



(10) 授权公告号 CN 112399973 B

(45) 授权公告日 2022.12.16

(21) 申请号 201980037301.2

(22) 申请日 2019.06.04

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112399973 A

(43) 申请公布日 2021.02.23

(66) 本国优先权数据
PCT/CN2018/090012 2018.06.05 CN
PCT/CN2019/086821 2019.05.14 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.03

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2019/089980 2019.06.04

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/233413 EN 2019.12.12

(73) 专利权人 江苏康宁杰瑞生物制药有限公司
地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区
方洲路175号

(72) 发明人 徐霆 郭康平 杨东 王嬿琳
金宇灏 汪晶晶

(74) 专利代理机构 上海巛石知识产权代理事务
所(普通合伙) 31309
专利代理师 张琤

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 106967172 A, 2017.07.21
CN 107400166 A, 2017.11.28

审查员 李岚

权利要求书2页 说明书38页
序列表59页 附图14页

(54) 发明名称

二聚体及其用途

(57) 摘要

本公开提供了由两条多肽链形成的二聚体,其中所述两条多肽链中的每一条都包含抗体Fc亚单位,其中所述二聚体包含两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域(ISVD),所述ISVD中的至少一个能够特异性结合PD-L1,并且所述ISVD中的至少一个能够特异性结合CTLA4。

1. 一种由两条多肽链形成的二聚体,其中所述两条多肽链中的每一条都包含能够特异性结合PD-L1的ISVD和能够特异性结合CTLA4的ISVD;

所述能够特异性结合PD-L1的ISVD包含重链可变结构域,其包含氨基酸序列为SEQ ID NO:3的HCDR1、氨基酸序列为SEQ ID NO:4的HCDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:5的HCDR3;

所述能够特异性结合CTLA4的ISVD包含重链可变结构域,其包含氨基酸序列为SEQ ID NO:17的HCDR1、氨基酸序列为SEQ ID NO:18的HCDR2和氨基酸序列为SEQ ID NO:19的HCDR3。

2. 根据权利要求1所述的二聚体,其中对于所述两条多肽链中的两条:

所述能够特异性结合PD-L1的ISVD通过接头与所述能够特异性结合CTLA4的ISVD融合;
以及

所述能够特异性结合CTLA4的ISVD通过接头与所述抗体Fc亚单位融合。

3. 根据权利要求1所述的二聚体,其中对于所述两条多肽链中的两条:

所述能够特异性结合PD-L1的ISVD的C末端通过接头与所述能够特异性结合CTLA4的ISVD的N末端融合;以及

所述能够特异性结合CTLA4的ISVD的C末端通过接头与所述抗体Fc亚单位的N末端融合。

4. 根据权利要求1所述的二聚体,其中对于所述两条多肽链中的两条:

所述能够特异性结合PD-L1的ISVD通过接头与所述能够特异性结合CTLA4的ISVD融合;
以及

所述能够特异性结合PD-L1的ISVD通过接头与所述抗体Fc亚单位融合。

5. 根据权利要求4所述的二聚体,其中对于所述两条多肽链中的两条:

所述能够特异性结合CTLA4的ISVD的C末端通过接头与所述能够特异性结合PD-L1的ISVD的N末端融合;以及

所述能够特异性结合PD-L1的ISVD的C末端通过接头与所述抗体Fc亚单位的N末端融合。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其中所述抗体Fc亚单位源自IgG Fc亚单位。

7. 根据权利要求6所述的二聚体,其中所述IgG是人IgG1。

8. 根据权利要求6所述的二聚体,其中所述抗体Fc亚单位包含如SEQ ID NO:35、38和39中任一项所示的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其中所述能够特异性结合PD-L1的ISVD能够阻断PD-L1与PD-1的结合。

10. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其中所述能够特异性结合PD-L1的ISVD能够阻断PD-L1与CD80的结合。

11. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其中所述能够特异性结合PD-L1的ISVD包含重链可变结构域,所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

12. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其中所述能够特异性结合CTLA4的ISVD能够与人CTLA4特异性结合。

13. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其中所述能够特异性结合CTLA4的ISVD

能够阻断CTLA4与CD80的结合。

14. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其中所述能够特异性结合CTLA4的ISVD能够阻断CTLA4与CD86的结合。

15. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其中所述能够特异性结合CTLA4的ISVD包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

16. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其为同二聚体。

17. 根据权利要求4所述的二聚体,其中所述接头包含如SEQ ID NO:33-34中任一项所示的氨基酸序列。

18. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其中所述两条多肽链中的一条或两条包含如SEQ ID NO:40-43中任一项所示的氨基酸序列。

19. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其中所述两条多肽链中的一条或两条包含如SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列。

20. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其能够阻断PD-L1与PD-1的结合。

21. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其能够阻断PD-L1与CD80的结合。

22. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其能够阻断CTLA4与CD80的结合。

23. 根据权利要求1-5中任一项所述的二聚体,其能够阻断CTLA4与CD86的结合。

24. 一种免疫缀合物,其包含权利要求1-23中任一项的二聚体。

25. 一种或多种分离的核酸,其编码根据权利要求1-23中任一项的二聚体。

26. 一种或多种载体,其包含根据权利要求25的一种或多种分离的核酸。

27. 一种分离的宿主细胞,其包含根据权利要求25的一种或多种分离的核酸或一种或多种根据权利要求26的载体。

28. 一种用于产生根据权利要求1-23中任一项的二聚体的方法,其包括(i)在实现所述二聚体表达和形成的条件下培养权利要求27的宿主细胞,以及(ii)收获所述形成的二聚体。

29. 一种药物组合物,包含有效量的权利要求1-23中任一项的二聚体或权利要求24的免疫缀合物,以及任选的药学上可接受的赋形剂。

30. 根据权利要求1-23中任一项所述的二聚体、权利要求24所述的免疫缀合物和/或权利要求29所述的药物组合物在制备用于治疗实体瘤的药物中的用途,其中所述实体瘤为黑色素瘤、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、肾癌、肺癌、胰腺癌、腹膜癌和/或子宫癌。

31. 权利要求30所述的用途,其中所述实体瘤为非小细胞肺癌NSCLC、三阴性乳腺癌TNBC和/或肾细胞癌RCC。

32. 根据权利要求1-23中任一项的二聚体、权利要求24的免疫缀合物和/或权利要求29所述的药物组合物在制备用于阻断CD80和/或CD86与CTLA4结合的试剂中的用途。

33. 根据权利要求1-23中任一项的二聚体、权利要求24的免疫缀合物和/或权利要求29所述的药物组合物在制备用于阻断PD1和/或CD80与PD-L1结合的试剂中的用途。

34. 根据权利要求1-23中任一项的二聚体、权利要求24的免疫缀合物和/或权利要求29所述的药物组合物在制备用于刺激免疫细胞分泌IL-2的试剂中的用途。

35. 根据权利要求1-23中任一项的二聚体、权利要求24的免疫缀合物和/或权利要求29所述的药物组合物在制备用于增强受试者中的免疫反应的试剂中的用途。

二聚体及其用途

背景技术

[0001] 阻断PD1/PD-L1相互作用可导致肿瘤特异性T细胞免疫增强,进而导致免疫系统清除肿瘤细胞。程序性死亡配体-1 (PD-L1) 在抗原提呈细胞以及许多人癌细胞上表达,并被证明在与PD-1结合时下调T细胞活化和细胞因子分泌。

[0002] 类似地,消除免疫调节分子诸如细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA4) 代表了通过操控免疫系统诱导肿瘤消退和延长患者生存期的新的有希望的策略。抗CTLA4抗体 (诸如伊匹单抗) 也已被开发并上市用于治疗癌症。

[0003] 最近,显示了使用单独的静脉内剂量的PD1/PD-L1抗体和CTLA4抗体的并行疗法的报道。然而,这些并行疗法有许多缺点。例如,增加了患者的不便,增加了疼痛,并且增加了制造和表征多种试剂的难度。另外,还报告了次优疗效和安全性问题。因此,对于治疗癌症的新的有希望的试剂,特别是能够同时作用于各种靶标的试剂,仍然存在未满足的医学需求。

发明内容

[0004] 本公开提供了包含两个多肽链单体的二聚体,其中所述两个多肽链单体中的每一个都包含抗体Fc亚单位。二聚体包含两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域 (ISVD), 所述ISVD中的至少一个能够特异性结合PD-L1, 并且所述ISVD中的至少一个能够特异性结合CTLA4。本公开还提供了包含所述二聚体的免疫缀合物、产生所述二聚体的方法和包含所述二聚体的药物组合物以及所述二聚体及药物组合物的用途。所述二聚体可用于治疗有需要的受试者的疾病,或用于制备治疗疾病诸如癌症的药物。

[0005] 一方面,本公开提供了二聚体。所述二聚体可由两条多肽链形成,其中两条多肽链中的每一条都包含抗体Fc亚单位。二聚体可包含两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域 (ISVD), 其中所述ISVD中的至少一个能够特异性结合PD-L1, 并且所述ISVD中的至少一个能够特异性结合CTLA4。

[0006] 在一些实施方案中,两条多肽链中的至少一条包含能够特异性结合PD-L1的ISVD和能够特异性结合CTLA4的ISVD。

[0007] 在一些实施方案中,两条多肽链中的每一条都包含能够特异性结合PD-L1的ISVD和能够特异性结合CTLA4的ISVD。

[0008] 在一些实施方案中,对于两条多肽链中的一条或两条,能够特异性结合PD-L1的ISVD任选地通过接头与能够特异性结合CTLA4的ISVD融合。

[0009] 在一些实施方案中,对于两个多肽链中的一条或两个条:能够特异性结合PD-L1的ISVD任选地通过接头与能够特异性结合CTLA4的ISVD融合,并且能够特异性结合CTLA4的ISVD任选地通过接头与抗体Fc亚单位融合。

[0010] 在一些实施方案中,对于两条多肽链中的一条或两条:能够特异性结合PD-L1的ISVD的C末端任选通过接头与能够特异性结合CTLA4的ISVD的N末端融合;并且能够特异性结合CTLA4的ISVD的C末端任选地通过接头与抗体Fc亚单位的N末端融合。

[0011] 在一些实施方案中,对于两条多肽链中的一条或两条:能够特异性结合PD-L1的ISVD任选地通过接头与能够特异性结合CTLA4的ISVD融合;并且能够特异性结合PD-L1的ISVD任选地通过接头与抗体Fc亚单位融合。

[0012] 在一些实施方案中,对于两条多肽链中的一条或两条:能够特异性结合CTLA4的ISVD的C末端任选地通过接头与能够特异性结合PD-L1的ISVD的N末端融合;并且能够特异性结合PD-L1的ISVD的C末端任选地通过接头与抗体Fc亚单位的N末端融合。

[0013] 在一些实施方案中,抗体Fc亚单位源自IgG Fc亚单位,诸如人IgG1。抗体Fc亚单位可包含如SEQ ID NO:35、38和39中的任一个中所示的氨基酸序列。

[0014] 在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD能够与人PD-L1的N末端IgV结构域结合。

[0015] 在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD能够与人PD-L1的残基I54、Y56、E58、Q66和/或R113结合。

[0016] 在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD还能够与人PD-L1的残基D61、N63、V68、M115、S117、Y123和/或R125结合。

[0017] 在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD能够与人PD-L1的构象表位结合,所述构象表位包含人PD-L1的残基I54、Y56、E58、Q66和R113。

[0018] 在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD能够与人PD-L1 N末端IgV结构域的构象表位结合,所述构象表位包含人PD-L1 N末端IgV结构域的残基I54、Y56、E58、Q66、R113、D61、N63、V68、M115、S117、Y123和R125。

[0019] 在一些实施方案中,人PD-L1的N末端IgV结构域包含如SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列。

[0020] 在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD能够阻断PD-L1与PD1的结合。在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD能够阻断PD-L1与CD80的结合。在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD与参考抗PD-L1抗体交叉竞争与PD-L1的结合,参考抗PD-L1抗体包含含有如SEQ ID NO:中所示的氨基酸序列的重链CDR3.1。在一些实施方案中,参考抗PD-L1抗体包含重链CDR3,其包含如SEQ ID NO:5和9中的任一个中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,参考抗PD-L1抗体包含重链CDR1,其包含如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,参考抗PD-L1抗体包含重链CDR1,其包含如SEQ ID NO:3和7中的任一个中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,参考抗PD-L1抗体包含重链CDR2,其包含如SEQ ID NO:4、8和11中的任一个中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,参考抗PD-L1抗体是能够特异性结合PD-L1的ISVD。在一些实施方案中,参考抗PD-L1抗体包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:6、10、12、13、14和15中的任一个中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,参考抗PD-L1抗体包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD包含重链CDR3,其包含如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD包含重链CDR3,其包含如SEQ ID NO:5和9中的任一个中所示的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD包含重链CDR1,其包含如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD包含重链

CDR1,其包含如SEQ ID NO:3和7中的任一个中所示的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD包含重链CDR2,其包含如SEQ ID NO:4、8和11中的任一个中所示的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:6、10、12、13、14和15中的任一个中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0025] 在一些实施方案中,能够特异性结合CTLA4的ISVD能够与人CTLA4特异性结合。

[0026] 在一些实施方案中,能够特异性结合CTLA4的ISVD能够阻断CTLA4与CD80的结合。

[0027] 在一些实施方案中,能够特异性结合CTLA4的ISVD能够阻断CTLA4与CD86的结合。

[0028] 在一些实施方案中,能够特异性结合CTLA4的ISVD与参考抗CTLA4抗体交叉竞争与CTLA4的结合,参考抗CTLA4抗体包含重链CDR3,其包含如SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,参考抗CTLA4抗体包含重链CDR1,其包含如SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,参考抗CTLA4抗体包含重链CDR2,其包含如SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,参考抗CTLA4抗体包含重链CDR2,其包含如SEQ ID NO:18、21和23中的任一个中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,参考抗CTLA4抗体包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:20、22和24-32中的任一个中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,参考抗CTLA4抗体包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,能够特异性结合CTLA4的ISVD包含重链CDR3,其包含如SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列。

[0030] 在一些实施方案中,能够特异性结合CTLA4的ISVD包含重链CDR1,其包含如SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列。

[0031] 在一些实施方案中,能够特异性结合CTLA4的ISVD包含重链CDR2,其包含如SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,能够特异性结合CTLA4的ISVD包含重链CDR2,其包含如SEQ ID NO:18、21和23中的任一个中所示的氨基酸序列。

[0032] 在一些实施方案中,能够特异性结合CTLA4的ISVD包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:20、22和24-32中的任一个中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,能够特异性结合CTLA4的ISVD包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方案中,本公开的二聚体是同二聚体。

[0034] 在一些实施方案中,包含在本公开的二聚体中的接头包含如SEQ ID NO:33-334中的任一个中所示的氨基酸序列。

[0035] 在一些实施方案中,二聚体的两条多肽链中的一条或两条包含如权利要求40-43、46、48和50中的任一个中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,二聚体的两条多肽链中的一条或两条包含SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列。

[0036] 在一些实施方案中,本公开的二聚体能够阻断PD-L1与PD-1的结合。

[0037] 在一些实施方案中,本公开的二聚体能够阻断PD-L1与CD80的结合。

[0038] 在一些实施方案中,本公开的二聚体能够阻断CTLA4与CD80的结合。

[0039] 在一些实施方案中,本公开的二聚体能够阻断CTLA4与CD86的结合。

- [0040] 另一方面,本公开提供了免疫缀合物,其包含本公开的二聚体。
- [0041] 另一方面,本公开提供了一种或多种编码本公开的二聚体的分离的核酸。
- [0042] 另一方面,本公开提供了一种或多种包含一种或多种根据本公开的分离的核酸的载体。
- [0043] 另一方面,本公开提供了分离的宿主细胞,其包含一种或多种根据本公开的分离的核酸。
- [0044] 另一方面,本公开提供了用于产生本公开的二聚体或免疫缀合物的方法。所述方法可包括(i)在影响二聚体的表达和形成的条件下培养本公开的宿主细胞,以及(ii)收获形成的二聚体。
- [0045] 另一方面,本公开提供了药物组合物,其包含有效量的本公开的二聚体、本公开的免疫缀合物以及任选的药理学上可接受的赋形剂。
- [0046] 另一方面,本公开提供了本公开的二聚体、本公开的免疫缀合物或本公开的药物组合物,其用于治疗有需要的受试者的疾病。所述疾病可以是癌症。
- [0047] 另一方面,本公开提供了本公开的二聚体或免疫缀合物在制备用于治疗有需要的受试者的癌症的药物中的用途。
- [0048] 另一方面,本公开提供了治疗有需要的受试者的癌症的方法,其包括给受试者施用有效量的本公开的二聚体或免疫缀合物。
- [0049] 另一方面,本公开提供了阻断CD80和/或CD86与CTLA4结合的方法,其包括施用本公开的二聚体或免疫缀合物。
- [0050] 另一方面,本公开提供了阻断PD1和/或CD80与PD-L1的结合的方法,其包括施用本公开的二聚体或免疫缀合物。
- [0051] 另一方面,本公开提供了刺激免疫细胞分泌IL-2的方法,其包括向免疫细胞施用本公开的二聚体或免疫缀合物。
- [0052] 另一方面,本公开提供了增强受试者免疫应答的方法,其包括向受试者施用本公开的二聚体或免疫缀合物。
- [0053] 根据以下详细描述对于本领域技术人员来说,本公开的其他方面和优点会是显而易见的,其中仅示出和描述了本公开的说明性实施方案。可以预料,本公开能够具有其它和不同的实施方案,并且其多处细节能够在各种明显的方面进行不脱离本公开的修改。因此,附图和描述在本质上被认为是说明性的,而不是限制性的。
- [0054] 通过引用并入
- [0055] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请通过引用并入本文,正如各单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地指出作为参考引入。

附图说明

- [0056] 在所附权利要求中具体列举了本公开的新颖特征。通过参考以下列举其中应用本公开原理的说明性实施方案的详细描述以及对应附图(在本文中也称为“图(figure)”和“图(FIG)”),将获得对本公开的特征和优点的更好理解本公开,其中:
- [0057] 图1说明了本公开的二聚体的实例。
- [0058] 图2A-2F说明了本公开的二聚体与CTLA4或PD-L1的结合。

- [0059] 图2G-2H说明了本公开的二聚体与表达PD-L1或CTLA4的细胞的结合。
- [0060] 图3A-3B说明了本公开的二聚体在阻断PD1与PD-L1的结合中的作用。
- [0061] 图3C说明了本公开的二聚体在阻断CD80与PD-L1的结合中的作用。
- [0062] 图3D-3E说明了本公开的二聚体在阻断CTLA4与CD80的结合中的作用。
- [0063] 图3F说明了本公开的二聚体在阻断CTLA4与CD86的结合中的作用。
- [0064] 图4A-4H说明了本公开的二聚体对PBMC的刺激。
- [0065] 图5A-5B说明了本公开的二聚体在体内对肿瘤生长的抑制。
- [0066] 图6说明了本公开的二聚体的体内pK。
- [0067] 图7说明了在体内肿瘤对本公开的二聚体的摄取。

具体实施方式

[0068] 虽然本文中已经示出和描述了本公开的各种实施方案,但对于本领域技术人员来说,这些实施方案显然仅仅是作为示例提供的。在不脱离本公开的情况下,本领域技术人员可以想到许多变化、改变和替换。应当理解,可采用本文所述的本公开的实施方案的各种替代方案。

[0069] 如本文中所用,术语“免疫缀合物”通常指通过将一种或多种免疫球蛋白相关分子或其片段与一种或多种其他分子缀合而形成的蛋白质性质的分子。所述其他分子可以同为免疫球蛋白相关分子或其片段。在一些情况下,其他分子可以不同于免疫球蛋白相关分子或其片段。所述一种或多种另外的分子可以相同或彼此不同。例如,所述其他分子可以是靶标结合元件和/或效应子元件,诸如毒素或信号分子。

[0070] 如本文中所用,术语“同源性”、“同源的”或“序列同一性”通常指两个或更多个多核苷酸序列之间或两个或更多个多肽序列之间的序列相似性或可互换性。当使用程序(例如,Emboss Needle或BestFit)来确定两个不同氨基酸序列之间的序列同一性、相似性或同源性时,可以使用默认设置,或者可以选择适当的评分矩阵,诸如blosum45或blosum80,以优化同一性、相似性或同源性分数。在一些实施方案中,同源的多核苷酸是那些在严格条件下杂交并且与参考序列具有至少60%、至少65%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%、甚至100%序列同一性的多核苷酸。当长度相当的序列被最佳对齐时,同源的多肽可以彼此具有至少80%、或至少90%、或至少95%、或至少97%、或至少98%、或至少99%的序列同一性。

[0071] 如在本文确定的多肽序列的上下文中所用,术语“序列同一性百分比(%)”通常是指在对齐序列并引入缺口(如有必要)以获得最大的序列同一性百分比之后并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分,查询序列中与第二、参考多肽序列或其部分的氨基酸残基或核苷酸相同的氨基酸残基或核苷酸的百分比。以确定氨基酸/核苷酸序列同一性百分比为目的的比对可以通过本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用公开可用的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE或Megalign (DNASTAR) 软件来实现。本领域技术人员可确定用于测量比对的合适参数,包括在被比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。同一性百分比可以在整个确定的多肽/多核苷酸序列的长度上测量,或者可以在较短的长度上测量,例如,在取自较大的确定的多肽/多核苷酸序列的片段的长度上测量。应当理解,表、图或序列表中由本文所示的序列支持的任何片段长度都可用来描述可在

其上测量百分比同一性的长度。

[0072] 如本文中所用,术语“双特异性抗体”通常指能与单个抗原或两个不同抗原上的两个不同表位结合的抗体。

[0073] 如本文中所用,术语“PD-L1”通常指程序性死亡配体1蛋白、其功能性变体和/或其功能性片段。PD-L1也被称为分化簇274 (CD274) 或B7同源物1 (B7-H1),并且是由CD274基因(人)编码的蛋白质。PD-L1与其受体程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 结合,所述程序性细胞死亡蛋白1在活化的T细胞、B细胞和巨噬细胞中表达 (Ishida等人,1992 *EMBO J*,11:3887-3395;Okazaki等人,Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice.*Science*,2001;291:319-22)。PD-L1与PD-1的复合通过抑制T细胞增殖和细胞因子IL-2和IFN- γ 的产生而发挥免疫抑制作用 (Freeman等人,Engagement of PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation,*J.Exp.Med.*2000,192:1027-1034;Carter等人,PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4⁺ and CD8⁺ T cells and is overcome by IL-2.*Eur.J.Immunol.*2002,32:634-643)。例如,术语“PD-L1”可包括与NCBI登录号Q9NZQ7具有至少约85%氨基酸序列同一性并且特异性结合PD1的多肽或其片段。术语PD-L1包括完整的PD-L1配体、可溶性PD-L1配体和包含与第二元件(如,蛋白质结构域)共价连接的PD-L1配体的功能活性元件的融合蛋白。PD-L1的定义还包括变体,其氨基酸序列与天然存在的PD-L1不同,但保留了与受体PD1特异性结合的能力。在PD-L1定义中,还包括增强PD1生物活性的变体。PD-L1序列在本领域中是已知的,并且例如以GenBank登录号29126提供。如本文中所用,术语“PD-L1”包括人PD-L1 (hPD-L1)、hPD-L1的变体、同种型和物种同源物,以及与hPD-L1具有至少一个共同表位的类似物。例如,术语“PD-L1”还涵盖来自其它物种的PD-L1,诸如其它哺乳动物,例如大鼠、小鼠、兔、非人灵长类动物、猪或牛。完整hPD-L1序列可在GenBank登录号29126下找到。

[0074] 如本文中所用,术语“PD-L1的N末端IgV结构域”通常指位于其N末端的人PD-L1的胞外结构域。术语“人PD-L1的N末端IgV结构域”也可指所述结构域内的表位。人PD-L1蛋白(包括信号肽)的N末端IgV结构域可包含如SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列。

[0075] 如本文中所用,术语“CTLA4”通常指细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4、其功能变体和/或其功能性片段。CTLA4是属于CD28家族的免疫抑制性受体。体内CTLA4只在T细胞 (CD4⁺和CD 8⁺细胞) 上表达,并与两种配体CD80和CD86 (也分别称为B7-1和B7-2) 结合。例如,术语“CTLA4”可包括与NCBI登录号AAL07473.1具有至少约85%的氨基酸序列同一性,并且与CD80和/或CD86特异性结合的多肽或其片段。术语“CTLA4”包括完整的CTLA4受体、其胞外结构域和包含与第二元件(如蛋白结构域)共价连接的CTLA4的功能活性元件的融合蛋白。在CTLA4的定义中,还包括在氨基酸序列上与天然存在的CTLA4不同,但保留了与配体CD80和/或CD86特异性结合的能力的变体。CTLA4序列在本领域中是已知的,如GenBank登录号1493中提供。如本文中所用,术语“CTLA4”包括人CTLA4 (hCTLA4)、hCTLA4的变体、同种型和物种同源物,以及与hCTLA4具有至少一个共同表位的类似物。例如,术语“CTLA4”还涵盖来自其它物种(诸如其它哺乳动物,例如大鼠、小鼠、兔、非人灵长类动物、猪或牛)的CTLA4。完整hCTLA4序列可在GenBank登录号1493下找到。

[0076] 如本文中所用,术语“抗体Fc亚单位”通常指抗体Fc结构域的组分。例如,抗体的Fc

结构域可由两个或更多个成员形成,并且每个成员可被认为是一个Fc亚单位。如本文中使用的,术语“Fc结构域”通常指抗体重链的Fc部分或Fc片段。例如,其可指免疫球蛋白重链恒定区的羧基末端部分,或其能够结合Fc受体的类似物或部分。已知,每个免疫球蛋白的重链恒定区包含四个或五个结构域。所述结构域按如下顺序命名:CH1-铰链-CH2-CH3(-CH4)。CH4存在于无铰链区的IgM中。可用于本公开的Fc结构域或Fc亚单位可包含CH3结构域。例如,Fc结构域或Fc亚单位可包含CH2结构域和CH3结构域。在一些实施方案中,Fc结构域或Fc亚单位还可包含免疫球蛋白铰链区。例如,Fc结构域或Fc亚单位可以从N末端到C末端包含CH2结构域和CH3结构域或由所述CH2结构域和CH3结构域组成。在另一个实例中,Fc结构域或Fc亚单位可以从N末端到C末端包含免疫球蛋白铰链区、CH2结构域和CH3结构域或由所述免疫球蛋白铰链区、CH2结构域和CH3结构域组成。Fc结构域或Fc亚单位内的氨基酸残基位置可以根据Kabat,E.A.等人,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH Publication No.91-3242来确定。

[0077] 如本文中所用,术语“Fc结构域”通常指免疫球蛋白重链的C末端区域,包括天然序列Fc区域和变体Fc区域。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能有所不同,但人IgG重链Fc区通常被定义为从Cys226位的氨基酸残基或从Pro230延伸到其羧基末端。Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)例如,可在抗体产生或纯化过程中除去,或者通过重组工程化编码抗体重链的核酸除去。因此,完整抗体的组合物可包括去除了所有K447残基的抗体群、未去除K447残基的抗体群、以及具有含和不含K447残基的抗体混合物的抗体群。适用于本公开抗体的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。

[0078] 除非本文另有指示,免疫球蛋白链中残基的编号是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版公共卫生服务,国家卫生研究院受体,Bethesda,Md.(1991)中的EU指数的编号。“Kabat EU指数”是指人IgG1 EU抗体的残基编号。

[0079] 如本文中所用,术语“二聚体”通常指由两个通常是非共价结合的单体单元形成的大分子聚合物。每个单体单元可以是分子,诸如多肽链或多核苷酸。如本文中所用,术语“同二聚体”通常指由两种基本上相同的单体,诸如两条基本上相同的多肽链组成或形成的二聚体。在一些情况下,同二聚体的两个单体在一个或多个区域或位置上可以不同,然而,这种差异不会引起单体的功能或结构的显著改变。例如,本领域的普通技术人员将认为在本公开所考虑的生物学特征背景下,两种单体之间的差异几乎没有或没有生物学和/或统计学意义。所述两种单体之间的结构/组成差异可以例如小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约10%、小于约5%或更小。

[0080] 如本文中所用,术语“融合的”或“融合”通常指两个多肽之间的共价键联。所述多肽通常通过肽键连接,或者直接相互连接,或者通过氨基酸接头连接。任选地,所述肽可通过本领域技术人员已知的非肽共价键联连接。

[0081] 如本文中所用,术语“融合蛋白”通常是指包含与异源多肽(即,与前一多肽或其结构域无关的多肽)的氨基酸序列直接或间接(例如,通过接头)融合的多肽的氨基酸序列,或可选地由其组成的多肽。

[0082] 如本文中所用,术语“免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)”通常指抗原结合结构域或片段,诸如分别为VHH结构域或VH或VL结构域。术语抗原结合分子或抗原结合蛋白可互换使用,并且还包括术语纳米抗体。免疫球蛋白单可变结构域还可以是轻链可变结构域序列(例

如,VL序列),或重链可变结构域序列(例如,VH序列);更具体地,其可以是源自常规四链抗体的重链可变结构域序列或源自重链抗体的重链可变结构域序列。因此,免疫球蛋白单可变结构域可以是结构域抗体或适于用作结构域抗体的免疫球蛋白序列、单结构域抗体或适于用作单结构域抗体的免疫球蛋白序列、“dAb”或适于用作dAb的免疫球蛋白序列、或包括但不限于VHH序列的纳米抗体。免疫球蛋白单可变区包括全人序列、人源化序列、以其它方式序列优化的序列或嵌合免疫球蛋白序列。免疫球蛋白单可变结构域和免疫球蛋白单可变结构域的结构可被认为由四个框架区或“FR”组成,然而不限于此,所述框架区在本领域中分别被称为“框架区1”或“FR1”、“框架区2”或“FR2”、“框架区3”或“FR3”以及“框架区4”或“FR4”;所述框架区被三个互补决定区或“CDR”打断,所述互补决定区在本领域中被分别称为“互补决定区1”或“CDR1”、“互补决定区2”或“CDR2”和“互补决定区3”或“CDR3”。

[0083] 如本文中所用,术语“人源化的”通常指抗体或其片段,其中非人抗体的CDR结构域外的一些、大部分或全部氨基酸被源自人免疫球蛋白的相应氨基酸替代。例如,在抗体的人源化形式中,CDR结构域外的一些、大部分或全部氨基酸已被来自人免疫球蛋白的氨基酸替代,然而一个或多个CDR区内的一些、大部分或全部氨基酸没有改变。氨基酸的小的添加、缺失、插入、取代或修饰是允许的,只要其不破坏抗体与其特异性抗原/表位结合的能力。人源化抗体可保持与原始抗体相似的抗原特异性。

[0084] 如本文中所用,术语“表位”或“抗原决定簇”通常指抗体所结合的抗原上的位点。表位可以由连续氨基酸(线性表位)形成或通过蛋白质的三级折叠而毗邻的不连续氨基酸(构象表位)形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常以独特的空间构象包括至少3个,更通常至少5个或8-10个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括,例如,x射线晶体学和二维核磁共振。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,Glenn E.Morris编辑(1996)。

[0085] 如本文中所用,术语“构象表位”通常是指通过蛋白质的三级折叠而毗邻的抗原(诸如PD-L1抗原)的非连续氨基酸残基。当多肽链折叠形成天然蛋白质时,这些非连续的氨基酸残基可汇聚在表面。构象表位包含但不限于功能性表位。

[0086] 如本文中所用,术语“功能性表位”通常是指活跃地促成抗体的结合,即形成“活跃表位”的抗原的氨基酸残基。任一个抗原的活跃促进性残基突变为丙氨酸都将会破坏抗体的结合,使得抗体的KD相对比值(KD突变型/KD野生型)可以是例如大于2倍,如大于3倍、大于4倍、大于6倍、大于10倍、大于20倍、大于30倍、大于40倍、大于50倍、大于60倍、大于70倍、大于80倍、大于90倍、大于100倍、大于150倍、大于200倍或更多。

[0087] 如本文中所用,术语“胞外结构域”通常指从细胞器和/或细胞的外膜突出的蛋白质(例如,膜蛋白如受体)的部分。如果多肽链数次穿过双层膜,则胞外结构域包括缠绕穿过膜的环。胞外结构域可识别特定的配体并对其做出反应。

