(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116323647 A
(43)申请公布日 2023.06.23

(21)申请号 202180060888.6
(22)申请日 2021.05.13
(30)优先权数据
63/024,422 2020.05.13 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.01.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/032313 2021.05.13
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/231773 EN 2021.11.18
(71)申请人 博纳姆治疗公司
地址 美国华盛顿州
(72)发明人 约翰·托马斯·马利根
莎诺·里·奥卡达
贾斯汀·理查德·基利布鲁
戴安·路易斯·霍伦鲍夫
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 贺淑东 武晶晶
(51)Int.Cl.
C07K 14/435(2006.01)

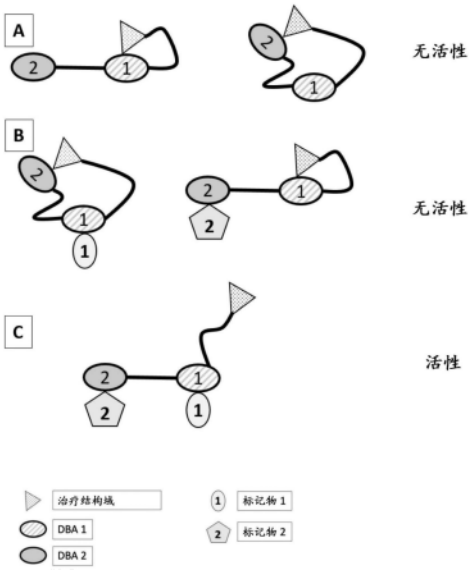
权利要求书5页 说明书212页 附图39页

(54)发明名称

蛋白质复合物的组合物及其使用方法

(57)摘要

本文提供了包含通过接头连接的传感器结构域和治疗结构域的蛋白质复合物及其使用方法。在本公开的各方面,所述治疗结构域的活性对于传感器结构域与靶标记物的结合具有依赖性。



CN 116323647 A

1.一种复合物,其包含:

a)治疗结构域;

b)接头;和

c)传感器结构域,

其中所述治疗结构域通过所述接头连接至所述传感器结构域,并且

其中所述传感器结构域被配置为结合所述治疗结构域和标记物。

2.如权利要求1所述的复合物,其中所述传感器结构域在所述标记物不存在的情况下结合至所述治疗结构域。

3.如权利要求1所述的复合物,其中当所述传感器结构域结合至所述标记物时,所述治疗结构域被阻止结合所述传感器结构域。

4.如权利要求1或2中任一项所述的复合物,其中当所述治疗结构域结合至所述传感器结构域时,所述治疗结构域的活性降低。

5.如权利要求1或3中任一项所述的复合物,其中当所述传感器结构域结合至所述标记物时,所述治疗结构域被配置为表现出治疗活性。

6.如权利要求1、3或5中任一项所述的复合物,其中当所述传感器结构域结合至所述标记物时,所述治疗结构域具有治疗活性。

7.如权利要求1-6中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域对于所述治疗结构域的亲和力具有条件依赖性。

8.如权利要求7所述的复合物,其中所述条件依赖性选自pH、温度、盐度和渗透性。

9.如权利要求1-8中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域包括抗体。

10.如权利要求9所述的复合物,其中所述抗体是抗体片段或抗体衍生物。

11.如权利要求1-10中任一项所述的复合物,其中所述复合物包含Fc结构域。

12.如权利要求1-11中任一项所述的复合物,其中所述复合物包含改善动力学特性的结构域。

13.如权利要求1-12中任一项所述的复合物,其中所述复合物具有至少12、24或48小时的血清循环半衰期。

14.如权利要求1-13中任一项所述的复合物,其中所述复合物包含多个单独表达的亚基。

15.如权利要求1-14中任一项所述的复合物,其中所述复合物包含两条重链和两条轻链。

16.如权利要求1-15中任一项所述的复合物,其中所述复合物包含第二治疗结构域。

17.如权利要求16所述的复合物,其中所述第二治疗结构域与所述治疗结构域不同。

18.如权利要求16所述的复合物,其中所述第二治疗结构域与所述治疗结构域相同。

19.如权利要求1-18中任一项所述的复合物,其中所述复合物包含第二传感器结构域。

20.如权利要求19所述的复合物,其中所述传感器结构域和所述第二传感器结构域靶向所述治疗结构域。

21.如权利要求20所述的复合物,其中所述传感器结构域和所述第二传感器结构域对于所述治疗结构域具有类似的亲和力。

22.如权利要求21所述的复合物,其中所述传感器结构域和所述第二传感器结构域对

于所述治疗结构域具有相差至少一个数量级的亲和力。

23.如权利要求21或22中任一项所述的复合物，其中所述第二传感器结构域靶向所述标记物。

24.如权利要求21或22中任一项所述的复合物，其中所述第二传感器结构域不靶向所述标记物。

25.如权利要求19-24中任一项所述的复合物，其中所述第二传感器结构域靶向第二标记物。

26.如权利要求25所述的复合物，其中在所述传感器结构域结合至所述标记物并且所述第二传感器结构域结合至所述第二标记物时，所述治疗结构域的活性是必需的。

27.如权利要求25或26中任一项所述的复合物，其中所述标记物和所述第二标记物与相同的细胞类型相关联。

28.如权利要求27所述的复合物，其中所述细胞类型是患病细胞类型。

29.如权利要求23-28中任一项所述的复合物，其中所述第二传感器结构域不靶向所述治疗结构域。

30.如权利要求23-29中任一项所述的复合物，其中所述第二传感器结构域靶向所述第二治疗结构域。

31.如权利要求29所述的复合物，其中所述第二传感器结构域不靶向治疗结构域。

32.如权利要求1-31中任一项所述的复合物，其中所述复合物是调节治疗蛋白。

33.如权利要求1-32中任一项所述的复合物，其中所述治疗结构域包括细胞因子、趋化因子、抗体、抗体片段、肽激动剂、肽拮抗剂、酶、可溶性受体、生长因子、蛋白质毒素、可溶性配体、小分子或其任何组合。

34.如权利要求9-33中任一项所述的复合物，其中所述抗体或抗体片段包括IgG、单结构域抗体片段、纳米抗体、scFab或单链可变片段(scFv)。

35.如权利要求1-34中任一项所述的复合物，其中所述治疗结构域包括IL-2受体激动剂。

36.如权利要求35所述的复合物，其中所述IL-2受体激动剂是IL-2、IL-15或其变体或融合物。

37.如权利要求1-36中任一项所述的复合物，其中所述治疗结构域包括IFNα、IFNγ、IL-12、IL-4、IL-8、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21、TGFβ、抗CD3抗体、抗CD28抗体或配体，CD40、GITR、OX40、CD137、CD27或死亡受体的抗体或配体，TGFBR2、VEGF-C、犬尿氨酸酶、IL-7、TNF、MICA、MICB、CD47的细胞外结构域，抗CTLA4抗体、抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体。

38.如权利要求1-37中任一项所述的复合物，其中所述治疗结构域结合至所述传感器结构域。

39.如权利要求1-38中任一项所述的复合物，其中所述治疗结构域、所述接头和所述传感器结构域分别表达为单肽。

40.如权利要求1-39中任一项所述的复合物，其中所述接头包括多肽。

41.如权利要求1-40中任一项所述的复合物，其中所述接头具有2至200个氨基酸的长度。

42.如权利要求40或41中任一项所述的复合物，其中所述接头的多肽缺乏人蛋白酶裂

解位点。

43.如权利要求1-42中任一项所述的复合物,其中所述接头:附接至所述传感器结构域的重链,附接至所述传感器结构域的轻链,是与所述传感器结构域的N末端的融合物,或者是与所述传感器结构域的C末端的融合物。

44.如权利要求1-42中任一项所述的复合物,其中所述接头:附接至所述治疗结构域的重链,附接至所述治疗结构域的轻链,是与所述治疗结构域的N末端的融合物,或者是与所述治疗结构域的C末端的融合物。

45.如权利要求1-44中任一项所述的复合物,其中在结合至所述传感器结构域时,所述治疗结构域的活性降低。

46.如权利要求1-45中任一项所述的复合物,其中在结合至所述传感器结构域时,所述治疗结构域无活性。

47.如权利要求1-46中任一项所述的复合物,其中在结合至所述治疗结构域时,所述传感器结构域阻断所述治疗结构域的活性。

48.如权利要求1-47中任一项所述的复合物,其中在所述传感器结构域结合至所述标记物时,所述治疗结构域具有活性。

49.如权利要求1-48中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域对于所述标记物的亲和力等于或大于所述传感器结构域对于所述治疗结构域的亲和力。

50.如权利要求1-49中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域对于所述标记物的亲和力是所述传感器结构域对于所述治疗结构域的亲和力的至少2倍、5倍、10倍、100倍、1000倍、10000倍或100000倍。

51.如权利要求1-50中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域是抗体或其片段。

52.如权利要求1-51中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域包括双特异性抗体的一个或两个抗原结合结构域。

53.如权利要求1-51中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域包括双特异性抗体的两个或更多个抗原结合结构域。

54.如权利要求1-51中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域包括双特异性抗体的三个或更多个抗原结合结构域。

55.如权利要求52所述的复合物,其中所述双特异性抗体包含能够结合至所述治疗结构域并且能够结合至所述标记物的第一抗原结合结构域,以及能够结合至所述标记物的第二抗原结合结构域。

56.如权利要求52所述的复合物,其中所述双特异性抗体包含能够结合至所述治疗结构域和所述标记物的第一抗原结合结构域,以及能够结合至第二标记物的第二抗原结合结构域。

57.如权利要求52所述的复合物,其中所述双特异性抗体包含能够结合至所述治疗结构域和所述标记物的第一抗原结合结构域,以及能够结合至所述治疗结构域和第二标记物的第二抗原结合结构域。

58.如权利要求52-57中任一项所述的复合物,其中所述双特异性抗体包含单个治疗结构域。

59.如权利要求54-56中任一项所述的复合物,其中所述治疗结构域是IFNα,所述第一

标记物是ATP,并且所述第二标记物是CEA。

60.如权利要求1-57中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域结合至IL-2受体激动剂和PD-1。

61.如权利要求58所述的复合物,其中所述IL-2受体激动剂是IL-2、IL-15或其变体或融合物。

62.如权利要求1-61中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域被配置为结合所述治疗结构域、所述标记物和第二标记物。

63.如权利要求62所述的复合物,其中所述传感器结构域的单个Fab被配置为结合所述治疗结构域、所述标记物和所述第二标记物。

64.如权利要求62或63中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域被配置为结合第三标记物。

65.如权利要求64所述的复合物,其中所述传感器结构域的所述单个Fab被配置为结合至所述第三标记物。

66.如权利要求1-65中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域结合至IFNα和PD-L1。

67.如权利要求1-66中任一项所述的复合物,其中所述标记物是表面蛋白、细胞表面标记物或可溶性ATP。

68.如权利要求1-67中任一项所述的复合物,其中所述标记物是分泌的蛋白。

69.如权利要求1-67中任一项所述的复合物,其中所述标记物由癌细胞表达。

70.如权利要求1-67中任一项所述的复合物,其中所述标记物由免疫细胞表达。

71.如权利要求1-70中任一项所述的复合物,其中所述标记物是PD-1。

72.如权利要求1-70中任一项所述的复合物,其中所述标记物是PD-L1。

73.如权利要求1-70中任一项所述的复合物,其中所述标记物是CEACAM5。

74.如权利要求1-70中任一项所述的复合物,其中所述标记物是FAP。

75.如权利要求1-70中任一项所述的复合物,其中所述标记物是LRRC15。

76.如权利要求1-70中任一项所述的复合物,其中所述标记物由基质细胞表达。

77.如权利要求1-70中任一项所述的复合物,其中所述标记物由内皮细胞表达。

78.如权利要求1-70中任一项所述的复合物,其中所述标记物是代谢物。

79.如权利要求1-70中任一项所述的复合物,其中所述标记物是腺苷、AMP、ADP或ATP。

80.如权利要求1-70中任一项所述的复合物,其中所述标记物是犬尿氨酸。

81.如权利要求1-80中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域包含选自表13的互补决定区。

82.如权利要求1-81中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域选自表13。

83.如权利要求1-82中任一项所述的复合物,其中所述复合物选自表15。

84.如权利要求1-83中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域包含与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:142-SEQ ID NO:173或SEQ ID NO:238-252中的任一个具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或100%序列同一性的互补决定区。

85.如权利要求1-83中任一项所述的复合物,其中所述传感器结构域与SEQ ID NO:21-

SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:127-SEQ ID NO:141中的任一个具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或100％序列同一性。

86.如权利要求1-83中任一项所述的复合物，其中所述蛋白质复合物与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:80-SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:174-175、SEQ ID NO:181-182、SEQ ID NO:195-196、SEQ ID NO:205-206、SEQ ID NO:210-212、SEQ ID NO:220-223、SEQ ID NO:226-231、SEQ ID NO:259-261、SEQ ID NO:266-282或SEQ ID NO:289-293中的任一个具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或100％序列同一性。

87.一种方法，其包括向有需要的对象施用如权利要求1-86中任一项所述的复合物。

88.一种治疗有需要的对象的方法，所述方法包括向所述有需要的对象施用如权利要求1-86中任一项所述的复合物。

89.如权利要求88所述的方法，其中所述施用包括静脉内、肌肉内或皮下施用。

90.如权利要求88-89中任一项所述的方法，其中所述有需要的对象患有癌症。

91.如权利要求88-90中任一项所述的方法，其中所述有需要的对象患有自身免疫性疾病。

92.如权利要求88-91中任一项所述的方法，其中所述有需要的对象患有病毒性疾病。

93.如权利要求88-82中任一项所述的方法，其中所述治疗结构域治疗所述有需要的对象。

94.如权利要求88-83中任一项所述的方法，其中所述有需要的对象是哺乳动物。

95.如权利要求94所述的方法，其中所述有需要的对象是人。

96.一种组合物，其包含编码如权利要求1-86中任一项所述的复合物的重组核酸。

97.一种药物组合物，其包含如权利要求1-86中任一项所述的复合物和药学上可接受的赋形剂。

98.一种药物组合物，其包含如权利要求96所述的组合物和药学上可接受的赋形剂。

蛋白质复合物的组合物及其使用方法

交叉引用

[0001] 本申请要求2020年5月13日提交的美国临时专利申请号63/024,422的权益,所述临时专利申请通过引用整体并入本文。

背景技术

[0002] 许多局部需要的有前途的治疗剂在全身施用时表现出毒性。需要可以全身递送但可以调节以在局部或在疾病标记物存在的情况下表现出治疗活性的药物。

发明内容

[0003] 在各个方面,本公开提供了一种复合物,其包含:a)治疗结构域;b)接头;和c)传感器结构域,其中所述治疗结构域通过所述接头连接至所述传感器结构域,并且其中所述传感器结构域能够结合所述治疗结构域和标记物。

[0004] 在一些方面,所述传感器结构域在所述标记物不存在的情况下结合至所述治疗结构域。在一些方面,在所述传感器结构域结合至所述标记物时,所述治疗结构域被阻止结合所述传感器结构域。在一些方面,在所述治疗结构域结合至所述传感器结构域时,所述治疗结构域的活性降低。在一些方面,在所述传感器结构域结合至所述标记物时,所述治疗结构域能够表现出治疗活性。在一些方面,在所述传感器结构域结合至所述标记物时,所述治疗结构域具有治疗活性。

[0005] 在一些方面,所述传感器结构域包括抗体。在一些方面,所述抗体是抗体片段或抗体衍生物。在一些方面,所述复合物包含Fc结构域。在一些方面,所述复合物包含改善动力学特性的结构域。在一些方面,所述复合物包含两条重链和两条轻链。

[0006] 在一些方面,所述复合物包含两个治疗结构域。在一些方面,所述复合物包含两个传感器结构域。在一些方面,所述复合物是调节治疗蛋白。在一些方面,所述治疗结构域是细胞因子、趋化因子、抗体、抗体片段、肽激动剂、肽拮抗剂、酶、可溶性受体、生长因子、蛋白质毒素、可溶性配体、小分子或其任何组合。在一些方面,所述抗体或抗体片段包括IgG、单结构域抗体片段、纳米抗体或单链可变片段(scFv)。

[0007] 在一些方面,所述治疗结构域是IL-2受体激动剂。在一些方面,所述IL-2受体激动剂是IL-2、IL-15或其变体或融合物。在一些方面,所述治疗结构域是IFNα、IFNγ、IL-12、IL-4、IL-8、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21、TGFβ、抗CD3抗体、抗CD28抗体或配体,CD40、GITR、OX40、CD137、CD27或死亡受体的抗体或配体,TGFBR2、VEGF-C、犬尿氨酸酶、IL-7、TNF、MICA、MICB、CD47的细胞外结构域,抗CTLA4抗体、抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体。在一些方面,所述治疗结构域结合至所述传感器结构域。

[0008] 在一些方面,所述接头是多肽接头。在一些方面,所述接头具有2至200个氨基酸的长度。在一些方面,所述接头:附接至所述传感器结构域的重链,附接至所述传感器结构域的轻链,是与所述传感器结构域的N末端的融合物,或者是与所述传感器结构域的C末端的融合物。在一些方面,所述接头:附接至所述治疗结构域的重链,附接至所述治疗结构域的

轻链，是与所述治疗结构域的N末端的融合物，或者是与所述治疗结构域的C末端的融合物。

[0009] 在一些方面，在结合至所述传感器结构域时，所述治疗结构域的活性降低。在一些方面，在结合至所述传感器结构域时，所述治疗结构域无活性。在一些方面，在结合至所述治疗结构域时，所述传感器结构域阻断所述治疗结构域的活性。在一些方面，在所述传感器结构域结合至所述标记物时，所述治疗结构域具有活性。在一些方面，所述传感器结构域对于所述标记物的亲和力等于或大于所述传感器结构域对于所述治疗结构域的亲和力。

[0010] 在一些方面，所述传感器结构域对于所述标记物的亲和力是所述传感器结构域对于所述治疗结构域的亲和力的至少2倍、5倍、10倍、100倍、1000倍、10000倍或100000倍。

[0011] 在一些方面，所述传感器结构域是抗体或其片段。在一些方面，所述传感器结构域包括双特异性抗体的一个或两个抗原结合结构域。在一些方面，所述双特异性抗体包含能够结合至所述治疗结构域并且能够结合至所述标记物的第一抗原结合结构域，以及能够结合至所述标记物的第二抗原结合结构域。在一些方面，所述双特异性抗体包含能够结合至所述治疗结构域和所述标记物的第一抗原结合结构域，以及能够结合至第二标记物的第二抗原结合结构域。在一些方面，所述双特异性抗体包含能够结合至所述治疗结构域和所述标记物的第一抗原结合结构域，以及能够结合至所述治疗结构域和第二标记物的第二抗原结合结构域。在一些方面，所述双特异性抗体包含单个治疗结构域。

[0012] 在一些方面，所述治疗结构域是IFNα，所述第一标记物是ATP，并且所述第二标记物是CEA。在一些方面，所述传感器结构域结合至IL-2受体激动剂和PD-1。在一些方面，所述IL-2受体激动剂是IL-2、IL-15或其变体或融合物。在一些方面，所述传感器结构域结合至IFNα和PD-L1。

[0013] 在一些方面，所述标记物是表面蛋白、细胞表面标记物或可溶性ATP。在一些方面，所述标记物是分泌的蛋白。在一些方面，所述标记物由癌细胞表达。在一些方面，所述标记物由免疫细胞表达。在一些方面，所述标记物是PD-1。在一些方面，所述标记物是PD-L1。在一些方面，所述标记物是CEACAM5。在一些方面，所述标记物是FAP。在一些方面，所述标记物是LRRC15。在一些方面，所述标记物由基质细胞表达。在一些方面，所述标记物由内皮细胞表达。在一些方面，所述标记物是代谢物。在一些方面，所述标记物是腺苷、AMP、ADP或ATP。在一些方面，所述标记物是犬尿氨酸。

[0014] 在一些方面，所述传感器结构域包含选自表13或表18的互补决定区。在一些方面，所述传感器结构域选自表13。在一些方面，所述复合物选自表15。

在一些方面，所述传感器结构域包含与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:142-SEQ ID NO:173或SEQ ID NO:238-252中的任一个具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或100％序列同一性的互补决定区。在一些方面，所述传感器结构域与SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:127-SEQ ID NO:141中的任一个具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或100％序列同一性。在一些方面，所述蛋白质复合物与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:80-SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:174-175、SEQ ID NO:181-182、SEQ ID NO:195-196、SEQ ID NO:205-206、SEQ ID NO:210-212、SEQ ID NO:220-223、SEQ ID NO:226-231、SEQ ID NO:259-261、SEQ ID NO:266-282、SEQ ID NO:289-293中的任一个或其片段具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或100％序列同一性。

[0015] 在各个方面，本公开提供了一种方法，其包括向有需要的对象施用以上复合物中的任一种。在各个方面，本公开提供了一种治疗有需要的对象的方法，所述方法包括向所述有需要的对象施用以上复合物中的任一种。在一些方面，所述施用包括静脉内、肌肉内或皮下施用。在一些方面，所述有需要的对象患有癌症。在一些方面，所述有需要的对象患有自身免疫性疾病。在一些方面，所述有需要的对象患有病毒性疾病。在一些方面，所述治疗结构域治疗所述有需要的对象。在一些方面，所述有需要的对象是哺乳动物。在一些方面，所述有需要的对象是人。

援引并入

[0016] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文，如同每个单独的出版物、专利或专利申请被明确且单独地指示通过引用并入。

附图说明

[0017] 本公开的新颖特征在所附权利要求书中特别地阐述。本专利或申请文件含有至少一幅以彩色绘制的附图。在提出请求并支付必要费用后，专利局将提供具有一张或多张彩色附图的本专利或专利申请公布的副本。通过参考阐述了利用本公开的原理的说明性实施方案的以下详细描述和附图将获得对本公开的特征和优点的更好的理解，在附图中：

[0018] 图1A和1B示出了本公开的蛋白质复合物的示意图。图1A示出了处于无活性状态的示例性双重结合蛋白质复合物。所述蛋白质复合物具有传感器结构域和治疗结构域。所述传感器结构域和治疗结构域通过接头连接。显示传感器结构域结合至治疗结构域，从而使治疗结构域无活性。图1B示出了处于活性状态的示例性双重结合蛋白质复合物。所述蛋白质复合物具有传感器结构域和治疗结构域。所述传感器结构域和治疗结构域通过接头连接。显示传感器结构域结合至标记物(例如，肿瘤标记物或其他疾病标记物)，从而使治疗结构域有活性。

[0019] 图2示出了结合至肿瘤时处于活性状态的蛋白质复合物的实例，以及未结合至肿瘤时处于无活性状态的蛋白质复合物的实例。

[0020] 图3示出了用于scFv抗体的无细胞表达的示例性gBlock序列。

[0021] 图4示出了候选PD-L1/IFNαDBA结合IFNα。

[0022] 图5示出了候选PD-L1/IFNαDBA结合PD-L1。

[0023] 图6示出了通过候选PD-L1/IFNαDBA抑制IFNα结合至IFNAR。

[0024] 图7示出了IFNα可以与PD-L1竞争结合至SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:26的候选PD-L1/IFNαDBA。

[0025] 图8示出了包含细胞因子治疗结构域和DBA(左)的蛋白质复合物的示意图和所述蛋白质复合物的序列(右)。

[0026] 图9A-F示出了本公开的其他蛋白质复合物的示意图，所述其他蛋白质复合物包含一个或多个传感器结构域和一个或多个治疗结构域。

[0027] 图10示出了与两种对照IFNα-抗体蛋白质复合物(抗HER2IFNα和抗PD-L1 IFNα，分别为SEQ ID NO:63-SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:62)相比，通过两种示例性PD-L1/IFNαDBA细胞因子蛋白质复合物(C08 IFNα和B09 IFNα，分别为SEQ ID NO:57-SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59-SEQ ID NO:60)产生的干扰素信号传导减少。

[0028] 图11示出了与对照IL-2-抗HER2蛋白质复合物(SEQ ID NO:65-SEQ ID NO:66)相比,通过五种示例性PD-1/IL-2DBA-细胞因子蛋白质复合物(2_A08、2_A11、2_B05、2_B07和7_A04,分别为SEQ ID NO:67-SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69-SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73-SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75-SEQ ID NO:76)产生的IL-2信号传导减少。

[0029] 图12示出了示例性PD-L1/IFNαDBA-细胞因子蛋白质复合物的PD-L1调节的IFNα活性。

[0030] 图13A-C示出了双特异性抗体的示意图,所述双特异性抗体包含一个治疗结构域和两个传感器结构域,使得两个传感器结构域必须结合其靶标记物以实现治疗结构域的活性。

[0031] 图14A-C示出了与本公开一致的含免疫球蛋白的蛋白质复合物。

[0032] 图15A-D提供了在涂覆有PD-1-Fc或IgG1对照蛋白的孔中具有图14A中描绘的结构的IL-2连接的蛋白质复合物的IL-2活性。活性测量为来自HEK-Blue™ IL-2报告细胞(一种工程化人肾细胞系,在其IL-2受体活化后产生可检测的颜色变化)的630nm信号的生长。图15A提供了PD-1/IL-2DBA-IL-2复合物的IL-2活性。图15B提供了抗Her2抗体-IL-2复合物的IL-2活性。图15C提供了抗IL-2抗体-IL-2复合物的活性。图15D提供了抗PD-1抗体-IL-2复合物的活性。

[0033] 图16A-F提供了在涂覆有PD-1-Fc或IgG1对照蛋白的孔中具有图14B中描绘的结构的蛋白质复合物的IL-2活性。活性测量为来自HEK-Blue™ IL-2报告细胞的630nm信号的生长。图16A-C提供了三种不同的PD-1/IL-2DBA-IL-2复合物的IL-2活性。图16D提供了抗PD-1抗体-IL-2复合物的活性。图16E提供了抗Her-2抗体-IL-2复合物的活性。图16F提供了抗IL-2抗体-IL-2复合物的活性。

[0034] 图17A-F提供了在涂覆有PD-1-Fc或IgG1对照蛋白的孔中具有图14C中描绘的结构的蛋白质复合物的IL-2活性。活性测量为来自HEK-Blue™ IL-2报告细胞的630nm信号的生长。图17B 17D提供了两种PD-1/IL-2DBA复合物的结果,所述复合物包含在Fab臂中的抗PD-1结构域和在Fc臂上的PD-1/IL-2DBA scFv。图17A、17C和17E-H提供了对照蛋白质复合物的结果。

[0035] 图18提供了PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物('2B07 IL-2mut')和两种对照复合物的野生型小鼠的血液中血清浓度降低的速率。

[0036] 图19A-D提供了在用PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物('2B07IL-2mut')和两种对照复合物处理后5天,从野生型小鼠收集的血液和脾脏组织中的$CD8^+$ T细胞和NK细胞计数。

[0037] 图20提供了作为在小鼠中肿瘤细胞植入后天数的函数的肿瘤体积测量值。小鼠接受各种静脉内剂量的PD-1/IL-2DBA-IL-2复合物、缺乏IL-2的PD-1/IL-2DBA复合物或同种型对照。

[0038] 图21A-F提供了六种单独的DBA PDL1-IFN变体在PD-L1存在(三角形)和不存在(正方形)的情况下IFNAR2结合的结果。

[0039] 图22A-H提供了通过五种PD-L1/IFNαDBA-细胞因子复合物和三种对照复合物进行的IFNAR2结合。

[0040] 图23A-D提供了四种单独的抗PD-L1和抗IL-15DBA的PD-L1和IL-15结合的ELISA测

量值。

[0041] 图24A-F提供了如通过对四种scFv DBA-IL-15复合物和两种单特异性抗IL-15抗体IL-15复合物的HEK-Blue™ IL-2报告细胞比色响应测量的IL-15活性。

[0042] 图25A-D提供了如通过对两种DBA-IL-15复合物和PDL1-IFN DBA对照蛋白质复合物的HEK-Blue™ IL-2报告细胞比色响应测量的IL-15活性。

[0043] 图26示出了五种双重结合scFv与CEA结合的ELISA结合数据。

[0044] 图27A-F显示了通过三种DBA-细胞因子蛋白质复合物、一种IFNα单特异性结合scFv和两种非IFNα结合scFv进行的IFNAR2结合。

[0045] 图28A提供了六种scFv与LRRC15的ELISA结合数据。来自图28A的结果在图28B中总结。

[0046] 图29A-F总结了通过四种LRRC15-IFN-αDBA-IFNα复合物和两种对照复合物进行的IFNAR2结合。

具体实施方式

[0047] 本公开提供了蛋白质复合物的组合物及其使用方法。由于有害的副作用或全身中靶毒性,有前途的治疗剂往往无法实现。本文提供了蛋白质复合物,所述蛋白质复合物在存在相关细胞和靶标的局部特异性地表现出治疗功效。此外,本公开的蛋白质复合物是自我调节的,在特定标记物不存在的情况下保持无活性,并且在特定标记物存在的情况下活化。本文公开的蛋白质复合物可以包含传感器结构域(例如,抗体或scFv),其经由接头连接至治疗结构域(例如,细胞因子、治疗抗体结构域、受体、配体)。传感器结构域可以是对治疗结构域和特定标记物具有亲和力的双重结合蛋白,使得标记物和治疗结构域竞争结合至传感器结构域。在一些实施方案中,所述双重结合蛋白是双重结合抗体。在标记物不存在的情况下,传感器结构域结合治疗结构域,从而使治疗结构域无法发挥活性。当传感器结构域结合至标记物时,治疗结构域未结合并且可以发挥活性。在一些实施方案中,通过复合物调节治疗活性可以是可逆的,也就是说,当传感器结构域与标记物解离时,传感器结构域可以结合治疗结构域,从而使治疗结构域再次无法发挥活性。因此,本公开的蛋白质复合物包含传感器结构域,其在标记物存在的情况下调节治疗结构域、结合标记物并使治疗结构域具有活性。本文公开了蛋白质复合物的各种结构和组成,包括药物制剂。本文还提供了用于通过向有需要的对象施用蛋白质复合物来治疗所述对象的方法。

[0048] 如本文所用,“标记物”可以是指被本文公开的蛋白质复合物的传感器结构域结合的部分。“标记物”的非限制性实例包括蛋白质、蛋白质修饰、碳水化合物、代谢物或任何其他可以被抗体结合的分子。标记物也可以是指疾病特异性标记物,诸如疾病状态(例如,癌症)的分子标记物。

[0049] 如本文所用,“靶标”可以是指本文公开的蛋白质复合物的治疗结构域可以通过其发挥作用的分子。“靶标”的非限制性实例包括细胞因子受体、细胞因子、配体、酶底物或任何其他分子,所述分子在被治疗结构域接触时对施用蛋白质复合物的对象(例如,人类或非人类动物)具有治疗影响。

[0050] 如本文所用,“抗体”可以是指含有部分或全部抗体可变结构域的抗体、抗体衍生物或其片段。

[0051] 术语“重组核酸”是指具有非天然存在的核苷酸序列的合成核酸。可以在实验室中合成重组核酸。通过使用DNA的酶促修饰,诸如酶限制消化、连接和DNA克隆而通过使用重组DNA技术来制备重组核酸。如本文所用的重组核酸可以是DNA或RNA。可以在体外转录重组DNA以产生信使RNA(mRNA),可以分离、纯化重组mRNA并且将其用于转染细胞。重组核酸可以编码蛋白质或多肽。可以将重组核酸在合适的条件下掺入到活细胞中,并且可以在活细胞内表达。如本文所用,核酸的“表达”通常是指核酸的转录和/或翻译。核酸表达的产物通常是蛋白质,但也可以是mRNA。在已经掺入重组核酸的细胞中检测到由重组核酸编码的mRNA被认为是核酸在细胞中“表达”的阳性证据。

[0052] 将核酸插入或掺入到细胞中的过程可以经由转化、转染或转导进行。转化是由细菌细胞摄取外来核酸的过程。此方法适于质粒DNA的增殖、蛋白质产生和其他应用。转化将重组质粒DNA引入从环境中摄取胞外DNA的感受态细菌细胞中。一些细菌物种在某些环境条件下天然是感受态的,但在实验室环境中人工诱导感染态。转染是迫使小分子诸如DNA、RNA或抗体引入到真核细胞中。只是为了产生混淆,“转染”也是指将噬菌体引入到细菌细胞中。‘转导’主要用于描述将重组病毒载体颗粒引入到靶细胞中,而‘感染’是指用野生型病毒对人或动物的自然感染。

蛋白质复合物

[0053] 本公开提供了可以自我调节治疗活性的复合物。本公开的蛋白质复合物可以包含传感器结构域和治疗结构域。所述传感器结构域和治疗结构域可以通过接头连接。传感器结构域可以调节治疗结构域的活性。调节治疗结构域的活性可以包括传感器结构域结合至治疗结构域,从而使治疗结构域无法发挥治疗活性。调节治疗结构域的活性还可以包括在传感器结构域结合至标记物时由传感器结构域解除对治疗结构域的结合或释放治疗结构域。标记物可以由与疾病相关联的细胞表达。例如,疾病可以是癌症,细胞可以是肿瘤细胞,并且标记物可以是在肿瘤细胞上表达的肿瘤特异性标记物。因此,本公开的蛋白质复合物是优异的药物候选,因为治疗结构域的传感器结构域依赖性活性允许局部活性,即使在全身施用蛋白质复合物时也是如此。与单独施用的治疗结构域相比,本公开的蛋白质复合物表现出调节的治疗结构域治疗活性。因此,与单独施用的游离治疗结构域相比,本公开的蛋白质复合物表现出降低的全身中靶毒性。

[0054] 本公开的蛋白质复合物可以具有Fc区。本公开的蛋白质复合物可以具有改善动力学特性的结构域。例如,本公开的蛋白质复合物还可以偶联至半衰期扩展剂,诸如Fc区、白蛋白、PEG或另一两性离子聚合物。本公开的蛋白质复合物可以具有两条重链和两条轻链。本公开的蛋白质复合物可以具有两条重链和一条轻链。本公开的蛋白质复合物可以包含多个传感器结构域和多个治疗结构域。例如,本公开的蛋白质复合物可以包含两个传感器结构域和两个治疗结构域,其全部连接并且其中两个治疗结构域结合至两个传感器结构域。在一些实施方案中,本公开的蛋白质复合物可以包含两个传感器结构域和一个治疗结构域,其全部连接并且其中所述治疗结构域可以结合至两个传感器结构域或两个传感器结构域中的仅一个。

[0055] 在一些实施方案中,标记物可以是表面蛋白,诸如细胞表面蛋白。标记物还可以是可溶性ATP。在一些实施方案中,标记物可以是分泌的蛋白。例如,分泌的蛋白可以是由增殖肿瘤细胞释放的蛋白质。在一些实施方案中,标记物可以由癌细胞表达。标记物可以由免疫

细胞表达。标记物可以由基质细胞表达。标记物可以由内皮细胞表达。示例性标记物包括PD1、PD-L1、CEACAM5、FAP、LRRC15、代谢物、腺苷、AMP、ADP、ATP或犬尿氨酸。其他标记物可以包括CRIPTO、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、糖蛋白NMB、CanAg、HER2(ErbB2/Neu)、CD56(NCAM)、CD70、CD79、CD138、PSCA、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、BCMA、E-选择素、EphB2、黑素转铁蛋白(Melanotransferin)、Muc16和TMEFF2或US 10,561,739中描述的任何其他标记物,其通过引用整体并入本文。其他标记物还可以包括BMPR1B、E16、STEAP1、0772P、MPF、Napi3b、信号素5b、PSCA hlg、ETBR、MSG783、STEAP2、TrpM4、CD21、CD79b、FcRH2、NCA、MDP、IL20Rα、短蛋白聚糖(Brevican)、EphB2R、ASLG659、PSCA、GEDA、BAFF-R、CD79a、CXCR5、HLA-DOB、P2X5、CD72、FCRHI、IRTA2或WO 2005/082023中描述的任何其他标记物,其通过引用整体并入本文。

[0056] 在一些实施方案中,传感器结构域与治疗结构域的结合相对于传感器结构域与标记物的结合由传感器结构域对于治疗结构域的相对亲和力来调节。在一些实施方案中,传感器结构域对于标记物的解离常数(Kd)可以低于传感器结构域对于治疗结构域的解离常数。因此,传感器对于标记物的亲和力可以高于对于治疗结构域的亲和力(更低的Kd)。本公开的传感器结构域可以例如通过亲和力成熟来工程化,以便对于标记物的亲和力高于对于治疗结构域的亲和力(更低的解离常数)。在标记物不存在的情况下,本公开的传感器结构域可以对于治疗结构域具有足够高的亲和力,使得治疗结构域被传感器结构域结合。在标记物存在的情况下,传感器结构域对于标记物的亲和力足够高(低解离常数),使得标记物超过治疗结构域以结合至传感器结构域。因此,平衡结合从传感器结构域结合至治疗结构域的状态转变为治疗结构域未结合并且传感器结构域结合至标记物的状态。

[0057] 传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少2倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少5倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少10倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少15倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少20倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少25倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少30倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少35倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少40倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少45倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少50倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少60倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少70倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少80倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少90倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少100倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少150倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少200倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少250倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少300倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少

350倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少400倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少450倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少500倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少1000倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少10000倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的至少100000倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的2至10倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的10至20倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的20至30倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的30至40倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的40至50倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的50至100倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的100至150倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的150至200倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的200至250倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的250至300倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的300至350倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的350至400倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的400至450倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的450至500倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的500至1000倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的10至80倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的30至70倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的40至60倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的20至50倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的10至1000倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的70至500倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的100至500倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的500至750倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的250至750倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的1000至100000倍。传感器结构域对于标记物的亲和力可以是对于治疗结构域的亲和力的2至100000倍。

[0058] 本公开的蛋白质复合物或其片段可以包含一个或多个与本文公开的任一个互补决定区(CDR)具有至少80％序列同一性的CDR。例如，本公开的蛋白质复合物或其片段可以包含一个或多个与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:142-173或SEQ ID NO:238-252中的任一个具有至少80％序列同一性的CDR。本公开的蛋白质复合物或其片段可以包含一个或多个与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:142-173或SEQ ID NO:238-252中的任一个具有至少85％序列同一性的CDR。本公开的蛋白质复合物或其片段可以包含一个或多个与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:142-173或SEQ ID NO:238-252中的任一个具有至少90％序列同一性的CDR。本公开的蛋白质复合物或其片段可以包含一个或多个与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:142-173或SEQ ID NO:238-252中的任一个具有至少

92％序列同一性的CDR。本公开的蛋白质复合物或其片段可以包含一个或多个与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:142-173或SEQ ID NO:238-252中的任一个具有至少95％序列同一性的CDR。本公开的蛋白质复合物或其片段可以包含一个或多个与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:142-173或SEQ ID NO:238-252中的任一个具有至少97％序列同一性的CDR。本公开的蛋白质复合物或其片段可以包含一个或多个与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:142-173或SEQ ID NO:238-252中的任一个具有至少99％序列同一性的CDR。本公开的蛋白质复合物或其片段可以包含一个或多个具有SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:142-173或SEQ ID NO:238-252中的任一个的CDR。

[0059] 蛋白质复合物或其片段可以与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:80-SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:174-175、SEQ ID NO:181-182、SEQ ID NO:195-196、SEQ ID NO:205-206、SEQ ID NO:210-212、SEQ ID NO:220-223、SEQ ID NO:226-231、SEQ ID NO:259-261、SEQ ID NO:266-282或SEQ ID NO:289-293或其片段中的任一个具有至少80％序列同一性。蛋白质复合物可以与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:80-SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:174-175、SEQ ID NO:181-182、SEQ ID NO:195-196、SEQ ID NO:205-206、SEQ ID NO:210-212、SEQ ID NO:220-223、SEQ ID NO:226-231、SEQ ID NO:259-261、SEQ ID NO:266-282或SEQ ID NO:289-293或其片段中的任一个具有至少85％序列同一性。蛋白质复合物可以与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:80-SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:174-175、SEQ ID NO:181-182、SEQ ID NO:195-196、SEQ ID NO:205-206、SEQ ID NO:210-212、SEQ ID NO:220-223、SEQ ID NO:226-231、SEQ ID NO:259-261、SEQ ID NO:266-282或SEQ ID NO:289-293或其片段中的任一个具有至少90％序列同一性。蛋白质复合物可以与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:80-SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:174-175、SEQ ID NO:181-182、SEQ ID NO:195-196、SEQ ID NO:205-206、SEQ ID NO:210-212、SEQ ID NO:220-223、SEQ ID NO:226-231、SEQ ID NO:259-261、SEQ ID NO:266-282或SEQ ID NO:289-293或其片段中的任一个具有至少92％序列同一性。蛋白质复合物可以与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:80-SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:174-175、SEQ ID NO:181-182、SEQ ID NO:195-196、SEQ ID NO:205-206、SEQ ID NO:210-212、SEQ ID NO:220-223、SEQ ID NO:226-231、SEQ ID NO:259-261、SEQ ID NO:266-282或SEQ ID NO:289-293或其片段中的任一个具有至少95％序列同一性。蛋白质复合物可以与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:80-SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:174-175、SEQ ID NO:181-182、SEQ ID NO:195-196、SEQ ID NO:205-206、SEQ ID NO:210-212、SEQ ID NO:220-223、SEQ ID NO:226-231、SEQ ID NO:259-261、SEQ ID NO:266-282或SEQ ID NO:289-293或其片段中的任一个具有至少97％序列同一性。蛋白质复合物可以与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:80-SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:174-175、SEQ ID NO:181-182、SEQ ID NO:195-196、SEQ ID NO:205-206、SEQ ID NO:210-212、SEQ ID NO:220-223、SEQ ID NO:226-231、SEQ ID NO:259-261、SEQ ID NO:266-282或SEQ ID NO:289-293或其片段中的任一个具有至少99％序列同一性。蛋白质复合物是SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:80-SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:174-175、SEQ ID NO:181-182、SEQ ID NO:195-196、SEQ ID NO:205-206、SEQ ID NO:210-212、SEQ ID NO:220-223、SEQ ID NO:226-231、SEQ ID NO:259-261、SEQ ID NO:266-282或SEQ ID NO:289-293或其片段中的任一个。

[0060] 本公开的蛋白质复合物可以与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:80-SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:174-175、SEQ ID NO:181-182、SEQ ID NO:195-196、SEQ ID NO:205-206、SEQ ID NO:210-212、SEQ ID NO:220-223、SEQ ID NO:226-231、SEQ ID NO:259-261、SEQ ID NO:266-282或SEQ ID NO:289-293或其片段中的任一个具有至少95％序列同一性，并且具有一个或多个与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:142-173或SEQ ID NO:238-252中的任一个具有至少80％序列同一性的CDR。本公开的蛋白质复合物可以具有以任何组合或顺序布置的选自SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:142-173或SEQ ID NO:238-252的CDR。

[0061] 以上任一个的片段可以保留传感器的功能结合结构域或治疗剂的任何功能治疗结构域。例如，双重结合抗体蛋白质复合物可以包括整个抗体或具有能够结合至标记物和治疗结构域的抗体区域的片段。在后一种情况下，片段可以是可以结合至标记物和治疗结构域的scFv。本公开的蛋白质复合物的示例性序列在以下表1中示出。

表1-示例性蛋白质复合物

SEQ ID NO	序列	描述
SEQ ID NO: 41	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLA QMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFG NQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFST KDSSAAWDETLLDKFYTELYQQL NDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSI LAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQ LVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFSNYYVHWVRQAPGQGLEWM GWMDPNSGGTGYAHQFQGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVY YCAKEVFSGWYDYWGQGTLVTVS SASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQS ISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGT KVEIKGKPIPNPLLGLDST	蛋白质复合物包括 DBA/细胞因子复合物，其具有 PD-L1/IFNα scFv 传感器结构域和 IFNα 治疗结构域 scFv_IFN-_重_GS20_PDL1-IFN_1A05_H_I39V_S58P_Q69H_K70Q
SEQ ID NO: 42	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTKNYMHWVRQAPGQGLE	蛋白质复合物包括 DBA/细

SEQ ID NO	序列	描述
	WLGWVSPDSGYTGYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCTTDLLSLELDDAFDIWGQGT MVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGS HASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGGGTKLEIKPRGPTIKPCPPCK CPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLR VVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVN NKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVY VLPPCEEEMTKKQVTLSCAVTDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYFMVSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRT PGK	胞因子复合物，其具有 PD-L1 抗体传感器结构域和 IFNα 治疗结构域，其中 DBA 是 scFv PDL1-IFN_uIFN_2D10scFv_KiH_PDL1-IFN_1A05_H_N36G_Pep1
SEQ ID NO: 43	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRI SLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQ KAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSS AAWDETLLDKFCTELYQQLNDLE ACVMQEERVGETPLMNADSILAV KKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVV RAEIVRSLSLSTNLQERLRRKEGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQ SGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFS	包括 DBA/细胞因子复合物的蛋白质复合物的第一条重链，所述复合物具有 PD-L1 结合结构域和 IFNα 治疗结构域

SEQ ID NO	序列	描述
	GYYIHWVRQAPGQGLEWMGWMD SNSGGTGYAQKFQGRVTMTRDTS TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAKE VFSGWYDYWGQGTLVTVSSAKTT APSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCL VKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPP KIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHR EDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSG KEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVCVLPPPEEEMTKKQVT LWCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKT ELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLR VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGK	PDL1- IFN_uIFN_2D 10scFv_KiH_P DL1- IFN_1A05_H_ N36G_Pep2
SEQ ID NO: 44	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFG QGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKW KIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDST YSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEA THKTSTSPIVKSFNRNEC	包括 DBA/细胞因子复合物的蛋白质复合物的第一条轻链，所述复合物具有 PD-L1 scFv 传感器结构域和 IFNα 治疗结构域

SEQ ID NO	序列	描述
		PDL1-IFN_uIFN_2D10scFv_KiH_PDL1-IFN_1A05_H_N36G_Pep3
SEQ ID NO: 303	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFTRYYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGYASY	PD1-IL2_3x_Cterm_Nivo_2B07_H_H37Y_L_A107Y_S109R； AF4505_pep2

SEQ ID NO	序列	描述
	AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCAAGLFIWGQGT LVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGS HASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSIGRWLAWYQQKPGKAPK LLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYNRFP VTFGPGTKVDIK	
SEQ ID NO: 304	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCK ASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAV YYCATNDDYWGQGTLVTVSSAKT TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGC LVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWP SQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRG PTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFP PKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTH REDYNSTLRVVSALPIQHQDWMS GKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKP KGSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQ VSLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLKSDGSYFMYSK LTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HNHHTTKSFSRTPGGGGGSGGGGS	PD1- IL2_3x_Cterm _Nivo_704var AF4504_pep2

SEQ ID NO	序列	描述
	GGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASGYTFTRYYMHW VRQAPGQGLEWMGIINPRAGYTSY ALKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCTSGWDVWGQGT LVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGS HASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISTWLAWYQQKPGKAPK LLIYAASSLDSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSFP VTFGQGTKVEIK	
SEQ ID NO: 181	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTDMLTFEFYMPK KATELKHLQCLERELKPLEEVLNL AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGDTFTRYYVHWVRQ APGQGLEWMGIINPSGGYASYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCAAGLFIWGQGTLV TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTG SSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVT VTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKV DKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAA	PD1-IL2_3x_Asym_PD1-IL2_2B07_H_H37Y_L_W38Y_A107Y

SEQ ID NO	序列	描述
	GGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTC VVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEV HTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI QHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGA PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEE EMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYV EWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDG SYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSC SVVHEGLHNHHTTESFSRTPGK	
SEQ ID NO: 182	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGDTFTRYYVHWVRQAPGQGLE WMGIINPSGGYASYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAAGLFIWGQGTLVTVSSAKTT APSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCL VKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPP KIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHR EDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSG KEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVS LTCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKT ELNYKNTEPVLKSDGSYFMYSKLT VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN	PD1- IL2_3x_Asym_ PD1- IL2_2B07_H_ H37Y_L_W38 Y_A107Y

SEQ ID NO	序列	描述
	HHTTKSFSRTPGGGGSGGGSHHHHHH	
SEQ ID NO: 183	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLERELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPRAGYTSYALKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTSGWDVWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTESFSRTPGK	PD1-IL2_3x_Asym_PD1-IL2_7A04_H_M115W_L_Q68D

SEQ ID NO	序列	描述
SEQ ID NO: 184	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLE WMGIINPRAGYTSYALKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCTSGWDVWGQGTLVTVSSAKT TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGC LVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWP SQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRG PTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFP PKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTH REDYNSTLRVVSALPIQHQDWMS GKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKP KGSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQ VSLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLKSDGSYFMYSK LTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HNHHTTKSFSRTPGGGGSGGGSHH HHHH	PD1-IL2_3x_Asym_PD1-IL2_7A04_H_M115W_L_Q68D

