



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113166269 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 07

(21) 申请号 201980074538.8

(22) 申请日 2019.11.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113166269 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(30) 优先权数据
62/760,801 2018.11.13 US
62/855,580 2019.05.31 US
62/898,991 2019.09.11 US
62/931,478 2019.11.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.05.12

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/061226 2019.11.13

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/102387 EN 2020.05.22

(73) 专利权人 指南针制药有限责任公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 贡兵 R·雷纳德 A·F·乌潘特
梁倬纶 B·J·沃尔夫
U·埃斯基欧卡克 P·巴赫鲁
D·I·阿尔布

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003
专利代理师 吴小瑛 付文川

(51) Int.Cl.
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 104853776 A, 2015.08.19
CN 107001478 A, 2017.08.01
审查员 陈晋

权利要求书2页 说明书96页
序列表65页 附图35页

(54) 发明名称

对抗检查点分子的多特异性结合构建体及其用途

(57) 摘要

本公开涉及通过减少免疫检查点抑制来阻止肿瘤逃逸的组合物及方法。在一些实施方案中,本文提供了组合物,所述组合物阻断PD-1与其配体(例如,PD-1及/或PD-L2)之间的相互作用,同时促进PD-1及其配体在其上表达的细胞的相互作用。本公开还提供了使用此类组合物的方法。

1. 一种多特异性抗原结合构建体,其包含至少两个抗原结合臂,其中:
第一臂结合PD-1并且包含重链可变区和轻链可变区,第一臂的重链可变区包含SEQ ID NO:77的CDRH1、SEQ ID NO:71的CDRH2和SEQ ID NO:75的CDRH3,
第二臂结合PD-1配体并且包含重链可变区和轻链可变区,第二臂的重链可变区包含SEQ ID NO:1的CDRH1、SEQ ID NO:7的CDRH2和SEQ ID NO:8的CDRH3;
其中,第一臂的轻链可变区和第二臂的轻链可变区均包含SEQ ID NO:9的CDRL1、SEQ ID NO:5的CDRL2和SEQ ID NO:10的CDRL3;并且
其中,所述多特异性抗原结合构建体阻断PD-1与PD-1配体的相互作用。
2. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:90的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。
3. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:90的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
4. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。
5. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
6. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第一和第二抗原结合臂均包含共同的轻链可变区。
7. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中所述构建体包含至少两个结合PD-1的臂和至少两个结合PD-L1的臂。
8. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中所述构建体包含特异性针对PD-1的二价抗体和特异性针对PD-L1的二价抗体,其中特异性针对PD-1的二价抗体和特异性针对PD-L1的二价抗体是连接的。
9. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第一臂的重链具有与SEQ ID NO:100的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列,并且其中第一臂和第二臂的轻链具有与SEQ ID NO:101的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。
10. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第一臂的重链具有与SEQ ID NO:100的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列,并且其中第一臂和第二臂的轻链具有与SEQ ID NO:101的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
11. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第一臂的重链具有SEQ ID NO:100的氨基酸序列,并且其中第一臂和第二臂的轻链具有SEQ ID NO:101的氨基酸序列。
12. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:90的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
13. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:90的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。
14. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第一臂的重链可变区包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列。
15. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

16. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:55的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

17. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第二臂的重链可变区包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列。

18. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第一臂的重链具有与SEQ ID NO:100的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列,并且其中第一臂和第二臂的轻链具有与SEQ ID NO:101的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

19. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第一臂的重链具有与SEQ ID NO:100的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列,并且其中第一臂和第二臂的轻链具有与SEQ ID NO:101的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

20. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第一臂结合免疫细胞表达的PD-1。

21. 如权利要求1的多特异性抗原结合构建体,其中第二臂结合第二细胞表达的PD-1配体。

22. 如权利要求21的多特异性抗原结合构建体,其中所述第二细胞是肿瘤细胞,且所述PD-1配体是PD-L1。

对抗检查点分子的多特异性结合构建体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请主张2018年11月13日提交的美国临时申请案号62/760,801、2019年5月31日提交的美国临时申请案号62/855,580、2019年9月11日提交的美国申请案号62/898,991、及2019年11月6日提交的美国申请案号62/931,478的优先权的效益。上述申请的全文以引用的方式并入本文。

背景技术

[0003] 癌症为美国及全世界导致死亡的主要原因之一。虽然在20世纪常见治疗(诸如手术、放射、化疗、激素疗法、靶向疗法及免疫疗法)已降低了癌症相关死亡的比率,但是截至2012年全世界诊断出1410万例新癌症病例,癌症死亡例有820万。即使在20世纪总体癌症生存率有所提高,癌症仍导致全世界七分之一的死亡。参见美国癌症协会,全球癌症事实与数据(American Cancer Society, Global Cancer Facts&Figures)第3版,Atlanta: American Cancer Society; 2015。

[0004] 近几年,越来越多证据表明,免疫系统作为肿瘤形成及进展的重要屏障发挥作用。具有抗肿瘤潜力或活性的天然产生的T细胞存在于癌症患者中这一原理,已使肿瘤学免疫疗法的开发合理化。免疫细胞(诸如T细胞、巨噬细胞及自然杀伤细胞)可显示抗肿瘤活性和有效控制恶性肿瘤的出现及生长。肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原可诱导免疫细胞识别并消除恶性肿瘤(Chen&Mellman, (2013) Immunity 39(1):1-10)。尽管存在肿瘤特异性免疫反应,但是恶性肿瘤经常通过各种免疫调节机制逃逸或避免免疫攻击,从而难以控制肿瘤的出现及进展(Motz&Coukos, (2013) Immunity 39(1):61-730)。实际上,癌症的新兴标志是利用此类免疫调节机制以及导致肿瘤逃逸和逃脱免疫杀死的抗肿瘤免疫反应的损坏(Hanahan及Weinberg (2011) Cell 144(5):646-674)。

[0005] 癌症免疫疗法的新方法涉及对抗这些免疫逃逸和逃脱机制并诱导内源免疫系统排斥肿瘤。然而,仍需要有效对抗免疫逃逸的新的治疗剂,尤其是癌症治疗剂。

[0006] 发明概述

[0007] 本公开部分基于靶向PD-1和PD-L1二者的新的多特异性的多价构建体,例如双特异性的四价构建体。如本文中所证实,这些多特异性构建体与单独抗体的组合相比,以及与临床检查点阻断剂相比,具有改良的体外和体内功效。本文还提供了新的单克隆抗PD-1抗体及其抗原结合片段,和新的单克隆抗PD-L1抗体及其抗原结合片段,用于此类多特异性的多价构建体。这些新的单克隆抗PD-1抗体和新的单克隆抗PD-L1抗体中的一些具有共同的轻链,从而允许产生具有惊人的优异类药性质(DLP)和制造便宜性以及类似于其亲本抗体的亲和力的多特异性的多价构建体。本公开亦部分基于以下发现:阻断免疫细胞表达的PD-1与在第二细胞上表达的其配体(例如,PD-L1或PD-L2)之间的相互作用,同时桥接免疫细胞与第二细胞(例如,另一免疫细胞或表达PD-1配体的肿瘤细胞)强烈增强了例如T细胞增殖、IFN γ 产生及分泌、和T细胞的溶细胞活性。因此,本文提供了阻断PD-1与其配体之间的相互作用同时促进PD-1及其配体(PD-L1或PD-L2)在其上表达的细胞的相互作用(桥接)的组合

物。如本文中所例示,具有“阻断和桥接”能力的本公开的此类组合物与例如具有化学计量的单独结合受体及配体的药剂的混合物或结合受体或配体的单药剂相比,提供了优越的抗肿瘤功效(如通过例如IFN γ 产生和分泌及体内活性所测)。亦发现本文所述的靶向PD-1及PD-L1二者的多特异性的多价构建体以价态依赖方式引起细胞表面上PD-1表达的损失。当以化学计量上等同的量使用亲本抗体的组合时,未观察到这种PD-1表达的损失。因此,本文所述的靶向PD-1及PD-L1二者的多特异性的多价构建体提供了具有增加的效能及功效的新的免疫治疗剂,用于治疗癌症。

[0008] 在一些实施方案中,本文所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者结合至少两个不同受体或表位(例如,PD-1及PD-L1),其中多特异性抗原结合构建体所结合的所述两个不同受体或表位在相同细胞的表面上表达。例如,在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体同时结合PD-1及PD-L1,其中PD-1及PD-L1在相同细胞的表面上表达。在一些实施方案中,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者结合至少两个不同受体或表位(例如,PD-1及PD-L1),其中多特异性抗原结合构建体所结合的所述两个不同受体或表位在两个不同细胞的表面上表达。例如,在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体同时结合在第一细胞的表面上表达的PD-1及在第二细胞的表面上表达的PD-1配体,例如,PD-L1或PD-L2。

[0009] 在一些实施方案中,本公开提供包含至少两个抗原结合臂的多特异性抗原结合构建体,其中第一臂结合免疫细胞表达的PD-1,第二臂结合第二细胞表达的PD-1配体,其中多特异性抗原结合构建体阻断PD-1与PD-1配体的相互作用。在一些实施方案中,PD-1配体为PD-L2。在一些实施方案中,PD-1配体为PD-L1。在一些实施方案中,免疫细胞为T细胞。在一些实施方案中,T细胞为CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为巨噬细胞。在一些实施方案中,第二细胞为第二免疫细胞。在一些实施方案中,第二免疫细胞为T细胞、B细胞、巨噬细胞、源自骨髓的抑制细胞、树突状细胞或间质基质细胞(mesenchymal stromal cell)中的任一者或多者。在一些实施方案中,第二免疫细胞为调节性T细胞。在一些实施方案中,第二细胞为肿瘤细胞。在一些实施方案中,肿瘤细胞系选自由以下组成的组:血癌、淋巴瘤、骨髓瘤、白血病、神经癌、黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肺癌、头颈癌、胃肠癌、肝癌、胰癌、泌尿生殖器癌、骨癌、肾癌及血管癌。在一些实施方案中,两个臂具有至少 1×10^{-7} M、至少 1×10^{-8} M、至少 1×10^{-9} M或至少 1×10^{-10} M的 K_D 。在一些实施方案中,一个臂与其靶的结合不阻断另一臂与其靶的结合。在一些实施方案中,第一臂及第二臂结合至其各自的靶且两个臂保持同时结合。在一些实施方案中,第一臂及第二臂与其各自靶的结合可将免疫细胞与第二细胞桥接在一起。在一些实施方案中,免疫细胞与第二细胞的桥接系通过流式细胞测量术测定的。在一些实施方案中,第一臂为PD-1的拮抗剂。

[0010] 在多特异性抗原结合构建体的一些实施方案中,第一臂结合PD-1且包含:(a)重链可变区,其包含(i)包含SEQ ID NO:70(FTFX₁X₂YAX₃X₄,其中X₁=S、R、G或N;X₂=D、S、N、A、R或G;X₃=M或L;X₄=S、L或N)的CDRH1;(ii)包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYYTYA)的CDRH2;及(iii)包含SEQ ID NO:72(ARGLDFIVGX₅TGNDY,其中X₅=A、Y或R)的CDRH3;及(b)轻链可变区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0011] 在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:73 (FTFSDYAMS),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:74 (ARGLDFIVGATGNDY)。在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:73 (FTFSDYAMS),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:76 (FTFSSYAMS),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:77 (FTFSSYAML),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:78 (FTFSNYALS),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:79 (FTFSAYAMN),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:80 (FTFRSYAMS),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:81 (FTFGRYAMS),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:82 (FTFNSYAMS),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:83 (FTFSNYAMS),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:74 (ARGLDFIVGATGNDY)。在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:84 (FTFSGYAMS),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:85 (ARGLDFIVGRTGNDY)。在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:86 (FTFSSYAMN),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:85 (ARGLDFIVGRTGNDY)。在一些实施方案中,第一臂的CDRH1包含SEQ ID NO:80 (FTFRSYAMS),第一臂的CDRH2包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),第一臂的CDRH3包含SEQ ID NO:85 (ARGLDFIVGRTGNDY)。

[0012] 在一些实施方案中,第一臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),第一臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),第一臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。

[0013] 在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:87至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:88至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:89至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:90至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:91至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:92至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:93至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:94至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:95至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID

NO:96至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:97至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:98至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:99至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一臂的轻链可变区包含与SEQ ID NO:59至少90%相同的氨基酸序列。

[0014] 在一些实施方案中,第二臂为PD-1配体的拮抗剂。在一些实施方案中,第二臂为PD-L2的拮抗剂。在一些实施方案中,第二臂为PD-L1的拮抗剂。在一些实施方案中,第二臂结合PD-L1且包含:a.重链可变区,其包含(i)包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1;(ii)包含SEQ ID NO:2 (GGIIPX₁X₂GX₃ATYA,其中X₁为V或I;X₂为F、L或V;且X₃为T或A)的CDRH2;及(iii)包含SEQ ID NO:3 (ARLKX₁ELKDAFDI,其中X₁为G、F或N)的CDRH3;及b.轻链可变区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:4 (RASQX₁ISSYLN,其中X₁为S、W或Q)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:6 (X₁QSYSTPLT,其中X₁为Q或F)的CDRL3。

[0015] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:7 (GGIIPILGAATYA)及第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGEKDAFDI)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:7 (GGIIPILGAATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGEKDAFDI);第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。

[0016] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGEKDAFDI);第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),及第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGEKDAFDI)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGEKDAFDI);第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:12 (RASQWISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGEKDAFDI);第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:13 (RASQQISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGEKDAFDI);第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。

[0017] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:15 (GGIIPIFGIANYA),及第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGEKDAFDI)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:15 (GGIIPIFGIANYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8

(ARLKGELKDAFDI);第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。

[0018] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:16(GGIIPNFGTATYA)及第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:17(ARLKGELKGAGDI)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:16(GGIIPNFGTATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:17(ARLKGELKGAGDI);第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。

[0019] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11(GGIIPVFGTATYA),及第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:18(ARLKFELKDAFDI)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11(GGIIPVFGTATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:18(ARLKFELKDAFDI),第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。

[0020] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11(GGIIPVFGTATYA),及第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:19(ARLKGELKDAFDE)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11(GGIIPVFGTATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:19(ARLKGELKDAFDE),第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。

[0021] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11(GGIIPVFGTATYA),及第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:20(ARLKNELKDAFDI)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11(GGIIPVFGTATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:20(ARLKNELKDAFDI),第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。

[0022] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:21(GGVIPFLGTANYA),及第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:22(ARLKGILKDALDI)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:21(GGVIPFLGTANYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:22(ARLKGILKDALDI),第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。

[0023] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:29(GRIIPIFGTADYA),及第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8(ARLKGELKDAFDI)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:29(GRIIPIFGTADYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8(ARLKGELKDAFDI),第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。

[0024] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),第二臂的

CDRH2包含SEQ ID NO:31 (GGIIPILGTATYA),及第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:31 (GGIIPILGTATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI),第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。

[0025] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:33 (GGIPIVATANYA),及第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:33 (GGIPIVATANYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI),第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。

[0026] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:34 (GGIPIFGKATYA),及第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI)。在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:34 (GGIPIFGKATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI),第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。

[0027] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI);第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:38 (FQSYSTPLT)。

[0028] 在一些实施方案中,第二臂的CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),第二臂的CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),第二臂的CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI);第二臂的CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),第二臂的CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及第二臂的CDRL3包含SEQ ID NO:39 (QQSYSTILT)。

[0029] 在一些实施方案中,第二臂包含:a.重链可变区,其包含(i)包含SEQ ID NO:14 (GTFSSYAFS)的CDRH1,(ii)包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2及(iii)包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;及b.轻链可变区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0030] 在一些实施方案中,第二臂包含重链可变区,重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS)的CDRH1,(ii)包含SEQ ID NO:24 (GGIPIVGIANYA)的CDRH2,及(iii)包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3。在一些实施方案中,第二臂包含轻链可变区,轻链可变区包含:(i)包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0031] 在一些实施方案中,第二臂包含重链可变区,重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS)的CDRH1,(ii)包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,及(iii)包含SEQ ID NO:25 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3。在一些实施方案中,第二臂包含轻链可变区,轻链可变区包含:(i)包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5

(AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0032] 在一些实施方案中,第二臂包含重链可变区,重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:23(GTFSSYAIS)的CDRH1,(ii)包含SEQ ID NO:26(GRIIPLFGTAHYA)的CDRH2,及(iii)包含SEQ ID NO:8(ARLKGELKDAFDI)的CDRH3。在一些实施方案中,第二臂包含轻链可变区,轻链可变区包含:(i)包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0033] 在一些实施方案中,第二臂包含重链可变区,重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:23(GTFSSYAIS)的CDRH1,(ii)包含SEQ ID NO:27(GRINPILGTANYA)的CDRH2,及(iii)包含SEQ ID NO:28(ARLKGELKDAFSI)的CDRH3。在一些实施方案中,第二臂包含轻链可变区,轻链可变区包含:(i)包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0034] 在一些实施方案中,第二臂包含重链可变区,重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:23(GTFSSYAIS)的CDRH1,(ii)包含SEQ ID NO:11(GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,及(iii)包含SEQ ID NO:30(ARLKGELKCAFDI)的CDRH3。在一些实施方案中,第二臂包含轻链可变区,轻链可变区包含:(i)包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0035] 在一些实施方案中,第二臂包含重链可变区,重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:122(GTKSSYAIS)的CDRH1,(ii)包含SEQ ID NO:11(GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,及(iii)包含SEQ ID NO:30(ARLKGELKCAFDI)的CDRH3。在一些实施方案中,第二臂进一步包含轻链可变区,轻链可变区包含:(i)包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0036] 在一些实施方案中,第二臂包含重链可变区,重链可变区包含(i)包含SEQ ID NO:36(GPFRSHAVS)的CDRH1,(ii)包含SEQ ID NO:11(GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,及(iii)包含SEQ ID NO:37(ARLKSELKDAFDI)的CDRH3。在一些实施方案中,第二臂包含轻链可变区,轻链可变区包含:(i)包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0037] 在一些实施方案中,结合PD-L1的第二臂包含:包含与SEQ ID NO:35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58中的任一者至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区,及包含与SEQ ID NO:59、60、61、62或63中的任一者至少90%相同的氨基酸序列的轻链可变区。

[0038] 在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:35(QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGELKDAFDIWGQGTMTVSS)至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:40(QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGELKDAFDIWGQGTMTVSS)至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:41(QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGELKDAFDIWGQGTMTVSS)至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:42(QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCK

KASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPNFGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGELKGAGDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:43 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKFELKDAFDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:44 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGELKDAFDEWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:45 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGELKDAFDIWGQGLTVTAST) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:46 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKNELKDAFDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:47 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGVIPFLGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGILKDALDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:48 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQDLEWMGGIIPVIGIANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGELKDAFDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:49 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGFEKDAFDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:50 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGRIIPLFGTAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGELKDAFDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:51 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGRINPILGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGELKDAFSDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:52 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGRIIPIFGTADYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGELKDAFDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:53 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGELKDAFDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:54 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRKGELKDAFDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:55 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGAATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKGELKDAFDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:56 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPIVATANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRKGELKDAFDIWGQGLTVTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与

SEQ ID NO:57 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRKGLKDAFDIWGQGTTLTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的重链可变区包含与SEQ ID NO:58 (QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGPFRSHAVSWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFGTATYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLKSELKDAFDIWGQGTTLTVSS) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的轻链可变区包含与SEQ ID NO:59 (DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的轻链可变区包含与SEQ ID NO:60 (DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQWISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的轻链可变区包含与SEQ ID NO:61 (DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的轻链可变区包含与SEQ ID NO:62 (DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQSYSTPLTFGGGTKVEIK) 至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二臂的轻链可变区包含与SEQ ID NO:63 (DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTILTFGGGTKVEIK) 至少90%相同的氨基酸序列。

[0039] 在本文所述任一方面的一些实施方案中,构建体为双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体为PD-1及PD-1配体二者的拮抗剂。在一些实施方案中,构建体包含共同轻链(a common light chain)。在一些实施方案中,所述臂中之一者或二者为适体。在一些实施方案中,所述臂中之一者或二者为除了抗体外的蛋白质。在一些实施方案中,构建体包含至少两个双特异性抗体。在一些实施方案中,所述至少两个双特异性抗体中之一者对PD-1是单价。在一些实施方案中,所述至少两个双特异性抗体中之一者对PD-1配体是单价。在一些实施方案中,所述臂中的至少一者为特异性针对PD-1的二价抗体。在一些实施方案中,所述臂中的至少一者为特异性针对PD-L1的二价抗体。在一些实施方案中,所述臂中的至少一者为特异性针对PD-1的二价抗体,且所述臂中的至少一者为特异性针对PD-L1的二价抗体。在一些实施方案中,所述臂中的至少一者对PD-1是二价。在一些实施方案中,所述臂中的至少一者对PD-L1是二价。在一些实施方案中,所述臂中的至少一者对PD-1是二价,且所述臂中的至少一者对PD-L1是二价。在一些实施方案中,双特异性抗体结合PD-1上的两个不同表位。在一些实施方案中,双特异性抗体结合PD-1配体上的两个不同表位。

[0040] 在一些实施方案中,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者包含至少两个单特异性抗体。在一些实施方案中,所述单特异性抗体中的至少一者为抗PD-1抗体。在一些实施方案中,抗PD-1抗体为二价抗PD-1抗体。在一些实施方案中,所述单特异性抗体中的至少一者为抗PD-L1抗体。在一些实施方案中,抗PD-1抗体为二价抗PD-L1抗体。在一些实施方案中,构建体包含二价抗PD-1抗体及二价抗PD-L1抗体。在一些实施方案中,构建体为融合构建体,其中包含抗PD-1抗体的可变重链的多肽融合至包含抗PD-L1抗体的可变重链的多肽。在一些实施方案中,包含抗PD-1抗体的可变重链的多肽借助连接物融合至包含抗PD-L1抗体的可变重链的多肽。在一些实施方案中,融合构建体包含共同轻链。在一些实施方案中,在共同轻链的存在下融合构建体的N-端可变重链结合至PD-1,在共同轻链的存

在下融合构建体的C-端可变重链结合至PD-L1。在一些实施方案中,在共同轻链的存在下融合构建体的N-端可变重链结合至PD-L1,在共同轻链的存在下融合构建体的C-端可变重链结合至PD-1。

[0041] 在一些方面和实施方案中,本公开提供了包含至少两个抗原结合单元的多特异性抗原结合构建体,其中第一抗原结合单元结合PD-1,第二抗原结合单元结合PD-1配体。在一些实施方案中,第一抗原结合单元结合免疫细胞表达的PD-1。在一些实施方案中,第二抗原结合单元结合第二细胞表达的PD-1。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体阻断PD-1与PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)的相互作用。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体阻断PD-1与PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)的相互作用。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含至少两个结合PD-1的抗原结合单元。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个结合PD-1的抗原结合单元。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含至少两个结合PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)的抗原结合单元。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个结合PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)的抗原结合单元。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含至少四个抗原结合单元,其中两个抗原结合单元结合PD-1,两个抗原结合单元结合PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含四个抗原结合单元,其中两个抗原结合单元结合PD-1,两个抗原结合单元结合PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)。在一些实施方案中,各抗原结合单元能独立地结合至其同源抗原,即,PD-1或PD-1配体,诸如PD-L1或PD-L2。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体促进来自细胞的PD-1表达的损失。在一些实施方案中,PD-1表达的损失是由于PD-1脱落。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体阻断PD-1与PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)的相互作用。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含共同轻链。例如,至少两个抗原结合单元包含共同轻链。

[0042] 在一些实施方案中,第一抗原结合单元结合PD-1且包含:

[0043] (a) 重链可变区,其包含(i)包含SEQ ID NO:70(FTFX₁X₂YAX₃X₄,其中X₁=S、R、G或N; X₂=D、S、N、A、R或G; X₃=M或L; X₄=S、L或N)的CDRH1; (ii)包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYYTYA)的CDRH2;及(iii)包含SEQ ID NO:72(ARGLDFIVGX₅TGNDY,其中X₅=A、Y或R)的CDRH3;以及

[0044] (b) 轻链可变区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1; (ii)包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0045] 在一些此类实施方案中,第一抗原结合单元结合PD-1且包含:

[0046] (a) 包含SEQ ID NO:73(FTFSDYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYYTYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:74(ARGLDFIVGATGNDY)的CDRH3;

[0047] (b) 包含SEQ ID NO:73(FTFSDYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYYTYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0048] (c) 包含SEQ ID NO:76(FTFSSYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYYTYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0049] (d) 包含SEQ ID NO:77(FTFSSYAML)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYYTYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0050] (e) 包含SEQ ID NO:78(FTFSNYALS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYYTYA)

的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0051] (f) 包含SEQ ID NO:79 (FTFSAYAMN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0052] (g) 包含SEQ ID NO:80 (FTFRSYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0053] (h) 包含SEQ ID NO:81 (FTFGRYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0054] (i) 包含SEQ ID NO:82 (FTFNSYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0055] (j) 包含SEQ ID NO:83 (FTFSNYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:74 (ARGLDFIVGATGNDY)的CDRH3;

[0056] (k) 包含SEQ ID NO:84 (FTFSGYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:85 (ARGLDFIVGRTGNDY)的CDRH3;

[0057] (l) 包含SEQ ID NO:86 (FTFSSYAMN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA)的CDRH2及包含SEQ ID NO:85 (ARGLDFIVGRTGNDY)的CDRH3;或

[0058] (m) 包含SEQ ID NO:80 (FTFRSYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),及包含SEQ ID NO:85 (ARGLDFIVGRTGNDY)的CDRH3。

[0059] 在一些实施方案中,第一抗原结合单元结合PD-1且包含:

[0060] (a) 包含与SEQ ID NO:87至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0061] (b) 包含与SEQ ID NO:88至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0062] (c) 包含与SEQ ID NO:89至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0063] (d) 包含与SEQ ID NO:90至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0064] (e) 包含与SEQ ID NO:91至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0065] (f) 包含与SEQ ID NO:92至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0066] (g) 包含与SEQ ID NO:93至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0067] (h) 包含与SEQ ID NO:94至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0068] (i) 包含与SEQ ID NO:95至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0069] (j) 包含与SEQ ID NO:96至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0070] (k) 包含与SEQ ID NO:97至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0071] (l) 包含与SEQ ID NO:98至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;或

[0072] (m) 包含与SEQ ID NO:99至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区。

[0073] 在一些实施方案中,第一抗原结合单元结合PD-1且包含包含与SEQ ID NO:59至少90%相同的氨基酸序列的轻链可变区。

[0074] 在一些实施方案中,第二抗原结合单元结合PD-L2。在一些实施方案中,第二抗原结合单元结合PD-L1。在一些实施方案中,第二抗原结合单元结合PD-L1且包含:

[0075] a. 重链可变区,其包含 (i) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1; (ii) 包含SEQ ID NO:2 (GGIIPX₁X₂GX₃ATYA,其中X₁为V或I;X₂为F、L或V;且X₃为T或A)的CDRH2;及 (iii) 包含SEQ ID NO:3 (ARLKX₁ELKDAFDI,其中X₁为G、F或N)的CDRH3;及

[0076] b. 轻链可变区,其包含: (i) 包含SEQ ID NO:4 (RASQX₁ISSYLN,其中X₁为S、W或Q)的

CDRL1; (ii) 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2; 及 (iii) 包含SEQ ID NO:6 (X_1 QSYSTPLT, 其中 X_1 为Q或F) 的CDRL3。

[0077] 在一些此类实施方案中, 第二抗原结合单元结合PD-L1且包含:

[0078] (a) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:7 (GGIIPILGAATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3;

[0079] (b) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:7 (GGIIPILGAATYA) 的CDRH2, 包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;

[0080] (c) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;

[0081] (d) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3;

[0082] (e) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:12 (RASQWISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;

[0083] (f) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:13 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;

[0084] (g) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;

[0085] (h) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:15 (GGIIPIFGIANYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3;

[0086] (i) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:15 (GGIIPIFGIANYA) 的CDRH2, 包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;

[0087] (j) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:16 (GGIIPNFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:17 (ARLKGELKGAGDI) 的CDRH3;

[0088] (k) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:16 (GGIIPNFGTATYA) 的CDRH2, 包含SEQ ID NO:17 (ARLKGELKGAGDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;

[0089] (l) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:18 (ARLKFELKDAFDI) 的CDRH3;

[0090] (m) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 包含SEQ ID NO:18 (ARLKFELKDAFDI) 的CDRH3, 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;

[0091] (n) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:19 (ARLKGELKDAFDE) 的CDRH3;

- [0092] (o) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:19 (ARLKGELKDAFDE)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;
- [0093] (p) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:20 (ARLKNELKDAFDI)的CDRH3;
- [0094] (q) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:20 (ARLKNELKDAFDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;
- [0095] (r) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:21 (GGVIPFLGTANYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:22 (ARLKGILKDALDI)的CDRH3;
- [0096] (s) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:21 (GGVIPFLGTANYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:22 (ARLKGILKDALDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;
- [0097] (t) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:29 (GRIIPFGTADYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;
- [0098] (u) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:29 (GRIIPFGTADYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;
- [0099] (v) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:31 (GGIIPILGTATYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI)的CDRH3;
- [0100] (w) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:31 (GGIIPILGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;
- [0101] (x) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:33 (GGIIPIVATANYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI)的CDRH3;
- [0102] (y) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:33 (GGIIPIVATANYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;
- [0103] (z) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:34 (GGIIPFGKATYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI)的CDRH3;
- [0104] (aa) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:34 (GGIIPFGKATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;
- [0105] (bb) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:38 (FQSYSTPLT)的CDRL3;
- [0106] (cc) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:39 (QQSYSTILT)的CDRL3;

- [0107] (dd) 包含SEQ ID NO:14 (GTFSSYAFS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;
- [0108] (ee) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:24 (GGIIPVFGIANYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3;
- [0109] (ff) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:24 (GGIIPVFGIANYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;
- [0110] (gg) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:25 (ARLKGEFKDAFDI) 的CDRH3;
- [0111] (hh) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:25 (ARLKGEFKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;
- [0112] (ii) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:26 (GRIIPLFGTAHYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3;
- [0113] (jj) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:26 (GRIIPLFGTAHYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;
- [0114] (kk) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:27 (GRINPILGTANYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:28 (ARLKGELKDAFSI) 的CDRH3;
- [0115] (ll) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:27 (GRINPILGTANYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:28 (ARLKGELKDAFSI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;
- [0116] (mm) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:30 (ARLKGELKCAFDI) 的CDRH3;
- [0117] (nn) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:30 (ARLKGELKCAFDI); 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;
- [0118] (oo) 包含SEQ ID NO:36 (GPFRSHAVS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:37 (ARLKSELKDAFDI) 的CDRH3; 或
- [0119] (pp) 包含SEQ ID NO:36 (GPFRSHAVS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:37 (ARLKSELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10

(QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0120] 在一些此类实施方案中,第二抗原结合单元结合PD-L1且包含包含与SEQ ID NO: 35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58中的任一者至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区,及包含与SEQ ID NO:59、60、61、62或63中的任一者至少90%相同的氨基酸序列的轻链可变区。

[0121] 在一些实施方案中,第二抗原结合单元结合PD-L1且包含包含以下氨基酸序列的重链可变区:

[0122] (a) 与SEQ ID NO:35至少90%相同的氨基酸序列;

[0123] (b) 与SEQ ID NO:40至少90%相同的氨基酸序列;

[0124] (c) 与SEQ ID NO:41至少90%相同的氨基酸序列;

[0125] (d) 与SEQ ID NO:42至少90%相同的氨基酸序列;

[0126] (e) 与SEQ ID NO:43至少90%相同的氨基酸序列;

[0127] (f) 与SEQ ID NO:44至少90%相同的氨基酸序列;

[0128] (g) 与SEQ ID NO:45至少90%相同的氨基酸序列;

[0129] (h) 与SEQ ID NO:46至少90%相同的氨基酸序列;

[0130] (i) 与SEQ ID NO:47至少90%相同的氨基酸序列;

[0131] (j) 与SEQ ID NO:48至少90%相同的氨基酸序列;

[0132] (k) 与SEQ ID NO:49至少90%相同的氨基酸序列;

[0133] (l) 与SEQ ID NO:50至少90%相同的氨基酸序列;

[0134] (m) 与SEQ ID NO:51至少90%相同的氨基酸序列;

[0135] (n) 与SEQ ID NO:52至少90%相同的氨基酸序列;

[0136] (o) 与SEQ ID NO:53至少90%相同的氨基酸序列;

[0137] (p) 与SEQ ID NO:54至少90%相同的氨基酸序列;

[0138] (q) 与SEQ ID NO:55至少90%相同的氨基酸序列;

[0139] (r) 与SEQ ID NO:56至少90%相同的氨基酸序列;

[0140] (s) 与SEQ ID NO:57至少90%相同的氨基酸序列;或

[0141] (t) 与SEQ ID NO:58至少90%相同的氨基酸序列。

[0142] 在一些实施方案中,第二抗原结合单元结合PD-L1且包含包含以下氨基酸序列的轻链可变区:

[0143] (a) 与SEQ ID NO:59至少90%相同的氨基酸序列;

[0144] (b) 与SEQ ID NO:60至少90%相同的氨基酸序列;

[0145] (c) 与SEQ ID NO:61至少90%相同的氨基酸序列;

[0146] (d) 与SEQ ID NO:62至少90%相同的氨基酸序列;或

[0147] (e) 与SEQ ID NO:63至少90%相同的氨基酸序列。

[0148] 在一些方面及实施方案中,本文中亦提供了包含四个抗原结合单元的多特异性抗原结合构建体,其中两个抗原结合单元结合PD-1,两个抗原结合单元结合PD-L1,且其中构建体包含与SEQ ID NO:100或102的氨基酸序列至少85%相同的重链氨基酸序列,及与SEQ ID NO:101或103的氨基酸序列至少85%相同的轻链氨基酸序列。

[0149] 在一些方面及实施方案中,本文中亦提供了包含四个抗原结合单元的多特异性抗

原结合构建体,其中两个抗原结合单元结合PD-1,两个抗原结合单元结合PD-L1,且其中构建体包含与SEQ ID NO:100的氨基酸序列至少85%相同的重链氨基酸序列及与SEQ ID NO:101的氨基酸序列至少85%相同的轻链氨基酸序列。

[0150] 在一些方面及实施方案中,本文中亦提供了包含四个抗原结合单元的多特异性抗原结合构建体,其中两个抗原结合单元结合PD-1,两个抗原结合单元结合PD-L1,且其中构建体包含与SEQ ID NO:102的氨基酸序列至少85%相同的重链氨基酸序列及与SEQ ID NO:103的氨基酸序列至少85%相同的轻链氨基酸序列。

[0151] 在一些实施方案中,构建体不包含Fc域。在一些实施方案中,第一臂或第二臂或二者包含包含一或多个免疫球蛋白Fc修饰的重链。在一些实施方案中,重链的免疫球蛋白Fc域包含促进第一臂与第二臂的异二聚化的一或多个氨基酸突变。在一些实施方案中,突变是存在于重链的CH3域。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体在四源杂交瘤细胞(quadroma cell)中产生。在一些实施方案中,构建体包含一或多个免疫球蛋白恒定区修饰。在一些实施方案中,免疫球蛋白恒定区包含促进抗体的异二聚化的一或多个氨基酸突变。在一些实施方案中,一或多个突变存在于一个臂的轻链恒定区中,一或多个突变存在于另一臂的重链恒定区中。在一些实施方案中,双特异性抗体为选自以下组成的组的形式:双特异性IgG、双特异性抗体片段、双特异性融合蛋白、附加IgG(appended IgG)和双特异性抗体结合物。在一些实施方案中,Fc区具有减少的效应功能。在一些实施方案中,Fc区增强了构建体的半衰期。

[0152] 在一些实施方案中,构建体包含与SEQ ID NO:100或102的氨基酸序列至少85%相同的重链氨基酸序列。在一些实施方案中,构建体包含与SEQ ID NO:101或103的氨基酸序列至少85%相同的轻链氨基酸序列。在一些实施方案中,构建体包含与SEQ ID NO:100的氨基酸序列至少85%相同的重链氨基酸序列,且其中构建体包含与SEQ ID NO:101的氨基酸序列至少85%相同的轻链氨基酸序列。在一些实施方案中,构建体包含与SEQ ID NO:102的氨基酸序列至少85%相同的重链氨基酸序列,且其中构建体包含与SEQ ID NO:103的氨基酸序列至少85%相同的轻链氨基酸序列。

[0153] 在一些实施方案中,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者是无糖基化的。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能结合人类PD-1。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能结合鼠科PD-1。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能结合食蟹猴PD-1。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能以类似亲和力结合人类、鼠科及食蟹猴PD-1。

[0154] 在一些实施方案中,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者能降低细胞上的PD-1水平。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能诱导PD-1降解。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能减少PD-1表达。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能减少PD-1细胞表面表达。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体通过诱导PD-1自细胞表面脱落来减少PD-1细胞表面表达。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能结合PD-1及PD-L1二者且降低细胞上的PD-1水平。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能结合PD-1和PD-L1二者且诱导PD-1降解。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能结合PD-1和PD-L1二者且减少PD-1表达。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能诱导PD-1自免疫细胞脱落。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体

能结合PD-1和PD-L1二者且诱导PD-1自免疫细胞脱落。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能隔离PD-L1,使得PD-L1不能结合CD80。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能隔离PD-L1,使得PD-L1不能结合CD80,且其中CD80可自由结合CD28。在一些实施方案中,细胞为免疫细胞,诸如T细胞。在一些实施方案中,免疫细胞(例如,T细胞)为肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。在一些实施方案中,本文中所述的多特异性抗原结合分子与通过肿瘤微环境中的免疫细胞表达的PD-1的接合导致免疫细胞对PD-1的下调。在一些实施方案中,免疫细胞为T细胞。在一些实施方案中,免疫细胞(例如,T细胞)为肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0155] 在一些实施方案中,与参考抗原结合构建体(例如,派姆单抗(pembrolizumab)或阿特珠单抗(atezolizumab))相比或与抗原结合构建体的参考组合(例如,包含多特异性抗原结合构建体的PD-1臂和PD-L1臂的组合物,其中组合物中的PD-1臂和PD-L1臂不彼此结合)相比,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者能够诱导的干扰素- γ 水平高至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%(例如,如在金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)肠毒素A(“SEA”)测定法中所测量的)。在一些实施方案中,与参考抗原结合构建体(例如,派姆单抗或阿特珠单抗)相比或与抗原结合构建体的参考组合(例如,包含多特异性抗原结合构建体的PD-1臂及PD-L1臂的组合物,其中组合物中的PD-1臂及PD-L1臂不彼此结合)相比,多特异性抗原结合构建体能够诱导的介白素-2水平高至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%(例如,如在SEA测定法中所测量的)。

[0156] 在一些实施方案中,与参考抗原结合构建体(例如,派姆单抗或阿特珠单抗)相比或与抗原结合构建体的参考组合(例如,包含多特异性抗原结合构建体的PD-1臂和PD-L1臂的组合物,其中组合物中的PD-1臂和PD-L1臂不彼此结合)相比,多特异性抗原结合构建体诱导的肿瘤细胞(例如,白血病细胞、淋巴瘤细胞、黑色素瘤或乳癌细胞)杀死高至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、200%、300%、400%或500%。

[0157] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能延长患有癌症(例如,白血病、淋巴瘤、黑色素瘤及/或乳癌)的个体的生存期长于施用参考抗原结合构建体(例如,派姆单抗或阿特珠单抗)或抗原结合构建体的参考组合(例如,包含多特异性抗原结合构建体的PD-1臂和PD-L1臂的组合物,其中组合物中的PD-1臂和PD-L1臂不彼此结合)的个体至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%、200%、300%、400%或500%。在一些实施方案中,与未经处理的免疫细胞相比或与经参考抗原结合构建体(例如,派姆单抗或阿特珠单抗)或抗原结合构建体的参考组合(例如,包含多特异性抗原结合构建体的PD-1臂及PD-L1臂的组合物,其中组合物中的PD-1臂及PD-L1臂不彼此结合)处理的免疫细胞相比,多特异性抗原结合构建体能够诱导的PD-1自免疫细胞的脱落高至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%、200%、300%、400%或500%。在一些实施方案中,与未经处理的免疫细胞相比或与经参考抗原结合构建体(例如,派姆单抗或阿特珠单抗)或抗原结合构建体的参考组合(例如,包含多特异性抗原结合构建体的PD-1臂和PD-L1臂的组合物,其中组合物中的PD-1臂和PD-L1臂不彼此

结合)处理的免疫细胞相比,多特异性抗原结合构建体能(例如,通过引起PD-1自细胞表面脱落及/或诱导PD-1降解及/或减少PD-1表达)降低PD-1水平至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%、200%、300%、400%或500%。

[0158] 在一些实施方案中,本文中所述的多特异性抗原结合分子与细胞表达的PD-1的接合导致细胞的PD-1细胞表面表达的下调及/或损失。细胞表面表达的此下调或损失可部分由于例如细胞外PD-1自免疫细胞表面的脱落。在一些实施方案中,细胞为免疫细胞,诸如T细胞。在一些实施方案中,免疫细胞(例如,T细胞)为肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。在一些实施方案中,本文中所述的多特异性抗原结合分子与肿瘤微环境中的免疫细胞所表达的PD-1的接合导致该免疫细胞PD-1的下调。在一些实施方案中,免疫细胞为T细胞。在一些实施方案中,免疫细胞(例如,T细胞)为肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0159] 在一些方面中,本公开提供了一种治疗有需要个体的增殖性病症的方法,其包括向个体施用治疗上有效量的本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者,从而治疗个体的增殖性病症。在一些实施方案中,增殖性病症为癌症。在一些实施方案中,癌症是选自自由以下组成的组:血癌、神经癌、黑色素瘤、乳癌、肺癌、头颈癌、胃肠癌、肝癌、胰癌、泌尿生殖器癌、骨癌及血管癌。在一些实施方案中,本公开提供了一种增强有需要个体的免疫反应的方法,其包括向个体施用治疗上有效量的本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者,从而增强个体的免疫反应。在一些实施方案中,增强的免疫反应包括增强的T细胞功能、增强的NK细胞功能或增强的巨噬细胞功能中的任一者或多者。在一些实施方案中,T细胞功能的增强与结合PD-1或PD-1配体的药剂,或包含结合PD-1的药剂和结合PD-1配体的药剂的混合物相比,在施用多特异性抗原结合构建体后更大。在一些实施方案中,T细胞功能为增加的T细胞的IFN γ 产生、增强的T细胞生存、增加的T细胞增殖或自耗尽的T细胞表型的营救中的任一者或多者。在一些实施方案中,增强的T细胞功能与结合PD-1或PD-1配体的药剂,或包含结合PD-1的药剂和结合PD-1配体的药剂的混合物相比,在施用多特异性抗原结合构建体后更大。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体是经皮下、经静脉内、经皮内、经腹膜内、经口、经肌肉内或经颅内施用。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体结合至在个体的相同细胞的表面上表达的PD-1和PD-L1。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体结合至在个体的第一细胞的表面上表达的PD-1,且其中多特异性抗原结合构建体结合至在个体的第二细胞的表面上表达的PD-L1。

[0160] 在一些实施方案中,本公开提供了抗PD1抗体或其抗原结合片段,其中抗PD-1抗体或抗原结合片段包含:(a)重链可变区,其包含(i)包含SEQ ID NO:70(FTFX₁X₂YAX₃X₄,其中X₁=S、R、G或N;X₂=D、S、N、A、R或G;X₃=M或L;X₄=S、L或N)的CDRH1;(ii)包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYYTYA)的CDRH2;及(iii)包含SEQ ID NO:72(ARGLDFIVGX₅TGNDY,其中X₅=A、Y或R)的CDRH3;及(b)轻链可变区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3。在一些实施方案中,抗PD-1抗体或抗原结合片段包含:(a)重链可变区,其包含(i)包含SEQ ID NO:73、76、77、78、79、80、81、82、83、84或86中的任一者的氨基酸序列的CDRH1;(ii)包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的CDRH2;及(iii)包含SEQ ID NO:74、75或85中的任一者的氨基酸序列的CDRH3;及(b)轻链可变区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1;

(ii) 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2;及(iii) 包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3。在一些实施方案中,重链可变区包含与SEQ ID NO:87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99中的任一者的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链可变区包含与SEQ ID NO:59的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。

[0161] 在一些实施方案中,本公开提供了抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,其中抗PD-L1抗体或抗原结合片段包含:a.重链可变区,其包含(i) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1;(ii) 包含SEQ ID NO:2 (GGIIPX₁X₂GX₃ATYA,其中X₁为V或I;X₂为F、L或V;且X₃为T或A)的CDRH2;及(iii) 包含SEQ ID NO:3 (ARLKX₁ELKDAFDI,其中X₁为G、F或N)的CDRH3;及b.轻链可变区,其包含:(i) 包含SEQ ID NO:4 (RASQX₁ISSYLN,其中X₁为S、W或Q)的CDRL1;(ii) 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2;及(iii) 包含SEQ ID NO:6 (X₁QSYSTPLT,其中X₁为Q或F)的CDRL3。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体或抗原结合片段包含:(a) 重链可变区,其包含(i) 包含SEQ ID NO:1、14、23、36或122中的任一者的氨基酸序列的CDRH1;(ii) 包含SEQ ID NO:11、15、16、21、24、26、27、29、31、33或34中的任一者的氨基酸序列的CDRH2;及(iii) 包含SEQ ID NO:8、17、18、19、20、22、25、28、30、32或37中的任一者的氨基酸序列的CDRH3;及(b) 轻链可变区,其包含:(i) 包含SEQ ID NO:9、12或13中的任一者的氨基酸序列的CDRL1;(ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDRL2;及(iii) 包含SEQ ID NO:10、38或39中的任一者的氨基酸序列的CDRL3。在一些实施方案中,重链可变区包含与SEQ ID NO:40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58或35中的任一者的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链可变区包含与SEQ ID NO:59、60、61、62或63中的任一者的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。

[0162] 在一些实施方案中,本公开提供一种治疗有需要个体的增殖性病症的方法,其包括向个体施用治疗上有效量的本文中所公开的抗体或抗原结合构建体中的任一者,从而治疗个体的增殖性病症。在一些实施方案中,增殖性病症为癌症。在一些实施方案中,癌症选自以下组成的组:血癌、神经癌、黑色素瘤、乳癌、肺癌、头颈癌、胃肠癌、肝癌、胰癌、泌尿生殖器癌、骨癌及血管癌。

[0163] 在一些实施方案中,本公开提供一种增强有需要个体的免疫反应的方法,其包括向个体施用治疗上有效量的本文中所公开的抗体或抗原结合构建体中的任一者,从而增强个体的免疫反应。

[0164] 在一些实施方案中,本文中所述方法中的任一者可包括在与本文中所述的多特异性抗原结合分子接触之前及/或之后,检测一或多个细胞(或细胞群体,诸如TIL)的PD-1表达的存在或不存在。例如,本文中所述方法中的任一者可包括在向个体(例如,癌症患者)施用本文中所述的多特异性抗原结合分子之前及/或之后,检测一或多个细胞(或细胞群体,诸如TIL)的PD-1表达的存在或不存在。此类方法可用于例如测定用于治疗给定患者或患者群体的治疗上有效量的分子。检测PD-1表达的存在、减少及/或不不存在的方法为本领域技术人员已知,例如,使用流式细胞测量术、Western blotting、ELISA等。

[0165] 在另一方面中,本公开特征为一种方法,其包括在与本文中所述的多特异性抗原结合分子接触之前及/或之后,测量一或多个细胞(或细胞群体,诸如TIL)的PD-1表达的水平。在一些实施方案中,方法包括在向个体(例如,癌症患者)施用本文中所述的多特异性抗原结合分子之前及/或之后,测量一或多个细胞(或细胞群体,诸如TIL)的PD-1表达的水平。

[0166] 在又一方面中,本公开特征为一种方法,其包括在与本文中所述的多特异性抗原结合分子接触之前及/或之后,测量一或多个细胞(或细胞群体,诸如TIL)的PD-1表达的水平。例如,本文中所述方法中的任一者可包括在向个体(例如,癌症患者)施用本文中所述的多特异性抗原结合分子之前及/或之后,测量一或多个细胞(或细胞群体,诸如TIL)的PD-1表达的水平。此类方法可尤其用于检测或测量本文中所述分子对个体的生物效应。在一些实施方案中,在用本文中所述的多特异性抗原结合分子处理后免疫细胞(例如,自患者单离的TIL)的PD-1表达的水平的降低指示,分子已在个体中具有生物效应。在一些实施方案中,在用本文中所述的多特异性抗原结合分子处理后免疫细胞(例如,自患者分离的TIL)的PD-1表达的水平的降低指示,患者应接受一或多个剂量的所述分子,或以其他方式继续包含所述分子的疗法。

[0167] 在又一方面中,本公开特征为用于测定生物效应是否在用本文中所述的多特异性抗原结合分子处理的患者或患者群体中发生的方法。方法包括检测获自己已经施用本文中所述的多特异性抗原结合分子的一个或多个患者的一或多个测试免疫细胞(例如,效应免疫细胞,诸如于肿瘤微环境中的效应免疫细胞)的PD-1表达的存在或量,其中PD-1通过一或多个免疫细胞的PD-1表达(例如,细胞表面表达)水平相对于对照表达水平(例如,在施用所述分子之前与测试免疫细胞组织学类型相同的免疫细胞的PD-1表达水平)降低,指示生物效应已在患者或患者群体中产生。在一些实施方案中,方法包括在检测之前施用多特异性抗原结合分子。在一些实施方案中,方法包括向已经测定产生生物效应的患者或患者群体施用多特异性抗原结合分子。在一些实施方案中,对照PD-1表达水平大约为尚未诊断为患有癌症的个体群体中相同组织学类型的免疫细胞的PD-1的中间或平均表达水平。在一些实施方案中,对照PD-1表达水平大约为尚未施用本文中所述的多特异性抗原结合分子和/或结合和/或抑制PD-1的药剂的个体群体中的相同组织学类型的免疫细胞的PD-1的中间或平均表达水平。

[0168] 在又一方面中,本公开特征为一种减少个体(例如,癌症患者)中一或多个免疫细胞的PD-1表达的方法,所述方法包括向个体施用本文中所述的多特异性抗原结合分子,从而减少个体中一或多个免疫细胞的PD-1表达。在一些实施方案中,方法包括测定患者中一或多个免疫细胞的PD-1表达的减少是否产生。在一些实施方案中,方法包括自个体获得包含一或多个免疫细胞的生物样品(例如,肿瘤活组织检查)(例如,在向个体施用所述分子后)。在一些实施方案中,方法包括测量生物样品中一或多个免疫细胞的PD-1表达的水平。

[0169] 在又一方面中,本公开特征为一种抑制个体(例如,癌症患者)中PD-L1与CD80之间的结合的方法,所述方法包括向个体施用本文中所述的多特异性抗原结合分子,从而抑制个体中PD-L1与CD80之间之结合。

[0170] 附图简述

[0171] 本专利或申请档案含有以彩色执行的至少一个绘图。具有彩色绘图的本专利或专利申请公开案的副本将在请求及支付必要费用后由官方提供。

[0172] 图1显示在用包括派姆单抗x阿特珠单抗双特异性、纳武单抗(Nivolumab)x阿特珠单抗双特异性、KEYTRUDA和阿特珠单抗的混合物、及纳武单抗和阿特珠单抗的混合物的各种抗体混合物或双特异性抗体处理的混合淋巴细胞反应(MLR)检定中的干扰素- γ (IFN γ)的诱导,与单独KEYTRUDA相比。结果显示在所示测试抗体的最终浓度下以pg/mL计的IFN γ

的浓度。

[0173] 图2显示于用包括派姆单抗x纳武单抗双特异性、阿特珠单抗x阿特珠单抗四价融合、纳武单抗及阿特珠单抗的各种单克隆和双特异性抗体处理的混合淋巴细胞反应 (MLR) 检定中的干扰素- γ (IFN γ) 的诱导,与单独KEYTRUDA相比。结果显示在所示测试抗体的最终浓度下的以pg/mL计的IFN γ 的浓度。

[0174] 图3显示派姆单抗x阿特珠单抗双特异性体的示意图和氨基酸序列。针对派姆单抗_aglyco-IgG1- (G4S)₄重链(H链;SEQ ID NO:104)和轻链(L链;SEQ ID NO:105)及针对阿特珠单抗_FabH- (G4S)₄重链(H链;SEQ ID NO:106)和轻链(L链;SEQ ID NO:107)提供单独序列。

[0175] 图4显示纳武单抗x阿特珠单抗双特异性体的示意图及氨基酸序列。针对纳武单抗_aglyco-IgG1- (G₄S)₄重链(H链;SEQ ID NO:108)和轻链(L链;SEQ ID NO:109)及针对阿特珠单抗FabH- (G4S)₄重链(H链;SEQ ID NO:106)和轻链(L链;SEQ ID NO:107)提供单独序列。

[0176] 图5显示949aglyco-IgG1x阿特珠单抗双特异性体的示意图及氨基酸序列。针对949_aglyco-IgG1- (G₄S)₄重链(H链;SEQ ID NO:110)和轻链(L链;SEQ ID NO:111)及针对阿特珠单抗_FabH- (G4S)₄重链(H链;SEQ ID NO:106)和轻链(L链;SEQ ID NO:107)提供单独序列。

[0177] 图6显示阿特珠单抗x纳武单抗双特异性体的示意图及氨基酸序列。针对阿特珠单抗_aglyco-IgG1- (G4S)₄重链(H链;SEQ ID NO:112)和轻链(L链;SEQ ID NO:107)及纳武单抗_HC Fab- (G4S)₄重链(H链;SEQ ID NO:113)和轻链(L链;SEQ ID NO:109)提供单独序列。

[0178] 图7显示作为在各种浓度下测试的抗体的函数的混合淋巴细胞反应 (MLR) 检定中的IFN- γ 释放,单位pg/mL(右图)。这些结果指示呈多特异性形式的双特异性抗体PD-1xPD-L1(派姆单抗x阿特珠单抗)或(纳武单抗x阿特珠单抗)与派姆单抗和阿特珠单抗的混合物或纳武单抗和阿特珠单抗的混合物相比在飞摩尔(femtomolar)浓度下诱导更大IFN- γ 反应。显示针对mAb前体的双特异性形式的尺寸排阻层析法(左图)。

[0179] 图8显示识别证明协同作用的多特异性(例如,双特异性)抗体的工作流程的实例。过程包括在混合淋巴细胞反应 (MLR) 检定中无偏筛选检查点阻断剂组合,所述检定测量各种浓度下的IFN- γ 释放,单位pg/mL。在所说明的工作流程的第二步中,产生共同轻链双特异性体以进一步测试其功效;此处,描述了各种双特异性形式。在T细胞活化检定中,所识别的双特异性形式胜过已知PD-1阻断剂。

[0180] 图9A至9B显示在抗原非特异性T细胞检定中,双特异性体3与同种型对照抗体和KEYTRUDA二者相比,诱导通过CD3/CD28扩增的T-细胞的更高的K562-CD32-PDL1靶细胞杀死(图9A)和增加的IFN γ 产生(图9B)。甚至在0.01nM的低浓度下也可见通过双特异性体3的这种增加的杀死。

[0181] 图10A至10B显示双特异性体3对肿瘤细胞杀死的效应。图10A显示双特异性体3与KEYTRUDA及mAb1与mAb28的组合二者相比增加了通过在0.001至0.01nM的低浓度下的CMV特异性T-细胞对K562-A2-CMV-PDL1肿瘤抗原靶细胞的特异性杀死,这表明双特异性体3在较低剂量下可用于介导靶细胞的抗原特异性杀死。图10B显示双特异性体3较KEYTRUDA或mAb1与mAb28的组合在通过在0.001nM低浓度下的CMV特异性T-细胞特异性杀死Raji-A2-CMV-PDL1细胞肿瘤抗原靶细胞中更有效,这再次表明双特异性体3在较低剂量下可用于介导靶

细胞的抗原特异性杀死。

[0182] 图11显示于SEA刺激检定中,在所有测试剂量下,双特异性体3较KEYTRUDA诱导更多的IL-2。重要的是,双特异性体3与KEYTRUDA及mAb1与mAb28二者相比诱导增加的在更低抗体浓度下开始的IL-2产生。

[0183] 图12A至12G证实双特异性体3具有引起PD-1的内化及随后的降解或PD-1表达的损失的独特能力,并且此性质取决于所述分子的PD-1靶向臂及PD-L1靶向臂二者的接合。图12A至12B证实当与同种型对照、KEYTRUDA、mAb1与mAb28、阿特殊单抗、或阿特殊单抗与KEYTRUDA相比时,仅双特异性体3导致PD-1的内化及随后的降解或PD-1表达的损失。此外,如图12C中所示,当在添加双特异性体3的前5分钟将抗PD-L1抗体mAb1在50nM下添加至孔中时,双特异性体3驱动PD-1内化的能力丧失。这表明双特异性体3的两个臂应经接合以驱动PD-1表达损失和/或内化及/或降解。图12D显示当双特异性体的两个结合臂同时接合时,用双特异性体3的处理增加了上清液中PD-1的量。当PD-L1靶向臂通过mAb1阻断时,此效应丧失。这表明双特异性体3增加了PD-1脱落进入上清液。图12E证实结合臂的价态影响PD-1表达的损失程度。制备双特异性体5,其具有基于mAb1的VH及VL序列的结合PD-L1的第一N端Fab且具有基于mAb28的VH及VL序列的结合PD-1的第二N端Fab。换言之,双特异性体5与双特异性体3(其具有结合PD-L1的二价臂及结合PD-1的二价臂)相比具有一个结合PD-L1的单价臂及一个结合PD-1的单价臂。如所示,PD-1表达的损失在双特异性体5(二价)相比双特异性体3(四价)的更高剂量下开始出现,这表明双特异性体3的增加的价态导致对此差异。图12F证实用巴马司他(Batimastat)(其为多种MMP及ADAM(负责使蛋白质自细胞质膜裂解的脱落酶或蛋白酶)的广谱抑制剂)预处理极大减少了细胞相关的PD-1损失的量,这表明PD-1损失或脱落是由于通过MMP或ADAM蛋白酶的裂解。图12G表明当双特异性体3结合至呈反式构型(即,通过不同细胞表达)的PD-1及PD-L1时,其主要驱动细胞表面PD-1表达的损失。

