



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116390948 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 04

(21) 申请号 202180072768.8

顾怡

(22) 申请日 2021.11.18

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

(66) 本国优先权数据

专利代理师 吴瑜 顾云峰

PCT/CN2020/129918 2020.11.18 CN

PCT/CN2021/073341 2021.01.22 CN

(51) Int.Cl.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/28 (2006.01)

2023.04.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2021/131389 2021.11.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/105817 EN 2022.05.27

(71) 申请人 苏州创胜医药集团有限公司

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区

星湖街218号生物纳米园B6-501室

权利要求书10页 说明书90页

(72) 发明人 钱雪明 李红俊 滕菲 郭欢欢

序列表82页 附图26页

(54) 发明名称

双功能分子

(57) 摘要

本公开提供了包括PD-L1结合部分的蛋白质,所述PD-L1结合部分与TGF β 结合部分、IL-1结合部分、免疫刺激性多肽(例如,可溶性LAG3或可溶性CD4)或CD47结合部分连接;编码所述蛋白质的分离的多核苷酸;包含所述蛋白质的药物组合物和所述蛋白质、所述多核苷酸、所述药物组合物的用途。

1. 一种双功能分子,其包括与免疫检查点分子结合的第一部分和阻断白细胞介素-1 (IL-1)活性的第二部分。

2. 根据权利要求1所述的双功能分子,其中所述第一部分包括免疫刺激性检查点分子的激动剂,任选地,所述免疫刺激性检查点分子选自由以下组成的组:CD27、CD70、CD28、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、CD40、CD40L (CD154)、CD122、CD137、CD137L、OX40 (CD134)、OX40L (CD252)、GITR、ICOS (CD278) 和ICOSLG (CD275)、CD2、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、Nkp80、CD160和CD83。

3. 根据权利要求1所述的双功能分子,其中所述第一部分包括免疫抑制性检查点分子的拮抗剂,任选地,所述免疫抑制性检查点分子选自由以下组成的组:A2AR、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、BTLA (CD272)、CTLA-4 (CD152)、IDO1、IDO2、TDO、KIR、LAG3、NOX2、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 (CD328)、TIGIT、PVR (CD155)、SIGLEC9 (CD329)、CD160、LAIR1、2B4 (CD244)、CD47、B7-H5。

4. 根据权利要求3所述的双功能分子,其中所述免疫检查点分子是PD-L1。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的双功能分子,其中所述第一部分包括针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段,并且所述第二部分包括IL-1结合部分或IL-1受体 (IL-1R) 结合部分。

6. 根据权利要求5所述的双功能分子,其中所述IL-1结合部分包括IL-1R或其片段或变体、或针对IL-1的抗体或其抗原结合片段。

7. 根据权利要求6所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和/或轻链可变区来自选自由以下组成的组的抗IL-1 α 抗体:XB2001、鲁吉珠单抗、LY2189102和贝迈奇单抗,或者来自选自由以下组成的组的抗IL-1 β 抗体:SSGJ-613、CDP484、卡那单抗和吉伏组单抗。

8. 根据权利要求6所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:112的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:113的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:114的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:115的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:108或SEQ ID NO:116的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:117的序列的LCDR3。

9. 根据权利要求6所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:104的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:105的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:106的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:107的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:108的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:109的序列的LCDR3。

10. 根据权利要求6所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:112的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:113的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:114的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:115的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:116的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:117的序列的LCDR3。

11. 根据权利要求6所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包

括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:110和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:111和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

12. 根据权利要求6所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:102和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:103和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

13. 根据权利要求6所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:110和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:111和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

14. 根据权利要求5所述的双功能分子,其中所述IL-1R结合部分包括白细胞介素-1受体拮抗剂或其片段或变体、或针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段。

15. 根据权利要求14所述的双功能分子,其中所述针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和/或轻链可变区来自选自由以下组成的组的抗体:司柏索单抗、艾特利单抗、伊姆西多单抗、AMG 108、迈瑞利单抗、尼达利单抗、MEDI8968、REGN6490、HB0034和CSC012。

16. 一种双功能分子,其包括与PD-L1结合的第一部分和a) 阻断免疫抑制性细胞因子的活性或b) 刺激免疫的第二部分,其中所述第一部分包括针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变(VH)区和/或轻链可变(VL)区,其中所述重链可变区包括:

a) HCDR1,所述HCDR1包括DYVMN(SEQ ID NO:1)或与DYVMN具有至少80%序列同一性的同源序列,

b) HCDR2,所述HCDR2包括DINPNX₁X₂TX₃YNHKFKG(SEQ ID NO:19)或与DINPNX₁X₂TX₃YNHKFKG具有至少80%序列同一性的同源序列,以及

c) HCDR3,所述HCDR3包括WGDGPFAY(SEQ ID NO:3)或与WGDGPFAY具有至少80%序列同一性的同源序列,和/或

其中所述轻链可变区包括:

d) LCDR1,所述LCDR1包括选自由KASQNVX₄X₅X₆VA(SEQ ID NO:20)或与KASQNVX₄X₅X₆VA具有至少80%序列同一性的同源序列组成的组的序列,

e) LCDR2,所述LCDR2包括选自由SX₇SX₈RYT(SEQ ID NO:21)或与SX₇SX₈RYT具有至少80%序列同一性的同源序列组成的组的序列,以及

f) LCDR3,所述LCDR3包括选自由QQYSNYPT(SEQ ID NO:6)或与QQYSNYPT具有至少80%序列同一性的同源序列组成的组的序列;

其中X₁是G或A,X₂是G或D或Q或E或L,X₃是S或M或Q或L或V,X₄是G或P或K,X₅是A或G,X₆是A或I,X₇是A或N或R或V,并且X₈是N或H或V或D。

17. 根据权利要求16所述的双功能分子,其中所述重链可变区包括:

a) HCDR1,所述HCDR1包括SEQ ID NO:1的序列,

b) HCDR2, 所述HCDR2包括选自由以下组成的组的序列: SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18, 以及

c) HCDR3, 所述HCDR3包括SEQ ID NO:3的序列,
和/或

轻链可变区, 所述轻链可变区包括:

d) LCDR1, 所述LCDR1包括选自由以下组成的组的序列: SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,

e) LCDR2, 所述LCDR2包括选自由以下组成的组的序列: SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12, 以及

f) LCDR3, 所述LCDR3包括SEQ ID NO:6的序列。

18. 根据权利要求17所述的双功能分子, 其中所述重链可变区选自由以下组成的组:

a) 包括以下的重链可变区: 包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:2的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3;

b) 包括以下的重链可变区: 包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:13的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3;

c) 包括以下的重链可变区: 包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:14的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3;

d) 包括以下的重链可变区: 包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:15的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3; 以及

e) 包括以下的重链可变区: 包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:17的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3。

19. 根据权利要求17或18所述的双功能分子, 其中所述轻链可变区选自由以下组成的组:

a) 包括以下的轻链可变区: 包括SEQ ID NO:4的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:5的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3;

b) 包括以下的轻链可变区: 包括SEQ ID NO:9的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:5的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3;

c) 包括以下的轻链可变区: 包括SEQ ID NO:8的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:5的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3;

d) 包括以下的轻链可变区: 包括SEQ ID NO:4的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:12的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3; 以及

e) 包括以下的轻链可变区: 包括SEQ ID NO:4的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:11的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3。

20. 根据权利要求16到19中任一项所述的双功能分子, 其中所述针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一个或多个, 和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一个或多个, 其中:

a) 所述HFR1包括QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX₉FT (SEQ ID NO:40) 或与QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX₉FT具有至少80%序列同一性的同源序列,

b) 所述HFR2包括WVRQAPGQX₁₀LEWMG (SEQ ID NO:41) 或与WVRQAPGQX₁₀LEWMG具有至少

80%序列同一性的同源序列,

c) 所述HFR3序列包括RVTX₁₆TVDX₁₁SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCX₁₂X₁₃(SEQ ID NO:42)或与RVTX₁₆TVDX₁₁SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCX₁₂X₁₃具有至少80%序列同一性的同源序列,

d) 所述HFR4包括WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:25)或与WGQGTLVTVSS具有至少80%序列同一性的同源序列,

e) 所述LFR1包括DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:26)或与DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC具有至少80%序列同一性的同源序列,

f) 所述LFR2包括WYQQKPGKX₁₄PKLLIY(SEQ ID NO:43)或与WYQQKPGKX₁₄PKLLIY具有至少80%序列同一性的同源序列,

g) 所述LFR3包括GVPX₁₅RFSGSGSGTDFTX₁₇TISSLQPEDIATYYC(SEQ ID NO:44)或与GVPX₁₅RFSGSGSGTDFTX₁₇TISSLQPEDIATYYC具有至少80%序列同一性的同源序列,并且

h) 所述LFR4包括FGQGTKLEIK(SEQ ID NO:29)或与FGQGTKLEIK具有至少80%序列同一性的同源序列,

其中X₉是T或V,X₁₀是G或S,X₁₁是T或K,X₁₂是A或V,X₁₃是R或K,X₁₄是A或S,X₁₅是S或D,X₁₆是M或V,并且X₁₇是F或L。

21. 根据权利要求20所述的双功能分子,其中:

所述HFR1包括选自由SEQ ID NO:22和30组成的组的序列,

所述HFR2包括选自由SEQ ID NO:23和31组成的组的序列,

所述HFR3包括选自由SEQ ID NO:24和32-35组成的组的序列,

所述HFR4包括SEQ ID NO:25的序列,

所述LFR1包括来自由SEQ ID NO:26组成的组的序列,

所述LFR2包括选自由SEQ ID NO:27和36组成的组的序列,

所述LFR3包括选自由SEQ ID NO:28和37-38、39、45组成的组的序列,并且所述LFR4包括SEQ ID NO:29的序列。

22. 根据权利要求16到21中任一项所述的双功能分子,其中所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60和与其具有至少80%序列同一性的其同源序列。

23. 根据权利要求16到22中任一项所述的双功能分子,其中所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65和与其具有至少80%序列同一性的其同源序列。

24. 根据权利要求16所述的双功能分子,其中所述针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段包括选自由以下组成的组的一对重链可变区和轻链可变区序列:SEQ ID NO:49/54、50/54、51/54、52/54、49/55、50/55、51/55、52/55、58/62、58/63、58/64、58/65、59/62、59/63、59/64、59/65、60/62、60/63、60/64和60/65。

25. 根据权利要求16到24中任一项所述的双功能分子,其中所述针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段进一步包括一个或多个氨基酸残基取代或修饰,但仍保留对PD-L1的特定结合特异性和/或亲和力。

26. 根据权利要求25所述的双功能分子,其中所述取代或修饰中的至少一个取代或修饰在所述CDR序列中的一个或多个CDR序列中和/或在所述VH或VL序列的非CDR区中的一个或多个非CDR区中。

27. 根据权利要求16到26中任一项所述的双功能分子,其中所述针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段进一步包括免疫球蛋白恒定区,任选地人Ig的恒定区,或任选地人IgG的恒定区。

28. 根据权利要求27所述的双功能分子,其中所述恒定区包括人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区。

29. 根据权利要求28所述的双功能分子,其中所述恒定区包括Fc变体,所述Fc变体相对于对应野生型Fc区具有降低的效应子功能。

30. 根据权利要求29所述的双功能分子,其中所述Fc变体包括选自以下组成的组的一个或多个氨基酸残基取代:220S、226S、228P、229S、233P、234V、234G、234A、234F、234A、235A、235G、235E、236E、236R、237A、237K、238S、267R、268A、268Q、269R、297A、297Q、297G、309L、318A、322A、325L、328R、330S、331S和其任何组合,其中所述Fc区中的残基的编号为如Kabat中的EU索引的编号。

31. 根据权利要求29到30中任一项所述的双功能分子,其中所述Fc变体包括选自以下组成的组的突变的组合:a) K322A、L234A和L235A;b) P331S、L234F和L235E;c) L234A和L235A;d) N297A;e) N297Q;f) L235E;g) L234A和L235A (IgG1);h) F234A和L235A (IgG4);i) H268Q、V309L、A330S和P331S (IgG2);j) V234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S和P331S (IgG2),其中所述Fc区中的残基的编号为如Kabat中的EU索引的编号。

32. 根据权利要求29到31中任一项所述的双功能分子,其中所述Fc变体包括SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

33. 根据权利要求16到32中任一项所述的双功能分子,其中所述针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段是人源化的。

34. 根据权利要求16到33中任一项所述的双功能分子,其中所述抗原结合片段是双抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双抗体(ds双抗体)、单链抗体分子(scFv)、scFv二聚体(二价双抗体)、多特异性抗体、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、结构域抗体和二价结构域抗体。

35. 根据权利要求16到34中任一项所述的双功能分子,其中所述抗体或其抗原结合片段能够与人PD-L1和食蟹猴PD-L1两者结合。

36. 根据权利要求1到15中任一项所述的双功能分子,其中所述第一部分包括与根据权利要求16到35中任一项所述的抗体或其抗原结合片段竞争结合PD-L1的抗体或其抗原结合片段。

37. 根据权利要求16到36中任一项所述的双功能分子,其中所述免疫抑制性细胞因子包括转化生长因子β(TGF-β)超家族中的细胞因子、IL-1或血管内皮生长因子(VEGF)。

38. 根据权利要求37所述的双功能分子,其中所述TGF-β超家族中的免疫抑制性细胞因子包括TGF-β、骨形态发生蛋白(BMP)、激活素、NODAL和生长和分化因子(GDF)。

39. 根据权利要求16到38中任一项所述的双功能分子,其中所述免疫抑制性细胞因子是TGF-β。

40. 根据权利要求16到39中任一项所述的双功能分子,其中所述第二部分包括TGF β 结合部分。

41. 根据权利要求40所述的双功能分子,其中所述TGF β 结合部分包括可溶性TGF β 受体(TGF β R)或其TGF β 结合片段或变体、或针对TGF β 的抗体和其抗原结合片段。

42. 根据权利要求41所述的双功能分子,其中所述可溶性TGF β R包括所述TGF β R的胞外结构域(ECD)或其TGF β 结合片段或变体。

43. 根据权利要求42所述的双功能分子,其中所述TGF β R选自由以下组成的组:TGF β 受体I(TGF β RI)、TGF β 受体II(TGF β RII)、TGF β 受体III(TGF β RIII)和其任何组合。

44. 根据权利要求42所述的双功能分子,其中所述TGF β R是TGF β RII。

45. 根据权利要求44所述的双功能分子,其中所述TGF β RII相对于TGF β 2和TGF β 3而选择性地结合到TGF β 1。

46. 根据权利要求45所述的双功能分子,其中所述TGF β 1是人TGF β 1或小鼠TGF β 1。

47. 根据权利要求42到46中任一项所述的双功能分子,其中TGF β R的所述ECD包括SEQ ID NO:66、79、78、77的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少80%序列同一性但仍保留对TGF- β 的特定结合特异性和/或亲和力的序列。

48. 根据权利要求36所述的双功能分子,其中所述第二部分包括IL-1结合部分或IL-1受体(IL-1R)结合部分。

49. 根据权利要求48所述的双功能分子,其中所述IL-1结合部分包括可溶性IL-1R、IL-1R的IL-1结合片段或变体、或针对IL-1的抗体或其抗原结合片段。

50. 根据权利要求49所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和/或轻链可变区来自选自由以下组成的组的抗IL-1 α 抗体:XB2001、鲁吉珠单抗、LY2189102和贝迈奇单抗,或者来自选自由以下组成的组的抗IL-1 β 抗体:SSGJ-613、CDP484、卡那单抗和吉伏组单抗。

51. 根据权利要求49所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:112的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:113的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:114的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:115的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:108或SEQ ID NO:116的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:117的序列的LCDR3。

52. 根据权利要求49所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:104的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:105的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:106的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:107的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:108的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:109的序列的LCDR3。

53. 根据权利要求49所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:112的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:113的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:114的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:115的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:116的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:117的序列的LCDR3。

54. 根据权利要求49所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:110和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:111和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

55. 根据权利要求49所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:102和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:103和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

56. 根据权利要求49所述的双功能分子,其中所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:110和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:111和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

57. 根据权利要求49所述的双功能分子,其中所述双功能分子包括重链和/或轻链,所述重链包括SEQ ID NO:118或SEQ ID NO:120的氨基酸序列,所述轻链包括SEQ ID NO:119或SEQ ID NO:121的氨基酸序列。

58. 根据权利要求49所述的双功能分子,其中所述IL-1结合部分包括:IL-1RI的胞外结构域(ECD);IL-1RI、IL-1RI的ECD、IL-1RII或IL-1RII的ECD、或IL-1RAP或IL-1RAP的ECD、IL-1sRI或IL-1sRII中的任一者的IL-1结合片段或变体。

59. 根据权利要求48所述的双功能分子,其中所述IL-1R结合部分包括IL-1Ra或其IL-1结合片段或变体、或针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段。

60. 根据权利要求59所述的双功能分子,其中所述针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和/或轻链可变区来自选自由以下组成的组的抗体:司柏索单抗、艾特利单抗、伊姆西多单抗、AMG 108、迈瑞利单抗、尼达利单抗、MEDI8968、REGN6490、HB0034和CSC012。

61. 根据权利要求60所述的双功能分子,其中所述IL-1R结合部分包括SEQ ID NO:67或76的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:67或76具有至少80%序列同一性的氨基酸序列、或其IL-1结合片段或变体。

62. 根据权利要求48到49中任一项所述的双功能分子,其中所述IL-1是IL-1 α 或IL-1 β 。

63. 根据权利要求62所述的双功能分子,其中所述IL-1 β 是人IL-1 β 。

64. 根据权利要求16到36中任一项所述的双功能分子,其中所述第二部分刺激抗肿瘤免疫并且包括免疫刺激性多肽。

65. 根据权利要求64所述的双功能分子,其中所述免疫刺激性多肽包括白细胞介素(IL)-2(IL-2)、IL-15、IL-21、IL-10、IL-12、IL-23、IL-27、IL-35、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、可溶性CD4、可溶性LAG-3、IFN- α 或其功能等效物。

66. 根据权利要求65所述的双功能分子,其中所述可溶性LAG-3包括所述LAG-3的胞外结构域(ECD)或其MHCII结合变体。

67. 根据权利要求16到36中任一项所述的双功能分子,其中所述第二部分刺激抗肿瘤免疫并且包括免疫抑制性受体信号传导的拮抗剂。

68. 根据权利要求67所述的双功能分子,其中所述免疫抑制性受体是信号调节蛋白 α (SIRP α)。

69. 根据权利要求68所述的双功能分子,其中所述第二部分阻断CD47与SIRP α 之间的相互作用。

70. 根据权利要求69所述的双功能分子,其中所述第二部分包括CD47结合结构域或SIRP α 结合结构域。

71. 根据权利要求70所述的双功能分子,其中所述CD47结合结构域包括可溶性SIRP α 或其CD47结合片段或变体、或抗CD47抗体或其抗原结合片段。

72. 根据权利要求71所述的双功能分子,其中所述可溶性SIRP α 包括所述SIRP α 的胞外结构域(ECD)或其CD47结合变体。

73. 根据权利要求70所述的双功能分子,其中所述CD47结合结构域包括SEQ ID NO:84的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少80%序列同一性但仍保留对CD47的结合特异性的氨基酸序列。

74. 根据权利要求70所述的双功能分子,其中所述SIRP α 结合结构域包括可溶性CD47或其SIRP α 结合片段或变体、或抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段。

75. 根据权利要求74所述的双功能分子,其中所述可溶性CD47包括所述CD47的胞外结构域(ECD)或其SIRP α 结合片段或变体、抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段。

76. 根据前述权利要求中任一项所述的双功能分子,其进一步包括连接所述第一部分和所述第二部分的接头。

77. 根据权利要求76所述的双功能分子,其中所述接头选自自由以下组成的组:可切割接头、不可切割接头、肽接头、柔性接头、刚性接头、螺旋接头和非螺旋接头。

78. 根据权利要求77所述的双功能分子,其中所述接头包括((G)_nS)_m的氨基酸序列,其中m和n独立地是选自0到30的整数。

79. 根据权利要求16到78中任一项所述的双功能分子,其中所述双功能分子包括所述第二部分中的一个或多个第二部分。

80. 根据权利要求79所述的双功能分子,其中所述多个第二部分中的至少一个第二部分连接到所述第一部分多肽链的N端或C端。

81. 根据权利要求79所述的双功能分子,其中所述多个第二部分中的至少一个第二部分连接到:a)所述第一部分的重链的N端或C端,或b)所述第一部分的轻链的N端或C端。

82. 根据权利要求79所述的双功能分子,其中所述多个第二部分中的至少一个第二部分连接到所述第一部分的重链恒定区的C端。

83. 根据权利要求79所述的双功能分子,其中所述多个第二部分中的每个第二部分分别连接到所述第一部分的每个重链恒定区的C端。

84. 根据权利要求79所述的双功能分子,其中所述双功能分子包括所述第二部分中的多于一个第二部分,所述多于一个第二部分分别连接到:所述第一部分的重链的N端、所述第一部分的重链的C端、所述第一部分的轻链的N端、所述第一部分的轻链的C端或其任何组合。

85. 根据权利要求79到84中任一项所述的双功能分子,其中所述双功能分子包括同二聚体重链或异二聚体重链。

86. 根据权利要求79到84中任一项所述的双功能分子,其中所述重链就所述第二部分的存在或位置而言是异二聚体的。

87. 根据权利要求86所述的双功能分子,其中所述异二聚体重链包括具有所述第二部分的一条重链,而另一条重链不具有所述第二部分。

88. 根据权利要求86所述的双功能分子,其中所述异二聚体重链进一步包括以阻碍同二聚体化和/或有利于异二聚体化的方式缔合的异二聚体Fc区。

89. 根据权利要求86所述的双功能分子,其中所述异二聚体Fc区能够通过杵臼结构、疏水相互作用、静电相互作用、亲水相互作用或增加的柔性缔合成异二聚体。

90. 根据权利要求88到89中任一项所述的双功能分子,其中所述异二聚体Fc区在一条Fc多肽链中包括Y349C、T366S、L368A或Y407V或其任何组合并且在另一条Fc多肽链中包括S354C或T366W或其组合,其中所述Fc多肽链中的残基的编号为如Kabat中的EU索引的编号。

91. 根据前述权利要求中任一项所述的双功能分子,其进一步连接到一个或多个缀合物部分。

92. 根据权利要求91所述的双功能分子,其中所述缀合物部分包括清除修饰剂、化学治疗剂、毒素、放射性同位素、镧系元素、发光标记、荧光标记、酶-底物标记、DNA烷化剂、拓扑异构酶抑制剂、微管蛋白结合剂或其它抗癌药物,如雄激素受体抑制剂。

93. 一种药物组合物或试剂盒,其包含根据前述权利要求中任一项所述的双功能分子和药学上可接受的载体。

94. 一种分离的多核苷酸,其编码根据权利要求16到92中任一项所述的双功能分子。

95. 一种载体,其包括根据权利要求94所述的分离的多核苷酸。

96. 一种宿主细胞,其包括根据权利要求95所述的载体。

97. 一种表达根据权利要求16到92中任一项所述的双功能分子的方法,所述方法包括在表达根据权利要求95所述的载体的条件下培养根据权利要求96所述的宿主细胞。

98. 一种治疗、预防或减轻受试者的PD-L1相关疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求16到92中任一项所述的双功能分子和/或根据权利要求93所述的药物组合物或试剂盒。

99. 根据权利要求98所述的方法,其中所述疾病是免疫相关疾病或病症、癌症或传染病。

100. 根据权利要求99所述的方法,其中所述癌症选自以下组成的组:肺癌(例如,非小细胞肺癌)、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、支气管癌、骨癌、肝和胆管癌、卵巢癌、睾丸癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、脊柱癌、脑癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、结肠癌、结直肠癌、前列腺癌、胃食管癌、直肠癌、肛门癌、胃肠癌、皮肤癌、垂体癌、胃癌、阴道癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生异常综合征、肉瘤、畸胎瘤、胶质瘤和腺癌。

101. 根据权利要求98到100中任一项所述的方法,其中所述受试者已被鉴定为具有表达PD-L1的癌细胞。

102. 根据权利要求98到101中任一项所述的方法,其中所述PD-L1相关疾病对PD-L1/PD-1单一疗法具有抗性。

103. 根据权利要求98到102中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

104. 根据权利要求98到103中任一项所述的方法,其进一步包括施用治疗有效量的第

二治疗剂。

105. 根据权利要求104所述的方法, 其中所述第二治疗剂选自化学治疗剂、抗癌药物、放射疗法、免疫治疗剂、抗血管生成剂、靶向治疗剂、细胞治疗剂、基因治疗剂、激素治疗剂或细胞因子。

106. 一种根据权利要求16到92中任一项所述的双功能分子在制造用于治疗受试者的PD-L1相关疾病或病状的药物中的用途。

107. 一种治疗、预防或减轻受试者的疾病或病状的方法, 所述疾病或病状将受益于免疫抑制性细胞因子的抑制、持续免疫应答的诱导或抗肿瘤免疫的刺激, 所述方法包括施用有效量的根据权利要求16到92中任一项所述的双功能分子。

108. 根据权利要求107所述的方法, 其中所述免疫抑制性细胞因子是TGF β 。

109. 根据权利要求108所述的方法, 其中所述疾病或病状是TGF β 相关疾病或病状。

110. 根据权利要求109所述的方法, 其中所述TGF β 相关疾病是癌症、纤维化疾病或肾病。

111. 根据权利要求107所述的方法, 其中所述免疫抑制性细胞因子是IL-1。

112. 根据权利要求111所述的方法, 其中所述疾病或病状是IL-1相关疾病或病状。

113. 根据权利要求107所述的方法, 其中所述疾病或病状将受益于通过用免疫刺激性多肽刺激MHCII信号传导而诱导持续免疫应答。

114. 根据权利要求113所述的方法, 其中所述免疫刺激性多肽是可溶性LAG-3。

115. 根据权利要求107所述的方法, 其中所述疾病或病状将受益于通过抑制免疫抑制性受体信号传导而刺激抗肿瘤免疫。

116. 根据权利要求115所述的方法, 其中所述免疫抑制性受体是SIRP α 。

双功能分子

发明领域

[0001] 本公开总体涉及靶向免疫检查点分子(例如,PD-L1)并且阻断抗肿瘤免疫抑制(ATIS)细胞因子(例如,IL-1或TGF β)的活性或刺激免疫的新型双功能分子。

背景技术

[0002] 程序性死亡1(PD-1)及其配体PD-L1和PD-L2是T细胞介导的免疫应答的调节中的关键共抑制分子。PD-1是一种在外周组织中的激活的T细胞的表面上表达的具有单个胞外免疫球蛋白超家族(IgSF)V-集结构域(V-set domain)的I型膜蛋白(Zhang X等人,《免疫力(Immunity)》,2004,20(3):337-347)。PD-L1和PD-L2通常在树突状细胞和巨噬细胞上表达,并且它们的胞外结构域由膜远端IgSF V-集结构域和膜近端IgSF C-set结构域构成(Latchman Y等人,《自然免疫学(Nature Immunology)》,2001,2(3):261-268)。PD-1与其两个配体的连接通过PD-1的含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序和基于免疫受体酪氨酸的开关基序的细胞质结构域启动共抑制信号传导,从而引起SHP磷酸酶的激活,所述激活通过去磷酸化参与信号传导的效应分子来下调TCR信号传导(Chemnitz J M等人,《免疫学杂志(J. Immunol.)》,2004,173(2):945-954)。因此,PD-1信号传导可防止过度或有害的炎症并将对自身抗原的免疫耐受性维持在正常条件下(Collins A V等人,《免疫力》,2002,17(2):201-210)。

[0003] PD-L1还通过与另一种受体B7.1(也称为B7-1或CD80)相互作用来负调节T细胞功能。PD-L1/PD-1和PD-L1/B7.1复合物的形成负调节T细胞受体信号传导,从而导致随后下调T细胞激活并抑制抗肿瘤免疫活性(Butte M J等人,《免疫力》,2007,27(1):111-122)。

[0004] PD-L1在不同的肿瘤中经常过度表达并且其与T细胞上的PD-1相互作用使癌细胞能够避开T细胞介导的免疫应答(Okazaki T等人,《自然免疫学》,2013,14(12):1212-1218)。因此,阻断PD-1/PD-L1相互作用可以恢复T细胞激活和抗肿瘤应答(Callahan M K等人,《免疫力》,2016,44(5):1069-1078)。基于抗体的PD-1/PD-L1阻断疗法如阿特珠单抗(atezolizumab)(**Tecentriq®**)(Rittmeyer A等人,《柳叶刀(The Lancet)》,2017,389(10066):255-265)、阿维鲁单抗(avelumab)(**Bavencio®**)(Hamilton G等人,《生物治疗专家观点(Expert Opinion on Biological Therapy)》,2017,17(4):515-523)和德瓦鲁单抗(durvalumab)(**Imfinzi®**)(Brower V,《柳叶刀肿瘤学(The Lancet Oncology)》,2016,17(7):e275)的成功意味着在对抗人类癌症,尤其是实体瘤方面取得了突破性进展。尽管已显示肿瘤细胞和/或浸润性免疫细胞表达PD-L1与对PD-1/PD-L1靶向疗法的临床应答之间存在关联,但这种关联并非完美无缺(Herbst, R. 等人,《自然》515,563-567(2014); Taube J M等人,《临床癌症研究(Clinical cancer research)》,2014,20(19):5064-5074)。只有少数PD-L1阳性肿瘤对这些治疗有应答,然而某些PD-L1阴性肿瘤仍对治疗有应答。这增加了另外的因素控制患者对PD-1/PD-L1靶向疗法的应答的可能性,并且必须鉴定另外的预测性生物标志物以改善这些药剂的临床使用。

[0005] Mariathasan S等人发现缺乏应答与成纤维细胞中转化生长因子 β (TGF- β)信号传

导的特征相关 (Mariathasan S等人,《自然》,2018,554(7693):544-548)。David JM等人还发现,作为一种已知诱导上皮间充质转化(EMT)并抑制抗肿瘤免疫的多效性细胞因子,TGF- β 可以上调多种上皮NSCLC细胞系中的肿瘤PD-L1表达,并且上调与作为TGF- β 信号传导的关键下游效应子的Smad2的磷酸化有关(David J M等人,《肿瘤免疫学(Oncoimmunology)》,2017,6(10):e1349589)。在小鼠中,治疗性施用TGF- β 阻断抗体和抗PD-L1减少了基质细胞中的TGF- β 信号传导,促进T细胞渗透到肿瘤中心,并激发强烈的抗肿瘤免疫和肿瘤消退(Mariathasan S等人,《自然》,2018,554(7693):544-548)。

[0006] 然而,抗PD-L1抗体的低亲和力仍然对实现高治疗功效和低毒副作用提出了挑战。

[0007] 因此,需要具有对PD-L1具有高结合亲和力、改善的治疗功效和减少的毒副作用的治疗分子。

发明内容

[0008] 在整个本公开中,本文使用的冠词“一个”、“一种”和“所述”是指冠词的语法宾语中的一个或多个(即,至少一个)。举例来说,“一种抗体”意指一种抗体或多于一种抗体。

[0009] 在一个方面,本公开提供了一种双功能分子,其包括与免疫检查点分子结合的第一部分和阻断白细胞介素-1(IL-1)的活性的第二部分。

[0010] 在某些实施例中,所述第一部分包括免疫刺激性检查点分子的激动剂,任选地,所述免疫刺激性检查点分子选自由以下组成的组:CD27、CD70、CD28、CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、CD40、CD40L(CD154)、CD122、CD137、CD137L、OX40(CD134)、OX40L(CD252)、GITR、ICOS(CD278)和ICOSLG(CD275)、CD2、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160和CD83。

[0011] 在某些实施例中,所述第一部分包括免疫抑制性检查点分子的拮抗剂,任选地,所述免疫抑制性检查点分子选自由以下组成的组:A2AR、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、BTLA(CD272)、CTLA-4(CD152)、IDO1、IDO2、TDO、KIR、LAG3、NOX2、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、VISTA、SIGLEC7(CD328)、TIGIT、PVR(CD155)、SIGLEC9(CD329)、CD160、LAIR1、2B4(CD244)、CD47和B7-H5。

[0012] 在某些实施例中,所述免疫检查点分子是PD-L1。

[0013] 在某些实施例中,所述第一部分包括针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段,并且所述第二部分包括IL-1结合部分或IL-1受体(IL-1R)结合部分。

[0014] 在某些实施例中,所述IL-1结合部分包括IL-1R或其IL-1结合片段或变体、或针对IL-1的抗体或其抗原结合片段。

[0015] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和/或轻链可变区来自选自由以下组成的组的抗IL-1 α 抗体:XB2001、鲁吉珠单抗(lutikizumab)、LY2189102和贝迈奇单抗(bermekimab),或者来自选自由以下组成的组的抗IL-1 β 抗体:SSGJ-613、CDP484、卡那单抗(canakinumab)和吉伏组单抗(gevokizumab)。

[0016] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:112的序列的HCDR1;

包括SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:113的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:114的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:115的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:108或SEQ ID NO:116的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:117的序列的LCDR3。

[0017] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:104的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:105的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:106的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:107的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:108的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:109的序列的LCDR3。

[0018] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:112的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:113的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:114的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:115的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:116的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:117的序列的LCDR3。

[0019] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:110和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:111和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0020] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:102和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:103和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0021] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:110和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:111和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0022] 在某些实施例中,所述IL-1R结合部分包括白细胞介素-1受体拮抗剂或其片段或其变体、或针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段。

[0023] 在某些实施例中,所述针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和/或轻链可变区来自选自由以下组成的组的抗体:司柏索利单抗(spesolimab)、艾特利单抗(astegolimab)、伊姆西多单抗(imsidolimab)、AMG 108、迈瑞利单抗(melrilimab)、尼达利单抗(nidanilimab)、MEDI8968、REGN6490、HB0034和CSC012。

[0024] 在另一方面,一种双功能分子包括与PD-L1结合的第一部分和a) 阻断免疫抑制性细胞因子的活性或b) 刺激免疫的第二部分,其中所述第一部分包括针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变(VH)区和/或轻链可变(VL)区,其中所述重链可变区包括:

[0025] a) HCDR1,所述HCDR1包括DYVMN (SEQ ID NO:1) 或与DYVMN具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0026] b) HCDR2, 所述HCDR2包括DINPNX₁X₂TX₃YNHKFKG (SEQ ID NO:19) 或与DINPNX₁X₂TX₃YNHKFKG具有至少80%序列同一性的同源序列, 以及

[0027] c) HCDR3, 所述HCDR3包括WGDGPFAY (SEQ ID NO:3) 或与WGDGPFAY具有至少80%序列同一性的同源序列, 和/或

[0028] 其中所述轻链可变区包括:

[0029] d) LCDR1, 所述LCDR1包括选自由KASQNVX₄X₅X₆VA (SEQ ID NO:20) 或与KASQNVX₄X₅X₆VA具有至少80%序列同一性的同源序列组成的组的序列,

[0030] e) LCDR2, 所述LCDR2包括选自由SX₇SX₈RYT (SEQ ID NO:21) 或与SX₇SX₈RYT具有至少80%序列同一性的同源序列组成的组的序列, 以及

[0031] f) LCDR3, 所述LCDR3包括选自由QQYSNYPT (SEQ ID NO:6) 或与QQYSNYPT具有至少80%序列同一性的同源序列组成的组的序列;

[0032] 其中X₁是G或A, X₂是G或D或Q或E或L, X₃是S或M或Q或L或V, X₄是G或P或K, X₅是A或G, X₆是A或I, X₇是A或N或R或V, 并且X₈是N或H或V或D。

[0033] 在某些实施例中, 所述重链可变区包括:

[0034] a) HCDR1, 所述HCDR1包括SEQ ID NO:1的序列,

[0035] b) HCDR2, 所述HCDR2包括选自由以下组成的组的序列: SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18, 以及

[0036] c) HCDR3, 所述HCDR3包括SEQ ID NO:3的序列,

[0037] 和/或

[0038] 轻链可变区, 所述轻链可变区包括:

[0039] d) LCDR1, 所述LCDR1包括选自由以下组成的组的序列: SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,

[0040] e) LCDR2, 所述LCDR2包括选自由以下组成的组的序列: SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12, 以及

[0041] f) LCDR3, 所述LCDR3包括SEQ ID NO:6的序列。

[0042] 在某些实施例中, 所述重链可变区选自由以下组成的组:

[0043] a) 包括以下的重链可变区: 包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:2的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3;

[0044] b) 包括以下的重链可变区: 包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:13的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3;

[0045] c) 包括以下的重链可变区: 包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:14的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3;

[0046] d) 包括以下的重链可变区: 包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:15的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3;

[0047] e) 包括以下的重链可变区: 包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:17的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3; 以及

[0048] f) 包括以下的重链可变区: 包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:18的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3。

[0049] 在某些实施例中, 所述轻链可变区选自由以下组成的组:

[0050] a) 包括以下的轻链可变区:包括SEQ ID NO:4的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:5的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3;

[0051] b) 包括以下的轻链可变区:包括SEQ ID NO:9的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:5的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3;

[0052] c) 包括以下的轻链可变区:包括SEQ ID NO:8的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:5的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3;

[0053] d) 包括以下的轻链可变区:包括SEQ ID NO:4的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:12的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3;以及

[0054] e) 包括以下的轻链可变区:包括SEQ ID NO:4的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:11的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3。

[0055] 在某些实施例中,所述针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段进一步包括重链HFR1、HFR2、HFR3和HFR4中的一个或多个,和/或轻链LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的一个或多个,其中:

[0056] a) 所述HFR1包括氨基酸序列QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX₉FT (SEQ ID NO:40) 或与所述氨基酸序列具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0057] b) 所述HFR2包括氨基酸序列WVRQAPGQX₁₀LEWMG (SEQ ID NO:41) 或与所述氨基酸序列具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0058] c) 所述HFR3序列包括氨基酸序列

[0059] RVTX₁₆TVDX₁₁SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCX₁₂X₁₃ (SEQ ID NO:42) 或与所述氨基酸序列具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0060] d) 所述HFR4包括氨基酸序列WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:25) 或与所述氨基酸序列具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0061] e) 所述LFR1包括氨基酸序列DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:26) 或与所述氨基酸序列具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0062] f) 所述LFR2包括氨基酸序列WYQQKPGKX₁₄PKLLIY (SEQ ID NO:43) 或与所述氨基酸序列具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0063] g) 所述LFR3包括氨基酸序列GVPX₁₅RFSGSGSGTDFTX₁₇TISSLQPEDIATYYC (SEQ ID NO:44) 或与所述氨基酸序列具有至少80%序列同一性的同源序列,并且

[0064] h) 所述LFR4包括氨基酸序列FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:29) 或与所述氨基酸序列具有至少80%序列同一性的同源序列,

[0065] 其中X₉是T或V,X₁₀是G或S,X₁₁是T或K,X₁₂是A或V,X₁₃是R或K,X₁₄是A或S,X₁₅是S或D,X₁₆是M或V,并且X₁₇是F或L。

[0066] 在某些实施例中,

[0067] 所述HFR1包括选自自由SEQ ID NO:22和30组成的组的序列,

[0068] 所述HFR2包括选自自由SEQ ID NO:23和31组成的组的序列,

[0069] 所述HFR3包括选自自由SEQ ID NO:24和32-35组成的组的序列,

[0070] 所述HFR4包括SEQ ID NO:25的序列,

[0071] 所述LFR1包括来自自由SEQ ID NO:26组成的组的序列,

[0072] 所述LFR2包括选自自由SEQ ID NO:27和36组成的组的序列,

[0073] 所述LFR3包括选自由SEQ ID NO:28和37-38、39、45组成的组的序列,并且

[0074] 所述LFR4包括SEQ ID NO:29的序列。

[0075] 在某些实施例中,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60和与其具有至少80%序列同一性的其同源序列。

[0076] 在某些实施例中,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65和与其具有至少80%序列同一性的其同源序列。

[0077] 在某些实施例中,所述针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段包括选自由以下组成的组的一对重链可变区和轻链可变区序列:SEQ ID NO:49/54、50/54、51/54、52/54、49/55、50/55、51/55、52/55、58/62、58/63、58/64、58/65、59/62、59/63、59/64、59/65、60/62、60/63、60/64和60/65。

[0078] 在某些实施例中,所述针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段进一步包括一个或多个氨基酸残基取代或修饰,但仍保留对PD-L1的特定结合特异性和/或亲和力。

[0079] 在某些实施例中,所述取代或修饰中的至少一个取代或修饰在所述CDR序列中的一个或多个CDR序列中和/或在所述VH或VL序列的非CDR区中的一个或多个非CDR区中。

[0080] 在某些实施例中,所述针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段进一步包括免疫球蛋白恒定区,任选地人Ig的恒定区,或任选地人IgG的恒定区。

[0081] 在某些实施例中,所述恒定区包括人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区。

[0082] 在某些实施例中,所述人IgG1的Fc区包括SEQ ID NO:80或与SEQ ID NO:80具有至少80%(例如,至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的其变体。

[0083] 在某些实施例中,所述恒定区包括Fc变体,所述Fc变体相对于对应野生型Fc区具有降低的效应子功能。在某些实施例中,所述Fc区包括一个或多个氨基酸残基修饰或取代,从而使得相对于SEQ ID NO:80降低效应子功能。

[0084] 在某些实施例中,所述Fc区包括选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸残基取代:220S、226S、228P、229S、233P、234V、234G、234A、234F、234A、235A、235G、235E、236E、236R、237A、237K、238S、267R、268A、268Q、269R、297A、297Q、297G、309L、318A、322A、325L、328R、330S、331S和其任何组合,其中所述Fc区中的残基的编号为如Kabat中的EU索引的编号。

[0085] 在某些实施例中,所述Fc区包括选自由以下组成的组的突变的组合:a) K322A、L234A和L235A;b) P331S、L234F和L235E;c) L234A和L235A;c) N297A;d) N297Q;e) N297G;f) L235E;g) L234A和L235A(IgG1);h) F234A和L235A(IgG4);i) H268Q、V309L、A330S和P331S(IgG2);j) V234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S和P331S(IgG2),其中所述Fc区中的残基的编号为如Kabat中的EU索引的编号。

[0086] 在某些实施例中,所述Fc变体包括SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

[0087] 在某些实施例中,所述针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段是人源化的。

[0088] 在某些实施例中,所述抗原结合片段是双抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双抗体(ds

双抗体)、单链抗体分子(scFv)、scFv二聚体(二价双抗体)、多特异性抗体、骆驼化(camelized)单结构域抗体、纳米抗体、结构域抗体和二价结构域抗体。

[0089] 在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段能够与人PD-L1和食蟹猴PD-L1两者结合。

[0090] 在某些实施例中,所述第一部分包括与本文提供的抗体或其抗原结合片段竞争结合PD-L1的抗体或其抗原结合片段。

[0091] 在某些实施例中,所述免疫抑制性细胞因子包括转化生长因子 β (TGF- β)超家族中的细胞因子、IL-1或血管内皮生长因子(VEGF)。

[0092] 在某些实施例中,所述TGF- β 超家族中的免疫抑制性细胞因子包括TGF- β 、骨形态发生蛋白(BMP)、激活素、NODAL和生长和分化因子(GDF)。

[0093] 在某些实施例中,所述免疫抑制性细胞因子是TGF- β 。

[0094] 在某些实施例中,所述第二部分包括TGF β 结合部分。

[0095] 在某些实施例中,所述TGF β 结合部分包括可溶性TGF β 受体(TGF β R)或其TGF β 结合片段或变体、或针对TGF β 的抗体和其抗原结合片段。

[0096] 在某些实施例中,所述可溶性TGF β R包括所述TGF β R的胞外结构域(ECD)或其TGF β 结合片段或变体。

[0097] 在某些实施例中,所述TGF β R选自由以下组成的组:TGF β 受体I(TGF β RI)、TGF β 受体II(TGF β RII)、TGF β 受体III(TGF β RIII)和其任何组合。

[0098] 在某些实施例中,所述TGF β R是TGF β RII。

[0099] 在某些实施例中,所述TGF β RII相对于TGF β 2和TGF β 3而选择性地结合到TGF β 1。

[0100] 在某些实施例中,所述TGF β 1是人TGF β 1或小鼠TGF β 1。

[0101] 在某些实施例中,TGF β R的所述ECD包括SEQ ID NO:66、79、78、77的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少80%序列同一性但仍保留对TGF- β 的特定结合特异性和/或亲和力的序列。

[0102] 在某些实施例中,所述第二部分包括IL-1结合部分或IL-1受体(IL-1R)结合部分。

[0103] 在某些实施例中,所述IL-1结合部分包括可溶性IL-1R、IL-1R的IL-1结合片段或变体、或针对IL-1的抗体或其抗原结合片段。

[0104] 在某些实施例中,所述IL-1结合部分包括:IL-1RI的胞外结构域(ECD);IL-1RI、IL-1RI的ECD、IL-1RII或IL-1RII的ECD、或IL-1RAP或IL-1RAP的ECD、IL-1sRI或IL-1sRII中的任一者的IL-1结合片段或变体。

[0105] 在某些实施例中,所述IL-1R结合部分包括IL-1Ra或其IL-1结合片段或变体、或针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段。

[0106] 在某些实施例中,所述针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和/或轻链可变区来自选自由以下组成的组的抗体:司柏索单抗、艾特利单抗、伊姆西多单抗、AMG 108、迈瑞利单抗、尼达利单抗、MEDI8968、REGN6490、HB0034和CSC012。

[0107] 在某些实施例中,所述IL-1R结合部分包括SEQ ID NO:67或76的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:67或76具有至少80%序列同一性的氨基酸序列、或其IL-1结合片段或变体。

[0108] 在某些实施例中,所述IL-1是IL-1 α 或IL-1 β 。

[0109] 在某些实施例中,所述IL-1 β 是人IL-1 β 。

[0110] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和/或轻链可变区来自选自由以下组成的组的抗IL-1 α 抗体:XB2001、鲁吉珠单抗、LY2189102和贝迈奇单抗,或者来自选自由以下组成的组的抗IL-1 β 抗体:SSGJ-613、CDP484、卡那单抗和吉伏组单抗。

[0111] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:112的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:113的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:114的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:115的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:108或SEQ ID NO:116的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:117的序列的LCDR3。

[0112] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:104的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:105的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:106的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:107的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:108的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:109的序列的LCDR3。

[0113] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:112的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:113的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:114的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:115的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:116的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:117的序列的LCDR3。

[0114] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:110和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:111和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0115] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:102和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:103和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0116] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:110和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:111和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0117] 在某些实施例中,所述双功能分子包括重链和/或轻链,所述重链包括SEQ ID NO:118或SEQ ID NO:120的氨基酸序列,所述轻链包括SEQ ID NO:119或SEQ ID NO:121的氨基酸序列。

[0118] 在某些实施例中,所述第二部分刺激抗肿瘤免疫并且包括免疫刺激性多肽。

[0119] 在某些实施例中,所述免疫刺激性多肽包括白细胞介素(IL)-2(IL-2)、IL-15、IL-21、IL-10、IL-12、IL-23、IL-27、IL-35、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、可溶性

CD4、可溶性LAG-3或IFN- α 或其功能等效物。

[0120] 在某些实施例中,所述可溶性LAG-3包括所述LAG-3的胞外结构域(ECD)或其MHCII结合片段或变体。

[0121] 在某些实施例中,所述第二部分刺激抗肿瘤免疫并且包括免疫抑制性受体信号传导的拮抗剂。

[0122] 在某些实施例中,所述免疫抑制性受体是信号调节蛋白 α (SIRP α)。

[0123] 在某些实施例中,所述第二部分阻断CD47与SIRP α 之间的相互作用。

[0124] 在某些实施例中,所述第二部分包括CD47结合结构域或SIRP α 结合结构域。

[0125] 在某些实施例中,所述CD47结合结构域包括可溶性SIRP α 或其CD47结合片段或变体、或抗CD47抗体或其抗原结合片段。

[0126] 在某些实施例中,所述可溶性SIRP α 包括所述SIRP α 的胞外结构域(ECD)或其CD47结合片段或变体。

[0127] 在某些实施例中,所述可溶性SIRP α 包括SEQ ID NO:84的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少80%序列同一性但仍保留对CD47的结合特异性的氨基酸序列。

[0128] 在某些实施例中,所述SIRP α 结合结构域包括可溶性CD47或其SIRP α 结合片段或变体、或抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段。

[0129] 在某些实施例中,所述可溶性CD47包括所述CD47的胞外结构域(ECD)或其SIRP α 结合片段或变体、抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段。

[0130] 在某些实施例中,所述双功能分子进一步包括连接所述第一部分和所述第二部分的接头。

[0131] 在某些实施例中,所述接头选自由以下组成的组:可切割接头、不可切割接头、肽接头、柔性接头、刚性接头、螺旋接头和非螺旋接头。

[0132] 在某些实施例中,所述接头包括((G) n S) m 的氨基酸序列,其中 m 和 n 独立地是选自0到30的整数(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10)。在某些实施例中, n 是2、3、4或5,并且 m 是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在某些实施例中,所述接头包括SEQ ID NO:68的氨基酸序列。

[0133] 在某些实施例中,所述双功能分子包括所述第二部分中的一个或多个第二部分。

[0134] 在某些实施例中,所述多个第二部分中的至少一个第二部分连接到所述第一部分的多肽链的N端或C端。

[0135] 在某些实施例中,所述多个第二部分中的至少一个第二部分连接到:a)所述第一部分的重链的N端或C端,或b)所述第一部分的重链的N端或C端。

[0136] 在某些实施例中,所述多个第二部分中的至少一个第二部分连接到所述第一部分的重链恒定区的C端。

[0137] 在某些实施例中,所述多个第二部分中的每个第二部分分别连接到所述第一部分的每个重链恒定区的C端。

[0138] 在某些实施例中,所述双功能分子包括所述第二部分中的多于一个第二部分,所述多于一个第二部分分别连接到:所述第一部分的重链的N端、所述第一部分的重链的C端、所述第一部分的轻链的N端、所述第一部分的轻链的C端或其任何组合。

[0139] 在某些实施例中,所述双功能分子包括同二聚体重链或异二聚体重链。

[0140] 在某些实施例中,所述重链就所述第二部分的存在或位置而言是异二聚体的。

[0141] 在某些实施例中,所述异二聚体重链包括具有所述第二部分的一条重链,而另一条重链不具有所述第二部分。

[0142] 在某些实施例中,所述异二聚体重链进一步包括以阻碍同二聚体化和/或有利于异二聚体化的方式缔合的异二聚体Fc区。

[0143] 在某些实施例中,第一和所述异二聚体Fc区能够通过杵臼结构(knobs-into-holes)、疏水相互作用、静电相互作用、亲水相互作用或增加的柔性缔合成异二聚体。

[0144] 在某些实施例中,所述异二聚体Fc区在一个Fc区中包括Y349C、T366S、L368A或Y407V或其任何组合并且在另一个Fc区中包括S354C或T366W或其组合,其中所述Fc区中的残基的编号为如Kabat中的EU索引的编号。

[0145] 在某些实施例中,所述双功能分子进一步连接到一个或多个缀合物部分。

[0146] 在某些实施例中,所述缀合物部分包括清除修饰剂、化学治疗剂、毒素、放射性同位素、镧系元素、发光标记、荧光标记、酶-底物标记、DNA烷化剂、拓扑异构酶抑制剂、微管蛋白结合剂或其它抗癌药物,如雄激素受体抑制剂。

[0147] 在另一方面,本公开进一步提供了一种包含本文提供的双功能分子和药学上可接受的载体的药物组合物或试剂盒。

[0148] 在另一方面,本公开进一步提供了一种编码本文提供的双功能分子的分离的多核苷酸。

[0149] 在另一方面,本公开进一步提供了一种包括本文提供的分离的多核苷酸的载体。

[0150] 在另一方面,本公开进一步提供了一种包括本文提供的载体的宿主细胞。

[0151] 在另一方面,本公开进一步提供了一种表达本文提供的双功能分子的方法,所述方法包括在表达载体的条件下培养本文提供的宿主细胞。

[0152] 在另一方面,本公开进一步提供了一种治疗、预防或减轻受试者的PD-L1相关疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文提供的双功能分子和/或本文提供的药物组合物或试剂盒。

[0153] 在某些实施例中,所述疾病是免疫相关疾病或病症、癌症、自身免疫疾病或传染病。

[0154] 在某些实施例中,所述癌症选自以下组成的组:肺癌(例如,非小细胞肺癌)、肝癌、胰腺癌、乳腺癌、支气管癌、骨癌、肝和胆管癌、卵巢癌、睾丸癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、脊柱癌、脑癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、结肠癌、结直肠癌、前列腺癌、胃食管癌、直肠癌、肛门癌、胃肠癌、皮肤癌、垂体癌、胃癌、阴道癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生异常综合征、肉瘤、畸胎瘤、胶质瘤和腺癌。

[0155] 在某些实施例中,所述受试者已被鉴定为具有表达PD-L1的癌细胞。

[0156] 在某些实施例中,受试者是人。

[0157] 在某些实施例中,所述方法进一步包括施用治疗有效量的第二治疗剂。

[0158] 在某些实施例中,所述第二治疗剂选自化学治疗剂、抗癌药物、放射疗法、免疫治疗剂、抗血管生成剂、靶向治疗剂、细胞治疗剂、基因治疗剂、激素治疗剂或细胞因子。

[0159] 在另一方面,本公开提供了一种本文提供的双功能分子在制造用于治疗受试者的PD-L1相关疾病或病状的药物中的用途。

[0160] 在另一方面,本公开提供了一种治疗、预防或减轻受试者的疾病或病状的方法,所

述疾病或病状将受益于免疫抑制性细胞因子的抑制、持续免疫应答的诱导或抗肿瘤免疫的刺激,所述方法包括施用有效量的本文提供的双功能分子。

[0161] 在某些实施例中,所述免疫抑制性细胞因子是TGF β 。

[0162] 在某些实施例中,所述疾病或病状是TGF β 相关疾病或病状。

[0163] 在某些实施例中,所述TGF β 相关疾病是癌症、纤维化疾病或肾病。

[0164] 在某些实施例中,所述免疫抑制性细胞因子是IL-1。

[0165] 在某些实施例中,所述疾病或病状是IL-1相关疾病或病状。

[0166] 在某些实施例中,所述疾病或病状将受益于通过抑制免疫抑制性受体信号传导(例如,SIRPa信号传导)而刺激抗肿瘤免疫。

附图说明

[0167] 图1示出了通过ELISA测量的人源化4B6抗体与人PD-L1的结合。

[0168] 图2示出了通过ELISA测量的Hu4B6_HgLa与人PD-L1的结合。

[0169] 图3A-图3C示出了通过ELISA测量的AM-4B6-IgG1-TGF β R11I变体与PD-L1的结合。

[0170] 图4示出了使用流式细胞术对AM-4B6-IgG1-TGF β R11I变体的亲和力分级。

[0171] 图5A和5B示出了AM-4B6-IgG1-TGF β R11I变体对PD-L1/PD-1或PD-L1/B7-1的阻断。

[0172] 图6示出了使用基于细胞的测定,AM-4B6-IgG1-TGF β R11I变体对PD-L1/PD-1的阻断。

[0173] 图7示出了用稳定细胞系表达的AM4B6_hIgG1_TBRII(20-136)的SDS-PAGE。

[0174] 图8A和图8B示出了通过ELISA分析测量的与人PD-L1或食蟹猴PD-L1的结合。

[0175] 图9A-图9C示出了通过ELISA分析测量的与人PD-L1和B7家族其它成员和TGF β 超家族其它成员的结合。

[0176] 图10A-图10F示出了通过FACS分析测量的与PD-L1表达性细胞的结合。

[0177] 图11示出了通过FACS分析测量的与激活的人T细胞上的人PD-L1的结合。

[0178] 图12A-图12B示出了通过ELISA分析测量的对人PD-L1与人PD-1结合或食蟹猴PD-L1与食蟹猴PD-1结合的阻断。

[0179] 图13示出了通过ELISA分析测量的与hPD-L1和TGF β 1的同时结合。

[0180] 图14示出了使用报告基因测定的阻断hPD-L1/hPD-1。

[0181] 图15示出了使用TGF- β 报告基因HEK-293细胞系阻断TGF β 1信号传导。

[0182] 图16示出了AM4B6-hIgG1-TGF β R11I'对由结核菌素(TB)刺激的PBMC的IFN γ 释放的影响。

[0183] 图17A-图17B示出了在MC38-hPD-L1肿瘤模型中的抗肿瘤活性。

[0184] 图18A-图18B示出了在H460肿瘤模型中的抗肿瘤活性。

[0185] 图19A-图19B示出了在EMT6-hPD-L1肿瘤模型中的抗肿瘤活性。

[0186] 图20A-图20C示出了AM4B6-hIgG1-TGF β R11I的体内药代动力学和药效学研究。

[0187] 图21示出了通过ELISA测量的AM4B6-hIgG1-IL-1RA与人PD-L1的结合活性。

[0188] 图22示出了通过FACS分析测量的AM4B6-hIgG1-IL-1RA与人PD-L1的结合活性。

[0189] 图23示出了使用基于细胞的测定,AM4B6-hIgG1-IL-1RA对PD-L1/PD-1的阻断。

[0190] 图24示出了通过ELISA测量的AM4B6-IgG1-IL-1RA对人IL-1 β 的阻断活性。

- [0191] 图25示出了AM4B6-hIgG1-IL-1RA对报告细胞上的人IL-1 β 的阻断活性。
- [0192] 图26示出了不对称双功能抗体的SEC-HPLC纯度。
- [0193] 图27示出了通过ELISA测量的双功能分子与人PD-L1的结合。
- [0194] 图28示出了通过ELISA测量的双功能分子与人CD47的结合。
- [0195] 图29示出了IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和IgG-scFv-XOMA052-AM4B6bsAb与hIL-1 β 蛋白的ELISA结合活性。
- [0196] 图30示出了IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和IgG-scFv-XOMA052-AM4B6bsAb与hPD-L1蛋白的ELISA结合活性。
- [0197] 图31示出了通过FACS方法测量的IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和IgG-scFv-XOMA052-AM4B6与表达PD-L1的293T细胞的结合。
- [0198] 图32示出了IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和IgG-scFv-XOMA052-AM4B6的基于细胞的PD1/PD-L1阻断活性。
- [0199] 图33示出了IgG-scFv-XOMA052-AM4B6对HDF细胞上的人IL-1 β 的阻断活性。
- [0200] 图34示出了IgG-scFv-ACZ885-AM4B6对报告细胞上的hIL-1 β 的阻断活性。

