



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111565738 B

(45) 授权公告日 2023. 12. 26

(21) 申请号 201980007127.7

(22) 申请日 2019.02.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111565738 A

(43) 申请公布日 2020.08.21

(30) 优先权数据
62/636,825 2018.02.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.06.30

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/019786 2019.02.27

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/168947 EN 2019.09.06

(73) 专利权人 圆祥生科技股份有限公司
地址 中国台湾台北市南港区园区街3号17楼

(72) 发明人 何正宏 游忠哲 徐静轩 黄柏霖

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

专利代理师 张福根 吴小瑛

(51) Int.Cl.
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/50 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2017136562 A2, 2017.08.10
WO 2017200173 A1, 2017.11.23
CN 107602702 A, 2018.01.19
US 2015044216 A1, 2015.02.12
US 2008254512 A1, 2008.10.16
CN 107207593 A, 2017.09.26

审查员 张维捷

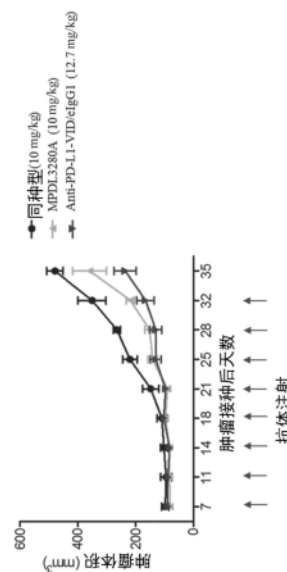
权利要求书2页 说明书17页
序列表29页 附图22页

(54) 发明名称

结合检查点阻碍物作为目标治疗的双功能性蛋白质

(57) 摘要

提供一种双特异性蛋白质,包含结合细胞表面蛋白的结合区、以及血管内皮生长因子抑制区。另提供一种抗体药物复合体,包含治疗试剂以及抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段结合至PD-L1及/或血管内皮生长因子抑制区,其中治疗试剂藉由连接子与抗体或抗原结合片段共价接合。



1. 一种双特异性抗体或其抗原结合部分,其特征在于,包含至少一多肽链,其中该多肽链包含:

—结合区,结合细胞表面蛋白,其中该结合区结合PD-L 1,且该结合区包含:

—重链可变区,其氨基酸序列为SEQ ID NO:4,以及一轻链可变区,其氨基酸序列为SEQ ID NO:3的第1-111位氨基酸;或

—重链可变区,其氨基酸序列为SEQ ID NO:6,以及一轻链可变区,其氨基酸序列为SEQ ID NO:5的第1-110位氨基酸;以及

—血管内皮生长因子抑制区,包含一氨基酸序列,该氨基酸序列为SEQ ID NO:9。

2. 如权利要求1所述之双特异性抗体或其抗原结合部分,其中该多肽链更包含:

—Fc区;以及

—Fab片段,与该Fc区的N端连接,且该Fab片段包含该结合区,

其中该血管内皮生长因子抑制区与该Fc区的C端连接。

3. 如权利要求2所述之双特异性抗体或其抗原结合部分,更包含一连接子位于该Fc区与该血管内皮生长因子抑制区之间。

4. 如权利要求3所述之双特异性抗体或其抗原结合部分,其中该双特异性抗体包含如SEQ ID NO.12或SEQ ID NO.13所示之氨基酸序列。

5. 如权利要求1所述之双特异性抗体或其抗原结合部分,其中该双特异性抗体或其抗原结合部分包含一对多肽链。

6. 如权利要求5所述之双特异性抗体或其抗原结合部分,其中该双特异性抗体为IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、或IgY抗体。

7. 如权利要求6所述之双特异性抗体或其抗原结合部分,其中该双特异性抗体为IgG抗体。

8. 如权利要求7所述之双特异性抗体或其抗原结合部分,其中该IgG抗体为IgG 1、IgG2、IgG3、或IgG4抗体。

9. 如权利要求8所述之双特异性抗体或其抗原结合部分,其中该Ig G 1抗体是抗体依赖性细胞介导之细胞毒性减低的Ig G 1抗体。

10. 如权利要求1所述之双特异性抗体或其抗原结合部分,其中该双特异性抗体是人类抗体。

11. 一种医药组合物,其特征在于,包含:

—如权利要求1-10任一项所述之双特异性抗体或其抗原结合部分,以及至少一药学上可接受的载剂。

12. 一种抗体药物复合体,其特征在于,包含:

—治疗试剂;以及

—如权利要求1-10任一项所述之双特异性抗体或其抗原结合部分,

其中治疗试剂藉由一连接子与该双特异性抗体或其抗原结合部分共价接合。

13. 一种如权利要求1-10任一项所述之双特异性抗体或其抗原结合部分用于制备治疗癌症的药物的用途,其特征在于,该癌症选自前列腺癌、肺癌和肾细胞癌所组成之群组。

14. 如权利要求13所述之用途,其中该治疗的有效剂量为0.001 μ g/kg至250mg/kg。

15. 一种核酸分子,其特征在于,其编码如权利要求1-10任一项所述之该双特异性抗体

或其抗原结合部分。

结合检查点阻碍物作为目标治疗的双功能性蛋白质

【技术领域】

[0001] 本发明是有关于一种抗体。特别是本发明是有关于一种用于癌症治疗的抗体。

【现有技术】

[0002] 人类中两种主要类型的淋巴细胞是T淋巴细胞(源自胸腺)和B淋巴细胞(源自骨髓)。这些细胞源自于骨髓和胎儿肝脏中的造血干细胞,并参与淋巴发育途径。这些干细胞的后代依照不同的途径成熟为B或T淋巴细胞。人类B淋巴细胞的发育完全在骨髓内发生。另一方面,T细胞从未成熟的前驱细胞发展而来,这些前驱细胞离开骨髓并通过血流到达胸腺,在那里它们增殖并分化成成熟的T淋巴细胞。

[0003] T细胞

[0004] T细胞是最丰富的(约75%的血液淋巴细胞)且有效的免疫毒杀细胞。效应T细胞(effector T-cells)在抗肿瘤免疫反应中的作用,获得体外研究和观察结果的强烈支持,CD8⁺ T细胞在几种类型肿瘤中的高渗透度(infiltration,又称浸润)与较佳的临床预后相关(Fridman等人,2012)。效应初始T细胞的活化需要至少三种互补信号:(i) TCR-CD3/Ag-MHC在共同受体(CD4或CD8)的辅助下的相互作用;(ii) 共同刺激分子如CD80或CD86与CD28的结合,CD40与CD40L的结合;及(iii) 辅助分子如细胞因子(cytokines)。

[0005] 共同刺激(co-stimulation)或向T细胞提供两种不同的信号是抗原提呈细胞(antigen presenting cell,APC)对休止状态T淋巴细胞活化的广泛接受模式(Lafferty和Cunningham,1975)。此模式进一步提供了对自我与非自我和免疫耐受的区分(Bretscher和Cohn,1970;Bretscher,1999;Jenkins和Schwartz,1987)。在识别主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MHC)下提呈外来抗原肽后,通过T细胞受体(TCR)转换成初级信号或抗原特异性信号。第二种或共同刺激信号藉由在抗原提呈细胞(antigen-presenting cell,APC)上表达共同刺激分子递送至T细胞,并诱导T细胞促进克隆扩充、细胞因子分泌和效应功能(effector function)(Lenschow等,1996)。在没有共同刺激的情况下,T细胞变得较不受抗原的刺激、不会产生有效的免疫反应,并且还可能导致对外来抗原无反应或具耐受性。

[0006] 免疫检查点蛋白:细胞程序死亡-配体1(programmed cell death protein 1 ligand,PD-L1)

[0007] 免疫检查点是关于一群抑制和刺激途径,主要由配体-受体相互作用引发免疫系统僵化,特别是T细胞介导的免疫,以维持自身耐受并调节外周组织中生理反应的持续时间和幅度,通常便能减少附带组织损伤(Pardoll,2012)。肿瘤细胞将某些检查点途径作为免疫抗性的主要机制。例如,PD-L1的表达量通常在人类癌症肿瘤细胞的表面上增加。PD-L1与其受体PD-1的相互作用在肿瘤浸润的淋巴细胞(tumor infiltrated lymphocytes,TILs)上表达,特别是在T细胞上,抑制局部T细胞介导的反应以逃避免疫监视(Liang等人,2006;Sznol与Chen,2013)。因此,对癌细胞免疫抑制信号的抑制、或对T细胞直接激动性刺激,将导致和/或诱导强烈且持续性的抗肿瘤免疫反应。最近的临床研究强烈建议藉由抗体免疫

检查点蛋白的阻碍、或由可溶性配体或受体的调节,是最有希望激发治疗性抗肿瘤免疫的方式(Topalian等,2014)。目前抗PD-1和抗细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4,CTLA-4)抗体已被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,FDA)批准用于治疗诸如黑素瘤的疾病。

[0008] 血管生成和血管内皮生长因子抑制区(vascular endothelial growth factor inhibition domain,VID)

[0009] 血管生成,即从已存在的血管形成新血管,是涉及胎儿发育和组织修复中正常且重要的过程。此过程受血管生成因子和抗血管生成因子的高度调节,并且涉及内皮细胞迁移和增殖、血管成熟和重塑、以及细胞外基质的降解。虽然它是正常生长和发育的重要过程,但血管生成在肿瘤生长中也参与关键作用。肿瘤需要血管供应来生长,并且可以通过促血管生长因子的表达来实现此一目的,包括血管内皮生长因子配体的家族成员(Hicklin和Ellis,2005)。当血管内皮生长因子和其他内皮生长因子结合至内皮细胞上的受体时,这些细胞内的信号被启动,促进新血管的生长和存活。用血管内皮生长因子特异性抗体(Avastin)、可溶性血管内皮生长因子受体(aflibercept)、或血管内皮生长因子酪氨酸激酶活性抑制剂(sunitinib)阻断血管内皮生长因子活性是已经用于治疗肿瘤或血管生成型疾病(例如AMD)的策略。

[0010] 双特异性(Bi-specific)/双功能性(bi-functional)抗体

[0011] 在1980年代出现了使用双特异性抗体能有效地将效应免疫细胞重新以肿瘤细胞做为目标的想法(Karpovsky等人,1984;Perez等人,1985;Staerz等人,1985)。基于不存在或存在Fc片段(fragment crystallizable segment,可结晶区域片段),双特异性支架(scaffold)通常区分为具有不同药物动力学特性的两个主要群组:类免疫球蛋白G(IgG-like)分子和小型重组双特异性形式,其中大多数衍生自单链可变片段(single chain variable fragment,scFv)。通过其小巧的尺寸,抗体片段通常比类IgG分子更能有效地穿透肿瘤,但是这种优势将因过短的血清半衰期(几小时)而减少,并限制了它们的整体肿瘤吸收程度和停留时间(Goldenberg等,2007)。相比之下,结合新生儿Fc受体Fc片段的存在,为类IgG形式提供了长血清半衰期(>10天)并有利于被肿瘤吸收和保留,但限制了对肿瘤的穿透性。

[0012] 最近的研究强调了免疫疗法的治疗功效,免疫疗法是利用患者自身免疫系统来破坏癌细胞的一类癌症治疗方法。在肿瘤内,阴性调节分子家族(统称为「检查点抑制剂」)的存在可抑制T细胞功能以抑制抗肿瘤的免疫力。检查点抑制剂,例如CTLA-4和PD-1,减弱T细胞增殖和细胞因子的产生。用拮抗剂(antagonist)单克隆抗体(monoclonal antibodies, mAbs)将CTLA-4或PD-1作为目标阻断并释放T细胞上的「刹车」,以增强抗肿瘤的免疫力。此外,最近的研究已经报导了PD-L1或PD-L2/PD-1途径与促血管生成基因[包括缺氧诱导因子(hypoxia inducible factors,HIF)和血管内皮生长因子]在几种恶性肿瘤[如经典霍奇金淋巴瘤(classical Hodgkin lymphoma,cHL)(Koh等人,2017)和神经胶质瘤(Xue等人,2017)]中的关联。Koh等人证实了PD-L1、血管内皮生长因子或微血管密度(microvessel density,MVD)之间的正相关。他们的研究结果提供了证据支持新的治疗方法,包括抗PD-L1/PD-1和抗血管内皮生长因子治疗的组合,以及目前的经典霍奇金淋巴瘤标准方案(Koh等,2017)。血管内皮生长因子还证明了其破坏癌症免疫周期中关键步骤的能力:T细胞浸润

(或渗入, infiltration) 到肿瘤中 (Kim和Chen, 2016; Terme等, 2012)。将血管内皮生长因子作为目标, 可以藉由增加T细胞浸润到肿瘤微环境中来帮助恢复部分癌症免疫循环 (Hughes等人, 2016; Terme等人, 2012; Wallin等人, 2016)。血管内皮生长因子途径的抑制可导致细胞黏附分子在内皮细胞上的表达增加, 增加肿瘤内T细胞数以产生免疫发炎的肿瘤微环境。

【发明内容】

[0013] 本公开内容的目的在于提供一种具有免疫调节和血管生成抑制的双特异性抗体, 用于治疗患有癌症的患者进行了检查, 例如前列腺癌 (prostate cancer)、肺癌 (lung cancer)、非小细胞肺癌 (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)、黑素瘤 (melanoma)、淋巴瘤 (lymphoma)、乳癌 (breast cancer)、头颈癌 (head and neck cancer)、肾细胞癌 (Renal cell carcinoma, RCC) 或卵巢癌 (ovarian cancer)。

[0014] 本公开内容提供了一种双特异性抗体或其抗原结合部分, 包含至少一多肽链, 其中多肽链包含: 结合细胞表面蛋白的结合区; 以及血管内皮生长因子抑制区。

[0015] 在一些实施方式中, 细胞表面蛋白包含细胞程序死亡-配体1 (PD-L1)、细胞程序死亡蛋白1 (PD-1)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、人类表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (CTLA-4)、淋巴细胞活化基因3 (Lymphocyte-activation gene 3, LAG3)、B和T淋巴细胞衰减因子 (B and T lymphocyte attenuator, BTLA)、OX40 (分化簇134, Cluster of differentiation 134, CD134)、CD27、CD28、肿瘤坏死因子受体超级家族成员9 (The tumor necrosis factor receptor superfamily 9, TNFRSF9或CD137)、诱导T细胞共同刺激分子 (inducible T-cell co-stimulator, ICOS或CD278)、CD40、或其组合。

[0016] 在一些实施方式中, 其中结合区结合PD-L1, 且结合区包含: 重链可变区包含氨基酸序列, 氨基酸序列与选自于由SEQ ID NO.4与SEQ ID NO.6所组成之群组的氨基酸序列具有至少约80%的序列同源性; 以及轻链可变区包含氨基酸序列, 氨基酸序列与选自于由SEQ ID NO.3的第1-111个位置氨基酸与SEQ ID NO.5的第1-110个位置氨基酸所组成之群组的氨基酸序列具有至少约80%的序列同源性。

[0017] 在一些实施方式中, 血管内皮生长因子抑制区系由血管内皮生长因子受体1或血管内皮生长因子受体2所形成。

[0018] 在一些实施方式中, 血管内皮生长因子抑制区包含氨基酸序列, 氨基酸序列与选自于由SEQ ID NOs.1、2、9、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、及其组合所组成之群组的氨基酸序列具有至少约80%的序列同源性。

[0019] 在一些实施方式中, 多肽链更包含: 抗原结晶区 (fragment crystallizable region, Fc区); 以及抗原结合片段 (fragment-antigen binding segment, Fab片段), Fab片段与Fc区的N端连接, 且包含结合区, 其中血管内皮生长因子抑制区与Fc区的C端连接。

[0020] 在一些实施方式中, 双特异性抗体或其抗原结合部分更包含连接子, 位于Fc区与血管内皮生长因子抑制区之间。

[0021] 在一些实施方式中, 双特异性抗体包含如SEQ ID NO.12或SEQ ID NO.13所示之氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方式中, 双特异性抗体或其抗原结合部分包含一对多肽链。