[0184] 图13A至13B显示使用双特异性体3的体内结果。图13A描绘实验方案的示意图。图13B证实双特异性体3及组合mAb1与mAb28组二者与同种型及KEYTRUDA组二者相比显著延迟了肿瘤生长。此外,在第24天,在双特异性体3组与经mAb1与mAb28的组合处理的组之间存在显著差异,其中双特异性体3与组合相比引起肿瘤生长的更大延迟。无T细胞转移组较含有T细胞的任何组具有更侵略性生长的肿瘤。在此模型中,KEYTRUDA在延迟KACP肿瘤生长方面与同种型对照相比没有优势。

[0185] 图14A至14B显示在K562-A2-CMV-PD-L1肿瘤小鼠模型中使用双特异性体3的体内结果。图14A及14B为说明以下的图:虽然不同处理组各者与未经处理的小鼠相比产生了平均肿瘤生长的延迟,但是用T细胞及双特异性体3处理导致随时间的平均肿瘤生长的最大延迟。无T细胞转移组较含有T细胞的任何组具有更侵略性生长的肿瘤。在此模型中,KEYTRUDA在延迟K562-A2-CMV-PD-L1肿瘤生长方面与同种型对照相比没有优势。

[0186] 图15A至15B说明于若干协同肿瘤模型中使用双特异性体3的体内结果。图15A为显示EMT-6协同肿瘤模型经双特异性体3处理与对照处理相比导致肿瘤生长的更大延迟的图。图15B为显示MB49协同肿瘤模型经双特异性体3处理与对照处理相比导致肿瘤生长的更大延迟的图。

[0187] 图16A至16B显示在人源化PD-1/PD-L1转基因小鼠的MC38-hPD-L1模型中使用双特异性体1的体内结果。图16A显示KEYTRUDA及双特异性体1处理二者与经对照处理的小鼠相

比均有效控制了MC38-hPD-L1肿瘤小鼠的肿瘤生长。图16B为生存率图,其说明了双特异性体1与经对照处理的小鼠相比增加了MC38-PD-L1肿瘤小鼠的生存率。

[0188] 图17A至17F说明在B16F10-hPD-L1模型中使用双特异性体3的体内结果。图17A为各显示不同处理对B16F10-HuPD-L1小鼠的15天截止时测量的肿瘤生长的影响的一系列图。不同组小鼠(n=8)经双特异性体3、KEYTRUDA、阿伏鲁单抗(Avelumab)、KEYTRUDA+阿伏鲁单抗组合、或同种型对照抗体处理。图17A显示各组的个体肿瘤体积迹线。转移酶在肿瘤大小截止(tumor-sizing cutoff)之前死亡的多只小鼠中鉴别。图17B显示跨处理组的平均肿瘤体积的差异,证实在肿瘤细胞接种后第15天,双特异性体3处理延迟B16F10-HuPD-L1小鼠中的平均肿瘤生长,较所测试的其他处理中的任一者显著更长。****, $P < 0.0001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$, 双侧ANOVA及塔基多重比较检验。图17B为比较不同处理对B16F10-HuPD-L1小鼠的在15天截止时测量的肿瘤体积的影响的图。转移酶在肿瘤大小截止前死亡的多只小鼠中鉴别。如图17B中所示,双特异性体3处理延迟了B16F10-hPD-L1小鼠中的平均肿瘤生长,较所测试的其他处理中的任一者显著更长。图17C为生存率图,其说明与利用所测试的其他处理中的任一者的生存率相比,经双特异性体3处理增加了B16F10-hPD-L1肿瘤小鼠的生存率。图17D显示在肿瘤细胞接种后21天,双特异性体3处理继续延迟B16F10-hPD-L1小鼠中的平均肿瘤生长,显著好于经KEYTRUDA的处理。图17E为生存率图,其说明与利用所测试的其他处理中的任一者的生存率相比,经双特异性体3处理增加了B16F10-HuPD-L1肿瘤小鼠的生存率。图17F提供了显示不同处理组各者的无肿瘤小鼠的数目的表格。经双特异性体3处理的组具有3只无肿瘤小鼠,而KEYTRUDA与阿伏鲁单抗的组合具有1只无肿瘤小鼠。

[0189] 图18A至18D证实双特异性体3具有类似于行为良好的单克隆抗体的类药性质(DLP)且维持亲本PD-1及PD-L1结合。图18A显示双特异性体3显示与亲本克隆mAb28类似地结合至表达人类PD-1的CHO细胞(上图)及与亲本克隆mAb1类似地结合至表达人类PD-L1的CHO细胞(下图)。图18B显示双特异性体3显示与亲本克隆mAb28类似地结合至表达食蟹猴PD-1的CHO细胞(上图)及与亲本克隆mAb1类似地结合至表达食蟹猴PD-L1的CHO细胞(下图)。图18C显示双特异性体3显示与亲本克隆mAb28类似地结合至表达小鼠PD-1的CHO细胞(上图)及与亲本克隆mAb1类似地结合至表达小鼠PD-L1的CHO细胞(下图)。图18D显示双特异性体3在蛋白质A层析后的尺寸排阻层析迹线(上图),其证实具有大于98%纯度的单峰,以及双特异性体3的示差扫描荧光法(DSF)迹线(下图),其证实所述分子具有高的热稳定性。

[0190] 发明详述

[0191] 除非另有指定,否则本文中所用的所有技术术语、注释及其他科学术语意欲具有熟习本公开所属领域的技术人员通常理解的含义。在一些情况下,出于清晰和/或便于参考,本文中定义了具有通常理解的含义的术语,且本文中此类定义的纳入不应必须解释为表示与本领域通常理解的内容的差异。本文中所述或参考的技术及过程一般由本领域技术人员充分理解并通常使用常规方法采用,诸如,例如,于Sambrook等人,Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY中所述的广泛利用的分子克隆方法。合适时,除非另有指定,否则一般根据制造商确定的方案及/或参数实施涉及使用市售试剂盒和试剂的过程。

[0192] 如本文中所用,除非上下文中另有明确指示,否则单数形式“一(a/an)”及“the”包

括复数指示物。

[0193] 在本说明书及权利要求书中,术语“约”用于修饰例如在描述本公开的实施方案中所采用的组合物中的成分的数量、浓度、体积、过程温度、过程时间、产率、流速、压力和类似值及其范围。术语“约”指例如通过用于制备化合物、组合物、浓缩物或使用调配物的典型测量及操作程序;通过这些过程中的非有意误差;通过用于实施所述方法的起始物质或成分的制造、来源或纯度方面的差异,以及类似近似考虑,可产生的数值量的变化。术语“约”亦涵盖由于具有特定初始浓度或混合物的调配物的老化而不同的量,及由于混合或处理具有特定初始浓度或混合物的调配物而不同的量。在通过术语“约”修饰的情况下,随附权利要求书包括这些数量的等同物。若该术语的使用在其所用的上下文中对于本领域技术人员不清楚,则“约”将意指特定值的至多加或减10%。

[0194] 关于抗原结合蛋白/区/臂与靶分子的结合,术语“特异性结合”、“特异性结合至”、“特异性针对”、“选择性结合”及“选择性针对”特定抗原(例如,多肽靶)或特定抗原上的表位意指结合可在测量上不同于非特异性或非选择性相互作用。特异性结合可例如通过测定分子的结合与对照分子的结合比较来测量。特异性结合亦可通过与类似于靶的对照分子(诸如过量未经标记的靶)竞争来测定。在该情况下,若经标记的靶与探针的结合被过量的未经标记靶竞争性地抑制,则指示特异性结合。

[0195] 术语“表位”意指能特异性结合至抗原结合蛋白的抗原的组分。表位往往由表面可接近氨基酸残基和/或糖侧链组成且可具有特定三维结构特征,以及特定电荷特征。构象及非构象表位的区别在于在变性溶剂的存在下丧失与前者但非后者的结合。表位可包含直接参与结合的氨基酸残基,及不直接参与结合的其他氨基酸残基。可使用用于表位测定的已知技术,诸如例如,测试结合至具有不同点突变的抗原变体的抗原结合蛋白来测定抗原结合蛋白结合的表位。

[0196] 在多肽序列与参考序列之间的“同一性”百分比定义为在比对序列且若必要引入空隙以达成最大序列同一性百分比后,多肽序列中与参考序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。目的是测定氨基酸序列同一性百分比的比对可以用属于本领域技能的各种方式达成,例如,使用公共可得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、MEGALIGN(DNASTAR)、CLUSTALW或CLUSTAL OMEGA软件。在一些实施方案中,使用CLUSTAL OMEGA软件进行比对。本领域技术人员可确定用于比对序列的适宜参数,包括达成跨正在比较的序列的全长的最大比对所需的任何算法。

[0197] 如本文中所用,术语“能”意指药剂或方法(例如,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体或方法中的任一者)具有达成适宜情形下的特定性质的能力(如本领域技术人员所了解),但是不需要与任何特定时刻的性质相关联。例如,当向表达PD-1和/或PD-L1的细胞施用,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者可能结合PD-1和/或PD-L1,但是当所述构建体在缺乏PD-1或PD-L1蛋白质的组合物中时,不期望所述构建体结合PD-1和/或PD-L1。

[0198] “保守性取代”或“保守性氨基酸取代”是指一或多个氨基酸用一或多个化学或功能相似氨基酸取代。提供相似氨基酸的保守性取代表是本领域熟知的。具有此类取代的多肽序列被称作“经保守性修饰的变体”或“变体”。此类经保守性修饰的变体是补充且不排除多晶型变体(polymorphic variant)、种间同源物及等位基因。保守性取代的一些实例可见

于例如Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* 第2版 (1993) W.H. Freeman & Co., New York, NY 中。

[0199] 本文中所公开的多肽可包含非天然产生的氨基酸序列。此类变体必需具有与起始分子小于100%的序列同一性或相似性。在某些实施方案中,变体将具有与起始(例如,天然产生或野生型)多肽的氨基酸序列约75%至小于100%,更优选约80%至小于100%,更优选约85%至小于100%,更优选约90%至小于100%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)和最优选约95%至小于100%氨基酸序列同一性或相似性的氨基酸序列(例如,跨变体分子的长度)。

[0200] 如本文中所用,“抗体”可指完整抗体(例如,完整免疫球蛋白)及抗体部分,例如,抗原结合部分。抗原结合部分包含至少一个抗原结合域。抗原结合域的一个实例为通过V_H-V_L二聚体形成的抗原结合域。抗体及抗原结合部分可通过其特异性结合的抗原描述。例如,PD-L1抗体或抗PD-L1抗体为特异性结合至PD-L1的抗体。

[0201] 可将V_H及V_L区进一步细分成与更保守的区域一起散布的高可变性区(高可变区(HVR),亦称作互补决定区(CDR))。将更保守的区域称作框架区(FR)。各V_H及V_L一般包含以下列顺序(自N端至C端)排列的三个CDR及四个FR:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。所述CDR参与抗原结合,且赋予抗体抗原特异性及结合亲和力。(参见Kabat等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 第5版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD。)

[0202] CDR参与抗原结合且赋予抗体抗原特异性及结合亲和力。在重链及轻链的可变域各者中存在三个CDR,其针对各可变域命名为CDR1、CDR2及CDR3。如本文中所用,术语“CDR集”指在能结合靶抗原的单一重链或轻链可变域中出现的三个CDR的组。这些CDR的精确边界根据不同系统有不同限定。可将三个重链CDR称作CDRH1、CDRH2及CDRH3,可将三个轻链CDR称作CDRL1、CDRL2及CDRL3。

[0203] 通过Kabat所述的系统,亦称作“根据Kabat编号”、“Kabat编号”、“Kabat定义”及“Kabat标记”提供适用于抗体的任何可变域的明确的残基编号系统,且提供限定各链的三个CDR的精确残基边界。(Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 及 (1991), 其内容的全文以引用的方式并入)。这些CDR被称作Kabat CDR且包含轻链可变域中的约残基24-34(CDR1)、50-56(CDR2)和89-97(CDR3)及重链可变域中的31-35(CDR1)、50-65(CDR2)和95-102(CDR3)。当根据Kabat定义CDR时,轻链FR残基位于约残基1-23(LCFR1)、35-49(LCFR2)、57-88(LCFR3)和98-107(LCFR4)及重链FR残基位于重链残基中的约残基1-30(HCFR1)、36-49(HCFR2)、66-94(HCFR3)和103-113(HCFR4)。“在Kabat中的EU索引”指人类IgG1 EU抗体的残基编号。

[0204] 本领域亦使用其他CDR编号系统(参见,例如,表A)。Chothia及同仁发现Kabat CDR内的某些子部分采取几乎相同的肽骨架构象,而不论其在氨基酸序列水平上具有极大多样性。(Chothia等人(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917;及Chothia等人(1989) *Nature* 342:877-883)。可将这些子部分命名为L1、L2及L3或H1、H2及H3,其中“L”及“H”各自指轻链区及重链区。可将这些CDR称作“Chothia CDR”、“Chothia编号”或“根据Chothia编号”,且包含轻链可变域中的约残基24-34(CDR1)、50-56(CDR2)和89-97(CDR3),及重链可变域中的26-32

(CDR1)、52-56(CDR2)和95-102(CDR3)。Mol.Biol.196:901-917(1987)。

[0205] MacCallum所述的系统,亦称作“根据MacCallum编号”或“MacCallum编号”包含轻链可变域中的约残基30-36(CDR1)、46-55(CDR2)和89-96(CDR3),及重链可变域中的30-35(CDR1)、47-58(CDR2)和93-101(CDR3)。MacCallum等人((1996)J.Mol.Biol.262(5):732-745)。

[0206] AbM所述的系统,亦称作“根据AbM编号”或“AbM编号”包含轻链可变域中的约残基24-34(CDR1)、50-56(CDR2)和89-97(CDR3),及重链可变域中的26-35(CDR1)、50-58(CDR2)和95-102(CDR3)。

[0207] 亦可使用可变区的IMGT(国际免疫遗传学信息系统)编号,其为根据IIMGT的方法的免疫球蛋白可变重链或轻链中的残基的编号,所述方法如于Lefranc,M.-P.,“The IMGT unique numbering for immunoglobulins,T cell Receptors and Ig-like domain”,The Immunologist,7,132-136(1999)中所述且其全文以引用的方式明确地并入本文中。如本文中所用,“IMGT序列编号”或“根据IMTG编号”指编码根据IMGT的可变区的序列的编号。针对重链可变域,当根据IMGT编号时,高可变区范围针对CDR1是氨基酸位置27至38,针对CDR2是氨基酸位置56至65,针对CDR3是氨基酸位置105至117。针对轻链可变域,当根据IMGT编号时,高可变区范围针对CDR1是氨基酸位置27至38,针对CDR2是氨基酸位置56至65,针对CDR3是氨基酸位置105至117。

[0208] 在本文所述的构建体及抗原结合臂的一些实施方案中,当根据Chothia编号来编号时,本文中所述的CDR包含轻链可变域中的约残基24-34(CDR1)、49-56(CDR2)和89-97(CDR3),及重链可变域中的27-35(CDR1)、49-60(CDR2)和93-102(CDR3)。在一些实施方案中,当根据Chothia编号来编号时,轻链可变域中的CDR2可包含氨基酸49-56。

[0209] 表A:CDR定义

	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
Kabat	31-35	50-65	95-102	24-34	50-56	89-97
根据 Chothia 编号的可 选 CDR	27-35	49-60	93-102	24-34	50-56	89-97
[0210] Chothia	26-32	52-56 或 50-56	95-102	24-34	50-56	89-97
MacCallu m	30-35	47-58	93-101	30-36	46-55	89-96
AbM	26-35	50-58	95-102	24-34	50-56	89-97
IMGT	27-38	56-65	105-117	27-38	56-65	105-117

[0211] 虽然与本文中所述的那些相似或等同的方法和材料亦可用于实施或测试本公开

所公开的方法及组合物,但是本文中描述了优选的方法和材料。本文中提及的所有公开、专利申请、专利及其他参考文献以引用的方式全文并入。

[0212] 以下进一步详细描述本公开的各个方面。其他定义阐述于整篇本说明书。

[0213] 免疫系统具有识别及消除肿瘤细胞的能力;然而,肿瘤可使用多种策略来逃逸免疫。最近研究已显示,抑制免疫检查点分子通过各种抗肿瘤抑制机理促进癌症进展。免疫检查点的阻断为活化或重新活化治疗性抗肿瘤免疫的方法之一。已针对许多同源抑制免疫检查点受体描述了各种配体。例如于Nair及Elkord, *Immunology&Cell Biology* (2018), 96: 21-33;及Jenkins等人, *British J.ofCancer* (2017), 118:9-16中评论。

[0214] 程序化死亡1 (PD-1) 蛋白为T细胞调节剂的延伸的CD28/CTLA-4家族的抑制成员 (Okazaki等人 (2002) *Curr Opin Immunol* 14:391779-82;Bennett等人 (2003) *J.Immunol.* 170:711-8)。CD28家族的其他成员包括CD28、CTLA-4、ICOS及BTLA。提出PD-1以单体存在,其缺少其他CD28家族成员的特征性的未配对的半胱氨酸残基。PD-1在经活化的B细胞、T细胞及单核细胞上表达。

[0215] PD-1基因编码55kDa I型跨膜蛋白 (Agata等人 (1996) *Int Immunol.* 8:765-72)。虽然结构上类似于CTLA-4,PD-1缺少对B7-1及B7-2结合而言重要的MYPPY基序。已识别PD-1的两种配体,PD-L1 (B7-H1) 及PD-L2 (B7-DC),已显示所述配体在结合至PD-1后下调T细胞活化 (Freeman等人 (2000) *J.Exp.Med.* 192:1027-34;Carter等人 (2002) *Eur.J.Immunol.* 32:634-43)。PD-L1及PD-L2均为结合至PD-1但是不结合至其他CD28家族成员的B7同源物。PD-L1在各种人类癌症中均是丰富的 (Dong等人 (2002) *Nat.Med.* 8:787-9)。

[0216] PD-1被称作免疫抑制蛋白,其负调节TCR信号 (Ishida,Y.等人 (1992) *EMBOJ.* 11: 3887-3895;Blank,C.等人 (Epub 2006Dec.29) *Immunol.Immunother.* 56(5):739-745)。PD-1与PD-L1之间的相互作用可充当免疫检查点,其可导致例如肿瘤浸润淋巴细胞的减少、T细胞受体介导的增殖的减少、和/或通过癌细胞的免疫逃逸 (Dong等人 (2003) *J.Mol.Med.* 81: 281-7;Blank等人 (2005) *Cancer Immunol.Immunother.* 54:307-314;Konishi等人 (2004) *Clin.CancerRes.* 10:5094-100)。免疫抑制可通过抑制PD-1与PD-L1或PD-L2的局部相互作用逆转;亦当PD-1与PD-L2的相互作用被阻断时,效应是累加的 (Iwai等人 (2002) *Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA* 99:12293-7;Brown等人 (2003) *J.Immunol.* 170:1257-66)。

[0217] PD-L1,亦称作分化簇274 (CD274) 或B7同源物1 (B7-H1),为40kDa的I型跨膜蛋白,其在特定事件 (诸如妊娠、组织同种异体移植、自体免疫疾病及其他疾病状态,如肝炎) 期间在抑制免疫系统中起作用。举例而言,人类PD-L1包含SEQ ID NO:115 (UniProt Q9NZQ7) 的氨基酸序列。正常情况下,免疫系统对与外源或内源危险信号相关联的外来抗原反应,其触发抗原特异性CD8⁺T细胞和/或CD4⁺辅助细胞的增殖。在癌症中,在癌细胞上表达的PD-L1结合至免疫效应细胞 (例如,T细胞) 上的其配体PD-1。PD-L1与PD-1的结合传送抑制信号,该信号减少淋巴结中的抗原特异性T细胞的增殖,同时减少调节性T细胞 (抗炎抑制性T细胞) 的细胞凋亡。PD-1/PD-L1相互作用亦诱导肿瘤特异性T细胞的细胞凋亡,促进CD4⁺T细胞分化成Foxp3⁺调节性T细胞,及促进肿瘤细胞抵抗细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 攻击,从而允许肿瘤逃逸宿主免疫系统。

[0218] 本公开涉及通过减少由于PD-1与其配体 (例如,PD-L1和/或PD-L2) 之间的相互作用产生的免疫检查点抑制来抑制肿瘤逃逸的组合物及方法。具体而言,本文提供了包含新

颖的多特异性的多价构建体(诸如双特异性的四价构建体)的组合物,所述构建体阻断PD-1与其配体(例如,PD-1和/或PD-L2)之间的相互作用,同时促进上面表达有PD-1及其配体的细胞的相互作用(桥接)。与个体抗体的组合相比,以及与临床检查点阻断剂相比,具有“阻断及桥接”能力的本公开的此类组合物增加了体外及体内效能并强烈增强例如T细胞增殖、IFN γ 产生和/或分泌、T细胞的溶细胞活性、和/或自功能耗尽营救T细胞,以提供优越的抗肿瘤功效(可通过各种方法显现的生物效应,其包括但不限于例如肿瘤体积的减少、肿瘤细胞数目的减少、肿瘤细胞增殖的减少、和/或肿瘤细胞存活的减少)。本文中亦提供新颖单克隆抗PD-1抗体及其抗原结合片段,及新颖的单克隆抗PD-L1抗体及其抗原结合片段,用于此类多特异性的多价构建体。这些新颖的单克隆抗PD-1抗体及新颖的单克隆抗PD-L1抗体中的一些共享共同轻链,从而允许产生具有优异类药物性质和可制造性,以及类似于其亲本抗体的亲和力的多特异性的多价构建体。

[0219] 因此,本公开提供包含至少两个抗原结合臂或抗原结合单元的多特异性抗原结合构建体,其中第一抗原结合臂或单元结合免疫细胞表达的PD-1,第二抗原结合臂或单元结合第二细胞表达的一或多种PD-1配体(例如,PD-L1和/或PD-L2)。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体阻断PD-1与其配体的相互作用。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体桥接其上表达有PD-1及其配体的细胞,以促进表达PD-1的免疫细胞的相互作用和/或功效。在一些实施方案中,所述抗原结合臂中的至少一者针对PD-1是二价的。在一些实施方案中,所述抗原结合臂中的至少一者针对PD-L1是二价的。在一些实施方案中,所述抗原结合臂中的至少一者针对PD-1是二价的,并且所述抗原结合臂中的至少一者针对PD-L1是二价的。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含至少两个结合PD-1的抗原结合单元。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个结合PD-1的抗原结合单元。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含至少两个结合PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)的抗原结合单元。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个结合PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)的抗原结合单元。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含至少四个抗原结合单元,其中两个抗原结合单元结合PD-1并且两个抗原结合单元结合PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含四个抗原结合单元,其中两个抗原结合单元结合PD-1并且两个抗原结合单元结合PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)。在本文所述方面中的任一者的一些实施方案中,构建体为双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体为PD-1及PD-1配体二者的拮抗剂。在一些实施方案中,构建体包含共同轻链。在一些实施方案中,所述抗原结合臂中的一者或二者为适体。在一些实施方案中,所述抗原结合臂中的一者或二者为除了抗体外的蛋白质。在一些实施方案中,构建体包含至少两个抗体。在一些实施方案中,所述抗原结合臂中的至少一者为特异性针对PD-1的二价抗体。在一些实施方案中,所述抗原结合臂中的至少一者为特异性针对PD-L1的二价抗体。在一些实施方案中,所述抗原结合臂中的至少一者为特异性针对PD-1的二价抗体,并且所述抗原结合臂中的至少一者为特异性针对PD-L1的二价抗体,使得构建体是四价。在一些实施方案中,双特异性抗体结合PD-1上的两个不同表位。在一些实施方案中,双特异性抗体结合PD-1配体上的两个不同表位。在一些方面中,本文中亦提供特异性结合PD-L1或PD-1的新颖的分离抗体及其抗原结合部分。在一些实施方案中,特异性结合PD-L1或PD-1的这些新颖的分离抗体及其抗原结合部分(诸如CDR、可变重链和/或可变轻链)可用在

本文所述的多特异性抗原结合构建体的一或多个抗原结合臂或单元。

[0220] 因此,如本文中所述,所公开的多特异性抗原结合构建体包含双特异性、三特异性、四特异性或多特异性抗体或其抗原结合部分。优选地,所述多特异性构建体针对至少一个,优选两个抗原结合臂是二价的,即,为双特异性的三价,或双特异性的四价分子。在各方面及实施方案中,本文中所述的多特异性构建体包含一或多个抗体和/或其抗原结合部分。例如,抗原结合臂可包含PD-1的给定抗体和/或PD-L1的给定抗体的可变重链和/或可变轻链或其互补决定区(CDR)。因此,在本文所述方面中的任一者的一些实施方案中,第一抗原结合臂、第二抗原结合臂、第一抗原结合单元、第二结合单元或其任何组合可包含抗体或其抗原结合部分。在本文所述方面中的任一者的一些实施方案中,第一抗原结合臂、第二抗原结合臂、第一抗原结合单元、第二结合单元或其任何组合为抗体或其抗原结合部分。

[0221] A. PD-L1拮抗剂

[0222] 在各方面及实施方案中,本公开提供抗PD-L1拮抗剂。在一些实施方案中,抗PD-L1拮抗剂为本文中所公开的抗PD-L1抗体或抗原结合分子中的任一者。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体或抗原结合分子不是多特异性抗原结合构建体的一部分,即,抗PD-L1抗体或抗原结合分子不是结合至多个表位的蛋白质构建体的一部分。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体或抗原结合部分可与不同抗体或抗原结合部分组合以形成多特异性抗原结合构建体。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能结合PD-L1上的表位及另一蛋白质上的表位。在一些实施方案中,另一蛋白质上的表位在PD-1上。

[0223] 因此,在各方面中,本文提供了特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分。在各方面中,特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分包含(a)重链可变区,其包含(i)包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN)的CDRH1;(ii)包含SEQ ID NO:2(GGIIPX₁X₂GX₃ATYA,其中X₁为V或I;X₂为F、L或V;且X₃为T或A)的CDRH2;及(iii)包含SEQ ID NO:3(ARLKX₁ELKDAFDI,其中X₁为G、F或N)的CDRH3;及(b)轻链可变区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:4(RASQX₁ISSYLN,其中X₁为S、W或Q)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:6(X₁QSYSTPLT,其中X₁为Q或F)的CDRL3。

[0224] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:7(GGIIPILGAATYA)及CDRH3包含SEQ ID NO:8(ARLKGEKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:7(GGIIPILGAATYA),CDRH3包含SEQ ID NO:8(ARLKGEKDAFDI);CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb1。

[0225] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:11(GGIIPVFGTATYA)及CDRH3包含SEQ ID NO:8(ARLKGEKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有这些方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1(GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:11(GGIIPVFGTATYA),CDRH3包含SEQ ID NO:8(ARLKGEKDAFDI);CDRL1包含SEQ ID NO:12(RASQWISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb2。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含

SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA), CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI); CDRL1包含SEQ ID NO:13 (RASQSISSYLN), CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS), 及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb3。

[0226] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA), CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI); CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN), CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS), 及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb4。具有此类重链及轻链可变CDR区的另一代表性抗体为mAb24。

[0227] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:14 (GTFSSYAFS), CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 及CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:14 (GTFSSYAFS), CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA), CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI); CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN), CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS), 及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb5。

[0228] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:15 (GGIIPIFGIANYA) 及CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:15 (GGIIPIFGIANYA), CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI); CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN), CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS), 及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb6。

[0229] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:16 (GGIIPNFGTATYA) 及CDRH3包含SEQ ID NO:17 (ARLKGELKGAGDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:16 (GGIIPNFGTATYA), CDRH3包含SEQ ID NO:17 (ARLKGELKGAGDI); CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN), CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS), 及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb7。

[0230] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA), 及CDRH3包含SEQ ID NO:18 (ARLKFELKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA), CDRH3包含SEQ ID NO:18 (ARLKFELKDAFDI), CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN), CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS), 及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb8。

[0231] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA), 及CDRH3包含SEQ ID NO:19

(ARLKGELKDAFDE)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),CDRH3包含SEQ ID NO:19 (ARLKGELKDAFDE),CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb9。

[0232] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),及CDRH3包含SEQ ID NO:20 (ARLKNELKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),CDRH3包含SEQ ID NO:20 (ARLKNELKDAFDI),CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb10。

[0233] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:21 (GGVIPFLGTANYA),及CDRH3包含SEQ ID NO:22 (ARLKGILKDALDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:21 (GGVIPFLGTANYA),CDRH3包含SEQ ID NO:22 (ARLKGILKDALDI),CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb11。

[0234] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS),CDRH2包含SEQ ID NO:24 (GGIIPIVGIANYA),及CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS),CDRH2包含SEQ ID NO:24 (GGIIPIVGIANYA),CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI),CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb12。

[0235] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS),CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),及CDRH3包含SEQ ID NO:25 (ARLKGEFKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS),CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),CDRH3包含SEQ ID NO:25 (ARLKGEFKDAFDI),CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb13。

[0236] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS),CDRH2包含SEQ ID NO:26 (GRIIPLFGTAHYA),及CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS),CDRH2包含SEQ ID NO:26 (GRIIPLFGTAHYA),CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI),CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代

表性抗体为mAb14。

[0237] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS),CDRH2包含SEQ ID NO:27 (GRINPILGTANYA),及CDRH3包含SEQ ID NO:28 (ARLKGELKDFAFSI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS),CDRH2包含SEQ ID NO:27 (GRINPILGTANYA),CDRH3包含SEQ ID NO:28 (ARLKGELKDFAFSI),CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb15。

[0238] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:29 (GRIIPIFGTADYA),及CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:29 (GRIIPIFGTADYA),CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI),CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb16。

[0239] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS),CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),及CDRH3包含SEQ ID NO:30 (ARLKGELKCAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS),CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),CDRH3包含SEQ ID NO:30 (ARLKGELKCAFDI),CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。

[0240] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:122 (GTKSSYAIS),CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),及CDRH3包含SEQ ID NO:30 (ARLKGELKCAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:122 (GTKSSYAIS),CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA),CDRH3包含SEQ ID NO:30 (ARLKGELKCAFDI),CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb17。

[0241] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:31 (GGIIPILGTATYA),及CDRH3包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:31 (GGIIPILGTATYA),CDRH3包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI),CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN),CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS),及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb18。

[0242] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:33 (GGIIPIVATANYA),及CDRH3包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN),CDRH2包含SEQ ID NO:33 (GGIIPIVATANYA),CDRH3包含SEQ ID

NO:32 (ARRKGELKDAFDI), CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN), CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS), 及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb19。

[0243] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:34 (GGIIPVFGKATYA), 及CDRH3包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:34 (GGIIPVFGKATYA), CDRH3包含SEQ ID NO:32 (ARRKGELKDAFDI), CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN), CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS), 及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb20。

[0244] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:36 (GPFRSHAVS), CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA), 及CDRH3包含SEQ ID NO:37 (ARLKSELKDAFDI)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:36 (GPFRSHAVS), CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA), CDRH3包含SEQ ID NO:37 (ARLKSELKDAFDI), CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN), CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS), 及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb21。

[0245] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA), CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI); CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN), CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS), 及CDRL3包含SEQ ID NO:38 (FQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb22。

[0246] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA), CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI); CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN), CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS), 及CDRL3包含SEQ ID NO:39 (QQSYSTILT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb23。

[0247] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN), CDRH2包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA), CDRH3包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI); CDRL1包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN), CDRL2包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS), 及CDRL3包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb24。

[0248] 在描述特定序列的各情况下, 亦提供包含具有与所述序列 (例如, SEQ ID NO:1-34 及36-39) 至少90%相同 (例如, 至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同) 的序列的实施方案。

[0249] 在一些方面中, 本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分, 其中抗体或其抗原结合部分包含: 包含与SEQ ID NO:35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58至少90%相同 (例如, 至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同) 的氨基酸序列

的重链可变区,及包含与SEQ ID NO:59、60、61、62或63至少90%相同(例如,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0250] 在一些方面中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含包含与SEQ ID NO:40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58至少90%相同(例如,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的重链可变区及包含与SEQ ID NO:59至少90%相同(例如,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0251] 在一些方面中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含包含与SEQ ID NO:35至少90%相同(例如,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的重链可变区及包含与SEQ ID NO:59、60、61、62或63至少90%相同(例如,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0252] 抗体mAb1至mAb23为衍生自亲本抗体mAb24的亲和力成熟抗体,如实例中所述。亲和力成熟抗体或其抗原结合部分为具有一或多个更改(例如,在一或多个CDR或FR中)的抗体或抗原结合片段,其与缺少所述更改的亲本抗体相比导致抗体对其抗原的亲和力的提高。在一些实施方案中,亲和力成熟抗体具有对PD-L1的纳摩尔或皮摩尔亲和力。在一些实施方案中,PD-L1抗体或其抗原结合部分具有至少 1×10^{-7} M、至少 1×10^{-8} M、至少 1×10^{-9} M、至少 1×10^{-10} M、至少 1×10^{-11} M、至少 1×10^{-12} M、或至少 1×10^{-13} M的 K_D 。

[0253] 表1显示mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5、mAb6、mAb7、mAb8、mAb9、mAb10、mAb11、mAb12、mAb13、mAb14、mAb15、mAb16、mAb17、mAb18、mAb19、mAb20、mAb21、mAb22及mAb23(即, mAb24的亲和力成熟变体)与人类PD-L1的结合亲和力(K_D)。如本文中所用,术语 K_D 指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。 $K_D = k_d/k_a$ 。如本文中所用,术语 k_d (sec^{-1})指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。亦将该值称作 k_{off} 值。如本文中所用,术语 k_a ($\text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$)指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率常数。亦将该值称作 k_{on} 值。

[0254] 表1.mAb1至mAb23与人类PD-L1的结合亲和力

[0255]

mAb	K_D (nM)	改善倍数
1	4.16	1.1
2	2.2	2.0
3	0.9	4.8
4	4.9	0.9
5	27.1	0.2
6	35.9	0.1
7	--	--
8	3.7	1.2
9	5.4	0.8

10	6.3	0.7
11	156	--
12	358	--
13	52.3	0.1
14	--	--
15	--	--
16	--	--
17	--	--
18	527	--
19	817	--
20	53.9	0.1
21	91.5	0.1
22	2.5	1.8
23	369	--

[0256] 表2提供mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5、mAb6、mAb7、mAb8、mAb9、mAb10、mAb11、mAb12、mAb13、mAb14、mAb15、mAb16、mAb17、mAb18、mAb19、mAb20、mAb21、mAb22及mAb23(即, mAb24的亲和力成熟变体)与人类PD-L1 (“huPDL1”)、食蟹猴PD-L1或鼠科PD-L1 (“muPDL1”)的细胞结合数据。人类或食蟹猴PD-L1在HEK细胞上表达;鼠科PD-L1在A20细胞上表达。将结合表示为 EC_{50} 值,其可根据在外源表达所关注抗原的细胞上滴定不同浓度的mAb来估计。可使用带荧光标签的二级体来检测及量化mAb结合。使用GRAPHPAD中的内建函数将表2中所示的数据拟合至1:1结合模型,产生 EC_{50} 值。

[0257] 表2.mAb1至mAb23与细胞上表达的人类、食蟹猴及鼠科PD-L1的细胞结合

[0258]

mAb	huPDL1 EC ₅₀ (nM)	改善倍数	食蟹猴 PDL1 EC ₅₀ (nM)	改善倍数	muPDL1 EC ₅₀ (nM)	改善倍数
1	0.04	3.3	0.09	3.21	0.74	5.26
2	0.06	2.2	0.08	3.76	2.00	1.96
3	0.11	1.3	ND	--	1.27	3.08
4	0.04	3.3	0.07	4.10	NB	--
5	0.09	1.5	0.39	0.74	NB	--
6	0.13	1.1	0.47	0.61	NB	--
7	ND	--	NB	--	NB	--
8	ND	--	0.08	3.42	NB	--
9	0.06	2.5	0.07	4.15	NB	--
10	0.04	3.2	0.09	3.05	NB	--
11	1.37	0.1	NB	--	NB	--
12	1.23	0.1	NB	--	NB	--
13	1.43	1.0	ND	--	NB	--
14	1.54	0.1	NB	--	NB	--

[0259]

mAb	huPDL1 EC ₅₀ (nM)	改善倍数	食蟹猴 PDL1 EC ₅₀ (nM)	改善倍数	muPDL1 EC ₅₀ (nM)	改善倍数
15	ND	--	NB	--	NB	--
16	NB	--	NB	--	NB	--
17	0.76	0.2	NB	--	NB	--
18	0.38	0.4	0.06	4.96	0.84	4.67
19	1.20	0.1	0.26	1.08	2.84	1.38
20	0.13	1.0	0.12	2.31	2.66	1.47
21	0.14	1.0	NB	--	NB	--
22	0.18	0.8	0.32	0.89	NB	--
23	0.83	0.2	NB	--	NB	--

[0260] *NB=不结合;ND=未测定;人类及食蟹猴PDL1在HEK细胞上表达;鼠科PDL1在A20细胞上表达

[0261] 本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含:包含与SEQ ID NO:35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58中的任一者至少90%相同(例如,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的重链可变区,及包含与SEQ ID NO:59、60、61、62或63中的任一者至少90%相同(例如,至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,重链可变区包含与SEQ ID NO:35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58中的任一者15个氨基酸或更少、14个氨基酸或更少、13个氨基酸或更少、12个氨基酸或更少、11个氨基酸或更少、10个氨基酸或更少、9个氨基酸或更少、8个氨基酸或更少、7个氨基酸或更少、6个氨基酸或更少、5个氨基酸或更少、4个氨基酸或更少、3个氨基酸或更少、2个氨基酸或更少、或1个氨基酸不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链可变区包含与SEQ ID NO:59、60、61、62或63中的任一者15个氨基酸或更少、14个氨基酸或更少、13个氨基酸或更少、12个氨基酸或更少、11个氨基酸或更少、10个氨基酸或更少、9个氨基酸或更少、8个氨基酸或更少、7个氨基酸或更少、6个氨基酸或更少、5个氨基酸或更少、4个氨基酸或更少、3个氨基酸或更少、2个氨基酸或更少、或1个氨基酸不同的氨基酸序列。表3及4各自提供重链可变序列SEQ ID No:35和40-58,以及轻链可变序列SEQ ID No:59-63的序列。

[0262] 表3.重链抗PD-L1可变序列

[0263]

SEQ ID NO	序列
35	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGGIIPVFGTATY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGELKDAFDI WGQGTMTVTVSS
40	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLE WMGGIIPVFGTATY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGELKDAFDI WGQGTTLTVTVSS
41	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGGIIPFGIANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGELKDAFDI WGQGTTLTVTVSS
42	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGGIIPNFGTATY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGELKGAGD IWGQGTTLTVTVSS
43	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGGIIPVFGTATY

[0264]

SEQ ID NO	序列
	AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKFELKDAFDI WGQGTLVTVSS
44	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGGIIPVFGTATY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGELKDAFD EWQGTLVTVSS
45	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGGIIPVFGTATY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGELKDAFDI WGQGTLVTAST
46	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGGIIPVFGTATY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKNELKDAFDI WGQGTLVTVSS
47	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGGVIPFLGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGILKDALDI WGQGTLVTVSS
48	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQDLEW MGGIIPVGIANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGELKDAFDI WGQGTLVTVSS
49	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIIPVFGTATY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGEFKDAFDI WGQGTLVTVSS

[0265]

SEQ ID NO	序列
50	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGRIIPLFGTAHY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGELKDAFDI WGQGTLVTVSS
51	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGRINPILGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGELKDAFSI WGQGTLVTVSS
52	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGRIIPFGTADY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGELKDAFDI WGQGTLVTVSS
53	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGKFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIIPVFGTATY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGELKCAFDI WGQGTLVTVSS
54	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGGIIPILGTATY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRKGELKDAFD IWQGTLVTVSS
55	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGGIIPILGAATY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKGELKDAFDI WGQGTLVTVSS
56	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGGIPIVATANY

[0266]	SEQ ID NO	序列
		AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRKGELKDAFD IWQGGLTVTVSS
	57	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGKATY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRKGELKDAFD IWQGGLTVTVSS
	58	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGPFRSHAVSWVRQAPGQGLE WMGGIIPVFGTATY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLKSELKDAFDI WGQGGLTVTVSS

[0267] 表4.轻链可变序列

[0268]	SEQ ID NO	序列
	59	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK
	60	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK
	61	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK
	62	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQSYSTPLTFGGGTKVEIK
	63	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTILTFGGGTKVEIK

[0269] 在一些实施方案中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58的重链可变区中的任一者的重链CDR,及SEQ ID NO:59、60、61、62或63的轻链可变区中的任一者的轻链CDR。

[0270] 在一些实施方案中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58的重链可变区中的任一者的重链CDR,及SEQ ID NO:59、60、61、62

或63的轻链可变区中的任一者的轻链CDR,其中所述重链及轻链CDR残基根据Kabat编号。

[0271] 在一些实施方案中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58的重链可变区中的任一者的重链CDR,及SEQ ID NO:59、60、61、62或63的轻链可变区中的任一者的轻链CDR,其中所述重链及轻链CDR残基根据Chothia编号。

[0272] 在一些实施方案中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58的重链可变区中的任一者的重链CDR,及SEQ ID NO:59、60、61、62或63的轻链可变区中的任一者的轻链CDR,其中所述重链及轻链CDR残基根据MacCallum编号。

[0273] 在一些实施方案中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58的重链可变区中的任一者的重链CDR,及SEQ ID NO:59、60、61、62或63的轻链可变区中的任一者的轻链CDR,其中所述重链及轻链CDR残基根据AbM编号。

[0274] 在一些实施方案中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58的重链可变区中的任一者的重链CDR,及SEQ ID NO:59、60、61、62或63的轻链可变区中的任一者的轻链CDR,其中所述重链及轻链CDR残基根据IMGT编号。

[0275] B.PD-1拮抗剂

[0276] 在一些方面及实施方案中,本公开提供抗PD-1拮抗剂。在一些实施方案中,抗PD-1拮抗剂为本文中所公开的抗PD-1抗体或抗原结合分子中的任一者。在一些实施方案中,抗PD-1抗体或抗原结合分子不是多特异性抗原结合构建体的一部分,即,抗PD-1抗体或抗原结合分子不是结合至多个表位的蛋白质构建体的一部分。在一些实施方案中,抗PD-1抗体或抗原结合部分可与不同抗体或抗原结合部分组合,以形成多特异性抗原结合构建体。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能结合PD-1上的表位及另一蛋白质上的表位。在一些实施方案中,另一蛋白质上的表位在PD-L1上。

[0277] 在一些实施方案中,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者包含PD-1拮抗剂。在一些实施方案中,PD-1拮抗剂为“抑制性受体”。如本文中所用,“抑制性受体”一般指当通过同源配体结合时,引起免疫反应的阻抑或抑制的免疫检查点分子,诸如已知增强肿瘤逃逸的那些。然而,在如本文中所用的一些实例中,“抑制性受体”具体指PD-1。

[0278] PD-1为免疫检查点抑制性受体,其含有包含氨基酸(S/I/V/L)xYxx(I/V/L)的保守序列的“免疫受体酪氨酸抑制基序”或“ITIM”,其中x为任何氨基酸。分析PD-1活性是否已受抑制的方法是本领域已知的且可通过本领域技术人员容易地设计。此类分析包括例如测试PD-1任何下游信号传导路径在体外或体内的效应。在PD-1与其配体相互作用后,ITIM基序通过例如Src激酶家族的酶被磷酸化,从而允许其募集其他酶,例如,磷酸酪氨酸磷酸酶SHP-1及SHP-2,或称作SHIP的肌醇-磷酸酶。已显示这些磷酸酶减少参与细胞信号传导的分子的活化。参见,例如,Barrow及Trowsdale(2006)Eur J Immunol.36(7):1646-53。因此,可使用本领域中已知的方法评估PD-1内的ITIM基序的磷酸化状态。同样,亦可检查下游因子(诸如磷酸酪氨酸磷酸酶)的存在。此外,本领域已知检测作为PD-1活性状态的代表的下游

因子(例如,经活化的T-细胞的核因子(NFAT)作为PD-1抑制的量度)的存在各种基于细胞的分析及试剂盒。在其他实例中,可使用简单结合检定来测定本公开的构建体是否可阻断PD-1与其配体的结合,如上所讨论。

[0279] 因此,在一些方面中,本文提供了特异性结合PD-1的抗体或其抗原结合部分。在一些方面中,特异性结合PD-1的抗体或其抗原结合部分包含(a)重链可变区,其包含(i)包含SEQ ID NO:70(FTFX₁X₂YAX₃X₄,其中X₁=S、R、G或N;X₂=D、S、N、A、R或G;X₃=M或L;X₄=S、L或N)的CDRH1;(ii)包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)的CDRH2;及(iii)包含SEQ ID NO:72(ARGLDFIVGX₅TGNDY,其中X₅=A、Y或R)的CDRH3;及(b)轻链可变区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1;(ii)包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0280] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:73(FTFSDYAMS),CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)及CDRH3包含SEQ ID NO:74(ARGLDFIVGATGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:73(FTFSDYAMS);CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA);CDRH3包含SEQ ID NO:74(ARGLDFIVGATGNDY);CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN);CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS);及CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb25。

[0281] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:73(FTFSDYAMS),CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)及CDRH3包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:73(FTFSDYAMS);CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA);CDRH3包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY);CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN);CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS);及CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb26。

[0282] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:76(FTFSSYAMS),CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)及CDRH3包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:76(FTFSSYAMS);CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA);CDRH3包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY);CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN);CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS);及CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb27。

[0283] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:77(FTFSSYAML),CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)及CDRH3包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:77(FTFSSYAML);CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA);CDRH3包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY);CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN);CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS);及CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb28。

[0284] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID

NO:78 (FTFSNYALS), CDRH2 包含 SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA) 及 CDRH3 包含 SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1 包含 SEQ ID NO:78 (FTFSNYALS); CDRH2 包含 SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA); CDRH3 包含 SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY); CDRL1 包含 SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN); CDRL2 包含 SEQ ID NO:5 (AASSLQS); 及 CDRL3 包含 SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变 CDR 区的代表性抗体为 mAb29。

[0285] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1 包含 SEQ ID NO:79 (FTFSAYAMN), CDRH2 包含 SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA) 及 CDRH3 包含 SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1 包含 SEQ ID NO:79 (FTFSAYAMN); CDRH2 包含 SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA); CDRH3 包含 SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY); CDRL1 包含 SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN); CDRL2 包含 SEQ ID NO:5 (AASSLQS); 及 CDRL3 包含 SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变 CDR 区的代表性抗体为 mAb30。

[0286] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1 包含 SEQ ID NO:80 (FTFRSYAMS), CDRH2 包含 SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA) 及 CDRH3 包含 SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1 包含 SEQ ID NO:80 (FTFRSYAMS); CDRH2 包含 SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA); CDRH3 包含 SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY); CDRL1 包含 SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN); CDRL2 包含 SEQ ID NO:5 (AASSLQS); 及 CDRL3 包含 SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变 CDR 区的代表性抗体为 mAb31。

[0287] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1 包含 SEQ ID NO:81 (FTFGRYAMS), CDRH2 包含 SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA) 及 CDRH3 包含 SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1 包含 SEQ ID NO:81 (FTFGRYAMS); CDRH2 包含 SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA); CDRH3 包含 SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY); CDRL1 包含 SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN); CDRL2 包含 SEQ ID NO:5 (AASSLQS); 及 CDRL3 包含 SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变 CDR 区的代表性抗体为 mAb32。

[0288] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1 包含 SEQ ID NO:82 (FTFNSYAMS), CDRH2 包含 SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA) 及 CDRH3 包含 SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1 包含 SEQ ID NO:82 (FTFNSYAMS); CDRH2 包含 SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA); CDRH3 包含 SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY); CDRL1 包含 SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN); CDRL2 包含 SEQ ID NO:5 (AASSLQS); 及 CDRL3 包含 SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变 CDR 区的代表性抗体为 mAb33。

[0289] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1 包含 SEQ ID NO:83 (FTFSNYAMS), CDRH2 包含 SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA) 及 CDRH3 包含 SEQ ID NO:74 (ARGLDFIVGATGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中, CDRH1 包含 SEQ ID NO:83 (FTFSNYAMS); CDRH2 包含 SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA); CDRH3 包含 SEQ ID NO:74 (ARGLDFIVGATGNDY); CDRL1 包含 SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN); CDRL2 包含 SEQ ID

NO:5 (AASSLQS);及CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb34。

[0290] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:84(FTFSGYAMS),CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)及CDRH3包含SEQ ID NO:85(ARGLDFIVGRTGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:84(FTFSGYAMS);CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA);CDRH3包含SEQ ID NO:85(ARGLDFIVGRTGNDY);CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN);CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS);及CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb35。

[0291] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:86(FTFSSYAMN),CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)及CDRH3包含SEQ ID NO:85(ARGLDFIVGRTGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:86(FTFSSYAMN);CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA);CDRH3包含SEQ ID NO:85(ARGLDFIVGRTGNDY);CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN);CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS);及CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb36。

[0292] 在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:80(FTFRSYAMS),CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)及CDRH3包含SEQ ID NO:85(ARGLDFIVGRTGNDY)。在这些方面及本文中所述的所有此类方面的一些实施方案中,CDRH1包含SEQ ID NO:80(FTFRSYAMS);CDRH2包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA);CDRH3包含SEQ ID NO:85(ARGLDFIVGRTGNDY);CDRL1包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN);CDRL2包含SEQ ID NO:5(AASSLQS);及CDRL3包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)。具有此类重链及轻链可变CDR区的代表性抗体为mAb37。

[0293] 在描述特定序列的各情况下,亦提供包含具有与所述序列(例如,SEQ ID NO:5、9、10或71-86)至少85%(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)同一性的序列的实施方案。

[0294] 在一些方面中,本公开亦提供特异性结合PD-1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含包含与SEQ ID NO:87-99中的任一者至少85%(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的重链可变区,及包含与SEQ ID NO:59至少85%(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,重链可变区包含与SEQ ID NO:90至少85%(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列,及轻链可变区包含与SEQ ID NO:59至少85%(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列。表7提供了重链可变序列SEQ ID No:87-99的序列,表4提供了轻链可变序列SEQ ID NO:59。在一些实施方案中,重链可变区包含与SEQ ID NO:87-99中的任一者15个氨

氨基酸或更少、14个氨基酸或更少、13个氨基酸或更少、12个氨基酸或更少、11个氨基酸或更少、10个氨基酸或更少、9个氨基酸或更少、8个氨基酸或更少、7个氨基酸或更少、6个氨基酸或更少、5个氨基酸或更少、4个氨基酸或更少、3个氨基酸或更少、2个氨基酸或更少、或1个氨基酸不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链可变区包含与SEQ ID NO:5915个氨基酸或更少、14个氨基酸或更少、13个氨基酸或更少、12个氨基酸或更少、11个氨基酸或更少、10个氨基酸或更少、9个氨基酸或更少、8个氨基酸或更少、7个氨基酸或更少、6个氨基酸或更少、5个氨基酸或更少、4个氨基酸或更少、3个氨基酸或更少、2个氨基酸或更少、或1个氨基酸不同的氨基酸序列。

[0295] 抗体mAb26至mAb37为衍生自亲本抗体mAb25的亲合力成熟抗体,如实例中所述。亲合力成熟抗体或其抗原结合部分为具有一或多个更改(例如,在一或多个CDR或FR中)的抗体或抗原结合片段,其与缺少所述更改的亲本抗体相比导致抗体对其抗原的亲合力的提高。在一些实施方案中,亲合力成熟抗体具有对PD-1的纳摩尔或皮摩尔亲合力。在一些实施方案中,PD-1抗体或其抗原结合部分具有至少 1×10^{-7} M、至少 1×10^{-8} M、至少 1×10^{-9} M、至少 1×10^{-10} M、至少 1×10^{-11} M、至少 1×10^{-12} M、或至少 1×10^{-13} M的 K_D 。

[0296] 表5和6提供了mAb25、mAb26、mAb27、mAb28、mAb29、mAb30、mAb31、mAb32、mAb33、mAb34、mAb35、mAb36及mAb37(即,mAb25的亲合力成熟变体)与人类PD-1(“huPD-1”)、食蟹猴PD-1(“cyPD-1”)或鼠科PD-1(“muPD-1”)的细胞结合数据。人类、食蟹猴或鼠科PD-1在CHO细胞上表达。将结合表示为 EC_{50} 值,其可通过在外源表达所关注抗原的细胞上滴定不同浓度的mAb来估计。可使用具有荧光标记的二级体来检测及量化mAb结合。使用GRAPHPAD中的内建函数将表5中所示的数据拟合至1:1结合模型,其产生 EC_{50} 值。

[0297] 表5:mAb25至mAb37与人类PD-1的结合亲合力

[0298]

mAb	K_D (nM)	超过亲本的提高 倍数
mAb25	240	
mAb26	10	24
mAb27	2.3	104
mAb28	5.6	43
mAb29	8.6	28
mAb30	3.1	77
mAb31	5.5	44
mAb32	2.1	114
mAb33	7	34
mAb34	7.2	33

[0299]

mAb35	9	27
mAb36	7.7	31
mAb37	14	17

[0300]

表6.mAb25至mAb37与细胞上表达的人类、食蟹猴及鼠科PD-1的细胞结合

[0301]

mAb	huPD-1 EC ₅₀ (nM)	超过亲本的 改善倍数	cyPD-1 EC ₅₀ (nM)	超过亲本的 改善倍数	muPD-1 EC ₅₀ (nM)
mAb25	0.915		8.59		NB
mAb26	3.74	0.2	1.54	5.6	17.9
mAb27	1.75	0.5	1.53	5.6	6.14
mAb28	3.94	0.2	1.48	5.8	0.814
mAb29	1.27	0.7	1.73	5.0	2.14
mAb30	2.77	0.3	2.05	4.2	4.05
mAb31	1.71	0.5	1.9	4.5	1.87
mAb32	1.51	0.6	1.29	6.7	2.8
mAb33	1.04	0.9	1.33	6.5	10.4
mAb34	3.87	0.2	1.33	6.5	20.5
mAb35	1.64	0.6	2.66	3.2	PF
mAb36	1.01	0.9	1.19	7.2	PF
mAb37	0.75	1.2	1.09	7.9	0.942

[0302]

*NB=不结合;PF=差拟合;人类、食蟹猴、鼠科PD-1在CHO细胞上表达

[0303]

表7.重链抗PD-1可变序列

[0304]

SE Q ID NO	序列
87	EVQLLES G GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEW

[0305]

SEQ ID NO	序列
	VSAISNSGTYTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGATGN DYWGQGTLVTVSS
88	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISNSGTYTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGYTGN DYWGQGTLVTVSS
89	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISNSGTYTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGYTGN DYWGQGTLVTVSS
90	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMLWVRQAPGKGLEWV SAISNSGTYTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGYTGN DYWGQGTLVTVSS
91	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYALSWVRQAPGKGLEWV SAISNSGTYTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGYTGN DYWGQGTLVTVSS
92	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYAMNWVRQAPGKGLEW VSAISNSGTYTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGYTGN DYWGQGTLVTVSS
93	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISNSGTYTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGYTGN

[0306]

SEQ ID NO	序列
	DYWGQGTLVTVSS
94	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGRYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISNSGTYYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGYTGN DYWGQGTLVTVSS
95	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISNSGTYYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGYTGN DYWGQGTLVTVSS
96	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISNSGTYYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGATGN DYWGQGTLVTVSS
97	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISNSGTYYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGRTGN DYWGQGTLVTVSS
98	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEW VSAISNSGTYYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGRTGN DYWGQGTLVTVSS
99	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISNSGTYYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGRTGN DYWGQGTLVTVSS

[0307] 在一些实施方案中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99的重链可变区中的任一者的重链CDR,及SEQ ID NO:59的轻链可变区的轻链CDR。

[0308] 在一些实施方案中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99的重链可变区中的任一者的重链CDR,及SEQ ID NO:59的轻链可变区的轻链CDR,其中所述重链及轻链CDR残基根据Kabat编号。

[0309] 在一些实施方案中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99的重链可变区中的任一者的重链CDR,及SEQ ID NO:59的轻链可变区的轻链CDR,其中所述重链及轻链CDR残基根据Chothia编号。

[0310] 在一些实施方案中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99的重链可变区中的任一者的重链CDR,及SEQ ID NO:59的轻链可变区的轻链CDR,其中所述重链及轻链CDR残基根据MacCallum编号。