具体实施方式

[0201] 本公开的以下描述仅旨在说明本公开的各个实施例。如此,所讨论的具体修改不应被解释为对本公开的范围的限制。对于本领域技术人员将显而易见的是,在不脱离本公开的范围的情况下,可以做出各种等同物、改变和修改,并且应当理解,此类等同实施例将被包括在本文中。在本文中引用的所有文献,包括公开出版物、专利和专利申请都通过引用的方式全文并入。

[0202] 定义

[0203] 本文中使用的术语“抗体”包括与特定抗原结合的任何免疫球蛋白、单克隆抗体、多克隆抗体、多价抗体、二价抗体、单价抗体、多特异性抗体或双特异性抗体。天然的完整抗体包括两条重(H)链和两条轻(L)链。哺乳动物的重链分为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ,每条重链由可变区(VH)以及第一、第二、第三和任选的第四恒定区(分别为CH1、CH2、CH3、CH4)组成;哺乳动物的轻链分为 λ 或 κ ,而每条轻链由可变区(VL)以及恒定区组成。抗体呈“Y”型,其中Y型结构的茎部由通过二硫键结合在一起的两条重链的第二和第三恒定区组成。Y的每个臂包括单条重链的与单个轻链的可变区和恒定区结合的可变区和第一恒定区。轻链和重链的可变区负责抗原结合。每条链的可变区通常含有三个高变区,称为互补决定区(CDR)(轻链CDR包括LCDR1、LCDR2、LCDR3,重链CDR包括HCDR1、HCDR2、HCDR3)。本文公开的抗体和抗原结合片段的CDR边界可以通过Kabat、IMGT、Chothia或Al-Lazikani规则来定义或鉴定(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A.M.,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》,273(4),927(1997); Chothia, C.等人,《分子生物学杂志(J Mol Biol.)》12月5日;186(3):651-63(1985); Chothia, C.和Lesk, A.M.,《分子生物学杂志》,196,901(1987); Chothia, C.等人,《自然》.12月21-28日;342(6252):877-83(1989); Kabat E.A.等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of immunological Interest)》,第5版公共卫生署(Public Health Service),国立卫生研究院(National Institutes of Health),马里兰州贝塞斯达(Bethesda, Md.) (1991); Marie-Paule Lefranc等人,《发育与比较免疫学

(Developmental and Comparative Immunology)》,27:55-77(2003);Marie-Paule Lefranc等人,《免疫组研究(Immunome Research)》,1(3), (2005);Marie-Paule Lefranc,《B细胞的分子生物学(Molecular Biology of B cells)》(第二版),第26章,481-514, (2015))。三个CDR由被称为框架区(FR)(轻链FR包括LFR1、LFR2、LFR3和LFR4,重链FR包括HFR1、HFR2、HFR3和HFR4)的侧翼段间隔开,所述框架区比CDR更加高度保守并形成支架以支撑高度可变环。重链和轻链的恒定区与抗原结合无关,但表现出多种效应子功能。如本文所使用的,术语“效应子功能”是指由抗体的Fc区与免疫细胞上的C1q补体蛋白或Fc受体(FcR)之间的相互作用引起的细胞介导或补体介导的细胞毒性作用。示例性效应子功能包括但不限于抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)和补体依赖性细胞毒性(CDC)效应。抗体基于其重链恒定区的氨基酸序列可以分成几类。抗体的五个主要类别或同种型是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,它们的特征分别在于存在 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链。几个主要的抗体类别被分为亚类,如IgG1(γ 1重链)、IgG2(γ 2重链)、IgG3(γ 3重链)、IgG4(γ 4重链)、IgA1(α 1重链)或IgA2(α 2重链)。

[0204] 在某些实施例中,本文提供的抗体涵盖其任何抗原结合片段。如本文所使用的,术语“抗原结合片段”是指由包括一个或多个CDR的抗体的一部分形成的抗体片段,或与抗原结合但不包括完整天然抗体结构的任何其它抗体片段。抗原结合片段的实例包括但不限于双抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双抗体(ds双抗体)、单链抗体分子(scFv)、scFv二聚体(二价双抗体)、双特异性抗体、多特异性抗体、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、结构域抗体和二价结构域抗体。抗原结合片段能够与亲本抗体所结合的共同抗原结合。

[0205] 抗体的“Fab”是指由单条轻链(包括可变区和恒定区)和单条重链的可变区和第一恒定区经二硫键结合起来组成的抗体的一部分。

[0206] “Fab'”是指包括铰链区的一部分的Fab片段。

[0207] “F(ab')₂”是指Fab'的二聚体。

[0208] 抗体(例如,IgG、IgA或IgD同种型)的“Fc”是指由第一重链的第二和第三恒定结构域经由二硫键与第二重链的第二和第三恒定结构域结合组成的抗体的一部分。IgM和IgE同种型抗体的Fc进一步包括第四恒定结构域。抗体的Fc部分负责多种不同的效应子功能,如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC),但在抗原结合中不起作用。

[0209] 抗体的“Fv”是指含有完整抗原结合位点的最小抗体片段。Fv片段由单条轻链的可变区与单条重链的可变区结合组成。

[0210] “单链Fv抗体”或“scFv”是指由轻链可变区与重链可变区直接相互连接或通过肽接头序列连接而成的经工程化的抗体(Huston JS等人《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》,85:5879(1988))。

[0211] “单链Fv-Fc抗体”或“scFv-Fc”是指由与抗体Fc部分连接的scFv组成的经工程化的抗体。

[0212] “骆驼化单结构域抗体”、“重链抗体”或“HCAb”是指含有两个V_H结构域而不含有轻链的抗体(Riechmann L.和Muyldermans S.,《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》.12月10日;231(1-2):25-38(1999);Muyldermans S.,《生物技术杂志(J Biotechnol.)》6月;

74(4):277-302(2001);W094/04678;W094/25591;美国专利第6,005,079号)。重链抗体最初来源于骆驼科(骆驼、单峰驼和美洲驼)。虽然缺失轻链,但是骆驼化抗体有确证的抗原结合全部功能(Hamers-Casterman C.等人,《自然》.6月3日;363(6428):446-8(1993);Nguyen VK.等人《免疫遗传学(Immunogenetics)》.4月;54(1):39-47(2002);Nguyen VK.等人《免疫学(Immunology)》.5月;109(1):93-101(2003))。重链抗体的可变区(VHH结构域)表示由适应性免疫应答产生的最小已知抗原结合单位(Koch-Nolte F.等人,《美国实验生物学会联合会杂志(FASEB J.)》11月;21(13):3490-8.Epub 2007年6月15日(2007))。

[0213] “纳米抗体”是指由来自重链抗体的VHH结构域以及两个恒定结构域CH2和CH3组成的抗体片段。

[0214] “双抗体”或“dAb”包括具有两个抗原结合位点的小抗体片段,其中所述片段包括在同一条多肽链上相连的VH结构域和VL结构域(VH-VL或VL-VH)(参见例如,Holliger P.等人,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》.7月15日;90(14):6444-8(1993);EP404097;W093/11161)。通过使用太短以至于不允许在同一条链上的两个结构域之间配对的接头,结构域被迫与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。这两个抗原结合位点可靶向相同或不同的抗原(或表位)。在一些实施例中,“双特异性ds双抗体”是靶向两种不同抗原(或表位)的双抗体。

[0215] “结构域抗体”是指仅含有重链可变区或轻链可变区的抗体片段。在某些情况下,两个或更多个VH结构域由肽接头共价连接形成二价或多价结构域抗体。二价结构域抗体的两个VH结构域可以靶向相同或不同的抗原。

[0216] 本文使用的术语“价”是指给定分子中存在指定数量的抗原结合位点。术语“单价”是指仅具有一个抗原结合位点的抗体或抗原结合片段;并且术语“多价”是指具有多个抗原结合位点的抗体或抗原结合片段。如此,术语“二价”、“四价”和“六价”分别表示抗原结合分子中存在两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段是二价的。

[0217] 如本文所使用的,“双特异性”抗体是指具有来源于两个不同的单克隆抗体的片段并且能够与两个不同的表位结合的人工抗体。所述两个表位可以存在于同一个抗原上,或者其可以存在于两个不同的抗原上。

[0218] 在某些实施例中,“scFv二聚体”是二价双抗体或双特异性scFv(BsFv),其包括二聚化的两个VH-VL(由肽接头连接)部分,使得一个部分的VH与另一个部分的VL协作形成两个结合位点,所述两个结合位点可以靶向相同抗原(或表位)或不同抗原(或表位)。在其它实施例中,“scFv二聚体”是双特异性双抗体,所述双特异性双抗体包括相互缔合的VH1-VL2(由肽接头连接)和VL1-VH2(也由肽接头连接),使得VH1和VL1协作,VH2和VL2协作,并且每个协作的配对具有不同的抗原特异性。

[0219] “dsFv”是指二硫键稳定的Fv片段,其单条轻链的可变区与单条重链的可变区之间的连接是二硫键。在一些实施例中,“(dsFv)²”或“(dsFv-dsFv’)”包括三条肽链:两个VH部分通过肽接头(例如,长的柔性接头)相连,并通过二硫键分别与两个VL部分结合。在一些实施例中,dsFv-dsFv’具有双特异性,其中每对通过二硫键配对的重链和轻链具有不同的抗原特异性。

[0220] 本文使用的术语“嵌合”是指具有来源于一种物种的重链和/或轻链的一部分并且

所述重链和/或轻链的其余部分来源于另一不同物种的抗体或抗原结合片段。在说明性实例中,嵌合抗体可以包括来源于人的恒定区和来源于非人动物(如来源于小鼠)的可变区。在一些实施例中,所述非人动物是哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、豚鼠或仓鼠。

[0221] 本文使用的术语“人源化”是指包括来源于非人动物的CDR、来源于人的FR区以及来源于人的恒定区(当适用时)的抗体或抗原结合片段。

[0222] 本文使用的术语“亲和力”是指免疫球蛋白分子(即,抗体)或其片段与抗原之间非共价相互作用的强度。

[0223] 本文使用的“特异性结合(specific binding)”或“特异性地结合(specifically binds)”是指两分子间的非随机结合反应,例如,抗体和抗原间的反应。特异性结合的特征可以在于结合亲和力,例如由 K_D 值表示,即,当抗原与抗原结合分子之间的结合达到平衡时解离速率与缔合速率的比率(k_{off}/k_{on})。可以通过使用本领域已知的任何常规方法测定 K_D ,包括但不限于,表面等离子共振法、Octet方法、微量热泳法、HPLC-MS方法和FACS测定方法。 $\leq 10^{-6}M$ (例如 $\leq 5 \times 10^{-7}M$ 、 $\leq 2 \times 10^{-7}M$ 、 $\leq 10^{-7}M$ 、 $\leq 5 \times 10^{-8}M$ 、 $\leq 2 \times 10^{-8}M$ 、 $\leq 10^{-8}M$ 、 $\leq 5 \times 10^{-9}M$ 、 $\leq 4 \times 10^{-9}M$ 、 $\leq 3 \times 10^{-9}M$ 、 $\leq 2 \times 10^{-9}M$ 或 $\leq 10^{-9}M$)的 K_D 值可以表示抗体或其抗原结合片段与PD-L1(例如人PD-L1或食蟹猴PD-L1)之间的特异性结合。

[0224] 本文使用的“竞争结合PD-L1”的能力是指第一抗体或其抗原结合片段抑制PD-L1与第二抗PD-L1抗体之间结合的相互作用到任何可检测的程度的能力。在一些实施例中,竞争结合PD-L1的抗体或抗原结合片段将PD-L1与第二抗PD-L1抗体之间结合的相互作用抑制至少85%或至少90%。在一些实施例中,此抑制可以大于95%或大于99%。

[0225] 本文使用的术语“氨基酸”是指含有氨基($-NH_2$)和羧基($-COOH$)官能团以及每个氨基酸特有的侧链的有机化合物。氨基酸名称在本公开中也以标准的单字母或三字母代码表示,总结如下:

名称	三字母代码	单字母代码
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酸	Glu	E
[0226] 谷氨酰胺	Gln	Q
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F

[0227]

脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

[0228] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。所述术语还适用于其中一个或多个氨基酸残基是对应天然存在的氨基酸的人造化学模拟物的氨基酸聚合物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0229] 当“保守取代”用于氨基酸序列时,是指将氨基酸残基用不同的具有相似理化性质的侧链的氨基酸残基替代。例如,可以在具有疏水侧链的氨基酸残基(例如Met、Ala、Val、Leu和Ile)之间、具有中性亲水侧链的氨基酸残基(例如Cys、Ser、Thr、Asn和Gln)之间、具有酸性侧链的氨基酸残基(例如Asp、Glu)之间、具有碱性侧链的氨基酸残基(例如His、Lys和Arg)之间或具有芳香族侧链的氨基酸残基(例如Trp、Tyr和Phe)之间进行保守取代。本领域已知,保守取代通常不会引起蛋白构象结构的显著变化,因此能够保留蛋白质的生物活性。

[0230] “百分比(%)序列同一性”在用于氨基酸序列(或核酸序列)时被定义为在进行序列比对,并且必要时引入空位以实现最大的对应性后,在候选序列中,与参考序列中的氨基酸(或核酸)残基相同的氨基酸(或核酸)残基的百分比。例如,可以使用公开可用的工具如BLASTN、BLASTp(可在美国国家生物技术信息中心(U.S.National Center for Biotechnology Information,NCBI)的网站上获得,还参见Altschul S.F.等人,《分子生物学杂志》,215:403-410(1990);Stephen F.等人,《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》,25:3389-3402(1997))、ClustalW2(可在欧洲生物信息研究所(European Bioinformatics Institute)的网站上获得,还参见Higgins D.G.等人,《酶学方法(Methods in Enzymology)》,266:383-402(1996);Larkin M.A.等人,《生物信息学(Bioinformatics)》(英国牛津(Oxford,England)),23(21):2947-8(2007))和ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件来实现比对以确定氨基酸(或核酸)序列的百分比序列同一性。本领域技术人员可以使用由所述工具提供的默认参数或可以根据比对的需要适当定制参数,例如通过挑选合适的算法。在某些实施例中,不同的残基位置可能因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是一个氨基酸残基被具有类似化学性质(例如,电荷或疏水性)的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。总体而言,保守氨基酸取代将不会实质上改变蛋白质的功能性质。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,百分比或类似性程度可以向上调整以校正取代的保守性质。用于作出此调整的方法是本领域技术人员所熟知的。参见例如,Pearson(1994)《分子生物学方法(Methods Mol.Biol.)》24:307-331,所述文献通过引用并入本文。

[0231] 如本文所使用的,“同源序列”是指这样的多核苷酸序列(或其互补链)或氨基酸序列,其与另一个序列在任选地比对时具有至少80%(例如至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)的序列同一性。

[0232] “分离的”物质已经经人工由自然状态改变。如果自然界中出现某种“分离的”组合

物或物质,那么其已经被改变或脱离其原始环境,或二者均有发生。例如,某一活体动物体内天然存在的多核苷酸或多肽不是“分离的”,但如果所述多核苷酸或多肽与其在天然状态下共存的物质充分分离并以基本上纯的状态存在,则可以认为是“分离的”。分离的“核酸”或“多核苷酸”可互换使用并指分离的核酸分子的序列。在某些实施例中,“分离的抗体或其抗原结合片段”是指纯度为至少60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的抗体或抗原结合片段,其中纯度由电泳方法(如SDS-PAGE、等电聚焦、毛细管电泳)或色谱方法(如离子交换色谱法或反相HPLC)确定。

[0233] 术语“受试者”包括人和非人动物。非人动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类动物、小鼠、大鼠、猫、兔、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除在指出时之外,术语“患者”或“受试者”在本文中可互换使用。

[0234] 如本文所使用的,“治疗(Treating或treatment)”病状包括预防或减轻病状、减缓病状的发作或发展速率、降低罹患病状的风险、预防或延迟与病状相关的症状的发展、减轻或结束与病状相关的症状、产生病状的完全或部分消退、治愈病状或其某种组合。

[0235] 本文使用的术语“载体”是指可以将遗传元件可操作地插入其中并使所述遗传元件获得表达以便产生由所述遗传元件编码的蛋白质、RNA或DNA或复制所述遗传元件的一种运载工具。载体可以用于转化、转导或转染宿主细胞,使其携带的遗传元件在宿主细胞内得以表达。载体的实例包括质粒、噬菌粒、粘粒、人工染色体如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)、如 λ 噬菌体或M13噬菌体等噬菌体以及动物病毒。载体可以含有多种用于控制表达的元件,包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、可选择元件和报告基因。另外,载体还可以含有复制起点。载体还可以包括协助其进入细胞的材料,包括但不限于,病毒颗粒、脂质体或蛋白质涂层。载体可以是表达载体或克隆载体。本公开提供的载体(例如表达载体)含有本文提供的编码抗体或其抗原结合片段的核酸序列、至少一个可操作地连接到所述核酸序列的启动子(例如,SV40、CMV、EF-1 α)以及至少一个选择标志物。

[0236] 如本文所使用的,“宿主细胞”是指其中已引入有外源多核苷酸和/或载体的细胞。

[0237] 如本文所使用的,术语“可溶性”是指分子(例如,蛋白质)溶解在溶剂(如液体和水性环境)中的能力。

[0238] 如本文所使用的,术语“转化生长因子 β ”和“TGF β ”是指具有来自受试者(例如,人)的任何TGF- β 的全长、天然氨基酸序列的任何TGF β 家族蛋白,包括前体和成熟TGF β 的潜在形式和相关或非相关复合物(“潜在TGF β ”)。在本文中提及此类TGF β 将被理解为提及任何一种当前鉴定的形式,包括TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3同种型及其潜在型式,以及未来鉴定的人TGF β 种类,包括衍生自任何已知TGF β 的序列并且与所述序列至少约75%、优选地至少约80%、更优选地至少约85%、仍更优选地至少约90%并且甚至更优选地至少约95%同源的多肽。具体术语“TGF β 1”、“TGF β 2”和“TGF β 3”是指文献中定义的TGF- β ,例如Derynck等人,《自然·癌症研究(Nature, Cancer Res.)》,47:707(1987);Seyedin等人,《生物化学杂志》,261:5693-5695(1986);deMartin等人,《欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.)》,6:3673(1987);Kuppner等人,《国际癌症杂志(Int. J. Cancer)》,42:562(1988)。术语“转化生长因子 β ”、“TGF β ”、“TGFbeta”、“TGF- β ”和“TGF-beta”在本公开中可互换使用。

[0239] 如本文所使用的,术语“人TGF β 1”是指由人TGFB1基因(例如,野生型人TGFB1基因)编码的TGF β 1蛋白。示例性野生型人TGF β 1蛋白由GenBank登录号NP_000651.3提供。如本文所使用的,术语“人TGF β 2”是指由人TGFB2基因(例如,野生型人TGFB2基因)编码的TGF β 2蛋白。示例性野生型人TGF β 2蛋白由GenBank登录号NP_001129071.1和NP_003229.1提供。如本文所使用的,术语“人TGF β 3”是指由人TGFB3基因(例如,野生型人TGFB3基因)编码的TGF β 3蛋白。示例性野生型人TGF β 3蛋白由GenBank登录号NP_003230.1、NP_001316868.1和NP_001316867.1提供。

[0240] 如本文所使用的,术语“小鼠TGF β 1”、“小鼠TGF β 2”和“小鼠TGF β 3”是指分别由小鼠TGFB1基因(例如,野生型小鼠TGFB1基因)、小鼠TGFB2基因(例如,野生型小鼠TGFB2基因)和小鼠TGFB3基因(例如,野生型小鼠TGFB3基因)编码的TGF β 1蛋白、TGF β 2蛋白和TGF β 3蛋白。示例性野生型小鼠(小家鼠(*Mus musculus*))TGF β 1蛋白由GenBank登录号NP_035707.1和CAA08900.1提供。示例性野生型小鼠TGF β 2蛋白由GenBank登录号NP_033393.2提供。示例性野生型小鼠TGF β 3蛋白由GenBank登录号AAA40422.1提供。

[0241] 如本文所使用的,术语“TGF β 受体”是指结合至少一种TGF β 同种型的任何受体。通常,TGF β 受体包括TGF β 受体I(TGF β RI)、TGF β 受体II(TGF β RII)或TGF β 受体III(TGF β RIII)。

[0242] 关于人,术语“TGF β 受体I”或“TGF β RI”是指人TGF β 受体1型序列,包括野生型TGF β RI以及其已知能够与至少一种TGF β 同种型结合的所有同种型和变体。野生型TGF β RI的示例性氨基酸序列可在GenBank登录号ABD46753.1或UniProtKB-P36897下获得,也包括在本文中作为SEQ ID NO:69。变体TGF β RI可以具有与SEQ ID NO:69的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列并保留野生型序列(例如SEQ ID NO:69)的TGF β 结合活性的至少25%、35%、50%、75%、90%、95%或99%。

[0243] 关于人,术语“TGF β 受体II”或“TGF β RII”是指人TGF β 受体2型同种型A序列,包括野生型TGF β RII以及其已知能够与至少一种TGF β 同种型结合的所有同种型和变体。野生型TGF β RII同种型A或同种型1的示例性氨基酸序列可在GenBank登录号NP_001020018.1或UniProtKB-P37173-1下获得,也包括在本文中作为SEQ ID NO:70,并且野生型TGF β RII同种型B可在GenBank登录号NP_003233.4或UniProtKB-P37173-2下获得,也包括在本文中作为SEQ ID NO:71。变体TGF β RII可以具有与SEQ ID NO:70或71具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的序列并保留野生型序列(例如SEQ ID NO:70或71)的TGF β 结合活性的至少25%、35%、50%、75%、90%、95%或99%。

[0244] 关于人,术语“TGF β 受体III”或“TGF β RIII”是指人TGF β 受体3型序列,包括野生型TGF β RIII以及所有同种型和变体。野生型TGF β RIII的示例性氨基酸序列可在GenBank登录号NP_003234.2或UniProtKB-Q03167下获得,也包括在本文中作为SEQ ID NO:72。

[0245] 如本文所使用的,关于某种参考蛋白或肽的术语“变体”是指参考蛋白或肽的经修饰型式,例如其功能等效物、片段、融合体、衍生物、模拟物或任何组合,所述经修饰型式具有与参考序列具有至少70%(例如80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列同一性的氨基酸序列并保留参考序列(例如野生型序列)的生物活性或结合活性的至少25%(例如35%、50%、75%、90%、95%或99%)。所述变体可以是参考蛋

白或肽的片段、突变体、融合体、截短体或其任何组合。

[0246] 如本文所使用的,术语“白细胞介素-1”或“IL-1”包括IL-1 α 和IL-1 β 、它们的前体(例如pro-IL-1 α 和pro-IL-1 β)、同种型和变体。

[0247] 如本文所使用的,术语“人IL-1 α ”是指由人IL1A基因(例如,野生型人IL1A基因)编码的IL-1 α 蛋白以及同种型和变体。UniProtKB-P01583提供了示例性野生型人IL1 α 蛋白。

[0248] 如本文所使用的,术语“人IL-1 β ”是指由人IL1B基因(例如,野生型人IL1B基因)编码的IL-1 β 蛋白。示例性野生型人IL1 β 蛋白由GenBank登录号NP_000567.1或UniProtKB-C9JVK0提供。

[0249] 如本文所使用的,术语“IL-1受体”或“IL-1R”是指可以与IL-1结合的受体,包括其能够与IL-1结合的所有野生型受体、同种型和变体。通常,存在两种类型的IL-1受体,即IL-1受体I(IL-1RI)和IL-1受体II(IL-1RII)。IL-1RII充当与配体结合而不转导信号的诱饵受体。IL-1RII的蛋白水解切割引起可溶性受体,例如IL-1sRI和IL-1sRII的形成,所述可溶性受体与配体结合而不转导信号(细节参见Thomas G.Kennedy,《激素百科全书(Encyclopedia of Hormones)》中的第V.B.2.章,2003)。IL-1sRI和IL-1sRII是IL-1RII的蛋白水解切割产物并且可以是一组IL-1RII的胞外结构域片段。术语IL-1R还旨在涵盖辅助受体IL-1RAP,所述辅助受体可以与结合到IL-1 β 的IL-1RI缔合,以形成高亲和力的白细胞介素1受体复合物,所述复合物介导NF- κ -B的白细胞介素1依赖性激活和其它通路。

[0250] 如本文所使用的,术语“IL-1RI”包括野生型IL-1RI以及其能够与IL-1 α 和/或IL-1 β 结合的所有同种型和变体。野生型IL-1RI的示例性氨基酸序列可在UniProtKB-P14778下获得,也包括在本文中作为SEQ ID NO:73。

[0251] 如本文所使用的,术语“IL-1RII”包括野生型IL-1RII以及其能够与IL-1 α 和/或IL-1 β 结合的所有同种型和变体。野生型IL-1RII的示例性氨基酸序列可在UniProtKB-P27930下获得,也包括在本文中作为SEQ ID NO:75。

[0252] 如本文所使用的,术语“IL-1RAP”包括野生型IL-1RAP以及其能够与结合到IL-1 β 的IL-1R结合的所有同种型和变体。野生型IL-1RAP的示例性氨基酸序列可在UniProtKB-Q9NPH3下获得,也包括在本文中作为SEQ ID NO:74。

[0253] 如本文所使用的,术语“IL-1sRI”包括可以通过涉及金属蛋白酶的蛋白水解切割产生的所有可溶形式的IL-1RI。天然存在的IL-1sRI的分子量可以在约45kDa到60Kda的范围内。此术语还涵盖IL-1sRI的能够与IL-1 α 和/或IL-1 β 结合的所有同种型和变体。

[0254] 如本文所使用的,术语“IL-1sRII”包括可以通过涉及金属蛋白酶的蛋白水解切割产生的所有可溶形式的IL-1RII。天然存在的IL-1sRII的分子量可以在约45kDa到60Kda的范围内。此术语还涵盖IL-1sRII的能够与IL-1 α 和/或IL-1 β 结合的所有同种型和变体。

[0255] 如本文所使用的,术语“IL-1受体拮抗剂”通常包括可以与IL-1 α 或IL-1 β 竞争结合IL-1受体并抑制IL-1 α 或IL-1 β 活性的任何蛋白。IL-1受体拮抗剂可以包括天然存在的拮抗剂,如IL-1Ra、IL-1sRI和IL-1sRII,以及其它可以阻断IL-1 α 或IL-1 β 的结合以结合到IL-1受体,具体地IL-1RI的人工拮抗剂。

[0256] 如本文所使用的,术语“IL-1Ra”包括野生型IL-1Ra以及其能够与IL-1 α 和/或IL-1 β 结合的所有同种型和变体。野生型IL-1Ra的示例性氨基酸序列可在UniProtKB-P18510下获得,也包括在本文中作为SEQ ID NO:76。

[0257] 如本文所使用的,“癌症”是指以恶性细胞生长或赘生物、异常增殖、浸润或转移为特征的任何医学病状,并且可以是良性或恶性的,并且包括实体瘤和非实体瘤(例如血液系统恶性肿瘤)如白血病。如本文所使用的,“实体瘤”是指赘生性和/或恶性细胞的实体团块。

[0258] 术语“药学上可接受的”表示指定的载体、媒剂、稀释剂、赋形剂和/或盐通常与构成调配物的其它成分在化学和/或物理上相容,并且与其接受者在生理上相容。

[0259] 本文提及“约”值或参数包括(并且描述)指向所述值或参数本身的实施例。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。数字范围包括定义所述范围的数字。一般而言,术语“约”是指变量的指示值以及在指示值的实验误差范围内(例如在平均值的95%置信区间内)或在指示值的10%以内(以较大者为准)的变量的所有值。

[0260] 当关于氨基酸序列(例如,肽、多肽或蛋白质)使用时,术语“融合”或“融合的”是指例如通过化学键合或重组手段将两个或更多个氨基酸序列组合成天然不存在的单一氨基酸序列。融合氨基酸序列可以通过两个编码多核苷酸序列的基因重组产生,并且可以通过将含有重组多核苷酸的构建体引入到宿主细胞中的方法表达。

[0261] 术语“药学上可接受的”表示指定的载体、媒剂、稀释剂、赋形剂和/或盐通常与构成调配物的其它成分在化学和/或物理上相容,并且与其接受者在生理上相容。

[0262] I. 靶向免疫检查点分子并阻断IL-1活性的双功能分子

[0263] 本公开提供了一种双功能分子,其包括与免疫检查点分子结合的第一部分和阻断白细胞介素-1(IL-1)的活性的第二部分。本文提供的双功能分子通过用IL-1结合部分或IL-1受体(IL-1R)结合部分(即,双功能分子的第二部分)阻断IL-1与IL-1受体之间的相互作用,允许阻断和/或降低肿瘤微环境中的IL-1活性。IL-1结合部分和/或IL-1R结合部分可以连接到靶向免疫检查点分子的部分(即,双功能分子的第一部分),所述免疫检查点分子可以在某些肿瘤细胞或免疫细胞的表面上发现。

[0264] IL-1是炎症细胞因子。炎症是肿瘤微环境的重要组成部分,并且IL-1在致癌作用和肿瘤进展中起着关键作用(A.Mantovani等人,《免疫学评论(Immunol Rev.)》2018年1月;281(1):57-61.)。IL-1在肿瘤起始和进展中在不同水平上起作用,包括驱动慢性非可控性炎症、肿瘤血管生成、IL-17通路的激活、骨髓源性抑制细胞(MDSC)的诱导和巨噬细胞募集、侵袭和转移(出处同上)。

[0265] 免疫检查点分子在某些免疫细胞如T细胞、自然杀伤细胞等上表达。一些癌细胞也可以表达某些免疫检查点分子,这可能阻断免疫检查点的激活,从而使癌细胞避开免疫系统的监视。

[0266] 通过减少肿瘤微环境中的IL-1并减少检查点阻断,本公开提供了一种新型双功能分子,所述新型双功能分子可以用于治疗免疫检查点相关疾病,如癌症、自身免疫疾病、传染病等。

[0267] 在某些实施例中,第一部分包括具有免疫刺激或共刺激活性的检查点分子的激动剂。此类免疫刺激性检查点分子可包括但不限于CD27、CD70、CD28、CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、CD40、CD40L(CD154)、CD122、CD137、CD137L、OX40(CD134)、OX40L(CD252)、GITR、ICOS(CD278)和ICOSLG(CD275)、CD2、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKP80、CD160和CD83。

[0268] 在某些实施例中,第一部分包括具有免疫抑制或共抑制活性的检查点分子的抑制

剂。此类免疫抑制性检查点分子可以包括但不限于A2AR、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、BTLA (CD272)、CTLA-4 (CD152)、IDO1、IDO2、TDO、KIR、LAG3、NOX2、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 (CD328)、TIGIT、PVR (CD155)、SIGLEC9 (CD329)、CD160、LAIR1、2B4 (CD244)、CD47和B7-H5。

[0269] 在某些实施例中,所述免疫检查点分子是PD-L1。在某些实施例中,第一部分包括针对PD-L1的抗体部分或其抗原结合片段。在某些实施例中,第一部分包括针对PD-L1的拮抗剂抗体部分或其抗原结合片段。

[0270] 在某些实施例中,所述第二部分包括IL-1结合部分或IL-1受体(IL-1R)结合部分。

[0271] IL-1 α 和IL-1 β 都是促炎的并且与IL-1R结合。在与IL-1 α 或IL-1 β 结合后,IL-1R可以将IL-1R辅助蛋白和衔接蛋白MyD88募集到受体复合物,从而引起下游信号传导级联的激活,并最终激活大量免疫和炎症基因。本发明人发现,阻断IL-1的活性或其与IL-1R的结合与免疫检查点分子的调节的组合将是有益的。

[0272] 在某些实施例中,IL-1是IL-1 α 或IL-1 β 。在某些实施例中,IL-1 β 是人IL-1 β 。

[0273] 在某些实施例中,所述第二部分包括IL-1结合部分。在某些实施例中,所述IL-1结合部分特异性结合到IL-1 α 或IL-1 β 。在某些实施例中,所述IL-1结合部分包括可溶性IL-1R、IL-1R的IL-1结合片段或变体、或针对IL-1的抗体或其抗原结合片段。

[0274] 可溶性IL-1R可以是IL-1R的结构域或片段,例如IL-1R的胞外结构域(ECD)。可替代地,可溶性IL-1R也可以是IL-1sRI或IL-1sRII,它们是天然可溶性并能够与IL-1结合的同种型。

[0275] 技术人员将理解,IL-1RI或IL-1RI的ECD、或IL-1RII或IL-1RII的ECD、或IL-1RAP或IL-1RAP的ECD、或IL-1sRI或IL-1sRII的缩短片段可能足以结合到IL-1(例如,IL-1 α 或IL-1 β),只要此类片段含有IL-1结合结构域。因此,本公开还涵盖IL-1RI、IL-1RI的ECD、或IL-1RII、或IL-1RII的ECD、或IL-1RAP、或IL-1RAP的ECD、IL-1sRI和IL-1sRII中的任一者的所有IL-1结合片段和变体。在某些实施例中,IL-1结合部分包括SEQ ID NO:73、74或75的氨基酸序列或其IL-1结合片段或变体。在某些实施例中,IL-1结合部分包括与SEQ ID NO:73、74和75中的任一者具有至少80%序列同一性的氨基酸序列或其IL-1结合片段或变体。

[0276] 在某些实施例中,IL-1结合部分包括针对IL-1的抗体或其抗原结合片段。也可以使用针对IL-1的抗体或其抗原结合片段,只要此类抗体或抗原结合片段可以干扰IL-1(例如IL-1 α 或IL-1 β)与IL-1R的结合即可。

[0277] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和/或轻链可变区来自选自以下组成的组的抗IL-1 α 抗体:XB2001、鲁吉珠单抗、LY2189102和贝迈奇单抗,或者来自选自以下组成的组的抗IL-1 β 抗体:SSGJ-613、CDP484、卡那单抗和吉伏组单抗。

[0278] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:112的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:113的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:114的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:115的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:108或SEQ ID NO:116的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:117的序列的LCDR3。

[0279] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:104的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:105的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:106的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:107的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:108的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:109的序列的LCDR3。

[0280] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:112的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:113的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:114的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:115的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:116的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:117的序列的LCDR3。

[0281] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:110和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:111和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0282] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:102和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:103和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0283] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:110和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:111和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0284] 在某些实施例中,所述第二部分包括IL-1R结合部分。

[0285] 在某些实施例中,IL-1R结合部分包括IL-1Ra或其IL-1R结合片段或变体。IL-1Ra是IL-1R的拮抗剂并且可以与IL-1 α 或IL-1 β 竞争结合IL-1R。类似地,技术人员将理解IL-1Ra的缩短片段可能足以用于结合IL-1R和/或与IL-1 α 或IL-1 β 竞争。在某些实施例中,IL-1R结合部分包括截短形式的IL-1Ra。在某些实施例中,IL-1R结合部分包括SEQ ID NO:67或76的氨基酸序列或其任何IL-1结合片段或变体。在某些实施例中,IL-1R结合部分包括与SEQ ID NO:67或76具有至少80%序列同一性的氨基酸序列或其任何IL-1结合片段或变体。技术人员将理解,野生型IL-1Ra的变体也可用于本公开,只要此类变体能够与IL-1 α 或IL-1 β 竞争与IL-1R结合即可。

[0286] 在某些实施例中,IL-1R结合部分包括针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段。也可以使用针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段,只要此类抗体或抗原结合片段可以与IL-1 α 或IL-1 β 竞争与IL-1R结合即可。

[0287] 在某些实施例中,所述针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和/或轻链可变区来自选自由以下组成的组的抗体:司柏索单抗、艾特利单抗、伊姆西多单抗、AMG 108、迈瑞利单抗、尼达利单抗、MEDI8968、REGN6490、HB0034和CSC012。

[0288] II. 靶向PD-L1的双功能分子和第二部分

[0289] 当肿瘤微环境(“TME”)富集有免疫抑制性细胞因子时,PD-1/PD-L1轴检查点抑制剂(例如,PD-L1抗体)的治疗功效可能受到限制。局部微环境中的此类免疫抑制性细胞因子的信号传导可以减少肿瘤浸润性T细胞,并使它们偏向Tregs并减弱免疫效应细胞的激活。

[0290] 在一个方面,本公开内容提供了一种新型双功能分子,其包括与PD-L1结合的第一部分和a)阻断免疫抑制性细胞因子的活性或b)刺激抗肿瘤免疫的第二部分。所述分子可以是化合物、肽、多肽、蛋白质或其任何组合。第二部分可以通过阻断免疫抑制活性或细胞因子或增加或刺激免疫来恢复肿瘤微环境中的免疫应答。

[0291] 在某些实施例中,本文提供的双功能分子包括与PD-L1结合的第一部分(即,PD-L1结合部分)和阻断免疫抑制性细胞因子的活性的第二部分。

[0292] 在某些实施例中,免疫抑制性细胞因子包括转化生长因子 β (TGF- β)超家族中的细胞因子、IL-1或血管内皮生长因子(VEGF)。在某些实施例中,所述TGF- β 超家族中的免疫抑制性细胞因子包括骨形态发生蛋白(BMP)、激活素、NODAL和生长和分化因子(GDF)。

[0293] 在某些实施例中,所述免疫抑制性细胞因子是TGF- β 。在某些实施例中,所述免疫抑制性细胞因子是IL-1。

[0294] 在某些实施例中,所述第二部分包括TGF β 结合部分。在某些实施例中,所述第二部分包括IL-1结合部分。如本文所使用的,术语“结合部分”、“结合片段”是指具有与靶分子或复合物特异性结合的能力的部分或片段。术语“TGF β 结合部分”是指具有与TGF β 家族的一个或多个家族成员或同种型(例如,TGF β 1、TGF β 2或TGF β 3)特异性结合的能力的部分。类似地,术语“IL-1结合部分”是指具有与IL-1家族的一个或多个家族成员(例如,IL-1 α 、IL-1 β)特异性结合的能力的部分。

[0295] 在某些实施例中,本文提供的双功能分子包括与PD-L1结合的第一部分(即,PD-L1结合部分)和刺激抗肿瘤免疫的第二部分。在某些实施例中,所述第二部分包括免疫刺激性多肽或其功能等效物或其变体。在某些实施例中,所述免疫刺激性多肽是白细胞介素(IL)-2(IL-2)、IL-15、IL-21、IL-10、IL-12、IL-23、IL-27、IL-35、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、可溶性CD4、可溶性LAG-3或IFN- α 或其功能等效物。

[0296] 在某些实施例中,所述第二部分包括免疫抑制性受体信号传导的拮抗剂。在某些实施例中,所述免疫抑制性受体是SIRP α 。

[0297] 在某些实施例中,所述双功能分子包括所述第二部分中的一个或多个第二部分。在某些实施例中,所述第二部分中的所述一个或多个第二部分可以具有相同的类型,例如,所述一个或多个第二部分中的每个第二部分可以阻断免疫抑制性细胞因子的活性,或者所述一个或多个第二部分中的每个第二部分可以刺激抗肿瘤免疫。在某些实施例中,所述第二部分中的所述一个或多个第二部分可以具有不同的类型。在某些实施例中,所述多个第二部分中的每个第二部分可以具有相同的序列或者可以具有不同的氨基酸序列。

[0298] i. TGF β 结合部分

[0299] 在某些实施例中,所述TGF β 结合部分包括可溶性TGF β 受体(TGFBR)或其TGF β 结合片段或变体、或针对TGF β 的抗体和其抗原结合片段。

[0300] “TGF β 结合部分”在本公开中也可以称为“TGF β 陷阱(TGF β Trap)”。因此,靶向PD-L1和TGF β 两者的蛋白质在本公开中也可以称为“抗PD-L1/TGF β 陷阱”。

[0301] 在某些实施例中,TGF β 结合部分与人和/或小鼠TGF β 结合。在某些实施例中,TGF β

结合部分能够拮抗和/或抑制TGFβ信号传导通路。在某些实施例中，TGFβ结合部分能够拮抗和/或抑制TGFβ。

[0302] 在本公开中，TGFβ结合部分可以包括与TGFβ家族的一个或多个家族成员或同种型特异性结合的任何部分。在某些实施例中，TGFβ结合部分包括与TGFβ1 (例如，人TGFβ1)、TGFβ2 (例如，人TGFβ2) 和/或TGFβ3 (例如，人TGFβ3) 结合的部分或其具有相似或改善的TGFβ结合亲和力的变体。在某些实施例中，TGFβ结合部分包括与TGFβ1 (例如，人TGFβ1) 结合的部分。在某些实施例中，TGFβ结合部分包括与TGFβ2 (例如，人TGFβ2) 结合的部分。在某些实施例中，TGFβ结合部分包括与TGFβ3 (例如，人TGFβ3) 结合的部分。在某些实施例中，TGFβ结合部分包括与TGFβ1 (例如，人TGFβ1) 和TGFβ2 (例如，人TGFβ2) 两者特异性结合的部分。在某些实施例中，TGFβ结合部分包括与TGFβ1 (例如，人TGFβ1) 和TGFβ3 (例如，人TGFβ3) 两者特异性结合的部分。在某些实施例中，TGFβ结合部分包括与TGFβ2 (例如，人TGFβ2) 和TGFβ3 (例如，人TGFβ3) 两者特异性结合的部分。在某些实施例中，TGFβ结合部分包括与TGFβ1 (例如，人TGFβ1)、TGFβ2 (例如，人TGFβ2) 和TGFβ3 (例如，人TGFβ3) 中的每一者特异性结合的部分。本领域技术人员将理解，与TGFβ家族的一个家族成员或同种型结合的TGFβ结合部分可能能够以相似或更高的亲和力与TGFβ家族的一个或多个其它家族成员或同种型结合。

[0303] 在某些实施例中，TGFβ结合部分包括相对于TGFβ2和/或TGFβ3而选择性地结合到TGFβ1的部分。

[0304] 在某些实施例中，TGFβ结合部分包括以相似的亲和力与人TGFβ1和小鼠TGFβ1特异性结合的部分。

[0305] 在某些实施例中，本公开的TGFβ结合部分包括可溶性TGFβ受体 (TGFβR) 或其TGFβ结合片段或变体。

[0306] 示例性TGFβ受体包括TGFβRI、TGFβRII和TGFβRIII。在某些实施例中，TGFβ受体选自自由以下组成的组：TGFβ受体I (TGFβRI)、TGFβ受体II (TGFβRII)、TGFβ受体III (TGFβRIII) 和其任何组合。在某些实施例中，TGFβ受体是TGFβRI (例如，人TGFβRI)。在某些实施例中，TGFβ受体是TGFβRII (例如，人TGFβRII)。在某些实施例中，TGFβ受体是TGFβRIII (例如，人TGFβRIII)。

[0307] 在某些实施例中，TGFβ结合部分包括TGFβ受体 (例如，人TGFβ受体) 的胞外结构域 (ECD) 或其TGFβ结合片段或变体。在某些实施例中，TGFβ受体的ECD包括TGFβRI (例如，人TGFβRI) 的ECD、TGFβRII (例如，人TGFβRII) 的ECD、TGFβRIII (例如，人TGFβRIII) 的ECD或其任何组合。在某些实施例中，TGFβRII的ECD包括SEQ ID NO:66、79的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少80% (例如，至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 序列同一性但仍保留对TGFβ的结合特异性的氨基酸序列。在某些实施例中，TGFβRI的ECD包括SEQ ID NO:77的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少80% (例如，至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 序列同一性但仍保留对TGFβ的结合特异性的氨基酸序列。在某些实施例中，TGFβRIII的ECD包括SEQ ID NO:78的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少80% (例如，至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 序列同一性但仍保留对TGFβ的结合特异性的氨基酸序列。

[0308] 在某些实施例中，TGFβ结合部分包括针对TGFβ的抗体和其抗原结合片段。示例性

抗TGF β 抗体包括非苏木单抗(fresolimumab)和美替木单抗(metelimumab)以及在以下中描述的抗TGF β 抗体或其抗原结合片段:例如,US7494651B2、US8383780B2、US8012482B2、WO 2017141208A1,所述文献中的每个文献通过引用整体并入本文。

[0309] 在某些实施例中,TGF β 结合部分包括一种或多种TGF β 受体的一个或多个ECD和/或一种或多种抗TGF β 抗体或其抗原结合片段的组合。

[0310] 所述一个或多个ECD可以相同或不同。例如,TGF β 结合部分可以包括TGF β 受体的ECD的相同重复序列,或者可替代地可以包括同一TGF β 受体的不同ECD序列的组合,或者可替代地可以包括来自不同TGF β 受体的不同ECD的组合。类似地,所述一种或多种抗TGF β 抗体可以相同或不同。

[0311] 在某些实施例中,TGF β 结合部分包括选自由以下组成的组的ECD的组合(或融合体):TGF β RI(例如,人TGF β RI)的ECD、TGF β RII(例如,人TGF β RII)的ECD、TGF β RIII(例如,人TGF β RIII)的ECD或其任何组合。

[0312] 在某些实施例中,TGF β 结合部分包括一种或多种抗TGF β 抗体或其抗原结合片段的组合(或融合体)。

[0313] 在某些实施例中,TGF β 结合部分包括以下的组合(或融合体):ECD,所述ECD选自由以下组成的组:TGF β RI(例如,人TGF β RI)的ECD、TGF β RII(例如,人TGF β RII)的ECD、TGF β RIII(例如,人TGF β RIII)的ECD;一种或多种抗TGF β 抗体或其抗原结合片段;或其任何组合。

[0314] ii. IL-1结合部分

[0315] 在某些实施例中,所述第二部分包括IL-1结合部分。在某些实施例中,IL-1是IL-1 α 或IL-1 β 。在某些实施例中,IL-1 β 是人IL-1 β 。

[0316] 在某些实施例中,所述IL-1结合部分特异性结合到IL-1 α 或IL-1 β 。在某些实施例中,所述IL-1结合部分包括相对于IL-1 α 而选择性地结合到IL-1 β 的部分或相对于IL-1 β 而选择性地结合到IL-1 α 的部分。

[0317] 在某些实施例中,所述IL-1结合部分包括可溶性IL-1R、IL-1R的IL-1结合片段或变体、或针对IL-1的抗体或其抗原结合片段。

[0318] 可溶性IL-1R可以包括IL-1R的结构域或片段或变体,例如,IL-1R的胞外结构域(ECD)。可替代地,可溶性IL-1R也可以包括IL-1sRI或IL-1sRII,它们是天然可溶性并能够与IL-1结合的同种型。

[0319] 技术人员将理解,IL-1R或IL-1R的ECD、或IL-1sRI或IL-1sRII的缩短片段可能足以结合到IL-1(例如,IL-1 α 或IL-1 β),只要此类片段含有IL-1结合结构域。因此,本文提供的IL-1结合部分还可以包括IL-1R、IL-1R的ECD、IL-1sRI和IL-1sRII中的任一者的IL-1结合片段。在某些实施例中,IL-1结合部分包括SEQ ID NO:73、74或75的氨基酸序列或其IL-1结合片段或变体。在某些实施例中,IL-1结合部分包括与SEQ ID NO:73、74和75中的任一者具有至少80%序列同一性的氨基酸序列或其IL-1结合片段或变体。

[0320] 在某些实施例中,IL-1结合部分包括针对IL-1的抗体或其抗原结合片段。也可以使用针对IL-1的抗体或其抗原结合片段,只要此类抗体或抗原结合片段可以干扰IL-1(例如IL-1 α 或IL-1 β)与IL-1R的结合即可。

[0321] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和/或轻链可变区来自选自由以下组成的组的抗IL-1 α 抗体:

XB2001、鲁吉珠单抗、LY2189102和贝迈奇单抗,或者来自选自由以下组成的组的抗IL-1 β 抗体:SSGJ-613、CDP484、卡那单抗和吉伏组单抗。

[0322] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:104或SEQ ID NO:112的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:105或SEQ ID NO:113的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:106或SEQ ID NO:114的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:115的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:108或SEQ ID NO:116的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:109或SEQ ID NO:117的序列的LCDR3。

[0323] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:104的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:105的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:106的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:107的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:108的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:109的序列的LCDR3。

[0324] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括:包括SEQ ID NO:112的序列的HCDR1;包括SEQ ID NO:113的序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:114的序列的HCDR3,所述轻链可变区包括:包括SEQ ID NO:115的序列的LCDR1;包括SEQ ID NO:116的序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:117的序列的LCDR3。

[0325] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:110和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:111和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0326] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:102和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:103和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0327] 在某些实施例中,所述针对IL-1的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:110和与其具有至少80%序列同一性的同源序列,所述轻链可变区包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:111和与其具有至少80%序列同一性的同源序列。

[0328] 在某些实施例中,IL-1结合部分包括选自由以下组成的组的一个或多个部分的组合:IL-1R、IL-1R的ECD、IL-1sRI、IL-1sRII、针对IL-1的抗体、其任何IL-1结合片段和其任何组合。此类一个或多个部分可以通过直接键连接或可以通过合适的接头连接。

[0329] 在某些实施例中,IL-1R结合部分包括IL-1Ra或其IL-1R结合片段或变体。IL-1Ra是IL-1R的拮抗剂并且可以与IL-1 α 或IL-1 β 竞争结合IL-1R。类似地,技术人员将理解IL-1Ra的缩短片段可能足以用于结合IL-1R和/或与IL-1 α 或IL-1 β 竞争。在某些实施例中,IL-1R结合部分包括截短形式的IL-1Ra。在某些实施例中,IL-1R结合部分包括SEQ ID NO:67的氨基酸序列或其任何IL-1结合片段或变体。在某些实施例中,IL-1R结合部分包括与SEQ ID NO:67具有至少80%序列同一性的氨基酸序列或其任何IL-1结合片段或变体。技术人员将

理解,野生型IL-1Ra的变体也可用于本公开,只要此类变体能够与IL-1 α 或IL-1 β 竞争与IL-1R结合即可。

[0330] 在某些实施例中,IL-1R结合部分包括针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段。也可以使用针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段,只要此类抗体或抗原结合片段可以与IL-1 α 或IL-1 β 竞争与IL-1R结合即可。

[0331] 在某些实施例中,IL-1R结合部分包括选自由以下组成的组的一个或多个部分的组合:IL-1Ra、针对IL-1R的抗体、其任何IL-1R结合片段或变体和其任何组合。此类一个或多个部分可以通过直接键连接或可以通过合适的接头连接。

[0332] 在某些实施例中,所述针对IL-1R的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区和/或轻链可变区来自选自由以下组成的组的抗体:司柏索利单抗、艾特利单抗、伊姆西多单抗、AMG 108、迈瑞利单抗、尼达利单抗、MEDI8968、REGN6490、HB0034和CSC012。

[0333] iii. 免疫刺激性多肽

[0334] 在某些实施例中,所述第二部分包括免疫刺激性多肽或其功能等效物或其变体。在某些实施例中,免疫刺激性多肽是可溶性CD4、可溶性LAG-3或其功能等效物。

[0335] 在某些实施例中,可溶性LAG-3包括LAG-3的胞外结构域(ECD)或其MHC II类(MHCII)结合片段或变体。

[0336] LAG-3(Uniprot编号:Q61790)属于免疫球蛋白(Ig)超家族,是一种包括503个氨基酸的I型跨膜蛋白。Lag-3包括胞内结构域(ICD)、跨膜结构域(TMD)和胞外结构域(ECD)。ECD包括四个Ig样结构域,即D1到D4,其中D1包括9条 β -链:A、B、C、C'、C''、D、E、F和G链。在C链与C'链之间,存在另外的序列,所述另外的序列具有形成“额外环”的约30个氨基酸。据报道,此类“额外环”涉及LAG-3与MHCII之间的相互作用。在某些实施例中,可溶性LAG-3包括额外环、D1结构域、D1加D2结构域或其任何MHC II结合片段或变体的氨基酸序列。在某些实施例中,可溶性LAG-3包括SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101的氨基酸序列或其任何MHC II结合片段或变体。

[0337] LAG-3在激活的T细胞、天然杀伤细胞、B细胞和浆细胞样树突状细胞上表达。LAG-3的主要配体是MHC II类,与CD4相比,LAG-3以更高的亲和力与MHC II类结合。连接肽(CP)存在于LAG-3的D4与TMD之间,其中在金属蛋白酶ADAM10和/或ADAM17的存在下发生切割以产生经切割的可溶性LAG-3。参见例如Huard等人,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A)》1997;94:5744-9.;Workman等人,《免疫学杂志(J Immunol)》2002;169:5392-5.doi:10.4049/jimmunol.169.10.5392;和Lawrence等人,《癌症免疫治疗杂志(J Immunother Cancer)》.2015;3(增刊2):P216,所述文献通过引用并入本文。

[0338] LAG-3还编码可被翻译成可溶形式的LAG-3的替代性剪接变体。可溶性LAG-3通过MHCII信号传导激活抗原呈递细胞(APC),从而使得体内抗原特异性T细胞应答增加。例如,可溶性LAG-3激活树突状细胞(DC),并且据报道参与细胞因子激活(如TNF- α 和/或IL-12激活)的旁观者T细胞的促炎活动,并且它可以直接激活DC。参见例如Triebel,《免疫学趋势(Trends Immunol.)》,2003,24:619-622,其通过引用并入本文。

[0339] 在某些实施例中,可溶性LAG-3包括依替莫德 α (Eftilagimod alpha)(IMP321)或其MHC II结合片段或变体。IMP321是LAG-3的可溶性二聚体重组形式。IMP321通过借助于

MHCII分子刺激树突状细胞来诱导持续的免疫应答。MP321和抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的组合疗法已显示协同激活T细胞(具体地CD8⁺T细胞)。参见例如Luc等人,在NLM目录添加到搜索中的PubMed搜索中的未来肿瘤行动搜索(Future Oncol Actions Search in PubMed Search in NLM Catalog Add to Search)。2019年6月;15(17):1963-1973.doi:10.2217/fon-2018-0807.Epub 2019年4月12日.;Julio等人,《临床肿瘤学杂志(Journal of Clinical Oncology)》,第37卷,第15期;和US10874713B,所述文献通过引用并入本文。

[0340] iv. 免疫抑制性受体信号传导的拮抗剂

[0341] 在某些实施例中,所述第二部分包括免疫抑制性受体信号传导的拮抗剂。在某些实施例中,所述免疫抑制性受体是SIRP α 。

[0342] 如本文所使用的,可与术语“信号调节蛋白 α ”互换的术语“SIRP α ”是指主要在骨髓细胞和树突状细胞上表达的抑制性受体。SIRP α 属于SIRPs家族,所述家族还包括其它几种跨膜糖蛋白,包括SIRP β 和SIRP γ 。SIRPs家族的每个成员都含有3个相似的胞外Ig样结构域,而跨膜和细胞质结构域不同。

[0343] SIRP α 可以与传递“不要吃我”信号以抑制吞噬作用的CD47结合,并且阻断CD47介导的SIRP α 在吞噬细胞上的接合可以引起去除带有“吃我”信号的活细胞。CD47是一种广泛表达的跨膜糖蛋白,具有一个胞外N末端IgV结构域、五个跨膜结构域和一个短的C末端胞内尾。CD47作为SIRP α 的细胞配体发挥作用。肿瘤细胞经常过度表达CD47以避免巨噬细胞介导的破坏。已证明CD47与SIRP α 的相互作用参与巨噬细胞介导的吞噬作用的调节(Takenaka等人,《自然免疫学(Nature Immunol.)》,8(12):1313-1323,2007)。

[0344] 在某些实施例中,所述第二部分阻断CD47与SIRP α 之间的相互作用。在各种临床前模型中,阻断CD47与SIRP α 相互作用的疗法会刺激体外癌细胞的吞噬作用和体内抗肿瘤免疫应答。

