202235104

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202235104 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：110143071 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 11 月 18 日

(51)Int. Cl.： *A61K39/395 (2006.01)* *C07K14/47 (2006.01)*
C07K14/725 (2006.01) *C07K16/28 (2006.01)*
C07K16/30 (2006.01) *C12N5/20 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2020/11/18 世界智慧財產權組織 PCT/CN2020/129918
2021/01/22 世界智慧財產權組織 PCT/CN2021/073341

(71)申請人：中國大陸商蘇州創勝醫藥集團有限公司 (中國大陸) SUZHOU TRANSCENTA THERAPEUTICS CO., LTD. (CN)
中國大陸

(72)發明人：錢 雪明 QIAN, XUEMING (US) ；李紅俊 LI, HONGJUN (CN) ；滕菲 TENG, FEI (CN) ；郭歡歡 GUO, HUANHUAN (CN) ；顧 怡 GU, YI (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：116 項 圖式數：34 共 335 頁

(54)名稱

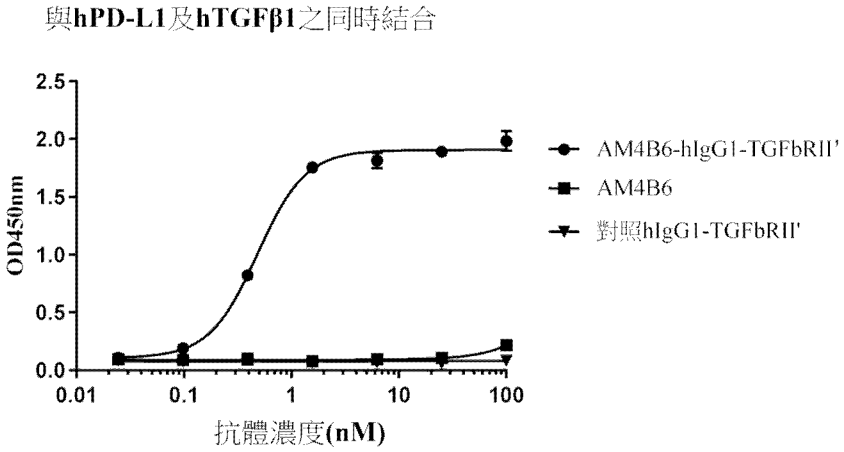
雙功能分子

(57)摘要

本發明提供包含與 TGFβ 結合部分、IL-1 結合部分、免疫刺激性多肽(例如，可溶性 LAG3 或可溶性 CD4)或 CD47 結合部分連接之 PD-L1 結合部分的蛋白質、編碼該等蛋白質之經分離聚核苷酸、包含該等蛋白質之醫藥組合物及該等蛋白質、該等聚核苷酸、該等醫藥組成物之用途。

The present disclosure provides proteins comprising a PD-L1-binding moiety linked to a TGFβ-binding moiety, IL-1-binding moiety, immunostimulatory polypeptides (e.g., soluble LAG3 or soluble CD4) or CD47-binding moiety, isolated polynucleotides encoding the same, pharmaceutical compositions comprising the same and the uses thereof.

指定代表圖：


與hPD-L1及hTGFβ1之同時結合
OD450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度(nM)
AM4B6-hIgG1-TGFbRII'
AM4B6
對照hIgG1-TGFbRII'

【圖13】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

雙功能分子

【英文發明名稱】

BI-FUNCTIONAL MOLECULES

【中文】

本發明提供包含與TGFβ結合部分、IL-1結合部分、免疫刺激性多肽(例如，可溶性LAG3或可溶性CD4)或CD47結合部分連接之PD-L1結合部分的蛋白質、編碼該等蛋白質之經分離聚核苷酸、包含該等蛋白質之醫藥組合物及該等蛋白質、該等聚核苷酸、該等醫藥組成物之用途。

【英文】

The present disclosure provides proteins comprising a PD-L1-binding moiety linked to a TGFβ-binding moiety, IL-1-binding moiety, immunostimulatory polypeptides (e.g., soluble LAG3 or soluble CD4) or CD47-binding moiety, isolated polynucleotides encoding the same, pharmaceutical compositions comprising the same and the uses thereof.

【指定代表圖】

圖13

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

雙功能分子

【英文發明名稱】

BI-FUNCTIONAL MOLECULES

【技術領域】

【0001】 本發明大體上關於靶向免疫檢查點分子(例如，PD-L1)且阻斷抗腫瘤免疫抑制(ATIS)細胞介素(例如，IL-1或TGFβ)活性或刺激免疫之新穎雙功能分子。

【先前技術】

【0002】 計劃性死亡1(PD-1)及其配位體PD-L1及PD-L2為T細胞介導之免疫反應之調節中的關鍵共抑制分子。PD-1為一種在末梢組織中之經活化T細胞之表面上表現之具有單個胞外免疫球蛋白超家族(IgSF) V-set域之I型膜蛋白(Zhang X等人,Immunity, 2004, 20(3): 337-347)。PD-L1及PD-L2通常在樹突狀細胞及巨噬細胞上表現，且其胞外域係由膜遠端IgSF V-set域及膜近端IgSF C-set域構成(Latchman Y等人, Nature Immunology, 2001, 2(3): 261-268)。PD-1與其兩個配位體之連接係經由PD-1之含有基於免疫受體酪胺酸之抑制模體及基於免疫受體酪胺酸之轉換模體的細胞質域啟動共抑制性信號傳導，因此引起SHP磷酸酶活化，從而藉由使參與信號傳導之效應分子去磷酸化來下調TCR信號傳導(Chemnitz J M等人, J. Immunol., 2004, 173(2): 945-954)。因此，PD-1信號傳導防止過度或有害的炎症且在正常條件下維持對自身抗原之免疫耐受性(Collins A V等人, Immunity, 2002, 17(2): 201-210)。

【0003】 PD-L1亦經由與另一受體B7.1 (亦稱為B7-1或CD80)相互作用來負調節T細胞功能。PD-L1/PD-1及PD-L1/B7.1複合物之形成負調節T細胞受體信號傳導，隨後引起T細胞活化之下調及對抗腫瘤免疫活性之抑制(Butte M J等人, Immunity, 2007, 27(1): 111-122)。

【0004】 PD-L1經常在不同腫瘤中過度表現且其與T細胞上之PD-1之相互作用使得癌細胞能夠避開T細胞介導之免疫反應(Okazaki T等人, Nature immunology, 2013, 14(12): 1212-1218)。因此，阻斷PD-1/PD-L1相互作用可恢復T細胞活化及抗腫瘤反應(Callahan M K等人, Immunity, 2016, 44(5): 1069-1078)。諸如阿特珠單抗(atezolizumab) (Tecentriq®) (Rittmeyer A等人, The Lancet, 2017, 389(10066): 255-265)、阿維魯單抗(avelumab) (Bavencio®) (Hamilton G等人, Expert Opinion on Biological Therapy, 2017, 17(4): 515-523)及德瓦魯單抗(durvalumab) (Imfinzi®) (Brower V, The Lancet Oncology, 2016, 17(7): e275)之基於抗體之PD-1/PD-L1阻斷療法的成功在對抗人類癌症，尤其實體瘤方面提供了突破。儘管已顯示由腫瘤細胞及/或浸潤性免疫細胞進行之PD-L1表現與對PD-1/PD-L1靶向療法之臨床反應之間存在關聯，但此關聯並非完美無缺(Herbst, R.等人, Nature 515, 563–567 (2014)；Taube J M等人, Clinical cancer research, 2014, 20(19): 5064-5074)。只有少數PD-L1陽性腫瘤對此等治療有反應，然而某些PD-L1陰性腫瘤亦對治療有反應。此增加了額外因素控制患者對PD-1/PD-L1靶向療法之反應之可能性，且必須鑑定額外預測性生物標誌物以改善此等藥劑之臨床使用。

【0005】 Mariathasan S等人發現，缺乏反應係與纖維母細胞中轉型生長因子β (TGF-β)信號傳導之特徵相關(Mariathasan S等人, Nature,

2018, 554(7693): 544-548)。David JM等人亦發現，作為一種已知誘導上皮間質轉化(EMT)且抑制抗腫瘤免疫之多效性細胞介素，TGF-β可上調多種上皮NSCLC細胞株中之腫瘤PD-L1表現，且上調係與作為TGF-β信號傳導之關鍵下游效應子之Smad2的磷酸化有關(David J M等人, Oncoimmunology, 2017, 6(10): e1349589)。在小鼠中，TGF-β阻斷抗體及抗PD-L1之治療性投與減少了基質細胞中之TGF-β信號傳導，促進了T細胞滲透至腫瘤中心中，且激發強烈抗腫瘤免疫及腫瘤消退(Mariathasan S等人, Nature, 2018, 554(7693): 544-548)。

【0006】 然而，抗PD-L1抗體之低親和力仍對達成高治療功效及低毒副作用提出了挑戰。

【0007】 因此，需要具有針對PD-L1之高結合親和力、經改善之治療功效及經降低之毒副作用的治療分子。

【發明內容】

【0008】 在整個本發明中，冠詞「一(a/an)」及「該」在本文中用於指該冠詞之文法賓語中之一個或超過一個(亦即，至少一個)。舉例而言，「一抗體」意謂一種抗體或超過一種抗體。

【0009】 在一個態樣中，本發明提供了包含與免疫檢查點分子結合之第一部分及阻斷介白素-1(IL-1)活性之第二部分的雙功能分子。

【0010】 在某些實施例中，第一部分包含免疫刺激性檢查點分子之促效劑，該免疫刺激性檢查點分子視情況選自由以下組成之群：CD27、CD70、CD28、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、CD40、CD40L (CD154)、CD122、CD137、CD137L、OX40 (CD134)、OX40L (CD252)、GITR、ICOS (CD278) 及 ICOSLG (CD275)、CD2、ICAM-1、LFA-1

(CD11a/CD18)、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160及CD83。

【0011】在某些實施例中，第一部分包含免疫抑制性檢查點分子之拮抗劑，該免疫抑制性檢查點分子視情況選自由以下組成之群：A2AR、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、BTLA (CD272)、CTLA-4 (CD152)、IDO1、IDO2、TDO、KIR、LAG3、NOX2、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 (CD328)、TIGIT、PVR (CD155)、SIGLEC9 (CD329)、CD160、LAIR1、2B4 (CD244)、CD47及B7-H5。

【0012】在某些實施例中，免疫檢查點分子為PD-L1。

【0013】在某些實施例中，第一部分包含針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段，且第二部分包含IL-1結合部分或IL-1受體(IL-1R)結合部分。

【0014】在某些實施例中，IL-1結合部分包含IL-1R或其IL-1結合片段或變異體、或針對IL-1之抗體或其抗原結合片段。

【0015】在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區及/或輕鏈可變區係來自選自由以下組成之群之抗IL-1α抗體：XB2001、魯吉珠單抗(lutikizumab)、LY2189102及貝邁奇單抗(bermekimab)，或來自選自由以下組成之群之抗IL-1β抗體：SSGJ-613、CDP484、卡那單抗(canakinumab)及吉伏組單抗(gevokizumab)。

【0016】在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 104或SEQ ID NO: 112之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 105或SEQ ID

NO: 113之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 106或SEQ ID NO: 114之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 107或SEQ ID NO: 115之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 108或SEQ ID NO: 116之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 109或SEQ ID NO: 117之序列的LCDR3。

【0017】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 104之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 105之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 106之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 107之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 108之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 109之序列的LCDR3。

【0018】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 112之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 113之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 114之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 115之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 116之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 117之序列的LCDR3。

【0019】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 110及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 111及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0020】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包

含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 102及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 103及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0021】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 110及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 111及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0022】 在某些實施例中，IL-1R結合部分包含介白素-1受體拮抗劑或其片段或變異體、或針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段。

【0023】 在某些實施例中，針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區及/或輕鏈可變區係來自選自由以下組成之群之抗體：司柏索利單抗(spesolimab)、艾特利單抗(astegolimab)、伊姆西多單抗(imsidolimab)、AMG 108、邁瑞利單抗(melrilimab)、尼達利單抗(nidanilimab)、MEDI8968、REGN6490、HB0034及CSC012。

【0024】 在另一態樣中，雙功能分子包含與PD-L1結合之第一部分及a)阻斷免疫抑制性細胞介素活性或b)刺激免疫之第二部分，其中第一部分包含有包含重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區之針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段，其中重鏈可變區包含：

a) HCDR1，其包含**DYYMN** (SEQ ID NO: 1)或與**DYYMN**具有至少80%序列一致性之同源序列，

b) HCDR2，其包含**DINPNNX$_1$X$_2$TX$_3$YNHKFKG** (SEQ ID NO: 19)或與**DINPNNX$_1$X$_2$TX$_3$YNHKFKG**具有至少80%序列一致性之同源序列，以及

c) HCDR3，其包含**WGDGPFAY** (SEQ ID NO: 3)或與**WGDGPFAY**具有至少80%序列一致性之同源序列，且/或

其中輕鏈可變區包含：

d) LCDR1，其包含選自由**KASQNVX$_4$X$_5$X$_6$VA** (SEQ ID NO: 20)或與**KASQNVX$_4$X$_5$X$_6$VA**具有至少80%序列一致性之同源序列組成之群之序列，

e) LCDR2，其包含選自由**SX$_7$SX$_8$RYT** (SEQ ID NO: 21)或與**SX$_7$SX$_8$RYT**具有至少80%序列一致性之同源序列組成之群之序列，以及

f) LCDR3，其包含選自由**QQYSNYPT** (SEQ ID NO: 6)或與**QQYSNYPT**具有至少80%序列一致性之同源序列組成之群之序列；

其中X$_1$為G或A，X$_2$為G或D或Q或E或L，X$_3$為S或M或Q或L或V，X$_4$為G或P或K，X$_5$為A或G，X$_6$為A或I，X$_7$為A或N或R或V，且X$_8$為N或H或V或D。

【0025】 在某些實施例中，重鏈可變區包含：

a) HCDR1，其包含SEQ ID NO: 1之序列，

b) HCDR2，其包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 18，以及

c) HCDR3，其包含SEQ ID NO: 3之序列，

且/或

輕鏈可變區包含：

d) LCDR1，其包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 9，

e) LCDR2，其包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11及SEQ ID NO: 12，以及

f) LCDR3，其包含SEQ ID NO: 6之序列。

【0026】 在某些實施例中，重鏈可變區選自由以下組成之群：

a)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 2之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；

b)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 13之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；

c)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 14之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；

d)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 15之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；

e)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 17之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；以及

f)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 18之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區。

【0027】 在某些實施例中，輕鏈可變區選自由以下組成之群：

a)包含有包含SEQ ID NO: 4之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 5之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區；

b)包含有包含SEQ ID NO: 9之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 5之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區；

c)包含有包含SEQ ID NO: 8之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 5之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區；

d)包含有包含SEQ ID NO: 4之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 12之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區；以及

e)包含有包含SEQ ID NO: 4之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 11之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區。

【0028】 在某些實施例中，針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段進一步包含重鏈HFR1、HFR2、HFR3及HFR4中之一或多個及/或輕鏈LFR1、LFR2、LFR3及LFR4中之一或多個，其中：

a) HFR1包含胺基酸序列 **QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX$_9$FT** (SEQ ID NO: 40)或與其具有至少80%序列一致性之同源序列，

b) HFR2包含胺基酸序列**WVRQAPGQX$_{10}$LEWMG** (SEQ ID NO: 41)或與其具有至少80%序列一致性之同源序列，

c) HFR3序列包含胺基酸序列 **RVTX$_{16}$TVDX$_{11}$SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCX$_{12}$X$_{13}$** (SEQ ID NO: 42)或與其具有至少80%序列一致性之同源序列，

d) HFR4包含胺基酸序列**WGQGTLVTVSS** (SEQ ID NO: 25)或與其具有至少80%序列一致性之同源序列，

e) LFR1包含胺基酸序列**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC** (SEQ

ID NO: 26)或與其具有至少80%序列一致性之同源序列，

f) LFR2包含胺基酸序列**WYQQKPGKX$_{14}$PKLLIY** (SEQ ID NO: 43)或與其具有至少80%序列一致性之同源序列，

g) LFR3包含胺基酸序列

GVPX$_{15}$RFSGSGSGTDFTX$_{17}$TISSLQPEDIATYYC (SEQ ID NO: 44)或與其具有至少80%序列一致性之同源序列，且

h) LFR4包含胺基酸序列**FGQGTKLEIK** (SEQ ID NO: 29)或與其具有至少80%序列一致性之同源序列，

其中X_9為T或V，X_{10}為G或S，X_{11}為T或K，X_{12}為A或V，X_{13}為R或K，X_{14}為A或S，X_{15}為S或D，X_{16}為M或V，且X_{17}為F或L。

【0029】 在某些實施例中，

HFR1包含選自由SEQ ID NO: 22及30組成之群之序列，

HFR2包含選自由SEQ ID NO: 23及31組成之群之序列，

HFR3包含選自由SEQ ID NO: 24及32-35組成之群之序列，

HFR4包含SEQ ID NO: 25之序列，

LFR1包含來自由SEQ ID NO: 26組成之群之序列，

LFR2包含選自由SEQ ID NO: 27及36組成之群之序列，

LFR3包含選自由SEQ ID NO: 28及37-38、39、45組成之群之序列，且

LFR4包含SEQ ID NO: 29之序列。

【0030】 在某些實施例中，重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO:

58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0031】在某些實施例中，輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0032】在某些實施例中，針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段包含一對選自由以下組成之群之重鏈可變區及輕鏈可變區序列：SEQ ID NO: 49/54、50/54、51/54、52/54、49/55、50/55、51/55、52/55、58/62、58/63、58/64、58/65、59/62、59/63、59/64、59/65、60/62、60/63、60/64及60/65。

【0033】在某些實施例中，針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段進一步包含一或多個胺基酸殘基取代或修飾，但保留針對PD-L1之特定結合特異性及/或親和力。

【0034】在某些實施例中，該等取代或修飾中之至少一個係在CDR序列中之一或多個中及/或在VH或VL序列之非CDR區中之一或多個中。

【0035】在某些實施例中，針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段進一步包含免疫球蛋白恆定區，視情況人Ig之恆定區，或視情況人IgG之恆定區。

【0036】在某些實施例中，恆定區包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之Fc區。

【0037】在某些實施例中，人IgG1之Fc區包含SEQ ID NO: 80或與其具有至少80%(例如，至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)

序列一致性之其變異體。

【0038】 在某些實施例中，恆定區包含Fc變異體，該Fc變異體相對於對應野生型Fc區具有經減弱之效應功能。在某些實施例中，Fc區包含一或多個胺基酸殘基修飾或取代，從而產生相對於SEQ ID NO: 80經減弱之效應功能。

【0039】 在某些實施例中，Fc區包含選自由以下組成之群之一或多個胺基酸殘基取代：220S、226S、228P、229S、233P、234V、234G、234A、234F、234A、235A、235G、235E、236E、236R、237A、237K、238S、267R、268A、268Q、269R、297A、297Q、297G、309L、318A、322A、325L、328R、330S、331S及其任何組合，其中Fc區中之殘基編號為如Kabat中之EU索引之編號。

【0040】 在某些實施例中，Fc區包含選自由以下組成之群之突變之組合：a) K322A、L234A及L235A；b) P331S、L234F及L235E；c) L234A及L235A；c) N297A；d) N297Q；e) N297G；f) L235E；g) L234A及L235A (IgG1)；h) F234A及L235A (IgG4)；i) H268Q、V309L、A330S及P331S (IgG2)；j) V234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S及P331S (IgG2)，其中Fc區中之殘基編號為如Kabat中之EU索引之編號。

【0041】 在某些實施例中，Fc變異體包含SEQ ID NO: 81之胺基酸序列。

【0042】 在某些實施例中，針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段為人源化的。

【0043】 在某些實施例中，抗原結合片段為雙功能抗體、Fab、

Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fv片段、二硫鍵穩定之Fv片段(dsFv)、$(dsFv)_2$、雙特異性dsFv (dsFv-dsFv')、二硫鍵穩定之雙功能抗體(ds雙功能抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙功能抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。

【0044】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段能夠與人PD-L1及食蟹獼猴PD-L1兩者結合。

【0045】 在某些實施例中，第一部分包含與本文所提供之抗體或其抗原結合片段競爭結合至PD-L1之抗體或其抗原結合片段。

【0046】 在某些實施例中，免疫抑制性細胞介素包含轉型生長因子β (TGF-β)超家族、IL-1或血管內皮生長因子(VEGF)中之細胞介素。

【0047】 在某些實施例中，TGF-β超家族中之免疫抑制性細胞介素包括TGF-β、骨成形性蛋白(BMP)、活化素、NODAL以及生長及分化因子(GDF)。

【0048】 在某些實施例中，免疫抑制性細胞介素為TGF-β。

【0049】 在某些實施例中，第二部分包含TGFβ結合部分。

【0050】 在某些實施例中，TGFβ結合部分包含可溶性TGFβ受體(TGFβR)或其TGFβ結合片段或變異體、或針對TGFβ之抗體及其抗原結合片段。

【0051】 在某些實施例中，可溶性TGFβR包含TGFβR之胞外域(ECD)或其TGFβ結合片段或變異體。

【0052】 在某些實施例中，TGFβR選自由以下組成之群：TGFβ受體I (TGFβRI)、TGFβ受體II (TGFβRII)、TGFβ受體III (TGFβRIII)及其任何組合。

【0053】 在某些實施例中，TGFβR為TGFβRII。

【0054】 在某些實施例中，相對於TGFβ2及TGFβ3，TGFβRII選擇性地結合至TGFβ1。

【0055】 在某些實施例中，TGFβ1為人TGFβ1或小鼠TGFβ1。

【0056】 在某些實施例中，TGFβR之ECD包含SEQ ID NO: 66、79、78、77之胺基酸序列或與該胺基酸序列具有至少80%序列一致性、但保留針對TGF-β之特定結合特異性及/或親和力之序列。

【0057】 在某些實施例中，第二部分包含IL-1結合部分或IL-1受體(IL-1R)結合部分。

【0058】 在某些實施例中，IL-1結合部分包含可溶性IL-1R、IL-1R之IL-1結合片段或變異體、或針對IL-1之抗體或其抗原結合片段。

【0059】 在某些實施例中，IL-1結合部分包含：IL-1RI之胞外域(ECD)；IL-1RI、IL-1RI之ECD、IL-1RII或IL-1RII之ECD、或IL-1RAP或IL-1RAP之ECD、IL-1sRI或IL-1sRII中任一者之IL-1結合片段或變異體。

【0060】 在某些實施例中，IL-1R結合部分包含IL-1Ra或其IL-1結合片段或變異體、或針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段。

【0061】 在某些實施例中，針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區及/或輕鏈可變區係來自選自由以下組成之群之抗體：司柏索利單抗、艾特利單抗、伊姆西多單抗、AMG 108、邁瑞利單抗、尼達利單抗、MEDI8968、REGN6490、HB0034及CSC012。

【0062】 在某些實施例中，IL-1R結合部分包含SEQ ID NO: 67或76

之胺基酸序列、或與SEQ ID NO: 67或76具有至少80%序列一致性之胺基酸序列、或其IL-1結合片段或變異體。

【0063】 在某些實施例中，IL-1為IL-1α或IL-1β。

【0064】 在某些實施例中，IL-1β為人IL-1β。

【0065】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區及/或輕鏈可變區係來自選自由以下組成之群之抗IL-1α抗體：XB2001、魯吉珠單抗、LY2189102及貝邁奇單抗，或來自選自由以下組成之群之抗IL-1β抗體：SSGJ-613、CDP484、卡那單抗及吉伏組單抗。

【0066】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 104或SEQ ID NO: 112之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 105或SEQ ID NO: 113之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 106或SEQ ID NO: 114之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 107或SEQ ID NO: 115之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 108或SEQ ID NO: 116之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 109或SEQ ID NO: 117之序列的LCDR3。

【0067】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 104之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 105之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 106之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 107之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 108之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 109之序列的LCDR3。

【0068】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包

含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 112之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 113之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 114之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 115之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 116之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 117之序列的LCDR3。

【0069】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 110及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 111及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0070】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 102及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 103及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0071】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 110及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 111及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0072】 在某些實施例中，雙功能分子包含有包含SEQ ID NO: 118或SEQ ID NO:120之胺基酸序列的重鏈及/或包含SEQ ID NO: 119或SEQ

ID NO:121之胺基酸序列的輕鏈。

【0073】 在某些實施例中，第二部分刺激抗腫瘤免疫且包含免疫刺激性多肽。

【0074】 在某些實施例中，免疫刺激性多肽包含介白素(IL)-2 (IL-2)、IL-15、IL-21、IL-10、IL-12、IL-23、IL-27、IL-35、粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、可溶性CD4、可溶性LAG-3或IFN-α或其功能等效物。

【0075】 在某些實施例中，可溶性LAG-3包含LAG-3之胞外域(ECD)或其MHCII結合片段或變異體。

【0076】 在某些實施例中，第二部分刺激抗腫瘤免疫且包含免疫抑制性受體信號傳導之拮抗劑。

【0077】 在某些實施例中，免疫抑制性受體為信號調節蛋白α(SIRPα)。

【0078】 在某些實施例中，第二部分阻斷CD47與SIRPα之間的相互作用。

【0079】 在某些實施例中，第二部分包含CD47結合域或SIRPα結合域。

【0080】 在某些實施例中，CD47結合域包含可溶性SIRPα或其CD47結合片段或變異體、或抗CD47抗體或其抗原結合片段。

【0081】 在某些實施例中，可溶性SIRPα包含SIRPα之胞外域(ECD)或其CD47結合片段或變異體。

【0082】 在某些實施例中，可溶性SIRPα包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或與該胺基酸序列具有至少80%序列一致性、但保留針對CD47

之結合特異性之胺基酸序列。

【0083】在某些實施例中，SIRPα結合域包含可溶性CD47或其SIRPα結合片段或變異體、或抗SIRPα抗體或其抗原結合片段。

【0084】在某些實施例中，可溶性CD47包含CD47之胞外域(ECD)或其SIRPα結合片段或變異體、抗SIRPα抗體或其抗原結合片段。

【0085】在某些實施例中，雙功能分子進一步包含連接第一部分及第二部分之連接子。

【0086】在某些實施例中，連接子選自由以下組成之群：可裂解連接子、不可裂解連接子、肽連接子、可撓性連接子、剛性連接子、螺旋連接子及非螺旋連接子。

【0087】在某些實施例中，連接子包含((G)nS)m之胺基酸序列，其中m及n獨立地為選自0至30之整數(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10)。在某些實施例中，n為2、3、4或5，且m為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在某些實施例中，連接子包含SEQ ID NO: 68之胺基酸序列。

【0088】在某些實施例中，雙功能分子包含該等第二部分中之一或多個。

【0089】在某些實施例中，該等第二部分中之至少一個連接至第一部分之多肽鏈之N端或C端。

【0090】在某些實施例中，該等第二部分中之至少一個連接至：a)第一部分之重鏈之N端或C端，或b)第一部分之輕鏈之N端或C端。

【0091】在某些實施例中，該等第二部分中之至少一個連接至第一部分之重鏈恆定區之C端。

【0092】在某些實施例中，該等第二部分中之各者分別連接至第一

部分之各重鏈恆定區之C端。

【0093】 在某些實施例中，雙功能分子包含分別連接至以下之該等第二部分中之超過一個：第一部分之重鏈之N端、第一部分之重鏈之C端、第一部分之輕鏈之N端、第一部分之輕鏈之C端或其任何組合。

【0094】 在某些實施例中，雙功能分子包含同二聚體重鏈或異二聚體重鏈。

【0095】 在某些實施例中，就第二部分之存在或位置而言，重鏈為異二聚體的。

【0096】 在某些實施例中，異二聚體重鏈包含一個具有第二部分之重鏈及另一不具有第二部分之重鏈。

【0097】 在某些實施例中，異二聚體重鏈進一步包含以阻礙同二聚及/或有利於異二聚之方式締合之異二聚體Fc區。

【0098】 在某些實施例中，第一及異二聚體Fc區能夠經由杵-臼、疏水相互作用、靜電相互作用、親水相互作用或經提高之可撓性來締合成異二聚體。

【0099】 在某些實施例中，異二聚體Fc區在一個Fc區中包含Y349C、T366S、L368A或Y407V或其任何組合且在另一Fc區中包含S354C或T366W或其組合，其中Fc區中之殘基編號為如Kabat中之EU索引之編號。

【0100】 在某些實施例中，雙功能分子進一步連接至一或多個結合物部分。

【0101】 在某些實施例中，結合物部分包含清除修飾劑、化學治療劑、毒素、放射性同位素、鑭系元素、發光標記、螢光標記、酶-受質標

記、DNA烷化劑、拓樸異構酶抑制劑、微管蛋白結合劑或諸如雄激素受體抑制劑之其他抗癌藥物。

【0102】 在另一態樣中，本發明進一步提供一種包含本文提供之雙功能分子及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物或套組。

【0103】 在另一態樣中，本發明進一步提供一種編碼本文提供之雙功能分子之經分離聚核苷酸。

【0104】 在另一態樣中，本發明進一步提供一種包含本文提供之經分離聚核苷酸之載體。

【0105】 在另一態樣中，本發明進一步提供一種包含本文提供之載體之宿主細胞。

【0106】 在另一態樣中，本發明進一步提供一種表現本文提供之雙功能分子之方法，該方法包含在表現載體之條件下培養本文提供之宿主細胞。

【0107】 在另一態樣中，本發明進一步提供一種治療、預防或緩解個體之PD-L1相關疾病之方法，該方法包含向個體投與治療有效量之本文提供之雙功能分子及/或本文提供之醫藥組合物或套組。

【0108】 在某些實施例中，該疾病為免疫相關疾病或病症、癌症、自體免疫疾病或傳染病。

【0109】 在某些實施例中，癌症選自由以下組成之群：肺癌(例如，非小細胞肺癌)、肝癌、胰臟癌、乳癌、支氣管癌、骨癌、肝及膽管癌、卵巢癌、睪丸癌、腎癌、膀胱癌、頭頸癌、脊柱癌、腦癌、子宮頸癌、子宮癌、子宮內膜癌、結腸癌、結直腸癌、前列腺癌、胃食道癌、直腸癌、肛門癌、胃腸癌、皮膚癌、垂體癌、胃癌、陰道癌、甲狀腺癌、神經膠質

母細胞瘤、星形細胞瘤、黑色素瘤、骨髓化生不良症候群、肉瘤、畸胎瘤、神經膠質瘤及腺癌。

【0110】在某些實施例中，個體已經鑑定為具有表現PD-L1之癌細胞。

【0111】在某些實施例中，個體為人。

【0112】在某些實施例中，該方法進一步包含投與治療有效量之第二治療劑。

【0113】在某些實施例中，第二治療劑選自化學治療劑、抗癌藥物、放射療法、免疫治療劑、抗血管生成劑、靶向治療劑、細胞治療劑、基因治療劑、激素治療劑或細胞介素。

【0114】在另一態樣中，本發明提供一種本文提供之雙功能分子用於製造用以治療個體之PD-L1相關疾病或病狀之藥劑的用途。

【0115】在另一態樣中，本發明提供一種治療、預防或緩解個體之疾病或病狀之方法，該疾病或病狀將受益於免疫抑制性細胞介素之抑制、持續免疫反應之誘導或抗腫瘤免疫之刺激，該方法包含投與有效量之本文提供之雙功能分子。

【0116】在某些實施例中，免疫抑制性細胞介素為TGFβ。

【0117】在某些實施例中，該疾病或病狀為TGFβ相關疾病或病狀。

【0118】在某些實施例中，TGFβ相關疾病為癌症、纖維化疾病或腎病。

【0119】在某些實施例中，免疫抑制性細胞介素為IL-1。

【0120】在某些實施例中，該疾病或病狀為IL-1相關疾病或病狀。

【0121】 在某些實施例中，該疾病或病狀將受益於藉由抑制例如SIRPa信號傳導之免疫抑制性受體信號傳導進行之抗腫瘤免疫之刺激。

【圖式簡單說明】

【0122】 圖1示出根據ELISA之人源化4B6抗體與人PD-L1之結合。

【0123】 圖2示出根據ELISA之Hu4B6_HgLa與人PD-L1之結合。

【0124】 圖3A-圖3C示出根據ELISA之AM-4B6-IgG1-TGFβRII變異體與PD-L1之結合。

【0125】 圖4示出使用流式細胞分析技術之AM-4B6-IgG1-TGFβRII變異體之親和力分級。

【0126】 圖5A及圖5B示出AM-4B6-IgG1-TGFβRII變異體對PD-L1/PD-1或PD-L1/B7-1之阻斷。

【0127】 圖6示出使用基於細胞之分析之AM-4B6-IgG1-TGFβRII變異體對PD-L1/PD-1之阻斷。

【0128】 圖7示出經穩定細胞株表現之AM4B6_hIgG1_TBRII (20-136)之SDS-PAGE。

【0129】 圖8A及圖8B示出根據ELISA分析之與人PD-L1或食蟹獼猴PD-L1之結合。

【0130】 圖9A-圖9C示出根據ELISA分析之與人PD-L1及B7家族其他成員以及TGFβ超家族其他成員之結合。

【0131】 圖10A-圖10F示出根據FACS分析之與表現PD-L1之細胞之結合。

【0132】 圖11示出根據FACS分析之與經活化人T細胞上之人PD-L1之結合。

【0133】 圖12A-圖12B示出根據ELISA分析之對人PD-L1與人PD-1結合或食蟹獼猴PD-L1與食蟹獼猴PD-1結合之阻斷。

【0134】 圖13示出根據ELISA分析之與hPD-L1及TGFb1之同時結合。

【0135】 圖14示出使用報導體分析之阻斷hPD-L1/hPD-1。

【0136】 圖15示出使用TGF-β報導體HEK-293細胞株之阻斷TGFβ1信號傳導。

【0137】 圖16示出AM4B6-hIgG1-TGFβRII'對經結核菌素(TB)刺激之PBMC之IFNγ釋放的作用。

【0138】 圖17A-圖17B示出MC38-hPD-L1腫瘤模型中之抗腫瘤活性。

【0139】 圖18A-圖18B示出H460腫瘤模型中之抗腫瘤活性。

【0140】 圖19A-圖19B示出EMT6-hPD-L1腫瘤模型中之抗腫瘤活性。

【0141】 圖20A-圖20C示出AM4B6-hIgG1-TGFβRII活體內藥物動力學及藥效動力學研究。

【0142】 圖21示出根據ELISA之AM4B6-hIgG1-IL-1RA與人PD-L1之結合活性。

【0143】 圖22示出根據FACS分析之AM4B6-hIgG1-IL-1RA與人PD-L1之結合活性。

【0144】 圖23示出使用基於細胞之分析之AM4B6-hIgG1-IL-1RA對PD-L1/PD-1之阻斷。

【0145】 圖24示出根據ELISA之AM4B6-IgG1-IL-1RA對人IL-1β之

阻斷活性。

【0146】 圖25示出AM4B6-hIgG1-IL-1RA對報導細胞上之人IL-1β之阻斷活性。

【0147】 圖26示出不對稱雙功能抗體之SEC-HPLC純度。

【0148】 圖27示出如藉由ELISA量測之雙功能分子與人PD-L1之結合。

【0149】 圖28示出如藉由ELISA量測之雙功能分子與人CD47之結合。

【0150】 圖29示出IgG-scFv-ACZ885-AM4B6及IgG-scFv-XOMA052-AM4B6雙特異性抗體對hIL-1β蛋白之ELISA結合活性。

【0151】 圖30示出IgG-scFv-ACZ885-AM4B6及IgG-scFv-XOMA052-AM4B6雙特異性抗體對hPD-L1蛋白之ELISA結合活性。

【0152】 圖31示出根據FACS方法之IgG-scFv-ACZ885-AM4B6及IgG-scFv-XOMA052-AM4B6與表現PD-L1之293T細胞之結合。

【0153】 圖32示出IgG-scFv-ACZ885-AM4B6及IgG-scFv-XOMA052-AM4B6之基於細胞之PD1/PD-L1阻斷活性。

【0154】 圖33示出IgG-scFv-XOMA052-AM4B6對HDF細胞上之任IL-1β之阻斷活性。

【0155】 圖34示出IgG-scFv-ACZ885-AM4B6對報導細胞上之hIL-1β之阻斷活性。

【實施方式】

【0156】 本發明之以下描述僅意欲說明本發明之各個實施例。如此，所論述之具體修改不應解釋為對本發明之範疇之限制。對於熟習此項

技術者顯而易見的是，在不脫離本發明之範疇之情況下可作出各種等效方案、改變及修改，且應理解，本文將包括該等等效實施例。包括公開、專利及專利申請之本文所引用之所有參考文獻皆以全文引用之方式併入本文中。

定義

【0157】 如本文所使用之術語「抗體」包括與特定抗原結合之任何免疫球蛋白、單株抗體、多株抗體、多價抗體、二價抗體、單價抗體、多特異性抗體或雙特異性抗體。天然完整抗體包含兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈。哺乳動物重鏈經分類為α、δ、ε、γ及μ，各重鏈由可變區(VH)以及第一恆定區、第二恆定區、第三恆定區及視情況選用之第四恆定區(分別為CH1、CH2、CH3、CH4)組成；哺乳動物輕鏈經分類為λ或κ，而各輕鏈由可變區(VL)及恆定區組成。抗體呈「Y」形，其中Y之主幹由經由二硫鍵鍵結而結合在一起之兩個重鏈之第二恆定區及第三恆定區組成。Y之各臂包括與單一輕鏈之可變區及恆定區結合之單一重鏈之可變區及第一恆定區。輕鏈及重鏈之可變區負責抗原結合。兩個鏈中之可變區一般含有三個高變區，該等高變區稱為互補決定區(CDR) (輕鏈CDR，包括LCDR1、LCDR2及LCDR3；重鏈CDR，包括HCDR1、HCDR2、HCDR3)。本文所揭示之抗體及抗原結合片段之CDR邊界可藉由Kabat、IMGT、Chothia或Al-Lazikani慣例來加以定義或鑑定(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., *J. Mol. Biol.*, 273(4), 927 (1997)；Chothia, C. 等人, *J Mol Biol.* 12月5日; 186(3):651-63 (1985)；Chothia, C.及Lesk, A.M., *J Mol Biol.*, 196,901 (1987)；Chothia, C. 等人, *Nature*. 12月21-28日; 342(6252):877-83 (1989)；Kabat E.A. 等人,Sequences of Proteins of immunological

Interest, 第5版公共衛生局(Public Health Service), 國立衛生研究院(National Institutes of Health), Bethesda, Md. (1991)；Marie-Paule Lefranc等人, *Developmental and Comparative Immunology*, 27: 55-77 (2003)；Marie-Paule Lefranc等人, *Immunome Research*, 1(3), (2005)；Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (第二版), 第26章, 481-514, (2015))。三個CDR經插入側接伸長段之間，該等側接伸長段稱為框架區(FR) (輕鏈FR，包括LFR1、LFR2、LFR3及LFR4；重鏈FR，包括HFR1、HFR2、HFR3及HFR4)，比CDR更加高度保守且形成骨架以支撐高變環。重鏈及輕鏈之恆定區不參與抗原結合，但展現出多種效應功能。如本文所使用之術語「效應功能」係指由抗體之Fc區與免疫細胞上之C1q補體蛋白或Fc受體(FcR)之間的相互作用引起的細胞介導或補體介導之細胞毒性作用。例示性效應功能包括但不限於抗體依賴性細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞介導之吞噬作用(ADCP)及補體依賴性細胞毒性(CDC)效應。抗體係基於其重鏈恆定區之胺基酸序列分成幾類。抗體之五個主要類別或同型為IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，其特徵分別在於存在α、δ、ε、γ及μ重鏈。幾個主要抗體類別經分為諸如IgG1 (γ1重鏈)、IgG2 (γ2重鏈)、IgG3 (γ3重鏈)、IgG4 (γ4重鏈)、IgA1 (α1重鏈)或IgA2 (α2重鏈)之亞類。

【0158】 在某些實施例中，本文提供之抗體涵蓋其任何抗原結合片段。如本文所使用之術語「抗原結合片段」係指由包含一或多個CDR之抗體之一部分形成的抗體片段，或與抗原結合、但不包含完整天然抗體結構之任何其他抗體片段。抗原結合片段之實例包括但不限於雙功能抗體、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv片段、二硫鍵穩定之Fv片段(dsFv)、$(dsFv)_2$、雙

特異性dsFv (dsFv-dsFv')、二硫鍵穩定之雙功能抗體(ds雙功能抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙功能抗體)、雙特異性抗體、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。抗原結合片段能夠結合至與親本抗體結合之相同抗原。

【0159】 關於抗體之「Fab」係指由藉由二硫鍵與單一重鏈之可變區及第一恆定區結合之單一輕鏈(可變區及恆定區兩者)組成的抗體之彼部分。

【0160】 「Fab'」係指包括鉸鏈區之一部分之Fab片段。

【0161】 「$F(ab')_2$」係指Fab'之二聚體。

【0162】 關於抗體(例如，IgG、IgA或IgD同型)之「Fc」係指由經由二硫鍵鍵結與第二重鏈之第二恆定域及第三恆定域結合之第一重鏈之第二恆定域及第三恆定域組成的抗體之彼部分。關於IgM及IgE同型抗體之Fc進一步包含第四恆定域。抗體之Fc部分負責諸如抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及補體依賴性細胞毒性(CDC)之多種效應功能，但在抗原結合中不起作用。

【0163】 關於抗體之「Fv」係指用於攜帶完整抗原結合位點之抗體之最小片段。Fv片段由與單一重鏈之可變區結合之單一輕鏈之可變區組成。

【0164】 「單鏈Fv抗體」或「scFv」係指由直接或經由肽連接子序列彼此連接之輕鏈可變區及重鏈可變區組成的經工程改造之抗體(Huston JS等人 *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:5879(1988))。

【0165】 「單鏈Fv-Fc抗體」或「scFv-Fc」係指由與抗體Fc區連接之scFv組成的經工程改造之抗體。

【0166】「駱駝化單域抗體」、「重鏈抗體」或「HCAb」係指含有兩個V_H域而不含有輕鏈之抗體(Riechmann L.及Muyldermans S., *J Immunol Methods*. 12月10日; 231(1-2):25-38 (1999)；Muyldermans S., *J Biotechnol*. 6月; 74(4):277-302 (2001)；WO94/04678；WO94/25591；美國專利第6,005,079號)。重鏈抗體最初衍生自駱駝科(駱駝、單峰駝及美洲駝)。雖然不含輕鏈，但駱駝化抗體具有真實抗原結合組庫(Hamers-Casterman C.等人, *Nature*. 6月3日; 363(6428):446-8 (1993)；Nguyen VK. 等人 *Immunogenetics*. 4月; 54(1):39-47 (2002)；Nguyen VK. 等人 *Immunology*. 5月; 109(1): 93-101 (2003))。重鏈抗體之可變域(VHH域)表示由適應性免疫反應生成之最小已知抗原結合單元(Koch-Nolte F.等人, *FASEB J*. 11月; 21(13): 3490-8. 電子版2007年6月15日(2007))。

【0167】「奈米抗體」係指由來自重鏈抗體之VHH域以及兩個恆定域CH2及CH3組成之抗體片段。

【0168】「雙功能抗體」或「dAb」包括具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，其中該片段包含在同一多肽鏈中與VL域連接之VH域(VH-VL或VL-VH) (參見例如，Holliger P.等人, Proc Natl Acad Sci USA. 7月15日; 90(14):6444-8 (1993)；EP404097；WO93/11161)。藉由使用太短以至於不允許在同一鏈上之兩個域之間進行配對之連接子，該等域被強制與另一鏈之互補域配對，從而產生兩個抗原結合位點。該等抗原結合位點可靶向相同或不同抗原(或抗原決定基)。在某些實施例中，「雙特異性ds雙功能抗體」為靶向兩種不同抗原(或抗原決定基)之雙功能抗體。

【0169】「域抗體」係指僅含有重鏈可變區或輕鏈可變區之抗體片段。在某些情況下，兩個或更多個VH域係用肽連接子共價連接以產生二

價或多價域抗體。二價域抗體之兩個VH域可靶向相同或不同抗原。

【0170】 如本文所使用之術語「價」係指給定分子中存在規定數目之抗原結合位點。術語「單價」係指僅具有單個抗原結合位點之抗體或抗原結合片段；且術語「多價」係指具有多個抗原結合位點之抗體或抗原結合片段。如此，術語「二價」、「四價」及「六價」分別表示抗原結合分子中存在兩個結合位點、四個結合位點及六個結合位點。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段為二價的。

【0171】 如本文所使用之「雙特異性」抗體係指具有衍生自兩個不同單株抗體之片段且能夠與兩個不同抗原決定基結合之人工抗體。該兩個抗原決定基可存在於同一抗原上，或其可存在於兩個不同抗原上。

【0172】 在某些實施例中，「scFv二聚體」為二價雙功能抗體或雙特異性scFv(BsFv)，該二價雙功能抗體或雙特異性scFv (BsFv)包含與另一VH-VL部分二聚之VH-VL (藉由肽連接子連接)以使得一個部分之VH與另一部分之VL配位且形成兩個結合位點，該兩個結合位點可靶向相同抗原(或抗原決定基)或不同抗原(或抗原決定基)。在其他實施例中，「scFv二聚體」為雙特異性雙功能抗體，該雙特異性雙功能抗體包含與VH1-VL2 (亦藉由肽連接子連接)締合之VL1-VH2 (藉由肽連接子連接)以使得VH1與VL1配位且VH2與VL2配位，且各經配位對具有不同抗原特異性。

【0173】 「dsFv」係指二硫鍵穩定之Fv片段，其中單一輕鏈之可變區與單一重鏈之可變區之間的鍵為二硫鍵。在一些實施例中，「(dsFv)2」或「(dsFv-dsFv')」包含三個肽鏈：藉由肽連接子(例如，長可撓性連接子)連接且經由二硫橋鍵分別與兩個VL部分結合之兩個VH部分。在一些實施例中，dsFv-dsFv'具有雙特異性，其中各經二硫鍵配對之

重鏈及輕鏈具有不同抗原特異性。

【0174】 如本文所使用之術語「嵌合」係指具有衍生自一種物種之重鏈及/或輕鏈之一部分及衍生自不同物種之重鏈及/或輕鏈之其餘部分的抗體或抗原結合片段。在說明性實例中，嵌合抗體可包含衍生自人之恆定區及衍生自諸如小鼠之非人動物之可變區。在一些實施例中，非人動物為例如小鼠、大鼠、兔、山羊、綿羊、豚鼠或倉鼠之哺乳動物。

【0175】 如本文所使用之術語「人源化」係指抗體或抗原結合片段包含衍生自非人動物之CDR、衍生自人之FR區以及在適用時衍生自人之恆定區。

【0176】 如本文所使用之術語「親和力」係指免疫球蛋白分子(亦即，抗體)或其片段與抗原之間的非共價相互作用強度。

【0177】 如本文所使用之術語「特異性結合(specific binding/specifically binds)」係指兩個分子之間的非隨機結合反應，例如抗體與抗原之間的非隨機結合反應。特異性結合之特徵可在於結合親和力，該結合親和力例如由K_D值，亦即當抗原與抗原結合分子之間的結合達到平衡時解離速率與締合速率之比(k_{off}/k_{on})表示。K_D可藉由使用此項技術中已知之任何習知方法來測定，該方法包括但不限於表面電漿共振法、八隅體法、微尺度熱泳法、HPLC-MS法及FACS分析法。$\leq 10^{-6}$ M (例如$\leq 5 \times 10^{-7}$ M、$\leq 2 \times 10^{-7}$ M、$\leq 10^{-7}$ M、$\leq 5 \times 10^{-8}$ M、$\leq 2 \times 10^{-8}$ M、$\leq 10^{-8}$ M、$\leq 5 \times 10^{-9}$ M、$\leq 4 \times 10^{-9}$ M、$\leq 3 \times 10^{-9}$ M、$\leq 2 \times 10^{-9}$ M或$\leq 10^{-9}$ M)之K_D值可指示抗體或其抗原結合片段與PD-L1 (例如人PD-L1或食蟹獼猴PD-L1)之間的特異性結合。

【0178】 如本文所使用之「競爭結合至PD-L1」之能力係指第一抗

體或抗原結合片段抑制PD-L1與第二抗PD-L1抗體之間的結合相互作用達到任何可偵測程度之能力。在某些實施例中，競爭結合至PD-L1之抗體或抗原結合片段將PD-L1與第二抗PD-L1抗體之間的結合相互作用抑制了至少85%或至少90%。在某些實施例中，此抑制可大於95%或大於99%。

【0179】 如本文所使用之術語「胺基酸」係指含有胺($-NH_2$)及羧基(-COOH)官能基以及對各胺基酸具有特異性之側鏈的有機化合物。胺基酸名稱在本發明中亦以標準單字母或三字母代碼形式表示，該等代碼彙總如下：

名稱	三字母代碼	單字母代碼
丙胺酸	Ala	A
精胺酸	Arg	R
天冬醯胺酸	Asn	N
天冬胺酸	Asp	D
半胱胺酸	Cys	C
麩胺酸	Glu	E
麩醯胺酸	Gln	Q
甘胺酸	Gly	G
組胺酸	His	H
異白胺酸	Ile	I
白胺酸	Leu	L
離胺酸	Lys	K
甲硫胺酸	Met	M
苯丙胺酸	Phe	F
脯胺酸	Pro	P
絲胺酸	Ser	S
蘇胺酸	Thr	T
色胺酸	Trp	W
酪胺酸	Tyr	Y
纈胺酸	Val	V

【0180】 如在本文中可互換使用之術語「多肽」、「肽」及「蛋白質」係指具有胺基酸殘基之聚合物。該術語亦適用於其中一或多個胺基酸殘基為對應天然存在之胺基酸之人工化學模擬物的胺基酸聚合物，以及天

然存在之胺基酸聚合物及非天然存在之胺基酸聚合物。

【0181】 關於胺基酸序列之「保守取代」係指用不同的具有類似物理化學特性之具有側鏈之胺基酸殘基置換一胺基酸殘基。舉例而言，可在具有疏水側鏈之胺基酸殘基(例如Met、Ala、Val、Leu及Ile)之間、在具有中性親水側鏈之胺基酸殘基(例如Cys、Ser、Thr、Asn及Gln)之間、在具有酸性側鏈之胺基酸殘基(例如Asp、Glu)之間、在具有鹼性側鏈之胺基酸殘基(例如His、Lys及Arg)之間或在具有芳族側鏈之胺基酸殘基(例如Trp、Tyr及Phe)之間進行保守取代。如此項技術中已知，保守取代通常不會造成蛋白質構形結構顯著變化，且因此可保留蛋白質之生物活性。

【0182】 關於胺基酸序列(或核酸序列)之「序列一致性百分比(%)」經定義為在進行序列比對且必要時引入間隙以達成最大對應性之後候選序列中之胺基酸(或核酸)殘基與參考序列中之胺基酸(或核酸)殘基的一致性百分比。可例如使用諸如BLASTN、BLASTp (可在美國國家生物技術資訊中心(U.S. National Center for Biotechnology Information，NCBI)之網站上獲得，亦參見Altschul S.F.等人, J. Mol. Biol., 215:403–410 (1990)；Stephen F.等人, Nucleic Acids Res., 25:3389–3402 (1997))、ClustalW2 (可在歐洲生物資訊研究所(European Bioinformatics Institute)之網站上獲得，亦參見Higgins D.G.等人, Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996)；Larkin M.A.等人, Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007))及ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體之公開可用的工具來達成出於測定胺基酸(或核酸)序列一致性百分比之目的進行的比對。熟習此項技術者可使用由該工具提供之預設參數，或可適當時例如藉由選擇合適的演算法定製比對參數。在某些實施例中，非一致殘基位置之不同之

處可在於保守胺基酸取代。「保守胺基酸取代」為其中胺基酸殘基經具有類似化學特性(例如，電荷或疏水性)之具有側鏈(R基)之另一胺基酸殘基取代的胺基酸取代。一般而言，保守胺基酸取代將不會實質上改變蛋白質之功能特性。在兩個或更多個胺基酸序列與彼此不同之處在於保守取代之情況下，類似性百分比或程度可向上調整以校正取代之保守性質。用於作出此調整之方法為熟習此項技術者所熟知的。參見例如，Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331，該文獻以引用之方式併入本文中。

【0183】 如本文所使用之「同源序列」係指在視情況比對時與另一序列具有至少80% (例如至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列一致性之聚核苷酸序列(或其互補股)或胺基酸序列。

【0184】 「經分離」物質已相對於自然狀態得到人工改變。若自然界中出現「經分離」組合物或物質，則其已相對於其原始環境改變或自其移除或以上兩者。舉例而言，活體動物體內天然存在之聚核苷酸或多肽不為「經分離」的，但若同一聚核苷酸或多肽與其在天然狀態下共存之物質充分分離以便以實質上純的狀態存在，則該聚核苷酸或多肽為「經分離」的。經分離「核酸」或「聚核苷酸」可互換使用且係指經分離核酸分子之序列。在某些實施例中，「經分離抗體或其抗原結合片段」係指如藉由電泳法(諸如SDS-PAGE、等電聚焦、毛細管電泳)或層析法(諸如離子交換層析法或反相HPLC)所測定，純度為至少60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%之抗體或抗原結合片段。

【0185】 術語「個體」包括人及非人動物。非人動物包括所有脊椎

動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人靈長類動物、小鼠、大鼠、貓、兔、綿羊、狗、牛、雞、兩棲動物及爬行動物。除在指出時之外，術語「患者」或「個體」在本文中可互換使用。