[0311] 在一些实施方案中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99的重链可变区中的任一者的重链CDR,及SEQ ID NO:59的轻链可变区的轻链CDR,其中所述重链及轻链CDR残基根据AbM编号。

[0312] 在一些实施方案中,本公开亦提供特异性结合PD-L1的抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID NO:87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99的重链可变区中的任一者的重链CDR,及SEQ ID NO:59的轻链可变区的轻链CDR,其中所述重链及轻链CDR残基根据IMGT编号。

[0313] C.多特异性抗原结合构建体

[0314] 在一些方面中,本公开提供通过抑制PD-L1与PD-1之间的相互作用(例如,在肿瘤细胞上表达的PD-L1与在T细胞上表达的PD-1之间的相互作用)来增强对肿瘤细胞的免疫反应的组合物及方法。提供特异性或选择性结合PD-L1或PD-1的抗体或其抗原结合部分。如本文中所用,术语“特异性结合至”、“特异性针对”、“选择性结合”及“选择性针对”PD-L1或PD-1,或PD-L1或PD-1上的表位意指结合可在测量上不同于非特异性或非选择性相互作用。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分特异性结合至人类PD-L1或PD-1和/或小鼠PD-L1或PD-1。特异性结合可例如通过测定分子的结合与对照分子的结合比较来测量。特异性结合亦可通过与类似于靶的对照分子(诸如过量的未经标记的靶)竞争来测定。在该情况下,若经标记的靶与探针的结合被过量的未经标记的靶竞争性地抑制,则指示特异性结合。

[0315] 在一些实施方案中,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者结合至至少两个不同受体或表位(例如,PD-1及PD-L1),其中通过多特异性抗原结合构建体结合的所述两个不同受体或表位在相同细胞的表面上表达。例如,在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体同时结合至PD-1及PD-L1,其中PD-1及PD-L1在相同细胞的表面上表达。在一些实施方案中,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者结合至至少两个不同受体或表位(例如,PD-1及PD-L1),其中通过多特异性抗原结合构建体结合的所述两个不同受体或表位在两个不同细胞的表面上表达。例如,在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体同时结合至在第一细胞的表面上表达的PD-1及在第二细胞的表面上表达的PD-L1。

[0316] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能结合人类PD-1。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能结合鼠科PD-1。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能结合食蟹猴PD-1。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体能以相似亲和力结合人类、鼠科及食蟹猴PD-1。

[0317] 在一些方面及实施方案中,本公开提供了包含至少两个抗原结合单元的多特异性

抗原结合构建体,其中第一抗原结合单元结合PD-1,第二抗原结合单元结合PD-1配体。在一些实施方案中,第一抗原结合单元结合免疫细胞表达的PD-1。在一些实施方案中,第二抗原结合单元结合第二细胞表达的PD-1。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体阻断PD-1与PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)的相互作用。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体阻断PD-1与PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)的相互作用。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含至少两个结合PD-1的抗原结合单元。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个结合PD-1的抗原结合单元。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含至少两个结合PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)的抗原结合单元。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含两个结合PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)的抗原结合单元。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含至少四个抗原结合单元,其中两个抗原结合单元结合PD-1,两个抗原结合单元结合PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含四个抗原结合单元,其中两个抗原结合单元结合PD-1及两个抗原结合单元结合PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)。在一些实施方案中,各抗原结合单元能独立地结合至其同源抗原,即,PD-1或PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体促进来自细胞的PD-1表达的损失。在一些实施方案中,PD-1表达的损失是由于PD-1脱落。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体阻断PD-1与PD-1配体(诸如PD-L1或PD-L2)的相互作用。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含共同轻链。例如,至少两个抗原结合单元包含共同轻链。

[0318] 在一些实施方案中,第一抗原结合单元结合PD-1且包含:

[0319] (a) 重链可变区,其包含(i)包含SEQ ID NO:70(FTFX₁X₂YAX₃X₄,其中X₁=S、R、G或N; X₂=D、S、N、A、R或G; X₃=M或L; X₄=S、L或N)的CDRH1; (ii)包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)的CDRH2;及(iii)包含SEQ ID NO:72(ARGLDFIVGX₅TGNDY,其中X₅=A、Y或R)的CDRH3;及

[0320] (b) 轻链可变区,其包含:(i)包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1; (ii)包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2;及(iii)包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3。

[0321] 在一些此类实施方案中,第一抗原结合单元结合PD-1且包含:

[0322] (a) 包含SEQ ID NO:73(FTFSDYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:74(ARGLDFIVGATGNDY)的CDRH3;

[0323] (b) 包含SEQ ID NO:73(FTFSDYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0324] (c) 包含SEQ ID NO:76(FTFSSYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0325] (d) 包含SEQ ID NO:77(FTFSSYAML)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0326] (e) 包含SEQ ID NO:78(FTFSNYALS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0327] (f) 包含SEQ ID NO:79(FTFSAYAMN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75(ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0328] (g) 包含SEQ ID NO:80(FTFRSYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71(SAISNSGTYTYYA)

的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0329] (h) 包含SEQ ID NO:81 (FTFGRYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0330] (i) 包含SEQ ID NO:82 (FTFNSYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:75 (ARGLDFIVGYTGNDY)的CDRH3;

[0331] (j) 包含SEQ ID NO:83 (FTFSNYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:74 (ARGLDFIVGATGNDY)的CDRH3;

[0332] (k) 包含SEQ ID NO:84 (FTFSGYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:85 (ARGLDFIVGRTGNDY)的CDRH3;

[0333] (l) 包含SEQ ID NO:86 (FTFSSYAMN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA)的CDRH2及包含SEQ ID NO:85 (ARGLDFIVGRTGNDY)的CDRH3;或

[0334] (m) 包含SEQ ID NO:80 (FTFRSYAMS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:71 (SAISNSGTYTYYA),及包含SEQ ID NO:85 (ARGLDFIVGRTGNDY)的CDRH3。

[0335] 在一些实施方案中,第一抗原结合单元结合PD-1且包含:

[0336] (a) 包含与SEQ ID NO:87至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0337] (b) 包含与SEQ ID NO:88至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0338] (c) 包含与SEQ ID NO:89至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0339] (d) 包含与SEQ ID NO:90至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0340] (e) 包含与SEQ ID NO:91至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0341] (f) 包含与SEQ ID NO:92至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0342] (g) 包含与SEQ ID NO:93至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0343] (h) 包含与SEQ ID NO:94至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0344] (i) 包含与SEQ ID NO:95至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0345] (j) 包含与SEQ ID NO:96至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0346] (k) 包含与SEQ ID NO:97至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;

[0347] (l) 包含与SEQ ID NO:98至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区;或

[0348] (m) 包含与SEQ ID NO:99至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区。

[0349] 在一些实施方案中,第一抗原结合单元结合PD-1且包含包含与SEQ ID NO:59至少90%相同的氨基酸序列的轻链可变区。

[0350] 在一些实施方案中,第二抗原结合单元结合PD-L2。在一些实施方案中,第二抗原结合单元结合PD-L1。在一些实施方案中,第二抗原结合单元结合PD-L1且包含:

[0351] a. 重链可变区,其包含 (i) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1; (ii) 包含SEQ ID NO:2 (GGIIPX₁X₂GX₃ATYA,其中X₁为V或I;X₂为F、L或V;且X₃为T或A)的CDRH2;及 (iii) 包含SEQ ID NO:3 (ARLKX₁ELKDAFDI,其中X₁为G、F或N)的CDRH3;及

[0352] b. 轻链可变区,其包含: (i) 包含SEQ ID NO:4 (RASQX₁ISSYLN,其中X₁为S、W或Q)的CDRL1; (ii) 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2;及 (iii) 包含SEQ ID NO:6 (X₁QSYSTPLT,其中X₁为Q或F)的CDRL3。

[0353] 在一些此类实施方案中,第二抗原结合单元结合PD-L1且包含:

[0354] (a) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:7 (GGIIPILGAATYA)的

CDRH2,及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;

[0355] (b) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:7 (GGIIPILGAATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0356] (c) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0357] (d) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;

[0358] (e) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;包含SEQ ID NO:12 (RASQWISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0359] (f) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;包含SEQ ID NO:13 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0360] (g) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0361] (h) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:15 (GGIIPIFGIANYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;

[0362] (i) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:15 (GGIIPIFGIANYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0363] (j) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:16 (GGIIPNFGTATYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:17 (ARLKGELKGAGDI)的CDRH3;

[0364] (k) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:16 (GGIIPNFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:17 (ARLKGELKGAGDI)的CDRH3;包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0365] (l) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:18 (ARLKFELKDAFDI)的CDRH3;

[0366] (m) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:18 (ARLKFELKDAFDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0367] (n) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:19 (ARLKGELKDAFDE)的CDRH3;

[0368] (o) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:19 (ARLKGELKDAFDE)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0369] (p) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)

的CDRH2,及包含SEQ ID NO:20(ARLKNELKDAFDI)的CDRH3;

[0370] (q) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:20(ARLKNELKDAFDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0371] (r) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:21 (GGVIPFLGTANYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:22(ARLKGILKDALDI)的CDRH3;

[0372] (s) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:21 (GGVIPFLGTANYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:22(ARLKGILKDALDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0373] (t) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:29 (GRIIPFGTADYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:8(ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;

[0374] (u) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:29 (GRIIPFGTADYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:8(ARLKGELKDAFDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0375] (v) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:31 (GGIIPILGTATYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:32(ARRKGELKDAFDI)的CDRH3;

[0376] (w) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:31 (GGIIPILGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:32(ARRKGELKDAFDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0377] (x) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:33 (GGIIPIVATANYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:32(ARRKGELKDAFDI)的CDRH3;

[0378] (y) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:33 (GGIIPIVATANYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:32(ARRKGELKDAFDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0379] (z) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:34 (GGIIPFGKATYA)的CDRH2,及包含SEQ ID NO:32(ARRKGELKDAFDI)的CDRH3;

[0380] (aa) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:34 (GGIIPFGKATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:32(ARRKGELKDAFDI)的CDRH3,包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3;

[0381] (bb) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:8(ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:38(FQSYSTPLT)的CDRL3;

[0382] (cc) 包含SEQ ID NO:1 (GTFSSYAIN)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2,包含SEQ ID NO:8(ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:39(QQSYSTILT)的CDRL3;

[0383] (dd) 包含SEQ ID NO:14 (GTFSSYAFS)的CDRH1,包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA)的CDRH2及包含SEQ ID NO:8(ARLKGELKDAFDI)的CDRH3;包含SEQ ID NO:9(RASQSISSYLN)的CDRL1,包含SEQ ID NO:5(AASSLQS)的CDRL2,及包含SEQ ID NO:10(QQSYSTPLT)的CDRL3;

- [0384] (ee) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:24 (GGIPIVGIANYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3;
- [0385] (ff) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:24 (GGIPIVGIANYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;
- [0386] (gg) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:25 (ARLKGEFKDAFDI) 的CDRH3;
- [0387] (hh) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:25 (ARLKGEFKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;
- [0388] (ii) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:26 (GRIIPLFGTAHYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3;
- [0389] (jj) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:26 (GRIIPLFGTAHYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:8 (ARLKGELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;
- [0390] (kk) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:27 (GRINPILGTANYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:28 (ARLKGELKDAFSI) 的CDRH3;
- [0391] (ll) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:27 (GRINPILGTANYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:28 (ARLKGELKDAFSI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;
- [0392] (mm) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:30 (ARLKGELKCAFDI) 的CDRH3;
- [0393] (nn) 包含SEQ ID NO:23 (GTFSSYAIS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:30 (ARLKGELKCAFDI); 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3;
- [0394] (oo) 包含SEQ ID NO:36 (GPFRSHAVS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:37 (ARLKSELKDAFDI) 的CDRH3; 或
- [0395] (pp) 包含SEQ ID NO:36 (GPFRSHAVS) 的CDRH1, 包含SEQ ID NO:11 (GGIIPVFGTATYA) 的CDRH2, 及包含SEQ ID NO:37 (ARLKSELKDAFDI) 的CDRH3; 包含SEQ ID NO:9 (RASQSISSYLN) 的CDRL1, 包含SEQ ID NO:5 (AASSLQS) 的CDRL2, 及包含SEQ ID NO:10 (QQSYSTPLT) 的CDRL3。
- [0396] 在一些此类实施方案中, 第二抗原结合单元结合PD-L1且包含包含与SEQ ID NO:35、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57或58中的任一者至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区, 及包含与SEQ ID NO:59、60、61、62或63中的任一者

至少90%相同的氨基酸序列的轻链可变区。

[0397] 在一些实施方案中,第二抗原结合单元结合PD-L1且包含包含以下的重链可变区:

[0398] (a) 与SEQ ID NO:35至少90%相同的氨基酸序列;

[0399] (b) 与SEQ ID NO:40至少90%相同的氨基酸序列;

[0400] (c) 与SEQ ID NO:41至少90%相同的氨基酸序列;

[0401] (d) 与SEQ ID NO:42至少90%相同的氨基酸序列;

[0402] (e) 与SEQ ID NO:43至少90%相同的氨基酸序列;

[0403] (f) 与SEQ ID NO:44至少90%相同的氨基酸序列;

[0404] (g) 与SEQ ID NO:45至少90%相同的氨基酸序列;

[0405] (h) 与SEQ ID NO:46至少90%相同的氨基酸序列;

[0406] (i) 与SEQ ID NO:47至少90%相同的氨基酸序列;

[0407] (j) 与SEQ ID NO:48至少90%相同的氨基酸序列;

[0408] (k) 与SEQ ID NO:49至少90%相同的氨基酸序列;

[0409] (l) 与SEQ ID NO:50至少90%相同的氨基酸序列;

[0410] (m) 与SEQ ID NO:51至少90%相同的氨基酸序列;

[0411] (n) 与SEQ ID NO:52至少90%相同的氨基酸序列;

[0412] (o) 与SEQ ID NO:53至少90%相同的氨基酸序列;

[0413] (p) 与SEQ ID NO:54至少90%相同的氨基酸序列;

[0414] (q) 与SEQ ID NO:55至少90%相同的氨基酸序列;

[0415] (r) 与SEQ ID NO:56至少90%相同的氨基酸序列;

[0416] (s) 与SEQ ID NO:57至少90%相同的氨基酸序列;或

[0417] (t) 与SEQ ID NO:58至少90%相同的氨基酸序列。

[0418] 在一些实施方案中,第二抗原结合单元结合PD-L1且包含包含以下的轻链可变区:

[0419] (a) 与SEQ ID NO:59至少90%相同的氨基酸序列;

[0420] (b) 与SEQ ID NO:60至少90%相同的氨基酸序列;

[0421] (c) 与SEQ ID NO:61至少90%相同的氨基酸序列;

[0422] (d) 与SEQ ID NO:62至少90%相同的氨基酸序列;或

[0423] (e) 与SEQ ID NO:63至少90%相同的氨基酸序列。

[0424] 在一些实施方案中,本公开提供多特异性抗原结合构建体,其包含本文中所公开的PD-1拮抗剂中的任一者及本文中所公开的PD-1配体(诸如PD-L1)的拮抗剂中的任一者。例如,双特异性体3为特异性结合人类PD-1及人类PD-L1的多特异性四价抗原结合构建体。构建体包含抗PD-1 IgG1抗体(mAb28),其中抗体的重链为在其C端进一步包含抗PD-L1抗体(mAb1)的重链可变区的融合蛋白,抗PD-L1抗体经由聚GGGS(SEQ ID NO:120)连接子连接至抗BCMA抗体的Fc区。构建体的抗PD-1部分及抗PD-L1部分的轻链是相同的(SEQ ID NO:101)。双特异性体3(其结构由图13A中的例子表示)包含SEQ ID NO:100中所述的重链序列及SEQ ID NO:101中所述的轻链序列。

[0425] 在一些实施方案中,本公开提供特异性结合PD-1及PD-L1的多特异性抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含包含与SEQ ID NO:100或102至少85%(例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少

97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的重链区及包含与SEQ ID NO:101或103至少85% (例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的轻链区。

[0426] 在一些实施方案中,本公开提供特异性结合PD-1及PD-L1的多特异性抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含包含与SEQ ID NO:100至少85% (例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的重链区,及包含与SEQ ID NO:101至少85% (例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的轻链区。在一些实施方案中,重链区包含与SEQ ID NO:10015个氨基酸或更少、14个氨基酸或更少、13个氨基酸或更少、12个氨基酸或更少、11个氨基酸或更少、10个氨基酸或更少、9个氨基酸或更少、8个氨基酸或更少、7个氨基酸或更少、6个氨基酸或更少、5个氨基酸或更少、4个氨基酸或更少、3个氨基酸或更少、2个氨基酸或更少、或1个氨基酸不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链区包含与SEQ ID NO:10115个氨基酸或更少、14个氨基酸或更少、13个氨基酸或更少、12个氨基酸或更少、11个氨基酸或更少、10个氨基酸或更少、9个氨基酸或更少、8个氨基酸或更少、7个氨基酸或更少、6个氨基酸或更少、5个氨基酸或更少、4个氨基酸或更少、3个氨基酸或更少、2个氨基酸或更少、或1个氨基酸不同的氨基酸序列。

[0427] 在一些实施方案中,本公开提供特异性结合PD-1及PD-L1的多特异性抗体或其抗原结合部分,其中抗体或其抗原结合部分包含包含与SEQ ID NO:102至少85% (例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的重链区,及包含与SEQ ID NO:103至少85% (例如,至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同)的氨基酸序列的轻链区。在一些实施方案中,重链区包含与SEQ ID NO:10215个氨基酸或更少、14个氨基酸或更少、13个氨基酸或更少、12个氨基酸或更少、11个氨基酸或更少、10个氨基酸或更少、9个氨基酸或更少、8个氨基酸或更少、7个氨基酸或更少、6个氨基酸或更少、5个氨基酸或更少、4个氨基酸或更少、3个氨基酸或更少、2个氨基酸或更少、或1个氨基酸不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链区包含与SEQ ID NO:10315个氨基酸或更少、14个氨基酸或更少、13个氨基酸或更少、12个氨基酸或更少、11个氨基酸或更少、10个氨基酸或更少、9个氨基酸或更少、8个氨基酸或更少、7个氨基酸或更少、6个氨基酸或更少、5个氨基酸或更少、4个氨基酸或更少、3个氨基酸或更少、2个氨基酸或更少、或1个氨基酸不同的氨基酸序列。

[0428] 在一些方面及实施方案中,本文中亦提供包含四个抗原结合单元的多特异性抗原结合构建体,其中两个抗原结合单元结合PD-1,两个抗原结合单元结合PD-L1,且其中构建体包含与SEQ ID NO:100或102的氨基酸序列至少85%相同的重链氨基酸序列,及与SEQ ID NO:101或103的氨基酸序列至少85%相同的轻链氨基酸序列。

[0429] 在一些方面及实施方案中,本文中亦提供包含四个抗原结合单元的多特异性抗原结合构建体,其中两个抗原结合单元结合PD-1,两个抗原结合单元结合PD-L1,且其中构建体包含与SEQ ID NO:100的氨基酸序列至少85%相同的重链氨基酸序列及与SEQ ID NO:101的氨基酸序列至少85%相同的轻链氨基酸序列。

[0430] 在一些方面及实施方案中,本文中亦提供包含四个抗原结合单元的多特异性抗原结合构建体,其中两个抗原结合单元结合PD-1,两个抗原结合单元结合PD-L1,且其中构建体包含与SEQ ID NO:102的氨基酸序列至少85%相同的重链氨基酸序列及与SEQ ID NO:103的氨基酸序列至少85%相同的轻链氨基酸序列。

[0431] 表8.多特异性重链序列

[0432]

SEQ ID NO	序列
100	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMLWVRQAPGKGLEWV SAISNSGTYTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGYTGND YWGQGT LTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSG LYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP CPAPELLGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSQVQLV

[0433]

SEQ ID NO	序列
	QSGAEVKKPGSSV KVSCKASGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGAATYAQKFQGR VTITADESTSTA YMELSSLRSED TAVYYCARLKGELKDAFDIWGQGTLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTY ICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
102	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMLWVRQAPGKGLEWV SAISNSGTYYTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLDFIVGYTGND YWGQGTLTVTVSS AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLES DL YTLSSSVTVPSSRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVP EVSSVFIFPP KPKDVLITLTPKVTCTVVVDISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTQPREE QFASTFRSVSEL PIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKE QMAKDKVSLTC MITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNPKS NWEAGNTFTCSVL HEGLHNHHTEKSLSHSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAE VKKPGSSVKVSCA SGGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGAATYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSS LRSED TAVYYCARLKGELKDAFDIWGQGTLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPG

[0434]	SEQ ID NO	序列
		SAAQTNSMVTLG CLVKGYPFEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLESDLYTLSSSVTVPSSPRPS ETVTCNVAHP ASSTKVDKKIVPRDCG

[0435] 表9. 多特异性轻链序列

[0436]	EQ ID NO	序列
	01	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	03	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKR ADAAPTVSIFPPSS EQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQ DSKDSTYSMSSTLTITK DEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE

[0437] 如本文中所用,术语“多特异性抗原结合构建体”指双特异性、三特异性或多特异性抗原结合构建体,及其抗原结合部分或片段。多特异性抗原结合构建体可为单个多功能多肽或其可为彼此共价或非共价结合的两个或更多个分子(例如,多肽和/或适体)的多聚复合物。术语“多特异性抗原结合构建体”包括可与另一功能分子(例如,另一种肽、蛋白质和/或适体)连接或共同表达的抗体(或其抗原结合片段)。例如,抗体或其片段可与一或多种其他分子实体(诸如蛋白质或其片段)功能上连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式),以产生具有第二结合特异性的双特异性或多特异性抗原结合分子。如本文中所用,术语“多特异性抗原结合构建体”亦包括双特异性、三特异性或多特异性抗体

或其抗原结合片段。在某些实施方案中,抗体与另一抗体或其抗原结合片段功能连接以产生具有第二结合特异性的双特异性抗体。本文中其他地方也描述了本公开的双特异性及多特异性抗体。

[0438] 如本文中所用,抗原结合“臂”指形成结合至抗原的多特异性抗原结合构建体的区域的构建体的单元、域、区或类似者。因此,“第一臂”与多特异性抗原结合构建体的“第二臂”形成构建体的单独结合区,各臂形成抗原结合单元。一般而言,一个“臂”(第一臂)在其抗原结合或抗原特异性方面不同于另一“臂”(第二臂)。因此,在双特异性二价抗体的实例中,抗体的一个臂结合至抗原A,而抗体的另一臂结合至抗原B。在一些实施方案中,于双特异性二价抗体的实例中,抗体的一个臂结合至抗原A,而抗体的另一臂结合至抗原B或C(由于例如结构相似性与两种抗原(诸如PD-L1及PD-L2)交叉反应)。参见,例如,美国专利9,845,356。类似地,在四价双特异性抗体(例如,通过接合两个不同抗体形成)的实例中,一个“臂”指结合至抗原A的抗体的区域(即使二价抗体的两个结合位点结合至抗原A),“另一臂”指结合至抗原B的抗体的区域(即使二价抗体的两个结合位点结合至抗原B)。在一些实施方案中,在四价双特异性抗体(例如,通过接合两个不同抗体形成)的实例中,一个“臂”指结合至抗原A的抗体的区域(即使二价抗体的两个结合位点结合至抗原A),“另一臂”指结合至抗原B或C的抗体的区域(即使二价抗体的两个结合位点可结合至抗原B或C)。参见,例如,美国专利9845356。本领域技术人员显而易见的是,“第一”或“第二”可交换使用。

[0439] 当用于描述抗原结合构建体或蛋白质或抗原结合臂时,术语“价”指抗原结合构建体或蛋白质中的识别(结合)位点的数目,不管那些不同的识别或结合位点是否结合至相同表位。各识别位点特异性识别并因此能结合抗原上的一个表位(结合位点)。当抗原结合蛋白包含超过一个识别位点时(例如,当抗原结合蛋白为IgG时,其具有其可变区中的两个识别位点),各识别位点可特异性识别相同抗原上的相同表位,或不同表位,无论是否在相同或不同抗原上。多价可增加亲合力(avidity),即,抗原结合臂或构建体与相关抗原或靶受体之间的结合强度。亲合力与表位或抗原决定簇与抗原结合单元上的其结合位点之间的亲和力(affinity),以及抗原结合单元上存在的相关结合位点的实际数目二者相关。

[0440] 在一些实施方案中,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者包含多价(例如,二价)抗体或抗原结合片段,其中所述价中的至少两者特异性结合PD-1。在一些实施方案中,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者包含多价(例如,二价)抗体或抗原结合片段,其中所述价中的至少两者特异性结合PD-1配体(例如,PD-L1或PD-L2)。在一些实施方案中,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者包含多价(例如,二价)抗体或抗原结合片段,其中所述价中的至少两者特异性结合PD-L1。在一些实施方案中,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者包含第一多价(例如,二价)抗体或抗原结合片段及第二多价(例如,二价)抗体或抗原结合片段,其中第一多价抗体或抗原结合片段的价中的至少两者特异性结合PD-1,且其中第二多价抗体或抗原结合片段的价中的至少两者特异性结合PD-L1。在一些实施方案中,本文中所公开的多特异性抗原结合构建体中的任一者为四价构建体,其中四价构建体包含第一二价抗体或抗原结合片段及第二二价抗体或抗原结合片段,其中第一二价抗体或抗原结合片段的价均特异性针对PD-1上的相同表位,且其中第二二价抗体或抗原结合片段的价均特异性针对PD-L1上的相同表位。在此类四价构建体的一些实施方案中,第一及第二二价抗体或其抗原结合片段或部分使用具有

相同氨基酸序列的轻链。换言之,四价构建体包含共同轻链。例如,具有SEQ ID NO:101或SEQ ID NO:103的序列的轻链。

[0441] 在一些实施方案中,第一臂为PD-1的拮抗剂。在一些实施方案中,第二臂为PD-1配体(例如,PD-L1和/或PD-L2)的拮抗剂。在一些实施方案中,第一臂为PD-1的拮抗剂,且第二臂为同源PD-1配体(例如,PD-L1和/或PD-L2)的拮抗剂。

[0442] 当提及抗原结合臂的生物活性使用时,术语“拮抗剂”、“拮抗”及“抑制”表示抗原结合臂结合各自细胞上的其靶(例如,PD-1)并部分或完全阻断、抑制和/或减少通过PD-1的生物反应。在一些实施方案中,以剂量依赖性方式观察到在拮抗剂存在下的抑制。在一些实施方案中,测量的信号(例如,生物活性)低于在可比较条件下利用阴性对照测量的信号至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约100%。本文中亦公开了鉴别适用于本公开的方法的拮抗剂的方法。例如,这些方法包括(但不限于)诸如酶联免疫吸附检定(ELISA)、FORTE BIO©系统及放射免疫检定(RIA)的结合检定。这些检定测定拮抗剂结合所关注多肽(例如,PD-1或其配体)的能力并因此指示拮抗剂抑制、中和或阻断所关注多肽的活性的能力。亦可使用功能检定测定拮抗剂的功效,诸如拮抗剂抑制多肽的功能的能力。例如,功能检定可包括使多肽与候选拮抗剂分子接触并测量与多肽正常相关联的一或多种生物活性的可检测的变化。拮抗剂的效能通常通过其 IC_{50} 值(抑制激动剂反应的50%所需的浓度)定义。 IC_{50} 值越低,拮抗剂的效能越大且抑制最大生物反应所需的浓度越低。

[0443] 在一些实施方案中,至少一个抗原结合臂具有至少 $1 \times 10^{-7}M$ 、至少 $1 \times 10^{-8}M$ 、至少 $1 \times 10^{-9}M$ 、至少 $1 \times 10^{-10}M$ 、至少 $1 \times 10^{-11}M$ 、至少 $1 \times 10^{-12}M$ 或至少 $1 \times 10^{-13}M$ 的 K_D 。在一些实施方案中,抗原结合臂二者均具有相同或相似 K_D 。如本文中所用,术语“ K_D ”(M)指特定抗原结合臂/抗原相互作用的解离平衡常数。 $K_D = k_d/k_a$ 。如本文中所用,术语 k_d (sec^{-1})指特定抗原结合臂/抗原相互作用的解离速率常数。该值亦称作 k_{off} 值。如本文中所用,术语 k_a ($M^{-1} \times sec^{-1}$)指特定抗原结合臂/抗原相互作用的缔合速率常数。该值亦称作 k_{on} 值。

[0444] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体的一个臂(例如,第一臂)与其靶的结合不阻断另一臂(例如,第二臂)与其靶的结合。在一些实施方案中,一个臂的结合不在空间上阻碍第二臂结合其靶。例如,在第一臂结合至PD-1后,第二臂自由结合PD-1的配体(例如,PD-L1和/或PD-L2)。因此,在一些实施方案中,第一臂及第二臂结合至其各自靶并且两个臂保持同时结合。

[0445] 在一些实施方案中,第一臂及第二臂与其各自靶的结合将免疫细胞与第二细胞桥接在一起,使两个细胞紧密靠近。如本文中所用,“桥接”指接合两种细胞类型(例如,表达PD-1的一种免疫细胞,及表达其配体-PD-L1的第二细胞),或使两个细胞紧密靠近在一起;所述两个细胞不必物理接触。因此,多特异性抗原结合构建体充当两个细胞的连接体(例如,桥),所述两个细胞各自表达PD-1或其配体。

[0446] 用于测定两个细胞是否通过本公开的构建体桥接或连接在一起的方法是本领域已知的。例如,在一些实施方案中,免疫细胞及第二细胞的桥接是通过例如流式细胞测量术、FRET、免疫沉淀、显微镜或荧光板读取器测定。

[0447] 在一些实施方案中,多特异性构建体的第一臂及第二臂与其各自靶的结合导致靶(例如,PD-1)的胞外域的下调和/或脱落和/或降解。如本文中所用,“下调”指一过程,通过该过程细胞减少细胞组分(诸如RNA或蛋白)的数量。在细胞表面蛋白质受体的情况下,下调可通过由于结合至配体或本文中所述构建体中的任一者而导致的受体内化产生。脱落或胞外域脱落指一种过程,通过该过程细胞表面蛋白质经蛋白质水解裂解,导致其胞外域释放至细胞外环境中。调节胞外域脱落的脱落酶的非限制性实例包括去整合素(disintegrin)及金属蛋白酶(ADAM)家族的成员,诸如ADAM8、ADAM9、ADAM 10、ADAM12、ADAM15、ADAM 17及ADAM 28,及基质金属蛋白酶(MMP),诸如MMP2、MMP3、MMP7、MMP9及MMP14。距质膜的距离及裂解位点区的结构被认为比胞外域脱落中的特定序列更重要。蛋白质降解或蛋白质水解指一组过程,所述过程导致蛋白质中的肽键中的一或多者通过称作蛋白酶的蛋白质水解酶的催化或非酶促(例如在极低或极高pH下)的水解。在真核细胞中,两种主要路径—泛素蛋白酶体路径及溶酶体蛋白质水解—介导蛋白质降解。用于测定靶受体是否通过本文中所公开的多特异性构建体下调和/或脱落和/或降解的方法是本领域已知的,且述于实例中,参见,例如,图12A至12C;例如,流式细胞测量术、Western印迹、免疫沉淀、显微镜或荧光板读取器。

[0448] 如本文所述,本公开的构建体可桥接表达PD-1的免疫细胞和表达其配体的第二细胞,诸如第二免疫细胞和/或癌症或肿瘤细胞。本领域技术人员知晓,免疫细胞的类型取决于待治疗的疾病的背景;可根据在考虑的病症容易地确定免疫细胞的特定类型。在一些实施方案中,免疫细胞为T细胞,例如,调节性T细胞(亦称作抑制T细胞),包括CD8⁺T细胞及CD4⁺T细胞,及亚型,诸如CD4⁺FOXP3⁺T_{reg}细胞、CD4⁺FOXP3⁻T_{reg}细胞、Tr1细胞、Th3细胞及T_{reg}17细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为B细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为巨噬细胞。

[0449] 类似地,第二细胞的类型取决于在考虑的病症。在一些实施方案中,第二细胞(表达PD-1配体的细胞)为第二免疫细胞,例如,调节性免疫细胞。在一些实施方案中,调节性免疫细胞为调节性T细胞、B细胞、巨噬细胞、源自骨髓的抑制细胞、树突状细胞或间质基质细胞中的任一者或多者。在一些实施方案中,调节性免疫细胞为调节性T细胞,例如,CD8⁺T细胞或CD4⁺T细胞。

[0450] 在一些实施方案中,第二细胞为肿瘤细胞。如本文中所用,“肿瘤细胞”不但有时与“癌细胞”可交换使用,而且包含与正常细胞相比展示增加的增殖的非恶性(非癌)细胞。在一些实施方案中,肿瘤细胞为可通过阻断免疫细胞表达的PD-1与在第二细胞上表达的其配体(例如,PD-L1或PD-L2)之间的相互作用,同时桥接免疫细胞及肿瘤细胞来治疗的癌症。在一些实施方案中,肿瘤细胞系选自由以下组成的组:血癌、淋巴瘤、骨髓瘤、白血病、神经癌、黑色素瘤、乳癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肺癌、头颈癌、胃肠癌、肝癌、胰癌、泌尿生殖器癌、骨癌、肾癌及血管癌。在一些实施方案中,肿瘤细胞选自由以下组成的组:卡波西氏(Kaposi's)肉瘤、白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、髓母细胞瘤、前髓细胞性单核细胞性单核细胞性红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病、慢性淋巴细胞性白血病、套细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、伯基特氏(Burkitt's)淋巴瘤及边缘区B细胞淋巴瘤、真性红细胞增多淋巴瘤、霍奇金氏病(Hodgkin's disease)、非霍奇金氏病、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏(Waldenstrom's)巨球蛋白血症、重链病、实体肿瘤、肉瘤及癌、纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血

管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏 (Ewing's) 瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠肉瘤、结肠直肠癌、胰癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌 (hepatoma)、胆管癌、绒膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、威尔姆氏 (Wilm's) 瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、鼻咽癌、食道癌 (esophageal carcinoma)、基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑及中枢神经系统 (CNS) 癌、子宫颈癌、绒膜癌、结肠直肠癌、结缔组织癌、消化系统癌、子宫内膜癌、食道癌 (esophageal cancer)、眼癌、头颈癌、胃癌、上皮内肿瘤、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌 (小细胞、大细胞)、黑色素瘤、神经母细胞瘤；口腔癌 (例如唇、舌、口及咽)、卵巢癌、胰癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌；呼吸系统癌、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌及泌尿系统癌。

[0451] 如本文中所述,本发明的多特异性抗原结合构建体包含双特异性、三特异性、四特异性或多特异性抗体 (免疫球蛋白) 或其抗原结合部分或片段。

[0452] 术语“免疫球蛋白”指一类结构上相关的蛋白质,其一般包含两对多肽链:一对轻 (L) 链及一对重 (H) 链。在“完整的免疫球蛋白”中,这些链中的所有四者通过二硫键互相连接。免疫球蛋白的结构已得到明确表征。参见,例如,Paul, *Fundamental Immunology* 第7版,第5章 (2013) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA。简言之,各重链通常包含重链可变区 (V_H) 及重链恒定区 (C_H)。重链恒定区通常包含三个域, C_{H1} 、 C_{H2} 及 C_{H3} 。各轻链通常包含轻链可变区 (V_L) 及轻链恒定区。轻链恒定区通常包含一个域,缩写为 C_L 。本文中术语“免疫球蛋白” (Ig) 有时可与术语“抗体”交换使用。

[0453] 术语“抗体”描述一种免疫球蛋白分子,并且在本文中以其最广泛意义使用。抗体具体而言包含完整抗体 (例如,完整免疫球蛋白),及抗体片段 (诸如抗体的抗原结合片段),如本文中所述。因此,“抗体”可指完整抗体及其抗原结合片段。抗体包含至少一个抗原结合域。抗原结合域的一个实例为由 V_H - V_L 二聚体形成的抗原结合域。抗体可通过其特异性结合的抗原描述。例如,PD-1 抗体 (或者称作抗PD-1抗体) 为特异性结合至抑制性受体PD-1的抗体。

[0454] 可将 V_H 及 V_L 区进一步细分成散布更保守性区的高可变性区 (“高可变区 (HVR)”); 亦称作“互补决定区” (CDR)。更保守性区被称作框架区 (FR)。各 V_H 及 V_L 一般包含以下列顺序 (自N端至C端) 排列的三个CDR及四个FR: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。所述CDR参与抗原结合,并赋予抗体抗原特异性和结合亲和力。参见Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 第5版 (1991) Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 其全文以引用的方式并入。

[0455] 可基于恒定域的序列将来自脊椎动物物种的轻链分配至称作 κ 及 λ 的两种类型中的一者。

[0456] 可将来自脊椎动物物种的重链分配至五种不同类别 (或同种型) 中的一者: IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM。亦将这些类别分别命名为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。根据序列及功能的差异将 IgG 及 IgA 类别进一步分成子类别。人类表达下列子类别: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2。

[0457] 产生及筛选对抗所需靶的抗体的方是本领域熟知的。如本文中所述,进一步修饰

抗体以获得增强的性质(例如,增强的亲和力、嵌合化、人源化)以及产生抗原结合片段的方法是本领域熟知的。

[0458] 术语“嵌合抗体”指抗体,其中重链和/或轻链的组分源自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分源自不同来源或物种。

[0459] 非人类抗体的“人源化”形式为含有源自非人类抗体的最小序列的嵌合抗体。人源化抗体一般为人类免疫球蛋白(受体抗体),其中来自一或多个CDR的残基被来自非人类抗体(供体抗体)的一或多个CDR的残基取代。供体抗体可为具有所需特异性、亲和力或生物效应的任何适宜的非人类抗体,诸如小鼠、大鼠、兔、鸡或非人类灵长类动物抗体。在一些实例中,受体抗体的所选框架区残基被来自供体抗体的对应框架区残基取代。人源化抗体亦可包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。可作出此类修饰以进一步精修抗体功能。进一步细节参见Jones等人,(1986) *Nature*, 321:522-525; Riechmann等人,(1988) *Nature*, 332:323-329;及Presta,(1992) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596,其各者全文系以引用的方式并入。

[0460] “人类抗体”为具有对应于由人类或人类细胞产生或源自非人类来源的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列的抗体,所述非人类来源利用了人类抗体库或人类抗体编码序列(例如,获自人类来源或重新设计)。人类抗体尤其排除了人源化抗体。

[0461] 在一些实施方案中,抗体分子包括双体抗体及单链分子,以及抗体的抗原结合片段(例如,Fab、F(ab')₂及Fv)。例如,抗体分子可包含重(H)链可变域序列(本文中缩写为VH),及轻(L)链可变域序列(本文中缩写为VL)。在一些实施方案中,抗体分子包含或由重链及轻链组成(称作半抗体)。在另一实例中,抗体分子包含两个重(H)链可变域序列及两个轻(L)链可变域序列,从而形成两个抗原结合位点,诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fd、Fd'、Fv、单链抗体(例如,scFv)、单可变域抗体、双体抗体(Dab)(二价的双特异性)及嵌合(例如,人源化)抗体,其可通过修饰全抗体或使用重组DNA技术重新合成的那些抗体产生。这些功能抗体片段保留与其各自抗原选择性结合的能力。抗体及抗体片段可来自抗体的任何类别,包括但不限于IgG、IgA、IgM、IgD及IgE,及来自抗体的任何子类别(例如,IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3及IgG4)。抗体分子的制备可是单克隆或多克隆。抗体分子亦可为人类、人源化、CDR接枝或体外产生的抗体。抗体可具有选自例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重链恒定区。抗体亦可具有选自例如κ或λ的轻链。在一些实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:64 (ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK)至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的IgG1重链恒定区。在一些实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:68 (ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK)至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的IgG4重链恒定区。在一些实施方案中,抗体包含具有与SEQ ID NO:69 (ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG)至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的IgG4重链恒定区。

[0462] 抗体分子的抗原结合部分或片段是本领域所熟知的,且包括例如:(i)Fab片段,由VL、VH、CL及CH1域组成的单价片段;(ii)F(ab')₂片段,包含在铰链区处通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由VH及CH1域组成的Fd片段;(iv)由抗体的单臂的VL及VH域组成的Fv片段,(v)双体抗体(dAb)片段,其由VH域组成;(vi)骆驼科或骆驼化可变域;(vii)单链Fv(scFv),参见,例如,Bird等人(1988)Science 242:423-426;及Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;(viii)单域抗体。这些抗体片段可使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且利用与完整抗体相同的方式通过效用筛选所述片段。

[0463] 抗体分子亦可为单域抗体。单域抗体可包括其互补决定区为单域多肽的部分的抗体。实例包括但不限于重链抗体、天然缺乏轻链的抗体、衍生自常规4-链抗体的单域抗体、经工程改造的抗体及除了衍生自抗体的那些之外的单域支架。单域抗体可为本领域的任一者,或任何未来的单域抗体。单域抗体可源自任何物种,包括但不限于小鼠、人类、骆驼、美洲驼、鱼、鲨鱼、山羊、兔及牛。根据本公开的另一方面,单域抗体为称作缺乏轻链的重链抗体的天然产生的单域抗体。此类单域抗体公开在WO 9404678中。出于清晰原因,本文中源自天然缺乏轻链的重链抗体的此可变域称作VHH或纳米抗体,以将其区别于四链免疫球蛋白的常规VH。此VHH分子可源自于骆驼科物种中(例如于骆驼camel、美洲驼llama、单峰骆驼dromedary、羊驼alpaca及原驼guanaco中)养育的抗体。除了骆驼科外的其他物种可产生天然缺乏轻链的重链抗体;此类VHH在本公开的范围。

[0464] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体包含双特异性抗体。双特异性抗体具有对不超过两种抗原的特异性,但是可具有超过两个结合位点,如本文中所述。双特异性抗体分子特征在于具有对第一抗原(例如,PD-1)结合特异性的第一免疫球蛋白可变域序列及具有对第二抗原(例如,PD-1配体,诸如PD-L1配体)结合特异性的第二免疫球蛋白可变域序列。在一些实施方案中,双特异性抗体分子包含具有对第一抗原结合特异性的scFv或其片段,及具有对第二抗原结合特异性的scFv或其片段。参见,例如,Kontermann&Brinkmann,(2015),Drug DiscoveryToday,20(7):838-47,其全文以引用的方式并入。

[0465] 可用于产生本文中所述的多价和/或多特异性构建体,诸如不对称及对称架构二者的多价和/或多特异性抗体形式的各种形式及方法是本领域中已知的。此类形式的非限制性实例包括(i)少Fc的双特异性抗体形式,诸如串联单链可变片段(scFv₂-taFv)及三抗体,包括双特异性T细胞接合子(BiTE)及双特异性杀手细胞接合子(BiKE)分子;包含单域抗体的双特异性单域抗体融合蛋白,诸如VH或VL域、VHH、VNAR及纳米抗体;双体抗体及双体抗体衍生物,包括串联双体抗体及双重亲和力再靶向(DART)蛋白质;Fab融合蛋白;及其他少Fc的融合蛋白,通过使用异二聚肽或来自各种蛋白质的微抗体,例如,具有螺旋线圈结构的

亮氨酸拉链; (ii) 具有不对称架构的双特异性IgG, 诸如具有来自两个不同抗体的重链及轻链的不对称IgG; 具有不对称Fc区的双特异性IgG, 其使用杵臼方法, 静电相互作用(转向)以避免CH3域的同源二聚化, 通过引入电荷对至IgG1及IgG2的铰链区的较佳重链异二聚化, 链交换工程化域(SEED) 异二聚体及基于T细胞受体(BEAT) 技术的抗体的双特异性接合; 不对称Fc及CH3融合蛋白; (iii) 具有对称架构的双特异性抗体, 诸如通过融合scFv、融合域抗体及支架蛋白、融合Fab臂及融合额外可变重链及轻链域的附加IgG; 经修饰的IgG分子; 对称Fc-及CH3-基础上的双特异性抗体; 及使用免疫球蛋白衍生的同源二聚域的双特异性抗体。参见, 例如, [The making of bispecific antibodies,] Brinkmann及Kontermann, MABS 2017, 第9卷: 2, 第182至212页, 其内容的全文以引用的方式并入本文中。亦参见例如美国专利第5,731,168号中所述的“杵臼”方法; 如在例如WO 09/089004、WO 06/106905及WO 2010/129304中所述的静电转向的Fc配对; 如在例如WO 07/110205中所述的链交换工程化域(SEED) 异二聚体形成; 如在例如WO 08/119353、WO 2011/131746及WO 2013/060867中所述的Fab臂交换; 双抗体结合物, 例如, 使用具有胺反应性基团及巯基反应性基团的异双功能试剂通过抗体交联以产生双特异性结构, 如在例如美国专利案第4,433,059号中所述; 通过两个重链之间二硫键的还原和氧化循环重组来自不同抗体的半抗体(重-轻链对或Fab)产生的双特异性抗体决定位(determinant), 如在例如美国专利案第4,444,878号中所述; 三功能抗体, 例如, 通过巯基反应性基团交联的三个Fab'片段, 如在例如美国专利案第5,273,743号中所述; 生物合成结合蛋白, 例如, 通过C-端尾, 优选通过二硫键或胺反应性化学交联而交联的scFv对, 如在例如美国专利案第5,534,254号中所述; 双功能抗体, 例如, 通过已取代恒定域的亮氨酸拉链(例如, c-fos及c-jun) 二聚化的具有不同结合特异性的Fab片段, 如在例如美国专利案第5,582,996号中所述; 双特异性及寡特异性单价及寡价受体, 例如, 通过一种抗体的CH1区与通常具有相关轻链的另一种抗体的VH区之间的多肽间隔子连接的两种抗体(两个Fab片段)的VH-CH1区, 如在例如美国专利案第5,591,828号中所述; 双特异性DNA-抗体结合物, 例如, 抗体或Fab片段通过DNA的双链片段的交联, 如在例如美国专利案第5,635,602中所述; 双特异性融合蛋白, 例如, 含有两个scFv与其间的亲水性螺旋肽连接物以及完整恒定区的表达构建体, 如在例如美国专利案第5,637,481号中所述; 多价及多特异性结合蛋白, 例如, 具有Ig重链可变区的结合区的第一域以及具有Ig轻链可变区的结合区的第二域的多肽的二聚体, 一般称作双体抗体(亦包含针对双特异性、三特异性或四特异性分子创建的更高阶结构), 如在例如美国专利案第5,837,242号中所述; 进一步与肽间隔子连接至抗体铰链区及CH3区的具有经连接的VL及VH链的微抗体构建体, 其可经二聚化以形成双特异性/多价分子, 如在例如美国专利案第5,837,821号中所述; 与短肽连接子(例如, 5或10个氨基酸)或根本无连接子以任何方向连接的VH及VL域, 其可形成用于形成双特异性双体抗体的二聚体、三聚体及四聚体, 如在例如美国专利案第5,844,094号中所述; 通过具有可交联基团的肽链在C端连接的VH域(或家族成员中的VL域)串进一步与VL域缔合, 以形成一系列Fv(或scFv), 如在例如美国专利案第5,864,019号中所述; 及具有通过肽连接子连接的VH及VL域二者的单链结合多肽通过非共价或化学交联组合成多价结构, 以形成例如使用scFv或双体抗体形式二者的同源二价、异源二价、三价及四价结构, 如在例如美国专利案第5,869,620号中所述。额外的示例性多特异性及双特异性分子及制备其的方法见于例如美国专利案第5,910,573号、美国专利案第5,932,448号、美国专利案第5,959,083号、美

国专利案第5,989,830号、美国专利案第6,005,079号、美国专利案第6,239,259号、美国专利案第6,294,353号、美国专利案第6,333,396号、美国专利案第6,476,198号、美国专利案第6,511,663号、美国专利案第6,670,453号、美国专利案第6,743,896号、美国专利案第6,809,185号、美国专利案第6,833,441号、美国专利案第7,129,330号、美国专利案第7,183,076号、美国专利案第7,521,056号、美国专利案第7,527,787号、美国专利案第7,534,866号、美国专利案第7,612,181、US2002004587A1、US2002076406A1、US2002103345A1、US2003207346A1、US2003211078A1、US2004219643A1、US2004220388A1、US2004242847A1、US2005003403A1、US2005004352A1、US2005069552A1、US2005079170A1、US2005100543A1、US2005136049A1、US2005136051A1、US2005163782A1、US2005266425A1、US2006083747A1、US2006120960A1、US2006204493A1、US2006263367A1、US2007004909A1、US2007087381A1、US2007128150A1、US2007141049A1、US2007154901A1、US2007274985A1、US2008050370A1、US2008069820A1、US2008152645A1、US2008171855A1、US2008241884A1、US2008254512A1、US2008260738A1、US2009130106A1、US2009148905A1、US2009155275A1、US2009162359A1、US2009162360A1、US2009175851A1、US2009175867A1、US2009232811A1、US2009234105A1、US2009263392A1、US2009274649A1、EP346087A2、W00006605A2、W002072635A2、W004081051A1、W006020258A2、W02007044887A2、W02007095338A2、W02007137760A2、W02008119353A1、W02009021754A2、W02009068630A1、W09103493A1、W09323537A1、W09409131A1、W09412625A2、W09509917A1、W09637621A2、W09964460A1中。上述申请案的内容的全文以引用的方式并入本文中。

[0466] 在一些实施方案中,本公开的多特异性抗原结合构建体为双特异性抗体。本公开的双特异性抗体可针对PD-1及PD-L1或对抗PD-1及PD-L2产生。双特异性抗体的抗体臂可通过标准技术产生,如本文中所公开。在一些实施方案中,针对PD-1及其配体的任何已知抗体可用于产生本公开的双特异性抗体。例如,本文中已例示此类双特异性构建体(参见,例如,图3中派姆单抗(PD-1抗体)与阿特珠单抗(PD-L1抗体)接合;图4中纳武单抗(PD-1抗体)与阿特珠单抗(PD-L1抗体)接合)。如本文中所例示,可使用本领域中已知和/或可得抗体产生本文中所述的多特异性抗原结合构建体(例如,双特异性抗体)。

[0467] 在一些实施方案中,双特异性抗体是二价的,例如,一个臂是针对PD-1单价,而另一臂是针对PD-L1或PD-L2或二者单价,例如,与两种配体交叉反应)。在一些实施方案中,双特异性抗体是四价,诸如本文中所述的新颖的双特异性体3及双特异性体4抗体。例如,如图3中所说明,派姆单抗结合臂是针对PD-1二价,各结合PD-1上的相同表位,而阿特珠单抗结合臂是针对PD-L1二价,各结合PD-L1上的相同表位。这亦可见于例如图8中的双特异性形式(图8中呈现的工作流程的步骤2的左图中所说明的示例性共同轻链双特异性)。图8中的示例性共同轻链双特异性形式(工作流程的步骤2的右图中所说明的形式)表示四价双特异性形式的另一实例。与四价双特异性形式(其中第一抗原结合臂接合至Fc区的相对端上的第二抗原结合臂)相比,此处第一抗原结合臂的各Fab均接合至第二抗原结合臂的各Fab。例如,使用连接子将第一抗原结合臂的一个Fab连接至第二抗原结合臂的Fab,其中各抗原结合臂共享共同轻链。参见,图8,工作流程的步骤2的右图中所说明的形式。

[0468] 在一些实施方案中,双特异性抗体是四价的,其中一个臂是针对PD-1二价,各结合PD-1上的两个不同表位。在一些实施方案中,双特异性抗体是四价的,其中一个臂是针对

PD-1的配体(PD-L1和/或PD-L2)二价,各结合PD-1的配体上的两个不同表位。在一些实施方案中,双特异性抗体是四价的,其中一个臂是针对PD-1二价,各结合PD-1上的两个不同但是重叠的表位。在一些实施方案中,双特异性抗体是四价的,其中一个臂是针对PD-1配体(PD-L1和/或PD-L2)二价,各结合PD-1配体(PD-L1和/或PD-L2)上的两个不同但是重叠的表位。在一些实施方案中,双特异性抗体是四价的,其中一个臂是针对PD-1二价且各结合PD-1上的相同表位。在一些实施方案中,双特异性抗体是四价的,其中一个臂是针对PD-1配体(PD-L1和/或PD-L2)二价,且各结合PD-1配体(PD-L1和/或PD-L2)上的相同表位。在一些实施方案中,双特异性抗体是四价的,其中一个臂是针对PD-1上的相同表位二价;及另一臂是针对PD-1配体(PD-L1和/或PD-L2)上的相同表位二价。

[0469] 在一些实施方案中,双特异性抗体为PD-1及PD-L1二者的拮抗剂。在一些实施方案中,双特异性抗体为PD-1及PD-L2二者的拮抗剂。在一些实施方案中,双特异性抗体为PD-1及配体PD/L1和PD-L2二者(例如,与两种配体交叉反应)的拮抗剂。

[0470] 在某些实施方案中,第一抗原结合臂及第二抗原结合臂通过至少一个氨基的连接子氨基酸序列连接。任选地,连接子氨基酸序列包含GGGS_x(SEQ ID NO:121),其中x为1至6之间且包含1和6的整数。

[0471] 在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体不包含免疫球蛋白Fc域。

[0472] 在一些实施方案中,构建体包含免疫球蛋白Fc域。在一些实施方案中,构建体的第一臂或第二臂或二者包含包含一或多个免疫球蛋白Fc修饰的重链。在一些实施方案中,重链的免疫球蛋白Fc域包含一或多个氨基酸突变,所述突变例如促进第一臂及第二臂的异二聚,促进血清半衰期,和/或修饰效应功能。在一些实施方案中,突变存在于重链的CH3域中。参见,例如,Xu等人,mAbs 7(1):231-42,2015。

[0473] 虽然传统Fc融合蛋白及抗体为非引导相互作用配对的实例,已设计呈不对称相互作用配对的各种经工程化Fc域(Spiess等人,(2015)Molecular Immunology 67(2A):95-106),以促进例如第一抗原结合臂及第二抗原结合臂的异二聚化。增加单个细胞系中含Fc多肽链的所需配对从而以可接受的产率产生优选的不对称融合蛋白的各种方法是本领域已知的[参见,例如,Klein等人(2012)mAbs 4:653-663;及Spiess等人(2015)Molecular Immunology 67(2PartA):95-106]。获得含Fc多肽的所需配对的方法包括但不限于基于电荷的配对(静电转向)、“杵臼”立体配对、SEEDbody配对及基于亮氨酸拉链的配对。参见,例如,Ridgway等人(1996)Protein Eng 9:617-621;Merchant等人(1998)Nat Biotech 16:677-681;Davis等人(2010)Protein Eng Des Sel 23:195-202;Gunasekaran等人(2010);285:19637-19646;Wranik等人(2012)J Biol Chem287:43331-43339;US5932448;WO 1993/011162;WO 2009/089004及WO 2011/034605。

[0474] 例如,可促进特异性多肽之间的相互作用的一种方法为将隆凸入腔(杵臼)互补区进行工程改造,诸如述于Arathoon等人,U.S.7,183,076;Carter等人,U.S.5,731,168;及Kumar等人,WO 2016/164089中,其全文以引用的方式并入本文中。“隆凸”通过用更大侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)取代来自第一多肽(例如,第一相互作用配对)的接界的小氨基酸侧链来构造。与隆凸相同或相似大小的互补“腔”任选地在第二多肽(例如,第二相互作用配对)的接界上通过用更小者(例如,丙氨酸或苏氨酸)取代大氨基酸侧链来创建。在适宜定位和尺寸的隆凸或腔存在于第一多肽或第二多肽的接界的情况下,仅需分别将在相邻接界的

对应腔或隆凸进行工程改造。

[0475] 在中性pH(7.0)下,天冬氨酸及谷氨酸是带负电的,赖氨酸、精氨酸及组氨酸是带正电的。可使用这些带电残基促进异二聚体的形成并同时阻止同型二聚体的形成。吸引力相互作用在相反电荷之间发生,排斥性相互作用在相似电荷之间发生。部分地,通过实施带电残基的定点突变,本文中所公开的蛋白质复合物利用吸引力相互作用用于促进异多聚体形成(例如,异二聚体形成),和任选地,利用排斥性相互作用用于阻止同型二聚体形成(例如,同型二聚体形成)。

[0476] 例如,IgG1 CH3域接界包含参与域-域相互作用的四个独特的带电残基对:Asp356-Lys439'、Glu357-Lys370'、Lys392-Asp399'及Asp399-Lys409'[第二链中的残基编号通过(')显示]。应注意,本文中指示IgG1 CH3域中的残基所用的编号方案与Kabat的EU编号方案一致。由于存在于CH3-CH3域相互作用中的2倍对称,各独特相互作用将在结构中表示两次(例如,Asp-399-Lys409'及Lys409-Asp399')。在野生型序列中,K409-D399'支持异二聚体及同型二聚体二者的形成。在第一链中转换电荷极性的单一突变(例如,K409E;正电至负电)导致对于形成第一链同型二聚体不利的相互作用。由于相同电荷之间发生的排斥相互作用,产生了不利的相互作用(负-负;K409E-D399'及D399-K409E')。在第二链中转换电荷极性的相似突变(D399K';负至正)导致对于第二链同型二聚体的形成不利的相互作用(K409'-D399K'及D399K-K409')。但是,同时,这两种突变(K409E及D399K')导致对于异二聚体的形成有利的相互作用(K409E-D399K'及D399-K409')。静电转向对异二聚体形成和同型二聚体阻止的作用可进一步通过另外带电残基的突变增强,所述带电残基可与或可不与第二链中的相反带电残基(包括例如Arg355及Lys360)配对。参见,例如,WO 2016/164089。