- [0023] 在一些实施方式中,双特异性抗体为IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、或IgY抗体。
- [0024] 在一些实施方式中,双特异性抗体为IgG抗体。
- [0025] 在一些实施方式中,IgG抗体为IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4抗体。
- [0026] 在一些实施方式中,IgG1抗体是抗体依赖性细胞介导之细胞毒性减低的IgG1抗体。
- [0027] 在一些实施方式中,双特异性抗体是人类抗体。
- [0028] 本公开内容另提供了一种医药组合物,包含:如前述之双特异性抗体或其抗原结合部分,以及至少一药学上可接受的载剂。
- [0029] 本公开内容另提供了一种抗体药物复合体,包含:治疗试剂;以及双特异性抗体或抗原结合片段,结合至PD-L1及/或血管内皮生长因子抑制区,其中治疗试剂藉由连接子与双特异性抗体或抗原结合片段共价接合。
- [0030] 在一些实施方式中,双特异性抗体或抗原结合片段系选自于如前述之双特异性抗体或抗原结合片段。
- [0031] 本公开内容另提供了一种治疗癌症的方法,此方法包含对有需要之个体施予有效剂量之如前述之双特异性抗体或其抗原结合部分。
- [0032] 在一些实施方式中,癌症系选自于由前列腺癌、肺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、淋巴瘤、乳癌、头颈癌、肾细胞癌和卵巢癌所组成之群组。
- [0033] 在一些实施方式中,双特异性抗体或其抗原结合部分治疗癌症的有效剂量为0.001 μ g/kg至250mg/kg。
- [0034] 本公开内容另提供了一种核酸分子,其编码如前述之双特异性抗体或其抗原结合部分。
- [0035] 本公开内容另提供了一种对于个体诊断癌症的方法,包含:(a)从个体取得体液样本或细胞样本;(b)以可检测一组癌症标志之表达的一种或多种抗体接触体液样本或细胞样本,这组癌症标志系选自于由PD-L1与血管内皮生长因子所组成之群组;(c)试验一种或多种抗体与体液样品或细胞样品的结合能力;以及(d)于试验中评估个体之癌症状态,其系藉由测定及比较与正常对照组之抗体结合程度,以确定个体具有癌症。
- [0036] 本公开内容另提供了一种评估一个体罹患癌症之风险的方法,包含:(a)从个体取得体液样本或细胞样本;(b)以可检测一组癌症标志之表达的一种或多种抗体接触体液样本或细胞样本,这组癌症标志系选自于由PD-L1与血管内皮生长因子所组成之群组;(c)试验一种或多种抗体与体液样品或细胞样品的结合能力;以及(d)于试验中评估个体之癌症状态,其系藉由测定及比较与正常对照组之抗体结合程度,以确定个体是否具有罹患癌症之风险。
- [0037] **【图式简单说明】**
- [0038] 为让本发明之上述和其他目的、特征、优点与实施例能更明显易懂,所附图式之说明如下:
- [0039] 图1显示免疫检查点调节T细胞介导的免疫。抗体可以依需求使用针对检查点的激动或拮抗(agonistic or antagonistic)的抗体建构双功能融合蛋白,例如抗ICOS、抗CD28、抗OX40、抗CD27、抗PD-1、抗CTLA4、抗LAG3、或抗BTLA。
- [0040] 图2A与2B显示藉由直接酶联免疫分析法(direct enzyme-linked immunosorbent

assay, ELISA) 筛选重组PD-L1的噬菌体克隆(clone)。

[0041] 图3显示通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)以非还原试剂对PD-L1专一性之抗体先导物(antibody lead)纯化,以揭示其完整性和纯度。

[0042] 图4显示纯化的抗免疫检查点蛋白的直接配体结合活性与抗PD-L1抗体先导物拮抗PD-L1的实施例。首先将以配体预先涂覆(pre-coated)的孔槽与所示各种浓度的抗体先导物一起培养。然后用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)接合(conjugated)的山羊抗人类IgG Fab特异性抗体检测结合的蛋白质,并依OD₄₅₀读值绘图。

[0043] 图5显示使用表达PD-L1的293细胞的流式分析(flow analysis)。表达PD-L1的人类胚胎肾细胞293(Human embryonic kidney 293 cells, HEK293)首先与纯化的抗体先导物一起培养,并用Alexa[®]-488接合的山羊抗人类IgG(重链+轻链, H+L)检测结合的抗体,然后进行荧光活化细胞分选仪(fluorescence-activated cell sorter, FACS)分析。

[0044] 图6显示以纯化的抗PD-L1抗体阻碍PD-1/PD-L1的相互作用。将所示的纯化抗体与具有生物素的PD-L1-Fc和预先涂覆的PD-1/His用于96孔盘中以评估PD-1/PD-L1相互作用的抑制活性。藉由链霉亲和素(streptavidin)-结合辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)-Alexa[®]-488检测重组PD-1与重组PD-L1-Fc的结合,并通过ELISA分析。

[0045] 图7A与7B显示在抗体治疗3天(图7A)或5天(图7B)后,具有1或10微克/毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)的抗PD-L1抗体先导物于混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)分析中刺激IL-2和/或IFN- γ 产生。

[0046] 图8显示抗体重链Fc与来自血管内皮生长因子受体的血管内皮生长因子抑制区(VID)融合的结构。

[0047] 图9显示抗免疫检查点抗体-VID双特异性抗体的PAGE凝胶分析的实施例。纯化的融合蛋白,两种抗PD-L1-VID双特异性抗体显示分别具有约220千道尔顿(kDa)的分子量(非还原型),并且两种抗体中皆具有约85kDa的重链和约25kDa的轻链(还原型)。M表示是标准液(marker)、栏1是非还原型抗PD-L1-VID/eIgG1、栏2是还原型的抗PD-L1-VID/eIgG1、栏3是非还原的抗PD-L1-VID/IgG4、以及栏2是还原型的抗PD-L1-VID/IgG4,每栏注入3 μg 。

[0048] 图10A和10B显示藉由分子筛选层析-高效能液相层析(Size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography, SEC-HPLC)分析从HEK293细胞获得纯化的抗PD-L1-VID/IgG4(图10A)和抗PD-L1-VID/eIgG1(图10B)的双特异性抗体的纯度。

[0049] 图11A和11B显示实施例藉由直接ELISA分析纯化的抗PD-L1-VID双特异性抗体与PD-L1(图11A)和VEGF₁₆₅(图11B)的结合活性。首先将配体预先涂覆的孔槽与所示各种浓度的测试样品一起培养。然后用辣根过氧化物酶接合的山羊抗人类IgG Fc或F(ab')₂特异性抗体检测结合的抗体,并绘制OD₄₅₀读值。

[0050] 图12显示藉由纯化的抗PD-L1-VID双特异性抗体抑制VEGF₁₆₅刺激人类脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的增殖。将VEGF₁₆₅与测试样品一起预先培养一天而后施于HUVEC细胞,以监测受VEGF₁₆₅刺激的HUVEC细胞其增殖的情形。培

养3天后,通过MTS试剂(Promega)测定细胞增殖。将吸光值对测试样品的抗体浓度作图,并测定细胞增殖被抑制50%时的浓度(IC_{50})。

[0051] 图13A和13B显示双特异性抗体协同刺激(synergic stimulates)在3或5天后以混合淋巴细胞反应(MLR)测定T细胞活化所产生的IL-2(图13A)和IFN- γ (图13B),实验使用同种型IgG(isotype IgG)、参考抗体(MPDL3280A)或抗PD-L1-VID/eIgG1双特异性抗体治疗。

[0052] 图14A、14B和14C显示来自不同物种的抗PD-L1-VID/eIgG1双特异性抗体的体外血清稳定性(图14A:人类血清;图14B:小鼠血清;图14C:食蟹猕猴血清,Cyno serum)。将纯化的抗体在来自不同物种的血清中(15 μ g/mL)培养于37 $^{\circ}$ C、持续1、2、3、5、7和14天。培养完成后,将收集的样品用于三明治ELISA(sandwich ELISA)测定以确定PD-L1和VEGF₁₆₅的相对结合能力。基于血清中双特异性抗体的浓度绘制半衰期。

[0053] 图15A是显示以抗PD-L1-VID/eIgG1双特异性抗体和单克隆抗体,处理Fox Chase SCID[®]Beige小鼠中(prostate cancer cell lines,PC-3)肿瘤生长影响的图式。图15B显示肿瘤大小在双特异性抗体治疗后第35天显著小于同种型(isotype)或参考抗体的治疗。

[0054] 图16A、16B和16C显示抗PD-L1-VID抗体相比于单独抗PD-L1在以IFN- γ 刺激的A549中(图16A)、在人类非小细胞肺癌细胞(NCI-H292)中(图16B)、或是在稳定表达PD-L1的293细胞中(图16C),皆能维持其抗原结合特异性;MFI:平均荧光强度(mean fluorescence intensity)。

[0055] **【实施方式】**

[0056] 现在将参照本发明的实施方案详细地进行说明,本发明实施方案的实例将结合附图进行说明。

[0057] 本发明描述了分离具功能性VEGF抑制区的双功能性蛋白质的表达、纯化和特征,所述功能性VEGF抑制区位于抗免疫检查点蛋白质抗体的Fc区的C端。这些蛋白质与其相应的检查点相互作用,并传递抑制信号以调节T细胞参与免疫,同时中和VEGF诱导的血管生成。本发明中Fc融合蛋白的组成皆源自于人类,因此预期是非免疫原性的(non-immunogenic)并且可以用于人类的治疗。

[0058] 双特异性分子如双特异性抗体(bispecific antibodies,BsAb)提供了用单一治疗剂、同时将相同分子目标或不同目标上的多个抗原决定簇(epitopes)做为目标的手段。作为癌症疗法,它们具有潜力赋予新的或更有效的活性、降低商品成本、并促进新治疗方案的开发,而不是两种单克隆抗体的混合物(Chames和Baty,2009;Hollander,2009;Thakur和Lum,2010)。最近,catumaxomab是一种以人类上皮细胞黏附分子(human epithelial cell adhesion molecule,EpCAM)和CD3作为目标的三功能双特异性抗体,已显示出对上皮癌的腹膜癌(peritoneal carcinomatosis of epithelial cancers)患者有明显的临床益处(Heiss等人,2010),对CD19和CD3具有双重特异性结合能力的双特异性T细胞结合(bispecific T-cell engaging,BiTE)抗体在CD19表达恶性血液病(hematological malignancies)的患者中,也表现出令人鼓舞的临床活性(Bargou等人,2008)。尽管人们对开发作为癌症治疗剂的双特异性分子非常感兴趣,但是过去在生产具稳定和活性的双特异性分子技术中面临挑战,并阻碍了大多数双特异性形式的临床评价。许多工程化抗体(engineered Abs)形式,包括类IgG双特异性抗体已经克服稳定性或溶解度的问题(Bargou

等人,2008;Demarest和Glaser,2008;Lu等人,2005)。此外,已经采取了几种策略来提高双特异性分子的产品质量和体内稳定性,包括PEG化(PEGylation)、与人类血清白蛋白接合、以及Fc的工程化(Muller等人,2007;Ridgway等人,1996)。上述一般形式的双特异性抗体具有以下优点:编码两个可变区(variable region)的核苷酸序列、单个连接子、或一个间隔子(spacer)可以在单个启动子的控制下于合适的宿主表达生物中。这增加了设计这些结构的灵活性以及实验者在其生产过程中的控制程度。此外,IgG的Fc对用于设计新疗法中是非常具有吸引力的架构,因为它包含除结合能力之外的所有抗体功能。Fc的工程对于提高双特异性抗体有效性而言是至关重要的。因此,以IgG为基础的结构在本发明中用于癌症治疗,并以免疫细胞或促血管生成蛋白为两个独立的目标。

[0059] 以免疫检查点蛋白为目标是活化抗肿瘤免疫中备受期待的方法。目前临床上评估了抗检查点蛋白,例如PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG3等(图1)。初步的实验数据已显示免疫检查点蛋白抑制剂能够增强抗肿瘤免疫力,并在临床反应上具有药效持久性的潜力。然而,尽管这些药物在许多恶性肿瘤中具有显著的临床功效,但很明显它们对许多患者来说仍不够有效。许多其他免疫调节途径,如由骨髓表达或分泌的抑制因子、以及肿瘤微环境中的基质细胞(stromal cell),是与免疫检查点阻碍物协同作用的潜在目标。因此,结合抗癌或双特异性抗体疗法对于实现癌症患者的完全缓解和治疗是不可或缺的。同时,以VEGF为目标已经知道藉由减少肿瘤血管生成(Hicklin和Ellis,2005),并且可以藉由增加T细胞浸润进入肿瘤微环境来帮助恢复部分癌症免疫循环(Hughes等人,2016;Terme等人,2012;Wallin等人,2016)。

[0060] 人类VEGF受体的细胞外配体结合区(SEQ ID Nos.1和2)能够结合VEGF配体,并且包含一种或多种VEGF受体之一或多种类IgG区D1-D7(表1)。较佳地,VEGF受体的细胞外配体结合区包含第一VEGF受体的类IgG区D2、和第二VEGF受体的类IgG区D3,其中第一和第二VEGF受体是相同或不同的VEGF受体。在本发明中,VEGF抑制区(VID)为VEGF受体的细胞外配体结合区,包含VEGF受体1(VEGFR1)的类IgG区D2和VEGFR2的类IgG区D3,以阻断VEGF并减少血管生成。

[0061] 表1、人类VEGF受体的类IgG区的氨基酸序列

[0062]

名称	SEQ ID NO.	序列
人类 VEGFR1 的 D1	14	PELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAA HKWSLPPEMVSKESEKRSITKSA
人类 VEGFR1 的 D2	15	GRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIP DGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCE ATVNGH
人类 VEGFR1 的 D3	16	IDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTP LNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRID QNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYT CRVRSGPSFKSVNTSVH
人类 VEGFR1 的 D4	17	TVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVK AFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRG YSLIHKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFK NLTAT
人类 VEGFR1 的 D5	18	PQIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTA YGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARCFDC SNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMAL EGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNK VGTVGRNISFYIT
人类 VEGFR1 的 D6	19	PNGFHVNLEKMPTEGEDLKLSCVTNKF LYRDVTWILLRTVNNRMTMHYSISKQKM AITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTYACR ARNVYTGEEILQ
人类 VEGFR1 的 D7	20	PYLLRNLSDHTVAISSSTLDCHANGVP EPQITWFKNNHKIQQEPGII LGPGSSTLFI ERVTEEDEGVYHCKATNQKGSVESSAY LT
人类	21	NTTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSEQ

	VEGFR2 的 D1		RVEVTECSDGLFCKLTIPKVIGNDTGA YKCFYRETDL
	人类 VEGFR2 的 D2	22	NKNKTVVIPCLGSIISNLNVSLCARYPEK RFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAG MVFCEAKINDE
	人类 VEGFR2 的 D3	23	YDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDL KTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGL YTCAASSGLMTKKNST
	人类 VEGFR2 的 D4	24	FVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYL GYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVL TIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSH VVS
[0063]	人类 VEGFR2 的 D5	25	PQIGEKSLISPVDSYQYGTTQTLTCTVY AIPPPHHIHWYWQLEEECANEPSQAVS VTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEVNKN QFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYK CEAVNKVGRGERVISFHVT
	人类 VEGFR2 的 D6	26	PEITLQPDMQPTEQESVSLWCTADRSTF ENLTWYKLGQPPLPIHVGELPTPVCKN LDTLWKLNATMFSNSTNDILIMELKNA SLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQ LT
	人类 VEGFR2 的 D7	27	PTITGNLENQTTSIGESIEVSCTASGNPPP QIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNL IRRVRKEDEGLYTCQACSVLGC AKVEA FFI

[0064] 在一些实施方式中,血管内皮生长因子抑制区包含氨基酸序列,氨基酸序列与选自于由SEQ ID N0s.1、2、9、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、及其组合所组成之群组的氨基酸序列具有至少约80%的序列同源性。在一些实施例中,血管内皮生长因子抑制区与前述的氨基酸序列具有至少约85%、90%或95%的序列同源性。

[0065] 本发明描述了来自人类VEGF受体的VEGF抑制区(VID)与抗免疫检查点蛋白抗体Fc融合的结构、表达和特征。如果融合对应处被其他免疫检查点取代例如抗CTLA-4、CD3、OX40抗体、或细胞表面目标分子例如抗EGFR、抗HER2、抗CD40抗体,则位于融合结构N端的抗PD-L1抗体将会增强融合蛋白的免疫力,并超过以免疫增强剂活化免疫力的方式。

[0066] 本发明提供双特异性抗体或其抗原结合部分,包含结合区结合细胞表面蛋白;和血管内皮生长因子(VEGF)抑制区。在一些实施方式中,结合区结合PD-L1包含重链可变区与轻链可变区。重链可变区包含氨基酸序列与选自于由SEQ ID N0.4与SEQ ID N0.6所组成之

群组的氨基酸序列具有至少约80%的序列同源性。在一些实施例中,重链可变区包含与前述的氨基酸序列具有至少约85%、90%或95%的序列同源性。轻链可变区包含氨基酸序列与选自于由SEQ ID NO.3的第1-111个位置氨基酸与SEQ ID NO.5的第1-110个位置氨基酸所组成之群组的氨基酸序列具有至少约80%的序列同源性。在一些实施例中,轻链可变区包含与前述的氨基酸序列具有至少约85%、90%或95%的序列同源性。

[0067] 自OmniMab库产生的抗体

[0068] 为了产生针对PD-L1具疗效的抗体,进行了OmniMab噬菌粒库(phagemid library)的选择。噬菌粒库由AP Biosciences公司(APBio Inc.)从超过100个健康捐赠者B细胞收集产生。在第一轮筛选中使用之噬菌体系以Hyperphage (M13K07 Δ pIII,德国海德堡Progen公司)制备。针对PD-L1的固相筛选和细胞筛选是用于选择PD-L1特异性结合物,并从OmniMab库中分离。在第一轮选择中使用重组人类PD-L1-Fc (APBio Inc.)进行固相筛选,然后将表达PD-L1的HEK293细胞用于富集(enrichment)另外两轮。在三轮选择后,特异性PD-L1结合物藉由使用相应的重组蛋白以直接ELISA筛选和分离(图2A和2B)。预先涂覆的PD-L1-Fc重组蛋白以含有补救噬菌体(rescued phages)的上清液印记(blots)1小时,并用含有0.1% Tween-20的磷酸盐缓冲生理盐水(phosphate buffered saline, PBS)洗涤三次。噬菌体藉由辣根过氧化物酶接合的抗M13抗体(Roche)检测,并以TMB底物(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine substrate, TMB substrate)做为信号产生,并记录OD₄₅₀读值。分离阳性结合物并送测序以确认重链和轻链的序列和多样性。对PD-L1专一的重链和轻链可变区如SEQ ID NO.3至SEQ ID NO.6所示:SEQ ID NO.3是PD-L1 clone 6的轻链、SEQ ID NO.4是PD-L1 clone 6的重链可变区、SEQ ID NO.5是PD-L1 clone 32的轻链、SEQ ID NO.6是PD-L1 clone 32的重链可变区。如图2A与2B所示,与阴性对照组相比,许多克隆被分离出并且已知其特异性地识别相应的抗原。