【0186】 如本文所使用之「治療(treating/treatment)」病狀包括預防或緩解病狀、減緩病狀之發作或發展速率、降低罹患病狀之風險、預防或延遲與病狀相關之症狀之發展、減輕或結束與病狀相關之症狀、產生病狀之完全或部分消退、治癒病狀或其某種組合。

【0187】 如本文所使用之術語「載體」係指可將遺傳元件可操作地插入其中以便引起該遺傳元件表現以使得產生由該遺傳元件編碼之蛋白質、RNA或DNA或複製該遺傳元件的媒劑。載體可用於轉型、轉導或轉染宿主細胞以便引起其所攜帶之遺傳元件在宿主細胞內表現。載體之實例包括質體、噬菌體、黏接質體、諸如酵母人工染色體(YAC)、細菌人工染色體(BAC)或P1衍生之人工染色體(PAC)之人工染色體、諸如λ噬菌體或M13噬菌體之噬菌體以及動物病毒。載體可含有多種用於控制表現之元件，該等元件包括啟動子序列、轉錄起始序列、增強子序列、可選擇元件及報導基因。另外，載體亦可含有複製起點。載體亦可包括協助其進入細胞中之物質，該等物質包括但不限於病毒粒子、脂質體或蛋白質外殼。載體可為表現載體或選殖載體。本發明提供含有本文提供之編碼抗體或其抗原結合片段之核酸序列、至少一個可操作地連接至該核酸序列之啟動子(例如，SV40、CMV、EF-1α)以及至少一個選擇標誌物的載體(例如表現載體)。

【0188】 如本文所使用之「宿主細胞」係指其中已引入有外源聚核苷酸及/或載體之細胞。

【0189】 如本文所使用之術語「可溶性」係指分子(例如，蛋白質)能夠溶解於諸如液體及水性環境之溶劑中。

【0190】 如本文所使用之術語「轉型生長因子β」及「TGFβ」係指具有來自個體(例如，人)之任何TGF-β，包括前驅體及成熟TGFβ之潛伏形式及相關或非相關複合物(「潛伏TGFβ」)之全長、天然胺基酸序列的任何TGFβ家族蛋白。在本文中提及該TGFβ蛋白應理解為提及包括TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3同型及其潛伏型式之當前經鑑定形式中之任一種，以及包括衍生自任何已知TGFβ之序列且與該序列至少約75%、較佳地至少約80%、更佳地至少約85%、仍更佳地至少約90%且甚至更佳地至少約95%同源之多肽的未來經鑑定之人TGFβ物種。具體術語「TGFβ1」、「TGFβ2」及「TGFβ3」係指例如Derynck等人, *Nature*, *Cancer Res.*, 47: 707 (1987)；Seyedin等人, *J. Biol. Chem.*, 261: 5693-5695 (1986)；deMartin等人, *EMBO J.*, 6: 3673 (1987)；Kuppner等人, *Int. J. Cancer*, 42: 562 (1988)之文獻中經定義之TGF-β。術語「轉型生長因子β」、「TGFβ (TGFβ/TGFbeta/TGF-β/TGF-beta)」在本發明中可互換使用。

【0191】 如本文所使用之術語「人TGFβ1」係指由人TGFB1基因(例如，野生型人TGFB1基因)編碼之TGFβ1蛋白。例示性野生型人TGFβ1蛋白係以GenBank寄存編號NP_000651.3形式提供。如本文所使用之術語「人TGFβ2」係指由人TGFB2基因(例如，野生型人TGFB2基因)編碼之TGFβ2蛋白。例示性野生型人TGFβ2蛋白係以GenBank寄存編號NP_001129071.1及NP_003229.1形式提供。如本文所使用之術語「人TGFβ3」係指由人TGFB3基因(例如，野生型人TGFB3基因)編碼之

TGFβ3蛋白。例示性野生型人TGFβ3蛋白係以GenBank寄存編號NP_003230.1、NP_001316868.1及NP_001316867.1形式提供。

【0192】如本文所使用之術語「小鼠TGFβ1」、「小鼠TGFβ2」及「小鼠TGFβ3」係指分別由小鼠TGFB1基因(例如，野生型小鼠TGFB1基因)、小鼠TGFB2基因(例如，野生型小鼠TGFB2基因)及小鼠TGFB3基因(例如，野生型小鼠TGFB3基因)編碼之TGFβ1蛋白、TGFβ2蛋白及TGFβ3蛋白。例示性野生型小鼠(家鼷鼠(*Mus musculus*)) TGFβ1蛋白係以GenBank寄存編號NP_035707.1及CAA08900.1形式提供。例示性野生型小鼠TGFβ2蛋白係以GenBank寄存編號NP_033393.2形式提供。例示性野生型小鼠TGFβ3蛋白係以GenBank寄存編號AAA40422.1形式提供。

【0193】如本文所使用之術語「TGFβ受體」係指結合至少一種TGFβ同型之任何受體。一般而言，TGFβ受體包括TGFβ受體I (TGFβRI)、TGFβ受體II (TGFβRII)或TGFβ受體III (TGFβRIII)。

【0194】關於人之術語「TGFβ受體I」或「TGFβRI」係指人TGFβ受體1型序列，包括野生型TGFβRI以及其已知能夠與至少一種TGFβ同型結合之所有同型及變異體。野生型TGFβRI之例示性胺基酸序列可以GenBank寄存編號ABD46753.1或以UniProtKB-P36897獲得，亦以SEQ ID NO: 69形式包括在本文中。變異TGFβRI可具有與SEQ ID NO: 69之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性之序列且保留野生型序列(例如SEQ ID NO: 69)之TGFβ結合活性之至少25%、35%、50%、75%、90%、95%或99%。

【0195】關於人之術語「TGFβ受體II」或「TGFβRII」係指人

TGFβ受體2型同型A序列，包括野生型TGFβRII以及其已知能夠與至少一種TGFβ同型結合之所有同型及變異體。野生型TGFβRII同型A或同型1之例示性胺基酸序列可以GenBank寄存編號NP_001020018.1或以UniProtKB-P37173-1獲得，亦以SEQ ID NO: 70形式包括在本文中，且野生型TGFβRII同型B可以GenBank寄存編號NP_003233.4或以UniProtKB-P37173-2獲得，亦以SEQ ID NO: 71形式包括在本文中。變異TGFβRII可具有與SEQ ID NO: 70或71具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列一致性之序列且保留野生型序列(例如SEQ ID NO: 70或71)之TGFβ結合活性之至少25%、35%、50%、75%、90%、95%或99%。

【0196】 關於人之術語「TGFβ受體III」或「TGFβRIII」係指人TGFβ受體3型序列，包括野生型TGFβRII以及所有同型及變異體。野生型TGFβRIII之例示性胺基酸序列可以GenBank寄存編號NP_003234.2或以UniProtKB-Q03167獲得，亦以SEQ ID NO: 72形式包括在本文中。

【0197】 如本文所使用之關於某種參考蛋白或肽之術語「變異體」意謂參考蛋白或肽之經修飾型式，例如功能等效物、片段、融合體、衍生物、模擬物或其任何組合，該經修飾型式具有與參考序列具有至少70%(例如80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列一致性之胺基酸序列且保留參考序列(例如野生型序列)之生物活性或結合活性之至少25% (例如35%、50%、75%、90%、95%或99%)。該變異體可為參考蛋白或肽之片段、突變體、融合體、截短體或其任何組合。

【0198】 如本文所使用之術語「介白素-1」或「IL-1」包括IL-1α及

IL-1β、其前驅體(例如前驅IL-1α及前驅IL-1β)、同型及變異體。

【0199】 如本文所使用之術語「人IL-1α」係指由人IL1A基因(例如，野生型人IL1A基因)編碼之IL-1α蛋白以及同型及變異體。例示性野生型人IL1α蛋白係以UniProtKB-P01583形式提供。

【0200】 如本文所使用之術語「人IL-1β」係指由人IL1B基因(例如，野生型人IL1B基因)編碼之IL-1β蛋白。例示性野生型人IL1β蛋白係以GenBank寄存編號NP_000567.1或以UniProtKB-C9JVK0提供。

【0201】 如本文所使用之術語「IL-1受體」或「IL-1R」係指可與IL-1結合之受體，包括其能夠與IL-1結合之所有野生型受體、同型及變異體。一般而言，存在兩種類型之IL-1受體，亦即IL-1受體I (IL-1RI)及IL-1受體II (IL-1RII)。IL-1RII充當與配位體結合而不轉導信號之誘餌受體。IL-1RII之蛋白水解裂解引起例如IL-1sRI及IL-1sRII之可溶性受體形成，該等可溶性受體與配位體結合而不轉導信號(細節參見Thomas G. Kennedy, Encyclopedia of Hormones中之第V.B.2.章, 2003)。IL-1sRI及IL-1sRII為IL-1RII之蛋白水解裂解產物且可為一組IL-1RII之胞外域片段。術語IL-1R亦意欲涵蓋輔受體IL-1RAP，該輔受體IL-1RAP可與結合至IL-1β之IL-1RI締合以形成高親和力介白素1受體複合物，該複合物介導NF-κ-B及其他路徑之介白素1依賴性活化。

【0202】 如本文所使用之術語「IL-1RI」包括野生型IL-1RI以及其能夠與IL-1α及/或IL-1β結合之所有同型及變異體。野生型IL-1RI之例示性胺基酸序列可以UniProtKB-P14778獲得，亦以SEQ ID NO: 73形式包括在本文中。

【0203】 如本文所使用之術語「IL-1RII」包括野生型IL-1RII以及

其能夠與IL-1α及/或IL-1β結合之所有同型及變異體。野生型IL-1RII之例示性胺基酸序列可以UniProtKB-P27930獲得，亦以SEQ ID NO: 75形式包括在本文中。

【0204】 如本文所使用之術語「IL-1RAP」包括野生型IL-1RAP以及其能夠與結合至IL-1β之IL-1R結合之所有同型及變異體。野生型IL-1RAP之例示性胺基酸序列可以UniProtKB-Q9NPH3獲得，亦以SEQ ID NO: 74形式包括在本文中。

【0205】 如本文所使用之術語「IL-1sRI」包括可藉由涉及金屬蛋白酶之蛋白水解裂解產生之IL-1RI之所有可溶性形式。天然存在之IL-1sRI之分子量可在約45 kDa至60 Kda範圍內。此術語亦涵蓋能夠與IL-1α及/或IL-1β結合之IL-1sRI之所有同型及變異體。

【0206】 如本文所使用之術語「IL-1sRII」包括可藉由涉及金屬蛋白酶之蛋白水解裂解產生之IL-1RII之所有可溶性形式。天然存在之IL-1sRII之分子量可在約45 kDa至60 Kda範圍內。此術語亦涵蓋能夠與IL-1α及/或IL-1β結合之IL-1sRII之所有同型及變異體。

【0207】 如本文所使用之術語「IL-1受體拮抗劑」一般包括可與IL-1α或IL-1β競爭結合至IL-1受體且抑制IL-1α或IL-1β活性之任何蛋白質。IL-1受體拮抗劑可包括諸如IL-1Ra、IL-1sRI及IL-1sRII之天然存在之拮抗劑以及可阻斷IL-1α或IL-1β之結合以結合至IL-1受體，詳言之IL-1RI之其他人工拮抗劑。

【0208】 如本文所使用之術語「IL-1Ra」包括野生型IL-1Ra以及其能夠與IL-1α及/或IL-1β結合之所有同型及變異體。野生型IL-1Ra之例示性胺基酸序列可以UniProtKB-P18510獲得，亦以SEQ ID NO: 76形式包括

在本文中。

【0209】 如本文所使用之「癌症」係指特徵在於惡性細胞生長或贅生物、異常增殖、浸潤或轉移之任何醫學病狀，且可為良性或惡性的，且包括諸如白血病之實體瘤及非實體癌(例如血液科惡性疾病)兩者。如本文所使用之「實體瘤」係指贅生性細胞及/或惡性細胞之實體塊。

【0210】 術語「醫藥學上可接受之」指示(多種)指定載劑、媒劑、稀釋劑、賦形劑及/或鹽一般與構成調配物之其他成分在化學及/或物理上相容，且與其接受者在生理上相容。

【0211】 本文提及「約」值或參數包括(且描述)關於該值或參數本身之實施例。舉例而言，提及「約X」之描述包括「X」之描述。數值範圍包括定義該範圍之數值。一般而言，術語「約」係指變數之指示值以及在指示值之實驗誤差範圍內(例如在平均值之95%信賴區間內)或在指示值之10%內(以較大者為準)之變數之所有值。

【0212】 當關於胺基酸序列(例如，肽、多肽或蛋白質)使用時，術語「融合」或「經融合」係指例如藉由化學鍵結或重組手段將兩個或更多個胺基酸序列組合成非天然存在之單一胺基酸序列。融合胺基酸序列可藉由兩個編碼聚核苷酸序列之基因重組產生，且可藉由將含有重組聚核苷酸之構築體引入宿主細胞中之方法來表現。

【0213】 術語「醫藥學上可接受之」指示(多種)指定載劑、媒劑、稀釋劑、賦形劑及/或鹽一般與構成調配物之其他成分在化學及/或物理上相容，且與其接受者在生理上相容。

I. 靶向免疫檢查點分子且阻斷IL-1活性之雙功能分子

【0214】 本發明提供包含與免疫檢查點分子結合之第一部分及阻斷

介白素-1 (IL-1)活性之第二部分的雙功能分子。本文提供之雙功能分子允許藉由用IL-1結合部分或IL-1受體(IL-1R)結合部分(亦即，雙功能分子之第二部分)阻斷IL-1與IL-1受體之間的相互作用來阻斷及/或降低腫瘤微環境中之IL-1活性。IL-1結合部分及/或IL-1R結合部分可連接至靶向免疫檢查點分子之部分(亦即，雙功能分子之第一部分)，該免疫檢查點分子可在某些腫瘤細胞或免疫細胞之表面上存在。

【0215】 IL-1為炎性細胞介素。炎症為腫瘤微環境之重要組成部分，且IL-1在致癌過程及腫瘤發展中起著關鍵作用(A. Mantovani等人, Immunol Rev. 2018年1月; 281(1): 57–61.)。IL-1在包括驅動慢性非可控性炎症、腫瘤血管生成、IL-17路徑活化、骨髓源性抑制細胞(MDSC)之誘導以及巨噬細胞募集、侵襲及轉移之腫瘤起始及發展中以不同程度起作用(出處同上)。

【0216】 免疫檢查點分子在諸如T細胞、自然殺手細胞等之某些免疫細胞上表現。一些癌細胞亦可表現某些免疫檢查點分子，此可阻斷免疫檢查點之活化，從而使得癌細胞能夠避開免疫系統之監視。

【0217】 藉由減少腫瘤微環境中之IL-1且減少檢查點阻斷，本發明提供可用於治療諸如癌症、自體免疫疾病、傳染病等之免疫檢查點相關疾病之新穎雙功能分子。

【0218】 在某些實施例中，第一部分包含具有免疫刺激或共刺激活性之檢查點分子之促效劑。該等免疫刺激性檢查點分子可包括但不限於CD27、CD70、CD28、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、CD40、CD40L (CD154)、CD122、CD137、CD137L、OX40 (CD134)、OX40L (CD252)、GITR、ICOS (CD278)及ICOSLG (CD275)、CD2、ICAM-1、

LFA-1 (CD11a/CD18)、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160及CD83。

【0219】在某些實施例中，第一部分包含具有免疫抑制或共抑制活性之檢查點分子之抑制劑。該等免疫抑制性檢查點分子可包括但不限於A2AR、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、BTLA (CD272)、CTLA-4 (CD152)、IDO1、IDO2、TDO、KIR、LAG3、NOX2、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 (CD328)、TIGIT、PVR (CD155)、SIGLEC9 (CD329)、CD160、LAIR1、2B4 (CD244)、CD47及B7-H5。

【0220】在某些實施例中，免疫檢查點分子為PD-L1。在某些實施例中，第一部分包含針對PD-L1之抗體部分或其抗原結合片段。在某些實施例中，第一部分包含針對PD-L1之拮抗劑抗體部分或其抗原結合片段。

【0221】在某些實施例中，第二部分包含IL-1結合部分或IL-1受體(IL-1R)結合部分。

【0222】IL-1α及IL-1β兩者均為促炎的且與IL-1R結合。在與IL-1α或IL-1β結合後，IL-1R可將IL-1R輔助蛋白及轉接蛋白MyD88兩者募集至受體複合物，從而引起下游信號傳導級聯之活化且最終引起大量免疫及炎症基因活化。本發明人發現，阻斷IL-1活性或其與IL-1R之結合以及免疫檢查點分子之調節將為有用的。

【0223】在某些實施例中，IL-1為IL-1α或IL-1β。在某些實施例中，IL-1β為人IL-1β。

【0224】在某些實施例中，第二部分包含IL-1結合部分。在某些實施例中，IL-1結合部分特異性結合至IL-1α或IL-1β。在某些實施例中，IL-1結合部分包含可溶性IL-1R、IL-1R之IL-1結合片段或變異體、或針對

IL-1之抗體或其抗原結合片段。

【0225】 可溶性IL-1R可為IL-1R之域或片段，例如IL-1R之胞外域(ECD)。可替代地，可溶性IL-1R亦可為作為天然可溶且能夠與IL-1結合之同型的IL-1sRI或IL-1sRII。

【0226】 技術人員應理解，IL-1RI或IL-1RI之ECD、或IL-1RII或IL-1RII之ECD、或IL-1RAP或IL-1RAP之ECD、或IL-1sRI或IL-1sRII之經縮短片段結合至IL-1 (例如，IL-1α或IL-1β)可為足夠的，只要此類片段含有IL-1結合域即可。因此，本發明亦涵蓋IL-1RI、IL-1RI之ECD、或IL-1RII或IL-1RII之ECD、或IL-1RAP或IL-1RAP之ECD、IL-1sRI及IL-1sRII中任一者之所有IL-1結合片段及變異體。在某些實施例中，IL-1結合部分包含SEQ ID NO: 73、74或75之胺基酸序列或其IL-1結合片段或變異體。在某些實施例中，IL-1結合部分包含與SEQ ID NO: 73、74及75中之任一者具有至少80%序列一致性之胺基酸序列或其IL-1結合片段或變異體。

【0227】 在某些實施例中，IL-1結合部分包含針對IL-1之抗體或其抗原結合片段。亦可使用針對IL-1之抗體或其抗原結合片段，只要該等抗體或抗原結合片段可干擾IL-1 (例如IL-1α或IL-1β)與IL-1R之結合即可。

【0228】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區及/或輕鏈可變區係來自選自由以下組成之群之抗IL-1α抗體：XB2001、魯吉珠單抗、LY2189102及貝邁奇單抗，或來自選自由以下組成之群之抗IL-1β抗體：SSGJ-613、CDP484、卡那單抗及吉伏組單抗。

【0229】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包

含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 104或SEQ ID NO: 112之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 105或SEQ ID NO: 113之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 106或SEQ ID NO: 114之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 107或SEQ ID NO: 115之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 108或SEQ ID NO: 116之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 109或SEQ ID NO: 117之序列的LCDR3。

【0230】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 104之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 105之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 106之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 107之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 108之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 109之序列的LCDR3。

【0231】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 112之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 113之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 114之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 115之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 116之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 117之序列的LCDR3。

【0232】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 110及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 111及與以上序列具有至少80%序

列一致性之其同源序列。

【0233】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 102及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 103及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0234】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 110及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 111及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0235】 在某些實施例中，第二部分包含IL-1R結合部分。

【0236】 在某些實施例中，IL-1R結合部分包含IL-1Ra或其IL-1R結合片段或變異體。IL-1Ra為IL-1R之拮抗劑且可與IL-1α或IL-1β競爭結合至IL-1R。類似地，技術人員應理解，IL-1Ra之經縮短片段用於結合至IL-1R及/或與IL-1α或IL-1β競爭可為足夠的。在某些實施例中，IL-1R結合部分包含IL-1Ra之經截短形式。在某些實施例中，IL-1R結合部分包含SEQ ID NO: 67或76之胺基酸序列或其任何IL-1結合片段或變異體。在某些實施例中，IL-1R結合部分包含與SEQ ID NO: 67或76具有至少80%序列一致性之胺基酸序列或其任何IL-1結合片段或變異體。技術人員應理解，野生型IL-1Ra之變異體亦可用於本發明中，只要此類變異體能夠與IL-1α或IL-1β競爭與IL-1R結合即可。

【0237】 在某些實施例中，IL-1R結合部分包含針對IL-1R之抗體或

其抗原結合片段。亦可使用針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段，只要該等抗體或抗原結合片段可與IL-1α或IL-1β競爭與IL-1R結合即可。

【0238】 在某些實施例中，針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區及/或輕鏈可變區係來自選自由以下組成之群之抗體：司柏索利單抗、艾特利單抗、伊姆西多單抗、AMG 108、邁瑞利單抗、尼達利單抗、MEDI8968、REGN6490、HB0034及CSC012。

II. 靶向PD-L1及第二部分之雙功能分子

【0239】 當腫瘤微環境(「TME」)富集免疫抑制性細胞介素時，PD-1/PD-L1軸檢查點抑制劑(例如，PD-L1抗體)之治療功效可能會受到限制。局部微環境中之該等免疫抑制性細胞介素之信號傳導可減少腫瘤浸潤性T細胞，且使其偏向Treg且減弱免疫效應細胞之活化。

【0240】 在一個態樣中，本發明提供包含與PD-L1結合之第一部分及a)阻斷免疫抑制性細胞介素活性或b)刺激抗腫瘤免疫之第二部分的新穎雙功能分子。該分子可為化合物、肽、多肽、蛋白質或其任何組合。第二部分可藉由阻斷免疫抑制活性或細胞介素、或增加或刺激免疫來恢復腫瘤微環境中之免疫反應。

【0241】 在某些實施例中，本文提供之雙功能分子包含與PD-L1結合之第一部分(亦即，PD-L1結合部分)及阻斷免疫抑制性細胞介素活性之第二部分。

【0242】 在某些實施例中，免疫抑制性細胞介素包含轉型生長因子β (TGF-β)超家族、IL-1或血管內皮生長因子(VEGF)中之細胞介素。在某些實施例中，TGF-β超家族中之免疫抑制性細胞介素包括骨成形性蛋白

(BMP)、活化素、NODAL以及生長及分化因子(GDF)。

【0243】 在某些實施例中，免疫抑制性細胞介素為TGF-β。在某些實施例中，免疫抑制性細胞介素為IL-1。

【0244】 在某些實施例中，第二部分包含TGFβ結合部分。在某些實施例中，第二部分包含IL-1結合部分。如本文所使用之術語「結合部分」、「結合片段」係指能夠與目標分子或複合物特異性結合之部分或片段。術語「TGFβ結合部分」係指能夠與TGFβ家族之一或多個家族成員或同型(例如，TGFβ1、TGFβ2或TGFβ3)特異性結合之部分。類似地，術語「IL-1結合部分」係指能夠與IL-1家族之一或多個家族成員(例如，IL-1α、IL-1β)特異性結合之部分。

【0245】 在某些實施例中，本文提供之雙功能分子包含與PD-L1結合之第一部分(亦即，PD-L1結合部分)及刺激抗腫瘤免疫之第二部分。在某些實施例中，第二部分包含免疫刺激性多肽或其功能等效物或其變異體。在某些實施例中，免疫刺激性多肽為介白素(IL)-2 (IL-2)、IL-15、IL-21、IL-10、IL-12、IL-23、IL-27、IL-35、粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、可溶性CD4、可溶性LAG-3或IFN-α或其功能等效物。

【0246】 在某些實施例中，第二部分包含免疫抑制性受體信號傳導之拮抗劑。在某些實施例中，免疫抑制性受體為SIRPα。

【0247】 在某些實施例中，雙功能分子包含該等第二部分中之一或多者。在某些實施例中，該等第二部分中之一或多者可為相同類型，例如，其中之各者可阻斷免疫抑制性細胞介素活性，或其中之各者可刺激抗腫瘤免疫。在某些實施例中，該等第二部分中之一或多者可為不同類型。

在某些實施例中，該等第二部分中之各者可具有相同序列或可具有不同胺基酸序列。

i. TGFβ結合部分

【0248】在某些實施例中，TGFβ結合部分包含可溶性TGFβ受體(TGFβR)或其TGFβ結合片段或變異體、或針對TGFβ之抗體及其抗原結合片段。

【0249】「TGFβ結合部分」在本發明中亦可稱為「TGFβ Trap」。因此，靶向PD-L1及TGFβ兩者之蛋白質在本發明中亦可稱為「抗PD-L1/TGFβ Trap」。

【0250】在某些實施例中，TGFβ結合部分與人及/或小鼠TGFβ結合。在某些實施例中，TGFβ結合部分能夠拮抗及/或抑制TGFβ信號傳導路徑。在某些實施例中，TGFβ結合部分能夠拮抗及/或抑制TGFβ。

【0251】在本發明中，TGFβ結合部分可包含與TGFβ家族之一或多個家族成員或同型特異性結合之任何部分。在某些實施例中，TGFβ結合部分包含與TGFβ1 (例如，人TGFβ1)、TGFβ2 (例如，人TGFβ2)及/或TGFβ3 (例如，人TGFβ3)結合之部分或其具有類似或經改善之TGFβ結合親和力之變異體。在某些實施例中，TGFβ結合部分包含與TGFβ1 (例如，人TGFβ1)結合之部分。在某些實施例中，TGFβ結合部分包含與TGFβ2 (例如，人TGFβ2)結合之部分。在某些實施例中，TGFβ結合部分包含與TGFβ3 (例如，人TGFβ3)結合之部分。在某些實施例中，TGFβ結合部分包含與TGFβ1 (例如，人TGFβ1)及TGFβ2 (例如，人TGFβ2)兩者特異性結合之部分。在某些實施例中，TGFβ結合部分包含與TGFβ1 (例如，人TGFβ1)及TGFβ3 (例如，人TGFβ3)兩者特異性結合之部分。在某

些實施例中，TGFβ結合部分包含與TGFβ2 (例如，人TGFβ2)及TGFβ3 (例如，人TGFβ3)兩者特異性結合之部分。在某些實施例中，TGFβ結合部分包含與TGFβ1 (例如，人TGFβ1)、TGFβ2 (例如，人TGFβ2)及TGFβ3 (例如，人TGFβ3)中之各者特異性結合之部分。熟習此項技術者應瞭解，與TGFβ家族之一個家族成員或同型結合之TGFβ結合部分可能夠以類似或更高親和力與TGFβ家族之一或多個其他家族成員或同型結合。

【0252】 在某些實施例中，TGFβ結合部分包含相對於TGFβ2及/或TGFβ3選擇性地結合至TGFβ1之部分。

【0253】 在某些實施例中，TGFβ結合部分包含以類似親和力與人TGFβ1及小鼠TGFβ1特異性結合之部分。

【0254】 在某些實施例中，本發明之TGFβ結合部分包含可溶性TGFβ受體(TGFβR)或其TGFβ結合片段或變異體。

【0255】 例示性TGFβ受體包括TGFβRI、TGFβRII及TGFβRIII。在某些實施例中，TGFβ受體選自由以下組成之群：TGFβ受體I (TGFβRI)、TGFβ受體II (TGFβRII)、TGFβ受體III (TGFβRIII)及其任何組合。在某些實施例中，TGFβ受體為TGFβRI (例如，人TGFβRI)。在某些實施例中，TGFβ受體為TGFβRII (例如，人TGFβRII)。在某些實施例中，TGFβ受體為TGFβRIII (例如，人TGFβRIII)。

【0256】 在某些實施例中，TGFβ結合部分包含TGFβ受體(例如，人TGFβ受體)之胞外域(ECD)或其TGFβ結合片段或變異體。在某些實施例中，TGFβ受體之ECD包含TGFβRI (例如，人TGFβRI)之ECD、TGFβRII (例如，人TGFβRII)之ECD、TGFβRIII (例如，人TGFβRIII)之ECD或其任何組合。在某些實施例中，TGFβRII之ECD包含SEQ ID NO: 66、79之

胺基酸序列或與該胺基酸序列具有至少80% (例如，至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列一致性、但保留針對TGFβ之結合特異性之胺基酸序列。在某些實施例中，TGFβRI之ECD包含SEQ ID NO: 77之胺基酸序列或與該胺基酸序列具有至少80% (例如，至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列一致性、但保留針對TGFβ之結合特異性之胺基酸序列。在某些實施例中，TGFβRIII之ECD包含SEQ ID NO: 78之胺基酸序列或與該胺基酸序列具有至少80% (例如，至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列一致性、但保留針對TGFβ之結合特異性之胺基酸序列。

【0257】 在某些實施例中，TGFβ結合部分包含針對TGFβ之抗體及其抗原結合片段。例示性抗TGFβ抗體包括非蘇木單抗(fresolimumab)及美替木單抗(metelimumab)以及在以下中描述之抗TGFβ抗體或其抗原結合片段：例如，US7494651B2、US8383780B2、US8012482B2、WO 2017141208A1，該等案中之各者以全文引用之方式併入本文中。

【0258】 在某些實施例中，TGFβ結合部分包含一或多種TGFβ受體之一或多個ECD及/或一或多種抗TGFβ抗體或其抗原結合片段的組合。

【0259】 一或多個ECD可相同或不同。舉例而言，TGFβ結合部分可包含TGFβ受體之ECD之相同重複序列，或可替代地，可包含同一TGFβ受體之不同ECD序列之組合，或可替代地，可包含來自不同TGFβ受體之不同ECD之組合。類似地，一或多種抗TGFβ抗體可相同或不同。

【0260】 在某些實施例中，TGFβ結合部分包含選自由以下組成之

群之ECD之組合(或融合體)：TGFβRI (例如，人TGFβRI)之ECD、TGFβRII (例如，人TGFβRII)之ECD、TGFβRIII (例如，人TGFβRIII)之ECD或其任何組合。

【0261】 在某些實施例中，TGFβ結合部分包含一或多種抗TGFβ抗體或其抗原結合片段之組合(或融合體)。

【0262】 在某些實施例中，TGFβ結合部分包含以下之組合(或融合體)：選自由以下組成之群之ECD：TGFβRI (例如，人TGFβRI)之ECD、TGFβRII (例如，人TGFβRII)之ECD、TGFβRIII (例如，人TGFβRIII)之ECD；一或多種抗TGFβ抗體或其抗原結合片段；或其任何組合。

ii. IL-1結合部分

【0263】 在某些實施例中，第二部分包含IL-1結合部分。在某些實施例中，IL-1為IL-1α或IL-1β。在某些實施例中，IL-1β為人IL-1β。

【0264】 在某些實施例中，IL-1結合部分特異性結合至IL-1α或IL-1β。在某些實施例中，IL-1結合部分包含相對於IL-1α選擇性地結合至IL-1β之部分或相對於IL-1β選擇性地結合至IL-1α之部分。

【0265】 在某些實施例中，IL-1結合部分包含可溶性IL-1R、IL-1R之IL-1結合片段或變異體、或針對IL-1之抗體或其抗原結合片段。

【0266】 可溶性IL-1R可包含IL-1R之域或片段或變異體，例如，IL-1R之胞外域(ECD)。可替代地，可溶性IL-1R亦可包含作為天然可溶且能夠與IL-1結合之同型的IL-1sRI或IL-1sRII。

【0267】 技術人員應理解，IL-1R或IL-1R之ECD、或IL-1sRI或IL-1sRII之經縮短片段結合至IL-1 (例如，IL-1α或IL-1β)可為足夠的，只要此類片段含有IL-1結合域即可。因此，本文提供之IL-1結合部分亦可包含

IL-1R、IL-1R之ECD、IL-1sRI及IL-1sRII中之任一者之IL-1結合片段。在某些實施例中，IL-1結合部分包含SEQ ID NO: 73、74或75之胺基酸序列或其IL-1結合片段或變異體。在某些實施例中，IL-1結合部分包含與SEQ ID NO: 73、74及75中之任一者具有至少80%序列一致性之胺基酸序列或其IL-1結合片段或變異體。

【0268】 在某些實施例中，IL-1結合部分包含針對IL-1之抗體或其抗原結合片段。亦可使用針對IL-1之抗體或其抗原結合片段，只要該等抗體或抗原結合片段可干擾IL-1 (例如IL-1α或IL-1β)與IL-1R之結合即可。

【0269】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區及/或輕鏈可變區係來自選自由以下組成之群之抗IL-1α抗體：XB2001、魯吉珠單抗、LY2189102及貝邁奇單抗，或來自選自由以下組成之群之抗IL-1β抗體：SSGJ-613、CDP484、卡那單抗及吉伏組單抗。

【0270】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 104或SEQ ID NO: 112之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 105或SEQ ID NO: 113之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 106或SEQ ID NO: 114之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 107或SEQ ID NO: 115之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 108或SEQ ID NO: 116之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 109或SEQ ID NO: 117之序列的LCDR3。

【0271】 在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 104之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 105之序列的HCDR2及包含SEQ

ID NO: 106之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 107之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 108之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 109之序列的LCDR3。

【0272】在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 112之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 113之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 114之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 115之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 116之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 117之序列的LCDR3。

【0273】在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 110及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 111及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0274】在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 102及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 103及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0275】在某些實施例中，針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 110及與其具有至少80%序列一致性之其同源序

列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 111及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【0276】 在某些實施例中，IL-1結合部分包含選自由以下組成之群之一或多個部分之組合：IL-1R、IL-1R之ECD、IL-1sRI、IL-1sRII、針對IL-1之抗體、其任何IL-1結合片段及其任何組合。該一或多個部分可藉由直接鍵連接或可藉由合適的連接子連接。

【0277】 在某些實施例中，IL-1R結合部分包含IL-1Ra或其IL-1R結合片段或變異體。IL-1Ra為IL-1R之拮抗劑且可與IL-1α或IL-1β競爭結合至IL-1R。類似地，技術人員應理解，IL-1Ra之經縮短片段用於結合至IL-1R及/或與IL-1α或IL-1β競爭可為足夠的。在某些實施例中，IL-1R結合部分包含IL-1Ra之經截短形式。在某些實施例中，IL-1R結合部分包含SEQ ID NO: 67之胺基酸序列或其任何IL-1結合片段或變異體。在某些實施例中，IL-1R結合部分包含與SEQ ID NO: 67具有至少80%序列一致性之胺基酸序列或其任何IL-1結合片段或變異體。技術人員應理解，野生型IL-1Ra之變異體亦可用於本發明中，只要此類變異體能夠與IL-1α或IL-1β競爭與IL-1R結合即可。

【0278】 在某些實施例中，IL-1R結合部分包含針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段。亦可使用針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段，只要該等抗體或抗原結合片段可與IL-1α或IL-1β競爭與IL-1R結合即可。

【0279】 在某些實施例中，IL-1R結合部分包含選自由以下組成之群之一或多個部分之組合：IL-1Ra、針對IL-1R之抗體、其任何IL-1R結合片段或變異體及其任何組合。該一或多個部分可藉由直接鍵連接或可藉由合適的連接子連接。

【0280】在某些實施例中，針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區及/或輕鏈可變區係來自選自由以下組成之群之抗體：司柏索利單抗、艾特利單抗、伊姆西多單抗、AMG 108、邁瑞利單抗、尼達利單抗、MEDI8968、REGN6490、HB0034及CSC012。

iii. 免疫刺激性多肽

【0281】在某些實施例中，第二部分包含免疫刺激性多肽或其功能等效物或其變異體。在某些實施例中，免疫刺激性多肽為可溶性CD4、可溶性LAG-3或其功能等效物。

【0282】在某些實施例中，可溶性LAG-3包含LAG-3之胞外域(ECD)或其MHC II類(MHCII)結合片段或變異體。

【0283】LAG-3 (Uniprot編號：Q61790)屬於免疫球蛋白(Ig)超家族，為一種包含503個胺基酸之I型跨膜蛋白。Lag-3包含胞內域(ICD)、跨膜域(TMD)及胞外域(ECD)。ECD包含四個Ig樣域，亦即D1至D4，其中D1包含9個β-鏈：A、B、C、C'、C''、D、E、F及G鏈。在C鏈與C'鏈之間，存在形成「額外環」之具有約30個胺基酸之額外序列。據報導，該「額外環」參與LAG-3與MHCII之間的相互作用。在某些實施例中，可溶性LAG-3包含額外環、D1域、D1加D2域或其任何MHC II結合片段或變異體之胺基酸序列。在某些實施例中，可溶性LAG-3包含SEQ ID NO: 99、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101之胺基酸序列或其任何MHC II結合片段或變異體。

【0284】LAG-3在經活化T細胞、天然殺手細胞、B細胞及漿細胞樣樹突狀細胞上表現。LAG-3之主要配位體為MHC II類，與CD4相比，

LAG-3以更高親和力與MHC II類結合。連接肽(CP)存在於LAG-3之D4與TMD之間，其中在存在金屬蛋白酶ADAM10及/或ADAM17之情況下發生裂解以產生經裂解之可溶性LAG-3。參見例如Huard等人, Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:5744-9.；Workman等人, J Immunol 2002;169:5392–5.doi:10.4049/jimmunol.169.10.5392；及Lawrence等人, J Immunother Cancer. 2015; 3(增刊2): P216，該等文獻以引用之方式併入本文中。

【0285】 LAG-3亦編碼經轉譯成LAG-3之可溶性形式的替代性剪接變異體。可溶性LAG-3經由MHCII信號傳導來活化抗原呈現細胞(APC)，從而引起活體內抗原特異性T細胞反應增加。舉例而言，可溶性LAG-3活化樹突狀細胞(DC)，且據報導，其參與經細胞介素活化(諸如經TNF-α及/或IL-12活化)之旁觀者T細胞的促炎活動，且其可直接活化DC。參見例如Triebel, Trends Immunol., 2003, 24: 619-622，該文獻以引用之方式併入本文中。

【0286】 在某些實施例中，可溶性LAG-3包含依替莫德α (Eftilagimod alpha) (IMP321)或其MHC II結合片段或變異體。IMP321為LAG-3之可溶性二聚體重組形式。IMP321藉由經由MHCII分子刺激樹突狀細胞來誘導持續免疫反應。已顯示MP321及抗PD-1抗體或抗PD-L1抗體之組合療法協同活化T細胞(詳言之，CD8+ T細胞)。參見例如Luc等人, Future Oncol Actions Search in PubMed Search in NLM Catalog Add to Search. 2019年6月; 15(17):1963-1973. doi:10.2217/fon-2018-0807. 電子版2019年4月12日.；Julio等人, Journal of Clinical Oncology, 第37卷, 第15期；及US10874713 B，該等文獻及該案以引用之方式併入本文中。

iv. 免疫抑制性受體信號傳導之拮抗劑

【0287】 在某些實施例中，第二部分包含免疫抑制性受體信號傳導之拮抗劑。在某些實施例中，免疫抑制性受體為SIRPα。

【0288】 如本文所使用，可與術語「信號調節蛋白α」互換之術語「SIRPa」係指主要在骨髓細胞及樹突狀細胞上表現之抑制性受體。SIRPα屬於SIRPs家族，該家族亦包括幾種其他跨膜糖蛋白，包括SIRPβ及SIRPγ。SIRPs家族之各成員含有3個類似的胞外Ig樣域及不同的跨膜及細胞質域。

【0289】 SIRPa可與遞送「不要吃我」信號以抑制吞噬作用之CD47結合，且阻斷CD47介導之SIRPa於吞噬細胞上之接合可引起移除攜帶「吃我」信號之活細胞。CD47為一種廣泛表現之跨膜糖蛋白，該跨膜糖蛋白具有一個胞外N端IgV域、五個跨膜域及一個短C端胞內尾。CD47充當SIRPα之細胞配位體。腫瘤細胞經常過度表現CD47以避開巨噬細胞介導之破壞。已顯示CD47與SIRPα之相互作用參與巨噬細胞介導之吞噬作用之調節(Takenaka等人, *Nature Immunol.*, 8(12): 1313-1323, 2007)。

【0290】 在某些實施例中，第二部分阻斷CD47與SIRPα之間的相互作用。在各種臨床前模型中，阻斷CD47與SIRPα相互作用之療法會刺激活體外癌細胞吞噬作用及活體內抗腫瘤免疫反應。

【0291】 第二部分可包含CD47結合域或SIRPα結合域。在某些實施例中，免疫抑制性受體為信號調節蛋白α (SIRPα)。在某些實施例中，第二部分阻斷CD47與SIRPα之間的相互作用。在某些實施例中，第二部分包含CD47結合域或SIRPα結合域。在某些實施例中，CD47結合域包含可溶性SIRPα或其CD47結合片段、或抗CD47抗體或其抗原結合片段。

【0292】 在某些實施例中，可溶性SIRPα包含SIRPα之胞外域(ECD)

或其CD47結合片段或變異體。在某些實施例中，可溶性SIRP包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或與該胺基酸序列具有至少80% (例如，至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列一致性、但保留針對CD47之結合特異性之胺基酸序列。視情況而言，可溶性SIRP為經工程改造之高親和力SIRP變異體，該變異體有效地拮抗癌細胞上之CD47，但其本身不會誘導巨噬細胞吞噬作用。在某些實施例中，SIRP變異體包含相對於SEQ ID NO: 98之選自由以下組成之群之一或多個突變：L4V、L4I、V6I、V6L、A21V、V27I、V27L、I31T、I31S、I31F、E47V、E47L、K53R、E54Q、H56P、H56R、V63I、S66T、S66G、K68R、V92I、F94L、F94V及F103V。在某些實施例中，SIRPa變異體包含選自由以下組成之群之突變之組合：1) V27I、K53R、S66T、K68R、F103V；2) L4V、V27L、E47V、K53R、E54Q、S66G、K68R、V92I；3) L4V、V6I、A21V、V27I、I31T、E47L、K53R、H56P、S66T、K68R、F94L；4) V6I、V27I、I31S、E47V、K53R、E54Q、H56P、S66G、V92I、F94L；5) L4I、A21V、V27I、I31F、E47V、K53R、E54Q、H56R、S66G、F94V、F103V；6) L4V、V6I、V27I、I31F、E47V、K53R、H56R、S66G、K68R、V92I、F94L；7) L4V、V6L、I31F、E47V、K53R、H56P、S66G、V92I、F103V；8) V6I、V27I、I31F、E47L、K53R、E54Q、H56P、S66T；9) L4V、V6I、V27I、I31F、E47V、K53R、E54Q、H56P、V63、S66T、K68R、V92I；10) V6I、V27I、I31T、E47V、K53R、E54Q、H56P、S66G、K68R、V92I、F103V；及11) V6I、V27I、I31F、E47V、K53R、E54Q、H56P、S66T、V92I。參見例如Kipp

Weiskopf等人 Science 341, 88 (2013)，該文獻以引用之方式併入本文中。

【0293】在某些實施例中，SIRPα結合域包含可溶性CD47或其SIRPα結合片段、或抗SIRPα抗體或其抗原結合片段。在某些實施例中，可溶性CD47包含CD47之胞外域(ECD)或其SIRPα結合片段、抗SIRPα抗體或其抗原結合片段。

【0294】在某些實施例中，CD47結合域包含抗CD47抗體及其抗原結合片段。例示性抗CD47抗體包括但不限於人源化5F9抗體、B6H12抗體及ZF1抗體。參見Lu等人, OncoTargets and Therapy, 第13卷, DOI https: //doi.org/10.2147/OTT.S249822，該文獻以引用之方式併入本文中。在某些實施例中，SIRPα結合域包含抗SIRPα抗體或其抗原結合片段。例示性抗SIRPa抗體包括但不限於BI765064及AL008。參見例如WO2019073080A1、WO2019175218A1及WO2018107058A1，該等案以引用之方式併入本文中。

【0295】在某些實施例中，CD47結合域包含一或多種SIRPα、SIRPβ或SIRPγ之一或多個ECD及/或一或多種抗CD47抗體或其抗原結合片段的組合。

【0296】一或多個ECD可相同或不同。舉例而言，CD47結合域可包含SIRPα、SIRPβ或SIRPγ之ECD之相同重複序列，或可替代地，可包含同一SIRPα、SIRPβ或SIRPγ之不同ECD序列之組合，或可替代地，可包含來自不同SIRPα、SIRPβ或SIRPγ之不同ECD之組合。類似地，一或多種抗CD47抗體可相同或不同。

【0297】在某些實施例中，CD47結合域包含選自由以下組成之群

之ECD之組合(或融合體)：SIRPα之ECD、SIRPβ之ECD、SIRPγ之ECD或其任何組合。

【0298】在某些實施例中，CD47結合域包含一或多種抗CD47抗體或其抗原結合片段之組合(或融合體)。

【0299】在某些實施例中，CD47結合域包含以下之組合(或融合體)：選自由以下組成之群之ECD：SIRPα之ECD、SIRPβ之ECD、SIRPγ之ECD；一或多種抗CD47抗體或其抗原結合片段；或其任何組合。

v. **PD-L1結合部分**

【0300】在某些實施例中，本文提供之雙功能分子包含第一部分，該第一部分為PD-L1結合部分。

【0301】在某些實施例中，本發明之PD-L1結合部分與PD-L1（例如，人PD-L1或食蟹獼猴PD-L1)結合。在某些實施例中，本發明之PD-L1結合部分與人PD-L1結合。在某些實施例中，本發明之PD-L1結合部分與食蟹獼猴PD-L1結合。

【0302】在某些實施例中，本發明之PD-L1結合部分包含抗PD-L1抗體部分。在某些實施例中，例示性抗PD-L1抗體經揭示於本發明之抗PD-L1抗體章節及說明性抗PD-L1抗體章節中。

【0303】在某些實施例中，抗PD-L1抗體部分包含一或多個CDR。在某些實施例中，抗PD-L1抗體部分包含在本發明之說明性抗PD-L1抗體章節中描述之一或多個CDR。在某些實施例中，抗PD-L1抗體部分包含重鏈可變區(VH)及輕鏈可變區(VL)。在某些實施例中，抗PD-L1抗體部分包含如本發明之說明性抗PD-L1抗體章節中揭示之抗PD-L1抗體的VH及VL。

【0304】在某些實施例中，抗PD-L1抗體部分進一步包含附加至重鏈可變區之羧基端之重鏈恆定域。在某些實施例中，重鏈恆定區衍生自由IgA、IgG及IgM組成之群。在某些實施例中，重鏈恆定區衍生自人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2或IgM。在某些實施例中，抗PD-L1抗體部分進一步包含附加至輕鏈可變區之羧基端之輕鏈恆定域。在某些實施例中，輕鏈恆定區衍生自κ輕鏈或λ輕鏈。在某些實施例中，重鏈恆定區包含SEQ ID NO: 80或81之胺基酸序列。在某些實施例中，輕鏈恆定區包含SEQ ID NO: 82之胺基酸序列。

vi. 第一部分與第二部分之間的連接

【0305】在本發明中，第二部分可連接至第一部分之任何部分。舉例而言，諸如TGFβ結合部分或IL-1結合部分之第二部分可連接至諸如PD-L1結合部分(例如，抗PD-L1抗體部分)的第一部分之任何合適部分。

【0306】在某些實施例中，PD-L1結合部分包含一或多個諸如抗體重鏈及輕鏈之多肽鏈。

【0307】在某些實施例中，雙功能分子包含該等第二部分中之一或多者。在某些實施例中，該等第二部分中之至少一者連接至第一部分之多肽鏈之胺基端(N端)或羧基端(C端)。在某些實施例中，該等第二部分中之至少一者連接至第一部分之重鏈之N端或C端，或連接至第一部分之輕鏈之N端或C端。

【0308】在某些實施例中，該等第二部分中之至少一者連接至第一部分之重鏈恆定區之C端。在某些實施例中，該等第二部分中之各者分別連接至第一部分之各重鏈恆定區之C端。

【0309】在某些實施例中，雙功能分子包含該等第二部分中之至少

兩者，該至少兩者中之各者分別連接至第一部分之各重鏈之C端，或該至少兩者中之各者分別連接至第一部分之各輕鏈之C端。在某些實施例中，雙功能分子包含該等第二部分中之至少兩者，該至少兩者中之各者分別連接至第一部分之各重鏈之N端，或該至少兩者中之各者分別連接至第一部分之各輕鏈之N端。

【0310】 在某些實施例中，雙功能分子包含分別連接至以下之該等第二部分中之超過一者：第一部分之重鏈之N端、第一部分之重鏈之C端、第一部分之輕鏈之N端、第一部分之輕鏈之C端或其任何組合。舉例而言，雙功能分子可包含該等第二部分中之至少兩者，該至少兩者中之一者連接至第一部分之重鏈之C端且另一者連接至第一部分之輕鏈之C端。舉例而言，雙功能分子可包含該等第二部分中之至少兩者，該至少兩者中之一者連接至第一部分之重鏈之N端且另一者連接至第一部分之輕鏈之N端。

【0311】 在某些實施例中，一或多個TGFβ結合部分、一或多個IL-1結合部分、一或多種免疫刺激性多肽(例如，可溶性LAG3或可溶性CD4)或一或多個CD47結合部分在選自由以下組成之群之一或多個位置處連接至抗PD-L1抗體部分：抗PD-L1抗體部分之1)重鏈可變區之N端、2)輕鏈可變區之N端、3)重鏈可變區之C端、4)輕鏈可變區之C端、5)重鏈恆定區之C端、6)輕鏈恆定區之C端以及7)其任何組合。

【0312】 在某些實施例中，雙功能分子包含同二聚體重鏈。在某些實施例中，雙功能分子包含異二聚體重鏈。重鏈就第二部分之存在或位置而言為異二聚體的。在某些實施例中，異二聚體重鏈包含一個具有第二部分之重鏈及另一不具有第二部分之重鏈。

vii. 連接子

【0313】 第二部分可直接或經由連接子連接至第一部分。直接連接可為化學連接(諸如共價鍵)。

【0314】 在某些實施例中，雙功能分子進一步包含連接第一部分及第二部分之連接子。如本文所使用之術語「連接子」可為能夠與至少兩個待連接之實體反應的任何合適雙功能部分，從而鍵合該等實體以形成一個分子或維持該等實體足夠緊密地締合。連接子可與或不與其反應官能基一起整合至所得連接分子或結構中。

【0315】 在某些實施例中，該連接子選自由以下組成之群：可裂解連接子、不可裂解連接子、肽連接子、可撓性連接子、剛性連接子、螺旋連接子及非螺旋連接子。

【0316】 在某些實施例中，該連接子包含肽連接子。肽連接子可由藉由肽鍵連接在一起之胺基酸殘基構成。在某些實施例中，肽連接子可進一步包含一或多個非天然胺基酸。在某些實施例中，肽連接子包含具有至少1、2、3、4、5、8、10、15、20、30、50或更多個藉由肽鍵連接之胺基酸殘基且能夠連接兩個或更多個多肽的胺基酸序列。肽連接子可具有或可不具有二級結構。

【0317】 可使用任何合適的肽連接子。許多肽連接子序列為此項技術中已知的，參見例如Holliger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)；Poljak等人, *Structure* 2:1121-1123 (1994)。在某些實施例中，肽連接子可包含選自以下之胺基酸殘基或由選自以下之胺基酸殘基組成：甘胺酸、絲胺酸、丙胺酸、甲硫胺酸、天冬醯胺酸及麩醯胺酸。在一些實施例中，肽連接子可由諸如甘胺酸及丙胺酸之大部分無空間位阻之胺

基酸構成。在一些實施例中，連接子為聚甘胺酸、聚丙胺酸、甘胺酸與丙胺酸之組合(諸如聚(Gly-Ala))或甘胺酸與絲胺酸之組合(諸如聚(Gly-Ser))。

【0318】 在某些實施例中，連接子包含((G)nS)m之胺基酸序列，其中m及n獨立地為選自以下之整數：0至30、1至29、2至28、3至27、4至26、5至25、6至24、7至23、8至22、9至21、10至20、11至19、12至18、13至17、14至16或5。在某些實施例中，m為4且n為4。

【0319】 在某些實施例中，連接子包含SEQ ID NO: 68之胺基酸序列。在某些實施例中，連接子包含與SEQ ID NO: 68具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列一致性之胺基酸序列。

viii. 抗PD-L1抗體及其抗原結合片段

【0320】 在某些實施例中，本文提供之雙功能分子之PD-L1結合部分包含有包含抗PD-L1抗體或其抗原結合片段之部分。在某些實施例中，抗PD-L1抗體及其抗原結合片段能夠特異性地結合至PD-L1。

【0321】 在某些實施例中，如藉由Biacore分析所量測，本文提供之抗PD-L1抗體及其抗原結合片段以不超過0.8 nM、不超過0.7 nM、不超過0.6 nM、不超過0.5 nM或不超過0.4 nM之K_D值特異性地結合至人PD-L1。Biacore分析係基於表面電漿共振技術，參見例如Murphy, M.等人, *Current protocols in protein science*, 第19章, 單元19.14, 2006。在某些實施例中，K_D值係藉由如在本發明之實例6中描述之方法來量測。