[0477] 因此,在一些实施方案中,本文所述的多特异性抗原结合构建体(例如,双特异性构建体)可包含免疫球蛋白的恒定域,包括例如,免疫球蛋白的Fc部分。例如,第一臂可包含源自IgG(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgA(IgA1或IgA2)、IgE或IgM免疫球蛋白的Fc域的氨基酸序列。任选地,第二臂可包含源自IgG(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgA(IgA1或IgA2)、IgE或IgM的Fc域的氨基酸序列。此类免疫球蛋白域可包含促进异二聚体形成的一或多个氨基酸修饰(例如,缺失、添加和/或取代)。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体为IgG1同种型。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体为IgG1同种型且包含取代。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体为IgG2同种型。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体为IgG3同种型。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体为IgG4同种型。在一些实施方案中,多特异性抗原结合构建体为IgG4同种型且包含取代。在一些实施方案中,当根据EU编号进行编号时,取代是在Ser228处。在一些实施方案中,Ser228处的取代为S228P。在一些实施方案中,第一臂及第二臂包含源自相同免疫球蛋白类别及亚型的Fc域。在一些实施方案中,第一臂及第二臂包含源自不同免疫球蛋白类别或亚型的Fc域。类似地,第一臂和/或第二臂(例如,不对称对或非引导相互作用对)包含免疫球蛋白的经修饰的恒定域,包括例如,促进异二聚体形成的一或多个氨基酸修饰(例如,缺失、添加和/或取代)。产生具有所需异二聚体形成的Fc修饰的方法是本领域已知的。

[0478] 在一些实施方案中,Fc域可经修饰以增加本文中所公开的多特异性抗原结合构建体的血清半衰期。包含例如与中性pH相比增强或减少在酸性pH下与Fc受体的抗体结合的一或多个突变的Fc域是本领域已知的。例如,本文中所公开的构建体可包含Fc域的C_H2或C_H3区

中的突变,其中所述突变增加Fc域与FcRn在酸性环境中(例如,在pH范围是约5.5至约6.0的核内体中)的亲和力。当向动物施用,此类突变可导致构建体的血清半衰期的增加。针对所需特征(诸如增加的血清半衰期)修饰Fc域的方法是本领域已知的。

[0479] 在一些实施方案中,本文中所述的构建体包含经改变的重链恒定区,其相对于其对应未经改变的恒定区具有减少的(或无)效应功能。涉及本文中所述构建体的恒定区的效应功能可通过改变恒定区或Fc区的性质来调节。经改变的效应功能包括例如下列活性中的一或多者的调节:抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)、细胞凋亡、结合至一或多个Fc-受体及促炎反应。调节指通过含有经改变的恒定区的个体抗体展示的效应功能活性与恒定区的未经改变形式的活性相比的增加、减少或消除。在特定实施方案中,调节包括活性废除或完全不存在的状况。

[0480] 具有经改变的FcR结合亲和力和/或ADCC活性和/或经改变的CDC活性的经改变的恒定区是与恒定区的未经改变形式相比具有增强或减少的FcR结合活性和/或ADCC活性和/或CDC活性的多肽。显示与FcR的结合增加的经改变的恒定区结合至少一个FcR,较未经改变的多肽具有更大亲和力。显示与FcR的结合减少的经改变的恒定区结合至少一个FcR,较恒定区的未经改变形式具有更低亲和力。与天然序列免疫球蛋白恒定区或Fc区和FcR的结合水平相比,显示与FcR的结合减少的此类变体可具有与FcR很少或无可观结合,例如,与FcR结合的0至50%(例如,小于50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1%)。类似地,显示经调节的ADCC和/或CDC活性的经改变的恒定区可展示与未经改变的恒定区相比增加或减少的ADCC和/或CDC活性。例如,在一些实施方案中,包含经改变的恒定区的本文中所述抗体中的任一者或多者可展示恒定区的未经改变形式的ADCC和/或CDC活性的约0至50%(例如,小于50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1%)。包含显示降低的ADCC和/或CDC的经改变的恒定区的本文中所述的多特异性抗原结合构建体可展示降低的或无ADCC和/或CDC活性。

[0481] 在一些实施方案中,本文中所述的多特异性抗原结合构建体展示减少的或无效应功能。在一些实施方案中,所述多特异性抗原结合构建体包含杂合恒定区或其部分,诸如G2/G4杂合恒定区(参见,例如,Burton等人(1992) *Adv Immun* 51:1-18;Canfield等人(1991) *JExp Med* 173:1483-1491;及Mueller等人(1997) *Mol Immunol* 34(6):441-452)。

[0482] 在一些实施方案中,本文中所述的多特异性抗原结合构建体可含有展示增强或降低的补体依赖性细胞毒性(CDC)的经改变的恒定区。经调节的CDC活性可通过在抗体的Fc区中引入一或多个氨基酸取代、插入或缺失来达成。参见,例如,美国专利案第6,194,551号。

[0483] 本文中所述的构建体及抗原结合臂可部分包含支架域、蛋白质或部分,例如,不提供靶受体结合活性,但是可提供构建体的部分或域的分子,所述构建体的部分或域提供空间组织、结构支持、连接多个受体结合单元的工具或其他所需特性(例如,提高的半衰期)。各种支架技术及组合物是本领域已知的且可容易连接或结合至本文中所述的抗原结合单元。支架域、蛋白质或部分可源自抗体或不源自抗体。此类支架蛋白及其域一般通过先前存在的抗原结合蛋白的基于组合化学的改造而获得。

[0484] 可认为非抗体蛋白支架分成两种结构类别,域大小构建体(在6至20kDa的范围内)

及限制肽(在2至4kDa范围内)。域大小非抗体支架包括但不限于亲合体、affilin、抗运载蛋白(anticalin)、atrimmer、DARPin、FN3支架(诸如黏附素(adnectin)及centyrin)、fynomer、Kunitz域、pronectin及OBody。肽大小非抗体支架包括例如艾菲尔亲和聚体(avimer)、双环肽及半胱氨酸结。这些非抗体支架及基于其或衍生其的基础蛋白或肽由例如Simeon及Chen, *Protein Cell* 9(1):3-14(2018); Vazquez-Lombardi等人, *Drug Discovery Today* 20:1271-1283(2015), 及通过Binz等人, *Nature Biotechnol.* 23:1257-1268(2005) (其各者的内容的全文以引用的方式并入本文中) 评论。使用非抗体支架的优点包括增加的亲和力、靶中和及稳定性。各种非抗体支架亦可克服抗体支架的一些限制, 例如, 组织渗透、更小尺寸及热稳定性。当需要双特异性构建体时, 一些非抗体支架亦可允许更容易构建, 不被例如轻链相关问题阻止。在非抗体支架上构建构建体的方法是本领域技术人员已知的。虽然不正式在抗体支架上, 此类构建体经常包含抗体结合域, 而无论是否呈单域抗体、scFv或提供特异性靶结合能力的其他抗体结合域变体的形式。

[0485] 因此, 在本文所述方面中的任一者的一些实施方案中, 构建体可包含非抗体支架蛋白。在本文所述方面中的任一者的一些实施方案中, 受体结合单元中的至少一者可包含非抗体支架蛋白。本领域技术人员应了解, 在一些实施方案中, 非抗体支架蛋白的支架部分可包含例如源自人类第十纤连蛋白III型域(10Fn3)的黏附素支架或部分; 源自人类脂质运载蛋白的抗运载蛋白支架(例如, 诸如述于例如WO2015/104406中的那些); 源自低密度相关蛋白(LRP)和/或极低密度脂蛋白受体(VLDLR)的A域的艾菲尔亲和聚体支架或蛋白质片段; FYN酪氨酸激酶的SH3域的fynomer支架或部分; Kunitz型蛋白酶抑制剂(诸如人类胰蛋白酶抑制剂、抑肽酶(牛胰腺胰蛋白酶抑制剂)、阿兹海默氏(Alzheimer's)淀粉样前体蛋白及组织因子路径抑制剂的kunitz域支架或部分; 打结素支架(半胱氨酸结微蛋白), 诸如基于来自喷瓜(*E. elaterium*)的胰蛋白酶抑制剂的打结素支架; 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)蛋白A的Z域的亲合体支架或所有或部分; β -发夹模拟支架; 经设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)支架或基于锚蛋白重复(AR)蛋白的人工蛋白支架; 或源自或基于人类转铁蛋白、人类CTLA-4、人类晶体蛋白及人类泛素的任何支架。例如, 可使人类转铁蛋白针对人类转铁蛋白受体的结合位点多样化, 以创建转铁蛋白变体的不同库, 所述变体中的一些已获得对不同抗原的亲和力。参见, 例如, Ali等人(1999) *J. Biol. Chem.* 274:24066-24073。未参与结合受体的人类转铁蛋白的部分保持不带电并用作支架, 类似抗体的框架区, 以呈现不同的结合位点。然后筛选库, 因为根据本文中所述的方法, 抗体库是针对所关注的靶抗原的, 以识别具有对靶抗原的最佳选择性及亲和力的那些变体。参见, 例如, Hey等人(2005) *TRENDS Biotechnol.* 23(10):514-522。

[0486] D. 用于产生多特异性抗原结合构建体的方法

[0487] 本公开亦特征为用于产生本文中所述的多特异性抗原结合构建体中的任一者的方法。在一些实施方案中, 用于产生本公开的构建体的方法包括用于制备如本文中所述的抗体和/或其片段的方法。此类方法是本领域熟知的且可包括例如将个体(例如, 非人类哺乳动物)用适宜免疫原免疫。例如, 为产生结合至PD-1的抗体, 本领域技术人员可将适宜个体(例如, 非人类哺乳动物, 诸如大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、狗、猫、猪、山羊、马或非人类灵长类动物)用全长PD-1多肽, 诸如包含SEQ ID NO.: 114 (GenBank登录号NP_005009.2; UniProt Q15116)中所述的氨基酸序列的全长人类PD-1多肽、其抗原片段和/或其变体免疫。类似地,

为产生结合至PD-1配体(例如,PD-L1)的抗体,本领域技术人员可将适宜个体用全长PD-L1多肽,诸如包含SEQ ID NO.:115(GenBank登录号NP_054862.1,UniProt Q9NZQ7)中所述的氨基酸序列的全长人类PD-L1多肽、其抗原片段和/或其变体免疫。类似地,为产生结合至PD-L2的抗体,本领域技术人员可将适宜个体用全长PD-L2多肽,诸如包含SEQ ID NO.:116(GenBank登录号NP_079515.2,UniProt Q9BQ51)中所述的氨基酸序列的全长人类PD-L2多肽、其抗原片段和/或其变体免疫。

[0488] 本领域技术人员知晓,全长多肽(PD-1、PD-L1或PD-L2)可用作抗原并且可针对所需结合性质(例如,阻断PD-1/配体相互作用;桥接其上表达PD-1及其配体的细胞的能力)筛选抗体。本领域技术人员亦知晓,可基于多肽的已知结构特征选择多肽(PD-1、PD-L1或PD-L2)的抗原片段。例如,已结构上明确表征了PD-1/PD-L1及PD-1/PD-L2相互作用(参见,例如,Zak,K.等人(2015)Structure 23(12):2341-48;Ghiotto,M.等人(2010)Int'l Immuno.22(8):651-60;Freeman,G.(2008)PNAS 105(30):10275-76;Lazar-Molnar,E.等人(2008)PNAS105:10483-88,其全文以引用的方式并入)。因此,例如基于本领域可得的受体/配体接界信息的PD-1、PD-L1和/或PD-L2内区域可用于设计具有所需结合性质的适宜抗原片段。例如,PD-1胞外域含有典型CD28家族的单一IgV域,其中PD-L1及PD-L2由典型B7家族的IgV及IgC域组成。PD-1、PD-L1和/或PD-L2的结构显示1:1化学计量,相互作用主要在IgV域的面之间。IgV域包含约120个氨基酸,所述氨基酸经组织成9个平行 β 链(ABCC' C" DEFG),所述链用环连接。已显示PD-1使用前 β 面(GFCC' 链及CC'、CC"及FG环)结合至PD-L1的 β 面(GFCC')或PD-L2的 β 面(AGFC链及FG环)。此外,PD-1的C、F及G链的六个氨基酸形成凹的疏水核,该核与F和G链以及PD-L2的FG环相互作用。涉及结合至PD-1的14个残基中的八者在PD-L1与PD-L2之间是相同或高度保留的。使用此信息,本领域技术人员可确定产生具有所需性质的抗体的适宜抗原区。例如,本领域技术人员可产生与配体PD-L1及PD-L2二者交叉反应的抗体(参见,例如,美国专利9845356)。

[0489] 可将适宜个体(例如,非人类哺乳动物)用适宜抗原免疫并随后加强免疫许多次,足以引起哺乳动物产生抗体。可向个体(例如,非人类哺乳动物)施用免疫原与佐剂。可用于在个体中产生抗体的佐剂包括但不限于蛋白质佐剂;细菌佐剂,例如,全菌(BCG、短小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)或明尼苏达沙门氏菌(*Salmonella minnesota*))及的细菌组分,包含细胞壁骨架、海藻糖二霉菌酸酯、单磷酸基脂质A、结核菌(*tubercle bacillus*)的甲醇可提取残余物(MER)、完全或不完全弗氏(Freund's)佐剂;病毒佐剂;化学佐剂,例如,氢氧化铝及碘乙酸及半琥珀酸胆固醇酯。可用于诱导免疫反应的方法中的其他佐剂包括例如霍乱毒素及副痘病毒蛋白质。亦参见Bieg等人(1999)Autoimmunity 31(1):15-24。亦参见例如Lodmell等人(2000)Vaccine 18:1059-1066;Johnson等人(1999)J Med Chem 42:4640-4649;Baldridge等人(1999)Methods 19:103-107;及Gupta等人(1995)Vaccine 13(14):1263-1276。

[0490] 在一些实施方案中,所述方法包括制备分泌结合至免疫原的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。例如,将适宜哺乳动物(诸如实验室小鼠)用如上所述的多肽(例如,PD-1、PD-L1、PD-L2)或抗原片段免疫。可在免疫原的至少一个加强免疫后2至4天将经免疫哺乳动物的抗体产生细胞(例如,脾的B细胞)分离并然后于培养物中短暂生长,之后与适宜骨髓瘤细胞系的细胞融合。可在融合促进剂(诸如例如,牛痘病毒或聚乙二醇)的存在下将细胞融合。将融

合中获得的杂交细胞克隆,并选择分泌所需抗体的细胞克隆。例如,可将利用适宜免疫原免疫的Balb/c小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞系PAI或骨髓瘤细胞系Sp2/0-Ag 14的细胞融合。在融合后,将细胞在补充有选择介质(例如HAT介质)的适宜培养基中以规则间隔扩增,以防止正常骨髓瘤细胞长得超过所需杂交瘤细胞。然后筛选获得的杂交瘤细胞用于分泌所需抗体(例如,结合至PD-1的抗体)。

[0491] 在一些实施方案中,本领域技术人员可自非免疫偏向库识别抗PD-1抗体,如于例如美国专利案第6,300,064号(颁与Knappik等人;MorphosysAG)及Schoonbroodt等人(2005)NucleicAcidsRes 33(9):e81中所述。

[0492] 在一些实施方案中,本文中所述的方法可包括或联合使用例如噬菌体展示技术、细菌展示、酵母表面展示、真核病毒展示、哺乳动物细胞展示及无细胞(例如,核糖体展示)抗体筛选技术(参见,例如,Etz等人(2001)JBacteriol183:6924-6935;Cornelis(2000)Curr Opin Biotechnol 11:450-454;Klemm等人(2000)Microbiology 146:3025-3032;Kieke等人(1997)Protein Eng 10:1303-1310;Yeung等人(2002)Biotechnol Prog 18:212-220;Boder等人(2000)Methods Enzymology 328:430-444;Grabherr等人(2001)Comb Chem High Throughput Screen 4:185-192;Michael等人(1995)Gene Ther 2:660-668;Pereboev等人(2001)J Virol 75:7107-7113;Schaffitzel等人(1999)J Immunol Methods 231:119-135;及Hanes等人(2000)NatBiotechnol 18:1287-1292)。

[0493] 使用各种噬菌体展示方法识别抗体的方法是本领域已知的。在噬菌体展示方法中,功能抗体域是在携带编码其的多核苷酸序列的噬菌体粒子的表面上展示。可利用此噬菌体展示抗体的抗原结合域,诸如从库或组合抗体库(例如,人类或鼠科)表达的Fab、Fv或经二硫键稳定的Fv抗体片段。这些方法中使用的噬菌体通常为丝状噬菌体,诸如fd及M13。抗原结合域被表达为与噬菌体外壳蛋白pIII、pVIII或pIX中的任一者重组融合的蛋白。参见,例如,Shi等人(2010)JMB 397:385-396。可用于制备本文中所述的免疫球蛋白或其片段的噬菌体展示方法的实例包括公开于以下的那些:Brinkman等人(1995)JImmunol Methods 182:41-50;Ames等人(1995)J Immunol Methods 184:177-186;Kettleborough等人(1994)Eur J Immunol 24:952-958;Persic等人(1997)Gene187:9-18;Burton等人(1994)Advances in Immunology 57:191-280;及PCT公开案编号W0 90/02809、W0 91/10737、W0 92/01047、W0 92/18619、W0 93/11236、W0 95/15982及W0 95/20401。适宜方法亦述于例如美国专利案第5,698,426号、第5,223,409号、第5,403,484号、第5,580,717号、第5,427,908号、第5,750,753号、第5,821,047号、第5,571,698号、第5,427,908号、第5,516,637号、第5,780,225号、第5,658,727号、第5,733,743及第5,969,108号中。

[0494] 在一些实施方案中,可使用自经免疫哺乳动物的B细胞收集的mRNA,产生噬菌体展示抗体库。例如,可从如上所述的用PD-1多肽免疫的小鼠分离包含B细胞的脾细胞样品。可从所述细胞分离mRNA并使用标准分子生物技术转化成cDNA。参见,例如,Sambrook等人(1989)“Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版”,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Harlow及Lane(1988),见上;Benny K.C.Lo(2004),见上;及Borrebaek(1995),见上。编码免疫球蛋白的重链及轻链多肽的可变区的cDNA用于构建噬菌体展示库。产生此库的方法述于例如Merz等人(1995)J Neurosci Methods 62(1-2):213-9;Di Niro等人(2005)Biochem J 388(Pt 3):889-894;及Engberg

等人(1995)Methods Mol Biol 51:355-376中。

[0495] 在一些实施方案中,可采用选择和筛选的组合来识别来自例如源自杂交瘤的抗体群体或噬菌体展示抗体库的所关注抗体。适宜方法是本领域已知的且述于例如Hoogenboom (1997) Trends in Biotechnology 15:62-70; Brinkman等人(1995), 见上; Ames等人(1995), 见上; Kettleborough等人(1994), 见上; Persic等人(1997), 见上; 及Burton等人(1994), 见上。例如, 使用标准分子生物技术产生均编码噬菌体外壳蛋白(例如, M13噬菌体的pIII、pVIII或pIX)的融合蛋白的复数个噬菌粒载体及不同抗原组合区, 然后引入细菌(例如, 大肠杆菌(E.coli))群体。在一些实施方案中, 噬菌体在细菌中的表达可能需要使用辅助噬菌体。在一些实施方案中, 不需要辅助噬菌体(参见, 例如, Chasteen等人, (2006) Nucleic Acids Res 34(21):e145)。回收自细菌产生的噬菌体, 然后与例如结合至固体支持物(经固定)的靶抗原接触。亦可使噬菌体与抗原在溶液中接触, 随后使复合物结合至固体支持物。

[0496] 可使用本领域已知的任何基于免疫学或生物化学的方法表征使用上述方法筛选的抗体的亚群对特定抗原(例如, 人类PD-1)的特异性和结合亲和力。例如, 可例如使用基于免疫学或生物化学的方法(诸如但不限于如上所述的ELISA检定、SPR检定、免疫沉淀检定、亲和力层析法和平衡透析)测定抗体与PD-1的特异性结合。可用于分析抗体的免疫特异性结合及交叉反应性的免疫检定包括但不限于使用诸如以下的技术的竞争性及非竞争性检定系统: Western blot、RIA、ELISA(酶联免疫吸附检定)、“夹心”免疫检定、免疫沉淀检定、免疫扩散检定、凝集检定、补体固定检定、免疫放射测量检定、荧光免疫检定和蛋白A免疫检定。此类检定是常规的并且本领域熟知。

[0497] 应了解, 上述方法亦可用于测定例如抗PD-1抗体是否不结合至全长人类PD-1和/或PD-1蛋白。

[0498] 在选定的CDR氨基酸序列为短序列(例如, 长度少于10至15个氨基酸)的实施方案中, 可如以下所述化学合成编码所述CDR的核酸: 例如Shiraishi等人(2007) Nucleic Acids Symposium Series 51(1):129-130及美国专利案第6,995,259号。针对编码受体抗体的给定核酸序列, 可使用标准分子生物技术将编码CDR的核酸序列的区域用化学合成的核酸取代。化学合成的核酸的5'及3'端可以是合成的, 以包含用于将所述核酸克隆至编码供体抗体的可变区的核酸中的黏性端限制酶位点。或者, 可使用本领域已知的DNA组装技术(例如, Gibson组装), 将一起能编码抗体的化学合成的核酸的片段接合在一起。

[0499] 选择的任何抗体可进一步进行修饰以产生如本文中所述的抗原结合片段, 和/或使用本领域已知的技术进行操作以产生如文本中所述的多特异性抗原结合构建体。例如, 可使用交联方法以使用具有胺反应性基团及巯基反应性基团的异双功能试剂产生双特异性结构, 如在例如美国专利案第4,433,059号中所述; 可通过两条重链之间的二硫键的还原及氧化循环而重组来自不同抗体的半抗体(重链-轻链对或Fab), 来产生双特异性抗体决定位, 如在例如美国专利案第4,444,878号中所述; 三功能抗体, 例如, 可通过巯基反应性基团交联三个Fab'片段, 如在例如美国专利案第5,273,743号中所述。本文中描述产生双特异性构建体的其他方法, 例如, 产生具有共同轻链的双特异性构建体的方法。本文中所述构建体中所用的共同轻链的氨基酸序列的非限制性实例包括SEQ ID NO:59-63。

[0500] E. 多特异性抗原结合构建体的表达及纯化

[0501] 可使用分子生物学及蛋白质化学领域中已知的各种技术产生本文中所述的其多特异性抗原结合构建体。例如,可将编码多特异性抗原结合构建体(作为单一多功能多肽或作为多聚复合物的单独分子-例如,一个抗原结合臂独立于另一抗原结合臂)的核酸插入到含有转录及转译调节序列的表达载体中,所述调节序列包括例如启动子序列、核糖体结合位点、转录开始及终止序列、翻译开始及终止序列、转录终止信号、多腺苷酸化信号、及增强子或活化子序列。所述调节序列包含启动子及转录开始和终止序列。此外,表达载体可包含超过一个复制系统使得其可维持在两种不同生物体中,例如在用于表达的哺乳动物或昆虫细胞中以及在用于克隆和扩增的原核宿主。

[0502] 若干可能载体系统可用于在哺乳动物细胞中根据核酸表达经克隆的重链及轻链多肽。一类载体依赖于所需基因序列整合至宿主细胞基因组。已稳定整合DNA的细胞可通过同时引入耐药基因,诸如大肠杆菌gpt (Mulligan及Berg (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2072) 或Tn5 neo (Southern及Berg (1982) *Mol Appl Genet* 1:327) 来选择。可将可选择的标记基因连接至待表达的DNA基因序列,或通过共转染引入相同细胞中 (Wigler et al. (1979) *Cell* 16:77)。第二类载体利用对染色体外质粒赋予自主复制能力的DNA元件。这些载体可源自动物病毒,诸如牛乳头瘤病毒 (Sarver等人 (1982) *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 7147)、巨细胞病毒、多瘤病毒 (Deans等人 (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1292) 或SV40病毒 (Lusky及Botchan (1981) *Nature* 293:79)。

[0503] 可以适合核酸随后表达的方式将表达载体引入细胞。引入方法主要由以下讨论的靶向细胞类型指示。示例性方法包括CaPO₄沉淀、脂质体融合、阳离子脂质体、电穿孔、病毒转染、葡聚糖介导的转染、聚凝胺 (polybrene) 介导的转染、原生质体融合以及直接显微注射。

[0504] 用于抗体或其抗原结合片段的表达的适宜宿主细胞包括酵母、细菌、昆虫、植物及哺乳动物细胞。特别关注的是细菌 (诸如大肠杆菌)、真菌 (诸如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 及毕赤酵母 (*Pichia pastoris*))、昆虫细胞 (诸如SF9)、哺乳动物细胞系 (例如,人类细胞系) 以及原代细胞系。

[0505] 在一些实施方案中,抗体或其片段可在转基因动物 (例如,转基因哺乳动物) 中表达和纯化。例如,抗体可在转基因非人类哺乳动物 (例如,啮齿动物) 中产生并从乳分离,如在例如Houdebine (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13(6):625-629; van Kuik-Romeijn等人 (2000) *Transgenic Res* 9(2):155-159; 及Pollock等人 (1999) *J Immunol Methods* 231(1-2): 147-157中所述。

[0506] 可通过在培养条件和时间足以允许蛋白质表达的情况下,培养用含有编码抗体或其片段的核酸的表达载体转化的宿主细胞,从细胞产生所述抗体及其片段。用于蛋白质表达的此类条件将随着表达载体及宿主细胞的选择变化,并且本领域技术人员通过常规实验可容易确定。例如,在大肠杆菌中表达的抗体可自内含体再折叠 (参见,例如,Hou等人 (1998) *Cytokine* 10:319-30)。细菌表达系统及其使用方法是本领域熟知的 (参见 *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley&Sons, 及 *Molecular Cloning--A Laboratory Manual*-第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001))。密码子、适宜表达载体及适宜宿主细胞的选择将根据许多因素变化,且可根据需要容易地进行优化。本文中所述的抗体 (或其片段) 可在哺乳动物细胞中或在其他表达系统中表达,所述表达系统

包括但不限于酵母、杆状病毒及或体外表达系统(参见,例如,Kaszubska等人(2000) *Protein Expression and Purification* 18:213-220)。

[0507] 在表达后,可分离抗体及其片段。抗体或其片段可由本领域技术人员已知的各种方法,根据样品中存在的其他组分进行分离或纯化。标准纯化方法包括电泳、分子技术、免疫学技术及层析法技术(包括离子交换、疏水、亲和及反相HPLC层析法)。例如,可使用标准抗抗体柱(例如,蛋白-A或蛋白-G柱)纯化抗体。超滤及渗滤技术与蛋白质浓度结合亦可使用。参见,例如,Scopes (1994) “*Protein Purification*, 第3版”, Springer-Verlag, New York City, New York。必要纯化程度将取决于所需用途变化。在一些实例中,不纯化表达的抗体或其片段将是必须的。

[0508] 测定经纯化的抗体或其片段的产率或纯度的方法是本领域已知的,且包括例如Bradford检定、UV光谱法、缩二脲蛋白质检定、Lowry蛋白质检定、氨基黑蛋白质检定、高压液相层析法(HPLC)、质谱法(MS)及凝胶电泳法(例如,使用蛋白质染色,诸如考马斯蓝或胶体银染色)。

[0509] F. 多特异性抗原结合构建体的修饰

[0510] 可将多特异性抗原结合构建体按照其表达及纯化修饰为单个多功能多肽,或为多聚复合物的单独分子,例如,一个抗原结合臂与另一抗原结合臂分开。所述修饰可为共价或非共价修饰。通过例如使多肽的靶向氨基酸残基与能与所选侧链或末端残基反应的有机衍生剂反应,可将此类修饰引入到抗体或抗原结合片段中。可使用各种标准中的任一者选择用于修饰的适宜位点,所述标准包括例如抗体或片段的结构分析或氨基酸序列分析。

[0511] 本文中所提供的氨基酸序列以单字母氨基酸编码显示,所述单字母氨基酸编码可与三字母氨基酸编码交换使用。氨基酸指可并入肽、多肽或蛋白质的任何单体单元。20种天然或经遗传编码的 α -氨基酸如下:丙氨酸(Ala或A)、精氨酸(Arg或R)、天冬酰胺(Asn或N)、天冬氨酸(Asp或D)、半胱氨酸(Cys或C)、谷氨酰胺(Gln或Q)、谷氨酸(Glu或E)、甘氨酸(Gly或G)、组氨酸(His或H)、异亮氨酸(Ile或I)、亮氨酸(Leu或L)、赖氨酸(Lys或K)、蛋氨酸(Met或M)、苯丙氨酸(Phe或F)、脯氨酸(Pro或P)、丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、色氨酸(Trp或W)、酪氨酸(Tyr或Y)及缬氨酸(Val或V)。这20种天然氨基酸的结构示于例如Stryer等人, *Biochemistry*, 第5版, Freeman and Company (2002) 中。术语氨基酸亦包括非天然氨基酸、经修饰的氨基酸(例如,具有经修饰的侧链和/或骨架)及氨基酸类似物。

[0512] 在两种或更多种核酸或多肽序列的情况下,术语相同或同一性百分比指当针对最大对应度在比较窗或指定区上进行比较和比对时,相同的或具有特定百分比(例如,在特定区域90%或95%或更大同一性)的相同核苷酸或氨基酸残基的两种或更多种序列或子序列,如使用下列序列比较算法中的一者或通过手工比对及视觉检查所测量。

[0513] 序列的同一性或相似性定义为,在比对序列并引入空隙(若必要)以达成最大序列同一性百分数后,候选序列中与起始氨基酸残基相同的氨基酸残基(即,相同残基)的百分比。用于比较的序列比对方法是本领域熟知的。用于比较的序列的最佳比对可例如通过以下实施:Smith及Waterman的局部同源性算法(*Adv. Appl. Math.* 2:482, 1970), 通过Needleman及Wunsch的同源性比对算法(*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), 通过Pearson及Lipman的相似性搜索方法(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988), 通过这些算法的计算机实施(例如, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group,

575Science Dr.,Madison,Wis.中的GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA)或通过手工比对及视觉检查(参见,例如,Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology(1995增刊))。

[0514] 应了解,如同所有肽、多肽及蛋白质(包括其片段),本文中所述的构建体、抗体或其抗原结合部分的氨基酸序列中(例如,在重链可变区和/或轻链可变区中)的另外修饰可发生而不改变抗体或其抗原结合片段的性质或功能。此类修饰包括保守性氨基酸取代,使得各所述序列任选含有一或多个保守性氨基酸取代。下列基团各含有彼此为保守性取代的氨基酸。这些基团作为示例与其他保守性取代是本领域技术人员已知的。

[0515] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0516] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0517] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0518] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0519] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V);

[0520] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);

[0521] 7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);及

[0522] 8) 半胱氨酸(C)、蛋氨酸(M)

[0523] 举例而言,当提及特定残基处的天冬氨酸时,亦涵盖该残基处的保守性取代,例如,谷氨酸。亦涵盖非保守性取代,例如,用甘氨酸取代脯氨酸。

[0524] 在一些实施方案中,构建体、抗体或其抗原结合部分可结合至异源部分。异源部分可为例如异源多肽、治疗剂(例如,毒素或药物)或可检测标记,诸如但不限于放射性标记、酶促标记、荧光标记、重金属标记、发光标记或亲和力标签(诸如生物素或链霉亲和素)。适宜的异源多肽包括例如用于纯化抗体或片段的抗原标签(例如,FLAG(DYKDDDDK)(SEQ ID NO:117)、聚组氨酸(6-His;HHHHHH(SEQ ID NO:118))、血凝素(HA;YPYDVPDYA(SEQ ID NO:119))、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或麦芽糖结合蛋白(MBP))。异源多肽亦包括可用作诊断或可检测标记物的多肽(例如,酶),例如,荧光素酶、荧光蛋白(例如,绿色荧光蛋白(GFP))或氯霉素乙酰基转移酶(CAT)。适宜的放射性标记包括例如³²P、³³P、¹⁴C、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S及³H。适宜的荧光标记包括不限于荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、绿色荧光蛋白(GFP)、DYLIGHT™488、藻红蛋白(PE)、碘化丙啶(PI)、PerCP、PE-ALEXAFLUOR®700、Cy5、别藻蓝蛋白及Cy7。发光标记包括例如各种发光镧系(例如,铕或铽)螯合物中的任一者。例如,适宜的铕螯合物包括二乙基三胺五乙酸(DTPA)或四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)的铕螯合物。酶促标记包括例如碱性磷酸酶、CAT、荧光素酶及辣根过氧化物酶。

[0525] 可使用许多已知化学交联剂中的任一者将两种蛋白质(例如,抗体及异源部分)交联。此类交联剂的实例为经由键联连接两个氨基酸残基的那些,所述键联包括“受阻”二硫键。在这些键联中,交联单元内的二硫键经保护(通过阻碍二硫键的任一侧上的基团)免于通过例如还原型谷胱甘肽或二硫还原酶的作用还原。一种适宜试剂,4-琥珀酰基氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫)甲苯(SMPT)利用蛋白质中之一者上的末端赖氨酸及另一者上的末端半胱氨酸形成两种蛋白质之间的此键联。亦可使用通过各蛋白质上的不同偶联部分交联的异双功能试剂。其他有用交联剂包括不限于连接两个氨基的试剂(例如,N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰基氧基琥珀酰亚胺)、连接两个巯基的试剂(例如,1,4-双-马来酰亚胺基丁烷)、连接氨基及巯基的试剂(例如,间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、连接氨基

及羧基的试剂(例如,4-[对叠氮基水杨酰氨基]丁胺)以及连接氨基和存在于精氨酸侧链中的胍鎓基的试剂(例如,对叠氮基苯基乙二醛单水合物)。

[0526] 在一些实施方案中,可将放射性标记直接结合至抗体的氨基酸骨架。或者,可包含放射性标记作为更大分子的部分(例如,与游离氨基酸结合以形成相关蛋白质的间碘苯基(mIP)衍生物(参见,例如,Rogers等人(1997) JNuclMed38:1221-1229)或螯合物(例如,至DOTA或DTPA))的间[¹²⁵I]碘苯基-N-羟基琥珀酰亚胺([¹²⁵I]mIPNHS)中的¹²⁵I),其继而结合至蛋白质骨架。将放射性标记或含其的更大分子/螯合物结合至本文中所述的抗体或抗原结合片段的方法是本领域已知的。此类方法包括在促进放射性标记或螯合物与蛋白质结合的条件(例如,pH、盐浓度和/或温度)下,用放射性标记培育蛋白质(参见,例如,美国专利案第6,001,329号)。

[0527] 将荧光标签(有时称作“荧光团”)结合至蛋白质(例如,抗体)的方法是蛋白质化学技术领域已知的。例如,可使用附接至荧光团的琥珀酰基(NHS)酯或四氟苯基(TFP)酯部分将荧光团结合至蛋白质的游离胺基(例如,赖氨酸的)或巯基(例如,半胱氨酸)。在一些实施方案中,可将荧光团结合至异双功能交联剂部分,诸如磺基-SMCC。适宜结合方法包括在促进荧光团与蛋白质结合的条件下用荧光团孵育抗体蛋白或其片段。参见,例如,Welch及Redvanly(2003)“Handbook of Radiopharmaceuticals:Radiochemistry and Applications”,John Wiley and Sons(ISBN 0471495603)。

[0528] 在一些实施方案中,可例如利用改良例如血液、血清或其他组织的循环中的抗体的稳定化和/或停留的部分,对抗体或片段进行修饰。例如,抗体或片段可如例如Lee等人(1999) Bioconjug Chem 10(6):973-8;Kinstler等人(2002) Advanced Drug Deliveries Reviews 54:477-485;及Roberts等人(2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54:459-476中所述进行PEG化或HES化(Fresenius Kabi,德国;参见,例如,Pavisić等人(2010) IntJPharm 387(1-2):110-119)。稳定部分可改良抗体(或片段)的稳定性或停留至少1.5(例如,至少2、5、10、15、20、25、30、40或50或更多)倍。

[0529] 在一些实施方案中,本文中所述的抗体或其抗原结合片段可被糖基化。在一些实施方案中,本文中所述的抗体或其抗原结合片段可经历酶促或化学处理,或自细胞产生,使得抗体或片段具有减少的或不存在糖基化。产生具有减少的糖基化的抗体的方法是本领域已知且述于例如美国专利案第6,933,368号;Wright等人(1991) EMBO J 10(10):2717-2723;及Co等人(1993) Mol Immunol 30:1361中。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是无糖基化的。

[0530] G. 医药组合物及调配物

[0531] 本公开亦提供了医药组合物,其包含本公开的多特异性抗原结合构建体与药学上可接受的稀释剂、载剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂,其与本文中所公开的方法一起使用。此类医药组合物可用于患有例如如本文中所公开的癌症的个体中。

[0532] 在某些实施方案中,可接受的调配物优选在所采用的剂量及浓度下对接受者无毒。在某些实施方案中,所述调配物是用于皮下和/或静脉内施用。在某些实施方案中,医药组合物可包含用于改性、维持或保存例如组合物的pH、渗透压、黏度、澄清、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸收或渗透的调配物。在某些实施方案中,适宜调配物包括但不限于氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗菌剂;抗

氧化剂(诸如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(诸如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);膨胀剂(诸如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(诸如乙二胺四乙酸(EDTA));复合剂(诸如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精);填料;单糖;二糖;及其他碳水化合物(诸如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、调味剂及稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(诸如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐反离子(诸如钠);防腐剂(诸如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己啶、山梨酸或过氧化氢);溶剂(诸如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(诸如甘露醇或山梨醇);悬浮剂;表面活性剂或润湿剂(诸如普朗尼克(pluronic)、PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯(诸如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80)、triton、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、tyloxapal);稳定性增强剂(诸如蔗糖或山梨醇);张力增强剂(诸如碱金属卤化物(优选氯化钠或氯化钾)、甘露醇、山梨醇);递送媒剂;稀释剂;赋形剂和/或医药佐剂。(Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,A.R.Gennaro编辑,Mack Publishing Company(1995))。在某些实施方案中,调配物包含PBS;20mM NaOAc,pH 5.2,50mM NaCl;和/或10mM NaOAc,pH5.2,9%蔗糖。在某些实施方案中,最佳医药组合物将由本领域技术人员根据例如意欲施用的途径、递送形式及所需剂量确定。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,见上。在某些实施方案中,此类组合物可影响多特异性抗原结合构建体的物理状态、稳定性、体内释放速率和/或体内清除率。

[0533] 在某些实施方案中,医药组合物中的主要媒剂或载剂可天然是水性或非水性的。例如,在某些实施方案中,适宜的媒剂或载剂可为注射用水、生理盐水溶液或人工脑脊髓液,其可能补充有用于胃肠外施用的组合物中常见的其他物质。在某些实施方案中,盐水包含等渗磷酸盐缓冲盐水。在某些实施方案中,中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水为另外的示例性媒剂。因此在某些实施方案中,医药组合物包含约pH 7.0至8.5的Tris缓冲液或约pH 4.0至5.5的乙酸盐缓冲液,其可进一步包含山梨醇或适宜替代物。在某些实施方案中,包含本文中所公开的多特异性抗原结合构建体的组合物可通过将具有所需纯度的所选组合物与任选调配剂(Remington's Pharmaceutical Sciences,见上)混合以冻干饼或水溶液形式制备,用于储存。此外,在某些实施方案中,可使用适宜的赋形剂(诸如蔗糖)将包含本文中所公开的多特异性抗原结合构建体的组合物调配成冻干物。

[0534] 在某些实施方案中,可选择医药组合物用于胃肠外递送。在某些实施方案中,可选择所述组合物用于吸入或用于通过消化道递送,诸如经口。此类医药上可接受的组合物的制备在本领域技术人员的能力内。

[0535] 在某些实施方案中,调配组分以施用位点可接受的浓度存在。在某些实施方案中,使用缓冲液将组合物维持在生理pH下或在稍微更低pH下,通常在约5至约8的pH范围内。

[0536] 在某些实施方案中,当考虑胃肠外施用,治疗组合物可呈无热原胃肠外可接受的水溶液的形式,其包含多特异性抗原结合构建体在医药上可接受的媒剂中。在某些实施方案中,用于胃肠外注射的媒剂为无菌蒸馏水,其中多特异性抗原结合构建体调配成无菌等渗溶液并适当保存。在某些实施方案中,制备可包括所需分子与可提供产品的可控或持续释放的药剂,诸如可注射微球、可生物侵蚀的粒子、聚合化合物(诸如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠或脂质体的调配,然后产品可经由积存注射法递送。在某些实施方案中,亦可使用透

明质酸且可具有促进循环中的持续时间的的作用。在某些实施方案中,可使用可移植药物递送装置引入所需分子。

[0537] 在某些实施方案中,可调配医药组合物用于吸入。在某些实施方案中,可将多特异性抗原结合构建体调配成干粉用于吸入。在某些实施方案中,可利用推进剂调配包含多特异性抗原结合构建体的吸入溶液用于喷雾递送。在某些实施方案中,可使溶液成雾状。肺施用进一步述于PCT申请案编号PCT/US94/001875中,其描述经化学修饰的蛋白质的肺递送。

[0538] 在某些实施方案中,期望调配物可经口施用。在某些实施方案中,以此方式施用的多特异性抗原结合构建体可利用或不利用于诸如锭剂及胶囊的固体剂型的混合中习惯使用的那些载剂调配。在某些实施方案中,胶囊可经设计,以当生物可利用率最大化且前全身降解最小化时使胶囊在胃肠道的位点释放调配物的活性部分。在某些实施方案中,可包含至少一种额外剂,以促进多特异性抗原结合构建体的吸收。在某些实施方案中,亦可采用稀释剂、调味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、悬浮剂、锭剂崩解剂及黏合剂。

[0539] 在某些实施方案中,医药组合物可包括有效量的多特异性抗原结合构建体与适用于制造锭剂的无毒赋形剂混合。在某些实施方案中,通过将锭剂溶解于无菌水或另一种适宜媒剂中,可将溶液制备成单位剂型。在某些实施方案中,适宜赋形剂包括但不限于惰性稀释剂,诸如碳酸钙、碳酸钠或碳酸氢钠、乳糖或磷酸钙;或黏合剂,诸如淀粉、明胶或阿拉伯胶;或润滑剂,诸如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。

[0540] 其他医药组合物对本领域技术人员是明显的,包含含有持续或可控递送调配物中的多特异性抗原结合构建体的调配物。在某些实施方案中,用于调配各种其他持续或可控递送工具(诸如脂质体载体、可生物侵蚀的微粒或多孔珠及积存注射)的技术亦为本领域技术人员已知的。参见,例如,PCT申请案编号PCT/US93/00829,其描述用于递送医药组合物的多孔聚合微粒的可控释放。在某些实施方案中,持续释放制剂可包含呈成型物品(例如,膜或微胶囊)的形式的半渗透聚合物基质。持续释放基质可包括聚酯、水凝胶、聚乳酸(美国专利案第3,773,919号及EP 058,481)、L-谷氨酸及 γ 乙基-L-谷氨酸酯的共聚物(Sidman等人Biopolymers, 22:547-556(1983))、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer等人, J.Biomed.Mater.Res., 15:167-277(1981)及Langer, Chem.Tech., 12:98-105(1982))、乙烯乙酸乙烯酯(Langer等人, 见上)或聚-D(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)。在某些实施方案中,持续释放组合物亦可包含脂质体,其可通过本领域已知的若干方法中的任一者制备。参见,例如,Eppstein等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82:3688-3692(1985);EP 036,676;EP 088,046及EP143,949。

[0541] 用于体内施用的医药组合物通常是无菌的。在某些实施方案中,此可通过通过无菌过滤膜过滤实现。在某些实施方案中,在组合物冻干的情况下,可在冻干及复原之前或之后进行使用此方法杀菌。在某些实施方案中,用于胃肠外施用的组合物可呈冻干形式或呈溶液储存。在某些实施方案中,一般将胃肠外组合物放入具有无菌存取埠的容器(例如,静脉内溶液袋或具有可通过皮下注射针刺穿的瓶塞的小瓶)中。

[0542] 在某些实施方案中,一旦已调配医药组合物,可将其呈溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体或呈脱水或冻干粉末储存于无菌小瓶中。在某些实施方案中,此类调配物可呈即用形式或呈在施用之前复原的形式(例如,冻干)储存。

[0543] 在某些实施方案中,提供用于产生单一剂量施用单元的试剂盒。在某些实施方案

中,试剂盒可包含具有干燥蛋白质的第一容器及具有水性调配物的第二容器。在某些实施方案中,包含含有单室及多室预填充注射器(例如,液体注射器及冻干剂注射器(lyosyringe))的试剂盒。

[0544] 在某些实施方案中,治疗上采用的包含多特异性抗原结合构建体的医药组合物的有效量将取决于例如治疗环境及目标。本领域技术人员将了解,根据某些实施方案的治疗用的适宜剂量水平因此将部分取决于递送的分子、使用多特异性抗原结合构建体的适应症、施用途及患者的尺寸(体重、体表或器官大小)和/或条件(年龄及一般健康)变化。在某些实施方案中,临床医生可滴定剂量并修改施用途以获得最佳治疗效果。

[0545] 在某些实施方案中,给药频率将考虑所用的调配物中的多特异性抗原结合构建体的药物动力学参数。在某些实施方案中,临床医生将施用组合物直至达到达成所需效果的剂量。在某些实施方案中,组合物因此可以单一剂量或以两个或更多个剂量(其可或可不含相同量的所需分子)随时间,或以连续输注经由移植装置或导管施用。适宜剂量的进一步精修由本领域技术人员常规作出,并且在其常规进行的任务的范围内。在某些实施方案中,适宜剂量可通过使用适宜剂量-响应数据确定。

[0546] 在某些实施方案中,医药组合物的施用途是符合已知方法,例如,经口,通过注射通过静脉内、腹膜内、大脑内(实质内)、脑室内、肌肉内、皮下、眼内、动脉内、门静脉内或病灶内途径;通过持续释放系统或通过移植装置。在某些实施方案中,组合物可通过大剂量注射或通过输注连续施用或通过移植装置施用。在某些实施方案中,组合疗法的各个要素可通过不同途径施用。

[0547] 在某些实施方案中,组合物可经由膜、海绵状物或另一适宜材料的移植局部施用,所需分子已经吸收或封装在该材料上。在某些实施方案中,在使用移植装置的情况下,可将装置移植入任何适宜组织或器官,并且所需分子的递送可经由扩散、定时释放大剂量或连续施用。在某些实施方案中,可期望以离体方式使用包含多特异性抗原结合构建体的医药组合物。在这些实例中,将已自患者移除的细胞、组织和/或器官暴露于包含多特异性抗原结合构建体的医药组合物中,之后将所述细胞、组织和/或器官随后移植回患者中。

[0548] 在某些实施方案中,多特异性抗原结合构建体可通过移植某些细胞递送,所述细胞已使用诸如本文中所述的那些方法遗传工程改造以表达及分泌多肽。在某些实施方案中,此类细胞可为动物或人类细胞,且可是自体同源、异源或转基因。在某些实施方案中,可将所述细胞永生。在某些实施方案中,为减少免疫反应的机会,可将所述细胞封装以避免周围组织的浸润。在某些实施方案中,封装材料通常为允许释放蛋白质产物但是防止细胞被患者免疫系统或来自周围组织的其他有害因素破坏的可生物降解的半渗透聚合外壳或膜。

[0549] H. 使用方法

[0550] 如本文中所述,本公开提供一种治疗有需要个体的增殖性病症的方法,其包括向个体施用治疗有效量的本公开的多特异性抗原结合构建体。在一些实施方案中,本公开提供一种增强有需要个体的免疫反应(例如,增强的T细胞功能,诸如自T细胞功能耗尽营救;增强的T细胞介导的反应;增加的炎性细胞因子分泌和/或产生,例如,来自T细胞的IFN γ 分泌和/或产生;增强的NK细胞功能;增强的巨噬细胞功能)的方法,其包括向个体施用治疗有效量的本公开的多特异性抗原结合构建体。如本文中所例示,与结合PD-1或其配体(例如

PD-L1或PD-L2)的药剂(例如抗体)相比,或与包含结合PD-1的药剂(例如抗体)和结合其配体的药剂(例如抗体)的混合物相比,在施用本文中所公开的多特异性抗原结合构建体后的免疫反应的增强更大。在一些实施方案中,与结合PD-1或其配体的药剂(例如抗体)相比,或与包含结合PD-1的药剂(例如抗体)和结合其配体的药剂(例如抗体)的混合物相比,免疫反应的增强(例如,增强的T细胞功能,诸如自T细胞功能耗尽营救;增强的T细胞介导的反应;增加的炎性细胞因子,来自T细胞的IFN γ 分泌和/或产生;增强的NK细胞功能;增强的巨噬细胞功能)高至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%或更多。本文中亦提供通过向个体施用有效量的如本文所述的多特异性抗原结合构建体、抗体或其抗原结合片段、医药组合物或蛋白质结合物,治疗或延迟个体的癌症进展或减少或抑制个体的肿瘤生长的方法。

[0551] 本文中所述的组合物尤其可用于治疗或预防个体的各种癌症的方法中。

[0552] 可使用各种方法向个体(例如,人类个体)施用组合物,所述方法部分取决于施用途径。所述途径可为例如静脉内注射或输注(IV)、皮下注射(SC)、腹膜内(IP)注射、肌肉内注射(IM)或鞘内注射(IT)。注射可以是大量(bolus)或连续输注。

[0553] 如本文中所用,术语“个体”意指哺乳动物个体。示例性个体包括但不限于人类、猴、狗、猫、小鼠、大鼠、牛、马、骆驼、山羊及绵羊。在一些实施方案中,个体为人类。在一些实施方案中,个体患有或疑似患有可用本文中所提供的多特异性抗原结合构建体治疗的疾病或病状。在一些实施方案中,疾病或病状为癌症。在一些实施方案中,个体为患有可用本文中所提供的多特异性抗原结合构建体治疗的癌症的人类。在一些实施方案中,个体为疑似患有可用本文中所提供的多特异性抗原结合构建体治疗的癌症的人类。

[0554] 在一些实施方案中,任何疾病或病症的“治疗(treating/treatment)”指改善存在于个体中的疾病或病症。在另一实施方案中,“治疗(treating/treatment)”包括改善至少一个物理参数,所述参数可以是个体难以识别的。在又一实施方案中,“治疗(treating/treatment)”包括在身体上(例如,可识别症状的稳定)或在生理上(例如,物理参数的稳定)或在二者上调节疾病或病症。在又一实施方案中,“治疗(treating/treatment)”包括延迟或预防疾病或病症的发作。

[0555] 如本文中所用,术语“治疗有效量”或“有效量”指当向个体施用,有效治疗疾病或病症的多特异性抗原结合构建体的量。

[0556] 如本文中所用,“施用(administer/administration)”指注射或以其他方式物理递送存在于身体外面的物质(例如,本文中所提供的多特异性抗原结合构建体)至患者的行为,诸如通过黏膜、皮内、静脉内、肌肉内递送和/或本文所述或本领域已知的物理递送的任何其他方法。当治疗疾病或其症状时,物质的施用通常于疾病或其症状发作后发生。当预防疾病或其症状时,物质的施用通常在疾病或其症状发作之前发生。

[0557] 施用可通过例如局部输注、注射或借助移植物达成。移植物可为多孔、无孔或凝胶状材料,包括膜,诸如硅橡胶膜或纤维。移植物可经构造用于将组合物持续或周期性释放至个体。参见,例如,美国专利申请公开案第20080241223号;美国专利案第5,501,856号、第4,863,457号及第3,710,795号;EP488401;及EP 430539,其各者的公开内容的全文以引用的方式并入本文中。可经由基于例如扩散、可侵蚀或对流系统(例如,渗透泵、可生物降解移植物、电扩散系统、电渗透系统、蒸汽压力泵、电解泵、泡腾泵、压电泵、基于侵蚀的系统或电机

系统)的可移植装置将组合物递送至个体。

[0558] 在一些实施方案中,本公开的多特异性抗原结合构建体是经由局部施用在治疗上递送至个体。

[0559] 如本文中所用,术语“增强的T细胞功能”或“T细胞的活化”指这样一个细胞过程,在该过程中其表面上表达抗原特异性T细胞受体的成熟T细胞识别其同源抗原并通过进入细胞循环、分泌细胞因子或裂解酶及启动或变得有能力进行基于细胞的效应功能来响应。T细胞活化需要至少两个信号,以被完全活化。第一个在通过抗原主要组织相容性复合体(MHC)接合T细胞抗原特异性受体(TCR)后发生,第二个通过随后接合共刺激分子(例如CD28)发生。这些信号被传送至核并导致T细胞的克隆扩增,细胞表面上的活化标记物的上调,分化成效应细胞,诱导细胞毒性或细胞因子分泌,诱导细胞凋亡,或其组合。在一些实施方案中,“增强的T细胞功能”亦涵盖增强的T细胞的生存率和/或增强的T细胞的增殖。测量此类活性的方法是常规的并且本领域中已知。在一些实施方案中,“增强的T细胞功能”亦涵盖T细胞自耗尽的表型的营救,使得达成一或多个T细胞功能的恢复或增加。如本领域中所知,T细胞耗尽的状态通过T细胞效应功能的连续丧失,诸如除了共抑制受体的大量持续上调外的炎性细胞因子产生、增殖能力、代谢适应性、及独特转录和表观遗传特征表征。可使用本领域中已知及本文中所述的技术(例如,体外非特异性T细胞+K562-PD-L1肿瘤靶细胞检定)测量T细胞耗尽及其改变。

[0560] 如本文中所用,术语T细胞介导的反应指T细胞,包括但不限于效应T细胞(例如CD8⁺细胞、效应 γ δ T细胞)及辅助T细胞(例如CD4⁺细胞,包括其子集,诸如T_H1、T_H2、T_H3、T_H17、T_H9及T_{FR}细胞)介导的任何反应。T细胞介导的反应包括例如T细胞细胞毒性、T细胞细胞因子分泌及增殖。本文中所述的抗体或其片段的适宜剂量(该剂量能治疗或预防个体的癌症)可取决于各种因素,包括例如待治疗的个体的年龄、性别及体重以及所用的特定抑制剂化合物。例如,治疗患有癌症的个体所需要的整个多特异性抗原结合构建体的剂量与治疗相同个体所需的多特异性抗原结合构建体的片段(例如Fab'抗体)的剂量不同。影响向个体施用的剂量的其他因素包括例如癌症的类型或严重程度。例如,患有转移性黑色素瘤的个体与患有胶质母细胞瘤的个体相比可能需要施用多特异性抗原结合构建体的不同剂量。其他因素可包括,例如同时发生的或先前影响个体的其他医学病症、个体的一般健康、个体的遗传倾向、饮食、施用时间、排泄率、药物组合及向个体施用的任何其他额外疗法。亦应了解,任何特定个体的特定剂量及治疗方案亦将取决于治疗医师(例如医生或护士)的判断。本文中描述了适宜剂量。在一些实施方案中,本文中所述的多特异性抗原结合构建体在高及低剂量二者下均有效。

[0561] 医药组合物可包含治疗有效量的本文中所述的多特异性抗原结合构建体。此类有效量可由本领域技术人员部分基于所施用抗体的效应或抗体和一或多种其他活性剂的组合效应(若使用超过一种药剂)容易地确定。本文中所述的抗体或其片段的治疗有效量亦可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别及体重,及抗体(和一或多种其他活性剂)在个体中引起所需反应(例如,肿瘤生长的减少)的能力的因素而变化。例如,多特异性抗原结合构建体的治疗有效量可抑制(减轻特定病症的严重程度或消除特定病症的发生)和/或预防特定病症和/或本领域中已知或本文中所述的特定病症的症状中的任一者。治疗有效量亦为其中组合物的任何毒性或有害效应被治疗上的有益效果超过的量。

[0562] 可进一步在例如I期剂量递增研究中评价本文中所述的多特异性抗原结合构建体中的任一者的适宜人类剂量。参见,例如,van Gurp等人(2008) *Am J Transplantation* 8 (8):1711-1718; Hanouska等人(2007) *Clin Cancer Res* 13 (2,part1):523-531; 及 Hetherington等人(2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (10):3499-3500。

[0563] 此类组合物的毒性及治疗功效可通过已知医药程序在细胞培养物或实验动物(例如本文中所述的癌症中的任一者的动物模型)中测定。这些程序可用于例如测定 LD_{50} (对群体50%致死的剂量)及 ED_{50} (在群体50%中治疗有效的剂量)。毒性与治疗效果之间的剂量比率为治疗指数,可将其表示为比率 LD_{50}/ED_{50} 。优先显示高治疗指数的抗体或其抗原结合片段。虽然可使用展示毒性副作用的组合物,但是应小心设计递送系统以将此类化合物靶向受影响组织的位点并使对正常细胞的潜在损害最小化从而减少副作用。

[0564] 获自细胞培养检定和动物研究的数据可用于调配用于人类的剂量范围。此类抗体或其抗原结合片段的剂量一般位于包含具有很少或无毒性的 ED_{50} 在内的所述抗体或片段的循环浓度的范围内。剂量可根据所采用的剂型及所利用的施用途径在此范围内变化。针对本文中所述的多特异性抗原结合构建体,治疗有效剂量可根据细胞培养检定初步估测。可在动物模型中调配剂量以获得包含在细胞培养物中所测定的 EC_{50} (即,达成症状的半数最大抑制的构建体例如抗体的浓度)的循环血浆浓度范围。此信息可用于更精确确定人类中的可用剂量。血浆水平可例如通过高效液相层析法测量。在一些实施方案中,例如,在需要局部施用(例如,至眼或关节)的情况下,可使用细胞培养或动物建模来确定达成局部位点内的治疗有效浓度所需的剂量。

