM 乙酸钠 pH 4.0 中 340-450mM 盐浓度梯度的氯化钠部分分离二聚体和三聚体。只含有三聚体的级分用 SDS-PAGE 鉴定，然后汇集并加入 1/5 体积的 1M Tris pH 8.0 将 pH 增加到 8。为防止在浓缩过程中三聚体发生沉淀(采用 5K 截留 Viva 螺转浓缩器; Vivascience)，样品中加入 10% 甘油。

**体外功能的结合分析: TNF 受体分析和细胞分析**

采用 TNF 受体和细胞分析可测定三聚体与人 TNF α 的亲和力。受体分析中的 IC50 是 0.3nM ；细胞分析中的 ND50 范围在 3-10nM 之间(例如，

3nM)。

**其它可能的 TAR1-5-19CYS 三聚体形式**

**TAR1-5-19CYS 也可采用下列试剂形成三聚体:**

PEG 三聚体和常规合成的马来酰亚胺三聚体

Nektar(Shearwater)提供一系列多臂 PEGs，其能化学修饰 PEG 末端。因此，采用一种在每个臂末端具有马来酰亚胺功能团的 PEG 三聚体使 dAb 发生三聚化，方式与前述的采用 TMEA 的方法相同。PEG 还具有增加三聚体的可溶性的优点可防止三聚体的聚集。因此，可生成一种 dAb 三聚体，其中每个 dAb 具有连接在马来酰亚胺功能团上的 C 末端半胱氨酸，马来酰亚胺功能团连接到 PEG 三聚体上。

在 dAb C-末端加入多肽连接子或铰链

小连接子可以是$(Gly_4Ser)n$ 这里 n=l-10，如，1，2，3，4，5，6 或 7，也可以是一种免疫球蛋白(如，IgG 铰链区或随机肽序列(如，从随机肽序列库中筛选的)，能重组在 dAb 和末端半胱氨酸之间。当用于制备多聚合体(如，二聚体或三聚体)时，这还能在单个单体间引入更大的弹性度和距离，这有助于改进对靶的结合特性，例如：如同人 TNF α 的多亚基靶。

**实施例 9.**

**针对人血清白蛋白(HSA)和小鼠血清白蛋白(MSA)的单个区域抗体集合物(dAb)的筛选**

本实施例解释一种制备针对血清白蛋白的单个区域抗体(dAb)方法。描述了同时针对小鼠血清白蛋白(MSA)和人血清白蛋白(HSA)的 dAb 的筛选方法。在实验中利用了三种人噬菌体展示抗体库，每一种基于单个人 $V_H$ 框架(见图 13：基于 V3-23/DP47 和 JH4b 的胚系 $V_H$ 序列)或 VK 框架(见图 15：基于 ol2/o2/DPK9 和 Jkl 的胚系 VK 序列)，具有纳入互补决定区(CDR1，CDR2 和 CDR3)的的 NNK 密码子编码的侧链多样性。

库 1($V_H$):

多样性位于：H30，H31，H33，H35，H50，H52，H52a，H53，H55，H56，H58，H95，H97，H98.

库大小：$6.2 \times 10^9$

库 2($V_H$):

多样性位于: H30, H31, H33, H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H97, H98, H99, H100, Hl00a, Hl00b.

库大小: $4.3 \times 10^9$

库 3(V κ):

多样性位于: L30, L31, L32, L34, L50, L53, L91, L92, L93, L94, L96

库大小: $2 \times 10^9$

$V_H$ 和 V κ 库已通过各自结合蛋白 A 和蛋白 L 属类配体预筛选，因此未选择库中的大多数克隆是功能性的。上述库大小与预筛选后的大小一致。

分别采用每一种库进行针对血清白蛋白的两轮筛选。每一轮筛选中，抗原用 4mlPBS 配成 100μg/ml 的浓度用于包被免疫管(nunc)。第一轮选择中，3 种库的每一种针对 HSA(Sigma)和 MSA(Sigma)分别淘选(panned)。在第二轮选择中，来自 6 个第一轮选择的每一个的噬菌体针对(i)相同抗原(如: 第一轮 MSA, 第二轮 MSA)再一次被淘选和针对(ii)相互的抗原(如: 第一轮 MSA, 第二轮 HSA)被淘选，导致总共 12 次第二轮筛选。在每种情况下，第二轮选择后，鉴定 48 个克隆结合 HSA 和 MSA 的特性。可溶性 dAb 片段的制备按照所述的 scFv 片段方法进行(Harrison et al, Methods Enzymol.1996; 267: 83-109)。标准 ELISA 方法依照(Hoogenboom et al.(1991)Nucleic Acids Res., 19: 4133)方法，只是用 2% tween PBS 作为封闭缓冲液。结合的 dAb 的检测既可用蛋白 L-HRP(Sigma)(对于 V κ)又可以用蛋白 A-HRP(Amersham Pharmacia Biotech)(对于 $V_H$)。

用固相 ELISA 法测定超过背景的信号表明能结合 MSA、HSA 或它们二者的 dAb。只结合于板上的可溶形式全部是特异性针对血清白蛋白的。然后对所述克隆测序(见下表)提示确定了 21 个独特的 dAb 序列。筛选的 V κ dAb 克隆之间最小相似度(氨基酸水平)为 86.25%((69/80) × 100; 此是当所有多样化残基不同时的结果，例如: 克隆 24 和 34)。筛选的 $V_H$ dAb 克隆之间最小相似度为 94 %((127/136) × 100)。

接下来，根据能从溶液中捕获生物素化抗原的能力测定血清白蛋白结合 dAb。遵循上述 ELISA 方法，不同的只是用 1μg/ml 蛋白 L(对于 V κ 克隆)和 1μg/ml 蛋白 A(对于 $V_H$ 克隆)包被 ELISA 板。方法中从溶液中捕获的是可溶性 dAb，是用生物素化的 MSA 或 HAS 以及链霉亲和素 HRP。根据操作说明制备生物素化的 MSA 和 HSA，以达到获得每个血清白蛋白分

子平均 2 个生物素分子的目的。鉴定出 24 个克隆能在 ELISA 中从溶液中捕获生物素化的 MSA。其中 2 个(以下的克隆 2 和 38)也能捕获生物素化的 HSA。接着，根据它们结合包被在 CM5 Biacore 芯片上的 MSA 的能力检测 dAb，发现 8 个克隆能结合 Biacore 芯片上的 MSA。

| dAb(全部捕获生物素化的MSA) | H或κ | CDR1 | CDR2 | CDR3 | 在biacore中结合MSA? | 捕获生物素化的HSA? |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $V_k$ 库 3 模板（模拟） | κ | XXXLX | XAXLQS | QQXXXXPXT | | |
| 2, 4, 7, 41, | κ | SSYLN | RASPLQS | QQTYSVPPT | | ✓ 所有4个都结合 |
| 38, 54 | κ | SSYLN | RASPLQS | QQTYRIPPT | | ✓ 两个都结合 |
| 46, 47, 52, 56 | κ | FKSLK | NASYLQS | QQVVYWPVT | | |
| 13, 15 | κ | YYHLK | KASTLQS | QQVRKVPRT | | |
| 30, 35 | κ | RRYLK | QASVLQS | QQGLYPPIT | | |
| 19, | κ | YNWLK | RASSLQS | QQNVVIPRT | | |
| 22, | κ | LWHLR | HASLLQS | QQSAVYPKT | | |
| 23, | κ | FRYLA | HASHLQS | CQRLLYPKT | | |
| 24, | κ | FYHLA | PASKLQS | QQRARWPRT | | |
| 31, | κ | IWHLN | RASRLQS | QQVARVPRT | | |
| 33, | κ | YRYLR | KASSLQS | QQYVGYPWT | | |
| 34, | κ | LKYLK | NASHLQS | QQTTYYPIT | | |
| 53, | κ | LRYLR | KASWLQS | QQVLYYPQT | | |
| 11, | κ | LRSLK | AASRLQS | QQVVYWPAT | ✓ | |
| 12, | κ | FRHLR | AASRLQS | QQVALYPKT | ✓ | |
| 17, | κ | RKYLR | TASSLQS | QQNLFWPRT | ✓ | |
| 18, | κ | RRYLN | AASSLQS | QQMLFYPKT | ✓ | |
| 16, 21 | κ | IKHLK | GASRLQS | QQGARWPQT | ✓ | |
| 25, 26 | κ | YYRLK | KASTLQS | QQVRKVPRT | ✓ | |
| 27, | κ | YKHLK | NASHLQS | QQVGRYPRT | ✓ | |
| 55, | κ | FKSLK | NASYLQS | QQVVYWPVT | ✓ | |
| $V_H$ 库 1（和 2）模板（模拟） | H | XXYXXX | X1XXXGXXTXYADSVKG | XXXX(XXXX)FDY | | |
| 8, 10 | H | WVYQMD | SISAFGAKTLYADSVKG | LSGKFDY | | |
| 36, | H | WSYQMT | SISSFGSSTLYADSVKG | GRDHNYSLFDY | | |

在所有情况下，框架结构与相应模板序列中的框架结构相同，在 CDRs 中具有上表指出的多样性。

能结合 Biacore 芯片上 MSA 的 8 个克隆中，选择两个能在大肠杆菌中高表达的克隆(克隆 MSA16 和 MSA26)以备进一步研究(见例 10)。

图 16 中给出 MSA16 和 26 的核苷酸和氨基酸全长序列。

**实施例 10. 测定 MSA 结合 dAb MSA16 和 MSA26 的亲和力和在小鼠体内的血清半衰期**

dAb MSA16 和 MSA26 表达在大肠杆菌外周胞质中，用蛋白 L-琼脂糖亲和树脂(Affitech, Norway)分批吸附法纯化，接着用 pH 2.2 的甘氨酸洗脱。然后用 Biacore 抑制分析纯化的 dAb 以确定 $K_d$ 值。简言之，测试纯化的 MSA16 和 MSA26 以确定能在包被有高密度 MSA 的 CM5 BiaCore 上获得 200RUs 反应时所需 dAb 的浓度。一旦所需 dAb 浓度确定，在预期 $K_d$ 值左右范围浓度的 MSA 抗原预先与 dAb 混合并孵育过夜。然后在 30μl/分钟的高流率(flow-rate)测量每份预混合物中结合到包被在 BiaCore 上的 MSA 上的

dAb。结果曲线用作生成 Klotz 图，给出估算的 $K_d$ 值(MSA16 为 200nM，MSA 26 为 70nM(图 17 A 和 B)。

接着，将克隆 MSA16 和 MSA26 克隆入具有 HA 标记(核酸序列：TATCCTTATGATGTTCCTGATTATGCA 和氨基酸序列：YPYDVPDYA)的表达载体中，以 2-10 mg 的量表达在大肠杆菌中，用蛋白 L-琼脂糖亲和树脂(Affitech, Norway)纯化上清，并用 pH2.2 的甘氨酸洗脱。测定 dAb 在小鼠体内的血清半衰期。分别将大约 1. 5mg/kg 剂量的 MSA26 和 MSA16 单次静脉注射到 CD1 小鼠体内。用羊抗-HA(Abcam, UK)捕获和蛋白 L-HRP(invitrogen)检测 ELISA 法分析血清水平，用 4% Marve 封闭，0. 05% tween PBS 洗涤。用存在于小鼠血清原液中已知浓度的 dAb 建立标准曲线以保证与实验样品的可比性。用 2 区室模型(compartment model)模拟显示 MSA-26 的 tl/2 α 为 0.16hr、tl/2 β 为 14.5hr、曲线下面积(AUC)为 465hr. mg/ml(资料未提供)，MSA-16 的 tl/2a 为 0.98hr、t l/2 β 为 36.5hr、AUC 为 913hr. mg/ml(图 18)。与 HEL4(抗鸡卵白溶菌酶 dAb)相比，两种抗-MSA 克隆具有相当长的半衰期，其 tl/2 α 为 0.06hr, tl/2 β 为 0. 34hr。

**实施例 11. $V_H$- $V_H$ 和 V κ -V κ 双特异性 Fab 样片段的制备**

本实施例描述一种制备 $V_H$- $V_H$ 和 V κ -V κ 双特异性 Fab 样片段的方法。在构建所述每种 Fab 样片段之前，结合所选靶的 dAb 先从类似于实例 9 中描述的 dAb 库中选出。分离结合鸡卵溶菌酶(Sigma)的 $V_H$ dAb 即 HEL4，同时分离结合 TNF α 受体(R and D systems)的第二 $V_H$ dAb(TAR2h-5)。这些序列在序列列表中给出。通过筛选和亲和力成熟分离能结合 TNF α (TARl-5-19)的 V κ dAb，其序列在序列列表中给出。本实验还应用在实例 9 中描述的第二 V κ dAb(MSA 26)，其序列在图 17B 中。

用 SalI 和 Not I 消化包含上述 4 种 dAb 表达载体的 DNA 获得编码 dAb 的 DNA。在琼脂糖凝胶电泳上分离消化产物纯化预期大小的条带(300-400bp)，切下这一条带，用 Qiagen 凝胶纯化试剂盒(Qiagen, UK)进行凝胶纯化。然后将编码 dAb 的 DNA 插入 $C_H$ 或 C κ 载体中(图 8 和图 9)如下表所示。

| dAb | 靶抗原 | dAb $V_H$ 或 dAb Vκ | 插入载体 | 标记（C 末端） | 抗生素抗性 |
|---|---|---|---|---|---|
| HEL4 | 鸡卵溶菌酶 | $V_H$ | $C_H$ | myc | 氯霉素 |
| TAR2-5 | TNF 受体 | $V_H$ | Cκ | Flag | 氨苄青霉素 |
| TAR1-5-19 | TNF α | Vκ | $C_H$ | myc | 氯霉素 |
| MSA 26 | 小鼠血清白蛋白 | Vκ | Cκ | Flag | 氨苄青霉素 |

用 $V_HC_H$ 和 $V_HC\kappa$ 构建物共同转化 HB2151 细胞。另外，用 $V\kappa C_H$ 和 $V\kappa C\kappa$ 构建物共同转化 HB2151 细胞。每一转染细胞系培养物过夜生长(含 5%葡萄糖、10μg/ml 氯霉素和 100μg/ml 氨苄青霉素的 2×Ty，以维持对 $C_H$ 和 Cκ 质粒的抗生素选择)。过夜培养物与新鲜培养基(2×Ty, 10μg/ml 氯霉素和 100μg/ml 氨苄青霉素)共同孵育生长直到 OD 值为 0.7-0.9，然后添加 IPTG 以诱导 $C_H$ 和 Cκ 构建物的表达。然后，用蛋白 A 纯化法(对于共同转化的 $V_HC_H$ 和 $V_HC\kappa$)和 MSA 亲和树脂纯化法(对于共同转化的 $V\kappa C_H$ 和 $V\kappa C\kappa$)从外周胞质中纯化表达的 Fab 样片段。

**$V_H$-$V_H$ 双特异性**

用凝胶分离蛋白以鉴定 $V_HC_H$ 和 $V_HC\kappa$ 双特异性的表达。凝胶被吸附并且通过 myc 标记和 flag 标记的 Western 印迹方法检测 Fab 片段大小的条带，表明 Fab 样片段的 $V_HC_H$ 和 $V_HC\kappa$ 部分都存在。接着，为了测定是否双特异性的两半存在于同一 Fab 样片段中，用含 3 mg/ml 鸡卵溶菌酶(HEL)的重碳酸钠缓冲液 4℃过夜包被 ELISA 板，100 ul /孔。然后，用 2% tween PBS 封闭板孔(如实例 1 中所述)，接着与 $V_HC_H$ 和 $V_HC\kappa$ 双特异性 Fab 样片段共同孵育。用 9el0(一种结合 myc 标记的单克隆抗体，Roche)和抗小鼠 IgG-HRP(Amersham Pharmacia Biotech)检测双特异性物质通过非相关链(non cognate chain)与 HEL 的结合。$V_HC_H$ 和 $V_HC\kappa$ 双特异性 Fab 样片段的信号是 0.154，而单独表达的 $V_HC\kappa$ 链的背景信号是 0.069。这说明 Fab 样片段对靶抗原具有结合特异性。

**Vκ-Vκ 双特异性**

在 MSA 亲和树脂上纯化共转化的 $V\kappa C_H$ 和 $V\kappa C\kappa$ 双特异性 Fab 样片段后，所得蛋白用于探查包被有 1μg/ml TNFα 和包被有 10μg/ml MSA 的 ELISA 板。正如预期一样，当用蛋白 L-HRP 检测 ELISA 板时，出现高于背景的信号(数据未显示)。这表明蛋白片段能结合 MSA(因此用 MSA 亲和柱纯化)，在接下来的 ELISA 中也能结合 TNFα，从而确定了抗体片段的双特异性。这种蛋白片段后来用于两个后续实验。首先，用 $V\kappa C_H$ 和 $V\kappa C\kappa$

双特异性 Fab 样片段探查包被有 1μg/ml TNFα的 ELISA 板，同时用能在 ELISA 上释放相同信号时测得浓度的 TNFα结合 dAb 作为对照。在有/无 2mg/ml MSA 时双特异性和对照 dAb 用于探查 ELISA 板。双特异孔中的信号减少大于 50%，而抗 dAb 孔中的信号一点没有减少(见图 19a)。同样蛋白用于有/无 MSA 的受体分析中，也显示了 MSA 竞争(见图 19c)。这表明 MSA 与 TNFα竞争结合双特异性蛋白片段。

**实施例 12. 具有对小鼠血清白蛋白和 TNFα双特异性的 cys 连接的 Vκ-Vκ双特异抗体的制备**

本例描述了一种制备双特异性抗体片段的方法，该抗体是通过二硫键的化学偶联生成，特异性地针对小鼠血清白蛋白和 TNFα。MSA16(来自实施例 1)和 TAR1-5-19 dAb 被再克隆进入一个基于 pET 的有 C 末端半胱氨酸而无标记的载体中。两种 dAb 的表达水平为 4-10mg，用蛋白 L-琼脂糖亲和树脂(Affitiech, Norway)从上清中纯化所述 dAb。然后用二硫苏糖醇还原半胱氨酸标记的 dAb。用二硫代二吡啶偶联 TAR1-5- 19 dAb 以阻止二硫键的重新合成导致 PEP 1-5-19 同二聚体的形成。混合两种不同的 dAb(pH 6.5)促进二硫键的形成并生成 TARl-5-19 和 MSA16 cys 连接的异二聚体。这种制备两种不同蛋白偶联物的方法最初由 King 等描述(King TP, Li Y Kochoumian L Biochemistry. 1978 voll7 : 1499-506 Preparation of protein conjugates via intermolecular disulfide bond formation)。异二聚体从单体中的分离是通过阳离子交换方法。分离物是通过在 SDS 凝胶中出现预期大小的条带而得到鉴定。用 TNF 受体分析鉴定所得异二聚体的种类，发现中和 TNF 的 IC50 大约为 18 nM。然后，用恒定浓度(18nM)的异二聚体和一系列稀释的 MSA 和 HSA 进行重复受体分析。一定浓度范围((直到 2 mg/ml)的 HSA 不能降低二聚体抑制 TNFα的能力。然而。MSA 的加入导致二聚体剂量依赖地抑制 TNFα的能力下降(图 20)。这表明 MSA 和 TNFα竞争结合 cys 连接的 TARl-5-19/MSA16 二聚体。

**数据总结**

在前述实施例的实验中所得数据在附录 4 中列出。

本发明书提供的全部出版物和所述出版物中引用的参考文献在这里一并纳入本文作为参考。所述方法的各种各样的修改和变更以及发明体系

对本领域技术人员来说将很直观，未偏离发明范围和精神。尽管本发明描述了具体的优选实施方案，但应该明白权利要求的发明不应该过度局限于这些具体的实施方案。事实上，对完成本发明所述模式的各种修改对于分子生物学或相关领域中的技术人员而言是显而易见的，它们都在本发明权利要求的范围之内。

**附录 1：增加体内半衰期的多肽**

α 1 糖蛋白(α酸性糖蛋白)(AAG)

α 1 抗胰凝乳蛋白(ACT)

α 1 抗胰蛋白酶(AAT)

α 1 微球蛋白(蛋白 HC)(AIM)

α 2 巨球蛋白 (A2M)

抗凝血酶 III(AT III)

Apo 脂蛋白 A-1(Apo A-1)

Apo 脂蛋白 B(Apo B)

2-微球蛋白(β 2M)

血浆铜蓝蛋白(Cp)

补体成分(C3)

补体成分(C4)

Cl 酯酶抑制物(Cl INH)