A.传感器结构域

[0062] 本公开的蛋白质复合物包含传感器结构域。传感器结构域可以是能够感测第一部分的存在并调节第二部分的任何蛋白质，其中第一部分是标记物(例如，肿瘤细胞标记物)，并且第二部分是治疗结构域(例如，细胞因子治疗结构域)。例如，本公开提供了一种传感器结构域，其可以是能够结合第一部分并结合并阻断第二部分的活性的抗体或抗体片段，其中第一部分是标记物(例如，肿瘤细胞标记物)，并且第二部分是治疗结构域(例如，细胞因子治疗结构域)。在第一部分不存在的情况下，传感器结构域结合第二部分。如果将第一部分引入系统中，则传感器结构域结合第一部分并解除对第二部分的结合。因此，第二部分的结合和解除结合是可逆的。传感器结构域通过结合治疗结构域并阻止其与其靶标(例如，受体、配体或底物)结合来灭活或阻断治疗结构域的活性。传感器结构域通过在标记物结合时释放治疗结构域以作用于其靶标来调节治疗结构域。

[0063] 在一些实施方案中，传感器结构域是双重结合蛋白，诸如双重结合抗体。双重结合蛋白可以能够结合标记物和治疗结构域。本公开的双重结合蛋白可以被选择或工程化以结合标记物和治疗结构域。与治疗结构域相比，双重结合蛋白对于标记物可以具有更高的亲和力。双重结合蛋白可以是亲和力成熟的，以便与治疗结构域相比，对于标记物具有更高的亲和力。

[0064] 在一些实施方案中，传感器结构域是抗体。传感器结构域也可以是抗体片段。与本文公开的传感器结构域一致的抗体片段保留其表现出与标记物和治疗结构域两者双重结合的能力。双特异性抗体的一个或两个结构域可以是本公开的蛋白质复合物的传感器结构域。在使用双特异性抗体的情况下，双特异性抗体可以包含可以结合治疗结构域和标记物的第一抗原结合结构域，并且还可以包含能够结合标记物的第二抗原结合结构域。在一些实施方案中，双特异性抗体可以具有结合治疗结构域和第一标记物的第一抗原结合结构域，以及结合第二标记物的第二抗原结合结构域。在一些实施方案中，双特异性抗体可以具有结合治疗结构域和第一标记物的第一抗原结合结构域，以及结合治疗结构域和第二标记物的第二抗原结合结构域。在一些实施方案中，第一和第二抗原结合结构域可以结合至相同的治疗结构域(图13)。

[0065] 在一些实施方案中，两个传感器结构域可以结合至单个IFNα结构域，其通过接头连接至两个抗体结构域；第一抗体结构域可以结合至CEA(第一标记物)和IFNα结构域，并且第二抗体结构域可以结合至ATP(第二标记物)和IFNα结构域，使得IFNα仅在CEA和ATP存在的情况下才能结合其受体(图13)。

[0066] 在一些实施方案中，传感器结构域是抗PD1或抗PDL1抗体或其片段(例如，结合PD1或PD-L1的scFv)。在一些实施例中，传感器结构域结合至标记物，包括表面蛋白诸如细胞表面蛋白、可溶性ATP、分泌的蛋白、PD1、PD-L1、CEACAM5、FAP、LRRC15、代谢物、腺苷、AMP、ADP、ATP、或犬尿氨酸、或CRIPTO、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、糖蛋白NMB、CanAg、HER2(ErbB2/Neu)、CD56(NCAM)、CD70、CD79、CD138、PSCA、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、BCMA、E-选择素、EphB2、黑素转铁蛋白、Muc16和TMEFF2、BMPR1B、E16、STEAP1、0772P、MPF、Napi3b、信号素5b、PSCA hlg、ETBR、MSG783、STEAP2、TrpM4、CD21、CD79b、FcRH2、NCA、MDP、IL20Rα、短蛋白聚糖、EphB2R、ASLG659、PSCA、GEDA、BAFF-R、CD79a、CXCR5、HLA-DOB、P2X5、CD72、FCRHI、IRTA2、唾液酸、或US 10,561,739(通过引用整体并入本文)或WO 2005/082023(通过引用整体并入本文)中描述的任何其他标记物。

[0067] 在一些实施方案中，传感器结构域具有条件依赖性靶亲和力。许多细胞类型，包括一系列癌细胞类型，产生与健康细胞不同的特定细胞外和组织特异性微环境。最近，细胞外钠消耗与某些脑癌之间的联系受到极大关注。作为另一个实例，一些癌症产生低pH微环境，这可能影响膜组质子化和构象模式的变化。因此，传感器结构域可以在特定条件存在的情况下对于靶标记物具有增强的亲和力。传感器结果域可以对pH、温度、盐度、渗透压或其任何组合产生应答。例如，传感器结构域可以在特定条件存在的情况下对于靶分子具有高一个数量级的亲和力或者对于治疗结构域具有低一个数量级的亲和力。特定条件可以影响传感器(例如，传感器的电荷或构象)、靶标(例如，靶标的电荷或溶解度)或两者。

B.治疗结构域

[0068] 本公开的蛋白质复合物包含治疗结构域。本公开的治疗结构域经由接头连接至传

感器结构域以形成蛋白质复合物。治疗结构域可以通过结合至靶标来发挥治疗活性。例如，治疗结构域可以是细胞因子，并且其靶标可以是受体靶标。在细胞因子结合至其受体靶标时，细胞因子可以调节细胞增殖、活化、分化并且/或者可以发挥抗肿瘤或抗病毒活性。与本公开的蛋白质复合物一致的治疗结构域包括细胞因子、趋化因子、抗体、抗体片段、肽激动剂、肽拮抗剂、酶、可溶性受体、生长因子、蛋白质毒素、可溶性配体、小分子或其组合。在一些实施方案中，抗体或抗体片段包括IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、Fab、F(ab)'2、单结构域抗体片段(例如，纳米抗体)、双体抗体、scFab、scFv、$(scFv)_2$或任何片段(例如，Fc结构域或CH结构域)或其组合。

[0069] 在一些实施方案中，本公开的蛋白质复合物包含治疗结构域，其包括IL-2受体激动剂、IL-12受体激动剂或IFNα或这些细胞因子的变体或融合物。在一些方案中，治疗结构域可以是IFNα、IFNγ、IL-12、IL-4、IL-8、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21、TGFβ、抗CD3抗体、抗CD28抗体或配体，CD40、GITR、OX40、CD137、CD27或死亡受体的抗体或配体，TGFBR2、VEGF-C、犬尿氨酸酶、IL-7、TNF、MICA、MICB、CD47的细胞外结构域，抗CTLA4抗体、抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体。治疗结构域也可以是任何以上提及部分的片段。片段保留与其靶标(例如，IL-2受体)结合所需的部分的功能区域和活性所需的任何功能区域。

C.接头

[0070] 本文公开的蛋白质复合物可以包含接头。接头可以连接两个结构域，诸如传感器结构域和治疗结构域。接头可以连接传感器结构域的两个部分，例如轻链可变结构域和重链可变结构域。各种接头与本公开的蛋白质复合物一致。在一些实施方案中，接头可以是氨基酸接头或化学接头。

[0071] 接头可以是稳定接头。例如，接头可以维持治疗结构域与传感器结构域之间的连接，即使在传感器结构域与标记物结合并且因此治疗结构域与传感器结构域的结合解除时也是如此。例如，尽管传感器结构域可以解除与治疗结构域的结合，但治疗结构域可以经由接头保持与传感器结构域连接。与此活性一致的接头的实例可以包括不可裂解的接头。

[0072] 接头也可以是柔性接头。柔性接头是足够长以允许治疗结构域一旦与传感器结构域解除结合就结合至其靶标的接头。接头的柔性可以影响治疗功效。例如，在传感器结构域与标记物结合并解除与治疗结构域的结合时，治疗结构域需要能够遇到并结合其治疗靶标(例如，与标记物位于同一细胞表面上的受体或在与标记物相邻的细胞表面上的受体)。如果接头不足够柔性以允许治疗结构域结合其治疗靶标，则治疗功效可能会降低或不被发挥出来。当接头是柔性的时，治疗结构域可以能够结合其治疗靶标并发挥高治疗功效。接头的柔性可以由接头的长度产生。例如，短接头可以在空间上阻碍治疗结构域结合其靶标。较长的接头可以允许蛋白质复合物更具柔性，并允许治疗结构域结合其靶标。在一些实施方案中，接头过长可能影响传感器结构域结合治疗结构域的能力，并在标记物不存在的情况下抑制活性。在一些实施方案中，接头过长可能影响蛋白质治疗结构域的稳定性或蛋白质治疗结构域在体内的半衰期。

[0073] 在一些实施例中，接头可以附接至传感器结构域的重链或传感器结构域的轻链。接头可以与传感器结构域的N末端或C末端融合。在一些实施方案中，接头可以附接至治疗结构域的重链或轻链，或者与治疗结构域的N末端或C末端融合。例如，接头可以附接至scFV或ScFab的N末端或C末端。

[0074] 氨基酸接头。氨基酸接头可以包含任何氨基酸残基。在一些实施方案中，受青睐的氨基酸残基是具有熵柔性的氨基酸残基。本公开的氨基酸接头中受青睐的氨基酸残基可以包括甘氨酸和丝氨酸。其他优选的氨基酸残基可以包括丙氨酸、脯氨酸、苏氨酸和谷氨酸。在优选实施方案中，氨基酸接头可以具有3至60个氨基酸残基的长度。在一些实施方案中，氨基酸接头可以包含20个氨基酸残基。在一些实施方案中，氨基酸接头可以包含40个氨基酸残基。在一些实施方案中，氨基酸接头可以包含60个氨基酸残基。在一些实施方案中，氨基酸接头可以包含80个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少5个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少10个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少15个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少20个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少25个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少30个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少35个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少40个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少45个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少50个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少55个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少60个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少65个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少70个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少75个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少80个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少85个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少90个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少95个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少100个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少110个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少120个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少130个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少140个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少150个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少160个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少170个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少180个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少190个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少200个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少300个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少400个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含至少500个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含5至10个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含10至15个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含15至20个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含20至25个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含25至30个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含30至35个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含35至40个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含40至45个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含45至50个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含50至55个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含55至60个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含60至65个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含65至70个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含70至75个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含75至80个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含80至85个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含85至90个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含90至95个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含95至100个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含5至80个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含20至40个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含20至80个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含30至60个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含40至50个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含10至30个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含10至20个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含5至25个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含25至75个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含100至500个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含100至300个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含5至500个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过100个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过90个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超

过80个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过70个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过60个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过50个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过40个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过30个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过20个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过10个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过95个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过90个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过85个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过80个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过75个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过70个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过65个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过60个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过55个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过50个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过45个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过40个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过35个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过30个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过25个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过20个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过15个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过10个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过200个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过300个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过400个氨基酸残基。氨基酸接头可以包含不超过500个氨基酸残基。

不可裂解的接头。

[0075] 本公开的不可裂解的接头可以包括稳定的化学接头。与本公开的蛋白质复合物一致的用于连接传感器结构域和治疗结构域的不可裂解的接头的实例可以包括硫醚接头、烷基接头、聚合物接头。接头可以是SMCC接头或PEG接头。在优选实施方案中，接头可以是PEG接头。

[0076] 不可裂解的接头还可以包括不可蛋白水解裂解的肽。不可蛋白水解裂解的肽对于给定样品或生物体中存在的蛋白酶可以是惰性的。例如，肽对于所有人蛋白酶裂解序列可以是惰性的，并且因此可以在人和人样品内具有高度稳定性。这种肽还可以具有二级结构，其使蛋白酶裂解位点对于蛋白酶是惰性的或蛋白酶无法接近。本公开的不可裂解的接头可以在25℃下在pH 7缓冲液中在人蛋白酶存在的情况下具有至少1小时、至少2小时、至少4小时、至少8小时、至少12小时、至少16小时、至少1天、至少2天、至少3天、至少1周、至少2周或至少1个月的裂解半衰期。

D.蛋白质复合物结构

[0077] 本公开提供了跨越一系列结构的多种蛋白质复合物。本公开的蛋白质复合物可以包含作为单个单元表达的治疗结构域和传感器结构域。治疗结构域可以作为传感器结构域的N末端扩展、作为传感器结构域的C末端扩展表达，或设置在传感器结构域内。例如，蛋白质复合物可以包括肽，其从N末端至C末端包含治疗结构域、肽接头、scFv结构域和任选地标签，诸如纯化标签(例如，V5或myc标签)或定位信号。可替代地，治疗结构域和传感器结构域可以在表达后偶联(例如，化学偶联)。

[0078] 蛋白质复合物可以包含多个蛋白质亚基。多个蛋白质亚基(例如，一个治疗结构域和一个传感器结构域、两个传感器结构域或一个传感器结构域的两个亚基)可以在表达后化学或物理偶联。多个蛋白质亚基可以包括多个传感器和/或治疗结构域。传感器和/或治疗结构域可以由单个蛋白质亚基、多个蛋白质亚基或其部分组成。例如，传感器结构域可以

包括抗体Fab区,其包含免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链的一部分。

[0079] 多个蛋白质亚基可以包含有利于其选择性偶联的物理手柄。物理手柄可以实现蛋白质亚基之间的自发、不可逆和/或非介导(例如,不需要伴侣蛋白或催化复合物)偶联,从而实现复杂和不对称的蛋白质复合物。例如,在单个中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达的两个不同的蛋白质复合物亚基,可以包含物理手柄,其在细胞输出之前自发且不可逆地偶联。此类物理手柄可以包括‘杵臼’(KIH)构建体或电荷交换构建体,其中两个蛋白质亚基包括具有相互结合亲和力和特异性的物理结构。此类物理手柄可以包括共价结合对,例如被配置成形成二硫键的多个硫醇。物理手柄可以使得容易地产生包含相同或不同结构域的蛋白质复合物。

[0080] 蛋白质复合物可以包含两个或更多个相同的结构域。这种蛋白质复合物的实例在图14A中提供,其说明了与两个IL-2治疗结构域偶联的抗体(多传感器结构域)。在这个实例中,蛋白质复合物包含复合的两个蛋白质免疫球蛋白轻链亚基和两个免疫球蛋白重链亚基以形成感受态抗体。两个免疫球蛋白重链亚基包括与IL-2治疗结构域偶联的N末端接头。每个免疫球蛋白重链与免疫球蛋白轻链偶联,使得蛋白质复合物包含两个Fab区,每个区域分别经由接头与治疗结构域偶联。

[0081] 虽然以上实例提供了具有两个相同传感器结构域和两个相同治疗结构域的对称蛋白质复合物,但是蛋白质复合物还可以包含多个不同的传感器和/或治疗结构域。这种蛋白质复合物可以包含具有第一臂和第二臂的免疫球蛋白单元,所述第一臂由重链-轻链对组成,所述第二臂由抗体片段,诸如scFv、scFab、VH或其片段组成。在这种情况下,重链、抗体片段或轻链可以包含具有接头和治疗结构域的N末端延伸,分别如图9A、C和F所示。可替代地,重链、抗体片段或轻链可以包含具有接头和治疗结构域的C末端延伸。蛋白质复合物还可以包含具有单个治疗结构域的对称免疫球蛋白单元。例如,如图9B所示,免疫球蛋白单元可以包含在单个重链上的N末端接头和治疗单元。可替代地,免疫球蛋白单元可以包含在单个轻链上的N末端接头和治疗单元。免疫球蛋白单元还可以包含一对与单个Fc区偶联的抗体片段。免疫球蛋白单元可以包含纳米抗体。免疫球蛋白单元可以包含双体抗体。

[0082] 在一些情况下,多个不同的传感器结构域与多个不同的治疗结构域缔合。此类多个传感器结构域可以具有共同的靶标。例如,蛋白质复合物可以包含第一传感器结构域和第二传感器结构域,所述第一传感器结构域与IL-2治疗结构域缔合并且对于IL-2和PD-1具有亲和力,所述第二传感器结构域与IFNα治疗结构域缔合并且对于IFNα和PD-1具有亲和力。可替代地,多个传感器结构域可以具有单独的靶标。例如,蛋白质复合物可以包含第一传感器结构域和第二传感器结构域,所述第一传感器结构域与IL-2治疗结构域缔合并且对于IL-2和PD-1具有亲和力,所述第二传感器结构域与IFNα治疗结构域缔合并且对于IFNα和CEACAM5具有亲和力。

[0083] 蛋白质复合物可以包含被一个或多个传感器结构域靶向的治疗结构域。包含此类多个传感器结构域的蛋白质复合物的活性可以具有多靶标依赖性。此概念在图13中说明,其提供了一种蛋白质复合物,所述蛋白质复合物包含治疗结构域、靶向治疗结构域和第一靶标(‘标记物1’)的第一传感器结构域以及靶向治疗结构域和第二靶标(‘标记物2’)的第二传感器结构域。在此实例中,标记物1的存在导致治疗结构域结合至DBA 2,而标记物2的存在导致治疗结构域结合至DBA 1。然而,标记物1和标记物2的存在释放了治疗结果域,从

而增强其活性。因此，蛋白质复合物的活性在其两个标记物存在的情况下是必需的。这种系统的一个实例可以是一种蛋白质复合物，其包含靶向IL-2和PD-1的第一传感器结构域和靶向IL-2和CEACAM5的第二传感器结构域，使得CEACAM5和PD-1是蛋白质复合物的IL-2活性必需的。蛋白质复合物可以对于至少2个、至少3个、至少4个或至少5个靶标记物具有依赖性。蛋白质复合物可以对于至多5个、至多4个、至多3个、至多2个或单个靶标记物具有依赖性。

[0084] 多标记物活性依赖性可以增强蛋白质复合物的选择性。一些细胞，包括许多形式的癌细胞，相对于健康细胞在其表面蛋白质组中具有微小变化，从而使单特异性靶向无法区分患病细胞。因此，选择性靶向特定患病细胞或组织可能需要靶向多个标记物。本公开的蛋白质复合物可以靶向至少2个、至少3个、至少4个或至少5个标记物。本公开的蛋白质复合物可以靶向至多5个、至多4个、至多3个或至多2个标记物。在一些情况下，蛋白质复合物靶向的标记物中的至少一个通常在靶细胞或组织与健康细胞或组织之间共享。在一些情况下，蛋白质复合物靶向的全部标记物通常在靶细胞或组织与健康细胞或组织之间共享。

[0085] 本公开的传感器结果域可以靶向至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个标记物，并且不靶向治疗结构域。本公开的传感器结果域可以靶向至多2个、至多3个、至多4个、至多5个、至多6个、至多7个、至多8个、至多9个或至多10个标记物，并且不靶向治疗结构域。本公开的传感器结果域可以靶向单个治疗结构域和至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个标记物。本公开的传感器结果域可以靶向单个治疗结构域和至多1个、至多2个、至多3个、至多4个、至多5个、至多6个、至多7个、至多8个、至多9个或至多10个标记物。本公开的传感器结果域可以靶向至少两个治疗结构域和至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个标记物。本公开的传感器结果域可以靶向至少两个治疗结构域和至多1个、至多2个、至多3个、至多4个、至多5个、至多6个、至多7个、至多8个、至多9个或至多10个标记物。

[0086] 两个传感器结构域对于治疗结构域可以具有相同的亲和力，或者对于治疗结构域可以具有不同的亲和力。两个传感器结构域对于治疗结构域的亲和力可以相差至少1个数量级、至少2个数量级、至少3个数量级或至少4个数量级。两个传感器结构域对于治疗结构域的亲和力可以相差至多4个数量级、至多3个数量级、至多2个数量级或至多1个数量级。多个传感器结构域对于不同治疗结构域的亲和力的组合可以增强蛋白质复合物对于靶标记物的亲和力。例如，蛋白质复合物可以包含弱靶向第一细胞表面标记物且弱靶向治疗结构域的第一传感器结构域，和强靶向第二细胞表面标记物且强靶向治疗结构域的第二传感器结构域，使得蛋白质复合物在第二细胞表面标记物存在的情况下表现出弱活性并且在第一和第二细胞表面标记物存在的情况下表现出强活性。

[0087] 蛋白质复合物的两个传感器结构域也可以靶向单独的治疗结构域。例如，蛋白质复合物可以包含靶向IL-2和PD-1的第一传感器结构域，和靶向IFNα和CEACAM5的第二传感器结构域。蛋白质复合物可以包含不靶向治疗结构域的传感器结构域。这种传感器结构域可以帮助靶标定位，或者可以增强单独的传感器结构域对于治疗结构域的活性。图14C中提供了包含不靶向治疗结构域的传感器结构域的蛋白质复合物的实例。此系统包含单特异性抗PD-1抗体，其中第一重链包含与治疗结构域偶联的C末端接头，并且第二重链包含与对于治疗结构域和靶标记物具有双重特异性的传感器结构域偶联的C末端接头。

[0088] 蛋白质复合物可以包含单个靶标、2个靶标、3个靶标、4个靶标或多于4个靶标。蛋白质复合物可以包含至少2个靶标、至少3个靶标或至少4个靶标。蛋白质复合物可以包含至多4个靶标、至多3个靶标或至多2个靶标。蛋白质复合物可以包含单个传感器结构域、2个传感器结构域、3个传感器结构域、4个传感器结构域或多于4个传感器结构域。蛋白质复合物可以包含至少2个传感器结构域、至少3个传感器结构域或至少4个传感器结构域。例如，蛋白质复合物可以包含具有Fab区传感器结构域的IgM抗体或具有4个Fab区传感器结构域的IgA抗体。

[0089] 蛋白质复合物可以具有一系列传感器结构域与治疗结构域的比率。蛋白质复合物可以包含相等数量的传感器结构域和治疗结构域，其实例由图14A提供，说明了具有2个传感器结构域和2个治疗结构域的蛋白质复合物，并且由图8提供，说明了具有单个传感器结构域和单个治疗结构域的蛋白质复合物。蛋白质复合物包含的传感器结构域的数量可以大于治疗结构域，诸如图9A、9B、9C、9F和14B的蛋白质复合物，其各自包含两个传感器结构域和一个治疗结构域。在这种情况下，治疗结构域可以能够与多个传感器结构域相互作用，或者可以受限于与多于一个传感器结构域相互作用。传感器结构域可以与其相互作用的治疗结构域的数量可以取决于其接头。接头可以足够短，以便防止治疗结构域与传感器结构域相互作用，或者可以足够长，以便允许治疗结构域与多个传感器结构域相互作用。

[0090] 在特定情况下，蛋白质复合物可以包含具有Fc偶联的治疗结构域和传感器结构域的抗体。如图14C所示，蛋白质复合物可以包含具有第一重链C末端延伸和第二重链C末端延伸的抗体，所述第一重链C末端延伸包含接头和治疗结构域，所述第二重链C末端延伸包含接头和传感器结构域。这种设计的抗体可以包含跨其Fab和C末端延伸传感器结构域的共同靶标。例如，抗体Fab区和C末端延伸传感器结构域可以各自靶向PD-1。相反，这种设计的抗体可以包含跨其Fab区和C末端延伸传感器结构域的单独靶标。

[0091] 在一些实施方案中，本文所述的蛋白质复合物中的氨基酸可以包含保守取代。保守取代可以包括用具有相似生化特性(例如，电荷、疏水性和大小)的不同氨基酸取代一种氨基酸。表33中提供了保守取代以及可以是但不一定是优选的取代的实例。

表33-示例性保守取代

原始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0092] 在一些实施方案中，本公开描述了一种编码本文公开的蛋白质复合物的重组核酸。在一些实施方案中，重组核酸包含编码整个蛋白质复合物的质粒或载体。在一些实施方案中，重组核酸包含分别编码治疗结构域、传感器结构域和接头的质粒或载体。在一些实施方案中，重组核酸包含一起编码治疗结构域、传感器结构域和接头中的任意两个的质粒或载体。

药物制剂

[0093] 蛋白质复合物或编码本公开的蛋白质复合物的重组核酸可以被配制为药物组合物。药物组合物可以包含药学上可接受的载剂或赋形剂。如本文所用，“药学上可接受的”或“药理学上可接受的”包括在适当情况下施用至对象时不产生不良反应、过敏反应或其他不利反应的分子实体和组合物。“药学上可接受的载剂”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。此类介质和药剂用于药物活性物质的用途是本领域熟知的。除非在任何常规介质或药剂与活性成分不相容的情况下，否则考虑了它在治疗性组合物中的使用。还经常将补充性活性成分并入组合物中。

应用

[0094] 本公开的蛋白质复合物可以用于各种治疗应用。本公开的蛋白质复合物可以用作治疗剂以施用至有需要的对象。所述对象可以是人或非人哺乳动物。所述对象可以是患有疾病。所述疾病可以是癌症。所述癌症可以是急性淋巴细胞性白血病(ALL)；急性髓细胞性白血病(AML)；青少年癌症；肾上腺皮质癌；艾滋病相关癌症；卡波西肉瘤(软组织肉瘤)；艾滋病相关淋巴瘤(淋巴瘤)；原发性中枢神经系统淋巴瘤(淋巴瘤)；肛门癌；阑尾癌-参见胃肠道类癌肿瘤；星形细胞瘤，儿童期(脑癌)；非典型畸胎/横纹肌样肿瘤，儿童期，中枢神经系统(脑癌)；皮肤基底细胞癌-参见皮肤癌；胆管癌；膀胱癌；骨癌(包括尤文氏肉瘤和骨肉瘤以及恶性纤维组织细胞瘤)；脑肿瘤；乳腺癌；支气管肿瘤(肺癌)；伯基特淋巴瘤-参见非霍奇金淋巴瘤；类癌肿瘤(胃肠道)；原发灶不明的癌；心脏(心脏)肿瘤，儿童期；中枢神经系统；非典型畸胎/横纹肌样肿瘤，儿童期(脑癌)；髓母细胞瘤和其他中枢神经系统胚胎性肿瘤，儿童期(脑癌)；生殖细胞肿瘤，儿童期(脑癌)；原发性中枢神经系统淋巴瘤；子宫颈癌；儿童期癌症；儿童期癌症，不常见；胆管细胞癌-参见胆管癌；脊索瘤，儿童期(骨癌)；慢性淋巴细胞性白血病(CLL)；慢性粒细胞性白血病(CML)；慢性骨髓增殖性肿瘤；结直肠癌；颅咽管瘤，儿童期(脑癌)；皮肤t细胞淋巴瘤-参见淋巴瘤(蕈样真菌病和Sézary综合征)；导管原位癌(DCIS)-参见乳腺癌；胚胎肿瘤，髓母细胞瘤和其他中枢神经系统，儿童期(脑癌)；子宫内膜癌(子宫癌)；室管膜瘤，儿童期(脑癌)；食道癌；嗅神经母细胞瘤(头颈癌)；尤文氏肉瘤(骨癌)；颅外生殖细胞肿瘤，儿童期；性腺外生殖细胞肿瘤；眼癌；眼内黑色素瘤；视网膜母细胞瘤；输卵管癌；骨纤维组织细胞瘤、恶性和骨肉瘤；胆囊癌；胃癌(胃癌)；胃肠道类癌肿瘤；胃肠道间质瘤(GIST)(软组织肉瘤)；生殖细胞肿瘤；儿童期中枢神经系统生殖细胞肿瘤(脑癌)；儿童颅外生殖细胞肿瘤；性腺外生殖细胞肿瘤；卵巢生殖细胞肿瘤；睾丸癌；妊娠滋养细胞疾病；毛细胞白血病；头颈癌；心脏肿瘤，儿童期；肝细胞(肝)癌；组织细胞增多症，朗格汉斯细胞；霍奇金淋巴瘤；下咽癌(头颈癌)；眼内黑色素瘤；胰岛细胞肿瘤，胰腺神经内分泌肿瘤；卡波西肉瘤(软组织肉瘤)；肾(肾细胞)癌；朗格汉斯细胞组织细胞增多症；喉癌(头颈癌)；白血病；唇癌和口腔癌(头颈癌)；肝癌；肺癌(非小细胞、小细胞、胸膜肺母细胞瘤和气管支气管肿瘤)；淋巴瘤；男性乳腺癌；骨恶性纤维组织细胞瘤和骨肉瘤；黑色素瘤；黑色素瘤，眼内(眼睛)；梅克尔细胞癌(皮肤癌)；间皮瘤，恶性；转移性癌症；转移性鳞状颈癌伴隐匿原发性(头颈癌)；具有坚果基因改变的中线癌；口癌(头颈癌)；多发性内分泌肿瘤综合征；多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤；蕈样真菌病(淋巴瘤)；骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增殖性肿瘤；慢性粒细胞性白血病(CML)；急性髓细胞性白血病(AML)；慢性骨髓增殖性肿瘤；鼻腔和鼻旁窦癌(头颈癌)；鼻咽癌(头颈癌)；神经母细胞瘤；非霍奇金淋巴瘤；非

小细胞肺癌;口腔癌、唇癌和口腔癌和口咽癌(头颈癌);骨肉瘤和骨恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌;胰腺癌;胰腺神经内分泌肿瘤(胰岛细胞肿瘤);乳头状瘤病(儿童喉);副神经节瘤;鼻旁窦和鼻腔癌(头颈癌);甲状旁腺癌;阴茎癌;咽癌(头颈癌);嗜铬细胞瘤;垂体瘤;浆细胞肿瘤/多发性骨髓瘤;胸膜肺母细胞瘤(肺癌);怀孕和乳腺癌;原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤;原发性腹膜癌;前列腺癌;直肠癌;复发性癌症;肾细胞(肾)癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤,儿童期(软组织肉瘤);唾液腺癌(头颈癌);肉瘤;儿童期横纹肌肉瘤(软组织肉瘤);儿童期血管肿瘤(软组织肉瘤);尤文氏肉瘤(骨癌);卡波西肉瘤(软组织肉瘤);骨肉瘤(骨癌);软组织肉瘤;子宫肉瘤;Sézary综合征(淋巴瘤);皮肤癌;小细胞肺癌;小肠癌;软组织肉瘤;小细胞肺癌;小肠癌;软组织肉瘤;皮肤鳞状细胞癌-参见皮肤癌;鳞状颈癌伴隐匿性原发性转移性(头颈癌);胃癌(胃癌);t细胞淋巴瘤,皮肤-参见淋巴瘤(蕈样真菌病和Sèzary综合征);睾丸癌;喉癌(头颈癌);鼻咽癌;口咽癌;下咽癌;胸腺瘤和胸腺癌;甲状腺癌;气管支气管肿瘤(肺癌);肾盂和输尿管的移行细胞癌(肾(肾细胞)癌);未知原发性癌;儿童期不常见的癌症;输尿管和肾盂,移行细胞癌(肾(肾细胞)癌);尿道癌;子宫癌,子宫内膜;子宫肉瘤;阴道癌;血管肿瘤(软组织肉瘤);外阴癌;肾母细胞瘤和其他儿童期肾肿瘤;或青年人的癌症或https://www.cancer.gov/types处提及的任何癌症。

[0095] 除治疗癌症之外,本公开的蛋白质复合物在靶向、条件活性可能是有利的各种其他环境中具有潜在的应用。在自身免疫性疾病和炎性疾病中,通过整体免疫抑制起作用的疗法的缺点是使患者更容易受到各种机会性感染的影响。另外,半衰期短且在疾病组织中缺乏积累可能限制免疫抑制重组细胞因子的功效。本公开的蛋白质复合物可以通过允许免疫调节剂(包括IL-4、IL-10、TGF-β和TNFR2)选择性地靶向递送到受影响的解剖位置,同时在外围保持沉默来解决这些缺点。另外的应用可以包括细胞类型特异性治疗靶向,诸如Treg细胞定向IL-2。在特定器官中或在炎症标记物存在的情况下,靶向的条件性激活阿片受体激动剂可以降低疼痛控制的成瘾风险。

[0096] 蛋白质复合物可以作为药物组合物施用。本公开的药物组合物可以是本文所述的任何蛋白质复合物与其他化学组分的组合,诸如载剂、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂。所述药物组合物有助于向生物体施用本文所述的蛋白质化合物。药物组合物可以通过各种形式和途径以治疗有效量作为药物组合物施用,包括例如静脉内、皮下、肌肉内、直肠、气雾剂、肠胃外、眼部、肺部、经皮、阴道、光学、鼻腔、口服、吸入、真皮、关节内、鞘内、鼻内和局部施用。药物组合物可以以局部或全身方式施用,例如,经由将本文所述的蛋白质复合物直接注射到器官中,任选地在储库中。

[0097] 肠胃外注射可以被配制用于弹丸式注射或连续输注。药物组合物可以呈作为油性或水性媒介物中的无菌悬浮液、溶液或乳液的适于肠胃外注射的形式,并且可以含有配制剂,诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。用于肠胃外施用的药物制剂包括呈水溶性形式的本文所述的蛋白质复合物的水性溶液。本文所述的蛋白质复合物的悬浮液可以制备为油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或媒介物包括脂肪油(诸如芝麻油)或合成脂肪酸酯(诸如油酸乙酯或甘油三酸酯)或脂质体。水性注射悬浮液可以含有增加悬浮液粘度的物质,诸如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。悬浮液还可以含有合适的稳定剂或增加此类本文所述的蛋白质复合物的溶解性和/或减少其聚集以允许制备高度浓缩溶液的药剂。可替代地,本文所述的蛋白质复合物可以是冻干的或呈粉末形式,用于在使用之前用合适的媒介物(例

如，无菌的无热原水)重构。在一些实施方案中，将纯化的蛋白质复合物静脉内施用。本公开的蛋白质复合物可以具有足够长的血清半衰期(例如，如实施例17所示)，以实现包括每日一次、交替日、每周两次、每周一次、每两周一次或每月一次给药频率的给药方案。本公开的蛋白质复合物可以具有至少12小时、至少24小时、至少36小时、至少48小时、至少72小时、至少96小时、至少120小时、至少168小时、至少250小时、至少320小时或至少400小时的血清半衰期。血清半衰期可以是人血清半衰期、鼠血清半衰期、猪血清半衰期、牛血清半衰期、犬血清半衰期、猫血清半衰期或野兔血清半衰期。

[0098] 本公开的蛋白质复合物可以在外科手术过程中直接，或经由经皮、皮下、肌肉内、肿瘤内、鞘内、局部或局部递送应用于器官或器官组织或细胞。在一些实施方案中，本公开的蛋白质复合物可以直接注射到滑膜中(例如，用于施用针对类风湿性关节炎的包含IL-10的蛋白质复合物)。在一些实施方案中，蛋白质复合物可以直接应用于癌组织(例如，肿瘤)。本文所述的蛋白质复合物可以局部施用，并且可以被配制成各种可局部施用的组合物，诸如溶液、悬浮液、洗液、凝胶、浆料、医用棒、护肤膏、乳膏和软膏。此类药物组合物可以含有增溶剂、稳定剂、张力增强剂、缓冲液以及防腐剂。

[0099] 在实践本文提供的治疗方法或用途中，向患有病状的对象施用治疗有效量的在药物组合物中的本文所述的蛋白质复合物。在一些情况下，药物组合物将影响动物的生理学，诸如免疫系统、炎症应答或其他生理学影响。在一些实施方案中，对象是哺乳动物，诸如人。治疗有效量可以广泛地根据疾病严重性、对象的年龄和相对健康、所使用的化合物的效力和其他因素而广泛变化。

[0100] 药物组合物可以使用一种或多种生理上可接受的载剂(包括赋形剂和助剂)来配制，所述载剂有助于将活性化合物加工成可以在药学上使用的制剂。制剂可以根据所选的施用途径来修改。包含本文所述的蛋白质复合物的药物组合物可以通过例如在重组系统中表达蛋白质复合物、纯化蛋白质复合物、冻干蛋白质复合物、混合或溶解来制造。所述药物组合物可以包含至少一种药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂以及本文中描述为游离碱或药学上可接受的盐形式的化合物。

[0101] 用于制备本文所述的蛋白质复合物的方法包括将本文所述的蛋白质复合物与一种或多种惰性的、药学上可接受的赋形剂或载剂一起配制以形成固体、半固体或液体组合物。固体组合物包括例如粉末、片剂、可分散颗粒剂、胶囊剂、扁囊剂和栓剂。这些组合物还可以含有少量的无毒辅助物质，诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂和其他药学上可接受的添加剂。

[0102] 本文所述的某些方法包括向对象施用包含本公开(例如，如本文所述)的蛋白质复合物的静脉内药物组合物。蛋白质复合物的静脉内药物组合物包括适合于经由任何静脉内方法施用至对象的任何制剂，所述静脉内方法包括弹丸式注射、随时间发生的输注或本领域已知的任何其他静脉内方法。在一些方面，输注速率使得剂量在小于五分钟、多于五分钟但小于15分钟或大于15分钟的时间段内被施用。在其他方面，输注速率使得剂量在小于5分钟的时间段内被施用。在其他方面，输注速率使得剂量在大于5分钟且小于15分钟的时间段内被施用。在一些其他方面，输注速率使得剂量在大于15分钟的时间段内被施用。

[0103] 如本文所用，“产品”或“剂型”是指用于施用的任何固体、半固体、冻干、水性、液体或冷冻制剂或制品。在施用时，活性部分从产品中释放的速率经常受到构成产品本身的赋

形剂和/或产品特征的极大影响。例如，片剂上的肠溶衣被设计来将所述片剂的内容物与胃内容物分开，以防止例如胃降解，这经常引起胃肠道不适或损伤。根据目前公认的常规理解，活性部分的全身暴露将对于制剂的微小变化相对不敏感。

[0104] 药学上可接受的赋形剂的非限制性实例可以例如在以下中找到:Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版(Easton,Pa.:Mack Publishing Company,1995);Hoover,John E.,Remington'sPharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pennsylvania1975;Liberman,H.A.和Lachman,L.编,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Decker,New York,N.Y.,1980;以及Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第7版(Lippincott Williams&Wilkins1999)，其中的每一个通过引用整体并入本文。

[0105] 本公开的蛋白质复合物可以有效量施用至患者。如本文所用，术语“有效量”可以是指施用的药剂或化合物的足够量，其将在一定程度上缓解所治疗的疾病或病状的一种或多种症状。结果可以是疾病的体征、症状或病因的减轻和/或缓解，或者生物系统的任何其他期望变化。含有此类药剂或化合物的组合物可以被施用，以用于预防、增强和/或治疗性治疗。在任何个体情况下的适当“有效”量可以使用诸如剂量递增研究的技术来确定。

[0106] 本公开的方法、组合物和试剂盒可以包括预防、治疗、阻止、逆转或改善病状的症状的方法。所述治疗可以包括用本公开的蛋白质复合物治疗对象(例如，罹患疾病或病状的个体、家养动物、野生动物或实验室动物)。可以施用本公开的蛋白质复合物，以治疗对象的疾病。所述对象可以是人。所述对象是人;非人灵长类动物，诸如黑猩猩和其他猿类和猴物种;农场动物，诸如牛、马、绵羊、山羊、猪;家养动物，诸如兔、狗和猫;实验室动物，包括啮齿动物，诸如大鼠、小鼠和豚鼠等。所述对象可以具有任何年龄。对象可以是例如老年人、成人、青少年、青春期前、儿童、幼儿、婴儿或子宫内的胎儿。

[0107] 可以在疾病的临床发作之前向对象提供治疗。可以在疾病的临床发作之后向对象提供治疗。可以在疾病的临床发作之后1天、1周、6个月、12个月或2年或更长时间之后向对象提供治疗。可以在疾病的临床发作之后向对象提供治疗，持续超过1天、1周、1个月、6个月、12个月、2年或更长时间。可以在疾病的临床发作之后向对象提供治疗，持续小于1天、1周、1个月、6个月、12个月或2年。治疗还可以包括在临床试验中对人进行治疗。治疗可以包括向对象施用药物组合物，诸如在整个本公开中描述的药物组合物中的一种或多种。治疗可以包括每日一次给药。治疗可以包括通过以下方式将本公开的蛋白质复合物递送至对象:静脉内、皮下、肌肉内、通过吸入、真皮、关节内注射、口服、鞘内、经皮、鼻内、经由腹膜途径，或直接递送到患病组织上或中，例如，经由局部、关节内注射途径或注射途径的应用。

[0108] 在一些实施方案中，本公开提供了一种用于治疗癌症的方法，所述方法包括向有需要的对象施用有效量的本公开的蛋白质复合物。

[0109] 在一些实施方案中，本公开提供了一种用于治疗癌症的方法，所述方法包括向有需要的对象施用有效量的包含本公开的蛋白质复合物和药学上可接受的载剂的药物组合物。

试剂盒

[0110] 本公开的蛋白质复合物可以提供在各种试剂盒中。在一些实施方案中，包含本公开的蛋白质复合物的药物组合物可以作为试剂盒提供。试剂盒可以包括包含蛋白质复合物

的容器。治疗性蛋白质复合物可以呈单剂量或多剂量的可注射溶液的形式提供，或者作为将在注射之前重构的无菌粉末提供。可替代地，这种试剂盒可以包括干粉分散器、液体气溶胶发生器或雾化器，用于施用治疗性蛋白质复合物。这种试剂盒还可以包括关于药物组合物的适应症和使用的书面信息。

[0111] 除非另外定义，否则本文所用的所有技术术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。如本说明书以及随附权利要求中所用，除非上下文另外明确指示，否则单数形式的“一个/种(a/an)”与“所述”包括复数提及形式。除非另有说明，否则本文对“或”的任何引用旨在涵盖“和/或”。

[0112] 每当术语“至少”、“大于”或“大于或等于”在一系列两个或更多个数值中的第一数值之前时，术语“至少”、“大于”或“大于或等于”适用于此系列数值中的每个数值。例如，大于或等于1、2或3等同于大于或等于1、大于或等于2或大于或等于3。

[0113] 每当术语“不超过”、“小于”或“小于或等于”或“至多”在一系列两个或更多个数值中的第一数值之前时，术语“不超过”、“小于”或“小于或等于”或“至多”适用于此系列数值中的每个数值。例如，小于或等于3、2或1等同于小于或等于3、小于或等于2或小于或等于1。

[0114] 如果值被描述为范围，则将理解，这种公开包括公开此范围内所有可能的子范围，以及落在此范围内的特定数值，而不论是否明确声明了特定数值或特定子范围。

实施例

[0115] 以下实施例是说明性的，并且不限于本文所述的装置、方法、系统和试剂盒的范围。

实施例1

IFNα和PD-L1特异性双重结合抗体(DBA)的选择

[0116] 此实施例描述了本公开的传感器结构域的分离，具体地，IFNα和PD-L1特异性双重结合抗体(DBA)的选择。从Tumbler抗体噬菌体展示文库(Distributed Bio,Inc.)分离抗PD-L1和抗IFNαDBA。构建抗体噬菌体展示文库，以并入Superhuman 2.0抗体文库的重链CDR1、重链CDR2和轻链多样性，结合来自所述的PD-L1结合抗体的10个重链(“HC”)CDR3序列(SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:10)，如以下表2所示。

表2-PD-L1结合剂的HC-CDR3

SEQ ID NO	序列	描述
SEQ ID NO: 1	CARDRIAVAGFDYW	PD-L1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 2	CAKEVFSGWYDYW	PD-L1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 3	CTTDLLSLELDDAFDIW	PD-L1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 4	CARSLFPTIFGVEVAFDIW	PD-L1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 5	CARDSYYYDSFDYW	PD-L1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 6	CARHGEWGSGWPFDYW	PD-L1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 7	CARDLLPAIFSGEVNDAFDIW	PD-L1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 8	CARETIAVAGFDPW	PD-L1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 9	CARDVLPTIFGVVSDAFDIW	PD-L1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 10	CARGDYGDYFDYW	PD-L1 结合剂的 HC-CDR3

[0117] 将文库在PD-L1(开发PD-L1结合,其中PD-L1充当标记物)与IFNα(开发IFNα结合,其中IFNα是受传感器结构域调节的治疗结构域)之间进行四轮交替选择。每轮将噬菌体文库与抗原(PD-L1或IFNα)一起温育,在磁珠上捕获,在Kingfisher磁粉处理器上洗涤,从磁珠中洗脱,并通过在大肠杆菌中传代来扩增。在第1轮中,将噬菌体文库与50nM的人PD-L1-Fc融合物(R&D Systems,产品编号156-B7)一起温育,并且在蛋白G磁珠上捕获。在第2轮中,将噬菌体文库与100nM生物素化的人IFNα(Genscript,产品编号Z03003,使用标准方案进行生物素化)一起温育,并且在链霉亲和素磁珠上捕获。在第3轮中,将噬菌体文库与50nM的食蟹猴PD-L1-Fc融合物一起温育,并且在蛋白G磁珠上捕获。在第4轮中,将噬菌体文库与50nM生物素化的人IFNα一起温育,并且在链霉亲和素磁珠上捕获。将最终选择物作为单个菌落

铺板,并且选择380个菌落进行Sanger测序。选择41个独特的克隆进行表达。将每个克隆的scFv序列针对大肠杆菌表达进行密码子优化,并且将对应的DNA序列合成为gBlock(Integrated DNA Technologies,Inc.),具有T7启动子、翻译起始位点、Myc标签、scFv序列、V5标签序列和T7终止子。如果抗体可变区的框架序列与种系序列不同,则用种系序列合成克隆的第二个版本。gBlock表达片段的示例性序列在图3中示出(SEQ ID NO:40,GCGAATTAATACGACTCACTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGAATAATATATGTCTACTTCAACAGAACAAAAGTTAATTAGTGAAGAAGATTTACAGGTCCAGTTGGTTCAGTCAGGCGCAGAAGTCAAAAAGCCGGGAGCGAGTGTCAAAGTATCTTGTAAAGCGAGCGGTGGTACTTTTAGTAGTTATGCGATTTCCTGGGTTCGCCAAGCCCCGGGACAGGGTCTGGAATGGATGGGTATTATTGACCCTTCCGTGACTTACACCCGCTACGCTCAGAAATTCCAGGGACGTGTTACCATGACCCGCGATACCAGCACCAGTACCGTTTACATGGAACTTTCCTCCCTGAGATCGGAAGACACGGCCGTGTATTATTGCGCTCGCTCACTCTTTCCGACCATCTTCGGCGTTGAAGTCGCCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTAAGTTCCGCAAGTGGCGGTGGTGGTAGTGGTGGAGGTGGATCAGGAGGAGGTGGTTCTCACGCATCAGACATTCAAATGACACAGAGTCCATCATCCCTTTCTGCCTCCGTGGGTGACCGGGTGACGATAACCTGCCAAGCTAGCCAAGACATTAGCAACTATCTGAACTGGTACCAGCAAAAGCCTGGGAAAGCTCCGAAACTATTGATTTACGGTGCGTCGACTCTCCAGAGTGGGGTACCTAGTCGTTTTTCCGGTTCAGGGTCGGGTACAGATTTTACCCTTACTATTTCCTCTCTGCAGCCAGAAGACTTTGCTACTTATTACTGCCAACAGACTTATTCGACTCCGATTACGTTTGGCCAGGGAACCAAAGTCGAAATCAAAGGCAAGCCGATCCCGAACCCTCTGCTGGGATTAGACAGCACGTAACTAGCATAACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTT)。使用无细胞转录/翻译系统(Cosmo Bio USA,Inc.,PUREfrex2.1,产品#GFK-PF213具有DS补充剂,产品#GFK-PF005)表达来自每个gBlock片段的蛋白质。

[0118] 将含有V5标记的scFv的无细胞表达样品在384孔板中连续稀释。将Alexa Fluor 647标记的抗V5抗体与Eu标记的IFNα2a或PD-L1一起添加到每个孔中。将板在室温下温育2小时,并且在配备HTRF激光模块的Envision(Perkin Elmer)上读取HTRF信号。为了检查DBA结合结构域阻断干扰素α受体2(IFNAR2)与IFNα结合的能力,使用PURExfrex 2.1体外翻译系统合成V5标记的DBA scFv,并在384孔板中连续稀释。将Eu标记的IFNα与IFNAR2-Fc和APC标记的抗Fc抗体一起添加到每个孔中。将板在室温下温育2小时,并且在Envision(Perkin Elmer)上读取HTRF信号作为IFNα:IFNAR2结合的量度。来自结合和抑制曲线的荧光信号值在表4中总结,并且IFNα和PD-L1的结合曲线分别在图4和图5中示出。IFNAR2阻断曲线在图6中示出。具有SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:27的序列的DBA能够结合IFNα(图4)和PD-L1(图5)两者。SEQ ID NO:24阻断IFNα与IFNAR2结合,并且SEQ ID NO:26减少IFNα与IFNAR2的结合(图6)。

表3-DBA和对照

SEQ ID NO	序列	描述
SEQ ID NO: 21	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFSNYYIHWVRQAPGQG LEWMGWMDSNSGGTGYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCAKEVFSGWYDYWG QGTLVTVSSASGGGGSGGGGSG GGGSHASDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYSTPYTFGQGTKVEIK	DBA 能够结合 PD-L1 标记物和 IFNα 治疗结构域
SEQ ID NO: 22	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWVGWMDPKSGNTGYAQKFQG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARSLFPTIFGVEVAFDI WGQGTLVTVSSASGGGGSGGGG SGGGGSHASDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCQASQDINNYLNWY QQKPGKAPKLLIYKASSLEPGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQKSNDVPFTFGQGTKVEI	DBA 能够结合 PD-L1 标记物和 IFNα 治疗结构域

SEQ ID NO	序列	描述
	K	
SEQ ID NO: 23	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGGTFSSYYMHWVRQAPGQG LEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARSLFPTIFGVEVAF DIWGQGTLVTVSSASGGGGSGG GGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLESGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSIPITFGQGTRLEIK	DBA 能够结合 PD-L1 标记物和 IFNα 治疗结构域
SEQ ID NO: 24	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGGTFTGYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWVNPNSGNTGYAQKF QGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCARSLFPTIFGVEVAF DIWGQGTLVTVSSASGGGGSGG GGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSPPPTFGQGTKLEI K	DBA 能够结合 PD-L1 标记物和 IFNα 治疗结构域
SEQ ID NO: 25	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGNTFTDYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWMNPNSGNTGYAQKF QGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR	DBA 能够结合 PD-L1 标记物和 IFNα 治疗结构域

