



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119095880 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 06

(21) 申请号 202380030362.2

P · 乌玛尼亚 D · 韦内茨

(22) 申请日 2023.03.27

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(30) 优先权数据

专利代理师 封新琴

22164773.8 2022.03.28 EP

(51) Int.Cl.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/40 (2006.01)

2024.09.25

C07K 14/57 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 16/24 (2006.01)

PCT/EP2023/057751 2023.03.27

C07K 16/46 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C12N 15/13 (2006.01)

W02023/186756 EN 2023.10.05

C12N 15/62 (2006.01)

(71) 申请人 豪夫迈 · 罗氏有限公司

A61K 39/395 (2006.01)

地址 瑞士巴塞尔

A61K 38/21 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(72) 发明人 S · 卡拉布洛

L · 坎波斯卡拉斯科萨 S · 加斯

权利要求书3页 说明书130页

L · F · 昆兹 E · 莫斯纳 E · 绍尔

序列表 (电子公布) 附图17页

(54) 发明名称

干扰素 γ 变体以及包含这些变体的抗原结合分子

(57) 摘要

本发明涉及新的抗原结合分子,其包含 (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体以及 (ii) 以C末端氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止的干扰素 γ (IFNG) 变体多肽;涉及其中包括的新的IFNG变体多肽;涉及产生这些分子的方法;以及涉及其使用方法。

1. 一种抗原结合分子,其包含
 - (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体,以及
 - (ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体,其中所述IFNG变体多肽的特征在于其在C末端以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止。
2. 根据权利要求1所述的抗原结合分子,其中所述IFNG变体多肽包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成。
3. 根据权利要求1或2所述的抗原结合分子,其中与肿瘤相关抗原特异性结合的所述抗体为与成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 特异性结合的抗体。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗原结合分子,其中与FAP特异性结合的所述抗体包含
 - (a) 重链可变区 (V_H FAP), 所述重链可变区包含: 重链互补决定区 (CDR-H1), 其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列; CDR-H2, 其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列; 和CDR-H3, 其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列; 以及轻链可变区 (V_L FAP), 所述轻链可变区包含: 轻链互补决定区 (iv) CDR-L1, 其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列; CDR-L2, 其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列; 和CDR-L3, 其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列; 或者
 - (b) 重链可变区 (V_H FAP), 所述重链可变区包含: CDR-H1, 其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列; CDR-H2, 其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列; 和CDR-H3, 其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列; 以及轻链可变区 (V_L FAP), 所述轻链可变区包含: CDR-L1, 其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列; CDR-L2, 其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列; 和CDR-L3, 其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗原结合分子,其中与FAP特异性结合的所述抗体包含: 重链可变区 (V_H FAP), 其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列; 以及轻链可变区 (V_L FAP), 其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列; 或者所述抗体包含: 重链可变区 (V_H FAP), 其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列; 以及轻链可变区 (V_L FAP), 其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含IgG1 Fc结构域或IgG4 Fc结构域,并且其中所述Fc结构域包含一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代降低所述抗体与Fc受体的结合亲和力和/或效应子功能。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的抗原结合分子,其中所述Fc结构域属于人IgG1亚类,具有氨基酸突变L234A、L235A和P329G(根据Kabat EU索引进行EU编号)。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的抗原结合分子,其中第一IFNG变体多肽以其N末端经由第一接头融合到第一重链的C末端,并且第二IFNG变体多肽以其N末端经由第二接头融合到第二重链的C末端。
9. 根据权利要求8所述的抗原结合分子,其中所述第一接头和所述第二接头为肽接头。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子为蛋白酶可活化的并且包含蛋白酶识别位点和掩蔽部分。
11. 根据权利要求10所述的抗原结合分子,其中所述蛋白酶识别位点为用于matrilysin的底物。
12. 根据权利要求10或11所述的抗原结合分子,其中所述蛋白酶识别位点包含PQARK

(SEQ ID NO:20)或HQARK(SEQ ID NO:21),特别是PQARK(SEQ ID NO:20),或由其组成。

13.根据权利要求10至12中任一项所述的抗原结合分子,其中所述蛋白酶识别位点为将所述掩蔽部分与所述IFNG变体多肽进行连接的可切割肽接头的一部分。

14.根据权利要求10至13中任一项所述的抗原结合分子,其中所述掩蔽部分在其N末端经由所述可切割肽接头融合到所述IFNG变体多肽的C末端。

15.根据权利要求10至14中任一项所述的抗原结合分子,其中所述掩蔽部分在其N末端经由稳定的接头融合到所述Fc结构域的C末端,并且在其C末端经由所述可切割肽接头融合到所述IFNG变体多肽的N末端。

16.根据权利要求10至15中任一项所述的抗原结合分子,其中所述掩蔽部分为与IFNG特异性结合的抗体或抗体片段。

17.根据权利要求10至16中任一项所述的抗原结合分子,其中所述掩蔽部分为与IFNG特异性结合的scFv。

18.根据权利要求10至17中任一项所述的抗原结合分子,其中与IFNG特异性结合的所述scFv包含

(a)重链可变区(V_H IFNG),所述重链可变区包含:CDR-H1,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;CDR-H2,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;和CDR-H3,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L IFNG),所述轻链可变区包含:轻链互补决定区(iV) CDR-L1,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;或者

(b)重链可变区(V_H IFNG),所述重链可变区包含:CDR-H1,其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;CDR-H2,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;和CDR-H3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L IFNG),所述轻链可变区包含:

CDR-L1,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

19.根据权利要求10至18中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中与IFNG特异性结合的scFv包含

(a)重链可变区(V_H IFNG),其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;

以及轻链可变区(V_L IFNG),其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;或者

(b)重链可变区(V_H IFNG),其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列;

以及轻链可变区(V_L IFNG),其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

(i)包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的两条重链,以及包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的两条轻链;或者

(ii)包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的两条重链,以及包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的两条轻链;或者

(iii)包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的两条重链,以及包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的两条轻链;或者

(iv)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的两条重链,以及包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的两条轻链。

21. 一种干扰素 γ (IFNG) 变体多肽, 其中所述IFNG变体多肽的特征在于其以C末端氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止。

22. 根据权利要求21所述的IFNG变体多肽, 其中所述IFNG变体多肽包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成。

23. 一种或多种分离的多核苷酸, 其编码根据权利要求1至20中任一项所述的抗原结合分子或根据权利要求21或22所述的IFNG变体多肽。

24. 一种表达载体, 其包含根据权利要求23所述的一种或多种分离的多核苷酸。

25. 一种原核或真核宿主细胞, 其包含根据权利要求23所述的一种或多种分离的多核苷酸或根据权利要求24所述的表达载体。

26. 一种产生抗原结合分子或IFNG变体多肽的方法, 所述方法包括以下步骤:a) 在适合表达所述抗原结合分子或IFNG变体多肽的条件下培养根据权利要求25所述的原核或真核宿主细胞, 以及b) 任选地回收所述抗原结合分子或IFNG变体多肽。

27. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1至20中任一项所述的抗原结合分子或根据权利要求21或22所述的IFNG变体多肽以及药用赋形剂。

28. 根据权利要求1至20中任一项所述的抗原结合分子或根据权利要求21或22所述的IFNG变体多肽, 其用作药物。

29. 根据权利要求1至20中任一项所述的抗原结合分子或根据权利要求21或22所述的IFNG变体多肽, 其用于癌症的治疗。

30. 根据权利要求1至20中任一项所述的抗原结合分子或根据权利要求21或22所述的IFNG变体多肽, 其用于癌症的治疗, 其中所述抗原结合分子或所述IFNG变体多肽用于与化学治疗剂、放射和/或用于在癌症免疫疗法中使用的其他药剂组合施用。

31. 根据权利要求1至20中任一项所述的抗原结合分子或根据权利要求21或22所述的IFNG变体多肽在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

32. 一种治疗个体的疾病的方法, 所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的呈药用形式的根据权利要求1至20中任一项所述的抗原结合分子或根据权利要求21或22所述的IFNG变体多肽。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述疾病为癌症。

干扰素 γ 变体以及包含这些变体的抗原结合分子

技术领域

[0001] 本发明涉及新抗原结合分子,其包含(i)与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体以及(ii)以C末端氨基酸序列KRRKP(SEQ ID NO:1)终止的新干扰素 γ (IFNG)变体多肽;具体地涉及包含与成纤维细胞活化蛋白(FAP)特异性结合的抗体和新IFNG变体多肽的抗原结合分子。另外,本发明涉及其中包括的新IFNG变体多肽,并且涉及编码抗原结合分子或IFNG变体多肽的多核苷酸分子,以及包含此类多核苷酸分子的载体和宿主细胞。本发明的其他方面为这些分子的产生方法及其使用方法。

背景技术

[0002] 近年来,免疫疗法治疗癌症的应用急剧增长,并且癌症免疫疗法已成为抗击癌症的重要策略。包括抗PD-1在内的免疫检查点调节剂已被确立为许多癌症类型的护理标准。然而,尽管癌症免疫疗法在过去几年中有已取得的所有进展,但由于固有的或适应性抗性机制,一些患者仍然对可用的免疫疗法没有反应。特别是,越来越清楚的是,对癌症免疫疗法没有反应的患者通常以非炎症免疫表型为特征。事实上,肿瘤中的免疫细胞浸润与患者对免疫疗法治疗的反应能力之间显示了相关性。总体而言,患者有开发新疗法的明确医疗需求,该新疗法旨在增强免疫原性并增加肿瘤中的免疫细胞浸润。

[0003] 与上述的开发并行的是,对细胞因子作为潜在癌症治疗的兴趣急剧增加。干扰素 γ (IFNG或IFN- γ)是主要由活化的淋巴细胞(如CD4⁺和CD8⁺T细胞)以及自然杀伤(NK)细胞响应于炎症或免疫刺激而产生和分泌的细胞因子。IFNG是同二聚体,并且其受体(IFNGR1和IFNGR2)在造血细胞和非造血细胞中表达。IFNGR1在细胞表面上稳定表达,而IFNGR2差异表达并用于调控IFNG信号。IFNG与其受体的结合会诱导Janus激酶JAK1和JAK2的募集和活化,该Janus激酶磷酸化并活化STAT1。磷酸化后,STAT1易位至细胞核,在那里其结合特异性启动子并调节IFNG调控的基因的转录。

[0004] 与市场上和正在开发的许多癌症疗法相反,IFNG具有作用于肿瘤细胞和多种免疫细胞(包括T细胞和树突状细胞)两者的能力。IFNG对不同细胞类型的效应具有几个益处,其包括1)增强肿瘤细胞和抗原呈递细胞两者的表面上MHC-I分子的表达,2)通过诱导CXCL9、CXCL10和CXCL11的生产将免疫细胞募集到肿瘤部位以及3)增加肿瘤抗原交叉呈递的能力,随后增强抗肿瘤免疫反应。除了所有这些效应之外,IFNG在Th1环境的生成、单核细胞分化、巨噬细胞极化和血管生成中发挥作用。基于IFNG的细胞抑制、促凋亡和抗增殖功能,IFNG被认为潜在地可用于癌症疗法中。

[0005] 然而,IFNG的受体在许多不同的细胞类型上表达,并且因此其活性可能会因汇效应而减弱。IFNG也可能显示出不期望副作用。此外,可能会出现施用、生物利用度和半衰期短的问题。因此,需要可以选择性活化肿瘤环境中的T细胞的新IFNG分子。WO 2017/139468 A1公开了包含结合Her2的scFv和以氨基酸序列AKTGKRRSQ(SEQ ID NO:127)终止的干扰素 γ 单体的融合蛋白。然而,仍然需要提供具有高稳定性以维持IFNG活性并且更适合对人类患者施用的分子。

发明内容

[0006] 为了克服主要与剂量限制毒性和汇效应相关联的当前挑战,我们开发了一种靶向肿瘤的掩蔽的IFNG,其在循环和健康组织中失活,并且仅在肿瘤部位有活性,从而引发上述益处。将活性IFNG直接递送至肿瘤环境将克服T细胞和NK细胞活化后产生的IFNG的潜在剂量限制,并且特别是,它将提供在免疫荒漠型肿瘤中也有效的机会,目前这些肿瘤更需要新癌症免疫疗法。

[0007] 因此,本发明提供了一种新颖方法,即通过将IFNG变体与和肿瘤相关抗原、特别是成纤维细胞活化蛋白(FAP)结合的抗体缀合,将具有用于免疫疗法的有利特性的IFNG变体直接靶向免疫效应细胞(诸如细胞毒性T淋巴细胞),而不是肿瘤细胞。这导致肿瘤微环境中T细胞的活化。成纤维细胞活化蛋白(FAP)是一种丝氨酸蛋白酶,在癌症相关基质细胞的细胞表面上以及次级淋巴器官的成纤维细胞网状细胞上高度表达,但在正常组织中的表达却非常有限。FAP在各种癌症适应症中非常普遍,使其可用作应在肿瘤基质内积累的药物的靶向部分。

[0008] 本发明的分子包含以C末端氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止的干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体。本文已显示,KRKR补片、即KRKR (SEQ ID NO:78) 的氨基酸序列的存在对于IFNG的活性是重要的。本发明人发现,为了避免蛋白水解,野生型IFNG的C末端必须用脯氨酸帽来稳定,使得IFNG变体多肽的序列以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止。

[0009] 因此,本文提供了抗原结合分子,其包含

[0010] (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体,以及

[0011] (ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体,其中IFNG变体多肽的特征在于C末端氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1),意味着其在C末端以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止。

[0012] 因此,这些抗原结合分子包含与两个相同的干扰素 γ (IFNG) 变体多肽融合的抗体,该两个相同的干扰素 γ (IFNG) 变体多肽与野生型IFNG不同,以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止。在一个方面,干扰素 γ (IFNG) 变体多肽包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一个方面,干扰素 γ (IFNG) 变体多肽由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成。在一个特定方面,该IFNG变体多肽包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成。

[0013] 在一个方面,提供了抗原结合分子,其包含(i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体以及(ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体,其中IFNG变体多肽的特征在于其在C末端以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止,并且其中任选地经由接头,第一IFNG变体多肽以其N末端融合到第一重链的C末端,并且第二IFNG变体多肽以其N末端融合到第二重链的C末端。

[0014] 在一个方面,与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体为与成纤维细胞活化蛋白(FAP) 特异性结合的抗体。在一个方面,提供了抗原结合分子,其中与FAP特异性结合的抗体包含:(a) 重链可变区(V_H FAP),该重链可变区包含:重链互补决定区(CDR-H1),其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;CDR-H2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;和CDR-H3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L FAP),该轻链可变区包含:轻链互补决定区(iv)CDR-L1,

其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;或者(b)重链可变区(V_H FAP),该重链可变区包含:CDR-H1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;CDR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;和CDR-H3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L FAP),该轻链可变区包含:CDR-L1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一个方面,提供了抗原结合分子,其中与FAP特异性结合的抗体包含:重链可变区(V_H FAP),其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L FAP),其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;或者该抗体包含:重链可变区(V_H FAP),其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L FAP),其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一个特定方面,提供了抗原结合分子,其中与FAP特异性结合的抗体包含:重链可变区(V_H FAP),其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L FAP),其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0015] 在一个方面,该抗原结合分子包含Fc结构域,特别是IgG1 Fc结构域或IgG4 Fc结构域。在一个方面,Fc结构域包含降低抗体与Fc受体的结合亲和力和/或效应子功能的一个或多个氨基酸取代。在一个方面,Fc结构域属于人IgG1亚类,其具有氨基酸突变L234A、L235A和P329G(根据Kabat EU索引的EU编号)。在另一方面,Fc结构域为鼠类Fc结构域,并且包含氨基酸突变D265A和P329G(根据Kabat EU索引的EU编号)。

[0016] 在一个方面,抗原结合分子为蛋白酶可活化的并且包含蛋白酶识别位点和掩蔽部分。因此,抗原结合分子包含(i)与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体,(ii)干扰素 γ (IFNG)变体多肽的同二聚体,其中IFNG变体多肽的特征在于其在C末端以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1)终止,(iii)蛋白酶识别位点和(iv)掩蔽部分。

[0017] 在一个方面,蛋白酶识别位点为用于matrilysin的底物。在一个方面,蛋白酶识别位点包含氨基酸序列PQARK (SEQ ID NO:20) 或HQARK (SEQ ID NO:21) 或由其组成。在一个特定方面,蛋白酶识别位点包含氨基酸序列PQARK (SEQ ID NO:20) 或由其组成。在一个方面,蛋白酶识别位点为将掩蔽部分与IFNG变体多肽连接的可切割肽接头的一部分。

[0018] 在一个方面,提供了抗原结合分子,其中掩蔽部分在其N末端经由可切割肽接头(掩蔽释放形式)融合到IFNG变体多肽的C末端。在一个方面,IFNG变体多肽在其N末端经由稳定的接头融合到抗体的C末端。

[0019] 在另一方面,提供了抗原结合分子,其中掩蔽部分在其N末端经由稳定的接头融合到Fc结构域的C末端并且在其C末端经由可切割肽接头(细胞因子释放形式)融合到IFNG变体多肽的N末端。

[0020] 在一个方面,掩蔽部分为与IFNG特异性结合的抗体片段。在一个特定方面,掩蔽部分为与IFNG特异性结合的scFv。

[0021] 在一个方面,与IFNG、特别是scFv特异性结合的掩蔽部分包含

[0022] (a)重链可变区(V_H IFNG),该重链可变区包含:CDR-H1,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;CDR-H2,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;和CDR-H3,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L IFNG),该轻链可变区包含:轻链互补决定区(iv) CDR-L1,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;或者

