



(10) 授权公告号 CN 114106190 B

(45) 授权公告日 2025.04.08

(21) 申请号 202010897917.1

A61K 47/68 (2017.01)

(22) 申请日 2020.08.31

A61K 51/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 39/395 (2006.01)

申请公布号 CN 114106190 A

A61P 35/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.03.01

(56) 对比文件

(73) 专利权人 普米斯生物技术(珠海)有限公司

CN 109942712 A, 2019.06.28

地址 519080 广东省珠海市香洲区唐家湾

CN 102753577 A, 2012.10.24

镇科技七路1号4栋10-B单元

审查员 吕丽珊

(72) 发明人 缪小牛 陈乘 袁志军 黄威峰

曾浚玮 孙左宇

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 刘海罗

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

权利要求书4页 说明书21页

序列表21页 附图6页

(54) 发明名称

一种抗VEGF/PD-L1双特异性抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种抗PD-L1/VEGF双特异性抗体的用途。具体地,本发明提供了一种抗PD-L1/VEGF双特异性抗体,该抗体具有阻断PD-L1与受体PD-1结合的功能及阻断VEGF与其受体结合的功能。该双特异性抗体可以通过同时激活免疫系统并阻断肿瘤血管生成,起到更好的杀灭肿瘤作用。并且,本发明提供了所述双特异性抗体的氨基酸序列、相应的表达载体和能够表达该双特异性抗体的宿主细胞,以及本发明双特异性抗体生产方法。

1. 一种双特异性抗体,其特征在于,所述双特异性抗体包括:

(a) 抗PD-L1单域抗体;和

(b) 抗VEGF的抗体;

其中,所述抗PD-L1单域抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示。

2. 如权利要求1所述的双特异性抗体,其特征在于,所述的双特异性抗体包括1-3个抗PD-L1单域抗体。

3. 如权利要求1所述的双特异性抗体,其特征在于,所述的双特异性抗体还包含Fc段。

4. 如权利要求3所述的双特异性抗体,其特征在于,所述双特异性抗体的Fc段选自下组:人IgG结构域、CH1+CL1结构域,或其组合。

5. 如权利要求1所述的双特异性抗体,其特征在于,所述的双特异性抗体含有如式I和式II所示结构的多肽,

A1-L1-CH-L2-B (式I)

A2-L3-CL (式II)

其中,

A1是抗VEGF抗体的重链可变区VH;

A2是抗VEGF抗体的轻链可变区VL;

B是抗PD-L1单域抗体;

L1、L2和L3各自独立地为无或连接元件;

CH是人IgG重链恒定区CH;

CL是人κ轻链恒定区CL;和

“-”为肽键;

并且其中,式I所示的多肽与式II所示的多肽通过二硫键作用而形成异源二聚体。

6. 如权利要求5所述的双特异性抗体,其特征在于,所述人IgG重链恒定区CH为LALA突变型的人IgG重链恒定区CH。

7. 如权利要求1所述的双特异性抗体,其特征在于,所述双特异性抗体是具有如式III或式IV所示结构的多肽,

A3-L4-Fc-L5-B (式III)

B-L6-Fc-L7-A3 (式IV)

其中,

A3的氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示;

B是抗PD-L1单域抗体;

L4、L5、L6和L7各自独立地为无或连接元件;

Fc是人IgG的Fc区段;和

“-”为肽键。

8. 如权利要求7所述的双特异性抗体,其特征在于,所述人IgG的Fc区段为LALA突变型的人IgG的Fc区段。

9. 如权利要求5所述的双特异性抗体,其特征在于,所述抗VEGF抗体的重链可变区VH具有衍生自贝伐单抗(Bevacizumab)的重链可变区氨基酸序列,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示。

10. 如权利要求5所述的双特异性抗体,其特征在于,所述抗VEGF抗体的轻链可变区VL具有衍生自贝伐单抗(Bevacizumab)的轻链可变区氨基酸序列,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示。

11. 如权利要求5所述的双特异性抗体,其特征在于,所述抗VEGF抗体的重链可变区VH具有衍生自雷尼单抗(Ranibizumab)的重链可变区氨基酸序列,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示。

12. 如权利要求5所述的双特异性抗体,其特征在于,所述抗VEGF抗体的轻链可变区VL具有衍生自雷尼单抗(Ranibizumab)的轻链可变区氨基酸序列,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 15所示。

13. 如权利要求5所述的双特异性抗体,其特征在于,所述人IgG重链恒定区CH中具有LALA突变,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。

14. 如权利要求5所述的双特异性抗体,其特征在于,所述人 κ 轻链恒定区CL的氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示。

15. 如权利要求7所述的双特异性抗体,其特征在于,所述人IgG的Fc区段具有LALA突变,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 18所示。

16. 如权利要求5或7所述的双特异性抗体,其特征在于,所述连接元件的序列为(G4S)_n,其中,n为正整数。

17. 如权利要求16所述的双特异性抗体,其特征在于,n为1、2、3、4、5或6。

18. 如权利要求5或7所述的双特异性抗体,其特征在于,所述连接元件的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6或7所示。

19. 如权利要求5所述的双特异性抗体,其特征在于,所述双特异性抗体含有如式I和式II所示结构的多肽,其中所述式I所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示,并且所述式II所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示。

20. 如权利要求5所述的双特异性抗体,其特征在于,所述双特异性抗体含有如式I和式II所示结构的多肽,其中所述式I所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示,并且所述式II所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示。

21. 如权利要求5所述的双特异性抗体,其特征在于,所述双特异性抗体含有如式I和式II所示结构的多肽,其中所述式I所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示,并且所述式II所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 14所示。

22. 如权利要求5所述的双特异性抗体,其特征在于,所述双特异性抗体含有如式I和式II所示结构的多肽,其中所述式I所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示,并且所述式II所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO: 14所示。

23. 如权利要求7所述的双特异性抗体,其特征在于,所述双特异性抗体是具有如式III所示结构的多肽,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 16所示。

24. 如权利要求7所述的双特异性抗体,其特征在于,所述双特异性抗体是具有如式III所示结构的多肽,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 19所示。

25. 如权利要求5所述的双特异性抗体,其特征在于,所述的双特异性抗体同时含有如式I和式II所示结构的多肽,并且式I所示的多肽与式II所示的多肽通过二硫键作用而形成异源二聚体i;

并且,所述异源二聚体i之间,通过CH结构域之间的二硫键作用而形成同源二聚体ii。

26. 如权利要求7所述的双特异性抗体,其特征在于,所述的双特异性抗体是具有如式III或式IV所示结构的多肽,并且所述的如式III或式IV所示结构的多肽之间,通过Fc区段之间的二硫键作用而形成同源二聚体。

27. 一种分离的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸编码如权利要求1所述的双特异性抗体。

28. 如权利要求27所述的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸编码权利要求5所述的双特异性抗体,并且所述多核苷酸中,编码所述式I所示结构多肽的多核苷酸序列与编码所述式II所示结构多肽的多核苷酸序列的比例为1:1。

29. 一种载体,其特征在于,所述载体含有如权利要求27所述的多核苷酸。

30. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞含有如权利要求29所述的载体,或其基因组中整合有如权利要求27所述的多核苷酸;

或者,所述的宿主细胞表达如权利要求1所述的双特异性抗体。

31. 如权利要求30所述的宿主细胞,其特征在于,所述的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞。

32. 一种产生如权利要求1所述双特异性抗体的方法,其特征在于,包括步骤:

(a) 在合适的条件下,培养如权利要求30所述的宿主细胞,从而获得含所述双特异性抗体的培养物;和

(b) 对步骤(a)中得到的培养物进行纯化和/或分离,获得所述的双特异性抗体。

33. 如权利要求32所述的方法,其特征在于,所述纯化可以通过蛋白A亲和柱纯化分离获得目标抗体。

34. 一种免疫偶联物,其特征在于,所述免疫偶联物含有:

(a) 如权利要求1所述的双特异性抗体;和

(b) 偶联部分,其为可检测标记物。

35. 一种免疫偶联物,其特征在于,所述免疫偶联物含有:

(a) 如权利要求1所述的双特异性抗体;和

(b) 选自下组的偶联部分:药物、毒素、细胞因子、或酶、金纳米颗粒或纳米棒、纳米磁粒、病毒外壳蛋白或VLP,或其组合。

36. 如权利要求34或35所述的免疫偶联物,其特征在于,所述免疫偶联物含有:多价的如权利要求1所述的双特异性抗体,其中所述多价是指在所述免疫偶联物的氨基酸序列中包含多个重复的如权利要求1所述的双特异性抗体。

37. 如权利要求1所述的双特异性抗体或如权利要求34或35所述的免疫偶联物的用途,其特征在于,用于制备试剂、检测板或试剂盒;其中,所述试剂、检测板或试剂盒用于:检测样品中PD-L1和/或VEGF。

38. 如权利要求37所述的用途,其特征在于,所述的试剂为选自下组的一种或多种试剂:同位素示踪剂、造影剂、流式检测试剂、细胞免疫荧光检测试剂、纳米磁粒和显像剂。

39. 如权利要求37所述的用途,其特征在于,所述的检测为体内检测或体外检测。

40. 如权利要求37所述的用途,其特征在于,所述的检测包括流式检测、细胞免疫荧光检测。

41. 如权利要求1所述的双特异性抗体或如权利要求34或35所述的免疫偶联物的用途, 其特征在于, 用于制备药剂, 其中, 所述药剂用于治疗或预防表达PD-L1的肿瘤或是表达VEGF的肿瘤, 并且所述的肿瘤选自下组: 多发性骨髓病、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、肝癌、白血病、肾脏肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、宫颈癌、淋巴瘤、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤, 或其组合。

42. 如权利要求41所述的用途, 其特征在于, 所述白血病为急性髓细胞白血病和慢性粒细胞性白血病, 或者所述淋巴瘤为非霍奇金淋巴瘤。

43. 一种药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物含有:

- (i) 如权利要求1所述的双特异性抗体, 或如权利要求34或35所述的免疫偶联物; 和
- (ii) 药学上可接受的载体。

44. 如权利要求43所述的药物组合物, 其特征在于, 所述的药物组合物中还含有治疗肿瘤的其他药物。

45. 如权利要求44所述的药物组合物, 其特征在于, 所述治疗肿瘤的其他药物为细胞毒性药物。

46. 如权利要求43所述的药物组合物, 其特征在于, 所述的药物用于阻断PD-1和PD-L1的相互作用, 同时阻断VEGF和VEGFR的相互作用。

47. 如权利要求43所述的药物组合物, 其特征在于, 所述的药物组合物用于制备防治肿瘤的药物。

48. 如权利要求1所述的双特异性抗体的一种或多种选自下组的用途, 其特征在于, 所述用途包括:

(i) 用于检测人PD-L1分子和/或VEGF分子; (ii) 用于流式检测; (iii) 用于细胞免疫荧光检测; (iv) 用于阻断PD-1和PD-L1的相互作用; 和 (v) 用于阻断VEGF和VEGFR的相互作用; 并且所述用途为非诊断目的且非治疗目的。

49. 一种重组蛋白, 其特征在于, 所述的重组蛋白具有: (i) 如权利要求1所述的双特异性抗体; 以及 (ii) 协助表达和/或纯化的标签序列。

50. 一种非诊断目的且非治疗目的的检测样品中PD-L1和/或VEGF的方法, 其特征在于, 所述方法包括步骤: (1) 将样品与如权利要求1所述的双特异性抗体接触; (2) 检测是否形成抗原-抗体复合物, 其中形成复合物就表示样品中存在PD-L1和/或VEGF。

51. 一种PD-L1和/或VEGF检测试剂, 其特征在于, 所述的检测试剂包含如权利要求34或35所述的免疫偶联物和检测学上可接受的载体。

52. 一种检测PD-L1和/或VEGF的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒含有如权利要求34或35所述的免疫偶联物或如权利要求51所述的检测试剂, 以及说明书。

53. 如权利要求52所述的试剂盒, 其特征在于, 所述的说明书记载, 所述的试剂盒用于非侵入性地检测待测对象的PD-L1和/或VEGF表达。

一种抗VEGF/PD-L1双特异性抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种抗VEGF/PD-L1双特异性抗体及其用途。