[0345] 所述第二部分可以包括CD47结合结构域或SIRP α 结合结构域。在某些实施例中,所述免疫抑制性受体是信号调节蛋白 α (SIRP α)。在某些实施例中,所述第二部分阻断CD47与SIRP α 之间的相互作用。在某些实施例中,所述第二部分包括CD47结合结构域或SIRP α 结合结构域。在某些实施例中,所述CD47结合结构域包括可溶性SIRP α 或其CD47结合片段、或抗CD47抗体或其抗原结合片段。

[0346] 在某些实施例中,所述可溶性SIRP α 包括所述SIRP α 的胞外结构域(ECD)或其CD47结合片段或变体。在某些实施例中,可溶性SIRP α 包括SEQ ID NO:84的氨基酸序列或与所述氨基酸序列具有至少80%(例如,至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性但仍保留对CD47的结合特异性的氨基酸序列。任选地,可溶性SIRP α 是经工程化的高亲和力SIRP α 变体,所述变体有效地拮抗癌细胞上的CD47,但本身不会诱导巨噬细胞吞噬作用。在某些实施例中,SIRP α 变体包括选自以下组成的组的相对于SEQ ID NO:98的一个或多个突变:L4V、L4I、V6I、V6L、A21V、V27I、V27L、I31T、I31S、I31F、E47V、E47L、K53R、E54Q、H56P、H56R、V63I、S66T、S66G、K68R、V92I、F94L、F94V和F103V。在某些实施例中,SIRP α 变体包括选自以下组成的组的突变的组合:1) V27I、K53R、S66T、K68R、F103V;2) L4V、V27L、E47V、K53R、E54Q、S66G、K68R、V92I;3) L4V、V6I、A21V、V27I、I31T、E47L、K53R、H56P、S66T、K68R、F94L;4) V6I、V27I、I31S、E47V、K53R、E54Q、H56P、S66G、V92I、F94L;5) L4I、A21V、V27I、I31F、E47V、K53R、E54Q、H56R、S66G、F94V、F103V;

6) L4V、V6I、V27I、I31F、E47V、K53R、H56R、S66G、K68R、V92I、F94L; 7) L4V、V6L、I31F、E47V、K53R、H56P、S66G、V92I、F103V; 8) V6I、V27I、I31F、E47L、K53R、E54Q、H56P、S66T; 9) L4V、V6I、V27I、I31F、E47V、K53R、E54Q、H56P、V63、S66T、K68R、V92I; 10) V6I、V27I、I31T、E47V、K53R、E54Q、H56P、S66G、K68R、V92I、F103V; 和11) V6I、V27I、I31F、E47V、K53R、E54Q、H56P、S66T、V92I。参见例如Kipp Weiskopf等人《科学(Science)》341, 88 (2013), 其通过引用并入本文。

[0347] 在某些实施例中, 所述SIRP α 结合结构域包括可溶性CD47或其SIRP α 结合片段、或抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中, 所述可溶性CD47包括所述CD47的胞外结构域(ECD)或其SIRP α 结合片段、抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段。

[0348] 在某些实施例中, CD47结合结构域包括抗CD47抗体和其抗原结合片段。示例性抗CD47抗体包括但不限于人源化5F9抗体、B6H12抗体和ZF1抗体。参见Lu等人, 《肿瘤指标与疗法(OncoTargets and Therapy)》, 第13卷, DOI <https://doi.org/10.2147/OTT.S249822>, 其通过引用并入本文。在某些实施例中, SIRP α 结合结构域包括抗SIRP α 抗体或其抗原结合片段。示例性抗SIRP α 抗体包括但不限于BI765064和AL008。参见例如WO 2019073080A1、WO 2019175218A1和WO 2018107058A1, 所述文献通过引用并入本文。

[0349] 在某些实施例中, CD47结合结构域包括一个或多个SIRP α 、SIRP β 或SIRP γ 的一个或多个ECD和/或一种或多种抗CD47抗体或其抗原结合片段的组合。

[0350] 所述一个或多个ECD可以相同或不同。例如, CD47结合结构域可以包括SIRP α 、SIRP β 或SIRP γ 的ECD的相同重复序列, 或者可替代地可以包括相同SIRP α 、SIRP β 或SIRP γ 的不同ECD序列的组合, 或者可替代地可以包括来自不同SIRP α 、SIRP β 或SIRP γ 的不同ECD的组合。类似地, 所述一种或多种抗CD47抗体可以相同或不同。

[0351] 在某些实施例中, CD47结合结构域包括选自由以下组成的组的ECD的组合(或融合体): SIRP α 的ECD、SIRP β 的ECD、SIRP γ 的ECD或其任何组合。

[0352] 在某些实施例中, CD47结合结构域包括一种或多种抗CD47抗体或其抗原结合片段的组合(或融合体)。

[0353] 在某些实施例中, CD47结合结构域包括以下的组合(或融合体): ECD, 所述ECD选自由以下组成的组: SIRP α 的ECD、SIRP β 的ECD、SIRP γ 的ECD; 一种或多种抗CD47抗体或其抗原结合片段; 或其任何组合。

[0354] v. PD-L1结合部分

[0355] 在某些实施例中, 本文提供的双功能分子包括第一部分, 所述第一部分是PD-L1结合部分。

[0356] 在某些实施例中, 本公开的PD-L1结合部分与PD-L1(例如, 人PD-L1或食蟹猴PD-L1)结合。在某些实施例中, 本公开的PD-L1结合部分与人PD-L1结合。在某些实施例中, 本公开的PD-L1结合部分与食蟹猴PD-L1结合。

[0357] 在某些实施例中, 本公开的PD-L1结合部分包括抗PD-L1抗体部分。在某些实施例中, 示例性抗PD-L1抗体在本公开的抗PD-L1抗体章节和说明性抗PD-L1抗体章节中公开。

[0358] 在某些实施例中, 抗PD-L1抗体部分包括一个或多个CDR。在某些实施例中, 抗PD-L1抗体部分包括在本公开的说明性抗PD-L1抗体章节中描述的一个或多个CDR。在某些实施例中, 抗PD-L1抗体部分包括重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。在某些实施例中, 抗PD-L1抗体部分包括如本公开的说明性抗PD-L1抗体章节中公开的抗PD-L1抗体的VH和VL。

[0359] 在某些实施例中,抗PD-L1抗体部分进一步包括附加到重链可变区的羧基端的重链恒定结构域。在某些实施例中,重链恒定区来源于由IgA、IgG和IgM组成的组。在某些实施例中,重链恒定区来源于人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2或IgM。在某些实施例中,抗PD-L1抗体部分进一步包括附加到轻链可变区的羧基端的轻链恒定结构域。在某些实施例中,轻链恒定区来源于κ轻链或λ轻链。在某些实施例中,重链恒定区包括SEQ ID NO:80或81的氨基酸序列。在某些实施例中,轻链恒定区包括SEQ ID NO:82的氨基酸序列。

[0360] vi. 第一部分与第二部分之间的连接

[0361] 在本公开中,第二部分可以连接到第一部分的任何部分。例如,如TGFβ结合部分或IL-1结合部分等第二部分可以连接到第一部分的任何合适的部分,所述第一部分如PD-L1结合部分(例如,抗PD-L1抗体部分)。

[0362] 在某些实施例中,PD-L1结合部分包括一条或多条多肽链,如抗体重链和轻链。

[0363] 在某些实施例中,所述双功能分子包括所述第二部分中的一个或多个第二部分。在某些实施例中,所述多个第二部分中的至少一个第二部分连接到所述第一部分的多肽链的氨基端(N端)或羧基(C端)。在某些实施例中,所述多个第二部分中的所述至少一个第二部分连接到所述第一部分的重链的N端或C端或连接到第一部分轻链的N端或C端。

[0364] 在某些实施例中,所述多个第二部分中的所述至少一个第二部分连接到所述第一部分的重链恒定区的C端。在某些实施例中,所述多个第二部分中的每个第二部分分别连接到所述第一部分的每个重链恒定区的C端。

[0365] 在某些实施例中,所述双功能分子包括所述第二部分中的至少两个第二部分,所述至少两个第二部分中的每个第二部分分别连接到所述第一部分的每条重链的C端,或者所述至少两个第二部分中的每个第二部分分别连接到所述第一部分的每条轻链的C端。在某些实施例中,所述双功能分子包括所述第二部分中的至少两个第二部分,所述至少两个第二部分中的每个第二部分分别连接到所述第一部分的每条重链的N端,或者所述至少两个第二部分中的每个第二部分分别连接到所述第一部分的每条轻链的N端。

[0366] 在某些实施例中,所述双功能分子包括所述第二部分中的多于一个第二部分,所述多于一个第二部分分别连接到:所述第一部分的重链的N端、所述第一部分的重链的C端、所述第一部分轻链的N端、所述第一部分轻链的C端或其任何组合。例如,所述双功能分子可以包括所述第二部分中的至少两个第二部分,所述至少两个第二部分中的一个第二部分连接到所述第一部分的重链的C端,并且另一个第二部分连接到所述第一部分轻链的C端。例如,所述双功能分子可以包括所述第二部分中的至少两个第二部分,所述至少两个第二部分中的一个第二部分连接到所述第一部分的重链的N端,并且另一个第二部分连接到所述第一部分轻链的N端。

[0367] 在某些实施例中,一个或多个TGFβ结合部分、一个或多个IL-1结合部分、一种或多种免疫刺激性多肽(例如,可溶性LAG3或可溶性CD4)或一个或多个CD47结合部分在选自以下组成的组的一个或多个位置处连接到抗PD-L1抗体部分:抗PD-L1抗体部分的1)重链可变区的N端,2)轻链可变区的N端,3)重链可变区的C端;4)轻链可变区的C端;5)重链恒定区的C端;6)轻链恒定区的C端;以及7)其任何组合。

[0368] 在某些实施例中,所述双功能分子包括同二聚体重链。在某些实施例中,所述双功能分子包括异二聚体重链。所述重链就所述第二部分的存在或位置而言是异二聚体的。在

某些实施例中,所述异二聚体重链包括具有所述第二部分的一条重链,而另一条重链不具有所述第二部分。

[0369] vii. 接头

[0370] 所述第二部分可以直接或通过接头连接到所述第一部分。直接连接可以是化学连接(如共价键)。

[0371] 在某些实施例中,所述双功能分子进一步包括连接所述第一部分和所述第二部分的接头。如本文所使用的,术语“接头”可以是任何合适的双功能部分,所述双功能部分能够与至少两个要连接的实体反应,从而将实体键合以形成一个分子或保持实体足够紧密地缔合。所述接头可以整合到所得连接分子或结构中而具有或不具有其反应的官能团。

[0372] 在某些实施例中,所述接头选自由以下组成的组:可切割接头、不可切割接头、肽接头、柔性接头、刚性接头、螺旋接头和非螺旋接头。

[0373] 在某些实施例中,所述接头包括肽接头。肽接头可以由通过肽键连接在一起的氨基酸残基构成。在某些实施例中,肽接头可以进一步包括一种或多种非天然氨基酸。在某些实施例中,肽接头包括具有通过肽键连接的至少1、2、3、4、5、8、10、15、20、30、50或更多个氨基酸残基并且能够连接两个或更多个多肽的氨基酸序列。肽接头可以具有或不具有二级结构。

[0374] 可以使用任何合适的肽接头。许多肽接头序列是本领域已知的,参见例如Holliger等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》90:6444-6448(1993);Poljak等人,《结构(Structure)》2:1121-1123(1994)。在某些实施例中,肽接头可以包括选自以下的氨基酸残基或由选自以下的氨基酸残基组成:甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。在一些实施例中,肽接头可以由大部分无空间位阻的氨基酸如甘氨酸和丙氨酸构成。在一些实施例中,接头是聚甘氨酸、聚丙氨酸、甘氨酸和丙氨酸的组合(如聚(Gly-Ala))或甘氨酸和丝氨酸的组合(如聚(Gly-Ser))。

[0375] 在某些实施例中,所述接头包括((G)_nS)_m的氨基酸序列,其中m和n独立地是选自以下的整数:0到30、1到29、2到28、3到27、4到26、5到25、6到24、7到23、8到22、9到21、10到20、11到19、12到18、13到17、14到16或5。在某些实施例中,m是4,并且n是4。

[0376] 在某些实施例中,所述接头包括SEQ ID NO:68的氨基酸序列。在某些实施例中,所述接头包括与SEQ ID NO:68具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0377] viii. PD-L1抗体和其他抗原结合片段

[0378] 在某些实施例中,本文提供的双功能分子的PD-L1结合部分包括包含抗PD-L1抗体或其抗原结合片段的部分。在某些实施例中,抗PD-L1抗体和其抗原结合片段能够特异性地结合到PD-L1。

[0379] 在某些实施例中,如通过Biacore测定所测量的,本文提供的抗PD-L1抗体和其抗原结合片段以不超过0.8nM、不超过0.7nM、不超过0.6nM、不超过0.5nM或不超过0.4nM的K_D值特异性地结合到人PD-L1。Biacore测定基于表面等离子共振技术,参见例如Murphy,M.等人,《蛋白科学实验指南(Current protocols in protein science)》,第19章,单元19.14,2006。在某些实施例中,K_D值是通过如在本公开的实例6中描述的方法来测量的。

[0380] 本文提供的抗体或其抗原结合片段与人PD-L1的结合也可以用“半最大有效浓度”(EC₅₀)值表示,其是指抗体的观察到其最大结合的50%的浓度。EC₅₀值可以通过本领域已知的结合测定来测量,例如直接或间接结合测定,如酶联免疫吸附测定(ELISA)、荧光激活细胞分选(FACS)测定和其它结合测定。在某些实施例中,如通过ELISA所测量的,本文提供的抗体和其抗原结合片段以不超过0.3nM、不超过0.2nM、不超过0.1nM或不超过0.09nM的EC₅₀(即,50%结合浓度)特异性地结合到PD-L1。在某些实施例中,如通过FACS测定所测量的,本文提供的抗体和其抗原结合片段以不超过1.4nM、不超过1.3nM、不超过1.2nM、不超过1.1nM、不超过1.0nM、不超过0.3nM、不超过0.25nM或不超过0.21nM的EC₅₀(即,50%结合浓度)特异性地结合到PD-L1。

[0381] 在一些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段特异性地结合到PD-L1。在一些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段不与B7家族的其它成员结合。

[0382] 在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体和其抗原结合片段能够阻断PD-L1与其结合配偶体(例如,PD-1和B7-1)之间的相互作用,如通过ELISA所测量的,所述相互作用的IC50不超过2.2、2.1、2.0、1.9、1.8或1.2ug/ml。

[0383] 在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体和其抗原结合片段能够阻断PD-L1与其结合配偶体(例如,PD-1)之间的相互作用,如通过基于细胞的测定所测量的,所述相互作用的EC50不超过1.3、1.2、1.1、1.0、0.9或0.8nM。

[0384] ix.说明性抗PD-L1抗体和其他抗原结合片段

[0385] 在某些实施例中,本公开的抗PD-L1抗体(即,针对PD-L1的抗体)和其抗原结合片段包括一个或多个(例如,1、2、3、4、5或6个)CDR,所述一个或多个CDR包括选自由以下组成的组的序列:DYYMN(SEQ ID NO:1)、DINPNNX₁X₂TX₃YNHKFKG(SEQ ID NO:19)、WGDGPFAY(SEQ ID NO:3)、KASQNVX₄X₅X₆VA(SEQ ID NO:20)、SX₇SX₈RYT(SEQ ID NO:21)、QQYSNYPT(SEQ ID NO:6),其中X₁是G或A,X₂是G或D或Q或E或L,X₃是S或M或Q或L或V,X₄是G或P或K,X₅是A或G,X₆是A或I,X₇是A或N或R或V,X₈是N或H或V或D。

[0386] 在某些实施例中,所述重链可变区包括:

[0387] a)HCDR1,所述HCDR1包括SEQ ID NO:1的序列,

[0388] b)HCDR2,所述HCDR2包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18,以及

[0389] c)HCDR3,所述HCDR3包括SEQ ID NO:3的序列,

[0390] 和/或

[0391] 轻链可变区,所述轻链可变区包括:

[0392] d)LCDR1,所述LCDR1包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,

[0393] e)LCDR2,所述LCDR2包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12,以及

[0394] f)LCDR3,所述LCDR3包括SEQ ID NO:6的序列。

[0395] 在某些实施例中,所述重链可变区选自由以下组成的组:

[0396] g)包括以下的重链可变区:包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:2的

序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3;

[0397] h) 包括以下的重链可变区:包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:13的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3;

[0398] i) 包括以下的重链可变区:包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:14的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3;

[0399] j) 包括以下的重链可变区:包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:15的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3;以及

[0400] k) 包括以下的重链可变区:包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:17的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3;以及

[0401] l) 包括以下的重链可变区:包括SEQ ID NO:1的序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:18的序列的HCDR2和包括SEQ ID NO:3的序列的HCDR3。

[0402] 在某些实施例中,所述轻链可变区选自由以下组成的组:

[0403] a) 包括以下的轻链可变区:包括SEQ ID NO:4的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:5的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3;

[0404] b) 包括以下的轻链可变区:包括SEQ ID NO:9的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:5的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3;

[0405] c) 包括以下的轻链可变区:包括SEQ ID NO:8的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:5的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3;

[0406] d) 包括以下的轻链可变区:包括SEQ ID NO:4的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:12的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3;以及

[0407] e) 包括以下的轻链可变区:包括SEQ ID NO:4的序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:11的序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6的序列的LCDR3。

[0408] 如本文所使用的,抗体“4B6”是指包括具有SEQ ID NO:46的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:47的序列的轻链可变区的单克隆抗体。

[0409] 在某些实施例中,本公开提供了包括抗体4B6或抗体4B6的变体的一个或多个(例如,1、2、3、4、5或6个)CDR序列的抗PD-L1抗体和其抗原结合片段。CDR边界通过Kabat规则定义或鉴定。

[0410] 在某些实施例中,本公开提供了抗PD-L1抗体和其抗原结合片段,所述抗体和其抗原结合片段包括:包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1;包括选自由SEQ ID NO:2、13、14、15、17和18组成的组的氨基酸序列的HCDR2;和包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3;和/或包括选自由SEQ ID NO:4、7、8-9组成的组的氨基酸序列的LCDR1;包括选自由SEQ ID NO:5、10、11-12组成的组的氨基酸序列的LCDR2;和包括SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3。

[0411] 表1. 抗体4B6的CDR氨基酸序列。

抗体	区	CDR1	CDR2	CDR3
[0412] 4B6	HCDR	SEQ ID NO: 1 DYVMN	SEQ ID NO: 2 DINPNNGGTSYNHKFKG	SEQ ID NO: 3 WGDGPFAY
	LCDR	SEQ ID NO: 4 KASQNVGAAVA	SEQ ID NO: 5 SASNRYT	SEQ ID NO: 6 QQYSNYPT

[0413] 表2. 抗体4B6的可变区氨基酸序列。

	抗体	VH	VL
[0414]	4B6	SEQ ID NO: 46 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY VFTDYIMNWVKQSHGKSLEWIGDINP NNGGTSYNHKFKGKATVTVDKSSRTA YMELLSLTSEDSAVYYCVKWGDGPFAY WGQGTTLVTVSA	SEQ ID NO: 47 DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQ NVGAATAWYQQKPGQSPKLLIYSASNR YTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSED LADYFCQQYSNYPTFGSGTKLGIK

[0415] 已知CDR负责抗原结合。然而,已经发现并非所有的6个CDR都是不可缺少或不可改变的。换言之,可以替换或改变或修饰抗PD-L1抗体4B6中的一个或多个CDR,但仍基本上保留对PD-L1的特异性结合亲和力。

[0416] 在某些实施例中,本文提供的抗体和其抗原结合片段包括合适的框架区(FR)序列,只要所述抗体和其抗原结合片段可以特异性地结合到PD-L1即可。上表1中提供的CDR序列是从小鼠抗体获得的,但所述CDR序列可以使用如重组技术等本领域已知的合适方法移植到如小鼠、人、大鼠、兔等任何合适物种的任何合适FR序列。

[0417] 在某些实施例中,本文提供的抗体和其抗原结合片段是人源化的。人源化抗体或其抗原结合片段在其于人中降低的免疫原性方面是期望的。人源化抗体在其可变区是嵌合的,因为非人CDR序列被移植到人或基本上人的FR序列。抗体或抗原结合片段的人源化基本上可以通过用非人(如鼠)CDR基因取代人免疫球蛋白基因中的对应人CDR基因来进行(参见例如,Jones等人(1986)《自然》321:522-525;Riechmann等人(1988)《自然》332:323-327;Verhoeyen等人(1988)《科学》239:1534-1536)。

[0418] 可以使用本领域已知的方法选择合适的人重链和轻链可变结构域以实现此目的。在说明性实例中,可以使用“最佳拟合”方法,其中针对已知人可变结构域序列的数据库筛选或BLAST非人(例如,啮齿动物)抗体可变结构域序列,并且最接近非人查询序列的人序列被鉴定并用作用于移植非人CDR序列的人支架(参见例如Sims等人,(1993)《免疫学杂志》151:2296;Chothia等人(1987)《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》196:901)。可替代地,来源于所有人抗体的共有序列的框架可以用于移植非人CDR(参见例如Carter等人(1992)《美国国家科学院院刊》,89:4285;Presta等人(1993)《免疫学杂志》,151:2623)。

[0419] 在一些实施例中,本公开提供了4B6的12种人源化抗体,它们分别被命名为Hu4B6_Hg.2La.1、Hu4B6_Hg.2La.2、Hu4B6_Hg.2La.4、Hu4B6_Hg.2La.6、Hu4B6_Hg.3La.1、Hu4B6_Hg.3La.2、Hu4B6_Hg.3La.4、Hu4B6_Hg.3La.6、Hu4B6_Hg.5La.1、Hu4B6_Hg.5La.2、Hu4B6_Hg.5La.4和Hu4B6_Hg.5La.6。4B6的每种人源化抗体的重链和轻链可变区的SEQ ID NO在表5中示出。4B6的12种人源化抗体中的每种人源化抗体的CDR在表5(加下划线的序列)中示出。CDR边界通过Kabat规则定义或鉴定。

[0420] 下表3a示出了人源化4B6的变体CDR的氨基酸序列,下表3b示出了人源化4B6重链和轻链可变区的FR。下表4示出了嵌合抗体4B6的12种人源化抗体的每条重链和轻链的FR氨基酸序列,所述人源化抗体分别被命名为Hu4B6_Hg.2La.1、Hu4B6_Hg.2La.2、Hu4B6_Hg.2La.4、Hu4B6_Hg.2La.6、Hu4B6_Hg.3La.1、Hu4B6_Hg.3La.2、Hu4B6_Hg.3La.4、Hu4B6_Hg.3La.6、Hu4B6_Hg.5La.1、Hu4B6_Hg.5La.2、Hu4B6_Hg.5La.4和Hu4B6_Hg.5La.6。这12种人源化抗体的重链可变区和轻链可变区在表5中示出。

[0421] 表3a. 4B6的人源化抗体的CDR变体的氨基酸序列。

SEQ ID NO.	序列	注释
7	KASQNVGAIVA	4B6-L-CDR1-1
8	KASQNVPAAVA	4B6-L-CDR1-2
9	KASQNVKGAVA	4B6-L-CDR1-3
10	SNSHRYT	4B6-L-CDR2-1
11	SRSVRYT	4B6-L-CDR2-2
12	SVSDRYT	4B6-L-CDR2-3
13	DINPNNADTMYNHKFKG	4B6-H-CDR2-1
14	DINPNNAQQTQYNHKFKG	4B6-H-CDR2-2
15	DINPNNAEPLYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-3
16	DINPNNGLTSYNHKFKG	4B6-H-CDR2-4
17	DINPNNAQTVYNHKFKG	4B6-H-CDR2-5
18	DINPNNAGTSYNHKFKG	H-CDR2-WT (G55A)

[0424] 表3b. 4B6和4B6的人源化抗体的FR序列的氨基酸序列。

SEQ ID NO.	序列	注释
22	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	人类种系序列的 HFR1
23	WVRQAPGQGLEWMG	人类种系序列的 HFR2
24	RVTMTDRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	人类种系序列的 HFR3
25	WGQGTLLTVSS	人类种系序列的 HFR4
26	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	人类种系序列的 LFR1
27	WYQQKPGKAPKLLIY	人类种系序列的 LFR2
28	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDVATYYC	人类种系序列的 LFR3
29	FGQGTKLEIK	人类种系序列的 LFR4
30	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFT	HFR1 变体
31	WVRQAPGQSLEWMG	HFR2 变体
32	RVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	HFR3 变体 1
33	RVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVK	HFR3 变体 2
34	RVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	HFR3 变体 3
35	RVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVK	HFR3 变体 4
36	WYQQKPGKSPKLLIY	LFR2 变体
37	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLPEDVATYYC	LFR3 变体 1
38	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLPEDVATYYC	LFR3 变体 2
39	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLPEDVATYYC	变体 1-FR3 的 F73L 突变
45	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLPEDVATYYC	LC 变体 2-FR3 的 F73L、A43S、S60D

[0426] 表4. 4B6的人源化抗体的每个人源化重链和轻链可变区的FR氨基酸序列。

[0427]

VH 或 VL 名称	FR1 (SEQ ID NO.)	FR2 (SEQ ID NO.)	FR3 (SEQ ID NO.)	FR4 (SEQ ID NO.)
Hu4B6_Hg.2	30	31	35	25
AM4B6_Hg.3	30	31	35	25
AM4B6_Hg.5	30	31	35	25
AM4B6_La.1	26	27	37	29
AM4B6_La.2	26	27	37	29
AM4B6_La.4	26	27	37	29
AM4B6_La.6	30	31	35	25

[0428] 下表5示出了人源化4B6重链可变区的3种变体(即,Hu4B6_Hg.2、Hu4B6_Hg.3和Hu4B6_Hg.5)和人源化4B6轻链可变区的4种变体(即,AM4B6_La.1、AM4B6_La.2、AM4B6_La.4、AM4B6_La.6)。

[0429] 表5.4B6的人源化抗体的可变区的氨基酸序列。

[0430]

抗体	VH	VL
AM4B6_ Hg.2La.1	Hu4B6_Hg.2, SEQ ID NO: 58 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDINP NNA QTQ YNHKFKGRVT VTVDK SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC VKW GDGPFAYWGQGT LTVSS	AM4B6_La.1, SEQ ID NO: 62 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VKG AVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYT GVPSRFSGSGSGTDFT LT ISSLPEDIA TYYC QQYSNYPT FGQGTKLEIK
AM4B6_ Hg.2La.2	Hu4B6_Hg.2, SEQ ID NO: 58 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDINP NNA QTQ YNHKFKGRVT VTVDK SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC VKW GDGPFAYWGQGT LTVSS	AM4B6_La.2, SEQ ID NO: 63 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VPA AVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYT GVPSRFSGSGSGTDFT LT ISSLPEDIA TYYC QQYSNYPT FGQGTKLEIK
AM4B6_ Hg.2La.4	Hu4B6_Hg.2, SEQ ID NO: 58 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDINP NNA QTQ YNHKFKGRVT VTVDK SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC VKW GDGPFAYWGQGT LTVSS	AM4B6_La.4, SEQ ID NO: 64 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VGA AV AWYQQKPGKAPKLLIYS VSDRYT GVPSRFSGSGSGTDFT LT ISSLPEDIA TYYC QQYSNYPT FGQGTKLEIK
AM4B6_ Hg.2La.6	Hu4B6_Hg.2, SEQ ID NO: 58 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDINP NNA QTQ YNHKFKGRVT VTVDK SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC VKW GDGPFAYWGQGT LTVSS	AM4B6_La.6, SEQ ID NO: 65 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VGA AV AWYQQKPGKAPKLLIYS RSVRYT GVPSRFSGSGSGTDFT LT ISSLPEDIA TYYC QQYSNYPT FGQGTKLEIK
AM4B6_ Hg.3La.1	AM4B6_Hg.3, SEQ ID NO: 59 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDINP NNA ETL YNHKFKGRVT VTVDK SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC VKW GDGPFAYWGQGT LTVSS	AM4B6_La.1, SEQ ID NO: 62 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VKG AVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYT GVPSRFSGSGSGTDFT LT ISSLPEDIA TYYC QQYSNYPT FGQGTKLEIK
AM4B6_ Hg.3La.2	AM4B6_Hg.3, SEQ ID NO: 59 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDINP NNA ETL YNHKFKGRVT VTVDK SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC VKW GDGPFAYWGQGT LTVSS	AM4B6_La.2, SEQ ID NO: 63 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VPA AVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYT GVPSRFSGSGSGTDFT LT ISSLPEDIA TYYC QQYSNYPT FGQGTKLEIK
AM4B6_ Hg.3La.4	AM4B6_Hg.3, SEQ ID NO: 59 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDINP NNA ETL YNHKFKGRVT VTVDK SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC VKW GDGPFAYWGQGT LTVSS	AM4B6_La.4, SEQ ID NO: 64 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VGA AV AWYQQKPGKAPKLLIYS VSDRYT GVPSRFSGSGSGTDFT LT ISSLPEDIA TYYC QQYSNYPT FGQGTKLEIK

[0431]

AM4B6_Hg.3La.6	AM4B6_Hg.3, SEQ ID NO: 59 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNNA ETLYNHKFKGRVTVTVDKSI STAYMELS RLRSDDTAVYYCVKWDGDPFAYWGQGT LTVSS	AM4B6_La.6, SEQ ID NO: 65 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNNA GTSYNHKFKGRVTVTVDKSI STAYMELS RLRSDDTAVYYCVKWDGDPFAYWGQGT LTVSS
AM4B6_Hg.5La.1	AM4B6_Hg.5, SEQ ID NO: 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNNA QTVYNHKFKGRVTVTVDKSI STAYMELS RLRSDDTAVYYCVKWDGDPFAYWGQGT LTVSS	AM4B6_La.1, SEQ ID NO: 62 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VKGA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYT GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDIA TYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
AM4B6_Hg.5La.2	AM4B6_Hg.5, SEQ ID NO: 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNNA QTVYNHKFKGRVTVTVDKSI STAYMELS RLRSDDTAVYYCVKWDGDPFAYWGQGT LTVSS	AM4B6_La.2, SEQ ID NO: 63 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VPA A VAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYT GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDIA TYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
AM4B6_Hg.5La.4	AM4B6_Hg.5, SEQ ID NO: 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNNA QTVYNHKFKGRVTVTVDKSI STAYMELS RLRSDDTAVYYCVKWDGDPFAYWGQGT LTVSS	AM4B6_La.4, SEQ ID NO: 64 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VGA A VAWYQQKPGKAPKLLIYSVSDRYT GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDIA TYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
AM4B6_Hg.5La.6	AM4B6_Hg.5, SEQ ID NO: 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNNA QTVYNHKFKGRVTVTVDKSI STAYMELS RLRSDDTAVYYCVKWDGDPFAYWGQGT LTVSS	AM4B6_La.6, SEQ ID NO: 65 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYV FTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNNA GTSYNHKFKGRVTVTVDKSI STAYMELS RLRSDDTAVYYCVKWDGDPFAYWGQGT LTVSS

[0432] 在某些实施例中,除了非人的CDR序列之外,本文提供的人源化抗PD-L1抗体或其抗原结合片段由基本上全人序列构成。在一些实施例中,可变区FR和恒定区(如果存在)完全或基本上来自人免疫球蛋白序列。人FR序列和人恒定区序列可以源自不同的人免疫球蛋白基因,例如,FR序列源自一种人抗体并且恒定区源自另一种人抗体。在一些实施例中,人源化抗体或其抗原结合片段包括人重链HFR1-4和/或轻链LFR1-4。

[0433] 在一些实施例中,源自人的FR区可以包括与其所源自的人免疫球蛋白相同的氨基酸序列。在一些实施例中,人FR的一个或多个氨基酸残基被来自亲本非人抗体的对应残基取代。在某些实施例中,这可能是期望的,以使人源化抗体或其片段非常接近非人亲本抗体结构,从而优化结合特性(例如,增加结合亲和力)。在某些实施例中,本文提供的人源化抗体或其抗原结合片段在多个人FR序列中的每个人FR序列中包括不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸残基取代,或者在重链或轻链可变结构域的所有FR序列中包括不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸残基取代。在一些实施例中,氨基酸残基的此类变化可以仅存在于重链FR区、仅存在于轻链FR区、或存在于两条链中。在某些实施例中,使人FR序列的一个或多个氨基酸随机突变以增加结合亲和力。在某些实施例中,使人FR序列的一个或多个氨基酸回复突变为亲本非人抗体的对应氨基酸以增加结合亲和力。

[0434] 在某些实施例中,本公开的人源化抗PD-L1抗体和其抗原结合片段包括:重链HFR1,所述重链HFR1包括QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX₉FT(SEQ ID NO:40)的序列或与所述序列具有至少80%序列同一性的同源序列;重链HFR2,所述重链HFR2包括

WVRQAPGQX₁₀LEWMG (SEQ ID NO:41) 的序列或与所述序列具有至少80%序列同一性的同源序列;重链HFR3,所述重链HFR3包括RVTX₁₆TVDX₁₁SISTAYMELSRSDDTAVYYCX₁₂X₁₃ (SEQ ID NO:42) 的序列或与所述序列具有至少80%序列同一性的同源序列;和重链HFR4,所述重链HFR4包括WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:25) 的序列或与所述序列具有至少80%序列同一性的同源序列,其中X₉是T或V,X₁₀是G或S,X₁₁是T或K,X₁₂是A或V,并且X₁₃是R或K。

[0435] 在某些实施例中,本公开的人源化抗PD-L1抗体和其抗原结合片段包括:轻链LFR1,所述轻链LFR1包括DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:26) 的序列或与所述序列具有至少80%序列同一性的同源序列;轻链LFR2,所述轻链LFR2包括WYQQKPGKX₁₄PKLLIY (SEQ ID NO:43) 的序列或与所述序列具有至少80%序列同一性的同源序列;轻链LFR3,所述轻链LFR3包括GVPX₁₅RFSGSGSGTDFTX₁₇TISSLQPEDVATYYC (SEQ ID NO:44) 的序列或与所述序列具有至少80%序列同一性的同源序列;和轻链LFR4,所述轻链LFR4包括FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:29) 的序列或与所述序列具有至少80%序列同一性的同源序列,其中X₁₄是A或S,X₁₅是S或D,X₁₆是M或V,并且X₁₇是F或L。

[0436] 在某些实施例中,HFR1包括选自SEQ ID NO:22和30组成的组的序列,HFR2包括选自SEQ ID NO:23和31组成的组的序列,HFR3包括选自SEQ ID NO:24和32-35组成的组的序列,HFR4包括SEQ ID NO:25的序列,LFR1包括选自SEQ ID NO:26组成的组的序列,LFR2包括选自SEQ ID NO:27和36组成的组的序列,LFR3包括选自SEQ ID NO:28和37-38、39、45组成的组的序列,并且LFR4包括SEQ ID NO:29的序列。

[0437] 在某些实施例中,本公开的人源化抗PD-L1抗体和其抗原结合片段包括包含在重链可变区中的HFR1、HFR2、HFR3和/或HFR4序列,所述重链可变区选自以下组成的组:Hu4B6_Hg.2 (SEQ ID NO:58)、AM4B6_Hg.3 (SEQ ID NO:59)、AM4B6_Hg.5 (SEQ ID NO:60)。

[0438] 在某些实施例中,本公开的人源化抗PD-L1抗体和其抗原结合片段包括包含在轻链可变区中的LFR1、LFR2、LFR3和/或LFR4序列,所述轻链可变区选自以下组成的组:AM4B6_La.1 (SEQ ID NO:62)、AM4B6_La.2 (SEQ ID NO:63)、AM4B6_La.4 (SEQ ID NO:64) 和 AM4B6_La.6 (SEQ ID NO:65)。

[0439] 在某些实施例中,所述重链可变区包括选自以下组成的组的序列:SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60和与其具有至少80%序列同一性的其同源序列。在某些实施例中,所述轻链可变区包括选自以下组成的组的序列:SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65和与其具有至少80%序列同一性的其同源序列。在某些实施例中,所述针对PD-L1的抗体或其抗原结合片段包括选自以下组成的组的一对重链可变区和轻链可变区序列:SEQ ID NO:49/54、50/54、51/54、52/54、49/55、50/55、51/55、52/55、58/62、58/63、58/64、58/65、59/62、59/63、59/64、59/65、60/62、60/63、60/64和60/65。

[0440] 这些示例性人源化抗PD-L1抗体保留了对PD-L1的特异性结合能力或亲和力,并且在所述方面优于亲本小鼠抗体4B6。

[0441] 在一些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体和抗原结合片段包括重链可变结构域的全部或一部分和/或轻链可变结构域的全部或一部分。在一个实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段是由本文提供的重链可变结构域的全部或一部分组成的单结

构域抗体。此类单结构域抗体的更多信息可在本领域中获得(参见例如,美国专利第6,248,516号)。

[0442] 在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段进一步包括免疫球蛋白(Ig)恒定区,所述恒定区任选地进一步包括重链和/或轻链恒定区。在某些实施例中,重链恒定区包括CH1、铰链和/或CH2-CH3区(或任选的CH2-CH3-CH4区)。在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包括人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2或IgM的重链恒定区。在某些实施例中,轻链恒定区包括C κ 或C λ 。本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段的恒定区可以与野生型恒定区序列相同或在一个或多个突变中不同。

[0443] 在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段对人PD-L1具有特异性结合亲和力,这足以提供诊断和/或治疗用途。

[0444] 本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段可以是单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、重组抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、标记抗体、二价抗体、抗独特型抗体或融合蛋白。重组抗体是使用重组方法在体外而不是在动物体内制备的抗体。

[0445] 在某些实施例中,PD-L1结合部分包括抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与包括选自以下组成的组的一对重链可变区和轻链可变区序列的抗体或其抗原结合片段竞争结合PD-L1:SEQ ID NO:49/54、50/54、51/54、52/54、49/55、50/55、51/55、52/55、58/62、58/63、58/64、58/65、59/62、59/63、59/64、59/65、60/62、60/63、60/64和60/65。

[0446] x. 抗体变体

[0447] 本文提供的抗PD-L1抗体和其抗原结合片段还涵盖本文提供的抗体序列的各种变体。

[0448] 在某些实施例中,所述抗体变体在以上的表1提供的多个CDR序列中的一个或多个CDR序列中、以上的表3a、3b和5提供的重链可变区或轻链可变区的多个非CDR序列中的一个或多个非CDR序列中、和/或恒定区(例如,Fc区)中包括一个或多个修饰或取代。此类变体保留了其亲本抗体对PD-L1的结合特异性,但具有一种或多种由修饰或取代赋予的期望性质。例如,抗体变体可以具有改善的抗原结合亲和力、改善的糖基化模式、降低的糖基化风险、减少的脱氨基作用、减少或耗竭的效应子功能、改善的FcRn受体结合、增加的药代动力学半衰期、pH敏感性和/或与缀合的相容性(例如,一个或多个引入的半胱氨酸残基)。

[0449] 可以使用本领域已知的方法,例如“丙氨酸扫描诱变”,筛选亲本抗体序列以鉴定合适的或优选的待修饰或取代的残基(参见例如Cunningham和Wells(1989)《科学》,244:1081-1085)。简要地说,可以鉴定靶标残基(例如带电的残基,如Arg、Asp、His、Lys和Glu)并由中性或带负电的氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)替代,并且产生经修饰的抗体,并且针对所关注性质对其进行筛选。如果在特定的氨基酸位置处的取代表现出所关注功能性改变,则所述位置可以被鉴定为潜在的用于修饰或取代的残基。可以通过用另一种残基(例如半胱氨酸残基、带正电荷的残基等)取代来进一步评估所述潜在的残基。

[0450] xi. 亲和性变体

[0451] 抗体的亲和性变体可以在上表1中提供的一个或多个CDR序列、上表3b和4中提供的一个或多个FR序列或上表5中提供的重链或轻链可变区序列中含有修饰或取代。本领域技术人员可以基于上表1中的CDR序列和上表5中的可变区序列容易地鉴定FR序列,因为本

领域公知在可变区中,CDR区侧接两个FR区。亲和性变体保留了亲本抗体对PD-L1的特异性结合亲和力,或者甚至比亲本抗体具有更高的PD-L1特异性结合亲和力。在某些实施例中,CDR序列、FR序列或可变区序列中的至少一个(或全部)取代包括保守取代。

[0452] 本领域技术人员将理解,在上表1和3a中提供的CDR序列以及上表5中提供的可变区序列中,一个或多个氨基酸残基可以被取代,但所得抗体或抗原结合片段仍保留对PD-L1的结合亲和力或结合能力或者甚至具有改进的结合亲和力或结合能力。可以使用本领域已知的各种方法来实现此目的。例如,可以生成抗体变体(如Fab或scFv变体)的文库,并用噬菌体展示技术表达,随后针对与PD-L1结合的亲和力对其进行筛选。再例如,计算机软件可以用于虚拟模拟抗体与PD-L1的结合,并鉴定抗体上的形成结合界面的氨基酸残基。在取代中可以避开此类残基以防止结合亲和性的降低,或者可以作为取代的靶标以获得更强的结合。

[0453] 在某些实施例中,本文提供的人源化抗PD-L1抗体或其抗原结合片段在多个CDR序列中的一个或多个CDR序列和/或多个FR序列中的一个或多个FR序列中包括一个或多个氨基酸残基取代。在某些实施例中,亲和性变体在CDR序列和/或FR序列中总共包括不超过20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个取代。

[0454] 在某些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包括1、2或3个CDR序列,所述CDR序列与以上表1和3a中所列出的一个(或多个)序列具有至少80%(例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列同一性,但仍以相对于其亲本抗体而言相似或甚至更高的水平保留了对PD-L1的特异性结合亲和力。

[0455] 在某些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包括一个或多个可变区序列,所述一个或多个可变区序列与以上表5中所列出的一个(或多个)序列具有至少80%(例如,至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列同一性,但仍以相对于其亲本抗体而言相似或甚至更高的水平保留了对PD-L1的特异性结合亲和力。在一些实施例中,在上表5中列出的可变区序列中总共取代、插入或缺失了1到10个氨基酸。在一些实施例中,取代、插入或缺失发生在CDR之外的区中(例如,在FR中)。

[0456] xii. 糖基化变体

[0457] 本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段还涵盖糖基化变体,可以获得所述糖基化变体以增加或减少所述抗体或其抗原结合片段的糖基化程度。

[0458] 抗PD-L1抗体或其抗原结合片段可以包括引入或去除糖基化位点的一个或多个修饰。糖基化位点是具有侧链的氨基酸残基,碳水化合物部分(例如,寡糖结构)可以连接到所述侧链。抗体的糖基化通常是N连接的或O连接的。N连接是指碳水化合物部分连接到天冬酰胺残基(例如,如天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸等三肽序列中的天冬酰胺残基)的侧链,其中X是除了脯氨酸之外的任何氨基酸。O连接的糖基化是指将N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟基氨基酸连接,最常见的是与丝氨酸或苏氨酸连接。可以很方便地去除天然糖基化位点,例如通过改变氨基酸序列,使得存在于所述序列中的上述三肽序列(对于N连接的糖基化位点)或者丝氨酸或苏氨酸残基(对于O连接的糖基化位点)中的一个被取代。可以通过引入此类三肽序列或者丝氨酸或苏氨酸残基以相似的方式产生新的糖基化位点。

[0459] 在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体和抗原结合片段包括一个或多个突变

以去除一个或多个脱酰胺位点。在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体和抗原结合片段在重链中的G55(例如,G55A)处包括突变。测试了这些突变并且据信这些突变不会负面影响本文提供的抗体的结合亲和力。

[0460] xiii. 半胱氨酸工程化的变体

[0461] 本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段还涵盖半胱氨酸工程化的变体,所述变体包括一个或多个引入的游离半胱氨酸氨基酸残基。

[0462] 游离半胱氨酸残基是不为二硫键的一部分的半胱氨酸残基。半胱氨酸工程化的变体可用于通过例如马来酰亚胺或卤乙酰基在经工程化的半胱氨酸的位点处与例如细胞毒性化合物和/或成像化合物、标记或放射性同位素等缀合。用于工程化抗体或其抗原结合片段以引入游离半胱氨酸残基的方法是本领域已知的,参见例如,W02006/034488。

[0463] xiv. Fc变体

[0464] 本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段还涵盖Fc变体,所述Fc变体在Fc区和/或铰链区处包括一个或多个氨基酸残基修饰或取代,例如以提供改变的效应子功能,如ADCC和CDC。通过抗体工程改变ADCC活性的方法在本领域已有描述,参见例如Shields RL.等人,《生物化学杂志(J Biol Chem.)》2001,276(9):6591-604;Idusogie EE.等人,《免疫学杂志(J Immunol.)》2000,164(8):4178-84;Steurer W.等人,《免疫学杂志》1995,155(3):1165-74;Idusogie EE.等人,《免疫学杂志》2001,166(4):2571-5;Lazar GA.等人,《美国国家科学院院刊(PNAS)》,2006,103(11):4005-4010;Ryan MC.等人,《分子癌症治疗(Mol.Cancer Ther.)》,2007,6:3009-3018;Richards JO,.等人,《分子癌症治疗》2008,7(8):2517-27;Shields R.L.等人,《生物化学杂志》,2002,277:26733-26740;Shinkawa T.等人,《生物化学杂志》,2003,278:3466-3473。

[0465] 本文提供的抗体或抗原结合片段的CDC活性也可以例如通过改善或减少C1q结合和/或CDC来改变(参见例如W099/51642;Duncan和Winter《自然》322:738-40(1988);美国专利第5,648,260号;美国专利第5,624,821号);和关于Fc区变体的其它实例的W094/29351。可以将选自Fc区的氨基酸残基329、331和322的一个或多个氨基酸替换为不同的氨基酸残基,以改变C1q结合和/或减少或消除补体依赖性细胞毒性(CDC)(参见Idusogie等人的美国专利第6,194,551号)。也可以引入一个或多个氨基酸取代,以改变抗体固定补体的能力(参见Bodmer等人的PCT公开W0 94/29351)。

[0466] 在某些实施例中,本文提供的Fc变体相对于野生型Fc(例如,IgG1的Fc)具有降低的效应子功能,并且在选自由以下组成的组的位置处包括一个或多个氨基酸取代:Fc区的220、226、228、229、233、234、235、236、237、238、267、268、269、270、297、309、318、320、322、325、328、329、330、331和332(参见W02016/196228;Richards等人(2008)《分子癌症治疗学(Mol.Cancer Therap.)》7:2517;Moore等人(2010)《单克隆抗体(mAbs)》2:181;和Strohl(2009)《生物技术当前述评(Current Opinion in Biotechnology)》20:685-691),其中Fc区中残基的编号为如Kabat中的EU索引的编号。减少的效应子功能的示例性取代包括但不限于220S、226S、228P、229S、233P、234V、234G、234A、234F、234A、235A、235G、235E、236E、236R、237A、237K、238S、267R、268A、268Q、269R、297A、297Q、297G、309L、318A、322A、325L、328R、330S、331S或其任何组合(参见W02016/196228;和Strohl(2009)《生物技术当前述评》20:685-691)。

[0467] 在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段具有降低的效应子功能,并且在IgG1中在选自以下组成的组的位置处包括一个或多个氨基酸取代:234、235、237、238、268、297、309、330和331。在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段是IgG1同种型并且包括选自以下组成的组的一个或多个氨基酸取代:N297A、N297Q、N297G、L235E、L234A、L235A、L234F、L235E、P331S和其任何组合。

[0468] 在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段是IgG1同种型并且包括L234A和L235A突变。在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段是IgG1同种型并且包括L234F、L235E和P331S。定位于Fc结构域的CH2区中的取代的L234F、L235E和P331S集合(也称为FES三重突变)可以消除FC γ R和C1q结合,从而使得抗体无法引发ADCC或CDC (Oganesyan等人,《晶体学报D(Acta Crystallogr.D)》64:700-704(2008))。PCT/US2013/36872已经表明,与野生型亲本分子(例如,野生型IgG1Fc)相比,在变体Fc结构域(例如,抗体中的变体Fc结构域)中组合这些突变使Fc结构域具有降低的热稳定性。在某些实施例中,所述Fc变体包括SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

[0469] 在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段是IgG2同种型,并且包括选自以下组成的组的一个或多个氨基酸取代:H268Q、V309L、A330S、P331S、V234A、G237A、P238S、H268A和其任何组合(例如,H268Q/V309L/A330S/P331S、V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S)。在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段是IgG4同种型,并且包括选自以下组成的组的一个或多个氨基酸取代:S228P、N297A、N297Q、N297G、L235E、F234A、L235A和其任何组合。在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段是IgG2/IgG4交叉同种型。Rother RP等人,《自然生物技术(Nat Biotechnol)》25:1256-1264(2007)中描述了IgG2/IgG4交叉同种型的实例。

[0470] 在某些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段包括改善与新生儿Fc受体(FcRn)的pH依赖性结合的一个或多个氨基酸取代。此类变体可以具有延长的药代动力学半衰期,因为它在酸性pH下与FcRn结合,使其得以免于在溶酶体中降解,并且随后被转移并释放到细胞外。工程化抗体或其抗原结合片段以提高与FcRn的结合亲和力的方法是本领域众所周知的,参见例如Vaughn,D.等人,《结构》,6(1):63-73,1998;Kontermann,R.等人,《抗体工程(Antibody Engineering)》,第1卷,第27章:将Fc区工程化以改善PK,由施普林格(Springer)出版,2010年;Yeung,Y.等人,《癌症研究(Cancer Research)》,70:3269-3277(2010);和Hinton,P.等人,《免疫学杂志(J.Immunology)》,176:346-356(2006)。

[0471] 在某些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段在Fc区的界面中包括一个或多个氨基酸取代以便于和/或促进异二聚体化。这些修饰包括将突起引入到第一Fc多肽中并且将空腔引入到第二Fc多肽中,其中突起可以定位于空腔中,以便促进第一Fc多肽与第二Fc多肽的相互作用以形成异二聚体或复合物。产生具有这些修饰的抗体的方法是本领域已知的,例如,如美国专利第5,731,168号中所述。

[0472] xv. 抗原结合片段

[0473] 本文提供的双功能分子中的PD-L1结合部分还涵盖抗PD-L1抗原结合片段。各种类型的抗原结合片段是本领域已知的并且可以基于本文提供的抗PD-L1抗体和其不同变体(如亲和性变体、糖基化变体、Fc变体、半胱氨酸工程化的变体等)开发,所述抗体包括例如其CDR在上表1和3a中示出并且其可变序列在表2和5中示出的示例性抗体。

[0474] 在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗原结合片段是双抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv片段、二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双抗体(ds双抗体)、单链抗体分子(scFv)、scFv二聚体(二价双抗体)、多特异性抗体、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、结构域抗体和二价结构域抗体。

[0475] 多种技术可以用于产生此类抗原结合片段。说明性方法包括完整抗体的酶消化(参见例如Morimoto等人,《生物化学与生物物理方法杂志(Journal of Biochemical and Biophysical Methods)》24:107-117(1992);和Brennan等人,《科学》,229:81(1985))、通过如大肠杆菌(E.Coli)等宿主细胞进行的重组表达(例如,对于Fab、Fv和ScFv抗体片段)、如上文讨论的从噬菌体展示文库筛选(例如,对于ScFv)以及两个Fab'-SH片段的化学偶联以形成F(ab')₂片段(Carter等人,《生物/技术(Bio/Technology)》10:163-167(1992))。用于产生抗体片段的其它技术对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0476] 在某些实施例中,抗原结合片段是scFv。以下中描述了scFv的产生:例如W0 93/16185;美国专利第5,571,894号;和第5,587,458号。ScFv可以在氨基端或羧基端与效应蛋白融合以提供融合蛋白(参见例如《抗体工程》,Borrebaeck编辑)。

[0477] 在某些实施例中,本文提供的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段是二价的、四价的、六价的或多价的。任何超过二价的分子被认为是多价的,涵盖例如三价、四价、六价等。

[0478] 如果两个结合位点都特异性地结合到同一抗原或同一表位,则二价分子可以是单特异性的。在某些实施例中,这提供了比单价对应物更强的与抗原或表位的结合。类似地,多价分子也可以是单特异性的。在某些实施例中,在二价或多价抗原结合部分中,结合位点的第一价和结合位点的第二价在结构上相同(即,具有相同的序列)或在结构上不同(即,具有不同的序列,但具有相同的特异性)。

[0479] 如果两个结合位点对不同的抗原或表位具有特异性,则二价也可以是双特异性的。这也适用于多价分子。例如,当两个结合位点对第一抗原(或表位)是单特异性的并且第三结合位点对第二抗原(或表位)是特异性的时,三价分子可以是双特异性的。

[0480] xvi. 双特异性抗体

[0481] 在某些实施例中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段是双特异性的。在某些实施例中,除了本文提供的第二部分之外,PD-L1结合抗体或其抗原结合片段进一步连接到与所述抗PD-L1抗体或其抗原结合片段具有不同结合特异性的额外功能结构域。

[0482] 在某些实施例中,本文提供的双特异性抗体或其抗原结合片段能够特异性结合到除PD-L1之外(以及除第二部分结合的靶标之外)的第二抗原或PD-L1上的第二表位(或第二部分结合的靶标上的第二表位)。

[0483] xvii. 双功能分子

[0484] 在某些实施例中,本文提供的双功能分子能够与PD-L1和由第二部分结合的靶标结合。在某些实施例中,本文提供的双功能分子能够与PD-L1和TGFβ两者结合,或与PD-L1和IL-1两者结合,或与PD-L1和IL-1R两者结合,或与PD-L1和MHCII两者结合,或与PD-L1和CD47两者结合,或与PD-L1和SIRPα两者结合。

[0485] 在某些实施例中,如通过ELISA测定所测量的,本公开的靶向PD-L1和TGFβ的双功能分子以不超过2.0nM(例如,不超过2.0nM、不超过1.2nM、不超过1.1nM、不超过1.0nM、不超过0.9nM、不超过0.8nM)的EC₅₀与人TGFβ1特异性地结合。在某些实施例中,如通过ELISA测定

所测量的,本公开的靶向PD-L1和TGFβ的蛋白质能够同时与PD-L1和TGFβ结合。在某些实施例中,如通过Biacore测定所测量的,本公开的靶向PD-L1和TGFβ的双功能分子能够以不超过0.8nM、不超过0.7nM、不超过0.6nM、不超过0.5nM或不超过0.4nM的 K_D 值与人PD-L1特异性地结合。在某些实施例中,如通过ELISA测定所测量的,本公开的靶向PD-L1和TGFβ的双功能分子能够以不超过2.0nM(例如,不超过2.0nM、不超过1.2nM、不超过1.1nM、不超过1.0nM、不超过0.9nM、不超过0.8nM)的 K_D 值与人TGFβ1特异性地结合。

[0486] 在某些实施例中,本公开的靶向PD-L1和TGFβ的双功能分子能够以剂量依赖性方式对肿瘤生长抑制表现出协同作用。

[0487] 在某些实施例中,与仅包括免疫检查点分子的分子相比,本公开的靶向PD-L1和TGFβ的双功能分子能够表现出抗肿瘤免疫细胞向肿瘤微环境中的浸润增强。

[0488] 在某些实施例中,本公开的靶向PD-L1和TGFβ的双功能分子能够选择性地降低血浆中至少90%(例如,至少80%、70%、60%、50%、40%、30%或20%)的TGFβ1并且此类降低可以维持至少10、14或21天。

[0489] 在某些实施例中,所述双功能分子包括异二聚体重链。所述重链就所述第二部分的存在或位置而言是异二聚体的。在某些实施例中,所述异二聚体重链包括具有所述第二部分的一条重链,而另一条重链不具有所述第二部分,其中所述第二部分包括CD47结合结构域(例如,可溶性SIRPα)或SIRPα结合结构域。

[0490] 在所述双功能分子中,所述异二聚体重链包括具有所述第二部分的一条重链,而另一条重链不具有所述第二部分。所述异二聚体重链可以进一步包括以阻碍同二聚体化和/或有利于异二聚体化的方式缔合的异二聚体Fc区。例如,可以选择异二聚体Fc区,使得它们不相同并且它们优先在彼此之间形成异二聚体而不是在它们自身内形成同二聚体。在某些实施例中,所述异二聚体Fc区能够通过形成杵臼结构、疏水相互作用、静电相互作用、亲水相互作用或增加的柔性缔合成异二聚体。在某些实施例中,异二聚体Fc区包括分别突变成能够形成杵臼结构的CH2和/或CH3结构域。杵结构可以通过将第一CH2/CH3多肽中的小氨基酸残基替换为较大的氨基酸残基来获得,并且臼结构可以通过将较大的残基替换为较小的残基来获得。在某些实施例中,异二聚体Fc区包括含有S354C和T366W取代(SEQ ID NO: 96,杵结构)的IgG1同种型的第一CH3结构域和含有Y349C、T366S、L368A和Y407V取代(SEQ ID NO: 97,臼结构)的IgG1同种型的第二CH3结构域。