[0023] (b) 重链可变区 (V_H IFNG), 该重链可变区包含: CDR-H1, 其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列; CDR-H2, 其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列; 和CDR-H3, 其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列; 以及轻链可变区 (V_L IFNG), 该轻链可变区包含: CDR-L1, 其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列; CDR-L2, 其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列; 和CDR-L3, 其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0024] 在一个方面, 与IFNG、特别是scFv特异性结合的掩蔽部分包含: (a) 重链可变区 (V_H IFNG), 其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列; 以及轻链可变区 (V_L IFNG), 其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列; 或者 (b) 重链可变区 (V_H IFNG), 其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列; 以及轻链可变区 (V_L IFNG), 其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一个特定方面, 与IFNG、特别是scFv特异性结合的掩蔽部分包含: (a) 重链可变区 (V_H IFNG), 其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列; 以及轻链可变区 (V_L IFNG), 其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0025] 在一个特定方面, 本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子, 其中所述抗原结合分子包含

[0026] (i) 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的两条重链, 以及包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的两条轻链; 或者

[0027] (ii) 包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的两条重链, 以及包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的两条轻链; 或者

[0028] (iii) 包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的两条重链, 以及包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的两条轻链; 或者

[0029] (iv) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的两条重链, 以及包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的两条轻链。

[0030] 此外, 本文提供了干扰素 γ (IFNG) 变体多肽, 其中IFNG变体多肽的特征在于C末端氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1)。在一个方面, IFNG变体多肽为人IFNG变体多肽并且包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成。在另一方面, IFNG变体多肽为小鼠IFNG变体多肽并且包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成。

[0031] 根据本发明的另一方面, 提供了编码如本文之前所述的抗原结合分子的一种或多种分离的多核苷酸。还提供了编码如本文之前所述的IFNG变体多肽的分离的多核苷酸。本发明进一步提供了载体, 特别是表达载体, 其包含本发明的分离的多核苷酸; 并且提供了宿主细胞, 其包含本发明的分离的核酸或表达载体。在一些方面, 宿主细胞为真核细胞, 特别是哺乳动物细胞。在一些方面, 宿主细胞为原核细胞。在另一方面, 提供了产生如本文之前所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽的方法, 其包括在适合表达抗原结合分子或IFNG变体多肽的条件下培养如上所述的宿主细胞, 以及分离抗原结合分子或IFNG变体多肽。本发明还涵盖抗原结合分子, 其包含IFNG变体多肽或通过本文所述的方法产生的IFNG变体多肽。

[0032] 本发明还提供了药物组合物, 其包含如本文之前所述的抗原结合分子或如本文之前所述的IFNG变体多肽和药用载体。在一个方面, 药物组合物包含另外的治疗剂。在一个方面, 药物组合物用于疾病的治疗。在一个特定方面, 疾病为癌症。

[0033] 本发明还涵盖如本文之前所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽, 或包含抗原结合分子或IFNG变体多肽的药物组合物, 其用作药物。

[0034] 在一个方面, 提供了如本文之前所述的抗原结合分子或如本文之前所述的IFNG变

体多肽或本发明的药物组合物,其用于在治疗癌症中使用。在另一具体方面,本发明提供了如本文之前所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽,其用于在治疗癌症中使用,其中抗原结合分子或IFNG变体多肽与化学治疗剂、放射和/或用于在癌症免疫疗法中使用的其他药剂组合施用。

[0035] 在进一步方面,本发明提供了一种抑制个体中肿瘤细胞生长的方法,其包括向个体施用有效量的如本文之前所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽或本发明的药物组合物,以抑制肿瘤细胞的生长。在另一方面,本发明提供了一种治疗个体的疾病的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的如本文之前所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽或本发明的药物组合物。在一个具体方面,疾病为癌症。

[0036] 还提供如本文之前所述的抗原结合分子在制造用于治疗有需要的个体的疾病的药物中的用途,特别是在制造用于治疗癌症的药物中的用途。在一个具体方面,疾病为癌症。在上述方面中的任何方面,个体为哺乳动物,特别是人。

附图说明

[0037] 图1A至1C提供了IFNG C末端序列的工程化的概述。在图1A中,显示了实例1中制备的IFNG分子的形式示意性方案。IFNG融合到靶向IgG抗体的重链的C末端。IgG融合的IFNG野生型C末端易于蛋白水解降解,导致截短变体在信号传导中失活。在图1B中,显示了缺失某些C末端氨基酸的IFNG C末端序列。对于缺失系列,C末端残基被逐渐去除,并且然后用其他氨基酸替换以提供帽。KRKR序列对于活性是重要的并且必须保守图1C给出了如实例1中所述在突变系列中的KRKR序列中引入的氨基酸突变的概述。图1D显示了掩蔽释放形式的示意性方案。IFNG经由稳定的接头(接头1)融合到靶向IgG的重链的C末端。为了产生掩蔽形式,IFNG特异性scFv结构域经由可切割接头(具有PQARK切割位点的接头2)融合到IFNG的C末端。图1E显示了细胞因子释放形式的示意性方案。IFNG经由可切割接头(具有PQARK切割位点的接头2)融合到IFNG特异性scFv结构域的C末端,该IFNG特异性scFv结构域经由稳定的接头(接头1)融合到靶向IgG的重链。

[0038] 图2A至2C显示了在HEK-blue IFNG报告细胞上测量的人IFNG缺失系列变体的信号传导活性。在图2A中,比较了野生型IFNG (P1AF3568)、失活变体 (P1AF3569) 和文献 (Slodowski等人) 中描述的具有IFNG变体的分子的信号传导活性。图2B比较了野生型IFNG分子 (P1AF3568) 与含有脯氨酸封端的IFNG变体的分子。图2C比较了野生型IFNG分子 (P1AF3568) 与含有丝氨酸-脯氨酸封端的IFNG变体的分子。

[0039] 图3A至3C显示了在HEK-blue IFNG报告细胞上测量的人IFNG突变系列变体的信号传导活性。在图3A中,比较了具有C末端KRKR (P1AF3574) 的IFNG变体与IFNG变体分子的信号传导活性,其中KRKR补片中的一个或两个氨基酸已用谷氨酸替换。图3B比较了具有C末端KRKR (P1AF3574) 的IFNG变体与IFNG变体分子的信号传导活性,其中KRKR补片中的一个或两个氨基酸已用脯氨酸替换。图3C比较了具有C末端KRKR (P1AF3574) 的IFNG变体与IFNG变体分子的信号传导活性,其中KRKR补片中的一个或两个氨基酸已用丝氨酸替换。

[0040] 图4A显示了人和鼠类野生型IFNG以及工程化的IFNG变体的多重序列比对。显示的比对的序列为共有序列 (SEQ ID NO:125)、人IFNG KRKR 1-132 (SEQ ID NO:2)、鼠类IFNG KRKR 22-153 (SEQ ID NO:3)、人野生型IFNG (SEQ ID NO:60) 和小鼠野生型IFNG (SEQ ID

NO:61)。图4B显示了与FAP靶向、未掩蔽的IFNG的活性相比,响应于用含有可切割PQARK接头的FAP靶向、抗鼠类IFNG-scFv掩蔽的IFNG化合物(有和没有Matriptase)处理两天,鼠类MC38-huCEA肿瘤细胞系上MHC-I的诱导。图4C显示了与FAP靶向、未掩蔽的IFNG的活性相比,响应于用含有可切割PQARK接头的FAP靶向、抗鼠类IFNG-scFv掩蔽的IFNG化合物(有和没有Matriptase)处理两天,鼠类MC38-huCEA肿瘤细胞系上PD-L1的诱导。

[0041] 图5显示了研究布局,其突出了为测试P1AG3755体内的活性而进行的体内研究的关键事件。KPC4662-huCEA肿瘤模型是被排除的肿瘤模型,这意味着CD8 T细胞仅存在于肿瘤的外围。MHC-I和PD-L1表达在基线时较低。P1AG3755以两种不同剂量给药一次,以观察MHC-I、PD-L1表达和CD8浸润的变化。

[0042] 图6A和图6B显示了在研究的不同时间点时癌细胞(图6A)和成纤维细胞(图6B)中的MHC-I表达。通过流式细胞术测量,仅在较高剂量下,在疗法施用后早期和晚期(第3天和第7天),癌细胞和成纤维细胞上的MHC-I表达在统计学上显著增加。图6C和图6D显示了在研究的不同时间点时癌细胞(图6C)和成纤维细胞(图6D)中的PD-L1表达。在较高剂量下,但仅在治疗后3天而不是治疗后7天,两种细胞类型上的PD-L1表达在统计学上也显著增加。

[0043] 图7显示了通过免疫荧光(3DIP)进行的组织学分析的结果并说明肿瘤切片中的CD8 T细胞浸润和MHCI表达。P1AG3755施用后3天和7天,MHCI表达以剂量依赖性方式增加,确认了流式细胞术结果。MHCI表达的增加为局部的,并且对于整个肿瘤来说并不相同。MHCI表达模式与肿瘤核心中CD8 T细胞的存在相关。

[0044] 在图8中,其显示,通过流式细胞术测量,CD8浸润到肿瘤中与媒介物组没有统计学上的显著差异。这是可以预料的,因为CD8 T细胞浸润遵循高度局部化的MHCI表达。通过免疫荧光成像,变得清楚的是,与疗法后第7天相比,疗法后第3天,CD8 T细胞在MHC-I阳性区域中的存在更加强烈。

[0045] 图9涉及细胞因子分析,并且显示T细胞吸引趋化因子CXCL9仅在疗法注射(以10mg/kg)后7天在血清中在统计学上显著增加,但在疗法注射之前没有增加,在较低剂量下没有增加,并且在肿瘤组织中没有增加。

[0046] 图10A显示了如实例6中所述的空间掩蔽的IFNG(P1AG8692)的示意图。IFNG变体插入IgG1抗体的上铰链区与下铰链区之间。图10B显示了未掩蔽的对照化合物(P1AG8697)的示意图,其中IFNG变体经由接头(接头4)融合到Fab。图10C为显示了在HEK-blue IFNG报告细胞上测量的空间掩蔽的IFNG变体的活性作为相对吸光度的图。

具体实施方式

[0047] 定义

[0048] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科技术语都具有如在本发明所属领域中通常使用的相同含义。出于解释本说明书的目的,将应用以下定义,并且在适当时,以单数形式使用的术语也将包括复数,反之亦然。

[0049] 如本文所用,术语“抗原结合分子”在其最广义上是指特异性结合抗原决定簇的分子。抗原结合分子的实例为抗体、双特异性抗体或多特异性抗体、免疫缀合物、抗体片段和支架抗原结合蛋白。

[0050] 如本文所用,术语“与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体”或“与肿瘤相关抗原特异

性结合的部分”是指与抗原决定簇特异性结合的多肽分子。在一个方面,抗原结合结构域能够通过其靶细胞抗原活化信号传导。在一个特定方面,抗原结合结构域能够将其连接的实体(例如,IFNG变体多肽)引导至靶位点,例如引导至携带抗原决定簇的特定类型的肿瘤细胞或肿瘤基质。能够与肿瘤相关抗原特异性结合的抗原结合结构域包括如本文进一步定义的抗体及其片段。另外,能够与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体包括如本文进一步定义的支架抗原结合蛋白,例如基于设计的重复序列蛋白或设计的重复序列结构域的结合结构域(参见例如WO 2002/020565)。特别地,能够与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体为能够与成纤维细胞活化蛋白(FAP)特异性结合的抗体。关于抗体或其片段,术语“与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体”是指分子的部分,其包含与抗原的部分或全部特异性结合并且与之互补的区域。可通过例如一种或多种抗体可变结构域(也称为抗体可变区)来提供能够特异性抗原结合的抗原结合结构域。具体地,能够特异性抗原结合的抗原结合结构域包括抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。在另一方面,“能够与肿瘤相关抗原特异性结合的抗原结合结构域”也可以是Fab片段或交叉Fab片段。

[0051] 本文的术语“抗体”以最广义使用并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性和多特异性抗体(例如,双特异性抗体),以及抗体片段,只要它们表现出期望的抗原结合活性即可。

[0052] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即,除了可能的变异抗体(例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的生产过程中产生,此类变体通常以少量存在)之外,包含该群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。

[0053] 如本文所用,术语“单特异性”抗体表示具有一个或多个结合位点的抗体,每个结合位点与相同抗原的相同表位结合。术语“双特异性”意指抗原结合分子能够与至少两种独特的抗原决定簇特异性结合。通常,双特异性抗原结合分子包含两个抗原结合位点,这两个抗原结合位点中的每个抗原结合位点对不同的抗原决定簇具有特异性。在某些实施例中,双特异性抗原结合分子能够同时结合两种抗原决定簇,特别是在两种独特细胞上表达的两种抗原决定簇。如本文所述的双特异性抗原结合分子还可形成多特异性抗体的一部分。

[0054] 本申请中所用的术语“价态”表示在对一种独特抗原决定簇具有特异性的抗原结合分子中存在特定数量的对一种独特抗原决定簇具有特异性的结合位点。因此,术语“二价”、“四价”和“六价”分别表示在抗原结合分子中存在对特定抗原决定簇具有特异性的两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点。在本发明的特定方面,根据本发明的双特异性抗原结合分子对特定抗原决定簇可以是单价的,意味着它们对所述抗原决定簇仅具有一个结合位点,或者对特定抗原决定簇可以是二价或四价的,意味着它们对所述抗原决定簇分别具有两个结合位点或四个结合位点。

[0055] 术语“全长抗体”和“完整抗体”在本文中可互换使用地是指具有与天然抗体结构基本上相似的结构抗体。“天然抗体”是指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG类抗体是约150000道尔顿的异四聚体糖蛋白,其由通过二硫键键合的两条轻链和两条重链构成。从N末端到C末端,每条重链具有可变区(VH)(也称为可变重链结构域或重链可变结构域),之后是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)(也称为重链恒定区)。类似地,

从N末端到C末端,每条轻链具有可变区(VL)(也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域),接着是轻链恒定结构域(CL)(也称为轻链恒定区)。抗体的重链可以分配为五种类型中的一种,该五种类型被称为 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)或 μ (IgM),它们中的一些可以进一步分为亚型,例如 γ 1(IgG1)、 γ 2(IgG2)、 γ 3(IgG3)、 γ 4(IgG4)、 α 1(IgA1)和 α 2(IgA2)。抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列,可以归属于两种类型中的一种,这两种类型称为卡帕(κ)和兰姆达(λ)。

[0056] “抗体片段”是指完整抗体以外的分子,其包含完整抗体的一部分,该部分结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的示例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双体抗体、三体抗体、四体抗体、交叉Fab片段;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);以及单结构域抗体。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人,Nat Med 9,129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如Plückthun,载于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,New York,第269至第315页(1994);还可参见W0 93/16185;以及美国专利号5,571,894和5,587,458。关于对包含补救受体结合表位残基并具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。双体抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,该双体抗体可以是二价的或双特异性的,参见例如:EP 404,097;W0 1993/01161;Hudson等人,Nat Med 9,129-134(2003);以及Hollinger等人,Proc Natl Acad Sci USA 90,6444-6448(1993)。在Hudson等人,Nat Med 9,129-134(2003)中也描述了三体抗体和四体抗体。单结构域抗体为包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施例中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA;参见例如美国专利号6,248,516B1)。抗体片段可以通过各种技术制备,这些技术包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化,以及由重组宿主细胞(例如大肠杆菌(E.coli)或噬菌体)产生,如本文所述。

[0057] 木瓜蛋白酶消化完整抗体产生两个称为“Fab”片段的相同的抗原结合片段,每个“Fab”片段含有重链可变结构域和轻链可变结构域以及轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。因此,如本文所用,术语“Fab片段”是指包含轻链片段以及重链的VH结构域和第一恒定结构域(CH1)的抗体片段,该轻链片段包含VL结构域和轻链恒定结构域(CL)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于Fab'片段在重链CH1结构域的羧基末端添加了一些残基,这些残基包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是Fab'片段,其中恒定结构域的半胱氨酸残基具有游离巯基。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,该片段具有两个抗原结合位点(两个Fab片段)和Fc区的一部分。根据本发明,术语“Fab片段”还包括如下文所定义的“交叉Fab片段”或“交换型Fab片段”。

[0058] 术语“交叉Fab片段”或“xFab片段”或“交换型Fab片段”是指这样的Fab片段,其中重链和轻链的可变区或恒定区被交换。交换型Fab分子的两种不同链组成是可能的,并且包含在本发明的双特异性抗体中:在一个方面,Fab重链和轻链的可变区被交换,即交换型Fab分子包含由轻链可变区(VL)和重链恒定区(CH1)组成的肽链,以及由重链可变区(VH)和轻链恒定区(CL)组成的肽链。该交换型Fab分子也称为CrossFab_(VLVH)。在另一方面,当Fab重链和轻链的恒定区被交换时,交换型Fab分子包含由重链可变区(VH)和轻链恒定区(CL)组成的肽链,以及由轻链可变区(VL)和重链恒定区(CH1)组成的肽链。该交换型Fab分子也称为CrossFab_(CLCH1)。