[0565] 在一些实施方案中,可结合其他癌症疗法进行所述方法。例如,可在放射、手术、靶向或细胞毒性化疗、化学放射疗法、激素疗法、免疫疗法、基因疗法、细胞移植疗法、精确药剂、基因组编辑疗法或其他医药疗法的同时、之前或之后向个体施用组合物。

[0566] 如上所述,本文中所述的多特异性抗原结合构建体是用于治疗选自以下组成的组的各种癌症:血癌、淋巴瘤、骨髓瘤、白血病、神经癌、皮肤癌、乳癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肺癌、头颈癌、胃肠癌、肝癌、胰癌、泌尿生殖器癌、骨癌、肾癌及血管癌。任选地,癌症选自以下组成的组:卡波西氏肉瘤、白血病、急性淋巴细胞性白血病(etv6、aml1、亲环蛋白b)、急性髓细胞性白血病、髓母细胞瘤、髓样细胞性单核细胞性白血病、慢性白血病、慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病、慢性淋巴细胞性白血病(亲环蛋白b)、套细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤(Ig-独特型)、真性红细胞增多淋巴瘤、霍奇金氏病(imp-1、EBNA-1)、非霍奇金氏病、骨髓瘤(MUC家族、p21ras)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链病、实体肿瘤、肉瘤、癌、纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠肉瘤、结肠癌(p21ras、HER2/neu、c-erbB-2、MUC家族)、胰癌、乳癌(MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、卵巢癌、前列腺癌(前列腺特异性抗原(PSA)及其抗原性表位PSA-1、PSA-2及PSA-3、PSMA、HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌(HER2/neu、c-erbB-2)、肝癌、肝细胞癌(α -胎蛋白)、胆管癌、绒膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、威尔姆氏瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸瘤(NY-ESO-1)、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(HER2/neu、c-erbB-2)、膀胱癌、上皮癌、神

经胶质瘤(E-钙黏着蛋白、 α -连环蛋白、 β -连环蛋白、 γ -连环蛋白、p120ctn)、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤(p53蛋白质、gp75、癌胚抗原、GM2及GD2神经节苷脂、Melan-A/MART-1、cdc27、MAGE-3、p21ras、gp100)、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、鼻咽癌(Imp-1、EBNA-1)、食道癌(esophageal carcinoma)、基底细胞癌、胆道癌(p21ras)、膀胱癌(p21ras)、骨癌、脑及中枢神经系统(CNS)癌、子宫颈癌(p53、p21ras)、绒膜癌(CEA)、结肠直肠癌(结肠直肠相关抗原(CRC)-C017-1A/GA733、APC)、结缔组织癌、消化系统癌、子宫内膜癌、食道癌(esophageal cancer)、眼癌、头颈癌、胃癌(HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、上皮细胞癌(亲环蛋白b)、上皮内肿瘤、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌(小细胞、大细胞)(CEA、MAGE-3、NY-ESO-1)、口腔癌(例如唇、舌、口及咽癌)、卵巢癌(MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、胰癌、直肠癌、呼吸系统癌、皮肤癌、甲状腺癌及泌尿系统癌。

[0567] 在一些实施方案中,本文中所述的多特异性抗原结合构建体可作为单药疗法向个体施用。或者,如上所述,抗体或其片段可作为与另一治疗(例如,针对癌症的另一治疗)的组合疗法向个体施用。例如,组合疗法可包括向个体(例如,人类患者)施用对患有癌症或有发展癌症风险的个体提供治疗效益的一或多种其他药剂。适用于与本公开的组合物共同施用的化疗剂包括例如:紫杉醇(taxol)、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羟基蒽二酮、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神霉素(mithramycin)、放线菌素(actinomycin)D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、及嘌呤霉素(puromycin)及其类似物或同系物。另外的药剂包括例如抗代谢物(例如,胺甲喋呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶、达喀尔巴嗪(decarbazine))、烷基化剂(例如,二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、噻替派(thioTEPA)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇、链脲霉素(streptozotocin)、丝裂霉素C、顺式-二氯二胺铂(II)(DDP)、普鲁卡嗪(procarbazine)、六甲蜜胺(altretamine)、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、奈达铂(nedaplatin)、沙铂(satraplatin)或四硝酸三铂)、蒽环霉素(anthracycline)(例如柔红霉素(先前称作柔红霉素(daunomycin))及多柔比星)、抗生素(例如更生霉素(先前称作放线菌素)、博来霉素(bleomycin)、光神霉素及安曲霉素(anthracycline)(AMC))及抗有丝分裂剂(例如,长春新碱及长春碱)及替莫唑胺(temozolomide)。在一些实施方案中,同时施用多特异性抗原结合构建体和一或多种其他活性剂。在其他实施方案中,第一时间施用多特异性抗原结合构建体并第二时间施用一或多种其他活性剂。在一些实施方案中,第一时间施用一或多种其他活性剂并第二时间施用多特异性抗原结合构建体。

[0568] 本文中所述的多特异性抗原结合构建体可替换或增强先前或目前施用的疗法。例如,在用多特异性抗原结合构建体治疗后,一或多种其他活性剂的施用可停止或减少,例如,在更低水平或剂量下施用。在一些实施方案中,可维持先前疗法的施用。在一些实施方

案中,将维持先前疗法直至多特异性抗原结合构建体的水平达到足以提供治疗效果的水平。可组合施用所述两种疗法。

[0569] 如本文中所定义,监测个体(例如人类患者)癌症改善意指评价个体疾病参数的变化,例如,肿瘤生长的减少。在一些实施方案中,在施用后至少一(1)小时,例如,至少2、4、6、8、12、24或48小时,或至少1天、2天、4天、10天、13天、20天或更多,或至少1周、2周、4周、10周、13周、20周或更多,进行评价。可在下列时期中的一或多个评价个体:在开始治疗前、在治疗期间、或在已施用治疗之一或多个要素后。评价可包括评价进一步治疗的需要,例如,评价是否应改变剂量、施用频率或治疗的持续时间。其亦可包括评价添加或放弃选定治疗模式(例如,添加或放弃本文中所述癌症的治疗中的任一者)的需要。

[0570] 在一些实施方案中,施用本文中所述的多特异性抗原结合构建体,以例如通过增加T细胞活化和/或增殖来调节患者的T细胞反应。阻断免疫细胞表达的PD-1与其配体之间的相互作用强烈增强了T细胞增殖、IFN γ 产生和分泌及T细胞的溶细胞活性。桥接表达PD-1的免疫细胞与表达PD-1配体(例如PD-L1或PD-L2)的第二细胞(例如另一免疫细胞或肿瘤细胞)可强烈增强T细胞增殖、IFN γ 产生和分泌及T细胞的溶细胞活性。因此,在一些实施方案中,向有需要患者施用本公开的多特异性抗原结合构建体以诱导或增加T细胞活化、增强T细胞增殖、诱导IFN γ 的产生和/或分泌、和/或诱导溶细胞性T细胞反应。

实施例

[0571] 虽然本公开已参考其特定实施方案进行了描述,但是本领域技术人员应了解,可在不背离本公开的真正精神及范围下作出各种变化并可对等效物进行取代。此外,可作出许多修改以使特定情况、材料、物质的组成、方法、方法步骤适应于本公开的目标、精神及范围。所有此类修改在在本公开的范围。

[0572] 实例1:诱导T细胞中的干扰素- γ (IFN γ)

[0573] 为评估PD1/PDL1双特异性抗体对T-细胞活化的效应,在混合淋巴细胞反应(MLR)中分析了IFN γ 的产生。测试了组合纳武单抗x阿特珠单抗、949x阿特珠单抗、J43x阿特珠单抗、帕地单抗(Pidilizumab)x阿特珠单抗、阿特珠单抗x纳武单抗或度伐单抗(Durvalumab)x纳武单抗的结合域的无糖基化双特异性抗体。抗体949指美国专利9102728中所公开的PD-1抗体。抗体J43指抗鼠科PD-1抗体。将KEYTRUDA(阻断PD-1且已知诱导IFN γ 产生的人源化抗体(Merck))用作比较。纳武单抗x阿特珠单抗、949x阿特珠单抗及阿特珠单抗x纳武单抗的示意性氨基酸序列各自示于图4至6中。使用本领域中已知的方法产生了本文中例示并测试的每个双特异性体形式。例如,如图4中所示,使用本领域中已知的方法将阿特珠单抗Fab的重链部分与纳武单抗的重链Fc部分交联。本文中描述了利用或不利用连接子序列情况下交联两种蛋白质(诸如Fab的重链及IgG分子的重链)的适宜方法。该研究证实各种浓度的上述双特异性抗体均可诱导T细胞中的IFN γ 反应。

[0574] 从源自三个独立人类供体(D985、D7603及D5004)的leukopak (HemaCare, Van Nuys, CA)分离外周血单核细胞(PBMC)。使用免疫磁性细胞分离(EASYSEP™; Stemcell Technologies, Vancouver BC),通过阴性选择自PBMC富集了总T细胞。使用免疫磁性细胞分离(EASYSEP™; Stemcell Technologies, Vancouver BC)自PBMC分离了单核细胞。分别将T细胞在 1×10^6 个细胞/ml浓度下重悬于完全RPMI中,并将单核细胞调整至 5×10^5 个细胞/ml。在96

孔板中,将100 μ l含有T细胞的培养基以 1×10^5 个细胞/孔密度接种,接着添加100 μ l单核细胞悬浮液(E:T比率2:1)。接下来,添加50 μ l含有抗体的各种稀释的培养基以达到0nM、0.5nM、5nM或50nM的最终浓度。将板在37 $^{\circ}$ C下于CO₂培育箱中孵育5天。在孵育期结束时,收集细胞上清液并通过MSD检定(Mesoscale Diagnostics, Rockville, MD)分析IFN γ 水平。

[0575] 实例2:在用派姆单抗/阿特珠单抗双特异性抗体处理的T细胞中诱导干扰素- γ (IFN γ)

[0576] 为评估PD1/PDL1双特异性抗体对T-细胞活化的效应,在混合淋巴细胞反应(MLR)中分析了IFN γ 的产生。将派姆单抗x阿特珠单抗双特异性体、派姆单抗mAb、阿特珠单抗Fab、KEYTRUDA和阿特珠单抗Fab的混合物、以及KEYTRUDA(阻断PD-1且已知诱导IFN γ 产生的人源化抗体(Merck))用作比较。派姆单抗x阿特珠单抗双特异性抗体的示意性氨基酸序列示于图3中。与针对本文中所例示并测试的其他双特异性形式相似的描述,使用本领域中已知的方法产生了图3中所示的双特异性形式。如图3中所示,使用本领域中已知的方法使阿特珠单抗Fab的重链部分与派姆单抗的重链Fc部分的c端交联。本文中描述了利用或不利用连接子序列情况下交联两种蛋白质(诸如Fab的重链及IgG分子的重链)的适宜方法。这些结果指示,派姆单抗x阿特珠单抗(靶向PD-1及PD-L1的双特异性抗体)与单独派姆单抗、阿特珠单抗Fab或KEYTRUDA单独处理相当地诱导T细胞中的IFN γ 反应。

[0577] 如上所述制备T细胞。添加体积50 μ l的含有抗体的各种稀释的培养基,以达到0nM、0.5nM、5nM或50nM的最终浓度。将板在37 $^{\circ}$ C下于CO₂培育箱中孵育5天。在孵育期结束时,收集培养物上清液并通过MSD检定(Mesoscale Diagnostics, Rockville, MD)分析IFN- γ 水平。

[0578] 实例3:比较用靶向PD-1及PD-L1的双特异性抗体或靶向PD-1/PD-L1的单克隆抗体的混合物处理的T细胞中的干扰素- γ (IFN γ) 诱导

[0579] 为评估PD-1xPD-L1或PD-L1xPD-L1双特异性抗体对T细胞活化的效应,在混合淋巴细胞反应(MLR)中分析了IFN- γ 产生。测试了派姆单抗x阿特珠单抗双特异性抗体、纳武单抗x阿特珠单抗双特异性抗体、KEYTRUDA和阿特珠单抗的混合物、纳武单抗和阿特珠单抗的混合物及使用单独KEYTRUDA(阻断PD-1且已知诱导IFN γ 产生的人源化抗体(Merck))作为比较。

[0580] 如上所述制备T细胞。添加体积50 μ l的含有抗体的各种稀释的培养基以达到0nM、0.01nM、0.001nM或0.0001nM的最终浓度。将板在37 $^{\circ}$ C下于CO₂培育箱中孵育5天。在孵育期结束时,收集培养物上清液并通过MSD检定(Mesoscale Diagnostics, Rockville, MD)分析了IFN- γ 水平。

[0581] 图1显示在所测试抗体的最终浓度下以pg/mL的IFN- γ 的浓度,如所指示。这些结果指示,双特异性PD-1xPD-L1抗体(诸如派姆单抗x阿特珠单抗)或PDL1/PDL1双特异性抗体纳武单抗/阿特珠单抗较PD1及PDL1特异性抗体的混合物或单独PD-1抗体(KEYTRUDA)诱导了更高的IFN γ 反应。

[0582] 实例4:比较用靶向PD-1/PD-L1的双特异性抗体或靶向PD-1或PD-L1的单克隆抗体处理的T细胞中的干扰素- γ (IFN γ) 诱导

[0583] 为评估PD-1xPD-L1或PD-L1xPD-L1双特异性抗体对T细胞活化的效应,在混合淋巴细胞反应(MLR)中分析了IFN γ 产生。测试了派姆单抗x纳武单抗双特异性抗体、阿特珠单抗

x阿特殊单抗四价单特异性抗体,并使用单独纳武单抗、单独阿特殊单抗及KEYTRUDA(派姆单抗)(阻断PD-1(Merck)且已知诱导IFN γ 产生的人源化抗体)作为比较。

[0584] 如上所述制备了T细胞。添加体积50 μ l的含有抗体的各种稀释的培养基以达到0nM、0.01nM、0.001nM或0.0001nM的最终浓度。将板在37 $^{\circ}$ C下于CO₂孵育箱中孵育5天。在孵育期结束时,收集培养物上清液并通过MSD检定(Mesoscale Diagnostics,Rockville,MD)分析了IFN- γ 水平。

[0585] 图2显示在PBS中在所测试抗体的最终浓度下以pg/mL计的IFN- γ 的浓度,如所指示。这些结果指示,双特异性体PD1xPDL1(派姆单抗x纳武单抗)或PD-L1xPD-L1抗体(阿特殊单抗x阿特殊单抗)诱导T细胞中与单独PD-1(阿特殊单抗或KEYTRUDA)或PD-L1(纳武单抗)特异性抗体相似的IFN- γ 反应。

[0586] 图7显示在PBS中在所测试抗体的最终浓度下以pg/mL计的IFN- γ 的浓度,如所指示。这些结果指示,与派姆单抗和阿特殊单抗的混合物或纳武单抗和阿特殊单抗的混合物相比,呈多特异性形式的双特异性抗体PD-1xPD-L1(派姆单抗x阿特殊单抗)或(纳武单抗x阿特殊单抗)在混合淋巴细胞反应(MLR)中在飞摩尔浓度下诱导更高的IFN- γ 反应。这些结果表明由多特异性形式引起的协同效应。

[0587] 图8显示用于识别证实协同作用的多特异性(例如双特异性)抗体的示例性工作流程。该方法包括无偏筛选混合淋巴细胞反应(MLR)中的检查点阻断剂组合,其测量了在以pg/mL的各种浓度下的IFN γ 释放,如本文中其他地方所述(参见,例如,在题名为非特异性T细胞+K562-PD-L1肿瘤靶细胞检定之下的小节)。在所示工作流程的第二步骤中,产生共同轻链双特异性体以进一步测试其功效,并且描述了各种示例性共同轻链双特异性体形式。所识别的共同轻链双特异性体形式在T细胞活化检定中胜过已知PD-1阻断剂。

[0588] 实例5:抗PD-1和抗PD-L1抗体构建体及多特异性抗原结合分子的产生及表征

[0589] 抗PD-L1抗体的亲和力成熟

[0590] 衍生自PD-L1抗体mAb24的亲和力成熟的抗PD-L1抗体是通过构建突变库、哺乳动物展示分选及筛选单克隆IgG而产生的。所述库含有引入了CDRH1、CDRH2及CDRH3的合成多样性的重链突变,同时保持了轻链序列恒定(除了在一些情况下),以维持与单一轻链构建体的兼容性。所述库经历了3轮哺乳动物展示分选,分选目的在于增加对人类PD-L1的亲和力并维持小鼠交叉反应性。在各轮中,在最初结合至经生物素化的抗原(即,用过量未经标记的抗原或亲本IgG孵育1小时)后采用解离率竞争(off-rate competition)步骤。在最后的分选轮后,挑选克隆,分析其序列,并通过Wasatch SPR结合动力学及细胞结合平衡检定分析独特的克隆,以识别首要候选物(lead candidate)。

[0591] 将自不同选择轮得到的抗PD-L1抗体在 k_d/k_a 双对数图上绘图。在SPRi读取器(MX96,Carterra,Salt Lake City,UT)上于PBS-Tween 0.01%的运行缓冲液中,测定表观缔合及解离动力学速率常数(k_a 及 k_d 值)。使抗人类PD-L1抗体在CFM(Carterra)上的羧甲基葡聚糖水凝胶50L芯片(XanTec bioanalytics GmbH,Dusseldorf,德国)上共价结合。使用新鲜混合的活化试剂(150 μ l 0.4M EDC及150 μ l 0.1M磺基-NHS含于5ml H₂O中)将SPR基板的表面活化7分钟。使用含于乙酸缓冲液pH 4.5中的10mg/ml的抗体印刷15分钟。然后将印刷的芯片在SPRi读取器(MX96,Carterra)上用1M乙醇胺淬灭15分钟。针对动力学分析,依序注射经纯化的重组His标记的人类PD-L1(0、2.05、5.12、12.8、32、80、200、500nM)。针对各浓

度,存在5分钟缔合,接着是10分钟解离。在SPR检验工具及Scrubber软件(Biosensor Tools LLC, Salt Lake City, UT)中处理及分析数据。将动力学数据参考空隙参考点并双参考缓冲周期,然后全局拟合至1:1结合模型,以测定其表观缔合及解离动力学速率常数(k_a 及 k_d 值)。比率 k_d/k_a 用于导出各抗原/mAb相互作用的 K_D 值,即, $K_D=k_d/k_a$ 。

[0592] 抗PD-1抗体的亲和力成熟

[0593] 衍生自PD-1抗体mAb25的亲和力成熟的抗PD-1抗体是通过构建突变库、噬菌体展示淘选及筛选单克隆抗体而产生。所述库含有引入了CDRH1、CDRH2及CDRH3的合成多样性的重链突变,同时保持了轻链序列恒定,以维持与单一轻链构建体的兼容性。所述库经历了4轮噬菌体展示淘选,目的在于增加对人类PD-1的亲和力并获得小鼠交叉反应性。在各轮中,在最初结合至经生物素化的抗原(即,用过量未经标记的抗原或亲本IgG孵育1小时)后采用解离率竞争步骤。在最后分选轮后,挑选考虑,分析其序列,并通过Octet SPR结合动力学及细胞结合平衡检定分析独特的Fab克隆,以识别首要候选物。将首要候选物自Fab转变成人类IgG并进一步表征。

[0594] 将自不同选择轮得到的抗PD-1抗体在 k_d/k_a 双对数图上绘图。在SPRi读取器(MX96, Carterra, Salt Lake City, UT)上于PBS-Tween 0.01%的运行缓冲液中,测定表观缔合及解离动力学速率常数(k_a 及 k_d 值)。使抗人类PD-1抗体在CFM(Carterra)上的羧甲基葡聚糖水凝胶50L芯片(XanTec bioanalytics GmbH, Dusseldorf, 德国)上共价结合。使用新鲜混合的活化试剂(150 μ l 0.4M EDC及150 μ l 0.1M磺基-NHS含于5ml H_2O 中)将SPR基板的表面活化7分钟。使用含于乙酸缓冲液pH 4.5中的10mg/ml的抗体印刷15分钟。然后将印刷的芯片在SPRi读取器(MX96, Carterra)上用1M乙醇胺淬灭15分钟。针对动力学分析,依序注射经纯化的重组His标记的人类PD-1(0、2.05、5.12、12.8、32、80、200、500nM)。针对各浓度,存在5分钟缔合,接着是10分钟解离。在SPR检验工具及Scrubber软件(Biosensor Tools LLC, Salt Lake City, UT)中处理及分析数据。将动力学数据参考空隙参考点及双参考缓冲周期,及然后全局拟合至1:1结合模型,以测定其表观缔合及解离动力学速率常数(k_a 及 k_d 值)。比率 k_d/k_a 用于导出各抗原/mAb相互作用的 K_D 值,即, $K_D=k_d/k_a$ 。

[0595] 非特异性T细胞+K562-PD-L1肿瘤靶细胞检定

[0596] 使用阴性选择试剂盒将T细胞从先前冷冻的PBMC(外周血单核细胞)分离,并使用IMMUNOCULT™抗CD3/CD28 T细胞活化剂于补充有10%FBS的X-VIVO 15培养基(“X-10”)中活化。3天后,将细胞更换至含有5ng/ml IL-2及2.5ng/ml IL-7的X-10培养基(“hX-10”)中。每2至3天,将细胞饲喂新鲜hX-10。活化10天后,将IMMUNOCULT™扩增的T细胞用CELLTRACE™ Violet标记并在具有50,000个T细胞及25,000个K32P细胞/孔的96孔圆底板中与K562细胞共培养,所述K562细胞经稳定转导以表达人类CD32B及PD-L1(“K32P”)。以10倍稀释进行的范围是10-0.001nM的最终浓度下添加抗体(双特异性体3、KEYTRUDA及同种型对照)连同0.25 μ g/ml抗CD3(克隆OKT3)。3天后,收集上清液用于经由MSD板测量IFN γ 细胞因子的产生,并将细胞染色用于流式细胞测量术,然后在BD LSRFORTESSA™细胞计上运行以查看T细胞活化及靶细胞杀死。通过计数实验孔中的活K32P靶的数目与一组无CD3对照孔中的K32P靶的数目比较,来测量靶细胞杀死。然后在GraphPadPrism中分析所有数据。如图9A至9B中所示,双特异性体3与同种型对照抗体及KEYTRUDA二者相比诱导了更高量的IFN γ 及K32P靶细胞杀死。

[0597] CMV抗原召回检定

[0598] 将第12天扩增的来自HLAA02:01供体的CMV抗原特异性CD8+T细胞解冻并在含2 μ g/ml DNase I的hX-10培养基中休息过夜。第二天,收集细胞,并使用Ficoll1分离法移除死亡细胞。然后将剩余细胞与表达HLA-A02:01、CMV蛋白质pp65-IRES-GFP及PD-L1的K562细胞(“KACP”, GFP+)及表达HLA-A02:01的K562细胞(“KA”, GFP-)在96孔圆底板中共培养,CMV T细胞25,000个/孔、KACP细胞50,000个/孔及KA细胞50,000个/孔。添加最终浓度是10-0.0001nM抗体(双特异性体3、KEYTRUDA、mAb1与mAb28的组合及同种型对照)。该剂量包括10与0.1nM之间的10倍稀释且然后是2倍稀释直至0.0001nM。在共培养2天后,经由流式细胞测量术分析KACP肿瘤靶的特异性杀死。将特异性杀死比率计量地定义为活GFP+KACP细胞与GFP-KA细胞的比率,相对于不存在T细胞时的这些细胞的比率标准化。如图10A中所示,双特异性体3增加了肿瘤抗原靶细胞的特异性杀死。双特异性体3介导的增加通常高于所观察的KEYTRUDA,而在高剂量下,mAb1与mAb28的组合杀死了相等数目的KACP细胞。关键地,在抗体的低剂量(0.001至0.01nM)下,双特异性体3与KEYTRUDA以及mAb1与mAb28的组合二者相比显示KACP细胞杀死的增加,这表示双特异性体3可用于在较低剂量下介导靶细胞的抗原特异性杀死。

[0599] 在单独实验中,以类似于以上针对K562细胞特异性杀死检定所述的方式,检查双特异性体3对Raji细胞特异性杀死的效应。简言之,将CMV抗原特异性CD8+T细胞与表达HLA-A02:01、CMV蛋白质pp65-IRES-GFP及PD-L1的Raji细胞(“RACP”, GFP+)及表达HLA-A02:01的Raji细胞(“RA”, GFP-)在96孔圆底板中共培养,CMV T细胞25,000个/孔、RACP细胞50,000个/孔及RA细胞50,000个/孔。添加抗体(双特异性体3、KEYTRUDA、mAb1与mAb28的组合及同种型对照),最终浓度是10-0.0001nM。该剂量包括10与0.1nM之间的10倍稀释且然后是2倍稀释直至0.0001nM。共培养2天后,经由流式细胞测量术分析RACP肿瘤靶的特异性杀死。将特异性杀死比率计量地定义为活GFP+RACP细胞与GFP-RA细胞的比率,相对于不存在T细胞时的这些细胞的比率标准化。如图10B中所示,双特异性体3增加了肿瘤抗原靶细胞的特异性杀死。双特异性体3介导的增加较针对KEYTRUDA或mAb1与mAb28的组合所见明显更高,而在高剂量下,双特异性体3及mAb1与mAb28的组合引起可相比拟的靶细胞杀死。这些数据指示双特异性体3可用于在较低剂量下介导靶细胞的抗原特异性杀死。

[0600] 金黄色葡萄球菌肠毒素A(“SEA”)检定

[0601] 将先前冷冻的PBMC解冻并用0.1mg/ml DNase I在PBS中孵育15分钟,通过40 μ m尼龙网过滤器,然后于X-10培养基中以100,000个细胞/孔在96圆底板接种。添加抗体(双特异性体3、KEYTRUDA、mAb1与mAb28的组合及同种型对照),最终浓度在10与0.0001nM之间,连同10ng/ml SEA。在共培养3天后,分析IL-2细胞因子的产生。如图11中所示,双特异性体3较KEYTRUDA在所有测试剂量下均诱导更多IL-2。重要的是,与KEYTRUDA及mAb1与mAb28的组合二者相比,双特异性体3诱导的IL-2产生的增加开始于抗体的较低浓度下。

[0602] PD-1表达测定检定

[0603] 将先前冷冻的PBMC解冻并用0.1mg/ml DNA酶I在PBS中孵育15分钟,通过过滤器,然后在具有0.25 μ g/ml抗CD3(克隆OKT3)及0.25 μ g/ml抗CD28(克隆CD28.2)的hX-10中以1 $\times 10^6$ 个细胞/ml接种3天。3天后,通过细胞旋转并移除过量培养基将细胞调整至2 $\times 10^6$ 个细胞/ml含于hX-10中。然后将细胞重悬并在48孔板中以1 $\times 10^6$ 个细胞/孔(0.5ml)接种。然后添

加抗体(双特异性体3、KEYTRUDA、mAb1与mAb28的组合、阿特珠单抗或同种型对照)至各孔以得到1ml/孔hX-10的最终体积,其中抗体的最终浓度是0.01nM或1nM。过夜培养后,将细胞收集至1.5ml Eppendorf管中并于含有蛋白酶抑制剂混合物的100 μ l裂解缓冲液中裂解。通过旋转使粒子的上清液澄清后,将经澄清的上清液储存在-80 $^{\circ}$ C直至用于Western印迹。针对Western印迹,调整样品以包含1X LDS样品缓冲液及1X还原剂,在70 $^{\circ}$ C下加热10分钟,然后将20 μ l/孔加载于4至12%Bis-Tris凝胶上。凝胶运行后,将其转移至硝化纤维膜,在室温下用含5%干乳的TBS-0.1%Tween-20(TBST)封闭1小时,在TBST中洗涤,然后在4 $^{\circ}$ C下于含5%牛血清白蛋白的TBST中用抗PD-1(克隆D4W2J,Cell Signaling Technologies)或抗 β -肌动蛋白(克隆13E5,Cell Signaling Technologies)抗体孵育过夜。第二天,将膜在TBST中洗涤,用结合有HRP的抗兔IgG抗体孵育,在TBST中洗涤,然后用SUPERSIGNALTM Pico底物显色。在Amersham成像仪600上收集化学发光及白光影像并进行叠加,以产生所示影像。如图12A中所示,双特异性体3在其通过PD-1的内化和/或随后降解和/或脱落引起细胞PD-1表达的损失的能力方面是独特的。

[0604] 在随后的检定中,将先前冷冻的PBMC解冻并用0.1mg/ml DNA酶I于PBS中孵育15分钟,通过过滤器,然后在具有0.25 μ g/ml抗CD3(克隆OKT3)及0.25 μ g/ml抗CD28(克隆CD28.2)的hX-10中以 1×10^6 个细胞/ml接种3天。3天后,通过旋转并移除过量培养基将细胞调整至 2×10^6 个细胞/ml含于hX-10中。然后将细胞重悬并于48孔板中以 1×10^6 个细胞/孔(0.5ml)接种。然后添加抗体(双特异性体3、KEYTRUDA、mAb1与mAb28的组合、阿特珠单抗、阿特珠单抗与KEYTRUDA、具有50nM mAb 1的双特异性体3或同种型对照)至各孔以得到1ml/孔hX-10的最终体积,抗体的最终浓度是0.1nM、1nM或10nM。过夜培养后,将细胞收集至1.5ml Eppendorf管中并于含有蛋白酶抑制剂混合物的100 μ l裂解缓冲液中裂解。通过旋转使粒子的上清液澄清后,将经澄清的上清液储存在-80 $^{\circ}$ C直至用于Western印迹。针对Western印迹,调整样品以包含1X LDS样品缓冲液及1X还原剂,在70 $^{\circ}$ C下加热10分钟,然后将10 μ l/孔加载于4至12%Bis-Tris凝胶上。凝胶运行后,将其转移至硝化纤维膜,在室温下用含5%干乳的TBS-0.1%Tween-20(TBST)封闭1小时,在TBST中洗涤,然后在4 $^{\circ}$ C下于含5%牛血清白蛋白的TBST中用抗PD-1(克隆D4W2J,Cell Signaling Technologies)或抗 β -肌动蛋白(克隆13E5,Cell Signaling Technologies)抗体孵育过夜。第二天,将膜于TBST中洗涤,用结合有HRP的抗兔IgG抗体孵育,在TBST中洗涤,然后用SUPERSIGNALTM Pico底物显色。在Amersham成像仪600上收集化学发光及白光影像并叠加,以产生所示影像。如图12B至12C中所示,双特异性体3在其通过PD-1的内化和/或随后降解和/或PD-1的脱落引起细胞表面PD-1表达的损失的能力方面是独特的。此外,当将抗PD-L1抗体mAb1以50nM添加至含有双特异性体3的孔中时,双特异性体3失去了通过PD-1内化和/或PD-1的随后降解和/或脱落驱动细胞表面PD-1表达的损失的能力。这表明应接合双特异性体3的两臂以通过PD-1的内化和/或降解和/或脱落驱动细胞表面PD-1表达的损失。

[0605] 图12D显示当同时接合双特异体3的两个结合臂时,用双特异性体处理增加了上清液中的PD-1的量。当PD-L1靶向臂并mAb1(亲本PD-L1臂抗体)阻断时,此效应丧失。这表明双特异性体3增加了PD-1脱落至上清液中。

[0606] 接下来研究效价相对结合臂顺序的效应。产生新颖1双特异性体(双特异性体5),其具有源自mAb1的VH及VL序列的结合PD-L1的第一N端Fab,及源自mAb28的VH及VL序列的结

合PD-1的第二N端Fab。换言之,当其共享用于结合至PD-1及PD-L1的相同VH及VL序列时,双特异性体5与双特异性体3(其具有结合PD-L1的二价臂及结合PD-1的二价臂)相比具有结合PD-L1的一个单价臂及结合PD-1的一个单价臂。

[0607] 在T75烧瓶中的含有IL-2及IL-7的hX-10培养基中,将 40×10^6 个PBMC用 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗CD3及 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗CD28处理3天。将细胞于烧瓶中孵育3天,无操作。在第3天,收集细胞无需洗掉旧培养基中的任一者。将细胞在1ml的最终体积下接种于48孔板的孔中,其中细胞是 1×10^6 个细胞/孔且抗体是 0.01 nM 、 0.1 nM 、 1 nM 及 10 nM 。过夜孵育后,将细胞收集至1.5ml管中,洗涤以自孔收集所有细胞,然后裂解并用于Western印迹。针对PD-1及肌动蛋白运行Western印迹。图12E证实,结合臂的价态影响了PD-1表达损失的程度。如所示,相比双特异性体3(二价结合臂,总价=4或四价),PD-1表达的损失在双特异性体5(单价结合臂,总价=2或二价)的更高剂量下开始出现,这表明双特异性体3的增加的价态对此差异负责。

[0608] 接下来,使用巴马司他(多个MMP和ADAM的广谱抑制剂,所述MMP和ADAM为负责将蛋白质自细胞质膜裂解掉的脱落酶或蛋白酶)检测ADAM/MMP抑制的效应。简言之,在T75烧瓶中于含有IL-2和IL-7的hX-10培养基中将 40×10^6 个PBMC用 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗CD3及 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗CD28处理3天。将细胞于烧瓶中孵育3天,无操作。在第3天,收集细胞无需洗掉旧培养基中的任一者。将细胞在1ml的最终体积下接种于48孔板的孔中, 1×10^6 个细胞/孔。在抗体添加之前至少1/2小时,以 $0 \mu\text{M}$ 、 $1.25 \mu\text{M}$ 、 $2.5 \mu\text{M}$ 、 $5 \mu\text{M}$ 及 $10 \mu\text{M}$ 的增加浓度添加巴马司他或DMSO溶剂并在 37°C 下预孵育,以查看ADAM/MMP抑制的结果。然后以 1 nM 添加同种型对照及双特异性体3。过夜孵育后,将细胞收集至1.5ml管,洗涤以自孔收集所有细胞,然后裂解并用于Western印迹。针对PD-1及肌动蛋白运行Western印迹。图12F证实巴马司他(多个MMP和ADAM的广谱抑制剂)预处理极大降低了细胞相关的PD-1损失的量,这表明PD-1损失或脱落是由于通过MMP或ADAM蛋白酶的裂解。图12G表明,当双特异性体3结合至呈反式构型(即,通过不同细胞表达)的PD-1及PD-L1时,其主要驱动细胞表面PD-1表达的损失。考虑到PD-1及PD-L1可在相同细胞上表达,研究了结合至顺式PD-1及PD-L1的双特异性体3是否导致PD-1表达的损失或PD-1脱落,或通过双特异性体3结合是否需要呈反式,其中双特异性体3桥接第一细胞(诸如表达PD-L1的肿瘤细胞)和第二细胞(诸如表达PD-1的T效应细胞)。实验中使用表达仅PD-1、仅PD-L1或PD-1和PD-L1二者的Jurkat细胞。简言之,将总计 0.5×10^6 个表达PD-1的Jurkat细胞、表达PD-1和PD-L1的Jurkat细胞、或仅表达PD-1或仅表达PD-L1的Jurkat细胞的1:1混合物用同种型对照或双特异性体3在 0.01 、 0.1 及 1 nM 下处理。过夜孵育后,将细胞收集至1.5ml管中,洗涤以自孔收集所有细胞,然后裂解并用于Western印迹。运行Western印迹以测定PD-1及肌动蛋白水平。

[0609] 双特异性体3的体内功能

[0610] 收集第13天扩增的来自HLA A02:01供体的CMV抗原特异性CD8+T细胞,然后与表达HLA-A02:01、CMV蛋白质pp65-IRES-GFP及PD-L1的K562细胞(“KACP”)以2:1的KACP:CMV T细胞比率以及基质胶混合,使得 $100 \mu\text{l}$ 包含1X基质胶、 5×10^6 个KACP细胞及 2.5×10^6 个CMV T细胞。将NSG小鼠在其侧腹皮下移植 $100 \mu\text{l}$ 制备的基质胶-KACP-CMV T细胞混合物/小鼠。在移植当天开始抗体给药并以等摩尔量(针对各单克隆 $200 \mu\text{g}$,针对双特异性体3 $333 \mu\text{g}$)下提供,并且每3天将小鼠用抗体再给药。处理组包含在单独基质胶中提供KACP肿瘤细胞的对照组(“无T细胞转移”)以及提供同种型、KEYTRUDA、mAb1及mAb28(mAb1+mAb28)或双特异性体3的

组。每组有5只小鼠,并每日监测小鼠,每周两次测量肿瘤。图13A中示意性描述了所述方案。如图13B中所示,无T细胞转移组较含有T细胞的任何组具有更侵略性生长的肿瘤。在该模型中,KEYTRUDA在延迟KACP肿瘤生长方面与同种型对照相比没有优势。双特异性体3以及mAb1与mAb28组合组二者与同种型及KEYTRUDA组二者相比具有肿瘤生长的显著延迟。在第24天,双特异性体3组与用mAb1与mAb28的组合处理的组之间存在显著差异,其中双特异性体3与组合相比引起肿瘤生长的延迟。

[0611] 实例6:针对双特异性体3的药理学研究的体内研究

[0612] NSG小鼠的K562-A2-CMV-PD-L1靶细胞及CMVT细胞的共接种模型

[0613] 在利用图13A中示意性描述的方案的两个单独研究中,将NSG雌性小鼠皮下共注射含有 5×10^6 个K562-A2-CMV-PD-L1 (“KACP”)细胞以及 2.5×10^6 (图13B及14A;效应子:靶比率=0.5:1)或 5×10^6 (图14B;效应子:靶比率=1:1)个自相同供体体外扩增的CMV特异性T细胞的100 μ L基质胶。在接种日将小鼠盲分成5组,分别5只小鼠/组或10只小鼠/组。为测定人类T细胞的抗肿瘤活性,在两个研究中将第一组小鼠仅用肿瘤细胞注射。第二组接受人类IgG1同种型对照抗体(0.2mg Q3Dx5)。第三组接受KEYTRUDA(0.2mg Q3Dx5),将第四组用双特异性体3(0.333mg Q3Dx5)处理,第五组接受抗PD-1(mAb28)及抗PD-L1(mAb1)抗体(各0.2mg Q3Dx5)的组合。所有抗体经腹膜内注射并在移植日开始给药。通过肿瘤体积测量监测的肿瘤生长、体重损失及总生存率,确定抗肿瘤活性。每周测量肿瘤大小及体重2至3次,当肿瘤接近2000mm³或小鼠损失体重的20%时,将小鼠安乐死。使用Graph Pad Prism软件分析数据并绘图。如图14A及14B中所述,双特异性体3与所测试的不同单克隆抗体相比显示增加的抗肿瘤功效。

[0614] 可移植同基因小鼠模型

[0615] 将乳癌EMT-6细胞(5×10^4 个/小鼠)移植于BALB/c雌性小鼠的乳房脂肪垫中。当建立肿瘤(肿瘤体积约50mm³)时,将小鼠分组(n=8)并用人类IgG1同种型对照(0.2mg Q3Dx3)或双特异性体3(0.333mg Q3Dx3)处理。将抗体通过腹膜内注射递送。

[0616] 使用类似研究设计,在雌性C57BL/6小鼠中皮下注射膀胱癌MB-49细胞(5×10^5 个/小鼠)。当建立肿瘤(肿瘤体积约75mm³)时,将小鼠分组(n=8)并用人类IgG1同种型对照(0.2mg Q3Dx3)或双特异性体3(0.333mg Q3Dx3)处理。将抗体通过腹膜内注射递送。

[0617] 针对两种研究,每周测量肿瘤大小及体重2至3次,当肿瘤接近2000mm³或小鼠损失体重的20%时,将小鼠安乐死。将结果通过Graph Pad Prism软件绘图及分析。双特异性体3与同种型对照处理相比显示在EMT-6乳癌细胞模型(图15A)中和MB-49细胞模型(图15B)中的更大抗肿瘤功效。

[0618] 转基因小鼠的经工程改造的可移植同基因模型

[0619] 将经工程改造以表达人类PD-L1(MC-38-hPD-L1)的小鼠结肠癌MC-38细胞皮下注射于C57BL/6雌性小鼠中,其中PD-1及PD-L1的细胞外域用人类PD-1及PD-L1取代,而不修饰受体-配体对的跨膜域及信号域。人类PD-1及PD-L1的遗传敲入允许测试与KEYTRUDA头对头的本发明双特异性PD-1xPD-L1抗体,其不与小鼠PD-1相互作用,并因此不可在同基因小鼠模型中评价。将具有建立的MC-38-hPD-L1肿瘤的小鼠分组(n=8)并用同种型对照(0.2mg Q3Dx3)、KEYTRUDA(0.2mg Q3Dx3)或双特异性体3(0.333mg Q3Dx3)腹膜内处理。用双特异性体3的处理控制了MC-38-hPD-L1肿瘤生长,较同种型对照处理或KEYTRUDA处理显著更好(图

16A)。此外,双特异性体3处理与经同种型对照或KEYTRUDA处理的小鼠相比导致MC-38-hPD-L1肿瘤小鼠的生存率的增加(图16B)。

[0620] 在单独的研究中,将C57BL/6人类PD-1/PD-L1转基因雌性小鼠用 1×10^5 个B16F10-hPD-L1细胞(极具侵略性的小鼠黑色素瘤细胞系)皮下注射。一旦黑色素瘤可见(于肿瘤细胞接种4天后)就将小鼠分组成5组($n=8$),其接受下列处理。组1接受同种型对照人类IgG1(0.2mg Q3Dx3),组2接受阿伏鲁单抗(0.2mg Q3Dx3),组3接受KEYTRUDA(0.2mg Q3Dx3),组4接受双特异性体3(0.333Q3Dx3),组5接受KEYTRUDA与阿伏鲁单抗的组合(各0.2mg Q3Dx3)。针对两种研究,每周测量肿瘤大小及体重2至3次,当肿瘤接近 2000mm^3 或小鼠损失体重的20%时,将小鼠安乐死。记录及分析生存。将数据通过Graph Pad Prism软件绘图并分析。如图17A及17B中所述,双特异性体3与所测试的其他处理组相比显著更有效延迟B16F10-hPD-L1小鼠中的肿瘤生长。此外,用双特异性体3处理的B16F10-hPD-L1小鼠较接受其他所测试的治疗的小鼠生存平均更长(图17C及图17E)。

[0621] 实例7:双特异性体3具有类单克隆DLP及类亲本结合

[0622] 图18A至18D证实,双特异性体3具有类似于行为良好的单克隆抗体的类药性质(DLP)且维持亲本PD-1和PD-L1结合。图18A显示双特异性体3显示与亲本克隆mAb28类似地结合至表达人类PD-1的CHO细胞(上图),与亲本克隆mAb1类似地结合至表达人类PD-L1的CHO细胞(下图)。图18B显示双特异性体3显示与亲本克隆mAb28类似地结合至表达食蟹猴PD-1的CHO细胞(上图),与亲本克隆mAb1类似地结合至表达食蟹猴PD-L1的CHO细胞(下图)。图18C显示双特异性体3显示与亲本克隆mAb28类似地结合至表达小鼠PD-1的CHO细胞(上图),与亲本克隆mAb1类似地结合至表达小鼠PD-L1的CHO细胞(下图)。图18D显示双特异性体3在蛋白A层析法后的尺寸排阻层析迹线(上图),其证实具有大于98%纯度的单峰,以及双特异性体3的示差扫描荧光法(DSF)迹线(下图),其证实分子具有高的热稳定性。

[0623] 序列

[0624] SEQ ID NO:114 (GenBank登陆号NP_005009.2,UniProt Q15116-全长人类PD-1前体)

[0625] mqipqapwvp vwavlqlgwr pgwfldspdr pwnpptfspa llvvtgedna tftcsfsnts
esfvlnwurm spsnqtdkla afpedrsqpg qdcrfrvtql pnggrdfhmsv vrarrndsgt
ylcgaislap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp rpagqfqtltv vgvvggllgs
lvllvwvlav icsraargti garrtgqplk edpsavpvfs vdygeldfqw rektpeppvp
[0626] cvpeqteyat ivfpsgmgts sparrgsadg prsaqplrpe dghcswpl

[0627] SEQ ID NO:115 (GenBank登陆号NP_054862.1,UniProt Q9NZQ7-人类PD-L1)

mrifavfifm tywhllnaft vtvpkdlyvv eygsnmtiec kfpvekqldl aalivyweme
dkniiqfvhg eedlkvqhss yrqrarllkd qlslgnaalq itdvklqdag vyrcmisyyg
[0628] adykritkv napynkinqr ilvvdptse heltcqaegy pkaeviwts dhqvlsgktt
ttnskreekl fnvtstlrin tttneifyct frldpeenh taelvipelp lahppnerth
lvilgaillc lgvaltfifr lrkgrmmdvk kcgiaqdtnsk kqsdthleet

[0629] SEQ ID NO:116 (GenBank登陆号NP_079515.2,UniProt Q9BQ51-人类PD-L2)

[0630] mifllllmlsl elqlhqiaal ftvtvpkely iiehgsnvtl ecnfdtgshv nlgaitaslq
kvendtsphr eratllleeql plgkasfhip qvqvrdeggy qciiiygvas dykyltlkvk
asyrkinthi lkvpctdeve ltcqatgypl aevswpnsvs pantsrsrtp eglyqvtsvl
rlkpppggrnf scvfwnthvr eltlasidlq sqmeprrthpt wllhifipfc iiafifiatv
ialrkqlcqk lysskdttkr pvtttkrevn sai

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 指南针制药有限责任公司 (COMPASS THERAPEUTICS LLC)
- [0003] <120> 对抗检查点分子的多特异性结合构建体及其用途
- [0004] <130> 1848492-0002-007-W01
- [0005] <140>
- [0006] <141> 2019-11-13
- [0007] <150> 62/931,478
- [0008] <151> 2019-11-06
- [0009] <150> 62/898,991
- [0010] <151> 2019-09-11
- [0011] <150> 62/855,580
- [0012] <151> 2019-05-31
- [0013] <150> 62/760,801
- [0014] <151> 2018-11-13
- [0015] <160> 122
- [0016] <170> PatentIn version 3.5
- [0017] <210> 1
- [0018] <211> 9
- [0019] <212> PRT
- [0020] <213> 人工序列
- [0021] <220>
- [0022] <223> 人工序列的描述:合成的肽
- [0023] <400> 1
- [0024] Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Asn
- [0025] 1 5
- [0026] <210> 2
- [0027] <211> 13
- [0028] <212> PRT
- [0029] <213> 人工序列
- [0030] <220>
- [0031] <223> 人工序列的描述:合成的肽
- [0032] <220>
- [0033] <221> MOD_RES
- [0034] <222> (6) .. (6)
- [0035] <223> Val或者Ile
- [0036] <220>
- [0037] <221> MOD_RES
- [0038] <222> (7) .. (7)

[0039] <223> Phe, Leu或者Val
 [0040] <220>
 [0041] <221> MOD_RES
 [0042] <222> (9) .. (9)
 [0043] <223> Thr或者Ala
 [0044] <400> 2
 [0045] Gly Gly Ile Ile Pro Xaa Xaa Gly Xaa Ala Thr Tyr Ala
 [0046] 1 5 10
 [0047] <210> 3
 [0048] <211> 13
 [0049] <212> PRT
 [0050] <213> 人工序列
 [0051] <220>
 [0052] <223> 人工序列的描述:合成的肽
 [0053] <220>
 [0054] <221> MOD_RES
 [0055] <222> (5) .. (5)
 [0056] <223> Gly, Phe或者Asn
 [0057] <400> 3
 [0058] Ala Arg Leu Lys Xaa Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile
 [0059] 1 5 10
 [0060] <210> 4
 [0061] <211> 11
 [0062] <212> PRT
 [0063] <213> 人工序列
 [0064] <220>
 [0065] <223> 人工序列的描述:合成的肽
 [0066] <220>
 [0067] <221> MOD_RES
 [0068] <222> (5) .. (5)
 [0069] <223> Ser, Trp或者Gln
 [0070] <400> 4
 [0071] Arg Ala Ser Gln Xaa Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 [0072] 1 5 10
 [0073] <210> 5
 [0074] <211> 7
 [0075] <212> PRT
 [0076] <213> 人工序列
 [0077] <220>

[0078] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0079] <400> 5
[0080] Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
[0081] 1 5
[0082] <210> 6
[0083] <211> 9
[0084] <212> PRT
[0085] <213> 人工序列
[0086] <220>
[0087] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0088] <220>
[0089] <221> MOD_RES
[0090] <222> (1) .. (1)
[0091] <223> Gln或者Phe
[0092] <400> 6
[0093] Xaa Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
[0094] 1 5
[0095] <210> 7
[0096] <211> 13
[0097] <212> PRT
[0098] <213> 人工序列
[0099] <220>
[0100] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0101] <400> 7
[0102] Gly Gly Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ala Ala Thr Tyr Ala
[0103] 1 5 10
[0104] <210> 8
[0105] <211> 13
[0106] <212> PRT
[0107] <213> 人工序列
[0108] <220>
[0109] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0110] <400> 8
[0111] Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile
[0112] 1 5 10
[0113] <210> 9
[0114] <211> 11
[0115] <212> PRT
[0116] <213> 人工序列

[0117] <220>
[0118] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0119] <400> 9
[0120] Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
[0121] 1 5 10
[0122] <210> 10
[0123] <211> 9
[0124] <212> PRT
[0125] <213> 人工序列
[0126] <220>
[0127] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0128] <400> 10
[0129] Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
[0130] 1 5
[0131] <210> 11
[0132] <211> 13
[0133] <212> PRT
[0134] <213> 人工序列
[0135] <220>
[0136] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0137] <400> 11
[0138] Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala
[0139] 1 5 10
[0140] <210> 12
[0141] <211> 11
[0142] <212> PRT
[0143] <213> 人工序列
[0144] <220>
[0145] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0146] <400> 12
[0147] Arg Ala Ser Gln Trp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
[0148] 1 5 10
[0149] <210> 13
[0150] <211> 11
[0151] <212> PRT
[0152] <213> 人工序列
[0153] <220>
[0154] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0155] <400> 13

[0156]	Arg Ala Ser Gln Gln Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
[0157]	1 5 10
[0158]	<210> 14
[0159]	<211> 9
[0160]	<212> PRT
[0161]	<213> 人工序列
[0162]	<220>
[0163]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0164]	<400> 14
[0165]	Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Phe Ser
[0166]	1 5
[0167]	<210> 15
[0168]	<211> 13
[0169]	<212> PRT
[0170]	<213> 人工序列
[0171]	<220>
[0172]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0173]	<400> 15
[0174]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Ala Asn Tyr Ala
[0175]	1 5 10
[0176]	<210> 16
[0177]	<211> 13
[0178]	<212> PRT
[0179]	<213> 人工序列
[0180]	<220>
[0181]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0182]	<400> 16
[0183]	Gly Gly Ile Ile Pro Asn Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala
[0184]	1 5 10
[0185]	<210> 17
[0186]	<211> 13
[0187]	<212> PRT
[0188]	<213> 人工序列
[0189]	<220>
[0190]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0191]	<400> 17
[0192]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Gly Ala Gly Asp Ile
[0193]	1 5 10
[0194]	<210> 18

[0195]	<211>	13
[0196]	<212>	PRT
[0197]	<213>	人工序列
[0198]	<220>	
[0199]	<223>	人工序列的描述:合成的肽
[0200]	<400>	18
[0201]	Ala Arg Leu Lys Phe Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile	
[0202]	1	5 10
[0203]	<210>	19
[0204]	<211>	13
[0205]	<212>	PRT
[0206]	<213>	人工序列
[0207]	<220>	
[0208]	<223>	人工序列的描述:合成的肽
[0209]	<400>	19
[0210]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Glu	
[0211]	1	5 10
[0212]	<210>	20
[0213]	<211>	13
[0214]	<212>	PRT
[0215]	<213>	人工序列
[0216]	<220>	
[0217]	<223>	人工序列的描述:合成的肽
[0218]	<400>	20
[0219]	Ala Arg Leu Lys Asn Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile	
[0220]	1	5 10
[0221]	<210>	21
[0222]	<211>	13
[0223]	<212>	PRT
[0224]	<213>	人工序列
[0225]	<220>	
[0226]	<223>	人工序列的描述:合成的肽
[0227]	<400>	21
[0228]	Gly Gly Val Ile Pro Phe Leu Gly Thr Ala Asn Tyr Ala	
[0229]	1	5 10
[0230]	<210>	22
[0231]	<211>	13
[0232]	<212>	PRT
[0233]	<213>	人工序列

[0234] <220>
[0235] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0236] <400> 22
[0237] Ala Arg Leu Lys Gly Ile Leu Lys Asp Ala Leu Asp Ile
[0238] 1 5 10
[0239] <210> 23
[0240] <211> 9
[0241] <212> PRT
[0242] <213> 人工序列
[0243] <220>
[0244] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0245] <400> 23
[0246] Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
[0247] 1 5
[0248] <210> 24
[0249] <211> 13
[0250] <212> PRT
[0251] <213> 人工序列
[0252] <220>
[0253] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0254] <400> 24
[0255] Gly Gly Ile Ile Pro Ile Val Gly Ile Ala Asn Tyr Ala
[0256] 1 5 10
[0257] <210> 25
[0258] <211> 13
[0259] <212> PRT
[0260] <213> 人工序列
[0261] <220>
[0262] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0263] <400> 25
[0264] Ala Arg Leu Lys Gly Glu Phe Lys Asp Ala Phe Asp Ile
[0265] 1 5 10
[0266] <210> 26
[0267] <211> 13
[0268] <212> PRT
[0269] <213> 人工序列
[0270] <220>
[0271] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0272] <400> 26

[0273]	Gly Arg Ile Ile Pro Leu Phe Gly Thr Ala His Tyr Ala
[0274]	1 5 10
[0275]	<210> 27
[0276]	<211> 13
[0277]	<212> PRT
[0278]	<213> 人工序列
[0279]	<220>
[0280]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0281]	<400> 27
[0282]	Gly Arg Ile Asn Pro Ile Leu Gly Thr Ala Asn Tyr Ala
[0283]	1 5 10
[0284]	<210> 28
[0285]	<211> 13
[0286]	<212> PRT
[0287]	<213> 人工序列
[0288]	<220>
[0289]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0290]	<400> 28
[0291]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Ser Ile
[0292]	1 5 10
[0293]	<210> 29
[0294]	<211> 13
[0295]	<212> PRT
[0296]	<213> 人工序列
[0297]	<220>
[0298]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0299]	<400> 29
[0300]	Gly Arg Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asp Tyr Ala
[0301]	1 5 10
[0302]	<210> 30
[0303]	<211> 13
[0304]	<212> PRT
[0305]	<213> 人工序列
[0306]	<220>
[0307]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0308]	<400> 30
[0309]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Cys Ala Phe Asp Ile
[0310]	1 5 10
[0311]	<210> 31

[0312] <211> 13
[0313] <212> PRT
[0314] <213> 人工序列
[0315] <220>
[0316] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0317] <400> 31
[0318] Gly Gly Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ala Thr Tyr Ala
[0319] 1 5 10
[0320] <210> 32
[0321] <211> 13
[0322] <212> PRT
[0323] <213> 人工序列
[0324] <220>
[0325] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0326] <400> 32
[0327] Ala Arg Arg Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile
[0328] 1 5 10
[0329] <210> 33
[0330] <211> 13
[0331] <212> PRT
[0332] <213> 人工序列
[0333] <220>
[0334] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0335] <400> 33
[0336] Gly Gly Ile Ile Pro Ile Val Ala Thr Ala Asn Tyr Ala
[0337] 1 5 10
[0338] <210> 34
[0339] <211> 13
[0340] <212> PRT
[0341] <213> 人工序列
[0342] <220>
[0343] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0344] <400> 34
[0345] Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala Thr Tyr Ala
[0346] 1 5 10
[0347] <210> 35
[0348] <211> 120
[0349] <212> PRT
[0350] <213> 人工序列

[0351]	<220>
[0352]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0353]	<400> 35
[0354]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0355]	1 5 10 15
[0356]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0357]	20 25 30
[0358]	Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0359]	35 40 45
[0360]	Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
[0361]	50 55 60
[0362]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0363]	65 70 75 80
[0364]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0365]	85 90 95
[0366]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
[0367]	100 105 110
[0368]	Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[0369]	115 120
[0370]	<210> 36
[0371]	<211> 9
[0372]	<212> PRT
[0373]	<213> 人工序列
[0374]	<220>
[0375]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0376]	<400> 36
[0377]	Gly Pro Phe Arg Ser His Ala Val Ser
[0378]	1 5
[0379]	<210> 37
[0380]	<211> 13
[0381]	<212> PRT
[0382]	<213> 人工序列
[0383]	<220>
[0384]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0385]	<400> 37
[0386]	Ala Arg Leu Lys Ser Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile
[0387]	1 5 10
[0388]	<210> 38
[0389]	<211> 9