[0491] 在某些实施例中,所述双功能分子包括重链和/或轻链,所述重链包括SEQ ID NO: 118或SEQ ID NO: 120的氨基酸序列,所述轻链包括SEQ ID NO: 119或SEQ ID NO: 121的氨基酸序列。

[0492] xviii. 缀合物

[0493] 在一些实施例中,双功能分子进一步包括一个或多个缀合物部分。缀合物部分可以连接到双功能分子。缀合物部分是可以连接到双功能分子的部分。设想多种缀合物部分可以连接到本文提供的双功能分子(参见例如,“缀合物疫苗(Conjugate Vaccines)”,对微生物学和免疫学的贡献(Contributions to Microbiology and Immunology),J.M.Cruse和R.E.Lewis,Jr.(编辑),纽约Carger出版社(Carger Press,New York),(1989))。这些缀合物部分可以通过共价结合、亲和结合、嵌入、配位结合、络合、缔合、共混或添加等方法与双功能分子连接。在一些实施例中,双功能分子可以通过接头连接到一种或多种缀合物。

[0494] 在某些实施例中,本文提供的双功能分子可以被工程化成在表位结合部分之外含有特异性位点,所述特异性位点可以用于结合到一个或多个缀合物部分。例如,此类位点可以包括一个或多个反应性氨基酸残基,例如半胱氨酸或组氨酸残基,以促进与缀合物部分的共价连接。

[0495] 在某些实施例中,双功能分子可以间接地或通过另一缀合物部分连接到缀合物部分。例如,本文提供的双功能分子可以与生物素缀合,然后间接缀合到与抗生物素蛋白缀合的第二缀合物。在一些实施例中,缀合物部分包括清除修饰剂(例如,延长半衰期的聚合物,如PEG)、化学治疗剂、毒素、放射性同位素、镧系元素、可检测标记(例如,发光标记、荧光标记、酶底物标记)、DNA烷基化剂、拓扑异构酶抑制剂、微管蛋白结合剂、纯化部分或其它抗癌药物。

[0496] “毒素”可以是对细胞有害或可以损伤或杀死细胞的任何药剂。毒素的实例包括但不限于紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、MMAE、MMAF、DM1、长春碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、阿霉素(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羧基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神霉素(mithramycin)、放线菌素D(actinomycin D)、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)、嘌呤霉素(puromycin)及其类似物、抗代谢物(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪)、烷化剂(例如氮芥、塞替派苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)和洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺、白消安(busulfan)、二溴甘露醇、链脲霉素(streptozotocin)、丝裂霉素C(mitomycin C)和二氯二胺铂(II)(DDP顺铂)、蒽环霉素(anthracycline)(例如柔红霉素(以前的道诺霉素(daunomycin)和阿霉素)、抗生素(例如更生霉素(dactinomycin)(以前的放线菌素)、博来霉素(bleomycin)、光神霉素和氨茴霉素(anthramycin)(AMC))、抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春碱)、拓扑异构酶抑制剂和微管蛋白结合剂。

[0497] 可检测标记的实例可以包括荧光标记(例如,荧光素、罗丹明(rhodamine)、丹酰、藻红蛋白或德克萨斯红(Texas Red))、酶底物标记(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶或 β -D-半乳糖苷酶)、放射性同位素(例如, ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 和 ^{32}P 、其它镧系元素)、发光标记、发色团部分、地高辛(digoxigenin)、生物素/抗生物素蛋白、DNA分子或用于检测的金。

[0498] 在某些实施例中,缀合物部分可以是帮助增加双功能分子的半衰期的清除修饰剂。说明性实例包括水溶性聚合物,例PEG、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇/丙二醇的共聚物等。聚合物可以具有任何分子量,并且可以是支化的或未支化的。连接到抗体的聚合物的数量可能会有所不同,并且如果连接的聚合物多于一种,则它们可以是相同或不同的分子。

[0499] 在某些实施例中,缀合物部分可以是纯化部分,如磁珠。

[0500] 在某些实施例中,本文提供的双功能分子用作缀合物的基础。

[0501] III. 多核苷酸和重组方法

[0502] 本公开提供了编码本文提供的双功能分子的分离的多核苷酸。如本文所使用的，术语“核酸”或“多核苷酸”是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA) 和其聚合物。除非另外指出，否则特定多核苷酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体 (例如，简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP 和互补序列以及明确指出的序列。具体地说，简并密码子取代可以通过生成序列来实现，在所述序列中，一个或多个所选的 (或全部) 密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代 (参见 Batzer 等人,《核酸研究 (Nucleic Acid Res.)》19:5081 (1991); Ohtsuka 等人,《生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)》, 260:2605-2608 (1985); 以及 Rossolini 等人,《分子与细胞探测 (Mol. Cell. Probes)》, 8:91-98 (1994))。

[0503] 对单克隆抗体进行编码的 DNA 可使用常规程序 (例如通过使用能够与对抗体的重链和轻链进行编码的基因特异性地结合的寡核苷酸探针) 容易地分离和测序。编码 DNA 也可以通过合成方法获得。

[0504] 可以使用本领域已知的重组技术将编码双功能分子的分离的多核苷酸插入到载体中用于进一步克隆 (DNA 的扩增) 或用于表达。许多载体可用。载体组件通常包括但不限于以下中的一种或多种: 信号序列、复制起点、一种或多种标志物基因、增强子元件、启动子 (例如, SV40、CMV、EF-1 α) 和转录终止序列。

[0505] 本公开提供了包括本文提供的分离的多核苷酸的载体。在某些实施例中, 本文提供的多核苷酸编码双功能分子、与核酸序列可操作地连接的至少一种启动子 (例如, SV40、CMV、EF-1 α) 和至少一种选择标志物。载体的实例包括但不限于逆转录病毒 (包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒 (例如, 单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳多空病毒 (例如, SV40)、 λ 噬菌体和 M13 噬菌体、质粒 pcDNA3.3、pMD18-T、pOptivec、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM.、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、PCR 2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bos 等。

[0506] 可以将包括编码双功能分子的多核苷酸序列的载体引入到宿主细胞以进行克隆或基因表达。用于克隆或表达本文载体中的 DNA 的合适宿主细胞是上述原核细胞、酵母细胞或高等真核细胞。用于此目的的合适的原核细胞包括真细菌, 如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体, 例如肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 如埃希氏杆菌属 (Escherichia) (例如, 大肠杆菌 (E. coli))、肠杆菌属 (Enterobacter)、欧文氏菌属 (Erwinia)、克雷伯氏菌属 (Klebsiella)、变形杆菌属 (Proteus)、沙门氏菌属 (Salmonella) (例如, 鼠伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhimurium))、沙雷氏菌属 (Serratia) (例如, 粘质沙雷氏菌 (Serratia marcescans)) 和志贺氏菌属 (Shigella); 以及芽孢杆菌属 (Bacilli), 如枯草芽孢杆菌 (B. subtilis) 和地衣芽孢杆菌 (B. licheniformis); 假单胞菌属 (Pseudomonas), 如铜绿假单胞菌 (P. aeruginosa) 和链霉菌属 (Streptomyces)。

[0507] 除了原核细胞之外, 真核微生物如丝状真菌或酵母也是编码双功能分子的载体的合适克隆或表达宿主。酿酒酵母 (Saccharomyces cerevisiae) 或普通面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。然而, 许多其它属、种和株都比较常用且在本文中适用, 如粟酒裂

殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)宿主,例如乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045)、魏氏克鲁维酵母(*K.wickerhamii*) (ATCC 24,178)、克鲁维酵母(*K.waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilarum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*)和马克斯克鲁维酵母(*K.marxianus*);耶氏酵母属(*Yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183,070);假丝酵母(*Candida*);里氏木霉(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234);粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*);许旺酵母(*Schwanniomyces*),如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);和丝状真菌(filamentous fungi),例如脉孢菌(*Neurospora*)、青霉菌(*Penicillium*)、弯颈霉(*Tolypocladium*)和曲霉菌(*Aspergillus*)宿主(如钩巢曲霉(*A.nidulans*)和黑曲霉(*A.niger*))。

[0508] 用于表达本文提供的糖基化双功能分子的合适宿主细胞源自多细胞生物。无脊椎细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已鉴定多种杆状病毒株和变体以及对应的许可性昆虫宿主细胞,所述许可性昆虫宿主细胞来自于如以下等宿主:草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及斑蚊(*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) (果蝇)和家蚕(*Bombyx mori*)。多种用于转染的病毒株为公众可得,例如苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*) NPV的L-1变体以及家蚕 NPV的Bm-5株变体,并且此类病毒都可以根据本发明用作本文的病毒,特别是用于转染草地夜蛾细胞。棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄和烟草的植物细胞培养物也可以用作宿主。

[0509] 然而,最感兴趣的是脊椎动物细胞,并且脊椎动物细胞在培养物(组织培养物)中的繁殖已成为常规程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是由SV40(COS-7, ATCC CRL1651)转化的猴肾CV1系;人胚胎肾系(被亚克隆以在悬浮培养物中生长的293或293细胞, Graham等人,《普通病毒学期刊(J.Gen.Virol.)》36/59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人,《美国国家科学院院刊》77:4216(1980));小鼠支持细胞(TM4, Mather,《生殖生物学(Biol.Reprod.)》23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);布法罗大鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人,《纽约科学院年鉴(Annals N.Y.Acad.Sci.)》383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;以及人肝癌细胞系(Hep G2)。在一些实施例中,宿主细胞是哺乳动物培养的细胞系,如CHO、BHK、NS0、293和其衍生物。

[0510] 用上述用于产生双功能分子的表达或克隆载体转化宿主细胞,并将所述宿主细胞在常规营养培养基中培养,所述常规营养培养基被改性成适于诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望的序列的基因。在另一个实施例中,双功能分子可以通过本领域已知的同源重组产生。在某些实施例中,宿主细胞能够产生本文提供的双功能分子。

[0511] 本公开还提供了一种表达本文提供的双功能分子的方法,所述方法包括在表达本公开的载体的条件下培养本文提供的宿主细胞。用于产生本文提供的双功能分子的宿主细胞可以在多种培养基中培养。可商购获得的培养基如Ham's F10(西格马(Sigma))、最低必

需培养基(Minimal Essential Medium, MEM) (西格马)、RPMI-1640(西格马)和杜氏改良伊氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) (西格马)适用于培养宿主细胞。另外,在以下中描述的任何培养基都可以用作宿主细胞的培养基:Ham等人,《酶学方法(Meth. Enz.)》58:44 (1979);Barnes等人,《分析生物化学(Anal. Biochem.)》102:255 (1980);美国专利第4,767,704号;第4,657,866号;第4,927,762号;第4,560,655号;或第5,122,469号;WO 90/03430;WO 87/00195;或美国专利Re. 30,985。任何这些培养基都可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如GENTAMYCINTM药物)、微量元素(定义为最终浓度通常在微摩尔范围内的无机化合物)和葡萄糖或等效能量源。也可以以本领域技术人员已知的适当浓度包括任何其它必要的补充物。如温度、pH等培养条件是先前与被选定以用于表达的宿主细胞一起使用的那些条件,并且对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0512] 当使用重组技术时,双功能分子可以在细胞内、周质间隙中产生,或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内产生双功能分子,那么作为第一步骤,可以例如通过离心或超滤来去除宿主细胞或溶解的片段的微粒状碎片。Carter等人,《生物/技术》10:163-167 (1992)描述了一种用于分离分泌到大肠杆菌的周质间隙的抗体的程序。简而言之,将细胞糊在醋酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)的存在下解冻约30分钟。细胞碎片可以通过离心去除。当双功能分子被分泌到培养基中时,通常首先使用可商购获得的蛋白质浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)对来自此类表达系统的上清液进行浓缩。如PMSF等蛋白酶抑制剂可以包括在上述步骤中的任何步骤中以抑制蛋白水解,并且可以包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0513] 由细胞制备的双功能分子可以使用例如羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析、DEAE-纤维素离子交换色谱法、硫酸铵沉淀、盐析和亲和色谱法来纯化,其中亲和色谱法是优选的纯化技术。

[0514] 在某些实施例中,固定在固相上的蛋白A用于抗体和其抗原结合片段的免疫亲和纯化。蛋白A是否合适作为亲和配体取决于双功能分子中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可以用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark等人,《免疫学方法杂志(J. Immunol. Meth.)》62:1-13 (1983))。蛋白G被推荐用于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss等人,《欧洲分子生物学学会杂志》5:1567-1575 (1986))。亲和配体附着的基质最通常为琼脂糖,但其它基质也是可用的。机械力稳定的基质如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯与用琼脂糖相比可实现更快的流速和更短的处理时间。在抗体包括CH3结构域的情况下,Bakerbond ABXTM树脂(新泽西州菲利普斯堡的马林克罗特贝克有限公司(J.T.Baker, Phillipsburg, N.J.)可用于纯化。根据待回收的抗体,用于蛋白质纯化的其它技术也是可用的,如在离子交换柱上进行分级、乙醇沉淀、反相HPLC、在二氧化硅上进行色谱法、在肝素SEPHAROSTM上进行色谱法、在阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上进行色谱法、色谱聚焦、SDS-PAGE、以及硫酸铵沉淀。

[0515] 在任何初步纯化步骤之后,可以使用pH介于约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液使包含所关注抗体和污染物的混合物经受低pH疏水相互作用色谱法,优选地在低盐浓度(例如,约0-0.25M盐)下进行。

[0516] IV. 药物组合物

[0517] 本公开进一步提供了包含双功能分子和一种或多种药学上可接受的载体的药物组合物。

[0518] 用于本文公开的药物组合物的药学上可接受的载体可以包括例如药学上可接受的液体、凝胶或固体载体、水性媒剂、非水性媒剂、抗微生物剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、麻醉剂、悬浮剂/分配剂、多价螯合剂或螯合剂、稀释剂、佐剂、赋形剂或无毒辅助物质、本领域已知的其它组分或其各种组合。

[0519] 合适的组分可以包括例如抗氧化剂、填料、粘结剂、崩解剂、缓冲剂、防腐剂、润滑剂、调味剂、增稠剂、着色剂、乳化剂或稳定剂，如糖和环糊精。合适的抗氧化剂可以包括例如甲硫氨酸、抗坏血酸、EDTA、硫代硫酸钠、铂、过氧化氢酶、柠檬酸、半胱氨酸、硫代甘油、巯基乙酸、硫代山梨糖醇、丁基化羟基茴香醚(butylated hydroxanisole)、丁基化羟基甲苯和/或没食子酸丙酯。如本文所公开的，在包含本文提供的双功能分子和缀合物的组合物中包括一种或多种如甲硫氨酸等抗氧化剂降低了双功能分子的氧化。这种氧化降低可防止或减少结合亲和力的丧失，从而提高抗体稳定性并最大化保质期。因此，在某些实施例中，提供了包含一种或多种如本文公开的双功能分子和一种或多种如甲硫氨酸等抗氧化剂的药物组合物。进一步提供了用于通过将双功能分子与一种或多种如甲硫氨酸等抗氧化剂混合来防止本文提供的双功能分子的氧化、延长所述双功能分子的保质期和/或提高所述双功能分子的功效的方法。

[0520] 为了进一步说明，例如，药学上可接受的载体可以包括：水性媒剂，如氯化钠注射液、林格氏注射液(Ringer's injection)、等渗右旋糖注射液、无菌水注射液或右旋糖和乳酸林格氏注射液；非水性媒剂，如植物来源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油；细菌抑制或真菌抑制浓度下的抗微生物剂；等渗剂，如氯化钠或右旋糖；缓冲剂，如磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂；抗氧化剂，如硫酸氢钠；局部麻醉剂，如盐酸普鲁卡因；悬浮和分散剂，如羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮；乳化剂，如聚山梨醇酯80(TWEEN-80)；多价螯合剂或螯合剂，如EDTA(乙二胺四乙酸)或EGTA(乙二醇四乙酸)；乙醇；聚乙二醇；丙二醇；氢氧化钠；盐酸；柠檬酸或乳酸。可以将用作载体的抗微生物剂添加到多剂量容器中的药物组合物中，所述抗微生物剂包括苯酚或甲酚、汞剂、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵。合适的赋形剂可以包括例如水、盐水、右旋糖、甘油或乙醇。合适的无毒辅助物质可以包括例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解度增强剂或如乙酸钠、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或环糊精等药剂。

[0521] 药物组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳液、丸剂、胶囊、片剂、缓释调配物或粉末。口服调配物可以包括标准载体，如医药级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0522] 在某些实施例中，将药物组合物调配成可注射组合物。可注射药物组合物可以以任何常规形式制备，所述常规形式例如液体溶液、悬浮液、乳液或适用于产生液体溶液、悬浮液或乳液的固体形式。注射制剂可以包括准备注射的无菌和/或无热原溶液、准备在使用前与溶剂组合的无菌干燥可溶性产品(如冻干粉末，包括皮下注射片剂)、准备注射的无菌悬浮液、准备在使用前与媒剂组合的无菌干燥的不溶性产品以及无菌和/或无热原乳液。溶液可以是水性的或非水性的。

[0523] 在某些实施例中,单位剂量肠胃外制剂被包装在安瓿、小瓶或带有针头的注射器中。正如本领域已知和实践的那样,所有用于肠胃外施用的制剂都应该是无菌且无热原的。

[0524] 在某些实施例中,无菌冻干粉末通过将本文公开的双功能分子溶解在合适的溶剂中来制备。所述溶剂可以含有赋形剂,所述赋形剂可改善粉末或由粉末制备的重构溶液的稳定性或其它药理学组分。可以使用的赋形剂包括但不限于水、右旋糖、山梨糖醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其它合适的药剂。溶剂可以含有缓冲剂,如柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾、或本领域技术人员已知的其它此类缓冲剂,在一个实施例中,所述缓冲剂为约中性pH。随后对溶液进行无菌过滤,然后在本领域技术人员已知的标准条件下冻干,从而提供期望的调配物。在一个实施例中,将所得溶液分配到小瓶中以冻干。每个小瓶可以含有单剂量或多剂量的双功能分子或其组合物。用略微高于每次剂量所需或多次剂量所需的量(例如约10%)过填充小瓶是可接受的,以便促进取样精确和给药精确。可以在适当的条件下如在约4℃到室温下储存冻干粉末。

[0525] 用注射用水将冻干粉末重构,从而提供用于肠胃外施用的调配物。在一个实施例中,为了重构,将无菌和/或无热原水或其它合适的液体载体添加到冻干粉末中。精确的量取决于给予的所选疗法并且可以根据经验确定。

[0526] V. 试剂盒

[0527] 在某些实施例中,本公开提供了包括本文提供的双功能分子和/或本文提供的药物组合物的试剂盒。在某些实施例中,本公开提供了包括本文提供的双功能分子和第二治疗剂的试剂盒。在某些实施例中,第二治疗剂选自自由以下组成的组:化学治疗剂、抗癌药物、放射疗法、免疫治疗剂、抗血管生成剂、靶向疗法、细胞疗法、基因疗法、激素疗法、抗病毒剂、抗生素、镇痛剂、抗氧化剂、金属螯合剂和细胞因子。

[0528] 如将对本领域的技术人员显而易见的是,如果需要,此类试剂盒可以进一步包括各种常规药物试剂盒组件中的一个或多个,例如具有一种或多种药学上可接受的载体的容器、另外的容器等。试剂盒中还可以包括指示待施用的组分的量的说明书(作为插入物或作为标签)、施用指南和/或用于混合组分的指南。

[0529] VI. 使用方法

[0530] 在另一方面,本公开提供了一种治疗、预防或减轻受试者的PD-L1相关疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文提供的双功能分子或本文提供的药物组合物或试剂盒。

[0531] 在某些实施例中,受试者是人。

[0532] PD-1相关病状和病症可以是免疫相关疾病或病症、癌症、自身免疫疾病或传染病。

[0533] 在某些实施例中,PD-1相关病状和病症包括癌症,例如,非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、有真菌特征的真菌病(mycoses fungoids)、默克尔细胞癌(merkel cell cancer)和其它血液学恶性肿瘤,如经典霍奇金淋巴瘤(CHL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的B细胞淋巴瘤、EBV阳性和阴性PTLD以及EBV相关的弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、浆母细胞淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻咽癌和HHV8相关的原发性渗出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、中枢神经系统(CNS)赘生物,如原发性CNS淋巴瘤、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤。在某些

实施例中,肿瘤和癌症是转移性的,尤其是表达PD-L1的转移性肿瘤。

[0534] 在某些实施例中,PD-1相关病状和病症包括自身免疫疾病。自身免疫疾病包括但不限于获得性免疫缺陷综合征(AIDS,它是一种具有自身免疫组分的病毒性疾病)、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森氏病(autoimmune Addison's disease)、自身免疫性糖尿病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性淋巴增生综合征(ALPS)、自身免疫性血小板减少性紫癜(ATP)、白塞氏病(Behcet's disease)、心肌病、口炎性腹泻-疱疹样皮炎;慢性疲劳免疫功能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIPD)、瘢痕性类天疱疮、冷凝集素病、肢端硬皮综合征(crest syndrome)、克罗恩氏病(Crohn's disease)、德戈斯病(Degos'disease)、幼年性皮肌炎、盘状狼疮、原发性混合性冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯氏病(Graves'disease)、吉兰-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、胰岛素依赖型糖尿病、幼年型慢性关节炎(斯蒂尔氏病(Still's disease))、幼年型类风湿性关节炎、梅尼埃氏病(Meniere's disease)、混合性结缔组织病、多发性硬化症、重症肌无力、严重贫血(pemacious anemia)、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病关节炎、雷诺氏现象(Raynaud's phenomena)、莱特尔氏综合征(Reiter's syndrome)、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病(进行性系统性硬化症(PSS),也称为系统性硬化症(SS))、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、僵人综合征、系统性红斑狼疮、高安氏动脉炎(Takayasu arteritis)、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、白癜风和韦格纳氏肉芽肿(Wegener's granulomatosis)。

[0535] 在某些实施例中,PD-1相关病状和病症包括传染病。传染病包括例如,慢性病毒感染,例如,真菌感染、寄生虫/原生动物感染或慢性病毒感染,例如,疟疾、粗球孢子菌病(coccidioiodomycosis immitis)、组织胞浆菌病、甲真菌病、曲霉菌病、芽生菌病、白色念珠菌病、副球孢子菌病(paracoccidioiomycosis)、微孢子虫病、棘阿米巴角膜炎(Acanthamoeba keratitis)、阿米巴病、蛔虫病、巴贝斯虫病、小袋虫病、浣熊贝蛔虫病(Baylisascariasis)、南美锥虫病(Chagas disease)、华支睾吸虫病、锥蝇属(Cochliomyia)、隐孢子虫病、裂头绦虫病、麦地那龙线虫病、包虫病、象皮病、蛲虫病、肝片吸虫病、姜片虫病、丝虫病、贾第虫病、颞口线虫病(Gnathostomiasis)、膜壳绦虫病、等孢球虫病、片山热(Katayama fever)、利什曼病、莱姆病(Lyme disease)、后殖吸虫病、蝇蛆病、盘尾丝虫病、虱病、疥疮、血吸虫病、昏睡病、类圆线虫病、绦虫病、弓蛔虫病、弓形体病、旋毛虫病、鞭虫病、锥虫病、蠕虫感染、乙型肝炎(HBV)感染、丙型肝炎(HCV)感染、疱疹病毒感染、艾普斯登-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)感染、HIV-1感染、HIV-2感染、巨细胞病毒感染、单纯疱疹病毒I型感染、单纯疱疹病毒II型感染、人乳头瘤病毒感染、腺病毒感染、卡波西西肉瘤相关疱疹病毒流行病感染、细环病毒(转矩特诺病毒(Torquetenovirus))感染、人T嗜淋巴细胞病毒I感染、人T嗜淋巴细胞病毒II感染、水痘带状疱疹病毒感染、JC病毒感染或BK病毒感染。

[0536] 在某些实施例中,PD-L1相关疾病是表达PD-L1的癌症或过度表达PD-L1的癌症。“表达PD-L1的癌症”是一种涉及癌细胞或肿瘤细胞在其细胞表面存在PD-L1蛋白的癌症。

“过度表达PD-L1的癌症”是与相同组织类型的非癌细胞相比，在癌症或肿瘤细胞的细胞表面具有显著更高水平的PD-L1的癌症。

[0537] PD-L1表达或过度表达可以在诊断或预后测定中通过评估存在于细胞表面上的PD-L1水平增加来确定(例如,通过免疫组织化学测定;IHC)。可替代地或另外地,可以例如通过荧光原位杂交(FISH;参见1998年10月出版的W098/45479)、southern印迹或聚合酶链反应(PCR)技术,如实时定量PCR(RT-PCR)来测量细胞中编码PD-L1的核酸的水平。还可以通过测量如血清等生物流体中的脱落抗原(例如,PD-L1胞外结构域或可溶性PD-L1)来研究PD-L1过度表达。除了上述测定之外,熟练的从业者还可获得各种体内测定。例如,可以将患者体内的细胞暴露于抗PD-L1抗体,所述抗体任选地用可检测标记(例如,放射性同位素)进行标记,并且可以例如通过外部扫描放射性或通过分析取自先前暴露于抗体的患者的活组织检查评估抗体与患者细胞的结合。

[0538] 在一些实施例中,受试者已被鉴定为可能对PD-1拮抗剂有应答。所关注生物样品上PD-L1的存在或水平可以指示生物样品所源自的受试者是否可能对PD-1拮抗剂有应答。在一些实施例中,测试样品源自癌细胞或组织、或肿瘤浸润免疫细胞。在某些实施例中,测试生物样品中PD-L1的存在或上调水平指示应答的可能性。如本文所使用的,术语“上调”是指与使用相同抗体检测的参考样品中的PD-L1蛋白水平相比,测试样品中PD-L1的蛋白水平总体增加不少于10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或更大。参考样品可以是健康或非患病个体获得的对照样品,或者是从测试样品所获自的同一个体获得的健康或非患病样品。例如,参考样品可以是与测试样品(例如,肿瘤)相邻或在测试样品附近的非患病样品。

[0539] 在某些实施例中,PD-L1相关疾病对PD-L1/PD-1单一疗法具有抗性。如本文所使用的,“PD-L1/PD-1单一疗法”是指通过抑制或减少PD-L1和PD-1相互作用或信号传导而起作用的单一疗法。示例性PD-L1/PD-1单一疗法可以包括抗PD-L1抗体疗法、抗PD-1抗体疗法或涉及针对PD-1或PD-L1的小分子抑制剂的单一疗法。“抗性”意指所述疾病对PD-L1/PD-1单一疗法没有应答或敏感性或具有降低的应答或敏感性。降低的应答可以通过例如需要增加剂量以实现给定功效来指示。在某些实施例中,所述疾病可能对PD-L1/PD-1单一疗法无应答。例如,尽管使用PD-L1/PD-1单一疗法治疗,癌细胞或肿瘤大小仍会增加,或者疾病显示回归到其以前的状态,例如,在部分康复后恢复先前的症状。对PD-L1/PD-1单一疗法的抗性可以是新发的或获得性的。

[0540] 在另一方面,本公开提供了一种治疗、预防或减轻受试者的疾病或病状的方法,所述疾病或病状将受益于免疫抑制性细胞因子的抑制、持续免疫应答的诱导或抗肿瘤免疫的刺激,所述方法包括施用有效量的本文提供的双功能分子或本文提供的药物组合物。

[0541] 在一些实施例中,所述免疫抑制性细胞因子是TGFβ或IL-1。在一些实施例中,所述免疫抑制性细胞因子是TGFβ1或IL-1β。

[0542] 在一些实施例中,所述疾病或病状是TGFβ相关疾病或病状。在一些实施例中,所述TGFβ相关疾病是癌症、纤维化疾病或肾病。

[0543] 在某些实施例中,所述TGFβ相关疾病是癌症。在某些实施例中,所述癌症选自由以下组成的组:结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌癌、头颈癌、肝癌、鼻咽

癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、基底细胞癌、皮肤癌、鳞状细胞皮肤癌、皮肤纤维肉瘤突起、默克尔细胞癌、胶质母细胞瘤、胶质瘤、肉瘤、间皮瘤和骨髓增生异常综合征。

[0544] 在某些实施例中,所述TGF β 相关疾病是纤维化疾病。纤维化疾病是涉及纤维化的疾病或病状。纤维化是一种瘢痕形成过程,是慢性器官(例如肺、肝脏、肾脏、皮肤、心脏、肠道或肌肉)损伤的常见特征。纤维化的特征在于转化生长因子- β (TGF- β) 活性升高,从而导致胞外基质和其它纤维化相关蛋白的沉积增加和改变。

[0545] 纤维化疾病可以包括肺、肝脏、肾脏、眼睛、皮肤、心脏、肠道或肌肉的纤维化疾病。肺的纤维化疾病的实例包括肺纤维化、囊性纤维化、肺动脉高压、进行性大块纤维化、闭塞性细支气管炎、与慢性哮喘或特发性肺相关的气道重塑。肝脏的纤维化疾病的实例包括肝硬化或非酒精性脂肪性肝炎。肾脏的纤维化疾病的实例包括如肾纤维化、缺血性肾损伤、肾小管间质纤维化、糖尿病肾病、肾硬化或肾毒性。眼睛的纤维化疾病的实例包括如角膜纤维化、视网膜下纤维化。皮肤的纤维化疾病的实例包括如肾源性系统性纤维化、瘢痕疙瘩或硬皮病。心脏的纤维化疾病的实例包括心内膜心肌纤维化或陈旧性心肌梗塞。

[0546] 在一些实施例中,所述疾病或病状是IL-1相关疾病或病状。在一些实施例中,所述IL-1相关疾病是自身炎性疾病、代谢综合征、急性炎症、慢性炎症或恶性肿瘤。

[0547] 在一些实施例中,所述疾病或病状将受益于通过用免疫刺激性多肽(例如,可溶性LAG-3)刺激MHCII信号传导而诱导持续免疫应答。在一些实施例中,所述疾病或病状是癌症、病毒感染、寄生虫感染或其组合。

[0548] 在一些实施例中,所述疾病或病状将受益于通过抑制免疫抑制性受体信号传导而刺激抗肿瘤免疫。在一些实施例中,所述免疫抑制性受体是SIRP α 。在某些实施例中,所述疾病、病症或病状与SIRP α 相关,如癌症、实体瘤、慢性感染、炎性疾病、多发性硬化、自身免疫疾病、神经系统疾病、脑损伤、神经损伤、红细胞增多症、血色病、外伤、感染性休克、纤维化、动脉粥样硬化、肥胖症、II型糖尿病、移植功能障碍或关节炎。在一些实施例中,所述癌症是肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、胆囊癌、胃癌、肺癌、支气管癌、骨癌、肝和胆管癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌、卵巢癌、睾丸癌、肾癌、肾盂和输尿管癌、唾液腺癌、小肠癌、尿道癌、膀胱癌、头颈癌、脊柱癌、脑癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、结肠癌、结直肠癌、直肠癌、肛门癌、食道癌、胃肠癌、皮肤癌、前列腺癌、垂体癌、阴道癌、甲状腺癌、喉癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生异常综合征、肉瘤、畸胎瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、T或B细胞淋巴瘤、GI器官间质瘤、软组织肿瘤、肝细胞癌和腺癌。在一些实施例中,所述癌症是表达CD47的癌症或过度表达CD47的癌症。

[0549] 本文提供的双功能分子的治疗有效量将取决于本领域已知的各种因素,例如,体重、年龄、既往病史、目前的药物治疗、受试者的健康状况和交叉反应的潜力、过敏、敏感性和不良副作用,以及施用途径和疾病发展的程度。本领域技术人员(例如,医师或兽医)可以根据这些和其它情况或要求的指示按比例减少或增加剂量。

[0550] 在某些实施例中,本文提供的双功能分子可以以约0.01mg/kg到约100mg/kg的治疗有效剂量施用。在某些实施例中,施用剂量可以在治疗过程中改变。例如,在某些实施例中,初始施用剂量可以高于随后的施用剂量。在某些实施例中,施用剂量可以在治疗过程中

根据受试者的反应而变化。

[0551] 可以调整剂量方案以提供最佳的期望应答(例如,治疗应答)。例如,可以施用单一剂量,或者可以随时间的推移施用多个分开的剂量。

[0552] 本文提供的双功能分子可以通过本领域已知的任何途径施用,例如,肠胃外(例如,皮下、腹膜内、静脉内,包括静脉内输注、肌内或皮内注射)或非肠胃外(例如,口服、鼻内、眼内、舌下、直肠或局部)途径。

[0553] 在一些实施例中,本文提供的双功能分子可以单独施用或与治疗有效量的第二治疗剂组合施用。例如,本文公开的双功能分子可以与第二治疗剂组合施用,所述第二治疗剂例如化学治疗剂、抗癌药物、放射疗法、免疫治疗剂、抗血管生成剂、靶向疗法、细胞疗法、基因疗法、激素疗法、抗病毒剂、抗生素、镇痛剂、抗氧化剂、金属螯合剂或细胞因子。

[0554] 如本文所使用的,术语“免疫疗法”是指刺激免疫系统对抗如癌症等疾病或以一般方式增强免疫系统的疗法类型。免疫疗法的实例包括但不限于检查点调节剂、过继细胞转移、细胞因子、溶瘤病毒和治疗性疫苗。

[0555] “靶向疗法”是作用于与癌症相关的特定分子的疗法类型,所述特定分子如存在于癌细胞中但不存在于正常细胞中或在癌细胞中更丰富的特定蛋白质,或有助于癌症生长和存活的癌症微环境中的靶分子。靶向疗法将治疗剂靶向肿瘤,从而使正常组织免受治疗剂的影响。

[0556] 在这些实施例中的某些实施例中,与一种或多种另外的治疗剂组合施用的本文提供的双功能分子可以与一种或多种另外的治疗剂同时施用,并且在这些实施例中的某些实施例中,所述双功能分子和所述另外的治疗剂可以作为相同药物组合物的一部分施用。然而,与另一种治疗剂“组合”施用的双功能分子不必与所述药剂同时施用或不必要与所述药剂在同一组合物中施用。在另一种药剂之前或之后施用的双功能分子被认为是与所述药剂“组合”施用,如本文所使用的短语,即使抗体或抗原结合片段和第二药剂通过不同途径施用也是如此。在可能的情况下,与本文公开的抗体或其抗原结合片段组合施用的另外的治疗剂根据另外的治疗剂的产品信息表中列出的时间表或根据医生桌上参考手册(Physicians' Desk Reference) 2003(《医生桌上参考手册》,第57版;医疗经济学公司(Medical Economics Company); ISBN:1563634457;第57版(2002年11月))或本领域众所周知的方案施用。

[0557] 在另一方面,本公开还提供了本文提供的双功能分子和/或本文提供的药物组合物在制造用于治疗受试者的PD-L1相关疾病和/或TGF- β 相关疾病和/或IL-1相关疾病和/或CD47相关疾病的药物中的用途。

[0558] 提供以下实例以更好地说明所要求保护的发明并且不应将所述实例解释为限制本发明的范围。下文描述的所有具体组合物、材料和方法全部或部分地落入本发明的范围内。这些具体组合物、材料和方法不旨在限制本发明,而仅用于说明落入本发明范围内的具体实施例。本领域技术人员可以在不运用发明能力和不脱离本发明范围的情况下开发出等效的组合物、材料和方法。将理解,可以在本文描述的程序中做出许多变化,同时仍然保持在本发明的界限内。本发明人的意图是此类变化包括在本发明的范围内。

[0559] 实例

[0560] 实例1:人源化4B6抗体的产生、表达和纯化

[0561] 源自专利W0 2017161976A1的包括如下所示的SEQ ID NO:46的VH序列和SEQ ID NO:47的VL序列的抗PD-L1mAb 4B6是强效PD-1/PD-L1阻滞剂。此抗体由小鼠杂交瘤抗体产生,因此需要适当的人源化。小鼠抗体4B6的可变结构域的序列用于鉴定与其相应鼠框架具有最高同源性的种系序列。计算机建模用于设计具有互补决定区(CDR)移植和回复突变的人源化变体。

[0562] 小鼠/嵌合重链可变区(SEQ ID NO:46):

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYVFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSYNHKFK

[0563]

GKATVTVDKSSRTAYMELLSLTSEDSAVYYCVKWDGPFAYWGQGLTVTSA

[0564] 小鼠/嵌合轻链可变区(SEQ ID NO:47):

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGAAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGS

[0565]

GSQTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSNYPTFGSGTKLGIK

[0566] 注意:斜体部分表示框架(FR),并且下划线部分表示CDR序列。顺序是FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0567] 轻链的人种系框架序列VK/1-33和重链的VH/1-2分别用于CDR移植。

[0568] 重链变体1、2、3和4(即,VH变体1、2、3和4)通过将三个CDR直接移植到VH种系序列(SEQ ID NO:48)以及另外对VH变体1(SEQ ID NO:49)的M69V、R71V、VH变体2(SEQ ID NO:50)的M69V、R71V、A93V、R94K、VH变体3(SEQ ID NO:51)的M69V、R71V、T73K、T28V和VH变体4(SEQ ID NO:52)的M69V、R71V、A93V、R94K、T73K、T28V、G44S分别进行回复突变来获得。

[0569] 4B6VH的种系序列:

[0570] VH/1-2(4B6-VH种系,SEQ ID NO:48):

[0571] *QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT*
MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR

[0572] VH/1-2变体1(4B6_Ha,SEQ ID NO:49):

[0573] *QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVT*
VTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWGDGPFAYWGQGLTVTVSS

[0574] VH/1-2变体2(4B6_Hb,SEQ ID NO:50):

[0575] *QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVT*
VTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWDGPFAYWGQGLTVTVSS

[0576] VH/1-2变体3(Hu4B6_Hc,SEQ ID NO:51):

[0577] *QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVT*
VTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWGDGPFAYWGQGLTVTVSS

[0578] VH/1-2变体4(Hu4B6_Hd,SEQ ID NO:52):

[0579] *QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVT*
VTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWDGPFAYWGQGLTVTVSS

[0580] 轻链变体1和2(VL变体1和2)通过将三个CDR直接移植到种系序列(SEQ ID NO:53)以及另外对VL变体1(SEQ ID NO:54)的F73L突变和VL变体2(SEQ ID NO:55)的F73L、A43S、S60D分别进行回复突变获得。

[0581] 4B6VL的种系序列:

[0582] VK/1-33(4B6-VL-种系,SEQ ID NO:53):

[0583] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGT
DFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNL

[0584] VK/1-33变体1(Hu4B6_La, SEQ ID NO:54) :

[0585] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGA AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK

[0586] VK/1-33变体2(Hu4B6_Lb, SEQ ID NO:55) :

[0587] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGA AVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVPDFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK

[0588] 合成上述重链和轻链可变区的cDNA,并且然后将所述cDNA与人IgG1和人κ的恒定区序列融合。将所得抗体基因序列克隆到表达载体中。使用来自凯杰公司(Qiagen)的Plasmid Maxiprep System制备大规模DNA,以用于人源化4B6变体表达,如表6所示,并使用来自英杰公司(Invitrogen)的ExpiFectamine™ CHO试剂根据制造商的方案进行细胞转染。当细胞存活率超过60%时收获上清液并通过0.22um过滤胶囊过滤以去除细胞碎片。随后将经过滤的上清液加载到预平衡的蛋白质-A亲和柱上。用平衡缓冲液(PBS)洗涤蛋白A树脂,并且然后使用25mM柠檬酸盐(pH 3.5)洗脱抗体。通过使用1M Tris-碱(pH9.0)将纯化的抗体溶液调节到pH 6.0-7.0。内毒素控制在1EU/mg以下。最后,纯化的抗体通过SDS-PAGE进行表征。

[0589] 表6. 人源化4B6变体的表达

鼠抗体 4B6 的人源化序列组合			
	Hu4B6_L0	Hu4B6_La (SEQ ID NO : 54)	Hu4B6_Lb (SEQ ID NO : 55)
[0590]	Hu4B6_H0		
	Hu4B6_Ha (SEQ ID NO : 49)	Hu4B6_HaLa	Hu4B6_HaLb
	Hu4B6_Hb (SEQ ID NO : 50)	Hu4B6_HbLa	Hu4B6_HbLb
[0591]	Hu4B6_Hc (SEQ ID NO : 51)	Hu4B6_HcLa	Hu4B6_HcLb
	Hu4B6_Hd (SEQ ID NO : 52)	Hu4B6_HdLa	Hu4B6_HdLb

[0592] 注意:此表示出了不同突变的各种序列组合。例如,Hu4B6_HaLa指示人源化鼠抗体Hu4B6_HaLa上存在两种突变(重链Hu4B6_Ha和轻链Hu4B6_La),以此类推。Hu4B6_L0和Hu4B6_H0是CDR移植获得的,所述CDR移植缺少关键回复突变,因此其不用于表达。

[0593] 实例2:通过ELISA测定测量的与人PD-L1的结合

[0594] 通过ELISA方法评估人源化抗体的结合。简而言之,将人PD-L1-His固定在板上。将表6中列出的人源化4B6抗体在PBS中连续稀释并添加温育1小时。接下来,添加山羊pAb对人IgG-HRP和TMB以检测OD450nm处的结合。

[0595] 如图1所示,测试所有人源化变体以筛选最好的变体。所有变体都保留了它们的结合活性,并且Hu4B6_HdLa显示出比其它变体更好的结合活性。

[0596] 分析了此抗体的CDR序列,并且发现重链的CDR2中存在NG基序。在表达和纯化过程中可能存在脱氨基的风险。为了去除脱酰胺热点,将G55A的突变(下方粗体和放大)引入到

Hu4B6_Hd中。然后获得Hu4B6_Hg (SEQ ID NO:56), 并且对人PD-L1的亲合力不受影响, 如图2所示。

[0597] Hu4B6_Hg (SEQ ID NO:56):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNA

[0598] GTSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLLTVSS

[0599] 实例3: 单克隆噬菌体ELISA和序列分析

[0600] 尽管Hu4B6-HgLa保留了嵌合4B6的活性, 但作为拮抗剂药物, 更高的亲合力是优选的。基于Hu4B6-HgLa序列, CDR中的定点诱变和体外解离速率依赖性选择的几个淘选循环被进一步用于亲合力成熟。首先, 将4B6-HgLa的VL和VH结构域通过重叠PCR扩增并通过肽接头(G_4S) 3连接形成scFv, 然后亚克隆到噬菌粒载体pComb3x (武汉妙灵生物 (Wuhan MiaoLingBio), P0862) 中, 作为通过SfiI切割位点进行亲合力成熟的野生型序列。

[0601] 为了研究重链和轻链的CDR1和CDR2对4B6亲合力成熟的单独的贡献, 将构建上述每个CDR的一个SPM (小扰动诱变) 噬菌体文库, 因为两条链的抗体CDR3通常在抗原结合中起着重要的作用。将两条链的CDR1和CDR2序列与种系序列比对, 并且重链和轻链的可变区的种系分别为IGHV1-2和IGKV1-33。种系CDR序列的生物信息学分析结果用于指导文库设计。

[0602] 在确定氨基酸突变位点和取代序列后, 设计简并引物以增加突变文库的多样性。扩增多样化的CDR片段, 以构建4B6scFv基因突变文库。将scFv基因与pComb3XSS噬菌体展示载体连接以生成scFv文库。每个CDR (包括表2中列出的HCDR1、HCDR2、LCDR1和LCDR2) 的基于密码子的引物建立为独立文库, 并且将4B6亲合力成熟文库分为4个文库。HCDR1的容量为 1.76×10^8 CFU, HCDR2的容量为 1.81×10^8 CFU, LCDR1的容量为 2.34×10^8 CFU, 并且LCDR2的容量为 2.00×10^8 CFU。每个文库随机选取5或6个克隆进行菌落测序。结果表明, 构建的文库的插入率为100%。

[0603] 将 $10 \mu\text{g/ml}$ hPD-L1 (Acro Biosystems, PD1-H5229) 抗原包被到ELISA板, 并在 37°C 下与 $200 \mu\text{L}$ 噬菌体 (1×10^{10} pfu/ml噬菌体展示文库) 反应1小时。洗涤后, 将OD600为大约0.5的TG1 (Lucigen, 60502-2) 直接添加到孔中进行感染, 并与噬菌体一起温育15分钟。足够体积的M13K07辅助噬菌体 (NEB, N0315S) 到对数中期培养用于文库噬菌粒拯救, 并且将噬菌体生成和纯化以用于下一轮筛选。筛选过程重复3轮, 并且第2轮抗原浓度下降到 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 且第3轮抗原浓度下降到 $1 \mu\text{g/ml}$ 。

[0604] 进行ELISA结合测定以检测这些多克隆噬菌体变体的效价。在3轮淘选之后, 包括4B6-H-CDR2、4B6-L-CDR1和4B6-L-CDR2的3个文库明显富集。

[0605] 对于这3个文库, 挑取每个文库的96个克隆并进行噬菌体ELISA以检测它们的结合活性。简而言之, 将 $1 \mu\text{g/ml}$ hPD-L1 (Acro Biosystems, PD1-H5229) 抗原包被到ELISA板并在 4°C 下放置过夜。然后添加 $300 \mu\text{L}$ 的3% (w/v) 脱脂牛奶, 以在室温下封闭1小时。1小时后, 将含有单克隆抗体片段噬菌体的 $100 \mu\text{L}$ 上清液与作为阴性对照的PBS一起添加并且在 37°C 下温育1小时。0.5% PBS+Tween-20用于洗涤3次, 并且添加 $100 \mu\text{L}$ HRP偶联抗M13mAb (1:20000, Sino Biological, 11973-MM05T-H)。在室温下温育1小时后, 添加混合的TMB (InnoReagents, TMB-S-003) 底物试剂并将板在室温下温育5分钟。添加 0.1M H_2SO_4 终止反应, 然后记录OD450nm。挑选阳性克隆以用于由Genewiz (中国苏州) 进行DNA测序。序列在表7

中示出。

[0606] 表7. 4B6scFv噬菌体文库的阳性克隆的序列

[0607]

AM4B6_Hg		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYMNWVRQAPGQSL EWMGDINPNNAGTSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRRLSDD TAVYYCVKWDGDPFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 56)
Hu4B6_Hg.2	G57Q, S59Q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYMNWVRQAPGQSL EWMGDINPNNAGTQYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRRLSDD TAVYYCVKWDGDPFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 58)
AM4B6_Hg.3	G57E, S59L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYMNWVRQAPGQSL EWMGDINPNNAGTLYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRRLSDD TAVYYCVKWDGDPFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 59)
AM4B6_Hg.5	G57Q, S59V	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYMNWVRQAPGQSL EWMGDINPNNAGTVYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRRLSDD TAVYYCVKWDGDPFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 60)
Hu4B6_La		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGA ~~AV~~ AWYQQKPGKAPK LLIYSASNRYTGVP ~~SR~~ FSGSGSGTDFTLTIS ~~SL~~ QPED ~~IA~~ TY ~~YC~~ QQ YSNYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 61)
AM4B6_La.1	G30K, A31G	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVKG ~~AV~~ AWYQQKPGKAPK LLIYSASNRYTGVP ~~SR~~ FSGSGSGTDFTLTIS ~~SL~~ QPED ~~IA~~ TY ~~YC~~ QQ YSNYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)
AM4B6_La.2	G30P	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVPA ~~AV~~ AWYQQKPGKAPK LLIYSASNRYTGVP ~~SR~~ FSGSGSGTDFTLTIS ~~SL~~ QPED ~~IA~~ TY ~~YC~~ QQ YSNYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 63)
AM4B6_La.4	A51V, N53D	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGA ~~AV~~ AWYQQKPGKAPK LLIYSVSDRYTGVP ~~SR~~ FSGSGSGTDFTLTIS ~~SL~~ QPED ~~IA~~ TY ~~YC~~ QQ YSNYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 64)

[0608] 注意：下划线序列是指CDR序列，并且加粗氨基酸是指突变氨基酸。

[0609] 实施4：用于检测结合亲和力的生物层干涉测量法 (BLI)

[0610] 生物层干涉测量法 (BLI) 用于测试4B6scFv变体对人PD-L1-Fc (Sino Biological, 70110-D02H) 抗原的结合亲和力。材料和程序分别在表8和表9中示出。结果在表10-12中示出。根据结合亲和力结果，4个轻链变体 (L-CDR1-2、L-CDR1-3、L-CDR2-2、L-CDR2-3) 和3个重链变体 (H-CDR2-2、H-CDR2-3、H-CDR2-5) 被选择用于未来的构建。

[0611] 表8 BLI测定中使用的样品和材料

细胞类型	样品 ID
基线	KD 缓冲液
[0612] 负载量	PD-L1-FC (3.25 µg/ml)
基线 2	KD 缓冲液
样品	4B6 scFv (5.2 µg/ml)
参考孔	KD 缓冲液
[0613] 再生	再生缓冲液
中和	KD 缓冲液

[0614] 表9 BLI测定程序

[0615]	步骤类型	测定时间
	基线	60 秒
	加载	180 秒
	基线 2	120 秒
	缔合	180 秒
	离解	240 秒
	再生	5 秒

[0616] 表10.4B6-L-CDR1突变变体的结合亲和力分级

[0617]	样品编号	序列	$K_{on} (\times 10^5 M^{-1} s^{-1})$	$K_{off} (\times 10^{-3} M^{-1} s^{-1})$	$K_d (\times 10^{-9} M)$	增加倍数
	L-CDR1-WT	KASQNVGAAVA (SEQ ID NO: 4)	0.358	1.01	28.2	----
	L-CDR1-1	KASQNVGAIVA (SEQ ID NO: 7)	0.412	0.285	6.91	4.08
	L-CDR1-2	KASQNVPAAVA (SEQ ID NO: 8)	2.71	1.54	5.68	4.96
	L-CDR1-3	KASQNVKGAVA (SEQ ID NO: 9)	0.911	0.253	2.78	10.14

[0618] 表11.4B6-L-CDR2突变变体的结合亲和力分级

[0619]	样品编号	序列	$K_{on} (\times 10^5 M^{-1} s^{-1})$	$K_{off} (\times 10^{-3} M^{-1} s^{-1})$	$K_d (\times 10^{-9} M)$	增加倍数
	L-CDR2-WT	SASNRYT (SEQ ID NO: 5)	0.381	1.05	27.6	----
	L-CDR2-1	SNSHRYT (SEQ ID NO: 10)	0.468	0.377	8.06	3.42
	L-CDR2-2	SRSVRYT (SEQ ID NO: 11)	1.62	0.540	3.34	8.26
	L-CDR2-3	SVSDRYT (SEQ ID NO: 12)	1.24	0.543	4.37	6.32

[0620] 表12.4B6-H-CDR2突变变体的结合亲和力分级

[0621]	样品编号	序列	$K_{on} (\times 10^5 M^{-1} s^{-1})$	$K_{off} (\times 10^{-3} M^{-1} s^{-1})$	$K_d (\times 10^{-9} M)$	增加倍数
	H-CDR2-WT (G55A)	DINPNNAGTSYNHKFKG (SEQ ID NO: 18)	0.463	1.24	26.7	----
	H-CDR2-1	DINPNNADTMYNHKFKG (SEQ ID NO: 13)	1.41	0.495	3.52	7.6
	H-CDR2-2	DINPNAQTQYNHKFKG (SEQ ID NO: 14)	1.01	0.244	2.42	11.03
	H-CDR2-3	DINPNAETLYNHKFKG (SEQ ID NO: 15)	1.16	0.283	2.43	10.99
	H-CDR2-4	DINPNGLTSYNHKFKG (SEQ ID NO: 16)	1.17	0.517	4.43	6.03
	H-CDR2-5	DINPNAQTVYNHKFKG (SEQ ID NO: 17)	1.02	0.245	2.40	11.13

[0622] 实施5AM-4B6-hIgG1-TGFβRII (1-136)融合蛋白的构建和表达

[0623] 将所选重链和轻链变体与hIgG1-TGFβRII(1-136)融合蛋白交叉组合并表达。TGFβRII(1-136)具有在SEQ ID NO:79中所示的氨基酸序列:

[0624] TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFVFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKN
DENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[0625] hIgG1的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:80):

[0626] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0627] TGFβRII(1-136)通过肽接头(G4S)₄G(SEQ ID NO:68)连接到hIgG1的羧基端。

[0628] hκ的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:82):

[0629] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0630] 完整抗体变体以AM(亲和力成熟)为前缀。重链和轻链的序列构建体在表13中示出,并且完整抗体的设计在表14中示出。例如,如表13和表14所示,双功能分子“AM-4B6-hIgG1-TGFβRII变体1”具有重链和轻链,其中从N端到C端的重链包括:Hu4B6_Hg.2-hIgG1-(G4S)4G-TGFβRII(1-136);并且从N端到C端的轻链包括:Hu4B6_La.1-hκ。相同的命名法适用于表14中的其它变体。

[0631] 根据制造商的方案,使用来自英杰公司的ExpiFectamine™ CHO试剂(赛默(Thermo),A29129)进行重链和轻链的共转染。在第10天收获上清液并通过亲和色谱法纯化。

[0632] 表13 AM-4B6-hIgG1-TGFβRII重链和轻链变体的列表

名称	突变位点	区	序列
Hu4B6_Hg.2_hIgG1-(G4S)4G-TGFβRII	G57Q, S59Q	H-CDR2-2	DINPNAQTQYNHKFKG
Hu4B6_Hg.3_hIgG1-(G4S)4G-TGFβRII	G57E, S59L	H-CDR2-3	DINPNAETLYNHKFKG
[0633] Hu4B6_Hg.5_hIgG1-(G4S)4G-TGFβRII	G57Q, S59V	H-CDR2-5	DINPNAQTVYNHKFKG
Hu4B6_La.1_hKappa	G30K, A31G	L-CDR1-3	KASQNVKGAVA
Hu4B6_La.2_hKappa	G30P	L-CDR1-2	KASQNVPAAVA
Hu4B6_La.4_hKappa	A51V, N53D	L-CDR2-2	SRSVRYT
Hu4B6_La.6_hKappa	A51R, N53V	L-CDR2-3	SVSDRYT

[0634] 表14.AM-4B6-hIgG1-TGFβRII抗体变体的列表

样品编号	重链	轻链
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 1	Hu4B6_Hg.2 (SEQ ID NO: 58)	Hu4B6_La.1 (SEQ ID NO: 62)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 2		Hu4B6_La.2 (SEQ ID NO: 63)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 3		Hu4B6_La.4 (SEQ ID NO: 64)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 4		Hu4B6_La.6 (SEQ ID NO: 66)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 5	Hu4B6_Hg.3 (SEQ ID NO: 59)	Hu4B6_La.1 (SEQ ID NO: 62)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 6		Hu4B6_La.2 (SEQ ID NO: 63)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 7		Hu4B6_La.4 (SEQ ID NO: 64)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 8		Hu4B6_La.6 (SEQ ID NO: 65)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 9	Hu4B6_Hg.5 (SEQ ID NO: 60)	Hu4B6_La.1 (SEQ ID NO: 62)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 10		Hu4B6_La.2 (SEQ ID NO: 63)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 11		Hu4B6_La.4 (SEQ ID NO: 64)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 12		Hu4B6_La.6 (SEQ ID NO: 65)

[0637] 实例6:AM-4B6-hIgG1-TGFβRII变体对hPD-L1的结合亲和力

[0638] 通过ELISA测定测量的与hPD-L1的结合

[0639] 将1μg/ml hPD-L1 (Acro Biosystems, PD1-H5229) 抗原包被到ELISA板并在4℃下放置过夜。然后添加300μl的3% (w/v) 脱脂牛奶, 以在室温下封闭1小时。在1小时后, 将100μl的浓度范围为100nM到0.006nM(四倍连续稀释) 的AM-4B6-hIgG1-TGFβRII变体或原始4B6-hIgG1-TGFβRII与作为阴性对照的PBS一起添加并在室温下温育1小时。0.5% PBS+Tween-20用于洗涤3次, 并且添加100μl HRP偶联的抗人Fc抗体 (1:20000, 艾博抗 (Abcam), ab98624), 在室温下温育1小时后, 添加混合的TMB底物试剂 (InnoReagents, TMB-S-003) 并在室温下温育5分钟, 然后通过添加0.1M H₂SO₄终止。OD450nm由微板读数器记录。

[0640] 如图3A-图3C所示, 当与原始4B6-hIgG1-TGFβRII比较时, 所有变体都具有增强的结合信号和亲和力。鉴于这些变体之间的差异有限, 表面等离子共振技术被用于进一步评估它们的结合亲和力。

[0641] 通过Biacore测量的与hPD-L1的结合

[0642] 将4μg/ml AM-4B6-hIgG1-TGFβRII变体或原始4B6-hIgG1-TGFβRII固定在S系列蛋白A芯片的表面上。将人PD-L1稀释到适当的浓度梯度 (0nM、1.875nM、3.75nM、7.5nM、15nM、30nM、60nM) 并注射到Biacore 2000的样品通道中。结果在表15中示出。AM-4B6-hIgG1-TGFβRII变体7与人PD-L1的结合亲和力比原始4B6-hIgG1-TGFβRII提高了约15倍。