C-反应蛋白(CRP)

半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(Cys C)

铁蛋白(FER)

纤维蛋白原(FIB)

纤连蛋白(FN)

触珠蛋白(Hp)

血液结合素(HPX)

免疫球蛋白 A(IgA)

免疫球蛋白 D(IgD)

免疫球蛋白 E(IgE)

免疫球蛋白 G(IgG)

免疫球蛋白 M(IgM)

免疫球蛋白轻链(kapa/lambda)

脂蛋白(a)[Lp(a)]

甘露糖结合蛋白(MBP)

肌球蛋白(Myo)

血浆酶原(PSM)

前白蛋白(甲状腺素运载蛋白)(PAL)

视黄醇结合蛋白(RBP)

类风湿因子(RF)

血清淀粉状蛋白 A(SAA)

可溶性转铁蛋白受体(sTfR)

转铁蛋白(Tf)

**附件 2**

| 配对 | 治疗相关参考 |
|---|---|
| TNFα/TGFβ | 将 TNFα/TGFβ 注射到胶原诱导关节炎模型的踝关节内明显增强关节的炎症，对非胶原攻击的小鼠无效。 |
| TNFα/IL-1 | TNF/IL-1 在葡萄膜炎、疟疾(低血糖，No)的发病中起协同作用，在炎症中协同诱导多型核白细胞(PMN)的迁移，协同诱导 PMN 浸透进入腹膜，协同诱导内皮细胞分泌 IL-1，炎症时很重要，IL-1 或 TNF 单独诱导关节滑膜中某些细胞的浸润。IL-1 诱导 PMN，TNF 诱导单核细胞，由于增加的 PMN，它们一起诱导更严重的炎症反应。<br>循环的心肌抑制物(休克时存在)是低水平的协同起作用的 TNFα 和 IL-1。 |
| TNFα/IL-2 | 与杀伤性 T 细胞的协同活化最相关。 |
| TNFα/IL-3 | TNFa 诱导次级造血细胞因子，从而导致 IL-3 和 TNFa 协同刺激急性髓性白血病母细胞的克隆增生 Cancer Res.1992 Apr 15;52(8):2197-201。 |

| | |
|---|---|
| TNFα/IL-4 | TNFα/IL-4 协同诱导内皮细胞上 VCAM 表达，提示在哮喘中发挥作用。类似 RA 滑膜炎；TNFα/IL-4 协同诱导角质细胞中 IL-6 的表达；TNFa 与 IL-4 或 IL-13 的组合能通过增加 mRNA 的稳定性使培养的成纤维细胞样的滑膜细胞中 VCAM-1 的水平持续升高。AM J Pathol.1999 Apr;154(4):1149-58。 |
| TNFα/IL-5 | 支气管过敏成人及其儿童中肿瘤坏死因子系统和血清中 IL-4、IL-5、IL-8、嗜酸性阳离子蛋白、IgE 水平之间的关系，*Allergy Astham Proc* .2003 Mar-Apr;24(2)111-8。 |
| TNFα/IL-6 | TNFα和 IL-6 是一种新的人类髓样细胞系 OH-2 细胞的有效生长因子，*Eur J Haematol*.1994 Jul;53(1):31-7。 |
| TNFα/IL-8 | TNFα和 IL-8 与 PMNs 协同激活血小板。提示在急性呼吸窘迫综合症中的作用。<br>见 IL-5/ TNFα(哮喘)。中性粒细胞介导的血小板活化中 TNFα和 IL-8 之间的协同作用。*Eur Cytokine Netw* 1994 Sep-Oct;5(5):455-60(成人呼吸窘迫综合症(ARDS))。 |
| TNFα/IL-9 | |
| TNFα/IL-10 | IL-10 诱导和与 TNF 协同诱导慢性感染 T 细胞上 HIV 的表达。 |
| TNFα/IL-11 | 细胞因子协同诱导破骨细胞分化：被永生化细胞或正常的颅盖细胞所支持，*Am J Physiol Cell Physiol*.2002 Sep;283(3):C679-87.(骨损伤)。 |
| TNFα/IL-12 | |

| | |
|---|---|
| TNFα/IL-13 | 在培养的纤维母细胞样滑膜成纤维细胞中的持续高表达VCAM-1可通过TNFα合并IL-4或IL-13增加mRNA稳定性而获得，*Am J Pathol*.1999 Apr 154;(4):1149-58。<br>IL-13和TNFα协同诱导人鼻纤维母细胞中eotaxin的产生，*Clin Exp Allergy*.2000 Mar;30(3):348-55。<br>IL-13和TNFα协同诱导人鼻纤维母细胞中eotaxin的产生，*Clin Exp Allergy*.2000 Mar;30(3):348-55(过敏性炎症)。<br>在儿童肾病综合症治疗反应中血清TNFα和IL-13的含义，*Cytokine*.2003 Feb 7;21(3):155-9。 |
| TNFα/IL-14 | 吸入性肿瘤坏死因子在轻度哮喘患者中的作用，*Thorax*.2002 Sep;57(9):774-8。 |
| TNFα/IL-15 | 吸入性肿瘤坏死因子在轻度哮喘患者中的作用，*Thorax*.2002 Sep;57(9):774-8。 |
| TNFα/IL-16 | TNFα诱导的呼吸道内皮细胞中IL-16的合成：5-羟色胺的刺激激活，*Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Mar;28(3):354-62(呼吸道炎症)。<br>风湿性关节炎患者中前炎症细胞因子与循环IL-16之间的相关性，*Rheumatology(Oxford)*. 2001 Apr; 40(4): 474-5(无摘要)。<br>IL-16在克罗恩病中水平上调并介导小鼠TNBS肠炎，*Gastroenterology*. 2000 Oct; 119(4):972-82。 |
| TNFα/IL-17 | 抑制IL-17 TNFα/可预防包氏螺旋体菌感染小鼠关节炎的发展，*Infect Immun*. 2003 Jun; 71(6): 3437-42。<br>IL-17协同TNFα在体外诱导软骨损伤。*Ann Rheum Dis*. 2002 Oct; 61(10):870-6。<br>GM-CSF在TNFα和IL-17引起的呼吸道中性粒细胞聚集中的作用。*Eur Respir J*. 2003 Mar; 21(3):387-93.(呼吸道炎症)。<br>概括了IL-1、TNFα和IL-17协同上调人膝关节炎半月板移植体中NO和前列腺素E2的生成，*Arthritis Rheum*. 2001 Sep ; 44(9): 2078-83。 |

| | |
|---|---|
| TNFα/IL-18 | 风湿性关节炎病人膝关节滑膜组织中 IL-18 的表达与 IL-1 和 TNFα水平的增高相结合，*Arthritis Rheum.* 2003 Feb; 48(2):339- 47。<br>概括了 II 型糖尿病患者血清中 IL-18 和 TNFα水平的增高：与糖尿病肾病的关系 *Metabolism.* 2003 May ; 52(5): 605-8。 |
| TNFα/IL-19 | 概括了 IL-19 诱导 IL-6 和 TNFα的产生并通过 TNFα引起细胞凋亡，*J Immunol.* 2002 Oct 15; 169(8): 4288-97。 |
| TNFα/IL-20 | 细胞因子概要: IL-20 一种新的皮炎效应分子，*Curr Biol.* 2001 Jul 10 ; 11(13): R531-4。 |
| TNFα/补体 | 炎症与凝集：对于败血症患者的推论，*Clin Infect Dis.* 2003 May 15; 36(10): 1259-65. Epub 2003 May 08. 综述。 |
| TNFα/IFN-γ | 诱导大脑中 MHC<br>协同抗病毒反应/IFN-β诱导<br>中性粒细胞活化/呼吸爆发<br>内皮细胞活化<br>注意应用 TNFα/IFN-γ抗病毒治疗时的毒性作用<br>人星型胶质细胞表达 CX3C 趋化因子<br>许多关于炎症反应的论文-如 LPS，巨噬细胞活化<br>抗—TNF 和抗—IFN-γ协同保护致死性内毒素血症小鼠 |
| TGF-β/IL-1 | 人造骨细胞合成前列腺素<br>小肠内皮细胞产生 IL-6(炎症模型)<br>刺激肺成纤维细胞中的 IL-11 和 IL-6(炎症模型)<br>视网膜中 IL-6 和 IL-8 的生成 |
| TGF-β/IL-6 | 软骨肉瘤(Chondrocarcoma)增殖 |
| IL-1/IL-2 | B 细胞活化<br>LAK 细胞活化<br>T 细胞活化<br>在淋巴因子激活的杀伤细胞产生中 IL-1 和 IL-2 的协同作用是由 TNFα和 TNFβ(淋巴毒素)介导的，*Cytokine.* 1992 Nov; 4(6): 479-87 |
| IL-1/IL-3 | |

| | |
|---|---|
| IL-1/IL-4 | B 细胞活化<br>IL-4 诱导内皮细胞活化中 IL-1 的表达。 |
| IL-1/IL-5 | |
| IL-1/IL-6 | B 细胞活化<br>T 细胞活化<br>IL-1 诱导 IL-6 表达<br>C3 和血清淀粉表达(急性期反应)<br>HIV 表达<br>软骨胶原损伤 |
| IL-1/IL-7 | 在 IL-1 诱导的胸腺细胞增殖中 IL-7 是必需的。在 GM-CSF 或 TNF 与 IL-1 协同作用中的 IL-7，*J Immunol.* 1992 Jan 148(1): 99-105。 |
| IL-1/IL-8 | |
| IL-1/IL-10 | |
| IL-1/IL-11 | 细胞因子协同诱导破骨细胞分化：被永生或正常的颅顶细胞所支持，*Am J Physiol Cell Physiol.*2002 Sep;283(3):C679-87.(骨损伤)。 |
| IL-1/IL-16 | 风湿性关节炎患者中前炎症细胞因子与循环 IL-16 之间的相关性，*Rheumatology*(Oxford). 2001 Apr; 40(4): 474-5.无摘要。 |
| IL-1/IL-17 | 抑制 IL-17 TNFα/可预防包氏螺旋体菌感染小鼠关节炎的发展，*Infect Immun.* 2003 Jun; 71(6): 3437-42。<br>IL-17 在骨关节炎中软骨破坏和滑膜损伤中的作用，*Osteoarthritis Cartilage.*2002 Oct; 10(10): 799-807。<br>概括了 IL-1、TNFα和 IL-17 协同上调人膝关节炎半月板移植体中 NO 和前列腺素 E2 的生成，*Arthritis Rheum.* 2001 Sep ; 44(9): 2078-83。 |
| IL-1/IL-18 | 风湿性关节炎病人膝关节滑膜组织中 IL-18 的表达与 IL-1 和 TNFα水平的增高相结合，*Arthritis Rheum.* 2003 Feb; 48(2):339- 47。 |
| IL-1/IFN-γ | |

| | |
|---|---|
| IL-2/IL-3 | T 细胞增殖<br>B 细胞增殖 |
| IL-2/IL-4 | B 细胞增殖<br>T 细胞增殖<br>(选择性诱导 CD8 和 NK 淋巴细胞的活化)IL-2Rβ拮抗物 P1-30 可协同 IL-2、IL-4、IL-9 和 IL-15 的作用：生物学和分子效应。*J Immunol.* 2000 Oct 15; 165(8): 4312-8。 |
| IL-2/IL-5 | B 细胞增殖/IgG 分泌<br>IL-5 诱导 B 细胞上 IL-2 受体 |
| IL-2/IL-6 | 细胞毒性 T 细胞的发育 |
| IL-2/IL-7 | |
| IL-2/IL-9 | 见 IL-2/IL-4(NK 细胞) |
| IL-2/IL-10 | B 细胞活化 |
| IL-2/IL-12 | IL-12 协同 IL-2 诱导人类新鲜 NK 细胞中淋巴因子激活的细胞毒性、穿孔素和颗粒酶基因的表达，*Cell Immunol.* 1995 Oct 1; 165(1): 33-43.(T 细胞活化)。 |
| IL-2/IL-15 | 见 IL-2/IL-4(NK 细胞)<br>(T 细胞活化和增殖)IL-15 和 IL-2：体内 T 细胞生死问题。*Nat Med.* 2001 Jan; 7(1):114-8。 |
| IL-2/IL-16 | IL-16 和 IL-2 协同激活 CD4+T 细胞。*J Immunol.* 1998 Mar 1 ; 160(5): 2115-20。 |
| IL-2/IL-17 | IL-17 早期参与人和实验性肾脏异体移植排斥的证据，*J Patlrol.* 2002 Jul ; 197(3): 322-32。 |
| IL-2/IL-18 | IL-18 协同 IL-2 诱导小鼠致死性肺损伤：间质性肺炎发病中细胞因子、趋化因子和自然杀伤细胞的潜在作用。*Blood.* 2002 Feb 15 ; 99(4):1289- 98。 |
| IL-2/TGF-β | CD4 效应子命运的控制：转化生长因子β1 和 IL-2 协同防止凋亡并促进效应子扩增，*J Exp Med* 1995 Sep 1; 182(3): 699-709。 |

| | |
|---|---|
| IL-2/IFN-γ | B 细胞分泌 Ig<br>IL-2 诱导 T 细胞表达 IFN-γ |
| IL-2/IFN-α/β | 无 |
| IL-3/IL-4 | 协同肥大细胞生长<br>IL-4 与 GM-CSF 或 IL-3 在诱导人单核细胞表达 CD23 中的协同效应：IFN-α和 IFN-γ的调节效应。*Cytokine.* 1994 Jul; 6(4): 407-13。 |
| IL-3/IL-5 | |
| IL-3/IL-6 | |
| IL-3/IFN-γ | IL-4与IFN-γ协同增加人小肠内皮细胞中全部多聚IgA受体水平。蛋白酪氨酸激酶的作用。*J Immunol.* 1996 Jun 15; 156(12): 4807-14。 |
| IL-3/GM-CSF | 细胞因子对人嗜酸性细胞 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体α链表达的差别调节：IL-3、IL-5 和 GM-CSF 下调 IL-5 受体α表达伴随着对 IL-5 反应的降低，但上调 IL-3 受体α表达，*J Immunol.*2003 Jun1; 170(11): 5359-66.(过敏性炎症)。 |
| IL-4/IL-2 | IL-4 协同增加 IL-2 或 IL-12 诱导小鼠 NK 细胞表达 IFN-γ，Blood. 2003 Mar 13 [Epub 印刷前]。 |
| IL-4/IL-5 | 增加肥大细胞对 IgE 反应时组胺等的分泌。<br>类天疱疮中相关的 Th2 样细胞因子反应。IL-4 和 IL-5 在发病中的作用。*Int J Immunopathol Pharmacol.*1999 May-Aug; 12(2): 55-61。 |
| IL-4/IL-6 | |
| IL-4/IL-10 | |
| IL-4/IL-11 | 维持小鼠初始造血干细胞增殖过程中 IL-11 和 IL-4 之间的协同交互作用。*Blood.* 1991 Sep 15; 78(6):1448-51。 |

| | |
|---|---|
| IL-4/IL-12 | IL-4 和 IL-18 对树突状细胞产生 IL-12 依赖性 IFN-γ的协同效应。*J Immunol.* 2000 Jan 1; 164(1): 64-71.(增加 Thl/Th2 区别)。<br>IL-4 协同增加 IL-2 或 IL-12 诱导小鼠 NK 细胞表达 IFN-γ，Blood. 2003 Mar 13 [Epub 印刷前]。 |
| IL-4/IL-13 | 概括了 IL-4 和 IL-13 信号连接图。*Science.* 2003 Jun 6; 300(5625): 1527-8.(过敏、哮喘)。<br>抑制 IL-4/IL-13 受体系统预防过敏敏感性而不影响过敏性哮喘小鼠模型的建立。*J Aller Clin Immunol.* 2003 Jun ; 111(6): 1361-1369。 |
| IL-4/IL-16 | (哮喘)IL-4/IL-9 和外源性 IL-16 诱导 BEAS-2B 细胞产生 IL-16，BEAS-2B 细胞是一种支气管上皮细胞系。*Cell Immunol.* 2001 Feb 1; 207(2): 75-80。 |
| IL-4/IL-17 | IL-4 和 IL-17 协同刺激人结肠肌纤维细胞中 IL-6 的分泌。*J Mol Med.* 2002 Nov; 10(5): 631-4(肠炎)。 |
| IL-4/IL-24 | IL-24 表达在大鼠和人巨噬细胞上。*Irnnmunobiology.* 2002 Jul ; 205(3):321-34。 |
| IL-4/IL-25 | 概述新的 IL-17 家族成员促进肺中 Thl 或 Th2 反应：新奇细胞因子 IL-25 的体内作用。*J Immunol.* 2002 Jul 1; 169(1):443-53.(过敏性炎症)。<br>概述了 FcεRI 介导激活肥大细胞产生 IL-25。*Blood.* 2003 May 1; 101(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02.(过敏性炎症)。 |
| IL-4/IFN-γ | 概述了 IL-4 诱导内皮细胞产生 IL-6：与 IFN-γ的协同作用。*Eur J Immunol.*1991 Jan ; 21(1): 97-101。 |
| IL-4/SCF | SCF 和 IL-4 调节人小肠肥大细胞。*Immunol Rev.* 2001 Feb; 179: 57-60(综述)。 |
| IL-5/IL-3 | 细胞因子对人嗜酸性细胞 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体α链表达的差别调节：IL-3、IL-5 和 GM-CSF 下调 IL-5 受体α表达伴随着对 IL-5 反应的降低，但上调 IL-3 受体α表达，*J Immunol.*2003 Jun1; 170(11): 5359-66(过敏性炎症见摘要)。 |

| | |
|---|---|
| IL-5/IL-6 | |
| IL-5/IL-13 | 用地塞米松抑制小鼠过敏性呼吸道炎症和呼吸道超敏反应：嗜酸性细胞、IL-5 和 IL-13 的作用。*J Aller Clin Immunol.* 2003 May ; 111(5): 1049-61。 |
| IL-5/IL-17 | 小鼠过敏性哮喘模型吸入过敏原后 IL-17 协同中性粒细胞在呼吸道中的浸润，*Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Jan; 28(l): 42-5。 |
| IL-5/IL-25 | 概述新的 IL-17 家族成员促进肺中 Thl 或 Th2 反应：新奇细胞因子 IL-25 的体内作用。*J Immunol.* 2002 Jul 1; 169(1):443-53.(过敏性炎症)。<br>概述了 FcεRI 介导激活肥大细胞产生 IL-25。*Blood.* 2003 May 1; 101(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02.(过敏性炎症)。 |
| IL-5/IFN-γ | |
| IL-3/GM-CSF | 细胞因子对人嗜酸性细胞 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 受体α链表达的差别调节：IL-3、IL-5 和 GM-CSF 下调 IL-5 受体α表达伴随着对 IL-5 反应的降低，但上调 IL-3 受体α表达，*J Immunol.*2003 Jun1; 170(11): 5359-66.(过敏性炎症)。 |
| IL-6/IL-10 | |
| IL-6/IL-11 | |
| IL-6/IL-16 | IL-16 刺激人单核细胞前炎症细胞因子的表达和产生，*Immunology.* 2000 May; 100(1): 63-9。 |
| IL-6/IL-17 | IL-17 通过 IL-6 旁分泌/自分泌环刺激呼吸道粘液素基因表达。*J Biol Chem.* 2003 May 9; 278(19): 17036-43. Epub 2003 Mar 06.(呼吸道炎症，哮喘)。 |
| IL-6/IL-19 | 概括了 IL-19 诱导 IL-6 和 TNFα的产生并通过 TNFα诱导细胞凋亡。*J Immunol.* 2002 Oct 15; 169(8): 4288- 97。 |
| IL-6/IFN-g | |
| IL-7/IL-2 | IL-7 加重移植物抗宿主疾病。*Blood.* 2002 Oct 1;100(7): 2642-9。 |

