I757290

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I757290 B**

(45)公告日： 中華民國 111 (2022) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：106115065 (22)申請日： 中華民國 106 (2017) 年 05 月 05 日

(51)Int. Cl.： *C07K14/705 (2006.01)* *C07K16/28 (2006.01)*
C12N15/12 (2006.01) *A61K39/00 (2006.01)*
A61K39/395 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2016/05/06 美國 62/332,788

(71)申請人：美商麥迪紐有限責任公司 (美國) MEDIMMUNE, LLC (US)
美國

(72)發明人：卡斯圖藍根 史琳那 KASTURIRANGAN, SRINATH (US)；高 常壽 GAO, CHANGSHOU (US)；瑞尼 高地弗雷 RAINEY, GODFREY (US)；莫羅 米雪兒 MORROW, MICHELLE (GB)；道伯森 克萊兒 露易絲 DOBSON, CLAIRE LOUISE (GB)；德雷比克 史黛西 DRABIC, STACEY (US)；史考菲爾德 戴倫 SCHOFIELD, DARREN (US)；卡雷索 傑安路卡 CARLESSO, GIANLUCA (IT)；裴里吉 克莉斯坦 POLLIZZI, KRISTEN (US)；梅佐 亞利夫 MAZOR, YARIV (IL)；歐柏斯特 麥可 OBERST, MICHAEL (US)；漢蒙德 史考特 A HAMMOND, SCOTT A. (US)；羅伯 布萊恩 LOBO, BRIAN (US)；梅尼華 派克許 MANIKWAR, PRAKASH (IN)；希曼 強納森 SEAMAN, JONATHAN (GB)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 104987421A WO 2014209804A1

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：90 共 374 頁

(54)名稱

雙特異性結合蛋白及其用途

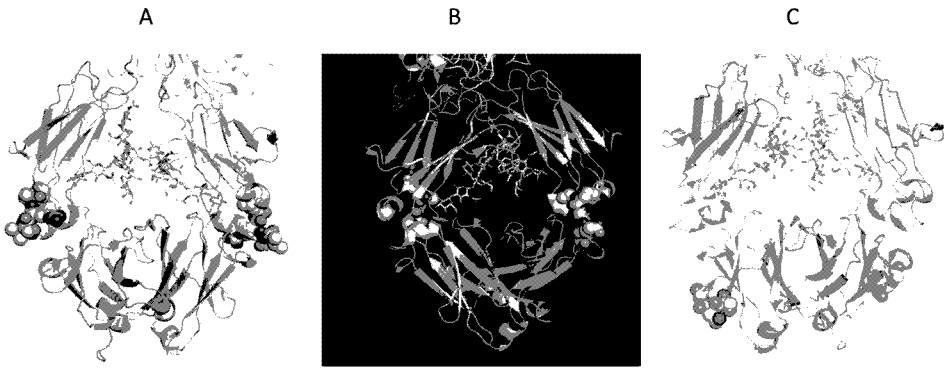
(57)摘要

本發明概括性地提供結合兩個表位(例如，第一及第二表位)且呈二價用以結合至該等第一及第二表位中之每一者的蛋白。本發明亦提供結合至靶蛋白之特異性結合蛋白，包括抗體。本發明亦提供包含該等蛋白之組合物、編碼該等蛋白之核酸分子及製備該等蛋白之方法。本發明提供誘導個體免疫反應之方法以及治療或預防個體癌症之方法，其係藉由向該個體投與該等蛋白、核酸分子及/或組合物來實施。

The disclosure generally provides proteins that bind two epitopes (e.g., a first and a second epitope) and that are bivalent for binding to each of the first and second epitopes. The disclosure also provides for specific binding proteins, including antibodies, which bind to a target protein. The disclosure also provides compositions comprising such proteins, nucleic acid molecules encoding such proteins and methods of making such proteins. The disclosure provides methods of inducing an immune response in a subject as well as methods for treating or preventing cancer in a subject by administering the proteins, nucleic acid molecules and/or compositions to the subject.

TW I757290 B

指定代表圖：



【圖 1】

專利案號：106115065

公告本

申請日：106/05/05

I757290

IPC分類：C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明摘要】

【中文發明名稱】

雙特異性結合蛋白及其用途

【英文發明名稱】

BISPECIFIC BINDING PROTEINS AND USES THEREOF

【中文】

本發明概括性地提供結合兩個表位(例如，第一及第二表位)且呈二價用以結合至該等第一及第二表位中之每一者的蛋白。本發明亦提供結合至靶蛋白之特異性結合蛋白，包括抗體。本發明亦提供包含該等蛋白之組合物、編碼該等蛋白之核酸分子及製備該等蛋白之方法。本發明提供誘導個體免疫反應之方法以及治療或預防個體癌症之方法，其係藉由向該個體投與該等蛋白、核酸分子及/或組合物來實施。

【英文】

The disclosure generally provides proteins that bind two epitopes (e.g., a first and a second epitope) and that are bivalent for binding to each of the first and second epitopes. The disclosure also provides for specific binding proteins, including antibodies, which bind to a target protein. The disclosure also provides compositions comprising such proteins, nucleic acid molecules encoding such proteins and methods of making such proteins. The disclosure provides methods of inducing an immune response in a subject as well as methods for treating or preventing cancer in a subject by administering the proteins, nucleic acid molecules and/or compositions to the subject.

【指定代表圖】

圖1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

雙特異性結合蛋白及其用途

【英文發明名稱】

BISPECIFIC BINDING PROTEINS AND USES THEREOF

【技術領域】

【先前技術】

癌症仍係主要的全球性健康負擔。儘管癌症之治療已取得進展，但業內對更有效且毒性較小之療法仍存在迫切的醫學需要，尤其對於彼等患有抵抗現有治療劑之晚期疾病或癌症之患者而言。

業內公認免疫系統在腫瘤控制中之作用，具體而言T細胞介導之細胞毒性。越來越多的證據表明，在疾病之早期及晚期階段二者中，T細胞控制癌症患者中之腫瘤生長及存活。然而，腫瘤特異性T細胞反應在癌症患者中難以增加及持續。當與使用非特異性化學治療劑及/或輻射之療法相比時，刺激或增強針對癌症之先天免疫反應之癌症免疫療法的不斷進步及成功使該等治療劑成為頗具吸引力之治療選擇。

業內已鑑別出多個可用作針對癌症之腫瘤免疫(IO)治療劑之分子靶。正研究其在腫瘤免疫療法領域中之治療潛能之一些分子靶包括細胞毒性T淋巴球抗原-4 (CTLA-4或CD152)、程式化死亡配體1 (PD-L1或B7-H1或CD274)、程式化死亡-1 (PD-1)、OX40 (CD134或TNFRSF4)及含T細胞免疫球蛋白及黏蛋白結構域之T細胞抑制受體-3 (TIM3)。儘管該等靶中之一些已成功地用於治療(例如，PD-1及CTLA-4)，但許多患者對已研發出之治療劑無反應。且儘管可考慮包括較高劑量及/或免疫療法組合之

治療方案，該等療法可與增加的副作用風險相關，該等副作用往往隨較高劑量及累積暴露增加，且在與組合免疫療法一起使用時似乎為加和的。一些常見副作用包括垂體炎、甲狀腺炎、腎上腺機能不全、小腸結腸炎、皮膚炎、肺炎、肝炎、胰臟炎、運動及感覺神經病變以及關節炎。另外，由於免疫治療劑通常與高成本相關，故包括免疫治療劑組合之療法對患者而言可為成本高昂的。

因此，業內仍需要繼續鑑別IO治療劑之候選靶，研發針對現有靶之新治療劑及研發避免當前所用免疫療法之缺點(包括缺少患者反應及與組合治療相關之增加的副作用風險)之治療策略。對靶分子之組合具有雙特異性之IO治療劑(例如，結合蛋白)、尤其當與對個別單特異性結合蛋白之組合之結合親和力相比時展現較大的靶分子結合親和力之彼等代表一類治療潛能尤其合意的分子。

【發明內容】

本發明提供雙特異性分子或蛋白，其結合兩個表位(例如，第一及第二表位)且呈二價以結合至第一及第二表位中之每一者。本發明亦提供誘導個體免疫反應之方法以及治療或預防個體(例如，人類個體)癌症之方法，其係藉由向個體投與蛋白、核酸分子及/或組合物來實施。

在一態樣中，本發明提供含有以下各項之蛋白：結合至第一表位之第一結合結構域(BD1)、結合至第二表位之第二結合結構域(BD2)及具有C_H2及C_H3結構域之Fc區；其中Fc區包括處於C_H2結構域中、C_H3結構域中或C_H2及C_H3結構域之界面處的溶劑暴露環上之BD2；且其中蛋白呈二價以結合至第一及第二表位中之每一者。

在另一態樣中，本發明提供組合物，其含有如本文任一態樣之蛋白

或抗體及醫藥上可接受之載劑。

在另一態樣中，本發明提供治療或預防個體癌症之方法，該方法涉及向個體(例如，人類個體)投與如本文任一態樣之蛋白或抗體。在各個實施例中，癌症係以下中之一或多者：卵巢癌、乳癌、結腸直腸癌、前列腺癌、子宮頸癌、子宮癌、睪丸癌、膀胱癌、頭頸癌、黑色素瘤、胰臟癌、腎細胞癌及肺癌。

在另一態樣中，本發明提供誘導個體免疫反應之方法，該方法涉及向個體(例如，人類個體)投與如本文任一態樣之蛋白或抗體。

在另一態樣中，本發明提供核酸分子，其具有編碼如本文任一態樣之蛋白或抗體之核苷酸序列。

在另一態樣中，本發明提供載體，其含有如本文任一態樣之核酸分子。

在另一態樣中，本發明提供宿主細胞，其含有如本文任一態樣之載體。

在一態樣中，本發明提供結合至PD-1及CTLA-4之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:1之胺基酸序列之第一肽及具SEQ ID NO:2之胺基酸序列之第二肽。

在另一態樣中，本發明提供結合至PD-1及CTLA-4之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:3之胺基酸序列之第一肽及具SEQ ID NO:4之胺基酸序列之第二肽。

在另一態樣中，本發明提供結合至PD-1及CTLA-4之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:5之胺基酸序列之第一肽及具SEQ ID NO:6之胺基酸序列之第二肽。

在一態樣中，本發明提供結合至PD-1及CTLA-4之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:9之胺基酸序列之第一重鏈、具SEQ ID NO:7之胺基酸序列之第一輕鏈、具SEQ ID NO:12之胺基酸序列之第二重鏈及具SEQ ID NO:4之胺基酸序列之第二輕鏈。

在一態樣中，本發明提供結合至PD-L1及CTLA-4之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:14之胺基酸序列之第一肽及具SEQ ID NO:15之胺基酸序列之第二肽。

在另一態樣中，本發明提供結合至PD-L1及CTLA-4之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:16之胺基酸序列之第一肽及具SEQ ID NO:17之胺基酸序列之第二肽。

在另一態樣中，本發明提供結合至PD-L1及CTLA-4之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:18之胺基酸序列之第一肽及具SEQ ID NO:19之胺基酸序列之第二肽。

在一態樣中，本發明提供結合至PD-1及TIM3之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:22之胺基酸序列之第一肽及具SEQ ID NO:23之胺基酸序列之第二肽。

在另一態樣中，本發明提供結合至PD-1及TIM3之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:91之胺基酸序列之第一肽及具SEQ ID NO:23或SEQ ID NO: 92之胺基酸序列之第二肽。

在一態樣中，本發明提供結合至PD-1及TIM3之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:9之胺基酸序列之第一重鏈、具SEQ ID NO:7之胺基酸序列之第一輕鏈、具SEQ ID NO:27或SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之第二重鏈及具SEQ ID NO:26或SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之第二輕

鏈。

在一態樣中，本發明提供結合至OX40及PD-L1之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:34之胺基酸序列之第一肽及具SEQ ID NO:32之胺基酸序列之第二肽。

在另一態樣中，本發明提供結合至OX40及PD-L1之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:35之胺基酸序列之第一肽及具SEQ ID NO:32之胺基酸序列之第二肽。

在另一態樣中，本發明提供結合至OX40及PD-L1之雙特異性結合蛋白，其具有具SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:94之胺基酸序列之第一肽及具SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:93之胺基酸序列之第二肽。

在一態樣中，本發明提供結合至TIM3之抗體或其抗原結合片段，其具有具CDR1、CDR2及CDR3之重鏈及具CDR1、CDR2及CDR3之輕鏈，其中重鏈CDR1包含SEQ ID NO:88，重鏈CDR2包含SEQ ID NO:80，重鏈CDR3包含SEQ ID NO:81，且輕鏈CDR1包含SEQ ID NO:82，輕鏈CDR2包含SEQ ID NO:83，輕鏈CDR3包含SEQ ID NO:84。

在其他態樣中，本發明提供組合物，其具有雙特異性結合蛋白及醫藥上可接受之載劑；核酸分子，其具有編碼雙特異性結合蛋白之核苷酸序列；治療或預防個體癌症之方法，其係藉由投與雙特異性結合蛋白來實施；及增強個體免疫反應之方法，其係藉由投與雙特異性結合蛋白來實施。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，Fc區包含處於C_H2結構域中、C_H3結構域中或C_H2及C_H3結構域界面處的胺基酸序列中之溶劑暴露環上之BD2。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，溶劑暴露環包括C_H2結構域之胺基酸序列。在特定實施例中，溶劑暴露環包括胺基酸序列ISRTP (SEQ ID NO: 39)。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，溶劑暴露環包括C_H3結構域之胺基酸序列。在特定實施例中，溶劑暴露環包括胺基酸序列SNG。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，溶劑暴露環包括C_H2結構域及C_H3結構域界面之胺基酸序列。在特定實施例中，如技術方案7之蛋白，其中溶劑暴露環包含胺基酸序列AKGQP (SEQ ID NO: 40)。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，BD2係或包括單鏈可變片段(scFv)。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，BD1係或包括為Fab結構域、scFv、單結構域抗體及抗體可變結構域中之一或多者之結合結構域。在特定實施例中，BD1包括Fab結構域。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，Fab結構域經由抗體鉸鏈區連接至Fc區。在某些實施例中，Fc區係或包括為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE或IgD之Fc區中之一或多者之結構域。在特定實施例中，Fc區包含變體Fc區。在一些實施例中，Fc區係無醣基化、去醣基化及/或無岩藻糖基化的或具有減少的岩藻糖基化。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，蛋白進一步包括介於BD2與Fc區之間之蛋白連接體L1。在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，蛋白進一步包括介於BD2與Fc區之間之第一蛋白連接體L1及第二蛋白連接體L2。在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，BD2經由蛋白連接體L1與Fc區締合。在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，BD2經由兩個

蛋白連接體L1及L2與Fc區締合。在某些實施例中，L1及L2獨立地選自$(G_4S)_2$ (SEQ ID NO:41)、$(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:42)及$(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:43)。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，蛋白包括自N末端至C末端具有以下多肽結構域之嵌合重鏈：V_H1-C_H1-C_H2(N末端)-BD2-C_H2(C末端)-C_H3；且BD1包括Fab結構域；其中V_H1包括Fab結構域之重鏈可變結構域且C_H1包括Fab之重鏈恆定結構域1。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，蛋白包括自N末端至C末端具有以下多肽結構域之嵌合重鏈：V_H1-C_H1-C_H2-BD2-C_H3；且BD1包括Fab結構域；其中V_H1包含Fab結構域之重鏈可變結構域且C_H1包括Fab之重鏈恆定結構域1。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，蛋白包括自N末端至C末端具有以下多肽結構域之嵌合重鏈：V_H1-C_H1-C_H2-C_H3(N末端)-BD2-C_H3(C末端)；且BD1包括Fab結構域；其中V_H1包括Fab結構域之重鏈可變結構域，且C_H1包括Fab之重鏈恆定結構域1。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，BD2係或包括scFv。在特定實施例中，scFv自N末端至C末端包括：V_H2-多肽連接體-V_L2或V_L2-多肽連接體-V_H2；其中V_H2包括scFv之重鏈可變結構域且V_L2包括scFv之輕鏈可變結構域。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，蛋白進一步包括介於BD2與Fc區之間之蛋白連接體L1。在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，蛋白進一步包括介於BD2與Fc區之間之第一蛋白連接體L1及第二蛋白連接體L2。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，BD2經由連接體(L1)締合至Fc區之C_H2結構域、C_H3結構域或C_H2及C_H3結構域之界面。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，BD2經由兩個蛋白連接體L1及L2締合至Fc區之C_H2結構域、C_H3結構域或C_H2及C_H3結構域之界面。在各個實施例中，L1及L2獨立地選自長度為1-25個胺基酸之蛋白連接體。在特定實施例中，L1及L2獨立地選自$(G_4S)_2$ (SEQ ID NO:41)、$(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:42)及$(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:43)。

在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，第一及第二表位係不同的。在本文所描繪任一態樣之各個實施例中，第一及第二表位係相同的。

【圖式簡單說明】

出於圖解說明本發明之目的，在圖式中繪示本發明之某些態樣。然而，本發明並不限於圖式中所繪示態樣之精確排列及方法。

圖1A-1F繪示本文所述某些實例性蛋白之一般示意圖。**圖1A-1C**使用PyMOL圖解說明CH2及CH3區且將溶劑暴露之表面環區域鑑別為球體。**圖1A**繪示CH2區中之環；**圖1B**繪示CH2-CH3界面中之環；且**圖1C**繪示CH3區中之環。**圖1D-1F**分別圖解說明包括代表性BD1及BD2結構域作為Fab及scFv結構域之實例性構築體。**圖1D**繪示在鉸鏈區附接之BD1及在CH2區中之溶劑暴露環處附接之BD2。**圖1E**繪示在鉸鏈區附接之BD1及在CH2-CH3界面中之溶劑暴露環處附接之BD2。**圖1F**繪示在鉸鏈區附接之BD1及在CH3區中之溶劑暴露環處附接之BD2。

圖2A-2C提供如本文所述在CH2中、CH2-CH3界面處及CH3中之溶劑可及環序列之展開視圖。納入BD2 (scFv)之構築體之實例包括在**圖2A-2C**中之每一者中。**圖2A**圖解說明經鑑別在CH2-CH3界面上游之CH2環中

之代表性環序列ISRTP (SEQ ID NO:39)。**圖2B**圖解說明CH2-CH3界面中之代表性環序列AKGQP (SEQ ID NO:40)。**圖2C**圖解說明CH2-CH3界面下游之CH3區中之代表性環序列SNG。

圖3展示靶向PD-1及CTLA-4之BiS2、BiS3及BiS5構築體之同時結合。跡線A9顯示BiS2 PD-1/CTLA-4，跡線B9顯示Bis3 PD-1/CTLA-4，且跡線C9顯示Bis5 PD-1/CTLA-4。

圖4顯示所提出PD-1/CTLA-4阻斷機制之示意圖。

圖5顯示展示靶向PD-1及CTLA-4之DuetMab構築體之同時結合之octet結合分析的結果。

圖6A-D顯示，在報導基因分析中PD-1/CTLA-4雙特異性結合蛋白抑制PD-1及CTLA-4路徑。圖6A繪示經由PD-1阻斷之T細胞活化。圖6B繪示經由CTLA-4阻斷之T細胞活化。圖6C顯示PD-1報導基因分析之結果。圖6D顯示CTLA-4報導基因分析之結果。

圖7顯示SEB分析之結果，其顯示PD-1/CTLA-4 DuetMab及BiS5Ab在葡萄球菌腸毒素B (SEB)分析中具有等效活性。

圖8A-B顯示與同型及親代mAb對照相比PD-1/CTLA-4 DuetMab在SEB分析中之活性。

圖9A-B顯示與PD-1/CTLA-4 DuetMab相比PD-1/CTLA-4 BiS5Ab在SEB分析中之活性。

圖10A-C顯示，PD-1/CTLA-4 DuetMab及BiS5Ab在混合淋巴球反應(MLR)分析中具有等效活性。圖10A係分析之示意圖(n=4個供體；2次獨立實驗)。

圖11A-D顯示與同型對照相比PD-1/CTLA-4 DuetMab在MLR分析中

之活性(n=2個供體；1次實驗)。

圖12A-D顯示與親代mAb對照相比PD-1/CTLA-4 DuetMab在MLR分析中之活性(n=2個供體；1次實驗)。

圖13A-D顯示與競爭抗體相比PD-1/CTLA-4 DuetMab在MLR分析中之活性(n=2個供體；1次實驗)。

圖14顯示食蟹猴中之單次劑量藥物動力學/藥效學(PK/PD)研究之研究設計。

圖15A-B顯示，PD-1/CTLA-4 DuetMab顯示食蟹猴中之明確藥效學(PD)。

圖16A-B顯示投用PD-1/CTLA-4 DuetMab (MEDI5752)及PD-1/CTLA-4 BiS5Ab (MEDI8500)之食蟹猴中之T細胞依賴性抗體反應(TDAR)。

圖17顯示研究PD-1/CTLA-4雙特異性分子之模型系統，其中穩定CHO細胞表現不同量之人類PD-1及/或CTLA-4。

圖18A-C顯示，PD-1/CTLA-4 DuetMab同時結合相同細胞表面上之PD-1及CTLA-4。

圖19A-C顯示確定在飽和表現過量PD-1之細胞上之CTLA-4中，協同結合是否與抗PD-1及抗CTLA-4抗體之組合相區分的實驗。

圖20A-D顯示，PD-1及CTLA-4親代單株抗體結合並佔據其靶受體而對未靶向受體無可量測之效應。

圖21A-D顯示，PD-1/CTLA-4 DuetMab以與單株抗體之組合相比低約250倍之濃度飽和表現過量PD-1之CHO細胞上之CTLA-4。

圖22A-F顯示，PD-1/CTLA-4 DuetMab以與僅表現CTLA-4之細胞

相比低約500倍之濃度飽和表現過量PD-1之CHO細胞上之CTLA-4。

圖23A-B顯示PD-1/CTLA-4 DuetMab優先順式結合至相同細胞表面上之PD-1及CTLA-4。圖23B中之曲美目單抗(Treme)係CTLA-4 mAb。

圖24A-D顯示PD-1/CTLA-4 DuetMab及親代單株抗體與經培養T細胞之結合及內化。PD-1/CTLA-4 DuetMab具有曲美目單抗(tremelimumab)之內化性質。

圖25A顯示內化分析之示意圖。**圖25B**顯示，PD-1/CTLA-4 DuetMab在表現10倍過量PD-1之穩定CHO細胞中具有曲美目單抗之內化性質。

圖26展示靶向PD-L1及CTLA-4之BiS2、BiS3及BiS5構築體之同時結合。跡線A11顯示Bis2 PD-L1CTLA-4，跡線B11顯示Bis3 PD-L1/CTLA-4，且跡線C11顯示Bis5 PD-L1/CTLA-4。

圖27A展示靶向PD-1及TIM3之BiS3構築體(純系62，野生型)之同時結合。**圖27B**展示靶向PD-1及TIM3之DuetMab構築體(純系62，野生型)之同時結合。

圖28A-28C提供在細胞殺死分析中單特異性TIM3及雙特異性PD-1_TIM3PD-1雙特異性構築體之細胞殺死活性之匯總。**圖28A**顯示在18 hr時共培養孔之明視野影像。抗TIM-3+抗PD1或TIM-3/PD-1雙特異性格式之組合增強腫瘤細胞死亡且增加T細胞活化，如藉由黏附細胞之減少及增強的T細胞破裂(凝集)所評價。**圖28B**顯示在與黑色素瘤特異性CD8+ T細胞共培養18 hr後對腫瘤細胞之活力染料攝取之評價。**圖28C**顯示共培養18 hr後之IFNγ分泌。雙特異性構築體通常展示較佳殺死活性，其中DuetMab格式展現最穩健的殺死活性。

圖29展示具有TIM3臂序列之PD-1/TIM3 DuetMab構築體之同時結合，該構築體係純系62之親和力成熟變體。

圖30顯示PD-1/TIM3雙特異性抗體(包括BiS3、BiS5及DuetMab)與過表現人類TIM3或人類PD1之CHO細胞之結合。PD-1及TIM3表現數據顯示於插圖中。

圖31顯示經活化T細胞純系(DMF4)上之TIM3及PD-1表現數據。

圖32A-C繪示CMV抗原喚醒分析之結果，其顯示PD-1/TIM3雙特異性抗體(包括BiS3、BiS5及DuetMab)展示與同型治療相比增強的活性(3個供體(1-2個重複/治療/供體)，1次實驗)。

圖33A-D顯示，在混合淋巴球反應(MLR)分析中在高於8 nM之濃度下，PD-1/TIM3雙特異性抗體(包括BiS3、BiS5及DuetMab)增強干擾素(IFNγ) (2-4個重複孔/治療/1個供體對/2次獨立實驗中之1者)。

圖34A-C顯示使用PD-1/TIM3雙特異性抗體(包括BiS3、BiS5及DuetMab)之PD-1報導基因分析(雙細胞系統)之結果。所有雙特異性格式皆展示與親代LO115 IgG1相似之活性(3-5次獨立實驗/3個生物重複/治療之編譯)。

圖35顯示使用BiS2及BiS3 OX40/PD-L1雙特異性分子之octet分析之結果。

圖36A-B顯示使用BiS2及BiS3 OX40/PD-L1雙特異性分子之SEB分析之結果。

圖37顯示使用BiS2及BiS3 OX40/PD-L1雙特異性分子之PD-L1報導基因分析之結果。

圖38顯示使用BiS2及BiS3 OX40/PD-L1雙特異性分子之CMV Ag喚

醒分析之結果。

圖39顯示展示靶向PD-L1及OX40之OX40(SLR)/PD-L1 BiS5構築體之同時結合之octet結合分析的結果。

圖40A-F顯示靶向PD-L1及OX40之雙特異性構築體與表現人類或食蟹猴OX40及PD-L1/B7H1之CHO細胞之結合。

圖41A-B顯示藉由流式細胞術(HyperCyt)量測的靶向PD-L1及OX40之雙特異性構築體與Jurkat OX40報導基因細胞NCI H358、CHOK1 B7H1(PD-L1) /OKT3細胞及HEK CD32a細胞之結合。

圖42A-B顯示使用OX40/PD-L1雙特異性分子之PD-L1報導基因分析之結果。

圖43A-B顯示在HEK CD32a細胞中使用OX40/PD-L1雙特異性分子之OX40報導基因分析之結果。

圖44A-B顯示在過表現CHOK PD-L1之細胞中使用OX40/PD-L1雙特異性分子之OX40報導基因分析之結果。

圖45A-B顯示使用OX40/PD-L1雙特異性分子對腫瘤細胞之PD-L1介導之OX40的激動作用。

圖46A-D顯示之結果指示，在用於OX40/腫瘤細胞分析之對照中，使用OX40/PD-L1雙特異性分子及NCI H358 PD-L1 KO細胞未檢測到激動作用。

圖47A-D顯示使用OX40/PD-L1雙特異性分子之SEB分析之結果。

圖48A顯示測試OX40/PD-L1雙特異性分子之Treg阻抑分析實驗之示意圖。圖48B-C顯示基於雙特異性分子結合之Treg阻抑。

圖49顯示使用OX40/PD-L1雙特異性分子之Treg阻抑分析之結果。

圖50顯示使用OX40/PD-L1雙特異性分子之Treg阻抑分析之結果。

圖51A-B顯示測試OX40/PD-L1雙特異性分子之混合白血球反應(MLR)分析實驗之設計。

圖52A-E顯示使用OX40/PD-L1雙特異性分子之MLR分析之結果。

圖53A-B顯示，BiS2及BiS5 OX40/PD-L1雙特異性分子調介天然殺手(NK)細胞對表現PD-L1或OX40之CHO細胞之抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)。

圖54顯示，BiS2及BiS5 OX40/PD-L1雙特異性分子調介NK細胞對表現PD-L1及OX40之CHO細胞之抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)。

圖55顯示，在抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)中，BiS2及BiS5 OX40/PD-L1雙特異性分子增加NK細胞對表現PD-L1及OX40之CHO細胞之CD107a動員。

圖56顯示，BiS2及BiS5 OX40/PD-L1雙特異性分子調介NK細胞對經活化同種異體T細胞之抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)。

圖57A-B顯示，在抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)中，BiS5 OX40/PD-L1增加來自兩個不同供體之NK細胞對經活化同種異體T細胞之CD107a動員。

圖58顯示比較OX40/PD-L1雙特異性分子之PK/PD之研究設計。

圖59顯示在食蟹猴中PD-L1/OX40雙特異性分子之血清濃度時間概況之比較。

圖60顯示PD-L1/OX40雙特異性分子對血清中之可溶性PD-L1之消耗。

圖61A-F提供PD-L1/OX40雙特異性分子之藥效學數據之匯總。基線定義為劑量前第-5天及第0天之平均值。

圖62繪示PD-1/OX40 BiS2 IgG4P單株抗體(mAb)之示意圖。

圖63繪示PD-1/OX40 BiS2 mAb之可能作用機制。

圖64繪示兩個不同批次之PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb與PD1-His及人類OX40-Fc之同時結合活性。

圖65A繪示OX40報導基因分析之示意圖。圖65B顯示使用PD1 LO115 mAb、OX40 mAb、對照mAb及PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb之OX40報導基因分析之結果。

圖66A繪示PD-1/PD-L1報導基因分析之示意圖。圖66B顯示使用PD1 LO115 mAb、OX40 mAb、對照mAb及PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb之PD1/PD-L1報導基因分析之結果。

圖67顯示使用PD-1(LO115)/OX40雙特異性分子之BiS2變體及對照之SEB分析之結果。

圖68顯示使用PD-1(LO115)/OX40雙特異性分子之BiS2變體及對照之CMV抗原喚醒分析之結果。

圖69顯示使用PD-1(AMP514)/OX40雙特異性分子之BiS2及BiS3變體及對照之CMV抗原喚醒分析之結果。

圖70顯示在食蟹猴中在單次IV劑量後PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb之血清濃度-時間概況。數據表示3個雄性/組之平均值 ± 標準偏差。LLOQ (5 ng/mL)由虛線顯示。PKC=藥物動力學濃度；LLOQ = 量化下限。

圖71顯示在食蟹猴中單次IV投與PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb後之

Ki67陽性CD4+及CD8+記憶T細胞%。數據表示3個雄性/組之平均值 ± 標準偏差。左圖A表示CD4+記憶T細胞且右圖顯示CD8+記憶T細胞。IV = 靜脈內。

圖72顯示量化食蟹猴血清中之PD-1/OX40之代表性標準曲線。

圖73A-73E提供本文所揭示之雙特異性結合蛋白(「BiS5」)在不同pH值下相對於不同BiS格式(「BiS4」)之說明性DSC溫度記錄圖。**圖73A**圖解說明pH對BiS4之熱穩定性之效應。**圖73B**圖解說明pH對BiS5之熱穩定性之效應。**圖73C**繪示BiS4之具有$T_{開始}$、T_m1、T_m2及T_m3之代表性曲線擬合之DSC溫度記錄圖。**圖73D**繪示BiS5之具有$T_{開始}$、T_m1、T_m2及T_m3之代表性曲線擬合之DSC溫度記錄圖。**圖73E**繪示表示pH對BiS4及BiS5格式之$T_{開始}$、T_m1、T_m2及T_m3之效應之圖。

圖74A及74B繪示在40℃下儲存4週之前及之後在pH 7.5下試樣之HP-SEC分析。**圖74A**提供在熱應力之前及之後BiS4及BiS5之SEC層析圖之疊加圖，實線對應於時間0時(無應力)之BiS4及BiS5試樣且虛線對應於在40℃下培育4週(有應力)之BiS4及BiS5試樣。**圖74B**提供條形圖，其表示pH 7.5對不同種類(單體、片段及聚集物)之BiS4及BiS5之效應，如在第0天及在40℃下4週後所量測。

圖75A-75C提供動力學圖，其顯示在40℃下pH 7.5對BiS4 (三角形跡線)及BiS5 (圓形跡線)之加速及短期儲存穩定性的效應。**圖75A**顯示剩餘單體之百分比，如藉由HP-SEC在4週時段內所量測。**圖75B**顯示片段化百分比，如藉由HP-SEC在4週時段內所量測。**圖75C**顯示聚集百分比，如藉由HP-SEC在4週時段內所量測。所呈現之數據來自單瓶分析。

圖76A-76C繪示BiS4 (三角形)及BiS5 (圓形)之pH速率概況圖。**圖**

76A顯示在40℃下不同pH條件對單體損失速率之效應。**圖76B**顯示在40℃下不同pH條件對片段化速率之效應。**圖76C**顯示在40℃下不同pH條件對聚集速率之效應。

圖77A及77B繪示BiS4及BiS5片段化之其他分析。**圖77A**顯示，在pH 7.5及40℃下(在時間 = 0時)，分子皆不展現可觀片段化。**圖77B**顯示，在與**圖77A**相同之條件下，但在40℃下儲存2週後，對BiS4觀察到可觀片段化且對BiS5觀察到少量片段化。

圖78繪示BiS4及BiS5片段化(左圖)及聚集(右圖)隨pH變化之分析。兩種格式在較低(5.5) pH下皆具有減少的片段化及聚集，而BiS5在用於片段化及聚集二者之兩個pH值下皆具有優良性能。

圖79繪示用於構築體(左圖) A、B、C及D以及(右圖) E、F、G及H之本文所揭示之若干BiS5雙特異性結合蛋白之DSC溫度記錄圖。構築體A及E包括IS-RTP處之scFv；B及F包括AK-GQP處之scFv；C及G包括S-NG處之scFv；且D及H包括SN-G處之scFv。用於構築體A、B、C及D之scFv係2F4 (IgG係LC10)，而用於E、F、G及H之scFv係LC10 (IgG係2F4)。各個T_M值與以下結構域相關：T_M1 = CH2/scFv；T_M2 = Fab；T_M3 = CH3。

圖80繪示FcRn與本文所揭示之雙特異性結合蛋白(構築體D及H)結合之代表性數據集。scFv在CH2-CH3結構域(即，在ISTRP環內)中之位置可對FcRn結合活性具有效應。

圖81繪示FcγR與本文所揭示之雙特異性結合蛋白(構築體E、G及H與FcγRIIIa-158V)結合之代表性數據集。插圖反映與主圖相同之數據，其在FcγRIIIa-158V注射時經再正規化。所有構築體皆能夠結合FcγR，且可觀察到基於scFv結構域之位置之親和力差別。

圖82顯示，完整ISRTP環對說明性雙特異性結合構築體(例如，A及E)之FcRn結合至關重要。引入N3環並未補償ISRTP環之中斷(BiS5E+N3)。將引入N3環中之scFv插入IgG1 Fc中使得IgG無法結合FcRn。x軸中之時間係以秒量測。

圖83繪示每一BiS1、BiS2、BiS3、BiS4及BiS5構築體之一般示意性結構格式。符號「k1」及「k2」指示如實例3中所論述之動力學分析中所用之片段化模式。

圖84繪示每一BiS1、BiS2、BiS3、BiS4及BiS5之片段化速率隨pH之變化。

圖85繪示每一BiS1、BiS2、BiS3、BiS4及BiS5之聚集速率隨pH之變化。

圖86繪示每一BiS1、BiS2、BiS3、BiS4及BiS5之單體損失速率隨pH之變化。

圖87繪示每一BiS1、BiS2、BiS3、BiS4及BiS5之HPSEC層析圖上之片段化模式及與峰之對應的表示。

圖88繪示在還原條件下片段化模式之代表性分析。

圖89繪示BiS5在還原及非還原條件下之結構排列。

圖90繪示SEB分析格式。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

本申請案主張於2016年5月6日提出申請之美國臨時申請案第62/332,788號之權益，該申請案之揭示內容之全文皆以引用方式併入本文中。

序列表

本申請案係以電子格式與序列表一起提出申請。該序列表係以創建於2017年5月2日、標題為IOBS_100_ST25.txt之檔案形式提供，其大小為244 kb。序列表之電子格式中之資訊之全文皆以引用方式併入本文中。

在繼續進一步詳細闡述本發明之前應理解，本發明並不限於特定組合物或製程步驟，因此可發生變化。必須註明，除非上下文另外明確指示，否則如說明書及隨附申請專利範圍中所用之單數形式「一(a及an)」及「該」包括複數個指示物。

除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語皆具有與熟習本發明所屬技術領域者通常所理解相同之含義。舉例而言，Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show，第2版，2002, CRC Press；Dictionary of Cell and Molecular Biology，第3版，1999, Academic Press；及Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology，修訂版，2000, Oxford University Press向熟習此項技術者提供本發明中所用之許多術語之一般辭典。

胺基酸在本文中可藉由其通常已知之三個字母符號或藉由IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission所推薦之一字母符號提及。同樣，核苷酸可藉由其公認之單字母代碼提及。

除非另外指明，否則抗體之可變結構域、互補決定區(CDR)及框架區(FR)中胺基酸之編號遵循如以下文獻中所述之Kabat定義：Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可含有較少或額外之對應於可變結構

域FR或CDR之縮短或插入之胺基酸。舉例而言，重鏈可變結構域可包括在H2之殘基52後之單胺基酸插入(根據Kabat之殘基52a)及重鏈FR殘基82後之插入殘基(例如，根據Kabat之殘基82a、82b及82c等)。可藉由將給定抗體序列之同源區與「標準」Kabat編號序列比對來確定該抗體殘基之Kabat編號。框架殘基之最大比對通常需要在編號系統中插入「間隔體」殘基，以用於Fv區。另外，在任一給定Kabat位點編號之某些個別殘基之身份可因種間或對偶基因趨異性而隨抗體鏈而變化。

如本文所用術語「抗體」及「抗體」(亦稱為免疫球蛋白)涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、自至少兩個不同的表位結合片段形成之多特異性抗體(例如多特異性抗體，例如PCT公開案WO2009018386、PCT申請案第PCT/US2012/045229號，其全文皆以引用方式併入本文中)、BiSAb、人類抗體、人類化抗體、駱駝化抗體、單鏈Fv (scFv)、單鏈抗體、單結構域抗體、結構域抗體、Fab片段、F(ab')2片段、展現所述生物活性之抗體片段(例如抗原結合部分)、二硫鍵連接之Fv (dsFv)及抗個體基因型(抗Id)抗體(包括例如針對本發明抗體之抗Id抗體)、胞內抗體及上述任一者之表位結合片段。具體而言，抗體包括免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子之免疫活性片段(即含有至少一個抗原結合位點之分子)。抗體亦包括肽與抗體或其部分之融合物，例如融合至Fc結構域之蛋白。免疫球蛋白分子可具有任一同型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、亞同型(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或異型(例如Gm，例如G1m(f、z、a或x)、G2m(n)、G3m(g、b或c)、Am、Em及Km(1、2或3))。抗體可衍生自任何哺乳動物，包括(但不限於)人類、猴、豬、馬、兔、狗、貓、小鼠等或其他動物(例如鳥，例如雞)。

CTLA-4

細胞毒性T淋巴球相關蛋白4 (CTLA-4)在活化T細胞上表現且用作共抑制劑以在CD28介導之T細胞活化後保持所檢查之T細胞反應。人們認為CTLA-4調控在TCR接合後幼稚及記憶T細胞之早期活化之幅度，且係影響抗腫瘤免疫性及自體免疫性二者之中心抑制路徑之一部分。CTLA-4排他性地在T細胞上表現，且其配體CD80 (B7.1)及CD86 (B7.2)之表現主要限於抗原呈遞細胞、T細胞及其他免疫調介細胞。業內已報導阻斷CTLA-4信號傳導路徑之拮抗性抗CTLA-4抗體會增強T細胞活化。一種該抗體伊匹單抗(ipilimumab)於2011年經FDA批准用於治療轉移性黑色素瘤。業內已提出使用抗CTLA-4抗體來治療感染及腫瘤及上調適應性免疫反應(參見美國專利第6,682,736號；第7,109,003號；第7,132,281號；第7,411,057號；第7,824,679號；第8,143,379號；第7,807,797號；第8,491,895號；第8,883,984號；及美國公開案第20150104409號，其全文皆以引用方式併入本文中)。

PD-L1

程式化死亡配體1 (PD-L1)亦係參與控制T細胞活化之受體及配體之複合系統之一部分。在正常組織中，PD-L1在T細胞、B細胞、樹突狀細胞、巨噬細胞、間質幹細胞、骨髓衍生性肥大細胞以及各種非造血細胞上表現。其正常功能係經由與其兩個受體：程式化死亡1 (亦稱為PD-1或CD279)及CD80 (亦稱為B7-1或B7.1)之相互作用調控T細胞活化與耐受性之間之平衡。PD-L1亦由腫瘤表現且在多個位點處起作用，以幫助腫瘤避開檢測並由宿主免疫系統消除。PD-L1係以高頻率在寬範圍之癌症中表現。在一些癌症中，PD-L1之表現與縮短的存活期及不利預後相關。阻斷

PD-L1與其受體之間之相互作用的抗體能夠減輕PD-L1依賴性免疫阻抑效應，且增強活體外抗腫瘤T細胞之細胞毒性活性。德瓦魯單抗(durvalumab)係能夠阻斷PD-L1與PD-1及CD80受體二者之結合之針對人類PD-L1的人類單株抗體。業內已提出使用抗PD-L1抗體來治療感染及腫瘤及增強適應性免疫反應(參見美國專利第8,779,108號及第9,493,565號，其全文皆以引用方式併入本文中)。

PD-1

程式化死亡-1 (「PD-1」)係擴展的CD28/CTLA-4 T細胞調控家族之約31 kD I型膜蛋白成員(參見Ishida, Y.等人(1992) 「Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death」, EMBO J. 11 :3887-3895。

PD-1在活化T細胞、B細胞及單核球上表現(Agata, Y.等人(1996) 「Expression of the PD-1 Antigen on the Surface of Stimulated Mouse T and B Lymphocytes」, Int. Immunol. 8(5):765-772；Martin-Orozco, N.等人(2007) 「Inhibitory Costimulation and Anti-Tumor Immunity」, Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298)。PD-1係在藉由結合PDL-1或PDL-2活化後負責下調免疫系統之受體(Martin-Orozco, N.等人(2007) 「Inhibitory Costimulation and Anti-Tumor Immunity」, Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298)且用作細胞死亡誘導物(Ishida, Y.等人(1992) 「Induced Expression of PD-1, A Novel Member of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death」, EMBO J. 11: 3887-3895；Subudhi, S.K.等人(2005) 「The Balance of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition」, J. Molec. Med. 83: 193-202)。此過

程經由過表現PD-L1引起阻抑性免疫反應而用於許多腫瘤中。

PD-1係在腫瘤學中用於免疫介導療法之經充分驗證之靶，且具有來自臨床試驗之治療尤其黑色素瘤及非小細胞肺癌(NSCLC)之陽性結果。PD-1/PD-L-1相互作用之拮抗性抑制增加T細胞活化，從而增強宿主免疫系統對腫瘤細胞之識別及消除。業內已提出使用抗PD-1抗體來治療感染及腫瘤及增強適應性免疫反應(參見美國專利第7,521,051號；第7,563,869號；第7,595,048號)。

OX40

OX40 (CD134；TNFRSF4)係主要在活化$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞、調控T (Treg)細胞及天然殺手(NK)細胞上發現之腫瘤壞死因子受體(Croft等人，2009, *Immunol Rev.* 229:173-91)。OX40具有一種已知內源配體OX40配體(OX40L；CD152；TNFSF4)，其以三聚體形式存在且可使OX40聚簇，從而產生T細胞內之強效細胞信號傳導事件。同前。經由活化$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞上之OX40之信號傳導可增強細胞介素產生、顆粒酶及穿孔蛋白釋放以及效應及記憶T細胞彙集物之擴增(Jensen等人，2010, *Semin Oncol.* 37:524-32)。另外，Treg細胞上之OX40信號傳導抑制Treg之擴增，關閉Treg之誘導並阻斷Treg阻抑功能(Voo等人，2013, *J Immunol.* 191:3641-50；Vu等人，2007, *Blood.* 110:2501-10)。

免疫組織化學研究及早期流式細胞術分析顯示，OX40在浸潤寬範圍之人類癌症之T細胞上表現(Baruah等人，2011, *Immunobiology* 217:668-675；Curti等人，2013, *Cancer Res.* 73:7189-98；Ladanyi等人，2004, *Clin Cancer Res.* 10:521-30；Petty等人，2002, *Am J Surg.* 183:512-8；Ramstad等人，2000, *Am J Surg.* 179:400-6；Sarff等人，2008, *Am J*

Surg. 195:621-5; 論述625；Vetto等人，1997, *Am J Surg*. 174:258-65)。儘管不希望受限於理論，腫瘤浸潤淋巴球上之OX40表現與若干人類癌症之較長存活期相關，此表明OX40信號可在建立抗腫瘤免疫反應中起作用(Ladanyi等人，2004, *Clin Cancer Res*. 10:521-30；Petty等人，2002, *Am J Surg*. 183:512-8)。

在多種非臨床小鼠腫瘤模型中，已成功地使用OX40激動劑(包括抗體及OX40配體融合蛋白)且具有有希望的結果(Kjaergaard等人，2000, *Cancer Res*. 60:5514-21；Ndhlovu等人，2001, *J Immunol*. 167:2991-9；Weinberg等人，2000, *J Immunol*. 164:2160-9)。經由OX40共刺激T細胞促進抗腫瘤活性，其在一些情形下耐久，從而提供針對後續腫瘤激發之長效保護(Weinberg等人，2000, *J Immunol*. 164:2160-9)。顯示效應T細胞之Treg細胞抑制及共刺激為OX40激動劑之腫瘤生長抑制所必需(Piconese等人，2008, *J Exp Med*. 205:825-39)。已探究出許多策略及技術經由與疫苗、化學療法、放射療法及免疫療法組合來增強OX40激動劑療法之抗腫瘤效應(Jensen等人，2010, *Semin Oncol*. 37:524-32；Melero等人，2013, *Clin Cancer Res*. 19:997-1008)。業內已提出使用抗OX40抗體來治療感染及腫瘤及上調適應性免疫反應(參見美國公開案第20160137740號，其全文皆以引用方式併入本文中)。

TIM3

T細胞抑制受體Tim-3 (含T細胞免疫球蛋白及黏蛋白結構域-3)在調控抗腫瘤免疫性中起作用，此乃因其在產生IFN-γ之CD4+輔助1 (Th1)及CD8+ T細胞毒性1 (Tc1) T細胞上表現。其最初鑑別為T細胞抑制受體，起特異性用於限制Th1及Tc1 T細胞反應之持續時間及量值的免疫檢查點

受體作用。其他研究已鑑別出，Tim-3路徑可與PD-1路徑協作以促進癌症中CD8+ T細胞之嚴重功能障礙表型之研發。調控T細胞(Treg)亦已在某些癌症中表現。鑒於TIM3路徑參與在一些癌症中具有免疫阻抑性之關鍵免疫細胞群體，故其代表有吸引力之候選腫瘤免疫療法。參見Anderson, A.C., *Cancer Immunol Res.*, (2014) 2:393-398；及Ferris, R.L.等人，*J Immunol.* (2014) 193:1525-1530。

A. 雙特異性結合蛋白

將多個結合位點添加至對單一結合結構域具有特異性之分子中可極大地增強分子之能力(例如治療性、診斷性等)。舉例而言，雙特異性抗體可結合至相同靶生物分子之一個以上之區域，從而賦予大於僅結合至靶上之一個表位之單特異性多肽的特異性。或者，雙特異性抗體可結合至多個靶生物分子，例如存在於複合物中之靶或期望螯合及/或聚簇之靶。在第三情形下，相同雙特異性抗體可在任一給定時間發揮不同功能，此端視其靶分子之位置及/或表現而定。

本文闡述新穎結合蛋白。該等新穎結合蛋白之一種該構形稱為「DuetMab」。DuetMab具有以下基本結構：Fc區，其具有經修飾重鏈，其中經修飾重鏈之CH1區具有天然半胱胺酸至非半胱胺酸胺基酸之取代及天然非半胱胺酸胺基酸至半胱胺酸胺基酸之取代；經修飾相應輕鏈，其中經修飾輕鏈之CL區亦具有天然半胱胺酸至非半胱胺酸胺基酸之取代及天然非半胱胺酸胺基酸至半胱胺酸胺基酸之取代；第二Fc區，其具有第二重鏈；及第二相應經修飾輕鏈，其中經修飾重鏈直接連接至相應經修飾輕鏈且處於單獨靶結合臂上，第二重鏈直接連接至第二相應輕鏈，且其中經取代半胱胺酸之源自天然非半胱胺酸胺基酸至半胱胺酸胺基酸之取代的經修

飾重鏈及經修飾相應輕鏈之源自天然非半胱胺酸胺基酸至半胱胺酸胺基酸之取代的經取代半胱胺酸可形成二硫鍵。與DuetMab相關之揭示內容可參見例如美國專利第9,527,927號，其全文皆以引用方式併入本文中。

該等新穎結合蛋白之其他實例性構形稱為「BiSAb」。實例性BiSAb之示意圖以及具體BiSAb之特定實例提供於本文中。更通常而言，BiSAb係含有兩個結合單元之多肽，該等結合單元中之每一者結合至表位(例如，結合單元1結合至第一表位且結合單元2結合至第二表位)。基本BiSAb呈二價以結合至兩個表位中之每一者(例如，多肽包含兩個結合單元1 (「BD1」或「BU1」)及兩個結合單元2 (「BD2」或「BU2」))。因此，倘若結合單元1及2結合不同的表位，則BiSAb具有習用雙特異性抗體之多特異性及習用抗體分子之二價。在結合單元1及2結合相同表位之實施例中，BiSAb具有習用抗體之單特異性但呈四價。除結合單元外，BiSAb亦包括連接體多肽及Fc部分。本發明係關於眾多種靶向調節免疫反應之分子之雙特異性結合蛋白，例如BiSAb及包含BiSAb核心之蛋白。通常，本文所述之新穎結合蛋白平臺及實例性雙特異性結合蛋白(BiSAb)包含結合單元/結構域、連接體多肽及Fc部分。本發明亦提供編碼該等BiSAb之核酸分子以及包括該等核酸且可用於產生及使用該等BiSAb之方法中的載體及宿主細胞。BiSAb、包含BiSAb核心之結合蛋白及BiSAb之各個部分更詳細闡述於本文中。

在一些態樣中，BiSAb可包含兩個衍生自特定結合蛋白(即抗體)之重鏈-輕鏈對，其中重鏈及輕鏈各自包含可變區(例如VL及VH)，其一起形成第一結合單元，且其中重鏈各自進一步包含第二結合單元(例如附接至Fc或Fab之scFv結構域)。倘若第一及第二結合單元結合不同表位，則每一重

鏈-輕鏈對具有雙特異性且兩對一起對每一表位呈二價。倘若第一及第二結合單元結合相同表位，則每一重鏈-輕鏈對具有單特異性且兩對一起對表位呈四價。在一些態樣中，兩個重鏈-輕鏈對相同。在一些態樣中，兩個重鏈-輕鏈對不同。

在具體實施例中，BiSAb之結構域可基於已知免疫球蛋白結構域。諸如單株抗體(mAb)等免疫球蛋白分子廣泛用作診斷及治療劑，且用於改造mAb之結合片段之方法為業內所熟知。單株抗體與所有免疫球蛋白分子一樣係由重鏈及輕鏈肽亞單位構成，該等亞單位各自包括可變及恆定結構域，其賦予結合特異性(可變結構域)及同型(恆定結構域)。

本文所揭示之BiSAb可具有與習用抗體類似之整體結構，但不同之處可在於存在另一結合單元，其附接於Fab結構域內之位置、附接於遠離Fab結構域之位置及附接於鉸鏈或Fc區內(例如，CH2、CH3或CH4區內或該等區域之界面(例如CH2-CH3界面)處)。因此，與呈二價以結合至單一表位之習用抗體不同，BiSAb呈二價以結合至兩個表位。然而，如本文所述，BiSAb仍可維持習用抗體之多種期望性質，例如結合FcRn之能力及結合C1q及Fcγ受體之能力(例如，指示調介抗體及補體依賴性細胞毒性之能力)。

本文所述之結合結構域可包含僅含mAb分子之部分之抗原結合片段，例如Fab、$F(ab')_2$、Fab'、scFv、二scFv、sdAb片段，此乃因已發現該等片段用作診斷或治療劑。另外，可改變可變結構域中之特定殘基以改良抗體及抗體片段之結合特異性及/或穩定性。不直接參與抗原結合之其他殘基可經替代以「人類化」非人類抗體之區域且降低mAb之免疫原性。

儘管BiSAb不同於習用抗體，例如，其呈二價以結合至兩個不同表

位(或呈四價以結合至單一表位)，但BiSAb之許多部分衍生自或類似於習用抗體部分。業內已知之任何mAb結構域及/或片段可用於本文所述之BiSAb中。具體而言，BiSAb可包含Fab及/或scFv片段或其變體。scFv之實例性非限制性變體包括(但不限於)串聯二scFv、串聯三scFv、雙價抗體及三價抗體。

本發明概言之係關於新穎結合蛋白，其中BiSAb係說明性實例。其他實例係包含BiSAb核心以及一或多個其他結合單元之結合蛋白及/或包含延長的BiSAb核心之結合蛋白。應理解，每當本文闡述BiSAb或BiSAb之特徵時，該描述通常適用於本發明之新穎結合蛋白，無論該等結合蛋白係包括兩個結合單元抑或兩個以上之結合單元。因此，術語BiSAb例示本文所述之結合蛋白，且倘若上下文容許，則對BiSAb之任何該提及亦可用於闡述包含BiSAb核心之結合蛋白。

新穎BiSAb結構平臺.

在一態樣中，本發明提供BiSAb結合蛋白，其具有包含通常藉由**圖1A-1F**中之示意圖圖解說明之結構域之結構平臺。該等圖具有說明性，且因此介於其他殘基之間之插入亦在所揭示結合蛋白之範疇內。**圖1A-1C**繪示在IgG1之CH2-CH3界面處使用PyMOL建模之抗體Fc區，且圖解說明本發明之若干實例性BiSAb。在CH2-CH3界面處或附近鑑別出三個表面暴露環，其可能能夠耐受第二結合部分(例如，scFv)之插入且不會損害IgG或第二結合部分之結構完整性或穩定性。**圖1A**係在CH2-CH3界面處附近之CH2區中鑑別出之一個該代表性環ISRTP (SEQ ID NO:39)之示意圖。**圖1D**亦顯示代表性構築體IS-scFv-RTP，其中scFv插入ISRTP環之S與R之間。**圖1B**係在CH2-CH3界面處鑑別出之代表性環AKGQP (SEQ ID

NO:40)之示意圖。**圖1E**顯示代表性構築體AK-scfv-GQP，其中scFv插入AKGQP環之K與G之間。**圖1C**係在CH2-CH3界面下游之CH3區中鑑別出之代表性環SNG之示意圖。**圖1F**亦顯示代表性構築體S-scfv-NG，其中scFv插入SNG環之S與N之間。本文實例提供定向為SN-scFv-G之構築體之說明，其中scFv插入SNG環之N與G之間。

因此，本發明之一態樣係關於包含兩個相同重鏈-輕鏈對之BiSAb，其中每一重鏈-輕鏈對具有雙特異性且兩個相同對一起對每一表位呈二價。每一重鏈-輕鏈對包含結合結構域(BD)，其可包含結合第一表位之Fab結構域(結合單元1)、結合第二表位之第二結合結構域(BD2) (或可為例如scFv之結合單元2)及Fc區。在一些實施例中，第二結合結構域可與Fab結構域締合。在一些實施例中，BiSAb之Fc區可與結合第二表位之第二結合結構域(BD2) (結合單元2；在**圖1D-1F**中繪示為scFv)締合。

在一些實施例中，本發明提供BiSAb，其具有包含兩條嵌合重鏈之一般平臺結構，該兩條嵌合重鏈各自包含重鏈可變區(VH1)、重鏈恆定區(CH1)、鉸鏈或多肽連接體區、包含CH2結構域及CH3結構域之Fc區，其中視情況在一或兩側上側接有多肽連接體(L1及/或L2)之第二結合結構域(BD2)與Fc區中之以下序列中之溶劑暴露環締合：(i) CH2區，(ii) CH2及CH3區之界面，或(iii) CH3區。本發明此態樣之BiSAb亦包含兩條習用抗體輕鏈，其各自包含形成第一結合結構域(BD1)之一部分之輕鏈可變區(VL1)及輕鏈恆定區(CL)。**圖1D-1F**中所圖解說明之具體BiSAb之結合結構域(BD2)係scFv。

圖1D-1F提供BiSAb之有用示意圖，BiSAb在本文中亦可稱為BiSAb「核心」。如**圖1D**中所顯示，多肽鏈包含具有以下各項之重鏈：VH1結構

域、CH1結構域、鉸鏈/連接體、部分N末端CH2結構域、可選連接體(在本文中稱為L1或第一多肽連接體)、結合單元2 (例如scFv之VL2及VH2)、另一可選連接體(例如，L2或第二多肽連接體)、剩餘C末端CH2結構域及CH3結構域。由於此重鏈可包括具有替代性結合蛋白及/或傳統輕鏈區之BD2，故其在本文中稱為嵌合重鏈。BiSAb包含兩條該等嵌合重鏈，且該等重鏈可相同或不同。應注意，結合單元1之可變重鏈結構域(VH)稱為VH1。在某些態樣中，此為結合至第一表位之Fab可變重鏈。類似地，結合單元1之可變輕鏈結構域(VL)稱為VL1。在某些態樣中，此為結合至第一表位之Fab可變輕鏈。相比之下，結合單元2之結構域用編號「2」表示，例如對於結合單元2係結合至第二表位之scFv之態樣為VH2及VL2。

類似地，如**圖1E**中所顯示，多肽鏈包含具有以下各項之重鏈：VH1結構域、CH1結構域、鉸鏈/連接體、CH2結構域、可選連接體(在本文中稱為L1或第一多肽連接體)、結合單元2 (例如scFv之VL2及VH2)、另一可選連接體(例如，L2或第二多肽連接體)及CH3結構域。在此實施例中，BiSAb包含第二結合結構域，其圖解說明為與Fc之CH2及CH3區界面處之序列締合之scFv。

如**圖1F**中所顯示，多肽鏈包含具有以下各項之重鏈：VH1結構域、CH1結構域、鉸鏈/連接體、CH2結構域、部分CH3結構域、可選連接體(在本文中稱為L1或第一多肽連接體)、結合單元2 (例如scFv之VL2及VH2)、另一可選連接體(例如，L2或第二多肽連接體)、CH3結構域。

在該等實施例中，BiSAb通常包括嵌合重鏈序列中之典型或經修飾之抗體鉸鏈區。含有鉸鏈區之胺基酸序列之非限制性實例包括：EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:44)；EPKSCDKT (SEQ ID

NO:45)；EPKSCGKT (SEQ ID NO:46)；EPKSC (SEQ ID NO:47)。

在闡述與本文所揭示之某些BiSAb分子之具體結構平臺相關之態樣的一般格式後，下文更詳細闡述所揭示BiSAb之各個部分及實例性功能性質。在其他實施例中，本發明涵蓋且提供本文以及其他揭示內容中簡單闡述之包含替代性結構格式及排列之其他BiSAb結合蛋白(例如，參見美國公開案第20090155275號及美國專利第9,580,509號)，該等專利中之每一者皆以引用方式併入本文中。

1. 結合單元

本發明BiSAb包含至少兩個結合單元或結合結構域(結合單元/結構域1及結合單元/結構域2)。在某些態樣中，每一結合單元結合至不同表位，即位於同一靶分子上之不同表位或不同靶上之表位。由於BiSAb之每一結合單元成對存在(存在兩個結合單元1及兩個結合單元2)，故BiSAb展現與每一表位之二價結合。根據本文教示應理解，倘若每一結合單元結合相同表位，則BiSAb將展現與該表位之四價結合。

在某些態樣中，第一結合單元係Fab片段，例如習用單株抗體之Fab片段或重組產生之包含可變輕鏈(VL1)、恆定輕鏈(CL)、可變重鏈(VH1)及恆定重鏈部分(CH1)之抗原結合片段。視情況，Fab之輕鏈及重鏈可經由一或多個二硫連接(例如經由適宜抗體鉸鏈區)互連。Fab結合至第一表位。

在某些態樣中，Fab衍生自或基於習用單株抗體(例如習用鼠類、人類化或人類抗體)之序列。在某些態樣中，含有衍生自或基於習用單株抗體序列之Fab之BiSAb保留習用抗體之一或多種功能活性(例如，保留至少80%或更大(80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%)之功能

活性)。舉例而言，在某些態樣中，含有該Fab之BiSAb保留習用抗體之抗原親和力、抑制活性、免疫系統調節活性、活化或誘導免疫反應及/或細胞(例如，癌細胞)殺死活性中之一或多者。

在某些態樣中，本發明BiSAb包含結合單元2，且結合單元2包含結合第二表位之結合結構域。結合單元2 (或結合結構域2 (BD2))可利用任何適宜策略與BiSAb締合。如本文所用，BD2與BiSAb「締合」(例如，在一些實施例中在Fc區內，在其他實施例中在Fab區內)意指兩個分子之間具有相互作用，使得BD2保持對靶結合之定向及與BiSAb結構之Fc部分或與Fab部分之締合。該等相互作用之實例包括經由胺基酸連接體共價鍵結，經由重組表現Fab區內、鉸鏈區內或Fc區內之CH2、CH3或CH2及CH3界面或CH4區處之BD2共價鍵結，及非共價相互作用(例如彼等相同區域內之凡得瓦(Waals)及氫鍵結相互作用)。在本發明範疇內之結合結構域(或「BD」或「結合單元」)之非限制性實例包括抗體可變區、抗體片段、scFv、單鏈雙價抗體或業內已知之其他結合結構域。結合結構域亦包括雙特異性單鏈雙價抗體或經設計以結合兩個不同表位之單鏈雙價抗體。在一態樣中，可用於構築本發明之多特異性表位結合結構域之表位結合結構域例示於US20100298541及US20130079280中，該等專利出於所有目的以引用方式併入本文中。

在某些態樣中，BiSAb可包含包括scFv之結合結構域。因此，在某些態樣中，結合單元2包含scFv。應理解，scFv涵蓋包含經由撓性多肽連接體連接至可變輕鏈結構域(VL)之可變重鏈結構域(VH)之多肽鏈。**圖1D-1F**顯示實例性BiSAb之示意圖，其中BD (在此處繪示為結合單元2)係具有可表示為VL2及VH2之如本文所述結構域之scFv。在一些態樣中，VH2與

VL2之間之多肽連接體包含蛋白酶裂解位點。scFv之VH及VL結構域可衍生自相同或不同抗體。在一些態樣中，scFv之VH或VL可包含一或多個結合至所關注靶之CDR，而VH或VL結構域之其餘部分衍生自不同抗體或係合成的。在一些態樣中，scFv包含抗體(例如業內已知結合至所關注靶之抗體)之至少一個CDR。在一些態樣中，scFv包含給定抗體之至少兩個CDR。在一些態樣中，scFv包含給定抗體之至少三個CDR。在一些態樣中，scFv包含給定抗體之至少四個CDR。在一些態樣中，scFv包含給定抗體之至少五個CDR。在一些態樣中，scFv包含給定抗體之至少六個CDR。

在某些態樣中，BD可包含受體之配體結合結構域或配體之受體結合結構域。在一些態樣中，BD包含對選自由以下組成之群之靶上之一或多個表位具有結合親和力之序列：CTLA-4、PD-1、PD-L1、OX40及TIM3，如上文所述。在一些實施例中，結合結構域對選自由以下組成之群之靶展現特異性結合活性：CTLA-4、PD-1、PD-L1、OX40及TIM3。本文所揭示之BiSAb可包含對本文所揭示之分子靶具有結合親和力或特異性結合活性之結合結構域之任一組合。舉例而言，本文所揭示之BiSAb可包含允許雙特異性結合至靶之結合結構域之組合，包括：CTLA-4及PD-1；CTLA-4及PD-L1；CTLA-4及TIM3；PD-1及PD-L1；PD-L1及OX40；PD-1及TIM3；PD-L1及TIM3；及TIM3。包括結合具體靶組合之結合結構域之BiSAb說明於實例中且包括以下非限制性組合：PD-1/CTLA-4；PD-L1/CTLA-4；PD-1/OX40；PD-L1/OX40；及PD-1/TIM3。

在一些其他實施例中，BiSAb對至少一個靶分子展現大於用於產生

BiSAb之親代單特異性結合序列之結合活性的結合活性(例如，結合親和力及/或結合特異性)。在類似實施例中，BiSAb可對兩個靶分子展現大於用於產生BiSAb之兩條親代單特異性結合序列之結合活性的結合活性(例如，結合親和力及/或結合特異性)。在另一實施例中，BiSAb可對兩個靶分子展現大於用於產生BiSAb之親代單特異性結合序列之組合之結合活性的結合活性(例如，結合親和力及/或結合特異性)。BiSAb相對於單獨或呈組合形式之親代單特異性結合序列增強之結合性質提供相對於使用靶向相同分子之單特異性治療劑(即使在組合使用時)意外的優點。

在一些實施例中，本發明係關於結合至選自由以下組成之群之靶之抗體或其抗原結合片段：CTLA-4、PD-1、PD-L1、OX40及TIM3。在該等實施例中，抗體或其抗原結合片段可包含重鏈序列及輕鏈序列或重鏈序列及輕鏈序列之包含重鏈及輕鏈序列之CDR1、CDR2及CDR3序列的部分。在其他實施例中，抗體或其抗原結合片段可包含重鏈可變(HCv)區序列及輕鏈可變(LCv)區序列或HCv及LCv之包含直鏈及輕鏈序列之CDR1、CDR2及CDR3序列的部分。在其他實施例中，抗體或其抗原結合片段可包含重鏈及輕鏈序列之CDR1、CDR2、及CDR3序列。在一些實施例中，抗體可為嵌合、人類化或人類抗體。在一些實施例中，抗體可為多株或單株抗體。在其他實施例中，抗體係單株抗體。

在一些實施例中，可使用包含如上文所論述該等「親代」抗體之抗原結合區之全部或一部分的結構域來產生本文所揭示之雙特異性結合蛋白(BiSAb)。實例中所說明之非限制性實施例提供關於可鑑別及組合抗體序列以產生展現與分子靶組合之雙特異性結合之BiSAb的方法之描述。

可單獨或組合使用若干方法來改良包含scFv分子之BiSAb之穩定

性。可單獨或與本文所述其他方法中之一或多者組合使用之一種可能方法係改造連接scFv結構域之連接體的長度及/或組成以穩定scFv部分。

可使用之另一可能方法係將至少兩個胺基酸取代(亦稱為修飾或突變)引入scFv之VH及/或VL結構域中以促進二硫鍵形成(例如，參見Brinkmann等人，1993, PNAS, 90:7538-42；Zhu等人，1997, Prot. Sci. 6:781-8；Reiter等人，1994, Biochem. 33:5451-9；Reiter等人，1996, Nature 14: 1239-45；Luo等人，1995, J. Biochem. 118:825-31；Young等人，1995, FEBS Let. 377:135-9；Glockshuber等人，1990, Biochem. 29:1362-7)。此方法可單獨或與本文所述其他方法中之一或多者組合使用。

在某些態樣中，可將一或多個突變引入scFv之VH及VL結構域中之每一者中以在表現包含scFv之BiSAb時促進VH與VL結構域之間之鏈間二硫鍵形成。在另一態樣中，將兩個突變引入鏈之相同結構域中。在某一態樣中，將兩個突變引入不同鏈中。在某些態樣中，引入多個互補突變以促進多個二硫鍵或其他穩定相互作用之形成。在某些態樣中，引入半胱胺酸以促進二硫鍵形成。可突變成半胱胺酸之實例性胺基酸包括VH2之胺基酸43、44、45、46、47、103、104、105及106及VL2之胺基酸42、43、44、45、46、98、99、100及101。前述編號係基於鑑別僅相對於scFv之VH2及VL2之位置(而非相對於本文所提供BiSAb或SEQ ID NO之全長序列中之胺基酸位置)之Kabat編號。可突變成半胱胺酸殘基之胺基酸位置之實例性組合包括：VH44-VL100、VH105-VL43、VH105-VL42、VH44-VL101、VH106-VL43、VH104-VL43、VH44-VL99、VH45-VL98、VH46-VL98、VH103-VL43、VH103-VL44及VH103-VL45。在一些態樣

中，將VH之胺基酸44及VL之胺基酸100突變成半胱胺酸。

可單獨或與本文所述其他方法中之一或多者組合使用之另一方法係選擇scFv之結構域之順序。在某些態樣中，VH結構域相對於VL結構域之定向經最佳化以用於穩定性。在某些態樣中，scFv呈VH-連接體-VL定向。在某些態樣中，scFv呈VL-連接體-VH定向。在關於本文所揭示新穎BiSAb格式之實施例中，scFv中之結構域定向可決定scFv與BiSAb之Fc部分締合之方式。而此更詳細闡述於下文多肽連接體之上下文中。。然而，簡言之，鑒於BD (例如，scFv)藉由可選多肽連接體(L1)及(L2)互連至CH2、CH3或CH2及CH3之界面，結構域之順序決定scFv之互連至L1之部分及scFv之互連至L2之部分。

可單獨或與本文所述之其他方法組合使用之另一方法係藉由突變scFv之一或多個表面殘基引入一或多個穩定突變。在一些態樣中，在scFv之VH及/或VL結構域中之一或兩者中突變1個、2個、3個、4個、5個、6個或6個以上之殘基。在某些態樣中，僅在scFv之VH結構域中製造改變。在某些態樣中，僅在scFv之VL結構域中製造改變。在某些態樣中，在scFv之VH及VL結構域二者中製造改變。可在每一結構域中製造相同數量之改變或可在每一結構域中製造不同數量之改變。在某些態樣中，改變中之一或多者係來自存在於未經修飾之親代scFv中之殘基的保守胺基酸取代。在其他態樣中，改變中之一或多者係來自存在於未經修飾之親代scFv中之殘基的非保守胺基酸取代。在scFv之VH或VL結構域中之一或兩者中製造多個取代時，每一取代獨立地係保守或非保守取代。在某些態樣中，所有取代皆為保守取代。在某些態樣中，所有取代皆為非保守的。在某些態樣中，至少一個取代係保守的。在某些態樣中，至少一個取代係非保守

的。

可單獨或與其他方法組合使用之另一方法係藉由突變一或多個存在於scFv之VH及/或VL結構域中之殘基引入一或多個胺基酸取代，以匹配已知抗體之VH及/或VL結構域之共有序列之該具體位置的最頻繁殘基。在某些態樣中，在scFv之VH結構域及/或VL結構域中之一或兩者中之1個、2個、3個、4個、5個、6個或6個以上之位置引入取代。可在每一結構域中製造相同數量之改變或可在每一結構域中製造不同數量之改變。在某些態樣中，序列中匹配給定共有序列之一或多個改變係來自存在於未經修飾之VH及/或VL序列中之殘基的保守胺基酸取代。在其他態樣中，改變中之一或多者代表來自存在於未經修飾之VH及/或VL序列中之殘基的非保守胺基酸取代。在scFv之VH或VL結構域中之一或兩者中製造多個取代時，每一取代獨立地係保守或非保守取代。在某些態樣中，所有取代皆為保守取代。在某些態樣中，所有取代皆為非保守取代。在某些態樣中，至少一個取代係保守的。在某些態樣中，至少一個取代係非保守的。

應注意，闡述為可用於修飾或穩定scFv部分之任一修飾可適用於修飾Fab部分。舉例而言，BiSAb之Fab部分之可變結構域可經修飾以改良穩定性、抗原結合及諸如此類。另外，Fab或scFv部分可經修飾以降低免疫原性。

在某些態樣中，結合單元2 (BD)係scFv，例如衍生自習用單株抗體且包含藉由撓性連接體(例如甘胺酸-絲胺酸連接體)互連之可變輕鏈(VL2)及可變重鏈(VH2)之scFv。視情況，scFv之可變輕鏈及可變重鏈可進一步經由一或多個二硫連接互連，且如上文所述可包括一或多個突變或變化。scFv結合至第二表位。在某些態樣中，第二表位與結合單元1所結合之第

一表位不同。在其他態樣中，第二表位與結合單元1所結合之第一表位相同。在某些態樣中，scFv衍生自或基於習用單株抗體(例如習用鼠類、人類化或人類抗體)之序列。在某些態樣中，含有衍生自或基於習用單株抗體序列之scFv之BiSAb保留習用抗體之一或多種功能活性(例如，保留至少80%或更大(80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%)之功能活性)。舉例而言，在某些態樣中，含有該scFv之BiSAb保留習用抗體之抗原親和力、抑制活性或細胞殺死活性中之一或多者。

在某些態樣中，BiSAb包含本文所述之任一結合單元1及任一結合單元2，包括結合單元1及結合單元2之任一組合。舉例而言，在某些態樣中，本發明提供多肽，其包含結合至具體靶(例如，結合至具體靶上之表位)之Fab (例如包含具體胺基酸序列或由具體核苷酸序列編碼之Fab)及/或結合至具體靶(例如，結合至具體靶上之表位)之scFv (例如包含具體胺基酸序列或由具體核苷酸序列編碼之scFv)。

如上文詳細闡述，結合單元1及結合單元2可經由連接體多肽1 (L1、L2)經由共價鍵結與BiSAb締合。通常，連接係藉助BiSAb之嵌合重鏈，使得互連係藉助重鏈C_H2結構域、重鏈C_H3結構域或重鏈C_H2結構域及C_H3結構域之界面，或在一些實施例中在鉸鏈區或Fab結構域內。L1及L2之長度及序列可彼此獨立地變化，且實例性構形闡述於本文中。本發明涵蓋BiSAb，其包含結合單元及連接體多肽之任一組合，包括結合期望靶之特定結合單元及本文所述之特定L1及L2多肽連接體之任一組合。

2. Fc區

如本文所用「Fc區」涵蓋衍生自免疫球蛋白(較佳人類免疫球蛋白)之恆定區(包括恆定區之片段、類似物、變體、突變體或衍生物)之結構域。

適宜免疫球蛋白包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4及其他類別，例如IgA、IgD、IgE及IgM。Fc區可為天然序列Fc區或改變的Fc區。免疫球蛋白之Fc區通常包含兩個恆定結構域、C_H2結構域及C_H3結構域，且視情況包含C_H4結構域。本發明之BiSAb包括包含C_H2結構域及C_H3結構域之Fc區。

a. 改變的Fc區

改變的Fc區(在本文中亦稱為「變體Fc區」)可用於改變本發明BiSAb之效應物功能及/或半衰期。可在Fc區中製造一或多個變化以改變分子之功能及/或藥物動力學性質。該等變化可減小或增加IgG之C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)或FcγR結合以及抗體依賴性細胞毒性(ADCC)或抗體依賴性細胞介導之吞噬作用(ADCP)。本發明涵蓋BiSAb，其中已製造多個改變以藉由增強或減弱功能或提供期望效應物功能來精密地調整效應物功能。因此，在本發明之一態樣中，BiSAb包含變體Fc區(即，已如下文所論述經改變之Fc區)。包含變體Fc區之BiSAb在本文中亦稱為「Fc變體BiSAb」。如本文所用「天然」係指未經修飾之親代序列，且包含天然Fc區之BiSAb在本文中稱為「天然Fc BiSAb」。Fc變體BiSAb可藉由多種熟習此項技術者所熟知之方法來產生。非限制性實例包括分離抗體編碼區(例如，自雜交瘤)及在Fc區中製造一或多個期望取代。或者，可將BiSAb之抗原結合部分(例如，可變區)亞選殖至編碼變體Fc區之載體中。在一態樣中，變體Fc區展現與天然Fc區相比相似程度之誘導效應物功能。在另一態樣中，變體Fc區展現與天然Fc相比較高之效應物功能誘導。在另一態樣中，變體Fc區展現與天然Fc相比較低之效應物功能誘導。變體Fc區之一些特定態樣詳述於下文中。量測效應物功能之方法為業內所熟知。

一般而言，效應物功能係經由改變Fc區來修飾，該等改變包括(但不

限於)胺基酸取代、胺基酸添加、胺基酸缺失及改變Fc胺基酸之轉譯後修飾(例如醣基化)。可使用下文所述之方法來精密地調整本發明BiSAb之效應物功能、Fc區對FcR結合性質(例如，親和力及特異性)之比率，以產生具有期望性質之BiSAb。

應理解，如本文所用之Fc區包括包含抗體分子之恆定區、不包括第一恆定區免疫球蛋白結構域之多肽。因此，Fc係指IgA、IgD及IgG之最後兩個恆定區免疫球蛋白結構域，及IgE及IgM之最後三個恆定區免疫球蛋白結構域，及該等結構域之撓性鉸鏈N末端之全部或一部分。對於IgA及IgM，Fc可包括J鏈。對於IgG，Fc包含免疫球蛋白結構域Cγ2及Cγ3 (Cγ2及Cγ3)以及視情況Cγ1 (Cγ1)與Cγ2 (Cγ2)之間之下鉸鏈的一部分。儘管Fc區之邊界可發生變化，但如本文所用之人類IgG重鏈Fc區包含殘基A231至其羧基末端，其中編號係依照如Kabat中所述之EU索引。Fc可指分離中之此區域，或抗體、抗體片段或Fc融合蛋白上下文中之此區域。已在多個不同Fc位置觀察到多型性，該等位置包括(但不限於)如EU索引編號之IgG1之位置270、272、312、315、356及358，且因此在所呈現序列與先前技術序列之間可存在微小差別。