[0088] 如本文中所用,术语“接头”通常指连接或联接两个多肽序列(例如联接两个多肽结构域)的合成氨基酸序列。接头可以通过肽键连接两个氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的接头以线性序列将生物活性部分与第二部分连接。例如,肽接头可以是非免疫原性的和柔性的,诸如那些包含丝氨酸和甘氨酸序列或Ala-Ala-Ala重复序列的肽接头。取决于二聚体的特定构建体,肽接头可以包含例如3-30个(诸如至少3个、至少4个、至少5个、至

少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26、至少27个、至少28个、至少29个、至少30个)氨基酸残基。

[0089] 如本文中所用,术语“N末端”可以与“N端”互换使用,它们通常指多肽链的氨基端/末端。

[0090] 术语“C末端”可与“C端”互换使用,如本文中所用,它们通常指多肽链的羧基端/末端。

[0091] 如本文中所用,术语“PBMC细胞”通常指外周血单核细胞,其可包括淋巴细胞(T细胞、B细胞、NK细胞)和单核细胞。可以使用Ficoll(分离血层的亲水性多聚糖)和/或梯度离心(其可将血液分离成顶层血浆,然后是一层PBMC和底层多形核细胞(诸如嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞)和红细胞)从全血中提取这些细胞。

[0092] 如本文中所用,术语“有效量”通常是指足以提供足够高的浓度以对其受体产生有益效果的剂量。任何特定受试者的具体治疗有效剂量水平可取决于多种因素,包括所治疗的病症、病症的严重性、具体组分的活性、施用途径、清除率、治疗持续时间、受试者的年龄、体重、性别、饮食和一般健康状况以及其它相关因素。

[0093] 如本文中所用,术语“药学上可接受的赋形剂”通常指与药物施用相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0094] 如本文中所用,术语“宿主细胞”通常指个体细胞、细胞系或细胞培养物,其可以是或已经是受试质粒或载体的受体,包含本公开的分离的核酸,或表达本公开的二聚体。宿主细胞可包括单个宿主细胞的后代。由于自然的、偶然的或有意的突变,后代可能不一定与原始亲代细胞完全相同(在形态上或在总DNA互补的基因组上)。宿主细胞可包括用本公开的载体体外转染的细胞。宿主细胞可以是细菌细胞(例如大肠杆菌(E.coli))、酵母细胞或其它真核细胞,例如COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、HEK293细胞、COS-1细胞、NS0细胞或骨髓瘤细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是HEK293细胞。

[0095] 如本文中所用,术语“载体”通常指能够在合适的宿主中自我复制的核酸分子,其将插入的核酸分子转移到宿主细胞中和/或在宿主细胞之间转移。该术语可包括主要用于将DNA或RNA插入细胞的载体,主要用于DNA或RNA复制的复制载体,以及用于DNA或RNA转录和/或翻译的表达载体。还包括提供不止一个上述功能的载体。“表达载体”是当被引入到合适的宿主细胞中时可被转录并翻译成一种或多种多肽的多核苷酸。“表达系统”通常意指包含可用于产生所需表达产物的表达载体的合适的宿主细胞。

[0096] 如本文中所用,术语“分离的核酸”通常是指从其天然环境中分离,或人工合成的,任何长度的分离形式的核苷酸(无论是脱氧核糖核苷酸还是核糖核苷酸),或其类似物。

[0097] 如本文中所用,术语“癌症”通常指任何临床可检测程度的肿瘤生长或转移。癌症可以是实体瘤、血液学癌症或淋巴瘤。例如,癌症可以选自肺癌(诸如非小细胞肺癌)、乳腺癌(诸如三阴性乳腺癌)、肾癌(诸如肾细胞癌)、黑色素瘤、宫颈癌、子宫癌、胰腺癌、腹膜癌、卵巢癌和结肠癌。癌症可以是晚期或转移性癌症。

[0098] 如本文中所用,术语“IL-2”或“IL2”通常指白细胞介素-2、其功能变体和/或其功能性片段。术语“IL2”包括人IL-2(hIL-2),以及来自其它物种(诸如其它哺乳动物,如例大

鼠、小鼠、兔、非人灵长类动物、猪或牛)的IL-2。hIL-2如Genbank Submission,NCBI登录号P60568描述。术语“IL-2”也可以指能够刺激hIL-2依赖性溶细胞性和辅助T细胞系增殖的多肽,如Gillis,S.等人,J.Immunol.(1978)120:2027-2032和Watson,J.,J.Exp.Med.(1979)150:1510-1519的标准测定中所列举。

[0099] 如本文中所用,术语“免疫细胞”通常是指免疫系统的细胞。免疫细胞可能包括参与保护身体免受传染病和/或外来病原体侵害的细胞。免疫细胞可包括先天免疫系统的细胞和适应性免疫系统的细胞。免疫细胞可包括白血球(leukocytes)或白细胞(leucocytes),诸如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞。可对更多的亚型进行分类;例如,在淋巴细胞中,有B细胞、T细胞和天然杀伤(NK)细胞。

[0100] 如本文中所用,术语“受试者”通常指人或非人动物,包括但不限于猫、狗、马、猪、牛、羊、山羊、兔子、小鼠、大鼠或猴子。

[0101] 如本文中所用,术语“约”通常是指在本领域正常公差范围内的变化,并且通常是指在所述值的 $\pm 10\%$ 内,诸如9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%内。除非另从上下文中清楚得知,否则本文提供的所有数值都用术语“约”来修饰。

[0102] 如本文中所用,术语“与其特异性结合”或“对其特异”通常是指可测量和可再现的相互作用,诸如靶标与抗体之间的结合,其决定了在包括生物分子在内的异质分子群体存在的情况下靶标的存在。例如,与靶标(其可以是表位)特异性结合的抗体是以比其与其它靶标结合更大的亲和力、亲合力、更容易和/或更长的持续时间结合该靶标的抗体。在一个实施方案中,抗体与无关靶标的结合程度小于约10%的抗体与靶标的结合,如通过放射免疫测定法(RIA)测量的。在某些实施方案中,与靶标特异性结合的抗体具有 $<1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $<1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $<1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $<1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或 $<1 \times 10^{-10} \text{M}$ 的解离常数(KD)。在某些实施方案中,抗体与在不同物种的蛋白质中保守的蛋白质表位特异性结合。在另一个实施方案中,特异性结合可包括但不限于要求排他性结合。

[0103] 如本文中所用,术语“抗体”通常指免疫球蛋白或其片段或衍生物,并且涵盖任何包含抗原结合位点的多肽,无论其是在体外还是在体内产生的。该术语包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体、非特异性抗体、人源化抗体、单链抗体、嵌合抗体、合成抗体、重组抗体、杂交抗体、突变抗体和嫁接抗体(grafted antibody)。除非另外用术语“完整的”修饰,如在“完整的抗体”中,出于本公开的目的,术语“抗体”还包括抗体片段,诸如Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv、scFv、Fd、dAb及其它保留抗原结合功能(即与例如CTLA-4或PD-L1特异性结合的能力)的抗体片段。典型地,此类片段将包含抗原结合结构域。

[0104] 基本的4链抗体单元是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成的异四聚糖蛋白。IgM抗体由5个基本异四聚体单元和称为J链的另一多肽组成,并且含有10个抗原结合位点,而IgA抗体包含2-5个基本4链单元组成,其可以聚合形成与J链结合的多价组装体。在IgG的情况下,4链单元通常约为150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键与H链连接,而两条H链通过一个或多个二硫键相互连接,这取决于H链的同种型。每条H和L链也有规则间隔的链内二硫桥。每条H链在N端具有可变结构域(VH),在每条 α 和 γ 链中随后是三个恒定结构域(CH),以及在 μ 和 ϵ 同种型中是四个CH结构域。每条L链的N端具有可变结构域(VL),然后另一端具有恒定结构域。VL与VH对齐,CL与重链的第一个恒定区(CH1)对齐。特定氨基

酸残基被认为在轻链可变结构域与重链可变结构域之间形成界面。VH和VL的配对一起形成单个抗原结合位点。不同种类抗体的结构和性质,参见,例如,Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Sties,Abba I.Terr和Tristram G.Parslow(编辑),Appleton&Lange,Norwalk,Conn.,1994,第71页和第6章。任何脊椎动物物种的L链都可根据其恒定区的氨基酸序列分为两种明显不同的类型,称为 κ 和 λ 。根据其重链恒定结构域(CH)的氨基酸序列,免疫球蛋白可被分为不同的类别或同种型。有五类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,分别命名为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。基于CH的序列和功能的相对较小差异, γ 类和 α 类被进一步分为亚类,例如,人表达以下亚类:IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1和IgK1。

[0105] 如本文中所用,术语“多肽链”通常指包含两个或更多个共价连接的肽的大分子。多肽链中的肽可通过肽键相互连接。每条多肽链可包含一个N末端或氨基端和一个C末端或羧基端。

[0106] 如本文中所用,术语“CD80”通常指CD28/CTLA4的配体(也称为B7.1)、其功能变体和/或其功能性片段。CD80通过在专职抗原呈递细胞(APC)的表面表达。例如,术语“CD80”可包括与NCBI登录号P33681具有至少约85%氨基酸序列同一性,并且特异性结合CTLA4的多肽或其片段。CD80的定义还包括在氨基酸序列上与天然存在的CD80不同但保留与CTLA4特异性结合的能力的变体。CD80的定义还包括增强CTLA4生物活性的变体。CD80序列在本领域中是已知的,并且在例如GenBank登录号P33681下提供。如本文中所用,术语“CD80”包括人CD80(hCD80)、hCD80的变体、同种型和物种同源物,以及与hCD80具有至少一个共同表位的类似物。例如,术语“CD80”还包括来自其它物种(诸如其它哺乳动物,例如大鼠、小鼠、兔、非人灵长类动物、猪或牛)的CD80。完整的hCD80序列可在GenBank登录号P33681下找到。

[0107] 如本文中所用,术语“CD86”通常指CD28/CTLA4的配体(也称为B7.2)、其功能变体和/或其功能片段。CD86通常在专职抗原呈递细胞(APC)的表面表达。例如,术语“CD86”可包括与NCBI登录号P42081具有至少约85%氨基酸序列同一性并且特异性结合CTLA4的多肽或其片段。CD86的定义还包括在氨基酸序列与天然存在的CD86不同但保留与CTLA4特异性结合的能力的变体。CD86的定义还包括增强CTLA4生物活性的变体。CD86序列在本领域是已知的,并且例如在GenBank登录号U04343下提供。如本文中所用,术语“CD86”包括人CD86(hCD86)、hCD86的变体、同种型和物种同源物,以及与hCD86具有至少一个共同表位的类似物。例如,术语“CD86”还涵盖来自其它物种(诸如其它哺乳动物,例如大鼠、小鼠、兔、非人灵长类动物、猪或牛)的CD86。完整的hCD86序列可在GenBank登录号U04343下找到。

[0108] 如本文中所用,术语“PD1”通常指程序性死亡-1受体(也称为CD279)、其功能变体和/或其功能性片段。PD1通常在T细胞、B细胞、天然杀伤T细胞、活化的单核细胞和树突状细胞(DC)上表达。PD1可与其配体PD-L1和PD-L2结合。例如,术语“PD1”可包括与NCBI登录号P42081具有至少约85%氨基酸序列同一性并且特异性结合PD-L1的多肽或其片段。PD1的定义还包括在氨基酸序列上与天然存在的PD1不同但保留与PD-L1特异性结合的能力的变体。PD1的定义中还包括增强PD-L1的生物活性的变体。PD1序列在本领域是已知的,并且例如在GenBank登录号Q15116.3下提供。如本文中所用,术语“PD1”包括人PD1(hPD1)、hPD1的变体、同种型和物种同源物,以及与hPD1具有至少一个共同表位的类似物。例如,术语“PD1”还涵盖来自其它物种(诸如其它哺乳动物,例如大鼠、小鼠、兔、非人灵长类动物、猪或牛)的PD1。

完整的hPD1序列可在GenBank登录号Q15116.3下找到。

[0109] 如本文中所用,术语“阻断”通常指抑制或降低分子与其特异性结合配偶体之间,诸如配体与其特异性受体之间的结合活性。

[0110] 术语“阻断抗体”和“拮抗抗体”在本文中可互换使用,通常指抑制或降低其结合的抗原的生物活性的抗体。在一些实施方案中,阻断抗体或拮抗抗体基本上或完全抑制抗原的生物活性。本公开的能够特异性结合PD-L1的ISVD或能够特异性结合CTLA4的ISVD可以是阻断性或拮抗性ISVD。例如,本公开的能够特异性结合PD-L1的ISVD可阻断PD-L1与其受体PD-1之间的相互作用,从而阻断通过PD-L1的信号传导,从而使T细胞从对抗原刺激的功能障碍状态恢复至功能性反应。本公开的CTLA4特异性ISVD可阻断CTLA4与CD80/CD86之间的相互作用,从而阻断通过CTLA4的信号传导,从而使T细胞从对抗原刺激的功能障碍状态恢复至功能性反应。

[0111] 术语“交叉竞争结合”、“交叉竞争”、“交叉阻断”、“被交叉阻断的”和“使交叉阻断的”在本文中可互换使用,通常是指抗体或其片段通过变构调节直接或间接干扰本公开的另一种抗体(例如,本公开的能够特异性结合PD-L1的ISVD或能够特异性结合CTLA4的ISVD)与靶标/抗原(例如,分别为PD-L1或CTLA4)结合的能力。抗体或其片段能够干扰另一种抗体与靶标的结合的程度,以及因此根据本公开其是否可被认为交叉阻断或交叉竞争,可使用竞争性结合测定法来确定。一种特别合适的交叉竞争定量测定,使用基于FACS或基于AlphaScreen的方法来测量标记的(例如His标记的、生物素化的或放射性标记的)抗体或其片段和另一种抗体或其片段之间在其与靶标的结合方面的竞争。通常,交叉竞争性抗体或其片段是,例如在交叉竞争测定中在测定过程中以及在第二抗体或其片段存在的情况下,所述抗体与靶标结合,使得根据本公开的免疫球蛋白单可变结构域或多肽的记录取代高达由以给定量存在的待测的潜在交叉阻断抗体或其片段产生的最大理论取代(例如,由需要被交叉阻断的(未标记的)抗体或其片段产生的取代)的100%(例如,在基于FACS的竞争性测定中)。优选地,交叉竞争性抗体或其片段的记录取代在10%与100%之间,例如在50%与100%之间。

[0112] 如本文中所用,术语“显著减少的”或“显著不同的”通常指两个数值(通常一个与分子相关,另一个与参考/比较分子相关)之间足够高的差异程度,使得本领域技术人员将认为这两个值之间的差异在由所述值(例如,KD值)测量的生物特征的上下文中有生物学意义和/或统计显著性。相比参考/比较分子的值,所述两个值之间的差异例如大于约10%、大于约20%、大于约30%、大于约40%和/或大于约50%。

[0113] 如本文中所用,术语“基本上相似”或“基本上相同”通常指两个数值(例如,一个与本公开的分子相关,另一个与参考/比较分子相关)之间足够高的相似程度,使得本领域技术人员将认为两个值之间的差异在由所述值(例如,KD值)测量的生物特征的上下文几乎无或无生物学意义和/或统计显著性。相比参考/比较分子的值,所述两个值之间的差值例如小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%和/或小于约10%。

[0114] 如本文中所用,术语“增强免疫应答”通常指诱导、引起或刺激免疫细胞(诸如T细胞或PBMC细胞)具有持续或增强的生物功能,或更新或重新激活衰竭或无活性的免疫细胞。增强免疫细胞功能的实例包括:相对于干预前的此类水平,PBMC细胞分泌的IL-2增加,增殖增加,抗原反应性增加例如,病毒或病原体清除)。增加的水平可以为至少30%,例如至少

40%，至少50%，至少60%，至少70%，至少80%，至少90%，至少100%，至少120%，至少150%，或至少200%。测量这种增加的方式是本领域普通技术人员已知的。

[0115] 如本文中所用，术语抗体的“可变区”或“可变结构域”通常指抗体重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可分别称为“VH”和“VL”。这些结构域通常是抗体中最易变的部分（相对于同类的其它抗体），并包含抗原结合位点。

[0116] 如本文中所用，术语“可变的”通常是指抗体中可变结构域的某些片段在序列上有很大的差异的事实。V结构域介导抗原结合，并确定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而，可变性并不是均匀地分布在可变域的整体跨度上。相反，其集中在轻链和重链可变区中的三个称为高变区（CDR或HVR）的区段中。可变结构域中更高度保守的部分被称为框架区（FR）。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区，主要采用 β -折叠构型，由三个CDR连接，这形成连接 β -折叠结构的环，在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的CDR由FR区紧密地保持在一起，并且与来自另一条链的CDR一起，促成抗体的抗原结合位点的形成（参见Kabat等人，*Sequences of Immunological Interest*，第5版，National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)）。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但表现出各种效应子功能，诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0117] 如本文中所用，术语“CDR”、“HVR”或“HV”通常是指抗体可变结构域的区域，其序列高度可变的和/或形成结构上确定的环。通常，抗体包含六个CDR；三个在VH中（HCDR1、HCDR2、HCDR3），三个在VL中（LCDR1、LCDR2、LCDR3）。本公开的ISVD可以仅包括3个CDR（例如，在VH中有HCDR1、HCDR2和HCDR3）。在天然抗体中，HCDR3和LCDR3在六种CDR中表现出最大的多样性，尤其是HCDR3被认为在赋予抗体良好的特异性方面起着独特的作用。参见，例如，Xu等人，*Immunity* 13:37-45 (2000)；Johnson和Wu，*Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo编辑，Human Press, Totowa, N.J., 2003)。事实上，仅由重链组成的天然存在的骆驼抗体在轻链不存在的情况下有功能并且稳定。参见，例如，Hamers-Casterman等人，*Nature* 363:446-448 (1993)；Sheriff等人，*Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)。

[0118] 许多CDR描述正在使用中并且涵盖于本文中。Kabat互补决定区（CDR）基于序列可变性，是最常用的（Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版公共卫生服务，国家卫生研究院公共卫生服务，国家卫生研究院受体，Bethesda, Md. (1991)）。相反Chothia指的是结构环的位置（Chothia和Lesk，*J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)）。AbM CDR代表了Kabat HVR与Chothia结构环之间的折衷，并且被Oxford Molecular's AbM抗体建模软件使用。

[0119] “接触”CDR基于对可用复杂晶体结构的分析。下面显示来自这些CDR中的各残基：

[0120]

环	Kabat	AbM	Chothia	接触
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
HCDR1 (Kabat编号)	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
HCDR1 (Chothia编号)	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0121] CDR可包含如下的“扩展CDR”：VL中的24-36或24-34 (LCDR1)、46-56或50-56 (LCDR2) 和89-97或89-96 (LCDR3)，VH中的26-35 (HCDR1)、50-65或49-65 (HCDR2) 和93-102、94-102或95-102 (HCDR3)。对于这些定义中的每一个，根据Kabat等人(同上)对可变结构域残基进行编号。

[0122] 表述“根据Kabat的可变结构域残基编号”或“根据Kabat的氨基酸位置编号”及其变化形式，通常指Kabat等人(同上)中用于二聚体/多肽链的编制的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。对于给定的多肽，可通过在同源区域将多肽的序列与Kabat编号的“标准”序列进行比对来确定残基的Kabat编号。

[0123] “框架”或“FR”残基是指除本文定义的CDR残基之外的那些可变结构域残基。“人通用框架”或“人受体框架”是代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常出现的氨基酸残基的框架。通常，人免疫球蛋白VL或VH序列选自可变结构域序列的亚组。通常，序列的亚组是如Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版公共卫生服务, 国家卫生研究院公共卫生服务, 国家卫生研究院受体, Bethesda, Md. (1991) 中的亚组。例如，对于VL，所述亚组可以是如Kabat等人(同上)中的kappa I、kappa II、kappa III或kappa IV亚组。另外，对于VH，所述亚组可以是如Kabat等人(同上)中的亚组I、亚组II或亚组III。或者，人通用框架可源自上述框架，其中特定残基(诸如人框架残基)是通过将供体框架序列与各种人框架序列的集合比对，基于其与供体框架的同源性来选择的。“源自”人免疫球蛋白框架或人通用框架的受体人框架可包含其相同的氨基酸序列，或者其可包含预先存在的氨基酸序列变化。在一些实施方案中，预先存在的氨基酸变化的数量为10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、或2个或更少。

[0124] 在本公开中，特定SEQ ID NO. 中所示的氨基酸序列或核苷酸序列还涵盖其的与其具有基本上相同的功能/性质的同源物或变体。例如，与其具有至少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%或更高序列同一性的序列；和/或具有一个或多个(例如，几个，诸如1-10个、1-9个、1-8个、1-7个、1-6个、1-5个、1-4个、1-3个、1-2个)氨基酸或核苷酸添加、缺失或取代的变体。

[0125] 二聚体、免疫缀合物、分离的多核苷酸、载体和宿主细胞

[0126] 一方面，本公开提供了二聚体。所述二聚体可由两条多肽链形成，其中两条多肽链中的每一条都包含抗体Fc亚单位。例如，二聚体可由两条多肽链组成，其中每条多肽链包含抗体Fc亚单位，并且一条多肽链的抗体Fc亚单位可以与另一条多肽链的抗体Fc亚单位缔合形成二聚体。在实例中，二聚体的两条多肽链不彼此融合(例如，通过肽接头或通过肽键)而成为单个多肽链。

[0127] 二聚体可包含两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域 (ISVD)。例如，二聚体的一条多肽链可包含两个或更多个ISVD，而二聚体的另一条多肽链不包含任何ISVD。在另一个实例中，两条多肽链中的每一条可包含一个或多个ISVD。在另一个实例中，两条多肽链中的每一条可以包含两个或更多个ISVD。

[0128] ISVD中的至少一个可能特异性结合PD-L1，ISVD中的至少一个可能特异性结合CTLA4。例如，二聚体的一条多肽链可包含一个或多个能够特异性结合PD-L1的ISVD和一个或多个能够特异性结合CTLA4的ISVD，而二聚体的另一条多肽链不包含任何ISVD。在另一

个实例中,二聚体的一条多肽链可包含一个或多个能够特异性结合PD-L1的ISVD,二聚体的另一条多肽链可包含一个或多个能够特异性结合CTLA4的ISVD。在另一个实例中,二聚体的一条多肽链可包含一个或多个能够特异性结合PD-L1的ISVD和一个或多个能够特异性结合CTLA4的ISVD,二聚体的另一个多肽链可包含一个或多个能够特异性结合PD-L1的ISVD和/或一个或多个能够特异性结合CTLA4的ISVD。

[0129] 所述一个或多个能够特异性结合PD-L1的ISVD可以相同或不同。所述一个或多个能够特异性结合CTLA4的ISVD可以相同或不同。

[0130] 在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD不包含任何抗体轻链CDR。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD不包含任何抗体轻链可变区。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD不包含任何抗体轻链或其任何片段。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD至少包含重链CDR3。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD包含重链CDR1。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD包含重链CDR2。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD至少包含重链可变区。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD是抗PD-L1 VHH。可对能够特异性结合PD-L1的ISVD进行源化。

[0131] 在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD不包含任何抗体轻链CDR。在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD不包含任何抗体轻链可变区。在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD不包含任何抗体轻链或其任何片段。在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD至少包含重链CDR3。在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD包含重链CDR1。在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD包含重链CDR2。在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD包含重链可变区。在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD是抗CTLA4 VHH。能够特异性结合CTLA4的ISVD可以是人源化的。

[0132] 在一些情况下,两条多肽链中的至少一条可同时包含能够特异性结合PD-L1的ISVD和能够特异性结合CTLA4的ISVD。例如,两条多肽链中的一条可包含一个或多个能够特异性结合PD-L1的ISVD和一个或多个能够特异性结合CTLA4的ISVD。在另一个实例中,两条多肽链中的每一条可包含一个或多个能够特异性结合PD-L1的ISVD和一个或多个能够特异性结合CTLA4的ISVD。

[0133] 对于两条多肽链中的一条或两条,能够特异性结合PD-L1的ISVD可任选地通过接头与能够特异性结合CTLA4的ISVD融合。例如,在两条多肽链中的一条或两条中,可存在一个或多个能够特异性结合PD-L1的ISVD,以及一个或多个能够特异性结合CTLA4的ISVD。当单个多肽链中存在两个或更多个能够特异性结合PD-L1的ISVD时,它们可以彼此融合(例如,直接地或通过肽接头),并且它们中的一个或多个可以进一步与一个或多个能够特异性结合CTLA4的ISVD融合。当在单个多肽链中存在两个或更多个能够特异性结合CTLA4的ISVD时,它们可以彼此融合(例如,直接地或通过肽接头),并且它们中的一个或多个可进一步与一个或多个能够特异性结合PD-L1的ISVD融合。一个或多个接头(例如,肽接头)可以存在于任意两个ISVD之间,例如,两个对L1特异的ISVD之间,两个能够特异性结合CTLA4的ISVD之间,或者一个能够特异性结合PD-L1的ISVD与一个能够特异性结合CTLA4的ISVD之间。

[0134] 对于两条多肽链中的一条或两条,能够特异性结合PD-L1的ISVD可以任选地通过接头与能够特异性结合CTLA4的ISVD融合;并且能够特异性结合CTLA4的ISVD又可以任选地通过接头与抗体Fc亚单位融合。例如,在单个多肽链中,能够特异性结合PD-L1的ISVD可以

直接(例如,框内)或通过接头与能够特异性结合CTLA4的ISVD融合,以及能够特异性结合CTLA4的ISVD可以直接(例如,框内)或通过接头与抗体Fc亚单位融合。当在单个多肽链中存在不止一个能够特异性结合PD-L1的ISVD和/或不止一个能够特异性结合CTLA4的ISVD时,能够特异性结合PD-L1的ISVD和能够特异性结合CTLA4的ISVD可按照任何顺序直接或通过接头彼此融合,并且至少一个能够特异性结合CTLA4的ISVD可直接(例如,框内)或通过接头与抗体Fc亚单位融合。例如,对于两条多肽链中的一条或两条,能够特异性结合PD-L1的ISVD的C端可以任选地通过接头与能够特异性结合CTLA4的ISVD的N端融合;并且能够特异性结合CTLA4的ISVD的C端可以任选地通过接头与抗体Fc亚单位的N末端融合。例如,在单个多肽链中,能够特异性结合PD-L1的ISVD之一的C端可以直接(例如,框内)或通过接头与能够特异性结合CTLA4的ISVD之一的N端融合,并且能够特异性结合CTLA4的ISVD之一的C端可以直接(例如,框内)或通过接头与抗体Fc亚单位的N端融合。在实施例中,当在单个多肽链中存在不止一个能够特异性结合PD-L1的ISVD和/或不止一个能够特异性结合CTLA4的ISVD时,能够特异性结合PD-L1的ISVD和能够特异性结合CTLA4的ISVD可按照任何顺序直接或通过接头彼此融合,然而,至少一个能够特异性结合PD-L1的ISVD的C端可以直接(例如,框内)或通过接头与至少一个能够特异性结合CTLA4的ISVD的N末端融合,并且至少一个能够特异性结合CTLA4的ISVD的C端可以直接(例如,框内)或通过接头与抗体Fc亚单位的N端融合。

[0135] 对于两条多肽链中的一条或两条,能够特异性结合CTLA4的ISVD可以任选地通过接头与能够特异性结合PD-L1的ISVD融合;并且能够特异性结合PD-L1的ISVD又可以任选地通过接头与抗体Fc亚单位融合。例如,在单个多肽链中,能够特异性结合CTLA4的ISVD可以直接(例如,框内)或通过接头与能够特异性结合PD-L1的ISVD融合,并且能够特异性结合PD-L1的ISVD可以直接(例如,框内)或通过接头与抗体Fc亚单位融合。当在单个多肽链中存在不止一个能够特异性结合PD-L1的ISVD和/或不止一个能够特异性结合CTLA4的ISVD时,能够特异性结合PD-L1的ISVD和能够特异性结合CTLA4的ISVD可按照任何顺序直接(例如,框内)或通过接头彼此融合,并且至少一个能够特异性结合PD-L1的ISVD可以直接(例如,框内)或通过接头与抗体Fc亚单位融合。例如,对于两条多肽链中的一条或两条,能够特异性结合CTLA4的ISVD的C端可以任选地通过接头与能够特异性结合PD-L1的ISVD的N端融合;并且能够特异性结合PD-L1的ISVD的C端可以任选地通过接头与抗体Fc亚单位的N端融合。例如,在单个多肽链中,能够特异性结合CTLA4的ISVD之一的C端可以直接(例如,框内)或通过接头与能够特异性结合PD-L1的ISVD之一的N端融合,并且能够特异性结合PD-L1的ISVD的C端可以直接(例如,框内)或通过接头与抗体Fc亚单位的N端融合。在实例中,当在单个多肽链中存在不止一个能够特异性结合PD-L1的ISVD和/或不止一个能够特异性结合CTLA4的ISVD时,能够特异性结合PD-L1的ISVD和能够特异性结合CTLA4的ISVD可按照任何顺序直接(例如,框内)或通过接头彼此融合,然而,至少一个能够特异性结合CTLA4的ISVD的C端可以直接(例如,框内)或通过接头与至少一个能够特异性结合PD-L1的ISVD的N端融合,并且至少一个能够特异性结合PD-L1的ISVD的C端可以直接(例如,框内)或通过接头与抗体Fc亚单位的N端融合。

[0136] 本申请中采用的接头(例如,肽接头)(例如,如由本申请的二聚体包含的)可以是合成氨基酸序列,其例如通过肽键连接或联接两个多肽序列。例如,肽接头可包含1-10个氨基酸(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个氨基酸)、1-15个氨

基酸(例如,1-10个、11个、12个、13个、14个或15个氨基酸)、1-20个氨基酸(例如,1-15个、16个、17个、18个、19个或20个氨基酸)、1-30个氨基酸或更多个氨基酸(例如,1-20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个氨基酸)。例如,肽接头可包含如SEQ ID NO:33-34中的任一个中所示的氨基酸序列。

[0137] 抗体Fc亚单位可源自IgG Fc亚单位。例如,IgG可选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在一些实施方案中,IgG是人IgG1,并且IgG Fc亚单位是人IgG1 Fc亚单位。在一些实施方案中,Fc亚单位包含与如SEQ ID NO:35、38和39中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少80%(例如,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少100%)同一性的氨基酸序列。例如,Fc亚单位可包含在如SEQ ID NO:35、38和39中的任一个中所示的氨基酸序列中具有一个或多个(例如,1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多个)氨基酸缺失、插入和/或取代的氨基酸序列。

[0138] 在一些实施方案中,Fc亚单位可以是IgG Fc亚单位的变体(例如,人IgG1 Fc亚单位的变体)。例如,变体可包含一个或多个氨基酸突变,其增强或降低ADCC或CDC活性。作为另一个实例,变体可包含一个或多个氨基酸突变,其影响包含变体的分子的结合活性和/或半衰期。作为又一个实例,变体可包含一个或多个氨基酸突变,其影响两个或更多个Fc亚单位(或Fc单体)之间的相互作用(例如,缔合)和/或增加或降低Fc异二聚体形成的效率,例如,变体可包含如在CN102558355A、CN103388013A、CN105820251A或CN106883297A(其每一个通过引用并入本文)中所述的氨基酸取代中的一个或多个。

[0139] 能够特异性结合PD-L1的ISVD可以能够与人PD-L1特异性结合。例如,能够特异性结合PD-L1的ISVD可以能够与人PD-L1的胞外结构域中的表位特异性结合。此类表位在本领域中是已知的,例如,如由Gang Hao等人,J.Mol.Recognit.2015;28:269-276,Zhang等人,Oncotarget.2017Oct;08(52):90215-90224和Zhang等人,Cell Discov.2017Mar 7;3:17004中所示的。

[0140] 例如,能够特异性结合PD-L1的ISVD可以能够与人PD-L1的N末端IgV结构域结合。PD-L1的N末端IgV结构域(包括信号肽)可以包含如SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列。在本公开中,能够特异性结合PD-L1的ISVD可以能够与人PD-L1 N末端IgV结构域的残基I54、Y56、E58、Q66和/或R113结合。在具体的实施方案中,能够特异性结合PD-L1的ISVD能够与人PD-L1 N末端IgV结构域的残基I54、Y56、E58、Q66和R113(例如,SEQ ID NO:64的氨基酸残基I54、Y56、E58、Q66和/或SEQ的R113)结合。能够特异性结合PD-L1的ISVD可以能够进一步与人PD-L1 N末端IgV结构域的残基D61、N63、V68、M115、S117、Y123和/或R125(例如,SEQ ID NO:64的氨基酸残基D61、N63、V68、M115、S117、Y123和/或R125)结合。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD可以能够与人PD-L1 N末端IgV结构域的残基I54、Y56、E58、Q66、R113、D61、N63、V68、M115、S117、Y123和/或R125(例如,SEQ ID NO:64的氨基酸残基I54、Y56、E58、Q66、R113、D61、N63、V68、M115、S117、Y123和/或R125)结合。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD能够与人PD-L1 N末端IgV结构域的构象表位结合,该构象表位可包含人PD-L1 N末端IgV结构域的残基I54、Y56、E58、Q66和/或R113(例如,SEQ ID NO:64的氨基酸残基I54、Y56、E58、Q66和/或R113)。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD能够