| | |
|---|---|
| IL-7/IL-12 | 在人 T 细胞活化上 IL-7 和 IL-12 的协同效应。*J Immunol* 1995 May 15; 154(10): 5093-102。 |
| IL-7/IL-15 | IL-7 和 IL-15 调节皮肤 T 细胞淋巴瘤中 bcl-2 和 c-myb 基因表达。*Blood* 2001 Nov1; 98(9): 2778-83.(生长因子)。 |
| IL-8/IL-11 | 红细胞增多症中 IL-8 和 IL-11 的异常产生。*Cytokine*. 2002 Nov 21; 20(4):178-83。 |
| IL-8/IL-17 | 关节损伤中 IL-17 的作用。*Drug News Perspect*. 2002 Jan; 15(1): 17-23.(关节炎)<br>概述了 IL-17 刺激人呼吸道内皮细胞表达 IL-8、生长相关癌基因-α和粒细胞克隆刺激因子。*Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Jun; 26(6): 748-53.(呼吸道炎症)。 |
| IL-8/CSF | IL-8: 一种针对人类造血前体细胞的自分泌/旁分泌生长因子，其作用是协同 CSF-1 促进单核-巨噬细胞生长和分化。*Exp Hematol*. 1999 Jan;27(l): 28-36。 |
| IL-8/VGEF | 在原发或复发性恶性神经胶质瘤中 VEGF、bFGF、IL-8 和 IL-12 的腔内水平。*J Neurooncol*. 2003 May; 62(3): 297-303。 |
| IL-9/IL-4 | 抗 IL-9 抗体治疗可抑制小鼠哮喘模型呼吸道炎症和超敏反应，*Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Aug 1; 166(3): 409-16。 |
| IL-9/IL-5 | 肺部 IL-9 的过表达诱导 Th2 细胞因子表达，导致免疫病理。*J Clin Invest*. 2002 Jan; 109(1):29-39。<br>Th2 细胞因子和哮喘。IL-9 作为一种治疗哮喘的靶。*Respir Res*. 2001 ; 2(2):80-4. Epub 2001 Feb 15. 综述。<br>概括了 IL-9 增强 IL-5 受体的表达和人嗜酸性细胞分化和生存。*Blood*.2000 Sep 15; 96 (6):2163-71(哮喘)。 |
| IL-9/IL-13 | 抗 IL-9 抗体治疗可抑制小鼠哮喘模型呼吸道炎症和超敏反应，*Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Aug 1; 166(3): 409-16。<br>IL-13 对内皮细胞的直接效应导致哮喘中呼吸道超敏反应和粘液过量产生。*Nat Med*. 2002 Aug ;(8): 885-9。 |
| IL-9/IL-16 | 见 IL-4/IL-16 |

| | |
|---|---|
| IL-10/IL-2 | 在体液免疫应答中 IL-10 和 IL-2 的相互作用：IL-10 协同 IL-2 增强人 B 淋巴细胞反应，机制不同于 CD25 表达上调。*Cell Immunol.* 1994 Sep ; 157(2): 478-88。 |
| IL-10/IL-12 | |
| IL-10/TGF-β | 在正常免疫和特异性免疫治疗中 IL-10 和 TGF-β 协同调节 T 细胞对粘膜过敏原的应答。*Eur J Immunol.* 2003 May;33(5):1205-14。 |
| IL-10/IFN-γ | |
| IL-11/IL-6 | IL-6 和 IL-11 通过 RANKL 非依赖机制维持破骨细胞的形成。*Bone.*2003 Jan; 32(1):1-7.(炎症中骨吸收)。 |
| IL-11/IL-17 | 急、慢性皮肤损坏之间 IL-11 和 IL-17 体内表达的两极化。*Allergy Clin Immunol.* 2003 Apr; 111(4): 875-81.(过敏性皮炎)。<br>IL-17 通过 NF-κB 配体/护骨素(护骨蛋白)受体激活物失衡促进小鼠胶原诱导关节炎骨侵蚀。*J Immunol.* 2003 Mar 1; 170(5): 2655-62。 |
| IL-11/TGF-β | 急、慢性皮肤损坏之间 IL-11 和 IL-17 体内表达的两极化。*J Allergy Clin Immunol.* 2003 Apr; 111(4): 875-81.(过敏性皮炎)。 |
| IL-12/IL-13 | 系统性红斑狼疮中 IL-12 和 IL-13 失衡与类属特异性风湿因子和抗心磷脂抗体之间的关系。*Clin Rheumatol.* 2003 May ; 22(2): 107-11。 |
| IL-12/IL-17 | 活动性炎症肠疾病中 IL-12 和 IL-17 的上调。Scand J GastroenteroL 2003 Feb; 38(2) : 180-5。 |
| IL-12/IL-18 | IL-12 和 IL-18 对自然杀伤细胞的协同增殖和活化作用。*Cytokine.* 1999 Nov ; 11(11): 822-30。<br>IL-12 和 IL-18 引起的炎性肝脂肪变性。*J Interferon Cytokine Res.*2003 Mar;23(3):155-62。 |
| IL-12/IL-23 | 脑自身免疫病炎症的关键细胞因子是 IL-23 而不是 IL-12。Nature. 2003 Feb13;421 (6924):744-8。<br>概括了在促进细胞免疫过程中 IL-23 的独特作用。*J leukoc Biol.* 2003 Jan; 73(1): 49-56.综述。 |

| | |
|---|---|
| IL-12/IL-27 | 概括了由 EBI3 和 p28 蛋白组成的异质二聚体---IL-27 诱导初始 CD4(+)T 细胞的增殖，*Immunity.* 2002 Jun ; 16(6): 779-90。 |
| IL-12/IFN-γ | IL-12 诱导 B、T 细胞表达 IFN-γ作为免疫刺激部分。 |
| IL-13/IL-5 | 见 IL-5/IL-13 |
| IL-13/IL-25 | 概述新的 IL-17 家族成员促进肺中 Thl 或 Th2 反应：新奇细胞因子 IL-25 的体内作用。*J Immunol.* 2002 Jul 1; 169(1):443-53.(过敏性炎症)。<br>概述了 FcεRI 介导激活肥大细胞产生 IL-25。*Blood.* 2003 May 1; 101(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02.(过敏性炎症)。 |
| IL-15/IL-13 | IL-13 和 IL-15 在子宫内膜异位症和正常生育妇女中异位内膜和正常内膜上的差异表达。*Am J Reprod Immunol.* 2003 Feb; 49(2): 75-83。 |
| IL-15/IL-16 | 皮肤 T 细胞淋巴瘤中 IL-15 和 IL-16 的过表达：蕈样霉菌病进展中阶段依赖性增加。*Exp Dermatol.* 2000 Aug ; 9(4): 248-51。 |
| IL-15/IL-17 | 概括了在脂多糖诱导的呼吸道中性粒细胞增多中，由淋巴细胞和中性粒细胞产生的 IL-17 是必需的：IL-15 作为一种可能触发剂。*J Immunol.* 2003 Feb 15;170(4):2106-12.(呼吸道炎症)。 |
| IL-15/IL-21 | IL-21 与 IL-15 或 IL-18 协同增加人 NK 细胞和 T 细胞产生 IFN- γ。*J Immunol.* 2003 Jun 1; 170(11): 5464-9。 |
| IL-17/IL-23 | IL-23 促进明显的 CD4 T 细胞活化状态特征表现为 IL-17 的产生。*J Biol Chem.*2003 Jan 17 ; 278(3):1910-4. Epub 2002 Nov 03。 |
| IL-17/TGF-β | 急、慢性皮肤损坏之间 IL-11 和 IL-17 体内表达的两极化。*J Allergy Clin Immunol.* 2003 Apr; 111(4): 875-81.(过敏性皮炎)。 |

| | |
|---|---|
| IL-18/IL-12 | IL-12 和 IL-18 对自然杀伤细胞的协同增殖和活化作用。*Cytokine.* 1999 Nov ; 11(11): 822-30。<br>概括了 IL-12 对小鼠慢性移植物抗宿主疾病中体外 Ig 产生的抑制作用：与 IL-18 协同作用。*Eur J Immunol.* 1998 Jun; 28(6): 2017-24。 |
| IL-18/IL-21 | IL-21 与 IL-15 或 IL-18 协同增加人 NK 细胞和 T 细胞产生 IFN- γ。*J Immunol.* 2003 Jun 1; 170(11): 5464-9。 |
| IL-18/TGF-β | 用皮质类固醇治疗 Graves 病眼病患者血清中的 IL-18 和转化生长因子 β1。*Int Immunopharmacol.* 2003 Apr ; 3(4): 549-52。 |
| IL-18/IFN- γ | |
| 抗 TNF α / 抗 CD4 | 对 DBA/1 关节炎小鼠的协同治疗作用 |

**附件 3 肿瘤结合物（oncology combinations）**

| **靶** | **疾病** | **配对物** |
|---|---|---|
| CD89 | 用作细胞毒细胞的募集者 | 所有 |
| CD19 | B 细胞淋巴瘤 | HLA-DR<br>CD5 |
| HLA-DR | B 细胞淋巴瘤 | CD89<br>CD19<br>CD5 |
| CD38 | 多发性骨髓瘤 | CD138<br>CD56<br>HLA-DR |
| CD138 | 多发性骨髓瘤 | CD38<br>CD56<br>HLA-DR |
| CD138 | 肺癌 | CD56<br>CEA |

| | | |
|---|---|---|
| CD33 | 急性髓样淋巴瘤 | CD34<br>HLA-DR |
| CD56 | 肺癌 | CD138<br>CEA |
| CEA | 泛癌(pan carcinoma) | MET 受体 |
| VEGF | 泛癌 | MET 受体 |
| VEGF 受体 | 泛癌 | MET 受体 |
| IL-13 | 哮喘/肺炎 | IL-4<br>IL-5<br>Eotaxin(s)<br>MDC<br>TARC<br>TNF α<br>IL-9<br>EGFR<br>CD40L<br>IL-25<br>MCP-1<br>TGF β |
| IL-4 | 哮喘 | IL-13<br>IL-5<br>Eotaxin(s)<br>MDC<br>TARC<br>TNF α<br>IL-9<br>EGFR<br>CD40L<br>IL-25<br>MCP-1<br>TGF β |

| | | |
|---|---|---|
| Eotaxin | 哮喘 | IL-5<br>Eotaxin-2<br>Eotaxin-3 |
| EGFR | 癌症 | HER2/neu<br>HER3<br>HER4 |
| HER2 | 癌症 | HER3<br>HER4 |
| TNFR1 | RA/Crohn’ s 病 | IL-1R<br>IL-6R<br>IL-18R |
| TNF α | RA/Crohn’ s 病 | IL- α / β<br>IL-6<br>IL-18<br>ICAM-1<br>IL-15<br>IL-17 |
| IL-1R | RA/Crohn’ s 病 | IL-6R<br>IL-18R |
| IL-18R | RA/Crohn’ s 病 | IL-6R |

**附件 4 数据总结**

| 靶 | dAb | 平衡解离常数(Kd=Koff/Kon) | Koff | 配体分析的 IC50 值 | 基于细胞的中和分析的 ND50 值 |
|---|---|---|---|---|---|
| TAR1 | TAR1 单体 | 300nM-5pM (即，$3 \times 10^{-7}$-$5 \times 10^{-12}$)，优选 50nM-20pM | $5 \times 10^{-1}$-$1 \times 10^{-7}$ | 500nM-100pM | 500nM- 50pM |
| | TAR1 二聚体 | 作为 TAR1 单体 | 作为 TAR1 单体 | 作为 TAR1 单体 | 作为 TAR1 单体 |
| | TAR1 三聚体 | 作为 TAR1 单体 | 作为 TAR1 单体 | 作为 TAR1 单体 | 作为 TAR1 单体 |
| | TAR1-5 | | | | |
| | TAR1-27 | | | | |
| | TAR1-5-19 单体 | 30nM | | | |
| | TAR1-5-19 同二聚体 | | | $(Gly_4Ser)_3$ 连接子= 20nm<br>$(Gly_4Ser)_5$ 连接子= 2nm<br>$(Gly_4Ser)_7$ 连接子= 10nm<br>Fab 形式 (Fab format)= lnM | =30nM<br>=3nM<br>=15nM |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | TAR1-5-19 异二聚体 | | 具有 $(Gly_4Ser)_n$ 连接子<br>TAR1-5-19d2=2nM<br>TARl-5-19d3= 8nM<br>TAR1-5-19d4=2-5nM<br>TARl-5-19d5= 8nM<br>Fab 形式 (Fab format)<br>TAR1-5-19CH dlCK = 6nM<br>TAR1-5-19CK dlCH = 6nM<br>TAR1-5-19CH d2CK = 8nM<br>TAR1-5-19CH d3CK = 3nM | =12nM<br>=10nM<br>=12nM |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | TAR1-5异二聚体 | | 具有$(Gly_4Ser)_n$ 连接子<br>TARl-5dl =30nM<br>TARl-5d2 = 50nM<br>TARl-5d3 = 300nM<br>TARl-5d4 = 3 nM<br>TARl-5d5 = 200nM<br>TARl-5d6 =100nM<br>Fab 形式<br>TAR1-5CHd2CK= 30nM<br>TARl-5CKd3CH = 100nM | =60nM |
| | TAR1-5-19 同三聚体 | | 0.3 nM | 3-10nM (例如,3nM) |
| | | | | |
| TAR2 | TAR2 单体 | 作为 TAR1 单体 | 500nM-100pM | 500nM- 50pM |
| | TAR2-10 | | | |
| | TAR2-5 | | | |

| 血清白蛋白 | 抗-SA 单体 | 1nM-500μM,优选 100nM-10μM<br>是双特异性形式时，靶亲和力是 SA dAb 亲和力的 1-100,000 倍的亲和力，例如 100pM（靶）和 10μM SA 亲和力 | | | 1nM-500μM, 优选 100nM-10μM<br>是双特异性形式时，靶亲和力是 SA dAb 亲和力的 1-100,000 倍的亲和力，例如 100pM（靶）和 10μM SA 亲和力 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | MSA-16 | 200 nM | | | | | |
| | MSA-26 | 70 nM | | | | | |

<110> 多曼蒂斯有限公司 (Domantis Limited)
Winter, Greg
Tomlinson, Ian
Ignatovich, Olga
Holt, Lucy
De Angelis, Elena

<120> 免疫球蛋白单个变体抗原结合区及其特异性构建体

<130> P014435WO ATM

<140> PCT/GB 03/02804
<141> 2003-06-30

<150> PCT/GB2002/003014
<151> 2002-06-28

<150> GB 0230202.4
<151> 2002-12-27

<160> 240

<170> Patentin version 3.1

<210> 1
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HEL4

<220>
<221> CDS

<222> (1)..(360)
<223>

<400> 1

```
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg       48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttt agg att agc gat gag       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Ile Ser Asp Glu
            20                  25                  30

gat atg ggc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gta      144
Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

tca agc att tat ggc cct agc ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg      192
Ser Ser Ile Tyr Gly Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgt gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tat tgc      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg agt gct ttg gag ccg ctt tcg gag ccc ctg ggc ttt tgg ggt cag      336
Ala Ser Ala Leu Glu Pro Leu Ser Glu Pro Leu Gly Phe Trp Gly Gln
            100                 105                 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg agc                                     360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 2
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HEL4

<400> 2

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 Arg Ile Ser Asp Glu
20 25 30

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

Ser Ser Ile Tyr Gly Pro Ser Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ala Leu Glu Pro Leu Ser Glu Pro Leu Gly Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR2-5

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(348)
<223>

<400> 3
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt gat ctt tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Leu Tyr
20 25 30

aat atg ttt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
Asn Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca ttt att agt cag act ggt agg ctt aca tgg tac gca gac tcc gtg 192
Ser Phe Ile Ser Gln Thr Gly Arg Leu Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

```
aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aaa acg ctg gag gat ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc      336
Ala Lys Thr Leu Glu Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

acc gtc tcg agc                                                     348
Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 4
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR2-5

<400> 4

```
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 Asp Leu Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Phe Ile Ser Gln Thr Gly Arg Leu Thr Trp 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Thr Leu Glu Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 5
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR1-5-19

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 5
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc gtt aag gag ttt 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Lys Glu Phe
20 25 30

tta tgg tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Trp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat atg gca tcc aat ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr Met Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag aag ttt aag ctg cct cgt 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Phe Lys Leu Pro Arg
85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR1-5-19

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Lys Glu Phe
20 25 30

Leu Trp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Met Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Phe Lys Leu Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 7
<211> 362
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> TAR2-10

<400> 7
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgcgtctc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttgag tggtattgga tgggttgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg gtctagagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagttaag 300

ttgggggggg ggcctaattt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcgagc 360

gc 362

<210> 8
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR2-10

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)
<223>

<400> 8
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt gag tgg tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Trp Tyr
20 25 30

tgg atg ggt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
Trp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg 192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aaa gtt aag ttg ggg ggg ggg cct aat ttt gac tac tgg ggc cag 336
Ala Lys Val Lys Leu Gly Gly Gly Pro Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg agc 360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR2-10

<400> 9

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 Glu Trp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Val Lys Leu Gly Gly Gly Pro Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR1-5-19

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 10

```
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tct ctg tct gca tct gta gga      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att gat agt tat      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
            20                  25                  30

tta cat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc     144
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat agt gca tcc gag ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc     192
Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct     240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gtt gtg tgg cgt cct ttt     288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
                85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgc                     324
```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR1-5-19

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 12
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR1-5-19

<400> 12
gcgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtaaaa ggacgccaca caacctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaactcgg atgcactata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caatgtaaat aactatcaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagagagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 13
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR1-5

<220>
<221> CDS

<222> (1)..(324)
<223>

<400> 13
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att ttt atg aat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Met Asn
20 25 30

tta ttg tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat aat gca tcc gtg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr Asn Ala Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gtt gtg tgg cgt cct ttt 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR1-5

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Met Asn
20 25 30

Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 15
<211> 324

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR1-5

<400> 15
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtaaaa ggacgccaca caacctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaacacgg atgcattata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac cacaataaat tcataaaaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 16
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 单体 - dAb1: 配偶体 dAb 存在于 TAR1-5d1 (3U 连接子), d5 (5U 连接子), d6 (7U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 16
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tat gat gcg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Asp Ala
20 25 30

tta gag tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat act gca tcc cgg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr Thr Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gtt atg cag cgt cct gtt 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Met Gln Arg Pro Val
85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 17
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单体 - dAb1: 配偶体 dAb 存在于 TAR1-5d1 (3U 连接子), d5 (5U 连接子), d6 (7U 连接子)

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Asp Ala
20 25 30

Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Thr Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Met Gln Arg Pro Val
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 18
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 单体 - dAb1: 配偶体 dAb 存在于 TAR1-5d1 (3U 连接子), d5 (5U 连接子), d6 (7U 连接子)

<400> 18
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtaaca ggacgctgca taacctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaccggg atgcagtata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac cactctaacg catcataaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 19

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 单体 - dAb2: 配偶体 dAb 存在于 TAR1-5d2 (3U 连接子), d3 (5U 连接子)

<400> 19
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcatttat gatgctttac agtggtacca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatact gcatcccggt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttig ctacgtacca ctgtcaacag gttatgcagc gtcctgttac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 20

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 单体 - dAb2: 配偶体 dAb 存在于 TAR1-5d2 (3U 连接子), d3 (5U 连接子)

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Asp Ala
20 25 30

Leu

<210> 21

<211> 74

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 单体 - dAb2: 配偶体 dAb 存在于 TAR1-5d2 (3U 连接子), d3 (5U 连接子)

<400> 21

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr
1 5 10 15

Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
20 25 30

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
35 40 45

Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Val Met Gln Arg Pro Val Thr Phe
50 55 60

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
65 70

<210> 22

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 单体 - dAb2: 配偶体 dAb 存在于 TAR1-5d2 (3U 连接子), d3 (5U 连接子)

<400> 22
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtaaca ggacgctgca taacctgttg 60

acagtggtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaccggg atgcagtata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac cactgtaaag catcataaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 23
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 单体 - dAb3: 配偶体 dAb 存在于 TAR1-5d4 (5U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 23
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc gtt aag gag ttt 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Lys Glu Phe
20 25 30

tta tgg tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Trp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat atg gca tcc aat ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr Met Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag aag ttt aag ctg cct cgt 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Phe Lys Leu Pro Arg
85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 24
<211> 108
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 单体 - dAb3: 配偶体 dAb 存在于 TAR1-5d4 (5U 连接子)

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Lys Glu Phe
20 25 30

Leu Trp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Met Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Phe Lys Leu Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 25
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 单体 - dAb3: 配偶体 dAb 存在于 TAR1-5d4 (5U 连接子)

<400> 25
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtacga ggcagcttaa acttctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaattgg atgccatata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caccataaaa actccttaac 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 26
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR1-27

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 26
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tgg acg aag      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Trp Thr Lys
            20                  25                  30

tta cat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc     144
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat atg gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc     192
Tyr Met Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct     240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag tgg ttt agt aat cct agt     288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Phe Ser Asn Pro Ser
                85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgc                     324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 27
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR1-27

<400> 27

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Trp Thr Lys
            20                  25                  30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Met Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Phe Ser Asn Pro Ser
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 28
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR1-27

<400> 28
gcgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtacta ggattactaa accactgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaactgg atgccatata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caatgtaact tcgtccaaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 29
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d1 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 29
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tag ccg att 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Pro Ile
20 25 30

tta tgt tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag att cag cat att cct gtg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Gln His Ile Pro Val
80 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 30
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d1 (3U 连接子)

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile

20 25

<210> 31
<211> 78
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d1 (3U 连接子)

<400> 31

Pro Ile Leu Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
1 5 10 15

Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
20 25 30

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
35 40 45

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Gln His Ile
50 55 60

Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
65 70 75

<210> 32
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d1 (3U 连接子)

<400> 32
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtcaca ggaatatgct gaatctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaactgg atgcagcata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caacataaaa tcggctaaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 33
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d2 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 33
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