在一態樣中，本發明涵蓋Fc變體BiSAb，其具有相對於天然Fc BiSAb改變的Fc配體結合性質(例如，Fc受體、C1q)。結合性質之實例包括(但不限於)結合特異性、平衡解離常數(K_d)、解離及締合速率(分別為$k_{解離}$及$k_{締合}$)、結合親和力及/或親合力。業內已知平衡解離常數(K_d)定義為$k_{解離}/k_{締合}$。在某些態樣中，具有低K_d之包含Fc變體區之BiSAb可比具有高K_d之BiSAb更合意。然而，在一些情況下，$k_{締合}$或$k_{解離}$之值可比K_d值更相關。熟習此項技術者可確定對給定應用最重要之動力學參數。舉例而言，減少

與一或多種陽性調控劑(例如，FcγRIIIA)之結合及/或增強與抑制性Fc受體(例如，FcγRIIB)之結合的修飾將適於降低ADCC活性。因此，對不同受體之結合親和力之比率(例如，平衡解離常數(K_d)之比率)可指示本發明Fc變體BiSAb之ADCC活性是增強抑或減弱。另外，減少與C1q結合之修飾將適於降低或消除CDC活性。

在一態樣中，Fc變體BiSAb展現與天然Fc BiSAb相比改變的對一或多種Fc受體之結合親和力，該等Fc受體包括(但不限於) FcRn、FcγRI (CD64，包括同種型FcγRIA、FcγRIB及FcγRIC)；FcγRII (CD32，包括同種型FcγRIIA、FcγRIIB及FcγRIIC)；及FcγRIII (CD16，包括同種型FcγRIIIA及FcγRIIIB)。

在某些態樣中，Fc變體BiSAb具有增加的Fc配體親和力。在其他態樣中，Fc變體BiSAb具有相對於天然Fc BiSAb減小的Fc配體親和力。

在特定態樣中，Fc變體BiSAb具有增強的與Fc受體FcγRIIIA之結合。在另一特定態樣中，Fc變體BiSAb具有增強的與Fc受體FcγRIIB之結合。在另一特定態樣中，Fc變體BiSAb具有增強的與Fc受體FcγRIIIA及FcγRIIB二者之結合。在某些態樣中，與天然Fc BiSAb相比，具有增強的與FcγRIIIA結合之Fc變體BiSAb並不具有結合FcγRIIB受體之同步增加。在特定態樣中，Fc變體BiSAb具有減少的與Fc受體FcγRIIIA之結合。在另一特定態樣中，Fc變體BiSAb具有減少的與Fc受體FcγRIIB之結合。在另一特定態樣中，Fc變體BiSAb具有增強的與Fc受體FcRn之結合。在另一特定態樣中，展現改變的FcγRIIIA及/或FcγRIIB親和力之Fc變體BiSAb具有增強的與Fc受體FcRn之結合。在另一特定態樣中，相對於天然Fc BiSAb，展現改變的FcγRIIIA及/或FcγRIIB親和力之Fc變體BiSAb具有改

變的與C1q之結合。

在另一態樣中，Fc變體BiSAb展現相對於天然Fc BiSAb增加或減小的C1q親和力。在另一特定態樣中，展現改變的C1q親和力之Fc變體BiSAb具有增強的與Fc受體FcRn之結合。在另一特定態樣中，相對於天然Fc BiSAb，展現改變的C1q親和力之Fc變體BiSAb具有改變的與FcγRIIIA及/或FcγRIIB之結合。

應意識到，抗體能夠經由業內統稱為抗體效應物功能之多個過程引導靶向抗原之攻擊及破壞。該等過程中稱為「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」者係指以下細胞毒性形式：結合至存在於某些細胞毒性細胞(例如天然殺手(NK)細胞、嗜中性球及巨噬細胞)上之Fc γ受體(FcγR)上之分泌性Ig使該等細胞毒性效應細胞能夠特異性結合至帶有抗原之靶細胞且隨後利用細胞毒素殺死該靶細胞。針對靶細胞表面之特異性高親和力IgG抗體「武裝」細胞毒性細胞且為該殺死所必需。靶細胞之溶解發生在細胞外，需要直接細胞與細胞接觸，且不涉及補體。術語效應物功能所涵蓋之另一過程係補體依賴性細胞毒性(下文稱為「CDC」)，其係指抗體介導之補體系統破壞靶細胞之生物化學事件。補體系統係在正常血漿中發現之與抗體組合破壞病原性細菌及其他外源細胞之複雜蛋白系統。術語效應物功能所涵蓋之另一過程係抗體依賴性細胞介導之吞噬作用(ADCP)，其係指細胞介導之反應，其中表現一或多個效應物配體之非特異性細胞毒性細胞識別靶細胞上之結合抗體且隨後引起靶細胞之吞噬作用。

涵蓋藉由活體外功能分析來表徵Fc變體BiSAb以確定一或多個FcγR介導之效應細胞功能。在某些態樣中，Fc變體BiSAb在活體內模型(例如

本文所闡述及揭示之彼等)中具有與基於活體外之分析中之彼等相似的結合性質及效應細胞功能。然而，本發明並不排除在基於活體外之分析中不展現期望表型、但展現活體內期望表型之Fc變體BiSAb。

可藉由增加Fc區對FcRn之結合親和力來增加包含Fc區之蛋白之血清半衰期。如本文所用術語「抗體半衰期」意指抗體之藥物動力學性質，其係抗體分子在其投與後之平均存活時間的量度。抗體半衰期可表示為自患者身體(或其他哺乳動物)或其特定區室消除50%之已知免疫球蛋白量所需之時間，例如如在血清中(即循環半衰期)或在其他組織中所量測。半衰期可隨免疫球蛋白或免疫球蛋白類別而變化。一般而言，抗體(或BiSAb)半衰期之延長可延長所投與BiSAb之循環中之平均滯留時間(MRT)。

半衰期之延長允許減小給予患者之藥物量以及減小投與頻率。為延長BiSAb之血清半衰期，可將補救受體結合表位納入BiSAb (尤其抗體片段)中，如例如美國專利第5,739,277號中所述。如本文所用術語「補救受體結合表位」係指IgG分子(例如，IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)之Fc區中負責延長IgG分子之活體內血清半衰期之表位。或者，可藉由修飾鑑別為參與Fc與FcRn受體之間之相互作用的胺基酸殘基來產生具有延長的半衰期之本發明BiSAb(參見例如美國專利第6,821,505號及第7,083,784號)。另外，可藉由業內廣泛使用之技術偶聯至PEG或白蛋白來延長本發明BiSAb之半衰期。

預期將其他結合結構域插入如本文所述之Fc區中及/或抗原之後續結合可影響Fc活性。例如，結合抗原可增加或減小對FcgR, C1q及FcRn之結合親和力及活性。此將產生抗原依賴性開關以調節多個抗體依賴性過程。在一態樣中，抗原結合可減小與FcRn之相互作用，此允許游離BiSAb與

FcRn相互作用且具有正常半衰期，但允許BiSAb-Ag複合物之快速清除/細胞內化。另外，此可允許BD2抗原介導之相互作用以對BD1所結合抗原之清除具有效應。在另一態樣中，BiSAb可包含直接插入BD2之Fc區(Fc-BD2)。

在一態樣中，本發明提供Fc變體，其中Fc區包含一或多個選自由以下組成之群之位置的修飾(例如，胺基酸取代、胺基酸插入、胺基酸缺失)：221、225、228、234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、250、251、252、254、255、256、257、262、263、264、265、266、267、268、269、279、280、284、292、296、297、298、299、305、308、313、316、318、320、322、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、339、341、343、370、373、378、392、416、419、421、428、433、434、435、436、440及443，其係如Kabat中所述之EU索引編號。視情況，Fc區可包含熟習此項技術者已知之其他及/或替代性位置之修飾(例如，參見美國專利5,624,821；6,277,375；6,737,056；7,083,784；7,317,091；7,217,797；7,276,585；7,355,008)。其他有用胺基酸位置及特定取代例示於以下各表中：US 6,737,056之表2及6-10；US 2006/024298之圖41中所呈現之表；US 2006/235208之圖5、12及15中所呈現之表；US 2006/0173170之圖8、9及10中所呈現之表以及WO 09/058492之圖8-10、13及14中所呈現之表。

在特定態樣中，本發明提供Fc變體，其中Fc區包含至少一個選自由以下組成之群之取代：221K、221Y、225E、225K、225W、228P、234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、

234F、235A、235D、235R、235W、235P、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235E、235F、236E、237L、237M、237P、239D、239E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、240A、240T、240M、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L、 243Y、243R、243Q、244H、245A、247L、247V、247G、250E、250Q、251F、252L、252Y、254S、254T、255L、256E、256F、256M、257C、257M、257N、262I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264Y、264E、265A、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、266I、266A、266T、266M、267Q、267L、268E、269H、269Y、269F、269R、270E、280A、284M、292P、292L、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、296I、296H、296G、297S、297D、297E、298A、298H、298I、298T、298F、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、305I、308F、313F、316D、318A、318S、320A、320S、322A、322S、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325T、325V、325H、326A、326D、326E、326G、326M、326V、327G、327W、327N、327L、328S、328M、328D、328E、328N、328Q、328F、328I、328V、328T、328H、328A、329F、329H、329Q、330K、330G、330T、330C、330L、330Y、330V、330I、330F、330R、330H、331G、331A、331L、331M、331F、331W、331K、331Q、331E、331S、331V、331I、331C、331Y、331H、331R、331N、331D、331T、332D、332S、332W、

332F、332E、332N、332Q、332T、332H、332Y、332A、333A、333D、333G、333Q、333S、333V、334A、334E、334H、334L、334M、334Q、334V、334Y、339T、370E、370N、378D、392T、396L、416G、419H、421K、428L、428F、433K、433L、434A、424F、434W、434Y、436H、440Y及443W，其係如Kabat中所述之EU索引編號。視情況，Fc區可包含熟習此項技術者已知之其他及/或替代性胺基酸取代，包括(但不限於)以下各表中所例示之彼等：US 6,737,056之表2及6-10；US 2006/024298之圖41中所呈現之表；US 2006/235208之圖5、12及15中所呈現之表；US 2006/0173170之圖8、9及10中所呈現之表以及US20090041770之圖8、9及10中所呈現之表，該等專利皆以引用方式併入本文中。

在特定態樣中，本發明提供Fc變體BiSAb，其中Fc區包含一或多個選自由以下組成之群之位置之至少一個修飾(例如，胺基酸取代、胺基酸插入、胺基酸缺失)：228、234、235及331，其係如Kabat中所述之EU索引編號。在一態樣中，修飾係至少一個選自由以下組成之群之取代：228P、234F、235E、235F、235Y及331S，其係如Kabat中所述之EU索引編號。

在另一特定態樣中，本發明提供Fc變體BiSAb，其中Fc區係IgG4 Fc區且包含一或多個選自由以下組成之群之位置之至少一個修飾：228及235，其係如Kabat中所述之EU索引編號。在另一特定態樣中，Fc區係IgG4 Fc區且非天然胺基酸選自由以下組成之群：228P、235E及235Y，其係如Kabat中所述之EU索引編號。

在另一特定態樣中，本發明提供Fc變體BiSAb，其中Fc區包含一或

多個選自由以下組成之群之位置之至少一個非天然胺基酸：239、330及332，其係如Kabat中所述之EU索引編號。在一態樣中，修飾係至少一個選自由以下組成之群之取代：239D、330L、330Y及332E，其係如Kabat中所述之EU索引編號。參見美國專利第7,317,091號，其全文皆以引用方式併入本文中。

在特定態樣中，本發明提供Fc變體BiSAb，其中Fc區包含一或多個選自由以下組成之群之位置之至少一個非天然胺基酸：252、254及256，其係如Kabat中所述之EU索引編號。在一態樣中，修飾係至少一個選自由以下組成之群之取代：252Y、254T及256E，其係如Kabat中所述之EU索引編號。參見美國專利第7,083,784號，其全文皆以引用方式併入本文中。

在某些態樣中，本發明提供Fc變體BiSAb，其中Fc區包含如Kabat中所述之EU索引編號之位置428之非天然胺基酸。在一態樣中，位置428之修飾選自由以下組成之群：428T、428L、428F及428S，其係如Kabat中所述之EU索引編號。參見美國專利第7,670,600號，其全文皆以引用方式併入本文中。在另一態樣中，Fc變體BiSAb可進一步包含如Kabat中所述之EU索引編號之位置434之非天然胺基酸。在一態樣中，位置434之修飾選自由以下組成之群：434A、434S及434F，其係如Kabat中所述之EU索引編號。在其他態樣中，本發明提供Fc變體BiSAb，其中Fc區包含如Kabat中所述之EU索引編號之位置428及434之非天然胺基酸。在特定態樣中，Fc區包含428L、434S。參見美國專利第8,088,376號。

在某些態樣中，由IgG抗體引起之效應物功能強烈地依賴於連接至蛋白Fc區之碳水化合物部分(Claudia Ferrara等人，2006, Biotechnology

and Bioengineering 93:851-861)。因此，Fc區之醣基化可經修飾以增加或降低效應物功能(參見例如Umana等人，1999, Nat. Biotechnol 17:176-180；Davies等人，2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294；Shields等人，2002, J Biol Chem 277:26733-26740；Shinkawa等人，2003, J Biol Chem 278:3466-3473；美國專利第6,602,684號；第6,946,292號；第7,064,191號；第7,214,775號；第7,393,683號；第7,425,446號；第7,504,256號；POTELLIGENT™技術(Biowa, Inc. Princeton, N.J.)；GLYCOMAB™醣基化改造技術(GLYCART biotechnology AG, Zurich, 瑞士))。因此，在一態樣中，本發明BiSAb之Fc區包含改變的胺基酸殘基醣基化。在另一態樣中，改變的胺基酸殘基醣基化可降低效應物功能。在另一態樣中，改變的胺基酸殘基醣基化可增加效應物功能。在特定態樣中，Fc區具有減少的岩藻糖基化。在另一態樣中，Fc區係無岩藻糖基化的(參見例如美國專利申請公開案第2005/0226867號)。在一態樣中，該等具有增加的效應物功能、特定而言ADCC之BiSAb係在宿主細胞(例如，CHO細胞、浮萍(Lemna minor))中產生，該等宿主細胞經改造以產生具有與親代細胞所產生之多肽相比高100倍以上之ADCC之高度去岩藻糖基化之多肽(Mori等人，2004, Biotechnol Bioeng 88:901-908；Cox等人，2006, Nat Biotechnol., 24:1591-7)。

將唾液酸添加至IgG分子上之寡醣中可增強其抗發炎活性且改變其細胞毒性(Keneko等人，Science, 2006, 313:670-673；Scallon等人，Mol. Immuno. 2007 Mar;44(7):1524-34)。上文所提及之研究展示，具有增加的唾液酸化之IgG分子具有抗發炎性質，而具有減少的唾液酸化之IgG分子具有增加的免疫刺激性質(例如，增加的ADCC活性)。因此，BiSAb可

經修飾具有適用於具體應用之唾液酸化概況(美國公開案第2009/0004179號及國際公開案第WO 2007/005786號)。

在一態樣中，本發明BiSAb之Fc區包含與天然Fc區相比改變的唾液酸化概況。在一態樣中，本發明BiSAb之Fc區包含與天然Fc區相比增加的唾液酸化概況。在另一態樣中，本發明BiSAb之Fc區包含與天然Fc區相比減少的唾液酸化概況。

在一態樣中，本發明之Fc變體可與諸如以下文獻中所揭示之彼等其他已知Fc變體組合：Ghetie等人，1997, Nat Biotech. 15:637-40；Duncan等人，1988, Nature 332:563-564；Lund等人，1991, J. Immunol 147:2657-2662；Lund等人，1992, Mol Immunol 29:53-59；Alegre等人，1994, Transplantation 57:1537-1543；Hutchins等人，1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92:11980-11984；Jefferis等人，1995, Immunol Lett. 44:111-117；Lund等人，1995, Faseb J 9:115-119；Jefferis等人，1996, Immunol Lett 54:101-104；Lund等人，1996, J Immunol 157:4963-4969；Armour等人，1999, Eur J Immunol 29:2613-2624；Idusogie等人，2000, J Immunol 164:4178-4184；Reddy等人，2000, J Immunol 164:1925-1933；Xu等人，2000, Cell Immunol 200:16-26；Idusogie等人，2001, J Immunol 166:2571-2575；Shields等人，2001, J Biol Chem 276:6591-6604；Jefferis等人，2002, Immunol Lett 82:57-65；Presta等人，2002, Biochem Soc Trans 30:487-490)；美國專利第5,624,821號；第5,885,573號；第5,677,425號；第6,165,745號；第6,277,375號；第5,869,046號；第6,121,022號；第5,624,821號；第5,648,260號；第6,528,624號；第6,194,551號；第6,737,056號；第

7,122,637號；第7,183,387號；第7,332,581號；第7,335,742號；第7,371,826號；第6,821,505號；第6,180,377號；第7,317,091號；第7,355,008號。熟習此項技術者將容易地明瞭Fc結構域之其他修飾及/或取代及/或添加及/或缺失。

應注意，以包含天然Fc之BiSAb格式呈現之多肽保留結合FcRn及C1q及調介ADCC之能力，如實例中所顯示。因此，在某些態樣中，BiSAb保留結合FcRn及/或C1q及/或一或多個Fcγ受體(FcγR)之能力。舉例而言，在某些態樣中，與結合至BiSAb所結合之一個表位之習用抗體相比，BiSAb保留至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之結合FcRn及/或C1q及/或一或多個FcγR之能力。在某些態樣中，BiSAb係自一或兩種習用抗體之結合結構域產生，且與彼等習用抗體中一或兩者之活性進行比較。

改變的Fc區亦可用於產生重鏈異二聚體，以產生包含兩個不同重鏈-輕鏈對之BiSAb。為促進異二聚體之形成，改造一對Fc區之間的界面以最大化自重組細胞培養物回收之異二聚體之百分比。在某些態樣中，界面包含CH3結構域之至少一部分。在此方法中，藉由用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)替代第一抗體分子界面之一或多個小胺基酸側鏈來產生「突出」。藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)替代較大胺基酸側鏈在第二抗體分子之界面上產生大小與較大側鏈相同或相似之補償性「空腔」。此提供增加異二聚體相對於其他不期望末端產物(例如同二聚體)之產率的機制。CH3修飾包括例如一條重鏈上之Y407V/T366S/L368A及另一重鏈上之T366W；一條重鏈上之S354C/T366W及另一重鏈上之Y349C/Y407V/T366S/L368A。產生一條鏈上之突出及另一鏈上之空腔的

其他修飾闡述於以下文獻中：U.S. 7,183,076；US 2014/0348839；及Merchant等人，1998, Nat. Biotech 16:677-681。可產生突出-空腔排列之修飾之一些非限制性實例呈現於**表1a**中。可用於產生異二聚體之其他修飾包括(但不限於)改變跨越Fc二聚體界面之電荷極性、使得靜電匹配Fc區之共表現產生異二聚化之彼等。改變電荷極性之修飾包括(但不限於)下**表1b**中所呈現之彼等(亦參見US20090182127；Gunasekaran等人，2010, JBC 285:19637-46)。另外，Davis等人(2010, Prot. Eng. Design & Selection 23:195-202)闡述使用為人類IgG及IgA CH3結構域之衍生物之鏈交換改造結構域(SEED) CH3區之異二聚Fc平臺(亦參見WO 2007/110205)。

表1a. 用於異二聚化之CH3修飾(突出-空腔)

一條重鏈中之修飾	另一重鏈中之修飾
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
T366Y	Y407T
T394W	F405A
T366Y/F405A	T394W/Y407T
T366W/F405W	T394S/Y407A
F405W	T394S
D399C	K392C
T366W	T366S/L368A/Y407V
T366W/D399C	T366S/L368A/K392C/Y407V
T366W/K392C	T366S/D399C/L368A/Y407V
S354C/T366W	Y349C/T366S//L368A/Y407V
Y349C/T366W	S354C/T366S//L368A/Y407V
E356C/T366W	Y349C/T366S//L368A/Y407V
Y349C/T366W	E356C/T366S//L368A/Y407V
E357C/T366W	Y349C/T366S//L368A/Y407V
Y349C/T366W	E357C/T366S//L368A/Y407V

表1b. 用於異二聚化之CH3修飾

一條重鏈中之修飾	另一重鏈中之修飾
K370E/D399K/K439D	D356K/E357K/K409D
K409D	D399K
K409E	D399K
K409E	D399R
K409D	D399R
D339K	E356K
D399K/E356K	K409D/K392D
D399K/E356K	K409D/K439D
D399K/E357K	K409D/K370D
D399K/E356K/E357K	K409D/K392D/K370D
D399K/E357K	K409D/K392D
K392D/K409D	D399K
K409D/K360D	D399K

熟習此項技術者應理解，在一些態樣中，Fc融合蛋白可因包含Fc區之分子之同二聚性質而形成二聚體。在一些態樣中，結合蛋白(例如，BiSAb)之Fc區可經差異改造具有突變以：促進及/或維持異二聚化(例如，嵌合突變、互補突變、對接及鎖定突變、隆凸於孔洞中突變、鏈交換改造之結構域(SEED)突變等，參見例如美國專利第7,183,076號；Merchant等人 (1998) Nat. Biotech 16:677-681 ； Ridgway 等 人 (1996) Protein Engineering 9:617-621；Davis等人(2010) Prot. Eng. Design & Selection 23:195-202 ； WO 2007/110205 ； WO 2007/147901 ； Gunasekaran等人 (2010) JBC 285:19637-46，該等文獻皆以引用方式併入本文中)。因此，結合蛋白可經改造以形成異二聚體，其包含例如融合至第一Fc區或其片段之第一結合蛋白、結合結構域或BiSAb及融合至第二Fc區或片段之第二

(即，不同)結合蛋白、結合結構域或BiSAb，其中第一及第二Fc區或其片段已經改造以異二聚體化。

3. 醣基化

除醣基化以改變多肽之效應物功能之能力外，可變區之經修飾醣基化可改變抗體(或BiSAb)對靶抗原之親和力。在一態樣中，本發明BiSAb之可變區之醣基化模式經修飾。舉例而言，可製備無醣基化之BiSAb(即，BiSAb缺少醣基化)。可改變醣基化以例如增加BiSAb對靶抗原之親和力。該等碳水化合物修飾可藉由例如改變BiSAb序列內之一或多個醣基化位點來實現。舉例而言，可製造一或多個胺基酸取代以消除一或多個可變區框架醣基化位點，由此消除該位點之醣基化。該無醣基化可增加BiSAb對抗原之親和力。該方法進一步詳細闡述於美國專利第5,714,350號及第6,350,861號中。亦可製造一或多個胺基酸取代以消除存在於Fc區中之醣基化位點(例如，IgG之天冬醯胺297)。另外，無醣基化BiSAb可在缺少所需醣基化機構之細菌細胞中產生。

4. 多肽連接體

連接體可用於將BiSAb嵌合重鏈之結構域/區域連結至鄰接分子中。如本文所述，BiSAb可包括一個、兩個或更多個連接體多肽(例如，L1及L2)。另外，BiSAb可包括其他連接體，例如互連scFv之可變重鏈及輕鏈之撓性連接體。另外，BiSAb可包括其他連接體，例如互連scFv之可變重鏈及輕鏈之撓性連接體及連接其他結合單元與BiSAb核心結構之其他連接體。

連接體之實例性非限制性實例係包含至少4個殘基之多肽鏈。該等連接體之部分可具撓性、親水性且其自身具有極少或無二級結構(連接體部

分或撓性連接體部分)。可使用至少4個胺基酸之連接體來連結在分子已組裝後位於彼此附近之結構域及/或區域。亦可使用較長或較短連接體。因此，連接體之長度可為約1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、25個、30個、35個、40個、45個或約50個殘基。當使用多個連接體來互連分子之部分時，連接體可相同或不同(例如，相同或不同的長度及/或胺基酸序列)。

連接體可為可裂解連接體，其含有至少一個可被裂解試劑選擇性裂解之鍵。可裂解連接體可用於幫助移除連接體序列之全部或一部分。連接體可經改造以含有蛋白酶裂解位點，以使得裂解發生在連接體之中間或連接體之至少一個末端。舉例而言，凝血酶位點可在連接體之兩個側接末端中之每一者處經改造。端視所用連接體之類型，裂解亦可由諸如TCEP、TFA、及DTT等藥劑調介。連接體可經設計以使得裂解試劑自裂解產物之連接體移除所有殘基。其他實例性非限制性連接體包括前藥連接體，其鍵可在活體內條件下(例如在內源酶或其他內源因子存在下或僅在存在於身體或身體細胞中之水性流體中)選擇性裂解。當BiSAb含有一個以上之多肽連接體時，每一連接體可不同，或至少一個連接體可與其他各者不同。在一些態樣中，BiSAb包含可裂解連接體。在特定態樣中，BiSAb包含scFv，其中scFv包含介於VH2與VL2之間之可裂解連接體。

連接體有助於形成期望結構。連接體可包含$(Gly\text{-}Ser)_n$殘基，其中一些Glu或Lys殘基分散於各處以增加溶解度。或者或另外，連接體可不包含任何絲胺酸殘基，該等連接體在連接體經歷O連接之醣基化時可較佳。在一些態樣中，例如若利用連接體之二聚化使BiSAb之結構域呈其正確摺

疊構形，則連接體可含有半胱胺酸殘基。在一些態樣中，BiSAb包含至少兩個連結多肽之結構域之多肽連接體。在其他態樣中，BiSAb包含至少三個多肽連接體。在其他態樣中，BiSAb包含四個或更多個多肽連接體。

在一些態樣中，多肽連接體包含Fc部分之一部分。舉例而言，在一些態樣中，多肽連接體可包含IgG1、IgG2、IgG3及/或IgG4抗體之免疫球蛋白鉸鏈結構域之一部分。在一些態樣中，多肽連接體包含IgG1、IgG2、IgG3及/或IgG4之突變免疫球蛋白鉸鏈結構域之一部分。在一些態樣中，多肽連接體包含IgG1、IgG2、IgG3及/或IgG4抗體之免疫球蛋白鉸鏈區/結構域之至少5個、7個、8個或15個胺基酸殘基。在一些態樣中，多肽連接體包含IgG1、IgG2、IgG3及/或IgG4抗體之經修飾免疫球蛋白鉸鏈區/結構域之至少5個、7個、8個或15個胺基酸殘基。

多肽連接體可包含通常包含3個半胱胺酸之鉸鏈區之全部或一部分。在某些態樣中，所選鉸鏈區相對於完整及/或天然鉸鏈區經截短或以其他方式經改變或取代，使得僅保留一或兩個半胱胺酸殘基。類似地，在某些其他態樣中，多肽連接體可包含鉸鏈區之突變或以其他方式改變的部分，其中半胱胺酸殘基之數量因胺基酸取代或缺失而減少，例如突變或以其他方式改變的鉸鏈區含有0個、1個或2個半胱胺酸殘基，如本文所述。

因此，突變或以其他方式改變的鉸鏈結構域可自(或使用)含有一或多個半胱胺酸殘基之野生型免疫球蛋白鉸鏈結構域衍生或構築。在某些態樣中，鉸鏈區之突變或以其他方式改變的部分可含有0個或僅1個半胱胺酸殘基，其中突變或以其他方式改變的鉸鏈區係或衍生自分別含有一或多個或兩個或更多個半胱胺酸殘基之野生型免疫球蛋白鉸鏈區。在鉸鏈區之突變或以其他方式改變的部分中，野生型免疫球蛋白鉸鏈區之半胱胺酸殘基較

佳缺失或經無法形成二硫鍵之胺基酸取代。在一些態樣中，鉸鏈區之突變或以其他方式改變的部分係或衍生自人類IgG野生型鉸鏈區，其可包括四個人類IgG同型子類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中之任一者。

在一些態樣中，多肽連接體包含鉸鏈區之包含與免疫球蛋白輕鏈形成二硫鍵之半胱胺酸殘基(EU殘基220)的部分。在一些態樣中，多肽連接體包含鉸鏈區之包含EU殘基C220處之胺基酸取代的改變的部分。在一些態樣中，多肽連接體包含胺基酸取代C220V。

在一些態樣中，多肽連接體包含防止鉸鏈相關之自發自體裂解之胺基酸取代。在一些態樣中，多肽連接體包含EU位置D221之位置處之胺基酸取代。在一些態樣中，多肽連接體包含胺基酸取代D221G。在一些態樣中，多肽連接體缺少胺基酸D221。

如上文所論述，一些實施例包括一或多個包含gly-ser連接體或由其組成之多肽連接體。如本文所用術語「gly-ser連接體」係指由甘胺酸及絲胺酸殘基組成之肽。實例性gly-ser連接體包含式$(Gly_4Ser)n$之胺基酸序列，其中n係正整數(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。gly-ser連接體之一些較佳及非限制性實例包括$(Gly_4Ser)_2$ (SEQ ID NO:41)及$(Gly_4Ser)_4$ (SEQ ID NO:42)以及$(Gly_4Ser)_3$ (SEQ ID NO:43)。在其他態樣中，兩個或更多個gly-ser連接體串聯納入多肽連接體中。在一些態樣中，多肽連接體包含鉸鏈區之至少一部分(例如，衍生自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4分子)及一系列gly-ser胺基酸殘基(例如gly-ser連接體，例如$(Gly_4Ser)n$，其中n係2、3或4)。

在某些態樣中，連接體(例如，L1及/或L2及/或L3等)包括鉸鏈部分及連接體部分(例如包含gly-ser連接體之連接體部分)二者。在其他態樣

中，L1及/或L2包括僅鉸鏈部分或僅連接體部分，例如gly-ser連接體。在其他態樣中，L1及L2包括gly-ser連接體部分。在某些態樣中，BiSAb內之gly-ser連接體具有相同長度，而在其他態樣中，BiSAb內之gly-ser連接體部分(例如，L1及L2)具有不同長度。當BiSAb包含scFv時，scFv之重鏈及輕鏈可藉由撓性連接體連接至BiSAb (例如，BD1、Fab、Fc等)。此撓性連接體通常不包括鉸鏈部分，而是gly-ser連接體或其他撓性連接體。可容易地選擇及最佳化互連scFv之結構域之撓性連接體之長度及胺基酸序列(例如$(Gly_4Ser)n$ (SEQ ID NO:48)，其中n係2、3或4或更大) 。

無論用於互連各個結合單元及結構域(例如，介於結合結構域/單元之間(例如，Fab-scFv))或結合結構域/單元與Fc (例如，經由L1及L2之scFv)之多肽連接體如何，BiSAb可視情況包含其他多肽連接體。該等其他多肽連接體之長度及序列經獨立地選擇。舉例而言，BiSAb可進一步包含互連scFv之可變重鏈及輕鏈之撓性多肽連接體。此撓性多肽連接體可包含gly-ser連接體。通常，此連接體不包括鉸鏈部分。

本文預期，改變側接BD2之連接體之長度可影響BD2抗原結合位點之定向及相對於BiSAb分子其餘部分之間距。舉例而言，短N末端連接體及長C末端連接體可產生使結合位點一致地在一個方向上之定向，而長N末端及短C末端連接體可賦予相反構象定向。因此，連接體長度可經調節以定向BD2抗原結合位點且對產生或避免BD1與BD2之間及/或BD2與結合抗體分子之Fc或其他結構域之其他實體之間的位阻效應具有重要影響。

5. BiSAb之特定構形

如上文所論述，本發明之一態樣係關於包含兩個重鏈-輕鏈對之BiSAb結構排列(平臺) (圖解說明於**圖1A-1F**中)。在此態樣之一些實施例

中，BiSAb嵌合重鏈之多肽序列可包含包括抗體重鏈可變結構域(VH1)之多肽序列、包括抗體重鏈恆定結構域1 (CH1)之多肽序列、Fc結構域之一部分、包括第一多肽連接體(L1)之多肽序列、包括結合結構域(BD2)之多肽序列、包括第二多肽連接體(L2)之多肽序列及包括Fc結構域其餘部分之多肽序列。在一些態樣中，Fc結構域包含C_H2結構域及C_H3結構域。因此，某些實施例提供BiSAb嵌合重鏈，其可包含自N末端至C末端呈以下定向之多肽序列：VH1-C_H1-C_H2(N末端)-L1-BD2-L2-C_H2(C末端)-C_H3；VH1-C_H1-C_H2-L1-BD2-L2-C_H3；及VH1-C_H1-C_H2-C_H3(N末端)-L1-BD2-L2-C_H3(C末端)。BiSAb輕鏈之多肽序列可包含輕鏈可變結構域(VL1)及輕鏈恆定結構域(CL)。因此，BiSAb輕鏈可包含自N末端至C末端呈以下定向之多肽序列：VL1-CL。應注意，VH1、VL1及CL用於表示結合第一表位之「結合單元1」(BD1)之部分。BD2用於表示結合第二表位之「結合單元2」之部分。

在結合結構域係scFv之態樣中，BiSAb嵌合重鏈可包含包括抗體重鏈可變結構域(VH1)之多肽序列、包括抗體重鏈恆定結構域1 (CH1)之多肽序列、包括第一多肽連接體(L1)之多肽序列、包括抗體輕鏈可變結構域(VL2)之多肽序列、包括撓性連接體之多肽序列、包括抗體重鏈可變結構域(VH2)之多肽序列、包括第二多肽連接體(L2)之多肽序列及包括抗體Fc結構域之多肽序列。因此，包含scFv作為BD2之BiSAb之嵌合重鏈可包含自N末端至C末端呈以下定向之多肽序列：VH1-CH1-CH2(N末端)-L1-VL2-L3-VH2-L2-CH2(C末端)-CH3；VH1-CH1-CH2-L1-VL2-L3-VH2-L2-CH3；VH1-CH1-CH2-CH3(N末端)-L1-VL2-L3-VH2-L2-CH3(C末端)；VH1-CH1-CH2(N末端)-L1-VH2-L3-VL2-L2-CH2(C末端)-CH3；

VH1-CH1-CH2-L1-VH2-L3-VL2-L2-CH3 ； 及VH1-CH1-CH2-CH3(N末端)-L1-VH2-L3-VL2-L2-CH3(C末端)。

嵌合重鏈係包含胺基酸序列(例如，每一多肽結構域之胺基酸序列)之多肽鏈。嵌合重鏈係包含胺基酸序列(例如，每一多肽結構域之胺基酸序列)之多肽鏈。應注意，VH1、VL1及CL用於表示結合單元1之部分，其中VH1及VL1表示結合第一表位之部分。VH2及VL2用於表示結合第二表位之結合單元2之部分。在某些態樣中，其他scFv結合結構域存在於構成BiSAb核心(其中BiSAb核心進一步包含結合單元(BD) 3及/或4及/或5)之多肽之N末端及/或C末端。在某些態樣中，在BiSAb核心內存在一個以上之scFv結合結構域。每一其他scFv包含稱為VH3、VH4、VH5之抗體重鏈可變區及稱為VL3、VL4、VL5之相應抗體輕鏈可變區。

6. 標記、偶聯物及部分

在某些特徵中，藥物及其他分子可經由位點特異性偶聯靶向BiSAb。舉例而言，BiSAb可包含半胱胺酸改造之結構域(包括半胱胺酸改造成結合單元及/或Fc結構域)，其產生游離硫醇基用於偶聯反應。在某些態樣中，BiSAb經改造以納入特異性偶聯位點。在一些態樣中，本發明提供Fc變體BiSAb，其中Fc區包含以下位置中之一或多者之胺基酸取代：239、282、289、297、312、324、330、335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422及442，其係如EU索引編號。在一些態樣中，Fc區包含以下位置之群中之一或多者之取代：a) 289及440；b) 330及440；c) 339及440；d) 359及440；e) 289及359；f) 330及359；g) 339及359；h) 289及339；i) 330及339；j) 289及330；k) 339及442；l) 289、339及442；m) 289、330及339；n) 330、339及442；及o)

289、330及442。在其他態樣中，本發明提供BiSAb，其中Fab臂之CH1結構域包含以下位置中之一或多者之取代：131、132、134、135、136及139，其係如EU索引編號。在一態樣中，取代包含對選自以下之胺基酸之取代：半胱胺酸、離胺酸、酪胺酸、組胺酸、硒基半胱胺酸及硒基甲硫胺酸。在特定態樣中，取代係半胱胺酸。產生穩定半胱胺酸改造抗體之方法闡述於U.S. 7,855,275、U.S. 20110033378及US20120213705中，該等專利之內容之全文皆以引用方式併入本文中。

7. 實例性靶

儘管可產生與本文所述之各個DuetMab及BiSAb平臺相關之態樣及實施例以結合至任何期望靶，但本文所揭示之BiSAb較佳靶向特定靶分子對(例如，結合單元1結合一個靶且結合單元2結合另一靶)。如上文所論述且如下文說明性實例中所例示，本文所揭示之抗體DuetMab及BiSAb靶向調節接受個體或所培養免疫細胞之免疫反應的分子。在一些實施例中，結合結構域對選自由以下組成之群之靶展現特異性結合活性：CTLA-4、PD-1、PD-L1、OX40及TIM3。DuetMab及BiSAb可包含呈不同順序及定向之不同結合結構域之組合，其中該等結構域對本文所揭示之靶具有結合親和力或特異性結合至該等靶。舉例而言，本文所揭示之DuetMab及BiSAb可包含允許雙特異性結合至靶之結合結構域之組合，包括：CTLA-4及PD-1；CTLA-4及PD-L1；及CTLA-4；CTLA-4及TIM3；PD-1及PD-L1；PD-L1及OX40；PD-1及TIM3；PD-L1及TIM3。包括結合具體靶組合之結合結構域之DuetMab及BiSAb說明於實例中且包括以下非限制性組合：PD-1/CTLA-4；PD-L1/CTLA-4；PD-1/TIM3；及PD-L1/OX40。在某些實施例中，BiSAb具有相對於用於產生BiSAb之組合個別單特異性結

合蛋白之結合性質增強的結合性質。

在某些態樣中，本發明之DuetMab或BiSAb結合相同靶上之兩個不同表位(例如，結合單元1結合靶上之第一表位且結合單元2結合相同靶上之第二表位)。

在一些態樣中，本發明DuetMab或BiSAb之多聚性質賦予標記或治療劑靶向特定細胞類型或分子靶之能力。舉例而言，DuetMab或BiSAb中之一個功能結構域可結合至細胞表面之靶，而相同DuetMab或BiSAb中之另一功能結構域結合至可用於檢測之半抗原或標記劑。類似地，一個功能結構域可結合至細胞靶，而第二功能結構域結合至毒素。由於兩種結合反應係經由單一分子調介，故毒素可置於其影響細胞毒性功能之細胞靶附近。

B. 編碼BiSAb之核酸分子

本發明提供編碼BiSAb之核酸分子。本發明之一態樣提供編碼本發明之任一BiSAb之核酸分子。核酸分子可編碼本文所揭示任一BiSAb分子以及本文所揭示任一個別結合結構域(例如，scFv)之重鏈及/或輕鏈。熟習此項技術者應瞭解，鑒於核酸密碼子簡併性以及具體生物體之密碼子頻率，該等多核苷酸分子之核苷酸序列可發生變化，如業內通常已知。

C. 產生BiSAb之載體及宿主細胞及後續純化

本發明係關於產生BiSAb之方法。在某些態樣中，編碼本文所揭示BiSAb之全部或一部分之重組核酸分子可操作地連接至表現構築體中之一或多條調控核苷酸序列。編碼BiSAb輕鏈及嵌合重鏈之核酸序列可在相同表現載體中以任一定向(例如，輕鏈在重鏈之前或反之亦然)進行選殖或可在兩個不同載體中進行選殖。若使用一個載體實施表現，則兩個編碼基因

可具有其自身遺傳元件(例如，啟動子、RBS、前導序列、終止子、聚A等)或其可選殖有一個單組遺傳元件，但與順反子元件連接。調控核苷酸序列通常將適於用於表現之宿主細胞。對於多種宿主細胞，多種類型之適宜表現載體及適宜調控序列為業內已知。通常，該一或多個調控核苷酸序列可包括(但不限於)啟動子序列、前導序列或信號序列、核糖體結合位點、轉錄起始及終止序列、轉譯起始及終止序列以及增強子或活化序列。本發明涵蓋如業內已知之組成型或誘導型啟動子。啟動子可為天然啟動子或組合一個以上啟動子元件之雜合啟動子。表現構築體可存於細胞中之游離基因體(例如質體)上，或表現構築體可插入染色體中。

在某些態樣中，表現載體含有可選擇標記物基因以允許選擇經轉變之宿主細胞。可選擇標記物基因為業內所熟知且將隨所用宿主細胞而變化。在某些態樣中，本發明係關於表現載體，其包含編碼多肽且可操作地連接至至少一個調控序列之核苷酸序列。調控序列為業內公認的且經選擇以引導所編碼多肽之表現。因此，術語調控序列包括啟動子、增強子及其他表現控制元件。實例性非限制性調控序列闡述於Goeddel; *Gene Expression Technology*: *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990)中。應理解，表現載體之設計可取決於諸如以下等因素：欲轉變之宿主細胞之選擇及/或期望表現之蛋白之類型。另外，亦應考慮具體載體之拷貝數、控制該拷貝數之能力及該載體所編碼之任何其他蛋白(例如抗生素標記物)之表現。

本發明進一步係關於產生本發明BiSAb之方法。舉例而言，可在適宜條件下培養經一個或一個以上之編碼BiSAb之表現載體(例如，編碼嵌合重鏈及輕鏈之單一載體或兩個載體，一者編碼嵌合重鏈且一者編碼輕

鏈)轉染之宿主細胞以允許進行多肽之表現。BiSAb可自含有該多肽之細胞與培養基之混合物分泌並分離。或者，BiSAb可保留在細胞質中或膜部分中，並收穫、溶解細胞且分離蛋白。細胞培養物包括宿主細胞、培養基及其他副產物。適用於細胞培養之培養基為業內所熟知。BiSAb可使用業內已知用於純化蛋白之技術自細胞培養基、宿主細胞或二者分離，該等技術包括離子交換層析、凝膠過濾層析、超濾、電泳及免疫親核純化。在某些態樣中，BiSAb製備為含有促進其純化之結構域之融合蛋白。

可藉由將所選殖基因或其部分連接至適於在原核細胞、真核細胞(酵母、禽類、昆蟲或哺乳動物)或二者中表現之載體中來產生重組核酸。產生重組多肽之表現媒劑包括質體及其他載體。例如，適宜載體包括以下類型之質體：在原核細胞(例如大腸桿菌(*E. coli*))中表現之pBR322衍生之質體、pEMBL衍生之質體、pEX衍生之質體、pBTac衍生之質體及pUC衍生之質體。在某些態樣中，哺乳動物表現載體含有促進載體在細菌中繁殖之原核序列及一或多個在真核細胞中表現之真核轉錄單元二者。適於轉染真核細胞之哺乳動物表現載體之實例係pcDNAI/amp、pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo及pHyg衍生載體。該等載體中之一些經來自細菌質體(例如pBR322)之序列修飾，以促進在原核及真核細胞二者中之複製及抗藥性選擇。或者，可使用諸如牛乳頭瘤病毒(BPV-1)或艾伯斯坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus)等病毒之衍生物(pHEBo、pREP衍生及p205)在真核細胞中瞬時表現蛋白。業內已知多種用於製備質體及轉變宿主生物體之方法。關於用於原核及真核細胞二者之其他適宜表現系統以及一般重組程序參見*Molecular Cloning A Laboratory Manual*，第2版，

Sambrook、Fritsch及Maniatis編輯(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)，第16及17章。在一些情況下，可能期望藉由使用桿狀病毒表現系統來表現重組多肽。該等桿狀病毒表現系統之實例包括pVL衍生之載體(例如pVL1392、pVL1393及pVL941)、pAcUW衍生之載體(例如pAcUW1)及pBlueBac衍生之載體(例如含有β-gal之pBlueBac III)。

產生分子後，其可立即藉由業內已知用於純化蛋白、免疫球蛋白分子或其他多聚分子之任一方法、使用多種技術來純化，該等技術係例如層析(例如，離子交換層析、親和層析(尤其針對特定抗原蛋白A或蛋白G之親和層析)及分篩管柱層析)、離心、差異溶解度或用於純化蛋白之任何其他標準技術。另外，本文所揭示之分子可融合至異源多肽序列(例如，親和標籤)，如促進純化常規所採用。

無論如何產生及純化BiSAb，可實施(在純化之前及/或之後)結合分析(例如雙ELISA分析)以確認BiSAb之功能結合活性。該等結合分析通常為業內已知。

D. 醫藥調配物

在某些態樣中，本發明提供醫藥組合物。該等醫藥組合物可為包含編碼BiSAb之核酸分子之組合物。該等醫藥組合物亦可為包含DuetMab、BiSAb、DuetMab之組合或BiSAb之組合以及醫藥上可接受之賦形劑之組合物。在某些態樣中，使用本發明之醫藥組合物作為藥劑。

E. 用途

如本文所論述，可使用DuetMab及BiSAb來結合與癌症及細胞增生性疾病或病症相關之靶，該等疾病或病症例如可藉由抑制免疫阻抑活性及/或藉由誘導與靶分子相關之免疫反應而對免疫療法有反應。舉例而言，

異常信號傳導及/或抑制的免疫反應可有助於不期望細胞增殖及癌症。因此，可使用本文所揭示之DuetMab、BiSAb及抗體來治療與抑制、減少或不充分的靶向癌症之免疫反應相關之不期望細胞增殖及/或癌症。具體而言，腫瘤之腫瘤生長曲線及/或腫瘤之體積可藉由投與DuetMab或BiSAb以誘導及/或刺激個體(例如患有癌症之人類患者)之免疫反應來減小。

因此，本發明亦係關於多種方法，其包含向有需要之個體投與本文所揭示之結合蛋白。在一態樣中，本發明係關於誘導患有癌症或具有罹患癌症風險之個體之免疫反應的方法，其包含向個體投與本文所揭示之結合蛋白。在一些實施例中，該方法活化個體之針對癌症之免疫反應。在一些實施例中，該方法增強個體之針對癌症之免疫反應。在一些實施例中，該方法活化在個體中受抑制之免疫反應路徑，其中該活化增加個體之靶向癌症之免疫反應。在一些實施例中，該方法增強個體之靶向癌症之免疫反應路徑。

在另一態樣中，本發明係關於治療有需要之個體之癌症的方法，其包含向個體投與本文所揭示之結合蛋白。在一實施例中，治療癌症之方法包含停止或減緩個體癌症之生長。在一實施例中，治療癌症之方法包含停止或減緩癌症轉移至個體之其他區域。在一實施例中，治療癌症之方法包含殺死個體之癌細胞。在一實施例中，治療癌症之方法包含終止個體癌細胞之增殖及/或擴散。

在上述態樣之各個實施例中，該等方法係關於治療個體之腫瘤疾病及/或癌症疾病。在實施例中，癌症選自對在個體中誘導之免疫反應敏感之癌症之群。在一些實施例中，癌症係以下中之一或多者：卵巢癌、乳癌、結腸直腸癌、前列腺癌、子宮頸癌、子宮癌、睪丸癌、膀胱癌、頭頸

癌、黑色素瘤、胰臟癌、腎細胞癌或肺癌。在一些實施例中，癌症選自消化或胃腸癌(例如，肛門癌；膽管癌；肝外膽管癌；闌尾癌；類癌腫瘤、胃腸癌；結腸癌；結腸直腸癌，包括兒童期結腸直腸癌；食管癌，包括兒童期食管癌；膽囊癌；胃(gastric、stomach)癌，包括兒童期胃癌；肝細胞癌(例如，肝細胞癌)，包括成人(原發性)肝細胞癌及兒童期肝細胞癌；胰臟癌，包括兒童期胰臟癌；肉瘤、橫紋肌肉瘤；胰島細胞胰臟癌；直腸癌；及小腸癌)；肺癌(例如，非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌(SCLC))；頭頸癌(例如，唇及口腔癌；口腔癌，包括兒童期口腔癌；下嘴癌；喉癌，包括兒童期喉癌；隱匿性原發性轉移性鱗狀頸癌；口癌；鼻腔及副鼻竇癌；鼻咽癌，包括兒童期鼻咽癌；口咽癌；副甲狀腺癌；咽癌；唾液腺癌，包括兒童期唾液腺癌；喉癌；及甲狀腺癌)；卵巢癌及乳癌。

在上述方法中，投與個體之結合蛋白之量可在個體中有效地誘導免疫反應、增加免疫反應、停止或減緩癌症之生長、停止或減緩癌症之轉移、殺死癌細胞及/或減緩或停止癌細胞之增殖及/或擴散。

在上述方法之實施例中，結合蛋白包含如本文所揭示之DuetmAb或BiSAb。在上述方法之一些實施例中，結合蛋白包含抗體或其抗原結合片段，如本文所揭示。

如本文中所用術語「個體」意欲包括人類及非人類動物、尤其哺乳動物。個體之實例包括人類個體，例如患有病症(例如本文所述病症，例如癌症)之人類患者或正常個體。「非人類動物」包括所有脊椎動物，例如非哺乳動物(例如雞、兩棲動物、爬行動物)及哺乳動物，例如非人類靈長類動物、家養及/或農業上有用之動物(例如綿羊、狗、貓、牛、豬等)及齧齒類動物(例如小鼠、大鼠、倉鼠、天竺鼠等)。在特定實施例中，個體係

人類患者。

「治療(treatment或treat)」係指治療性治療及預防性(prophylactic或preventative)措施二者。彼等需要治療之個體包括已患有病症之彼等以及易患病症之彼等或欲預防病症之彼等。因此，當用於疾病或需要治療之個體時，該等術語包括(但不限於)與未經治療之個體相比終止或減緩疾病進展、緩解疾病、預防症狀、減輕疾病及/或症狀嚴重程度或縮短疾病長度。在實施例中，治療之方法可緩和所治療具體疾病之一或多種臨床適應症。

提供下文實例以說明本文所提供揭示內容之具體態樣及實施例，且不應理解為限制本說明書之範疇或隨附所主張標的物。

實例

材料及方法

免疫反應調節分析

使用巨細胞病毒(CMV)抗原喚醒分析來評估由本文所述之某些免疫治療分子誘導之潛在免疫反應。用於分析之試劑包括：

- CMV反應性冷凍末梢血單核細胞(PBMC)；
- AIM V®培養基(Life Technologies，目錄號12055-091)；
- 磷酸鹽緩衝鹽水(PBS, Life Technologies，目錄號20012-043)；
- PepTivator® CMVpp65肽彙集物(Miltenyi Biotec，目錄號130-093-438, 50 μg/ml)；
- 卵白蛋白(Thermo scientific目錄號77120, 1 mg/ml)；
- 未經TC處理之Costar 96孔板(Corning，目錄號3788)；及
- 免疫治療分子。

一般分析方案：

在分析前一天將冷凍的PBMC於溫AIM V培養基中解凍。將細胞在Costar 96圓孔板中洗滌兩次。將細胞之濃度調節至1×10^6個細胞/mL之濃度。

將細胞等份(100 μL)分配於個別孔中，使板之外側各列及各行呈空白。將細胞靜置過夜。

第二天，將100 μL含有2× PepTivator CMV肽彙集物(最終濃度為0.1 μg/ml- 0.05 μg/ml)及2×免疫治療分子之AIMV培養基添加至孔中。

72小時後，將來自每一孔之25 μL上清液轉移至經預封阻及洗滌之MSD板(抗人類IFN γ)。添加標準品後，在室溫下將板培育2小時。在培育時段後，將MSD板洗滌三次。洗滌後，添加25 μL帶磺基標籤之檢測抗體且允許在室溫下反應1小時。將板再洗滌且添加150 μL 2× MSD讀取緩衝液，然後獲取讀數。

葡萄球菌腸毒素A/B (SEA/SEB)分析方案

在SEB或SEA分析方案用於測定DuetMab或BiSAb對IL-2免疫反應之效應之試劑包括：

- 白血球錐(NHSBT代碼NC24；來自Addenbrookes Hospital)；
- 50 ml Falcon管(BD 352070)；
- Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare 17-1440-02)；
- 抗CD3 (純系OKT3；1 mg/ml；eBioscience；目錄號：16-0037-85)；
- 氯化銨溶液(Stemcell Technologies 07850)；
- 葡萄球菌腸毒素A (SEA；Sigma, S-9399)或葡萄球菌腸毒素B

(SEB；Sigma, S-4881)原液，以1 mg/ml儲存在-20℃下；

- 培養基(皆來自Life Technologies)：補充有10% v/v熱不活化FCS (90005M)及100 U/ml青黴素(penicillin) + 100 ug/ml鏈黴素(streptomycin) (15140-122)之含有glutamax (61870)之RPMI1640；

- V底板(Greiner BioOne 651201)；

- 96孔平底板(Corning Costar 7107)。

用於IL-2 DELFIA ELISA之試劑包括：

- FLUONUNC Maxisorp ELISA板(Nunc 437958)；

- 經銪標記之鏈黴抗生物素蛋白SA-Eu (Perkin-Elmer 1244-360)；

- DELFIA®分析緩衝液(Perkin-Elmer，編號4002-0010)；

- DELFIA®增強溶液(Perkin-Elmer 4001-0010)；在使用前處於室溫下；

- 分析稀釋劑：補充有0.1% BSA之DELFIA洗滌緩衝液(0.05% Tween-20、20 mM Tris、150 mM NaCl；pH 7.2-7.4)，經無菌過濾；

- 奶粉(Marvel；Premier Foods)；

- 試樣稀釋劑(RPMI1640 + 10% FCS + 1%青黴素/鏈黴素，如上述)；

- PBS (ThermoFisher 14190235)；

- PBS-Tween (0.01% Tween-20於PBS中)；

- 人類IL-2 ELISA套組(Duoset DY202, R&D Systems)；

- 具有自動化板裝載器(Biostack)之Biotek板洗滌器(EL406)。

一般分析方案

使用密度梯度離心(Ficoll-Paque PLUS; GE Healthcare)自人類血液

白血球錐(NHS Blood and Transplant Service代碼NC24)分離PBMC，然後將紅血球溶解於氯化銨溶液(Stemcell Technologies)中。在37℃下將抗人類CD3 (純系OKT3，0.5 ug/ml於PBS中；eBioscience)於96孔平底板(Corning Costar 7107)中包覆2 hr。然後，添加0.2× 10^6個細胞/孔之於培養基(補充有10% v/v熱不活化牛血清及100U/100 ug/ml鏈黴素/青黴素(分別)之RPMI1640-Glutamax (Life Technologies))中之PBMC。藉由添加0.0088-0.1 ug/mL範圍內之葡萄球菌腸毒素A或B (SEB; Sigma Aldrich)進一步刺激PBMC，且將候選DuetMab或BiSAb添加至最終測試濃度。在37℃及5% CO_2下培養3天後，自細胞移除上清液且根據製造商之說明書使用商業ELISA (R&D Systems Duoset產品代碼DY202)來測定IL-2分泌。參見圖90。

混合白血球反應(MLR)分析方案(新鮮血液)

亦使用基於細胞之MLR分析來提供因應本文所揭示之DuetMab及BiSAb之T細胞功能之活體外關聯。用於自新鮮血樣實施MLR分析之試劑包括：

- 8 mL CPT肝素管；
- AIM-V培養基(無血清) Gibco編號12055-091，無添加劑；
- 50 ml尖底管；
- 2 ml低溫保存瓶；
- ACK溶解緩衝液(Gibco編號A10492-01)；
- 96孔經組織培養物處理之U底板BD falcon編號3077；
- PHA (Roche) 1 mg/ml (10 ug/mL最終濃度)，作為陽性對照。

一般分析方案

自抽取至CPT肝素管中之血樣製備PBMC。在25℃下在無制動器下以2700 rpm將管離心20 min。抽吸掉頂層血清。輕輕吸取剩餘材料，且收集CPT管塞上方之所有物質並置於50 ml尖底管中。向細胞中添加AIM-V培養基以洗滌細胞(在1500 rpm下3次，且打開制動器，在25℃下保持5分鐘)。使用紅血球溶解緩衝液溶解任何剩餘紅血球(例如，用約3 ml緩衝液溶解約5 min.)。用AIM-V培養基(1500 rpm，打開制動器，在25℃下保持5分鐘)將剩餘細胞洗滌兩次。若需要，將沈澱物統一至單一管中且重懸浮於AIM-V培養基中，並進行細胞計數。

為實施MLR分析，將細胞以50 ul AIM-V培養基/供體中之200,000個細胞/供體/孔平鋪於96孔板中(總共400,000個/ 100 ul)。添加稀釋於無血清AIM-V培養基中之(4×)50 ul/孔之候選分子。72 hr.後，使板成像且移除30 ul上清液用於人類TH1/TH2 (MSD)細胞介素分析。

人類TH1/TH2 MSD 10重方案

此分析用於測定存在於培養物上清液中之因應投與本文所揭示的DuetMab及BiSAb之細胞介素之量。為實施分析，藉由將200 mg封阻物B溶解於20 ml PBS/板中來製備封阻劑。將150 ul溶解封阻物添加至每一孔中。將板密封且在室溫下振盪2 hr或在4℃下振盪過夜。用PBST緩衝液將孔洗滌3×。藉由將10 ul冷凍的校準摻合物稀釋於1 ml稀釋劑中來製備校準物，且進一步連續稀釋4倍。為分離各孔，添加25 ul校準物(標準品)及25 ul試樣。在室溫下在振盪的同時將孔培育2 hr。培育後，用PBST將孔洗滌3×。

製備檢測抗體且將其稀釋至所需濃度，並添加至每一孔中。在室溫下在振盪的同時培育2 hr.後，於PBST中洗滌(3×)孔。在MSD機器上讀取

之前，將讀取緩衝液添加至每一孔中。

腫瘤特異性殺死分析方案

對人類$gp100_{209-217}$肽具有反應性之人類CD8+ T細胞系(JR6C12)由Dr. Steven Rosenberg (National Cancer Institute, Bethesda, MD)友情提供。在37℃下在96孔平底板中，將JR6C12細胞與經CFSE (CellTrace CFSE增殖套組，ThermoFisher)標記之人類黑色素瘤系(Mel624)以1:1比率(20,000個JR6C12 + 20,000個Mel624)共培養18小時。在共培養時間0時添加濃度為69 nM之候選分子。18 hr後，藉由明視野顯微鏡使孔可視化。收集上清液用於MSD分析且將黏附細胞胰蛋白酶化並於PBS中洗滌(2×)，然後進行活力染色(Zombie UV Fixable活力套組，Biolegend)。在LSRFortessa (BD)上藉由流式細胞術評價經CFSE標記細胞之活力染料攝取。

實例1. 用於結合結構域附接之候選Fc位置之鑑別

使用開源軟體PyMOL分子可視化系統，研究CH2及CH3區中以及CH2-CH3界面處或附近之抗體結構以鑑別出用於結合結構域附接之候選區域，例如暴露表面環。該等區域將適於插入第二結合結構域(例如，scFv)且不損害IgG或第二結合結構域自身之結構完整性或穩定性。根據分析，鑑別出三個區域(在**圖1A-1C**中表示為球體)。**圖1D**、**1E**及**1F**繪示結合蛋白之實施例，其顯示分別在**圖1A**、**1B**及**1C**中鑑別出之每一環中第二結合結構域(出於圖解說明之目的使用scFv)之附接。

圖2A提供在CH2-CH3界面附近之CH2區中鑑別出且包含序列ISRTP (SEQ ID NO:39)之一個經鑑別代表性環之胺基酸序列的更詳細示意圖。結合結構域可插入此胺基酸序列內以產生任何數量之代表性構築體，例如

如實例中所說明插入scFv結構域(例如，I-scFv-SRTP、IS-scFv-RTP、ISR-scFv-TP或ISRT-scFv-PscFV-ISRTP及ISRTP-scFV，其中「-scFv-」鑑別天然環序列中結合結構域可締合之點。**圖2B**係在CH2-CH3界面中鑑別出且包含胺基酸序列AKGQP (SEQ ID NO:40)之代表性環之類似示意圖。本文所述之代表性構築體可包括附接至如本文所述之此環序列之結合結構域(例如scFv結構域)，包括A-scFv-KGQP、AK-scFv-GQP、AKG-scFv-QP、AKGQ-scFv-P、scFV-AKGQ、AKGQ-scFV，其中「-scFv-」鑑別天然環序列中結合結構域可締合之點。圖2C提供在CH2-CH3界面下游之CH3區內鑑別出且包含胺基酸序列SNG之代表性環之示意圖。根據上述其他兩個環區域之說明性實施例論述之此環序列之代表性構築體包括scFV-SNG、S-scFv-NGSN-scFv-G及SNG-scFV。

實例2. 包括結合單元組合之一系列親代抗體及雙特異性結合蛋白之產生及表徵

研發並表徵一系列單株抗體。使用衍生自該等「親代」抗體之抗原結合序列(例如，CDR、HCv、LCv、HC、LC)之組合產生一系列雙特異性結合蛋白，且顯示其對組合之靶抗原具有雙特異性結合活性。雙特異性結合蛋白經設計以具有本文所揭示之具體結構平臺基序(即，「BiS5」)。

親代抗體序列闡述於下表中：

表2a. 親代抗體序列

PD-1

描述/靶	序列
PD-1 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMYWYQ QKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:23)
PD-1 LCv	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMYWYQ QKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:49)
PD-1 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQA PGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:50)
PD-1 HCv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQA PGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:51)

CTLA-4

描述/靶	序列
CTLA-4 HCv	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO:52)
CTLA-4 HC	GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVH (SEQ ID NO:53)
CTLA-4 LCv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYYSTPFTFGPGTKVEIK (SEQ ID NO:54)
CTLA-4 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO:55)

PD-L1

描述/靶	序列
PD-L1 (AMP714) HCv	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGYTFPDYYMNWVRQ APGKGLEWVGDIDPNYGGTTYNASVKGRFTISVDRSKSIA YLQMSSLKTEDTAVYYCARGALTDWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:56)
PD-L1 (AMP714) LC	QIQLTQSPSILSASVGDRVTITCRASSSVSYIYWFQQKPGKA PKPLIYATFNLASGVPSRFSGSGSGTSYTLTISSLQPEDFATY YCQQWSNNPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ

	DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:57)
PD-L1 (AMP714) LCv	QIQLTQSPSILSASVGDRVTITCRASSSVSYIYWFQQKPGKA PKPLIYATFNLASGVPSRFSGSGSGTSYTLTISSLQPEDFATY YCQQWSNNPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:58)
PD-L1 (MEDI4736) HCv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQ APGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLV TVSS (SEQ ID NO:59)
PD-L1 (MEDI4736) LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:33)
PD-L1 (MEDI4736) LCv	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:60)

TIM3

描述/靶	**序列**
TIM3 (WT) 62號 LC	QTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQ APVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVEAGDEAD YYCQVLDRRSDHWLFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS (SEQ ID NO:61)
TIM3 (WT) 62號 LCv	QTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQ APVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVEAGDEAD YYCQVLDRRSDHWLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:62)
TIM3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP

(WT) 62號 HC	GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGRGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:63)
TIM3 (WT) 62號 HCv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:64)
TIM3 （種系） 62 號 LC	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQ APVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVLDRRSDHWLFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS (SEQ ID NO:65)
TIM3 （種系） 62 號 LCv	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQ APVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVLDRRSDHWLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:66)
TIM3 （種系） 62 號 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP

	KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:67)
TIM3（種系）62號 HCv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:68)

OX40

描述/靶	序列
OX40 HCv	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRITINRDTSKNQYSLQLNS VTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:69)
OX40 LCv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGK APKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT YYCQQGSALPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:70)
OX40 HC	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRITINRDTSKNQYSLQLNS VTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT

	VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:71)
OX40 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGK APKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT YYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO:72)

表2b. 抗原序列

描述/靶	序列
PD-1 人類	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPA LLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAA FPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYL CGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQ FQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTG QPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEY ATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:73)
PD-L1 人類	MRIFAVFIFMTYWHLLNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQ AEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTL RINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTHL VILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQS DTHLEET (SEQ ID NO:74)
CTLA-4 人類	MACLGFQRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVA QPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTE VCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDT GLYICKVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWIL AAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTEP ECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:75)
TIM3	MFSHLPFDCVLLLLLLLLTRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTP

人類	AAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSR YWLNGDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKF NLKLVIKPAKVTPAPTRQRDFTAAFPRMLTTRGHGPAETQTL GSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGI CAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGLAN AVAEGIRSEENIYTIEENVYEVEEPNEYYCYVSSRQQPSQPLG CRFAMP (SEQ ID NO:76)
OX40 人類	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSND RCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPC KPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPG VDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSD AICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRP VEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPP DAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO:78)

實例2(a) PD-1/CTLA-4雙特異性結合蛋白

不受限於理論，PD-1及CTLA-4阻斷之組合存在較強臨床及臨床前原理。因此，將期望最大化PD-1及CTLA-4組合之風險/益處比(**圖4**)。

使用上表2中所鑑別之親代序列產生以下結合PD-1及CTLA-4之雙特異性結合蛋白。使用下文所鑑別之序列產生鑑別為Bis2、Bis3及Bis5之蛋白且使用如下文所論述之Octet結合分析評價同時抗原結合活性。

表3. PD-1/CTLA-4之BiS構築體

描述	**序列**
Bis2 PD-1/CTLA-4 HC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYYSTPFTFGCGTKVEIKGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSNKYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP

	RGATLYYYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVR QAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:1)
Bis2 PD-1/CTLA-4 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMY WYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:2)
Bis3 PD-1/CTLA-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWV RQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR

	WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLD WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGCGTKVEIKGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSN KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:3)
Bis3 PD-1/CTLA-4 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMY WYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:6)
Bis5 PD-1/CTLA-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWV RQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGC GTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGG VVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN

	SLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTT VTVSSGGGGSGGGGSGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK (SEQ ID NO:5)
Bis5 PD-1/CTLA-4 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMY WYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:6)

Octet結合分析(BiS2、BiS3及BiS5)

為評估本文所揭示雙特異性結合分子之結合，使用配備有Ni-NTA感測器尖端及10×動力學緩衝液之Octet QK (ForteBio, Menlo Park, CA)。對於此具體系列之雙特異性結合蛋白，帶His標籤之PD-L1-Fc、帶his標籤之PD-1-Fc及CTLA-4-Fc（人類重組蛋白）係購自R&D Systems (Minneapolis, MN)。所有結合分析皆係在25℃下實施。

在1000 rpm下搖動試樣板，然後進行分析。將Ni-NTA感測器尖端在1×動力學緩衝液中預潤濕5 min.。1×動力學緩衝液亦用作基線測定之運行緩衝液及抗原及雙特異性抗體之稀釋緩衝液。將Ni-NTA感測器尖端浸至用於抗原捕獲之100 nM帶his標籤之PD-L1-Fc (參見下文(b))或帶his標籤之PD-1-Fc中達約1 min。將經抗原包覆之感測器尖端各自浸至10 μg/ml雙特異性抗體中達約5分鐘，且然後移至一列含有100 nM CTLA-4-Fc抗原之孔中達2分鐘。結合結果顯示於**圖3**中。

使用上表2中所鑑別之親代序列產生結合PD-1及CTLA-4之呈DuetMab格式之雙特異性結合蛋白。使用下表4中之序列產生PD-1/CTLA-4 DuetMab且如下文所論述來評價，包括與PD-1/CTLA-4 Bis5

進行比較。

表4. PD-1/CTLA-4之DuetMab構築體

描述	序列
DuetMab PD-1(LO115) LC 胺基酸	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSC***SASSKHTNLYWSRHMY WY***QQKPGQAPRLLIY***LTSNRAT***GIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYC***QQWSSNP***FTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:7)
DuetMab PD-1(LO115) LC 核酸	CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCC TGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCTCCG CCTCCTCCAAGCACACCAACCTGTACTGGTCCCGGC ACATGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCC CTCGGCTGCTGATCTACCTGACCTCTAACCGGGCCAC CGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGGAACCCG AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTC CAACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGA AATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTG CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG T (SEQ ID NO:8)
DuetMab PD-1(LO115)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFTFSDYGMH***WV RQAPGKGLEWVA***YISSGSYTIYSADSVKG***RFTISRDNAK

HC 胺基酸	NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR***RAPNSFYEYYFDY***WG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:9)
DuetMab PD-1(LO115) HC 核酸	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCCGGCGGAGGACTGGTG CAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCT CCGGCTTCACATTCTCCGACTACGGCATGCACTGGGT CCGACAGGCCCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGGC CTACATCTCCTCCGGCTCCTACACCATCTACTCCGCCG ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACA ACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCT GCGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGTGCCAG ACGGGCCCCTAACTCCTTCTACGAGTACTACTTCGAC TACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCCTCT GCTAGCACCAAAGGTCCGAGCGTTTTTCCGCTGGCA CCGAGCAGCAAAAGCACCTCTGGTGGCACCGCAGCA CTGGGTTGTCTGGTGAAAGATTATTTTCCGGAACCGG TTACCGTTTCTTGGAATAGCGGTGCACTGACCAGCGG TGTTCATACCTTTCCGGCAGTTCTGCAGAGCAGCGGT CTGTATAGCCTGTCTAGCGTTGTTACCGTTCCGAGCA GCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTTGCAATGTGAA TCATAAACCGAGCAATACAAAAGTTGATAAACGCGTT GAACCGAAAAGCTGTGACAAAACTCACACGTGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAGTTCGGAGGGGGACCGTCA

	GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCCAGCCAGATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TCTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGAGCTGCGCGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTTAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAA (SEQ ID NO:10)
DuetMab CTLA-4 LC 胺基酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***RASQSINSYLD***WYQQK PGKAPKLLIY***AASSLQS***GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYC***QQYYSTP***FTFGPGTKVEIKGQPKAAPSVTL FPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTEVS (SEQ ID NO:4)
DuetMab CTLA-4 LC 核酸	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG CAAGTCAGAGCATTAACAGCTATTTAGATTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTA TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGG TTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA CCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA

	CTACTGTCAACAGTATTACAGTACTCCATTCACTTTCG GCCCTGGGACCAAAGTGGAAATCAAAGGTCAGCCCA AGGCGGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTGCTC TGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTG TCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTG GCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA GTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAAC AAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCT GAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAG GTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGT GGCCCCTACAGAAGTGTCA (SEQ ID NO:11)
DuetMab CTLA-4 HC 胺基酸	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS***GFTFSSYGMH***WV RQAPGKGLEWVA***VIWYDGSNKYYADSVKG***RFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR***DPRGATLYYYYYGM*** ***DV***WGQGTTVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS VDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:12)
DuetMab CTLA-4 HC 核酸	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGG CAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCA GACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAC AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC

	TGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA GAGATCCGAGGGGAGCTACCCTTTACTACTACTACTA CGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCTCAGCGTCGACCAAAGGTCCGAGCGTGTG CCCGCTGGCACCGAGCAGCAAAAGCACCTCTGGTGG CACCGCAGCACTGGGTTGTCTGGTGAAAGATTATTTT CCGGAACCGGTTACCGTTTCTTGGAATAGCGGTGCAC TGACCAGCGGTGTTCATACCTTTCCGGCAGTCCTGCA GAGCAGCGGTCTGTATAGCCTGTCTAGCGTTGTTACC GTTCCGAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTT GCAATGTGAATCATAAACCGAGCAATACCAAAGTTGA TAAACGCGTTGAACCGAAAAGCGTGGACAAAACTCA CACGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAGTTCGAGGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCagCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTCTACACCCTGCCCCCATGCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCTTA AGCCTGTCTCCGGGTAAA (SEQ ID NO:13)

Octet結合分析(DuetMab)

藉由Octet分析實施與兩種不同抗原之同時結合研究。將生物素化人類PD-1裝載於鏈黴抗生物素蛋白感測器上，然後進行連續相互作用，首先與DuetMab PD-1/CTLA-4且然後與可溶性CTLA-4抗原相互作用。使用鏈黴抗生物素蛋白(SA)生物感測器(ForteBio)來捕獲於PBS (pH 7.2)、3 mg/ml BSA、0.05% (v/v) Tween 20 (分析緩衝液)中之5 μg/ml生物素化人類PD-1。在洗滌步驟後，使所裝載之生物感測器經歷連續締合及解離相互作用，首先與攜載133 nM DuetMab PD-1/CTLA-4雙特異性抗體之試樣孔且然後與攜載200 nM人類CTLA-4抗原之孔相互作用。結合結果顯示於**圖5**中。

亦經由BiaCore評價PD-1/CTLA-4 DuetMab雙特異性抗體之固有動力學。使用BIAcore T200儀器(BIAcore)實施結合實驗。為捕獲抗體，將小鼠抗huIgG-Fab固定於CM5晶片上，達到2000 RU之目標反應。使100 nM DuetMab或mAb以20 μL/min流動5 min以達成約100個反應單位之捕獲抗體。然後以50 μl/min之流速連續注射抗原達5 min。使用BIAevaluation 4.1軟體根據非線性擬合計算動力學參數($k_{締合}$及$k_{解離}$)及解離常數(KD)。結合結果顯示於**表5**中。

表5. PD-1/CTLA-4之BiaCore數據

	捕獲表面	**PD1**	**CTLA 4**	**k締合**	**k解離**	**K_D**	**Chi^2**
				(× E+5 $M^{-1}s^{-1}$)	(× E-4 s^{-1})	(nM)	
抗 PD-1 (LO115) IgG	mu-抗huIgG	hu		3.02	2.37	0.79	0.08
	mu-抗	食蟹猴		3.46	2.38	0.69	0.06

	huIgG						
	mu-抗huIgG	mu		1.49	665	447	0.13
抗CTLA-4 IgG	mu-抗huIgG		hu	6.33	3.04	0.48	0.27
	mu-抗huIgG		食蟹猴	11.47	6.74	0.59	0.47
PD-1/CTLA-4 DuetMab	mu-抗huIgG	hu		2.95	2.36	0.81	0.03
	mu-抗huIgG	食蟹猴		4.90	2.15	0.44	0.03
	mu-抗huIgG	mu		1.40	693	496	0.12
	mu-抗huIgG		hu	6.84	4.21	0.42	0.08
	mu-抗huIgG		食蟹猴	11.43	6.34	0.55	0.18

報導基因分析

來自報導基因基因分析之結果顯示，PD-1/CTLA-4雙特異性結合蛋白抑制PD-1及CTLA-4路徑(**圖6A-D**)。BiS5結合蛋白與親本相比保留PD-1功效，但與抗CTLA-4 IgG相比具有約3倍降低之功效。DuetMab抗體具有約9倍降低之PD-1功效且對於CTLA-4降低約16倍(與IgG4P相比)。業內需要具有減少的CTLA-4靶向、但保留功能活性(例如，如下文SEB分析中所顯示)之分子。因此，PD-1/CTLA-4雙特異性結合蛋白可向患者提供安全性益處。

葡萄球菌腸毒素B (SEB)分析

來自SEB分析之結果顯示，DuetMab及BiS5Ab在SEB初級免疫細胞

分析中具有等效活性(**圖7**)，且DuetMab顯示與DummyDuet對照臂相比較大之活性(**圖8A**)。DuetMab顯示大致等效於親代分子之組合之活性，及與LO115或CTLA-4抗體MEDI1123 (曲美目單抗)相比較大之活性(**圖8B**)。最後，BiS5及DuetMab顯示與新同型對照之組合相比較大之活性(**圖9A-B**)。數據係自四個供體跨越兩次獨立實驗獲得，且該等具體分析需要使用IFNγ。

混合白血球反應(MLR)分析

實施MLR分析以測試PD-1/CTLA-4雙特異性分子。PD-1/CTLA-4 DuetMab及BiS5Ab在混合淋巴球反應(MLR)分析中具有等效活性(**圖10A-C**)。PD-1/CTLA-4 DuetMab具有與DummyDuet/同型對照臂之組合相比較大之活性(**圖11A-D**)。PD-1/CTLA-4 DuetMab具有與親代抗體對照之組合相比大致等效之活性(**圖12A-D**)。最後，PD-1/CTLA-4 DuetMab具有與競爭劑PD-1/CTLA-4組合相比大致等效之活性且具有大於單獨抗PD-1之活性(例如，派姆單抗(pembrolizumab)及尼沃魯單抗(nivolumab)) (**圖13A-D**)。

藥物動力學及藥效學(PK/PD)研究

實施研究以檢查食蟹猴中之單一劑量藥物動力學/藥效學(PK/PD)。研究設計顯示於**圖14**中。DuetMab顯示食蟹猴中之清晰藥效學(PD)，且對兩個分子觀察到穩健的PD反應(**圖15A-B**)。因此，確認PD-1/CTLA-4雙特異性結合蛋白在活體內環境中之活力。

T細胞依賴性抗體反應(TDAR)

向食蟹猴靜脈內(隱靜脈或頭靜脈)投用所指示劑量(0.5 mg/kg、5 mg/kg、50 mg/kg)之DuetMab或BiS5雙特異性分子。在無菌條件下用適

當量之無菌注射用水重構鑰孔帽貝血藍蛋白(KLH)。在每一動物之背上皮下投與兩次低劑量KLH溶液(第1天及第29天)。自所有動物獲得用於進一步分析之血樣。評估KLH特異性IgM及IgG抗體效價。使用ELISA檢測猴血清中之抗KLH抗體。

在投用PD-1/CTLA-4 DuetMab (**圖16A**)及PD-1/CTLA-4 BiS5Ab (**圖16B**)之食蟹猴中可見T細胞依賴性抗體反應(TDAR)。

表現不同量之人類PD-1及/或CTLA-4之CHO細胞

研發出模型系統以使用表現不同量之人類PD-1及/或CTLA-4之穩定CHO細胞研究PD-1/CTLA-4雙特異性分子(**圖17**)。藉由流式細胞術使用經螢光標記之可溶性PD-1及CTLA-4蛋白來檢測細胞結合之DuetMab上之游離抗原結合臂。此分析之結果顯示，PD-1/CTLA-4 DuetMab同時結合相同細胞表面上之PD-1及CTLA-4 (**圖18A-C**)。

將CTLA-4連續胞吞至經格形蛋白包覆之坑中，以僅產生小部分在任一給定時間下在細胞表面上表現之受體。細胞表面CTLA-4之再循環較為快速，其中80%以上之表面CTLA-4在5分鐘內內化。因此，實施實驗以解決在飽和表現過量PD-1之細胞上之CTLA-4中，協同結合是否區分PD-1/CTLA-4 DuetMab與抗PD-1及抗CTLA-4抗體之組合(**圖19A-C**)。使用經標記之抗PD-1及抗CTLA-4 mAb獨立地測定每一靶抗原之受體佔據。

發現，親代單株抗體結合並佔據其靶受體且對未靶向受體無可量測之效應(**圖20A-D**)。PD-1/CTLA-4 DuetMab以與單株抗體之組合相比低約250倍之濃度飽和表現過量PD-1之CHO細胞上之CTLA-4 (**圖21A-D**)。PD-1/CTLA-4 DuetMab以與僅表現CTLA-4之細胞相比低約500倍之濃度飽和表現過量PD-1之CHO細胞上之CTLA-4 (**圖22A-F**)。PD-1/CTLA-4

DuetMab優先順式結合至相同細胞表面上之PD-1及CTLA-4，如藉由量化總預混合CHO群體內之雙聯體形成所測定(**圖23A-B**)。然而，PD-1/CTLA-4 DuetMab亦可反式結合至單表現細胞。PD-1/CTLA-4 DuetMab具有親代抗CTLA-4抗體曲美目單抗之內化性質(**圖24A-D**)。不受限於理論，此分子所顯示之效應可誘導PD-1之下調。亦在表現10倍過量PD-1之穩定CHO細胞中可見PD-1/CTLA-4 DuetMab之內化性質(**圖25B**)。

實例2(b) PD-L1/CTLA-4雙特異性結合蛋白

使用上表2中所鑑別之親代序列產生以下結合PD-1及CTLA-4之雙特異性結合蛋白。使用下表6中之序列產生鑑別為Bis2、Bis3及Bis5之蛋白且使用如上文部分2(a)中所述之Octet結合分析評價同時抗原結合活性(**圖26**)。

表6. PD-L1/CTLA-4之BiS構築體

描述	序列
Bis2 PD-L1/CTLA-4 HC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYYSTPFTFGCGTKVEIKGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSNKYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP RGATLYYYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVR QAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC

	PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:14)
Bis2 PD-L1/CTLA-4 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:15)
Bis3 PD-L1/CTLA-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWV RQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLD WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGCGTKVEIKGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSN KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY

	YCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:16)
Bis3 PD-L1/CTLA-4 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:17)
Bis5 PD-L1/CTLA-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWV RQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFG CGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGG GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLE WVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK (SEQ ID NO:18)
Bis5 PD-L1/CTLA-4 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI

	FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:19)

實例2(c) PD-1/TIM3雙特異性結合蛋白

使用上表2中所鑑別之親代序列產生以下結合PD-1及TIM3之雙特異性結合蛋白(表7)。使用下文所鑑別之序列產生鑑別為Bis3、Bis5及DuetMab之蛋白且藉由Octet分析評價同時結合研究。簡言之，使用鏈黴抗生物素蛋白(SA)生物感測器(ForteBio)來捕獲於PBS (pH 7.2)、3 mg/ml BSA、0.05% (v/v) Tween 20 (分析緩衝液)中之2 μg/ml生物素化人類TIM3-IgV結構域。在洗滌步驟後，使所裝載之生物感測器經歷連續締合及解離相互作用，首先與攜載200 nM雙特異性抗體之試樣孔且然後與攜載200 nM PD-1抗原之孔相互作用。將生物素化人類TIM3-IgV結構域裝載於鏈黴抗生物素蛋白感測器上，然後進行連續相互作用，首先與雙特異性分子且然後與PD-1抗原相互作用。結合結果顯示於**圖27A-27B**中。

表7. PD-1/TIM3之BiS構築體

描述	**序列**
TIM3 WT 62號scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYW GRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQTVLTQP PSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQAPVL VIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVEAGDEAD YYCQVLDRRSDHWLFGCGTKLTVL (SEQ ID NO:20)
PD-1 重鏈+TIM3(WT 62號) scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWV RQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYW

	GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGS GGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGN YFEYWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQ TVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQQKP GQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVEA GDEADYYCQVLDRRSDHWLFGCGTKLTVL (SEQ ID NO :21)
BiS5 PD-1 重鏈+TIM3(WT 62號) scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWV RQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGSYGTYYGNYFEYWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGS

	GGGGSGGGGSQTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIG GKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNS GNTATLTIHRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHWLFGCGT KLTVLGGGGSGGGGSGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK (SEQ ID NO:22)
BiS5 PD-1 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMY WYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:23)
BiS3 PD-1 重鏈 +TIM3(WT 62 號) scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWV RQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGS GGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGN YFEYWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQ TVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQQKP GQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVEA GDEADYYCQVLDRRSDHWLFGCGTKLTVL

	(SEQ ID NO:24)
BiS3 PD-1 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMY WYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:23)
DuetMab PD-1重鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWV RQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:25)
DuetMab TIM3 LC	QTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQQK PGQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVE AGDEADYYCQVLDRRSDHWLFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEVS (SEQ ID NO:26)
DuetMab TIM3 HC 隆凸	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYW GRGTLVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLV

	KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:27)

腫瘤特異性殺死活性分析

Rosenberg純系-黑色素瘤殺死分析.