结合人PD-L1 N末端IgV结构域的构象表位,该构象表位可包含人PD-L1 N末端IgV结构域的残基I54、Y56、E58、Q66、R113、D61、N63、V68、M115、S117、Y123和/或R125(例如,SEQ ID NO:64的氨基酸残基I54、Y56、E58、Q66、R113、D61、N63、V68、M115、S117、Y123和/或R125)。

[0141] 本公开的能够特异性结合PD-L1的ISVD(例如,PD-L1 ISVD-9及其人源化变体)与人PD-L1的N末端IgV结构域结合。以PD-L1 ISVD-9为例,PD-L1 ISVD-9(SEQ ID NO:6)的残基Phe 101与人PD-L1 N末端IgV结构域的Tyr56相互作用,并且当人PD-L1 N末端IgV结构域的Tyr56被Ala取代时,PD-L1 ISVD-9与PD-L1之间的结合亲和力降低了200多倍。当人PD-L1 N末端IgV结构域的Ile54被Ala取代时,PD-L1 ISVD-9与PD-L1之间的结合亲和力降低了约40倍。PD-L1 ISVD-9(SEQ ID NO:6)的残基Asp99与人PD-L1 N末端IgV结构域的Arg113相互作用,并且当人PD-L1 N末端IgV结构域的Arg113被Ala取代时,PD-L1 ISVD-9与PD-L1之间的结合亲和力降低了约90倍。PD-L1 ISVD-9(SEQ ID NO:6)的残基Ser100与人PD-L1 N末端IgV结构域的Glu58相互作用,并且当人PD-L1 N末端IgV结构域的Glu58被Ala取代时,PD-L1 ISVD-9与PD-L1之间的结合亲和力降低了约25倍。PD-L1 ISVD-9(SEQ ID NO:6)的残基Thr105与人PD-L1 N末端IgV结构域的Gln66相互作用,并且当人PD-L1 N末端IgV结构域的Gln66被Ala取代时,PD-L1 ISVD-9与PD-L1之间的结合亲和力降低了约82倍。另外,人PD-L1 N末端IgV结构域的残基D61、N63、V68、M115、S117、Y123和R125可能参与了PD-L1 ISVD-9与人PD-L1之间的相互作用,用Ala取代这些残基导致结合亲和力降低约2-10倍。这些结果概述于下表1中。

[0142] 表1人PD-L1中的取代对结合PD-L1 ISVD-9的影响

[0143]	人 PD-L1 突变	KD (M)	KD, 突变 / KD, WT
	WT	5.92 E-09	1
[0143]	I54A	2.42E-07	40.9
	Y56A	1.24E-06	209.5
	E58A	1.49E-07	25.2
[0144]	D61A	1.99E-08	3.4
	N63A	2.30E-08	3.9
	Q66A	4.88E-07	82.4
	V68A	2.76E-08	4.7
	R113A	5.34E-07	90.2
	M115A	5.51E-08	9.3
	S117A	1.26E-08	2.1
	Y123A	4.24E-08	7.2
	R125A	2.97E-08	5.0

[0145] 能够特异性结合PD-L1的ISVD可以能够阻断PD-L1与PD1的结合。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD可以能够阻断PD-L1与CD80的结合。

[0146] 能够特异性结合PD-L1的ISVD可以能够与抗PD-L1抗体交叉竞争与PD-L1的结合。

[0147] 参考抗PD-L1抗体可以包含重链CDR3。重链CDR3可包含如DSFX1X2PTCX3X4X5X6SSGAFQY(SEQ ID NO:1)中所示的氨基酸序列,其中X1可以是E或G;X2可以是D或Y;X3可以是T或P;X4可以是L或G;X5可以是V或P;以及X6可以是T或A。在一些情况

下,参考抗PD-L1抗体可包含重链CDR3,其包含如SEQ ID NO:5和9中的任一个中所示的氨基酸序列。参考抗PD-L1抗体还可包含重链CDR1。重链CDR1可包含如GX₁X₂X₃X₄X₅RCMA (SEQ ID NO:2)中所示的氨基酸序列,其中X₁可为K或N;X₂可为M或I;X₃可为S或I;X₄可为S或R以及X₅可为R或V;例如,参考抗PD-L1抗体可包含重链CDR1,其包含如SSEQ ID NO:3和7中的任一个中所示的氨基酸序列。在一些情况下,参考抗PD-L1抗体可能包含重链CDR2。重链CDR2可包含如SEQ ID NO:4、8和11中的任一个中所示的氨基酸序列。在一些情况下,参考PD-L1抗体是能够特异性结合PD-L1的ISVD,诸如抗PD-L1 VHH。参考抗PD-L1抗体可包含重链可变结构域。参考抗PD-L1抗体可包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:6、10、12、13、14和15中的任一个中所示的氨基酸序列。例如,重链可变区可以包含如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0148] 在本公开中,能够特异性结合PD-L1的ISVD(例如,如包含在本公开的二聚体中的)可以包含重链CDR3。重链CDR3可包含如DSFX₁X₂PTCX₃X₄X₅X₆SSGAFQY (SEQ ID NO:1)中所示的氨基酸序列,其中X₁可为E或G;X₂可为D或Y;X₃可为T或P;X₄可为L或G;X₅可为V或P;和X₆可为T或A。例如,能够特异性结合PD-L1的ISVD可包含重链CDR3,其包含如SEQ ID NO:5和9中的任一个中所示的氨基酸序列。

[0149] 例如,能够特异性结合PD-L1的ISVD可包含重链CDR3,其包含与SEQ ID NO:5和9中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少80%(例如,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%)同一性的氨基酸序列。在一些情况下,重链CDR3可包含在SEQ ID NO:5和9中的任一个中所示的序列具序列中具有一个或多个(例如,1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多个)氨基酸缺失、插入和/或取代的氨基酸序列。

[0150] 在本公开中,能够特异性结合PD-L1的ISVD(例如,如包含在本公开的二聚体中的)还可包含重链CDR1。重链CDR1可包含如GX₁X₂X₃X₄X₅RCMA (SEQ ID NO:2)中所示的氨基酸序列,其中X₁可为K或N;X₂可为M或I;X₃可为S或I;X₄可为S或R;和X₅可为R或V。例如,能够特异性结合PD-L1的ISVD可包含重链CDR1,其包含如SEQ ID NO:3和7中的任一个中所示的氨基酸序列。

[0151] 例如,能够特异性结合PD-L1的ISVD可包含重链CDR1,其包含与SEQ ID NO:3和7中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少80%(例如,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少100%)同一性的氨基酸序列。在一些情况下,重链CDR1可包含在SEQ ID NO:3和7中的任一个中所示的序列具有一个或多个(例如,1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多个)氨基酸缺失、插入和/或取代的氨基酸序列。

[0152] 在本公开中,能够特异性结合PD-L1的ISVD(例如,如包含在本公开的二聚体中的)还可包含重链CDR2。重链CDR2可包含任何合适的氨基酸序列。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD可包含重链CDR2,其包含如SEQ ID NO:4、8和11中的任一个中所示的氨基酸序列。

[0153] 例如,能够特异性结合PD-L1的ISVD可包含重链CDR2,其包含与SEQ ID NO:4、8和

11中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少80% (例如,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少100%) 同一性的氨基酸序列。在一些情况下,重链CDR2可包含在SEQ ID NO:4、8和11中的任一个中所示的序列中具有一个或多个 (例如,1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多个) 氨基酸缺失、插入和/或取代的氨基酸序列。

[0154] 在本公开中,能够特异性结合PD-L1的ISVD (如包含在本公开的二聚体中的) 可包含重链可变结构域。能够特异性结合PD-L1的ISVD可以包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:6、10、12、13、14和15中的任一个中所示的氨基酸序列。例如,重链可变结构域可包含如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0155] 例如,能够特异性结合PD-L1的ISVD可包含重链可变结构域,其包含与如SEQ ID NO:6、10、12、13、14和15中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少80% (例如,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少100%) 同一性的氨基酸序列。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD可包括重链可变结构域,其包含在如SEQ ID NO:6、10、12、13、14和15中的任一个中所示的序列中具有一个或多个 (例如,1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多个) 氨基酸缺失、插入和/或取代的氨基酸序列。

[0156] 在本公开中,能够特异性结合PD-L1的ISVD可包含如SEQ ID NO:6、10、12、13、14和15中的任一个中所示的氨基酸序列。例如,能够特异性结合PD-L1的ISVD (如包含在本公开的二聚体中的) 可包含如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。例如,能够特异性结合PD-L1的ISVD可包含与SEQ ID NO:6、10、12、13、14和15中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少80% (例如,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少100%) 同一性的氨基酸序列。在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD可包含在如SEQ ID NO:6、10、12、13、14和15中的任一个中所示的序列中具有一个或多个 (例如,1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多个) 氨基酸缺失、插入和/或取代的氨基酸序列。

[0157] 在一些情况下,能够特异性结合PD-L1的ISVD包含重链可变结构域 (VH或VHH) 或由所述重链可变结构域组成。

[0158] 例如,能够特异性结合PD-L1的ISVD可选自PD-L1 ISVD-9、PD-L1 ISVD-6、PD-L1 ISVD-m3、PD-L1 ISVD-4、PD-L1 ISVD-11和PD-L1 ISVD-13。

[0159] 能够特异性结合CTLA4的ISVD可以能够与人CTLA4特异性结合。例如,能够特异性结合CTLA4的ISVD可以能够与人CTLA4的胞外结构域中的表位特异性结合,这样的表位可包括CN107400166A中描述的那些,和由Udupi A. Ramagopal等人,PNAS 2017May, 114 (21) 描述的那些。

[0160] 能够特异性结合CTLA4的ISVD可以能够阻断CTLA4与CD80的结合。在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD可以能够阻断CTLA4与CD86的结合。在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD可以是人源化的。

[0161] 能够特异性结合CTLA4的ISVD可与参考抗CTLA4抗体交叉竞争与CTLA4的结合。

[0162] 参考抗CTLA4抗体可包含重链CDR3。重链CDR3可包含如SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列。参考抗CTLA4抗体还可包含重链CDR1。重链CDR1可包含如SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列。在一些情况下,参考抗CTLA4抗体可包含重链CDR2。重链CDR2可包含如AIX1X2GGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:16) 中所示的氨基酸序列,其中X1可为Y或S;并且X2可为I或L。例如,重链CDR2可包含如SEQ ID NO:18、21和23中的任一个中所示的氨基酸序列。在一些情况下,参考抗CTLA4抗体是能够特异性结合CTLA4的ISVD,诸如抗CTLA4 VHH。参考抗CTLA4抗体可包含重链可变结构域。参考抗CTLA4抗体可包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:20、22、24-32中的任一个中所示的氨基酸序列。例如,重链可变结构域可包含如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0163] 在本公开中,能够特异性结合CTLA4的ISVD(例如,如包含在本公开的二聚体中的)可包含重链CDR3。重链CDR3可包含如SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列。

[0164] 在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD可包含重链CDR3,其包含与SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列具有至少80% (例如,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少100%) 同一性的氨基酸序列。在一些情况下,重链CDR3可包含在SEQ ID NO:19中所示的序列中具有一个或多个(例如,1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多个)氨基酸缺失、插入和/或取代的氨基酸序列。

[0165] 在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD(例如,如包含在本公开的二聚体中的)还可包含重链CDR1。重链CDR1可包含如SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列。

[0166] 在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD可包含重链CDR1,其包含与SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列具有至少80% (例如,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少100%) 同一性的氨基酸序列。在一些情况下,重链CDR1可包含在如SEQ ID NO:17中所示的序列中具有一个或多个(例如,1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多个)氨基酸缺失、插入和/或取代的氨基酸序列。

[0167] 在本公开中,能够特异性结合CTLA4的ISVD(例如,如包含在本公开的二聚体中的)还可包含重链CDR2。重链CDR2可包含如AIX1X2GGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:16) 中所示的氨基酸序列,其中X1可为Y或S;并且X2可为I或L。在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD可包含重链CDR2,其包含SEQ ID NO:18、21和23中的任一个中所示的氨基酸序列。

[0168] 例如,能够特异性结合CTLA4的ISVD可包含重链CDR2,其包含与如SEQ ID NO:18、21和23中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少80% (例如,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少100%) 同一性的氨基酸序列。在一些情况下,重链CDR2可包含在SEQ ID NO:18、21和23中的任一个中所示的序列中具有一个或多个(例如,1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多个)氨基酸缺失、插入和/或取代的氨基酸序列。

[0169] 在本公开中,能够特异性结合CTLA4的ISVD(如包含在本公开的二聚体中的)可包含重链可变结构域。能够特异性结合CTLA4的ISVD可包含重链可变结构域,其包含如SEQ ID NO:20、22和24-32中的任一个中所示的氨基酸序列。例如,重链可变结构域可以包含如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0170] 例如,能够特异性结合CTLA4的ISVD可包含重链可变结构域,其包含与如SEQ ID NO:20、22和24-32中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少80%(例如,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少100%)同一性的氨基酸序列。在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD可包含在如SEQ ID NO:20、22和24-32中的任一个中所示的序列中具有一个或多个(例如,1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多个)氨基酸缺失、插入和/或取代的氨基酸序列。

[0171] 在本公开中,能够特异性结合CTLA4的ISVD可包含如SEQ ID NO:20、22和24-32中的任一个中所示的氨基酸序列。例如,能够特异性结合CTLA4的ISVD(如包含在本公开的二聚体中的)可包含如SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列。

[0172] 例如,能够特异性结合CTLA4的ISVD可包含与如SEQ ID NO:20、22和24-32中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少80%(例如,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少100%)同一性的氨基酸序列。在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD可包含在如SEQ ID NO:20、22和24-32中的任一个中所示的序列中具有一个或多个(例如,1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多个)氨基酸缺失、插入和/或取代的氨基酸序列。

[0173] 在一些情况下,能够特异性结合CTLA4的ISVD包含重链可变结构域(VH或VHH)或由所述重链可变结构组成。

[0174] 例如,能够特异性结合CTLA4的ISVD可选自CTLA4 ISVD-34、CTLA4 ISVD-C1、CTLA4 ISVD-13、CTLA4 ISVD-26、CTLA4 ISVD-27、CTLA4 ISVD-28、CTLA4 ISVD-29、CTLA4 ISVD-30、CTLA4 ISVD-31、CTLA4 ISVD-32和CTLA4 ISVD-33。

[0175] 例如,本申请的二聚体可包含两条多肽链或由其组成。两条多肽链的氨基酸序列可以相同或不同。在一些情况下,本公开的二聚体可以是同二聚体。

[0176] 在本公开中,二聚体的两条多肽链中的一条或两条可包含如权利要求40-43、46、48和50中任一项所示的氨基酸序列。例如,二聚体的两条多肽链中的一条或两条可包含如SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列。

[0177] 在具体实施方案中,二聚体的两条多肽链中的一条或两条可包含与SEQ ID NO:40-43、46、48和50中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少80%(例如,至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少100%)同一性的氨基酸序列。在一些情况下,二聚体的两条多肽链中的一条或两条可包含在如SEQ ID NO:40-43、46、48和50中的任一个中所示的序列具有一个或多个(例如,1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多个)氨基酸缺

失、插入和/或取代的氨基酸序列。

[0178] 在实例中,能够特异性结合PD-L1的ISVD可与能够特异性结合CTLA4的ISVD的N末端氨基酸融合(直接或间接地,例如通过接头,诸如肽接头),形成双特异性结合部分。然后,一个这样的双特异性结合部分可以与本公开的一个Fc亚单位的N末端氨基酸融合(直接或间接地,例如,通过接头,诸如肽接头),以提供二聚体的一条多肽链。然后,另一个这样的双特异性结合部分可以与本公开的另一个Fc亚单位的N末端氨基酸融合(直接或间接地,例如,通过接头,诸如肽接头),以提供二聚体的另一条多肽链。两条多肽链的两个Fc亚单位可以彼此结合(例如,通过非共价相互作用和/或二硫键或其它共价键,在一些情况下,这种共价键不是肽键)以形成二聚体。两个双特异性结合部分可以相同或不同。两个Fc亚单位可以相同或不同。

[0179] 在一些实施方案中,二聚体是包含两条相同多肽链的蛋白质性质的同二聚体,其中每条多肽链包含与Fc亚单位之一融合的双特异性结合部分之一,并且两个Fc亚单位彼此结合形成蛋白质性质的同二聚体。两个Fc亚单位可以通过非共价相互作用和/或二硫键或其它共价键相互结合,在一些情况下,这种共价键不是肽键。

[0180] 本公开的二聚体可以能够与CD80和/或CD86竞争与CTLA4的结合。例如,可在使用表达CTLA4的细胞系(诸如表达CTLA4的HEK293细胞系)的体外实验中检测竞争。作为另一个实例,可以在ELISA测定诸如竞争性ELISA测定中检测竞争。

[0181] 本公开的二聚体可以能够与PD1和/或CD80竞争与PD-L1的结合。例如,可以在体外实验中使用表达PD-L1的细胞系(诸如表达PD-L1的A375细胞系)来检测竞争。作为另一个实例,可以在ELISA测定诸如竞争性ELISA测定中检测竞争。

[0182] 本公开的二聚体可以能够阻断PD-L1与PD-1的结合。在一些情况下,本公开的二聚体可以能够阻断PD-L1与CD80的结合。在一些情况下,本公开的二聚体可以能够阻断CTLA4与CD80的结合。在一些情况下,本公开的二聚体可以能够阻断CTLA4与CD86的结合。

[0183] 本公开的二聚体可以与CTLA4结合,其中KD值不超过约 1×10^{-6} M,例如,不超过约 1×10^{-7} M,不超过约 1×10^{-8} M,不超过约 0.5×10^{-8} M,不超过约 1×10^{-9} M,不超过约 1×10^{-10} M或更低。

[0184] 本公开的二聚体可以与PD-L1结合,其中KD值不超过约 1×10^{-6} M,例如,不超过约 1×10^{-7} M、不超过约 1×10^{-8} M、不超过约 0.5×10^{-8} M、不超过约 1×10^{-9} M、不超过约 1×10^{-10} M或更低。

[0185] 本公开的二聚体可以能够刺激免疫细胞(例如,PBMC细胞)分泌免疫调节剂(例如,IL-2)。

[0186] 例如,本公开的二聚体可选自aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.9-L-aCTLA4.34-Fc、aCTLA4.34-aPDL1.9-Fc、aCTLA4.34-L-aPDL1.9-Fc、aPDL1.6-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.m3-aCTLA4.34-Fc和aPDL1.9-aCTLA4.13-Fc。

[0187] 另一方面,本公开提供了免疫缀合物。所述免疫缀合物可包含一种或多种根据本公开的二聚体。免疫缀合物还可包含一个或多个附加部分,诸如一个或多个附加结合部分,或一个或多个附加效应子部分。

[0188] 另一方面,本公开提供了编码本申请的二聚体的一种或多种分离的核酸。例如,一种或多种分离的核酸可包含一种或多种(例如,1-2种、1-3种、1-4种、1-5种、1-6种、1-7种、

1-8种、1-9种、1-10种或更多种)核酸分子。每个核酸分子可以编码完整的二聚体或其部分。例如,核酸分子可包含编码二聚体的不同部分(例如,对PD-L1或其部分特异的ISVD,对CTLA4或其部分特异的ISVD,Fc亚单位或其部分,和/或双特异性结合部分或其部分等)的各种片段,可将所述各种片段直接或间接地连接在一起以形成一个核酸分子。在一些情况下,存在不止一种核酸分子,并且每种核酸分子编码二聚体的一部分(例如,对PD-L1或其部分特异的ISVD,对CTLA4或其部分特异的ISVD,Fc亚单位或其部分,和/或双特异性结合部分或其部分,等等)。

[0189] 根据本公开的一种或多种分离的核酸可基于反映它们编码的表达产物的氨基酸序列的信息来制备或获得。这可根据本领域的常见实践来实现,例如,通过自动化DNA合成和/或重组DNA技术来实现。或者,在一些情况下,可从合适的天然来源分离根据本公开的一种或多种分离的核酸。

[0190] 另一方面,本公开提供了包含一种或多种分离的一种或多种载体。例如,一种或多种载体可包含一种或多种(例如,1-2种、1-3种、1-4种、1-5种、1-6种、1-7种、1-8种、1-9种、1-10种或更多种)根据本公开的分离的核酸。

[0191] 合适的载体可包括例如质粒、内质质粒(endoplasmic plasmid)或YAC。载体可以是使得能够在体外和/或体内(即,在合适的宿主细胞、宿主器官和/或表达系统中)表达根据本公开的二聚体的表达载体。表达载体通常可包含至少一种根据本公开的分离的核酸,所述分离的核酸与一种或多种合适的表达调控元件(例如,启动子、增强子、终止子等)可操作地连接。选择在特定宿主中表达的元件及其序列对本领域技术人员来说是常见的。对根据本公开的二聚体的表达有用或必需的调控元件和其它元件的具体实例包括,例如,启动子、增强子、终止子、整合因子、选择标记、前导序列、报告基因。

[0192] 在一些实施方案中,一种或多种根据本公开的载体可选自:质粒、病毒载体、粘粒和人工染色体。在一些情况下,载体可以选自:PET32b(Novagen)、pCMVp-NEO-BAN、pEGFP、pEGFT-Actin、pSV2和CMV4。在一些实施方案中,载体是pCDNA4(Invitrogen,Cat V86220)和/或PET32b(Novagen,产品编号:69016-3)。

[0193] 另一方面,本公开提供了包含一种或多种分离的核酸或一种或多种分离的载体的宿主细胞。例如,宿主细胞可包含一种或多种(例如,1-2种、1-3种、1-4种、1-5种、1-6种、1-7种、1-8种、1-9种、1-10种或更多种)根据本公开的分离的核酸,和/或一个或多个(例如,1-2种、1-3种、1-4种、1-5种、1-6种、1-7种、1-8种、1-9种、1-10种或更多种)根据本公开的载体。

[0194] 根据本公开的宿主细胞可选自:细菌细胞、真菌细胞、哺乳动物细胞和两栖动物细胞、昆虫细胞、植物细胞和本领域中用于表达异源蛋白质的任何其它细胞。

[0195] 细菌细胞可包括革兰阴性细菌菌株(例如,大肠杆菌菌株、变形杆菌属菌株和假单胞菌属菌株)和革兰阳性细菌菌株(例如,芽孢杆菌的芽孢杆菌属菌株、链霉菌属菌株、葡萄球菌属菌株和乳球菌属菌株)。

[0196] 真菌细胞可包括木霉属、脉孢菌属和曲霉属种的细胞,或酵母属(例如,酿酒酵母)、溶菌酶酵母(裂殖酵母)(例如,粟酒裂殖酵母)、毕赤酵母属(例如,毕赤酵母和甲醇毕赤酵母)和汉逊酵母属的细胞。

[0197] 哺乳动物细胞可包括例如HEK293细胞、CHO细胞、BHK细胞、HeLa细胞、COS细胞和由其衍生的工程细胞,诸如GS敲除CHO细胞。

[0198] 药物组合物

[0199] 另一方面,本公开提供了包含根据本公开的二聚体和/或免疫缀合物和任选的药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些情况下,所述药物组合物可包含细胞或组织(诸如,基因工程的细胞或组织),根据本公开的二聚体和/或免疫缀合物或其片段可包含在此类细胞或组织中。

[0200] 药学上可接受的赋形剂的实例包括但不限于惰性固体稀释剂和填充剂、稀释剂、无菌水溶液和各种有机溶剂、渗透促进剂、增溶剂和佐剂。

[0201] 在一些实施方案中,将二聚体或免疫缀合物配制用于口服施用、静脉内施用、肌肉施用、肿瘤部位的原位施用、吸入、直肠施用、阴道施用、经皮肤施用或通过皮下储库施用。

[0202] 所述药物组合物可用于抑制肿瘤生长。例如,药物组合物可抑制或延迟疾病的发展或进展,可以减小肿瘤大小(甚至基本消除肿瘤),并且可以缓解和/或稳定疾病状况。

[0203] 以下描述的是非限制性示例性药物组合物及其制备方法。

[0204] 所述药物组合物可以例如以适合肠胃外注射的无菌溶液、悬浮液或乳液的形式。药物组合物可以适于精确剂量的单次施用的单位剂型。药物组合物还可包含根据本公开的二聚体和/或免疫缀合物作为活性成分,并且可包含常规药物载体或赋形剂。另外,其可包含其它药物或药剂、载体、佐剂等。

[0205] 示例性肠胃外施用形式包括但不限于本公开的二聚体和/或免疫缀合物在无菌水溶液(例如,丙二醇水溶液或葡萄糖水溶液)中的溶液或悬浮液。如果需要,此类剂型可以适当当地用盐诸如组氨酸和/或磷酸盐进行缓冲。

[0206] 在一些实施方案中,本公开提供了用于包含本公开的二聚体和/或免疫缀合物以及适于注射的药物赋形剂的注射用药物组合物。

[0207] 其中可掺入本公开的药物组合物以用于注射施用的形式包括含水悬浮液或油悬浮液,或含有适当油的乳液,或无菌水溶液,以及类似的药物媒介物。

[0208] 本公开还包括包含活性成分(例如,本公开的二聚体和/或免疫缀合物)的无水药物组合物和剂型,因为水可促进一些多肽的降解。本公开的无水药物组合物和剂型可使用无水或低水分的成分和低水分或低湿度条件来制备。

[0209] 可以根据常规药物配制技术将本公开的二聚体和/或免疫缀合物与药物载体紧密混合。根据施用所需的制剂形式,载体可以采取多种形式。在制备组合物时,可以使用任何常用的药物介质作为载体,例如水、乙二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂等。

[0210] 本公开的药物组合物可包含治疗有效量的活性剂(例如,本公开的二聚体和/或免疫缀合物)。治疗有效量是能够预防和/或治疗(至少部分地)患有疾患或病症或具有发展该疾患或病症的风险的受试者的疾患或病症(例如,癌症)和/或其任何并发症的主题药物组合物的量。所包含的活性剂的具体量/浓度可以根据施用方法和患者的需要而变化,并且可基于例如体积、粘度和/或患者的体重等来确定。例如,合适的剂量可以是约0.1mg或1mg/kg/日至约150mg/kg/日(诸如约0.1mg/kg至约0.3mg/kg、约0.1mg/kg至约1mg/kg、约0.1mg/kg至约3mg/kg、约0.1mg/kg至约5mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg,诸如约1mg/kg至约5mg/kg,诸如约3mg/kg至约5mg/kg);有时,剂量可以甚至更高。

[0211] 医疗用途和治疗方法

[0212] 根据本公开的二聚体、免疫缀合物或药物组合物可用于治疗有需要的受试者的疾

病。

[0213] 另一方面,本公开提供了根据本公开的二聚体、免疫缀合物或药物组合物在治疗有需要的受试者的疾病方面的用途。

[0214] 另一方面,本公开提供了根据本公开的二聚体、免疫缀合物或药物组合物在制备用于治疗有需要的受试者的疾病的药物中的用途。

[0215] 另一方面,本公开提供了治疗有需要的受试者的疾病的方法,其包括向受试者施用有效量的根据本公开的二聚体、免疫缀合物或药物组合物。

[0216] 所述疾病或病症可以是潜在受PD-L1结合部分和/或CTLA4结合部分影响的疾病或病症。

[0217] 药物可以配制成适于静脉给药的形式。

[0218] 在一些实施方案中,所述疾病或症状是癌症。癌症可以是实体瘤、血液学癌症或淋巴瘤。例如,癌症可选自肺癌(诸如非小细胞肺癌)、乳腺癌(诸如三阴性乳腺癌)、肾癌(诸如肾细胞癌)、黑色素瘤、宫颈癌、子宫癌、胰腺癌、腹膜癌、卵巢癌和结肠癌。癌症可以是晚期或转移性癌症。

[0219] 在一些情况下,癌症可能对PD-1拮抗剂和/或PD-L1拮抗剂的治疗无反应。例如,利用PD-1拮抗剂和/或PD-L1拮抗剂的治疗不会导致癌症进展或肿瘤生长的显著或可观察到的延迟或抑制。在一些情况下,在施用本公开的二聚体/组合物/免疫缀合物之前,癌症未曾用PD-1拮抗剂和/或PD-L1拮抗剂治疗。PD-1拮抗剂可以是PD-1阻断抗体。PD-L1拮抗剂可以是PD-L1阻断抗体。

[0220] 癌症或癌细胞可以在受试者体内,例如人或非人动物(例如,哺乳动物)体内的癌症或癌细胞。

[0221] 在一些情况下,癌症/肿瘤可能无法切除。

[0222] 在一些情况下,癌症/肿瘤可以是转移性的(诸如转移性实体瘤)。

[0223] 在一些情况下,癌症/肿瘤可以是难治性的和/或不能耐受标准疗法。

[0224] 受试者可以是哺乳动物。在一些实施例中,哺乳动物是人。在一些实施方案中,哺乳动物是小鼠、大鼠、猫、狗、兔子、猪、绵羊、马、牛、山羊、沙鼠、仓鼠、豚鼠、猴子或任何其它哺乳动物。许多这样的哺乳动物可以是本领域已知的作为某些疾病或病症(包括实体瘤和/或其它癌症)的临床前模型的受试者(例如,Talmadge等人,2007 Am.J.Pathol.170:793; Kerbel,2003 Canc.Biol.Therap.2(4续1):S134;Man等人,2007 Canc.Met.Rev.26:737; Cespedes等人,2006 Clin.Transl Oncol.8:318)。

[0225] 另一方面,本公开提供了阻断CD80和/或CD86与CTLA4结合的方法,其包括施用根据本公开的二聚体、免疫缀合物或药物组合物。

[0226] 另一方面,本公开提供了阻断PD1和/或CD80与PD-L1结合的方法,其包括施用根据本公开的二聚体、免疫缀合物或药物组合物。

[0227] 另一方面,本公开提供了刺激免疫细胞分泌细胞因子(诸如,白细胞介素,例如IL-2)的方法,其包括向免疫细胞施用根据本公开的二聚体、免疫缀合物或药物组合物。所述免疫细胞可包括例如PBMC细胞、T细胞或其它免疫细胞。

[0228] 另一方面,本公开提供了增强受试者的免疫反应的方法,其包括向受试者施用根据本公开的二聚体、免疫缀合物或药物组合物。

[0229] 增强的免疫反应可包括例如增强的体液免疫应答(即,B细胞反应)和/或细胞反应(即,T细胞反应)。增强的体液免疫反应可通过例如在受治疗的受试者中显示增加的抗体滴度(例如,如通过Elisa测定的)来证明。增强的细胞免疫反应可通过例如显示受经处理的T细胞或来自经治疗的受试者的T细胞被更高度地活化来证明。T细胞活化可通过测量抗原体外刺激T细胞时的T细胞增殖或T细胞细胞因子细化来评估(例如,通过ELISpot)。T细胞活化还可通过流式细胞术进行测定。

[0230] 制备二聚体的方法

[0231] 另一方面,本公开提供了产生根据本公开的二聚体的方法,其包括(i)在实现二聚体的表达和形成的条件下培养本公开的宿主细胞以及(ii)收获形成的二聚体。

[0232] 在一些实施方案中,所述方法不包括根据本公开在宿主细胞表达的产物中富集二聚体。

[0233] 在一些实施方案中,所述方法还包括分离和/或纯化二聚体的步骤。

[0234] 在一些实施方案中,所述方法还包括用编码/表达本公开的二聚体、其一个或多个成员或其片段的多核苷酸/载体转染/转化宿主细胞。

[0235] 在一些实施方案中,本公开的二聚体通过在适合蛋白质表达的条件下在细胞中表达载体而产生。

[0236] 可在适合蛋白质表达的条件中变化的因素包括诸如孵育时间、温度和培养基等因素,并且可取决于细胞类型,并且将由本领域普通技术人员容易地确定。

[0237] 在一些实施方案中,在产生本公开的二聚体的过程中,将宿主细胞在培养物中生长,并且在可用于生长培养物的任何装置(包括发酵罐)中生长。可将细胞作为单层生长或附着于表面。或者,可将宿主细胞悬浮生长。可将细胞在无血清培养基中生长。所述培养基可以是商购可得的培养基。