SEQ ID NO	序列	描述
	SEDTAVYYCARSLFPTIFGVEVAF DIWGQGTLVTVSSASGGGGSGG GGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSTPPTFGQGTRLEI K	
SEQ ID NO: 26	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGIIDPSVTYTRYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCARSLFPTIFGVEVAFDIW GQGTLVTVSSASGGGGSGGGGS GGGGSHASDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCQASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYGASTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQTYSTPITFGQGTKVEIK	DBA 能够结合PD-L1 标记物和IFNα 治疗结构域
SEQ ID NO: 27	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGWMDANNGNTGYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARSLFPTIFGVEVAF DIWGQGTLVTVSSASGGGGSGG GGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQSVSSYLNW YQQKPGKAPKLLIYKASSLESGV	DBA 能够结合PD-L1 标记物和IFNα 治疗结构域

SEQ ID NO	序列	描述
	PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSSSTPLSFGGGTKVEI K	
SEQ ID NO: 28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ GTLVTVSSASGGGGSGGGGSGG GGSHASDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDVNTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIK	抗 HER2 对照
SEQ ID NO: 29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLE WVAWISPYGGSTYYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LVTVSSAASGGGGSGGGGSGGG GSHASDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYLYHPATFGQGTKVEIK	抗 PD-L1 对照
SEQ ID NO: 30	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA TSGYTFTEYIIHWVRQAPGKGLE WVASINPDYDITNYNQRFKGRFT	抗 IFNα 对照

SEQ ID NO	序列	描述
	ISLDKSKRTAYLQMNSLRAEDTA VYYCASWISDFFDYWGQGTLVT VSSASGGGGSGGGGSGGGGSHA SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSVSTSSYSYMHWYQQKPG KAPKVLISYASNLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ HSWGIPRTFGQGTKVEIK	

表4-来自结合和抑制曲线的荧光信号值

名称	PDL1 结合	IFNα 结合	IFNAR2-IFN 结合
PDL1-IFN-R01-A03	2,715	20,447	42,528
PDL1-IFN-R01-A04	2,377	10,890	45,590
PDL1-IFN-R01-A05 (SEQ ID NO: 21)	3,113	7,115	50,505
PDL1-IFN-R01-A06 (SEQ ID NO: 22)	2,781	8,563	44,019
PDL1-IFN-R01-A07	3,010	4,496	52,343
PDL1-IFN-R01-A08	2,274	19,905	40,314
PDL1-IFN-R01-A09	1,628	6,585	50,070
PDL1-IFN-R01-A09V2	1,894	5,264	49,709
PDL1-IFN-R01-A10	1,969	6,105	48,781
PDL1-IFN-R01-A11 (SEQ ID NO: 23)	2,965	14,613	41,796
PDL1-IFN-R01-A12	2,133	9,478	53,273
PDL1-IFN-R01-B01	3,172	7,460	44,230
PDL1-IFN-R01-B02	2,695	7,190	42,135
PDL1-IFN-R01-B03	2,383	4,072	44,076
PDL1-IFN-R01-B04	2,518	12,736	42,948
PDL1-IFN-R01-B04V2	2,703	12,952	43,748
PDL1-IFN-R01-B05	2,074	3,480	50,563

名称	PDL1 结合	IFNα 结合	IFNAR2-IFN 结合
PDL1-IFN-R01-B06	3,084	17,212	43,958
PDL1-IFN-R01-B07	2,897	6,271	40,647
PDL1-IFN-R01-B07V2	2,907	6,111	42,880
PDL1-IFN-R01-B08	2,924	4,042	46,089
PDL1-IFN-R01-B09 (SEQ ID NO: 24)	1,378	35,717	31,232
PDL1-IFN-R01-B10	899	4,118	46,508
PDL1-IFN-R01-B11	2,525	14,580	43,204
PDL1-IFN-R01-B12 (SEQ ID NO: 25)	2,977	9,230	44,505
PDL1-IFN-R01-C01	2,780	6,975	47,032
PDL1-IFN-R01-C02	2,923	4,123	49,398
PDL1-IFN-R01-C03	2,671	6,522	46,323
PDL1-IFN-R01-C04	2,917	7,761	48,699
PDL1-IFN-R01-C05	2,802	3,427	47,470
PDL1-IFN-R01-C06	399	4,380	49,878
PDL1-IFN-R01-C06V2	391	4,130	47,685
PDL1-IFN-R01-C07	2,139	24,494	43,262
PDL1-IFN-R01-C08 (SEQ ID NO: 26)	2,746	45,175	14,739
PDL1-IFN-R01-C08V2	2,812	55,319	16,753
PDL1-IFN-R01-C09	2,388	4,346	48,696
PDL1-IFN-R01-C10	2,489	12,727	43,275
PDL1-IFN-R01-C10V2	2,665	11,972	43,576
PDL1-IFN-R01-C11 (SEQ ID NO: 27)	3,043	7,730	40,503
PDL1-IFN-R01-C12	1,006	13,135	44,871
PDL1-IFN-R01-D01	582	7,018	39,109
PDL1-IFN-R01-D03	2,904	6,084	42,638
PDL1-IFN-R01-D05	2,325	6,402	49,246
PDL1-IFN-R01-D06	2,907	8,326	45,581

名称	PDL1 结合	IFNα 结合	IFNAR2-IFN 结合
PDL1-IFN-R01-D07	414	4,974	38,164
抗 Her2 对照(SEQ ID NO: 28)	425	4,275	52,922
抗 PD-L1 对照(SEQ ID NO: 29)	2,445	1,803	39,121
抗 IFN 对照(SEQ ID NO: 30)	416	19,098	51,190
无 DNA 对照	422	4,135	45,042

实施例2

结合人PD-1和人IL-2的一组双重结合抗体(DBA)的分离

[0119] 此实施例描述了本公开的传感器结构域,具体地,结合人PD-1和人IL-2的一组DBA的分离。从Tumbler抗体噬菌体展示文库(Distributed Bio,Inc.)分离抗PD-1和抗IL-2DBA。构建抗体噬菌体展示文库,以并入Superhuman 2.0抗体文库的重链CDR1、重链CDR2和轻链多样性,结合来自PD-1结合抗体的10个重链CDR3序列(SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:20)。

表5-PD-1结合剂的HC-CDR3

SEQ ID NO	序列	描述
SEQ ID NO: 11	CAAGLFIW	PD-1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 12	CAGGWLDW	PD-1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 13	CARDHLGGSYQPW	PD-1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 14	CARDLVGVSPGINYVPRYYYYYYGMDVW	PD-1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 15	CARDTGLGYYYGSGDFDYW	PD-1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 16	CARSGYSYGYYFDYW	PD-1 结合剂的 HC-CDR3

SEQ ID NO	序列	描述
SEQ ID NO: 17	CARTGGYPAIDSW	PD-1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 18	CASGWDVW	PD-1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 19	CASSPLQWVDVW	PD-1 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 20	CTSGMDVW	PD-1 结合剂的 HC-CDR3

[0120] 将此文库通过标准方案进行四轮选择。简而言之,将噬菌体文库与抗原一起温育,然后在磁珠上捕获,并且在Kingfisher磁粉处理器上洗涤,从磁珠中洗脱,并通过在大肠杆菌中传代来扩增。第1轮与50nM人PD-1-His融合物(R&D Systems,产品编号8986-PD)一起温育,并且用TRIS NTA生物素(Sigma-Aldrich,产品编号75543)和链霉亲和素磁珠捕获。第2轮与100nM生物素化的IL-2(Creative Biomart,产品编号IL2-501H,使用标准方案进行生物素化)一起温育,并且在链霉亲和素磁珠上捕获。第3轮与50nM食蟹猴PD-1-Fc融合物(R&DSystems,产品编号8578-PD)一起温育,并且在蛋白G磁珠上捕获。第4轮与50nM生物素化的人IL-2一起温育,并且在链霉亲和素磁珠上捕获。将最终选择物作为单个菌落铺板,并且选择380个菌落进行Sanger测序。选择151个独特的克隆进行表达。将每个克隆的scFv系列针对大肠杆菌表达进行密码子优化,并且将对应的DNA序列送至Integrated DNA Technologies,Inc.(IDT),合成为具有T7启动子、翻译起始位点和T7终止子的gBlock(参见图3中的gBlock示例性序列)。使用PURExpress体外蛋白质合成试剂盒(New England Biolabs,Inc.,产品编号E6800)表达编码scFv的来自每个gBlock的蛋白质。将PURExpress scFv蛋白直接用于HTRF结合测定和基于细胞的功能测定。测试每个scFv与PD-1和人IL-2的结合。81种抗体对PD-1和IL-2两者显示双重结合活性,并且结合曲线的荧光信号值的总结在表7中示出。为了检查DBA结合结构域阻断IL-2受体结合的能力,将V5标记的DBA scFv在384孔板中连续稀释。铕标记的链霉亲和素、生物素标记的IL-2(Acro Biosystems,产品编号IL2-H82E4)、IL-2受体β(Fc-IL2RB)(Acro Biosystems,产品编号ILB-H5253)和APC标记的抗Fc抗体。将板在室温下温育2小时,并且在Envision(Perkin Elmer)上读取HTRF信号作为IL-2:IL2RB结合的量度。四种scFv(SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:34)结合PD-1,结合IL-2并阻断IL-2与IL-2RB的结合(表7)。

表6-DBA和对照

SEQ ID NO	序列	描述
SEQ ID NO: 31	QVQLVQSGAEVKKPGVSVKVSC KASGYTFPRSYIHWVRQAPGQGL EWMGWINPHSGDTYYAQNFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARDTGLGYYYGSGDFD YWGQGTLVTVSSASGGGGSGGG GSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRASQSISRYLNWY QQKPGKAPKLLIYTASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQANRFPLTFGPGTKVDI K	DBA 能够结合 PD-1 标记物和 IL-2 治疗剂
SEQ ID NO: 32	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFPRYHIHWVRQAPGQG LEWMGMINPSGGTTTYAQKFQG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARDTGLGYYYGSGDF DYWGQGTLVTVSSASGGGGSGG GGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLS	DBA 能够结合 PD-1 标记物和 IL-2 治疗剂

SEQ ID NO	序列	描述
	ASVGDRVTITCRASQSISSWLAW YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSHSFPLTFGGGTKVEI K	
SEQ ID NO: 33	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTRYYIHWVRQAPGQG LEWMGWINAYNGDTNYAQKLQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARDSYYYDSFDYWG QGTLVTVSSASGGGGSGGGGSG GGGSHASDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQTITDWLAWYQQ KPGKAPKLLIYGASNLQGGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQYYSSWTFGQGTKVEIK	DBA 能够结合 PD-1 标记物和 IL-2 治疗剂
SEQ ID NO: 34	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYYMHWVRQAPGQG LEWMGIINPSDGSTTYAQSFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASGWDVWGQGTLVTV SSASGGGGSGGGGSGGGGSHAS DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSVFSSANNKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQYFGTPVTFGGGTKVEIK	DBA 能够结合 PD-1 标记物和 IL-2 治疗剂

表7

名称	PD1 结合	IL2 结合	IL2RB 阻断
无 DNA	5	6	1,490
PD1-IL2-R01-H08	576	-9	1,829
PD1-IL2-R01-H09	1,015	131	1,772
PD1-IL2-R02-A03	1,508	635	1,714
PD1-IL2-R02-A04	909	978	1,618
PD1-IL2-R02-A05	1,557	23	1,735
PD1-IL2-R02-A06	357	515	1,772
PD1-IL2-R02-A08	995	520	1,612
PD1-IL2-R02-A09	1,421	1,470	1,495
PD1-IL2-R02-A10	500	838	1,847
PD1-IL2-R02-A11	1,625	1,559	1,783
PD1-IL2-R02-A12	1,725	130	1,586
PD1-IL2-R02-B01	746	1,077	1,516
PD1-IL2-R02-B02	1,740	1,107	1,849

名称	PD1 结合	IL2 结合	IL2RB 阻断
PD1-IL2-R02-B04	11	2,346	1,536
PD1-IL2-R02-B05	1,665	2,489	1,613
PD1-IL2-R02-B06	1,527	32	1,605
PD1-IL2-R02-B07	1,685	628	1,814
PD1-IL2-R02-B08	1,446	92	1,680
PD1-IL2-R02-B10	211	343	1,607
PD1-IL2-R02-B11	1,426	915	1,509
PD1-IL2-R02-B12	1,264	316	1,762
PD1-IL2-R02-C01	1,463	296	1,743
PD1-IL2-R02-C02 (SEQ ID NO: 31)	1,299	298	1,069
PD1-IL2-R02-C03 (SEQ ID NO: 32)	1,383	293	1,211
PD1-IL2-R02-C04	1,622	575	1,857
PD1-IL2-R02-C06	1,376	34	1,684

名称	PD1 结合	IL2 结合	IL2RB 阻断
PD1-IL2-R02-C07	34	87	1,607
PD1-IL2-R02-C08	1,468	619	1,671
PD1-IL2-R02-C10	174	256	1,757
PD1-IL2-R02-C12	1,367	340	1,723
PD1-IL2-R02-D01	1,421	68	1,614
PD1-IL2-R02-D02	1,473	539	1,726
PD1-IL2-R06-A10	1,269	9	1,796
PD1-IL2-R06-A11	1,376	34	1,762
PD1-IL2-R06-A12	1,305	7	1,681
PD1-IL2-R06-B01	10	2,109	1,307
PD1-IL2-R06-B02	1,666	15	1,799
PD1-IL2-R06-B03	923	4	1,661
PD1-IL2-R06-B04	1,782	28	1,666
PD1-IL2-R06-B06	1,223	17	1,648

名称	PD1 结合	IL2 结合	IL2RB 阻断
PD1-IL2-R06-B08	1,777	1,160	1,738
PD1-IL2-R06-B10	13	31	1,847
PD1-IL2-R06-B11	1,534	24	1,699
PD1-IL2-R06-B12	822	1,125	1,604
PD1-IL2-R06-C02	1,667	26	1,671
PD1-IL2-R06-C04	1,491	7	1,759
PD1-IL2-R06-C08	1,448	8	1,693
PD1-IL2-R06-C09	1,158	1,525	1,602
PD1-IL2-R06-C11	1,879	-2	1,785
PD1-IL2-R06-C12	1,669	1,998	1,033
PD1-IL2-R06-D02	280	432	1,677
PD1-IL2-R06-D03	9	93	1,606
PD1-IL2-R06-D05	505	-3	1,786
PD1-IL2-R06-D07	1,577	24	1,820

名称	PD1 结合	IL2 结合	IL2RB 阻断
PD1-IL2-R06-D10	1,751	49	1,719
PD1-IL2-R06-D11	405	593	1,576
PD1-IL2-R06-D12	1,024	1,423	1,649
PD1-IL2-R06-E01	1,628	3	1,724
PD1-IL2-R06-E02	1,554	16	1,598
PD1-IL2-R06-E04 (SEQ ID NO: 33)	50	247	1,108
PD1-IL2-R06-E05	1,364	14	1,734
PD1-IL2-R06-E06	1,627	15	1,735
PD1-IL2-R06-E07	1,801	12	1,698
PD1-IL2-R06-E09	1,467	11	1,511
PD1-IL2-R06-E11	1,805	294	1,767
PD1-IL2-R06-E12	4	-7	1,735
PD1-IL2-R06-F01	196	280	1,629
PD1-IL2-R06-	1,377	28	1,642

名称	PD1 结合	IL2 结合	IL2RB 阻断
F03			
PD1-IL2-R06-F04	26	779	1,726
PD1-IL2-R06-F05	1,493	18	1,625
PD1-IL2-R06-F06	1,577	46	1,595
PD1-IL2-R06-F07	1,544	335	1,682
PD1-IL2-R06-F08	1,570	9	1,780
PD1-IL2-R06-F09	30	41	1,776
PD1-IL2-R06-F10	1,745	24	1,607
PD1-IL2-R06-F11	1,586	12	1,574
PD1-IL2-R06-F12	623	8	1,645
PD1-IL2-R06-G01	130	184	1,640
PD1-IL2-R06-G02	1,754	20	1,623
PD1-IL2-R06-G04	1,348	13	1,596
PD1-IL2-R06-G05	1,382	10	1,846
PD1-IL2-R06-	1,383	4	1,744

名称	PD1 结合	IL2 结合	IL2RB 阻断
G06			
PD1-IL2-R06-G08	1,708	124	1,533
PD1-IL2-R06-G09	557	756	1,527
PD1-IL2-R06-G10	1,595	35	1,703
PD1-IL2-R06-G11	1,469	17	1,709
PD1-IL2-R06-G12	1,281	1,479	1,713
PD1-IL2-R06-H01	381	4	1,647
PD1-IL2-R06-H02	1,501	20	1,748
PD1-IL2-R06-H03	1,132	1,449	1,617
PD1-IL2-R06-H04	355	1	1,677
PD1-IL2-R06-H05	1,409	21	1,561
PD1-IL2-R06-H06	1,491	23	1,650
PD1-IL2-R06-H07	12	13	1,701
PD1-IL2-R06-H08	847	1,118	1,746
PD1-IL2-R06-	1,732	22	1,662

名称	PD1 结合	IL2 结合	IL2RB 阻断
H09			
PD1-IL2-R06-H10	830	1,151	1,569
PD1-IL2-R07-A03	1,786	28	1,511
PD1-IL2-R07-A04	730	973	1,613
PD1-IL2-R07-A05	477	663	1,327
PD1-IL2-R07-A08	1,628	841	1,618
PD1-IL2-R07-A09 (SEQ ID NO: 34)	1,235	2,040	910
PD1-IL2-R07-A10	1,716	63	1,518
PD1-IL2-R07-B01	1,397	32	1,565
PD1-IL2-R07-B02	192	321	1,634
PD1-IL2-R07-B03	65	202	1,604
PD1-IL2-R07-B04	1,862	410	1,527
PD1-IL2-R07-B05	965	351	1,389
PD1-IL2-R07-B06	1,882	44	1,497

名称	PD1 结合	IL2 结合	IL2RB 阻断
PD1-IL2-R07-B07	6	2,549	1,517
PD1-IL2-R07-B08	906	1,047	1,475
PD1-IL2-R07-B09	1,788	27	1,384
PD1-IL2-R07-B10	18	19	1,635
PD1-IL2-R07-B11	1,765	9	1,641
PD1-IL2-R07-C01	230	367	1,536
PD1-IL2-R07-C02	236	304	1,500
PD1-IL2-R07-C03	20	1,347	1,536
PD1-IL2-R07-C07	15	275	1,665
PD1-IL2-R07-C10	1,064	317	1,550
PD1-IL2-R07-C11	1,523	642	1,460
PD1-IL2-R07-C12	1,377	49	1,707
PD1-IL2-R07-D01	1,541	79	1,657
PD1-IL2-R07-D03	1,483	33	1,481

名称	PD1 结合	IL2 结合	IL2RB 阻断
PD1-IL2-R07-D04	923	1,104	1,517
PD1-IL2-R07-D06	1,664	416	1,734
PD1-IL2-R07-D07	6	835	1,512
PD1-IL2-R07-D10	1,580	193	1,572
PD1-IL2-R07-D11	1,401	798	1,614
PD1-IL2-R07-E02	1,473	992	1,830
PD1-IL2-R07-E03	1,459	422	1,683
PD1-IL2-R07-E05	512	913	1,513
PD1-IL2-R07-E06	1,483	1,178	1,526
PD1-IL2-R07-E07	1,181	1,060	1,524
PD1-IL2-R07-E08	1,604	472	1,717
PD1-IL2-R07-E09	1,733	23	1,569
PD1-IL2-R07-E10	1,472	251	1,545
PD1-IL2-R07-E11	1,146	56	1,777

名称	PD1 结合	IL2 结合	IL2RB 阻断
PD1-IL2-R07-E12	1,698	106	1,764
PD1-IL2-R07-F01	3	17	1,529
PD1-IL2-R07-F02	348	752	1,537
PD1-IL2-R07-F03	1,788	520	1,750
PD1-IL2-R07-F04	1,416	145	1,767
PD1-IL2-R07-F06	1,422	438	1,579
PD1-IL2-R07-F09	1,589	17	1,456
PD1-IL2-R07-F10	24	19	1,778
PD1-IL2-R07-F12	505	196	1,553
PD1-IL2-R07-G01	4	214	1,560
PD1-IL2-R07-G02	1,610	61	1,735
PD1-IL2-R07-G04	82	147	1,600
PD1-IL2-R07-G05	981	216	1,475
PD1-IL2-R07-G06	860	512	1,655

名称	PD1 结合	IL2 结合	IL2RB 阻断
PD1-R04-C10	1,552	4	1,550
PD1-R07-A05	653	19	1,730
PD1-R07-A10	484	25	2,290
PD1-R07-C09	1,911	20	2,080
PD1-R07-D03	1,733	22	2,208
PD1-R07-D05	1,760	16	1,578
PD1-R07-D06	1,997	22	1,749
PD1-R07-E05	633	24	2,246
PD1-R07-G12	907	11	1,577
PD1-R15-B02	1,671	28	1,797
PDL1-DB03-H02	18	11	1,725
抗 Her2 (SEQ ID NO: 28)	4	20	1,636

实施例3

双重结合抗体(DBA)对于靶标的竞争性结合

[0121] 此实施例描述了标记物与双重结合抗体(DBA)的治疗结构域之间的竞争性结合。为了测试PD-L1(标记物)与IFNα(治疗剂)竞争结合至DBA结合结构域的能力,使用PURExpress 2.1体外翻译系统合成V5标记的DBA或对照scFv,并且以单一稀释度添加到384孔板中。将Eu标记的PD-L1和Alexa Fluor 647标记的抗V5抗体添加到所有孔中,并在室温下温育30分钟。将滴定浓度的IFNα添加到所有孔中,并且将板在室温下温育1小时。在Envision(Perkin Elmer)上读取HTRF信号。如图7所示,IFNα与PD-L1竞争结合至DBA克隆B09(SEQ ID NO:24)和C08(SEQ ID NO:26),而抗PD-L1单特异性抗体的结合不受IFNα浓度的影响。

实施例4

筛选结合亲和力改善的双重结合抗体(DBA)

[0122] 此实施例说明了筛选结合亲和力改善的双重结合抗体(DBA)。将每个DBA的序列与它所衍生自的亲本单一特异性抗体以及同一亲本单一特异性抗体所衍生自的其他DBA对齐。利用此序列信息,设计了在CDR区及其相邻区中具有氨基酸取代的变体,以测试与任一抗原的结合是否改变。另外,考虑了可以改善稳定性的序列变体。代表性变体在表8和表9中示出。表8和表9中提供的CDR序列对应于HCDR1-HCDR2-HCDR3,其中取代具有下划线和粗体。双重结合PD-L1和IFNα变体的序列在表10中提供。

表8-抗PDL1 02_A08、DBA PDL1-IFN_1A05和变体的重链CDR区

SEQ ID NO	描述	CDR 序列
SEQ ID NO: 305	亲本单特异性抗体 PDL1_02_A08	CKASGYTFSGYYMHW - WMGWMDPNSGYTGYAHQFQGRV – CAKEVFSGWYDYWGQ
SEQ ID NO: 306	双重结合抗体(DBA) PDL1-IFN R01 A05	CKASGYTFSNYYIHW - WMGWMDSNSGGTGYAQKFQGRV - CAKEVFSGWYDYWGQ
SEQ ID NO: 307	DBA 变体 H_N36G	CKASGYTFS**G**YYIHW - WMGWMDSNSGGTGYAQKFQGRV - CAKEVFSGWYDYWGQ
SEQ ID	DBA 变体 H_I39V_S58P_Q69H_K70Q	CKASGYTFSNYY**V**HW - WMGWMD**P**NSGGTGYA**HQ**FQGRV

SEQ ID NO	描述	CDR 序列
NO: 308		- CAKEVFSGWYDYWGQ
SEQ ID NO: 309	DBA 变体 H_G64Y_Q69H	CKASGYTFSNYYIHW - WMGWMDSNSG**Y**TGYA**H**KFQGRV - CAKEVFSGWYDYWGQ

表9-抗PDL1 02_A08、DBA PDL1-IFN_1A05和变体的轻链CDR区

SEQ ID NO	构建体	CDR 序列
SEQ ID NO: 310	亲本单特异性抗体 PDL1 02 A08	CRASQTISSYLNWY - IYAASTLESGVPSR - YYCQQGYSTPITFGPGTKVDIK
SEQ ID NO: 311	双重结合抗体(DBA) PDL1-IFN_R01_A05	CRASQSISSYLNWY - IYAASSLQSGVPSR - YYCQQSYSTPYTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 312	L_Q68E	CRASQSISSYLNWY - IYAASSLESGVPSR - YYCQQSYSTPYTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 313	L_Q68E_E125D	CRASQSISSYLNWY - IYAASSL**E**SGVPSR - YYCQQSYSTPYTFGQGTKV**D**IK

表10-双重结合PD-L1和IFNα变体的序列

SEQ ID NO	变体	序列
SEQ ID NO: 35	H_N36G	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FSGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDSNS

SEQ ID NO	变体	序列
		GGTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQG TLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPYTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 36	H_I39V _S58P_ Q69H_ K70Q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FSNYYVHWVRQAPGQGLEWMGWMDPNS GGTGYAHQFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQG TLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPYTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 37	H_G64 Y_Q69 H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FSNYYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDSNS GYTGYAHKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQG TLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPYTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 38	L_Q68E	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FSNYYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDSNS GGTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL

SEQ ID NO	变体	序列
		SSLRSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQG TLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPYTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:39	L_Q68E _E125D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FSNYYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDSNS GGTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQG TLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPYTFGQGTKVDIK

[0123] 将每个变体的scFv序列针对大肠杆菌表达进行密码子优化,并且将对应的DNA序列合成为gBlock(Integrated DNA Technologies,Inc.),具有T7启动子、翻译起始位点、Myc标签、scFv序列、V5标签序列和T7终止子。使用无细胞转录/翻译系统(Cosmo Bio USA,Inc.,PURExpress2.1,产品#GFK-PF213具有DS补充剂,产品#GFK-PF005)表达由gBlock片段编码的蛋白质。如实施例1中所述测定无细胞表达样品的PD-L1和IFNα结合。

[0124] 也可以通过展示方法,诸如噬菌体展示和mRNA展示生成具有不同结合亲和力的变体。用于这些方法的文库可以通过用随机氨基酸变化改变CDR或通过改变CDR中被鉴定为适合变化的位置来由亲本抗体产生。

实施例5

双重结合抗体(DBA)的结合亲和力

[0125] 此实施例描述了蛋白质复合物,具体地,双重结合抗体(DBA)的结合亲和力。使用PURExpress 2.1体外翻译系统将变体合成为V5标记的scFv,并且在1X动力学缓冲液(KB,forteBIO)中1:30稀释以用于测试。将生物素化的抗V5抗体(克隆SV5-Pk1 BioRad,使用EZ-Link®磺基-NHS-LC-生物素,THERMO进行生物素化)在1X KB中稀释至80nM,然后加载到OctetRED96e仪器上的链霉亲和素生物传感器尖端(SA,forteBIO)上。然后向这些尖端加载scFv,持续240秒。将加载的尖端转移到1X KB中60秒以建立基线,然后浸入160nM ACRO人PDL1-his中150秒以测量缔合,然后浸入1X KB中180秒以测量解离。在此解离后,立即测量1X KB中的基线信号,将尖端浸入5,000nM IFNα2b(GenScript)中150秒以测量缔合,然后浸入1X KB中240秒以测量解离。将数据拟合到1:1动力学模型。IFNα2b结合的应答为定性阴性

或阳性。表11中使用的DBA变体的序列在表8和表9中提供。

表11-DBA变体的结合动力学

	KD(PD-L1,nM)	IFNα结合(@5uM)
H_G64Y_Q69H	13	+/-
H_I39V_S58P_Q69H_K70Q	8	-
H_N36G	37	+
L_Q68E	21	+
L_Q68E_E125D	21	+
PDL1-IFN_R01_A05	120	未测试

[0126] 呈这种或其他抗体形式的DBA的亲和力可以用类似的方式测量,以使用蛋白质相互作用的标准测量方法生成定量或半定量测量,包括生物层干涉测量(例如,Octet,Molecular Devices LLC.)、表面等离子体共振(例如,BiaCore,GE Healthcare Life Sciences)、动力学排除(KinExA,Sapidyne Instruments,Inc.)或其他生物物理方法。此外,共价连接构建体中靶标对于DBA的表观亲和力可以用这些方法通过竞争非连接结合剂来测量。

实施例6

双重结合抗体(DBA)-细胞因子蛋白质复合物

[0127] 此实例描述了本公开的双重结合抗体(DBA)-细胞因子蛋白质复合物。将本公开的各种DBA-细胞因子蛋白质复合物设计成包含细胞因子、接头和一个或多个双重结合抗体结构域。示例性蛋白质复合物在图8(左)中示出,并且其氨基酸序列在图8(右)中示出。其他示例性构建体的图形表示在图9中示出(SEQ ID NO:42-SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:77-SEQ ID NO:79)。

[0128] 一系列DBA-细胞因子蛋白质复合物可以设计成具有两个标记物结合结构域和一个治疗结构域。此系列中使用的DBA(在表13中提供,序列在表14中提供)对于标记物和治疗结构域表现出一系列亲和力。示例性DBA复合物在表12、表15和表16中提供。

表12-示例性DBA细胞因子蛋白质复合物

SEQ ID NO	序列	描述
SEQ ID NO: 42	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTKNYMHWVRQAPGQGLE WLGWVSPDSGYTGYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCTTDLLSLELDDAFDIWGQGTM VTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSH ASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTF GGGTKLEIKPRGPTIKPCPPCKCPA PNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSP IVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNN	PD-L1/IFNα 蛋白质复合物具有能够结合 PD-L1 标记物和 IFNα 治疗结构域的 DBA 传感器结构域并且具有 IFNα 治疗活性

SEQ ID NO	序列	描述
	VEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSA LPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL GAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPP CEEEMTKKQVTLSCAVTDFMPEDI YVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMVSKLRVEKKNWVERNSY SCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	
SEQ ID NO: 43	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRI SLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQK AETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFCTELYQQLNDLEACV MQEERVGETPLMNADSILAVKKYF RRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIV RSLSLSTNLQERLRRKEGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFSGYYI HWVRQAPGQGLEWMGWMDSNSG GTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCAKEVFSG WYDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVL QSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPC PPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQ ISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNS TLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCK	PD-L1/IFNα 蛋白质复合物具有能够结合 PD-L1 标记物和 IFNα 治疗结构域的 DBA 传感器结构域并且具有 IFNα 治疗活性

SEQ ID NO	序列	描述
	VNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQ VCVLPPPEEEMTKKQVTLWCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKN WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK SFSRTPGK	
SEQ ID NO: 44	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQ GTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLT SGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTY SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEAT HKTSTSPIVKSFNRNEC	PD-L1/IFNα 蛋白质复合物具有能够结合 PD-L1 标记物和 IFNα 治疗结构域的 DBA 传感器结构域并且具有 IFNα 治疗活性
SEQ ID NO: 45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGIIDPSVTYTRYAQKFQGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYY CARSLFPTIFGVEVAFDIWGQGTLV TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGS SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDK KIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGG PSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVV VDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTA	PD-L1/IFNα 蛋白质复合物具有能够结合 PD-L1 标记物和 IFNα 治疗结构域的 DBA 传感器结构域并且具有 IFNα 治疗活性

SEQ ID NO	序列	描述
	QTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ DWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIER TISKPKGSVRAPQVYVLPPCEEEMT KKQVTLSCAVTDFMPEDIYVEWTN NGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMV SKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGK	
SEQ ID NO: 46	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRI SLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQK AETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFCTELYQQLNDLEACV MQEERVGETPLMNADSILAVKKYF RRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIV RSLSLSTNLQERLRRKEGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGIIDPSVTYTR YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGV EVAFDIWGQGTLVTVSSAKTTAPS VYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAV LQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSIT CNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKP CPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIK DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDV QISWFVNNVEVHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK	PD-L1/IFNα 蛋白质复合物具有能够结合 PD-L1 标记物和 IFNα 治疗结构域的 DBA 传感器结构域并且具有 IFNα 治疗活性

SEQ ID NO	序列	描述
	CKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRA PQVCVLPPPEEEMTKKQVTLWCM VTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNY KNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTT KSFSRTPGK	
SEQ ID NO: 47	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQA SQSISNYLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQTYSTPITFGQ GTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLT SGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTY SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEAT HKTSTSPIVKSFNRNEC	PD-L1/IFNα 蛋白质复合物具有能够结合 PD-L1 标记物和 IFNα 治疗结构域的 DBA 传感器结构域并且具有 IFNα 治疗活性
SEQ ID NO: 48	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRI SLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQK AETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFCTELYQQLNDLEACV MQEERVGETPLMNADSILAVKKYF RRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIV RSLSLSTNLQERLRRKEGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGIIDPSVTYTR YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGV	示例性 Seq_C_Pep1 不对称 DBA-细胞因子复合物 scFv-IgG 形式

SEQ ID NO	序列	描述
	EVAFDIWGQGTLVTVSSASGGGGS GGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCQASQDISNYLNW YQQKPGKAPKLLIYGASTLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQTYSTPITFGQGTKVEIKAKT TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCL VKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPP KIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRE DYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKE FKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPCEEEMTKKQVTLSC AVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN YKNTEPVLDSDGSYFMVSKLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK	
SEQ ID NO: 49	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFSGYYIHWVRQAPGQGLE WMGWMDSNSGGTGYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLV TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGS SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV	示例性 Seq_C_Pep2 不对称 DBA-细胞因子复合物 scFv-IgG 形式

SEQ ID NO	序列	描述
	TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDK KIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGG PSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVV VDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTA QTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ DWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIER TISKPKGSVRAPQVCVLPPPEEEMT KKQVTLWCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFM YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVH EGLHNHHTTKSFSRTPGK	
SEQ ID NO: 50	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQ GTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLT SGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTY SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEAT HKTSTSPIVKSFNRNEC	示例性 Seq_C_Pep3 不对称 DBA-细胞因子复合物 scFv-IgG 形式
SEQ ID NO: 51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFSTYYIHWVRQAPGQGLE WMGIINPSGGGTVYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAAGLFIWGQGTLVTVSSAKTT APSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCL VKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS	PD1-IL2_6C12_N36T_Sym_L_Long_Pep1 对称 DBA-细胞因子复合物 IgG 形式

SEQ ID NO	序列	描述
	QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPP KIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRE DYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKE FKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTC MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN YKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK	
SEQ ID NO: 52	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF CQSIISTLTVPGVGVPGAGVPGVGV PGGGVPGVGVPGGGVPGAGVPGG GVPGVGVPGAGVPGVGVPGGGDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ YISSGLAWYQQKPGKAPKLLIYKA SSLDNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQYERLPLTFGGG TKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKID GSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYS MSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATH KTSTSPIVKSFNRNEC	PD1- IL2_6C12_N3 6T_Sym_L_Lo ng_Pep2 对称 DBA-细 胞因子复合物 IgG 形式

SEQ ID NO	序列	描述
SEQ ID NO: 53	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF CQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFSTYYIHWVRQAPGQ GLEWMGIINPSGGGTVYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCAAGLFIWGQGTLVTVSSAK TTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGC LVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWP SQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRG PTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFP PKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHR EDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGS VRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLT CMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTEL NYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVE KKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPGK	PD1-IL2_6C12_N36T_D68E_Sym_H_Short_Pep1 对称 DBA-细胞因子复合物 IgG 形式
SEQ ID NO: 54	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQYISSGLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLENGVPSRFSGSGSGTDFTLT	PD1-IL2_6C12_N36T_D68E_Sy

SEQ ID NO	序列	描述
	ISSLQPEDFATYYCQQYERLPLTFG GGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKW KIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDST YSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEA THKTSTSPIVKSFNRNEC	m_H_Short_Pep2 对称 DBA-细胞因子复合物 IgG 形式
SEQ ID NO: 77	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTTYYVHWVRQAPGQGLE WMGIINPSGGSTSYAQNFQGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVY YCASGWDVWGQGTTVTVSSAKTT APSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCL VKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPP KIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRE DYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKE FKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTC MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN YKNTEPVLDSDGSYFMYSDLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHT TESFSRTPGK	PD1-IL2_L_7A05scFv_PD1-R07-A05_Pep1 不对称 DBA-细胞因子复合物 IgG-scFv 形式
SEQ ID NO: 78	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTTYYVHWVRQAPGQGLE WMGIINPSGGSTSYAQNFQGRVTM	PD1-IL2_L_7A05scFv_PD1-R07-

SEQ ID NO	序列	描述
	TRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVY YCASGWDVWGQGTTVTVSSASGG GGSGGGGSGGGGSHASEIVMTQSP ATLSVSPGERATLSCRASQSVNTYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATG IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDF AVYYCQQYGSSPVTFGQGTRLEIK PRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSV FIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDV SEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQ THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWM SGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKP KGSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQV SLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKT ELNYKNTEPVLKSDGSYFMYSKLT VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGGGGSGGGSHHHH HH	A05_Pep2 不对称 DBA-细胞因子复合物 IgG-scFv 形式
SEQ ID NO: 79	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTDMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF CQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATL SCRASQSVNTYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYGSS	PD1-IL2_L_7A05scFv_PD1-R07-A05_Pep3 不对称 DBA-细胞因子复合物 IgG-scFv 形式

SEQ ID NO	序列	描述
	PVTFGQGTRLEIKRADAAPTVSIFP PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDI NVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQD SKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNS YTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	

表13-双重结合抗体(DBA)

双重结合抗体	标记物	治疗剂	HV* SEQ ID NO:	LV** SEQ ID NO:	HV_cdr1 SEQ ID NO:	HV_cdr2 SEQ ID NO:	HV_cdr3 SEQ ID NO:	LV_cdr1 SEQ ID NO:	LV_cdr2 SEQ ID NO:	LV_cdr3 SEQ ID NO:
AB001718	PD-1	IL-2	127	135	142	148	154	157	163	168
AB001744	PD-1	IL-2	128	136	143	148	154	158	163	169
AB002022	PD-1	IL-2	129	137	144	149	154	159	164	170
AB001609	PD-L1	IFNα	130	138	145	150	155	160	165	171
AB001638	PD-L1	IFNα	130	139	145	150	155	161	165	172
AB001843	PD-L1	IFNα	131	140	146	151	156	162	166	173
AB001866	PD-L1	IFNα	132	140	147	152	156	162	166	173

双重结合抗体	标记物	治疗剂	HV* SEQ ID NO:	LV** SEQ ID NO:	HV_cdr1 SEQ ID NO:	HV_cdr2 SEQ ID NO:	HV_cdr3 SEQ ID NO:	LV_cdr1 SEQ ID NO:	LV_cdr2 SEQ ID NO:	LV_cdr3 SEQ ID NO:
AB001875	PD-L1	IFNα	133	140	143	153	156	162	166	173
AB001909	PD-L1	IFNα	134	141	143	151	156	162	167	173

*HV是指相应抗体的重链可变区

**LV是指相应抗体的轻链可变区

表14-DBA蛋白质组分的序列

SEQ ID NO:	DBA蛋白质组分	序列
SEQ ID NO: 127	AB001718_HV	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFSTYYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGGTVYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAAGLFIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 128	AB001744_HV	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYYIHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGGTVYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAAGLFIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:	AB002022_HV	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV

SEQ ID NO:	DBA 蛋白质组分	序列
129		SCKASGDTFTRHYVHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGYASYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCAAGLFI WGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 130	AB001609_HV	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGIIDPSVTYTRYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCARSLFPTIF GVEVAFDIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 131	AB001843_HV	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFSGYYIHWVRQAP GQGLEWMGWMDSNSGGTGY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCAKEVF SGWYDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 132	AB001866_HV	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFSNYYVHWVRQA PGQGLEWMGWMDPNSGGTG YAHQFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCAKEVF SGWYDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 133	AB001875_HV	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFSNYYIHWVRQAP GQGLEWMGWMDSNSGYTGY AQQFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCAKEVF

SEQ ID NO:	DBA 蛋白质组分	序列
		SGWYDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 134	AB001909_HV	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFSNYYIHWVRQAP GQGLEWMGWMDSNSGGTGY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCAKEVF SGWYDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 135	AB001718_LV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQYISSGLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLDNGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYERLPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 136	AB001744_LV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSIGTGLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLDNGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNRAPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 137	AB002022_LV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSIGRWLAWYQQKPGK APKLLIYSASNLETGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYESFPVTFGPGTKVDIK
SEQ ID NO: 138	AB001609_LV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISNRLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSNSTPFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:	AB001638_LV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT

SEQ ID NO:	DBA 蛋白质组分	序列
139		CQASQSISNYLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQTYSTPITFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 140	AB001843_LV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYSTPYTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 141	AB001909_LV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYSTPYTFGQGTKVDIK
SEQ ID NO: 142	AB001718_HV_cdr 1	GDTFSTYYVH
SEQ ID NO: 143	AB001744_HV_cdr 1	GYTFSNYYIH
SEQ ID NO:144	AB002022_HV_cdr 1	GDTFTRHYVH
SEQ ID NO: 145	AB001609_HV_cdr 1	GGTFSSYAIS
SEQ ID NO: 146	AB001843_HV_cdr 1	GYTFSGYYIH
SEQ ID NO: 147	AB001866_HV_cdr 1	GYTFSNYYVH
SEQ ID NO: 148	AB001718_HV_cdr 2	IINPSGGGTVYAQKFQG

SEQ ID NO:	DBA 蛋白质组分	序列
SEQ ID NO: 149	AB002022_HV_cdr 2	IINPSGGYASYAQKFQG
SEQ ID NO: 150	AB001609_HV_cdr 2	IIDPSVTYTRYAQKFQG
SEQ ID NO: 151	AB001843_HV_cdr 2	WMDSNSGGTGYAQKFQG
SEQ ID NO: 152	AB001866_HV_cdr 2	WMDPNSGGTGYAHQFQG
SEQ ID NO: 153	AB001875_HV_cdr 2	WMDSNSGYTGYAQQFQG
SEQ ID NO:154	AB001718_HV_cdr 3	AAGLFI
SEQ ID NO: 155	AB001609_HV_cdr 3	ARSLFPTIFGVEVAFDI
SEQ ID NO: 156	AB001843_HV_cdr 3	AKEVFSGWYDY
SEQ ID NO: 157	AB001718_LV_cdr1	RASQYISSGLA
SEQ ID NO: 158	AB001744_LV_cdr1	RASQSIGTGLA
SEQ ID NO: 159	AB002022_LV_cdr1	RASQSIGRWLA
SEQ ID NO: 160	AB001609_LV_cdr1	RASQSISNRLA
SEQ ID NO: 161	AB001638_LV_cdr1	QASQSISNYLA
SEQ ID NO: 162	AB001843_LV_cdr1	RASQSISSYLN

SEQ ID NO:	DBA 蛋白质组分	序列
SEQ ID NO: 163	AB001718_LV_cdr2	KASSLDN
SEQ ID NO:164	AB002022_LV_cdr2	SASNLET
SEQ ID NO: 165	AB001609_LV_cdr2	KASSLES
SEQ ID NO: 166	AB001843_LV_cdr2	AASSLQS
SEQ ID NO: 167	AB001909_LV_cdr2	AASSLES
SEQ ID NO: 168	AB001718_LV_cdr3	QQYERLPL
SEQ ID NO: 169	AB001744_LV_cdr3	QQYNRAPL
SEQ ID NO: 170	AB002022_LV_cdr3	QQYESFPV
SEQ ID NO: 171	AB001609_LV_cdr3	QQSNSTPF
SEQ ID NO: 172	AB001638_LV_cdr3	QQTYSTPI
SEQ ID NO: 173	AB001843_LV_cdr3	QQSYSTPY

表15-示例性DBA-细胞因子蛋白质复合物

名称	DBA / 治疗剂	DBA	类型	DBA结构域	治疗结构域	第 2 Ab 结构域	重链 1 SEQ ID NO:	重链 2 SEQ ID NO:	重链 3 SEQ ID NO:
AF003229	PD-1 / IL-2	AB001718	图9b	2	1	N/A	80	97	114
AF003230	PD-1 / IL-2	AB001744	图9b	2	1	N/A	81	98	115
AF003232	PD-1 / IL-2	AB002022	图9b	2	1	N/A	82	99	116
AF003250	PD-1 / IL-2	AB001718	图9a	1	1	抗 PD-1	83	100	117
AF003251	PD-1 / IL-2	AB001744	图9a	1	1	抗 PD-1	84	101	118
AF003253	PD-1 / IL-2	AB002022	图9a	1	1	抗 PD-1	85	102	119
AF003103	PD-L1 / IFNα	AB001609	图9b	2	1	N/A	86	103	120
AF003	PD-L1 / IFNα	AB0019	图9b	2	1	N/A	87	104	126

名称	DBA / 治疗剂	DBA	类型	DBA结构域	治疗结构域	第2 Ab结构域	重链1 SEQ ID NO:	重链2 SEQ ID NO:	重链3 SEQ ID NO:
104		09							
AF003105	PD-L1 / IFNα	AB001843	图9b	2	1	N/A	88	105	122
AF003106	PD-L1 / IFNα	AB001875	图9b	2	1	N/A	89	106	123
AF003217	PD-L1 / IFNα	AB001609	图9a	1	1	抗PD-L1	90	107	124
AF003218	PD-L1 / IFNα	AB001843	图9a	1	1	抗PD-L1	91	108	125
AF003219	PD-L1 / IFNα	AB001909	图9a	1	1	抗PD-L1	92	109	126
AF002618	PD-L1 / IFNα	AB001609	图9d	2	2	N/A	93		110
AF002639	PD-L1 / IFNα	AB001875	图9d	2	2	N/A	94		111
AF002	PD-L1 / IFNα	AB0016	图9e	2	2	N/A	95		112

名称	DBA / 治疗剂	DBA	类型	DBA结构域	治疗结构域	第2 Ab结构域	重链1 SEQ ID NO:	重链2 SEQ ID NO:	重链3 SEQ ID NO:
645		09							
AF002666	PD-L1 / IFNα	AB0018 75	图9e	2	2	N/A	96		277

表16-表15中的肽的序列

SEQ ID NO:	DBA	序列
SEQ ID NO: 80	AF003229_Pep1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS TLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSG AEVKKPGASVKVSCKASGDTFSTYYVHWVRQ APGQGLEWMGIINPSGGGTVYAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAAGLFI WGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTG SSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAA GGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTL RVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAP IERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVT LTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTE

SEQ ID NO:	DBA	序列
		PVLDSDGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCS VVHEGLHNHHTTESFSRTPGK
SEQ ID NO: 81	AF0032 30_Pep1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS TLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSG AEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYYIHWVRQ APGQGLEWMGIINPSGGGTVYAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAAGLFI WGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTG SSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAA GGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTL RVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAP IERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVT LTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTE PVLDSDGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCS VVHEGLHNHHTTESFSRTPGK
SEQ ID NO: 82	AF0032 32_Pep1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS TLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSG AEVKKPGASVKVSCKASGDTFTRHYVHWVR

SEQ ID NO:	DBA	序列
		QAPGQGLEWMGIINPSGGYASYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAAGL FIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTT GSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNA AGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSE DDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNST LRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGA PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQV TLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT EPVLDSDGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSC SVVHEGLHNHHTTESFSRTPGK
SEQ ID NO: 83	AF0032 50_Pep1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS TLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSG AEVKKPGASVKVSCKASGDTFSTYYVHWVRQ APGQGLEWMGIINPSGGGTVYAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAAGLFI WGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTG SSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAA GGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTL

SEQ ID NO:	DBA	序列
		RVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAP IERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVT LTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTE PVLDSDGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCS VVHEGLHNHHTTESFSRTPGK
SEQ ID NO: 84	AF0032 51_Pep1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS TLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSG AEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYYIHWVRQ APGQGLEWMGIINPSGGGTVYAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAAGLFI WGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTG SSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAA GGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTL RVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAP IERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVT LTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTE PVLDSDGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCS VVHEGLHNHHTTESFSRTPGK
SEQ ID NO: 85	AF0032 53_Pep1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL

SEQ ID NO:	DBA	序列
		KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS TLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSG AEVKKPGASVKVSCKASGDTFTRHYVHWVR QAPGQGLEWMGIINPSGGYASYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAAGL FIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTT GSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNA AGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSE DDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNST LRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGA PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQV TLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT EPVLDSDGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSC SVVHEGLHNHHTTESFSRTPGK
SEQ ID NO: 86	AF003103_Pep1	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKD RHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFCTELYQQLNDLEA CVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLY LTEKKYSPCAWEVVRAEIVRSLSLSTNLQERL RRKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQ SGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGIIDPSVTYTRYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLF PTIFGVEVAFDIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVY PLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW

SEQ ID NO:	DBA	序列
		NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSST WPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPC PPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPI VTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQT QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK CKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVCVLP PPEEEMTKKQVTLWCMVTDFMPEDIYVEWTN NGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTP GK
SEQ ID NO: 87	AF003104_Pep1	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKD RHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFCTELYQQLNDLEA CVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLY LTEKKYSPCAWEVVRAEIVRSLSLSTNLQERL RRKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSN YYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDSNSGGTGY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLVTVSS AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS SSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIE PRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNN VEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVR

SEQ ID NO:	DBA	序列
		APQVCVLPPPEEEMTKKQVTLWCMVTDFMPE DIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFM YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 88	AF0031 05_Pep1	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKD RHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFCTELYQQLNDLEA CVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLY LTEKKYSPCAWEVVRAEIVRSLSLSTNLQERL RRKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQ SGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSGYYIHWV RQAPGQGLEWMGWMDSNSGGTGYAQKFQG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA KEVFSGWYDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYP LAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWN SGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTW PSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPP CKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVT CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQT HREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCK VNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVCVLPPPE EEMTKKQVTLWCMVTDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKN WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 89	AF0031 06_Pep1	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKD RHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFCTELYQQLNDLEA

SEQ ID NO:	DBA	序列
		CVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLY LTEKKYSPCAWEVVRAEIVRSLSLSTNLQERL RRKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQ SGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYYIHWV RQAPGQGLEWMGWMDSNSGYTGYAQQFQG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA KEVFSGWYDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYP LAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWN SGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTW PSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPP CKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVT CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQT HREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCK VNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVCVLPPPE EEMTKKQVTLWCMVTDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKN WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 90	AF0032 17_Pep1	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKD RHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFCTELYQQLNDLEA CVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLY LTEKKYSPCAWEVVRAEIVRSLSLSTNLQERL RRKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQ SGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGIIDPSVTYTRYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLF PTIFGVEVAFDIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVY

SEQ ID NO:	DBA	序列
		PLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSST WPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPC PPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPI VTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQT QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK CKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVCVLP PPEEEMTKKQVTLWCMVTDFMPEDIYVEWTN NGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTP GK
SEQ ID NO: 91	AF0032 18_Pep1	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKD RHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFCTELYQQLNDLEA CVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLY LTEKKYSPCAWEVVRAEIVRSLSLSTNLQERL RRKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQ SGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSGYYIHWV RQAPGQGLEWMGWMDSNSGGTGYAQKFQG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA KEVFSGWYDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYP LAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWN SGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTW PSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPP CKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVT CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQT HREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCK

SEQ ID NO:	DBA	序列
		VNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVCVLPPPE EEMTKKQVTLWCMVTDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKN WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 92	AF0032 19_Pep1	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKD RHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFCTELYQQLNDLEA CVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLY LTEKKYSPCAWEVVRAEIVRSLSLSTNLQERL RRKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQ SGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYYIHWV RQAPGQGLEWMGWMDSNSGGTGYAQKFQG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA KEVFSGWYDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYP LAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWN SGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTW PSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPP CKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVT CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQT HREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCK VNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVCVLPPPE EEMTKKQVTLWCMVTDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKN WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 93	AF0026 18_Pep1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSS YAISWVRQAPGQGLEWMGIIDPSVTYTRYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV

SEQ ID NO:	DBA	序列
		YYCARSLFPTIFGVEVAFDIWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYF PEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS SVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEP RGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDV LMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDI YVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK SFSRTPGK
SEQ ID NO: 94	AF002639_Pep1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSN YYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDSNSGYTGY AQQFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLVTVSSAKT TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPR GPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVE VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWM SGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAP QVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDI YVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK SFSRTPGK

SEQ ID NO:	DBA	序列
SEQ ID NO: 95	AF002645_Pep1	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKD RHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLE ACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITL YLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQES LRSKEVPGVGVPGAGVPGVGVPGGGVPGVGV PGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGAGVPGVGV PGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGG TFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGIIDPSVTYTR YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARSLFPTIFGVEVAFDIWGQGTLVTV SSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVK GYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY TLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDK KIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPK IKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKG SVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGS YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLH NHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 96	AF002666_Pep1	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKD RHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLE ACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITL YLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQES

SEQ ID NO:	DBA	序列
		LRSKEVPGVGVPGAGVPGVGVPGGGVPGVGV PGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGAGVPGVGV PGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFSNYYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDSNSGY TGYAQQFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLVTVSS AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS SSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIE PRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNN VEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVR APQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPE DIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFM YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 97	AF0032 29_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFST YYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGGTVYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAAGLFIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPL APVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWP SQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTC VVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTH REDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV

SEQ ID NO:	DBA	序列
		NNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEK EMTKKQVSLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKT ELNYKNTEPVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGGGGS GGGSHHHHHH
SEQ ID NO: 98	AF0032 30_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSN YYIHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGGTVYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAAGLFIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLA PVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTC VVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTH REDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV NNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEK EMTKKQVSLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKT ELNYKNTEPVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGGGGS GGGSHHHHHH
SEQ ID NO: 99	AF0032 32_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFTR HYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGYASYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAAGLFIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPL APVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWP SQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC

SEQ ID NO:	DBA	序列
		KCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTC VVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTH REDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV NNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEK EMTKKQVSLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKT ELNYKNTEPVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGGGGS GGGSHHHHHH
SEQ ID NO: 100	AF0032 50_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTT YYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQ NFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCASGWDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGG GSGGGGSHASEIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNTYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYY CQQYGSSPVTFGQGTRLEIKPRGPTIKPCPPCK CPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCV VVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHR EDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVN NKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEKE MTKKQVSLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKTE LNYKNTEPVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWVE RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGGGGSG GGSHHHHHH
SEQ ID NO: 101	AF0032 51_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTT YYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQ NFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV

SEQ ID NO:	DBA	序列
		YYCASGWDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGG GSGGGGSHASEIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNTYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYY CQQYGSSPVTFGQGTRLEIKPRGPTIKPCPPCK CPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCV VVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHR EDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVN NKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEKE MTKKQVSLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKTE LNYKNTEPVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWVE RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGGGGSG GGSHHHHHH
SEQ ID NO: 102	AF0032 53_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTT YYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQ NFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCASGWDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGG GSGGGGSHASEIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVNTYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYY CQQYGSSPVTFGQGTRLEIKPRGPTIKPCPPCK CPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCV VVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHR EDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVN NKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEKE MTKKQVSLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKTE LNYKNTEPVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWVE

SEQ ID NO:	DBA	序列
		RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGGGGSG GGSHHHHHH
SEQ ID NO:103	AF003103_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSS YAISWVRQAPGQGLEWMGIIDPSVTYTRYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCARSLFPTIFGVEVAFDIWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYF PEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS SVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEP RGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDV LMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPCEEEMTKKQVTLSCAVTDFMPEDI YVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMVS KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK SFSRTPGKHHHHHH
SEQ ID NO: 104	AF003104_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSN YYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDSNSGGTGY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLVTVSSAKT TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPR GPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVE VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWM

SEQ ID NO:	DBA	序列
		SGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAP QVYVLPPCEEEMTKKQVTLSCAVTDFMPEDIY VEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMVSK LRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKS FSRTPGKHHHHHH
SEQ ID NO: 105	AF003105_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSG YYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDSNSGGTGY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLVTVSSAKT TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPR GPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVE VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWM SGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAP QVYVLPPCEEEMTKKQVTLSCAVTDFMPEDIY VEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMVSK LRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKS FSRTPGKHHHHHH
SEQ ID NO: 106	AF003106_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSN YYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDSNSGYTGY AQQFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLVTVSSAKT TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS

SEQ ID NO:	DBA	序列
		VTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPR GPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVE VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWM SGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAP QVYVLPPCEEEMTKKQVTLSCAVTDFMPEDIY VEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMVSK LRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKS FSRTPGKHHHHHH
SEQ ID NO: 107	AF0032 17_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTK NYMHWVRQAPGQGLEWLGWVSPDSGYTGY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCTTDLLSLELDDAFDIWGQGTMVTVSS ASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIKPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVH TAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSG KEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPCEEEMTKKQVTLSCAVTDFMPEDIYVE WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMVSKLR VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFS RTPGK
SEQ ID NO:	AF0032 18_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTK NYMHWVRQAPGQGLEWLGWVSPDSGYTGY

SEQ ID NO:	DBA	序列
108		AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCTTDLLSLELDDAFDIWGQGTMVTVSS ASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIKPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVH TAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSG KEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPCEEEMTKKQVTLSCAVTDFMPEDIYVE WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMVSKLR VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFS RTPGK
SEQ ID NO: 109	AF003219_Pep2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTK NYMHWVRQAPGQGLEWLGWVSPDSGYTGY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCTTDLLSLELDDAFDIWGQGTMVTVSS ASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIKPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVH TAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSG KEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPCEEEMTKKQVTLSCAVTDFMPEDIYVE

SEQ ID NO:	DBA	序列
		WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMVSKLR VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFS RTPGK
SEQ ID NO: 110	AF0026 18_Pep2	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKD RHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLE ACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITL YLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQES LRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNRLAWYQQK PGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSNSTPFTFGQGTKVE IKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC
SEQ ID NO: 111	AF0026 39_Pep2	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKD RHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLE ACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITL YLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQES LRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVE IKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSK

SEQ ID NO:	DBA	序列
		DSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC
SEQ ID NO: 112	AF0026 45_Pep2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNRL AWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNSTPFTF GQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
SEQ ID NO:114	AF0032 29_Pep3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYISSGL AWYQQKPGKAPKLLIYKASSLDNGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYERLPLTF GGGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
SEQ ID NO: 115	AF0032 30_Pep3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGTGL AWYQQKPGKAPKLLIYKASSLDNGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNRAPLTF GGGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
SEQ ID NO: 116	AF0032 32_Pep3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGRWL AWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYESFPVTF GPGTKVDIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS

SEQ ID NO:	DBA	序列
		VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
SEQ ID NO: 126	AF0032 19_Pep3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTF GQGTKVDIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

实施例7

PD-L1/IFNα蛋白质复合物减少I型IFNα报告子活化

[0129] 此实施例证明了相对于不受调节的抗体-IFNα免疫细胞因子,本公开的PD-L1/IFNα蛋白复合物,具体地,PD-L1/IFNαDBA/细胞因子复合物减少了I型IFNα报告子活化。此实验中使用的DBA-细胞因子蛋白质复合物和对照免疫细胞因子是IgG蛋白,其IFNα通过由4个“GGGGS”重复序列构成的接头融合至重链的N末端,如图9E中所例示。合成两种DBA-细胞因子复合物的基因,C08 IFNα(CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGIIDPSVTYTRYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGVEVAFDIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK;SEQ ID NO:57和

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTPITFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC;SEQ ID NO:58)以及

B09 IFNα

(CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWVNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGVEVA

FDIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY
TLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISL
SPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAP
IERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMY
SKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK;SEQ ID NO:59和

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSPPPTFGQGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDI
NVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC;SEQ ID
NO:60),以及两种对照免疫细胞因子,抗Her2 IFNα

(CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLF
STKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVV
RAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAI
SWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGVEVA
FDIWGQGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY
TLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISL
SPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAP
IERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMY
SKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK;SEQ ID NO:61和

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIDRLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDI
NVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC;SEQ ID
NO:62)和抗PD-L1 IFNα

(CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLF
STKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVV
RAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI
HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS
SVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIV
TCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERT
ISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLR
VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK;SEQ ID NO:63和

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK

LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYT

TPPTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY

PKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS
FNRNEC;SEQ ID NO:64),在HEK293细胞中表达并进行蛋白A纯化(GenScript)。将滴定浓度的DBA-细胞因子复合物和抗体-细胞因子对照与50,000个I型IFNα报告细胞(InvivoGen)一起添加到完全DMEM(+10% FBS,2mM L-谷氨酰胺,丙酮酸钠)中的96孔板中。将板在37℃下温育过夜,并通过向180uL QUANTI-Blue溶液(InvivoGen)中添加20uL培养上清液来显影。

在室温下温育30分钟之后，在630nm处在Envision(Perkin Elmer)上读取板。在PD-L1不存在的情况下，与等摩尔量的对照抗PD-L1或抗HER2 IFNα免疫细胞因子相比，IFNα拴系的PD-L1-IFNαDBA复合物C08和B09显示报告子活化降低(图10)。

实施例8

PD-1/IL-2双重结合抗体(DBA)细胞因子复合物减少$CD8^+$ T细胞STAT5磷酸化

[0130] 此实施例描述了通过本公开的PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物进行的CD8+ T细胞STAT5磷酸化。合成表17中所示的PD-1/IL-2DBA的基因并在HEK293中表达为IgG蛋白，其IL-2通过接头(Genscript)融合至重链或轻链的N末端。虽然只有两种抗体作为scFv阻断IL-2与IL-2RB结合，但超过30种抗体能够减少通过连接的IL-2结构域进行IL-2信号传导。选择这些DBA的一个示例性集用于分析并与对照抗HER2-IL-2免疫细胞因子进行比较(表17)。

表17-IgG PD-1/IL-2DBA蛋白质复合物

名称	重链序列 SEQ ID NO	轻链序列 SEQ ID NO
抗 HER2	(SEQ ID NO: 65) EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNG YTRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYW GQGTLVTVSSAKTTAPSVY PLAPVCGDTTGSSVTLGCL VKGYFPEPVTLTWNSGSLS SGVHTFPAVLQSDLYTLSS SVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIK PCPPCKCPAPNAAGGPSVFI FPPKIKDVLMISLSPIVTCV VVDVSEDDPDVQISWFVN NVEVHTAQTQTHREDYNS TLRVVSALPIQHQDWMSG KEFKCKVNNKDLGAPIERT	(SEQ ID NO: 66) APTSSSTKKTQLQLEHLL LDLQMILNGINNYKNPK LTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWIT FCQSIISTLTVPGVGVPG AGVPGVGVPGGGVPGV GVPGGGVPGAGVPGGG VPGVGVPGAGVPGVGV PGGGDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAPKLL IYSASFLYSGVPSRFSGS RSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQHYTTPPTFGQ GTKVEIKRADAAPTVSIF

名称	重链序列 SEQ ID NO	轻链序列 SEQ ID NO
	ISKPKGSVRAPQVYVLPPPE	PPSSEQLTSGGASVVCFL
	EEMTKKQVTLTCMVTDFM	NNFYPKDINVKWKIDGS
	PEDIYVEWTNNGKTELNY	ERQNGVLNSWTDQDSK
	KNTEPVLDSDGSYFMYSKL	DSTYSMSSTLTLTKDEY
	RVEKKNWVERNSYSCSVV	ERHNSYTCEATHKTSTS
	HEGLHNHHTTKSFSRTPGK	PIVKSFNRNEC
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 68)
	QVQLVQSGAEVKKPGASV	APTSSSTKKTQLQLEHLL
	KVSCKVSGYTFTSYDINWV	LDLQMILNGINNYKNPK
	RQAPGQGLEWMGWINPNS	LTRMLTFKFYMPKKATE
	GDTGYAQKFQGRVTMTRD	LKHLQCLEEELKPLEEV
	TSTSTVYMELSSLRSEDTA	LNLAQSKNFHLRPRDLIS
	VYYCARDTGLGYYYGSGD	NINVIVLELKGSETTFMC
	FDYWGQGTLVTVSSAKTT	EYADETATIVEFLNRWIT
	APSVYPLAPVCGDTTGSSV	FCQSIISTLTVPGVGVPG
	TLGCLVKGYFPEPVTLTWN	AGVPGVGVPGGGVPGV
	SGSLSSGVHTFPAVLQSDL	GVPGGGVPGAGVPGGG
	YTLSSSVTVTSSTWPSQSIT	VPGVGVPGAGVPGVGV
	CNVAHPASSTKVDKKIEPR	PGGGDIQMTQSPSSLSAS
	GPTIKPCPPCKCPAPNAAG	VGDRVTITCQASQDIHN
	GPSVFIFPPKIKDVLMISLSP	YLNWYQQKPGKAPKLLI
	IVTCVVVDVSEDDPDVQIS	YDVSNLETGVPSRFSGS
	WFVNNVEVHTAQTQTHRE	GSGTDFTLTISSLQPEDF
	DYNSTLRVVSALPIQHQDW	ATYYCQQAISFPLTFGG
	MSGKEFKCKVNNKDLGAP	GTKVEIKRADAAPTVSIF
2-A08	IERTISKPKGSVRAPQVYVL	PPSSEQLTSGGASVVCFL

名称	重链序列 SEQ ID NO	轻链序列 SEQ ID NO
	PPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTE LNYKNTEPVLDSDGSYFM YSKLRVEKKNWVERNSYS CSVVHEGLHNHHTTKSFSR TPGK	NNFYPKDINVKWKIDGS ERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTLTKDEY ERHNSYTCEATHKTSTS PIVKSFNRNEC
2-A11	(SEQ ID NO: 69) QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGHTFTRYYMHW VRQAPGQGLEWMGIINPSG GYATYAQKFQGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCASGWDVWGQGTLV TVSSAKTTAPSVYPLAPVC GDTTGSSVTLGCLVKGYFP EPVTLTWNSGSLSSGVHTF PAVLQSDLYTLSSSVTVTSS TWPSQSITCNVAHPASSTK VDKKIEPRGPTIKPCPPCKC PAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWFVNNVEVHTA QTQTHREDYNSTLRVVSAL PIQHQDWMSGKEFKCKVN NKDLGAPIERTISKPKGSVR APQVYVLPPPEEEMTKKQV	(SEQ ID NO: 70) APTSSSTKKTQLQLEHLL LDLQMILNGINNYKNPK LTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWIT FCQSIISTLTVPGVGVPG AGVPGVGVPGGGVPGV GVPGGGVPGAGVPGGG VPGVGVPGAGVPGVGV PGGGDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQSINS WLAWYQQKPGKAPKLL IYATSTLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSFPPTFGQ GTKVEIKRADAAPTVSIF PPSSEQLTSGGASVVCFL

名称	重链序列 SEQ ID NO	轻链序列 SEQ ID NO
	TLTCMVTDFMPEDIYVEW TNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK	NNFYPKDINVKWKIDGS ERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTLTKDEY ERHNSYTCEATHKTSTS PIVKSFNRNEC
2-B05	(SEQ ID NO: 71) QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTNYYIHW VRQAPGQGLEWMGIINPRA GYTSYALKFQGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAGGWLDWGQGTLV TVSSAKTTAPSVYPLAPVC GDTTGSSVTLGCLVKGYFP EPVTLTWNSGSLSSGVHTF PAVLQSDLYTLSSSVTVTSS TWPSQSITCNVAHPASSTK VDKKIEPRGPTIKPCPPCKC PAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWFVNNVEVHTA QTQTHREDYNSTLRVVSAL PIQHQDWMSGKEFKCKVN NKDLGAPIERTISKPKGSVR APQVYVLPPPEEEMTKKQV TLTCMVTDFMPEDIYVEW	(SEQ ID NO: 72) APTSSSTKKTQLQLEHLL LDLQMILNGINNYKNPK LTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWIT FCQSIISTLTVPGVGVPG AGVPGVGVPGGGVPGV GVPGGGVPGAGVPGGG VPGVGVPGAGVPGVGV PGGGDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQSISSW LAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSFTMPITFGQGT RLEIKRADAAPTVSIFPP SSEQLTSGGASVVCFLN NFYPKDINVKWKIDGSE

名称	重链序列 SEQ ID NO	轻链序列 SEQ ID NO
	TNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK	RQNGVLNSWTDQDSKD STYSMSSTLTLTKDEYE RHNSYTCEATHKTSTSPI VKSFNRNEC
2-B07	(SEQ ID NO: 73) QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGDTFTRHYVHW VRQAPGQGLEWMGIINPSG GYASYAQKFQGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAAGLFIWGQGTLVT VSSAKTTAPSVYPLAPVCG DTTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVTSST WPSQSITCNVAHPASSTKV DKKIEPRGPTIKPCPPCKCP APNAAGGPSVFIFPPKIKDV LMISLSPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWFVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALP IQHQDWMSGKEFKCKVNN KDLGAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPPEEEMTKKQVT LTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDS	(SEQ ID NO: 74) APTSSSTKKTQLQLEHLL LDLQMILNGINNYKNPK LTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWIT FCQSIISTLTVPGVGVPG AGVPGVGVPGGGVPGV GVPGGGVPGAGVPGGG VPGVGVPGAGVPGVGV PGGGDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQSIGR WLAWYQQKPGKAPKLL IYSASNLETGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQANSFPVTFGP GTKVDIKRADAAPTVSIF PPSSEQLTSGGASVVCFL NNFYPKDINVKWKIDGS ERQNGVLNSWTDQDSK

名称	重链序列 SEQ ID NO	轻链序列 SEQ ID NO
	DGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK	DSTYSMSSTLTLTKDEY ERHNSYTCEATHKTSTS PIVKSFNRNEC
7-A04	(SEQ ID NO: 75) QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTDYYMHW VRQAPGQGLEWMGIINPRA GYTSYALKFQGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCTSGMDVWGQGTLV TVSSAKTTAPSVYPLAPVC GDTTGSSVTLGCLVKGYFP EPVTLTWNSGSLSSGVHTF PAVLQSDLYTLSSSVTVTSS TWPSQSITCNVAHPASSTK VDKKIEPRGPTIKPCPPCKC PAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSED DPDVQISWFVNNVEVHTA QTQTHREDYNSTLRVVSAL PIQHQDWMSGKEFKCKVN NKDLGAPIERTISKPKGSVR APQVYVLPPPEEEMTKKQV TLTCMVTDFMPEDIYVEW TNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWV	(SEQ ID NO: 76) APTSSSTKKTQLQLEHLL LDLQMILNGINNYKNPK LTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWIT FCQSIISTLTVPGVGVPG AGVPGVGVPGGGVPGV GVPGGGVPGAGVPGGG VPGVGVPGAGVPGVGV PGGGDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQSISTW LAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSYSFPVTFGQGT KVEIKRADAAPTVSIFPP SSEQLTSGGASVVCFLN NFYPKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKD STYSMSSTLTLTKDEYE

名称	重链序列 SEQ ID NO	轻链序列 SEQ ID NO
	ERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK	RHNSYTCEATHKTSTSPI VKSFNRNEC

[0131] 将PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物在完全RPMI(+10% FBS,2mM L-谷氨酰胺,丙酮酸钠)中系列稀释并添加到96孔板中。将2x10^5个人PBMC添加到每个孔中,并且将板在37℃下温育20分钟。然后将等体积的预温热的固定缓冲液(Biolegend)添加到每个孔中,并且将板在37℃下温育10分钟。然后将细胞在4℃下在预冷却的Perm缓冲液III(BD Biosciences)中固定30分钟。将细胞用FACS洗涤缓冲液(PBS+2% FBS,2mM EDTA)中洗涤,并且用在FACS洗涤缓冲液中1:20稀释的针对CD3、CD4、CD8(BioLegend)和磷酸化STAT5(BD Biosciences)的荧光标记的抗体染色。将细胞在4℃下温育1小时,用FACS洗涤缓冲液洗涤,并在SA3800光谱分析仪上进行分析。在PD-1不存在的情况下,与单特异性对照抗HER2 IL-2免疫细胞因子相比,PD-1/IL-2DBA/细胞因子复合物在T细胞中诱导更少的STAT5磷酸化(图11)。

实施例9

PD-L1/IFNα双重结合抗体(DBA)细胞因子复合物调节干扰素受体结合

此实施例描述了PD-L1/IFNαDBA-细胞因子复合物调节干扰素受体结合。选择SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:55的DBA-细胞因子复合物(MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGNTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGVEVAFDIWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTRLEIKGKPIPNPLLGLDST)进行分析,阴性对照具有类似的结构,基于HER2结合scFv(SEQ ID NO:56,

MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQE
EFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTE
LYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEK
KYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM
NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASGGGG
SGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA
VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGKPIPNPLLGLDST)。使用无细胞转录/翻译系统(Cosmo Bio USA,Inc.,PURExfrex2.1,产品#GFK-PF213具有DS补充剂,产品#GFK-PF005)表达蛋白质。将96孔ELISA板在4℃下用抗V5抗体(SV5-pk1)以50ng/孔涂覆。通过添加200ul/孔的SuperBlock和0.05% Tween 20(SBT)将板洗涤两次,并且将最终SBT洗涤液在抽吸之前在室温下温育15min。然后将SBT中每种构建体的蛋白质的稀释系列以50μl/孔添加到抗V5涂覆的板中,并

在室温下温育1小时。然后将每个板用PBS和0.05％Tween 20(PBST)洗涤三次。然后用抗IFNα、IFNAR2-生物素、PDL1-hFc-Avi或IFNAR2-生物素和PDL1-hFc-Avi的组合在SBT中以50ul/孔在室温下探测结合的构建体，进行1小时。将板用PBST洗涤3x。以50ul/孔添加山羊抗mIgG-HRP或链霉亲和素-HRP，并在室温下温育30min，接着用PBST洗涤3x。通过添加50ul/孔的TMB来对板进行显影，并且用等体积的ELISA终止溶液使反应终止。如图12(左上)所示，随着PD-L1的添加，IFNAR2与DBA-IFNα复合物(SEQ ID NO:41)的结合以剂量依赖性方式增加。IFNAR2与对照HER2特异性抗体-IFNα复合物(SEQ ID NO:56)的结合不受PD-L1添加的影响(图12，右上)。IFNAR2与含有SEQ ID NO:55的DBA-IFNα复合物的结合不受这些浓度的PD-L1添加的影响(图12，底部)。SEQ ID NO:55的蛋白质复合物与SEQ ID NO:41的蛋白质复合物类似，不同之处在于SEQ ID NO:55的传感器结构域对于IFNα的亲和力高于SEQ ID NO:41的传感器结构域。本发明的蛋白质复合物可能需要它们对标记物的亲和力与它们对治疗结构域的亲和力之间取得正确的平衡。

实施例10

PD-L1/IFNα蛋白质复合物的体外PD-L1依赖性IFNα活性

[0132] 此实施例描述了PD-L1/IFNα蛋白质复合物的体外PD-L1依赖性IFNα活性。PD-L1/IFNα蛋白质复合物包含能够结合PD-L1标记物和IFNα治疗结构域的DBA，其中蛋白质复合物经由接头连接至IFNα治疗细胞因子。在PD-L1不存在的情况下，PD-L1传感器结构域结合IFNα治疗结构域，使IFNα治疗剂呈惰性。在PD-L1存在的情况下(例如，PD-L1在细胞，诸如肿瘤细胞或免疫细胞上表达)，PD-L1传感器结构域结合PD-L1，从而解除与IFNα治疗结构域的结合并允许IFNα表现出治疗活性。

[0133] 设计并重组表达或化学合成PD-L1/IFNα蛋白质复合物。将PD-L1/IFNα蛋白质复合物体外施用于细胞(例如，在细胞培养物中)。在PD-L1标记物不存在的情况下，IFNα结构域仍然与PD-L1传感器结构域结合，并且没有观察到治疗作用。细胞可以内源性或活化之后或在引入编码PD-L1的基因后表达PD-L1。如果细胞是表达PD-L1标记物的肿瘤细胞，则治疗作用可以是抑制细胞生长或诱导IFNα应答性基因。在细胞是免疫细胞的情况下，治疗作用可以是细胞生长、活化或诱导IFN应答性基因。在细胞是细胞类型混合物的一部分的情况下，可以监测混合物中应答细胞群体的任何这些变化。

实施例11

体内PD-L1依赖性IFNα活性

[0134] 此实施例描述了PD-L1/IFNα蛋白质复合物的体内PD-L1依赖性IFNα活性。PD-L1/IFNα蛋白质复合物包含经由接头连接至IFNα细胞因子的PD-L1传感器结构域(例如，抗PD-L1抗体或抗PD-L1scFv)，其中IFNα细胞因子是治疗剂。在PD-L1不存在的情况下，PD-L1传感器结构域结合IFNα治疗结构域，使IFNα治疗剂呈惰性。在PD-L1存在的情况下(例如，PD-L1在细胞，诸如肿瘤细胞或免疫细胞上表达)，PD-L1传感器结构域结合PD-L1，从而解除与IFNα治疗结构域的结合并允许IFNα表现出治疗活性。

[0135] 重组表达或化学合成PD-L1/IFNα蛋白质复合物。将PD-L1/IFNα蛋白质复合物体内施用于有需要的对象。施用通过静脉内、肌肉内、皮下、皮内、腹膜内或粘膜进行。在PD-L1不存在的情况下，IFNα治疗结构域仍然与PD-L1传感器结构域结合，并且没有观察到治疗功效(例如，对象的细胞增殖没有被抑制)。在PD-L1存在的情况下，PD-L1传感器结构域结合PD-

L1并解除与IFNα治疗结构域的结合。观察到治疗功效(例如,细胞增殖被抑制或发生免疫细胞活化)。所述细胞是表达PD-L1的肿瘤细胞。所述对象是有需要的人或非人动物。所述对象患有疾病。所述疾病是癌症。

实施例12

人细胞中的PD-1依赖性IL-2活性

[0136] 此实施例描述了PD-1/IL-2蛋白质复合物在人细胞中的体外和体内PD-1依赖性IL-2活性。PD-1/IL-2蛋白质复合物包含经由接头连接至IL-2细胞因子治疗结构域的PD-1传感器结构域(例如,抗PD-1抗体或抗PD-1scFv),其中IL-2细胞因子是治疗剂。在PD-1不存在的情况下,PD-1传感器结构域结合IL-2治疗结构域,使IL-2治疗剂呈惰性。在PD-1存在的情况下(例如,PD-1在细胞,诸如免疫细胞上表达),PD-1传感器结构域结合PD-1,从而解除与IL-2治疗结构域的结合并允许IL-2表现出治疗活性。

[0137] 重组表达或化学合成PD-1/IL-2蛋白质复合物。将PD-1/IL-2蛋白质复合物体外施用于人细胞或体内施用于有需要的小鼠或人对象。人细胞是表达PD-1的细胞。施用至小鼠或人对象通过静脉内、肌肉内、皮下、皮内、腹膜内或粘膜进行。在PD-1不存在的情况下,IL-2治疗结构域仍然与PD-1传感器结构域结合,并且没有观察到治疗功效(例如,体外和对象的细胞活化没有改变)。在PD-1存在的情况下,PD-1传感器结构域结合PD-1并解除与IL-2治疗结构域的结合。观察到治疗功效(例如,在体外和对象中体内观察到细胞活化)。所述对象患有疾病。所述疾病是癌症。细胞可以内源性或活化之后或在引入编码PD-1的基因后表达PD-1。治疗功效可以是细胞生长、分化、活化或诱导IL2应答性基因。在体外,在细胞是细胞类型混合物的一部分的情况下,可以监测混合物中应答细胞群体的任何这些变化。

实施例13

肿瘤组织中的生物活性

[0138] 此实施例描述了肿瘤组织中的生物活性。重组表达或化学合成本公开的蛋白质复合物。所述蛋白质复合物包含连接至治疗结构域的传感器结构域。所述接头是肽接头。传感器结构域能够结合至治疗剂和标记物。在标记物不存在的情况下,传感器结构域结合治疗结构域,从而使治疗结构域无法结合至其靶标且无法发挥治疗活性。在标记物存在的情况下,传感器结构域结合标记物,从而使治疗结构域自由结合至其靶标且能够发挥治疗活性。将蛋白质复合物体外施用于细胞或体内施用于有需要的对象。所述细胞表达传感器结构域所结合的标记物。所述细胞是肿瘤细胞或免疫细胞。所述对象是人或非人动物。所述对象患有疾病。所述疾病是癌症。施用至对象通过静脉内、肌肉内、皮下、皮内、腹膜内或粘膜进行。

[0139] 在施用蛋白质复合物时,传感器结构域体外或在对象中体内结合标记物并解除与治疗结构域的结合。在体外或在对象中体内观察到治疗功效,例如肿瘤细胞的细胞增殖减慢或完全停止,并且肿瘤细胞被消除。

实施例14

蛋白质复合物在肿瘤模型中的活性

[0140] 此实施例描述了肿瘤模型中的活性。肿瘤模型评估蛋白质复合物的功效和全身中靶效应。肿瘤模型评估本公开的蛋白质复合物表现出传感器结构域调节治疗结构域的活性的能力。

[0141] 重组表达或化学合成本公开的蛋白质复合物。所述蛋白质复合物包含连接至治疗

结构域的传感器结构域。所述接头是肽接头。传感器结构域能够结合至治疗结构域和标记物。在标记物不存在的情况下，传感器结构域结合治疗结构域，从而使治疗结构域无法结合至其靶标且无法发挥治疗活性。在标记物存在的情况下，传感器结构域结合标记物，从而使治疗结构域自由结合至其靶标且能够发挥治疗活性。在肿瘤模型中体外或体内施用蛋白质复合物。肿瘤模型中的肿瘤细胞或免疫细胞表达传感器结构域所结合的标记物。体内施用通过静脉内、肌肉内、皮下、皮内、腹膜内或粘膜进行。

[0142] 肿瘤测量。在施用蛋白质复合物之前，或在未施用蛋白质复合物的对照样品中，肿瘤的测量指示肿瘤继续增殖。例如，使用卡尺测量肿瘤模型(例如，肿瘤的小鼠模型)中的实体瘤。在施用蛋白质复合物之前，或在未施用蛋白质复合物的对照样品中，实体瘤的大小继续增长，如使用卡尺测量到肿瘤大小增加所指示。在施用蛋白质复合物时，随着时间的推移，传感器结构域结合在肿瘤上表达的标记物并且治疗结构域未结合，从而产生治疗功效。通过观察到随时间推移使用卡尺测量的肿瘤大小降低而验证了治疗功效。

[0143] 免疫活化。在施用蛋白质复合物之前，或在未施用蛋白质复合物的对照样品中，实体瘤的大小继续增长，如使用卡尺测量到肿瘤大小增加所指示。在施用蛋白质复合物时，随着时间的推移，传感器结构域结合标记物并且治疗结构域未结合，从而产生治疗功效。通过与对照样品相比观察到肿瘤、淋巴结或全身免疫细胞的差异而验证了治疗功效。所述差异可以是免疫细胞表型、活化状态、分化状态或特异性。

[0144] 细胞因子标记物的全身诱导。与对照相比，在施用蛋白质复合物后未观察到细胞因子标记物的诱导或细胞因子标记物的全身诱导减少。

[0145] 体重减轻。与对照相比，在施用蛋白质复合物后未观察到体重减轻或体重减轻减少。

实施例15

PD-1/IL-2DBA细胞因子复合物诱导淋巴细胞系中的STAT5磷酸化

[0146] 此实施例描述了PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物诱导淋巴细胞系中的STAT5磷酸化。为了评估PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物活性对于与PD-1结合的依赖性，生成了IL-2R+T细胞系(诸如Hut78或Jurkat E6.1)的表达PD-1的变体。用滴定浓度的本公开的PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物处理PD-1+和PD-1-变体细胞系，并且通过磷酸化流式细胞术(phospho-flow)、TR-FRET或用于测量IL-2信号传导的其他测定来评估STAT5磷酸化。

[0147] 对HEK 293IL-2报告细胞系进行工程化以表达PD-1。用滴定浓度的PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物处理PD-1+和PD-1-变体细胞系，并且评估报告子活性作为IL-2信号传导的量度。PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物表现出对于PD-1+变体细胞系的增加效力。

实施例16

PD-1/IL-2DBA细胞因子复合物在原代淋巴细胞中诱导STAT5磷酸化以及活化和增殖的其他标记物

[0148] 此实施例描述了PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物在原代淋巴细胞中诱导STAT5磷酸化以及活化和增殖的其他标记物。用细胞增殖染料标记PBMC，并且与滴定浓度的本公开的PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物一起温育4天。用针对免疫细胞分型标记物的抗体对PBMC进行染色，以区分CD4+和CD8+ T细胞、Treg细胞和自然杀伤(NK)细胞以及细胞活化的标记物，诸如CD25。通过流式细胞术检查免疫细胞亚群上的染料稀释度作为增殖的量度。

[0149] 使用免疫磁性阴性选择(STEMCELL)从PBMC中分离总T细胞,并用板结合的抗CD3和可溶性抗CD28刺激72小时以诱导PD-1的表达。将PD-1+ T细胞与滴定浓度的PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物一起温育20分钟。通过流式细胞术在固定和透化的T细胞中测量STAT5磷酸化。在一些实验中,PD-1可以在用PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物处理之前用抗PD-1在T细胞阻断,以评估PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物活性对于与PD-1结合的依赖性。当PD-1被阻断时,PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物诱导微少STAT5磷酸化,从而显示活性取决于其结合PD-1的能力。

实施例17

非肿瘤外周组织中的体内PD-1/IL-2DBA细胞因子复合物信号传导

[0150] 此实施例描述了野生型小鼠的血液中的PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物药代动力学以及非肿瘤外周组织中复合物的信号传导。在静脉内(i.v.)给药复合物的小鼠中测量PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物以及合适的非调节对照(诸如抗PD-1、抗HER2-IL-2或抗PD-1-IL-2)的血清半衰期和外周组织活性。在处理之后的不同时间点处收集血液、脾脏或两者并染色以鉴定CD8+ T细胞和NK细胞。

[0151] 为了检查循环中PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物的半衰期,野生型C57BL/6小鼠接受单次2.5毫克/千克静脉内剂量的PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物(2B07 IL-2mut;SEQ ID NO:205-206)、抗HER2/IL-2-细胞因子复合物(始终打开的IL-2mut;SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:207)或抗IL-2/IL-2-细胞因子复合物(始终关闭的IL-2mut;;SEQ ID SEQ ID NO:208-209),如表20中所概述。在给药后30分钟、4、24、48、72、96和168小时处通过眶后窦对小鼠进行放血。将血液收集到血清分离管中,并且将分离的血清冷冻在-80℃下,直至分析。为了确定细胞因子复合物的血清水平,将96孔高结合ELISA板用1ug/mL兔抗hu IL-2捕获抗体(克隆ab9618,Abcam)在碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中在4C下涂覆过夜。将板洗涤三次并用SuperBlock封闭缓冲液(Thermo Scientific)封闭1小时。将来自不同时间点和处理组的血清样品在SuperBlock中稀释,添加到板中,并温育1小时。为了检测细胞因子复合物,将板与山羊抗小鼠Fc-HRP(Jackson ImmunoResearch)一起在SuperBlock中以1:5000温育1小时。然后将板洗涤并用TMB底物显影。使用EnVision 2105酶标仪(PerkinElmer)在450nm处测量吸光度(OD)。如图18所示,检测到在所有时间点处检查的PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物的血清浓度与抗IL-2/IL-2-细胞因子复合物类似。相比之下,非调节抗HER2/IL-2-细胞因子复合物的血清浓度显示随时间推移血清浓度降低更大。

表20-IgG PD-1/IL-2DBA和对照蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
2B07 IL-2 mut	SEQ ID NO: 205	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY KNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQ VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFTR HYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGYASY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAAGLFIWGQGTLVTVSSAKTTAPS VYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPV TLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSV TVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEP RGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIK DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKP KGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMV TDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLD SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVV

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		HEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 206	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGR WLAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYES FPVTFGPGTKVDIKRADAAPTVSIFPPSSEQL TSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSER QNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDE YERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
抗HER2/IL-2-细胞因子复合物	SEQ ID NO: 64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR FSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 207	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY KNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTV SSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLV KGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS DLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASS

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		TKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGP SVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTL RVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLG APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTK KQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTEL NYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
始终关闭的 IL-2 mut	SEQ ID NO: 208	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY KNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSY TLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDT VRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSNWDALDYWGQGTLVTVSSAKTT APSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFP EPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS SSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPK IKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALP IQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTIS KPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTC MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEP VLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSC

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 209	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNVGT NVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYT YPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQL TSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSER QNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDE YERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

[0152] 为了检查外周组织中PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物的活性，野生型C57BL/6小鼠接受单次2.5毫克/千克静脉内剂量的PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物(2B07 IL-2mut;SEQ ID NO:205-206)、抗HER2/IL-2-细胞因子复合物(始终打开的IL-2mut;SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:207)、抗IL-2/IL-2-细胞因子复合物(始终关闭的IL-2mut;SEQ ID NO:208-209)(如表20所示)或PBS。在给药之前，通过ELISA确认每个IL-2细胞因子复合物中存在完整的IL-2，作为验证其生物活性潜力的一种手段。在处理后5天收集血液和脾脏，通过流式细胞术分析，以定量每个脾脏和每微升血液中CD8+ T细胞和NK细胞的数量。PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物不诱导CD8 T细胞或NK细胞的扩增，而HER2/IL-2-细胞因子复合物诱导外周CD8+ T细胞和NK细胞的扩增(图19A-D)。

实施例18

PD-1/IL-2DBA细胞因子复合物在同系肿瘤模型中调控抗肿瘤免疫性

[0153] 此实施例描述了PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物在MC38同系小鼠肿瘤模型中调控抗肿瘤免疫性。评估PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物在体内驱动抗肿瘤免疫性的能力。将500,000个MC38肿瘤细胞皮下植入人PD-1敲入小鼠(GenOway)中。每周两次测量肿瘤，并且将体积计算为(长度×宽度×宽度/2)。将小鼠随机分到处理组中，并且当肿瘤达到～100mm^3的体积时开始处理。在肿瘤植入后第7、10和13天，将小鼠用PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物(2B07 IL-2mut;SEQ ID NO:210-212)、缺乏IL-2的PD-1/IL-2DBA(2B07;SEQ ID NO:212-213)或同种型对照(SEQ ID NO:214-215)(如以下表21所示)以5或0.5毫克/千克的指示剂量静脉内处理。与缺乏IL-2的PD-1/IL-2DBA或同种型对照相比，PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物显示增加的肿瘤生长抑制(图20)。

表21-IgG PD-1/IL-2DBA和对照蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
2B07 IL-2 mut	SEQ ID NO: 210	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY KNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA QSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQ LVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFTRYY VHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGYASYAQK FQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVY YCAAGLFIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLA PVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTW PSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCP PCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPI VTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKE FKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVY VLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSDL

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTES FSRTPGK
	SEQ ID NO: 211	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFT RYYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGYASY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCAAGLFIWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVKDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKSDGSY FMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 212	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGRY LAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFP VTFGPGTKVDIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
缺乏 IL-2 的 PD-1/IL-2	SEQ ID NO: 212	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGRY LAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFP

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
DBA		VTFGPGTKVDIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 213	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFT RYYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGYASY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCAAGLFIWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSY FMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGK
同种型对照	SEQ ID NO: 214	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 215	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

实施例19

PD-1/IL-2DBA细胞因子复合物在异种移植物/人免疫细胞混合物模型中调控抗肿瘤免疫性

[0154] 此实施例描述了PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物在异种移植物/人免疫细胞混合物模型中调控抗肿瘤免疫性。为了检查PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物在体内环境中驱动抗肿瘤免疫性的能力,使用混合物系统。将总人PBMC或人T细胞和单核细胞来源的树突细胞(moDC)的组合以1:4的比率与人肿瘤细胞(例如,HPAC、A375、H441)混合,并且皮下共植入到NSG小鼠的斜腹中。一天后,开始用本公开的PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物或合适的非调节对照(诸如抗PD-1、抗HER2-IL-2或抗PD-1-IL-2)进行处理。至少每周两次测量肿瘤并且将体积计算为(长度×宽度×高度/2)。与抗PD-1和抗HER2-IL-2相比,PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物表现出增加的抗肿瘤功效,并且与抗PD-1-IL-2相比,表现出降低的肿瘤外活性。

实施例20

在板结合的PD-L1或表达PD-L1的肿瘤细胞存在的情况下PD-L1/IFN-αDBA细胞因子复合物诱导髓细胞成熟

[0155] 此实施例描述了在板结合的PD-L1或表达PD-L1的肿瘤细胞存在的情况下PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物诱导髓细胞成熟。通过免疫磁性阴性选择(STEMCELL)从新鲜人PBMC中纯化CD14+单核细胞。通过在含有10% FBS的RPMI-1640培养基中用hGM-CSF和hIL-4培养纯化的单核细胞5天来生成单核细胞来源的树突细胞(moDC)。为了检查PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物的条件活性,将单核细胞或moDC与滴定浓度的本公开的PD-L1/IFN-α

DBA-细胞因子复合物一起添加到涂覆PD-L1或HER-2的板中。在一些实验中，将人单核细胞或moDC与表达不同水平PD-L1的肿瘤细胞系和滴定浓度的PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物共培养。将培养物在37℃下温育过夜，并且通过流式细胞术评估CD80、CD83、CD86和HLA-DR的表达，作为髓细胞活化的量度。预期PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物仅在PD-L1存在的情况下诱导单核细胞和moDC活化。

实施例21

PD-L1/IFN-αDBA细胞因子复合物在混合淋巴细胞反应中诱导T细胞活化

[0156] 此实施例描述了PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物在混合淋巴细胞反应中诱导T细胞活化。为了评估PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物对于T细胞功能的直接和间接影响，使用免疫磁性阴性选择(STEMCELL)从人PBMC中分离CD14+单核细胞，并在hGM-CSF和hIL-4存在的情况下下培养5天以诱导moDC。从不同健康供体的人PBMC中纯化CD8+ T细胞并用细胞增殖染料标记。将两种细胞类型与滴定浓度的本公开的PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物一起在涂覆PD-L1或HER2的板中组合。在其他实验中，用滴定浓度的PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物和表达不同水平的PD-L1的肿瘤细胞系培养两种细胞类型。在其他实验中，细胞可以具有小鼠来源。将培养物温育5天，并且通过流式细胞术评估T细胞染料稀释度作为增殖的量度。通过ELISA评估培养上清液中细胞因子(例如，IFN-γ)的浓度。PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物在PD-L1存在的情况下增加T细胞活化和增殖。

实施例22

外周组织中的体内PD-L1/IFN-αDBA细胞因子复合物信号传导

[0157] 此实施例描述了外周组织中的体内PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物信号传导。为了检查非肿瘤组织中的PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物活性，向野生型C57BL/6小鼠静脉内(i.v.)注射100ug本公开的PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物或由抗PD-L1和IFN-α组成的类似结构的非调节免疫细胞因子(PD-L1-IFNα免疫细胞因子)。每日对动物称重以监测IFN-α诱导的毒性。在给药后6小时和24小时收集血清，并且通过ELISA定量MCP-1、IL-6、IL-10、TNF-α和IFN-γ水平。在一些组中，在给药后6小时和24小时从脾脏和肝脏中分离RNA。通过qPCR评估IFN刺激基因(包括ISG15、IRF7和MX2)的诱导。接受非调节抗PD-L1-IFN-α免疫细胞因子的小鼠经历体重减轻、血清细胞因子水平增加和IFN靶基因诱导，而给药PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物的小鼠显示出微少证据的外周IFN-α信号传导。

实施例23

PD-L1-IFN-αDBA-细胞因子复合物在同系肿瘤模型中调控抗肿瘤免疫性

[0158] 此实施例描述了PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物在同系肿瘤模型中调控抗肿瘤免疫性。评估PD-L1/IFN-αDBA细胞因子复合物蛋白质在体内驱动抗肿瘤免疫性的能力。将表达野生型或人PD-L1的同系小鼠肿瘤细胞(例如，MC38、CT26、4T1或A20)皮下植入到野生型或人PD-L1敲入小鼠(Genoway)中。至少每周两次测量肿瘤并且将体积计算为(长度×宽度×高度/2)。将小鼠随机分到不同组中并且当肿瘤达到～100mm^{3}的体积时开始治疗。用本公开的PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物或合适的非调节对照(例如，抗PD-L1、抗HER2-IFN-α免疫细胞因子或抗PD-L1-IFN-α免疫细胞因子)i.v.或肿瘤内处理小鼠。在一些实验中，在处理后5天处死小鼠，并且收获肿瘤并酶促解离以进行免疫分型。通过流式细胞术确定肿瘤浸润免疫细胞亚群(包括CD4+和CD8+ T细胞、Treg细胞、NK细胞和DC)的频率和表型。

PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物抑制肿瘤生长的程度与抗HER2-IFN-α相同或更大,但肿瘤外活性更低。PD-L1/IFNαDBA-细胞因子复合物增加抗肿瘤免疫应答,如免疫浸润的数量和表型所指示,其程度与抗HER2-IFNα免疫细胞因子相同或更大,但肿瘤外活性更低。

实施例24

PD-L1/IFN-αDBA在异种移植物/人免疫细胞混合物模型中调控抗肿瘤免疫性

[0159] 此实施例描述了PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物在异种移植物/人免疫细胞混合物模型中调控抗肿瘤免疫性。为了检查PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物在体内环境中驱动抗肿瘤免疫性的能力,使用混合物系统。将总人PBMC或人T细胞和moDC的组合以1:4的比率与人肿瘤细胞(例如,HPAC、A375、H441)混合,并且皮下共植入到NSG小鼠的斜腹中。一天后开始用本公开的PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物或合适的非调节对照(诸如抗PD-L1、抗HER2-IFN-α免疫细胞因子或抗PD-L1-IFN-α免疫细胞因子)进行i.v.处理。至少每周两次测量肿瘤并且将体积计算为(长度×宽度×高度/2)。PD-L1/IFN-αDBA-细胞因子复合物抑制肿瘤生长的程度与抗HER2-IFN-α相同或更大,但肿瘤外活性更低。