背景技术

[0002] 程序性死亡因子1配体1(programmed death 1 ligand 1,PD-L1)又称CD274,为B7家族成员,是PD-1的配体。PD-L1属于I型跨膜蛋白,共290个氨基酸,包含1个IgV样区、1个IgC样区、1个跨膜疏水区和1个由30个氨基酸组成的胞内区。与其他B7家族分子不同的是,PD-L1具有负向调节免疫应答的作用。研究发现,PD-L1主要表达于活化的T细胞、B细胞、巨噬细胞和树突状细胞等,除淋巴细胞外,PD-L1也表达于其他多种组织如胸腺、心脏、胎盘等的内皮细胞,以及各类非淋巴系如黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、结肠癌、乳腺癌、食道癌、头颈癌等。PD-L1在调节自身反应性T、B细胞和免疫耐受方面具有一定广泛性,并且在外周组织T和B细胞应答起作用。PD-L1在肿瘤细胞上的高表达与癌症患者的不良预后相关。

[0003] 血管内皮生长因子又称血管通透因子(vascular permeability factor,VPF)或血管调理素(vasculotropin),最先从肿瘤细胞分离出来,是一种能与肝素结合的二聚体糖蛋白分子,并能特异性地作用于血管内皮细胞,是血管内皮细胞特异的有丝分裂素。具有增加微静脉、小静脉通透性,促进血管内皮细胞分裂、增殖以及诱导血管形成等作用。VEGF参与许多血管生成依赖性疾病的发病及其进展,包括癌症、某些炎性疾病以及糖尿病视网膜病变等。因此,在抗肿瘤药物研究中,VEGF是一个重要的靶点。

[0004] 目前上市在售的抗体药物多为单克隆抗体,治疗性单克隆抗体已被用于治疗癌症、自身免疫病、炎症和其他疾病,多数是针对一个靶标的特异性。然而,病人接受单克隆抗体治疗可能产生耐药性或无应答。并且有些疾病在体内的影响因素是多方面的,包括不同的信号通路、不同的细胞因子和受体的调节机制等,单一靶点的免疫疗法似乎并不足以摧毁癌细胞。因此,需要通过组合不同的药物,或是使用多特异性抗体的多重靶向策略来实现。

[0005] 双功能抗体虽然是抗体药物研发的方向,但面临诸多挑战,比如临床前评价模型、表达量低、稳定性差、工艺复杂、质控差异性大等问题,因此一直以来双功能抗体的研发困难重重。

[0006] 因此,本领域迫切开发一种特异性佳、疗效好且易于制备的抗肿瘤双特异性抗体。

发明内容

[0007] 本发明的目的就是提供一种特异性佳、疗效好且易于制备的抗VEGF/PD-L1双特异性抗体。

[0008] 在本发明的第一方面,提供了一种双特异性抗体,所述双特异性抗体包括:

[0009] (a) 抗PD-L1单域抗体;和

[0010] (b) 抗VEGF的抗体或元件。

[0011] 在另一优选例中,所述的双特异性抗体包括1-3个抗PD-L1单域抗体,较佳地,包括1或2个抗PD-L1单域抗体。

[0012] 在另一优选例中,所述的PD-L1单域抗体可以阻断PD-1和PD-L1的相互作用。

[0013] 在另一优选例中,所述的双特异性抗体还包含Fc段。

[0014] 在另一优选例中,所述双特异性抗体的Fc段选自下组:人IgG结构域、CH1+CL1结构域,或其组合。

[0015] 在另一优选例中,所述人IgG结构域是经过改造的突变型IgG结构域,优选地为LALA突变型的IgG结构域。

[0016] 在另一优选例中,所述的双特异性抗体含有如式I和式II所示结构的多肽,

[0017] A1-L1-CH-L2-B (式I)

[0018] A2-L3-CL (式II)

[0019] 其中,

[0020] A1是抗VEGF抗体的重链可变区VH;

[0021] A2是抗VEGF抗体的轻链可变区VL;

[0022] B是抗PD-L1单域抗体;

[0023] L1、L2和L3各自独立地为无或连接元件;

[0024] CH是人IgG重链恒定区CH(优选地为LALA突变型);

[0025] CL是人κ轻链恒定区CL;和

[0026] “-”为肽键;

[0027] 并且其中,式I所示的多肽与式II所示的多肽通过二硫键作用而形成异源二聚体。

[0028] 在另一优选例中,所述双特异性抗体是具有如式III或式IV所示结构的多肽,

[0029] A3-L4-Fc-L5-B (式III)

[0030] B-L6-Fc-L7-A3 (式IV)

[0031] 其中,

[0032] A3是可以结合VEGF并阻断其活性的结构域;

[0033] B是抗PD-L1单域抗体;

[0034] L4、L5、L6和L7各自独立地为无或连接元件;

[0035] Fc是人IgG的Fc区段(优选地为LALA突变型);和

[0036] “-”为肽键。

[0037] 在另一优选例中,所述抗VEGF的重链可变区VH具有衍生自贝伐单抗(Bevacizumab)的重链可变区氨基酸序列,其氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,或与SEQ ID NO:3所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%)的序列同一性。

[0038] 在另一优选例中,所述抗VEGF的轻链可变区VL具有衍生自贝伐单抗(Bevacizumab)的轻链可变区氨基酸序列,其氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,或与SEQ ID NO:9所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%)的序列同一性。

[0039] 在另一优选例中,所述抗VEGF的重链可变区VH具有衍生自雷尼单抗(Ranibizumab)的重链可变区氨基酸序列,其氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,或与SEQ ID NO:13所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%)的序列同一性。

[0040] 在另一优选例中,所述抗VEGF的轻链可变区VL具有衍生自雷尼单抗

(Ranibizumab)的轻链可变区氨基酸序列,其氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,或与SEQ ID NO:15所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%)的序列同一性。

[0041] 在另一优选例中,所述可以结合VEGF并阻断其活性的结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,或与SEQ ID NO:17所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%)的序列同一性。

[0042] 在另一优选例中,所述抗PD-L1单域抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,或与SEQ ID NO:5所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%)的序列同一性。

[0043] 在另一优选例中,所述人IgG重链恒定区CH中具有LALA突变,其氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,或与SEQ ID NO:4所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%)的序列同一性。

[0044] 在另一优选例中,所述人 κ 轻链恒定区CL的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,或与SEQ ID NO:10所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%)的序列同一性。

[0045] 在另一优选例中,所述人IgG的Fc区段具有LALA突变,其氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,或与SEQ ID NO:18所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%)的序列同一性。

[0046] 在另一优选例中,所述接头元件的序列为 $(G_4S)_n$,其中,n为正整数(例如1、2、3、4、5或6),优选地,n为2或4。

[0047] 在另一优选例中,所述接头元件的氨基酸序列如SEQ ID NO:6或7所示,或与SEQ ID NO:6或7所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%)的序列同一性。

[0048] 在另一优选例中,所述双特异性抗体含有如式I和式II所示结构的多肽,其中所述式I所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,并且所述式II所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。(即Ava-2GS-NSD)

[0049] 在另一优选例中,所述双特异性抗体含有如式I和式II所示结构的多肽,其中所述式I所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,并且所述式II所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。(即Ava-4GS-NSD)

[0050] 在另一优选例中,所述双特异性抗体含有如式I和式II所示结构的多肽,其中所述式I所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示,并且所述式II所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示。(即Luc-2GS-NSD)

[0051] 在另一优选例中,所述双特异性抗体含有如式I和式II所示结构的多肽,其中所述式I所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,并且所述式II所示结构的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示。(即Luc-4GS-NSD)

[0052] 在另一优选例中,所述双特异性抗体是具有如式III所示结构的多肽,其氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。(即NSD-Elyea)

[0053] 在另一优选例中,所述双特异性抗体是具有如式III所示结构的多肽,其氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示。(即Elyea-NSD)

[0054] 在另一优选例中,所述的双特异性抗体同时含有如式I和式II所示结构的多肽,并且式I所示的多肽与式II所示的多肽通过二硫键作用而形成异源二聚体i;

[0055] 并且,所述异源二聚体i之间,通过CH结构域之间的二硫键作用而形成同源二聚体ii。

[0056] 在另一优选例中,所述的双特异性抗体是具有如式III或式IV所示结构的多肽,并且所述的如式III或式IV所示结构的多肽之间,通过Fc区段之间的二硫键作用而形成同源二聚体。

[0057] 在本发明的第二方面,提供了一种分离的多核苷酸,所述多核苷酸编码如本发明第一方面所述的双特异性抗体。

[0058] 在另一优选例中,当所述双特异性抗体含有如式I和式II所示结构的多肽时,所述多核苷酸中,编码所述式I所示结构多肽的多核苷酸序列与编码所述式II所示结构多肽的多核苷酸序列的比例为1:1。

[0059] 在本发明的第三方面,提供了一种载体,所述载体含有如本发明第二方面所述的多核苷酸。

[0060] 在另一优选例中,所述的载体选自下组:DNA、RNA、病毒载体、质粒、转座子、其他基因转移系统、或其组合;优选地,所述表达载体包括病毒载体,如慢病毒、腺病毒、AAV病毒、逆转录病毒、或其组合。

[0061] 在本发明的第四方面,提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞含有如本发明第三方面所述的载体,或其基因组中整合有如本发明第二方面所述的多核苷酸;

[0062] 或者,所述的宿主细胞表达如本发明第一方面所述的双特异性抗体。

[0063] 在另一优选例中,所述的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞。

[0064] 在另一优选例中,所述的宿主细胞选自下组:大肠杆菌、酵母细胞、哺乳动物细胞。

[0065] 在本发明的第五方面,提供了一种产生如本发明第一方面所述双特异性抗体的方法,包括步骤:

[0066] (a) 在合适的条件下,培养如本发明第四方面所述的宿主细胞,从而获得含所述双特异性抗体的培养物;和

[0067] (b) 对步骤(a)中得到的培养物进行纯化和/或分离,获得所述的双特异性抗体。

[0068] 在另一优选例中,所述纯化可以通过蛋白A亲和柱纯化分离获得目标抗体。

[0069] 在另一优选例中,所述经过纯化分离后的目标抗体纯度大于95%,大于96%、大于97%、大于98%、大于99%,优选为100%。

[0070] 在本发明的第六方面,提供了一种免疫偶联物,所述免疫偶联物含有:

[0071] (a) 如本发明第一方面所述的双特异性抗体;和

[0072] (b) 选自下组的偶联部分:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶、金纳米颗粒/纳米棒、纳米磁粒、病毒外壳蛋白或VLP、或其组合。

[0073] 在另一优选例中,所述的放射性核素包括:

[0074] (i) 诊断用同位素,所述的诊断用同位素选自下组:Tc-99m、Ga-68、F-18、I-123、I-125、I-131、In-111、Ga-67、Cu-64、Zr-89、C-11、Lu-177、Re-188、或其组合;和/或

[0075] (ii) 治疗用同位素,所述的治疗用同位素选自下组:Lu-177、Y-90、Ac-225、As-211、Bi-212、Bi-213、Cs-137、Cr-51、Co-60、Dy-165、Er-169、Fm-255、Au-198、Ho-166、I-125、I-131、Ir-192、Fe-59、Pb-212、Mo-99、Pd-103、P-32、K-42、Re-186、Re-188、Sm-153、Ra223、Ru-106、Na24、Sr89、Tb-149、Th-227、Xe-133Yb-169、Yb-177、或其组合。

[0076] 在另一优选例中,所述偶联部分为药物或毒素。

[0077] 在另一优选例中,所述的药物为细胞毒性药物。

[0078] 在另一优选例中,所述的细胞毒性药物选自下组:抗微管蛋白药物、DNA小沟结合试剂、DNA复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱、或其组合。

[0079] 特别有用的细胞毒性药物类的例子包括,例如,DNA小沟结合试剂、DNA烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂、典型的细胞毒性药物包括、例如奥瑞他汀(auristatins)、喜树碱(camptothecins)、多卡霉素/倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊甙(etoposides)、美登木素(maytansines)和美登素类化合物(maytansinoids)(例如DM1和DM4)、紫杉烷(taxanes)、苯二氮卓类(benzodiazepines)或者含有苯二氮卓的药物(benzodiazepine containing drugs)(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBDs),吲哚啉苯并二氮卓类(indolinobenzodiazepines)和噁唑啉烷并苯并二氮卓类(oxazolidinobenzodiazepines))、长春花生物碱(vinca alkaloids)、或其组合。

[0080] 在另一优选例中,所述的毒素选自下组:

[0081] 耳他汀类(例如,耳他汀E、耳他汀F、MMAE和MMAF)、金霉素、类美坦西醇、蓖麻毒素、蓖麻毒素A-链、考布他汀、多卡米星、多拉司他汀、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羧基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -八叠球菌、白树毒素、迈托毒素(mitogellin)、局限曲菌素(retstrictocin)、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白(curicin)、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草(*Saponaia officinalis*)抑制剂、糖皮质激素、或其组合。