```
gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att ggg tag gat      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly     Asp
            20                  25                  30

tta cat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc     144
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
            35                  40                  45

tat acg gca tcc ctt ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc     192
Tyr Thr Ala Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
        50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct     240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
    65                  70                  75

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag cag agt gct ttt cct aat     288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gln Ser Ala Phe Pro Asn
80                  85                  90                  95

acg ctc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg                     324
Thr Leu Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                100                 105
```

<210> 34
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d2 (3U 连接子)

<400> 34

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly
            20                  25                  30
```

<210> 35
<211> 77
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d2 (3U 连接子)

<400> 35

```
Asp Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
1               5                   10                  15

Ile Tyr Thr Ala Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
            20                  25                  30

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
        35                  40                  45

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gln Ser Ala Phe Pro
    50                  55                  60

Asn Thr Leu Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
65                  70                  75
```

<210> 36

<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d2 (3U 连接子)

<400> 36
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gagcgtatta ggaaaagcac tctgctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaaaggg atgccgtata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caatgtaaat cctacccaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 37
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d7 (3U连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 37
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tcc gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc ata acg aag aat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Lys Asn
20 25 30

tta ctt tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat tag gca tcc tct ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag ctt cgt cat aag cct ccg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Arg His Lys Pro Pro
80 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 38
<211> 49
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d7 (3U连接子)

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Lys Asn
20 25 30

Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr

<210> 39
<211> 58
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d7 (3U连接子)

<400> 39

Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
20 25 30

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Arg His Lys Pro Pro Thr Phe
35 40 45

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
50 55

<210> 40
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d7 (3U连接子)

<400> 40
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtcgga ggcttatgac gaagctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaagagg atgcctaata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caaagtaaat tcttcgttat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acggatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 41
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d8 (3U连接子)

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 41
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tag aag tct 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Lys Ser
20 25 30

tta agg tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat cat gca tcc gat ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr His Ala Ser Asp Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag atg gtt aat agt cct gtt 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Val Asn Ser Pro Val
80 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 42
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d8 (3U连接子)

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
20 25

<210> 43
<211> 78
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d8 (3U连接子)

<400> 43

Lys Ser Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
1 5 10 15

Leu Ile Tyr His Ala Ser Asp Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
20 25 30

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
35 40 45

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Val Asn Ser
50 55 60

Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
65 70 75

<210> 44
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d8 (3U 连接子)

<400> 44
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtaaca ggactattaa ccatctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaatcgg atgcatgata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caccttaaag acttctaaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 45
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d12 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 45
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tag acg gcg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Ala
20 25 30

tta cat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat tct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag tcg agt ttt ttg cct ttt 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Phe Leu Pro Phe
80 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 46
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d12 (3U 连接子)

<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
20 25

<210> 47
<211> 78
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d12 (3U 连接子)

<400> 47

Thr Ala Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
1 5 10 15

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
20 25 30

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
35 40 45

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Phe Leu
50 55 60

Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
65 70 75

<210> 48
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d12 (3U 连接子)

<400> 48
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtaaaa ggcaaaaaac tcgactgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaactgg atgcagaata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caatgtaacg ccgtctaaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 49
<211> 324
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d16 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 49

```
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att ggg ccg aat       96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Pro Asn
            20                  25                  30

tta gag tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc      192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag cag atg ggg cgt cct cgg      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gln Met Gly Arg Pro Arg
                85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg                      324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 50
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d16 (3U 连接子)

<400> 50

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Pro Asn
            20                  25                  30

Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gln Met Gly Arg Pro Arg
                85                  90                  95
```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 51
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d16 (3U 连接子)

<400> 51
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtccga ggacgcccca tctgctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaactgg atgcagcata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac cactctaaat tcggcccaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 52
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d23 (5U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 52
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att aag cat tag 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Lys His
20 25 30

tta gct tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat aag gca tcc gtg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr Lys Ala Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag ctt agg cgt cgt cct act 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Arg Arg Arg Pro Thr
80 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 53
<211> 31

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d23 (5U 连接子)

<400> 53

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Lys His
20 25 30

<210> 54
<211> 76
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d23 (5U 连接子)

<400> 54

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr Lys Ala Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
20 25 30

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
35 40 45

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Arg Arg Arg Pro Thr
50 55 60

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
65 70 75

<210> 55
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d23 (5U 连接子)

<400> 55
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtagta ggacgacgcc taagctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaacacgg atgccttata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caagctaact aatgcttaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 56
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d30 (7U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 56

```
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc gtt aag gct tag       96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Lys Ala
            20                  25                  30

tta act tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
            35                  40                  45

tat aag gca tcc act ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc      192
Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
        50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
    65                  70                  75

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag cat agt tct agg cct tat      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Ser Arg Pro Tyr
80                  85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg                      324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                100                 105
```

<210> 57
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d30 (7U 连接子)

<400> 57

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Lys Ala
            20                  25                  30
```

<210> 58
<211> 76
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d30 (7U 连接子)

<400> 58

```
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
1               5                   10                  15

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
            20                  25                  30
```

```
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
        35                  40                  45

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Ser Arg Pro Tyr
    50                  55                  60

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
65                  70                  75
```

<210> 59
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d30 (7U 连接子)

<400> 59
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtataa ggcctagaac tatgctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaagtgg atgccttata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caagttaact aagccttaac 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 60
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d31 (7U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 60
```
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att gag aat cgg      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asn Arg
            20                  25                  30

tta ggt tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc     144
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat tag gcg tcc ttg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc     192
Tyr     Ala Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
        50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct     240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
    65                  70                  75

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gat tcg tat ttt cct cgt     288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ser Tyr Phe Pro Arg
80                  85                  90                  95
```

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 61
<211> 49
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d31 (7U 连接子)

<400> 61

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asn Arg
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr

<210> 62
<211> 58
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d31 (7U 连接子)

<400> 62

Ala Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
20 25 30

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ser Tyr Phe Pro Arg Thr Phe
35 40 45

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
50 55

<210> 63
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d31 (7U 连接子)

<400> 63
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtacga ggaaaatacg aatcctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaacaagg acgcctaata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caacctaacc gattctcaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 64
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d36 (7U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 64

```
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att atg gat aag       96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Met Asp Lys
            20                  25                  30

tta aag tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat tag gca tcc att ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc      192
Tyr     Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
        50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
    65                  70                  75

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gat agt ggg ggt cct aat      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ser Gly Gly Pro Asn
80                  85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg                      324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                100                 105
```

<210> 65
<211> 49
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d36 (7U 连接子)

<400> 65

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Met Asp Lys
            20                  25                  30

Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr
```

<210> 66
<211> 58
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d36 (7U 连接子)

<400> 66

Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
20 25 30

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ser Gly Gly Pro Asn Thr Phe
35 40 45

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
50 55

<210> 67
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d36 (7U 连接子)

<400> 67
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtatta ggacccccac tatcctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaaatgg atgcctaata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac cactttaact tatccataat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

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

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d37 (7U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 68
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att ggg agg aat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Arg Asn
20 25 30

tta gag tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144

```
Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat gat gca tcc cat ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc      192
Tyr Asp Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag tcg cgt tgg ctt cct cgt      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Trp Leu Pro Arg
                85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg                      324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 69
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d37 (7U 连接子)

<400> 69

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Arg Asn
            20                  25                  30

Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Asp Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Trp Leu Pro Arg
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 70
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d37 (7U 连接子)

<400> 70

```
ccgtttgatt tccaccttgg tccctggcc gaacgtacga ggaagccaac gcgactgttg      60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt     120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaatggg atgcatcata     180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac cactctaaat tcctcccaat     240
```

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 71
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d39 (7U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 71
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agg aag atg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Lys Met
20 25 30

tta gtt tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat cgg gca tcc tat ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr Arg Ala Ser Tyr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gct ttt cgg cgg cct agg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Arg Arg Pro Arg
85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 72
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d39 (7U 连接子)

<400> 72

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Lys Met
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Tyr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Arg Arg Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 73
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR1-27d39 (7U 连接子)

<400> 73
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtccta ggccgccgaa aagcctgttg 60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaatagg atgcccgata 180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caaactaaca tcttcctaat 240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga 300

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 74
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TAR2h-5

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(345)
<223>

<400> 74
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt gat ctt tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Leu Tyr
20 25 30

aat atg ttt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
Asn Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca ttt att agt cag act ggt agg ctt aca tgg tac gca gac tcc gtg 192
Ser Phe Ile Ser Gln Thr Gly Arg Leu Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

```
gcg aaa acg ctg gag gat ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc      336
Ala Lys Thr Leu Glu Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

acc gtc tcg                                                          345
Thr Val Ser
        115


<210>  75
<211>  115
<212>  PRT
<213>  人工序列

<220>
<223>  TAR2h-5

<400>  75

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 Asp Leu Tyr
            20                  25                  30


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


Ser Phe Ile Ser Gln Thr Gly Arg Leu Thr Trp 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Lys Thr Leu Glu Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110


Thr Val Ser
        115


<210>  76
<211>  345
<212>  DNA
<213>  人工序列

<220>
<223>  TAR2h-5

<400>  76
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaaa tcctccagcg ttttcgcaca     60

gtaatatacc gcggtgtcct cggcacgcag gctgttcatt tgcagataca gcgtgttctt    120

ggaattgtcg cgggagatgg tgaaccggcc cttcacggag tctgcgtacc atgtaagcct    180

accagtctga ctaataaatg agacccactc tagacccttc cctggagcct ggcggaccca    240

aaacatatta taaagatcaa aggtgaatcc ggaggctgca caggagagac gcagggaccc    300

cccaggctgt accaagcctc ccccagactc caacagctgc acctc                    345
```

<210> 77
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d1 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223>

<400> 77
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt ccg gtt tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Pro Val Tyr
20 25 30

atg atg ggt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
Met Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca tcg att gat gct ctt ggt ggg cgg aca ggt tac gca gac tcc gtg 192
Ser Ser Ile Asp Ala Leu Gly Gly Arg Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aaa act atg tcg aat aag acg cat acg ttt gac tac tgg ggc cag 336
Ala Lys Thr Met Ser Asn Lys Thr His Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg 357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 78
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d1 (3U 连接子)

<400> 78

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 Pro Val Tyr
20 25 30

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

Ser Ser Ile Asp Ala Leu Gly Gly Arg Thr Gly 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Thr Met Ser Asn Lys Thr His Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
        115
```

<210> 79
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d1 (3U 连接子)

<400> 79
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaac gtatgcgtct tattcgacat 60

agttttcgca cagtaatata ccgcggtgtc ctcggcacgc aggctgttca tttgcagata 120

cagcgtgttc ttggaattgt cgcgggagat ggtgaaccgg cccttcacgg agtctgcgta 180

acctgtccgc ccaccaagag catcaatcga tgagacccac tctagaccct tccctggagc 240

ctggcggacc caacccatca tataaaccgg aaaggtgaat ccggaggctg cacaggagag 300

acgcagggac cccccaggct gtaccaagcc tccccccagac tccaacagct gcacctc 357

<210> 80
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d2 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(345)
<223>

<400> 80
```
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg      48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt gtg gct tat      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Val Ala Tyr
            20                  25                  30

aat atg act tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc     144
Asn Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

tca agt att aat act ttt ggt aat tag aca agg tac gca gac tcc gtg     192
Ser Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asn     Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                      60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat     240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65                  70                  75

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt     288
```

```
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
80                  85                  90                  95

gcg aaa ggt agt agg cct ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc      336
Ala Lys Gly Ser Arg Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
                100                 105                 110

acc gtc tcg                                                          345
Thr Val Ser
```

<210> 81
<211> 56
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d2 (3U 连接子)

<400> 81

```
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 Val Ala Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asn
    50                  55
```

<210> 82
<211> 58
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d2 (3U 连接子)

<400> 82

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

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Arg Pro Phe Asp Tyr
        35                  40                  45

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
    50                  55
```

<210> 83
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d2 (3U 连接子)

<400> 83

```
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaaa ggcctactac ctttcgcaca     60
```

gtaatatacc gcggtgtcct cggcacgcag gctgttcatt tgcagataca gcgtgttctt 120

ggaattgtcg cgggagatgg tgaaccggcc cttcacggag tctgcgtacc ttgtctaatt 180

accaaaagta ttaatacttg agacccactc tagaccctte cctggagcct ggcggaccca 240

agtcatatta taagccacaa aggtgaatcc ggaggctgca caggagagac gcagggaccc 300

cccaggctgt accaagcctc ccccagactc caacagctgc acctc 345

<210> 84
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d3 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223>

<400> 84

```
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg       48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt tag ggg tat       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe     Gly Tyr
            20                  25                  30

cgt atg ggt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc      144
Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
            35                  40                  45

tca tgg att acg cgt act ggt ggg acg aca cag tac gca gac tcc gtg      192
Ser Trp Ile Thr Arg Thr Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Ala Asp Ser Val
        50                  55                  60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65                  70                  75

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
80                  85                  90                  95

gcg aaa ccg gcg aag ctt gtt ggg gtt ggg ttt gac tac tgg ggc cag      336
Ala Lys Pro Ala Lys Leu Val Gly Val Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
                100                 105                 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg                                         357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            115
```

<210> 85
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d3 (3U 连接子)

<400> 85

```
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
20 25

<210> 86
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d3 (3U 连接子)

<400> 86

Gly Tyr Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
1 5 10 15

Trp Val Ser Trp Ile Thr Arg Thr Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Ala Asp
20 25 30

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
35 40 45

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
50 55 60

Tyr Cys Ala Lys Pro Ala Lys Leu Val Gly Val Gly Phe Asp Tyr Trp
65 70 75 80

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
85

<210> 87
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d3 (3U 连接子)

<400> 87
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaac ccaaccccaa caagcttcgc 60

cggtttcgca cagtaatata ccgcggtgtc ctcggcacgc aggctgttca tttgcagata 120

cagcgtgttc ttggaattgt cgcgggagat ggtgaaccgg cccttcacgg agtctgcgta 180

ctgtgtcgtc ccaccagtac gcgtaatcca tgagacccac tctagaccct tccctggagc 240

ctggcggacc caacccatac gataccccta aaaggtgaat ccggaggctg cacaggagag 300

acgcagggac cccccaggct gtaccaagcc tcccccagac tccaacagct gcacctc 357

<210> 88
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d4 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS

<222> (1)..(357)
<223>

<400> 88
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt cgg aag tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Lys Tyr
20 25 30

tag atg ggg tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca cag att ggt gcg aag ggt cag tct aca gat tac gca gac tcc gtg 192
Ser Gln Ile Gly Ala Lys Gly Gln Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
80 85 90 95

gcg aaa aag aag agg ggg gag aat tat ttt ttt gac tac tgg ggc cag 336
Ala Lys Lys Lys Arg Gly Glu Asn Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg 357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 89
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d4 (3U 连接子)

<400> 89

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 Lys Tyr
20 25 30

<210> 90
<211> 86
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d4 (3U 连接子)

<400> 90

Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gln Ile Gly Ala Lys Gly Gln Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
20 25 30

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
35 40 45

```
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
    50                  55                  60

Lys Lys Lys Arg Gly Glu Asn Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
65                  70                  75                  80

Thr Leu Val Thr Val Ser
                85
```

<210> 91
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d4 (3U 连接子)

<400> 91
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaaa aaataattct ccccccctctt 60

ctttttcgca cagtaatata ccgcggtgtc ctcggcacgc aggctgttca tttgcagata 120

cagcgtgttc ttggaattgt cgcgggagat ggtgaaccgg cccttcacgg agtctgcgta 180

atctgtagac tgacccttcg caccaatctg tgagacccac tctagaccct tccctggagc 240

ctggcggacc caccccatct aatacttccg aaaggtgaat ccggaggctg cacaggagag 300

acgcagggac cccccaggct gtaccaagcc tcccccagac tccaacagct gcacctc 357

<210> 92
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d5 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223>

<400> 92
```
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg      48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt cgg cgg tat      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
            20                  25                  30

agt atg tcg tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc     144
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

tca gat att tct cgt tct ggt cgg tat aca cat tac gca gac tcc gtg     192
Ser Asp Ile Ser Arg Ser Gly Arg Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat     240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt     288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

```
gcg aaa cgt att gat tct tct cag aat ggg ttt gac tac tgg ggc cag      336
Ala Lys Arg Ile Asp Ser Ser Gln Asn Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg                                          357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
        115
```

<210> 93
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d5 (3U 连接子)

<400> 93

```
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 Arg Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Asp Ile Ser Arg Ser Gly Arg Tyr Thr His 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Arg Ile Asp Ser Ser Gln Asn Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
        115
```

<210> 94
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d5 (3U 连接子)

<400> 94

```
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaac ccattctgag aagaatcaat     60

acgtttcgca cagtaatata ccgcggtgtc ctcggcacgc aggctgttca tttgcagata    120

cagcgtgttc ttggaattgt cgcgggagat ggtgaaccgg cccttcacgg agtctgcgta    180

atgtgtatac cgaccagaac gagaaatatc tgagacccac tctagaccct tccctggagc    240

ctggcggacc cacgacatac tataccgccg aaaggtgaat ccggaggctg cacaggagag    300

acgcagggac cccccaggct gtaccaagcc tcccccagac tccaacagct gcacctc       357
```

<210> 95
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d6 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(345)
<223>

<400> 95
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt tag ggg tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Tyr
20 25 30

aag atg ttt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
Lys Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg 192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
80 85 90 95

gcg aaa cag aag gag aat ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc 336
Ala Lys Gln Lys Glu Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

acc gtc tcg 345
Thr Val Ser

<210> 96
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d6 (3U 连接子)

<400> 96

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
20 25

<210> 97
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d6 (3U 连接子)

<400> 97

Gly Tyr Lys Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
1 5 10 15

Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
20 25 30

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
35 40 45

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
50 55 60

Tyr Cys Ala Lys Gln Lys Glu Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75 80

Leu Val Thr Val Ser
85

<210> 98
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d6 (3U 连接子)

<400> 98
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaaa ttctccttct gtttcgcaca 60

gtaatatacc gcggtgtcct cggcacgcag gctgttcatt tgcagataca gcgtgttctt 120

ggaattgtcg cgggagatgg tgaaccggcc cttcacggag tctgcgtagt atgtgctacc 180

accactacca ctaatagctg agacccactc tagacccttc cctggagcct ggcggaccca 240

aaacatctta tacccctaaa aggtgaatcc ggaggctgca caggagagac gcagggaccc 300

cccaggctgt accaagcctc ccccagactc caacagctgc acctc 345

<210> 99
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d7 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223>

<400> 99
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt ggg gat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr
20 25 30

gct atg tgg tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144

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

tca gtg att agt tcg aat ggt ggg agt aca ttt tac gca gac tcc gtg      192
Ser Val Ile Ser Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aaa cgt gtt cgt aag agg act cct gag ttt gac tac tgg ggc cag      336
Ala Lys Arg Val Arg Lys Arg Thr Pro Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg                                         357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
        115
```

<210> 100
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d7 (3U 连接子)

<400> 100

```
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 Gly Asp Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Val Ile Ser Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Arg Val Arg Lys Arg Thr Pro Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
        115
```

<210> 101
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d7 (3U 连接子)

<400> 101
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaac tcaggagtcc tcttacgaac 60

acgtttcgca cagtaatata ccgcggtgtc ctcggcacgc aggctgttca tttgcagata 120

cagcgtgttc ttggaattgt cgcgggagat ggtgaaccgg cccttcacgg agtctgcgta 180

aaatgtactc ccaccattcg aactaatcac tgagacccac tctagaccct tccctggagc 240

ctggcggacc caccacatag cataatcccc aaaggtgaat ccggaggctg cacaggagag 300

acgcagggac cccccaggct gtaccaagcc tcccccagac tccaacagct gcacctc 357

<210> 102
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d8 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223>

<400> 102
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt agg agg tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
20 25 30

aag atg ggt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
Lys Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca gcg att ggg agg aat ggt acg aag aca aat tac gca gac tcc gtg 192
Ser Ala Ile Gly Arg Asn Gly Thr Lys Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aaa att tat acg ggg aag cct gct gcg ttt gac tac tgg ggc cag 336
Ala Lys Ile Tyr Thr Gly Lys Pro Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg 357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 103
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d8 (3U 连接子)