[0069] 亚克隆(subcloning)和表达/纯化作为IgG形式筛选出的PD-L1特异性结合物

[0070] 为了便于快速筛选具有T细胞活化功能的特异性结合物,由ELISA筛选出PD-L1的阳性结合物的重链和轻链,接着进行扩增、分解(digest)与亚克隆到携带IgG4恒定区(constant region)的APBio特异性IgG表达载体中(SEQ ID NO.7)。在序列验证后,制备质粒(plasmid)并使用293fectin转染试剂(Invitrogen)转染到HEK293细胞中以表达抗体。培养4天后,藉由蛋白G层析(Protein G chromatography)将分泌到无血清培养基的抗体从培养基上清液中亲和纯化出。纯化的抗体接着浓缩,并于PBS缓冲液中透析。透析蛋白的最终浓度藉由NanoDrop2000分光亮度计测定,且在没有还原剂的条件下以SDS-PAGE测定纯度和完整性,如图3所示。各种纯化的抗体先导物、参考抗体(MPDL3280A)的完整性在HEK293细胞中是正常的。

[0071] 由直接ELISA测定PD-L1特异性IgG先导物的结合活性

[0072] PD-L1的纯化抗体先导物(抗PD-L1抗体先导物)于人类PD-L1-Fc直接涂覆的装置中进行ELISA结合特征分析。图4显示抗PD-L1抗体的ELISA结合结果。对于PD-L1特异性抗体,大多数先导物显示出与参考抗体(Ref Ab, MPDL3280A, Roche)相似或更好的结合活性。

[0073] 纯化的人类PD-L1IgG1 Fc嵌合体(PD-L1-Fc chimera, APBio)在PBS中透析,调整浓度至1mg/mL,然后再用PBS稀释至最终浓度为1 μ g/mL。将Nunc-Immuno Maxisorp 96孔盘以每孔0.1mL重组PD-L1-Fc嵌合体涂覆,留下空孔用于非特异性结合的对照组,并在4 $^{\circ}$ C培

养过夜。移除PD-L1-Fc嵌合体溶液,孔盘用0.4mL冲洗缓冲液(wash buffer,含0.1%Tween-20的PBS溶液)洗涤三次。将孔盘中所有的孔槽加入0.4mL封闭缓冲液(blocking buffer,含5%低脂奶粉的PBS),并在室温下培养混合1小时。移除封闭缓冲液后,用0.4mL冲洗缓冲液洗涤孔盘三次。在PBS中制备PD-L1测试抗体的连续稀释液,每孔加入0.1mL稀释的抗体。将孔盘在室温下培养1小时。移除抗体溶液,每孔用0.4mL冲洗缓冲液洗涤孔盘三次。辣根过氧化物酶标记的山羊抗人类IgG F(ab')₂特异性F(ab')₂抗体(Jackson Immunoresearch#109-036-097)用PBS以1:2000稀释,每孔加入0.1mL。将孔盘于室温下培养1小时,并用每孔0.4mL的冲洗缓冲液洗涤。加入0.1mL TMB试剂(Invitrogen)并在室温下培养1至5分钟。藉由加入0.05mL 1N盐酸(HCl)终止反应,并在Bio-Tek Spectra上于450nm处读取吸光值。计算抗PD-L1抗体先导物对PD-L1的EC₅₀并显示,由直接ELISA侦测出大多数先导物具有良好的结合活性,MPDL3280A(Ref Ab)也呈现相同的结果(图4)。

[0074] 通过FACS确认PD-L1特异性IgG先导物的结合活性

[0075] 纯化的抗体先导物(抗PD-L1抗体先导物)也用于流式细胞技术,以确定和比较先导物与PD-L1表达的HEK293细胞的结合活性。图5显示,稳定表达PD-L1的HEK293细胞经FACS可知相应抗体先导物的结合活性。

[0076] FACS分析以抗PD-L1抗体先导物将稳定表达PD-L1的293细胞进行染色,以检测PD-L1结合活性。稳定表达的293细胞与1μg/mL纯化的抗PD-L1抗体先导物、参考抗体(Ref Ab MPDL3280A)、或作为阴性对照的同种型抗体在冰上培养1小时。用1倍PBS洗涤细胞三次,然后在冰上与Alexa-488接合的山羊抗人类IgG(H+L)(Invitrogen Inc.)再一起培养1小时。染色后,用1倍PBS洗涤细胞三次,并重新悬浮于1倍PBS/2%胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS)中,然后通过FACS Calibur(BD Biosciences,Inc.)和FlowJo(TreeStar,LLC)分析。如图5所示,大多数抗PD-L1抗体先导物与参考抗体皆具有良好的结合活性。这显示选自OmniMab库的噬菌体克隆确实可识别细胞中原来的PD-L1。

[0077] 配体竞争结合(ELISA测定)

[0078] 抗体先导物所显示的结合选择性和亲和力测定,是用于评价本发明的抗PD-L1抗体先导物阻断PD-L1与PD-1结合的能力。

[0079] 抗体藉由ELISA测试阻断人类PD-L1-Fc嵌合体(PD-L1-Fc)与重组人类PD-1/His(hPD-1/His)结合的能力。将纯化的重组hPD-1/His(APBio)在PBS中透析至1mg/mL,然后以生物素(biotin,Abcam)进行接合。将Nunc Maxisorp 96孔盘用在PBS中的250ng hPD-1/His涂覆过夜。移除hPD-1/His溶液,用0.4mL冲洗缓冲液(0.1%Tween-20的PBS溶液)洗涤孔盘三次。所有孔槽中加入0.4mL封闭缓冲液(含5%低脂奶粉的PBS),在室温下培养1小时并混合。在封闭步骤期间,将抗体原液(antibody stocks)在PBS中以200nM至0nM的范围以2倍连续稀释。将纯化的重组生物素接合的PD-L1-Fc嵌合体在PBS中稀释至4μg/mL。用0.2mL冲洗缓冲液(0.1%Tween-20的PBS溶液)洗涤以PD-1/His涂覆的孔盘三次。将60μL抗体稀释液(抗PD-L1抗体先导物或参考抗体Ref Ab MPDL3280A)单独加入60μL生物素接合的PD-L1-Fc嵌合体,并在室温下培养1小时。孔盘被洗涤的方式如前所述。将链霉亲和素(streptavidin)接合辣根过氧化物酶在PBS中以1:2000稀释,将100μL所得溶液加入到经洗涤的孔盘的孔槽中,并在室温下培养1小时。孔盘被洗涤的方式如前所述,每个孔槽中加入100μL TMB受质溶液并培养10分钟。用50μL 1N HCl终止反应,并使用Bio-Tek读数器读取

450nm处的吸光值如图6所示。部分抗体先导物藉由竞争ELISA (competition ELISA) 抑制PD-1-PD-L1之间的相互作用。与参考抗体 (Ref Ab MPDL3280A) 相比,大多数抗体先导物显示出类似的阻断活性。

[0080] 藉由抗PD-L1抗体抑制PD-1:PD-L1配体相互作用以增强刺激T细胞活化

[0081] PD-1信息传导途径抑制中度TCR/CD28共同刺激信号,首先减少细胞因子产生而T细胞增殖则没有减少。随着TCR/CD28共同刺激信号减弱,PD-1途径占主导地位,细胞因子的产生大幅减少,同时也伴随着增殖的减少。因此,为了藉由抑制PD-1与PD-L1的相互作用来确认PD-1的抑制情形,本发明的人类抗体增强T细胞活化,并进行混合淋巴细胞反应 (MLR)。

[0082] 通过RosetteSep™人类单核细胞富集组 (产品型号15068) 富集来自人类全血的单核细胞,并在分化培养基含10%FBS RPMI 1640、100ng/mL (1000U/mL) GM-CSF、100ng/mL (500U/mL) 中培养6天。由DC-SIGN-PE、与异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 抗体接合的抗CD14、与PE抗体接合的抗CD83、或与FITC抗体接合的抗CD80检查从单核细胞分化的树突细胞 (dendritic cells, DC), 以在混合淋巴细胞反应中验证分化情形与验证曾经为抗原提呈细胞 (antigen-presenting cell, APC)。

[0083] 藉由RosetteSep™人类CD4⁺ T细胞富集组 (商品型号15062) 分离来自人类全血的异体 (Allogenic) CD4⁺ T细胞。用抗CD4接合的APC抗体检查CD4⁺ T细胞的纯度以确保纯度高于95%,然后用1 μ M CFSE (CellTrace™ CFSE细胞增殖试剂盒, Life technologies, 商品型号C34554) 标记T细胞增殖试验。标记的CD4⁺ T细胞用于与未成熟的树突细胞及不同的抗体先导物共同培养3天和5天,以观察抗体先导物是否可以通过阻断PD-1和PD-L1之间的相互作用来恢复T细胞活化。培养3天和5天后,收集上清液中的细胞因子,例如藉由ELISA定量的IL-2和IFN- γ 。与同种型IgG (iso#1, #2) 处理的培养物相比 (如图7A和7B所示), 向未成熟树突细胞和异体T细胞培养物中添加抗PD-L1抗体先导物 (克隆6、32、28、51、64、27和37) 预期会导致T细胞增殖和细胞因子产生增加。在第3天 (图7A) 或第5天 (图7B) 抗体处理后与同种型抗体处理相比, MLR中IL-2和IFN- γ 产生显著增加,特别是对于抗PD-L1抗体克隆6。抗体治疗5天后,细胞因子的增加仍然显著,其结果与参考抗体 (ref) MPDL3280A相似。这显示抗PD-L1抗体克隆6应该是双特异性抗体复合物的潜在先导物之一。

[0084] 抗PD-L1-VID抗体的结构、表达和纯化

[0085] 由于双特异性被设计为与VEGF抑制区融合的IgG,因此抗PD-L1抗体克隆6被指定为IgG形式。另一方面,VEGF受体中的VEGF结合区D1和D2与抗PD-L1克隆6抗体中Fc区的C端融合在一起。由于Fc同种型或工程化Fc对于改善哺乳动物细胞中双特异性抗体的有效性或产生是重要的,因此,两种不同的Fc同种型: IgG4 (SEQ ID NO.7) 和工程化IgG1 (eIgG1, 经抗体依赖性细胞介导之细胞毒性减低, SEQ ID NO.8) 用于双特异性架构。VID (SEQ ID NO.9) 与双特异性抗PD-L1抗体Fc融合的结构绘示于图8中。将短小灵活的多肽连接子 (GGGG)₃ (SEQ ID NO.10) 置于例如Fc区的抗PD-L1抗体重链C端 (SEQ ID NO.4) 和VID的N端之间,以确保正确折叠并尽量减少空间阻碍。IgG4和eIgG1的抗PD-L1-VID重链的编码序列显示在SEQ ID NO.12和NO.13中。建构的抗体Fc融合蛋白由信号肽 (SEQ ID NO.11) 引导并由哺乳动物细胞表达,并通过一步蛋白G色谱法 (1-step Protein G chromatography) 从转染的细胞培养上清液中纯化。如图9所示,在单步纯化过程中可以获得大于95%的纯度,并且显示纯化的融合蛋白具有正确的分子量 (Mw = 220kDa)。由于低纯度或低回收率是在化学、制造

和控制(chemistry, manufacturing, and controls, CMC)生产双特异性抗体或融合蛋白时的主要问题,因此,两种纯化的双特异性抗体也使用高效能液相层析的尺寸筛析层析法(size exclusion column, SEC),以评估双特异性抗体的纯度(图10A和10B)。两种双特异性抗体,无论是抗PD-L1-VID/IgG4(图10A)还是抗PD-L1-VID/eIgG1(图10B),在SEC-HPLC分析中均显示纯度高于99%。这显示此模式可以在CMC开发中易于执行,并在进一步发展中提供成功的机会。

[0086] 如图8所示, Fc末端与VID融合的抗免疫检查点抗体的结构。在一些实施方式中, 抗体可以是抑制性免疫检查点抗体(例如抗PD-L1、抗PD-1、抗CTLA4、抗LAG3等)、刺激性抗体(例如抗CD28、抗CD137、抗CD27、抗ICOS等)、或细胞表面受体/抗原(例如HER2、EGFR等)。将连接子置于抗体Fc和VID之间以产生双特异性抗体。

[0087] 融合蛋白与PD-L1和VEGF₁₆₅的结合亲和力

[0088] 使用直接ELISA来测量双特异性抗体与PD-L1或VEGF₁₆₅(VEGF-A的剪接变异, splice variant)的结合亲和力。重组VEGF捕获蛋白(trapping protein, VEGFR-Fc)和抗PD-L1抗体克隆6分别作为VEGF和PD-L1的阳性对照。VEGFR-Fc(aflibercept)是一种可溶性VEGF受体,其经基因工程作为治疗用途,并且目前被美国食品和药物管理局批准用于治疗年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)。VEGFR-Fc含有VEGFR1的第二类Ig区(D2)与VEGFR2的第三类Ig区(D3)融合,再与人类IgG1的Fc区融合(Holash等人, 2002)。

[0089] 将100 μ L涂覆溶液(1 μ g/mL VEGF₁₆₅在PBS中, pH 7.2)加入到ELISA 96孔盘的每个孔槽中,并将孔盘在4 $^{\circ}$ C培养过夜。将孔槽用400 μ L PBS缓冲液冲洗两次,并用纸巾小心地移除过量的液体。每个孔槽中加入400 μ L封闭溶液(含5%脱脂乳的PBS),并将孔盘在室温下培养1小时。用PBS缓冲液洗涤孔槽两次。将双特异性抗体和对照组样品在封闭溶液中连续稀释三倍,最高蛋白质浓度为100nM。将100 μ L连续稀释的样品加入每个孔槽中。盖上孔盘并在孔盘振荡器(plate shaker, 约100rpm)上于室温培养1小时。用冲洗缓冲液(0.05% Tween-20的PBS溶液)洗涤孔槽三次。将100 μ L在封闭溶液中以1:2500稀释的辣根过氧化物酶接合山羊抗人类IgG Fc特异性抗体加入每个孔槽中。将孔盘密封并在孔盘振荡器上于室温培养1小时。用洗涤缓冲液将板洗涤三次。每个孔槽中加入100 μ L TMB受质,将孔盘培养3至5分钟以使反应发生。为了停止反应,每个孔槽中加入100 μ L终止溶液(1N HCl)。使用ELISA孔盘读数器(Bio-Tek)在450nm吸光波长下测定每个孔槽的光密度(optical density, OD)。将吸光值相对于融合蛋白或对照组的蛋白质浓度作图,并侦测出信号为最大有效浓度之一半(EC₅₀)时的浓度。同时,PD-L1对两种双特异性抗体的结合活性也如上所述进行,除了双特异性抗体的结合是藉由辣根过氧化物酶接合山羊抗人类IgG F(ab')₂特异性F(ab')₂抗体所检测。

[0090] 如图11A中所示的数据,抗PD-L1-VID/IgG4和抗PD-L1-VID/eIgG1抗体对于重组PD-L1蛋白的结合亲和力为0.075(表示为EC₅₀值)。两种双特异性抗体与阳性对照组抗PD-L1克隆6抗体(0.1nM)都进行比较结合活性。同时,还记录了VEGF结合活性测试的结果。如图11B中所示的数据,与阳性对照组VEGFR-Fc(aflibercept)相比,两种双特异性抗体显示出相似的VEGF结合活性。无论是PD-L1或VEGF结合活性,两种双特异性抗体均不影响PD-L1或VEGF各自的结合活性。

[0091] 由抗PD-L1-VID双特异性抗体抑制HUVEC增殖

[0092] 进行人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 增殖测定以测试本发明中双特异性抗体的功能。如上所述, VEGFR-Fc作为阳性对照组。将100 μ L涂覆溶液(在二次蒸馏水中含有1%明胶, gelatin)加入到ELISA 96孔盘的每个孔槽中, 并将孔盘在37 $^{\circ}$ C下培养2小时或过夜。用PBS缓冲液洗涤孔槽两次。将在内皮细胞生长培养基内的3500个HUVEC细胞加入至每个孔槽中, 并将孔盘在37 $^{\circ}$ C培养过夜。将所示样品稀释于测定缓冲液 (assay buffer: Medium-199含1倍Earle's Salts、10% FBS、10mM HEPES、1倍抗生素/抗真菌剂) 中, 最高蛋白质浓度为30nM。将样品与VEGF₁₆₅ (8ng/mL) 混合, 并将混合物在室温下培养过夜。然后用200 μ L PBS洗涤孔槽。每个孔槽中加入100 μ L VEGF₁₆₅/样品混合物, 并将孔盘在37 $^{\circ}$ C下用5% CO₂培养72小时。培养后, 将10 μ L MTS检测试剂 [(3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxy phenyl) -2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium) 与吩嗪硫酸甲酯 (phenazine methosulfate) 于蒸馏水PBS中] 加入每个孔槽中, 并将孔盘在37 $^{\circ}$ C下培养2.5小时。使用ELISA孔盘读数器 (Bio-Tek) 在490nm的吸光波长下测定每个孔槽的OD值。将吸光值对测试样品的蛋白质浓度作图, 并测定细胞增殖被抑制50%时的浓度 (IC₅₀)。对于本发明的测试融合蛋白, 确定细胞增殖的抑制情形 (IC₅₀) 在0.1070和0.1233nM之间。双特异性抗体之一的抗PD-L1-VID/eIgG1显示出比另一种双特异性抗体的抗PD-L1-VID/IgG4更好的抑制效果 (图12, 0.1070nM对比0.1233nM)。抗PD-L1-VID/eIgG1的IC₅₀与阳性对照VEGFR-Fc (0.1072nM) 的IC₅₀一样好。