【0322】 本文提供之抗體或其抗原結合片段與人PD-L1之結合亦可

藉由「半最大有效濃度」(EC_{50})值表示，該值係指在觀測到其最大結合之50%情況下之抗體濃度。EC_{50}值可藉由此項技術中已知之結合分析來量測，該等結合分析例如為直接或間接結合分析，諸如酶聯免疫吸附分析(ELISA)、螢光經活化細胞分選(FACS)分析及其他結合分析。在某些實施例中，如藉由ELISA所量測，本文提供之抗體及其抗原結合片段以不超過0.3 nM、不超過0.2 nM、不超過0.1 nM或不超過0.09 nM之EC_{50} (亦即，50%結合濃度)特異性地結合至PD-L1。在某些實施例中，如藉由FACS分析所量測，本文提供之抗體及其抗原結合片段以不超過1.4 nM、不超過1.3 nM、不超過1.2 nM、不超過1.1 nM、不超過1.0 nM、不超過0.3 nM、不超過0.25 nM或不超過0.21 nM之EC_{50} (亦即，50%結合濃度)特異性地結合至PD-L1。

【0323】 在一些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段特異性地結合至PD-L1。在一些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段不與B7家族之其他成員結合。

【0324】 在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體及其抗原結合片段能夠阻斷PD-L1與其結合配偶體(例如，PD-1及B7-1)之間的相互作用，如藉由ELISA所量測，該相互作用之IC50不超過2.2、2.1、2.0、1.9、1.8或1.2 μg/ml。

【0325】 在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體及其抗原結合片段能夠阻斷PD-L1與其結合配偶體(例如，PD-1)之間的相互作用，如藉由基於細胞之分析所量測，該相互作用之EC50不超過1.3、1.2、1.1、1.0、0.9或0.8 nM。

ix. 說明性抗PD-L1抗體及其抗原結合片段

【0326】在某些實施例中，本發明之抗PD-L1抗體(亦即，針對PD-L1之抗體)及其抗原結合片段包含一或多個(例如，1、2、3、4、5或6個)CDR，該一或多個CDR包含選自由以下組成之群之序列：**DYYMN** (SEQ ID NO: 1)、**DINPNNX$_1$X$_2$TX$_3$YNHKFKG** (SEQ ID NO: 19)、**WGDGPFAY** (SEQ ID NO: 3)、**KASQNVX$_4$X$_5$X$_6$VA** (SEQ ID NO: 20)、**SX$_7$SX$_8$RYT** (SEQ ID NO: 21)、**QQYSNYPT** (SEQ ID NO: 6)，其中X_1為G或A，X_2為G或D或Q或E或L，X_3為S或M或Q或L或V，X_4為G或P或K，X_5為A或G，X_6為A或I，X_7為A或N或R或V，X_8為N或H或V或D。

【0327】在某些實施例中，重鏈可變區包含：

a) HCDR1，其包含SEQ ID NO: 1之序列，

b) HCDR2，其包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 18，以及

c) HCDR3，其包含SEQ ID NO: 3之序列，

且/或

輕鏈可變區包含：

d) LCDR1，其包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 9，

e) LCDR2，其包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11及SEQ ID NO: 12，以及

f) LCDR3，其包含SEQ ID NO: 6之序列。

【0328】在某些實施例中，重鏈可變區選自由以下組成之群：

g)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 2之

序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；

h)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 13之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；

i)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 14之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；

j)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 15之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；以及

k)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 17之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；以及

l)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 18之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區。

【0329】 在某些實施例中，輕鏈可變區選自由以下組成之群：

a)包含有包含SEQ ID NO: 4之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 5之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區；

b)包含有包含SEQ ID NO: 9之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 5之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區；

c)包含有包含SEQ ID NO: 8之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 5之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區；

d)包含有包含SEQ ID NO: 4之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 12之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區；以及

e)包含有包含SEQ ID NO: 4之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 11之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區。

【0330】 如本文所使用之抗體「4B6」係指包含具有SEQ ID NO: 46之序列之重鏈可變區及具有SEQ ID NO: 47之序列之輕鏈可變區的單株抗體。

【0331】 在某些實施例中，本發明提供包含抗體4B6或抗體4B6之變異體之一或多個(例如，1、2、3、4、5或6個) CDR序列的抗PD-L1抗體及其抗原結合片段。CDR邊界係藉由Kabat慣例來加以定義或鑑定。

【0332】 在某些實施例中，本發明提供包含以下之抗PD-L1抗體及其抗原結合片段：包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列的HCDR1、包含選自由SEQ ID NO: 2、13、14、15、17及18組成之群之胺基酸序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的HCDR3；及/或包含選自由SEQ ID NO: 4、7、8-9組成之群之胺基酸序列的LCDR1、包含選自由SEQ ID NO: 5、10、11-12組成之群之胺基酸序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的LCDR3。

【0333】 表1.抗體4B6之CDR胺基酸序列。

抗體	區	CDR1	CDR2	CDR3
4B6	HCDR	**SEQ ID NO: 1** DYYMN	**SEQ ID NO: 2** DINPNNGGTSYNHKFKG	**SEQ ID NO: 3** WGDGPFAY
	LCDR	**SEQ ID NO: 4** KASQNVGAAVA	**SEQ ID NO: 5** SASNRYT	**SEQ ID NO: 6** QQYSNYPT

【0334】 表2. 抗體4B6之可變區胺基酸序列。

抗體	VH	VL
4B6	SEQ ID NO: 46 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YVFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGDI NPNNGGTSYNHKFKGKATVTVDKSS RTAYMELLSLTSEDSAVYYCVKWGD GPFAYWGQGTLVTVSA	SEQ ID NO: 47 DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKA SQNVGAAVAWYQQKPGQSPKLLIY SASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SNMQSEDLADYFCQQYSNYPTFGS GTKLGIK

【0335】 已知CDR負責抗原結合。然而，已發現，並非所有6個CDR皆為不可缺少或不可改變的。換言之，置換或改變或修飾抗PD-L1抗體4B6中之一或多個CDR、但實質上保留針對PD-L1之特異性結合親和力係可能的。

【0336】 在某些實施例中，本文提供之抗體及其抗原結合片段包含合適的框架區(FR)序列，只要該等抗體及其抗原結合片段可特異性地結合至PD-L1即可。上表1中提供之CDR序列係自小鼠抗體獲得，但其可使用諸如重組技術之此項技術中已知之合適方法接枝至諸如小鼠、人、大鼠、兔等之任何合適物種之任何合適FR序列。

【0337】 在某些實施例中，本文提供之抗體及其抗原結合片段為人源化的。人源化抗體或其抗原結合片段於人中經降低之免疫原性係所需的。人源化抗體在其可變區中為嵌合的，此係因為非人CDR序列經接枝至人FR序列或實質上人FR序列。抗體或抗原結合片段之人源化基本上可藉由用非人(諸如鼠) CDR基因取代人免疫球蛋白基因中之對應人CDR基因來執行(參見例如，Jones等人 (1986) *Nature* 321:522-525；Riechmann等人 (1988) *Nature* 332:323-327；Verhoeyen等人 (1988) *Science* 239:1534-1536)。

【0338】 可使用此項技術中已知之方法選擇合適的人重鏈及輕鏈可變域以達成此目的。在說明性實例中，可使用「最佳擬合」方法，其中針對已知人可變域序列之資料庫篩選或BLAST非人(例如，嚙齒動物)抗體可變域序列，且最接近非人查詢序列之人序列經鑑定且用作用於接枝非人CDR序列之人骨架(參見例如Sims等人, (1993) *J. Immunol.*151:2296；Chothia等人 (1987) *J. Mot. Biol.*196:901)。可替代地，衍生自所有人抗體

之共有序列之框架可用於接枝非人CDR（參見例如Carter等人（1992）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285；Presta等人（1993）*J. Immunol.*,151:2623）。

【0339】在一些實施例中，本發明提供4B6之12種人源化抗體，該等抗體分別經命名為Hu4B6_Hg.2La.1、Hu4B6_Hg.2La.2、Hu4B6_Hg.2La.4、Hu4B6_Hg.2La.6、Hu4B6_Hg.3La.1、Hu4B6_Hg.3La.2、Hu4B6_Hg.3La.4、Hu4B6_Hg.3La.6、Hu4B6_Hg.5La.1、Hu4B6_Hg.5La.2、Hu4B6_Hg.5La.4及Hu4B6_Hg.5La.6。4B6之各人源化抗體之重鏈及輕鏈可變區之SEQ ID NO在表5中示出。4B6之12種人源化抗體中之各者之CDR在表5中示出(下劃線序列)。CDR邊界係藉由Kabat慣例來加以定義或鑑定。

【0340】下表3a示出人源化4B6之變異CDR之胺基酸序列，下表3b示出人源化4B6重鏈及輕鏈可變區之FR。下表4示出嵌合抗體4B6之12種人源化抗體之各重鏈及輕鏈之FR胺基酸序列，該等抗體分別經命名為Hu4B6_Hg.2La.1、Hu4B6_Hg.2La.2、Hu4B6_Hg.2La.4、Hu4B6_Hg.2La.6、Hu4B6_Hg.3La.1、Hu4B6_Hg.3La.2、Hu4B6_Hg.3La.4、Hu4B6_Hg.3La.6、Hu4B6_Hg.5La.1、Hu4B6_Hg.5La.2、Hu4B6_Hg.5La.4及Hu4B6_Hg.5La.6。此12種人源化抗體之重鏈可變區及輕鏈可變區在表5中示出。

【0341】 表3a. 4B6之人源化抗體之CDR變異體之胺基酸序列。

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

【0342】 表3b. 4B6及4B6之人源化抗體的FR序列之胺基酸序列。

SEQ ID NO.	序列	註釋
22	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	人類生殖系序列之HFR1
23	WVRQAPGQGLEWMG	人類生殖系序列之HFR2
24	RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	人類生殖系序列之HFR3
25	WGQGTLVTVSS	人類生殖系序列之HFR4
26	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	人類生殖系序列之LFR1
27	WYQQKPGKAPKLLIY	人類生殖系序列之LFR2
28	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC	人類生殖系序列之LFR3
29	FGQGTKLEIK	人類生殖系序列之LFR4
30	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFT	HFR1變異體
31	WVRQAPGQSLEWMG	HFR2變異體
32	RVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	HFR3變異體1
33	RVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVK	HFR3變異體2
34	RVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	HFR3變異體3
35	RVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVK	HFR3變異體4
36	WYQQKPGKSPKLLIY	LFR2變異體
37	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYC	LFR3變異體1
38	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYC	LFR3變異體2
39	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYC	變異1-FR3之F73L突變
45	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYC	LC變異2-FR3之F73L、A43S、S60D

【0343】 表4. 4B6之人源化抗體之各人源化重鏈及輕鏈可變區之FR胺基酸序列。

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

【0344】 下表5示出人源化4B6重鏈可變區之3種變異體(亦即，Hu4B6_Hg.2、Hu4B6_Hg.3及Hu4B6_Hg.5)及人源化4B6輕鏈可變區之4種變異體(亦即，AM4B6_La.1、AM4B6_La.2、AM4B6_La.4、AM4B6_La.6)。

表5. 4B6之人源化抗體之可變區之胺基酸序列。

抗體	VH	VL
AM4B6_Hg.2La.1	**Hu4B6_Hg.2, SEQ ID NO: 58** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V**FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A**Q**T**QYNHKFKGRVT**V**T**V**D**K**SISTAYMELSRLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTLVTVSS	**AM4B6_La.1, SEQ ID NO: 62** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN**VKG**AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
AM4B6_Hg.2La.2	**Hu4B6_Hg.2, SEQ ID NO: 58** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V**FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A**Q**T**QYNHKFKGRVT**V**T**V**D**K**SISTAYMELSRLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTLVTVSS	**AM4B6_La.2, SEQ ID NO: 63** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN**VPA**AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
AM4B6_Hg.2La.4	**Hu4B6_Hg.2, SEQ ID NO: 58** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V**FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A**Q**T**QYNHKFKGRVT**V**T**V**D**K**SISTAYMELSRLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTLVTVSS	**AM4B6_La.4, SEQ ID NO: 64** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN**V**GAAVAWYQQKPGKAPKLLIYS**V**S**D**RYTGVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK

AM4B6_ Hg.2La.6	**Hu4B6_Hg.2, SEQ ID NO: 58** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V** FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A** **Q**T**Q**YNHKFKGRVT**V**TV**V**D**K**SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTL VTVSS	**AM4B6_La.6, SEQ ID NO: 65** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VGAAVAWYQQKPGKAPKLLIYS**R**S**V**RYT GVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIA TYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
AM4B6_ Hg.3La.1	**AM4B6_Hg.3, SEQ ID NO: 59** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V** FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A** **E**T**L**YNHKFKGRVT**V**TV**V**D**K**SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTL VTVSS	**AM4B6_La.1, SEQ ID NO: 62** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN V**KG**AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYT GVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIA TYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
AM4B6_ Hg.3La.2	**AM4B6_Hg.3, SEQ ID NO: 59** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V** FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A** **E**T**L**YNHKFKGRVT**V**TV**V**D**K**SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTL VTVSS	**AM4B6_La.2, SEQ ID NO: 63** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN V**P**AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYT GVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIA TYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
AM4B6_ Hg.3La.4	**AM4B6_Hg.3, SEQ ID NO: 59** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V** FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A** **E**T**L**YNHKFKGRVT**V**TV**V**D**K**SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTL VTVSS	**AM4B6_La.4, SEQ ID NO: 64** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VGAAVAWYQQKPGKAPKLLIYS**V**S**D**RYT GVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIA TYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
AM4B6_ Hg.3La.6	**AM4B6_Hg.3, SEQ ID NO: 59** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V** FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A** **E**T**L**YNHKFKGRVT**V**TV**V**D**K**SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTL VTVSS	**AM4B6_La.6, SEQ ID NO: 65** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V** FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A** GTSYNHKFKGRVT**V**TV**V**D**K**SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTL VTVSS
AM4B6_ Hg.5La.1	**AM4B6_Hg.5, SEQ ID NO: 60** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V** FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A** **Q**T**V**YNHKFKGRVT**V**TV**V**D**K**SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTL VTVSS	**AM4B6_La.1, SEQ ID NO: 62** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN V**KG**AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYT GVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIA TYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
AM4B6_ Hg.5La.2	**AM4B6_Hg.5, SEQ ID NO: 60** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V** FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A** **Q**T**V**YNHKFKGRVT**V**TV**V**D**K**SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTL VTVSS	**AM4B6_La.2, SEQ ID NO: 63** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN V**P**AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYT GVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIA TYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK

AM4B6_ Hg.5La.4	**AM4B6_Hg.5, SEQ ID NO: 60** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V** FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A** **Q**T**V**YNHKFKGRVT**V**T**V**D**K**SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTL VTVSS	**AM4B6_La.4, SEQ ID NO: 64** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VGAAVAWYQQKPGKAPKLLIYS**V**S**D**RYT GVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIA TYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
AM4B6_ Hg.5La.6	**AM4B6_Hg.5, SEQ ID NO: 60** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V** FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A** **Q**T**V**YNHKFKGRVT**V**T**V**D**K**SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTL VTVSS	**AM4B6_La.6, SEQ ID NO: 65** QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V** FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LEWMGDINPNN**A** GTSYNHKFKGRVT**V**T**V**D**K**SISTAYMELS RLRSDDTAVYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTL VTVSS

【0345】 在某些實施例中，除了非人CDR序列之外，本文提供之人源化抗PD-L1抗體或其抗原結合片段由實質上全人序列構成。在一些實施例中，可變區FR及恆定區(若存在)完全或實質上來自人免疫球蛋白序列。人FR序列及人恆定區序列可衍生自不同人免疫球蛋白基因，例如，FR序列衍生自一種人抗體且恆定區衍生自另一人抗體。在一些實施例中，人源化抗體或其抗原結合片段包含人重鏈HFR1-4及/或輕鏈LFR1-4。

【0346】 在一些實施例中，衍生自人之FR區可與衍生其之人免疫球蛋白包含相同胺基酸序列。在一些實施例中，人FR之一或多個胺基酸殘基經來自親本非人抗體之對應殘基取代。在某些實施例中，可能需要使人源化抗體或其片段非常接近非人親本抗體結構以便最佳化結合特徵(例如，提高結合親和力)。在某些實施例中，本文提供之人源化抗體或其抗原結合片段在該等人FR序列中之各者中包含不超過10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸殘基取代，或在重鏈或輕鏈可變域之所有FR序列中包含不超過10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸殘基取代。在一些實施例中，該胺基酸殘基變化可僅存在於重鏈FR區中，僅存在於輕鏈FR區中，或存在於兩個鏈中。在某些實施例中，使人FR序列之一或多個胺基酸隨機突變以提高結合親和力。在某些實施例中，使人FR序列之一或

多個胺基酸回復突變為親本非人抗體之對應胺基酸以提高結合親和力。

【0347】在某些實施例中，本發明之人源化抗PD-L1抗體及其抗原結合片段包含：重鏈HFR1，其包含**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX$_9$FT** (SEQ ID NO: 40)之序列或與該序列具有至少80%序列一致性之同源序列；重鏈HFR2，其包含**WVRQAPGQX$_{10}$LEWMG** (SEQ ID NO: 41)之序列或與該序列具有至少80%序列一致性之同源序列；重鏈HFR3，其包含**RVTX$_{16}$TVDX$_{11}$SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCX$_{12}$X$_{13}$** (SEQ ID NO: 42)之序列或與該序列具有至少80%序列一致性之同源序列；及重鏈HFR4，其包含**WGQGTLVTVSS** (SEQ ID NO: 25)之序列或與該序列具有至少80%序列一致性之同源序列，其中X$_9$為T或V，X$_{10}$為G或S，X$_{11}$為T或K，X$_{12}$為A或V，且X$_{13}$為R或K。

【0348】在某些實施例中，本發明之人源化抗PD-L1抗體及其抗原結合片段包含：輕鏈LFR1，其包含**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC** (SEQ ID NO: 26)之序列或與該序列具有至少80%序列一致性之同源序列；輕鏈LFR2，其包含**WYQQKPGKX$_{14}$PKLLIY** (SEQ ID NO: 43)之序列或與該序列具有至少80%序列一致性之同源序列；輕鏈LFR3，其包含**GVPX$_{15}$RFSGSGSGTDFTX$_{17}$TISSLQPEDIATYYC** (SEQ ID NO: 44)之序列或與該序列具有至少80%序列一致性之同源序列；及輕鏈LFR4，其包含**FGQGTKLEIK** (SEQ ID NO: 29)之序列或與該序列具有至少80%序列一致性之同源序列，其中X$_{14}$為A或S，X$_{15}$為S或D，X$_{16}$為M或V，且X$_{17}$為F或L。

【0349】在某些實施例中，HFR1包含選自由SEQ ID NO: 22及30組

成之群之序列，HFR2包含選自由SEQ ID NO: 23及31組成之群之序列，HFR3包含選自由SEQ ID NO: 24及32-35組成之群之序列，HFR4包含SEQ ID NO: 25之序列，LFR1包含選自由SEQ ID NO: 26組成之群之序列，LFR2包含選自由SEQ ID NO: 27及36組成之群之序列，LFR3包含選自由SEQ ID NO: 28及37-38、39、45組成之群之序列，且LFR4包含SEQ ID NO: 29之序列。

【0350】 在某些實施例中，本發明之人源化抗PD-L1抗體及其抗原結合片段包含含於重鏈可變區中之HFR1、HFR2、HFR3及/或HFR4序列，該重鏈可變區選自由以下組成之群：Hu4B6_Hg.2 (SEQ ID NO: 58)、AM4B6_Hg.3 (SEQ ID NO: 59)、AM4B6_Hg.5 (SEQ ID NO: 60)。

【0351】 在某些實施例中，本發明之人源化抗PD-L1抗體及其抗原結合片段包含含於輕鏈可變區中之LFR1、LFR2、LFR3及/或LFR4序列，該輕鏈可變區選自由以下組成之群：AM4B6_La.1 (SEQ ID NO: 62)、AM4B6_La.2 (SEQ ID NO: 63)、AM4B6_La.4 (SEQ ID NO: 64)及AM4B6_La.6 (SEQ ID NO: 65)。

【0352】 在某些實施例中，重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列。在某些實施例中，輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列。在某些實施

例中，針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段包含一對選自由以下組成之群之重鏈可變區及輕鏈可變區序列：SEQ ID NO: 49/54、50/54、51/54、52/54、49/55、50/55、51/55、52/55、58/62、58/63、58/64、58/65、59/62、59/63、59/64、59/65、60/62、60/63、60/64及60/65。

【0353】 此等例示性人源化抗PD-L1抗體保留針對PD-L1之特異性結合能力或親和力，且在該態樣中優於親本小鼠抗體4B6。

【0354】 在一些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體及抗原結合片段包含重鏈可變域之全部或一部分及/或輕鏈可變域之全部或一部分。在一個實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段為由本文提供之重鏈可變域之全部或一部分組成之單域抗體。此類單域抗體之更多資訊可在此項技術中獲得(參見例如，美國專利第6,248,516號)。

【0355】 在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段進一步包含免疫球蛋白(Ig)恆定區，該恆定區視情況進一步包含重鏈及/或輕鏈恆定區。在某些實施例中，重鏈恆定區包含CH1、鉸鏈及/或CH2-CH3區(或視情況選用之CH2-CH3-CH4區)。在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段包含人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2或IgM之重鏈恆定區。在某些實施例中，輕鏈恆定區包含Cκ或Cλ。本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段之恆定區可與野生型恆定區序列相同或在一或多個突變方面不同。

【0356】 在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段對人PD-L1具有特異性結合親和力，此足以提供診斷及/或治療用途。

【0357】 本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段可為單株抗

體、多株抗體、人源化抗體、嵌合抗體、重組抗體、雙特異性抗體、多特異性抗體、經標記抗體、二價抗體、抗遺傳型抗體或融合蛋白。重組抗體為使用重組方法在活體外而非在動物體內製備之抗體。

【0358】 在某些實施例中，PD-L1結合部分包含抗PD-L1抗體或其抗原結合片段，該抗PD-L1抗體或其抗原結合片段與包含一對選自由以下組成之群之重鏈可變區及輕鏈可變區序列之抗體或其抗原結合片段競爭結合至PD-L1：SEQ ID NO: 49/54、50/54、51/54、52/54、49/55、50/55、51/55、52/55、58/62、58/63、58/64、58/65、59/62、59/63、59/64、59/65、60/62、60/63、60/64及60/65。

x. 抗體變異體

【0359】 本文提供之抗PD-L1抗體及其抗原結合片段亦涵蓋本文提供之抗體序列之各種變異體。

【0360】 在某些實施例中，抗體變異體在上表1中提供之CDR序列中之一或多個、上表3a、表3b及表5中提供之重鏈可變區或輕鏈可變區之非CDR序列中之一或多個及/或恆定區(例如，Fc區)中包含一或多個修飾或取代。該等變異體保留其親本抗體對PD-L1之結合特異性，但具有一或多種由(多個)修飾或(多個)取代賦予之所需特性。舉例而言，抗體變異體可具有經改善之抗原結合親和力、經改善之醣化模式、經降低之醣化風險、經減少之脫胺、經減少或耗竭之效應功能、經改善之FcRn受體結合、經延長之藥物動力學半衰期、經提高之pH敏感性及/或經提高之與結合之相容性(例如，一或多個所引入之半胱胺酸殘基)。

【0361】 可使用例如「丙胺酸掃描突變誘發」之此項技術中已知之方法篩選親本抗體序列以鑑定合適或較佳的待修飾或取代之殘基(參見例

如Cunningham及Wells (1989) Science, 244:1081-1085)。簡言之，可鑑定目標殘基(例如帶電殘基，諸如Arg、Asp、His、Lys及Glu)且經中性或帶負電胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)置換，且產生經修飾之抗體且針對所關注特性對其進行篩選。若在特定胺基酸位置處之取代展現所關注功能性改變，則該位置可經鑑定為潛在的用於修飾或取代之殘基。可藉由用一種不同類型之殘基(例如半胱胺酸殘基、帶正電殘基等)取代來進一步評估潛在殘基。

xi. 親和變異體

【0362】 抗體之親和變異體可在上表1中提供之一或多個CDR序列、上表3b及4中提供之一或多個FR序列或上表5中提供之重鏈或輕鏈可變區序列中含有修飾或取代。熟習此項技術者可基於上表1中之CDR序列及上表5中之可變區序列容易地鑑定FR序列，此係因為此項技術中熟知在可變區中，CDR區側接兩個FR區。親和變異體保留親本抗體對PD-L1之特異性結合親和力，或甚至比親本抗體具有更高的PD-L1特異性結合親和力。在某些實施例中，CDR序列、FR序列或可變區序列中之至少一個(或全部)取代包含保守取代。

【0363】 熟習此項技術者應理解，在上表1及表3a中提供之CDR序列以及上表5中提供之可變區序列中，一或多個胺基酸殘基可經取代，但所得抗體或抗原結合片段仍保留針對PD-L1之結合親和力或結合能力或甚至具有經改善之結合親和力或結合能力。可使用此項技術中已知之各種方法來達成此目的。舉例而言，可生成抗體變異體(諸如Fab或scFv變異體)之文庫，且用噬菌體展示技術表現該文庫，且隨後針對與PD-L1之結合親和力對該文庫進行篩選。再舉例而言，可使用電腦軟體來虛擬地模擬抗體

與PD-L1之結合，且鑑定抗體上之形成結合界面之胺基酸殘基。在取代中可避開該等殘基以防止結合親和力降低，或靶向該等殘基進行取代以提供更強的結合。

【0364】 在某些實施例中，本文提供之人源化抗PD-L1抗體或其抗原結合片段在CDR序列中之一或多個及/或FR序列中之一或多個中包含一或多個胺基酸殘基取代。在某些實施例中，親和變異體在CDR序列及/或FR序列中總共包含不超過20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個取代。

【0365】 在某些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段包含1、2或3個與上表1及表3a中所列出之一個(或多個)序列具有至少80% (例如，至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列一致性、但以相對於其親本抗體而言類似或甚至更高之位準保留針對PD-L1之特異性結合親和力的CDR序列。

【0366】 在某些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段包含一或多個與上表5中所列出之一個(或多個)序列具有至少80% (例如，至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列一致性，但以相對於其親本抗體而言類似或甚至更高之位準保留針對PD-L1之特異性結合親和力的可變區序列。在一些實施例中，在上表5中列出之可變區序列中總共取代、插入或缺失1至10個胺基酸。在一些實施例中，取代、插入或缺失發生在CDR之外的區域中(例如，FR中)。

xii. 醣化變異體

【0367】 本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段亦涵蓋醣化變

異體，可獲得該等醣化變異體以提高或降低該等抗體或其抗原結合片段之醣化程度。

【0368】 抗PD-L1抗體或其抗原結合片段可包含一或多個引入或移除醣化位點之修飾。醣化位點為具有可與碳水化合物部分(例如，寡醣結構)連接之側鏈之胺基酸殘基。抗體之醣化通常為N連接的或O連接的。N連接係指碳水化合物部分連接至天冬醯胺酸殘基，例如三肽序列中之天冬醯胺酸殘基，諸如天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-蘇胺酸)的側鏈，其中X為除了脯胺酸之外的任何胺基酸。O連接之醣化係指N-乙醯半乳糖胺、半乳糖或木糖中之一者連接至羥基胺基酸，最常見地連接至絲胺酸或蘇胺酸。可方便地實現天然醣化位點移除，例如藉由改變胺基酸序列以使得存在於序列中之上述三肽序列(對於N連接之醣化位點)或絲胺酸或蘇胺酸殘基(對於O連接之醣化位點)中之一者經取代。可藉由引入此類三肽序列或絲胺酸或蘇胺酸殘基以類似方式產生新的醣化位點。

【0369】 在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體及抗原結合片段包含一或多個突變以移除一或多個脫醯胺位點。在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體及抗原結合片段在重鏈中之G55 (例如，G55A)處包含突變。測試此等突變且咸信此等突變不會負面影響本文提供之抗體之結合親和力。

xiii. 經半胱胺酸工程改造之變異體

【0370】 本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段亦涵蓋經半胱胺酸工程改造之變異體，該等變異體包含一或多個所引入之游離半胱胺酸胺基酸殘基。

【0371】 游離半胱胺酸殘基為不為二硫橋鍵之一部分之半胱胺酸殘

基。經半胱胺酸工程改造之變異體可用於經由例如順丁烯二醯亞胺或鹵乙醯基在經工程改造之半胱胺酸位點處與例如細胞毒性化合物及/或成像化合物、標記或放射性同位素等結合。用於工程改造抗體或其抗原結合片段以引入游離半胱胺酸殘基之方法為此項技術中已知的，參見例如WO2006/034488。

xiv. Fc變異體

【0372】本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段亦涵蓋Fc變異體，該等Fc變異體在Fc區及/或鉸鏈區處包含一或多個胺基酸殘基修飾或取代，例如以提供諸如ADCC及CDC之經改變之效應功能。藉由抗體工程改造來改變ADCC活性之方法在此項技術中已有描述，參見例如Shields RL.等人, J Biol Chem. 2001. 276(9): 6591-604；Idusogie EE.等人, J Immunol. 2000.164(8):4178-84；Steurer W.等人, J Immunol. 1995, 155(3): 1165-74；Idusogie EE.等人,J Immunol. 2001, 166(4): 2571-5；Lazar GA.等人, PNAS, 2006, 103(11): 4005-4010；Ryan MC.等人, Mol. Cancer Ther., 2007, 6: 3009-3018；Richards JO,等人, Mol. Cancer Ther. 2008, 7(8): 2517-27；Shields R. L.等人, J. Biol. Chem, 2002, 277: 26733-26740；Shinkawa T.等人, J. Biol. Chem, 2003, 278: 3466-3473。

【0373】本文提供之抗體或抗原結合片段之CDC活性亦可例如藉由改善或減少C1q結合及/或CDC來改變(參見例如關於Fc區變異體之其他實例之WO99/51642；Duncan及Winter Nature 322:738-40 (1988)；美國專利第5,648,260號；美國專利第5,624,821號)；及WO94/29351。可將選自Fc區之胺基酸殘基329、331及322之一或多個胺基酸置換為不同胺基酸殘基以改變C1q結合及/或減少或消除補體依賴性細胞毒性(CDC) (參見

Idusogie等人之美國專利第6,194,551號)。亦可引入一或多個胺基酸取代以改變抗體固定補體之能力(參見Bodmer等人之PCT公開案WO 94/29351)。

【0374】在某些實施例中，本文提供之Fc變異體相對於野生型Fc(例如，IgG1之Fc)具有經減弱之效應功能，且在選自由以下組成之群之位置處包含一或多個胺基酸取代：Fc區之220、226、228、229、233、234、235、236、237、238、267、268、269、270、297、309、318、320、322、325、328、329、330、331及332 (參見WO2016/196228；Richards等人 (2008) *Mol. Cancer Therap.* 7:2517；Moore等人 (2010) *mAbs* 2:181；及Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691)，其中Fc區中之殘基編號為如Kabat中之EU索引之編號。經減弱之效應功能之例示性取代包括但不限於220S、226S、228P、229S、233P、234V、234G、234A、234F、234A、235A、235G、235E、236E、236R、237A、237K、238S、267R、268A、268Q、269R、297A、297Q、297G、309L、318A、322A、325L、328R、330S、331S或其任何組合(參見WO2016/196228；及Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691)。

【0375】在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段具有經減弱之效應功能，且在IgG1中在選自由以下組成之群之位置處包含一或多個胺基酸取代：234、235、237、238、268、297、309、330及331。在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段係IgG1同型且包含選自由以下組成之群之一或多個胺基酸取代：N297A、N297Q、N297G、L235E、L234A、L235A、L234F、L235E、

P331S及其任何組合。

【0376】 在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段係IgG1同型且包含L234A及L235A突變。在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段係IgG1同型且包含L234F、L235E及P331S。定位於Fc域之CH2區中之取代之L234F、L235E及P331S集合(亦稱為FES三重突變)可消除FCγR及C1q結合，從而使得抗體無法引發ADCC或CDC (Oganesyan等人, Acta Crystallogr. D 64:700-704 (2008))。PCT/US2013/36872已表明，與例如野生型IgG1 Fc之野生型親本分子相比，在例如抗體中之變異Fc域的變異Fc域(中組合此等突變使Fc域具有經降低之熱穩定性。在某些實施例中，該Fc變異體包含SEQ ID NO: 81之胺基酸序列。

【0377】 在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段係IgG2同型，且包含選自由以下組成之群之一或多個胺基酸取代：H268Q、V309L、A330S、P331S、V234A、G237A、P238S、H268A及其任何組合(例如，H268Q/V309L/A330S/P331S、V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S)。在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段係IgG4同型，且包含選自由以下組成之群之一或多個胺基酸取代：S228P、N297A、N297Q、N297G、L235E、F234A、L235A及其任何組合。在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段係IgG2/IgG4交叉同型。Rother RP等人, Nat Biotechnol 25:1256–1264 (2007)中描述IgG2/IgG4交叉同型之實例。

【0378】 在某些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段包含改善與新生兒Fc受體(FcRn)之pH依賴性結合之一或多個胺基酸取代。此類

變異體可具有經延長之藥物動力學半衰期，此係因為其在酸性pH下與FcRn結合，此使其得以免於在溶酶體中降解，且隨後經易位且釋放至細胞外。工程改造抗體或其抗原結合片段以提高與FcRn之結合親和力之方法為此項技術中熟知的，參見例如Vaughn, D.等人, *Structure*, 6(1): 63-73, 1998；Kontermann, R.等人, *Antibody Engineering*, 第1卷, 第27章:Engineering of the Fc region for improved PK, 由Springer出版, 2010年；Yeung, Y.等人, *Cancer Research*, 70: 3269-3277 (2010)；及Hinton, P.等人, *J. Immunology*, 176:346-356 (2006)。

【0379】 在某些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段在Fc區之界面中包含一或多個胺基酸取代以便於及/或促進異二聚。此等修飾包含將突起引入第一Fc多肽中且將空腔引入第二Fc多肽中，其中突起可定位於空腔中以便促進第一Fc多肽與第二Fc多肽之相互作用以形成異二聚體或複合物。產生具有此等修飾之抗體之方法為此項技術中已知的，例如如美國專利第5,731,168號中所描述。

xv. 抗原結合片段

【0380】 本文提供之雙功能分子中之PD-L1結合部分亦涵蓋抗PD-L1抗原結合片段。各種類型之抗原結合片段為此項技術中已知的且可基於本文提供之抗PD-L1抗體及其不同變異體(諸如親和變異體、醣化變異體、Fc變異體、經半胱胺酸工程改造之變異體等)研發，該等抗PD-L1抗體包括例如其CDR在上表1及表3a中示出且其可變序列在表2及表5中示出之例示性抗體。

【0381】 在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗原結合片段為雙功能抗體、Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、Fv片段、二硫鍵穩定之Fv片段

(dsFv)、$(dsFv)_2$、雙特異性dsFv (dsFv-dsFv')、二硫鍵穩定之雙功能抗體(ds雙功能抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙功能抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。

【0382】 可使用多種技術產生該等抗原結合片段。說明性方法包括完整抗體之酶消化(參見例如Morimoto等人, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*24:107-117 (1992)；及Brennan等人, *Science*, 229:81 (1985))、藉由諸如大腸桿菌(*E. Coli*)之宿主細胞進行之重組表現(例如，對於Fab、Fv及ScFv抗體片段)、自如上文論述之噬菌體展示文庫篩選(例如，對於ScFv)以及用於形成$F(ab')_2$片段之兩個Fab'-SH片段之化學偶聯(Carter等人, *Bio/Technology*10:163-167 (1992))。用於產生抗體片段之其他技術對熟習此項技術者而言為顯而易見的。

【0383】 在某些實施例中，抗原結合片段為scFv。以下中描述scFv之產生：例如WO 93/16185；美國專利第5,571,894號；及第5,587,458號。ScFv可在胺基端或羧基端處與效應蛋白融合以得到融合蛋白(參見例如Antibody Engineering, Borrebaeck編)。

【0384】 在某些實施例中，本文提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段為二價、四價、六價或多價的。任何超過二價之分子均視為多價的，涵蓋例如三價、四價、六價等。

【0385】 若兩個結合位點均特異性地結合至同一抗原或同一抗原決定基，則二價分子可為單特異性的。在某些實施例中，此提供了比單價對應物更強的與抗原或抗原決定基之結合。類似地，多價分子亦可為單特異性的。在某些實施例中，在二價或多價抗原結合部分中，結合位點之第一價及結合位點之第二價在結構上相同(亦即，具有相同序列)或在結構上不

同(亦即，具有不同序列，但具有相同特異性)。

【0386】 若兩個結合位點對不同抗原或抗原決定基具有特異性，則二價亦可為雙特異性的。此亦適用於多價分子。舉例而言，當兩個結合位點對第一抗原(或抗原決定基)具有單特異性且第三結合位點對第二抗原(或抗原決定基)具有特異性時，三價分子可為雙特異性的。

xvi. 雙特異性抗體

【0387】 在某些實施例中，抗PD-L1抗體或其抗原結合片段為雙特異性的。在某些實施例中，除了本文提供之第二部分之外，PD-L1結合抗體或其抗原結合片段進一步連接至與該抗PD-L1抗體或其抗原結合片段具有不同結合特異性之額外功能域。

【0388】 在某些實施例中，本文提供之雙特異性抗體或其抗原結合片段能夠特異性結合至除PD-L1之外(以及除第二部分所結合之目標之外)的第二抗原或PD-L1上之第二抗原決定基(或第二部分所結合之目標上之第二抗原決定基)。

xvii. 雙功能分子

【0389】 在某些實施例中，本文提供之雙功能分子能夠與PD-L1及第二部分所結合之目標兩者結合。在某些實施例中，本文提供之雙功能分子能夠與PD-L1及TGFβ兩者結合，或與PD-L1及IL-1兩者結合，或與PD-L1及IL-1R兩者結合，或與PD-L1及MHCII兩者結合，或與PD-L1及CD47兩者結合，或與PD-L1及SIRPα兩者結合。

【0390】 在某些實施例中，如藉由ELISA分析所量測，本發明之靶向PD-L1及TGFβ之雙功能分子以不超過2.0 nM (例如，不超過2.0 nM、不超過1.2 nM、不超過1.1 nM、不超過1.0 nM、不超過0.9 nM、不超過0.8

nM)之EC_{50}與人TGFβ1特異性地結合。在某些實施例中，如藉由ELISA分析所量測，本發明之靶向PD-L1及TGFβ之蛋白質能夠同時與PD-L1及TGFβ結合。在某些實施例中，如藉由Biacore分析所量測，本發明之靶向PD-L1及TGFβ之雙功能分子能夠以不超過0.8 nM、不超過0.7 nM、不超過0.6 nM、不超過0.5 nM或不超過0.4 nM之K_D值與人PD-L1特異性地結合。在某些實施例中，如藉由ELISA分析所量測，本發明之靶向PD-L1及TGFβ之雙功能分子能夠以不超過2.0 nM (例如，不超過2.0 nM、不超過1.2 nM、不超過1.1 nM、不超過1.0 nM、不超過0.9 nM、不超過0.8 nM)之K_D值與人TGFβ1特異性地結合。

【0391】 在某些實施例中，本發明之靶向PD-L1及TGFβ之雙功能分子能夠以劑量依賴性方式對腫瘤生長抑制展現出協同效應。

【0392】 在某些實施例中，與僅包含免疫檢查點分子之分子相比，本發明之靶向PD-L1及TGFβ之雙功能分子能夠展現出抗腫瘤免疫細胞向腫瘤微環境中之浸潤增強。

【0393】 在某些實施例中，本發明之靶向PD-L1及TGFβ之雙功能分子能夠選擇性地降低血漿中至少90% (例如，至少80%、70%、60%、50%、40%、30%或20%)之TGFβ1且該降低可維持至少10、14或21天。

【0394】 在某些實施例中，雙功能分子包含異二聚體重鏈。重鏈就第二部分之存在或位置而言為異二聚體的。在某些實施例中，異二聚體重鏈包含一個具有第二部分之重鏈及另一不具有第二部分之重鏈，其中第二部分包含CD47結合域(例如，可溶性SIRPα)或SIRPα結合域。

【0395】 在雙功能分子中，異二聚體重鏈包含一個具有第二部分之重鏈及另一不具有第二部分之重鏈。異二聚體重鏈可進一步包含以阻礙同

二聚及/或有利於異二聚之方式締合的異二聚體Fc區。舉例而言，可選擇異二聚體Fc區以使得其不相同且其優先在彼此之間形成異二聚體而非在其自身內形成同二聚體。在某些實施例中，異二聚體Fc區能夠經由杵-臼形成、疏水相互作用、靜電相互作用、親水相互作用或經增加之可撓性締合成異二聚體。在某些實施例中，異二聚體Fc區包含分別突變成能夠形成杵-臼之CH2及/或CH3域。杵可藉由將第一CH2/CH3多肽中之小胺基酸殘基置換為較大胺基酸殘基來獲得，且臼可藉由將較大殘基置換為較小殘基來獲得。在某些實施例中，異二聚體Fc區包含含有S354C及T366W取代(SEQ ID NO: 96，杵)之IgG1同型之第一CH3域及含有Y349C、T366S、L368A及Y407V取代(SEQ ID NO: 97，臼)之IgG1同型之第二CH3域。

【0396】 在某些實施例中，雙功能分子包含有包含SEQ ID NO: 118或SEQ ID NO:120之胺基酸序列的重鏈及/或包含SEQ ID NO: 119或SEQ ID NO:121之胺基酸序列的輕鏈。

xviii. 結合物

【0397】 在一些實施例中，雙功能分子進一步包含一或多個結合物部分。結合物部分可連接至雙功能分子。結合物部分為可連接至雙功能分子之部分。經考慮多種結合物部分可連接至本文提供之雙功能分子(參見例如，「Conjugate Vaccines」, Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse及R. E. Lewis, Jr. (編), Carger Press, New York, (1989))。此等結合物部分可藉由共價結合、親和結合、嵌入、配位結合、複合、締合、共混或添加等方法與雙功能分子連接。在一些實施例中，雙功能分子可藉由連接子連接至一或多種結合物。

【0398】 在某些實施例中，本文提供之雙功能分子可經工程改造以

在抗原決定基結合部分之外含有特異性位點，該等特異性位點可用於結合至一或多個結合物部分。舉例而言，此類位點可包括一或多個例如半胱胺酸或組胺酸殘基之反應性胺基酸殘基以便於與結合物部分共價連接。

【0399】在某些實施例中，雙功能分子可間接地或經由另一結合物部分連接至一結合物部分。舉例而言，本文提供之雙功能分子可與生物素結合，隨後間接結合至與抗生物素蛋白結合之第二結合物。在一些實施例中，結合物部分包含清除修飾劑(例如延長半衰期之聚合物，諸如PEG)、化學治療劑、毒素、放射性同位素、鑭系元素、可偵測標記(例如，發光標記、螢光標記、酶受質標記)、DNA烷基化劑、拓樸異構酶抑制劑、微管蛋白結合劑、純化部分或其他抗癌藥物。

【0400】「毒素」可為對細胞有害或可損傷或殺滅細胞之任何藥劑。毒素之實例包括但不限於紫杉醇、細胞鬆弛素B、短桿菌肽D、溴化乙錠、吐根鹼、絲裂黴素、依託泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、MMAE、MMAF、DM1、長春鹼(vinblastine)、秋水仙鹼(colchicin)、小紅莓(doxorubicin)、道諾黴素(daunorubicin)、二羧基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神黴素(mithramycin)、放線菌素D(actinomycin D)、1-去氫睾酮、糖皮質激素、普魯卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)、嘌呤黴素(puromycin)及其類似物、抗代謝物(例如甲氨蝶呤、6-巰基嘌呤、6-硫鳥嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶達卡巴啡)、烷基化劑(例如甲基二(氯乙基)胺、塞替派苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法侖(melphalan)、卡莫司汀(carmustine) (BSNU)及洛莫司汀(lomustine) (CCNU)、環磷醯

胺、白消安(busulfan)、二溴甘露醇、鏈佐黴素(streptozotocin)、絲裂黴素C (mitomycin C)及二氯二胺鉑(II) (DDP順鉑)、蒽環黴素(anthracycline)(例如道諾黴素(daunorubicin) (以前為道諾黴素(daunomycin)及小紅莓)、抗生素(例如更生黴素(dactinomycin)(以前為放線菌素)、博來黴素(bleomycin)、光神黴素及氨茴黴素(anthramycin) (AMC))、抗有絲分裂劑(例如長春新鹼及長春鹼)、拓樸異構酶抑制劑及微管蛋白結合劑。

【0401】 可偵測標記之實例可包括螢光標記(例如，螢光素、羅丹明(rhodamine)、丹醯、藻紅蛋白或德克薩斯紅(Texas Red))、酶受質標記(例如，辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶、螢光素酶、葡糖澱粉酶、溶菌酶、糖氧化酶或β-D-半乳糖苷酶)、放射性同位素(例如，123I、124I、125I、131I、35S、3H、111In、112In、14C、64Cu、67Cu、86Y、88Y、90Y、177Lu、211At、186Re、188Re、153Sm、212Bi及32P、其他鑭系元素)、發光標記、發色團部分、地高辛(digoxigenin)、生物素/抗生物素蛋白、DNA分子或用於偵測之金。

【0402】 在某些實施例中，結合物部分可為幫助延長雙功能分子之半衰期之清除修飾劑。說明性實例包括諸如PEG、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啶酮、乙二醇/丙二醇之共聚物及其類似物之水溶性聚合物。聚合物可具有任何分子量，且可為分支化或未分支化的。連接至抗體之聚合物之數目可能會有所不同，且若連接超過一種聚合物，則其可為相同或不同分子。

【0403】 在某些實施例中，結合物部分可為諸如磁珠之純化部分。

【0404】 在某些實施例中，本文提供之雙功能分子用作結合物之基

質。

III.聚核苷酸及重組方法

【0405】 本發明提供編碼本文提供之雙功能分子之經分離聚核苷酸。如本文所使用之術語「核酸」或「聚核苷酸」係指呈單鏈或雙鏈形式之去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非另外指出，否則特定聚核苷酸序列亦隱含地涵蓋其經保守修飾之變異體(例如，簡併密碼子取代)、對偶基因、異種同源物、SNP及互補序列以及明確指出之序列。具體而言，簡併密碼子取代可藉由生成序列來達成，在該等序列中，一或多個所選(或全部)密碼子之第三位經混合鹼基及/或去氧肌苷殘基取代(參見Batzer等人, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991)；Ohtsuka等人, *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985)；以及Rossolini等人, *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994))。

【0406】 編碼單株抗體之DNA易於使用習知程序(例如藉由使用能夠與編碼抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性地結合之寡核苷酸探針)來分離及定序。編碼DNA亦可藉由合成方法獲得。

【0407】 可使用此項技術中已知之重組技術將編碼雙功能分子之經分離聚核苷酸插入載體中以用於進一步選殖(DNA擴增)或用於表現。許多載體係可用的。載體組件一般包括但不限於以下中之一或多種：信號序列、複製起點、一或多種標誌物基因、增強子元件、啟動子(例如，SV40、CMV、EF-1α)及轉錄終止序列。

【0408】 本發明提供包含本文提供之經分離聚核苷酸之載體。在某些實施例中，本文提供之聚核苷酸編碼雙功能分子、與核酸序列可操作地連接之至少一種啟動子(例如，SV40、CMV、EF-1α)及至少一種選擇標

誌物。載體之實例包括但不限於逆轉錄病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒(例如，單純疱疹病毒)、痘病毒、桿狀病毒、乳頭瘤病毒、乳多泡病毒(例如，SV40)、λ噬菌體及M13噬菌體、質體pcDNA3.3、pMD18-T、pOptivec、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM.、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、PCR 2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bos等。

【0409】 可將包含編碼雙功能分子之聚核苷酸序列之載體引入宿主細胞中以用於選殖或基因表現。用於選殖或表現本文載體中之DNA之合適宿主細胞為上述原核細胞、酵母細胞或高等真核細胞。用於此目的之合適原核細胞包括真細菌，諸如革蘭氏陰性(Gram-negative)或革蘭氏陽性(Gram-positive)生物體，例如腸桿菌科(Enterobacteriaceae)，諸如埃希氏桿菌屬(Escherichia)，例如大腸桿菌(E. coli)；腸桿菌屬(Enterobacter)、歐文氏菌屬(Erwinia)、克雷伯氏菌屬(Klebsiella)、變形桿菌屬(Proteus)；沙門氏菌屬(Salmonella)，例如鼠傷寒沙門氏菌(Salmonella typhimurium)；沙雷氏菌屬(Serratia)，例如黏質沙雷氏菌(Serratia marcescans)；及志賀氏菌屬(Shigella)；以及芽孢桿菌屬(Bacilli)，諸如枯草芽孢桿菌(B. subtilis)及地衣芽孢桿菌(B. licheniformis)；假單胞菌屬(Pseudomonas)，諸如銅綠假單胞菌(P. aeruginosa)；及鏈黴菌屬

(Streptomyces)。

【0410】 除了原核細胞之外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物亦為用於編碼雙功能分子之載體之合適的選殖或表現宿主。釀酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)或普通麵包酵母最常用於低等真核宿主微生物體中。然而，許多其他屬、種及菌株通常可用且在本文中適用，諸如粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe)；克魯維酵母屬(Kluyveromyces)宿主，例如乳酸克魯維酵母(K. lactis)、脆弱克魯維酵母(K. fragilis) (ATCC 12,424)、保加利亞克魯維酵母(K. bulgaricus) (ATCC 16,045)、魏氏克魯維酵母(K. wickeramii) (ATCC 24,178)、克魯雄酵母(K. waltii) (ATCC 56,500)、果蠅克魯維酵母(K. drosophilarum) (ATCC 36,906)、耐熱克魯維酵母(K. thermotolerans)及馬克斯克魯維酵母(K. marxianus)；耶氏酵母屬(yarrowia) (EP 402,226)；巴斯德畢赤酵母(Pichia pastoris) (EP 183,070)；假絲酵母(Candida)；里氏木黴(Trichoderma reesia) (EP 244,234)；粗糙脈孢菌(Neurospora crassa)；許旺酵母(Schwanniomyces)，諸如西方許旺酵母(Schwanniomyces occidentalis)；及絲狀真菌(filamentous fungi)，例如脈孢菌(Neurospora)、青黴菌(Penicillium)、彎頸黴(Tolypocladium)及曲黴菌(Aspergillus)宿主，諸如鉤巢麴黴(A. nidulans)及黑麴黴(A. niger)。

【0411】 用於表現本文提供之醣化雙功能分子之合適宿主細胞衍生自多細胞生物體。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑定出多種桿狀病毒株及變異體以及對應的許可性昆蟲宿主細胞，許可性昆蟲宿主細胞來自諸如以下之宿主：草地夜蛾(Spodoptera frugiperda) (毛蟲)、埃及斑蚊(Aedes aegypti) (蚊子)、白紋伊蚊(Aedes albopictus) (蚊子)、黑

腹果蠅(Drosophila melanogaster) (果蠅)及家蠶(Bombyx mori)。多種用於轉染之病毒株係可公開獲得的，例如苜蓿銀紋夜蛾(Autographa californica) NPV之L-1變異體以及家蠶NPV之Bm-5株，且該等病毒可根據本發明用作本文之病毒，特別用於轉染草地夜蛾細胞。棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄及菸草之植物細胞培養物亦可用作宿主。

【0412】 然而，最關注脊椎動物細胞，且脊椎動物細胞在培養物(組織培養物)中之繁殖已成為常規程序。有用哺乳動物宿主細胞株之實例為經SV40轉型之猴腎CV1株(COS-7，ATCC CRL 1651)；人胚胎腎株(經亞選殖以在懸浮培養物中生長之293或293細胞，Graham等人, J. Gen. Virol. 36/59 (1977))；幼倉鼠腎細胞(BHK，ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR (CHO, Urlaub等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；小鼠賽特利細胞(sertoli cell) (TM4，Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76，ATCC CRL-1587)；人子宮頸癌細胞(HELA，ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK，ATCC CCL 34)；布法羅大鼠(buffalo rat)肝細胞(BRL 3A，ATCC CRL 1442)；人肺細胞(W138，ATCC CCL 75)；人肝細胞(Hep G2，HB 8065)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562，ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；以及人肝癌細胞株(Hep G2)。在一些實施例中，宿主細胞為諸如CHO、BHK、NS0、293及其衍生物之哺乳動物培養細胞株。

【0413】 用上述用於產生雙功能分子之表現或選殖載體轉型宿主細胞，且將該等宿主細胞在習知營養培養基中培養，該習知營養培養基經改

良成適於誘導啟動子、選擇轉型子或擴增編碼所需序列之基因。在另一實施例中，雙功能分子可藉由此項技術中已知之同源重組產生。在某些實施例中，宿主細胞能夠產生本文提供之雙功能分子。

【0414】 本發明亦提供一種表現本文提供之雙功能分子之方法，該方法包含在表現本發明之載體之條件下培養本文提供之宿主細胞。用於產生本文提供之雙功能分子之宿主細胞可在多種培養基中經培養。諸如Ham's F10 (Sigma)、最低必需培養基(Minimal Essential Medium，MEM) (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)及杜氏改良伊氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium，DMEM) (Sigma)之市售培養基適用於培養宿主細胞。另外，在以下中描述之任何培養基均可用作宿主細胞之培養基：Ham等人, Meth. Enz. 58:44 (1979)；Barnes等人, Anal. Biochem. 102:255 (1980)；美國專利第4,767,704號；第4,657,866號；第4,927,762號；第4,560,655號；或第5,122,469號；WO 90/03430；WO 87/00195；或美國專利Re. 30,985。任何此等培養基均可根據需要補充激素及/或其他生長因子(諸如胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝液(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如GENTAMYCINTM藥物)、痕量元素(經定義為通常以在微莫耳範圍內之最終濃度存在之無機化合物)及葡萄糖或等效能量源。亦可包括呈熟習此項技術者已知之適當濃度之任何其他必要補充物。諸如溫度、pH及其類似者之培養條件為先前與經選定以用於表現之宿主細胞一起使用之培養條件，且對於熟習此項技術者而言將為顯而易見的。