<400> 103

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 Arg Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Gly Arg Asn Gly Thr Lys Thr Asn 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ile Tyr Thr Gly Lys Pro Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 104
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d8 (3U 连接子)

<400> 104
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaac gcagcaggct tccccgtata 60

aattttcgca cagtaatata ccgcggtgtc ctcggcacgc aggctgttca tttgcagata 120

cagcgtgttc ttggaattgt cgcgggagat ggtgaaccgg cccttcacgg agtctgcgta 180

atttgtcttc gtaccattcc tcccaatcgc tgagacccac tctagaccct tccctggagc 240

ctggcggacc caacccatct tatacctcct aaaggtgaat ccggaggctg cacaggagag 300

acgcagggac cccccaggct gtaccaagcc tccccccagac tccaacagct gcacctc 357

<210> 105
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d9 (3U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223>

<400> 105
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt aag aag tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Lys Tyr

```
           20                  25                  30

tag atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc      144
    Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
            35                  40                  45

tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg      192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
        50                  55                  60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65                  70                  75

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
80                  85                  90                  95

gcg aaa atg ctg agg act aag aat aag gtg ttt gac tac tgg ggc cag      336
Ala Lys Met Leu Arg Thr Lys Asn Lys Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
                100                 105                 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg                                         357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            115


<210>  106
<211>  32
<212>  PRT
<213>  人工序列

<220>
<223>  配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d9 (3U 连接子)

<400>  106

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 Lys Lys Tyr
            20                  25                  30


<210>  107
<211>  86
<212>  PRT
<213>  人工序列


<220>
<223>  配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d9 (3U 连接子)

<400>  107

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1               5                   10                  15


Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
            20                  25                  30


Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
        35                  40                  45


Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
    50                  55                  60


Lys Met Leu Arg Thr Lys Asn Lys Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
65                  70                  75                  80
```

Thr Leu Val Thr Val Ser
85

<210> 108
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d9 (3U 连接子)

<400> 108
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaac accttattct tagtcctcag 60

cattttcgca cagtaatata ccgcggtgtc ctcggcacgc aggctgttca tttgcagata 120

cagcgtgttc ttggaattgt cgcgggagat ggtgaaccgg cccttcacgg agtctgcgta 180

gtatgtgcta ccaccactac cactaatagc tgagacccac tctagaccct tccctggagc 240

ctggcggacc caagacatct aatacttctt aaaggtgaat ccggaggctg cacaggagag 300

acgcagggac cccccaggct gtaccaagcc tcccccagac tccaacagct gcacctc 357

<210> 109
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d10 (5U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223>

<400> 109
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt agg agg tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
20 25 30

aag atg ggt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
Lys Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca gcg att ggg agg aat ggt acg aag aca aat tac gca gac tcc gtg 192
Ser Ala Ile Gly Arg Asn Gly Thr Lys Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aaa att tat acg ggg aag cct gct gcg ttt gac tac tgg ggc cag 336
Ala Lys Ile Tyr Thr Gly Lys Pro Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg 357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 110
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d10 (5U 连接子)

<400> 110

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 Arg Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Gly Arg Asn Gly Thr Lys Thr Asn 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ile Tyr Thr Gly Lys Pro Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 111
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d10 (5U 连接子)

<400> 111
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaac gcagcaggct tccccgtata 60

aattttcgca cagtaatata ccgcggtgtc ctcggcacgc aggctgttca tttgcagata 120

cagcgtgttc ttggaattgt cgcgggagat ggtgaaccgg cccttcacgg agtctgcgta 180

atttgtcttc gtaccattcc tcccaatcgc tgagacccac tctagaccct tccctggagc 240

ctggcggacc caacccatct tatacctcct aaaggtgaat ccggaggctg cacaggagag 300

acgcagggac cccccaggct gtaccaagcc tcccccagac tccaacagct gcacctc 357

<210> 112
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d11 (5U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223>

<400> 112
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt tag agt tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr
20 25 30

cgg atg ggt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca agt att tcg tcg agg ggt agg cat aca tct tac gca gac tcc gtg 192
Ser Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg His Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
80 85 90 95

gcg aaa agg gtt ccg ggt cgg ggg cgt tct ttt gac tac tgg ggc cag 336
Ala Lys Arg Val Pro Gly Arg Gly Arg Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg 357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 113
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d11 (5U 连接子)

<400> 113

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
20 25

<210> 114
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d11 (5U 连接子)

<400> 114

Ser Tyr Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
1 5 10 15

Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg His Thr Ser Tyr Ala Asp

```
            20                  25                  30

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
        35                  40                  45

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
    50                  55                  60

Tyr Cys Ala Lys Arg Val Pro Gly Arg Gly Arg Ser Phe Asp Tyr Trp
65                  70                  75                  80

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                85
```

<210> 115
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d11 (5U 连接子)

<400> 115
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaaa gaacgccccc gacccggaac 60

ccttttcgca cagtaatata ccgcggtgtc ctcggcacgc aggctgttca tttgcagata 120

cagcgtgttc ttggaattgt cgcgggagat ggtgaaccgg cccttcacgg agtctgcgta 180

agatgtatgc ctacccctcg acgaaatact tgagacccac tctagaccct tccctggagc 240

ctggcggacc caacccatcc gataactcta aaaggtgaat ccggaggctg cacaggagag 300

acgcagggac cccccaggct gtaccaagcc tccccccagac tccaacagct gcacctc 357

<210> 116
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d12 (5U 连接子)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223>

<400> 116
```
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg       48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc ccc ttt cgt cgg tat       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Arg Arg Tyr
            20                  25                  30

cgg atg agg tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc      144
Arg Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

tca ggt att tct ccg ggt ggt aag cat aca acg tac gca gac tcc gtg      192
Ser Gly Ile Ser Pro Gly Gly Lys His Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
```

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

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aaa ggt gag ggg ggg gcg agt tct gcg ttt gac tac tgg ggc cag      336
Ala Lys Gly Glu Gly Gly Ala Ser Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg                                         357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
        115


<210>  117
<211>  119
<212>  PRT
<213>  人工序列

<220>
<223>  配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d12 (5U 连接子)

<400>  117

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 Pro Phe Arg Arg Tyr
            20                  25                  30


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


Ser Gly Ile Ser Pro Gly Gly Lys His Thr Thr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Lys Gly Glu Gly Gly Ala Ser Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110


Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
        115


<210>  118
<211>  357
<212>  DNA
<213>  人工序列

<220>
<223>  配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d12 (5U 连接子)

<400>  118
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaac gcagaactcg ccccccccctc     60

acctttcgca cagtaatata ccgcggtgtc ctcggcacgc aggctgttca tttgcagata     120

cagcgtgttc ttggaattgt cgcgggagat ggtgaaccgg cccttcacgg agtctgcgta     180

cgttgtatgc ttaccacccg gagaaatacc tgagacccac tctagaccct tccctggagc     240
```

```
ctggcggacc cacctcatcc gataccgacg aaaggggaat ccggaggctg cacaggagag    300

acgcagggac cccccaggct gtaccaagcc tccccccagac tccaacagct gcacctc      357


<210>  119
<211>  357
<212>  DNA
<213>  人工序列

<220>
<223>  配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d13 (5U 连接子)

<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(357)
<223>


<400>  119
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg       48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt tag cgg tat       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe     Arg Tyr
            20                  25                  30

ggg atg gtt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc      144
Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
            35                  40                  45

tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg      192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
        50                  55                  60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65                  70                  75

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
80                  85                  90                  95

gcg aaa cgg cat agt tct gag gct agg cag ttt gac tac tgg ggc cag      336
Ala Lys Arg His Ser Ser Glu Ala Arg Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
                100                 105                 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg                                         357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            115


<210>  120
<211>  29
<212>  PRT
<213>  人工序列

<220>
<223>  配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d13 (5U 连接子)

<400>  120

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
            20                  25


<210>  121
<211>  89
```

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d13 (5U 连接子)

<400> 121

Arg Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
1 5 10 15

Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
20 25 30

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
35 40 45

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
50 55 60

Tyr Cys Ala Lys Arg His Ser Ser Glu Ala Arg Gln Phe Asp Tyr Trp
65 70 75 80

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
85

<210> 122
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 配偶体 dAb 单体 存在于 TAR2h-5d13 (5U 连接子)

<400> 122
cgagacggtg accagggttc cctggcccca gtagtcaaac tgcctagcct cagaactatg 60

ccgtttcgca cagtaatata ccgcggtgtc ctcggcacgc aggctgttca tttgcagata 120

cagcgtgttc ttggaattgt cgcgggagat ggtgaaccgg cccttcacgg agtctgcgta 180

gtatgtgcta ccaccactac cactaatagc tgagacccac tctagaccct tccctggagc 240

ctggcggacc caaaccatcc cataccgcta aaaggtgaat ccggaggctg cacaggagag 300

acgcagggac cccccaggct gtaccaagcc tcccccagac tccaacagct gcacctc 357

<210> 123
<211> 720
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 双特异性抗体

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(720)
<223>

<400> 123
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat 96

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

gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc      144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg      192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aaa agt tat ggt gct ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc      336
Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

acc gtc tcg agc ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc agc ggc ggt      384
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

ggc ggg tcg acg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct      432
Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
    130                 135                 140

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc      480
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
145                 150                 155                 160

att agc agc tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct      528
Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
                165                 170                 175

aag ctc ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca      576
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
            180                 185                 190

agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc      624
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
        195                 200                 205

agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac      672
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
    210                 215                 220

agt acc cct aat acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg      720
Ser Thr Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
225                 230                 235                 240
```

<210> 124
<211> 240
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 双特异性抗体

<400> 124

```
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 Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
```

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
    130                 135                 140

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
145                 150                 155                 160

Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
                165                 170                 175

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
        195                 200                 205

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
    210                 215                 220

Ser Thr Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
225                 230                 235                 240
```

<210> 125
<211> 332
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 存在于载体 1 和 2 中的可变区

<220>
<221> CDS
<222> (69)..(332)
<223>

<400> 125
caggaaacag ctatgaccat gattacgcca agcttgcatg caaattctat ttcaaggaga 60

cagtcata atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta 110
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu
1 5 10

ctc gcg gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg ttt gac tac tgg ggc cag 158

```
Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
15                  20                  25                  30

gga acc ctg gtc acc gtc tcg agc ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt      206
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                35                  40                  45

ggc agc ggc ggt ggc ggg tcg acg gac atc cag atg acc cag gcg gcc      254
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ala Ala
            50                  55                  60

gca gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat ggg gcc gca tag      302
Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
        65                  70                  75

act gtt gaa agt tgt tta gca aaa cct cat                              332

Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His
        80                  85


<210>  126
<211>  77
<212>  PRT
<213>  人工序列

<220>
<223>  存在于载体 1 和 2 中的可变区

<400>  126

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1               5                   10                  15


Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            20                  25                  30


Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        35                  40                  45


Gly Gly Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ala Ala Ala Glu
    50                  55                  60


Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
65                  70                  75


<210>  127
<211>  10
<212>  PRT
<213>  人工序列

<220>
<223>  存在于载体 1 和 2 中的可变区

<400>  127

Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His
1               5                   10


<210>  128
<211>  27
<212>  DNA
<213>  人工序列

<220>
<223>  仅在 V 区载体 2 插入

<220>
```

<221> CDS
<222> (1)..(27)
<223>

<400> 128
cat cat cat cac cat cac ggg gcc gca 27
His His His His His His Gly Ala Ala
1 5

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 仅在 V 区载体 2 插入

<400> 129

His His His His His His Gly Ala Ala
1 5

<210> 130
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH 链 K8

<400> 130

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 Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser His Ile Ser Pro Tyr Gly Ala Asn Thr Arg 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Leu Arg Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 131
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH 链 VH2

<400> 131

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 Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Asp Ile Gly Ala Thr Gly Ser Lys Thr Gly Tyr Ala Asp Pro 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Lys Val Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 132
<211> 55
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH链 VH4

<400> 132

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 Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Arg Ile Asn Gly Pro Gly
50 55

<210> 133
<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH链 VH4

<400> 133

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

```
Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala
            20                  25                  30

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Gly Ala Pro Phe Asp
        35                  40                  45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    50                  55                  60
```

<210> 134
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH链 VHC11

<400> 134

```
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 Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Ser Ile Pro Ala Ser Gly Leu His Thr Arg 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Pro Gly Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 135
<211> 56
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH链 VHA10sd

<400> 135

```
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 Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
```

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

Ser Asp Ile Glu Arg Thr Gly Tyr
50 55

<210> 136
<211> 59
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH链 VHA10sd

<400> 136

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

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Lys Val Leu Val Phe Asp Tyr
35 40 45

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
50 55

<210> 137
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH链 VHA1sd

<400> 137

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 Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Lys Lys Val Leu Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 138
<211> 55
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH链 vha5sd

<400> 138

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 Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Thr Ile Pro Ala Asn Gly
50 55

<210> 139
<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH链 VHA5sd

<400> 139

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

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

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Leu Leu Gln Phe Asp
35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
50 55 60

<210> 140
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH链 VHC5sd

<400> 140

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 Ser Ser Tyr
20 25 30

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

```
        35                  40                  45

Ser Asp Ile Ala Ala Thr Gly Ser Ala Thr Ser 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Lys Ile Leu Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115


<210>  141
<211>  116
<212>  PRT
<213>  人工序列

<220>
<223>  VH链 VHC11sd

<400>  141

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 Ser Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Thr Ile Ser Ser Val Gly Gln Ser Thr Arg 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Asn Leu Met Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115


<210>  142
<211>  108
<212>  PRT
<213>  人工序列

<220>
<223>  Vkappa链 K8

<400>  142
```

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Arg Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Pro Trp Arg Ser Pro Gly
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 143
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa链 E5sd

<400> 143

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Leu Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Trp Trp Leu Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 144
<211> 49
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa 链 C3

<400> 144

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr

<210> 145
<211> 58
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa 链 C3

<400> 145

Ala Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
20 25 30

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Val Tyr Asp Pro Leu Thr Phe
35 40 45

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
50 55

<210> 146
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 文库 1 的模拟 VH 序列

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(348)
<223>

<400> 146
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt agc agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

```
tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg      192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgt gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aaa agt tat ggt gct ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc      336
Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

acc gtc tcg agc                                                     348
Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 147
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 文库 1 的模拟 VH 序列

<400> 147

```
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 Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 148
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 文库 1 的模拟 VH 序列

<400> 148

```
gctcgagacg gtgaccaggg ttccctggcc ccagtagtca aaagcaccat aacttttcgc     60
```

acagtaatat accgcggtgt cctcggcacg caggctgttc atttgcagat acagcgtgtt 120

cttggaattg tcacgggaga tggtgaaccg gcccttcacg gagtctgcgt agtatgtgct 180

accaccacta ccactaatag ctgagaccca ctctagaccc ttccctggag cctggcggac 240

ccagctcatg gcatagctgc taaaggtgaa tccggaggct gcacaggaga gacgcaggga 300

ccccccaggc tgtaccaagc ctcccccaga ctccaacagc tgcacctc 348

<210> 149
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 文库 2 的模拟 VH 序列

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)
<223>

<220>
<221> misc_feature
<222> (307)..(308)
<223> n = a 或 t 或 c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (310)..(311)
<223> n = a 或 t 或 c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (313)..(314)
<223> n = a 或 t 或 c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (316)..(317)
<223> n = a 或 t 或 c 或 g

<400> 149

```
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg       48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt agc agc tat       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc      144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg      192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgt gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

```
gcg aaa agt tat ggt gct nnk nnk nnk nnk ttt gac tac tgg ggc cag      336
Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg agc                                    360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  150
<211>  120
<212>  PRT
<213>  人工序列

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (103)..(103)
<223>  在位置 103 处存在由 nnk 编码的'Xaa', 该 nnk 编码所有氨基酸以及 TAG 密码子

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (104)..(104)
<223>  在位置 104 处存在由 nnk 编码的'Xaa', 该 nnk 编码所有氨基酸以及 TAG 密码子

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (105)..(105)
<223>  在位置 105 处存在由 nnk 编码的'Xaa', 该 nnk 编码所有氨基酸以及 TAG 密码子

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (106)..(106)
<223>  在位置 106 处存在由 nnk 编码的'Xaa', 该 nnk 编码所有氨基酸以及 TAG 密码子

<220>
<223>  文库 2 的模拟 VH 序列


<400>  150

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 Ser Ser Tyr
            20                  25                  30


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


Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110


Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  151
<211>  360
```

<210> 151
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 文库 2 的模拟 VH 序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (44)..(45)
<223> n = a 或 t 或 c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (47)..(48)
<223> n = a 或 t 或 c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(51)
<223> n = a 或 t 或 c 或 g

<220>
<221> misc_feature
<222> (53)..(54)
<223> n = a 或 t 或 c 或 g

<400> 151
gctcgagacg gtgaccaggg ttccctggcc ccagtagtca aaknnknnkn nknnagcacc 60

ataacttttc gcacagtaat ataccgcggt gtcctcggca cgcaggctgt tcatttgcag 120

atacagcgtg ttcttggaat tgtcacggga gatggtgaac cggcccttca cggagtctgc 180

gtagtatgtg ctaccaccac taccactaat agctgagacc cactctagac ccttccctgg 240

agcctggcgg acccagctca tggcatagct gctaaaggtg aatccggagg ctgcacagga 300

gagacgcagg gacccccccag gctgtaccaa gcctccccca gactccaaca gctgcacctc 360

<210> 152
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 库 3 的模拟 $V_K$ 序列

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 152
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

tta aat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

```
tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc      192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag agt tac agt acc cct aat      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Asn
                85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg                      324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 153
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 库3的模拟 Vκ 序列

<400> 153

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Asn
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 154
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 库3的模拟 Vκ 序列
<400> 154

```
ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtatta ggggtactgt aactctgttg     60

acagtagtac gtagcaaaat cttcaggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt    120

cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaaactgg atgcagcata    180

gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctggtac caatttaaat agctgctaat    240

gctctgactt gcccggcaag tgatggtgac acggtctcct acagatgcag acagggagga    300
```

tggagactgg gtcatctgga tgtc 324

<210> 155
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 MSA dAb MSA 16

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 155
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att att aag cat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ile Lys His
20 25 30

tta aag tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat ggt gca tcc cgg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag ggg gct cgg tgg cct cag 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Arg Trp Pro Gln
85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 156
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 MSA dAb MSA 16

<400> 156

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ile Lys His
20 25 30

Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Arg Trp Pro Gln
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 157
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 MSA dAb MSA 26

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223>

<400> 157
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tat tat cat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Tyr His
20 25 30

tta aag tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat aag gca tcc acg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gtt cgg aag gtg cct cgg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Arg Lys Val Pro Arg
85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 158
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 MSA dAb MSA 26

<400> 158

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Tyr His
20 25 30

Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

```
        35                  40                  45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Arg Lys Val Pro Arg
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 159
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽连接子

<400> 159

```
Gly Gly Gly Gly Ser
1               5
```

<210> 160
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽连接子

<400> 160

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

<210> 161
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽连接子

<400> 161

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

<210> 162
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽连接子

<400> 162

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

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 163
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽连接子

<400> 163

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 164
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽连接子

<400> 164

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

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

<210> 165
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽连接子

<400> 165

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

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

Gly Gly Ser
35

<210> 166
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽连接子

<400> 166

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

1 5 10 15

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 167
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽连接子

<400> 167

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

<210> 168
<211> 50
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽连接子

<400> 168

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser
50

<210> 169

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 169

cggccatggc gtcaacggac at 22

<210> 170

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 170
atgtgcgctc gagcgtttga ttt 23

<210> 171

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 IgGC1 铰链修饰形式

<400> 171

Glu Pro Lys Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 172

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> TAR1-5-19CYS

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223>

<400> 172
tgg agc gcg tcg acg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tct ctg 48
Trp Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
1 5 10 15

tct gca tct gta gga gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag 96
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
20 25 30

```
agc att gat agt tat tta cat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc      144
Ser Ile Asp Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
        35                  40                  45

cct aag ctc ctg atc tat agt gca tcc gag ttg caa agt ggg gtc cca      192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

tca cgt ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc      240
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65                  70                  75                  80

agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gtt      288
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val
                85                  90                  95

gtg tgg cgt cct ttt acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa      336
Val Trp Arg Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110

cgg tgc taa taa gga tcc ggc                                        357
Arg Cys         Gly Ser Gly
                115
```

<210> 173

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TAR1-5-19CYS

<400> 173

