



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202134269 A

(43) 公開日：中華民國 110 (2021) 年 09 月 16 日

- (21) 申請案號：109142821 (22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 12 月 04 日
- (51) Int. Cl. : *C07K16/18 (2006.01)* *C07K16/24 (2006.01)*
A61K39/395 (2006.01) *A61P37/06 (2006.01)*
- (30) 優先權：2019/12/06 美國 62/944,619
 2020/01/23 歐洲專利局 20305056.2
 2020/02/28 歐洲專利局 20000090.9
 2020/03/02 歐洲專利局 20305216.2
- (71) 申請人：比利時商艾伯霖克斯公司 (比利時) ABLYNX NV (BE)
 比利時
 法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)
 法國
- (72) 發明人：羅梅拉爾 海蒂 ROMMELAERE, HEIDI (BE)；雅士德 克里斯坦 ASBRAND,
 CHRISTIAN (DE)；布里格 安 BRIGE, ANN (BE)；科尼利斯 西格里德
 CORNELIS, SIGRID (BE)；勞倫特 艾里克 LORENT, ERIC (BE)
- (74) 代理人：陳彥希；何愛文
- 申請實體審查：無 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：16 共 144 頁

(54) 名稱

包含靶向 TNF α 及 IL-23 之免疫球蛋白單可變結構域的多肽

(57) 摘要

本技術旨在提供新型藥物。特言之，本技術提供了包含至少三個免疫球蛋白單可變結構域 (ISVD) 的多肽，其特徵在於至少一個 ISVD 與 TNF α 結合，並且至少兩個 ISVD 與 IL-23 結合。本技術還提供了核酸、載體和組成物。

The present technology aims at providing a novel type of drug. Specifically, the present technology provides polypeptides comprising at least three immunoglobulin single variable domains (ISVDs), characterized in that at least one ISVD binds to TNF α and at least two ISVDs bind to IL-23. The present technology also provides nucleic acids, vectors and compositions.



202134269

【發明摘要】

【中文發明名稱】 包含靶向TNF α 和IL-23之免疫球蛋白單可變結構域的多肽

【英文發明名稱】 POLYPEPTIDES COMPRISING IMMUNOGLOBULIN SINGLE VARIABLE DOMAINS TARGETING TNF α AND IL-23

【中文】

本技術旨在提供新型藥物。特言之，本技術提供了包含至少三個免疫球蛋白單可變結構域（ISVD）的多肽，其特徵在於至少一個ISVD與TNF α 結合，並且至少兩個ISVD與IL-23結合。本技術還提供了核酸、載體和組成物。

【英文】

The present technology aims at providing a novel type of drug. Specifically, the present technology provides polypeptides comprising at least three immunoglobulin single variable domains (ISVDs), characterized in that at least one ISVD binds to TNF α and at least two ISVDs bind to IL-23. The present technology also provides nucleic acids, vectors and compositions.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 包含靶向TNF α 和IL-23之免疫球蛋白單可變結構域的多肽

【英文發明名稱】 POLYPEPTIDES COMPRISING IMMUNOGLOBULIN
SINGLE VARIABLE DOMAINS TARGETING
TNF α AND IL-23

【技術領域】

【0001】 本技術涉及靶向TNF α 和IL-23的p19次單元的多肽。其還涉及編碼所述多肽的核酸分子和包含所述核酸的載體，以及包含所述多肽、核酸或載體的組成物。本技術進一步涉及將這些產品用於治療患有發炎性腸病、乾癬、乾癬性關節炎或化膿性汗腺炎的受試者的方法。此外，本技術涉及生產這些產品的方法。

【先前技術】

【0002】 自體免疫性或發炎性疾病是機體針對自身組織產生免疫反應的結果。自體免疫性或發炎性疾病通常是慢性的，並且甚至可能危及生命。自體免疫性或發炎性疾病尤其包括發炎性腸病（諸如克隆氏症和潰瘍性結腸炎）、乾癬、乾癬性關節炎和化膿性汗腺炎。發炎性腸病，諸如克隆氏症和潰瘍性結腸炎，是一種涉及腸道發炎並伴有上皮損傷的慢性發炎性疾病。其他慢性自體免疫性疾病，諸如乾癬、乾癬性關節炎和化膿性汗腺炎的特徵是發紅、乾燥、發癢或鱗狀皮膚斑塊，關節疼痛性發炎，或者皮膚上出現發炎和紅腫腫塊。已經發現，患有乾癬的患者更可能患有某些共病症（comorbidities），包括糖尿病和發炎性腸病（諸如克隆氏症或潰瘍性結腸炎）以及癌症。

【0003】 細胞激素23（IL-23）是一種細胞因子，其在慢性發炎誘導過程中對各種免疫細胞的啟動是重要的。IL-23是細胞因子IL-6、IL-17、GM-CSF和IL-22的

上游調節劑，並且是由與p40次單元（所述p40次單元與細胞因子IL-12共有，並且也稱為IL-12 β次單元）共價連接的p19次單元（IL-23 α次單元，在本文中也被稱為IL-23p19）組成的異二聚體。此外，IL-23在T細胞發炎性免疫反應以及先天淋巴細胞的發炎性活性的調節方面發揮重要作用。IL-23被暗示與發炎性疾病（包括發炎性腸病和其他自體免疫性疾病）有關。

【0004】 腫瘤壞死因子α（TNFα）是一種同三聚體細胞因子，其主要由單核細胞和巨噬細胞產生，但已知也由CD4⁺和CD8⁺周邊血液T淋巴細胞分泌。TNFα可以作為可溶形式或作為跨膜蛋白存在。TNFα的主要作用是調節免疫細胞。TNFα充當內生性熱原，並且其產生的調節異常與多種人類疾病有關，包括發炎性腸病和其他自體免疫性疾病，諸如乾癬。

【0005】 FDA目前批准的用於發炎性腸病的治療包括抗TNFα生物製劑（諸如Simponi® [戈利木單抗/golimumab]、Enbrel® [依那西普/etanercept]、Remicade® [英夫利昔單抗/infliximab]和Humira® [阿達木單抗/adalimumab]）。然而，當前用於發炎性腸疾病的抗TNFα治療面臨大量對當前可用治療無反應的患者，並且大部分患者在治療12個月後發生對抗TNFα治療的反應喪失。

【0006】 對於乾癬和乾癬性關節炎，僅少數患者接受了生物製劑治療（包括REMICADE® [英夫利昔單抗]和HUMIRA® [阿達木單抗]，以及靶向細胞因子IL-12和IL-23的共有p40次單元的STELARA® [優特克單抗/ustekinumab]）。正在研究靶向IL-23的進一步抗體治療，包括古塞庫單抗（guselkumab）（Tremfya；批准用於乾癬以及發炎性腸病和乾癬性關節炎的3期臨床試驗）和瑞莎珠單抗（risankizumab）（Skyrizi；批准用於乾癬以及乾癬性關節炎和克隆氏症的3期臨床試驗）。雖然靶向p19的抗IL-23抗體類別可以在乾癬中賦予一些疾病抑制功效，但患有不同和/或另外的自體免疫性疾病的患者不一定同等程度地受益於這些治療。例如，在乾癬性關節炎中，用抗IL23治療不能改善發炎關節的反應。在發炎性腸病中，多於一半的患者對TNF抑制劑無反應或喪失反應。化膿性汗腺

炎也是如此，到目前為止，唯一批准的治療是HUMIRA® [阿達木單抗]，但是僅約50%的患者有反應。

【0007】 靶向多種疾病因子可以例如通過兩種單獨的生物製劑（例如與不同治療靶標結合的抗體）的共投予或組合使用來實現。然而，從現實和商業角度兩者來看，共投予或組合使用單獨的生物製劑可能具有挑戰性。例如，兩次注射單獨的產品使治療方案對於患者更加不便且更痛苦，這可能對順服性造成負面影響。對於兩種單獨產品的單次注射，提供在兩種產品的所需濃度下允許可接受的粘度和合適的穩定性的配製品可能是困難的或不可能的。另外，共投予和共配製需要生產兩種單獨的藥物，這可能會增加總體成本。

【0008】 能夠結合兩種不同抗原的雙特異性抗體已被建議作為解決與單獨生物製劑（諸如抗體）的共投予或組合使用相關的此類限制的一種策略。

【0009】 已有多種形式的雙特異性抗體構築體被提出。例如，雙特異性抗體形式可能涉及兩種抗體或其片段的化學綴合（Brennan, M等人, *Science*, 1985. 229(4708): 第81-83頁；Glennie, M. J.等人, *J Immunol*, 1987. 139(7): 第2367-2375頁）。在某些形式中，與特定抗原結合的單鏈Fv（scFv）片段連接到與單獨抗原結合的IgG抗體（例如，WO 2016/073406，其描述了抗TNF α /抗IL-23 IgG-scFv雙特異性抗體）。WO 2019/027780描述了異二聚體IgG抗體，其中一對重鏈和輕鏈可變區靶向TNF α ，並且另一對重鏈和輕鏈可變區靶向IL-23。

【0010】 然而，此類雙特異性抗體形式的缺點包括在高濃度下的高粘度，使得例如皮下投予具有挑戰性，並且每個結合單元需要兩個可變結構域相互作用以進行特異性和高親和力結合，這包括對多肽穩定性和生產效率的影響。此類雙特異性抗體形式也可能潛在地導致與輕鏈錯配或重鏈錯配有關的化學、製造和控制（CMC）問題。

【發明內容】

【0011】 在一些實施例中，本技術涉及特異性靶向TNF α 和IL-23的多肽或構築體。與單特異性抗TNF α 或抗IL-23多肽相比，同時靶向TNF α 和IL-23導致其調節發炎反應的效率較高。

【0012】 所述多肽顯示出對TNF α 和IL-23（例如人和食蟹猴TNF α 和IL-23）的高效力，可以有效地產生（例如在微生物宿主（諸如畢赤酵母（*Pichia*），例如巴斯德畢赤酵母（*P. pastoris*））中），並且在高濃度下顯示出低粘度，係有利且便於皮下投予。此外，可以證實此類多肽對於待治療的受試者中所預先存在的抗體（即，在第一次用所述抗體構築體治療之前存在於受試者中的抗體）具有有限的反應性。在其他實施例中，此類多肽在待治療的受試者中表現出夠長的半衰期，使得可以方便地將連續的治療間隔開。

【0013】 本技術的多肽包含至少三個免疫球蛋白單可變結構域（ISVD）或由其組成，其中至少一個ISVD特異性地結合TNF α ，並且至少兩個ISVD特異性地結合IL-23的p19次單元。在一個實施例中，與TNF α 結合的至少一個ISVD特異性地結合人類TNF α ，並且與IL-23結合的至少兩個ISVD特異性地結合人類IL-23的p19次單元。

【0014】 在一個實施例中，所述多肽進一步包含視情況地經由一個或多個肽連接子連接的一個或多個其他基團、殘基、部分（moiety）或結合單元，其中相較於沒有所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元的對應多肽，所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元提供具有增加的半衰期的多肽。例如，結合單元可以是與（人類）血清蛋白（諸如人類血清白蛋白）結合的ISVD。

【0015】 還提供了能夠表現本技術的多肽的核酸分子、包含所述核酸的載體，以及包含所述多肽、核酸或載體的組成物。

【0016】 使用本技術的多肽、包含所述多肽的組成物，以及包含含有編碼所述多肽的核苷酸序列的核酸的組成物，可以作為藥物。用作藥物的多肽包含至少三個免疫球蛋白單可變結構域（ISVD）或由其組成，其中每個所述ISVD包含視

情況地經由一個或多個肽連接子所連接的三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3）；並且其中：

a) 第一ISVD包含

i. CDR1，其為SEQ ID NO: 6的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 6具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 10具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) 第二ISVD包含

iv. CDR1，其為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，其為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，其為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 15具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

c) 第三ISVD包含

vii. CDR1，其為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

viii. CDR2，其為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

ix. CDR3，其為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，

其中，ISVD的順序是從N端開始。

【0017】 本技術的組成物是用作藥物。所述組成物可以是醫藥組成物，其進一步包含至少一種醫藥上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑和/或佐劑，並且視情況地包含一種或多種其他醫藥活性多肽和/或化合物。

【0018】 所述多肽（可能存在於組成物中或可能由核酸所編碼）因此包含至少三個免疫球蛋白單可變結構域（ISVD）或由其組成，其中每個所述ISVD包含視情況地經由一個或多個肽連接子所連接的三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3）；並且其中：

a) 第一ISVD包含

i. CDR1，其為SEQ ID NO: 6的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 6具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 10具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) 第二ISVD包含

iv. CDR1，其為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，其為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，其為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 15具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

c) 第三ISVD包含

vii. CDR1，其為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

viii. CDR2，其為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

ix. CDR3，其為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，

其中，ISVD的順序是從N端開始。

【0019】 在一個實施例中，所述多肽特異性地結合TNF α 和IL-23的p19次單元。在一個實施例中，所述多肽特異性地結合人類TNF α 和人類IL-23的p19次單元。在一個實施例中，存在於所述多肽中的第一ISVD特異性地結合TNF α ，並且存在於所述多肽中的第二和第三ISVD特異性地結合IL-23的p19次單元。在一個實施例中，存在於所述多肽中的第一ISVD特異性地結合人類TNF α ，並且存在於所述多肽中的第二和第三ISVD特異性地結合人類IL-23的p19次單元。

【0020】 本技術的多肽可以包含：

a) 第一ISVD，其包含為SEQ ID NO: 6的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列的CDR3；

b) 第二ISVD，其包含為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列的CDR3；和

c) 第三ISVD，其包含為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列的CDR1；為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列的CDR3。

【0021】 本技術的多肽可以包含：

a) 第一ISVD，其具有包含與SEQ ID NO: 2高於90%（諸如95%）的序列同一性的胺基酸序列；

b) 第二ISVD，其具有包含與SEQ ID NO: 3高於90%（諸如95%）的序列同一性的胺基酸序列；和

c) 第三胺基酸序列，其包含與SEQ ID NO: 5高於90%（諸如95%）同一性的序列同一性。

【0022】 本技術的多肽可以包含：

a) 第一ISVD，其包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列；

b) 第二ISVD，其包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；和

c) 第三ISVD，其包含SEQ ID NO: 5的胺基酸序列。

【0023】 本技術的多肽可以進一步包含視情況地經由一個或多個肽連接子連接的一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元，其中與沒有所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元的相應多肽相比，所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元提供具有增加的半衰期的多肽。提供具有增加的半衰期的多肽的所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元可以選自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可以結合血清蛋白的結合單元、Fc部分，以及可以結合血清蛋白的小蛋白或肽。提供具有增加的半衰期的多肽的結合單元可以選自可以結合血清白蛋白（諸如人類血清白蛋白）或血清免疫球蛋白（諸如IgG），例如人類血清白蛋白的結合單元。

【0024】 本技術的多肽可以包含與人類血清白蛋白結合的ISVD，其包含：

i. CDR1，其為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0025】 在一個實施例中，與人類血清白蛋白結合的ISVD包含為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列的CDR3。在一個實施例中，與人類血清白蛋白結合的ISVD包含與SEQ ID NO: 4高於90%（諸如95%）的序列同一性。在一個實施例中，與人類血清白蛋白結合的ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列或由其組成。

【0026】 與人類血清白蛋白結合的ISVD可以定位於本技術的多肽中的任何位置（即N端、兩個構建單元（building blocks）之間、或C端）。在一個實施例中，與人類血清白蛋白結合的ISVD定位於特異性地結合IL-23的p19次單元的第二和第三ISVD之間。

【0027】 本技術的多肽可以包含含有與SEQ ID NO: 1高於90%（諸如95%）的序列同一性的胺基酸序列。在一個實施例中，本技術的多肽包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列或由其組成。

【0028】 還提供了包含編碼本技術多肽的核苷酸序列的核酸。

【0029】 還提供了包含這種核酸的宿主或宿主細胞。

【0030】 還提供了用於產生本技術多肽的方法，所述方法至少包括以下步驟：

a) 在合適的宿主細胞或宿主生物體或另一合適的表現系統中，表現編碼本技術多肽的核酸；視情況地隨後進行：

b) 分離和/或純化所述多肽。

【0031】 還提供了包含至少一種本技術多肽或編碼本技術多肽的核酸的組成物。所述組成物可以是醫藥組成物，其進一步包含至少一種醫藥上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑和/或佐劑，並且視情況地包含一種或多種其他醫藥活性多肽和/或化合物。

【0032】 本技術的多肽可以用於治療。更特言之，本技術的多肽可以用於治療自體免疫性或發炎性疾病，諸如選自發炎性腸病（諸如克隆氏症和潰瘍性結腸炎）、乾癬、乾癬性關節炎和化膿性汗腺炎（*Hidradenitis suppurativa*）的疾病。

【0033】 因此，本技術還涵蓋治療自體免疫性或發炎性疾病的方法。在一些實施例中，本技術涵蓋治療選自發炎性腸病（諸如克隆氏症和潰瘍性結腸炎）、乾癬、乾癬性關節炎和化膿性汗腺炎的疾病的方法，其中所述方法包括向有需要的受試者投予醫藥活性量的本技術多肽、編碼本技術多肽的核酸或包含其的組成物。

【0034】 因此，本技術還涵蓋本技術多肽的用途，其係用來製備治療自體免疫性或發炎性疾病的醫藥組成物。在一些實施例中，本技術還涵蓋本技術多肽在製備用於治療選自發炎性腸病（諸如克隆氏症和潰瘍性結腸炎）、乾癬、乾癬性關節炎和化膿性汗腺炎的疾病之醫藥組成物之用途。

【0035】 特言之，本技術提供以下實施例：

【0036】 實施例1. 一種多肽、包含所述多肽的組成物，或包含含有編碼所述多肽的核苷酸序列的核酸的組成物，用以作為藥物，其中所述多肽包含至少三個免疫球蛋白單可變結構域（ISVD）或由其組成，其中每個所述ISVD包含視情況地經由一個或多個肽連接子所連接的三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3）；並且其中：

a) 第一ISVD包含

x. CDR1，其為SEQ ID NO: 6的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 6具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

xi. CDR2，其為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 10具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

xii. CDR3，其為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) 第二ISVD包含

xiii. CDR1，其為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

xiv. CDR2，其為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

xv. CDR3，其為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 15具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

c) 第三ISVD包含

xvi. CDR1，其為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

xvii. CDR2，其為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

xviii. CDR3，其為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，

其中，ISVD的順序是從N端開始。

【0037】 實施例2. 根據實施例1之所述使用的組成物，其是醫藥組成物，其進一步包含至少一種醫藥上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑和/或佐劑，並且視情況地包含一種或多種其他醫藥活性多肽和/或化合物。

【0038】 實施例3. 根據實施例1或2之所述使用的多肽或組成物，其中所述多肽特異性地結合TNF α 和IL-23的p19次單元。

【0039】 實施例4. 根據實施例1至3中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中所述多肽特異性地結合人類TNF α 和人類IL-23的p19次單元。

【0040】 實施例5. 根據實施例1至4中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中所述第一ISVD特異性地結合TNF α ，並且所述第二和第三ISVD特異性地結合IL-23的p19次單元。

【0041】 實施例6. 根據實施例1至5中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中所述第一ISVD特異性地結合人類TNF α ，並且所述第二和第三ISVD特異性地結合人類IL-23的p19次單元。

【0042】 實施例7. 根據實施例1至6中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中：

a) 所述第一ISVD包含為SEQ ID NO: 6的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列的CDR3；

b) 所述第二ISVD包含為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列的CDR3；並且

c) 所述第三ISVD包含為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列的CDR3。

【0043】 實施例8. 根據實施例1至7中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中：

a) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 2高於90%（諸如95%）的序列同一性；

b) 所述第二ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 3高於90%（諸如95%）的序列同一性；並且

c) 所述第三ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 5高於90%（諸如95%）同一性的序列同一性。

【0044】 實施例9. 根據實施例1至8中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中：

a) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列；

b) 所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；並且

c) 所述第三ISVD包含SEQ ID NO: 5的胺基酸序列。

【0045】 實施例10.根據實施例1至9中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中所述多肽進一步包含視情況地經由一個或多個肽所連接子連接的一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元，其中相較於沒有所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元的對應多肽，所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元提供的多肽有較高的半衰期。

【0046】 實施例11.根據實施例10之所述使用的多肽或組成物，其中提供多肽具有較高半衰期的所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元，係選自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可以結合血清蛋白的結合單元、Fc部分，以及可以結合血清蛋白的小蛋白或肽。

【0047】 實施例12.根據實施例10至11中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中提供多肽具有較高半衰期的所述結合單元，係選自可以結合血清白蛋白（諸如人類血清白蛋白）或血清免疫球蛋白（諸如IgG）的結合單元。

【0048】 實施例13.根據實施例12之所述使用的多肽或組成物，其中提供多肽具有較高半衰期的所述結合單元是可以結合人類血清白蛋白的ISVD。

【0049】 實施例14.根據實施例13之所述使用的多肽或組成物，其中與人類血清白蛋白結合的ISVD包含

i. CDR1，其為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 8具有2或1

個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0050】 實施例15.根據實施例13至14中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中與人類血清白蛋白結合的ISVD包含為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列的CDR3。

【0051】 實施例16.根據實施例13至15中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中與人類血清白蛋白結合的所述ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 4高於90%（諸如95%）的序列同一性。

【0052】 實施例17.根據實施例13至16中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中與人類血清白蛋白結合的所述ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列或由其組成。

【0053】 實施例18.根據實施例1至17中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中所述多肽的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 1高於90%（諸如95%）的序列同一性。

【0054】 實施例19.根據實施例1至18中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中所述多肽包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列或由其組成。

【0055】 實施例20.根據實施例1至19中任一項之所述使用的多肽或組成物，其用於治療自體免疫性或發炎性疾病，諸如選自發炎性腸病（諸如克隆氏症和潰瘍性結腸炎）、乾癬、乾癬性關節炎和化膿性汗腺炎的疾病。

【0056】 實施例21.一種多肽，所述多肽包含至少三個免疫球蛋白單可變結構域（ISVD）或由其組成，其中每個所述ISVD包含視情況地經由一個或多個肽連接子所連接的三個互補決定區（分別為CDR1至CDR3）；並且其中：

a) 第一ISVD包含

x. CDR1，其為SEQ ID NO: 6的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 6具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

xi. CDR2，其為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 10具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

xii. CDR3，其為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) 第二ISVD包含

xiii. CDR1，其為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

xiv. CDR2，其為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

xv. CDR3，其為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 15具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

c) 第三ISVD包含

xvi. CDR1，其為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

xvii. CDR2，其為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

xviii. CDR3，其為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 17具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列，

其中，ISVD的順序是從N端開始。

【0057】 實施例22.根據實施例21所述的多肽，其中所述多肽特異性地結合TNF α 和IL-23的p19次單元。

【0058】 實施例23.根據實施例21或22所述的多肽，其中所述多肽特異性地結合人類TNF α 和人類IL-23的p19次單元。

【0059】 實施例24.根據實施例21至23中任一項所述的多肽，其中所述第一ISVD特異性地結合TNF α ，並且所述第二和第三ISVD特異性地結合IL-23的p19次單元。

【0060】 實施例25.根據實施例21至24中任一項所述的多肽，其中所述第一ISVD特異性地結合人類TNF α ，並且所述第二和第三ISVD特異性地結合人類IL-23的p19次單元。

【0061】 實施例26.根據實施例21至25中任一項所述的多肽，其中：

- a) 所述第一ISVD包含為SEQ ID NO: 6的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列的CDR3；
- b) 所述第二ISVD包含為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列的CDR3；並且
- c) 所述第三ISVD包含為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列的CDR3。

【0062】 實施例27.根據實施例21至26中任一項所述的多肽，其中：

- a) 所述第一ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 2高於90%（諸如95%）的序列同一性；
- b) 所述第二ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 3高於90%（諸如95%）的序列同一性；並且
- c) 所述第三ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 5高於90%（諸如95%）同一性的序列同一性。

【0063】 實施例28.根據實施例21至27中任一項所述的多肽，其中：

- a) 所述第一ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列；
- b) 所述第二ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列；並且
- c) 所述第三ISVD包含SEQ ID NO: 5的胺基酸序列。

【0064】 實施例29.根據實施例21至28中任一項所述的多肽，其中所述多肽進一步包含視情況地經由一個或多個肽連接子所連接的一個或多個其他基團、殘

基、部分或結合單元，其中相較於沒有所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元的對應多肽，所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元提供具有較高半衰期的多肽。

【0065】 實施例30.根據實施例29所述的多肽，其中提供多肽具有較高半衰期的所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元，係選自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可以結合血清蛋白的結合單元、Fc部分，以及可以結合血清蛋白的小蛋白或肽。

【0066】 實施例31.根據實施例29至30中任一項所述的多肽，其中提供多肽具有較高半衰期的所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元，係選自可以結合血清白蛋白（諸如人類血清白蛋白）或血清免疫球蛋白（諸如IgG）的結合單元。

【0067】 實施例32.根據實施例31所述的多肽，其中提供多肽具有較高半衰期的所述結合單元是可以結合人類血清白蛋白的ISVD。

【0068】 實施例33.根據實施例32所述的多肽，其中與人類血清白蛋白結合的ISVD包含：

i. CDR1，其為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0069】 實施例34.根據實施例32至33中任一項所述的多肽，其中與人類血清白蛋白結合的ISVD包含為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列的CDR3。

【0070】 實施例35.根據實施例32至34中任一項所述的多肽，其中與人類血清白蛋白結合的所述ISVD的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 4高於90%（諸如95%）的序列同一性。

【0071】 實施例36.根據實施例32至35中任一項所述的多肽，其中與人類血清白蛋白結合的所述ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列或由其組成。

【0072】 實施例37.根據實施例21至36中任一項所述的多肽，其中所述多肽的胺基酸序列包含與SEQ ID NO: 1高於90%（諸如95%）的序列同一性。

【0073】 實施例38.根據實施例21至37中任一項所述的多肽，其中所述多肽包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列或由其組成。

【0074】 實施例39.一種核酸，所述核酸包含編碼根據實施例21至38中任一項所述的多肽的核苷酸序列。

【0075】 實施例40.一種宿主或宿主細胞，所述宿主或宿主細胞包含根據實施例39所述的核酸。

【0076】 實施例41.一種用於產生根據實施例21至38中任一項所述的多肽的方法，所述方法至少包括以下步驟：

a) 在合適的宿主細胞或宿主生物體或另一合適的表現系統中，表現根據實施例39所述的核酸；視情況地隨後進行：

b) 分離和/或純化根據實施例21至38中任一項所述的多肽。

【0077】 實施例42.一種組成物，所述組成物包含至少一種根據實施例21至38中任一項所述的多肽，或根據實施例39所述的核酸。

【0078】 實施例43.根據實施例42所述的組成物，其是醫藥組成物，其進一步包含至少一種醫藥上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑和/或佐劑，並且視情況地包含一種或多種其他醫藥活性多肽和/或化合物。