【0415】 當使用重組技術時，雙功能分子可在細胞內、周質間隙中產生，或直接分泌至培養基中。若雙功能分子係在細胞內產生，則作為第

一步驟，可例如藉由離心或超濾來移除宿主細胞或溶解片段之微粒狀碎片。Carter等人, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)描述一種用於分離經分泌至大腸桿菌之周質間隙中之抗體的程序。簡言之，將細胞糊在存在醋酸鈉(pH 3.5)、EDTA及苯甲基磺醯氟(PMSF)之情況下解凍約30分鐘。細胞碎片可藉由離心來移除。當雙功能分子經分泌至培養基中時，通常首先使用例如Amicon或Millipore Pellicon超濾單元之市售蛋白質濃縮過濾器對來自該等表現系統之上清液進行濃縮。諸如PMSF之蛋白酶抑制劑可包括在前述步驟中之任一個中以抑制蛋白水解，且可包括抗生素以防止外來污染物生長。

【0416】 由細胞製備之雙功能分子可使用例如羥基磷灰石層析法、凝膠電泳、透析、DEAE-纖維素離子交換層析法、硫酸銨沈澱、鹽析及親和層析法來純化，其中親和層析法為較佳純化技術。

【0417】 在某些實施例中，使用固定在固相上之蛋白A用於抗體及其抗原結合片段之免疫親和純化。蛋白A作為親和配位體之合適性視雙功能分子中存在之任何免疫球蛋白Fc域之物種及同型而定。蛋白A可用於純化基於人γ1、γ2或γ4重鏈之抗體(Lindmark等人, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。蛋白G經推薦用於所有小鼠同型及人γ3 (Guss等人, EMBO J. 5:1567 1575 (1986))。親和配位體所附著之基質最常為瓊脂糖，但其他基質亦為可用的。諸如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯之機械穩定型基質與瓊脂糖相比可允許達成更快的流速及更短的處理時間。在抗體包含CH3域之情況下，Bakerbond ABXTM樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)可用於純化。視待回收之抗體而定，諸如離子交換管柱分級、乙醇沈澱、逆相HPLC、二氧化矽層析法、肝素SEPHAROSETM層析法、陰

離子或陽離子交換樹脂(諸如聚天冬胺酸管柱)層析法、層析聚焦、SDS-PAGE以及硫酸銨沈澱之其他用於蛋白質純化之技術亦為可用的。

【0418】 在(多個)任何初步純化步驟之後，可使用pH介於約2.5-4.5之間的溶離緩衝液使包含所關注抗體及污染物之混合物進行低pH疏水相互作用層析法，該層析法較佳地在低鹽濃度(例如，約0-0.25 M鹽)下執行。

IV. 醫藥組合物

【0419】 本發明進一步提供包含雙功能分子及一或多種醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。

【0420】 用於本文揭示之醫藥組合物中之醫藥學上可接受之載劑可包括例如醫藥學上可接受之液體、凝膠或固體載劑、水性媒劑、非水性媒劑、抗微生物劑、等張劑、緩衝劑、抗氧化劑、麻醉劑、懸浮劑/分配劑、多價螯合劑或螯合劑、稀釋劑、佐劑、賦形劑或無毒輔助物質、此項技術中已知之其他組分或其各種組合。

【0421】 合適組分可包括例如抗氧化劑、填充劑、黏結劑、崩解劑、緩衝劑、防腐劑、潤滑劑、調味劑、增稠劑、著色劑、乳化劑或諸如糖及環糊精之穩定劑。合適抗氧化劑可包括例如甲硫胺酸、抗壞血酸、EDTA、硫代硫酸鈉、鉑、過氧化氫酶、檸檬酸、半胱胺酸、硫代甘油、巰基乙酸、硫代山梨糖醇、丁基化羥基茴香醚(butylated hydroxanisol)、丁基化羥基甲苯及/或沒食子酸丙酯。如本文所揭示，在包括本文提供之雙功能分子及結合物之組合物中包含一或多種諸如甲硫胺酸之抗氧化劑降低了雙功能分子之氧化。此氧化降低可防止或減少結合親和力喪失，從而提高抗體穩定性且最大化保質期。因此，在某些實施例中，提供包括一或

多種如本文揭示之雙功能分子及一或多種諸如甲硫胺酸之抗氧化劑的醫藥組合物。進一步提供用於藉由將雙功能分子與一或多種諸如甲硫胺酸之抗氧化劑混合來防止本文提供之雙功能分子氧化、延長雙功能分子保質期及/或提高雙功能分子功效之方法。

【0422】 為了進一步說明，醫藥學上可接受之載劑可包括：例如水性媒劑，諸如氯化鈉注射液、林格氏注射液(Ringer's injection)、等張右旋糖注射液、無菌水注射液或右旋糖及乳酸林格氏注射液；非水性媒劑，諸如植物來源之固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油；細菌抑制或真菌抑制濃度下之抗微生物劑；等張劑，諸如氯化鈉或右旋糖；緩衝劑，諸如磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝劑；抗氧化劑，諸如硫酸氫鈉；局部麻醉劑，諸如鹽酸普魯卡因；懸浮及分散劑，諸如羧甲基纖維素鈉、羥丙基甲基纖維素或聚乙烯吡咯啶酮；乳化劑，諸如聚山梨醇酯80 (TWEEN-80)；多價螯合劑或螯合劑，諸如EDTA (乙二胺四乙酸)或EGTA (乙二醇四乙酸)；乙醇；聚乙二醇；丙二醇；氫氧化鈉；鹽酸；檸檬酸或乳酸。可將用作載體之抗微生物劑添加至多劑量容器中之醫藥組合物中，該等抗微生物劑包括苯酚或甲酚、汞劑、苯甲醇、氯丁醇、對羥基苯甲酸甲酯及對羥基苯甲酸丙酯、硫柳汞、氯化苄烷銨及苄索氯銨。合適賦形劑可包括例如水、鹽水、右旋糖、甘油或乙醇。合適無毒輔助物質可包括例如潤濕劑或乳化劑、pH緩衝劑、穩定劑、溶解度增強劑或諸如乙酸鈉、脫水山梨糖醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或環糊精之試劑。

【0423】 醫藥組合物可為液體溶液、懸浮液、乳液、丸劑、膠囊、錠劑、緩釋調配物或散劑。口服調配物可包括諸如醫藥級甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、聚乙烯吡咯啶酮、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂等之標準載

劑。

【0424】 在某些實施例中，將醫藥組合物調配成可注射組合物。可注射醫藥組合物可以任何習知形式製備，該習知形式例如為液體溶液、懸浮液、乳液或適用於產生液體溶液、懸浮液或乳液之固體形式。注射製劑可包括準備注射之無菌及/或無熱原溶液、準備在臨使用前與溶劑組合之無菌乾燥可溶性產品(諸如凍乾粉末，包括皮下注射錠劑)、準備注射之無菌懸浮液、準備在臨使用前與媒劑組合之無菌乾燥不溶性產品以及無菌及/或無熱原乳液。溶液可為水性或非水性的。

【0425】 在某些實施例中，單位劑量腸胃外製劑經封裝在安瓿、小瓶或帶有針頭之注射器中。如此項技術中已知及實踐，所有用於腸胃外投與之製劑皆應為無菌且無熱原的。

【0426】 在某些實施例中，無菌凍乾粉末係藉由將如本文揭示之雙功能分子溶解在合適溶劑中來製備。該溶劑可含有提高穩定性之賦形劑或粉末或由粉末製備之復原溶液之其他藥理學組分。可使用之賦形劑包括但不限於水、右旋糖、山梨糖醇、果糖、玉米糖漿、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其他合適試劑。溶劑可含有諸如檸檬酸鹽、磷酸鈉或磷酸鉀之緩衝劑、或熟習此項技術者已知之其他該緩衝劑，在一個實施例中，其他該緩衝劑為約中性pH。隨後，對溶液進行無菌過濾，之後在熟習此項技術者已知之標準條件下凍乾，從而得到所需調配物。在一個實施例中，將所得溶液分配至小瓶中以凍乾。各小瓶可含有單劑量或多劑量之雙功能分子或其組合物。用比一次劑量或一組劑量所需之量高(例如約10%)之少量過填充小瓶係可接受的以便促進取樣精確及給藥精確。可在諸如約4℃至室溫之適當條件下儲存凍乾粉末。

【0427】 用注射用水復原凍乾粉末，得到用於腸胃外投與之調配物。在一個實施例中，為了復原，將無菌及/或無熱原水或其他合適液體載劑添加至凍乾粉末中。精確量視所給予之所選療法而定且可根據經驗確定。

V. 套組

【0428】 在某些實施例中，本發明提供包含本文提供之雙功能分子及/或本文提供之醫藥組合物的套組。在某些實施例中，本發明提供包含本文提供之雙功能分子及第二治療劑的套組。在某些實施例中，第二治療劑選自由以下組成之群：化學治療劑、抗癌藥物、放射療法、免疫治療劑、抗血管生成劑、靶向療法、細胞療法、基因療法、激素療法、抗病毒劑、抗生素、鎮痛劑、抗氧化劑、金屬螯合劑及細胞介素。

【0429】 如將對熟悉此項技術者顯而易見，若需要，該等套組可進一步包含各種習知醫藥套組組分中之一或多者，例如具有一或多種醫藥學上可接受之載劑之容器、額外容器等。套組中亦可包括指示待投與之組分之量的呈插頁或標籤形式之說明書、投與指南及/或用於混合組分之指南。

VI. 使用方法

【0430】 在另一態樣中，本發明提供一種治療、預防或緩解個體之PD-L1相關疾病之方法，該方法包含向個體投與治療有效量之本文提供之雙功能分子或本文提供之醫藥組合物或套組。

【0431】 在某些實施例中，個體為人。

【0432】 PD-1相關病狀及病症可為免疫相關疾病或病症、癌症、自體免疫疾病或傳染病。

【0433】在某些實施例中，PD-1相關病狀及病症包括癌症，例如非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結直腸癌、卵巢癌、乳癌、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、神經膠質母細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、真菌樣黴菌病(mycoses fungoids)、默克爾細胞癌(merkel cell cancer)；及其他血液科惡性疾病，諸如經典霍奇金淋巴瘤(classical Hodgkin lymphoma，CHL)、原發性縱隔大B細胞淋巴瘤、富含T細胞/組織細胞之B細胞淋巴瘤、EBV陽性及陰性PTLD以及EBV相關之彌漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、漿母細胞淋巴瘤、結外NK/T細胞淋巴瘤、鼻咽癌及HHV8相關之原發性滲出性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤；中樞神經系統(CNS)贅瘤，諸如原發性CNS淋巴瘤、脊髓軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤。在某些實施例中，腫瘤及癌症為轉移性的，尤其表現PD-L1之轉移性腫瘤。

【0434】在某些實施例中，PD-1相關病狀及病症包括自體免疫疾病。自體免疫疾病包括但不限於後天性免疫缺陷症候群(AIDS，其為一種具有自體免疫組分之病毒性疾病)、斑禿、強直性脊柱炎、抗磷脂症候群、自體免疫性阿狄森氏病(autoimmune Addison's disease)、自體免疫性糖尿病、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性肝炎、自體免疫性內耳病(AIED)、自體免疫性淋巴增生症候群(ALPS)、自體免疫性血小板減少性紫癜(ATP)、白塞氏病(Behcet's disease)、心肌病、口炎性腹瀉-疱疹樣皮炎；慢性疲勞免疫功能障礙症候群(CFIDS)、慢性炎性脫髓鞘性多發性神經病(CIPD)、瘢痕性類天疱瘡、冷凝集素病、肢端硬皮症候群(crest syndrome)、克羅恩氏病(Crohn's disease)、德戈斯病(Degos' disease)、幼年性皮肌炎、盤狀狼瘡、原發性混合性冷球蛋白血症、纖維肌痛-纖維

肌炎、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、吉-巴二氏症候群(Guillain-Barre syndrome)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、特發性肺纖維化、特發性血小板減少性紫癜(ITP)、IgA腎病、胰島素依賴型糖尿病、幼年型慢性關節炎(斯蒂爾氏病(Still's disease))、幼年型類風濕性關節炎、梅尼埃氏病(Meniere's disease)、混合性結締組織病、多發性硬化症、重症肌無力、嚴重貧血(pemacious anemia)、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺體症候群、風濕性多肌痛、多肌炎及皮肌炎、原發性無丙種球蛋白血症、原發性膽汁性肝硬化、銀屑病、銀屑病關節炎、雷諾氏現象(Raynaud's phenomena)、萊特爾氏症候群(Reiter's syndrome)、風濕熱、類風濕性關節炎、結節病、硬皮病(進行性系統性硬化症(PSS)，亦稱為系統性硬化症(SS))、乾燥症候群(Sjogren's syndrome)、僵人症候群、系統性紅斑狼瘡、高安氏動脈炎(Takayasu arteritis)、顳動脈炎/巨細胞動脈炎、潰瘍性結腸炎、葡萄膜炎、白癜風及韋格納氏肉芽腫(Wegener's granulomatosis)。

【0435】在某些實施例中，PD-1相關病狀及病症包括傳染病。傳染病包括例如慢性病毒感染，例如真菌感染、寄生蟲/原生動物感染或慢性病毒感染，例如瘧疾、粗球孢子菌病(coccidioiodmycosis immitis)、組織胞漿菌病、甲真菌病、曲黴菌病、芽生菌病、白色念珠菌病、副球孢子菌病(paracoccidioiomycosis)、微孢子蟲病、棘阿米巴角膜炎(Acanthamoeba keratitis)、阿米巴病、蛔蟲病、巴貝斯蟲病、小袋蟲病、浣熊貝蛔蟲病(Baylisascariasis)、南美錐蟲病(Chagas disease)、華支睾吸蟲病、錐蠅屬(Cochliomyia)、隱孢子蟲病、裂頭絛蟲病、麥地那龍線蟲病、包蟲病、象皮病、蠕蟲病、肝片吸蟲病、薑片蟲病、絲蟲病、賈第蟲

病、顎口線蟲病(Gnathostomiasis)、膜殼絛蟲病、等孢球蟲病、片山熱(Katayama fever)、利什曼病、萊姆病(Lyme disease)、後殖吸蟲病、蠅蛆病、盤尾絲蟲病、虱病、疥瘡、血吸蟲病、昏睡病、類圓線蟲病、絛蟲病、弓蛔蟲病、弓形體病、旋毛蟲病、鞭蟲病、錐蟲病、蠕蟲感染、乙型肝炎(HBV)感染、丙型肝炎(HCV)感染、疱疹病毒感染、艾普斯登-巴爾病毒(Epstein-Barr virus)感染、HIV-1感染、HIV-2感染、巨細胞病毒感染、單純疱疹病毒I型感染、單純疱疹病毒II型感染、人乳頭瘤病毒感染、腺病毒感染、卡波西肉瘤相關疱疹病毒流行病感染、細環病毒(轉矩特諾病毒(Torquetenovirus))感染、人T嗜淋巴細胞病毒I感染、人T嗜淋巴細胞病毒II感染、水痘帶狀疱疹病毒感染、JC病毒感染或BK病毒感染。

【0436】 在某些實施例中，PD-L1相關疾病為表現PD-L1之癌症或過度表現PD-L1之癌症。「表現PD-L1之癌症」為一種涉及在細胞表面處存在PD-L1蛋白之癌細胞或腫瘤細胞的癌症。「過度表現PD-L1之癌症」為與相同組織類型之非癌細胞相比，在癌症或腫瘤細胞之細胞表面具有顯著更高含量之PD-L1的癌症。

【0437】 PD-L1表現或過度表現可在診斷或預後分析中藉由評估存在於細胞表面上之PD-L1含量增加來測定(例如，藉由免疫組織化學分析；IHC)。可替代地或另外，可例如藉由螢光原位雜交(FISH；參見1998年10月出版之WO98/45479)、南方墨點法或諸如即時定量PCR (RT-PCR)之聚合酶鏈反應(PCR)技術來量測細胞中編碼PD-L1之核酸含量。吾人亦可藉由量測諸如血清之生物流體中之脫落抗原(例如，PD-L1胞外域或可溶性PD-L1)來研究PD-L1過度表現。除了上述分析之外，熟練從業者亦可獲得各種活體內分析。舉例而言，吾人可將患者體內之細胞暴露於抗PD-

L1抗體，該抗體視情況經可偵測標記(例如，放射性同位素)標記，且可例如藉由外部掃描放射性或藉由分析取自先前暴露於抗體之患者之活體組織切片來評估抗體與患者細胞之結合。

【0438】 在一些實施例中，個體已經鑑定為可能對PD-1拮抗劑有反應。所關注生物樣本上PD-L1之存在或含量可指示衍生生物樣本之個體是否可能對PD-1拮抗劑有反應。在一些實施例中，測試樣本衍生自癌細胞或組織、或腫瘤浸潤免疫細胞。在某些實施例中，測試生物樣本中PD-L1之存在或上調位準指示反應之可能性。如本文所使用之術語「上調」係指與使用相同抗體偵測之參考樣本中之PD-L1蛋白含量相比，測試樣本中PD-L1之蛋白含量總體增加不少於10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或更大。參考樣本可為自健康或非患病個體獲得之對照樣本，或為自提供測試樣本之同一個體獲得之健康或非患病樣本。舉例而言，參考樣本可為與測試樣本(例如，腫瘤)相鄰或在測試樣本附近之非患病樣本。

【0439】 在某些實施例中，PD-L1相關疾病對PD-L1/PD-1單一療法具有抗性。如本文所使用之「PD-L1/PD-1單一療法」係指藉由抑制或減少PD-L1及PD-1相互作用或信號傳導而起作用之單一療法。例示性PD-L1/PD-1單一療法可包括抗PD-L1抗體療法、抗PD-1抗體療法或涉及針對PD-1或PD-L1之小分子抑制劑之單一療法。「抗性」意謂該疾病對PD-L1/PD-1單一療法沒有反應或敏感性或具有經降低之反應或敏感性。經降低之反應可藉由例如需要增加劑量以達成給定功效來指示。在某些實施例中，該疾病可能對PD-L1/PD-1單一療法無反應。舉例而言，儘管使用PD-L1/PD-1單一療法治療，癌細胞或腫瘤大小仍會增加，或疾病顯示消

退至其以前狀態，例如，在部分恢復後回到先前症狀。對PD-L1/PD-1單一療法之抗性可為新發的或後天的。

【0440】 在另一態樣中，本發明提供一種治療、預防或緩解個體之疾病或病狀之方法，該疾病或病狀將受益於免疫抑制性細胞介素之抑制、持續免疫反應之誘導或抗腫瘤免疫之刺激，該方法包含投與有效量之本文提供之雙功能分子或本文提供之醫藥組合物。

【0441】 在一些實施例中，免疫抑制性細胞介素為TGFβ或IL-1。在一些實施例中，免疫抑制性細胞介素為TGFβ1或IL-1β。

【0442】 在一些實施例中，該疾病或病狀為TGFβ相關疾病或病狀。在一些實施例中，TGFβ相關疾病為癌症、纖維化疾病或腎病。

【0443】 在某些實施例中，TGFβ相關疾病為癌症。在某些實施例中，該癌症選自由以下組成之群：結直腸癌、乳癌、卵巢癌、胰臟癌、胃癌、前列腺癌、腎癌、子宮頸癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲狀腺癌、子宮內膜癌、子宮癌、膀胱癌、神經內分泌癌、頭頸癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、黑色素瘤、基底細胞癌、皮膚癌、鱗狀細胞皮膚癌、皮膚纖維肉瘤突起、默克爾細胞癌、神經膠質母細胞瘤、神經膠質瘤、肉瘤、間皮瘤及骨髓化生不良症候群。

【0444】 在某些實施例中，TGFβ相關疾病為纖維化疾病。纖維化疾病為涉及纖維化之疾病或病狀。纖維化為一種瘢痕形成過程，瘢痕形成過程係例如肺、肝、腎、皮膚、心臟、腸道或肌肉中之慢性器官損傷之常見特點。纖維化之特徵在於轉型生長因子-β (TGF-β)活性升高，從而導致胞外基質及其他纖維化相關蛋白之沈積增加及改變。

【0445】 纖維化疾病可包括肺、肝、腎、眼睛、皮膚、心臟、腸道

或肌肉之纖維化疾病。肺之纖維化疾病之實例包括肺纖維化、囊性纖維化、肺動脈高壓、進行性大塊纖維化、閉塞性細支氣管炎、與慢性哮喘或特發性肺相關之氣道重塑。肝之纖維化疾病之實例包括肝硬化或非酒精性脂肪性肝炎。腎之纖維化疾病之實例包括諸如腎纖維化、缺血性腎損傷、腎小管間質纖維化、糖尿病腎病、腎硬化或腎毒性。眼睛之纖維化疾病之實例包括諸如角膜纖維化、視網膜下纖維化。皮膚之纖維化疾病之實例包括諸如腎源性系統性纖維化、瘢痕疙瘩或硬皮病。心臟之纖維化疾病之實例包括心內膜心肌纖維化或陳舊性心肌梗塞。

【0446】 在一些實施例中，該疾病或病狀為IL-1相關疾病或病狀。在一些實施例中，IL-1相關疾病為自身炎性疾病、代謝症候群、急性炎症、慢性炎症或惡性疾病。

【0447】 在一些實施例中，該疾病或病狀將受益於藉由用免疫刺激性多肽(例如，可溶性LAG-3)刺激MHCII信號傳導進行之持續免疫反應之誘導。在一些實施例中，該疾病或病狀為癌症、病毒感染、寄生蟲感染或其組合。

【0448】 在一些實施例中，該疾病或病狀將受益於藉由抑制免疫抑制性受體信號傳導進行之抗腫瘤免疫之刺激。在一些實施例中，免疫抑制性受體為SIRPα。在某些實施例中，該疾病、病症或病狀與SIRPa相關，諸如癌症、實體瘤、慢性感染、炎性疾病、多發性硬化、自體免疫疾病、神經系統疾病、腦損傷、神經損傷、紅細胞增多症、血色病、外傷、感染性休克、纖維化、動脈粥樣硬化、肥胖症、II型糖尿病、移植功能障礙或關節炎。在一些實施例中，該癌症為肛門癌、闌尾癌、星形細胞瘤、基底細胞癌、膽囊癌、胃癌、肺癌、支氣管癌、骨癌、肝及膽管癌、胰臟癌、

乳癌、肝癌、卵巢癌、睾丸癌、腎癌、腎盂及輸尿管癌、唾液腺癌、小腸癌、尿道癌、膀胱癌、頭頸癌、脊柱癌、腦癌、子宮頸癌、子宮癌、子宮內膜癌、結腸癌、結直腸癌、直腸癌、肛門癌、食道癌、胃腸癌、皮膚癌、前列腺癌、垂體癌、陰道癌、甲狀腺癌、喉癌、神經膠質母細胞瘤、黑色素瘤、骨髓化生不良症候群、肉瘤、畸胎瘤、慢性淋巴細胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、急性淋巴細胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、多發性骨髓瘤、T或B細胞淋巴瘤、GI器官間質瘤、軟組織腫瘤、肝細胞癌及腺癌。在一些實施例中，該癌症為表現CD47之癌症或過度表現CD47之癌症。

【0449】 本文提供之雙功能分子之治療有效量將視例如體重、年齡、既往病史、目前藥物治療、個體之健康狀況及交叉反應之潛在性、過敏、敏感性及不良副作用以及投與途徑及疾病發展程度之此項技術中已知之各種因素而定。熟習此項技術者(例如，醫師或獸醫)可根據此等及其他情況或要求之指示按比例減少或增加劑量。

【0450】 在某些實施例中，本文提供之雙功能分子可以約0.01 mg/kg至約100 mg/kg之治療有效劑量投與。在某些實施例中，投與劑量可在治療過程中改變。舉例而言，在某些實施例中，初始投與劑量可高於後續投與劑量。在某些實施例中，投與劑量可在治療過程中根據個體之反應而變化。

【0451】 可調整劑量方案以提供最佳所需反應(例如，治療反應)。舉例而言，可投與單次劑量，或可隨時間推移投與多次分開劑量。

【0452】 本文提供之雙功能分子可藉由此項技術中已知之任何途徑，例如腸胃外(例如皮下、腹膜內、靜脈內，包括靜脈內輸注、肌內或

皮內注射)或非腸胃外(例如口服、鼻內、眼內、舌下、直腸或局部)途徑投與。

【0453】 在一些實施例中，本文提供之雙功能分子可單獨投與或與治療有效量之第二治療劑組合投與。舉例而言，本文揭示之雙功能分子可與第二治療劑組合投與，該第二治療劑例如為化學治療劑、抗癌藥物、放射療法、免疫治療劑、抗血管生成劑、靶向療法、細胞療法、基因療法、激素療法、抗病毒劑、抗生素、鎮痛劑、抗氧化劑、金屬螯合劑或細胞介素。

【0454】 如本文所使用之術語「免疫療法」係指刺激免疫系統對抗諸如癌症之疾病或以一般方式增強免疫系統之療法類型。免疫療法之實例包括但不限於檢查點調節劑、過繼細胞輸入、細胞介素、溶瘤病毒及治療性疫苗。

【0455】 「靶向療法」為作用於與癌症相關之特定分子之療法類型，該等特定分子諸如為存在於癌細胞中但不存在於正常細胞中或在癌細胞中更豐富之特定蛋白質、或有助於癌症生長及存活之癌症微環境中之目標分子。靶向療法將治療劑靶向腫瘤，從而使正常組織免受治療劑影響。

【0456】 在某些此等實施例中，與一或多種額外治療劑組合投與之本文提供之雙功能分子可與一或多種額外治療劑同時投與，且在某些此等實施例中，雙功能分子及(多種)額外治療劑可作為同一醫藥組合物之一部分投與。然而，與另一治療劑「組合」投與之雙功能分子不必與該藥劑同時投與或不必與該藥劑在同一組合物中投與。在另一藥劑之前或之後投與之雙功能分子視為與該藥劑「組合」投與，「組合」為本文所使用之片語，即使抗體或抗原結合片段及第二藥劑係經由不同途徑投與。在可能情

況下，與本文揭示之抗體或其抗原結合片段組合投與之額外治療劑係根據額外治療劑之產品資訊表中列出之排程或根據Physicians' Desk Reference 2003(Physicians' Desk Reference, 第57版; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 第57版(2002年11月))或此項技術中熟知之方案投與。

【0457】 在另一態樣中，本發明亦提供本文提供之雙功能分子及/或本文提供之醫藥組合物用於製造用以治療個體之PD-L1相關疾病及/或TGF-β相關疾病及/或IL-1相關疾病及/或CD47相關疾病之藥劑的用途。

【0458】 提供以下實例以更好地說明所主張之發明且不應將該等實例解釋為限制本發明之範疇。下文描述之所有具體組合物、材料及方法全部或部分地落入本發明之範疇內。此等具體組合物、材料及方法不意欲限制本發明，而僅用於說明落入本發明之範疇內之具體實施例。熟習此項技術者可在不運用發明能力及不脫離本發明之範疇之情況下研發等效組合物、材料及方法。應理解，可在本文描述之程序中作出許多改變，同時仍保持在本發明之界限內。本發明人之意圖在於該等改變包括在本發明之範疇內。

實例

實例1：人源化4B6抗體之產生、表現及純化

【0459】 源自專利WO 2017161976A1之包含如下所示之SEQ ID NO: 46之VH序列及SEQ ID NO: 47之VL序列的抗PD-L1 mAb 4B6為強效PD-1/PD-L1阻斷劑。此抗體由小鼠雜交瘤抗體產生，因此其需要適當的人源化。小鼠抗體4B6之可變域之序列係用於鑑定與其相應鼠框架具有最高同源性之生殖系序列。電腦建模係用於設計具有互補決定區(CDR)接枝

及回復突變之人源化變異體。

[0460] 小鼠/嵌合重鏈可變區(SEQ ID NO: 46)：

EVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKASGYVFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSYN
QKFKGKATVTVDKSSRTAYMELLSLTSEDSAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLVTVSA。

[0461] 小鼠/嵌合輕鏈可變區(SEQ ID NO: 47)：

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDR
FTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSNYPLTFGSGTKLEIK。

[0462] 注意：斜體部分表示框架(FR)，且下劃線部分表示CDR序列。次序為FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0463] 輕鏈之人生殖系框架序列VK/1-33及重鏈之VH/1-2分別用於CDR接枝。

[0464] 重鏈變異體1、2、3及4 (亦即，VH變異體1、2、3及4)藉由將三個CDR直接接枝至VH生殖系序列(SEQ ID NO: 48)以及另外對用於VH變異體1 (SEQ ID NO: 49)之M69V、R71V、用於VH變異體2 (SEQ ID NO: 50)之M69V、R71V、A93V、R94K、用於VH變異體3 (SEQ ID NO: 51)之M69V、R71V、T73K、T28V及用於VH變異體4 (SEQ ID NO: 52)之M69V、R71V、A93V、R94K、T73K、T28V、G44S分別進行回復突變來獲得。

[0465] 4B6 VH之生殖系序列：

[0466] VH/1-2 (4B6-VH生殖系，SEQ ID NO: 48)：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINP
NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWGDGPFAYWGQ
GTLVTVSS。

[0467] VH/1-2變異體1 (4B6_Ha，SEQ ID NO: 49)：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPN
NGGTSYNEKFKGRVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWGDGPFAYWGQ
GTLVTVSS。

[0468] VH/1-2變異體2 (4B6_Hb，SEQ ID NO: 50)：
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPN
NGGTSYNQKFKGRVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQ
GTLVTVSS
。

[0469] VH/1-2變異體3 (Hu4B6_Hc，SEQ ID NO: 51)：
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINP
NNGGTSYNQKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWGDGPFAYWG
QGTLVTVSS
。

[0470] VH/1-2變異體4 (Hu4B6_Hd，SEQ ID NO: 52)：
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPN
NGGTSYNQKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQ
GTLVTVSS
。

[0471] 輕鏈變異體1及2 (VL變異體1及2)藉由將三個CDR直接接枝至生殖系序列(SEQ ID NO: 53)以及另外對用於VL變異體1 (SEQ ID NO: 54)之F73L突變及用於VL變異體2 (SEQ ID NO: 55)之F73L、A43S、S60D分別進行回復突變來獲得。

[0472] 4B6 VL之生殖系序列：

[0473] VK/1-33 (4B6_VL_生殖系，SEQ ID NO: 53)：
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETG
VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLP
。

[0474] VK/1-33變異體1 (Hu4B6_La,SEQ ID NO: 54)：
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
。

[0475] VK/1-33變異體2 (Hu4B6_Lb,SEQ ID NO: 55)：
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGAAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK
。

【0476】 合成上述重鏈及輕鏈可變區之cDNA，且隨後將該等cDNA與人IgG1及人κ之恆定區序列融合。將所得抗體基因序列選殖至表現載體中。藉由使用來自Qiagen之質體大量純化系統(Plasmid Maxiprep System)製備大規模DNA以用於人源化4B6變異體表現，如表6中所示，且根據製造商方案使用來自Invitrogen之ExpiFectamine™ CHO試劑進行細胞轉染。當細胞活力超過60%時收取上清液且藉由0.22 um過濾膠囊過濾以移除細胞碎片。隨後，將經過濾之上清液裝載至預平衡之蛋白質-A親和管柱上。用平衡緩衝液(PBS)洗滌蛋白A樹脂，且隨後使用25 mM檸檬酸鹽(pH 3.5)溶離抗體。藉由使用1 M Tris-鹼(pH 9.0)將經純化抗體溶液調節至pH 6.0-7.0。將內毒素控制在1 EU/mg以下。最後，藉由SDS-PAGE表徵經純化之抗體。

【0477】 **表6.人源化4B6變異體之表現**

鼠抗體4B6之人源化序列組合			
	Hu4B6_L0	Hu4B6_La (SEQ ID NO : 54)	Hu4B6_Lb (SEQ ID NO : 55)
Hu4B6_H0			
Hu4B6_Ha (SEQ ID NO : 49)		Hu4B6_HaLa	Hu4B6_HaLb
Hu4B6_Hb (SEQ ID NO : 50)		Hu4B6_HbLa	Hu4B6_HbLb
Hu4B6_Hc (SEQ ID NO : 51)		Hu4B6_HcLa	Hu4B6_HcLb
Hu4B6_Hd (SEQ ID NO : 52)		Hu4B6_HdLa	Hu4B6_HdLb

【0478】 注意：此表示出不同突變之各種序列組合。舉例而言，Hu4B6_HaLa指示人源化鼠抗體Hu4B6_HaLa上存在兩種突變(重鏈Hu4B6_Ha及輕鏈Hu4B6_La)等等。Hu4B6_L0及Hu4B6_H0係藉由CDR接枝獲得的，其缺少關鍵回復突變，因此不將其用於表現。

實例2：根據ELISA分析之與人PD-L1之結合

[0479] 藉由ELISA方法評估人源化抗體之結合。簡言之，將人PD-L1-His固定在板上。將表6中列出之人源化4B6抗體在PBS中連續稀釋且添加以培育1小時。接下來，添加針對人IgG-HRP之山羊pAb及TMB以偵測OD450 nm下之結合。

[0480] 如圖1中所示，測試所有人源化變異體以篩選最好的人源化變異體。所有變異體皆保留其結合活性，且Hu4B6_HdLa顯示出比其他變異體更好的結合活性。

[0481] 吾等分析此抗體之CDR序列，且發現重鏈之CDR2中存在NG模體。在表現及純化過程中可能存在脫胺風險。為了移除脫醯胺熱點，將G55A之突變(下方加粗且放大)引入Hu4B6_Hd中。隨後，獲得Hu4B6_Hg (SEQ ID NO: 56)，且針對人PD-L1之親和力不受影響，如圖2中所示。

[0482] Hu4B6_Hg (SEQ ID NO: 56)：
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMG
DINPNNAGTSYNEKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWG
DGPFAYWGQGTLVTVSS 。

實例3：單株噬菌體ELISA及序列分析

[0483] 儘管Hu4B6-HgLa保留嵌合4B6之活性，但作為拮抗劑藥物，更高親和力為較佳的。基於Hu4B6-HgLa序列，CDR中之定點突變誘發及活體外解離速率依賴性選擇之幾個淘選循環被進一步用於親和力成熟。首先，將4B6-HgLa之VL域及VH域藉由重疊PCR擴增且藉由肽連接子(G4S)3連接以形成scFv，隨後選殖至噬菌體載體pComb3x (Wuhan MiaoLingBio，P0862)中，作為經由SfiI裂解位點進行親和力成熟之野生

型序列。

【0484】 為了研究重鏈及輕鏈之CDR1及CDR2對4B6親和力成熟之個別貢獻，將構築上述各CDR之一個SPM (小擾動突變誘發)噬菌體文庫，此係因為兩個鏈之抗體CDR3通常在抗原結合中起著重要作用。將兩個鏈之CDR1及CDR2序列與生殖系序列比對，且重鏈及輕鏈之可變區之生殖系分別為IGHV1-2及IGKV1-33。將生殖系CDR序列之生物資訊學分析結果用於指導文庫設計。

【0485】 在確定胺基酸突變位點及取代序列後，設計簡併引子以增加突變文庫之多樣性。擴增多樣化CDR片段以構築4B6 scFv基因突變文庫。將scFv基因與pComb3XSS噬菌體展示載體連接以生成scFv文庫。將各CDR (包括表2中列出之HCDR1、HCDR2、LCDR1及LCDR2)之基於密碼子之引子建立為獨立文庫，且將4B6親和力成熟文庫劃分為4個文庫。HCDR1之容量為1.76×10^8 CFM，HCDR2之容量為1.81×10^8 CFM，LCDR1之容量為2.34×10^8 CFM，且LCDR2之容量為2.00×10^8 CFM。各文庫隨機選取5或6個殖株進行菌落定序。結果表明，所構築文庫之插入率為100%。

【0486】 將10 μg/ml hPD-L1 (Acro Biosystems，PD1-H5229)抗原包覆至ELISA板，且在37℃下與200 μL噬菌體(1×10^{10} pfu/ml噬菌體展示文庫)反應1小時。洗滌後，將OD600為約0.5之TG1 (Lucigen，60502-2)直接添加至孔中進行感染，且與噬菌體一起培育15分鐘。體積足以用於對數中期培養之M13KO7輔助噬菌體(NEB，N0315S)用於文庫噬菌體拯救，且生成噬菌體且純化以用於下一輪篩選。篩選過程重複3輪，且第2輪抗原濃度下降至2.5 μg/ml且第3輪抗原濃度下降至1 μg/ml。

【0487】 進行ELISA結合分析以偵測此等多株噬菌體變異體之力價。在3輪淘選之後，包括4B6-H-CDR2、4B6-L-CDR1及4B6-L-CDR2之3個文庫明顯富集。

【0488】 對於此3個文庫，各文庫選取96個殖株且使其進行噬菌體ELISA以偵測其結合活性。簡言之，將1 μg/ml hPD-L1 (Acro Biosystems，PD1-H5229)抗原包覆至ELISA板且在4℃下置放過夜。然後，添加300 μL之3%(w/v)脫脂乳，以在室溫下阻斷1小時。1小時後，將含有單株抗體片段噬菌體之100 μl上清液與作為陰性對照之PBS一起添加且在37℃下培育1小時。使用0.5% PBS+Tween-20用於洗滌3次，且添加100 μl HRP偶聯型抗M13 mAb (1:20000，Sino Biological，11973-MM05T-H)。在室溫下培育1小時後，添加混合TMB (InnoReagents，TMB-S-003)受質試劑且將板在室溫下培育5分鐘。添加0.1 M H_2SO_4終止反應，然後記錄OD450 nm。選取陽性殖株以用於由Genewiz (中國蘇州)進行之DNA定序。序列在表7中示出。

【0489】 **表7. 4B6 scFv噬菌體文庫之陽性殖株之序列**

AM4B6_Hg		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V**FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LE WMGDINPNN**A**GTSYNHKFKGRVT**V**T**V**D**K**SISTAYMELSRLRSDDTA VYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO: 56)
Hu4B6_Hg.2	G57Q, S59Q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V**FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LE WMGDINPNN**AQ**T**Q**YNHKFKGRVT**V**T**V**D**K**SISTAYMELSRLRSDDTA VYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO: 58)
AM4B6_Hg.3	G57E, S59L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V**FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LE WMGDINPNN**AE**T**L**YNHKFKGRVT**V**T**V**D**K**SISTAYMELSRLRSDDTA VYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO: 59)
AM4B6_Hg.5	G57Q, S59V	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY**V**FTDYYMNWVRQAPGQ**S**LE WMGDINPNN**AQ**T**V**YNHKFKGRVT**V**T**V**D**K**SISTAYMELSRLRSDDTA VYYC**VK**WGDGPFAYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO: 60)
Hu4B6_La		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGAAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIATYYCQQYS NYPTFGQGTKLEIK(SEQ ID NO: 61)

AM4B6_La.1	G30K, A31G	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNV**KG**AVAWYQQKPGKAPKL LIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIATYYCQQYS NYPTFGQGTKLEIK(SEQ ID NO: 62)
AM4B6_La.2	G30P	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNV**P**AAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIATYYCQQYS NYPTFGQGTKLEIK(SEQ ID NO: 63)
AM4B6_La.4	A51V, N53D	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGAAVAWYQQKPGKAPKL LIYS**V**S**D**RYTGVPSRFSGSGSGTDFT**L**TISSLQPEDIATYYCQQYS NYPTFGQGTKLEIK(SEQ ID NO: 64)

注意：下劃線序列係指CDR序列，且加粗胺基酸係指突變胺基酸。

實例4：用於偵測結合親和力之生物層干涉測量法(BLI)

【0490】使用生物層干涉測量法(BLI)用於測試4B6 scFv變異體對人PD-L1-Fc (Sino Biological，70110-D02H)抗原之結合親和力。材料及程序分別在表8及表9中示出。結果在表10-12中示出。根據結合親和力結果，4個輕鏈變異體(L-CDR1-2、L-CDR1-3、L-CDR2-2、L-CDR2-3)及3個重鏈變異體(H-CDR2-2、H-CDR2-3、H-CDR2-5)經選擇用於未來構築。

【0491】**表8 BLI分析中使用之樣本及材料**

孔類型	樣本ID
基線	KD緩衝液
裝載	PD-L1-FC (3.25 μg/ml)
基線2	KD緩衝液
樣本	4B6 scFv (5.2 μg/ml)
參考孔	KD緩衝液
再生	再生緩衝液
中和	KD緩衝液

【0492】 表9 BLI分析程序

步驟類型	分析時間
基線	60秒
裝載	180秒
基線2	120秒
締合	180秒
解離	240秒
再生	5秒

【0493】 表10. 4B6-L-CDR1突變變異體之結合親和力分級

樣本編號	序列	$K_{on}(\times10^{5}M^{-1}s^{-1})$	$K_{off}(\times10^{-3}M^{-1}s^{-1})$	$K_{d}(\times10^{-9}M)$	增加倍數
L-CDR1-WT	KASQNVGAAVA (SEQ ID NO: 4)	0.358	1.01	28.2	----
L-CDR1-1	KASQNVGAIVA (SEQ ID NO: 7)	0.412	0.285	6.91	4.08
L-CDR1-2	KASQNVPAAVA (SEQ ID NO: 8)	2.71	1.54	5.68	4.96
L-CDR1-3	KASQNVKGAVA (SEQ ID NO: 9)	0.911	0.253	2.78	10.14

【0494】 表11. 4B6-L-CDR2突變變異體之結合親和力分級

樣本編號	序列	$Kon(\times10^{5}M^{-1}s^{-1})$	$Koff(\times10^{-3}M^{-1}s^{-1})$	Kd(×10-9M)	增加倍數
L-CDR2-WT	SASNRYT (SEQ ID NO: 5)	0.381	1.05	27.6	----
L-CDR2-1	SNSHRYT (SEQ ID NO: 10)	0.468	0.377	8.06	3.42
L-CDR2-2	SRSVRYT (SEQ ID NO: 11)	1.62	0.540	3.34	8.26
L-CDR2-3	SVSDRYT (SEQ ID NO: 12)	1.24	0.543	4.37	6.32

[0495] 表12. 4B6-H-CDR2突變變異體之結合親和力分級

樣本編號	序列	K_{on}($\times 10^5 M^{-1}s^{-1}$)	K_{off}($\times 10^{-3} M^{-1}s^{-1}$)	K_d($\times 10^{-9} M$)	增加倍數
H CDR2-WT (G55A)	DINPNNAGTSYNIKFKG (SEQ ID NO: 18)	0.463	1.24	26.7	.....
H CDR2-1	DINPNNADTMYNIKFKG (SEQ ID NO: 13)	1.41	0.495	3.52	7.6
H CDR2-2	DINPNNAQTQYNIKFKG (SEQ ID NO: 14)	1.01	0.244	2.42	11.03
H CDR2-3	DINPNNAETLYNIKFKG (SEQ ID NO: 15)	1.16	0.283	2.43	10.99
H CDR2-4	DINPNNGLTSYNIKFKG (SEQ ID NO: 16)	1.17	0.517	4.43	6.03
H CDR2-5	DINPNNAQTVYNIKFKG (SEQ ID NO: 17)	1.02	0.245	2.40	11.13

實例5：AM-4B6-hIgG1-TGFβRII (1-136)融合蛋白之構築及表現

[0496] 將所選重鏈變異體及輕鏈變異體交叉組合，且用hIgG1-TGFβRII (1-136)融合蛋白表現。TGFβRII (1-136)具有在SEQ ID NO: 79中闡釋之胺基酸序列：

TPPTVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE
VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPD

。

hIgG1之胺基酸序列如下(SEQ ID NO: 80)：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

。

TGFβRII (1-136)係藉由肽連接子(G4S)4G (SEQ ID NO: 68)連接至hIgG1之羧基端。

hκ之胺基酸序列如下(SEQ ID NO: 82)：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

。

[0497] 至少抗體變異體以AM (親和力成熟)為字首。重鏈及輕鏈之序列構築體在表13中示出，且至少抗體之設計在表14中示出。舉例而言，如表13及表14中所示，雙功能分子「AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體1」具有重鏈及輕鏈，其中重鏈自N端至C端包括：Hu4B6 Hg.2-hIgG1-(G4S)4G-TGFβRII(1-136)；且輕鏈自N端至C端包括：Hu4B6 La.1-hκ。命名法同樣適用於表14中之其他變異體。

[0498] 根據製造商方案使用來自Invitrogen之ExpiFectamine™ CHO試劑(Thermo，A29129)進行重鏈及輕鏈之共轉染。在第10天收取上清液且藉由親和層析法進行純化。

【0499】 表13 AM-4B6-hIgG1-TGFβRII重鏈及輕鏈變異體之清單

名稱	突變位點	區	序列
Hu4B6_Hg.2_hIgG1 - (G4S)4G- TGFβRII	G57Q, S59Q	H-CDR2-2	DINPNNAQTQYNHKFKG
Hu4B6_Hg.3_hIgG1 - (G4S)4G- TGFβRII	G57E, S59L	H-CDR2-3	DINPNNAETLYNHKFKG
Hu4B6_Hg.5_hIgG1 - (G4S)4G- TGFβRII	G57Q, S59V	H-CDR2-5	DINPNNAQTVYNHKFKG
Hu4B6_La.1_hκ	G30K, A31G	L-CDR1-3	KASQNVKGAVA
Hu4B6_La.2_hκ	G30P	L-CDR1-2	KASQNVPAAVA
Hu4B6_La.4_hκ	A51V, N53D	L-CDR2-2	SRSVRYT
Hu4B6_La.6_hκ	A51R, N53V	L-CDR2-3	SVSDRYT

【0500】 表14. AM-4B6-hIgG1-TGFβRII抗體變異體之清單

樣本編號	重鏈	輕鏈
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體1	Hu4B6_Hg.2 (SEQ ID NO: 58)	Hu4B6_La.1 (SEQ ID NO: 62)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體2		Hu4B6_La.2 (SEQ ID NO: 63)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體3		Hu4B6_La.4 (SEQ ID NO: 64)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體4		Hu4B6_La.6 (SEQ ID NO: 66)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體5	Hu4B6_Hg.3 (SEQ ID NO: 59)	Hu4B6_La.1 (SEQ ID NO: 62)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體6		Hu4B6_La.2 (SEQ ID NO: 63)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體7		Hu4B6_La.4 (SEQ ID NO: 64)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體8		Hu4B6_La.6 (SEQ ID NO: 65)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體9	Hu4B6_Hg.5 (SEQ ID NO: 60)	Hu4B6_La.1 (SEQ ID NO: 62)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體10		Hu4B6_La.2 (SEQ ID NO: 63)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體11		Hu4B6_La.4 (SEQ ID NO: 64)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體12		Hu4B6_La.6 (SEQ ID NO: 65)

實例6：AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體對hPD-L1之結合親和力

【0501】 根據ELISA分析之與hPD-L1之結合

【0502】 將1 μg/ml hPD-L1 (Acro Biosystems，PD1-H5229)抗原包覆至ELISA板且在4℃下置放過夜。然後添加300 μl之3%(w/v)脫脂乳以在室溫下阻斷1小時。在1小時後，將100 μl之濃度範圍為100 nM至0.006 nM (四倍連續稀釋度)之AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體或原始4B6-hIgG1-TGFβRII與作為陰性對照之PBS一起添加且在室溫下培育1小時。使用0.5% PBS+Tween-20用於洗滌3次，且添加100 μl HRP結合型抗人Fc抗體(1:20000，Abcam，ab98624)，在室溫下培育1小時後，添加混合TMB受質試劑(InnoReagents，TMB-S-003)且在室溫下培育5分鐘，然後藉由添加0.1 M H_2SO_4終止。藉由微板讀取器記錄OD450 nm。

【0503】 如圖3A-圖3C中所示，當與原始4B6-hIgG1-TGFβRII比較時，所有變異體皆具有經增強之結合信號及親和力。鑒於此等變異體之間的差異有限，將表面電漿共振技術用於進一步評估其結合親和力。

【0504】 根據Biacore之與hPD-L1之結合

【0505】 將4 μg/ml AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體或原始4B6-hIgG1-TGFβRII固定在S系列蛋白A晶片之表面上。將人PD-L1稀釋至適當濃度梯度(0 nM、1.875 nM、3.75 nM、7.5 nM、15 nM、30 nM、60 nM)且注射至Biacore 2000之樣本通道中。結果在表15中示出。AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體7與人PD-L1之結合親和力比原始4B6-hIgG1-TGFβRII提高了約15倍。

【0506】 表15. 根據Biacore之AM-4B6-hIgG1-TGFβRII與hPD-L1之結合親和力

分析物	樣本編號	樣本名稱	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
PD-L1 his	1	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體5	2.060E+5	1.487E-4	7.218E-10
	2	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體7	3.815E+5	1.479E-4	3.876E-10
	3	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體2	3.231E+5	1.676E-4	5.189E-10
	4	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體10	2.444E+5	1.476E-4	6.039E-10
	5	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體11	2.688E+5	1.366E-4	5.083E-10
	6	4B6-hIgG1-TGFβRII	2.107E+5	0.001156	5.489E-9

【0507】 根據FACS分析之與於細胞表面上表現之PD-L1之結合

【0508】 293T-PD-L1-CD3L細胞係由邁博斯生物科學(MabSpace Bioscience)產生以用於表徵PD-L1抗體。用人PD-L1及抗CD3 scFv兩者轉染細胞。將AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體或原始4B6-hIgG1-TGFβRII在稀釋緩衝液(具有2% BSA之PBS)中連續稀釋(5倍稀釋度)以獲得8個濃度。收取且離心293T-PD-L1-CD3L細胞。將該等細胞以2 × 10^6 個細胞毫升之密度再懸於PBS中，然後以每孔100微升添加至板中。在離心且移除上清液後，將經稀釋之抗體添加至板中且在4℃下培育30分鐘。在用稀釋緩衝液洗滌兩次後，將PE結合之驢抗人IgG(H+L) (Jacksonimmuno，709-116-149)添加至板中且在4℃下培育30分鐘。在洗滌後，將細胞再懸於200 µl PBS中且藉由流式細胞分析技術進行分析。

【0509】 如圖4中所示，此5種變異體以類似EC50與於293T-PD-L1-CD3L細胞表面上表現之PD-L1結合。變異體7之EC50略低於其他變異體之EC50，此情況與藉由Biacore量測之結合親和力結果一致。

實例7：AM-4B6-hIgG1-TGFbRII變異體之PD-1/PD-L1阻斷活性

【0510】 根據ELISA分析之PD-1/PD-L1及B7-1/PD-L1阻斷

為了測試配位體/受體阻斷活性，將0.5 µg/ml hPD-L1-Fc抗原包覆至

ELISA板且在4℃下置放過夜。添加300 μL阻斷緩衝液以在室溫下阻斷1小時。在1小時後，添加50 μl之濃度範圍為100 nM至0.024 nM (四倍連續稀釋度)之AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體7或原始4B6-hIgG1-TGFβRII以及50 μl之濃度為1 μg/ml之PD-L1-his且在室溫下培育1小時。使用0.5% PBS+Tween-20用於洗滌3次，且添加100 μl HRP結合型鏈黴抗生物素蛋白(1:5000，Abcam，目錄號ab7403)。在室溫下培育1.5小時後，添加混合TMB受質試劑且在室溫下培育5分鐘，然後藉由添加0.1 M H_2SO_4終止。藉由微板讀取器記錄OD450 nm。如圖5A-圖5B中所示，兩個樣本均可阻斷PD-L1/PD-1或PD-L1/B7-1，而AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體7之IC50較低，此表明變異體7具有經提高之活性。

【0511】 根據基於細胞之分析之PD-1/PD-L1阻斷

【0512】 在此分析中，293T-PD-L1-CD3L細胞表現PD-L1及抗CD3 scFv，而Jurkat-NFAT-Luc-PD1細胞表現PD-1且攜帶可在CD3刺激情況下活化之NFAT信號。NFAT活化引起下游螢光素酶基因轉錄及表現，此可藉由其受質加以偵測。該兩個細胞係由邁博斯生物科學產生。

【0513】 簡言之，收取293T-PD-L1-CD3L細胞且以2 × 10^6個細胞/毫升之密度再懸。將每孔20 μl細胞添加至半孔板中。將AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體或原始4B6-hIgG1-TGFβRII在含2% FBS之RPMI培養基中連續稀釋(3倍稀釋度)以獲得8個濃度。向半孔板中每孔添加20 μl抗體且將板在37℃、5% CO_2下培育30分鐘。收取Jurkat-NFAT-Luc-PD1細胞且以4 × 10^6個細胞/毫升之密度再懸於含有2% FBS之RPMI培養基中。最後，將每孔20 μl細胞及5 ng/ml TGF-β (R&D，240-B-010)添加至半孔板中且在37℃、5% CO_2下培育5小時。將60 μl之OneGlo偵測試劑

(Promega，E6120)添加至各孔中且在室溫下培育5分鐘。由微板讀取器讀取發光信號。藉由GraphPad Prism分析資料。

[0514] 如圖6中所示，與之前ELISA結果一致，與其他變異體相比，變異體7在此基於細胞之分析中具有最強效的阻斷活性。因此，將AM-4B6-hIgG1-TGFβRII變異體7之4B6 Fab部分縮寫為AM4B6，且在以下實驗中進一步評估AM4B6-hIgG1-TGFβRII融合蛋白。