```
Trp Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
1               5                   10                  15

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
            20                  25                  30

Ser Ile Asp Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
        35                  40                  45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val
                85                  90                  95

Val Trp Arg Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Arg Cys
```

<210> 174

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> TAR1-5-19CYS

<400> 174
gccggatcct tattagcacc gtttgatttc caccttggtc ccttggccga acgtaaaagg 60

acgccacaca acctgttgac agtagtacgt agcaaaatct tcaggttgca gactgctgat 120

ggtgagagtg aaatctgtcc cagatccact gccactgaaa cgtgatggga ccccactttg 180

caactcggat gcactataga tcaggagctt aggggctttc cctggtttct gctggtacca 240

atgtaaataa ctatcaatgc tctgacttgc ccggcaagtg atggtgacac ggtctcctac 300

agatgcagac agagaggatg gagactgggt catctggatg tccgtcgacg cgctcca 357

<210> 175

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 175
tggagcgcgt cgacggacat ccagatgacc cagtctcca 39

<210> 176

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 176
ttagcagccg gatccttatt agcaccgttt gatttccac 39

<210> 177
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vκ CDR1

<400> 177

Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5

<210> 178
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 178

Phe Lys Ser Leu Lys
1 5

<210> 179
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 179

Tyr Tyr His Leu Lys
1 5

<210> 180
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 180

Arg Arg Tyr Leu Lys
1 5

<210> 181
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 181

Tyr Asn Trp Leu Lys
1 5

<210> 182
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 182

Leu Trp His Leu Arg
1 5

<210> 183

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 183

Phe Arg Tyr Leu Ala
1 5

<210> 184
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 184

Phe Tyr His Leu Ala
1 5

<210> 185
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 185

Ile Trp His Leu Asn
1 5

<210> 186
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 186

Tyr Arg Tyr Leu Arg
1 5

<210> 187
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 187

Leu Lys Tyr Leu Lys
1 5

<210> 188
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 188

Leu Arg Tyr Leu Arg
1 5

<210> 189
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 189

Leu Arg Ser Leu Lys
1 5

<210> 190
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 190

Phe Arg His Leu Lys
1 5

<210> 191
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 191

Arg Lys Tyr Leu Arg
1 5

<210> 192
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 192

Arg Arg Tyr Leu Asn
1 5

<210> 193
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 193

Ile Lys His Leu Lys
1 5

<210> 194
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR1

<400> 194

Tyr Lys His Leu Lys
1 5

<210> 195
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1

<400> 195

Trp Val Tyr Gln Met Asp
1 5

<210> 196
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR1

<400> 196

Trp Ser Tyr Gln Met Thr
1 5

<210> 197
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa 模拟 CDR2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 由 nnk 编码的 Xaa，nnk 编码全部氨基酸以及 TAG 密码子

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 由 nnk 编码的 Xaa，nnk 编码全部氨基酸以及 TAG 密码子

<400> 197

Xaa Ala Ser Xaa Leu Gln Ser
1 5

<210> 198

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 198

Arg Ala Ser Pro Leu Gln Ser
1 5

<210> 199
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 199

Asn Ala Ser Tyr Leu Gln Ser
1 5

<210> 200
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 200

Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 201
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 201

Gln Ala Ser Val Leu Gln Ser
1 5

<210> 202
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 202

Arg Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 203
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 203

His Ala Ser Leu Leu Gln Ser
1 5

<210> 204
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 204

His Ala Ser His Leu Gln Ser
1 5

<210> 205
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 205

Pro Ala Ser Lys Leu Gln Ser
1 5

<210> 206
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 206

Arg Ala Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 207
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 207

Lys Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 208
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 208

Asn Ala Ser His Leu Gln Ser
1 5

<210> 209
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 209

Lys Ala Ser Trp Leu Gln Ser
1 5

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

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 210

Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

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

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 211

Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

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

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 212

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

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

<220>
<223> Vkappa CDR2

<400> 213

Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 214
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH 模拟 CDR2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 由 nnk 编码的 Xaa，nnk 编码全部氨基酸以及 TAG 密码子

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(5)
<223> 由 nnk 编码的 Xaa，nnk 编码全部氨基酸以及 TAG 密码子

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(8)
<223> 由 nnk 编码的 Xaa，nnk 编码全部氨基酸以及 TAG 密码子

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 由 nnk 编码的 Xaa，nnk 编码全部氨基酸以及 TAG 密码子

<400> 214

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

Gly

<210> 215
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR2

<400> 215

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

Gly

<210> 216
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR2

<400> 216

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

Gly

<210> 217
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa 模拟 CDR3

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(6)
<223> 由 nnk 编码的 Xaa，nnk 编码全部氨基酸以及 TAG 密码子

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 由 nnk 编码的 Xaa，nnk 编码全部氨基酸以及 TAG 密码子

<400> 217

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5

<210> 218
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 218

Gln Gln Thr Tyr Ser Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 219
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 219

Gln Gln Thr Tyr Arg Ile Pro Pro Thr
1 5

<210> 220
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 220

Gln Gln Val Val Tyr Trp Pro Val Thr
1 5

<210> 221

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 221

Gln Gln Val Arg Lys Val Pro Arg Thr
1 5

<210> 222
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 222

Gln Gln Gly Leu Tyr Pro Pro Ile Thr
1 5

<210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 223

Gln Gln Asn Val Val Ile Pro Arg Thr
1 5

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 224

Gln Gln Ser Ala Val Tyr Pro Lys Thr
1 5

<210> 225
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 225

Gln Gln Arg Leu Leu Tyr Pro Lys Thr
1 5

<210> 226
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 226

Gln Gln Arg Ala Arg Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 227
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 227

Gln Gln Val Ala Arg Val Pro Arg Thr
1 5

<210> 228
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 228

Gln Gln Tyr Val Gly Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 229
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 229

Gln Gln Thr Thr Tyr Tyr Pro Ile Thr
1 5

<210> 230
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 230

Gln Gln Val Leu Tyr Tyr Pro Gln Thr
1 5

<210> 231
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 231

Gln Gln Val Val Tyr Trp Pro Ala Thr
1 5

<210> 232
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 232

Gln Gln Val Ala Leu Tyr Pro Lys Thr
1 5

<210> 233
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 233

Gln Gln Asn Leu Phe Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 234
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 234

Gln Gln Met Leu Phe Tyr Pro Lys Thr
1 5

<210> 235
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 235

Gln Gln Gly Ala Arg Trp Pro Gln Thr
1 5

<210> 236
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Vkappa CDR3

<400> 236

Gln Gln Val Gly Arg Tyr Pro Lys Thr
1 5

<210> 237
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR3

<400> 237

Leu Ser Gly Lys Phe Asp Tyr
1 5

<210> 238
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH CDR3

<400> 238

Gly Arg Asp His Asn Tyr Ser Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 239

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HA 标记

<400> 239
tatccttatg atgttcctga ttatgca 27

<210> 240
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HA 标记

<400> 240

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

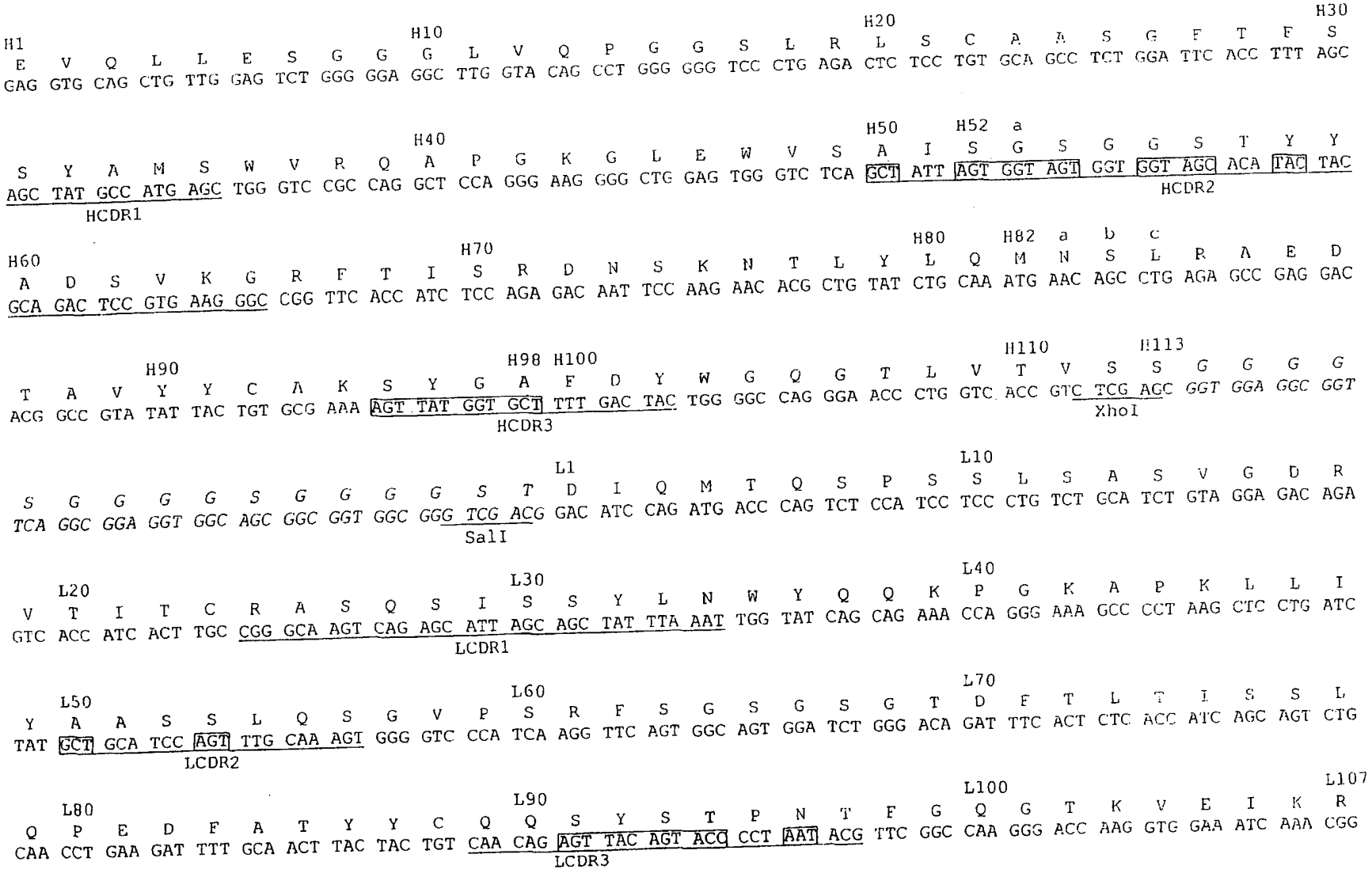
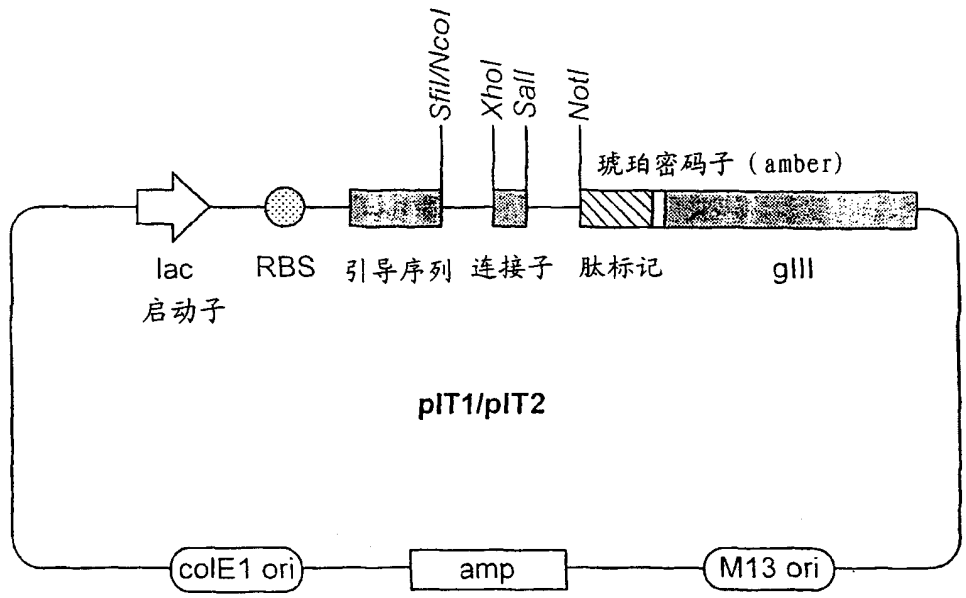

H1 H10 H20 H30
E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC
H40 H50 H52 a
S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y
AGC TAT GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC
HCDR1
HCDR2
H60 H70 H80 H82 a b c
A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC
H90 H98 H100 H110 H113
T A V Y Y C A K S Y G A F D Y W G Q G T L V T V S S G G G G
ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAA AGT TAT GGT GCT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC GGT GGA GGC GGT
HCDR3
XhoI
L1 L10
S G G G G S G G G G S T D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
TCA GGC GGA GGT GGC AGC GGC GGT GGC GGG TCG ACG GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA
SalI
L20 L30 L40
V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I
GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC
LCDR1
L50 L60 L70
Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L
TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG
LCDR2
L80 L90 L100 L107
Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P N T F G Q G T K V E I K R
CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT AAT ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
LCDR3

图 1




RBS

CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATA ATG AAA TAC CTA

---------->  M K Y L

LMB3

SfiI NcoI

TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG TTT

L P T A A A G L L L L A A Q P A M A E V F

XhoI 连接子

GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT

D Y W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G

SalI NotI

GGC AGC GGC GGT GGC GGG TCG ACG GAC ATC CAG ATG ACC CAG GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC

G S G G G G S T D I Q M T Q A A A E Q K L

<----------

连接新的序列

*HIS-tag*

CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA

H H H H H H G A A

（仅在PIT2中的插入）

*myc-tag* *Gene III*

ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA TAG ACT GTT GAA AGT TGT TTA GCA AAA CCT CAT

I S E E D L N G A * T V E S C L A K P H

<----------

pHEN seq

图 2

$V_H$ 链

| | FR1 | | | CDR1 | FR2 | CDR2 | | FR3 | | | | | CDR3 | FR4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | 10 | 11 | |
| | 12345678901234567890123456789 | | | 12345 | 67890123456789 | 012a3456789012345 | | 678901234567890 | 12abc345678901234 | | | 567801 | 234567890123 | |
| $V_H$ 模拟 (dummy) | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS | | | SYAMS | WVRQAPGKGLEWVS | AISGSGGSTYYADSVKG | | RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK | | | | | SYGAFDY | WGQGTLVTVSS |
| K8 | ---------- | | | ----- | ---------- | H-SPY-AN-R------- | | ---------- | | | | | GLRA--- | ---------- |
| VH2 | ---------- | | | ----- | ---------- | D-GAT-SK-G---P--- | | ---------- | | | | | KVLT--- | ---------- |
| VH4 | ---------- | | | ----- | ---------- | R-NGP-*A-G------- | | ----------I---------- | | | | | HGAP--- | ---------- |
| VHC11 | ---------- | | | ----N | ---------- | S-PAS-LH-R------- | | ---------- | | | | | PGLG--- | ---------- |
| VHA10sd | ---------- | | | ----- | ---------- | D-ERT-Y*-R------- | | ---------- | | | | | KVLV--- | ---------- |
| VHA1sd | ---------- | | | ----- | ---------- | E-SAN-SK-Q------- | | -L---------- | | | | | KVLQ--- | ---------- |
| VHA5sd | ---------- | | | ----- | ---------- | T-PAN-*V-R------- | | ---------- | | | | | SLLQ--- | ---------- |
| VHC5sd | ---------- | | | ----- | ---------- | D-AAT-SA-S------- | | ---------- | | | | | KILK--- | ---------- |
| VHC11sd | ----------S--- | | | ----- | ---------- | T-SSV-QS-R------- | | ---------- | | | | | NLNS--- | ---------- |

$V_k$ 链

| | FR1 | | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | | | | CDR3 | FR4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| | 12345678901234567890123 | | 45678901234 | 567890123456789 | 0123456 | 78901234567890123456789012345678 | | | 901234567 | 89012345678 | |
| $V_k$ 模拟 (dummy) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC | | RASQSISSYLN | WYQQKPGKAPKLLIY | AASSLQS | GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC | | | QQSYSTPWT | FGQGTKVEIKR | |
| K8 | ---------- | | ---------- | ---------- | R--H--- | ---------- | | | --PWRS-G- | ---------- | |
| E5sd | ---------- | | -----V----- | ---------- | L--R--- | ---------- | | | --WWL-P- | ---------- | |
| C3 | ---------- | | ---------- | ---------- | *--L--- | ---------- | | | --RVYD-L- | ---------- | |

图 3

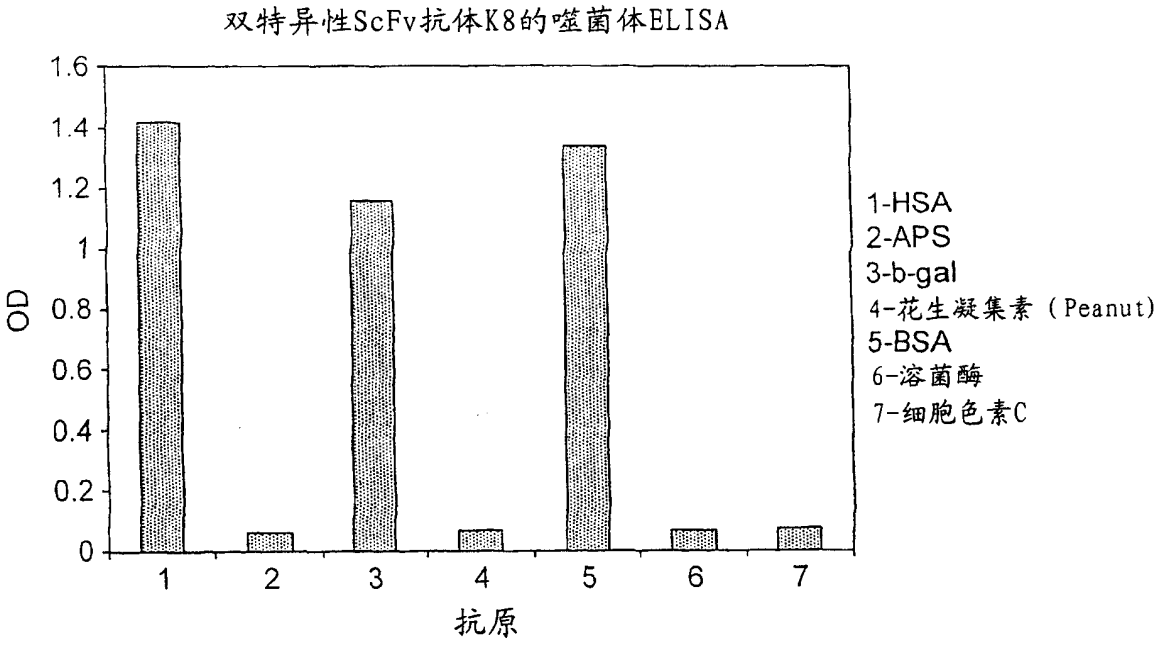

双特异性ScFv抗体K8的噬菌体ELISA
OD
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1
2
3
4
5
6
7
抗原
1-HSA
2-APS
3-b-gal
4-花生凝集素（Peanut）
5-BSA
6-溶菌酶
7-细胞色素C

图 4

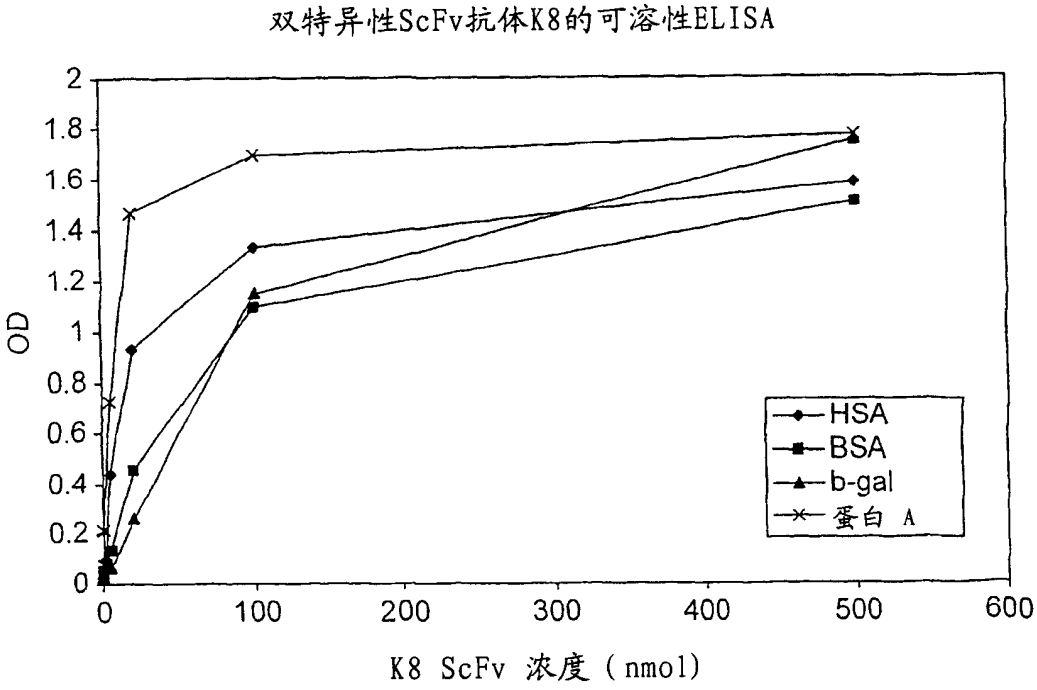

双特异性ScFv抗体K8的可溶性ELISA
OD
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
100
200
300
400
500
600
K8 ScFv 浓度（nmol）
HSA
BSA
b-gal
蛋白 A

图 5

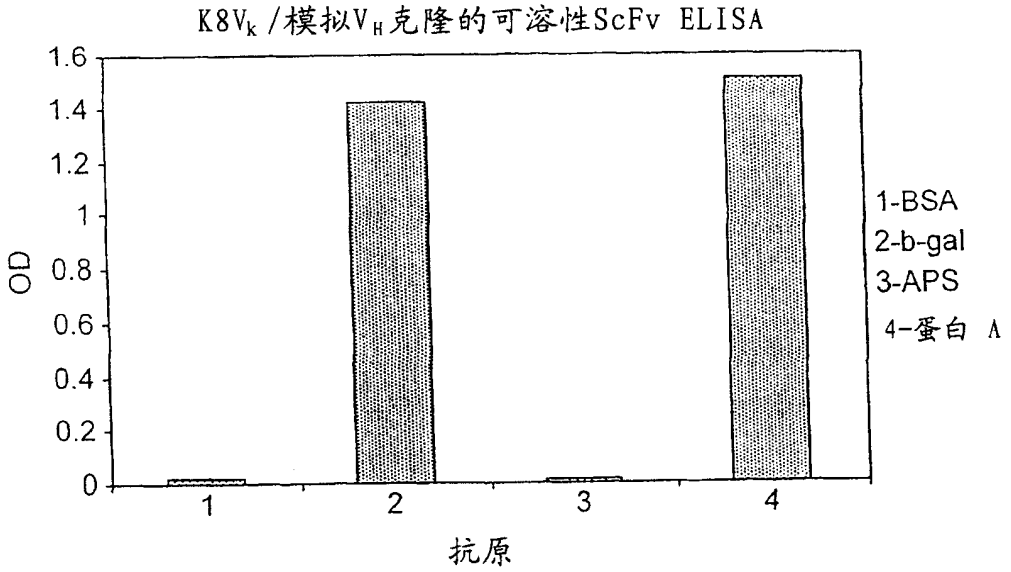

K8Vk /模拟VH克隆的可溶性ScFv ELISA
OD
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1
2
3
4
抗原
1-BSA
2-b-gal
3-APS
4-蛋白 A

图 6

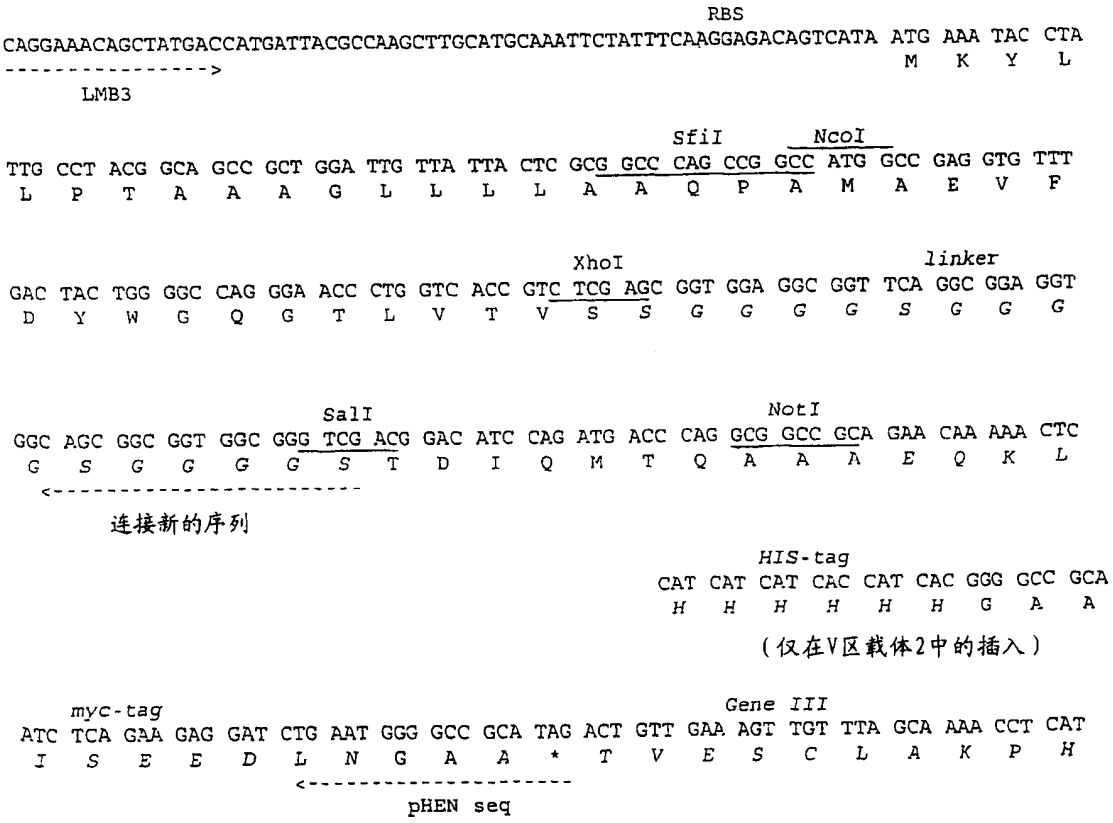

RBS
CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATA ATG AAA TAC CTA
M K Y L
LMB3
SfiI NcoI
TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG TTT
L P T A A A G L L L L A A Q P A M A E V F
XhoI linker
GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT
D Y W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G
SalI NotI
GGC AGC GGC GGT GGC GGG TCG ACG GAC ATC CAG ATG ACC CAG GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC
G S G G G G S T D I Q M T Q A A A E Q K L
连接新的序列
HIS-tag
CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA
H H H H H H G A A
(仅在V区载体2中的插入)
myc-tag
Gene III
ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA TAG ACT GTT GAA AGT TGT TTA GCA AAA CCT CAT
I S E E D L N G A A * T V E S C L A K P H
pHEN seq

图 7

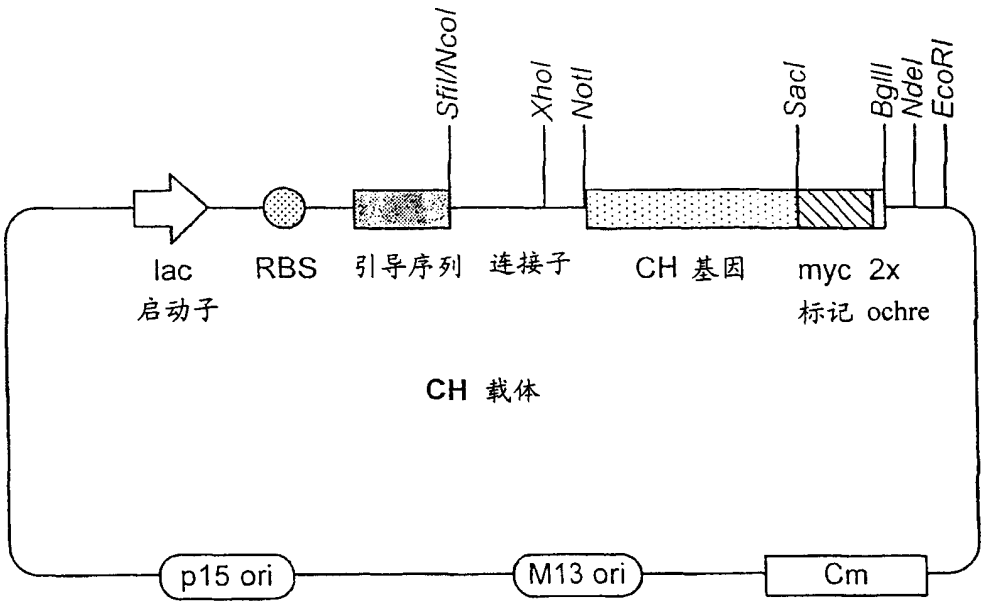

SfiI/NcoI
XhoI
NotI
SacI
BglII
NdeI
EcoRI
lac
启动子
RBS
引导序列
连接子
CH 基因
myc
标记
2x
ochre
CH 载体
p15 ori
M13 ori
Cm

图 8

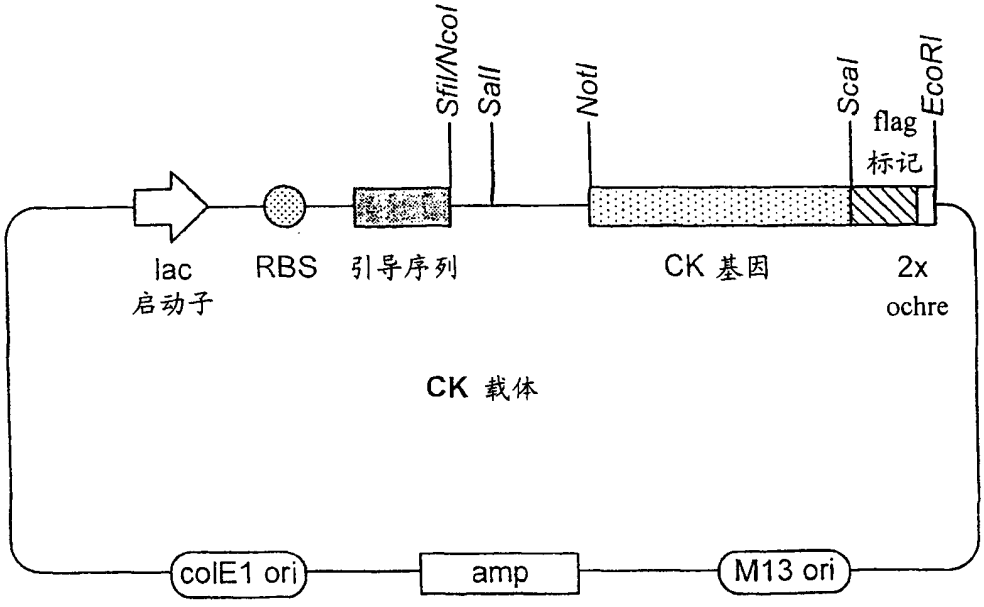

SfiI/NcoI
SalI
NotI
ScaI
flag
标记
EcoRI
lac
启动子
RBS
引导序列
CK 基因
2x
ochre
CK 载体
colE1 ori
amp
M13 ori

图 9

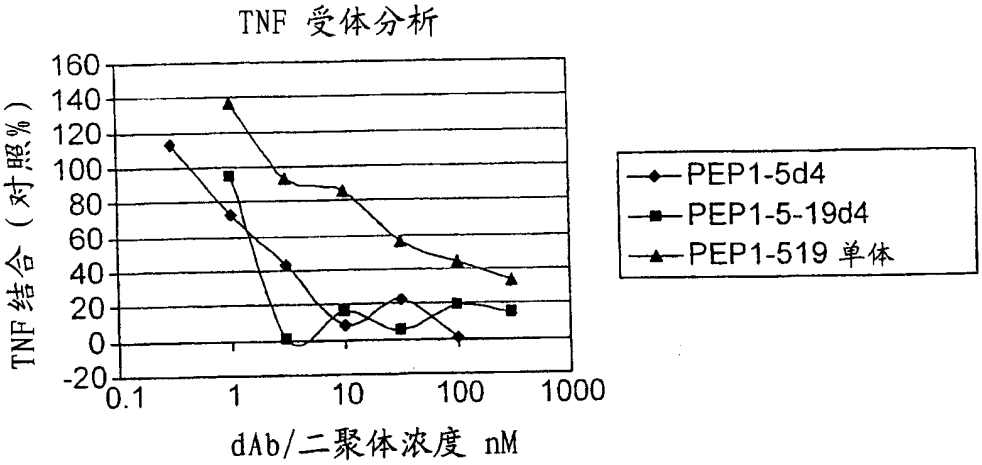

TNF 受体分析
TNF 结合（对照%）
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.1
1
10
100
1000
dAb/二聚体浓度 nM
PEP1-5d4
PEP1-5-19d4
PEP1-519 单体

图 10

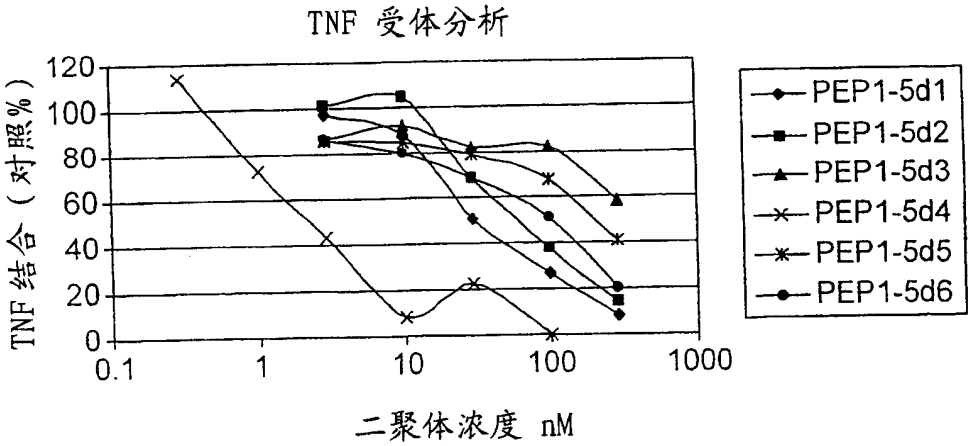

TNF 受体分析
TNF 结合（对照%）
120
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
1000
二聚体浓度 nM
PEP1-5d1
PEP1-5d2
PEP1-5d3
PEP1-5d4
PEP1-5d5
PEP1-5d6

图 11

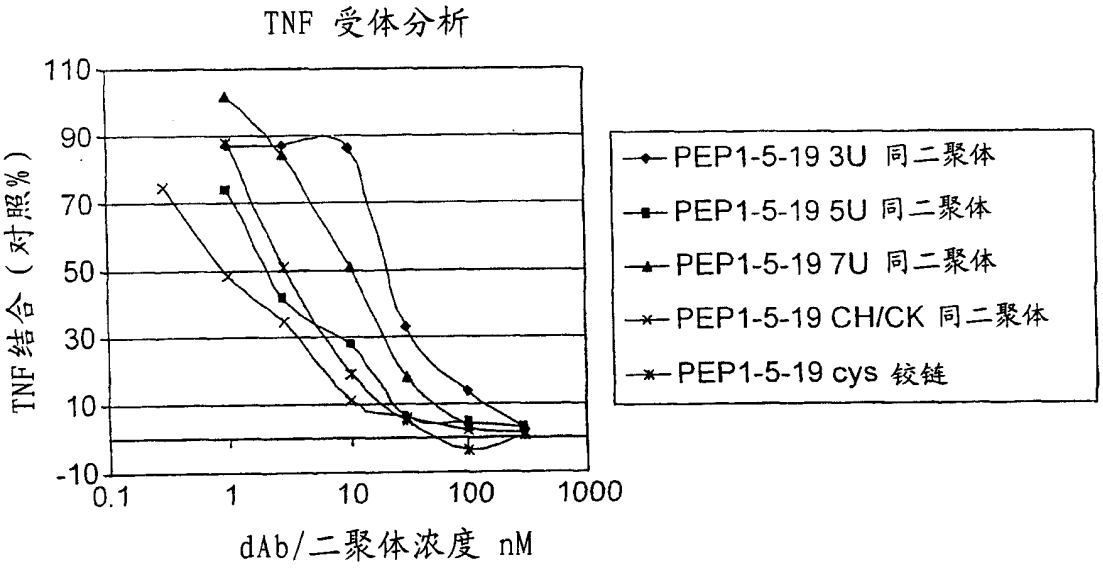

TNF 受体分析
TNF结合（对照%）
110
90
70
50
30
10
-10
0.1
1
10
100
1000
dAb/二聚体浓度 nM
PEP1-5-19 3U 同二聚体
PEP1-5-19 5U 同二聚体
PEP1-5-19 7U 同二聚体
PEP1-5-19 CH/CK 同二聚体
PEP1-5-19 cys 铰链

图 12

库1的模拟$V_H$序列