[0059] “单链Fab片段”或“scFab”是由抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定结构域1(CH1)、抗体轻链可变结构域(VL)、抗体轻链恒定结构域(CL)和接头组成的多肽,其中该抗体结构域和该接头在N末端至C末端方向上具有以下顺序中的一种:a) VH-CH1-接头-VL-CL, b) VL-CL-接头-VH-CH1, c) VH-CL-接头-VL-CH1, 或d) VL-CH1-接头-VH-CL;并且其中该接头是至少30个氨基酸,优选是32个至50个氨基酸的多肽。所述单链Fab片段经由CL结构域与CH1结构域之间的天然二硫键而稳定化。此外,这些单链Fab分子可以通过经由插入半胱氨酸残基(例如根据Kabat编号的可变重链中的位置44和可变轻链中的位置100)生成链间二硫键,而进一步稳定化。

[0060] “交换型单链Fab片段”或“x-scFab”是由抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定结构域1(CH1)、抗体轻链可变结构域(VL)、抗体轻链恒定结构域(CL)和接头组成的多肽,其中该抗体结构域和该接头在N末端至C末端方向上具有以下顺序中的一种:a) VH-CL-接头-VL-CH1和b) VL-CH1-接头-VH-CL;其中VH和VL一起形成与抗原特异性结合的抗原结合位点,并且其中该接头是至少30个氨基酸的多肽。此外,这些x-scFab分子可以通过经由插入半胱氨酸残基(例如根据Kabat编号的可变重链中的位置44和可变轻链中的位置100)生成链间二硫键,而进一步稳定化。

[0061] “单链可变片段(scFv)”是抗体的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的融合蛋白,与十个至约25个氨基酸的短接头肽连接。接头通常富含甘氨酸以获得柔性,以及富含丝氨酸或苏氨酸以获得溶解度,并且可以将 V_H 的N末端与 V_L 的C末端连接,或反之亦然。尽管去除了恒定区并引入了接头,但该蛋白保留了原始抗体的特异性。scFv抗体例如描述于Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96中。另外,抗体片段包含单链多肽,该单链多肽的特征在于具有VH结构域,即能够与VL结构域一起装配到功能性抗原结合位点;或具有VL结构域的特征,即能够与VH结构域一起装配到功能性抗原结合位点,从而提供全长抗体的抗原结合特性。

[0062] “支架抗原结合蛋白”是本领域已知的,例如纤连蛋白和设计的锚蛋白重复序列蛋白(DARPin)已被用作抗原结合结构域的替代支架,参见例如Gebauer和Skerra, *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol* 13:245-255 (2009) 和Stumpp等人, *Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today* 13:695-701 (2008)。在本发明的一个方面,支架抗原结合蛋白选自由以下项组成的组:CTLA-4 (Evibody)、脂质运载蛋白 (Anticalin)、蛋白A衍生的分子(诸如蛋白A的Z结构域(亲和体))、A结构域(Avimer/巨型抗体)、血清转铁蛋白(反式体);设计的锚蛋白重复序列蛋白(DARPin)、抗体轻链或重链的可变结构域(单结构域抗体, sdAb)、抗体重链的可变结构域(纳米抗体, aVH)、 V_{NAR} 片段、纤连蛋白(AdNectin)、C型凝集素结构域(四连接素);新抗原受体 β -内酰胺酶的可变结构域(V_{NAR} 片段)、人 γ -晶体蛋白或泛素蛋白(Affilin分子);人蛋白酶抑制剂的kunitz型结构域、微型体(诸如来自knottin家族的蛋白质)、肽适体和纤连蛋白(adnectin)。CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4)是主要在CD4⁺T细胞上表达的CD28家族受体。其细胞外结构域具有可变结构域样Ig折叠。对应于抗体CDR的环可以用异源序列取代,以赋予不同的结合性质。经工程化以具有不同结合特异性的CTLA-4分子也称为Evibody(例如US7166697B1)。Evibody与抗体(例如结构域抗体)的分离的可变区大小大致相同。关于进一步的细节,参见Journal of

Immunological Methods 248(1-2), 31-45 (2001)。脂质运载蛋白是细胞外蛋白质家族,可转运小的疏水性分子,诸如类固醇、胆素、类视黄醇和脂质。它们具有刚性 β -片层二级结构,在锥形结构的开口端处具有许多环,可以工程化改造成与不同的靶抗原结合。Anticalin的大小介于160-180个氨基酸之间,并且来源于脂质运载蛋白。关于进一步的细节,参见Biochim Biophys Acta 1482:337-350 (2000)、US7250297B1和US20070224633。亲和体是来源于金黄色酿脓葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的蛋白A的支架,其可以被工程化改造以结合抗原。该结构域由约58个氨基酸的三螺旋束组成。已经通过表面残基的随机化形成了文库。关于进一步细节,参见Protein Eng. Des. Sel. 2004, 17, 455-462和EP 1641818A1。Avimer是来源于A结构域支架家族的多结构域蛋白质。约35个氨基酸的天然结构域采用确定的二硫键键合结构。多样性是通过重组A结构域家族表现出的自然变异而形成的。关于进一步的细节,参见Nature Biotechnology 23(12), 1556-1561 (2005)和Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (2007年6月)。转铁蛋白是单体血清转运糖蛋白。可以通过在允许的表面环中插入肽序列来工程化改造转铁蛋白,以结合不同的靶抗原。工程化改造的转铁蛋白支架的示例包括反式体。关于进一步的细节,参见J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)。设计的锚蛋白重复序列蛋白 (DARPin) 来源于锚蛋白,锚蛋白是介导整合膜蛋白与细胞支架的附接的蛋白质家族。单个锚蛋白重复序列是由两个 α -螺旋和一个 β -转角组成的33残基基序。它们可通过随机化每个重复序列中的第一 α -螺旋和 β -转角中的残基,而设计成结合不同的靶抗原。它们的结合界面可以通过增加模块的数量来增加(亲和力成熟方法)。关于进一步的细节,参见J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003)、PNAS 100(4), 1700-1705 (2003)和J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007)以及US20040132028A1。单结构域抗体是由单一单体可变抗体结构域组成的抗体片段。第一单结构域来源于骆驼科动物的抗体重链的可变结构域(纳米抗体或V_HH片段)。此外,术语单结构域抗体包含自体人重链可变结构域(aVH)或来源于鲨鱼的V_{NAR}片段。纤连蛋白可以经工程化以结合抗原的支架。Adnectin由III型人纤连蛋白(FN3)的15个重复单元的第10结构域的天然氨基酸序列的主链组成。 β -夹层的一个端部处的三个环可以经工程化,以使Adnectin能够特异性识别目标治疗靶标。关于进一步细节,参见Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005)、US20080139791、W02005056764和US6818418B1。肽适体是组合的识别分子,该组合的识别分子由恒定的支架蛋白,通常是硫氧还蛋白(TrxA)组成,该恒定的支架蛋白含有在活性位点处插入的受约束的可变肽环。关于进一步细节,参见Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005)。微型体来源于含有3个至4个半胱氨酸桥、长度为25个至50个氨基酸的天然存在的微蛋白,该微蛋白的实例包括KalataBI和芋螺毒素以及knottin。微蛋白具有环,其可以经工程化为包括多达25个氨基酸而不影响微蛋白的整体折叠。关于工程化改造的knottin结构域的进一步细节,参见W02008098796。

[0063] 作为参考分子的“与相同表位结合的抗体”是指这样的抗原结合分子,在竞争测定中该抗原结合分子使参考分子与其抗原的结合被阻断50%或更多,并且相反地,在竞争测定中参考分子使抗原结合分子与其抗原的结合被阻断50%或更多。作为参考分子的“并非与相同表位结合的抗体”是指这样的抗原结合分子,在竞争测定中所述抗原结合分子未使参考分子与其抗原的结合阻断50%或更多,并且相反地,在竞争测定中参考分子未使抗原结合分子与其抗原的结合阻断50%或更多。

[0064] 术语“抗原结合结构域”或“抗原结合位点”是指抗原结合分子的一部分,其包含与抗原的一部分或全部特异性结合并互补的区域。在抗原较大的情况下,抗原结合分子可以仅与抗原的特定部分结合,该部分称为表位。抗原结合结构域可以由例如一个或多个可变结构域(也称为可变区)提供。优选地,抗原结合结构域包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

[0065] 如本文所用,术语“抗原决定簇”与“抗原”和“表位”同义,并且是指多肽大分子上的位点(例如一段连续的氨基酸或由非连续氨基酸的不同区域组成的构象构型),抗原结合部分与该位点结合,从而形成抗原结合部分-抗原复合物。有用的抗原决定簇可以在例如肿瘤细胞的表面上、病毒感染细胞的表面上、其他患病细胞的表面上、免疫细胞的表面上、血清中的游离物和/或细胞外基质(ECM)中找到。除非另有说明,否则本文中用作抗原的蛋白质可以是来自任何脊椎动物来源的任何天然形式的蛋白质,该脊椎动物来源包括哺乳动物诸如灵长类动物(例如人类)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。在一个特定实施例中,抗原是人蛋白质。当提及本文中的特定蛋白质时,该术语涵盖“全长”、未加工的蛋白质,以及由细胞内加工而产生的任何形式的蛋白质。该术语还涵盖天然存在的蛋白质变体,例如剪接变体或等位基因变体。

[0066] “特异性结合”是指结合对于抗原具有选择性,并且可以与不需要的或非特异性的相互作用区分开。抗原结合分子与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)或本领域技术人员熟悉的其他技术(例如表面等离子体共振(SPR)技术(在BIAcore仪器上分析)(Liljeblad等人,Glyco J 17,323-329(2000))以及传统的结合测定(Heeley, Endocr Res 28,217-229(2002))来测量。在一个实施例中,例如如通过SPR所测得的,抗原结合分子与不相关蛋白的结合程度小于该抗原结合分子与抗原的结合程度的约10%。在某些实施例中,与抗原结合的分子具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(Kd)。

[0067] “亲和力”或“结合亲和力”是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指内在结合亲和力,其反映了结合对的成员(例如抗体和抗原)之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以用解离常数(Kd)表示,解离常数(Kd)是解离速率常数与缔合速率常数(分别为 k_{off} 和 k_{on})的比率。因此,等效亲和力可以包括不同的速率常数,只要速率常数的比率保持相同即可。亲和力可以通过本领域已知的常规方法测量,包括本文所述的那些方法。测量亲和力的特定方法是表面等离子体共振(SPR)。

[0068] “亲和力成熟的”抗体是指在一个或多个高变区(HVR)中具有一个或多个改变的抗体,与不具有此类改变的亲本抗体相比,此类改变导致了抗体对抗原的亲和力的改善。

[0069] 如本文所用的“肿瘤相关抗原”或TAA是指存在于靶细胞表面上的抗原决定簇,该靶细胞例如肿瘤中的细胞(诸如癌细胞或肿瘤基质的细胞)。在某些实施例中,靶细胞抗原为肿瘤细胞表面的抗原。在一个实施例中,TAA选自由以下项组成的组:成纤维细胞活化蛋白(FAP)、癌胚抗原(CEA)、叶酸受体 α (FolR1)、黑素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖(MCSP)、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER2)和p95HER2。特别地,肿瘤相关抗原为成纤维细胞活化蛋白(FAP)。

[0070] 术语“成纤维细胞活化蛋白(FAP)”也称为脯氨酰内肽酶FAP或Seprase(EC

3.4.21) ,除非另有说明,否则该术语是指任何脊椎动物来源的任何天然FAP,该脊椎动物来源哺乳动物诸如灵长类动物(例如人)、非人灵长类动物(例如食蟹猴)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。该术语涵盖“全长”的未加工FAP,以及通过细胞中加工产生的任何形式的FAP。该术语还涵盖FAP的天然存在的变体,例如剪接变体或等位基因变体。在一个实施例中,本发明的抗原结合分子能够特异性结合到人、小鼠和/或食蟹猴FAP。人FAP的氨基酸序列示出于UniProt (www.uniprot.org) 登录号Q12884 (版本149,SEQ ID NO:46) 或NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2中。人FAP的细胞外结构域(ECD)从氨基酸位置26处延伸至位置760处。小鼠FAP的氨基酸序列示出于UniProt登录号P97321 (版本126,SEQ ID NO:47) 或NCBI RefSeq NP_032012.1中。小鼠FAP的胞外结构域(ECD)从氨基酸位置26延伸至氨基酸位置761。优选地,本发明的抗FAP结合分子与FAP的细胞外结构域结合。

[0071] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗原结合分子与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)。参见例如,Kindt等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007)。单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异性。

[0072] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域中在序列上高变并且确定抗原结合特异性的各个区域,例如“互补决定区”(“CDR”)。

[0073] 通常,抗体包含六个CDR;三个在VH中(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),并且三个在VL中的(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。本文中的示例性CDR包括:

[0074] (a) 出现在以下氨基酸残基处的高可变环:26至32(L1)、50至52(L2)、91至96(L3)、26至32(H1)、53至55(H2)和96至101(H3)(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0075] (b) 出现在以下氨基酸残基处的CDR:24至34(L1)、50至56(L2)、89至97(L3)、31至35b(H1)、50至65(H2)和95至102(H3)(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991));以及

[0076] (c) 出现在以下氨基酸残基处的抗原接触点:27c至36(L1)、46至55(L2)、89至96(L3)、30至35b(H1)、47至58(H2),和93至101(H3)(MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996))。

[0077] 除非另外指明,否则CDR根据出处同上的Kabat等人所述的方法确定。本领域的技术人员将理解,CDR名称也可以根据出处同上的Chothia所述的方法、出处同上的McCallum所述的方法或者任何其他在科学上接受的命名系统来确定。

[0078] “框架”或“FR”是指除互补决定区(CDR)之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由以下四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,CDR和FR序列通常在VH(或VL)中以如下序列出现:FR1-CDR-H1(CDR-L1)-FR2-CDR-H2(CDR-L2)-FR3-CDR-H3(CDR-L3)-FR4。

[0079] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,在该抗体中重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分来源于不同的来源或物种。

[0080] 抗体的“类别”是指抗体的重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五大类抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且它们中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如

IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0081] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施例中,人源化抗体将基本上包含所有的至少一个,通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有HVR(例如CDR)对应于非人抗体的HVR,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。“人源化形式”的抗体,例如非人抗体,是指已经经历进行过人源化的抗体。本发明涵盖的“人源化抗体”的其他形式为这样的抗体,其中相对于原始抗体,恒定区已经过额外的修饰或改变以产生根据本发明的特性,尤其是关于C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合的特性。

[0082] 术语“CH1结构域”表示大致从EU 118位延伸至EU 215位(根据Kabat的EU编号系统)的抗体重链多肽部分。在一个方面,CH1结构域具有ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV(SEQ ID NO:48)的氨基酸序列。通常,具有EPKSC(SEQ ID NO:49)的氨基酸序列的片段随后连接CH1结构域与铰链区。

[0083] 术语“铰链区”表示抗体重链多肽的在野生型抗体重链中连接CH1结构域和CH2结构域的部分,例如根据Kabat的EU编号系统从约位置216至约位置230,或根据Kabat的EU编号系统从约位置226至约位置230。其他IgG亚类的铰链区可以通过与IgG1亚类序列的铰链区半胱氨酸残基比对来确定。铰链区通常是由两种氨基酸序列相同的多肽组成的二聚体分子。铰链区通常包含多达25个氨基酸残基,并且是柔性的,允许相关联靶结合位点独立地移动。铰链区可细分为三个结构域:上铰链区、中铰链区和下铰链区(参见例如,Roux等人,J.Immunol.161(1998)4083)。在一个方面,铰链区具有氨基酸序列DKTHTCPXCP(SEQ ID NO:50),其中X为S或P。在一个方面,铰链区具有氨基酸序列HTCPXCP(SEQ ID NO:51),其中X为S或P。在一个方面,铰链区具有氨基酸序列CPXCP(SEQ ID NO:52),其中X为S或P。

[0084] 本文中的术语“Fc结构域”或“Fc区”用于定义含有恒定区的至少一部分的抗体重链C末端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。IgG Fc区包含IgG CH2结构域和IgG CH3结构域。人IgG Fc区的“CH2结构域”通常从约第231位的氨基酸残基延伸至约第340位的氨基酸残基。(根据Kabat的EU编号系统)。在一个方面,CH2结构域具有APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQESTYRW SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIETKISKAK(SEQ ID NO:53)的氨基酸序列。CH2结构域的独特之处在于它与另一个结构域的配对不紧密。相反,两个N连接的支链碳水化合物链介于完整天然Fc区的两个CH2结构域之间。据推测,碳水化合物可能为结构域-结构域配对提供替代物,并有助于稳定CH2结构域。Burton,Mol.Immunol.22(1985)161-206。在一个实施例中,碳水化合物链连接至CH2结构域。本文的CH2结构域可以为天然序列CH2结构域或变体CH2结构域。“CH3结构域”包含Fc区中C末端至CH2结构域的一段残基(即,来自根据EU编号系统(根据IgG的Kabat)的约341位处的氨基酸残基到约447位处的氨基酸残基)。在一个方面,CH3结构域具有GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:54)的氨基酸序列。本文的CH3区可以是天然序列CH3结构域或变体CH3结构域(例如在其一个链中具有引入的“凸起”(“杵”)并在其另一个链中具有相应的引入的“空腔”(“臼”)的CH3结构

域;参见美国专利号5,821,333,其以引用方式明确并入本文)。此类变体CH3结构域可用于促进如本文所述的两条不相同的抗体重链的异源二聚化。在一个实施例中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。除非本文另外规定,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,EU编号系统也称为EU索引,如在Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。