【0079】 實施例44.一種治療自體免疫性疾病或發炎性疾病的方法，其中所述方法包括對有需要的受試者投予醫藥活性量的根據實施例21至38中任一項所述的多肽，或根據實施例42至43中任一項所述的組成物。

【0080】 實施例45.根據實施例44所述的方法，其中所述自體免疫性疾病或發炎性疾病選自發炎性腸病（諸如克隆氏症和潰瘍性結腸炎）、乾癬、乾癬性關節炎和化膿性汗腺炎。

【0081】 實施例45.根據實施例21至38中任一項所述的多肽或根據實施例42至43中任一項所述的組成物在製備用於治療自體免疫性疾病或發炎性疾病的醫藥組成物方面的用途。

【0082】 實施例46.根據實施例45所述的多肽或組成物的用途，其中所述自體免疫性疾病或發炎性疾病選自發炎性腸病（諸如克隆氏症和潰瘍性結腸炎）、乾癬、乾癬性關節炎和化膿性汗腺炎。

【圖式簡單說明】

【0083】 圖1：顯示TNF α 和IL-23與經由人類血清白蛋白（HSA）捕獲的F027500069同時結合的傳感圖。

【0084】 圖2：F027500069和抗hTNF α 參考mAb在Glo response™ HEK293_NF κ B-NLucP報告物測定法中，對可溶性人類（A）和食蟹猴（B）TNF α 的抑制。IRR00096是陰性對照V_{HH}。資料點是全域平均值（n = 2），誤差棒表示 +/- SD。

【0085】 圖3：F027500069、抗hIL-23參考mAb1、抗hIL-23參考mAb2在Glo response™ HEK293_人類IL-23R/IL-12Rb1-Luc2P報告物測定法中對人類（A）和食蟹猴（B）IL-23的抑制。IRR00096是陰性對照V_{HH}。資料點是全域平均值（n = 2），誤差棒表示 +/- SD。

【0086】 圖4：方框圖，示出了與對照F027301099相比，存在於96個人類血清樣品中的預先存在的抗體與F027500069的結合。

【0087】 圖5：方框圖，示出了與對照多肽F027301099和F027301186相比，存在於96個人類血清樣品中的預先存在的抗體與F027500069、F027500093、F027500095和F027500096的結合。

【0088】 圖6：在Tg197人類TNF轉基因小鼠模型中對多關節炎的抑制。繪製了不同治療組（n = 8隻小鼠/組）中隨時間推移的關節炎得分。從6周齡開始，動物每周兩次接受腹膜內注射指定化合物。顯示的是平均每周關節炎得分 \pm SEM。統計學是雙因素ANOVA和Bonferroni多重比較檢定。

【0089】 圖7：Tg197小鼠模型中關節炎得分曲線下面積隨時間推移的橫條圖。顯示的是個別數值（符號）和平均值 \pm SEM（條狀）。統計學是單因子變異數分析（one-way ANOVA）和Bonferroni多重比較檢定。

【0090】 圖8：Tg197小鼠模型的足部組織學得分的橫條圖。顯示的是個別數值（符號）和平均值 \pm SEM（條狀）。統計學是單因子變異數分析（one-way ANOVA）和Bonferroni多重比較檢定。

【0091】 圖9：在人類IL-23模型中對皮膚發炎的抑制。橫條圖說明了不同治療組（n = 10隻小鼠/組）的耳皮腫脹。從第1天到第4天，動物每天接受皮內注射重組人類IL-23或PBS。在第1天和第3天，動物接受腹膜內注射指定化合物。顯示的是第5天時耳皮厚度相對於基線的平均變化 \pm SEM。統計學是ANOVA和Bonferroni多重比較檢定。

【0092】 圖10：在人類IL-23誘發的皮膚發炎模型的第5天，形成皮膚活檢的組織IL-22濃度的橫條圖。顯示的是個別數值（符號）和平均值 \pm SEM（條狀）。統計學是ANOVA和Bonferroni多重比較檢定。

【0093】 圖11：通過腹膜內以及皮下途徑兩者投予的F027500069對皮膚發炎的抑制。橫條圖說明了不同治療組（n = 8隻小鼠/組）的耳皮腫脹。從第1天到第4天，動物每天接受皮內注射重組人類IL-23或PBS。在第1天和第3天投予指定劑量的腹膜內（IP）或皮下（SC）注射。顯示的是第5天時耳皮厚度相對於基線的平均變化 \pm SEM。統計學是ANOVA和Bonferroni多重比較檢定。

【0094】 圖12：在通過腹膜內以及皮下途徑兩者遞送F027500069的情況下，在第5天，形成皮膚活檢的組織IL-22濃度的橫條圖。顯示的是個別數值（符號）和平均值 \pm SEM（條狀）。統計學是ANOVA和Bonferroni多重比較檢定。

【0095】 圖13：在人類TNF α /TNFR1敲入小鼠中的膠原抗體誘導的關節炎（CAIA）模型中對關節炎得分的抑制。顯示了不同治療組（n = 8隻小鼠/組）中隨時間推移的關節炎得分。在第1天，在LPS注射後6小時，動物接受單次腹膜內注射指定化合物。顯示的是平均每天關節炎得分 \pm SEM。統計學是雙因素ANOVA和Bonferroni多重比較檢定。

【0096】 圖14：在人類TNF α 敲入小鼠中進行的人類IL-23皮膚注射模型中對IL-23和TNF α 誘導的發炎的雙重抑制（n = 4至10隻小鼠/組）。從第1天到第4天，動物每天接受皮內注射重組人類IL-23或PBS。第1天和第3天，腹膜內注射指定化合物。顯示的是第5天時耳皮厚度相對於基線的平均變化 \pm SEM。統計學是ANOVA和Bonferroni多重比較檢定。

【0097】 圖15：在細胞因子的單特異性或雙特異性抑制後，發炎皮膚組織中的差異性皮膚組織基因表現。差異表現基因（DEG，其倍數變化 > 2 ， $p < 0.001$ ）的卞氏圖表（Venn diagram）。F027500069中總共769個DEG中的199個對這種治療是特異的。

【0098】 圖16：ISVD構築體F027500069的示意圖，從N端到C端顯示經由9GS連接子連接的單價構建單元（building blocks）/ISVD 6C11、119A03/1、ALB23002和81A12。

【實施方式】

【0099】 本技術旨在提供新型藥物，用於治療發炎性腸病（諸如克隆氏症和潰瘍性結腸炎）、乾癬、乾癬性關節炎或化膿性汗腺炎。

【0100】 本案發明人令人驚訝地發現，與單特異性抗TNF α 或抗IL-23p19多肽相比，包含至少三個ISVD（其中至少一個ISVD特異性地結合TNF α 並且至少兩個ISVD特異性地結合IL-23的p19次單元）的多肽可以用於更有效地治療自體免疫性或發炎性疾病。

【0101】 在一些實施例中，本技術的多肽顯示對TNF α 和IL-23（例如人類或食蟹猴TNF α 和IL-23）的高效力。在一些實施例中，本技術的多肽是有效產生的（例如在微生物宿主中，諸如畢赤酵母，例如巴斯德畢赤酵母）。在一些實施例中，本技術的多肽在高濃度下具有低粘度，有利於和方便皮下投予是。此外，在一些實施例中，本技術的多肽對待治療的受試者中預先存在的抗體（即，在第一次用所述抗體構築體治療之前存在於受試者中的抗體）具有有限的反應性。在其他實施例中，此類多肽在待治療的受試者中表現出足夠長的半衰期，使得可以方便地將連續的治療間隔開。

【0102】 所述多肽是至少雙特異性的，但也可以是例如三特異性、四特異性或五特異性的。此外，所述多肽是至少三價的，但也可以是例如四價或五價的。

【0103】 術語「雙特異性」、「三特異性」、「四特異性」或「五特異性」均落在術語「多特異性」範圍內，並且分別是指與兩種、三種、四種或五種不同的目標分子結合。術語「二價」、「三價」、「四價」或「五價」均落在術語「多價」範圍內，並且分別表示存在兩個、三個、四個或五個結合單元（諸如ISVD）。例如，所述多肽可以是三特異性四價的，諸如包含四個ISVD或由其組成的多肽，其中一個ISVD與人類TNF α 結合，兩個ISVD與人類IL-23結合，並且一個ISVD與人類血清白蛋白結合。例如，如果兩個ISVD結合IL-23的p19次單元上的兩個不同表位，則這種多肽可以同時是雙互補位的。術語「雙互補位」是指與同一目標分子的兩個不同部分（即表位）結合。

【0104】 如本文所用，術語「第一ISVD」、「第二ISVD」、「第三ISVD」等僅表示ISVD彼此的相對位置，其中編號從本技術多肽的N端開始。因此，「第一ISVD」比「第二ISVD」更靠近N端，而「第二ISVD」比「第三ISVD」更靠近N端，等等。因此，當從C端考慮時，ISVD排列是相反的。由於編號不是絕對的，並且僅指示所述至少三個ISVD的相對位置，因此不排除多肽中可能存在其他結合單元/構建單元（building blocks），諸如與TNF α 或IL-23的p19次單元結合的另外的ISVD，或者與另一個目標結合的ISVD。此外，不排除可以在其間放置

其他結合單元/構建單元 (building blocks) (諸如ISVD) 的可能性。例如，如下文進一步所述 (具體參見第5.3節「(體內)半衰期延長」)，所述多肽可以進一步包含與人類血清白蛋白結合的另一個ISVD，其甚至可以位於例如「第二ISVD」與「第三ISVD」之間。

【0105】 鑒於上述，本技術提供了包含至少三個ISVD或由其組成的多肽，其中至少一個ISVD特異性地結合TNF α ，並且至少兩個ISVD特異性地結合IL-23的p19次單元。

【0106】 特異性地結合IL-23的所述至少兩個ISVD，係與IL-23的p19次單元結合。特異性地結合IL-23的所述至少兩個ISVD可以與IL-23的p19次單元上的不同表位結合。特異性地結合IL-23的ISVD中的至少一個可能能夠阻斷IL-23的功能，諸如阻斷IL-23與IL-23R之間的相互作用和/或抑制IL-23誘發的IL-22釋放。

【0107】 所述多肽的元件例如ISVD可以通過一個或多個合適的連接子 (諸如肽連接子) 彼此連接。

【0108】 使用連接子連接兩個或更多個(多)肽是本領域熟知的。示例性肽連接子在表A-5中示出。一類常用肽連接子被稱為「Gly-Ser」或「GS」連接子。這些是基本上由甘胺酸 (G) 和絲胺酸 (S) 殘基組成的連接子，並且通常包含肽基序的一個或多個重複，所述肽基序諸如GGGGS (SEQ ID NO: 47) 基序 (例如，具有式(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) n ，其中 n 可以是1、2、3、4、5、6、7或更大)。此類GS連接子的一些常用例子是9GS連接子 (GGGGSGGGS, SEQ ID NO: 50)、15GS連接子 ($n=3$; SEQ ID NO: 52) 和35GS連接子 ($n=7$; SEQ ID NO: 57)。例如，參考了Chen等人, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013年10月15日; 65(10): 1357–1369；和Klein等人, *Protein Eng. Des. Sel.* (2014) 27 (10): 325-330。在本技術多肽的一個實施例中，使用9GS連接子將所述多肽的組分彼此連接。

【0109】 在一個實施例中，特異性地結合TNF α 的ISVD位於所述多肽的N端處。發明人令人驚訝地發現，這種構型可以增加所述多肽的產品產量。

【0110】 同樣在一個實施例中，特異性地結合IL-23的ISVD之一，係位於所述多肽的C端處。

【0111】 因此，所述多肽從所述多肽的N端開始依次包含以下各項或由其組成：特異性地結合TNF α 的ISVD、可以阻斷IL-23功能的特異性地結合IL-23的第一ISVD、視情況存在的結合單元（其提供如本文所定義之具有較高半衰期的多肽），以及特異性地結合IL-23的第二ISVD。在一個實施例中，提供多肽的具有較高半衰期的結合單元是ISVD。

【0112】 在一個實施例中，所述多肽從所述多肽的N端開始依次包含以下各項或由其組成：特異性地結合TNF α 的ISVD、連接子、可以阻斷IL-23功能的特異性地結合IL-23的第一ISVD、連接子、與人類血清白蛋白結合的ISVD、連接子，以及特異性地結合IL-23的第二ISVD。一方面，每個連接子都是9GS連接子。

【0113】 所述多肽的此類構型，可以提供較高的產品產量和良好的CMC特徵，包括表現產量、粘度和其他生物物理特性。

【0114】 在一個實施例中，本技術的多肽表現出對與人類血清中預先存在的抗體有較低的結合。為此，在一個實施例中，所述多肽在至少一個ISVD中包含胺基酸位置11處的纈胺酸(V)和胺基酸位置89處的白胺酸(L)（根據Kabat編號）。在一個實施例中，所述多肽在每個ISVD中包含胺基酸位置11處的纈胺酸(V)和胺基酸位置89處的白胺酸(L)（根據Kabat編號）。在另一個實施例中，所述多肽在C端ISVD的C端處包含1至5個（天然存在的）胺基酸延伸，諸如單個丙胺酸(A)延伸。ISVD的C端通常是VTVSS（SEQ ID NO: 112）。在另一個實施例中，所述多肽在至少一個ISVD中包含位置110（根據Kabat編號）處的離胺酸(K)或麩醯胺酸(Q)。在另一個實施例中，所述ISVD在至少一個ISVD中包含位置112（根據Kabat編號）處的離胺酸(K)或麩醯胺酸(Q)。在這些實施例中，ISVD的C端是VKVSS（SEQ ID NO: 113）、VQVSS（SEQ ID NO: 114）、VTVKS（SEQ ID NO:146）、VTVQS（SEQ ID NO:147）、VKVKS（SEQ ID NO:148）、VKVQS（SEQ ID NO:149）、VQVKS（SEQ ID NO:150）或VQVQS

(SEQ ID NO:151)，使得在添加單個丙胺酸後，所述多肽的C端例如包含序列 VTVSSA (SEQ ID NO: 115)、VKVSSA (SEQ ID NO: 116)、VQVSSA (SEQ ID NO: 117)、VTVKSA (SEQ ID NO:152)、VTVQSA (SEQ ID NO:153)、VKVKSA (SEQ ID NO:154)、VKVQSA (SEQ ID NO:155)、VQVKSA (SEQ ID No:156)或VQVQSA (SEQ ID NO:157)。在一個實施例中，C端包含VKVSSA (SEQ ID NO: 116)。在另一個實施例中，所述多肽在每個ISVD中包含胺基酸位置11處的纈胺酸(V)和胺基酸位置89處的白胺酸(L)(根據Kabat編號)，視情況地在至少一個ISVD中包含位置110(根據Kabat編號)處的離胺酸(K)或麩醯胺酸(Q)，並且在C端ISVD的C端處包含1至5個(天然存在的)胺基酸延伸，諸如單個丙胺酸(A)延伸，使得所述多肽的C端例如包含序列VTVSSA (SEQ ID NO: 115)、VKVSSA(SEQ ID NO: 116)或VQVSSA(SEQ ID NO: 117)，諸如VKVSSA (SEQ ID NO: 116)。關於這方面的更多資訊，參見例如WO 2012/175741和WO 2015/173325。

【0115】 在另一個實施例中，本技術的多肽包含含有與SEQ ID NO: 1高於90%，諸如高於95%或高於99%的序列同一性的胺基酸序列或由其組成，其中四個ISVD的CDR分別如以下章節「5.1免疫球蛋白單可變結構域」和「5.3(體內)半衰期延長」中示出的項目A至D(或A'至D'，如果使用Kabat定義)所定義，其中特言之：

- 特異性地結合TNF α 的ISVD包含為SEQ ID NO: 6的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列的CDR3；

- 特異性地結合IL-23的p19次單元的第一ISVD包含為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列的CDR3；

- 特異性地結合IL-23的p19次單元的第二ISVD包含為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 17的

胺基酸序列的CDR3；並且

- 與人類血清白蛋白結合的ISVD包含為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列的CDR3，

或者可替代地如果使用Kabat定義：

- 特異性地結合TNF α 的ISVD包含為SEQ ID NO: 122的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 130的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 138的胺基酸序列的CDR3；

- 特異性地結合IL-23的p19次單元的第一ISVD包含為SEQ ID NO: 123的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 131的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 139的胺基酸序列的CDR3；

- 特異性地結合IL-23的p19次單元的第二ISVD包含為SEQ ID NO: 125的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 133的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 141的胺基酸序列的CDR3；並且

- 與人類血清白蛋白結合的ISVD包含為SEQ ID NO: 124的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 132的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 140的胺基酸序列的CDR3。

【0116】 在另一個實施例中，所述多肽包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列或由其組成。在另一個實施例中，所述多肽由SEQ ID NO: 1的胺基酸序列組成。

【0117】 在一個實施例中，相較於SEQ ID NO: 1的胺基酸組成的多肽，本技術的多肽對人類TNF α 和人類IL-23具有至少一半的結合親和力或至少相同的結合親和力，其中結合親和力是使用相同方法，諸如表面電漿共振（SPR）所測量的。

【0118】 5.1 免疫球蛋白單可變結構域

【0119】 術語「免疫球蛋白單可變結構域」（ISVD）可與「單可變結構域」互換使用，定義了其中抗原結合位點存在於單個免疫球蛋白結構域上並由其形成

的免疫球蛋白分子。這使ISVD與「常規」免疫球蛋白（例如單株抗體）或其片段（諸如Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、二scFv）區分開來，其中兩個免疫球蛋白結構域，尤其是兩個可變結構域，相互作用形成抗原結合位點。通常，在常規的免疫球蛋白中，重鏈可變結構域（V_H）和輕鏈可變結構域（V_L）相互作用形成抗原結合位點。在這種情況下，V_H和V_L兩者的互補決定區（CDR）將有助於抗原結合位點，即總共6個CDR將參與抗原結合位點形成。

【0120】 鑒於以上定義，常規4鏈抗體（諸如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE分子；本領域已知）的抗原結合結構域或衍生自這種常規4鏈抗體的Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段（諸如二硫鍵連接的Fv或scFv片段）或雙抗體（全部都在本領域中已知）的抗原結合結構域通常不會被視為ISVD，因為在這些情況下，與抗原的對應表位之結合通常不是通過一個單一免疫球蛋白結構域發生，而是通過一對相連的免疫球蛋白結構域，諸如輕鏈和重鏈可變結構域，即通過共同結合到對應抗原的表位的免疫球蛋白結構域的V_H-V_L對發生。

【0121】 相反地，ISVD能夠特異性地結合抗原的表位，而無需與另外的免疫球蛋白可變結構域配對。ISVD的結合位點由單個V_H、單個V_{HH}或單個V_L結構域形成。

【0122】 如此一來，ISVD可以是輕鏈可變結構域序列（例如，V_L序列）或其合適的片段；或重鏈可變結構域序列（例如，V_H序列或V_{HH}序列）或其合適的片段；只要其能夠形成單個抗原結合單元；即，基本上由ISVD組成的功能性抗原結合單元，使得單個抗原結合結構域不需要與另一個可變結構域相互作用以形成功能性抗原結合單元。

【0123】 ISVD可以例如是重鏈ISVD，諸如V_H、V_{HH}，包括駝類化V_H或人類化V_{HH}。在一個實施例中，其是V_{HH}，包括駝類化V_H或人類化V_{HH}。重鏈ISVD可以衍生自常規的四鏈抗體或重鏈抗體。

【0124】 例如，ISVD可以是單結構域抗體（或適合用作單結構域抗體的胺基酸序列）、「dAb」或dAb（或適合用作dAb的胺基酸序列）或Nanobody®（如本

文所定義，並且包括但不限於 V_{HH})；其他單可變結構域，或其任一種的任何合適的片段。

【0125】 特言之，ISVD可以是Nanobody® (諸如 V_{HH} ，包括人類化 V_{HH} 或駝類化 V_H) 或其合適的片段。*Nanobody®*、*Nanobodies®*和*Nanoclone®*是註冊商標。

【0126】 「 V_{HH} 結構域」，也稱為 V_{HH} 、 V_{HH} 抗體片段和 V_{HH} 抗體，最初被描述為「重鏈抗體」(即「沒有輕鏈的抗體」)的抗原結合免疫球蛋白可變結構域，參見Hamers-Casterman等人 Nature 363: 446-448, 1993。選擇術語「 V_{HH} 結構域」以便將這些可變結構域與存在於常規4鏈抗體中的重鏈可變結構域(在本文中稱為「 V_H 結構域」)和存在於常規4鏈抗體中的輕鏈可變結構域(在本文中稱為「 V_L 結構域」)區分開來。有關 V_{HH} 的進一步描述，參考Muyldermans的評論文章 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001)。

【0127】 通常，免疫球蛋白的生成涉及對實驗動物進行免疫，融合免疫球蛋白產生細胞以產生融合瘤，並針對所需特異性進行篩選。可替代地，可以通過篩選初始的(naive)、免疫的或合成的文庫，例如通過噬菌體展示來生成免疫球蛋白。

【0128】 免疫球蛋白序列(諸如Nanobodies®)的生成已經在各種出版物中廣泛描述，其中，WO 94/04678、Hamers-Casterman等人 1993 (Nature 363: 446-448, 1993)和Muyldermans等人 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001)可以作為例子。在這些方法中，用目標抗原對駱駝科動物進行免疫，以便誘導針對所述目標抗原的免疫反應。對從所述免疫獲得的Nanobodies®庫進一步篩選結合目標抗原的Nanobodies®。

【0129】 在這些情況下，抗體的生成需要純化的抗原，用來免疫和/或篩選。可以從天然來源或在重組生產過程中純化抗原。

【0130】 免疫球蛋白序列的免疫和/或篩選可以使用此類抗原的肽片段來進行。

【0131】 本技術可以使用不同來源的免疫球蛋白序列，包括小鼠、大鼠、兔、驢、人和駱駝科動物免疫球蛋白序列。本技術還包括完全人序列、人類化序列

或嵌合序列。例如，本技術包括駱駝科動物免疫球蛋白序列和人類化駱駝科動物免疫球蛋白序列，或駝類化結構域抗體，例如駝類化dAb，如Ward等人所述（Nature 341: 544, 1989）（參見例如WO 94/04678以及Davies和Riechmann, Febs Lett., 339:285-290, 1994和Prot. Eng., 9:531-537, 1996）。此外，本技術還使用融合的免疫球蛋白序列，例如形成多價和/或多特异性構築體（對於含有一個或多個V_{HH}結構域的多價和多特异性多肽及其製備，也參考Conrath等人, J. Biol. Chem., 第276卷, 10. 7346-7350, 2001，以及例如WO 96/34103和WO 99/23221），以及包含標籤或其他功能部分（例如毒素、標記物、放射化學物質等）的免疫球蛋白序列，其可由本技術的免疫球蛋白序列衍生而來。

【0132】 「人類化V_{HH}」包含對應於天然存在的V_{HH}結構域的胺基酸序列但已經被「人類化」的胺基酸序列，即通過用在來自人類的常規4鏈抗體（例如，如上所指出）的V_H結構域的一個或多個對應位置出現的一個或多個胺基酸殘基替代所述天然存在的V_{HH}序列的胺基酸序列中（並且特別是在骨架序列中）的一個或多個胺基酸殘基來進行。這能以本身已知的方式進行，這對於熟習此項技術者來說是清楚的，例如基於本文的進一步描述和現有技術（例如WO 2008/020079）。同樣，應注意，此類人類化V_{HH}可以以任何本身已知的合適方式來獲得，並且因此並不嚴格限於已經使用包含天然存在的V_{HH}結構域作為起始材料的多肽獲得的多肽。

【0133】 「駝類化V_H」包含對應於天然存在的V_H結構域的胺基酸序列但已經被「駝類化」的胺基酸序列，即通過用在重鏈抗體的V_{HH}結構域的一個或多個相應位置出現的一個或多個胺基酸殘基替代來自常規4鏈抗體的天然存在的V_H結構域的胺基酸序列中的一個或多個胺基酸殘基來進行。這能以本身已知的方式進行，這對於熟習此項技術者來說是清楚的，例如基於本文的進一步描述和現有技術（例如WO 2008/020079）。如本文所定義，此類「駝類化」取代通常插入形成和/或存在於V_H-V_L界面的胺基酸位置處和/或所謂的駱駝科標誌殘基處（參見例如WO 94/04678以及Davies和Riechmann, 1994和1996, 同上）。在一個實施

例中，用作產生或設計駝類化 V_H 的起始材料或起點的 V_H 序列是來自哺乳動物的 V_H 序列，或人類的 V_H 序列，諸如 V_H3 序列。然而，應注意，可以以任何本身已知的合適方式獲得這種駝類化 V_H ，並且因此並不嚴格限於使用包含天然存在的 V_H 結構域作為起始材料的多肽所獲得的多肽。

【0134】 ISVD序列的結構可以被認為由四個架構區（「FR」）構成，其在本領域和本文中分別被稱為「架構區1」（「FR1」）；「架構區2」（「FR2」）；「架構區3」（「FR3」）；和「架構區4」（「FR4」）；所述架構區被三個互補決定區（「CDR」）中斷，所述三個互補決定區在本領域和本文中分別被稱為「互補決定區1」（「CDR1」）；「互補決定區2」（「CDR2」）；和「互補決定區3」（「CDR3」）。

【0135】 如WO 08/020079的第58頁和第59頁的段落q) 中進一步描述的，ISVD的胺基酸殘基可以根據由Kabat等人（“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services, NIH貝塞斯達, 馬里蘭州, 出版號91）給出的用於 V_H 結構域的通用編號進行編號，如在Riechmann和Muyldermans, 2000 (J. Immunol. Methods 240 (1-2): 185-195；參見例如該出版物的圖2) 的文章中應用於來自駱駝科動物的 V_{HH} 結構域。應注意，如本領域中對於 V_H 結構域和 V_{HH} 結構域所熟知的，每個CDR中胺基酸殘基的總數可以變化，並且可能不對應於由Kabat編號指示的胺基酸殘基的總數。即，根據Kabat編號的一個或多個位置可能在實際序列中不被佔據，或者實際序列可能含有比Kabat編號所允許的數量更多的胺基酸殘基。這意味著，通常，根據Kabat的編號可以對應於或可以不對應於實際序列中胺基酸殘基的實際編號。 V_H 結構域和 V_{HH} 結構域中的胺基酸殘基的總數通常將在110至120的範圍內，通常在112至115之間。然而，應注意，較小和較長的序列也可能適用於本文所述的目的。