使用Rosenberg純系JR6C12及黑色素瘤細胞系Mel324來測試TIM3/PD-1雙特異性結合分子及親代TIM3抗體之一般細胞殺死活性。

一般分析方案

JR6C12細胞用作效應物，且係自黑色素瘤患者擴增且特異性針對gp100-黑色素瘤抗原之人類CD8+ T細胞系。為評價治療潛能，用螢光標記Mel624腫瘤細胞且向其中添加效應物(JR6C12)及結合TIM3及或PD-1之候選抗體。將細胞共培養16小時。**圖28A**中之多個圖提供添加與抗PD1組合或呈PD-1/TIM3雙特異性分子(如表7中所述)形式之TIM3 62增強T細胞活化及腫瘤殺死的視覺表示。

另外，如**圖28B-28C**中所顯示，PD-1/TIM3雙特異性分子展示相對於抗TIM3、抗PD-1或同型對照單一療法最大之腫瘤殺死功效，如藉由(b)腫瘤細胞活力染料攝取及(c) IFN-γ分泌所評價。

除純系62外，使用上表2中所鑑別之親代序列產生另一呈DuetMab格式之結合PD-1及TIM3之雙特異性結合蛋白。使用下表8中之序列產生PD-

1/TIM3 DuetMab。自純系62之親和力成熟變體O13-1獲得TIM3臂之序列，且自LO115獲得抗PD-1臂之序列，其與用於上述PD-1/CTLA-4 DuetMab雙特異性抗體之PD-1臂一致。如下文所論述評價PD-1(LO115)/TIM3(O13-1)雙特異性抗體，包括與PD-1/TIM3 BiS3及BiS5進行比較。

表8. PD-1/TIM3之DuetMab構築體

描述	序列
DuetMab PD-1(LO115) LC 胺基酸	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMY WYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:7)
DuetMab PD-1(LO115) LC 核酸	CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCC TGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCTCCG CCTCCTCCAAGCACACCAACCTGTACTGGTCCCGGC ACATGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCC CTCGGCTGCTGATCTACCTGACCTCTAACCGGGCCAC CGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGGAACCCG AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTC CAACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGA AATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTG CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA

	AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG T (SEQ ID NO:8)
DuetMab PD-1(LO115) HC 胺基酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWV RQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:9)
DuetMab PD-1(LO115) HC 核酸	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCCGGCGGAGGACTGGTG CAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCT CCGGCTTCACATTCTCCGACTACGGCATGCACTGGGT CCGACAGGCCCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGGTGGC CTACATCTCCTCCGGCTCCTACACCATCTACTCCGCCG ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACA ACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCT GCGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGTGCCAG ACGGGCCCCTAACTCCTTCTACGAGTACTACTTCGAC TACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCCTCT GCTAGCACCAAAGGTCCGAGCGTTTTTCCGCTGGCA CCGAGCAGCAAAAGCACCTCTGGTGGCACCGCAGCA CTGGGTTGTCTGGTGAAAGATTATTTTCCGGAACCGG TTACCGTTTCTTGGAATAGCGGTGCACTGACCAGCGG TGTTCATACCTTTCCGGCAGTTCTGCAGAGCAGCGGT

	CTGTATAGCCTGTCTAGCGTTGTTACCGTTCCGAGCA GCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTTGCAATGTGAA TCATAAACCGAGCAATACAAAAGTTGATAAACGCGTT GAACCGAAAAGCTGTGACAAAACTCACACGTGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAGTTCGAGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCCAGCCAGCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTCTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGAGCTGCGCGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTTA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA (SEQ ID NO:10)
DuetMab TIM3(O13-1) LC 胺基酸	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQK PGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVLDRRSDHFLFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTEVS (SEQ ID NO:28)
DuetMab TIM3(O13-1)	AGCTACGTGCTGACGCAGCCGCCGTCAGTGTCAGTG GCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGA

LC 核酸	GACAACATTGGAGGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAG CAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGTTGGTCATCTATT ATGATAGTGACCGGCCCTCAGGCATCCCTGAGCGATT CTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGAC CATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGATTA TTACTGTCAGGTGTTGGATCGTCGTAGTGATCATTTCC TGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTC AGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGC CCTGCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACAC TGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGT GACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAA GGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAA GCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCC TGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACA GCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGA AGACAGTGGCCCCTACAGAAGTGTCA (SEQ ID NO:29)
DuetMab TIM3(O13-1) HC 胺基酸	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYW GQGTLVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKT HTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:30)
BiS3 PD- 1(LO115)/TIM3(	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWV RQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNA

O13-1) HC 胺基酸	KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYY GNYFEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQ KPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRV EAGDEADYYCQVLDRRSDHFLFGCGTKLTVL (SEQ ID NO:89)
BiS3 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) LC 胺基酸	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMY WYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:90)
BiS5 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) HC 胺基酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWV RQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV

	VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSG GSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGSYGTYYGNYFEYWGQGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGD NIGGKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSG SNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHFLFGC GTKLTVLGGGGSGGGGSGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:91)
BiS5 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) LC 胺基酸	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMY WYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:92)
DuetMab TIM3(O13-1) HC-核酸	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT CAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCG AGAGGGTCCTATGGTACCTACTACGGAAACTACTTTG AATACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCGA GTGCGTCGACCAAAGGTCCGAGCGTGTGCCCGCTGG CACCGAGCAGCAAAAGCACCTCTGGTGGCACCGCAG

	CACTGGGTTGTCTGGTGAAAGATTATTTTCCGGAACC GGTTACCGTTTCTTGGAATAGCGGTGCACTGACCAGC GGTGTTCATACCTTTCCGGCAGTCCTGCAGAGCAGCG GTCTGTATAGCCTGTCTAGCGTTGTTACCGTTCCGAGC AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTTGCAATGTGA ATCATAAACCGAGCAATACCAAAGTTGATAAACGCGT TGAACCGAAAAGCGTGGACAAAACTCACACGTGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAGTTCGAGGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCCAGCCAGCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTCTACACCCTGCCCCCATGCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCTTAAGCCTGT CTCCGGGTAAA (SEQ ID NO:31)

Octet結合分析(DuetMab、TIM3臂親和力成熟變體)

藉由Octet分析實施與兩種不同抗原PD-1及TIM3之同時結合研究。將生物素化人類TIM3裝載於鏈黴抗生物素蛋白感測器上，然後進行連續

相互作用，首先與PD-1/TIM3 DuetMab且然後與可溶性PD-1抗原相互作用。使用鏈黴抗生物素蛋白(SA)生物感測器(ForteBio)來捕獲於PBS (pH 7.2)、3 mg/ml BSA、0.05% (v/v) Tween 20 (分析緩衝液)中之5 μg/ml生物素化人類TIM3。在洗滌步驟後，使所裝載之生物感測器經歷連續締合及解離相互作用，首先與攜載具有純系62 TIM3抗體之親和力成熟變體TIM3臂(O13-1)之DuetMab PD-1/CTLA-4雙特異性抗體(以200 nM裝載)之試樣孔且然後與攜載200 nM人類PD-1抗原之孔相互作用。結合結果顯示於**圖29**中。

亦經由BiaCore評價PD-1/TIM3 DuetMab雙特異性抗體之固有動力學。使用BIAcore T200儀器(BIAcore)實施結合實驗。為捕獲抗體，將小鼠抗huIgG-Fab固定於CM5晶片上，達到2000 RU之目標反應。使100 nM DuetMab或mAb以20 μL/min流動5 min以達成約100個反應單位之捕獲抗體。然後以50 μl/min之流速連續注射抗原達5 min。使用BIAevaluation 4.1軟體根據非線性擬合計算動力學參數($k_{締合}$及$k_{解離}$)及解離常數(KD)。結合結果顯示於表9中。

表9. PD-1/TIM3之BiaCore數據

捕獲	TIM3	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	K_D (nM)	捕獲	PD-1	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	K_D (nM)
O13-1 IgG1-TM	人類	1.88E+06	7.52E-03	**4.01**	LO115 IgG1-TM	人類	3.02E+05	2.37E-04	**0.79**
DuetMab	人類	1.96E+06	8.13E-03	**4.15**	DuetMab	人類	2.95E+05	2.36E-04	**0.69**
O13-1 IgG1-TM	食蟹猴	2.79E+06	7.18E-02	**25.69**	LO115 IgG1-TM	食蟹猴	3.46E+05	2.38E-04	**0.81**
DuetMab	食蟹猴	2.98E+06	7.61E-02	**25.57**	DuetMab	食蟹猴	4.90E+05	2.15E-04	**0.44**

PD-1/TIM3雙特異性抗體(包括BiS3、BiS5及DuetMab)結合至過表現人類TIM3或人類PD-1之CHO細胞(**圖30**及表25)，PD-1及TIM3表現

(DMF4)顯示於**圖31**中。

表25

	抗-TIM3 LOO131	抗-PD1 LO115	Duetmab	Bis3	Bis5	Nip228 Hu IgG1TM
EC50	0.003968	NA	0.1036	0.02853	0.01603	NA
R^2	0.9951	0.9792	0.9982	0.9964	0.9954	0.9804

CMV Ag喚醒分析

在CMV抗原喚醒分析中與同型治療相比，PD-1/TIM3雙特異性抗體(包括BiS3、BiS5及DuetMab)增強CD8+ T細胞增殖(**圖32A-C**)。

混合白血球反應(MLR)分析

在混合淋巴球反應(MLR)分析中，PD-1/TIM3雙特異性抗體(包括BiS3、BiS5及DuetMab)增強干擾素(IFNγ)分泌，其中活性趨勢高於單療法及組合療法(**圖33A-D**)。

PD-1/TIM3雙特異性抗體(包括BiS3、BiS5及DuetMab)展示在主要表現PD-1之jurkat NFκB報導基因系(87% PD-1單陽性)中與親代LO115 IgG1相似之活性(**圖34A-C**)。

總之，對PD-1/TIM-3產生三種雙特異性格式(DuetMab、Bis3及Bis5)。所有雙特異性格式顯示等效於或優於抗PD-1之活體外功能，此表明該等分子可提供優於當前腫瘤免疫策略之優點。

實例2(d) OX40/PD-L1雙特異性結合蛋白

使用上表2中所鑑別之親代序列產生以下結合PD-L1及OX40之雙特異性結合蛋白。使用下表10中之序列產生鑑別為Bis2、Bis3及Bis5之蛋白且使用如下文所論述之Octet結合分析來評價同時抗原結合活性。

表10. OX40/PD-L1之BiS構築體

描述	序列
OX40 LCv κ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:32)
OX40SLR LCv κ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:93)
BiS2- PD-L1 - OX40 HC -4P	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYWMSWVRQAPGKCLEWVANIKQDGSEKYYV DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQVQ LQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHP GKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRITINRDTSKNQYSL QLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE

	PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:34)
BiS3-OX40 HC-4P-PD-L1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWNWIR KHPGKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRITINRDTSKNQ YSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGG GSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGCGTKVEIKGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSRYWMSWVRQAPGKCLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:35)
BiS5-OX40 HC-4P-PD-L1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWNWIR KHPGKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRITINRDTSKNQ YSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG

	QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCR ASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGCG TKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKCLEW VANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:36)
BiS5-OX40SLR HC-G1-N434A- PD-L1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWNWIR KHPGKGLEYIGYISYNAITYHNPSLKSRITINRDTSKNQ YSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYEGGHAMDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKCLEWVANIKQDGS EKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQ RVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGCGTK VEIKGGGGSGGGGSGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHAHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:94)

Octet結合分析

為評估本文所揭示雙特異性結合分子之結合，使用配備有Ni-NTA感測器尖端及10×動力學緩衝液之Octet QK (ForteBio, Menlo Park, CA)。對於此具體系列之雙特異性結合蛋白，帶His標籤之PD-L1-Fc、帶his標籤之PD-1-Fc及hOX40-Fc（人類重組蛋白）係購自R&D Systems (Minneapolis, MN)。所有結合分析皆係在25℃下實施。

在1000 rpm下搖動試樣板，然後進行分析。將Ni-NTA感測器尖端在1×動力學緩衝液中預潤濕5 min.。1×動力學緩衝液亦用作基線測定之運行緩衝液及抗原及雙特異性抗體之稀釋緩衝液。將Ni-NTA感測器尖端浸至用於抗原捕獲之100 nM帶his標籤之PD-L1-Fc (參見下文(b))或帶his標籤之PD-1-Fc中達約1 min。將經抗原包覆之感測器尖端各自浸至10 μg/ml雙特異性抗體中達約5分鐘，且然後移至一列含有100 nM hOX40-Fc抗原之孔中達2分鐘。結合結果顯示，BiS2/BiS3 OX40Ab/PD-L1分子結合至PD-L1-His及hOX40-Fc二者，且BiS2 OX40Ab/PD-L1以大於BiS3 OX40Ab/PD-L1之親和力結合。使用BiS2 PD-1/OX40作為對照(**圖35**)。

葡萄球菌腸毒素B (SEB)分析

使用上述方案之SEB分析顯示，呈BiS2及BiS3格式二者之OX40/PD-L1雙特異性分子皆具活性(**圖36A-B**)。

PD-L1報導基因分析

材料：

- 細胞系及培養條件：
- 人類PD-1 Jurkat NFAT螢光素酶純系2報導基因
- 表現PD-L1之CHO scFv OKT3 (UBC) (所有細胞皆維持於加濕組

織培養培育器中37℃下之RPMI 1640培養基加10% FBS及1×青黴素/鏈黴素抗生素(RPMI完全培養基)中)。

- RPMI-1640，LifeTechnologies目錄號A1049101
- 熱不活化新生小牛血清(FBS)，LifeTechnologies目錄號26010074
- 完全RPMI培養基：RPMI-1640加10% FBS
- 100×青黴素/鏈黴素，LifeTechnologies目錄號15140-122
- 96孔經TC處理之平底培養板，Costar 3903，VWR目錄號29444-010
- SteadyGlo螢光素酶分析系統，Promega，目錄號E2510
- 測試抗體
- EnVision多標記讀板儀，Perkin Elmer

方法：

對於中和PD-L1抑制之2-細胞生物活性分析，將表現PD-L1之CHO scFv OKT3細胞胰蛋白酶化，用溫RPMI完全培養基中和，且收集於50 mL尖底管中。使細胞在室溫下在380g下沈澱5 min，且然後懸浮於新鮮RPMI完全培養基中且在Vi細胞計數器上計數。將表現PD-L1之CHO scFv OKT3細胞調節至0.4e6/mL且如板佈局上所顯示平鋪25 μL (10,000個細胞)/孔。使細胞黏附至板達3小時。此後，將50 μL含有測試試劑之RPMI (2×最終濃度)等分至CHO細胞中且再培育1小時。此培育給予測試試劑結合至CHO細胞表面上之PD-L1時間。在1小時時，將表現PD-1之Jurkat NFAT螢光素酶報導基因細胞收集於50 mL尖底管中，在室溫下在380g下沈澱5 min，且重懸浮於新鮮的溫RPMI完全培養基中。將細胞調節至1.2e6/mL且將25 μL (30,000)細胞平鋪於含有表現PD-L1之CHO scFv

OKT3細胞及檢品之孔中。

將細胞及測試試劑進一步培育18小時以供PD-1 Jurkat報導基因細胞活化。此後，製備SteadyGlo螢光素酶試劑且將100 μL等分至每一孔。藉由在室溫下輕輕振盪(200 rpm定軌振盪器) 15 min來達成完全溶解。溶解後，使用US96發光方案在Envision多標記讀板儀上量測螢光素酶活性。在Graphpad Prism軟體中繪製螢光素酶RLU對log [測試試劑]，且使用非線性回歸分析S形劑量-反應曲線之4參數擬合來測定PD-L1拮抗作用之EC_{50}值。

結果：

使用5點劑量調定及100 nM起始點(PD-L1)針對PD-L1/PD-1親本及NIP228(G4P)對照測試OX40/PD-L1 BiS2/3。顯示OX40-PD-L1 BisAb二者皆具活性且具有強於PD-L1(4736)親本之激動作用(**圖37**)。BiS2及BiS3格式以類似方式發揮作用。

CMV Ag喚醒分析

在CMV Ag喚醒分析(使用上述方案)中，BiS2及BiS3分子展示相對於組合相同之活性(**圖38**)。

上文所論述之所有結合及免疫反應分析提供以下說明性數據：本文所揭示之雙特異性結合分子對兩個靶分子展現特異性結合，在一些情況下大於個別單特異性親代結合分子(抗體)之組合的結合活性，且可誘導或增強免疫反應。另外，顯示該等分子對癌細胞系具有細胞殺死活性。因此，數據顯示，該等分子及雙特異性平臺結構代表優良的候選腫瘤免疫治療劑。

Octet結合分析(OX40(SLR)/PD-L1 BiS5)

為評估本文所揭示雙特異性結合分子之結合，使用配備有Ni-NTA感測器尖端及10×動力學緩衝液之Octet QK (ForteBio, Menlo Park, CA)。對於此具體系列之雙特異性結合蛋白，帶His標籤之PD-L1-Fc、帶his標籤之PD-1-Fc及hOX40-Fc（人類重組蛋白）係購自R&D Systems (Minneapolis, MN)。所有結合分析皆係在25℃下實施。結合結果顯示，BiS5 OX40Ab/PD-L1分子結合至PD-L1-His及hOX40-Fc二者(**圖39**)。

PD-L1/OX40 BiS5結合至表現人類或食蟹猴OX40及PD-L1/B7H1之CHO細胞(**圖40A-F**)。亦藉由流式細胞術(HyperCyt)量測PD-L1/OX40 BiS5構築體之結合(**圖42**)。OX40 IgG4P及OX40/PD-L1雙特異性分子結合至Jurkat OX40報導基因細胞。PD-L1 IgG及OX40/PD-L1雙特異性分子結合至NCI H358及CHOK1 B7H1(PD-L1) /OKT3細胞。所有IgG及雙特異性分子結合至HEK CD32a細胞。

PD-L1及OX40報導基因分析

在PD-L1報導基因分析(使用上述方案)中，所有PD-L1 scFv皆含有雙特異性分子且陽性對照IgG展示活性(**圖42A-B**)。單臂OX40對照及同型對照在此分析中不展示任何活性。EC_{50}值及希爾斜率(hill slope)與在抗PD-L1親代對照及PD-L1Bis2、Bis3及Bis5構築體之先前分析中所獲得之值一致。

在使用HEK CD32a細胞之OX40報導基因分析中，雙特異性構築體具有彼此相同之活性，且觀察到Fc介導之激動作用(**圖43A-B**)。OX40/PD-L1 Bis5 N434A IgG1具有等效於OX40 IgG4P及MEDI0562 (OX40 IgG1)之EC_{50}活性。

在使用過表現PD-L1之CHOK1細胞之OX40報導基因分析中，

OX40/PD-L1雙特異性分子顯示相同的激動作用(**圖44A-B**)。OX40/PD-L1 Bis5 N434A IgG1具有等效於所測試OX40/PD-L1 Bis5雙特異性Mab之其他Fc變體之EC_{50}活性。使用OX40 IgG或PD-L1 IgG未檢測到激動作用。因此，展示PD-L1介導之OX40激動作用。

檢測使用OX40/PD-L1雙特異性分子對腫瘤細胞之PD-L1介導之OX40激動作用(**圖45A-B**)。OX40/PD-L1雙特異性分子在此分析中顯示相同的激動作用-鐘形曲線。使用OX40 IgG未觀察到激動作用，因此展示使用雙特異性分子優於OX40 IgG加PD-L1 IgG組合之益處。使用NCI H358 PD-L1 KO細胞未見激動作用(**圖46A-D**)，此顯示使用細胞可見之NCI H358激動作用具有PD-L1特異性。

葡萄球菌腸毒素B (SEB)分析

在SEB分析中，OX40/PD-L1雙特異性分子具有大於針對OX40及PD-L1之個別抗體之組合的活性(**圖47A-D**)。具體而言，G4P構築體具有大於G1構築體之活性。野生型、含有YTE之變體及N434A變體具有等效活性。

Treg阻抑分析

實施Treg阻抑分析以測試OX40/PD-L1雙特異性分子(**圖4A-D**)。OX40/PD-L1雙特異性分子僅在PD-L1存在下對CD4+ T_{eff}有活性(**圖49及50**)。不受限於理論，此指示OX40之反式交聯。OX40/PD-L1雙特異性分子阻抑T_{reg}抑制性效應，但僅在藉由結合至板固定PD-L1交聯時如此。

混合白血球反應(MLR)分析

實施MLR分析以測試OX40/PD-L1雙特異性分子(**圖51A-B**)。OX40/PD-L1雙特異性分子具有大於針對OX40及PD-L1之個別抗體之組

合的活性(**圖52A-E**)。

抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)分析

實施ADCC分析以測試OX40/PD-L1雙特異性分子。ADCC分析使用剛剛分離之NK細胞作為效應細胞以及過表現PD-L1 B7H1之CHOK1細胞及過表現OX40之CHOK1細胞分別作為靶細胞，效應物對靶(E:T)比率為20:1。利用5小時後銪自經標記靶細胞之釋放來分析靶細胞溶解。在ADCC分析中，OX40/PD-L1 BiS2及BiS5調介針對表現PD-L1或OX40之CHO細胞之ADCC (**圖53及54**)。

使用E:T比率為10:1的剛剛分離之NK細胞作為效應細胞以及過表現PD-L1及OX40之CHO K1作為靶細胞實施CD107a動員分析。在4小時後藉由流式細胞術分析NK細胞之細胞表面之CD107a動員。在抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)分析中，BiS2及BiS5 OX40/PD-L1雙特異性分子增加NK細胞對表現PD-L1及OX40之CHO細胞之CD107a動員(**圖55**)。BiS2及BiS5 OX40/PD-L1雙特異性分子增加NK細胞對具有上調的OX40及PD-L1之經活化同種異體T細胞之CD107a動員(**圖56**)。BiS5 OX40/PD-L1增加來自兩個不同供體之NK細胞對經活化同種異體T細胞之CD107a動員(**圖57A-B**)。

藥物動力學及藥效學(PK/PD)研究

設計研究以比較OX40/PD-L1雙特異性分子之PK/PD (**圖58**)。比較食蟹猴中PD-L1/OX40雙特異性分子之血清濃度時間概況(**圖59**及表11)。Bis5 OX40/PD-L1 IgG1 N434A分子之大於WT Bis5分子之平均$T_{1/2}$；Bis5 OX40/PD-L1 IgG1 N434A分子之清除率與WT Bis5分子相比較小。兩種分子類似地減少血清中之可溶性PD-L1，且引起Ki67+總記憶CD4+ T

細胞、總記憶CD8+ T細胞及NK細胞之百分比顯著增加。

表11. BiS5-OX40/PD-L1-G1之藥物動力學參數

檢品	動物	AUC最終 (ng*h/mL)	AUCinf (ng*h/mL)	AUC外推% (%)	C0 (ng/mL)	Cmax (ng/mL)
BiS5-OX40/PD-L1-G1 N434A	2028	5490000	6840000	19.8	82900	82300
	2033	6530000	10800000	39.7	77700	79100
	2059	6510000	9260000	29.7	94500	89800
	平均值	**6180000**	**8980000**	**29.7**	**85000**	**83700**
	SD	**597000**	**2000000**	**9.91**	**8610**	**5520**
BiS5-OX40/PD-L1-G1 WT	2032	4260000	4530000	6.08	104000	101000
	2047	3670000	3900000	5.84	131000	105000
	2056	4190000	4340000	3.45	74400	74400
	平均值	**4040000**	**4260000**	**5.13**	**103000**	**93300**
	SD	**320000**	**324000**	**1.45**	**28200**	**16500**

檢品	動物	Tmax (h)	Cl (mL/min/kg)	Vss (L/kg)	T1/2 (h)	Rsq
BiS5-OX40/PD-L1-G1 N434A	2028	2	0.0122	0.0773	70	0.836
	2033	6	0.0077	0.0842	128	0.873
	2059	2	0.00899	0.0746	97.1	0.933
	平均值	**3.33**	**0.00963**	**0.0787**	**98.3**	**0.881**
	SD	**2.31**	**0.0023**	**0.00496**	**28.9**	**0.049**
BiS5-OX40/PD-L1-G1 WT	2032	2	0.0184	0.0596	37.9	0.952
	2047	2	0.0214	0.0672	44.6	0.987
	2056	2	0.0192	0.0555	34	0.99
	平均值	**2**	**0.0196**	**0.0608**	**38.9**	**0.976**
	SD	**0**	**0.00154**	**0.00593**	**5.35**	**0.0211**

OX40/PD-L1雙特異性分子使血清可溶性PD-L1濃度降低至分析LLOQ以下(**圖60**)。N434A突變改良BiS5-OX40/PD-L1-G1之藥物動力學。具體而言，CL減小約一半；T1/2及AUCinf相應地增加2倍；且Cmax

及Vss未受影響。此與先前報告之此突變對單株抗體PK之效應一致。因此，推進BiS5-OX40/PD-L1-G1 IO BisAb之mAb樣PK。在2週時，BiS5-OX40/PD-L1-G1 BiSAb之血清濃度低於量化限值(BLOQ)且可與ADA相關。

比較PD-L1 OX40 Bis5組與對照(抗PcrV-Psl對照) Ab組(**圖61A-F**)可見總記憶CD4、總記憶CD8及NK細胞增殖(Ki67+細胞之百分比)之實質性及統計學上顯著之增加。在PD-1 LO115與PD-L1 OX40 Bis5組之間可見總記憶CD4、總記憶CD8及NK細胞增殖(Ki67+)之顯著差別趨勢。在PD-L1 OX40 Bis5 N434A (半衰期延長)形式與G1形式之間無統計學上顯著之增殖差別。PD-L1 OX40 Bis5 N434A及IgG1形式皆為生物活性雙特異性分子。

實例2(e). OX40/PD-1雙特異性結合蛋白

使用上表2中所鑑別之親代序列產生以下結合PD-1及OX40之雙特異性結合蛋白。使用下表24中之序列產生鑑別為Bis2及Bis3之蛋白且使用如下文所述之Octet結合分析評價同時抗原結合活性。

表24. OX40/PD-1之BiS構築體

描述	序列
PD1 LCv κ	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMY WYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 97)
BiS2- PD-1- OX40 HC -4P	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFATYYCQQGSALPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYG

	GSFSSGYWNWIRKHPGKCLEYIGYISYNGITYHNPSLKS RITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYD GGHAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGL EWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:95)
BiS3-OX40 HC-4P-PD-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWV RQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGCGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLT CAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKCLEYIGYISYNGITYH NPSLKSRITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARY KYDYDGGHAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:96)

猴PD-1以及人類及食蟹猴OX40之雙特異性抗體(**圖62**；PD-1結合蛋白以灰色繪示且OX40結合蛋白以淺灰色繪示)。不受限於理論，所提出作用機制表明在順式結合至OX40及PD-1二者後T細胞上之雙信號傳導效應、T細胞共刺激表面受體OX40之激動作用及免疫阻抑性PD-1之阻斷(**圖63**)。

Octet結合分析

顯示兩個不同批次之PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb對PD1-His及人類OX40-Fc之同時結合活性(**圖64**)。

OX40報導基因分析

PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb顯示與其他OX40激動劑相當之活性(**圖65A-B**)。將蛋白儲存在4℃下且立即使用，冷凍/解凍三次，在4℃下儲存7天且在40℃下儲存7天。活性報告為相對光單位對mAb濃度。在4℃下在第0天時PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb之EC_{50}為約2 nM。

PD-1/PD-L1報導基因分析

PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb顯示與其他PD-1激動劑相當之活性(**圖66A-B**)。將蛋白儲存在4℃下且立即使用，冷凍/解凍三次，在4℃下儲存7天且在40℃下儲存7天。活性報告為相對光單位對mAb濃度。在4℃下在第0天時PD1 (LO115)/OX40 BiS2 mAb之EC_{50}為約1 nM。已實施兩組初級人類活體外功效分析：使用葡萄球菌腸毒素B (SEB)之抗原喚醒T細胞分析及T細胞共刺激。

葡萄球菌腸毒素B (SEB)分析

在SEB分析中，PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb誘導在培養3天後在細胞上清液中檢測到之IL-2量之增加(**圖67**)。因此，PD-1/OX40 BiS2 mAb可同時結合至其人類靶抗原且可共刺激活體外T細胞。

在抗原喚醒分析中，與親代mAb及親代mAb之組合相比，PD-1/OX40 BiS2 mAb驅動干擾素(IFN)-γ之量增加(**圖68及69**)。

CMV Ag喚醒分析

CMV Ag喚醒分析(使用上述方案)之結果，BiS2及BiS3分子並不展示相對於組合相同之活性(**圖70**)。數據顯示，PD-1/OX40 BiS2 IgG4P mAb在活體外及活體內有活性。結構與PD1/OX40 BiS2不同之PD-1/OX40 BiS3無可檢測到之活性。因此，PD-1/OX40 BiS3 (無活性)與BiS2 (有活性)不同。

藥物動力學及藥效學(PK/PD)研究

將食蟹猴視為藥理學上相關之非臨床物種以測試PD-1/OX40 BiS2 mAb之功能活性。在食蟹猴之非GLP (優良實驗室規範(Good Laboratory Practices))研究中評價PD-1/OX40 BiS2 mAb之藥物動力學(PK)及藥效學(PD)。在食蟹猴(n=3；雄性)中在單一靜脈內(IV)劑量後在0.1 mg/kg至30 mg/kg劑量範圍內評估PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb PK及PD (Ki67陽性CD4+及CD8+總記憶T細胞%)。在劑量前及劑量後第1天、第8天、第11天及第15天收集PBMC，低溫保存且在藉由流式細胞術分析之前解凍。總之，PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb展示大致線性之PK，其中短半衰期為0.6-1.7天(**圖70**；表12)。

表12. PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb之平均藥物動力學參數.

劑量 (mg/kg)	C_{max} (ug/mL)	$AUC_{最終}$(天*ug/mL)	AUC_{INF} (天*ug/mL)	CL (mL/天/kg)	$T_{1/2}$ (天)	Vss (mL/kg)
0.1	**2.0** (0.5)	**1.6** (0.3)	**1.7** (0.3)	**60.2** (9.0)	**0.6** (0.1)	**47.4** (18.3)
1	**25.1** (3.1)	**24.8** (7.5)	**25.1** (7.3)	**41.8** (10.4)	**0.9** (0.3)	**43.2** (17.4)
10	**211** (19)	**203** (9.2)	**207** (18.0)	**48.6** (4.2)	**1.7** (0.2)	**72.7** (8.8)
30	**607** (83)	**576** (49)	**577** (61)	**52.3** (5.5)	**1.5** (0.2)	**85.6** (4.3)

各值呈現為平均值(標準偏差)。$AUC_{最終}$ = 至最終可量測濃度之濃度時間曲線下面積；AUC_{INF} = 至無限時間之濃度時間曲線下面積；C_{max} = 最大觀察濃度；CL：全身清除率；$T_{1/2}$ = 半衰期；Vss：末期分佈體積；V_{ss}：穩態分佈體積。

平均峰值濃度(C_{max})隨劑量之成比例增加約為0.1 mg/kg下之2.0 μg/mL至30 mg/kg下之607 μg/mL。AUC∞隨劑量之成比例增加約為0.1 mg/kg下之1.7 μg•天/mL至30 mg/kg下之577 μg•天/mL。平均血清清除率介於41.8 mL/天/kg至60.2 mL/天/kg範圍內。穩態分佈體積介於43.2 mL/kg至85.6 mL/kg範圍內。PD結果(**圖71**)顯示CD4+總記憶T細胞增殖(Ki67)之劑量依賴性增加及CD8+總記憶T細胞增殖(Ki67)之增加。顯示量化食蟹猴血清中之PD-1/OX40之代表性標準曲線(**圖72**)。

實例3. BiSAb構築體之物理及化學穩定性

如本文所述實施一系列實驗以評估及評價BiSAb構築體相對於其他雙特異性結合蛋白結構策略及平臺之物理及化學穩定性。具體而言，下文所論述之系列穩定性研究鑑別及分析多個pH範圍對BiSAb穩定性(例如，水解、片段化、聚集、熱穩定性)之效應。如數據顯示，對於多個BiSAb格式之不同說明性實施例，本文所揭示之BiSAb (在下文研究中鑑別為「BiS5」，且如表13中所顯示呈D/H格式)展示相對於所有其他BiSAb結構

基序意外且令人驚奇的物理及化學穩定性。

表13. BiS5穩定性研究構築體

構築體	序列
D IgG: LC10 scFv: 2F4 SN-(scFv)-G 胺基酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHDMHWV RQATGKGLEWVSGIGTAGDTYYPDSVKGRFTISRENAK NSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARDRYSPTGHYYGMDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESN*GGGGSGGGGS*EIVMTQSPATLSVSPGE RATLSCRASQSVSSYLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRA TGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYQNW PLLTFGCGTKLEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EVQL LESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYMMQWVRQAP GKCLEWVSSIWPSGGKTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARVRRGGATDYWGQGTLVT VSS*GGGGSGGGGS*GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO:37) V區加下劃線，連接體以斜體顯示。序列如下：LC10VH、CH1、鉸鏈、CH2、CH3 (N末端)、L1-2F4VL-連接體-2F4VH-L2、CH3 (C末端)
H IgG: 2F4 scFv: LC10 SN-(scFv)-G	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYMMQWV RQAPGKGLEWVSSIWPSGGKTYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVRRGGATDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY

胺基酸	FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESN*GGGGSGGGGS*DIQMTQSPSTLSASVGDRVTI TCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCKQYADYWTFG **C**GTKVEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHDMHWVRQATGK**C**LE WVSGIGTAGDTYYPDSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNS LRAGDTAVYYCARDRYSPTGHYYGMDVWGQGTTVTV SS*GGGGSGGGGS*GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO:38) V區加下劃線，連接體以斜體顯示。序列如下：2F4VH、CH1、鉸鏈、CH2、CH3 (N末端)、L1-LC10VL-連接體-LC10VH-L2、CH3 (C末端)

實例3.1

在本文所揭示之BiS格式(「BiS5」)與包括兩個在鉸鏈區(即，介於Fc區與Fab區之間)連接之結合結構域(scFv結構域)之另一BiS格式(鑑別為「BiS4」)之間實施進一步比較。在中國倉鼠卵巢(CHO)中表現BiS4及BiS5蛋白，且藉由常規層析方法純化。如上文所註明，該兩種格式具有相似的Fab及scFv序列，其之間之主要差別為scFv結構域之位置(對於BiS4，scFv位於鉸鏈區中；對於此具體BiS5，scFv位於C_H3結構域中之SNG環中，如本文所論述)。將經純化BiS分子供應於PBS緩衝液中且使用NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware)使用1.54

M^{-1} cm^{-1}之消光係數測定蛋白濃度。

pH篩選及短期穩定性研究

對於pH篩選研究，將BiS4及BiS5抗體濃縮至約12 mg/mL且針對6種不同pH條件、20 mM琥珀酸鈉(pH 5.0)、組胺酸/組胺酸HCl (pH 5.5、6.0及6.5)及磷酸鈉(pH 7.0及7.5) (其皆含有240 mM蔗糖)透析。透析係藉由使用Slide-A-Lyzer透析盒(10 kDa分子量截止(MWCO), Thermo-Fisher, Rockford, Illinois)來實施。完成透析後，摻入0.02%聚山梨醇酯80且將蛋白之最終濃度調節至約10 mg/mL。在預消毒之層流淨化罩中使用0.22 μm過濾器(Millipore, Billerica, Massachusetts)對BiS4及BiS5調配物進行滅菌。將1毫升等份分配至3 mL硼矽酸鹽玻璃I型瓶中(West Pharmaceutical Services, Exton, Pennsylvania)。將試樣儲存在40℃下且在時間0時及儲存1週、2週、3週及4週後藉由SEC分析。

差示掃描量熱法(DSC)

使用連接至溫度調控自動取樣器之VP-Capillary DSC (Malvern Instruments Ltd., Westborough, Massachusetts)獲得時間0試樣之差示掃描量熱法溫度記錄圖。為獲取溫度記錄圖，使用1 mg/mL之蛋白濃度以及在20℃-100℃之溫度範圍內90℃/h之掃描速率。將BiS4及BiS5在介於5.0至7.5範圍內之不同pH條件下之溫度記錄圖緩衝液減去且收集基線。使用Origin 7 SR4軟體包之DSC外掛程式實施數據分析。將實驗結果擬合至具有三個躍遷之多狀態模型以計算熔融溫度(T_m)值。將第一熱躍遷之熱容量(C_p)值達到500 cal mol^{-1}℃$^{-1}$之點視為開始溫度($T_{開始}$)。

高效粒徑篩析層析(HP-SEC)

為基於大小分離聚集物及片段種類與單體，使用具有能夠記錄200-

400 nm UV吸光度光譜之光電二極體陣列檢測器及7.8 × 30 cm^2, 5 μm, 250Å, Tosho TSKgel G3000SWxl (TOSOH Biosciences, King of Prussia, Pennsylvania)及相應保護管柱之Agilent高效液相層析系統來分析穩定性試樣。為分離該等種類，使用含有0.1M無水磷酸氫二鈉、0.1M硫酸鈉、0.01%疊氮化鈉之移動相(pH 6.8)及1 mL min^{-1}之流速。所注射蛋白之量為約250 μg。使用280 nm之吸光度光譜監測BiS4及BiS5之分離。量化可溶性聚集物(多聚體及二聚體)、單體及片段之峰面積。然後，計算每一種類之百分比且針對培育時間進行繪製以形成動力學曲線。藉由計算每一動力學曲線之斜率形成每個月之單體損失、片段化及聚集速率之pH概況曲線。

BiS4及BiS5之熱穩定性

經由分析藉由使用毛細管DSC獲得且在六種不同pH條件下產生之溫度記錄圖來評估pH對BiS4及BiS5熱穩定性之效應。**圖74A**及**74B**分別顯示在pH 5.0至7.5下BiS4及BiS5之DSC溫度記錄圖之疊加。如**圖73**中所顯示，每一溫度記錄圖顯示具有轉換溫度T_m1、T_m2及T_m3之三個熱解摺疊事件。第一轉換(T_m1)可能與C_H2及scFv結構域之同時解摺疊相關，而第二(T_m2)及第三(T_m3)轉換與C_H3及F_{ab}結構域之解摺疊相關。對於兩種格式，在pH增加至高達6.5時觀察到$T_{開始}$、T_m1、T_m2及T_m3增加(**圖73A**、**73B**、**73E**及下表14)。對於BiS4及BiS5，在所有pH條件下未觀察到$T_{開始}$、T_m2、及T_m3之差別(**圖73E**及表15)，此指示鉸鏈區或C_H3結構域中scFv之存在不會影響C_H3及F_{ab}之熱穩定性。有趣的是，對於BiS5在所有pH條件下觀察到T_m1稍微增加，此指示當scFv位於C_H3結構域中時，scFv、C_H2或二者之熱穩定性增加。

表14：pH對BiS4及BiS5之熱開始溫度($T_{開始}$)及熱熔融溫度(T_m1、T_m2及T_m3)之效應，如藉由毛細管DSC所量測.

	BiS4				BiS5			
pH	$T_{開始}$	T_m1	T_m2	T_m3	$T_{開始}$	T_m1	T_m2	T_m3
5.0	56.3	67.8	81.9	84.1	55.9	69.5	81.8	83.9
5.5	56.8	67.8	81.6	83.8	57.0	69.4	81.7	83.7
6.0	59.3	69.3	83.1	85.3	59.4	70.7	83.1	85.2
6.5	60.6	70.3	83.8	86.0	60.6	71.6	83.8	85.9
7.0	60.6	70.2	82.2	84.7	59.9	71.2	81.5	84.3
7.5	60.3	70.0	81.5	84.2	59.6	71.0	81.0	83.9

BiS4及BiS5之物理及化學穩定性

在40℃下持續高達4週評估BiS4及BiS5格式在不同pH值(介於5.0至7.5範圍內)下之物理及化學穩定性。使用「時間0」時之HP-SEC層析圖來比較HP-SEC層析圖其他時間點之總面積、單體、聚集物及片段含量。BiS4及BiS5之在pH 7.5時間0下與4週相比之代表性層析圖顯示於**圖74A**中。所有試樣皆主要含有單體及少量可溶性聚集物且含或不含片段。在時間0 (實線)時，大多數試樣為單體且無其他可注意到之差別，只是兩個試樣之間峰高度之小差別可能歸因於濃度之微小差別(**圖74A**)。虛線顯示兩種格式在pH條件下在40℃下儲存4週後HP-SEC層析圖之疊加。在加速溫度應力條件下，兩種格式顯示另一峰、早期溶析峰(多聚種類)、單體減少及升高的片段量(**圖74A**)。因片段化所致之單體損失在BiS4中與BiS5相比更顯著，此指示BiS5在化學上更穩定。基於其結構、可能的片段化位點及滯留時間推測，小片段峰(RT約為10.8 min)係Fab，且大片段峰(RT約為9.8 min)及肩峰(RT約為8.7 min)分別係含有scFv之Fab及其含有Fab、scFv及Fc之相應較高分子量片段(HMWF)。

為較佳評估scFv之位置對BiS4及BiS5之物理及化學穩定性之效應，將針對時間0及40℃、pH 7.5下4週之每一種類之總面積%繪製於條形圖中(**圖74B**)。如**圖74B**中所顯示，在時間0時，BiS4及BiS5之單體純度係相似的。在40℃下培育高達4週之試樣顯示所形成片段之類型及含量之顯著差別。對於BiS4試樣，分別形成11.8%、7.2%及3.5%之肩峰(RT約為8.7 min)、大片段(RT約為9.8 min)及小片段(RT約為10.8 min) (**圖74B**)。令人驚奇的是，BiS5試樣顯示僅1.4%之小片段(RT約為10.8 min)，此可能歸因於來自結構域兩側之scFv系鏈至Fc (**圖89**)。

圖75A-75C顯示在40℃、pH 7.5下培育之BiS4及BiS5試樣之聚集、片段化及單體損失之動力學。BiS4試樣顯示與BiS5相比更快速之單體損失速率(**圖75A**)。BiS4及BiS5在pH 7.5下之單體損失速率分別為27.4%/月及4.5%/月(**圖75A**)。對於BiS4，大部分單體損失歸因於為23.9%/月之片段化，且在較小程度上歸因於為3.5%/月之聚集(**圖75B**及**75C**)。有趣的是，對於BiS5，聚集之速率(2.8%/月)似乎稍高於片段化速率(1.7%/月)(**圖75B-75C**)。

藉由繪製彼等值對6個pH條件來實施pH對BiS4及BiS5格式之物理及化學穩定性之效應、每個月之單體損失、片段化及聚集速率的進一步分析(**圖76A-76C**)。在介於pH 5.0-7.5範圍內之所有六種pH條件下，BiS5格式之單體損失速率低於BiS4 (**圖76A**)，此表明本文所揭示之BiS5格式具有意外的優於其他雙特異性蛋白格式之物理及化學穩定性。對於BiS4，即使在較低pH條件下，大部分單體降解主要歸因於片段化(**圖76B**)。BiS5顯示在所測試之所有pH條件下與BiS4相比較低之片段化速率。令人驚奇的是與BiS4相比，BiS5之片段化速率在整個較寬pH範圍內似乎較為平坦且

較低。不受限於任何具體理論，在BiS5中觀察到之較低片段化速率可源自在scFv之任一末端連接其與Fc之G_4S連接體。一個連接至Fc之G_4S連接體之片段化可不釋放scFv，此乃因其仍可經由另一G_4S連接體連接至Fc。在BiS4及BiS5中，聚集速率似乎在所測試之所有pH條件下較為相似(**圖76C**)，此表明scFv之位置對聚集動力學具有較小效應，此亦藉由觀察到如使用毛細管DSC所量測之在所有pH條件下兩種格式之間之$T_{開始}$無變化來支持(**圖73E**及上文所論述之表14)。在pH 7.5及40℃下(在時間 = 0下)，所有分子皆不展現可觀片段化(**圖77A**)，但在相同條件下在40℃下儲存2週後，對BiS4觀察到可觀片段化且對BiS5觀察到少量片段化(**圖77B**)。BiS4及BiS5二者在較低(5.5) pH下具有減少的片段化及聚集，而對於片段化及聚集二者BiS5在兩個pH值下具有優異性能(**圖78**)。此系列實驗展示，與BiS4相比，本文所揭示之BiS5具有優異的化學穩定性及相似的物理穩定性。

實例3.2

實施其他研究以評估本文所揭示並鑑別為構築體A-H (例如，參見上文表13及相關實例)之雙特異性結合蛋白之不同實施例之物理及化學穩定性。使用DSC、加速的儲存穩定性以及FcRn及FcgR結合分析來分析該等構築體，如下文所述。

差示掃描量熱法分析

使用Microcal VP-DSC掃描微熱量計(Microcal)實施此數據集之DSC實驗。使用0.22 μm過濾器過濾用於DSC之所有溶液及試樣且脫氣，然後裝載至熱量計中。用於DSC研究之抗體為>98%單體，如藉由分析型SEC所測定。在DSC分析之前，在25 mM組胺酸-HCl (pH 6.0)中徹底透析(至

少3次緩衝液交換)所有試樣。使用來自此透析之緩衝液作為參考緩衝液用於後續DSC實驗。在試樣量測之前，自試樣量測減去基線量測(緩衝液對緩衝液)。將經透析試樣(濃度為1 mg/ml)添加至試樣孔中且以1℃/min掃描速率實施DSC量測。使用由Microcal提供之Origin™ DSC軟體實施數據分析及解捲積。使用非2態模型實施解捲積分析且使用100個迭代週期獲得最佳擬合。$T_{開始}$定義為溫度記錄圖似乎具有非0斜率時之定性溫度。T_m定義為集中之一半分子未摺疊時之溫度，且計算為對應於溫度記錄圖上之每一峰最大值之溫度值。

不同構築體之結果呈現於**圖79**中。通常，當與包括LC10作為scFv之構築體E、G、H相比時，包括2F4作為scFv之構築體A、C、D具有較低T_M1。不受限於理論，TM1值之差別可歸因於LC10 scFv結構域相對於2F4可變結構域之固有較佳之熱穩定性。數據表明，具有2F4作為scFv之構築體A-D將不如具有LC10作為scFv之構築體E-H熱穩定。

加速的儲存穩定性分析

將構築體之濃度正規化至1 mg/mL。將1 mL之每一雙特異性構築體或IgG對照等分至1.5 ml埃彭道夫(Eppendorf)管中。在靜態培育器中在45℃下將試樣培育2週。在3天、7天及14天時分析試樣且評價其穩定性。在每一時間點下，實施目視檢查以記錄增加的濁度或沈澱。使用0.2 um旋轉管柱過濾試樣且將120 ul試樣等分至HPLC瓶中，確保在瓶底部無氣泡。然後在Agilent 1100系列HPLC-SEC上使用TSK-GEL G3000SW_{XL}(300×7.8 mm) Tosoh Bioscience管柱、使用0.1M磷酸鈉、0.1M硫酸鈉(pH6.8)作為運行緩衝液來測試試樣以檢查聚集及降解。注射60 μL試樣且以1 mL/min之流速運行。捕獲單體滯留時間(min)、總峰面積、單體%、

聚集物%、片段%、單體損失%且用於分析型SEC分析。結果匯總於表15中。

表15：加速的穩定性研究.

構築體	T_M1 (℃)	單體% 第0天	單體% 第0天	聚集% 第0天	聚集% 第7天	降解% 第0天	降解% 第7天
A	57.11	97.1	**68.4**	2.2	**30.0**	.64	1.7
C	59.01	80.4	**79.7**	9.7	**20.4**	0.0	0.0
D	58.82	92.2	90.8	7.2	8.6	0.5	0.6
E	65.83	91.3	91.2	1.7	0.0	7.0	8.2
G	68.7	99.3	99.1	0.0	0.0	0.7	0.9
H	67.5	99.4	99.2	0.0	0.0	0.6	0.8

如本文所述，上述構築體中scFv結構域之位置如下(其中「-」指示scFv)：A及E處於IS-RTP處；B及F處於AK-GQP處；C及G處於S-NG處；且D及H處於SN-G處。多個T_M值與以下結構域相關：T_M1 = CH2/scFv；T_M2 = Fab；T_M3 = CH3。數據往往顯示，2F4 scFv插入ISRTP (A)及SNG (C)環中之構築體A及C比在相同位置插入LC10 scfv之構築體E及G更易聚集。此觀察表明，scFv結構域之序列一致性及行為可對雙特異性結合蛋白構築體之穩定性具有效應。另外，根據上文可預測，含有2F4 scFv之構築體D將具有類似於A及C之較低穩定性；然而將2F4 scFv插入SNG環中似乎會穩定分子且減弱形成聚集物之趨勢。總而言之，此加速的穩定性研究指示，Fc區內之scFv序列及位置可在BiSAb構築體之穩定性中起可量測作用。

FcRn及FcγR結合分析

使用BIAcore 3000儀器(BIAcore)實施結合實驗。為捕獲抗體，將1000 RU IsdH (Fab)抗原固定於CM5晶片上。使100 nM之BiSAb構築體

或mAb對照以20 μL/min流經5 min以捕獲抗體。使5 uM huFcRn或FcγR I、IIa、IIb、IIIa-158V或IIIA158F以5 μL/min流經20 min。於PBS + 5 uM EDTA (pH 6.0)中實施FcRn結合，同時於PBS + 5 uM EDTA (pH 7.4)中實施FcRn結合。

評估構築體A、C、D、E、G及H之FcRn結合。雙特異性構築體E及H中之每一者及2F4 IgG與FcRn結合之代表性數據顯示於**圖80**中。具有CH2-CH3界面下游之scFv之構築體似乎保留FcRn結合(例如，D及H構築體)。具有位於CH2-CH3界面上游之ISRTP環內之scFv之構築體似乎移除可檢測之FcRn結合(例如，A及E構築體)。ISRTP環處於Fc中已知延長半衰期之YTE突變(M252Y/S254T/T256E)的區域內，已知該等YTE突變對FcRn結合至關重要。

測試構築體A、C、D、E、G及H與FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa-158F及FcγRIIIa-158V之結合。構築體E、G及H與FcγRIIIa-158V結合之代表性數據顯示於**圖81**中。所測試之所有構築體保留與FcγR之結合，但具有不同親和力(**圖81**，插圖)。表16顯示所觀察到之多種構築體與FcγR之結合趨勢。

表16：FcγR結合趨勢.

FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIIa158F	FcγRIIIa158V
D > C > A	D > C > A	D > C > A	D > C > A	D > C > A
H > G > E	H > G > E	H > G > E	H > G > E	H > G > E

當與具有插入CH2-CH3界面下游之SNG環中之scFv之其他構築體(C、D、G及H)相比時，所觀察到之FcγR與具有插入CH2-CH3界面上游之ISRTP環中之scFv之構築體(A及E)結合的差別顯示一致地減少之FcγR結合。

嘗試評估藉由將延長半衰期之環(N3)引入Fc區是否可改良或恢復構築體A及E中之FcRn結合。**圖82**係代表性數據且顯示對於E構築體，BiS5Ab E及引入有N3環之構築體E (BiS5Ab E + N3)皆無法結合FcRn。另外，將LC10 scFv插入N3環(N3 scFv)中且保持ISRTP環完整亦使FcRn結合減少至可檢測量以下。該等數據指示，至少對於E構築體而非本文所揭示之每一構築體，ISRTP環及N3環(若存在)二者需要完整且未經修飾以保留FcRn結合。

實例3.3

除比較BiS4與本文所揭示之雙特異性結合構築體(BiS5)外，實施研究以評估其他三個鑑別為BiS1、BiS2及BiS3之BiS結構基序平臺(參見**圖83**)。如藉由參考**圖83**將瞭解，該等平臺之一個結合結構域(圖解說明為scFv結構域)之位置發生變化。在五個基序中，僅BiS4及BiS5包括兩個連接體部分作為至較大蛋白之附接點，其他各者(BiS1、BiS2及BiS3)藉由單一連接體附接。

簡言之，使用上文實例3.1及3.2中所論述之技術分析每一構築體之代表性分子之穩定性。將每一構築體之試樣添加至pH為5.0、5.5、6.0、6.5、7.0及7.5之緩衝液中且在40℃下儲存兩個月之時段以上。然後使用HP-SEC分析試樣之片段化速率(**圖84**)、聚集速率(**圖85**)及單體損失速率(**圖86**)。在該等條件下，分析指示本文所揭示之雙特異性結合蛋白格式(「BiS5」；且如上表13中所表示呈D/H格式)在所有pH條件下相對於所有其他格式具有優異的物理及化學穩定性。

SEC數據亦用於使各個峰映射至BiS分子之相應片段(**圖87**)。映射係基於包括以下各項之假設：在分子之鉸鏈及連接體區中發生片段化、片段

之大小、理論片段化及預期片段種類與在其他格式中所觀察到之片段種類之比對方式。儘管在每一格式中之較低分子量片段(LMWF)之間存在良好拆分，但在所有格式中之單體與較高分子量片段(HMWF)之間亦存在較差或無拆分。基於表17中之資訊推斷出，HP-SEC技術低估了BiS格式中大於單株抗體之片段化程度。如下文所論述研發候補分析。

表17：片段化分析 - SEC低估了BiS格式之片段化速率.

種類	Mol. Wt. (kDa)	RT* (min)	在40℃下每個月之片段化% (2個月)				
			BiS1	BiS2	BiS3	BiS4	BiS5
BiSAb單體	*200*	*7.9*	*3.4*	*3.4*	*0.8*	*6.2*	*0.5*
2Fab + 1scFv + Fc[2]	175	7.9	x (k_2)	x (k_2)	x (k_2)		
1Fab + 2scFv + Fc[2]	150	7.9			x (k_1)	x (k_2')	x (k_1)
1Fab + 1scFv + Fc[3]	125	8.7	1.7 (k_1)	0.8 (k_1)	-	3.4 (k_1')	-
1Fab + 1scFv	75	9.7	0.9 (k_1)	1.0 (k_1)	-	1.5 (k_1')	-
1Fab	50	10.6	-	-	0.4 (k_1)	1.2 (k_2')	0.5(k_1)
1scFv	25	11.0	0.8 (k_2)	0.6 (k_2)	0.4 (k_2)	-	-

*滯留時間

[1]單體損失包括僅因片段化所致之損失且不包括聚集。

[2]速率可因HMWF與單體共溶析而被低估。

[3]肩峰之速率可因下拉積分(drop down integration)而變化。

研發出替代性分析以使用莫耳消光係數基於以下假設計算HMWF之片段化速率：(i)在降解期間，若檢測到小片段則亦應存在相應大片段；(ii)在穩定性研究之持續時間期間不會顯著發生二級片段化(片段之片段)；及(iii)片段化發生在連接體區及/或鉸鏈區中。基於以下關係確定片段化速率：

單體 = LMWF + HMWF

k_t k_{LMWF} k_{HMWF}

mEC_m mEC_{LMWF} mEC_{HMWF}

$$k_{HMWF} = \frac{k_{LMWF}}{mEC_{LMWF}} \times mEC_{HMWF}$$

表18：推知的片段化分析.

種類	Mol. Wt. (kDa)	RT (min)	在40℃下每個月之片段化% (2個月)				
			BiS1	BiS2	BiS3	BiS4	BiS5
BiSAb單體[1]	*200*	*7.9*	*3.4*	*3.4*	*0.8*	*6.2*	*0.5*
2Fab + 1scFv + Fc[2]	175	7.9	3.6 (k_2)	2.7 (k_2)	1.9 (k_2)		
1Fab + 2scFv + Fc[2]	150	7.9			1.6 (k_1)	4.7 (k_2')	1.8 (k_1)
1Fab + 1scFv + Fc[3]	125	8.7	1.4 (k_1)	1.6 (k_1)	-	2.5 (k_1')	-
1Fab + 1scFv	75	9.7	0.9 (k_1)	1.0 (k_1)	-	1.5 (k_1')	-
1Fab	50	10.6	-	-	0.4 (k_1)	1.2 (k_2')	0.5(k_1)
1scFv	25	11.0	0.8 (k_2)	0.6 (k_2)	0.4 (k_2)	-	-
總k_1 (鉸鏈)			2.3	2.6	2.0	4.0	2.3
總k_2 (G_4S連接體)			4.4	3.3	2.3	5.9	-
總($k = k_1 + k_2$)			**6.7**	**5.9**	**4.3**	**9.9**	**2.3**

[1]單體損失包括僅因片段化所致之損失且不包括聚集。

[2]速率可因HMWF與單體共溶析而被低估。

[3]肩峰之速率可因不完全拆分之峰之積分而變化。

另外，在還原條件下使用構築體實施片段化速率之分析以鑑別形成二硫鍵是否對片段化及穩定性具有效應。此分析之代表性數據呈現於(**圖86**)中。在還原條件下，對所有BiS格式可觀察到較高片段化速率，但BiS1除外(表19)。推斷出在還原條件下之較高片段化速率確認BiS5構築體中之scFv部分系鏈至CH3區(**圖89**)。

表19：片段化分析 - 還原條件.

種類	Mol. Wt. (kDa)	RT (min)	在40℃下每個月之片段化% (2個月) (SEC/還原性GXII)				
			BiS1	BiS2	BiS3	BiS4	BiS5
BiSAb單體[1]	*200*	*7.9*	*3.4/**2.3***	*3.4/**3.9***	*0.8/**3.3***	*6.2/**8.8***	*0.5/**6.1***
2Fab + 1scFv + Fc[2]	175	7.9	x (k_2)	x (k_2)	x (k_2)		
1Fab + 2scFv + Fc[2]	150	7.9			x (k_1)	x (k_2')	x (k_1)
1Fab + 1scFv + Fc[3]	125	8.7	1.7 (k_1)	0.8 (k_1)	-	3.4 (k_1')	-
1Fab + 1scFv	75	9.7	0.9 (k_1)	1.0 (k_1)	-	1.5 (k_1')	-
1Fab	50	10.6	-	-	0.4 (k_1)	1.2 (k_2')	0.5(k_1)
1scFv	25	11.0	0.8 (k_2)	0.6 (k_2)	0.4 (k_2)	-	-

表20：片段化分析之綜述.

分析方法	在40℃下每個月之片段化% (2個月)				
	BiS1	BiS2	BiS3	BiS4	BiS5
標準HPSEC	3.4	3.4	0.8	6.4	0.5
標準HPSEC之替代性分析	6.7	5.9	4.3	9.9	2.3
非還原性GXII	3.0	2.7	2.0	6.4	1.2
還原性GXII	2.3	3.9	3.3	8.8	6.1
G_4S連接體/分子之總數	4	4	4	6	6

進一步研究上文所揭示之穩定二硫鍵之特徵。結果顯示於下表23及24中。產生在scFv中含及不含穩定二硫鍵之呈BiS4及BiS5 (scFv插入SN-G環中)格式之對應於兩種不同特異性之雙特異性抗體。加速的穩定性研究指示，不含穩定二硫鍵之BiS4構築體具有因降解所致之實質性單體損失，此係藉由引入穩定VL-VH二硫鍵來防止。該等結果指示，移除BiS5構築體中scFv中之穩定二硫鍵對其穩定性不具顯著效應。

表21

抗EGFR IgG / 抗 Her2 scFv	T_M1 (℃)	單體% 第0天	單體% 第14天	聚集% 第0天	聚集% 第14天	降解% 第0天	降解% 第14天
含DSB之BiS5	71.17	100	100	0.0	0.0	0.0	0.0
不含DSB之BiS5	69.83	95.1	97.0	4.9	3.0	0.0	0.0
含DSB之BiS4	72.28	100	98.4	0.0	0.0	0.0	1.6
不含DSB之BiS4	69.34	95.7	86.7	4.3	2.3	0.0	11.1

表22

D-LC10 IgG/2F4 scFv		單體% 第0天	單體% 第14天	聚集% 第0天	聚集% 第14天	降解% 第0天	降解% 第14天
含DSB之BiS5	58.82	92.2	89.6	7.2	9.7	0.5	0.7
不含DSB之BiS5	54.22	92.4	86.1	4.4	10.1	3.0	3.9
含DSB之BiS4	66.74	99.0	98.2	1.0	0.0	0.0	1.9
不含DSB之BiS4	56.10	97.7	83.9	2.0	7.7	0.3	8.5

基於所有上述數據，本文所揭示之雙特異性結合蛋白格式似乎係所測試之所有格式中之最穩定者。另外，根據最小化片段化及聚集二者，BiSAb5在所測試之較低pH值(例如，5.0、5.5及6.0)下似乎最穩定。因此，本文所揭示BisAb之意外且令人驚奇的穩定性特徵提供相對於用於改造雙特異性結合分子之其他結構平臺及格式之另一優點。

參考文獻之納入

本文所提及之所有出版物及專利之全文皆以引用方式併入本文中，

如同將每一個別出版物或專利特定且個別地指示以引用方式併入本文中一般。

儘管已論述本發明之特定態樣，但上文說明書係說明性而非限制性。熟習此項技術者將在審閱本說明書及下文申請專利範圍後明瞭本發明之多種變化形式。本發明之完整範疇應參考申請專利範圍連同其等效內容之完整範疇及說明書連同該等變化形式來確定。

【序列表】

<110> 美商麥迪紐有限責任公司 (MEDIMMUNE, LLC)

<120> 雙特異性結合蛋白及其用途

<130> IOBS-100

<150> 62/332,788
<151> 2016-05-06

<160> 97

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 711
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
115 120 125

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
145 150 155 160

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala
165 170 175

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
180 185 190

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
210 215 220

Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
225 230 235 240

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
275 280 285

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
290 295 300

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile
305 310 315 320

Tyr Ser Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
325 330 335

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
340 345 350

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu
355 360 365

Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
385 390 395 400

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
405 410 415

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
420 425 430

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

435 440 445

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
450 455 460

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
465 470 475 480

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
485 490 495

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
500 505 510

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
515 520 525

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
530 535 540

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
545 550 555 560

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
565 570 575

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
580 585 590

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
595 600 605

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
610 615 620

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
625 630 635 640

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
645 650 655

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
660 665 670

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
675 680 685

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
690 695 700

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
705 710

<210> 2
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
20 25 30

Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
85 90 95

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 3
<211> 711
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
450 455 460

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
465 470 475 480

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln

485 490 495

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser
500 505 510

Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
515 520 525

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
530 535 540

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly
545 550 555 560

Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
565 570 575

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
580 585 590

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
595 600 605

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg
610 615 620

Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp
625 630 635 640

Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
645 650 655

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
660 665 670

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly
675 680 685

Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
690 695 700

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
705 710

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

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gln Pro Lys Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Cys Ser Glu Glu Leu Gln Ala
115 120 125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
130 135 140

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
165 170 175

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr
180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
195 200 205

Pro Thr Glu Val Ser
210

<210> 5
<211> 721
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
385 390 395 400

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
405 410 415

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr
420 425 430

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser
435 440 445

Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
450 455 460

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
465 470 475 480

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Cys
485 490 495

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
500 505 510

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val
515 520 525

Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser

530 535 540

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val
545 550 555 560

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr
565 570 575

Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
580 585 590

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
595 600 605

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg
610 615 620

Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
625 630 635 640

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
645 650 655

Gly Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
660 665 670

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
675 680 685

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
690 695 700

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
705 710 715 720

Lys

<210> 6
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 6

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
20 25 30

Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
85 90 95

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 7
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
20 25 30

Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
85 90 95

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 8
<211> 610
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 8
cgagagagcc accctgagct gctccgcctc ctccaagcac accaacctgt actggtcccg 60

gcacatgtac tggtatcagc agaagcccgg ccaggccccc cggctgctga tctacctgac 120

ctctaaccgg gccaccggca tccctgccag attctccggc tctggctccg gcaccgactt 180

caccctgacc atctccagcc tggaacccga ggacttcgcc gtgtactact gccagcagtg 240

gtcctccaac ccettcacct tcggccaggg caccaagctg gaaatcaagc gtacggtggc 300

tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc 360

tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga 420

taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag 480

cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt 540

ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag 600

gggagagtgt 610

<210> 9
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 10
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 10
gaggtgcagc tggtggaatc cggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60
tcttgcgccg cctccggctt cacattctcc gactacggca tgcactgggt ccgacaggcc 120
cctggaaagg gcctggaatg ggtggcctac atctcctccg gctcctacac catctactcc 180
gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tccggggaca acgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac acagccgtgt actactgtgc cagacgggcc 300
cctaactcct tctacgagta ctacttcgac tactggggcc agggcaccac cgtgaccgtg 360
tcctctgcta gcaccaaagg tccgagcgtt tttccgctgg caccgagcag caaaagcacc 420
tctggtggca ccgcagcact gggttgtctg gtgaaagatt attttccgga accggttacc 480
gtttcttgga atagcggtgc actgaccagc ggtgttcata cctttccggc agttctgcag 540
agcagcggtc tgtatagcct gtctagcgtt gttaccgttc cgagcagcag cctgggcacc 600
cagacctata tttgcaatgt gaatcataaa ccgagcaata caaaagttga taaacgcgtt 660
gaaccgaaaa gctgtgacaa aactcacacg tgcccaccgt gcccagcacc tgagttcgag 720
gggggaccgt cagtcttcct cttccccccа aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 780
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccagcat cgagaaaacc 1020
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtct gcaccctgcc cccatcccgg 1080
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg agctgcgcgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctcgttagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1356

<210> 11
<211> 639
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 11
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattaac agctatttag attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag tattacagta ctccattcac tttcggccct 300

gggaccaaag tggaaatcaa aggtcagccc aaggcggccc cctcggtcac tctgttcccg 360

ccctgctctg aggagcttca agccaacaag gccacactgg tgtgtctcat aagtgacttc 420

tacccgggag ccgtgacagt ggcctggaag gcagatagca gccccgtcaa ggcgggagtg 480

gagaccacca caccctccaa acaaagcaac aacaagtacg cggccagcag ctacctgagc 540

ctgacgcctg agcagtggaa gtcccacaga agctacagct gccaggtcac gcatgaaggg 600

agcaccgtgg agaagacagt ggcccctaca gaagtgtca 639

<210> 12
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 12

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Cys Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 13
<211> 1365
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 13
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatccg 300

aggggagcta ccctttacta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctcagcgtc gaccaaaggt ccgagcgtgt ttccgctggc accgagcagc 420

aaaagcacct ctggtggcac agcagcactg ggttgtctgg tgaaagatta ttttccggaa 480

ccggttaccg tttcttggaa tagcggtgca ctgaccagcg gtgttcatac ctttccggca 540

gtcctgcaga gcagcggtct gtatagcctg tctagcgttg ttaccgttcc gagcagcagc 600

ctgggcaccc agacctatat ttgcaatgtg aatcataaac cgagcaatac caaagttgat 660

aaacgcgttg aaccgaaaag cgtggacaaa actcacacgt gcccaccgtg cccagcacct 720

gagttcgagg ggggaccgtc agtcttcctc ttccccccaa aacccaagga caccctcatg 780

atctcccgga ccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840

gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960

tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agccagcatc 1020

gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtcta caccctgccc 1080

ccatgccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc 1140

tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200

accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg 1260

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320

cacaaccact acacgcagaa gagcttaagc ctgtctccgg gtaaa 1365

<210> 14
<211> 710
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
115 120 125

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
145 150 155 160

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala
165 170 175

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

180 185 190

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
210 215 220

Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
225 230 235 240

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
275 280 285

Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
290 295 300

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
305 310 315 320

Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
325 330 335

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
340 345 350

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu
355 360 365

Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
370 375 380

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
385 390 395 400

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
405 410 415

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
420 425 430

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
435 440 445

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
450 455 460

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
465 470 475 480

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
485 490 495

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
500 505 510

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
515 520 525

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
530 535 540

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
545 550 555 560

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
565 570 575

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
580 585 590

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
595 600 605

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
610 615 620

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
625 630 635 640

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
645 650 655

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
660 665 670

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
675 680 685

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
690 695 700

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
705 710

<210> 15
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 15

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 16
<211> 710
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 16

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
450 455 460

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
465 470 475 480

Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln
485 490 495

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu
500 505 510

Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
515 520 525

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
530 535 540

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr
545 550 555 560

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
565 570 575

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
580 585 590

Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
595 600 605

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln
610 615 620

Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly
625 630 635 640

Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
645 650 655

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
660 665 670

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala
675 680 685

Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
690 695 700

Thr Val Thr Val Ser Ser
705 710

<210> 17
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 17

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 18
<211> 720
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 18

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
385 390 395 400

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
405 410 415

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln
420 425 430

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser
435 440 445

Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
450 455 460

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
465 470 475 480

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly
485 490 495

Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
500 505 510

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
515 520 525

Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
530 535 540

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg
545 550 555 560

Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp
565 570 575

Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
580 585 590

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
595 600 605

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly
610 615 620

Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
625 630 635 640

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
645 650 655

Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
660 665 670

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
675 680 685

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
690 695 700

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
705 710 715 720

<210> 19
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 19

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 20
<211> 250
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 20

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr
130 135 140

Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala
145 150 155 160

Ser Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp
165 170 175

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp
180 185 190

Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
195 200 205

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu
210 215 220

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His Trp Leu
225 230 235 240

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
245 250

<210> 21
<211> 709
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 21

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
450 455 460

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
465 470 475 480

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val
485 490 495

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
500 505 510

Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
515 520 525

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
530 535 540

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr
545 550 555 560

Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu

565 570 575

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
580 585 590

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro
595 600 605

Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly
610 615 620

Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
625 630 635 640

Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser
645 650 655

Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
660 665 670

Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
675 680 685

Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His Trp Leu Phe Gly Cys Gly Thr
690 695 700

Lys Leu Thr Val Leu
705

<210> 22
<211> 719
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 22

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
385 390 395 400

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
405 410 415

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp
420 425 430

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
450 455 460

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
465 470 475 480

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser
485 490 495

Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
500 505 510

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
515 520 525

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Leu Thr Gln
530 535 540

Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Ser Ile Ser Cys
545 550 555 560

Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys
565 570 575

Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp Arg Pro
580 585 590

Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala
595 600 605

Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
610 615 620

Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His Trp Leu Phe Gly Cys Gly
625 630 635 640

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
645 650 655

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
660 665 670

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
675 680 685

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
690 695 700

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
705 710 715

<210> 23
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 23

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
20 25 30

Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
85 90 95

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 24
<211> 709
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 24