[0085] 术语“野生型Fc结构域”表示与自然界中发现的Fc结构域的氨基酸序列相同的氨基酸序列。野生型人Fc结构域包括天然人IgG1 Fc区(非A和A同种异型)、天然人IgG2 Fc区、天然人IgG3 Fc区和天然人IgG4 Fc区以及其天然存在的变体。野生型Fc区表示在SEQ ID NO:55(IgG1,白种人同种异型)、SEQ ID NO:56(IgG1,非裔美国人同种异型)、SEQ ID NO:57(IgG2)、SEQ ID NO:58(IgG3)和SEQ ID NO:59(IgG4)中。术语“变体(人)Fc结构域”表示与“野生型”(人)Fc结构域氨基酸序列的氨基酸序列区别在于至少一个“氨基酸突变”的氨基酸序列。在一个方面,与天然Fc区相比,变体Fc区具有至少一个氨基酸突变,诸如在天然Fc区中从约一个到约十个氨基酸突变,并且在一个方面,从约一个到约五个氨基酸突变。在一个方面,(变体)Fc区与野生型Fc区具有至少约95%的同源性。

[0086] “杵臼(knob-into-hole)”技术描述于例如US 5,731,168;US 7,695,936;Ridgway等人,Prot Eng 9,617-621(1996)和Carter,J Immunol Meth 248,7-15(2001)中。通常,该方法涉及在第一多肽的界面处引入突起(“杵”)并在第二多肽的界面中引入相应的空腔(“臼”),使得该突起可以定位在该空腔中,以便促进异二聚体的形成并阻碍同二聚体的形成。突起是通过用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)取代来自第一多肽的界面的小氨基酸侧链而构建的。具有与突起相同或相似大小的补偿空腔是通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)取代大氨基酸侧链而在第二多肽的界面中创建的。突起和空腔可以通过改变编码多肽的核酸来制备,例如通过位点特异性诱变或通过肽合成。在具体实施例中,杵修饰包含Fc结构域的两个亚基中的一个中的氨基酸取代T366W,而臼修饰包含Fc结构域的两个亚基中的另一个中的氨基酸取代T366S、L368A和Y407V。在另一个具体实施例中,包含杵修饰的Fc结构域的亚基另外包含氨基酸取代S354C,而包含臼修饰的Fc结构域的亚基另外包含氨基酸取代Y349C。引入这两个半胱氨酸残基导致在Fc区的两个亚基之间形成二硫键,从而进一步稳定化二聚体(Carter,J Immunol Methods 248,7-15(2001))。

[0087] “与免疫球蛋白的Fc区等同的区域”旨在包括免疫球蛋白的Fc区的天然存在的等位基因变体,以及具有产生取代、添加或缺失但基本上不降低免疫球蛋白介导效应子功能(诸如抗体依赖性细胞毒性)的能力的修改的变体。举例而言,可以使一个或多个氨基酸从免疫球蛋白的Fc区的N末端或C末端缺失,而基本上不丧失生物学功能。可以根据本领域中已知的一般规则来选择此类变体,以便对活性具有最小的影响(参见例如Bowie,J.U.等人,Science 247:1306-10(1990))。

[0088] 术语“效应子功能”是指可归因于抗体的Fc区、随着抗体同种型而变化的那些生物学活性。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、细胞因子分泌、免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取、下调细胞表面受体(例如B细胞受体),以及B

细胞活化。

[0089] Fc受体结合依赖性效应子功能可通过抗体的Fc区与Fc受体(FcR)的相互作用来介导,该Fc受体是造血细胞上的特异性细胞表面受体。Fc受体属于免疫球蛋白超家族,并且已被证明可通过吞噬免疫复合物来介导去除抗体包被的病原体,并且通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)来裂解涂有相应抗体的红细胞以及其他各种细胞靶点(例如,肿瘤细胞)(参见例如Van de Winkel, J.G.和Anderson, C.L., J. Leukoc. Biol. 49(1991) 511-524)。FcR由其对免疫球蛋白同种型的特异性来定义: IgG抗体的Fc受体称为Fc γ R。Fc受体结合描述于例如: Ravetch, J.V.和Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9(1991) 457-492; Capel, P.J., 等人, Immunomethods 4(1994) 25-34; de Haas, M., 等人, J. Lab. Clin. Med. 126(1995) 330-341和Gessner, J.E., 等人, Ann. Hematol. 76(1998) 231-248中。

[0090] IgG抗体(Fc γ R) Fc区受体的交联触发多种效应子功能,包括吞噬作用、抗体依赖性细胞毒性、炎症介质的释放以及免疫复合物清除和抗体产生的调节。已在人体中鉴定出三类Fc γ R,其中包括:

[0091] -Fc γ RI (CD64) 以高亲和力结合单体IgG,并且在巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞上表达。Fc区IgG中在氨基酸残基E233-G236、P238、D265、N297、A327和P329(根据Kabat的EU索引编号)中的至少一个残基处的修饰降低与Fc γ RI的结合。在233-236位的IgG2残基被IgG1和IgG4取代,使得与Fc γ RI的结合力降低 10^3 倍,并且消除了人单核细胞对抗体敏化红细胞的应答(Armour, K.L. 等人, Eur. J. Immunol. 29(1999) 2613-2624)。

[0092] -Fc γ RII (CD32) 以中等至低亲和力结合复合IgG,并得到广泛表达。该受体可分为两种亚型,即Fc γ RIIA和Fc γ RIIB。Fc γ RIIA存在于许多参与杀伤的细胞(例如巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞)中,并且似乎能够活化杀伤过程。Fc γ RIIB似乎在抑制过程中起作用,并且存在于B细胞、巨噬细胞以及肥大细胞和嗜酸性粒细胞中。在B细胞上,它似乎起到抑制免疫球蛋白进一步产生以及同种型转换为例如IgE类的作用。在巨噬细胞上, Fc γ RIIB用于抑制由Fc γ RIIA介导的吞噬作用。在嗜酸性粒细胞和肥大细胞上, B型可能通过IgE与其单独受体的结合而有助于抑制这些细胞的活化。发现例如抗体(包含在至少一个氨基酸残基E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292和K414(根据Kabat的EU索引编号)的突变的IgG Fc区)对Fc γ RIIA的结合力降低。

[0093] -Fc γ RIII (CD16) 以中等至低亲和力结合IgG,并且包括两种类型。Fc γ RIIIA存在于NK细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞以及一些单核细胞和T细胞上,并且介导ADCC。Fc γ RIIB在中性粒细胞上的表达水平高。发现例如抗体(包含在至少一个氨基酸残基E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338和D376(根据Kabat的EU索引编号)的突变的IgG Fc区)对Fc γ RIIIA的结合力降低。

[0094] Shields, R.L. 等人 J. Biol. Chem. 276(2001) 6591-6604描述了人IgG1上与Fc受体的结合位点的定位、上述突变位点以及测量与Fc γ RI和Fc γ RIIA结合的方法。

[0095] 术语“ADCC”或“抗体依赖性细胞毒性”是由Fc受体结合介导的功能,并且是指在效应子细胞存在下本文所报道的抗体对靶细胞的裂解。通过测量抗体与表达Fc γ 受体的细胞(诸如重组表达Fc γ RI和/或Fc γ RIIA或NK细胞(在本质上表达Fc γ RIIIA)的细胞)的结合来研究抗体诱导介导ADCC的初始步骤的能力。特别地,测量NK细胞上与Fc γ R的结合。

[0096] “活化Fc受体”是这样的Fc受体,其在抗体的Fc区接合后,引起刺激携带受体的细

胞执行效应子功能的信号传导事件。活化性Fc受体包括Fc γ RIIIa (CD16a)、Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIa (CD32) 和Fc α RI (CD89)。特定的活化性Fc受体是人Fc γ RIIIa (参见UniProt登录号P08637, 版本141)。

[0097] 本文所用, 术语“IFNG”是指任何干扰素 γ 多肽, 包括重组生产的多肽、合成生产的多肽以及从细胞或组织 (诸如从T-淋巴细胞和NK细胞) 和其他来源分离的IFNG。如从任何来源所分离或如所生产的, IFNG多肽在长度上可以是异质的并且典型地长度范围为124个至146个氨基酸。典型地在两个末端观察到异质性, 在N末端是由于翻译后去除Cys-Tyr-Cys氨基酸, 并且在C末端是由于可变的蛋白水解加工。由于多肽的N-糖基化也可能导致异质性。IFNG多肽的异质性可以根据IFNG多肽的来源而不同。因此, 提及IFNG多肽是指所生产或分离的异质群体。

[0098] IFNG是一种响应于病毒感染或癌症生长而分泌的细胞因子。IFNG调控T细胞I类和II类MHC抗原表达、Fc受体和巨噬细胞。IFNG通过由两条不同链组成的多聚体受体复合物进行信号传导: IFNG受体结合亚基 (IFNGR、IFNGR1) 和跨膜辅助因子 (IFNGR2)。IFNG信号传导复合物是在配体驱动的IFNG受体二聚化时形成的。如适当的话, 如本文所用, 术语“IFNG多肽”可以包括其单体或二聚体形式。如本文所用, 术语“人IFNG” (huIFNG) 包括IFNG、等位基因变体同工型、合成分子、从人组织和细胞分离的蛋白质、及其修饰形式, 示例性人野生型IFNG多肽示于SEQ ID NO:60中。如本文所用, 术语“小鼠IFNG” (muIFNG) 包括IFNG、等位基因变体同工型、合成分子、从鼠类组织和细胞分离的蛋白质、及其修饰形式, 示例性小鼠野生型IFNG多肽示于SEQ ID NO:61中。

[0099] 如本文所用, 术语“IFNG变体多肽”是指单体IFNG多肽, 其中与野生型IFNG多肽的氨基酸序列相比, 一个或多个氨基酸被截短和/或其中存在氨基酸取代、缺失或插入。

[0100] 术语“抗IFNG抗体”、“抗IFNG”、“IFNG抗体”和“与IFNG特异性结合的抗体”是指能够以足够的亲和力与IFNG特异性结合的抗体或抗体片段, 使得该抗体或抗体片段可用作在靶向IFNG中的诊断剂和/或治疗剂。当与包含IFNG的分子缔合时, 抗IFNG抗体可以充当分子的掩蔽部分。本文具体公开了可阻断细胞因子的活性的对IFNG具有特异性的scFv。在一个方面, 例如通过放射免疫测定法 (RIA) 或流式细胞术 (FACS) 所测得的, 抗IFNG抗体与不相关的非IFNG蛋白的结合程度小于该抗体与IFNG结合程度的约10%。在某些实施例中, 与IFNG结合的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如, 10^{-6}M 或更小, 例如 10^{-6}M 至 10^{-13}M , 例如 10^{-8}M 至 10^{-10}M) 的解离常数 (K_D)。在一个方面, 抗-IFNG抗体为抗体片段, 特别是scFv。

[0101] 术语“接头”或“肽接头”是指包含一个或多个氨基酸、典型地约2个至30个氨基酸的肽。肽接头是本领域中已知的或在本文中描述的。合适的非免疫原性接头肽是例如 $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 或 $G_4(SG_4)_n$ 肽接头, 其中“n”通常为介于1与10之间、典型地介于2与5之间的数字, 特别是3, 即选自由以下项组成的组的肽: GGGGS (SEQ ID NO:62)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO:63)、SGGGSGGGG (SEQ ID NO:64)、GGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO:65)、 $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:66)、 $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:67) 和 $(G_4S)_5$ (SEQ ID NO:68)、GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO:69)、和GGGSGGG (SEQ ID NO:72), 但也包括诸如LEVLFFQG (SEQ ID NO:73) 或GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGLEVLFFQGPGGGGSGGGG (SEQ ID NO:74) 的肽接头。特别感兴趣的肽接头为蛋白酶可切割接头 (“可切割接头”)

GGGSGGGSGGGPQARKGGGGSGGGG (SEQ ID NO:70) 或GGGSGGGSGGGHQARKGGGGSGGGG (SEQ ID NO:71)。“不可切割接头”为不会被蛋白酶识别并且对蛋白水解稳定的肽接头。

[0102] 如本申请中所用的术语“氨基酸”表示包括以下项的天然存在的羧基 α -氨基酸的组:丙氨酸(三字母代码:ala,单字母代码:A)、精氨酸(arg,R)、天冬酰胺(asn,N)、天冬氨酸(asp,D)、半胱氨酸(cys,C)、谷氨酰胺(gln,Q)、谷氨酸(glu,E)、甘氨酸(gly,G)、组氨酸(his,H)、异亮氨酸(ile,I)、亮氨酸(leu,L)、赖氨酸(lys,K)、甲硫氨酸(met,M)、苯丙氨酸(phe,F)、脯氨酸(pro,P)、丝氨酸(ser,S)、苏氨酸(thr,T)、色氨酸(trp,W)、酪氨酸(try,Y)和缬氨酸(val,V)。

[0103] “融合”或“连接”意指组分(例如,抗体和Fab片段的重链)直接地或经由一个或多个肽接头而通过肽键连接。

[0104] 相对于参考多肽(蛋白质)序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”被定义为在比对候选序列与参考多肽序列并引入空位(如果必要的话)以实现最大的序列同一性百分比之后,并且在出于比对的的目的而不考虑将任何保守性取代作为序列同一性的组成部分并且不考虑将任何保守性取代作为序列同一性的组成部分的情况下,候选序列中的氨基酸残基与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以通过本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用公众可获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、Clustal W、Megalign(DNASTAR)软件或FASTA程序包。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。可替代地,可以使用序列比较计算机程序ALIGN-2来生成同一性百分比值。ALIGN-2序列比较计算机程序由基因泰克公司编写,并且源代码已经与用户文档一起提交到U.S.Copyright Office,Washington D.C.,20559,在那里以美国版权登记号TXU510087注册,并且在WO 2001/007611中有所描述。除非另外指明,否则出于本文的目的,使用FASTA包版本36.3.8c或更高版本的ggsearch程序,利用BLOSUM50比较矩阵生成氨基酸序列同一性百分比的值。FASTA程序包由W.R.Pearson和D.J.Lipman(1988),“Improved Tools for Biological Sequence Analysis”,PNAS 85:2444-2448;W.R.Pearson(1996)“Effective protein sequence comparison”Meth.Enzymol.266:227-258;以及Pearson等人.(1997),Genomics 46:24-36创作并且可从www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml或www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta公开获得。可替代地,可以使用可在fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi处访问的公共服务器来比较序列,使用ggsearch(全局蛋白质:蛋白质)程序和默认选项(BLOSUM50;开放:-10;ext:-2;Ktup=2)来确保执行全局而非局部比对。在输出比对标头中给出氨基酸同一性百分比。

[0105] 在某些实施例中,考虑了本文提供的双特异性抗原结合分子的氨基酸序列变体。例如,可能需要改善含TNF配体三聚体的抗原结合分子的结合亲和力和/或其他生物学特性。含TNF配体三聚体的抗原结合分子的氨基酸序列变体可以通过向编码分子的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内残基的缺失、和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以实现最终构建体,前提条件是最终构建体具有期望的特征,例如抗原结合。用于取代诱变的感兴趣的位点包括HVR和框架(FR)。保守性取代在表B中表头“优选的取代”下提供,并在下文中参考氨基酸侧链类别(1)至(6)进一步描述。可以将氨基酸取代引入目标分子中,并对产物进行期望的活性(例

如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性、或改善的ADCC或CDC) 筛选。

[0106] 表A

原始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp、Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala

原始残基	示例性取代	优选取代
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0109] 可根据共同的侧链特性将氨基酸分组：

[0110] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0111] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0112] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0113] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0114] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0115] (6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

[0116] 非保守性取代将需要用这些类别中的一个的成员交换另一类别。

[0117] 术语“氨基酸序列变体”包括实质性变体,其中在亲本抗原结合分子(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基中存在氨基酸取代。通常,相对于亲本抗原结合分子,选为用于进一步研究的一个或多个所得变体将在某些生物学特性方面(例如,亲和力增加、免疫原性降低)有改变(例如,改善)和/或将基本上保留亲本抗原结合分子的某些生物学特性。示例性取代变体是亲和力成熟抗体,其可例如使用诸如本文所述的那些基于噬菌体展示的亲和力成熟技术方便地生成。简而言之,将一个或多个CDR残基突变并且将变体抗原结合分子展示在噬菌体上并针对特定生物活性(例如结合亲和力)进行筛选。在某些实施例中,取代、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内,只要此类改变基本上不降低抗原结合分子的抗原结合能力即可。例如,可在CDR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文提供的保守性取代)。可用于鉴定可被靶向诱变的抗体残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells(1989) *Science*, 244:1081-1085所述。在此方法中,鉴定残基或一组靶残基(例如,带电残基,诸如Arg、Asp、His、Lys和Glu)并用中性或带负电的氨基酸(例如,丙氨酸或多丙氨酸)替换以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始取代展示功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。替代性地或另外地,利用抗原-抗原结合分子复合物的晶体结构来鉴定抗体与抗原之间的接触点。可靶向或消除作为取代的候选的此类接触残基和相邻残基。可筛选变体以确定它们是否具备期望的特性。

[0118] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及一个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的示例包括具有N末端甲硫氨酰残基的本发明的双特异性抗原结合分子。分子的其他插入变体包括与增加双特异性抗原结合分子的血清半衰期的多肽的N末端或C末端的融合。