【0136】 在本申請案中，除非另有說明，否則CDR序列是根據如Kontermann和Dübel（編 2010, Antibody Engineering, 第2卷, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, 第3章, 第33-51頁）中所述的AbM編號確定的。根據此方法，FR1包含位

置1-25處的胺基酸殘基，CDR1包含位置26-35處的胺基酸殘基，FR2包含位置36-49處的胺基酸，CDR2包含位置50-58處的胺基酸殘基，FR3包含位置59-94處的胺基酸殘基，CDR3包含位置95-102處的胺基酸殘基，並且FR4包含位置103-113處的胺基酸殘基。

【0137】 CDR區的確定也可以根據不同的方法進行。在根據Kabat的CDR確定中，ISVD的FR1包含位置1-30處的胺基酸殘基，ISVD的CDR1包含位置31-35處的胺基酸殘基，ISVD的FR2包含位置36-49處的胺基酸，ISVD的CDR2包含位置50-65處的胺基酸殘基，ISVD的FR3包含位置66-94處的胺基酸殘基，ISVD的CDR3包含位置95-102處的胺基酸殘基，並且ISVD的FR4包含位置103-113處的胺基酸殘基。

【0138】 在這樣的免疫球蛋白序列中，骨架序列可以是任何合適的骨架序列，並且合適的骨架序列的例子對於熟習此項技術者將是清楚的，例如基於標準手冊以及本文中提及的進一步公開和現有技術。

【0139】 骨架序列是免疫球蛋白骨架序列或者例如通過人類化或駝類化衍生自免疫球蛋白骨架序列的骨架序列的合適組合。例如，骨架序列可以是衍生自輕鏈可變結構域（例如V_L序列）和/或重鏈可變結構域（例如V_H序列或V_{HH}序列）的骨架序列。一方面，骨架序列是衍生自V_{HH}序列的骨架序列，其中所述骨架序列可以視情況地被部分或完全人類化；或者是已經駝類化的常規V_H序列（如本文所定義）。

【0140】 特言之，本技術中使用的ISVD序列中存在的骨架序列可以含有一個或多個標誌殘基（如本文所定義），使得ISVD序列是Nanobody®，諸如V_{HH}，包括人類化V_{HH}或駝類化V_H。此類骨架序列的合適組合的一些非限制性例子將從本文的進一步公開中變得清楚。

【0141】 同樣，如本文針對免疫球蛋白序列的一般描述，也可以使用任何前述的合適片段或片段的組合，諸如含有一個或多個CDR序列的片段，其適當地側

接一個或多個骨架序列和/或經由一個或多個骨架序列連接；例如，以與這些CDR和骨架序列相同的順序可以出現在衍生所述片段的完整免疫球蛋白序列中。

【0142】 然而，應注意，關於ISVD序列的起源或用於表現所述ISVD序列的核苷酸序列的起源，以及關於產生或獲得或者已經產生或獲得所述ISVD序列或核苷酸序列的方式，本技術不受此限。因此，ISVD序列可以是天然存在的序列（來自任何合適的物種）或者合成的或半合成的序列。在特定但非限制性的方面，ISVD序列是天然存在的序列（來自任何合適的物種）或者合成的或半合成的序列，包括但不限於「人類化」（如本文所定義）免疫球蛋白序列（諸如部分或完全人類化的小鼠或兔免疫球蛋白序列，並且特別是部分或完全人類化的V_{HH}序列）、「駝類化」（如本文所定義）免疫球蛋白序列，以及通過諸如以下的技術獲得的免疫球蛋白序列：親和力成熟（例如，從合成的、隨機的或天然存在的免疫球蛋白序列開始）、CDR移植、鑲面（veneering）、組合衍生自不同免疫球蛋白序列的片段、使用重疊引物的PCR組裝，以及熟習此項技術者熟知的工程化免疫球蛋白序列的類似技術；或任何前述的任何適當組合。

【0143】 類似地，核苷酸序列可以是天然存在的核苷酸序列或者合成的或半合成的序列，並且可以是例如通過PCR從合適的天然存在的模板所分離的序列，例如從細胞分離的DNA或RNA、已經從文庫（並且特別是，表現文庫）分離的核苷酸序列、已經通過將突變引入天然存在的核苷酸序列製備的核苷酸序列（使用本身已知的任何合適的技術，諸如錯配PCR）、已經通過使用重疊引物的PCR製備的核苷酸序列，或者已經使用本身已知的DNA合成技術製備的核苷酸序列。

【0144】 如上所述，ISVD可以Nanobody®或其合適的片段。對於Nanobodies®的一般描述，參考以下進一步描述，以及本文引用的現有技術。然而，在這方面，應注意，此描述和現有技術主要描述了所謂的「V_H3類」的Nanobodies®，即與諸如DP-47、DP-51或DP-29的V_H3類的人種系序列具有高度序列同源性的Nanobodies®。然而，應注意，本技術在其最廣泛的意義上通常可以使用任何類型的Nanobody®，並且例如還使用屬於所謂的「V_H4類」的Nanobodies®，即與

諸如DP-78的V_H4類的人種系序列具有高度序列同源性的Nanobodies®，如例如WO 2007/118670中所述。

【0145】 通常，Nanobodies®（特別是V_{HH}序列，包括（部分）人類化V_{HH}序列和駝類化V_H序列）的特徵可以是在一個或多個骨架序列（同樣如本文進一步所述）中存在一個或多個「標誌殘基」（如本文所述）。因此，通常可以將Nanobody®定義為具有（一般）結構的免疫球蛋白序列

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

其中FR1至FR4分別是指架構區1至4，並且其中CDR1至CDR3分別是指互補決定區1至3，並且其中一個或多個標記殘基係如本文進一步所定義者。

【0146】 特言之，Nanobody®可以是具有（一般）結構的免疫球蛋白序列

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

其中FR1至FR4分別是指架構區1至4，並且其中CDR1至CDR3分別是指互補決定區1至3，並且其中骨架序列係如本文所進一步定義者。

【0147】 更特言之，Nanobody®可以是具有（一般）結構的免疫球蛋白序列

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

其中FR1至FR4分別是指架構區1至4，並且其中CDR1至CDR3分別是指互補決定區1至3，並且其中：

根據Kabat編號的位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108處的一個或多個胺基酸殘基選自下表A-6中提及的標誌殘基。

【0148】 表A-6：奈米抗體中的標誌殘基

位置	人V _H 3	標誌殘基
11	L, V; 主要是L	L、S、V、M、W、F、T、Q、E、A、R、G、K、Y、N、P、I; 較佳L
37	V、I、F; 通常是V	F ⁽¹⁾ 、Y、V、L、A、H、S、I、W、C、N、G、D、T、P, 較佳F ⁽¹⁾ 或Y
44 ⁽⁸⁾	G	E ⁽³⁾ 、Q ⁽³⁾ 、G ⁽²⁾ 、D、A、K、R、L、P、S、V、H、T、N、W、M、I; 較佳G ⁽²⁾ 、E ⁽³⁾ 或Q ⁽³⁾ ; 最佳G ⁽²⁾ 或Q ⁽³⁾ 。
45 ⁽⁸⁾	L	L ⁽²⁾ 、R ⁽³⁾ 、P、H、F、G、Q、S、E、T、Y、C、I、D、V; 較佳L ⁽²⁾ 或R ⁽³⁾
47 ⁽⁸⁾	W、Y	F ⁽¹⁾ 、L ⁽¹⁾ 或W ⁽²⁾ G、I、S、A、V、M、R、Y、E、

		P、T、C、H、K、Q、N、D；較佳W ⁽²⁾ 、L ⁽¹⁾ 或F ⁽¹⁾
83	R或K；通常是R	R、K ⁽⁵⁾ 、T、E ⁽⁵⁾ 、Q、N、S、I、V、G、M、L、A、D、Y、H；較佳K或R；最佳K
84	A、T、D；主要是A	P ⁽⁵⁾ 、S、H、L、A、V、I、T、F、D、R、Y、N、Q、G、E；較佳P
103	W	W ⁽⁴⁾ 、R ⁽⁶⁾ 、G、S、K、A、M、Y、L、F、T、N、V、Q、P ⁽⁶⁾ 、E、C；較佳W
104	G	G、A、S、T、D、P、N、E、C、L；較佳G
108	L、M或T；主要是L	Q、L ⁽⁷⁾ 、R、P、E、K、S、T、M、A、H；較佳Q或L ⁽⁷⁾
<p>注釋：</p> <p>(1) 特別但非排他地，與位置43-46處的KERE或KQRE組合。</p> <p>(2) 通常為位置44-47處的GLEW。</p> <p>(3) 通常為位置43-46處的KERE或KQRE，例如為位置43-47處的KEREL、KEREF、KQREL、KQREF、KEREG、KQREW或KQREG。可替代地，諸如以下的序列也是可能的：TERE（例如TEREL）、TQRE（例如TQREL）、KECE（例如KECEL或KECER）、KQCE（例如KQCEL）、RERE（例如REREG）、RQRE（例如RQREL、RQREF或RQREW）、QERE（例如QEREG）、QQRE（例如QQREW、QQREL或QQREF）、KGRE（例如KGREG）、KDRE（例如KDREV）。一些其他可能但不太優選的序列包括例如DECKL和NVCEL。</p> <p>(4) 具有位置44-47處的兩個GLEW，以及位置43-46處的KERE或KQRE。</p> <p>(5) 常常為天然存在的V_{HH}結構域的位置83-84處的KP或EP。</p> <p>(6) 特別但非排他地，與位置44-47處的GLEW組合。</p> <p>(7) 前提是當位置44-47為GLEW時，（非人類化的）V_{HH}序列中的位置108總是為Q，所述序列還含有103處的W。</p> <p>(8) GLEW基團還含有位置44-47處的GLEW樣序列，如例如GVEW、EPEW、GLER、DQEW、DLEW、GIEW、ELEW、GPEW、EWLP、GPER、GLER和ELEW。</p>		

【0149】 本技術尤其使用可以結合TNF α 或IL-23的p19次單元的ISVD。在本技術的上下文中，「與某種目標分子結合」具有本領域中如在抗體及其相應抗原的情境中所理解的常見含義。

【0150】 本技術的多肽可以包含與TNF α 結合的一個或多個ISVD以及與IL-23結合的兩個或更多個ISVD。例如，所述多肽可以包含與TNF α 結合的一個ISVD和與IL-23的p19次單元結合的兩個ISVD。

【0151】 在一些實施例中，至少一個ISVD可以在功能上阻斷其目標分子。例如，ISVD可以阻斷TNF α 與TNFR（TNF受體）之間的相互作用，或者可以阻斷IL-23與IL-23R（IL-23受體）之間的相互作用。在本技術的多肽中，至少一個ISVD可以在功能上阻斷IL-23，例如通過阻斷IL-23與IL-23R之間的相互作用和/或抑制

IL-23誘發的IL-22釋放。因此，在一個實施例中，本技術的多肽包括與TNF α 結合並在功能上阻斷TNF α 的一個ISVD，以及與IL-23結合的兩個ISVD，其中之一可以在功能上阻斷IL-23。

【0152】 本技術中使用的ISVD形成本技術多肽的一部分，所述多肽包含至少三個ISVD或由其組成，使得所述多肽可以特異性地結合TNF α 和IL-23。

【0153】 因此，用於本技術多肽的所述至少三個ISVD的目標分子是TNF α 和IL-23。例如是哺乳動物TNF α 和IL-23。除了人類TNF α （Uniprot登錄號P01375）和人類IL-23（IL-23A，p19次單元的Uniprot登錄號：Q9NPF7）之外，來自其他物種的形式也適用於本技術，例如來自小鼠、大鼠、兔、貓、狗、山羊、綿羊、馬、豬、非人類靈長類動物（諸如食蟹猴（在本文中也被稱為「*cyno*」））、或駱駝科動物（諸如駱馬或羊駝）的TNF α 和IL-23。

【0154】 可以在本技術中使用的特異性地結合TNF α 或IL-23的p19次單元的ISVD的特定實施例係如以下項目A至C所述：

【0155】 A. 特異性地結合人類TNF α 的ISVD並包含

- i. CDR1，其為SEQ ID NO: 6的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 6具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；
- ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 10具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和
- iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 14具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0156】 在一個實施例中，所述ISVD包含為SEQ ID NO: 6的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 10的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 14的胺基酸序列的CDR3。

【0157】 這種特異性地結合人類TNF α 的ISVD的例子具有如表A-2中針對構築體6C11所指示的一個或多個或所有架構區（除了在先前項目A中定義的CDR之

外)。在一個實施例中，其是包含構築體6C11 (SEQ ID NO: 2, 參見表A-1和A-2) 的完整胺基酸序列或由其組成的ISVD。

【0158】 在另一個實施例中，特異性地結合人類TNF α 的ISVD的胺基酸序列可以具有與SEQ ID NO: 2高於90%，諸如高於95%或高於99%的序列同一性，其中CDR如先前項目A所定義。在一個實施例中，特異性地結合TNF α 的ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列或由其組成。

【0159】 當這種特異性地結合TNF α 的ISVD在至少一個CDR中相對於對應參考CDR序列(上述項目A)具有2個或1個胺基酸差異時，與構築體6C11 (SEQ ID NO: 2) 相比，ISVD對人類TNF α 具有至少一半的結合親和力，或至少相同的結合親和力，其中結合親和力是使用相同方法(諸如SPR)測量的。

【0160】 B. 特異性地結合人類IL-23的p19次單元的ISVD並包含

i. CDR1，其為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 7具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 11具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 15具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0161】 在一個實施例中，所述ISVD包含為SEQ ID NO: 7的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 11的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 15的胺基酸序列的CDR3。

【0162】 這種特異性地結合人類IL-23的ISVD的例子具有如表A-2中針對構築體119A03/1所指示的一個或多個或所有架構區(除了在先前項目B中所定義的CDR之外)。在一個實施例中，其是包含構築體119A03/1 (SEQ ID NO: 3, 參見表A-1和A-2) 的完整胺基酸序列或由其組成的ISVD。

【0163】 另外，在另一個實施例中，特異性地結合人類IL-23的ISVD，其胺基酸序列可以具有與SEQ ID NO: 3高於90%，諸如高於95%或高於99%的序列同一

性，其中CDR如先前項目B所定義。在一個實施例中，與IL-23結合的ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列或由其組成。

【0164】 當這種與IL-23結合的ISVD在至少一個CDR中相對於對應參考CDR序列（以上項目B）具有2個或1個胺基酸差異時，與構築體119A03/1（SEQ ID NO: 3）相比，ISVD對人類IL-23具有至少一半的結合親和力，或至少相同的結合親和力，其中結合親和力是使用相同方法（諸如SPR）測量的。

【0165】 在一個實施例中，包含與SEQ ID NO: 11（TIESGSRTN）具有2個或1個胺基酸差異的CDR2的ISVD，在CDR2序列的胺基酸位置3處不具有E至N取代和/或在CDR2序列的胺基酸位置9處不具有N至Y取代。在另一個實施例中，這種ISVD在CDR2序列的胺基酸位置3處不具有E至N取代，並且在CDR2序列的胺基酸位置9處不具有N至Y取代。在包含與SEQ ID NO: 11（TIESGSRTN）具有2個或1個胺基酸差異的CDR2的ISVD的此類實施例中，E被維持為所述CDR2序列的位置3處的胺基酸和/或N被維持為所述CDR2序列的位置9處的胺基酸。在另一個實施例中，所述CDR2序列的胺基酸位置3處的E和胺基酸位置9處的N兩者均被維持。與在所述CDR2序列的胺基酸位置3處不包含N的相同多肽相比，並且特別是與在所述胺基酸位置處包含E的相同多肽相比，使用在所述胺基酸位置處包含N的ISVD可以例如由於脫胺基作用導致在所述多肽的生產過程中胺基酸序列穩定性降低。與在所述CDR2序列的胺基酸位置9處不包含Y的相同多肽相比，並且特別是與在所述胺基酸位置處包含N的相同多肽相比，使用在所述胺基酸位置處包含Y的ISVD可以導致所述多肽的蛋白質聚集增加。

【0166】 C. 特異性地結合人類IL-23的p19次單元的ISVD並包含

- i. CDR1，其為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 9具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；
- ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 13具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和
- iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 17具有

2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0167】 在一個實施例中，所述ISVD包含為SEQ ID NO: 9的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 13的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 17的胺基酸序列的CDR3。

【0168】 這種特異性地結合人類IL-23的ISVD的例子，係具有如表A-2中針對構築體81A12所指示的一個或多個或所有架構區（除了在先前項目C中定義的CDR之外）。在一個實施例中，其是包含構築體81A12（SEQ ID NO: 5，參見表A-1和A-2）的完整胺基酸序列或由其組成的ISVD。

【0169】 另外，在另一個實施例中，特異性地結合人類IL-23的ISVD的胺基酸序列可以具有與SEQ ID NO: 5高於90%，諸如高於95%或高於99%的序列同一性，其中CDR如先前項目C所定義。在一個實施例中，與IL-23結合的ISVD包含SEQ ID NO: 5的胺基酸序列或由其組成。

【0170】 當這種特異性地結合IL-23的ISVD在至少一個CDR中相對於對應參考CDR序列（以上項目C）具有2個或1個胺基酸差異時，相較於構築體81A12（SEQ ID NO: 5），ISVD對人類IL-23具有至少一半的結合親和力，或至少相同的結合親和力，其中結合親和力是使用相同的方法（諸如SPR）測量的。

【0171】 在一個實施例中，如上述項目A至C所定義的每個ISVD，都包含在本技術的多肽中。與由SEQ ID NO: 1的胺基酸組成的多肽相比，這種包含如上述項目A至C所定義的每個ISVD的本技術多肽，係對人類TNF α 和人類IL-23具有至少一半的結合親和力或至少相同的結合親和力，其中結合親和力是使用相同方法（諸如SPR）測量的。

【0172】 上述項目A至C中提及的SEQ ID NO，是基於根據AbM定義的CDR定義（參見表A-2）。注意，根據Kabat定義（參見表A-2.1），定義相同CDR的SEQ ID NO同樣可以用於以上項目A至C。

【0173】 因此，如上文使用AbM定義所述可以用於本技術中的特異性地結合TNF α 或IL-23的p19次單元的特異性ISVD，也可以使用以下項目A'至C'中所闡述的Kabat定義來描述：

【0174】 A'. 特異性地結合人類TNF α 的ISVD並包含

- i. CDR1，其為SEQ ID NO: 122的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 122具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；
- ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 130的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 130具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和
- iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 138的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 138具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0175】 在一個實施例中，所述ISVD包含為SEQ ID NO: 122的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 130的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 138的胺基酸序列的CDR3。

【0176】 這種特異性地結合人類TNF α 的ISVD的例子，係具有如表A-2.1中針對構築體6C11所指示的一個或多個或所有架構區（除了在先前項目A中定義的CDR之外）。在一個實施例中，其是包含構築體6C11（SEQ ID NO: 2，參見表A-1和A-2.1）的完整胺基酸序列或由其組成的ISVD。

【0177】 另外，在另一個實施例中，特異性地結合人類TNF α 的ISVD的胺基酸序列可以具有與SEQ ID NO: 2高於90%，諸如高於95%或高於99%的序列同一性，其中CDR如先前項目A'所定義。在一個實施例中，特異性地結合TNF α 的ISVD包含SEQ ID NO: 2的胺基酸序列或由其組成。

【0178】 當這種特異性地結合TNF α 的ISVD在至少一個CDR中相對於對應參考CDR序列（以上項目A'）具有2個或1個胺基酸差異時，相較於構築體6C11（SEQ ID NO: 2），ISVD對人類TNF α 具有至少一半的結合親和力，或至少相同的結合親和力，其中結合親和力是使用相同的方法（諸如SPR）測量的。

【0179】 B'. 特異性地結合人類IL-23的p19次單元的ISVD並包含

- i. CDR1，其為SEQ ID NO: 123的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 123具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；
- ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 131的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 131具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和
- iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 139的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 139具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0180】 在一個實施例中，所述ISVD包含為SEQ ID NO: 123的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 131的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 139的胺基酸序列的CDR3。

【0181】 這種特異性地結合人類IL-23的ISVD的例子，係具有如表A-2.1中針對構築體119A03/1所指示的一個或多個或所有架構區(除了在先前項目B'中定義的CDR之外)。在一個實施例中，其是包含構築體119A03/1 (SEQ ID NO: 3，參見表A-1和A-2.1) 的完整胺基酸序列或由其組成的ISVD。

【0182】 另外，在另一個實施例中，特異性地結合人類IL-23的ISVD的胺基酸序列，可以具有與SEQ ID NO: 3高於90%，諸如高於95%或高於99%的序列同一性，其中CDR如先前項目B'所定義。在一個實施例中，與IL-23結合的ISVD包含SEQ ID NO: 3的胺基酸序列或由其組成。

【0183】 當這種與IL-23結合的ISVD在至少一個CDR中相對於對應參考CDR序列(以上項目B')具有2個或1個胺基酸差異時，與構築體119A03/1 (SEQ ID NO: 3) 相比，ISVD對人類IL-23具有至少一半的結合親和力，或至少相同的結合親和力，其中結合親和力是使用相同的方法(諸如SPR)測量的。

【0184】 在一個實施例中，包含CDR2 (其包含與SEQ ID NO: 131 (TIESGSRTNYADSVKG)具有2個或1個胺基酸差異的胺基酸序列或由其組成) 的ISVD在所述CDR2序列的胺基酸位置3處，不具有E至N取代和/或在所述CDR2序列的胺基酸位置9處不具有N至Y取代。在另一個實施例中，這種ISVD在CDR2序列的胺基酸位置3處不具有E至N取代，並且在CDR2序列的胺基酸位置9處不具

有N至Y取代。在包含CDR2(其包含與SEQ ID NO: 131(TIESGSRTNYADSVKG)具有2個或1個胺基酸差異的胺基酸序列或由其組成)的ISVD的此類實施例中，E被維持為所述CDR2序列的位置3處的胺基酸和/或N被維持為所述CDR2序列的位置9處的胺基酸。在另一個實施例中，所述CDR2序列的胺基酸位置3處的E和胺基酸位置9處的N兩者均被維持。相較於在所述CDR2序列的胺基酸位置3處不包含N的相同多肽，並且特別是相較於在所述胺基酸位置處包含E的相同多肽，使用在所述胺基酸位置處包含N的ISVD可以例如由於脫胺基作用，而導致在所述多肽的生產過程中胺基酸序列穩定性降低。相較於在所述CDR2序列的胺基酸位置9處不包含Y的相同多肽，並且特別是相較於在所述胺基酸位置處包含N的相同多肽，使用在所述胺基酸位置處包含Y的ISVD可以導致所述多肽的蛋白質聚集增加。

【0185】 C'. 特異性地結合人類IL-23的p19次單元的ISVD並包含

- i. CDR1，其為SEQ ID NO: 125的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 125具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；
- ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 133的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 133具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和
- iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 141的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 141具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0186】 在一個實施例中，所述ISVD包含為SEQ ID NO: 125的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 133的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 141的胺基酸序列的CDR3。

【0187】 這種特異性地結合人類IL-23的ISVD的例子，具有如表A-2.1中針對構築體81A12所指示的一個或多個或所有架構區(除了在先前項目C'中定義的CDR之外)。在一個實施例中，其是包含構築體81A12 (SEQ ID NO: 5，參見表A-1和A-2.1)的完整胺基酸序列或由其組成的ISVD。

【0188】 另外，在另一個實施例中，特異性地結合人類IL-23的ISVD的胺基酸序列可以具有與SEQ ID NO: 5高於90%，諸如高於95%或高於99%的序列同一性，其中CDR如先前項目C'所定義。在一個實施例中，與IL-23結合的ISVD包含SEQ ID NO: 5的胺基酸序列或由其組成。

【0189】 當這種特異性地結合IL-23的ISVD在至少一個CDR中相對於對應參考CDR序列(以上項目C')具有2個或1個胺基酸差異時，相較於構築體81A12 (SEQ ID NO: 5)，ISVD對人類IL-23具有至少一半的結合親和力，或至少相同的結合親和力，其中結合親和力是使用相同方法(諸如SPR)測量的。

【0190】 在一個實施例中，如上述項目A'至C'所定義的每個ISVD，都包含在本技術的多肽中。相較於由SEQ ID NO: 1的胺基酸組成的多肽，這種包含如以上項目A'至C'所定義的每個ISVD的本技術多肽，對人類TNF α 和人類IL-23具有至少一半的結合親和力或至少相同的結合親和力，其中結合親和力是使用相同方法(諸如SPR)測量的。

【0191】 第一胺基酸序列與第二胺基酸序列之間的「序列同一性」的百分比，可以通過將[第一胺基酸序列中與第二胺基酸序列中相應位置處的胺基酸殘基相同的胺基酸殘基的數量]除以[第一胺基酸序列中胺基酸殘基的總數]並乘以[100%]來計算，其中第二胺基酸序列中胺基酸殘基的每個缺失、插入、取代或添加(與第一胺基酸序列相比)被認為是單個胺基酸殘基(即單個位置處)的差異。

【0192】 通常，出於根據上文概述的計算方法確定兩個胺基酸序列之間「序列同一性」的百分比的目的，將具有最大胺基酸殘基數量的胺基酸序列作為「第一」胺基酸序列，並將另一個胺基酸序列作為「第二」胺基酸序列。

【0193】 如本文所用的「胺基酸差異」是指單個胺基酸殘基相對於參考序列的缺失、插入或取代。在一個實施例中，「胺基酸差異」是取代。

【0194】 在一個實施例中，胺基酸取代是保守取代。此類保守取代是其中以下(a) - (e)組中的一個胺基酸被同一組中的另一個胺基酸殘基取代之取代：(a) 小型

脂族、非極性或微極性殘基：Ala、Ser、Thr、Pro和Gly；(b) 極性、帶負電荷的殘基及其（不帶電荷的）醯胺：Asp、Asn、Glu和Gln；(c) 極性、帶正電荷的殘基：His、Arg和Lys；(d) 大的脂族、非極性殘基：Met、Leu、Ile、Val和Cys；和(e) 芳族殘基：Phe、Tyr和Trp。