```
     E   V   Q   L   L   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G
1    GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
     CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC CAT GTC GGA CCC CCC

     S   L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y
49   TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
     AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CGG AGG CCT AAG TGG AAA TCG TCG ATA

     A   M   S   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V
97   GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
     CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG

     S   A   I   S   G   S   G   G   S   T   Y   Y   A   D   S   V
145  TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
     AGT CGA TAA TCA CCA TCA CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC

     K   G   R   F   T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y
193  AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
     TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA

     L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C
241  CTG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT
     GAC GTT TAC TTG TCG GAC GCA CGG CTC CTG TGG CGC CAT ATA ATG ACA

     A   K   S   Y   G   A   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V
289  GCG AAA AGT TAT GGT GCT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC
     CGC TTT TCA ATA CCA CGA AAA CTG ATG ACC CCG GTC CCT TGG GAC CAG

     T   V   S   S
337  ACC GTC TCG AGC
     TGG CAG AGC TCG
```

图 13

库2的模拟$V_H$序列

```
     E   V   Q   L   L   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G
1    GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
     CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC CAT GTC GGA CCC CCC

     S   L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y
49   TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
     AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CGG AGG CCT AAG TGG AAA TCG TCG ATA

     A   M   S   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V
97   GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
     CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG

     S   A   I   S   G   S   G   G   S   T   Y   Y   A   D   S   V
145  TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
     AGT CGA TAA TCA CCA TCA CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC

     K   G   R   F   T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y
193  AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
     TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA

     L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C
241  CTG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT
     GAC GTT TAC TTG TCG GAC GCA CGG CTC CTG TGG CGC CAT ATA ATG ACA

     A   K   S   Y   G   A   X   X   X   X   F   D   Y   W   G   Q
289  GCG AAA AGT TAT GGT GCT NNK NNK NNK NNK TTT GAC TAC TGG GGC CAG
     CGC TTT TCA ATA CCA CGA NNK NNK NNK NNK AAA CTG ATG ACC CCG GTC

     G   T   L   V   T   V   S   S
337  GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC
     CCT TGG GAC CAG TGG CAG AGC TCG
```

图 14

库3的模拟$V_k$序列

```
      D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G
1     GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA
      CTG TAG GTC TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGG GAC AGA CGT AGA CAT CCT

      D   R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   S   I   S   S   Y
49    GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT
      CTG GCA CAG TGG TAG TGA ACG GCC CGT TCA GTC TCG TAA TCG TCG ATA

      L   N   W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I
97    TTA AAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC
      AAT TTA ACC ATG GTC GTC TTT GGT CCC TTT CGG GGA TTC GAG GAC TAG

      Y   A   A   S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G
145   TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC
      ATA CGA CGT AGG TCA AAC GTT TCA CCC CAG GGT AGT GCA AAG TCA CCG

      S   G   S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P
193   AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT
      TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG TCG TCA GAC GTT GGA

      E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q   S   Y   S   T   P   N
241   GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT AAT
      CTT CTA AAA CGA TGC ATG ATG ACA GTT GTC TCA ATG TCA TGG GGA TTA

      T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K   R
289   ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
      TGC AAG CCG GTT CCC TGG TTC CAC CTT TAG TTT GCC
```

图 15

抗MSA dAbs MSA 16和 MSA 26的核苷酸和氨基酸序列

A: MSA 16

```
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S

GTA GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC
 V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   S