[0238] 虽然本文已经示出和描述了本公开的优选实施方案,但对于本领域技术人员来说,显而易见的是此类实施方案仅作为示例提供。在不脱离本公开的情况下,本领域技术人员将会想到许多变化、改变和替换。应当理解,可在实践本公开中采用本文描述的本公开的实施方案的各种替代方案。以下权利要求旨在限定本公开的范围,并且在这些权利要求及其等同物的范围内的方法和结构由此被覆盖。

[0239] 实施例

[0240] 阐述以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供如何制造和使用本公开的完整公开和描述,并不旨在限制发明人认为是其发明的范围,也不旨在表示下面的实验是所有或唯一进行的实验。已努力确保所用数字的准确性(例如,数量、温度等),但是应该考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份数是重量份,分子量是重均分子量,温度是摄氏度,压力等于或接近大气压。可以使用标准缩写,例如bp、一个碱基对或多个碱基对;kb,一千碱基或数千碱基;pL,一皮升或多皮升);s或sec,一秒或数秒;min,一分钟或数分钟;h或hr,一小时或数多个小时;aa,一个或多个氨基酸;nt,一个或多个核苷酸;i.m.,肌肉(地);i.p.,腹膜内(地);s.c.,皮下(地);等等。

[0241] 实施例1蛋白质的制备

[0242] 重组DNA技术

[0243] 如Sambrook等人,Molecular cloning:A laboratory manual;Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 中所述, 使用标准方法操作 DNA。根据制造商的说明使用分子生物试剂。在 Kabat, E.A. 等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, NIH Publication No.91-3242 中给出了关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息见。

[0244] 基因合成

[0245] 所需的基因区段通过使用合适模板的 PCR 产生, 或者通过自动基因合成从合成寡核苷酸和 PCR 产物合成。这种基因合成可从例如 (Life Technologies, Inc. Carlsbad, Calif.) 和 Geneart AG (Regensburg, Germany) 商购获得。将侧翼为单一限制性内切酶切割位点的基因区段克隆到标准克隆性载体/测序载体中。从转化的细菌中纯化质粒, 并通过紫外光谱测定其浓度。通过 DNA 测序确认亚克隆的基因片段的 DNA 序列。基因区段被设计成具有合适的限制性位点, 以允许亚克隆到相应的表达载体中。

[0246] 1.1 能够特异性结合 CTLA4 的 ISVD

[0247] 根据下面描述的氨基酸序列, 重组产生了能够特异性结合 CTLA4 的下列 ISVD。

[0248] 在能够特异性结合 CTLA4 的 ISVD 中, CTLA4 ISVD-13 和 CTLA4 ISVD-C1 具有相同的 CDR1 序列和相同的 CDR3 序列, 它们在 CDR2 区域略有不同。

[0249] CTLA4 ISVD-C1 和 CTLA4 ISVD-13 的人源化变体是使用蛋白质表面重修方法和将 CDR 移植到 VHH 的通用框架上制备的。简言之, 使用 Modeller9 软件分别对 CTLA4 ISVD-C1 和 CTLA4 ISVD-13 进行建模, 所使用的参考抗体是抗体 cAb-Lys3 (PDB 编号: 1XFP), 并计算其相对溶剂可及性。人源化变体是通过取代预测暴露于溶剂的 CTLA4 ISVD-C1 和 CTLA4 ISVD-13 中的一个或多个氨基酸而产生的。

[0250] CTLA4 ISVD-C1 包含重链可变结构域, 其包含具有如 SEQ ID NO:17 中所示的氨基酸序列的 HCDR1、具有如 SEQ ID NO:21 中所示的氨基酸序列的 HCDR2 和具有如 SEQ ID NO:19 中所示的氨基酸序列的 HCDR3。CTLA4 ISVD-C1 包含如 SEQ ID NO:22 中所示的氨基酸序列。

[0251] CTLA4 ISVD-31 为 CTLA4 ISVD-C1 的人源化变体。CTLA4 ISVD-31 包含重链可变结构域, 其包含具有如 SEQ ID NO:17 中所示的氨基酸序列的 HCDR1、具有如 SEQ ID NO:18 中所示的氨基酸序列的 HCDR2 和具有如 SEQ ID NO:19 中所示的氨基酸序列的 HCDR3。CTLA4 ISVD-31 包含如 SEQ ID NO:30 中所示的氨基酸序列。

[0252] CTLA4 ISVD-32 为 CTLA4 ISVD-C1 的另一种人源化变体。CTLA4 ISVD-32 包含重链可变结构域, 其包含具有如 SEQ ID NO:17 中所示的氨基酸序列的 HCDR1、具有如 SEQ ID NO:18 中所示的氨基酸序列的 HCDR2 和具有如 SEQ ID NO:19 中所示的氨基酸序列的 HCDR3。CTLA4 ISVD-32 包含如 SEQ ID NO:31 中所示的氨基酸序列。

[0253] CTLA4 ISVD-33 为 CTLA4 ISVD-C1 的另一种人源化变体。CTLA4 ISVD-33 包含重链可变结构域, 其包含具有如 SEQ ID NO:17 中所示的氨基酸序列的 HCDR1、具有如 SEQ ID NO:18 中所示的氨基酸序列的 HCDR2 和具有如 SEQ ID NO:19 中所示的氨基酸序列的 HCDR3。CTLA4 ISVD-33 包含如 SEQ ID NO:32 中所示的氨基酸序列。

[0254] CTLA4 ISVD-34 为 CTLA4 ISVD-C1 的另一种人源化变体。CTLA4 ISVD-34 包含重链可变结构域, 其包含具有如 SEQ ID NO:17 中所示的氨基酸序列的 HCDR1、具有如 SEQ ID NO:18 中所示的氨基酸序列的 HCDR2 和具有如 SEQ ID NO:19 中所示的氨基酸序列的 HCDR3。CTLA4 ISVD-34 包含如 SEQ ID NO:20 中所示的氨基酸序列。

[0255] CTLA4 ISVD-13包含重链可变结构域,其包含具有如SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的HCDR1、具有如SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列的HCDR2和具有如SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的HCDR3。CTLA4 ISVD-13包含如SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列。

[0256] CTLA4 ISVD-26为CTLA4 ISVD-13的人源化变体。CTLA4 ISVD-26包含重链可变结构域,其包含具有如SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的HCDR1、具有如SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列的HCDR2和具有如SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的HCDR3。CTLA4ISVD-26包含如SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列。

[0257] CTLA4 ISVD-27为CTLA4 ISVD-13的另一种人源化变体。CTLA4 ISVD-27包含重链可变结构域,其包含具有如SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的HCDR1、具有如SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列的HCDR2和具有如SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的HCDR3。CTLA4 ISVD-27包含如SEQ ID NO:26中所示的氨基酸序列。

[0258] CTLA4 ISVD-28为CTLA4 ISVD-13的另一种人源化变体。CTLA4 ISVD-28包含重链可变结构域,其包含具有如SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的HCDR1、具有如SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列的HCDR2和具有如SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的HCDR3。CTLA4 ISVD-28包含如SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列。

[0259] CTLA4 ISVD-29为CTLA4 ISVD-13的另一种人源化变体。CTLA4 ISVD-29包含重链可变结构域,其包含具有如SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的HCDR1、具有如SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列的HCDR2和具有如SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的HCDR3。CTLA4 ISVD-29包含如SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列。

[0260] CTLA4 ISVD-30为CTLA4 ISVD-13的另一种人源化变体。CTLA4 ISVD-30包含重链可变结构域,其包含具有如SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的HCDR1、具有如SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列的HCDR2和具有如SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的HCDR3。CTLA4 ISVD-30包含如SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列。

[0261] 通过Kabat定义与Chothia定义组合来定义CDR序列。

[0262] 1.2能够特异性结合PD-L1的ISVD

[0263] 根据下面描述的氨基酸序列,重组产生了下列能够特异性结合PD-L1的ISVD。

[0264] PD-L1 ISVD-6 (尤其是在CDR3区中)的氨基酸序列与PD-L1 ISVD-4及其人源化变体的氨基酸序列高度相似。PD-L1-I SVD-m3的CDR1和CDR3与PD-L1-I SVD-4的CDR1和CDR3相同,但其CDR2区与PD-L1 ISVD-4的CDR2区有很大不同。

[0265] PD-L1 ISVD-4的人源化变体是使用蛋白质表面重修和将CDR移植到VHH的通用框架上制备的。简言之,使用Modeller9软件对PD-L1 ISVD-4进行建模,所使用的参考抗体是抗体cAb-Lys3 (PDB编号:1XFP),并计算其相对溶剂可及性。人源化变体是通过取代预测暴露于溶剂的PD-L1 ISVD-4中的一个或多个氨基酸而产生的。

[0266] PD-L1 ISVD-4包含重链可变结构域,其包含具有如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的HCDR1、具有如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的HCDR2和具有如SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的HCDR3。PD-L1 ISVD-4包含如SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列。

[0267] PD-L1 ISVD-9为PD-L1 ISVD-4的人源化变体。CTLA4 ISVD-9包含重链可变结构域,其包含具有如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的HCDR1、具有如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的HCDR2和具有如SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的HCDR3。D-L1 ISVD-9包含

如SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0268] PD-L1 ISVD-11为PD-L1 ISVD-4的另一种人源化变体。CTLA4 ISVD-11包含重链可变结构域,其包含具有如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的HCDR1、具有如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的HCDR2和具有如SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的HCDR3。D-L1 ISVD-11包含如SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列。

[0269] PD-L1 ISVD-13为PD-L1 ISVD-4的另一种人源化变体。PD-L1 ISVD-13包含重链可变结构域,其包含具有如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的HCDR1、具有如SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的HCDR2和具有如SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的HCDR3。PD-L1 ISVD-13包含如SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列。

[0270] CTLA4 ISVD-6包含重链可变结构域,其包含具有如SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的HCDR1、具有如SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的HCDR2和具有如SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列的HCDR3。PD-L1 ISVD-6包含如SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列。

[0271] CTLA4 ISVD-m3包含重链可变结构域,其包含具有如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的HCDR1、具有如SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列的HCDR2和具有如SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的HCDR3。CTLA4 ISVD-m3包含如SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列。

[0272] 通过Kabat定义与Chothia定义组合来定义CDR序列。

[0273] 1.3产生本公开的二聚体

[0274] 作为示例,产生了本公开的以下二聚体:aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.9-L-aCTLA4.34-Fc、aCTLA4.34-aPDL1.9-Fc、aCTLA4.34-L-aPDL1.9-Fc、aPDL1.6-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.m3-aCTLA4.34-Fc和aPDL1.9-aCTLA4.13-Fc。

[0275] 具有铰链的人IgG1-Fc区的氨基酸序列(SEQ ID No:35或38)是基于蛋白质数据库 Uniprot (P01857)的人免疫球蛋白 γ 1(IgG1)的恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO:36)获得的。然后使用在线工具DNaworks (helixweb.nih.gov/dnaworks/) 设计了编码其的相应DNA序列。

[0276] 对于aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc,通过短接头GAP(SEQ ID NO:33)将实施例1.2的PD-L1 ISVD-9与实施例1.1的CTLA4 ISVD-34的N末端融合,获得了双特异性结合部分aPDL1.9-aCTLA4.34。然后通过铰链将aPDL1.9-aCTLA4.34与人IgG1-Fc区的N末端氨基酸融合,获得了aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc,其包含如SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列。

[0277] 对于aPDL1.9-L-aCTLA4.34-Fc,通过长接头GGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:34)将实施例1.2的PD-L1 ISVD-9与实施例1.1的CTLA4 ISVD-34的N末端融合,获得了双特异性结合部分aPDL1.9-L-aCTLA4.34。然后通过铰链将aPDL1.9-aCTLA4.34与人IgG1-Fc区的N末端氨基酸融合,获得了aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc,其包含如SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列。

[0278] 对于aCTLA4.34-aPDL1.9-Fc,通过短接头GAP(SEQ ID NO:33)将实施例1.1的CTLA4 ISVD-34与实施例1.2的PD-L1 ISVD-9的N末端融合,获得了双特异性结合部分CTLA4.34-aPDL1.9。然后通过铰链将aCTLA4.34-aPDL1.9与人IgG1-Fc区的N末端氨基酸融合,获得了aCTLA4.34-aPDL1.9-Fc,其包含如SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列。

[0279] 对于aCTLA4.34-L-aPDL1.9-Fc,通过长接头GGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:34)将实施例1.1的CTLA4 ISVD-34与实施例1.2的PD-L1 ISVD-9的N末端融合,获得了双特异性结合部分aCTLA4.34-L-aPDL1.9。然后通过铰链将aCTLA4.34-L-aPDL1.9与人IgG1-Fc区的N末

端氨基酸融合,获得了aCTLA4.34-L-aPDL1.9-Fc,其包含如SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列。

[0280] 对于aPDL1.6-aCTLA4.34-Fc,通过短接头GAP (SEQ ID NO:33) 将实施例1.2的PD-L1ISVD-6与实施例1.1的CTLA4 ISVD-34的N末端融合,获得了双特异性结合部分aPDL1.6-aCTLA4.34。然后通过铰链将aPDL1.6-aCTLA4.34与人IgG1-Fc区的N末端氨基酸融合,获得了aPDL1.6-aCTLA4.34-Fc,其包含如SEQ ID NO:46中所示的氨基酸序列。

[0281] 对于aPDL1.m3-aCTLA4.34-Fc,通过短接头GAP (SEQ ID NO:33) 将实施例1.2的PD-L1 ISVD-m3与实施例1.1的CTLA4 ISVD-34的N末端融合,获得了双特异性结合部分aPDL1.m3-aCTLA4.34。然后通过铰链将aPDL1.m3-aCTLA4.34与人IgG1-Fc区的N末端氨基酸融合,获得了aPDL1.m3-aCTLA4.34-Fc,其包含如SEQ ID NO:48中所示的氨基酸序列。

[0282] 对于aPDL1.9-aCTLA4.13-Fc,通过短接头GAP (SEQ ID NO:33) 将实施例1.2的PD-L1ISVD-9与实施例1.1的CTLA4 ISVD-13的N末端融合,获得了双特异性结合部分aPDL1.9-aCTLA4.13。然后通过铰链将aPDL1.9-aCTLA4.13与人IgG1-Fc区的N末端氨基酸融合,获得了aPDL1.9-aCTLA4.13-Fc,其包含如SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列。

[0283] 1.4产生对照分子

[0284] 作为对照,制备了dAb,其为无功能的单结构域多肽(在野生型或双敲除小鼠中均无功能),包含如SEQ ID NO:37中所示的氨基酸序列。

[0285] 具有铰链的人IgG1-Fc区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:35或38) 是基于蛋白质数据库Uniprot (P01857) 的人免疫球蛋白 γ 1 (IgG1) 的恒定区氨基酸序列 (SEQ ID NO:36) 获得的。然后使用在线工具DNAworks (helixweb.nih.gov/dnaworks/) 设计了编码其的相应DNA序列。

[0286] 然后,制备了下列对照二聚体:aPDL1.9-dAb-Fc、dAb-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.6-dAb-Fc、aPDL1.m3-dAb-Fc和dAb-aCTLA4.13-Fc。

[0287] 在aPDL1.9-dAb-Fc中,通过短接头 (SEQ ID NO:33) 将实施例1.2的PD-L1 ISVD-9与对照dAb的N末端融合,获得了aPDL1.9-dAb。然后通过铰链将aPDL1.9-dAb与人IgG1-Fc区的N末端氨基酸融合,获得了aPDL1.9-dAb-Fc,其包含如SEQ ID NO:44中所示的氨基酸序列。

[0288] 在aPDL1.6-dAb-Fc中,通过短接头 (SEQ ID NO:33) 将实施例1.2的PD-L1 ISVD-6与对照dAb的N末端融合,获得了aPDL1.6-dAb。然后通过铰链将aPDL1.6-dAb与人IgG1-Fc区的N末端氨基酸融合,获得了aPDL1.6-dAb-Fc,其包含如SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列。

[0289] 在aPDL1.m3-dAb-Fc中,通过短接头 (SEQ ID NO:33) 将实施例1.2的PD-L1 ISVD-m3与对照dAb的N末端融合,获得了aPDL1.m3-dAb。然后通过铰链将aPDL1.m3-dAb与人IgG1-Fc区的N末端氨基酸融合,获得了aPDL1.m3-dAb-Fc,其包含如SEQ ID NO:49中所示的氨基酸序列。

[0290] 在dAb-aCTLA4.34-Fc中,通过短接头 (SEQ ID NO:33) 将对照dAb与实施例1.1的CTLA4 ISVD-34的N末端融合,获得了dAb-aCTLA4.34。然后通过铰链将dAb-aCTLA4.34与人IgG1-Fc区的N末端氨基酸融合,获得了dAb-aCTLA4.34-Fc,其包含如SEQ ID NO:45中所示的氨基酸序列。

[0291] 在dAb-aCTLA4.13-Fc中,通过短接头(SEQ ID NO:33)将对照dAb与实施例1.1的CTLA4 ISVD-13的N末端融合,获得了dAb-aCTLA4.13。然后通过铰链将dAb-aCTLA4.13与人IgG1-Fc区的N末端氨基酸融合,获得了dAb-aCTLA4.13-Fc,其包含如SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列。

[0292] 图1A-1B提供了本公开的二聚体的实例,其中1表示能够特异性结合PD-L1的ISVD,2表示能够特异性结合CTLA4的ISVD,3表示包含Fc亚单位的Fc结构域,4表示双特异性结合部分。

[0293] 1.5表达和纯化

[0294] 将编码上文实施例1.3和实施例1.4中描述的aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.9-L-aCTLA4.34-Fc、aCTLA4.34-aPDL1.9-Fc、aCTLA4.34-L-aPDL1.9-Fc、aPDL1.6-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.m3-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.9-aCTLA4.13-Fc、aPDL1.9-dAb-Fc、dAb-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.6-dAb-Fc、aPDL1.m3-dAb-Fc或dAb-aCTLA4.13-Fc的核酸序列克隆到表达载体pCDNA4(Invitrogen,Cat V86220)中,分别获得了相应的重组表达载体。

[0295] 然后,用这些重组表达载体转染HEK293细胞以进行重组蛋白表达。简言之,用Freestyle293培养基稀释质粒,其中加入PEI(聚乙烯亚胺)溶液。将每种质粒/PEI溶液加入HEK293细胞悬液中,在37℃、10%CO₂、90rpm的条件下培养5-6天。收集上清液并使用蛋白A亲和色谱法进行纯化,以分别获得纯化的重组蛋白二聚体或对照分子:aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.9-L-aCTLA4.34-Fc、aCTLA4.34-aPDL1.9-Fc、aCTLA4.34-L-aPDL1.9-Fc、aPDL1.6-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.m3-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.9-aCTLA4.13-Fc、aPDL1.9-dAb-Fc、dAb-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.6-dAb-Fc、aPDL1.m3-dAb-Fc和dAb-aCTLA4.13-Fc。

[0296] 作为实例,对二聚体aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc、aPDL1.9-L-aCTLA4.34-Fc、aCTLA4.34-aPDL1.9-Fc、aCTLA4.34-L-aPDL1.9-Fc以及对照aPDL1.9-dAb-Fc和dAb-aCTLA4.34-Fc的产率进行了检测,结果如表2所示。

[0297] 表2二聚体和对照分子的表达

蛋白质	产率(mg/L)	SE-HPLC主峰(%)
aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc	385	98.5
aPDL1.9-L-aCTLA4.34-Fc	360	98.9
aCTLA4.34-aPDL1.9-Fc	320	98.6
aCTLA4.34-L-aPDL1.9-Fc	372	98.6
aPDL1.9-dAb-Fc	300	96.7
dAb-aCTLA4.34-Fc	280	98.1

[0299] 实施例2结合活性

[0300] 2.1方法

[0301] 2.1.1通过ELISA测试的对可溶性CTLA4的结合亲和力

[0302] 用CTLA4-muFc(与小鼠Fc的N端融合的人CTLA4胞外结构域,其氨基酸序列如SEQ ID NO:52所示)涂覆96-孔板。加入不同浓度的样品和对照分子。将HRP标记的山羊抗人Fc抗体用于检测。在用TMB显影后,在微孔板读数器中在450/650nm的波长处读取板。

[0303] 2.1.2通过ELISA测试的对可溶性PD-L1的结合亲和力

[0304] 用人PD-L1-muFc(与小鼠Fc的N端融合的人PD-L1胞外结构域,其氨基酸序列如SEQ

ID N0:53中所示)。加入不同浓度的样品和对照分子。将HRP标记的山羊抗人Fc抗体用于检测。在用TMB显影后,在微孔板读数器中在450/650nm的波长处读取板。

[0305] 2.1.3通过桥接ELISA测试的对可溶性PD-L1和CTLA4的结合亲和力

[0306] 用人PD-L1-huFc(与小鼠Fc的N端融合的人PD-L1胞外结构域,其氨基酸序列如SEQ ID N0:54中所示)。加入不同浓度的样品和对照分子。然后,将CTLA4-muFc用于检测结合的样品,然后将HRP标记的山羊抗小鼠Fc抗体用作二抗。在用TMB显影后,在微孔板读数器中在450/650nm的波长处读取板。

[0307] 2.1.4通过SPR测试的结合亲和力

[0308] 使用Biacore X100进行测定。将样品稀释并以3nM的浓度固定在蛋白A传感器芯片表面上。将含CTLA4的溶液稀释,分别制备成800nM、400nM、200nM、100nM和50nM的浓度。或者如果使用PD-L1-muFc,将其稀释至100nM、33.3nM、11.1nM、3.70nM、1.23nM。在结合、解离和再生后,测量结合的动力学常数(KD)。

[0309] 2.1.5通过BLI测量的结合

[0310] 使用ForteBio's Octet K2平台进行测定。稀释样品到10μg/ml的浓度,并使用生物传感器捕获样品。稀释含PD-L1的溶液,并分别制备成50nM、25nM、12.5nM、6.25nM和3.125nM的浓度。在进行标准化(基线)、结合、解离和再生程序后,获得了动力学常数(KD)。

[0311] 2.1.6膜结合的配体的结合活性

[0312] 与375-hPD-L1细胞的体外结合

[0313] 将样品稀释并分别制备成0.091μM、0.27μM、0.82μM、2.45μM、7.41μM、22.22μM、66.67μM和200μM的浓度。将A375-hPD-L1细胞(恒定表达人PD-L1蛋白的A375细胞系,通过将人PD-L1表达盒稳定转染入A374细胞系而产生的)密度调节至 4×10^6 个细胞/ml。在结合和洗涤程序后,装载样品用于流式细胞术分析,以测量中值荧光强度(MFI)。

[0314] HEK293-CTLA 4细胞的体外结合

[0315] 将样品稀释至2μM(由1 2μM的原液制备的),然后用稀释缓冲液进行5倍连续稀释。将HEK293-CTLA4细胞(瞬时表达人CTLA4蛋白的HEK293细胞系,其通过将人CTLA4表达盒瞬时转染入HEK293细胞系而产生)密度调节至 4×10^6 个细胞/ml。在结合和洗涤程序之后,总共测试了8个浓度梯度。

[0316] 2.2结果

[0317] 图2A显示了本公开的二聚体与可溶性人CTLA4的结合。可以看出,无论是能够特异性结合CTLA4的ISVD在二聚体的N端还是能够特异性结合PD-L1的ISVD在二聚体的N端,都观察到相当的结合亲和力,例如,如由EC50值所示的。类似地,当在能够特异性结合CTLA4的ISVD与能够特异性结合PD-L1的ISVD之间使用短接头(例如,GAP)或长接头(例如,GGGGSGGGSGGGGS)时,观察到相当的结合亲和力。aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc、aCTLA4.34-aPDL1.9-Fc、aPDL1.9-L-aCTLA4.34-Fc和aCTLA4.34-L-aPDL1.9-Fc的EC50值约为40ng/mL。

[0318] 图2B显示了本公开的二聚体与可溶性人PD-L1的结合。抗PD-L1抗体杜伐单抗用作阳性对照,另外,aPDL1.9-dAb-Fc也用作对照,其不包含任何功能性CTLA4靶向部分。

[0319] 可以看出,对于本公开的二聚体(例如,aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc)、抗PD-L1抗体杜伐单抗和对照分子aPDL1.9-dAb-Fc,观察到相当的结合亲和力,其中EC50值约为0.6nM。

[0320] 图2C显示了本公开的二聚体与可溶性人CTLA4的结合。抗CTLA4抗体伊匹单抗

(Bristol-Myers Squibb) 用作阳性对照, 另外, 也将dAb-aCTLA4.34-Fc用作对照, 其其不包含任何功能性PD-L1靶向部分。

[0321] 可以看出, 对于本公开的二聚体 (例如, aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc)、抗CTLA4抗体伊匹单抗和对照分子dAb-aCTLA4.34-Fc观察到相当的结合亲和力, 其中EC50值约为0.5nM。

[0322] 图2D显示了本公开的二聚体与可溶性人CTLA4和可溶性PD-L1的结合, 如用桥接ELISA所检测的。可以看出, 无论是能够特异性结合CTLA4的ISVD在二聚体的N端还是能够特异性结合PD-L1的ISVD在二聚体的N端, 都观察到相当的结合亲和力, 例如, 如由EC50值所示的。类似地, 当在能够特异性结合CTLA4的ISVD与能够特异性结合PD-L1的ISVD之间使用短接头 (例如, GAP) 或长接头 (例如, GGGSGGGSGGGGS) 时, 观察到相当的结合亲和力。另外, 结果显示本公开的二聚体 (例如, aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc、aCTLA4.34-aPDL1.9-Fc、aPDL1.9-L-aCTLA4.34-Fc、aCTLA4.34-L-aPDL1.9-Fc) 可以以相当的结合亲和力与CTLA4和PD-L1结合。

[0323] 图2E显示了本公开的二聚体与可溶性人CTLA4和可溶性PD-L1的结合, 如用桥接ELISA所检测的。可以看出, 对于二聚体中的CTLA4 ISVD-34或二聚体中的CTLA4 ISVD-13, 获得了相当的结合亲和力。

[0324] 图2F显示了本公开的二聚体与可溶性人CTLA4和可溶性PD-L1的结合, 如用桥接ELISA所检测的。可以看出, 对于二聚体中的PD-L1 • ISVD-9、PD-L1 • ISVD-6或PD-L1 • ISVD-m3, 获得了相当的结合亲和力, aPDL1.6-aCTLA4.34-Fc的EC50值略高于aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc或aPDL1.m3-aCTLA4.34-Fc的EC50值。有趣的是, 尽管PD-L1 ISVD-9和PD-L1 ISVD-m3包含几乎完全不同的CDR2序列, 但它们在用于本公开的二聚体时表现相似, 表明CDR2序列可能对二聚体的功能不是至关重要的。

[0325] 还检测了本公开的二聚体 (例如aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc) 与在细胞表面表达的PD-L1或CTLA4的结合活性, 并将其与对照分子 (例如, 杜伐单抗、伊匹单抗、aPDL1.9-dAb-Fc或dAb-aCTLA4.34-Fc) 的结合活性进行比较。结果如图2G和2H所示。

[0326] 图2G显示, 本公开的二聚体 (例如, aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc) 可与A375-hPDL1细胞结合, 其EC50值与杜伐单抗和aPDL1.9-dAb-Fc的相似。

[0327] 图2H显示了本公开的二聚体 (例如, aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc) 可与HEK293-CTLA4细胞结合, 其EC50值与dAb-aCTLA4.34-Fc的相似。然而, 本公开的二聚体 (例如, aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc) 与HEK293-CTLA4细胞结合, 其EC50值高于伊匹单抗, 表明对细胞表面CTLA4的结合亲和力降低。这些结果表明, 本公开的二聚体的毒性可以比伊匹单抗的毒性低。

[0328] 实施例3阻断效力

[0329] 3.1方法

[0330] 3.1.1对PD-L1与PD-L1或CD80的结合的阻断效力

[0331] 通过竞争性ELISA评估本公开的二聚体在阻断PD-L1与CD80的结合方面的能力。

[0332] 简言之, 用3μg/ml的PD-L1-huFc (SEQ ID NO:54) 涂覆96孔板。将PD1-muFc (SEQ ID NO:58) 与本公开的二聚体的混合物, 或CD80-muFc (SEQ ID NO:55) 与本公开的二聚体的混合物加入到涂覆有PD-L1-huFc的板上。所使用的PD1-muFc的浓度为10μg/ml, CD80-muFc的浓度为100μg/ml。将本公开的二聚体进行连续稀释。将HRP标记的山羊抗小鼠IgG1抗体用于检测结合的PD1-muFc或CD80-muFc, 其量应与本公开的二聚体的阻断效力反向相关。在用

TMB显影之后,在微孔板读取器中在450/650nm的波长处读取该板。

[0333] 3.1.2对CTLA4与CD80或CD86的结合的阻断效力

[0334] 通过竞争性ELISA评估本公开的二聚体在阻断CTLA4与CD80或CD86的结合方面的能力。

[0335] 简言之,用3 μ g/ml的CTLA4-huFc (SEQ ID NO:56) 涂覆96孔板。将CD80-muFc (SEQ ID NO:55) 与本公开的二聚体的混合物,或CD86-muFc (SEQ ID NO:57) 与本公开的二聚体的混合物加入到涂覆有CTLA4-huFc的板上。将本公开的二聚体进行连续稀释。将HRP标记的山羊抗小鼠IgG1抗体用于检测结合的CD86-muFc或CD80-muFc。在用TMB显影之后,在微孔板读取器中在450/650nm的波长处读取该板。

[0336] 3.2结果

[0337] 图3A显示了本公开的二聚体在阻断PD-L1与PD-1的结合方面的能力。可以看出,无论是在二聚体的N末端具有能够特异性结合CTLA4的ISVD,还是在二聚体的N末端具有能够特异性结合PD-L1的ISVD,都观察到类似的阻断能力,例如,如通过IC50值所显示的。类似地,当在能够特异性结合CTLA4的ISVD与能够特异性结合PD-L1的ISVD之间使用短接头(例如,GAP)或长接头(例如,GGGSGGGSGGGGS)时,观察到类似的阻断能力。

[0338] 图3B显示了本公开的二聚体在阻断PD-L1与PD-1的结合方面的能力。可以看出,本公开的二聚体的阻断能力与阳性对照度伐单抗或aPDL1.9-dAb-Fc的阻断能力相当。

[0339] 图3C显示了本公开的二聚体在阻断PD-L1与CD80的结合方面的能力。可以看出,本公开的二聚体的阻断能力与阳性对照度伐单抗或aPDL1.9-dAb-Fc的阻断能力相当。

[0340] 图3D显示了本公开的二聚体在阻断PD-L1与CD80的结合方面的能力。可以看出,本公开的二聚体CTLA4.34-aPDL1.9-Fc和aCTLA4.34-L-aPDL1.9-Fc的阻断能力强于aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc和aPDL1.9-L-aCTLA4.34-Fc的阻断能力。

[0341] 图3E显示了本公开的二聚体在阻断CTLA4与CD80的结合方面的能力。可以看出,本公开的二聚体的阻断能力与阳性对照伊匹单抗或dAb-aCTLA4.34-Fc的阻断能力相当。

[0342] 图3F显示了本公开的二聚体在阻断CTLA4与CD86的结合方面的能力。可以看出,本公开的二聚体的阻断能力与阳性对照dAb-aCTLA4.34-Fc的阻断能力相当。另外,本公开的二聚体的结合能力比伊匹单抗的结合能力稍弱。

[0343] 实施例4 PBMC刺激

[0344] 4.1方法

[0345] 检测了本公开的二聚体在刺激免疫反应方面的体外活性,例如通过PBMC细胞分泌IL-2所揭示的。简言之,从不同健康供体分离PBMC,并将其分别与浓度为200ng/ml的葡萄球菌肠毒素B (SEB) 一起孵育。加入不同浓度(0.015nM、0.15nM、1.5nM或15nM)的本公开的二聚体或对照分子。孵育5天后,收集上清液,并利用Human IL-2 Duo Set ELISA试剂盒分析IL-2的水平。

[0346] 4.2结果

[0347] 图4A-4H显示了添加了本公开的二聚体的SEB刺激的PBMC分泌IL-2。X坐标表示添加的二聚体或对照分子的浓度;Y坐标表示分泌的IL-2的浓度。

[0348] 图4A-4D显示了从4个不同供体的PBMC获得的结果。可以看出,本公开的二聚体(例如,aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc)增强免疫反应的能力明显强于对照分子或其组合,表明了强协