【0195】 在一個實施例中，保守取代如下；Ala變成Gly或變成Ser；Arg變成Lys；Asn變成Gln或變成His；Asp變成Glu；Cys變成Ser；Gln變成Asn；Glu變成Asp；Gly變成Ala或變成Pro；His變成Asn或變成Gln；Ile變成Leu或變成Val；Leu變成Ile或變成Val；Lys變成Arg,變成Gln或變成Glu；Met變成Leu,變成Tyr或變成Ile；Phe變成Met,變成Leu或變成Tyr；Ser變成Thr；Thr變成Ser；Trp變成Tyr；Tyr變成Trp；和/或Phe變成Val、變成Ile或變成Leu。

【0196】 5.2 特異性

【0197】 術語「特異性」、「特異性地結合」或「特異性結合」是指特定結合單元（諸如ISVD）可以以足夠高的親和力結合的來自相同生物體的不同目標分子（諸如抗原）的數量（參見下文）。「特異性」、「特異性地結合」或「特異性結合」在本文中與「選擇性」、「選擇性地結合」或「選擇性結合」互換使用。結合單元（諸如ISVD）特異性地結合其指定的目標。

【0198】 可以基於親和力確定結合單元的特異性/選擇性。親和力表示分子相互作用的強度或穩定性。親和力通常通過KD或解離常數給出，單位為莫耳/升（或M）。親和力也可以表示為締合常數KA，其等於 $1/KD$ 並且具有（莫耳/升）⁻¹（或M⁻¹）的單位。

【0199】 親和力是部分與目標分子上結合位點之間的結合強度的量度：KD值越低，目標分子與目標部分之間的結合強度越強。

【0200】 通常，本技術中使用的結合單元（諸如ISVD）將以 10^{-5} 至 10^{-12} 莫耳/升或更低、 10^{-7} 至 10^{-12} 莫耳/升或更低、或 10^{-8} 至 10^{-12} 莫耳/升的解離常數（KD）（即

以 10^5 至 10^{12} 升/莫耳或更高、 10^7 至 10^{12} 升/莫耳或更高、或 10^8 至 10^{12} 升/莫耳的締合常數 (KA)) 結合到其目標。

【0201】 高於 10^{-4} 莫耳/升的任何KD值 (或小於 10^4 升/莫耳的任何KA值) 通常被認為指示非特異性結合。

【0202】 被認為具有特異性的生物學相互作用 (諸如免疫球蛋白序列與抗原的結合) 的KD通常在 10^{-5} 莫耳/升 (10000 nM或 $10\mu\text{M}$) 至 10^{-12} 莫耳/升 (0.001 nM或1 pM) 或更低的範圍內。

【0203】 因此, 特異性/選擇性結合可能意味著, 使用相同的測量方法, 例如SPR, 結合單元 (或包含其的多肽) 以 10^{-5} 至 10^{-12} 莫耳/升或更低的KD值結合到TNF α 和/或IL-23, 並以高於 10^{-4} 莫耳/升的KD值結合到相關細胞因子。IL-23的相關細胞因子的例子是IL-12, 因為它與IL-23共有p40次單元。TNF α 的相關細胞因子的例子是TNF超家族成員FASL、TNF β 、LIGHT、TL-1A、RANKL。因此, 在本技術的一個實施例中, 包含在所述多肽中的至少一個ISVD以 10^{-5} 至 10^{-12} 莫耳/升或更低的KD值結合到 (人類) TNF α , 並以高於 10^{-4} 莫耳/升的KD值結合到同一物種的FASL、TNF β 、LIGHT、TL-1A、RANKL, 並且包含在所述多肽中的至少兩個ISVD以 10^{-5} 至 10^{-12} 莫耳/升或更低的KD值結合到IL-23, 並以高於 10^{-4} 莫耳/升的KD值結合到同一物種的IL-12。

【0204】 因此, 與由SEQ ID NO: 1的胺基酸組成的多肽相比, 本技術的多肽對人類TNF α 和人類IL-23具有至少一半的結合親和力或至少相同的結合親和力, 其中結合親和力是使用相同方法 (諸如SPR) 測量的。

【0205】 特異性結合來自某個物種的某種目標並不排除結合單元也可以特異性地結合來自不同物種的類似目標。例如, 特異性結合人類TNF α 不排除結合單元或包含所述結合單元的多肽也可以特異性地結合來自食蟹猴的TNF α 。同樣, 例如, 特異性結合人類IL-23不排除結合單元或包含所述結合單元的多肽也可以特異性地結合來自食蟹猴 (「cyno」) 的IL-23。

【0206】 結合單元與其指定靶標的特異性結合可以以本身已知的任何合適方式來確定，所述方式包括例如Scatchard分析和/或競爭性結合測定，諸如放射免疫測定（RIA）、酵素免疫測定（EIA）和三明治競爭測定，以及它們在本領域中本身已知的不同變化態樣；以及本文提及的其他技術。

【0207】 如熟習此項技術者將清楚的，解離常數可以是實際的或表觀的解離常數。用於確定解離常數的方法對熟習此項技術者將是清楚的，並且例如包括以下提及的技術。在此方面，還將清楚的是，可能不可以測量高於 10^{-4} 莫耳/升或 10^{-3} 莫耳/升（例如， 10^{-2} 莫耳/升）的解離常數。視情況地，熟習此項技術者還將清楚的是，可以基於（實際或表觀）締合常數（ K_A ），借助關係式 $[K_D = 1/K_A]$ 來計算（實際或表觀）解離常數。

【0208】 可以經由本身已知的不同技術（諸如熟知的表面電漿共振（SPR）生物感測器技術）來測量兩個分子之間的分子相互作用的親和力（參見例如Ober等人 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559）。如本文所用，術語「表面電漿共振」是指一種光學現象，其允許通過檢測生物感測器矩陣內蛋白質濃度的改變來分析即時生物特異性相互作用，其中一個分子固定在生物感測器晶片上，並且另一個分子在流動條件下經過固定的分子，從而得到 $k_{\text{締合}}$ 、 $k_{\text{解離}}$ 測量值，並且因此得到 K_D （或 K_A ）值。例如，這可以使用熟知的BIAcore®系統（BIAcore International AB，一家GE Healthcare公司，烏普薩拉，瑞典和皮斯卡塔韋，新澤西州）進行。有關進一步說明，參見Jonsson等人（1993, Ann. Biol. Clin. 51: 19-26）、Jonsson等人（1991 Biotechniques 11: 620-627）、Johnson等人（1995, J. Mol. Recognit. 8: 125-131）和Johnson等人（1991, Anal. Biochem. 198: 268-277）。

【0209】 另一種熟知的確定生物分子相互作用的親和力的生物感測器技術是生物層干涉法（bio-layer Interferometry，BLI）（參見例如Abdiche等人 2008, Anal. Biochem. 377: 209-217）。如本文所用，術語「生物層干涉法」或「BLI」是指無標籤光學技術，其分析從兩個表面反射的光的干涉圖案：內部參考層（參考

光束)和生物感測器尖端上的固定蛋白質的層(信號光束)。結合到生物感測器尖端的分子數量的變化會導致干涉圖案的偏移,報告為波長偏移(nm),其幅度是結合到生物感測器尖端表面的分子數量的直接量度。由於可以即時測量相互作用,因此可以確定締合和解離速率和親和力。例如,BLI可以使用熟知的Octet®系統(ForteBio,Pall Life Sciences的分公司,門洛派克,美國)來進行。

【0210】 可替代地,可以使用KinExA®平臺(Sapidyne Instruments Inc,博伊西,美國),在動力學排斥測定法(KinExA)中測量親和力(參見例如Drake等人2004,Anal. Biochem.,328:35-43)。如本文所用,術語「KinExA」是指測量未修飾分子的真實平衡結合親和力和動力學的基於溶液的方法。使抗體/抗原複合物的平衡溶液通過具有用抗原(或抗體)預包被的珠的柱,從而允許游離的抗體(或抗原)與被包被的分子結合。用結合抗體(或抗原)的螢光標記的蛋白完成了對如此捕獲的抗體(或抗原)的檢測。

【0211】 GYROLAB®免疫測定系統為自動化生物分析和快速樣品周轉提供了平臺(Fraley等人2013,Bioanalysis 5:1765-74)。

【0212】 5.3 (體內)半衰期延長

【0213】 所述多肽可以進一步包含視情況地經由一個或多個肽連接子連接的一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元,其中與沒有所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元的相應多肽相比,所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元提供具有增加的(體內)半衰期的多肽。體內半衰期延長意指,例如,所述多肽在投予後在哺乳動物(諸如人受試者)中具有增加的半衰期。半衰期可以表示為例如 $t_{1/2\beta}$ 。

【0214】 基團、殘基、部分或結合單元的類型通常不受限制,並且可以例如選自聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可以結合血清蛋白的結合單元、Fc部分,以及可以結合血清蛋白的小型蛋白或肽。

【0215】更特言之，提供具有增加的半衰期的多肽的所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元可以選自可以結合血清白蛋白（諸如人類血清白蛋白）或血清免疫球蛋白（諸如IgG）的結合單元。在一個實施例中，提供具有增加的半衰期的多肽的所述一個或多個其他基團、殘基、部分或結合單元是可以結合人類血清白蛋白的結合單元。在一個實施例中，結合單元是ISVD。

【0216】例如，WO 2004/041865描述了與血清白蛋白（並且特別是針對人類血清白蛋白）結合的ISVD，其可以與其他蛋白質（諸如與所需目標結合的一個或多個其他ISVD）連接，以增加所述蛋白質的半衰期。

【0217】國際申請WO 2006/122787描述了針對（人類）血清白蛋白的多種ISVD。這些ISVD包括稱為Alb-1的ISVD（WO 2006/122787中的SEQ ID NO: 52）及其人類化變異體，諸如Alb-8（WO 2006/122787中的SEQ ID NO: 62）。同樣，這些可以用於延長治療性蛋白質和多肽以及其他治療性實體或部分的半衰期。

【0218】此外，WO 2012/175400描述了Alb-1的進一步改進的形式，稱為Alb-23。

【0219】在一個實施例中，所述多肽包含選自Alb-1、Alb-3、Alb-4、Alb-5、Alb-6、Alb-7、Alb-8、Alb-9、Alb-10（WO 2006/122787）和Alb-23的血清白蛋白結合部分。在一個實施例中，血清白蛋白結合部分是Alb-8或Alb-23或其變異體，如WO 2012/175400的第7-9頁所示。在一個實施例中，血清白蛋白結合部分選自WO 2012/175741、WO 2015/173325、WO 2017/080850、WO 2017/085172、WO 2018/104444、WO 2018/134235和WO 2018/134234中所述的白蛋白結合劑。表A-4也示出了一些血清白蛋白結合劑。在一個實施例中，本技術多肽的另一組分如以下項目D所述：

D. 與人類血清白蛋白結合的ISVD並包含

- i. CDR1，其為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 8具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；
- ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 12具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 16具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0220】 在一個實施例中，所述ISVD包含為SEQ ID NO: 8的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 12的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 16的胺基酸序列的CDR3。

【0221】 這種與人類血清白蛋白結合的ISVD的實施例，係具有如表A-2中針對構築體ALB23002所指示的一個或多個或所有架構區（除了在先前項目D中定義的CDR之外）。在一個實施例中，其是包含構築體ALB23002（SEQ ID NO: 4，參見表A-1和A-2）的完整胺基酸序列或由其組成的ISVD。

【0222】 也可以使用Kabat定義將項目D描述為：

D'.與人類血清白蛋白結合的ISVD並包含

i. CDR1，其為SEQ ID NO: 124的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 124具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，其為SEQ ID NO: 132的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 132具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為SEQ ID NO: 140的胺基酸序列或者與SEQ ID NO: 140具有2或1個胺基酸差異的胺基酸序列。

【0223】 在一個實施例中，所述ISVD包含為SEQ ID NO: 124的胺基酸序列的CDR1、為SEQ ID NO: 132的胺基酸序列的CDR2和為SEQ ID NO: 140的胺基酸序列的CDR3。

【0224】 這種與人類血清白蛋白結合的ISVD的實施例，係具有如表A-2.1中針對構築體ALB23002所指示的一個或多個或所有架構區（除了在先前項目D'中定義的CDR之外）。在一個實施例中，其是包含構築體ALB23002（SEQ ID NO: 4，參見表A-1和A-2.1）的完整胺基酸序列或由其組成的ISVD。

【0225】 在另一個實施例中，與人類血清白蛋白結合的ISVD的胺基酸序列也可以具有與SEQ ID NO: 4高於90%，諸如高於95%或高於99%的序列同一性，其中

CDR如先前項目D或D'所定義。在一個實施例中，與人類血清白蛋白結合的ISVD包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列或由其組成。

【0226】 當這種與人類血清白蛋白結合的ISVD在至少一個CDR中相對於對應參考CDR序列（以上項目D或D'）具有2個或1個胺基酸差異時，與構築體ALB23002（SEQ ID NO: 4）相比，ISVD對人類血清白蛋白具有至少一半的結合親和力，或至少相同的結合親和力，其中結合親和力是使用相同的方法（諸如SPR）測量的。

【0227】 在一個實施例中，當這種與人類血清白蛋白結合的ISVD具有C端位置時，其表現出C端延伸，諸如C端丙胺酸（A）或甘胺酸（G）延伸。在一個實施例中，這種ISVD選自SEQ ID NO: 33、34、36、38、39、40、41、42、43和45（參見下表A-4）。在另一個實施例中，與人類血清白蛋白結合的ISVD具有不同於C端位置的另一個位置（即不是本技術的多肽的C端ISVD）。在一個實施例中，這種ISVD選自SEQ ID NO: 4、31、32、35和37（參見下表A-4）。

【0228】 5.4 核酸分子

【0229】 本文還提供了編碼本技術的多肽的核酸分子。

【0230】 「核酸分子」（可與「核酸」互換使用）是經由磷酸酯主鏈彼此連接以形成核苷酸序列的核苷酸單體的鏈。核酸可以用於轉化/轉染宿主細胞或宿主生物體，例如用於多肽的表現和/或生產。用於生產目的的合適的宿主或宿主細胞對熟習此項技術者將是清楚的，並且可以例如是任何合適的真菌、原核或真核細胞或細胞株或任何合適的真菌、原核或真核生物體。包含編碼本技術多肽的核酸的宿主或宿主細胞也被本技術涵蓋。

【0231】 核酸可以是例如DNA、RNA或其雜合體，並且還可以包含（例如化學地）修飾的核苷酸，如PNA。其可以是單鏈或雙鏈的。在一個實施例中，其為雙鏈DNA的形式。例如，本技術的核苷酸序列可以是基因組DNA、cDNA。

【0232】 本技術的核酸可以以本身已知的方式製備或獲得，和/或可以從合適的天然來源中分離。編碼天然存在的（多）肽的核苷酸序列可以例如進行定點誘變，以便提供編碼具有序列變異的多肽的核酸分子。同樣，如熟習此項技術者將清楚的，為了製備核酸，也可以以合適的方式將數個核苷酸序列，諸如至少一個編碼靶向部分的核苷酸序列和例如編碼一個或多個連接子的核酸連接在一起。

【0233】 用於產生核酸的技術對熟習此項技術者將是清楚的，並且可以例如包括但不限於自動化DNA合成；定點誘變；組合兩個或更多個天然存在的和/或合成的序列（或其兩個或更多個部分），引入導致截短的表現產物表現的突變；引入一個或多個限制性位點（例如，以產生可能易於使用合適的限制性酶消化和/或連接的匣和/或區域），和/或借助使用一個或多個「錯配」引物的PCR反應引入突變。

【0234】 5.5 載體

【0235】 本文還提供了包含編碼本技術多肽的核酸分子的載體。如本文所用的載體是適用於將遺傳物質攜帶到細胞中的媒劑。載體包括裸核酸，諸如質粒或mRNA，或嵌入到更大結構諸如脂質體或病毒載體中的核酸。

【0236】 在一些實施例中，載體包含至少一種核酸，其視情況地連接到一個或多個調節元件，例如像一個或多個合適的啟動子、增強子、終止子等。在一個實施例中，載體是表現載體，即適用於在合適的條件下（例如當所述載體被引入（例如人）細胞中時）表現編碼的多肽或構築體的載體。基於DNA的載體包括用於轉錄（例如啟動子和多聚腺苷酸信號）和翻譯（例如Kozak序列）的元件的存在。

【0237】 在一個實施例中，在載體中，所述至少一種核酸和所述調節元件彼此「可操作地連接」，這通常意指它們彼此之間具有功能關係。例如，如果啟動子能夠啟動或以其他方式控制/調節編碼序列的轉錄和/或表現，則所述啟動子被

認為與編碼序列「可操作地連接」（其中，所述編碼序列應理解為「在所述啟動子的控制下」）。通常，當兩個核苷酸序列可操作地連接時，它們將取向相同，並且通常也處於同一閱讀框中。它們通常也基本上是連續的，儘管這也可能不是必需的。

【0238】 在一個實施例中，載體的任何調節元件使得它們能夠在預期的宿主細胞或宿主生物體中提供其預期的生物學功能。

【0239】 例如，啟動子、增強子或終止子在預期的宿主細胞或宿主生物體中應是「可操作的」，這意味著例如所述啟動子應能夠啟動或以其他方式控制/調節與其可操作地連接的核苷酸序列（例如編碼序列）的轉錄和/或表現。

【0240】 5.6 組成物

【0241】 本技術還提供了組成物，其包含至少一種本技術的多肽、至少一種編碼本技術多肽的核酸分子或至少一種包含這種核酸分子的載體。所述組成物可以是醫藥組成物。所述組成物可以進一步包含至少一種醫藥上可接受的載劑、稀釋劑或賦形劑和/或佐劑，並且視情況地包含一種或多種其他醫藥活性多肽和/或化合物。

【0242】 5.7 宿主生物體

【0243】 本技術還涉及宿主細胞或宿主生物體，其包含本技術的多肽、編碼本技術多肽的核酸，和/或包含編碼本技術多肽的核酸分子的載體。

【0244】 合適的宿主細胞或宿主生物體對熟習此項技術者是清楚的，並且是例如任何合適的真菌、原核或真核細胞或細胞株或任何合適的真菌、原核或真核生物體。具體例子包括HEK293細胞、CHO細胞、大腸桿菌（*Escherichia coli*）或巴斯德畢赤酵母（*Pichia pastoris*）。在一個實施例中，宿主是巴斯德畢赤酵母。

【0245】 5.8 所述多肽的方法和用途

【0246】 本技術還提供了用於產生本技術多肽的方法。所述方法可以包括用編碼所述多肽的核酸轉化/轉染宿主細胞或宿主生物體，在宿主中表現所述多肽，視情況地隨後進行一個或多個分離和/或純化步驟。特言之，所述方法可以包括：

a) 在合適的宿主細胞或宿主生物體或另一合適的表現系統中，表現編碼所述多肽的核酸序列；視情況地隨後進行：

b) 分離和/或純化所述多肽。

【0247】 用於生產目的的合適的宿主細胞或宿主生物體對熟習此項技術者將是清楚的，並且可以例如是任何合適的真菌、原核或真核細胞或細胞株或任何合適的真菌、原核或真核生物體。具體例子包括HEK293細胞、CHO細胞、大腸桿菌或巴斯德畢赤酵母。在一個實施例中，宿主是巴斯德畢赤酵母。

【0248】 本技術的多肽、如所述的核酸分子或載體，或者包含本技術多肽、核酸分子或載體的組成物可用作藥物。

【0249】 因此，本技術提供了用作藥物的本技術的多肽、如所述的核酸分子或載體，或者包含本技術多肽、核酸分子或載體的組成物。

【0250】 本文還提供了本技術的多肽、如所述的核酸分子或載體，或者包含本技術多肽、核酸分子或載體的組成物，用於（預防性和/或治療性）治療。

【0251】 本文還提供了本技術的多肽、如所述的核酸分子或載體，或者包含本技術的多肽、核酸分子或載體的組成物，用於（預防性和/或治療性）治療自體免疫性或發炎性疾病。

【0252】 本文還提供了本技術的多肽、如所述的核酸分子或載體，或者包含本技術的多肽、核酸分子或載體的組成物，用於（預防性和/或治療性）治療發炎性腸病（諸如克隆氏症和潰瘍性結腸炎）、乾癬、乾癬性關節炎和化膿性汗腺炎。

【0253】 本文進一步提供了治療自體免疫性或發炎性疾病的（預防性和/或治療性）方法，其中所述方法包括向有需要的受試者投予醫藥活性量的本技術的多

肽、如所述的核酸分子或載體，或者包含本技術的多肽、核酸分子或載體的組成物。

【0254】 本文進一步提供了治療發炎性腸病（諸如克隆氏症和潰瘍性結腸炎）、乾癬、乾癬性關節炎和化膿性汗腺炎的（預防性和/或治療性）方法，其中所述方法包括向有需要的受試者投予醫藥活性量的本技術的多肽、如所述的核酸分子或載體，或者包含本技術的多肽、核酸分子或載體的組成物。

【0255】 本文進一步提供了本技術的多肽、如所述的核酸分子或載體，或者包含所述多肽、核酸分子或載體的組成物在製備用於治療自體免疫性或發炎性疾病的醫藥組成物方面的用途。

【0256】 本文進一步提供了本技術的多肽、如所述的核酸分子或載體、或者包含所述多肽、核酸分子或載體的組成物在製備用於治療發炎性腸病（諸如克隆氏症和潰瘍性結腸炎）、乾癬、乾癬性關節炎或化膿性汗腺炎的醫藥組成物方面的用途。

【0257】 發炎性腸病可以例如是克隆氏症或潰瘍性結腸炎。

【0258】 在本技術的上下文中提及的「受試者」可以是任何動物。在一個實施例中，受試者是哺乳動物。在哺乳動物之間，可以區分人類與非人類哺乳動物。非人動物可以是例如陪伴動物（例如狗、貓）、家畜（例如牛、馬、綿羊、山羊或豬動物），或通常用於研究目的和/或用於產生抗體的動物（例如小鼠、大鼠、兔、貓、狗、山羊、綿羊、馬、豬、非人類靈長類動物（諸如食蟹猴）或駱駝科動物（諸如駱馬或羊駝）。

【0259】 在預防和/或治療目的的情況下，受試者可以是任何動物，並且更特言之是任何哺乳動物。在一個實施例中，受試者是人類受試者。

【0260】 包括多肽、核酸分子和載體、或組成物的物質，可以通過任何合適的投予途徑投予受試者，例如通過腸內（諸如口服或直腸）或腸胃外（諸如表皮、舌下、頰、鼻、關節內、皮內、肌內、腹膜內、靜脈內、皮下、經皮或經粘膜）

授予。在一個實施例中，物質通過腸胃外授予（諸如肌內、皮下或皮內授予）來授予。在一個實施例中，使用皮下授予。

【0261】 可以將有效量的多肽、如所述的核酸分子或載體，或者包含所述多肽、核酸分子或載體的組成物授予受試者，以便提供預期的治療結果。

【0262】 可以授予一個或多個劑量。如果授予多於一個劑量，則可以合適的間隔授予所述劑量，以便最大化所述多肽、組成物、核酸分子或載體的作用。

【0263】 表A-1：在四價多肽F027500069內鑒定的不同單價V_{HH}構建單元

(building blocks) 的胺基酸序列（「ID」是指如本文所用的SEQ ID NO）

名稱	ID	胺基酸序列
6C11	2	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQ APGKGREFVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRPEDTALYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVT VSS
119A03/1	3	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLL TIAWYRQAPGKQREL VATIESGSR TN YADSVKGRFTISRDN SKKT VY LQMNSLRPEDTALYYCQTSGSGSPNFWGQGLTV TVSS
ALB23002	4	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQ APGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
81A12	5	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTLSSYAMGWFRQ APGKEREFVARISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRPEDTALYYCAKDPSPYYRGSAYLLSGSYDSWG QGLTVKVSS

【0264】 表A-2：根據AbM編號的CDR和架構的序列（「ID」是指給定的SEQ ID NO）

ID	V _{HH}	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
2	6C11	18	DVQLV ESGGGV VQPGGS LRLSCT AS	6	GFTFSTA DMG	20	WFR QAP GKG REF VA	10	RISG IDGT TY	24	YDEPVKGR FTISRDN SK NTVYLQM NSLRPEDT ALYYCRS	14	PRYA DQW SAYD Y	28	WGQG TLVT VSS
3	119A03/1	19	EVQLVE SGGGV VQPGGS LRLSCA AS	7	GRIFSLPA SGNIFNL LTIA	21	WY RQA PGK QRE LVA	11	TIES GSR TN	25	YADSVKG RFTISRDN S KKT VY LQ MNSLRPED TALYYCQT	15	SGSG SPNF	28	WGQG TLVT VSS
4	ALB23002	19	EVQLVE SGGGV VQPGGS LRLSCA	8	GFTFRSF GMS	22	WV RQA PGK GPE	12	SISG SGS DTL	26	YADSVKG RFTISRDN S KNTLYLQ MNSLRPED	16	GGSL SR	29	SSQGT LTV SS

ID	V _{HH}	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
			AS				WVS				TALYYCTI				
5	81A12	19	EVQLVE SGGGV VQPGGS LRLSCA AS	9	GRTLSSY AMG	23	WFR QAP GKE REF VA	13	RISQ GGT AIY	27	YADSVKG RFTISR DNS KNTVYLQ MNSLRPED TALYYCA K	17	DPSP YYRG SAYL LSGS YDS	30	WGQG TLVK VSS

【0265】表A-2.1：根據Kabat編號的CDR和架構的序列（「ID」是指給定的SEQ ID NO）

ID	V _{HH}	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4
2	6C11	118	DVQLV ESGGG VVQPG GSLRL SCTAS GFTFS	122	TADM G	126	WFR QAP GKG REF VA	130	RISGIDG TTYDEP VKG	134	RFTISR DNSKN TVYLQ MNSLR PEDTA LYYCR S	138	PRYA DQW SAYD Y	142	WGQ GTLV TVSS
3	119A03/ 1	119	EVQLV ESGGG VVQPG GSLRL SCAAS GRIFS	123	LPASG NIFNL LTIA	127	WY RQA PGK QRE LVA	131	TIESGSR TNYADS VKG	135	RFTISR DNSKK TVYLQ MNSLR PEDTA LYYCQ T	139	SGSG SPNF	143	WGQ GTLV TVSS
4	ALB230 02	120	EVQLV ESGGG VVQPG GSLRL SCAAS GFTFR	124	SFGMS	128	WV RQA PGK GPE WVS	132	SISGSGS DTLYAD SVKG	136	RFTISR DNSKN TLYLQ MNSLR PEDTA LYYCT I	140	GGSL SR	144	SSQG TLVT VSS
5	81A12	121	EVQLV ESGGG VVQPG GSLRL SCAAS GRTLS	125	SYAM G	129	WFR QAP GKE REF VA	133	RISQGGT AIYYADS VKG	137	RFTISR DNSKN TVYLQ MNSLR PEDTA LYYCA K	141	DPSP YYRG SAYL LSGS YDS	145	WGQ GTLV KVSS