[0643] 表15. 通过Biacore测量的AM-4B6-hIgG1-TGFβRII与hPD-L1的结合亲和力

[0644]	分析物	样品编号	样品名称	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
	PD-L1	1	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 5	2.060E+5	1.487E-4	7.218E-10
[0645]	his	2	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 7	3.815E+5	1.479E-4	3.876E-10
		3	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 2	3.231E+5	1.676E-4	5.189E-10
		4	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 10	2.444E+5	1.476E-4	6.039E-10
		5	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 变体 11	2.688E+5	1.366E-4	5.083E-10
		6	4B6-hIgG1-TGFβRII	2.107E+5	0.001156	5.489E-9

[0646] 通过FACS测定测量的与细胞表面上表达的PD-L1的结合

[0647] 293T-PD-L1-CD3L细胞由迈博斯生物科学(MabSpace Bioscience)产生,以用于表征PD-L1抗体。用人PD-L1和抗CD3scFv转染细胞。将AM-4B6-hIgG1-TGFβRII变体或原始4B6-hIgG1-TGFβRII连续稀释(5倍稀释)以在稀释缓冲液(含2%BSA的PBS)中获得8个浓度。收获并离心293T-PD-L1-CD3L细胞。将它们以 2×10^6 个细胞/ml的密度重悬于PBS中,然后以每孔100ul添加到板中。在离心并去除上清液后,将稀释的抗体添加到板并且在4℃下温育30分钟。在用稀释缓冲液洗涤两次后,将PE缀合的驴抗人IgG(H+L)(Jacksonimmuno,709-116-149)添加到板并在4℃下温育30分钟。在洗涤后,将细胞重悬于200μl PBS中并通过流式细胞术进行分析。

[0648] 如图4所示,这5种变体以相似的EC50与在293T-PD-L1-CD3L细胞表面表达的PD-L1结合。变体7的EC50略低于其它变体,这与通过Biacore测量的结合亲和力结果一致。

[0649] 实例7:AM-4B6-hIgG1-TGFβRII变体的PD-1/PD-L1阻断活性

[0650] 通过ELISA测定测量的PD-1/PD-L1和B7-1/PD-L1阻断

[0651] 为了测试配体/受体阻断活性,将0.5μg/ml hPD-L1-Fc抗原包被到ELISA板并在4℃下放置过夜。添加300μl封闭缓冲液,以在室温下封闭1小时。在1小时后,添加50μl的浓度范围为100nM到0.024nM(四倍连续稀释)的AM-4B6-hIgG1-TGFβRII变体7或原始4B6-hIgG1-TGFβRII以及50μl的浓度为1μg/ml的PD-L1-his并且在室温下温育1小时。0.5%PBS+Tween-20用于洗涤3次,并且添加100μlHRP偶联的链霉亲和素(1:5000,艾博抗,目录号ab7403)。在室温下温育1.5小时后,添加混合的TMB底物试剂并在室温下温育5分钟,然后添加0.1M H₂SO₄终止。OD450nm由微板读数器记录。如图5A-图5B所示,两个样品都可以阻断PD-L1/PD-1或PD-L1/B7-1,而AM-4B6-hIgG1-TGFβRII变体7的IC50较低,这表明变体7具有更高的活性。

[0652] 通过基于细胞的测定测量的PD-1/PD-L1阻断

[0653] 在此测定中,293T-PD-L1-CD3L细胞表达PD-L1和抗CD3scFv,而Jurkat-NFAT-Luc-PD1细胞表达PD-1并携带可以用CD3刺激激活的NFAT信号。NFAT激活导致下游荧光素酶基因转录和表达,这可以通过其底物进行检测。所述两个细胞由迈博斯生物科学产生。

[0654] 简而言之,收获293T-PD-L1-CD3L细胞并以 2×10^6 个细胞/ml的密度重悬。将每孔20μl细胞添加到半孔板中。将AM-4B6-hIgG1-TGFβRII变体或原始4B6-hIgG1-TGFβRII连续稀释(3倍稀释)以在含2%FBS的RPMI培养基中获得8个浓度。向半孔板中每孔添加20μl抗体并且将板在37℃、5%CO₂下温育30分钟。收获Jurkat-NFAT-Luc-PD1细胞并以 4×10^6 个细胞/ml的密度重悬于含有2%FBS的RPMI培养基中。最后,将每孔20μl细胞和5ng/ml TGF-β(R&D, 240-B-010)添加到半孔板中并在37℃、5%CO₂下温育5小时。将60μl的OneGlo检测试剂(普

洛麦格 (Promega), E6120) 添加到每个孔中并在室温下温育5分钟。发光信号由微板读数器读取。数据通过GraphPad Prism分析。

[0655] 如图6所示,与之前的ELISA结果一致,与其它变体相比,变体7在此基于细胞的测定中具有最强效的阻断活性。因此,将AM-4B6-hIgG1-TGFβRII变体7的4B6Fab部分简称为AM4B6,并在以下实验中进一步评估AM4B6-hIgG1-TGFβRII融合蛋白。

[0656] 实例8:AM4B6-hIgG1-TGFβRII'的体外生成和表征

[0657] AM4B6-hIgG1-TGFβRII的克隆和表达

[0658] 据报道,截短的TGFβRII ECD₂₀₋₁₃₆是可溶性的并保留了结合TGFβ1的能力(Kim-Ming Lo等人,US9676863B2,2017;Christian C.等人,《蛋白质表达和纯化(Protein Expression and Purification)》,2000,20:98-104)。接下来,将TGFβRII₁₋₁₃₆的胞外结构域的全长替换为截短的胞外结构域并评估可开发性和稳定性。来自稳定细胞系的SDS-PAGE结果表明,蛋白质表达对于截短和全长TGFβRII ECD都很好,但截短的TGFβRII ECD₂₀₋₁₃₆的蛋白质稳定性比全长TGFβRII ECD好得多(图7)。截短的TGFβRII ECD₂₀₋₁₃₆的序列如下:

[0659] 稳定的TGF-β陷阱、TGF-βRII胞外结构域(20-136)的序列

[0660] GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDF
ILEDAAAPKICIMKEKKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

[0661] (SEQ ID NO:66)

[0662] 包括截短的TGF-βRII(即TGF-βRII(20-136),SEQ ID NO:66)的双功能分子用于此实例以及实例9-11。此类双功能分子的名称用TGFβRII'表示,以区别于TGF-βRII(1-136)。例如,AM4B6-hIgG1-TGFβRII'表示具有TGF-βRII(20-136)的分子。

[0663] 通过ELISA测定测量的与来自不同物种的PD-L1的结合

[0664] 将1μg/ml人PD-L1(Acro Biosystems,PD1-H5229)或食蟹猴PD-L1抗原包被到ELISA板上并在4℃下放置过夜。然后添加300μl的3%(w/v)脱脂牛奶,以在室温下封闭1小时。在1小时后,添加100μl的浓度范围为100nM到0.02nM(四倍连续稀释)的AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或对照hIgG1-TGFβRII'并在室温下温育1小时。0.5%PBS+Tween-20用于洗涤3次,并且添加100μl HRP偶联的抗人Fc抗体(1:20000,艾博抗(Abcam),ab98624),在室温下温育1小时后,添加混合的TMB底物试剂(InnoReagents,TMB-S-003)并在室温下温育5分钟,并且通过添加0.1M H₂SO₄终止。OD_{450nm}由微板读数器记录。

[0665] 如图8A和图8B所示,AM4B6-hIgG1-TGFβRII'以与人PD-L1相似的EC₅₀与食蟹猴PD-L1交叉反应。

[0666] 通过ELISA测量的与来自不同物种的TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3的结合

[0667] 根据来自Uniport网站(<https://www.uniprot.org/>)上公布的4种常见物种:人、食蟹猴、小鼠和大鼠的TGFβ1、TGFβ2和TGFβ3的序列,TGFβ成员是相当保守。人TGFβ1和食蟹猴TGFβ1的序列相同;小鼠TGFβ1和大鼠TGFβ1相同;人TGFβ2和食蟹猴TGFβ2相同;小鼠TGFβ2和大鼠TGFβ2相同;人TGFβ3、食蟹猴TGFβ3和小鼠TGFβ3相同。

[0668] 对于TGFβ1和TGFβ3,程序如下:将0.5μg/ml人TGFβ1(Sino Biological,10804-HNAC)或小鼠TGFβ1(Novoprotein,CK33)或人TGFβ3(金斯瑞(Genscript),Z03430)或大鼠TGFβ3(Novoprotein,CJ44)抗原包被到ELISA板并在4℃下放置过夜。然后添加300μl的3%

(w/v) 脱脂牛奶, 以在室温下封闭1小时。在1小时后, 添加100 μ l 的浓度范围为100nM到0.006nM(四倍连续稀释)的AM4B6-hIgG1-TGF β R11'或对照hIgG1-TGF β R11'并在室温下温育1小时。0.5%PBS+Tween-20用于洗涤3次, 并且添加100 μ l HRP偶联的抗人Fc抗体(1:20000, 艾博抗(Abcam), ab98624), 在室温下温育1小时后, 添加混合的TMB底物试剂(InnoReagents, TMB-S-003)并在室温下温育5分钟, 并且通过添加0.1M H₂SO₄终止。OD450nm由微板读数器记录。

[0669] 对于TGF β 2, 测试程序不同: 将2 μ g/ml的AM4B6-hIgG1-TGF β R11'或对照hIgG1-TGF β R11'包被到ELISA板并在4 $^{\circ}$ C下放置过夜。然后添加300 μ l的3% (w/v) 脱脂牛奶, 以在室温下封闭1小时。在1小时后, 添加100 μ l 的浓度范围为39.4nM到0.3nM(两倍连续稀释)的人TGF β 2或小鼠TGF β 2并在室温下温育1小时。0.5%PBS+Tween-20用于洗涤3次, 并且添加100 μ l的TGF β 2生物素化抗体(1:10000, R&D, BAF302)。在室温下温育1小时并洗涤后, 添加100 μ l的HRP-链霉亲和素(1:5000, 艾博抗, ab7403)并将板在室温下温育1小时。在洗涤后, 添加混合的TMB底物试剂(InnoReagents, TMB-S-003)并在室温下温育5分钟, 并且通过添加0.1M H₂SO₄终止。OD450nm由微板读数器记录。

[0670] 结果总结在表16中。对于与TGF β 1的结合亲和力, 不同物种之间的EC₅₀值非常相似。此外, 与TGF β 1和TGF β 3的结合亲和力显著高于TGF β 2, 这表明对TGF β 1和TGF β 3的阻断活性可能比TGF β 2更有效。

[0671] 表16. AM4B6-hIgG1-TGF β R11'与TGF β 1、TGF β 2和TGF β 3的结合

通过 ELISA 测量的与来自不同物种的 TGF β 1、TGF β 2 和 TGF β 3 的结合 (EC ₅₀ , nM)						
TGF β 1		TGF β 2		TGF β 3		
人类	小鼠	人类	小鼠	人类	大鼠	
0.748	0.800	8.459	8.884	5.257	3.733	

[0673] 通过ELISA测定测量的与B7家族或TGF β 超家族内的其它成员的结合

[0674] 对于B7家族, 将0.5 μ g/ml hPD-L1(Acro Biosystems, PD1-H5229)或hPD-L2或B7-2或B7-1或B7-H2或B7-H3或B7-H4或VISTA包被到ELISA板并在4 $^{\circ}$ C下放置过夜。对于TGF β 超家族, 将0.5 μ g/ml人激活素A、BMP-2、LAP或TGF β 1在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。然后添加300 μ l的3% (w/v) 脱脂牛奶, 以在室温下封闭1小时。在1小时后, 添加100 μ l 的浓度范围为100nM到0.006nM(连续稀释)的AM4B6-hIgG1-TGF β R11'并在室温下温育1小时。0.5%PBS+Tween-20用于洗涤3次, 并且添加100 μ l HRP偶联的抗人Fc抗体(1:20000, 艾博抗(Abcam), ab98624), 在室温下温育1小时后, 添加混合的TMB底物试剂(InnoReagents, TMB-S-003)并在室温下温育5分钟, 并且通过添加0.1M H₂SO₄终止。OD450nm由微板读数器记录。

[0675] 如图9A-图9B所示, AM4B6-hIgG1-TGF β R11'特异性结合到PD-L1而不是也属于B7家族的其它抗原。如图9C所示, AM4B6-hIgG1-TGF β R11'特异性结合到TGF- β 1而不是也属于TGF β 超家族的其它抗原。

[0676] AM4B6-hIgG1-TGF β R11'与表达PD-L1的细胞的结合

[0677] MC38/hPD-L1是通过经由CRISPR-Cas9系统删除mPD-L1, 然后使用慢病毒转导hPD-L1来产生的。此细胞系由中国医学科学院苏州系统医学研究所系统医学中心(Center of Systems Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences Suzhou Institute of Systems Medicine)秦晓峰教授实验室提供(Huang, Anfei等人《科学报告(Scientific

Reports)》7(2017):42687.)。将MC-38/hPD-L1细胞在RPMI1640+10%FBS中培养。EMT-6/hPD-L1是稳定表达经转染的人PD-L1基因的小鼠乳腺癌细胞系。将EMT-6/hPD-L1细胞在Waymouth的(1×)MB752/1+15%FBS中培养。NCI-H460细胞购自COBIOER有限公司(COBIOER Ltd)。它是一种具有PD-L1表达的人肺上皮肿瘤细胞系。将NCI-H460细胞在RPMI1640+10%FBS中培养。NCI-H292细胞购自COBIOER有限公司。它是一种具有PD-L1表达的人肺上皮肿瘤细胞系。将NCI-H292细胞在RPMI1640+10%FBS+1nM丙酮酸钠溶液中培养。FACS分析方案与实例6第3节相同。

[0678] 将人或食蟹猴PBMC (TPCS, 目录号PB025C) 从液氮中回收并重悬于具有10%FBS的RPMI1640中。添加5μg/ml的PHA(西格马(Sigma), 目录号L8902) 以刺激PBMC激活并将细胞培养3天。收集激活的PBMC并且离心并以 2×10^6 个细胞/ml的密度重悬于PBS中, 并且以每孔100μl添加到板中。将AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或AM4B6或对照hIgG1-TGFβRII'连续稀释(5倍稀释)以在稀释缓冲液(含2%BSA的PBS)获得10个浓度。在离心并去除板中的上清液后, 将稀释的抗体添加到具有激活的PBMC的板中并在4℃下温育1小时。用稀释缓冲液洗涤两次后, 添加Alexa488标记的小鼠抗人CD3(Biolegend, 目录号300320) 和APC标记的抗人IgG二级抗体(BD, 目录号550931) 并在4℃下温育30分钟。在洗涤后, 将细胞重悬于150μl PBS中并通过流式细胞术进行分析。

[0679] 如图10A-图10F所示, AM4B6-hIgG1-TGFβRII'可以以与单独的AM4B6mAb相似的亲和力与在这些癌细胞系和激活的人或食蟹猴T细胞上表达的PD-L1结合。

[0680] 与激活的人T细胞的结合

[0681] 将人PBMC (TPCS, 目录号PB025C) 从液氮中回收并重悬于具有10%FBS的RPMI1640中。添加5μg/ml的PHA(西格马, 目录号L8902) 以刺激PBMC激活并将细胞培养3天。收集激活的PBMC并且离心并以 2×10^6 个细胞/ml的密度重悬于PBS中, 并且以每孔100μl添加到板中。将AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或AM4B6或对照hIgG1-TGFβRII'连续稀释(5倍稀释)以在稀释缓冲液(含2%BSA的PBS)获得10个浓度。在离心并去除板中的上清液后, 将稀释的抗体添加到具有激活的PBMC的板中并在4℃下温育1小时。用稀释缓冲液洗涤两次后, 添加Alexa488标记的小鼠抗人CD3(Biolegend, 目录号300320) 和APC标记的抗人IgG二级抗体(BD, 目录号550931) 并在4℃下温育30分钟。在洗涤后, 将细胞重悬于150μl PBS中并通过流式细胞术进行分析。

[0682] 如图11所示, AM4B6-hIgG1-TGFβRII'可以结合到在激活的人T细胞上表达的PD-L1。

[0683] 通过ELISA测定测量的对hPD-L1/hPD-1和食蟹猴PD-L1/食蟹猴PD-1的阻断

[0684] 将0.5μg/ml的hPD-L1-Fc或0.5μg/ml的食蟹猴PD-L1-Fc包被到ELISA板并在4℃下放置过夜。添加300μL的3% (w/v) 脱脂牛奶, 以在室温下封闭1小时。在1小时后, 添加100μl的浓度范围为100nM到0.02nM(四倍连续稀释)的AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或AM4B6以及0.5μg/ml的hPD-1-Fc-生物素或食蟹猴PD-1-Fc-生物素并在室温下温育1小时。0.5% PBS+Tween-20用于洗涤3次, 并且添加100μl HRP偶联的链霉亲和素(1:5000)。在室温下温育1小时后, 添加混合的TMB底物试剂并在室温下温育5分钟, 然后添加0.1M H₂SO₄终止。OD450nm由微板读数器记录。

[0685] 如图12A-图12B所示, AM4B6-hIgG1-TGFβRII'还可以以与阻断人PD-L1/人PD-1的

IC50相似的IC50完全阻断食蟹猴PD-L1/食蟹猴PD-1。

[0686] 与hPD-L1和hTGFβ1的同进结合

[0687] 将0.5μg/ml的hTGFβ-1包被到ELISA板并在4℃下放置过夜。然后添加300μl的封闭缓冲液,以在室温下封闭1小时。在1小时后,添加100μl的浓度范围为100nM到0.02nM(四倍连续稀释)的AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或AM4B6或对照hIgG1-TGFβRII'并在室温下温育1小时。0.5%PBS+Tween-20用于洗涤3次,并且然后每孔添加0.5μg/ml的hPD-L1-生物素。在1小时后,添加100μl的HRP偶联的链霉亲和素(1:5000)。在室温下温育1小时后,添加混合的TMB底物试剂(InnoReagents,TMB-S-003)并在室温下温育5分钟,并且通过添加0.1M H₂SO₄终止。OD450nm由微板读数器记录。

[0688] 如图13所示,由抗PD-L1抗体AM4B6和TGFβRII'构成的AM4B6-hIgG1-TGFβRII'可以同时结合两个靶标,这表明其双特异性或双功能特性。

[0689] 通过报告细胞测定测量的对hPD-L1/hPD-1的阻断

[0690] 方案与实例15第2节相同。如图14所示,AM4B6-hIgG1-TGFβRII'可以阻断PD-L1/PD-1的抑制并随后逆转信号传导激活,这与单独的AM4B6mAb相同。

[0691] 通过报告细胞测定测量的对TGFβ1信号传导的阻断

[0692] TGFβ报告基因HEK-293细胞系购自Genomeditech(目录:GM-C05346)并于具有5%二氧化碳的37℃温育器中在含有10%FBS、4μg/ml杀稻瘟素、400μg/ml新霉素、125μg/ml潮霉素、0.75μg/ml嘌呤霉素和1%Pen/Strep的DMEM培养基中培养。

[0693] 在对数生长期收集细胞并重悬于DMEM培养基中并以 2×10^4 个细胞/100μl/孔的密度种植在96孔板中。在细胞培养过夜后,将培养基更换为75μl含有10ng/ml人TGFβ1的培养基。以最终浓度范围为100nM到0.02nM(三倍连续稀释)添加75μl的AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或AM4B6,。将板在37℃温育器中培养16小时。ONE-Glo™荧光素酶检测系统以150μl/孔添加,并且在室温下温育10分钟后,用微板读数器读取板。

[0694] 如图15所示,AM4B6-hIgG1-TGFβRII'对TGFβ1信号传导显示出强效的阻断活性,其中IC50为0.35nM,而单独的AM4B6mAb没有阻断活性,这表明阻断活性是TGFβ1特异性的。

[0695] AM4B6-hIgG1-TGFβRII'对由结核菌素(TB)刺激的PBMC的IFN-γ释放的影响

[0696] 从液氮中回收人PBMC并以 2×10^6 /mL的密度重悬细胞。添加TB到终浓度为1.33μg/mL;在37℃下培养5天。在第六天,收集诱导的PBMC并且离心,用PBS洗涤一次,重悬于新鲜培养基中,调整到 1×10^6 /mL的密度,并且以180μL/孔接种到96孔细胞板中。将稀释的抗体以20μL/孔添加到96孔细胞培养板中。对照组和空白组添加有20μL PBS。将细胞培养板在37℃下在5%CO₂温育器中温育3天。在温育结束时,将细胞上清液稀释10倍并且用IFN-γ ELISA检测试剂盒(R&D,DY285B)检测IFN-γ的分泌水平。

[0697] 如图16所示,AM4B6-hIgG1-TGFβRII'诱导的IFN-γ释放水平显著高于单独的AM4B6mAb,这表明其激活活性由于其双特异性结合和阻断活性而更强效。

[0698] AM4B6-hIgG1-TGFβRII'的ADCC/CDC活性

[0699] 对于ADCC测定,效应细胞:Jurkat-NFAT Luc-FcγRIIIa-158V细胞系由(苏州)迈博斯生物科学有限公司(Mabspace Biosciences(Suzhou)Co.,Limited)构建。靶细胞:HEK-293T-hPD-L1细胞(购自冠科生物技术公司(Crown Biosciences Inc.),目录:2005)。

[0700] 将HEK-293T-hPD-L1细胞以10,000个细胞/12.5μl/孔添加细胞培养板。然后以

12.5 μ l/孔添加最终浓度范围为200nM到0.003nM的AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 稀释液。然后将板放置于37 $^{\circ}$ C的温育器中,以使抗体和细胞温育30分钟。然后将Jurkat-NFAT Luc-Fc γ RIIa-158V细胞以60,000个细胞/25 μ l/孔添加到孔中。然后将板放置于37 $^{\circ}$ C的温育器中持续6小时。ONE-GloTM荧光素酶检测系统以50 μ l/孔添加,并且在室温下温育10分钟后,用微板读数器读取板。

[0701] 对于CDC测定,靶细胞也是HEK-293T-hPD-L1细胞。将HEK-293T-hPD-L1细胞以10,000个细胞/25孔添加细胞培养板。然后以12.5 μ l/孔添加最终浓度范围为200nM到0.3nM的AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 稀释液。然后将板放置于37 $^{\circ}$ C的温育器中,以使抗体和细胞温育30分钟。将HEK-293T-hPD-L1细胞用40%补体以50 μ l/孔(最终浓度为20%)处理,然后在37 $^{\circ}$ C下温育80分钟。ONE-GloTM荧光素酶检测系统以100 μ l/孔添加,并且在室温下温育10分钟后,用微板读数器读取板。

[0702] 结果表明AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 对HEK-293T-hPD-L1细胞既没有ADCC也没有CDC活性(数据未示出)。

[0703] 实例9:AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 的体内功效

[0704] C57BL/6小鼠上的MC38-hPD-L1肿瘤模型

[0705] 使用最近开发的高效CRISPR/Cas9系统敲除小鼠肿瘤细胞系MC38(ATCC)中的内源性小鼠PD-L1。简而言之,设计靶向小鼠PD-L1基因的第一编码外显子的sgRNA,并且将细胞通过“打了就跑”(hit-and-run)CRISPR/Cas9+sgRNA构建体转染并从中选择敲除细胞。完全敲除小鼠内源性PD-L1的细胞通过FACS分析鉴定PD-L1在稳态或干扰素 γ 刺激下的细胞表面表达,随后通过TA克隆和靶向基因组区测序进行验证。为了生成人PD-L1替代细胞系,将人PD-L1cDNA的编码序列克隆到FG12衍生的慢病毒载体中。然后用表达人PD-L1的慢病毒感染小鼠PD-L1敲除细胞,并且FACS分析证实了在建立的细胞系中人PD-L1的高水平和稳定表达。MC38的此经工程化的细胞被命名为MC38-hPD-L1。

[0706] 将MC38-hPD-L1细胞作为单层培养物在补充有10%热灭活胎牛血清的RPMI1640培养基中于37 $^{\circ}$ C下在空气中含有5%CO₂的气氛中体外维持。收获在指数生长期中生长的肿瘤细胞并计数以用于肿瘤接种。向每只雌性SPF级C57BL/6小鼠接种混合的 2×10^6 MC38-hPD-L1细胞和50%基质凝胶。当肿瘤大小为大约90mm³时,选择荷瘤小鼠并将其随机分到5个组(n=8)。用2.5mg/kg同种型对照、3mg/kg同种型对照TGF β RII'、2.5mg/kg AM4B6、0.3mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'、1mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'和3mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'处理动物。将所有抗体通过腹膜内注射每周两次施用,持续4周。使用卡尺(INSIZE)在两个维度上每周测量两次或三次肿瘤大小,并且使用以下公式以mm³为单位表示体积: $V=0.5a \times b^2$,其中a和b分别为肿瘤的长直径和短直径。使用Prism GraphPad分析结果并表示为平均值 $\pm$ S.E.M.。通过T检验进行两组之间的比较,并且如果p为 $* < 0.05$ 并且 $** < 0.01$,则认为差异是显著的。

[0707] 如图17A-图17B所示,3mg/kg同种型对照TGF β RII'根本不抑制肿瘤生长,这表明单独的TGF β RII'几乎没有功效。2.5mg/kg AM4B6只有部分抑制作用,这与0.3mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'相似,似乎不足以控制肿瘤生长。随着剂量的增加,肿瘤体积越来越小。3mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'以84%的TGI几乎使肿瘤生长完全停止(表17)。

[0708] 表17. 第32天MC38-hPD-L1肿瘤模型中抗体的肿瘤生长抑制(TGI)(平均值 $\pm$

S.E.M.n=8)

	处理	肿瘤大小 ($\pm$ SEM, mm ³)	TGI (%)	p 值对同种型对照
[0709]	同种型对照 2.5 mg/kg	3877.77 $\pm$ 712.67		
	同种型对照-TGF β RII' 3 mg/kg	3489.60 $\pm$ 880.53	10.01	0.6713
	AM4B6 2.5 mg/kg	2105.51 $\pm$ 443.56	45.70	0.0183
	AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 0.3 mg/kg	2411.61 $\pm$ 742.60	37.81	0.0931
	AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 1 mg/kg	1646.12 $\pm$ 517.06	57.55	0.0063
	AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 3 mg/kg	601.31 $\pm$ 197.10	84.49	0.00006

[0710] NOD-SCID小鼠上的H460肿瘤和人PBMC共接种模型

[0711] H460细胞购自COBIOER有限公司。将H460细胞作为单层培养物在补充有10%热灭活胎牛血清的RPMI1640培养基中于37℃下在空气中含有5%CO₂的气氛中体外维持。收获在指数生长期中生长的肿瘤细胞并计数以用于肿瘤接种。向每只雌性SPF级NOD-SCID小鼠接种混合的 3×10^6 H460细胞(模型组)或与 1.5×10^6 人PBMC混合的 3×10^6 H460细胞。接种前将所有细胞悬浮液与基质胶以1:1的比率充分混合。在接种后大约4小时,将动物分成7组(n=10)并不同地给药。将动物用16.7mg/kg对照hIgG1、或20mg/kg对照hIgG1-TGF β RII'、或16.7mg/kg AM4B6、或5mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'、或10mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'、或20mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'处理。模型组不做任何处理。将所有抗体通过腹膜内注射每周两次施用,持续5周。使用卡尺(INSIZE)在两个维度上每周测量两次或三次肿瘤大小,并且使用以下公式以mm³为单位表示体积: $V=0.5a \times b^2$,其中a和b分别为肿瘤的长直径和短直径。使用GraphPad Prism分析结果并表示为平均值 $\pm$ S.E.M.。通过T检验进行两组之间的比较,并且如果p为 $* < 0.05$ 并且 $** < 0.01$,则认为差异是显著的。

[0712] 如图18A-图18B所示,20mg/kg同种型对照TGF β RII'根本不抑制肿瘤生长。16.7mg/kg AM4B6仅具有部分抑制作用,而5mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'已经具有明显更好的肿瘤抑制作用,这表明TGF β RII融合增加了单独AM4B6mAb的抗肿瘤功效。另外,在此模型中观察到AM4B6-hIgG1-TGF β RII'的明显剂量应答,再次表明功效取决于AM4B6-hIgG1-TGF β RII'。

[0713] C57BL/6小鼠上的EMT6-hPD-L1肿瘤模型

[0714] 敲除小鼠肿瘤细胞系EMT6(ATCC)中的内源性小鼠PD-L1并敲除细胞中的人PD-L1,将EMT6的经工程化的细胞命名为EMT6-hPD-L1。

[0715] 向小鼠皮下接种EMT6/hPD-L1肿瘤细胞,并且然后根据肿瘤体积随机分为7组,每组10只小鼠。在分组后,向第1组到第7组的动物每周两次通过腹膜内注射分别施用24.9mg/kg对照hIgG1、30mg/kg对照hIgG1-TGF β RII'、24.9mg/kg AM4B6、3mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'、10mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'或30mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII',持续4周。每周两次观察荷瘤小鼠的肿瘤体积和体重。如图19A-图19B所示,AM4B6-hIgG1-TGF β RII'在给药后第29天在3、10和30mg/kg下分别以21.43%、46.83%和79.39%的TGI剂量依赖性地抑制肿瘤生长。在等摩尔量下,AM4B6-hIgG1-TGF β RII'在30mg/kg下的抗肿瘤活性比AM4B6在24.9mg/kg下更明显,在所述组中,第29天的TGI为29.67%。

[0716] 实例10:AM4B6-hIgG1-TGF β RII'处理对MC38-hPD-L1肿瘤模型中肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的影响

[0717] 将MC38-hPD-L1肿瘤细胞按照与实例9相同的过程进行培养和接种。当肿瘤大小为250-300mm³时,选择荷瘤小鼠并将其随机分到4个组(n=6)。将动物用PBS、或3mg/kg同种型对照TGFβRII'、或2.5mg/kg AM4B6、或3mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'处理。将所有抗体通过静脉内注射每周两次施用,持续1或2周。分别在第2次给药后24小时和第4次给药后24小时收获肿瘤,然后用温和的MACS离解剂(MACS Dissociator)(美天旎生物技术(Miltenyi Biotec),130-093-235)离解并用小鼠肿瘤离解试剂盒(美天旎生物技术,130-096-730)在37℃下消化40分钟。在通过PE抗小鼠CD45(BD生物科学(BD bioscience),目录号553081)、APC抗小鼠CD8a(Biolegend,目录号100712)、APC抗小鼠NK1.1(Biolegend,目录号108710)、FITC抗小鼠颗粒酶B(Biolegend,目录号515403)和FITC抗小鼠IFNγ(英杰公司,目录号11-7311-82)染色后,使用FACS分析每组分离的单肿瘤细胞悬浮液的TIL亚群百分比,如表18和表19所示。

[0718] 表18. 第2次给药后24小时对MC38-hPD-L1肿瘤模型的TIL分析。

TIL 的亚群 (%)	CD8+ /CD45+	CD8+GZMB +/CD45+	NK1.1+ /CD45+	NK1.1+GZMB+ /CD45+	CD8+IFNγ +/CD45+	NK1.1+IFNγ +/CD45+
组(n=3)						
PBS	11.77% ± 0.95%	1.18% ± 0.00%	1.78% ± 0.57%	0.40% ± 0.07%	0.31% ± 0.03%	0.32% ± 0.03%
同种型对照 -TGFβRII' 3mpk	13.53% ± 3.64%	0.91% ± 0.36%	2.02% ± 0.48%	0.44% ± 0.14%	0.22% ± 0.02%	0.21% ± 0.02%
AM4B6 2.5mpk	13.80% ± 4.88%	1.26% ± 0.49%	2.70% ± 0.35%	0.63% ± 0.06%	0.30% ± 0.06%	0.27% ± 0.06%
AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 3mpk	11.32% ± 2.97%	1.11% ± 0.31%	2.59% ± 0.39%	0.72% ± 0.21%	0.26% ± 0.06%	0.27% ± 0.05%

[0720] 表19. 第4次给药后24小时对MC38-hPD-L1肿瘤模型的TIL分析。

TIL 的亚群 (%)	CD8+ /CD45+	CD8+GZMB +/CD45+	NK1.1+ /CD45+	NK1.1+GZMB+ /CD45+	CD8+IFNγ +/CD45+	NK1.1+IFNγ +/CD45+
组(n=3)						
PBS	9.36% ± 3.79%	0.72% ± 0.07%	1.54% ± 0.21%	0.31% ± 0.05%	0.30% ± 0.07%	0.31% ± 0.05%
同种型对照 -TGFβRII' 3mpk	10.53% ± 1.86%	0.66% ± 0.10%	1.90% ± 0.14%	0.27% ± 0.05%	0.21% ± 0.05%	0.20% ± 0.06%
AM4B6 2.5mpk	17.36% ± 3.16%	1.03% ± 0.24%	2.73% ± 0.46%	0.33% ± 0.02%	0.26% ± 0.04%	0.21% ± 0.03%
AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 3mpk	17.77% ± 0.88%	1.37% ± 0.15%	4.19% ± 1.12%	0.62% ± 0.16%	0.24% ± 0.04%	0.30% ± 0.04%

[0722] 在第2次给药后,不同处理组中TIL亚群的百分比没有显著变化(表18)。但在第4次给药后,与同种型对照TGFβRII'组相比,AM4B6组和AM4B6-hIgG1-TGFβRII'组的CD8+/CD45+%显著增加(表19)。与同种型对照TGFβRII'组相比,CD8+GZMB+%和NK1.1+%也增加了许多。这些发现表明CD8+T细胞和NK1.1T细胞可能受到AM4B6或AM4B6-hIgG1-TGFβRII'的刺激而激活和增殖,并且在肿瘤微环境中富集以促进肿瘤细胞杀伤。与AM4B6相比,AM4B6-hIgG1-TGFβRII'具有更高的CD8+GZMB+%和NK1.1+%,这与其通过上述TGI测量的更有效的抗肿瘤活性相关。

[0723] 实例11:AM4B6-hIgG1-TGFβRII'的体内药代动力学和药效学研究

[0724] 将C57BL/6雌性小鼠随机分为6组(n=3)。将动物用3mg/kg同种型对照TGFβRII'、

或2.5mg/kg AM4B6、或0.3mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'、或1mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'、或3mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'、或3mg/kg M7824类似物处理。M7824类似物由迈博斯生物科学根据US9676863中公开的序列产生。所有抗体均通过静脉单次注射施用。注射后,在以下不同时间点收集每只小鼠的200μl血液:给药前、注射后30分钟、2小时、8小时、24小时、48小时、第4天、第7天、第10天、第14天、第21天。收集每只小鼠的80μl血浆并测试抗体浓度。

[0725] 为了测量血浆中的抗体浓度,使用两种方法。第一种方法是检测整个双功能分子,包括AM4B6和TGFβRII'臂。通常,将1μg/ml的人PD-L1-his在室温下包被在96孔ELISA板上2小时。在封闭后,添加连续稀释的标准物和血浆样品并温育1.5小时。洗涤后添加0.1μg/ml生物素化抗人TGFβRII',然后在洗涤后添加链霉亲和素-HRP。最后,添加TMB以显色,用稀硫酸终止显色。通过微板阅读器读取板的OD450nm和OD620nm。通过OD450nm-OD620nm分析数据。

[0726] 第二种方法是仅检测AM4B6抗体臂。与上述程序类似,包被1μg/ml的人PD-L1-his,并且添加连续稀释的标准物和血浆样品并温育1.5小时。洗涤后,添加稀释的山羊HRP偶联的抗人IgG Fc抗体。最后,添加TMB以显色,用稀硫酸终止显色。通过微板阅读器读取板的OD450nm和OD620nm。通过OD450nm-OD620nm分析数据。

[0727] 为了评估抗体浓度与血浆中TGFβ变化之间的相关性,测试了血浆中TGFβ1和TGFβ2的浓度变化。简而言之,将4μg/ml的小鼠TGF-β1捕获抗体或2μg/ml的小鼠TGF-β2捕获抗体在室温下包被在96孔ELISA板上2小时。将10μl的1N HCl添加到50μl每种血浆样品中,并在室温下温育10分钟。通过添加10μl的1.2N NaOH/0.5M HEPES中和酸化样品,以确保最终pH值在7.2-7.6内。在封闭后,添加连续稀释的标准物和血浆样品并温育1.5小时。洗涤后添加TGF-β1或TGF-β2检测抗体,然后在洗涤后添加链霉亲和素-HRP。最后,添加TMB以显色,用稀硫酸终止显色。通过微板阅读器读取板的OD450nm和OD620nm。通过OD450nm-OD620nm分析数据。

[0728] 图20A示出了血浆中的抗体浓度变化。使用两种方法的PK曲线没有显著差异,这表明整个双功能分子AM4B6-hIgG1-TGFβRII'非常稳定,而没有像AM4B6mAb那样在体内异常切割和清除。同时,AM4B6-hIgG1-TGFβRII'在静脉内注射后30分钟内耗竭TGF-β1,甚至在0.3mg/kg的最低剂量下也是如此,如图20B所示。M7824类似物和同种型对照TGFβRII'也耗竭TGF-β1,但M7824类似物不能从第2天起保持所述作用,而AM4B6-hIgG1-TGFβRII'可以保持低水平的TGF-β1到第21天。这个结果也对应于它们的PK暴露(图20C),这表明TGF-β1可以作为AM4B6-hIgG1-TGFβRII'靶标参与血浆的良好药效标志物。未检测到小鼠血浆中TGF-β2的明显耗竭(现在示出数据)。

[0729] 实例12:AM4B6-hIgG1-IL-1RA融合蛋白的构建和表达

[0730] 将所选重链和轻链变体与hIgG1-IL-1RA(34-177)(UniProtKB,P18510)融合蛋白交叉组合并表达。重链和轻链的序列在表20中示出。

[0731] 表20. AM4B6-hIgG1-IL-1RA重链和轻链变体的列表

	名称	突变位点	区	序列
[0732]	AM4B6_Hg.3_hlgG1-(G4S)4G-IL-1RA	G57E, S59L	H-CDR2-3	DINPNNAETLYNHKFKG
	AM4B6_La.4_hk	A51V, N53D	L-CDR2-2	SRSVRYT

[0733] 类似于AM4B6-hIgG1-TGF β R1I'双功能分子,截短的人IL-1RA₃₄₋₁₇₇与AM4B6融合以获得更好的活性和稳定性。AM4B6-hIgG1-IL-1RA是AM4B6-hIgG1-IL-1RA(34-177)的简称。截短的人IL-1RA₃₄₋₁₇₇的序列如下:(SEQ ID NO:67)

[0734] KMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNVNLEEKIDVVPVIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSNRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE

[0735] 根据制造商的方案,使用来自英杰公司的ExpiFectamineTM CHO试剂(赛默(Thermo),A29129)进行重链和轻链的共转染。在第10天收获上清液并通过亲和色谱法纯化。

[0736] 实例13:AM4B6-hIgG1-IL-1RA双功能分子与hPD-L1的亲合力

[0737] 基于ELISA测定的与人PD-L1的结合

[0738] 将1 μ g/ml hPD-L1(Acro Biosystems,PD1-H5229)抗原包被到ELISA板并在4℃下包被过夜。然后添加300 μ l的2%(w/v)BSA,以在室温下封闭1小时。在温育1小时后,将100 μ l的浓度范围为10nM到0.00017nM(三倍连续稀释)的AM4B6-hIgG1-IL-1RA双功能分子或AM4B6-hIgG1单克隆抗体与作为阴性对照的PBST一起添加并在室温下温育1小时。具有0.5%Tween-20的PBS用于洗涤3次,并且添加100 μ l HRP偶联的抗人Fc抗体(1:20000,艾博抗,ab98624),在室温下温育1小时后,添加混合的TMB底物试剂(InnoReagents,TMB-S-003)并在室温下温育5分钟,并且通过添加0.1M H₂SO₄终止。OD450nm由微板阅读器记录。数据通过Graphpad prism分析。

[0739] 如图21所示,与AM4B6单克隆抗体相比,AM4B6-hIgG1-IL-1RA双功能分子具有相似的结合信号和亲合力。

[0740] 通过FACS测定测量的AM4B6-hIgG1-IL-1RA与在细胞表面上表达的PD-L1的结合

[0741] 293T-PD-L1-CD3L细胞由迈博斯生物科学产生,以用于表征PD-L1抗体。用人PD-L1和抗CD3scFv转染细胞。将AM4B6-hIgG1-IL-1RA双功能分子或AM4B6单克隆抗体连续稀释3倍以在稀释缓冲液(含2%BSA的PBS)中获得11个浓度。收获并离心293T-PD-L1-CD3L细胞。然后将它们以2 $\times 10^6$ 个细胞/ml的密度重悬于PBS中,并以每孔100 μ l添加到板中。在离心并去除上清液后,将稀释的抗体添加到板中并在4℃下温育30分钟。在用稀释缓冲液洗涤两次后,将PE缀合的驴抗人IgG(H+L)(Jacksonimmuno,709-116-149)添加到板并在4℃下温育30分钟。在洗涤后,将细胞重悬于200 μ l PBS中并通过流式细胞术进行分析。数据通过Graphpad prism分析。

[0742] 如图22所示,AM4B6-hIgG1-IL-1RA双功能分子和AM4B6-hIgG1可以以相似的EC50结合到细胞表面上表达的PD-L1,这与通过ELISA测量的亲合力结果一致。

[0743] 实例14:AM4B6-hIgG1-IL-1RA的PD1/PD-L1阻断活性

[0744] 在此测定中,293T-PD-L1-CD3L细胞表达PD-L1和抗CD3scFv,而Jurkat-NFAT-Luc-PD1细胞表达PD-1并携带可以被CD3刺激激活的NFAT信号。NFAT激活导致荧光素酶基因转录和表达,这可以通过其底物进行检测。两个细胞均由迈博斯生物科学产生。

[0745] 简而言之,收获293T-PD-L1-CD3L细胞并以2 $\times 10^6$ 个细胞/ml的密度重悬。将每孔20 μ l细胞添加到半孔板中。将AM4B6-hIgG1-IL-1RA双功能分子和AM4B6-hIgG1连续稀释(3倍稀释)以在含2%FBS的RPMI培养基中获得8个浓度。向半孔板中每孔添加20 μ l抗体并且将板在37℃、5%CO₂下温育30分钟。收获Jurkat-NFAT-Luc-PD1细胞并以4 $\times 10^6$ 个细胞/ml的密

度重悬于含有2%FBS的RPMI培养基中。最后,将每孔20 μ l细胞添加到半孔板中并在37℃、5%CO₂下温育5小时。将60 μ l的OneGlo检测试剂(普洛麦格(Promega),E6120)添加到每个孔中并在室温下温育5分钟。发光信号由微板读数器读取。数据通过GraphPad Prism分析。

[0746] 如图23所示,AM4B6-hIgG1-IL-1RA双功能分子和AM4B6-hIgG1在此基于细胞的测定中具有相似的对PD-L1的阻断活性。

[0747] 实例15:AM4B6-hIgG1-IL-1RA对人IL-1 β 的阻断活性

[0748] 基于ELISA的AM4B6-hIgG1-IL-1RA BsAb对hIL-1 β 的阻断活性

[0749] 为了测试配体/受体阻断活性,将5 μ g/ml人IL-1 β 蛋白(Sino Biological,目录号10139)包被到ELISA板上并在4℃下温育过夜。添加300 μ l封闭缓冲液,以在室温下封闭1小时。在1小时后,将50 μ l的连续浓度范围为200nM到0.03nM(三倍连续稀释)的AM4B6-hIgG1-IL-1RA BsAb或IL-1RA蛋白(Sino Biological,目录号10123-HNAE)以及50 μ l的10nM人IL-1RI-his(Sino Biological,目录号10126-H08H)添加到孔中并在室温下温育1小时。具有0.5%Tween-20的PBS用于洗涤3次,并且添加100 μ l的HRP偶联的his标签抗体(1:2000稀释,Genscript,目录号A00612),在室温下温育1小时。然后,添加混合的TMB底物试剂(InnoReagents,目录号:TMB-S-003)并在室温下温育5分钟,然后通过添加0.1M H₂SO₄终止。OD450nm由微板读数器记录。数据通过Graphpad prism分析。

[0750] 如图24所示,AM4B6-hIgG1-IL-1RA可以剂量依赖性地阻断IL-1 β ,并且AM4B6-hIgG1-IL-1RA对IL-1RI的阻断活性优于IL-1RA蛋白。

[0751] AM4B6-hIgG1-IL-1RA双功能分子对报告细胞上的hIL-1 β 的阻断活性

[0752] 在此测定中,HEK-BlueTM CD40L细胞购自Invivogen(目录号hkb-cd40),这些细胞通过用人CD40基因和NF- κ B诱导型SEAP构建体稳定转染HEK293细胞产生。CD40L与其受体CD40的结合触发级联反应,从而引起NF- κ B的激活和SEAP的后续产生,这可以通过QUANTI-Blue进行监测。HEK293细胞内源性地表达与CD40L共享共同信号通路的细胞因子IL-1 β 的受体。因此,可以使用中和抗体阻断IL-1 β 介导的SEAP产生。

[0753] 简而言之,收集对数期细胞的HEK293-CD40L细胞并且以 5×10^4 /孔(100 μ l/孔)的密度接种细胞到96孔板中以粘附过夜。将AM4B6-hIgG1-IL-1RA双特异性抗体和IL-1RA蛋白连续稀释(5倍稀释)以在完全培养基中获得10个浓度。向细胞中添加50 μ l/孔稀释的抗体(或IL-1RA蛋白)和50 μ l/孔人IL-1 β ,在37℃下温育24小时。第二天向新板中添加160 μ l的QUANTI-BlueTM溶液(Invivogen,目录号rep-qbs),并且向板中添加40 μ l细胞培养上清液。将板在37℃下温育2小时。使用分光光度计在620nm处确定SEAP水平。数据通过Graphpad prism分析。

[0754] 如图25所示,AM4B6-hIgG1-IL-1RA可以以剂量依赖性方式阻断IL-1 β ,并且AM4B6-hIgG1-IL-1RA对IL-1 β 的阻断活性强于IL-1RA蛋白,这与通过ELISA测量的阻断结果一致。

[0755] 实例16:AM4B6-SIRP α 双功能抗体的构建、表达、纯化

[0756] SIRP α _CV1是经工程化的高亲和力SIRP α 变体,所述变体有效地拮抗癌细胞上的CD47,但自身不会诱导巨噬细胞吞噬作用(KippWeiskopf等人,《科学》341,88(2013))。发明了针对PD-L1和CD47两者的双功能抗体,包括对称抗体(AM4B6-hIgG1-SIRP α 和3280A-hIgG1-SIRP α)和不对称抗体(AM4B6-hIgG1-SIRP α (KIH)和3280A-hIgG1-SIRP α (KIH)),其中KIH是杵臼结构的简称。这些分子的构建在表21中描述,并且测序的SIRP α _CV1也在下面列

出。

[0757] SIRPa_CV1序列(SEQ ID NO:84)：

[0758] EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKR
NNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS

[0759] 表21抗PD-L1-SIRPa双功能抗体的构建

[0760]

ID	轻链序列	重链序列 1	重链序列 2	注释
AM4B6-hIgG1-SIRPα	AM4B6-La.4-hk SEQ ID NO: 90	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S-(G4S)4G-SIRPa_CV1 SEQ ID NO: 91	不适用	SIRPα_CV1 序列来自 Kipp Weiskopf 《科学》 341, 88 (2013)
3280A-hIgG1-SIRPα	3280A-L-hk SEQ ID NO: 92	3280A-H-hIgG1(N297A)-(G4S)4G-SIRPα_CV1 SEQ ID NO: 93	不适用	3280A 是罗氏 (Roche) 的抗 PD-L1 抗体阿特珠单抗 (Atezolizumab) 的简称
AM4B6-hIgG1-SIRPα (KIH)	AM4B6-La.4-hk SEQ ID NO: 90	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S (杵结构)-SIRPa_CV1 SEQ ID NO: 94	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S (臼结构) SEQ ID NO: 95	杵结构: S354C、T366W 臼结构: Y349C、T366S、L368A、Y407V
3280A-hIgG1-SIRPα (KIH)	3280A-L-hk 3280A-L-hk SEQ ID NO: 92	3280A_H_hIgG1_L234F_L235E_P331S (杵结构)-SIRPa_CV1 SEQ ID NO: 96	3280A_H_hIgG1_L234F_L235E_P331S (臼结构) SEQ ID NO: 97	3280A 是罗氏的抗 PD-L1 抗体阿特珠单抗的简称

[0761] 根据制造商的方案,用Expi-CHO细胞表达所有4种双功能抗体。对于两种对称双功能抗体,通过一步Mabselect SuRe纯化获得高纯度抗体,但对于不对称双功能抗体,无法通过常规一步Mabselect SuRe纯化获得高纯度抗体。为获得高纯度的不对称抗体,使用HiTrap PrismA树脂对抗体进行精制纯化,并且不对称抗体的纯度优于95%。精制纯化程序描述如下。

[0762] 使用的缓冲液:

[0763] 平衡缓冲液:50mM Tris-HAc、150mM NaCl、pH 7.4。

[0764] 洗涤缓冲液:50mM NaAc/HAc、500mM NaCl、5%PEG、pH 5.5。

[0765] 洗脱缓冲液:50mM HAc、500mM NaCl、5%PEG、pH 3.0。

[0766] 用平衡缓冲液平衡HiTrap PrismA柱至少5个柱体积(CV),直到UV基线、洗脱液pH值和电导率不变。

[0767] 将样品加载到预平衡的HiTrap PrismA柱上。

[0768] 用5到10CV洗涤缓冲液洗涤,直到UV迹线返回到基线。

[0769] 用0-100%洗脱缓冲液在10-20CV中洗脱,并分别用几个管收集5-10个级分。用1M Tris-碱(pH 9.0)将pH调整到约6.0-7.0。

[0770] 然后通过SEC-HPLC表征级分。图26示出了3280A-hIgG1-SIRPα (KIH) 和AM4B6-

hIgG1-SIRP α (KIH)的纯度分别为95.33%和96.5%。

[0771] 用ELISA测试对人PD-L1或人CD47的亲合力。图27和28示出了双功能抗体对抗原的亲合力与亲本单克隆抗体(4B6mAb对照)或融合蛋白(SIRP α -Fc(FES))相当。

[0772] 实例17: IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和IgG-scFv-XOMA052-AM4B6双特异性抗体bsAb)的构建和表达

[0773] AM4B6的单链片段(scFv)的序列在下表中示出。抗IL-1 β 抗体吉伏组单抗(XOMA052)和卡那单抗(ACZ885)来自诺华公司(Novartis)。AM4B6的scFv连接至抗IL-1 β 抗体重链C末端以获得更好的活性和稳定性。scFv具有将VH连接至VL的GS接头(GGGGSGGGSGGGSGGGGS),并且在H44C和L100C(Kabat编号)残基之间包含结构域间的二硫键。抗IL-1 β 抗体(XOMA052和ACZ885)的序列在表22中示出。所构建的双特异性抗体分别被命名为IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和IgG-scFv-XOMA052-AM4B6。

[0774] 根据制造商的方案,使用来自英杰公司的ExpiFectamine™ CHO试剂(赛默, A29129)进行bsAb的重链和轻链的共转染。在第10天收获上清液并通过亲和色谱法纯化。

[0775] 实例18: IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb与hIL-1 β 的结合活性

[0776] 基于ELISA测定的与人IL-1 β 的结合

[0777] 将100 μ L的1 μ g/ml hIL-1 β 蛋白(SinoBiological, 目录号10139-HNAE)包被到ELISA板并在4℃下包被过夜。然后添加200 μ L的2% (w/v) BSA, 以在室温下封闭2小时。在温育后, 将100 μ L的浓度范围为20nM到0.000339nM(三倍连续稀释)的IgG-scFv-ACZ885-AM4B6、IgG-scFv-XOMA052-AM4B6bsAb、ACZ885和XOMA052与作为阴性对照的PBST一起添加并在室温下温育1小时。具有0.5% Tween-20的PBS用于洗涤3次, 并且添加100 μ L HRP缀合的抗人Fc抗体(1:20000, 艾博抗, ab98624)。在室温下温育1小时后, 添加混合的TMB底物试剂(InnoReagents, TMB-S-003)并在室温下温育5分钟, 并且通过添加0.1M H₂SO₄终止。OD450nm由微板读数器记录。数据通过Graphpad prism分析。

[0778] 如图29所示, 与ACZ885和XOMA052单克隆抗体相比, IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和IgG-scFv-XOMA052-AM4B6bsAb分别具有相似的与hIL-1 β 蛋白的结合活性。

[0779] 实例19: IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和IgG-scFv-XOMA052-AM4B6bsAb与hPD-L1的结合活性

[0780] 基于ELISA测定的与人PD-L1的结合

[0781] 将100 μ L的1 μ g/ml hPD-L1 (Acro Biosystems, PD1-H5229) 抗原包被到ELISA板并在4℃下包被过夜。然后添加300 μ L的2% (w/v) BSA, 以在室温下封闭1小时。在温育1小时后, 将100 μ L的浓度范围为20nM到0.000339nM(三倍连续稀释)的IgG-scFv-ACZ885-AM4B6、IgG-scFv-XOMA052-AM4B6bsAb或AM4B6-hIgG1单克隆抗体(AM4B6mAb)与作为阴性对照的PBST一起添加并在室温下温育1小时。具有0.5% Tween-20的PBS用于洗涤3次, 并且添加100 μ L HRP缀合的抗人Fc抗体(1:20000, 艾博抗, ab98624)。在室温下温育1小时后, 添加混合的TMB底物试剂(InnoReagents, TMB-S-003)并在室温下温育5分钟, 并且通过添加0.1M H₂SO₄终止。OD450nm由微板读数器记录。数据通过Graphpad prism分析。

[0782] 如图30所示, 与AM4B6单克隆抗体相比, IgG-scFv-ACZ885-AM4B6、IgG-scFv-XOMA052-AM4B6bsAb具有相似的与hPD-L1蛋白的结合活性。

[0783] 通过FACS方法测量的IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和IgG-scFv-XOMA052-AM4B6与表达PD-L1的293T细胞的结合

[0784] 293T-PD-L1-CD3L细胞由迈博斯生物科学产生,以用于表征PD-L1抗体。用人PD-L1和抗CD3scFv转染细胞。将IgG-scFv-ACZ885-AM4B6、IgG-scFv-XOMA052-AM4B6或AM4B6mAb连续稀释(4倍稀释)以在稀释缓冲液(含2%BSA的PBS)中获得9个浓度。收获并离心293T-PD-L1-CD3L细胞。然后将它们以 2×10^6 个细胞/ml的密度重悬于PBS中,并以每孔100 μ l添加到板中。在离心并去除上清液后,将稀释的抗体添加到板中并在4℃下温育30分钟。在用稀释缓冲液洗涤两次后,将PE缀合的驴抗人IgG(H+L)(Jacksonimmuno,709-116-149)添加到板并在4℃下温育30分钟。在洗涤后,将细胞重悬于200 μ l PBS中并通过流式细胞术进行分析。数据通过Graphpad prism分析。

[0785] 如图31所示,IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和IgG-scFv-XOMA052-AM4B6可以以相似的 EC_{50} 与细胞表面上表达的PD-L1结合,这与通过ELISA测量的亲和力结果一致。

[0786] 实例20:IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和IgG-scFv-XOMA052-AM4B6的PD1/PD-L1阻断活性

[0787] 在此测定中,293T-PD-L1-CD3L细胞表达PD-L1和抗CD3scFv,而Jurkat-NFAT-Luc-PD1细胞表达PD-1并携带可以被CD3刺激激活的NFAT信号。NFAT激活将导致荧光素酶基因转录和表达,这可以通过其底物进行检测。两个细胞系均由迈博斯生物科学产生。

[0788] 简而言之,收获293T-PD-L1-CD3L细胞并将其以 2×10^6 个细胞/ml的密度重悬。将每孔20 μ l细胞添加到半孔板中。将IgG-scFv-ACZ885-AM4B6、IgG-scFv-XOMA052-AM4B6和AM4B6-hIgG1连续稀释(3倍稀释)以在含有2%FBS的RPMI培养基中获得9个浓度。向半孔板中每孔添加20 μ l抗体并且将板在37℃、5%CO₂下温育30分钟。收获Jurkat-NFAT-Luc-PD1细胞并将其以 4×10^6 个细胞/ml的密度重悬于含有2%FBS的RPMI培养基中。最后,将每孔20 μ l细胞添加到半孔板中并在37℃、5%CO₂下温育5小时。将60 μ l的OneGlo检测试剂(普洛麦格,E6120)添加到每个孔中并在室温下温育5分钟。发光信号由微板读数器读取。数据通过GraphPad Prism分析。

[0789] 如图32所示,IgG-scFv-ACZ885-AM4B6、IgG-scFv-XOMA052-AM4B6和AM4B6-hIgG1在此基于细胞的测定中具有相似的对PD-L1的阻断活性。