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
450 455 460

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
465 470 475 480

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val
485 490 495

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
500 505 510

Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
515 520 525

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
530 535 540

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr
545 550 555 560

Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
565 570 575

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
580 585 590

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro
595 600 605

Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly
610 615 620

Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
625 630 635 640

Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser
645 650 655

Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
660 665 670

Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
675 680 685

Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His Trp Leu Phe Gly Cys Gly Thr
690 695 700

Lys Leu Thr Val Leu
705

<210> 25
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 25

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 26
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 26

Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
20 25 30

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

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
85 90 95

Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Cys Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val

195 200 205

Ala Pro Thr Glu Val Ser
210

<210> 27
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 27

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Cys Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly
450

<210> 28

<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 28

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
20 25 30

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

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
85 90 95

Phe Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Cys Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Val Ser
210

<210> 29
<211> 642

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 29
agctacgtgc tgacgcagcc gccgtcagtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt 60

acctgtgggg gagacaacat tggaggtaaa agtgttcact ggtaccagca gaagccaggc 120

caggcccctg tgttggtcat ctattatgat agtgaccggc cctcaggcat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240

gatgaggccg attattactg tcaggtgttg gatcgtcgta gtgatcattt cctgttcggc 300

ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggcgg cgccctcggt cactctgttc 360

ccgccctgct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tggtgtgtct cataagtgac 420

ttctacccgg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga 480

gtggagacca ccacaccctc caaacaaagc aacaacaagt acgcggccag cagctacctg 540

agcctgacgc ctgagcagtg gaagtcccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 600

gggagcaccg tggagaagac agtggccccc acagaagtgt ca 642

<210> 30
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 30

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Cys Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 31
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 31
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtcc 300

tatggtacct actacggaaa ctactttgaa tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 360

tcgagtgcgt cgaccaaagg tccgagcgtg tgccccgctgg caccgagcag caaaagcacc 420

tctggtggca ccgcagcact gggttgtctg gtgaaagatt attttccgga accggttacc 480

gtttcttgga atagcggtgc actgaccagc ggtgttcata cctttccggc agtcctgcag 540

agcagcggtc tgtatagcct gtctagcgtt gttaccgttc cgagcagcag cctgggcacc 600

cagacctata tttgcaatgt gaatcataaa ccgagcaata ccaaagttga taaacgcgtt 660

gaaccgaaaa gcgtggacaa aactcacacg tgcccaccgt gcccagcacc tgagttcgag 720

gggggaccgt cagtcttcct cttccccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 780

acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccagcat cgagaaaacc 1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtct acaccctgcc cccatgcccgg 1080

gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320

tacacgcaga agagcttaag cctgtctccg ggtaaa 1356

<210> 32
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 32

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 33
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 33

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 34
<211> 707
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 34

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
165 170 175

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
180 185 190

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
260 265 270

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
275 280 285

Ser Ser Gly Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu
290 295 300

Glu Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro
305 310 315 320

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
325 330 335

Tyr Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp
355 360 365

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
370 375 380

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
385 390 395 400

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
405 410 415

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
420 425 430

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
435 440 445

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn

450 455 460

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
465 470 475 480

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
485 490 495

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
500 505 510

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
515 520 525

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
530 535 540

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
545 550 555 560

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
565 570 575

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
580 585 590

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
595 600 605

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
610 615 620

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
625 630 635 640

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
645 650 655

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
660 665 670

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
675 680 685

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
690 695 700

Leu Gly Lys
705

<210> 35
<211> 707
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 35

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln
450 455 460

Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
465 470 475 480

Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
485 490 495

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser
500 505 510

Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
515 520 525

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val
530 535 540

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly
545 550 555 560

Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
565 570 575

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
580 585 590

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
595 600 605

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg
610 615 620

Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp
625 630 635 640

Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
645 650 655

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
660 665 670

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Trp
675 680 685

Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
690 695 700

Val Ser Ser
705

<210> 36
<211> 707
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln
450 455 460

Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
465 470 475 480

Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
485 490 495

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser
500 505 510

Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
515 520 525

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val
530 535 540

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly
545 550 555 560

Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
565 570 575

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
580 585 590

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
595 600 605

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg
610 615 620

Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp
625 630 635 640

Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
645 650 655

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
660 665 670

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Trp
675 680 685

Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
690 695 700

Val Ser Ser
705

<210> 37
<211> 718
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 37

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Arg Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
385 390 395 400

Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu
405 410 415

Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu
420 425 430

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
435 440 445

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
450 455 460

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu
465 470 475 480

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Asn Trp Pro Leu Leu
485 490 495

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
500 505 510

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
515 520 525

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
530 535 540

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Tyr Met
545 550 555 560

Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser
565 570 575

Ser Ile Trp Pro Ser Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
580 585 590

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
595 600 605

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
610 615 620

Arg Val Arg Arg Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
625 630 635 640

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
645 650 655

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
660 665 670

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
675 680 685

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
690 695 700

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 38
<211> 716
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 38

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

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

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

Ser Ser Ile Trp Pro Ser Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Arg Arg Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
385 390 395 400

Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
405 410 415

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln
420 425 430

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser
435 440 445

Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
450 455 460

Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr
465 470 475 480

Tyr Tyr Cys Lys Gln Tyr Ala Asp Tyr Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr
485 490 495

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
500 505 510

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
515 520 525

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
530 535 540

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Asp Met His Trp Val Arg Gln
545 550 555 560

Ala Thr Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Gly Thr Ala Gly
565 570 575

Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
580 585 590

Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
595 600 605

Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Ser Pro Thr
610 615 620

Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

625 630 635 640

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gln Pro
645 650 655

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
660 665 670

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
675 680 685

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
690 695 700

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 39

Ile Ser Arg Thr Pro
1 5

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 40

Ala Lys Gly Gln Pro
1 5

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 41

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

<210> 42
<211> 15

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 42

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

<210> 43
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 43

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

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 44
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 44

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 45

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
1 5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 46

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Lys Thr
1 5

<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 47

Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 48

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 49
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 49

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
20 25 30

Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
85 90 95

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 50
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 50

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr

210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 51
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 51

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 52

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 53
<211> 167
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4 HC

<400> 53

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

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
20 25 30

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
35 40 45

Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
50 55 60

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
65 70 75 80

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu
85 90 95

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165

<210> 54
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 54

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 55
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 55

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 56
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 56

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

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

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

Gly Asp Ile Asp Pro Asn Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Ala Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 57
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 57

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

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

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 58
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 58

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

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

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 59
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 59

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 60

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

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

<210> 61
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 61

Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
20 25 30

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

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
85 90 95

Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 62
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 62

Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
20 25 30

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

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
85 90 95

Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 63
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 63

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp

100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 64
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 64

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65

<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 65

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
20 25 30

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

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
85 90 95

Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 66
<211> 108

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 66

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
20 25 30

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

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
85 90 95

Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 67
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 67

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 68
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 68

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 69
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 69

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 70

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 71
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 71

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 72
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 72

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 73
<211> 288
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly

210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 74
<211> 176
<212> PRT
<213> 智人

<400> 74

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
20 25 30

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
35 40 45

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

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
65 70 75 80

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
85 90 95

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
100 105 110

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val
115 120 125

Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
130 135 140

Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile
145 150 155 160

Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr

165 170 175

<210> 75
<211> 223
<212> PRT
<213> 智人

<400> 75

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
50 55 60

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
210 215 220

<210> 76

<211> 301
<212> PRT
<213> 智人

<400> 76

```
Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1               5                  10                  15

Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
            20                  25                  30

Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
        35                  40                  45

Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
    50                  55                  60

Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser
65                  70                  75                  80

Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr
                85                  90                  95

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

Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val
        115                 120                 125

Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala
145                 150                 155                 160

Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu
            180                 185                 190

Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly
        195                 200                 205

Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe
    210                 215                 220

Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile
225                 230                 235                 240

Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu
```

245 250 255

Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr
260 265 270

Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln
275 280 285

Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
290 295 300

<210> 77
<211> 278
<212> PRT
<213> 智人

<400> 77

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

Leu Gln Glu Ala Ser Ser Leu Ser Val Gln Gln Gly Pro Asn Leu Leu
20 25 30

Gln Val Arg Gln Gly Ser Gln Ala Thr Leu Val Cys Gln Val Asp Gln
35 40 45

Ala Thr Ala Trp Glu Arg Leu Arg Val Lys Trp Thr Lys Asp Gly Ala
50 55 60

Ile Leu Cys Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Gly Ser Leu Ser Leu Gly Val
65 70 75 80

Cys Gly Pro Gln Gly Arg Leu Ser Trp Gln Ala Pro Ser His Leu Thr
85 90 95

Leu Gln Leu Asp Pro Val Ser Leu Asn His Ser Gly Ala Tyr Val Cys
100 105 110

Trp Ala Ala Val Glu Ile Pro Glu Leu Glu Glu Ala Glu Gly Asn Ile
115 120 125

Thr Arg Leu Phe Val Asp Pro Asp Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg
130 135 140

Ile Ala Ser Phe Pro Gly Phe Leu Phe Val Leu Leu Gly Val Gly Ser
145 150 155 160

Met Gly Val Ala Ala Ile Val Trp Gly Ala Trp Phe Trp Gly Arg Arg
165 170 175

Ser Cys Gln Gln Arg Asp Ser Gly Asn Ala Phe Tyr Ser Asn Val Leu

180 185 190

Tyr Arg Pro Arg Gly Ala Pro Lys Lys Ser Glu Asp Cys Ser Gly Glu
195 200 205

Gly Lys Asp Gln Arg Gly Gln Ser Ile Tyr Ser Thr Ser Phe Pro Gln
210 215 220

Pro Ala Pro Arg Gln Pro His Leu Ala Ser Arg Pro Cys Pro Ser Pro
225 230 235 240

Arg Pro Cys Pro Ser Pro Arg Pro Gly His Pro Val Ser Met Val Arg
245 250 255

Val Ser Pro Arg Pro Ser Pro Thr Gln Gln Pro Arg Pro Lys Gly Phe
260 265 270

Pro Lys Val Gly Glu Glu
275

<210> 78
<211> 277
<212> PRT
<213> 智人

<400> 78

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
85 90 95

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

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp

130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 79

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10

<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 80

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

Gly

<210> 81
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 81

Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr
1 5 10

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 82

Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His
1 5 10

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 83

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 84

Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
1 5

<210> 85
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 85

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 86

Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
20 25 30

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

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
85 90 95

Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 87
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 87

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys

<210> 88
<211> 214

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 88

Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
20 25 30

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

Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
85 90 95

Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 89
<211> 712
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> BiS3 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) HC

<400> 89

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
450 455 460

Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
465 470 475 480

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met
485 490 495

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Ala
500 505 510

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
515 520 525

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
530 535 540

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
545 550 555 560

Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln
565 570 575

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
580 585 590

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu
595 600 605

Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile
610 615 620

Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp Tyr Gln
625 630 635 640

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp
645 650 655

人工序列
Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
660 665 670

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp
675 680 685

Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His Phe Leu Phe Gly
690 695 700

Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
705 710

<210> 90
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BiS3 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) LC

<400> 90

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
20 25 30

Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
85 90 95

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 91
<211> 722
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BiS5 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) HC

<400> 91

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
385 390 395 400

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
405 410 415

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
420 425 430

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser
435 440 445

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
450 455 460

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
465 470 475 480

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
485 490 495

Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly
500 505 510

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
515 520 525

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val
530 535 540

Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg
545 550 555 560

Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp Tyr
565 570 575

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser
580 585 590

Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly
595 600 605

Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala
610 615 620

Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His Phe Leu Phe
625 630 635 640

Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
645 650 655

Gly Gly Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
660 665 670

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
675 680 685

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
690 695 700

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
705 710 715 720

Gly Lys

<210> 92
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BiS5 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) LC

<400> 92

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
20 25 30

Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
85 90 95

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 93
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40SLR LCv κ

<400> 93

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 94
<211> 720
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BiS5-OX40SLR HC-G1-N434A-PD-L1

<400> 94

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Ala Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Glu Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
385 390 395 400

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
405 410 415

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met
420 425 430

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Asn
435 440 445

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
450 455 460

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
465 470 475 480

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
485 490 495

Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
500 505 510

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
515 520 525

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr
530 535 540

Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
545 550 555 560

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr
565 570 575

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser
580 585 590

Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
595 600 605

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
610 615 620

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys
625 630 635 640

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
645 650 655

Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
660 665 670

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
675 680 685

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
690 695 700

Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715 720

<210> 95
<211> 707
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BiS2-PD-1- OX40 HC -4P

<400> 95

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
115 120 125

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr
130 135 140

Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly Tyr
145 150 155 160

Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Cys Leu Glu Tyr Ile Gly
165 170 175

Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser
180 185 190

Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln
195 200 205

Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
210 215 220

Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
275 280 285

Asp Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
290 295 300

Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp
305 310 315 320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
325 330 335

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp
355 360 365

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
370 375 380

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
385 390 395 400

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
405 410 415

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
420 425 430

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
435 440 445

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
450 455 460

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
465 470 475 480

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
485 490 495

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
500 505 510

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
515 520 525

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
530 535 540

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
545 550 555 560

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
565 570 575

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
580 585 590

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
595 600 605

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
610 615 620

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
625 630 635 640

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
645 650 655

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
660 665 670

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
675 680 685

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
690 695 700

Leu Gly Lys
705

<210> 96
<211> 707
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> BiS3-OX40 HC-4P-PD-1

<400> 96

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
450 455 460

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
465 470 475 480

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
485 490 495

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys
500 505 510

Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
515 520 525

Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
530 535 540

Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly
545 550 555 560

Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
565 570 575

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu
580 585 590

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys
595 600 605

Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Asn Trp Ile Arg
610 615 620

Lys His Pro Gly Lys Cys Leu Glu Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn
625 630 635 640

Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn
645 650 655

Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr
660 665 670

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr
675 680 685

Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
690 695 700

Val Ser Ser
705

<210> 97
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD1 LCv κ

<400> 97

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
20 25 30

Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
85 90 95

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種結合至PD-1及CTLA-4之雙特異性結合蛋白，其包含：包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列之第一輕鏈、包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之第二輕鏈。

【請求項2】

如請求項1之雙特異性結合蛋白，其中該雙特異性結合蛋白之Fc區係無醣基化的。

【請求項3】

如請求項1之雙特異性結合蛋白，其中該雙特異性結合蛋白之Fc區係去醣基化的。

【請求項4】

如請求項1之雙特異性結合蛋白，其中該雙特異性結合蛋白之Fc區具有減少的岩藻糖基化或係無岩藻糖基化的。

【請求項5】

一種組合物，其包含如請求項1之雙特異性結合蛋白，及醫藥上可接受之載劑。

【請求項6】

一種核酸分子，其包含編碼如請求項1之雙特異性結合蛋白之核苷酸序列。

【請求項7】

一種載體，其包含如請求項6之核酸分子。

【請求項8】

一種宿主細胞，其包含如請求項7之載體。

【請求項9】

一種如請求項1之雙特異性結合蛋白的用途，其係用於製備治療或預防癌症之藥物。

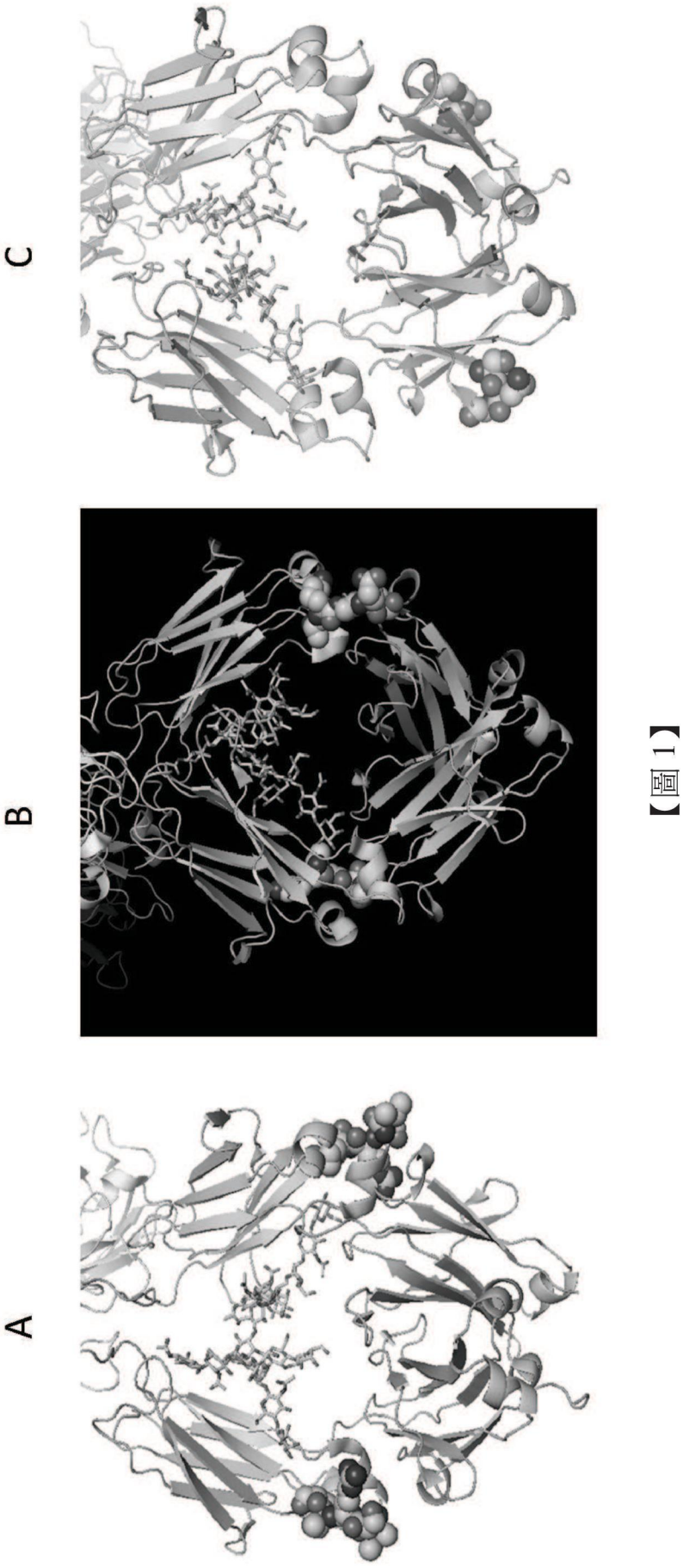
【請求項10】

如請求項9之用途，其中該癌症係以下中之一或多者：卵巢癌、乳癌、結腸直腸癌、前列腺癌、子宮頸癌、子宮癌、睪丸癌、膀胱癌、頭頸癌、黑色素瘤、胰臟癌、腎細胞癌及肺癌。

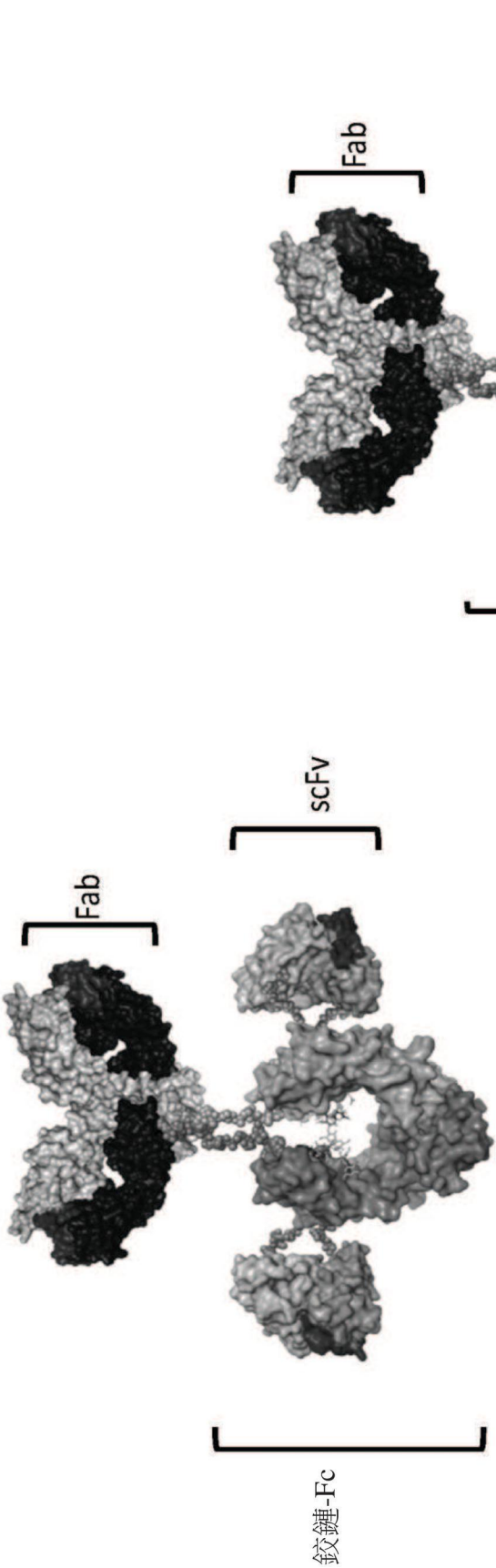
【請求項11】

一種如請求項1之雙特異性結合蛋白的用途，其係用於製備增強免疫反應之藥物。

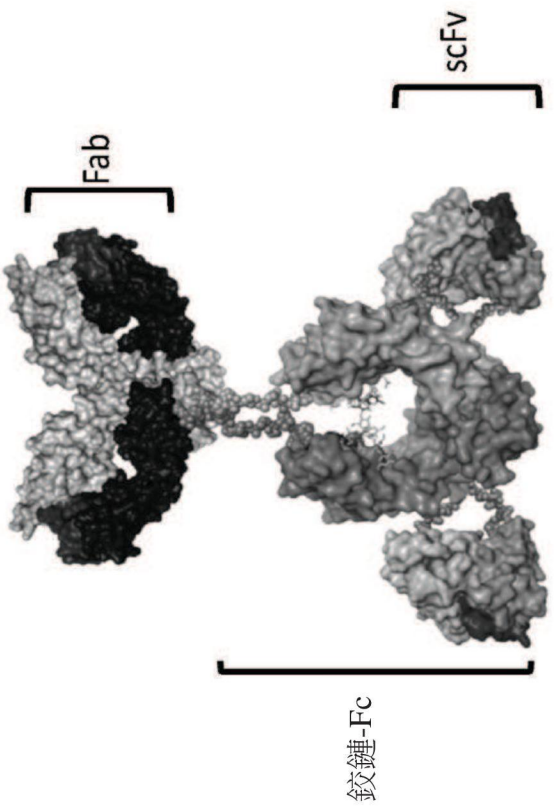
【發明圖式】



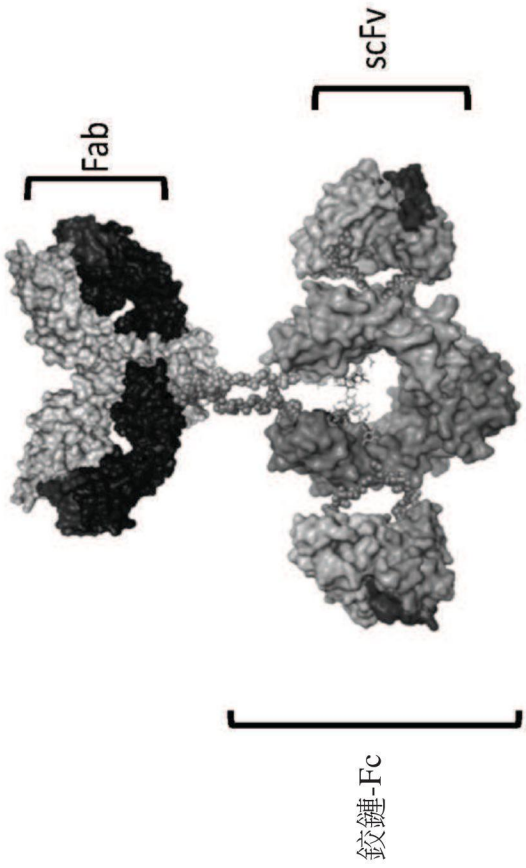
【圖 1】



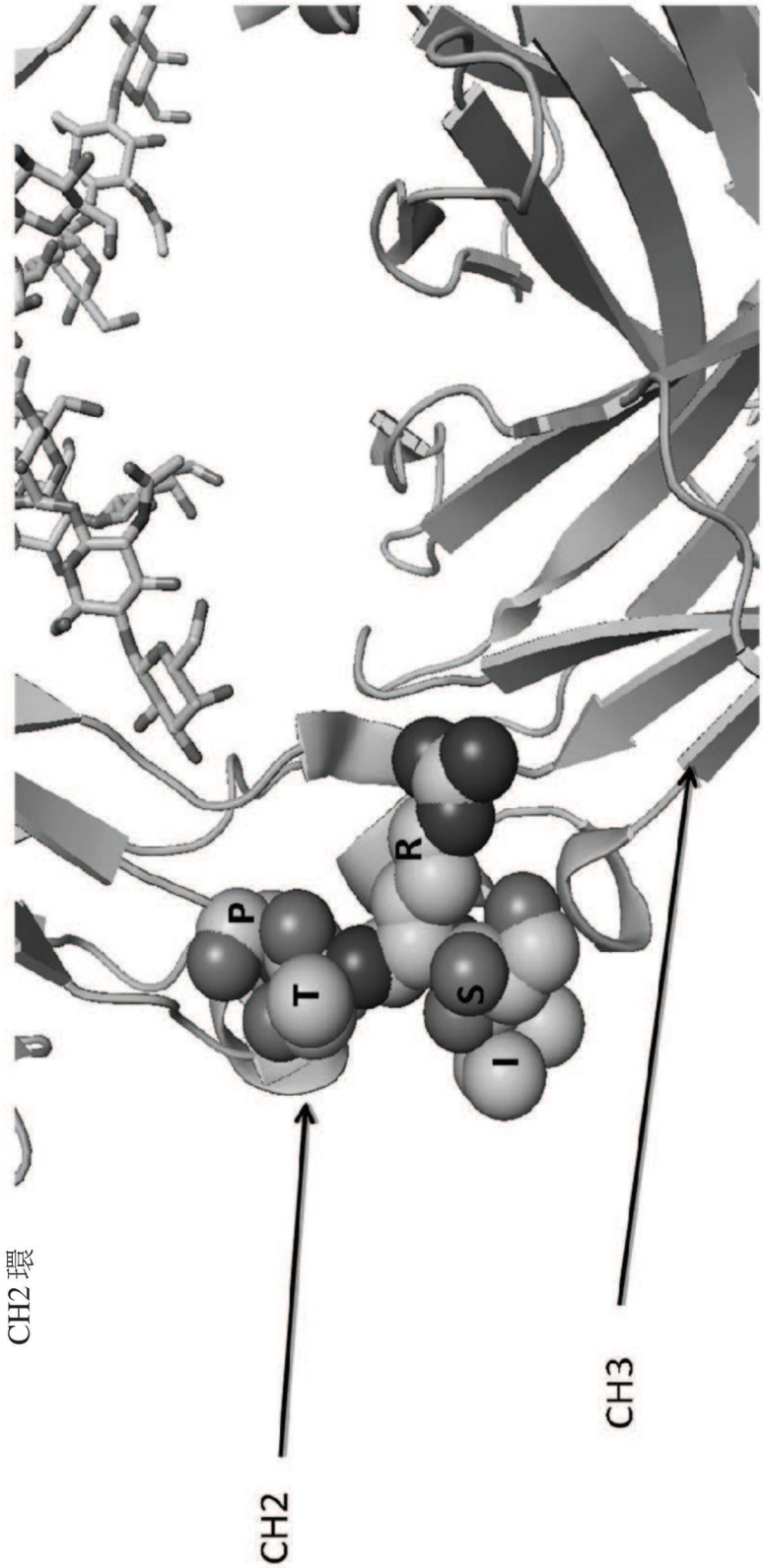
【圖 1D】



【圖 1F】

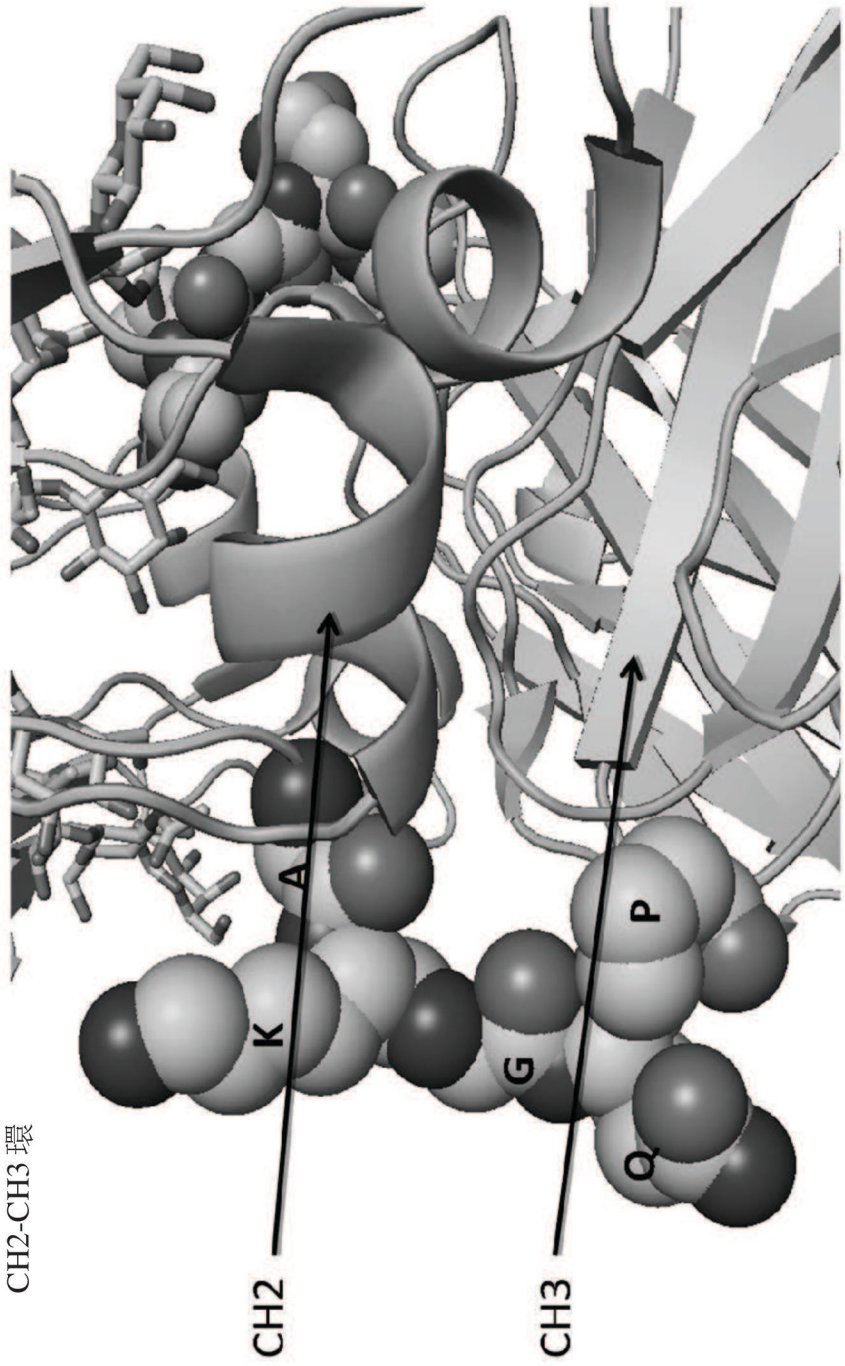


【圖 1E】



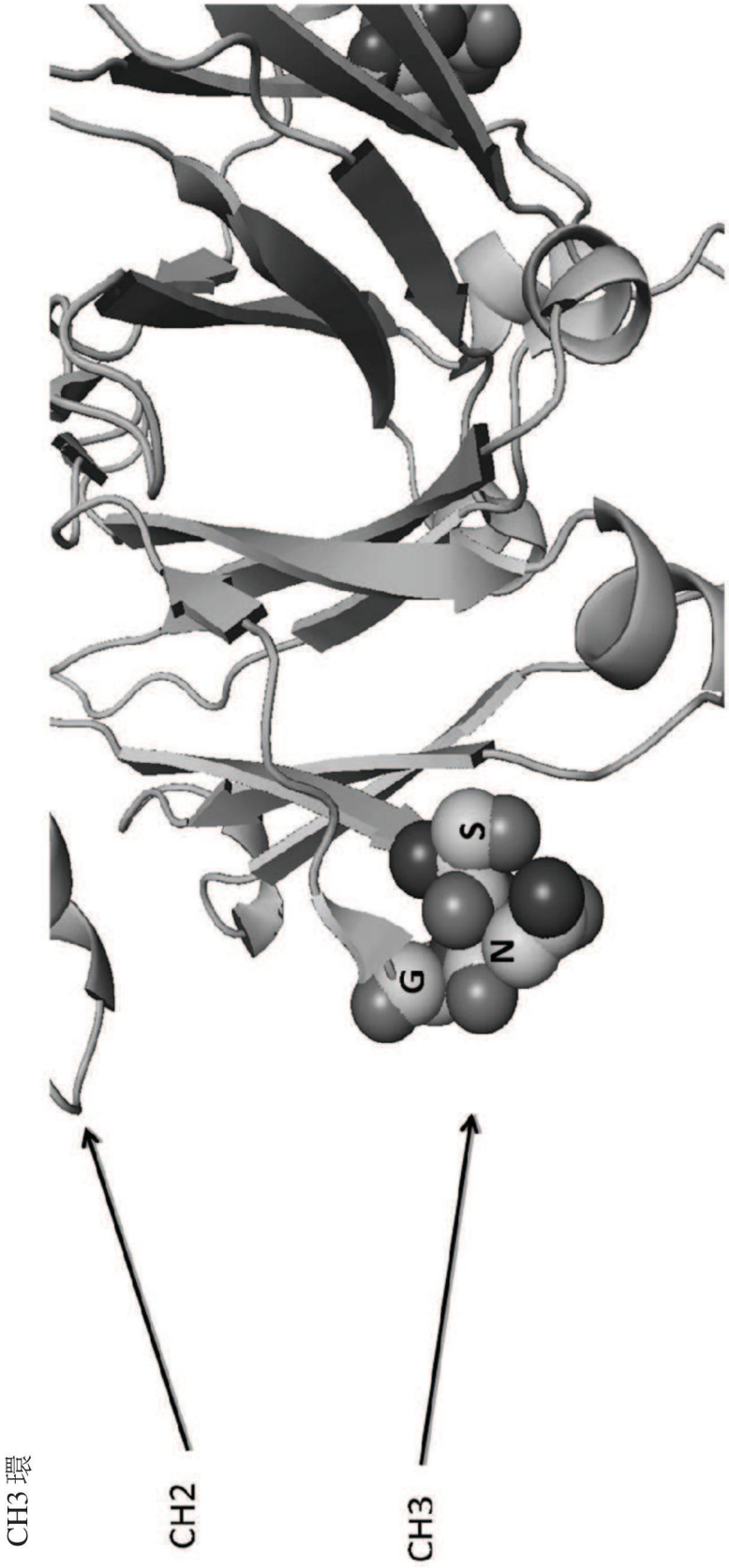
IS—scfv—RTP

【圖 2A】



AK—scfv—GQP B

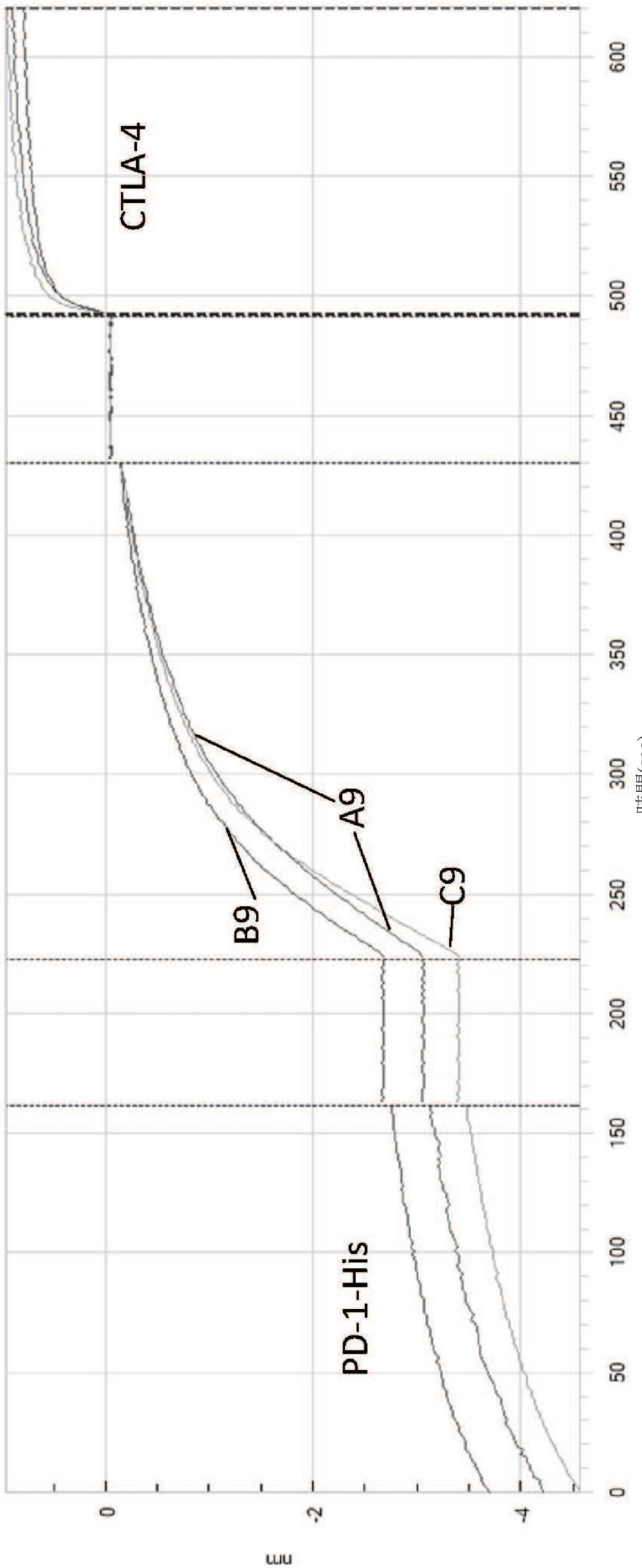
【圖 2B】



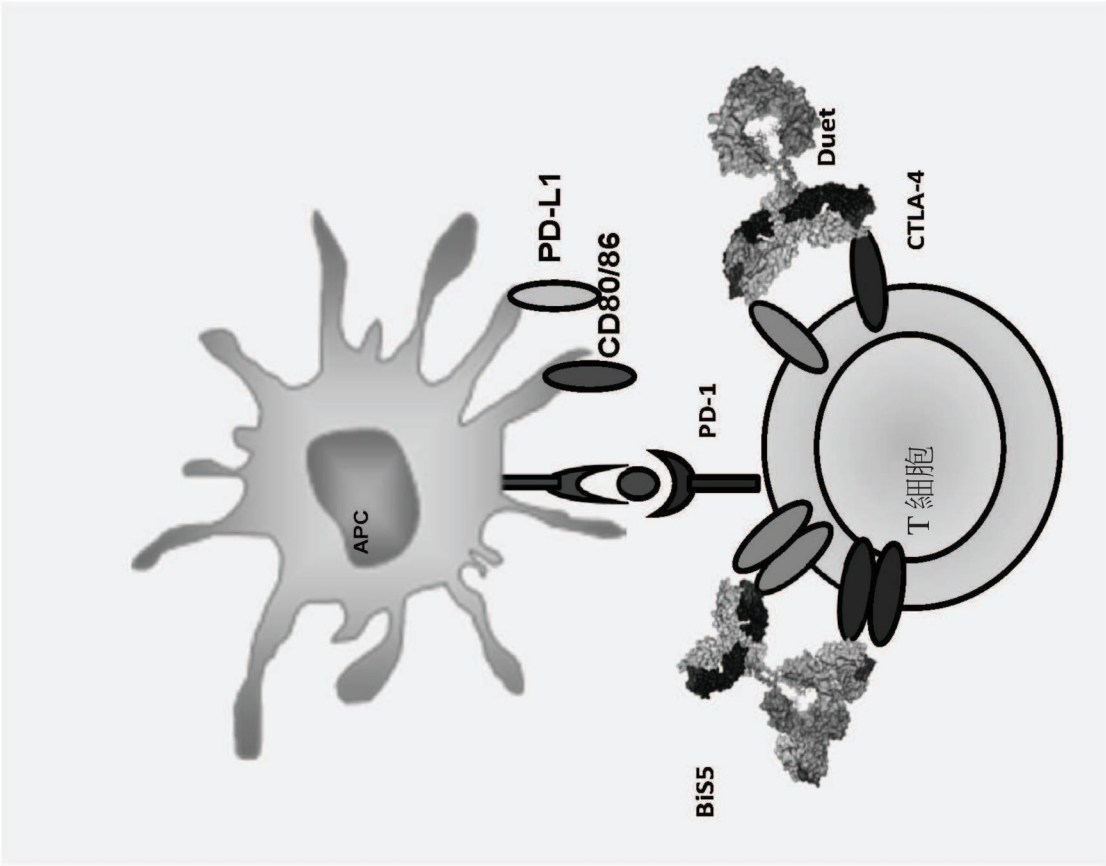
C　S—scFv—NG

D　SN—scFv—G

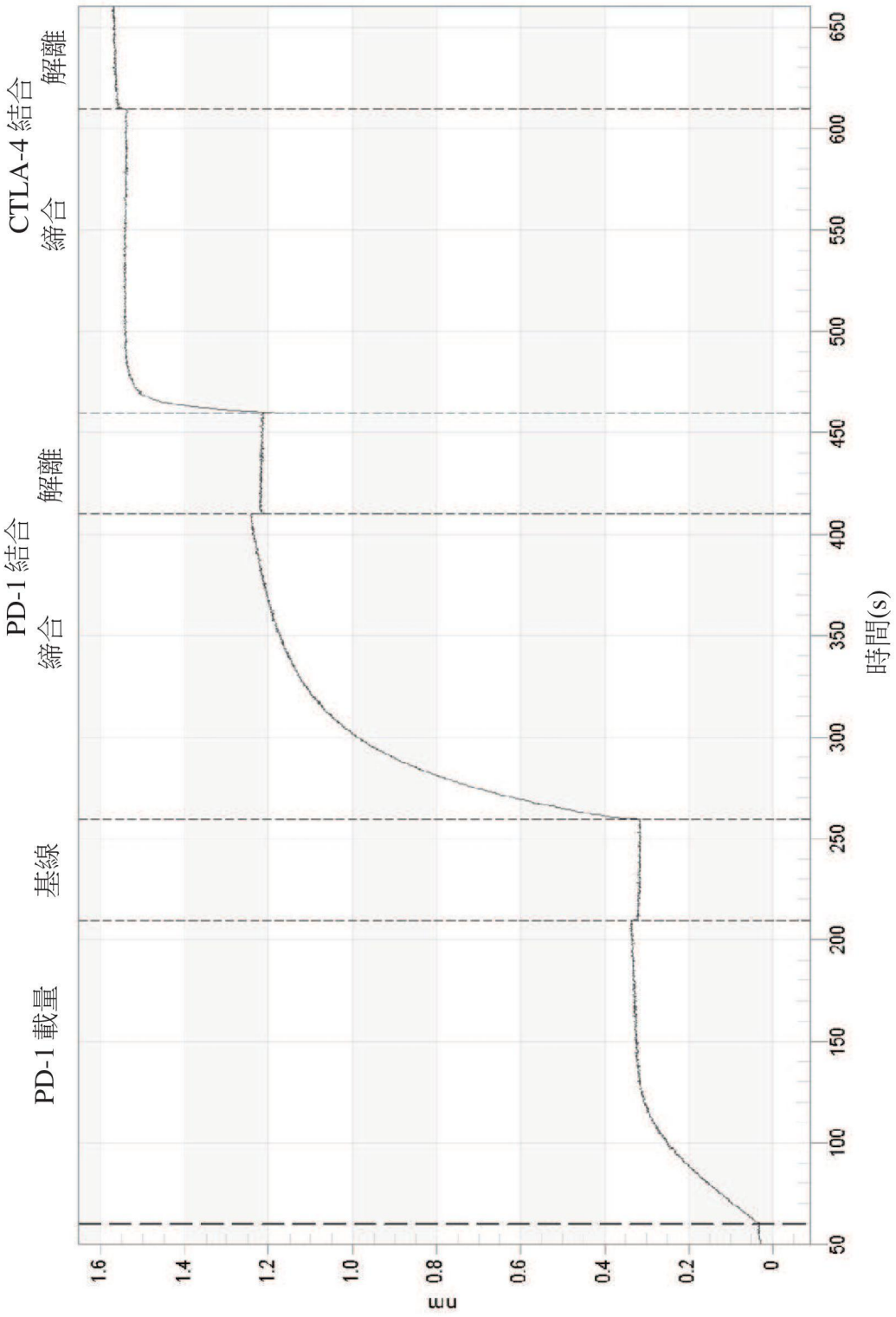
【圖 2C】


CTLA-4
PD-1-His
A9
B9
C9
nm
時間(sec)
A9 B9 C9
0
-2
-4
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600

【圖 3】

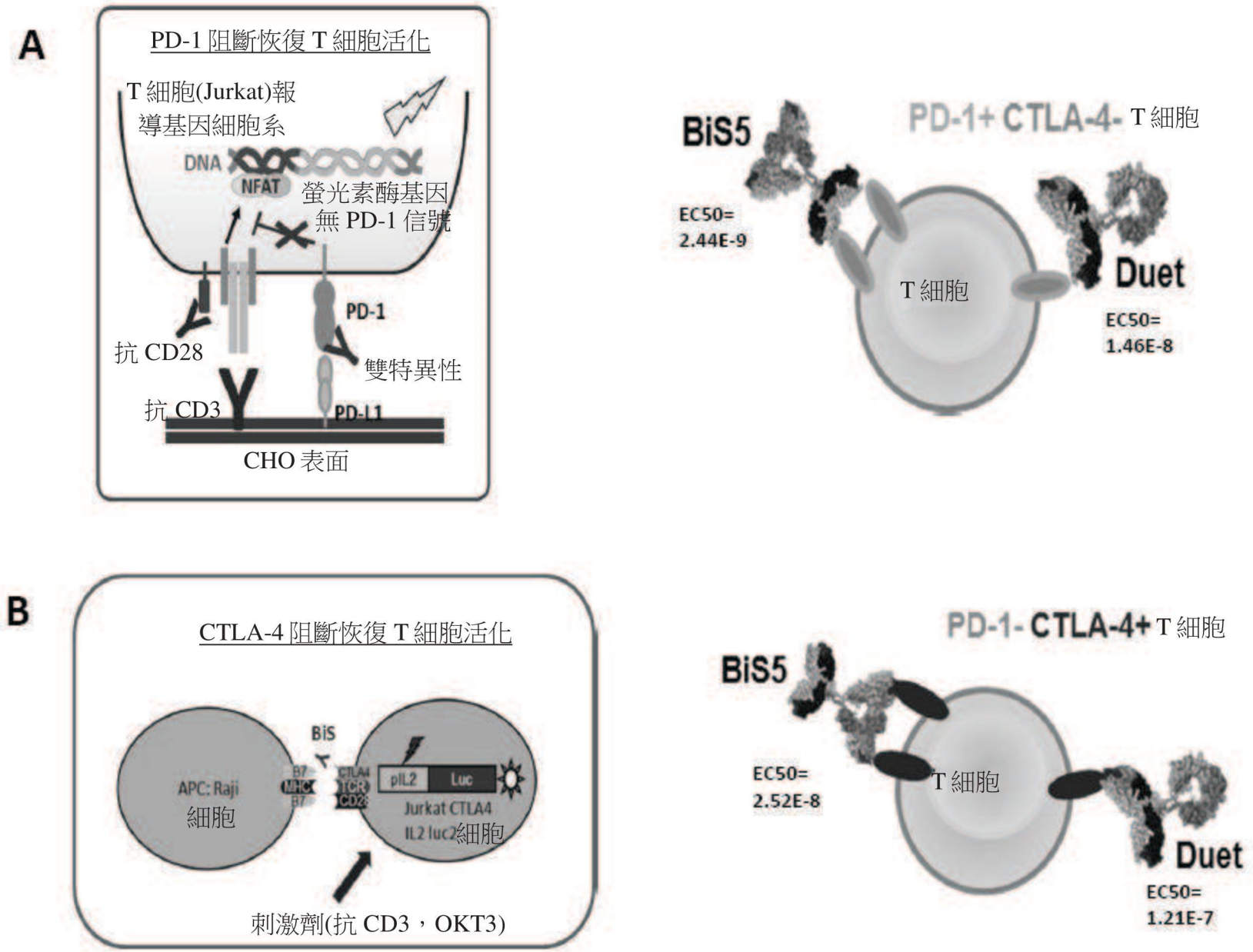


【圖 4】

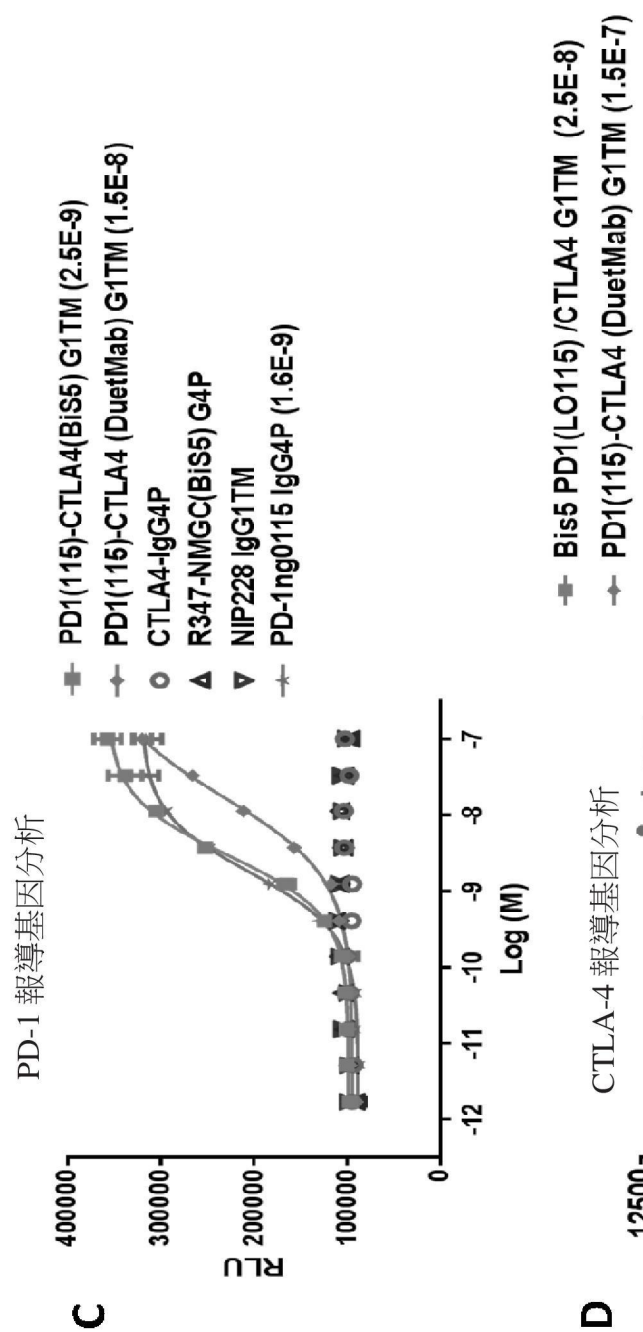

PD-1 載量
基線
PD-1 結合
締合
解離
CTLA-4 結合
締合
解離
nm
時間(s)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
650

【圖 5】

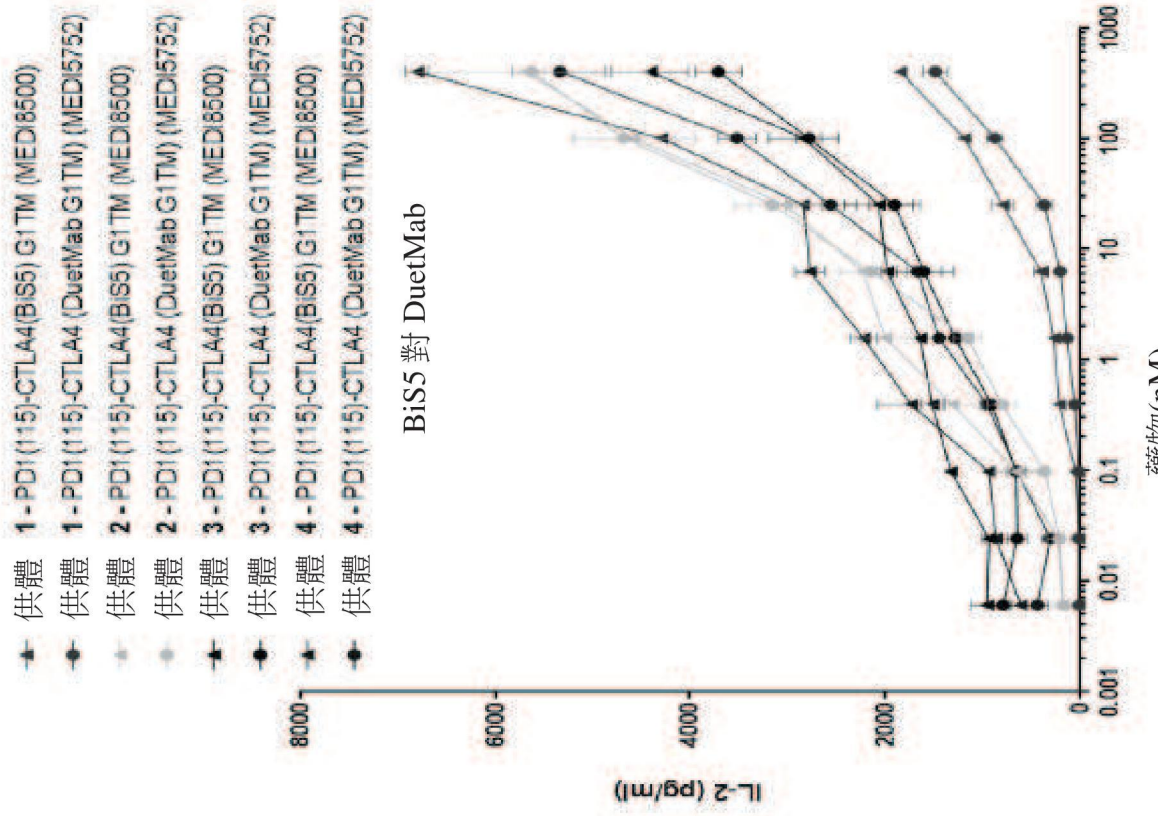
C205563DA.pdf
106115065
表單編號 A0202
第 9 頁，共 109 頁(發明圖式)
1063276267-0



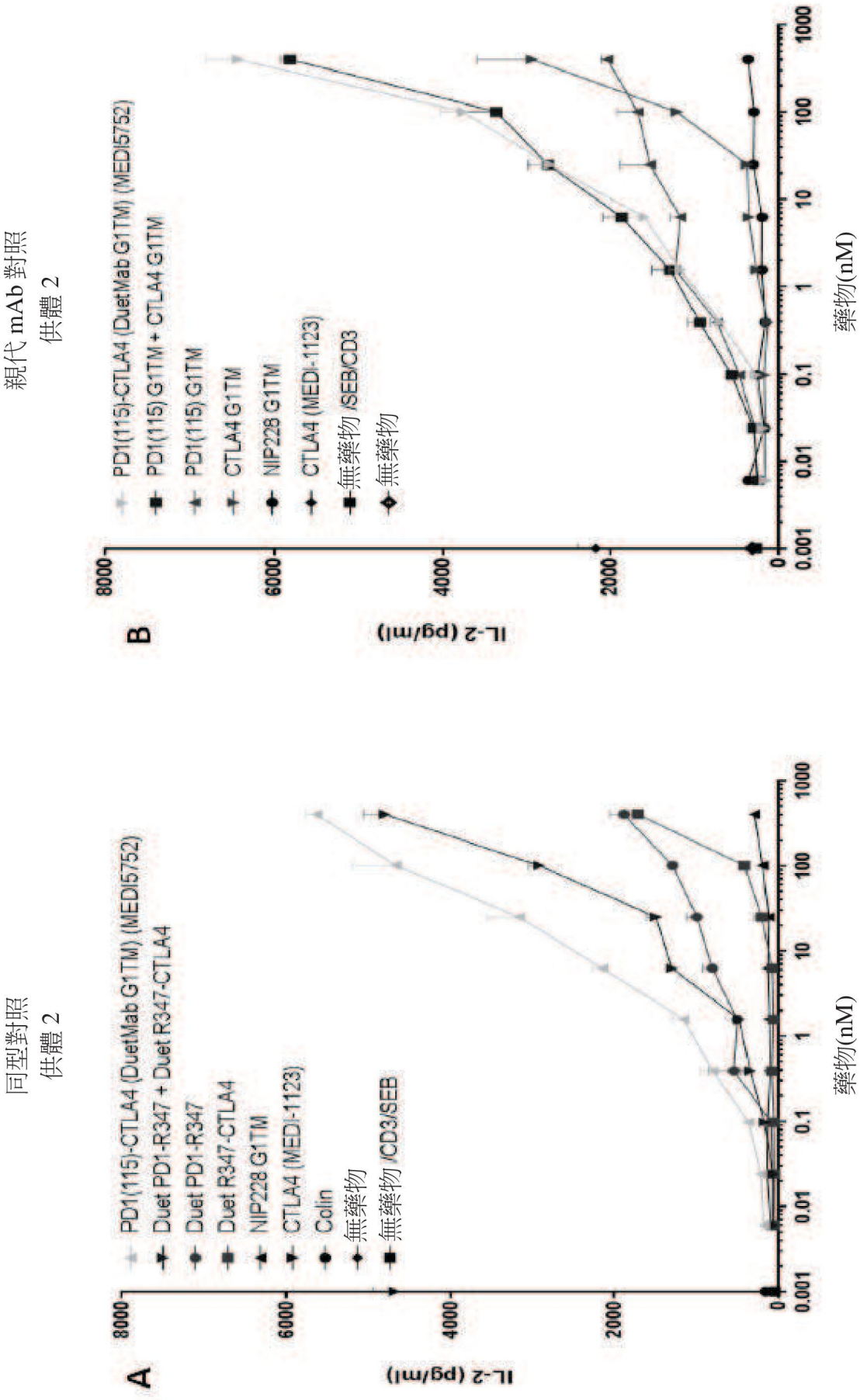
【圖 6】


C
PD-1 報導基因分析
PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (2.5E-9)
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab) G1TM (1.5E-8)
CTLA4-IgG4P
R347-NMGC(BiS5) G4P
NIP228 IgG1TM
PD-1ng0115 IgG4P (1.6E-9)
RLU
400000
300000
200000
100000
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
Log (M)
D
CTLA-4 報導基因分析
Bis5 PD1(LO115) /CTLA4 G1TM (2.5E-8)
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab) G1TM (1.5E-7)
CTLA4-IgG4P (7.5E-9)
PD1(514)-LO115-G4P
R347-NMGC(BiS5) G4P
NIP228 IgG1TM
曲美木單抗 IgG2k
分析緩衝液對照
RLU
12500
10000
7500
5000
2500
0
-10
-9
-8
-7
log (M)

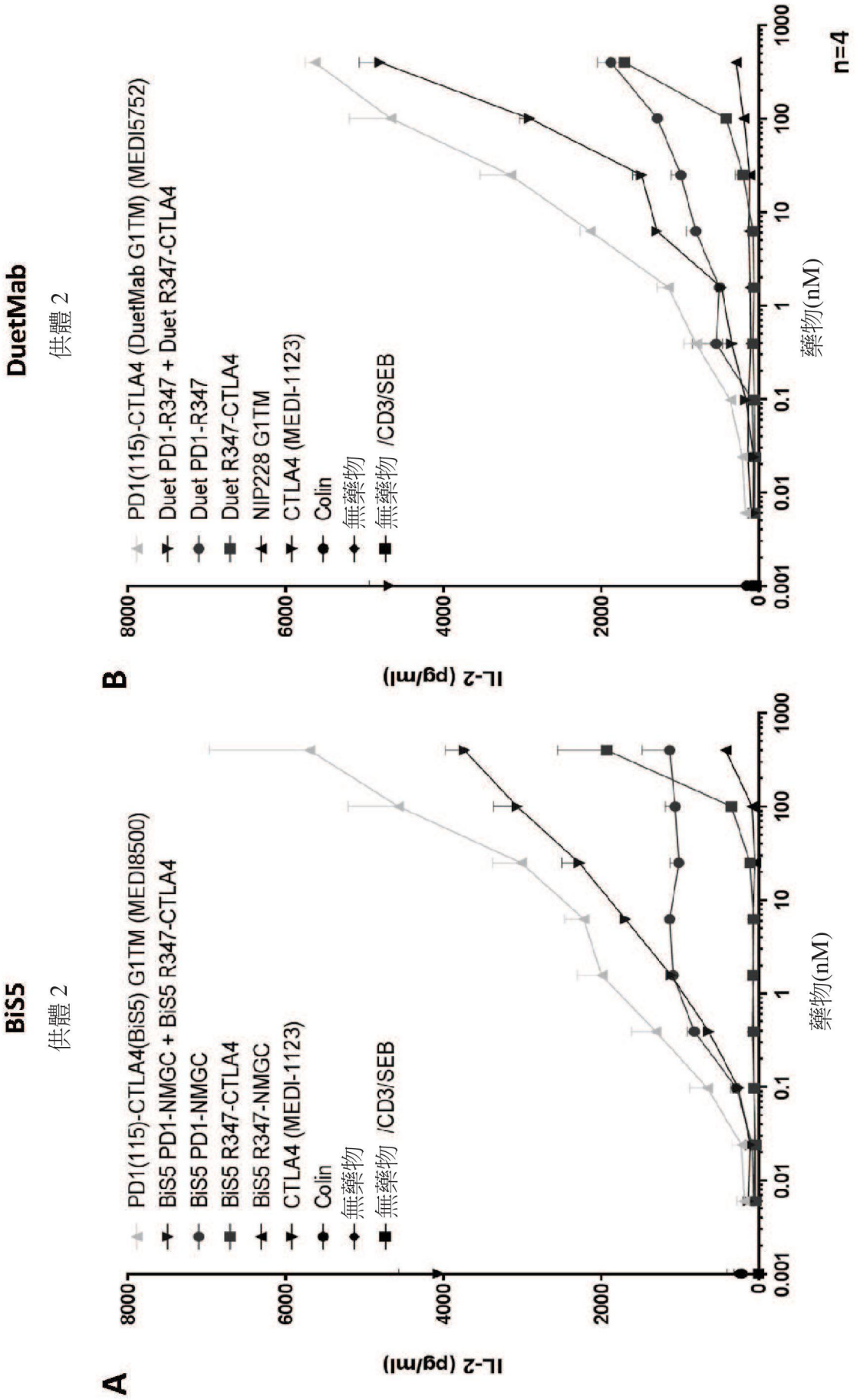
【圖 6】（續）


1 - PD1 (115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
1 - PD1 (115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
2 - PD1 (115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
2 - PD1 (115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
3 - PD1 (115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
3 - PD1 (115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
4 - PD1 (115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
4 - PD1 (115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供體
BiS5 對 DuetMab
IL-2 (pg/ml)
8000
6000
4000
2000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
藥物(nM)

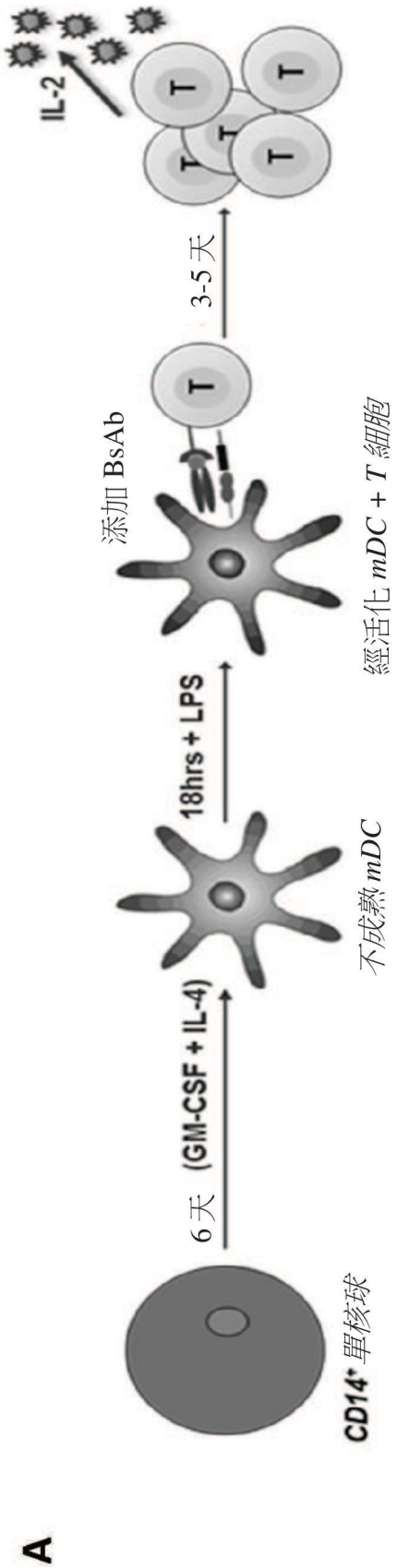
【圖 7】


同型對照
供體 2
親代 mAb 對照
供體 2
A
B
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
Duet PD1-R347 + Duet R347-CTLA4
Duet PD1-R347
Duet R347-CTLA4
NIP228 G1TM
CTLA4 (MEDI-1123)
Colin
無藥物
無藥物 /CD3/SEB
PD1(115) G1TM + CTLA4 G1TM
PD1(115) G1TM
CTLA4 G1TM
無藥物 /SEB/CD3

【圖 8】


BiS5
供體 2
DuetMab
供體 2
A
B
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
BiS5 PD1-NMGC + BiS5 R347-CTLA4
BiS5 PD1-NMGC
BiS5 R347-CTLA4
BiS5 R347-NMGC
CTLA4 (MEDI-1123)
Colin
無藥物
無藥物 /CD3/SEB
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
Duet PD1-R347 + Duet R347-CTLA4
Duet PD1-R347
Duet R347-CTLA4
NIP228 G1TM
CTLA4 (MEDI-1123)
Colin
無藥物
無藥物 /CD3/SEB
n=4

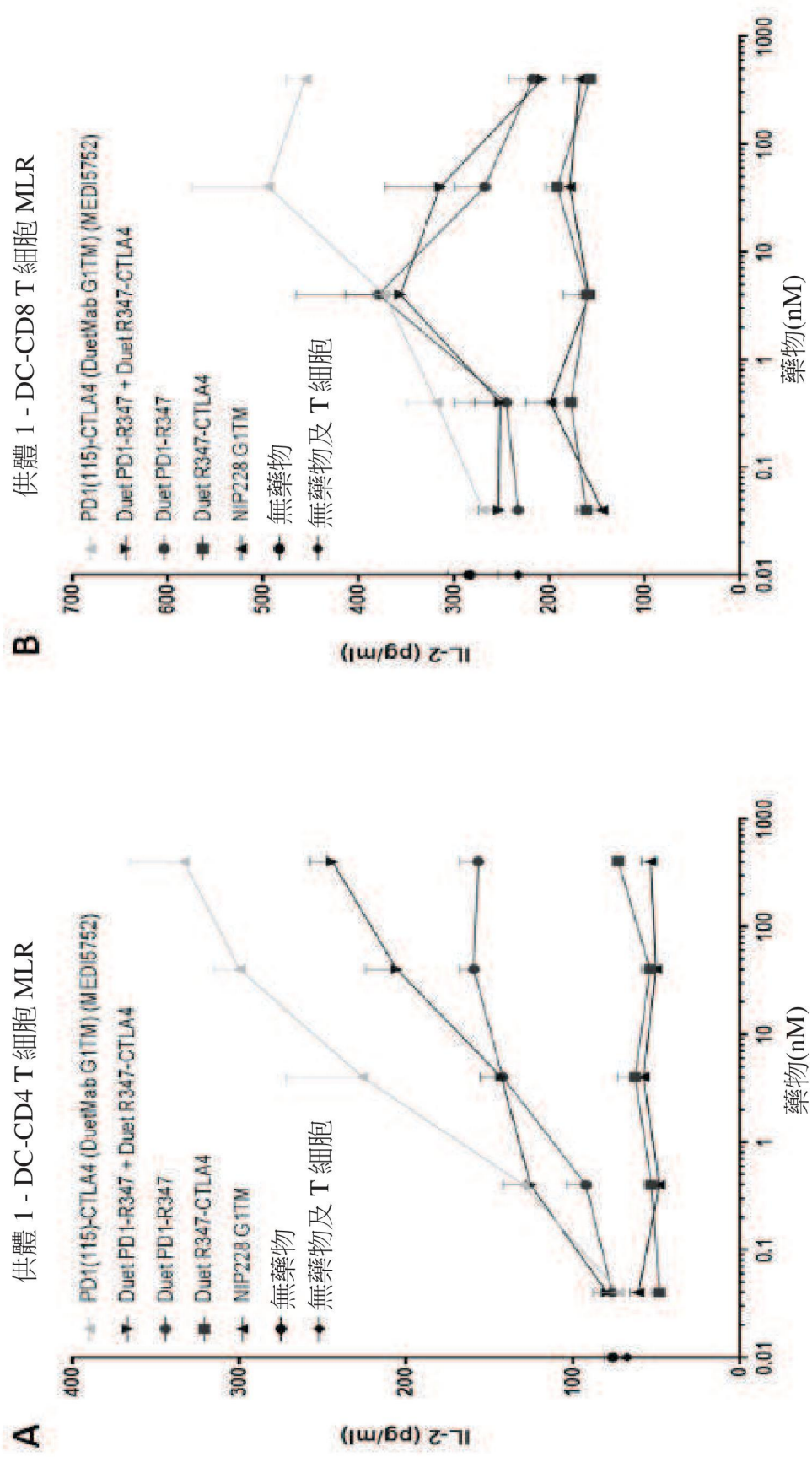
【圖 9】


A
CD14+ 單核球
6 天 (GM-CSF + IL-4)
不成熟 mDC
18hrs + LPS
添加 BsAb
經活化 mDC + T 細胞
3-5 天
IL-2
T

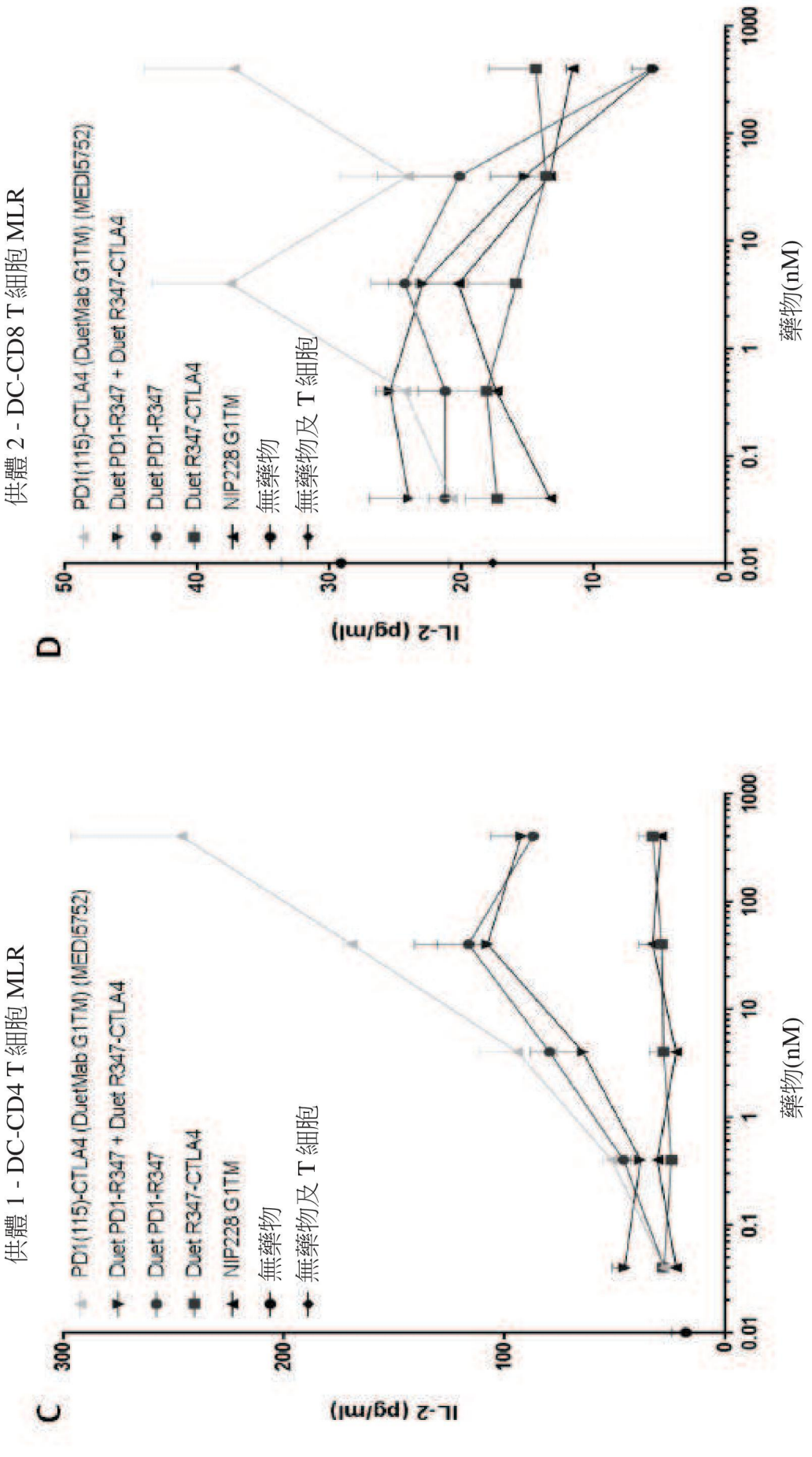
【圖 10】

B
供體 1 - PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
供體 1 - PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供體 2 - PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
供體 2 - PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供體 3 - PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
供體 3 - PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供體 4 - PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
供體 4 - PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
BiS5 對 DuetMab - DC-CD4 MLR
IL-2 (pg/ml)
0
250
500
750
1000
1250
1500
1750
0.001
0.01
0.1
1
10
100
藥物(nM)
C
供體 1 - PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
供體 1 - PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供體 2 - PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
供體 2 - PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供體 3 - PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
供體 3 - PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供體 4 - PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
供體 4 - PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
BiS5 對 DuetMab - DC-CD8 MLR
IL-2 (pg/ml)
0
100
200
300
400
0.001
0.01
0.1
1
10
100
藥物(nM)