【0266】表A-3：選定的多價多肽的胺基酸序列（「ID」是指給定的SEQ ID NO）

名稱	ID	胺基酸序列
----	----	-------

名稱	ID	胺基酸序列
F0275000 69	1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFTFSTADMGWFRQAPGKGR EFVARISGIDGTTYDEPVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTA LYYCRSPRYADQWSAYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGVVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQAPGKQR ELVATIESGSRTNYADSVKGRFTISRDNKKTIVYLQMNSLRPEDTAL YYCQTSGSGSPNFWGQGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVV QPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSS QGLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRT LSSYAMGWFRQAPGKEREFVARISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAKDPSPYYRGSAYLLSGSYDSWGO GTLVKVSSA

【0267】表A-4：結合血清白蛋白的ISVD序列(「ID」是指如本文所用的SEQ ID NO)

名稱	ID	胺基酸序列
Alb8	31	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN LRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSS
Alb23	32	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN LRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSS
Alb129	33	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN LRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSSA
Alb132	34	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN LRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSSA
Alb11	35	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN LRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSS
Alb11 (S112K)-A	36	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN LRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLVKVSSA
Alb82	37	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN LRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSS
Alb82-A	38	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN LRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSSA
Alb82-AA	39	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN LRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSSAA
Alb82-AAA	40	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN LRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSSAAA
Alb82-G	41	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN LRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSSG

Alb82-GG	42	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRPDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGG
Alb82-GGG	43	EVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRPDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG
Alb23002	4	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRPDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb223	45	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRPDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

【0268】 表A-5：連接子序列（「ID」是指如本文所用的SEQ ID NO）

名稱	ID	胺基酸序列
3A連接子	46	AAA
5GS連接子	47	GGGGS
7GS連接子	48	SGGSGGS
8GS連接子	49	GGGSGGS
9GS連接子	50	GGGSGGGGS
10GS連接子	51	GGGSGGGGS
15GS連接子	52	GGGSGGGGSGGGGS
18GS連接子	53	GGGSGGGGSGGGGSGGS
20GS連接子	54	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
25GS連接子	55	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30GS連接子	56	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
35GS連接子	57	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
40GS連接子	58	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
G1鉸鏈	59	EPKSCDKTHTCPPCP
9GS-G1鉸鏈	60	GGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
駱馬上部 長鉸鏈區	61	EPKTPKPQAAA
G3鉸鏈	62	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC PEPKSCDTPPPCPRC

【0269】 實例

【0270】 實例1：多特異性ISVD構築體的生成

【0271】 與TNF α 和IL-23結合的含ISVD的多肽F027500069（SEQ ID NO: 1）的鑒定，係源於一項資料驅動的多特異性工程化和格式化活動，其中包括基於以下的構建單元（building blocks）：抗TNF α V_{HH}構建單元（building blocks）（TNF06C11（WO 2017/081320）、TNF01C02（WO 2015/173325，SEQ ID NO:

327) 和VHH#3E (WO 2004/041862, SEQ ID NO: 4))、抗IL-23p19 V_{HH}構建單元(building blocks)(23IL37D05、23IL119A03和23IL81A12(WO 2009/068627))和抗HSA V_{HH}構建單元 (building blocks) ALB23002 (WO 2017085172, SEQ ID NO: 10)。應用了構建單元 (building blocks) 的不同位置/取向和不同的連接子長度 (9GS對35GS)，並證明這些對於不同參數 (效力、交叉反應性、表現等) 是至關重要的。在這種情況下，效力是指如實例6中測定的對TNF α 誘導的NF κ B體外活化的抑制，和如實例7和8中測定的對IL-23誘發的mIL-22離體產生的抑制以及對IL-23誘發的SIE啟動子體外活化的抑制。

【0272】 在巴斯德畢赤酵母中轉化包含38種構築體的組 (表1) 用於小規模生產。通過逐步添加甲醇來誘導ISVD構築體表現。將具有分泌的ISVD構築體的澄清培養基用作起始材料，用於經由蛋白A親和色譜法純化，隨後進行脫鹽。純化的樣品用於功能表徵和表現評價。

【0273】 一些構築體顯示出受損的效力，這取決於連接子長度和ISVD構建單元 (building blocks) 的相對位置。例如：當與短的9GS連接子連接時，二價VHH # 3E對食蟹猴TNF α 的效力顯著受損。另一個例子是，抗IL-23 ISVD構建單元 (building blocks) 37D05在多特異性構築體中的位置對於獲得最大效力是至關重要的。

【0274】 表1：所評價之38種不同多特異性ISVD格式的列表。BB = 構建單元 (building blocks)，ALB = ALB23002。

構築體ID	BB1	連接子1	BB2	連接子2	BB3	連接子3	BB4	連接子4	BB5
F027500001	37D05	35GS	ALB	35GS	6C11				
F027500002	6C11	35GS	ALB	35GS	37D05				
F027500003	37D05	35GS	6C11	35GS	ALB				
F027500004	6C11	35GS	37D05	35GS	ALB				
F027500005	6C11	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12		
F027500006	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	6C11		
F027500007	37D05	35GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02		
F027500008	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02	35GS	37D05		
F027500009	37D05	35GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E		
F027500010	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	35GS	37D05		
F027500011	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	1C02	30GS	1C02
F027500012	1C02	30GS	1C02	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12

F027500013	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	VHH#3E	9GS	VHH#3E
F027500014	VHH#3E	9GS	VHH#3E	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12
F027500063	6C11	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12		
F027500064	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	6C11		
F027500069	6C11	9GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12		
F027500070	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	9GS	6C11		
F027500073	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	1C02	35GS	1C02
F027500074	1C02	35GS	1C02	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12
F027500075	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	VHH#3E	9GS	VHH#3E
F027500076	VHH#3E	9GS	VHH#3E	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12
F027500077	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	9GS	1C02	35GS	1C02
F027500078	1C02	35GS	1C02	9GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12
F027500079	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	9GS	VHH#3E	9GS	VHH#3E
F027500080	VHH#3E	9GS	VHH#3E	9GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12
F027500082	119A03/1	35GS	81A12	9GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02
F027500083	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	9GS	119A03/1	35GS	81A12
F027500084	119A03/1	35GS	81A12	9GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E
F027500085	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02	35GS	119A03/1	35GS	81A12
F027500086	119A03/1	35GS	81A12	35GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02
F027500087	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E	35GS	119A03/1	35GS	81A12
F027500088	119A03/1	35GS	81A12	35GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E
F027500093	37D05	9GS	ALB	9GS	6C11				
F027500094	37D05	9GS	6C11	9GS	ALB				
F027500095	37D05	9GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02		
F027500096	37D05	9GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E		

【0275】隨後，將大組縮減成4種多特異性構築體的組，所述組由ISVD構築體F027500069、F027500093、F027500095和F027500096組成，已基於初步產量估計證明所述ISVD構築體對兩種目標（人類和食蟹猴）均有效，並具有高表現水準的潛力。

【0276】在巴斯德畢赤酵母中進行了較大規模的2L生產，以進行表現產量確定並評估生物物理特性和預先存在的抗體反應性。表2顯示，為了在巴斯德畢赤酵母中獲得高表現水準，需要構建單元（building blocks）的特定取向。從5 ml培養物中獲得的具有相同構建單元（building blocks），但取向不同且連接子長度不同的4種格式化ISVD構築體的表現產量清楚地表明，ISVD 6C11需要N端位置才能良好表現。這在F027500069和F027500070的2L發酵中得到了證實，其中具有N端6C11的ISVD構築體（F027500069）達到6.4 g/L的滴度，這是具有C端6C11的F027500070的3.2倍。

【0277】 表2：具有取向不同且連接子長度不同的構建單元（building blocks）

6C11、119A03/1和81A12的4種ISVD構築體的表現水準。

構築體 ID	BB1	連接子 1	BB2	連接子 2	BB3	連接子3	BB4	5 ml培養物的產量 (µg/ml)	2L發酵的產量 (g/L)
F027500063	6C11	35GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	129.0	
F027500064	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	35GS	6C11	81.7	
F027500069	6C11	9GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	165.2	6.4
F027500070	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12	9GS	6C11	104.6	2.0

【0278】 表3和實例9顯示，預先存在的抗體反應性，係受對應ISVD構築體的組成和效價驅動的。

【0279】 表3：相較於對照ISVD構築體F027301099和F027301186，存在於96個人類血清樣品中的預先存在的抗體與F027500069、F027500093、F027500095和F027500096的結合

構築體 ID	BB1	連接子1	BB2	連接子2	BB3	連接子3	BB4	連接子4	BB5	25%百分位數	中位RU水準	75%百分位數
F027301099	1B11	35GS	ALB	35GS	1B11	35GS	6C11			47	92	350
F027301186	1E07	35GS	1E07	35GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02	61	135	622
F027500069	6C11	9GS	119A03/1	9GS	ALB	9GS	81A12-A			-15	-8	5
F027500093	37D05	9GS	ALB	9GS	6C11-A					-12	-5	22
F027500095	37D05	9GS	1C02	9GS	ALB	9GS	1C02-A			0	7	22
F027500096	37D05	9GS	VHH#3E	9GS	ALB	9GS	VHH#3E-A			5	14	22

【0280】 最後，基於效力、減少的與預先存在的抗體的結合、較高表現水準和CMC特徵來選擇ISVD構築體F027500069，其在確定的緩衝液中在100 mg/mL濃度下的具有3.3 cP的低粘度，並且在146 mg/mL下具有6.4 cP的低粘度。

【0281】 實例2：多特異性ISVD構築體對TNF α 、IL-23和血清白蛋白的結合親和力

【0282】 F027500069對人和食蟹猴TNF α 、人類和食蟹猴IL-23以及人類和食蟹猴血清白蛋白的親和力(表示為平衡解離常數(K_D))在Gyrolab xP工作站(Gyros)上借助溶液內親和力測量來定量。

【0283】 在 K_D 控制的測量下,將連續稀釋的TNF α 或IL-23(範圍為1 μ M - 0.1 pM)或血清白蛋白(範圍為10 μ M - 1 pM)和固定量的F027500069(在TNF α 的情況下為50 pM,在IL-23的情況下為20 pM或12.5 pM,並且在血清白蛋白的情況下為1 nM)混合以進行相互作用,並培養24或48小時(在IL-23和TNF α 的情況下)或2小時(在血清白蛋白的情況下)以達到平衡。

【0284】 在受體控制的測量下,將連續稀釋的TNF α 或IL-23(範圍為1 μ M - 0.1 pM)或血清白蛋白(範圍為10 μ M - 1 pM)和固定量的F027500069(在TNF α 的情況下為5 nM,在IL-23的情況下為1.25 nM,並且在血清白蛋白的情況下為50 nM)混合以進行相互作用,並培養24或48小時(在IL-23和TNF α 的情況下)或2小時(在血清白蛋白的情況下)以達到平衡。

【0285】 生物素化的人類TNF α /IL-23/血清白蛋白被捕獲在Gyrolab Bioaffy 1000 CD的微結構中,其含有珠子管柱,並用作分子探針以從平衡溶液中捕獲游離F027500069。使TNF α /IL-23/血清白蛋白和F027500069的混合物(含有游離TNF α /IL-23/血清白蛋白、游離F027500069和TNF α /IL-23/血清白蛋白-F027500069複合物)流過所述珠,並捕獲與游離ISVD濃度成正比的小部分游離F027500069。然後注入螢光標記的抗V_{HH}抗體以標記任何捕獲的F027500069,並在沖洗掉過量的螢光探針後,確定螢光的變化。使用Gyrolab Analysis軟體完成稀釋系列的擬合,其中分析 K_D 控制和受體控制的曲線以確定 K_D 值。

【0286】 結果(表4)證明多特異性ISVD構築體以高親和力結合人類/食蟹猴IL-23和人類/食蟹猴TNF α 。

【0287】 表4：F027500069與人和食蟹猴IL-23、TNF α 和血清白蛋白的結合親和力

抗原	人類		食蟹猴		培養時間 (h)
	K _D (pM)	95% CI (pM)	K _D (pM)	95% CI (pM)	
IL-23	14.1	3.2 - 26.4	33.5	4.8 - 62.0	24
	28.1	17.0 - 39.0	51.2	22.1 - 80.1	48
TNF α	3.23	2.10 - 4.35	27.5	17.9 - 31.1	24
	3.39	1.53 - 5.26	18.6	12.9 - 24.4	48
SA	5900	5320 - 6480	10800	9010 - 12500	2

【0288】 實例3：多特異性ISVD構築體與膜結合TNF α 的結合

【0289】 使用流式細胞術在表現膜TNF α 的人HEK293H細胞上以及在從PBMC分離並用PMA和離子黴素刺激的活化CD4⁺細胞上，證實了F027500069與膜結合TNF α 的結合（顯示了表現TNF α 的HEK293H細胞的數據）。簡而言之，將細胞以 1×10^4 個細胞/孔的密度接種，並與從100 nM開始直至0.5 pM的F027500069稀釋系列在4°C下培養1小時。平行地，將細胞在接種之前用PBS中的4%多聚甲醛和0.1%戊二醛固定（以增加對膜結合TNF α 的檢測），並與ISVD稀釋系列在4°C下培養1小時或在室溫下培養24小時。將細胞洗滌3次，並且隨後與抗V_{HH} mAb在4°C下培養30分鐘，再次洗滌，並在4°C下與山羊抗小鼠PE標記的抗體培養30分鐘。將樣品洗滌並重懸於FACS緩衝液（含10% FBS和0.05%疊氮化鈉的D-PBS，補充有5 nM TOPRO3）中。然後在iQuescreener上分析細胞懸浮液。使用GraphPad Prism計算EC50值。在1小時培養後，對於活細胞和固定細胞，F027500069的EC50值在相同範圍內，但細胞的固定導致膜上TNF α 的表現水準更高（表5）。在24小時培養後，達到結合平衡，同時EC50提高6.6倍。

【0290】 表5：在1小時或24小時的培養時間後，F027500069與膜表現TNF α 的結合親和力

	T = 1h活細胞	T = 1h固定細胞	T = 24h固定細胞
分析物	EC50 (M)	EC50 (M)	EC50 (M)
F027500069	6.93E-10	8.11E-10	1.22E-10

【0291】 實例4：多特異性ISVD構築體選擇性地結合TNF α 和IL-23

【0292】經由SPR評估與TNF α 和IL-23相關的人類細胞因子結合的缺乏。測試了hIL-12，因為它與IL-23共有p40次單元。TNF超家族成員人類FASL、TNF β 、LIGHT、TL-1A、RANKL被測試為TNF α 的相關細胞因子。

【0293】使用胺偶聯將目標以10 μ g/mL固定600秒，且進行EDC/NHS的420秒注射用於活化，並且進行1 M乙醇胺HCl的420秒注射用於失活（Sierra感測器胺偶聯試劑盒II目錄號ACK-001-025）。將活化、失活和配體注入過程中的流速設置為10 μ l/min。通過從每種配體的pI減去約1.5來選擇10 mM乙酸鹽固定緩衝液的pH。

【0294】接下來，將1 μ M F027500069注入2分鐘，並以45 μ L/min的流速解離900s。使用1 x HBS-EP+ pH7.4作為運行緩衝液。作為陽性對照，注射了0.2 μ M α -huIL-12 Ab和0.5 μ M α -huFASL Ab、0.5 μ M α -huTNF β Ab、0.5 μ M α -huLIGHT Ab、0.5 μ M α -huTL-1A Ab和0.5 μ M α -huRANKL V_{HH}。F027500069和陽性對照與固定目標之間的相互作用通過檢測由於結合後晶片品質變化而發生的折射率增加來測量。

【0295】所有陽性對照均與各自的目標結合。未檢測到F027500069與人類IL-12、FASL、TNF β 、LIGHT、TL-1A、RANKL的結合。

【0296】 實例5：多特异性ISVD構築體與hIL-23和hTNF α 的同時結合

【0297】使用ProteOn XPR36裝置來確定F027500069是否可以同時與hTNF α 和hIL-23結合。為此，經由胺偶聯將HSA固定在GLC ProteOn感測器晶片上。將100 nM F027500069以10 μ l/min在HSA表面上注射2分鐘，以便經由ALB23002構建單元(building blocks)捕獲ISVD。隨後以10 μ l/min的流速注射100 nM hIL-23、hTNF α 或hOX40L或者100 nM IL-23 + 100 nM TNF α 、100 nM IL-23 + 100 nM OX40L或100 nM TNF α + 100 nM IL-13的混合物2分鐘，隨後進行後續600秒的解離步驟。通過將HCl (100 mM) 以45 μ l/min注射2分鐘來使HSA表面再生。傳感圖(圖1)表明，F027500069可以同時結合人類IL-23和人類TNF α ，如反應單位的增加所示：從僅TNF α 增加約500 RU，從僅IL-23增加約880 RU，並且對於IL-23和TNF α 混合

物增加約1300 RU。

【0298】 實例6：多特異性ISVD構築體對TNF α 誘導的NF κ B活化的體外抑制

【0299】 HEK293_NF κ B-NLucP細胞是表現TNF受體的細胞，其已用編碼在NF κ B依賴性啟動子控制下的Nano螢光素酶的報告子構築體穩定轉染。將細胞與可溶性人類和食蟹猴TNF α 一起培養導致NF κ B介導的Nano螢光素酶基因表現。使用添加到細胞上的以1：50比率與裂解緩衝液混合的Nano-Glo螢光素酶底物來測量Nano螢光素酶發光。將樣品在振盪器上混合5分鐘以獲得完全裂解。

【0300】 將Glo response™ HEK293_NF κ B-NLucP細胞以20000個細胞/孔接種在白色組織培養（TC）處理的具有透明底部的96孔板中的正常生長培養基中。將F027500069或參考化合物（抗TNF α 參考mAb）的稀釋系列添加到25 pM人類或70 pM 食蟹猴TNF α 中，並在30 μ M HSA存在下於37°C下與細胞培養5小時。

【0301】 F027500069以濃度依賴性方式抑制人和食蟹猴TNF α 誘導的NF κ B活化，其IC₅₀為38.8 pM（對於人類TNF α ）和128 pM（對於食蟹猴TNF α ），與抗TNF α 參考mAb相當（表6，圖2）。

【0302】 表6：相比於參考化合物抗hTNF α 參考mAb，在Glo response™ HEK293_NF κ B-NLucP報告物測定法中，F027500069介導的人和食蟹猴TNF α 中和的IC₅₀值

抗原	F02750069		抗hTNF α 參考mAb	
	人類TNF α	食蟹猴TNF α	人類TNF α	食蟹猴TNF α
NF κ B測定法IC ₅₀ (M)	3.88E-11	1.28E-10	5.74E-11	7.00E-11

【0303】 實例7：多特異性ISVD構築體對IL-23誘發的mIL-22產生的離體抑制

【0304】 人類(和食蟹猴)IL-23刺激小鼠脾細胞分泌mIL-17和mIL-22(Aggarwal等人 2003, J. Biol. Chem. 278(3): 1910-4)。已經證明F027500069離體阻斷IL-23誘發的mIL-22表現。去除5隻C57BL/6小鼠的脾臟，收集脾細胞並製備單細胞懸液。在20 ng/ml重組mIL-2的存在下培養細胞，並以400 000個細胞/孔接種在96孔

平底板中。將F027500069或參考化合物（抗hIL-23參考mAb1和抗hIL-23參考mAb2）的系列稀釋液與重組hIL-23（36 pM）或來自食蟹猴的重組IL-23（36 pM）在培養基中於室溫下預先孵育30分鐘，並且然後在30 μ M HSA存在下於37°C下與脾細胞再孵育3天。收集上清液並使用ELISA測量mIL-22的水準。

【0305】 表7中顯示的結果表明F027500069以濃度依賴性方式抑制hIL-23和食蟹猴IL-23誘發的mIL-22產生，其IC₅₀為43 pM（對於人類IL-23）和31 pM（對於食蟹猴IL-23）。所述抑制作用比參考化合物抗hIL-23參考mAb1和抗hIL-23參考mAb2的抑制作用更強。

【0306】 實例8：多特異性ISVD構築體對IL-23誘發的SIE啟動子活化的體外抑制

【0307】 用含有在SIE反應啟動子控制下的螢光素酶基因的報告物構築體穩定轉染Glo response™ HEK293_人類IL-23R/IL-12Rb1-Luc2P細胞。另外，這些細胞組成性地過表現人類IL-23受體的兩個次單元，即IL-12Rb1和IL-23R。當IL-23觸發這些細胞時，表現螢光素酶報告蛋白，通過添加底物5'-氟螢光素（Bio-Glo™ 螢光素酶測定系統）基於其酶促活性進行定量。

【0308】 將細胞在正常生長培養基中培養，並以15000個細胞/孔接種在白色組織培養處理的具有透明底部的96孔板中。將F027500069或參考化合物（抗hIL-23參考mAb1和抗hIL-23參考mAb2）的系列稀釋液添加到細胞中，隨後添加重組hIL-23（10 pM）或食蟹猴IL-23（40 pM）。在30 μ M HSA的存在下，將細胞於37°C下孵育4小時15分鐘。隨後，將Bio-Glo添加到每個孔中的細胞上，並測量螢光素酶發光。F027500069抑制人類和食蟹猴IL-23依賴性信號傳導，其IC₅₀分別為250 pM和323 pM（表7和圖3）。

【0309】 表7：相較於參考化合物抗hIL-23參考mAb1和抗hIL-23參考mAb2，在小鼠脾細胞測定法和Glo response™ HEK293_人類IL-23R/IL-12Rb1-Luc2P報告物測定法中，F027500069介導的人類和食蟹猴IL-23中和的IC₅₀值。

	F02750069	抗hIL-23參考	抗hIL-23參考
--	-----------	-----------	-----------

抗原			mAb1		mAb2	
	人類IL-23	食蟹猴IL-23	人類IL-23	食蟹猴IL-23	人類IL-23	食蟹猴IL-23
小鼠脾細胞測定法 IC50 (M)	4.34E-11	3.07E-11	1.55E-10	7.95E-10	6.80E-10	4.95E-09
IL-23報告物測定法 IC50 (M)	2.50E-10	3.23E-10	3.23E-10	5.73E-10	5.41E-10	7.21E-10

【0310】 實例9：多特異性ISVD構築體與預先存在的抗體的結合

【0311】 使用ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 在正常人類血清 (n=96) 中評估了ISVD構築體F027500069的預先存在的抗體反應性。將PBS/Tween (磷酸鹽緩衝鹽水, pH 7.4, 0.005% Tween20) 用作運行緩衝液, 並且在25°C下進行實驗。

【0312】 經由ALB23002構建單元 (building blocks) 與固定在晶片上的HSA的結合, 在晶片上捕獲ISVD。為了固定HSA, 用EDC/NHS (流速30 μ l/min) 活化ProteOn GLC感測器晶片的配體泳道, 並將HSA以100 μ l/ml注入pH 4.5的ProteOn醋酸鹽緩衝液中, 以實現大約3200 RU的固定水準。在固定後, 用乙醇胺HCl (流速30 μ l/min) 使表面失活。

【0313】 隨後, 將ISVD構築體以45 μ l/min在HSA表面上注射2分鐘, 以實現大約800 RU的ISVD捕獲水準。將含有預先存在的抗體的樣品以14,000 rpm離心2分鐘, 並將上清液在PBS-Tween20 (0.005%) 中以1:10稀釋, 然後以45 μ l/min注射2分鐘, 隨後進行後續400秒的解離步驟。在每個迴圈後 (即在新的ISVD捕獲和血液樣品注射步驟之前), 通過將HCl (100 mM) 以45 μ l/min注射2分鐘使HSA表面再生。在通過減去1) ISVD-HSA解離和2) 與參考配體泳道的非特異性結合進行雙重參考後, 獲得顯示預先存在的抗體結合的傳感圖。通過將報告點設置在125秒 (締合結束後5秒) 來確定預先存在的抗體的結合水準。相對於參考ISVD在125秒時的結合水準, 計算預先存在的抗體結合的減少百分比。

【0314】 相較於對照的未最佳化四價ISVD構築體F027301099, 藉由在每個構建單元 (building blocks) 中引入突變L11V和V89L以及C端丙胺酸, 針對減少的預

先存在的抗體結合進行最佳化的四價ISVD構築體F027500069顯示對預先存在的抗體的結合係顯著減少（表8和圖4）。

【0315】 表8：與對照ISVD構築體F027301099相比，存在於96個人類血清樣品中的預先存在的抗體與F027500069的結合

ID	簡短描述	25% 百分 位數	中位 RU水準	75% 百分 位數
F027301099	1B11-35GS-ALB23000-35GS-1B11-35GS-6C11	47	92	350
F027500069	6C11-9GS-119A03/1-9GS-ALB23002-9GS-81A12-A	-15	-8	5

【0316】 預先存在的抗體結合取決於多特異性構築體的效價和組成。表3和圖5證明，構築體F027500069顯示出比構築體F027500095和F027500096更低的預先存在的抗體反應性。

【0317】 實例10：在人類TNF α 轉基因Tg197多關節炎模型中對F027500069的評價。

【0318】 在TNF驅動的進行性多關節炎的Tg197小鼠模型中分析F027500069（Keffer等人, 1991, EMBO J., 10:4025-4031）。在這些小鼠中，將修飾的人類TNF α 基因作為轉基因插入到小鼠中。以使轉錄的mRNA更穩定的方式修飾了人類基因，並且由此導致TNF α 的過表現以及在所有四個腳掌中具有100%外顯率的自發性進行性關節炎。如果不治療，那麼體征和症狀在約6周齡時變得可見，並且不斷增加，直到從約10周齡起導致明顯的瀕死和死亡。通過評分系統對關節炎的嚴重程度進行了臨床評估，如下詳述：

關節炎得分 ¹	特徵
0 /沒有疾病	沒有關節炎（正常外觀，小鼠可以支撐其重量緊貼至倒置或傾斜表面（諸如線柵或籠蓋）一段時間，全身柔韌性/逃避性正常，抓力最大）
0.5 /輕度疾病	關節炎發作（輕度關節腫脹，所有其他參數如上）
1 /輕度至中度疾病	輕度至中度（關節因腫脹而變形，爪子發炎，所有其他參數如上）
1.5 /中度疾病	中度關節炎（關節-爪腫脹、變形+尾指向內變形，短暫支撐緊貼至倒置或傾斜表面（諸如線柵或籠蓋），全身柔韌性降低，抓力降低）
2 /中度至重度疾病	中度至重度關節炎（重度關節、爪子和手指腫脹，關節-腿部變形，無法支撐緊貼至倒置或傾斜表面（諸如線柵或籠蓋），無全身柔韌性，無抓力，攀爬/進食受影響，嘗試移動時開始搖晃，但能向前移動）
2.5 /重度疾病	重度關節炎（如上文的2 + 前爪的手指變形，小鼠運動受損，搖晃，不