同作用。

[0349] 对于二聚体aPDL1.6-aCTLA4.34-Fc、aCTLA4.34-aPDL1.9-Fc、aCTLA4.34-L-aPDL1.9-Fc、aPDL1.m3-aCTLA4.34-Fc和aPDL1.9-aCTLA4.13-Fc,获得了相似的结果,如图4E-4H所示。

[0350] 实施例5体内肿瘤抑制

[0351] 5.1方法

[0352] 5.1.1评估用二聚体在用375-PD-L1细胞和人PMBC转移的异种移植动物模型中的抗肿瘤效果

[0353] 为了评估本公开的二聚体的抗肿瘤效果,使用了aA375-hPD-L1/hPBMC异种移植小鼠模型。用人PD-L1(命名为A375-hPD-L1)稳定转染人黑色素瘤细胞系A375,将所述细胞系用于产生荷瘤异种移植动物模型。简言之,将A375-hPD-L1细胞与健康人PBMC以4:1的比例混合,然后皮下接种到NSG小鼠中。肿瘤接种后2-3小时,以0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg或30mg/kg的剂量每周两次向小鼠腹膜内施用本公开的二聚体(例如,aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc)。在指定的时间点测量肿瘤体积。

[0354] 5.1.2在MC38-HPd-L1双敲入模型中评估二聚体的抗肿瘤效果

[0355] 由于本公开的二聚体不与小鼠PD-L1或小鼠CTLA4交叉反应,因此通过用相应的人基因替代小鼠CTLA4和PD-L1基因来产生人源化双敲入(KI)小鼠,在本实施例中使用了这种双敲入小鼠模型。此外,通过用人PD-L1替代小鼠PD-L1,构建了鼠结肠癌MC38-hPD-L1细胞系(恒定地表达人PD-L1蛋白的MC38细胞系,其通过将人PD-L1表达盒稳定转染入MC38细胞系而产生)。在右前侧腹处给双KI C57BL/6小鼠皮下接种MC38-hPD-L1肿瘤细胞(3×10^5)。当平均肿瘤大小达到约60-80mm³时,将荷瘤动物随机纳入三组之一。每周2次向小鼠静脉内施用本公开的二聚体(例如,aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc)或对照免疫球蛋白(IVIG),进行总共5次。

[0356] 5.2结果

[0357] 本公开的二聚体的抗肿瘤效果如图5A和图5B所示。X坐标表示施用不同浓度的二聚体后的日期;Y坐标表示测量的肿瘤体积。

[0358] 图5A显示了从A375-hPD-L1/PBMC异种移植小鼠模型获得的结果,图5B显示了从MC38-hPd-L1/双KI模型获得的结果。IVIG代表静脉内免疫球蛋白,其用作同种型对照。

[0359] 可以看出,在0.3mg/kg或更高的剂量下,本公开的二聚体在两种模型中都具有显著的抗肿瘤活性。在双KI模型中,例如在第一次施用后第21天,肿瘤被剂量为3.0mg/kg和30mg/kg的本公开的二聚体完全抑制。

[0360] 实施例6体内药代动力学

[0361] 6.1方法

[0362] Sprague Dawley大鼠中的单剂量药代动力学研究

[0363] 向8只Sprague Dawley(SD)大鼠静脉内施用为10mg/kg的单剂量的本公开的二聚体(例如,aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc)。在系列时间点上获得血液样品,直至注射后第29天,以监测大鼠血清中的二聚体浓度。

[0364] 6.2结果

[0365] C_{max}在施用后立即达到约305.15±19.34μg/ml的二聚体,并且平均T_{1/2}约为

142.59±29.89小时,平均AUC(0-384h)约为10.58±0.68h*mg/ml,平均MRT为127.86±20.75小时。其它药代动力学参数示于表3中,并且浓度-时间曲线示于图6中。

[0366] 在图6中,X坐标表示施用二聚体前后的时间;Y坐标表示施用的二聚体的浓度。1-8表示八个独立重复(即8只不同的SD大鼠)的结果。

[0367] 表3大鼠中的PDL1.9-aCTLA4.34-Fc的药代动力学参数

aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc		T _{1/2} (h)	C _{max} (μg/ml)	AUC _{last} (h*mg/ml)	AUC _{inf} (h*mg/ml)	V (ml/kg)	Cl (ml/h/kg)	MRT (h)	AUC _(0-384h) (h*mg/ml)
10mpk	平均值	142.59	305.15	11.55	12.06	170.39	0.83	127.86	10.58
IV	SD	29.87	19.34	0.65	0.75	31.84	0.05	20.75	0.68

[0369] 实施例7肿瘤对二聚体的摄取

[0370] 用Na125I标记本公开的二聚体(例如aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc)或对照分子(例如,dAb-aCTLA4.34-Fc),然后用PD10柱纯化,用0.02mol/L磷酸盐缓冲液,pH 7.4洗涤,检测标记分子的放射性。如以上实施例5所述,将肿瘤细胞注射到小鼠中,当肿瘤达到约100-200mm³的体积时,将小鼠随机分成两组,每组3只小鼠,一组小鼠用于施用本公开的二聚体(例如,aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc),另一组小鼠用于施用对照分子(例如,dAb-aCTLA4.34-Fc)。

[0371] 用异氟醚麻醉荷瘤小鼠,然后将Na125I标记的二聚体或对照分子注入小鼠的尾静脉,剂量为每只小鼠约5MBq(或约135uCi)。

[0372] 分别在施用后1h、8h、1d、2d、3d、4d、5d和7d用Micro-SPECT/CT扫描小鼠。使用静态10min SPECT中等分辨率全身CT。记录动物体的体重、注射剂量、注射时间和剩余剂量。使用PMOD软件对肿瘤摄取的二聚体或对照分子的量进行定量。

[0373] 结果如图7所示。X坐标表示施用二聚体或对照分子后的时间;Y坐标表示肿瘤摄取的量。可以看出,与对照分子相比,本公开的二聚体被更快地摄取并富集在肿瘤中,并且从肿瘤中消失得更慢,这表明潜在的更好的功效和更低的毒性。

[0374] 实施例8本公开的二聚体在非人灵长类动物中的安全性和毒性

[0375] 在非人灵长类动物(例如,食蟹猴)中检测了本公开的二聚体的安全性和毒性。当向猴子施用本公开的二聚体(例如,aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc)时,对于所有治疗组(高达100mg/kg/周,这相当施用150mg/kg/周的伊匹单抗与150mg/kg/周的纳武单抗的组合)都没有观察到与药物相关的结肠炎。

[0376] 然而,当向猴子联合施用伊匹单抗和纳武单抗时(当将3mg/kg/周的伊匹单抗与10mg/kg/周的纳武单抗联合施用;或者当将10mg/kg/周的伊匹单抗与50mg/kg/周的纳武单抗联合施用),在所有治疗组中都发现了与治疗相关的腹泻,并且发现高剂量组(10mg/kg/周的伊匹单抗与50mg/kg/周的纳武单抗的组合)中的一只猴子在施用后第23天死于急性胃扩张。观察到这只猴子持续腹泻和体重下降。对于所有治疗组,观察与治疗相关的结肠变化。

[0377] 因此,与抗PD-1抗体(例如,纳武单抗)和抗CTLA4抗体(例如,伊匹单抗)的组合相比,对于本公开的二聚体,观察到更好的安全性和更低的毒性。

[0378] 实施例9二聚体在人患者中的安全性、疗效和药代动力学

[0379] 在患有晚期实体瘤的人患者中检测了本公开的二聚体(例如,aPDL1.9-

aCTLA4.34-Fc)的安全性、耐受性、药代动力学和疗效。

[0380] 简言之,将对于标准疗法是难治性的或不耐受的患有晚期不可切除或转移性实体瘤的患者纳入临床试验。一些患者接受了抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗,但在被纳入本临床试验之前,对这些治疗没有反应。

[0381] 每两周(Q2W)向患者静脉内施用本公开的二聚体(例如,aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc)。剂量限制毒性(DLT)评估期为28天。施用的剂量水平分别为0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、5mg/kg和10mg/kg。每8周根据RECIST 1.1进行疗效评估。

[0382] 10名患者(3名乳腺癌患者、1名宫颈癌患者、1名卵巢癌患者、1名肾癌患者、1名肺癌患者、1名胰腺癌患者、1名腹膜癌患者和1名子宫癌患者)被纳入(1名在0.3mg/kg组中;3名在1mg/kg组中;3名在3mg/kg组中,以及3名在5mg/kg组中)。治疗的中位持续时间为8周(2至24周)。对于5mg/kg剂量观察到1例DLT(3级免疫相关肝炎,总胆红素无升高;两周内可逆)。最常见的($\geq 30\%$)医疗紧急不良事件(TEAE)为疲劳、腹泻、恶心和呕吐。在3名患者中观察到某些免疫相关的TEAE(即下腹痛、关节痛、肝功能异常、甲状腺功能亢进、恶心和转氨酶升高)。

[0383] 3mg/kg队列中的一名非小细胞肺癌(NSCLC)患者显示完全缓解。1mg/kg队列中的2名患者(1名为三阴性乳腺癌(TNBC),1名为纳武单抗难治性肾细胞癌(RCC))显示该疾病的长期稳定性(>12 周)。另外,3mg/kg队列中的一名卵巢癌患者显示肿瘤大小显著减小(肿瘤大小减小56%)。

[0384] 在较低剂量(例如,低于1mg/kg的剂量)下观察到本公开的二聚体(例如,aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc)的更快清除,这可能归因于靶标介导的清除。

[0385] 对于3mg/kg及以上的剂量,本公开的二聚体的 $T_{1/2}$ 约为7天至9天。

[0386] 这些结果表明,本公开的二聚体具有可接受的安全特征,这与先前报道的其它免疫检测点抑制剂的安全性数据一致。初步疗效结果是有希望的。最初4个队列的药代动力学数据支持两周一次的方案。

[0387] 虽然本文已经示出并描述了本公开的优选实施方案,但对于本领域技术人员来说,显然此类实施方案仅作为示例提供。本公开不受说明书中提供的具体实例的限制。虽然已经参考前述说明书描述了本公开,但是本文中的实施方案的描述和示出不意味着以限制的意义来解释。在不脱离本公开的情况下,本领域技术人员现在将会想到许多变化、改变和取代。此外,应当理解,本公开的所有方面不限于本文阐述的取决于各种条件和变量的具体描述、配置或相对比例。应当理解,在实践本公开时,可以采用本文描述的本公开实施方案的各种替代方案。因此,预期本公开也将覆盖任何此类替代、修改、变化或等同物。下面的权利要求旨在限定本公开的范围,并且这些权利要求及其等同物范围内的方法和结构由此而被覆盖。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 江苏康宁杰瑞生物制药有限公司
- [0003] <120> 二聚体及其用途
- [0004] <130> 0096-PA-005CN
- [0005] <160> 64
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 19
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <220>
- [0012] <223> 抗PD-L1抗体的CDR3
- [0013] <220>
- [0014] <221> X
- [0015] <222> (4) .. (4)
- [0016] <223> X1=E/G
- [0017] <220>
- [0018] <221> X
- [0019] <222> (5) .. (5)
- [0020] <223> X=D/Y
- [0021] <220>
- [0022] <221> X
- [0023] <222> (9) .. (9)
- [0024] <223> ,X=T/P
- [0025] <220>
- [0026] <221> X
- [0027] <222> (10) .. (10)
- [0028] <223> ,X=L/G
- [0029] <220>
- [0030] <221> X
- [0031] <222> (11) .. (11)
- [0032] <223> ,X=V/P
- [0033] <220>
- [0034] <221> X
- [0035] <222> (12) .. (12)
- [0036] <223> X=T/A
- [0037] <400> 1
- [0038] Asp Ser Phe Xaa Xaa Pro Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Ser Gly Ala

[0039]	1	5	10	15
[0040]	Phe Gln Tyr			
[0041]	<210> 2			
[0042]	<211> 10			
[0043]	<212> PRT			
[0044]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0045]	<220>			
[0046]	<223> 抗PD-L1抗体的CDR1			
[0047]	<220>			
[0048]	<221> X			
[0049]	<222> (2) .. (2)			
[0050]	<223> X=K/N			
[0051]	<220>			
[0052]	<221> X			
[0053]	<222> (3) .. (3)			
[0054]	<223> X=M/I			
[0055]	<220>			
[0056]	<221> X			
[0057]	<222> (4) .. (4)			
[0058]	<223> X=S/I			
[0059]	<220>			
[0060]	<221> X			
[0061]	<222> (5) .. (5)			
[0062]	<223> X=S/R			
[0063]	<220>			
[0064]	<221> X			
[0065]	<222> (6) .. (6)			
[0066]	<223> X=R/V			
[0067]	<400> 2			
[0068]	Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Cys Met Ala			
[0069]	1	5	10	
[0070]	<210> 3			
[0071]	<211> 10			
[0072]	<212> PRT			
[0073]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0074]	<220>			
[0075]	<223> PD-L1 ISVD-9 CDR1			
[0076]	<400> 3			
[0077]	Gly Lys Met Ser Ser Arg Arg Cys Met Ala			

[0078]	1	5	10
[0079]	<210> 4		
[0080]	<211> 17		
[0081]	<212> PRT		
[0082]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0083]	<220>		
[0084]	<223> PD-L1 ISVD-9 CDR2		
[0085]	<400> 4		
[0086]	Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val Lys		
[0087]	1	5	10 15
[0088]	Gly		
[0089]	<210> 5		
[0090]	<211> 19		
[0091]	<212> PRT		
[0092]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0093]	<220>		
[0094]	<223> PD-L1 ISVD-9 CDR3		
[0095]	<400> 5		
[0096]	Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser Gly Ala		
[0097]	1	5	10 15
[0098]	Phe Gln Tyr		
[0099]	<210> 6		
[0100]	<211> 128		
[0101]	<212> PRT		
[0102]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0103]	<220>		
[0104]	<223> PD-L1 ISVD-9		
[0105]	<400> 6		
[0106]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0107]	1	5	10 15
[0108]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Met Ser Ser Arg Arg		
[0109]	20	25	30
[0110]	Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val		
[0111]	35	40	45
[0112]	Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val		
[0113]	50	55	60
[0114]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr		
[0115]	65	70	75 80
[0116]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		

[0117]	85	90	95
[0118]	Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser		
[0119]	100	105	110
[0120]	Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0121]	115	120	125
[0122]	<210> 7		
[0123]	<211> 10		
[0124]	<212> PRT		
[0125]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0126]	<220>		
[0127]	<223> PD-L1 ISVD-6 CDR1		
[0128]	<400> 7		
[0129]	Gly Asn Ile Ile Arg Val Arg Cys Met Ala		
[0130]	1	5	10
[0131]	<210> 8		
[0132]	<211> 17		
[0133]	<212> PRT		
[0134]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0135]	<220>		
[0136]	<223> PD-L1 ISVD-6 CDR2		
[0137]	<400> 8		
[0138]	Asn Ile Leu Thr Thr Thr Ile Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val Lys		
[0139]	1	5	10
[0140]	Gly		
[0141]	<210> 9		
[0142]	<211> 19		
[0143]	<212> PRT		
[0144]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0145]	<220>		
[0146]	<223> PD-L1 ISVD-6 CDR3		
[0147]	<400> 9		
[0148]	Asp Ser Phe Gly Tyr Pro Thr Cys Pro Gly Pro Ala Ser Ser Gly Ala		
[0149]	1	5	10
[0150]	Phe Gln Tyr		
[0151]	<210> 10		
[0152]	<211> 128		
[0153]	<212> PRT		
[0154]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0155]	<220>		

[0156] <223> PD-L1 ISVD-6
 [0157] <400> 10
 [0158] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 [0159] 1 5 10 15
 [0160] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn Ile Ile Arg Val Arg
 [0161] 20 25 30
 [0162] Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Gly
 [0163] 35 40 45
 [0164] Pro Asn Ile Leu Thr Thr Thr Ile Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
 [0165] 50 55 60
 [0166] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asn Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr
 [0167] 65 70 75 80
 [0168] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 [0169] 85 90 95
 [0170] Ala Ala Asp Ser Phe Gly Tyr Pro Thr Cys Pro Gly Pro Ala Ser Ser
 [0171] 100 105 110
 [0172] Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0173] 115 120 125
 [0174] <210> 11
 [0175] <211> 17
 [0176] <212> PRT
 [0177] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0178] <220>
 [0179] <223> PD-L1 ISVD-m3 CDR2
 [0180] <400> 11
 [0181] Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
 [0182] 1 5 10 15
 [0183] Gly
 [0184] <210> 12
 [0185] <211> 128
 [0186] <212> PRT
 [0187] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0188] <220>
 [0189] <223> PD-L1 ISVD-m3
 [0190] <400> 12
 [0191] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0192] 1 5 10 15
 [0193] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Met Ser Ser Arg Arg
 [0194] 20 25 30

[0195]	Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
[0196]	35 40 45
[0197]	Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
[0198]	50 55 60
[0199]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asn Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr
[0200]	65 70 75 80
[0201]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[0202]	85 90 95
[0203]	Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
[0204]	100 105 110
[0205]	Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0206]	115 120 125
[0207]	<210> 13
[0208]	<211> 128
[0209]	<212> PRT
[0210]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0211]	<220>
[0212]	<223> PD-L1 ISVD-4
[0213]	<400> 13
[0214]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0215]	1 5 10 15
[0216]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Met Ser Ser Arg Arg
[0217]	20 25 30
[0218]	Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
[0219]	35 40 45
[0220]	Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
[0221]	50 55 60
[0222]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asn Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr
[0223]	65 70 75 80
[0224]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[0225]	85 90 95
[0226]	Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
[0227]	100 105 110
[0228]	Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0229]	115 120 125
[0230]	<210> 14
[0231]	<211> 128
[0232]	<212> PRT
[0233]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0234]	<220>
[0235]	<223> PD-L1 ISVD-11
[0236]	<400> 14
[0237]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0238]	1 5 10 15
[0239]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Met Ser Ser Arg Arg
[0240]	20 25 30
[0241]	Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Val
[0242]	35 40 45
[0243]	Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
[0244]	50 55 60
[0245]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
[0246]	65 70 75 80
[0247]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0248]	85 90 95
[0249]	Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
[0250]	100 105 110
[0251]	Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0252]	115 120 125
[0253]	<210> 15
[0254]	<211> 128
[0255]	<212> PRT
[0256]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0257]	<220>
[0258]	<223> PD-L1 ISVD-13
[0259]	<400> 15
[0260]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0261]	1 5 10 15
[0262]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Met Ser Ser Arg Arg
[0263]	20 25 30
[0264]	Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
[0265]	35 40 45
[0266]	Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
[0267]	50 55 60
[0268]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
[0269]	65 70 75 80
[0270]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0271]	85 90 95
[0272]	Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser

[0273]	100	105	110
[0274]	Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0275]	115	120	125
[0276]	<210> 16		
[0277]	<211> 17		
[0278]	<212> PRT		
[0279]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0280]	<220>		
[0281]	<223> CDR2 of CTLA4		
[0282]	<220>		
[0283]	<221> X		
[0284]	<222> (3) .. (3)		
[0285]	<223> X=Y/S		
[0286]	<220>		
[0287]	<221> X		
[0288]	<222> (4) .. (4)		
[0289]	<223> X=I/L		
[0290]	<400> 16		
[0291]	Ala Ile Xaa Xaa Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
[0292]	1	5	10
[0293]	Gly		15
[0294]	<210> 17		
[0295]	<211> 5		
[0296]	<212> PRT		
[0297]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0298]	<220>		
[0299]	<223> CTLA4 ISVD-34 CDR1		
[0300]	<400> 17		
[0301]	Ala Tyr Cys Met Gly		
[0302]	1	5	
[0303]	<210> 18		
[0304]	<211> 17		
[0305]	<212> PRT		
[0306]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0307]	<220>		
[0308]	<223> CTLA4 ISVD-34 CDR2		
[0309]	<400> 18		
[0310]	Ala Ile Tyr Ile Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
[0311]	1	5	10
			15

[0312]	Gly
[0313]	<210> 19
[0314]	<211> 19
[0315]	<212> PRT
[0316]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0317]	<220>
[0318]	<223> CTLA4 ISVD-34 CDR3
[0319]	<400> 19
[0320]	Asp Val Ile Pro Thr Glu Thr Cys Leu Gly Gly Ser Trp Ser Gly Pro
[0321]	1 5 10 15
[0322]	Phe Gly Tyr
[0323]	<210> 20
[0324]	<211> 128
[0325]	<212> PRT
[0326]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0327]	<220>
[0328]	<223> CTLA4 ISVD-34
[0329]	<400> 20
[0330]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0331]	1 5 10 15
[0332]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ile Tyr Ser Ala Tyr
[0333]	20 25 30
[0334]	Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val
[0335]	35 40 45
[0336]	Ala Ala Ile Tyr Ile Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0337]	50 55 60
[0338]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0339]	65 70 75 80
[0340]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0341]	85 90 95
[0342]	Ala Ala Asp Val Ile Pro Thr Glu Thr Cys Leu Gly Gly Ser Trp Ser
[0343]	100 105 110
[0344]	Gly Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0345]	115 120 125
[0346]	<210> 21
[0347]	<211> 17
[0348]	<212> PRT
[0349]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0350]	<220>

[0351] <223> CTLA4 ISVD-C1 CDR2
 [0352] <400> 21
 [0353] Ala Ile Tyr Leu Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 [0354] 1 5 10 15
 [0355] Gly
 [0356] <210> 22
 [0357] <211> 128
 [0358] <212> PRT
 [0359] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0360] <220>
 [0361] <223> CTLA4 ISVD-C1
 [0362] <400> 22
 [0363] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 [0364] 1 5 10 15
 [0365] Ser Leu Gly Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ile Tyr Ser Ala Tyr
 [0366] 20 25 30
 [0367] Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0368] 35 40 45
 [0369] Ala Ala Ile Tyr Leu Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0370] 50 55 60
 [0371] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Ile Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0372] 65 70 75 80
 [0373] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Ser Cys
 [0374] 85 90 95
 [0375] Ala Ala Asp Val Ile Pro Thr Glu Thr Cys Leu Gly Gly Ser Trp Ser
 [0376] 100 105 110
 [0377] Gly Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0378] 115 120 125
 [0379] <210> 23
 [0380] <211> 17
 [0381] <212> PRT
 [0382] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0383] <220>
 [0384] <223> CTLA4 ISVD-13 CDR2
 [0385] <400> 23
 [0386] Ala Ile Ser Ile Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 [0387] 1 5 10 15
 [0388] Gly
 [0389] <210> 24

52

[0429]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0430]				85					90					95		
[0431]	Ala	Ala	Asp	Val	Ile	Pro	Thr	Glu	Thr	Cys	Leu	Gly	Gly	Ser	Trp	Ser
[0432]				100					105					110		
[0433]	Gly	Pro	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
[0434]				115					120					125		
[0435]	<210> 26															
[0436]	<211> 128															
[0437]	<212> PRT															
[0438]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0439]	<220>															
[0440]	<223> CTLA4 ISVD-27															
[0441]	<400> 26															
[0442]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[0443]	1			5					10					15		
[0444]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Ala	Tyr
[0445]				20					25					30		
[0446]	Cys	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Val	Gly	Val
[0447]				35					40					45		
[0448]	Ala	Ala	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[0449]				50					55					60		
[0450]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[0451]	65					70					75				80	
[0452]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0453]				85						90					95	
[0454]	Ala	Ala	Asp	Val	Ile	Pro	Thr	Glu	Thr	Cys	Leu	Gly	Gly	Ser	Trp	Ser
[0455]				100						105					110	
[0456]	Gly	Pro	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
[0457]				115						120					125	
[0458]	<210> 27															
[0459]	<211> 128															
[0460]	<212> PRT															
[0461]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0462]	<220>															
[0463]	<223> CTLA4 ISVD-28															
[0464]	<400> 27															
[0465]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[0466]	1			5						10					15	
[0467]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Ala	Tyr

[0468]	20	25	30
[0469]	Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Gly Val		
[0470]	35	40	45
[0471]	Ala Ala Ile Ser Ile Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0472]	50	55	60
[0473]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0474]	65	70	75
[0475]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0476]	85	90	95
[0477]	Ala Ala Asp Val Ile Pro Thr Glu Thr Cys Leu Gly Gly Ser Trp Ser		
[0478]	100	105	110
[0479]	Gly Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0480]	115	120	125
[0481]	<210> 28		
[0482]	<211> 128		
[0483]	<212> PRT		
[0484]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0485]	<220>		
[0486]	<223> CTLA4 ISVD-29		
[0487]	<400> 28		
[0488]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0489]	1	5	10
[0490]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ile Tyr Ser Ala Tyr		
[0491]	20	25	30
[0492]	Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val		
[0493]	35	40	45
[0494]	Ala Ala Ile Ser Ile Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0495]	50	55	60
[0496]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0497]	65	70	75
[0498]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0499]	85	90	95
[0500]	Ala Ala Asp Val Ile Pro Thr Glu Thr Cys Leu Gly Gly Ser Trp Ser		
[0501]	100	105	110
[0502]	Gly Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0503]	115	120	125
[0504]	<210> 29		
[0505]	<211> 128		
[0506]	<212> PRT		

[0507]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0508]	<220>															
[0509]	<223> CTLA4 ISVD-30															
[0510]	<400> 29															
[0511]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[0512]	1				5					10					15	
[0513]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Ala	Tyr
[0514]				20						25					30	
[0515]	Cys	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val
[0516]			35					40					45			
[0517]	Ala	Ala	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[0518]		50					55					60				
[0519]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[0520]	65					70					75				80	
[0521]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0522]				85						90					95	
[0523]	Ala	Ala	Asp	Val	Ile	Pro	Thr	Glu	Thr	Cys	Leu	Gly	Gly	Ser	Trp	Ser
[0524]				100						105					110	
[0525]	Gly	Pro	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
[0526]			115					120					125			
[0527]	<210> 30															
[0528]	<211> 128															
[0529]	<212> PRT															
[0530]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0531]	<220>															
[0532]	<223> CTLA4 ISVD-31															
[0533]	<400> 30															
[0534]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[0535]	1				5					10					15	
[0536]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Ala	Tyr
[0537]				20						25					30	
[0538]	Cys	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val
[0539]			35					40					45			
[0540]	Ala	Ala	Ile	Tyr	Ile	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[0541]		50					55					60				
[0542]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gln	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[0543]	65					70					75				80	
[0544]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0545]				85						90					95	

[0546]	Ala Ala Asp Val Ile Pro Thr Glu Thr Cys Leu Gly Gly Ser Trp Ser
[0547]	100 105 110
[0548]	Gly Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0549]	115 120 125
[0550]	<210> 31
[0551]	<211> 128
[0552]	<212> PRT
[0553]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0554]	<220>
[0555]	<223> CTLA4 ISVD-32
[0556]	<400> 31
[0557]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0558]	1 5 10 15
[0559]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ile Tyr Ser Ala Tyr
[0560]	20 25 30
[0561]	Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
[0562]	35 40 45
[0563]	Ala Ala Ile Tyr Ile Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0564]	50 55 60
[0565]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0566]	65 70 75 80
[0567]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0568]	85 90 95
[0569]	Ala Ala Asp Val Ile Pro Thr Glu Thr Cys Leu Gly Gly Ser Trp Ser
[0570]	100 105 110
[0571]	Gly Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0572]	115 120 125
[0573]	<210> 32
[0574]	<211> 128
[0575]	<212> PRT
[0576]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0577]	<220>
[0578]	<223> CTLA4 ISVD-33
[0579]	<400> 32
[0580]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0581]	1 5 10 15
[0582]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ile Tyr Ser Ala Tyr
[0583]	20 25 30
[0584]	Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Gly Val

[0585]	35	40	45
[0586]	Ala Ala Ile Tyr Ile Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0587]	50	55	60
[0588]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0589]	65	70	75
[0590]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0591]	85	90	95
[0592]	Ala Ala Asp Val Ile Pro Thr Glu Thr Cys Leu Gly Gly Ser Trp Ser		
[0593]	100	105	110
[0594]	Gly Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0595]	115	120	125
[0596]	<210> 33		
[0597]	<211> 3		
[0598]	<212> PRT		
[0599]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0600]	<220>		
[0601]	<223> 短接头		
[0602]	<400> 33		
[0603]	Gly Ala Pro		
[0604]	1		
[0605]	<210> 34		
[0606]	<211> 15		
[0607]	<212> PRT		
[0608]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0609]	<220>		
[0610]	<223> 长接头		
[0611]	<400> 34		
[0612]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
[0613]	1	5	10
[0614]	<210> 35		
[0615]	<211> 232		
[0616]	<212> PRT		
[0617]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0618]	<220>		
[0619]	<223> 具有铰链的IgG1-Fc区		
[0620]	<400> 35		
[0621]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
[0622]	1	5	10
[0623]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		

[0624]	20	25	30
[0625]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
[0626]	35	40	45
[0627]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
[0628]	50	55	60
[0629]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
[0630]	65	70	75
[0631]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
[0632]	85	90	95
[0633]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
[0634]	100	105	110
[0635]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
[0636]	115	120	125
[0637]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
[0638]	130	135	140
[0639]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
[0640]	145	150	155
[0641]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
[0642]	165	170	175
[0643]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
[0644]	180	185	190
[0645]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
[0646]	195	200	205
[0647]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
[0648]	210	215	220
[0649]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0650]	225	230	
[0651]	<210> 36		
[0652]	<211> 330		
[0653]	<212> PRT		
[0654]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0655]	<220>		
[0656]	<223> 人IgG1恒定区		
[0657]	<400> 36		
[0658]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
[0659]	1	5	10
[0660]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
[0661]	20	25	30
[0662]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		

[0663]	35	40	45
[0664]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
[0665]	50	55	60
[0666]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
[0667]	65	70	75
[0668]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
[0669]	85	90	95
[0670]	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
[0671]	100	105	110
[0672]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[0673]	115	120	125
[0674]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
[0675]	130	135	140
[0676]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
[0677]	145	150	155
[0678]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
[0679]	165	170	175
[0680]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
[0681]	180	185	190
[0682]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
[0683]	195	200	205
[0684]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
[0685]	210	215	220
[0686]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
[0687]	225	230	235
[0688]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[0689]	245	250	255
[0690]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[0691]	260	265	270
[0692]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[0693]	275	280	285
[0694]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[0695]	290	295	300
[0696]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0697]	305	310	315
[0698]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0699]	325	330	
[0700]	<210> 37		
[0701]	<211> 124		

[0702]	<212>	PRT
[0703]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0704]	<220>	
[0705]	<223>	对照dAb
[0706]	<400>	37
[0707]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly	
[0708]	1 5 10 15	
[0709]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Cys Met Gly	
[0710]	20 25 30	
[0711]	Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ala Leu Ala	
[0712]	35 40 45	
[0713]	Val Thr Gly Ile Ser Ile Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg	
[0714]	50 55 60	
[0715]	Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met	
[0716]	65 70 75 80	
[0717]	Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser	
[0718]	85 90 95	
[0719]	Thr Ile Arg Tyr Val Cys Pro Gly Leu Asn Arg Gly Asp Gln Phe Lys	
[0720]	100 105 110	
[0721]	Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser	
[0722]	115 120	
[0723]	<210>	38
[0724]	<211>	232
[0725]	<212>	PRT
[0726]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0727]	<220>	
[0728]	<223>	具有铰链区(C-S)的IgG1-Fc区
[0729]	<400>	38
[0730]	Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
[0731]	1 5 10 15	
[0732]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
[0733]	20 25 30	
[0734]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
[0735]	35 40 45	
[0736]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
[0737]	50 55 60	
[0738]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
[0739]	65 70 75 80	
[0740]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	

[0741]		85		90		95
[0742]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala					
[0743]		100		105		110
[0744]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro					
[0745]		115		120		125
[0746]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr					
[0747]		130		135		140
[0748]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser					
[0749]	145		150		155	160
[0750]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr					
[0751]		165		170		175
[0752]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr					
[0753]		180		185		190
[0754]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe					
[0755]		195		200		205
[0756]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys					
[0757]		210		215		220
[0758]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
[0759]	225		230			
[0760]	<210> 39					
[0761]	<211> 227					
[0762]	<212> PRT					
[0763]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0764]	<220>					
[0765]	<223> 无铰链的人IgG1-Fc区					
[0766]	<400> 39					
[0767]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly					
[0768]	1	5		10		15
[0769]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met					
[0770]		20		25		30
[0771]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His					
[0772]		35		40		45
[0773]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val					
[0774]		50		55		60
[0775]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr					
[0776]	65		70		75	80
[0777]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly					
[0778]		85		90		95
[0779]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile					