[0093] 在MLR中增强抗PD-L1-VID/eIgG1双特异性抗体先导物对T细胞活化的刺激

[0094] 通过抑制PD-1和PD-L1之间的相互作用, 来确定双特异性抗体在增强T细胞活化中的拮抗功能。如上所述, 将双特异性抗体先导物抗PD-L1-VID/eIgG1抗体应用于MLR, 然后在抗体处理3或5天后记录IL-2和IFN- γ 的产生。以等摩尔量 (mole) 单或双特异性抗体比较T细胞活化增强中的拮抗功能, 并将同种型IgG作为阴性对照组。如图13A和13B所示的数据, 抗PD-L1-VID/eIgG1抗体在处理3天后显示IL-2被显著诱导出, 并在处理5天后下降。细胞因子产生的概况与参考抗体MPDL3280A的施予情形高度相似。同时, 在处理3或5天后, 双特异性抗体中的IFN- γ 产量也有增加与积累。这显示抗PD-L1-VID/eIgG1双特异性抗体在T细胞活化中也具有拮抗功能, 参考抗体也有相同的结果而不损失本发明中的任何活性。

[0095] 抗PD-L1-VID/eIgG1双特异性抗体的体外血清稳定性

[0096] 将纯化的抗PD-L1-VID/eIgG1与来自不同物种的血清 (15 μ g/mL) 一起培养在37 $^{\circ}$ C水浴中。含有纯化的双特异性抗体的血清样品在不同时间点采集直至14天。如下使用三明治ELISA测定法测定血清样品中双特异性抗体的浓度。将以VEGF₁₆₅ (1 μ g/mL) 预先涂覆的孔槽与纯化抗PD-L1-VID/eIgG1双特异性抗体的滴定浓度 (titrated concentration) 一起培养, 作为标准曲线以计算血清中的抗体浓度 (现场配制, 第0天)。将来自不同时间点的收集样品也已预先涂覆的VEGF₁₆₅孔槽用于检测。以含有0.1% Tween-20的PBS洗涤后, 完整和结合的抗体在显色前用生物素化的PD-L1-Fc和辣根过氧化物酶接合的链霉抗生物素蛋白进行检测。血清中抗体的浓度以内插法计算, 然后如图14A、14B和14C所示绘示抗体的半衰期。在食蟹猕猴 (8.6天)、小鼠 (9.2天) 或人类血清 (11.9天) 中, 抗PD-L1-VID/eIgG1的半衰期长于8天。半衰期长可以提供双特异性抗体的使用灵活性, 在未来的动物研究或临床试验中具有较少的给药频率。

[0097] 双特异性抗体的抗肿瘤活性(体内模型)

[0098] 由于PD-L1在双特异性抗体中缺乏啮齿动物交叉反应性,阻碍了标准鼠同源或人类异种移植肿瘤模型用于评估抗体抗人类肿瘤的功效。因此,使用SCID-Bg小鼠(CB.17/Icr.Cg Pkrdc^{scid}Lyst^{bg}/CrI)产生新的huPBL-SCID-Bg异种肿瘤小鼠模型,其含有米色(beige,Bg)突变、缺乏T和B淋巴细胞、与缺乏有功能性自然杀手细胞(natural killer cell,NK cell)。

[0099] PC-3人类前列腺取自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC),并在含有L-谷氨酰胺(L-glutamine)、丙酮酸钠(sodium pyruvate)、青霉素/链霉素(penicillin/streptomycin)和10%热灭活的胎牛血清(heat-inactivated FBS,Gibco商品型号10437号)的RPMI-1640(Invitrogen)中培养。细胞在T-150Falcon烧瓶中生长至饱和。随后,用胰蛋白酶处理细胞(胰蛋白酶0.25%-EDTA;Invitrogen)并将生长放大至足够的细胞数用于接种。根据制造商的操作准则(STEMCELL Technologies Inc.),使用Lymphoprep™将从以肝素处理之血液(heparinized blood)中分离出外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocytes,PBMC)。将计数的细胞悬浮液进行组合,使得每只小鼠在PBS中单次推注(single bolus injection)0.1mL时,接受 0.75×10^6 个PBMC和 3×10^6 个肿瘤细胞。为了促进在小鼠内生长的肿瘤细胞,接着将另外0.1mL基质胶(matrigel)与组合细胞悬浮液混合,然后立即注射到制备小鼠。

[0100] 对于每只小鼠,将0.2mL体积的组合细胞悬浮液皮下注射到动物的右侧腹中。接种7天后,形成实体瘤并达到约 100mm^3 ,并且每周两次持续三至四周以双特异性抗体(10mg/kg)或对照组抗体以腹腔内注射(intraperitoneal injection,i.p.)的方式进行应激(challenged)。在实验期间每周两次通过Pressier卡尺进行肿瘤与测试样品的测量,并且也记录体重。肿瘤体积使用以下算式计算:长度 \times 宽度² $\times 0.44 =$ 体积(mm^3)并绘制在图15A中。在实验终止之前,肿瘤体积达到 2000mm^3 或动物体重减轻20%的情况时将小鼠从研究中移除。当在接种后第7天测量肿瘤时观察到类似的结果,并且根据肿瘤体积随机分配动物。对于动物研究,每组包含6只小鼠。如图15A中显示的数据,双特异性抗体在PC-3异种移植小鼠模型中显示出显著的抗肿瘤成效。肿瘤大小在接种后18天有变小,相同的结果在施予PD-L1参考抗体中也有观察到,并继续降低至 200mm^3 以下。图15B显示,在接种后第35天时,肿瘤大小在双特异性抗体治疗下显著小于同种型或参考抗体的治疗。这显示抗PD-L1-VID/eIgG1抗体对动物的抗肿瘤活性具有协同作用(synergic effect)。PC-3异种移植小鼠模型初步证明了双特异性抗体的抗肿瘤作用,并公开了其未来治疗药物的潜力。

[0101] 总体来说,这些结果表示双特异性抗体在PD-1/PD-L1信号传导中,维持其免疫检查点阻断并中和促血管生成蛋白VEGF。正在进行的研究将使用适当的动物模型进一步研究这些蛋白质的生物活性,例如人源化NOD.Cg-Prkdc^{scid} II2rg^{tmIwj1}/SzJ(NSG)模型中的PC-3肿瘤。

[0102] 本发明中的Fc区可以来自任何免疫球蛋白同种型(immunoglobulin isotypes)、亚类(subclasses)、同种异型(allotypes)、或工程化突变体(engineered mutants),例如钮与扣的Fc片段(knob and hole Fc fragment)。

实施例

[0103] 以下实施例描述了产生适合于将人类PD-L1和VEGF作为目标与治疗目的的单克隆抗体。从抗PD-L1抗体克隆6与从人类VEGF受体选出的VEGF捕获区分别产生组合的人类抗人类PD-L1和VEGF中和区(VEGF neutralized domains)。人类可变区(V区)序列的区段源自于无关的人类抗体(生殖细胞和非生殖细胞,germline and non-germline)序列数据库。

[0104] 实施例1产生与PD-L1和VEGF结合的IgG抗体

[0105] 本发明提供的特定抗体最初由Fabs与人类PD-L1结合产生。从噬菌体展示库(phage display library):OmniMab噬菌粒库中选择Fab,接着在交替筛选相应的Fc融合蛋白(PD-L1-Fc)和表达人类相应蛋白(PD-L1)的细胞。在直接ELISA筛选后,对阳性克隆的重链和轻链进行测序。这些Fab包括指定为PD-L1的「OM-PD-L1-6」和「OM-PD-L1-32」等。本案公开的PD-L1抗体:PD-L1-克隆6和PD-L1-克隆32,从HEK293细胞或CHO-S细胞中的「OM-PD-L1-6」和「OM-PD-L1-32」产生。同时将PD-L1和VEGF作为目标的双特异性抗体被设计为抗PD-L1-VID(VEGF抑制区)抗体。所提供的Fab之轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列,分别与轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列相同。

[0106] 实施例2抗PD-L1-VID双特异性抗体与其相应目标的体外结合

[0107] 如图8所示,建构抗PD-L1-VID双特异性抗体并在HEK293细胞或CHO-S细胞中表达。藉由蛋白G层析从培养上清液中亲和纯化含有双特异性抗体的培养基。接着浓缩经纯化的抗体,然后在PBS缓冲液中透析并藉由SDS-PAGE分析如图9所示。为了在ELISA上测试纯化的融合蛋白与PD-L1或VEGF₁₆₅的直接结合能力,以每孔100ng浓度的重组PD-L1涂覆在ELISA 96孔盘中。然后将各种浓度的纯化抗PD-L1-VID抗体加入每个孔槽中并培养1小时。洗涤后,每个孔槽中加入1:5000稀释的抗Fab或抗Fc辣根过氧化物酶接合物(Jackson Immunochemicals)并再培养1小时。最后洗涤后,加入TMB底物(Invitrogen Inc.)并测量450nm处的OD吸光值。使用GraphPad Prism 5通过S形曲线拟合(sigmoidal curve fitting)分析数据和计算EC₅₀。

[0108] 实施例3由FACS分析抗PD-L1-VID的抗原结合特异性

[0109] 为了测试抗PD-L1-VID抗体结合的特异性,PD-L1稳定表达的293细胞(人类胚肾细胞)、IFN- γ 刺激的A549(肺癌细胞)、或NCI-H292(黏液表皮样肺癌)以30nM连续三倍稀释抗PD-L1-VID抗体在冰上染色1小时,然后用1倍PBS洗涤3次。以Alexa-488接合的山羊抗人类IgG(H+L)检测结合的抗体融合蛋白,然后进行FACS分析。同种型抗体为测试的阴性对照组。结果显示,与单独的抗PD-L1相比,抗PD-L1-VID抗体维持其抗原结合特异性。(图16A、16B和16C)。

[0110] 实施例4抗PD-L1-VID双特异性抗体的体外免疫调节作用

[0111] 为了测量抗PD-L1-VID抗体调节T细胞反应能力,将纯化的T细胞与异体的树突细胞一起培养,藉由在GM-CSF和IL-4中培养单核细胞几天来制备。设置平行孔盘以允许在第3天和第5天收集上清液,使用市售ELISA试剂盒分别测量IL-2和IFN- γ 。Genentech/Roche的人源化抗PD-L1(MPDL3280A)将出现在预定孔盘中并作为阳性对照组。如图13A和13B所示,抗体处理3或5天后,在双特异性抗体处理以及参考抗体中IL-2和IFN- γ 的含量显著提升。它揭示了双特异性抗体仍然具有抑制T细胞和树突细胞之间PD-1/PD-L1的相互作用,以活化T细胞活性的能力。

[0112] 实施例5体内双特异性抗体诱导的人类白血球扩增

[0113] 由于缺乏可检测PD-L1抗体与鼠PD-L1的交叉反应性(cross-reactivity)、和对人免疫细胞存在的要求,因此需要开发用于双特异性抗体之体内功能评估的模型。具有严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficient, SCID)突变和缺乏IL-2受体共同 γ 链(通常称为NSG)的NOD遗传背景的小鼠,能够支持大量人类外周白血球(human peripheral blood leukocytes, huPBL)的植入并维持至少30天(King等人,2008)。此小鼠模型,也称为huPBL-NSG模型,用于评估体内全身施用抗体对人免疫细胞的效果。

[0114] 具体地,通过静脉内注射将600万新鲜分离的人类PBMC转移到huPBL-NSG小鼠中。PBMC注射9天后,通过腹腔内注射给动物并施用单一1mg/kg单克隆抗体、双特异性抗体或同种型对照抗体。在PBMC植入后第24至28天,通过流式细胞仪以人和鼠CD45抗体染色评估PBMC。前方和侧向散射轮廓用于确定框选淋巴细胞范围。双特异性抗体能够增强人类白血球的扩增,这可藉由移植小鼠外周血中人类CD45⁺细胞比例的增加来证明。每组具有 $n \geq 6$ 只小鼠。

[0115] 实施例6由抗PD-L1-VID/eIgG1抗体对huPBL-NSG中PC-3或A498肿瘤细胞生长的抑制

[0116] 属于PD-L1阳性的人类前列腺癌细胞株PC-3(ATCC[®]#CRL-1435)或肾癌细胞株A498(ATCC[®]HTB-44[™]),可用于huPBL-NSG小鼠中建立异种移植模型。对于肿瘤形成,如上所述,将每只小鼠 3×10^6 个PC-3细胞(或A498细胞)以皮下注射到huPBL-NSG小鼠中。为了评估对肿瘤生长的抑制作用,小鼠肿瘤细胞植入14天后,将每周两次持续4周以静脉注射不同浓度的抗PD-L1-VID/eIgG1抗体、参考抗体、或0.1至3mg/kg的同种型抗体。如Fox Chase SCID[®]Beige小鼠模型中所述,肿瘤生长将每周测量两次持续5周。

[0117] 实施例7小鼠和猴子中抗PD-L1-VID/eIgG1的药物动力学评估

[0118] 将10mg/kg至40mg/kg双功能蛋白(抗PD-L1-VID/eIgG1)通过皮下注射或静脉注射施予小鼠或猴子。在注射后不同时间点采集血清样品至15天。使用三明治ELISA测定法测定血清样品中Fc融合蛋白的浓度。

[0119] 虽然本发明已以实施方式公开如上,然其并非用以限定本发明,任何熟习此技艺者,在不脱离本发明之精神和范围内,当可作各种之更动与修饰,因此本发明之保护范围当视后附之权利要求书所界定者为准。

<110> 圆祥生命科技股份有限公司
 <120> 结合检查点阻碍物作为目标治疗的双功能性蛋白质
 <130> 9022-1808584
 <150> US 62/636,825
 <151> 2018-02-28
 <160> 27
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 732
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 1

Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile
 1 5 10 15

Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala
 20 25 30

[0001]

His Lys Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu
 35 40 45

Ser Ile Thr Lys Ser Ala Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser
 50 55 60

Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser
 65 70 75 80

Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr Glu Ser
 85 90 95

Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met
 100 105 110

Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu
 115 120 125

Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys
 130 135 140

Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp
 145 150 155 160

Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile
 165 170 175

Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr
 180 185 190

Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile
 195 200 205

Ser Thr Pro Arg Pro Val Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu
 210 215 220

Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp
 225 230 235 240

Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile
 245 250 255

[0002] Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile
 260 265 270

Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg
 275 280 285

Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp
 290 295 300

Lys Ala Phe Ile Thr Val Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr
 305 310 315 320

Val Ala Gly Lys Arg Ser Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe
 325 330 335

Pro Ser Pro Glu Val Val Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu
 340 345 350

Lys Ser Ala Arg Tyr Leu Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp
 355 360 365

Val Thr Glu Glu Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys
 370 375 380

Gln Ser Asn Val Phe Lys Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val
385 390 395 400

Lys Pro Gln Ile Tyr Glu Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala
405 410 415

Leu Tyr Pro Leu Gly Ser Arg Gln Ile Leu Thr Cys Thr Ala Tyr Gly
420 425 430

Ile Pro Gln Pro Thr Ile Lys Trp Phe Trp His Pro Cys Asn His Asn
435 440 445

His Ser Glu Ala Arg Cys Asp Phe Cys Ser Asn Asn Glu Glu Ser Phe
450 455 460

Ile Leu Asp Ala Asp Ser Asn Met Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ile Thr
465 470 475 480

Gln Arg Met Ala Ile Ile Glu Gly Lys Asn Lys Met Ala Ser Thr Leu
485 490 495

[0003]

Val Val Ala Asp Ser Arg Ile Ser Gly Ile Tyr Ile Cys Ile Ala Ser
500 505 510

Asn Lys Val Gly Thr Val Gly Arg Asn Ile Ser Phe Tyr Ile Thr Asp
515 520 525

Val Pro Asn Gly Phe His Val Asn Leu Glu Lys Met Pro Thr Glu Gly
530 535 540

Glu Asp Leu Lys Leu Ser Cys Thr Val Asn Lys Phe Leu Tyr Arg Asp
545 550 555 560

Val Thr Trp Ile Leu Leu Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr Met His Tyr
565 570 575

Ser Ile Ser Lys Gln Lys Met Ala Ile Thr Lys Glu His Ser Ile Thr
580 585 590

Leu Asn Leu Thr Ile Met Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr
595 600 605

Ala Cys Arg Ala Arg Asn Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln Lys
610 615 620

Lys Glu Ile Thr Ile Arg Asp Gln Glu Ala Pro Tyr Leu Leu Arg Asn
625 630 635 640

Leu Ser Asp His Thr Val Ala Ile Ser Ser Ser Thr Thr Leu Asp Cys
645 650 655

His Ala Asn Gly Val Pro Glu Pro Gln Ile Thr Trp Phe Lys Asn Asn
660 665 670

His Lys Ile Gln Gln Glu Pro Gly Ile Ile Leu Gly Pro Gly Ser Ser
675 680 685

Thr Leu Phe Ile Glu Arg Val Thr Glu Glu Asp Glu Gly Val Tyr His
690 695 700

Cys Lys Ala Thr Asn Gln Lys Gly Ser Val Glu Ser Ser Ala Tyr Leu
705 710 715 720

[0004] Thr Val Gln Gly Thr Ser Asp Lys Ser Asn Leu Glu
725 730

<210> 2
<211> 745
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro Arg Leu Ser
1 5 10 15

Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr Leu Gln Ile
20 25 30

Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro Asn Asn Gln
35 40 45

Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser Asp Gly Leu
50 55 60

Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn Asp Thr Gly
65 70 75 80

Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser Val Ile Tyr
85 90 95

Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser Val Ser Asp
100 105 110

Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys Thr Val Val
115 120 125

Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser Leu Cys Ala
130 135 140

Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg Ile Ser Trp
145 150 155 160

Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile Ser Tyr Ala
165 170 175

Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser Tyr Gln Ser
180 185 190

[0005] Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr Asp Val Val
195 200 205

Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val
210 215 220

Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn
225 230 235 240

Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg
245 250 255

Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr
260 265 270

Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys
275 280 285

Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg
290 295 300

Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser Leu

	305				310					315					320	
	Val	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	Ala	Lys	Tyr	Leu
					325					330					335	
	Gly	Tyr	Pro	Pro	Pro	Glu	Ile	Lys	Trp	Tyr	Lys	Asn	Gly	Ile	Pro	Leu
				340					345					350		
	Glu	Ser	Asn	His	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	His	Val	Leu	Thr	Ile	Met	Glu
			355					360					365			
	Val	Ser	Glu	Arg	Asp	Thr	Gly	Asn	Tyr	Thr	Val	Ile	Leu	Thr	Asn	Pro
		370					375					380				
	Ile	Ser	Lys	Glu	Lys	Gln	Ser	His	Val	Val	Ser	Leu	Val	Val	Tyr	Val
	385					390					395					400
	Pro	Pro	Gln	Ile	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Val	Asp	Ser	Tyr
					405					410					415	
[0006]	Gln	Tyr	Gly	Thr	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Tyr	Ala	Ile	Pro
				420					425					430		
	Pro	Pro	His	His	Ile	His	Trp	Tyr	Trp	Gln	Leu	Glu	Glu	Glu	Cys	Ala
			435					440					445			
	Asn	Glu	Pro	Ser	Gln	Ala	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Pro	Tyr	Pro	Cys	Glu
		450					455					460				
	Glu	Trp	Arg	Ser	Val	Glu	Asp	Phe	Gln	Gly	Gly	Asn	Lys	Ile	Glu	Val
	465					470					475					480
	Asn	Lys	Asn	Gln	Phe	Ala	Leu	Ile	Glu	Gly	Lys	Asn	Lys	Thr	Val	Ser
				485						490					495	
	Thr	Leu	Val	Ile	Gln	Ala	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Leu	Tyr	Lys	Cys	Glu
				500					505					510		
	Ala	Val	Asn	Lys	Val	Gly	Arg	Gly	Glu	Arg	Val	Ile	Ser	Phe	His	Val
			515					520					525			
	Thr	Arg	Gly	Pro	Glu	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Asp	Met	Gln	Pro	Thr	Glu
		530					535					540				

Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser Thr Phe Glu
545 550 555 560

Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro Ile His Val
565 570 575

Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr Leu Trp Lys
580 585 590

Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile Met
595 600 605

Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys Leu
610 615 620

Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val Arg Gln Leu
625 630 635 640

Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn Leu Glu Asn
645 650 655

[0007]

Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys Thr Ala Ser
660 665 670

Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr Leu
675 680 685

Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg Asn Leu Thr
690 695 700

Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala
705 710 715 720

Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe Ile Ile Glu
725 730 735

Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu
740 745

<210> 3
<211> 217
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

[0008]

Asn Ala Trp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

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

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

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

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Arg Arg Tyr
 20 25 30

Ser Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Ala Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Phe Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

[0009] Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Leu Ser Gly Asp Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Val Ile Tyr Glu Val Ala Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

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

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

[0010] Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

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

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 6
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Lys Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Val Val Pro Gly Tyr Ser Tyr Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 328

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

[0011]

<400> 7

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

[0012]

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly
325

<210> 8
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 人工合成 (Artificial Sequence)

<220>
 <223> 工程化IgG1 (eIgG1)之重链不变区

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

[0013]

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

[0014] Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 9
<211> 205
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

Gly Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
50 55 60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65 70 75 80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
100 105 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
115 120 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
130 135 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145 150 155 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
165 170 175

[0015] Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met
180 185 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys
195 200 205

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工合成 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 多肽连接子 (peptide linker)

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工合成 (Artificial Sequence)

<220>
<223> 信号肽 (signal peptide)

<400> 11

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 12

<211> 666

<212> PRT

<213> 人工合成 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 抗PD-L1克隆6重链-VID/IgG4双特异性抗体

<400> 12

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Arg Arg Tyr
20 25 30

[0016] Ser Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Gly Ala Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Phe Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Leu Ser Gly Asp Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly
 435 440 445
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp Thr
 450 455 460
 Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His
 465 470 475 480
 Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro
 485 490 495
 [0018] Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro
 500 505 510
 Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser
 515 520 525
 Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val
 530 535 540
 Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn
 545 550 555 560
 Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser
 565 570 575
 Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn
 580 585 590
 Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His
 595 600 605
 Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met

	130		135			140												
	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn		
	145					150					155				160			
	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln		
					165					170					175			
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser		
				180					185					190				
	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser		
			195					200					205					
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr		
		210					215					220						
	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser		
	225					230					235					240		
[0020]	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg		
					245					250					255			
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro		
				260					265					270				
	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala		
			275					280					285					
	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val		
		290					295					300						
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr		
	305					310					315					320		
	Lys	Cys	Ala	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr		
					325					330					335			
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu		
				340					345					350				
	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys		
			355					360					365					

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460

Gly Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
 465 470 475 480

[0021] Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
 485 490 495

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
 500 505 510

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
 515 520 525

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
 530 535 540

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
 545 550 555 560

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
 565 570 575

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
 580 585 590

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys

	595		600		605														
	His	Gln	His	Lys	Lys	Leu	Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly			
	610						615					620							
	Ser	Glu	Met	Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr			
	625					630					635					640			
	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met			
					645					650					655				
	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys						
				660					665										

<210> 14
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 14

	Pro	Glu	Leu	Ser	Leu	Lys	Gly	Thr	Gln	His	Ile	Met	Gln	Ala	Gly	Gln			
	1				5					10					15				

[0022]

	Thr	Leu	His	Leu	Gln	Cys	Arg	Gly	Glu	Ala	Ala	His	Lys	Trp	Ser	Leu			
				20					25					30					

	Pro	Glu	Met	Val	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Lys	Ser			
			35					40					45						

Ala

<210> 15
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 15

	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr			
	1				5					10					15				

	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys			
				20					25					30					

	Arg	Ile	Ile	Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr			
--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--	--	--

	35		40		45														
	Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His			
	50					55						60							
	<210>	16																	
	<211>	98																	
	<212>	PRT																	
	<213>	智人 (Homo sapiens)																	
	<400>	16																	
	Ile	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Pro	Arg	Pro	Val	Lys	Leu	Leu	Arg	Gly			
	1				5					10					15				
	His	Thr	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Thr	Thr	Pro	Leu	Asn	Thr	Arg			
				20					25					30					
	Val	Gln	Met	Thr	Trp	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Lys	Asn	Lys	Arg	Ala	Ser			
			35					40					45						
	Val	Arg	Arg	Arg	Ile	Asp	Gln	Ser	Asn	Ser	His	Ala	Asn	Ile	Phe	Tyr			
	50						55					60							
[0023]	Ser	Val	Leu	Thr	Ile	Asp	Lys	Met	Gln	Asn	Lys	Asp	Lys	Gly	Leu	Tyr			
	65					70					75				80				
	Thr	Cys	Arg	Val	Arg	Ser	Gly	Pro	Ser	Phe	Lys	Ser	Val	Asn	Thr	Ser			
					85					90					95				
	Val	His																	
	<210>	17																	
	<211>	87																	
	<212>	PRT																	
	<213>	智人 (Homo sapiens)																	
	<400>	17																	
	Thr	Val	Lys	His	Arg	Lys	Gln	Gln	Val	Leu	Glu	Thr	Val	Ala	Gly	Lys			
	1				5					10					15				
	Arg	Ser	Tyr	Arg	Leu	Ser	Met	Lys	Val	Lys	Ala	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu			
				20					25					30					
	Val	Val	Trp	Leu	Lys	Asp	Gly	Leu	Pro	Ala	Thr	Glu	Lys	Ser	Ala	Arg			

<400> 19

Pro Asn Gly Phe His Val Asn Leu Glu Lys Met Pro Thr Glu Gly Glu
1 5 10 15

Asp Leu Lys Leu Ser Cys Thr Val Asn Lys Phe Leu Tyr Arg Asp Val
20 25 30

Thr Trp Ile Leu Leu Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr Met His Tyr Ser
35 40 45

Ile Ser Lys Gln Lys Met Ala Ile Thr Lys Glu His Ser Ile Thr Leu
50 55 60

Asn Leu Thr Ile Met Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Cys Arg Ala Arg Asn Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln
85 90

[0025] <210> 20
<211> 87
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 20

Pro Tyr Leu Leu Arg Asn Leu Ser Asp His Thr Val Ala Ile Ser Ser
1 5 10 15

Ser Thr Thr Leu Asp Cys His Ala Asn Gly Val Pro Glu Pro Gln Ile
20 25 30

Thr Trp Phe Lys Asn Asn His Lys Ile Gln Gln Glu Pro Gly Ile Ile
35 40 45

Leu Gly Pro Gly Ser Ser Thr Leu Phe Ile Glu Arg Val Thr Glu Glu
50 55 60

Asp Glu Gly Val Tyr His Cys Lys Ala Thr Asn Gln Lys Gly Ser Val
65 70 75 80

Glu Ser Ser Ala Tyr Leu Thr
85

<210> 21
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 21

Asn Thr Thr Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp
 1 5 10 15

Leu Trp Pro Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr
 20 25 30

Glu Cys Ser Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val
 35 40 45

Ile Gly Asn Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp
 50 55 60

Leu
 65

[0026]

<210> 22
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 22

Asn Lys Asn Lys Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn
 1 5 10 15

Leu Asn Val Ser Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro
 20 25 30

Asp Gly Asn Arg Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro
 35 40 45

Ser Tyr Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile
 50 55 60

Asn Asp Glu
 65

<210> 23
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 23

Tyr Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly
20 25 30

Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys
35 40 45

Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys
50 55 60

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

Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser
85 90 95

Thr

[0027]

<210> 24

<211> 86

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 24

Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val
1 5 10 15

Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro
20 25 30

Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr
35 40 45

Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp
50 55 60

Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys
65 70 75 80

Gln Ser His Val Val Ser
85

<210> 25
<211> 128
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 25

Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val Asp Ser Tyr Gln
1 5 10 15

Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Pro Pro
20 25 30

Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu Glu Cys Ala Asn
35 40 45

Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr Pro Cys Glu Glu
50 55 60

[0028] Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys Ile Glu Val Asn
65 70 75 80

Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Thr
85 90 95

Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr Lys Cys Glu Ala
100 105 110

Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser Phe His Val Thr
115 120 125

<210> 26
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 26

Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln Pro Thr Glu Gln Glu Ser
1 5 10 15

Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser Thr Phe Glu Asn Leu Thr
20 25 30

Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro Ile His Val Gly Glu Leu
35 40 45

Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr Leu Trp Lys Leu Asn Ala
50 55 60

Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile Met Glu Leu Lys
65 70 75 80

Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys Leu Ala Gln Asp
85 90 95

Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val Arg Gln Leu Thr
100 105 110

<210> 27

<211> 87

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

[0029]

<400> 27

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

Ser Ile Glu Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile
20 25 30

Met Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val
35 40 45

Leu Lys Asp Gly Asn Arg Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu
50 55 60