	願意移動)
3 /非常重度疾病	非常重度關節炎（俯屈時檢測到強直，並且運動嚴重受損，小鼠瀕死，不再搖晃，向一側傾斜時不能容易地轉身/翻轉）。

¹關節炎得分如圖6的y軸所示。

【0319】 關節炎對針對人類TNF α 的抑制的治療劑的治療敏感(Shealy等人, 2002, Arthritis Res. 4(5): R7) 。

【0320】 出於建立劑量依賴性功效的目的，以治療性方式通過每周兩次腹膜內注射，向患有關節炎的明顯體征和症狀的6周齡動物投予不同劑量的F027500069（每組n = 8隻動物）。將從人骨髓瘤血清純化的人IgG1（BioXcell #BE0297）用作陰性對照，並將抗hTNF α 參考mAb用作抑制關節炎的陽性對照。分別以1.3 mg/kg體重、4 mg/kg和13.5 mg/kg的三種不同劑量強度投予F027500069。治療持續直到11周齡。每周一次確定臨床關節炎得分。如圖6所示，用F027500069進行治療導致臨床關節炎得分隨時間推移的劑量依賴性抑制。

【0321】 到第11周，用人類IgG1陰性對照抗體治療的動物的平均關節炎得分發展到 1.099 ± 0.1071 。抗hTNF α 參考mAb完全抑制了關節炎的進展，平均得分到第11周為 0.4844 ± 0.0594 。到第11周，F027500069減少關節炎進展，其平均得分為 0.8047 ± 0.0929 （1.3 mg/kg）、 0.7969 ± 0.0585 （4 mg/kg）和 0.6016 ± 0.0349 （13.5 mg/kg）。通過曲線下面積（AUC，圖7）分析了關節炎的總體抑制。在Tg197關節炎模型中，所有劑量的F027500069均顯著抑制了關節炎進展，與抗hTNF α 參考mAb相當。

【0322】 在治療完成後，對後肢踝關節進行處理以供組織學分析，並使用以下評分系統評價切片的關節炎結構體征：

對踝關節中的關節炎表型評分的累積組織病理學標準		
得分 ¹	疾病	標準
0	正常	沒有可檢測的病狀
1	輕度	滑膜增生和多形核浸潤的存在。可能存在輕度肌腱炎。
2	中度	血管翳和纖維組織形成以及局灶性軟骨下骨侵蝕
3	中度-重度	軟骨破壞和骨侵蝕
4	重度	廣泛的軟骨破壞和骨侵蝕。骨輪廓結構丟失

¹關節炎得分如圖8的y軸所示。

【0323】 組織學評分的結果在圖8中示出。在較高劑量下，F027500069顯著抑制了結構性關節炎和關節破壞。

【0324】 總之，結果表明F027500069對關節炎體徵和症狀的劑量依賴性抑制，以及對結構進展的抑制作用，其程度與抗TNF α 參考mAb相當。

【0325】 實例11：在人類IL-23誘發的皮膚發炎模型中對F027500069的評價。

【0326】 在小鼠中皮內注射重組IL-23導致急性皮膚發炎，其中在注射部位周圍變紅和腫脹。在組織學上，乾癬皮膚發炎的標誌是可見的，諸如由角化細胞增生引起的表皮增厚、角化病以及如T細胞和巨噬細胞的免疫細胞浸潤。在分子水準上，模型中的轉錄組變化與在人乾癬損傷皮膚中相比於正常皮膚觀察到的那些變化在很大程度上重疊（Gauld等人，2018, *Journal of Dermatological Science* 92:45–53）。因此，IL-23皮膚發炎模型類似於乾癬的機械模型。

【0327】 為了研究對IL-23介導的發炎的抑制作用，在自Rizzo等人，2011, *J Immunol*; 186:1495-1502調整的皮膚發炎模型中測試了F027500069。在第1、2、3和4天，將總體積為20 μ l的1 μ g重組人類IL-23皮內注射到雌性C57BL/6小鼠的右耳中。將PBS作為對照注射到一組小鼠的耳朵中。每天通過卡尺測量耳皮的增厚。在第1天和第3天，通過腹膜內注射投予F027500069和對照化合物。在第5天，處死小鼠，並進行皮膚打孔活組織檢查。在補充有蛋白酶抑制劑混合物的PBS中將活組織檢體均質化，並確定下游效應細胞因子IL-22的水準。

【0328】 出於建立劑量依賴性功效的目的，以治療性方式藉由每周兩次腹膜內注射，向患有關節炎的明顯體徵和症狀的6周齡動物投予不同劑量的ISVD構築體（每組n=10隻動物）。將從人類骨髓瘤血清純化的人類IgG1（BioXcell #BE0297）用作陰性對照，並將抗hIL-23參考mAb1用作抑制皮膚發炎的陽性對照。分別以0.13 mg/kg體重、0.4 mg/kg、1 mg/kg和4 mg/kg的四種不同劑量強度投予

F027500069。如圖9所示，用F027500069進行治療導致對皮膚腫脹的劑量依賴性抑制，將其描繪為耳朵厚度在第5天自基線的變化。

【0329】 在第5天進行皮膚活組織檢查，並製備組織均質物。利用Mesoscale Discovery V-plex小鼠IL-22測定試劑盒(#K152WVD, 圖10)測量了鼠IL-22水準。IL-23的投予導致可測量的IL-22水準，因為來自注射PBS的皮膚的所有樣品均低於所採用測定法的定量下限(LLOQ)。所有劑量的F027500069以及抗hIL-23參考mAb1均顯著抑制了IL-22組織水準(對於1 mg/kg劑量組，IL-22水準未測定)。

【0330】 此外，在IL-23誘發的皮膚發炎模型中的另一個實驗中評估了皮下投予的可行性。在第1天和第3天以腹膜內或皮下注射方式投予了兩個劑量的F027500069(0.1 mg/kg和1 mg/kg)，並獲得耳朵厚度的變化(圖11)。在此實驗中，將1 mg/kg劑量的無關V_{HH}用作陰性對照(Nab ctrl)，並將3 mg/kg劑量的抗hIL-23參考mAb1(IP)用作陽性對照。

【0331】 此外，從第5天皮膚活組織檢體均質物測量組織IL-22水準(圖12)。

【0332】 總之，結果證明了IL-23誘發的皮膚發炎在皮膚增厚方面以及在組織效應細胞因子水準方面均得到抑制。腹膜內以及皮下兩種投予途徑都是可行的。

【0333】 **實例12：在人類TNF α /TNFR1敲入小鼠中的膠原抗體誘導的關節炎模型中對F027500069的評價。**

【0334】 在專有小鼠中的膠原抗體誘導的關節炎(CAIA)模型中分析了F027500069，其中TNF α 和TNF受體1(TNFR1)兩者的基因座都被各自的人類基因座替代。

【0335】 在第0天，對每組8隻動物注射8 mg針對軟骨膠原2的單株抗體的混合物(ArthritoMab, MDbioscience, CIA-MAB-2C)。在第1天，通過注射25 μ g細菌脂多糖(LPS)觸發了關節炎的發展。在LPS注射後6小時，將測試化合物作為單次注射投予一次。基於如下詳述的關節炎得分，每天評估關節炎的體征和症狀發展直到第7天：

關節炎得分 ¹	特徵
--------------------	----

0	沒有臨床體征或症狀
1	踝關節和腕骨的輕度腫脹。
2	踝關節和腕骨的中度腫脹；足趾受累。輕度紅斑
3	整個爪子（包括足趾）的重度腫脹。重度紅斑。
對每個肢體從0至3單獨評分，總關節炎得分是所有4個肢體的得分總和，其中最大總分為12。	

¹關節炎得分如圖13的y軸所示。

【0336】 以1.3 mg/kg體重投予了F027500069，以0.5 mg/kg投予了抗hTNF α 參考mAb陽性對照。圖13示出了關節炎體徵和症狀隨時間推移的發展。F027500069或抗hTNF α 參考mAb兩者的單次預防性投予導致完全抑制關節炎的發展。

【0337】 實例13：在人類TNF α 敲入小鼠中的人類IL-23誘發的皮膚發炎模型中對F027500069的評價。

【0338】 由於F027500069僅結合並抑制人或靈長類動物靶標（IL-23和TNF α 兩者），因此在TNF α 人類化小鼠中重複了人類IL-23誘發的皮膚發炎。在這個專用品系中，小鼠的整個基因組TNF α 基因座被人基因座替代。外顯子-內含子結構和調控元件在小鼠與人類之間是保守的。事先已經評估了人類TNF α 在小鼠中的真實表現以及引發反應的功能能力。

【0339】 皮內注射hIL-23導致TNF α 表現的適度增加（自有資料和Gauld等人2018, Journal of Dermatological Science 92:45–53）。在此模型中投予了等莫耳劑量的F027500069和對應的單特異性ISVD構建單元（building blocks）F027500101（抗TNF α ）和F027500017（抗IL-23），以解決雙重靶向的潛在累加效應。投予的劑量強度為3.6 nmol/kg，對應於約0.1 mg/kg。選擇這一低劑量以允許一些剩餘的游離IL-23並因此允許下游TNF α 分泌。此外，投予了高劑量的F027500069以及抗hIL-23參考mAb1作為陽性對照。將耳朵厚度的變化針對高（Nab陰性對照）和低（無IL-23注射）對照進行歸一化（樣品減去低對照除以高對照減去低對照）。圖14示出了結果。3.6 nmol/kg F027500101的單特異性TNF α 抑制作用沒有抑制皮膚腫脹，而3.6 nmol/kg F027500017的單特異性IL-23抑制作用具有中度但顯著的

作用。3.6 nmol/kg F027500069對TNF α 和IL-23兩者的雙重靶向導致數值上優異的對皮膚腫脹的抑制。

【0340】 在第5天進行皮膚活組織檢查，並使用標準方法製備mRNA。在Illumina NovaSeq™ 6000平臺上對mRNA進行了配對末端、基於本體的全轉錄組測序。分析了相比於NAb對照差異表現的基因（DEG，倍數變化 > 2 ， $p < 0.001$ ）在治療組之間的重疊。如圖15所示，儘管單特異性治療組與多特異性治療組有很大重疊，但769個DEG中仍有199個對F027500069治療具有特異性。這表明，在此模型中，對TNF α 和IL-23兩者的雙重靶向導致獨特的分子反應，並可能協同地改善人類疾病。

【0341】 總之，結果表明，在IL-23誘發的皮膚發炎中對IL-23和TNF α 兩者的多特異性抑制導致對皮膚增厚的數值累加效應，並引起獨特的轉錄組學譜。

【0342】 工業適用性

【0343】 本文所述的多肽、編碼所述多肽的核酸分子、包含所述核酸的載體和組成物可以用於例如治療，諸如患有發炎性腸病、乾癬、乾癬性關節炎或化膿性汗腺炎的受試者的治療。

【符號說明】 無

序列表

<110> 德商阿布林克斯有限公司(Ablynx NV)

<110> 法商賽諾菲公司(Sanofi)

<120> 包含靶向 TNF α 和 IL-23 之免疫球蛋白單可變結構域的多肽

<130> 228667

<150> US 62/944,619

<151> 2019-12-06

<150> EP 20 305 056.2

<151> 2020-01-23

<150> EP 20 000 090.9

<151> 2020-02-28

<150> EP 20 305 216.2

<151> 2020-03-02

<160> 157

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 517

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F027500069

<400> 1

```

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

```


515

<210> 2
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 6C11

<400> 2
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Arg Ser Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 119A03/1

<400> 3
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Leu Pro
 20 25 30
 Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu Thr Ile Ala Trp Tyr Arg Gln
 35 40 45
 Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Glu Ser Gly Ser
 50 55 60
 Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro

第 3 頁，共 50 頁(序列表)

85 90 95
 Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Thr Ser Gly Ser Gly Ser Pro
 100 105 110
 Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 4
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ALB23002

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 81A12

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

50						55						60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr		
65					70					75					80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Lys	Asp	Pro	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser		
			100					105					110				
Gly	Ser	Tyr	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Lys	Val	Ser	Ser		
		115					120					125					

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR1

<400> 6
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala Asp Met Gly
 1 5 10

<210> 7
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR1

<400> 7
 Gly Arg Ile Phe Ser Leu Pro Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu
 1 5 10 15
 Thr Ile Ala

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR1

<400> 8

Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 9
Gly Arg Thr Leu Ser Ser Tyr Ala Met Gly
1 5 10

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

<220>
<223> CDR2

<400> 10
Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr
1 5 10

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 11
Thr Ile Glu Ser Gly Ser Arg Thr Asn
1 5

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 12
Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 13
Arg Ile Ser Gln Gly Gly Thr Ala Ile Tyr
1 5 10

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 14
Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr
1 5 10

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 15
Ser Gly Ser Gly Ser Pro Asn Phe
1 5

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 16

Gly Gly Ser Leu Ser Arg
 1 5

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 17

Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Gly Ser
 1 5 10 15
 Tyr Asp Ser

<210> 18

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR1

<400> 18

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser
 20 25

<210> 19

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR1

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20

25

<210> 20
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR2

<400> 20
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
 1 5 10

<210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR2

<400> 21
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
 1 5 10

<210> 22
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR2

<400> 22
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR2

<400> 23

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

<210> 24

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 24

Tyr Asp Glu Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 1 5 10 15
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Leu Tyr Tyr Cys Arg Ser
 35

<210> 25

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 25

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 1 5 10 15
 Lys Lys Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Thr
 35

<210> 26

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 26

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile
 35

<210> 27
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR3

<400> 27
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 1 5 10 15
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 20 25 30
 Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys
 35

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR4

<400> 28
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR4

<400> 29
 Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 30
 <211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR4

<400> 30
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser
1 5 10

<210> 31
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb8

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Alb23

<400> 32
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 33

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> A1b129

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala
 115

<210> 34

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> A1b132

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala
 115

<210> 35

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Alb11

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 36

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Alb11 (S112K)-A

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Lys
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala
 115

<210> 37

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Alb82

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 38
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Alb82-A

<400> 38
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala
 115

<210> 39
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Alb82-AA

<400> 39
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ala
 115

<210> 40
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> A1b82-AAA

<400> 40
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ala Ala
 115

<210> 41
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> A1b82-G

<400> 41
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr

35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115

<210> 44
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> A1b23002

<400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 45
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> A1b223

<400> 45
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala
 115

<210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 3A

<400> 46
 Ala Ala Ala
 1

<210> 47
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 5GS

<400> 47
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 7GS

<400> 48

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8GS

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 9GS

<400> 50

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 10GS

<400> 51

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

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 15GS

<400> 52

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

<210> 53

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 18GS

<400> 53

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

<210> 54

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 20GS

<400> 54

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> 55

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 25GS

<400> 55

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> 56
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 30GS

<400> 56
 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> 57
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 35GS

<400> 57
 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> 58
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 40GS

<400> 58
 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> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> G1 鉸鏈

<400> 59
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

<210> 60
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 9GS-G1 鉸鏈

<400> 60
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 1 5 10 15
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20

<210> 61
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 美洲駝上部長鉸鏈區

<400> 61
 Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro Gln Pro Ala Ala Ala
 1 5 10

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

<220>
 <223> G3 鉸鏈

<400> 62

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1 5 10 15
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 20 25 30
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
 35 40 45
 Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 50 55 60

<210> 63

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 63

Lys Glu Arg Glu
 1

<210> 64

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 64

Lys Gln Arg Glu
 1

<210> 65

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 65

Gly Leu Glu Trp
 1

<210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 66
Lys Glu Arg Glu Leu
1 5

<210> 67
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 67
Lys Glu Arg Glu Phe
1 5

<210> 68
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 68
Lys Gln Arg Glu Leu
1 5

<210> 69
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 69
Lys Gln Arg Glu Phe

1 5

<210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 70
Lys Glu Arg Glu Gly
1 5

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 71
Lys Gln Arg Glu Trp
1 5

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 72
Lys Gln Arg Glu Gly
1 5

<210> 73
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 73
Thr Glu Arg Glu
1

<210> 74
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 74
Thr Glu Arg Glu Leu
1 5

<210> 75
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 75
Thr Gln Arg Glu
1

<210> 76
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 76
Thr Gln Arg Glu Leu
1 5

<210> 77
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 77

Lys Glu Cys Glu

1

<210> 78

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 78

Lys Glu Cys Glu Leu

1

5

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 79

Lys Glu Cys Glu Arg

1

5

<210> 80

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 80

Lys Gln Cys Glu

1

<210> 81

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 81

Lys Gln Cys Glu Leu

1 5

<210> 82

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 82

Arg Glu Arg Glu

1

<210> 83

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 83

Arg Glu Arg Glu Gly

1 5

<210> 84

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 84

Arg Gln Arg Glu

1

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 85

Arg Gln Arg Glu Leu
1 5

<210> 86

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 86

Arg Gln Arg Glu Phe
1 5

<210> 87

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 87

Arg Gln Arg Glu Trp
1 5

<210> 88

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 88

Gln Glu Arg Glu
1

<210> 89

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 89
Gln Glu Arg Glu Gly
1 5

<210> 90
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 90
Gln Gln Arg Glu
1

<210> 91
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 91
Gln Gln Arg Glu Trp
1 5

<210> 92
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 92
Gln Gln Arg Glu Leu
1 5

<210> 93
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 93
Gln Gln Arg Glu Phe
1 5

<210> 94
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 94
Lys Gly Arg Glu
1

<210> 95
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 95
Lys Gly Arg Glu Gly
1 5

<210> 96
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 96

Lys Asp Arg Glu

1

<210> 97

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 97

Lys Asp Arg Glu Val

1

5

<210> 98

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 98

Asp Glu Cys Lys Leu

1

5

<210> 99

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 99

Asn Val Cys Glu Leu

1

5

<210> 100

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 100
Gly Val Glu Trp
1

<210> 101
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 101
Glu Pro Glu Trp
1

<210> 102
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 102
Gly Leu Glu Arg
1

<210> 103
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 基序

<400> 103
Asp Gln Glu Trp
1

<210> 104
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 104

Asp Leu Glu Trp

1

<210> 105

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 105

Gly Ile Glu Trp

1

<210> 106

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 106

Glu Leu Glu Trp

1

<210> 107

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 107

Gly Pro Glu Trp

1

<210> 108

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 108

Glu Trp Leu Pro
1

<210> 109

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 109

Gly Pro Glu Arg
1

<210> 110

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 110

Gly Leu Glu Arg
1

<210> 111

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基序

<400> 111

Glu Leu Glu Trp
1

<210> 112

<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端

<400> 112
Val Thr Val Ser Ser
1 5

<210> 113
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端

<400> 113
Val Lys Val Ser Ser
1 5

<210> 114
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端

<400> 114
Val Gln Val Ser Ser
1 5

<210> 115
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端

<400> 115
Val Thr Val Ser Ser Ala
1 5

<210> 116
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C端

<400> 116
 Val Lys Val Ser Ser Ala
 1 5

<210> 117
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C端

<400> 117
 Val Gln Val Ser Ser Ala
 1 5

<210> 118
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR1

<400> 118
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 119
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR1

<400> 119

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5					10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Ile	Phe	Ser		
			20					25					30		

<210> 120

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR1

<400> 120

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5					10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Arg		
			20					25					30		

<210> 121

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR1

<400> 121

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5					10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Leu	Ser		
			20					25					30		

<210> 122

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR1

<400> 122

Thr	Ala	Asp	Met	Gly
1			5	

<210> 123

<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 123
Leu Pro Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu Thr Ile Ala
1 5 10

<210> 124
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 124
Ser Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 125
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 125
Ser Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 126
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 126
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 127
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 127
Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 128
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 128
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 129
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 129
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 130
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 130

Arg Ile Ser Gly Ile Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Glu Pro Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 131
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR2

<400> 131
 Thr Ile Glu Ser Gly Ser Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 132
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR2

<400> 132
 Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 133
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR2

<400> 133
 Arg Ile Ser Gln Gly Gly Thr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 134
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR3

<400> 134
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Arg Ser
 20 25 30

<210> 135
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR3

<400> 135
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Thr
 20 25 30

<210> 136
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR3

<400> 136
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Ile
 20 25 30

<210> 137
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FR3

<400> 137
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

<210> 138
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR3

<400> 138
 Pro Arg Tyr Ala Asp Gln Trp Ser Ala Tyr Asp Tyr
 1 5 10

<210> 139
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CDR3

<400> 139
 Ser Gly Ser Gly Ser Pro Asn Phe
 1 5

<210> 140
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 140

Gly Gly Ser Leu Ser Arg

1 5

<210> 141

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 141

Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Gly Ser

1 5 10 15

Tyr Asp Ser

<210> 142

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR4

<400> 142

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 143

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR4

<400> 143

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 144

<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR4

<400> 144
Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 145
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR4

<400> 145
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Lys Val Ser Ser
1 5 10

<210> 146
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C端

<400> 146
Val Thr Val Lys Ser
1 5

<210> 147
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C端

<400> 147
Val Thr Val Gln Ser
1 5

<210> 148
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端

<400> 148
Val Lys Val Lys Ser
1 5

<210> 149
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端

<400> 149
Val Lys Val Gln Ser
1 5

<210> 150
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端

<400> 150
Val Gln Val Lys Ser
1 5

<210> 151
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端

<400> 151
Val Gln Val Gln Ser

1

5

<210> 152

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C 端

<400> 152

Val Thr Val Lys Ser Ala

1

5

<210> 153

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C 端

<400> 153

Val Thr Val Gln Ser Ala

1

5

<210> 154

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C 端

<400> 154

Val Lys Val Lys Ser Ala

1

5

<210> 155

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C 端

<400> 155

Val Lys Val Gln Ser Ala

1 5

<210> 156

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C端

<400> 156

Val Gln Val Lys Ser Ala

1 5

<210> 157

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C端

<400> 157

Val Gln Val Gln Ser Ala

1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種多肽、包含所述多肽的組成物或包含含有編碼所述多肽的核苷酸序列的核酸的組成物，以組成物用作藥物，其中所述多肽係特異性結合 TNF α 和 IL-23 的 p19 次單元，並且其中所述多肽包含至少三個免疫球蛋白單可變結構域 (ISVD) 或由其組成，其中每個所述 ISVD 包含三個互補決定區 (分別為 CDR1 至 CDR3)，其視情況地經由一或多個肽連接子所連接；並且其中：

a) 第一 ISVD 包含

i. CDR1，其為 SEQ ID NO: 6 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 6 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，其為 SEQ ID NO: 10 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 10 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為 SEQ ID NO: 14 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 14 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) 第二 ISVD 包含

iv. CDR1，其為 SEQ ID NO: 7 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 7 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，其為 SEQ ID NO: 11 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 11 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，其為 SEQ ID NO: 15 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 15 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

c) 第三 ISVD 包含

vii. CDR1，其為 SEQ ID NO: 9 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 9 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；

viii. CDR2，其為 SEQ ID NO: 13 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 13 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；和

ix. CDR3，其為 SEQ ID NO: 17 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 17 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列。

【請求項2】 如請求項 1 之所述使用的多肽或組成物，其中：

a) 所述第一 ISVD 的胺基酸序列包含與 SEQ ID NO: 2 高於 90% 的序列同一性；

b) 所述第二 ISVD 的胺基酸序列包含與 SEQ ID NO: 3 高於 90% 的序列同一性；並且

c) 所述第三 ISVD 的胺基酸序列包含與 SEQ ID NO: 5 高於 90% 同一性的序列同一性。

【請求項3】 如請求項 1 至 2 中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中：

a) 所述第一 ISVD 由 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列組成；

b) 所述第二 ISVD 由 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列組成；並且

c) 所述第三 ISVD 由 SEQ ID NO: 5 的胺基酸序列組成。

【請求項4】 如請求項 1 至 3 中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中所述多肽進一步包含與人類血清白蛋白結合的 ISVD，所述 ISVD 包含

i. CDR1，其為 SEQ ID NO: 8 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 8 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，其為 SEQ ID NO: 12 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 12 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為 SEQ ID NO: 16 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 16 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列。

【請求項5】 如請求項 4 之所述使用的多肽或組成物，其中與人類血清白蛋白結合的所述 ISVD 的胺基酸序列包含與 SEQ ID NO: 4 高於 90% 的序列同一性。

【請求項6】 如請求項 1 至 5 中任一項之所述使用的多肽或組成物，其中：所述多肽包含 SEQ ID NO: 1 的胺基酸序列或者由其組成。

【請求項7】 如請求項 1 至 6 中任一項之所述使用的多肽或組成物，其用於治療自體免疫性或發炎性疾病。

【請求項8】 如請求項 7 之所述使用的多肽或組成物，其中所述自體免疫性或發炎性疾病選自發炎性腸病（諸如克隆氏症或潰瘍性結腸炎）、乾癬、乾癬性關節炎和化膿性汗腺炎。

【請求項9】 一種多肽，所述多肽包含至少三個免疫球蛋白單可變結構域（ISVD）或由其組成，其中每個所述 ISVD 包含三個互補決定區（分別為 CDR1 至 CDR3），其視情況地經由一個或多個肽連接子所連接；並且其中：

a) 第一 ISVD 包含

i. CDR1，其為 SEQ ID NO: 6 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 6 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，其為 SEQ ID NO: 10 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 10 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為 SEQ ID NO: 14 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 14 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；

b) 第二 ISVD 包含

iv. CDR1，其為 SEQ ID NO: 7 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 7 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；

v. CDR2，其為 SEQ ID NO: 11 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 11 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；和

vi. CDR3，其為 SEQ ID NO: 15 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 15 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；並且

c) 第三 ISVD 包含

vii. CDR1，其為 SEQ ID NO: 9 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 9 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；

viii. CDR2，其為 SEQ ID NO: 13 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 13 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；和

ix. CDR3，其為 SEQ ID NO: 17 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 17 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列。