[0119] 在某些方面中,改变本文提供的双特异性抗原结合分子以增加或降低抗体糖基化的程度。可通过改变氨基酸序列,使得产生或去除一个或多个糖基化位点,从而便利地获得分子的糖基化变体。当含TNF配体三聚体的抗原结合分子包含Fc区时,附接于其上的碳水化合物可以被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体典型地包含支链的双触角寡糖,其通常通过N键连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32 (1997)。寡糖可包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及附接于双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施例中,可以对含TNF家族配体三聚体的抗原结合分子中的寡糖进行修饰,以产生具有某些改善的特性的变体。在一个方面,提供了本发明的双特异性抗原结合分子或抗体的变体,其具有缺乏附接(直接或间接)于Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构。此类岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能,参见例如美国专利公开号US2003/0157108(Presta, L.)或US2004/0093621(协和发酵工业株式会社(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))。在另一方面,本发明的双特异性抗原结合分子或抗体提供有两分型寡糖的变体,例如其中附接于Fc区的双触角寡糖是通过GlcNAc两分的。此类变体可具有降低的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能,参见例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);以及US2005/0123546(Umana等人)。还提供了在连接至Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的变体。此类抗体变体可具有改善的CDC功能并描述于例如WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju, S.);以及WO 1999/22764(Raju, S.)中。

[0120] 在某些方面,可期望产生本发明的双特异性抗原结合分子的半胱氨酸工程化改造

的变体,例如“thioMab”,其中分子的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定方面,取代的残基存在于分子的可接近位点。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基由此定位于抗体的可接近位点,并且可用于将抗体与其他部分,诸如药物部分或接头-药物部分缀合,以产生免疫缀合物。在某些方面,可用半胱氨酸取代下列残基中的任何一个或多个:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。可如例如美国专利号7,521,541中所述形成半胱氨酸工程化改造的抗原结合分子。

[0121] 如本文所用的“蛋白酶可活化的”,关于包含干扰素 γ (IFNG)变体的抗原结合分子,是指包含IFNG变体的分子,该IFNG变体由于降低或消除IFNG变体结合IFNG受体的能力的掩蔽部分而结合IFNG受体的能力降低或消除。当掩蔽部分通过蛋白水解切割(例如,通过对将掩蔽部分连接至包含IFNG变体的分子的接头进行蛋白水解切割)解离时,恢复与IFNG受体的结合,并且从而能够活化IFNG变体。

[0122] 如本文所用,“可逆地隐藏”是指掩蔽部分与IFNG变体多肽的结合,诸如以防止IFNG变体多肽与其受体结合。这种隐藏是可逆的,因为掩蔽部分可以例如通过蛋白酶切割从IFNG变体多肽释放出来,并且从而使IFNG变体多肽自由地与其受体结合。

[0123] 如本文所用,“蛋白酶”或“蛋白水解酶”是指在识别位点切割接头并由靶细胞表达的任何蛋白水解酶。此类蛋白酶可能由靶细胞分泌或保持与靶细胞相关,例如在靶细胞表面上。蛋白酶的实例包括但不限于金属蛋白酶,例如基质金属蛋白酶1-28和去整合素和金属蛋白酶(ADAM)2、7-12、15、17-23、28-30和33;丝氨酸蛋白酶,例如尿激酶型纤溶酶原活化剂和Matriptase;半胱氨酸蛋白酶(例如,组织蛋白酶S)和基质金属蛋白酶(例如,MMP-2和MMP-9)。Matriptase基质金属蛋白酶2(MMP-2、明胶酶A)和基质金属蛋白酶9(MMP-9、明胶酶B)例如在乳腺癌和卵巢癌中过表达。在宫颈癌、乳腺癌和卵巢癌以及上皮性卵巢癌(EOC)患者的腹水中检测到了MMP-2和MMP-9活性,但在这些患者的血清中未检测到(Demeter, A.等人, *Anticancer Res.* 2005, 25, 2885-2889)。虽然在正常上皮细胞中可以检测到matriptase,但matriptase活性主要在癌症中检测到(Le Beau, A. M.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 93-98)。

[0124] 术语“核酸”或“多核苷酸”包括包含核苷酸聚合物的任何化合物和/或物质。每个核苷酸由碱基组成,特别是嘌呤或嘧啶碱基(即胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))、糖(即脱氧核糖或核糖)和磷酸酯基团。通常,核酸分子通过碱基序列进行描述,其中所述碱基代表核酸分子的一级结构(线性结构)。碱基序列通常表示为从5'至3'。在本文中,术语核酸分子涵盖脱氧核糖核酸(DNA)(包括例如互补DNA(cDNA)和基因组DNA)、核糖核酸(RNA)(特别是信使RNA(mRNA))、DNA或RNA的合成形式,以及包含这些分子中的两种或更多种的混合聚合物。核酸分子可以是线性的或环状的。此外,术语核酸分子包括有义链和反义链,以及单链和双链形式。此外,本文所描述的核酸分子可含有天然存在的或非天然存在的核苷酸。非天然存在的核苷酸的实例包括具有衍生化的糖或磷酸主链键或经化学修饰的残基的经修饰的核苷酸碱基。核酸分子还涵盖适合作为用于本发明的抗体的体外和/或体内(例如,在宿主或患者体内)直接表达的载体的DNA和RNA分子。此类DNA(例如cDNA)或RNA(例如mRNA)载体可以是未修饰的或经修饰的。举例而言,可以对mRNA进行化学修饰以增强RNA载体的稳定性和/或编码分子的表达,使得可以将mRNA注射到受试者体内以在体内产生抗体(参见例如Stadler等人, *Nature Medicine* 2017, 在线发表于2017年6月12

日,doi:10.1038/nm.4356或EP 2 101 823 B1)。

[0125] “分离的”核酸是指已自其自然环境的组分中分离的核酸分子。经分离的核酸包括这样的核酸分子,其包含在通常含有核酸分子的细胞中,但该核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0126] “编码双特异性抗原结合分子或抗体的分离的核酸”是指编码双特异性抗原结合分子或抗体的重链和轻链(或其片段)的一种或多种核酸分子,包括在单个载体或单独的载体中的此类核酸分子,以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的此类核酸分子。

[0127] 关于与本发明的参考核苷酸序列具有至少例如95%“同一性”的核苷酸序列的核酸或多核苷酸,是指除了多核苷酸序列可包括参考核苷酸序列的每100个核苷酸至多五个点突变之外,多核苷酸的核苷酸序列与参考序列是一致的。换句话讲,为了获得具有与参考核苷酸序列至少95%同一性的核苷酸序列的多核苷酸,参考序列中至多5%的核苷酸可缺失或被另外的核苷酸取代,或参考序列中总核苷酸的至多5%的数量的核苷酸可插入到参考序列中。参考序列的这些改变可发生在参考核苷酸序列的5'或3'末端位置或那些末端位置之间的任意位置,或单个地散布在参考序列的残基之中,或以一个或多个连续的组散布在参考序列内。作为一种实际情况,可以使用已知的计算机程序,诸如上文针对多肽所讨论的程序(例如ALIGN-2),常规确定任何特定多核苷酸序列是否与本发明的核苷酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。

[0128] 术语“表达盒”是指通过重组或合成生成的多核苷酸,其具有允许特定核酸在靶细胞中转录的一系列特定核酸元件。重组表达盒可以并入质粒、染色体、线粒体DNA、质体DNA、病毒或核酸片段中。典型地,表达载体的重组表达盒部分除其他序列之外还包括待转录的核酸序列和启动子。在某些实施例中,本发明的表达盒包含编码本发明的双特异性抗原结合分子或其片段的多核苷酸序列。

[0129] 术语“载体”或“表达载体”与“表达构建体”是同义的并且是指用于将特定基因引入与其可操作地关联的靶细胞中并且指导该基因的表达的DNA分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体,以及并入其已被引入的宿主细胞的基因组中的载体。本发明的表达载体包含表达盒。表达载体允许大量稳定mRNA的转录。一旦表达载体处于靶细胞内部,即通过细胞转录和/或翻译机制产生由该基因编码的核糖核酸分子或蛋白。在一个实施例中,本发明的表达载体包含表达盒,所述表达盒包含编码本发明的双特异性抗原结合分子或其片段的多核苷酸序列。

[0130] 术语“宿主细胞”“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指外源核酸已被引入其中的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和来源于该原代转化细胞的子代,不考虑传代次数。子代可能不与亲本细胞的核酸内容物完全一致,而是可能含有突变。本文包括如在原始转化细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变子代。宿主细胞是可以用于生成本发明的双特异性抗原结合分子的任何类型的细胞系统。宿主细胞包括培养的细胞,举几个例子,例如培养的哺乳动物细胞,诸如CHO细胞、BHK细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、YO骨髓瘤细胞、P3X63小鼠骨髓瘤细胞、PER细胞、PER.C6细胞或杂交瘤细胞、酵母细胞、昆虫细胞和植物细胞,以及包括在转基因动物、转基因植物或培养的植物或动物组织中的细胞。

[0131] 药剂的“有效量”是指在其所施用的细胞或组织中产生生理学变化所需的量。

[0132] 药剂(例如药物组合物)的“治疗有效量”是指在必需的剂量和时段上有效实现期望的治疗或预防结果的量。治疗有效量的药剂例如消除、减少、延迟、最小化或预防疾病的不良反应。

[0133] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类动物,诸如猴)、兔以及啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。特别地,个体或受试者是人。

[0134] 术语“药物组合物”或“药物配制物”是指处于允许包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对于将被施用该药物组合物的受试者具有不可接受的毒性的附加组分的制剂。

[0135] “药用载体”是指药物组合物或配制物中除有效成分之外的成分,其对受试者是无毒的。药用载体包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂,或防腐剂。

[0136] 术语“包装插页”用于指治疗产品的商业包装中通常包括的说明书,其含有涉及此类治疗产品的使用的有关适应症、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌症和/或警告的信息。

[0137] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变型,诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指试图改变所治疗个体的自然进程的临床干预,并且可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、降低疾病进展的速率、改善或减轻疾病症状,以及缓解或改善预后。在一些实施例中,本发明的分子用于延迟疾病的发展或用于减缓疾病的进展。

[0138] 如本文所用的术语“癌症”是指增生性疾病,诸如淋巴瘤、淋巴细胞性白血病、肺癌、非小细胞肺(NSCL)癌、支气管肺泡细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、结肠癌、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、肝细胞癌、胆管癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、脊椎轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、神经鞘瘤、室管膜瘤、成髓细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤和尤文氏肉瘤,包括以上癌症中的任一种的难治性型式,或一种或多种以上癌症的组合。

[0139] 如本文所用,术语“化学治疗剂”是指可用于治疗癌症的化合物。在一个方面,化学治疗剂为抗代谢物。在一个方面,抗代谢物选自由以下项组成的组:氨基蝶呤、甲氨蝶呤、培美曲塞、雷替曲塞、克拉屈滨、氯法拉滨、氟达拉滨、巯基嘌呤、喷司他丁、硫鸟嘌呤、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、氟尿苷和吉西他滨。在一个特定方面,抗代谢物为卡培他滨或吉西他滨。在另一方面,抗代谢物为氟尿嘧啶。在一个方面,化学治疗剂是影响微管形成的药剂。在一个方面,影响微管形成的药剂选自由以下项组成的组:紫杉醇、多西他赛、长春新碱、长春碱、长春地辛、长春瑞滨、泰素帝、依托泊苷和替尼泊苷。在另一方面,化学治疗剂为烷化剂诸如环磷酰胺。在一个方面,化学治疗剂为细胞毒性抗生素,诸如拓扑异构酶II抑制剂。在一个方面,拓扑异构酶II抑制剂为多柔比星。

[0140] 术语“用于在癌症免疫疗法中使用的药剂”是指影响免疫系统的任何物质,包括单克隆抗体。本文所述的抗原结合分子可以被认为有这样的药剂。用于在癌症免疫疗法中使

用的药剂可用作治疗癌症的抗肿瘤剂。在一个方面,所述药剂包括但不限于抗CTLA4抗体(例如,伊匹单抗)、抗PD1抗体(例如,纳武单抗或派姆单抗)、PD-L1抗体(例如,阿特珠单抗、阿维单抗或德瓦鲁单抗)、LAG3抗体(例如,瑞拉利单抗)、PD1-LAG3双特异性抗体和TIGIT抗体(例如,替瑞利尤单抗)。

[0141] 含有干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的抗原结合分子

[0142] 本发明提供了含有干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的新抗原结合分子,其能够与肿瘤相关抗原、特别是成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 特异性结合,并因此将与FAP特异性结合的抗体与新IFNG变体多肽同二聚体组合。本文所述的抗原结合分子具有特别有利的特性,诸如可生产性、稳定性、结合亲和力、生物活性、靶向效率、降低的汇效应、优异的药代动力学 (PK) 特性、降低的毒性、延长的治疗窗以及从而可能增强的功效。

[0143] 示例性抗原结合分子

[0144] 在一个方面,本文公开了抗原结合分子,其特征在于包含干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体,其中IFNG变体多肽的特征在于C末端氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1)。本文已显示,KRKRP补片、即KRKRP (SEQ ID NO:78) 的氨基酸序列的存在对于IFNG的活性是重要的。最近,已确认KRKRP补片与IFNG与细胞外基质的硫酸乙酰肝素部分的结合有关,并且从而防止致命的全身毒性 (J.Kemna等人,Nature Immunology2023,24,414-422)。为了避免蛋白水解,野生型IFNG的C末端已用脯氨酸帽稳定,使得IFNG变体多肽的序列以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止。

[0145] 此外,抗原结合分子包含针对肿瘤相关抗原、特别是FAP的靶向部分。另外,本文所述的抗原结合分子包含Fc区,其包含降低效应子功能的突变。使用包含减少或消除效应子功能的突变的Fc区将通过经由Fc受体进行交联来防止非特异性激动作用,并且防止表达FAP的细胞的ADCC。如本文所述的抗原结合分子与常规IFNG相比具有优势,因为它们选择性诱导靶细胞处的免疫应答,该靶细胞典型地在肿瘤基质中 (即与肿瘤临近)。

[0146] 在存在表达FAP的细胞的情况下,本文所述的抗原结合分子能够上调MHCI和PDL1表达 (实例5)。在MHCI表达上调之后,抗原结合分子将增加肿瘤组织中CD8 T细胞的量 (实例5)。此外,用本文所述的抗原结合分子治疗导致疗法后CXCL9 (T细胞吸引趋化因子) 水平增加,这对于免疫浸润级联至关重要。

[0147] 本文提供了抗原结合分子,其包含

[0148] (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体,以及

[0149] (ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体,其中IFNG变体多肽的特征在于C末端氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1)。

[0150] 因此,提供了抗原结合分子,其包含 (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体和 (ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体,其中IFNG变体多肽的特征在于其在C末端以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止。

[0151] IFNG变体多肽在C末端被截短并在C末端用脯氨酸保护以防止其被蛋白水解。

[0152] 在一个方面,与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体为与成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 特异性结合的抗体。在一个方面,提供了抗原结合分子,其中与FAP特异性结合的抗体包含: (a) 重链可变区 (V_H FAP), 该重链可变区包含: 重链互补决定区 (CDR-H1), 其包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列; CDR-H2, 其包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列; 和CDR-H3, 其包含SEQ ID NO: 6

的氨基酸序列;以及轻链可变区 (V_L FAP),该轻链可变区包含:轻链互补决定区 (iv) CDR-L1,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;或者 (b) 重链可变区 (V_H FAP),该重链可变区包含:CDR-H1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;CDR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;和CDR-H3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;以及轻链可变区 (V_L FAP),该轻链可变区包含:CDR-L1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一个方面,提供了抗原结合分子,其中与FAP特异性结合的抗体包含:重链可变区 (V_H FAP),其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;以及轻链可变区 (V_L FAP),其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;或者该抗体包含:重链可变区 (V_H FAP),其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;以及轻链可变区 (V_L FAP),其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一个特定方面,提供了抗原结合分子,其中与FAP特异性结合的抗体包含:重链可变区 (V_H FAP),其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;以及轻链可变区 (V_L FAP),其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0153] 在一个方面,该抗原结合分子包含Fc结构域,特别是IgG1 Fc结构域或IgG4 Fc结构域。在一个方面,Fc结构域包含降低抗体与Fc受体的结合亲和力和/或效应子功能的一个或多个氨基酸取代。在一个方面,Fc结构域属于人IgG1亚类,其具有氨基酸突变L234A、L235A和P329G(根据Kabat EU索引的EU编号)。在另一方面,Fc结构域为鼠类Fc结构域,并且包含氨基酸突变D265A和P329G(根据Kabat EU索引的EU编号)。

[0154] 在一个方面,抗原结合分子为蛋白酶可活化的并且包含蛋白酶识别位点和掩蔽部分。因此,抗原结合分子包含 (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体, (ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体,其中IFNG变体多肽的特征在于其在C末端以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止, (iii) 蛋白酶识别位点和 (iv) 掩蔽部分。

[0155] 蛋白酶识别位点

[0156] 在一个方面,蛋白酶识别位点为用于matrilysin的底物。在一个方面,蛋白酶识别位点包含氨基酸序列PQARK (SEQ ID NO:20) 或HQARK (SEQ ID NO:21) 或由其组成。在一个特定方面,蛋白酶识别位点包含氨基酸序列PQARK (SEQ ID NO:20) 或由其组成。在一个方面,蛋白酶识别位点为将掩蔽部分与IFNG变体多肽连接的可切割肽接头的一部分。在一个方面,可切割肽接头包含SEQ ID NO:70或SEQ ID NO:71的氨基酸序列,在一个特定方面,可切割肽接头包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0157] 在一个方面,提供了抗原结合分子,其中掩蔽部分在其N末端经由可切割肽接头(掩蔽释放形式)融合到IFNG变体多肽的C末端。在一个方面,IFNG变体多肽在其N末端经由稳定的接头融合到抗体的C末端。