[0390]	<212>	PRT
[0391]	<213>	人工序列
[0392]	<220>	
[0393]	<223>	人工序列的描述:合成的肽
[0394]	<400>	38
[0395]	Phe Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr	
[0396]	1	5
[0397]	<210>	39
[0398]	<211>	9
[0399]	<212>	PRT
[0400]	<213>	人工序列
[0401]	<220>	
[0402]	<223>	人工序列的描述:合成的肽
[0403]	<400>	39
[0404]	Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Ile Leu Thr	
[0405]	1	5
[0406]	<210>	40
[0407]	<211>	120
[0408]	<212>	PRT
[0409]	<213>	人工序列
[0410]	<220>	
[0411]	<223>	人工序列的描述:合成的多肽
[0412]	<400>	40
[0413]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[0414]	1	5 10 15
[0415]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0416]	20	25 30
[0417]	Ala Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0418]	35	40 45
[0419]	Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe	
[0420]	50	55 60
[0421]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0422]	65	70 75 80
[0423]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0424]	85	90 95
[0425]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln	
[0426]	100	105 110
[0427]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0428]	115	120

[0429]	<210> 41
[0430]	<211> 120
[0431]	<212> PRT
[0432]	<213> 人工序列
[0433]	<220>
[0434]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0435]	<400> 41
[0436]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0437]	1 5 10 15
[0438]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0439]	20 25 30
[0440]	Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0441]	35 40 45
[0442]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0443]	50 55 60
[0444]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0445]	65 70 75 80
[0446]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0447]	85 90 95
[0448]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
[0449]	100 105 110
[0450]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0451]	115 120
[0452]	<210> 42
[0453]	<211> 120
[0454]	<212> PRT
[0455]	<213> 人工序列
[0456]	<220>
[0457]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0458]	<400> 42
[0459]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0460]	1 5 10 15
[0461]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0462]	20 25 30
[0463]	Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0464]	35 40 45
[0465]	Gly Gly Ile Ile Pro Asn Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
[0466]	50 55 60
[0467]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

[0468]	65	70	75	80
[0469]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0470]	85	90	95	
[0471]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Gly Ala Gly Asp Ile Trp Gly Gln			
[0472]	100	105	110	
[0473]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0474]	115	120		
[0475]	<210> 43			
[0476]	<211> 120			
[0477]	<212> PRT			
[0478]	<213> 人工序列			
[0479]	<220>			
[0480]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽			
[0481]	<400> 43			
[0482]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
[0483]	1 5 10 15			
[0484]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr			
[0485]	20 25 30			
[0486]	Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[0487]	35 40 45			
[0488]	Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe			
[0489]	50 55 60			
[0490]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[0491]	65 70 75 80			
[0492]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0493]	85 90 95			
[0494]	Ala Arg Leu Lys Phe Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln			
[0495]	100 105 110			
[0496]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0497]	115 120			
[0498]	<210> 44			
[0499]	<211> 120			
[0500]	<212> PRT			
[0501]	<213> 人工序列			
[0502]	<220>			
[0503]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽			
[0504]	<400> 44			
[0505]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
[0506]	1 5 10 15			

[0507]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0508]	20 25 30
[0509]	Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0510]	35 40 45
[0511]	Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
[0512]	50 55 60
[0513]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0514]	65 70 75 80
[0515]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0516]	85 90 95
[0517]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Glu Trp Gly Gln
[0518]	100 105 110
[0519]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0520]	115 120
[0521]	<210> 45
[0522]	<211> 120
[0523]	<212> PRT
[0524]	<213> 人工序列
[0525]	<220>
[0526]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0527]	<400> 45
[0528]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0529]	1 5 10 15
[0530]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0531]	20 25 30
[0532]	Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0533]	35 40 45
[0534]	Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
[0535]	50 55 60
[0536]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0537]	65 70 75 80
[0538]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0539]	85 90 95
[0540]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
[0541]	100 105 110
[0542]	Gly Thr Leu Val Thr Ala Ser Thr
[0543]	115 120
[0544]	<210> 46
[0545]	<211> 120

[0546]	<212>	PRT
[0547]	<213>	人工序列
[0548]	<220>	
[0549]	<223>	人工序列的描述:合成的多肽
[0550]	<400>	46
[0551]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[0552]	1 5 10 15	
[0553]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0554]	20 25 30	
[0555]	Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0556]	35 40 45	
[0557]	Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe	
[0558]	50 55 60	
[0559]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0560]	65 70 75 80	
[0561]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0562]	85 90 95	
[0563]	Ala Arg Leu Lys Asn Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln	
[0564]	100 105 110	
[0565]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0566]	115 120	
[0567]	<210>	47
[0568]	<211>	120
[0569]	<212>	PRT
[0570]	<213>	人工序列
[0571]	<220>	
[0572]	<223>	人工序列的描述:合成的多肽
[0573]	<400>	47
[0574]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[0575]	1 5 10 15	
[0576]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0577]	20 25 30	
[0578]	Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0579]	35 40 45	
[0580]	Gly Gly Val Ile Pro Phe Leu Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
[0581]	50 55 60	
[0582]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0583]	65 70 75 80	
[0584]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	

[0585]	85	90	95
[0586]	Ala Arg Leu Lys Gly Ile Leu Lys Asp Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln		
[0587]	100	105	110
[0588]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0589]	115	120	
[0590]	<210> 48		
[0591]	<211> 120		
[0592]	<212> PRT		
[0593]	<213> 人工序列		
[0594]	<220>		
[0595]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[0596]	<400> 48		
[0597]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
[0598]	1 5 10 15		
[0599]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0600]	20 25 30		
[0601]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asp Leu Glu Trp Met		
[0602]	35 40 45		
[0603]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Val Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
[0604]	50 55 60		
[0605]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0606]	65 70 75 80		
[0607]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0608]	85 90 95		
[0609]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln		
[0610]	100 105 110		
[0611]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0612]	115 120		
[0613]	<210> 49		
[0614]	<211> 120		
[0615]	<212> PRT		
[0616]	<213> 人工序列		
[0617]	<220>		
[0618]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[0619]	<400> 49		
[0620]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
[0621]	1 5 10 15		
[0622]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0623]	20 25 30		

[0624]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0625]	35 40 45
[0626]	Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
[0627]	50 55 60
[0628]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0629]	65 70 75 80
[0630]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0631]	85 90 95
[0632]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Phe Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
[0633]	100 105 110
[0634]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0635]	115 120
[0636]	<210> 50
[0637]	<211> 120
[0638]	<212> PRT
[0639]	<213> 人工序列
[0640]	<220>
[0641]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0642]	<400> 50
[0643]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0644]	1 5 10 15
[0645]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0646]	20 25 30
[0647]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0648]	35 40 45
[0649]	Gly Arg Ile Ile Pro Leu Phe Gly Thr Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
[0650]	50 55 60
[0651]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0652]	65 70 75 80
[0653]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0654]	85 90 95
[0655]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
[0656]	100 105 110
[0657]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0658]	115 120
[0659]	<210> 51
[0660]	<211> 120
[0661]	<212> PRT
[0662]	<213> 人工序列

[0663] <220>
 [0664] <223> 人工序列的描述:合成的多肽
 [0665] <400> 51
 [0666] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 [0667] 1 5 10 15
 [0668] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0669] 20 25 30
 [0670] Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [0671] 35 40 45
 [0672] Gly Arg Ile Asn Pro Ile Leu Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 [0673] 50 55 60
 [0674] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0675] 65 70 75 80
 [0676] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0677] 85 90 95
 [0678] Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Ser Ile Trp Gly Gln
 [0679] 100 105 110
 [0680] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0681] 115 120
 [0682] <210> 52
 [0683] <211> 120
 [0684] <212> PRT
 [0685] <213> 人工序列
 [0686] <220>
 [0687] <223> 人工序列的描述:合成的多肽
 [0688] <400> 52
 [0689] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 [0690] 1 5 10 15
 [0691] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0692] 20 25 30
 [0693] Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [0694] 35 40 45
 [0695] Gly Arg Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 [0696] 50 55 60
 [0697] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0698] 65 70 75 80
 [0699] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0700] 85 90 95
 [0701] Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln

[0702]	100	105	110
[0703]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0704]	115	120	
[0705]	<210> 53		
[0706]	<211> 120		
[0707]	<212> PRT		
[0708]	<213> 人工序列		
[0709]	<220>		
[0710]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[0711]	<400> 53		
[0712]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
[0713]	1 5 10 15		
[0714]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Lys Phe Ser Ser Tyr		
[0715]	20 25 30		
[0716]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[0717]	35 40 45		
[0718]	Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe		
[0719]	50 55 60		
[0720]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0721]	65 70 75 80		
[0722]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0723]	85 90 95		
[0724]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Cys Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln		
[0725]	100 105 110		
[0726]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0727]	115 120		
[0728]	<210> 54		
[0729]	<211> 120		
[0730]	<212> PRT		
[0731]	<213> 人工序列		
[0732]	<220>		
[0733]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[0734]	<400> 54		
[0735]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
[0736]	1 5 10 15		
[0737]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0738]	20 25 30		
[0739]	Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[0740]	35 40 45		

[0741]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
[0742]	50 55 60
[0743]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0744]	65 70 75 80
[0745]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0746]	85 90 95
[0747]	Ala Arg Arg Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
[0748]	100 105 110
[0749]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0750]	115 120
[0751]	<210> 55
[0752]	<211> 120
[0753]	<212> PRT
[0754]	<213> 人工序列
[0755]	<220>
[0756]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0757]	<400> 55
[0758]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0759]	1 5 10 15
[0760]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0761]	20 25 30
[0762]	Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0763]	35 40 45
[0764]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ala Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
[0765]	50 55 60
[0766]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0767]	65 70 75 80
[0768]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0769]	85 90 95
[0770]	Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
[0771]	100 105 110
[0772]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0773]	115 120
[0774]	<210> 56
[0775]	<211> 120
[0776]	<212> PRT
[0777]	<213> 人工序列
[0778]	<220>
[0779]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽

[0780]	<400> 56																
[0781]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
[0782]	1				5					10					15		
[0783]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
[0784]				20					25					30			
[0785]	Ala	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
[0786]			35					40					45				
[0787]	Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Val	Ala	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
[0788]		50					55					60					
[0789]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
[0790]	65					70					75					80	
[0791]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[0792]					85					90					95		
[0793]	Ala	Arg	Arg	Lys	Gly	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	
[0794]				100					105					110			
[0795]	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
[0796]			115					120									
[0797]	<210> 57																
[0798]	<211> 120																
[0799]	<212> PRT																
[0800]	<213> 人工序列																
[0801]	<220>																
[0802]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽																
[0803]	<400> 57																
[0804]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
[0805]	1				5					10					15		
[0806]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
[0807]				20					25					30			
[0808]	Ala	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
[0809]			35					40					45				
[0810]	Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Lys	Ala	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
[0811]		50					55					60					
[0812]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
[0813]	65					70					75					80	
[0814]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[0815]					85					90					95		
[0816]	Ala	Arg	Arg	Lys	Gly	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	
[0817]				100					105					110			
[0818]	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									

[0819]	115	120
[0820]	<210> 58	
[0821]	<211> 120	
[0822]	<212> PRT	
[0823]	<213> 人工序列	
[0824]	<220>	
[0825]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽	
[0826]	<400> 58	
[0827]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[0828]	1	15
[0829]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Pro Phe Arg Ser His	
[0830]	20	30
[0831]	Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0832]	35	45
[0833]	Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe	
[0834]	50	60
[0835]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0836]	65	80
[0837]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0838]	85	95
[0839]	Ala Arg Leu Lys Ser Glu Leu Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln	
[0840]	100	110
[0841]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0842]	115	120
[0843]	<210> 59	
[0844]	<211> 107	
[0845]	<212> PRT	
[0846]	<213> 人工序列	
[0847]	<220>	
[0848]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽	
[0849]	<400> 59	
[0850]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0851]	1	15
[0852]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr	
[0853]	20	30
[0854]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[0855]	35	45
[0856]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0857]	50	60

[0858]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0859]	65 70 75 80
[0860]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
[0861]	85 90 95
[0862]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0863]	100 105
[0864]	<210> 60
[0865]	<211> 107
[0866]	<212> PRT
[0867]	<213> 人工序列
[0868]	<220>
[0869]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0870]	<400> 60
[0871]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0872]	1 5 10 15
[0873]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Ser Ser Tyr
[0874]	20 25 30
[0875]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0876]	35 40 45
[0877]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0878]	50 55 60
[0879]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0880]	65 70 75 80
[0881]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
[0882]	85 90 95
[0883]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0884]	100 105
[0885]	<210> 61
[0886]	<211> 107
[0887]	<212> PRT
[0888]	<213> 人工序列
[0889]	<220>
[0890]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0891]	<400> 61
[0892]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0893]	1 5 10 15
[0894]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gln Ile Ser Ser Tyr
[0895]	20 25 30
[0896]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0897]	35	40	45
[0898]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0899]	50	55	60
[0900]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0901]	65	70	75
[0902]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu		
[0903]	85	90	95
[0904]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0905]	100	105	
[0906]	<210> 62		
[0907]	<211> 107		
[0908]	<212> PRT		
[0909]	<213> 人工序列		
[0910]	<220>		
[0911]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[0912]	<400> 62		
[0913]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0914]	1	5	10
[0915]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr		
[0916]	20	25	30
[0917]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[0918]	35	40	45
[0919]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0920]	50	55	60
[0921]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0922]	65	70	75
[0923]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu		
[0924]	85	90	95
[0925]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0926]	100	105	
[0927]	<210> 63		
[0928]	<211> 107		
[0929]	<212> PRT		
[0930]	<213> 人工序列		
[0931]	<220>		
[0932]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[0933]	<400> 63		
[0934]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0935]	1	5	10

[0936]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
[0937]	20 25 30
[0938]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0939]	35 40 45
[0940]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0941]	50 55 60
[0942]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0943]	65 70 75 80
[0944]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Ile Leu
[0945]	85 90 95
[0946]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0947]	100 105
[0948]	<210> 64
[0949]	<211> 330
[0950]	<212> PRT
[0951]	<213> 人工序列
[0952]	<220>
[0953]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0954]	<400> 64
[0955]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
[0956]	1 5 10 15
[0957]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[0958]	20 25 30
[0959]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[0960]	35 40 45
[0961]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[0962]	50 55 60
[0963]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
[0964]	65 70 75 80
[0965]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[0966]	85 90 95
[0967]	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
[0968]	100 105 110
[0969]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
[0970]	115 120 125
[0971]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[0972]	130 135 140
[0973]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
[0974]	145 150 155 160

[0975]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
[0976]	165 170 175
[0977]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[0978]	180 185 190
[0979]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[0980]	195 200 205
[0981]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[0982]	210 215 220
[0983]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
[0984]	225 230 235 240
[0985]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0986]	245 250 255
[0987]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0988]	260 265 270
[0989]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0990]	275 280 285
[0991]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0992]	290 295 300
[0993]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0994]	305 310 315 320
[0995]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0996]	325 330
[0997]	<210> 65
[0998]	<400> 65
[0999]	000
[1000]	<210> 66
[1001]	<400> 66
[1002]	000
[1003]	<210> 67
[1004]	<400> 67
[1005]	000
[1006]	<210> 68
[1007]	<211> 327
[1008]	<212> PRT
[1009]	<213> 人工序列
[1010]	<220>
[1011]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[1012]	<400> 68
[1013]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

[1014]	1	5	10	15
[1015]	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
[1016]	20	25	30	
[1017]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
[1018]	35	40	45	
[1019]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
[1020]	50	55	60	
[1021]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr			
[1022]	65	70	75	80
[1023]	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
[1024]	85	90	95	
[1025]	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro			
[1026]	100	105	110	
[1027]	Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
[1028]	115	120	125	
[1029]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
[1030]	130	135	140	
[1031]	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
[1032]	145	150	155	160
[1033]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe			
[1034]	165	170	175	
[1035]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
[1036]	180	185	190	
[1037]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu			
[1038]	195	200	205	
[1039]	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
[1040]	210	215	220	
[1041]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys			
[1042]	225	230	235	240
[1043]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
[1044]	245	250	255	
[1045]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
[1046]	260	265	270	
[1047]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
[1048]	275	280	285	
[1049]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
[1050]	290	295	300	
[1051]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
[1052]	305	310	315	320

[1053]	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys										
[1054]						325											
[1055]	<210>	69															
[1056]	<211>	326															
[1057]	<212>	PRT															
[1058]	<213>	人工序列															
[1059]	<220>																
[1060]	<223>	人工序列的描述:合成的多肽															
[1061]	<400>	69															
[1062]	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	
[1063]	1				5					10					15		
[1064]	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
[1065]				20					25					30			
[1066]	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
[1067]			35					40					45				
[1068]	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
[1069]		50					55					60					
[1070]	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	
[1071]	65					70					75					80	
[1072]	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
[1073]				85						90					95		
[1074]	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
[1075]				100					105					110			
[1076]	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
[1077]			115					120					125				
[1078]	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
[1079]		130					135					140					
[1080]	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
[1081]	145					150					155					160	
[1082]	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
[1083]				165						170					175		
[1084]	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
[1085]			180						185					190			
[1086]	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	
[1087]			195					200					205				
[1088]	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
[1089]		210					215					220					
[1090]	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
[1091]	225					230					235					240	

[1092]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[1093]	245 250 255
[1094]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[1095]	260 265 270
[1096]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[1097]	275 280 285
[1098]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
[1099]	290 295 300
[1100]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[1101]	305 310 315 320
[1102]	Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[1103]	325
[1104]	<210> 70
[1105]	<211> 9
[1106]	<212> PRT
[1107]	<213> 人工序列
[1108]	<220>
[1109]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[1110]	<220>
[1111]	<221> MOD_RES
[1112]	<222> (4) .. (4)
[1113]	<223> Ser, Arg, Gly或者Asn
[1114]	<220>
[1115]	<221> MOD_RES
[1116]	<222> (5) .. (5)
[1117]	<223> Asp, Ser, Asn, Ala, Arg或者Gly
[1118]	<220>
[1119]	<221> MOD_RES
[1120]	<222> (8) .. (8)
[1121]	<223> Met或者Leu
[1122]	<220>
[1123]	<221> MOD_RES
[1124]	<222> (9) .. (9)
[1125]	<223> Ser, Leu或者Asn
[1126]	<400> 70
[1127]	Phe Thr Phe Xaa Xaa Tyr Ala Xaa Xaa
[1128]	1 5
[1129]	<210> 71
[1130]	<211> 13

[1131]	<212>	PRT		
[1132]	<213>	人工序列		
[1133]	<220>			
[1134]	<223>	人工序列的描述:合成的肽		
[1135]	<400>	71		
[1136]		Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala		
[1137]	1	5	10	
[1138]	<210>	72		
[1139]	<211>	15		
[1140]	<212>	PRT		
[1141]	<213>	人工序列		
[1142]	<220>			
[1143]	<223>	人工序列的描述:合成的肽		
[1144]	<220>			
[1145]	<221>	MOD_RES		
[1146]	<222>	(10) .. (10)		
[1147]	<223>	Ala, Tyr或者Arg		
[1148]	<400>	72		
[1149]		Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Xaa Thr Gly Asn Asp Tyr		
[1150]	1	5	10	15
[1151]	<210>	73		
[1152]	<211>	9		
[1153]	<212>	PRT		
[1154]	<213>	人工序列		
[1155]	<220>			
[1156]	<223>	人工序列的描述:合成的肽		
[1157]	<400>	73		
[1158]		Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Ser		
[1159]	1	5		
[1160]	<210>	74		
[1161]	<211>	15		
[1162]	<212>	PRT		
[1163]	<213>	人工序列		
[1164]	<220>			
[1165]	<223>	人工序列的描述:合成的肽		
[1166]	<400>	74		
[1167]		Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Ala Thr Gly Asn Asp Tyr		
[1168]	1	5	10	15
[1169]	<210>	75		

[1170]	<211>	15
[1171]	<212>	PRT
[1172]	<213>	人工序列
[1173]	<220>	
[1174]	<223>	人工序列的描述:合成的肽
[1175]	<400>	75
[1176]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Tyr Thr Gly Asn Asp Tyr	
[1177]	1	5 10 15
[1178]	<210>	76
[1179]	<211>	9
[1180]	<212>	PRT
[1181]	<213>	人工序列
[1182]	<220>	
[1183]	<223>	人工序列的描述:合成的肽
[1184]	<400>	76
[1185]	Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser	
[1186]	1	5
[1187]	<210>	77
[1188]	<211>	9
[1189]	<212>	PRT
[1190]	<213>	人工序列
[1191]	<220>	
[1192]	<223>	人工序列的描述:合成的肽
[1193]	<400>	77
[1194]	Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Leu	
[1195]	1	5
[1196]	<210>	78
[1197]	<211>	9
[1198]	<212>	PRT
[1199]	<213>	人工序列
[1200]	<220>	
[1201]	<223>	人工序列的描述:合成的肽
[1202]	<400>	78
[1203]	Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Leu Ser	
[1204]	1	5
[1205]	<210>	79
[1206]	<211>	9
[1207]	<212>	PRT
[1208]	<213>	人工序列

[1209] <220>
[1210] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[1211] <400> 79
[1212] Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Ala Met Asn
[1213] 1 5
[1214] <210> 80
[1215] <211> 9
[1216] <212> PRT
[1217] <213> 人工序列
[1218] <220>
[1219] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[1220] <400> 80
[1221] Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Ala Met Ser
[1222] 1 5
[1223] <210> 81
[1224] <211> 9
[1225] <212> PRT
[1226] <213> 人工序列
[1227] <220>
[1228] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[1229] <400> 81
[1230] Phe Thr Phe Gly Arg Tyr Ala Met Ser
[1231] 1 5
[1232] <210> 82
[1233] <211> 9
[1234] <212> PRT
[1235] <213> 人工序列
[1236] <220>
[1237] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[1238] <400> 82
[1239] Phe Thr Phe Asn Ser Tyr Ala Met Ser
[1240] 1 5
[1241] <210> 83
[1242] <211> 9
[1243] <212> PRT
[1244] <213> 人工序列
[1245] <220>
[1246] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[1247] <400> 83

[1248]	Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser
[1249]	1 5
[1250]	<210> 84
[1251]	<211> 9
[1252]	<212> PRT
[1253]	<213> 人工序列
[1254]	<220>
[1255]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[1256]	<400> 84
[1257]	Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Met Ser
[1258]	1 5
[1259]	<210> 85
[1260]	<211> 15
[1261]	<212> PRT
[1262]	<213> 人工序列
[1263]	<220>
[1264]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[1265]	<400> 85
[1266]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Arg Thr Gly Asn Asp Tyr
[1267]	1 5 10 15
[1268]	<210> 86
[1269]	<211> 9
[1270]	<212> PRT
[1271]	<213> 人工序列
[1272]	<220>
[1273]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[1274]	<400> 86
[1275]	Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Asn
[1276]	1 5
[1277]	<210> 87
[1278]	<211> 122
[1279]	<212> PRT
[1280]	<213> 人工序列
[1281]	<220>
[1282]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[1283]	<400> 87
[1284]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1285]	1 5 10 15
[1286]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

[1287]	20	25	30
[1288]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1289]	35	40	45
[1290]	Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[1291]	50	55	60
[1292]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1293]	65	70	75
[1294]	80		
[1294]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1295]	85	90	95
[1296]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Ala Thr Gly Asn Asp Tyr Trp		
[1297]	100	105	110
[1298]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1299]	115	120	
[1300]	<210> 88		
[1301]	<211> 122		
[1302]	<212> PRT		
[1303]	<213> 人工序列		
[1304]	<220>		
[1305]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[1306]	<400> 88		
[1307]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1308]	1	5	10
[1309]	15		
[1309]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr		
[1310]	20	25	30
[1311]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1312]	35	40	45
[1313]	Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[1314]	50	55	60
[1315]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1316]	65	70	75
[1317]	80		
[1317]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1318]	85	90	95
[1319]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Tyr Thr Gly Asn Asp Tyr Trp		
[1320]	100	105	110
[1321]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1322]	115	120	
[1323]	<210> 89		
[1324]	<211> 122		
[1325]	<212> PRT		

[1326]	<213> 人工序列															
[1327]	<220>															
[1328]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽															
[1329]	<400> 89															
[1330]	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[1331]	1			5					10					15		
[1332]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
[1333]				20					25					30		
[1334]	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[1335]				35					40					45		
[1336]	Ser	Ala	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[1337]				50					55					60		
[1338]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[1339]	65					70					75					80
[1340]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[1341]						85					90					95
[1342]	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ile	Val	Gly	Tyr	Thr	Gly	Asn	Asp	Tyr	Trp
[1343]						100					105					110
[1344]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
[1345]						115					120					
[1346]	<210> 90															
[1347]	<211> 122															
[1348]	<212> PRT															
[1349]	<213> 人工序列															
[1350]	<220>															
[1351]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽															
[1352]	<400> 90															
[1353]	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[1354]	1			5						10					15	
[1355]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
[1356]				20						25					30	
[1357]	Ala	Met	Leu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[1358]				35						40					45	
[1359]	Ser	Ala	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[1360]				50						55					60	
[1361]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[1362]	65					70						75				80
[1363]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[1364]						85						90				95

[1365]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Tyr Thr Gly Asn Asp Tyr Trp
[1366]	100 105 110
[1367]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1368]	115 120
[1369]	<210> 91
[1370]	<211> 122
[1371]	<212> PRT
[1372]	<213> 人工序列
[1373]	<220>
[1374]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[1375]	<400> 91
[1376]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1377]	1 5 10 15
[1378]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
[1379]	20 25 30
[1380]	Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1381]	35 40 45
[1382]	Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1383]	50 55 60
[1384]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1385]	65 70 75 80
[1386]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1387]	85 90 95
[1388]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Tyr Thr Gly Asn Asp Tyr Trp
[1389]	100 105 110
[1390]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1391]	115 120
[1392]	<210> 92
[1393]	<211> 122
[1394]	<212> PRT
[1395]	<213> 人工序列
[1396]	<220>
[1397]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[1398]	<400> 92
[1399]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1400]	1 5 10 15
[1401]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
[1402]	20 25 30
[1403]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[1404]	35	40	45
[1405]	Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[1406]	50	55	60
[1407]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1408]	65	70	75
[1409]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1410]	85	90	95
[1411]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Tyr Thr Gly Asn Asp Tyr Trp		
[1412]	100	105	110
[1413]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1414]	115	120	
[1415]	<210> 93		
[1416]	<211> 122		
[1417]	<212> PRT		
[1418]	<213> 人工序列		
[1419]	<220>		
[1420]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[1421]	<400> 93		
[1422]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1423]	1	5	10
[1424]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr		
[1425]	20	25	30
[1426]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1427]	35	40	45
[1428]	Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[1429]	50	55	60
[1430]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1431]	65	70	75
[1432]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1433]	85	90	95
[1434]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Tyr Thr Gly Asn Asp Tyr Trp		
[1435]	100	105	110
[1436]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1437]	115	120	
[1438]	<210> 94		
[1439]	<211> 122		
[1440]	<212> PRT		
[1441]	<213> 人工序列		
[1442]	<220>		

[1443]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽															
[1444]	<400> 94															
[1445]	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[1446]	1			5					10					15		
[1447]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Gly	Arg	Tyr
[1448]				20					25					30		
[1449]	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[1450]			35					40					45			
[1451]	Ser	Ala	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[1452]		50					55					60				
[1453]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[1454]	65					70					75				80	
[1455]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[1456]				85					90					95		
[1457]	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ile	Val	Gly	Tyr	Thr	Gly	Asn	Asp	Tyr	Trp
[1458]				100					105					110		
[1459]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
[1460]				115					120							
[1461]	<210> 95															
[1462]	<211> 122															
[1463]	<212> PRT															
[1464]	<213> 人工序列															
[1465]	<220>															
[1466]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽															
[1467]	<400> 95															
[1468]	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[1469]	1			5					10					15		
[1470]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Ser	Tyr
[1471]				20					25					30		
[1472]	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[1473]			35					40					45			
[1474]	Ser	Ala	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[1475]		50					55					60				
[1476]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[1477]	65					70					75				80	
[1478]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[1479]				85					90					95		
[1480]	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ile	Val	Gly	Tyr	Thr	Gly	Asn	Asp	Tyr	Trp
[1481]				100					105					110		

[1482]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1483]	115 120
[1484]	<210> 96
[1485]	<211> 122
[1486]	<212> PRT
[1487]	<213> 人工序列
[1488]	<220>
[1489]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[1490]	<400> 96
[1491]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1492]	1 5 10 15
[1493]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
[1494]	20 25 30
[1495]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1496]	35 40 45
[1497]	Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1498]	50 55 60
[1499]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1500]	65 70 75 80
[1501]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1502]	85 90 95
[1503]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Ala Thr Gly Asn Asp Tyr Trp
[1504]	100 105 110
[1505]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1506]	115 120
[1507]	<210> 97
[1508]	<211> 122
[1509]	<212> PRT
[1510]	<213> 人工序列
[1511]	<220>
[1512]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[1513]	<400> 97
[1514]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1515]	1 5 10 15
[1516]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
[1517]	20 25 30
[1518]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1519]	35 40 45
[1520]	Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[1521]	50	55	60
[1522]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1523]	65	70	75
[1524]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
[1525]	85	90	95
[1526]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Arg Thr Gly Asn Asp Tyr Trp		
[1527]	100	105	110
[1528]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1529]	115	120	
[1530]	<210> 98		
[1531]	<211> 122		
[1532]	<212> PRT		
[1533]	<213> 人工序列		
[1534]	<220>		
[1535]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[1536]	<400> 98		
[1537]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1538]	1	5	10
[1539]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		15
[1540]	20	25	30
[1541]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1542]	35	40	45
[1543]	Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[1544]	50	55	60
[1545]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1546]	65	70	75
[1547]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
[1548]	85	90	95
[1549]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Arg Thr Gly Asn Asp Tyr Trp		
[1550]	100	105	110
[1551]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1552]	115	120	
[1553]	<210> 99		
[1554]	<211> 122		
[1555]	<212> PRT		
[1556]	<213> 人工序列		
[1557]	<220>		
[1558]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[1559]	<400> 99		

[1560]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1561]	1 5 10 15
[1562]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
[1563]	20 25 30
[1564]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1565]	35 40 45
[1566]	Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1567]	50 55 60
[1568]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1569]	65 70 75 80
[1570]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1571]	85 90 95
[1572]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Arg Thr Gly Asn Asp Tyr Trp
[1573]	100 105 110
[1574]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1575]	115 120
[1576]	<210> 100
[1577]	<211> 698
[1578]	<212> PRT
[1579]	<213> 人工序列
[1580]	<220>
[1581]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[1582]	<400> 100
[1583]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1584]	1 5 10 15
[1585]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1586]	20 25 30
[1587]	Ala Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1588]	35 40 45
[1589]	Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1590]	50 55 60
[1591]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1592]	65 70 75 80
[1593]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1594]	85 90 95
[1595]	Ala Arg Gly Leu Asp Phe Ile Val Gly Tyr Thr Gly Asn Asp Tyr Trp
[1596]	100 105 110
[1597]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[1598]	115 120 125

[1599]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[1600]	130 135 140
[1601]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[1602]	145 150 155 160
[1603]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[1604]	165 170 175
[1605]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[1606]	180 185 190
[1607]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[1608]	195 200 205
[1609]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
[1610]	210 215 220
[1611]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
[1612]	225 230 235 240
[1613]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[1614]	245 250 255
[1615]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[1616]	260 265 270
[1617]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[1618]	275 280 285
[1619]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr
[1620]	290 295 300
[1621]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[1622]	305 310 315 320
[1623]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
[1624]	325 330 335
[1625]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1626]	340 345 350
[1627]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
[1628]	355 360 365
[1629]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1630]	370 375 380
[1631]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1632]	385 390 395 400
[1633]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[1634]	405 410 415
[1635]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[1636]	420 425 430
[1637]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

[1638]	435	440	445
[1639]	Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly		
[1640]	450	455	460
[1641]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu		
[1642]	465	470	475 480
[1643]	Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly		
[1644]	485	490	495
[1645]	Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly		
[1646]	500	505	510
[1647]	Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ala Ala		
[1648]	515	520	525
[1649]	Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu		
[1650]	530	535	540
[1651]	Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp		
[1652]	545	550	555 560
[1653]	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Lys Gly Glu Leu Lys Asp Ala		
[1654]	565	570	575
[1655]	Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
[1656]	580	585	590
[1657]	Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
[1658]	595	600	605
[1659]	Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
[1660]	610	615	620
[1661]	Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
[1662]	625	630	635 640
[1663]	His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
[1664]	645	650	655
[1665]	Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
[1666]	660	665	670
[1667]	Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
[1668]	675	680	685
[1669]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
[1670]	690	695	
[1671]	<210> 101		
[1672]	<211> 214		
[1673]	<212> PRT		
[1674]	<213> 人工序列		
[1675]	<220>		
[1676]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		

[1677]	<400> 101
[1678]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1679]	1 5 10 15
[1680]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
[1681]	20 25 30
[1682]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[1683]	35 40 45
[1684]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1685]	50 55 60
[1686]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1687]	65 70 75 80
[1688]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
[1689]	85 90 95
[1690]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[1691]	100 105 110
[1692]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[1693]	115 120 125
[1694]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[1695]	130 135 140
[1696]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[1697]	145 150 155 160
[1698]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[1699]	165 170 175
[1700]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[1701]	180 185 190
[1702]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[1703]	195 200 205
[1704]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1705]	210
[1706]	<210> 102
[1707]	<211> 687
[1708]	<212> PRT
[1709]	<213> 人工序列
[1710]	<220>
[1711]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[1712]	<400> 102
[1713]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1714]	1 5 10 15
[1715]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

[1755]	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro
[1756]				340					345					350		
[1757]	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile
[1758]			355					360					365			
[1759]	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly
[1760]		370					375					380				
[1761]	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asn	Thr	Asn
[1762]	385					390				395						400
[1763]	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp
[1764]				405					410						415	
[1765]	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His
[1766]			420					425					430			
[1767]	Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly
[1768]		435					440					445				
[1769]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
[1770]	450					455					460					
[1771]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
[1772]	465					470				475						480
[1773]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
[1774]				485					490						495	
[1775]	Ala	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[1776]			500					505					510			
[1777]	Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Leu	Gly	Ala	Ala	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
[1778]			515				520					525				
[1779]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
[1780]	530					535				540						
[1781]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[1782]	545					550				555						560
[1783]	Ala	Arg	Leu	Lys	Gly	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln
[1784]				565				570					575			
[1785]	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val
[1786]			580					585					590			
[1787]	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr
[1788]			595				600					605				
[1789]	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr
[1790]	610					615				620						
[1791]	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
[1792]	625					630				635						640
[1793]	Leu	Glu	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser

[1794]	645								650				655				
[1795]	Ser	Pro	Arg	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	
[1796]	660								665				670				
[1797]	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly		
[1798]	675								680				685				
[1799]	<210> 103																
[1800]	<211> 214																
[1801]	<212> PRT																
[1802]	<213> 人工序列																
[1803]	<220>																
[1804]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽																
[1805]	<400> 103																
[1806]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
[1807]	1	5				10				15							
[1808]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	
[1809]	20								25				30				
[1810]	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
[1811]	35								40				45				
[1812]	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
[1813]	50								55				60				
[1814]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
[1815]	65	70								75				80			
[1816]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Leu	
[1817]	85								90				95				
[1818]	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	
[1819]	100								105				110				
[1820]	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	
[1821]	115								120				125				
[1822]	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile	
[1823]	130								135				140				
[1824]	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val	Leu	
[1825]	145	150								155				160			
[1826]	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Met	Ser	
[1827]	165								170				175				
[1828]	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	His	Asn	Ser	Tyr	
[1829]	180								185				190				
[1830]	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Val	Lys	Ser	
[1831]	195								200				205				
[1832]	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys											

[1833]	210	
[1834]	<210>	104
[1835]	<211>	472
[1836]	<212>	PRT
[1837]	<213>	人工序列
[1838]	<220>	
[1839]	<223>	人工序列的描述:合成的多肽
[1840]	<400>	104
[1841]	Gly Thr Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro	
[1842]	1	5 10 15
[1843]	Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	
[1844]	20	25 30
[1845]	Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu	
[1846]	35	40 45
[1847]	Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu	
[1848]	50	55 60
[1849]	Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr	
[1850]	65	70 75 80
[1851]	Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr	
[1852]	85	90 95
[1853]	Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp	
[1854]	100	105 110
[1855]	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro	
[1856]	115	120 125
[1857]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr	
[1858]	130	135 140
[1859]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr	
[1860]	145	150 155 160
[1861]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro	
[1862]	165	170 175
[1863]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr	
[1864]	180	185 190
[1865]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn	
[1866]	195	200 205
[1867]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser	
[1868]	210	215 220
[1869]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	
[1870]	225	230 235 240
[1871]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	

[1872]		245		250		255
[1873]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser					
[1874]		260		265		270
[1875]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu					
[1876]		275		280		285
[1877]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr					
[1878]		290		295		300
[1879]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn					
[1880]	305		310		315	320
[1881]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro					
[1882]		325		330		335
[1883]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln					
[1884]		340		345		350
[1885]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val					
[1886]		355		360		365
[1887]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val					
[1888]		370		375		380
[1889]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro					
[1890]	385		390		395	400
[1891]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr					
[1892]		405		410		415
[1893]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val					
[1894]		420		425		430
[1895]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu					
[1896]		435		440		445
[1897]	Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly					
[1898]		450		455		460
[1899]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser					
[1900]	465		470			
[1901]	<210> 105					
[1902]	<211> 222					
[1903]	<212> PRT					
[1904]	<213> 人工序列					
[1905]	<220>					
[1906]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽					
[1907]	<400> 105					
[1908]	Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser					
[1909]	1		5		10	15
[1910]	Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser					

[1911]		20		25		30													
[1912]	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln			
[1913]			35					40					45						
[1914]	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	Val			
[1915]		50					55					60							
[1916]	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr			
[1917]	65					70					75					80			
[1918]	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His			
[1919]				85					90					95					
[1920]	Ser	Arg	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile			
[1921]				100				105					110						
[1922]	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp			
[1923]			115					120				125							
[1924]	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn			
[1925]		130					135				140								
[1926]	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu			
[1927]	145					150				155						160			
[1928]	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp			
[1929]				165					170				175						
[1930]	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr			
[1931]				180					185				190						
[1932]	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser			
[1933]			195					200				205							
[1934]	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Leu	Glu					
[1935]		210						215				220							
[1936]	<210>	106																	
[1937]	<211>	250																	
[1938]	<212>	PRT																	
[1939]	<213>	人工序列																	
[1940]	<220>																		
[1941]	<223>	人工序列的描述:合成的多肽																	
[1942]	<400>	106																	
[1943]	Gly	Thr	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro			
[1944]	1			5					10				15						
[1945]	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser			
[1946]			20					25				30							
[1947]	Asp	Ser	Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu			
[1948]			35					40				45							
[1949]	Trp	Val	Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp			

[1950]	50	55	60
[1951]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr		
[1952]	65	70	75
[1953]	Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
[1954]	85	90	95
[1955]	Tyr Cys Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
[1956]	100	105	110
[1957]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
[1958]	115	120	125
[1959]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
[1960]	130	135	140
[1961]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
[1962]	145	150	155
[1963]	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
[1964]	165	170	175
[1965]	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
[1966]	180	185	190
[1967]	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
[1968]	195	200	205
[1969]	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
[1970]	210	215	220
[1971]	Lys Thr His Thr Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
[1972]	225	230	235
[1973]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
[1974]	245	250	
[1975]	<210> 107		
[1976]	<211> 218		
[1977]	<212> PRT		
[1978]	<213> 人工序列		
[1979]	<220>		
[1980]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[1981]	<400> 107		
[1982]	Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser		
[1983]	1	5	10
[1984]	Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser		
[1985]	20	25	30
[1986]	Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
[1987]	35	40	45
[1988]	Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe		

[1989]	50	55	60
[1990]	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu		
[1991]	65	70	75
[1992]	Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His		
[1993]	85	90	95
[1994]	Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val		
[1995]	100	105	110
[1996]	Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys		
[1997]	115	120	125
[1998]	Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
[1999]	130	135	140
[2000]	Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
[2001]	145	150	155
[2002]	Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
[2003]	165	170	175
[2004]	Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
[2005]	180	185	190
[2006]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
[2007]	195	200	205
[2008]	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Leu Glu		
[2009]	210	215	
[2010]	<210> 108		
[2011]	<211> 465		
[2012]	<212> PRT		
[2013]	<213> 人工序列		
[2014]	<220>		
[2015]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[2016]	<400> 108		
[2017]	Gly Thr Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro		
[2018]	1	5	10
[2019]	Gly Arg Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser		
[2020]	20	25	30
[2021]	Asn Ser Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
[2022]	35	40	45
[2023]	Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp		
[2024]	50	55	60
[2025]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr		
[2026]	65	70	75
[2027]	Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		

[2028]					85					90					95			
[2029]	Tyr	Cys	Ala	Thr	Asn	Asp	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr		
[2030]					100					105					110			
[2031]	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro		
[2032]					115					120					125			
[2033]	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val		
[2034]					130					135					140			
[2035]	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala		
[2036]					145					150					155			160
[2037]	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly		
[2038]					165					170					175			
[2039]	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly		
[2040]					180					185					190			
[2041]	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys		
[2042]					195					200					205			
[2043]	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys		
[2044]					210					215					220			
[2045]	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu		
[2046]					225					230					235			240
[2047]	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu		
[2048]					245					250					255			
[2049]	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys		
[2050]					260					265					270			
[2051]	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys		
[2052]					275					280					285			
[2053]	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu		
[2054]					290					295					300			
[2055]	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys		
[2056]					305					310					315			320
[2057]	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys		
[2058]					325					330					335			
[2059]	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser		
[2060]					340					345					350			
[2061]	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys		
[2062]					355					360					365			
[2063]	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln		
[2064]					370					375					380			
[2065]	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly		
[2066]					385					390					395			400

[2067]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
[2068]	405 410 415
[2069]	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
[2070]	420 425 430
[2071]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly
[2072]	435 440 445
[2073]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[2074]	450 455 460
[2075]	Ser
[2076]	465
[2077]	<210> 109
[2078]	<211> 218
[2079]	<212> PRT
[2080]	<213> 人工序列
[2081]	<220>
[2082]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[2083]	<400> 109
[2084]	Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser
[2085]	1 5 10 15
[2086]	Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
[2087]	20 25 30
[2088]	Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
[2089]	35 40 45
[2090]	Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe
[2091]	50 55 60
[2092]	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
[2093]	65 70 75 80
[2094]	Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp
[2095]	85 90 95
[2096]	Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
[2097]	100 105 110
[2098]	Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
[2099]	115 120 125
[2100]	Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
[2101]	130 135 140
[2102]	Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
[2103]	145 150 155 160
[2104]	Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
[2105]	165 170 175

[2106]	Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
[2107]	180 185 190
[2108]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
[2109]	195 200 205
[2110]	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Leu Glu
[2111]	210 215
[2112]	<210> 110
[2113]	<211> 472
[2114]	<212> PRT
[2115]	<213> 人工序列
[2116]	<220>
[2117]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[2118]	<400> 110
[2119]	Gly Thr Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro
[2120]	1 5 10 15
[2121]	Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Thr Phe Thr
[2122]	20 25 30
[2123]	Thr Tyr Pro Ile Glu Trp Met Lys Gln Asn His Gly Lys Ser Leu Glu
[2124]	35 40 45
[2125]	Trp Ile Gly Asn Phe His Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Glu
[2126]	50 55 60
[2127]	Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Val Glu Lys Ser Ser Thr Thr
[2128]	65 70 75 80
[2129]	Val Tyr Leu Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr
[2130]	85 90 95
[2131]	Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Gly Ser His Gly Gly Phe Val Tyr Trp
[2132]	100 105 110
[2133]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[2134]	115 120 125
[2135]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[2136]	130 135 140
[2137]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[2138]	145 150 155 160
[2139]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[2140]	165 170 175
[2141]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[2142]	180 185 190
[2143]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[2144]	195 200 205

[2145]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
[2146]	210 215 220
[2147]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
[2148]	225 230 235 240
[2149]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[2150]	245 250 255
[2151]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[2152]	260 265 270
[2153]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[2154]	275 280 285
[2155]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr
[2156]	290 295 300
[2157]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[2158]	305 310 315 320
[2159]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
[2160]	325 330 335
[2161]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[2162]	340 345 350
[2163]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
[2164]	355 360 365
[2165]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[2166]	370 375 380
[2167]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[2168]	385 390 395 400
[2169]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[2170]	405 410 415
[2171]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[2172]	420 425 430
[2173]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[2174]	435 440 445
[2175]	Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[2176]	450 455 460
[2177]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[2178]	465 470
[2179]	<210> 111
[2180]	<211> 219
[2181]	<212> PRT
[2182]	<213> 人工序列
[2183]	<220>

[2184]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽															
[2185]	<400> 111															
[2186]	Thr	Gly	Glu	Asn	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser
[2187]	1				5					10					15	
[2188]	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ile
[2189]					20					25					30	
[2190]	Ser	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Ala	Ser	Pro	Lys
[2191]					35					40					45	
[2192]	Leu	Trp	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg
[2193]					50					55					60	
[2194]	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser
[2195]	65									70					75	80
[2196]	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Gly
[2197]																
[2198]	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr
[2199]																
[2200]	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu
[2201]																
[2202]	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro
[2203]																
[2204]	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly
[2205]	145															
[2206]	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
[2207]																
[2208]	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His
[2209]																
[2210]	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
[2211]																
[2212]	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Leu	Glu					
[2213]																
[2214]	<210> 112															
[2215]	<211> 470															
[2216]	<212> PRT															
[2217]	<213> 人工序列															
[2218]	<220>															
[2219]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽															
[2220]	<400> 112															
[2221]	Gly	Thr	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro
[2222]	1					5									10	15

[2223]	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
[2224]				20				25					30			
[2225]	Asp	Ser	Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
[2226]			35					40					45			
[2227]	Trp	Val	Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp
[2228]		50					55					60				
[2229]	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr
[2230]	65					70					75					80
[2231]	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
[2232]					85					90					95	
[2233]	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	His	Trp	Pro	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
[2234]				100					105					110		
[2235]	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
[2236]				115					120				125			
[2237]	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
[2238]		130						135				140				
[2239]	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
[2240]	145					150					155					160
[2241]	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
[2242]					165					170					175	
[2243]	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
[2244]				180					185					190		
[2245]	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
[2246]			195					200					205			
[2247]	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
[2248]		210						215					220			
[2249]	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
[2250]	225					230					235					240
[2251]	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
[2252]					245					250					255	
[2253]	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
[2254]				260					265					270		
[2255]	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
[2256]			275					280					285			
[2257]	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg
[2258]		290						295					300			
[2259]	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
[2260]	305					310					315					320
[2261]	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu

[2262]					325					330					335	
[2263]	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
[2264]					340					345					350	
[2265]	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
[2266]					355					360					365	
[2267]	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
[2268]					370					375					380	
[2269]	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
[2270]	385					390					395					400
[2271]	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
[2272]					405					410						415
[2273]	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
[2274]					420					425					430	
[2275]	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
[2276]					435					440					445	
[2277]	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
[2278]					450					455					460	
[2279]	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser										
[2280]	465					470										
[2281]	<210> 113															
[2282]	<211> 245															
[2283]	<212> PRT															
[2284]	<213> 人工序列															
[2285]	<220>															
[2286]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽															
[2287]	<400> 113															
[2288]	Gly	Thr	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro
[2289]	1				5					10					15	
[2290]	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Asp	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Ser
[2291]					20					25					30	
[2292]	Asn	Ser	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
[2293]					35					40					45	
[2294]	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Asp
[2295]					50					55					60	
[2296]	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr
[2297]	65					70					75					80
[2298]	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
[2299]					85					90					95	
[2300]	Tyr	Cys	Ala	Thr	Asn	Asp	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr

[2301]	100							105							110							
[2302]	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro						
[2303]	115							120							125							
[2304]	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val						
[2305]	130							135							140							
[2306]	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala						
[2307]	145							150							155							
[2308]	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly						
[2309]	165							170							175							
[2310]	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly						
[2311]	180							185							190							
[2312]	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys						
[2313]	195							200							205							
[2314]	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Leu						
[2315]	210							215							220							
[2316]	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser						
[2317]	225							230							235							
[2318]	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser																	
[2319]	245																					
[2320]	<210>	114																				
[2321]	<211>	288																				
[2322]	<212>	PRT																				
[2323]	<213>	人(Homo sapiens)																				
[2324]	<400>	114																				
[2325]	Met	Gln	Ile	Pro	Gln	Ala	Pro	Trp	Pro	Val	Val	Trp	Ala	Val	Leu	Gln						
[2326]	1	5							10							15						
[2327]	Leu	Gly	Trp	Arg	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Trp						
[2328]	20							25							30							
[2329]	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Gly	Asp						
[2330]	35							40							45							
[2331]	Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	Val						
[2332]	50							55							60							
[2333]	Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala						
[2334]	65							70							75							
[2335]	Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg						
[2336]	85							90							95							
[2337]	Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg						
[2338]	100							105							110							
[2339]	Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu						

[2340]	115	120	125
[2341]	Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val		
[2342]	130	135	140
[2343]	Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro		
[2344]	145	150	155
[2345]	Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly		
[2346]	165	170	175
[2347]	Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys		
[2348]	180	185	190
[2349]	Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro		
[2350]	195	200	205
[2351]	Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly		
[2352]	210	215	220
[2353]	Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro		
[2354]	225	230	235
[2355]	Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly		
[2356]	245	250	255
[2357]	Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg		
[2358]	260	265	270
[2359]	Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu		
[2360]	275	280	285
[2361]	<210> 115		
[2362]	<211> 290		
[2363]	<212> PRT		
[2364]	<213> 人(Homo sapiens)		
[2365]	<400> 115		
[2366]	Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu		
[2367]	1	5	10
[2368]	Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr		
[2369]	20	25	30
[2370]	Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu		
[2371]	35	40	45
[2372]	Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile		
[2373]	50	55	60
[2374]	Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser		
[2375]	65	70	75
[2376]	Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn		
[2377]	85	90	95
[2378]	Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr		

[2379]	100							105							110							
[2380]	Arg	Cys	Met	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Val						
[2381]	115							120							125							
[2382]	Lys	Val	Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val						
[2383]	130							135							140							
[2384]	Asp	Pro	Val	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr						
[2385]	145							150							155							
[2386]	Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser						
[2387]	165							170							175							
[2388]	Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn						
[2389]	180							185							190							
[2390]	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr						
[2391]	195							200							205							
[2392]	Cys	Thr	Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu						
[2393]	210							215							220							
[2394]	Val	Ile	Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg	Thr	His						
[2395]	225							230							235							
[2396]	Leu	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	Ile	Leu	Leu	Cys	Leu	Gly	Val	Ala	Leu	Thr						
[2397]	245							250							255							
[2398]	Phe	Ile	Phe	Arg	Leu	Arg	Lys	Gly	Arg	Met	Met	Asp	Val	Lys	Lys	Cys						
[2399]	260							265							270							
[2400]	Gly	Ile	Gln	Asp	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp	Thr	His	Leu	Glu						
[2401]	275							280							285							
[2402]	Glu	Thr																				
[2403]	290																					
[2404]	<210>	116																				
[2405]	<211>	273																				
[2406]	<212>	PRT																				
[2407]	<213>	人(Homo sapiens)																				
[2408]	<400>	116																				
[2409]	Met	Ile	Phe	Leu	Leu	Leu	Met	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Gln	Leu	His	Gln						
[2410]	1	5							10							15						
[2411]	Ile	Ala	Ala	Leu	Phe	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Glu	Leu	Tyr	Ile	Ile						
[2412]	20							25							30							
[2413]	Glu	His	Gly	Ser	Asn	Val	Thr	Leu	Glu	Cys	Asn	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser						
[2414]	35							40							45							
[2415]	His	Val	Asn	Leu	Gly	Ala	Ile	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Val	Glu	Asn						
[2416]	50							55							60							
[2417]	Asp	Thr	Ser	Pro	His	Arg	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu						

[2418]	65	70	75	80
[2419]	Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp			
[2420]		85	90	95
[2421]	Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr			
[2422]		100	105	110
[2423]	Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr			
[2424]		115	120	125
[2425]	His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln			
[2426]		130	135	140
[2427]	Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val			
[2428]	145	150	155	160
[2429]	Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val			
[2430]		165	170	175
[2431]	Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys			
[2432]		180	185	190
[2433]	Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp			
[2434]		195	200	205
[2435]	Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His			
[2436]		210	215	220
[2437]	Ile Phe Ile Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val			
[2438]	225	230	235	240
[2439]	Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp			
[2440]		245	250	255
[2441]	Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala			
[2442]		260	265	270
[2443]	Ile			
[2444]	<210> 117			
[2445]	<211> 8			
[2446]	<212> PRT			
[2447]	<213> 人工序列			
[2448]	<220>			
[2449]	<223> 人工序列的描述:合成的肽			
[2450]	<400> 117			
[2451]	Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys			
[2452]	1	5		
[2453]	<210> 118			
[2454]	<211> 6			
[2455]	<212> PRT			
[2456]	<213> 人工序列			

[2457]	<220>
[2458]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[2459]	6xHis标签
[2460]	<400> 118
[2461]	His His His His His His
[2462]	1 5
[2463]	<210> 119
[2464]	<211> 9
[2465]	<212> PRT
[2466]	<213> 人工序列
[2467]	<220>
[2468]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[2469]	<400> 119
[2470]	Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
[2471]	1 5
[2472]	<210> 120
[2473]	<211> 4
[2474]	<212> PRT
[2475]	<213> 人工序列
[2476]	<220>
[2477]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[2478]	<400> 120
[2479]	Gly Gly Gly Ser
[2480]	1
[2481]	<210> 121
[2482]	<211> 30
[2483]	<212> PRT
[2484]	<213> 人工序列
[2485]	<220>
[2486]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[2487]	<220>
[2488]	<221> MISC_FEATURE
[2489]	<222> (1) .. (30)
[2490]	<223> 该序列可涵盖1-6 "Gly Gly Gly Gly Ser" 重复单元
[2491]	<400> 121
[2492]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[2493]	1 5 10 15
[2494]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[2495]	20 25 30

[2496]	<210>	122									
[2497]	<211>	5									
[2498]	<212>	PRT									
[2499]	<213>	未知									
[2500]	<220>										
[2501]	<223>	未知的描述:合成的肽									
[2502]	<400>	122									
[2503]	Gly	Thr	Lys	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ala	Iso	Ser	
[2504]	1				5					10	