【請求項10】 如請求項 9 所述的多肽，其中：

a) 所述第一 ISVD 的胺基酸序列包含與 SEQ ID NO: 2 高於 90% 的序列同一性；

b) 所述第二 ISVD 的胺基酸序列包含與 SEQ ID NO: 3 高於 90% 的序列同一性；並且

c) 所述第三 ISVD 的胺基酸序列包含與 SEQ ID NO: 5 高於 90% 同一性的序列同一性。

【請求項11】 如請求項 9 至 10 中任一項所述的多肽，其中：

a) 所述第一 ISVD 由 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列組成；

b) 所述第二 ISVD 由 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列組成；並且

c) 所述第三 ISVD 由 SEQ ID NO: 5 的胺基酸序列組成。

【請求項12】 如請求項 9 至 11 中任一項所述的多肽，其中所述多肽進一步包含與人類血清白蛋白結合的 ISVD，所述 ISVD 包含

i. CDR1，其為 SEQ ID NO: 8 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 8 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；

ii. CDR2，其為 SEQ ID NO: 12 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 12 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列；和

iii. CDR3，其為 SEQ ID NO: 16 的胺基酸序列或者與 SEQ ID NO: 16 具有 2 或 1 個胺基酸差異的胺基酸序列。

【請求項13】 如請求項 12 所述的多肽，其中與人類血清白蛋白結合的所述 ISVD 的胺基酸序列包含與 SEQ ID NO: 4 高於 90% 的序列同一性。

【請求項14】 如請求項 9 至 13 中任一項所述的多肽，其中所述多肽包含 SEQ ID NO: 1 的胺基酸序列或者由其組成。

【請求項15】 一種核酸，係包含編碼如請求項 9 至 14 中任一項所述的多肽的核苷酸序列。

【請求項16】 一種宿主或宿主細胞，所述宿主或宿主細胞包含如請求項 15 所述的核酸。

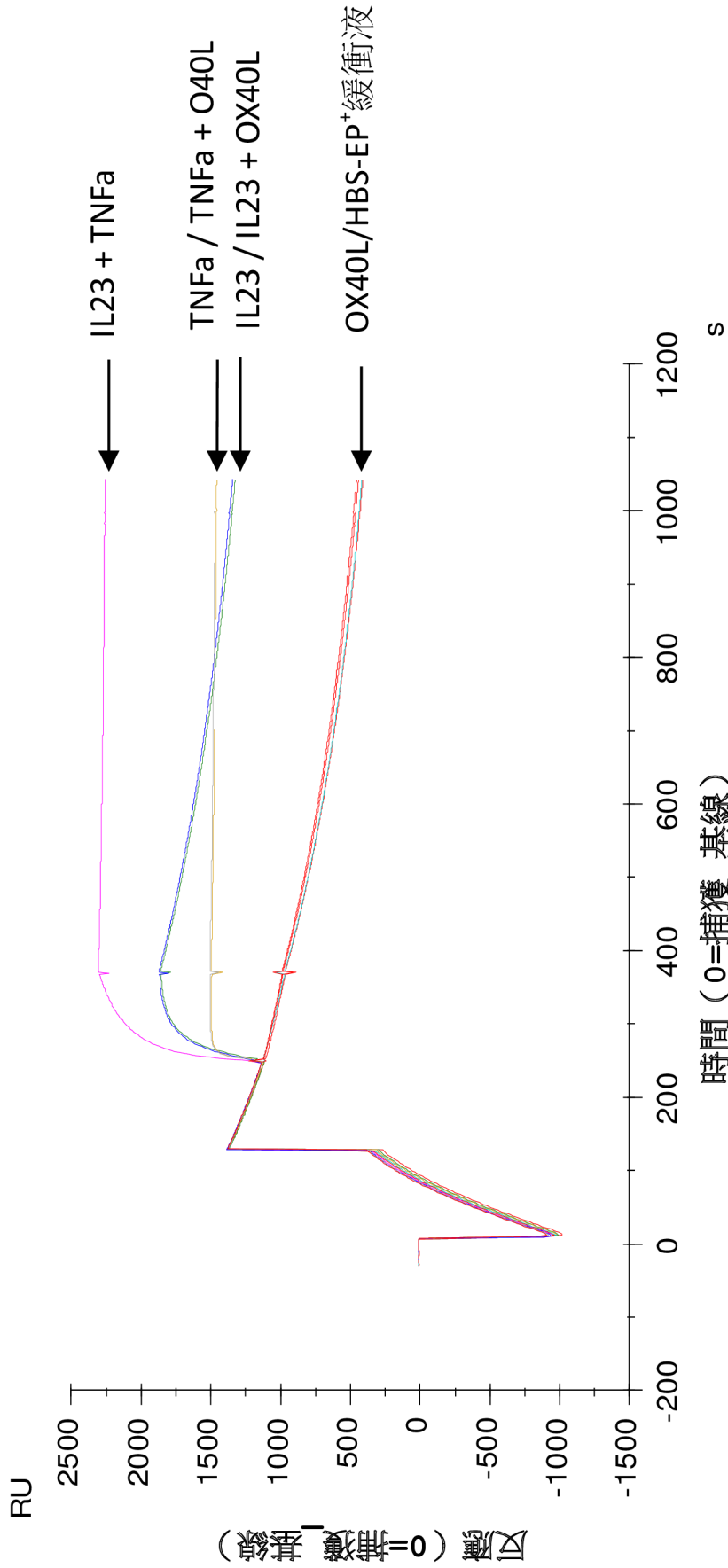
【請求項17】 一種用於產生如請求項 9 至 14 中任一項所述的多肽的方法，所述方法至少包括以下步驟：

a) 在合適的宿主細胞或宿主生物體或另一合適的表現系統中表現如請求項 15 所述的核酸；視情況地隨後進行：

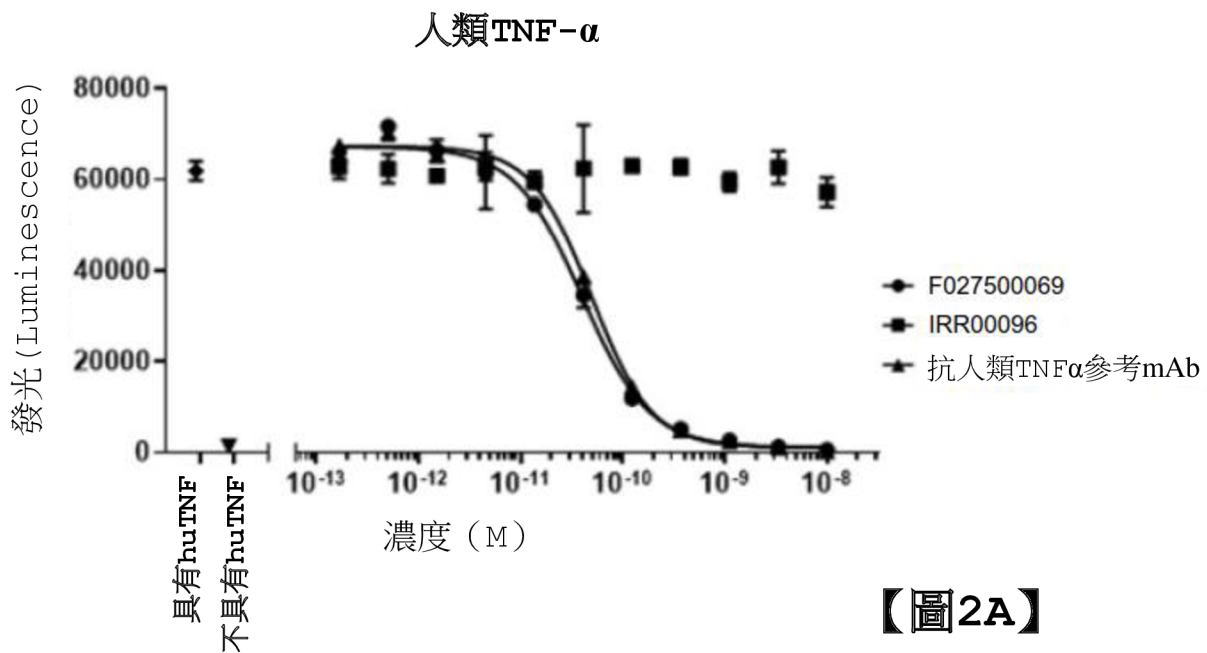
b) 分離和/或純化如請求項 9 至 14 中任一項所述的多肽。

【請求項18】 一種組成物，組成物係包含至少一種如請求項 9 至 14 中任一項所述的多肽，或如請求項 15 所述的核酸。

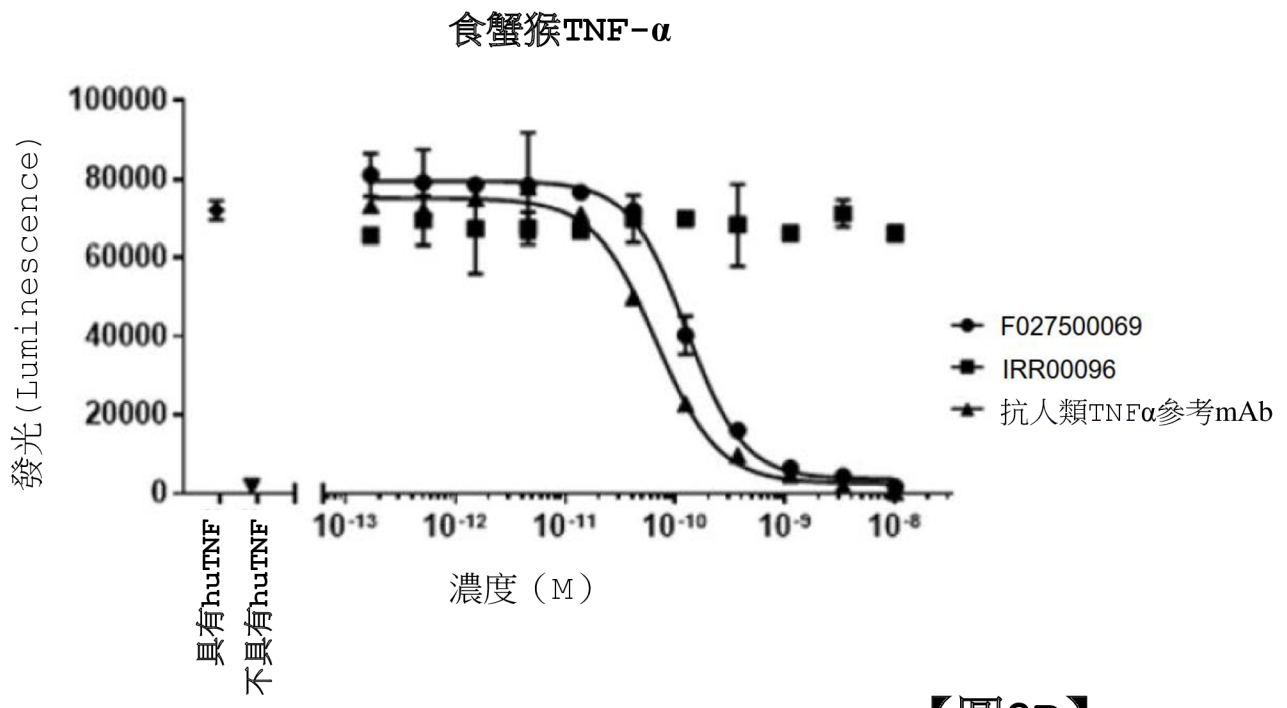
【發明圖式】



【圖1】

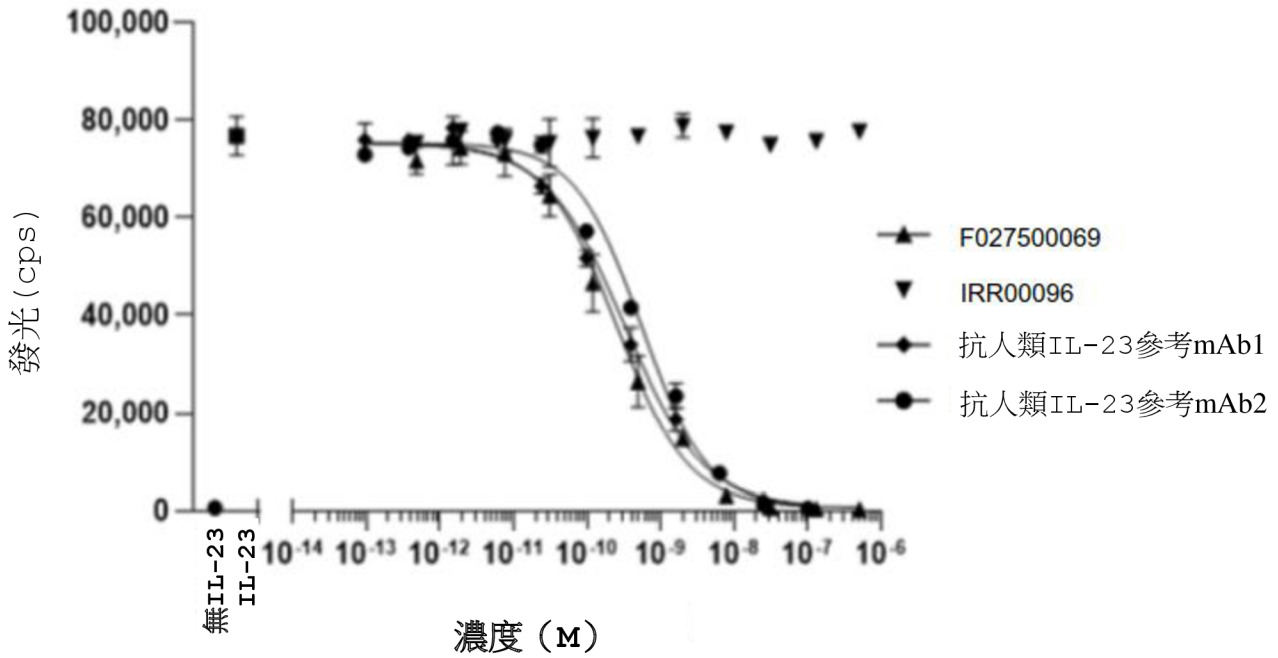


【圖2A】



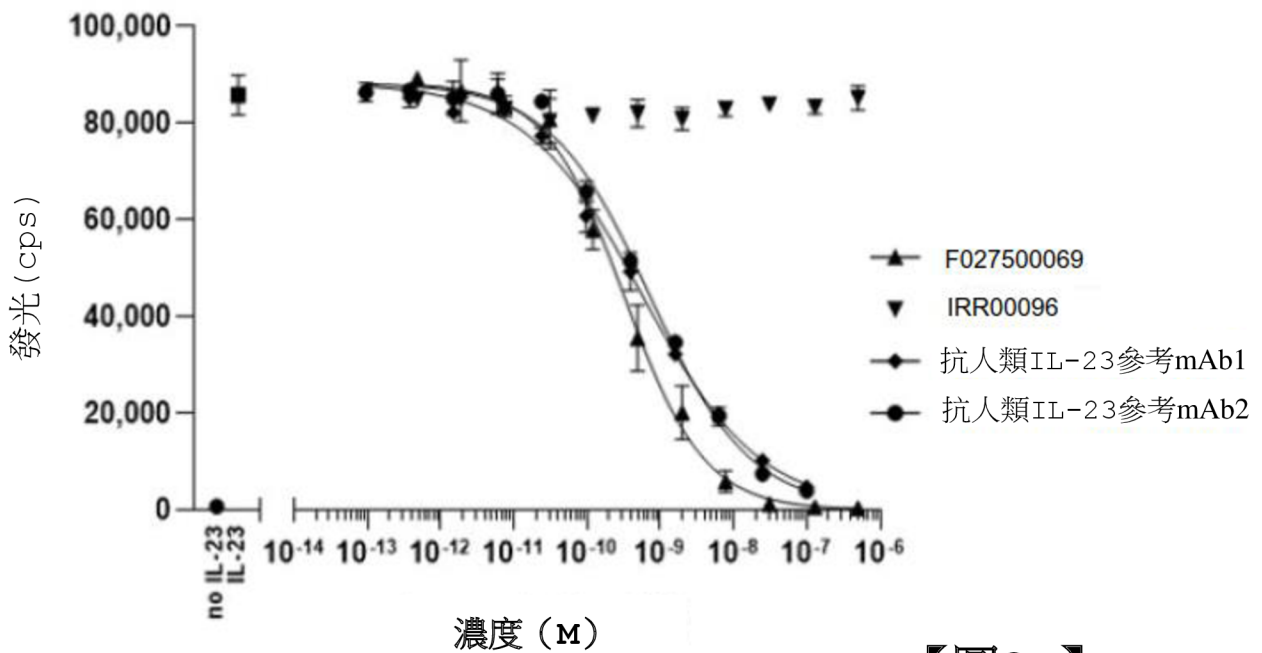
【圖2B】

人類IL-23 (10pM)

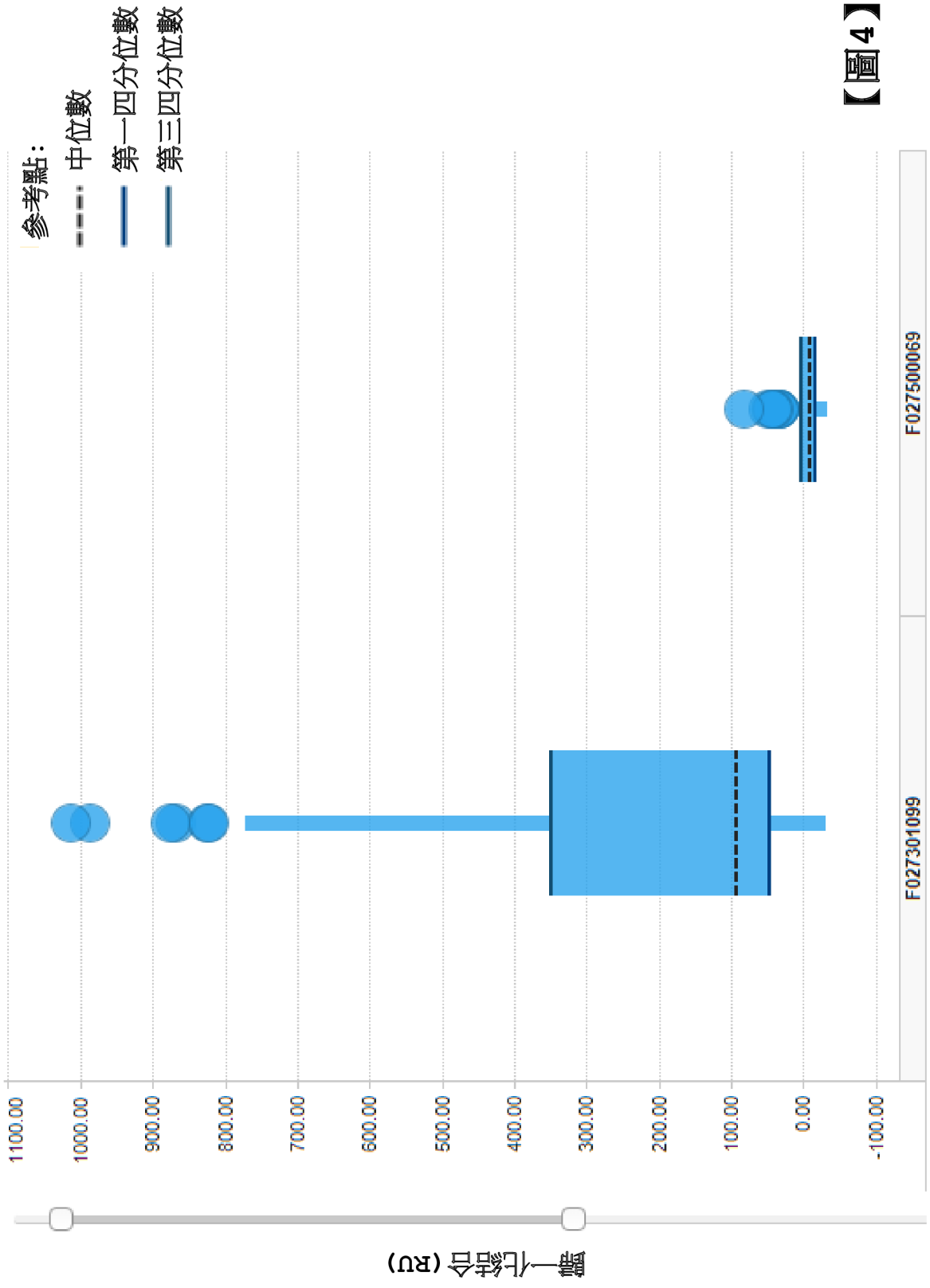


【圖3A】

食蟹猴IL-23 (40pM)



【圖3B】

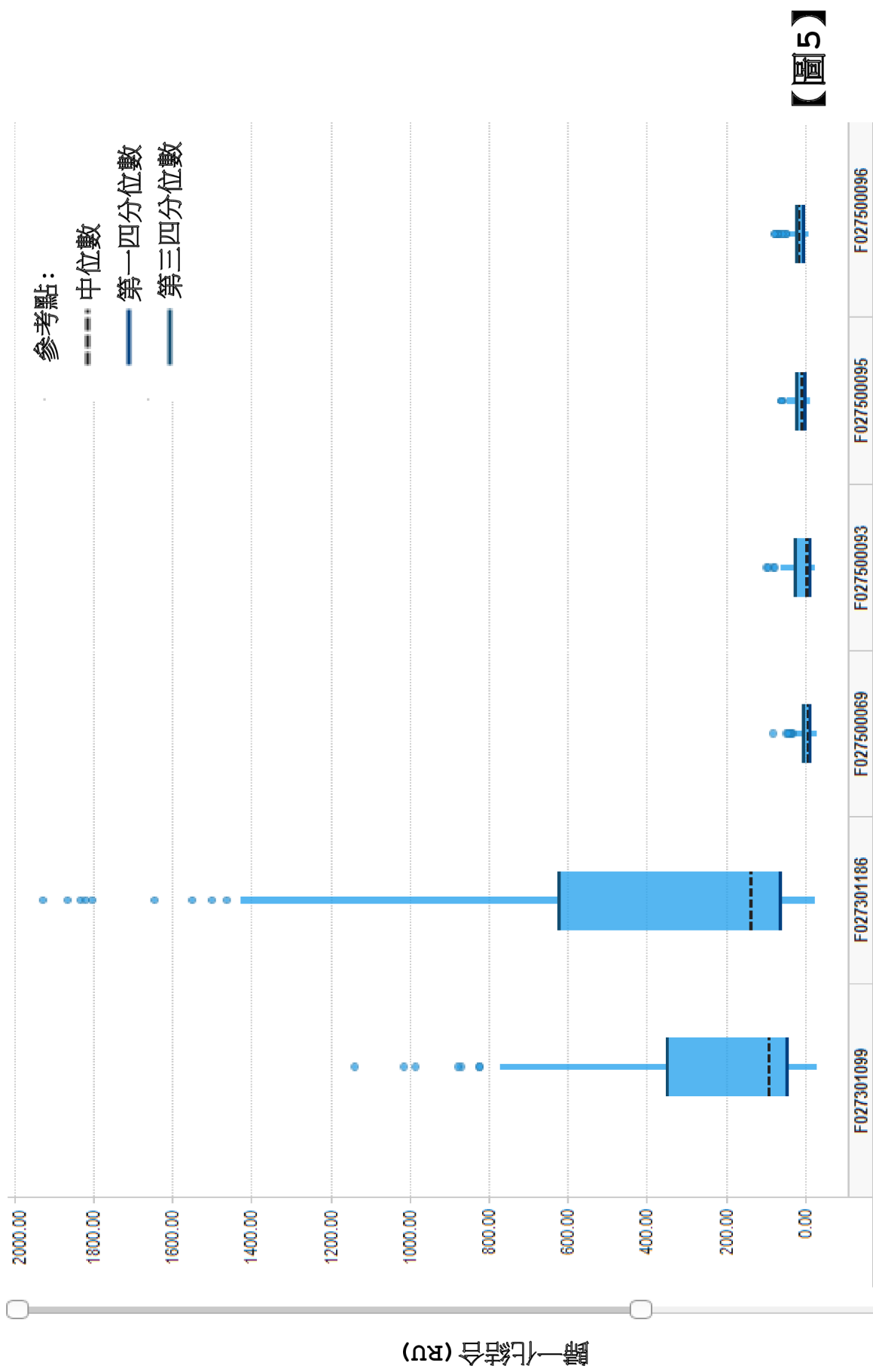


【圖 4】

F027500069

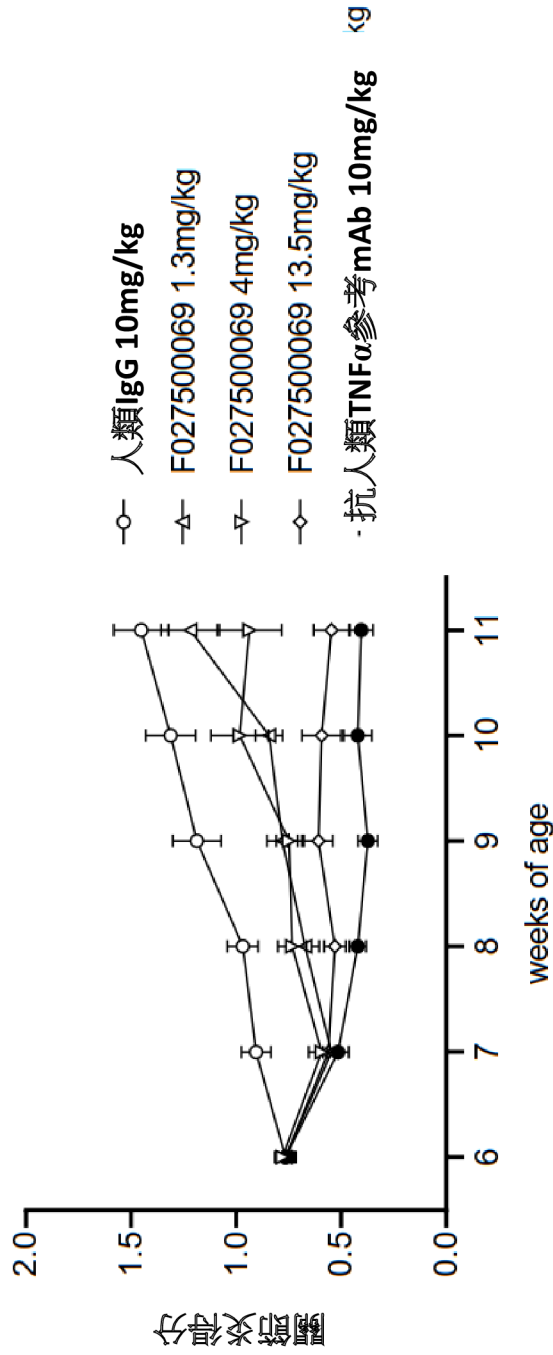
F027301099

第一化結合 (RU)