實例8：AM4B6-hIgG1-TGFβRII活體外生成及表徵

[0515] AM4B6-hIgG1-TGFβRII選殖及表現

[0516] 據報導，經截短TGFβRII ECD 20-136為可溶性的且保留結合TGFβ1之能力(Kim Ming Lo等人，US9676863 B2, 2017；Christian C.等人，Protein Expression and Purification, 2000, 20: 98-104)。接下來，將TGFβRII 1-136之全長胞外域置換為經截短胞外域且評估可發展性及穩定性。穩定細胞株之SDS-PAGE結果表明，對於經截短及全長TGFβRII ECD而言，蛋白質表現係良好的，但經截短TGFβRII ECD 20-136之蛋白質穩定性比全長TGFβRII ECD之蛋白質穩定性好得多(圖7)。經截短TGFβRII ECD 20-136之序列如下：

[0517] 穩定TGF-β trap、TGF-βRII胞外域(20-136)之序列

GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

(SEQ ID NO : 66)

。

[0518] 將包含經截短TGF-βRII (亦即TGF-βRII(20-136)，SEQ ID NO: 66)之雙功能分子用於此實例以及實例9-11。該等雙功能分子之名稱

係用TGFβRII'指示，以區別於TGF-βRII (1-136)。舉例而言，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'指示具有TGF-βRII (20-136)之分子。

【0519】 根據ELISA分析之與來自不同物種之PD-L1之結合

【0520】 將1 μg/ml人PD-L1 (Acro Biosystems，PD1-H5229)或食蟹獼猴PD-L1抗原包覆至ELISA板上且在4℃下置放過夜。然後添加300 μl之3%(w/v)脫脂乳以在室溫下阻斷1小時。在1小時後，添加100 μl之濃度範圍為100 nM至0.02 nM (四倍連續稀釋度)之AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或對照hIgG1-TGFβRII'且在室溫下培育1小時。使用0.5% PBS+Tween-20用於洗滌3次，且添加100 μl HRP結合型抗人Fc抗體(1:20000，Abcam，ab98624)，在室溫下培育1小時後，添加混合TMB受質試劑(InnoReagents，TMB-S-003)且在室溫下培育5分鐘，且藉由添加0.1 M H_2SO_4終止。藉由微板讀取器記錄OD450 nm。

【0521】 如圖8A及圖8B中所示，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'以與人PD-L1類似之EC50與食蟹獼猴PD-L1交叉反應。

【0522】 根據ELISA之與來自不同物種之TGFβ1、TGFβ2及TGFβ3之結合

【0523】 根據來自在Uniport網站(https://www.uniprot.org/)上公佈之4種常見物種：人、食蟹獼猴、小鼠及大鼠的TGFβ1、TGFβ2及TGFβ3之序列，TGFβ成員相當保守。人TGFβ1及食蟹獼猴TGFβ1之序列相同；小鼠TGFβ1及大鼠TGFβ1相同；人TGFβ2及食蟹獼猴TGFβ2相同；小鼠TGFβ2及大鼠TGFβ2相同；人TGFβ3、食蟹獼猴TGFβ3及小鼠TGFβ3相同。

【0524】 對於TGFβ1及TGFβ3，程序如下：將0.5 μg/ml人TGFβ1

(Sino Biological，10804-HNAC)或小鼠TGFβ1 (Novoprotein，CK33)或人TGFβ3 (Genscript，Z03430)或大鼠TGFβ3 (Novoprotein，CJ44)抗原包覆至ELISA板且在4℃下置放過夜。然後添加300 μl之3%(w/v)脫脂乳以在室溫下阻斷1小時。在1小時後，添加100 μl之濃度範圍為100 nM至0.006 nM (四倍連續稀釋度)之AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或對照hIgG1-TGFβRII'且在室溫下培育1小時。使用0.5% PBS+Tween-20用於洗滌3次，且添加100 μl HRP結合型抗人Fc抗體(1:20000，Abcam，ab98624)，在室溫下培育1小時後，添加混合TMB受質試劑(InnoReagents，TMB-S-003)且在室溫下培育5分鐘，且藉由添加0.1 M H_2SO_4終止。藉由微板讀取器記錄OD450 nm。

【0525】 對於TGFβ2，測試程序不同：將2 μg/ml之AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或對照hIgG1-TGFβRII'包覆至ELISA板且在4℃下置放過夜。然後添加300 μl之3%(w/v)脫脂乳以在室溫下阻斷1小時。在1小時後，添加100 μl之濃度範圍為39.4 nM至0.3 nM (兩倍連續稀釋度)之人TGFβ2或小鼠TGFβ2且在室溫下培育1小時。使用0.5% PBS+Tween-20用於洗滌3次，且添加100 μl之TGFβ2生物素化抗體(1:10000，R&D，BAF302)。在室溫下培育1小時且洗滌後，添加100 μl之HRP-鏈黴抗生物素蛋白(1:5000，Abcam，ab7403)，且將板在室溫下培育1小時。在洗滌後，添加混合TMB受質試劑(InnoReagents，TMB-S-003)且在室溫下培育5分鐘，且藉由添加0.1 M H_2SO_4終止。藉由微板讀取器記錄OD450 nm。

【0526】 結果彙總在表16中。對於與TGFβ1之結合親和力，不同物種之間的EC50值非常類似。此外，與TGFβ1及TGFβ3之結合親和力顯著高於與TGFβ2之結合親和力，此表明對TGFβ1及TGFβ3之阻斷活性可能比

對TGFβ2之阻斷活性更有效。

【0527】 表 16. AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 與 TGFβ1 、 TGFβ2 及 TGFβ3之結合

根據ELISA之與來自不同物種之TGFβ1、TGFβ2及TGFβ3之結合(EC_{50}，nM)					
TGFβ1		TGFβ2		TGFβ3	
人	小鼠	人	小鼠	人	大鼠
0.748	0.800	8.459	8.884	5.257	3.733

【0528】 根據ELISA分析之與B7家族或TGFβ超家族內之其他成員之結合

【0529】 對於B7家族，將0.5 μg/ml hPD-L1 (Acro Biosystems，PD1-H5229)或hPD-L2或B7-2或B7-1或B7-H2或B7-H3或B7-H4或VISTA包覆至ELISA板且在4℃下置放過夜。對於TGFβ超家族，將0.5 μg/ml人活化素A、BMP-2、LAP或TGFβ1在4℃下包覆過夜。然後添加300 μl之3%(w/v)脫脂乳以在室溫下阻斷1小時。在1小時後，添加100 μl之濃度範圍為100 nM至0.006 nM (連續稀釋)之AM4B6-hIgG1-TGFβRII'且在室溫下培育1小時。使用0.5% PBS+Tween-20用於洗滌3次，且添加100 μl HRP結合型抗人Fc抗體(1:20000，Abcam，ab98624)，在室溫下培育1小時後，添加混合TMB受質試劑(InnoReagents，TMB-S-003)且在室溫下培育5分鐘，且藉由添加0.1 M H_2SO_4終止。藉由微板讀取器記錄OD450 nm。

【0530】 如圖9A-圖9B中所示，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'特異性結合至PD-L1而非亦屬於B7家族之其他抗原。如圖9C中所示，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'特異性結合至TGF-β1而非亦屬於TGFβ超家族之其他抗原。

【0531】 AM4B6-hIgG1-TGFβRII'與表現PD-L1之細胞之結合

【0532】藉由經由CRISPR-Cas9系統使mPD-L1缺失，之後使用慢病毒轉導hPD-L1來產生MC38/hPD-L1。此細胞株由中國醫學科學院蘇州系統醫學研究所系統醫學中心(Center of Systems Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences Suzhou Institute of Systems Medicine)秦曉峰教授實驗室提供(Huang, Anfei等人 Scientific Reports 7 (2017): 42687.)。將MC-38/hPD-L1細胞在RPMI1640 + 10% FBS中培養。EMT-6/hPD-L1為穩定表現經轉染之人PD-L1基因之小鼠乳癌細胞株。將EMT-6/hPD-L1細胞在Waymouth之(1×)MB752/1 + 15% FBS中培養。NCI-H460細胞係購自COBIOER有限公司。其為一種具有PD-L1表現之人肺上皮腫瘤細胞株。將NCI-H460細胞在RPMI1640 + 10% FBS中培養。NCI-H292細胞係購自COBIOER有限公司。其為一種具有PD-L1表現之人肺上皮腫瘤細胞株。將NCI-H292細胞在RPMI1640 + 10% FBS + 1 nM丙酮酸鈉溶液中培養。FACS分析方案與實例6第3節相同。

【0533】自液氮中回收人或食蟹獼猴PBMC (TPCS，目錄號PB025C)且再懸於具有10% FBS之RPMI1640中。添加5 μg/ml之PHA (Sigma，目錄號L8902)以刺激PBMC活化且將細胞培養3天。收集經活化PBMC且離心且以2 × 10^6個細胞/毫升之密度再懸於PBS中，且以每孔100微升添加至板中。將AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或AM4B6或對照hIgG1-TGFβRII'在稀釋緩衝液(含2% BSA之PBS)中連續稀釋(5倍稀釋度)以獲得10個濃度。在離心且移除板中之上清液後，將經稀釋之抗體添加至具有經活化之PBMC之板中且在4℃下培育1小時。用稀釋緩衝液洗滌兩次後，添加Alexa488標記之小鼠抗人CD3 (Biolegend，目錄號300320)及APC標記之抗人IgG二級抗體(BD，目錄號550931)且在4℃下培育30分鐘。在洗滌

後，將細胞再懸於150 μl PBS中且藉由流式細胞分析技術進行分析。

【0534】 如圖10A-圖10F中所示，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'可以與單獨AM4B6 mAb類似之親和力與於此等癌細胞株及經活化之人或食蟹獼猴T細胞上表現之PD-L1結合。

【0535】 與經活化之人T細胞之結合

【0536】 自液氮回收人PBMC (TPCS，目錄號PB025C)且再懸於具有10% FBS之RPMI1640中。添加5 μg/ml之PHA (Sigma，目錄號L8902)以刺激PBMC活化且將細胞培養3天。收集經活化之PBMC且離心且以2 × 10^6個細胞/毫升之密度再懸於PBS中，且以每孔100微升添加至板中。將AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或AM4B6或對照hIgG1-TGFβRII'在稀釋緩衝液(含2% BSA之PBS)中連續稀釋(5倍稀釋度)以獲得10個濃度。在離心且移除板中之上清液後，將經稀釋之抗體添加至具有經活化之PBMC之板中且在4℃下培育1小時。用稀釋緩衝液洗滌兩次後，添加Alexa488標記之小鼠抗人CD3 (Biolegend，目錄號300320)及APC標記之抗人IgG二級抗體(BD，目錄號550931)且在4℃下培育30分鐘。在洗滌後，將細胞再懸於150 μl PBS中且藉由流式細胞分析技術進行分析。

【0537】 如圖11中所示，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'可與於經活化之人T細胞上表現之PD-L1結合。

【0538】 根據ELISA分析之對hPD-L1/hPD-1及食蟹獼猴PD-L1/食蟹獼猴PD-1之阻斷

【0539】 將0.5 μg/ml之hPD-L1-Fc或0.5 μg/ml之食蟹獼猴PD-L1-Fc包覆至ELISA板且在4℃下置放過夜。添加300 μL之3%(w/v)脫脂乳以在室溫下阻斷1小時。在1小時後，添加100 μl之濃度範圍為100 nM至0.02

nM (四倍連續稀釋度)之AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或AM4B6以及0.5 μg/ml之hPD-1-Fc-生物素或食蟹獼猴PD-1-Fc-生物素且在室溫下培育1小時。使用0.5% PBS+Tween-20用於洗滌3次，且添加100 μl HRP結合型鏈黴抗生物素蛋白(1:5000)。在室溫下培育1小時後，添加混合TMB受質試劑且在室溫下培育5分鐘，然後藉由添加0.1 M H_2SO_4終止。藉由微板讀取器記錄OD450 nm。

【0540】 如圖12A-圖12B中所示，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'亦可以與阻斷人PD-L1/人PD-1之IC50類似之IC50完全阻斷食蟹獼猴PD-L1/食蟹獼猴PD-1。

【0541】 與hPD-L1及hTGFβ1之同時結合

【0542】 將0.5 μg/ml之hTGFβ-1包覆至ELISA板且在4℃下置放過夜。然後添加300 μl阻斷緩衝液以在室溫下阻斷1小時。在1小時後，添加100 μl之濃度範圍為100 nM至0.02 nM (四倍連續稀釋度)之AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或AM4B6或對照hIgG1-TGFβRII'且在室溫下培育1小時。使用0.5% PBS+Tween-20用於洗滌3次，且然後每孔添加0.5 μg/ml之hPD-L1-生物素。在1小時後，添加100 μl之HRP結合型鏈黴抗生物素蛋白(1:5000)。在室溫下培育1小時後，添加混合TMB受質試劑(InnoReagents，TMB-S-003)且在室溫下培育5分鐘，且藉由添加0.1 M H_2SO_4終止。藉由微板讀取器記錄OD450 nm。

【0543】 如圖13中所示，由抗PD-L1抗體AM4B6及TGFβRII'構成之AM4B6-hIgG1-TGFβRII'可同時結合兩個目標，此表明其雙特異性或雙功能性特徵。

【0544】 根據報導細胞分析之對hPD-L1/hPD-1之阻斷

【0545】 方案與實例15第2節相同。如圖14中所示，AM4B6-hIgG1-TGFβRII可阻斷PD-L1/PD-1之抑制作用且隨後逆轉信號傳導活化，此情況與單獨AM4B6 mAb相同。

【0546】 根據報導細胞分析之對TGFβ1信號傳導之阻斷

【0547】 TGFβ報導體HEK-293細胞株係購自Genomeditech（目錄：GM-C05346)且將其在具有5%二氧化碳之37℃培育器中在含有10% FBS、4 μg/ml殺稻瘟菌素、400 μg/ml新黴素、125 μg/ml潮黴素、0.75 μg/ml嘌呤黴素及1%青黴素/鏈黴素之DMEM培養基中培養。

【0548】 在對數生長期收集細胞且再懸於DMEM培養基中且以2 × 10^4個細胞/100 μl/孔之密度種植在96孔板中。在培養細胞過夜後，將培養基更換為75 μl含有10 ng/ml人TGFβ1之培養基。以最終濃度範圍為100 nM至0.02 nM (三倍連續稀釋度)添加75 μl之AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或AM4B6。將板在37℃培育器中培養16小時。以150微升/孔添加ONE-GloTM螢光素酶偵測系統，且在室溫下培育10分鐘後，用微板讀取器讀取板。

【0549】 如圖15中所示，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'對TGFβ1信號傳導展示出強效阻斷活性，其中IC50為0.35 nM，而單獨AM4B6 mAb沒有阻斷活性，此表明阻斷活性為TGFβ1特異性的。

【0550】 AM4B6-hIgG1-TGFβRII'對經結核菌素(TB)刺激之PBMC之IFN-γ釋放的作用

【0551】 自液氮回收人PBMC且以2 × 10^6/mL之密度使細胞再懸。添加TB至最終濃度為1.33 μg/mL；在37℃下培養5天。在第六天，收集經誘導之PBMC且離心，用PBS洗滌一次，再懸於新鮮培養基中，調整至1 ×

10^6/ml之密度，且以180 μL/孔接種至96孔細胞板中。將經稀釋之抗體以20 μL/孔添加至96孔細胞培養板中。向對照組及空白組添加20 μL PBS。將細胞培養板在37℃下在5% CO_2培育器中培育3天。在培育結束時，將細胞上清液稀釋10倍且用IFN-γ ELISA偵測套組(R&D，DY285B)偵測IFNγ之分泌位準。

【0552】 如圖16中所示，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'誘導之IFN-γ釋放位準顯著高於單獨AM4B6 mAb誘導之IFN-γ釋放位準，此表明其活化活性由於其雙特異性結合及阻斷活性而更強效。

【0553】 AM4B6-hIgG1-TGFβRII'之ADCC/CDC活性

【0554】 對於ADCC分析，效應細胞：Jurkat-NFAT Luc-FcγRIIIa-158V細胞株係由(蘇州)邁博斯生物科學有限公司(Mabspace Biosciences (Suzhou) Co., Limited)構築。目標細胞：HEK-293T-hPD-L1細胞(購自冠科生物技術公司(Crown Biosciences Inc.)，目錄：2005)。

【0555】 將HEK-293T-hPD-L1細胞以10,000個細胞/12.5 μl/孔添加至細胞培養板中。然後以12.5 μl/孔添加最終濃度範圍為200 nM至0.003 nM之AM4B6-hIgG1-TGFβRII'稀釋液。然後將板置放於37℃培育器中以使抗體及細胞培育30分鐘。然後將Jurkat-NFAT Luc-FcγRIIIa-158V細胞以60,000個細胞/25 μl/孔添加至孔中。然後將板置放於37℃培育器中6小時。以50 μl/孔添加ONE-GloTM螢光素酶偵測系統，且在室溫下培育10分鐘後，用微板讀取器讀取板。

【0556】 對於CDC分析，目標細胞亦為HEK-293T-hPD-L1細胞。將HEK-293T-hPD-L1細胞以10,000個細胞/25孔添加至細胞培養板中。然後以12.5 μl/孔添加最終濃度範圍為200 nM至0.3 nM之AM4B6-hIgG1-

TGFβRII'稀釋液。然後將板置放於37℃培育器中以使抗體及細胞培育30分鐘。將HEK-293T-hPD-L1細胞用40%補體以50 μl/孔(最終濃度為20%)處理，然後在37℃下培育80分鐘。以100 μl/孔添加ONE-GloTM螢光素酶偵測系統，且在室溫下培育10分鐘後，用微板讀取器讀取板。

【0557】結果表明，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'對HEK-293T-hPD-L1細胞既沒有ADCC亦沒有CDC活性(資料未示出)。

實例9：AM4B6-hIgG1-TGFβRII'活體內功效

【0558】C57BL/6小鼠上之MC38-hPD-L1腫瘤模型

【0559】使用吾等最近研發之高效CRISPR/Cas9系統敲除小鼠腫瘤細胞株MC38(ATCC)中之內源性小鼠PD-L1。簡言之，設計靶向小鼠PD-L1基因之第一編碼外顯子之sgRNA，且藉由打了就跑(hit-and-run)CRISPR/Cas9+sgRNA構築體轉染細胞且自其中選擇經敲除細胞。藉由FACS分析鑑定完全敲除小鼠內源性PD-L1之細胞的穩態或經干擾素γ刺激之PD-L1細胞表面表現，且隨後藉由TA選殖及靶向基因體區定序進行驗證。為了生成人PD-L1置換細胞株，將人PD-L1 cDNA之編碼序列選殖至FG12衍生之慢病毒載體中。然後用表現人PD-L1之慢病毒感染小鼠PD-L1敲除細胞，且FACS分析證實在已建立細胞株中人PD-L1之高位準及穩定表現。MC38之此經工程改造之細胞經命名為MC38-hPD-L1。

【0560】在37℃下在空氣中在具有5% CO_2之氛圍中將MC38-hPD-L1細胞作為單層培養物活體外維持在補充有10%熱失活胎牛血清之RPMI1640培養基中。收取在指數生長期中生長之腫瘤細胞且計數以用於腫瘤接種。向各雌性SPF級C57BL/6小鼠接種混合2×10^6 MC38-hPD-L1細胞及50%基質凝膠。當腫瘤大小為約90 mm^3時，選擇負載腫瘤小鼠且

將其隨機分至5個組(n = 8隻)中。用2.5 mg/kg同型對照、3 mg/kg同型對照TGFβRII'、2.5 mg/kg AM4B6、0.3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'、1 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'及3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'治療動物。藉由腹膜內注射每週兩次投與所有抗體，持續4週。使用卡尺(INSIZE)在兩個維度上一週量測兩次或三次腫瘤大小，且使用以下公式以mm^3為單位表示體積：V=0.5 a×b^2，其中a及b分別為腫瘤之長直徑及短直徑。使用Prism GraphPad分析結果且結果表示為平均值±S.E.M.。藉由T檢定進行兩組之間的比較，且若p為*<0.05且**<0.01，則差異視為顯著的。

【0561】 如圖17A-圖17B中所示，3 mg/kg同型對照TGFβRII'並不抑制腫瘤生長，此表明單獨TGFβRII'幾乎沒有功效。2.5 mg/kg AM4B6僅具有部分抑制作用，此與0.3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'情況類似，其似乎不足以控制腫瘤生長。隨著劑量增加，腫瘤體積愈來愈小。3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'以84% TGI幾乎使腫瘤生長完全停止(表17)。

【0562】 表17. 第32天MC38-hPD-L1腫瘤模型中抗體之腫瘤生長抑制(TGI) (平均值±S.E.M.，n = 8隻)

治療	腫瘤大小 (±SEM，mm^3)	TGI(%)	p值相對於同型對照
同型對照2.5 mg/kg	3877.77±712.67		
同型對照-TGFβRII' 3 mg/kg	3489.60±880.53	10.01	0.6713
AM4B6 2.5 mg/kg	2105.51±443.56	45.70	0.0183
AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 0.3 mg/kg	2411.61±742.60	37.81	0.0931
AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 1 mg/kg	1646.12±517.06	57.55	0.0063
AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 3 mg/kg	601.31±197.10	84.49	0.00006

【0563】 NOD-SCID小鼠上之H460腫瘤及人PBMC共接種模型

【0564】 H460細胞係購自COBIOER有限公司。在37℃下在空氣中在含有5% CO_2之氛圍中將H460細胞作為單層培養物活體外維持在補充有10%熱失活胎牛血清之RPMI1640培養基中。收取在指數生長期中生長之腫瘤細胞且計數以用於腫瘤接種。向各雌性SPF級NOD-SCID小鼠接種混合3 × 10^6 H460細胞(模型組)或與1.5 × 10^6人PBMC混合之3 × 10^6 H460細胞。接種前將所有細胞懸浮液與基質膠以1:1比率充分混合。在接種後約4小時，將動物分組成7個組(n = 10隻)且不同地給藥。用16.7 mg/kg對照hIgG1、或20 mg/kg對照hIgG1-TGFβRII'、或16.7 mg/kg AM4B6、或5 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'、或10 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'、或20 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'治療動物。模型組不做任何治療。藉由腹膜內注射每週兩次投與所有抗體，持續5週。使用卡尺(INSIZE)在兩個維度上每週量測兩次或三次腫瘤大小，且使用以下公式以mm^3為單位表示體積：V=0.5 a×b^2，其中a及b分別為腫瘤之長直徑及短直徑。使用GraphPad Prism分析結果且結果表示為平均值±S.E.M.。藉由T檢定進行兩組之間的比較，且若p為*<0.05且**<0.01，則差異視為顯著的。

【0565】 如圖18A-圖18B中所示，20mg/kg同型對照TGFβRII'並不抑制腫瘤生長。16.7 mg/kg AM4B6僅具有部分抑制作用，而5 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'已具有明顯更好的腫瘤抑制作用，此表明TGFβRII融合提高了單獨AM4B6 mAb之抗腫瘤功效。另外，在此模型中觀測到AM4B6-hIgG1-TGFβRII'之明顯劑量反應，再次表明功效視AM4B6-hIgG1-TGFβRII'而定。

【0566】 C57BL/6小鼠上之EMT6-hPD-L1腫瘤模型

【0567】 敲除小鼠腫瘤細胞株EMT6 (ATCC)中之內源性小鼠PD-L1且敲除細胞中之人PD-L1，EMT6之經工程改造之細胞經命名為EMT6-hPD-L1。

【0568】 向小鼠皮下接種EMT6/hPD-L1腫瘤細胞，且然後根據腫瘤體積隨機分成7個組，其中每個組有10隻小鼠。在分組後，藉由腹膜內注射向第1組至第7組之動物每週兩次分別投與24.9 mg/kg對照hIgG1、30 mg/kg對照hIgG1-TGFβRII'、24.9 mg/kg AM4B6、3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'、10 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'或30 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'，持續4週。每週兩次觀測負載腫瘤小鼠之腫瘤體積及體重。如圖19A-圖19B中所示，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'在給藥後第29天在3、10及30 mg/kg下分別以21.43%、46.83%及79.39%之TGI劑量依賴性地抑制腫瘤生長。在等莫耳量下，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'在30 mg/kg下之抗腫瘤活性比AM4B6在24.9 mg/kg下之抗腫瘤活性更明顯，在該組中，第29天之TGI為29.67%。

實例10：MC38-hPD-L1腫瘤模型中AM4B6-hIgG1-TGFβRII'治療對腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)的作用

【0569】 遵循與實例9相同之過程培養及接種MC38-hPD-L1腫瘤細胞。當腫瘤大小為250-300 mm^3時，選擇負載腫瘤小鼠且將其隨機分至4個組(n = 6隻)中。用PBS、或3 mg/kg同型對照TGFβRII'、或2.5 mg/kg AM4B6、或3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'治療動物。藉由靜脈內注射每週兩次投與所有抗體，持續1或2週。分別在第2次給藥後24小時及第4次給藥後24小時收取腫瘤，之後用溫和的MACS解離劑(Miltenyi Biotec，130-093-235)解離且在37℃下用小鼠腫瘤解離套組(Miltenyi

Biotec，130-096-730)消化40分鐘。在藉由PE抗小鼠CD45 (BD bioscience，目錄號553081)、APC抗小鼠CD8a (Biolegend，目錄號100712)、APC抗小鼠NK1.1(Biolegend，目錄號108710)、FITC抗小鼠顆粒酶B(Biolegend，目錄號515403)及FITC抗小鼠IFNγ (Invitrogen，目錄號11-7311-82)染色後，使用FACS分析各組經分離單腫瘤細胞懸浮液之TIL亞群百分比，如表18及表19中所示。

【0570】 **表18.第2次給藥後24小時對MC38-hPD-L1腫瘤模型之TIL分析。**

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

【0571】 **表19.第4次給藥後24小時關於MC38-hPD-L1腫瘤模型之TIL分析。**

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

【0572】 在第2次給藥後，不同治療組中之TIL亞群百分比沒有顯著變化(表18)。但在第4次給藥後，與同型對照TGFβRII'組相比，AM4B6組及AM4B6-hIgG1-TGFβRII'組之CD8+/CD45+%顯著增加(表19)。與同型對照TGFβRII'組相比，CD8+GZMB+%及NK1.1+%亦增加很多。此等發

現表明，CD8+T細胞及NK1.1 T細胞可能受到AM4B6或AM4B6-hIgG1-TGFβRII'刺激而活化且增殖，且在腫瘤微環境中富集以促進腫瘤細胞殺滅。當與AM4B6相比時，如藉由上述TGI所量測，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'具有甚至更高的CD8+GZMB+%及NK1.1+%，此與其更有效的抗腫瘤活性相關。

實例11：AM4B6-hIgG1-TGFβRII'活體內藥物動力學及藥效動力學研究

【0573】 將C57BL/6雌性小鼠隨機分成6個組(n = 3隻)。用3 mg/kg同型對照TGFβRII'、或2.5 mg/kg AM4B6、或0.3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'、或1 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'、或3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'、或3 mg/kg M7824類似物治療動物。M7824類似物係由邁博斯生物科學根據US9676863中揭示之序列產生。所有抗體均藉由靜脈單次注射來投與。注射後，在以下不同時間點收集各小鼠之200 μl血液：給藥前、注射後30分鐘、2小時、8小時、24小時、48小時、第4天、第7天、第10天、第14天、第21天。收集各小鼠之80 μl血漿且測試抗體濃度。

【0574】 為了量測血漿中之抗體濃度，使用兩種方法。第一種方法為偵測包括AM4B6及TGFβRII'臂兩者之整個雙功能分子。一般而言，將1 μg/ml之人PD-L1-his在室溫下包覆在96孔ELISA板上2小時。在阻斷後，添加經連續稀釋之標準物及血漿樣本且培育1.5小時。洗滌後添加0.1 μg/ml生物素化抗人TGFβRII'，然後在洗滌後添加鏈黴抗生物素蛋白-HRP。最後，添加TMB以顯色，用稀硫酸終止顯色。藉由微板讀取器讀取板之OD450 nm及OD620 nm。藉由OD450 nm-OD620 nm分析資料。

【0575】 第二種方法為僅偵測AM4B6抗體臂。與上述程序類似，包

覆1 μg/ml之人PD-L1-his，且添加經連續稀釋之標準物及血漿樣本且培育1.5小時。洗滌後，添加經稀釋之山羊HRP結合型抗人IgG Fc抗體。最後，添加TMB以顯色，用稀硫酸終止顯色。藉由微板讀取器讀取板之OD450 nm及OD620 nm。藉由OD450 nm-OD620 nm分析資料。

【0576】 為了評估抗體濃度與血漿中TGFβ變化之間的相關性，測試血漿中TGFβ1及TGFβ2之濃度變化。簡言之，將4 μg/ml之小鼠TGF-β1捕獲抗體或2 μg/ml之小鼠TGF-β2捕獲抗體在室溫下包覆在96孔ELISA板上2小時。將10 μl之1 N HCl添加至50 μl各血漿樣本中，且在室溫下培育10分鐘。藉由添加10 μl之1.2 N NaOH/0.5 M HEPES中和經酸化樣本以確保最終pH值在7.2-7.6內。在阻斷後，添加經連續稀釋之標準物及血漿樣本且培育1.5小時。洗滌後添加TGF-β1或TGF-β2偵測抗體，然後在洗滌後添加鏈黴抗生物素蛋白-HRP。最後，添加TMB以顯色，用稀硫酸終止顯色。藉由微板讀取器讀取板之OD450 nm及OD620 nm。藉由OD450 nm-OD620 nm分析資料。

【0577】 圖20A示出了血漿中之抗體濃度變化。使用兩種方法之PK曲線沒有顯著差異，此表明整個雙功能分子AM4B6-hIgG1-TGFβRII'非常穩定，無異常活體內裂解及清除，如同AM4B6mAb情況一樣。且同時，AM4B6-hIgG1-TGFβRII'在靜脈內注射後30分鐘內耗竭TGF-β1，甚至在0.3 mg/kg最低劑量下亦如此，如圖20B中所示。M7824類似物及同型對照TGFβRII'亦耗竭TGF-β1，但M7824類似物自第2天起不能維持該作用，而AM4B6-hIgG1-TGFβRII'可維持低含量TGF-β1至第21天。此結果亦對應於其PK暴露(圖20C)，此表明TGF-β1可充當血漿中之AM4B6-hIgG1-TGFβRII'目標接合之良好藥效動力學標誌物。未偵測到小鼠血漿中TGF-

β2之明顯耗竭(資料現在示出)。

實例12：AM4B6-hIgG1-IL-1RA融合蛋白之構築及表現

[0578] 將所選重鏈變異體及輕鏈變異體交叉組合且用hIgG1-IL-1RA (34-177)(UniProtKB，P18510)融合蛋白表現。重鏈及輕鏈之序列在表20中示出。

[0579] 表20. AM4B6-hIgG1-IL-1RA重鏈及輕鏈變異體之清單

名稱	突變位點	區	序列
AM4B6 Hg.3 hIgG1-(G4S)4G-IL-1RA	G57E, S59L	H CDR2.3	DINPNNAETLYNHKFKG
AM4B6 La.4 hκ	A51V, N53D	L CDR2.2	SRSVRYT

[0580] 類似於AM4B6-hIgG1-TGFβRII雙功能分子，經截短之人IL-1RA 34-177與AM4B6融合以獲得更好的活性及穩定性。AM4B6-hIgG1-IL-1RA為AM4B6-hIgG1-IL-1RA (34-177)之簡稱。經截短之人IL-1RA 34-177之序列如下：(SEQ ID NO: 67)

KMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNVNLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGGK
MCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSENRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFL
CTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE

。

[0581] 根據製造商方案使用來自Invitrogen之ExpiFectamine™ CHO試劑(Thermo，A29129)進行重鏈及輕鏈之共轉染。在第10天收取上清液且藉由親和層析法進行純化。

實例13：AM4B6-hIgG1-IL-1RA雙功能分子對hPD-L1之親和力

[0582] 其於ELISA分析之與人PD-L1之結合

[0583] 將1 μg/ml hPD-L1 (Acro Biosystems，PD1-H5229)抗原包覆至ELISA板且在4℃下包覆過夜。然後添加300 μl之2%(w/v) BSA以在室溫下阻斷1小時。在培育1小時後，將100 μl之濃度範圍為10 nM至0.00017 nM (三倍連續稀釋度)之AM4B6-hIgG1-IL-1RA雙功能分子或

AM4B6-hIgG1單株抗體與作為陰性對照之PBST一起添加且在室溫下培育1小時。使用具有0.5% Tween-20之PBS用於洗滌3次，且添加100 μl HRP結合型抗人Fc抗體(1:20000，Abcam，ab98624)，在室溫下培育1小時後，添加混合TMB受質試劑(InnoReagents，TMB-S-003)且在室溫下培育5分鐘，且藉由添加0.1 M H_2SO_4終止。藉由微板讀取器記錄OD450 nm。藉由Graphpad prism分析資料。

【0584】 如圖21中所示，與AM4B6單株抗體相比，AM4B6-hIgG1-IL-1RA雙功能分子具有類似的結合信號及親和力。

【0585】 根據FACS分析之AM4B6-hIgG1-IL-1RA與於細胞表面上表現之PD-L1之結合

【0586】 293T-PD-L1-CD3L細胞係由邁博斯生物科學產生以用於表徵PD-L1抗體。用人PD-L1及抗CD3 scFv兩者轉染細胞。將AM4B6-hIgG1-IL-1RA雙功能分子或AM4B6單株抗體在稀釋緩衝液(含2% BSA之PBS)中以3倍稀釋度連續稀釋以獲得11個濃度。收取且離心293T-PD-L1-CD3L細胞。然後將該等細胞以2 × 10^6個細胞/毫升之密度再懸於PBS中，且以每孔100微升添加至板中。在離心且移除上清液後，將經稀釋之抗體添加至板中且在4℃下培育30分鐘。在用稀釋緩衝液洗滌兩次後，將PE結合型驢抗人IgG (H+L) (Jacksonimmuno，709-116-149)添加至板中且在4℃下培育30分鐘。在洗滌後，將細胞再懸於200 μl PBS中且藉由流式細胞分析技術進行分析。藉由Graphpad prism分析資料。

【0587】 如圖22中所示，AM4B6-hIgG1-IL-1RA雙功能分子及AM4B6-hIgG1可以類似的EC50與於細胞表面上表現之PD-L1結合，此與藉由ELISA量測之親和力結果一致。

實例14：AM4B6-hIgG1-IL-1RA之PD1/PD-L1阻斷活性

【0588】 在此分析中，293T-PD-L1-CD3L細胞表現PD-L1及抗CD3 scFv，而Jurkat-NFAT-Luc-PD1細胞表現PD-1且攜帶可藉由CD3刺激加以活化之NFAT信號。NFAT活化導致螢光素酶基因轉錄及表現，此可藉由其受質進行偵測。兩個細胞均由邁博斯生物科學產生。

【0589】 簡言之，收取293T-PD-L1-CD3L細胞且以2 × 10^6個細胞/毫升之密度再懸。將每孔20 μl細胞添加至半孔板中。將AM4B6-hIgG1-IL-1RA雙功能分子及AM4B6-hIgG1在含2% FBS之RPMI培養基中連續稀釋(3倍稀釋度)以獲得8個濃度。向半孔板中每孔添加20 μl抗體且將板在37℃、5% CO_2下培育30分鐘。收取Jurkat-NFAT-Luc-PD1細胞且以4 × 10^6個細胞/毫升之密度再懸於含有2% FBS之RPMI培養基中。最後，將每孔20 μl細胞添加至半孔板中且在37℃、5% CO_2下培育5小時。將60 μl之OneGlo偵測試劑(Promega，E6120)添加至各孔中且在室溫下培育5分鐘。藉由微板讀取器讀取發光信號。藉由GraphPad Prism分析資料。

【0590】 如圖23中所示，AM4B6-hIgG1-IL-1RA雙功能分子及AM4B6-hIgG1在此基於細胞之分析中具有類似的針對PD-L1之阻斷活性。

實例15：AM4B6-hIgG1-IL-1RA對人IL-1β之阻斷活性

【0591】 基於ELISA之AM4B6-hIgG1-IL-1RA BsAb對hIL-1β之阻斷活性

【0592】 為了測試配位體/受體阻斷活性，將5 μg/ml人IL-1β蛋白(Sino Biological，目錄號10139)包覆至ELISA板且在4℃下培育過夜。添加300 μl阻斷緩衝液以在室溫下阻斷1小時。在1小時後，將50 μl之連續濃

度範圍為200 nM至0.03 nM (三倍連續稀釋度)之AM4B6-hIgG1-IL-1RA BsAb或IL-1RA蛋白(Sino Biological，目錄號10123-HNAE)以及50 μl之10 nM人IL-1RI-his(Sino Biological，目錄號10126-H08H)添加至孔中且在室溫下培育1小時。使用具有0.5% Tween-20之PBS用於洗滌3次，且添加100 μl之HRP結合型his標籤抗體(1:2000稀釋，Genscript，目錄號A00612)，在室溫下培育1小時。然後，添加混合TMB受質試劑(InnoReagents，目錄號：TMB-S-003)且在室溫下培育5分鐘，然後藉由添加0.1 M H_2SO_4終止。藉由微板讀取器記錄OD450 nm。藉由Graphpad prism分析資料。

【0593】 如圖24中所示，AM4B6-hIgG1-IL-1RA可劑量依賴性地阻斷IL-1β，且AM4B6-hIgG1-IL-1RA對IL-1RI之阻斷活性優於IL-1RA蛋白對IL-1RI之阻斷活性。

【0594】 **AM4B6-hIgG1-IL-1RA雙功能分子對報導細胞上之hIL-1β之阻斷活性**

【0595】 在此分析中，HEK-Blue™ CD40L細胞係購自Invivogen (目錄號hkb-cd40)。此等細胞係藉由用人CD40基因及NF-kB誘導型SEAP構築體穩定地轉染HEK293細胞來產生。CD40L與其受體CD40之結合觸發級聯，從而引起NF-kB活化及後續SEAP產生，此可藉由QUANTI-Blue加以監測。HEK293細胞內源性地表現與CD40L共用共同信號傳導路徑之細胞介素IL-1β之受體。因此，可使用中和抗體來阻斷IL-1b介導之SEAP產生。

【0596】 簡言之，收集對數期細胞處之HEK293-CD40L細胞且以5 × 10^4/孔(100 μl/孔)之密度將細胞接種至96孔板中以黏附過夜。將

AM4B6-hIgG1-IL-1RA雙特異性抗體及IL-1RA蛋白在完全培養基中連續稀釋(5倍稀釋度)以獲得10個濃度。向細胞中添加50 μl/孔經稀釋之抗體(或IL-1RA蛋白)及50 μl/孔人IL-1β，在37℃下培育24小時。第二天向新板中添加160 μl之QUANTI-Bluc ™溶液(Invivogen，目錄號rep-qbs)，且向板中添加40 μl細胞培養上清液。將板在37℃下培育2小時。使用分光光度計測定620 nm下之SEAP含量。藉由Graphpad prism分析資料。

[0597] 如圖25中所示，AM4B6-hIgG1-IL-1RA可以劑量依賴性方式阻斷IL-1β，且AM4B6-hIgG1-IL-1RA對IL-1β之阻斷活性強於IL-1RA蛋白對IL-1β之阻斷活性，此與藉由ELISA量測之阻斷結果一致。

實例16：AM4B6-SIRPα雙功能抗體之構築、表現、純化

[0598] SIRPα_CV1為經工程改造之高親和力SIRPα變異體，該變異體有效地結抗癌細胞上之CD47、但自身不會誘導吞噬細胞吞噬作用(*KippWeiskopf*等人，*Science341, 88 (2013)*)。吾等發明了靶向PD-L1及CD47兩者之雙功能抗體，該等雙功能抗體包括對稱抗體(AM4B6-hIgG1-SIRPα及3280A-hIgG1-SIRPα)及不對稱抗體(AM4B6-hIgG1-SIRPα(KIH)及3280A-hIgG1-SIRPα(KIH))，其中KIH為杵-臼之簡稱。此等分子之構築在表21中有所描述，且經定序之SIRPα_CV1亦在下面列出。

[0599] SIRPa_CV1序列(SEQ ID NO: 84)：

EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPR VTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRA KPS 。

【0600】 表21抗PD-L1-SIRPa雙功能抗體之構築

ID	輕鏈序列	重鏈序列1	重鏈序列2	註釋
AM4B6-hIgG1-SIRPα	AM4B6-La.4-hκ SEQ ID NO: 90	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S-(G4S)4G-SIRPa_CV1 SEQ ID NO: 91	NA	SIRPα_CV1序列來自 Kipp Weiskopf Science 341, 88 (2013)
3280A-hIgG1-SIRPα	3280A-L-hκ SEQ ID NO: 92	3280A-H-hIgG1(N297A)-(G4S)4G-SIRPα_CV1 SEQ ID NO: 93	NA	3280A為Roche之抗PD-L1抗體阿特珠單抗(Atezolizumab)之簡稱
AM4B6-hIgG1-SIRPα(KIH)	AM4B6-La.4-hκ SEQ ID NO: 90	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S(杵)-SIRPa_CV1 SEQ ID NO: 94	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S(臼) SEQ ID NO: 95	杵：S354C、T366W 臼：Y349C、T366S、L368A、Y407V
3280A-hIgG1-SIRPα(KIH)	3280A-L-hκ 3280A-L-hκ SEQ ID NO: 92	3280A_H_hIgG1_L234F_L235E_P331S(杵)-SIRPa_CV1 SEQ ID NO: 96	3280A_H_hIgG1_L234F_L235E_P331S(臼) SEQ ID NO: 97	3280A為Roche之抗PD-L1抗體阿特珠單抗之簡稱

【0601】 根據製造商方案用Expi-CHO細胞表現所有4種雙功能抗體。對於兩種對稱雙功能抗體，在一步Mabselect SuRe純化之情況下獲得高純度抗體，但對於不對稱雙功能抗體，無法藉由習知的一步Mabselect SuRe純化獲得高純度抗體。為了獲得高純度不對稱抗體，吾等使用HiTrap PrismA樹脂對抗體進行高純化，且不對稱抗體之純度優於95%。高純化程序描述如下。

【0602】 所使用之緩衝液：

【0603】 平衡緩衝液：50 mM Tris-HAc、150 mM NaCl，pH 7.4。

【0604】 洗滌緩衝液：50 mM NaAc/HAc、500 mM NaCl、5% PEG，pH 5.5。

【0605】 溶離緩衝液：50 mM HAc、500 mM NaCl、5% PEG，pH 3.0。

【0606】 用平衡緩衝液平衡HiTrap PrismA管柱達至少5個管柱體積

(CV)直至UV基線、溶離液pH及傳導性不變。

【0607】 將樣本裝載至預平衡之HiTrap PrismA管柱上。

【0608】 用5至10 CV洗滌緩衝液洗滌直至UV跡線返回到基線。

【0609】 用10-20 CV之0-100%溶離緩衝液進行溶離，且分別用幾個管收集5-10個溶離份。用1 M Tris-鹼(pH 9.0)將pH調整至約6.0-7.0。

【0610】 然後，藉由SEC-HPLC表徵溶離份。圖26示出3280A-hIgG1-SIRPα (KIH)及AM4B6-hIgG1-SIRPα (KIH)之純度分別為95.33%及96.5%。

【0611】 用ELISA測試對人PD-L1或人CD47之親和力。圖27及圖28示出雙功能抗體對抗原之親和力與親本單株抗體(4B6 mAb對照)或融合蛋白(SIRPα-Fc (FES))對抗原之親和力相當。

【0612】實例17：IgG-scFv-ACZ885-AM4B6及IgG-scFv-XOMA052-AM4B6雙特異性抗體(bsAb)之構築及表現

【0613】 AM4B6之單鏈片段(scFv)之序列在下表中示出。抗-IL-1β抗體吉伏組單抗(XOMA052) 及卡那單抗(ACZ885)係來自Novartis。AM4B6之scFv連接至抗-IL-1β抗體重鏈C端以獲得更好的活性及穩定性。scFv具有將VH連接至VL之GS連接子(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS)，且在H44C殘基與L100C殘基(Kabat編號)之間含有一個域間二硫鍵。抗IL-1β抗體(XOMA052及ACZ885)之序列在表22中示出。所構築之雙特異性抗體分別經命名為IgG-scFv-ACZ885-AM4B6及IgG-scFv-XOMA052-AM4B6。

【0614】 根據製造商方案使用來自Invitrogen之ExpiFectamine™ CHO試劑(Thermo，A29129)進行bsAb之重鏈及輕鏈之共轉染。在第10天

收取上清液且藉由親和層析法進行純化。

【0615】實 例 18 ： IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 及 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb與hIL-1β之結合活性

【0616】基於ELISA分析之與人IL-1β蛋白之結合

【0617】將100μL 之1 μg/ml hIL-1β蛋白(SinoBiological，目錄號10139 -HNAE)抗原包覆至ELISA板且在4℃下包覆過夜。然後添加200 μl之2%(w/v) BSA以在室溫下阻斷2小時。在培育後，將100 μl之濃度範圍為20 nM至0.000339 nM（三倍連續稀釋度）之IgG-scFv-ACZ885-AM4B6、IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb、ACZ885或XOMA052與作為陰性對照之PBST一起添加且在室溫下培育1小時。使用具有0.5% Tween-20之PBS用於洗滌3次，且添加100 μl HRP結合型抗人Fc抗體(1:20000，Abcam，ab98624)，在室溫下培育1小時後，添加混合TMB受質試劑(InnoReagents，TMB-S-003)且在室溫下培育5分鐘，且藉由添加0.1 M H_2SO_4終止。藉由微板讀取器記錄OD450 nm。藉由Graphpad prism分析資料。

【0618】如圖29中所示，與ACZ885及XOMA052單株抗體相比，IgG-scFv-ACZ885-AM4B6及IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb分別具有類似的與hIL-1β蛋白之結合活性。

【0619】實 例 19 ： IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 及 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb與hPD-L1之結合活性

【0620】基於ELISA分析之與人PD-L1之結合

【0621】將100μL之1 μg/ml hPD-L1 (Acro Biosystems，PD1-H5229)抗原包覆至ELISA板且在4℃下包覆過夜。然後添加300 μl之

2%(w/v) BSA以在室溫下阻斷1小時。在培育1小時後，將100 μl之濃度範圍為20 nM至0.000339 nM（三倍連續稀釋度）之IgG-scFv-ACZ885-AM4B6、IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb或AM4B6-hIgG1單株抗體(AM4B6 mAb)與作為陰性對照之PBST一起添加且在室溫下培育1小時。使用具有0.5% Tween-20之PBS用於洗滌3次，且添加100 μl HRP結合型抗人Fc抗體(1:20000，Abcam，ab98624)，在室溫下培育1小時後，添加混合TMB受質試劑(InnoReagents，TMB-S-003)且在室溫下培育5分鐘，且藉由添加0.1 M H_2SO_4終止。藉由微板讀取器記錄OD450 nm。藉由Graphpad prism分析資料。

【0622】如圖30中所示，與AM4B6單株抗體相比，IgG-scFv-ACZ885-AM4B6、IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb具有類似的與hPD-L1蛋白之結合活性。

【0623】根據FACS方法之IgG-scFv-ACZ885-AM4B6及IgG-scFv-XOMA052-AM4B6與表現PD-L1之293T細胞之結合

【0624】293T-PD-L1-CD3L細胞係由邁博斯生物科學產生以用於表徵PD-L1抗體。用人PD-L1及抗CD3 scFv兩者轉染細胞。將IgG-scFv-ACZ885-AM4B6、IgG-scFv-XOMA052-AM4B6或AM4B6 mAb在稀釋緩衝液(具有2% BSA之PBS)中以4倍稀釋度連續稀釋以獲得9個濃度。收取且離心293T-PD-L1-CD3L細胞。然後將其以2 × 10^6個細胞/毫升之密度再懸於PBS中，且以每孔100微升添加至板中。在離心且移除上清液後，將經稀釋之抗體添加至板中且在4℃下培育30分鐘。在用稀釋緩衝液洗滌兩次後，將PE結合型驢抗人IgG (H+L) (Jacksonimmuno，709-116-149)添加至板中且在4℃下培育30分鐘。在洗滌後，將細胞再懸於200 μl PBS中

且藉由流式細胞分析技術進行分析。藉由Graphpad prism分析資料。

【0625】 如圖31中所示，IgG-scFv-ACZ885-AM4B6及IgG-scFv-XOMA052-AM4B6可以類似的EC_{50}與於細胞表面上表現之PD-L1結合，此與藉由ELISA量測之親和力結果一致。

實例20：IgG-scFv-ACZ885-AM4B6及IgG-scFv-XOMA052-AM4B6之PD1/PD-L1阻斷活性

【0626】 在此分析中，293T-PD-L1-CD3L細胞表現PD-L1及抗CD3 scFv，而Jurkat-NFAT-Luc-PD1細胞表現PD-1且攜帶可藉由CD3刺激加以活化之NFAT信號。NFAT活化導致螢光素酶基因轉錄及表現，此可藉由其受質進行偵測。兩個細胞株均由邁博斯生物科學產生。

【0627】 簡言之，收取293T-PD-L1-CD3L細胞且以2 × 10^6個細胞/毫升之密度再懸。將每孔20 μl細胞添加至半孔板中。將IgG-scFv-ACZ885-AM4B6、IgG-scFv-XOMA052-AM4B6及AM4B6-hIgG1在具有2% FBS之RPMI培養基中連續稀釋(3倍稀釋度)以獲得9個濃度。向半孔板中每孔添加20 μl抗體且將板在37℃、5% CO_2下培育30分鐘。收取Jurkat-NFAT-Luc-PD1細胞且以4 × 10^6個細胞/毫升之密度再懸於具有2% FBS之RPMI培養基中。最後，將每孔20 μl細胞添加至半孔板中且在37℃、5% CO_2下培育5小時。將60 μl之OneGlo偵測試劑(Promega，E6120)添加至各孔中且在室溫下培育5分鐘。藉由微板讀取器讀取發光信號。藉由GraphPad Prism分析資料。

【0628】 如圖32中所示，IgG-scFv-ACZ885-AM4B6、IgG-scFv-XOMA052-AM4B6及AM4B6-hIgG1在此基於細胞之分析中具有類似的針對PD-L1之阻斷活性。

實例21：IgG-scFv-XOMA052-AM4B6對人真皮纖維母細胞(HDF)上之人IL-1β之阻斷活性

【0629】 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6對HDF細胞上之人IL-1β之阻斷活性

【0630】 為了測試配位體/受體阻斷活性，用50 pg/mL重組人IL-1β (Sino Biological，目錄號10139)刺激100 μL/孔之4×10^4/mL HDF細胞，而無IL-1β刺激之細胞作為陰性對照。然後，將100 μL/孔之連續濃度範圍為100 nM至0.00038 nM (四倍連續稀釋度)之IgG-scFv-XOMA052-AM4B6及XOMA052添加至培養物中且在室溫下培育過夜(16-17小時)。刺激之後，使用套組說明書指導之IL-6 ELISA套組(R&D，DY206，P209026)來偵測細胞培養上清液中之IL-6釋放。

【0631】 如圖33中所示，IgG-scFv-XOMA052-AM4B6及XOMA052可劑量依賴性地阻斷IL-1β，且IgG-scFv-XOMA052-AM4B6對IL-1β之阻斷活性與HDF細胞上之XOMA052對IL-1β之阻斷活性類似。

【0632】 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6對報導細胞上之hIL-1β之阻斷活性

【0633】 在此分析中，HEK-Blue™ CD40L細胞係購自Invivogen (目錄號hkb-cd40)。此等細胞係藉由用人CD40基因及NF-kB誘導型SEAP構築體穩定地轉染HEK293細胞來產生。CD40L與其受體CD40之結合觸發級聯，從而引起NF-kB活化及後續SEAP產生，此可藉由QUANTI-Blue進行監測。HEK293細胞內源性地表現與CD40L共用共同信號傳導路徑之細胞介素IL-1β之受體。因此，可使用中和抗體阻斷IL-1β介導之SEAP產生。

【0634】 簡言之，收集對數期細胞處之HEK293-CD40L細胞且以5 × 10^4/孔(100 µl/孔)之密度將細胞接種至96孔板中以黏附過夜。將IgG-scFv-ACZ885-AM4B6及ACZ885在完全培養基中自100 nM連續稀釋(4倍稀釋度)以獲得9個濃度。向細胞中添加50 µl/孔經稀釋之抗體及50 µl/孔人IL-1β (1ng/mL)，在37℃下培育24小時。第二天，向新板中添加160 µl之QUANTI-Blue ™溶液(Invivogen，目錄號rep-qbs)，且向板中添加40 µl細胞培養上清液。將板在37℃下培育2小時。使用分光光度計測定620 nm下之SEAP含量。藉由Graphpad prism分析資料。

【0635】 如圖34中所示，IgG-scFv-ACZ885-AM4B6及ACZ885 (卡那單抗)可以劑量依賴性方式阻斷IL-1β，且IgG-scFv-ACZ885-AM4B6於HEK293-CD40L報導細胞上之阻斷活性與ACZ885 (卡那單抗)類似。