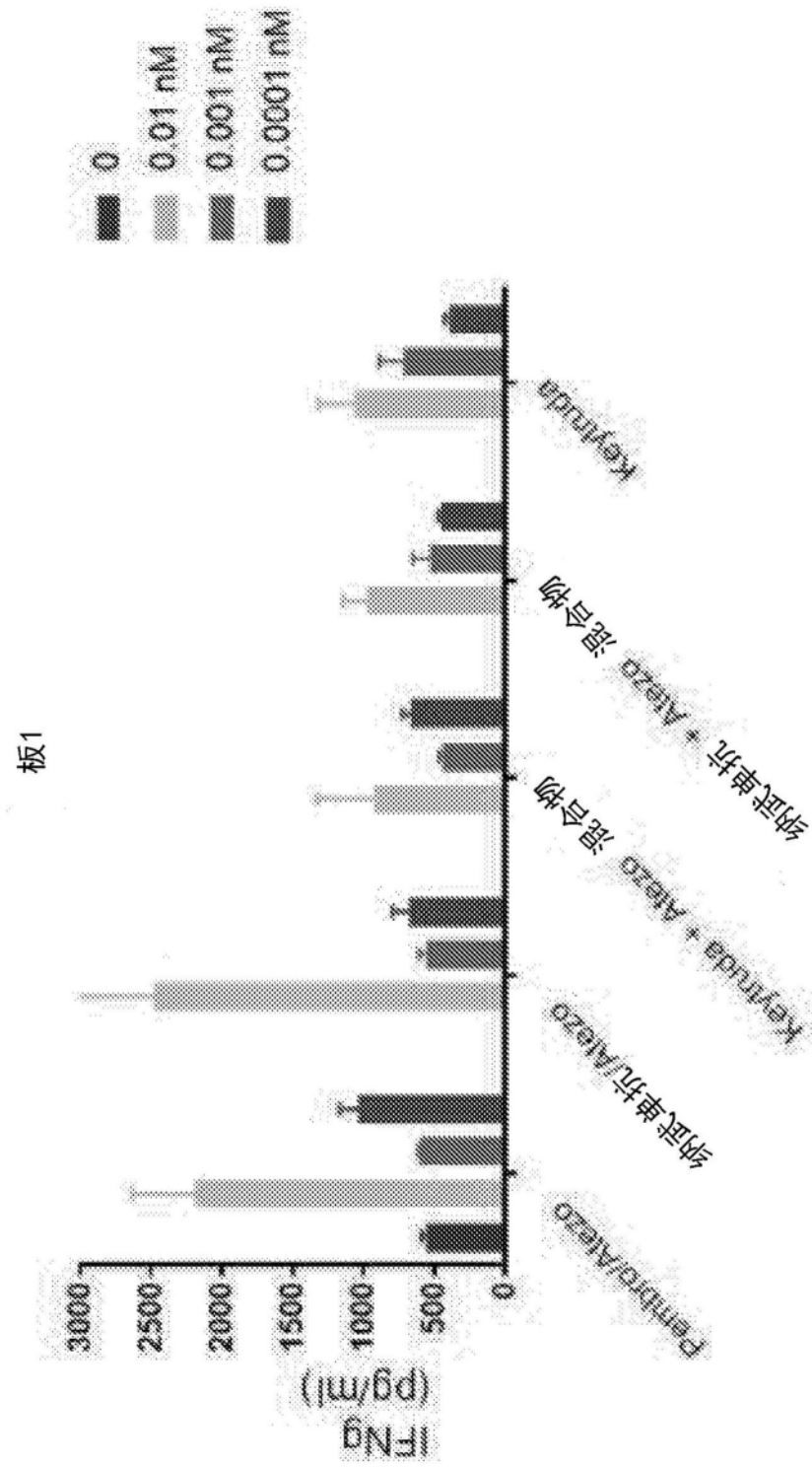


图1

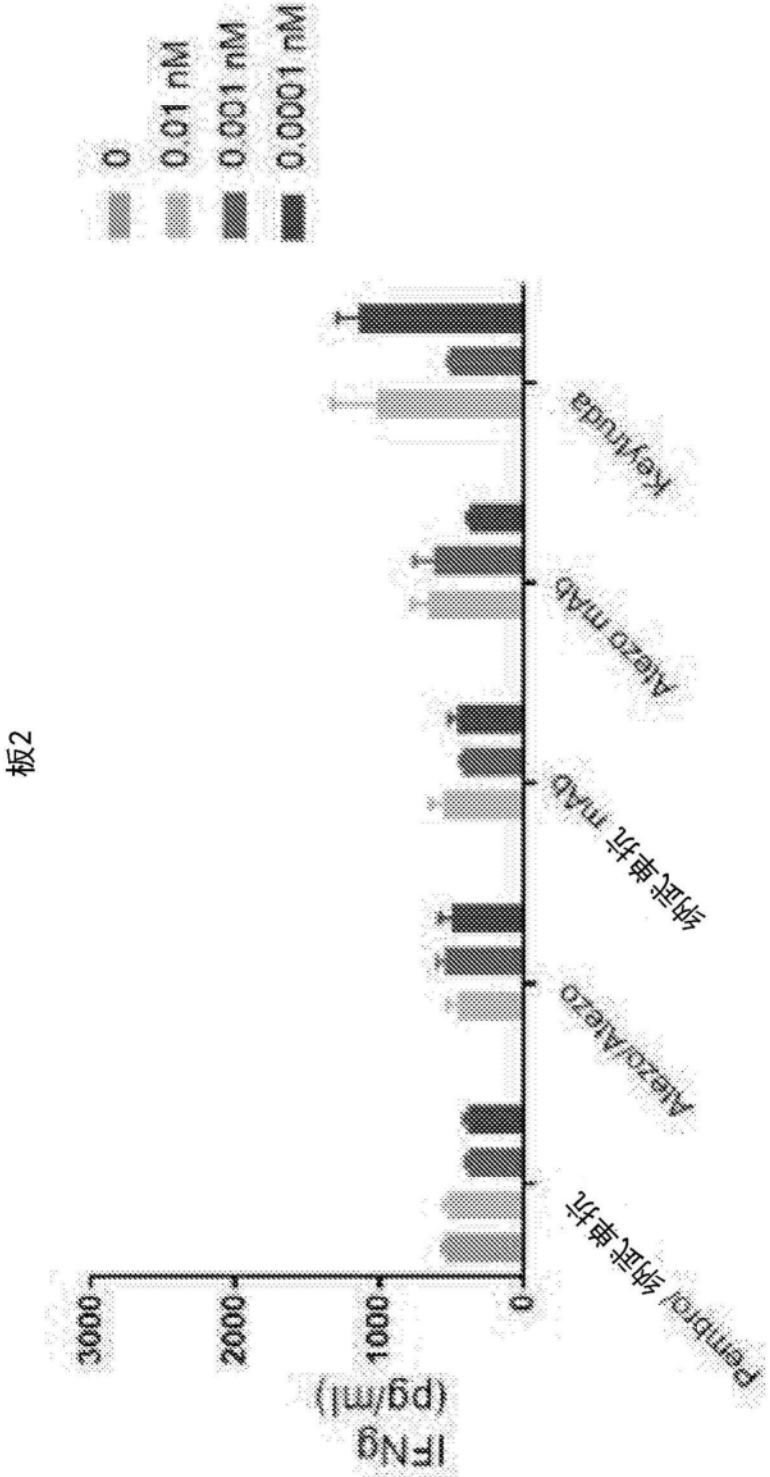
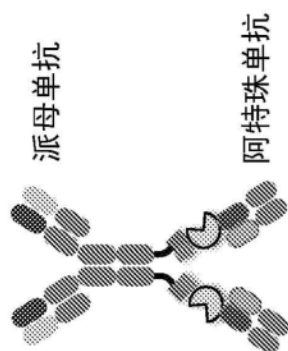


图2



派母单抗_ aglyco-IgG1- (G4S)₄

— H链

GTQVQLVQSGLVEKKPGASVK/SCKASGYTFTNYYMYW/RQAPGQGLEWMGINPSNGGTFNEKFKNRVTLTDDSSSTTTAYMELKSLQFDDDTAVYYCA
RRRDYRFDMGFYWGQGITVTSASSATGPS/VFLPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPPEPTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVITVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSDKTHTCPCPAPELLGGPSVDLPKPQDYLMSIRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVENVHNAKTKEREEQYAST
YRVRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEK/TISKAKGQPREPQVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPKGKGGCGSGGGGGGGGGGG

— 鏈

TGEIVLTQSPA TLSSLPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLA SYLESGVPARFSGSGGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLP LPTFG
 GGTKEIKRTVAAPSFIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFNRGECL

阿特珠单抗_HC Fab-(G4S)₄

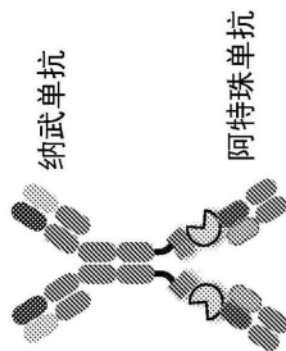
H链

[illegible]

— L链

TKSFNRGECLE
TTGDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLYHPATFGQGT
KVKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV

图3



• 纳武单抗_aglyco-IgG1-(G4S)₄

- H链

GTQVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAT
NDDYWGGQGTILVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPKGGGGGGGGGGGGGGG

- L链

TGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGGGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGECLE

• 阿特珠单抗_HC Fab-(G4S)₄

- H链

GTEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARR
HWPGGFDYWGGQGTILVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTLEGGGGGGGGGGGGGGG

- L链

TGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYASAFLYSGVPFRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVLYHPATFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGECLE

图4

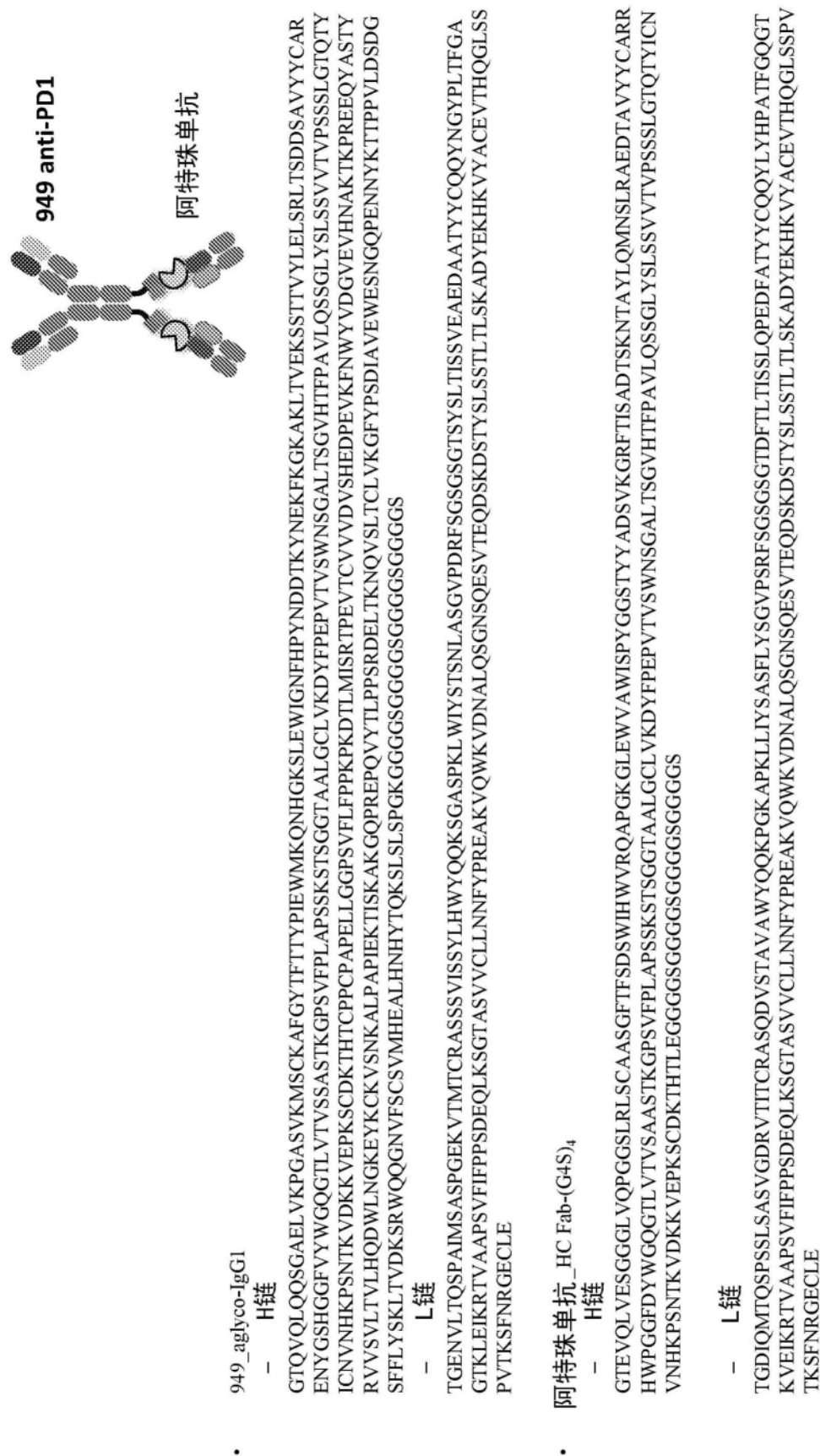


图5

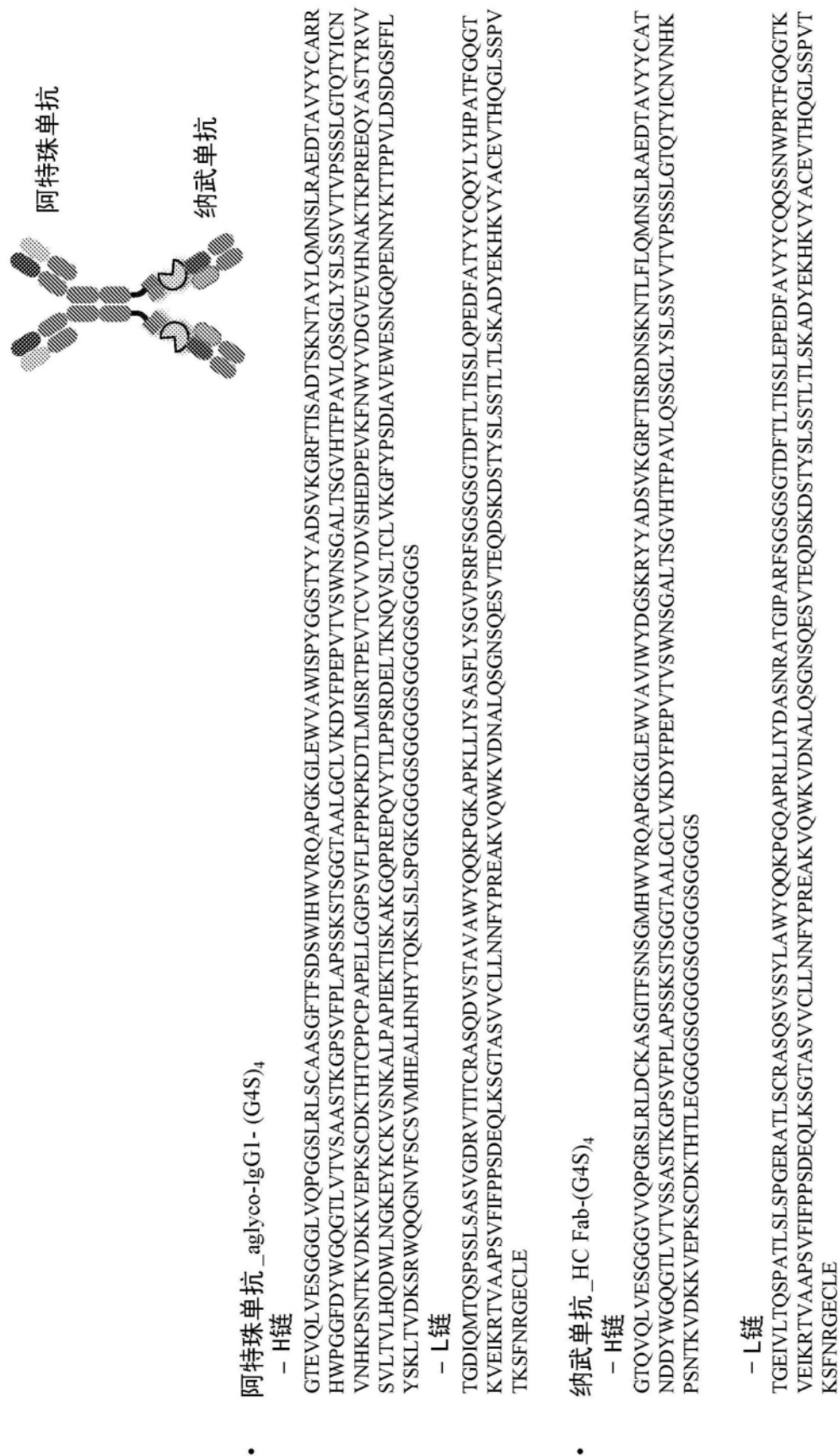


图6

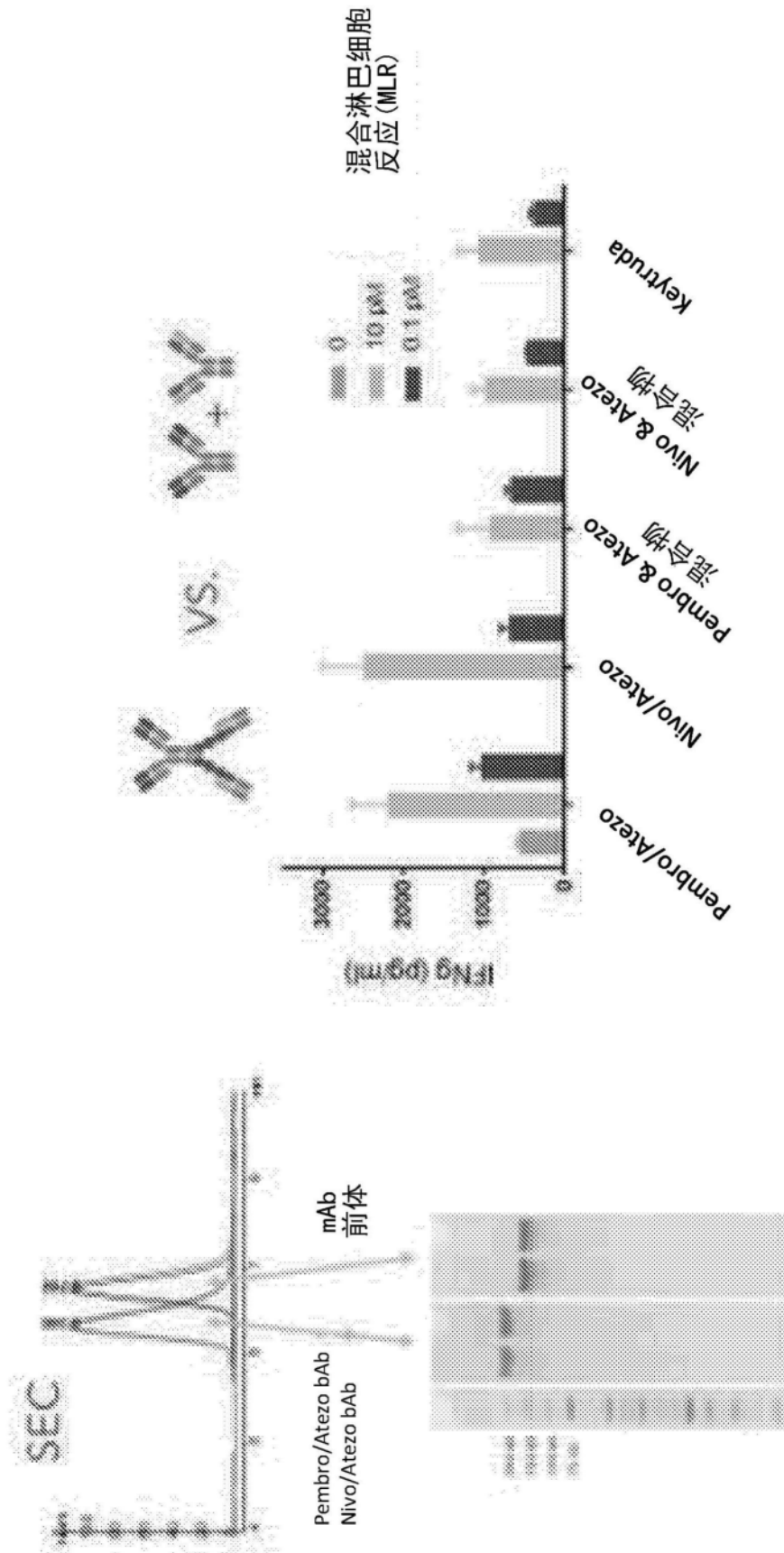


图7

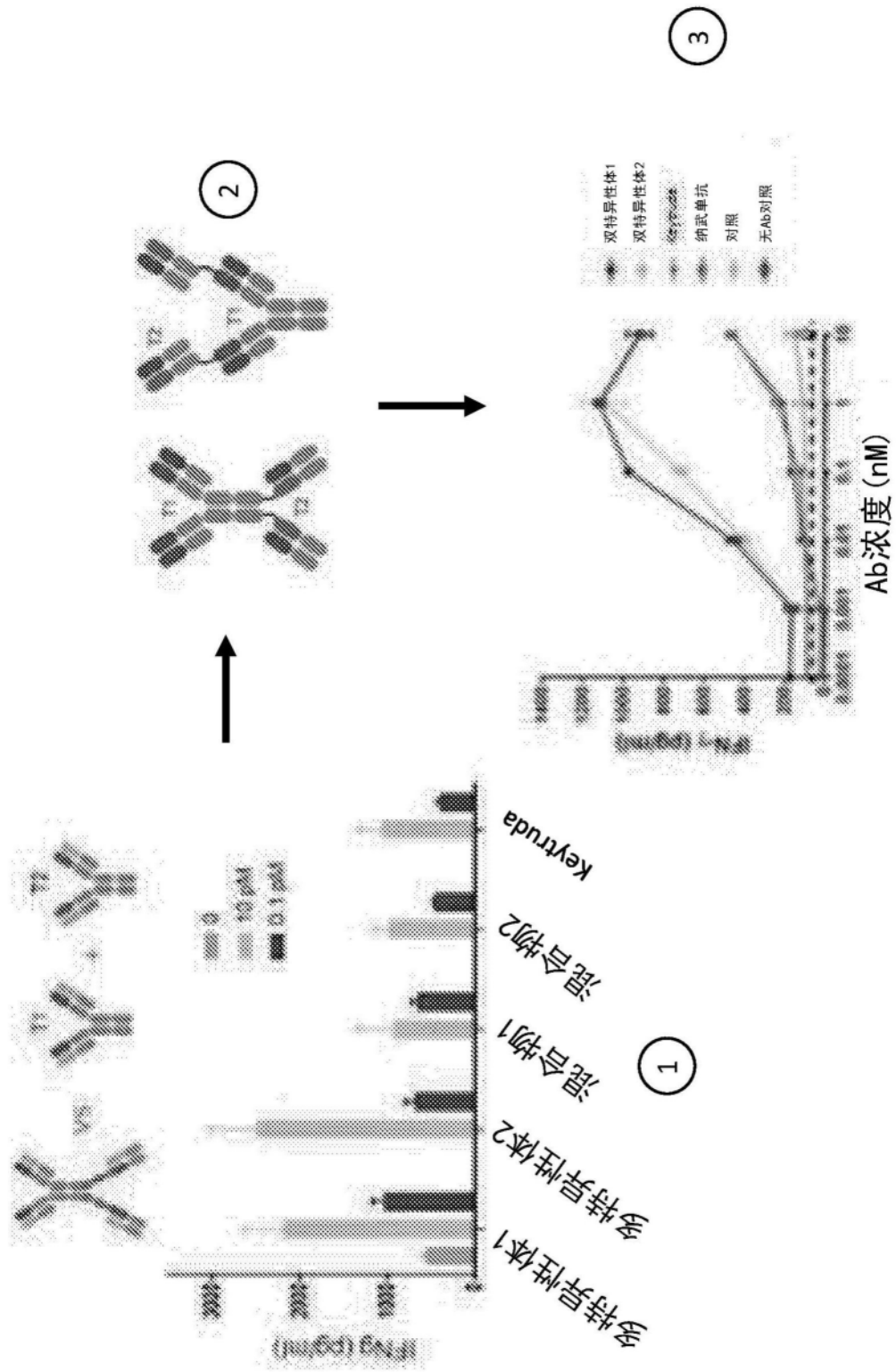


图8

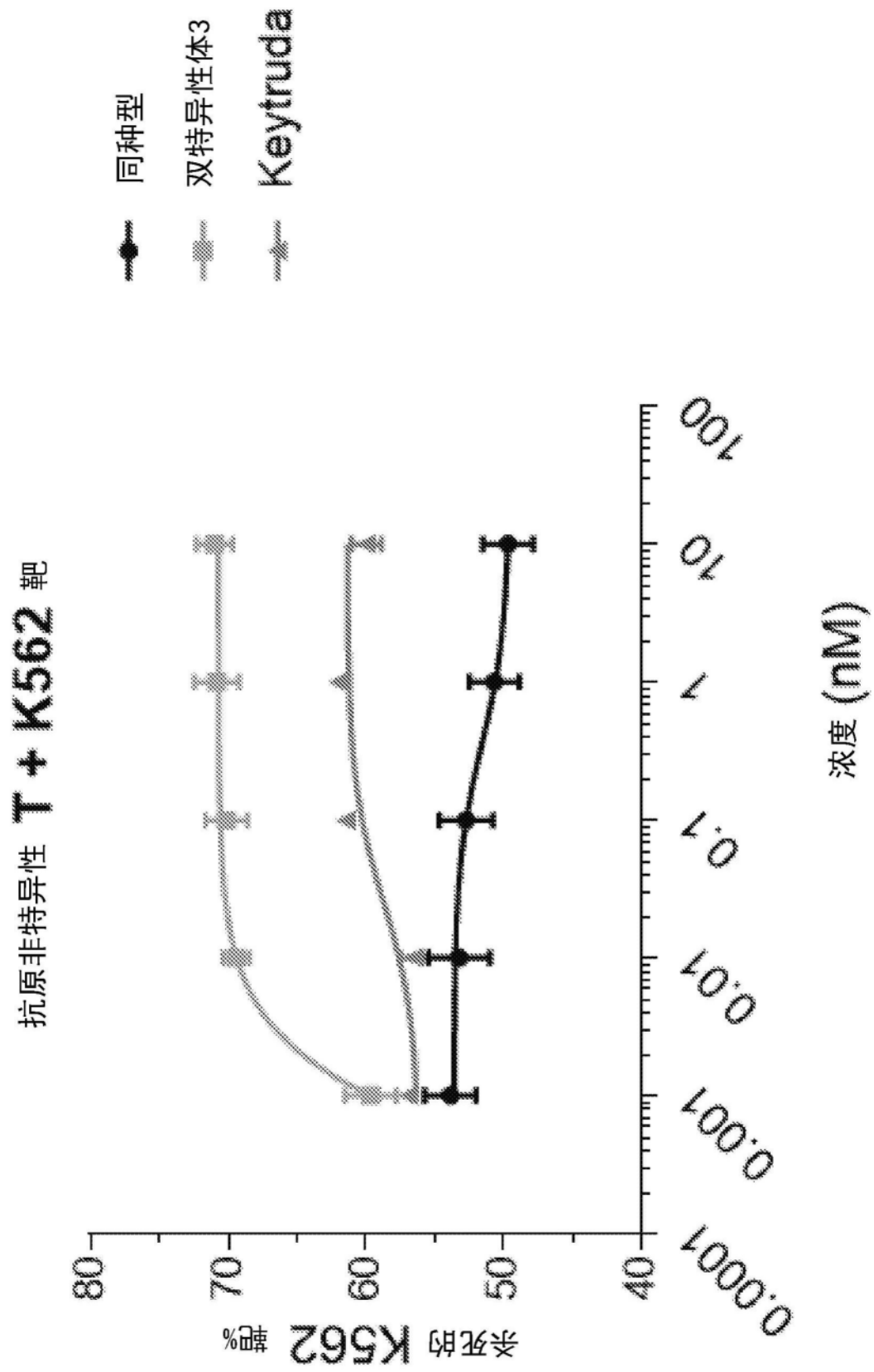


图9A

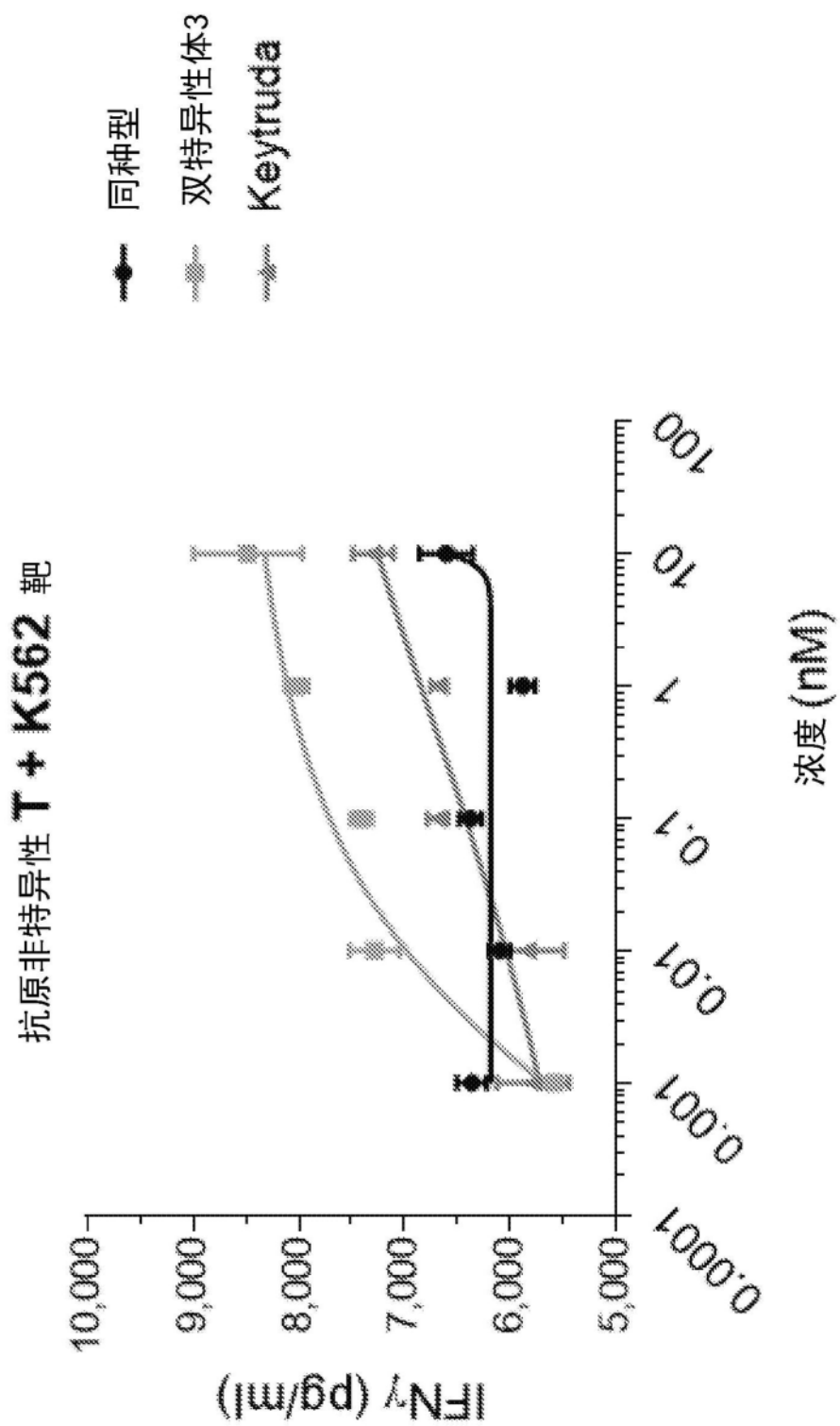


图9B

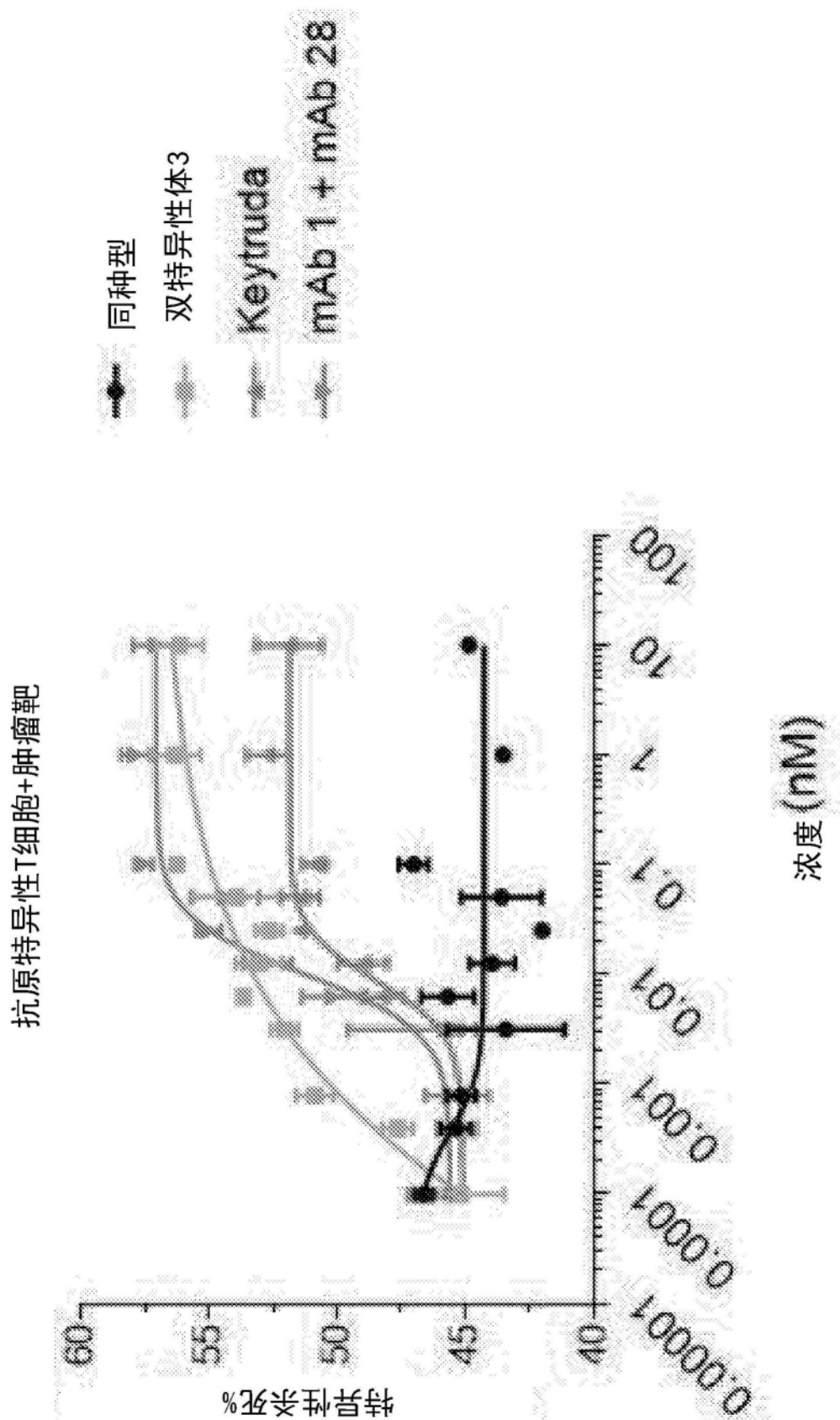


图10A

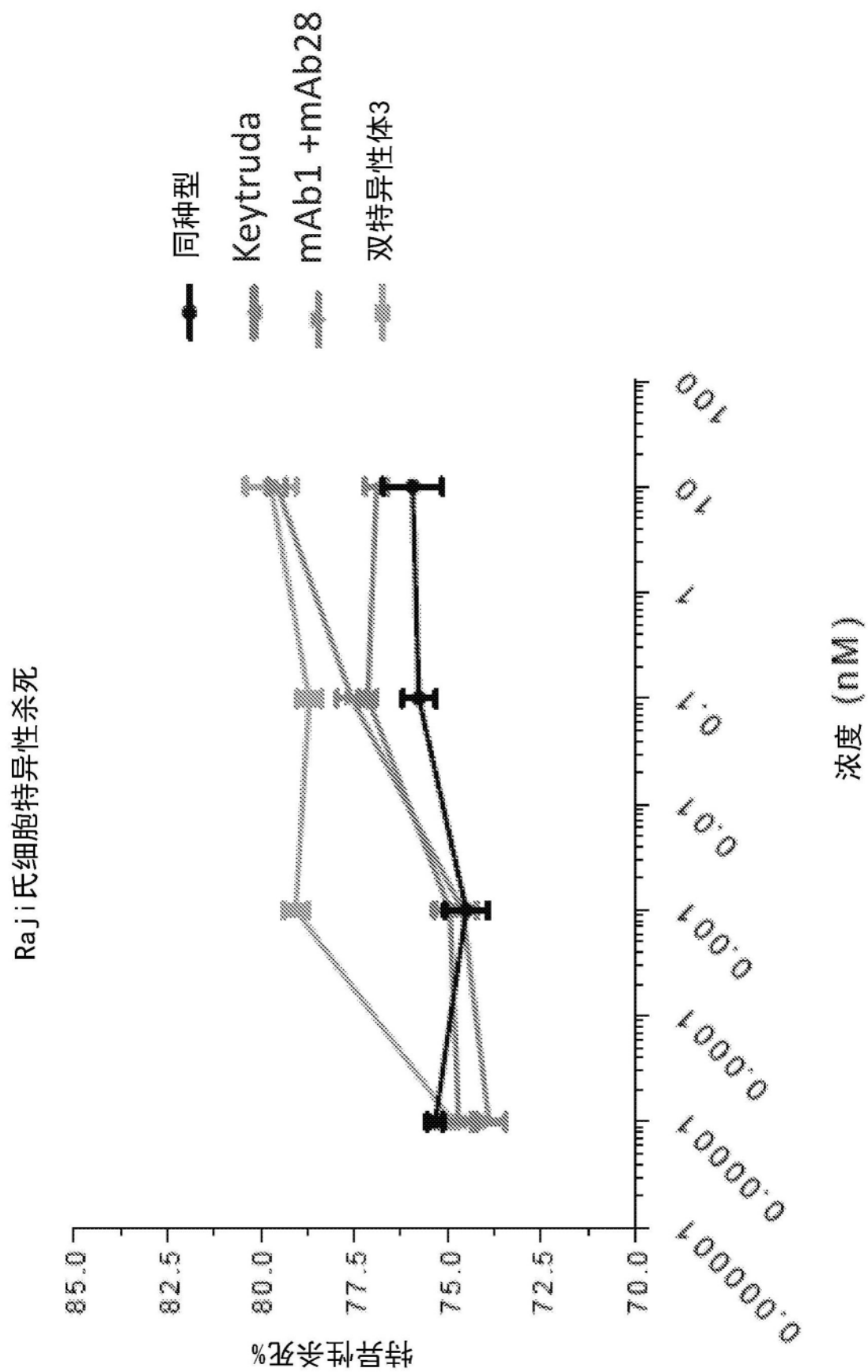


图10B

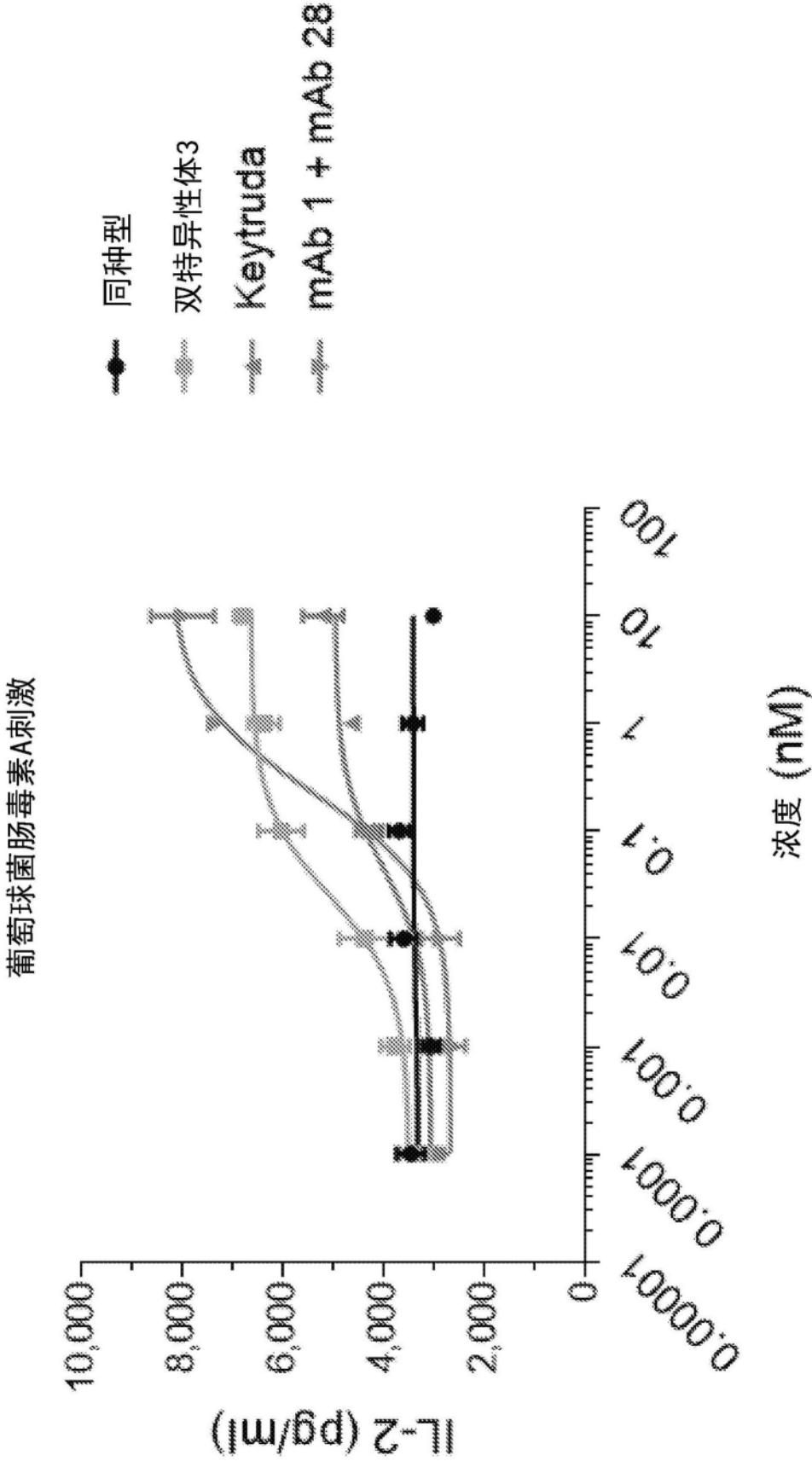


图11

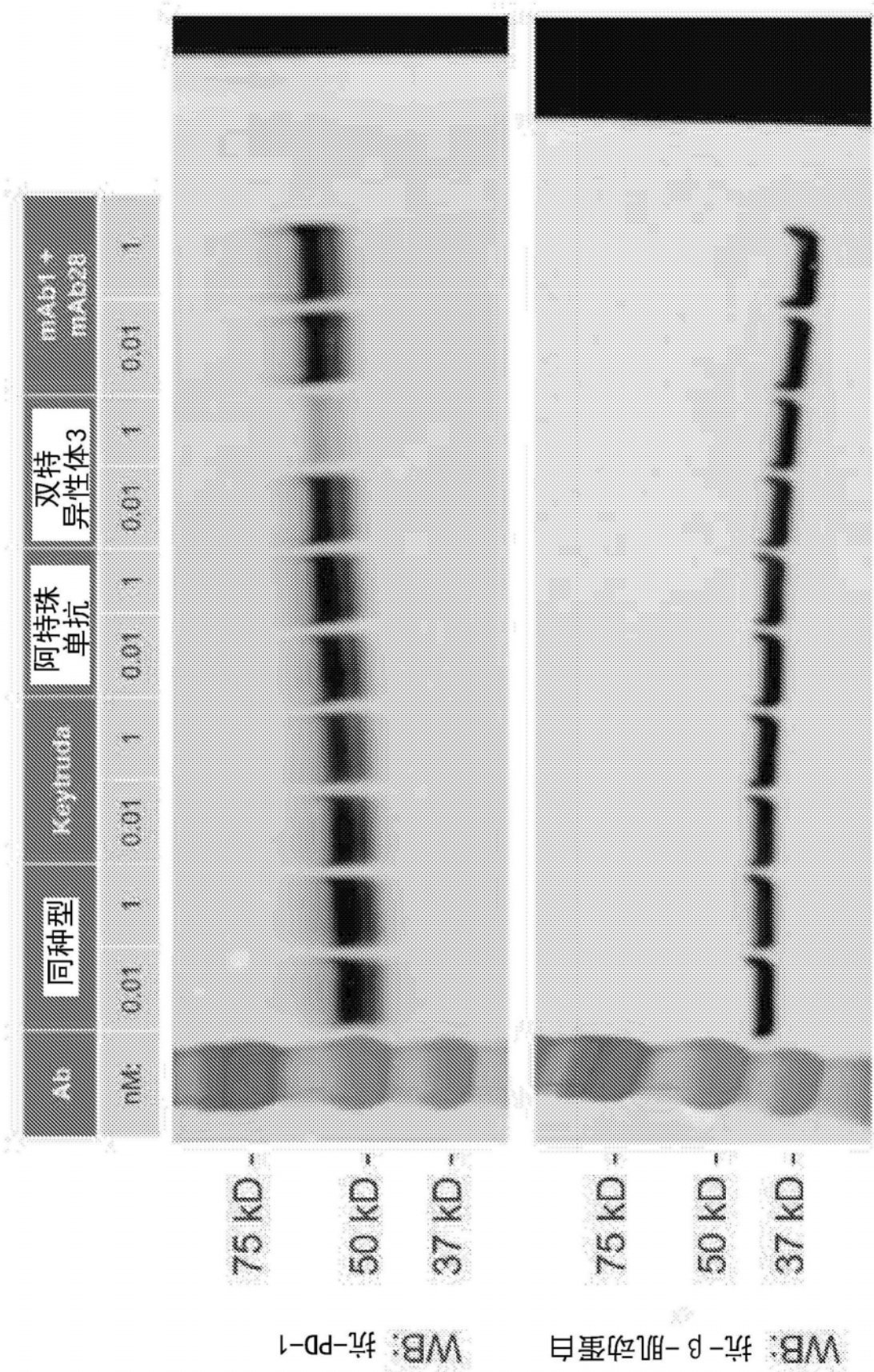


图12A

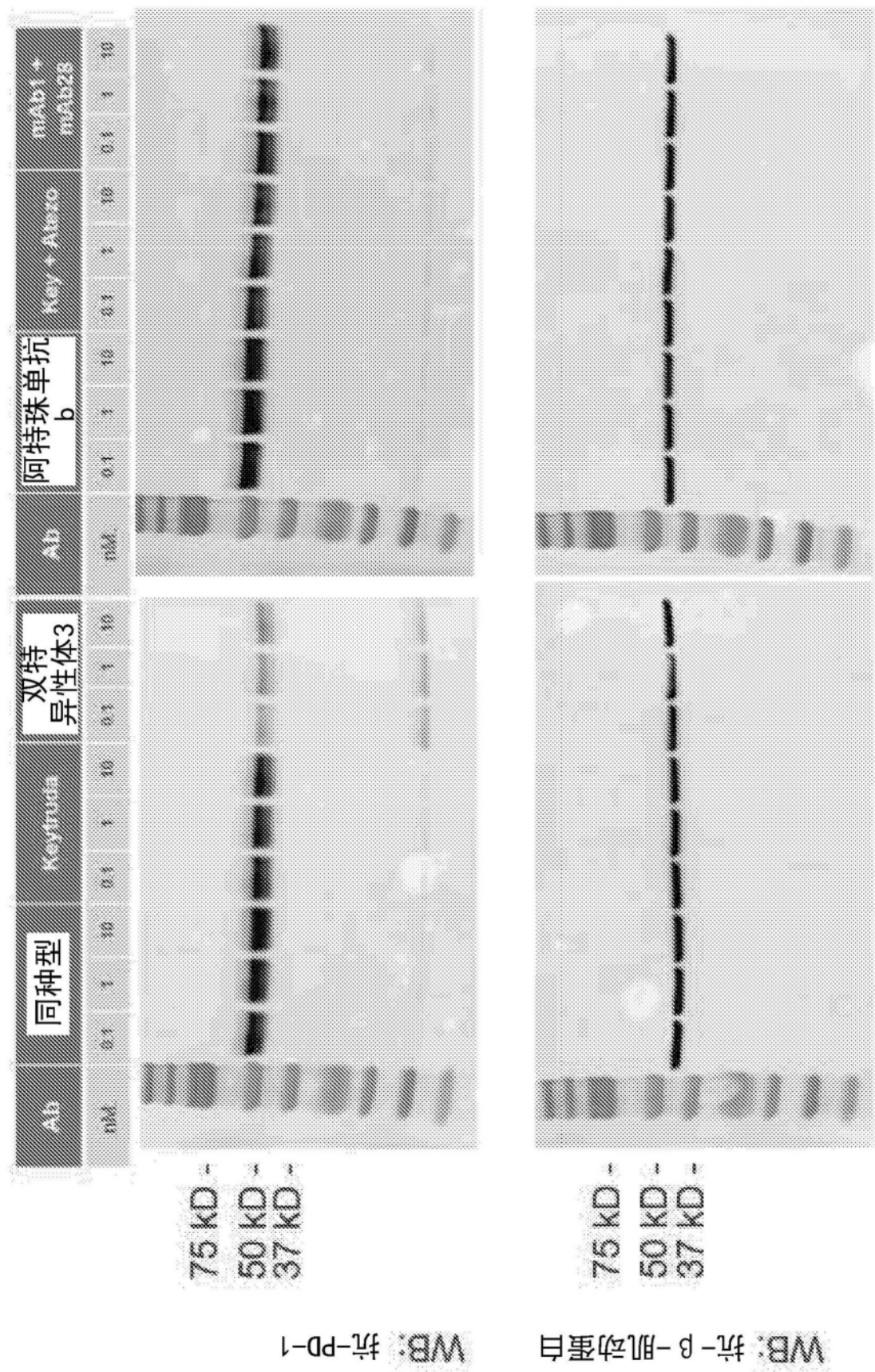


图12B

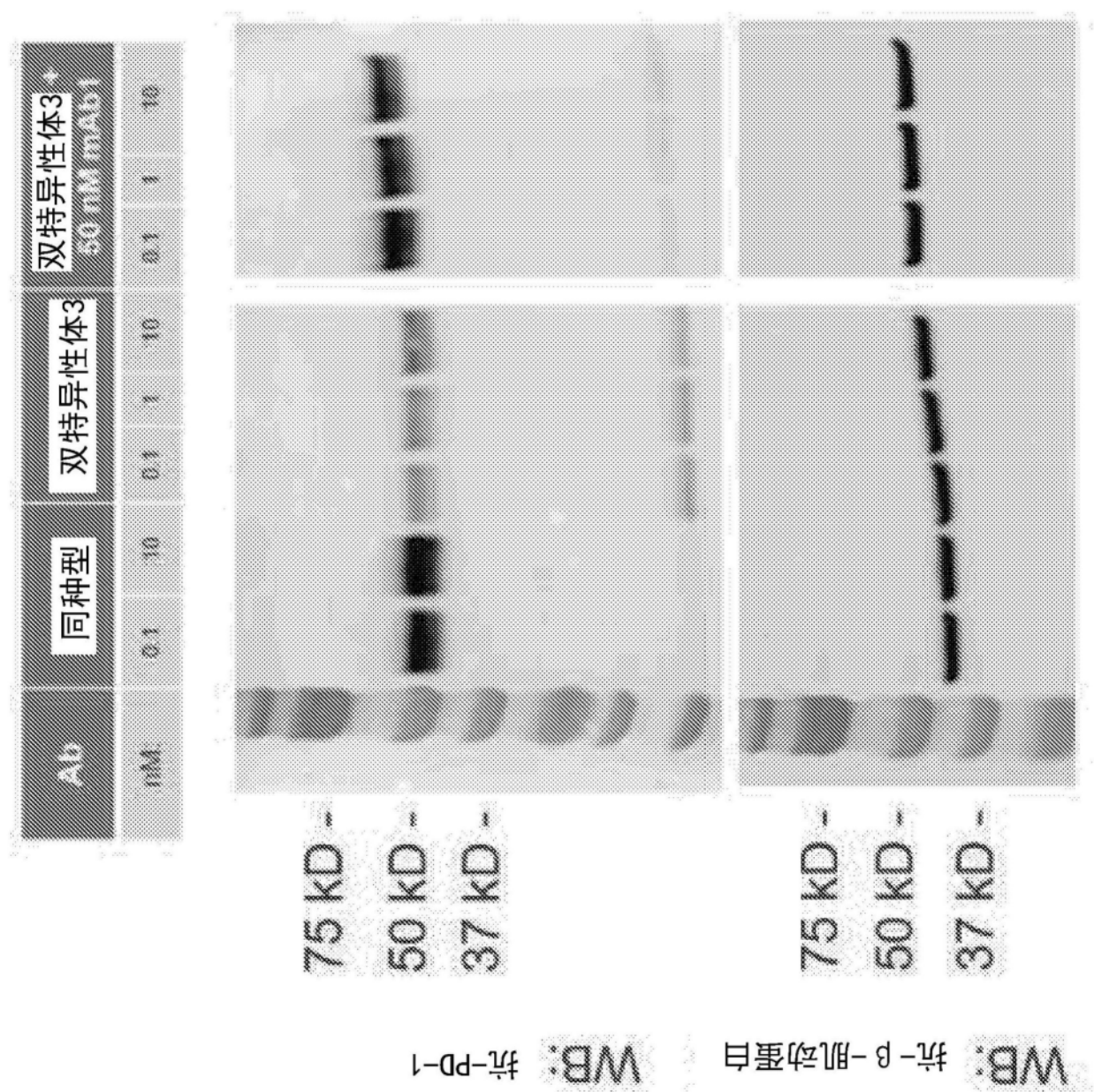


图12C

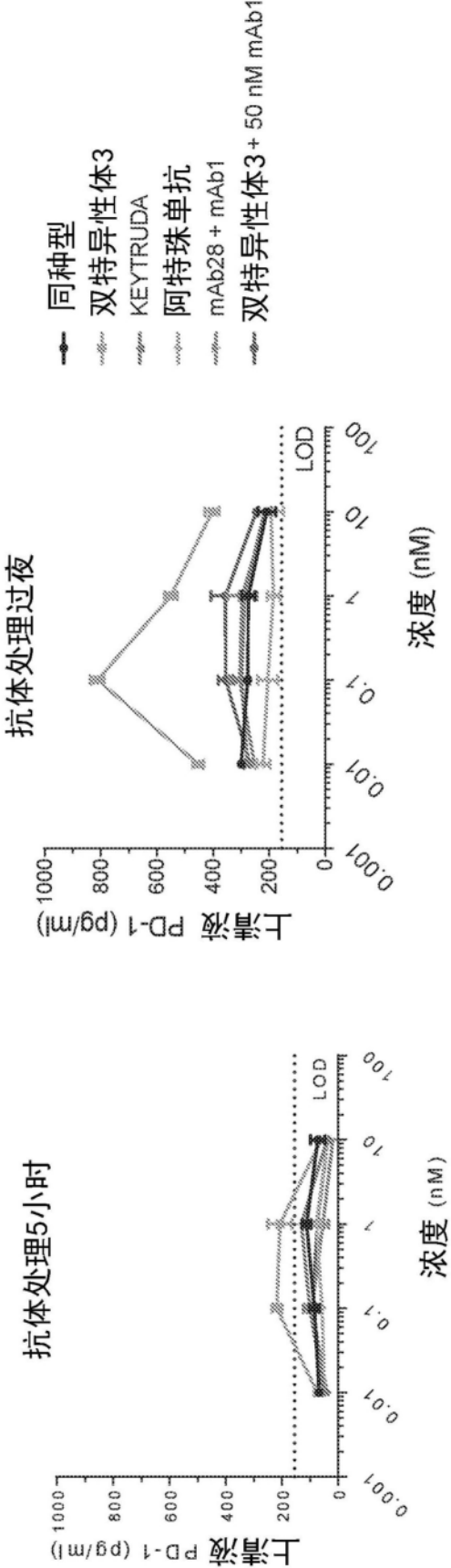
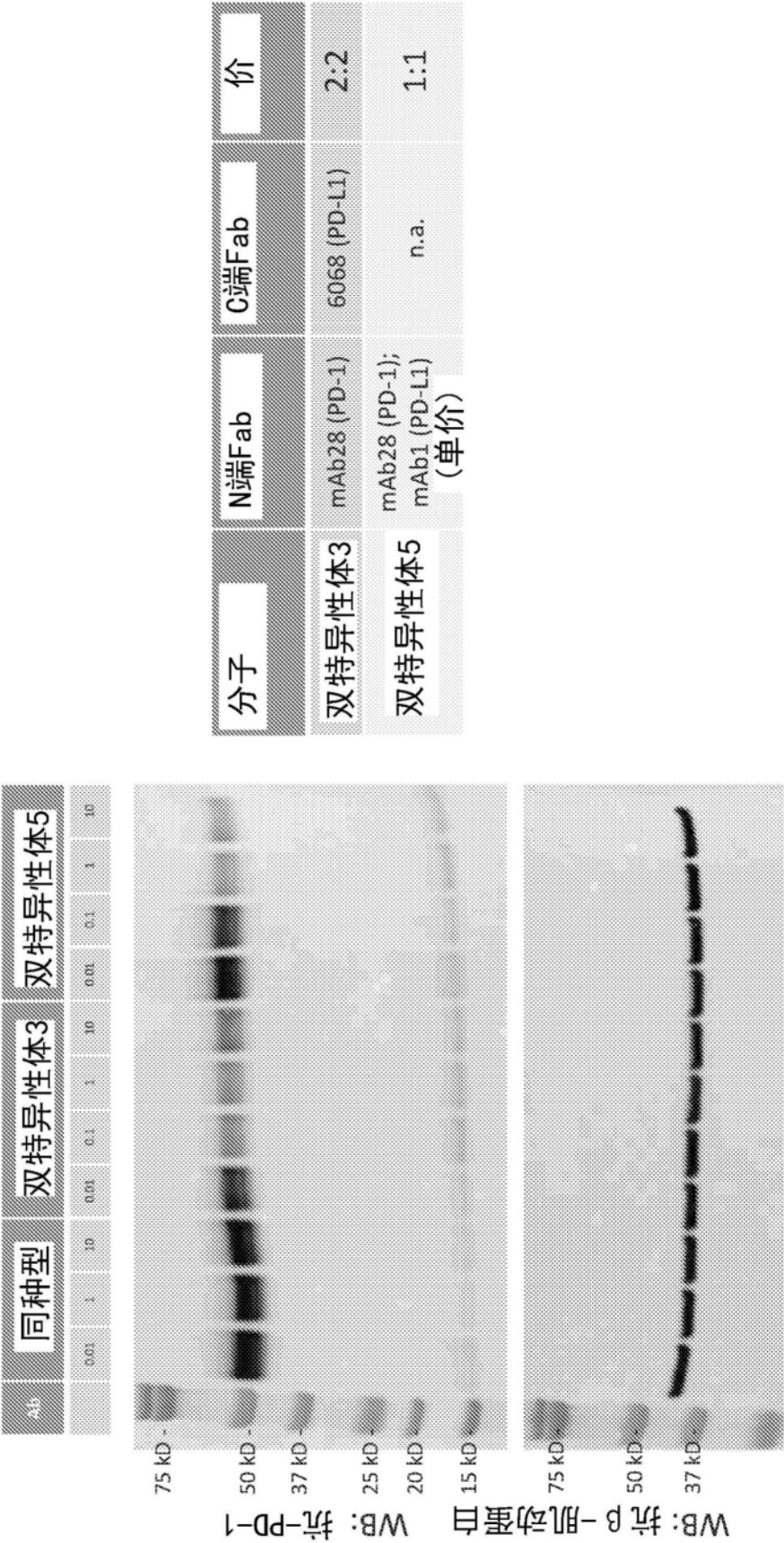