[0082] 在另一优选例中,所述偶联部分为可检测标记物。

[0083] 在另一优选例中,所述偶联物选自:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶、放射性核素、生物毒素、细胞因子(如IL-2)、抗体、抗体Fc片段、抗体scFv片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、前药激活酶(如DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL))、化疗剂(如顺铂)。

[0084] 在另一优选例中,所述免疫偶联物含有:多价(如二价)的如本发明第一方面所述的双特异性抗体。

[0085] 在另一优选例中,所述多价是指在所述免疫偶联物的氨基酸序列中包含多个重复的如本发明第一方面所述的双特异性抗体。

[0086] 在本发明的第七方面,提供了如本发明第一方面所述的双特异性抗体,或本发明第六方面所述的免疫偶联物的用途,用于制备药剂、试剂、检测板或试剂盒;其中,所述试剂、检测板或试剂盒用于:检测样品中PD-L1和/或VEGF;其中,所述药剂用于治疗或预防表达PD-L1(即PD-L1阳性)的肿瘤或是表达VEGF的肿瘤。

[0087] 在另一优选例中,所述的免疫偶联物的偶联部分为诊断用同位素。

[0088] 在另一优选例中,所述的试剂为选自下组的一种或多种试剂:同位素示踪剂、造影剂、流式检测试剂、细胞免疫荧光检测试剂、纳米磁粒和显像剂。

[0089] 在另一优选例中,所述检测样品中PD-L1和/或VEGF的试剂为(体内)检测PD-L1和/或VEGF分子的造影剂。

[0090] 在另一优选例中,所述的检测为体内检测或体外检测。

- [0091] 在另一优选例中,所述的检测包括流式检测、细胞免疫荧光检测。
- [0092] 在另一优选例中,所述的药剂用于阻断PD-1和PD-L1的相互作用,同时阻断VEGF和VEGFR的相互作用。
- [0093] 在另一优选例中,所述的肿瘤包括但不限于:急性髓细胞白血病、慢性粒细胞性白血病、多发性骨髓病、非霍奇金淋巴瘤、结直肠癌、乳腺癌、大肠癌、胃癌、肝癌、白血病、肾脏肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、前列腺癌、宫颈癌、淋巴瘤、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤。
- [0094] 在本发明的第八方面,提供了一种药物组合物,所述药物组合物含有:
- [0095] (i) 如本发明第一方面所述的双特异性抗体,或如本发明第六方面所述的免疫偶联物;和
- [0096] (ii) 药学上可接受的载体。
- [0097] 在另一优选例中,所述的免疫偶联物的偶联部分为药物、毒素、和/或治疗用同位素。
- [0098] 在另一优选例中,所述的药物组合物中还含有治疗肿瘤的其他药物,如细胞毒性药物。
- [0099] 在另一优选例中,所述的治疗肿瘤的其他药物包括紫杉醇、多柔比星、环磷酰胺、阿西替尼、乐伐替尼、派姆单抗。
- [0100] 在另一优选例中,所述的药物用于阻断PD-1和PD-L1的相互作用,同时阻断VEGF和VEGFR的相互作用。
- [0101] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于阻断PD-1/PD-L1和/或VEGF/VEGFR信号通路。
- [0102] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于治疗表达PD-L1蛋白(即PD-L1阳性)和/或表达VEGF蛋白(即VEGF阳性)的肿瘤。
- [0103] 在另一优选例中,所述的药物组合物为注射剂型。
- [0104] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于制备防治肿瘤的药物。
- [0105] 在本发明的第九方面,提供了如本发明第一方面所述的双特异性抗体的一种或多种选自下组的用途,包括:
- [0106] (i) 用于检测人PD-L1分子和/或VEGF分子;(ii) 用于流式检测;(iii) 用于细胞免疫荧光检测;(iv) 用于治疗肿瘤;(v) 用于肿瘤诊断;(vi) 用于阻断PD-1和PD-L1的相互作用;和(vii) 用于阻断VEGF和VEGFR的相互作用。
- [0107] 在另一优选例中,所述的肿瘤为表达PD-L1蛋白(即PD-L1阳性)和/或表达VEGF蛋白(即VEGF阳性)的肿瘤。
- [0108] 在另一优选例中,所述用途为非诊断的和非治疗的。
- [0109] 在本发明的第十方面,提供了一种重组蛋白,所述的重组蛋白具有:(i) 如本发明第一方面所述的双特异性抗体;以及(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。
- [0110] 在另一优选例中,所述的标签序列包括6His标签、HA标签和Fc标签。
- [0111] 在另一优选例中,所述的重组蛋白特异性结合于PD-L1和/或VEGF。
- [0112] 在本发明的第十一方面,提供了一种检测样品中PD-L1和/或VEGF的方法,所述方法包括步骤:(1) 将样品与如本发明第一方面所述的双特异性抗体接触;(2) 检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示样品中存在PD-L1和/或VEGF。

[0113] 在本发明的第十二方面,提供了一种治疗疾病的方法,所述方法包括:给需要的对象施用如本发明第一方面所述的双特异性抗体、如本发明第六方面所述的免疫偶联物,或如本发明第八方面所述的药物组合物。

[0114] 在另一优选例中,所述的对象包括哺乳动物,优选地是人。

[0115] 在本发明的第十三方面,提供了一种PD-L1和/或VEGF检测试剂,所述的检测试剂包含如本发明第六方面所述的免疫偶联物和检测学上可接受的载体。

[0116] 在另一优选例中,所述的免疫偶联物的偶联部分为诊断用同位素。

[0117] 在另一优选例中,所述的检测学上可接受的载体为无毒的、惰性的水性载体介质。

[0118] 在另一优选例中,所述的检测试剂为选自下组的一种或多种试剂:同位素示踪剂、造影剂、流式检测试剂、细胞免疫荧光检测试剂、纳米磁粒和显像剂。

[0119] 在另一优选例中,所述的检测试剂用于体内检测。

[0120] 在另一优选例中,所述的检测试剂的剂型为液态或粉状(如水剂,针剂,冻干粉,片剂,含服剂,吸雾剂)。

[0121] 在本发明的第十四方面,提供了一种检测PD-L1和/或VEGF的试剂盒,所述试剂盒含有如本发明第六方面所述的免疫偶联物或如本发明第十三方面所述的检测试剂,以及说明书。

[0122] 在另一优选例中,所述的说明书记载,所述的试剂盒用于非侵入性地检测待测对象的PD-L1和/或VEGF表达。

[0123] 在另一优选例中,所述的试剂盒用于表达PD-L1蛋白(即PD-L1阳性)和/或表达VEGF蛋白(即VEGF阳性)的肿瘤的检测。

[0124] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图简要说明

[0125] 图1显示了双特异性抗体结构示意图。

[0126] 图2显示了本发明的双特异性抗体可和细胞表面的人PD-L1蛋白结合。

[0127] 图3显示了本发明的特异性抗体可阻断VEGF蛋白和VEGFR蛋白的结合。

[0128] 图4显示了本发明的双特异性抗体可有效激活T细胞。

[0129] 图5显示了本发明的双特异性抗体具有较好的热稳定性,加速稳定性样品和原样品的抗原结合活性相似。

[0130] 图6显示了显示了本发明的双特异性抗体可以有效抑制小鼠体内的肿瘤生长。

具体实施方式

[0131] 本发明人经过广泛而深入的研究,经过大量的筛选,首次开发了一种抗PD-L1/VEGF双特异性抗体。实验结果表明,本发明的特异性抗体能够高特异性针对人的PD-L1蛋白,能够在靶向中和肿瘤微环境的VEGF基础上抑制PD-1/PD-L1通路,可以使T细胞恢复活性,增强免疫应答,从而更有效地提高抑制肿瘤发生和发展的效果。在此基础上完成了本发明。

[0132] 术语

[0133] 为了可以更容易地理解本公开,首先定义某些术语。如本申请中所使用的,除非本文另有明确规定,否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。在整个申请中阐述了其它定义。

[0134] 双特异性抗体

[0135] 如本文所用,术语“本发明的双特异性抗体”、“本发明的双抗”、“抗PD-L1/VEGF双特异性抗体”具有相同的含义,均指特异性识别和结合PD-L1和VEGF的双特异性抗体。

[0136] 本发明提供了一种抗PD-L1/VEGF双特异性抗体,其包括:抗PD-L1单域抗体和抗VEGF的抗体或元件。

[0137] 优选地,所述的双特异性抗体含有如式I和式II所示结构的多肽,

[0138] A1-L1-CH-L2-B (式I)

[0139] A2-L3-CL (式II)

[0140] 其中,

[0141] A1是抗VEGF抗体的重链可变区VH;

[0142] A2是抗VEGF抗体的轻链可变区VL;

[0143] B是抗PD-L1单域抗体;

[0144] L1、L2和L3各自独立地为无或连接元件;

[0145] CH是人IgG重链恒定区CH(优选地为LALA突变型);

[0146] CL是人κ轻链恒定区CL;和

[0147] “-”为肽键;

[0148] 并且其中,式I所示的多肽与式II所示的多肽通过二硫键作用而形成异源二聚体。

[0149] 或者,所述双特异性抗体是具有如式III或式IV所示结构的多肽,

[0150] A3-L4-Fc-L5-B (式III)

[0151] B-L6-Fc-L7-A3 (式IV)

[0152] 其中,

[0153] A3是可以结合VEGF并阻断其活性的结构域;

[0154] B是抗PD-L1单域抗体;

[0155] L4、L5、L6和L7各自独立地为无或连接元件;

[0156] Fc是人IgG的Fc区段(优选地为LALA突变型);和

[0157] “-”为肽键。

[0158] 在一个实施方式中,所述的双特异性抗体同时含有如式I和式II所示结构的多肽,并且式I所示的多肽与式II所示的多肽通过二硫键作用而形成异源二聚体i;

[0159] 并且,所述异源二聚体i之间,通过CH结构域之间的二硫键作用而形成同源二聚体ii。

[0160] 在另一个实施方式中,所述的双特异性抗体是具有如式III或式IV所示结构的多肽,并且所述的如式III或式IV所示结构的多肽之间,通过Fc区段之间的二硫键作用而形成同源二聚体。

[0161] 如本文所用,术语“单域抗体”、“纳米抗体VHH”、“纳米抗体”具有相同的含义,指克隆抗体重链的可变区,构建仅由一个重链可变区组成的纳米抗体(VHH),它是具有完整功能

的最小的抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区1 (CH1) 的抗体后,再克隆抗体重链的可变区,构建仅由一个重链可变区组成的纳米抗体 (VHH)。

[0162] 如本文所用,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区 (CDR) 或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区 (FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈 β -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ.No.91-3242,卷I,647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0163] 如本文所用,术语“构架区”(FR)指插入CDR间的氨基酸序列,即指在单一物种中不同的免疫球蛋白间相对保守的免疫球蛋白的轻链和重链可变区的那些部分。免疫球蛋白的轻链和重链各具有四个FR,分别称为FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L和FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。相应地,轻链可变结构域可因此称作(FR1-L) - (CDR1-L) - (FR2-L) - (CDR2-L) - (FR3-L) - (CDR3-L) - (FR4-L)且重链可变结构域可因此表示为(FR1-H) - (CDR1-H) - (FR2-H) - (CDR2-H) - (FR3-H) - (CDR3-H) - (FR4-H)。优选地,本发明的FR是人抗体FR或其衍生物,所述人抗体FR的衍生物与天然存在的人抗体FR基本相同,即序列同一性达到85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0164] 获知CDR的氨基酸序列,本领域的技术人员可轻易确定构架区FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L和/或FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。

[0165] 如本文所用,术语“人构架区”是与天然存在的人抗体的构架区基本相同的(约85%或更多,具体地90%、95%、97%、99%或100%)构架区。

[0166] 如本文所用,术语“亲和力”理论上通过完整抗体和抗原间的平衡缔合来定义。本发明双抗的亲和力可以通过KD值(解离常数)(或其它测定方式)进行评估或测定,例如生物膜层干涉技术(Bio-layer interferometry BLI),使用FortebioRed96仪器测量确定。

[0167] 如本文所用,术语“接头”是指插入免疫球蛋白结构域中为轻链和重链的结构域提供足够的可动性以折叠成交换双重可变区免疫球蛋白的一个或多个氨基酸残基。

[0168] 如本领域技术人员所知,免疫偶联物及融合表达产物包括:药物、毒素、细胞因子(cytokine)、放射性核素、酶和其他诊断或治疗分子与本发明的抗体或其片段结合而形成的偶联物。本发明还包括与所述的PD-L1/VEGF双特异性抗体或其片段结合的细胞表面标记物或抗原。