ATT ATT AAG CAT TTA AAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA
 I   I   K   H   L   K   W   Y   Q   Q   K   P   G   K

GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT GGT GCA TCC CGG TTG CAA AGT
 A   P   K   L   L   I   Y   G   A   S   R   L   Q   S

GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
 G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D

TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT
 F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A

ACG TAC TAC TGT CAA CAG GGG GCT CGG TGG CCT CAG ACG TTC
 T   Y   Y   C   Q   Q   G   A   R   W   P   Q   T   F

GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
 G   Q   G   T   K   V   E   I   K   R
```

B: MSA 26

```
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S

GTA GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC
 V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   S

ATT TAT TAT CAT TTA AAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA
 I   Y   Y   H   L   K   W   Y   Q   Q   K   P   G   K

GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAG GCA TCC ACG TTG CAA AGT
 A   P   K   L   L   I   Y   K   A   S   T   L   Q   S

GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
 G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D

TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT
 F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A

ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT CGG AAG GTG CCT CGG ACG TTC
 T   Y   Y   C   Q   Q   V   R   K   V   P   R   T   F

GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
 G   Q   G   T   K   V   E   I   K   R
```

图 16

(a)

MSA 16的Biacore抑制试验结果

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 MSA | 竞争 | 19. Fc=4-3 - 10 | 10nM MSA | 竞争 | 19. Fc=4-3 - 11 | 50nM MSA | 竞争 | 19. Fc=4-3 - 12 |
| 100nM MSA | 竞争 | 19. Fc=4-3 - 13 | 200nM MSA | 竞争 | 19. Fc=4-3 - 14 | 300nM MSA | 竞争 | 19. Fc=4-3 - 15 |
| 400nM MSA | 竞争 | 19. Fc=4-3 - 16 | 600nM MSA | 竞争 | 19. Fc=4-3 - 17 | 800nM MSA | 竞争 | 19. Fc=4-3 - 18 |

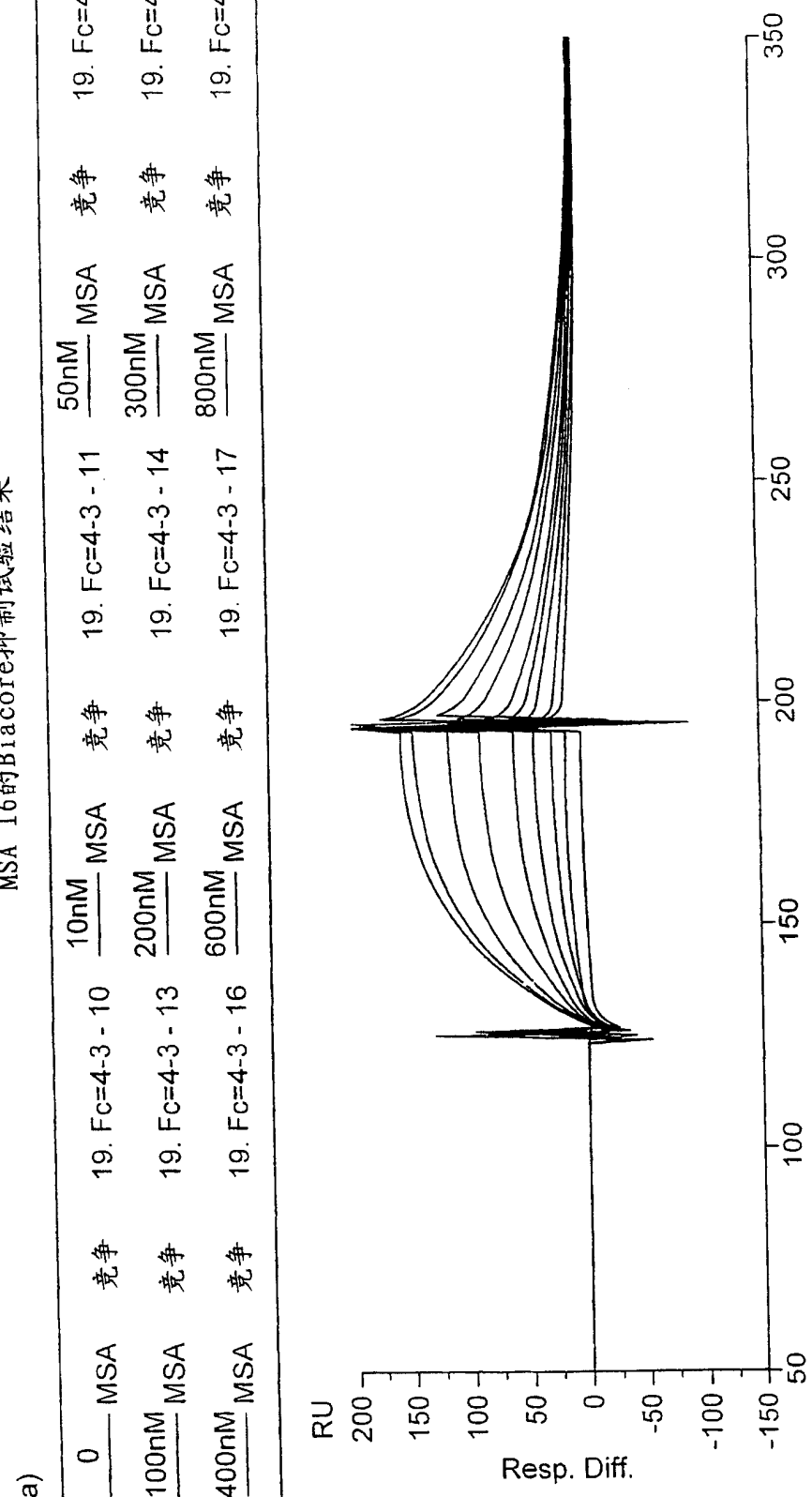



图 17

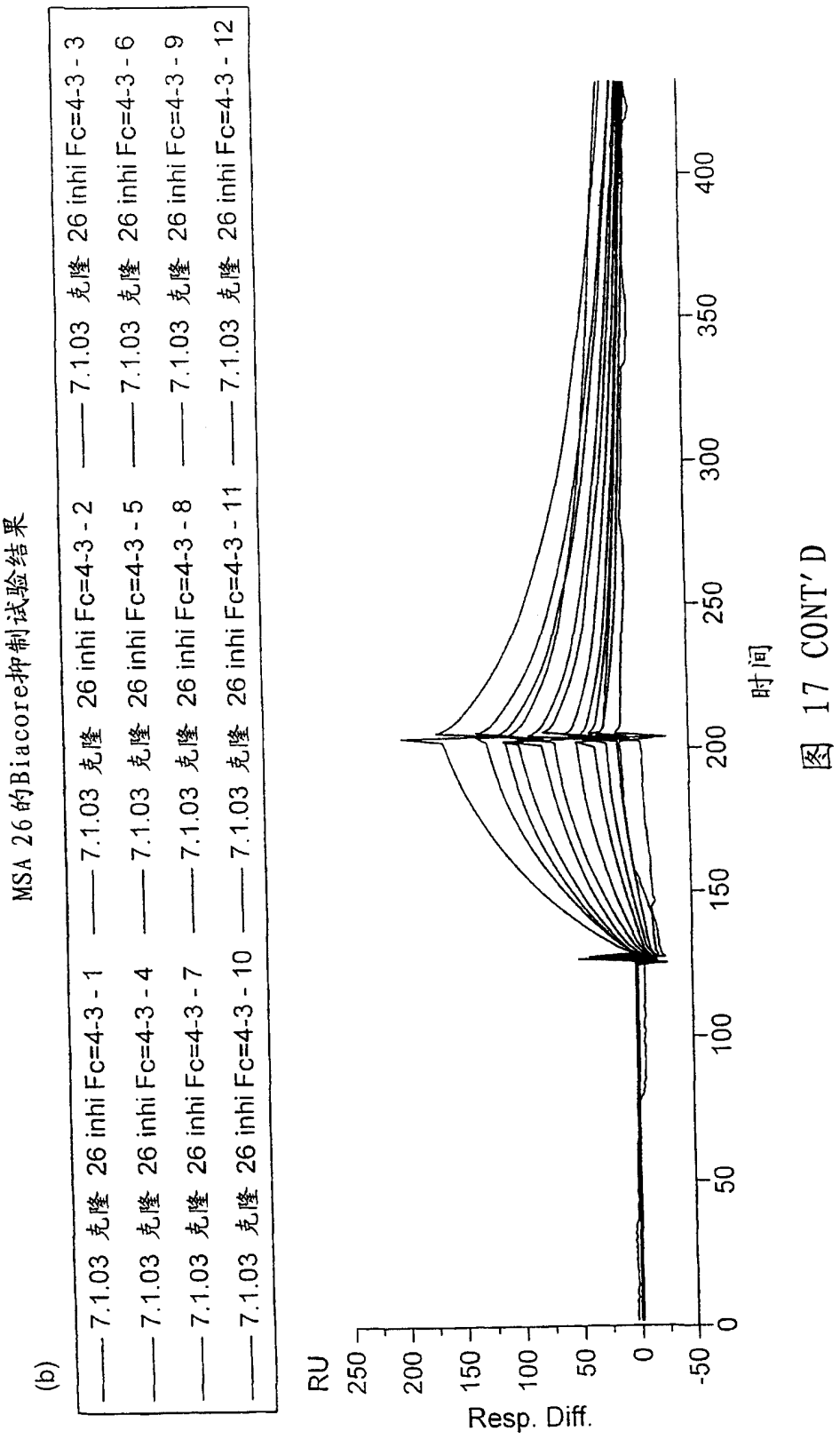

(b)
MSA 26的Biacore抑制试验结果
7.1.03 克隆 26 inhi Fc=4-3 - 1
7.1.03 克隆 26 inhi Fc=4-3 - 2
7.1.03 克隆 26 inhi Fc=4-3 - 3
7.1.03 克隆 26 inhi Fc=4-3 - 4
7.1.03 克隆 26 inhi Fc=4-3 - 5
7.1.03 克隆 26 inhi Fc=4-3 - 6
7.1.03 克隆 26 inhi Fc=4-3 - 7
7.1.03 克隆 26 inhi Fc=4-3 - 8
7.1.03 克隆 26 inhi Fc=4-3 - 9
7.1.03 克隆 26 inhi Fc=4-3 - 10
7.1.03 克隆 26 inhi Fc=4-3 - 11
7.1.03 克隆 26 inhi Fc=4-3 - 12
RU
250
200
150
100
50
0
-50
Resp. Diff.
0
50
100
150
200
250
300
350
400
时间

图 17 CONT'D

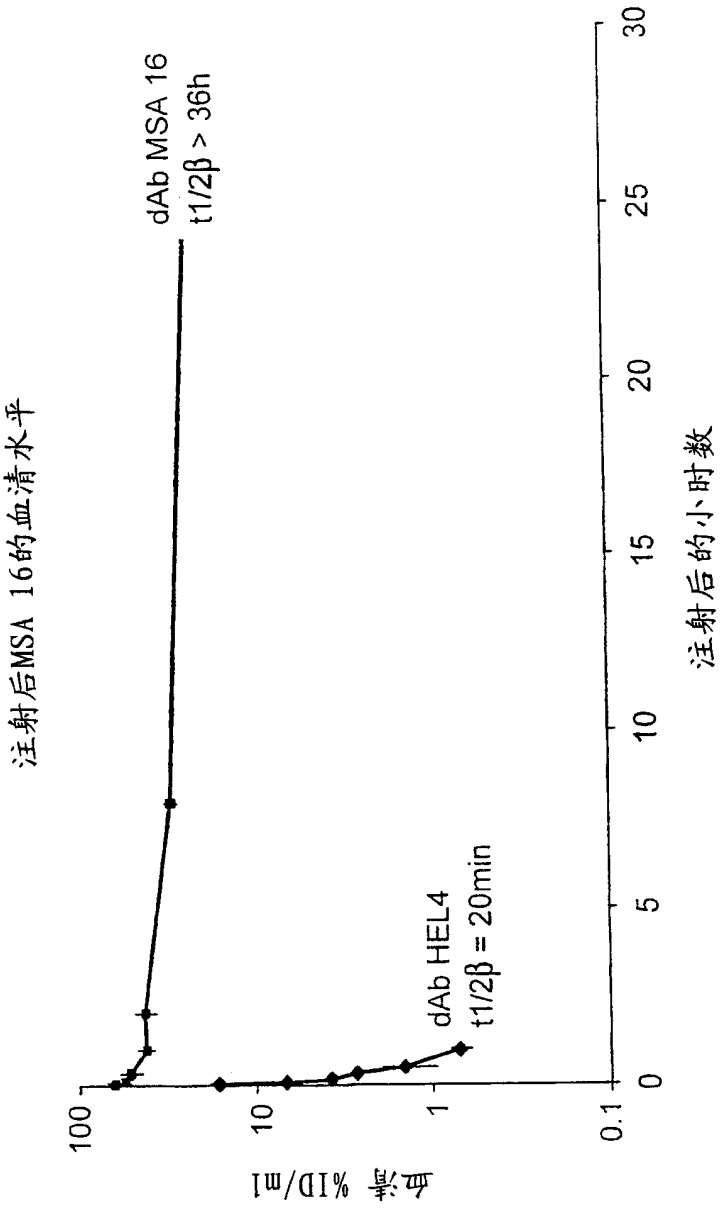
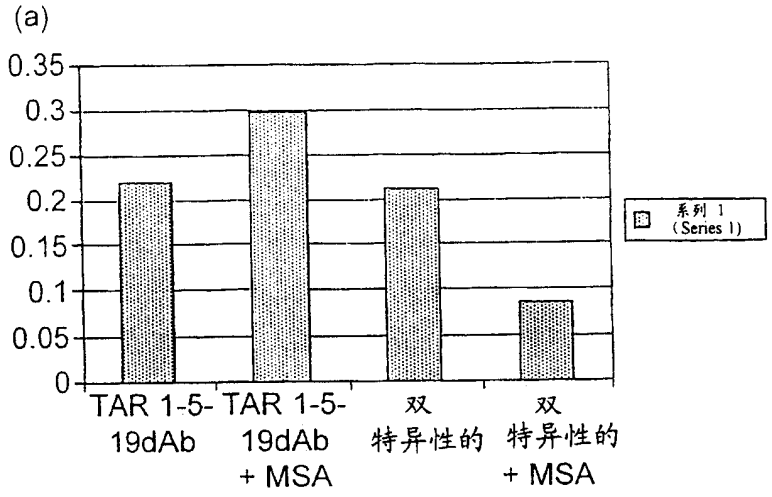
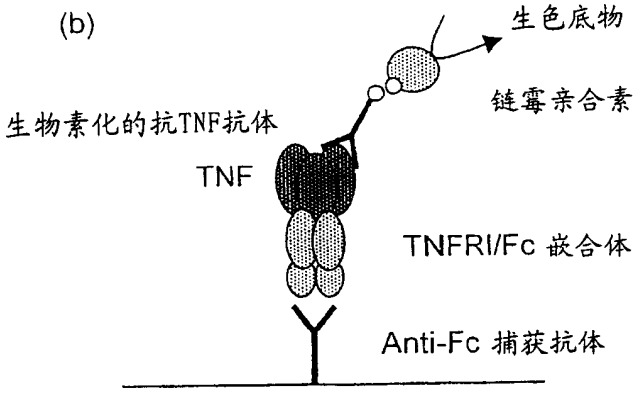

注射后MSA 16的血清水平
血清 %ID/ml
100
10
1
0.1
0
5
10
15
20
25
30
注射后的小时数
dAb MSA 16
t1/2β > 36h
dAb HEL4
t1/2β = 20min

图 18


(a)
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
TAR 1-5-19dAb
TAR 1-5-19dAb + MSA
双特异性的
双特异性的 + MSA
系列 1 (Series 1)


(b)
生色底物
链霉亲合素
生物素化的抗TNF抗体
TNF
TNFRI/Fc 嵌合体
Anti-Fc 捕获抗体

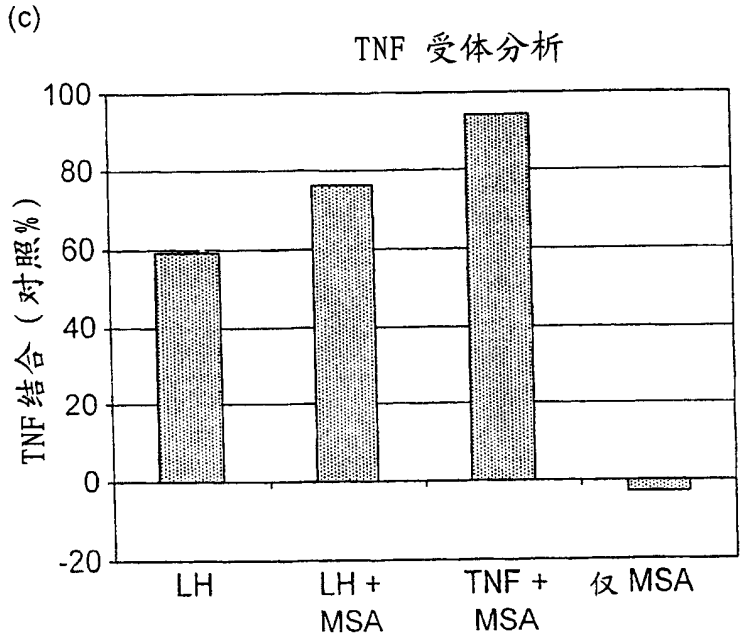

(c)
TNF 受体分析
TNF 结合（对照%）
100
80
60
40
20
0
-20
LH
LH + MSA
TNF + MSA
仅 MSA

图 19

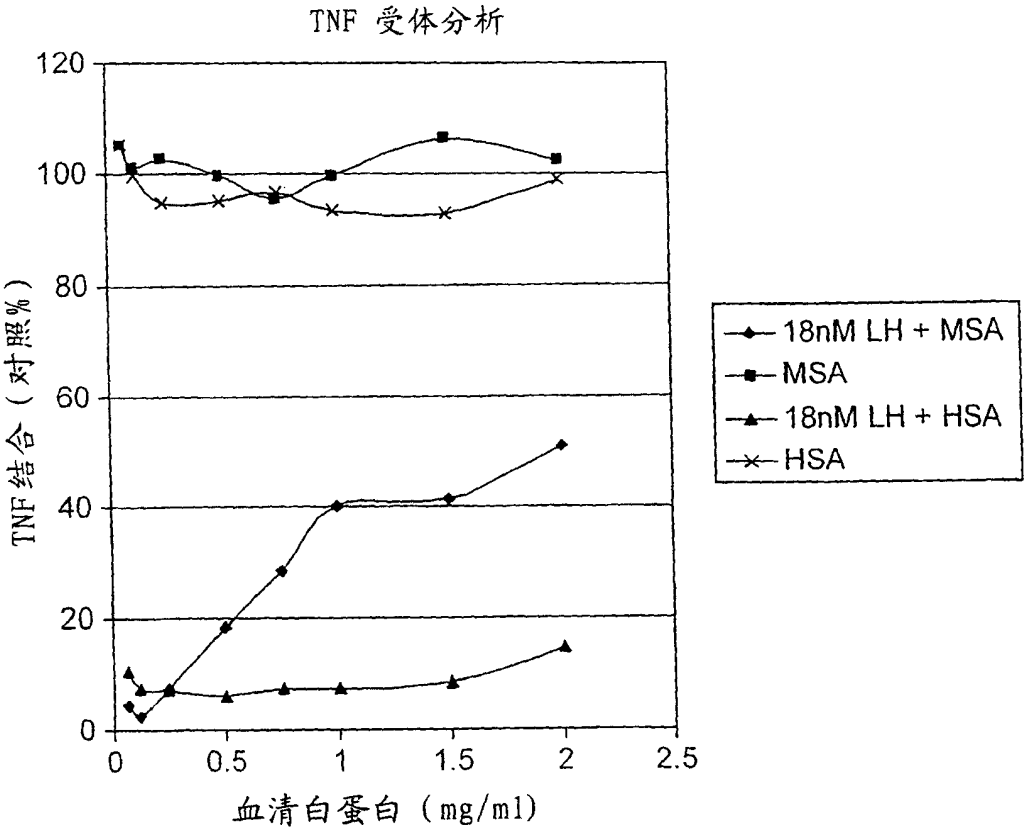

TNF 受体分析
120
100
80
60
40
20
0
TNF结合（对照%）
0
0.5
1
1.5
2
2.5
血清白蛋白（mg/ml）
18nM LH + MSA
MSA
18nM LH + HSA
HSA

图 20