[0780]	100	105	110
[0781]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[0782]	115	120	125
[0783]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
[0784]	130	135	140
[0785]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0786]	145	150	155
[0787]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0788]	165	170	175
[0789]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
[0790]	180	185	190
[0791]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[0792]	195	200	205
[0793]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[0794]	210	215	220
[0795]	Pro Gly Lys		
[0796]	225		
[0797]	<210> 40		
[0798]	<211> 493		
[0799]	<212> PRT		
[0800]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0801]	<220>		
[0802]	<223> aPDL1.9-aCTLA4.34-Fc		
[0803]	<400> 40		
[0804]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0805]	1	5	10
[0806]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Met Ser Ser Arg Arg		15
[0807]	20	25	30
[0808]	Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val		
[0809]	35	40	45
[0810]	Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val		
[0811]	50	55	60
[0812]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr		
[0813]	65	70	75
[0814]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
[0815]	85	90	95
[0816]	Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser		
[0817]	100	105	110
[0818]	Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		

[0819]	115	120	125
[0820]	Gly Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln		
[0821]	130	135	140
[0822]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ile Tyr		
[0823]	145	150	155
[0824]	Ser Ala Tyr Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
[0825]	165	170	175
[0826]	Glu Gly Val Ala Ala Ile Tyr Ile Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala		
[0827]	180	185	190
[0828]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
[0829]	195	200	205
[0830]	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
[0831]	210	215	220
[0832]	Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Val Ile Pro Thr Glu Thr Cys Leu Gly Gly		
[0833]	225	230	235
[0834]	Ser Trp Ser Gly Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[0835]	245	250	255
[0836]	Val Ser Ser Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys		
[0837]	260	265	270
[0838]	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
[0839]	275	280	285
[0840]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
[0841]	290	295	300
[0842]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
[0843]	305	310	315
[0844]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
[0845]	325	330	335
[0846]	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
[0847]	340	345	350
[0848]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
[0849]	355	360	365
[0850]	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
[0851]	370	375	380
[0852]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
[0853]	385	390	395
[0854]	Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
[0855]	405	410	415
[0856]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
[0857]	420	425	430

[0858]	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
[0859]			435						440							445
[0860]	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
[0861]			450						455							460
[0862]	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
[0863]			465						470							480
[0864]	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
[0865]							485									490
[0866]	<210> 41															
[0867]	<211> 505															
[0868]	<212> PRT															
[0869]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0870]	<220>															
[0871]	<223> aPDL1.9-L-aCTLA4.34-Fc															
[0872]	<400> 41															
[0873]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[0874]	1				5					10					15	
[0875]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Arg	Arg
[0876]					20					25					30	
[0877]	Cys	Met	Ala	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Arg	Val
[0878]			35						40						45	
[0879]	Ala	Lys	Leu	Leu	Thr	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ala	Asp	Ser	Val
[0880]		50						55					60			
[0881]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr
[0882]	65						70					75				80
[0883]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0884]						85					90				95	
[0885]	Ala	Ala	Asp	Ser	Phe	Glu	Asp	Pro	Thr	Cys	Thr	Leu	Val	Thr	Ser	Ser
[0886]				100						105					110	
[0887]	Gly	Ala	Phe	Gln	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
[0888]				115						120					125	
[0889]	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln
[0890]		130							135						140	
[0891]	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser
[0892]		145							150					155		160
[0893]	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Ala	Tyr	Cys
[0894]						165					170					175
[0895]	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Gly	Val	Ala
[0896]						180										190

[0897]	Ala	Ile	Tyr	Ile	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
[0898]				195				200					205			
[0899]	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
[0900]			210				215					220				
[0901]	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
[0902]	225					230					235					240
[0903]	Ala	Asp	Val	Ile	Pro	Thr	Glu	Thr	Cys	Leu	Gly	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly
[0904]					245					250					255	
[0905]	Pro	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
[0906]				260					265						270	
[0907]	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
[0908]				275				280					285			
[0909]	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
[0910]		290					295					300				
[0911]	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
[0912]	305					310					315					320
[0913]	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
[0914]					325					330					335	
[0915]	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
[0916]				340					345					350		
[0917]	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
[0918]			355					360					365			
[0919]	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
[0920]		370					375					380				
[0921]	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
[0922]	385					390					395					400
[0923]	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
[0924]					405					410					415	
[0925]	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
[0926]				420					425					430		
[0927]	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
[0928]			435					440					445			
[0929]	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
[0930]		450					455					460				
[0931]	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
[0932]	465					470					475					480
[0933]	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
[0934]					485					490					495	
[0935]	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							

[0936]	500	505
[0937]	<210> 42	
[0938]	<211> 493	
[0939]	<212> PRT	
[0940]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0941]	<220>	
[0942]	<223> aCTLA4.34-aPDL1.9-Fc	
[0943]	<400> 42	
[0944]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0945]	1 5 10 15	
[0946]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ile Tyr Ser Ala Tyr	
[0947]	20 25 30	
[0948]	Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val	
[0949]	35 40 45	
[0950]	Ala Ala Ile Tyr Ile Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[0951]	50 55 60	
[0952]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[0953]	65 70 75 80	
[0954]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0955]	85 90 95	
[0956]	Ala Ala Asp Val Ile Pro Thr Glu Thr Cys Leu Gly Gly Ser Trp Ser	
[0957]	100 105 110	
[0958]	Gly Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0959]	115 120 125	
[0960]	Gly Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
[0961]	130 135 140	
[0962]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Met Ser	
[0963]	145 150 155 160	
[0964]	Ser Arg Arg Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg	
[0965]	165 170 175	
[0966]	Glu Arg Val Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala	
[0967]	180 185 190	
[0968]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn	
[0969]	195 200 205	
[0970]	Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val	
[0971]	210 215 220	
[0972]	Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val	
[0973]	225 230 235 240	
[0974]	Thr Ser Ser Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	

[0975]					245					250					255		
[0976]	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	
[0977]					260					265					270		
[0978]	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
[0979]					275					280					285		
[0980]	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
[0981]					290					295					300		
[0982]	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
[0983]	305						310					315				320	
[0984]	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
[0985]							325					330				335	
[0986]	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
[0987]							340					345				350	
[0988]	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
[0989]							355								360		365
[0990]	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
[0991]							370								375		380
[0992]	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
[0993]	385						390						395			400	
[0994]	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
[0995]							405						410			415	
[0996]	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
[0997]							420								425		430
[0998]	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
[0999]							435								440		445
[1000]	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
[1001]							450								455		460
[1002]	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
[1003]	465						470						475			480	
[1004]	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
[1005]							485						490				
[1006]	<210>	43															
[1007]	<211>	505															
[1008]	<212>	PRT															
[1009]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)															
[1010]	<220>																
[1011]	<223>	aCTLA4.34-L-aPDL1.9-FC															
[1012]	<400>	43															
[1013]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	

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

[1053]	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
[1054]	325 330 335
[1055]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[1056]	340 345 350
[1057]	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[1058]	355 360 365
[1059]	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[1060]	370 375 380
[1061]	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
[1062]	385 390 395 400
[1063]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
[1064]	405 410 415
[1065]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
[1066]	420 425 430
[1067]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
[1068]	435 440 445
[1069]	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
[1070]	450 455 460
[1071]	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
[1072]	465 470 475 480
[1073]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
[1074]	485 490 495
[1075]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1076]	500 505
[1077]	<210> 44
[1078]	<211> 487
[1079]	<212> PRT
[1080]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1081]	<220>
[1082]	<223> aPDL1.9-dAb-Fc
[1083]	<400> 44
[1084]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1085]	1 5 10 15
[1086]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Met Ser Ser Arg Arg
[1087]	20 25 30
[1088]	Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
[1089]	35 40 45
[1090]	Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
[1091]	50 55 60

[1092]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
[1093]	65 70 75 80
[1094]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1095]	85 90 95
[1096]	Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
[1097]	100 105 110
[1098]	Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1099]	115 120 125
[1100]	Gly Ala Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
[1101]	130 135 140
[1102]	Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr
[1103]	145 150 155 160
[1104]	Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
[1105]	165 170 175
[1106]	Ala Leu Ala Val Thr Gly Ile Ser Ile Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1107]	180 185 190
[1108]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
[1109]	195 200 205
[1110]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys
[1111]	210 215 220
[1112]	Ala Ala Ser Thr Ile Arg Tyr Val Cys Pro Gly Leu Asn Arg Gly Asp
[1113]	225 230 235 240
[1114]	Gln Phe Lys Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu
[1115]	245 250 255
[1116]	Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[1117]	260 265 270
[1118]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[1119]	275 280 285
[1120]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[1121]	290 295 300
[1122]	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[1123]	305 310 315 320
[1124]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
[1125]	325 330 335
[1126]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[1127]	340 345 350
[1128]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
[1129]	355 360 365
[1130]	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

[1131]	370	375	380
[1132]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys		
[1133]	385	390	395 400
[1134]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
[1135]	405	410	415
[1136]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
[1137]	420	425	430
[1138]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
[1139]	435	440	445
[1140]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
[1141]	450	455	460
[1142]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
[1143]	465	470	475 480
[1144]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1145]	485		
[1146]	<210> 45		
[1147]	<211> 487		
[1148]	<212> PRT		
[1149]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1150]	<220>		
[1151]	<223> dAb-aCTLA4.34-Fc		
[1152]	<400> 45		
[1153]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly		
[1154]	1 5 10 15		
[1155]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Cys Met Gly		
[1156]	20 25 30		
[1157]	Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ala Leu Ala		
[1158]	35 40 45		
[1159]	Val Thr Gly Ile Ser Ile Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg		
[1160]	50 55 60		
[1161]	Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met		
[1162]	65 70 75 80		
[1163]	Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser		
[1164]	85 90 95		
[1165]	Thr Ile Arg Tyr Val Cys Pro Gly Leu Asn Arg Gly Asp Gln Phe Lys		
[1166]	100 105 110		
[1167]	Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Pro Gln		
[1168]	115 120 125		
[1169]	Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser		

[1170]	130	135	140
[1171]	Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ile Tyr Ser Ala Tyr Cys		
[1172]	145	150	155
[1173]	Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val Ala		
[1174]	165	170	175
[1175]	Ala Ile Tyr Ile Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
[1176]	180	185	190
[1177]	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu		
[1178]	195	200	205
[1179]	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
[1180]	210	215	220
[1181]	Ala Asp Val Ile Pro Thr Glu Thr Cys Leu Gly Gly Ser Trp Ser Gly		
[1182]	225	230	235
[1183]	Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu		
[1184]	245	250	255
[1185]	Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
[1186]	260	265	270
[1187]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
[1188]	275	280	285
[1189]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
[1190]	290	295	300
[1191]	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
[1192]	305	310	315
[1193]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
[1194]	325	330	335
[1195]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
[1196]	340	345	350
[1197]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
[1198]	355	360	365
[1199]	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
[1200]	370	375	380
[1201]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys		
[1202]	385	390	395
[1203]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
[1204]	405	410	415
[1205]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
[1206]	420	425	430
[1207]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
[1208]	435	440	445

[1209]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
[1210]	450 455 460
[1211]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[1212]	465 470 475 480
[1213]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1214]	485
[1215]	<210> 46
[1216]	<211> 491
[1217]	<212> PRT
[1218]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1219]	<220>
[1220]	<223> aPDL1.6-aCTLA4.34-Fc
[1221]	<400> 46
[1222]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
[1223]	1 5 10 15
[1224]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn Ile Ile Arg Val Arg
[1225]	20 25 30
[1226]	Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Gly
[1227]	35 40 45
[1228]	Pro Asn Ile Leu Thr Thr Thr Ile Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
[1229]	50 55 60
[1230]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asn Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr
[1231]	65 70 75 80
[1232]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[1233]	85 90 95
[1234]	Ala Ala Asp Ser Phe Gly Tyr Pro Thr Cys Pro Gly Pro Ala Ser Ser
[1235]	100 105 110
[1236]	Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[1237]	115 120 125
[1238]	Gly Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
[1239]	130 135 140
[1240]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ile Tyr
[1241]	145 150 155 160
[1242]	Ser Ala Tyr Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[1243]	165 170 175
[1244]	Glu Gly Val Ala Ala Ile Tyr Ile Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
[1245]	180 185 190
[1246]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
[1247]	195 200 205

[1248]	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
[1249]	210						215					220				
[1250]	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Asp	Val	Ile	Pro	Thr	Glu	Thr	Cys	Leu	Gly	Gly
[1251]	225					230					235				240	
[1252]	Ser	Trp	Ser	Gly	Pro	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
[1253]				245						250					255	
[1254]	Val	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
[1255]				260					265					270		
[1256]	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
[1257]				275				280					285			
[1258]	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
[1259]	290						295					300				
[1260]	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
[1261]	305					310					315				320	
[1262]	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
[1263]				325						330					335	
[1264]	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
[1265]				340					345					350		
[1266]	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
[1267]			355					360					365			
[1268]	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
[1269]	370						375					380				
[1270]	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp
[1271]	385					390					395				400	
[1272]	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
[1273]				405						410					415	
[1274]	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
[1275]				420					425					430		
[1276]	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
[1277]			435					440					445			
[1278]	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
[1279]	450						455					460				
[1280]	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
[1281]	465					470					475				480	
[1282]	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
[1283]				485						490						
[1284]	<210>	47														
[1285]	<211>	487														
[1286]	<212>	PRT														

[1287]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[1288]	<220>															
[1289]	<223> aPDL1.6-dAb-Fc															
[1290]	<400> 47															
[1291]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ala	Gly	Gly
[1292]	1				5					10					15	
[1293]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Asn	Ile	Ile	Arg	Val	Arg
[1294]					20					25					30	
[1295]	Cys	Met	Ala	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Arg	Gly
[1296]					35					40				45		
[1297]	Pro	Asn	Ile	Leu	Thr	Thr	Thr	Ile	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ala	Asp	Ser	Val
[1298]					50					55				60		
[1299]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gln	Asn	Asn	Ala	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr
[1300]	65					70					75					80
[1301]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
[1302]					85						90					95
[1303]	Ala	Ala	Asp	Ser	Phe	Gly	Tyr	Pro	Thr	Cys	Pro	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser
[1304]					100						105				110	
[1305]	Gly	Ala	Phe	Gln	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser
[1306]					115						120				125	
[1307]	Gly	Ala	Pro	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln
[1308]					130						135				140	
[1309]	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Tyr
[1310]	145					150					155					160
[1311]	Cys	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val
[1312]					165						170					175
[1313]	Ala	Leu	Ala	Val	Thr	Gly	Ile	Ser	Ile	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[1314]					180						185				190	
[1315]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gln	Asp	Asn	Val	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[1316]					195						200				205	
[1317]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Ala	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
[1318]					210						215				220	
[1319]	Ala	Ala	Ser	Thr	Ile	Arg	Tyr	Val	Cys	Pro	Gly	Leu	Asn	Arg	Gly	Asp
[1320]	225					230					235					240
[1321]	Gln	Phe	Lys	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu
[1322]					245						250					255
[1323]	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
[1324]					260						265				270	
[1325]	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys

[1326]	275	280	285
[1327]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
[1328]	290	295	300
[1329]	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
[1330]	305	310	315
[1331]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
[1332]	325	330	335
[1333]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
[1334]	340	345	350
[1335]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
[1336]	355	360	365
[1337]	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
[1338]	370	375	380
[1339]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys		
[1340]	385	390	395
[1341]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
[1342]	405	410	415
[1343]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
[1344]	420	425	430
[1345]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
[1346]	435	440	445
[1347]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
[1348]	450	455	460
[1349]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
[1350]	465	470	475
[1351]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1352]	485		
[1353]	<210> 48		
[1354]	<211> 491		
[1355]	<212> PRT		
[1356]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1357]	<220>		
[1358]	<223> aPDL1.m3-aCTLA4.34-Fc		
[1359]	<400> 48		
[1360]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1361]	1	5	10
[1362]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Met Ser Ser Arg Arg		
[1363]	20	25	30
[1364]	Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val		

[1365]	35	40	45
[1366]	Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe		
[1367]	50	55	60
[1368]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asn Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr		
[1369]	65	70	75
[1370]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys		
[1371]	85	90	95
[1372]	Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser		
[1373]	100	105	110
[1374]	Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser		
[1375]	115	120	125
[1376]	Gly Ala Pro Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln		
[1377]	130	135	140
[1378]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ile Tyr		
[1379]	145	150	155
[1380]	Ser Ala Tyr Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
[1381]	165	170	175
[1382]	Glu Gly Val Ala Ala Ile Tyr Ile Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala		
[1383]	180	185	190
[1384]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn		
[1385]	195	200	205
[1386]	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
[1387]	210	215	220
[1388]	Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Val Ile Pro Thr Glu Thr Cys Leu Gly Gly		
[1389]	225	230	235
[1390]	Ser Trp Ser Gly Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[1391]	245	250	255
[1392]	Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro		
[1393]	260	265	270
[1394]	Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
[1395]	275	280	285
[1396]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
[1397]	290	295	300
[1398]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn		
[1399]	305	310	315
[1400]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
[1401]	325	330	335
[1402]	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
[1403]	340	345	350

[1404]	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
[1405]	355 360 365
[1406]	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
[1407]	370 375 380
[1408]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
[1409]	385 390 395 400
[1410]	Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
[1411]	405 410 415
[1412]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
[1413]	420 425 430
[1414]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
[1415]	435 440 445
[1416]	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
[1417]	450 455 460
[1418]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
[1419]	465 470 475 480
[1420]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1421]	485 490
[1422]	<210> 49
[1423]	<211> 487
[1424]	<212> PRT
[1425]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1426]	<220>
[1427]	<223> aPDL1.m3-dAb-Fc
[1428]	<400> 49
[1429]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1430]	1 5 10 15
[1431]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Lys Met Ser Ser Arg Arg
[1432]	20 25 30
[1433]	Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
[1434]	35 40 45
[1435]	Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
[1436]	50 55 60
[1437]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asn Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr
[1438]	65 70 75 80
[1439]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[1440]	85 90 95
[1441]	Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
[1442]	100 105 110

[1443]	Gly	Ala	Phe	Gln	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser
[1444]			115					120					125			
[1445]	Gly	Ala	Pro	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln
[1446]			130					135					140			
[1447]	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Tyr
[1448]	145						150					155				160
[1449]	Cys	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val
[1450]						165					170					175
[1451]	Ala	Leu	Ala	Val	Thr	Gly	Ile	Ser	Ile	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[1452]				180						185				190		
[1453]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gln	Asp	Asn	Val	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[1454]			195						200					205		
[1455]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Ala	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
[1456]			210					215					220			
[1457]	Ala	Ala	Ser	Thr	Ile	Arg	Tyr	Val	Cys	Pro	Gly	Leu	Asn	Arg	Gly	Asp
[1458]	225						230					235				240
[1459]	Gln	Phe	Lys	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu
[1460]					245					250						255
[1461]	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
[1462]				260						265					270	
[1463]	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
[1464]			275					280						285		
[1465]	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
[1466]		290					295					300				
[1467]	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
[1468]	305						310				315					320
[1469]	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
[1470]					325					330					335	
[1471]	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
[1472]				340						345				350		
[1473]	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
[1474]			355						360					365		
[1475]	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
[1476]		370						375					380			
[1477]	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
[1478]	385						390				395					400
[1479]	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
[1480]					405					410				415		
[1481]	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys

[1482]	420							425							430						
[1483]	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser					
[1484]	435							440							445						
[1485]	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser					
[1486]	450							455							460						
[1487]	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser					
[1488]	465							470							475						
[1489]	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys														
[1490]	485																				
[1491]	<210> 50																				
[1492]	<211> 491																				
[1493]	<212> PRT																				
[1494]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)																				
[1495]	<220>																				
[1496]	<223> aPDL1.9-aCTLA4.13-Fc																				
[1497]	<400> 50																				
[1498]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly					
[1499]	1	5				10				15											
[1500]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Arg	Arg					
[1501]	20							25							30						
[1502]	Cys	Met	Ala	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Arg	Val					
[1503]	35							40							45						
[1504]	Ala	Lys	Leu	Leu	Thr	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ala	Asp	Ser	Val					
[1505]	50							55							60						
[1506]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr					
[1507]	65					70					75					80					
[1508]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys					
[1509]	85							90							95						
[1510]	Ala	Ala	Asp	Ser	Phe	Glu	Asp	Pro	Thr	Cys	Thr	Leu	Val	Thr	Ser	Ser					
[1511]	100							105							110						
[1512]	Gly	Ala	Phe	Gln	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
[1513]	115							120							125						
[1514]	Gly	Ala	Pro	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln					
[1515]	130							135							140						
[1516]	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Tyr					
[1517]	145					150					155					160					
[1518]	Ser	Ala	Tyr	Cys	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg					
[1519]	165							170							175						
[1520]	Val	Gly	Val	Ala	Ala	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala					

[1521]	180							185					190						
[1522]	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gln	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn			
[1523]	195							200					205						
[1524]	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Met			
[1525]	210							215					220						
[1526]	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Asp	Val	Ile	Pro	Thr	Glu	Thr	Cys	Leu	Gly	Gly			
[1527]	225							230					235					240	
[1528]	Ser	Trp	Ser	Gly	Pro	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr			
[1529]	245							250					255						
[1530]	Val	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro			
[1531]	260							265					270						
[1532]	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro			
[1533]	275							280					285						
[1534]	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr			
[1535]	290							295					300						
[1536]	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn			
[1537]	305							310					315					320	
[1538]	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg			
[1539]	325							330					335						
[1540]	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val			
[1541]	340							345					350						
[1542]	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser			
[1543]	355							360					365						
[1544]	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys			
[1545]	370							375					380						
[1546]	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp			
[1547]	385							390					395					400	
[1548]	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe			
[1549]	405							410					415						
[1550]	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu			
[1551]	420							425					430						
[1552]	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe			
[1553]	435							440					445						
[1554]	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly			
[1555]	450							455					460						
[1556]	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr			
[1557]	465							470					475					480	
[1558]	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
[1559]	485							490											

[1560]	<210> 51															
[1561]	<211> 487															
[1562]	<212> PRT															
[1563]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[1564]	<220>															
[1565]	<223> dAb-aCTLA4.13-Fc															
[1566]	<400> 51															
[1567]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ala	Gly	Gly
[1568]	1				5					10					15	
[1569]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Cys	Met	Gly
[1570]				20						25				30		
[1571]	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val	Ala	Leu	Ala
[1572]			35					40					45			
[1573]	Val	Thr	Gly	Ile	Ser	Ile	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
[1574]		50					55				60					
[1575]	Phe	Thr	Ile	Ser	Gln	Asp	Asn	Val	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met
[1576]	65					70					75				80	
[1577]	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Ala	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Ser
[1578]					85					90					95	
[1579]	Thr	Ile	Arg	Tyr	Val	Cys	Pro	Gly	Leu	Asn	Arg	Gly	Asp	Gln	Phe	Lys
[1580]				100					105					110		
[1581]	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ala	Pro	Gln
[1582]			115					120					125			
[1583]	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser
[1584]		130					135				140					
[1585]	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Ala	Tyr	Cys
[1586]	145					150					155				160	
[1587]	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Val	Gly	Val	Ala
[1588]					165					170					175	
[1589]	Ala	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
[1590]				180					185					190		
[1591]	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Gln	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
[1592]			195					200					205			
[1593]	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala
[1594]		210					215				220					
[1595]	Ala	Asp	Val	Ile	Pro	Thr	Glu	Thr	Cys	Leu	Gly	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly
[1596]	225					230					235				240	
[1597]	Pro	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu
[1598]					245					250					255	

[1599]	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
[1600]					260				265					270		
[1601]	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
[1602]				275				280						285		
[1603]	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
[1604]		290					295					300				
[1605]	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
[1606]	305					310					315					320
[1607]	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
[1608]					325					330					335	
[1609]	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
[1610]			340					345					350			
[1611]	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
[1612]			355					360					365			
[1613]	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
[1614]		370					375					380				
[1615]	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
[1616]	385					390				395						400
[1617]	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
[1618]				405				410							415	
[1619]	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
[1620]			420					425					430			
[1621]	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
[1622]			435					440					445			
[1623]	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
[1624]		450					455					460				
[1625]	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
[1626]	465					470				475						480
[1627]	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
[1628]				485												
[1629]	<210>	52														
[1630]	<211>	357														
[1631]	<212>	PRT														
[1632]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
[1633]	<220>															
[1634]	<223>	CTLA4-muFc														
[1635]	<400>	52														
[1636]	Met	His	Val	Ala	Gln	Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile
[1637]	1				5					10					15	

[1638]	Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Thr	Glu	Val
[1639]				20					25					30		
[1640]	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	Val	Cys
[1641]				35					40					45		
[1642]	Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser
[1643]				50					55					60		
[1644]	Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln
[1645]	65								70					75		80
[1646]	Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu
[1647]																
[1648]	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile
[1649]																
[1650]	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Gln	Gly	Ser	Met
[1651]																
[1652]	Asp	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
[1653]																
[1654]	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val
[1655]	145															160
[1656]	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile
[1657]																
[1658]	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val
[1659]																
[1660]	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser
[1661]																
[1662]	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu
[1663]																
[1664]	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala
[1665]	225															240
[1666]	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro
[1667]																
[1668]	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys
[1669]																
[1670]	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr
[1671]																
[1672]	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr
[1673]																
[1674]	Gln	Pro	Ile	Met	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu
[1675]	305															320
[1676]	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser

[1677]					325					330					335		
[1678]	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	
[1679]					340					345					350		
[1680]	His	Ser	Pro	Gly	Lys												
[1681]					355												
[1682]	<210>	53															
[1683]	<211>	452															
[1684]	<212>	PRT															
[1685]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)															
[1686]	<220>																
[1687]	<223>	PD-L1-muFc															
[1688]	<400>	53															
[1689]	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Asp	Leu	Tyr	Val	Val	Glu	Tyr	Gly	Ser	Asn	
[1690]	1				5					10					15		
[1691]	Met	Thr	Ile	Glu	Cys	Lys	Phe	Pro	Val	Glu	Lys	Gln	Leu	Asp	Leu	Ala	
[1692]				20					25					30			
[1693]	Ala	Leu	Ile	Val	Tyr	Trp	Glu	Met	Glu	Asp	Lys	Asn	Ile	Ile	Gln	Phe	
[1694]				35				40					45				
[1695]	Val	His	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Val	Gln	His	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gln	
[1696]		50					55					60					
[1697]	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn	Ala	Ala	Leu	
[1698]	65					70					75				80		
[1699]	Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Arg	Cys	Met	
[1700]					85					90					95		
[1701]	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Val	Lys	Val	Asn	
[1702]				100					105					110			
[1703]	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val	Asp	Pro	Val	
[1704]				115					120					125			
[1705]	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr	Pro	Lys	Ala	
[1706]		130					135					140					
[1707]	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser	Gly	Lys	Thr	
[1708]	145					150					155					160	
[1709]	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Asn	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Ser	
[1710]					165					170						175	
[1711]	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr	Cys	Thr	Phe	
[1712]				180					185					190			
[1713]	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	
[1714]				195					200				205				
[1715]	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg	Thr	Gly	Ser	Met	Asp	

[1716]	210	215	220
[1717]	Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
[1718]	225	230	235 240
[1719]	Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu		
[1720]	245	250	255
[1721]	Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser		
[1722]	260	265	270
[1723]	Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu		
[1724]	275	280	285
[1725]	Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr		
[1726]	290	295	300
[1727]	Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn		
[1728]	305	310	315 320
[1729]	Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro		
[1730]	325	330	335
[1731]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln		
[1732]	340	345	350
[1733]	Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val		
[1734]	355	360	365
[1735]	Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val		
[1736]	370	375	380
[1737]	Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln		
[1738]	385	390	395 400
[1739]	Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn		
[1740]	405	410	415
[1741]	Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val		
[1742]	420	425	430
[1743]	Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His		
[1744]	435	440	445
[1745]	Ser Pro Gly Lys		
[1746]	450		
[1747]	<210> 54		
[1748]	<211> 448		
[1749]	<212> PRT		
[1750]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1751]	<220>		
[1752]	<223> PD-L1-huFc		
[1753]	<400> 54		
[1754]	Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn		

[1755]	1	5	10	15
[1756]	Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu Ala			
[1757]	20	25	30	
[1758]	Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln Phe			
[1759]	35	40	45	
[1760]	Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg Gln			
[1761]	50	55	60	
[1762]	Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala Leu			
[1763]	65	70	75	80
[1764]	Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys Met			
[1765]	85	90	95	
[1766]	Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val Asn			
[1767]	100	105	110	
[1768]	Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro Val			
[1769]	115	120	125	
[1770]	Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys Ala			
[1771]	130	135	140	
[1772]	Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys Thr			
[1773]	145	150	155	160
[1774]	Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Asn Leu Phe Asn Val Thr Ser			
[1775]	165	170	175	
[1776]	Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr Phe			
[1777]	180	185	190	
[1778]	Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile Pro			
[1779]	195	200	205	
[1780]	Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr Asp Asp Lys Thr			
[1781]	210	215	220	
[1782]	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
[1783]	225	230	235	240
[1784]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
[1785]	245	250	255	
[1786]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
[1787]	260	265	270	
[1788]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
[1789]	275	280	285	
[1790]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
[1791]	290	295	300	
[1792]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
[1793]	305	310	315	320

[1794]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[1795]	325 330 335
[1796]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[1797]	340 345 350
[1798]	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[1799]	355 360 365
[1800]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[1801]	370 375 380
[1802]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[1803]	385 390 395 400
[1804]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[1805]	405 410 415
[1806]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[1807]	420 425 430
[1808]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1809]	435 440 445
[1810]	<210> 55
[1811]	<211> 442
[1812]	<212> PRT
[1813]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1814]	<220>
[1815]	<223> CD80-muFc
[1816]	<400> 55
[1817]	Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
[1818]	1 5 10 15
[1819]	Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
[1820]	20 25 30
[1821]	Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
[1822]	35 40 45
[1823]	Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
[1824]	50 55 60
[1825]	Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
[1826]	65 70 75 80
[1827]	Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
[1828]	85 90 95
[1829]	Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
[1830]	100 105 110
[1831]	Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
[1832]	115 120 125

[1833]	Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
[1834]	130 135 140
[1835]	Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
[1836]	145 150 155 160
[1837]	Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
[1838]	165 170 175
[1839]	Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
[1840]	180 185 190
[1841]	Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
[1842]	195 200 205
[1843]	Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
[1844]	210 215 220
[1845]	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
[1846]	225 230 235 240
[1847]	Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
[1848]	245 250 255
[1849]	Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp
[1850]	260 265 270
[1851]	Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu
[1852]	275 280 285
[1853]	Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met
[1854]	290 295 300
[1855]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser
[1856]	305 310 315 320
[1857]	Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
[1858]	325 330 335
[1859]	Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln
[1860]	340 345 350
[1861]	Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe
[1862]	355 360 365
[1863]	Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
[1864]	370 375 380
[1865]	Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe
[1866]	385 390 395 400
[1867]	Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
[1868]	405 410 415
[1869]	Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
[1870]	420 425 430
[1871]	Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

[1872]	435	440
[1873]	<210> 56	
[1874]	<211> 357	
[1875]	<212> PRT	
[1876]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[1877]	<220>	
[1878]	<223> CTLA4-huFc	
[1879]	<400> 56	
[1880]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile	
[1881]	1 5 10 15	
[1882]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val	
[1883]	20 25 30	
[1884]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys	
[1885]	35 40 45	
[1886]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser	
[1887]	50 55 60	
[1888]	Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln	
[1889]	65 70 75 80	
[1890]	Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu	
[1891]	85 90 95	
[1892]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile	
[1893]	100 105 110	
[1894]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys	
[1895]	115 120 125	
[1896]	Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu	
[1897]	130 135 140	
[1898]	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	
[1899]	145 150 155 160	
[1900]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
[1901]	165 170 175	
[1902]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	
[1903]	180 185 190	
[1904]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	
[1905]	195 200 205	
[1906]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	
[1907]	210 215 220	
[1908]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala	
[1909]	225 230 235 240	
[1910]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	