[0158] 在另一方面,提供了抗原结合分子,其中掩蔽部分在其N末端经由稳定的接头融合到Fc结构域的C末端并且在其C末端经由可切割肽接头(细胞因子释放形式)融合到IFNG变体多肽的N末端。

[0159] 掩蔽部分

[0160] 蛋白酶可活化的抗原结合分子包含掩蔽部分,特别是用于IFNG变体同二聚体的两个掩蔽部分。在一个方面,掩蔽部分为与IFNG变体多肽特异性结合并能够掩蔽它的抗体片段。在一个特定方面,掩蔽部分为与IFNG变体多肽特异性结合的scFv。

[0161] 在一个方面,与IFNG变体多肽、特别是scFv特异性结合的掩蔽部分包含

[0162] (a) 重链可变区 (V_H IFNG),该重链可变区包含:CDR-H1,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;CDR-H2,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;和CDR-H3,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;以及轻链可变区 (V_L IFNG),该轻链可变区包含:轻链互补决定区(iv) CDR-L1,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;或者

[0163] (b) 重链可变区 (V_H IFNG),该重链可变区包含:CDR-H1,其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;CDR-H2,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;和CDR-H3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;以及轻链可变区 (V_L IFNG),该轻链可变区包含:CDR-L1,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0164] 在一个方面,与IFNG变体多肽、特别是scFv特异性结合的掩蔽部分包含:(a) 重链可变区 (V_H IFNG),其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;以及轻链可变区 (V_L IFNG),其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;或者(b) 重链可变区 (V_H IFNG),其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列;以及轻链可变区 (V_L IFNG),其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一个特定方面,与IFNG变体多肽、特别是scFv特异性结合的掩蔽部分包含:(a) 重链可变区 (V_H IFNG),其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;以及轻链可变区 (V_L IFNG),其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0165] 在一个方面,与IFNG变体多肽特异性结合并掩蔽IFNG变体多肽的掩蔽部分包含与SEQ ID NO:38至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,与IFNG变体多肽特异性结合的掩蔽部分包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

[0166] 在另一方面,与IFNG变体多肽特异性结合并掩蔽IFNG变体多肽的掩蔽部分包含与SEQ ID NO:39至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,与IFNG变体多肽特异性结合的掩蔽部分包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0167] 掩蔽释放形式和细胞因子释放形式

[0168] 在一个方面,提供了抗原结合分子,其中掩蔽部分在其N末端经由可切割肽接头(掩蔽释放形式)融合到IFNG变体多肽的C末端。在一个方面,IFNG变体多肽在其N末端经由稳定的接头融合到抗体的C末端。该形式的示意性方案示于图1D中。

[0169] 在一个特定方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0170] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:40至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0171] 在另一特定方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0172] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:43至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:44至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID

N0:43的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID N0:44的氨基酸序列。

[0173] 在另一方面,提供了抗原结合分子,其中掩蔽部分在其N末端经由稳定的接头融合到Fc结构域的C末端并且在其C末端经由可切割肽接头(细胞因子释放形式)融合到IFNG变体多肽的N末端。该形式的示意性方案示于图1E中。

[0174] 在一个特定方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0175] 两条重链,其包含与SEQ ID N0:42至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID N0:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID N0:42的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID N0:41的氨基酸序列。

[0176] 在另一特定方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0177] 两条重链,其包含与SEQ ID N0:45至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID N0:44至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID N0:45的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID N0:44的氨基酸序列。

[0178] 包含空间掩蔽的IFNG变体多肽的形式

[0179] 本文还提供了抗原结合分子,其包含

[0180] (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体,以及

[0181] (ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体,其中IFNG变体多肽的特征在于其在C末端以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID N0:1) 终止,并且其中IFNG变体多肽插入抗体的上铰链区与下铰链区之间。

[0182] 这些抗原结合分子的特征在于它们包含空间隐藏的、即空间掩蔽的IFNG变体多肽。

[0183] 在一个方面,提供了抗原结合分子,其中IFNG变体多肽在其N末端经由第一接头融合到与肿瘤相关抗原、特别是FAP特异性结合的Fab结构域的VHCH1链的C末端。此外,IFNG变体多肽在其C末端经由第二接头融合到Fc结构域的下铰链区的N末端。该形式的示意性方案示于图10A中。

[0184] 在一个方面,第一接头为甘氨酸-丝氨酸接头。在一个特定方面,第一接头具有SEQ ID N0:69的氨基酸序列。

[0185] 在一个方面,第二接头为甘氨酸-丝氨酸接头或可切割接头。在一个特定方面,第二接头具有选自由以下项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID N0:72、SEQ ID N0:73或SEQ ID N0:75。

[0186] 在一个方面,下铰链区具有SEQ ID N0:76的氨基酸序列。在一个方面,下铰链区被缩短并且具有SEQ ID N0:77的氨基酸序列。

[0187] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0188] 两条重链,其包含与SEQ ID N0:119至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID N0:41至少约95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0189] 在另一方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0190] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:120至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0191] 在另一方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0192] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:121至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0193] 在又一方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0194] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:122至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0195] 在另一方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0196] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:123至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0197] 减少Fc受体结合和/或效应子功能的Fc结构域修饰

[0198] 本发明的抗原结合分子进一步包含Fc结构域,该Fc结构域由第一亚基和第二亚基构成并且包含降低抗原结合分子与Fc受体的结合亲和力和/或效应子功能的一个或多个氨基酸取代。因此,一个或多个氨基酸修饰可引入本文提供的抗体的Fc区中,从而生成Fc区变体。Fc区变体可包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),其在一个或多个氨基酸位置上包含氨基酸修饰(例如,取代)。

[0199] Fc结构域对本发明的双特异性抗体赋予有利的药代动力学特性,包括有助于靶组织中的良好积聚的长血清半衰期和有利的组织-血液分配比率。然而,与此同时,可能导致本发明的双特异性抗体不期望地靶向表达Fc受体的细胞,而不是优选的抗原携带细胞。因此,在特定实施例中,与天然IgG Fc结构域,特别是IgG1 Fc结构域或IgG4 Fc结构域相比,本发明的双特异性抗体的Fc结构域表现出降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应子功能。更具体地,Fc结构域为IgG1 Fc结构域。

[0200] 在一个此类方面,与天然IgG1 Fc结构域(或包含天然IgG1 Fc结构域的本发明的

双特异性抗原结合分子)相比,该Fc结构域(或包含该Fc结构域的本发明的双特异性抗原结合分子)表现出对Fc受体的结合亲和力的小于50%、优选地小于20%、更优选地小于10%且最优选地小于5%;和/或与天然IgG1 Fc结构域(或包含天然IgG1 Fc结构域的本发明的双特异性抗原结合分子)相比,该Fc结构域(或包含该Fc结构域的本发明的双特异性抗原结合分子)表现出效应子功能的小于50%、优选地小于20%、更优选地小于10%且最优选地小于5%。在一个方面,Fc结构域(或包含该Fc结构域的本发明的双特异性抗原结合分子)不显著结合Fc受体和/或诱导效应子功能。在一个特定方面,Fc受体是Fc γ 受体。在一个方面,Fc受体是人Fc受体。在一个方面,Fc受体是活化性Fc受体。在一个具体的方面,Fc受体是活化性人Fc γ 受体,更具体地是人Fc γ RIIIa、Fc γ RI或Fc γ RIIa,最具体地是人Fc γ RIIIa。在一个方面,Fc受体是抑制性Fc受体。在具体方面,Fc受体是抑制性人Fc γ 受体,更具体地是人Fc γ RIIB。在一个方面,效应子功能是CDC、ADCC、ADCP和细胞因子分泌中的一个或多个。在一个特定方面,效应子功能是ADCC。在一个方面,与天然IgG1 Fc结构域相比较,Fc结构域表现出基本上类似的对新生Fc受体(FcRn)的结合亲和力。当Fc结构域(或包含所述Fc结构域的本发明的双特异性抗原结合分子)表现出天然IgG1 Fc结构域(或包含天然IgG1Fc结构域的本发明的双特异性抗原结合分子)对FcRn的结合亲和力的大于约70%、具体地大于约80%、更具体地大于约90%时,实现了基本上类似的与FcRn的结合。

[0201] 在特定方面,Fc结构域经过工程化改造,以与非工程化改造的Fc结构域相比具有降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应子功能。在特定方面,本发明的双特异性抗原结合分子的Fc结构域包含降低Fc结构域对Fc受体的结合亲和力和/或效应子功能的一个或多个氨基酸突变。典型地,相同的一个或多个氨基酸突变存在于Fc结构域的两个亚基中的每一个中。在一个方面,氨基酸突变降低Fc结构域对Fc受体的结合亲和力。在另一方面,氨基酸突变将Fc结构域对Fc受体的结合亲和力降低至少2倍、至少5倍或至少10倍。在一个方面,与包含非工程化改造的Fc结构域的本发明的双特异性抗体相比,包含工程化改造的Fc结构域的本发明的双特异性抗原结合分子表现出对Fc受体的结合亲和力的少于20%、具体地少于10%、更具体地少于5%。在特定方面,Fc受体是Fc γ 受体。在其他方面,Fc受体是人Fc受体。在一个方面,Fc受体是抑制性Fc受体。在具体方面,Fc受体是抑制性人Fc γ 受体,更具体地是人Fc γ RIIB。在一些方面,Fc受体是活化的Fc受体。在一个具体的方面,Fc受体是活化性人Fc γ 受体,更具体地是人Fc γ RIIIa、Fc γ RI或Fc γ RIIa,最具体地是人Fc γ RIIIa。优选地,与这些受体中的每一个的结合降低。在一些方面,对互补组分的结合亲和力,尤其对C1q的特异性结合亲和力也降低了。在一个方面,对新生Fc受体(FcRn)的结合亲和力不降低。当Fc结构域(或包含所述Fc结构域的本发明的双特异性抗原结合分子)表现出Fc结构域的非工程化改造形式(或包含Fc结构域的所述非工程化改造形式的本发明的双特异性抗原结合分子)对FcRn的结合亲和力的大于约70%时,实现了基本上类似的与FcRn的结合,即实现了Fc结构域对所述受体的结合亲和力的保留。Fc结构域或包含所述Fc结构域的本发明的双特异性抗原结合分子可表现出这种亲和力的大于约80%或甚至大于约90%。在某些实施例中,本发明的双特异性抗原结合分子的Fc结构域被工程化改造,以相比于非工程化改造的Fc结构域具有降低的效应子功能。降低的效应子功能可以包括但不限于以下中的一个或多个:降低的补体依赖性细胞毒性(CDC)、降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、降低的抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)、减少的细胞因子分泌、减少的免疫复合物介

导的抗原呈递细胞的抗原摄取、减少的与NK细胞的结合、减少的与巨噬细胞的结合、减少的与单核细胞的结合、减少的与多形核细胞的结合、减少的直接信号传导诱导性细胞凋亡、降低的树突细胞成熟或减少的T细胞引发。

[0202] 具有降低的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一者或多者的取代的那些(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个处具有取代的Fc突变体,包括所谓的“DANA”Fc突变体,其残基265和297被取代为丙氨酸(美国专利号7,332,581)。描述了具有改善的或降低的与FcR的结合的某些抗体变体。(例如美国专利号6,737,056;WO 2004/056312,以及Shields,R.L.等人,J.Biol.Chem.276(2001)6591-6604)。

[0203] 在本发明的一个方面,Fc结构域在E233、L234、L235、N297、P331和P329位处包含氨基酸取代。在一些方面,Fc结构域包含氨基酸取代L234A和L235A(“LALA”)。在一个这样的实施例中,Fc结构域是IgG1 Fc结构域,特别是人IgG1 Fc结构域。在一个方面,所述Fc结构域在位置P329处包含氨基酸取代。在一个更具体的方面,氨基酸取代是P329A或P329G,特别是P329G。在一个实施例中,Fc结构域在位置P329处包含氨基酸取代并且包含选自E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S组成的组的另外的氨基酸取代。在更优选的方面,Fc结构域包含氨基酸突变L234A、L235A和P329G(“P329GLALA”)。氨基酸取代的“P329GLALA”组合几乎完全消除人IgG1 Fc结构域的Fc γ 受体结合,如PCT专利申请号WO 2012/130831 A1中所述。所述文档还描述了制备此类突变Fc结构域的方法和用于确定其性质(诸如Fc受体结合或效应子功能)的方法。此类抗体是具有突变L234A和L235A或具有突变L234A、L235A和P329G的IgG1(根据Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991的EU索引编号)。

[0204] 在一个方面,Fc结构域为IgG4 Fc结构域。在一个更具体的实施例中,Fc结构域是在S228位处(Kabat编号)包含氨基酸取代,具体地是氨基酸取代S228P的IgG4 Fc结构域。在一个更具体的实施例中,Fc结构域是包含氨基酸取代L235E和S228P以及P329G的IgG4 Fc结构域。这种氨基酸取代减少IgG4抗体的体内Fab臂交换(参见Stubenrauch等人,Drug Metabolism and Disposition 38,84-91(2010))。

[0205] 具有延长的半衰期和改善的与新生儿Fc受体(FcRn)结合、负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer,R.L.等人,J.Immunol.117(1976)587-593;以及Kim,J.K.等人,J.Immunol.24(1994)2429-2434)的抗体描述于US 2005/0014934中。那些抗体包含这样的Fc区,该Fc区中具有改善Fc区与FcRn的结合的一个或多个取代。此类Fc变体包括在以下Fc区残基中的一处或多处具有取代的Fc变体:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如对Fc区残基434的取代(美国专利号7,371,826)。关于Fc区变体的其他示例,还参见Duncan,A.R.和Winter,G.,Nature 322(1988)738-740;US 5,648,260;US 5,624,821;以及WO 94/29351。

[0206] 与Fc受体的结合可以例如通过ELISA或通过表面等离子体共振(SPR)使用标准仪器(诸如BIAcore仪器(GE Healthcare))容易地确定,并且Fc受体诸如可以通过重组表达获得。本文描述了合适的此类结合测定。另选地,可以使用已知表达特定Fc受体的细胞系(诸如表达Fc γ IIIa受体的人NK细胞)来评价Fc结构域或包含Fc结构域的细胞活化双特异性抗

原结合分子对Fc受体的结合亲和力。Fc结构域或本发明的包含Fc结构域的双特异性抗原结合分子的效应子功能可以通过本领域已知的方法来测量。本文描述了用于测量ADCC的合适测定。评定感兴趣的分子的ADCC活性的体外测定的其他示例描述于美国专利号5,500,362; Hellstrom等人, Proc Natl Acad Sci USA 83,7059-7063 (1986) 和Hellstrom等人, Proc Natl Acad Sci USA 82,1499-1502 (1985); 美国专利号5,821,337; Bruggemann等人, JExp Med 166,1351-1361 (1987)。另选地, 可以使用非放射性测定方法(参见例如, 用于流式细胞术的ACT1™非放射性细胞毒性测定(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA); 以及 CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison, WI))。用于此类测定的有效效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。替代性地或另外地, 可例如在诸如在Clynes等人, Proc Natl Acad Sci USA 95,652-656 (1998) 中公开的动物模型中体内评定目的分子的ADCC活性。

[0207] 以下部分描述了包含降低Fc受体结合和/或效应子功能的Fc结构域修饰的本文所述的抗原结合分子的优选的方面。在一个方面, 提供了抗原结合分子, 其包含: (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体以及(ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体, 其中IFNG变体多肽的特征在于C末端氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1), 并且其中抗原结合分子包含IgG1 Fc结构域或IgG4 Fc结构域, 并且其中Fc结构域包含降低抗体与Fc受体的结合亲和力和/或效应子功能的一个或多个氨基酸取代。在另一方面, 提供了抗原结合分子, 其包含: (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体以及(ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体, 其中IFNG变体多肽的特征在于其在C末端以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止, 并且其中Fc结构域属于人IgG1亚类, 其具有氨基酸突变L234A、L235A和P329G(根据Kabat EU索引的EU编号)。

[0208] 示例性IFNG变体多肽

[0209] 在一个方面, 提供了IFNG变体多肽, 其特征在于其在C末端以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止。本文已显示, KRKR补片、即KRKR (SEQ ID NO:78) 的氨基酸序列的存在对于IFNG的活性是重要的。为了避免蛋白水解, 野生型IFNG的C末端已用脯氨酸帽稳定, 使得IFNG变体多肽的序列以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止。

[0210] 在一个方面, 提供了包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成的IFNG变体多肽。在另一方面, 提供了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成的IFNG变体多肽。

[0211] 本文还提供了IFNG变体多肽的突变或插入变体, 其特征在于其在C末端以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止。