[0169] 如本文所用,术语“可变区”与“互补决定区(complementarity determining region,CDR)”可互换使用。

[0170] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述抗体的重链可变区包括三个互补决定区CDR1、CDR2、和CDR3。

[0171] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述抗体的重链包括上述重链可变区和重链恒定区。

[0172] 在本发明中,术语“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用,都

指特异性结合PD-L1和/或VEGF蛋白的多肽,例如具有重链可变区的蛋白或多肽。它们可含有或不含有起始甲硫氨酸。

[0173] 本发明还提供了具有本发明抗体的其他蛋白质或融合表达产物。具体地,本发明包括具有含可变区的重链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物(即免疫偶联物及融合表达产物),只要该可变区与本发明抗体的重链可变区相同或至少90%同源性,较佳地至少95%同源性。

[0174] 一般,抗体的抗原结合特性可由位于重链可变区的3个特定的区域来描述,称为可变区域(CDR),将该段间隔成4个框架区域(FR),4个FR的氨基酸序列相对比较保守,不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构,通过其间的FR形成的 β 折叠在空间结构上相互靠近,重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。

[0175] 本发明抗体的重链的可变区特别令人感兴趣,因为它们中至少部分涉及结合抗原。因此,本发明包括那些具有带CDR的抗体重链可变区的分子,只要其CDR与此处鉴定的CDR具有90%以上(较佳地95%以上,最佳地98%以上)的同源性。

[0176] 本发明不仅包括完整的抗体,还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此,本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

[0177] 如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列,或与6His标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0178] 本发明抗体指具有PD-L1和/或VEGF蛋白结合活性的双抗。该术语还包括具有与本发明抗体相同功能的、包含相同CDR区的多肽的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于):一个或多个(通常为1-50个,较佳地1-30个,更佳地1-20个,最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括本发明抗体的活性片段和活性衍生物。

[0179] 该多肽的变异形式包括:同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与本发明抗体的编码DNA杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

[0180] 本发明还提供了其他多肽,如包含单域抗体或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外,本发明还包括了本发明单域抗体的片段。通常,该片段具有本发明抗体的至少约50个连续氨基酸,较佳地至少约50个连续氨基酸,更佳地至少约80个连续氨基酸,最佳地至少约100个连续氨基酸。

[0181] 在本发明中,“本发明抗体的保守性变异体”指与本发明抗体的氨基酸序列相比,

有至多10个, 较佳地至多8个, 更佳地至多5个, 最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

[0182] 表A

[0183]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

[0184] 本发明还提供了编码上述抗体或其片段或其融合蛋白的多核苷酸分子。本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。

[0185] 编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列（和任选的附加编码序列）以及非编码序列。

[0186] 术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

[0187] 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少50%，较佳地至少70%，更佳地至少80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1) 在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如0.2×SSC, 0.1% SDS, 60℃；或(2) 杂交时加有变性剂，如50% (v/v) 甲酰胺, 0.1%小牛血清/0.1%Ficoll, 42℃等；或(3) 仅在两条序列之间的相同性至少在90%以上，更好是95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

[0188] 本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外,还可通过将重链的编码序列和表达标签(如6His)融合在一起,形成融合蛋白。

[0189] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子(核酸、蛋白等)包括以分离的形式存在的生物分子。

[0190] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0191] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0192] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属;鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞;真菌细胞如酵母;果蝇S2或Sf9的昆虫细胞;CHO、COS7、293细胞的动物细胞等。

[0193] 用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获,用CaCl₂法处理,所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用MgCl₂。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的DNA转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔,脂质体包装等。

[0194] 获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

[0195] 在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0196] 本发明的抗体可以单独使用,也可与可检测标记物(为诊断目的)、治疗剂、PK(蛋白激酶)修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。

[0197] 用于诊断目的可检测标记物包括但不限于:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

[0198] 可与本发明抗体结合或偶联的治疗剂包括但不限于:1.放射性核素;2.生物毒;3.细胞因子如IL-2等;4.金纳米颗粒/纳米棒;5.病毒颗粒;6.脂质体;7.纳米磁粒;8.前药激活酶(例如,DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL));10.化疗剂(例如,顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

[0199] 药物组合物

[0200] 本发明还提供了一种组合物。优选地,所述的组合物是药物组合物,它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白,以及药学上可接受的载体。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0201] 本发明的药物组合物可直接用于结合PD-L1和/或VEGF蛋白分子,因而可用于治疗肿瘤。此外,还可同时使用其他治疗剂。

[0202] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单域抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约10微克/千克体重-约50毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

[0203] 使用药物组合物时,是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重,较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约10毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0204] 标记的抗体

[0205] 在本发明的一个优选例中,所述抗体带有可检测标记物。更佳地,所述的标记物选自下组:同位素、胶体金标记物、有色标记物或荧光标记物。

[0206] 胶体金标记可采用本领域技术人员已知的方法进行。在本发明的一个优选的方案中,PD-L1/VEGF双特异性抗体可以用胶体金标记,得到胶体金标记的抗体。

[0207] 检测方法

[0208] 本发明还涉及检测PD-L1和/或VEGF蛋白的方法。该方法步骤大致如下:获得细胞和/或组织样本;将样本溶解在介质中;检测在所述溶解的样本中PD-L1和/或VEGF蛋白的水平。

[0209] 在本发明的检测方法中,所使用的样本没有特别限制,代表性的例子是存在于细胞保存液中的含细胞的样本。

[0210] 试剂盒

[0211] 本发明还提供了一种含有本发明的抗体(或其片段)或检测板的试剂盒,在本发明的一个优选例中,所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。

[0212] 本发明还提供了用于检测PD-L1和/或VEGF水平的检测试剂盒,该试剂盒包括识别PD-L1和/或VEGF蛋白的抗体,用于溶解样本的裂解介质,检测所需的通用试剂和缓冲液,如各种缓冲液、检测标记、检测底物等。该检测试剂盒可以是体外诊断装置。

[0213] 应用

[0214] 如上所述,本发明的单域抗体有广泛生物应用价值和临床应用价值,其应用涉及到与PD-L1和/或VEGF相关的疾病的诊断和治疗、基础医学研究、生物学研究等多个领域。一个优选的应用是用于针对PD-L1和/或VEGF的临床诊断和靶向治疗,如肿瘤治疗。

[0215] 本发明的主要优点包括：
 [0216] 1) 本发明双特异性抗体高特异性针对人的具有正确空间结构的PD-L1蛋白。
 [0217] 2) 本发明双特异性抗体的亲和力强。
 [0218] 3) 本发明双特异性抗体的生产简便。
 [0219] 4) 在靶向中和肿瘤微环境的VEGF基础上抑制PD-1/PD-L1通路,可以使T细胞恢复活性,增强免疫应答,更有效地提高抑制肿瘤发生和发展的效果。
 [0220] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0221] 本发明序列总结

[0222] 表B本发明抗体相关序列

[0223]

名称	序列	SEQ ID NO:
ava-2GS-NSD HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFTNYGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTGTEPT AADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGSGEVQLQESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYWMYWLRLQAPGKGLEWVSSINSDSSSTYYRDSVKGRFTISRDNKN TLYLQMNSLKSIEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS	1
ava-4GS-NSD HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFTNYGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTGTEPT AADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGSGGGGGSGGGGGSGEVQLQES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRLQAPGKGLEWVSSINSDSSSTYYRDSVKGR FTISRDNKNLTYLQMNSLKSIEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS	2
贝伐单抗 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFTNYGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTGTEPT AADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLVT VSS	3
G1 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	4
C-Ye-18-5	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRLQAPGKGLEWVSSINSDSSSTYY RDSVKGRFTISRDNKNLTYLQMNSLKSIEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS	5
G4S2	GGGGSGGGGSG	6
G4S4	GGGGSGGGGSGGGGGSG	7
ava-LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPTWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	8
贝伐单抗 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPTWTFGQGTKVEIK	9
CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	10
Luc-2GS-NSD HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTGTEPT AADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL	11

[0224]

	QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGSGEVQLQESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYWMYWLRAQAPGKLEWVSSINSDSSSTYYRDSVKGRFTISRDNKN TLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGGTQVTVSS	
Luc-4GS -NSD HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKLEWVGWINTYTGEPTY AADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGSGGGGGGGGGSGEVQLQES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRAQAPGKLEWVSSINSDSSSTYYRDSVKGR FTISRDNKNLTYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGGTQVTVSS	12
Luc VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKLEWVGWINTYTGEPTY AADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGLVT VSS	13
Luc- LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKVLITYFTSSLHSGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	14
Luc VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKVLITYFTSSLHSGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK	15
NSD-Ely ea	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRAQAPGKLEWVSSINSDSSSTYY RDSVKGRFTISRDNKNLTYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGGTQVTVSSDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGSGGGGGGGGG SGSDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKFFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGE KLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSKHKHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	16
Elyea	SDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKFFPLDTLIPDGKRIIWD RKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK LVNCTARTELNVGIDFNWEYPSKHKHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQ GLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK	17
Fc (LALA)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	18
Elyea-N SD	SDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKFFPLDTLIPDGKRIIWD RKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK LVNCTARTELNVGIDFNWEYPSKHKHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQ GLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN	19

Thermo),将质粒转入Expi-CHO细胞中,转染方法按照商品说明书,细胞培养5天后收集上清利用蛋白A磁珠(购自金斯瑞)分选法纯化目的蛋白。将磁珠用适当体积的结合缓冲液(PBS+0.1%吐温20,pH7.4)重悬(1-4倍磁珠体积)后加入至待纯化样品中,室温孵育1小时,期间温柔振荡。样品置于磁力架上(购自海狸),弃去上清,磁珠用结合缓冲液清洗3遍。按照磁珠体积的3-5倍体积加入洗脱缓冲液(0.1M sodium citrate,pH3.2)室温振荡5-10min,置回磁力架上,收集洗脱缓冲液,转移至已加入中和缓冲液(1M Tris,pH8.54)的收集管中混匀。

[0235] 实施例2:双特异性抗体亲和力测定

[0236] ForteBio亲和力测定按照现有的方法(Estep,P等人,基于溶液的高通量抗体-抗原亲和力和表位分级的测量,MAbs,2013.5(2):p.270-8)进行。简言之,传感器在分析缓冲液中线下平衡30min,然后线上检测60s建立基线,在线加载如上所述获得的经纯化的抗体至AHC传感器上。再将传感器放入100nM的PD-L1或VEGF抗原中作用5min,之后将传感器转移至PBS中解离5min。使用1:1结合模型进行动力学的分析。

[0237] 表1.候选分子和PD-L1结合亲和力

[0238]

编号	KD(M)	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)
Ava-2GS-NSD	8.48E-09	3.19E+05	2.70E-03
Luc-2GS-NSD	9.52E-09	2.81E+05	2.67E-03
Ava-4GS-NSD	7.12E-09	3.54E+05	2.52E-03
Luc-4GS-NSD	8.08E-09	3.21E+05	2.60E-03
NSD-Elyea	5.33E-09	3.22E+05	1.72E-03
Elyea-NSD	8.34E-09	3.39E+05	2.83E-03
C-Ye-18-5	8.75E-09	1.98E+05	1.73E-03

[0239] 表2.候选分子和VEGF结合亲和力

[0240]

编号	KD(M)	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)
Ava-2GS-NSD	1.38E-09	2.59E+05	3.58E-04
Luc-2GS-NSD	1.33E-09	1.77E+05	2.36E-04
Ava-4GS-NSD	1.51E-09	2.49E+05	3.75E-04
Luc-4GS-NSD	1.35E-09	1.82E+05	2.45E-04
NSD-Elyea	1.10E-09	6.48E+05	7.12E-04
Elyea-NSD	4.01E-10	9.14E+05	3.66E-04
Ranibizumab	2.29E-09	1.75E+05	4.00E-04
Bevacizumab	1.79E-09	1.71E+05	3.06E-04

[0241] 在如上方法的测定实验中,本发明所有的纯化样品和PD-L1及VEGF蛋白均有结合活性,且结合活性与对照抗体C-Ye-18-5(PD-L1单域抗体)、雷尼单抗(Ranibizumab)及贝伐单抗(Bevacizumab)相似。

[0242] 实施例3:纯化的双特异性抗体与PD-L1结合

[0243] 通过转染克隆到MCS的人PD-L1 cDNA(购自Sino Biological)的pCHO1.0载体(购自Invitrogen)产生过表达人PD-L1的CHO细胞(CHO-hPD-L1细胞)。将扩大培养的CHO-hPD-L1细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/ml,100 μ l/孔加入96孔流式板,离心备用。将纯化的PD-L1抗体用PBS稀释,400nM开始3倍稀释共12个点,将上述稀释好的样品100 μ l/孔加入上述带