[1911]					245					250					255	
[1912]	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln
[1913]					260					265					270	
[1914]	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
[1915]					275					280					285	
[1916]	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
[1917]					290					295					300	
[1918]	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
[1919]	305						310					315				320
[1920]	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
[1921]						325					330					335
[1922]	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
[1923]					340					345					350	
[1924]	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
[1925]					355											
[1926]	<210>	57														
[1927]	<211>	449														
[1928]	<212>	PRT														
[1929]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
[1930]	<220>															
[1931]	<223>	CD86-muFc														
[1932]	<400>	57														
[1933]	Tyr	Phe	Asn	Glu	Thr	Ala	Asp	Leu	Pro	Cys	Gln	Phe	Ala	Asn	Ser	Gln
[1934]	1				5					10					15	
[1935]	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Val	Val	Phe	Trp	Gln	Asp	Gln	Glu	Asn
[1936]					20					25					30	
[1937]	Leu	Val	Leu	Asn	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly	Lys	Glu	Lys	Phe	Asp	Ser	Val
[1938]					35					40					45	
[1939]	His	Ser	Lys	Tyr	Met	Gly	Arg	Thr	Ser	Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	Trp	Thr
[1940]					50					55					60	
[1941]	Leu	Arg	Leu	His	Asn	Leu	Gln	Ile	Lys	Asp	Lys	Gly	Leu	Tyr	Gln	Cys
[1942]	65						70					75				80
[1943]	Ile	Ile	His	His	Lys	Lys	Pro	Thr	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	His	Gln	Met
[1944]					85					90					95	
[1945]	Asn	Ser	Glu	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Asn	Phe	Ser	Gln	Pro	Glu	Ile	Val
[1946]					100					105					110	
[1947]	Pro	Ile	Ser	Asn	Ile	Thr	Glu	Asn	Val	Tyr	Ile	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser
[1948]					115					120					125	
[1949]	Ser	Ile	His	Gly	Tyr	Pro	Glu	Pro	Lys	Lys	Met	Ser	Val	Leu	Leu	Arg

[1950]	130	135	140
[1951]	Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln		
[1952]	145	150	155
[1953]	Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser		
[1954]	165	170	175
[1955]	Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr		
[1956]	180	185	190
[1957]	Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp		
[1958]	195	200	205
[1959]	Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro Gly Ser Met Asp Pro Lys Ser		
[1960]	210	215	220
[1961]	Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Val Ser		
[1962]	225	230	235
[1963]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr		
[1964]	245	250	255
[1965]	Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp		
[1966]	260	265	270
[1967]	Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr		
[1968]	275	280	285
[1969]	Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser		
[1970]	290	295	300
[1971]	Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
[1972]	305	310	315
[1973]	Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
[1974]	325	330	335
[1975]	Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr		
[1976]	340	345	350
[1977]	Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr		
[1978]	355	360	365
[1979]	Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln		
[1980]	370	375	380
[1981]	Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met		
[1982]	385	390	395
[1983]	Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys		
[1984]	405	410	415
[1985]	Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu		
[1986]	420	425	430
[1987]	Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly		
[1988]	435	440	445

93

[2028]	245																250				255							
[2029]	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys												
[2030]	260																265				270							
[2031]	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro												
[2032]	275																280				285							
[2033]	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr												
[2034]	290																295				300							
[2035]	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln												
[2036]	305																310				315				320			
[2037]	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asn	Thr	Asn	Gly												
[2038]	325																330				335							
[2039]	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu												
[2040]	340																345				350							
[2041]	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn												
[2042]	355																360				365							
[2043]	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Lys															
[2044]	370																375				380							
[2045]	<210> 59																											
[2046]	<211> 448																											
[2047]	<212> PRT																											
[2048]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)																											
[2049]	<220>																											
[2050]	<223> 伊匹单抗HC																											
[2051]	<400> 59																											
[2052]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg												
[2053]	1 5 10 15																											
[2054]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr												
[2055]	20 25 30																											
[2056]	Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val												
[2057]	35 40 45																											
[2058]	Thr	Phe	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Asn	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val												
[2059]	50 55 60																											
[2060]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr												
[2061]	65 70 75 80																											
[2062]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys												
[2063]	85 90 95																											
[2064]	Ala	Arg	Thr	Gly	Trp	Leu	Gly	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr												
[2065]	100 105 110																											
[2066]	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro												

[2067]	115	120	125
[2068]	Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
[2069]	130	135	140
[2070]	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
[2071]	145	150	155
[2072]	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
[2073]	165	170	175
[2074]	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
[2075]	180	185	190
[2076]	Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
[2077]	195	200	205
[2078]	Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
[2079]	210	215	220
[2080]	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
[2081]	225	230	235
[2082]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
[2083]	245	250	255
[2084]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
[2085]	260	265	270
[2086]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
[2087]	275	280	285
[2088]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
[2089]	290	295	300
[2090]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
[2091]	305	310	315
[2092]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
[2093]	325	330	335
[2094]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[2095]	340	345	350
[2096]	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[2097]	355	360	365
[2098]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[2099]	370	375	380
[2100]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[2101]	385	390	395
[2102]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[2103]	405	410	415
[2104]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[2105]	420	425	430

[2106]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[2107]	435 440 445
[2108]	<210> 60
[2109]	<211> 215
[2110]	<212> PRT
[2111]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2112]	<220>
[2113]	<223> 伊匹单抗LC
[2114]	<400> 60
[2115]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[2116]	1 5 10 15
[2117]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
[2118]	20 25 30
[2119]	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
[2120]	35 40 45
[2121]	Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
[2122]	50 55 60
[2123]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
[2124]	65 70 75 80
[2125]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
[2126]	85 90 95
[2127]	Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
[2128]	100 105 110
[2129]	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
[2130]	115 120 125
[2131]	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
[2132]	130 135 140
[2133]	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
[2134]	145 150 155 160
[2135]	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
[2136]	165 170 175
[2137]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
[2138]	180 185 190
[2139]	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
[2140]	195 200 205
[2141]	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[2142]	210 215
[2143]	<210> 61
[2144]	<211> 451

[2145]	<212>	PRT
[2146]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[2147]	<220>	
[2148]	<223>	度伐单抗HC
[2149]	<400>	61
[2150]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[2151]	1	5 10 15
[2152]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr	
[2153]	20	25 30
[2154]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[2155]	35	40 45
[2156]	Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val	
[2157]	50	55 60
[2158]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	
[2159]	65	70 75 80
[2160]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[2161]	85	90 95
[2162]	Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly	
[2163]	100	105 110
[2164]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	
[2165]	115	120 125
[2166]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala	
[2167]	130	135 140
[2168]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val	
[2169]	145	150 155 160
[2170]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	
[2171]	165	170 175
[2172]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val	
[2173]	180	185 190
[2174]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His	
[2175]	195	200 205
[2176]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	
[2177]	210	215 220
[2178]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
[2179]	225	230 235 240
[2180]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	
[2181]	245	250 255
[2182]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	
[2183]	260	265 270

[2184]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[2185]	275 280 285
[2186]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[2187]	290 295 300
[2188]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[2189]	305 310 315 320
[2190]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[2191]	325 330 335
[2192]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[2193]	340 345 350
[2194]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[2195]	355 360 365
[2196]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[2197]	370 375 380
[2198]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[2199]	385 390 395 400
[2200]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[2201]	405 410 415
[2202]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[2203]	420 425 430
[2204]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[2205]	435 440 445
[2206]	Pro Gly Lys
[2207]	450
[2208]	<210> 62
[2209]	<211> 215
[2210]	<212> PRT
[2211]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2212]	<220>
[2213]	<223> 度伐单抗LC
[2214]	<400> 62
[2215]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[2216]	1 5 10 15
[2217]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
[2218]	20 25 30
[2219]	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
[2220]	35 40 45
[2221]	Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
[2222]	50 55 60

[2223]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
[2224]	65 70 75 80
[2225]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
[2226]	85 90 95
[2227]	Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
[2228]	100 105 110
[2229]	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
[2230]	115 120 125
[2231]	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
[2232]	130 135 140
[2233]	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
[2234]	145 150 155 160
[2235]	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
[2236]	165 170 175
[2237]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
[2238]	180 185 190
[2239]	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
[2240]	195 200 205
[2241]	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[2242]	210 215
[2243]	<210> 63
[2244]	<211> 220
[2245]	<212> PRT
[2246]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2247]	<220>
[2248]	<223> 人PD-L1
[2249]	<400> 63
[2250]	Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn
[2251]	1 5 10 15
[2252]	Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu Ala
[2253]	20 25 30
[2254]	Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln Phe
[2255]	35 40 45
[2256]	Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg Gln
[2257]	50 55 60
[2258]	Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala Leu
[2259]	65 70 75 80
[2260]	Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys Met
[2261]	85 90 95

[2262]	Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val Asn
[2263]	100 105 110
[2264]	Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro Val
[2265]	115 120 125
[2266]	Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys Ala
[2267]	130 135 140
[2268]	Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys Thr
[2269]	145 150 155 160
[2270]	Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Asn Leu Phe Asn Val Thr Ser
[2271]	165 170 175
[2272]	Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr Phe
[2273]	180 185 190
[2274]	Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile Pro
[2275]	195 200 205
[2276]	Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr
[2277]	210 215 220
[2278]	<210> 64
[2279]	<211> 127
[2280]	<212> PRT
[2281]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2282]	<220>
[2283]	<223> 人PD-L1 N末端IgV结构域
[2284]	<400> 64
[2285]	Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
[2286]	1 5 10 15
[2287]	Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
[2288]	20 25 30
[2289]	Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
[2290]	35 40 45
[2291]	Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
[2292]	50 55 60
[2293]	Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
[2294]	65 70 75 80
[2295]	Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
[2296]	85 90 95
[2297]	Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
[2298]	100 105 110
[2299]	Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr
[2300]	115 120 125