[0212] 在一个方面, 本文提供了IFNG变体多肽, 其特征在于其在C末端以氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止, 其中SEQ ID NO:1中的一个或两个氨基酸用选自以下项组成的组的氨基酸替换: 丝氨酸(S)、脯氨酸(P) 和谷氨酸(E)。因此, 本文提供了IFNG变体多肽, 其特征在于其在C末端以选自以下项组成的组的氨基酸序列终止: AKTGSRKRP (SEQ ID NO:137)、AKTGKSKRP (SEQ ID NO:138)、AKTGKRSRP (SEQ ID NO:139)、AKTGKRKSP (SEQ ID NO:134)、AKTGPRKRP (SEQ ID NO:140)、AKTGKPKRP (SEQ ID NO:141)、AKTGKRPRP (SEQ ID NO:142)、AKTGKRPPP (SEQ ID NO:143)、AKTGERKRP (SEQ ID NO:144)、AKTGKEKRP (SEQ ID NO:145)、AKTGKRERP (SEQ ID NO:146)、AKTGKRKEP (SEQ ID NO:147)、AKTGSRSRP (SEQ ID NO:148)、AKTGPRPRP (SEQ ID NO:149)、AKTGERERP (SEQ ID NO:150)、AKTGKSKSP (SEQ ID NO:151)、AKTGKPKPP (SEQ ID NO:152)、AKTGKEKEP (SEQ ID NO:153)、AKTGSSKRP (SEQ ID NO:154)。

154)、AKTGPPKRP (SEQ ID NO:155)、AKTGEEKRP (SEQ ID NO:156)、AKTGKRSSP (SEQ ID NO:157)、AKTGKRPPP (SEQ ID NO:158) 和 AKTGKREEP (SEQ ID NO:159)。

[0213] 在一个优选的方面,本文提供了 IFNG 变体多肽,其特征在于其在 C 末端以氨基酸序列 KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止,其中 SEQ ID NO:1 中的一个或两个氨基酸用选自丝氨酸 (S) 或脯氨酸 (P) 的氨基酸替换。这包括 IFNG 变体多肽,其特征在于它们在 C 末端以选自以下项组成的组的氨基酸序列终止: AKTGSRKRP (SEQ ID NO:137)、AKTGKSKRP (SEQ ID NO:138)、AKTGKRSRP (SEQ ID NO:139)、AKTGKRKSP (SEQ ID NO:134)、AKTGPRKRP (SEQ ID NO:140)、AKTGKPKRP (SEQ ID NO:141)、AKTGKRPRP (SEQ ID NO:142)、AKTGKRPPP (SEQ ID NO:143)、AKTGSRSRP (SEQ ID NO:148)、AKTGPRPRP (SEQ ID NO:149)、AKTGKSKSP (SEQ ID NO:151)、AKTGKPKPP (SEQ ID NO:152)、AKTGSSKRP (SEQ ID NO:154)、AKTGPPKRP (SEQ ID NO:155)、AKTGKRSSP (SEQ ID NO:157) 和 AKTGKRPPP (SEQ ID NO:158)。

[0214] 本文还提供了抗原结合分子,其包含

[0215] (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体,以及

[0216] (ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体,其中 IFNG 变体多肽的特征在于其在 C 末端以氨基酸序列 KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止并且其中 SEQ ID NO:1 中的氨基酸中的一个或两个氨基酸用选自以下项组成的组的氨基酸替换: 丝氨酸 (S)、脯氨酸 (P) 和谷氨酸 (E)。

[0217] 在一个特定方面,提供了抗原结合分子,其包含

[0218] (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体,以及

[0219] (ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体,其中 IFNG 变体多肽的特征在于其在 C 末端以氨基酸序列 KRKRP (SEQ ID NO:1) 终止,并且其中 SEQ ID NO:1 中的氨基酸中的一个或两个氨基酸用选自丝氨酸 (S) 或脯氨酸 (P) 的氨基酸替换。

[0220] 在一个方面,提供了抗原结合分子,其包含

[0221] (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体,以及

[0222] (ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体,其中 IFNG 变体多肽的特征在于选自以下项组成的组的 C 末端氨基酸序列: AKTGSRKRP (SEQ ID NO:137)、AKTGKSKRP (SEQ ID NO:138)、AKTGKRSRP (SEQ ID NO:139)、AKTGKRKSP (SEQ ID NO:134)、AKTGPRKRP (SEQ ID NO:140)、AKTGKPKRP (SEQ ID NO:141)、AKTGKRPRP (SEQ ID NO:142)、AKTGKRPPP (SEQ ID NO:143)、AKTGSRSRP (SEQ ID NO:148)、AKTGPRPRP (SEQ ID NO:149)、AKTGKSKSP (SEQ ID NO:151)、AKTGKPKPP (SEQ ID NO:152)、AKTGSSKRP (SEQ ID NO:154)、AKTGPPKRP (SEQ ID NO:155)、AKTGKRSSP (SEQ ID NO:157) 和 AKTGKRPPP (SEQ ID NO:158)。

[0223] 在一个方面,本文提供了含有 IFNG 变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含两条重链,其包含与 SEQ ID NO:91 至少约 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与 SEQ ID NO:41 至少约 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含 SEQ ID NO:91 的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列。

[0224] 在一个方面,本文提供了含有 IFNG 变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含两条重链,其包含与 SEQ ID NO:92 至少约 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与 SEQ ID NO:41 至少约 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含 SEQ ID

N0:92的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID N0:41的氨基酸序列。

[0225] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含两条重链,其包含与SEQ ID N0:93至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID N0:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID N0:93的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID N0:41的氨基酸序列。

[0226] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含两条重链,其包含与SEQ ID N0:94至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID N0:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID N0:94的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID N0:41的氨基酸序列。

[0227] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含两条重链,其包含与SEQ ID N0:95至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID N0:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID N0:95的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID N0:41的氨基酸序列。

[0228] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含两条重链,其包含与SEQ ID N0:96至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID N0:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID N0:96的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID N0:41的氨基酸序列。

[0229] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含两条重链,其包含与SEQ ID N0:97至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID N0:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID N0:97的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID N0:41的氨基酸序列。

[0230] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含两条重链,其包含与SEQ ID N0:98至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID N0:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID N0:98的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID N0:41的氨基酸序列。

[0231] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0232] 两条重链,其包含与SEQ ID N0:103至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID N0:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID N0:103的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID N0:41的氨基酸序列。

[0233] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0234] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:104至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0235] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0236] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:106至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0237] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0238] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:107至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0239] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0240] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:109至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0241] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0242] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:110至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0243] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0244] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:112至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0245] 在一个方面,本文提供了含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0246] 两条重链,其包含与SEQ ID NO:113至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含与SEQ ID NO:41至少约95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一个方面,抗原结合分子包含两条重链,其包含SEQ ID

NO:113的氨基酸序列;以及两条轻链,其包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0247] 多核苷酸

[0248] 本文还提供编码如本文所述的抗原结合分子或其片段的分离的多核苷酸或编码如本文所述的IFNG变体多肽的分离的多核苷酸。

[0249] 编码本文公开的抗原结合分子的分离的多核苷酸可以表达为编码完整抗原结合分子的单个多核苷酸,或表达为共表达的多个(例如,两个或更多个)多核苷酸。由共表达的多核苷酸编码的多肽可以经由例如二硫键或其他手段缔合以形成功能性抗原结合分子。例如,免疫球蛋白的轻链部分可以由来自免疫球蛋白的重链部分的单独多核苷酸编码。当共表达时,重链多肽将与轻链多肽缔合以形成免疫球蛋白。

[0250] 在一些方面,分离的多核苷酸编码包含在如本文所述的抗原结合分子中的多肽。在一个方面,提供了编码IFNG变体多肽的分离的多核苷酸,其中IFNG变体多肽的特征在于C末端氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1)

[0251] 在一个方面,提供了编码抗原结合分子的分离的多核苷酸,该抗原结合分子包含(i)与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体以及(ii)IFNG变体多肽的同二聚体,其中IFNG变体多肽的特征在于C末端氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1)。在一个方面,提供了编码抗原结合分子的一种或多种分离的多核苷酸,该抗原结合分子包含(i)与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体以及(ii)IFNG变体多肽的同二聚体,其中IFNG变体多肽的特征在于C末端氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1), (iii)蛋白酶识别位点以及(iv)掩蔽部分。

[0252] 在某些实施例中,多核苷酸或核酸是DNA。在其他实施例中,本发明的多核苷酸是RNA,例如以信使RNA (mRNA)的形式。本发明的RNA可以是单链或双链的。

[0253] 重组方法

[0254] 如本文所述的抗原结合分子可通过例如重组生产获得。对于重组生产,提供一种或多种编码抗原结合分子或其多肽片段的多核苷酸。将一种或多种编码双特异性抗原结合分子的多核苷酸分离并插入至一种或多种载体中以用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类多核苷酸可使用常规方法容易地分离并且测序。在本发明的一个方面,提供一种载体,优选为表达载体,该载体包含本发明的多核苷酸中的一种或多种多核苷酸。可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建含有抗原结合分子(片段)的编码序列以及适当转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、合成技术和体内重组/遗传重组。参见例如以下文献中描述的技术:Maniatis等人,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Cold Spring Harbor Laboratory,N.Y.(1989);和Ausubel等人,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,Green Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y.(1989)。表达载体可以是质粒、病毒的一部分,或者可以是核酸片段。表达载体包括表达盒,编码抗原结合分子或其多肽片段的多核苷酸(即编码区)与启动子和/或其他转录或翻译控制元件可操作缔合地克隆至该表达盒中。如本文所用,“编码区”是核酸的一部分,该部分由翻译成氨基酸的密码子组成。尽管“终止密码子”(TAG、TGA或TAA)未被翻译成氨基酸,但其(如果存在的话)可被认为是编码区的一部分,而任何侧翼序列,例如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子、5'和3'非翻译区等不是编码区的一部分。两个或更多个编码区可存在于单个多核苷酸构建体中(例如在单个载体上),或在单独的多核苷酸构建体中(例如在单独的(不同的)载体上)。此外,任何载体可含有单一编码区,或可包

含两个或更多个编码区,例如本发明的载体可以编码一种或多种多肽,该一种或多种多肽在翻译后或翻译时通过蛋白水解切割分离成最终的蛋白质。此外,本发明的载体、多核苷酸或核酸可编码异源编码区,该异源编码区与编码本文公开的抗原结合分子或其多肽片段的多核苷酸或其变体或衍生物融合或不融合。异源编码区包括但不限于特化元件或基序,诸如分泌信号肽或异源功能结构域。可操作缔合是当基因产物(例如多肽)的编码区以某种方式与一个或多个调控序列缔合,以使基因产物的表达处于调控序列的影响或控制下。如果启动子功能的诱导导致编码期望的基因产物的mRNA的转录,并且如果两个DNA片段之间的键结性质不干扰表达调控序列指导基因产物表达的能力或干扰待转录的DNA模板的能力,则该两个DNA片段(诸如多肽编码区和与其相关的启动子)是“可操作地缔合的”。因此,如果启动子能够影响该核酸的转录,则启动子区域将与编码多肽的核酸可操作地缔合。启动子可以是细胞特异性启动子,该细胞特异性启动子仅在预定细胞中指导DNA的实质转录。除启动子外,其他转录控制元件,例如增强子、操纵子、阻遏物和转录终止信号,可以与多核苷酸可操作地缔合以指导细胞特异性转录。

[0255] 本文公开了合适的启动子和其他转录控制区。多种转录控制区是本领域技术人员已知的。这些转录控制区包括但不限于在脊椎动物细胞中起作用的转录控制区,诸如但不限于来自巨细胞病毒的启动子和增强子区段(例如立即早期启动子结合内含子-A)、猿猴病毒40(例如早期启动子)和逆转录病毒(诸如例如劳氏肉瘤病毒)。其他转录控制区包括来源于脊椎动物基因(诸如肌动蛋白、热休克蛋白、牛生长激素和兔 α 珠蛋白)的那些转录控制区,以及能够控制真核细胞中基因表达的其他序列。其他合适的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子以及诱导型启动子(例如四环素可诱导启动子)。类似地,各种翻译控制元件是本领域普通技术人员已知的。这些翻译控制元件包括但不限于核糖体结合位点、翻译起始和终止密码子,以及来源于病毒系统的元件(特别是内部核糖体进入位点,或IRES,也称为CITE序列)。表达盒还可以包括其他特征,诸如复制起点,和/或染色体整合元件,诸如逆转录病毒长末端重复序列(LTR),或腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)。

[0256] 本发明的多核苷酸和核酸编码区可以与编码分泌肽或信号肽的附加编码区缔合,该附加编码区指导由如本文提供的多核苷酸编码的多肽的分泌。例如,如果期望的分泌抗原结合分子或其多肽片段,可以将编码信号序列的DNA置于编码抗原结合分子或其多肽片段的核酸的上游。根据信号假设,由哺乳动物细胞分泌的蛋白质具有信号肽或分泌前导序列,一旦已经起始跨粗面内质网输出生长的蛋白质链,该信号肽或分泌前导序列就被从成熟蛋白质上切割下来。本领域普通技术人员知道由脊椎动物细胞分泌的多肽通常具有与该多肽的N末端融合的信号肽,该信号肽被从翻译的多肽上切割下来以生产该多肽的分泌或“成熟”形式。在某些实施例中,使用天然信号肽(例如免疫球蛋白重链或轻链信号肽),或保留指导与其可操作地缔合的多肽分泌的能力的该序列的功能性衍生物。替代性地,可以使用异源哺乳动物信号肽或其功能衍生物。例如,野生型前导序列可以被组织纤溶酶原活化剂(TPA)或小鼠 β 葡萄糖醛酸酶的前导序列取代。

[0257] 编码可用于促进后续纯化的短蛋白序列(例如组氨酸标签)或帮助标记融合蛋白的DNA可包括在编码本发明的双特异性抗原结合分子或其多肽片段的多核苷酸的内部或末端。

[0258] 在进一步方面,提供了包含一种或多种本发明的多核苷酸的宿主细胞。在某些方

面,提供了包含一种或多种载体的宿主细胞。多核苷酸和载体可以单独或组合地渗入本文中分别关于多核苷酸和载体描述的任何特征。在一个方面,宿主细胞包含载体(例如,已用载体转化或转染),该载体包含编码本文所述的抗原结合分子(的一部分)的多核苷酸。适于复制和支持抗原结合分子表达的宿主细胞是本领域中熟知的。此类细胞可以用特定的表达载体适当地转染或转导,并且可以生长大量含有载体的细胞以用于接种大规模发酵罐来获得足够量的抗原结合分子用于临床应用。合适的宿主细胞包括原核微生物,诸如大肠杆菌,或各种真核细胞,诸如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、昆虫细胞等。例如,多肽可以在细菌中生产,特别是当不需要糖基化时。多肽在表达后可以在可溶性级分中从细菌细胞糊状物中分离,并可以进一步纯化。除原核生物外,诸如丝状真菌或酵母之类的真核微生物也是用于编码多肽的载体的合适克隆或表达宿主,包括这样的真菌和酵母菌株,该真菌和酵母菌株的糖基化途径已经被“人源化”,从而导致生产具有部分或完全人糖基化模式的多肽。参见 Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004) 和 Li 等人, Nat Biotech 24, 210-215 (2006)。

[0259] 用于表达(糖基化)多肽的合适宿主细胞还来源于多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定出了可以与昆虫细胞结合使用,特别是用于转染草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的许多杆状病毒株。植物细胞培养物也可用作宿主。参见例如美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述了用于在转基因植物中生产抗体的PLANTIBODIES™技术)。脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例为由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或293T细胞,如例如在Graham等人, J Gen Virol 36, 59 (1977) 中所述)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、小鼠塞尔托利氏细胞(TM4细胞,如例如在Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980) 中所述)、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)、布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝细胞(Hep G2)、小鼠乳腺肿瘤细胞(MMT 060562)、TRI细胞(如例如在Mather等人, Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982) 中所述)、MRC 5细胞,以及FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括dhfr-CHO细胞(Urlaub等人, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980));以及骨髓瘤细胞系,诸如Y0、NS0、P3X63和Sp2/0。关于适用于蛋白质生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki和Wu, Methods in Molecular Biology, 第248卷(B.K.C.Lo编, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268页(2003)。宿主细胞包括培养细胞,例如仅举几个例子而言哺乳动物培养细胞、酵母细胞、昆虫细胞、细菌细胞和植物细胞,还包括转基因动物、转基因植物或培养植物或动物组织中所包含的细胞。在一个实施例中,宿主细胞是真核细胞,优选哺乳动物细胞,诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚肾(HEK)细胞或淋巴细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。用于在这些系统中表达外源基因的标准技术是本领域已知的。可以对表达包含免疫球蛋白的重链或轻链的多肽的细胞进行工程化改造,以便也表达另一条免疫球蛋白链,使得表达的产物为具有重链和轻链的免疫球蛋白。

[0260] 在一个方面,提供一种产生如本文公开的抗原结合分子或其多肽片段的方法,其中该方法包括在适于表达抗原结合分子或其多肽片段的条件下培养包含编码抗原结合分子或其多肽片段的多核苷酸的宿主细胞,以及从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收本发

明的抗原结合分子或其多肽片段。

[0261] 如本文所述制备的抗原结合分子可通过本领域已知的技术纯化,这些技术为诸如高效液相色谱法、离子交换色谱法、凝胶电泳法、亲和色谱法、尺寸排阻色谱法等。用于纯化特定蛋白质的实际条件将部分取决于诸如净电荷、疏水性、亲水性等因素,并且对于本领域技术人员而言将是显而易见的。对于亲和色谱法纯化,可以使用抗原结合分子结合的抗体、配体、受体或抗原。例如,对于本发明的融合蛋白的亲合色谱法纯化,可以使用具有蛋白A或蛋白G的基质。基本上如实例中所述,可使用顺序蛋白A或G亲和色谱和体积排阻色谱来分离抗原结合分子。抗原结合分子或其片段的纯度可以通过多种众所周知的分析方法中的任一种来确定,该分析方法包括凝胶电泳法、高压液相色谱法等。例如,如实例中所述的表达的抗原结合分子被证明为完整的并且适当组装,如还原和非还原SDS-PAGE所展现。