【0636】 **表22.本發明中提及之胺基酸序列**

SED ID NO.	序列	區
1	DYYMN	4B6_HCDR1
2	DINPNNGGTSYNHKFKG	4B6_HCDR2
3	WGDGPFAY	4B6_HCDR3
4	KASQNVGAAVA	4B6_LCDR1
5	SASNRYT	4B6_LCDR2
6	QQYSNYPT	4B6_LCDR3
7	KASQNVGAIVA	4B6-L-CDR1-1
8	KASQNVPAAVA	4B6-L-CDR1-2
9	KASQNVKGAVA	4B6-L-CDR1-3
10	SNSHRYT	4B6-L-CDR2-1
11	SRSVRYT	4B6-L-CDR2-2
12	SVSDRYT	4B6-L-CDR2-3
13	DINPNNADTMYNHKFKG	4B6-H-CDR2-1
14	DINPNNAQTQYNHKFKG	4B6-H-CDR2-2
15	DINPNNAETLYNHKFKG	4B6-H-CDR2-3
16	DINPNNGLTSYNHKFKG	4B6-H-CDR2-4
17	DINPNNAQTVYNHKFKG	4B6-H-CDR2-5
18	DINPNNAGTSYNHKFKG	H-CDR2-WT (G55A)
19	DINPNN$X_1X_2TX_3$YNHKFKG	HCDR2

20	KASQNV$X_4X_5X_6$VA	LCDR1
21	SX_7SX_8RYT	LCDR2
22	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	HFR1
23	WVRQAPGQGLEWMG	HFR2
24	RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	HFR3
25	WGQGTLVTVSS	HFR4
26	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	LFR1
27	WYQQKPGKAPKLLIY	LFR2
28	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC	LFR3
29	FGQGTKLEIK	LFR4
30	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFT	HFR1變異體
31	WVRQAPGQSLEWMG	HFR2變異體
32	RVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	HFR3變異體1
33	RVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVK	HFR3變異體2
34	RVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	HFR3變異體3
35	RVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVK	HFR3變異體4
36	WYQQKPGKSPKLLIY	LFR2變異體
37	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYC	LFR3變異體1
38	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYC	LFR3變異體2
39	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYC	變異1-FR3之F73L突變
40	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX_9FT	HFR1
41	WVRQAPGQX_{10}LEWMG	HFR2
42	RVTX_{16}TVDX_{11}SISTAYMELSRLRSDDTAVYYC$X_{12}X_{13}$	HFR3
43	WYQQKPGKX_{14}PKLLIY	LFR2
44	GVPX_{15}RFSGSGSGTDFTX_{17}TISSLQPEDIATYYC	LFR3
45	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYC	LC變異2-FR3之F73L、A43S、S60D
46	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYVFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSYNHKFKGKATVTVDKSSRTAYMELLSLTSEDSAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLVTVSA	4B6_VH
47	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGAAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSNYPTFGSGTKLGIK	4B6_VL
48	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	人源化4B6，VH生殖系
49	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWGDGPFAYWGQGTLVTVSS	人源化4B6，VH變異體1

50	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNW VRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVTVTV DTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWG QGTLVTVSS	人源化4B6，VH變異體2
51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVTVT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWGDGPFAYW GQGTLVTVSS	人源化4B6，VH變異體3
52	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVTVT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLVTVSS	人源化4B6，VH變異體4
53	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSL QPEDIATYYCQQYDNLP	人源化4B6，VL生殖系
54	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGAAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	人源化4B6，VL變異體1
55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGAAVAWYQ QKPGKSPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	人源化4B6，VL變異體2
56	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAGTSYNHKFKGRVTVT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLVTVSS	Hu4B6_Hg
57	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAGTSYNHKFKGRVTVT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLVTVSS	AM4B6_Hg
58	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAQTQYNHKFKGRVTVT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLVTVSS	Hu4B6_Hg.2
59	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAETLYNHKFKGRVTVT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLVTVSS	AM4B6_Hg.3
60	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAQTVYNHKFKGRVTVT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLVTVSS	AM4B6_Hg.5
61	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGAAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	Hu4B6_La

	SLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	
62	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVKGAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	AM4B6_La.1
63	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVPAAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	AM4B6_La.2
64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGAAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSVSDRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	AM4B6_La.4
65	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGAAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSRSVRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK	AM4B6_La.6
66	GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKP QEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTS NPD	經截短之TGF-β受體II 序列20-136
67	KMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNVNLEE KIDVVPIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEA VNITDLSENRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFL CTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE	經截短之IL-1 R-34-177
68	(G4S)4G	連接子
69	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSM CIAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKI ELPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPVCFVCISLMLMVYIC HNRTVIHHRVPNEEDPSLDRPFISEGTTLKDLIYDMTTS GSGSGLPLLVQRTIARTIVLQESIGKGRFGEVWRGKWR GEEVAVKIFSSREERSWFREAEIYQTVMLRHENILGFIA ADNKDNGTWTQLWLVSDYHEHGSLFDYLNRYTVTVE GMIKLALSTASGLAHLHMEIVGTQGKPAIAHRDLKSK NILVKKNGTCCIADLGLAVRHDSATDTIDIAPNHRVGT KRYMAPEVLDDSINMKHFESFKRADIYAMGLVFWEIA RRCSIGGIHEDYQLPYYDLVPSDPSVEEMRKVVCEQKL RPNIPNRWQSCEALRVMAKIMRECWYANGAARLTAL RIKKTLSQLSQQEGIKM	TGFβRI
70	TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLE TVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMC SCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLG VAISVIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMEFSEHC AIILEDDRSDISSTCANNINHNTELLPIELDTLVGKGRFA EVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIF SDINLKHENILQFLTAEERKTELGKQYWLITAFHAKGN	TGFβRII同型A

	LQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGR PKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLS VDDLANSGQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQT DVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPPFGSKVREH PCVESMKDNVLRDRGRPEIPSFWLNHQGIQMVCETLT ECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEE KIPEDGSLNTTK	
71	TIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINND MIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS ITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD FILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIF SEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYR VNRQQKLSSTWETGKTRKLMEFSEHCAIILEDDRSDISS TCANNINHNTELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNT SEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQ FLTAEERKTELGKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVIS WEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDL KSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSGQ VGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVL WEMTSRCNAVGEVKDYEPPFGSKVREHPCVESMKDN VLRDRGRPEIPSFWLNHQGIQMVCETLTECWDHDPEA RLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTT K	TGFβRII同型B
72	GPEPGALCELSPVSASHPVQALMESFTVLSGCASRGTT GLPQEVHVLNLRTAGQGPGQLQREVTLHLNPISSVHIH HKSVVFLLNSPHPLVWHLKTERLATGVSRLFLVSEGSV VQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARKEYGAV TSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFLSLNYLA EYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHIIELITPNSNPYSAFQ VDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILKCKKSVNWVIKSFDV KGSLKIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDDIPSTQGNLV KWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHLRLENNAEEMGD EEVHTIPPELRILLDPGALPALQNPPIRGGEGQNGGLPFP FPDISRRVWNEEGEDGLPRPKDPVIPSIQLFPGLREPEEV QGSVDIALSVKCDNEKMIVAVEKDSFQASGYSGMDVT LLDPTCKAKMNGTHFVLESPLNGCGTRPRWSALDGVV YYNSIVIQVPALGDSSGWPDGYEDLESGDNGFPGDMD EGDASLFTRPEIVVFNCSLQQVRNPSSFQEQPHGNITFN MELYNTDLFLVPSQGVFSVPENGHVYVEVSVTKAEQE LGFAIQTCFISPYSNPDRMSHYTIIENICPKDESVKFYSP KRVHFPIPQADMDKKRFSFVFKPVFNTSLLFLQCELTL CTKMEKHPQKLPKCVPPDEACTSLDASIIWAMMQNKK TFTKPLAVIHHEAESKEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDTLT VMGIAFAAFVIGALLTGALWYIYSHTGETAGRQQVPTS PPASENSSAAHSIGSTQSTPCSSSSTA	TGFβRIII

73	LEADKCKEREEKIILVSSANEIDVRPCPLNPNEHKGTIT WYKDDSKTPVSTEQASRIHQHKEKLWFVPAKVEDSGH YYCVVRNSSYCLRIKISAKFVENEPNLCYNAQAIFKQK LPVAGDGGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKDCKPL LLDNIHFSGVKDRLIVMNVAEKHRGNYTCHASYTYLG KQYPITRVIEFITLEENKPTRPVIVSPANETMEVDLGSQI QLICNVTGQLSDIAYWKWNGSVIDEDDPVLGEDYYSV ENPANKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFTCFAKNTHGID AAYIQLIYPVTNFQKHMIGICVTLTVIIVCSVFIYKIFKID IVLWYRDSCYDFLPIKASDGKTYDAYILYPKTVGEGST SDCDIFVFKVLPEVLEKQCGYKLFIYGRDDYVGEDIVE VINENVKKSRRLIIILVRETSGFSWLGGSSEEQIAMYNA LVQDGIKVVLLELEKIQDYEKMPESIKFIKQKHGAIRW SGDFTQGPQSAKTRFWKNVRYHMPVQRRSPSSKHQLL SPATKEKLQREAHVPLG	IL-1RI
74	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFEHFLKFNY STAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEK DVLWFRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEVVQ KDSCFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVK PTITWYMGCYKIQNFNNVIPEGMNLSFLIALISNNGNY TCVVTYPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSP NDHVVYEKEPGEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTID GKKPDDITIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTSEDL KRSYVCHARSAKGEVAKAAKVKQKVPAPRYTVELAC GFGATVLLVVILIVVYHVYWLEMVLFYRAHFGTDETIL DGKEYDIYVSYARNAEEEEFVLLTLRGVLENEFGYKL CIFDRDSLPGGIVTDETLSFIQKSRRLLVVLSPNYVLQG TQALLELKAGLENMASRGNINVILVQYKAVKETKVKE LKRAKTVLTVIKWKGEKSKYPQGRFWKQLQVAMPVK KSPRRSSSDEQGLSYSSLKNV	IL-1RAP
75	FTLQPAAHTGAARSCRFRGRHYKREFRLEGEPVALRCP QVPYWLWASVSPRINLTWHKNDSARTVPGEEETRMW AQDGALWLLPALQEDSGTYVCTTRNASYCDKMSIELR VFENTDAFLPFISYPQILTLSTSGVLVCPDLSEFTRDKTD VKIQWYKDSLLLDKDNEKFLSVRGTTHLLVHDVALED AGYYRCVLTFAHEGQQYNITRSIELRIKKKKEETIPVIIS PLKTISASLGSRLTIPCKVFLGTGTPLTTMLWWTANDT HIESAYPGGRVTEGPRQEYSENNENYIEVPLIFDPVTRE DLHMDFKCVVHNTLSFQTLRTTVKEASSTFSWGIVLAP LSLAFLVLGGIWMHRRCKHRTGKADGLTVLWPHHQD FQSYPK	IL-1RII
76	RPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ GPNVNLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGD ETRLQLEAVNITDLSENRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFES	IL-1RA

	AACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE	
77	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVEL	人TGFβRI 34-126之ECD
78	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD	人TGFβRII 24-159之ECD
79	GPEPGALCELSPVSASHPVQALMESFTVLSGCASRGTTGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQLQREVTLHLNPISSVHIHHKSVVFLLNSPHPLVWHLKTERLATGVSRLFLVSEGSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARKEYGAVTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFLSLNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHIIELITPNSNPYSAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILKCKKSVNWVIKSFDVKGSLKIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDDIPSTQGNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHLRLENNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALPALQNPPIRGGEGQNGGLPFPFPDISRRVWNEEGEDGLPRPKDPVIPSIQLFPGLREPEEVQGSVDIALSVKCDNEKMIVAVEKDSFQASGYSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLESPLNGCGTRPRWSALDGVVYYNSIVIQVPALGDSSGWPDGYEDLESGDNGFPGDMDEGDASLFTRPEIVVFNCSLQQVRNPSSFQEQPHGNITFNMELYNTDLFLVPSQGVFSVPENGHVYVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSNPDRMSHYTIIENICPKDESVKFYSPKRVHFPIPQADMDKKRFSFVFKPVFNTSLLFLQCELTLCTKMEKHPQKLPKCVPPDEACTSLDASIIWAMMQNKKTFTKPLAVIHHEAESKEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDTLTV	
80	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	hIgG1 aa序列：
81	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV	hIgG1_FES(L234F/L235E/P331S)

	LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGA	
82	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hκ aa序列
83	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGA	hIgG1_FES(L234F/L23 5E/P331S)
84	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFR GAGPGRVLIYNQRQGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRI GNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRA KPS	SIRPa_CV1
85	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK	3280A輕鏈可變區
86	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWV RQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWG QGTLVTVSS	3280A重鏈可變區
87	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGA	hIgG1(N297A)
88	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGA	hIgG1_L234F_L235E_P 331S(杵)S354C/T366W

89	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	hIgG1_L234F_L235E_P331S(臼)T366S/L368A/Y407V
90	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGAAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSVSDRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	AM4B6-La.4-hκ
91	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAETLYNHKFKGRVTVT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEEELQIIQPDKSVLV AAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQR QGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCI KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S-(G4S)4G-SIRPa_CV1
92	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	3280A-L-hκ
93	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWV RQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT	3280A-H-hIgG1(N297A)-(G4S)4G-SIRPα_CV1

	CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEEELQIIQPDKSVLV AAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQR QGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCI KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS	
94	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAETLYNHKFKGRVTVT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEEELQIIQPDKSVL VAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYY CIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S(杵)-SIRPa_CV1
95	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNNAETLYNHKFKGRVTVT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S(臼)
96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWV RQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD	3280A_H_hIgG1_L234F_L235E_P331S(杵)-SIRPa_CV1

	KTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEEELQIIQPDKSVL VAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYY CIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS	
97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWV RQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	3280A_H_hIgG1_L234F_L235E_P331S(臼)
98	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTVTSLIPVGPIQWF RGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDSTKRNNMDFSIR IGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVR AKPS	SIRPa_WT對偶基因1
99	LQPGAEVPVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAG VTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPR RYTVLSVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSL WLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQAS MT	LAG3 D1
100	LQPGAEVPVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAG VTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPR RYTVLSVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSL WLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQAS MTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRG QGRVPVRESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTY RDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPC	LAG3 D1+D2
101	GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRR	LAG3額外環
102	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGW IRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSRLTISKDTS KNQVSLKITSVTAADTAVYFCARNRYDPPWFVDWGQ GTLVTVSS	XOMA052 VH

103	DIQMTQSTSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQ KPGKAVKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQQEDFATYFCLQGKMLPWTFGQGTKLEIK	XOMA052 VL
104	TSGMGVG	XOMA052 HCDR1
105	HIWWDGDESYNPSLKS	XOMA052 HCDR2
106	NRYDPPWFVD	XOMA052 HCDR3
107	RASQDISNYLS	XOMA052 LCDR1
108	YTSKLHS	XOMA052 LCDR2
109	LQGKMLPWT	XOMA052 LCDR3
110	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYGMNW VRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNQYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNGLRAEDTAVYYCARDLRTGPFDYWG QGTLVTVSS	ACZ885 VH
111	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQK PDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLE AEDAAAYYCHQSSSLPFTFGPGTKVDIK	ACZ885 VL
112	VYGMN	ACZ885 HCDR1
113	IIWYDGDNQYYADSVKG	ACZ885 HCDR2
114	DLRTGPFDY	ACZ885 HCDR3
115	RASQSIGSSLH	ACZ885 LCDR1
116	YASQSFS	ACZ885 LCDR2
117	HQSSSLPFT	ACZ885 LCDR3
118	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGW IRQPSGKGLEWLAHIWWDGDESYNPSLKSRLTISKDTS KNQVSLKITSVTAADTAVYFCARNRYDPPWFVDWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGA GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDI NPNNAETLYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLRS DDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSVSDRYTGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQ GTKLTVL	IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 重鏈(HC)
119	DIQMTQSTSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQ KPGKAVKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISS	IgG-scFv-XOMA052-AM4B6

	LQQEDFATYFCLQGKMLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	輕鏈(LC)
120	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYGMNW VRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNQYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNGLRAEDTAVYYCARDLRTGPFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQCLEWMGD INPNNAETLYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLRS DDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGAAVAWYQQKPGKAPKLLIYSVSDRYTGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGC GTKLTVL	IgG-scFv-ACZ885-AM4B6重鏈(HC)
121	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQK PDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLE AEDAAAYYCHQSSSLPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	IgG-scFv-ACZ885-AM4B6輕鏈(LC)
122	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	G4S

【序列表】

<110> 中國大陸商蘇州創勝醫藥集團有限公司(SUZHOU TRANSCENTA THERAPEUTICS CO., LTD.)

<120> 雙功能分子

<130> 063694-8005WO03

<140> TW 110143071
<141> 2021-11-18

<150> PCT/CN2020/129918
<151> 2020-11-18

<150> PCT/CN2021/073341
<151> 2021-01-22

<160> 122

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1

Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 2

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 3

Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala Val Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 5

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 6

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
1 5

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ile Val Ala
1 5 10

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 8

Lys Ala Ser Gln Asn Val Pro Ala Ala Val Ala
1 5 10

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 9

Lys Ala Ser Gln Asn Val Lys Gly Ala Val Ala
1 5 10

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 10

Ser Asn Ser His Arg Tyr Thr
1 5

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 11

Ser Arg Ser Val Arg Tyr Thr
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 12

Ser Val Ser Asp Arg Tyr Thr
1 5

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 13

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Asp Thr Met Tyr Asn His Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 14

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gln Thr Gln Tyr Asn His Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 15

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr Asn His Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 16
<211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 16

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Leu Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 17

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gln Thr Val Tyr Asn His Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 18

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(8)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<400> 19

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Asn His Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(9)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<400> 20

Lys Ala Ser Gln Asn Val Xaa Xaa Xaa Val Ala
1 5 10

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<400> 21

Ser Xaa Ser Xaa Arg Tyr Thr
1 5

<210> 22
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 22

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

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

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 23

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 24
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 24

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 26

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 27

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 28
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 28

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 29

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 30
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 30

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

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

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 31

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 32
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 32

Arg Val Thr Val Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 33
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 33

Arg Val Thr Val Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 34
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 34

Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 35
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 35

Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 36

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 37
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 37

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 38
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 38

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 39
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 39

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 40
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<400> 40

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

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

<210> 41
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<400> 41

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Xaa Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 42
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(32)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<400> 42

Arg Val Thr Xaa Thr Val Asp Xaa Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
20 25 30

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<400> 43

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 44
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Xaa可爲任何天然存在之胺基酸

<400> 44

Gly Val Pro Xaa Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Xaa Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 45
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 45

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 46
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 46

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 47
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 47

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gly Ile Lys
100 105

<210> 48
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 49
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 49

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 50

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 51
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 51

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 52
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 52

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 53
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 53

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
85 90 95

<210> 54
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 54

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 55
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 55

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 56
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 56

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 57

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58
<211> 117

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 58

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gln Thr Gln Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 59

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 60

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gln Thr Val Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 61

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 62
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 62

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Lys Gly Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 63
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 63

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Pro Ala Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 64
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 64

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Val Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 65
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 65

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Arg Ser Val Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 66
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 66

Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe
1 5 10 15

Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr
20 25 30

Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys
35 40 45

Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu
50 55 60

Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile
65 70 75 80

Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys
85 90 95

Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn
100 105 110

Thr Ser Asn Pro Asp
115

<210> 67
<211> 144
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 67

Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr
1 5 10 15

Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val
20 25 30

Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu
35 40 45

Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser
50 55 60

Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu
65 70 75 80

Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp
85 90 95

Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe
100 105 110

Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met
115 120 125

Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
130 135 140

<210> 68
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 68

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

Gly Gly Gly Ser Gly
20

<210> 69
<211> 470
<212> PRT
<213> 智人

<400> 69

Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val
1 5 10 15

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

Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp
35 40 45

Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr
50 55 60

Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr
65 70 75 80

Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu Ala Ala Val
85 90 95

Ile Ala Gly Pro Val Cys Phe Val Cys Ile Ser Leu Met Leu Met Val
100 105 110

Tyr Ile Cys His Asn Arg Thr Val Ile His His Arg Val Pro Asn Glu
115 120 125

Glu Asp Pro Ser Leu Asp Arg Pro Phe Ile Ser Glu Gly Thr Thr Leu
130 135 140

Lys Asp Leu Ile Tyr Asp Met Thr Thr Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu
145 150 155 160

Pro Leu Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Arg Thr Ile Val Leu Gln Glu
165 170 175

Ser Ile Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Trp Arg Gly Lys Trp Arg
180 185 190

Gly Glu Glu Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Glu Glu Arg Ser
195 200 205

Trp Phe Arg Glu Ala Glu Ile Tyr Gln Thr Val Met Leu Arg His Glu
210 215 220

Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Asn Lys Asp Asn Gly Thr Trp
225 230 235 240

Thr Gln Leu Trp Leu Val Ser Asp Tyr His Glu His Gly Ser Leu Phe
245 250 255

Asp Tyr Leu Asn Arg Tyr Thr Val Thr Val Glu Gly Met Ile Lys Leu
260 265 270

Ala Leu Ser Thr Ala Ser Gly Leu Ala His Leu His Met Glu Ile Val
275 280 285

Gly Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys

290 295 300

Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Thr Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly
305 310 315 320

Leu Ala Val Arg His Asp Ser Ala Thr Asp Thr Ile Asp Ile Ala Pro
325 330 335

Asn His Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp
340 345 350

Asp Ser Ile Asn Met Lys His Phe Glu Ser Phe Lys Arg Ala Asp Ile
355 360 365

Tyr Ala Met Gly Leu Val Phe Trp Glu Ile Ala Arg Arg Cys Ser Ile
370 375 380

Gly Gly Ile His Glu Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Val Pro
385 390 395 400

Ser Asp Pro Ser Val Glu Glu Met Arg Lys Val Val Cys Glu Gln Lys
405 410 415

Leu Arg Pro Asn Ile Pro Asn Arg Trp Gln Ser Cys Glu Ala Leu Arg
420 425 430

Val Met Ala Lys Ile Met Arg Glu Cys Trp Tyr Ala Asn Gly Ala Ala
435 440 445

Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser Gln Leu Ser Gln
450 455 460

Gln Glu Gly Ile Lys Met
465 470

<210> 70
<211> 545
<212> PRT

<213> 智人

<400> 70

```
Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val
1               5                  10                  15

Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys
            20                  25                  30

Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn
        35                  40                  45

Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala
    50                  55                  60

Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His
65                  70                  75                  80

Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser
                85                  90                  95

Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe
            100                 105                 110

Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser
        115                 120                 125

Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln
    130                 135                 140

Val Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu Gly Val Ala Ile Ser Val
145                 150                 155                 160

Ile Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn Arg Gln Gln Lys Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Trp Glu Thr Gly Lys Thr Arg Lys Leu Met Glu Phe Ser Glu
            180                 185                 190
```

```
His Cys Ala Ile Ile Leu Glu Asp Asp Arg Ser Asp Ile Ser Ser Thr
        195                 200                 205

Cys Ala Asn Asn Ile Asn His Asn Thr Glu Leu Leu Pro Ile Glu Leu
    210                 215                 220

Asp Thr Leu Val Gly Lys Gly Arg Phe Ala Glu Val Tyr Lys Ala Lys
225                 230                 235                 240

Leu Lys Gln Asn Thr Ser Glu Gln Phe Glu Thr Val Ala Val Lys Ile
                245                 250                 255

Phe Pro Tyr Glu Glu Tyr Ala Ser Trp Lys Thr Glu Lys Asp Ile Phe
            260                 265                 270

Ser Asp Ile Asn Leu Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Leu Thr Ala
        275                 280                 285

Glu Glu Arg Lys Thr Glu Leu Gly Lys Gln Tyr Trp Leu Ile Thr Ala
    290                 295                 300

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

Ser Trp Glu Asp Leu Arg Lys Leu Gly Ser Ser Leu Ala Arg Gly Ile
                325                 330                 335

Ala His Leu His Ser Asp His Thr Pro Cys Gly Arg Pro Lys Met Pro
            340                 345                 350

Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn Ile Leu Val Lys Asn Asp
        355                 360                 365

Leu Thr Cys Cys Leu Cys Asp Phe Gly Leu Ser Leu Arg Leu Asp Pro
    370                 375                 380
```

Thr Leu Ser Val Asp Asp Leu Ala Asn Ser Gly Gln Val Gly Thr Ala
385 390 395 400

Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Glu Ser Arg Met Asn Leu Glu Asn
405 410 415

Val Glu Ser Phe Lys Gln Thr Asp Val Tyr Ser Met Ala Leu Val Leu
420 425 430

Trp Glu Met Thr Ser Arg Cys Asn Ala Val Gly Glu Val Lys Asp Tyr
435 440 445

Glu Pro Pro Phe Gly Ser Lys Val Arg Glu His Pro Cys Val Glu Ser
450 455 460

Met Lys Asp Asn Val Leu Arg Asp Arg Gly Arg Pro Glu Ile Pro Ser
465 470 475 480

Phe Trp Leu Asn His Gln Gly Ile Gln Met Val Cys Glu Thr Leu Thr
485 490 495

Glu Cys Trp Asp His Asp Pro Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys Val
500 505 510

Ala Glu Arg Phe Ser Glu Leu Glu His Leu Asp Arg Leu Ser Gly Arg
515 520 525

Ser Cys Ser Glu Glu Lys Ile Pro Glu Asp Gly Ser Leu Asn Thr Thr
530 535 540

Lys
545

<210> 71
<211> 570
<212> PRT
<213> 智人

<400> 71

Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln
1 5 10 15

Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu
20 25 30

Arg His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val
35 40 45

Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys
50 55 60

Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys
65 70 75 80

Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu
85 90 95

Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His
100 105 110

Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu
115 120 125

Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp
130 135 140

Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn
145 150 155 160

Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Thr Gly Ile Ser Leu Leu
165 170 175

Pro Pro Leu Gly Val Ala Ile Ser Val Ile Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr
180 185 190

Arg Val Asn Arg Gln Gln Lys Leu Ser Ser Thr Trp Glu Thr Gly Lys

195 200 205

Thr Arg Lys Leu Met Glu Phe Ser Glu His Cys Ala Ile Ile Leu Glu
210 215 220

Asp Asp Arg Ser Asp Ile Ser Ser Thr Cys Ala Asn Asn Ile Asn His
225 230 235 240

Asn Thr Glu Leu Leu Pro Ile Glu Leu Asp Thr Leu Val Gly Lys Gly
245 250 255

Arg Phe Ala Glu Val Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Thr Ser Glu
260 265 270

Gln Phe Glu Thr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Tyr Glu Glu Tyr Ala
275 280 285

Ser Trp Lys Thr Glu Lys Asp Ile Phe Ser Asp Ile Asn Leu Lys His
290 295 300

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

Gly Lys Gln Tyr Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Ala Lys Gly Asn Leu
325 330 335

Gln Glu Tyr Leu Thr Arg His Val Ile Ser Trp Glu Asp Leu Arg Lys
340 345 350

Leu Gly Ser Ser Leu Ala Arg Gly Ile Ala His Leu His Ser Asp His
355 360 365

Thr Pro Cys Gly Arg Pro Lys Met Pro Ile Val His Arg Asp Leu Lys
370 375 380

Ser Ser Asn Ile Leu Val Lys Asn Asp Leu Thr Cys Cys Leu Cys Asp
385 390 395 400

Phe Gly Leu Ser Leu Arg Leu Asp Pro Thr Leu Ser Val Asp Asp Leu
405 410 415

Ala Asn Ser Gly Gln Val Gly Thr Ala Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val
420 425 430

Leu Glu Ser Arg Met Asn Leu Glu Asn Val Glu Ser Phe Lys Gln Thr
435 440 445

Asp Val Tyr Ser Met Ala Leu Val Leu Trp Glu Met Thr Ser Arg Cys
450 455 460

Asn Ala Val Gly Glu Val Lys Asp Tyr Glu Pro Pro Phe Gly Ser Lys
465 470 475 480

Val Arg Glu His Pro Cys Val Glu Ser Met Lys Asp Asn Val Leu Arg
485 490 495

Asp Arg Gly Arg Pro Glu Ile Pro Ser Phe Trp Leu Asn His Gln Gly
500 505 510

Ile Gln Met Val Cys Glu Thr Leu Thr Glu Cys Trp Asp His Asp Pro
515 520 525

Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys Val Ala Glu Arg Phe Ser Glu Leu
530 535 540

Glu His Leu Asp Arg Leu Ser Gly Arg Ser Cys Ser Glu Glu Lys Ile
545 550 555 560

Pro Glu Asp Gly Ser Leu Asn Thr Thr Lys
565 570

<210> 72
<211> 831
<212> PRT
<213> 智人

<400> 72

Gly Pro Glu Pro Gly Ala Leu Cys Glu Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser
1 5 10 15

His Pro Val Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys
20 25 30

Ala Ser Arg Gly Thr Thr Gly Leu Pro Gln Glu Val His Val Leu Asn
35 40 45

Leu Arg Thr Ala Gly Gln Gly Pro Gly Gln Leu Gln Arg Glu Val Thr
50 55 60

Leu His Leu Asn Pro Ile Ser Ser Val His Ile His His Lys Ser Val
65 70 75 80

Val Phe Leu Leu Asn Ser Pro His Pro Leu Val Trp His Leu Lys Thr
85 90 95

Glu Arg Leu Ala Thr Gly Val Ser Arg Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly
100 105 110

Ser Val Val Gln Phe Ser Ser Ala Asn Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr
115 120 125

Glu Glu Arg Asn Phe Pro His Gly Asn Glu His Leu Leu Asn Trp Ala
130 135 140

Arg Lys Glu Tyr Gly Ala Val Thr Ser Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala
145 150 155 160

Arg Asn Ile Tyr Ile Lys Val Gly Glu Asp Gln Val Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Cys Asn Ile Gly Lys Asn Phe Leu Ser Leu Asn Tyr Leu Ala Glu Tyr
180 185 190

Leu Gln Pro Lys Ala Ala Glu Gly Cys Val Met Ser Ser Gln Pro Gln
195 200 205

Asn Glu Glu Val His Ile Ile Glu Leu Ile Thr Pro Asn Ser Asn Pro
210 215 220

Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Thr Ile Asp Ile Arg Pro Ser Gln
225 230 235 240

Glu Asp Leu Glu Val Val Lys Asn Leu Ile Leu Ile Leu Lys Cys Lys
245 250 255

Lys Ser Val Asn Trp Val Ile Lys Ser Phe Asp Val Lys Gly Ser Leu
260 265 270

Lys Ile Ile Ala Pro Asn Ser Ile Gly Phe Gly Lys Glu Ser Glu Arg
275 280 285

Ser Met Thr Met Thr Lys Ser Ile Arg Asp Asp Ile Pro Ser Thr Gln
290 295 300

Gly Asn Leu Val Lys Trp Ala Leu Asp Asn Gly Tyr Ser Pro Ile Thr
305 310 315 320

Ser Tyr Thr Met Ala Pro Val Ala Asn Arg Phe His Leu Arg Leu Glu
325 330 335

Asn Asn Ala Glu Glu Met Gly Asp Glu Glu Val His Thr Ile Pro Pro
340 345 350

Glu Leu Arg Ile Leu Leu Asp Pro Gly Ala Leu Pro Ala Leu Gln Asn
355 360 365

Pro Pro Ile Arg Gly Gly Glu Gly Gln Asn Gly Gly Leu Pro Phe Pro
370 375 380

Phe Pro Asp Ile Ser Arg Arg Val Trp Asn Glu Glu Gly Glu Asp Gly
385 390 395 400

Leu Pro Arg Pro Lys Asp Pro Val Ile Pro Ser Ile Gln Leu Phe Pro
405 410 415

Gly Leu Arg Glu Pro Glu Glu Val Gln Gly Ser Val Asp Ile Ala Leu
420 425 430

Ser Val Lys Cys Asp Asn Glu Lys Met Ile Val Ala Val Glu Lys Asp
435 440 445

Ser Phe Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Gly Met Asp Val Thr Leu Leu Asp
450 455 460

Pro Thr Cys Lys Ala Lys Met Asn Gly Thr His Phe Val Leu Glu Ser
465 470 475 480

Pro Leu Asn Gly Cys Gly Thr Arg Pro Arg Trp Ser Ala Leu Asp Gly
485 490 495

Val Val Tyr Tyr Asn Ser Ile Val Ile Gln Val Pro Ala Leu Gly Asp
500 505 510

Ser Ser Gly Trp Pro Asp Gly Tyr Glu Asp Leu Glu Ser Gly Asp Asn
515 520 525

Gly Phe Pro Gly Asp Met Asp Glu Gly Asp Ala Ser Leu Phe Thr Arg
530 535 540

Pro Glu Ile Val Val Phe Asn Cys Ser Leu Gln Gln Val Arg Asn Pro
545 550 555 560

Ser Ser Phe Gln Glu Gln Pro His Gly Asn Ile Thr Phe Asn Met Glu
565 570 575

Leu Tyr Asn Thr Asp Leu Phe Leu Val Pro Ser Gln Gly Val Phe Ser
580 585 590

Val Pro Glu Asn Gly His Val Tyr Val Glu Val Ser Val Thr Lys Ala
595 600 605

Glu Gln Glu Leu Gly Phe Ala Ile Gln Thr Cys Phe Ile Ser Pro Tyr
610 615 620

Ser Asn Pro Asp Arg Met Ser His Tyr Thr Ile Ile Glu Asn Ile Cys
625 630 635 640

Pro Lys Asp Glu Ser Val Lys Phe Tyr Ser Pro Lys Arg Val His Phe
645 650 655

Pro Ile Pro Gln Ala Asp Met Asp Lys Lys Arg Phe Ser Phe Val Phe
660 665 670

Lys Pro Val Phe Asn Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Cys Glu Leu Thr
675 680 685

Leu Cys Thr Lys Met Glu Lys His Pro Gln Lys Leu Pro Lys Cys Val
690 695 700

Pro Pro Asp Glu Ala Cys Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala
705 710 715 720

Met Met Gln Asn Lys Lys Thr Phe Thr Lys Pro Leu Ala Val Ile His
725 730 735

His Glu Ala Glu Ser Lys Glu Lys Gly Pro Ser Met Lys Glu Pro Asn
740 745 750

Pro Ile Ser Pro Pro Ile Phe His Gly Leu Asp Thr Leu Thr Val Met
755 760 765

Gly Ile Ala Phe Ala Ala Phe Val Ile Gly Ala Leu Leu Thr Gly Ala
770 775 780

Leu Trp Tyr Ile Tyr Ser His Thr Gly Glu Thr Ala Gly Arg Gln Gln
785 790 795 800

Val Pro Thr Ser Pro Pro Ala Ser Glu Asn Ser Ser Ala Ala His Ser
805 810 815

Ile Gly Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser Ser Ser Ser Thr Ala
820 825 830

<210> 73
<211> 552
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73

Leu Glu Ala Asp Lys Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val
1 5 10 15

Ser Ser Ala Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn
20 25 30

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

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

Trp Phe Val Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val
65 70 75 80

Val Arg Asn Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys Phe
85 90 95

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

Gln Lys Leu Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met
115 120 125

Glu Phe Phe Lys Asn Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp Tyr

130 135 140

Lys Asp Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val
145 150 155 160

Lys Asp Arg Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn
165 170 175

Tyr Thr Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile
180 185 190

Thr Arg Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg
195 200 205

Pro Val Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly
210 215 220

Ser Gln Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile
225 230 235 240

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

Leu Gly Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg
260 265 270

Ser Thr Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe
275 280 285

Tyr Lys His Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp
290 295 300

Ala Ala Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Phe Gln Lys His
305 310 315 320

Met Ile Gly Ile Cys Val Thr Leu Thr Val Ile Ile Val Cys Ser Val
325 330 335

Phe Ile Tyr Lys Ile Phe Lys Ile Asp Ile Val Leu Trp Tyr Arg Asp
340 345 350

Ser Cys Tyr Asp Phe Leu Pro Ile Lys Ala Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
355 360 365

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

Asp Cys Asp Ile Phe Val Phe Lys Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Lys
385 390 395 400

Gln Cys Gly Tyr Lys Leu Phe Ile Tyr Gly Arg Asp Asp Tyr Val Gly
405 410 415

Glu Asp Ile Val Glu Val Ile Asn Glu Asn Val Lys Lys Ser Arg Arg
420 425 430

Leu Ile Ile Ile Leu Val Arg Glu Thr Ser Gly Phe Ser Trp Leu Gly
435 440 445

Gly Ser Ser Glu Glu Gln Ile Ala Met Tyr Asn Ala Leu Val Gln Asp
450 455 460

Gly Ile Lys Val Val Leu Leu Glu Leu Glu Lys Ile Gln Asp Tyr Glu
465 470 475 480

Lys Met Pro Glu Ser Ile Lys Phe Ile Lys Gln Lys His Gly Ala Ile
485 490 495

Arg Trp Ser Gly Asp Phe Thr Gln Gly Pro Gln Ser Ala Lys Thr Arg
500 505 510

Phe Trp Lys Asn Val Arg Tyr His Met Pro Val Gln Arg Arg Ser Pro
515 520 525

Ser Ser Lys His Gln Leu Leu Ser Pro Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gln

530 535 540

Arg Glu Ala His Val Pro Leu Gly
545 550

<210> 74
<211> 550
<212> PRT
<213> 智人

<400> 74

Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met Arg Gln Ile Gln
1 5 10 15

Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro Leu Phe Glu His
20 25 30

Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala Gly Leu Thr Leu
35 40 45

Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu Glu Pro Ile Asn
50 55 60

Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys Asp Val Leu Trp
65 70 75 80

Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Met Leu
85 90 95

Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro Leu Glu Val Val
100 105 110

Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu Pro Val His Lys
115 120 125

Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys Pro Asn Val Asp
130 135 140

Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr Trp Tyr Met Gly
145 150 155 160

Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro Glu Gly Met Asn
165 170 175

Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Cys
180 185 190

Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His Leu Thr Arg Thr
195 200 205

Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asn Ala Val Pro Pro Val
210 215 220

Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys Glu Pro Gly Glu
225 230 235 240

Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe Leu Met Asp Ser
245 250 255

Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys Pro Asp Asp Ile
260 265 270

Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile Ser His Ser Arg Thr Glu
275 280 285

Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys Val Thr Ser Glu
290 295 300

Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala Arg Ser Ala Lys Gly Glu
305 310 315 320

Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Val Pro Ala Pro Arg Tyr
325 330 335

Thr Val Glu Leu Ala Cys Gly Phe Gly Ala Thr Val Leu Leu Val Val
340 345 350

Ile Leu Ile Val Val Tyr His Val Tyr Trp Leu Glu Met Val Leu Phe
355 360 365

Tyr Arg Ala His Phe Gly Thr Asp Glu Thr Ile Leu Asp Gly Lys Glu
370 375 380

Tyr Asp Ile Tyr Val Ser Tyr Ala Arg Asn Ala Glu Glu Glu Glu Phe
385 390 395 400

Val Leu Leu Thr Leu Arg Gly Val Leu Glu Asn Glu Phe Gly Tyr Lys
405 410 415

Leu Cys Ile Phe Asp Arg Asp Ser Leu Pro Gly Gly Ile Val Thr Asp
420 425 430

Glu Thr Leu Ser Phe Ile Gln Lys Ser Arg Arg Leu Leu Val Val Leu
435 440 445

Ser Pro Asn Tyr Val Leu Gln Gly Thr Gln Ala Leu Leu Glu Leu Lys
450 455 460

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

Val Gln Tyr Lys Ala Val Lys Glu Thr Lys Val Lys Glu Leu Lys Arg
485 490 495

Ala Lys Thr Val Leu Thr Val Ile Lys Trp Lys Gly Glu Lys Ser Lys
500 505 510

Tyr Pro Gln Gly Arg Phe Trp Lys Gln Leu Gln Val Ala Met Pro Val
515 520 525

Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln Gly Leu Ser Tyr
530 535 540

Ser Ser Leu Lys Asn Val
545 550

<210> 75
<211> 385
<212> PRT
<213> 智人

<400> 75

Phe Thr Leu Gln Pro Ala Ala His Thr Gly Ala Ala Arg Ser Cys Arg
1 5 10 15

Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Arg Glu Phe Arg Leu Glu Gly Glu Pro
20 25 30

Val Ala Leu Arg Cys Pro Gln Val Pro Tyr Trp Leu Trp Ala Ser Val
35 40 45

Ser Pro Arg Ile Asn Leu Thr Trp His Lys Asn Asp Ser Ala Arg Thr
50 55 60

Val Pro Gly Glu Glu Glu Thr Arg Met Trp Ala Gln Asp Gly Ala Leu
65 70 75 80

Trp Leu Leu Pro Ala Leu Gln Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Val Cys Thr
85 90 95

Thr Arg Asn Ala Ser Tyr Cys Asp Lys Met Ser Ile Glu Leu Arg Val
100 105 110

Phe Glu Asn Thr Asp Ala Phe Leu Pro Phe Ile Ser Tyr Pro Gln Ile
115 120 125

Leu Thr Leu Ser Thr Ser Gly Val Leu Val Cys Pro Asp Leu Ser Glu
130 135 140

Phe Thr Arg Asp Lys Thr Asp Val Lys Ile Gln Trp Tyr Lys Asp Ser
145 150 155 160

Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asn Glu Lys Phe Leu Ser Val Arg Gly Thr
165 170 175

Thr His Leu Leu Val His Asp Val Ala Leu Glu Asp Ala Gly Tyr Tyr
180 185 190

Arg Cys Val Leu Thr Phe Ala His Glu Gly Gln Gln Tyr Asn Ile Thr
195 200 205

Arg Ser Ile Glu Leu Arg Ile Lys Lys Lys Lys Glu Glu Thr Ile Pro
210 215 220

Val Ile Ile Ser Pro Leu Lys Thr Ile Ser Ala Ser Leu Gly Ser Arg
225 230 235 240

Leu Thr Ile Pro Cys Lys Val Phe Leu Gly Thr Gly Thr Pro Leu Thr
245 250 255

Thr Met Leu Trp Trp Thr Ala Asn Asp Thr His Ile Glu Ser Ala Tyr
260 265 270

Pro Gly Gly Arg Val Thr Glu Gly Pro Arg Gln Glu Tyr Ser Glu Asn
275 280 285

Asn Glu Asn Tyr Ile Glu Val Pro Leu Ile Phe Asp Pro Val Thr Arg
290 295 300

Glu Asp Leu His Met Asp Phe Lys Cys Val Val His Asn Thr Leu Ser
305 310 315 320

Phe Gln Thr Leu Arg Thr Thr Val Lys Glu Ala Ser Ser Thr Phe Ser
325 330 335

Trp Gly Ile Val Leu Ala Pro Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Gly
340 345 350

Gly Ile Trp Met His Arg Arg Cys Lys His Arg Thr Gly Lys Ala Asp

355 360 365

Gly Leu Thr Val Leu Trp Pro His His Gln Asp Phe Gln Ser Tyr Pro
370 375 380

Lys
385

<210> 76
<211> 152
<212> PRT
<213> 智人

<400> 76

Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp
1 5 10 15

Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala
20 25 30

Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val
35 40 45

Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys
50 55 60

Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu
65 70 75 80

Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys
85 90 95

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

Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp
115 120 125

Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr
130 135 140

Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
145 150

<210> 77
<211> 93
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 77

Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val
1 5 10 15

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

Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp
35 40 45

Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr
50 55 60

Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr
65 70 75 80

Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu
85 90

<210> 78
<211> 136
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 78

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
1 5 10 15

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp
20 25 30

Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys
35 40 45

Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val
50 55 60

Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp
65 70 75 80

Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro
85 90 95

Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met
100 105 110

Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
115 120 125

Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
130 135

<210> 79
<211> 767
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 79

Gly Pro Glu Pro Gly Ala Leu Cys Glu Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser
1 5 10 15

His Pro Val Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys
20 25 30

Ala Ser Arg Gly Thr Thr Gly Leu Pro Gln Glu Val His Val Leu Asn
35 40 45

Leu Arg Thr Ala Gly Gln Gly Pro Gly Gln Leu Gln Arg Glu Val Thr
50 55 60

Leu His Leu Asn Pro Ile Ser Ser Val His Ile His His Lys Ser Val
65 70 75 80

Val Phe Leu Leu Asn Ser Pro His Pro Leu Val Trp His Leu Lys Thr
85 90 95

Glu Arg Leu Ala Thr Gly Val Ser Arg Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly
100 105 110

Ser Val Val Gln Phe Ser Ser Ala Asn Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr
115 120 125

Glu Glu Arg Asn Phe Pro His Gly Asn Glu His Leu Leu Asn Trp Ala
130 135 140

Arg Lys Glu Tyr Gly Ala Val Thr Ser Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala
145 150 155 160

Arg Asn Ile Tyr Ile Lys Val Gly Glu Asp Gln Val Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Cys Asn Ile Gly Lys Asn Phe Leu Ser Leu Asn Tyr Leu Ala Glu Tyr
180 185 190

Leu Gln Pro Lys Ala Ala Glu Gly Cys Val Met Ser Ser Gln Pro Gln
195 200 205

```
Asn Glu Glu Val His Ile Ile Glu Leu Ile Thr Pro Asn Ser Asn Pro
    210                 215                 220

Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Thr Ile Asp Ile Arg Pro Ser Gln
225                 230                 235                 240

Glu Asp Leu Glu Val Val Lys Asn Leu Ile Leu Ile Leu Lys Cys Lys
                245                 250                 255

Lys Ser Val Asn Trp Val Ile Lys Ser Phe Asp Val Lys Gly Ser Leu
            260                 265                 270

Lys Ile Ile Ala Pro Asn Ser Ile Gly Phe Gly Lys Glu Ser Glu Arg
        275                 280                 285

Ser Met Thr Met Thr Lys Ser Ile Arg Asp Asp Ile Pro Ser Thr Gln
    290                 295                 300

Gly Asn Leu Val Lys Trp Ala Leu Asp Asn Gly Tyr Ser Pro Ile Thr
305                 310                 315                 320

Ser Tyr Thr Met Ala Pro Val Ala Asn Arg Phe His Leu Arg Leu Glu
                325                 330                 335

Asn Asn Ala Glu Glu Met Gly Asp Glu Glu Val His Thr Ile Pro Pro
            340                 345                 350

Glu Leu Arg Ile Leu Leu Asp Pro Gly Ala Leu Pro Ala Leu Gln Asn
        355                 360                 365

Pro Pro Ile Arg Gly Gly Glu Gly Gln Asn Gly Gly Leu Pro Phe Pro
    370                 375                 380

Phe Pro Asp Ile Ser Arg Arg Val Trp Asn Glu Glu Gly Glu Asp Gly
385                 390                 395                 400

Leu Pro Arg Pro Lys Asp Pro Val Ile Pro Ser Ile Gln Leu Phe Pro
                405                 410                 415
```

Gly Leu Arg Glu Pro Glu Glu Val Gln Gly Ser Val Asp Ile Ala Leu
420 425 430

Ser Val Lys Cys Asp Asn Glu Lys Met Ile Val Ala Val Glu Lys Asp
435 440 445

Ser Phe Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Gly Met Asp Val Thr Leu Leu Asp
450 455 460

Pro Thr Cys Lys Ala Lys Met Asn Gly Thr His Phe Val Leu Glu Ser
465 470 475 480

Pro Leu Asn Gly Cys Gly Thr Arg Pro Arg Trp Ser Ala Leu Asp Gly
485 490 495

Val Val Tyr Tyr Asn Ser Ile Val Ile Gln Val Pro Ala Leu Gly Asp
500 505 510

Ser Ser Gly Trp Pro Asp Gly Tyr Glu Asp Leu Glu Ser Gly Asp Asn
515 520 525

Gly Phe Pro Gly Asp Met Asp Glu Gly Asp Ala Ser Leu Phe Thr Arg
530 535 540

Pro Glu Ile Val Val Phe Asn Cys Ser Leu Gln Gln Val Arg Asn Pro
545 550 555 560

Ser Ser Phe Gln Glu Gln Pro His Gly Asn Ile Thr Phe Asn Met Glu
565 570 575

Leu Tyr Asn Thr Asp Leu Phe Leu Val Pro Ser Gln Gly Val Phe Ser
580 585 590

Val Pro Glu Asn Gly His Val Tyr Val Glu Val Ser Val Thr Lys Ala
595 600 605

Glu Gln Glu Leu Gly Phe Ala Ile Gln Thr Cys Phe Ile Ser Pro Tyr
610 615 620

Ser Asn Pro Asp Arg Met Ser His Tyr Thr Ile Ile Glu Asn Ile Cys
625 630 635 640

Pro Lys Asp Glu Ser Val Lys Phe Tyr Ser Pro Lys Arg Val His Phe
645 650 655

Pro Ile Pro Gln Ala Asp Met Asp Lys Lys Arg Phe Ser Phe Val Phe
660 665 670

Lys Pro Val Phe Asn Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Cys Glu Leu Thr
675 680 685

Leu Cys Thr Lys Met Glu Lys His Pro Gln Lys Leu Pro Lys Cys Val
690 695 700

Pro Pro Asp Glu Ala Cys Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala
705 710 715 720

Met Met Gln Asn Lys Lys Thr Phe Thr Lys Pro Leu Ala Val Ile His
725 730 735

His Glu Ala Glu Ser Lys Glu Lys Gly Pro Ser Met Lys Glu Pro Asn
740 745 750

Pro Ile Ser Pro Pro Ile Phe His Gly Leu Asp Thr Leu Thr Val
755 760 765

<210> 80
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 81
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala
325 330

<210> 82
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 82

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

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

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 83
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala
325 330

<210> 84
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 84

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

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro
20 25 30

Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu
35 40 45

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

Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys
85 90 95

Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
100 105 110

Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
115

<210> 85
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 85

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 86
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 86

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 87
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 87

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala
325 330

<210> 88
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 88

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala
325 330

<210> 89
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 89

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 90
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 90

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Val Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 91
<211> 587
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 91

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser
465 470 475 480

Val Leu Val Ala Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr
485 490 495

Ser Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro
500 505 510

Gly Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val
515 520 525

Thr Thr Val Ser Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile
530 535 540

Arg Ile Gly Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile
545 550 555 560

Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala
565 570 575

Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
580 585

<210> 92
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 92

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

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
            20                  25                  30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205
```

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 93
<211> 588
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 93

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

```
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            260                 265                 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        275                 280                 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    290                 295                 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
            340                 345                 350
```

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys
465 470 475 480

Ser Val Leu Val Ala Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile
485 490 495

Thr Ser Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly
500 505 510

Pro Gly Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg
515 520 525

Val Thr Thr Val Ser Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser
530 535 540

Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

Ile Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly
565 570 575

Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
580 585

<210> 94
<211> 587
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 94

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
355 360 365

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser
465 470 475 480

Val Leu Val Ala Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr
485 490 495

Ser Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro
500 505 510

Gly Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val
515 520 525

Thr Thr Val Ser Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile
530 535 540

Arg Ile Gly Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile
545 550 555 560

Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala
565 570 575

Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
580 585

<210> 95
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 95

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

```
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    290                 295                 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
            340                 345                 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
        355                 360                 365

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

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

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

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

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

<210> 96
<211> 588
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 96

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
            20                  25                  30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190
```

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys
465 470 475 480

Ser Val Leu Val Ala Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile
485 490 495

Thr Ser Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly
500 505 510

Pro Gly Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg
515 520 525

Val Thr Thr Val Ser Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser
530 535 540

Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

Ile Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly
565 570 575

Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
580 585

<210> 97
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 97

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
            20                  25                  30

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

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160
```

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 98
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 98

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

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Val Thr Ser Leu Ile Pro
20 25 30

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

Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60

Asp Ser Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
85 90 95

Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
100 105 110

Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
115

<210> 99
<211> 150
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 99

Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala
1 5 10 15

Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser
20 25 30

Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly
35 40 45

Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro
50 55 60

Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu
65 70 75 80

Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro
85 90 95

Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu
100 105 110

Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala
115 120 125

Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu
130 135 140

Gly Gln Ala Ser Met Thr
145 150

<210> 100
<211> 260
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 100

Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala
1 5 10 15

Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser
20 25 30

Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly
35 40 45

Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro
50 55 60

Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu
65 70 75 80

Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro
85 90 95

Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu
100 105 110

Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala
115 120 125

Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu
130 135 140

Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser
145 150 155 160

Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala
165 170 175

Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg
180 185 190

Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln
195 200 205

Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg
210 215 220

Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu
225 230 235 240

Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val
245 250 255

Gly Leu Pro Cys
260

<210> 101
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 101

Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His
1 5 10 15

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg
20 25

<210> 102
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 102

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 103
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 103

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 104

Thr Ser Gly Met Gly Val Gly
1 5

<210> 105
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 105

His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 106
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 106

Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp
1 5 10

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 107

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 108

Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 109

Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 110
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 110

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 111
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 111

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 112
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 112

Val Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 113
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 113

Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 114

Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 115

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
1 5 10

<210> 116
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 116

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 117

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 118
<211> 713
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 118

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
465 470 475 480

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
485 490 495

Tyr Val Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
500 505 510

Gln Ser Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr
515 520 525

Leu Tyr Asn His Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys
530 535 540