图1

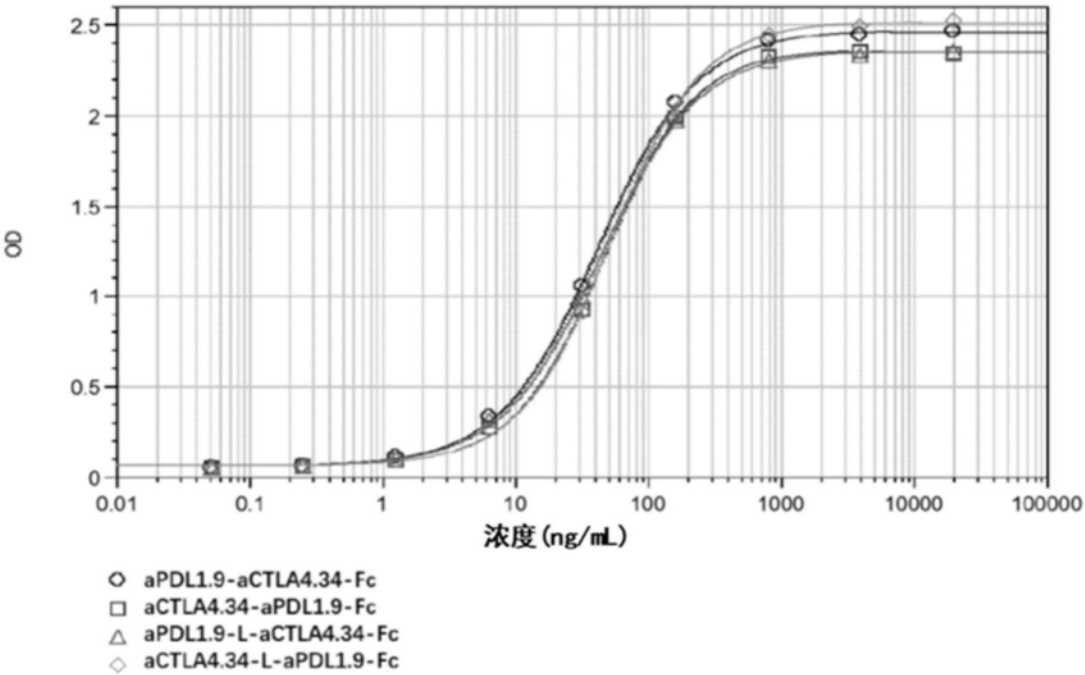


图2A

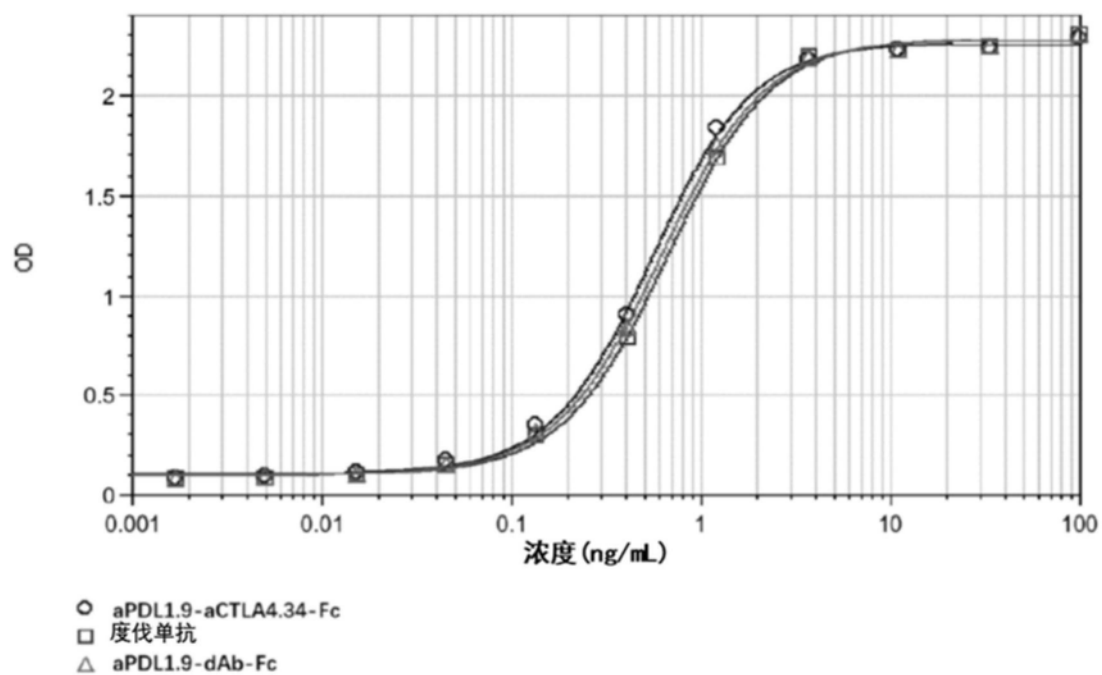


图2B

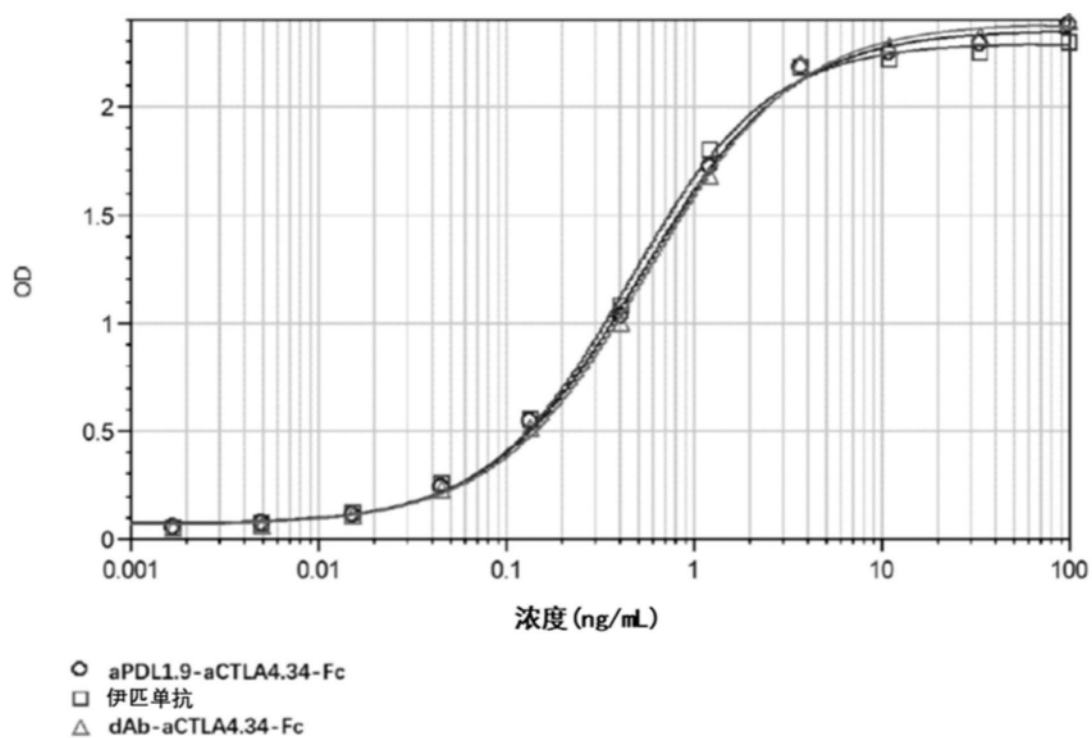


图2C

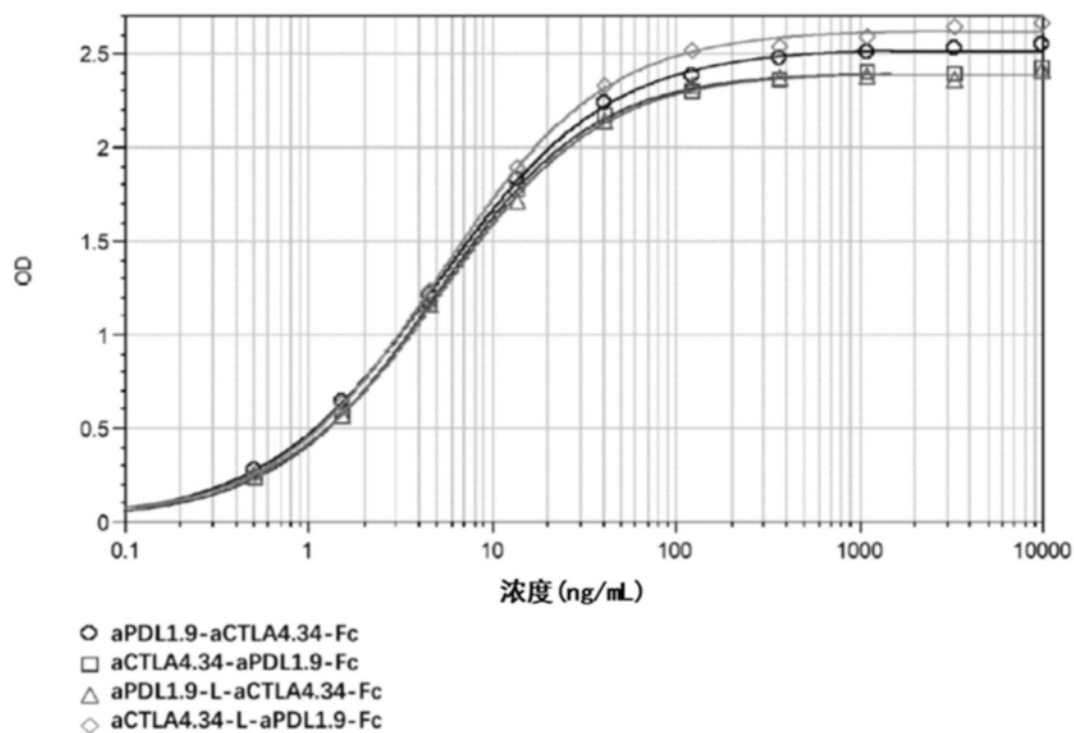


图2D

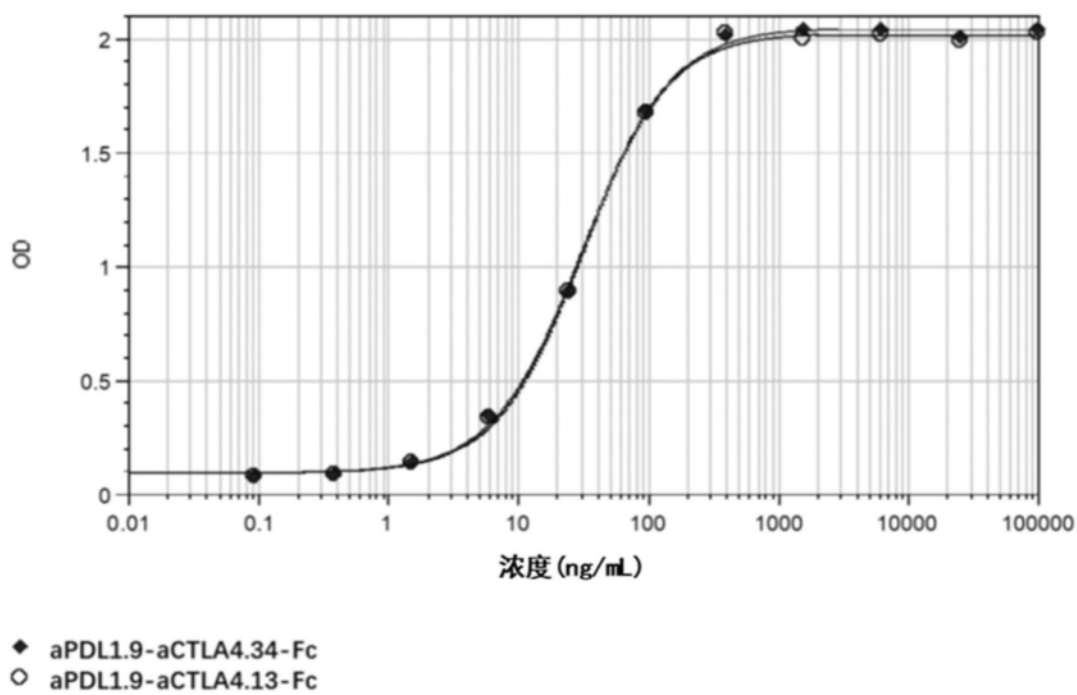


图2E

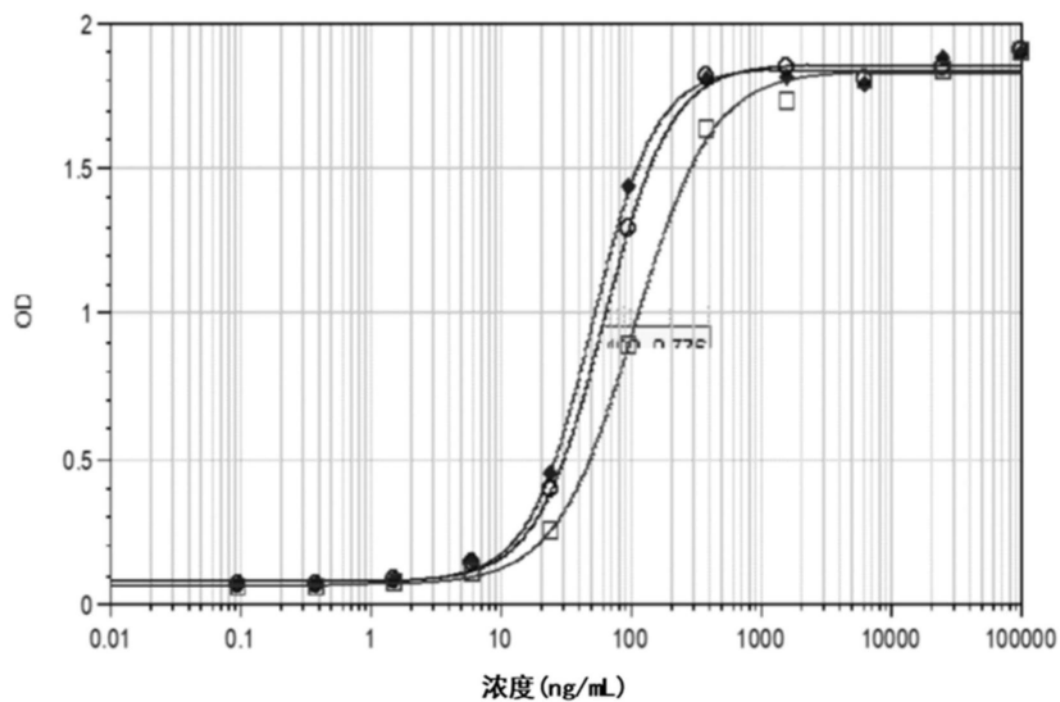


图2F

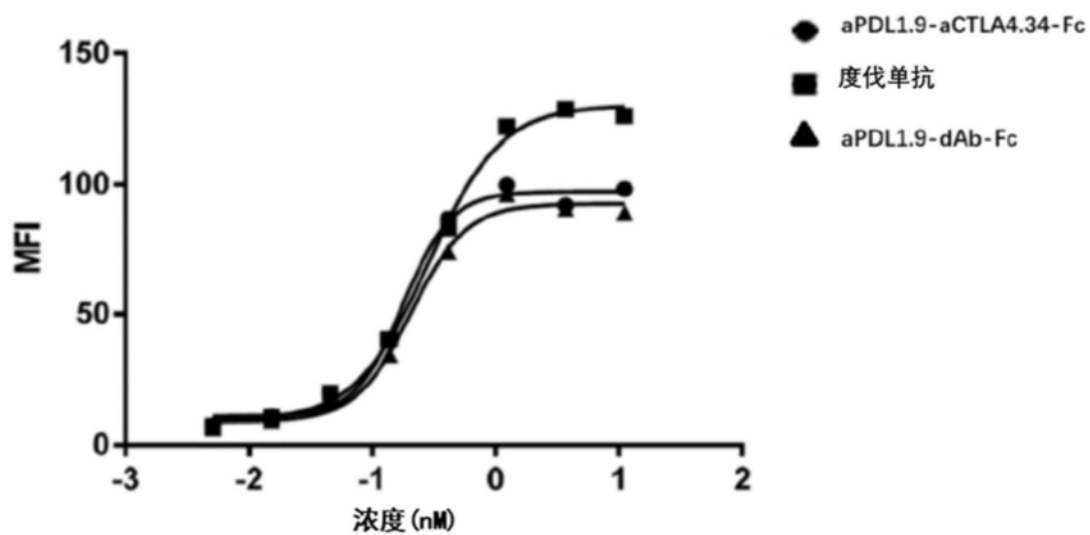


图2G

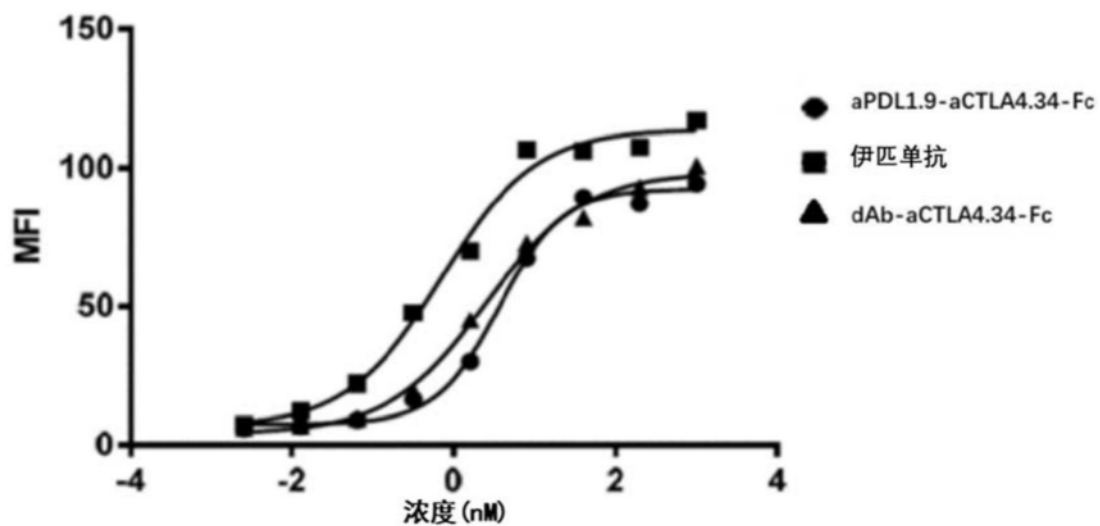


图2H

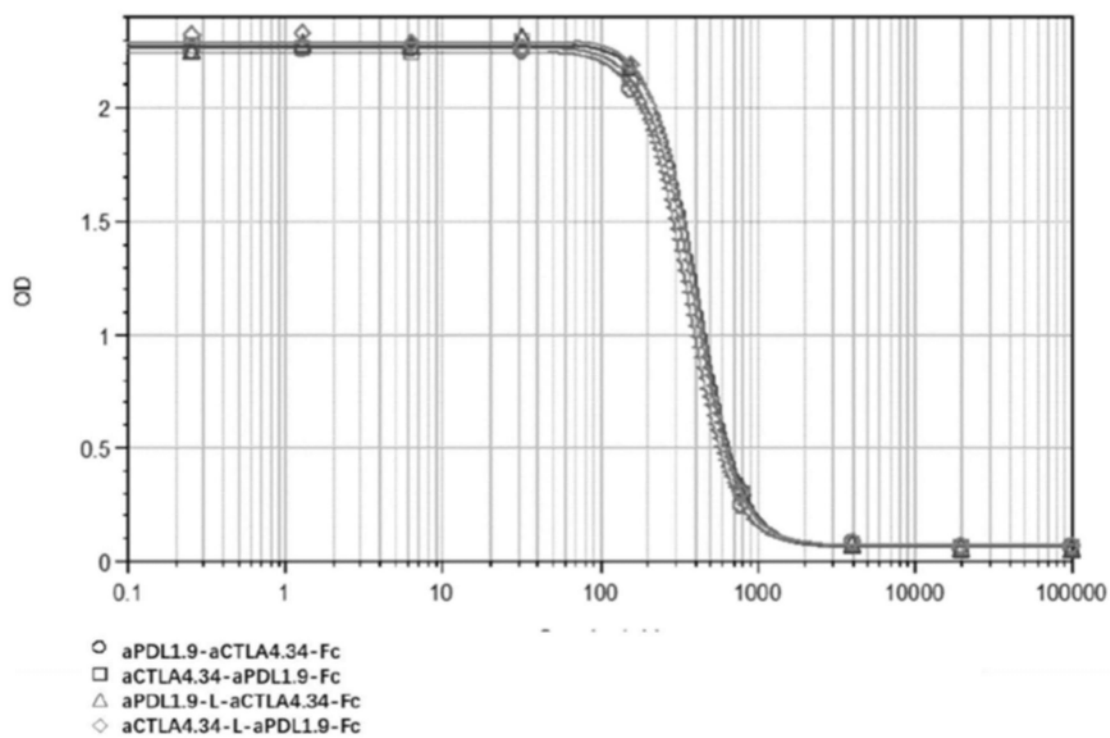


图3A

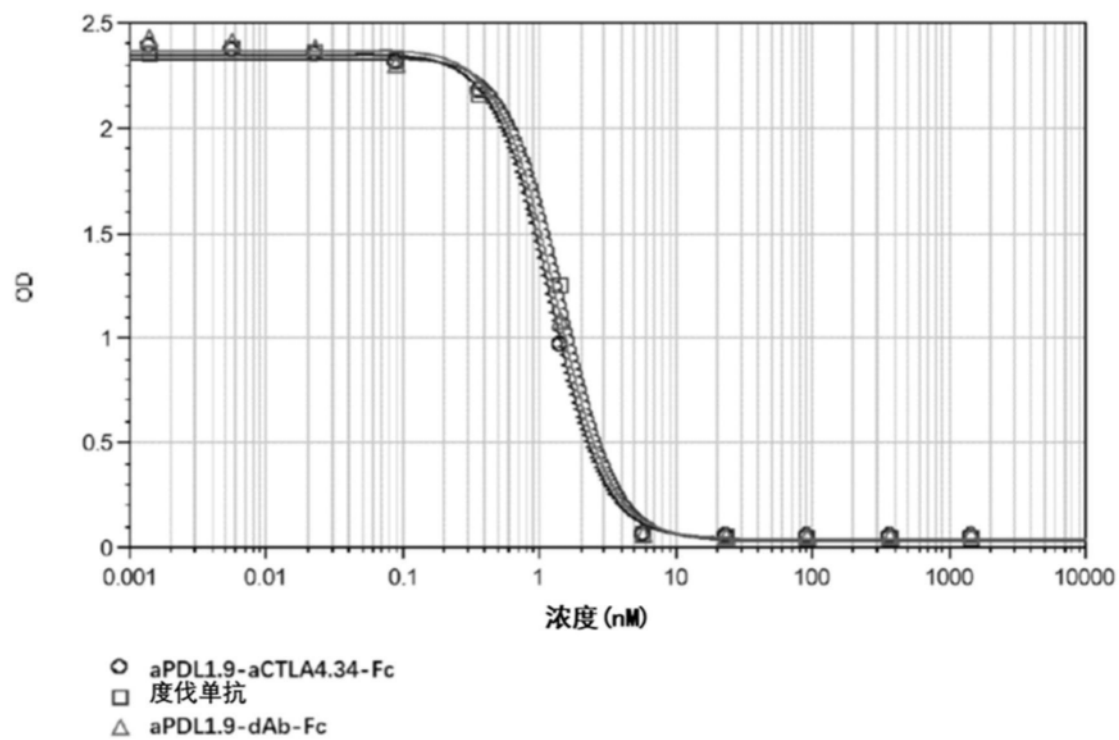


图3B

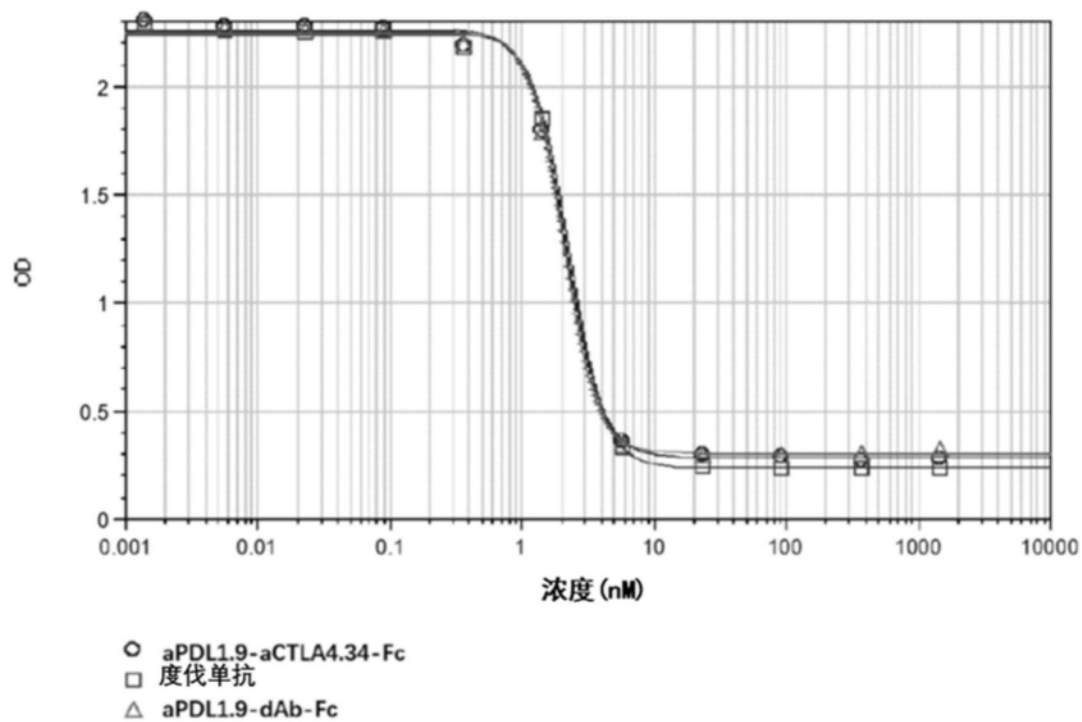


图3C

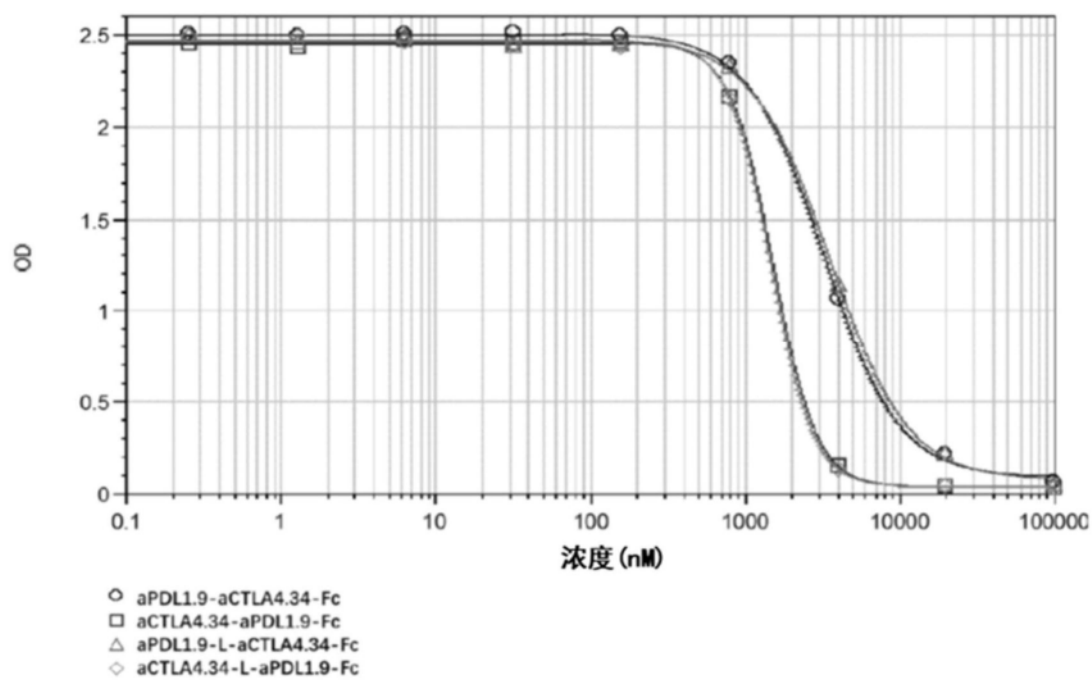


图3D

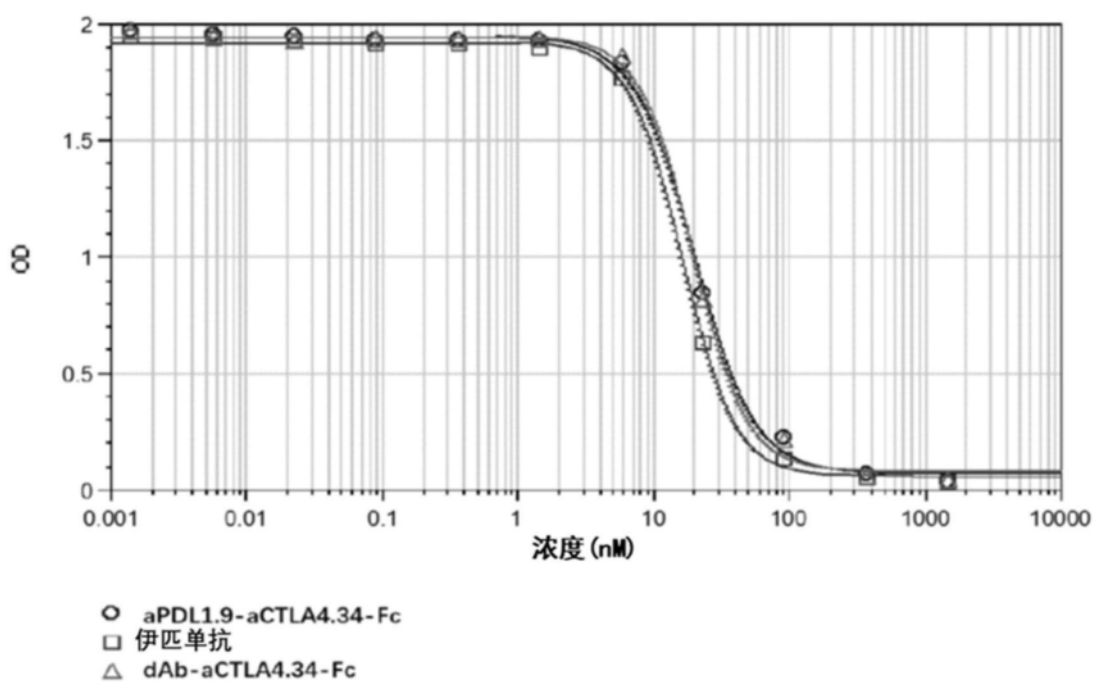


图3E

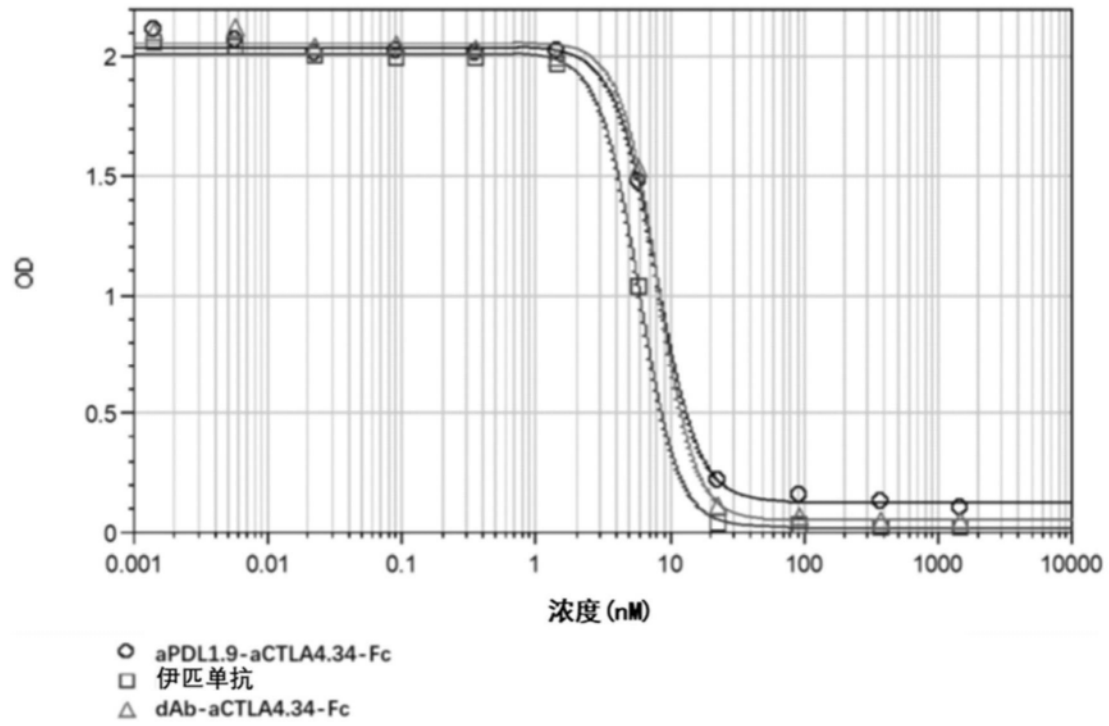


图3F

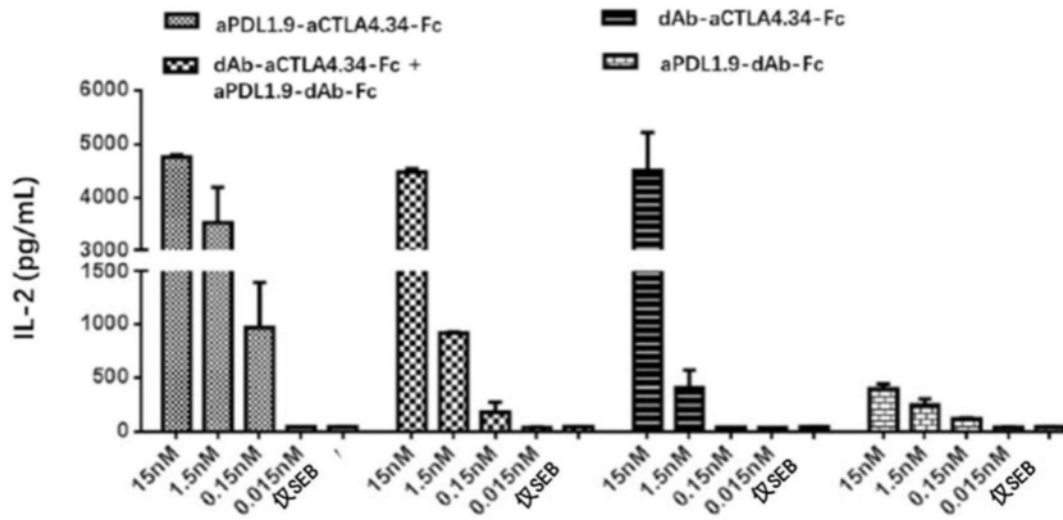


图4A

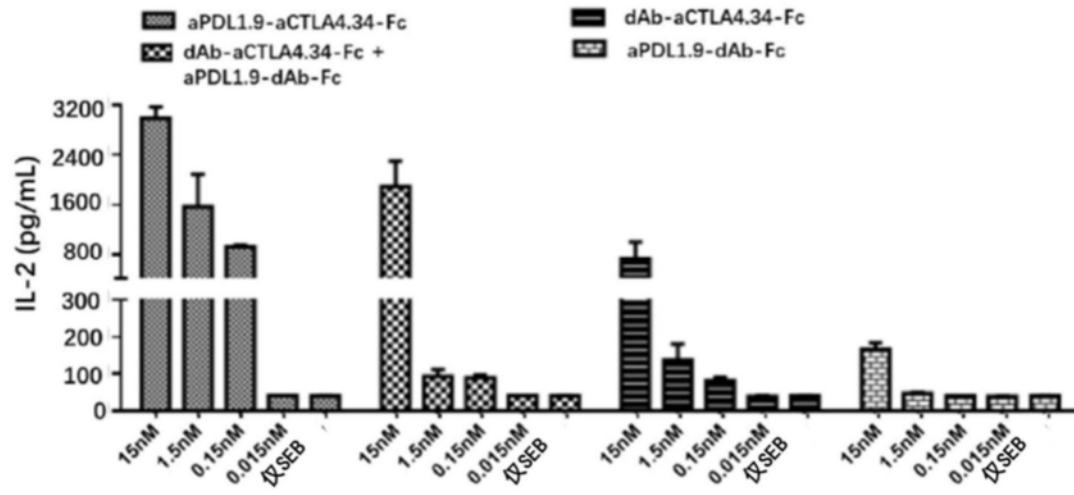


图4B

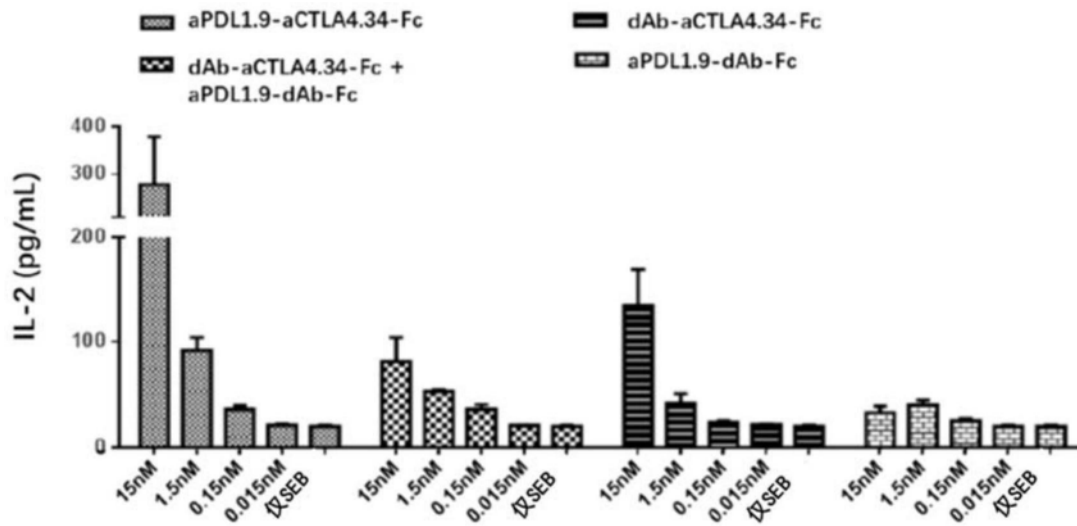


图4C

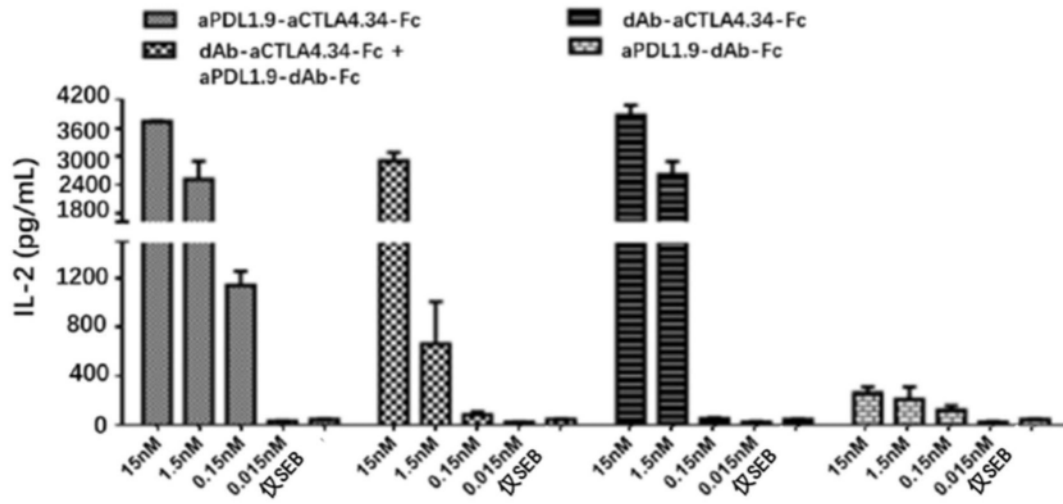


图4D

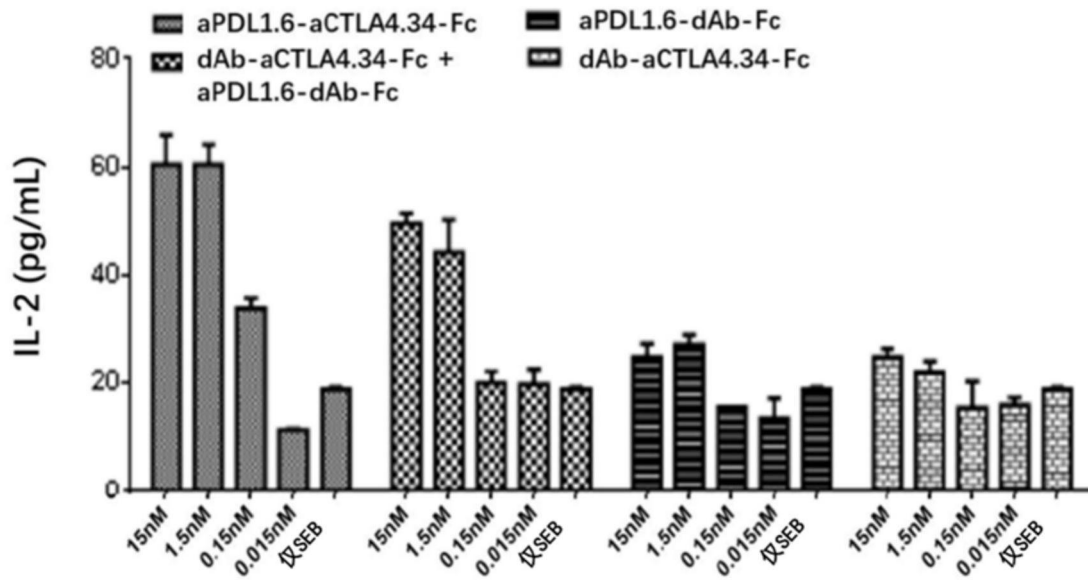


图4E

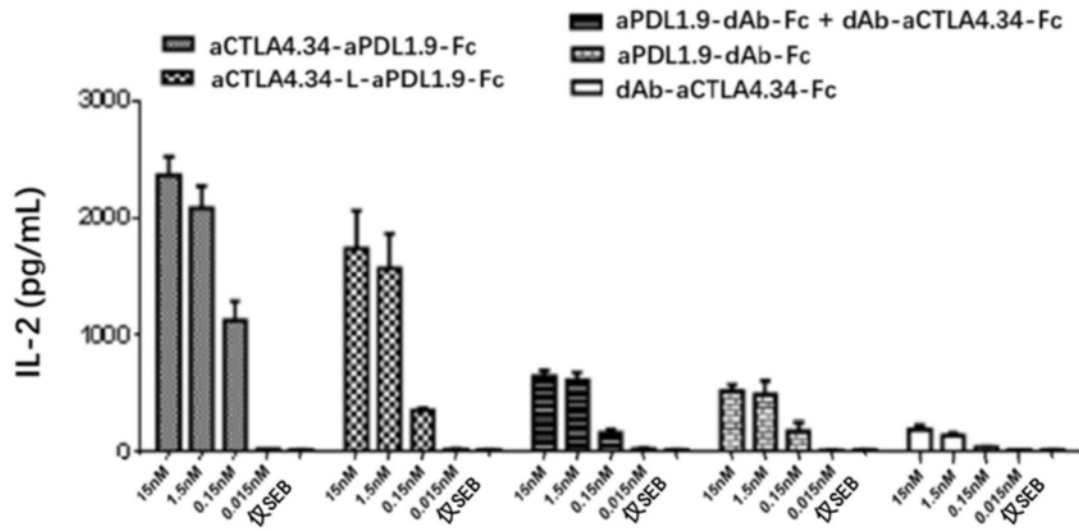


图4F

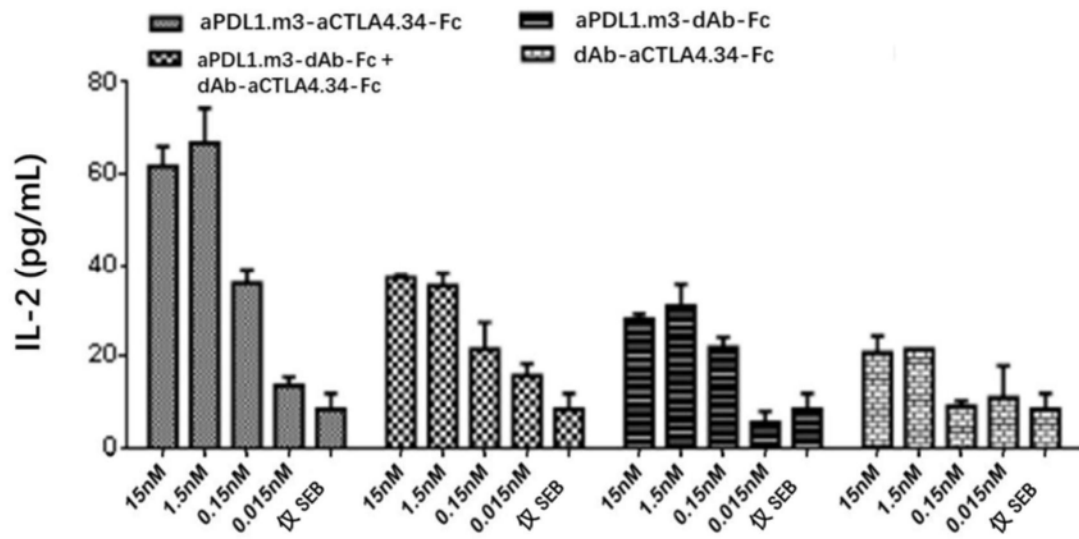


图4G

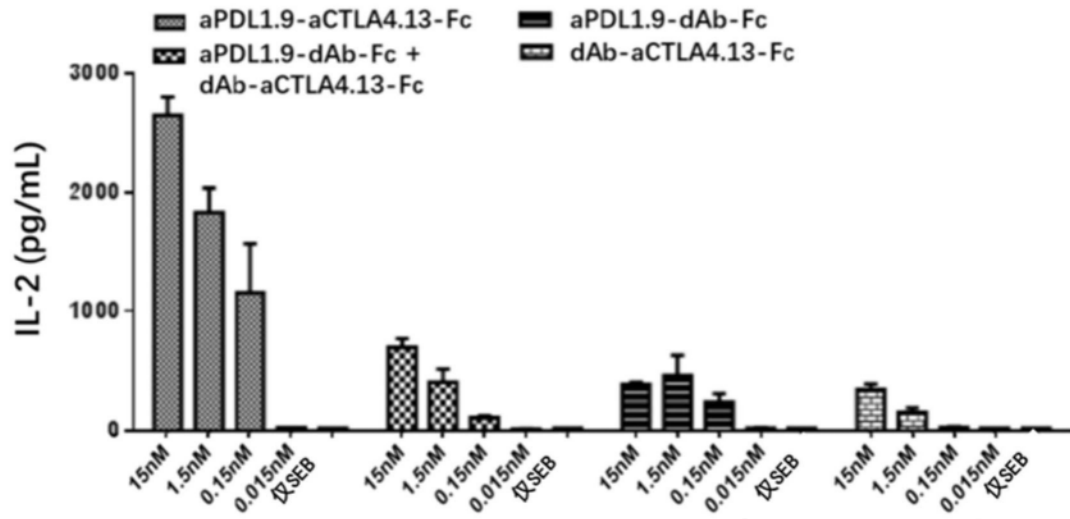


图4H

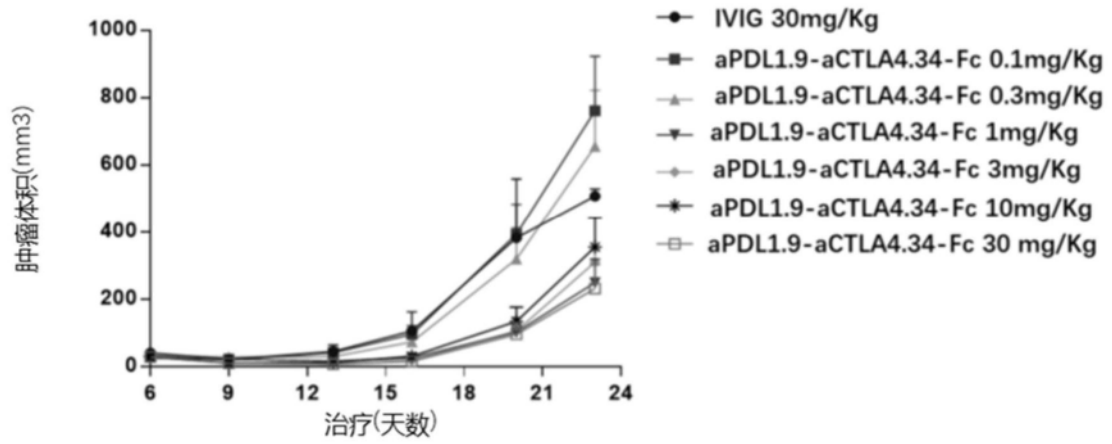


图5A

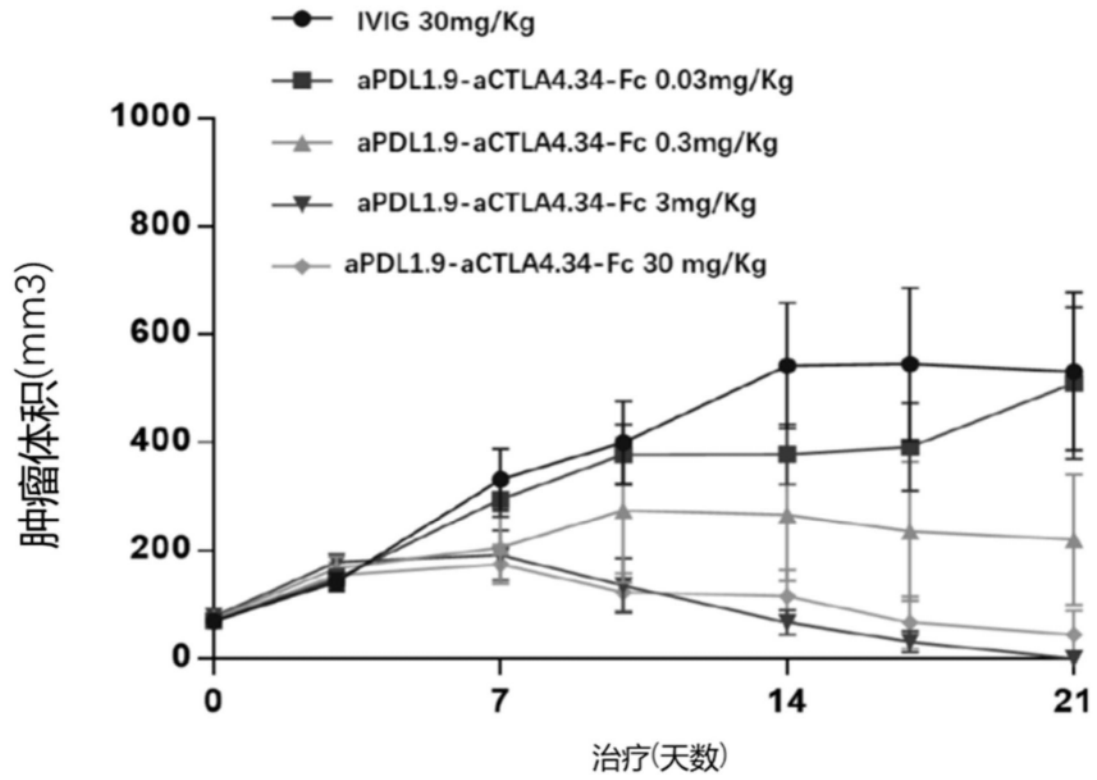


图5B

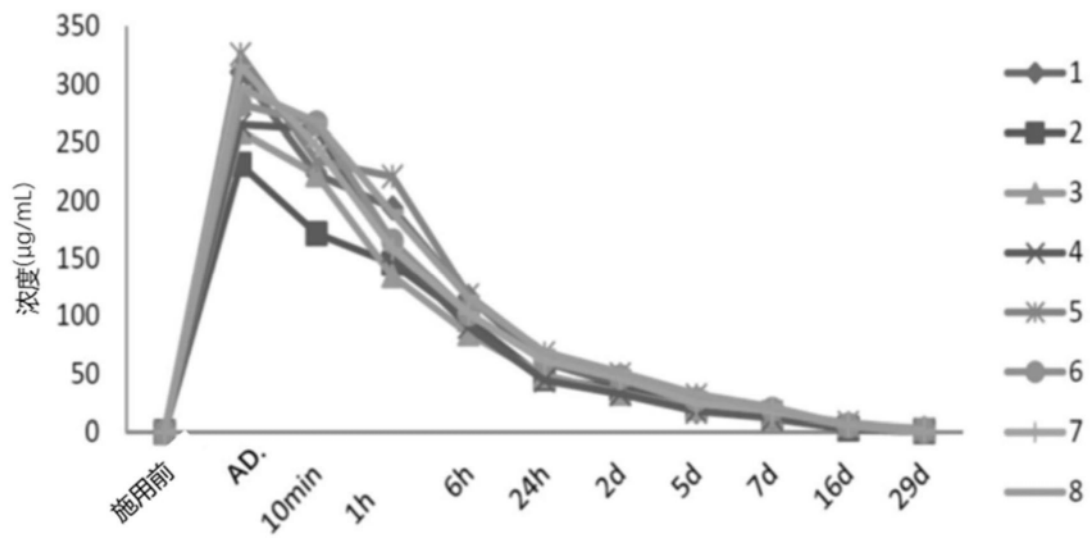


图6

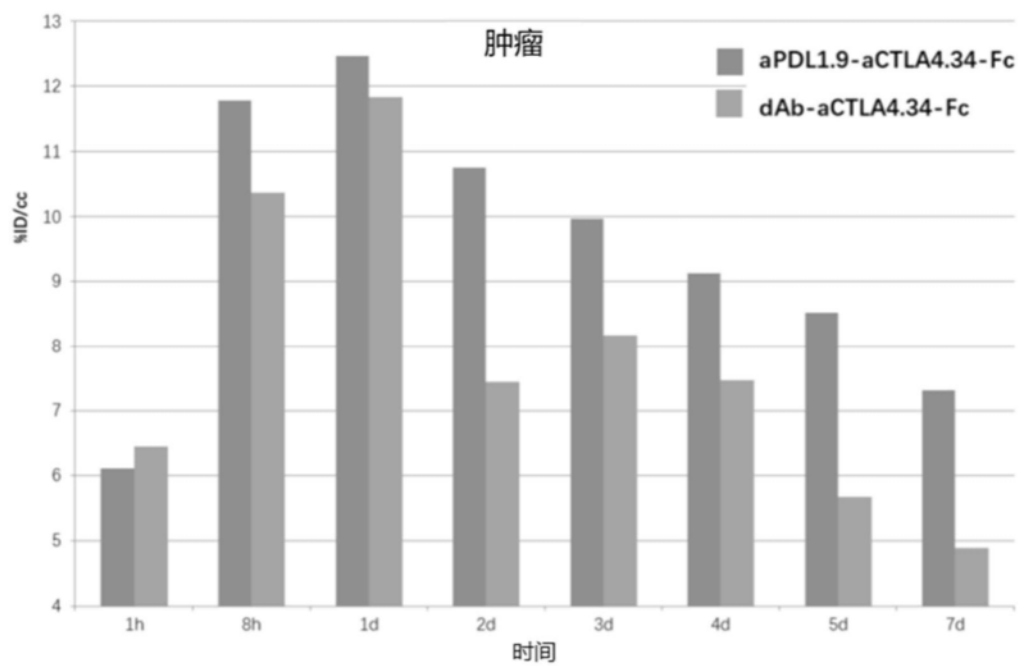


图7