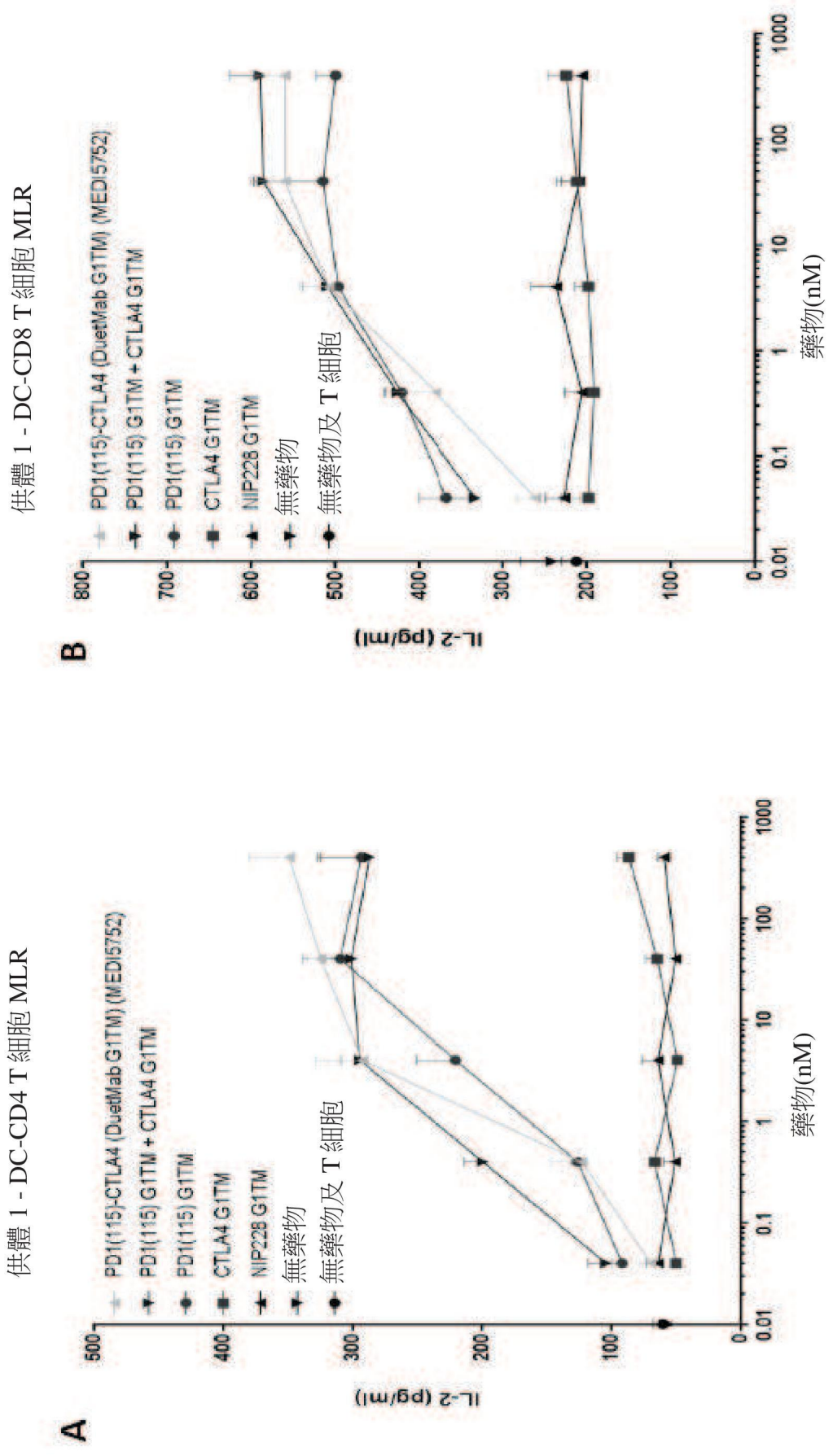
【圖 10】（續）


A
供體 1 - DC-CD4 T 細胞 MLR
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
Duet PD1-R347 + Duet R347-CTLA4
Duet PD1-R347
Duet R347-CTLA4
NIP228 G1TM
無藥物
無藥物及 T 細胞
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
B
供體 1 - DC-CD8 T 細胞 MLR
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
Duet PD1-R347 + Duet R347-CTLA4
Duet PD1-R347
Duet R347-CTLA4
NIP228 G1TM
無藥物
無藥物及 T 細胞
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)

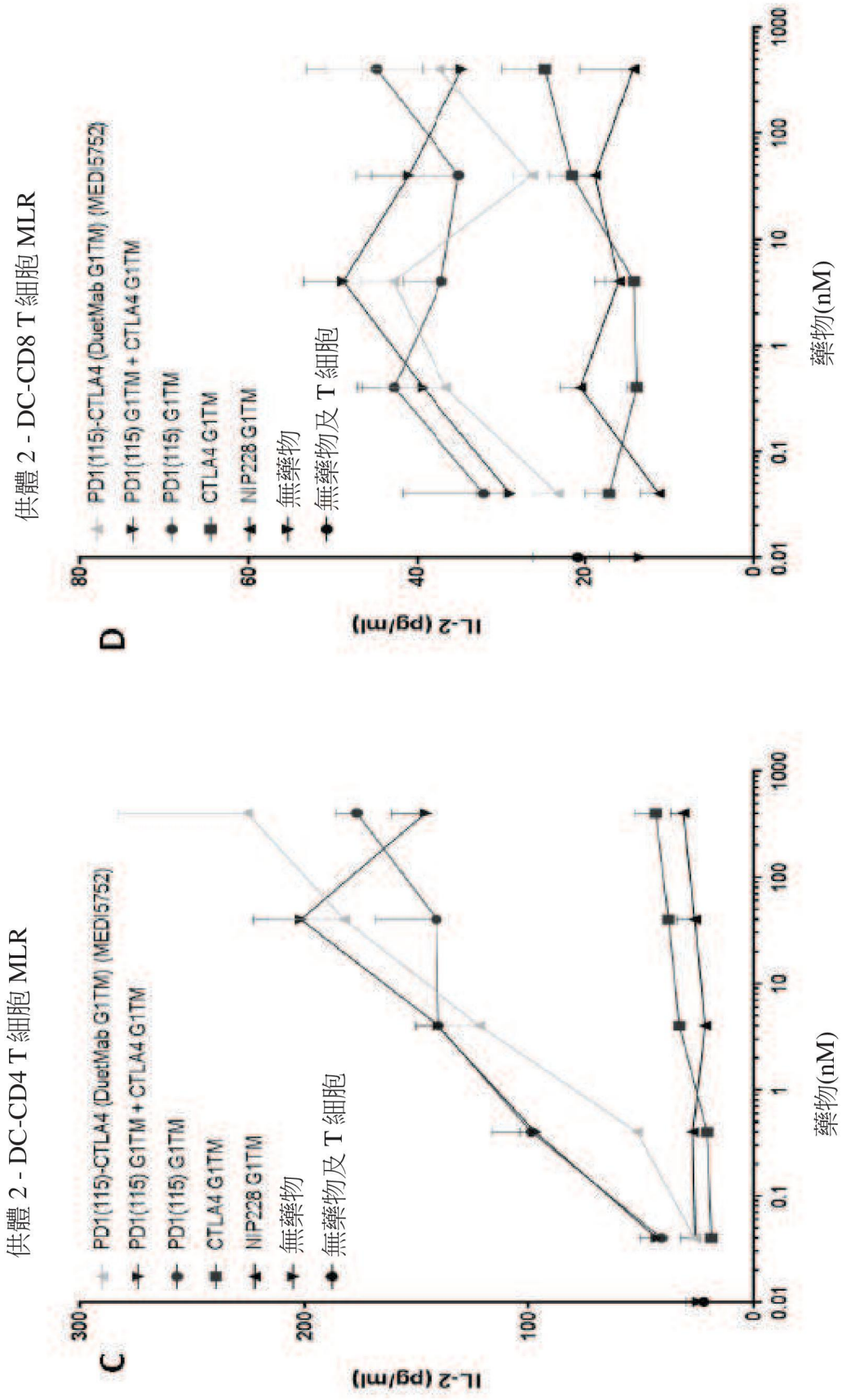
【圖 11】


供體 1 - DC-CD4 T 細胞 MLR
C
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
Duet PD1-R347 + Duet R347-CTLA4
Duet PD1-R347
Duet R347-CTLA4
NIP228 G1TM
無藥物
無藥物及 T 細胞
供體 2 - DC-CD8 T 細胞 MLR
D
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
Duet PD1-R347 + Duet R347-CTLA4
Duet PD1-R347
Duet R347-CTLA4
NIP228 G1TM
無藥物
無藥物及 T 細胞

【圖 11】（續）


供體 1 - DC-CD4 T 細胞 MLR
A
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
PD1(115) G1TM + CTLA4 G1TM
PD1(115) G1TM
CTLA4 G1TM
NIP228 G1TM
無藥物
無藥物及 T 細胞
供體 1 - DC-CD8 T 細胞 MLR
B
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
PD1(115) G1TM + CTLA4 G1TM
PD1(115) G1TM
CTLA4 G1TM
NIP228 G1TM
無藥物
無藥物及 T 細胞

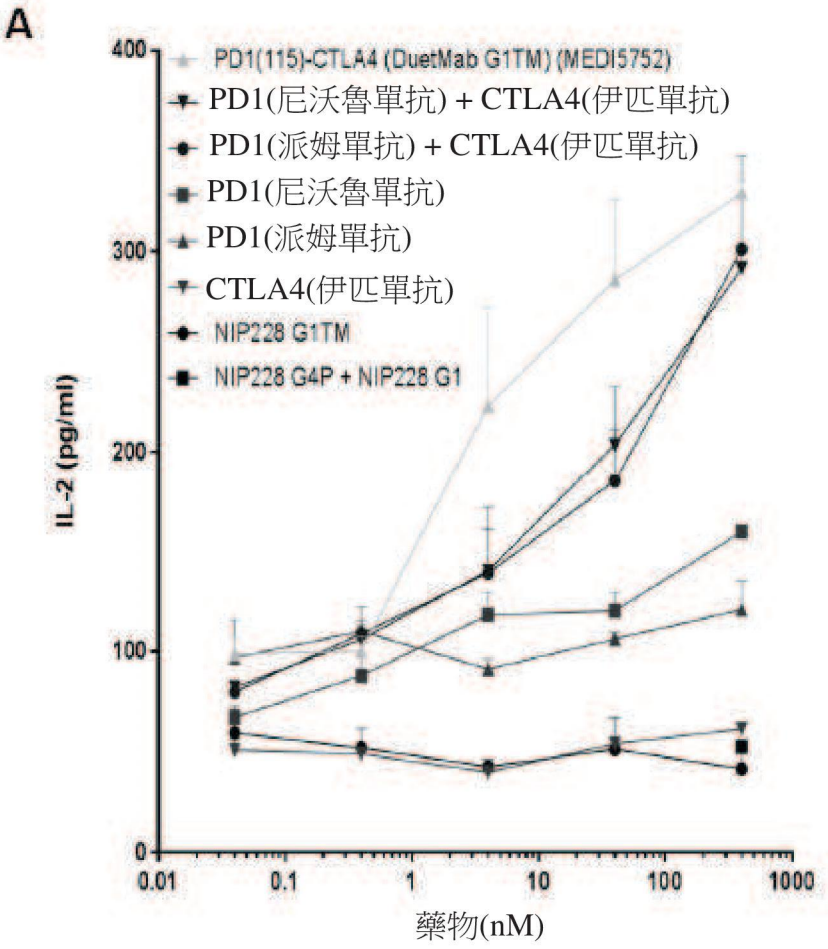
【圖 12】


供體 2 - DC-CD4 T 細胞 MLR
C
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
PD1(115) G1TM + CTLA4 G1TM
PD1(115) G1TM
CTLA4 G1TM
NIP228 G1TM
無藥物
無藥物及 T 細胞
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
供體 2 - DC-CD8 T 細胞 MLR
D
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
PD1(115) G1TM + CTLA4 G1TM
PD1(115) G1TM
CTLA4 G1TM
NIP228 G1TM
無藥物
無藥物及 T 細胞
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)

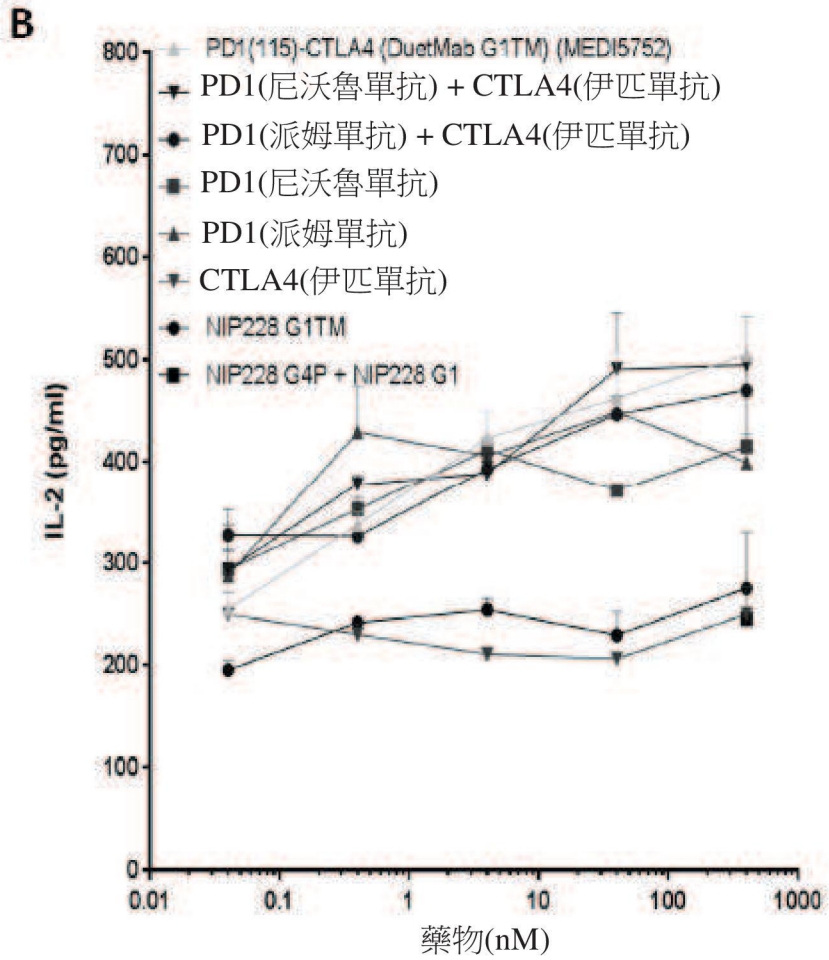
【圖 12】（續）

106115065
C205563DA.pdf
表單編號 A0202
第 20 頁，共 109 頁(發明圖式)
1063276267-0

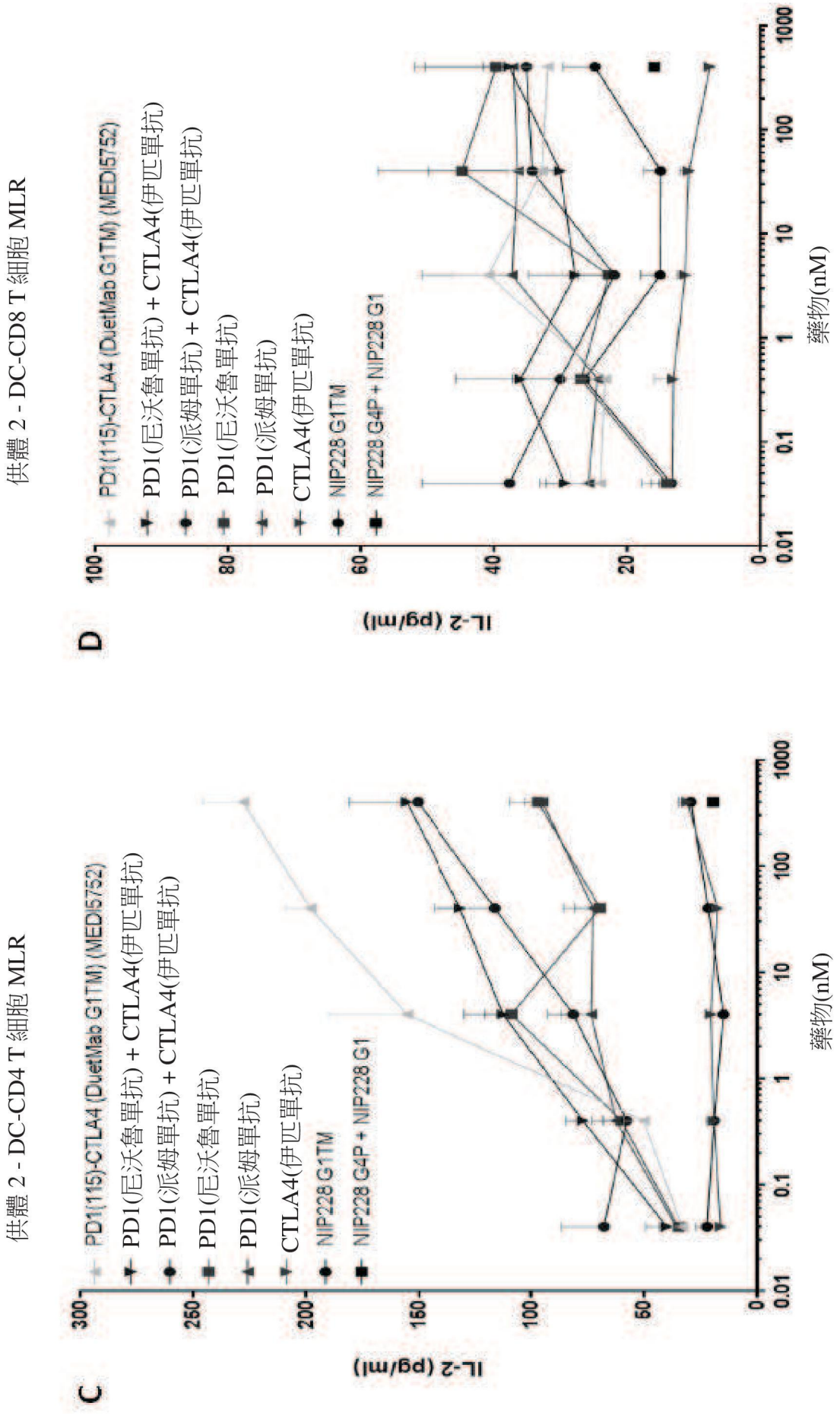
供體 1 - DC-CD4 T 細胞 MLR



供體 1 - DC-CD8 T 細胞 MLR



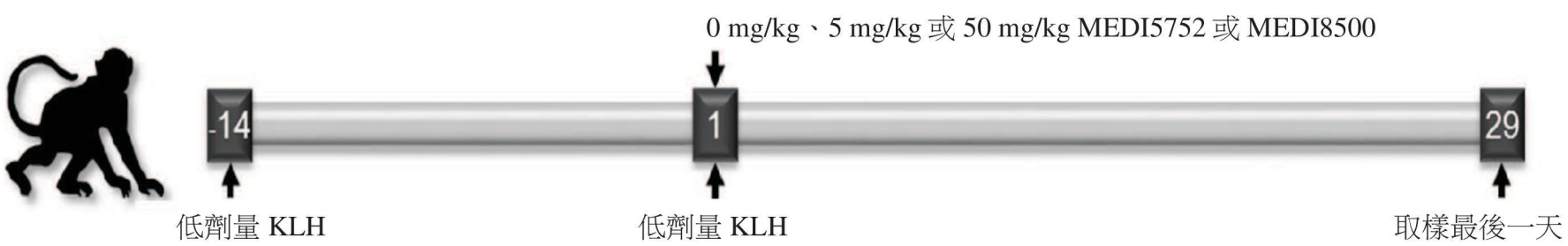
【圖 13】


供體 2 - DC-CD4 T 細胞 MLR
C
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MED15752)
PD1(尼沃魯單抗) + CTLA4(伊匹單抗)
PD1(派姆單抗) + CTLA4(伊匹單抗)
PD1(尼沃魯單抗)
PD1(派姆單抗)
CTLA4(伊匹單抗)
NIP228 G1TM
NIP228 G4P + NIP228 G1
供體 2 - DC-CD8 T 細胞 MLR
D
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MED15752)
PD1(尼沃魯單抗) + CTLA4(伊匹單抗)
PD1(派姆單抗) + CTLA4(伊匹單抗)
PD1(尼沃魯單抗)
PD1(派姆單抗)
CTLA4(伊匹單抗)
NIP228 G1TM
NIP228 G4P + NIP228 G1

【圖 13】（續）

C205563DA.pdf
106115065
表單編號 A0202
第 22 頁，共 109 頁(發明圖式)

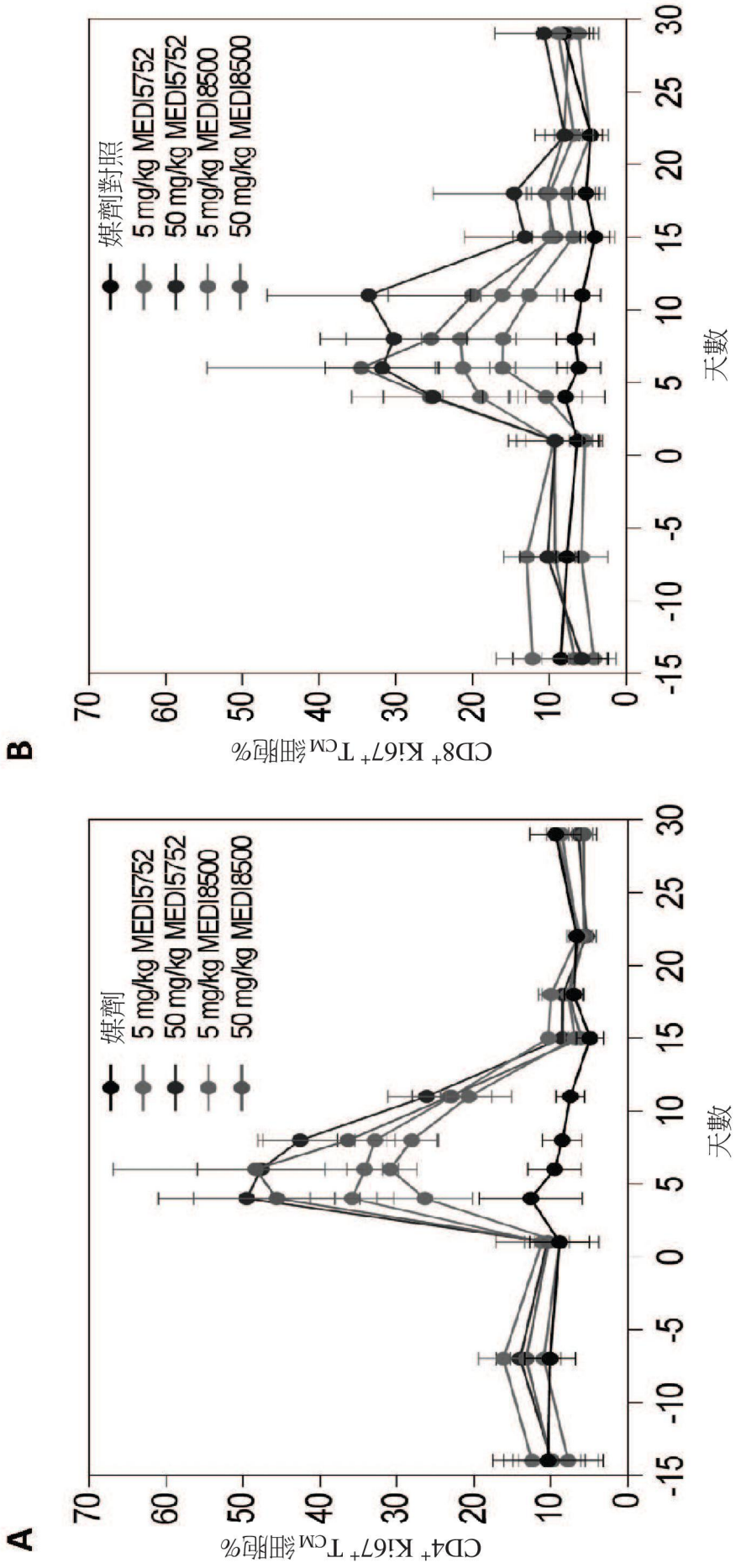
組	途徑	劑量數	動物
1. 媒劑	IV	1	4M
2. 5 mg/kg MEDI8500 (Bis5Ab)	IV	1	4M
3. 50 mg/kg MEDI8500 (Bis5Ab)	IV	1	4M
4. 5 mg/kg MEDI5752 (Duet mAb)	IV	1	4M
5. 50 mg/kg MEDI5752 (Duet mAb)	IV	1	4M



- 存活期不顯著 - 無臨床體徵
- PD 終點：sPD-1、Ki67 在所選 T 細胞亞組中上調、KLH 特異性 IgM/IgG、血液學

【圖 14】

1063276267-0


A
B
CD4+ Ki67+ TCM細胞%
CD8+ Ki67+ TCM細胞%
天數
媒劑
媒劑對照
5 mg/kg MEDI5752
50 mg/kg MEDI5752
5 mg/kg MEDI8500
50 mg/kg MEDI8500
70
60
50
40
30
20
10
0
-15
-10
-5
0
5
10
15
20
25
30

【圖 15】

A
MEDI5752
媒劑
5 mg/kg MEDI5752
50 mg/kg MEDI5752
5 mg/kg MEDI8500
50 mg/kg MEDI8500
抗 KLH IgM 效價
天數
B
MEDI8500
抗 KLH IgG 效價
0 mg/kg、5 mg/kg 或 50 mg/kg MEDI5752 或 MEDI8500
-14
1
29
低劑量 KLH
低劑量 KLH

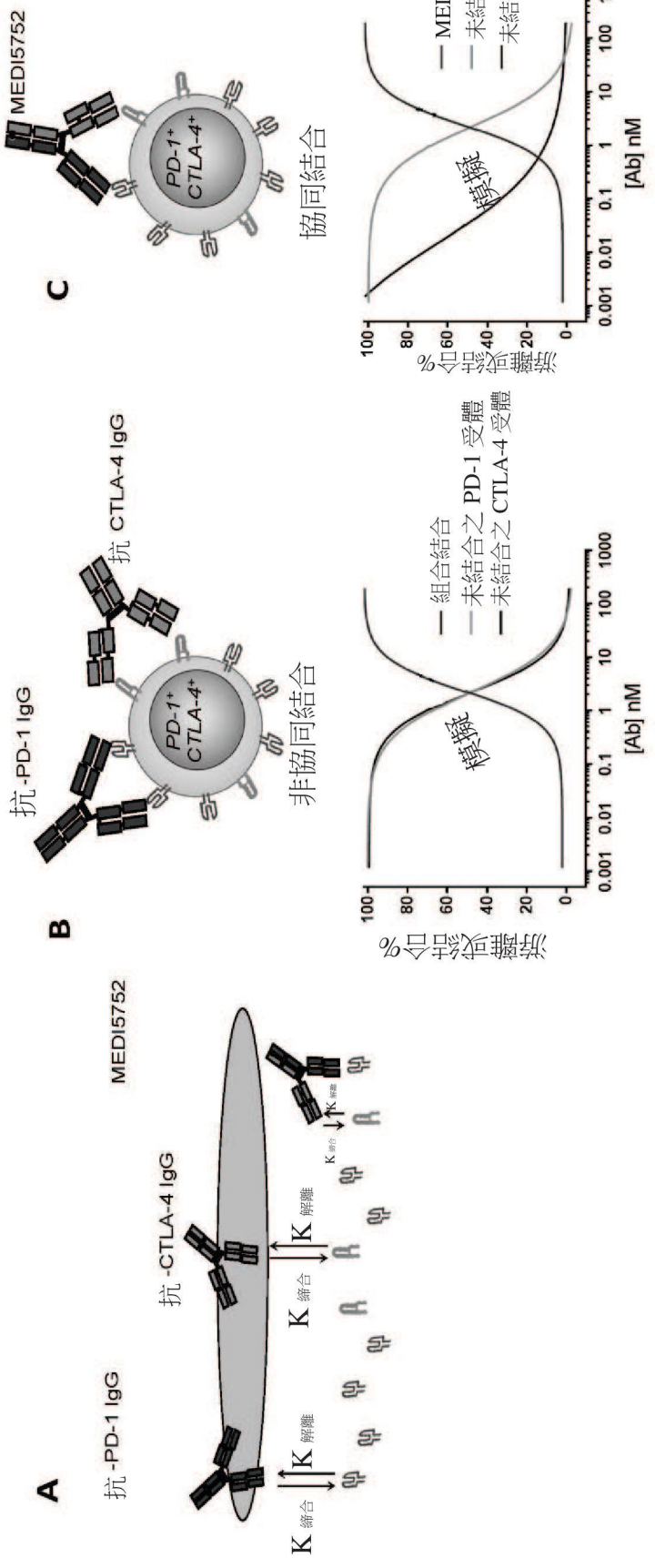
【圖 16】

CHO 細胞	PD-1 受體密度	CTLA-4 受體密度	PD-1/CTLA-4 比率
	2.4×10^6	-	-
	-	7.3×10^4	-
	7.3×10^5	5.5×10^4	約 10:1
	1.4×10^6	3.9×10^4	約 40:1

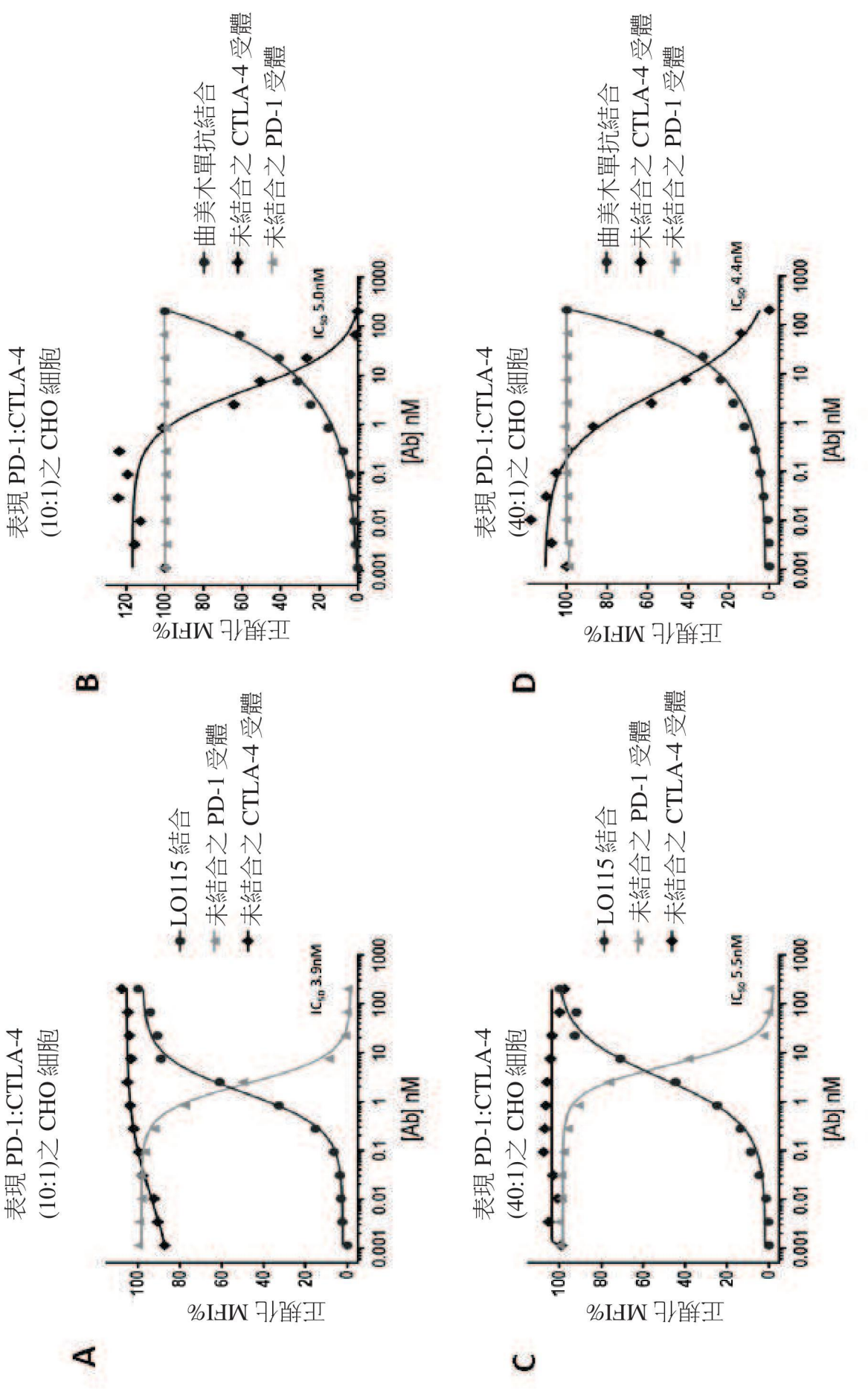
【圖 17】

A
經 APC 標記之 PD-1
抗-PD-1 IgG
PD-1+ CTLA-4+
PD-1/CTLA-4 雙陽性細胞
LO115-PE
sPD-1-APC
結合信號(MFI)
[Ab] nM
B
經 APC 標記之 CTLA-4
MEDI5752
PD-1+ CTLA-4-
PD-1 單陽性細胞
MEDI5752 PE
sCTLA-4 APC
C
MEDI5752
PD-1+ CTLA-4+
PD-1/CTLA-4 雙陽性細胞
MEDI5752 PE
sCTLA-4-APC

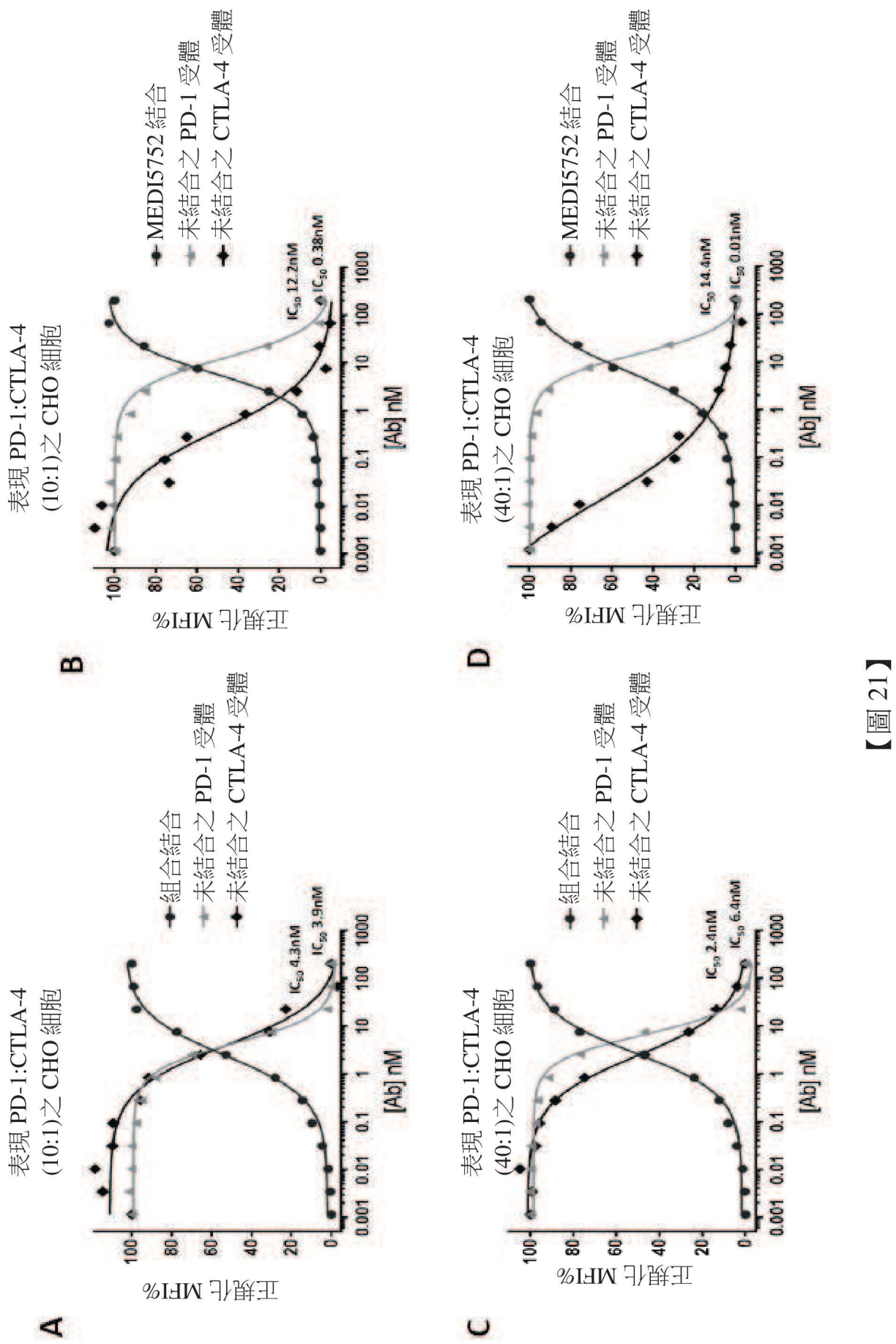
【圖 18】


A
抗 -PD-1 IgG
MEDI5752
抗 -CTLA-4 IgG
K 締合
K 解離
K 締合
K 解離
B
抗 -PD-1 IgG
抗 CTLA-4 IgG
PD-1+ CTLA-4+
非協同結合
游離受結合%
組合結合
未結合之 PD-1 受體
未結合之 CTLA-4 受體
模擬
[Ab] nM
C
MEDI5752
PD-1+ CTLA-4+
協同結合
游離受結合%
MEDI5752 結合
未結合之 PD-1 受體
未結合之 CTLA-4 受體
模擬
[Ab] nM

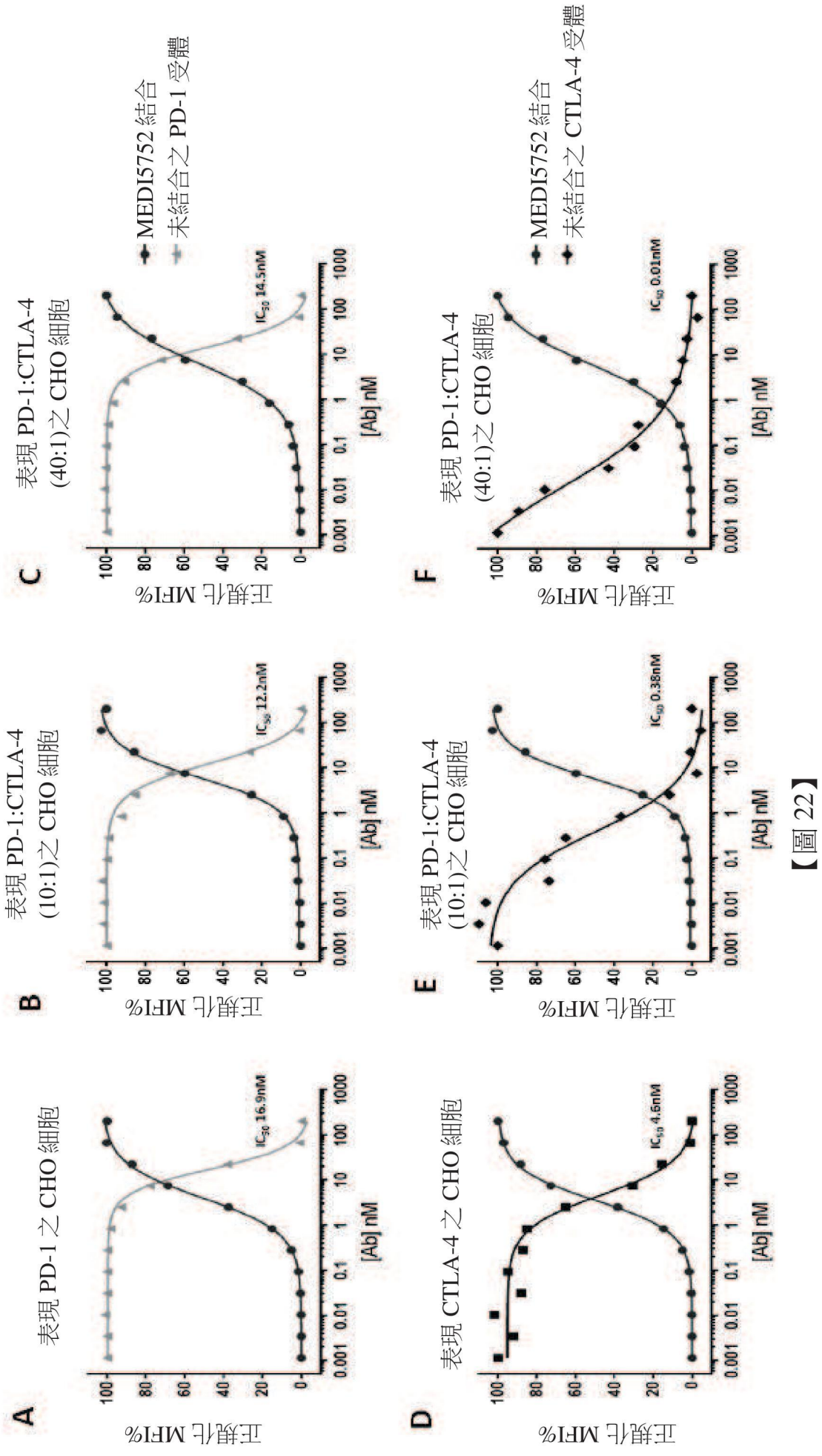
【圖 19】


A
表現 PD-1:CTLA-4
(10:1)之 CHO 細胞
正規化 MFI%
[Ab] nM
IC50 3.9nM
LO115 結合
未結合之 PD-1 受體
未結合之 CTLA-4 受體
B
表現 PD-1:CTLA-4
(10:1)之 CHO 細胞
正規化 MFI%
[Ab] nM
IC50 5.0nM
曲美木單抗結合
未結合之 CTLA-4 受體
未結合之 PD-1 受體
C
表現 PD-1:CTLA-4
(40:1)之 CHO 細胞
正規化 MFI%
[Ab] nM
IC50 5.5nM
LO115 結合
未結合之 PD-1 受體
未結合之 CTLA-4 受體
D
表現 PD-1:CTLA-4
(40:1)之 CHO 細胞
正規化 MFI%
[Ab] nM
IC50 4.4nM
曲美木單抗結合
未結合之 CTLA-4 受體
未結合之 PD-1 受體

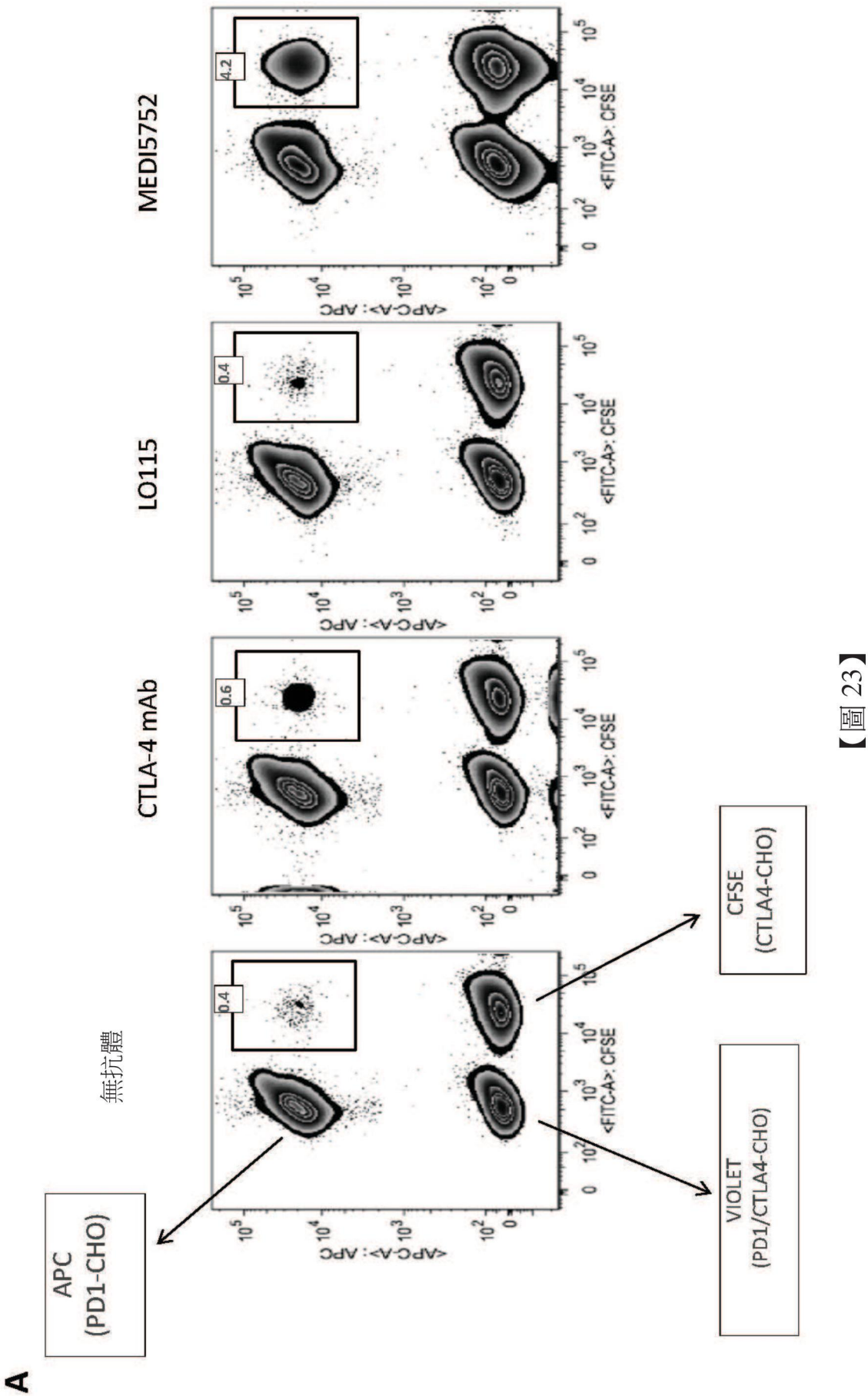
【圖 20】


A
表現 PD-1:CTLA-4
(10:1)之 CHO 細胞
正規化 MFI%
[Ab] nM
組合結合
未結合之 PD-1 受體
未結合之 CTLA-4 受體
IC50 4.3nM
IC50 3.9nM
B
表現 PD-1:CTLA-4
(10:1)之 CHO 細胞
正規化 MFI%
[Ab] nM
MEDI5752 結合
未結合之 PD-1 受體
未結合之 CTLA-4 受體
IC50 12.2nM
IC50 0.38nM
C
表現 PD-1:CTLA-4
(40:1)之 CHO 細胞
正規化 MFI%
[Ab] nM
組合結合
未結合之 PD-1 受體
未結合之 CTLA-4 受體
IC50 2.4nM
IC50 6.4nM
D
表現 PD-1:CTLA-4
(40:1)之 CHO 細胞
正規化 MFI%
[Ab] nM
MEDI5752 結合
未結合之 PD-1 受體
未結合之 CTLA-4 受體
IC50 14.4nM
IC50 0.01nM

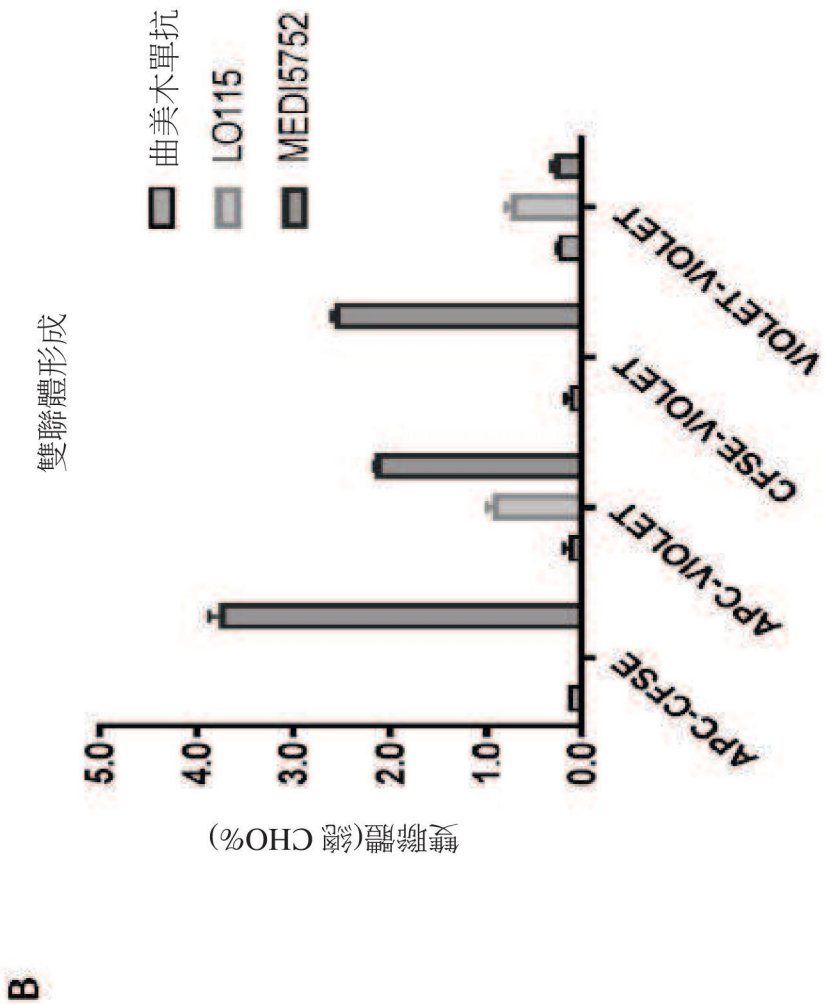
【圖 21】


A
表現 PD-1 之 CHO 細胞
B
表現 PD-1:CTLA-4
(10:1)之 CHO 細胞
C
表現 PD-1:CTLA-4
(40:1)之 CHO 細胞
MEDI5752 結合
未結合之 PD-1 受體
D
表現 CTLA-4 之 CHO 細胞
E
表現 PD-1:CTLA-4
(10:1)之 CHO 細胞
F
表現 PD-1:CTLA-4
(40:1)之 CHO 細胞
MEDI5752 結合
未結合之 CTLA-4 受體
正規化 MFI%
[Ab] nM
IC50 16.9nM
IC50 12.2nM
IC50 14.5nM
IC50 4.6nM
IC50 0.38nM
IC50 0.01nM

【圖 22】


A
APC
(PD1-CHO)
VIOLET
(PD1/CTLA4-CHO)
CFSE
(CTLA4-CHO)
無抗體
CTLA-4 mAb
LO115
MEDI5752
<APC-A>: APC
<FITC-A>: CFSE
0.4
0.6
0.4
4.2

【圖 23】


B
雙聯體形成
曲美木單抗
LO115
MEDI5752
雙聯體(總 CHO%)
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
APC-CFSE
APC-VIOLET
CFSE-VIOLET
VIOLET-VIOLET
CFSE: CTLA4-CHO
APC: PD1-CHO
VIOLET: PD1/CTLA4 CHO (10:1)

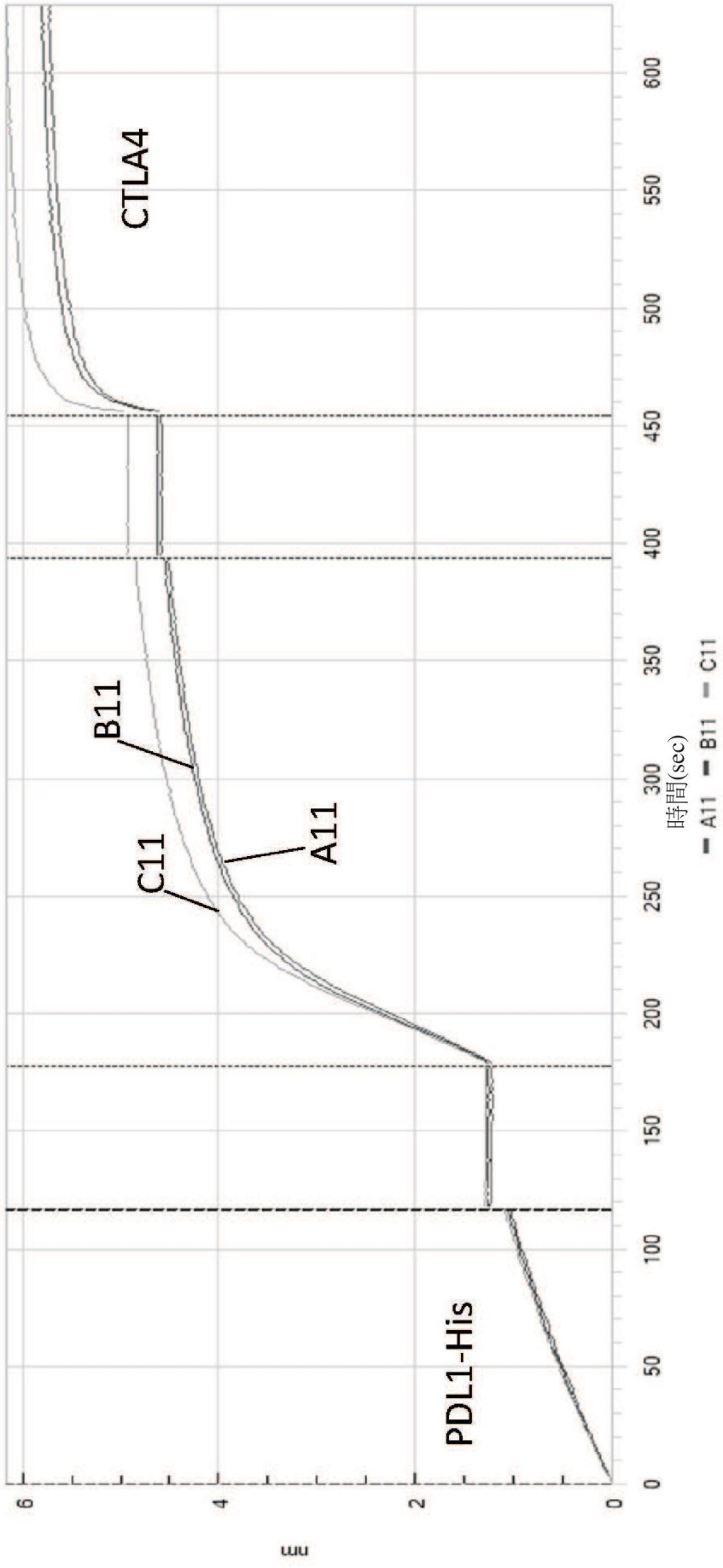
【圖 23】（續）

未經刺激
抗 CD3
抗 CD3+抗 CD28
內化
CD4+
CD4 陰性
IgG 結合(MFI)
log(Ab 濃度) (nM)
抗 CTLA-4
抗 PD-1
DuetMab
同型
內化信號(MFI)
[Ab] nM
CTLA4-pHAb Rep 1
CTLA4-pHAb +PD1
PD1-pHAb Rep1
PD1-pHAb +CTLA4
Duet-pHAb Rep1
A
B
C
D

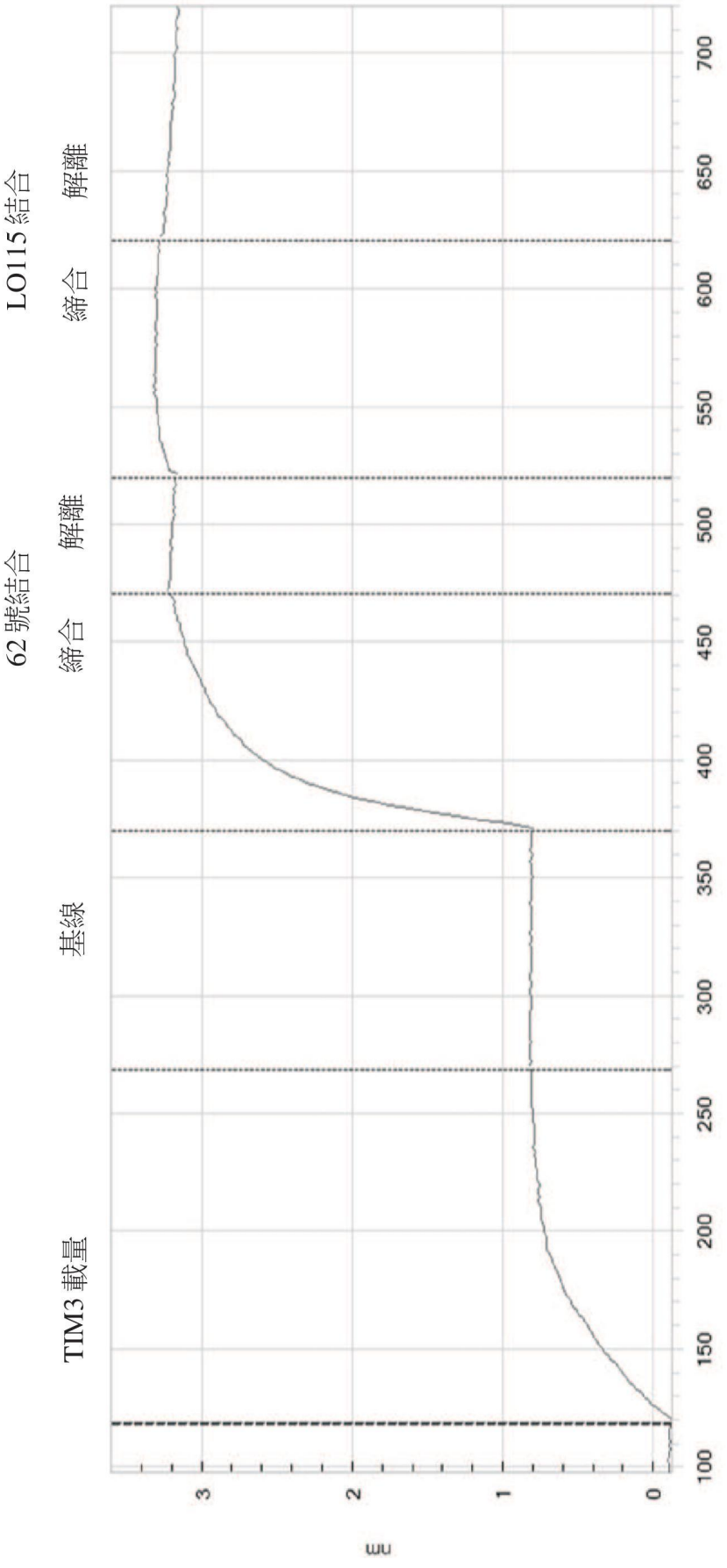
【圖 24】

A
螢光
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
細胞類型
pHAb 染料偶聯物
曲妥珠單抗-胺-pHAb
曲妥珠單抗-硫醇-pHAb
曲妥珠單抗-胺-pHAb
曲妥珠單抗-硫醇-pHAb
利妥普單抗-胺-pHAb
西妥普單抗-胺-pHAb
陽性試樣
陰性對照
B
內化
內化訊號(MFI)
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
log(Ab 濃度) (nM)
CTLA4-pHAb Rep 1
CTLA4-pHAb +PD1
PD1-pHAb Rep1
PD1-pHAb +CTLA4
Duet-pHAb Rep1

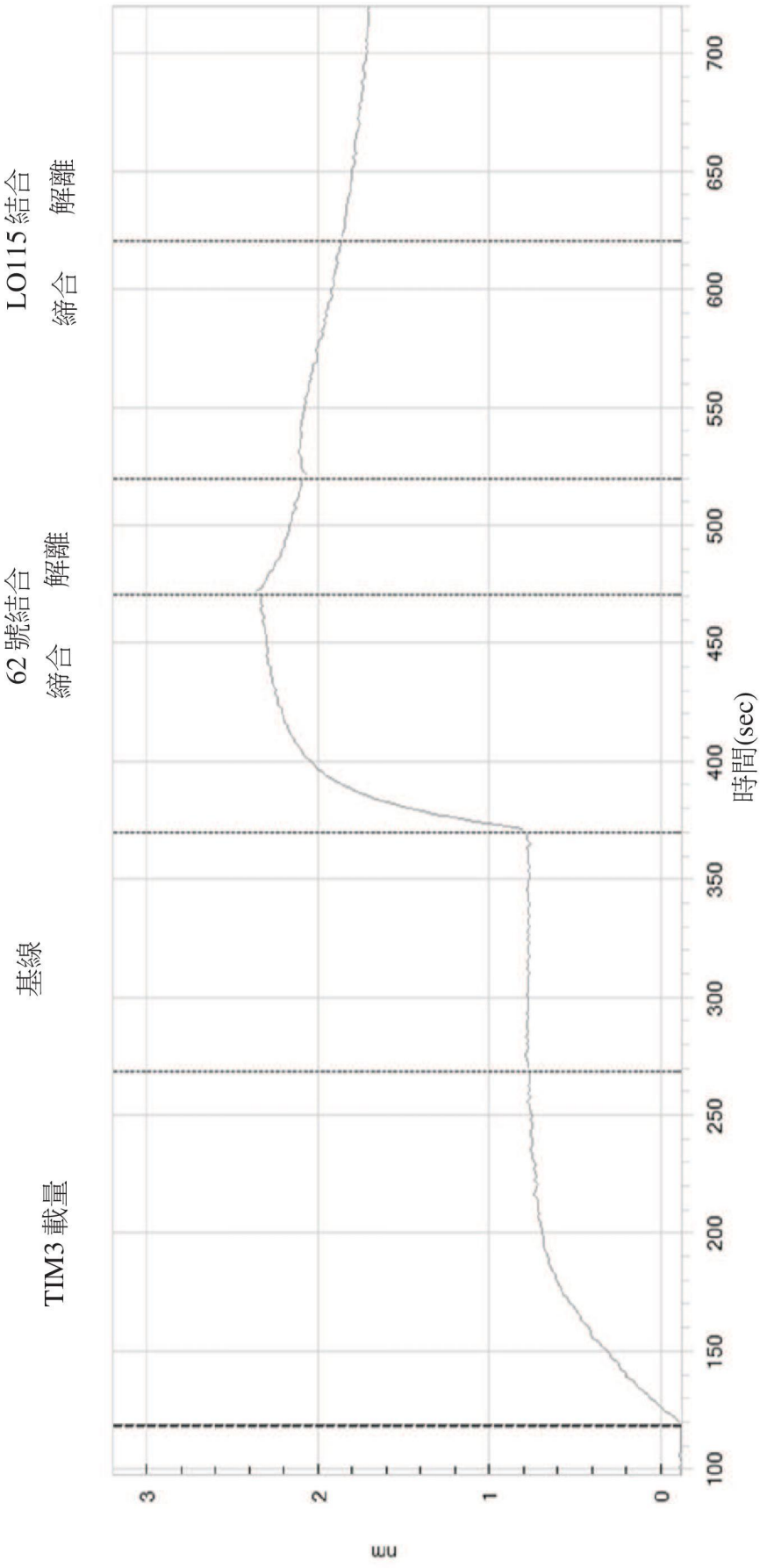
【圖 25】


CTLA4
B11
C11
A11
PDL1-His
nm
0
2
4
6
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
時間(sec)
A11
B11
C11

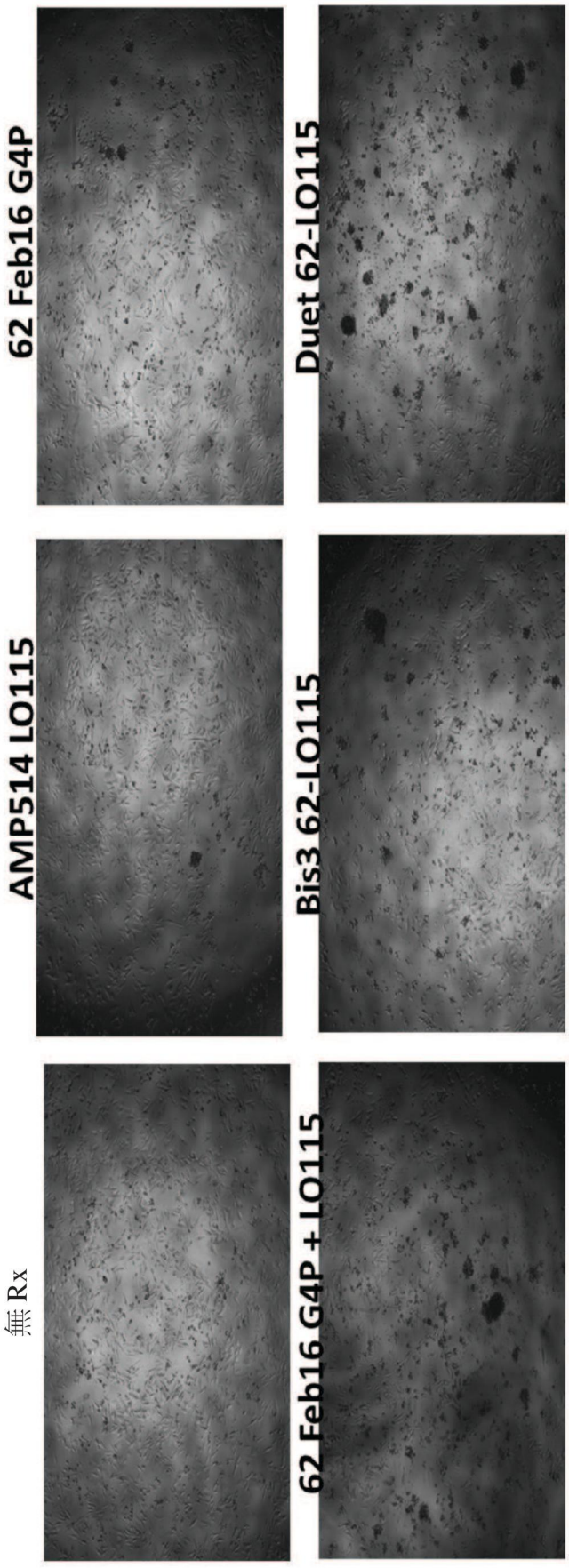
【圖 26】


TIM3 載量
基線
62 號結合
締合
解離
LO115 結合
締合
解離
nm
0
1
2
3
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700
時間(sec)

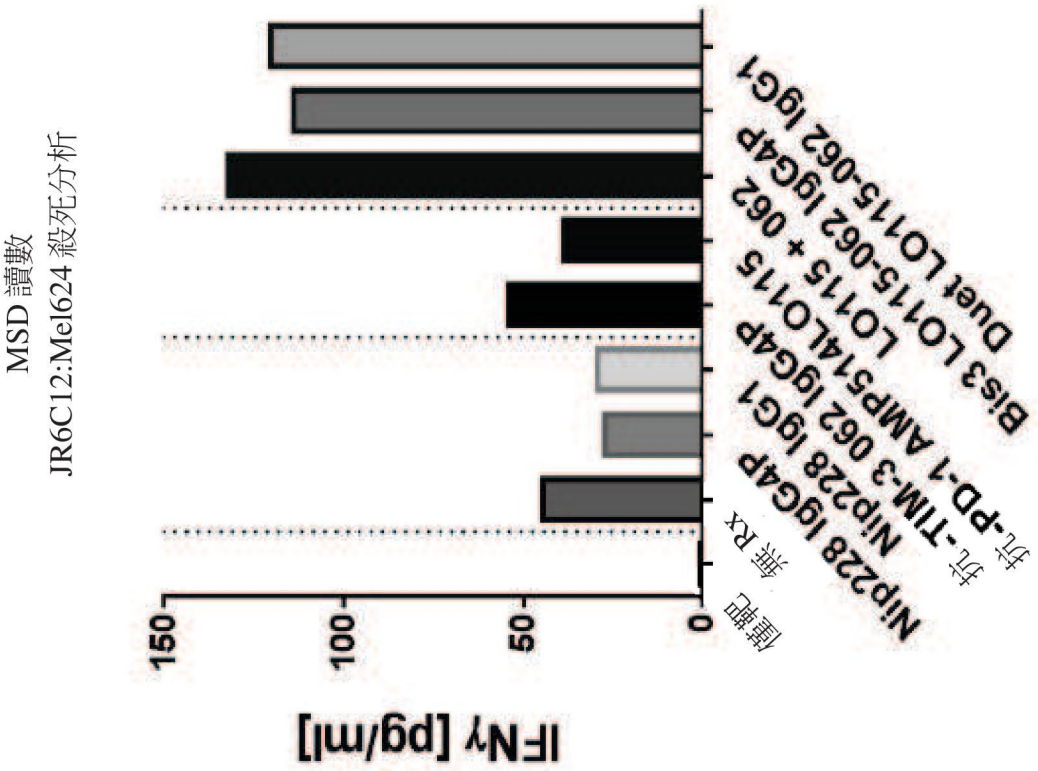
【圖 27A】


TIM3 載量
基線
62 號結合
締合
解離
LO115 結合
締合
解離
nm
0
1
2
3
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700
時間(sec)

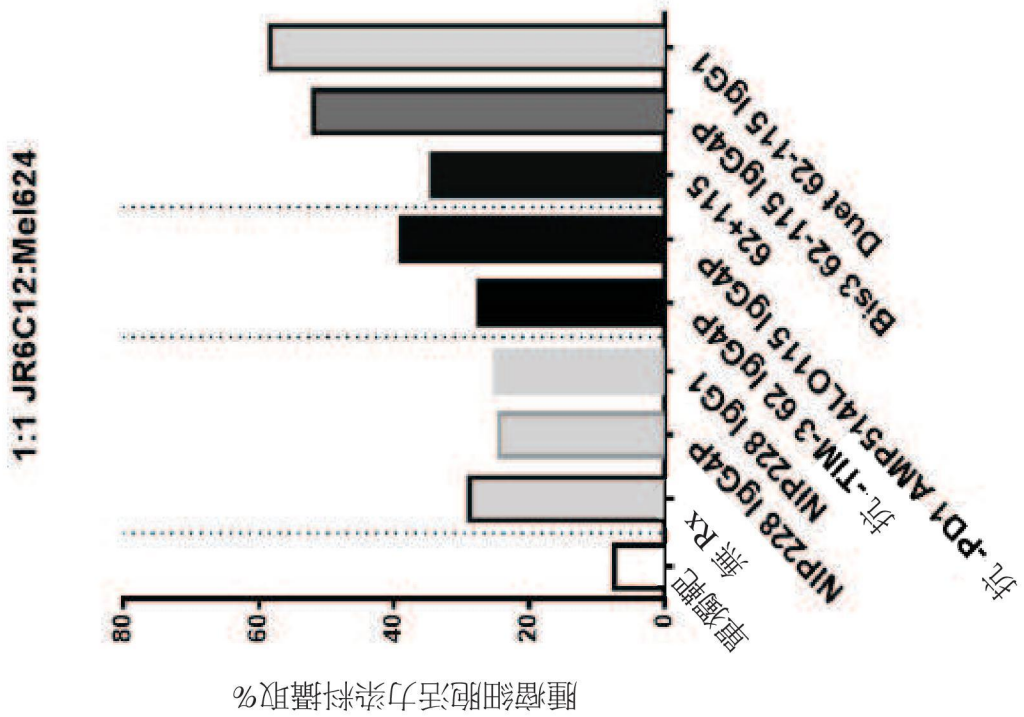
【圖 27B】


無 Rx
AMP514 LO115
62 Feb16 G4P
62 Feb16 G4P + LO115
Bis3 62-LO115
Duet 62-LO115

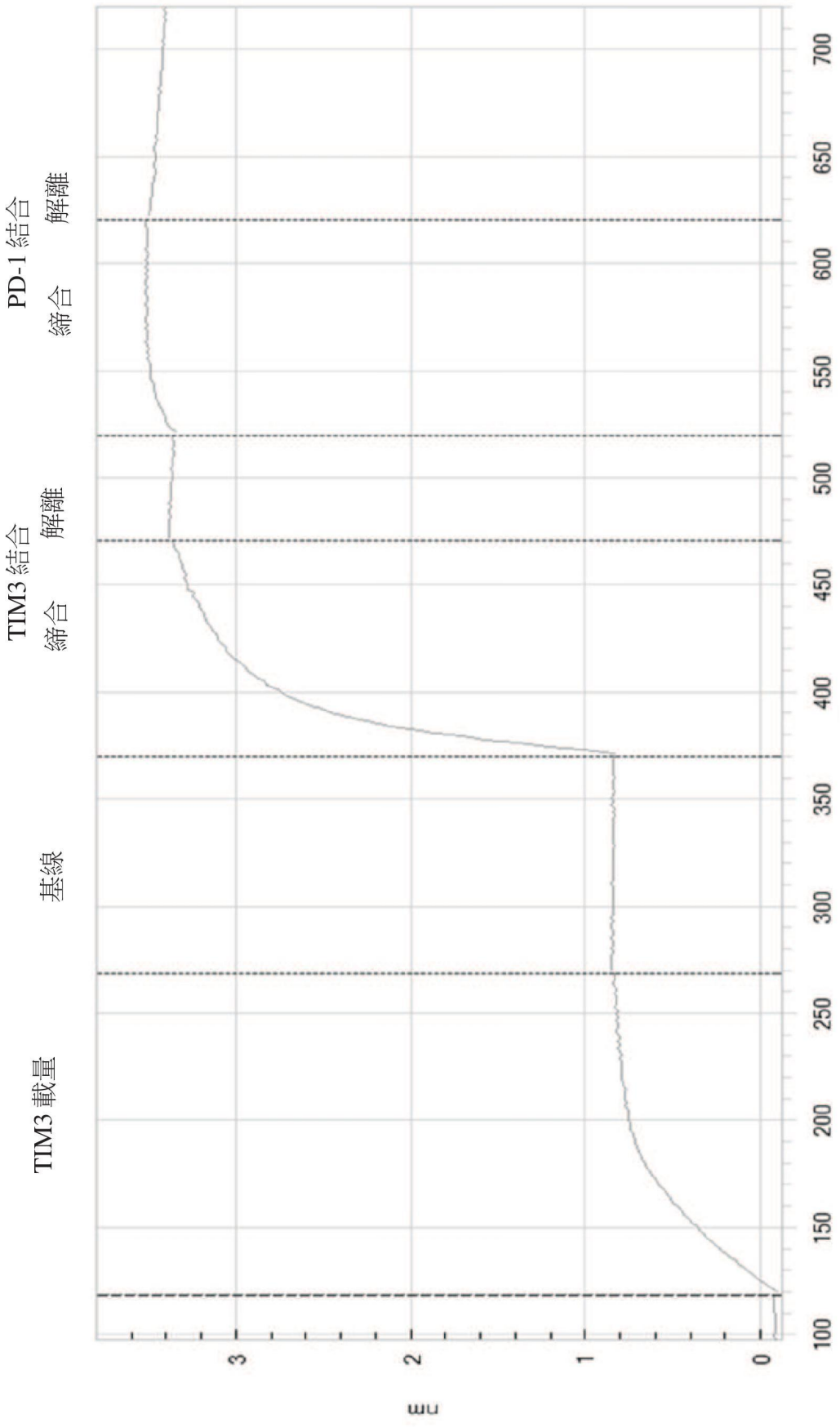
【圖 28A】


MSD 讀數
JR6C12:Mel624 殺死分析
IFNγ [pg/ml]
150
100
50
0
靶點
無 Rx
抗-PD-1 AMP514LO115 IgG4P
抗-TIM-3 062 IgG4P
Nip228 IgG4P
Nip228 IgG1
Bis3 LO115-062 IgG4P
Duet LO115-062 IgG1

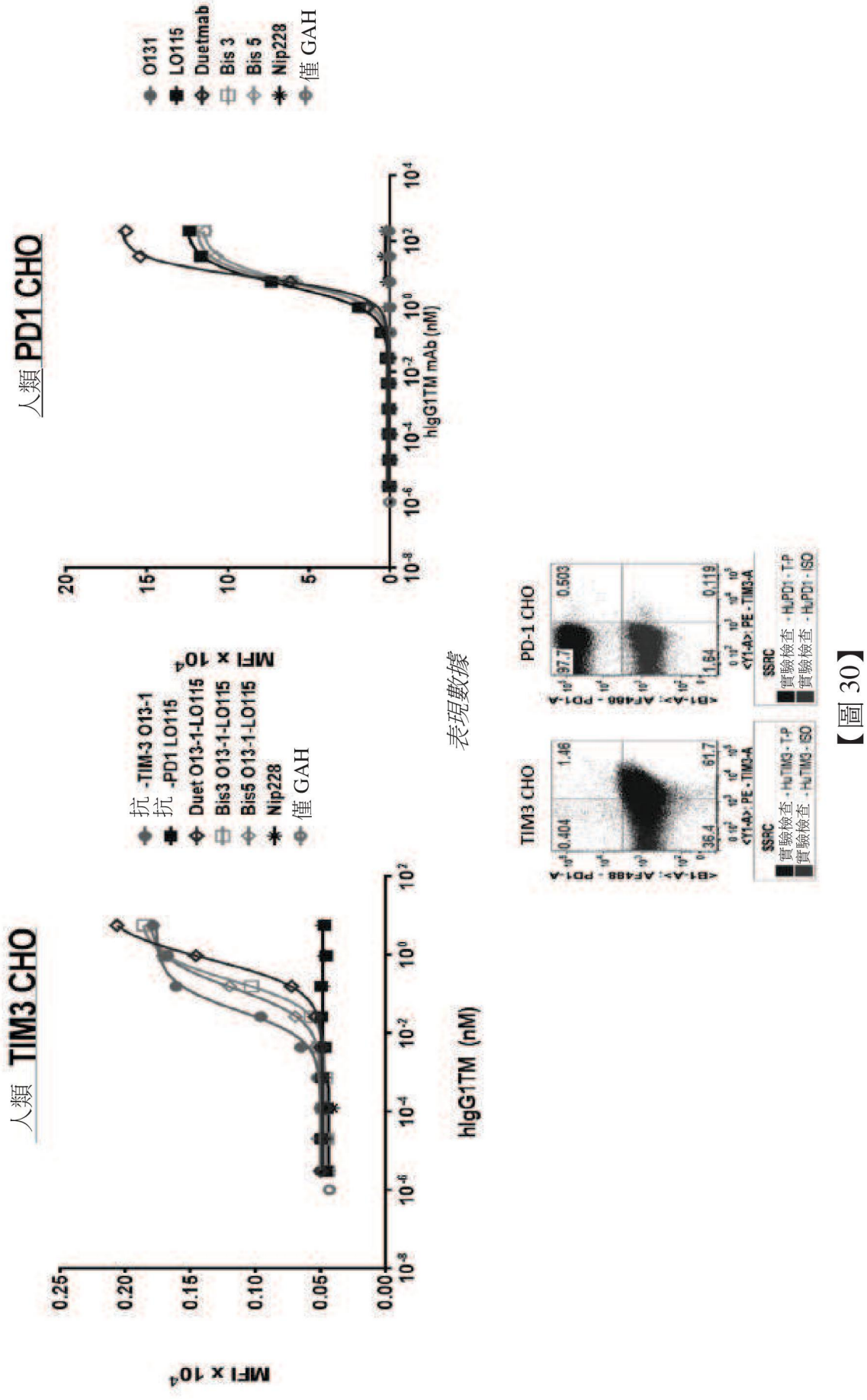
【圖 28C】


腫瘤細胞活力染料攝取%
1:1 JR6C12:Mel624
80
60
40
20
0
單獨靶
無 Rx
Nip228 IgG4P
抗-TIM-3 62 IgG1
Nip228 IgG1
抗-PD1 AMP514LO115 IgG4P
Bis3 62-115 IgG4P
62+115
Duet 62-115 IgG4P
Duet 62-115 IgG1