Asp Glu Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala
65 70 75 80

Lys Val Glu Ala Phe Phe Ile
85

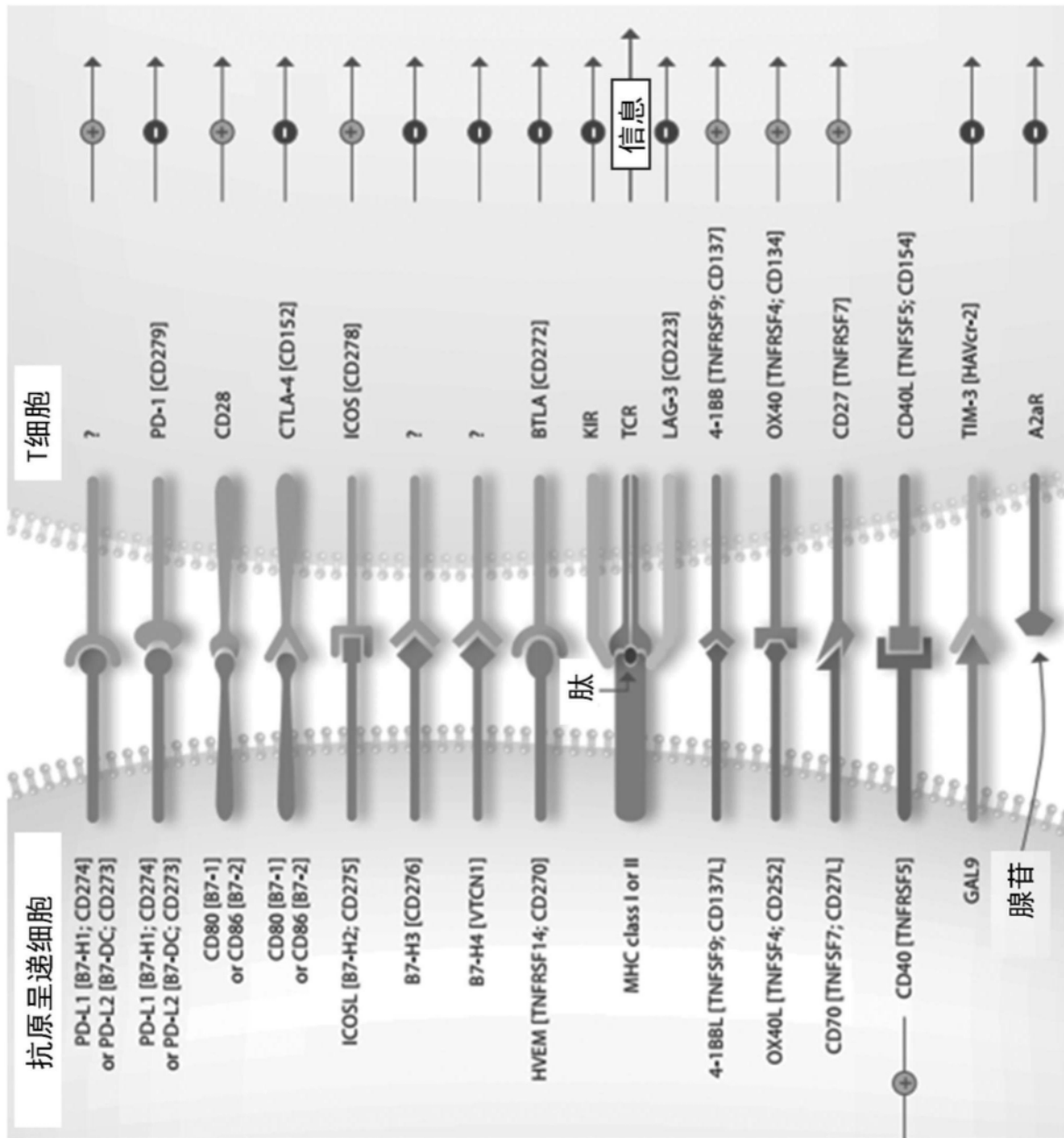


图1

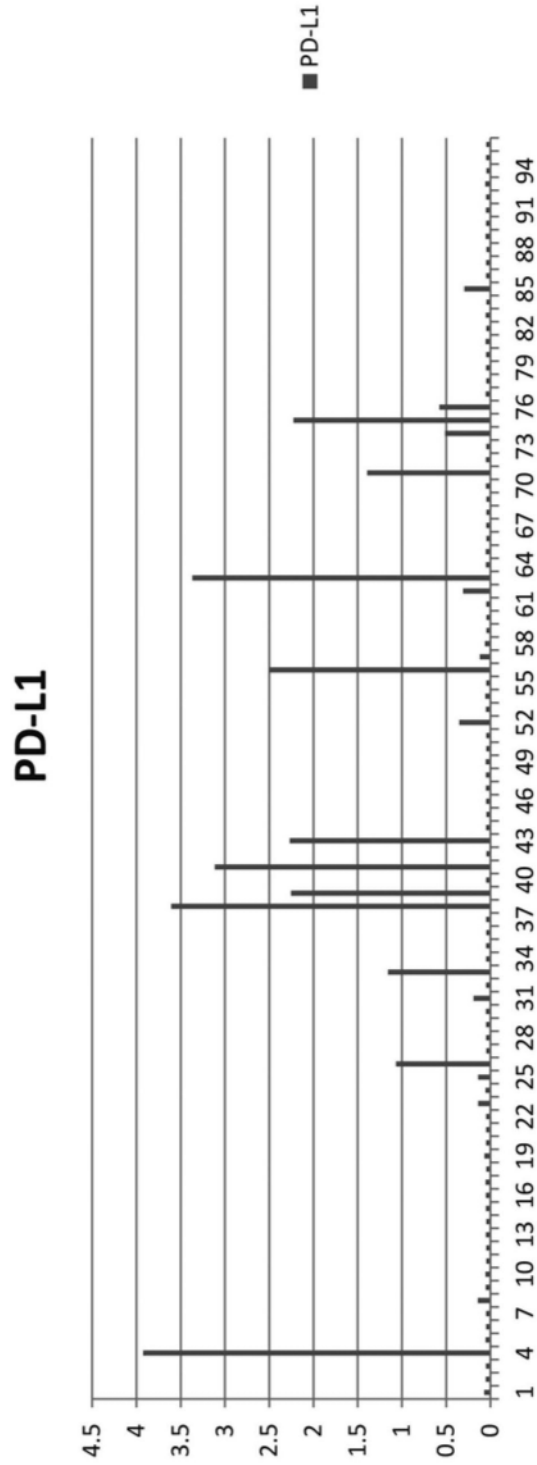


图2A



图2B

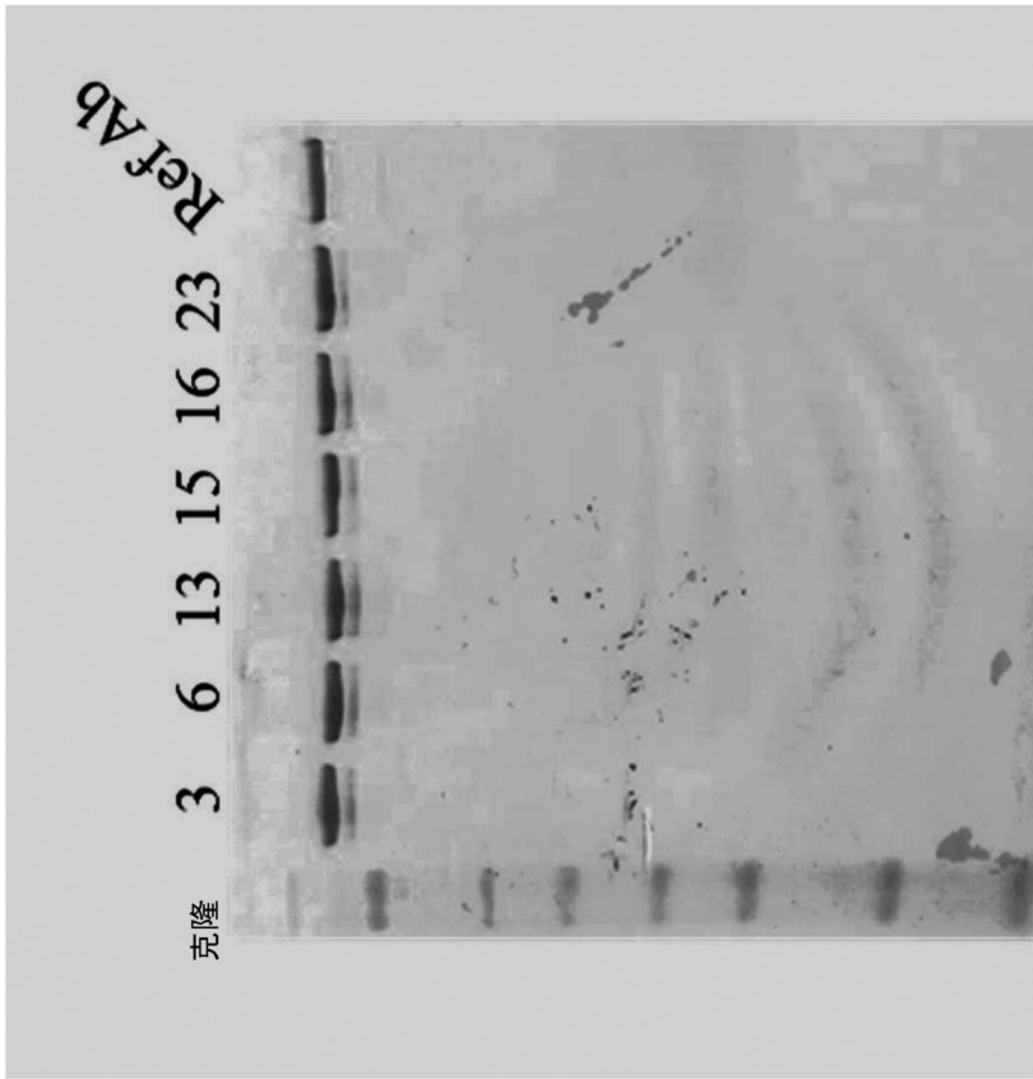


图3

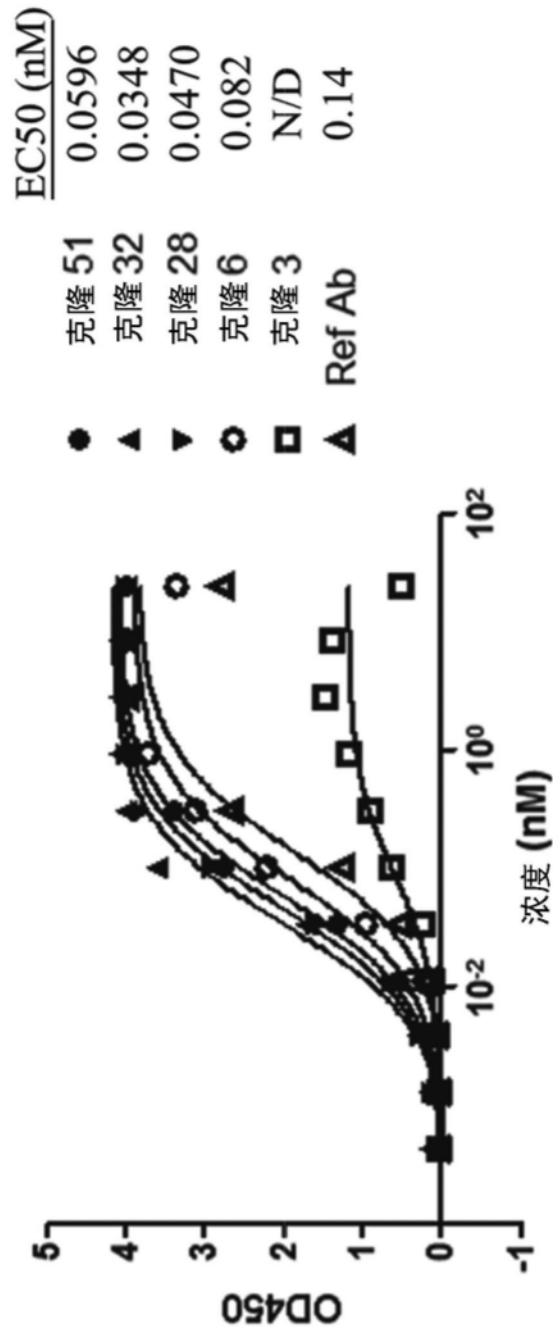


图4

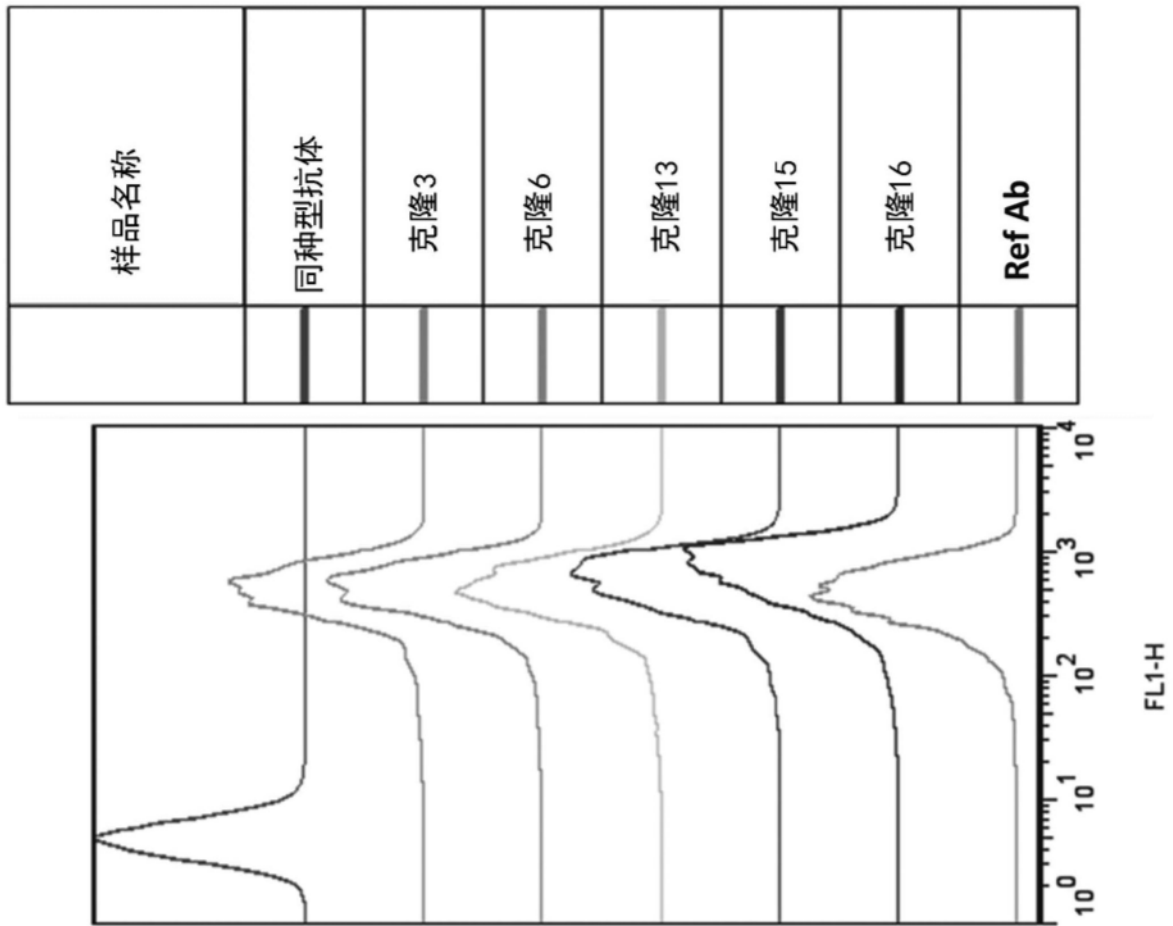


图5

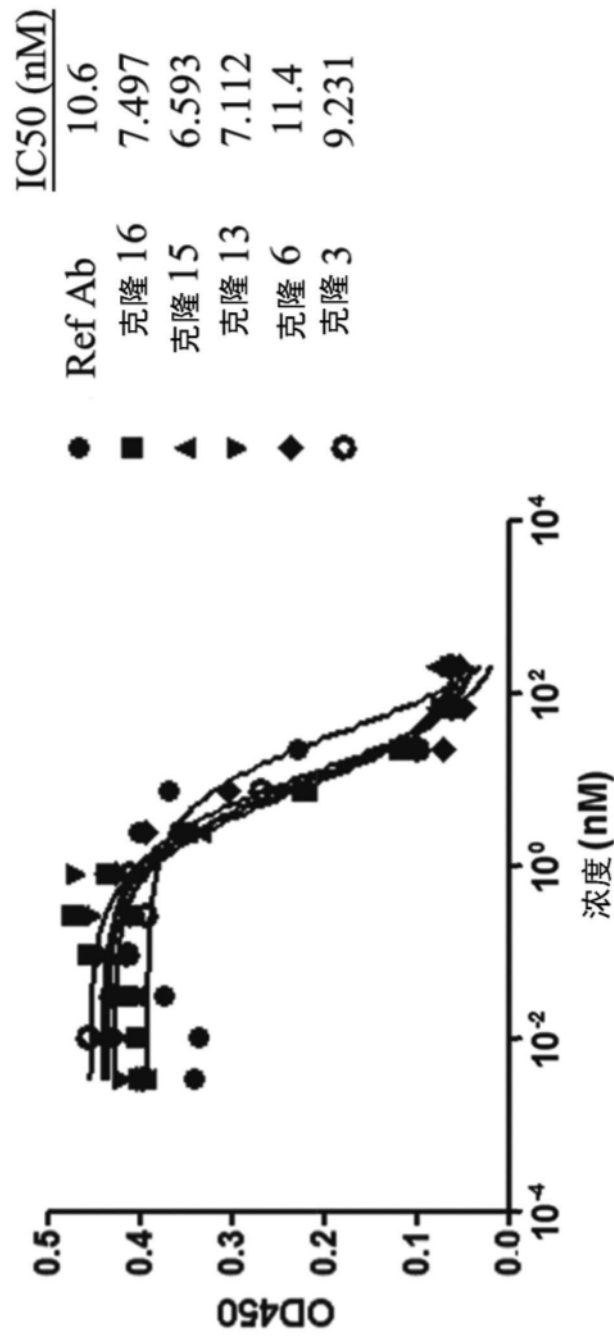


图9

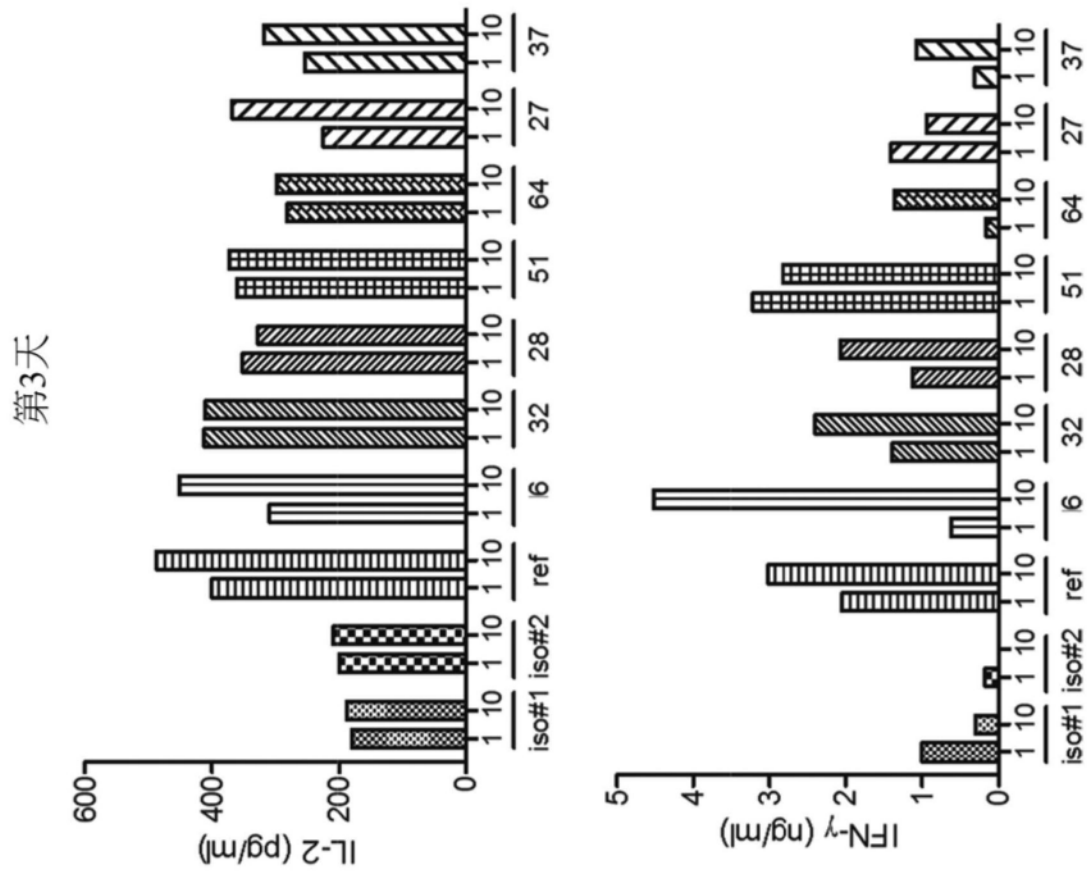