有细胞的96孔流式板中,4℃孵育30min,PBS清洗两次。100μl/孔加入用PBS稀释100倍的羊F(ab')₂抗人IgG-Fc(PE)(购自Abcam),4℃孵育30min,PBS清洗两次。100μl/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex(Bechman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。

[0244] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图2所示,本发明所有的纯化样品和CHO-hPD-L1细胞均有结合活性,且纯化样品的结合活性与对照抗体C-Ye-18-5相似。

[0245] 实施例4:ELISA检测VEGF/VEGFR蛋白水平结合阻断实验

[0246] 用ELISA包被液将人VEGFR蛋白稀释至合适浓度,加入ELISA板,4℃包被过夜。5%BSA室温封闭1小时。将待测样品梯度稀释并与生物素化标记的人VEGF蛋白室温共孵育1小时。将孵育好的样品加入封闭好的ELISA板,室温反应2小时。PBS洗液洗涤3次,加入稀释好的链霉亲和素(HRP)室温反应1小时,PBS洗液洗涤3次,加入ELISA显色液,室温放置3min,加入ELISA终止液,读取450nm处吸光度数值。结果如图3所示,Ava-2GS-NSD、Luc-2GS-NSD、Ava-4GS-NSD、Luc-4GS-NSD(图3A)及NSD-Elyea、Elyea-NSD(图3B)均可以完全阻断VEGF和VEGFR蛋白的相互作用。

[0247] 实施例5:混合淋巴细胞反应实验

[0248] 本实施例通过混合淋巴细胞反应实验(MLR)检测双特异性抗体品激活T细胞的活性。具体实验方法如下。

[0249] 复苏PBMC细胞(购自SAILY BIO,SLB-HPB),离心,用10ml X-VIVO-15培养基(购自LONZA)重悬PBMC,于细胞培养箱内37℃贴壁培养2h,吸去未贴壁细胞。加入10ml DC培养基(X-VIVO-15培养基加入10ng/ml GM-CSF(购自R&D),20ng/ml IL-4),培养3天,补加5ml DC培养基,继续培养至第6天,加入DC成熟培养基(X-VIVO-15培养基加入1000U/ml TNF-α(购自R&D),10ng/ml IL-6(购自R&D),5ng/ml IL-1β(购自R&D),1μM PGE2(购自Tocris)),培养2天,收集成熟的DC细胞,用X-VIVO-15培养基调整细胞密度为 2×10^5 细胞/ml。

[0250] 复苏另一位捐献者的PBMC细胞(购自SAILY BIO,SLB-HPB),离心,用10ml X-VIVO-15培养基重悬PBMC。用CD4⁺T细胞分选试剂盒(购自Stemcell)富集CD4⁺T细胞,X-VIVO-15重悬CD4⁺T细胞,调整细胞密度为 2×10^6 细胞/ml。将CD4⁺T细胞与上述收集的成熟DC细胞按1:1比例混合,100μl/孔加入96孔U底板。

[0251] 用X-VIVO-15培养基稀释纯化的双特异性抗体样品,200nM开始3倍稀释共9个点,100μl/孔加入上述混合细胞孔,培养5天,收集上清,ELISA(购自eBioscience)方法检测IFN-γ(图4A)和IL2(图4B)表达量。

[0252] 结果如图4所示,Ava-2GS-NSD、Luc-2GS-NSD、Ava-4GS-NSD、Luc-4GS-NSD、NSD-Elyea、Elyea-NSD均在MLR实验中显示较好的生物学活性,且激活水平与对照抗体C-Ye-18-5相似或优于对照抗体。

[0253] 实施例6:加速稳定性实验测定

[0254] 6.1加速稳定性样品纯度测定

[0255] 本实验通过检测双特异性抗体在40℃放置30天之后的纯度及生物学活性的变化,从而评价该抗体的长期热稳定性。使用SEC的方法测定了目的抗体在40℃放置0、14及30天后的纯度,实验结果如表3所示,双特异性抗体Ava-2GS-NSD、Luc-2GS-NSD、NSD-Elyea、Elyea-NSD的纯度没有明显变化。

[0256] 表3:加速稳定性样品单体比例

[0257]	样品名	0天	14天	30天
	Ava-2GS-NSD	98.9%	98.1%	97.0%
	Luc-2GS-NSD	97.4%	97.3%	96.3%
	NSD-Elyea	93.0%	97.1%	94.1%
	Elyea-NSD	99.7%	100.0%	98.4%

[0258] 6.2加速稳定性样品活性测定

[0259] 本实验利用FACS方法检测了加速稳定性实验样品和CHO-PDL1细胞的结合情况,方法同实施例3。用ELISA方法检测了加速稳定性样品和VEGF的结合情况,方法如下:用ELISA包被液将VEGFA重组蛋白稀释至 $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $100\mu\text{l}$ /孔加入ELISA板, 4°C 包被过夜。弃去包被液, $250\mu\text{l}$ /孔加入PBST洗3次,用5%BSA室温封闭1小时备用。将纯化的样品用1%BSA梯度稀释。将ELISA板弃去封闭液,将上述稀释好的样品 $100\mu\text{l}$ /孔加入封闭好的ELISA板,室温孵育2小时。 $250\mu\text{l}$ /孔加入PBST洗3次, $100\mu\text{l}$ /孔加入用1%BSA稀释的羊抗人Fc-HRP,室温孵育1小时, $250\mu\text{l}$ /孔加入PBST洗3次, $100\mu\text{l}$ /孔加入ELISA显色液,室温放置3min, $50\mu\text{l}$ /孔加入ELISA终止液,读取450nm处吸光度数值。

[0260] 实验结果如图5所示,双特异性抗体和CHO-PDL1细胞的结合(图5A)及和VEGF蛋白结合(图5B)的EC50没有明显变化。研究结果表明,本发明的双特异性抗体具有较好的热稳定性。

[0261] 实施例7:大鼠药代动力学评价

[0262] 本实验检测了抗PD-L1/VEGF双特异性抗体在大鼠体内的药代动力学性质,使用的SD大鼠6只(雌雄各半,12/12小时光/暗调节,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度40-70%,自由进水饮食)购自浙江维通利华实验技术有限公司。实验当天对SD大鼠单次尾静脉注射Ava-2GS-NSD或Elyea-NSD分子,注射剂量为 $10\text{mg}/\text{kg}$ 。

[0263] 取血时间点:给药后3min、4小时、10小时、24小时、48小时、72小时、120小时、168小时、240小时、336小时、504小时、672小时于大鼠颈静脉采血。全血样品 $2-8^{\circ}\text{C}$ 放置30min, 12000rpm 离心5min收集血清,所得血清再于 $2-8^{\circ}\text{C}$, 12000rpm 离心5min, -80°C 保存,ELISA检测血清中游离Ava-2GS-NSD或Elyea-NSD分子量。结果如表4所示,本发明Ava-2GS-NSD游离状态分子在SD大鼠体内半衰期约为320.6小时,Elyea-NSD游离状态分子在SD大鼠体内半衰期约为38.1小时。

[0264] 表4双特异性抗体在SD大鼠中的T1/2

[0265]	受试药物	给药方式	T1/2
	Ava-2GS-NSD	IV	320.6小时
	Elyea-NSD	IV	38.1小时

[0266] 实施例8:双特异性抗体的肿瘤抑制活性研究

[0267] 本实验采用人结肠癌LOVO细胞/NOG小鼠注射人PBMC模型测定双特异性抗体的抗肿瘤作用。体外培养扩增足够的LOVO细胞(购自Addexbio),胰酶消化后收集细胞,用PBS清洗3遍后计数,按 2×10^6 细胞/小鼠的量接种到雌性8周龄的NOG重度免疫缺陷小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司)右侧腹部皮下。每日观察细胞在NOG小鼠皮下成瘤情况,接种8天后每只小鼠尾静脉注射 6×10^6 PBMC。注射完PBMC过3天后,使用游标卡尺测量每只动物右侧腹部皮下肿瘤的最大宽轴W和最大长轴L,使用电子天平称量每只小鼠的体重。

按肿瘤体积 $T=1/2 \times W \times W \times L$ 计算每只小鼠右侧腹部皮下肿瘤体积。剔除瘤体积过大和过小的鼠,按平均瘤体积将NOG小鼠平均分为4组,每组6只。按如下分组给药方案分组并注射相应剂量的Ava-2GS-NSD。

[0268] 表5抗PD-L1/VEGF双特异性抗体肿瘤抑制活性实验方案

组别	给药类别	给药剂量	给药频率
Group 1	PBS	—	每周2次共6次
Group 2	Ava-2GS-NSD	24mg/kg	每周2次共6次
Group 3	Ava-2GS-NSD	4.8mg/kg	每周2次共6次
Group 4	Ava-2GS-NSD	1mg/kg	每周2次共6次

[0270] 每周2次测量小鼠肿瘤体积与小鼠体重。于接种肿瘤细胞31天后最后一次测量小鼠体重与肿瘤体积,对小鼠执行安乐死;与PBS组相比,Ava-2GS-NSD能剂量依赖性地抑制肿瘤的生长,1mg/kg、4.8mg/kg和24mg/kg剂量下的TGI分别为16.7%、44.9%和55.6%;其中,4.8mg/kg和24mg/kg组肿瘤体积与PBS组相比具有显著性差异。肿瘤平均重量的结果,以及肿瘤生长抑制率与肿瘤体积的趋势基本一致(图6A与表6)。

[0271] 表6各处理组对NOG小鼠皮下接种的LOVO肿瘤体积和TGI的影响

组别	给药类别	剂量(mg/kg)	肿瘤体积(mm ³)		肿瘤消退数	肿瘤生长抑制率 TGI (%)
			D31	D0		
[0272] Group 1	PBS	N/A	1837.18	77.49	0	N/A
Group 2	Ava-2GS-NSD	24	858.44***	77.65	0	55.6%
Group 3	Ava-2GS	4.8	1047.51**	77.85	0	44.9%
	-NSD					
[0273] Group 4	Ava-2GS-NSD	1	1542.63	77.78	0	16.7%

[0274] 注:与PBS组相比,“***” $P < 0.001$;“**” $P < 0.01$ 。

[0275] 每日观察各组小鼠状态未发现异常;每周两次称量小鼠体重,各组小鼠体重未发生明显降低,实验结束时各剂量组小鼠体重相比刚开始给药治疗时的体重,变化未超过13%,而且PBS组小鼠体重亦下降6%,考虑更可能是因为PBMC在小鼠体内重建导致的GvHD造成每组小鼠体重在实验后期均有所下降(见图6B);试验结束时各组小鼠解剖观察肝脏、肾脏、肺脏等主要脏器亦未见明显病变,表明各组药物在本试验所采用的给药剂量下对小鼠未见明显毒性。

[0276] 综上,Ava-2GS-NSD可剂量依赖性地抑制LOVO皮下移植瘤的生长,起效剂量为4.8mg/kg;3个给药剂量下(1mg/kg、4.8mg/kg和24mg/kg)对小鼠未见明显毒性。

[0277] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可

以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0039]	210	215	220
[0040]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala		
[0041]	225	230	235 240
[0042]	Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
[0043]	245	250	255
[0044]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
[0045]	260	265	270
[0046]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
[0047]	275	280	285
[0048]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
[0049]	290	295	300
[0050]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
[0051]	305	310	315 320
[0052]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
[0053]	325	330	335
[0054]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
[0055]	340	345	350
[0056]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
[0057]	355	360	365
[0058]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0059]	370	375	380
[0060]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0061]	385	390	395 400
[0062]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0063]	405	410	415
[0064]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0065]	420	425	430
[0066]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
[0067]	435	440	445
[0068]	Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Glu		
[0069]	450	455	460
[0070]	Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser		
[0071]	465	470	475 480
[0072]	Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp		
[0073]	485	490	495
[0074]	Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser		
[0075]	500	505	510
[0076]	Ser Ile Asn Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys		
[0077]	515	520	525

[0078]	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
[0079]	530 535 540
[0080]	Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0081]	545 550 555 560
[0082]	Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
[0083]	565 570 575
[0084]	Ser Ser
[0085]	<210> 2
[0086]	<211> 588
[0087]	<212> PRT
[0088]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0089]	<400> 2
[0090]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0091]	1 5 10 15
[0092]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
[0093]	20 25 30
[0094]	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0095]	35 40 45
[0096]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
[0097]	50 55 60
[0098]	Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
[0099]	65 70 75 80
[0100]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0101]	85 90 95
[0102]	Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
[0103]	100 105 110
[0104]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
[0105]	115 120 125
[0106]	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
[0107]	130 135 140
[0108]	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
[0109]	145 150 155 160
[0110]	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
[0111]	165 170 175
[0112]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
[0113]	180 185 190
[0114]	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
[0115]	195 200 205
[0116]	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys

[0117]	210	215	220
[0118]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala		
[0119]	225	230	235
[0120]	Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
[0121]	245	250	255
[0122]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
[0123]	260	265	270
[0124]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
[0125]	275	280	285
[0126]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
[0127]	290	295	300
[0128]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
[0129]	305	310	315
[0130]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
[0131]	325	330	335
[0132]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
[0133]	340	345	350
[0134]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
[0135]	355	360	365
[0136]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0137]	370	375	380
[0138]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0139]	385	390	395
[0140]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0141]	405	410	415
[0142]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0143]	420	425	430
[0144]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
[0145]	435	440	445
[0146]	Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
[0147]	450	455	460
[0148]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser		
[0149]	465	470	475
[0150]	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala		
[0151]	485	490	495
[0152]	Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln		
[0153]	500	505	510
[0154]	Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Asn Ser Asp Ser		
[0155]	515	520	525

[0156] Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 [0157] 530 535 540
 [0158] Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
 [0159] 545 550 555 560
 [0160] Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr
 [0161] 565 570 575
 [0162] Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0163] 580 585
 [0164] <210> 3
 [0165] <211> 123
 [0166] <212> PRT
 [0167] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0168] <400> 3
 [0169] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0170] 1 5 10 15
 [0171] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 [0172] 20 25 30
 [0173] Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0174] 35 40 45
 [0175] Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 [0176] 50 55 60
 [0177] Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 [0178] 65 70 75 80
 [0179] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0180] 85 90 95
 [0181] Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 [0182] 100 105 110
 [0183] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0184] 115 120
 [0185] <210> 4
 [0186] <211> 329
 [0187] <212> PRT
 [0188] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0189] <400> 4
 [0190] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 [0191] 1 5 10 15
 [0192] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 [0193] 20 25 30
 [0194] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

[0195]	35	40	45
[0196]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
[0197]	50	55	60
[0198]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
[0199]	65	70	75
[0200]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
[0201]	85	90	95
[0202]	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
[0203]	100	105	110
[0204]	Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[0205]	115	120	125
[0206]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
[0207]	130	135	140
[0208]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
[0209]	145	150	155
[0210]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
[0211]	165	170	175
[0212]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
[0213]	180	185	190
[0214]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
[0215]	195	200	205
[0216]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
[0217]	210	215	220
[0218]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
[0219]	225	230	235
[0220]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[0221]	245	250	255
[0222]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[0223]	260	265	270
[0224]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[0225]	275	280	285
[0226]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[0227]	290	295	300
[0228]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0229]	305	310	315
[0230]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0231]	325		
[0232]	<210> 5		
[0233]	<211> 115		

[0234] <212> PRT
 [0235] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0236] <400> 5
 [0237] Glu Val Gln Leu Gln 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 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0240] 20 25 30
 [0241] Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0242] 35 40 45
 [0243] Ser Ser Ile Asn Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 [0244] 50 55 60
 [0245] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0246] 65 70 75 80
 [0247] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0248] 85 90 95
 [0249] Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 [0250] 100 105 110
 [0251] Val Ser Ser
 [0252] 115
 [0253] <210> 6
 [0254] <211> 11
 [0255] <212> PRT
 [0256] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0257] <400> 6
 [0258] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 [0259] 1 5 10
 [0260] <210> 7
 [0261] <211> 21
 [0262] <212> PRT
 [0263] <213> 人工序列(artificial sequence)
 [0264] <400> 7
 [0265] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 [0266] 1 5 10 15
 [0267] Gly Gly Gly Ser Gly
 [0268] 20
 [0269] <210> 8
 [0270] <211> 214
 [0271] <212> PRT
 [0272] <213> 人工序列(artificial sequence)

[0273] <400> 8
 [0274] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0275] 1 5 10 15
 [0276] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 [0277] 20 25 30
 [0278] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 [0279] 35 40 45
 [0280] Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0281] 50 55 60
 [0282] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0283] 65 70 75 80
 [0284] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 [0285] 85 90 95
 [0286] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 [0287] 100 105 110
 [0288] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 [0289] 115 120 125
 [0290] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 [0291] 130 135 140
 [0292] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 [0293] 145 150 155 160
 [0294] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 [0295] 165 170 175
 [0296] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 [0297] 180 185 190
 [0298] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 [0299] 195 200 205
 [0300] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [0301] 210
 [0302] <210> 9
 [0303] <211> 107
 [0304] <212> PRT
 [0305] <213> 人工序列 (artificial sequence)
 [0306] <400> 9
 [0307] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0308] 1 5 10 15
 [0309] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 [0310] 20 25 30
 [0311] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

[0312]	35	40	45
[0313]	Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0314]	50	55	60
[0315]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0316]	65	70	75
[0317]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp		
[0318]	85	90	95
[0319]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0320]	100	105	
[0321]	<210> 10		
[0322]	<211> 107		
[0323]	<212> PRT		
[0324]	<213> 人工序列(artificial sequence)		
[0325]	<400> 10		
[0326]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
[0327]	1	5	10
[0328]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
[0329]	20	25	30
[0330]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[0331]	35	40	45
[0332]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[0333]	50	55	60
[0334]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
[0335]	65	70	75
[0336]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
[0337]	85	90	95
[0338]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0339]	100	105	
[0340]	<210> 11		
[0341]	<211> 578		
[0342]	<212> PRT		
[0343]	<213> 人工序列(artificial sequence)		
[0344]	<400> 11		
[0345]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0346]	1	5	10
[0347]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr		
[0348]	20	25	30
[0349]	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0350]	35	40	45

[0351]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
[0352]	50 55 60
[0353]	Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
[0354]	65 70 75 80
[0355]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0356]	85 90 95
[0357]	Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
[0358]	100 105 110
[0359]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
[0360]	115 120 125
[0361]	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
[0362]	130 135 140
[0363]	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
[0364]	145 150 155 160
[0365]	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
[0366]	165 170 175
[0367]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
[0368]	180 185 190
[0369]	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
[0370]	195 200 205
[0371]	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
[0372]	210 215 220
[0373]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
[0374]	225 230 235 240
[0375]	Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
[0376]	245 250 255
[0377]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
[0378]	260 265 270
[0379]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
[0380]	275 280 285
[0381]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
[0382]	290 295 300
[0383]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
[0384]	305 310 315 320
[0385]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
[0386]	325 330 335
[0387]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
[0388]	340 345 350
[0389]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln

[0390]	355	360	365
[0391]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0392]	370	375	380
[0393]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0394]	385	390	395
[0395]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0396]	405	410	415
[0397]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0398]	420	425	430
[0399]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
[0400]	435	440	445
[0401]	Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Glu		
[0402]	450	455	460
[0403]	Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser		
[0404]	465	470	475
[0405]	Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp		
[0406]	485	490	495
[0407]	Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser		
[0408]	500	505	510
[0409]	Ser Ile Asn Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys		
[0410]	515	520	525
[0411]	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu		
[0412]	530	535	540
[0413]	Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
[0414]	545	550	555
[0415]	Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val		
[0416]	565	570	575
[0417]	Ser Ser		
[0418]	<210> 12		
[0419]	<211> 588		
[0420]	<212> PRT		
[0421]	<213> 人工序列 (artificial sequence)		
[0422]	<400> 12		
[0423]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0424]	1	5	10
[0425]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr		
[0426]	20	25	30
[0427]	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0428]	35	40	45

[0429]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
[0430]	50 55 60
[0431]	Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
[0432]	65 70 75 80
[0433]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0434]	85 90 95
[0435]	Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
[0436]	100 105 110
[0437]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
[0438]	115 120 125
[0439]	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
[0440]	130 135 140
[0441]	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
[0442]	145 150 155 160
[0443]	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
[0444]	165 170 175
[0445]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
[0446]	180 185 190
[0447]	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
[0448]	195 200 205
[0449]	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
[0450]	210 215 220
[0451]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
[0452]	225 230 235 240
[0453]	Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
[0454]	245 250 255
[0455]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
[0456]	260 265 270
[0457]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
[0458]	275 280 285
[0459]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
[0460]	290 295 300
[0461]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
[0462]	305 310 315 320
[0463]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
[0464]	325 330 335
[0465]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
[0466]	340 345 350
[0467]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln

[0468]	355	360	365
[0469]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0470]	370	375	380
[0471]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0472]	385	390	395
[0473]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0474]	405	410	415
[0475]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0476]	420	425	430
[0477]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
[0478]	435	440	445
[0479]	Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
[0480]	450	455	460
[0481]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser		
[0482]	465	470	475
[0483]	Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala		
[0484]	485	490	495
[0485]	Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln		
[0486]	500	505	510
[0487]	Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Asn Ser Asp Ser		
[0488]	515	520	525
[0489]	Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser		
[0490]	530	535	540
[0491]	Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys		
[0492]	545	550	555
[0493]	Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr		
[0494]	565	570	575
[0495]	Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser		
[0496]	580	585	
[0497]	<210> 13		
[0498]	<211> 123		
[0499]	<212> PRT		
[0500]	<213> 人工序列 (artificial sequence)		
[0501]	<400> 13		
[0502]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0503]	1	5	10
[0504]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr		
[0505]	20	25	30
[0506]	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		

[0507]	35	40	45
[0508]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe		
[0509]	50	55	60
[0510]	Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr		
[0511]	65	70	75
[0512]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0513]	85	90	95
[0514]	Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val		
[0515]	100	105	110
[0516]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0517]	115	120	
[0518]	<210> 14		
[0519]	<211> 214		
[0520]	<212> PRT		
[0521]	<213> 人工序列(artificial sequence)		
[0522]	<400> 14		
[0523]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0524]	1	5	10
[0525]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr		
[0526]	20	25	30
[0527]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile		
[0528]	35	40	45
[0529]	Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0530]	50	55	60
[0531]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0532]	65	70	75
[0533]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp		
[0534]	85	90	95
[0535]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
[0536]	100	105	110
[0537]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
[0538]	115	120	125
[0539]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
[0540]	130	135	140
[0541]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
[0542]	145	150	155
[0543]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
[0544]	165	170	175
[0545]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		

[0546]	180	185	190
[0547]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
[0548]	195	200	205
[0549]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0550]	210		
[0551]	<210> 15		
[0552]	<211> 107		
[0553]	<212> PRT		
[0554]	<213> 人工序列(artificial sequence)		
[0555]	<400> 15		
[0556]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0557]	1 5 10 15		
[0558]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr		
[0559]	20 25 30		
[0560]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile		
[0561]	35 40 45		
[0562]	Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0563]	50 55 60		
[0564]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0565]	65 70 75 80		
[0566]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp		
[0567]	85 90 95		
[0568]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0569]	100 105		
[0570]	<210> 16		
[0571]	<211> 567		
[0572]	<212> PRT		
[0573]	<213> 人工序列(artificial sequence)		
[0574]	<400> 16		
[0575]	Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0576]	1 5 10 15		
[0577]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0578]	20 25 30		
[0579]	Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0580]	35 40 45		
[0581]	Ser Ser Ile Asn Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val		
[0582]	50 55 60		
[0583]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0584]	65 70 75 80		

[0585]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0586]				85					90					95		
[0587]	Ala	Lys	Asp	Pro	Gly	Gly	Tyr	Ala	Lys	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr
[0588]				100					105					110		
[0589]	Val	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
[0590]				115					120					125		
[0591]	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
[0592]				130					135					140		
[0593]	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
[0594]	145					150						155				160
[0595]	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
[0596]					165					170						175
[0597]	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
[0598]					180					185					190	
[0599]	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
[0600]					195					200					205	
[0601]	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
[0602]										210					215	
[0603]	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
[0604]	225						230					235				240
[0605]	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn
[0606]						245					250					255
[0607]	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
[0608]						260					265					270
[0609]	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
[0610]										275					280	
[0611]	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
[0612]										290					295	
[0613]	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
[0614]	305						310					315				320
[0615]	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
[0616]						325						330				335
[0617]	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
[0618]							340								345	
[0619]	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Gly	Arg	Pro
[0620]										355					360	
[0621]	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu
[0622]										370					375	
[0623]	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr

[0624]	385	390	395	400
[0625]	Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys			
[0626]	405	410	415	
[0627]	Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr			
[0628]	420	425	430	
[0629]	Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His			
[0630]	435	440	445	
[0631]	Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile			
[0632]	450	455	460	
[0633]	Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu			
[0634]	465	470	475	480
[0635]	Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile			
[0636]	485	490	495	
[0637]	Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu			
[0638]	500	505	510	
[0639]	Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe			
[0640]	515	520	525	
[0641]	Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu			
[0642]	530	535	540	
[0643]	Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr			
[0644]	545	550	555	560
[0645]	Phe Val Arg Val His Glu Lys			
[0646]	565			
[0647]	<210> 17			
[0648]	<211> 205			
[0649]	<212> PRT			
[0650]	<213> 人工序列(artificial sequence)			
[0651]	<400> 17			
[0652]	Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu			
[0653]	1	5	10	15
[0654]	Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val			
[0655]	20	25	30	
[0656]	Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr			
[0657]	35	40	45	
[0658]	Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe			
[0659]	50	55	60	
[0660]	Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu			
[0661]	65	70	75	80
[0662]	Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg			

[0702]	145	150	155	160
[0703]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
[0704]		165	170	175
[0705]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
[0706]		180	185	190
[0707]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
[0708]		195	200	205
[0709]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
[0710]		210	215	220
[0711]	Pro Gly			
[0712]	225			
[0713]	<210> 19			
[0714]	<211> 567			
[0715]	<212> PRT			
[0716]	<213> 人工序列(artificial sequence)			
[0717]	<400> 19			
[0718]	Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu			
[0719]	1	5	10	15
[0720]	Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val			
[0721]		20	25	30
[0722]	Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr			
[0723]		35	40	45
[0724]	Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe			
[0725]		50	55	60
[0726]	Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu			
[0727]	65	70	75	80
[0728]	Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg			
[0729]		85	90	95
[0730]	Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile			
[0731]		100	105	110
[0732]	Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr			
[0733]		115	120	125
[0734]	Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys			
[0735]		130	135	140
[0736]	His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly			
[0737]	145	150	155	160
[0738]	Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr			
[0739]		165	170	175
[0740]	Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met			

[0780]	Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Asn Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr
[0781]	500 505 510
[0782]	Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
[0783]	515 520 525
[0784]	Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala
[0785]	530 535 540
[0786]	Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly
[0787]	545 550 555 560
[0788]	Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0789]	565
[0790]	<210> 20
[0791]	<211> 108
[0792]	<212> PRT
[0793]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0794]	<400> 20
[0795]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
[0796]	1 5 10 15
[0797]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[0798]	20 25 30
[0799]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[0800]	35 40 45
[0801]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[0802]	50 55 60
[0803]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
[0804]	65 70 75 80
[0805]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[0806]	85 90 95
[0807]	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
[0808]	100 105

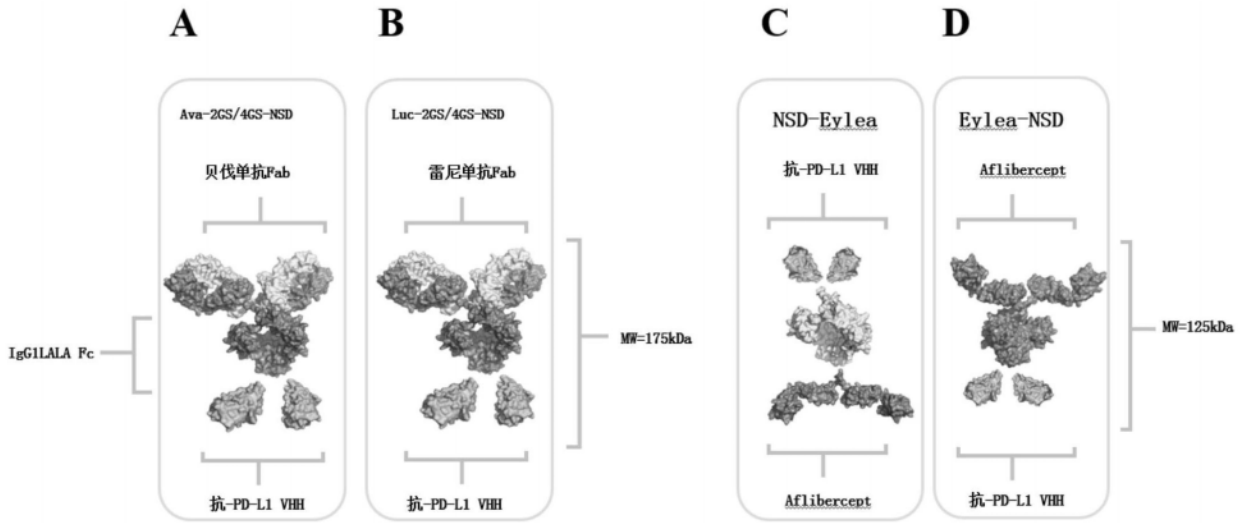
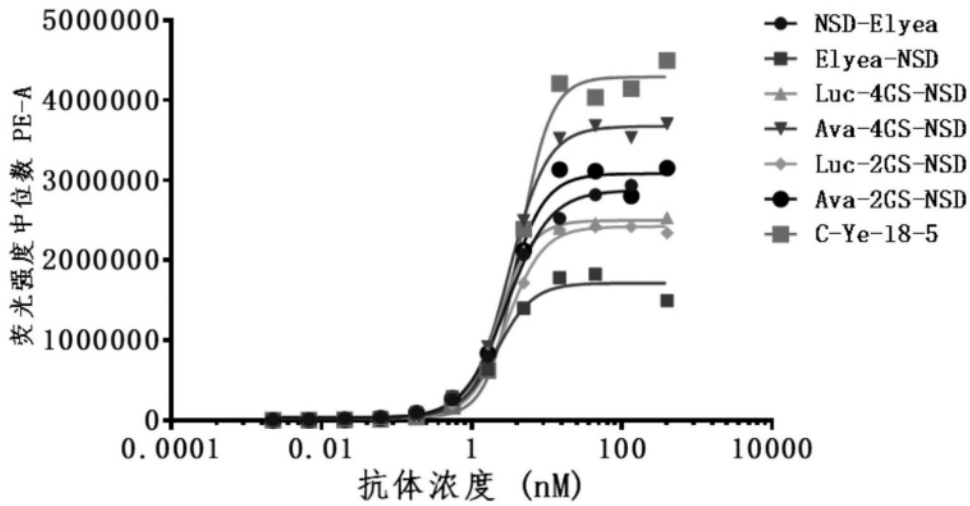


图1

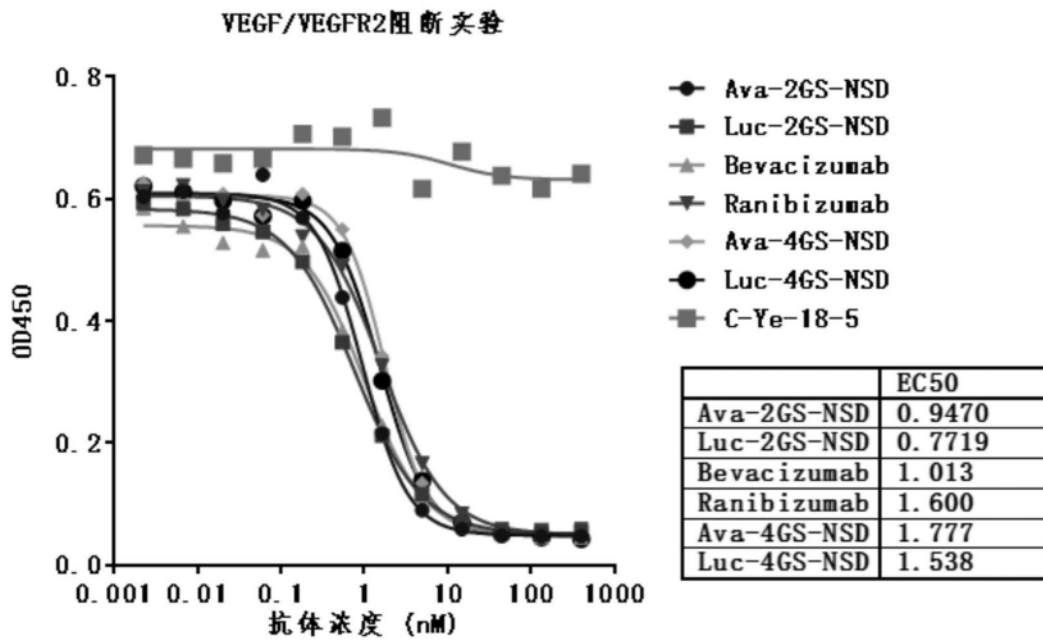
纯化的双特异性抗体于CHO-PD-L1结合活性



	NSD-Elyea	Elyea-NSD	Luc-4GS-NSD	Ava-4GS-NSD	Luc-2GS-NSD	Ava-2GS-NSD	C-Ye-18-5
EC50	2.938	2.151	2.261	3.147	2.922	2.965	4.287

图2

A



B

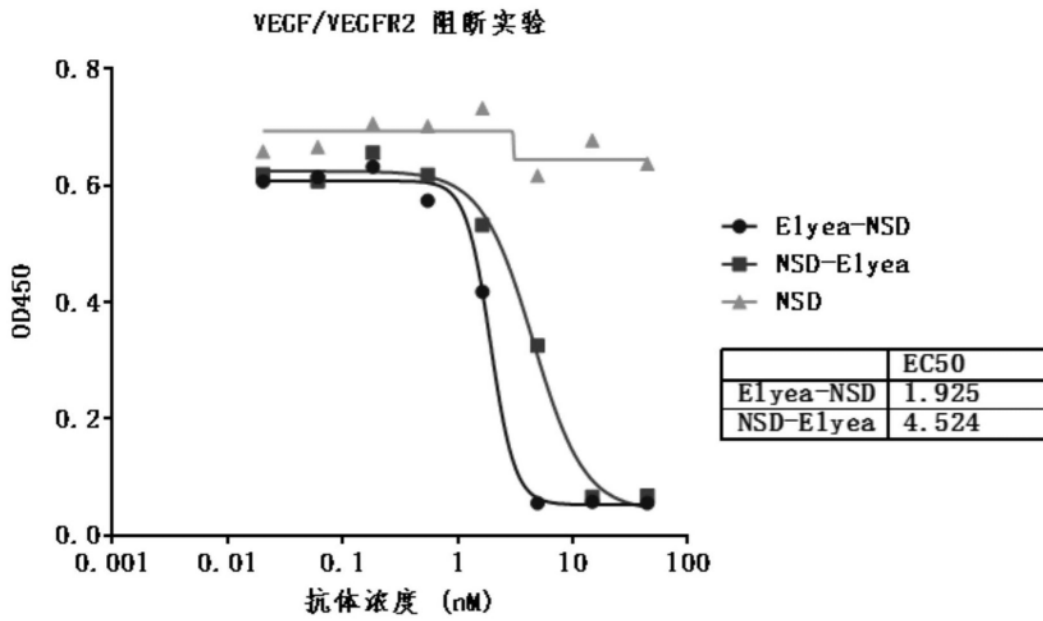
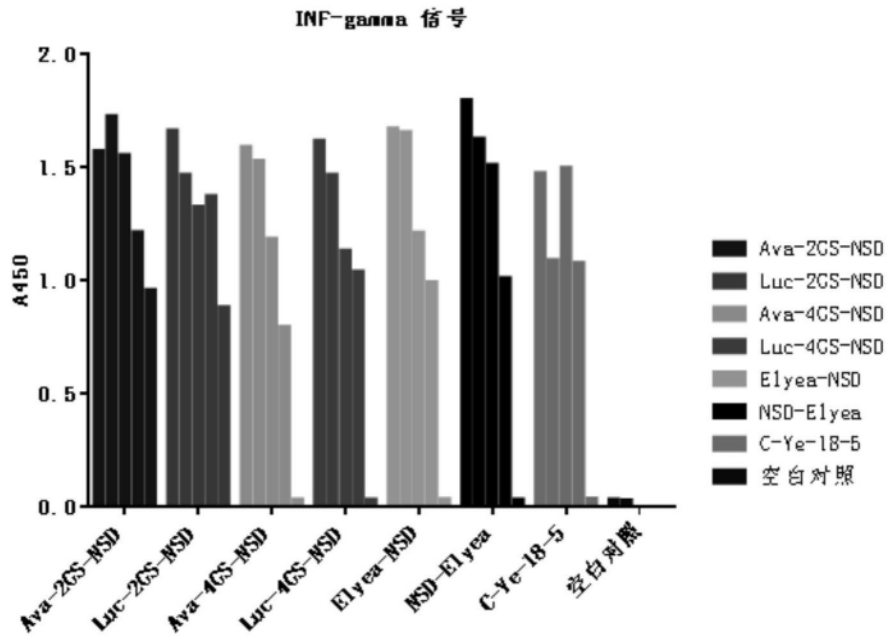