实施例25

蛋白质复合物的体外和体内表征

[0160] 此实施例描述了评价DBA-细胞因子复合物的体外和体内稳定性。重组表达或化学合成本公开的蛋白质复合物。所述蛋白质复合物包含连接至治疗结构域的传感器结构域。所述接头是肽接头。传感器结构域能够结合至治疗结构域和标记物。在标记物不存在的情况下,传感器结构域结合治疗结构域,从而使治疗结构域无法结合至其靶标且无法发挥治疗活性。在标记物存在的情况下,传感器结构域结合标记物,从而使治疗结构域自由结合至其靶标且能够发挥治疗活性。

[0161] 在体外,使用测量片段化、展开或聚集的生物物理表征方法,和/或使用测试功能活性变化的方法,在基线处或在应激条件(诸如高温、pH变化、氧化缓冲液或血清/血浆)中温育之后测试蛋白质复合物的稳定性和功能性。在体内,在哺乳动物(诸如小鼠、大鼠或非人灵长类动物)中给药后测量蛋白质的药代动力学特性,并且测量分布、清除和降解的特性。这些测量用于工程化或选择DBA-蛋白质复合物的最佳治疗形式。

实施例26

PD-1/IL-2双重结合抗体(DBA)细胞因子复合物调节IL-2受体信号传导

[0162] 此实施例描述了PD-1/IL-2DBA-细胞因子复合物在HEK-Blue™ IL-2报告细胞中的PD-1调节的IL-2活性。通过使用标准方案在哺乳动物细胞中表达以图14A-C所示的三种形式产生DBA-细胞因子复合物和对照抗体-细胞因子复合物。向384孔ELISA板的孔涂覆恒定浓度的PD-1-Fc或用抗Fc抗体捕获的IgG1对照蛋白(Jackson ImmunoResearch,产品#109-005-098)。将细胞因子复合物从6nM起始浓度在生长培养基中以1:4连续稀释8点,并且在添加HEK-Blue™ IL-2报告细胞之前短暂温育。

[0163] 具有图14A所示的结构的蛋白质复合物的结果在图15A-D中示出。如图14A所描绘,这种对称形式由一个连接至每个抗体可变结构域的IL-2组成。包含SEQ ID NO:174-175的PD-1/IL-2DBA-IL-2复合物AF4379的IL-2活性在PD-1涂覆孔中的EC50为31pM,而在IgG1涂覆孔中为62pM,如图15A所示,从而证明了PD-1依赖性。包含SEQ ID NO:64和176的抗体-细胞因子复合物AF4377(抗Her2抗体)和包含SEQ ID NO:177-178的AF4378(抗IL-2抗体)的

IL-2活性在PD-1存在的情况下保持不变(分别如图15B和图15C所示),而包含SEQ ID NO:179-180的抗PD-1抗体AF4376的IL-2活性在PD-1存在的情况下减少,如图15D所示。蛋白质复合物的序列在以下表22中总结。

表22-具有重链IL-2治疗结构域的IgG PD-1/IL-2DBA和对照蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
AF4379	SEQ ID NO: 174	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFTRYYVH WVRQAPGQGLEWMGIINPSGGYASYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC AAGLFIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPV CGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVT CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQ THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK CKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVL PPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRV EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFS RTPGK
	SEQ ID	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGRY

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
	NO: 175	LAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFP VTFGPGTKVDIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4377	SEQ ID NO: 64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 176	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAKTTAP SVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPV TLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVT VTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRG PTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSY FMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGK
AF4378	SEQ ID NO: 177	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAW VRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DSNWDALDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYP LAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSS TWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIK PCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISL SPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHT AQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSG KEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQ VYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIY VEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTT KSFSRTPGK
	SEQ ID	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNVGTN

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
	NO: 178	VGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYTYP YTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4376	SEQ ID NO: 179	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV ESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHW VRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVK GRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYC ATNDDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAP VCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWP SQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPP CKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIV TCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQT QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEF KCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYV LPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEW TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLR VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF SRTPGK
	SEQ ID	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
	NO: 180	AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPR TFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

[0164] 具有图14B中描绘的结构的蛋白质复合物的结果在图16A-F中示出。这种形式由包含两个抗体结构域和单个连接至所述结构域之一的IL-2的不对称复合物构成。PD-1/IL-2DBA-IL-2复合物AF4386(包含SEQ ID NO:212和181-182,结果在图16A中示出)、AF4387(包含SEQ ID NO:183-185,结果在图16B中示出)和AF4389(包含SEQ ID NO:186-188,结果在图16C中示出)的IL-2活性在PD-1涂覆孔中的EC50分别为50pM、57pM和118pM,并且在IgG1涂覆孔中分别为1.79nM、419pM和1.67nM,从而证明了PD-1依赖性。抗PD1对照蛋白AF4380(包含SEQ ID NO:180、189-190,结果在图16D中示出)、抗Her2对照蛋白AF4383(包含SEQ ID NO:64、191-192,结果在图16E中示出)和抗IL-2对照蛋白AF4384(包含SEQ ID NO:178、193-194,结果在图16F中示出)的IL-2活性保持不变。蛋白质复合物的序列在以下表23中总结。

表23-具有单个IL-2的IgG PD-1/IL-2PDA和对照蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
AF4386	SEQ ID NO: 181	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		QSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFTRYYVH WVRQAPGQGLEWMGIINPSGGYASYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC AAGLFIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPV CGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVT CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQ THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK CKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVL PPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSDLRV EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTESFS RTPGK
	SEQ ID NO: 182	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFT RYYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGYASY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCAAGLFIWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVKDFM

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKSDGSY FMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGGGGSGGGSHHHHHH
	SEQ ID NO: 212	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGRY LAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFP VTFGPGTKVDIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4387	SEQ ID NO: 183	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMH WVRQAPGQGLEWMGIINPRAGYTSYALKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC TSGWDVWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAP VCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWP SQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPP CKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIV TCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQT QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEF KCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYV LPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEW

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSDLR VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTESF SRTPGK
	SEQ ID NO: 184	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPRAGYTS YALKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTSGWDVWGQGTLVTVSSAKTTAPS VYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVT LTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVT VTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRG PTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVKDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKSDGSY FMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGGGGSGGGSHHHHHH
	SEQ ID NO: 185	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISTW LAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLDSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSFP VTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4389	SEQ ID NO: 186	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGHTFTRYYMH WVRQAPGQGLEWMGIINPSGGYATYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC ASGLFIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPV CGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVT CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQ THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK CKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVL PPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT NNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSDLRV EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTESFS RTPGK
	SEQ ID NO: 187	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHTFT RYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGYAT YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASGLFIWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVKDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKSDGSY FMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGGGGSGGGSHHHHHH
	SEQ ID NO: 188	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSW LAWYQQKPGKAPKLLIYATSTLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYRFP VTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4380	SEQ ID NO: 180	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPR TFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 189	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV ESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHW VRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVK

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		GRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYC ATNDDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAP VCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWP SQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPP CKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIV TCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQT QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEF KCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYV LPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEW TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSDLR VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTESF SRTPGK
	SEQ ID NO: 190	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVKDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKSDGSY FMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		HHTTKSFSRTPGGGGSGGGSHHHHHH
AF4383	SEQ ID NO: 64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 191	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAKTTAP SVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPV TLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVT VTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRG PTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSY FMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		HHTTESFSRTPGK
	SEQ ID NO: 192	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVK DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKS DGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGGGGSGGGSHHHHHH
AF4384	SEQ ID NO: 178	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNVGTN VGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYTYP YTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 193	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAW VRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DSNWDALDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYP LAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSS TWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIK PCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISL SPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHT AQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSG KEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQ VYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIY VEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS DLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTT ESFSRTPGK
	SEQ ID NO: 194	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS YTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPD TVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSNWDALDYWGQGTLVTVSSAKTT APSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEP RGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ DWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGS

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		VRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVKDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKSDG SYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HNHHTTKSFSRTPGGGGSGGGSHHHHHH

[0165] 具有图14C中描绘的结构的蛋白质复合物的结果在图17A-H中示出。如图14C所描绘,这些复合物是不对称的,并且由两个相同的单特异性Fab臂组成,其中单个IL-2通过柔性接头附接至一个Fc结构域,并且单个scFv通过柔性接头附接至另一个Fc结构域。活性PD-1/IL-2DBA复合物,包含SEQ ID NO:180、195、199的AF4403和包含SEQ ID NO:180、196、199的AF4404由Fab臂中的抗PD-1结构域和Fc臂上的PD-1/IL-2DBA scFv构成。对照抗体-细胞因子复合物由以下构成:a)抗体-细胞因子复合物,具有Fab臂上的非相关抗体和Fc上的DBA scFv(包含SEQ ID NO:64、197、202的AF4395和包含SEQ ID NO:64、198、202的AF4396),b)抗体-细胞因子复合物,具有Fc臂上的非DBA scFv(包含SEQ ID NO:180、199-200的AF4400和包含SEQ ID NO:180、199、201的AF4401),以及c)抗体-细胞因子复合物,具有Fab和scFv结构域两者中的非DBA抗体(包含SEQ ID NO:64、202-203的AF4392和包含SEQ ID NO:64、202、204的AF4393)。如图17B和17D所示,DBA-细胞因子复合物AF4403和AF4404的IL-2活性在PD-1涂覆孔中的EC50分别为31pM和26pM,并且在对照孔中分别为62pM和64pM,从而证明了IL-2活性的PD-1依赖性。以上所述的对照蛋白AF4395、AF4396、AF4400、AF4401、AF4392和AF4393在PD-1涂覆孔上的EC50均未显示低于涂覆IgG1蛋白的孔,如图17A、17C和17E-H所示。蛋白质复合物的序列在以下表24中总结。

表24-具有C末端scFv和IL-2的IgG PD-1和对照蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
AF4403	SEQ ID NO: 180	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPR TFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 195	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVKDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKSDGSY FMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDT FTRYYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGYA SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCAAGLFIWGQGTLVTVSSASGGGG

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		SGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIGRYLAWYQQKPGKAPKLLI YSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQYNSFPVTFGPGTKVDIKGGGSG GGSHHHHHH
	SEQ ID NO: 199	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSY FMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTESFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGSAPTS SSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPK LTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLERELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKG SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIST LT
AF4404	SEQ ID NO: 180	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPR TFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 196	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVKDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKSDGSY FMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPRAGYT SYALKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCTSGWDVWGQGTLVTVSSASGGG GSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQSISTWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		EDFATYYCQQSYSFPVTFGQGTKVEIKGGGS GGGSHHHHHH
	SEQ ID NO: 199	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSY FMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTESFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGSAPTS SSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPK LTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLERELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKG SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIST LT
AF4395	SEQ ID NO: 64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 197	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVK DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKS DGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGDTFTRYYVHWVRQAPGQGLEWMGIINPS GGYASYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCAAGLFIWGQGTLVTVSSAS GGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRASQSIGRYLAWYQQKPGKAP KLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQYNSFPVTFGPGTKVDIKG GGSGGGSHHHHHH
	SEQ ID	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
	NO: 202	TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTESFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGS APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLT
AF4396	SEQ ID NO: 64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
	NO: 198	TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVK DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKS DGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPR AGYTSYALKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCTSGWDVWGQGTLVTVSSAS GGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRASQSISTWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASSLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQSYSFPVTFGQGTKVEIKG GGSGGGSHHHHHH
	SEQ ID NO: 202	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTESFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGS APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLT
AF4400	SEQ ID NO: 180	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPR TFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 199	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSV

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSY FMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTESFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGSAPTS SSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPK LTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLERELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKG SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIST LT
	SEQ ID NO: 200	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		RAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVKDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKSDGSY FMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTR YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKV EIKGGGSGGGSHHHHHH
AF4401	SEQ ID NO: 180	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPR TFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 199	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSY FMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTESFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGSAPTS SSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPK LTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLERELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKG SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIST LT
	SEQ ID NO: 201	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVKDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKSDGSY FMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		HHTTKSFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSP DTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDSNWDALDYWGQGTLVTVSSASG GGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSAS VGDRVSITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAP KALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYFCQQYYTYPYTFGGGTKLEIKG GGSGGGSHHHHHH
AF4392	SEQ ID NO: 64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 202	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTESFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGS APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLT
	SEQ ID NO: 203	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVK DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKS DGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLV TVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIKGGGSGGGSHHHHHH
AF4393	SEQ ID NO: 64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 202	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		DGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTESFSRTPGGGGGSGGGGSGGGGS APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTDMLTFEFYMPKKATELKHLQCLEREL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE LKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTLT
	SEQ ID NO: 204	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVK DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKS DGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSY TYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTLVTVS SASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSS

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		LSASVGDRVSITCKASQNVGTNVGWYQQKP GKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYFCQQYYTYPYTFGGGTKL EIKGGGSGGGSHHHHHH

实施例27

通过使用标准方法对DBA亲和力进行工程化来改善调节

[0166] 此实施例描述了使用标准技术来修改DBA亲和力并改善DBA-细胞因子构建体的传感器依赖性活化范围。如实施例4所述制备DBA PDL1-IFN R01 A05(实施例1)的一系列变体,组装成DBA-细胞因子复合物并如实施例9所述进行测定。六种示例性变体DBA-细胞因子复合物的结果在图21A-F中示出。每个图都包括在PD-L1存在(三角形)和不存在(正方形)的情况下IFNAR2结合的数据。使用与对照IFNα抗体(圆圈)的结合来确认完整DBA复合物的存在,并且提供孔中捕获的DBA复合物的量的相对估计值。AF2719和五种变体DBA-细胞因子复合物在PD-L1不存在的情况下显示可忽略不计的IFNAR2结合,而在PD-L1存在的情况下显示不同水平的IFNAR2结合。AF3099(SEQ ID NO:293)在所有浓度的PD-L1下显示可忽略不计的IFNAR2结合,而IFNAR2与AF3092(SEQ ID NO:292)的结合信号与抗IFNα抗体结合类似。AF2719(SEQ ID NO:41)、AF3101(SEQ ID NO:289)、AF3093(SEQ ID NO:290)和AF3094(SEQ ID NO:291)显示相对于抗IFNα结合中间水平的IFNAR结合。总之,这些结果证明了抗体工程化的标准方法可以用于改善调节DBA-细胞因子复合物的治疗活性。蛋白质复合物序列在以下表25中提供。

表25-DBA-细胞因子蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
AF3099	SEQ ID	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISL

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
	NO: 293	FSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFSGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDSNSG GTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLVT VSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKV EIKGKPIPNPLLGLDST
AF3092	SEQ ID NO: 292	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISL FSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFSNYYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDPNSG GTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLVT VSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKV EIKGKPIPNPLLGLDST
AF2719	SEQ ID NO: 41	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISL FSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFSNYYVHWVRQAPGQGLEWMGWMDPNS GGTGYAHQFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLV TVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTK VEIKGKPIPNPLLGLDST
AF3101	SEQ ID NO: 289	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISL FSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFSNYYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDGNSG GTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLVT

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		VSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKV EIKGKPIPNPLLGLDST
AF3093	SEQ ID NO: 290	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISL FSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFSNYYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDSNSG YTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLVT VSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKV EIKGKPIPNPLLGLDST
AF3094	SEQ ID NO: 291	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISL FSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		TFSNYYIHWVRQAPGQGLEWMGWMDPNSG YTGYAHQFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLVT VSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKV EIKGKPIPNPLLGLDST

实施例28

PD-L1/IFNα双重结合抗体调节干扰素受体结合

[0167] 此实施例描述了PD-L1/IFNαDBA-细胞因子复合物调节干扰素受体结合。选择DBA-细胞因子复合物AF2659(SEQ ID NO:276-277)、AF2666(SEQ ID NO:96和277)、AF2645(SEQ ID NO:95和112)、AF2615(SEQ ID NO:279-280)和AF2616(SEQ ID NO:281-282)进行分析。用于组装这些复合物的DBA来源于实施例1中所述的三种亲本PD-L1/IFNαDBA:PDL1-IFN-R01-A05(AF2659和AF2666)、PDL1-IFN-R01-C08(AF2645)和PDL1-IFN-R01-B12(AF2615和AF2616),使用如实施例4中所述的标准抗体工程化技术。三种对照抗体-细胞因子构建体由单特异性抗体组装:AF2696(抗PDL1,SEQ ID NO:283-284)、AF2697(抗Her2,SEQ ID NO:214和286)和AF2698(抗IFNa,SEQ ID NO:287-288)。蛋白质复合物序列在以下表26中提供。八种抗体-细胞因子复合物以对称IgG分子形式产生,其中IFNα通过柔性接头附连至重链的N末端(AF2659、AF2666和AF2645,在图9e中以示意图示出)或通过柔性接头附连至轻链的N末端(AF2615、AF2616、AF2696、AF2697和AF2698,在图9d中以示意图示出)。所述蛋白质在哺乳动物细胞中表达并使用标准方案纯化。在不同量的PD-L1-Fc或Her2-Fc存在的情况下,用生物素化干扰素受体(IFNAR2)探测的每个孔上涂覆的恒定量的抗体-细胞因子构建体进行ELISA测定。在4℃下向384孔ELISA板以10微克/ml涂覆抗Fc抗体过夜,并用SuperBlock洗涤两次。将20微升的66.7nM抗体-细胞因子复合物添加到每个孔中,温育一小时并在PBS中洗涤三次。将最终浓度为5nM的生物素化IFNAR2蛋白与最终浓度为0.64nM、3.2nM、16nM、80nM或400nM的PD-L1-Fc蛋白或HER2-Fc蛋白一起添加到每个孔中。将板温育一小时,洗涤并使用链霉亲和素-HRP和标准ELISA方案进行生物素化的IFNAR2检测。如图22A-H所示,DBA-细胞因子复合物AF2659、AF2666、AF2645、AF2615和AF2616在PD-L1蛋白存在的情况下显示出IFNAR2结合的剂量依赖性诱导,但不受相同剂量范围的Her2蛋白的影响,从而证明了来源于三种不同亲本PD-L1/IFNA双重结合抗体的五种DBA构建体中的PD-L1依赖性INF活性。IFNAR2与三种对照抗体复合物AF2696、AF2697和AF2698的结合不受PD-L1浓度的显著影响。本发明的蛋白质复合物可以使用标准抗体工程化方法由多种双重结合抗体产生。

表26-DBA-细胞因子蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
AF2659	SEQ ID NO: 276	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEVPGVGVPGAGVPGVGVPGGGVP GVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGAGV PGVGVPGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFSNYYIHWVRQAPGQGLEWMGW MDSNSGYTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWG

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		QGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSS VTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTF PAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNA AGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVS EDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYN STLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKD LGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMT KKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTEL NYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVE RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 277	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPY TFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF2666	SEQ ID NO: 96	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEVPGVGVPGAGVPGVGVPGGGVP GVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGAGV PGVGVPGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFSNYYIHWVRQAPGQGLEWMGW

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		MDSNSGYTGYAQQFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCAKEVFSGWYDYWG QGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSS VTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTF PAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNA AGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVS EDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYN STLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKD LGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMT KKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTEL NYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVE RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 277	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPY TFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF2645	SEQ ID NO: 95	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEVPGVGVPGAGVPGVGVPGGGVP GVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGAGV

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		PGVGVPGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGIID PSVTYTRYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGVEVAFDIW GQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGS SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN AAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDV SEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNK DLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTE LNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 112	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNRL AWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNSTPFT FGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGG ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVL NSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNS YTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF2615	SEQ ID NO: 279	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGNTFT DYYMHWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNT GYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARSLFPTIFGVEVAFDIWGQGTLV TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGC

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		LVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ SDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASS TKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPS VFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPD VQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV VSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPI ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQV TLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSY SCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 280	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTF GQGTRLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGA SVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLN SWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSY TCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF2616	SEQ ID NO: 281	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGIIDPSVTYTRYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARSLFPTIFGVEVAFDIWGQGTLVTVSS

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY TLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVD KKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFP PKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS WFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSAL PIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTIS KPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTC MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSV VHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 282	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISNRLAW YQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTPITFGQ GTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV VCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF2696	SEQ ID NO: 283	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFS GYYMHWVRQAPGQGLEWMGWMDPNSGYT GYAHQFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		DTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQGTLVTVSS AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY TLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVD KKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFP PKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS WFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSAL PIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTIS KPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTC MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSV VHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 284	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASTLESGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYSTPITFGP GTKVDIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV VCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF2697	SEQ ID NO: 214	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 286	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS RSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGG ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVL NSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNS YTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF2698	SEQ ID	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGYTFTE

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
	NO: 287	YIIHWVRQAPGKGLEWVASINPDYDITNYNQ RFKGRFTISLDKSKRTAYLQMNSLRAEDTAV YYCASWISDFFDYWGQGTLVTVSSAKTTAPS VYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVT LTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVT VTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRG PTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNV EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQD WMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFM PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSY FMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 288	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTSSYS YMHWYQQKPGKAPKVLISYASNLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSWG IPRTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLT SGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

实施例29

IL-15和PD-L1特异性双重结合抗体的选择

[0168] 此实施例描述了本公开的传感器结构域的分离，具体地，IL-15和PD-L1特异性双重结合抗体(DBA)的选择。从实施例1中所述的IFNαTumbler抗体噬菌体展示文库分离抗PD-

L1和抗IL-15DBA。选择类似于实施例1中所述的方案，在PD-L1选择与IL-15选择之间交替。

[0169] 将最终选择物作为单个菌落铺板，并且选择380个菌落进行Sanger测序。筛选38个独特的克隆进行PD-L1和IL-15结合。将每个克隆的scFv DNA序列合成为gBlock(Integrated DNA Technologies,Inc.)，具有T7启动子、翻译起始位点、Myc标签、scFv序列、V5标签和T7终止子。使用如先前实施例中所述的PURExpress2.1无细胞转录/翻译系统表达蛋白质。对scFv样品进行ELISA分析以检测PDL1和IL15结合。在这些实验中，在4℃下以1ug/ml向384孔板的孔涂覆抗V5抗体(Sv5-Pk1，BioRad)过夜。在洗涤之后，将孔用SuperBlock(ThermoFisher,37515)封闭，接着在SuperBlock中添加饱和水平的scFv。在洗涤之后，添加抗原并将板温育一小时(PDL1-hFc-Avi,Acro Biosystems,PDL-H82F2)；AF33(SEQ ID NO:298-299)，使用标准方法进行生物素化；PD1-hFc-Avi的对照(Acro Biosystems,PD1-H82F1)；AF35(SEQ ID 63-64)，使用标准方法进行生物素化)。使用标准方法使用链霉亲和素HRP检测生物素化抗原。添加不同量的标记测试抗原以显示结合并估计不同scFv的相对亲和力。图23A-D示出了四种示例性双重结合scFv AF635(SEQ ID NO:216)、AF636(SEQ ID NO:217)、AF666(SEQ ID NO:218)和AF614(SEQ ID NO:219)的ELISA结合数据。所有四种抗体均显示与PD-L1和IL-15两者结合，在较低浓度的抗原下可检测到与PD-L1的结合。蛋白质复合物序列在以下表27中总结。

表27-DBA-细胞因子蛋白质复合物和对照蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
AF33	SEQ ID NO: 298	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGKGGGSGGGSHHHHH H
	SEQ ID NO: 299	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSG FKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC IRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGSGGGSGGGG SLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHD TVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		YCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIF PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRN EC
AF35	SEQ ID NO: 63	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAKTT APSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEP RGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ DWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGS VRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDG SYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
	NO: 64	VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF635	SEQ ID NO: 216	MSTSTEQKLISEEDLQVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGLE WMGIINPSGGSTRYAQKFQGRVTMTRDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGVEV AFDIWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGG GSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ SIRTYLNWYQQKPGKAPKLLIYSASNLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANSFPFTFGPGTKVDIKGKPIPNPLLGLDST
AF636	SEQ ID NO: 217	MSTSTEQKLISEEDLQVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYSFTSYYLHWVRQAPGQGLE WMGRISPRSGGTKNAQNFQGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCVRSLFPTIFGVE VAFDIWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGG GGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYYASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QGYQYPYTFGQGTKLEIKGKPIPNPLLGLDST
AF666	SEQ ID NO: 218	MSTSTEQKLISEEDLQVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFSTYYIHWVRQAPGQGLE WMGWMNPNSGNTGYAQTFQGRVTMTRDTS

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGV EVAFDIWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSG GGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QGYSTPRTFGQGTKVEIKGKPIPNPLLGLDST
AF614	SEQ ID NO: 219	MSTSTEQKLISEEDLQVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTNYYMHWVRQAPGQGL EWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIF GVEVAFDIWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGG SGGGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYSTPRTFGQGTKLEIKGKPIPNPLLGL DST

实施例30

PD-L1/IL-15双重结合抗体(DBA)细胞因子复合物调节IL-2受体信号传导

[0170] 此实施例描述了PD-L1/IL-15DBA-细胞因子复合物在报告细胞中调节IL-15活性。根据供应商的说明书使HEK-Blue™ IL-2报告细胞(Invivogen目录#hkb-il2)生长。细胞表达IL-2受体,并且通过诱导可以用比色测定读取的酶对IL-2或IL-15信号传导产生应答。使用实施例29和表28中所述的示例性双重结合scFv序列AF635(SEQ ID NO:216)、AF636(SEQ ID NO:217)、AF666(SEQ ID NO:218)和AF614(SEQ ID NO:219)来分别组装scFv DBA-细胞因子复合物AF4455(SEQ ID NO:220)、AF4456(SEQ ID NO:221)、AF4457(SQ ID NO:222)和AF4440(SEQ ID NO:223)。将两个单特异性抗IL-15scFv序列组装成细胞因子-scFv复合物AF4478(SEQ ID NO:224)和AF4479(SEQ ID NO:225)以充当阴性对照。蛋白质复合物序列在以下表28中提供。使用PURExpress2.1无细胞转录/翻译系统表达蛋白质。在4℃下向384孔ELISA板(Corning 3700)涂覆25微升/孔的1微克/ml在100mM碳酸氢盐溶液pH 9.0中的抗V5抗体(SV5-pk1)过夜。将板用100微升PBS+ Tween洗涤三次,并且用50ul/孔的SuperBlock洗涤一次。将每个样品的PURExpress反应物在Superblock中以1:2,160稀释,以20μl/孔添加到抗V5涂覆的板中,并且在室温下温育1小时以在板上捕获均匀量的scFv蛋白。然后将每个板用PBS和0.05% Tween 20(PBST)洗涤三次。将PDL-1蛋白(Acro Biosystems产品#PD1-H5358)或Fc蛋白(Acro Biosystems产品#FCC-H5214)在生长培养基(完全DMEM)中稀释至最

终浓度的2倍，并且每孔添加12.5微升。在温育15分钟之后，将12.5微升的HEK-Blue™ IL-2报告细胞(12,500个细胞)添加到每个孔中并温育过夜。将来自每个孔的5微升转移到含有45微升QuantiBlue溶液(Invivogen产品#rep-qbs)的新板中。在30至60分钟之后，使用Perkin-Elmer Envision测定630nm处的吸光度。

表28-DBA-细胞因子蛋白质复合物和对照蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
AF4455	SEQ ID NO: 220	MSTSTITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERY ICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTT PSLKCIRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGSGGG SGGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA TLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGSGS GSGGSGGSGSGGSGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGL

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		EWMGIINPSGGSTRYAQKFQGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGVE VAFDIWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGG GGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSIRTYLNWYQQKPGKAPKLLIYSASNLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QANSFPFTFGPGTKVDIKAAAGSGSEQKLISE EDLGKPIPNPLLGLDSTNA
AF4456	SEQ ID NO: 221	MSTSTITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERY ICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTT PSLKCIRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGSGGG SGGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA TLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGSGS GSGGSGGSGSGGSGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYSFTSYYLHWVRQAPGQGL EWMGRISPRSGGTKNAQNFQGRVTMTRDTS TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCVRSLFPTIFGV EVAFDIWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSG GGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYYASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGYQYPYTFGQGTKLEIKAAAGSGSEQKLI SEEDLGKPIPNPLLGLDSTNA
AF4457	SEQ ID NO: 222	MSTSTITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERY ICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTT

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		PSLKCIRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGSGGG SGGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA TLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGSGS GSGGSGGSGSGGSGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFSTYYIHWVRQAPGQGL EWMGWMNPNSGNTGYAQTFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFG VEVAFDIWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGS GGGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGYSTPRTFGQGTKVEIKAAAGSGSEQKLIS EEDLGKPIPNPLLGLDSTNA
AF4440	SEQ ID NO: 223	MSTSTITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERY ICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTT PSLKCIRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGSGGG SGGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA TLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGSGS GSGGSGGSGSGGSGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTNYYMHWVRQAPGQG LEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTI FGVEVAFDIWGQGTLVTVSSASGGGGSGGG

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		GSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYSTPRTFGQGTKLEIKAAAGSGSEQK LISEEDLGKPIPNPLLGLDSTNA
AF4478	SEQ ID NO: 224	MSTSTITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERY ICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTT PSLKCIRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGSGGG SGGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA TLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGSGS GSGGSGGSGSGGSGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGL EWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIF GVEVAFDIWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGG SGGGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASRSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYSTPRTFGQGTKVEIKAAAGSGSEQK LISEEDLGKPIPNPLLGLDSTNA
AF4479	SEQ ID NO: 225	MSTSTITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERY ICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTT PSLKCIRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGSGGG SGGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA TLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGSGS GSGGSGGSGSGGSGSQVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASGYSFTDYYVHWVRQAPGQGL EWVGGINPKRGDTVFAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGLGVFGV VDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGGGSGGG GSHASDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQS LLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYAATTL QSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQALQTPLTFGGGTKLEIKAAAGSGSEQ KLISEEDLGKPIPNPLLGLDST

[0171] 结果在图24A-F中示出。对于DBA-细胞因子复合物AF4455(SEQ ID NO:220)、AF4456(SEQ ID NO:221)、AF4457(SEQ ID NO:222)和AF4440(SEQ IDF:223),IL-15活性随着PD-L1(圆圈)的添加而以剂量依赖性方式增加,但随着Fc蛋白(正方形)的添加则不增加。来自单特异性IL-15scFv细胞因子复合物AF4478(SEQ ID NO:224)和AF4479(SEQ ID NO:225)的IL-15活性不随PD-L1或Fc蛋白的添加而改变。

[0172] 将来自AF614(SEQ ID NO:219)和AF666(SEQ ID NO:218)的示例性双重结合抗体序列组装成不对称的IgG分子,其中IL-15通过柔性接头附连至一条重链的N末端(如在图9b中以示意图示出),以分别产生AF4591(SEQ ID NO:226-228)和AF4592(SEQ ID NO:229-231)。从抗IL-15抗体(AF4659,SEQ ID NO:232-234)和PDL1-IFN双重结合抗体(AF4660,SEQ ID NO:235-237)以相同的形式组装两个对照。蛋白质复合物序列在表29中总结。所述蛋白质在哺乳动物细胞中表达并使用标准方案纯化。使用HEK-Blue™ IL-2报告细胞在与以上所述类似的测定中测定四种抗体-细胞因子复合物的IL-15活性,不同之处在于所有蛋白质都在生长培养基中的溶液中。将纯化的抗体-细胞因子复合物稀释至100pM的最终浓度,并以不同浓度的PD-L1或对照IgG1抗体进行测定。

表29-DBA-细胞因子蛋白质复合物和对照蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
AF4591	SEQ ID NO: 226	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSG FKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC IRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGSGGGSGGGG SLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHD TVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTNYYMHWVRQAPGQGLEWMG WMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGVEVAF DIWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDT TGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSIT CNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCP APNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVV VDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHR EDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV NNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPE EEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSDLRVEKK NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTESFSRTPG

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		K
	SEQ ID NO: 227	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NYYMHWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNT GYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARSLFPTIFGVEVAFDIWGQGTLV TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGC LVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ SDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASS TKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPS VFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPD VQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV VSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPI ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQV SLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TEPVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSY SCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 228	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPR TFGQGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4592	SEQ ID NO: 229	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSG FKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC IRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGSGGGSGGGG SLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		DVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHD TVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFSTYYIHWVRQAPGQGLEWMGW MNPNSGNTGYAQTFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGVEVAFD IWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTT GSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGV HTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPA PNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVV DVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRE DYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVN NKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEE EMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGK TELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSDLRVEKKN WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTESFSRTPGK
	SEQ ID NO: 230	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFS TYYIHWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTG YAQTFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARSLFPTIFGVEVAFDIWGQGTLVT VSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCL VKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS DLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASST KVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSV FIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDV

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		QISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVV SALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIER TISKPKGSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSL TCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTE PVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSC SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 231	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYSTPR TFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4659	SEQ ID NO: 232	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSG FKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC IRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGSGGGSGGGG SLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHD TVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGDTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGW MNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCATGITMIGYWGQGTL VTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLG CLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVL QSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPAS

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		STKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGP SVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDP DVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLR VVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAP IERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQV TLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TEPVLDSDGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSY SCSVVHEGLHNHHTTESFSRTPGK
	SEQ ID NO: 233	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTG YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCATGITMIGYWGQGTLVTVSSAKTT APSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEP RGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ DWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGS VRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVKDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKSDG SYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 234	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISSY LNWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP YTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4660	SEQ ID NO: 235	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSG FKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKC IRDPALVHQRPAPPSGGSGGGGSGGGSGGGG SLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES DVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHD TVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGIID PSMTYTRYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARSLFPTIFGLEVAFDIW GQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGS SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNV AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN AAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDV SEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNK DLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTE LNYKNTEPVLDSDGSYFMYSDLRVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTESFSRTPGK
	SEQ ID NO: 236	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGIIDPSMTYTRYA

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARSLFPTIFGLEVAFDIWGQGTLVTVSS AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY TLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVD KKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFP PKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS WFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSAL PIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTIS KPKGSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCL VKDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL KSDGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVV HEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 237	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISNR LAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTPI TFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

[0173] 结果在图25A-D中示出。对于DBA-细胞因子复合物AF4591(SEQ ID NO:226-228)和AF4592(SEQ ID NO:229-231),IL-15活性随着PD-L1的添加而以剂量依赖性方式增加,但随着Fc蛋白的添加则不增加。来自单特异性IL-15scFv细胞因子复合物AF4659(SEQ ID NO:232-234)和AF4660(SEQ ID NO:235-237)的IL-15活性不随PD-L1或Fc蛋白的添加而改变。

[0174] 本发明的基于四种不同的PD-L1/IL-15双重结合抗体以两种不同形式产生的蛋白质复合物显示PD-L1依赖性IL-15活性。

实施例31

IFN和CEA特异性双重结合抗体的选择和结合

[0175] 此实施例描述了本公开的传感器结构域的分离,具体地,IFNα和CEA特异性双重结合抗体(DBA)的选择。从与实施例1中所述的文库类似的Tumbler抗体噬菌体展示文库分离抗CEA和抗IFNαDBA。构建抗体噬菌体展示文库,以并入Superhuman 2.0抗体文库的重链CDR1、重链CDR2和轻链多样性,结合来自抗IFNα抗体的各种重链(“HC”)CDR3序列(表18)。所

述选择类似于实施例1中所述的方案，使用一轮IFNα选择(IFNα2b,GenScript,Z03002,使用标准方案进行生物素化)和一轮CEA选择(CEA-hFc,Sino Biologicals,11077-H02H)。

表18-IFNα结合剂的HC-CDR3

SEQ ID NO	序列	描述
SEQ ID NO: 238	CASGGSYSPWYFDLW	IFNα 结合剂的HC-CDR3
SEQ ID NO: 239	CASLAAAGPYYYYGMDVW	IFNα 结合剂的HC-CDR3
SEQ ID NO: 240	CVSSVGAGAYYYQGLDVW	IFNα 结合剂的HC-CDR3
SEQ ID NO: 241	CARDHDYLTSFGYW	IFNα 结合剂的HC-CDR3
SEQ ID NO: 242	CAFSSPTYYYYYGMDVW	IFNα 结合剂的HC-CDR3
SEQ ID NO: 243	CARVNYDFWSGQSLRFDPW	IFNα 结合剂的HC-CDR3
SEQ ID NO: 244	CATIKGLGAYYYYGMDVW	IFNα 结合剂的HC-CDR3
SEQ ID NO: 245	CASDHGWLDAFDIW	IFNα 结合剂的HC-CDR3

SEQ ID NO	序列	描述
SEQ ID NO: 246	CARDWYGDYFDYW	IFNα 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 247	CARGILSDYGDHAFDYW	IFNα 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 248	CARVDSSSSLHFDYW	IFNα 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 249	CARTSGYDLLFDYW	IFNα 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 250	CARVGGWGIYYYYGMDVW	IFNα 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 251	CARDPSYSTGYYDYW	IFNα 结合剂的 HC-CDR3
SEQ ID NO: 252	CARGSRADYW	IFNα 结合剂的 HC-CDR3

[0176] 在噬菌体中进行两轮选择后,将所得的DBA文库亚克隆为酵母表面展示载体,并转化为酵母,以使用标准方案进一步筛选。针对与CEA和IFNα的结合对酵母文库分选四次。在每一轮分选中,用CEA-Fc-生物素或IFNα-生物素标记文库,然后用链霉亲和素-PE(Abcam#ab239759)标记,并在Sony MA900细胞分选仪上基于PE荧光进行分选。进行四个分选,在100nM CEA-Fc-生物素、1000nM IFNα-生物素、10nM CEA-Fc-生物素和20nM CEA-Fc-生物素下进行标记。使用Zymoprep酵母质粒Miniprep II试剂盒(Zymo research D2004)在最终分选之后从酵母中分离质粒,并将其转化为DH5a大肠杆菌进行克隆。选择96个菌落进行Sanger测序,从中鉴定34个独特的克隆并筛选IFNα和CEA结合。使用含有T7启动子和翻译起始位点的正向引物以及含有T7终止子的反向引物通过PCR扩增每个克隆的scFv DNA序列,包括c-myc和V5标签。使用如先前实施例中所述的PURExpress2.1无细胞转录/翻译系统表达蛋白质。对scFv样品进行ELISA分析以检测CEA和IFNα结合。在这些实验中,在4℃下以1ug/ml向384孔板的孔涂覆抗V5抗体(Sv5-Pk1,BioRad)过夜。在洗涤之后,将孔用SuperBlock(ThermoFisher,37515)封闭,接着在SuperBlock中添加饱和水平的scFv。在洗涤之后,添加抗原并将板温育一小时。使用链霉亲和素HRP检测生物素化的IFNα,并且使用抗hFc-HRP检测CEA-Fc,并使用标准方法显影。添加不同量的标记测试抗原以显示结合并估计不同scFv的相对亲和力。图26示出了五种示例性双重结合scFv与CEA结合的ELISA结合数据。因为IFNα的结合亲和力太低而无法通过ELISA检测,因此通过生物层干涉测量(OctetRED96e)来测量与IFNα的结合,如实施例5中所述。结果在表19中列表。所有五种抗体均显示与CEA和IFN

两者结合,在较低浓度的抗原下可检测到与CEA的结合。

表19-抗IFNα结合结果

克隆ID	IFNα结合(@5uM)	ELISA	序列	HC-CDR3
8b2_A09	+	-	(SEQ ID NO: 253) MSTSTEVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYA MHWVRQAPGKGLEWVSA IGAGGGTYYADSVKGRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKT EDTAVYYCVSSVGAGAYY YQGLDVWGQGTLVTVSSA SGGGGSGGGGSGGGGSHA SDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDIFTYLNWYQ QRPGKAPKLLIYDASRLQT	SEQ ID NO: 240

克隆ID	IFNα结合(@5uM)	ELISA	序列	HC-CDR3
			GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPYTFGQGTKLEIKRAAAGSGSEQKLISEEDLGKPIPNPLLGLDST	
8b2_B10	+	-	(SEQ ID NO: 254) MSTSTEVQLLESGAEVKKPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADFVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSSVGAGAYYYQGLDVWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGVGNFLAWYQQKPGKAPKLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGGGTKLEIKRAAAGSGSEQKLISEEDLGKPIPNPLLGLDST	SEQ ID NO: 240
8b2_C02	+	-	-	

克隆 ID	IFNα 结合 (@5uM)	ELISA	序列	HC-CDR3
8b2_C03	+	-	-	
8b2_C08	+	-	(SEQ ID NO: 256) MSTSTEVQLLESGAEVKKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVDSSSSLHFDYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRIGTYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQTFNTPFTFGPGTKVDIKRAAAGSGSEQKLISEEDLGKPIPNPLLGLDST	SEQ ID NO: 248
AF317	(KD < 10nM)	+++	(SEQ ID NO: 257) MSTSTEQKLISEEDLQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYDINWVRQAPGQGLEWIGMINPSSGFTSAAQTFQGRVTMTRDTSTST	SEQ ID NO: 244

克隆 ID	IFNα 结合 (@5uM)	ELISA	序列	HC-CDR3
			VYMELSSLRSEDTAVYYC ATIKGLGAYYYYGMDVW GQGTTVTVSSASGGGGSG GGGSGGGGSHASDIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITCRAS QSIDRYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQSYSPPLTFGGGTK VEIKGSGLNDIFEAQKIEW HEGKPIPNPLLGLDST	
AF372	-	-	(SEQ ID NO: 258) MSTSTEQKLISEEDLEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCS RWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASGGGGSGGGGS GGGGSHASDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRASQDVN TAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRS GTDFTLTISSLQPEDFATYY	-

克隆ID	IFNα结合(@5uM)	ELISA	序列	HC-CDR3
			CQQHYTTPPTFGQGTKVEI KGSGLNDIFEAQKIEWHEG KPIPNPLLGLDST	

实施例32

CEA-IFNα双重结合抗体(DBA)细胞因子复合物调节IFNAR2(IFNα受体2)结合此实施例描述了呈图8所示形式的CEA/IFN DBA-细胞因子复合物调节IFN与受体IFNAR2的结合。选择SEQ ID NO:259、SEQ ID NO:260和SEQ ID NO:261的DBA-细胞因子复合物进行分析,具有类似结构的阴性对照是基于IFNα单特异性结合scFv(SEQ ID NO:300)和两个非IFNα结合scFv(一个具有SEQ ID NO:301并且一个具有SEQ ID NO:302)。DBA-细胞因子复合物和对照蛋白序列在表30中总结。为了测试癌胚抗原(CEA)调节IFNAR2结合的能力,生成了V5标记的构建体,其由与IFN-α连接的CEA-IFN-αDBA scFv组成。使用PURExpress 2.1体外翻译系统合成scFv,并以单次稀释添加到384孔板中。添加滴定浓度的CEA-Fc(SINO Biological)或PDL1-Fc(ACROBiosystems),并且将板在室温下温育30分钟。将Eu标记的IFNAR2(ACROBiosystems)和Alexa Fluor 647标记的抗V5抗体(Perkin Elmer)添加到所有孔中,并在室温下温育24小时。然后在Envision 2105酶标仪(Perkin Elmer)上读取HTRF信号。IFNAR2能够在增加浓度的CEA-Fc存在的情况下结合DBA-scFv复合物上的IFN-α。在PD-L1-Fc对照蛋白存在的情况下,没有观察到IFNAR2结合增加,所述对照蛋白不结合DBA-scFv蛋白质复合物。图27A-F中所示的结果证明了对于SEQ ID NO:259(图27A)、SEQ ID NO:260(图27B)和SEQ ID NO:261(图27C)的DBA-细胞因子复合物,IFNAR2结合随着CEA的添加而以剂量依赖性方式增加,但随着对照蛋白PDL1的添加不增加。来自单特异性IFN scFv细胞因子复合物的IFNAR2结合不随CEA或PD-L1的添加而改变。

表30-DBA-细胞因子蛋白质复合物和对照蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
DBA-细胞因子复合物	SEQ ID NO: 259	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISL FSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKEGGSGSGSGGSGGSGSGGS GSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIGAGGGTYY ADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDT AVYYCVSSVGAGAYYYQGLDVWGQGTLVT VSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRASQDIFTYLNWYQQRP GKAPKLLIYDASRLQTGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPYTFGQGTKL EIKRAAAGSGSEQKLISEEDLGKPIPNPLLGL DST
DBA-细胞因子复合物	SEQ ID NO: 260	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISL FSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKEGGSGSGSGGSGGSGSGGS GSEVQLLESGAEVKKPGGSLRLSCAASGFTV

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		SSNYMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADFVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCVSSVGAGAYYYQGLDVWGQGTLV TVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCRASQGVGNFLAWYQQ KPGKAPKLLIYGASTLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGGGT KLEIKRAAAGSGSEQKLISEEDLGKPIPNPLL GLDST
DBA-细胞因子复合物	SEQ ID NO: 261	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISL FSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKEGGSGSGSGGSGGSGSGGS GSEVQLLESGAEVKKPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARVDSSSSLHFDYWGQGTLVTVSSA SGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQRIGTYLNWYQQKPGK APKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQTFNTPFTFGPGTKVDIK RAAAGSGSEQKLISEEDLGKPIPNPLLGLDST
AF2589	SEQ ID NO: 300	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISL FSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY SFTSYDINWVRQAPGQGLEWIGMINPSSGFTS AAQTFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCATIKGLGAYYYYGMDVWGQGTTV TVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCRASQSIDRYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGT KVEIKGKPIPNPLLGLDST
AF2592	SEQ ID NO: 301	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISL FSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGG TFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGG TNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARSLFPTIFGVEVAFDIWGQGTT VTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIDRLAWYQ QKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGT KVDIKGKPIPNPLLGLDST

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
AF2594	SEQ ID NO: 302	MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISL FSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELY QQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVR KYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSF SLSTNLQESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTR YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKV EIKGKPIPNPLLGLDST

实施例33

LRRC15和IFNα特异性双重结合抗体的选择和结合

[0177] 此实施例描述了本公开的传感器结构域的分离,具体地,LRRC15和IFNα特异性双重结合抗体(DBA)的选择。从实施例31中所述的IFNαTumbler抗体噬菌体展示文库分离抗LRRC15和抗IFNαDBA。所述选择类似于实施例1中所述的方案,使用一轮IFNα选择(IFNα2b,GenScript,Z03002,使用标准方案进行生物素化)和一轮LRRC15选择(LRRC15-hFc,Sino Biologicals,15786-H02H)。

[0178] 在噬菌体中对100nM IFNα进行第一轮选择并且对100nM LRRC15进行第二轮选择之后,将所得的DBA文库亚克隆为酵母表面展示载体,并转化为酵母,以使用标准方案进一步筛选。针对与LRRC15和IFNα的结合对酵母文库分选四次。在每一轮分选中,用LRRC15-Fc-生物素或IFNα-生物素标记文库,然后用链霉亲和素-PE(Abcam#ab239759)标记,并在Sony MA900细胞分选仪上基于PE荧光进行分选。进行四个分选,在100nM LRRC15-Fc-生物素、1000nM IFNα-生物素、10nM LRRC15-Fc-生物素和10nM LRRC15-Fc-生物素下进行标记。使用Zymoprep酵母质粒Miniprep II试剂盒(Zymo research D2004)在最终分选之后从酵母中分离质粒,并将其转化为DH5a大肠杆菌进行克隆。选择96个菌落进行Sanger测序,从中鉴定24个独特的克隆并筛选IFNα和LRRC15结合。使用含有T7启动子和翻译起始位点的正向引物以及含有T7终止子的反向引物通过PCR扩增每个克隆的scFv DNA序列,包括c-myc和V5标签。使用如先前实施例中所述的PURExpress2.1无细胞转录/翻译系统表达蛋白质。对scFv样

品进行ELISA分析以检测LRRC15和IFNα结合。图28A示出了六种示例性scFv与LRRC15的ELISA结合数据。因为IFNα对于一些scFv的结合亲和力太低而无法通过ELISA检测，因此还通过生物层干涉测量(OctetRED96e)来测量与IFNα的结合，如实施例5中所述。结果和抗体序列在图28B中列表。所有六种抗体均显示与LRRC15和IFNα两者结合，在较低浓度的抗原下可检测到与LRRC15的结合。蛋白质复合物序列在表31中提供。

表31-DBA-细胞因子蛋白质复合物和对照蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
A03	SEQ ID NO: 262	MSTSTQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWMDP NNDDADYAQRFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCASLAAAGPYYYYGMDV WGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHA SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINN YLNWYQQKPGKAPKLLIYGASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYGT

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		PLTFGGGTKVEIKRAAAGSGSEQKLISEEDLG KPIPNPLLGLDST
i47_A11	SEQ ID NO: 314	MSTSTQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGTINPSD GDTTYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARVGGWGIYYYYGMDVWGQ GTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSWLA WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYTVPFS FGQGTKLEIKRAAAGSGSEQKLISEEDLGKPI PNPLLGLDST
i47_A12	SEQ ID NO: 315	MSTSTQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFINNDINWVRQAPGQGLEWMGGTIPIFG VHIYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCVSSVGAGAYYYYGMDVWGQGT LVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQM TQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSLPYTFGQ GTRLEIKRAAAGSGSEQKLISEEDLGKPIPNPL LGLDST
B03	SEQ ID NO: 263	MSTSTQVQLVQSGAEVKKPGASVEVSCKAS GGTFSSYAINWVRQAPGQGLEWMGWIDPKS GDTTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCASGGSYSPWYFDLWGQGTL VTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMT

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		QSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKSGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIKRAAAGSGSEQKLISEEDLGKPIPNPLLGLDST
B07	SEQ ID NO: 264	MSTSTQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWMDPNNDDADYAQRFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASLAAAGPYYYYGMDVWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASILEAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSAPITFGQGTRLEIKRAAAGSGSEQKLISEEDLGKPIPNPLLGLDST
B11	SEQ ID NO: 265	MSTSTQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWLGGTVPLFGISHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCVSSVGAGAYYYQGLDVWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSHASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLLPEDFATYYCQQSYLPPYSFGQGTKLEIKRAAAGSGSEQKLISEEDLGKPIPNPLLGLDST
AF372	SEQ ID NO: 258	MSTSTEQKLISEEDLEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAM DYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGS HASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDV NTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIKGSGLNDIFEAQKIEWHE GKPIPNPLLGLDST

实施例34

LRRC15-IFNα双重结合抗体(DBA)细胞因子复合物调节IFNAR2(IFNα受体2)结合

[0179] 此实施例描述了LRRC15/IFN DBA-细胞因子复合物与受体IFNAR2的LRRC15依赖性结合。此实施例的细胞因子复合物由LRRC15-IFN-αDBA IgG构成,其中IFN-α连接至一条重链的N末端(结构示意图在图9B中示出)。选择DBA-细胞因子复合物AF4581(SEQ ID NO:266-268)、AF4586(SEQ ID NO:269-271)、AF4587(SEQ ID NO:266-267、272)和AF4588(SEQ ID NO:273-275)进行分析。包括两种具有相同结构的细胞因子复合物作为对照:AF4305(SEQ ID NO:294-296),它是基于中和抗IFNα抗体,和AF4306(SEQ ID NO:64,192,297),它是基于抗Her2抗体。蛋白质复合物序列在表32中提供。使用标准方案在哺乳动物细胞中表达六种IgG细胞因子,并以单次稀释添加到384孔板中。添加滴定浓度的LRRC15-Fc(SINO Biological)、PDL1-Fc(ACROBiosystems)或CEA-Fc(SINO Biological),并且将板在室温下温育30分钟。将Eu标记的IFNAR2(ACROBiosystems)和Alexa Fluor 647标记的抗V5抗体(Perkin Elmer)添加到所有孔中,并在室温下温育24小时。然后在Envision 2105酶标仪(Perkin Elmer)上读取HTRF信号。图29A-F中所示的结果证明了对于AF4581、AF4586和AF4587的DBA-细胞因子复合物,IFNAR2结合随着LRRC15的添加而以剂量依赖性方式增加,但随着对照蛋白PDL1的添加则不增加,从而证明了IFNAR结合活性的LRRC15依赖性调节。来自AF4588和单特异性IFN scFv细胞因子复合物AF4305和AF4306的IFNAR2结合不随LRRC15或PD-L1的添加而改变。

[0180] 虽然本文已经示出并描述了本公开的优选实施方案,但对于本领域技术人员明显的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本公开内容的情况下,本领域技术人员将会想到许多变化、改变和替换。应理解,在实施本公开时可以采用本文所述的公开内容的实施方案的各种替代方案。旨在以所附权利要求书限定本公开的范围,并且由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同项。

表32-DBA-细胞因子蛋白质复合物和对照蛋白质复合物

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
AF4581	SEQ ID NO: 266	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGY YMHWVRQAPGQGLEWMGWMDPNNDDAD YAQRFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASLAAAGPYYYYGMDVWGQGTLV TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGC LVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ SDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASS TKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPS VFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPD

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		VQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV VSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPI ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQV TLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TEPVLDSDGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSY SCSVVHEGLHNHHTTESFSRTPGK
	SEQ ID NO: 267	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT GYYMHWVRQAPGQGLEWMGWMDPNNDD ADYAQRFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCASLAAAGPYYYYGMDVWGQGT LVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTL GCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAV LQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPA SSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGG PSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTL RVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGA PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQ VSLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK NTEPVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWVERNS YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 268	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINNY LNWYQQKPGKAPKLLIYGASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYGTP LTFGGGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4586	SEQ ID NO: 269	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGASVEVSCKASGGTFSSYA INWVRQAPGQGLEWMGWIDPKSGDTTYAQ KFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCASGGSYSPWYFDLWGQGTLVTVSSAKT TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFP EPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS SVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIE PRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIK DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKG SVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDG SYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HNHHTTESFSRTPGK
	SEQ ID NO: 270	QVQLVQSGAEVKKPGASVEVSCKASGGTFSS YAINWVRQAPGQGLEWMGWIDPKSGDTTY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCASGGSYSPWYFDLWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVK DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKS DGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 271	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSW LAWYQQKSGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYSFP FTFGPGTKVDIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4587	SEQ ID NO: 266	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGY YMHWVRQAPGQGLEWMGWMDPNNDDAD YAQRFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASLAAAGPYYYYGMDVWGQGTLV

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGC LVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ SDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASS TKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPS VFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPD VQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV VSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPI ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQV TLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TEPVLDSDGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSY SCSVVHEGLHNHHTTESFSRTPGK
	SEQ ID NO: 267	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT GYYMHWVRQAPGQGLEWMGWMDPNNDD ADYAQRFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCASLAAAGPYYYYGMDVWGQGT LVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTL GCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAV LQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPA SSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGG PSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTL RVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGA PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQ VSLTCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK NTEPVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWVERNS YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNY

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
	NO: 272	LNWYQQKPGKAPKLLIYGASILEAGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSAPI TFGQGTRLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGG ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVL NSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNS YTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4588	SEQ ID NO: 273	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYD INWVRQAPGQGLEWLGGTVPLFGISHYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CVSSVGAGAYYYQGLDVWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTESFSRTPGK

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
	SEQ ID NO: 274	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTS YDINWVRQAPGQGLEWLGGTVPLFGISHYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCVSSVGAGAYYYQGLDVWGQGTLVTV SSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLV KGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTK VDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFI FPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQ ISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS ALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIER TISKPKGSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSL TCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTE PVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSC SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
	SEQ ID NO: 275	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLLPEDFATYYCQQSYLPPYS FGQGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGG ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVL NSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNS YTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4305	SEQ ID NO: 294	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		QESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTAY DINWVRQAPGQGLEWVGIINPGSGSPMYAQ KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCVSSVGAGAYYYQGLDVWGQGTLVTVS SAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVK GYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL YTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKV DKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIF PPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQI SWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSA LPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTI SKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTC MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSDGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSV VHEGLHNHHTTESFSRTPGK
	SEQ ID NO: 295	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT AYDINWVRQAPGQGLEWVGIINPGSGSPMY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCVSSVGAGAYYYQGLDVWGQGTLVT VSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCL VKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS DLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASST KVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSV FIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDV QISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVV SALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIER

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		TISKPKGSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSL TCLVKDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTE PVLKSDGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSC SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGGGGSGGGSHH HHHH
	SEQ ID NO: 296	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIANY LNWYQQKPGKAPKLLIYSASNLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTQ WTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
AF4306	SEQ ID NO: 64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	SEQ ID NO: 192	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGY FPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKK IEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKI

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		KDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPPEKEMTKKQVSLTCLVK DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLKS DGSYFMYSKLTVEKKNWVERNSYSCSVVHE GLHNHHTTKSFSRTPGGGGSGGGSHHHHHH
	SEQ ID NO: 297	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLK DRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQI FNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLND LEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRI TLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNL QESLRSKEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAKTT APSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEP RGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ DWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGS VRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDG SYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL

蛋白质复合物	SEQ ID NO:	序列
		HNHHTTESFSRTPGK

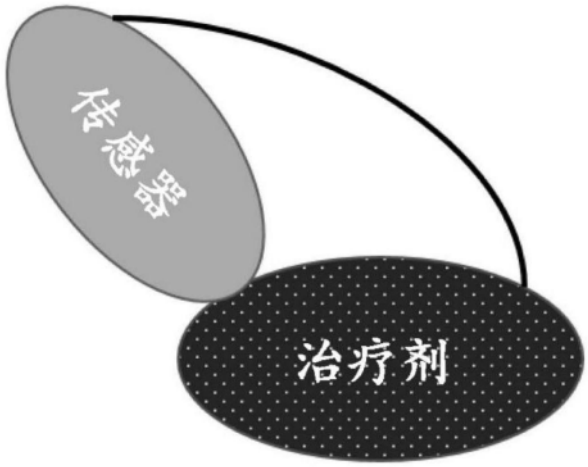


图1A

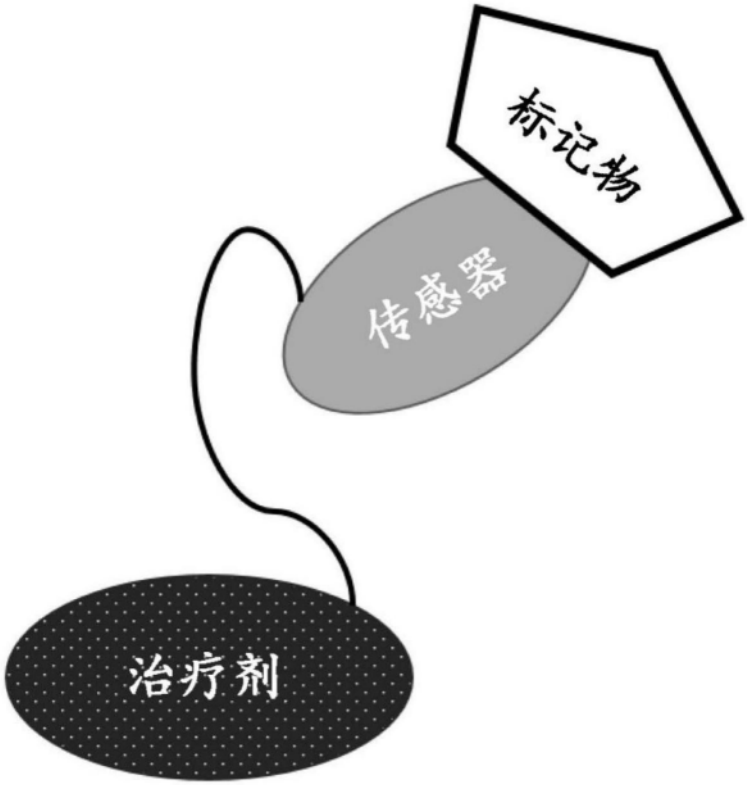


图1B

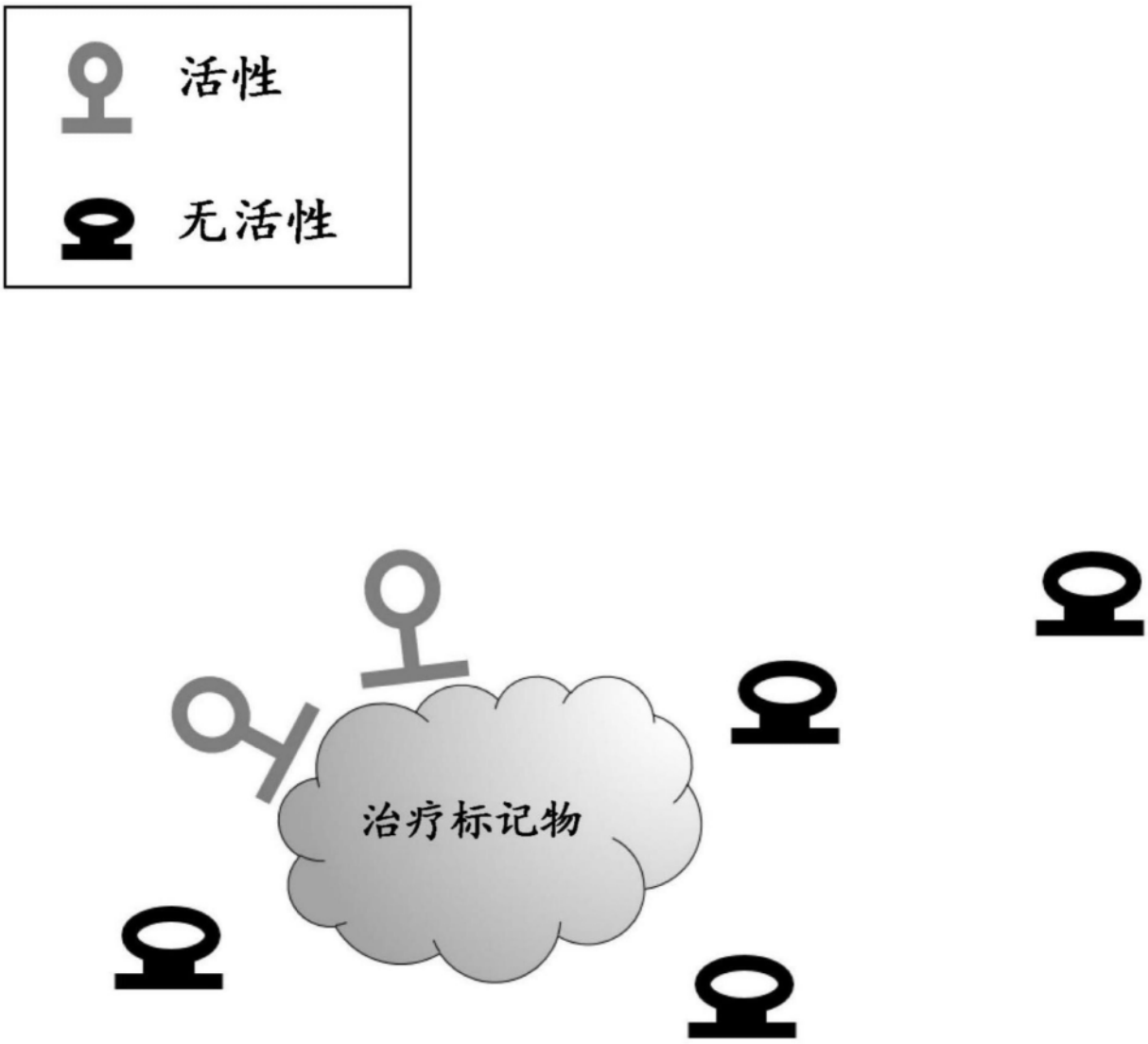


图2

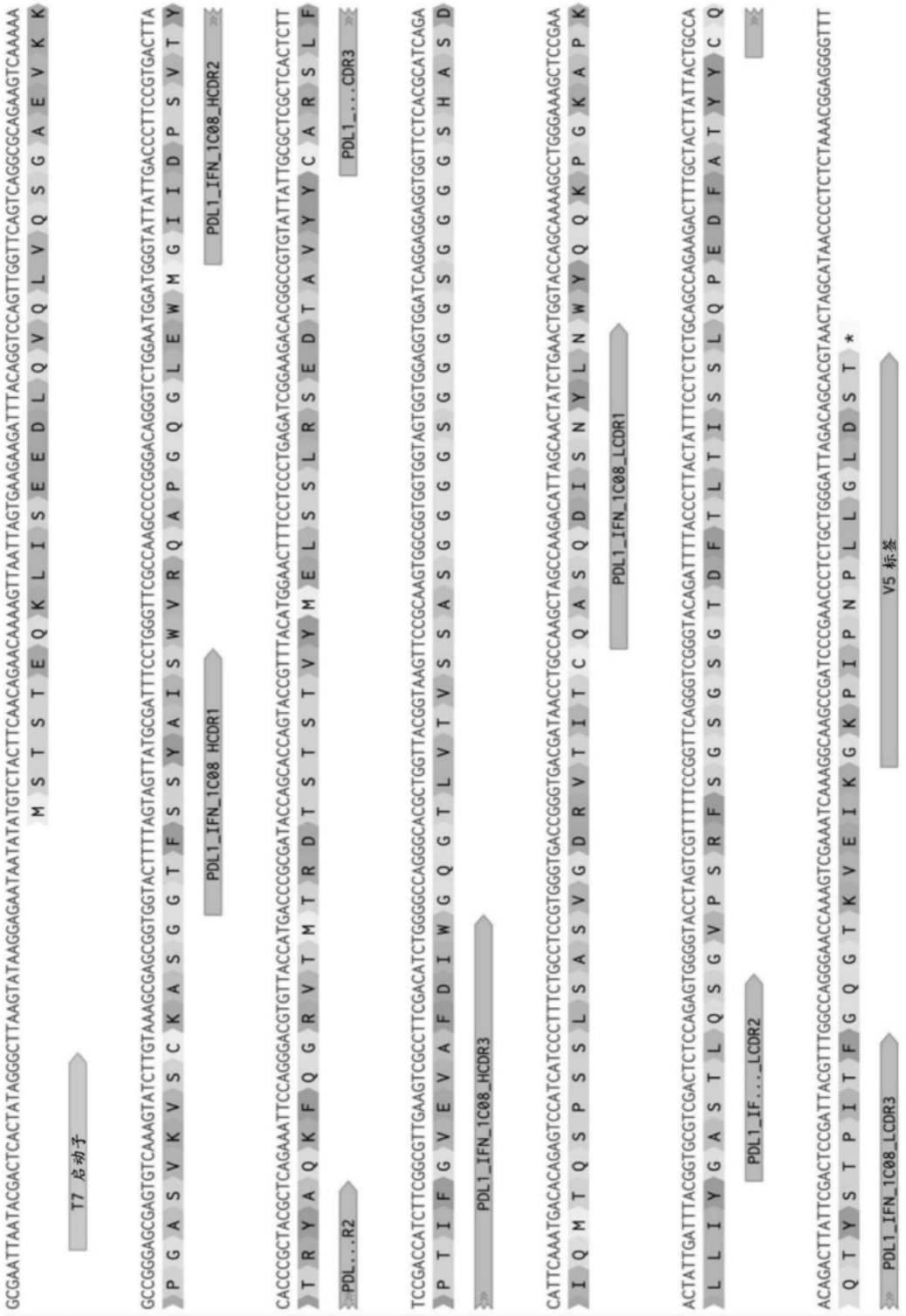

T7 启动子
PDL1_IFN_1C08_HCDR1
PDL1_IFN_1C08_HCDR2
PDL...R2
PDL1_...CDR3
PDL1_IFN_1C08_HCDR3
PDL1_IFN_1C08_LCDR1
PDL1_IF..._LCDR2
PDL1_IFN_1C08_LCDR3
V5 标签

图3

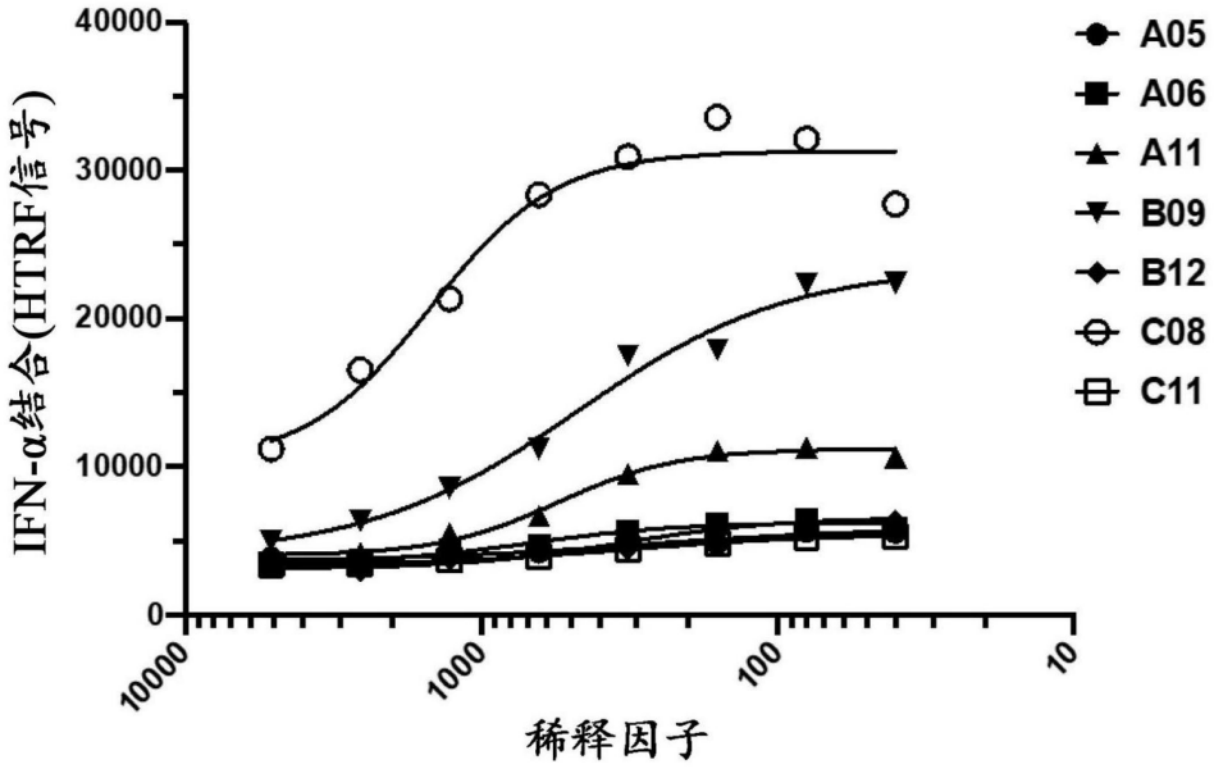

40000
30000
20000
10000
0
IFN-α结合(HTRF信号)
10000
1000
100
10
稀释因子
A05
A06
A11
B09
B12
C08
C11

图4

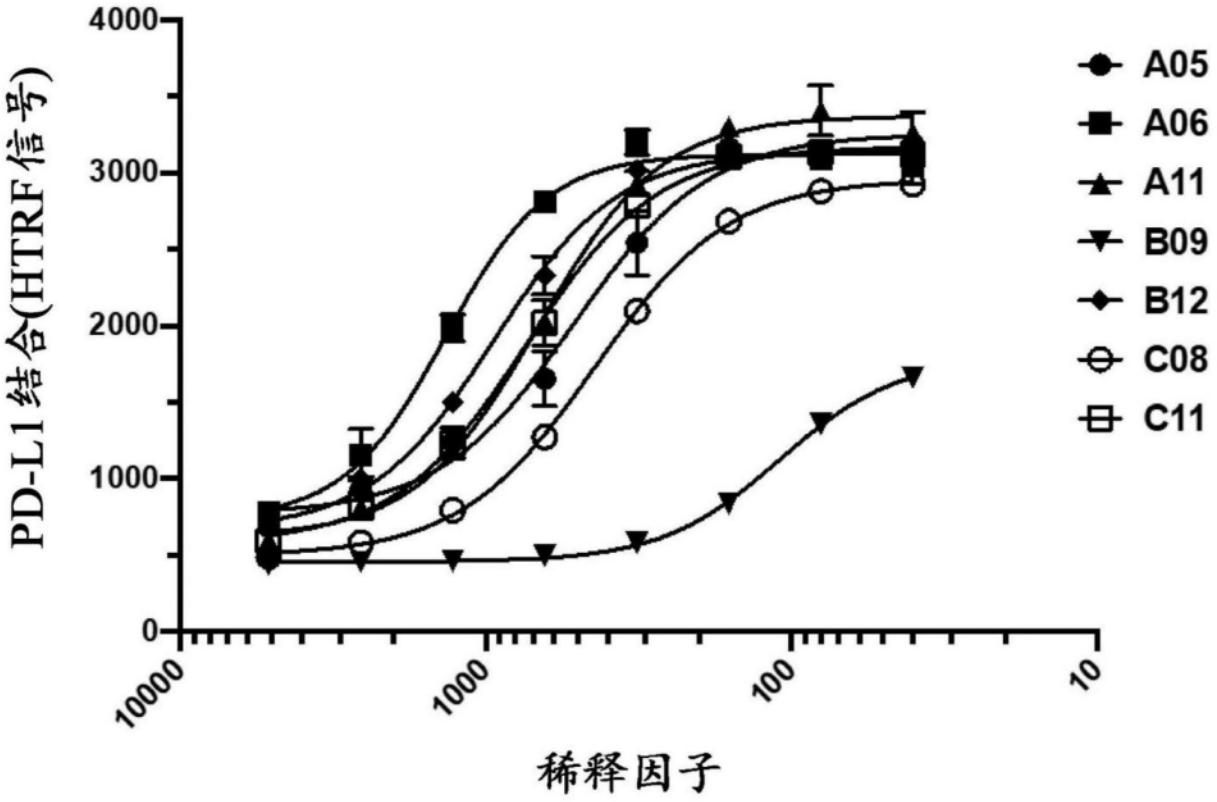

4000
3000
2000
1000
0
PD-L1结合(HTRF信号)
10000
1000
100
10
稀释因子
A05
A06
A11
B09
B12
C08
C11

图5

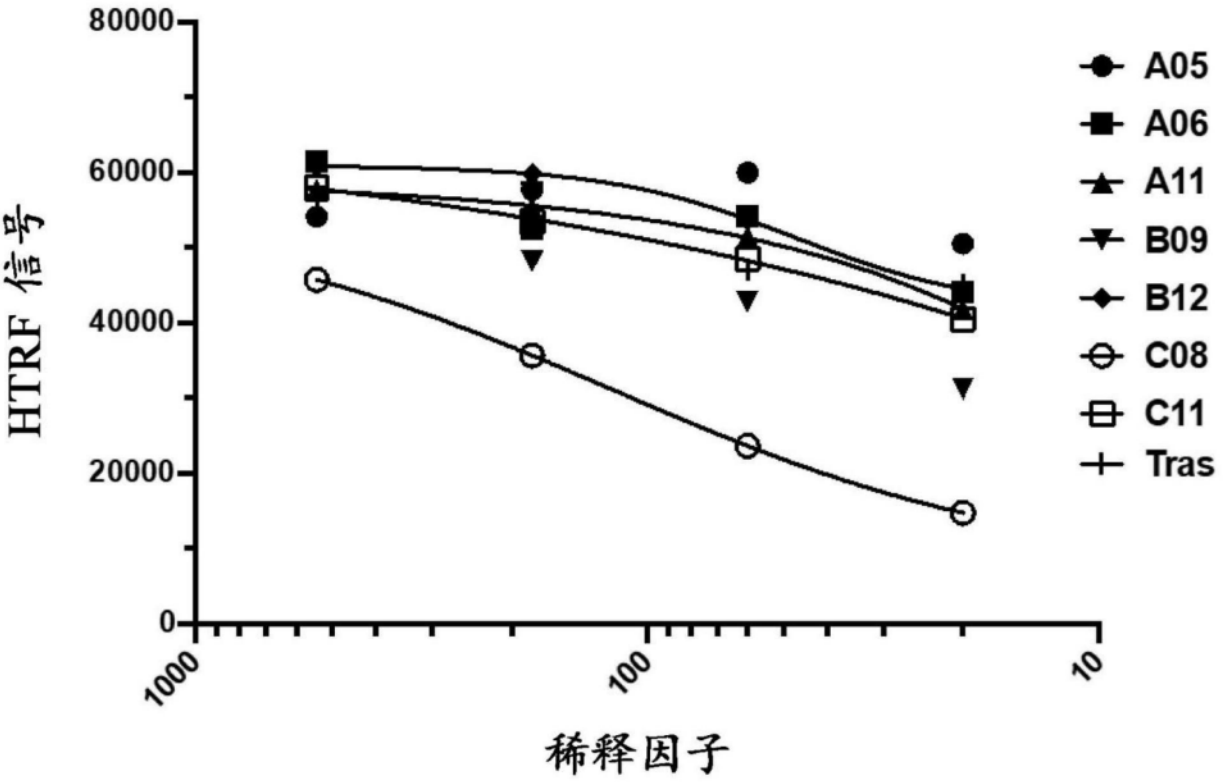

80000
60000
40000
20000
0
HTRF 信号
1000
100
10
稀释因子
A05
A06
A11
B09
B12
C08
C11
Tras

图6

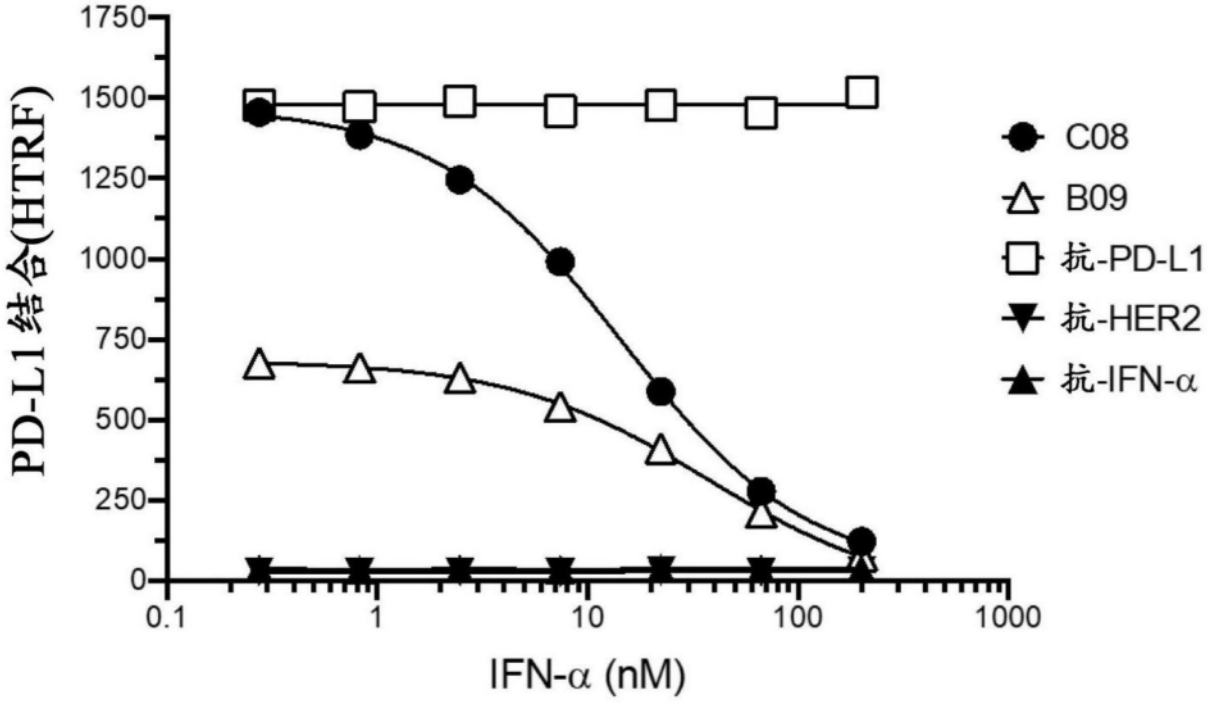
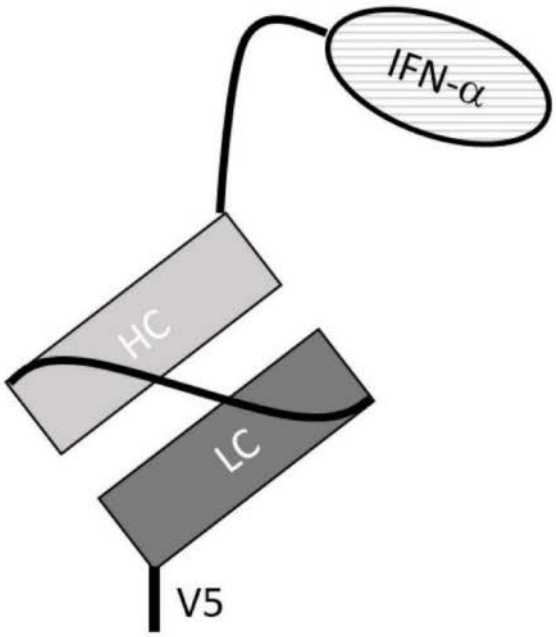

1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
PD-L1结合(HTRF)
0.1
1
10
100
1000
IFN-α (nM)
C08
B09
抗-PD-L1
抗-HER2
抗-IFN-α

图7



MSTSTCDLPQTHSLGSRRTLML
LAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP
QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQ
QIFNLFSTKDSSAAWDETLLDK
FYTELYQQLNDLEACVIQGVGV
TETPLMKEDSILAVRKYFQRIT
LYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMR
SFSLSTNLQESLRSKE
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC
KASGYTFSNYYVHWVRQAPGQG
LEWMGWMDPNSGGTGYAHQFQG
RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS
EDTAVYYCAKEVFSGWYDYWGQ
GTLVTVSS
ASGGGGSGGGGSGGGGSHAS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT
CRASQSISSYLNWYQQKPGKAP
KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
QQSYSTPYTFGQGTKVEIK
GKPIPNPLLGLDST

图8

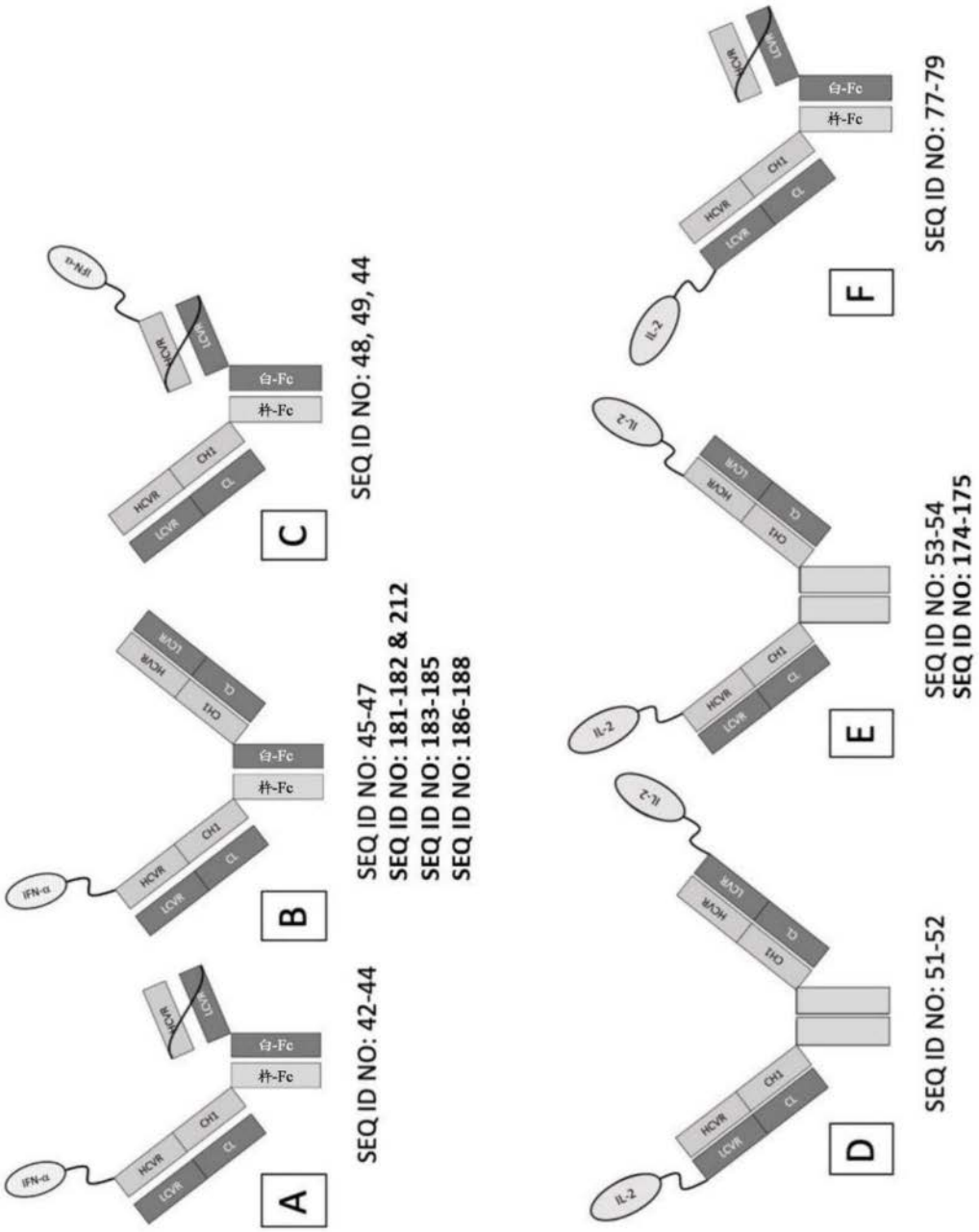

A
B
C
D
E
F
IFN-α
IL-2
白-Fc
杵-Fc
HCVR
LCVR
CH1
CL
SEQ ID NO: 42-44
SEQ ID NO: 45-47
SEQ ID NO: 181-182 & 212
SEQ ID NO: 183-185
SEQ ID NO: 186-188
SEQ ID NO: 48, 49, 44
SEQ ID NO: 51-52
SEQ ID NO: 53-54
SEQ ID NO: 174-175
SEQ ID NO: 77-79

图9

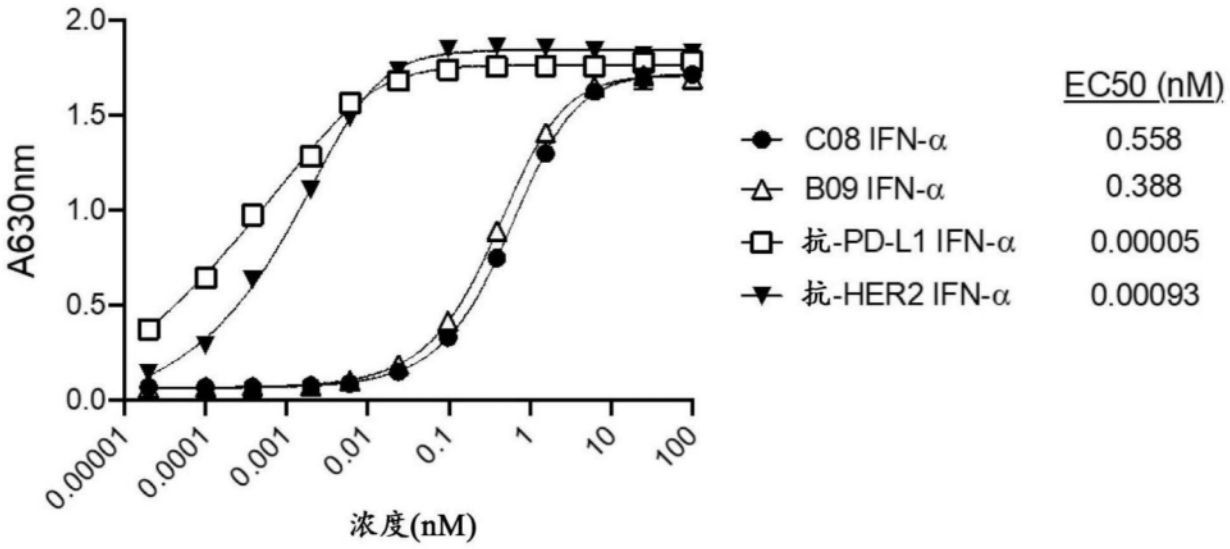

A630nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度(nM)
EC50 (nM)
C08 IFN-α 0.558
B09 IFN-α 0.388
抗-PD-L1 IFN-α 0.00005
抗-HER2 IFN-α 0.00093

图10

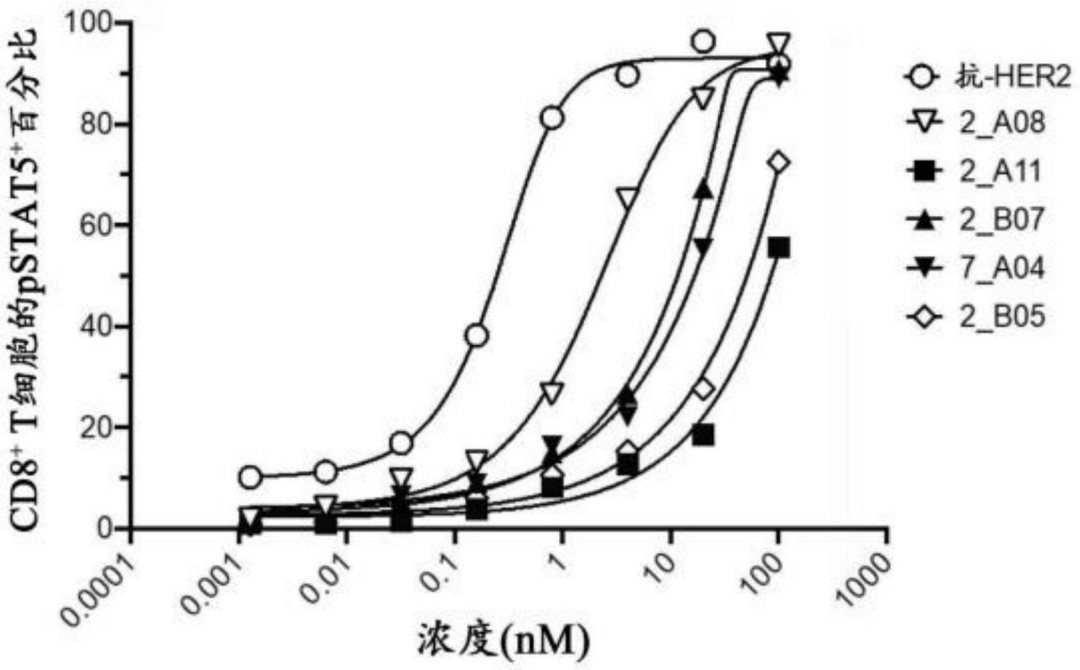

CD8⁺ T细胞的pSTAT5⁺百分比
100
80
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)
抗-HER2
2_A08
2_A11
2_B07
7_A04
2_B05

图11

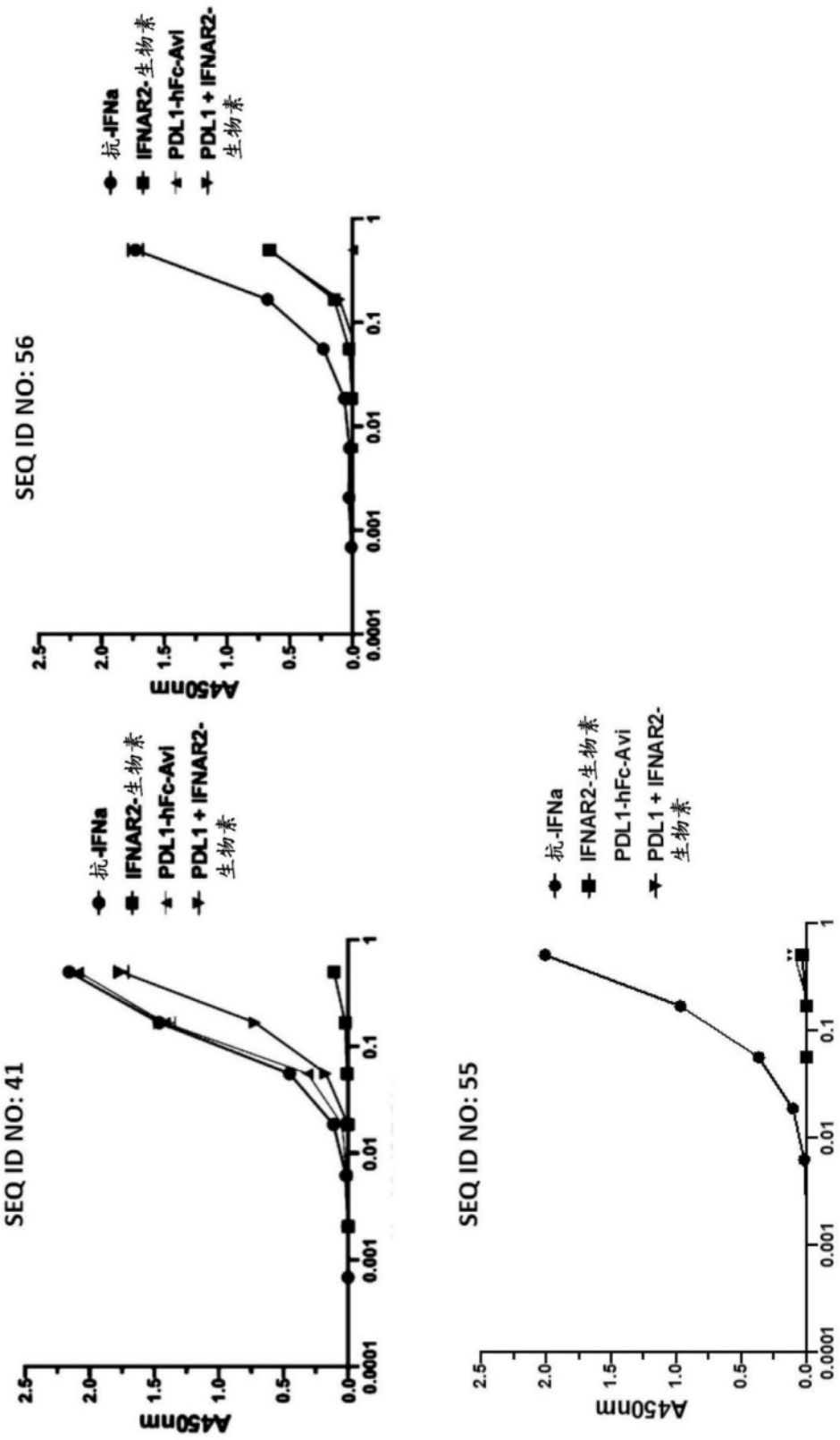

SEQ ID NO: 56
SEQ ID NO: 41
SEQ ID NO: 55
抗-IFNa
IFNAR2-生物素
PDL1-hFc-Avi
PDL1 + IFNAR2-生物素
A450nm