图7A

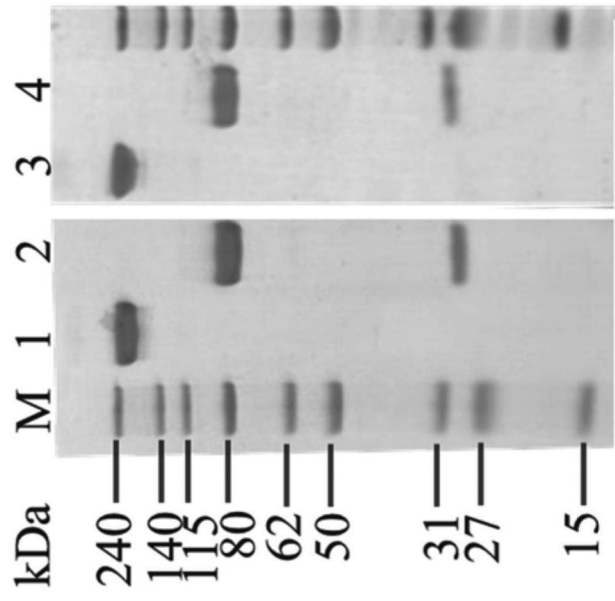


图9

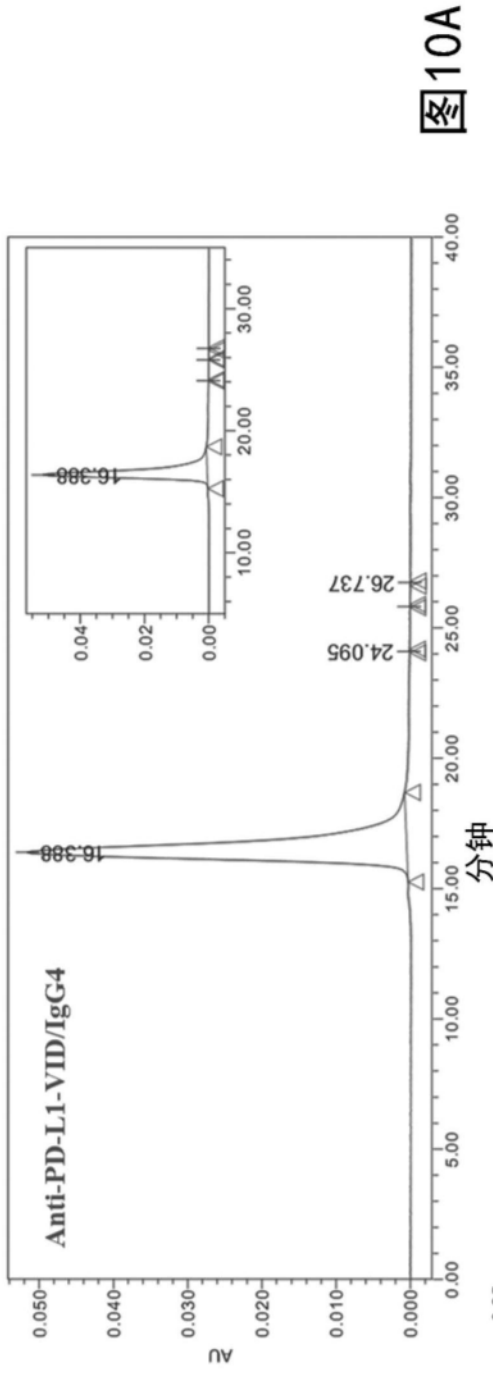


图10A

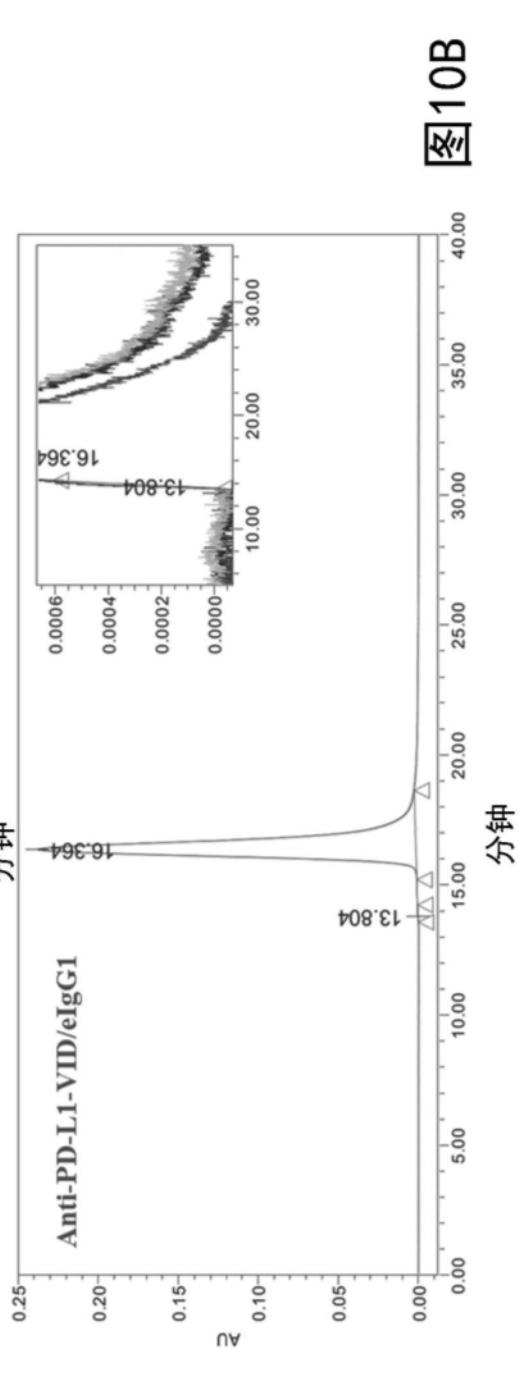


图10B

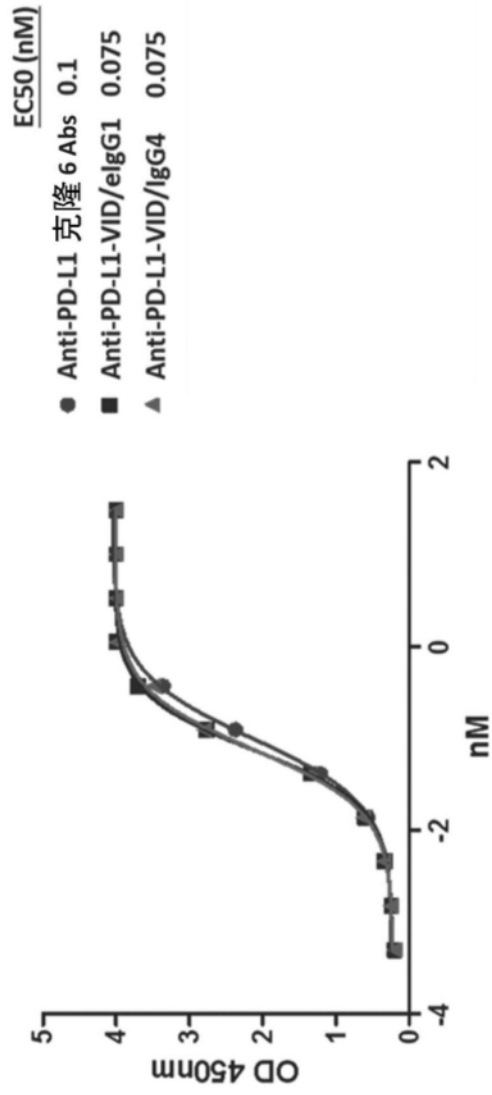


图11A

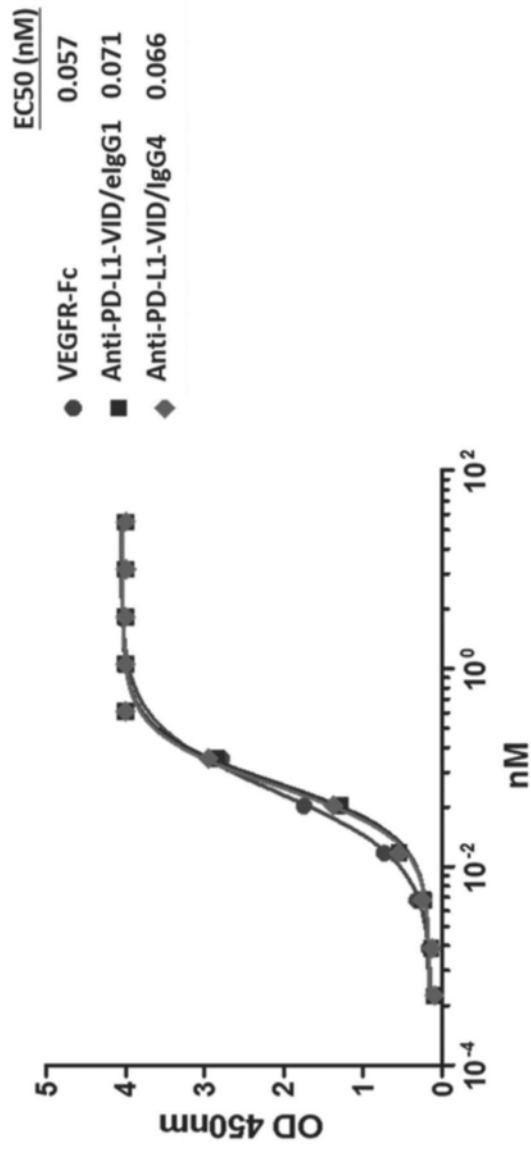


图11B

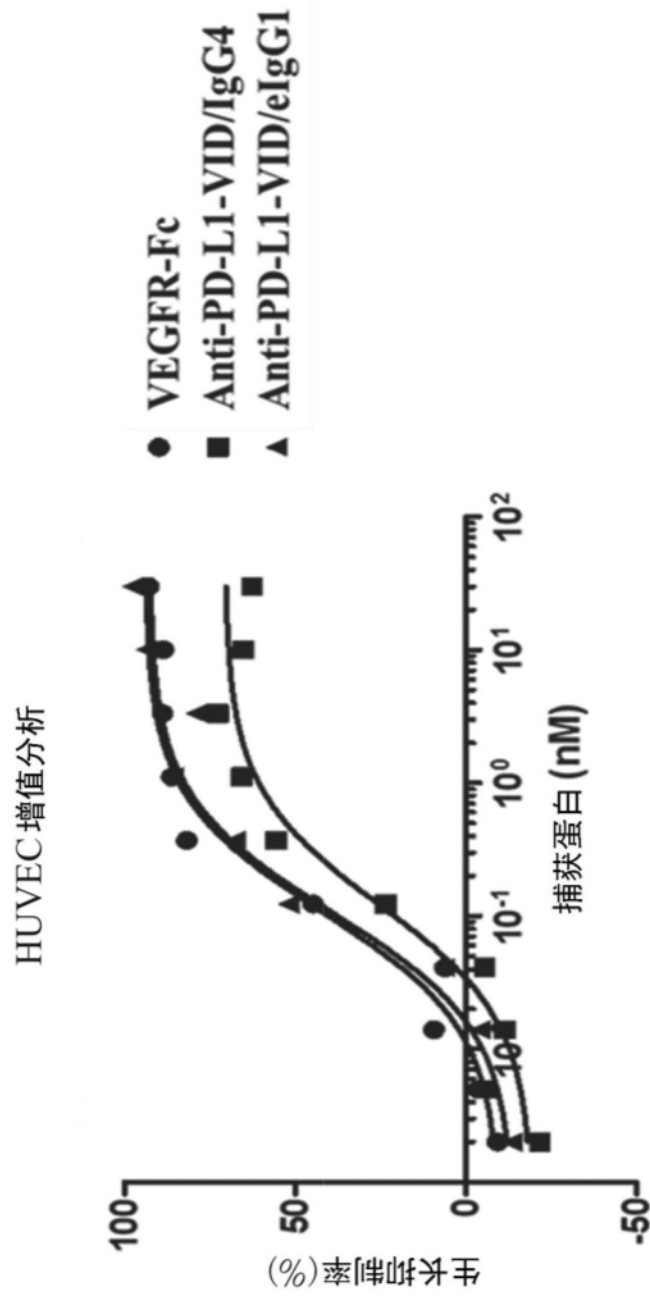


图12

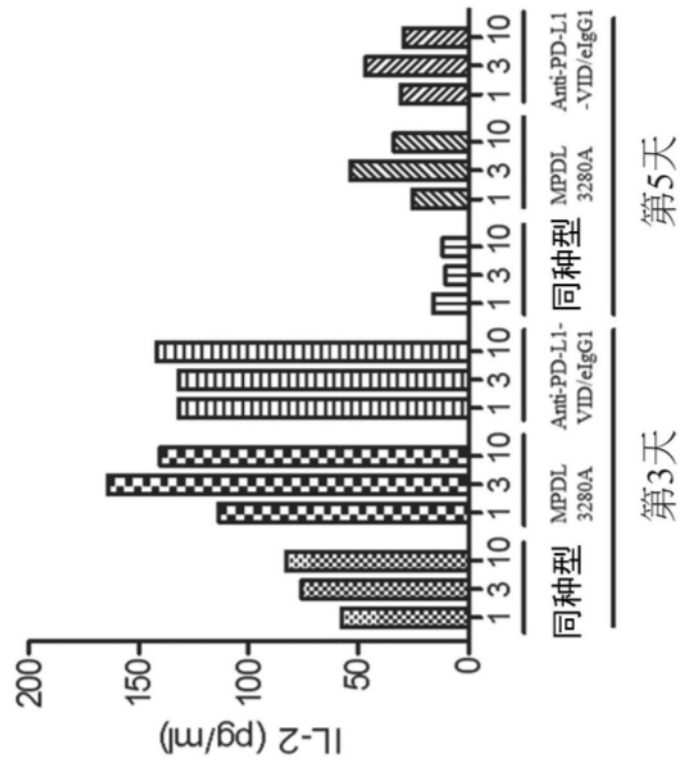


图13A

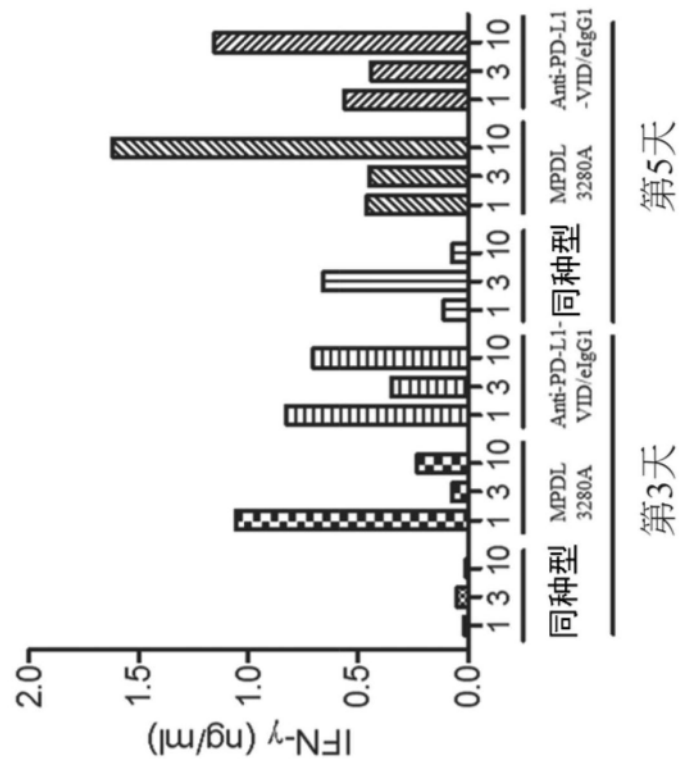
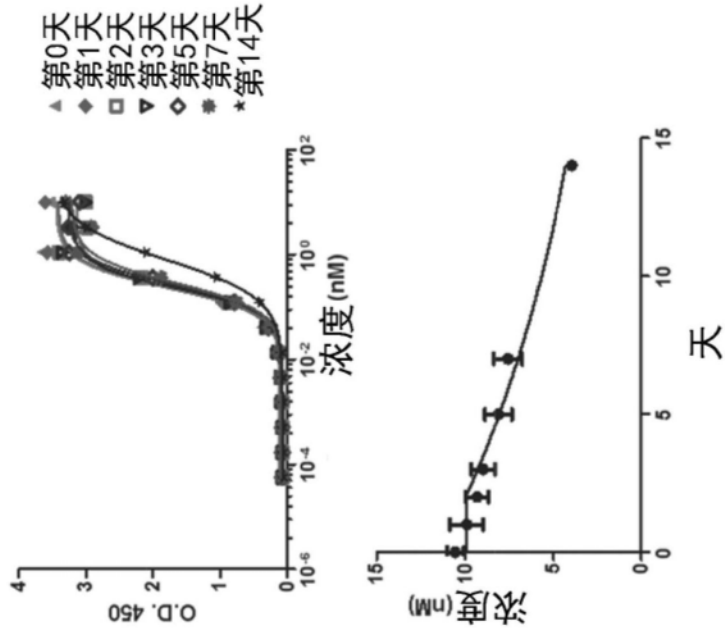