[0790] 实例21:IgG-scFv-XOMA052-AM4B6对人真皮成纤维(HDF)细胞上的人IL-1 β 的阻断活性

[0791] IgG-scFv-XOMA052-AM4B6对HDF细胞上的人IL-1 β 的阻断活性

[0792] 为了测试配体/受体阻断活性,用50pg/ml的重组人IL-1 β (Sino Biological,目录号10139)刺激100 μ L/孔的 4×10^4 /mL的HDF细胞,并用没有IL-1 β 刺激的细胞作为阴性对照。然后,将100 μ L/孔的连续浓度范围为100nM到0.00038nM(四倍连续稀释)的IgG-scFv-XOMA052-AM4B6和XOMA052添加到培养物中并在室温下温育过夜(16-17小时)。刺激之后,根据试剂盒说明的指导,使用IL-6ELISA试剂盒(R&D,DY206,P209026)来检测细胞培养上清液中的IL-6释放。

[0793] 如图33所示,IgG-scFv-XOMA052-AM4B6和XOMA052可以剂量依赖性地阻断IL-1 β ,并且IgG-scFv-XOMA052-AM4B6对IL-1 β 的阻断活性与XOMA052对HDF细胞的阻断活性相似。

[0794] IgG-scFv-ACZ885-AM4B6对报告细胞上的hIL-1 β 的阻断活性

[0795] 在此测定中,HEK-Blue™ CD40L细胞购自Invivogen(目录号hkb-cd40),这些细胞通过用人CD40基因和NF-κB诱导型SEAP构建体稳定转染HEK293细胞产生。CD40L与其受体CD40的结合触发级联反应,从而引起NF-κB的激活和SEAP的后续产生,这可以通过QUANTI-Blue进行监测。HEK293细胞内源地表达与CD40L共享共同信号传导通路的细胞因子IL-1β的受体。因此,可以使用中和抗体阻断IL-1β介导的SEAP产生。

[0796] 简而言之,收集对数期细胞的HEK293-CD40L细胞并且以 5×10^4 /孔(100μl/孔)的密度接种细胞到96孔板中以粘附过夜。将IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和ACZ885从100nM连续稀释(4倍稀释)以在完全培养基中获得9个浓度。向细胞中添加50μl/孔稀释的抗体和50μl/孔人IL-1β(1ng/mL),在37℃下温育24小时。第二天向新板中添加160μl的QUANTI-Blue™溶液(Invivogen,目录号rep-qbs),并且向板中添加40μl细胞培养上清液。将板在37℃下温育2小时。使用分光光度计在620nm下确定SEAP水平。数据通过Graphpad prism分析。

[0797] 如图34所示,IgG-scFv-ACZ885-AM4B6和ACZ885(卡那单抗)可以以剂量依赖性方式阻断IL-1β,并且IgG-scFv-ACZ885-AM4B6对HEK293-CD40L报告细胞的阻断活性与ACZ885(卡那单抗)相似。

[0798] 表22.本公开中提到的氨基酸序列

[0799]

SED ID NO.	序列	区
1	DYYMN	4B6_HCDR1
2	DINPNNGGTSYNHKFKG	4B6_HCDR2
3	WGDGPFAY	4B6_HCDR3
4	KASQNVGAAVA	4B6_LCDR1
5	SASNRYT	4B6_LCDR2
6	QQYSNYPT	4B6_LCDR3
7	KASQNVGAIVA	4B6-L-CDR1-1
8	KASQNVPAAVA	4B6-L-CDR1-2
9	KASQNVKGAVA	4B6-L-CDR1-3
10	SNSHRYT	4B6-L-CDR2-1
11	SRSVRYT	4B6-L-CDR2-2
12	SVSDRYT	4B6-L-CDR2-3
13	DINPNNADTMYNHKFKG	4B6-H-CDR2-1
14	DINPNNAQTYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-2
15	DINPNNAEATLYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-3
16	DINPNNGLTSYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-4
17	DINPNNAQTVYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-5
18	DINPNNAGTSYNHNKFKG	H-CDR2-WT (G55A)
19	DINPNNX ₁ X ₂ TX ₃ YNHNKFKG	HCDR2
20	KASQNVX ₄ X ₅ X ₆ VA	LCDR1
21	SX ₇ SX ₈ RYT	LCDR2
22	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	HFR1
23	WVRQAPGQGLEWMG	HFR2
24	RVTMTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	HFR3
25	WGQGTLLTVSS	HFR4
26	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	LFR1
27	WYQQKPGKAPKLLIY	LFR2
28	GVPSRFSGSGSGTDFITFTISSLQPEDIATYYC	LFR3
29	FGQGTKLEIK	LFR4
30	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFT	HFR1 变体
31	WVRQAPGQSLEWMG	HFR2 变体
32	RVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	HFR3 变体 1
33	RVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVK	HFR3 变体 2
34	RVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	HFR3 变体 3

[0800]

35	RVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVK	HFR3 变体 4
36	WYQQKPGKSPKLLIY	LFR2 变体
37	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	LFR3 变体 1
38	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	LFR3 变体 2
39	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	变体 1-FR3 的 F73L 突变
40	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX ₉ FT	HFR1
41	WVRQAPGQX ₁₀ LEWMG	HFR2
42	RVTX ₁₆ TVDX ₁₁ SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCX ₁₂ X ₁₃	HFR3
43	WYQQKPGKX ₁₄ PKLLIY	LFR2
44	GVPX ₁₅ RFSGSGSGTDFTX ₁₇ TISSLQPEDATYYC	LFR3
45	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	LC 变体 2-FR3 的 F73L、A43S、S60D
46	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYVFTDYYMN WVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSYNHKFKGKATV TVDKSSRTAYMELLSLTSEDSAVYYCVKWGDGPFA WGQGTLLTVSA	4B6_VH
47	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGAATAWY QQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTL TISNMQSEDLADYFCQQYSNYPTFGSGTKLGIK	4B6_VL
48	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMH WVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	人源化 4B6, VH 种系
49	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMN WVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVT VTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWGDGPFA YWGQGTLLTVSS	人源化 4B6, VH 变体 1
50	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMN WVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVT VTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFA YWGQGTLLTVSS	人源化 4B6, VH 变体 2
51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVT VTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWGDGPFA YWGQGTLLTVSS	人源化 4B6, VH 变体 3
52	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVT VTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFA YWGQGTLLTVSS	人源化 4B6, VH 变体 4
53	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQDISNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYDASNLETGVPDRFSGSGSGTDFTFI SSLQPEDATYYCQQYDNLP	人源化 4B6, VL 种系
54	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGAATAWY QQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	人源化 4B6, VL 变体 1

[0801]

55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGAATAVAYWY QQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDIAITYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	人源化 4B6, VL 变体 2
56	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYIMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAGTSYNHKFKGRVT VTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFA YWGQGTLLTVSS	Hu4B6_Hg
57	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYIMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAGTSYNHKFKGRVT VTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFA YWGQGTLLTVSS	AM4B6_Hg
58	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYIMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAGTSYNHKFKGRVT VTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFA YWGQGTLLTVSS	Hu4B6_Hg.2
59	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYIMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAGTSYNHKFKGRVT TVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFA YWGQGTLLTVSS	AM4B6_Hg.3
60	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYIMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAGTSYNHKFKGRVT VTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFA YWGQGTLLTVSS	AM4B6_Hg.5
61	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGAATAVAYWY QQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDIAITYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	Hu4B6_La
62	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVKGAATAVAYWY QQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDIAITYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	AM4B6_La.1
63	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVPAATAVAYWYQ QKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDIAITYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	AM4B6_La.2
64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGAATAVAYWY QQKPGKAPKLLIYSVSDRYTGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDIAITYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	AM4B6_La.4
65	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGAATAVAYWY QQKPGKAPKLLIYSRSVRYTGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDIAITYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	AM4B6_La.6
66	GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEK PQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETTFMCSCSSDECNDNIIFSEE YNTSNPD	截短的 TGF- β 受体 II 序 列 20-136
67	KMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNVNLE EKIDVVPIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQL EAVNITDLSNRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPG WFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE	截短的 IL-1 R-34-177
68	(G4S)4G	接头

[0802]

69	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNS MCIAEIDLIPDRPFVFCAPSSKTGSVTTYCCNQDHC NKIELPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPVCFCISLML MVYICHNRTVIHHRVPNEEDPSLDRPFISEGTTLDLI YDMTTSGSGSGLPLLQRTIARTIVLQESIGKGRFGEV WRGKWRGEEVAVKIFSSREERSWFREAEIYQTVMLR HENILGFIAADNKDNGTWTQLWLVS DYHEHGS LFDY LNRYTVTVEGMIKLALSTASGLAHLHMEIVGTQGKP AIAHRDLKSKNILVKKNGTCCIADLGLAVRHDSATDT IDIAPNHRVGT KRYMAPEVLDD SINMKHFESFKRADI YAMGLVFWEIARRCSIGGIHEDYQLPYDDLVPSPSV EEMRKVVCEQKL RPNIPNRWQSCEALRVMAKIMRE CWYANGAARLTALRIKKTLSQLSQQEGIKM	TGFβRI
70	TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRF STCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENI TLETVCHDPKLPYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGET FFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLL VIFQVTGIS LLPPLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKL MEFSEHCAIILED RSDISSTCANNINHNT ELLPIELDT LVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYA SWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAERKTEL GKQYW LITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIA HLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLC DFGLSLRLDPTLSVDDLANSQVGTARYMAPEVLES RMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEV KDYEPFPGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSF WLNHQGIQMV CETLTECWDHDPEARLTAQCVAERFS ELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK	TGFβRII 同种型 A
71	TIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHLRHINN DMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMS NCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC NDNIIFSEEYNTSNPDLLL VIFQVTGISLLPPLGVAISVI IIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLM EFSEHCAIILE DDRSDISSTCANNINHNT ELLPIELDTLVGKGRFAEV YKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFS DINLKHENILQFLTAERKTEL GKQYWLITAFHAKGN LQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCG RPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDP TLSVDDLANSQVGTARYMAPEVLES RMNLENVESF KQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSK VREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSF WLNHQGIQMV CETLTECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGR SCSEEKIPEDGSLNTTK	TGFβRII 同种型 B

[0803]

72	GPEPGALCELSPVASHPVQALMESFTVLSGCASRGT TGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQLQREVTLHLNPISSV HIIHKSUVFLLNSPHPLVWHLKTERLATGVSRLFLVS EGSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARD EYGAVTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFL SLNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHIIELITPN SNPYSAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILKCKKSV NWWIKSFDVKGSLKIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIR DDIPSTQGNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHL RLENNAEEMGDDEEVHTIPPELRILLDPGALPALQNPI RGGEQNGGLPFPFDPISRRVWNEEGEDGLPRPKDP VIPSIQLFPGPREPEEVQGSVDIALSVKCDNEKMIVAV EKDSFQASGYSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLES PLNGCGTRPRWSALDGVVYNSIVIQVPALGDSSGW PDGYEDLESGDNGFPGDMDEGDASLFTRPEIVVFNC SLQQVRNPSSFQEQPHGNITFNMELYNTDLFLVPSQG VFSVPENGHVYVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSN PDRMSHYTHIENICPKDES VKFYSPKRVHFPIQADMD KKRFSFVFKPVFNTSLLFLQCELTCTKMEKHPQKLP KCVPPDEACTSLDASIIWAMMQNKKTFTKPLAVIHHE AESKEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDTLTVMGIAFAAFV IGALLTGALWYIYSHTGETAGRQQVPTSPPASENSSA AHSIGSTQSTPCSSSSTA	TGFβRIII
73	LEADKCKEREKIIILVSSANEIDVRPCPLNPNEHKGTI TWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEKLWFVPAKVEDS GHYYCVVRNSSYCLRIKISAKFVENEPNLCYNAQAIF KQKLPVAGDGGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKD CKPLLLDNIHFSGVKDRLIVMNVAEKHRGNYTCHAS YTYLGKQYPITRVIEFITLEENKPTRPVIVSPANETME VDLGSQIQLICNVTGQLSDIAYWKWNGSVIDEDDPV LGEDYYSVENPANKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFT CFAKNTHGIDAAYIQLIYPVTNFQKHMIGICVTLTVII VCSVFIYKIFKIDIVLWYRDSCYDFLPIKASDGKTYDA YILYPKTVGEGSTSDCDIFVFKVLPEVLEKQCGYKLFI YGRDDYVGEDIVEVINENVKSRRLIILVRETSGFSW LGSSEEQIAMYNALVQDGIKVVLELEKIQDYEKM PESIKFIKQKHGAIRWSGDFTQGPQSAKTRFWKNVR YHMPVQRRSPSSKHQLLSPATKEKLQREAHVPLG	IL-1RI

[0804]

74	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFN YSTAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLENRISK EKDVLWFRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLE VVQKDSCFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYF PSSVKPTITWYMGCYKIQNFNNVIPEGMNLISFLIALIS NNGNYTCVVITYPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAV PPVIHSPNDHVVEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRN EVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHSRTEDETRTQILS IKKVTSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAKVQKVP APRYTVELACGFGATVLLVVLIVVYHVYWLEMVLF YRAHFGTDETLTGKEYDIYVSYARNAEEEEFVLLTL RGLVLENEFGYKLCIFDRDSLPGGIVTDETLISFIQKSR LLVVLSPNYVLQGTQALLELKAGLENMASRGNINVI LVQYKAVKETKVKELKRAKTVLTVIKWKGEKSKYP QGRFWKQLQVAMPVKKSPRRSSSDEQGLSYSSLKNV	IL-1RAP
75	FTLQPAAHGTGAARSCRFRGRHYKREFRLEGEPVALR CPQVPYWLWASVSPRINLTWHKNDARTVPGEETR MWAQDGA LWLLPALQEDSGTYVCTTRNASYCDKM SIELRVFENTDAFLPFISYPQILTLSTSGVLVCPDLSEFT RDKTDVKIQWYKDSLLLDKDNEKFLSVRGTHLLV HDVALEDAGYYRCVLTFAHEGQQYNITRSIELRIKKK KEETIPVIISPLKTISASLGSRLTIPCKVFLGTGTPLTMM LWWTANDTHIESAYPGGRVTEGPRQEYSENNENYIE VPLIFDPVTREDLHMDFKCVVHNTLSFQTLRTTVKE ASSTFSWGIVLAPLSLAFLVLGGIWMHRRCKHRTGK ADGLTVLWPHHQDFQSYPK	IL-1RII
76	RPSGRKSSKMQA FRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYL QGPVNLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKS GDETRLQLEAVNITDLSENKQDKRFAFIRSDSGPTTS FESAACPGWFLCTAMEADQPVSILTNPDEGVMVTK FYFQEDE	IL-1RA
77	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNS MCIAEIDLIPDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHC NKIELPTTVKSSPGLGPVEL	人 TGFβRI 34-126 的 ECD
78	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRF TCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENIT LETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETF FMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD	人 TGFβRII 24-159 的 ECD

[0805]

79	GPEPGALCELSPVASHPVQALMESFTVLSGCASRGT TGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQLQREVTLHLNPISSV HHHKS VVFLNSPHPLVWHLKTERLATGVSRLFLVS EGSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARD EYGA VTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFL SLNYLA EYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHIIELITPN SNPYSAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILKCKKSV NWWIKSFDVKGSLKIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIR DDIPSTQGNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHL RLENNAEEMGD EEVHTIPPELRILLDPGALPALQNPI RGGEGQNGGLPFPFDPISRRVWNEEGEDGLPRPKDP VIPSQ LFPGLREPEEVQGSVDIALSVKCDNEKMIVAV EKDSFQASGYSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLES PLNGCGTRPRWSALDG VVYNSIVIQVPALGDSSGW PDGYEDLES GDNFGPGDMDEGDASLFTRPEIVVFNC SLQQVRNPSSFQEQPHGNITFNMELYNTDLFLVPSQG VFSVPENGHVYVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSN PDRMSHYTIIENICPKDES VKFYSPKRVHFPIQADMD KKRFSFVFKPVFNTSLLFLQCELTCTKMEKHPQKLP KCVPPDEACTSLDASIIWAMMQNKKTFTKPLAVIHHE AESKEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDTLTV	人 TGFβRIII 21-787 的 ECD
80	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLT VLVHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	hlgG1 aa 序列:
81	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLT VLVHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GA	hlgG1_FES (L234F/L235E/P331S)
82	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hk aa 序列

[0806]

83	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GA	hIgG1_FES (L234F/L235E/P331S)
84	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWF RGAGPGRVLIYNQRQGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSI RIGNITPADAGTYCYCIKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELS VRAKPS	SIRPa_CV1
85	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQ QKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIK	3280A 轻链可变区
86	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLLVTVSS	3280A 重链可变区
87	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGA	hIgG1 (N297A)
88	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGA	hIgG1_L234F_L235E_P 331S (杵结构) S354C/T366W

[0807]

89	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	hIgG1_L234F_L235E_P 331S (白结构) T366S/L368A/Y407V
90	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGAATAWY QQKPGKAPKLLIYSVSDRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC	AM4B6-La.4-hk
91	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNAETLYNHKFKGRVT TVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCCKWGDPFAY WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGE EELQIIQPKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPQWFR GAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSIR IGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPPDVEFKSGAGTELSV RAKPS	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L 234F_L235E_P331S-(G4 S)4G-SIRPa_CV1
92	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC	3280A-L-hk

[0808]

93	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGE EELQIIQPKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFR GAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSIR IGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSV RAKPS	3280A-H-hlgG1(N297A) -(G4S)4G-SIRP α _CV1
94	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNAETLYNHKFKGRVT TVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPAY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG EEELQIIQPKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWF RGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSI RIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELS VRAPPS	AM4B6_Hg.3_hlgG1_L 234F_L235E_P331S (杆 结构) -SIRP α _CV1
95	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNAETLYNHKFKGRVT TVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPAY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	AM4B6_Hg.3_hlgG1_L 234F_L235E_P331S (白 结构)

[0809]

96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWF RGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSI RIGNITPADAGTYCYKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELS VRAKPS	3280A_H_hIgG1_L234F _L235E_P331S(杵结构) -SIRPa_CV1
97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	3280A_H_hIgG1_L234F _L235E_P331S(白结构)
98	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTVTSLIPVGPIQW FRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDSTKRNNMDF SIRIGNITPADAGTYCYKFRKGGSPDDVEFKSGAGTE LSVRAKPS	SIRPa_WT 等位基因 1
99	LQPGAEPVWVAQEGAPALPCSTIPLQDLSLLRRA GVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPR PRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGD FSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLG QASMT	LAG3 D1
100	LQPGAEPVWVAQEGAPALPCSTIPLQDLSLLRRA GVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPR PRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGD FSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLG QASMTASPPGSLRASDWILNCSFSRDPDRPASVHWF RNRGQGRVPVRESPPHHLAESFLFLPQVSPMDSGPW GCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLPPTPLTVYAGAGS RVGLPC	LAG3 D1+D2
101	GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRR	LAG3 额外环

[0810]

102	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVG WIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSRLTISK DTSKNQVSLKITSVTAADTAVYFCARNRYDPPWFVD WGQGTLLTVSS	XOMA052 VH
103	DIQMTQSTSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLSWYQ QKPGKAVKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLT ISSLQQEDFATYFCLQGKMLPWTFGQGGTKLEIK	XOMA052 VL
104	TSGMGVG	XOMA052 HCDR1
105	HIWWDGDESYNPSLKS	XOMA052 HCDR2
106	NRYDPPWFVD	XOMA052 HCDR3
107	RASQDISNYLS	XOMA052 LCDR1
108	YTSKLHS	XOMA052 LCDR2
109	LQGKMLPWT	XOMA052 LCDR3
110	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYGMN WVRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNDQYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNGLRAEDTAVYYCARDLRTGPF YWGQGTLLTVSS	ACZ885 VH
111	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQ KPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS LEAEDAAAYYCHQSSSLPFTFGPGTKVDIK	ACZ885 VL
112	VYGMN	ACZ885 HCDR1
113	IIWYDGDNDQYYADSVKG	ACZ885 HCDR2
114	DLRTGPFY	ACZ885 HCDR3
115	RASQSIGSSLH	ACZ885 LCDR1
116	YASQSFS	ACZ885 LCDR2
117	HQSSSLPFT	ACZ885 LCDR3
118	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVG WIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSRLTISK DTSKNQVSLKITSVTAADTAVYFCARNRYDPPWFVD WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYIMNW VRQAPGQSLEWMGDINPNAETLYNHKFKGRVTVT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGA AVAWYQQKPG KAPKLLIYSVSDRYTGVPFSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDIATYYCQYSNYPTFGQGTKLTVL	IgG-scFv-XOMA052-A M4B6 HC

[0811]

119	DIQMTQSTSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLSWYQ QKPGKAVKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLT ISSLQQEDFATYFCLQGKMLPWTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	IgG-scFv-XOMA052-A M4B6 LC
120	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYGMN WVRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNDQYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNGLR AEDTAVYYCARDLRTGPF YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYIMNW VRQAPGQCLEWMGDINPNAETLYNHKFKGRVTVT VDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGA AVAWYQQKPG KAPKLLIYSVSDRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDIATYYCQQYSNYPTFGCGTKLTVL	IgG-scFv-ACZ885-AM4 B6 HC
121	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQ KPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS LEAEDAAAYYCHQSSSLPFTFGPGTKVDIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	IgG-scFv-ACZ885-AM4 B6 LC
122	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	G4S

序列表

<110> (苏州)迈博斯生物科学有限公司(MABSPACE BIOSCIENCES (SUZHOU) CO., LTD.)

<120> 双功能分子

<130> 063694-8005W003

<150> PCT/CN2020/129918

<151> 2020-11-18

<150> PCT/CN2021/073341

<151> 2021-01-22

<160> 122

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

Asp Tyr Tyr Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 3

Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr

1 5
<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 4
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala Val Ala
1 5 10
<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 5
Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5
<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 6
Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
1 5
<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 7
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ile Val Ala
1 5 10
<210> 8
<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 8

Lys Ala Ser Gln Asn Val Pro Ala Ala Val Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 9

Lys Ala Ser Gln Asn Val Lys Gly Ala Val Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 10

Ser Asn Ser His Arg Tyr Thr

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 11

Ser Arg Ser Val Arg Tyr Thr

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 12

Ser Val Ser Asp Arg Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 13

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Asp Thr Met Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gln Thr Gln Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 15

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 16

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Leu Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 17

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gln Thr Val Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 18

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) .. (8)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<400> 19

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) .. (9)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<400> 20

Lys Ala Ser Gln Asn Val Xaa Xaa Xaa Val Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<400> 21

Ser Xaa Ser Xaa Arg Tyr Thr

1 5

<210> 22

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 23

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 24

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 26

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 27

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 28

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 29

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 30

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 30

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr

20 25 30

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 31

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10

<210> 32

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 32

Arg Val Thr Val Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 33

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 33

Arg Val Thr Val Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Lys

20 25 30

<210> 34

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 34

Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 35

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 35

Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Lys

20 25 30

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 36

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 37

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1	5	10	15
Leu Thr Ile Ser	Ser Leu Gln Pro	Glu Asp Ile Ala Thr	Tyr Tyr Cys
20	25	30	

<210> 38

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 38

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

<210> 39

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 39

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

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<222> (28) .. (28)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<400> 40

Gln Val Gln Leu	Val Gln Ser Gly	Ala Glu Val Lys	Lys Pro Gly Ala
1	5	10	15
Ser Val Lys Val	Ser Cys Lys Ala	Ser Gly Tyr Xaa	Phe Thr

	20	25	30
<210>	41		
<211>	14		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(9) .. (9)		
<223>	Xaa可为任何天然存在的氨基酸		
<400>	41		
	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Xaa Leu Glu Trp Met Gly		
	1 5 10		
<210>	42		
<211>	32		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(4) .. (4)		
<223>	Xaa可为任何天然存在的氨基酸		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(8) .. (8)		
<223>	Xaa可为任何天然存在的氨基酸		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(31) .. (32)		
<223>	Xaa可为任何天然存在的氨基酸		
<400>	42		
	Arg Val Thr Xaa Thr Val Asp Xaa Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu		
	1 5 10 15		
	Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa		
	20 25 30		
<210>	43		
<211>	15		

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) .. (9)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<400> 43

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

<222> (4) .. (4)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<400> 44

Gly Val Pro Xaa Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Xaa Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 45

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 45

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 46

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 46

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

<210> 47

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 47

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

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser		
65	70	75
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr		80
	85	90
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gly Ile Lys		95
100	105	
<210> 48		
<211> 98		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 48		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr		15
	20	25
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		30
35	40	45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
	85	90
Ala Arg		95
<210> 49		
<211> 117		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 49		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		15
	20	25
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		30
35	40	45
Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe		

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

115

<210> 50

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 50

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

115

<210> 51

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 51

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

<210> 52
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 52

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

<210> 53

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 53

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

<210> 54

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 54

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

100	105
<210> 55	
<211> 106	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 55	
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala	
20 25 30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr	
85 90 95	
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	
<210> 56	
<211> 117	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 56	
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe	
50 55 60	
Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 57

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

<210> 58

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 58

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 60

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

<210> 61

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 61

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 62

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 62

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

<210> 63

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 63

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

65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr			
	85	90	95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105		

<210> 64

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 64

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

Tyr Ser Val Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 65

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 65

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

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

<210> 66

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 66

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

<210> 67

<211> 144

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 67

Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr

1	5	10	15
Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val			
20	25	30	
Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu			
35	40	45	
Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser			
50	55	60	
Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu			
65	70	75	80
Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp			
85	90	95	
Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe			
100	105	110	
Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met			
115	120	125	
Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu			
130	135	140	

<210> 68

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 68

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
1	5	10	15
Gly Gly Gly Ser Gly			
20			

<210> 69

<211> 470

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 69

Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val			
1	5	10	15
Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val			
20	25	30	
Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp			
35	40	45	

Arg	Pro	Phe	Val	Cys	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Thr	Gly	Ser	Val	Thr	Thr
50						55					60				
Thr	Tyr	Cys	Cys	Asn	Gln	Asp	His	Cys	Asn	Lys	Ile	Glu	Leu	Pro	Thr
65					70					75					80
Thr	Val	Lys	Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Val	Glu	Leu	Ala	Ala	Val
				85					90					95	
Ile	Ala	Gly	Pro	Val	Cys	Phe	Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Met	Leu	Met	Val
			100					105					110		
Tyr	Ile	Cys	His	Asn	Arg	Thr	Val	Ile	His	His	Arg	Val	Pro	Asn	Glu
		115					120					125			
Glu	Asp	Pro	Ser	Leu	Asp	Arg	Pro	Phe	Ile	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr	Leu
	130					135					140				
Lys	Asp	Leu	Ile	Tyr	Asp	Met	Thr	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu
145					150					155					160
Pro	Leu	Leu	Val	Gln	Arg	Thr	Ile	Ala	Arg	Thr	Ile	Val	Leu	Gln	Glu
				165					170					175	
Ser	Ile	Gly	Lys	Gly	Arg	Phe	Gly	Glu	Val	Trp	Arg	Gly	Lys	Trp	Arg
		180						185					190		
Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Val	Lys	Ile	Phe	Ser	Ser	Arg	Glu	Glu	Arg	Ser
		195					200					205			
Trp	Phe	Arg	Glu	Ala	Glu	Ile	Tyr	Gln	Thr	Val	Met	Leu	Arg	His	Glu
	210					215					220				
Asn	Ile	Leu	Gly	Phe	Ile	Ala	Ala	Asp	Asn	Lys	Asp	Asn	Gly	Thr	Trp
225					230					235					240
Thr	Gln	Leu	Trp	Leu	Val	Ser	Asp	Tyr	His	Glu	His	Gly	Ser	Leu	Phe
				245					250					255	
Asp	Tyr	Leu	Asn	Arg	Tyr	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Gly	Met	Ile	Lys	Leu
		260						265					270		
Ala	Leu	Ser	Thr	Ala	Ser	Gly	Leu	Ala	His	Leu	His	Met	Glu	Ile	Val
		275					280					285			
Gly	Thr	Gln	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Ala	His	Arg	Asp	Leu	Lys	Ser	Lys
	290					295					300				
Asn	Ile	Leu	Val	Lys	Lys	Asn	Gly	Thr	Cys	Cys	Ile	Ala	Asp	Leu	Gly
305					310					315					320
Leu	Ala	Val	Arg	His	Asp	Ser	Ala	Thr	Asp	Thr	Ile	Asp	Ile	Ala	Pro
				325					330					335	
Asn	His	Arg	Val	Gly	Thr	Lys	Arg	Tyr	Met	Ala	Pro	Glu	Val	Leu	Asp
		340						345					350		
Asp	Ser	Ile	Asn	Met	Lys	His	Phe	Glu	Ser	Phe	Lys	Arg	Ala	Asp	Ile

355	360	365
Tyr Ala Met Gly Leu Val Phe Trp Glu Ile Ala Arg Arg Cys Ser Ile		
370	375	380
Gly Gly Ile His Glu Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Val Pro		
385	390	395
Ser Asp Pro Ser Val Glu Glu Met Arg Lys Val Val Cys Glu Gln Lys		400
405	410	415
Leu Arg Pro Asn Ile Pro Asn Arg Trp Gln Ser Cys Glu Ala Leu Arg		
420	425	430
Val Met Ala Lys Ile Met Arg Glu Cys Trp Tyr Ala Asn Gly Ala Ala		
435	440	445
Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser Gln Leu Ser Gln		
450	455	460
Gln Glu Gly Ile Lys Met		
465	470	
<210> 70		
<211> 545		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 70		
Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val		
1	5	10
Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys		
20	25	30
Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn		
35	40	45
Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala		
50	55	60
Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His		
65	70	75
Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser		
85	90	95
Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe		
100	105	110
Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser		
115	120	125
Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln		
130	135	140
Val Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu Gly Val Ala Ile Ser Val		

145	150	155	160
Ile Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn Arg Gln Gln Lys Leu Ser			
	165	170	175
Ser Thr Trp Glu Thr Gly Lys Thr Arg Lys Leu Met Glu Phe Ser Glu			
	180	185	190
His Cys Ala Ile Ile Leu Glu Asp Asp Arg Ser Asp Ile Ser Ser Thr			
	195	200	205
Cys Ala Asn Asn Ile Asn His Asn Thr Glu Leu Leu Pro Ile Glu Leu			
	210	215	220
Asp Thr Leu Val Gly Lys Gly Arg Phe Ala Glu Val Tyr Lys Ala Lys			
225	230	235	240
Leu Lys Gln Asn Thr Ser Glu Gln Phe Glu Thr Val Ala Val Lys Ile			
	245	250	255
Phe Pro Tyr Glu Glu Tyr Ala Ser Trp Lys Thr Glu Lys Asp Ile Phe			
	260	265	270
Ser Asp Ile Asn Leu Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Leu Thr Ala			
	275	280	285
Glu Glu Arg Lys Thr Glu Leu Gly Lys Gln Tyr Trp Leu Ile Thr Ala			
	290	295	300
Phe His Ala Lys Gly Asn Leu Gln Glu Tyr Leu Thr Arg His Val Ile			
305	310	315	320
Ser Trp Glu Asp Leu Arg Lys Leu Gly Ser Ser Leu Ala Arg Gly Ile			
	325	330	335
Ala His Leu His Ser Asp His Thr Pro Cys Gly Arg Pro Lys Met Pro			
	340	345	350
Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn Ile Leu Val Lys Asn Asp			
	355	360	365
Leu Thr Cys Cys Leu Cys Asp Phe Gly Leu Ser Leu Arg Leu Asp Pro			
	370	375	380
Thr Leu Ser Val Asp Asp Leu Ala Asn Ser Gly Gln Val Gly Thr Ala			
385	390	395	400
Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Glu Ser Arg Met Asn Leu Glu Asn			
	405	410	415
Val Glu Ser Phe Lys Gln Thr Asp Val Tyr Ser Met Ala Leu Val Leu			
	420	425	430
Trp Glu Met Thr Ser Arg Cys Asn Ala Val Gly Glu Val Lys Asp Tyr			
	435	440	445
Glu Pro Pro Phe Gly Ser Lys Val Arg Glu His Pro Cys Val Glu Ser			
450	455	460	

Met	Lys	Asp	Asn	Val	Leu	Arg	Asp	Arg	Gly	Arg	Pro	Glu	Ile	Pro	Ser
465						470				475					480
Phe	Trp	Leu	Asn	His	Gln	Gly	Ile	Gln	Met	Val	Cys	Glu	Thr	Leu	Thr
				485					490					495	
Glu	Cys	Trp	Asp	His	Asp	Pro	Glu	Ala	Arg	Leu	Thr	Ala	Gln	Cys	Val
			500					505					510		
Ala	Glu	Arg	Phe	Ser	Glu	Leu	Glu	His	Leu	Asp	Arg	Leu	Ser	Gly	Arg
		515					520					525			
Ser	Cys	Ser	Glu	Glu	Lys	Ile	Pro	Glu	Asp	Gly	Ser	Leu	Asn	Thr	Thr
	530					535					540				
Lys															
545															
<210>	71														
<211>	570														
<212>	PRT														
<213>	智人(Homo sapiens)														
<400>	71														
Thr	Ile	Pro	Pro	His	Val	Gln	Lys	Ser	Asp	Val	Glu	Met	Glu	Ala	Gln
1				5					10					15	
Lys	Asp	Glu	Ile	Ile	Cys	Pro	Ser	Cys	Asn	Arg	Thr	Ala	His	Pro	Leu
		20						25					30		
Arg	His	Ile	Asn	Asn	Asp	Met	Ile	Val	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Ala	Val
	35					40						45			
Lys	Phe	Pro	Gln	Leu	Cys	Lys	Phe	Cys	Asp	Val	Arg	Phe	Ser	Thr	Cys
	50					55					60				
Asp	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Met	Ser	Asn	Cys	Ser	Ile	Thr	Ser	Ile	Cys
65				70						75					80
Glu	Lys	Pro	Gln	Glu	Val	Cys	Val	Ala	Val	Trp	Arg	Lys	Asn	Asp	Glu
			85						90					95	
Asn	Ile	Thr	Leu	Glu	Thr	Val	Cys	His	Asp	Pro	Lys	Leu	Pro	Tyr	His
		100						105					110		
Asp	Phe	Ile	Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Cys	Ile	Met	Lys	Glu
	115						120					125			
Lys	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Phe	Met	Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Asp
	130					135					140				
Glu	Cys	Asn	Asp	Asn	Ile	Ile	Phe	Ser	Glu	Glu	Tyr	Asn	Thr	Ser	Asn
145				150						155					160
Pro	Asp	Leu	Leu	Leu	Val	Ile	Phe	Gln	Val	Thr	Gly	Ile	Ser	Leu	Leu
			165						170					175	

Pro	Pro	Leu	Gly	Val	Ala	Ile	Ser	Val	Ile	Ile	Ile	Phe	Tyr	Cys	Tyr	180	185	190
Arg	Val	Asn	Arg	Gln	Gln	Lys	Leu	Ser	Ser	Thr	Trp	Glu	Thr	Gly	Lys	195	200	205
Thr	Arg	Lys	Leu	Met	Glu	Phe	Ser	Glu	His	Cys	Ala	Ile	Ile	Leu	Glu	210	215	220
Asp	Asp	Arg	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Cys	Ala	Asn	Asn	Ile	Asn	His	225	230	235
Asn	Thr	Glu	Leu	Leu	Pro	Ile	Glu	Leu	Asp	Thr	Leu	Val	Gly	Lys	Gly	245	250	255
Arg	Phe	Ala	Glu	Val	Tyr	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	Thr	Ser	Glu	260	265	270
Gln	Phe	Glu	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Ile	Phe	Pro	Tyr	Glu	Glu	Tyr	Ala	275	280	285
Ser	Trp	Lys	Thr	Glu	Lys	Asp	Ile	Phe	Ser	Asp	Ile	Asn	Leu	Lys	His	290	295	300
Glu	Asn	Ile	Leu	Gln	Phe	Leu	Thr	Ala	Glu	Glu	Arg	Lys	Thr	Glu	Leu	305	310	315
Gly	Lys	Gln	Tyr	Trp	Leu	Ile	Thr	Ala	Phe	His	Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	325	330	335
Gln	Glu	Tyr	Leu	Thr	Arg	His	Val	Ile	Ser	Trp	Glu	Asp	Leu	Arg	Lys	340	345	350
Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Ile	Ala	His	Leu	His	Ser	Asp	His	355	360	365
Thr	Pro	Cys	Gly	Arg	Pro	Lys	Met	Pro	Ile	Val	His	Arg	Asp	Leu	Lys	370	375	380
Ser	Ser	Asn	Ile	Leu	Val	Lys	Asn	Asp	Leu	Thr	Cys	Cys	Leu	Cys	Asp	385	390	395
Phe	Gly	Leu	Ser	Leu	Arg	Leu	Asp	Pro	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Asp	Leu	405	410	415
Ala	Asn	Ser	Gly	Gln	Val	Gly	Thr	Ala	Arg	Tyr	Met	Ala	Pro	Glu	Val	420	425	430
Leu	Glu	Ser	Arg	Met	Asn	Leu	Glu	Asn	Val	Glu	Ser	Phe	Lys	Gln	Thr	435	440	445
Asp	Val	Tyr	Ser	Met	Ala	Leu	Val	Leu	Trp	Glu	Met	Thr	Ser	Arg	Cys	450	455	460
Asn	Ala	Val	Gly	Glu	Val	Lys	Asp	Tyr	Glu	Pro	Pro	Phe	Gly	Ser	Lys	465	470	475
Val	Arg	Glu	His	Pro	Cys	Val	Glu	Ser	Met	Lys	Asp	Asn	Val	Leu	Arg			

	485		490		495
Asp Arg Gly Arg Pro Glu Ile Pro Ser Phe Trp Leu Asn His Gln Gly					
500		505		510	
Ile Gln Met Val Cys Glu Thr Leu Thr Glu Cys Trp Asp His Asp Pro					
515		520		525	
Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys Val Ala Glu Arg Phe Ser Glu Leu					
530		535		540	
Glu His Leu Asp Arg Leu Ser Gly Arg Ser Cys Ser Glu Glu Lys Ile					
545		550		555	560
Pro Glu Asp Gly Ser Leu Asn Thr Thr Lys					
565		570			
<210> 72					
<211> 831					
<212> PRT					
<213> 智人(Homo sapiens)					
<400> 72					
Gly Pro Glu Pro Gly Ala Leu Cys Glu Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser					
1	5		10		15
His Pro Val Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys					
20		25		30	
Ala Ser Arg Gly Thr Thr Gly Leu Pro Gln Glu Val His Val Leu Asn					
35		40		45	
Leu Arg Thr Ala Gly Gln Gly Pro Gly Gln Leu Gln Arg Glu Val Thr					
50		55		60	
Leu His Leu Asn Pro Ile Ser Ser Val His Ile His His Lys Ser Val					
65		70		75	80
Val Phe Leu Leu Asn Ser Pro His Pro Leu Val Trp His Leu Lys Thr					
85		90		95	
Glu Arg Leu Ala Thr Gly Val Ser Arg Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly					
100		105		110	
Ser Val Val Gln Phe Ser Ser Ala Asn Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr					
115		120		125	
Glu Glu Arg Asn Phe Pro His Gly Asn Glu His Leu Leu Asn Trp Ala					
130		135		140	
Arg Lys Glu Tyr Gly Ala Val Thr Ser Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala					
145		150		155	160
Arg Asn Ile Tyr Ile Lys Val Gly Glu Asp Gln Val Phe Pro Pro Lys					
165		170		175	
Cys Asn Ile Gly Lys Asn Phe Leu Ser Leu Asn Tyr Leu Ala Glu Tyr					

			180				185				190					
Leu	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Glu	Gly	Cys	Val	Met	Ser	Ser	Gln	Pro	Gln	
			195				200				205					
Asn	Glu	Glu	Val	His	Ile	Ile	Glu	Leu	Ile	Thr	Pro	Asn	Ser	Asn	Pro	
			210				215				220					
Tyr	Ser	Ala	Phe	Gln	Val	Asp	Ile	Thr	Ile	Asp	Ile	Arg	Pro	Ser	Gln	
225							230				235				240	
Glu	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Lys	Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Leu	Lys	Cys	Lys	
			245								250				255	
Lys	Ser	Val	Asn	Trp	Val	Ile	Lys	Ser	Phe	Asp	Val	Lys	Gly	Ser	Leu	
			260								265				270	
Lys	Ile	Ile	Ala	Pro	Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Gly	Lys	Glu	Ser	Glu	Arg	
			275								280				285	
Ser	Met	Thr	Met	Thr	Lys	Ser	Ile	Arg	Asp	Asp	Ile	Pro	Ser	Thr	Gln	
290							295				300					
Gly	Asn	Leu	Val	Lys	Trp	Ala	Leu	Asp	Asn	Gly	Tyr	Ser	Pro	Ile	Thr	
305							310				315				320	
Ser	Tyr	Thr	Met	Ala	Pro	Val	Ala	Asn	Arg	Phe	His	Leu	Arg	Leu	Glu	
			325								330				335	
Asn	Asn	Ala	Glu	Glu	Met	Gly	Asp	Glu	Glu	Val	His	Thr	Ile	Pro	Pro	
			340								345				350	
Glu	Leu	Arg	Ile	Leu	Leu	Asp	Pro	Gly	Ala	Leu	Pro	Ala	Leu	Gln	Asn	
			355								360				365	
Pro	Pro	Ile	Arg	Gly	Gly	Glu	Gly	Gln	Asn	Gly	Gly	Leu	Pro	Phe	Pro	
370							375				380					
Phe	Pro	Asp	Ile	Ser	Arg	Arg	Val	Trp	Asn	Glu	Glu	Gly	Glu	Asp	Gly	
385							390				395				400	
Leu	Pro	Arg	Pro	Lys	Asp	Pro	Val	Ile	Pro	Ser	Ile	Gln	Leu	Phe	Pro	
			405								410				415	
Gly	Leu	Arg	Glu	Pro	Glu	Glu	Val	Gln	Gly	Ser	Val	Asp	Ile	Ala	Leu	
			420								425				430	
Ser	Val	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu	Lys	Met	Ile	Val	Ala	Val	Glu	Lys	Asp	
			435								440				445	
Ser	Phe	Gln	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Gly	Met	Asp	Val	Thr	Leu	Leu	Asp	
450							455				460					
Pro	Thr	Cys	Lys	Ala	Lys	Met	Asn	Gly	Thr	His	Phe	Val	Leu	Glu	Ser	
465							470				475				480	
Pro	Leu	Asn	Gly	Cys	Gly	Thr	Arg	Pro	Arg	Trp	Ser	Ala	Leu	Asp	Gly	
			485								490				495	

Val	Val	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ile	Val	Ile	Gln	Val	Pro	Ala	Leu	Gly	Asp
500				505				510							
Ser	Ser	Gly	Trp	Pro	Asp	Gly	Tyr	Glu	Asp	Leu	Glu	Ser	Gly	Asp	Asn
515				520				525							
Gly	Phe	Pro	Gly	Asp	Met	Asp	Glu	Gly	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Thr	Arg
530				535				540							
Pro	Glu	Ile	Val	Val	Phe	Asn	Cys	Ser	Leu	Gln	Gln	Val	Arg	Asn	Pro
545				550				555				560			
Ser	Ser	Phe	Gln	Glu	Gln	Pro	His	Gly	Asn	Ile	Thr	Phe	Asn	Met	Glu
565				570				575							
Leu	Tyr	Asn	Thr	Asp	Leu	Phe	Leu	Val	Pro	Ser	Gln	Gly	Val	Phe	Ser
580				585				590							
Val	Pro	Glu	Asn	Gly	His	Val	Tyr	Val	Glu	Val	Ser	Val	Thr	Lys	Ala
595				600				605							
Glu	Gln	Glu	Leu	Gly	Phe	Ala	Ile	Gln	Thr	Cys	Phe	Ile	Ser	Pro	Tyr
610				615				620							
Ser	Asn	Pro	Asp	Arg	Met	Ser	His	Tyr	Thr	Ile	Ile	Glu	Asn	Ile	Cys
625				630				635				640			
Pro	Lys	Asp	Glu	Ser	Val	Lys	Phe	Tyr	Ser	Pro	Lys	Arg	Val	His	Phe
645				650				655							
Pro	Ile	Pro	Gln	Ala	Asp	Met	Asp	Lys	Lys	Arg	Phe	Ser	Phe	Val	Phe
660				665				670							
Lys	Pro	Val	Phe	Asn	Thr	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Gln	Cys	Glu	Leu	Thr
675				680				685							
Leu	Cys	Thr	Lys	Met	Glu	Lys	His	Pro	Gln	Lys	Leu	Pro	Lys	Cys	Val
690				695				700							
Pro	Pro	Asp	Glu	Ala	Cys	Thr	Ser	Leu	Asp	Ala	Ser	Ile	Ile	Trp	Ala
705				710				715				720			
Met	Met	Gln	Asn	Lys	Lys	Thr	Phe	Thr	Lys	Pro	Leu	Ala	Val	Ile	His
725				730				735							
His	Glu	Ala	Glu	Ser	Lys	Glu	Lys	Gly	Pro	Ser	Met	Lys	Glu	Pro	Asn
740				745				750							
Pro	Ile	Ser	Pro	Pro	Ile	Phe	His	Gly	Leu	Asp	Thr	Leu	Thr	Val	Met
755				760				765							
Gly	Ile	Ala	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Ile	Gly	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	Ala
770				775				780							
Leu	Trp	Tyr	Ile	Tyr	Ser	His	Thr	Gly	Glu	Thr	Ala	Gly	Arg	Gln	Gln
785				790				795				800			
Val	Pro	Thr	Ser	Pro	Pro	Ala	Ser	Glu	Asn	Ser	Ser	Ala	Ala	His	Ser

				805					810					815	
Ile	Gly	Ser	Thr	Gln	Ser	Thr	Pro	Cys	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	
				820					825					830	
<210>	73														
<211>	552														
<212>	PRT														
<213>	智人(Homo sapiens)														
<400>	73														
Leu	Glu	Ala	Asp	Lys	Cys	Lys	Glu	Arg	Glu	Glu	Lys	Ile	Ile	Leu	Val
1				5					10					15	
Ser	Ser	Ala	Asn	Glu	Ile	Asp	Val	Arg	Pro	Cys	Pro	Leu	Asn	Pro	Asn
				20					25					30	
Glu	His	Lys	Gly	Thr	Ile	Thr	Trp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Ser	Lys	Thr	Pro
				35					40					45	
Val	Ser	Thr	Glu	Gln	Ala	Ser	Arg	Ile	His	Gln	His	Lys	Glu	Lys	Leu
				50					55					60	
Trp	Phe	Val	Pro	Ala	Lys	Val	Glu	Asp	Ser	Gly	His	Tyr	Tyr	Cys	Val
65					70					75					80
Val	Arg	Asn	Ser	Ser	Tyr	Cys	Leu	Arg	Ile	Lys	Ile	Ser	Ala	Lys	Phe
					85					90					95
Val	Glu	Asn	Glu	Pro	Asn	Leu	Cys	Tyr	Asn	Ala	Gln	Ala	Ile	Phe	Lys
				100						105				110	
Gln	Lys	Leu	Pro	Val	Ala	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Val	Cys	Pro	Tyr	Met
				115						120				125	
Glu	Phe	Phe	Lys	Asn	Glu	Asn	Asn	Glu	Leu	Pro	Lys	Leu	Gln	Trp	Tyr
					130				135					140	
Lys	Asp	Cys	Lys	Pro	Leu	Leu	Leu	Asp	Asn	Ile	His	Phe	Ser	Gly	Val
145					150					155					160
Lys	Asp	Arg	Leu	Ile	Val	Met	Asn	Val	Ala	Glu	Lys	His	Arg	Gly	Asn
					165					170					175
Tyr	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Gly	Lys	Gln	Tyr	Pro	Ile
				180						185				190	
Thr	Arg	Val	Ile	Glu	Phe	Ile	Thr	Leu	Glu	Glu	Asn	Lys	Pro	Thr	Arg
				195						200				205	
Pro	Val	Ile	Val	Ser	Pro	Ala	Asn	Glu	Thr	Met	Glu	Val	Asp	Leu	Gly
				210						215				220	
Ser	Gln	Ile	Gln	Leu	Ile	Cys	Asn	Val	Thr	Gly	Gln	Leu	Ser	Asp	Ile
225					230					235					240
Ala	Tyr	Trp	Lys	Trp	Asn	Gly	Ser	Val	Ile	Asp	Glu	Asp	Asp	Pro	Val

	245	250	255
Leu Gly Glu Asp Tyr Tyr Ser Val	Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg		
260	265	270	
Ser Thr Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile	Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe		
275	280	285	
Tyr Lys His Pro Phe Thr Cys Phe Ala	Lys Asn Thr His Gly Ile Asp		
290	295	300	
Ala Ala Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro	Val Thr Asn Phe Gln Lys His		
305	310	315	320
Met Ile Gly Ile Cys Val Thr Leu Thr	Val Ile Ile Val Cys Ser Val		
325	330	335	
Phe Ile Tyr Lys Ile Phe Lys Ile Asp	Ile Val Leu Trp Tyr Arg Asp		
340	345	350	
Ser Cys Tyr Asp Phe Leu Pro Ile Lys	Ala Ser Asp Gly Lys Thr Tyr		
355	360	365	
Asp Ala Tyr Ile Leu Tyr Pro Lys Thr	Val Gly Glu Gly Ser Thr Ser		
370	375	380	
Asp Cys Asp Ile Phe Val Phe Lys Val	Leu Pro Glu Val Leu Glu Lys		
385	390	395	400
Gln Cys Gly Tyr Lys Leu Phe Ile Tyr	Gly Arg Asp Asp Tyr Val Gly		
405	410	415	
Glu Asp Ile Val Glu Val Ile Asn Glu	Asn Val Lys Lys Ser Arg Arg		
420	425	430	
Leu Ile Ile Ile Leu Val Arg Glu Thr	Ser Gly Phe Ser Trp Leu Gly		
435	440	445	
Gly Ser Ser Glu Glu Gln Ile Ala Met	Tyr Asn Ala Leu Val Gln Asp		
450	455	460	
Gly Ile Lys Val Val Leu Leu Glu Leu	Glu Lys Ile Gln Asp Tyr Glu		
465	470	475	480
Lys Met Pro Glu Ser Ile Lys Phe Ile	Lys Gln Lys His Gly Ala Ile		
485	490	495	
Arg Trp Ser Gly Asp Phe Thr Gln Gly	Pro Gln Ser Ala Lys Thr Arg		
500	505	510	
Phe Trp Lys Asn Val Arg Tyr His Met	Pro Val Gln Arg Arg Ser Pro		
515	520	525	
Ser Ser Lys His Gln Leu Leu Ser Pro	Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gln		
530	535	540	
Arg Glu Ala His Val Pro Leu Gly			
545	550		

<210> 74
 <211> 550
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 74
 Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met Arg Gln Ile Gln
 1 5 10 15
 Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro Leu Phe Glu His
 20 25 30
 Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala Gly Leu Thr Leu
 35 40 45
 Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu Glu Pro Ile Asn
 50 55 60
 Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys Asp Val Leu Trp
 65 70 75 80
 Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Met Leu
 85 90 95
 Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro Leu Glu Val Val
 100 105 110
 Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu Pro Val His Lys
 115 120 125
 Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys Pro Asn Val Asp
 130 135 140
 Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr Trp Tyr Met Gly
 145 150 155 160
 Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro Glu Gly Met Asn
 165 170 175
 Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Cys
 180 185 190
 Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His Leu Thr Arg Thr
 195 200 205
 Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asn Ala Val Pro Pro Val
 210 215 220
 Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys Glu Pro Gly Glu
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe Leu Met Asp Ser
 245 250 255
 Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys Pro Asp Asp Ile
 260 265 270

Thr	Ile	Asp	Val	Thr	Ile	Asn	Glu	Ser	Ile	Ser	His	Ser	Arg	Thr	Glu
275				280				285							
Asp	Glu	Thr	Arg	Thr	Gln	Ile	Leu	Ser	Ile	Lys	Lys	Val	Thr	Ser	Glu
290				295				300							
Asp	Leu	Lys	Arg	Ser	Tyr	Val	Cys	His	Ala	Arg	Ser	Ala	Lys	Gly	Glu
305				310				315				320			
Val	Ala	Lys	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Gln	Lys	Val	Pro	Ala	Pro	Arg	Tyr
				325				330				335			
Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Cys	Gly	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Leu	Val	Val
				340				345				350			
Ile	Leu	Ile	Val	Val	Tyr	His	Val	Tyr	Trp	Leu	Glu	Met	Val	Leu	Phe
355				360				365							
Tyr	Arg	Ala	His	Phe	Gly	Thr	Asp	Glu	Thr	Ile	Leu	Asp	Gly	Lys	Glu
370				375				380							
Tyr	Asp	Ile	Tyr	Val	Ser	Tyr	Ala	Arg	Asn	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Phe
385				390				395				400			
Val	Leu	Leu	Thr	Leu	Arg	Gly	Val	Leu	Glu	Asn	Glu	Phe	Gly	Tyr	Lys
				405				410				415			
Leu	Cys	Ile	Phe	Asp	Arg	Asp	Ser	Leu	Pro	Gly	Gly	Ile	Val	Thr	Asp
				420				425				430			
Glu	Thr	Leu	Ser	Phe	Ile	Gln	Lys	Ser	Arg	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Leu
435				440				445							
Ser	Pro	Asn	Tyr	Val	Leu	Gln	Gly	Thr	Gln	Ala	Leu	Leu	Glu	Leu	Lys
450				455				460							
Ala	Gly	Leu	Glu	Asn	Met	Ala	Ser	Arg	Gly	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Leu
465				470				475				480			
Val	Gln	Tyr	Lys	Ala	Val	Lys	Glu	Thr	Lys	Val	Lys	Glu	Leu	Lys	Arg
				485				490				495			
Ala	Lys	Thr	Val	Leu	Thr	Val	Ile	Lys	Trp	Lys	Gly	Glu	Lys	Ser	Lys
				500				505				510			
Tyr	Pro	Gln	Gly	Arg	Phe	Trp	Lys	Gln	Leu	Gln	Val	Ala	Met	Pro	Val
515				520				525							
Lys	Lys	Ser	Pro	Arg	Arg	Ser	Ser	Ser	Asp	Glu	Gln	Gly	Leu	Ser	Tyr
530				535				540							
Ser	Ser	Leu	Lys	Asn	Val										
545				550											
<210> 75															
<211> 385															
<212> PRT															

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 75

Phe	Thr	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Thr	Gly	Ala	Ala	Arg	Ser	Cys	Arg
1				5					10					15	
Phe	Arg	Gly	Arg	His	Tyr	Lys	Arg	Glu	Phe	Arg	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro
		20						25					30		
Val	Ala	Leu	Arg	Cys	Pro	Gln	Val	Pro	Tyr	Trp	Leu	Trp	Ala	Ser	Val
		35					40						45		
Ser	Pro	Arg	Ile	Asn	Leu	Thr	Trp	His	Lys	Asn	Asp	Ser	Ala	Arg	Thr
		50				55					60				
Val	Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	Thr	Arg	Met	Trp	Ala	Gln	Asp	Gly	Ala	Leu
65					70					75					80
Trp	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Gln	Glu	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Val	Cys	Thr
				85					90					95	
Thr	Arg	Asn	Ala	Ser	Tyr	Cys	Asp	Lys	Met	Ser	Ile	Glu	Leu	Arg	Val
			100						105				110		
Phe	Glu	Asn	Thr	Asp	Ala	Phe	Leu	Pro	Phe	Ile	Ser	Tyr	Pro	Gln	Ile
		115						120					125		
Leu	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser	Gly	Val	Leu	Val	Cys	Pro	Asp	Leu	Ser	Glu
		130					135						140		
Phe	Thr	Arg	Asp	Lys	Thr	Asp	Val	Lys	Ile	Gln	Trp	Tyr	Lys	Asp	Ser
145					150					155					160
Leu	Leu	Leu	Asp	Lys	Asp	Asn	Glu	Lys	Phe	Leu	Ser	Val	Arg	Gly	Thr
				165					170					175	
Thr	His	Leu	Leu	Val	His	Asp	Val	Ala	Leu	Glu	Asp	Ala	Gly	Tyr	Tyr
			180						185					190	
Arg	Cys	Val	Leu	Thr	Phe	Ala	His	Glu	Gly	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ile	Thr
		195					200						205		
Arg	Ser	Ile	Glu	Leu	Arg	Ile	Lys	Lys	Lys	Lys	Glu	Glu	Thr	Ile	Pro
		210				215						220			
Val	Ile	Ile	Ser	Pro	Leu	Lys	Thr	Ile	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Ser	Arg
225					230					235					240
Leu	Thr	Ile	Pro	Cys	Lys	Val	Phe	Leu	Gly	Thr	Gly	Thr	Pro	Leu	Thr
				245					250					255	
Thr	Met	Leu	Trp	Trp	Thr	Ala	Asn	Asp	Thr	His	Ile	Glu	Ser	Ala	Tyr
			260					265					270		
Pro	Gly	Gly	Arg	Val	Thr	Glu	Gly	Pro	Arg	Gln	Glu	Tyr	Ser	Glu	Asn
		275					280					285			
Asn	Glu	Asn	Tyr	Ile	Glu	Val	Pro	Leu	Ile	Phe	Asp	Pro	Val	Thr	Arg