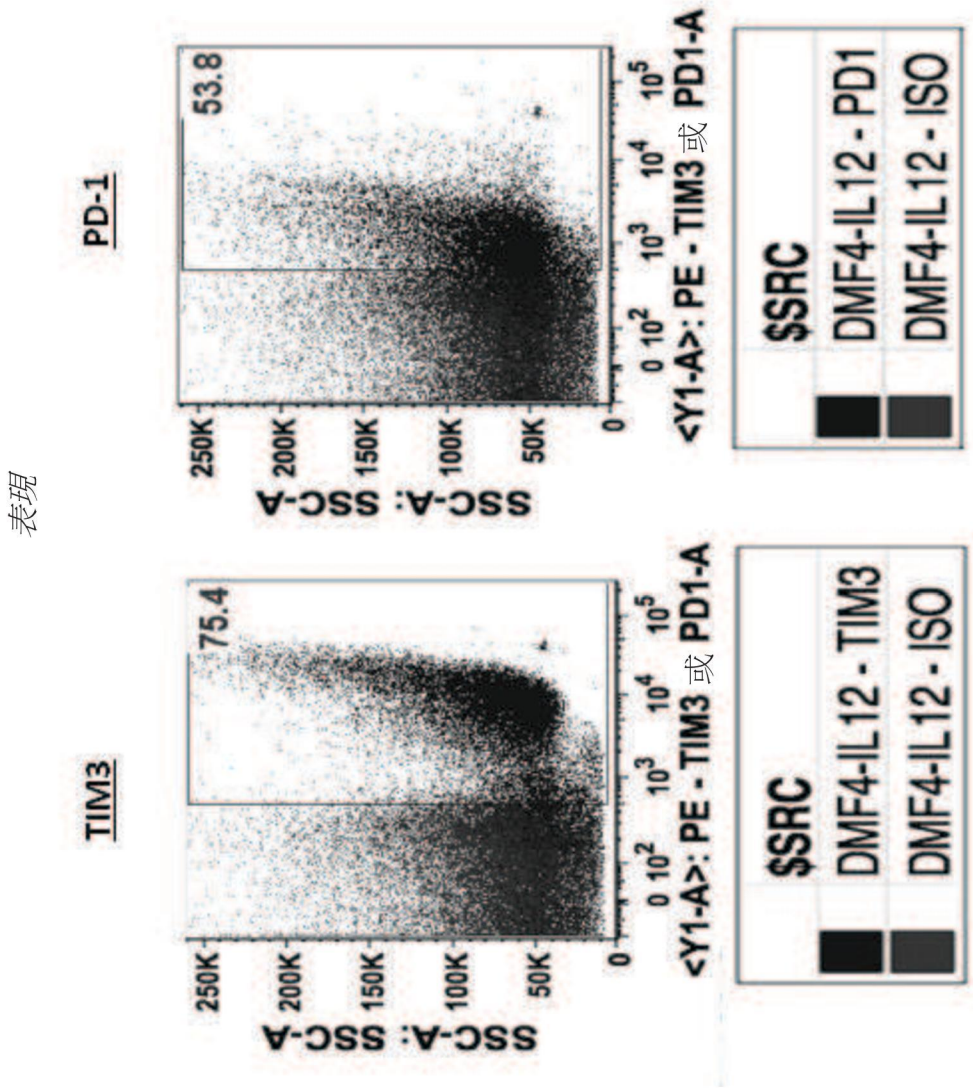
【圖 28B】


TIM3 載量
基線
TIM3 結合
締合
解離
PD-1 結合
締合
解離
nm
0
1
2
3
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700
時間(sec)

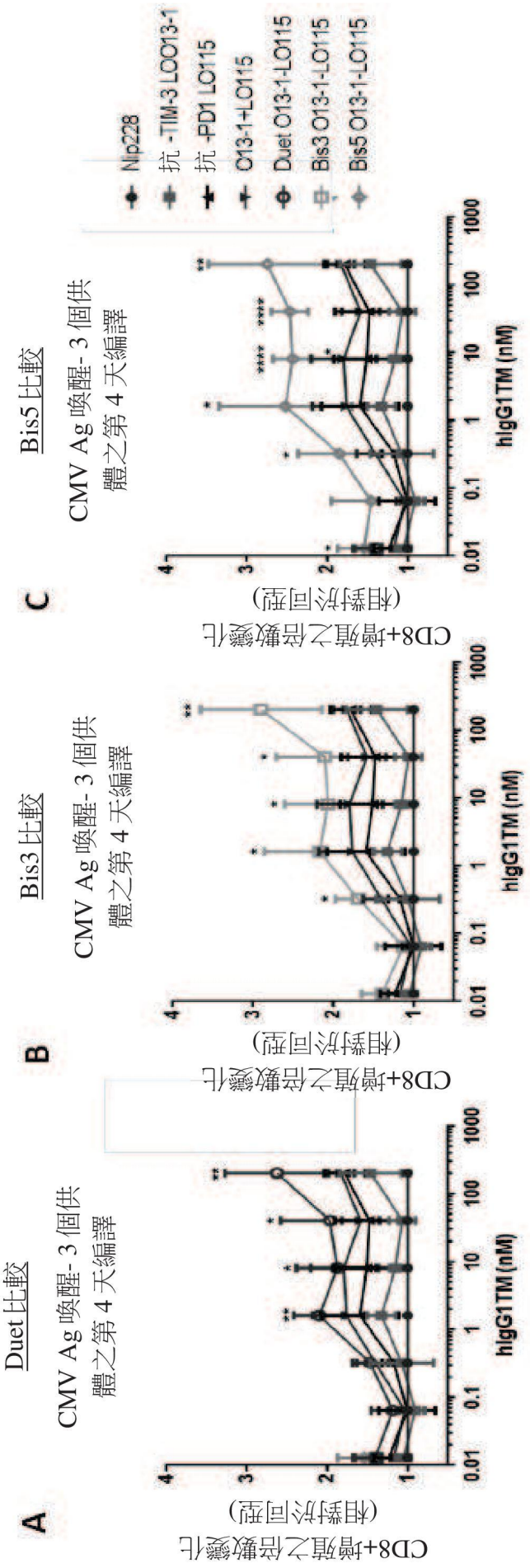
【圖 29】


人類 TIM3 CHO
MFI x 10⁴
hIgG1TM (nM)
抗 -TIM-3 O13-1
抗 -PD1 LO115
Duet O13-1-LO115
Bis3 O13-1-LO115
Bis5 O13-1-LO115
Nip228
僅 GAH
人類 PD1 CHO
hIgG1TM mAb (nM)
O131
LO115
Duetmab
Bis 3
Bis 5
Nip228
僅 GAH
表現數據
TIM3 CHO
PD-1 CHO
SSAC
實驗檢查 - HuTIM3 - T-P
實驗檢查 - HuTIM3 - ISO
實驗檢查 - HuPD1 - T-P
實驗檢查 - HuPD1 - ISO

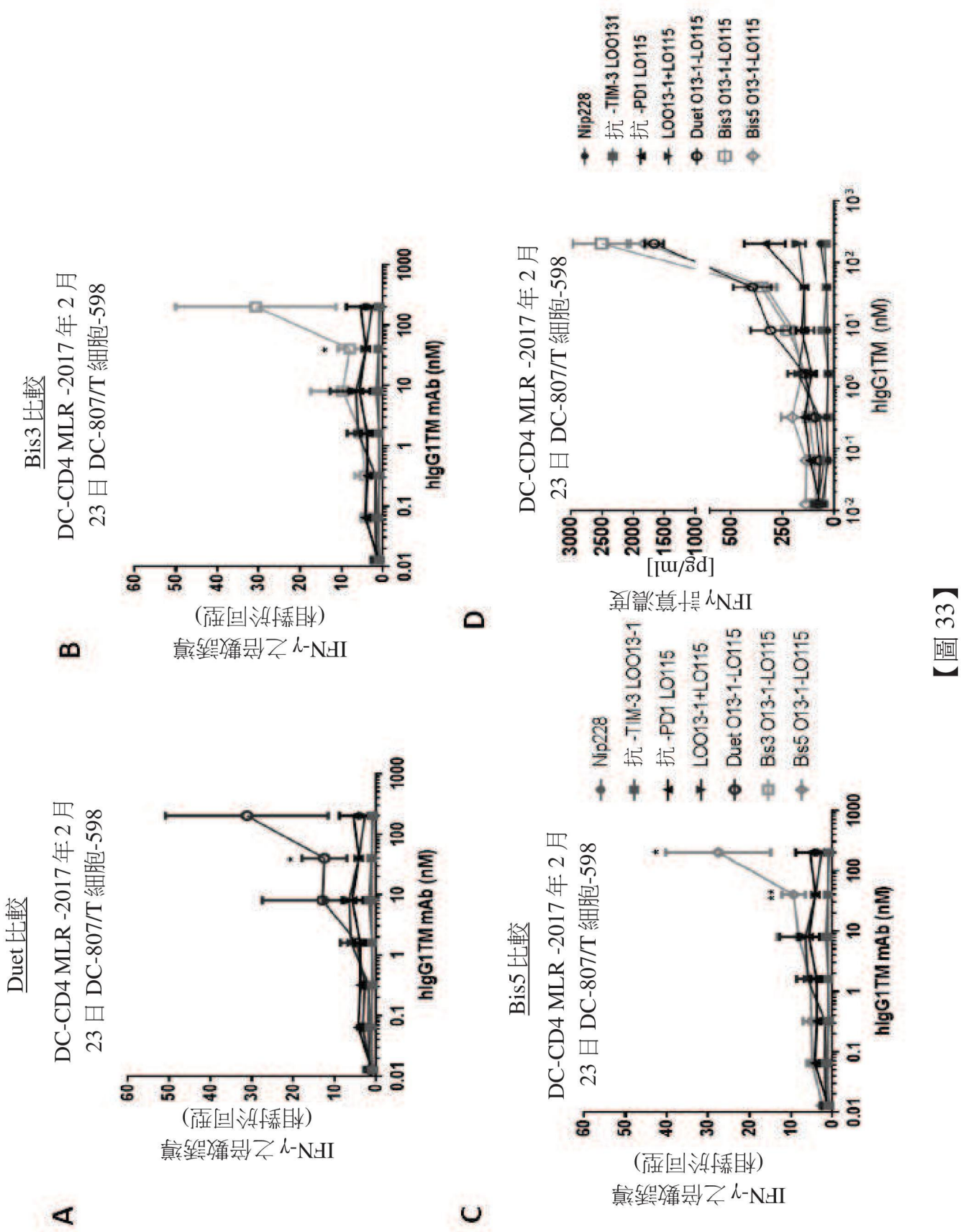
【圖 30】


表現
TIM3
PD-1
75.4
53.8
SSC-A: SSC-A
250K
200K
150K
100K
50K
0
0 10^2 10^3 10^4 10^5
<Y1-A>: PE - TIM3 或 PD1-A
$SRC
DMF4-IL12 - TIM3
DMF4-IL12 - ISO
DMF4-IL12 - PD1
DMF4-IL12 - ISO

【圖 31】


A
Duet 比較
CMV Ag 喚醒- 3 個供體之第 4 天編譯
CD8+增殖之倍數變化
(相對於同型)
hIgG1TM (nM)
B
Bis3 比較
CMV Ag 喚醒- 3 個供體之第 4 天編譯
CD8+增殖之倍數變化
(相對於同型)
hIgG1TM (nM)
C
Bis5 比較
CMV Ag 喚醒- 3 個供體之第 4 天編譯
CD8+增殖之倍數變化
(相對於同型)
hIgG1TM (nM)
Nip228
抗 -TIM-3 LOO13-1
抗 -PD1 LO115
O13-1+LO115
Duet O13-1-LO115
Bis3 O13-1-LO115
Bis5 O13-1-LO115

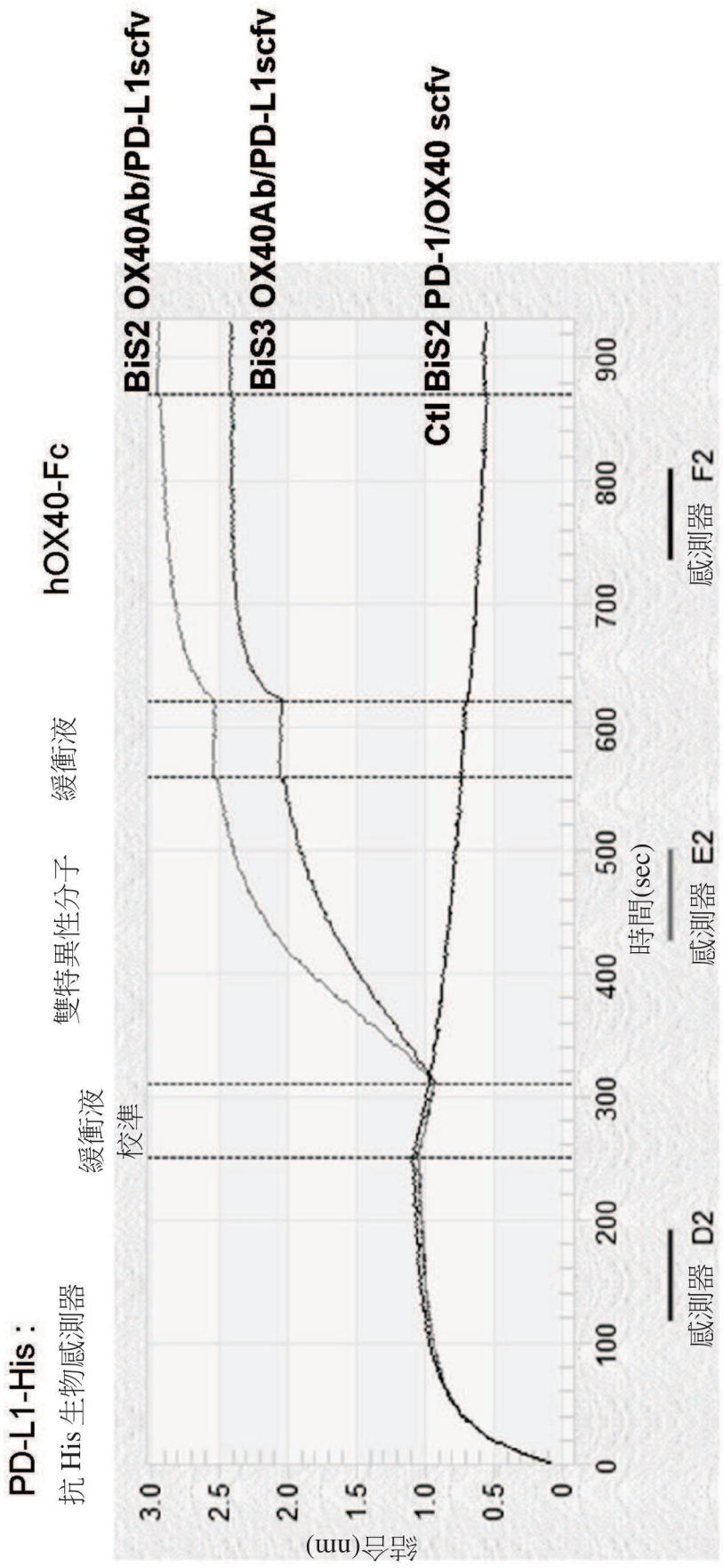
【圖 32】


A
Duet 比較
DC-CD4 MLR -2017 年 2 月
23 日 DC-807/T 細胞-598
IFN-γ 之倍數誘導
(相對於同型)
hIgG1TM mAb (nM)
B
Bis3 比較
DC-CD4 MLR -2017 年 2 月
23 日 DC-807/T 細胞-598
IFN-γ 之倍數誘導
(相對於同型)
hIgG1TM mAb (nM)
C
Bis5 比較
DC-CD4 MLR -2017 年 2 月
23 日 DC-807/T 細胞-598
IFN-γ 之倍數誘導
(相對於同型)
hIgG1TM mAb (nM)
Nip228
抗 -TIM-3 LO0131-1
抗 -PD1 LO115
LO013-1+LO115
Duet O13-1-LO115
Bis3 O13-1-LO115
Bis5 O13-1-LO115
D
DC-CD4 MLR -2017 年 2 月
23 日 DC-807/T 細胞-598
IFN-γ 計算濃度
[pg/ml]
hIgG1TM (nM)
Nip228
抗 -TIM-3 LO0131
抗 -PD1 LO115
LO013-1+LO115
Duet O13-1-LO115
Bis3 O13-1-LO115
Bis5 O13-1-LO115

【圖 33】

Nip228
抗 -TIM3 LOO13-1
抗 -PD1 LO115
O13-1+LO115
Duet
Bis3
Bis5
Duet 比較
NFkB - Duet 比較
Bis3 比較
NFkB - Bis3 比較
Bis5 比較
NFkB - Bis5 比較
螢光素酶表現之倍數變化(相對於同型)
hIgG1TM (nM)
A
B
C

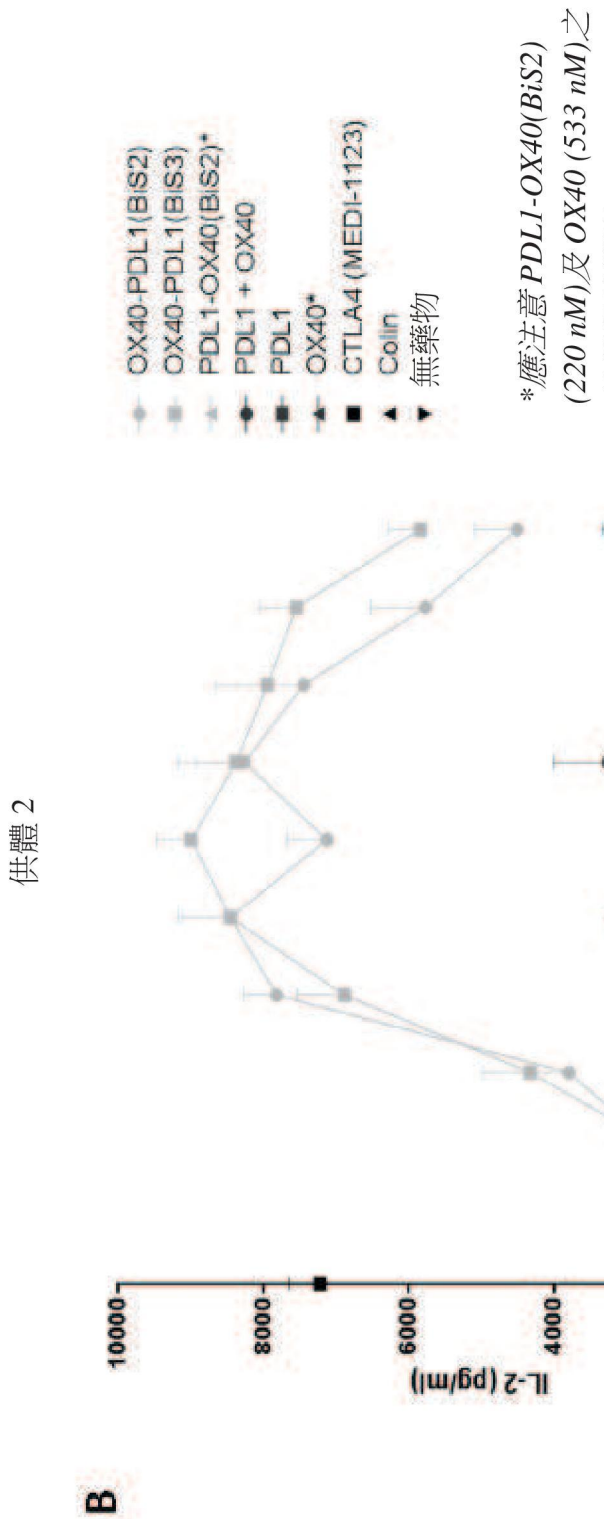
【圖 34】


PD-L1-His：
抗 His 生物感測器
緩衝液
校準
雙特異性分子
緩衝液
hOX40-Fc
BiS2 OX40Ab/PD-L1scfv
BiS3 OX40Ab/PD-L1scfv
Ctl BiS2 PD-1/OX40 scfv
結合(nm)
時間(sec)
感測器 D2
感測器 E2
感測器 F2

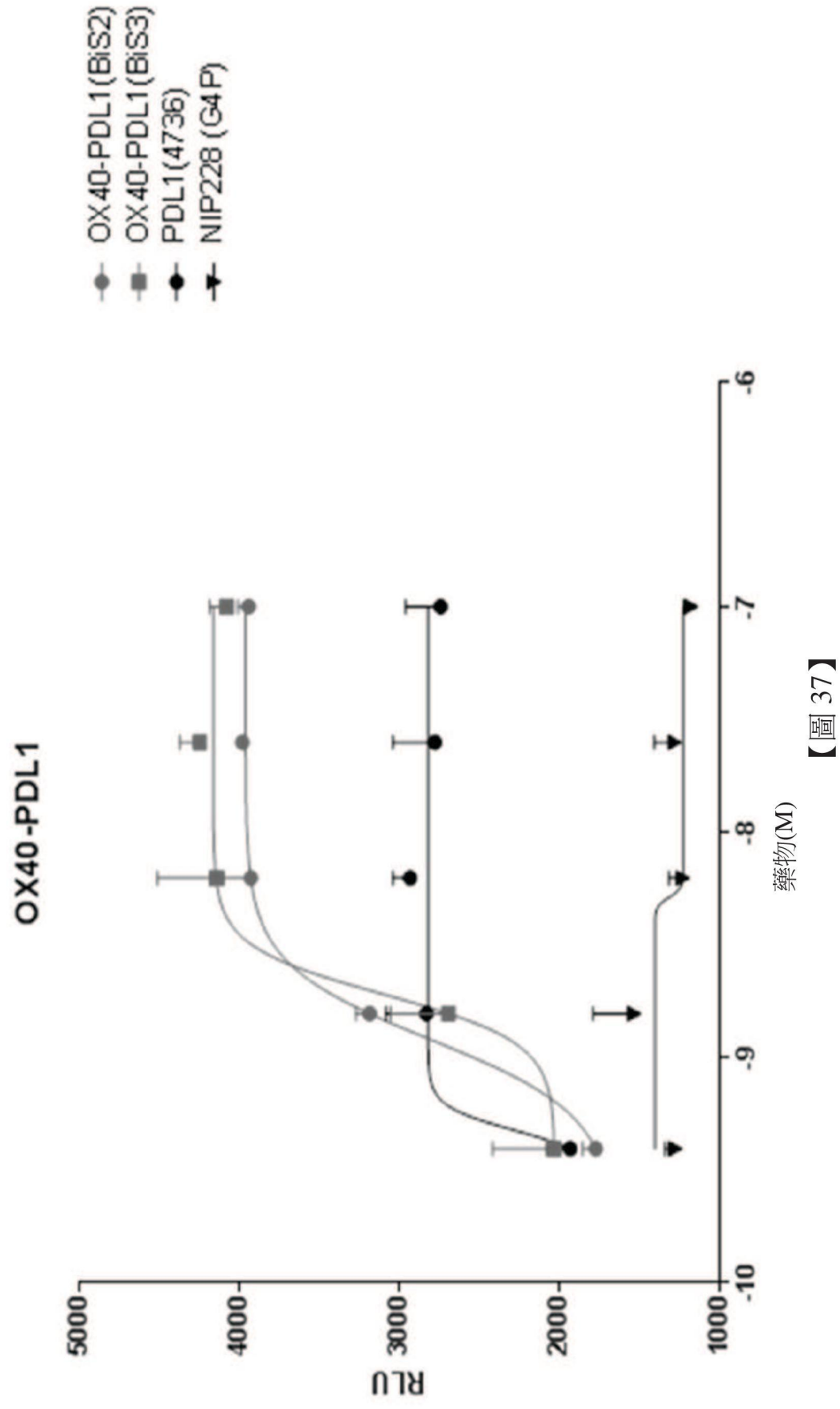
【圖 35】

A
供體 1
IL-2 (pg/ml)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
對照
0.01
0.1
1
10
100
1000
藥物(nM)
OX40-PDL1(BiS2)
OX40-PDL1(BiS3)
PDL1-OX40(BiS2)*
PDL1 + OX40
PDL1
OX40*
CTLA4 (MEDI-1123)
Colin
無藥物
*應注意 PDL1-OX40(BiS2) (220 nM)及 OX40 (533 nM) 之較低起始濃度

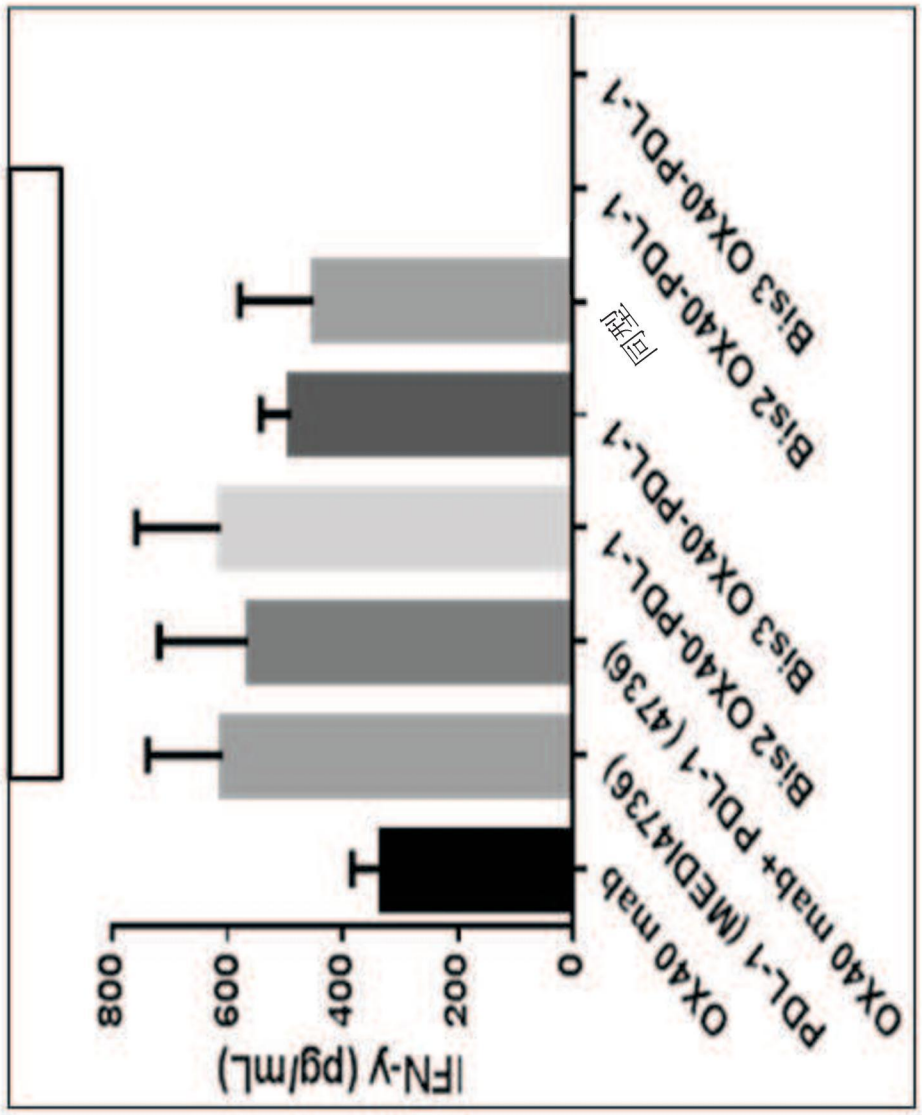
【圖 36】


B
供體 2
IL-2 (pg/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
對照
0.01
0.1
1
10
100
1000
藥物(nM)
OX40-PDL1(BiS2)
OX40-PDL1(BiS3)
PDL1-OX40(BiS2)*
PDL1 + OX40
PDL1
OX40*
CTLA4 (MEDI-1123)
Colin
無藥物
*應注意 PDL1-OX40(BiS2)
(220 nM)及 OX40 (533 nM)之
較低起始濃度

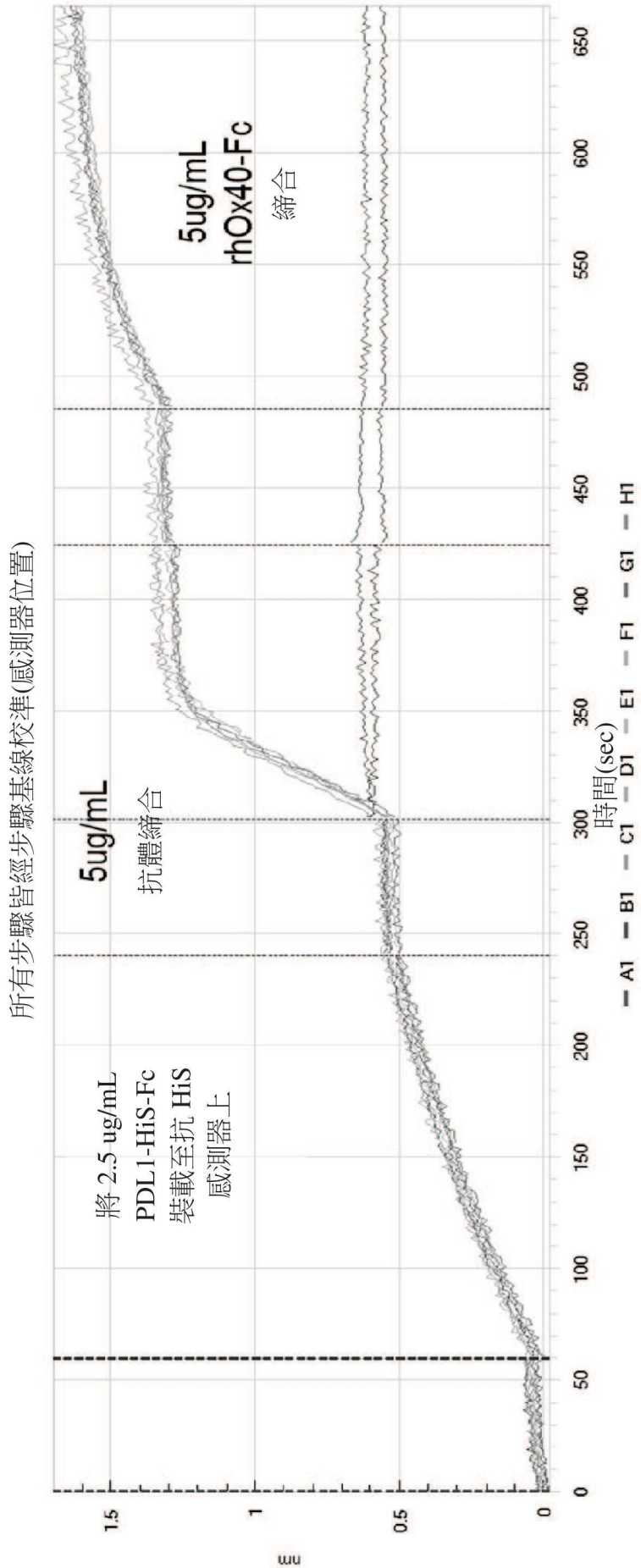
【圖 36】（續）


OX40-PDL1
OX40-PDL1(BiS2)
OX40-PDL1(BiS3)
PDL1(4736)
NIP228 (G4P)
RLU
5000
4000
3000
2000
1000
-10
-9
-8
-7
-6
藥物(M)

【圖 37】

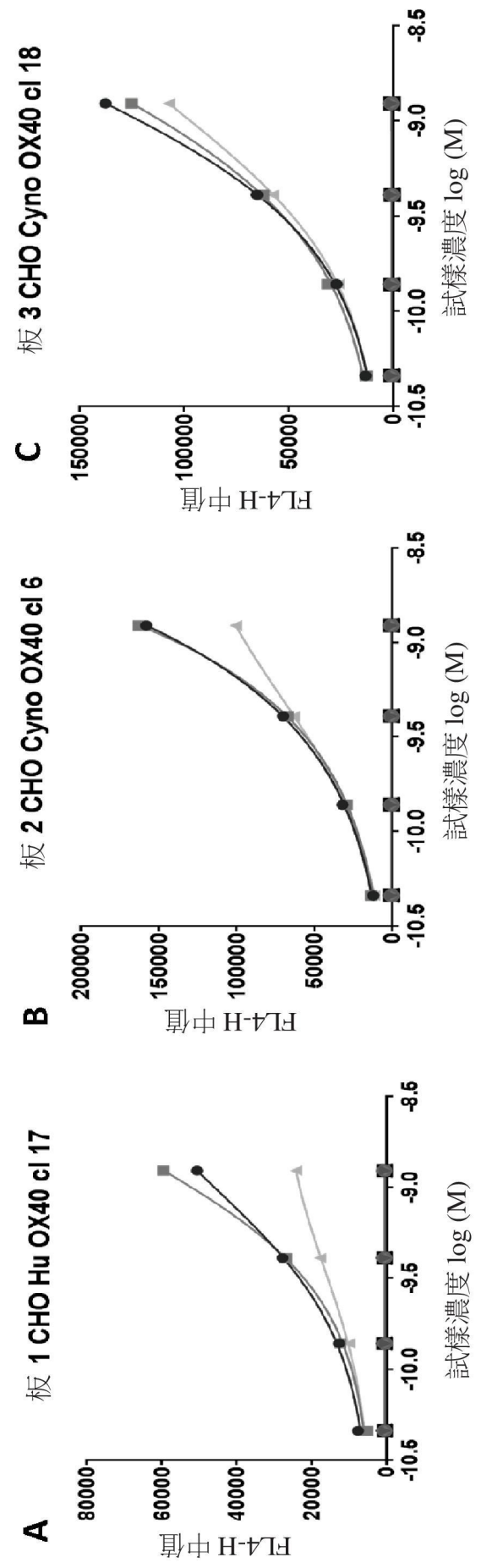

IFN-γ (pg/mL)
800
600
400
200
0
OX40 mab
PDL-1 (MEDI4736)
OX40 mab+ PDL-1 (4736)
Bis2 OX40-PDL-1
Bis3 OX40-PDL-1
同型
Bis2 OX40-PDL-1
Bis3 OX40-PDL-1

【圖 38】

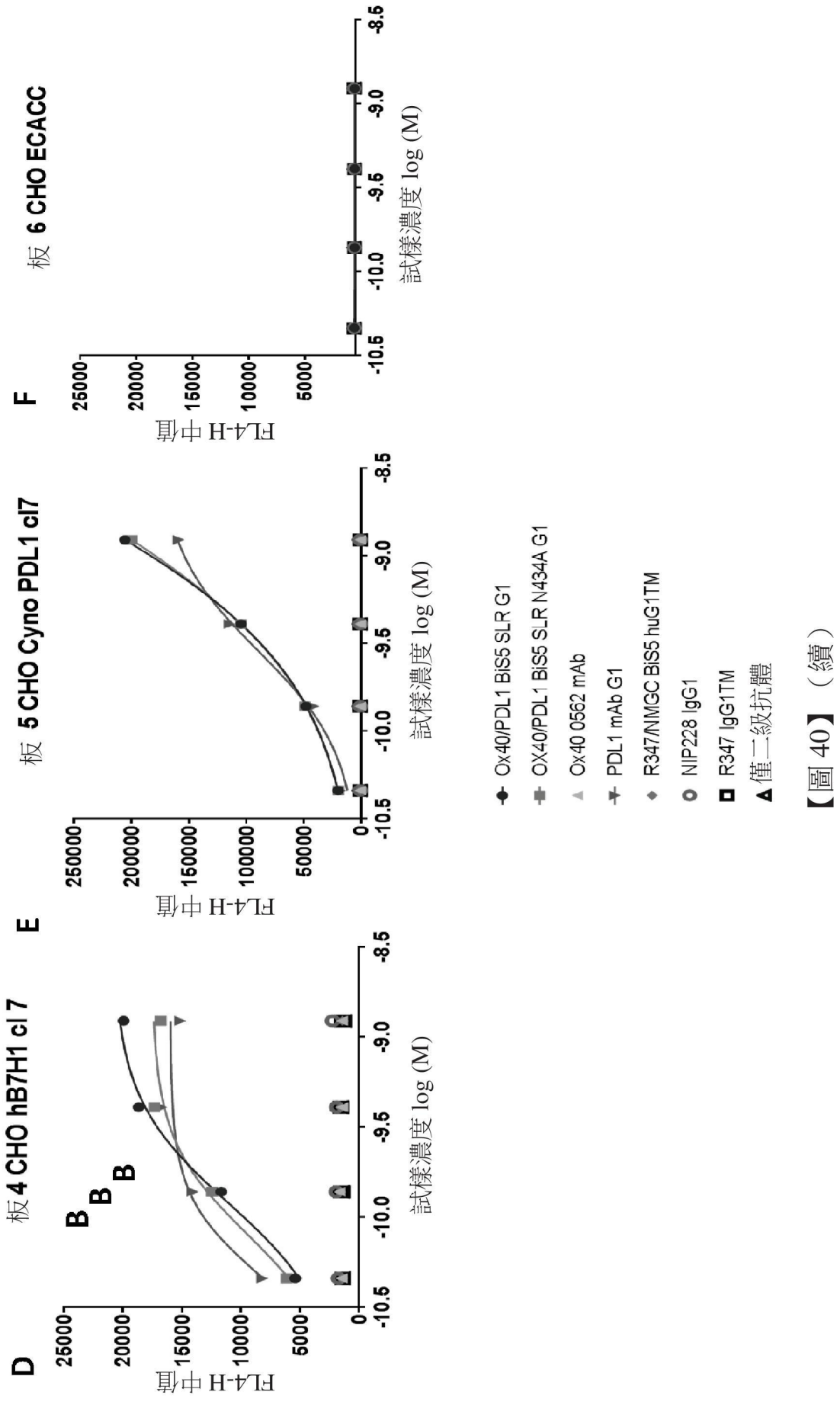


A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
BiS5 R347/nMGC G4P	BiS2 R347/OX40 G4P	BiS5 VH-VL YTE-G4P	BiS5 VH-VL N434A G1	BiS5 VH-VL N434A-G4P	BiS5 VH-VL G4P	BiS5 VL-VH G1	BiS5 VL-VH G4P

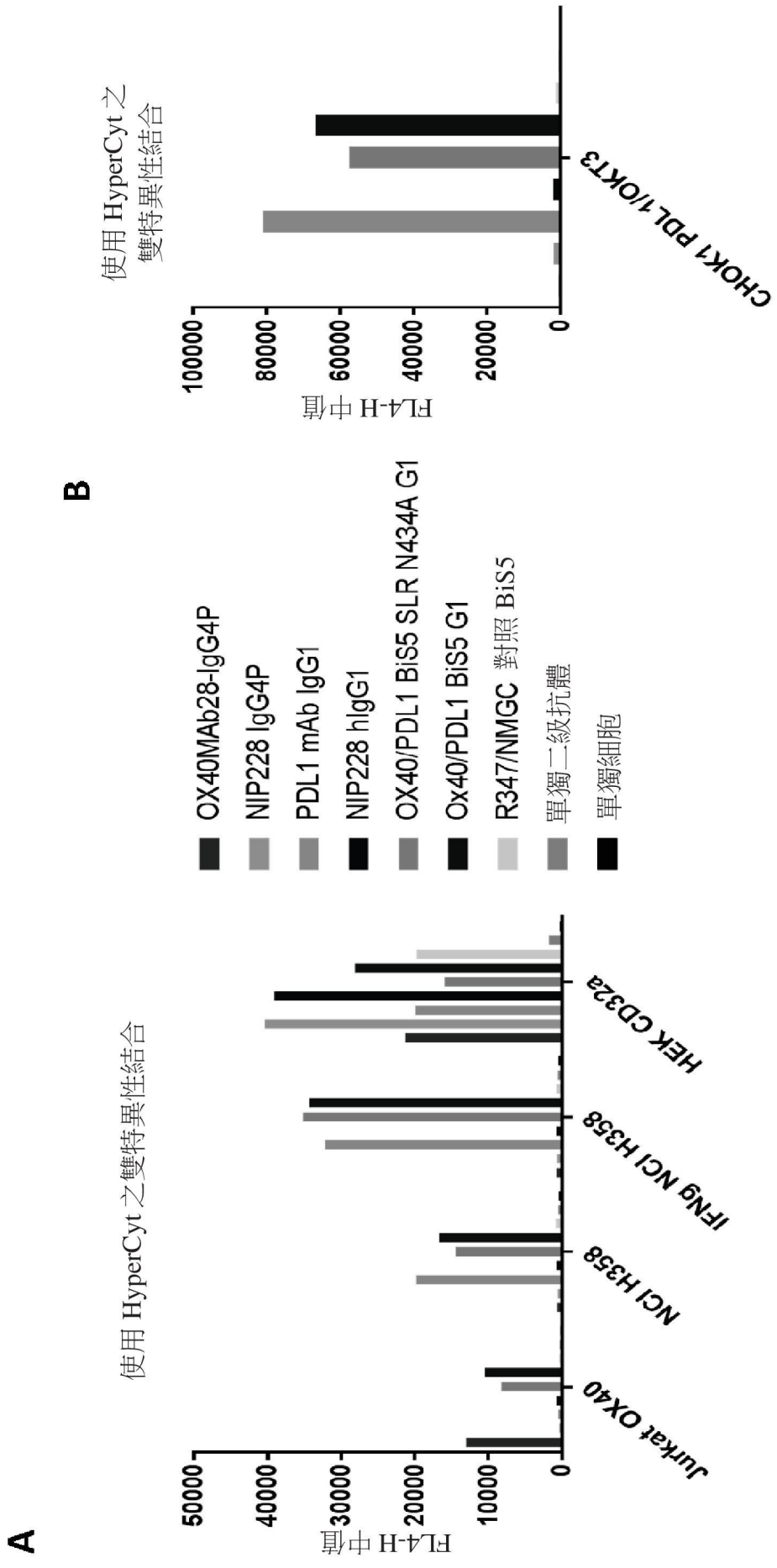
【圖 39】


A
板 1 CHO Hu OX40 cl 17
FL4-H 中值
試樣濃度 log (M)
B
板 2 CHO Cyno OX40 cl 6
FL4-H 中值
試樣濃度 log (M)
C
板 3 CHO Cyno OX40 cl 18
FL4-H 中值
試樣濃度 log (M)
Ox40/PDL1 BiS5 SLR G1
OX40/PDL1 BiS5 SLR N434A G1
Ox40 0562 mAb
PDL1 mAb G1
R347/NMGC BiS5 huG1TM
NIP228 lgG1
R347 lgG1TM
僅二級抗體

【圖 40】


D
板 4 CHO hB7H1 cl 7
E
板 5 CHO Cyno PDL1 cl7
F
板 6 CHO ECACC
FL4-H 中值
試樣濃度 log (M)
Ox40/PDL1 BiS5 SLR G1
OX40/PDL1 BiS5 SLR N434A G1
Ox40 0562 mAb
PDL1 mAb G1
R347/NMGC BiS5 huG1TM
NIP228 IgG1
R347 IgG1TM
僅二級抗體

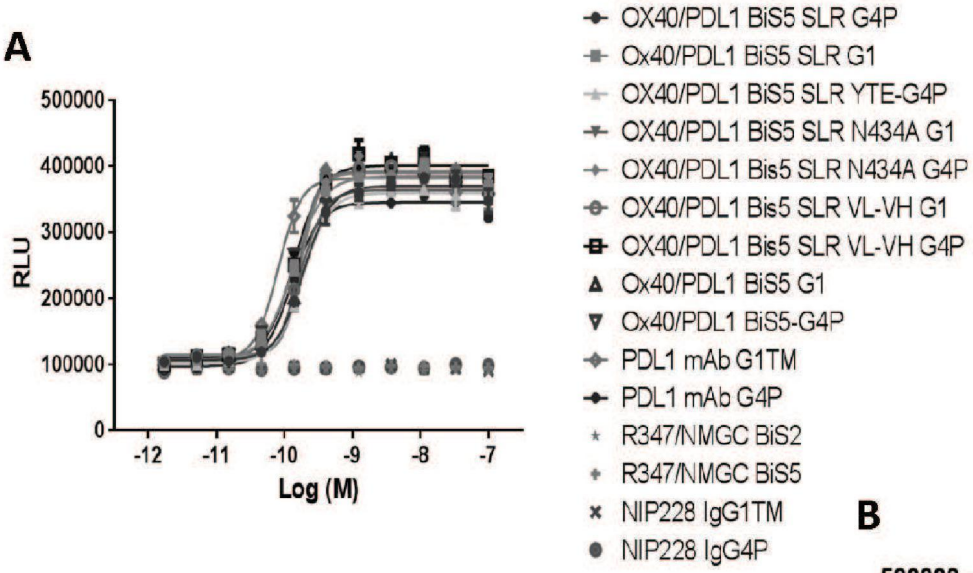
【圖 40】（續）


A
使用 HyperCyt 之雙特異性結合
FL4-H 中值
50000
40000
30000
20000
10000
0
Jurkat OX40
NCI H358
IFNg NCI H358
HEK CD32a
B
使用 HyperCyt 之
雙特異性結合
FL4-H 中值
100000
80000
60000
40000
20000
0
CHOK1 PDL1/OKT3
OX40MAb28-IgG4P
NIP228 IgG4P
PDL1 mAb IgG1
NIP228 hIgG1
OX40/PDL1 BiS5 SLR N434A G1
Ox40/PDL1 BiS5 G1
R347/NMGC 對照 BiS5
單獨二級抗體
單獨細胞

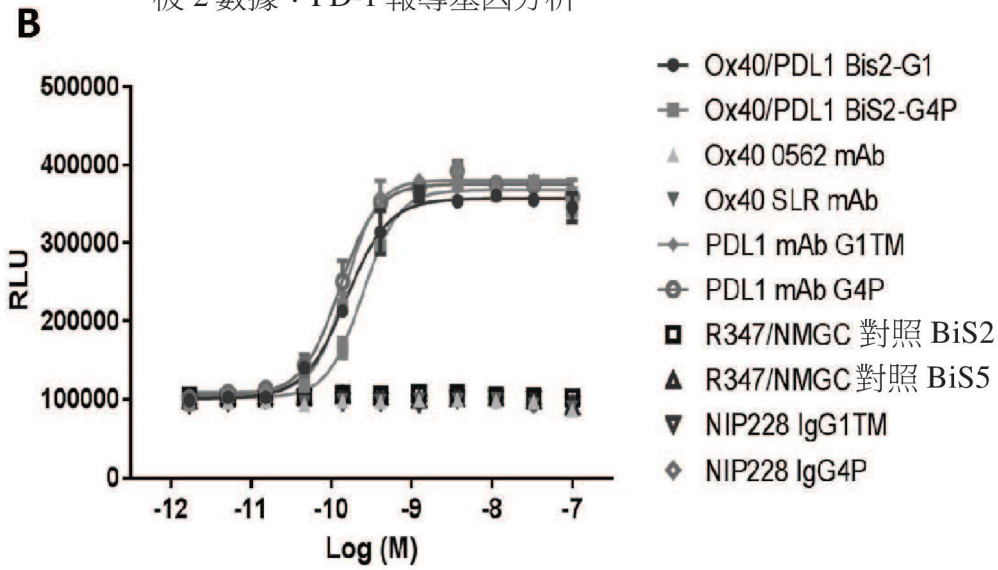
【圖 41】

106115065
C205563DA.pdf
表單編號 A0202
第 55 頁，共 109 頁(發明圖式)
1063276267-0

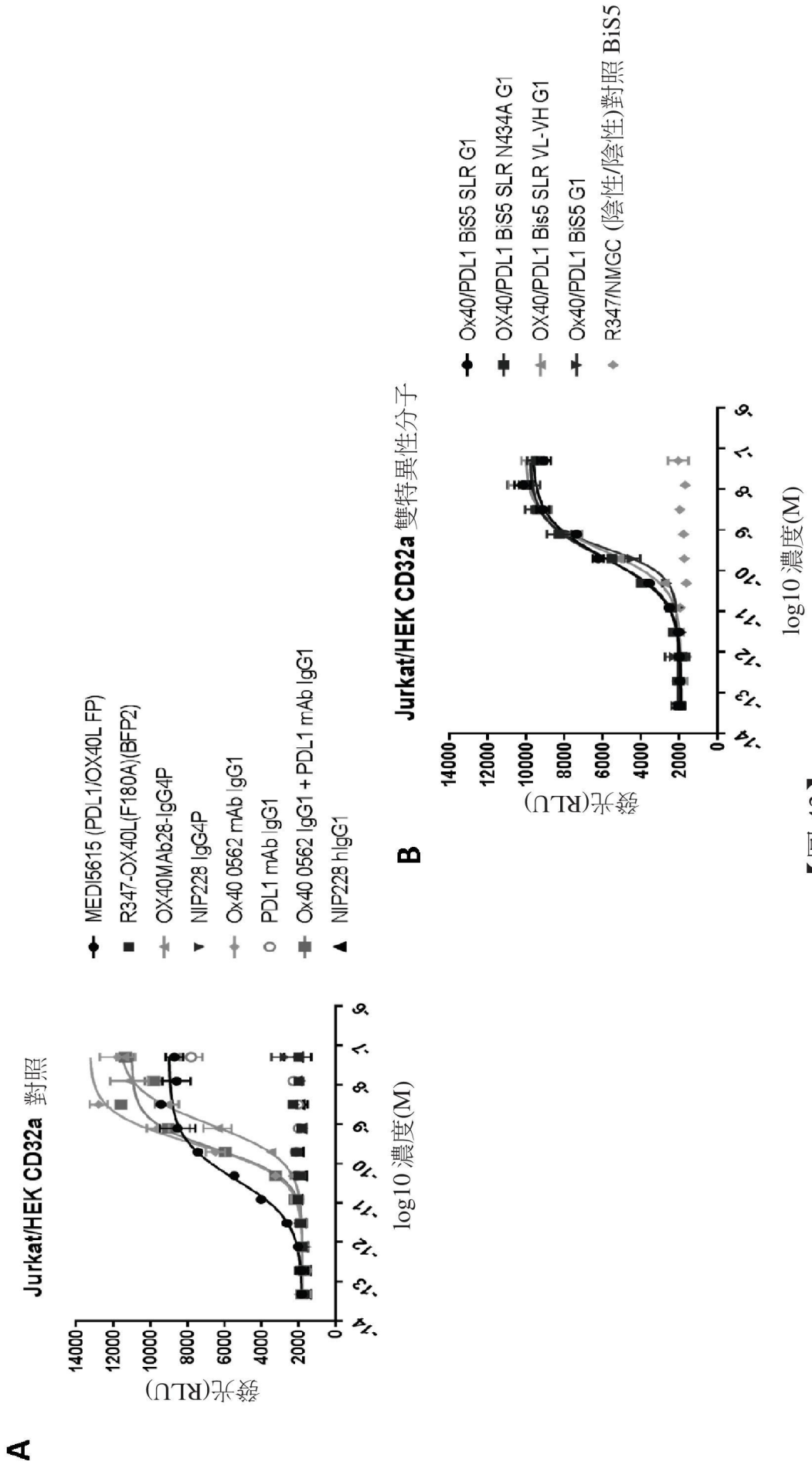
板 1 數據：PD-1 報導基因分析



板 2 數據：PD-1 報導基因分析



【圖 42】

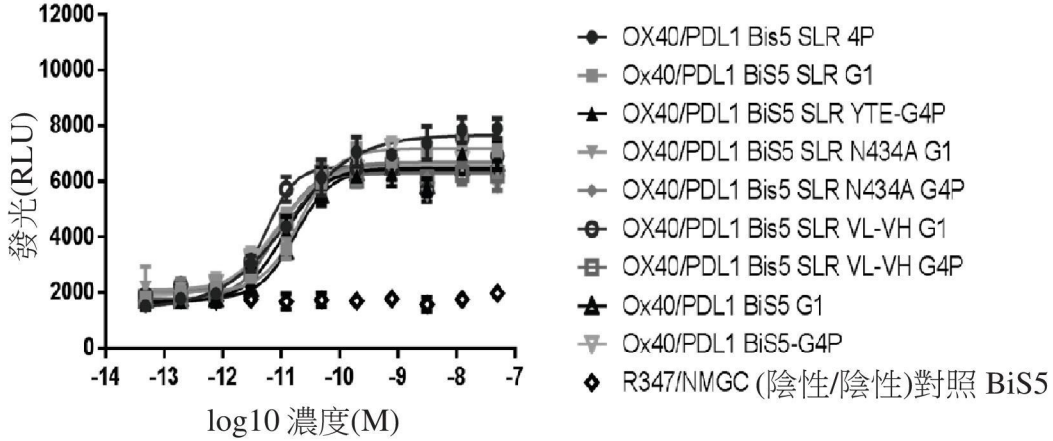

A
Jurkat/HEK CD32a 對照
MEDI5615 (PDL1/OX40L FP)
R347-OX40L(F180A)(BFP2)
OX40MAb28-IgG4P
NIP228 IgG4P
Ox40 0562 mAb IgG1
PDL1 mAb IgG1
Ox40 0562 IgG1 + PDL1 mAb IgG1
NIP228 hIgG1
發光(RLU)
log10 濃度(M)
B
Jurkat/HEK CD32a 雙特異性分子
Ox40/PDL1 BiS5 SLR G1
OX40/PDL1 BiS5 SLR N434A G1
OX40/PDL1 Bis5 SLR VL-VH G1
Ox40/PDL1 BiS5 G1
R347/NMGC (陰性/陰性)對照 BiS5
發光(RLU)
log10 濃度(M)

【圖 43】

106115065
C205563DA.pdf
表單編號 A0202
第 57 頁，共 109 頁(發明圖式)
1063276267-0

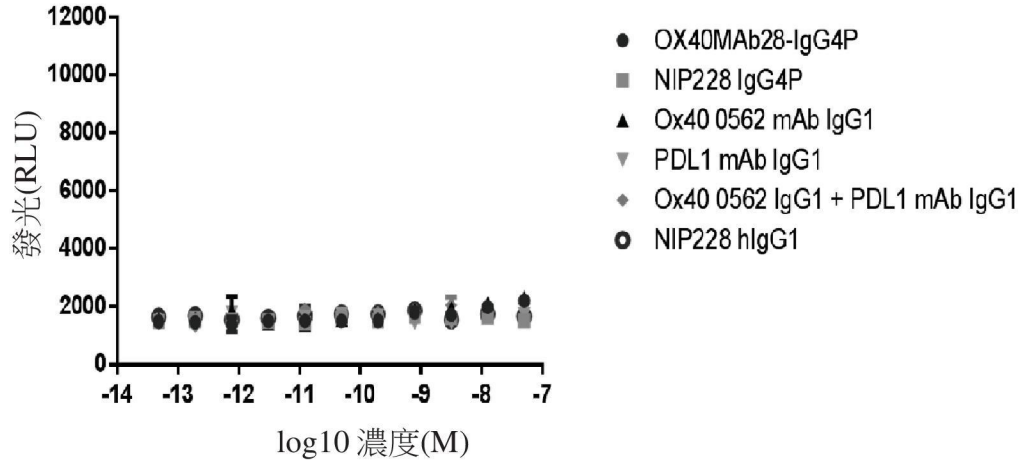
A

Jurkat OX40/CHOK1 分析 OX40/PDL1 雙特異性分子

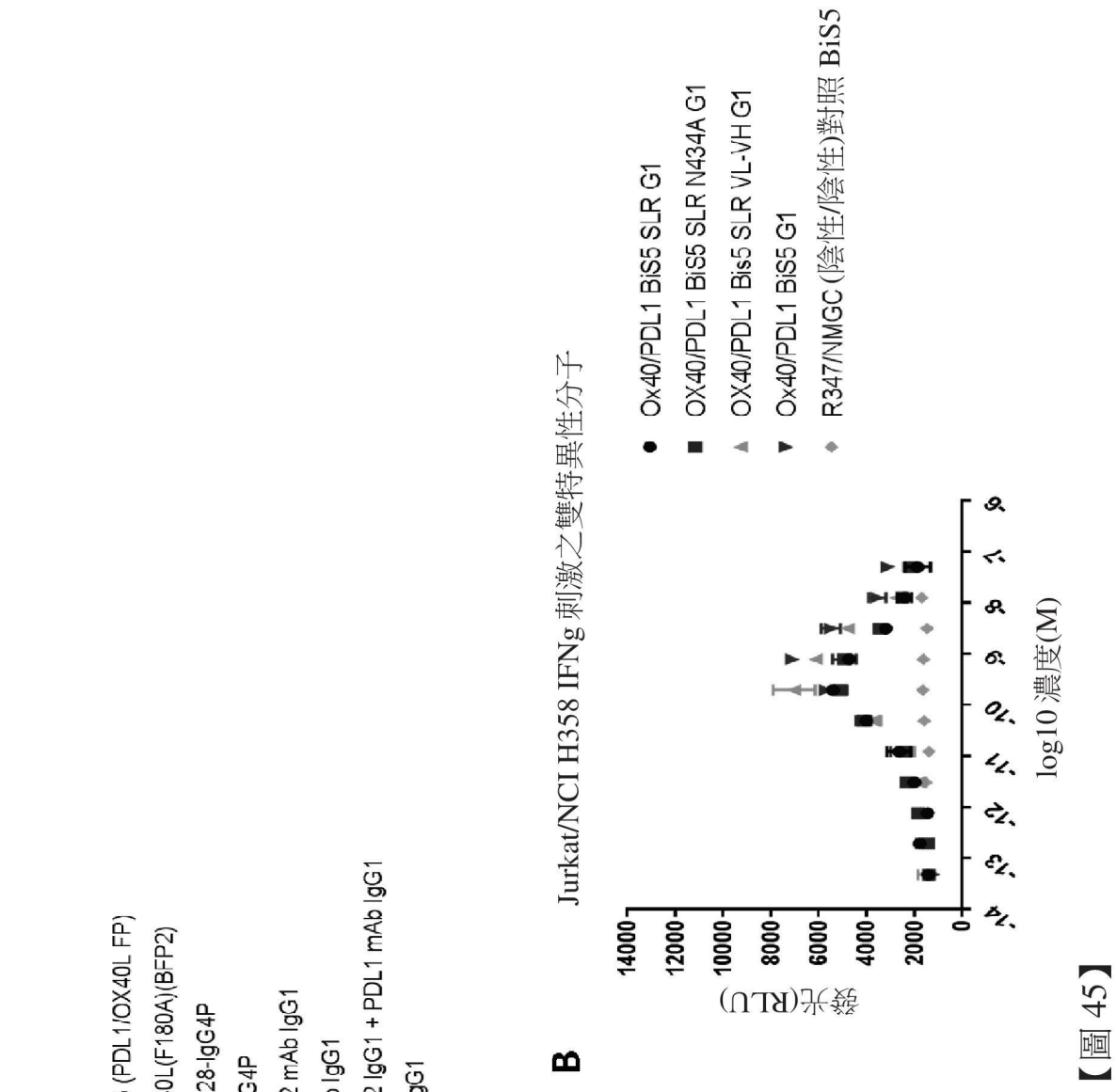


B

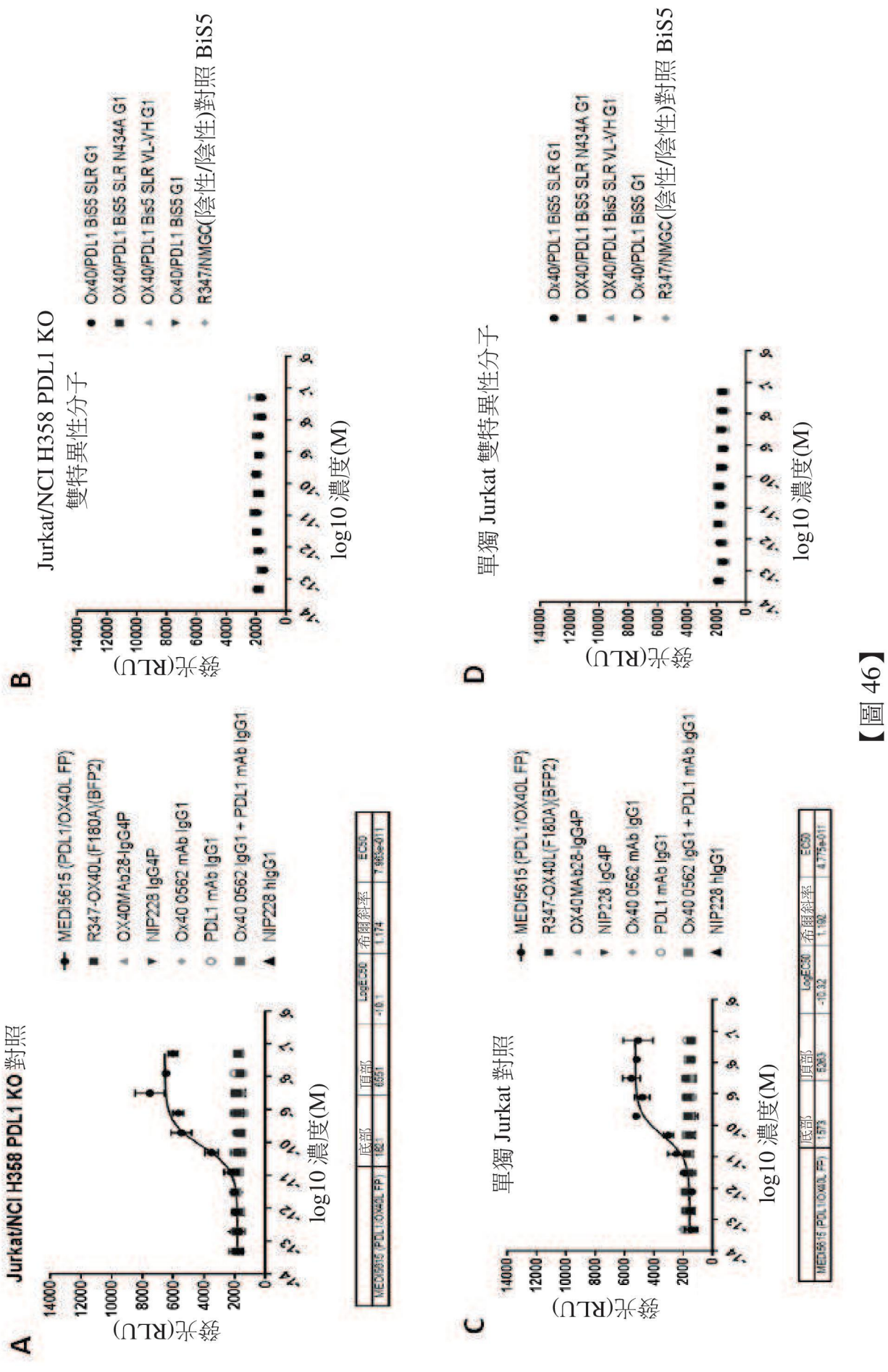
Jurkat OX40/CHOK1 分析 OX40/PDL1 IgG



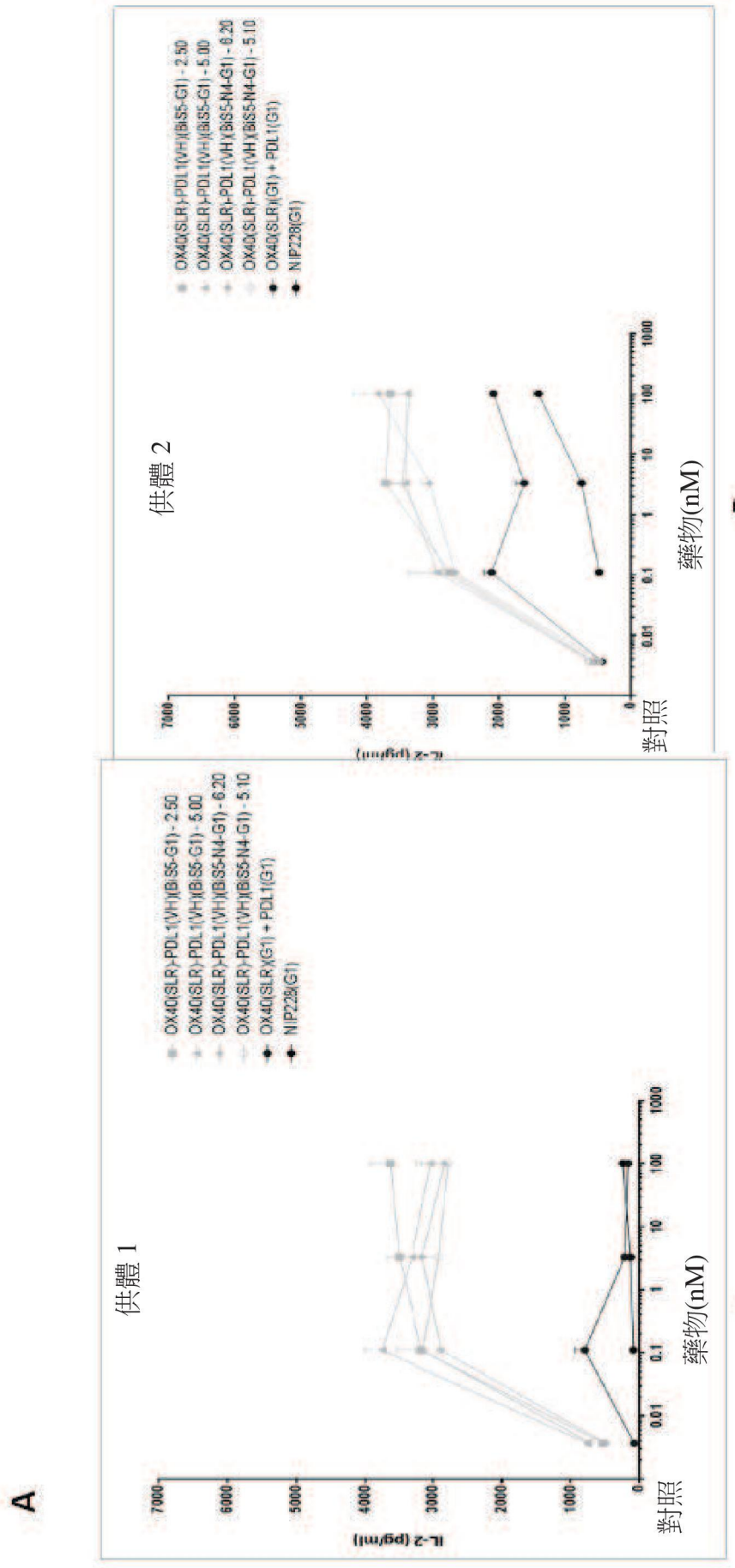
【圖 44】


A
Jurkat/NCI H358 IFNg 刺激之對照
MEDI5615 (PDL1/OX40L FP)
R347-OX40L(F180A)(BFP2)
OX40MAb28-IgG4P
NIP228 IgG4P
Ox40 0562 mAb IgG1
PDL1 mAb IgG1
Ox40 0562 IgG1 + PDL1 mAb IgG1
NIP228 hIgG1
發光(RLU)
log10 濃度(M)
B
Jurkat/NCI H358 IFNg 刺激之雙特異性分子
Ox40/PDL1 BiS5 SLR G1
OX40/PDL1 BiS5 SLR N434A G1
OX40/PDL1 Bis5 SLR VL-VH G1
Ox40/PDL1 BiS5 G1
R347/NMGC (陰性/陰性)對照 BiS5
發光(RLU)
log10 濃度(M)

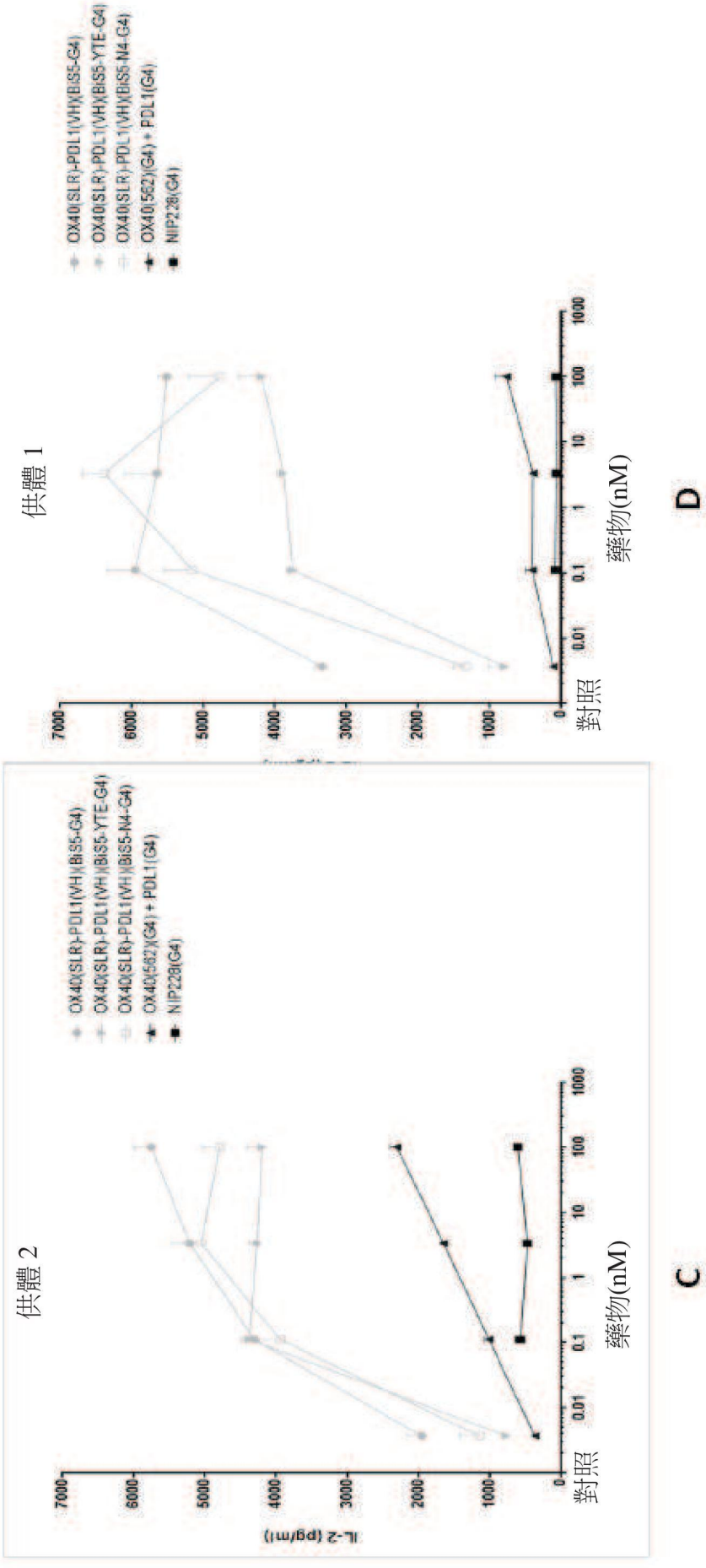
【圖 45】


A
Jurkat/NCI H358 PDL1 KO 對照
MEDI5615 (PDL1/OX40L FP)
R347-OX40L(F180A)(BFP2)
OX40MAb28-IgG4P
NIP228 IgG4P
Ox40 0562 mAb IgG1
PDL1 mAb IgG1
Ox40 0562 IgG1 + PDL1 mAb IgG1
NIP228 hIgG1
底部 頂部 LogEC50 希爾斜率 EC50
MEDI5615 (PDL1/OX40L FP) 1821 6551 -10.1 1.174 7.985e-011
發光(RLU)
log10 濃度(M)
B
Jurkat/NCI H358 PDL1 KO
雙特異性分子
Ox40/PDL1 BiS5 SLR G1
OX40/PDL1 BiS5 SLR N434A G1
OX40/PDL1 Bis5 SLR VL-VH G1
Ox40/PDL1 BiS5 G1
R347/NMGC(陰性/陰性)對照 BiS5
發光(RLU)
log10 濃度(M)
C
單獨 Jurkat 對照
MEDI5615 (PDL1/OX40L FP)
R347-OX40L(F180A)(BFP2)
OX40MAb28-IgG4P
NIP228 IgG4P
Ox40 0562 mAb IgG1
PDL1 mAb IgG1
Ox40 0562 IgG1 + PDL1 mAb IgG1
NIP228 hIgG1
底部 頂部 LogEC50 希爾斜率 EC50
MEDI5615 (PDL1/OX40L FP) 1573 8383 -10.32 1.192 4.775e-011
發光(RLU)
log10 濃度(M)
D
單獨 Jurkat 雙特異性分子
Ox40/PDL1 BiS5 SLR G1
OX40/PDL1 BiS5 SLR N434A G1
OX40/PDL1 Bis5 SLR VL-VH G1
Ox40/PDL1 BiS5 G1
R347/NMGC(陰性/陰性)對照 BiS5
發光(RLU)
log10 濃度(M)

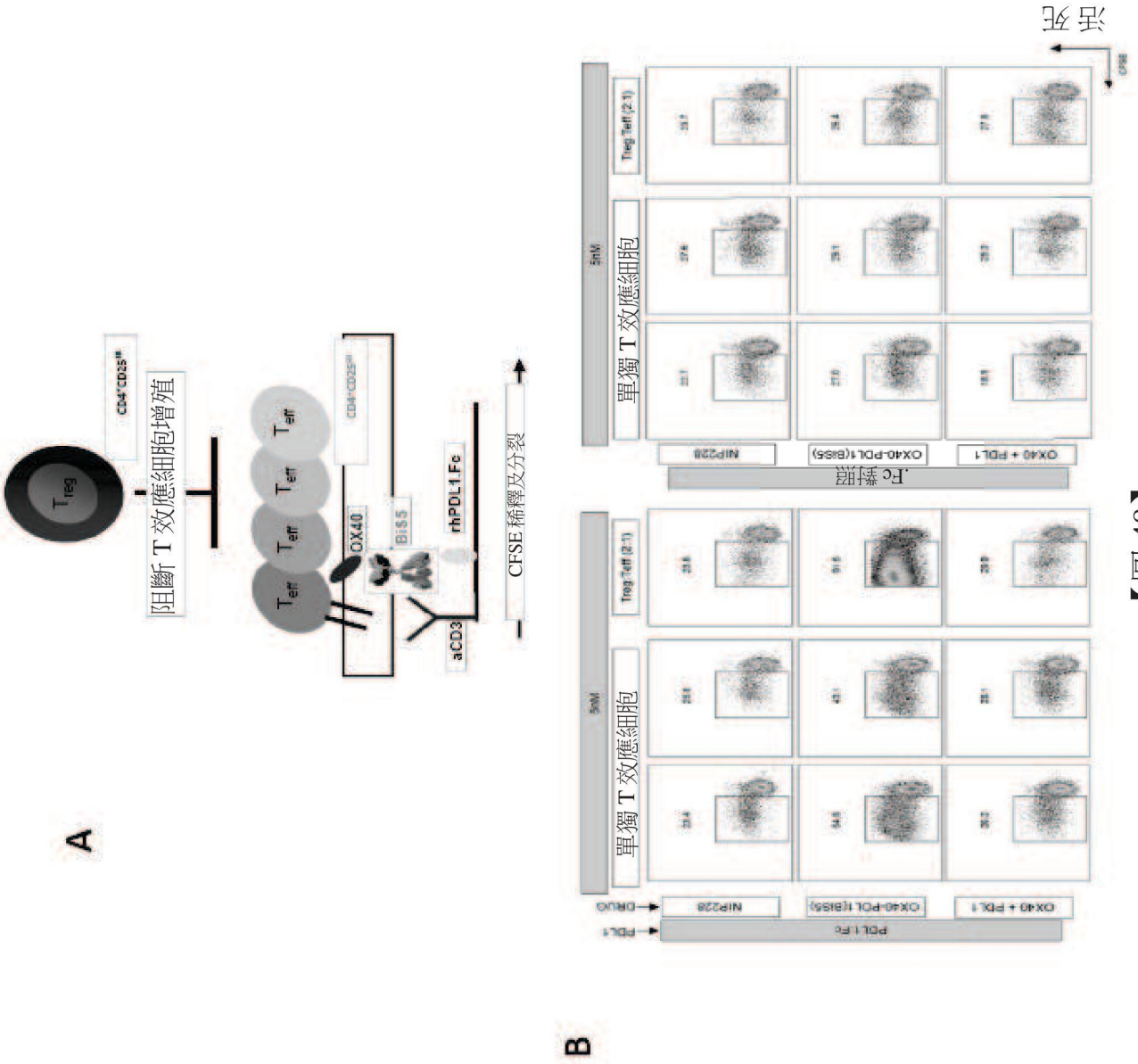
【圖 46】


A
供體 1
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BiS5-G1) - 2.50
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BiS5-G1) - 5.00
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BiS5-N4-G1) - 6.20
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BiS5-N4-G1) - 5.10
OX40(SLR)(G1) + PDL1(G1)
NIP228(G1)
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
對照
A
供體 2
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BiS5-G1) - 2.50
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BiS5-G1) - 5.00
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BiS5-N4-G1) - 6.20
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BiS5-N4-G1) - 5.10
OX40(SLR)(G1) + PDL1(G1)
NIP228(G1)
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
對照
B