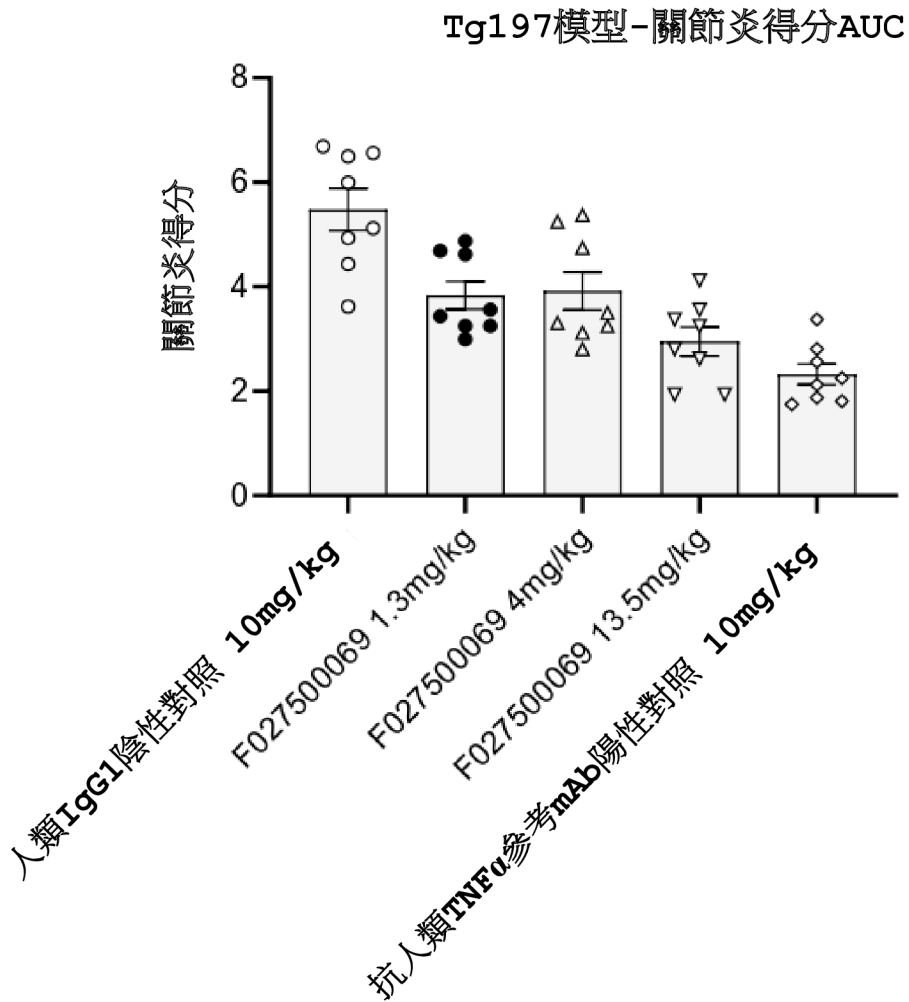
【圖 5】

Tg197模型-隨時間推移關節炎得分



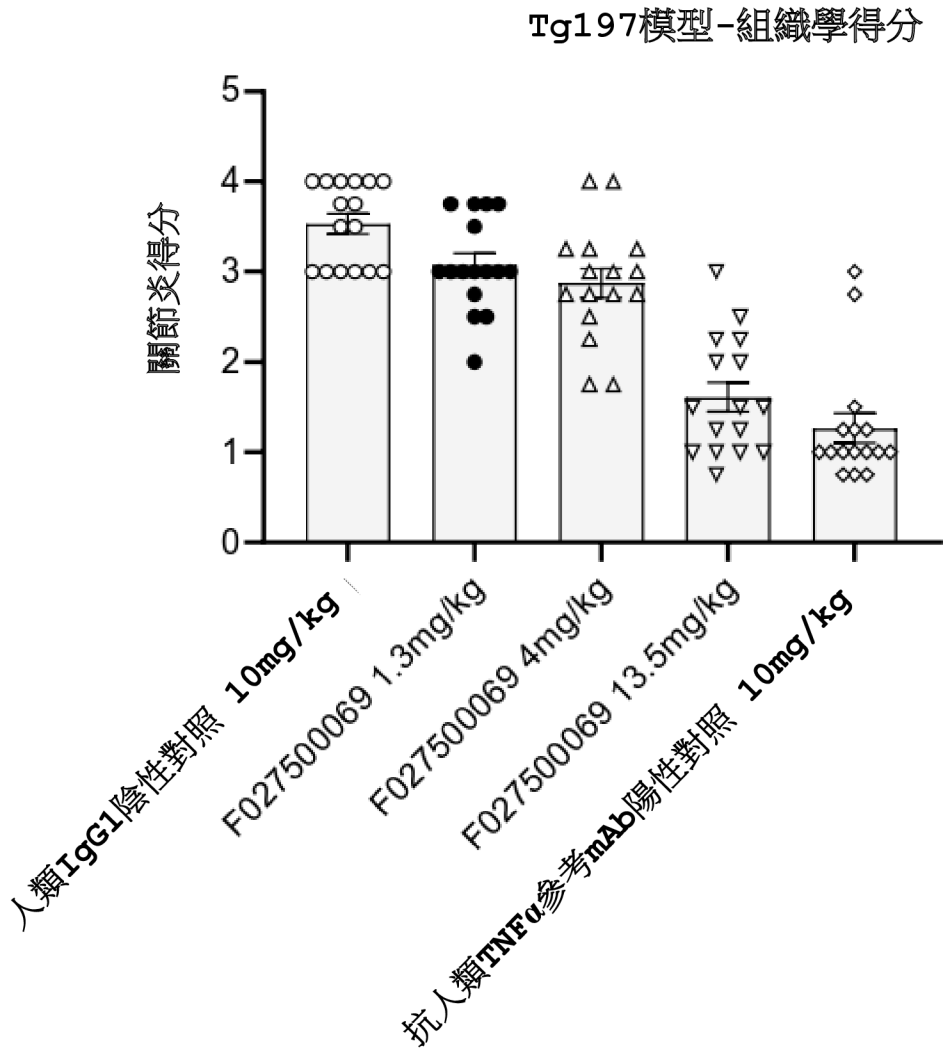
Bonferroni 多重比較檢定	第7周	第8周	第9周	第10周	第11周
人類IgG1 vs F027500069 1.3mg/kg	** 0.0037	* 0.0395	* 0.0481	* 0.0212	ns 0.9646
人類IgG1 vs F027500069 4mg/kg	* 0.0191	ns 0.1424	* 0.0278	ns 0.3645	ns 0.0927
人類IgG1 vs F027500069 13.5mg/kg	** 0.0052	** 0.0014	** 0.0047	** 0.0014	*** 0.0003
人類IgG1 vs 抗人類TNF α 參考mAb 10mg/kg	** 0.0023	*** 0.0002	*** 0.0004	*** 0.0002	*** 0.0001

【圖6】



Bonferroni 多重比較檢定	經調整的P值	
人類IgG1 vs F027500069 1.3mg/kg	**	0.0043
人類IgG1 vs F027500069 4mg/kg	**	0.0074
人類IgG1 vs F027500069 13.5mg/kg	****	<0.0001
人類IgG1 vs 抗人類TNFα參考mAb 10mg/kg	****	<0.0001

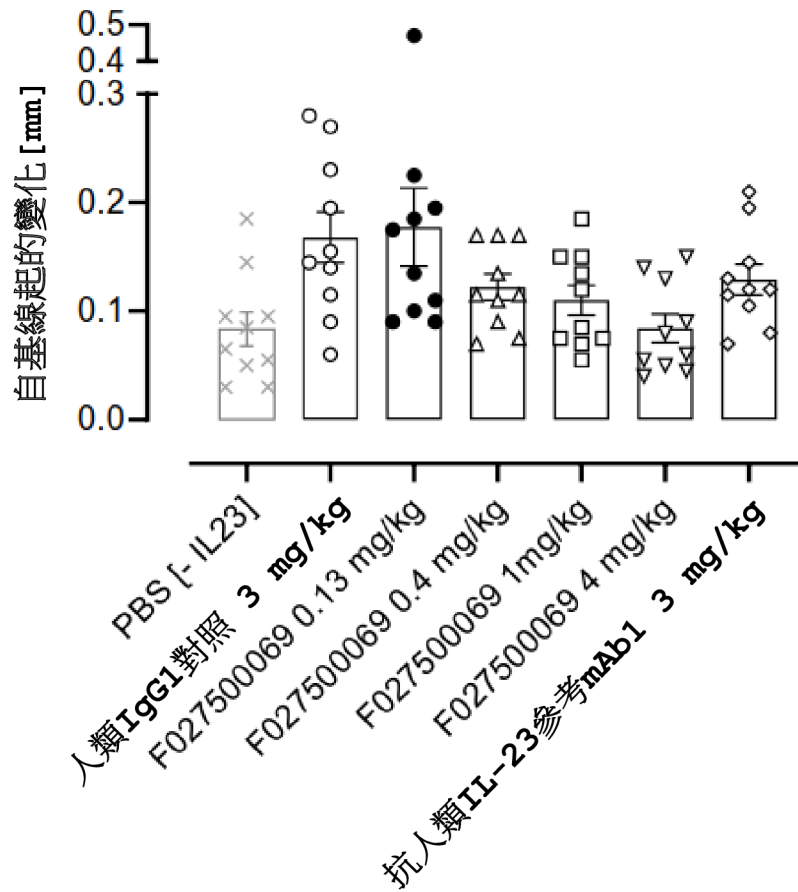
【圖7】



Bonferroni 多重比較檢定	經調整的 P 值	
人類IgG1 vs F027500069 1.3mg/kg	ns	0.1951
人類IgG1 vs F027500069 4mg/kg	*	0.012
人類IgG1 vs F027500069 13.5mg/kg	****	<0.0001
人類IgG1 vs 抗人類TNFα參考mAb 10mg/kg	****	<0.0001

【圖8】

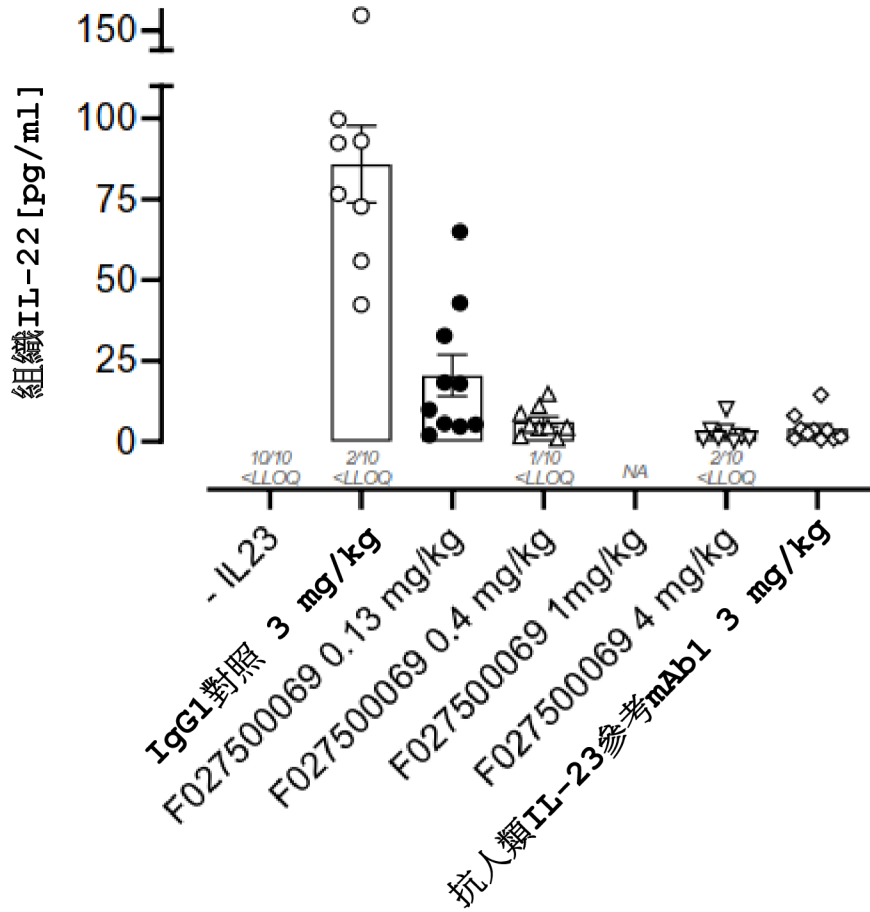
IL-23誘發的皮膚發炎-耳朵厚度d5



Bonferroni 多重比較檢定	經調整的P值	
PBS [-IL23] vs 人類IgG1 ctrl 3mg/kg	*	0.024
人類IgG1 vs F027500069 0.13mg/kg	ns	>0.9999
人類IgG1 vs F027500069 0.4mg/kg	ns	0.6531
人類IgG1 vs F027500069 1mg/kg	ns	0.2667
人類IgG1 vs F027500069 4mg/kg	*	0.0253
人類IgG1 vs 抗人類IL-23參考mAb1 3mg/kg	ns	>0.9999

【圖9】

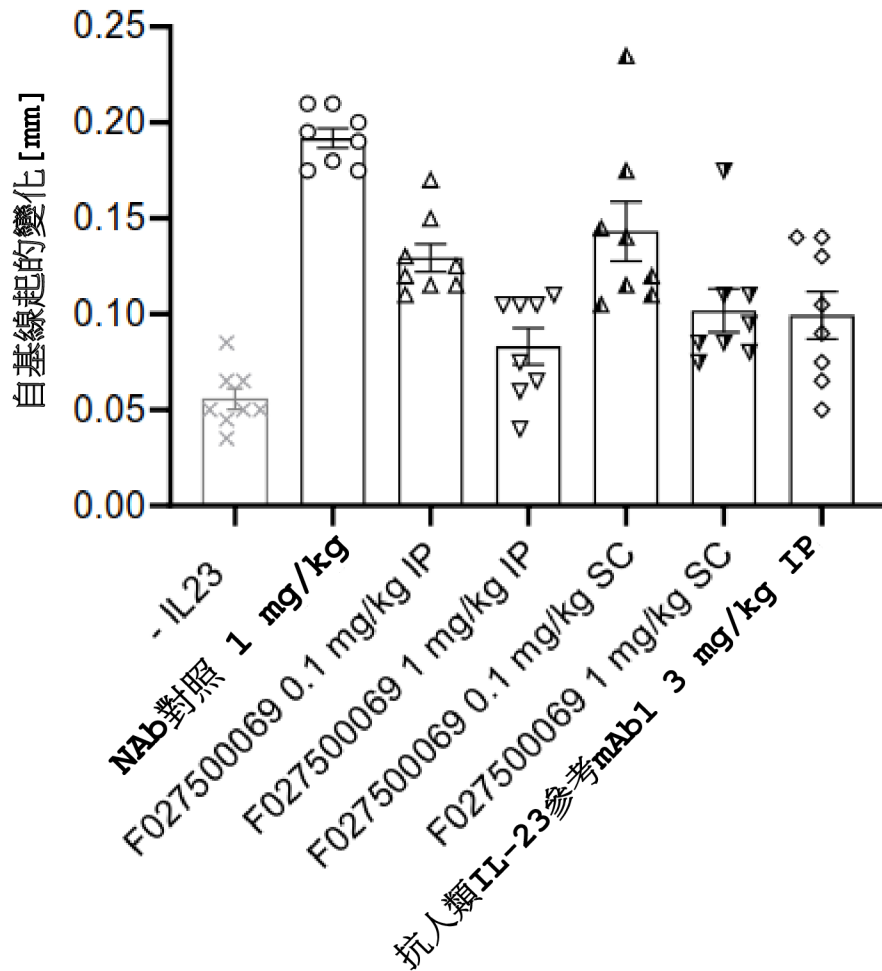
IL-23誘發的皮膚發炎-組織IL-22



Bonferroni 多重比較檢定	經調整的P值	
人類IgG1 vs F027500069 0.13mg/kg	****	<0.0001
人類IgG1 vs F027500069 0.4mg/kg	****	<0.0001
人類IgG1 vs F027500069 1mg/kg	未評估	
人類IgG1 vs F027500069 4mg/kg	****	<0.0001
人類IgG1 vs 抗人類IL-23參考mAb1 3mg/kg	****	<0.0001

【圖10】

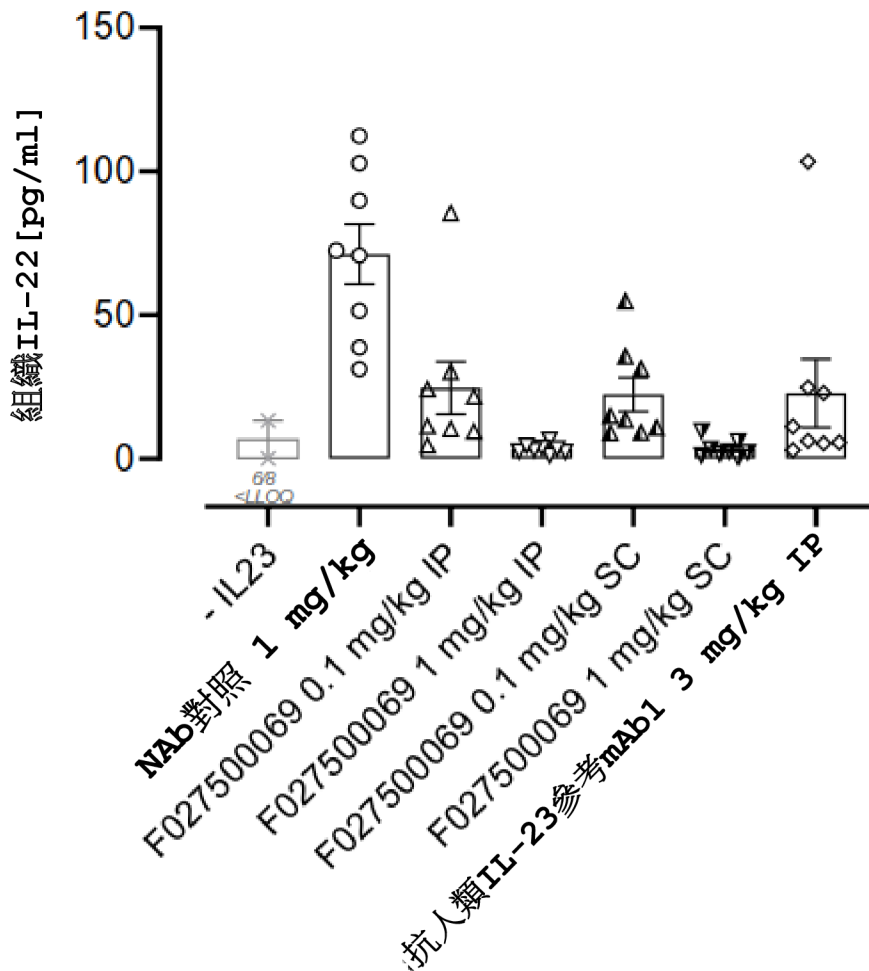
IL-23誘發的皮膚發炎-耳朵厚度d5



Bonferroni多重比較檢定	經調整的P值	
PBS [-IL23] vs Nab對照1 mg/kg	****	<0.0001
NAb對照 vs F027500069 0.1 mg/kg IP	***	0.0005
NAb對照 vs F027500069 1 mg/kg IP	****	<0.0001
NAb對照 vs F027500069 0.1 mg/kg SC	*	0.0107
NAb對照 vs F027500069 1 mg/kg SC	****	<0.0001
NAb對照 vs 抗人類IL-23參考mAb1 3mg/kg	****	<0.0001
F027500069 0.1 mg/kg IP vs SC	ns	>0.9999
F027500069 1 mg/kg IP vs SC	ns	>0.9999

【圖11】

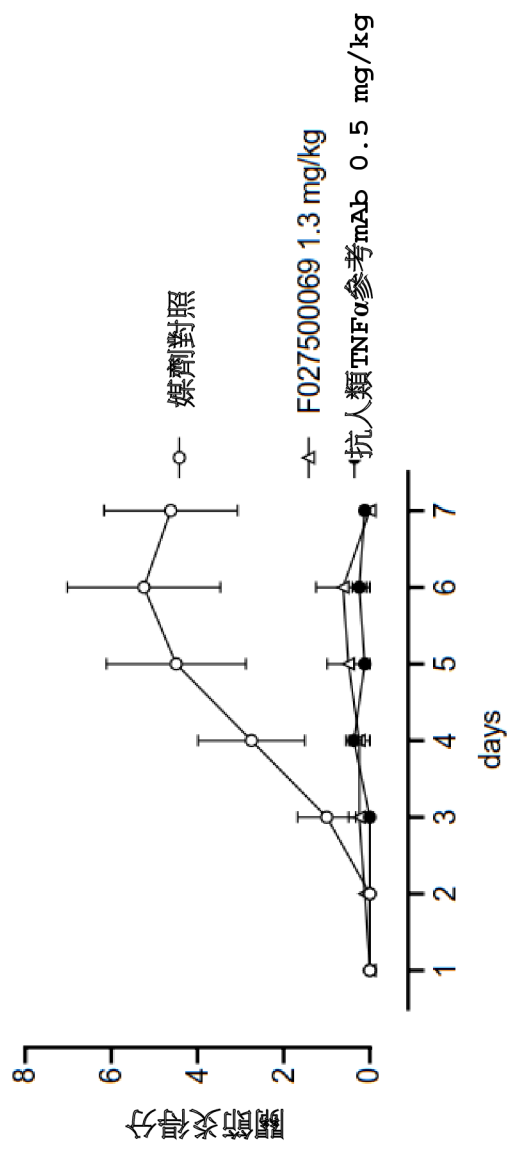
IL-23誘發的皮膚發炎-組織IL-22



Bonferroni 多重比較檢定	經調整的P值	
PBS [-IL23] vs Nab對照1 mg/kg	**	0.0048
NAb對照 vs F027500069 0.1 mg/kg IP	***	0.001
NAb對照 vs F027500069 1 mg/kg IP	****	<0.0001
NAb對照 vs F027500069 0.1 mg/kg SC	***	0.0005
NAb對照 vs F027500069 1 mg/kg SC	****	<0.0001
NAb對照 vs 抗人類IL-23餐考mAb1 3mg/kg	***	0.0006
F027500069 0.1 mg/kg IP vs SC	ns	>0.9999
F027500069 1 mg/kg IP vs SC	ns	>0.9999

【圖12】

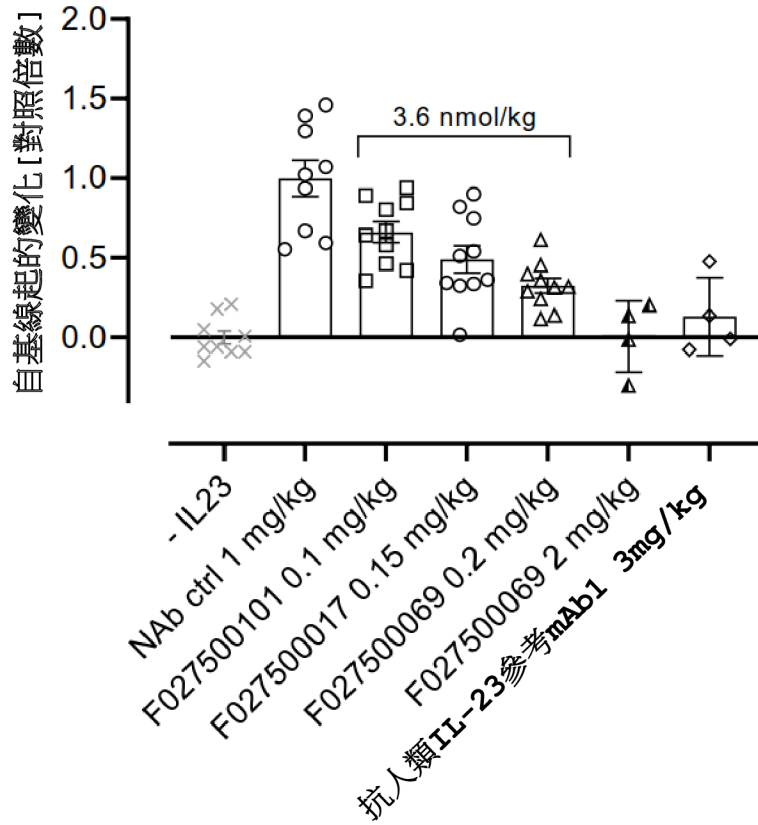
TNF/TNFR1人類化小鼠中的CAIA模型



Bonferroni 多重比較檢定	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	
媒劑對照 vs F027500069 1.3mg/kg	ns	0.1694	ns	0.0908	ns	0.0751 *
媒劑對照 vs 抗人類TNFα參考mAb 0.5mg/kg	ns	0.3713	ns	0.0621	ns	0.0524 *

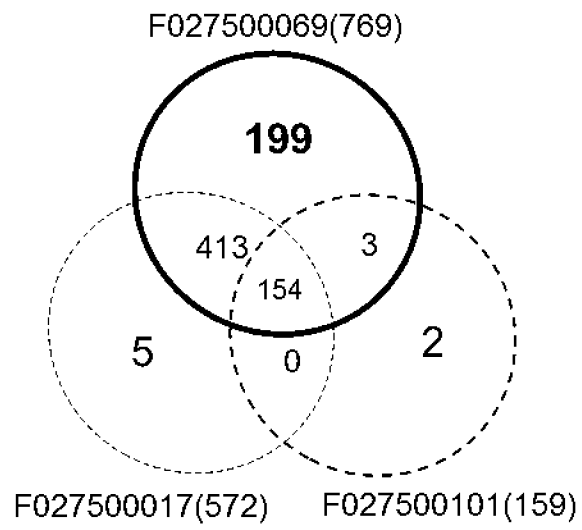
【圖13】

IL-23誘發的皮膚發炎-耳朵厚度d5



Bonferroni多重比較檢定	經調整的 P值	
Nab對照 1 mg/kg vs. F027500101 0.1 mg/kg	*	0.0115
Nab對照 1 mg/kg vs. F027500017 0.15 mg/kg	****	<0.0001
Nab對照 1 mg/kg vs. F027500069 0.2 mg/kg	****	<0.0001
F027500101 0.1 mg/kg vs. F027500069 0.2 mg/kg	**	0.0091
F027500017 0.15 mg/kg vs. F027500069 0.2 mg/kg	ns	0.557

【圖14】



【圖15】

F027500069



【圖16】