图12

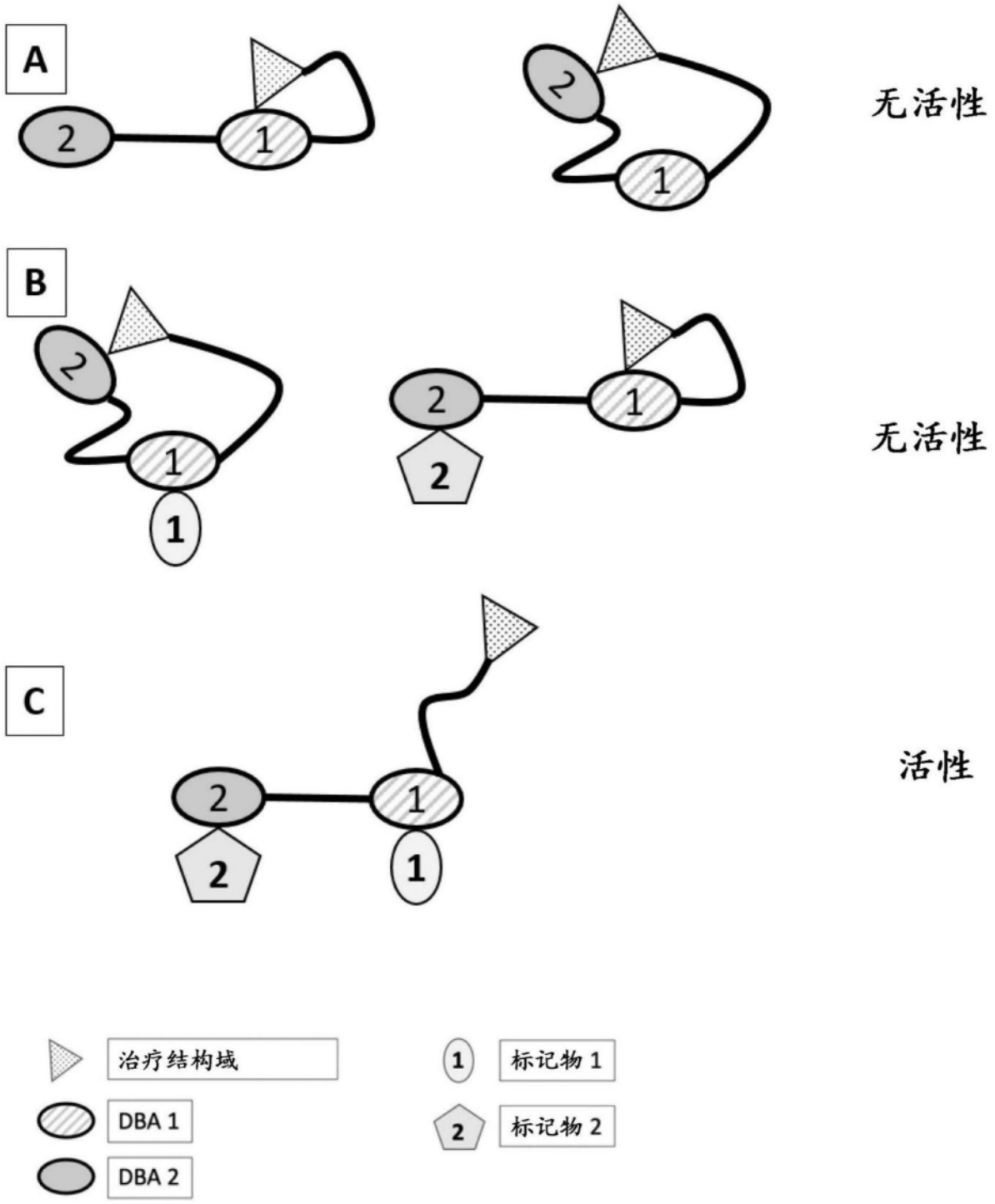


图13

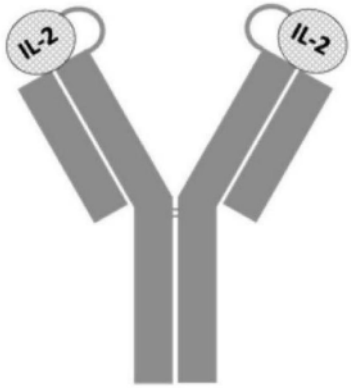


图14A

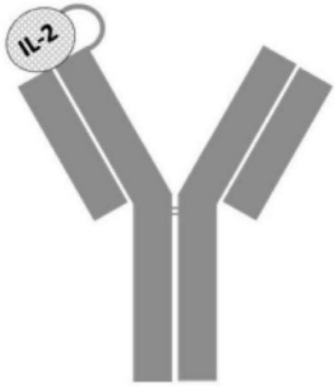


图14B

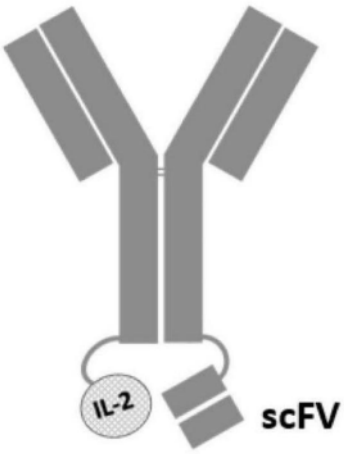


图14C

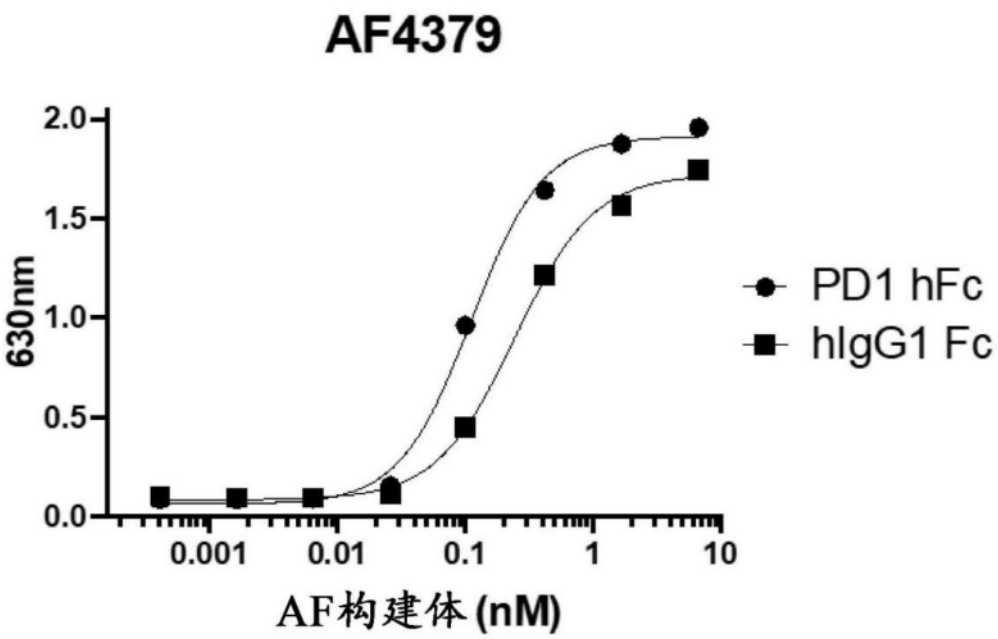

AF4379
630nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
AF构建体 (nM)
PD1 hFc
hIgG1 Fc

图15A

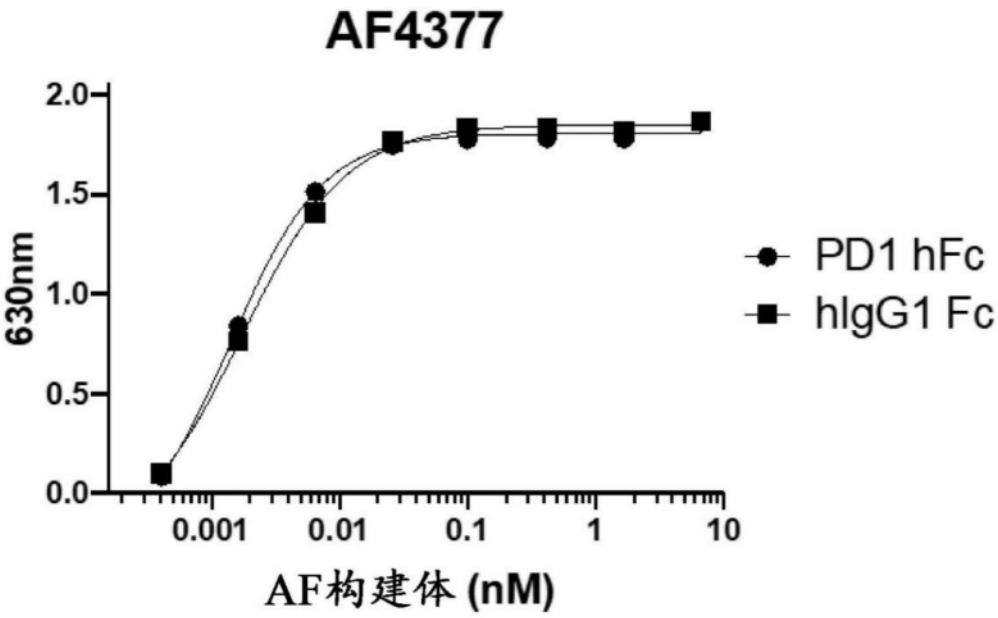

AF4377
630nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
AF构建体 (nM)
PD1 hFc
hIgG1 Fc

图15B

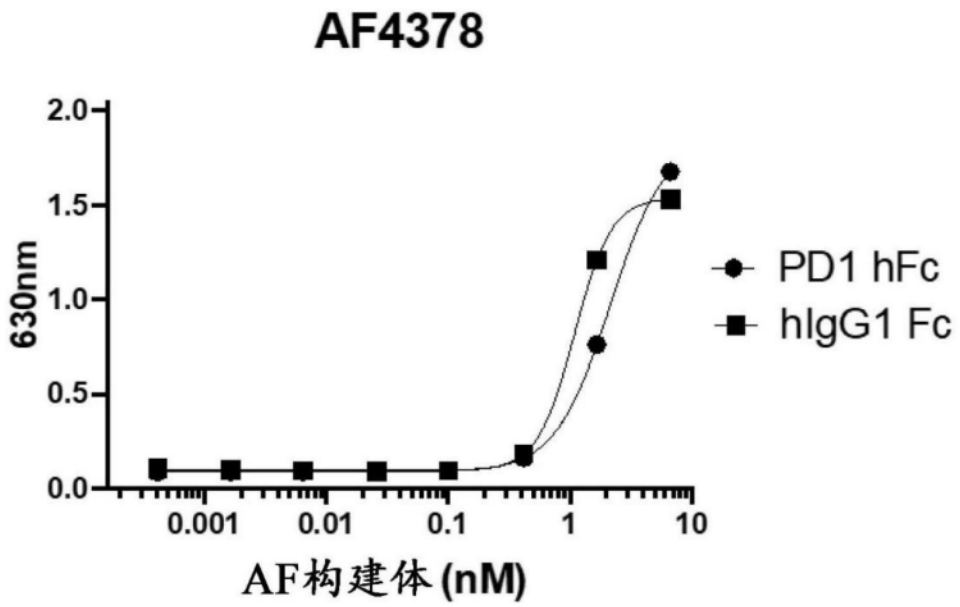

AF4378
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
630nm
0.001
0.01
0.1
1
10
AF构建体(nM)
PD1 hFc
hIgG1 Fc

图15C

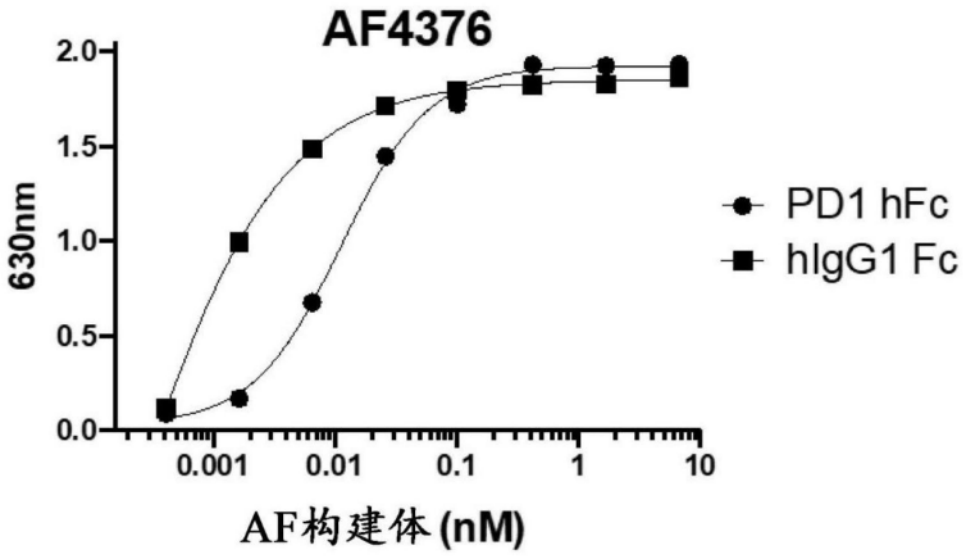

AF4376
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
630nm
0.001
0.01
0.1
1
10
AF构建体(nM)
PD1 hFc
hIgG1 Fc

图15D

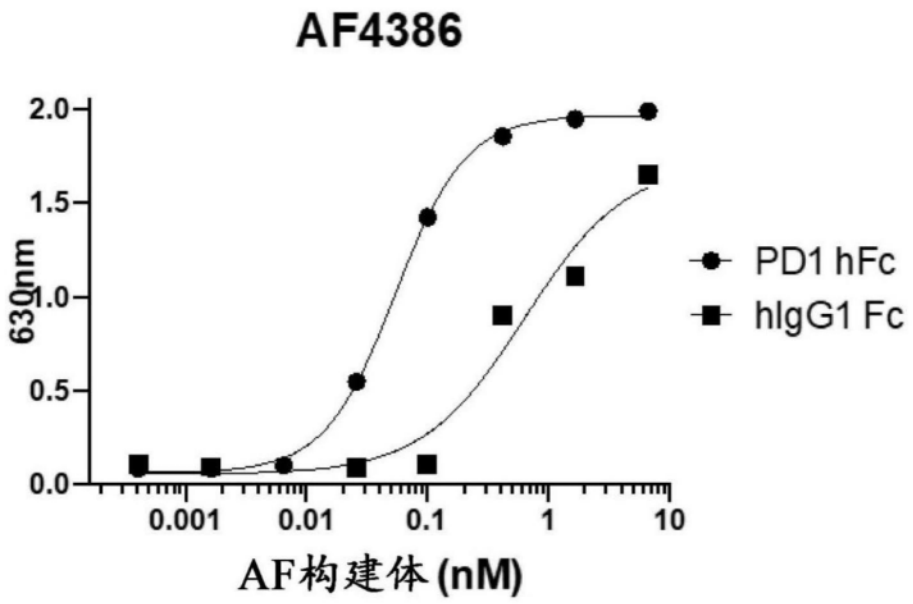

AF4386
630nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
AF构建体(nM)
PD1 hFc
hIgG1 Fc

图16A

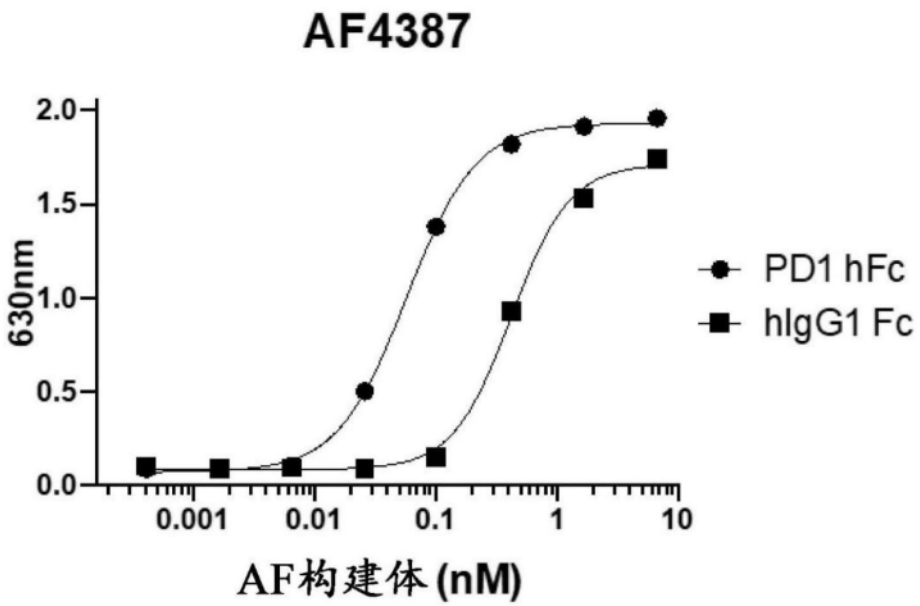

AF4387
630nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
AF构建体(nM)
PD1 hFc
hIgG1 Fc

图16B

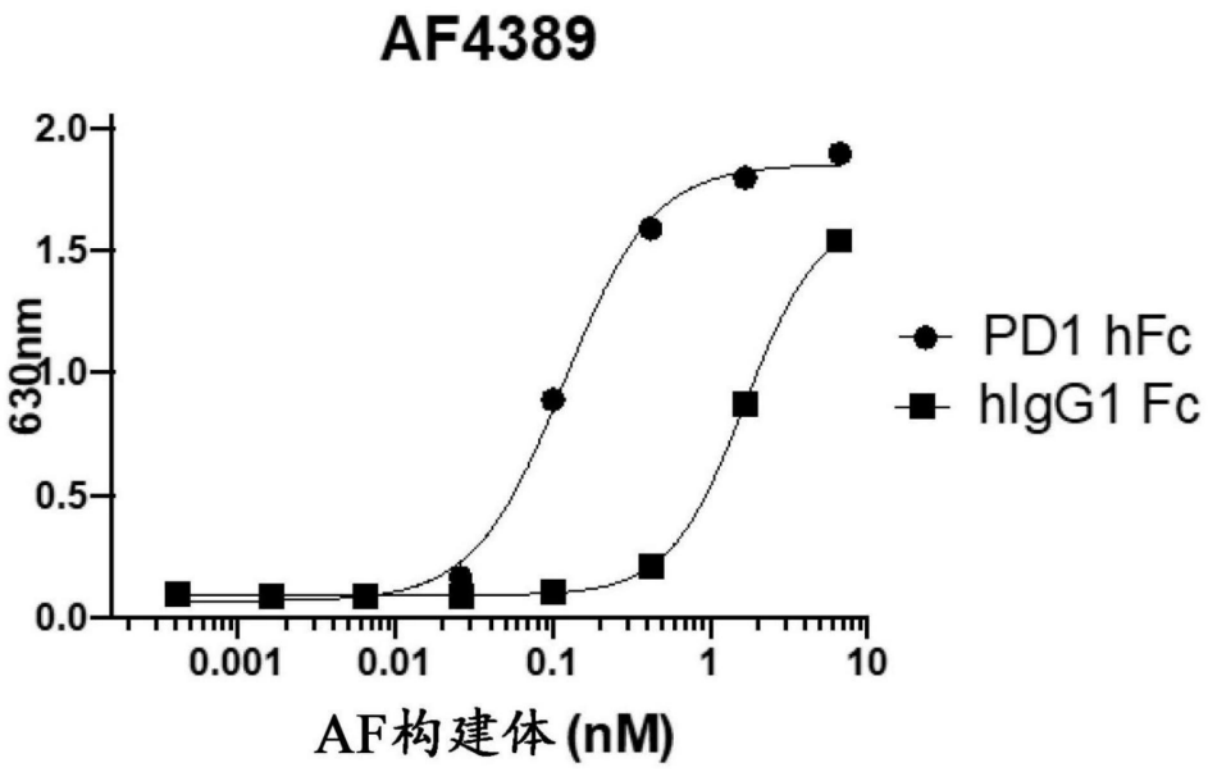

AF4389
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
630nm
0.001
0.01
0.1
1
10
AF构建体(nM)
PD1 hFc
hIgG1 Fc

图16C

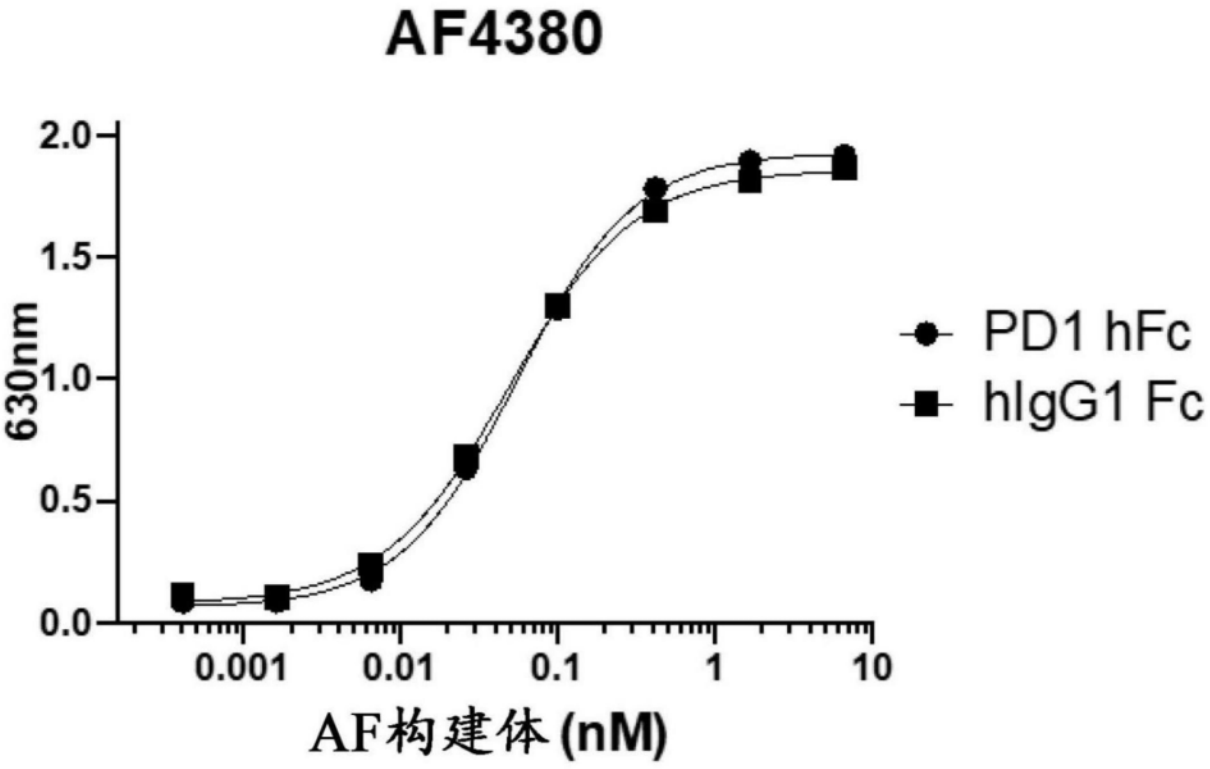

AF4380
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
630nm
0.001
0.01
0.1
1
10
AF构建体(nM)
PD1 hFc
hIgG1 Fc

图16D

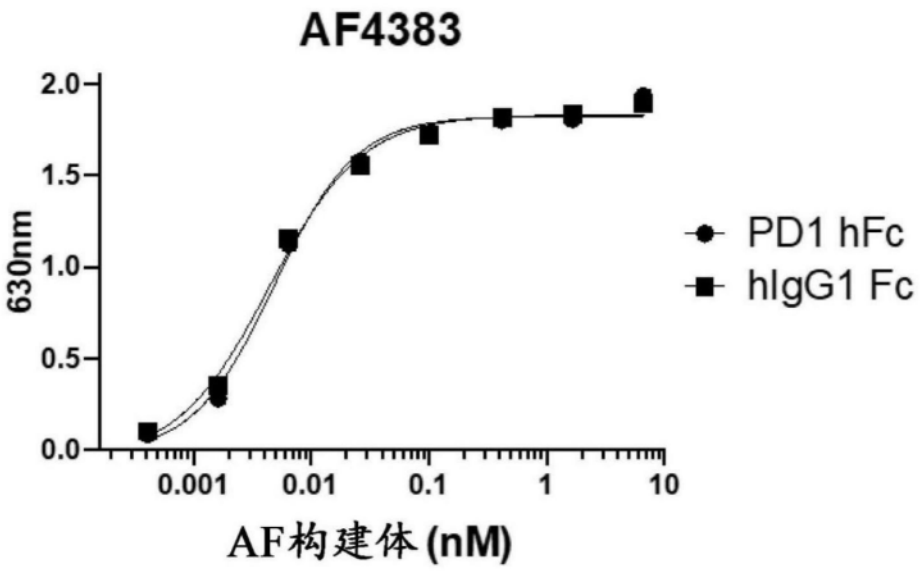

AF4383
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
630nm
0.001
0.01
0.1
1
10
AF构建体 (nM)
PD1 hFc
hIgG1 Fc

图16E

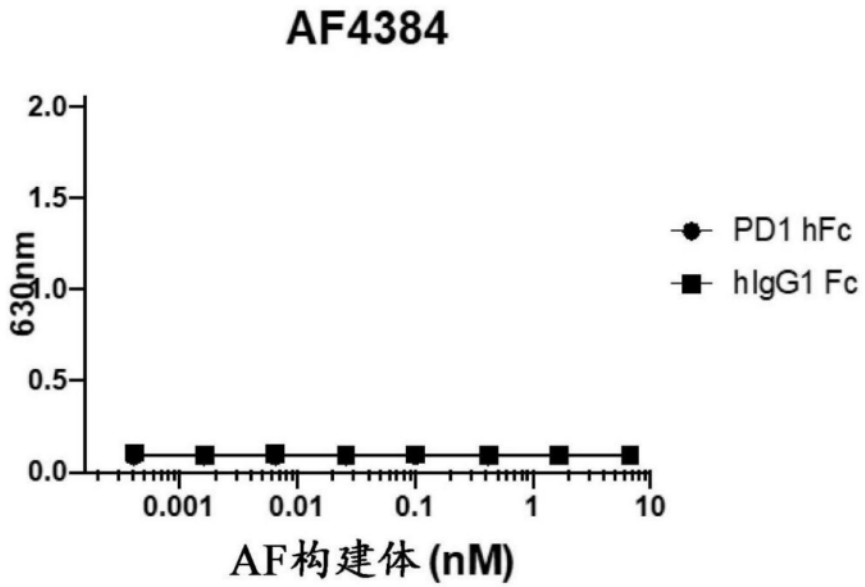

AF4384
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
630nm
0.001
0.01
0.1
1
10
AF构建体 (nM)
PD1 hFc
hIgG1 Fc

图16F

Fab: Her2 PD1

scFv

PD1/IL2 DBA 2B07 变体

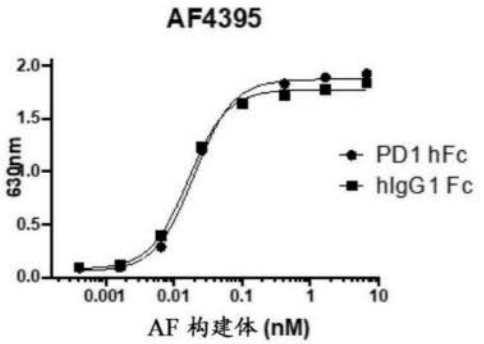


图 17A

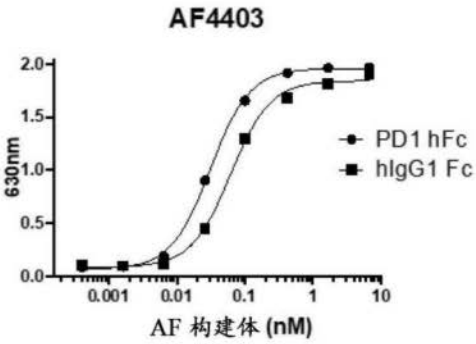


图 17B

PD1/IL2 DBA 7A04 变体

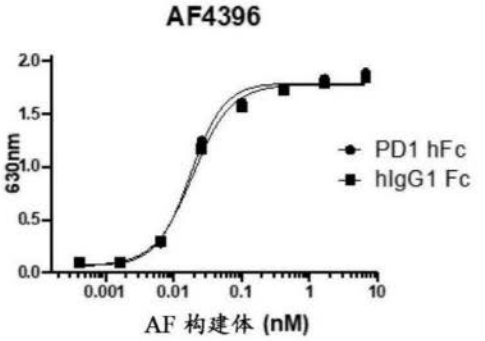


图 17C

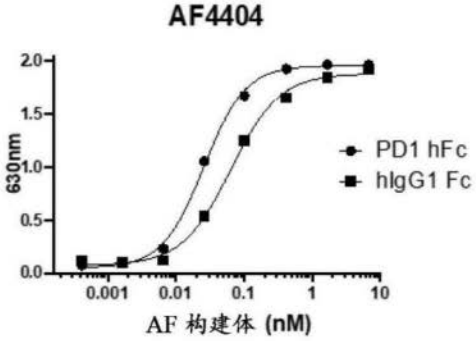


图 17D

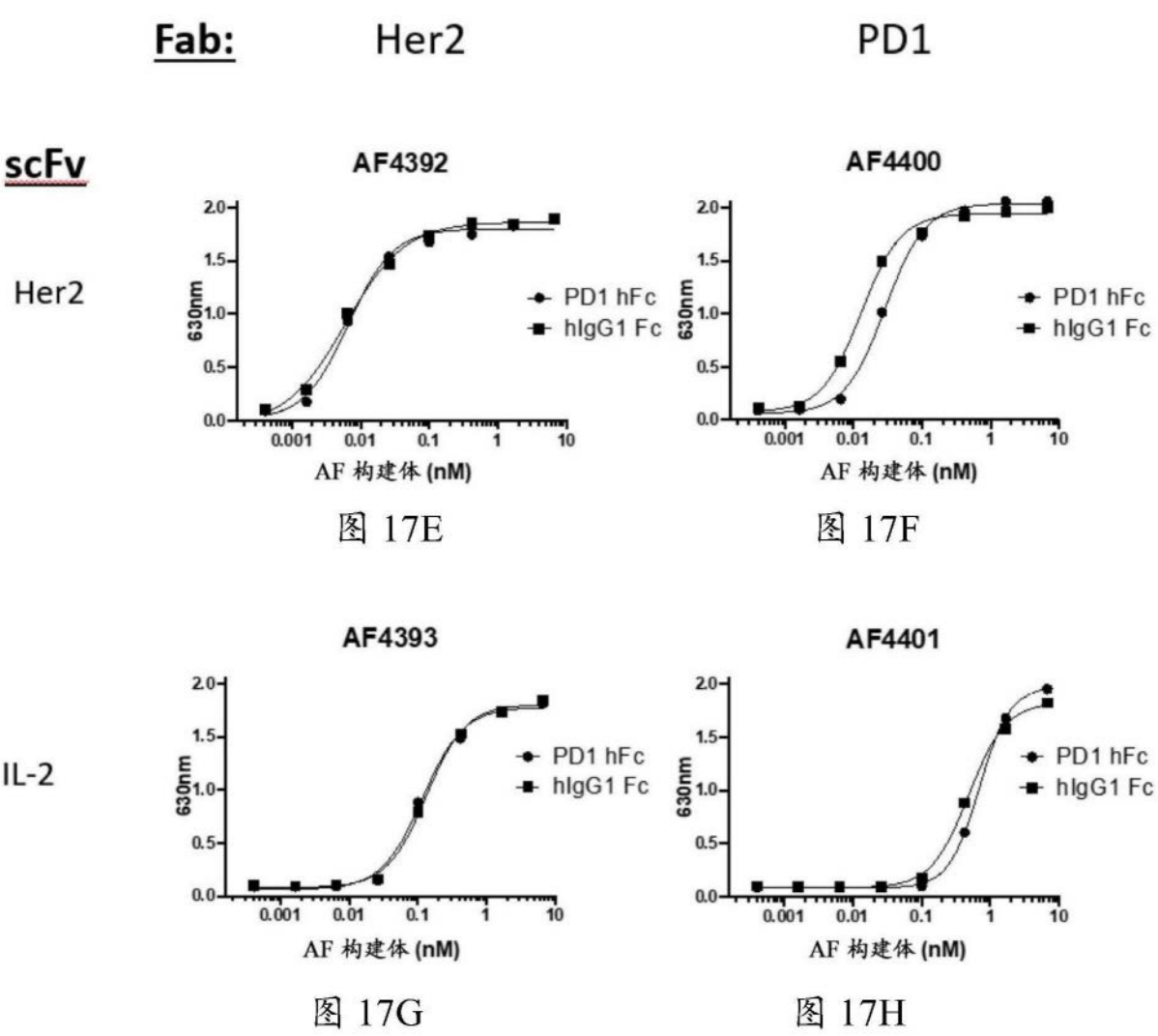


图 17E 图 17F

图 17G 图 17H

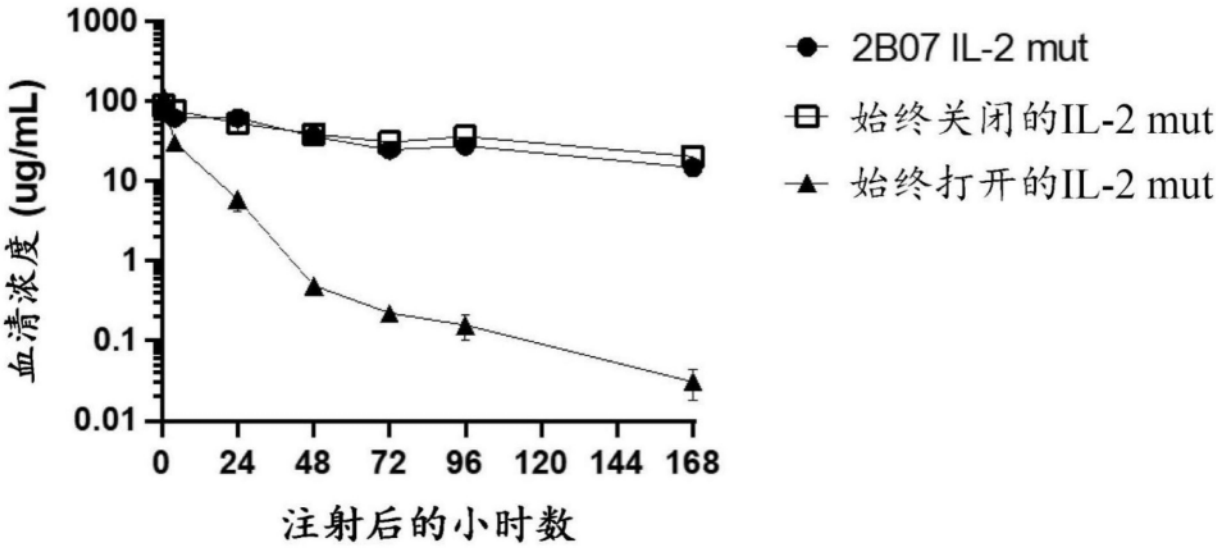

1000
100
10
1
0.1
0.01
血清浓度 (ug/mL)
0
24
48
72
96
120
144
168
注射后的小时数
2B07 IL-2 mut
始终关闭的IL-2 mut
始终打开的IL-2 mut

图18

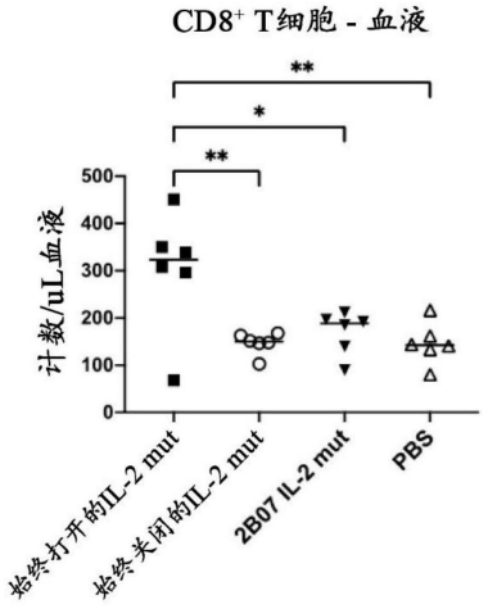

CD8+ T细胞 - 血液
**
*
**
500
400
300
200
100
0
计数/uL血液
始终打开的IL-2 mut
始终关闭的IL-2 mut
2B07 IL-2 mut
PBS

图19A

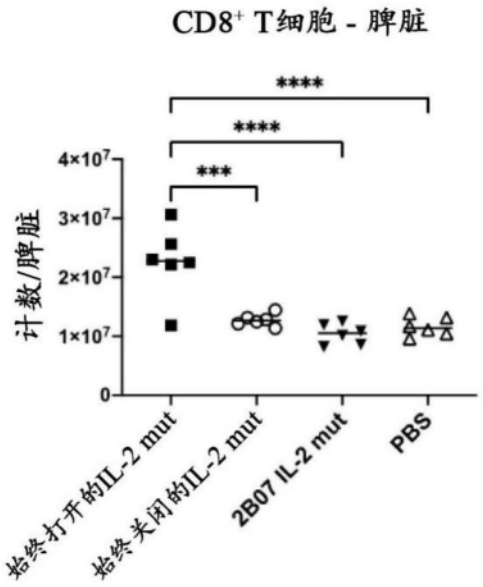

CD8+ T细胞 - 脾脏
****
****
***
4×10^7
3×10^7
2×10^7
1×10^7
0
计数/脾脏
始终打开的IL-2 mut
始终关闭的IL-2 mut
2B07 IL-2 mut
PBS

图19B

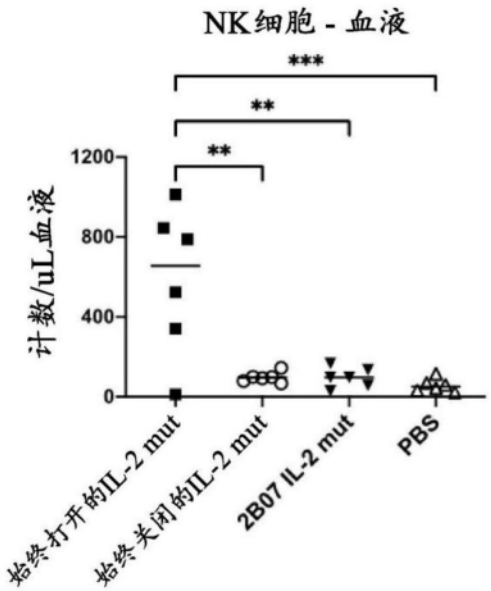

NK细胞 - 血液
***
**
**
1200
800
400
0
计数/uL血液
始终打开的IL-2 mut
始终关闭的IL-2 mut
2B07 IL-2 mut
PBS

图19C

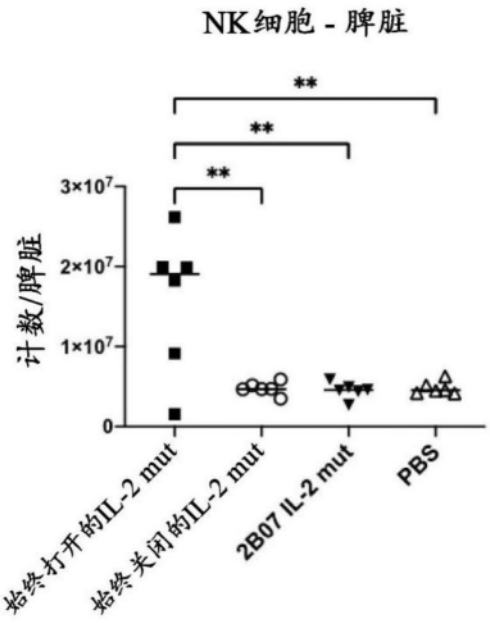

NK细胞 - 脾脏
**
**
**
3×10^7
2×10^7
1×10^7
0
计数/脾脏
始终打开的IL-2 mut
始终关闭的IL-2 mut
2B07 IL-2 mut
PBS

图19D

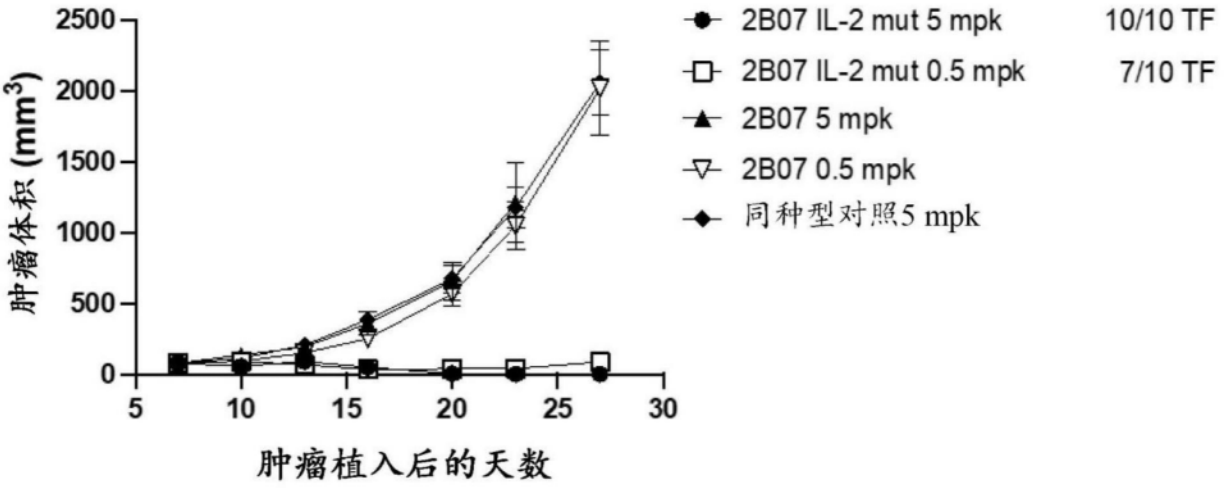

2500
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm3)
5
10
15
20
25
30
肿瘤植入后的天数
2B07 IL-2 mut 5 mpk 10/10 TF
2B07 IL-2 mut 0.5 mpk 7/10 TF
2B07 5 mpk
2B07 0.5 mpk
同种型对照5 mpk

图20

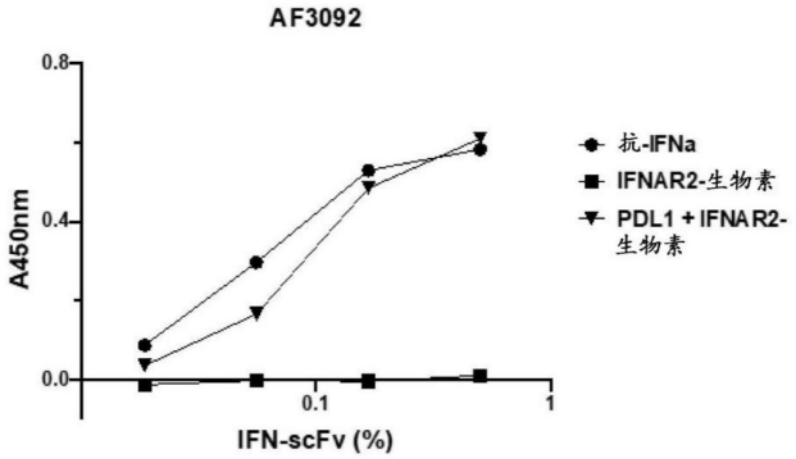


图21A

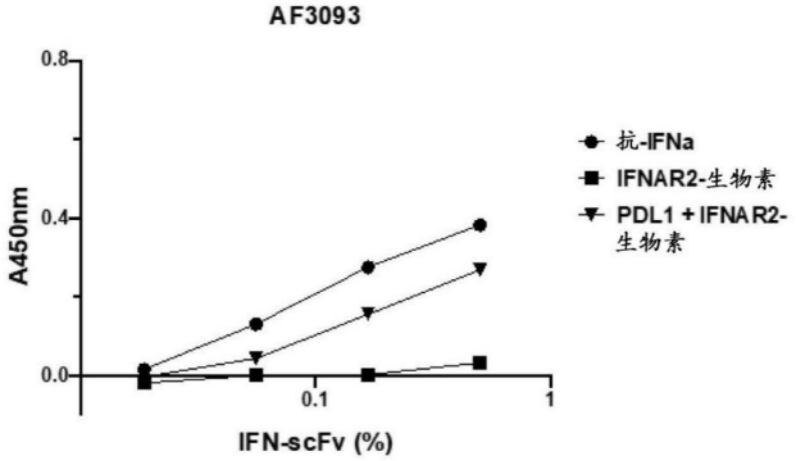


图21B

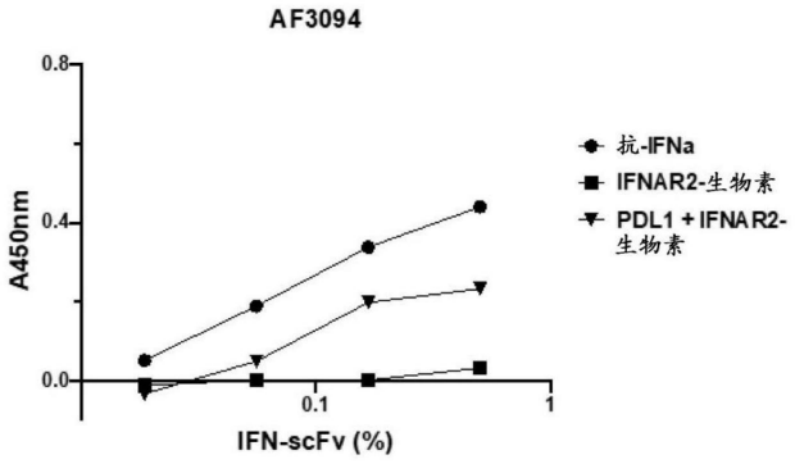


图21C

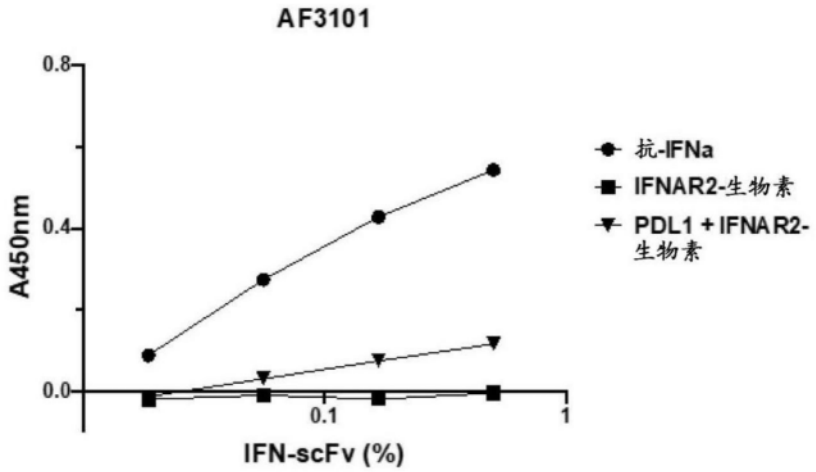


图21D

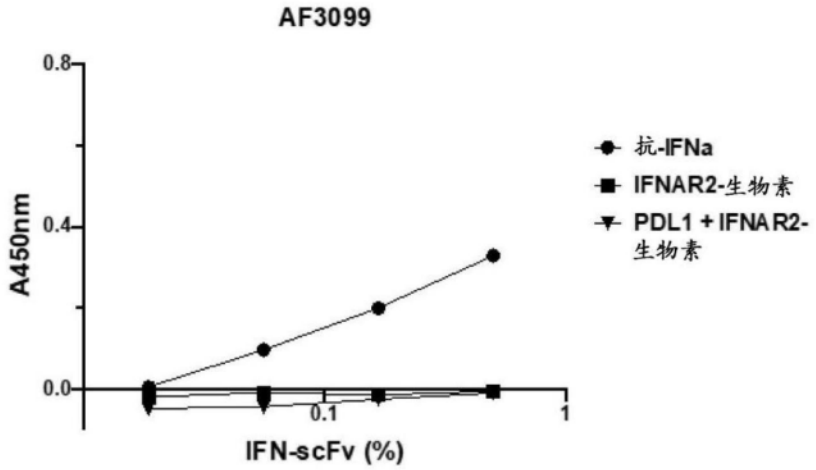


图21E

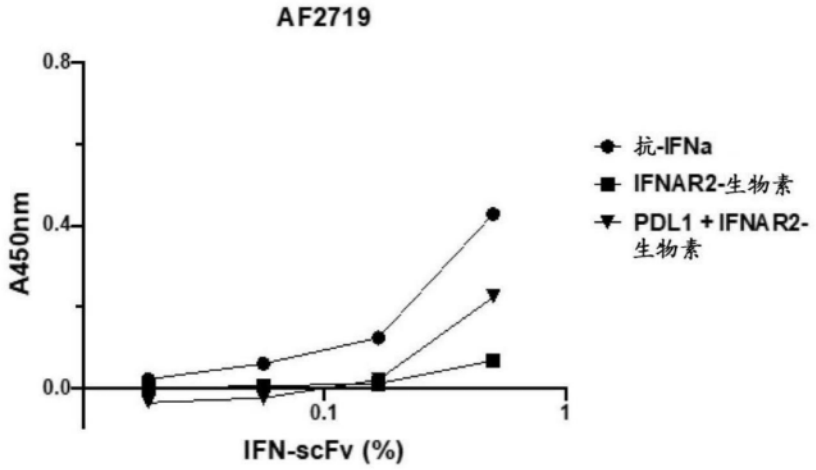


图21F

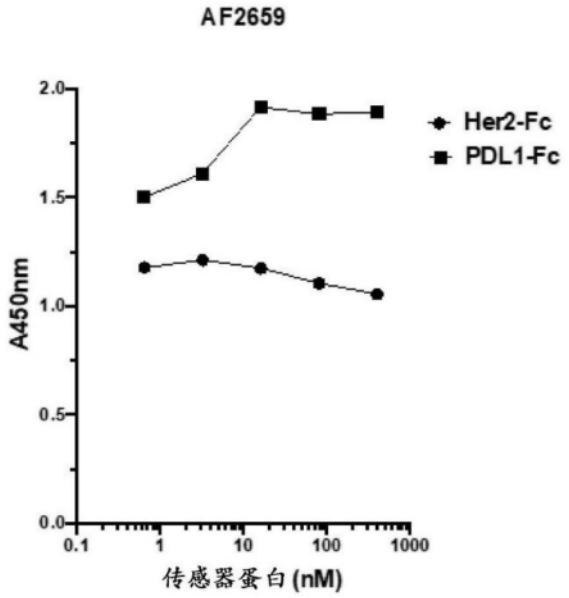

AF2659
Her2-Fc
PDL1-Fc
A450nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
传感器蛋白(nM)

图22A

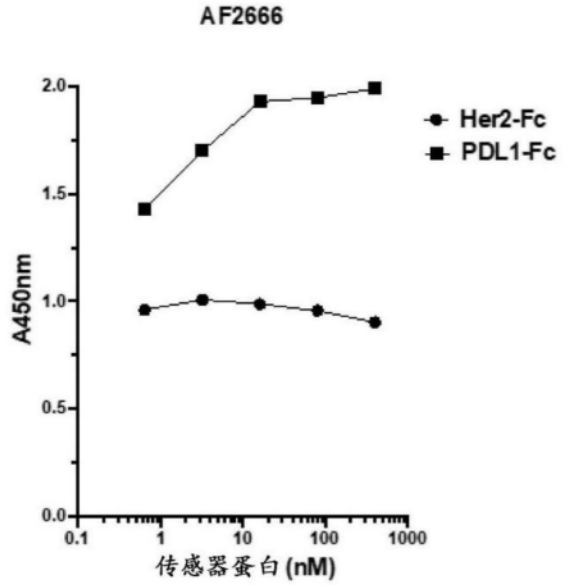

AF2666
Her2-Fc
PDL1-Fc
A450nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
传感器蛋白(nM)

图22B

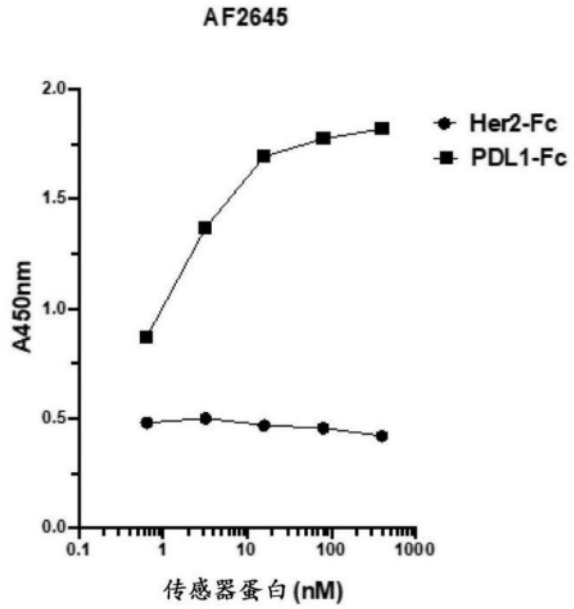

AF2645
Her2-Fc
PDL1-Fc
A450nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
传感器蛋白(nM)