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
545 550 555 560

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr
565 570 575

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
580 585 590

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
595 600 605

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
610 615 620

Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala Val
625 630 635 640

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
645 650 655

Ser Val Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
660 665 670

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
675 680 685

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr Phe
690 695 700

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
705 710

<210> 119
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 119

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

```
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 120
<211> 711

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 120

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
465 470 475 480

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val
485 490 495

Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys
500 505 510

Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr
515 520 525

Asn His Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile
530 535 540

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
545 550 555 560

Val Tyr Tyr Cys Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly
565 570 575

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
580 585 590

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
595 600 605

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
610 615 620

Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala Val Ala Trp
625 630 635 640

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Val
645 650 655

Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
660 665 670

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile
675 680 685

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr Phe Gly Cys
690 695 700

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
705 710

<210> 121
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 121

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 122
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 122

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

Gly Gly Gly Ser
20

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種雙功能分子，其包含與免疫檢查點分子結合之第一部分及阻斷介白素-1 (IL-1)活性之第二部分。

【請求項2】

如請求項1之雙功能分子，其中該第一部分包含免疫刺激性檢查點分子之促效劑，該免疫刺激性檢查點分子視情況選自由以下組成之群：CD27、CD70、CD28、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、CD40、CD40L (CD154)、CD122、CD137、CD137L、OX40 (CD134)、OX40L (CD252)、GITR、ICOS (CD278)及ICOSLG (CD275)、CD2、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160及CD83。

【請求項3】

如請求項1之雙功能分子，其中該第一部分包含免疫抑制性檢查點分子之拮抗劑，該免疫抑制性檢查點分子視情況選自由以下組成之群：A2AR、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、BTLA (CD272)、CTLA-4 (CD152)、IDO1、IDO2、TDO、KIR、LAG3、NOX2、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 (CD328)、TIGIT、PVR(CD155)、SIGLEC9 (CD329)、CD160、LAIR1、2B4 (CD244)、CD47、B7-H5。

【請求項4】

如請求項3之雙功能分子，其中該免疫檢查點分子為PD-L1。

【請求項5】

如前述請求項中任一項之雙功能分子，其中該第一部分包含針對PD-

L1之抗體或其抗原結合片段，且該第二部分包含IL-1結合部分或IL-1受體(IL-1R)結合部分。

【請求項6】

如請求項5之雙功能分子，其中該IL-1結合部分包含IL-1R或其片段或變異體、或針對IL-1之抗體或其抗原結合片段。

【請求項7】

如請求項6之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區及/或輕鏈可變區係來自選自由以下組成之群之抗IL-1α抗體：XB2001、魯吉珠單抗(lutikizumab)、LY2189102及貝邁奇單抗(bermekimab)，或來自選自由以下組成之群之抗IL-1β抗體：SSGJ-613、CDP484、卡那單抗(canakinumab)及吉伏組單抗(gevokizumab)。

【請求項8】

如請求項6之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 104或SEQ ID NO: 112之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 105或SEQ ID NO: 113之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 106或SEQ ID NO: 114之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 107或SEQ ID NO: 115之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 108或SEQ ID NO: 116之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 109或SEQ ID NO: 117之序列的LCDR3。

【請求項9】

如請求項6之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO:

104之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 105之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 106之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 107之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 108之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 109之序列的LCDR3。

【請求項10】

如請求項6之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 112之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 113之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 114之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 115之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 116之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 117之序列的LCDR3。

【請求項11】

如請求項6之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 110及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 111及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【請求項12】

如請求項6之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 102及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 103及

與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【請求項13】

如請求項6之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 110及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 111及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【請求項14】

如請求項5之雙功能分子，其中該IL-1R結合部分包含介白素-1受體拮抗劑或其片段或變異體、或針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段。

【請求項15】

如請求項14之雙功能分子，其中該針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區及/或輕鏈可變區係來自選自由以下組成之群之抗體：司柏索利單抗(spesolimab)、艾特利單抗(astegolimab)、伊姆西多單抗(imsidolimab)、AMG 108、邁瑞利單抗(melrilimab)、尼達利單抗(nidanilimab)、MEDI8968、REGN6490、HB0034及CSC012。

【請求項16】

一種雙功能分子，其包含與PD-L1結合之第一部分及a)阻斷免疫抑制性細胞介素活性或b)刺激免疫之第二部分，其中該第一部分包含有包含重鏈可變(VH)區及/或輕鏈可變(VL)區之針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈可變區包含：

a) HCDR1，其包含**DYYMN** (SEQ ID NO: 1)或與**DYYMN**具有至少

80%序列一致性之同源序列，

b) HCDR2，其包含**DINPNNX$_1$X$_2$TX$_3$YNHKFKG** (SEQ ID NO: 19)或與**DINPNNX$_1$X$_2$TX$_3$YNHKFKG**具有至少80%序列一致性之同源序列，以及

c) HCDR3，其包含**WGDGPFAY** (SEQ ID NO: 3)或與**WGDGPFAY**具有至少80%序列一致性之同源序列，及/或

其中該輕鏈可變區包含：

d) LCDR1，其包含選自由**KASQNVX$_4$X$_5$X$_6$VA** (SEQ ID NO: 20)或與**KASQNVX$_4$X$_5$X$_6$VA**具有至少80%序列一致性之同源序列組成之群之序列，

e) LCDR2，其包含選自由**SX$_7$SX$_8$RYT** (SEQ ID NO: 21)或與**SX$_7$SX$_8$RYT**具有至少80%序列一致性之同源序列組成之群之序列，以及

f) LCDR3，其包含選自由**QQYSNYPT** (SEQ ID NO: 6)或與**QQYSNYPT**具有至少80%序列一致性之同源序列組成之群之序列；

其中X$_1$為G或A，X$_2$為G或D或Q或E或L，X$_3$為S或M或Q或L或V，X$_4$為G或P或K，X$_5$為A或G，X$_6$為A或I，X$_7$為A或N或R或V，且X$_8$為N或H或V或D。

【請求項17】

如請求項16之雙功能分子，其中該重鏈可變區包含：

a) HCDR1，其包含SEQ ID NO: 1之序列，

b) HCDR2，其包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 18，以及

c) HCDR3，其包含SEQ ID NO: 3之序列，

及/或

輕鏈可變區包含：

d) LCDR1，其包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 9，

e) LCDR2，其包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11及SEQ ID NO: 12，以及

f) LCDR3，其包含SEQ ID NO: 6之序列。

【請求項18】

如請求項17之雙功能分子，其中該重鏈可變區選自由以下組成之群：

a)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 2之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；

b)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 13之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；

c)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 14之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；

d)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 15之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區；以及

e)包含有包含SEQ ID NO: 1之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 17之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 3之序列的HCDR3之重鏈可變區。

【請求項19】

如請求項17或18之雙功能分子，其中該輕鏈可變區選自由以下組成之群：

a)包含有包含SEQ ID NO: 4之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 5之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區；

b)包含有包含SEQ ID NO: 9之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 5之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區；

c)包含有包含SEQ ID NO: 8之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 5之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區；

d)包含有包含SEQ ID NO: 4之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 12之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區；以及

e)包含有包含SEQ ID NO: 4之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 11之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 6之序列的LCDR3之輕鏈可變區。

【請求項20】

如請求項16至19中任一項之雙功能分子，其中該針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段進一步包含重鏈HFR1、HFR2、HFR3及HFR4中之一或多個及/或輕鏈LFR1、LFR2、LFR3及LFR4中之一或多個，其中：

a)該HFR1包含**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX$_9$FT** (SEQ ID NO: 40)或與**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX$_9$FT**具有至少80%序列一致性之同源序列，

b)該HFR2包含**WVRQAPGQX$_{10}$LEWMG** (SEQ ID NO: 41)或與**WVRQAPGQX$_{10}$LEWMG**具有至少80%序列一致性之同源序列，

c)該HFR3序列包含

RVTX$_{16}$TVDX$_{11}$SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCX$_{12}$X$_{13}$ (SEQ ID NO: 42)或與**RVTX$_{16}$TVDX$_{11}$SISTAYMELSRLRSDDTAVYYCX$_{12}$X$_{13}$**具有至少80%序列一致性之同源序列，

d) 該 HFR4 包含 **WGQGTLVTVSS** (SEQ ID NO: 25) 或與**WGQGTLVTVSS**具有至少80%序列一致性之同源序列，

e)該LFR1包含**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC** (SEQ ID NO: 26)或與**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**具有至少80%序列一致性之同源序列，

f)該LFR2包含**WYQQKPGKX$_{14}$PKLLIY** (SEQ ID NO: 43)或與**WYQQKPGKX$_{14}$PKLLIY**具有至少80%序列一致性之同源序列，

g)該LFR3包含**GVPX$_{15}$RFSGSGSGTDFTX$_{17}$TISSLQPEDIATYYC** (SEQ ID NO: 44)或與**GVPX$_{15}$RFSGSGSGTDFTX$_{17}$TISSLQPEDIATYYC**具有至少80%序列一致性之同源序列，且

h) 該 LFR4 包含 **FGQGTKLEIK** (SEQ ID NO: 29) 或與**FGQGTKLEIK**具有至少80%序列一致性之同源序列，

其中X$_9$為T或V，X$_{10}$為G或S，X$_{11}$為T或K，X$_{12}$為A或V，X$_{13}$為R或K，X$_{14}$為A或S，X$_{15}$為S或D，X$_{16}$為M或V，且X$_{17}$為F或L。

【請求項21】

如請求項20之雙功能分子，其中：

該HFR1包含選自由SEQ ID NO: 22及30組成之群之序列，

該HFR2包含選自由SEQ ID NO: 23及31組成之群之序列，

該HFR3包含選自由SEQ ID NO: 24及32-35組成之群之序列，

該HFR4包含SEQ ID NO: 25之序列，

該LFR1包含來自由SEQ ID NO: 26組成之群之序列，

該LFR2包含選自由SEQ ID NO: 27及36組成之群之序列，

該LFR3包含選自由SEQ ID NO: 28及37-38、39、45組成之群之序列，且

該LFR4包含SEQ ID NO: 29之序列。

【請求項22】

如請求項16至21中任一項之雙功能分子，其中該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【請求項23】

如請求項16至22中任一項之雙功能分子，其中該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【請求項24】

如請求項16之雙功能分子，其中該針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段包含一對選自由以下組成之群之重鏈可變區及輕鏈可變區序列：SEQ ID NO: 49/54、50/54、51/54、52/54、49/55、50/55、51/55、52/55、58/62、58/63、58/64、58/65、59/62、59/63、59/64、59/65、60/62、

60/63、60/64及60/65。

【請求項25】

如請求項16至24中任一項之雙功能分子，其中該針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段進一步包含一或多個胺基酸殘基取代或修飾，但保留針對PD-L1之特定結合特異性及/或親和力。

【請求項26】

如請求項25之雙功能分子，其中該等取代或修飾中之至少一者係在CDR序列中之一或多個中及/或在VH或VL序列之非CDR區中之一或多個中。

【請求項27】

如請求項16至26中任一項之雙功能分子，其中該針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段進一步包含免疫球蛋白恆定區，視情況人Ig之恆定區，或視情況人IgG之恆定區。

【請求項28】

如請求項27之雙功能分子，其中該恆定區包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之Fc區。

【請求項29】

如請求項28之雙功能分子，其中該恆定區包含Fc變異體，該Fc變異體相對於對應野生型Fc區具有經減弱之效應功能。

【請求項30】

如請求項29之雙功能分子，其中該Fc變異體包含選自由以下組成之群之一或多個胺基酸殘基取代：220S、226S、228P、229S、233P、234V、234G、234A、234F、234A、235A、235G、235E、236E、

236R、237A、237K、238S、267R、268A、268Q、269R、297A、297Q、297G、309L、318A、322A、325L、328R、330S、331S及其任何組合，其中該Fc區中之殘基編號為如Kabat中之EU索引之編號。

【請求項31】

如請求項29或30中任一項之雙功能分子，其中該Fc變異體包含選自由以下組成之群之突變之組合：a) K322A、L234A及L235A；b) P331S、L234F及L235E；c) L234A及L235A；c) N297A；d) N297Q；e) N297G；f) L235E；g) L234A及L235A (IgG1)；h) F234A及L235A (IgG4)；i) H268Q、V309L、A330S及P331S (IgG2)；j) V234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S及P331S (IgG2)，其中該Fc區中之殘基編號為如Kabat中之EU索引之編號。

【請求項32】

如請求項29至31中任一項之雙功能分子，其中該Fc變異體包含SEQ ID NO: 81之胺基酸序列。

【請求項33】

如請求項16至32中任一項之雙功能分子，其中該針對PD-L1之抗體或其抗原結合片段為人源化的。

【請求項34】

如請求項16至33中任一項之雙功能分子，其中該抗原結合片段為雙功能抗體、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fv片段、二硫鍵穩定之Fv片段(dsFv)、$(dsFv)_2$、雙特異性dsFv (dsFv-dsFv')、二硫鍵穩定之雙功能抗體(ds雙功能抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙功能抗體)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體、奈米抗體、域抗體及二價域抗體。

【請求項35】

如請求項16至34中任一項之雙功能分子，其中該抗體或其抗原結合片段能夠與人PD-L1及食蟹獼猴PD-L1兩者結合。

【請求項36】

如請求項1至15中任一項之雙功能分子，其中該第一部分包含與如請求項16至35中任一項之抗體或其抗原結合片段競爭結合至PD-L1之抗體或其抗原結合片段。

【請求項37】

如請求項16至36中任一項之雙功能分子，其中該免疫抑制性細胞介素包含轉型生長因子β (TGF-β)超家族、IL-1或血管內皮生長因子(VEGF)中之細胞介素。

【請求項38】

如請求項37之雙功能分子，其中TGF-β超家族中之免疫抑制性細胞介素包含TGF-β、骨成形性蛋白(BMP)、活化素、NODAL以及生長及分化因子(GDF)。

【請求項39】

如請求項16至38中任一項之雙功能分子，其中該免疫抑制性細胞介素為TGF-β。

【請求項40】

如請求項16至39之雙功能分子，其中該第二部分包含TGFβ結合部分。

【請求項41】

如請求項40之雙功能分子，其中該TGFβ結合部分包含可溶性TGFβ

受體(TGFβR)或其TGFβ結合片段或變異體、或針對TGFβ之抗體及其抗原結合片段。

【請求項42】

如請求項41之雙功能分子，其中該可溶性TGFβR包含該TGFβR之胞外域(ECD)或其TGFβ結合片段或變異體。

【請求項43】

如請求項42之雙功能分子，其中該TGFβR選自由以下組成之群：TGFβ受體I (TGFβRI)、TGFβ受體II (TGFβRII)、TGFβ受體III (TGFβRIII)及其任何組合。

【請求項44】

如請求項42之雙功能分子，其中該TGFβR為TGFβRII。

【請求項45】

如請求項44之雙功能分子，其中相對於TGFβ2及TGFβ3，該TGFβRII選擇性地結合至TGFβ1。

【請求項46】

如請求項45之雙功能分子，其中該TGFβ1為人TGFβ1或小鼠TGFβ1。

【請求項47】

如請求項42至46中任一項之雙功能分子，其中該TGFβR之ECD包含SEQ ID NO: 66、79、78、77之胺基酸序列或與該胺基酸序列具有至少80%序列一致性、但保留針對TGF-β之特定結合特異性及/或親和力之序列。

【請求項48】

如請求項36之雙功能分子，其中該第二部分包含IL-1結合部分或IL-1受體(IL-1R)結合部分。

【請求項49】

如請求項48之雙功能分子，其中該IL-1結合部分包含可溶性IL-1R、IL-1R之IL-1結合片段或變異體、或針對IL-1之抗體或其抗原結合片段。

【請求項50】

如請求項49之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區及/或輕鏈可變區係來自選自由以下組成之群之抗IL-1α抗體：XB2001、魯吉珠單抗、LY2189102及貝邁奇單抗，或來自選自由以下組成之群之抗IL-1β抗體：SSGJ-613、CDP484、卡那單抗及吉伏組單抗。

【請求項51】