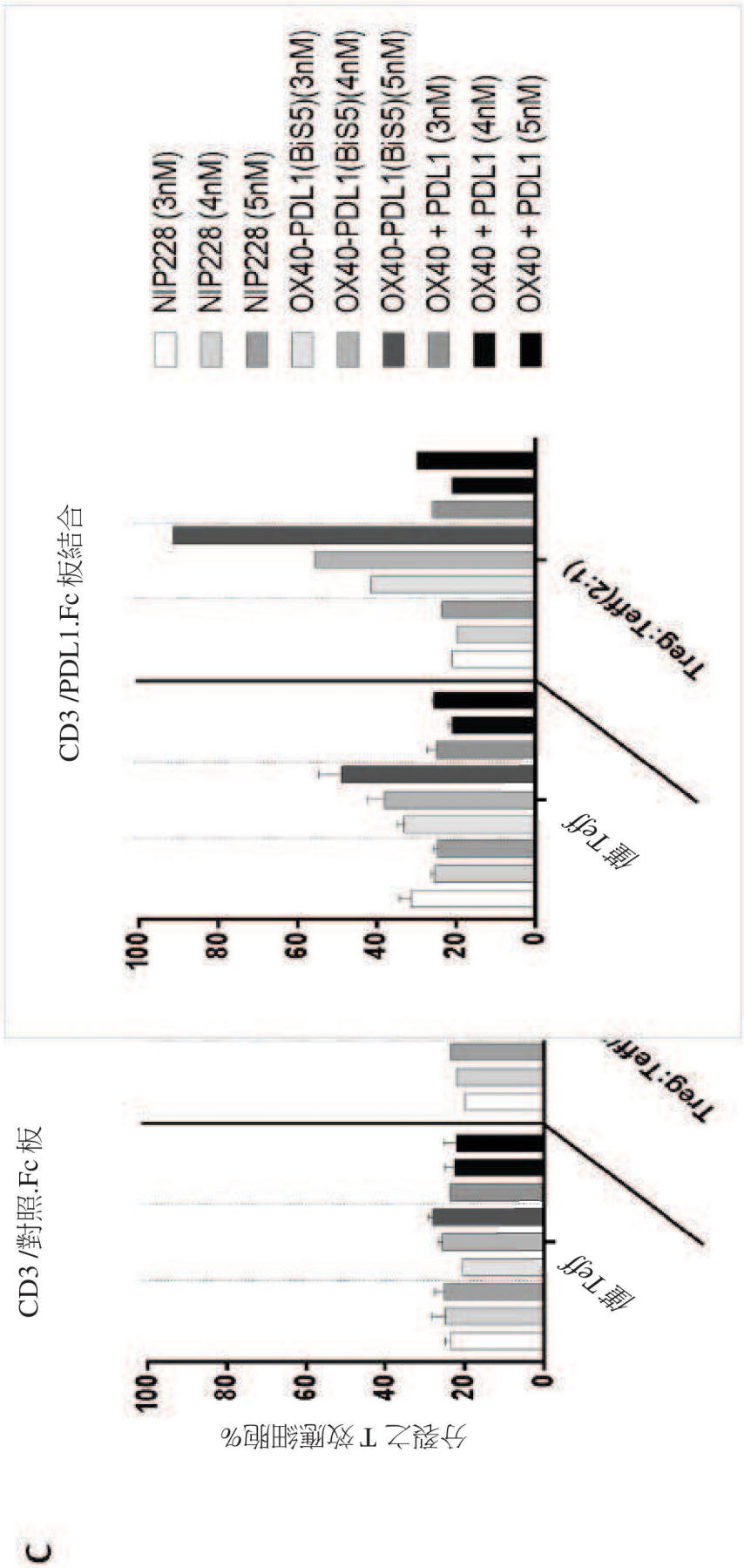
【圖 47】


供體 2
IL-2 (pg/ml)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
對照
0.01
0.1
1
10
100
1000
藥物(nM)
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BiS5-G4)
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BiS5-YTE-G4)
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BiS5-N4-G4)
OX40(562)(G4) + PDL1(G4)
NIP228(G4)
C
供體 1
D

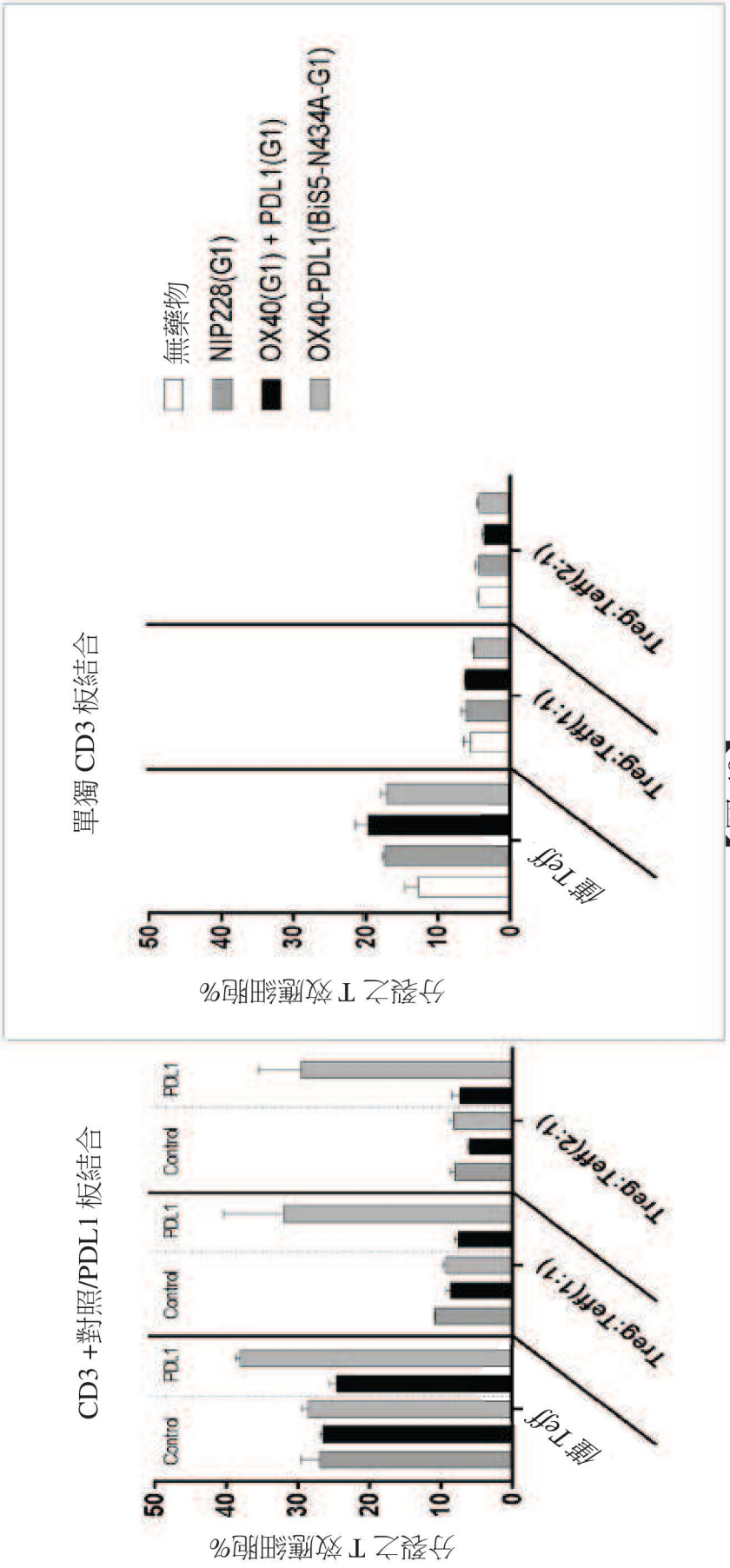
【圖 47】（續）


A
阻斷 T 效應細胞增殖
CD4+CD25hi
Treg
Teff
OX40
Bi8S
rhPDL1.Fc
aCD3
CFSE 稀釋及分裂
B
單獨 T 效應細胞
Treg Teff (2:1)
5nM
PDL1
DRUG
NIP228
OX40-PDL1(Bi8S)
OX40 + PDL1
PDL1.Fc
Fc 對照
活死

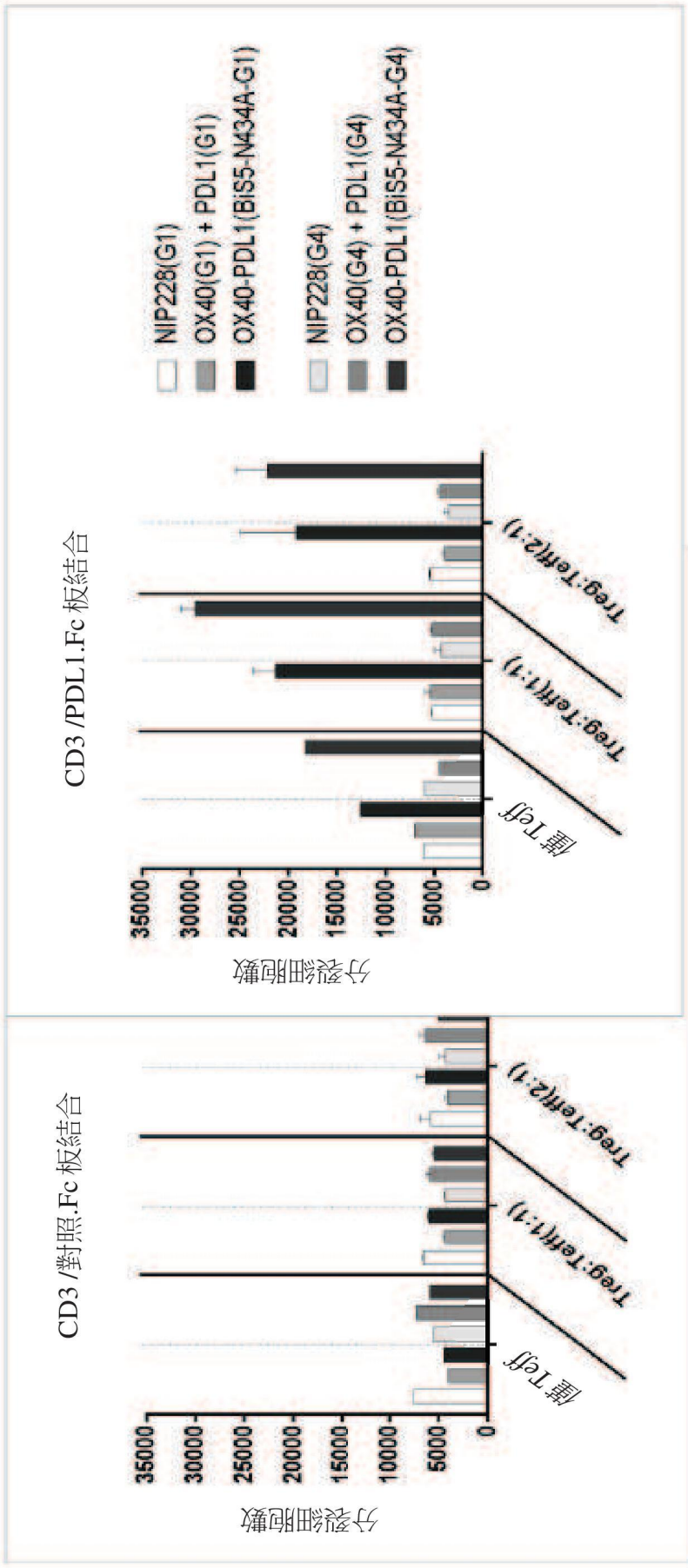
【圖 48】


C
分裂之 T 效應細胞%
CD3 /對照.Fc 板
CD3 /PDL1.Fc 板結合
NIP228 (3nM)
NIP228 (4nM)
NIP228 (5nM)
OX40-PDL1(BiS5)(3nM)
OX40-PDL1(BiS5)(4nM)
OX40-PDL1(BiS5)(5nM)
OX40 + PDL1 (3nM)
OX40 + PDL1 (4nM)
OX40 + PDL1 (5nM)
Treg:Teff(2:1)
Treg:Teff
Teff
0
20
40
60
80
100

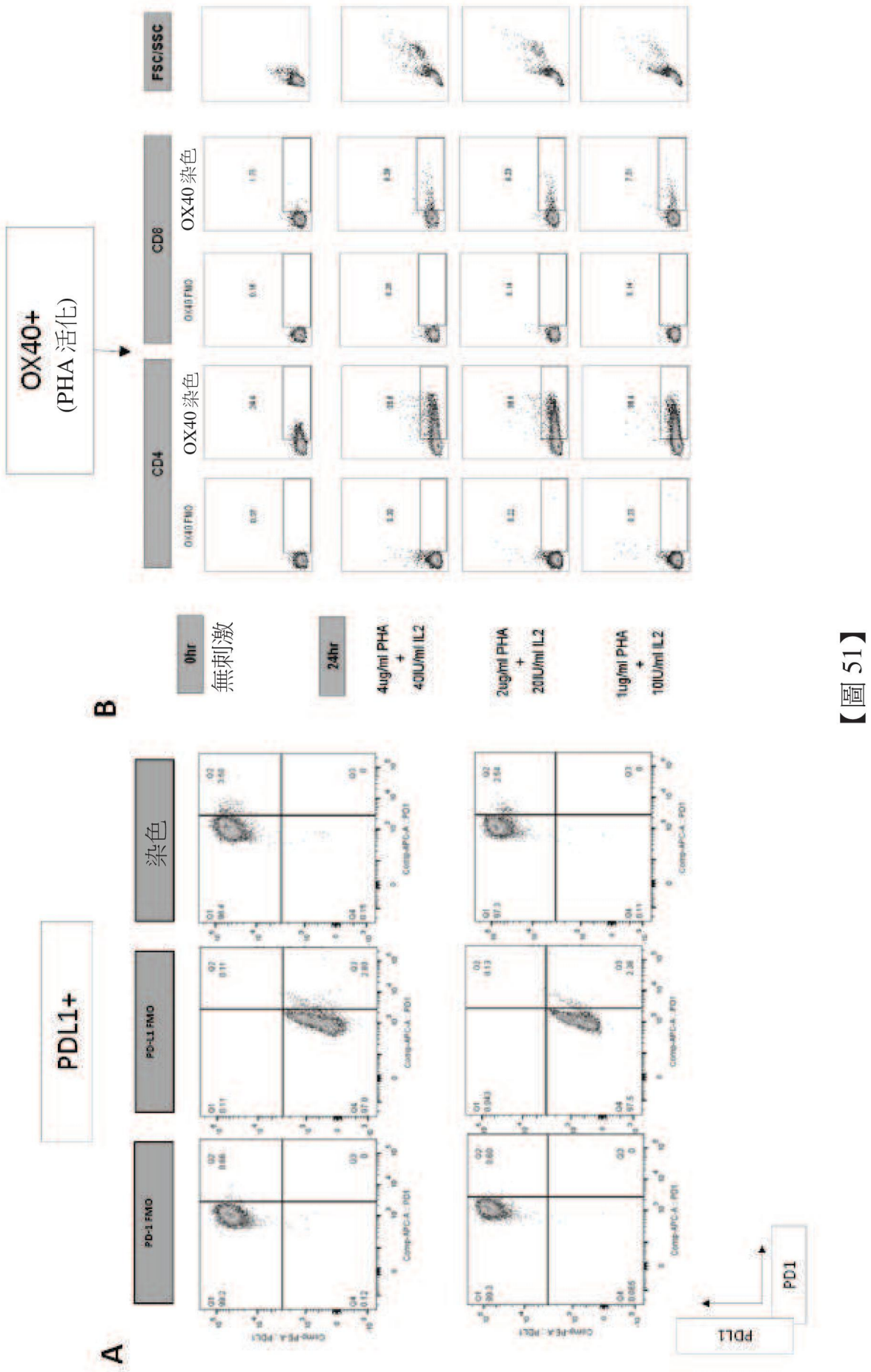
【圖 48】（續）


CD3 +對照/PDL1 板結合
分裂之 T 效應細胞%
50
40
30
20
10
0
Control
PDL1
Control
PDL1
Control
PDL1
Treg:Teff(2:1)
Treg:Teff(1:1)
Treg:Teff(2:1)
單獨 CD3 板結合
分裂之 T 效應細胞%
50
40
30
20
10
0
無藥物
NIP228(G1)
OX40(G1) + PDL1(G1)
OX40-PDL1(BiS5-N434A-G1)
Teff
Treg:Teff(1:1)
Treg:Teff(2:1)

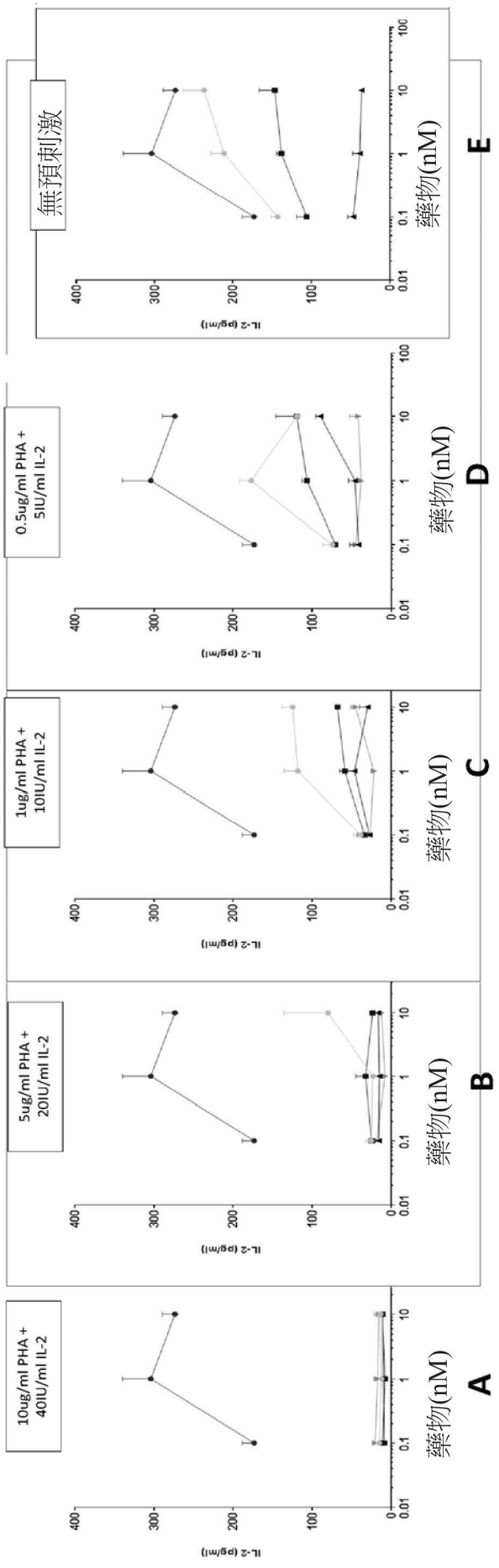
【圖 49】


NIP228(G1)
OX40(G1) + PDL1(G1)
OX40-PDL1(BIS5-N434A-G1)
NIP228(G4)
OX40(G4) + PDL1(G4)
OX40-PDL1(BIS5-N434A-G4)
CD3 /PDL1.Fc 板結合
CD3 /對照.Fc 板結合
分裂細胞數
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
單Teff
Treg:Teff(1:1)
Treg:Teff(2:1)

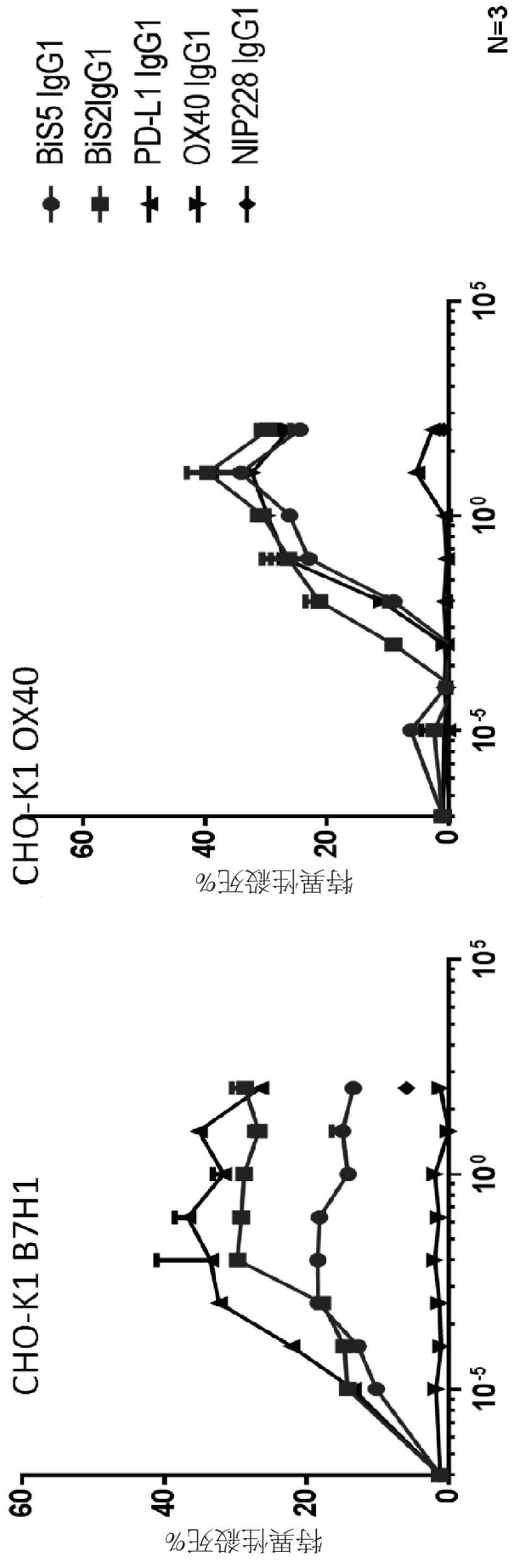
【圖 50】


A
PDL1+
PD-1 FMO
PD-L1 FMO
染色
PDL1
PD1
B
OX40+
(PHA 活化)
CD4
CD8
OX40 染色
OX40 FMO
FSC/SSC
0hr
無刺激
24hr
4ug/ml PHA
+
40IU/ml IL2
2ug/ml PHA
+
20IU/ml IL2
1ug/ml PHA
+
10IU/ml IL2

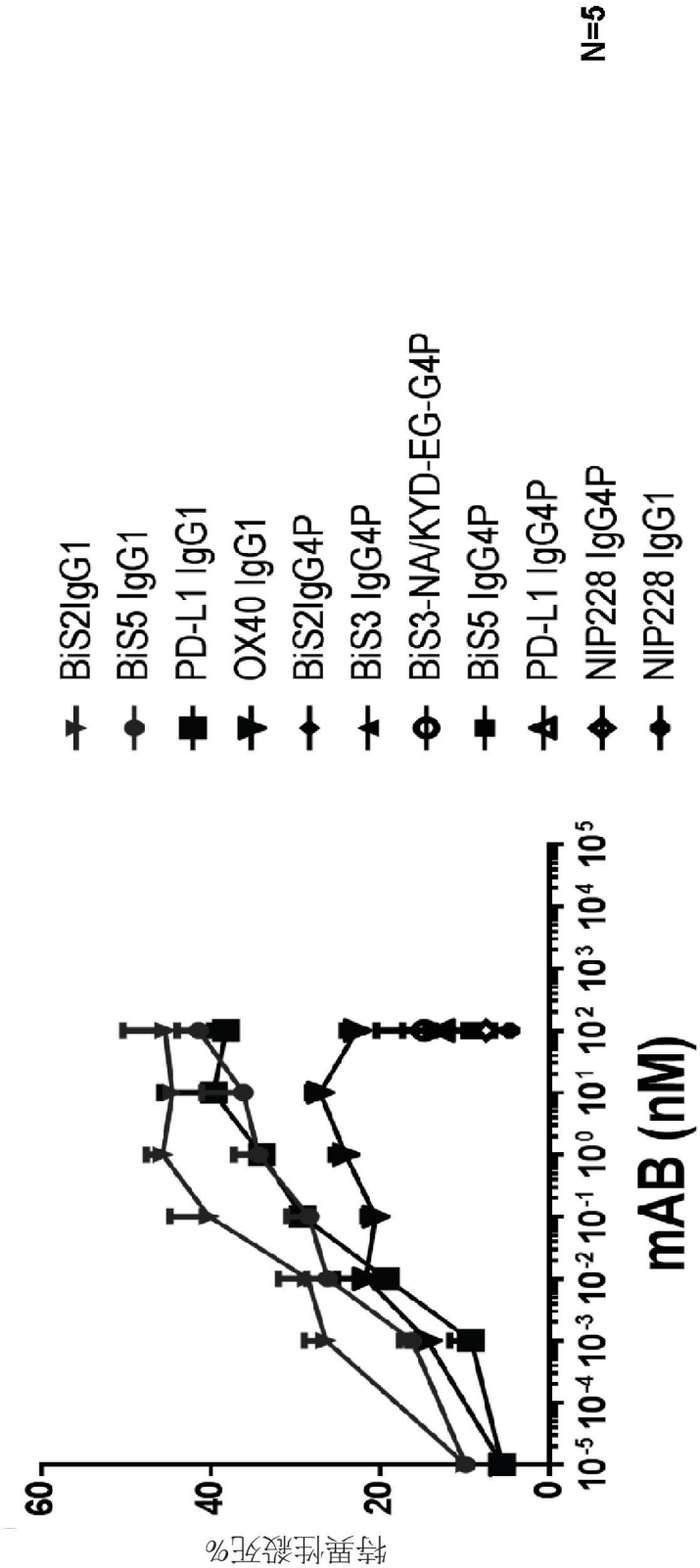
【圖 51】


10ug/ml PHA + 40IU/ml IL-2
5ug/ml PHA + 20IU/ml IL-2
1ug/ml PHA + 10IU/ml IL-2
0.5ug/ml PHA + 5IU/ml IL-2
無預刺激
IL-2 (pg/ml)
藥物(nM)
A
B
C
D
E
OX40-PDL1 BiS5(G1)
OX40(G1) + PDL1(G1)
NIP228(G1)
無藥物
PDL1-OX40L(G4)

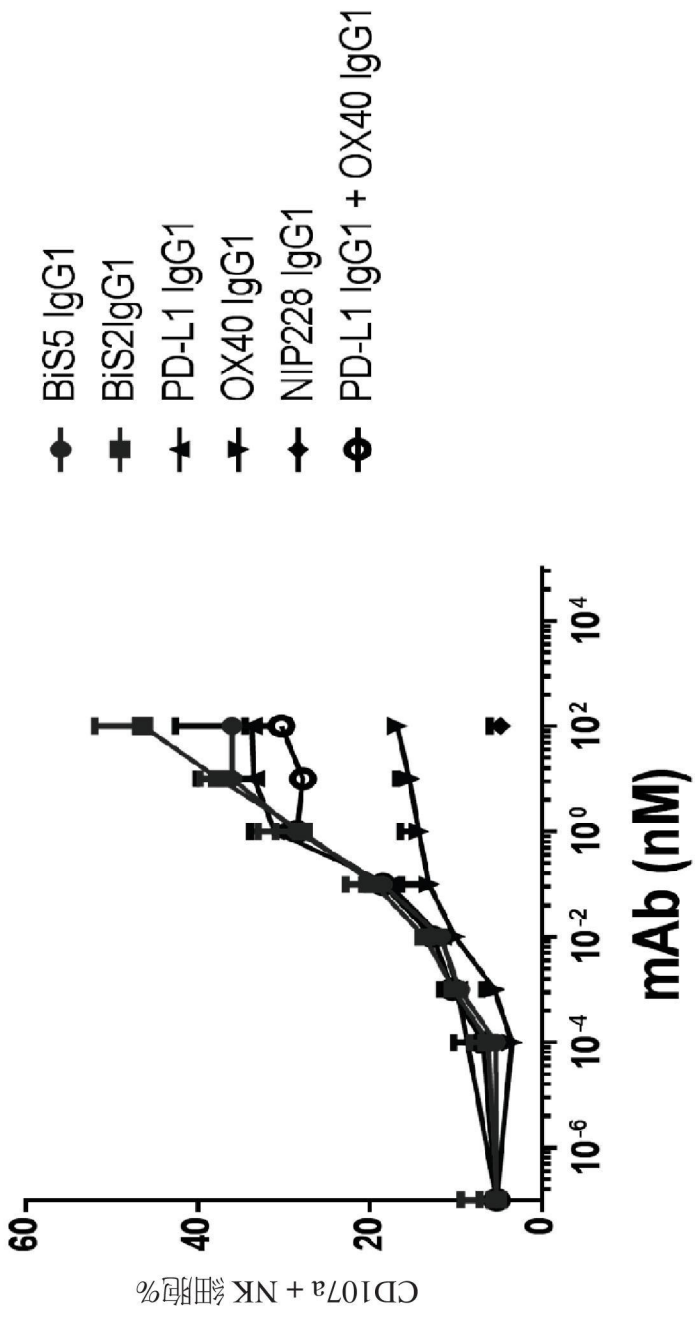
【圖 52】


BiS5 IgG1
BiS2IgG1
PD-L1 IgG1
OX40 IgG1
NIP228 IgG1
N=3
CHO-K1 B7H1
CHO-K1 OX40
特異性殺死%
mAB (nM)
A
B

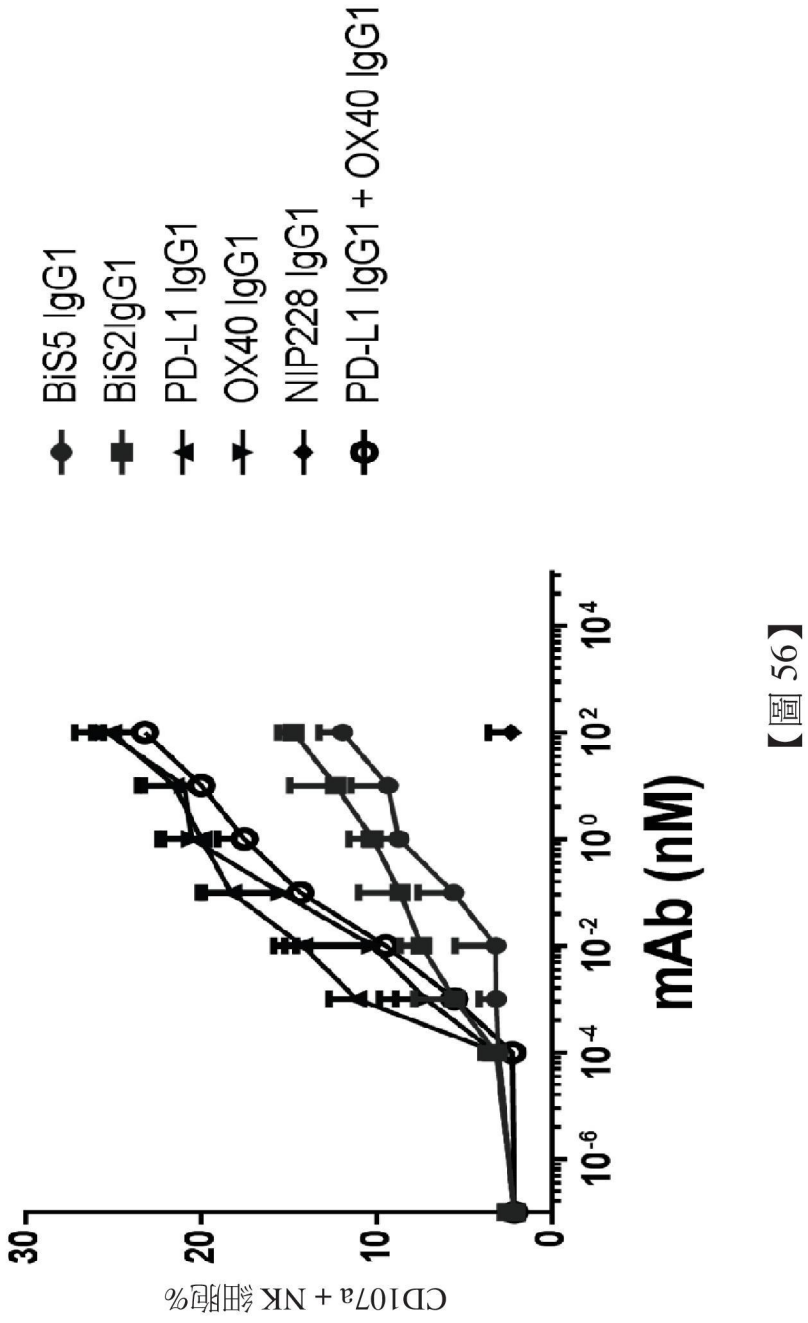
【圖 53】


BiS2IgG1
BiS5 IgG1
PD-L1 IgG1
OX40 IgG1
BiS2IgG4P
BiS3 IgG4P
BiS3-NA/KYD-EG-G4P
BiS5 IgG4P
PD-L1 IgG4P
NIP228 IgG4P
NIP228 IgG1
N=5
特異性殺死%
0
20
40
60
10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101 102 103 104 105
mAB (nM)

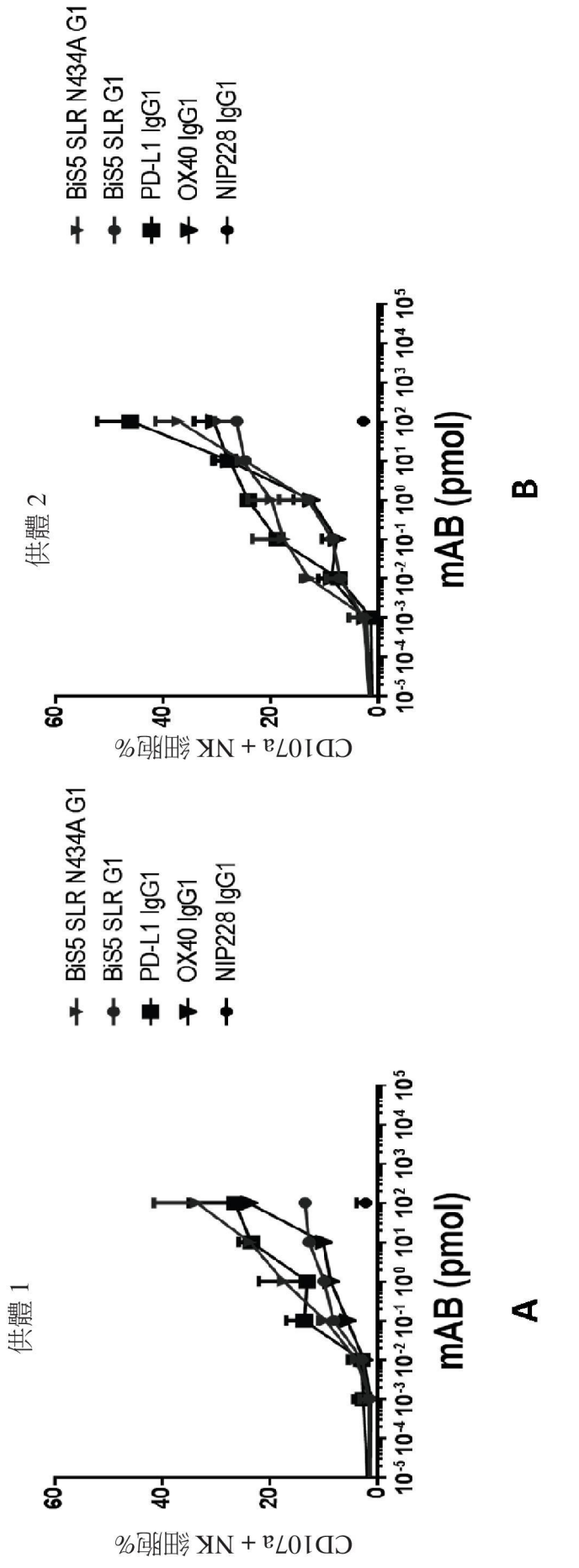
【圖 54】


BiS5 IgG1
BiS2IgG1
PD-L1 IgG1
OX40 IgG1
NIP228 IgG1
PD-L1 IgG1 + OX40 IgG1
CD107a + NK 細胞%
0
20
40
60
10-6
10-4
10-2
100
102
104
mAb (nM)

【圖 55】


BiS5 IgG1
BiS2IgG1
PD-L1 IgG1
OX40 IgG1
NIP228 IgG1
PD-L1 IgG1 + OX40 IgG1
CD107a + NK 細胞%
0
10
20
30
10-6
10-4
10-2
100
102
104
mAb (nM)

【圖 56】


供體 1
供體 2
CD107a + NK 細胞%
mAB (pmol)
BiS5 SLR N434A G1
BiS5 SLR G1
PD-L1 IgG1
OX40 IgG1
NIP228 IgG1
A
B

【圖 57】

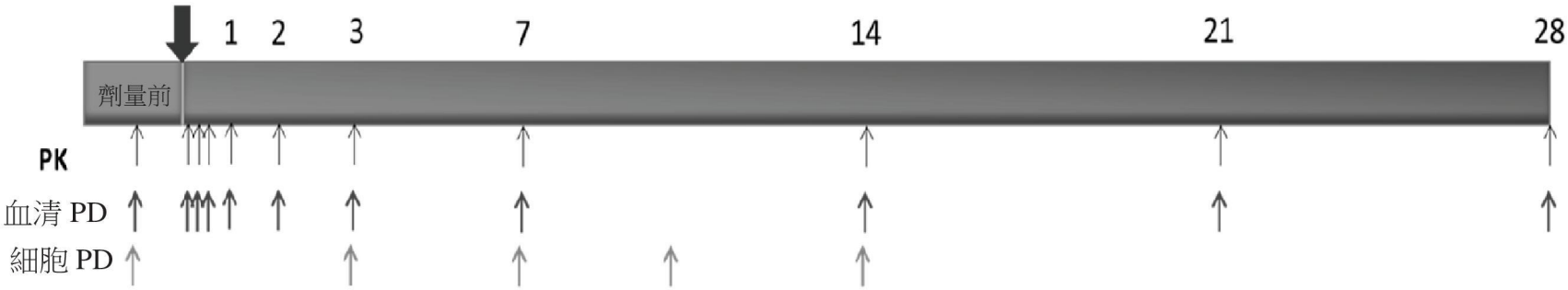
106115065
C205563DA.pdf
表單編號 A0202
第 73 頁，共 109 頁(發明圖式)
I757290
1063276267-0

研究設計

目標：比較 OX40/PD-L1 BisAb 之 PK/PD：

- ***BiS5-OX40/PD-L1-G1 N434A*** (含有延長半衰期之突變)
- ***BiS5-OX40/PD-L1-G1 WT (IgG1)***

以 5 mg/kg (1 mL/kg)單一 IV 注射(緩慢濃注)



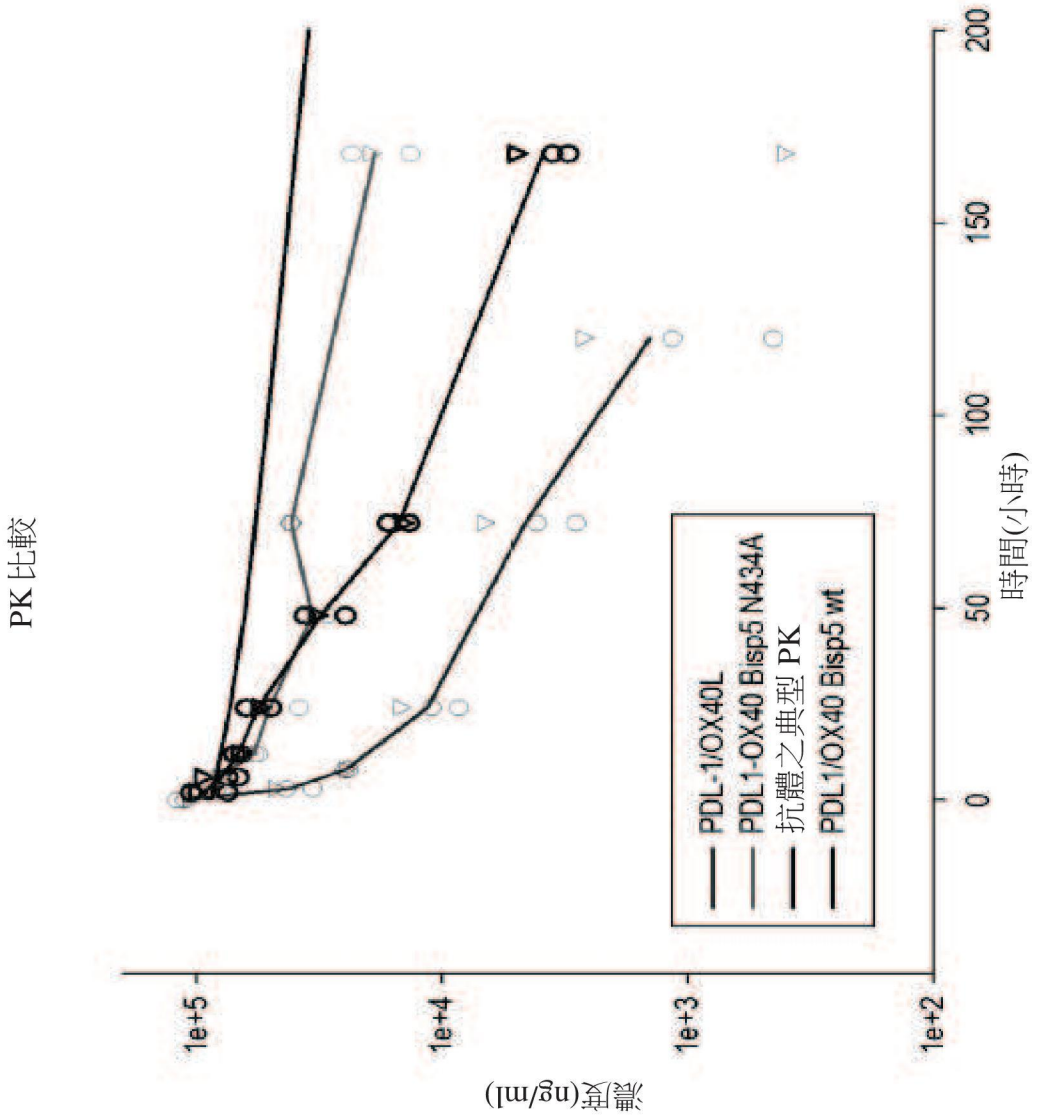
評估(n=3)

- 活力、臨床觀察、體檢、注射位點、體重、食物消耗
- PK：劑量前、劑量後 2 小時、6 小時、12 小時、24 小時、48 小時、72 小時及 168 小時、第 14 天、第 21 天、第 28 天
- ADA
- 血清 PD：可溶性 PD-L1 (一式兩份 PK 試樣)
- 細胞 PD：Ki67 染色之基於流動之評估

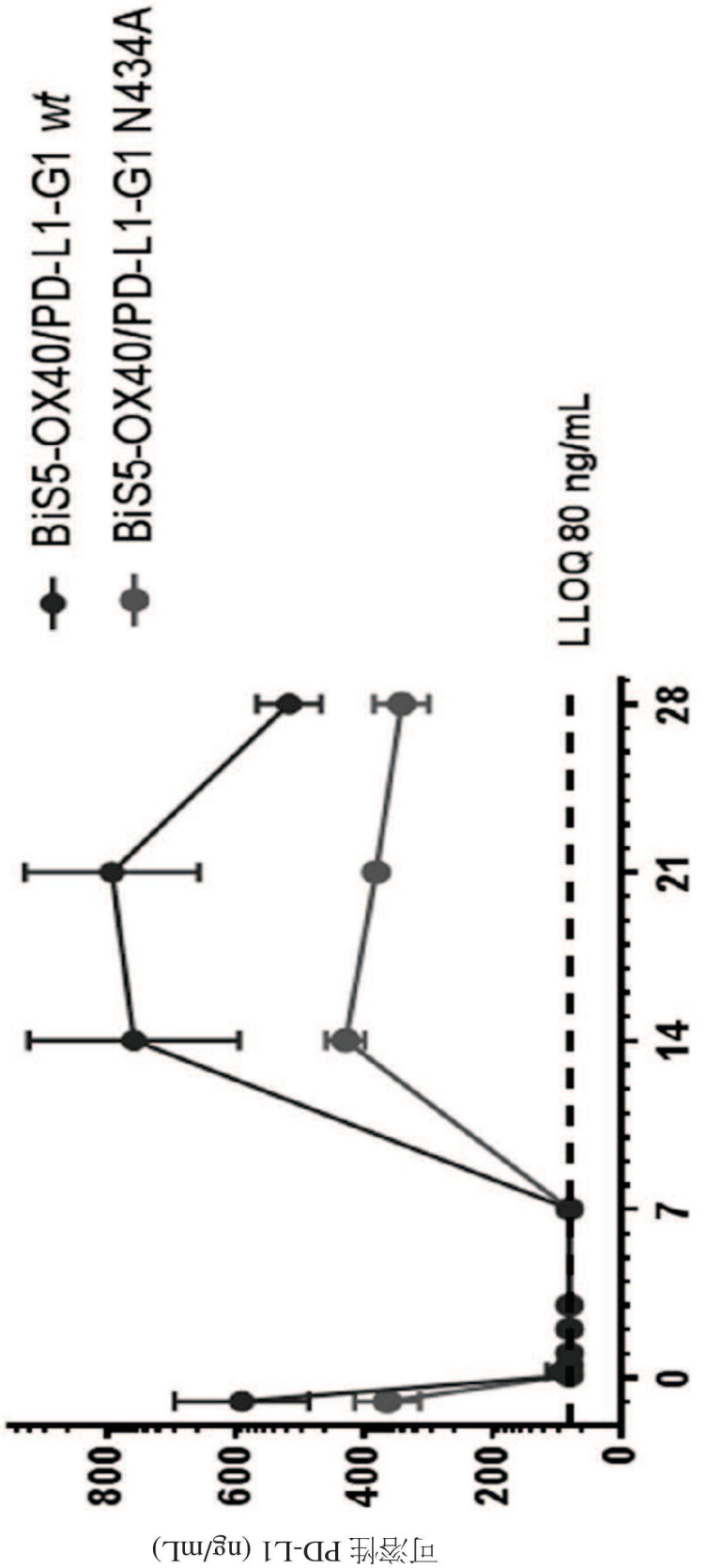
執行

- 注射至 PK 匯總之 50 天

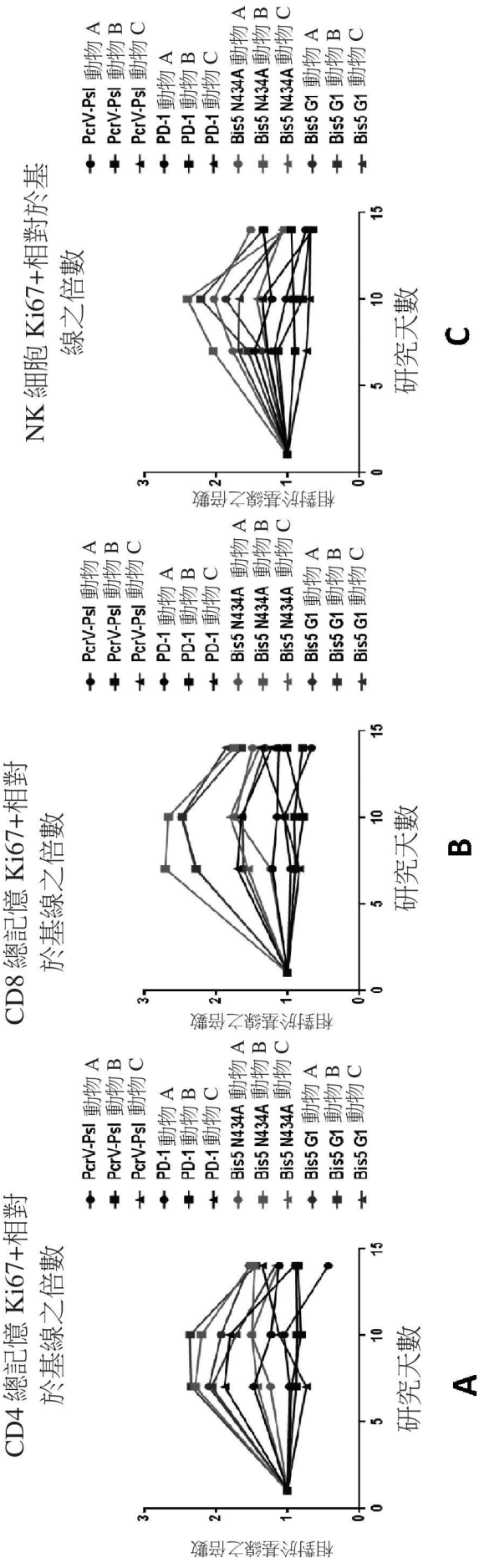
【圖 58】


PK 比較
濃度(ng/ml)
1e+5
1e+4
1e+3
1e+2
0
50
100
150
200
時間(小時)
PDL-1/OX40L
PDL1-OX40 Bisp5 N434A
抗體之典型 PK
PDL1/OX40 Bisp5 wt

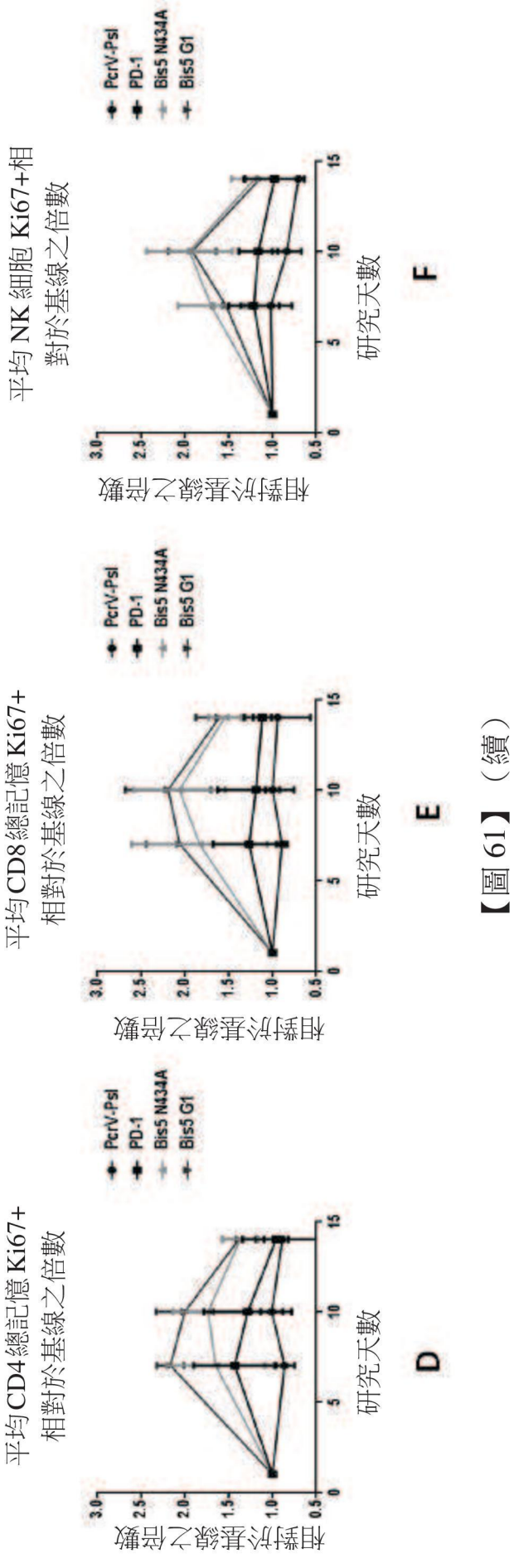
【圖 59】


BiS5-OX40/PD-L1-G1 wt
BiS5-OX40/PD-L1-G1 N434A
LLOQ 80 ng/mL
可溶性 PD-L1 (ng/mL)
800
600
400
200
0
0
7
14
21
28
天數

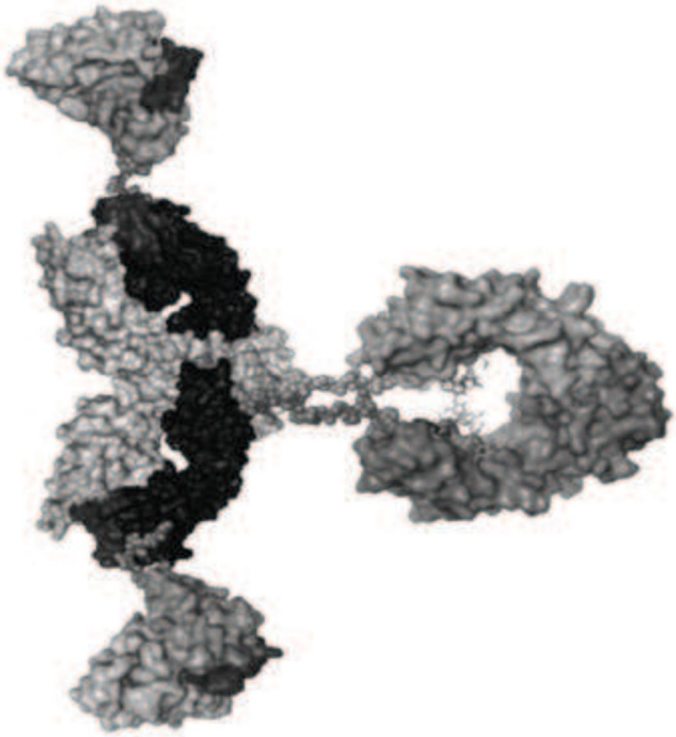
【圖 60】


CD4 總記憶 Ki67+相對於基線之倍數
CD8 總記憶 Ki67+相對於基線之倍數
NK 細胞 Ki67+相對於基線之倍數
相對於基線之倍數
研究天數
PcrV-Psl 動物 A
PcrV-Psl 動物 B
PcrV-Psl 動物 C
PD-1 動物 A
PD-1 動物 B
PD-1 動物 C
Bis5 N434A 動物 A
Bis5 N434A 動物 B
Bis5 N434A 動物 C
Bis5 G1 動物 A
Bis5 G1 動物 B
Bis5 G1 動物 C
A
B
C

【圖 61】

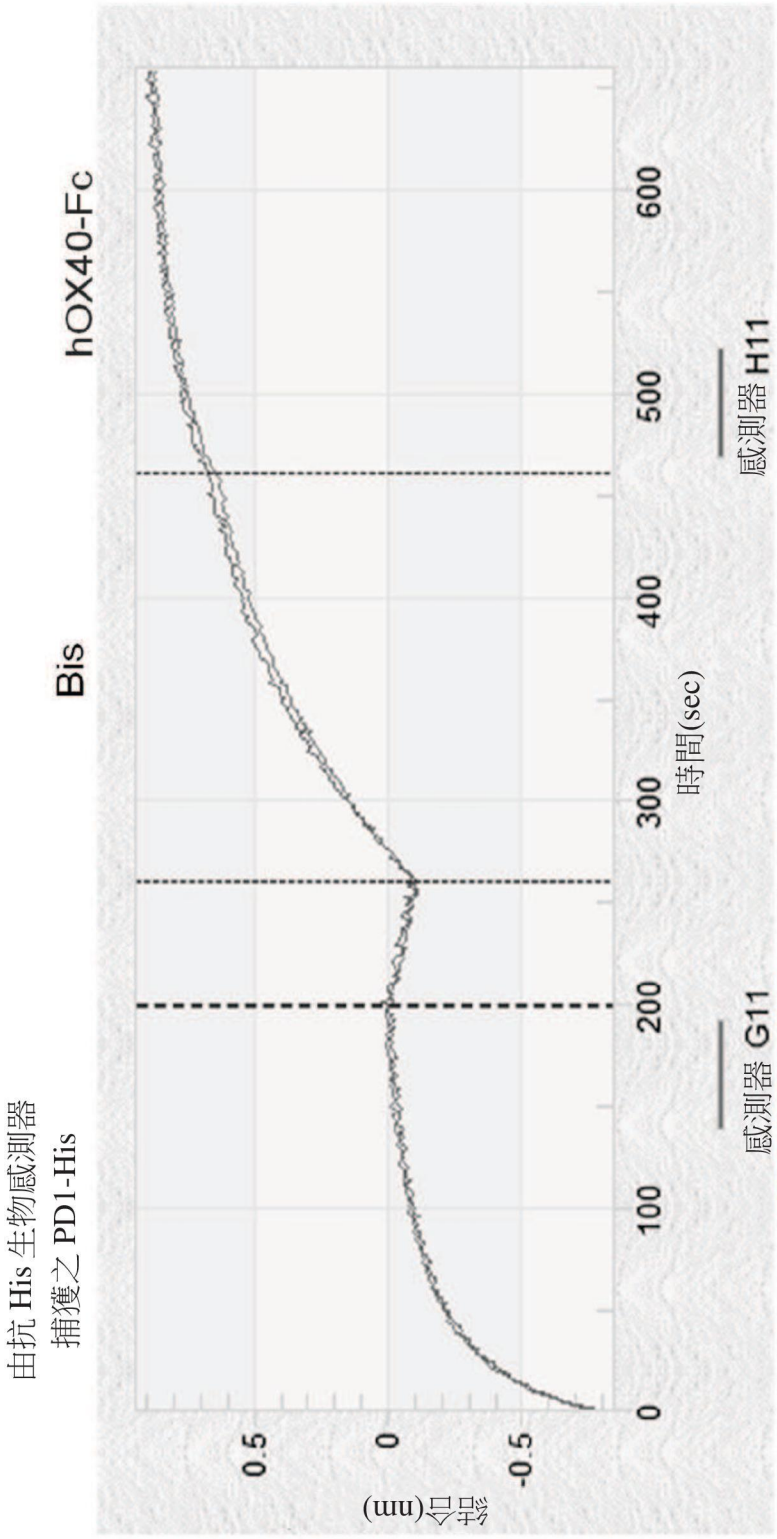

平均CD4總記憶 Ki67+
相對於基線之倍數
相對於基線之倍數
研究天數
PcrV-Psl
PD-1
Bis5 N434A
Bis5 G1
D
平均CD8總記憶 Ki67+
相對於基線之倍數
相對於基線之倍數
研究天數
E
平均 NK 細胞 Ki67+相
對於基線之倍數
相對於基線之倍數
研究天數
F

【圖 61】（續）



【圖 62】

【圖 63】


由抗 His 生物感測器
捕獲之 PD1-His
Bis
hOX40-Fc
0.5
0
-0.5
0
100
200
300
400
500
600
時間(sec)
感測器 G11
PD1(115)/OX40
批號 ML01545-09
25.5 mg/mL 原液
感測器 H11
PD1(115)/OX40
編號 P25128Feb16VR 作為對照

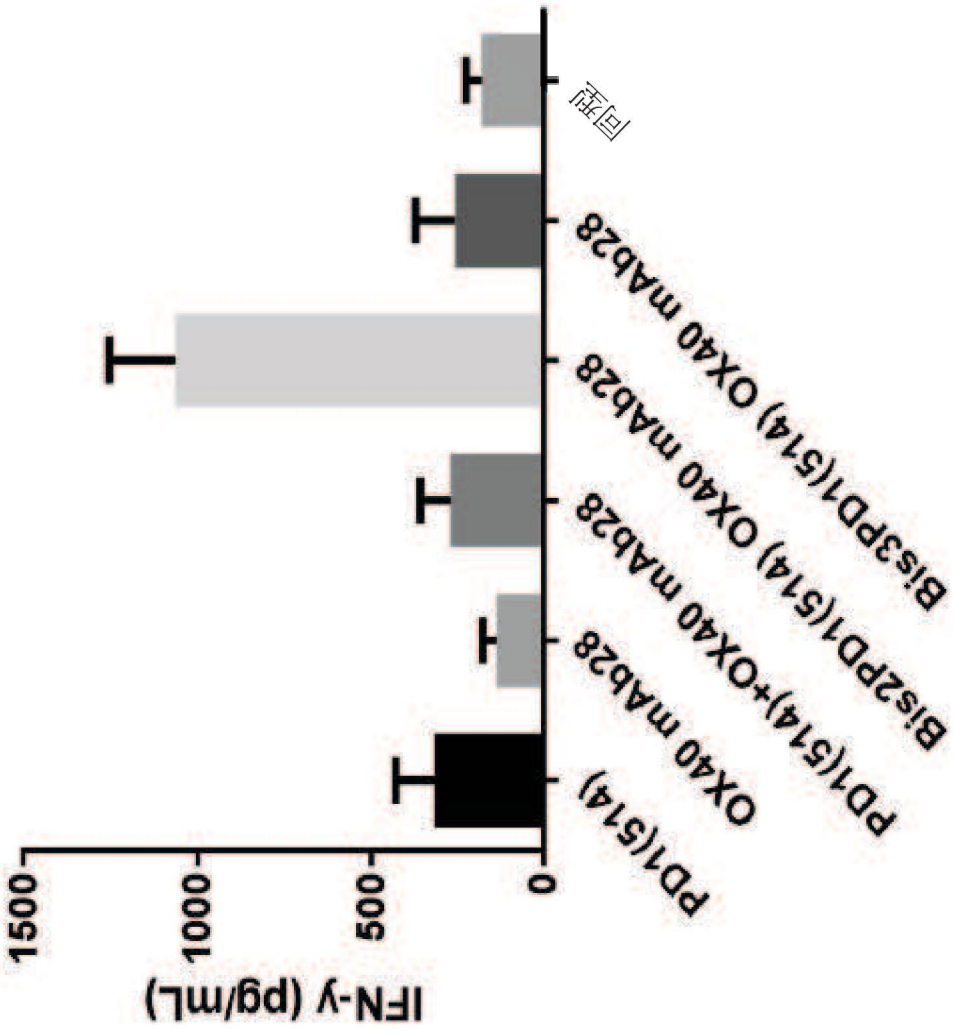
【圖 64】

A
Jurkat
NFκB
螢光素酶
共刺激信號
OX40
OX40 激動劑
FcγR
I
II
III
呈遞細胞
B
OX40 生物分析
RLU
50000
40000
30000
20000
10000
0
10⁻¹³ 10⁻¹² 10⁻¹¹ 10⁻¹⁰ 10⁻⁹ 10⁻⁸ 10⁻⁷
mAb 濃度(nM)
PD-1 LO115 IgG4P
OX40 mAb28 IgG4P
PD-1 LO115 OX40 mAb
BS2 4oC 第 0 天
PD-1 LO115 OX40 mAb
BS2 3X F/T
PD-1 LO115 OX40 mAb
BS2 4oC 第 7 天
PD-1 LO115 OX40 mAb
BS2 40oC 第 7 天
NIP228 IgG4P

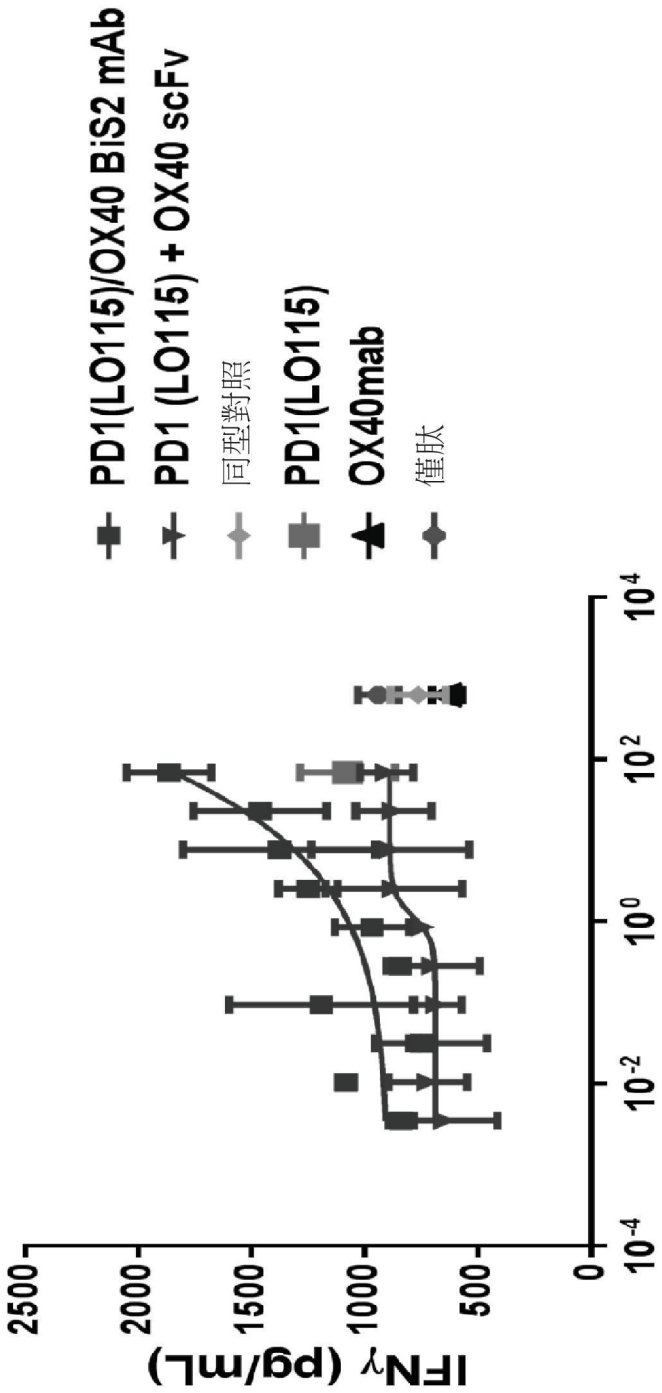
【圖 65】

A
抗CD3 scFv
PD-L1
PD-1
TCR
CHO
Jurkat NFAT-Luc
MEDI4736
6小時
螢光素酶
螢光素酶
B
PD-L1 生物分析
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
mAb 濃度(nM)
PD-1 LO115 IgG4P
OX40 mAb28 IgG4P
PD-1 LO115 OX40 mAb BS2 4oC 第 0 天
PD-1 LO115 OX40 mAb BS2 3X F/T
PD-1 LO115 OX40 mAb BS2 4oC 第 7 天
PD-1 LO115 OX40 mAb BS2 40oC 第 7 天
NIP228 IgG4P

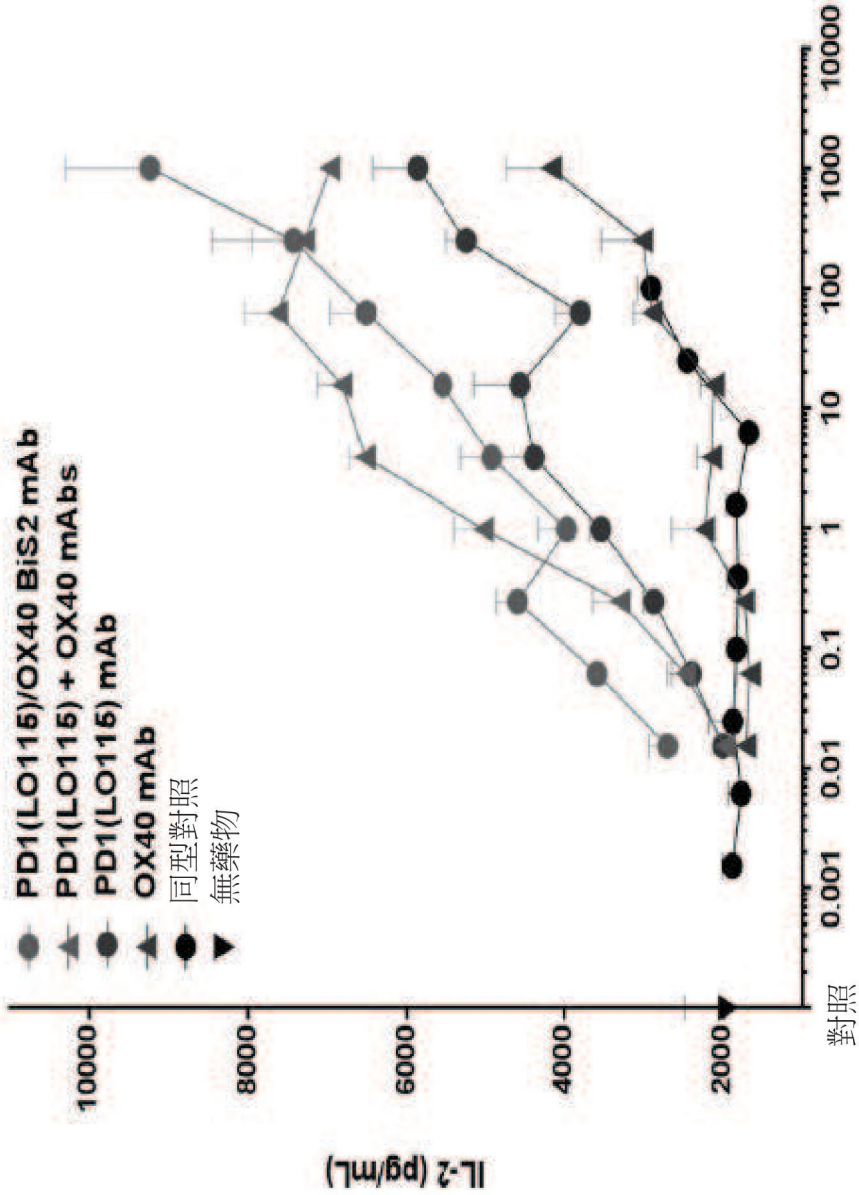
【圖 66】


IFN-γ (pg/mL)
1500
1000
500
0
PD1(514)
OX40 mAb28
PD1(514)+OX40 mAb28
Bis2PD1(514) OX40 mAb28
Bis3PD1(514) OX40 mAb28
同型

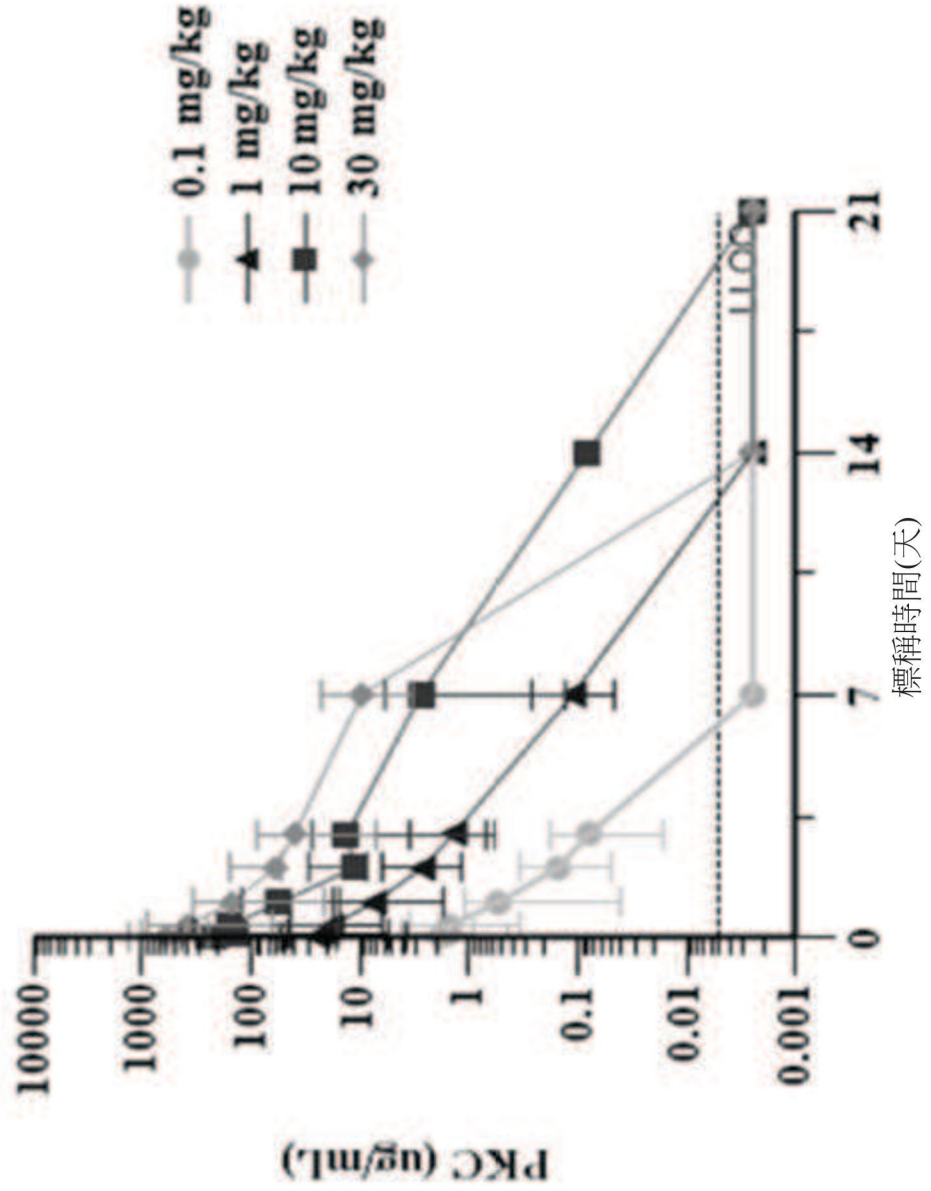
【圖 67】


PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb
PD1 (LO115) + OX40 scFv
同型對照
PD1(LO115)
OX40mab
僅肽
IFNγ (pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
10-4
10-2
100
102
104
抗體(nM)

【圖 68】


PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb
PD1(LO115) + OX40 mAbs
PD1(LO116) mAb
OX40 mAb
同型對照
無藥物
IL-2 (pg/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
對照
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗體(nM)

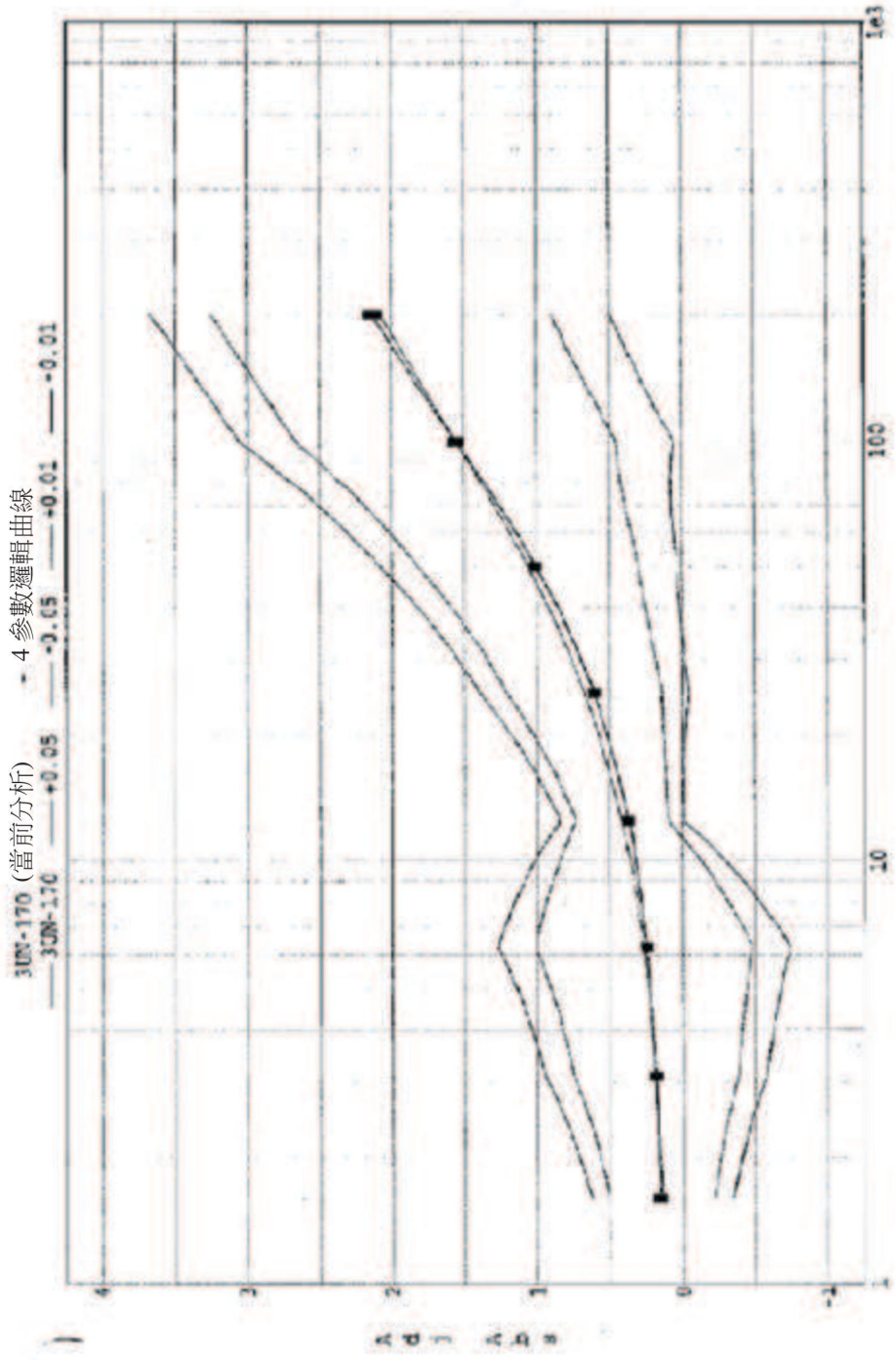
【圖 69】


0.1 mg/kg
1 mg/kg
10 mg/kg
30 mg/kg
LOQ
PKC (ug/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
7
14
21
標稱時間(天)