图13B

人类血清

对VEGF的结合活性

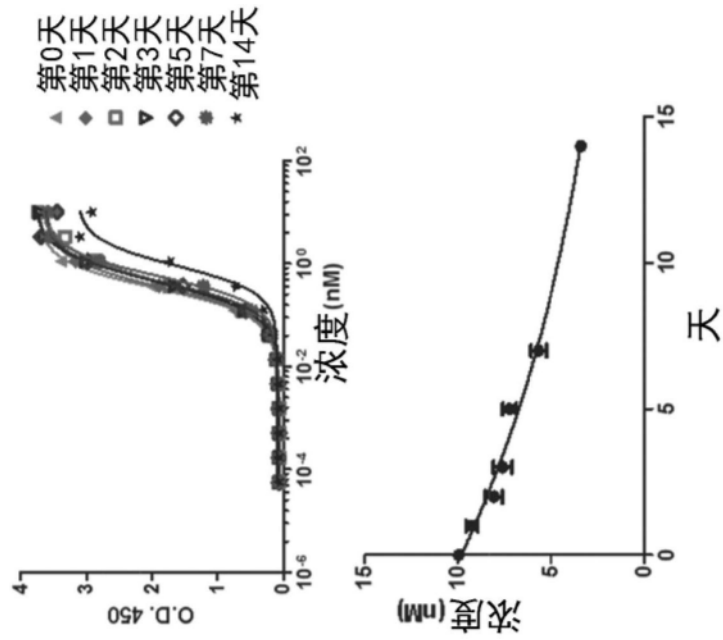


半衰期：11.9 天

图14A

小鼠血清

对VEGF的结合活性



半衰期：9.2 天

图14B

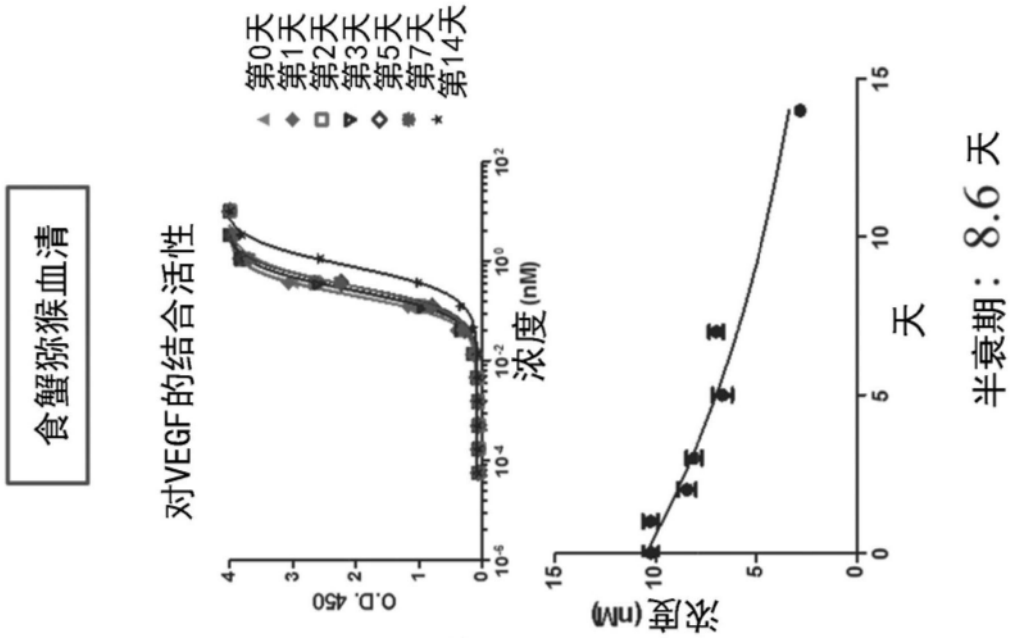


图14C

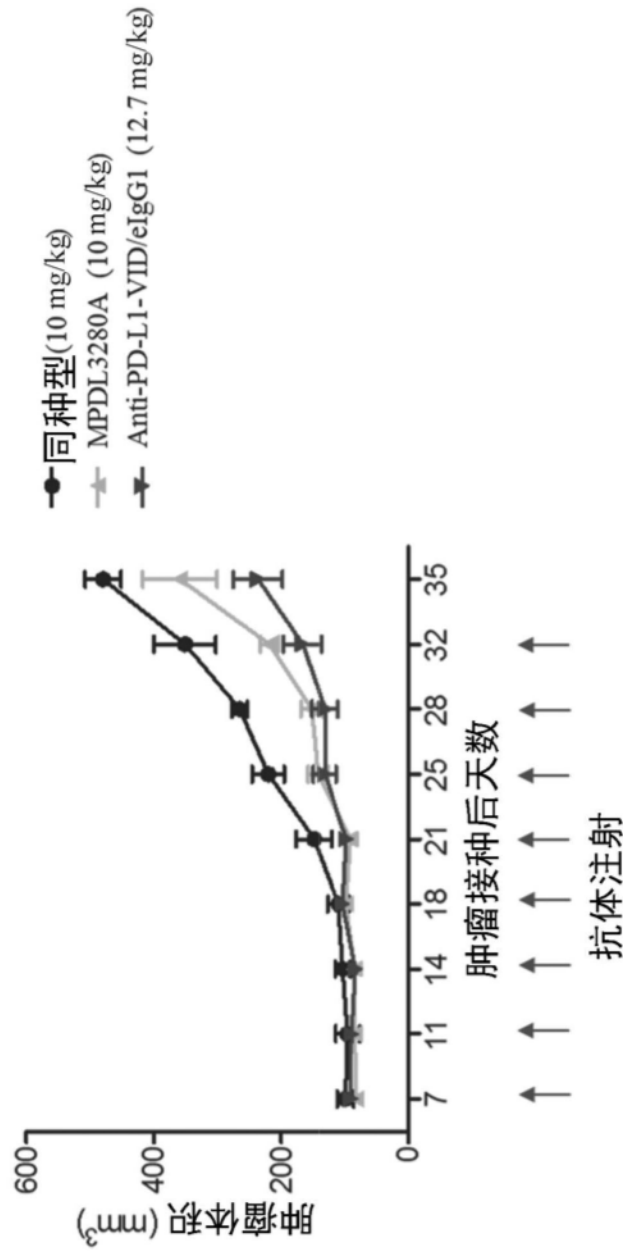


图15A

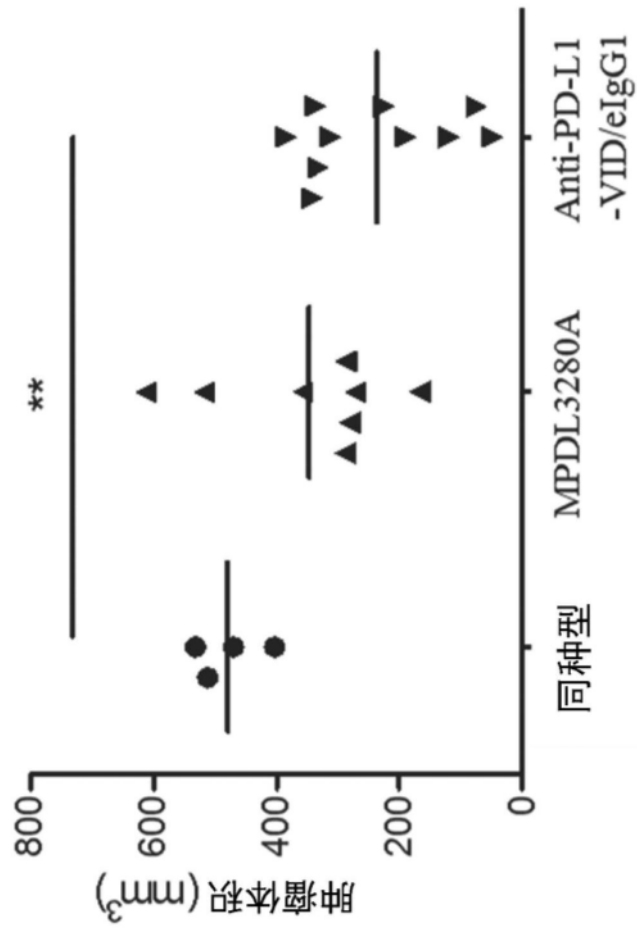


图15B

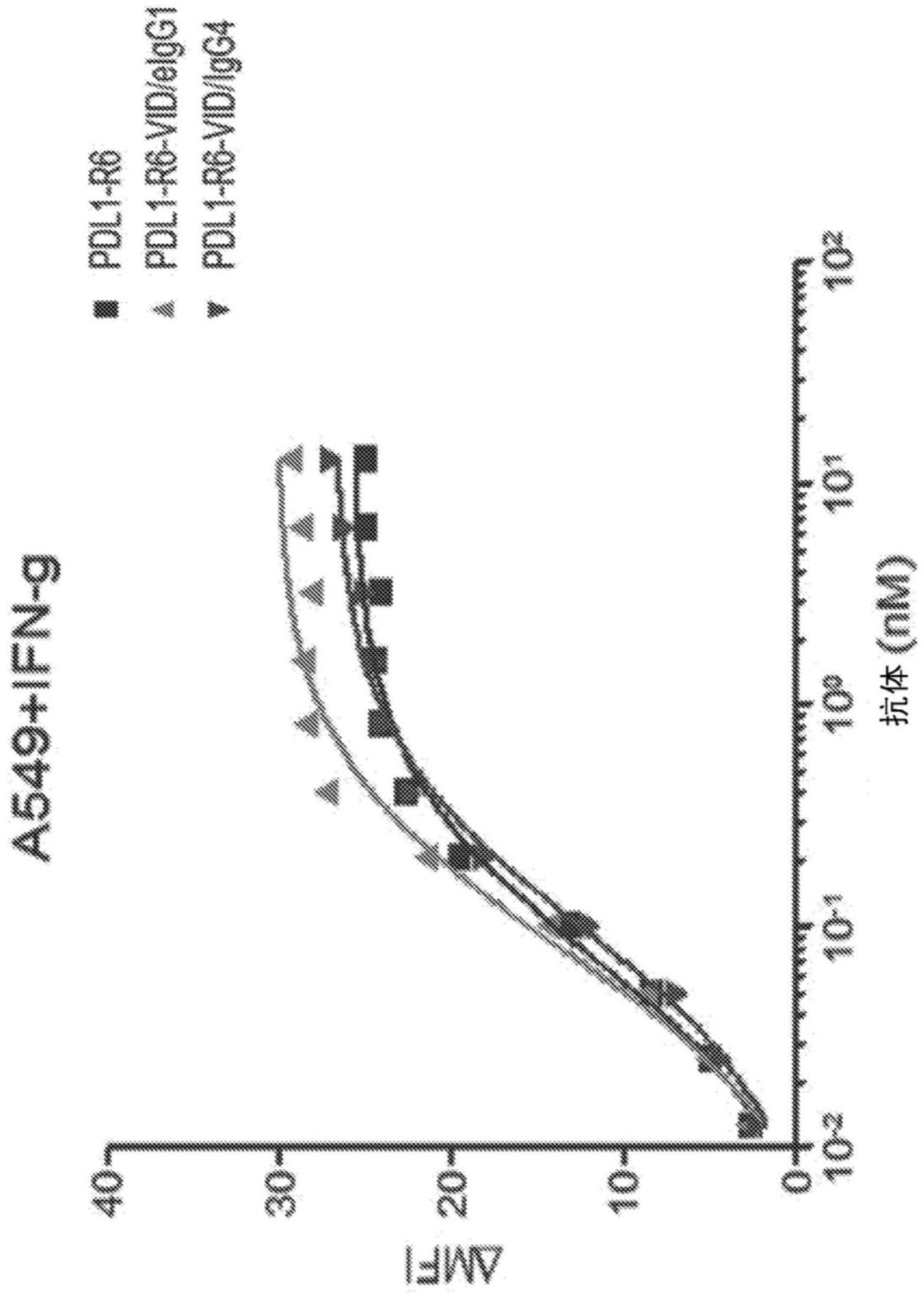


图16A

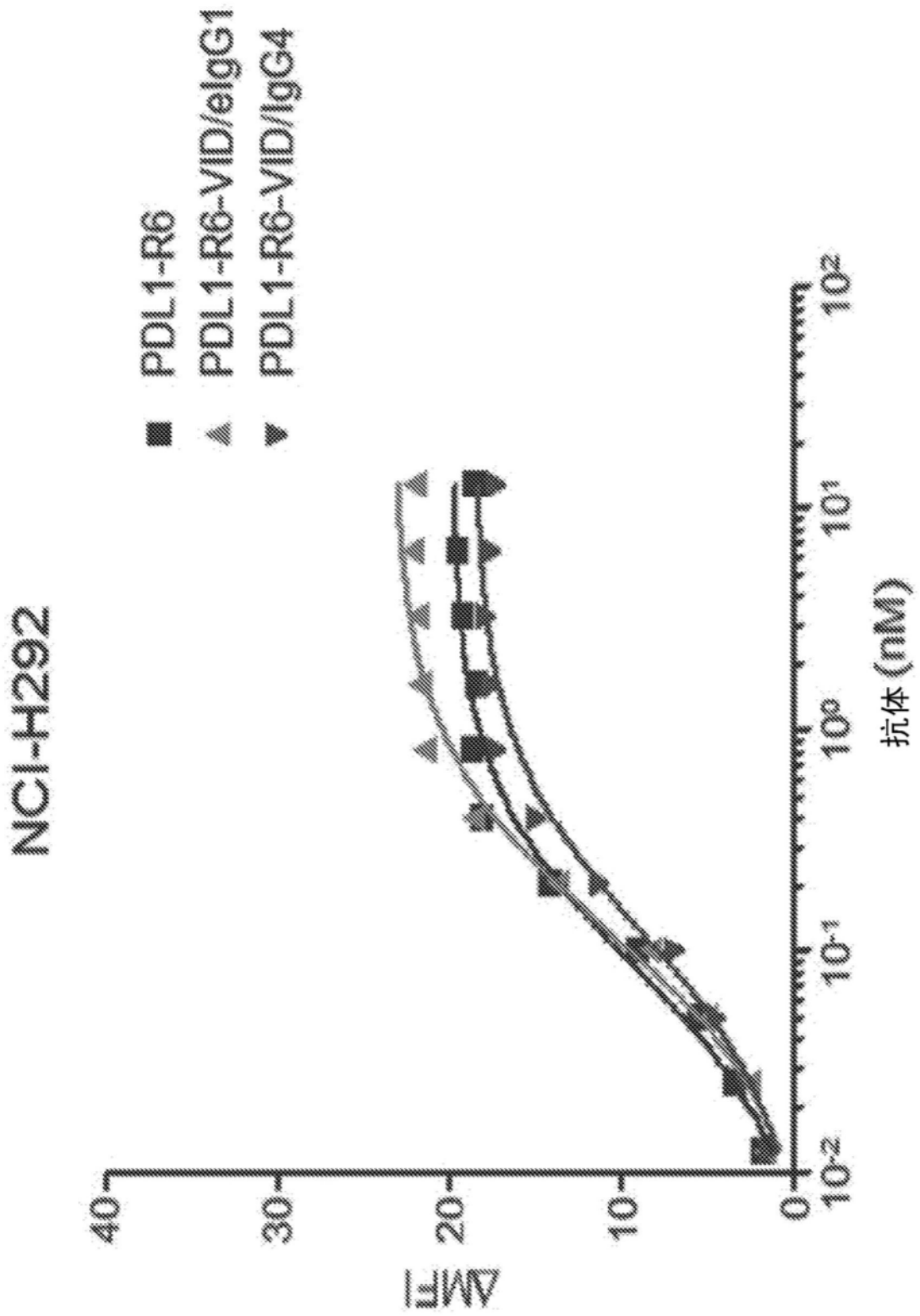


图16B

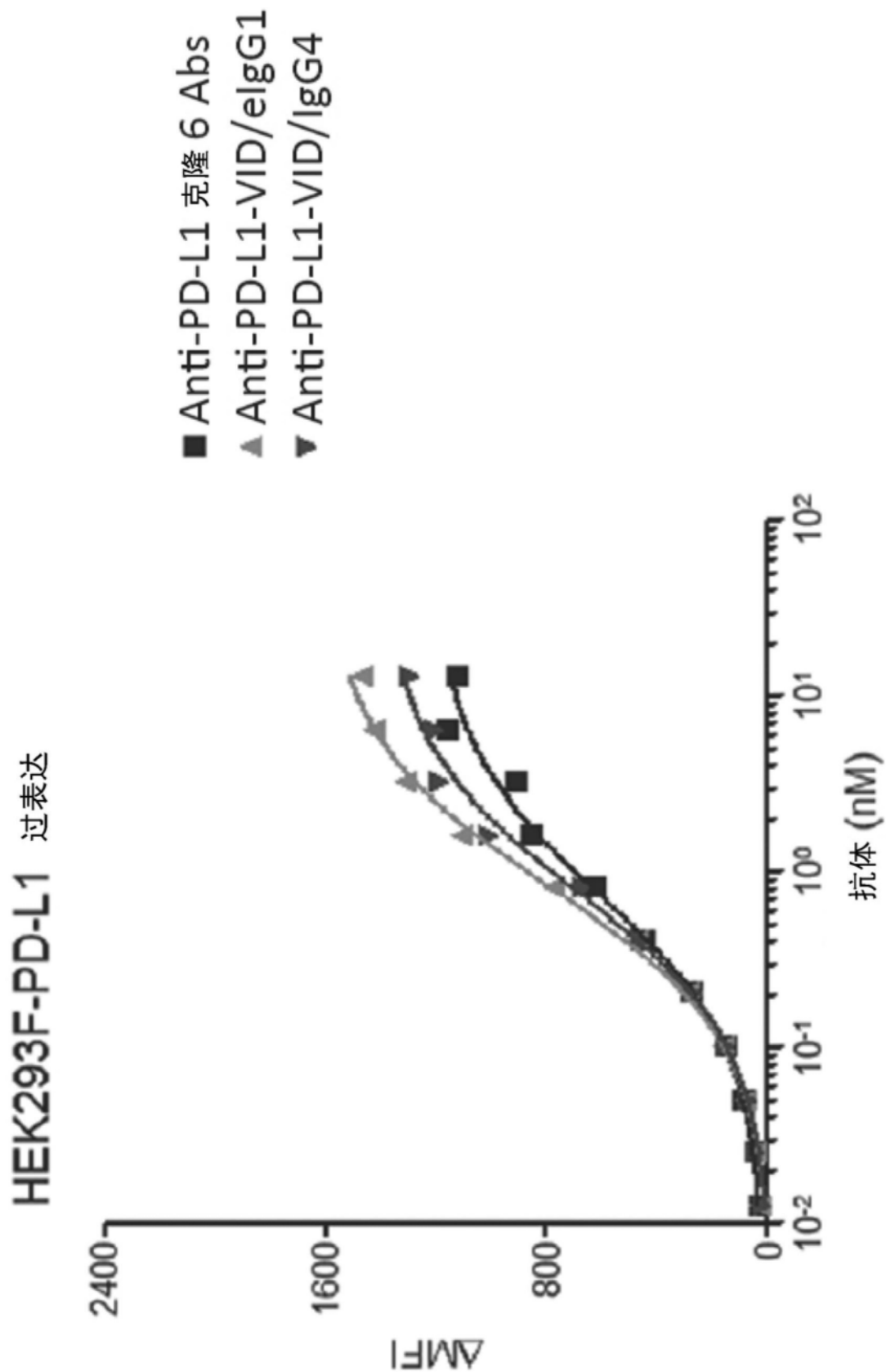


图16C