如請求項49之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 104或SEQ ID NO: 112之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 105或SEQ ID NO: 113之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 106或SEQ ID NO: 114之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 107或SEQ ID NO: 115之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 108或SEQ ID NO: 116之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 109或SEQ ID NO: 117之序列的LCDR3。

【請求項52】

如請求項49之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID

NO: 104之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 105之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 106之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 107之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 108之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 109之序列的LCDR3。

【請求項53】

如請求項49之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 112之序列的HCDR1、包含SEQ ID NO: 113之序列的HCDR2及包含SEQ ID NO: 114之序列的HCDR3，該輕鏈可變區包含有包含SEQ ID NO: 115之序列的LCDR1、包含SEQ ID NO: 116之序列的LCDR2及包含SEQ ID NO: 117之序列的LCDR3。

【請求項54】

如請求項49之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 110及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 111及與以上序列具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【請求項55】

如請求項49之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 102及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 103

及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【請求項56】

如請求項49之雙功能分子，其中該針對IL-1之抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 110及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列，該輕鏈可變區包含選自由以下組成之群之序列：SEQ ID NO: 111及與其具有至少80%序列一致性之其同源序列。

【請求項57】

如請求項49之雙功能分子，其中該雙功能分子包含有包含SEQ ID NO: 118或SEQ ID NO: 120之胺基酸序列的重鏈及/或包含SEQ ID NO: 119或SEQ ID NO: 121之胺基酸序列的輕鏈。

【請求項58】

如請求項49之雙功能分子，其中該IL-1結合部分包含：IL-1RI之胞外域(ECD)；IL-1RI、IL-1RI之ECD、IL-1RII或IL-1RII之ECD、或IL-1RAP或IL-1RAP之ECD、IL-1sRI或IL-1sRII中任一者之IL-1結合片段或變異體。

【請求項59】

如請求項48之雙功能分子，其中該IL-1R結合部分包含IL-1Ra或其IL-1結合片段或變異體、或針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段。

【請求項60】

如請求項59之雙功能分子，其中該針對IL-1R之抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區，該重鏈可變區及/或輕鏈可變區係來自選自由以下組成之群之抗體：司柏索利單抗、艾特利單抗、伊姆西多單

抗、AMG 108、邁瑞利單抗、尼達利單抗、MEDI8968、REGN6490、HB0034及CSC012。

【請求項61】

如請求項60之雙功能分子，其中該IL-1R結合部分包含SEQ ID NO: 67或76之胺基酸序列、或與SEQ ID NO: 67或76具有至少80%序列一致性之胺基酸序列、或其IL-1結合片段或變異體。

【請求項62】

如請求項48或49中任一項之雙功能分子，其中該IL-1為IL-1α或IL-1β。

【請求項63】

如請求項62之雙功能分子，其中該IL-1β為人IL-1β。

【請求項64】

如請求項16至36中任一項之雙功能分子，其中該第二部分刺激抗腫瘤免疫且包含免疫刺激性多肽。

【請求項65】

如請求項64之雙功能分子，其中該免疫刺激性多肽包含介白素(IL)-2(IL-2)、IL-15、IL-21、IL-10、IL-12、IL-23、IL-27、IL-35、粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、可溶性CD4、可溶性LAG-3、IFN-α或其功能等效物。

【請求項66】

如請求項65之雙功能分子，其中該可溶性LAG-3包含該LAG-3之胞外域(ECD)或其MHCII結合變異體。

【請求項67】

如請求項16至36中任一項之雙功能分子，其中該第二部分刺激抗腫瘤免疫且包含免疫抑制性受體信號傳導之拮抗劑。

【請求項68】

如請求項67之雙功能分子，其中該免疫抑制性受體為信號調節蛋白α(SIRPα)。

【請求項69】

如請求項68之雙功能分子，其中該第二部分阻斷CD47與SIRPα之間的相互作用。

【請求項70】

如請求項69之雙功能分子，其中該第二部分包含CD47結合域或SIRPα結合域。

【請求項71】

如請求項70之雙功能分子，其中該CD47結合域包含可溶性SIRPα或其CD47結合片段或變異體、或抗CD47抗體或其抗原結合片段。

【請求項72】

如請求項71之雙功能分子，其中該可溶性SIRPα包含該SIRPα之胞外域(ECD)或其CD47結合變異體。

【請求項73】

如請求項70之雙功能分子，其中該CD47結合域包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或與該胺基酸序列具有至少80%序列一致性、但保留針對CD47之結合特異性之胺基酸序列。

【請求項74】

如請求項70之雙功能分子，其中該SIRPα結合域包含可溶性CD47或

其SIRPα結合片段或變異體、或抗SIRPα抗體或其抗原結合片段。

【請求項75】

如請求項74之雙功能分子，其中該可溶性CD47包含該CD47之胞外域(ECD)或其SIRPα結合片段或變異體、抗SIRPα抗體或其抗原結合片段。

【請求項76】

如前述請求項中任一項之雙功能分子，其進一步包含連接該第一部分及該第二部分之連接子。

【請求項77】

如請求項76之雙功能分子，其中該連接子選自由以下組成之群：可裂解連接子、不可裂解連接子、肽連接子、可撓性連接子、剛性連接子、螺旋連接子及非螺旋連接子。

【請求項78】

如請求項77之雙功能分子，其中該連接子包含((G)nS)m之胺基酸序列，其中m及n獨立地為選自0至30之整數。

【請求項79】

如請求項16至78中任一項之雙功能分子，其中該雙功能分子包含該等第二部分中之一或多者。

【請求項80】

如請求項79之雙功能分子，其中該等第二部分中之至少一者連接至該第一部分之多肽鏈之N端或C端。

【請求項81】

如請求項79之雙功能分子，其中該等第二部分中之至少一者連接

至：a)該第一部分之重鏈之N端或C端，或b)該第一部分之輕鏈之N端或C端。

【請求項82】

如請求項79之雙功能分子，其中該等第二部分中之至少一者連接至該第一部分之重鏈恆定區之C端。

【請求項83】

如請求項79之雙功能分子，其中該等第二部分中之各者分別連接至該第一部分之各重鏈恆定區之C端。

【請求項84】

如請求項79之雙功能分子，其中該雙功能分子包含分別連接至以下之該等第二部分中之超過一者：該第一部分之重鏈之N端、該第一部分之重鏈之C端、該第一部分之輕鏈之N端、該第一部分之輕鏈之C端或其任何組合。

【請求項85】

如請求項79至84中任一項之雙功能分子，其中該雙功能分子包含同二聚體重鏈或異二聚體重鏈。

【請求項86】

如請求項79至84中任一項之雙功能分子，其中該等重鏈就該第二部分之存在或位置而言為異二聚體的。

【請求項87】

如請求項86之雙功能分子，其中該等異二聚體重鏈包含一個具有該第二部分之重鏈及另一不具有該第二部分之重鏈。

【請求項88】

如請求項86之雙功能分子，其中該等異二聚體重鏈進一步包含以阻礙同二聚及/或有利於異二聚之方式締合之異二聚體Fc區。

【請求項89】

如請求項86之雙功能分子，其中該等異二聚體Fc區能夠經由杵-臼、疏水相互作用、靜電相互作用、親水相互作用或經提高之可撓性來締合成異二聚體。

【請求項90】

如請求項88至89中任一項之雙功能分子，其中該等異二聚體Fc區在一個Fc多肽鏈中包含Y349C、T366S、L368A或Y407V或其任何組合且在另一Fc多肽鏈中包含S354C或T366W或其組合，其中該Fc多肽鏈中之殘基編號為如Kabat中之EU索引之編號。

【請求項91】

如前述請求項中任一項之雙功能分子，其進一步連接至一或多個結合物部分。

【請求項92】

如請求項91之雙功能分子，其中該結合物部分包含清除修飾劑、化學治療劑、毒素、放射性同位素、鑭系元素、發光標記、螢光標記、酶-受質標記、DNA烷化劑、拓樸異構酶抑制劑、微管蛋白結合劑或諸如雄激素受體抑制劑之其他抗癌藥物。

【請求項93】

一種醫藥組合物或套組，其包含如前述請求項中任一項之雙功能分子及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項94】

一種經分離聚核苷酸，其編碼如請求項16至92中任一項之雙功能分子。

【請求項95】

一種載體，其包含如請求項94之經分離聚核苷酸。

【請求項96】

一種宿主細胞，其包含如請求項95之載體。

【請求項97】

一種表現如請求項16至92中任一項之雙功能分子之方法，其包含在表現如請求項95之載體之條件下培養如請求項96之宿主細胞。

【請求項98】

一種治療、預防或緩解個體之PD-L1相關疾病之方法，其包含向該個體投與治療有效量之如請求項16至92中任一項之雙功能分子及/或如請求項93之醫藥組合物或套組。

【請求項99】

如請求項98之方法，其中該疾病為免疫相關疾病或病症、癌症或傳染病。

【請求項100】

如請求項99之方法，其中該癌症選自由以下組成之群：肺癌(例如，非小細胞肺癌)、肝癌、胰臟癌、乳癌、支氣管癌、骨癌、肝及膽管癌、卵巢癌、睪丸癌、腎癌、膀胱癌、頭頸癌、脊柱癌、腦癌、子宮頸癌、子宮癌、子宮內膜癌、結腸癌、結直腸癌、前列腺癌、胃食道癌、直腸癌、肛門癌、胃腸癌、皮膚癌、垂體癌、胃癌、陰道癌、甲狀腺癌、神經膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、黑色素瘤、骨髓化生不良症候群、肉瘤、畸胎

瘤、神經膠質瘤及腺癌。

【請求項101】

如請求項98至100中任一項之方法，其中該個體已經鑑定為具有表現PD-L1之癌細胞。

【請求項102】

如請求項98至101中任一項之方法，其中該PD-L1相關疾病對PD-L1/PD-1單一療法具有抗性。

【請求項103】

如請求項98至102中任一項之方法，其中該個體為人。

【請求項104】

如請求項98至103中任一項之方法，其進一步包含投與治療有效量之第二治療劑。

【請求項105】

如請求項104之方法，其中該第二治療劑選自化學治療劑、抗癌藥物、放射療法、免疫治療劑、抗血管生成劑、靶向治療劑、細胞治療劑、基因治療劑、激素治療劑或細胞介素。

【請求項106】

一種如請求項16至92中任一項之雙功能分子用於製造用以治療個體之PD-L1相關疾病或病狀之藥劑的用途。

【請求項107】

一種治療、預防或緩解個體之疾病或病狀之方法，該疾病或病狀將受益於免疫抑制性細胞介素之抑制、持續免疫反應之誘導或抗腫瘤免疫之刺激，該方法包含投與有效量之如請求項16至92中任一項之雙功能分

子。

【請求項108】

如請求項107之方法，其中該免疫抑制性細胞介素為TGFβ。

【請求項109】

如請求項108之方法，其中該疾病或病狀為TGFβ相關疾病或病狀。

【請求項110】

如請求項109之方法，其中該TGFβ相關疾病為癌症、纖維化疾病或腎病。

【請求項111】

如請求項107之方法，其中該免疫抑制性細胞介素為IL-1。

【請求項112】

如請求項111之方法，其中該疾病或病狀為IL-1相關疾病或病狀。

【請求項113】

如請求項107之方法，其中該疾病或病狀將受益於藉由用免疫刺激性多肽刺激MHCII信號傳導進行之持續免疫反應之誘導。

【請求項114】

如請求項113之方法，其中該免疫刺激性多肽為可溶性LAG-3。

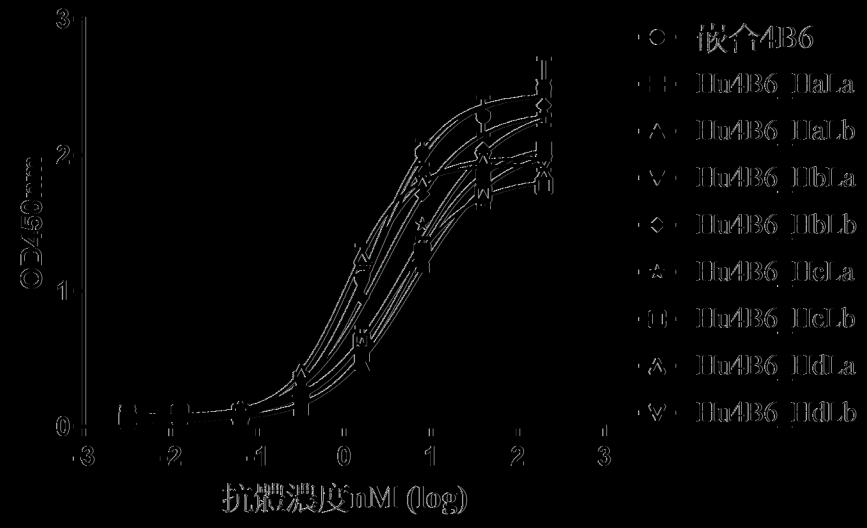
【請求項115】

如請求項107之方法，其中該疾病或病狀將受益於藉由抑制免疫抑制性受體信號傳導進行之抗腫瘤免疫之刺激。

【請求項116】

如請求項115之方法，其中該免疫抑制性受體為SIRPα。

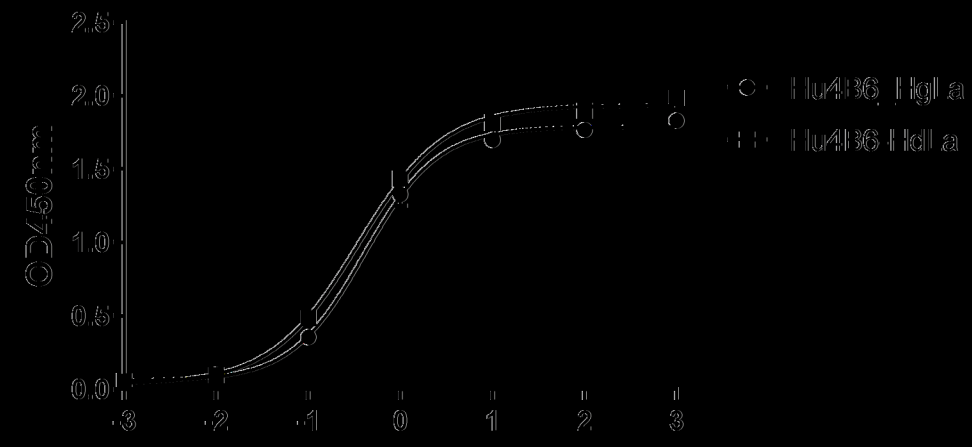
(發明圖式)



	嵌合4B6	Hu4B6_HaLa	Hu4B6_HaLb	Hu4B6_HbLa	Hu4B6_HbLb
EC50	2.047	5.158	6.263	2.375	2.805

Hu4B6_HcLa	Hu4B6_HcLb	Hu4B6_HdLa	Hu4B6_HdLb
5.738	3.437	1.042	1.465

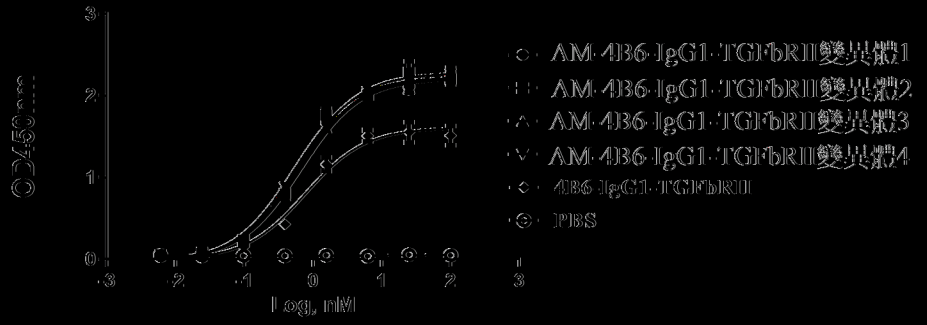
(圖1)



	Hu4B6_HgLa	Hu4B6_HdLa
EC50	0.4069	0.3469

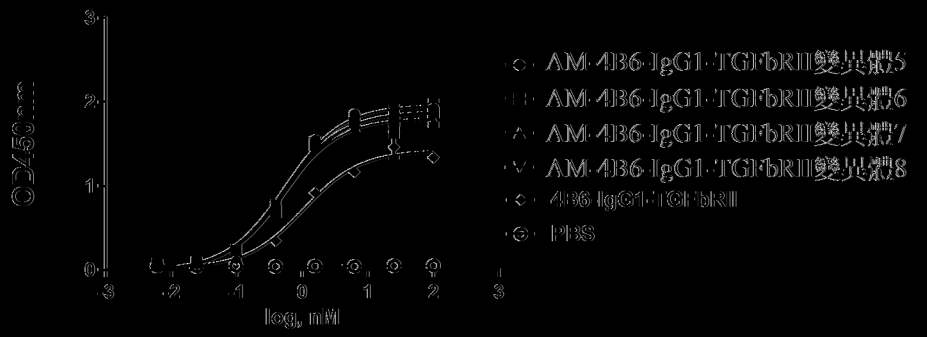
(圖2)

根據ELISA之AM-4B6(IgG1-TGFbRII)親和力分級



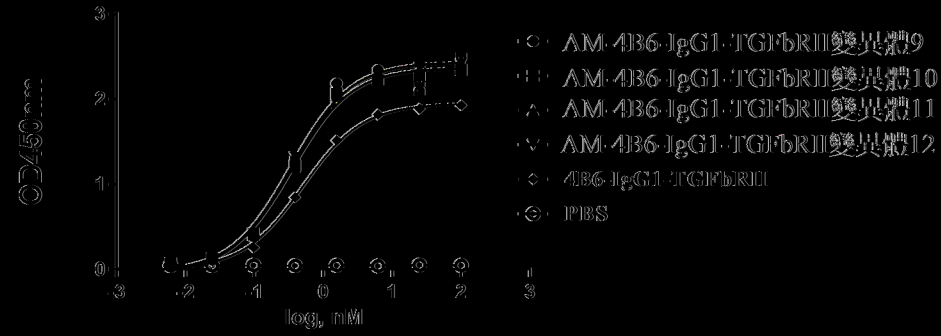
|(圖3A)|

根據ELISA之AM-4B6(IgG1-TGFbRII)親和力分級



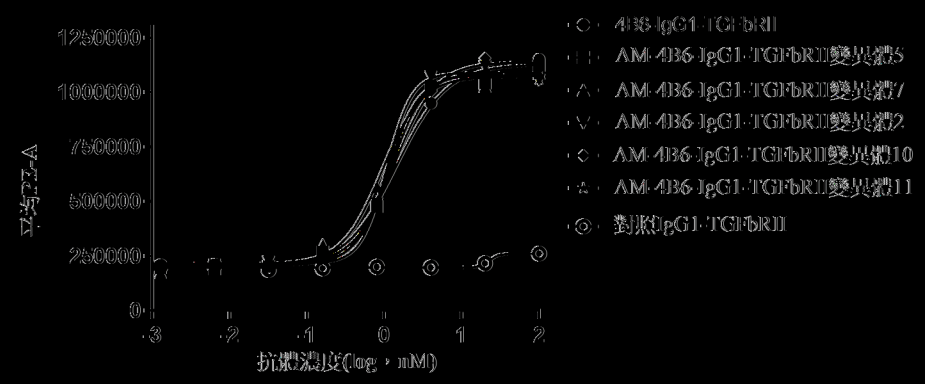
|(圖3B)|

根據ELISA之AM-4B6(IgG1-TGFbRII)親和力分級



|(圖3C)|

根據FACS分析之AM-4B6-IgG1-TGFbRII變異體親和力分級

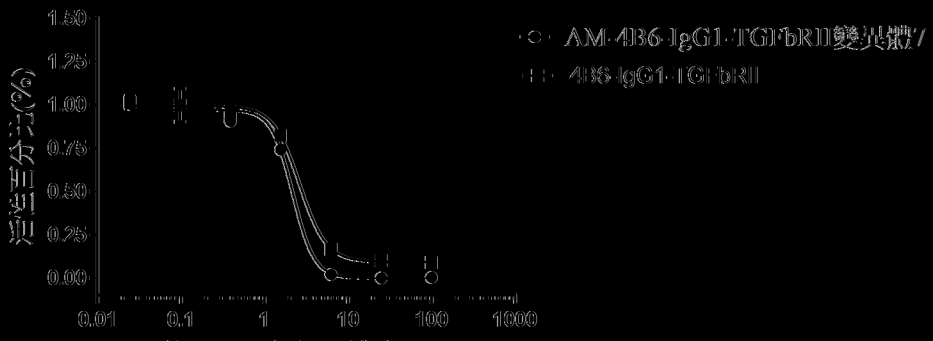


	4B6-IgG1-TGFbRII	AM-4B6-IgG1-TGFbRII變異體5	AM-4B6-IgG1-TGFbRII變異體7
EC50	1.436	1.196	0.9404

AM-4B6-IgG1-TGFbRII變異體2	AM-4B6-IgG1-TGFbRII變異體10	AM-4B6-IgG1-TGFbRII變異體11
1.074	1.363	1.11

|(|[4]|4)|

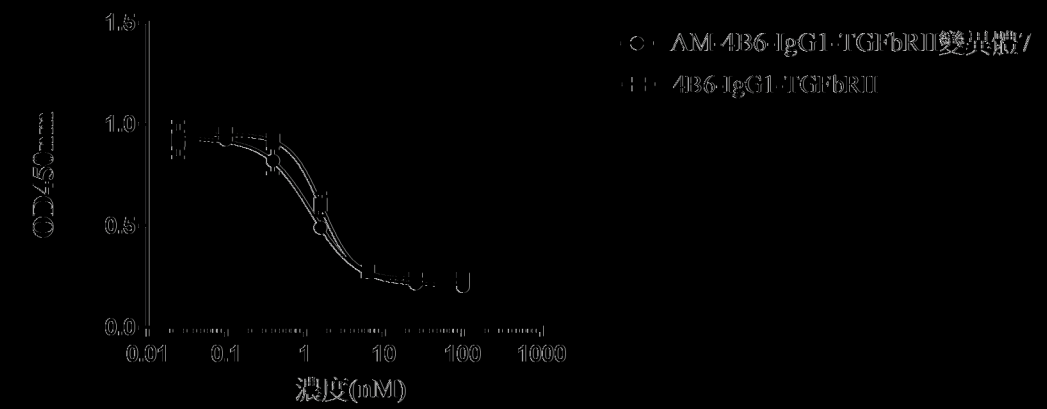
對hPD-L1/PD-1結合之阻斷



	AM-4B6-IgG1-TGFbRII變異體7	4B6-IgG1-TGFbRII
IC50	2.2	2.641

圖(圖5A)

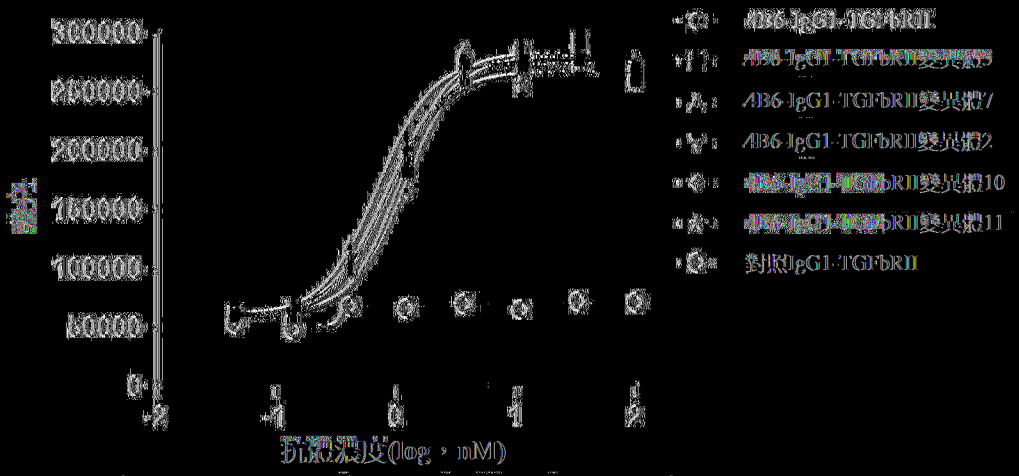
對hPD-L1/B7-1結合之阻斷



	AM-4B6-IgG1-TGFbRII變異體7	4B6-IgG1-TGFbRII
IC50	1.194	1.608

圖(圖5B)

AM-4B6-IgG1-TGFbRII變異體對PD-L1/PD-1之阻斷

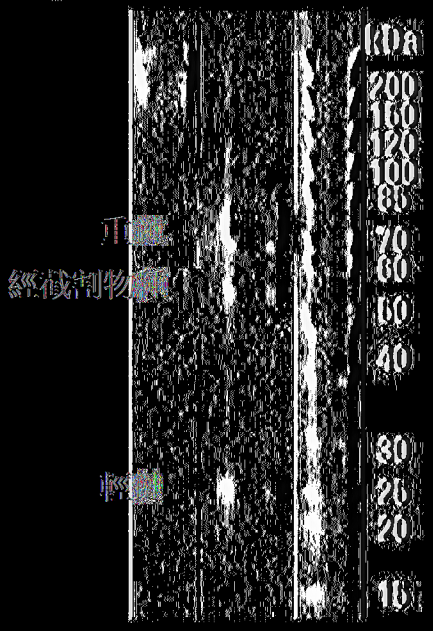


	4B6-IgG1-TGFbRII	4B6-IgG1-TGFbRII變異體5	4B6-IgG1-TGFbRII變異體7
EC50	0.9333	1.073	0.7112

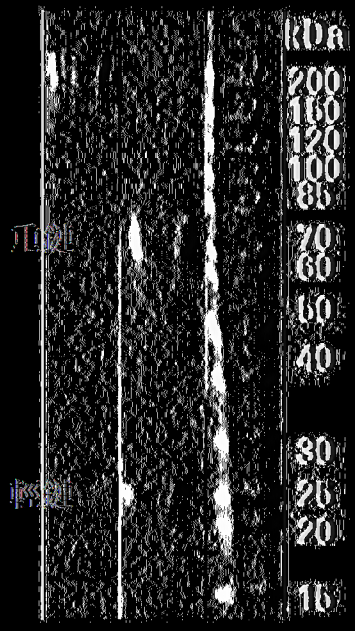
4B6-IgG1-TGFbRII變異體2	4B6-IgG1-TGFbRII變異體10	4B6-IgG1-TGFbRII變異體11
0.8679	1.203	0.8934

(圖6)

經穩定細胞株表現之
Hu4B6_HgLa_hIgG1_TGFbRII (1-136)

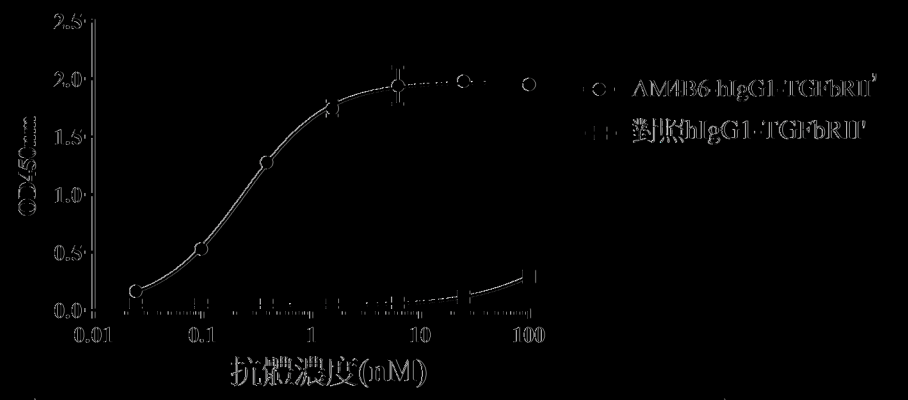


經穩定細胞株表現之
AM4B6_hIgG1_TGFbRII (20-136)



|(圖7)|

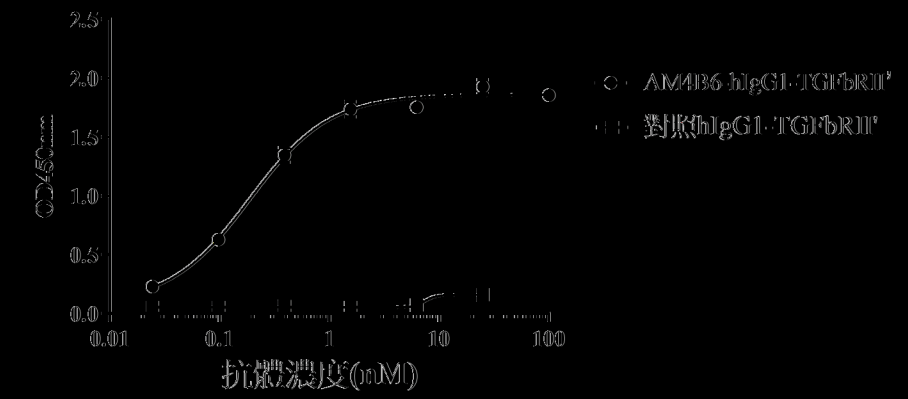
與人PD-L1之結合



	AM4B6 hIgG1-TGFbRII'	對照hIgG1-TGFbRII'
EC50	0.2397	151.8

(圖8A)

與食蟹獼猴PD-L1之結合



	AM4B6 hIgG1-TGFbRII'	對照hIgG1-TGFbRII'
EC50	0.1891	~ 7.398

(圖8B)

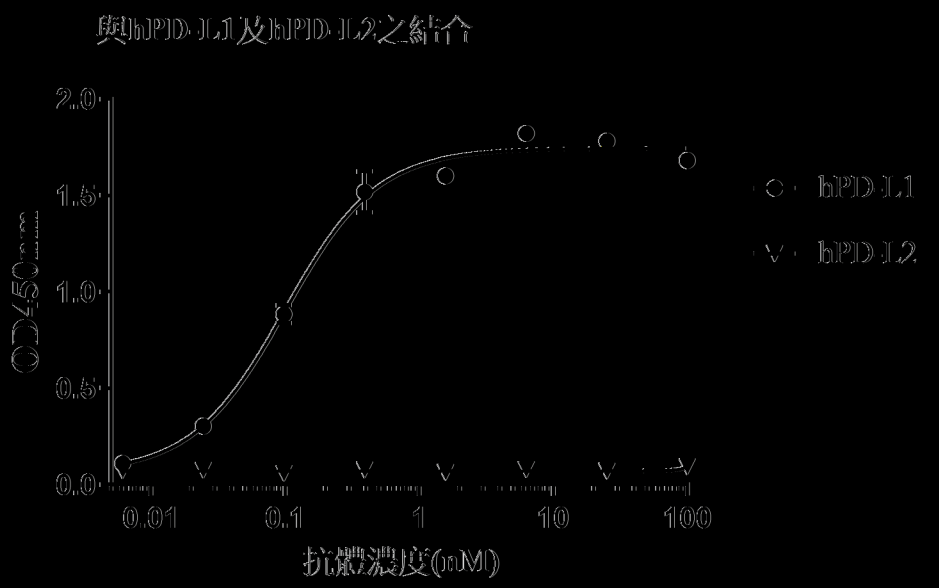

與hPD-L1及hPD-L2之結合
OD450nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度(nM)
hPD-L1
hPD-L2

圖9A

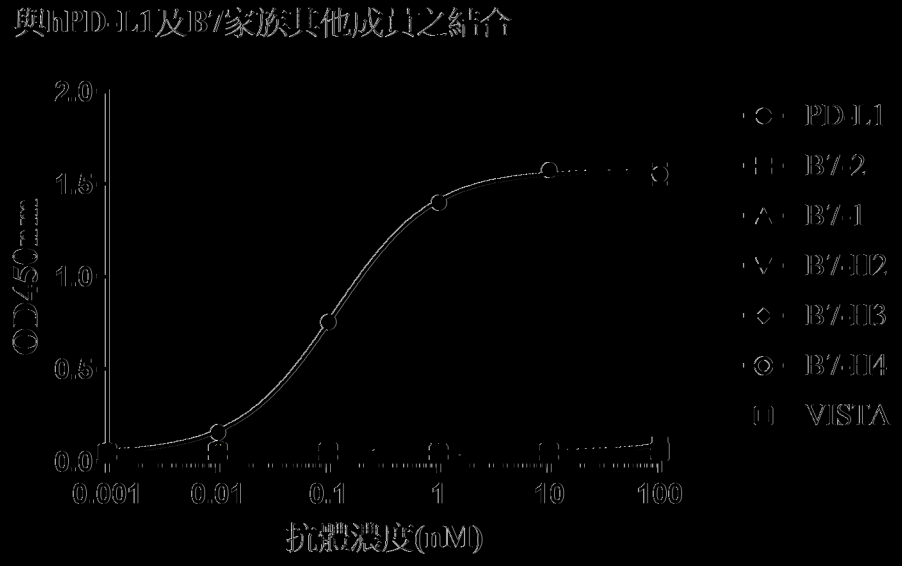
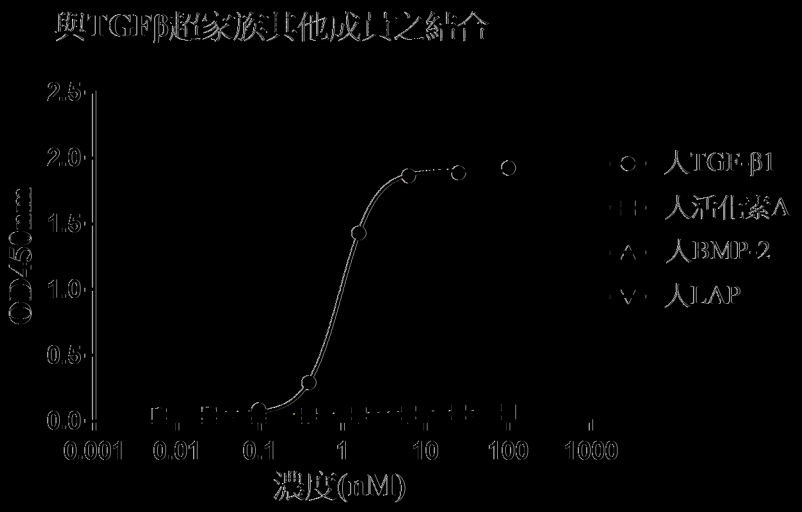
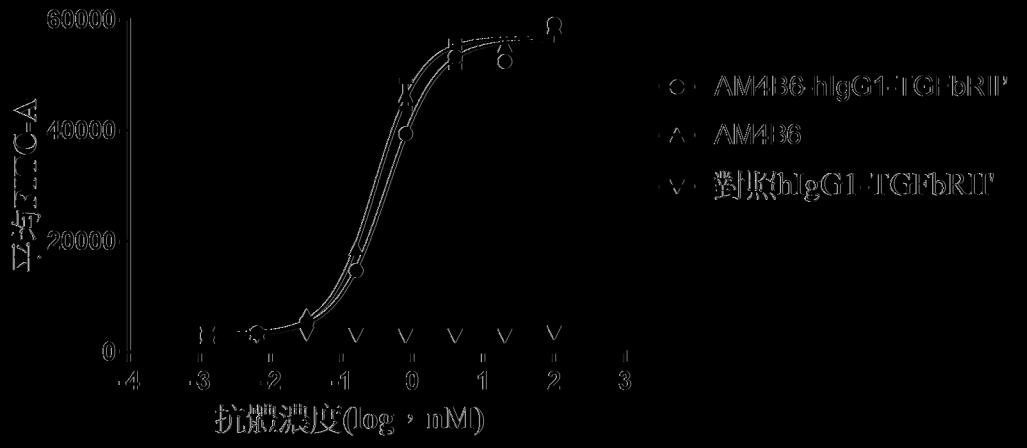

與hPD-L1及B7家族其他成員之結合
OD450nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗體濃度(nM)
PD-L1
B7-2
B7-1
B7-H2
B7-H3
B7-H4
VISTA

圖9B


與TGFβ超家族其他成員之結合
OD450 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
人TGF-β1
人活化素A
人BMP-2
人LAP

[圖9C]

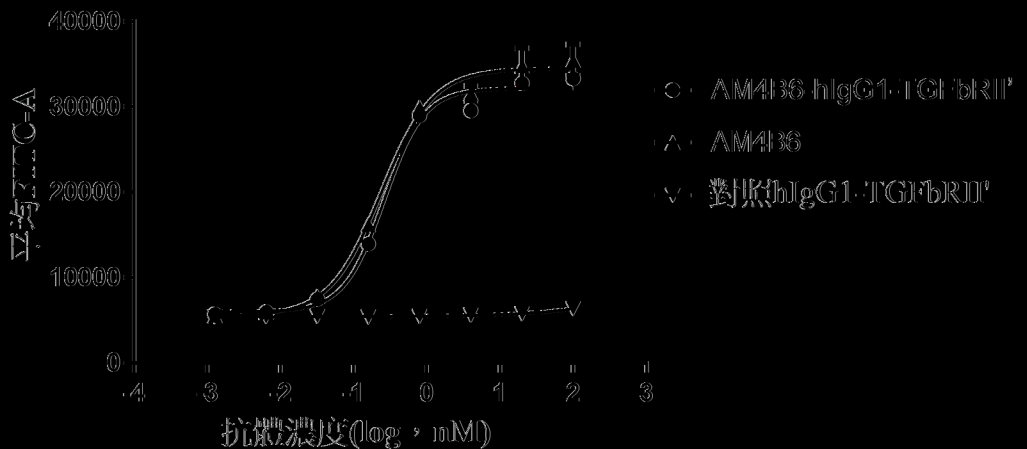
與MC38/hPD-L1細胞之結合



	AM4B6-hIgG1-TGFbRII'	AM4B6
EC50	0.4373	0.299

圖10A

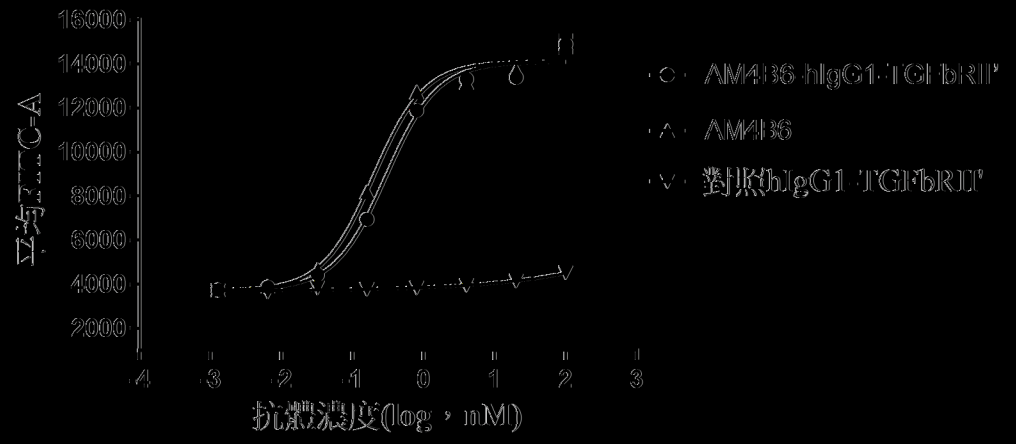
與EMT6/hPD-L1細胞之結合



	AM4B6-hIgG1-TGFbRII'	AM4B6
EC50	0.2614	0.2403

圖10B

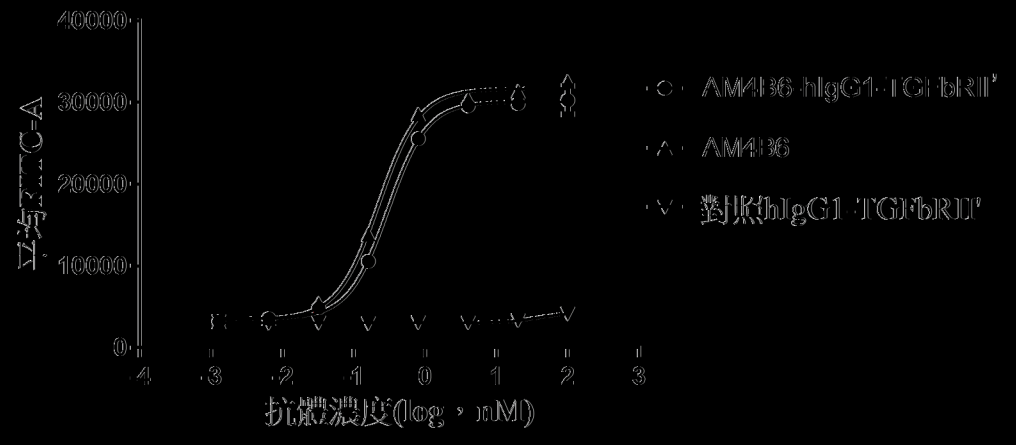
與NCI-H292細胞之結合



	AM4B6 hIgG1-TGFbRII'	AM4B6
EC50	0.2982	0.199

(圖10C)

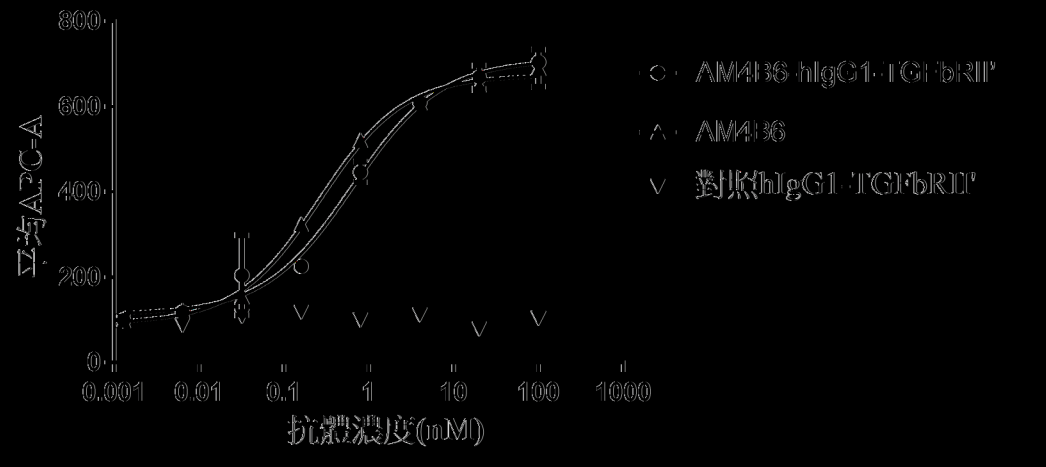
與NCI-H460細胞之結合



	AM4B6 hIgG1-TGFbRII'	AM4B6
EC50	0.2997	0.2224

(圖10D)

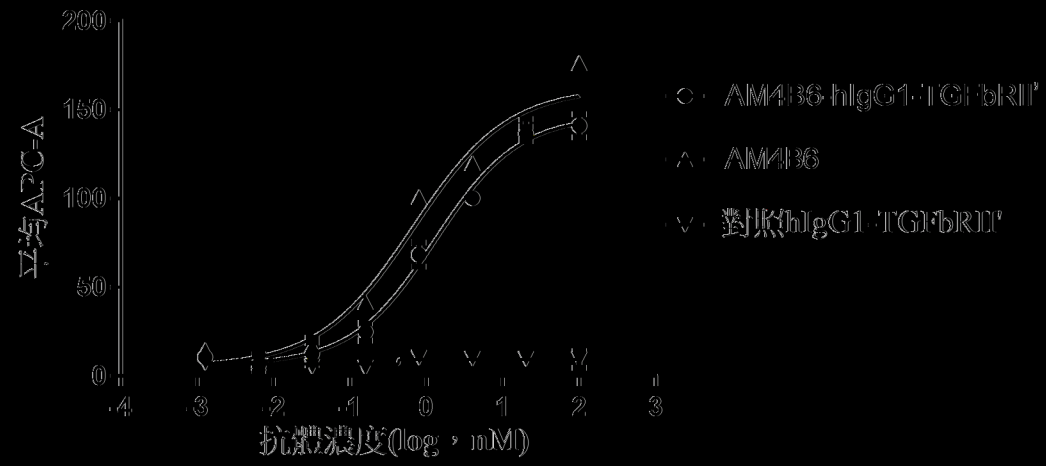
與經活化人PBMC之結合



	AM4B6 hIgG1-TGFbRII'	AM4B6
EC50	0.6437	0.267

(圖10E)

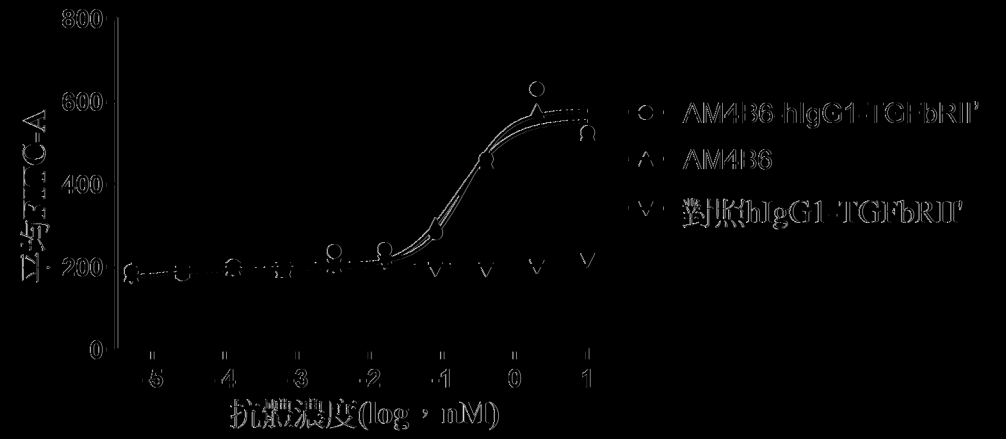
與經活化食蟹獼猴PBMC之結合



	AM4B6 hIgG1-TGFbRII'	AM4B6
EC50	1.306	0.684

(圖10F)

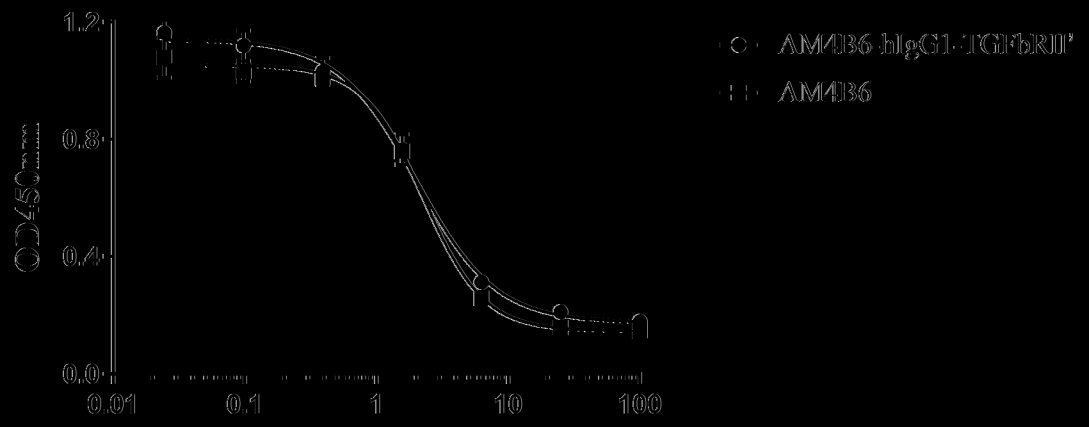
與於經活化人T細胞上表現之hPD-L1之結合



	AM4B6-hIgG1-TGFbRII'	AM4B6	對照hIgG1-TGFbRII'
EC50	0.2064	0.1604	~ 7.407e-013

(圖11)

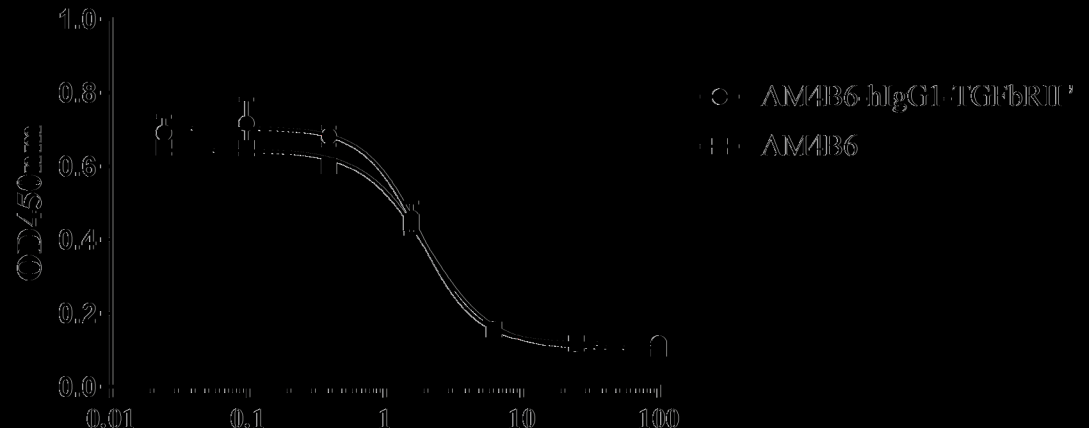
對hPD-L1/hPD-1結合之阻斷



	AM4B6-hIgG1-TGFbRII'	AM4B6
IC50	2.022	2.28

(圖12A)

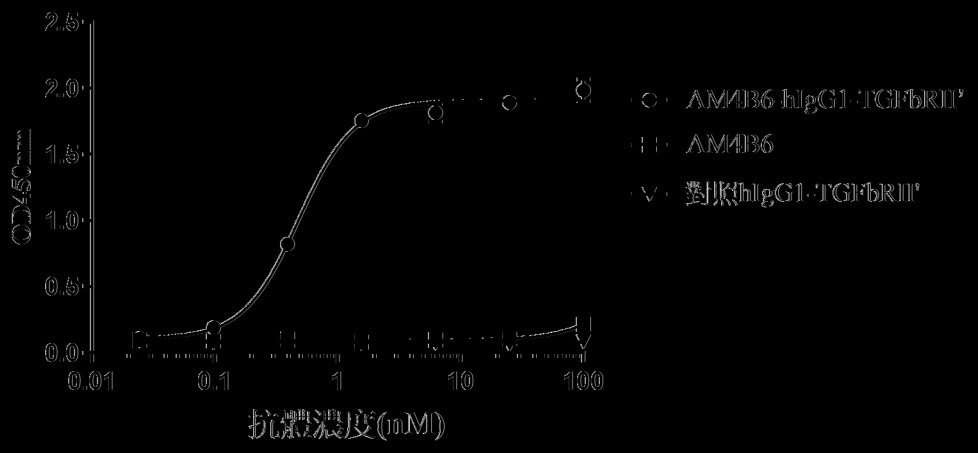
對食蟹獼猴PD-L1/食蟹獼猴PD-1結合之阻斷



	AM4B6-hIgG1-TGFbRII'	AM4B6
IC50	1.828	2.055

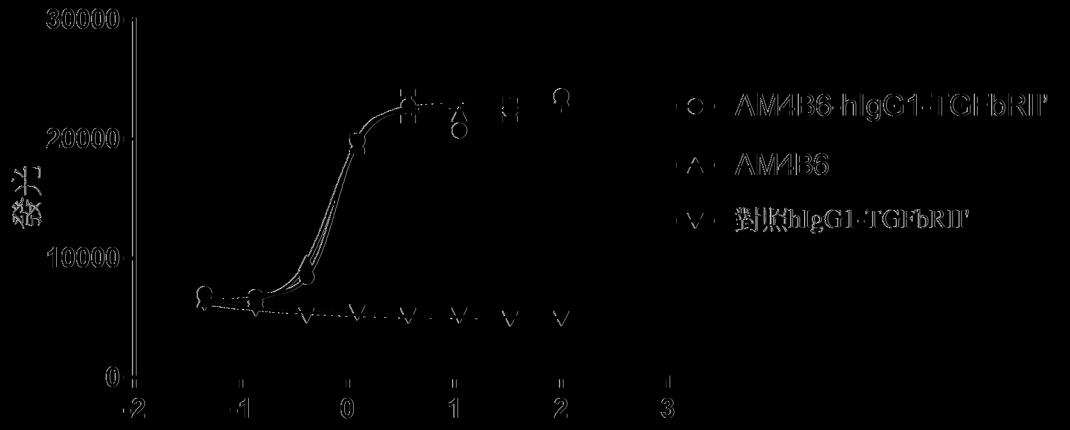
(圖12B)

與hPD-L1及hTGFβ1之同時結合



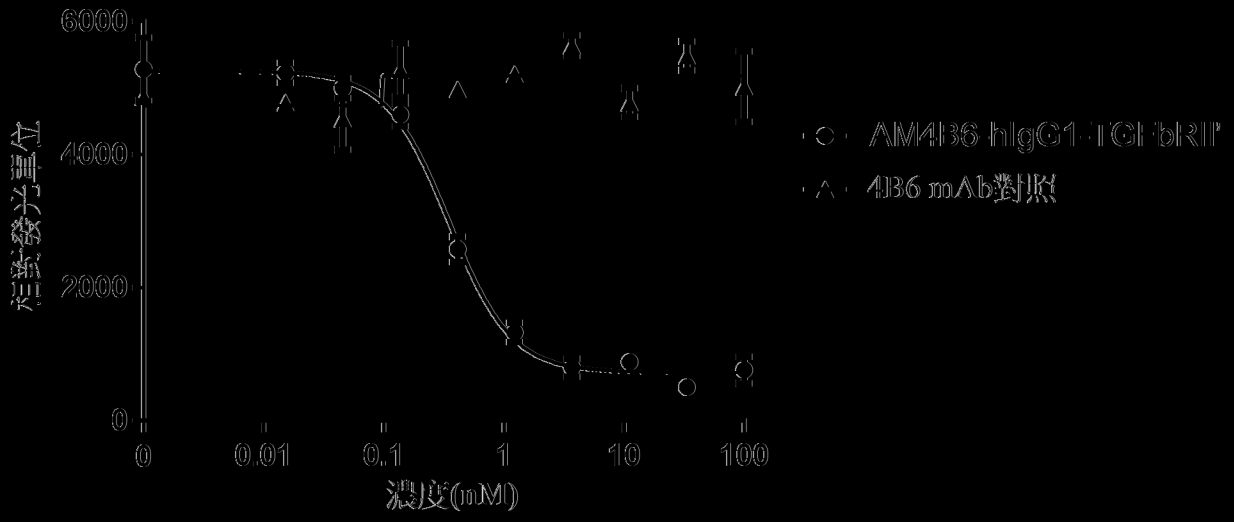
[圖13]

使用報導基分析之阻斷hPDL1



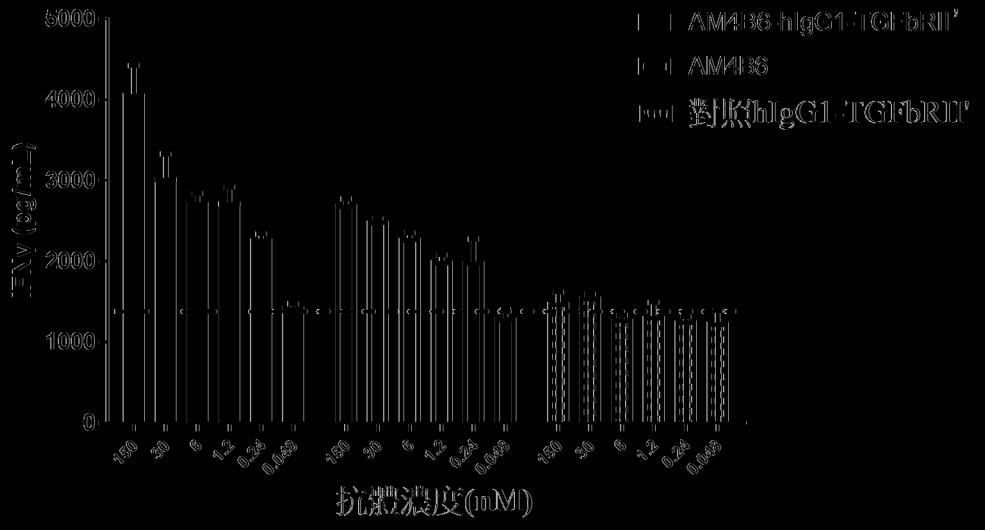
	AM4B6 hIgG1-TGFbRII'	AM4B6
IC50	0.7713	0.7144

[圖14]

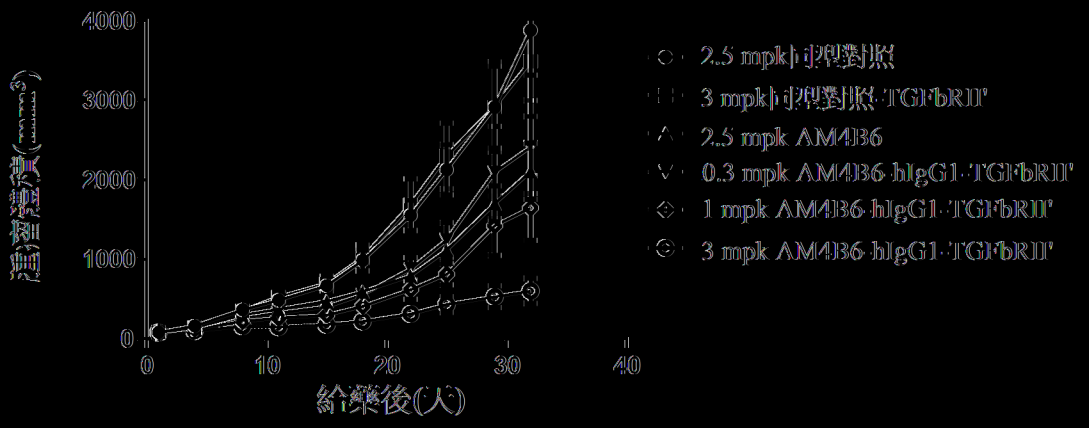


[圖15]

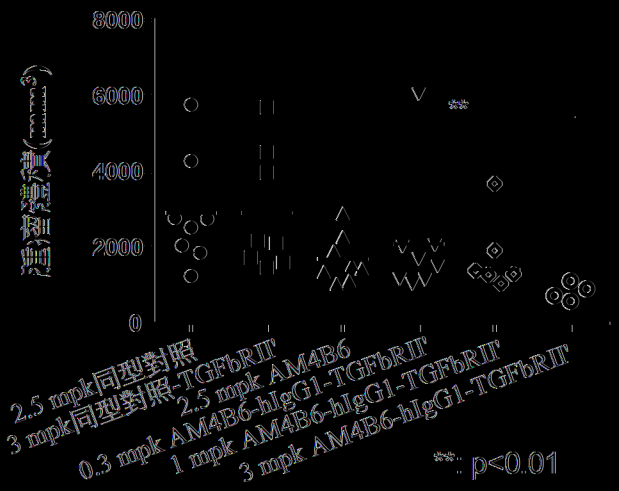
M4B6 hIgG1-TGFbRII'對經結核菌素(TB)刺激之PBMC的作用
(DC供體：TPCS、PB025C、A10K546006)



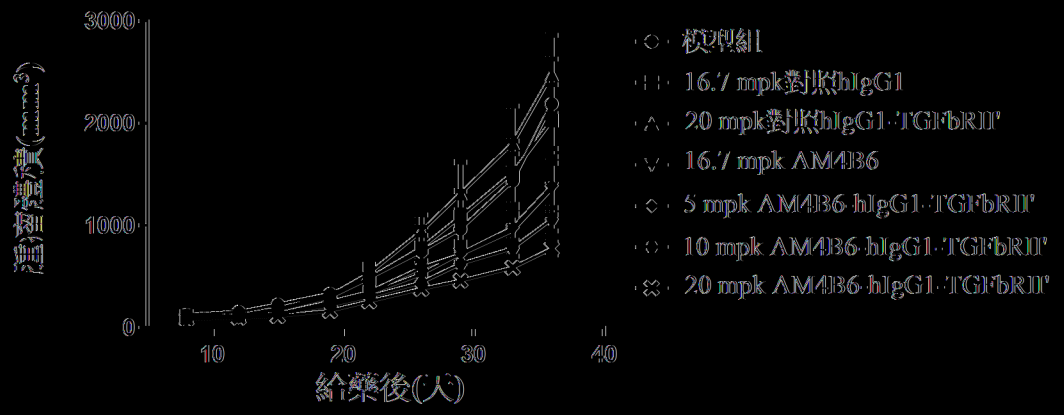
[圖16]


腫瘤體積(mm³)
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
給藥後(天)
2.5 mpk同型對照
3 mpk同型對照-TGFbRII'
2.5 mpk AM4B6
0.3 mpk AM4B6-hIgG1-TGFbRII'
1 mpk AM4B6-hIgG1-TGFbRII'
3 mpk AM4B6-hIgG1-TGFbRII'

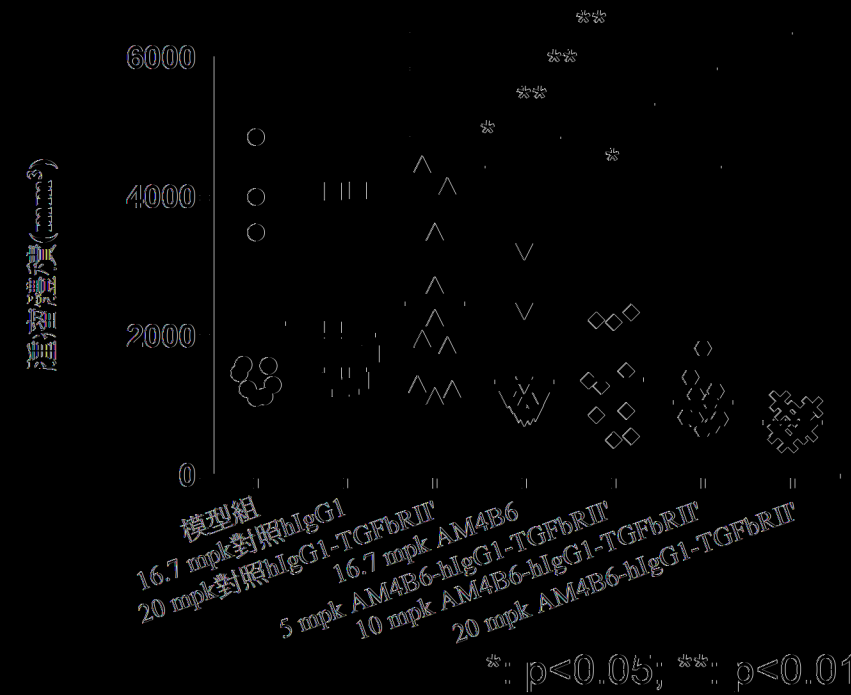
|(圖1'/A)|


腫瘤體積(mm³)
8000
6000
4000
2000
0
**
2.5 mpk同型對照
3 mpk同型對照-TGFbRII'
2.5 mpk AM4B6
0.3 mpk AM4B6-hIgG1-TGFbRII'
1 mpk AM4B6-hIgG1-TGFbRII'
3 mpk AM4B6-hIgG1-TGFbRII'
**: p<0.01

(圖1'/B)|

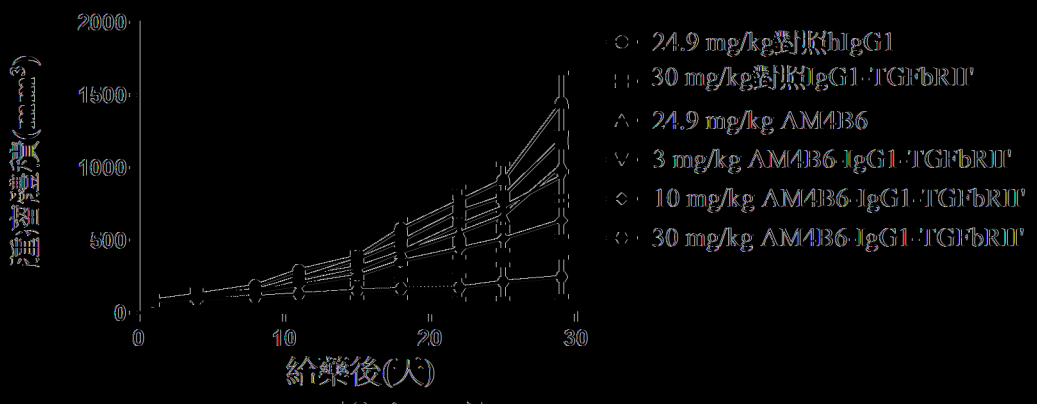


(圖18A)

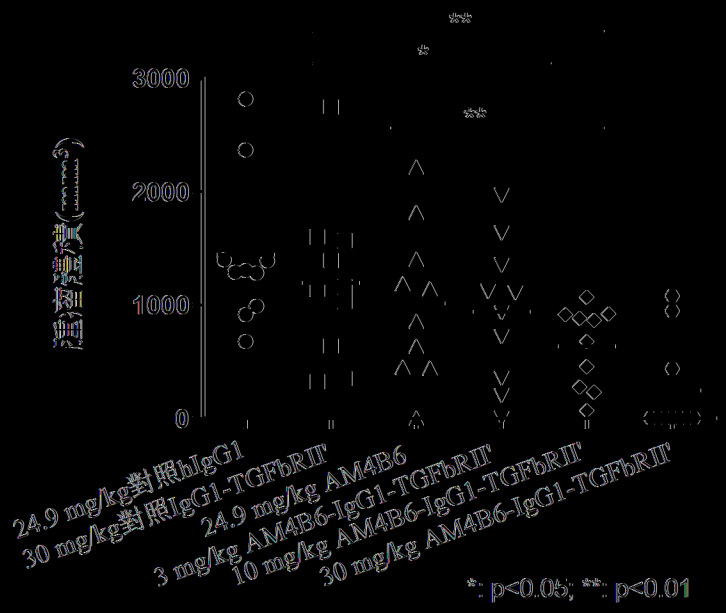


*: p<0.05; **: p<0.01

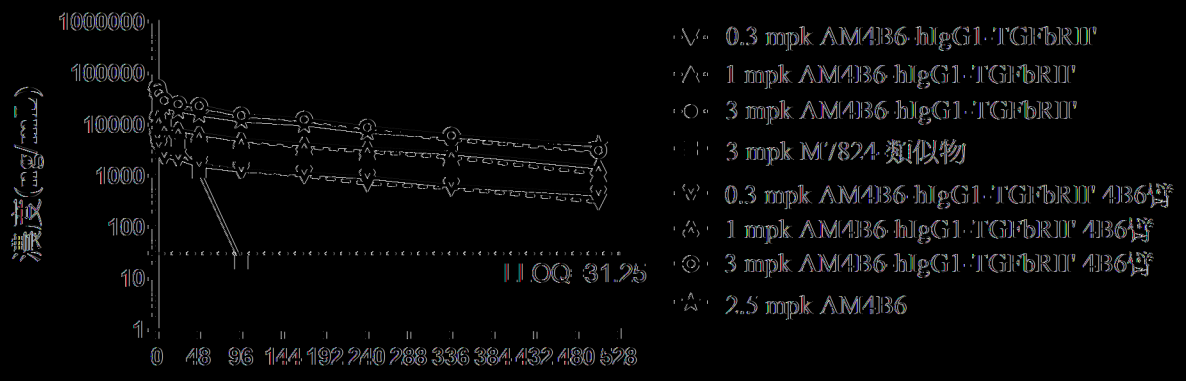
(圖18B)


2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
給藥後(天)
24.9 mg/kg對照hIgG1
30 mg/kg對照IgG1-TGFbRII'
24.9 mg/kg AM4B6
3 mg/kg AM4B6-IgG1-TGFbRII'
10 mg/kg AM4B6-IgG1-TGFbRII'
30 mg/kg AM4B6-IgG1-TGFbRII'

(圖19A)

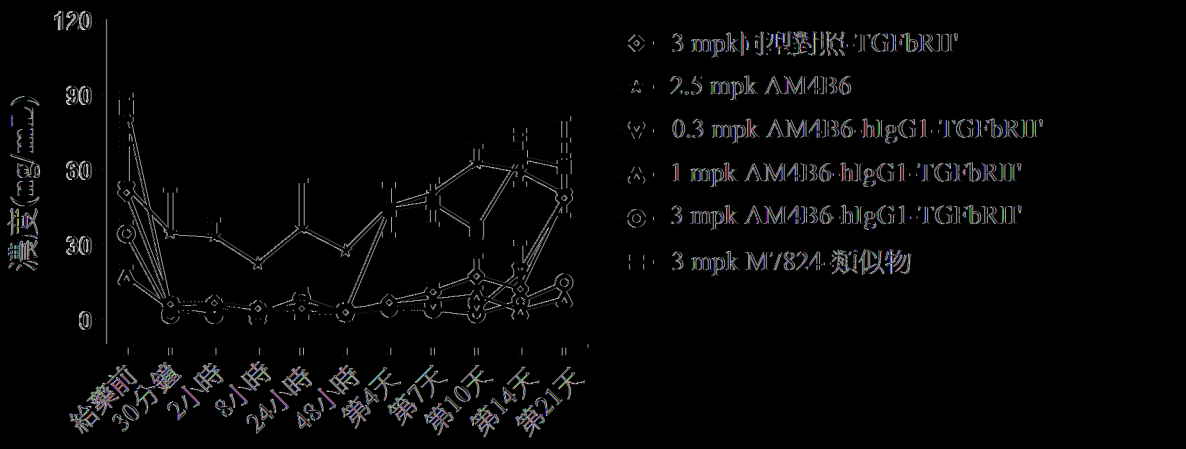

3000
2000
1000
0
24.9 mg/kg對照hIgG1
30 mg/kg對照IgG1-TGFbRII'
24.9 mg/kg AM4B6
3 mg/kg AM4B6-IgG1-TGFbRII'
10 mg/kg AM4B6-IgG1-TGFbRII'
30 mg/kg AM4B6-IgG1-TGFbRII'
*: p<0.05; **: p<0.01

(圖19B)



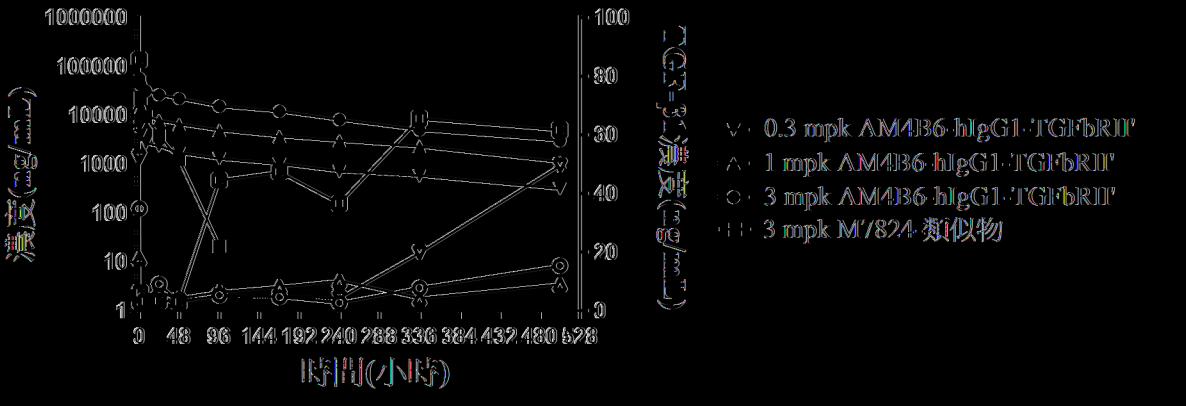
(圖20A)

C57BL/6小鼠中之血漿TGF-β1



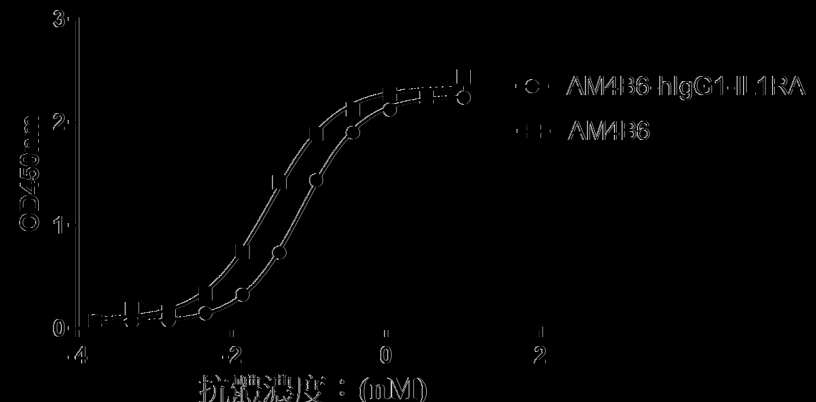
(圖20B)

PK-PD關係



(圖20C)

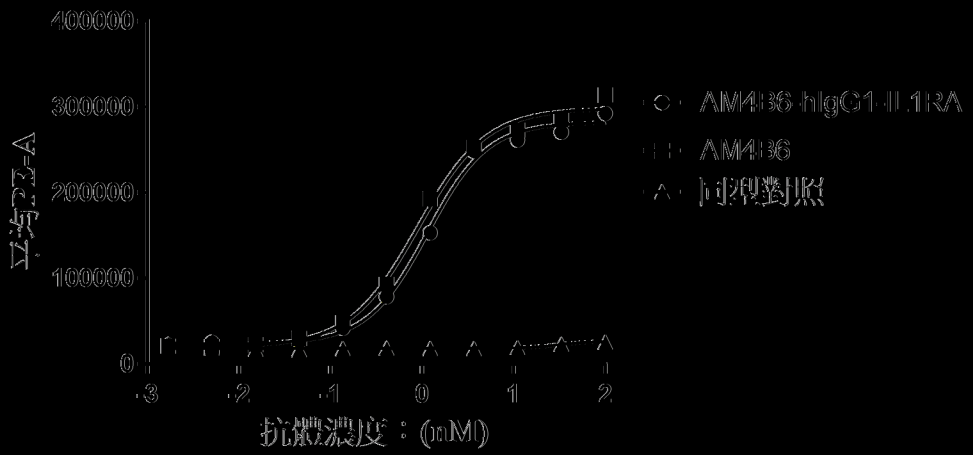
AM4B6-hIgG1-IL-1RA BsAb與hPDL1之結合活性



	AM4B6-hIgG1-IL-1RA	AM4B6
EC50	0.08154	0.03128

圖21

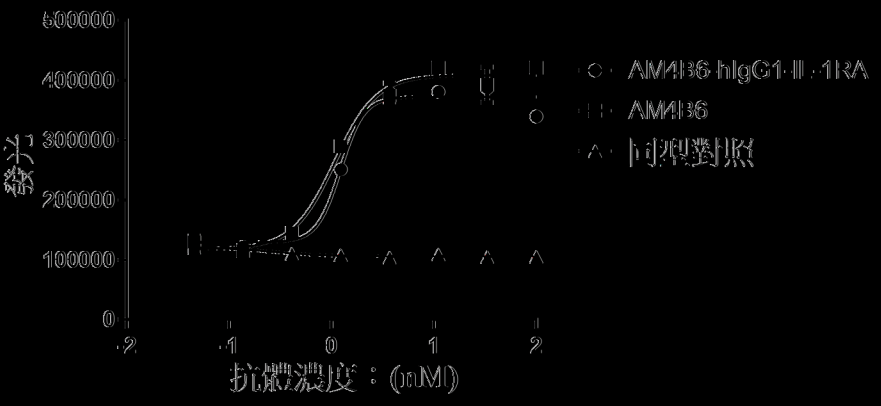
AM4B6-hIgG1-IL1RA與hPDL1之結合活性(FACS)



	AM4B6-hIgG1-IL-1RA	AM4B6	阿利珠單抗
EC50	1.146	0.9033	29.17

圖22

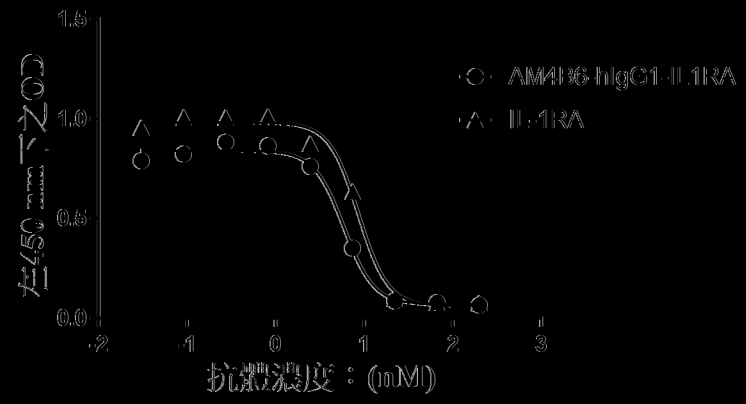
AM4B6-hIgG1-IL-1RA之PD-L1/PD-1阻斷活性



	AM4B6-hIgG1-IL-1RA	AM4B6	同型對照
IC50	1.227	1.083	0.275

(圖23)

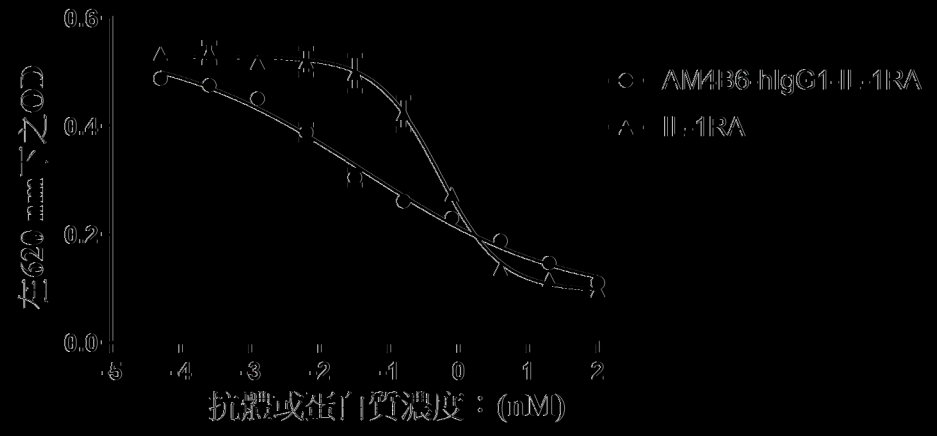
M4B6-hIgG1-IL-1RA之IL-1β/IL-1R1阻斷活性



	IL-1RA	AM4B6-hIgG1-IL1RA
IC50	8.681	5.947

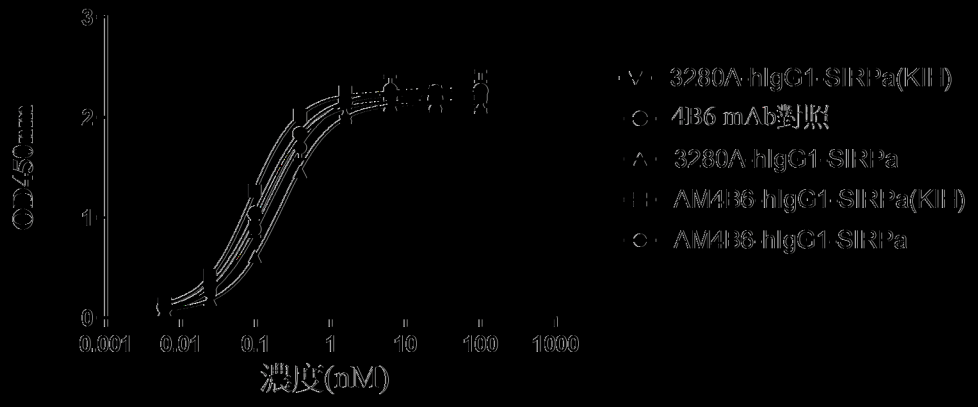
(圖24)

報導細胞上之AM4B6-hIgG1-IL-1RA之IL-1阻斷活性



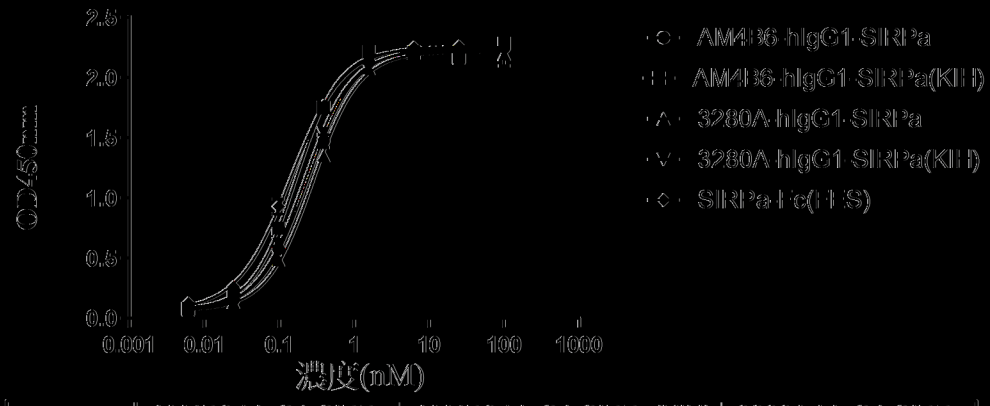
	IL-1RA	AM4B6-hIgG1-IL-1RA
IC50	0.5238	0.04344

|圖25|



	AM4B6-hIgG1-SIRPa	AM4B6-hIgG1-SIRPa(KIH)	3280A-hIgG1-SIRPa
EC50	0.1537	0.08527	0.2194
	3280A-hIgG1-SIRPa(KIH)	4B6 mAb對照	
EC50	0.1221	0.1140	

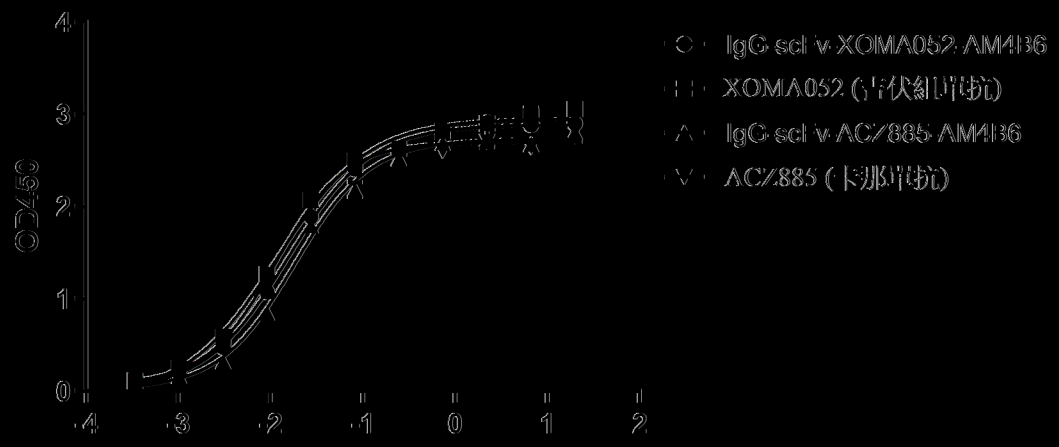
(圖27)



	AM4B6-hIgG1-SIRPa	AM4B6-hIgG1-SIRPa(KIH)	3280A-hIgG1-SIRPa
EC50	0.2403	0.1670	0.2820
	3280A-hIgG1-SIRPa(KIH)	SIRPa-Fc(H-S)	
EC50	0.2162	0.1417	

(圖28)

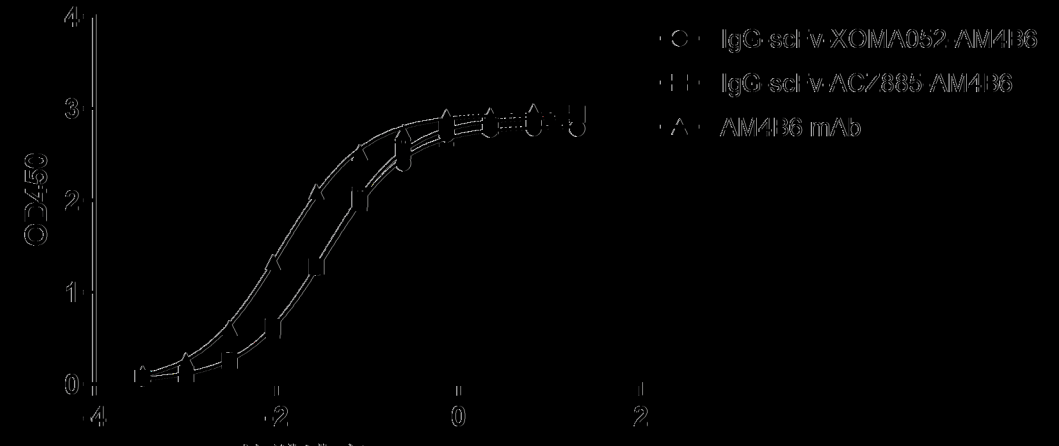
ELISA與人IL-1β蛋白之結合



	EC50
IgG scl v-XOMA052 AM4B6	0.01547
XOMA052 (母代組胺抗)	0.01191
IgG scl v-ACZ885 AM4B6	0.01816
ACZ885 (卡那單抗)	0.01129

[圖29]

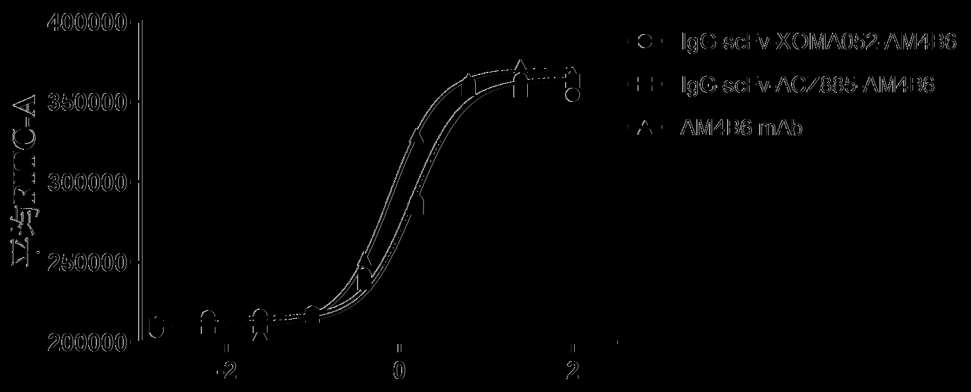
ELISA與人PD-L1蛋白之結合



	EC50
IgG scl v-XOMA052 AM4B6	0.03490
IgG scl v-ACZ885 AM4B6	0.03628
AM4B6 mAb	0.01139

[圖30]

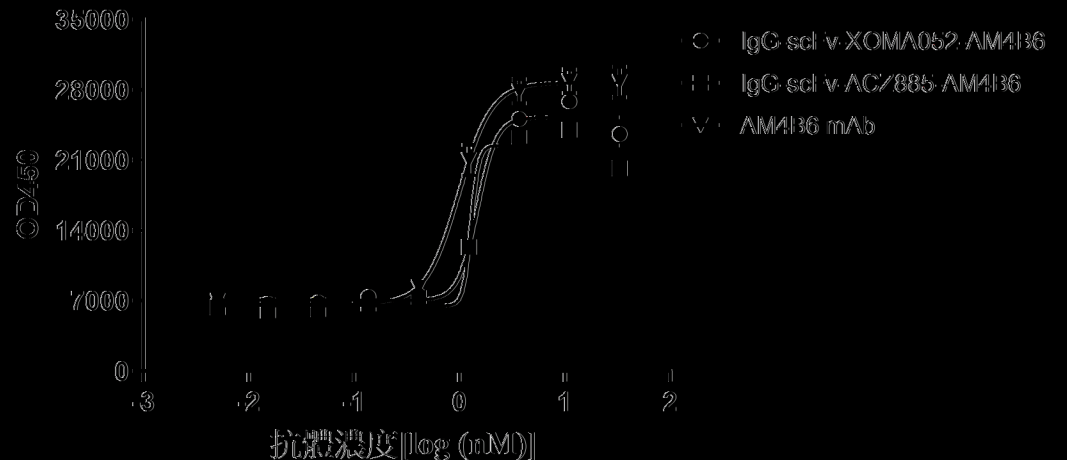
其於細胞之與表現人PD-L1之293T穩定細胞之結合



	IC50
IgG scl v XOMA052 AM4B6	1.401
IgG scl v AC/885 AM4B6	1.506
AM4B6 mAb	0.7736

[圖31]

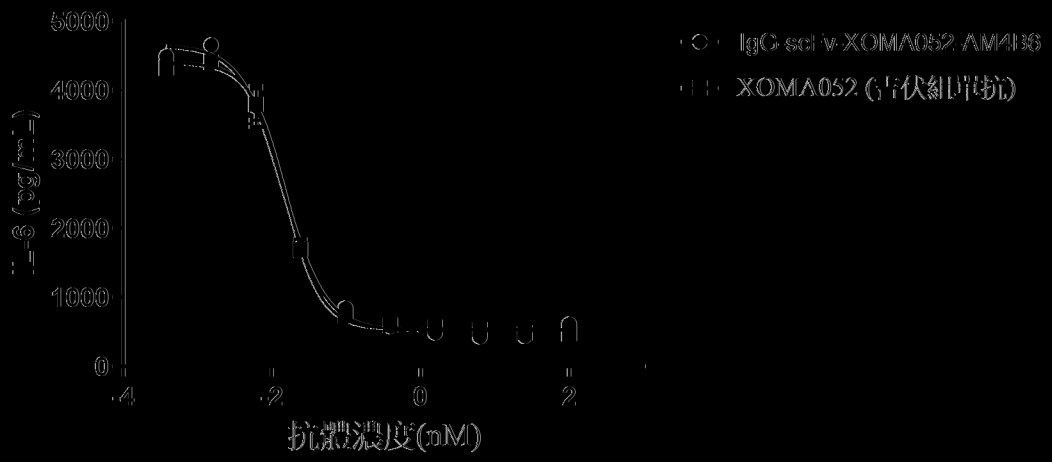
其於細胞之對PD-1/PD-L1相互作用之阻斷



	IC50
IgG scl v XOMA052 AM4B6	1.487
IgG scl v AC/885 AM4B6	~ 1.293
AM4B6 mAb	0.9941

[圖32]

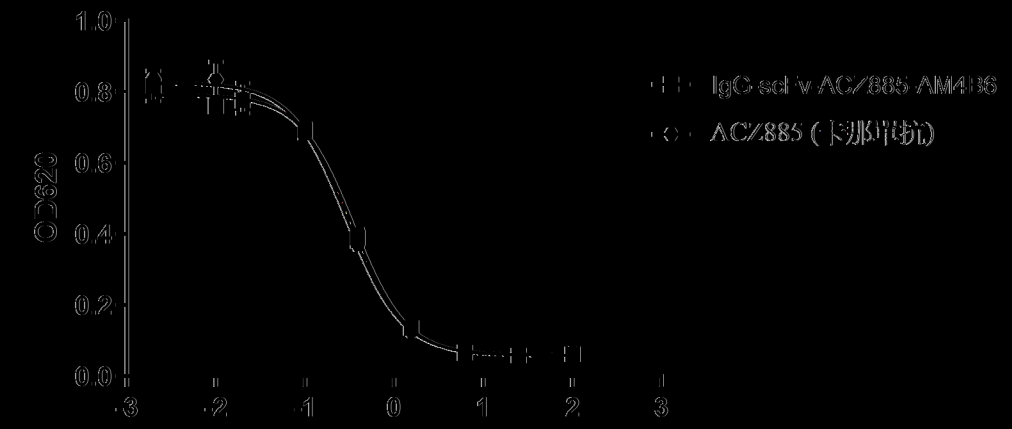
基於細胞之對表現人IL-1R之HDF細胞之阻斷



	IC50
IgG-scFv-XOMA052-AM4B6	0.01412
XOMA052 (母代組胜抗)	0.01544

(圖33)

基於細胞之對表現人IL-1R之
HEK293-CD40L報導細胞之阻斷



	IC50
IgG-scFv-AC/885-AM4B6	0.3459
AC/885 (卡那胜抗)	0.2941

(圖34)