图12D



分子	N端Fab	C端Fab	价
双特异性体3	mAb28 (PD-1)	6068 (PD-L1)	2:2
双特异性体5	mAb28 (PD-1); mAb1 (PD-L1) (单价)	n.a.	1:1

图12E

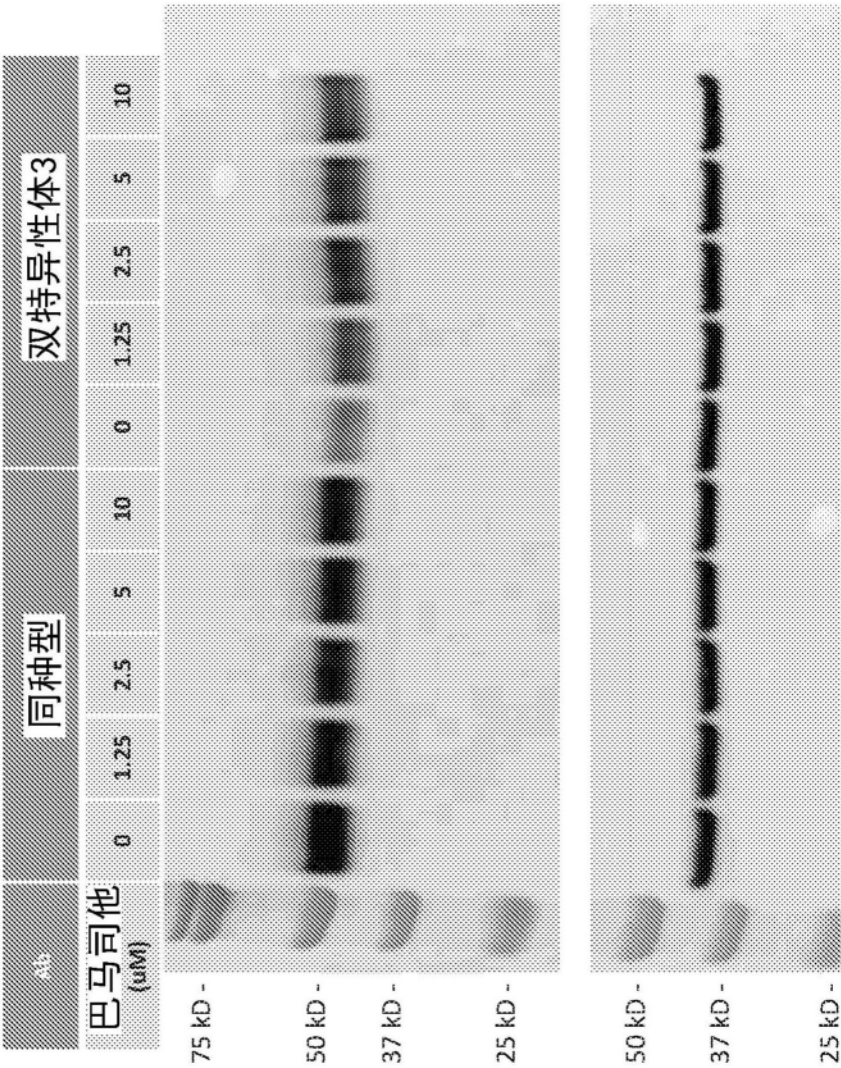


图12F

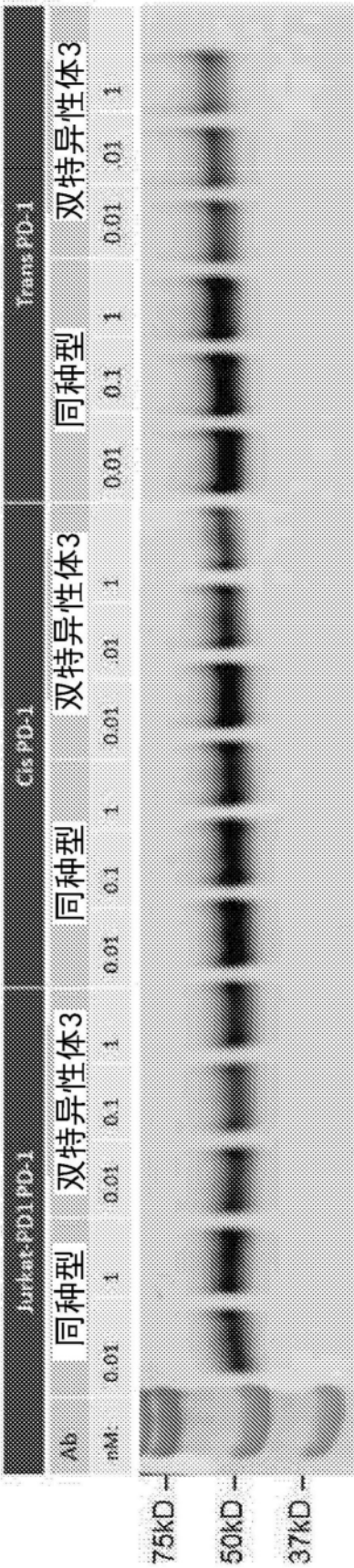


图12G

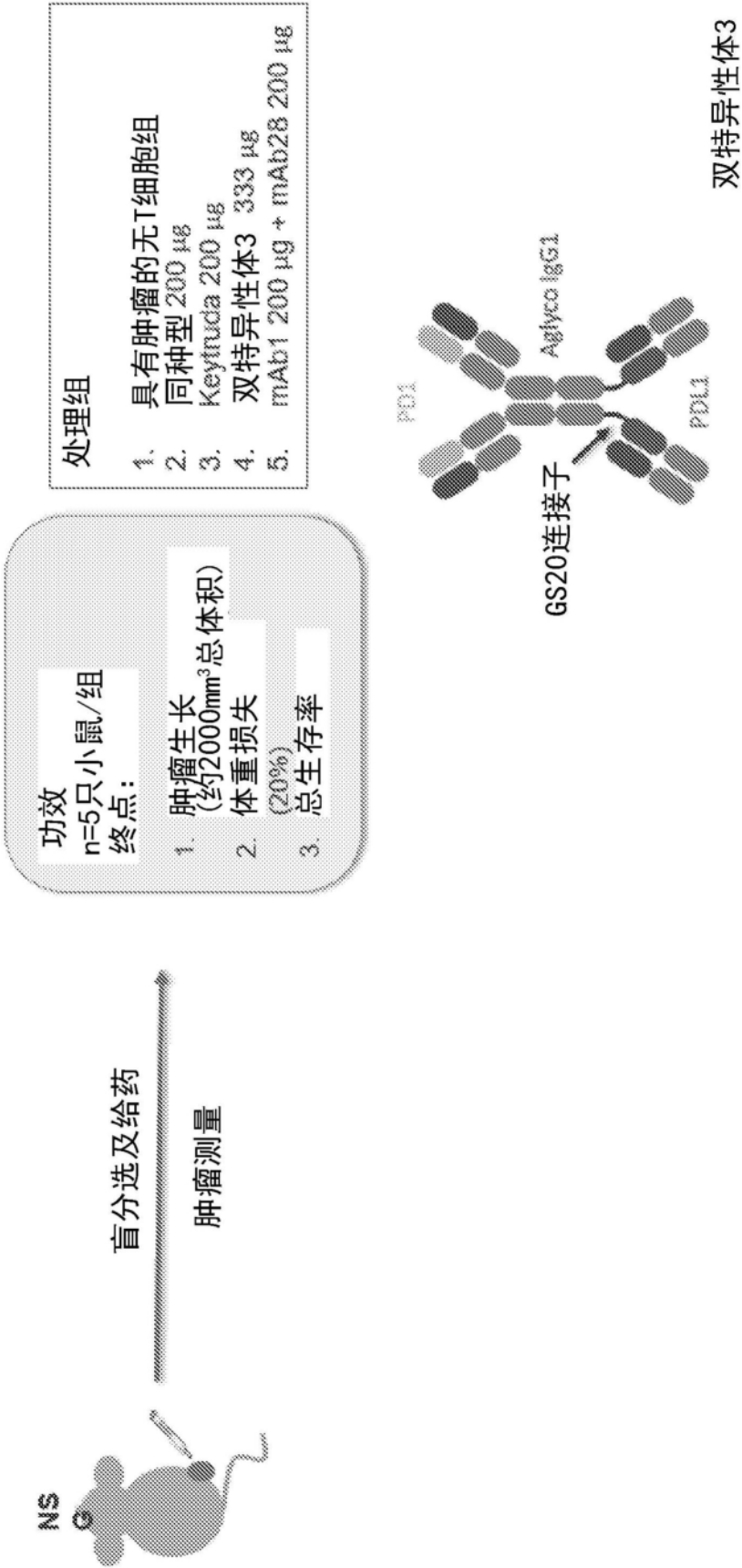


图13A

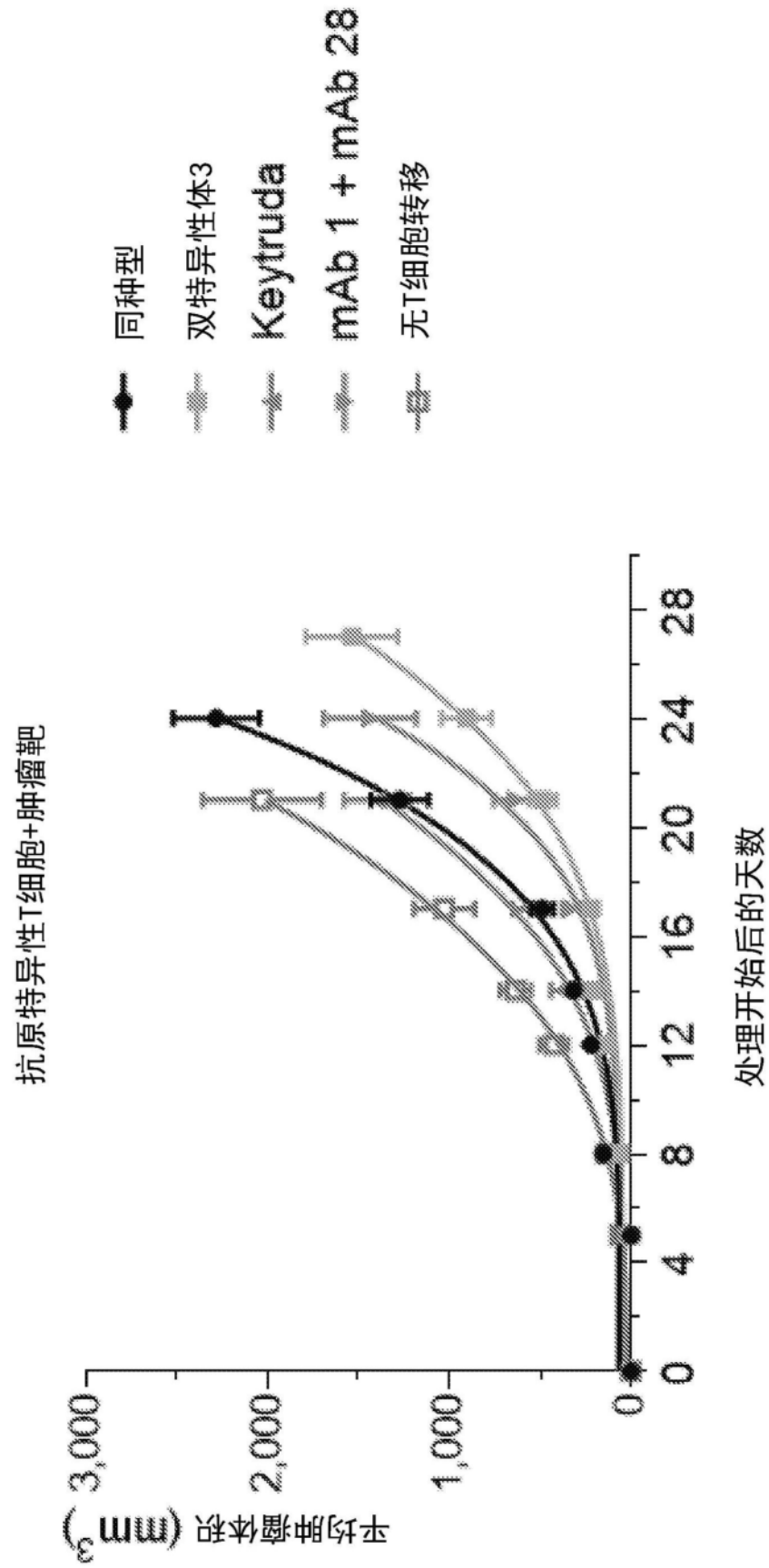


图13B

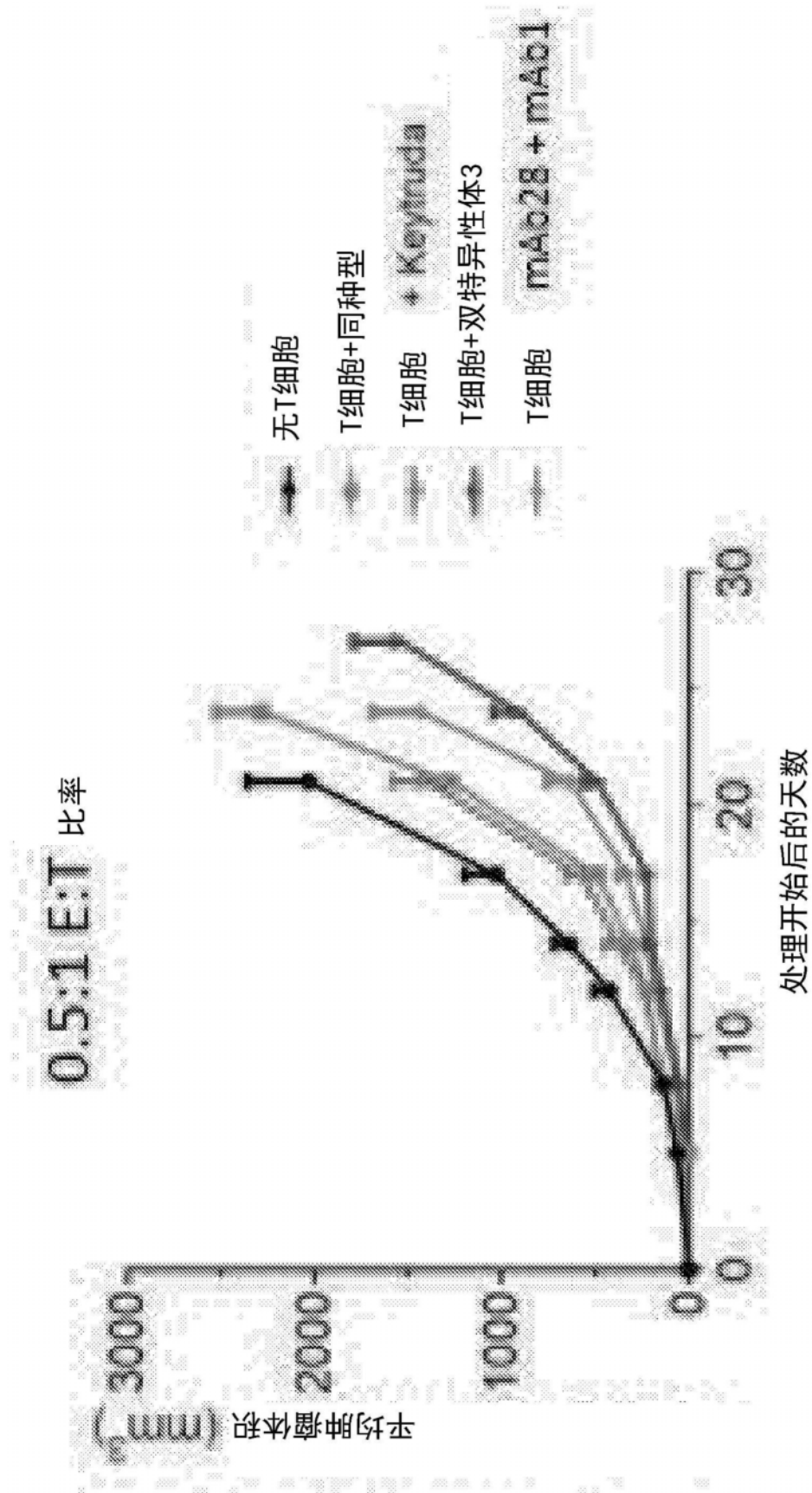


图14A

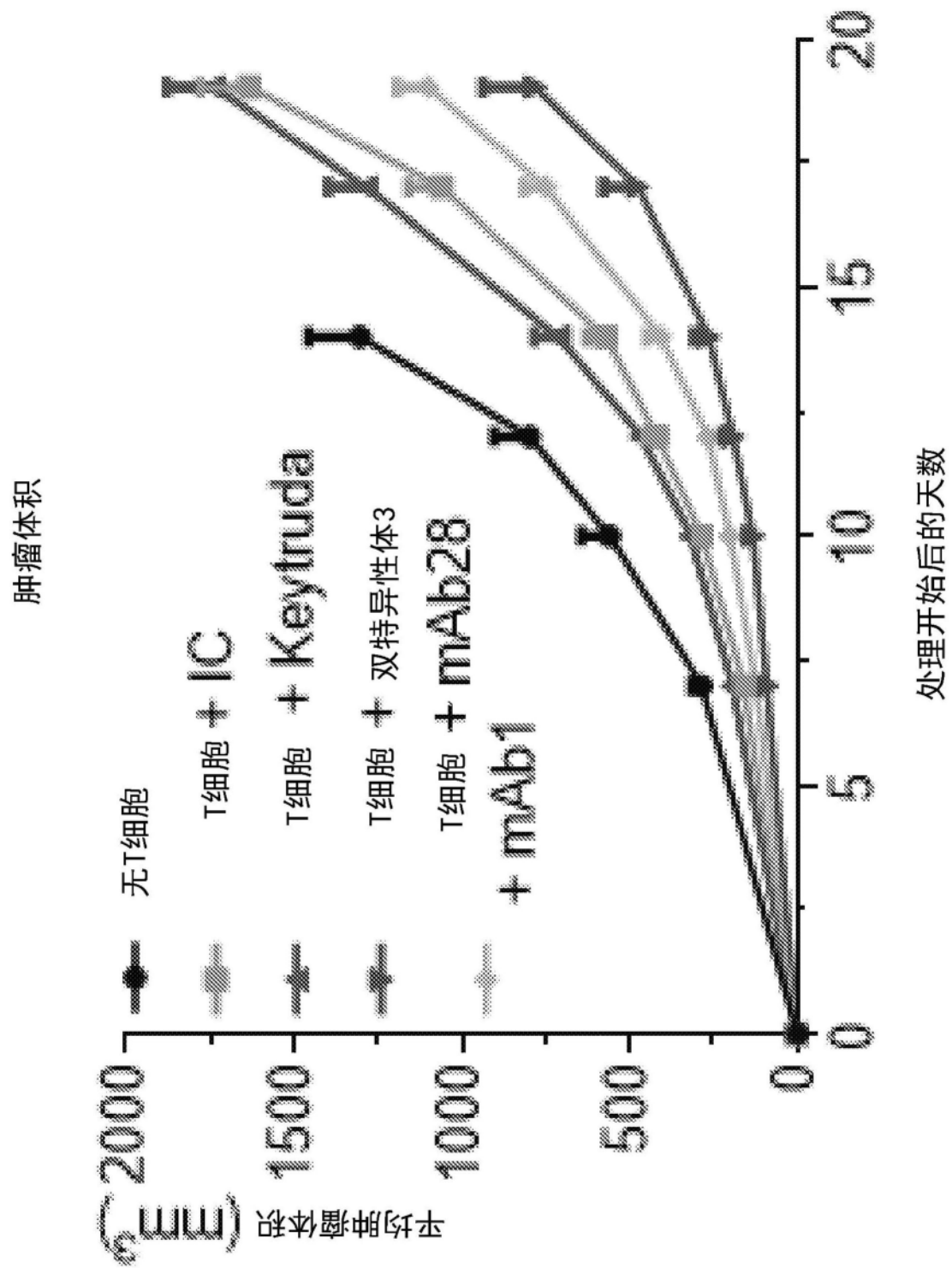


图14B

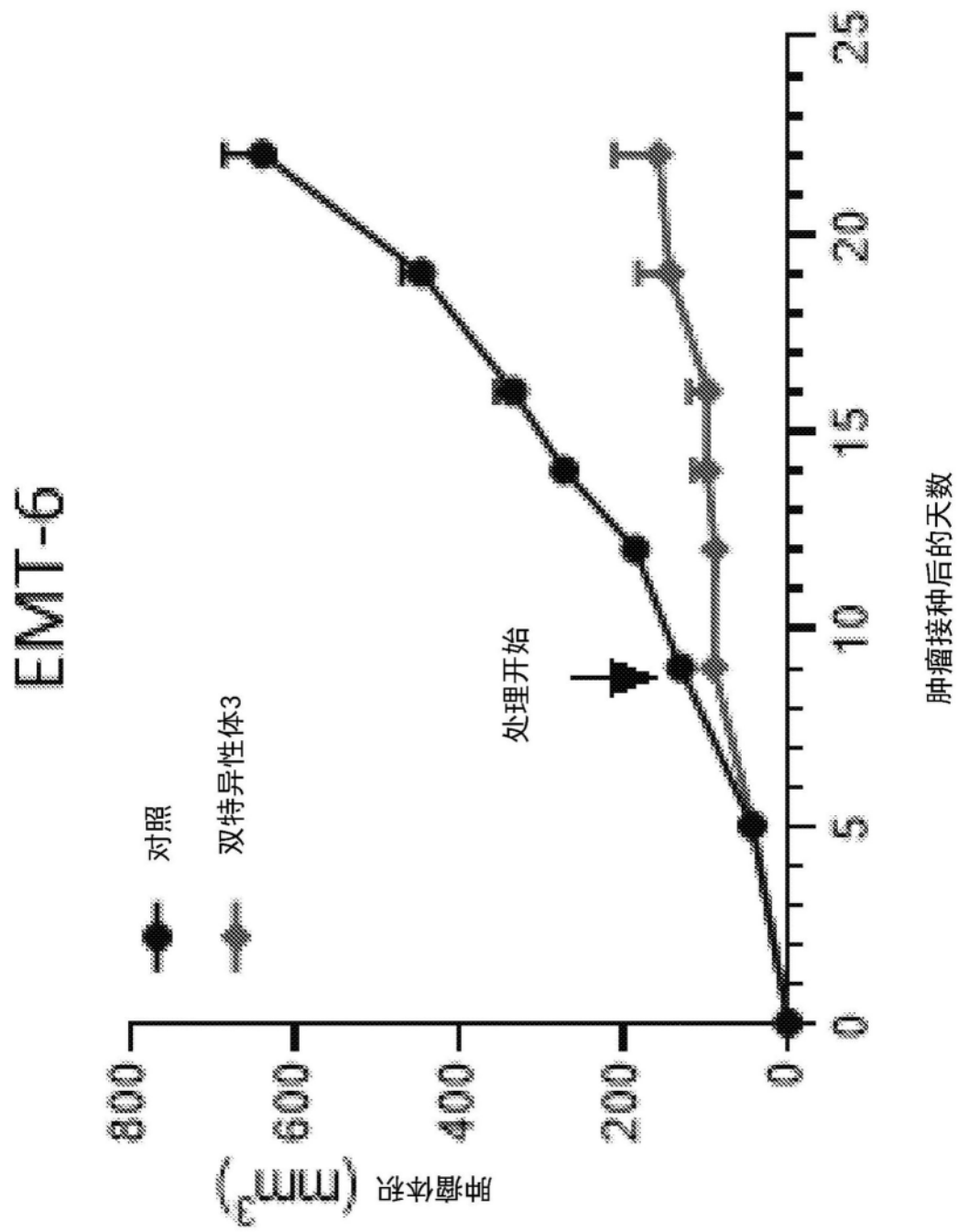


图15A

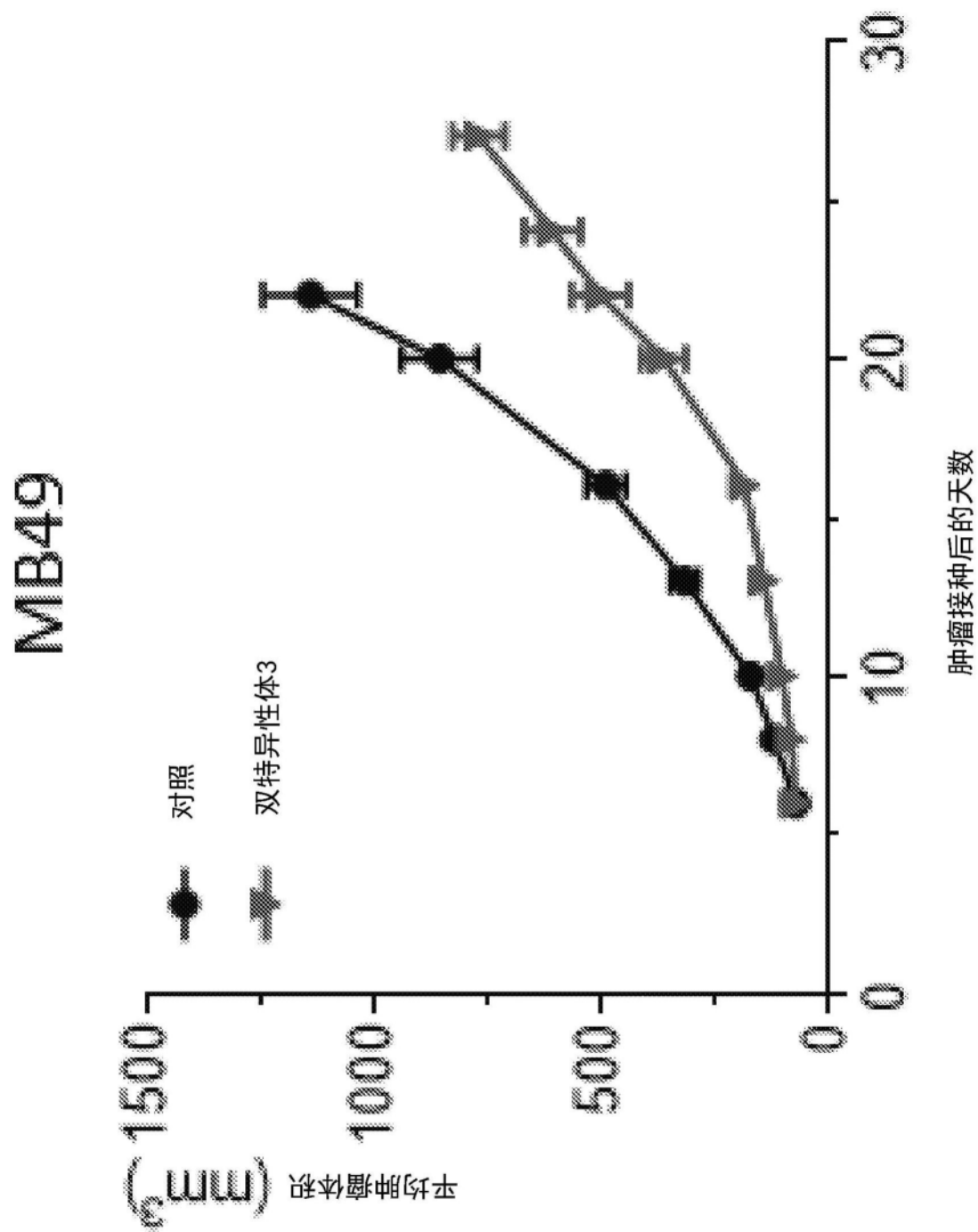


图15B

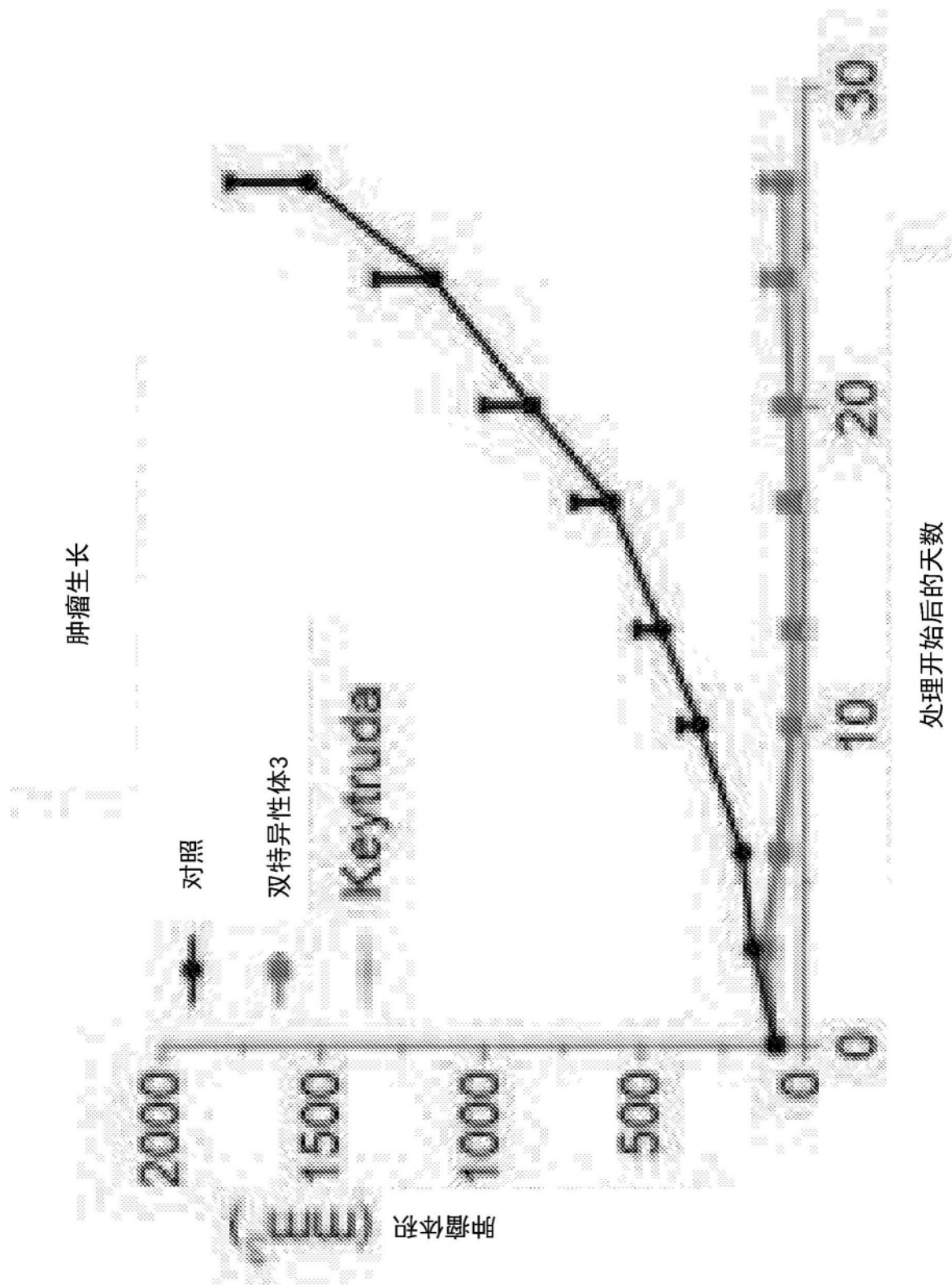


图16A

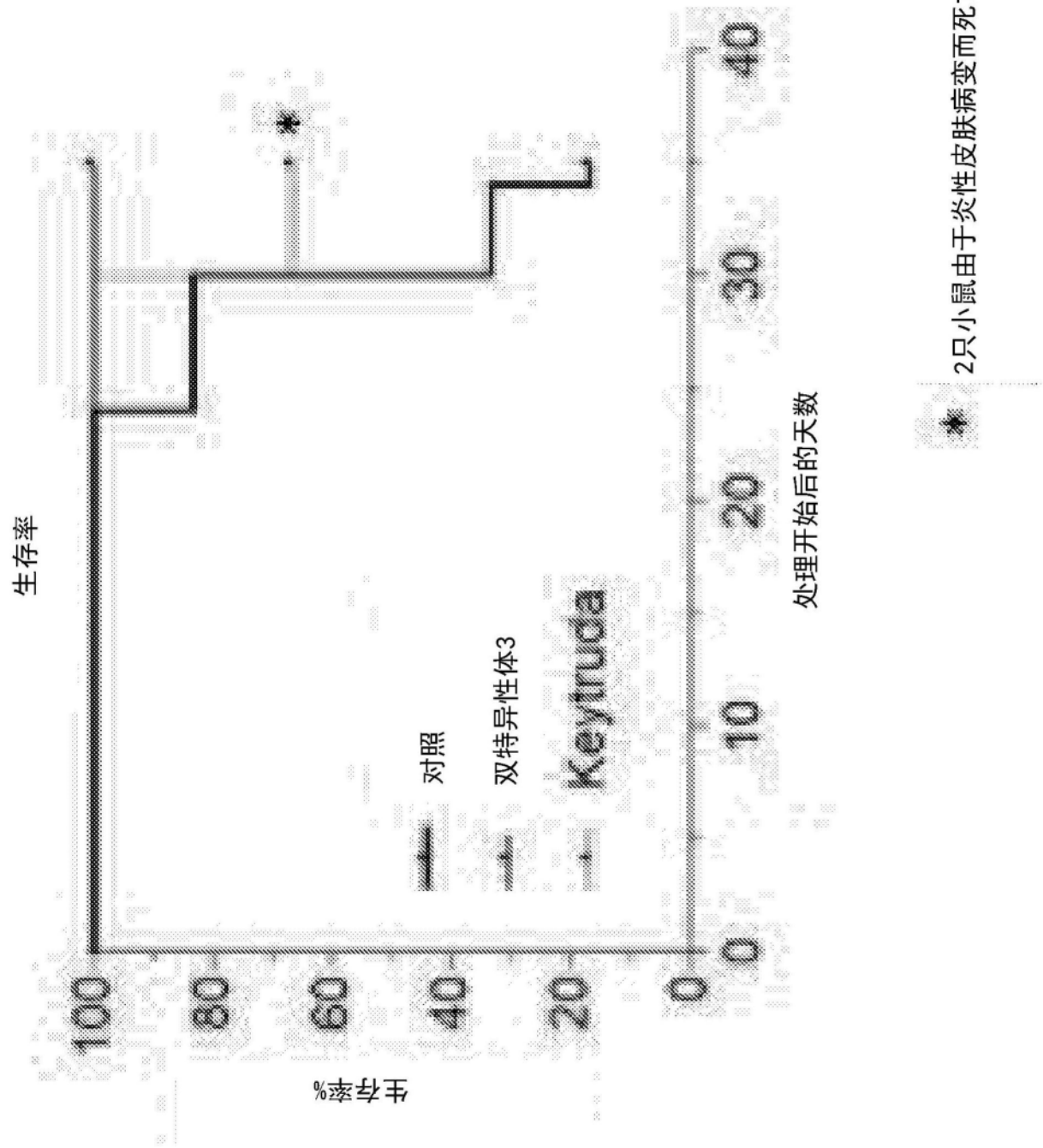


图16B

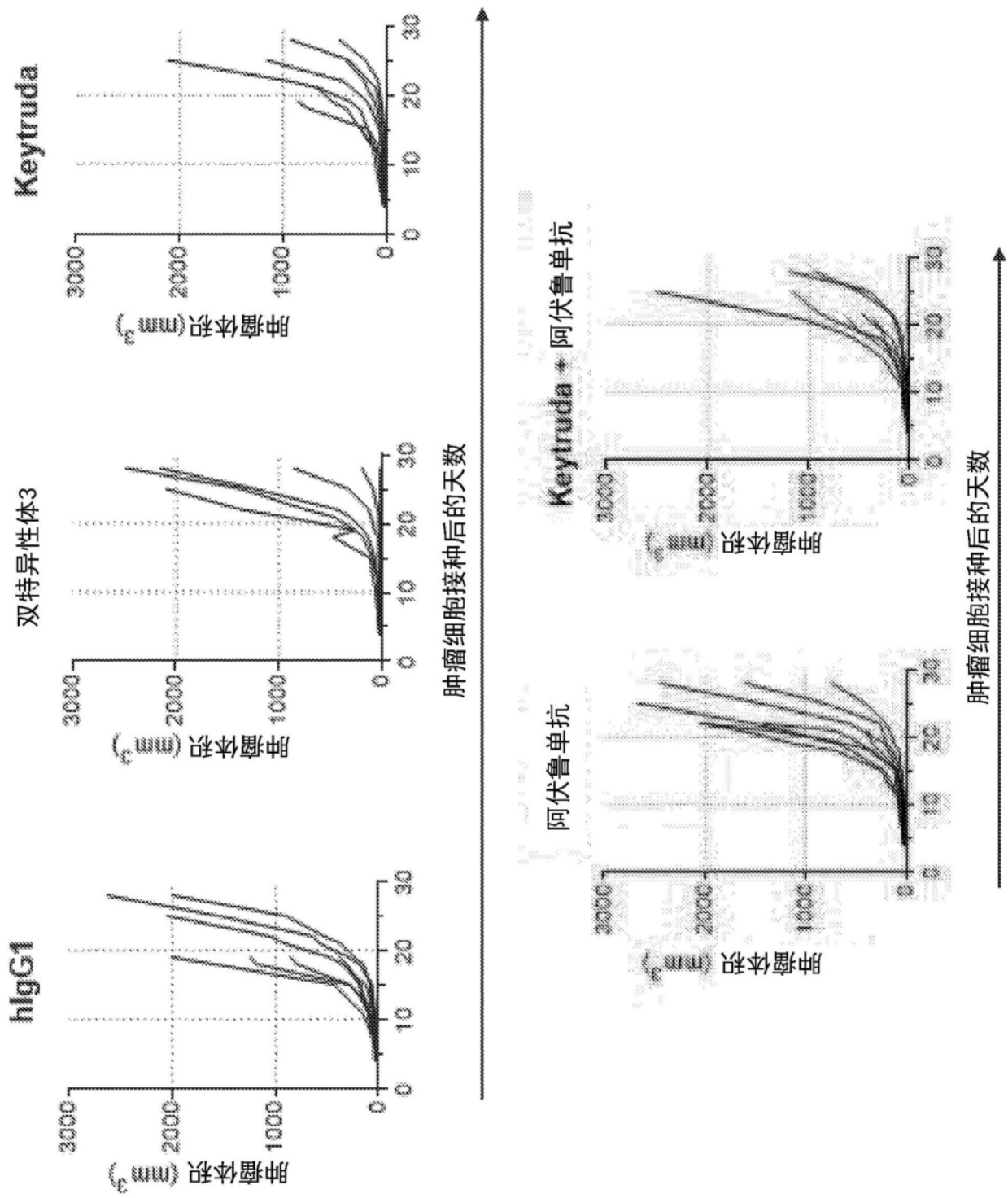


图17A

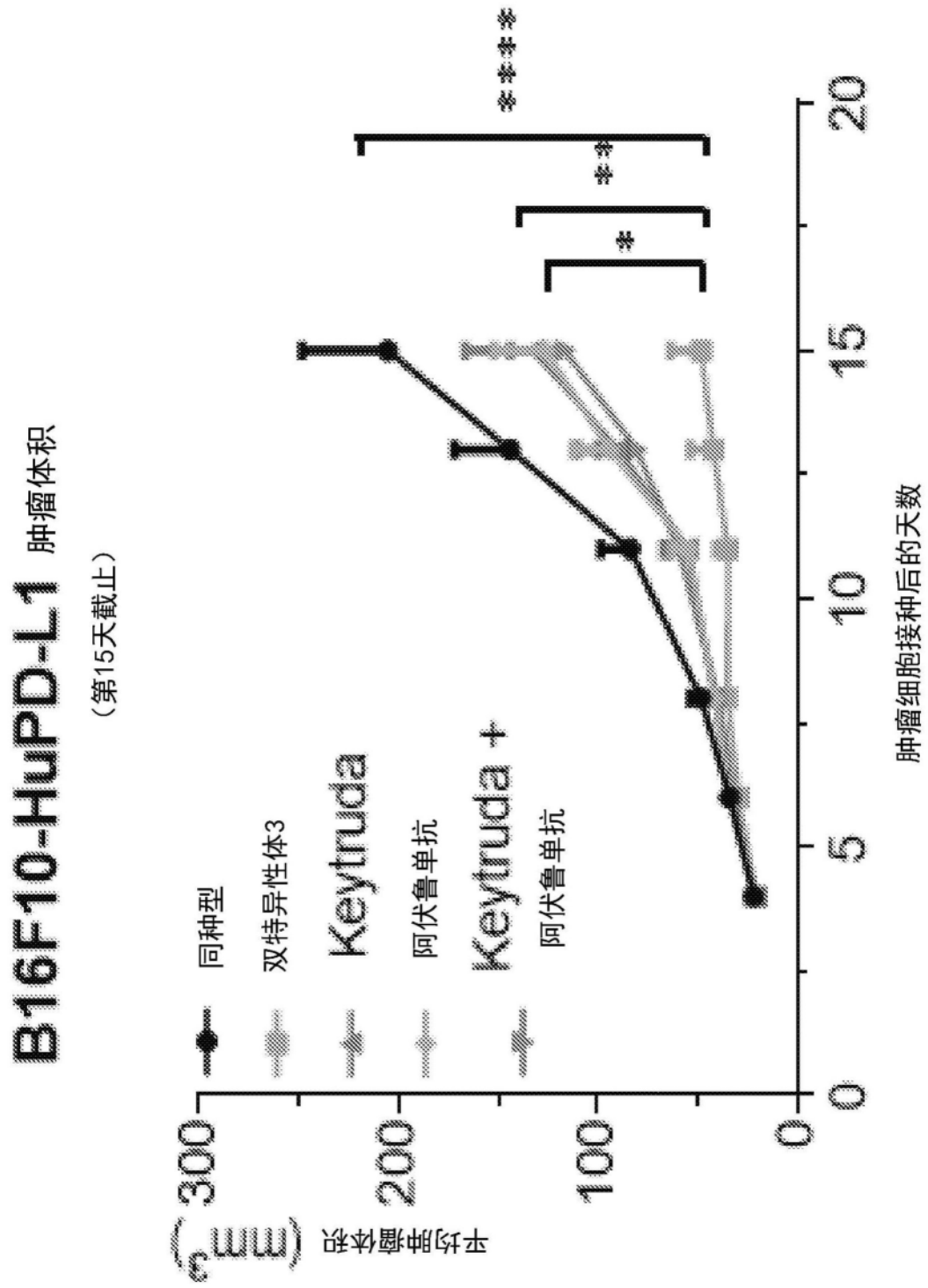


图17B

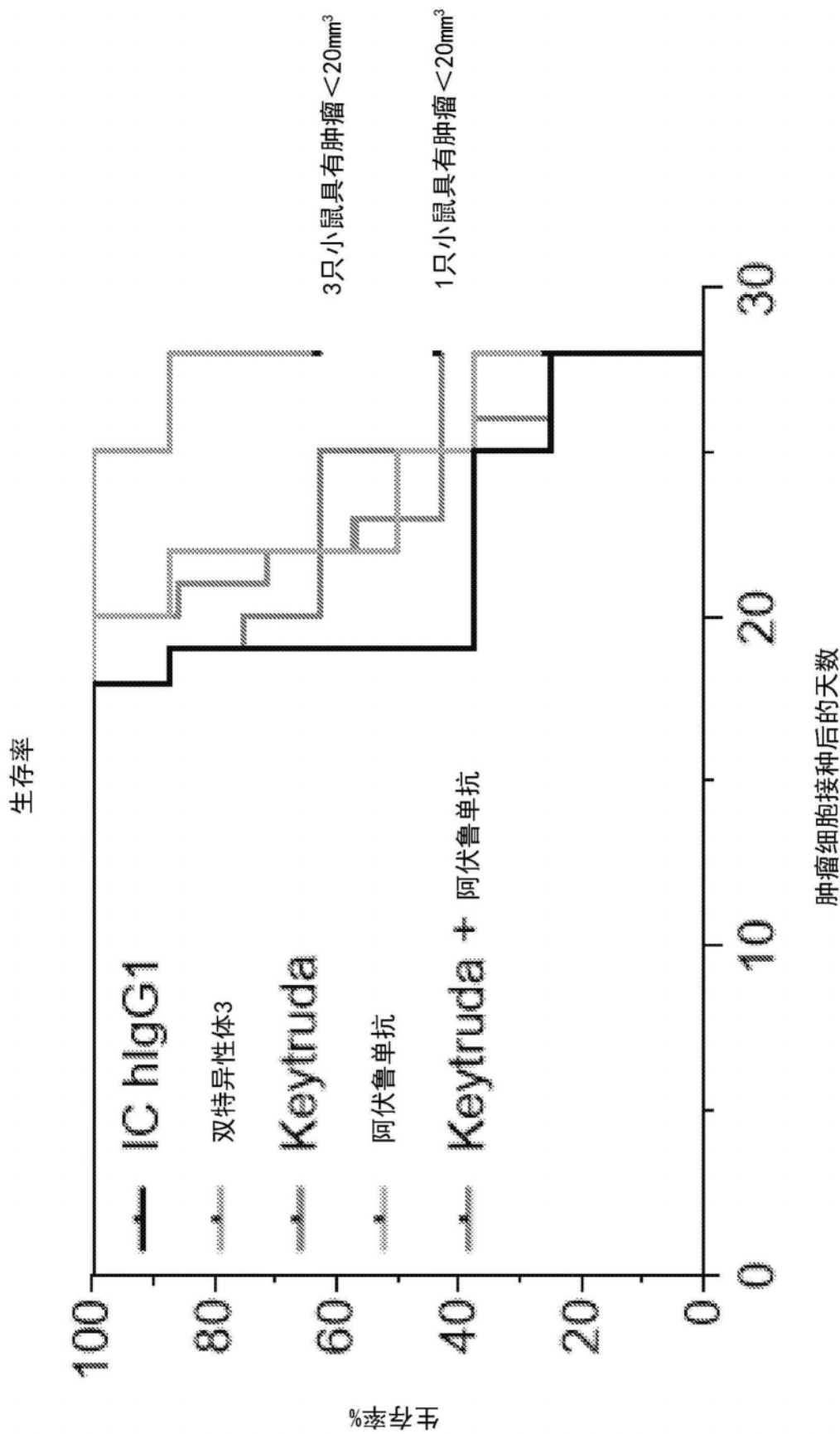


图17C

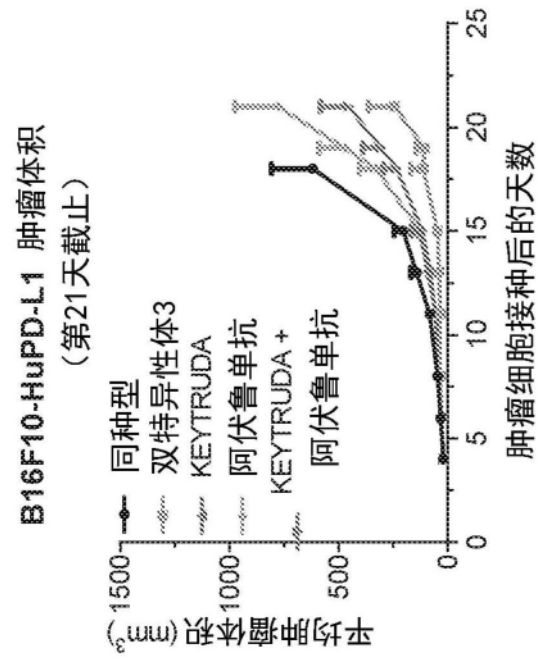


图17D

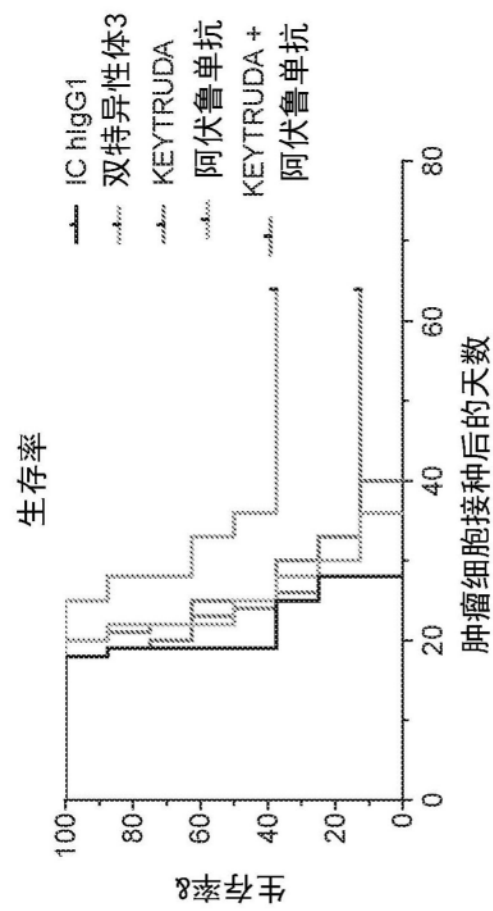


图17E

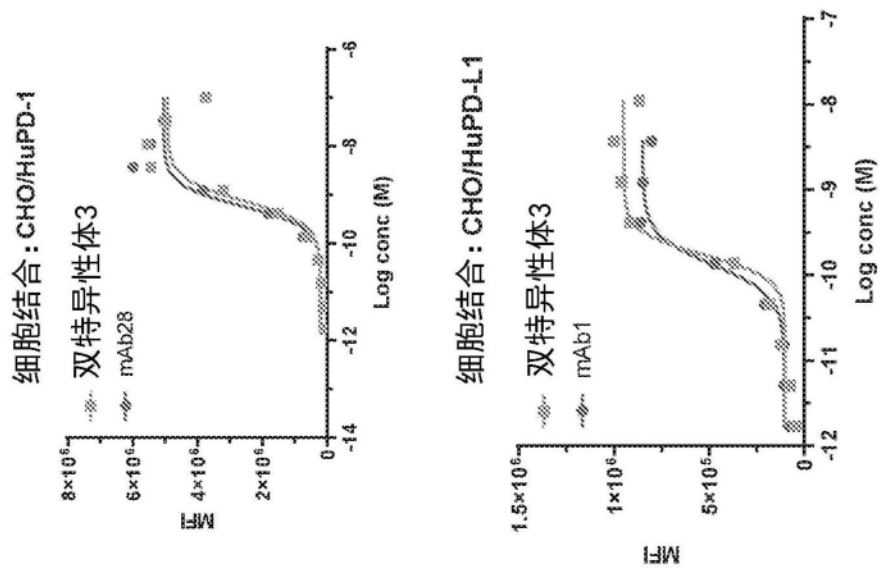


图18A

处理	无肿瘤/总计
IC hlgG1	0/8
双特异性体3	3/8
KEYTRUDA	0/8
阿伏鲁单抗	0/8
KEYTRUDA + 阿伏鲁单抗	1/8

图17F

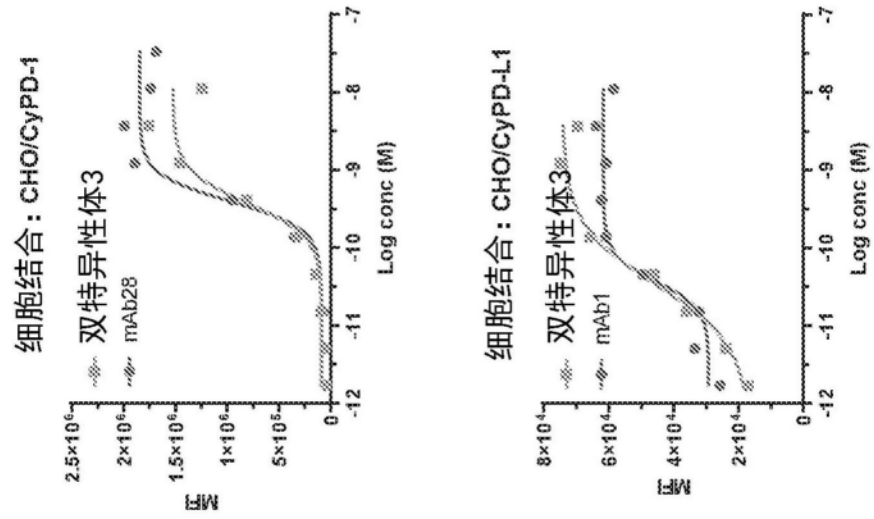


图18B

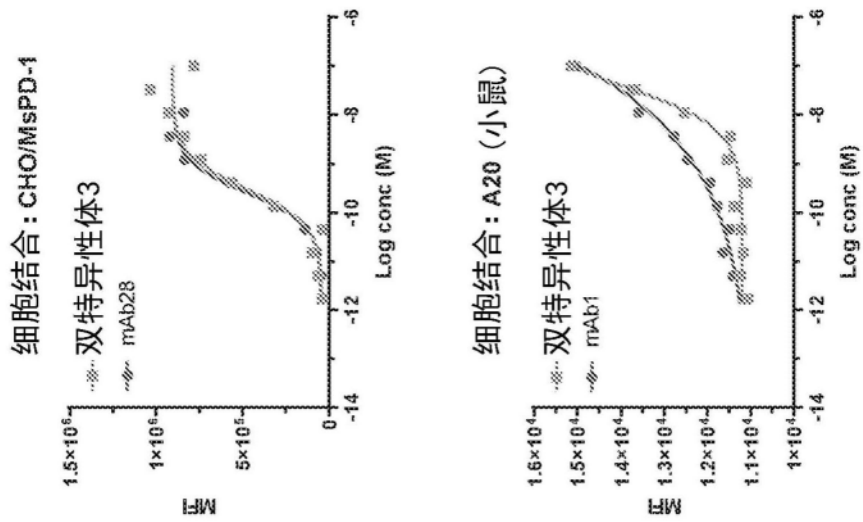


图18C

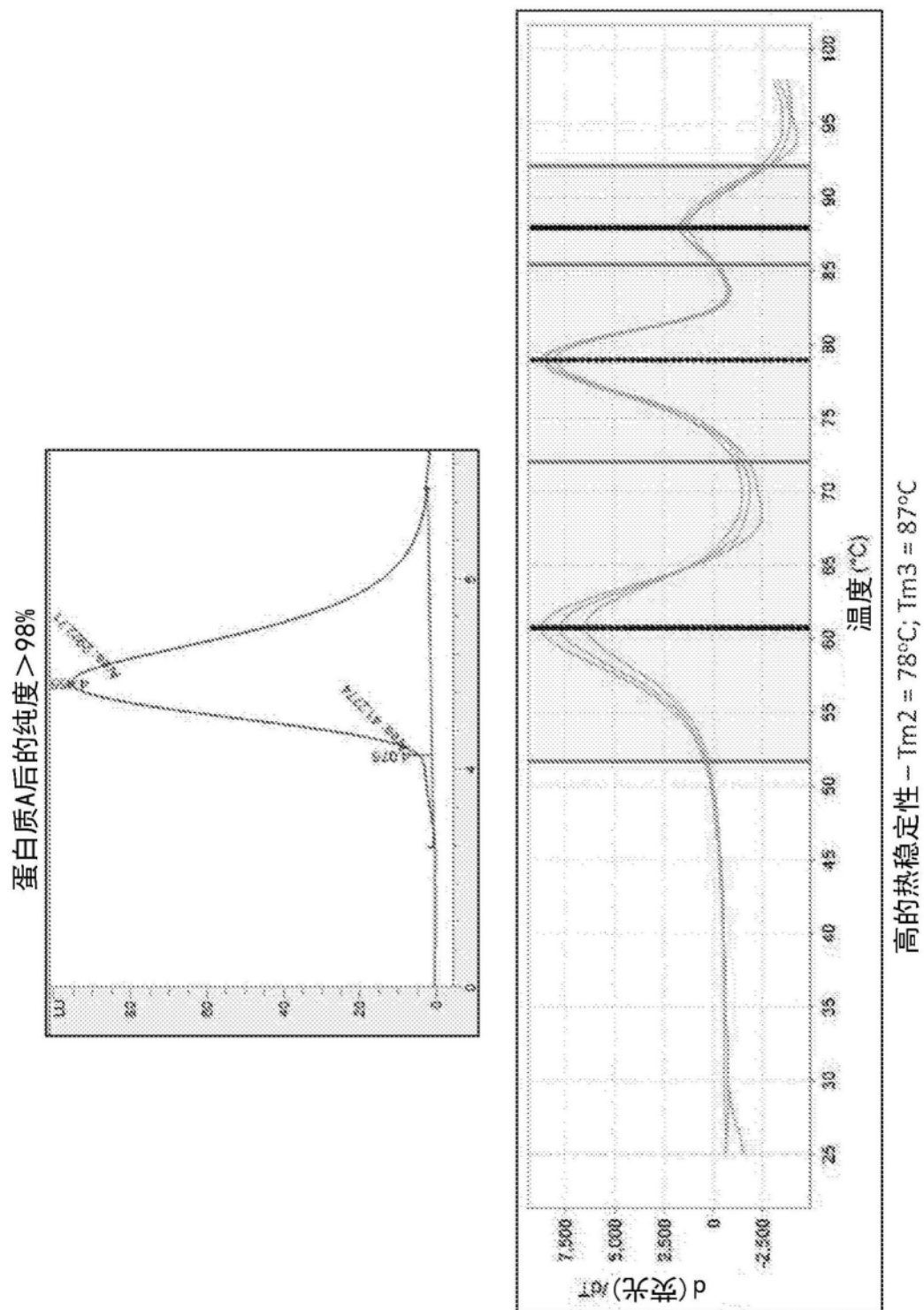


图18D