图3

A



B

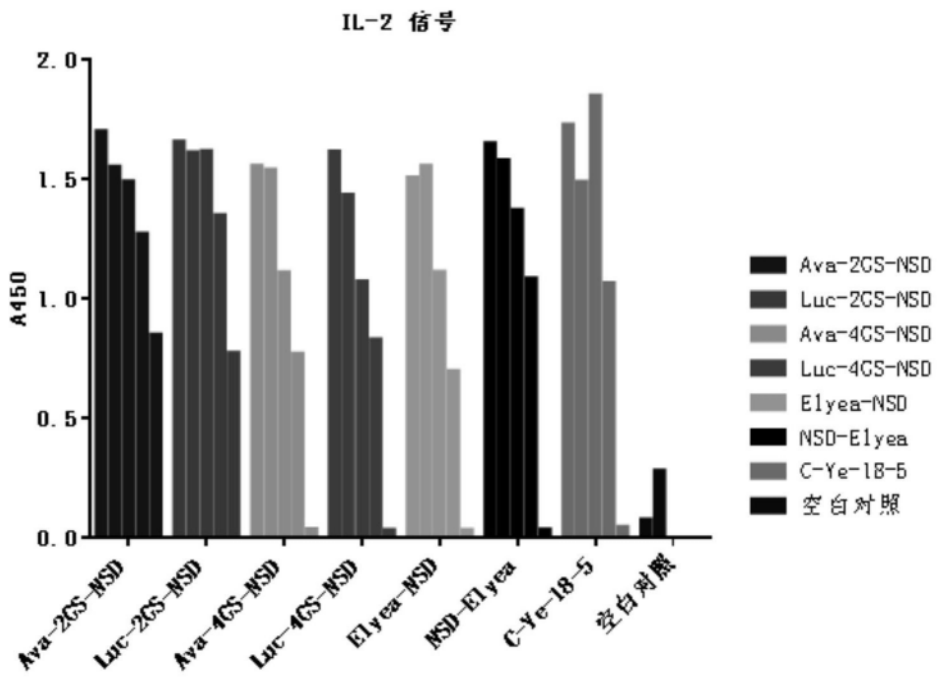


图4

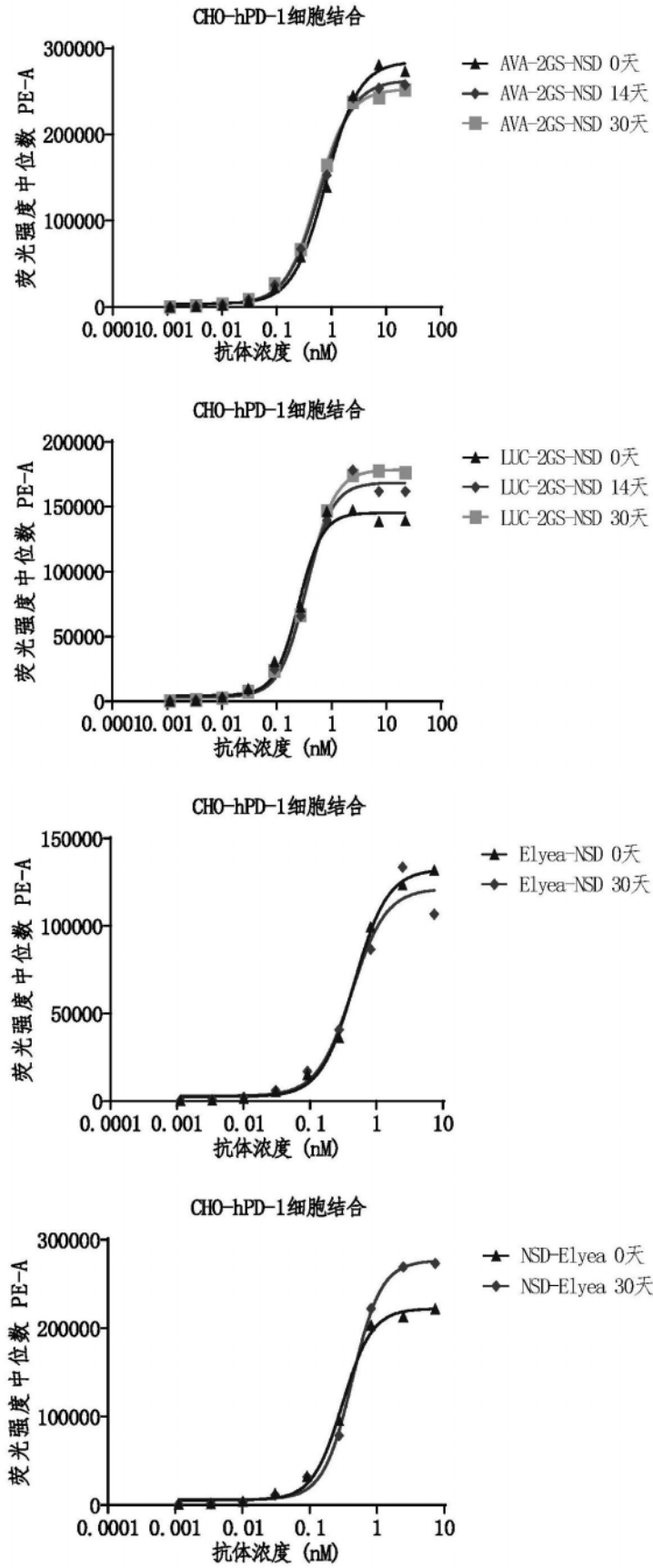


图5A

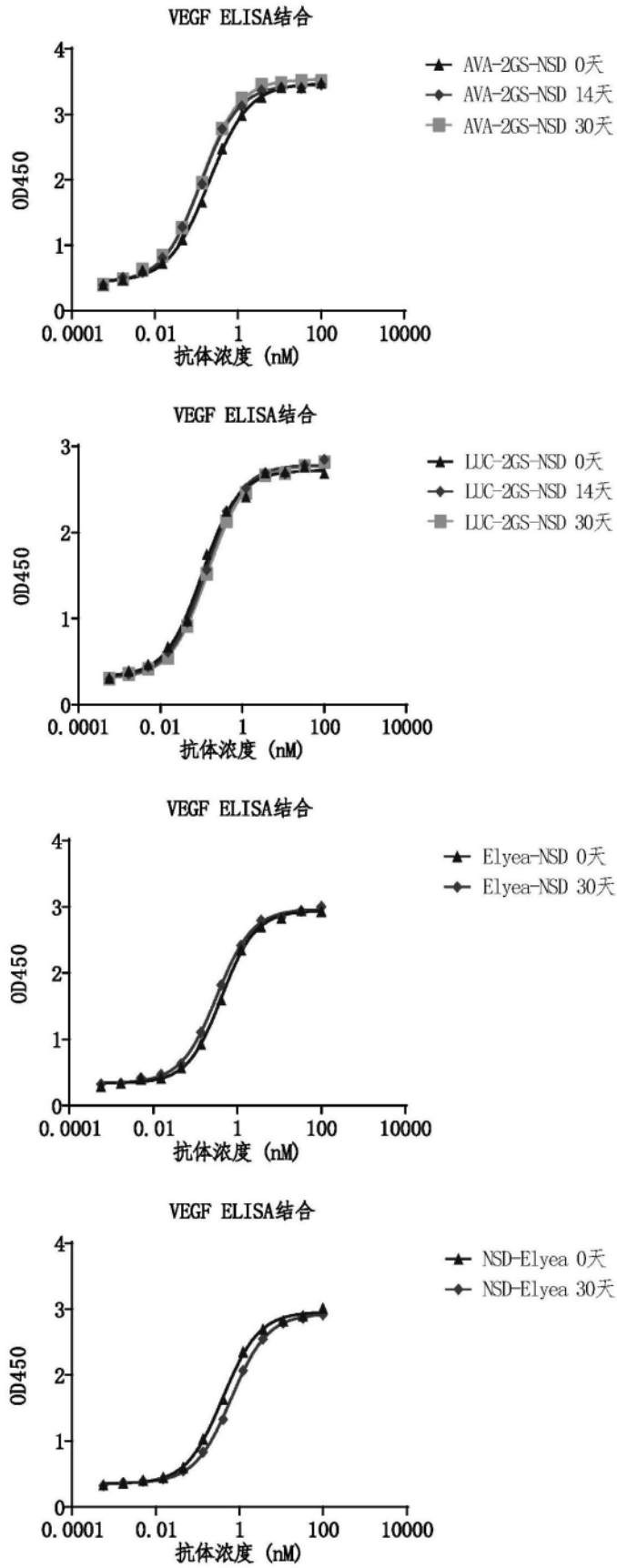
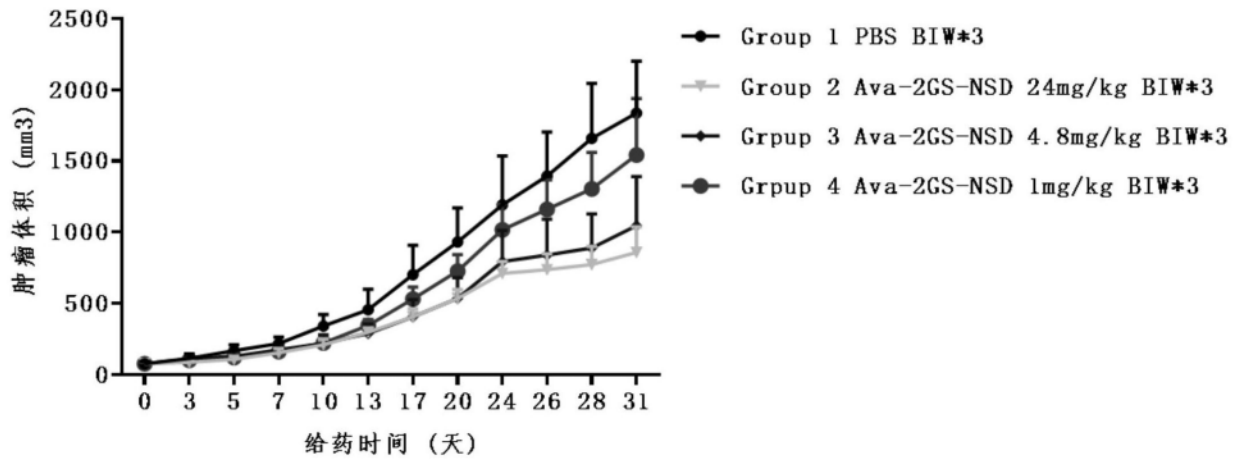


图5B

A

双特异性抗体的肿瘤抑制活性研究



B

双特异性抗体的安全性研究

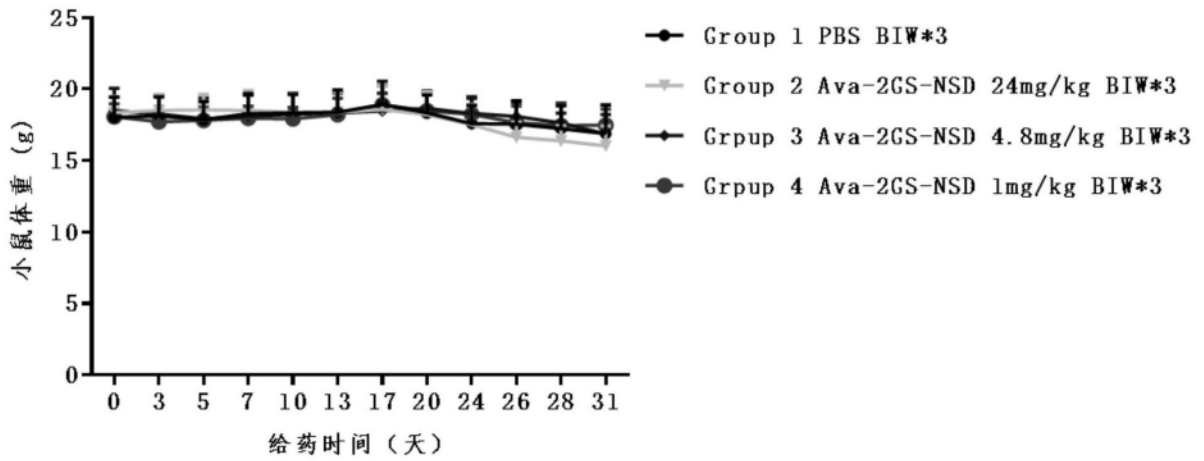


图6