290	295	300
Glu Asp Leu His Met Asp Phe Lys Cys Val Val His Asn Thr Leu Ser		
305	310	315
Phe Gln Thr Leu Arg Thr Thr Val Lys Glu Ala Ser Ser Thr Phe Ser		320
	325	330
Trp Gly Ile Val Leu Ala Pro Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Gly		335
	340	345
Gly Ile Trp Met His Arg Arg Cys Lys His Arg Thr Gly Lys Ala Asp		350
	355	360
Gly Leu Thr Val Leu Trp Pro His His Gln Asp Phe Gln Ser Tyr Pro		365
370	375	380
Lys		
385		
<210> 76		
<211> 152		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 76		
Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp		
1	5	10
Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala		
	20	25
Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val		30
	35	40
Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys		45
	50	55
Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu		60
65	70	75
Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys		80
	85	90
Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu		95
	100	105
Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp		110
	115	120
Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr		125
	130	135
Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu		140
145	150	
<210> 77		

<211> 93

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 77

```

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

```

<210> 78

<211> 136

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 78

```

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

```

Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
 115 120 125
 Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
 130 135
 <210> 79
 <211> 767
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 79
 Gly Pro Glu Pro Gly Ala Leu Cys Glu Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 His Pro Val Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys
 20 25 30
 Ala Ser Arg Gly Thr Thr Gly Leu Pro Gln Glu Val His Val Leu Asn
 35 40 45
 Leu Arg Thr Ala Gly Gln Gly Pro Gly Gln Leu Gln Arg Glu Val Thr
 50 55 60
 Leu His Leu Asn Pro Ile Ser Ser Val His Ile His His Lys Ser Val
 65 70 75 80
 Val Phe Leu Leu Asn Ser Pro His Pro Leu Val Trp His Leu Lys Thr
 85 90 95
 Glu Arg Leu Ala Thr Gly Val Ser Arg Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly
 100 105 110
 Ser Val Val Gln Phe Ser Ser Ala Asn Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr
 115 120 125
 Glu Glu Arg Asn Phe Pro His Gly Asn Glu His Leu Leu Asn Trp Ala
 130 135 140
 Arg Lys Glu Tyr Gly Ala Val Thr Ser Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala
 145 150 155 160
 Arg Asn Ile Tyr Ile Lys Val Gly Glu Asp Gln Val Phe Pro Pro Lys
 165 170 175
 Cys Asn Ile Gly Lys Asn Phe Leu Ser Leu Asn Tyr Leu Ala Glu Tyr
 180 185 190
 Leu Gln Pro Lys Ala Ala Glu Gly Cys Val Met Ser Ser Gln Pro Gln
 195 200 205
 Asn Glu Glu Val His Ile Ile Glu Leu Ile Thr Pro Asn Ser Asn Pro
 210 215 220

Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Thr Ile Asp Ile Arg Pro Ser Gln			
225	230	235	240
Glu Asp Leu Glu Val Val Lys Asn Leu Ile Leu Ile Leu Lys Cys Lys			
	245	250	255
Lys Ser Val Asn Trp Val Ile Lys Ser Phe Asp Val Lys Gly Ser Leu			
	260	265	270
Lys Ile Ile Ala Pro Asn Ser Ile Gly Phe Gly Lys Glu Ser Glu Arg			
	275	280	285
Ser Met Thr Met Thr Lys Ser Ile Arg Asp Asp Ile Pro Ser Thr Gln			
	290	295	300
Gly Asn Leu Val Lys Trp Ala Leu Asp Asn Gly Tyr Ser Pro Ile Thr			
305	310	315	320
Ser Tyr Thr Met Ala Pro Val Ala Asn Arg Phe His Leu Arg Leu Glu			
	325	330	335
Asn Asn Ala Glu Glu Met Gly Asp Glu Glu Val His Thr Ile Pro Pro			
	340	345	350
Glu Leu Arg Ile Leu Leu Asp Pro Gly Ala Leu Pro Ala Leu Gln Asn			
	355	360	365
Pro Pro Ile Arg Gly Gly Glu Gly Gln Asn Gly Gly Leu Pro Phe Pro			
	370	375	380
Phe Pro Asp Ile Ser Arg Arg Val Trp Asn Glu Glu Gly Glu Asp Gly			
385	390	395	400
Leu Pro Arg Pro Lys Asp Pro Val Ile Pro Ser Ile Gln Leu Phe Pro			
	405	410	415
Gly Leu Arg Glu Pro Glu Glu Val Gln Gly Ser Val Asp Ile Ala Leu			
	420	425	430
Ser Val Lys Cys Asp Asn Glu Lys Met Ile Val Ala Val Glu Lys Asp			
	435	440	445
Ser Phe Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Gly Met Asp Val Thr Leu Leu Asp			
	450	455	460
Pro Thr Cys Lys Ala Lys Met Asn Gly Thr His Phe Val Leu Glu Ser			
465	470	475	480
Pro Leu Asn Gly Cys Gly Thr Arg Pro Arg Trp Ser Ala Leu Asp Gly			
	485	490	495
Val Val Tyr Tyr Asn Ser Ile Val Ile Gln Val Pro Ala Leu Gly Asp			
	500	505	510
Ser Ser Gly Trp Pro Asp Gly Tyr Glu Asp Leu Glu Ser Gly Asp Asn			
	515	520	525
Gly Phe Pro Gly Asp Met Asp Glu Gly Asp Ala Ser Leu Phe Thr Arg			

530	535	540
Pro Glu Ile Val Val Phe Asn Cys Ser Leu Gln Gln Val Arg Asn Pro		
545	550	555
Ser Ser Phe Gln Glu Gln Pro His Gly Asn Ile Thr Phe Asn Met Glu		560
	565	570
Leu Tyr Asn Thr Asp Leu Phe Leu Val Pro Ser Gln Gly Val Phe Ser		575
	580	585
Val Pro Glu Asn Gly His Val Tyr Val Glu Val Ser Val Thr Lys Ala		590
	595	600
Glu Gln Glu Leu Gly Phe Ala Ile Gln Thr Cys Phe Ile Ser Pro Tyr		605
610	615	620
Ser Asn Pro Asp Arg Met Ser His Tyr Thr Ile Ile Glu Asn Ile Cys		
625	630	635
Pro Lys Asp Glu Ser Val Lys Phe Tyr Ser Pro Lys Arg Val His Phe		
	645	650
Pro Ile Pro Gln Ala Asp Met Asp Lys Lys Arg Phe Ser Phe Val Phe		655
	660	665
Lys Pro Val Phe Asn Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Cys Glu Leu Thr		670
	675	680
Leu Cys Thr Lys Met Glu Lys His Pro Gln Lys Leu Pro Lys Cys Val		685
	690	695
Pro Pro Asp Glu Ala Cys Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala		700
705	710	715
Met Met Gln Asn Lys Lys Thr Phe Thr Lys Pro Leu Ala Val Ile His		720
	725	730
His Glu Ala Glu Ser Lys Glu Lys Gly Pro Ser Met Lys Glu Pro Asn		735
	740	745
Pro Ile Ser Pro Pro Ile Phe His Gly Leu Asp Thr Leu Thr Val		750
	755	760
		765
<210> 80		
<211> 330		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 80		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		15

20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	

<210> 81
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 81
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala
 325 330

<210> 82

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 82

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

<210> 83

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 83

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
20	25	30	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
35	40	45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
100	105	110	
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
115	120	125	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
130	135	140	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
165	170	175	
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
180	185	190	
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
195	200	205	
Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
210	215	220	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
245	250	255	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
260	265	270	
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
275	280	285	
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala
 325 330

<210> 84

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 84

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

<210> 85

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 85

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

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala		80
	85	90
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		95
100	105	
<210>	86	
<211>	118	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	86	
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser		15
	20	25
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		30
	35	40
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		45
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
	85	90
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		95
	100	105
Leu Val Thr Val Ser Ser		110
115		
<210>	87	
<211>	330	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	87	
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
		15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
20	25	30	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
35	40	45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
100	105	110	
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
115	120	125	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
130	135	140	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
165	170	175	
Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
180	185	190	
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
195	200	205	
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
210	215	220	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
225	230	235	240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
245	250	255	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
260	265	270	
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
275	280	285	
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala			

325	330
<210> 88	
<211> 330	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 88	
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	
1 5 10 15	
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
20 25 30	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
35 40 45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
50 55 60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	
65 70 75 80	
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
85 90 95	
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
100 105 110	
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
115 120 125	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
130 135 140	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
145 150 155 160	
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
165 170 175	
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
180 185 190	
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
195 200 205	
Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
210 215 220	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu	
225 230 235 240	
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	

245																250								255															
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn																								
260																265								270															
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe																								
275																280								285															
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn																								
290																295								300															
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr																								
305																310								315								320							
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala																														
325																330																							
<210>																89																							
<211>																330																							
<212>																PRT																							
<213>																人工序列																							
<220>																																							
<223>																合成的																							
<400>																89																							
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys																								
1																5								10								15							
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr																								
20																25								30															
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser																								
35																40								45															
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser																								
50																55								60															
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr																								
65																70								75								80							
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys																								
85																90								95															
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys																								
100																105								110															
Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro																								
115																120								125															
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys																								
130																135								140															
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp																								
145																150								155								160							
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu																								

165								170				175					
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu		
180								185				190					
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn		
195								200				205					
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
210								215				220					
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu		
225								230				235				240	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr		
245								250				255					
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn		
260								265				270					
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe		
275								280				285					
Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn		
290								295				300					
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr		
305								310				315				320	
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
325								330									

 $\langle 210 \rangle$ 90

213

⟨212⟩ PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 合成的

 $\langle 400 \rangle$ 90

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

				85					90					95			
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro		
				100					105					110			
Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr		
				115					120					125			
Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys		
				130					135					140			
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu		
145									150					155			160
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser		
				165					170					175			
Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala		
				180					185					190			
Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe		
				195					200					205			
Asn	Arg	Gly	Glu	Cys													
				210													
<210>	91																
<211>	587																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	合成的																
<400>	91																
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala		
1				5					10					15			
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Val	Phe	Thr	Asp	Tyr		
				20					25					30			
Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Trp	Met		
				35					40					45			
Gly	Asp	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Ala	Glu	Thr	Leu	Tyr	Asn	His	Lys	Phe		
				50					55					60			
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Val	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65																	
				70					75					80			
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Val	Lys	Trp	Gly	Asp	Gly	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu		
				100					105					110			
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu		

115	120	125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr	Ser Gly Gly Thr	Ala Ala Leu Gly Cys
130	135	140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro	Glu Pro Val Thr	Val Ser Trp Asn Ser
145	150	155
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val	His Thr Phe Pro	Ala Val Leu Gln Ser
165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser	Ser Val Val Thr	Val Pro Ser Ser Ser
180	185	190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile	Cys Asn Val Asn His	Lys Pro Ser Asn
195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val	Glu Pro Lys Ser	Cys Asp Lys Thr His
210	215	220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	Pro Glu Phe Glu Gly	Gly Pro Ser Val
225	230	235
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	Lys Asp Thr Leu Met	Ile Ser Arg Thr
245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val Ser His	Glu Asp Pro Glu
260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	Asp Gly Val Glu Val	His Asn Ala Lys
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	Tyr Asn Ser Thr Tyr	Arg Val Val Ser
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln	Asp Trp Leu Asn Gly	Lys Glu Tyr Lys
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	Leu Pro Ala Ser Ile	Glu Lys Thr Ile
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	Arg Glu Pro Gln Val	Tyr Thr Leu Pro
340	345	350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr	Lys Asn Gln Val Ser	Leu Thr Cys Leu
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	Asp Ile Ala Val Glu	Trp Glu Ser Asn
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	Lys Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp Ser
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	Ser Lys Leu Thr Val	Asp Lys Ser Arg
405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	Ser Cys Ser Val Met	His Glu Ala Leu
420	425	430

His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala	Gly			
																435	440	445
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly			
																450	455	460
Gly	Gly	Ser	Gly	Glu	Glu	Glu	Leu	Gln	Ile	Ile	Gln	Pro	Asp	Lys	Ser			
																465	470	475
Val	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Glu	Thr	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Thr	Ile	Thr			
																485	490	495
Ser	Leu	Phe	Pro	Val	Gly	Pro	Ile	Gln	Trp	Phe	Arg	Gly	Ala	Gly	Pro			
																500	505	510
Gly	Arg	Val	Leu	Ile	Tyr	Asn	Gln	Arg	Gln	Gly	Pro	Phe	Pro	Arg	Val			
																515	520	525
Thr	Thr	Val	Ser	Asp	Thr	Thr	Lys	Arg	Asn	Asn	Met	Asp	Phe	Ser	Ile			
																530	535	540
Arg	Ile	Gly	Asn	Ile	Thr	Pro	Ala	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ile			
																545	550	555
Lys	Phe	Arg	Lys	Gly	Ser	Pro	Asp	Asp	Val	Glu	Phe	Lys	Ser	Gly	Ala			
																565	570	575
Gly	Thr	Glu	Leu	Ser	Val	Arg	Ala	Lys	Pro	Ser								
																580	585	

<210> 92

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 92

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

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
100				105				110							
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
115				120				125							
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
130				135				140							
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145				150				155				160			
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165				170				175			
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
				180				185				190			
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
195				200				205							
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
210															
<210> 93															
<211> 588															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 合成的															
<400> 93															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10				15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Ser
				20				25				30			
Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
35				40				45							
Ala	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
50				55				60							
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
65				70				75				80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90				95			
Ala	Arg	Arg	His	Trp	Pro	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
100				105				110							
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
115				120				125							

Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
130						135					140				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165					170					175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
	195						200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210					215					220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
	275						280						285		
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290					295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310				315						320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330				335		
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
		340					345						350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390				395						400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410				415		
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
		420					425					430			
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala

435	440	445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
450	455	460
Gly Gly Gly Ser Gly Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys		
465	470	475
Ser Val Leu Val Ala Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile		480
485	490	495
Thr Ser Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly		
500	505	510
Pro Gly Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg		
515	520	525
Val Thr Thr Val Ser Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser		
530	535	540
Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys		
545	550	555
Ile Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly		
565	570	575
Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser		
580	585	
<210> 94		
<211> 587		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 94		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr		15
20	25	30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr Asn His Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
85	90	95
Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		

	100		105		110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu					
115		120		125	
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys					
130		135		140	
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser					
145		150		155	160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser					
165		170		175	
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser					
180		185		190	
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn					
195		200		205	
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His					
210		215		220	
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val					
225		230		235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr					
245		250		255	
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu					
260		265		270	
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys					
275		280		285	
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser					
290		295		300	
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys					
305		310		315	320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile					
325		330		335	
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro					
340		345		350	
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu					
355		360		365	
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn					
370		375		380	
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser					
385		390		395	400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg					
405		410		415	

Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
420				425				430								
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala	Gly	
435				440				445								
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
450				455				460								
Gly	Gly	Ser	Gly	Glu	Glu	Glu	Leu	Gln	Ile	Ile	Gln	Pro	Asp	Lys	Ser	
465				470				475				480				
Val	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Glu	Thr	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Thr	Ile	Thr	
485				490				495								
Ser	Leu	Phe	Pro	Val	Gly	Pro	Ile	Gln	Trp	Phe	Arg	Gly	Ala	Gly	Pro	
500				505				510								
Gly	Arg	Val	Leu	Ile	Tyr	Asn	Gln	Arg	Gln	Gly	Pro	Phe	Pro	Arg	Val	
515				520				525								
Thr	Thr	Val	Ser	Asp	Thr	Thr	Lys	Arg	Asn	Asn	Met	Asp	Phe	Ser	Ile	
530				535				540								
Arg	Ile	Gly	Asn	Ile	Thr	Pro	Ala	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ile	
545				550				555				560				
Lys	Phe	Arg	Lys	Gly	Ser	Pro	Asp	Asp	Val	Glu	Phe	Lys	Ser	Gly	Ala	
565				570				575								
Gly	Thr	Glu	Leu	Ser	Val	Arg	Ala	Lys	Pro	Ser						
580				585												

<210> 95

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 95

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

Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95	
Val	Lys	Trp	Gly	Asp	Gly	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105				110			
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
			115				120					125			
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
			130				135				140				
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
145					150					155					160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
				165					170					175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
			180					185				190			
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
			195				200					205			
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
			210				215				220				
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
225					230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245					250					255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
			260					265				270			
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
			275				280					285			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
			290				295				300				
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305					310				315						320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325					330				335		
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro
			340					345				350			
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala
			355				360					365			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
			370				375				380				
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser

385	390	395	400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
	405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
	420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	435	440	445
<210>	96		
<211>	588		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的		
<400>	96		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser			
	20	25	30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
	115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly			
	130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
	165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
	180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			

195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala		
435	440	445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
450	455	460
Gly Gly Gly Ser Gly Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys		
465	470	475
Ser Val Leu Val Ala Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile		
485	490	495
Thr Ser Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly		
500	505	510

Pro Gly Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg		
515	520	525
Val Thr Thr Val Ser Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser		
530	535	540
Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys		
545	550	555
Ile Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly		
565	570	575
Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser		
580	585	
<210>	97	
<211>	448	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	97	
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser		
20	25	30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys		
355	360	365
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210>	98	
<211>	119	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 合成的

<400> 98

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

<210> 99

<211> 150

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 99

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

Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala
 115 120 125
 Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu
 130 135 140
 Gly Gln Ala Ser Met Thr
 145 150
 <210> 100
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 100
 Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala
 1 5 10 15
 Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser
 20 25 30
 Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly
 35 40 45
 Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro
 50 55 60
 Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu
 65 70 75 80
 Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro
 85 90 95
 Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 100 105 110
 Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala
 115 120 125
 Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu
 130 135 140
 Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser
 145 150 155 160
 Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala
 165 170 175
 Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg
 180 185 190
 Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln
 195 200 205

Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg
 210 215 220
 Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu
 225 230 235 240
 Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val
 245 250 255
 Gly Leu Pro Cys
 260
 <210> 101
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 101
 Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His
 1 5 10 15
 Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg
 20 25
 <210> 102
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 102
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln

	100		105		110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210>	103				
<211>	107				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	合成的				
<400>	103				
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
1	5		10		15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr					
	20		25		30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile					
	35		40		45
Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly					
	50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln					
65	70		75		80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp					
	85		90		95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	100		105		
<210>	104				
<211>	7				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	合成的				
<400>	104				
Thr Ser Gly Met Gly Val Gly					
1	5				
<210>	105				
<211>	16				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	合成的				

<400> 105

His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 106

Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp

1 5 10

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 107

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 108

Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser

1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 109

Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 110

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 110

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

<210> 111

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 111

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

65		70		75		80									
Glu	Asp	Ala	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Phe
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 112

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 112

Val Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 113

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

1 5 10 15

Gly

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 114

Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr

1 5

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 115

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His

1 5 10

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 116

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser

1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 117

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 118

<211> 713

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 118

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe

				85					90					95			
Cys	Ala	Arg	Asn	Arg	Tyr	Asp	Pro	Pro	Trp	Phe	Val	Asp	Trp	Gly	Gln		
				100				105						110			
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val		
				115				120						125			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala		
				130				135						140			
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser		
145						150				155					160		
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val		
				165					170						175		
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro		
				180					185					190			
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys		
				195				200						205			
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp		
				210				215						220			
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly		
225					230				235						240		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		
				245					250						255		
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu		
				260					265					270			
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
				275				280						285			
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		
				290				295						300			
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
305					310				315						320		
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Glu		
				325					330						335		
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr		
				340				345						350			
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu		
				355				360						365			
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp		
				370				375						380			
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val		
385					390				395						400		

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445
Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	450	455	460
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu			
465	470	475	480
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly			
	485	490	495
Tyr Val Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly			
	500	505	510
Gln Ser Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr			
	515	520	525
Leu Tyr Asn His Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys			
	530	535	540
Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp			
545	550	555	560
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr			
	565	570	575
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	580	585	590
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp			
	595	600	605
Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp			
	610	615	620
Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala Val			
625	630	635	640
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr			
	645	650	655
Ser Val Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser			
	660	665	670
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu			
	675	680	685
Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr Phe			
	690	695	700
Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			

705	710
<210> 119	
<211> 214	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的	
<400> 119	
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr	
20 25 30	
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln	
65 70 75 80	
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp	
85 90 95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
100 105 110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
115 120 125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
130 135 140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
145 150 155 160	
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
165 170 175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
180 185 190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
195 200 205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
210	
<210> 120	
<211> 711	
<212> PRT	

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 120

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Val	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Ile	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Gly	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90				95		
Ala	Arg	Asp	Leu	Arg	Thr	Gly	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
		115						120					125		
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
	130					135					140				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145				150						155				160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
			165						170				175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185				190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
		195					200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210					215					220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235				240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
			245						250				255		
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
		260						265				270			
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala

275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala		
435	440	445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
450	455	460
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys		
465	470	475
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val		
485	490	495
Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys		
500	505	510
Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr		
515	520	525
Asn His Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile		
530	535	540
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala		
545	550	555
Val Tyr Tyr Cys Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly		
565	570	575
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
580	585	590

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln		
595	600	605
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val		
610	615	620
Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala Val Ala Trp		
625	630	635
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Val		
645	650	655
Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser		
660	665	670
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile		
675	680	685
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr Phe Gly Cys		
690	695	700
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
705	710	
<210>	121	
<211>	214	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	121	
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys		
1	5	10
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser		
20	25	30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala		
65	70	75
Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe		
85	90	95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 122
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 122
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser
20

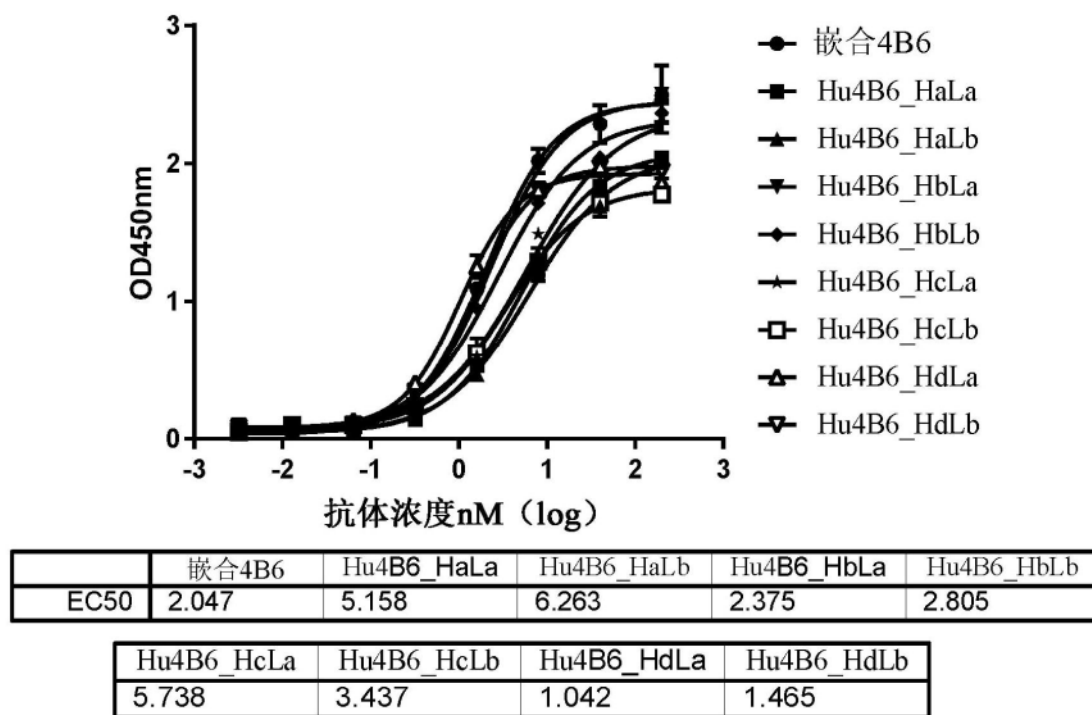


图1

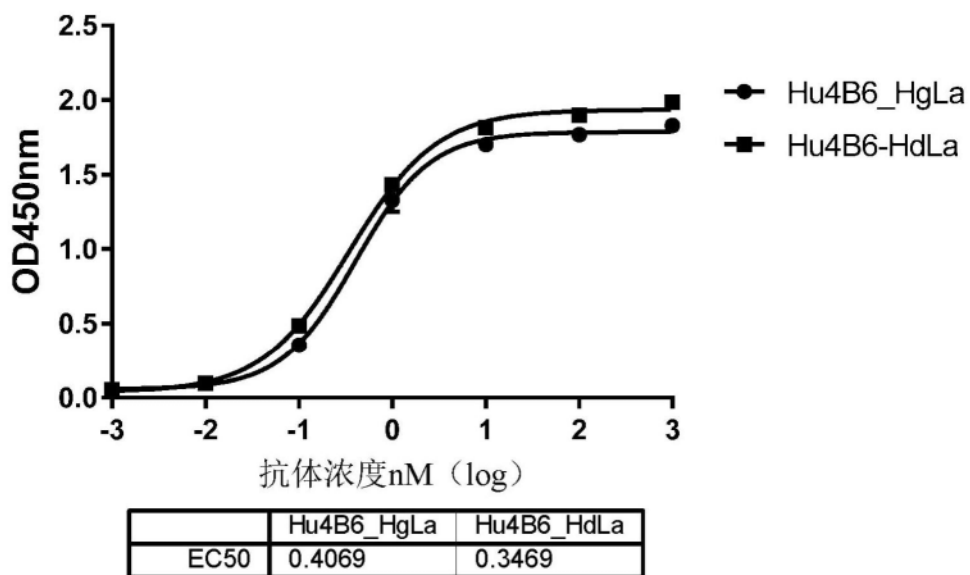


图2

通过ELISA测量的AM-4B6(IgG1-TGFbRII)亲和力分级

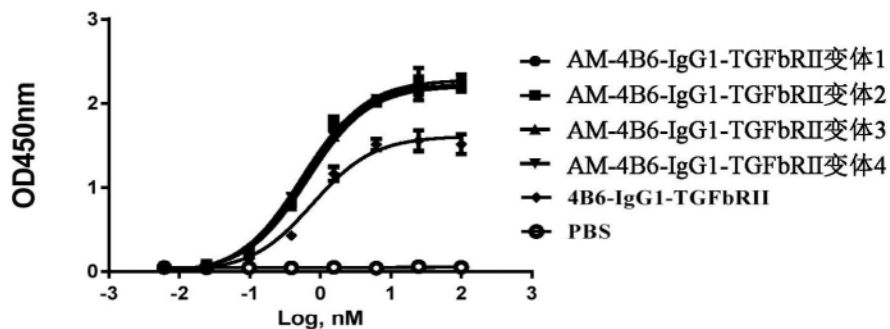


图3A

通过ELISA测量的AM-4B6(IgG1-TGFbRII)亲和力分级

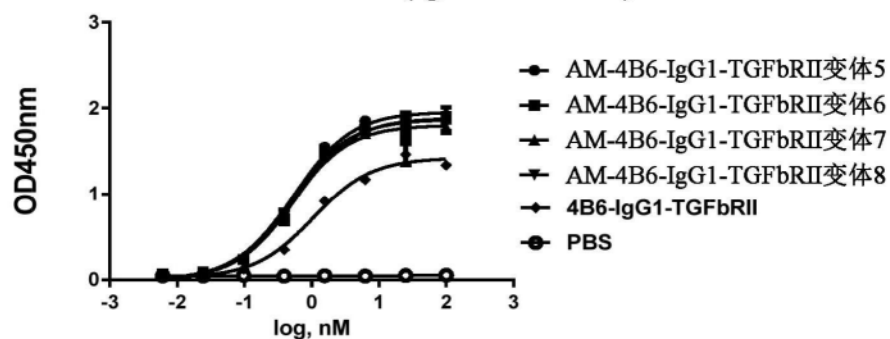


图3B

通过ELISA测量的AM-4B6(IgG1-TGFbRII)亲和力分级

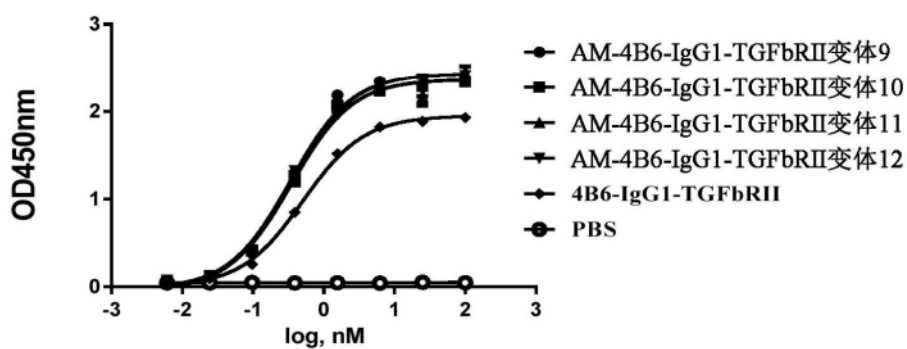
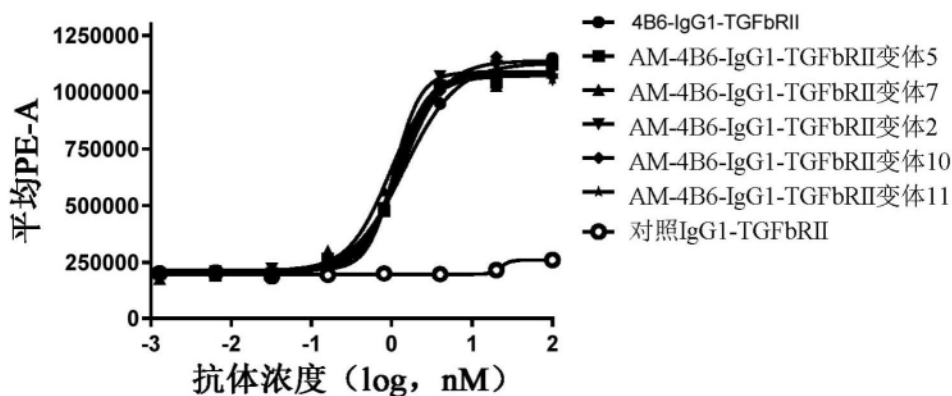


图3C

通过FACS分析的AM-4B6-IgG1-TGFbRII变体的亲和力分级

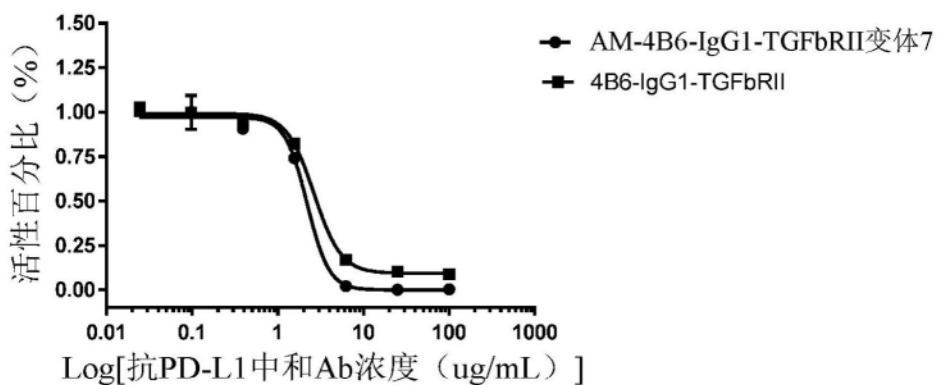


	4B6-IgG1-TGFbRII	AM-4B6-IgG1-TGFbRII变体5	AM-4B6-IgG1-TGFbRII变体7
EC50	1.436	1.196	0.9404

AM-4B6-IgG1-TGFbRII变体2	AM-4B6-IgG1-TGFbRII变体10	AM-4B6-IgG1-TGFbRII变体11
1.074	1.363	1.11

图4

对hPD-L1/PD-1结合的阻断



	AM-4B6-IgG1-TGFbRII变体7	4B6-IgG1-TGFbRII
IC50	2.2	2.641

图5A

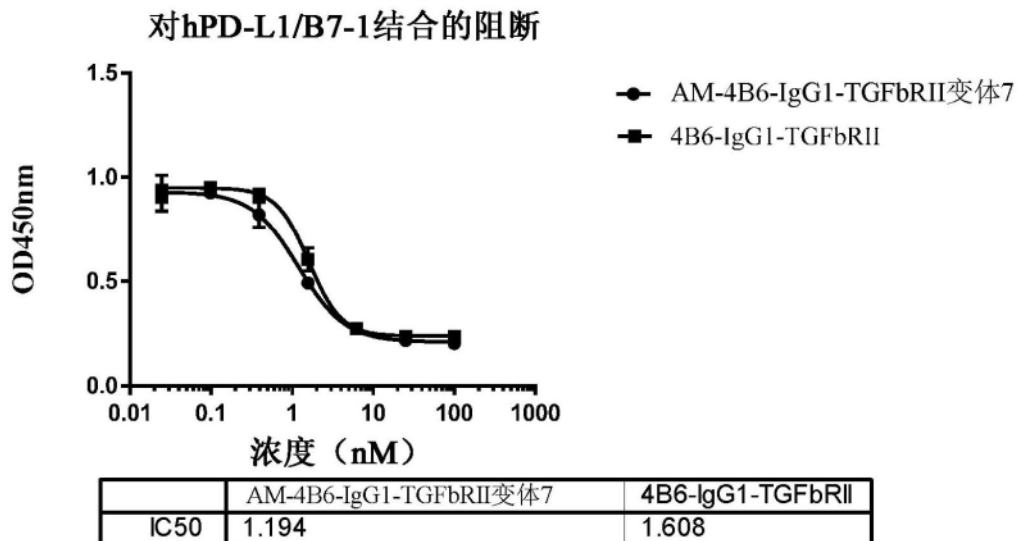


图5B

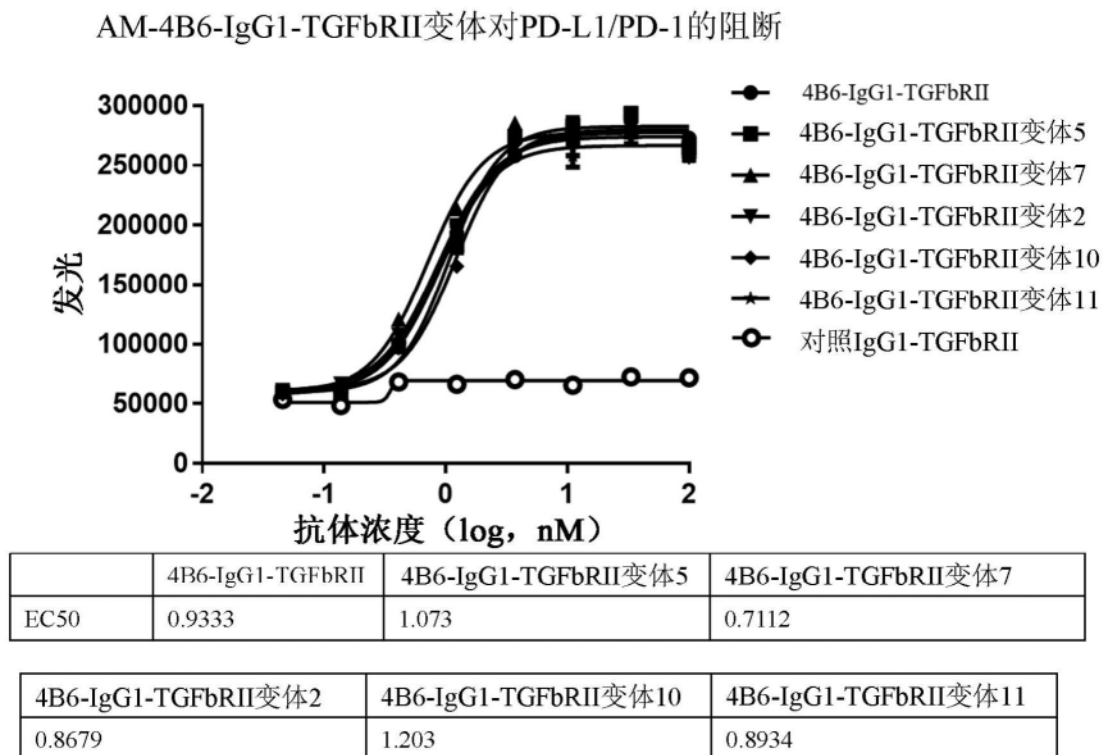


图6

用稳定细胞系表达的
Hu4B6_HgLa_hIgG1_TGFbRII (1-136)

用稳定细胞系表达的
AM4B6_hIgG1_TGFbRII (20-136)

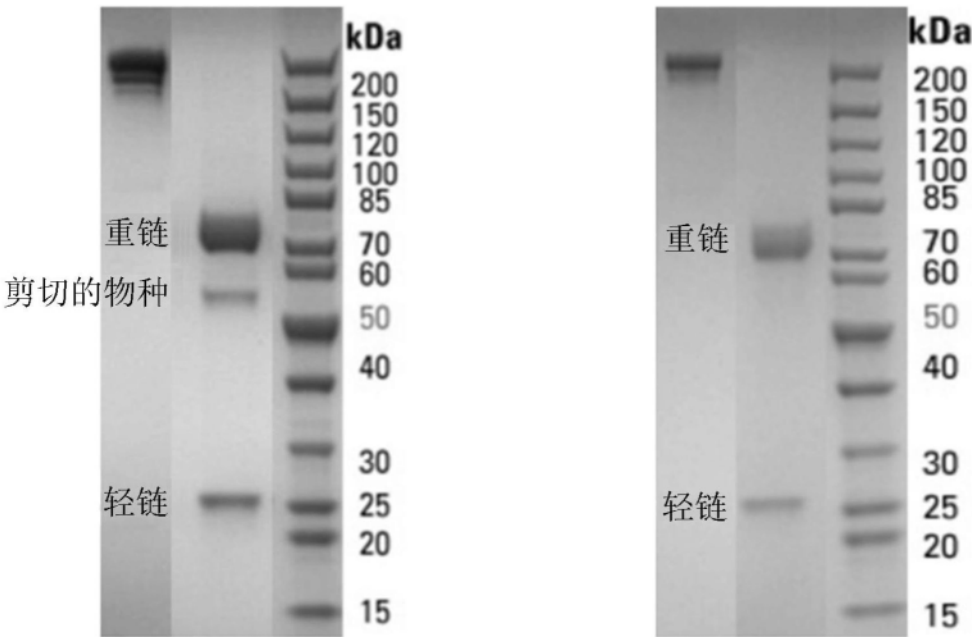


图7

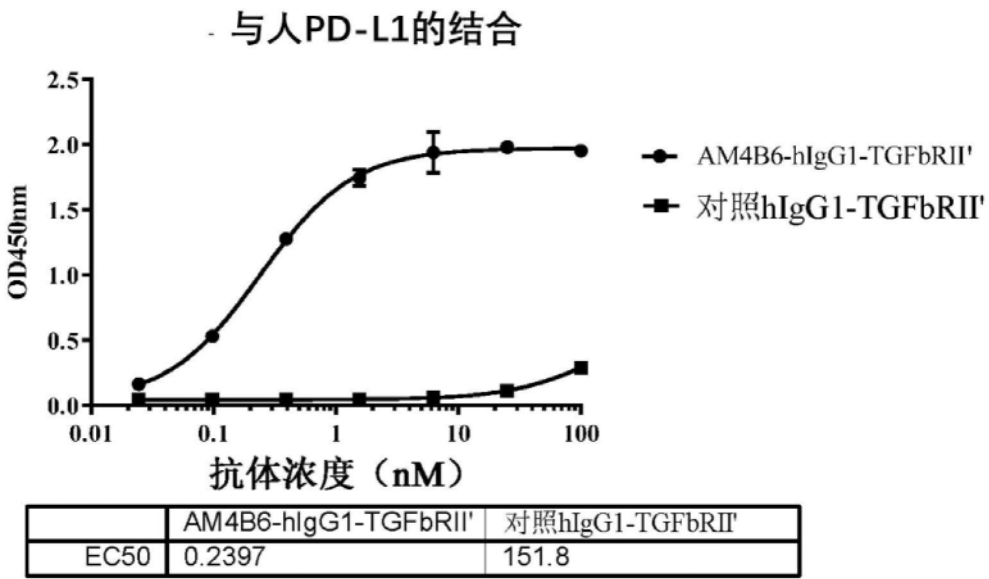


图8A

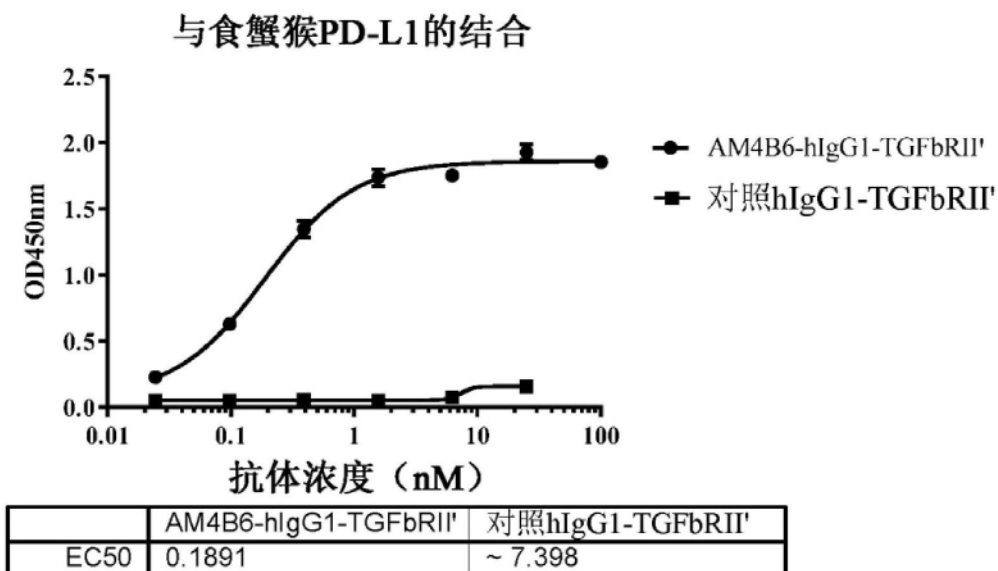


图8B

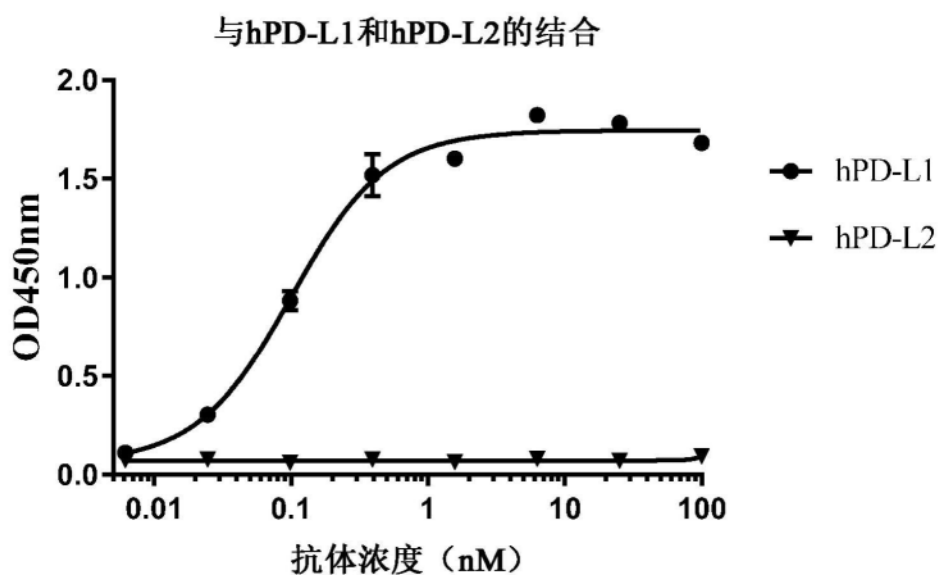


图9A

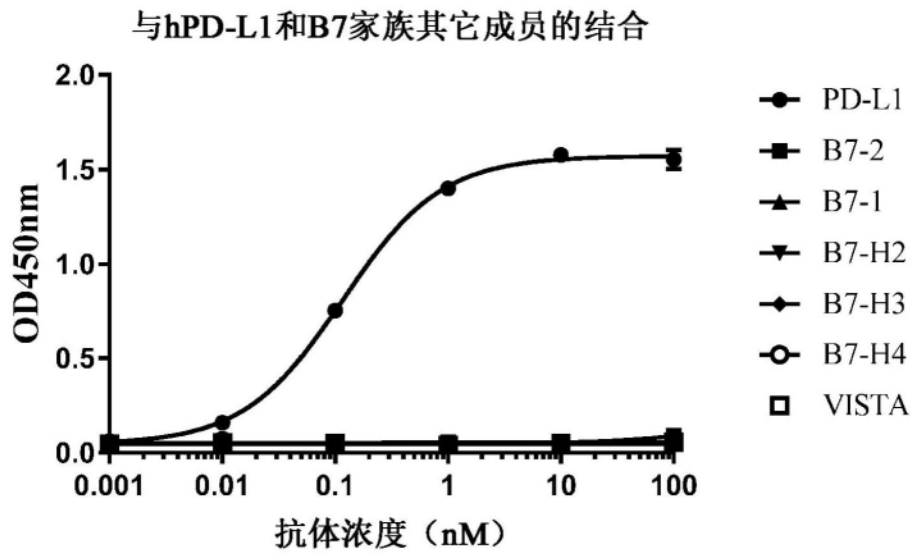


图9B

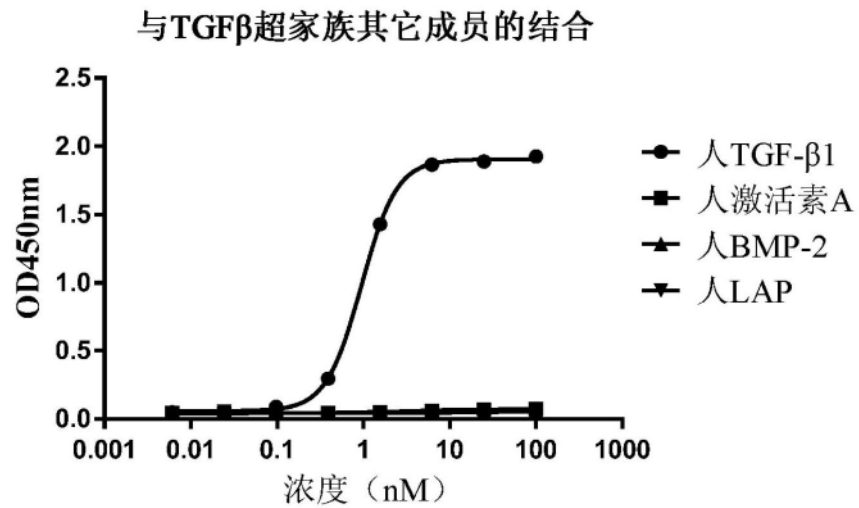


图9C

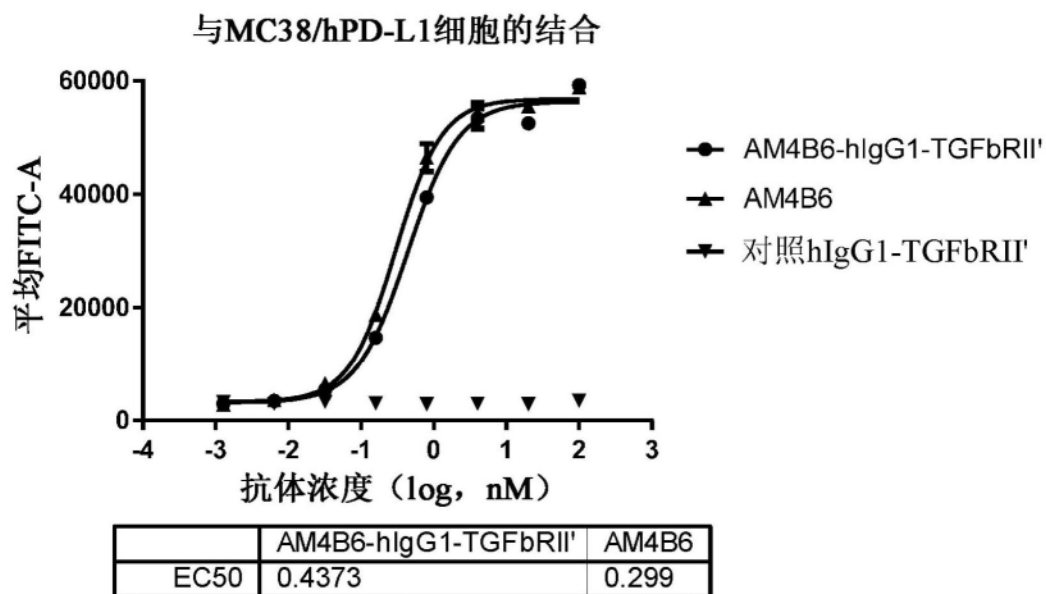


图10A

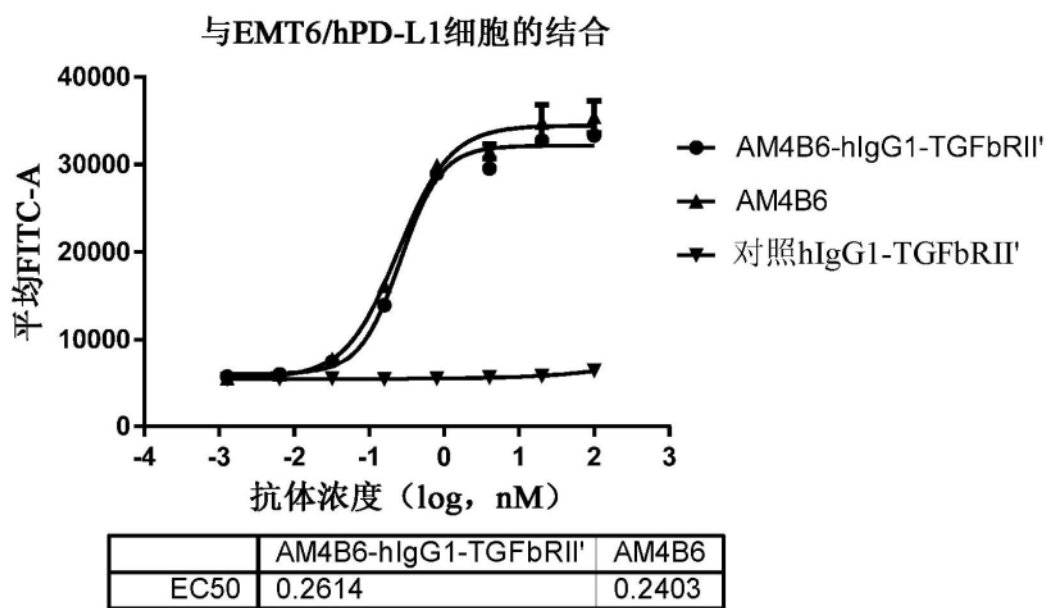


图10B

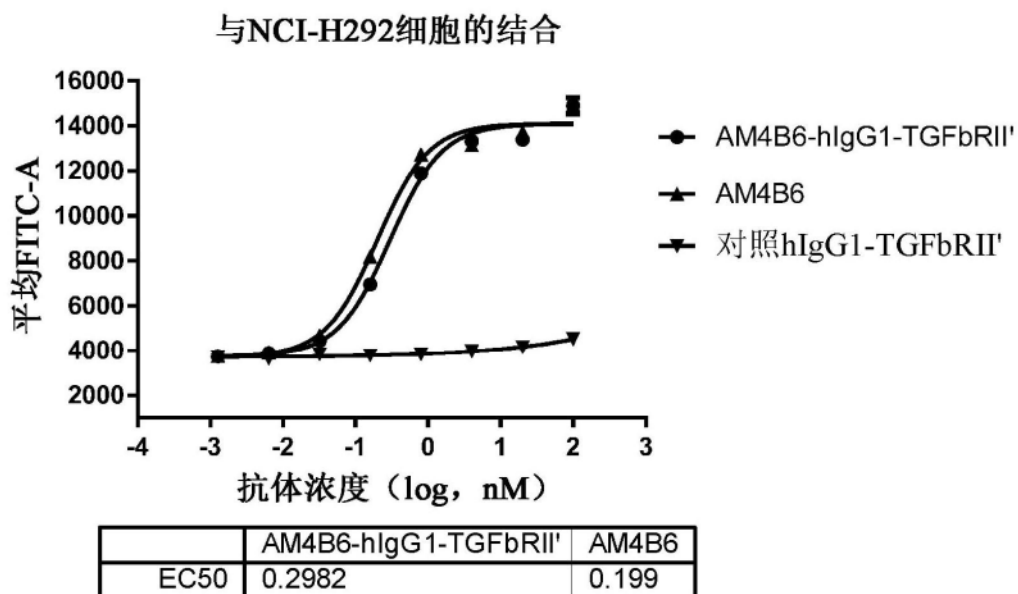


图10C

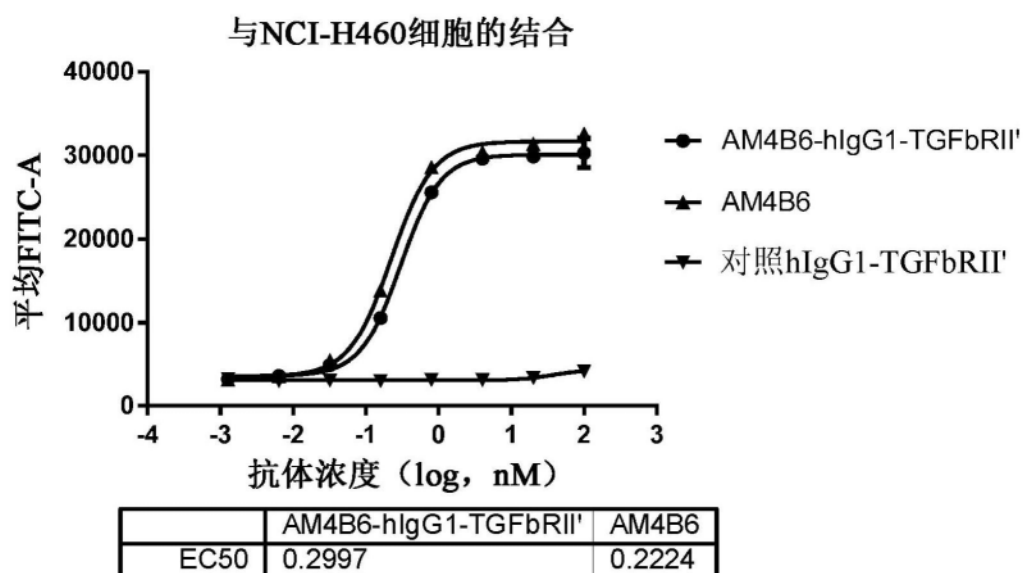


图10D

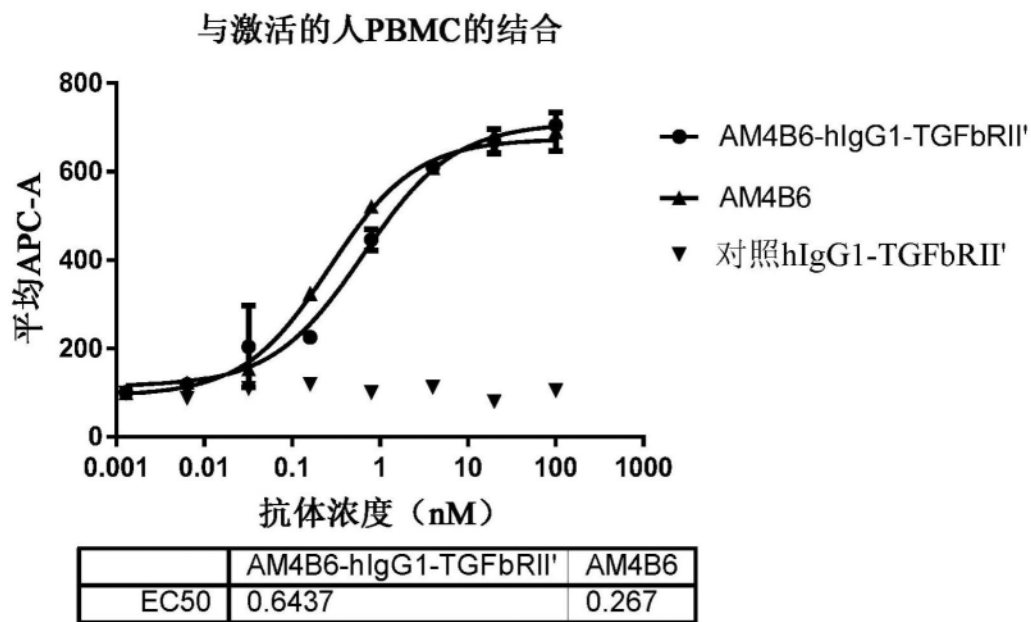


图10E

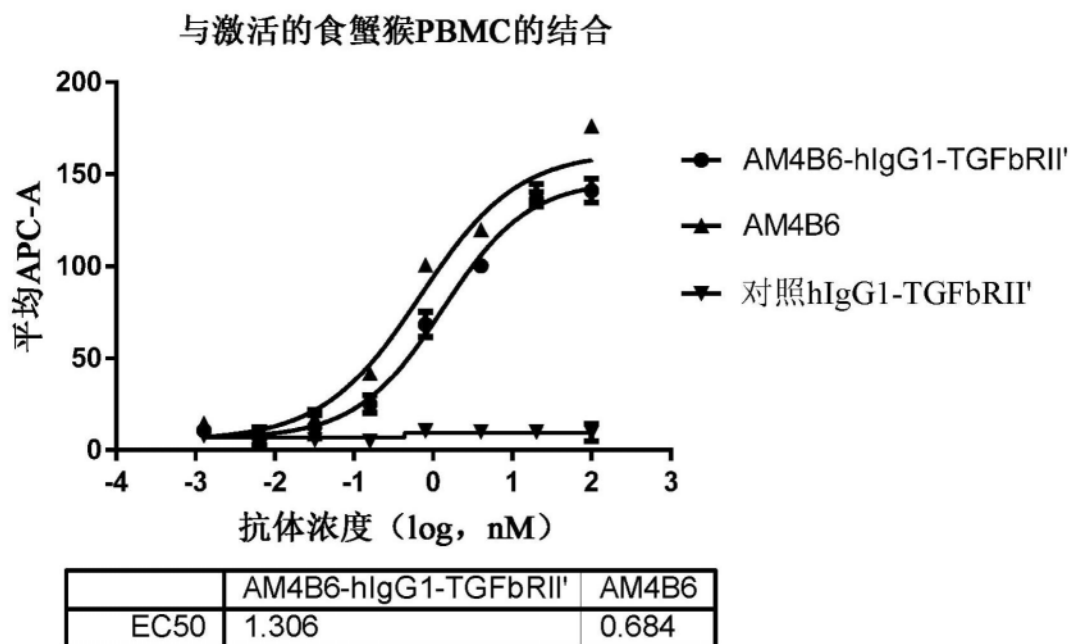
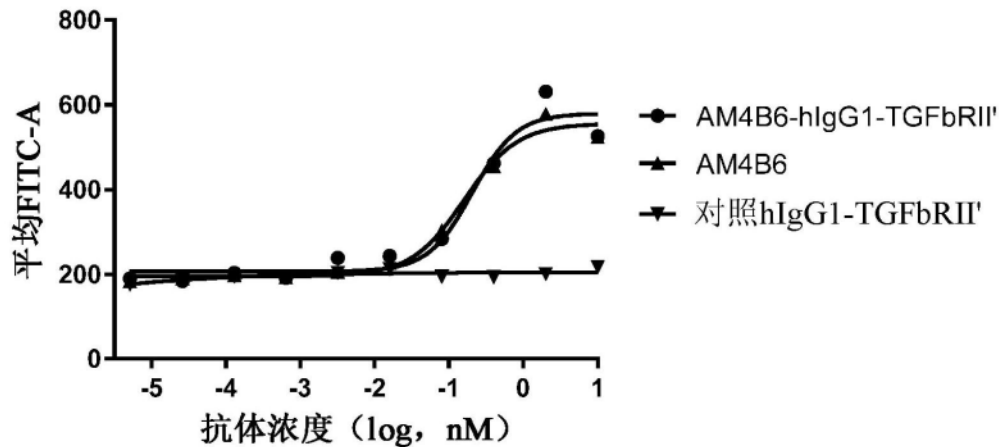