图22C

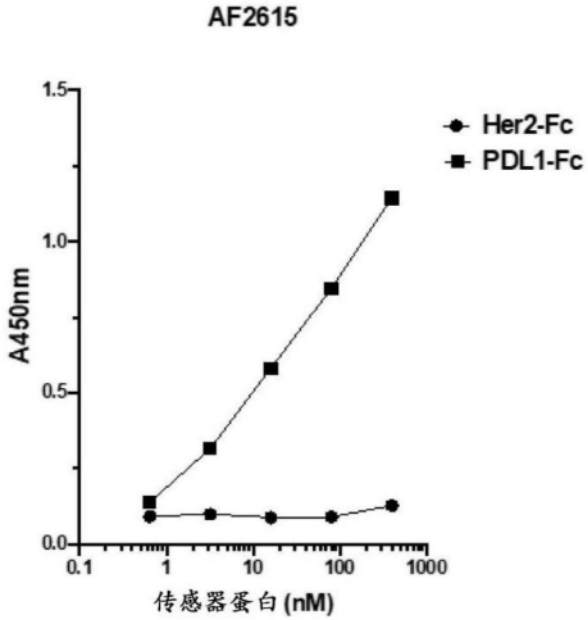

AF2615
Her2-Fc
PDL1-Fc
A450nm
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
传感器蛋白(nM)

图22D

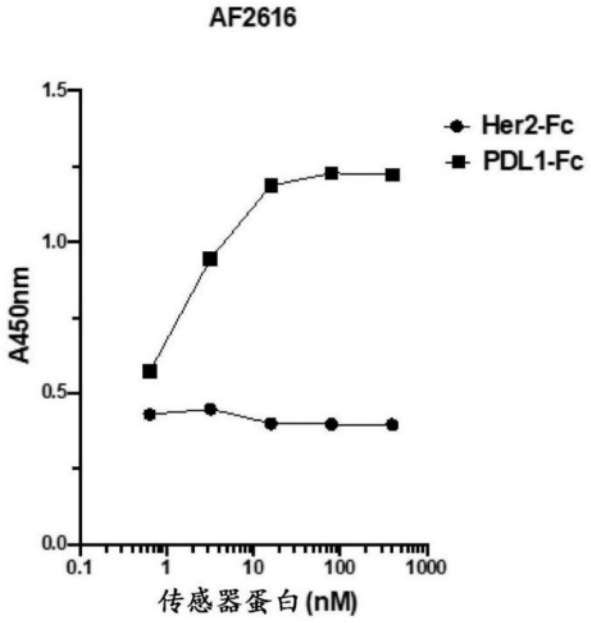

AF2616
Her2-Fc
PDL1-Fc
A450nm
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
传感器蛋白(nM)

图22E

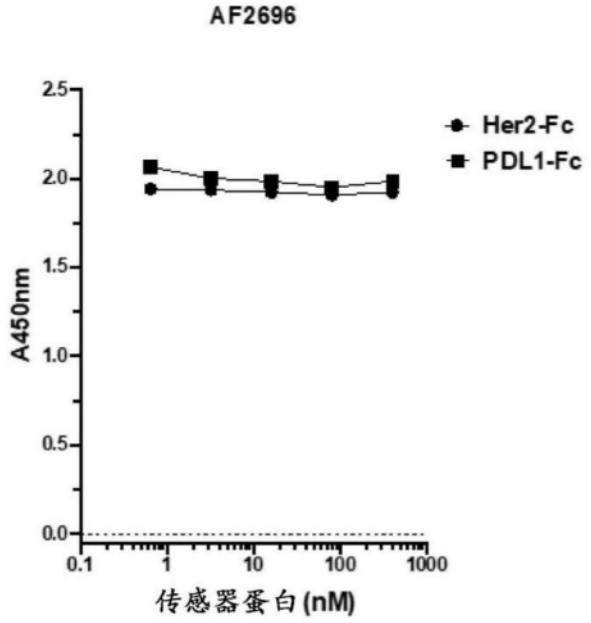

AF2696
Her2-Fc
PDL1-Fc
A450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
传感器蛋白(nM)

图22F

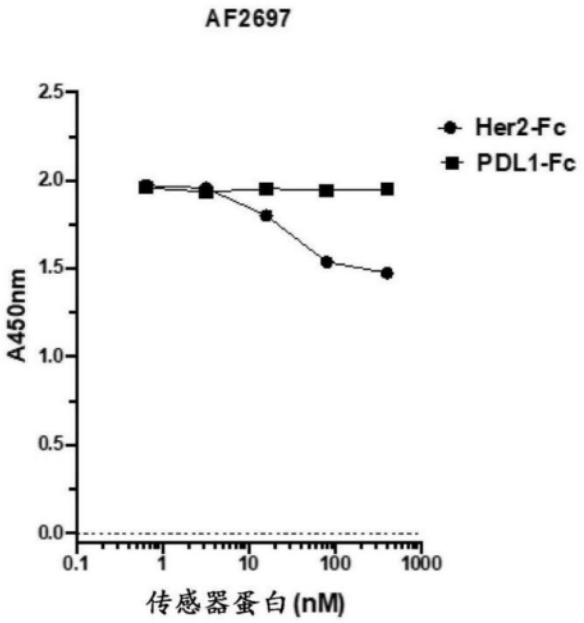

AF2697
Her2-Fc
PDL1-Fc
A450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
传感器蛋白(nM)

图22G

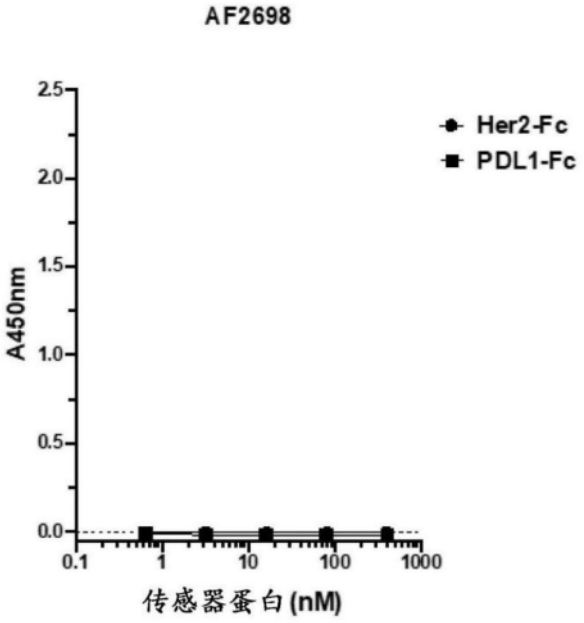

AF2698
Her2-Fc
PDL1-Fc
A450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
1000
传感器蛋白(nM)

图22H

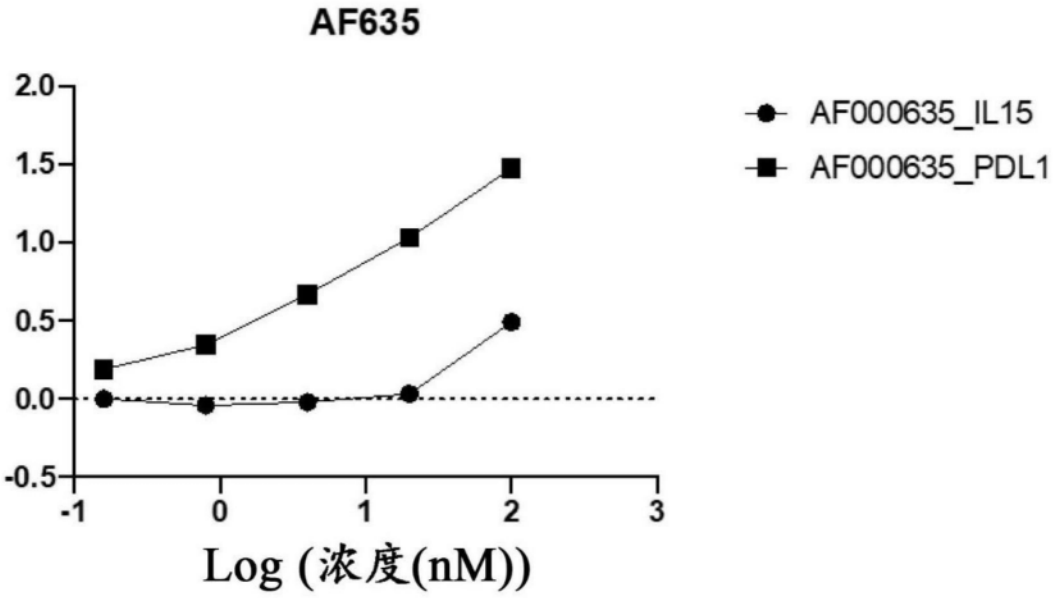

AF635
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1
0
1
2
3
Log (浓度(nM))
AF000635_IL15
AF000635_PDL1

图23A

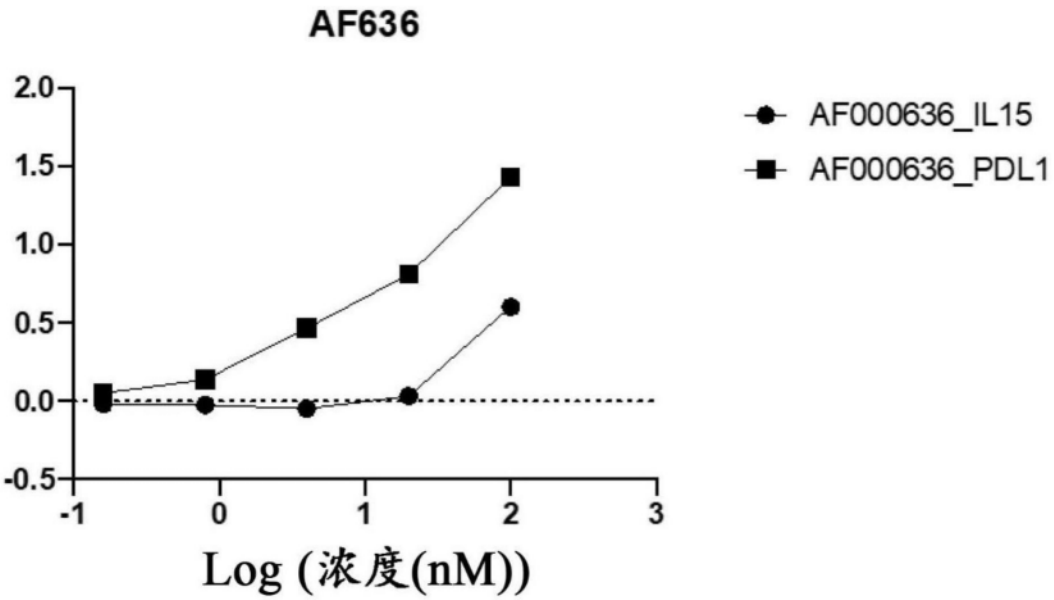

AF636
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1
0
1
2
3
Log (浓度(nM))
AF000636_IL15
AF000636_PDL1

图23B

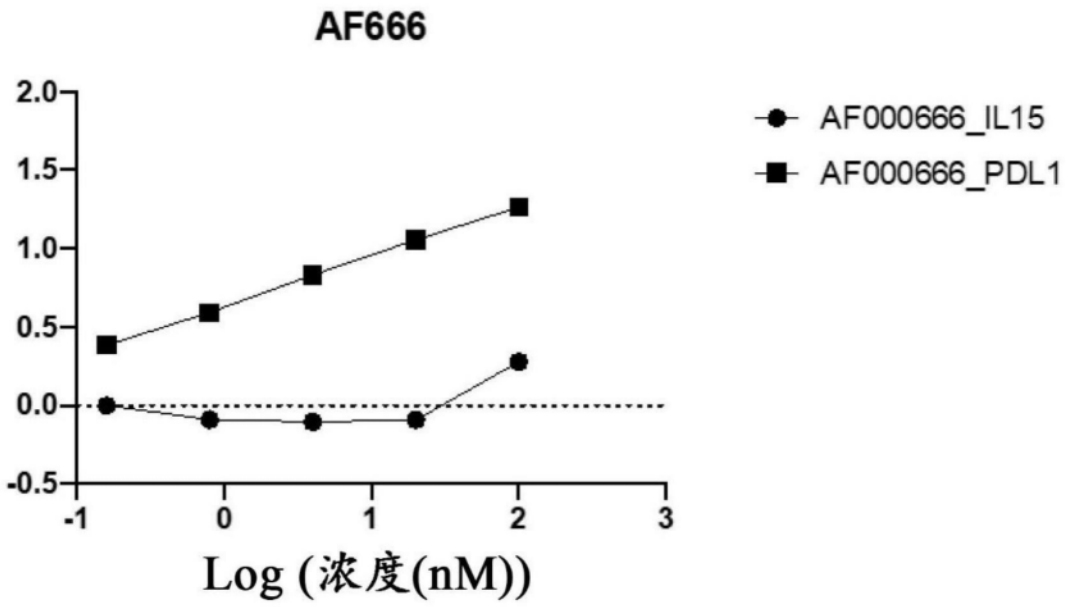

AF666
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1
0
1
2
3
Log (浓度(nM))
AF000666_IL15
AF000666_PDL1

图23C

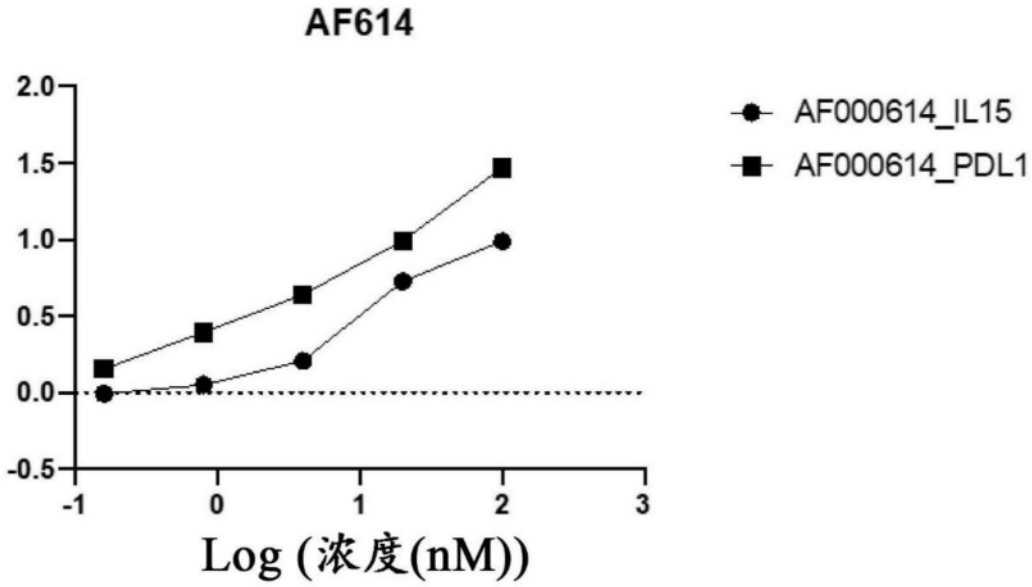

AF614
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1
0
1
2
3
Log (浓度(nM))
AF000614_IL15
AF000614_PDL1

图23D

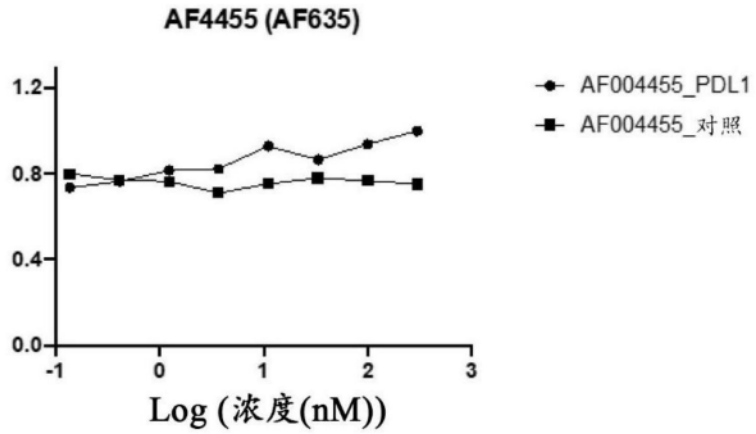


图24A

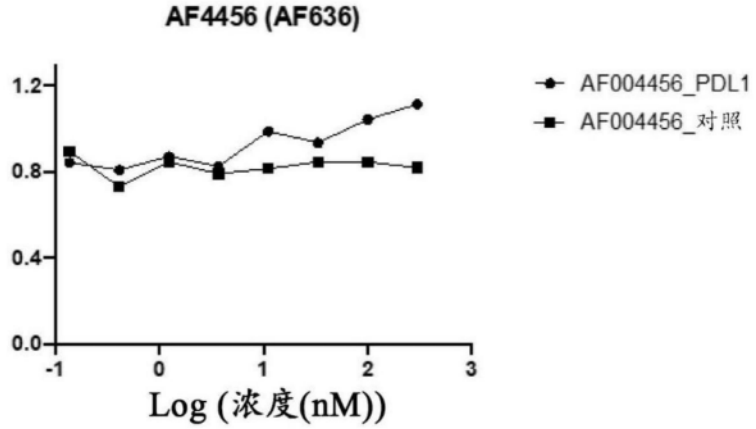


图24B

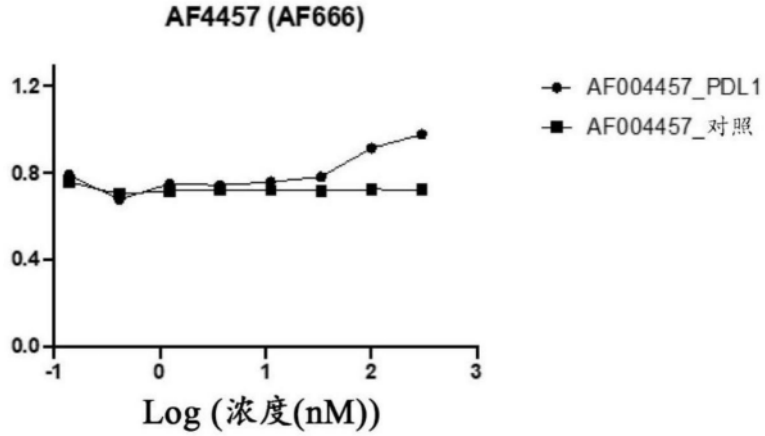


图24C

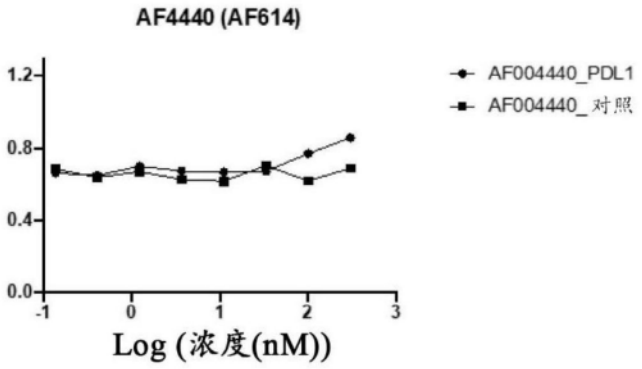


图24D

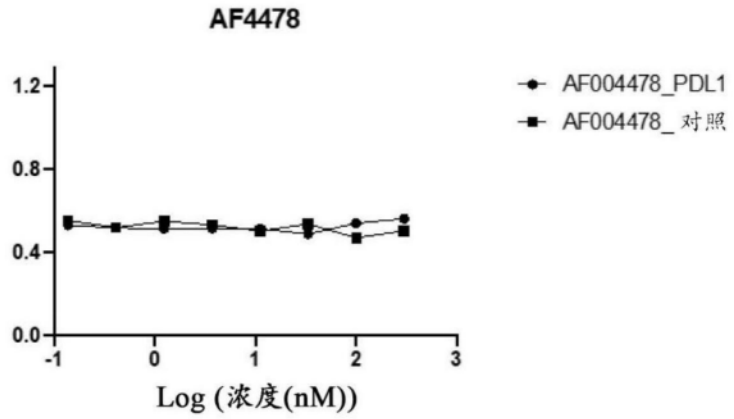


图24E

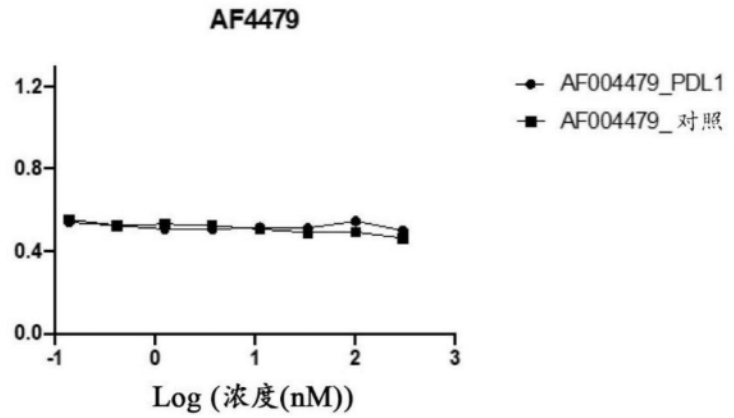


图24F

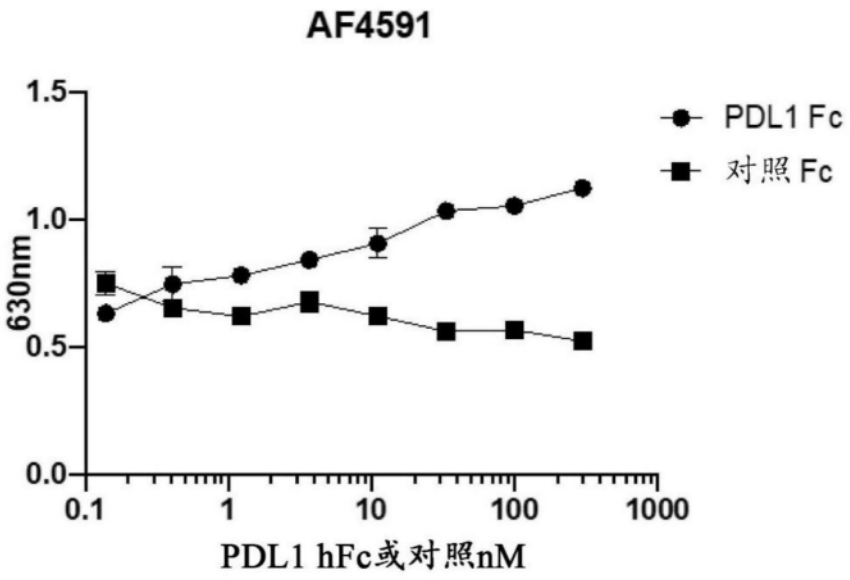

AF4591
1.5
1.0
0.5
0.0
630nm
0.1
1
10
100
1000
PDL1 hFc或对照nM
PDL1 Fc
对照 Fc

图25A

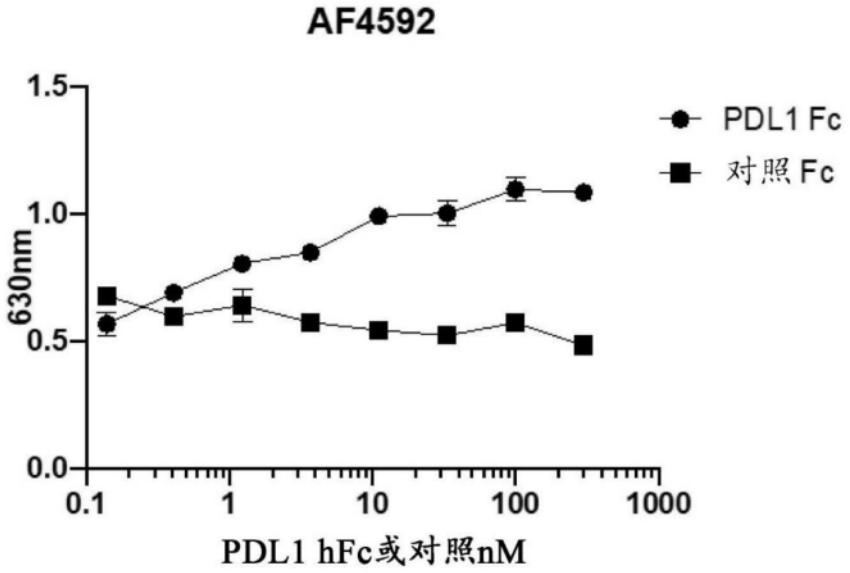

AF4592
1.5
1.0
0.5
0.0
630nm
0.1
1
10
100
1000
PDL1 hFc或对照nM
PDL1 Fc
对照 Fc

图25B

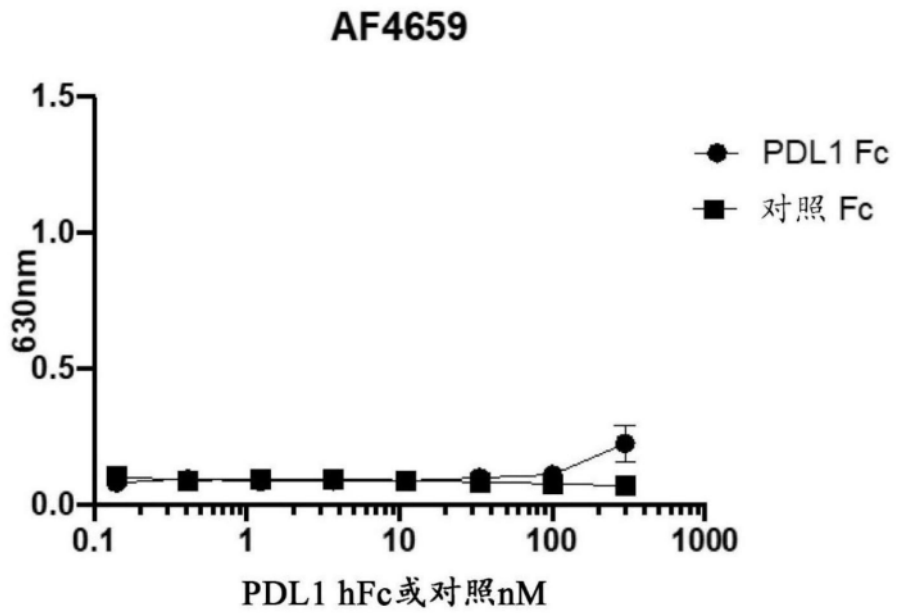

AF4659
1.5
1.0
0.5
0.0
630nm
0.1
1
10
100
1000
PDL1 hFc或对照nM
PDL1 Fc
对照 Fc

图25C

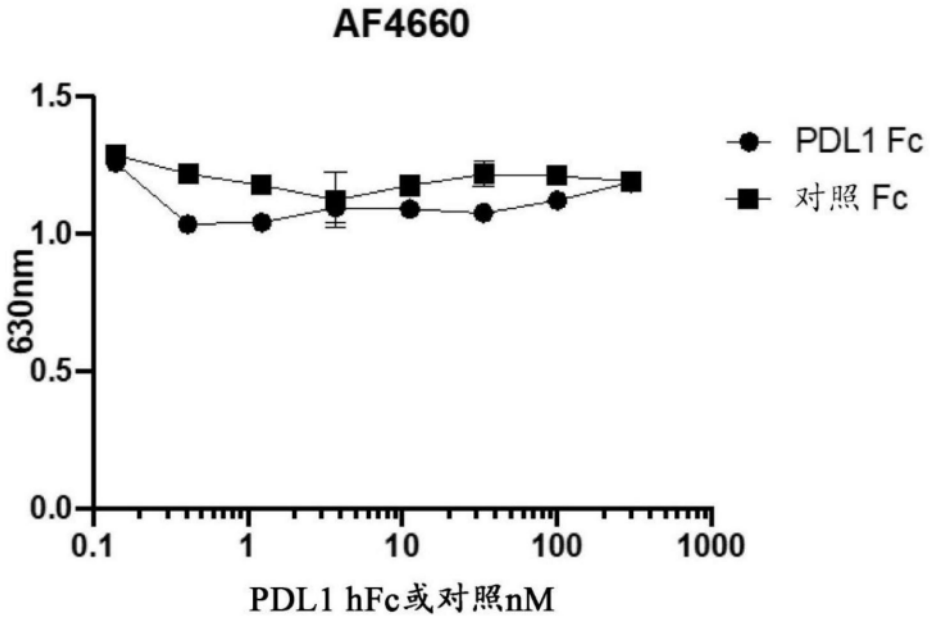

AF4660
1.5
1.0
0.5
0.0
630nm
0.1
1
10
100
1000
PDL1 hFc或对照nM
PDL1 Fc
对照 Fc

图25D

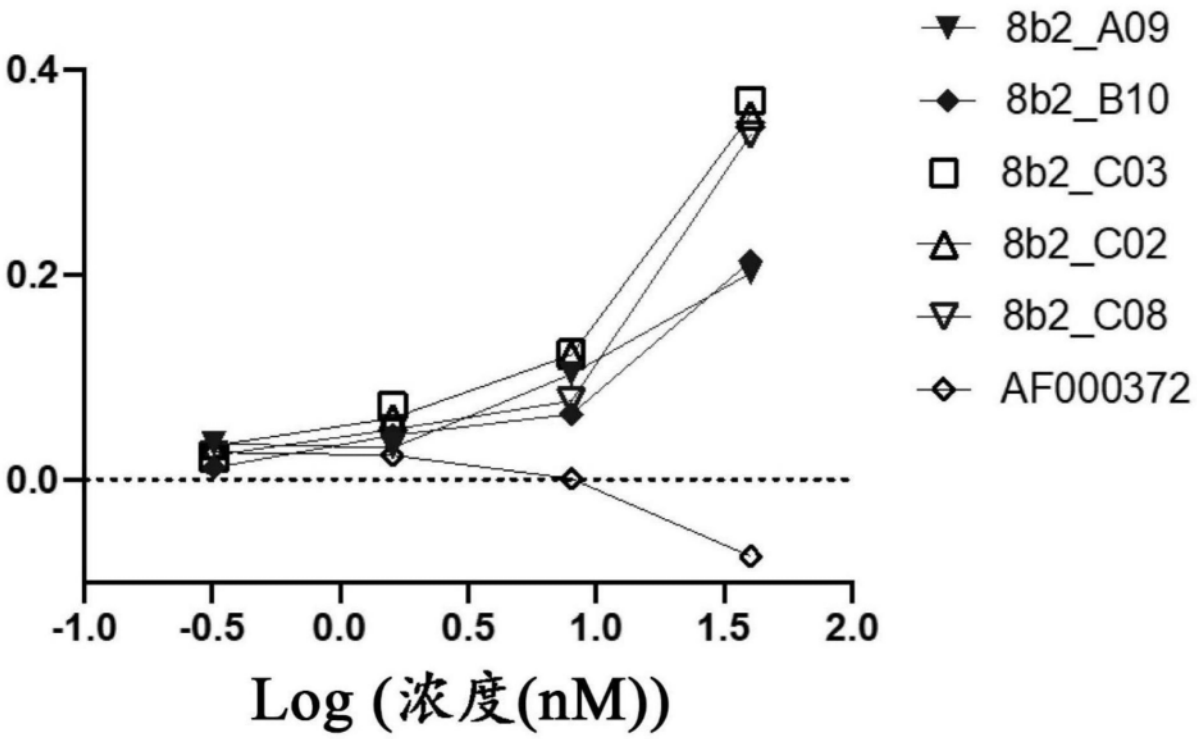

8b2_A09
8b2_B10
8b2_C03
8b2_C02
8b2_C08
AF000372
0.4
0.2
0.0
-1.0
-0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
Log (浓度(nM))

图26

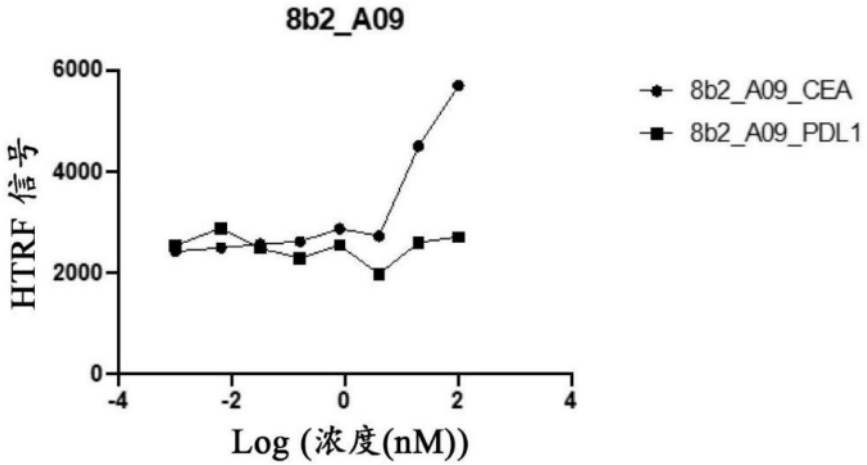

8b2_A09
6000
4000
2000
0
HTRF 信号
-4
-2
0
2
4
Log (浓度(nM))
8b2_A09_CEA
8b2_A09_PDL1

图27A

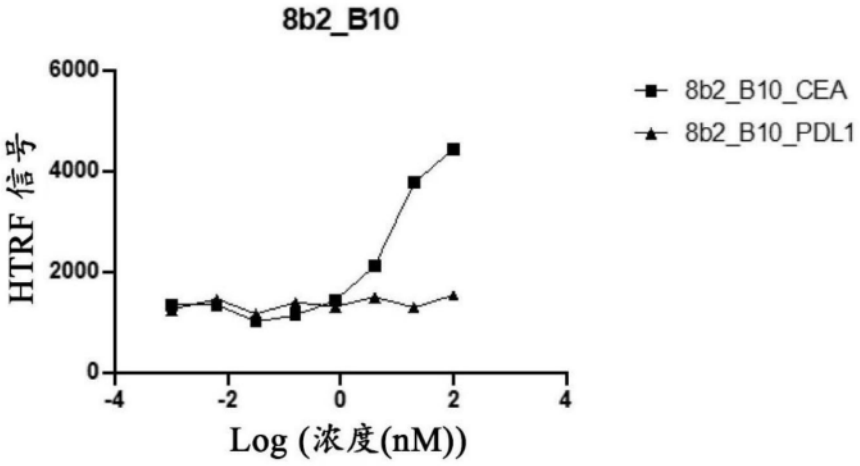


图27B

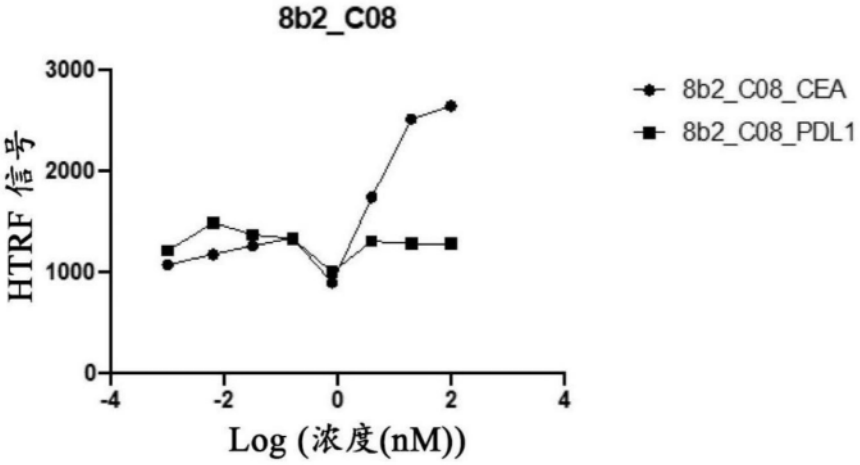


图27C

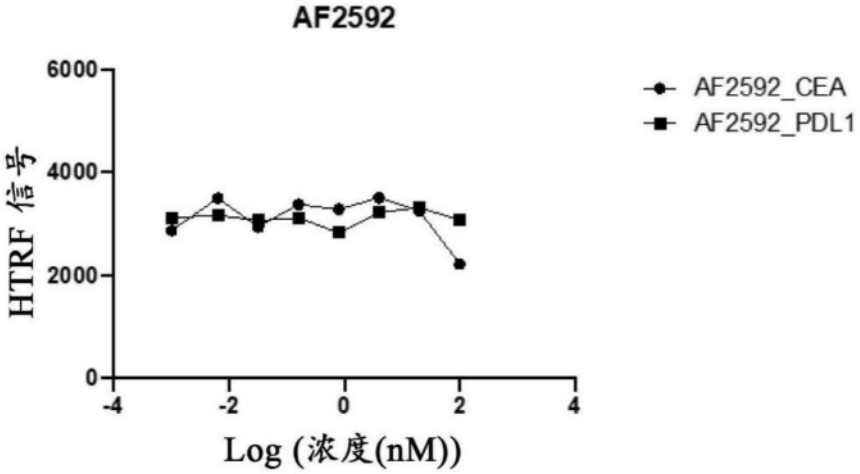


图27D

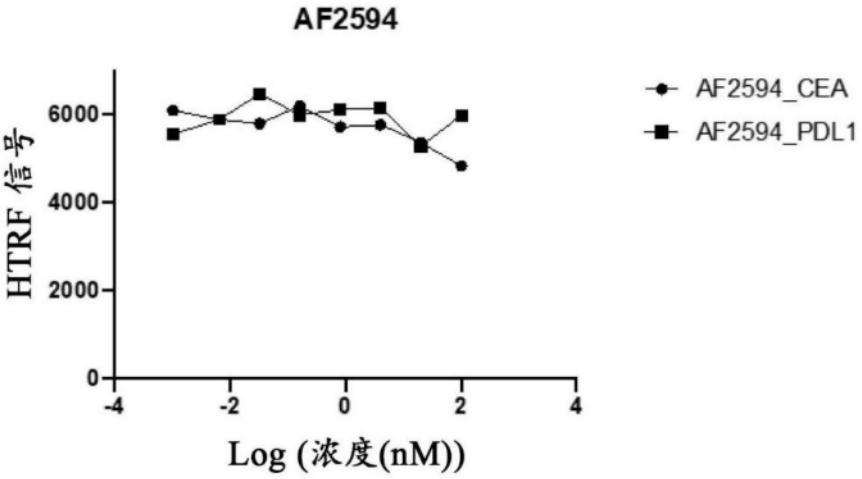

AF2594
HTRF 信号
6000
4000
2000
0
-4
-2
0
2
4
Log (浓度(nM))
AF2594_CEA
AF2594_PDL1

图27E

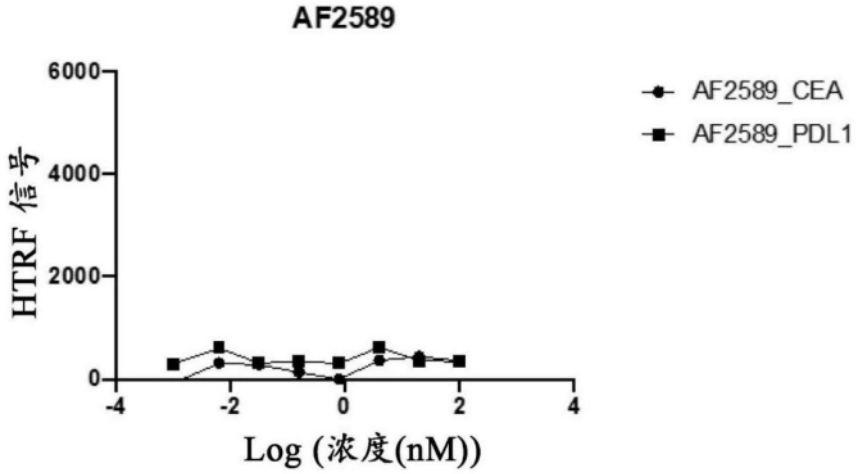

AF2589
HTRF 信号
6000
4000
2000
0
-4
-2
0
2
4
Log (浓度(nM))
AF2589_CEA
AF2589_PDL1

图27F

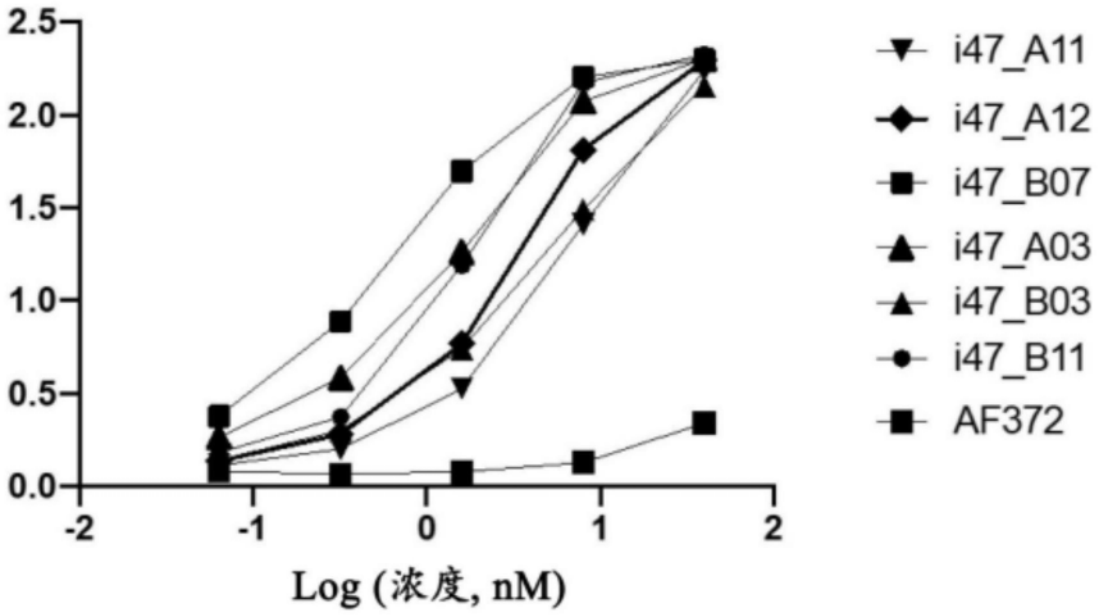


图28A

克隆ID	IFNα结合 (@5uM)	ELISA	序列
i47_A03	+	-	SEQ ID NO: 262
I47_A11	+	-	N/A
I47_A12	+	-	N/A
I47_B03	+	-	SEQ ID NO: 263
I47_B07	+	-	SEQ ID NO: 264
I47_B11	+	-	SEQ ID NO: 264
AF317	(KD < 10nM)	+++	SEQ ID NO: 257
AF372	-	-	SEQ ID NO: 258

图28B

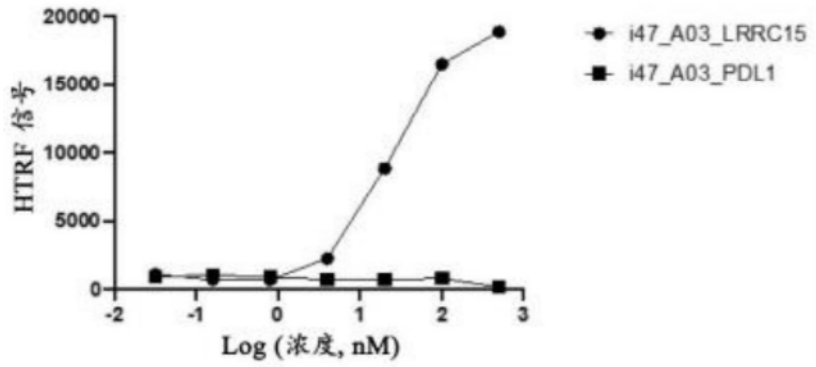


图29A

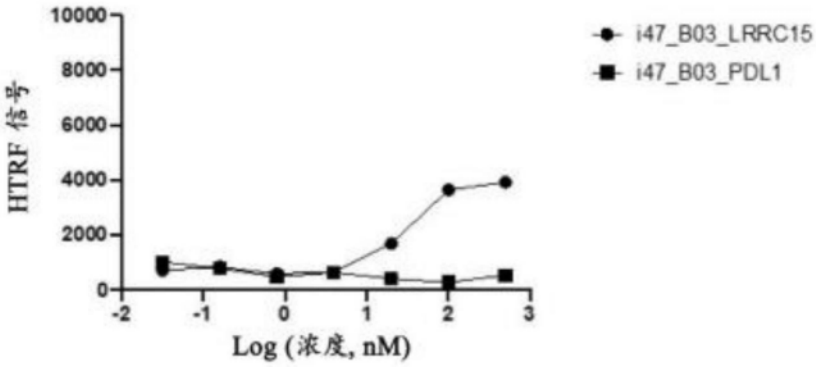


图29B

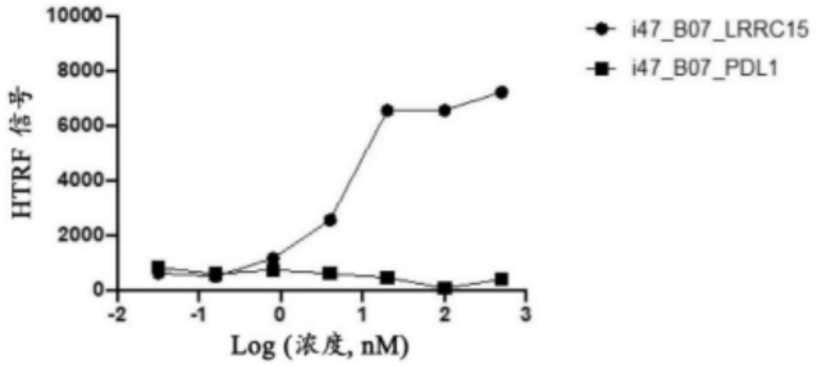


图29C

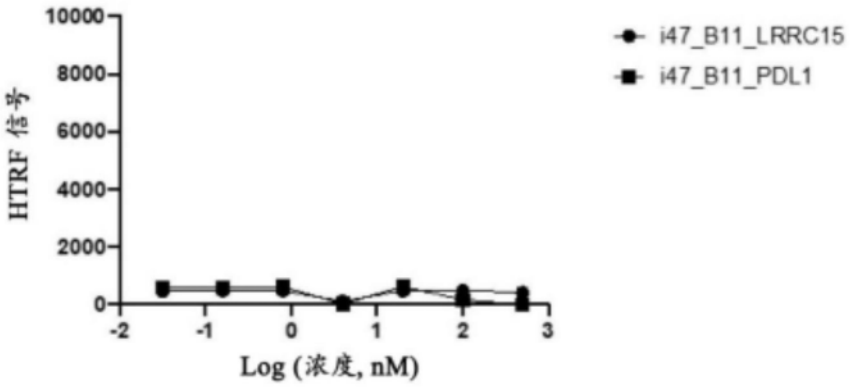


图29D

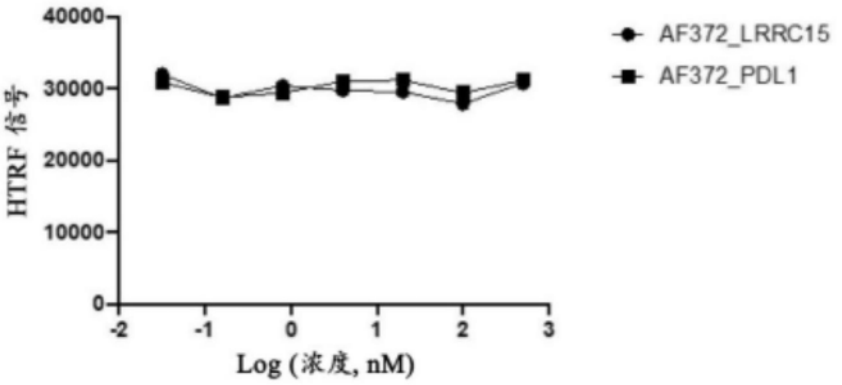


图29E

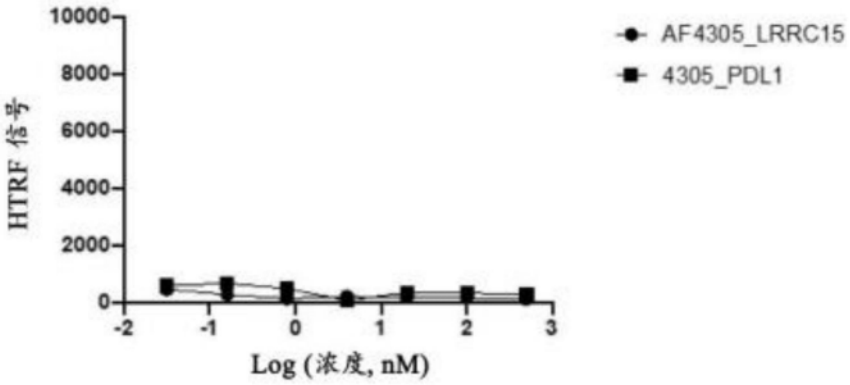


图29F