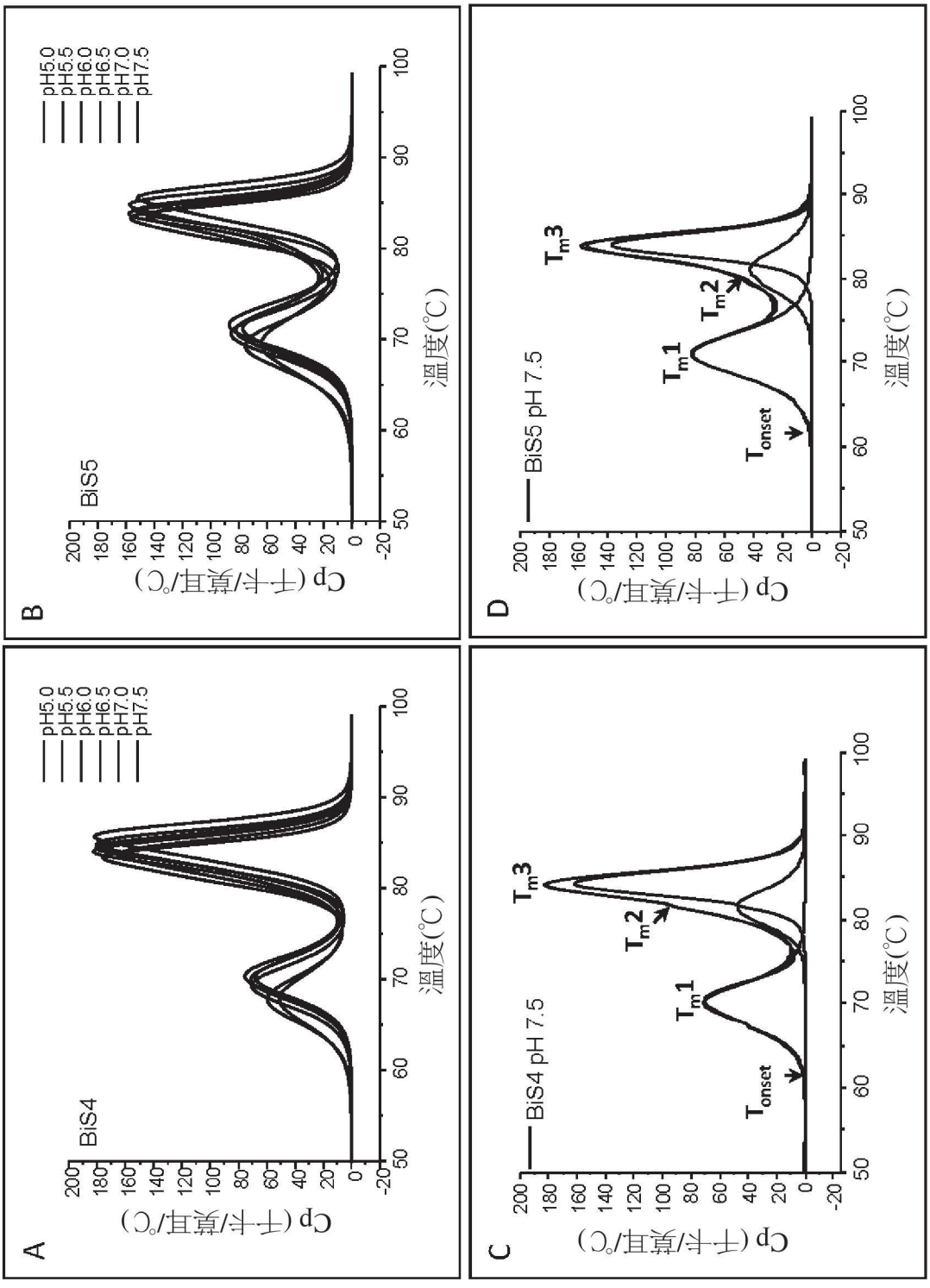
【圖 70】

Ki 67+ CD4+
0.1 mg/kg
1 mg/kg
10 mg/kg
30 mg/kg
3
2
1
0
基線
1
3
5
7
9
11
13
15
研究天數
Ki67+ CD4+記憶 T 細胞%之
倍數變化(平均值±SD)
Ki 67+ CD8+
0.1 mg/kg
1 mg/kg
10 mg/kg
30 mg/kg
3
2
1
0
基線
1
3
5
7
9
11
13
15
研究天數
Ki67+ CD8+記憶 T 細胞%之
倍數變化(平均值±SD)

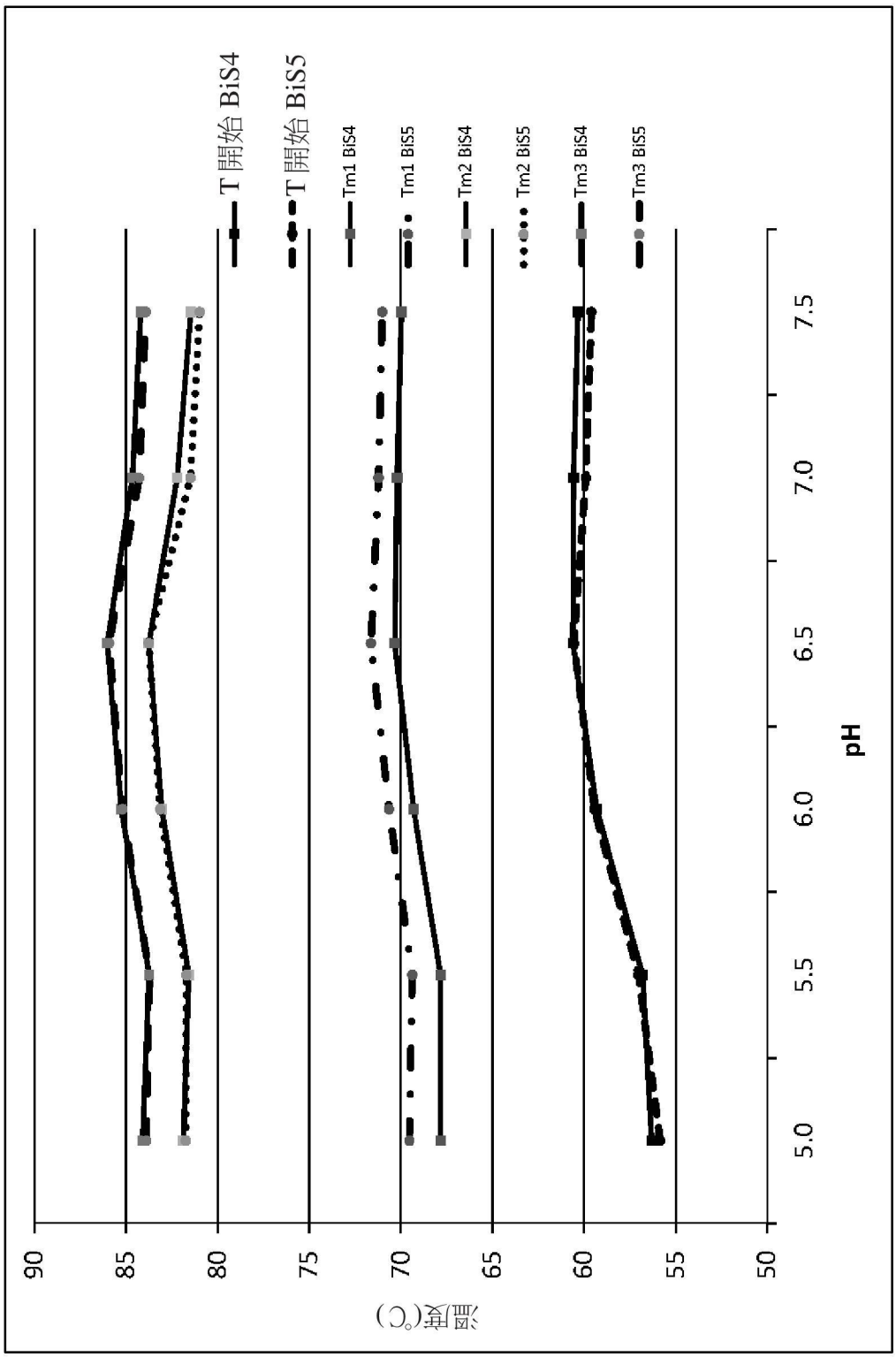
【圖 71】



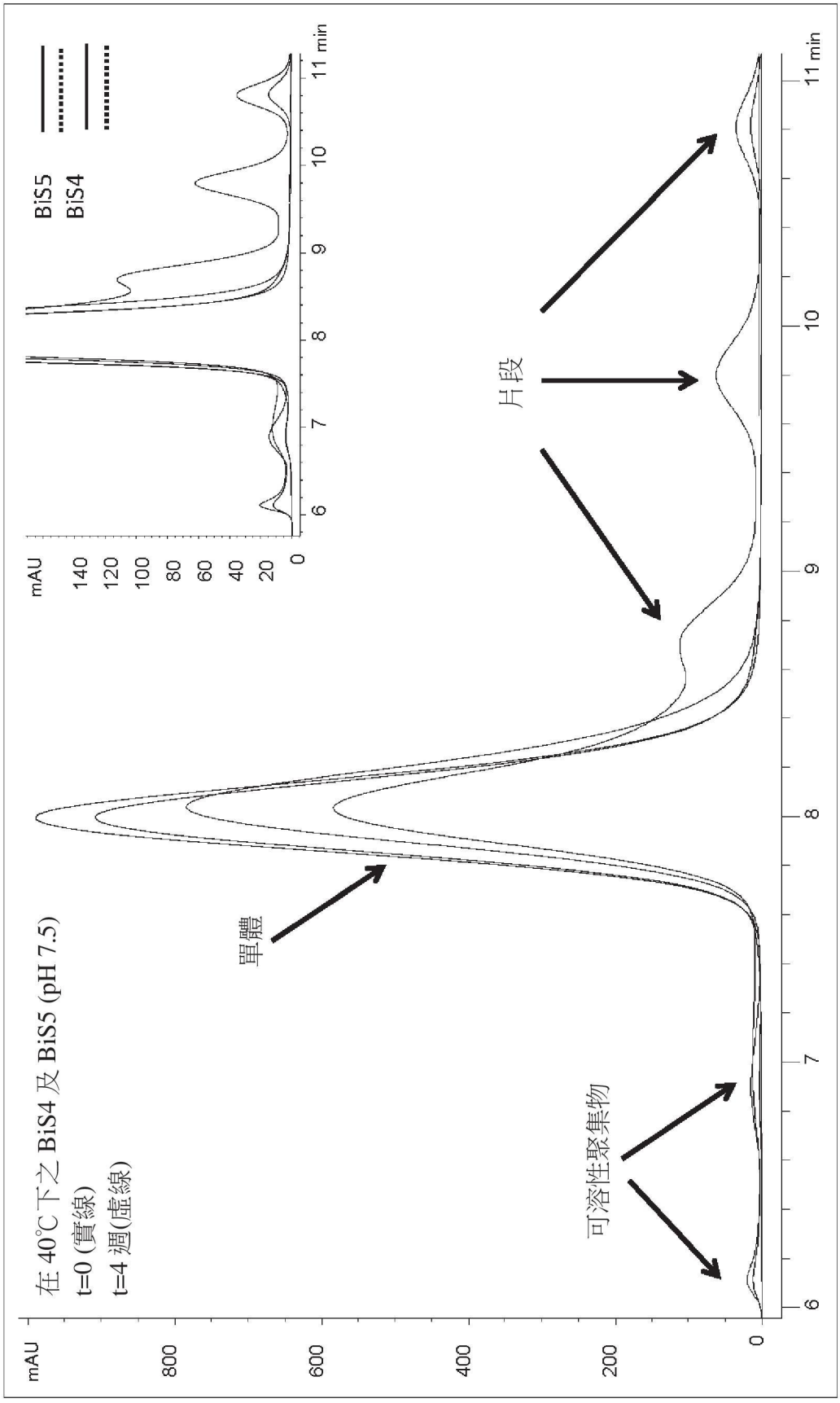
【圖 72】


A
BiS4
pH5.0
pH5.5
pH6.0
pH6.5
pH7.0
pH7.5
Cp (千卡/莫耳/°C)
溫度(°C)
B
BiS5
C
BiS4 pH 7.5
T_m1
T_m2
T_m3
T_{onset}
D
BiS5 pH 7.5

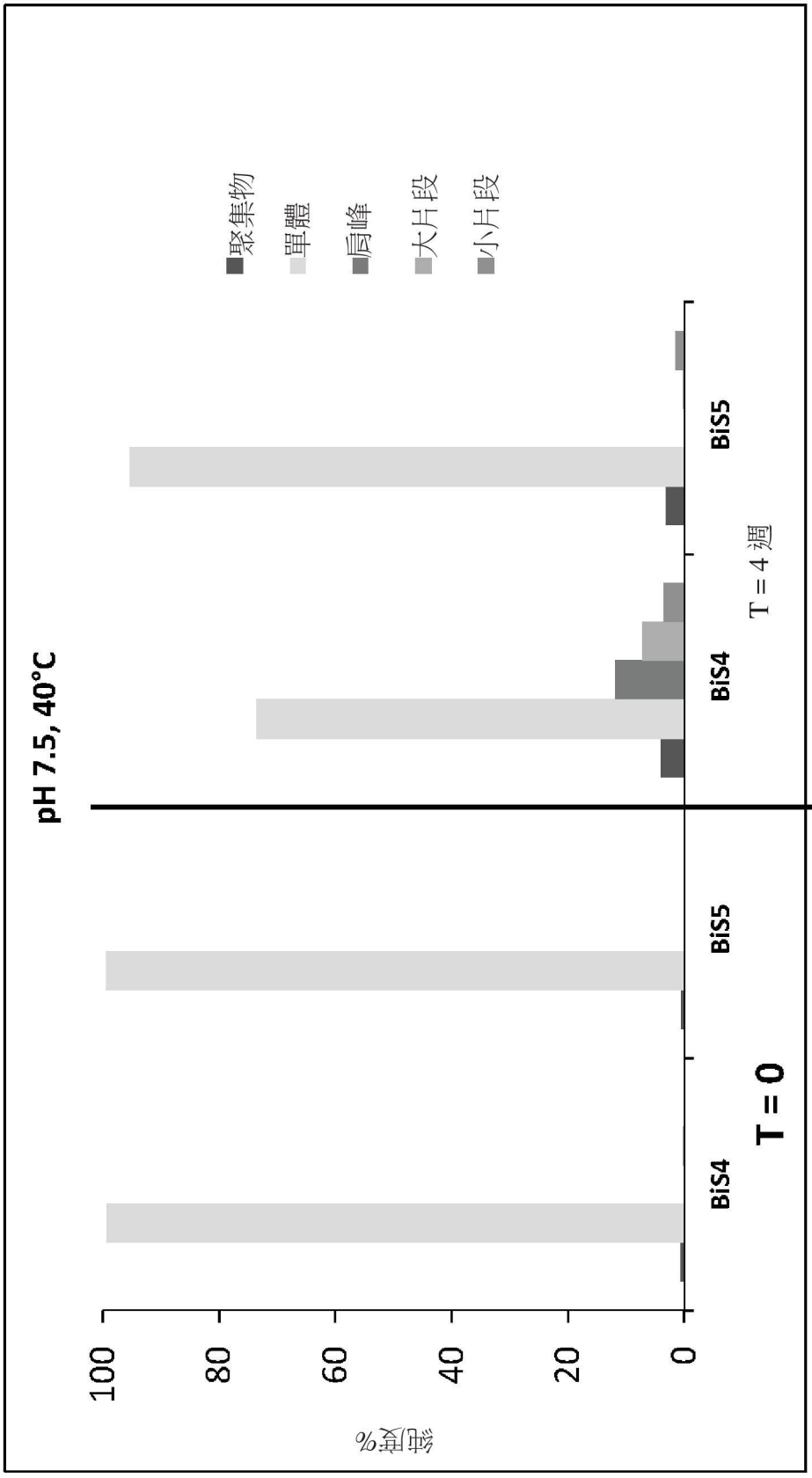
【圖 73A-73D】


T 開始 BiS4
T 開始 BiS5
Tm1 BiS4
Tm1 BiS5
Tm2 BiS4
Tm2 BiS5
Tm3 BiS4
Tm3 BiS5
溫度(°C)
pH
90
85
80
75
70
65
60
55
50
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5

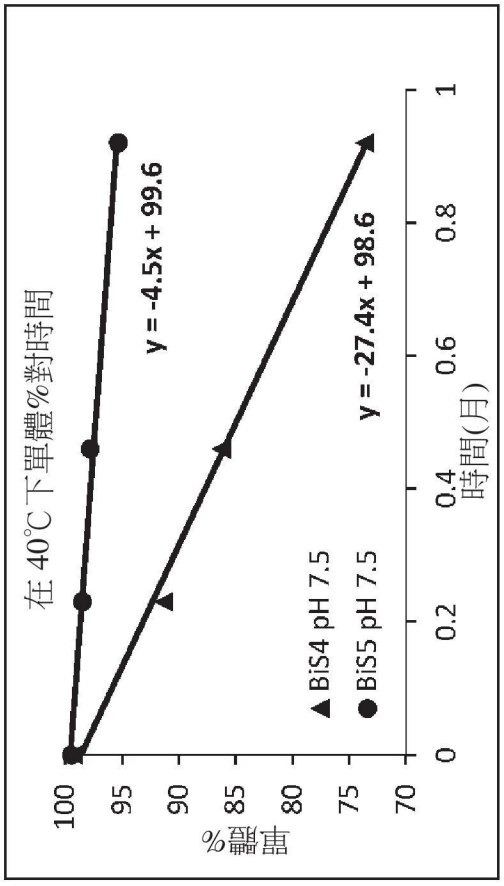
【圖 73E】


在 40℃下之 BiS4 及 BiS5 (pH 7.5)
t=0 (實線)
t=4 週(虛線)
mAU
800
600
400
200
0
6
7
8
9
10
11 min
單體
片段
可溶性聚集物
BiS5
BiS4
140
120
100
80
60
40
20

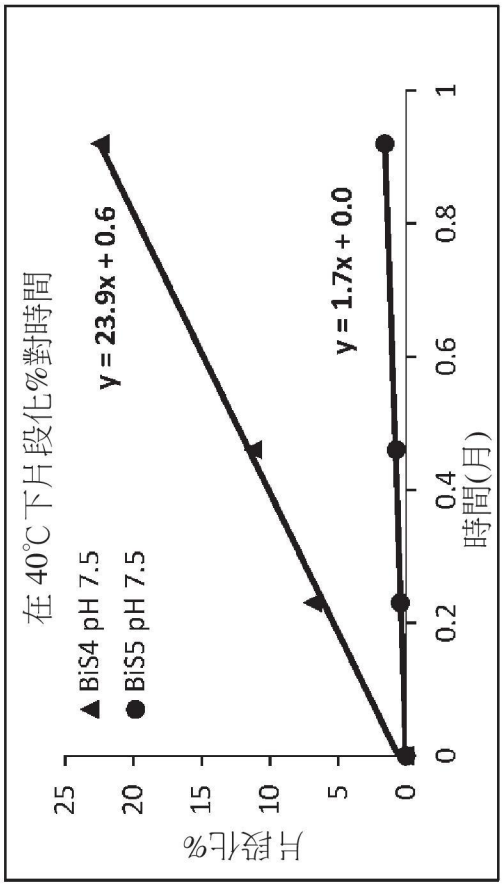
【圖 74A】


聚集物
單體
肩峰
大片段
小片段
pH 7.5, 40°C
T = 0
T = 4 週
BiS4
BiS5
BiS4
BiS5
純度%
0
20
40
60
80
100

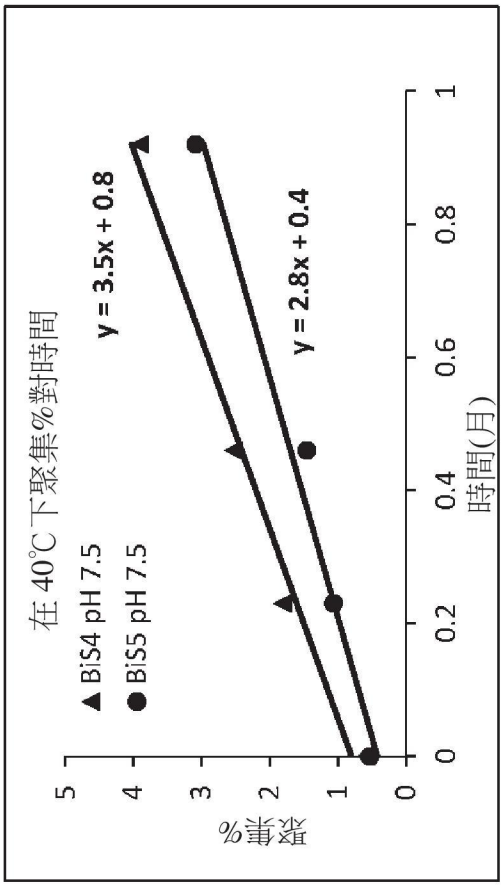
【圖 74B】



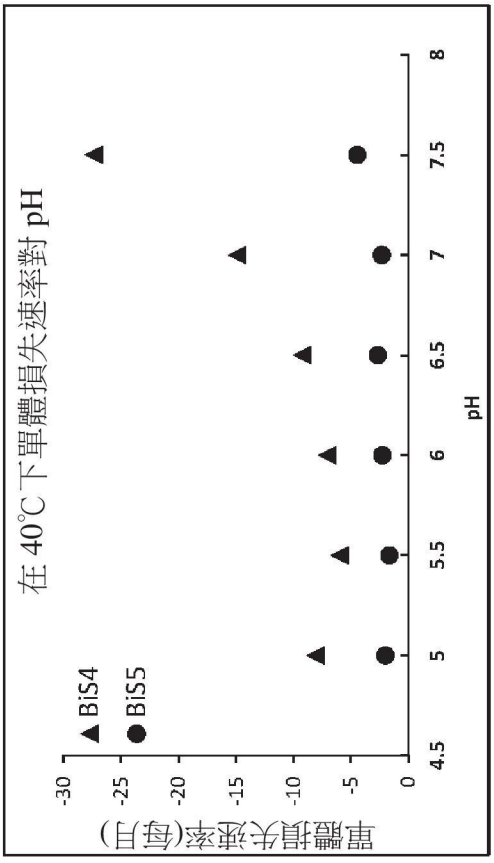
【圖 75A】



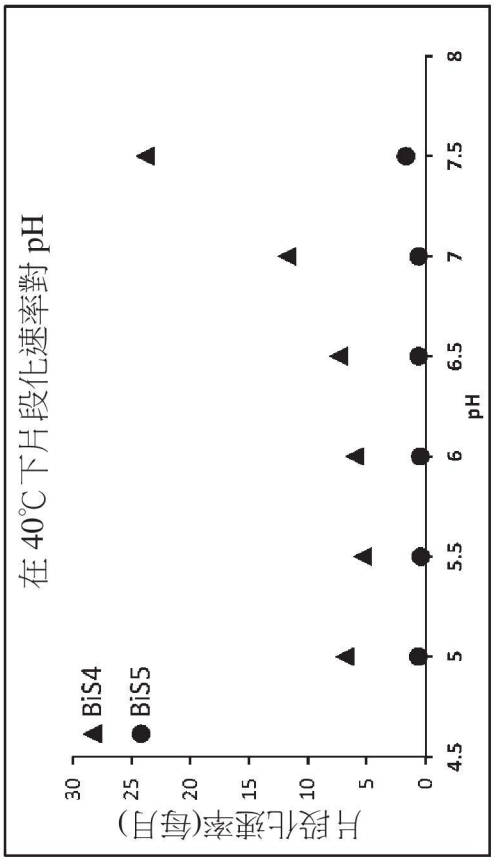
【圖 75B】



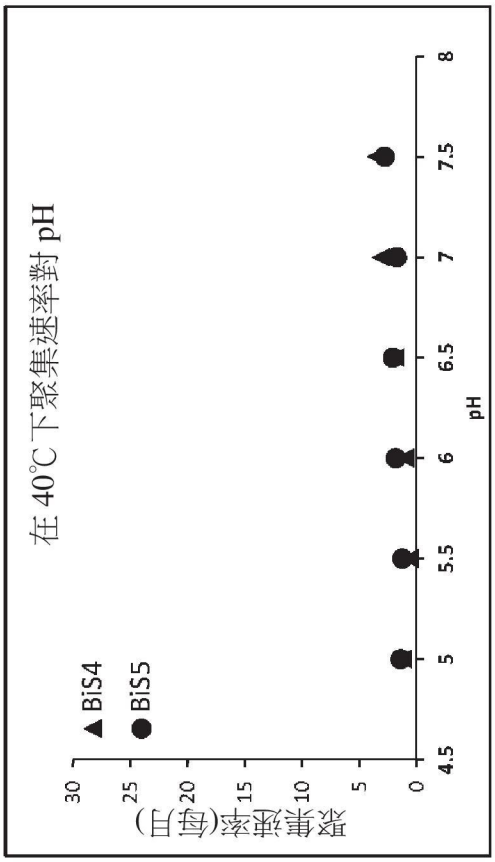
【圖 75C】



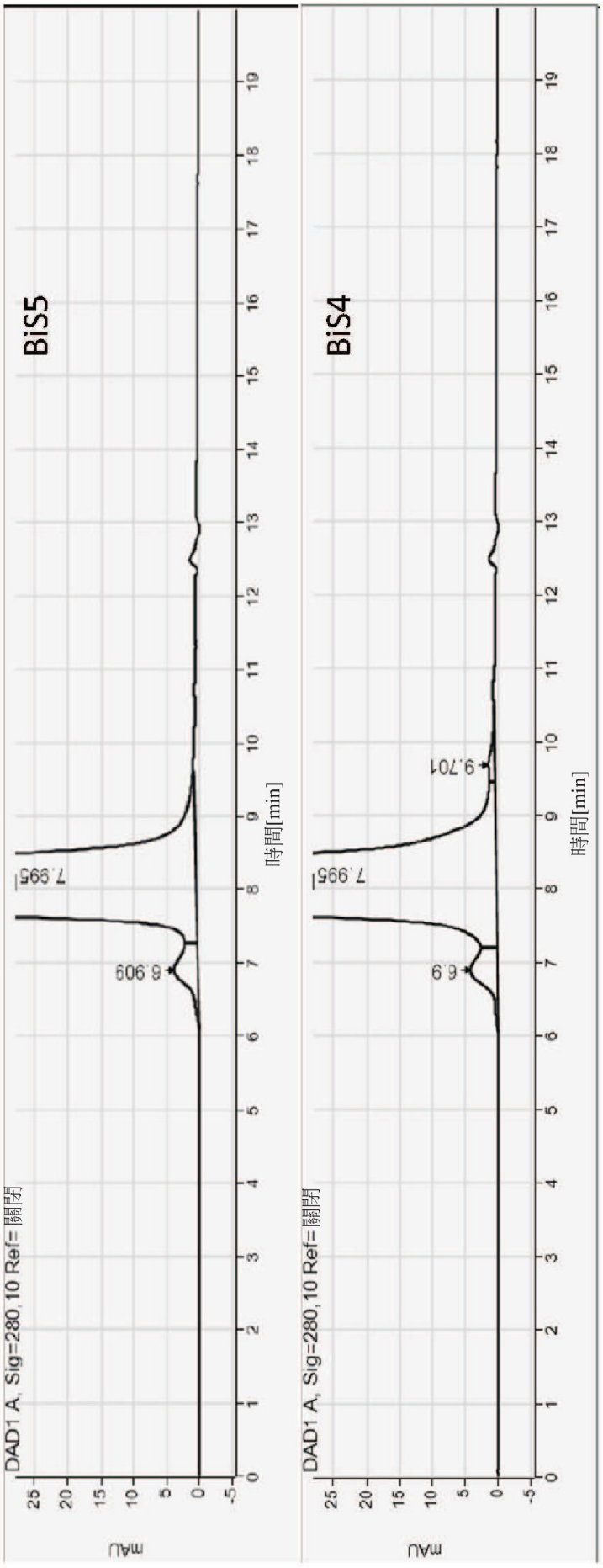
【圖 76A】



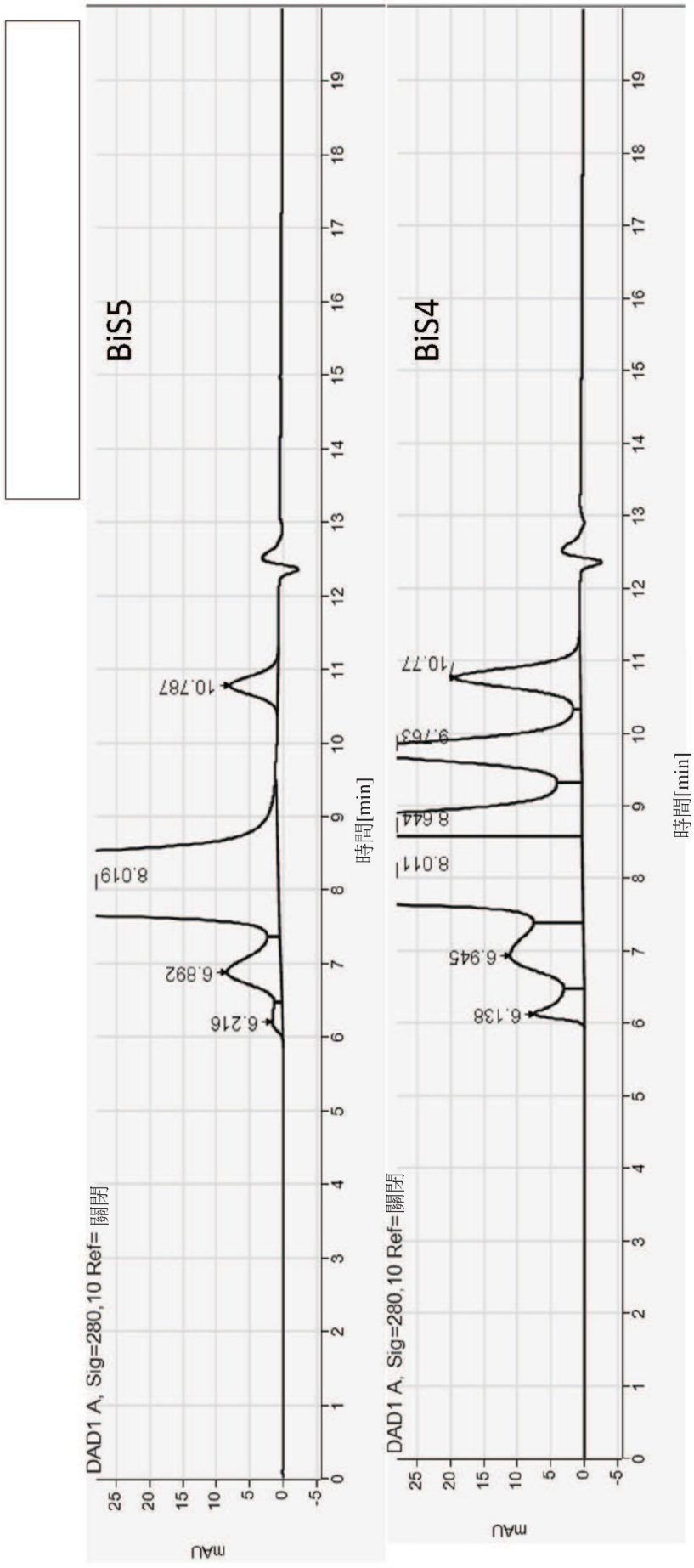
【圖 76B】



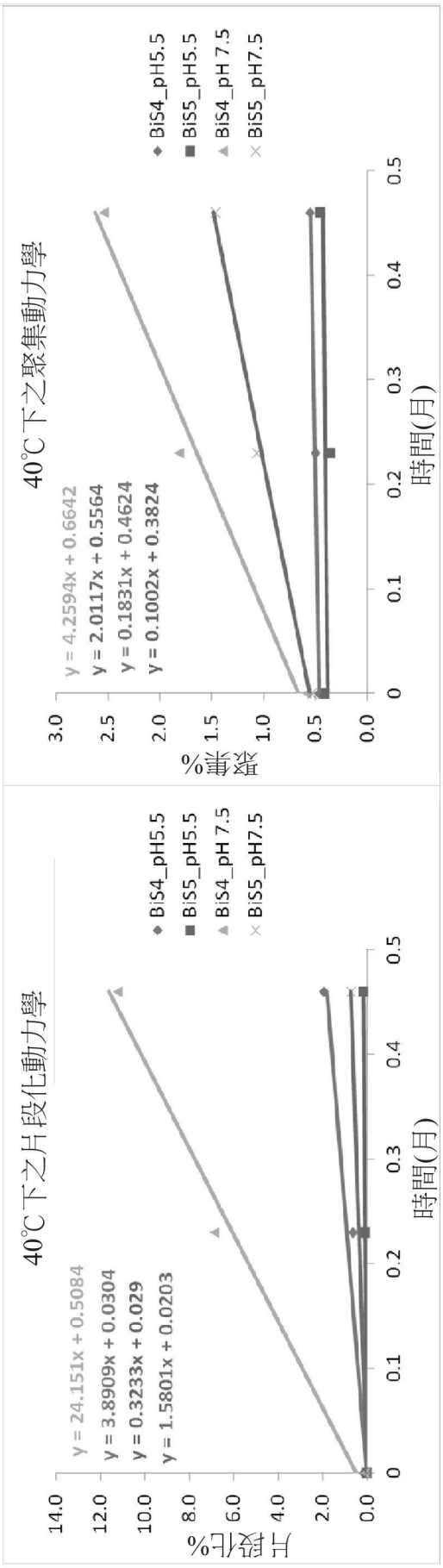
【圖 76C】


BIS5
DAD1 A, Sig=280,10 Ref=關閉
mAU
時間[min]
6.909
7.995
BIS4
DAD1 A, Sig=280,10 Ref=關閉
mAU
時間[min]
6.9
7.995
9.701

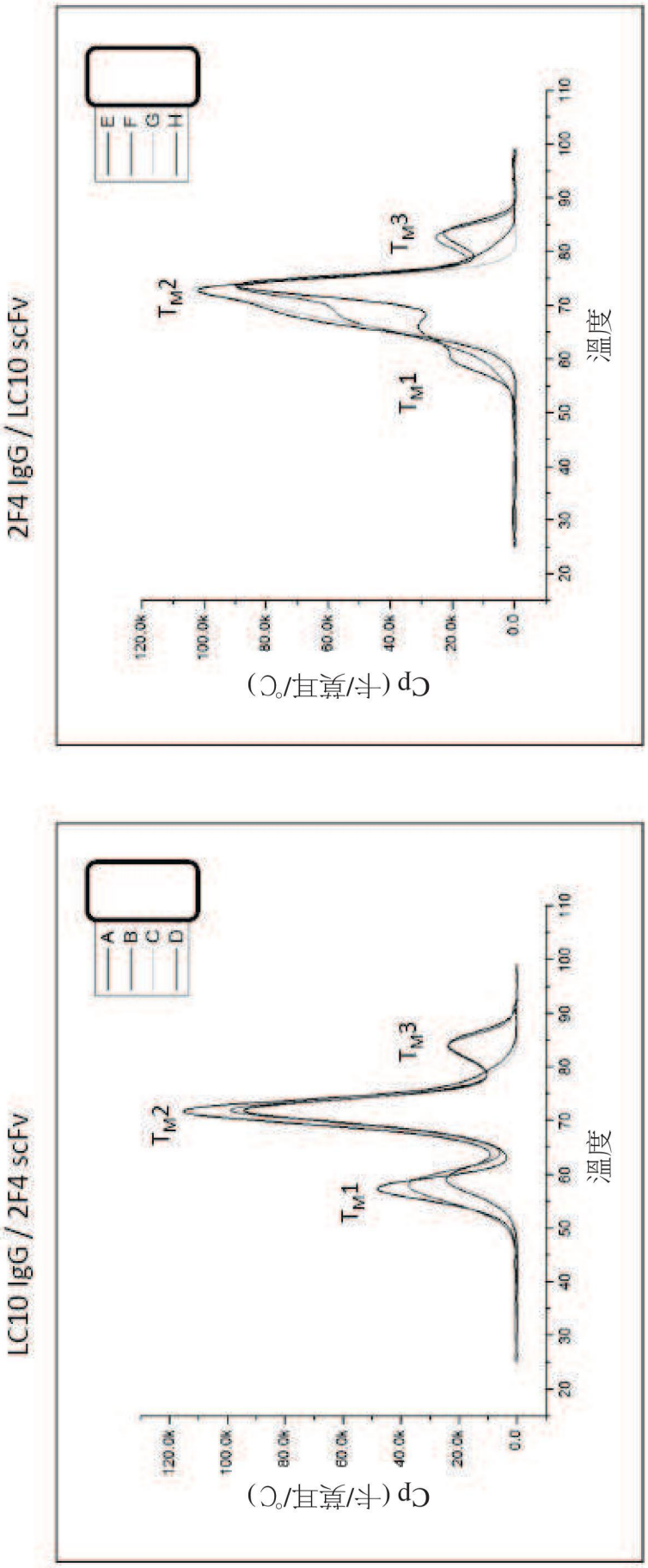
【圖 77A】


BiS5
DAD1 A, Sig=280,10 Ref= 關閉
mAU
時間[min]
8.019
6.892
6.216
10.787
BiS4
DAD1 A, Sig=280,10 Ref=關閉
mAU
時間[min]
10.77
9.763
8.644
8.011
6.945
6.138

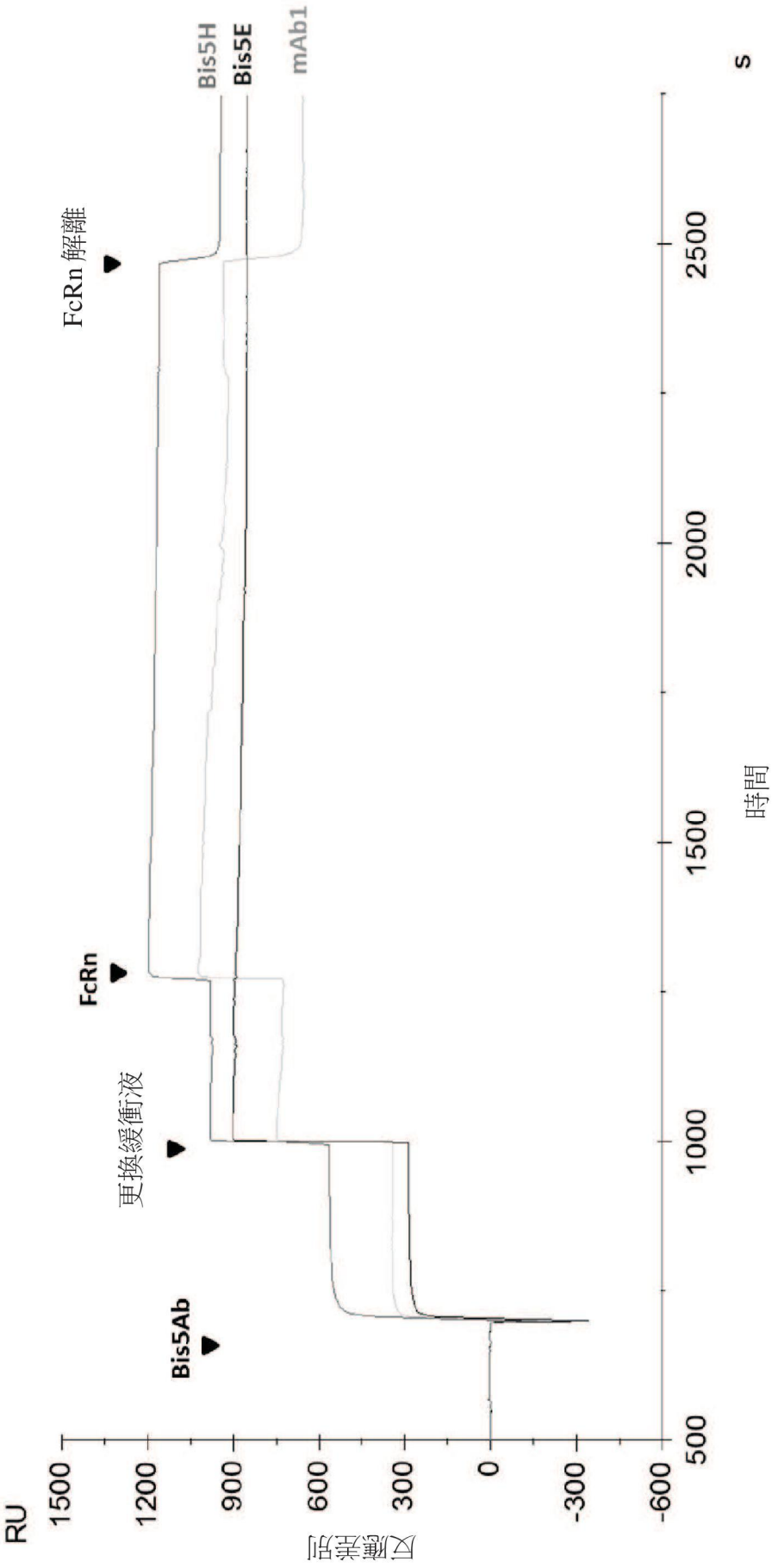
【圖 77B】


40℃下之片段化動力學
y = 24.151x + 0.5084
y = 3.8909x + 0.0304
y = 0.3233x + 0.029
y = 1.5801x + 0.0203
BiS4_pH5.5
BiS5_pH5.5
BiS4_pH 7.5
BiS5_pH7.5
片段化%
時間(月)
40℃下之聚集動力學
y = 4.2594x + 0.6642
y = 2.0117x + 0.5564
y = 0.1831x + 0.4624
y = 0.1002x + 0.3824
BiS4_pH5.5
BiS5_pH5.5
BiS4_pH 7.5
BiS5_pH7.5
聚集%
時間(月)

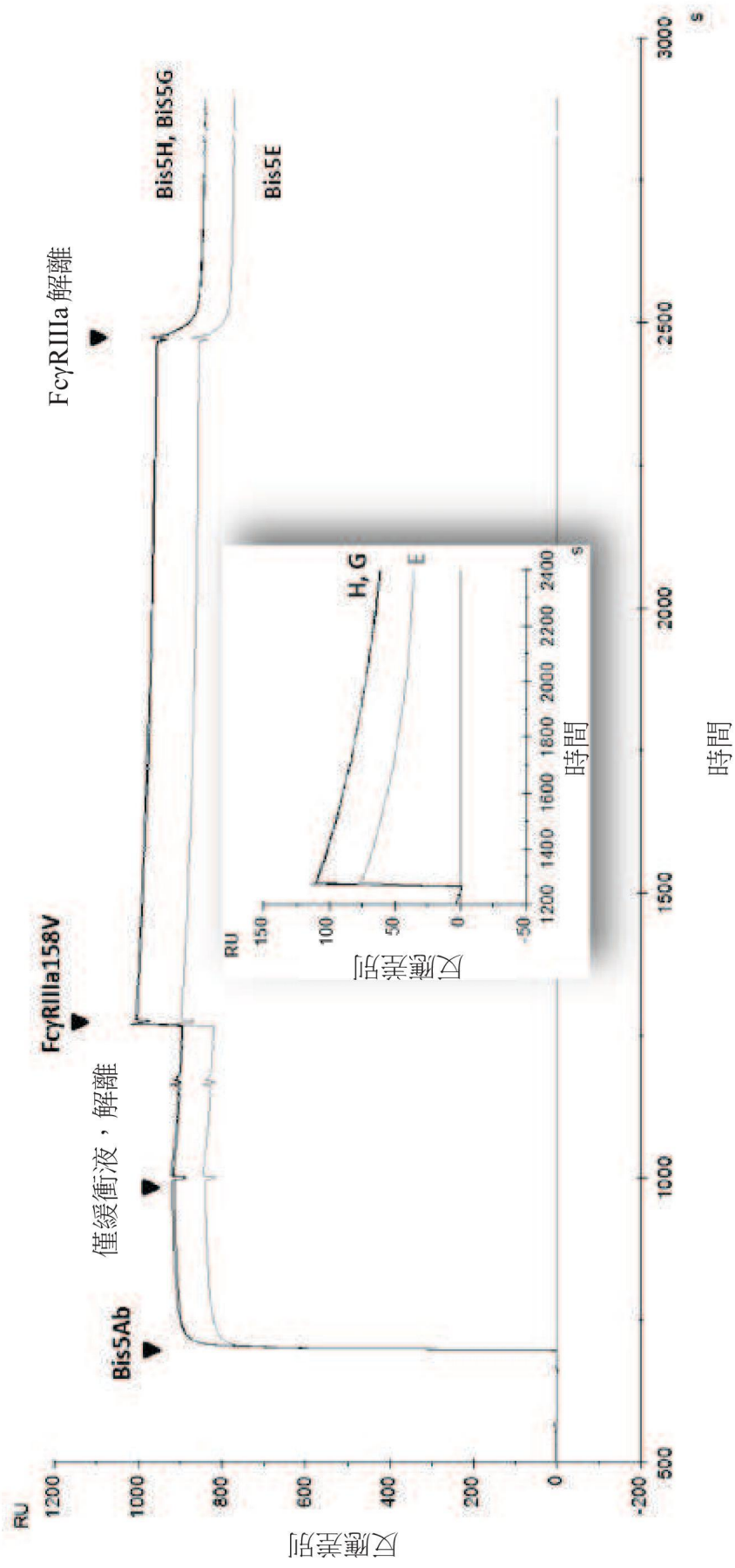
【圖 78】


LC10 IgG / 2F4 scFv
A
B
C
D
T_M1
T_M2
T_M3
Cp (卡/莫耳/°C)
溫度
2F4 IgG / LC10 scFv
E
F
G
H
T_M1
T_M2
T_M3
Cp (卡/莫耳/°C)
溫度

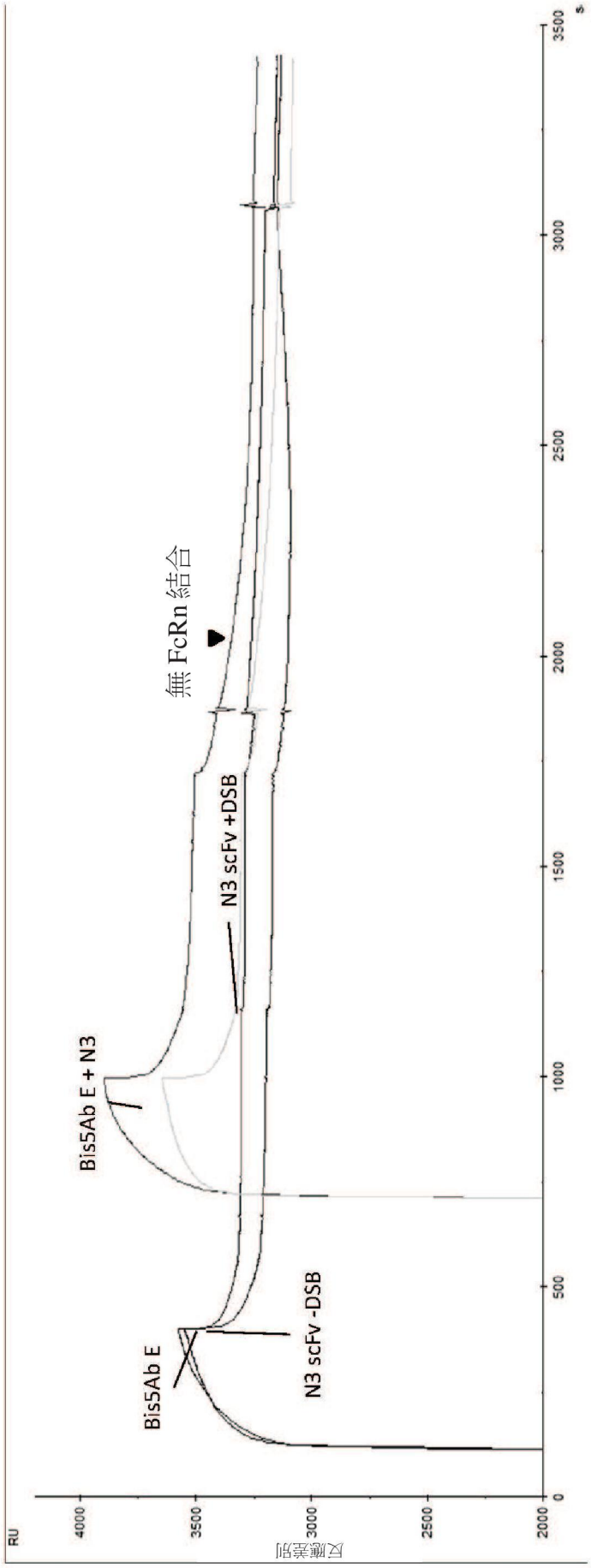
【圖 79】


RU
1500
1200
900
600
300
0
-300
-600
反應差別
500
1000
1500
2000
2500
s
時間
Bis5Ab
更換緩衝液
FcRn
FcRn 解離
Bis5H
Bis5E
mAb1

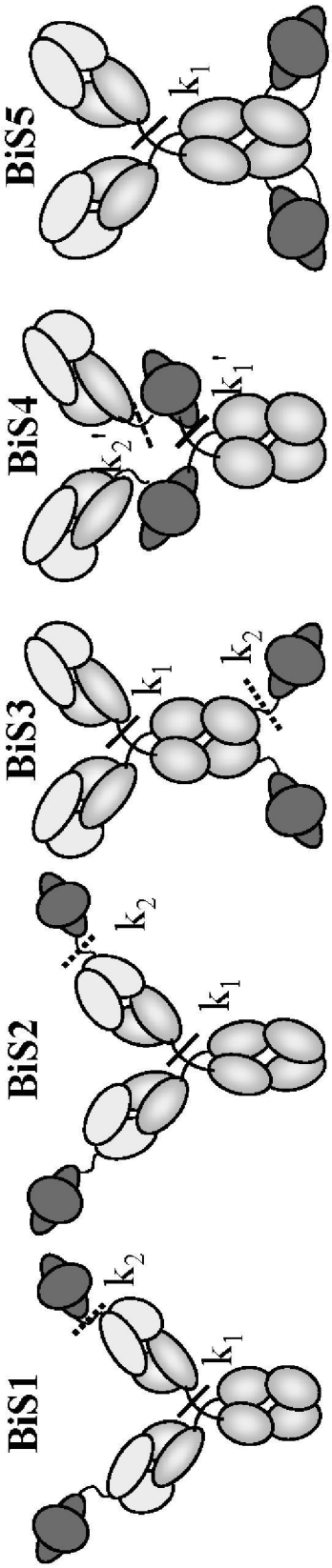
【圖 80】


反應差別
RU
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
500
1000
1500
2000
2500
3000
s
時間
Bis5Ab
僅緩衝液，解離
FcγRIIIa158V
FcγRIIIa 解離
Bis5H, Bis5G
Bis5E
反應差別
RU
150
100
50
0
-50
1200
1400
1600
1800
2000
2200
2400
s
時間
H, G
E

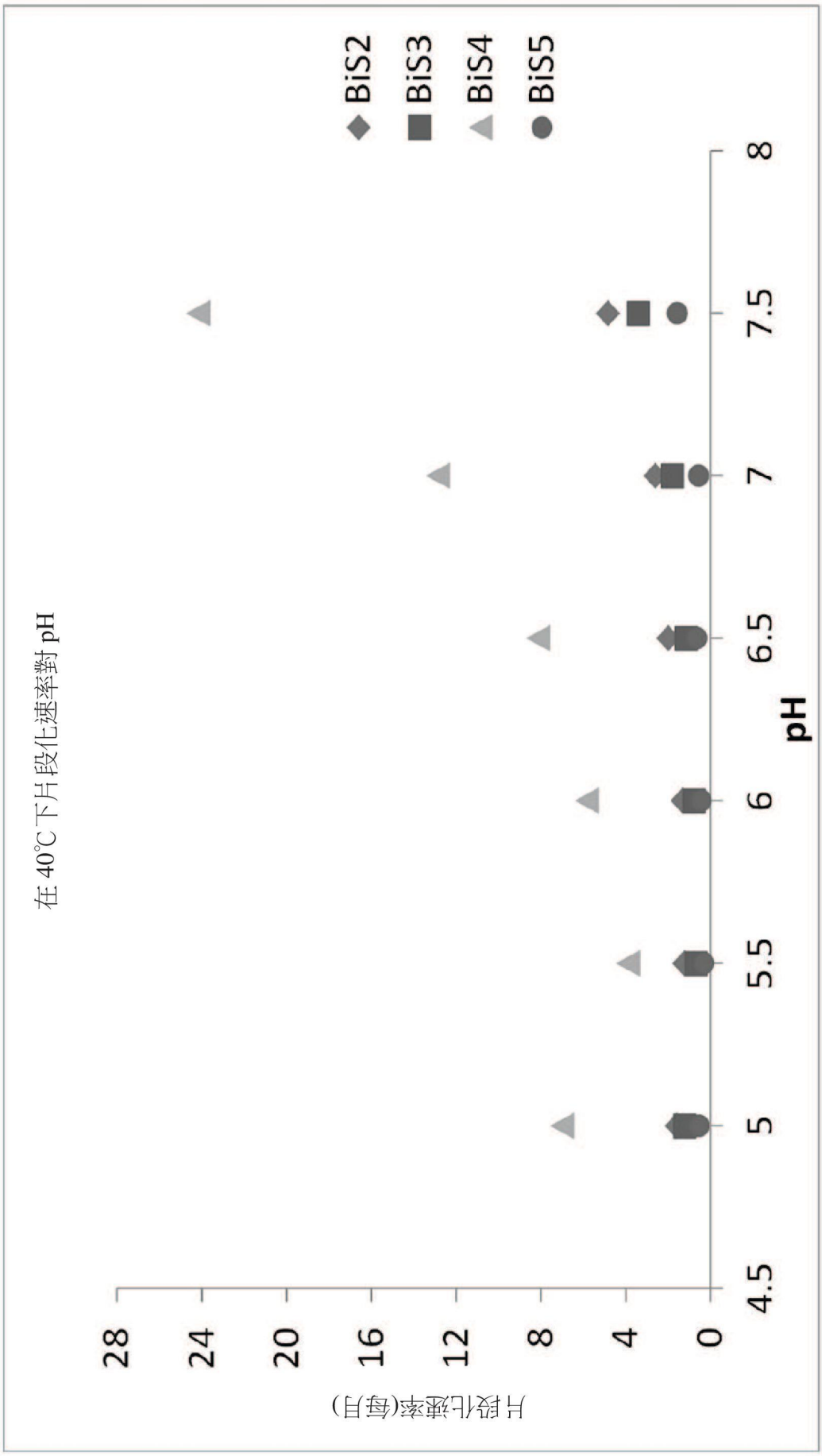
【圖 81】


RU
4000
3500
3000
2500
2000
反應差別
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
s
時間
無 FcRn 結合
Bis5Ab E + N3
N3 scFv +DSB
Bis5Ab E
N3 scFv -DSB

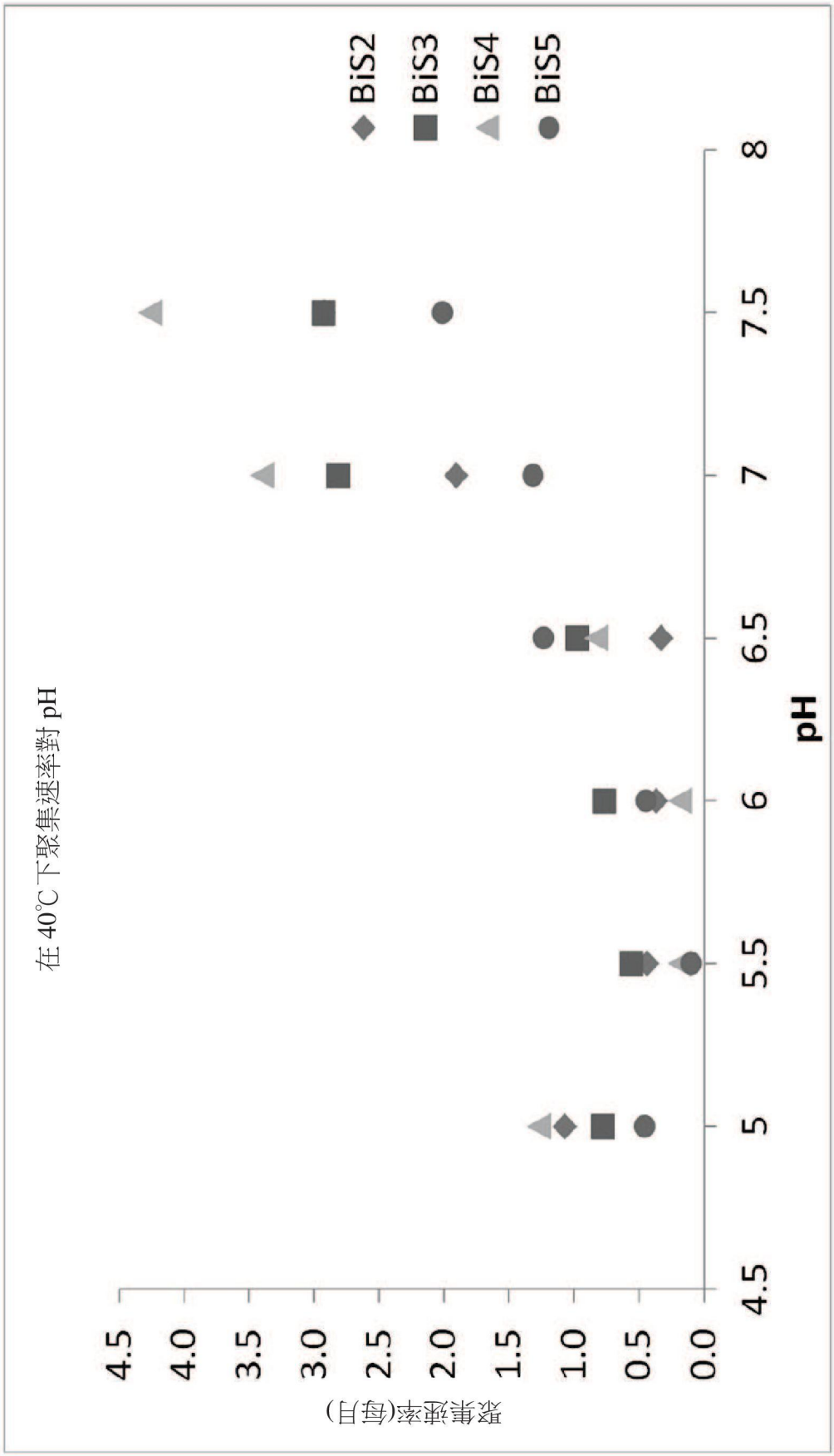
【圖 82】



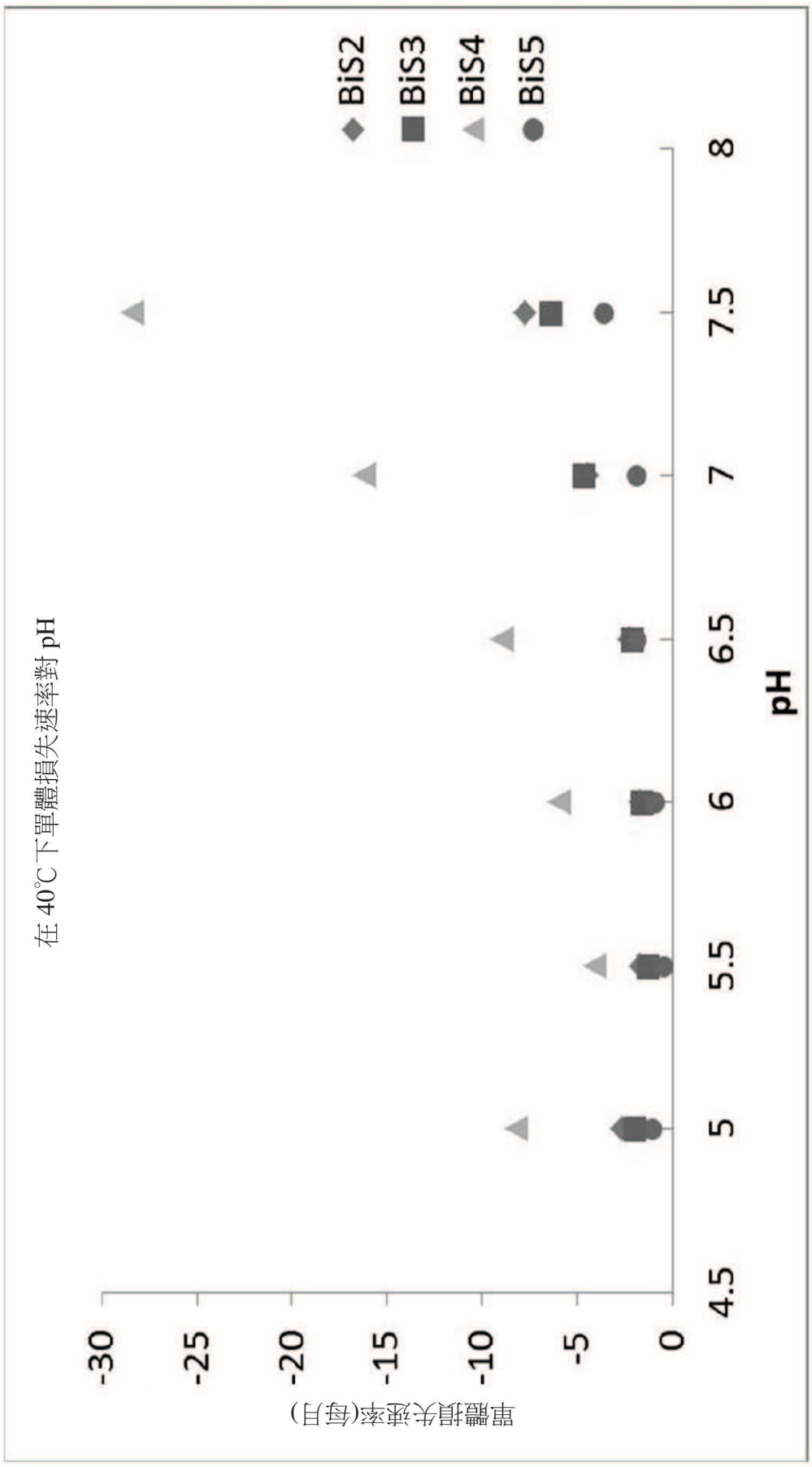
【圖 83】


在 40°C 下片段化速率對 pH
片段化速率(每月)
pH
BiS2
BiS3
BiS4
BiS5
0
4
8
12
16
20
24
28
4.5
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8

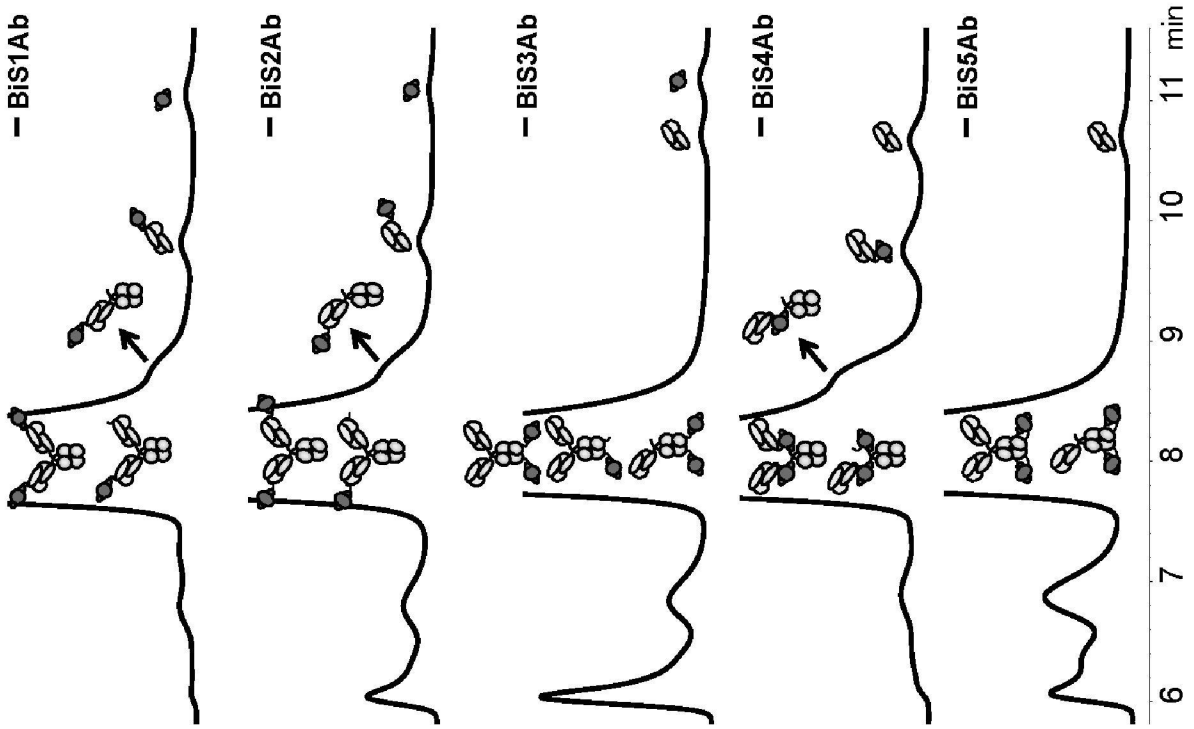
【圖 84】


在 40°C 下聚集速率對 pH
聚集速率(每月)
pH
BiS2
BiS3
BiS4
BiS5
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
4.5
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8

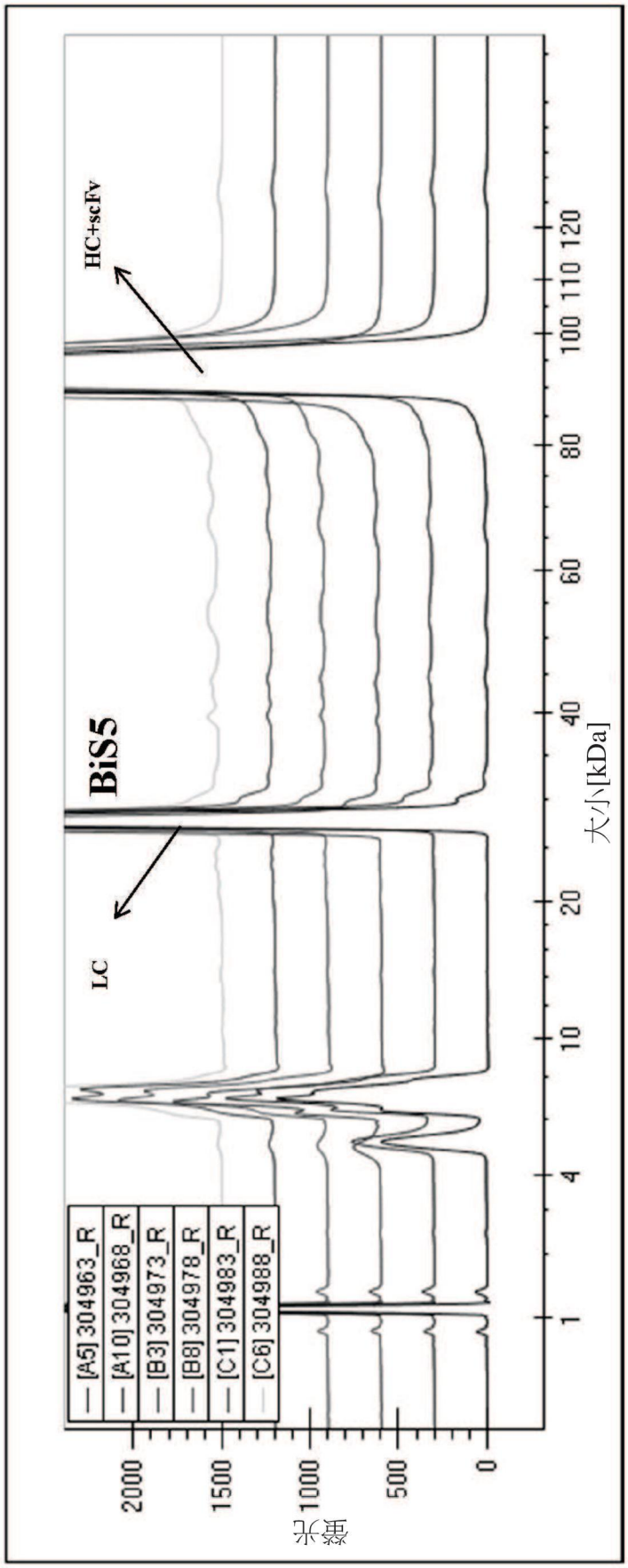
【圖 85】


在 40℃下單體損失速率對 pH
單體損失速率(每月)
-30
-25
-20
-15
-10
-5
0
4.5
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8
pH
BiS2
BiS3
BiS4
BiS5

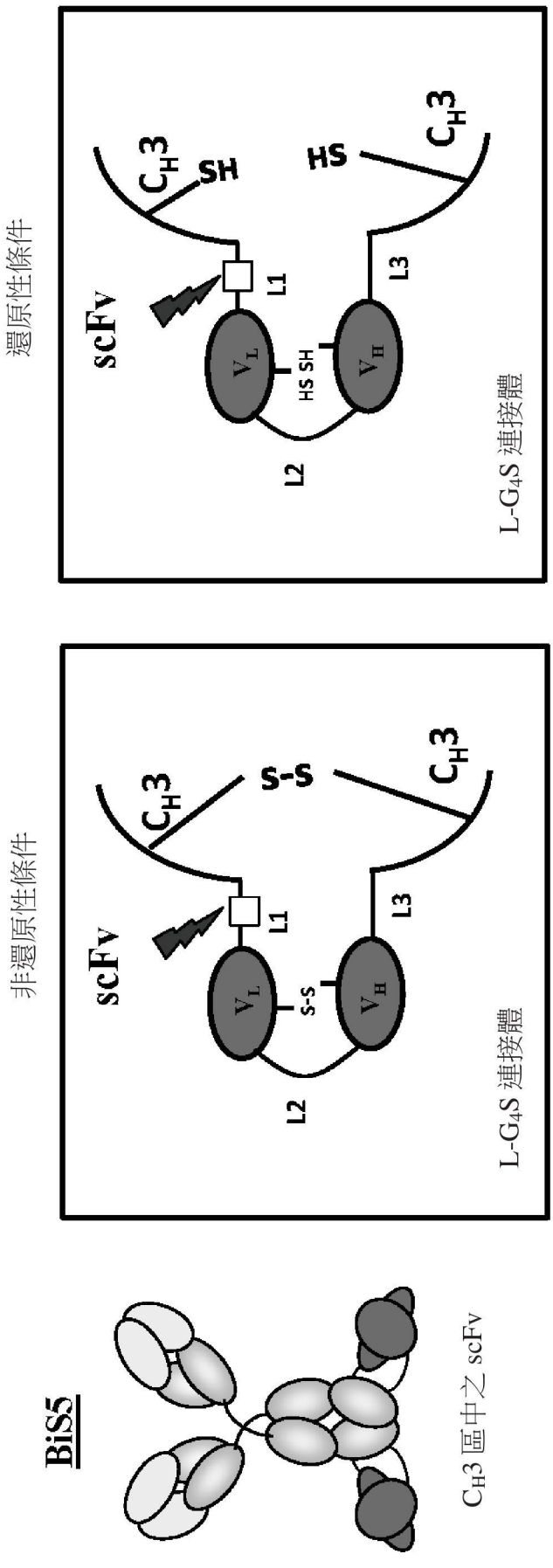
【圖 86】



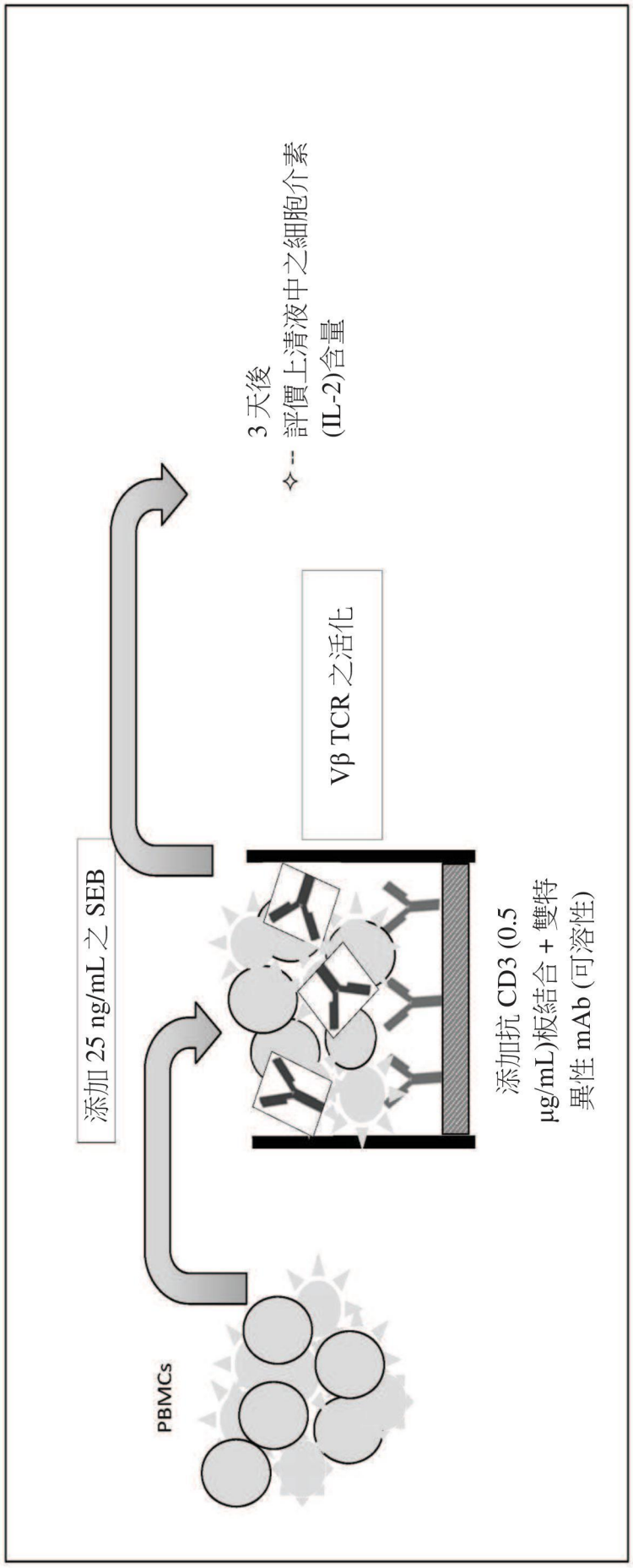
【圖 87】


HC+scFv
LC
BiS5
螢光
大小[kDa]
[A5] 304963_R
[A10] 304968_R
[B3] 304973_R
[B8] 304978_R
[C1] 304983_R
[C6] 304988_R
2000
1500
1000
500
0
1
4
10
20
40
60
80
100 110 120

【圖 88】


還原性條件
scFv
C_H3
SH
HS
C_H3
L1
L3
V_L
HS SH
V_H
L2
L-G_4S 連接體
非還原性條件
scFv
C_H3
S-S
C_H3
L1
L3
V_L
S-S
V_H
L2
L-G_4S 連接體
BiS5
C_H3 區中之 scFv

【圖 89】


SEB 分析格式
PBMCs
添加 25 ng/mL 之 SEB
添加抗 CD3 (0.5 μg/mL)板結合 + 雙特異性 mAb (可溶性)
Vβ TCR 之活化
3 天後
評價上清液中之細胞介素 (IL-2)含量

【圖 90】