图10F

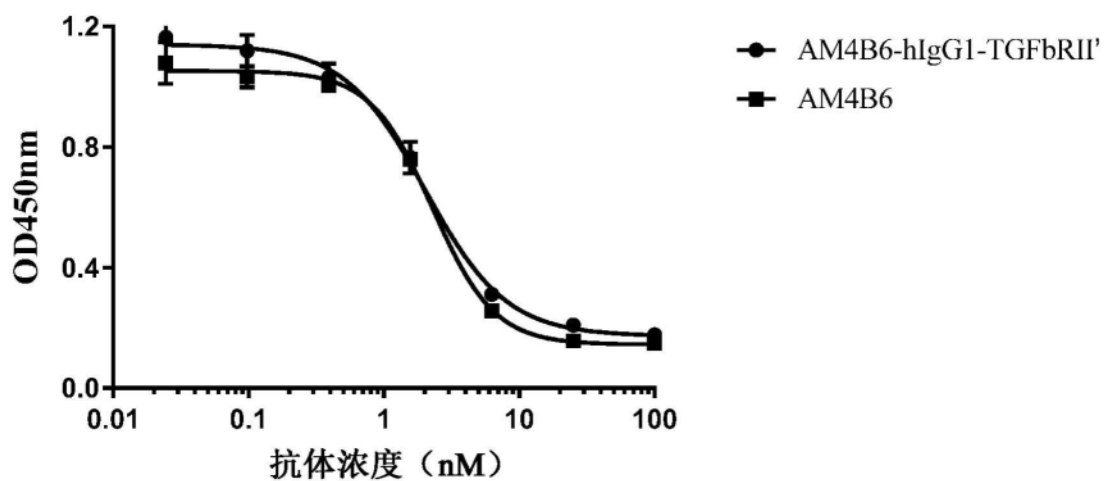
与激活的人T细胞上表达的hPD-L1的结合



	AM4B6-hIgG1-TGFbRII'	AM4B6	对照hIgG1-TGFbRII'
EC50	0.2064	0.1604	~ 7.407e-013

图11

对hPD-L1/hPD-1结合的阻断



	AM4B6-hIgG1-TGFbRII'	AM4B6
IC50	2.022	2.28

图12A

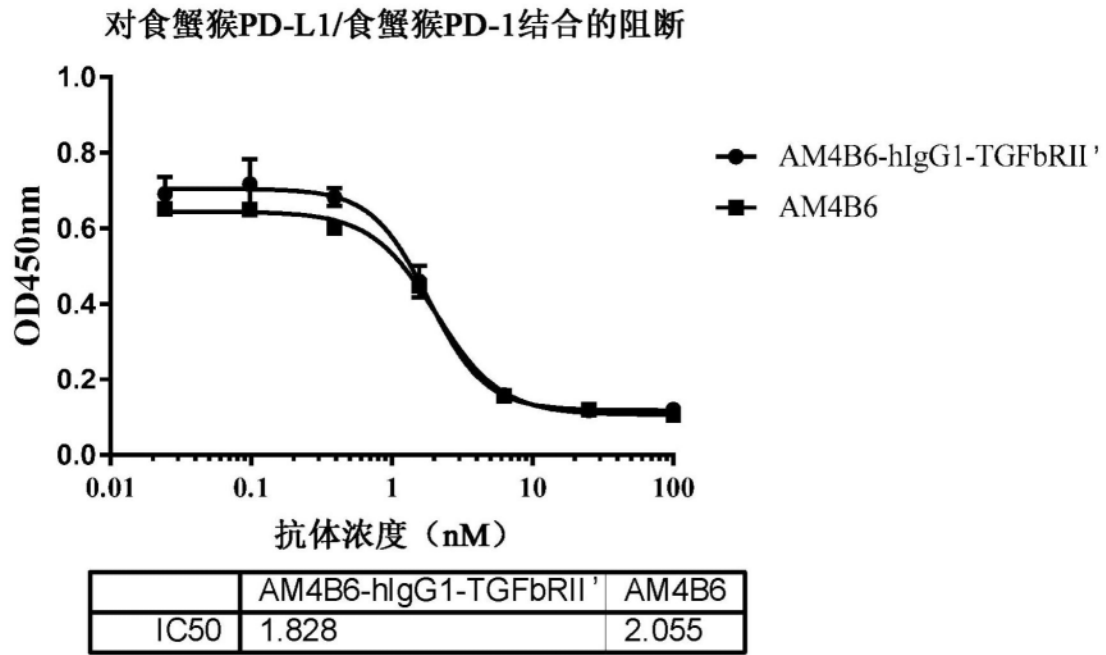


图12B

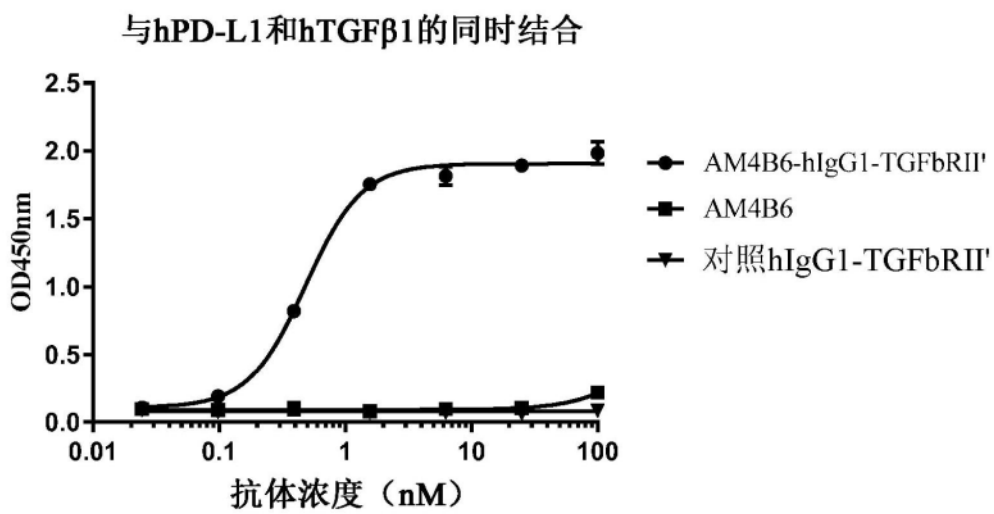


图13

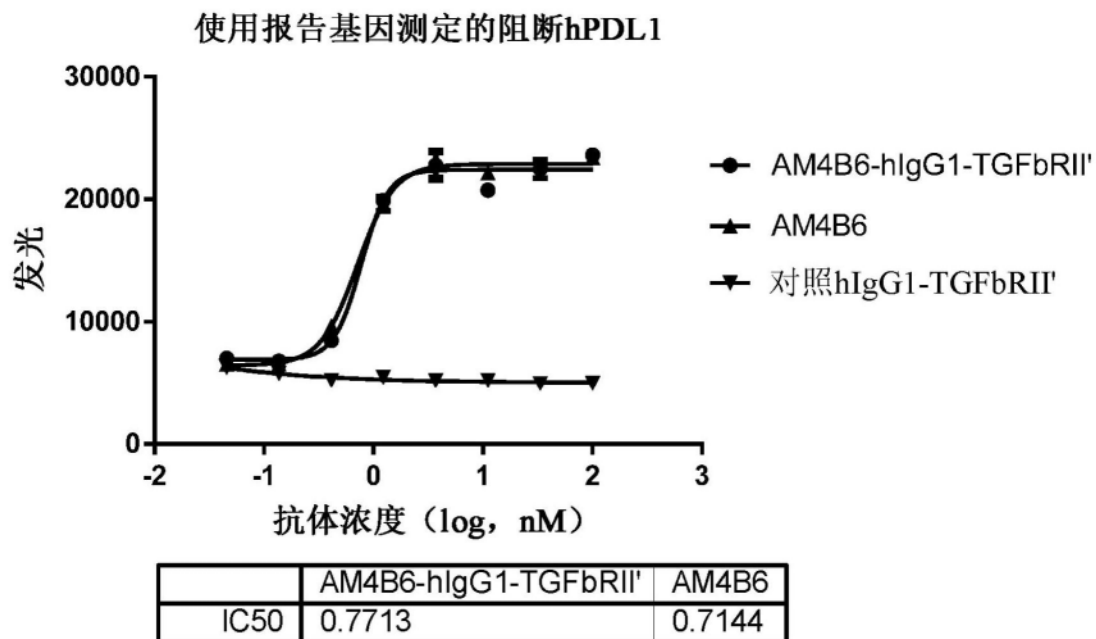


图14

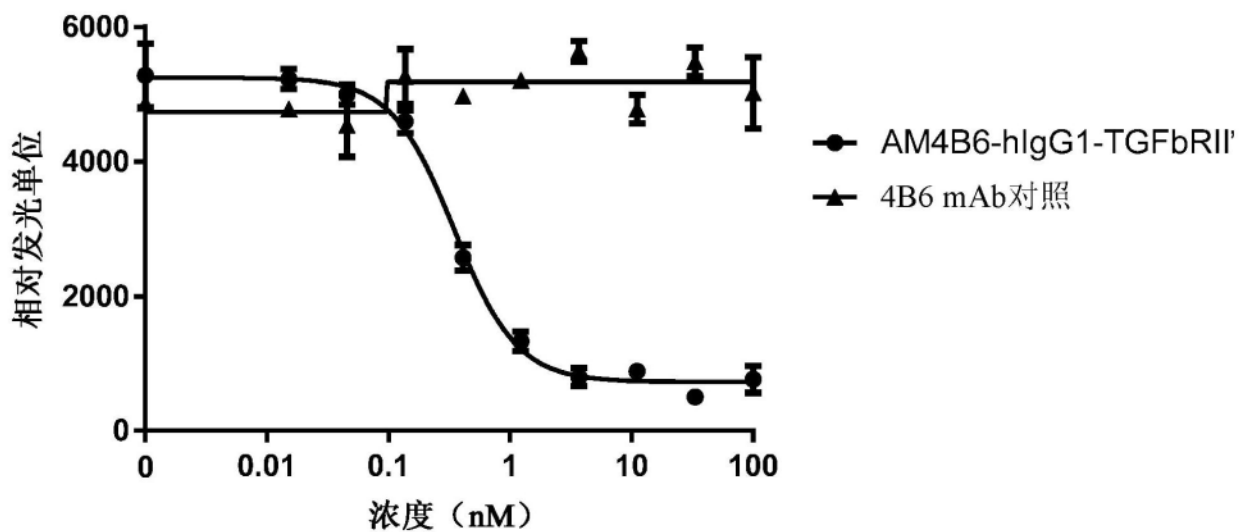


图15

AM4B6-hIgG1-TGFbRII'对结核菌素(TB)刺激的PBMC的影响
(DC供体: TPCS、PB025C、A10K546006)

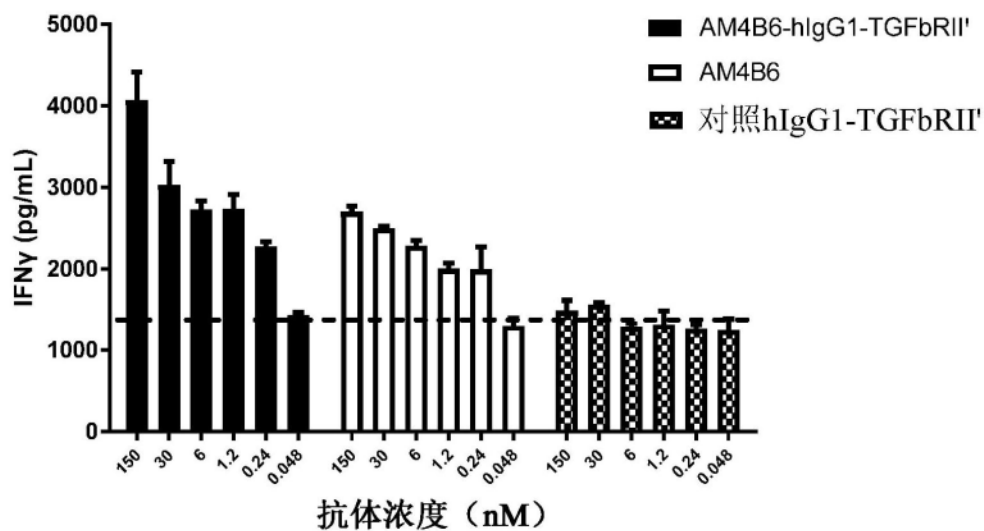


图16

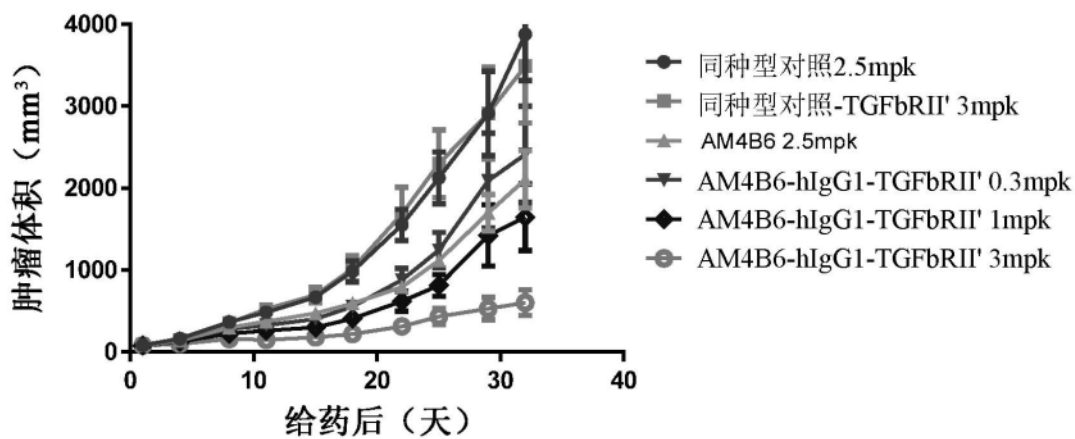


图17A

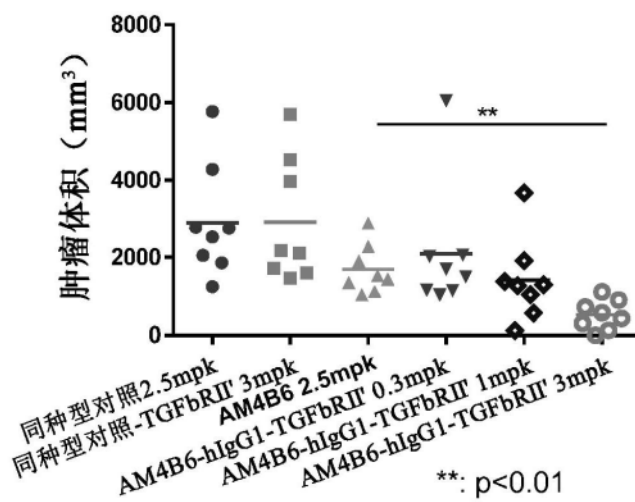


图17B

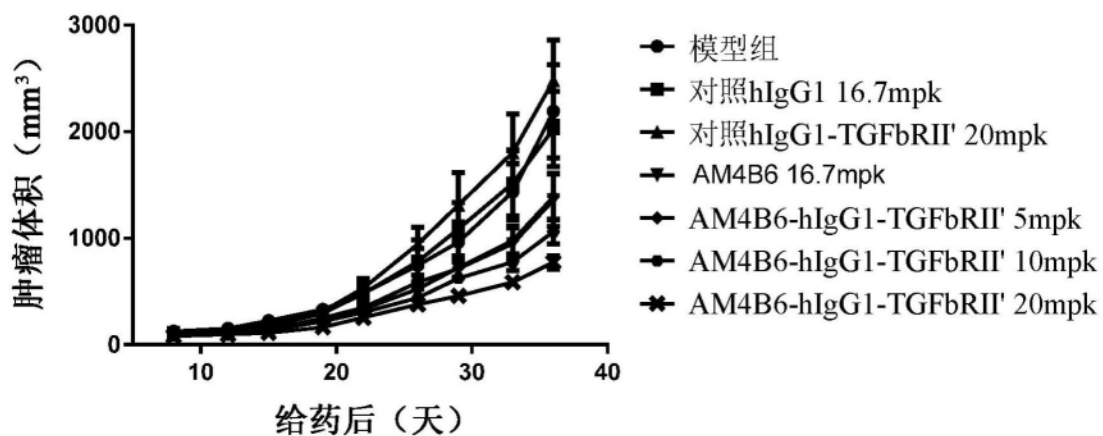


图18A

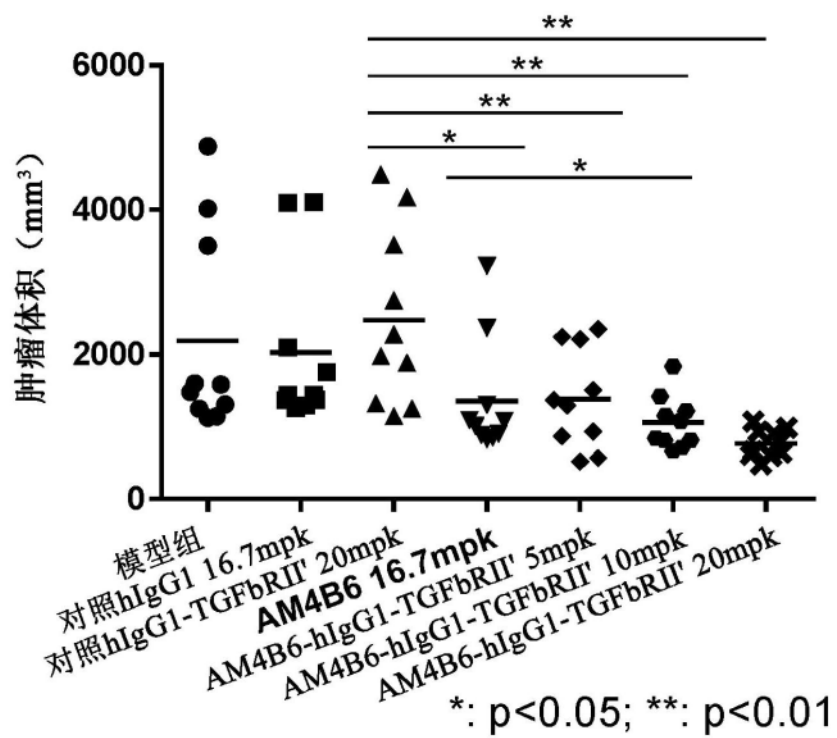


图18B

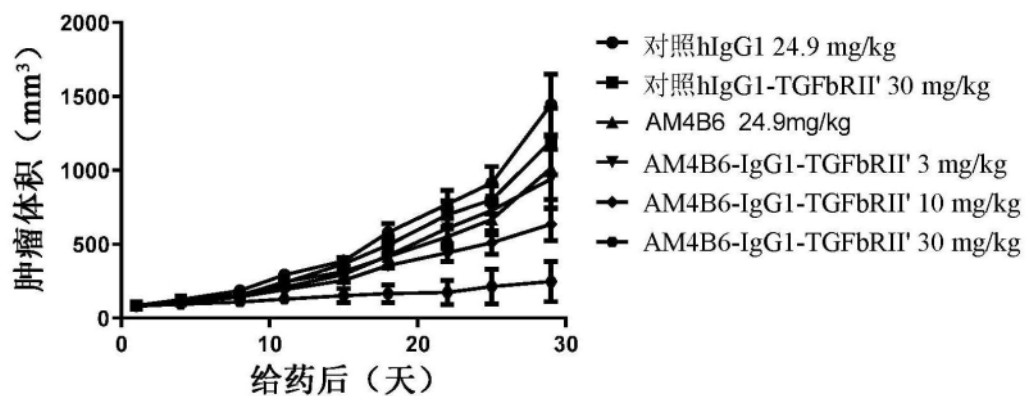


图19A

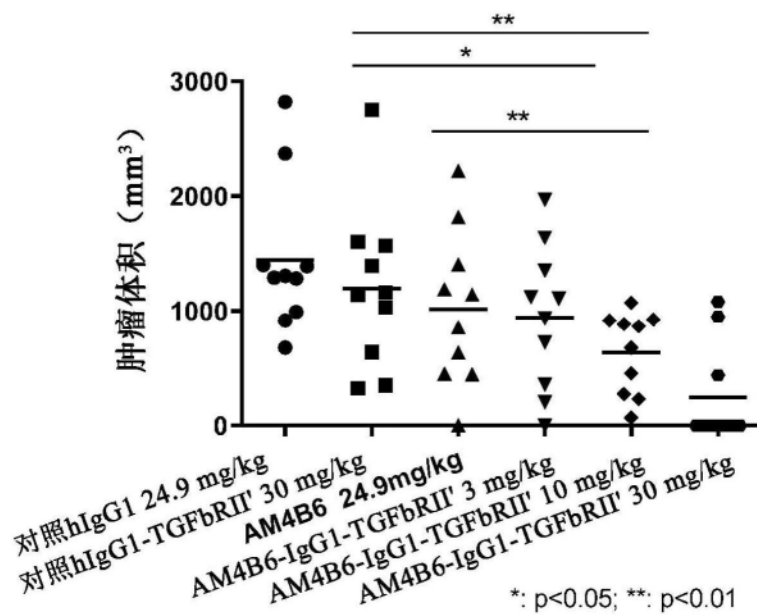


图19B

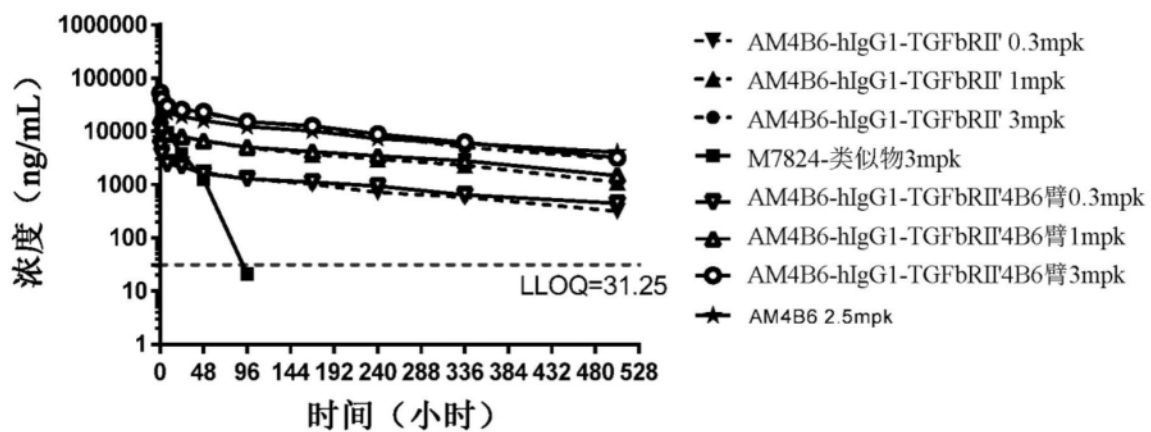


图20A

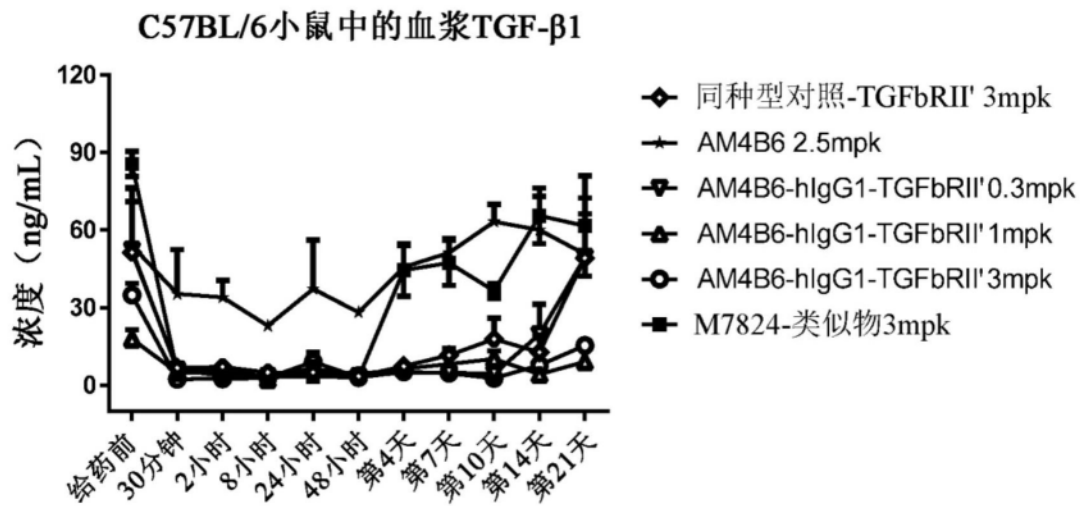


图20B

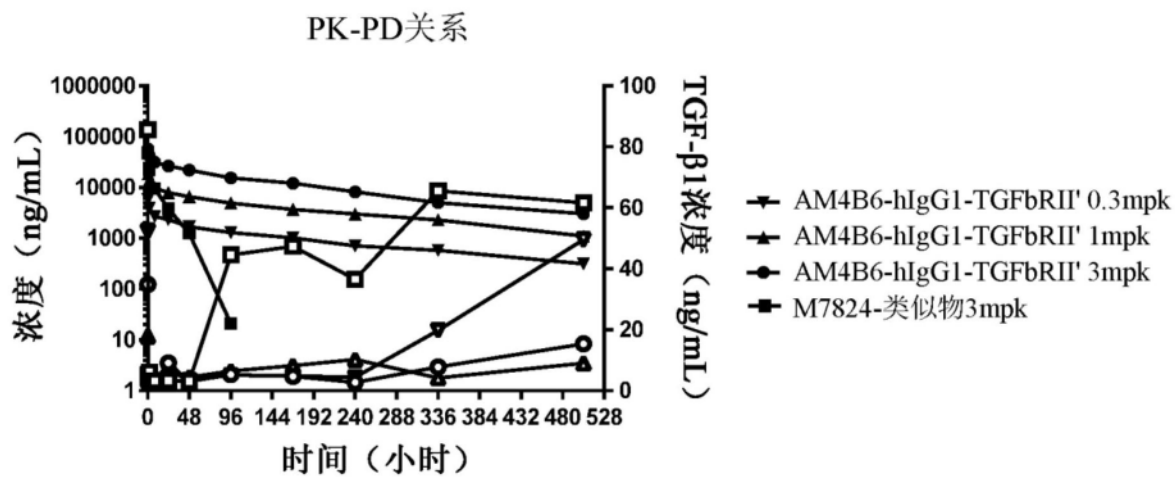


图20C

AM4B6-hIgG1-IL-1RA BsAb与hPD-L1的结合活性

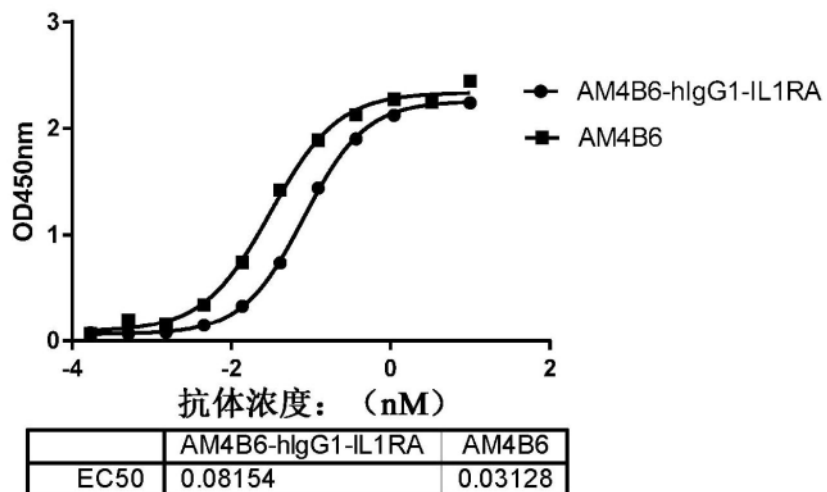


图21

AM4B6-hIgG1-IL-1RA与人PD-L1的结合活性 (FACS)

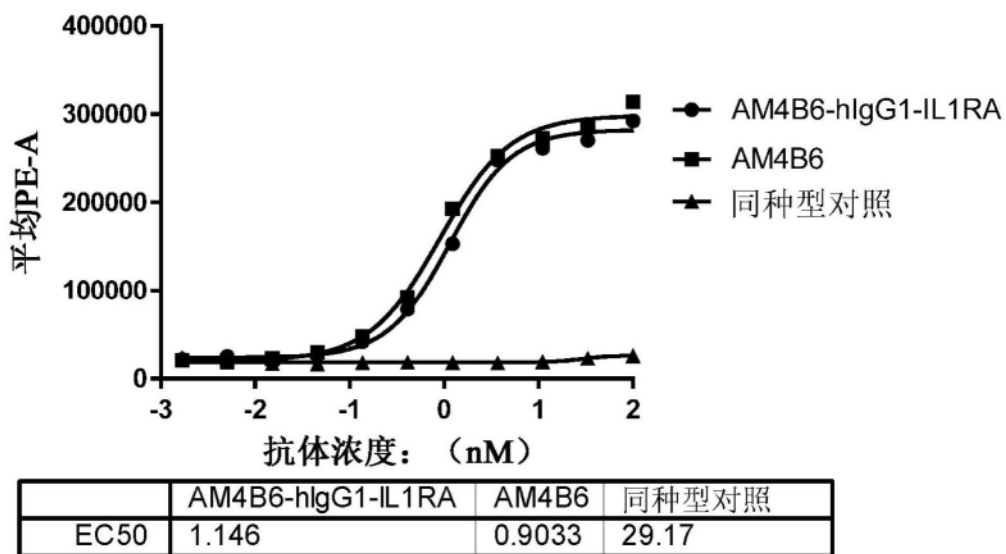
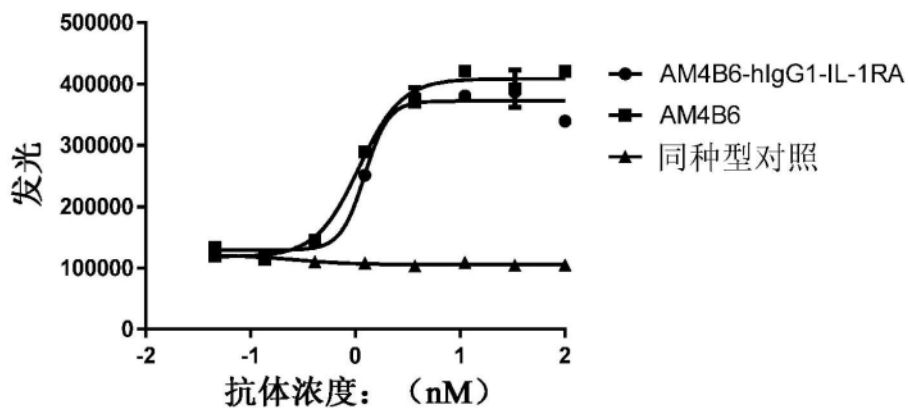


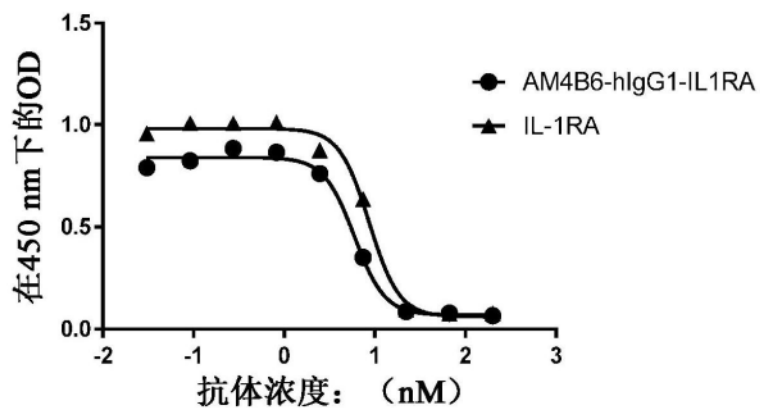
图22

AM4B6-hIgG1-IL-1RA的PD-L1/PD-1阻断活性



	AM4B6-hIgG1-IL-1RA	AM4B6	同种型对照
IC50	1.227	1.083	0.275

图23

AM4B6-hIgG1-IL-1RA的IL-1 β /IL-1R1阻断活性

	IL-1RA	AM4B6-hIgG1-IL-1RA
IC50	8.681	5.947

图24

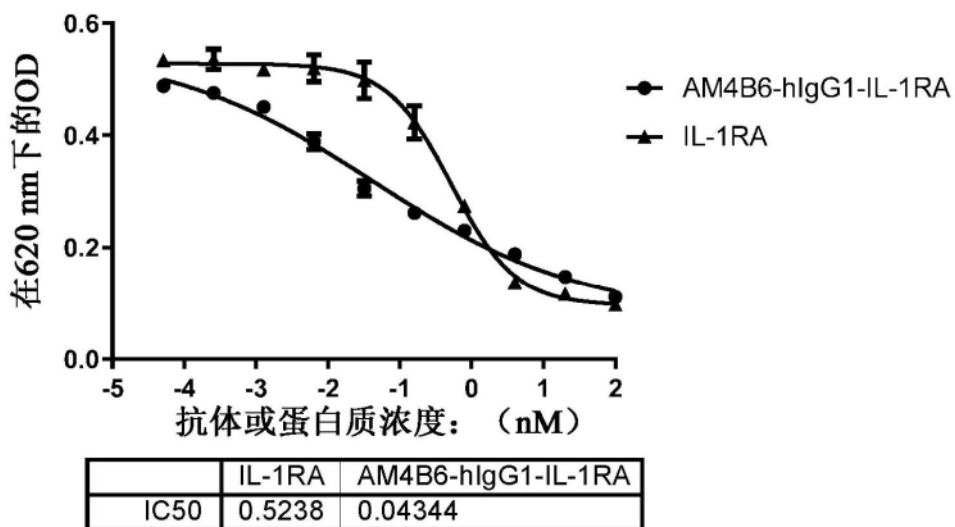
AM4B6-hIgG1-IL-1RA在报告细胞上对IL-1 β 的阻断活性

图25

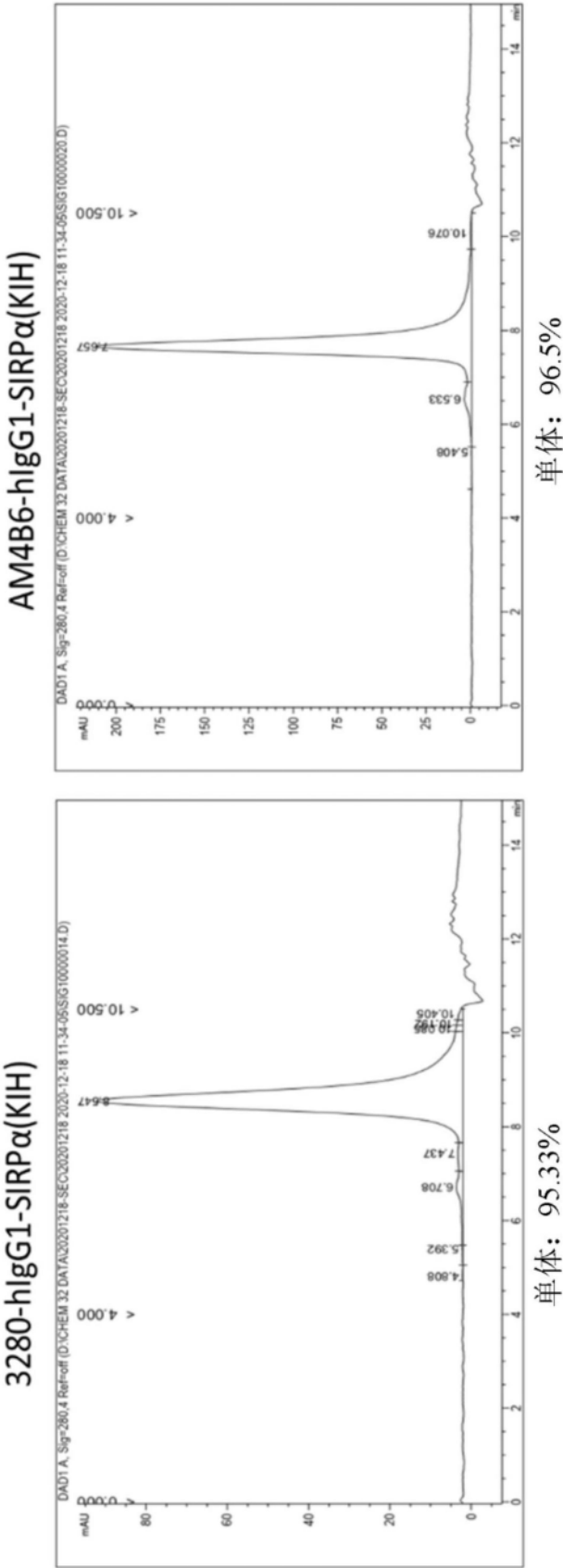
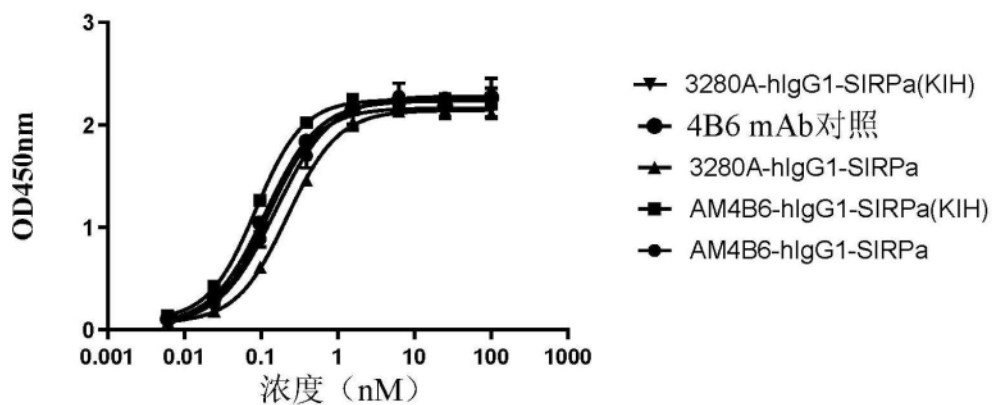
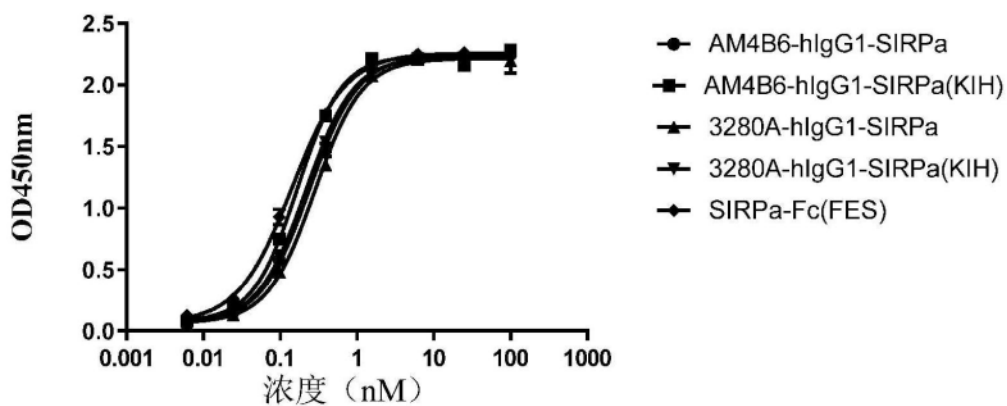


图26



	AM4B6-hlgG1-SIRPa	AM4B6-hlgG1-SIRPa(KIH)	3280A-hlgG1-SIRPa
EC50	0.1537	0.08527	0.2194
	3280A-hlgG1-SIRPa(KIH)	4B6 mAb对照	
EC50	0.1221	0.1140	

图27



	AM4B6-hlgG1-SIRPa	AM4B6-hlgG1-SIRPa(KIH)	3280A-hlgG1-SIRPa
EC50	0.2403	0.1670	0.2820
	3280A-hlgG1-SIRPa(KIH)	SIRPa-Fc(FES)	
EC50	0.2162	0.1417	

图28

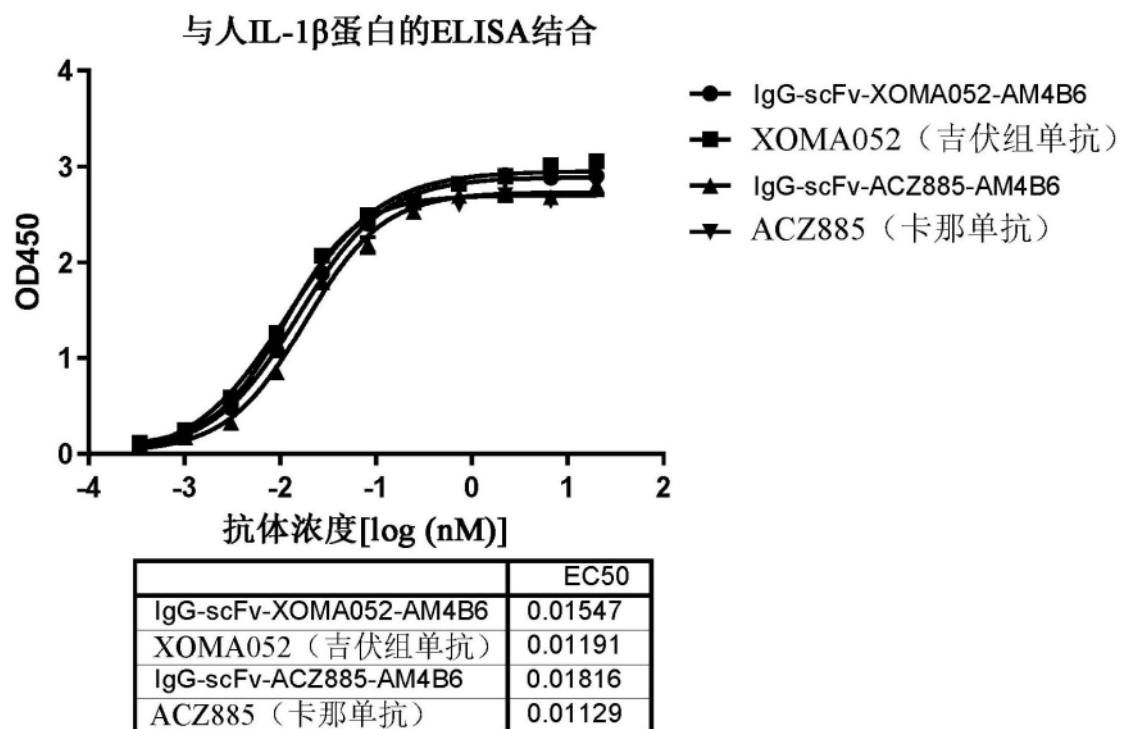


图29

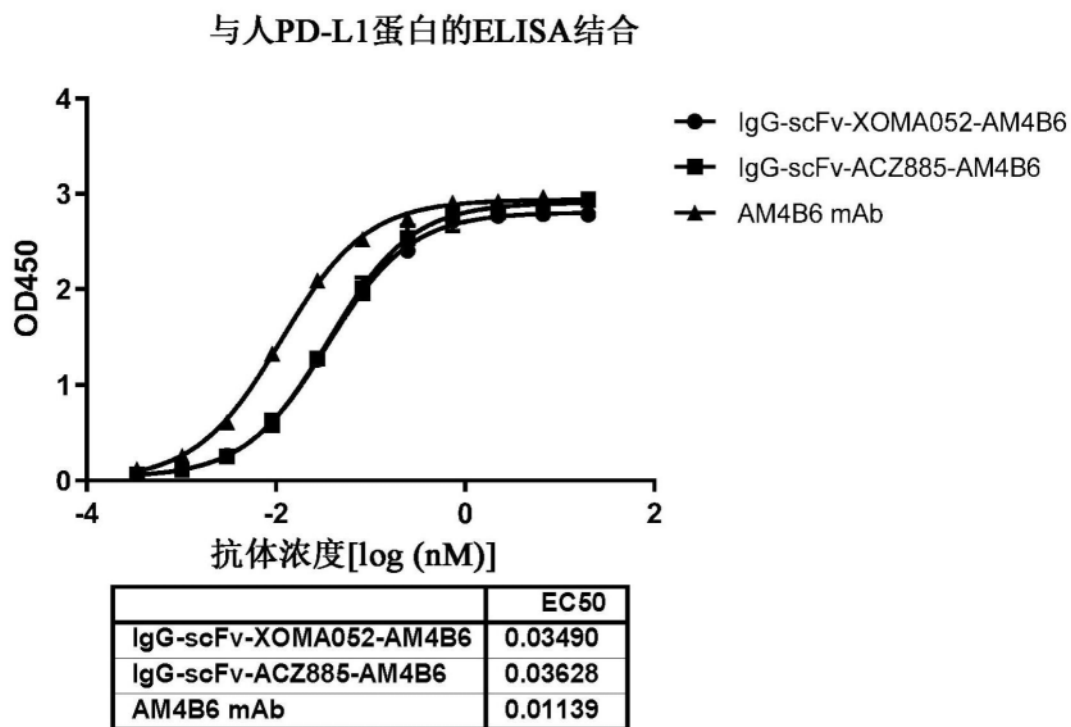


图30

与表达人PD-L1的293T稳定细胞的基于细胞的结合

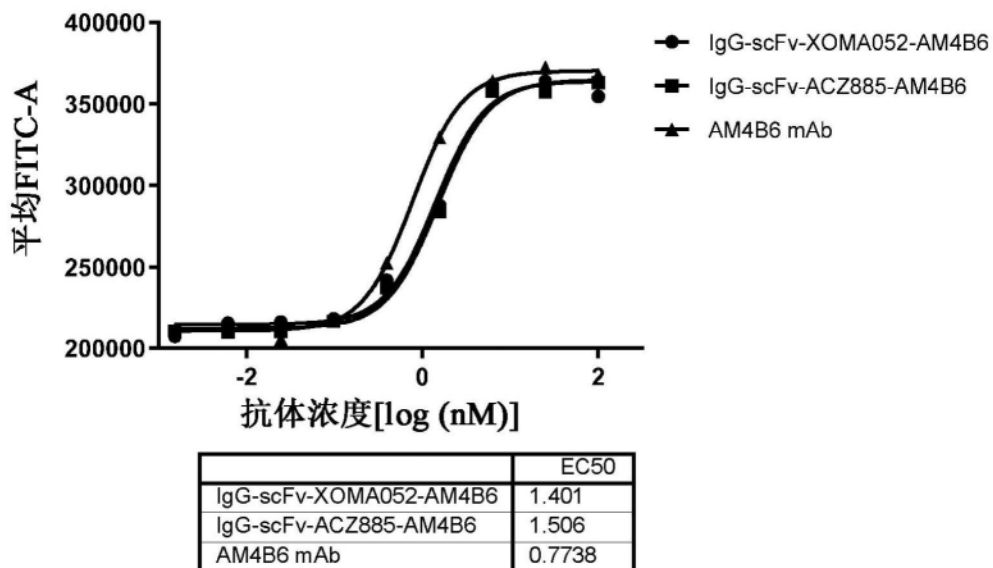


图31

对PD-1/PD-L1相互作用的基于细胞的阻断

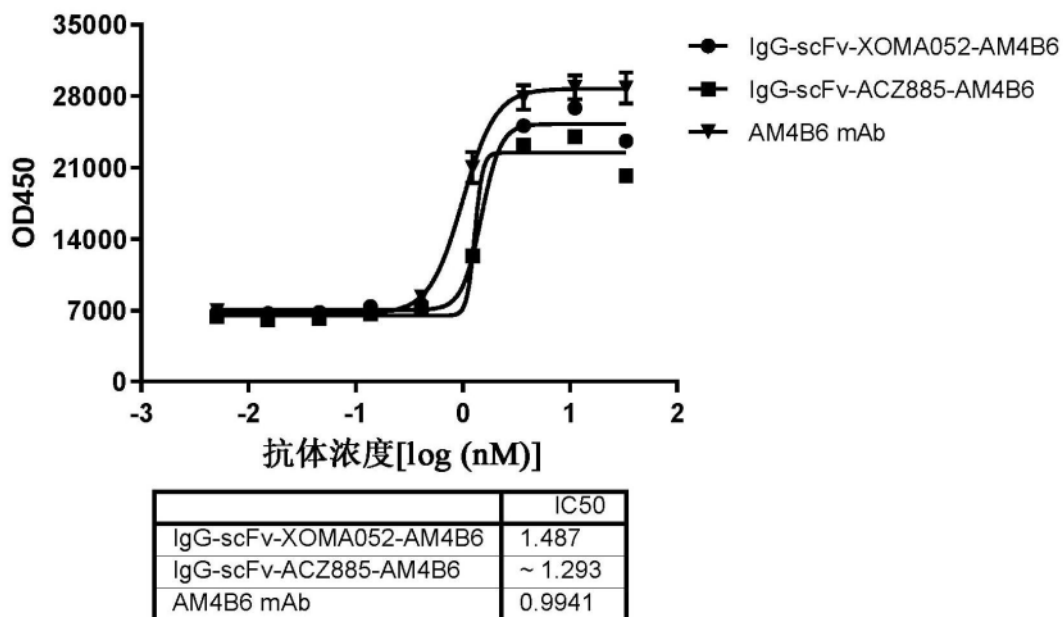


图32

对表达人IL-1R的HDF细胞的基于细胞的阻断

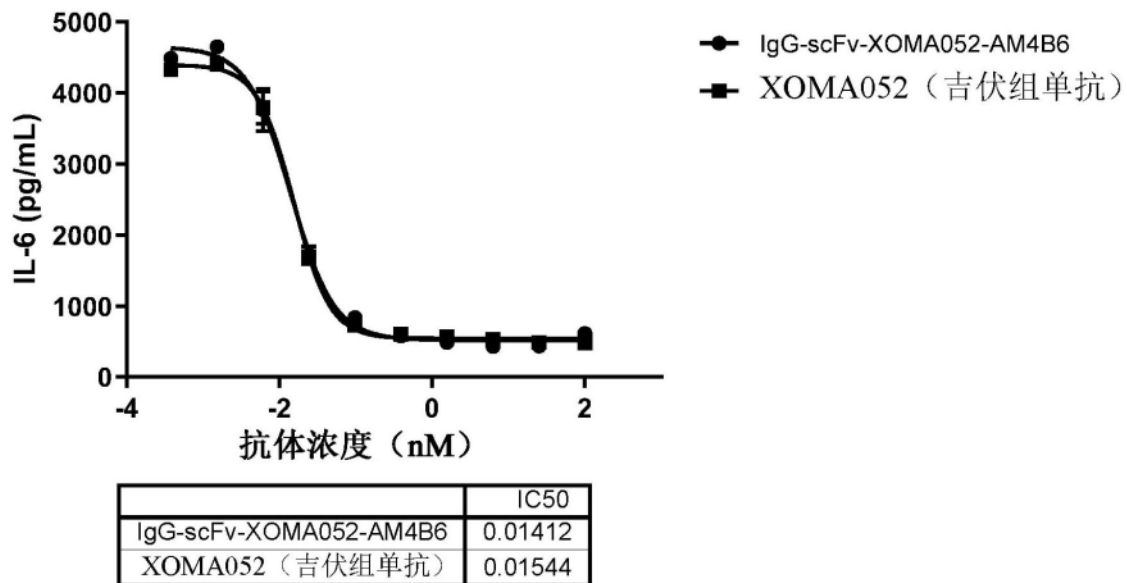


图33

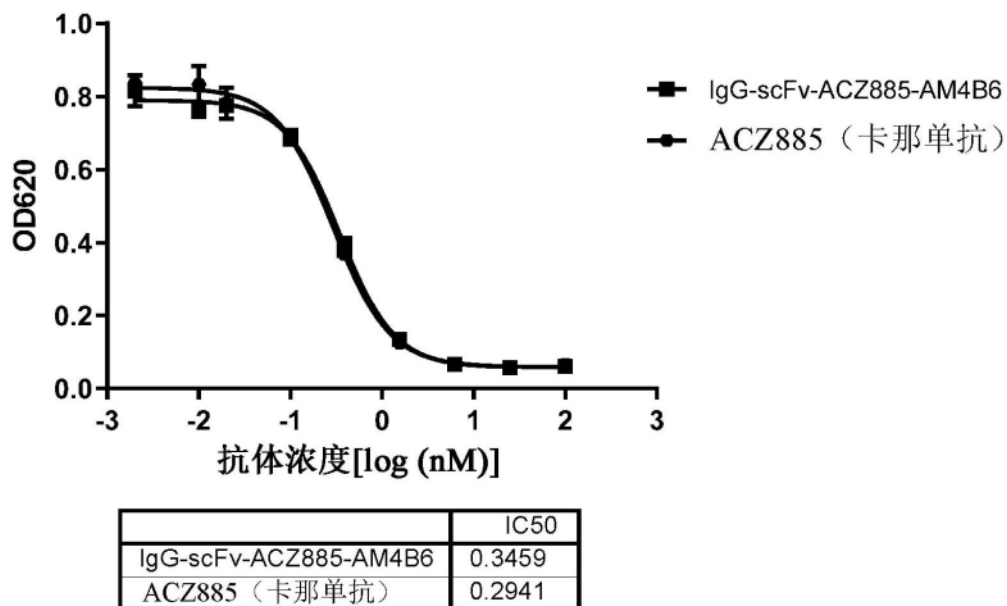
对表达人IL-1R的HEK293-CD40L
报告细胞的基于细胞的阻断

图34