[0262] 测定

[0263] 本文提供的抗原结合分子可以通过本领域已知的各种测定来表征其结合特性和/或生物学活性。特别地,它们的特征在于实例中更详细描述测定。

[0264] 1. 结合测定

[0265] 可以例如通过使用表达人成纤维细胞活化蛋白(FAP)的鼠类成纤维细胞系和流式细胞术(FACS)分析来评估本文提供的抗原结合分子和IFNG变体多肽与相应靶标表达细胞的结合。IFNG变体对IFNGR1和IFNGR1/2的结合行为可以通过如实例中所述的表面等离子体共振(SPR)来评定。

[0266] 2. 活性测定

[0267] 测试如本文所述的抗原结合分子和IFNG变体多肽的生物活性。生物活性可包括双特异性抗原结合分子的功效和特异性。IFNG变体多肽的活性可以通过如实例中所述的HEK Blue IFNG报告细胞测定来测量。此外,IFNG变体多肽和抗原结合分子的活性可以通过如实例中所述的鼠类MC38-huCEA肿瘤细胞系上MHC-I和PD-L1的上调以及化学引诱剂(CXCL9)的上调来测量。

[0268] 药物组合物、制剂和施用途径

[0269] 在进一步方面,提供了包含本文提供的抗原结合分子中的任一种的药物组合物,其例如用于在以下治疗方法中的任一种中使用。在一个方面,药物组合物包含本文提供的抗原结合分子中的任一种以及至少一种药用赋形剂。在另一方面,药物组合物包含本文提供的抗原结合分子中的任一种以及例如如下文所述的至少一种附加治疗剂。

[0270] 如本文所述的药物组合物包含治疗有效量的溶于或分散于药用载体中的一种或多种抗原结合分子。短语“药用或药理学上可接受的”是指分子实体和组合物在所采用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,即如适当的话施用于动物(诸如人)时不会产生不利的、过敏的或其他不良反应。含有如本文公开的至少一种抗原结合分子和任选地附加活性成分的药物组合物的制备将是鉴于本公开而为本领域的技术人员已知的,如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Printing Company,1990所例示,所述文献以引用方式并入本文。特别地,组合物为冻干制剂或水溶液。如本文所用,“药用赋形剂”包括任何和所有溶剂、缓冲剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗细菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、盐、稳定剂及它们的组合,如对本领域的普通技术人员所知。

[0271] 肠胃外组合物包括设计用于注射(例如,皮下、皮内、病灶内、静脉内、动脉内、肌

内、鞘内或腹膜内注射)的那些组合物。为了注射,可以在水溶液中、优选在生理上相容性缓冲液(诸如汉克斯溶液(Hanks' solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理盐水缓冲液)中配制本文公开的抗原结合分子。溶液可含有配制剂(formulatory agent),诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。可替代地,抗原结合分子可以是粉末形式,用于在使用前用合适的媒介物(例如无菌无热原水)构建。根据需要,通过将本发明的抗原结合分子以所需的量与下面列举的各种其他成分一起掺入适当的溶剂中,来制备无菌可注射溶液。例如,无菌可以通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。通常,通过将各种灭菌的活性成分掺入含有基础分散介质和/或其他成分的无菌媒介物中来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液、悬浮液或乳液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥或冻干技术,该真空干燥或冻干技术产生来自先前无菌过滤的液体介质的活性成分加上任何附加期望的成分的粉末。如果需要的话,液体介质应适当缓冲,并且在注射之前应首先使用足够的盐水或葡萄糖来使液体稀释剂等渗。该组合物必须是在制造和贮存条件下稳定的,并且保存为抗诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。应当理解,内毒素污染应以例如低于0.5ng/mg蛋白的安全水平保持最低。合适的药用赋形剂包括但不限于:缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如锌蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。水性注射悬浮液可含有增加悬浮液粘度的化合物,诸如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇、葡聚糖等。任选地,悬浮液还可以含有合适的稳定剂或增加化合物溶解度的试剂,以允许制备高浓度溶液。另外,活性化合物的悬浮液可以制备成适当的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或媒介物包括脂肪油,诸如芝麻油;或合成脂肪酸酯,诸如油酸乙酯或甘油三酯;或脂质体。

[0272] 活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备的微胶囊(例如,分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中;包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中;或包埋在粗乳液中。此类技术在Remington's Pharmaceutical Sciences(第18版Mack Printing Company, 1990)中公开。可以制备缓释制备物。缓释制备物的合适示例包括含有多肽的固态疏水聚合物的半透性基质,该基质呈例如膜或微胶囊的成型制品的形式。在特定方面,可注射组合物的延长吸收可以通过在所述组合物中使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝、明胶或它们的组合)来实现。

[0273] 除了先前描述的组合物之外,抗原结合分子也可以配制成长效制备物。此类长效制剂可以通过植入(例如皮下或肌肉植入)或通过肌肉注射施用。因此,例如,抗原结合分子可以用合适的聚合或疏水材料配制(例如作为可接受油中的乳液)或用离子交换树脂配制,或配制为微溶的衍生物,例如配制为微溶盐。

[0274] 包含如本文所述的抗原结合分子的药物组合物可通过常规的混合、溶解、乳化、包

封、包埋或冻干工艺进行生产。药物组合物可以使用一种或多种生理上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或助剂以常规方式配制,该载体、稀释剂、赋形剂或助剂有助于将蛋白质加工成可以在药学上使用的制备物。适当的配方取决于所选择的施用途径。

[0275] 如本文公开的抗原结合分子可以配制成以游离酸或碱、中性或盐形式的组合物。药用盐是基本上保留游离酸或游离碱的生物活性的盐。这些药用盐包括酸加成盐,例如用蛋白质性质组合物的游离氨基形成的酸加成盐,或用无机酸(诸如盐酸或磷酸)或有机酸(诸如乙酸、草酸、酒石酸或扁桃酸)形成的酸加成盐。用游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,诸如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁;或者有机碱,诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸或普鲁卡因。与相应的游离碱形式相比,药用盐倾向于更易溶于水性和其他质子溶剂中。本文的组合物还可含有多于一种对于所治疗的特定适应症是必需的活性成分,优选是具有不会彼此不利地影响的互补活性的活性成分。此类活性成分适当地以对预期目的有效的量组合存在。用于体内施用的制剂通常是无菌的。例如,无菌可以通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

[0276] 治疗方法和组合物

[0277] 本文提供的抗原结合分子中的任一种可用于治疗方法中。为了在治疗方法中使用,如本文所述的抗原结合分子可按照符合良好医学实践的方式配制、投配和施用。在这种情况下需要考虑的因素包括所治疗的特定疾患、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病症、疾患的原因、药剂的递送部位、施用方法、施用的时间安排,以及执业医师已知的其他因素。

[0278] 在一个方面,提供了如本文公开的抗原结合分子或IFNG变体多肽,其用作药物。

[0279] 在进一步方面,提供了如本文所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽,其用于在上调CXCL9中使用。此外,提供了如本文所述的抗原结合分子,其用于(i)治疗癌症,(ii)延迟癌症的进展,以及(iii)延长罹患癌症的患者的存活期,特别是在存在表达FAP的细胞的情况下。在一个特定方面,提供了如本文公开的抗原结合分子或IFNG变体多肽,其用于在治疗疾病中使用,特别是用于在治疗癌症中使用。

[0280] 在某些方面,提供了如本文所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽,其用于在治疗方法中使用。在一个方面,提供了如本文所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽,其用于在治疗有需要的个体的疾病中使用。在某些方面,提供了抗原结合分子或IFNG变体多肽,其用于在治疗患有疾病的个体的方法中使用,该方法包括向个体施用治疗有效量的双特异性抗原结合分子。在某些方面,待治疗的疾病是癌症。需要治疗的受试者、患者或“个体”通常是哺乳动物,更特别地是人。

[0281] 在进一步方面,本发明提供了本文所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽在制造或制备用于治疗有需要的个体的疾病的药物中的用途。在一个方面,药物用于治疗疾病的方法中,该方法包括向具有所述疾病的个体施用治疗有效量的所述药物。在某些方面,待治疗的疾病为增殖性疾患,特别是癌症。癌症的实例包括但不限于膀胱癌、脑癌、头颈癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、子宫内膜癌、食道癌、结肠癌、结直肠癌、直肠癌、胃癌、前列腺癌、血癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、骨癌以及肾癌。癌症的其他实例包括恶性肿瘤、淋巴瘤(例如,霍奇金氏淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤)、母细胞瘤、肉瘤和白血病。可以使用本发明的双特异性抗原结合分子或抗体治疗的其他细胞增殖疾患包括但不限于位于以下

部位中的肿瘤:腹部、骨骼、乳腺、消化系统、肝脏、胰腺、腹膜、内分泌腺(肾上腺、甲状旁腺、垂体、睾丸、卵巢、胸腺、甲状腺)、眼、头颈部、神经系统(中枢神经系统和外周神经系统)、淋巴系统、骨盆、皮肤、软组织、脾脏、胸部以及泌尿种系统。还包括癌前病症或病变和癌转移。在某些实施例中,癌症选自以下项组成的组:肾细胞癌、皮肤癌、肺癌、结直肠癌、乳腺癌、脑癌、头颈癌。本领域的技术人员易于认识到,在许多情况下,如本文所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽可能无法提供治愈,但可能提供益处。在一些方面,具有某些益处的生理变化也被视为具有治疗益处。因此,在一些方面,提供生理变化的抗原结合分子或IFNG变体多肽的量被视为“有效量”或“治疗有效量”。

[0282] 为了预防或治疗疾病,本文所述的抗原结合分子(当单独使用或与一种或多种其他附加治疗剂组合使用时)的适当剂量将取决于待治疗疾病的类型、施用途径、患者体重、具体分子、疾病的严重程度和进程、如本文所述的抗原结合分子是出于预防目的还是治疗目的施用、先前或同时进行治疗性干预、患者的临床病史和对双特异性抗原结合分子的应答以及主治医师的酌处权。在任何情况下,负责施用的执业者将针对个体受试者来确定组合物中活性成分的浓度和适当剂量。本文考虑到各种施用时间安排,包括但不限于在各个时间点处的单次或多次施用、推注施用,以及脉冲输注。

[0283] 如本文公开的抗原结合分子或IFNG变体多肽适于在一次或在一系列治疗中施用于患者。取决于疾病的类型和严重程度,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $15\text{mg}/\text{kg}$ (例如 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $10\text{mg}/\text{kg}$)的抗原结合分子或IFNG变体多肽可以为例如通过一次或多次单独施用或通过连续输注而施用于患者的初始候选剂量。取决于上述因素,一种典型的日剂量的范围可以为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多。对于数天或更长时间的重复施用,取决于病症,治疗通常会持续直至发生期望的疾病症状抑制。抗原结合分子或IFNG变体多肽的一种示例性剂量的范围将为约 $0.005\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 。在其他实例中,剂量还可包括每次施用约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $350\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $5\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $200\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $350\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $500\text{mg}/\text{kg}$ 体重至约 $1000\text{mg}/\text{kg}$ 体重或更多,以及其中可推导出的任何范围。在从本文所列数字可推导出的范围的示例中,可以基于上述数字施用约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 体重至约 $20\text{mg}/\text{kg}$ 体重、约 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重等的范围。因此,可以向患者施用约 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $5.0\text{mg}/\text{kg}$ 或 $10\text{mg}/\text{kg}$ (或它们的任何组合)的一种或多种剂量。此类剂量可以间歇地施用,例如每周或每三周施用(例如,使得患者接受约二至约二十或例如约六个剂量的融合蛋白)。在一个特定方面,双特异性抗原结合分子将每三周施用一次。可施用初始较高负荷剂量,然后施用一种或多种较低剂量。然而,其他给药方案可能有用。通过常规技术和测定可以容易地监测该疗法的进展。

[0284] 本文所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽通常将以有效实现预期目的量使用。为用于治疗或预防疾病病症,将抗原结合分子或IFNG变体多肽或其药物组合物以治疗有效量施用或施加。治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内,特别是根据本文提供的详细公开内容。对于全身施用,最初可以根据体外测定(诸如细胞培养测定)来估计治疗有效剂量。可以随后在动物模型中配制剂量,以实现包括如在细胞培养中测定的 IC_{50} 循环浓度范围。此类信息可用于更准确地确定对人类的有用剂量。还可以使用本领域熟知的技术来根据体内数据(例如动物模型)估计初始剂量。本领域的普通技术人员可以基于动物数

据来容易地优化对人的施用。

[0285] 剂量和间隔可以单独地调节,以提供足以维持疗效的本文公开的抗原结合分子或IFNG变体多肽的血浆水平。通过注射施用的常用患者剂量的范围是约0.1至50mg/kg/天,通常约0.1至1mg/kg/天。通过每天施用多个剂量可以实现治疗有效的血浆水平。可以例如通过HPLC来测量血浆中的水平。在局部施用或选择性摄入的情况下,抗原结合分子或IFNG变体多肽的有效局部浓度可能与血浆浓度无关。本领域的技术人员将能够在无需过多实验的情况下优化治疗有效的局部剂量。

[0286] 治疗有效剂量的本文所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽通常将提供治疗益处而不会引起实质性毒性。融合蛋白的毒性和治疗功效可通过细胞培养或实验动物中的标准药理学程序来测定。细胞培养测定和动物研究可以用于测定LD₅₀ (致死群体的50%的剂量)和ED₅₀ (在群体的50%中治疗有效的剂量)。毒性和疗效之间的剂量比是治疗指数,所述治疗指数可以表示为比率LD₅₀/ED₅₀。表现出大治疗指数的抗原结合分子是优选的。在一个方面,如本文公开的抗原结合分子或IFNG变体多肽表现出高治疗指数。从细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制适用于人类的一系列剂量。剂量优选在包括毒性很小或没有毒性的ED₅₀的循环浓度范围内。剂量可以取决于多种因素而在该范围内变化,所述多种因素例如所采用的剂型、所利用的施用途径、受试者的病症等。确切的配方、施用途径和剂量可以由个别医生根据患者的病症来选择(参见例如Fingl等人,1975,在:The Pharmacological Basis of Therapeutics,第1章,第1页中,该文献的全部内容以引用方式并入本文中)。

[0287] 用抗原结合分子治疗的患者的主治医师应知道由于毒性、器官功能障碍等而如何以及何时终止、中断或调节施用。相反地,如果临床应答不充分(排除毒性),则主治医师也会知道将治疗调节到更高水平。在目标疾患的管理中施用的剂量的大小将随着待治疗病症的严重程度、施用途径等而变化。例如,可以部分地通过标准预后评估方法来评估病症的严重性。此外,剂量和可能的剂量频率也将根据个体患者的年龄、体重和应答而变化。

[0288] 其他药剂和治疗

[0289] 如本文公开的抗原结合分子或IFNG变体多肽可以与治疗中的一种或多种其他药剂组合施用。例如,抗原结合分子或IFNG变体多肽可以与至少一种附加治疗剂共同施用。术语“治疗剂”包括可以施用用于治疗需要此类治疗的个体的症状或疾病的任何药剂。此类附加治疗剂可包含适合于所治疗的具体适应症的任何活性成分,优选地是具有不会彼此不利地影响的互补活性的活性成分。在某些实施例,另外的治疗剂是另一种抗癌剂,例如微管破坏剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、DNA嵌入剂、烷化剂、激素疗法、激酶抑制剂、受体拮抗剂、肿瘤细胞凋亡活化剂,或抗血管生成剂。在某些方面,附加治疗剂为免疫调节剂、细胞生长抑制剂、细胞粘附抑制剂、细胞毒性剂或细胞抑制剂、细胞凋亡活化剂或增加细胞对细胞凋亡诱导剂的敏感性的药剂。

[0290] 因此,提供了如本文所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽或包含其的药物组合物,其用于在治疗癌症中使用,其中抗原结合分子或IFNG变体多肽与化学治疗剂、放射和/或用于在癌症免疫疗法中使用的其他药剂组合施用。

[0291] 此类其他药剂适当地以对预期目的有效的量组合存在。此类其他药剂的有效量取决于所用双特异性抗体的量、疾患或治疗的类型,以及上面讨论的其他因素。本发明的双特异性抗原结合分子或抗体通常以与本文所述相同的剂量和施用途径,或本文所述剂量的约

1%至99%,或以任何剂量且通过经验/临床上确定为合适的途径使用。上述此类组合疗法涵盖组合施用(其中两种或更多种治疗剂被包含在同一组合物或单独的组合物中),以及分开施用,在分开施用的情况下,抗原结合分子或IFNG变体多肽的施用可以在施用附加治疗剂和/或佐剂之前、同时和/或之后发生。

[0292] 在进一步方面,提供了如本文之前所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽,其用于在治疗癌症中使用,其中抗原结合分子或IFNG变体多肽与另一种免疫调节剂组合施用。

[0293] 术语“免疫调节剂”是指影响免疫系统的任何物质,包括单克隆抗体。本文所述的分子可被视为免疫调节剂。免疫调节剂可用作治疗癌症的抗肿瘤剂。在一个方面,免疫调节剂包括但不限于抗CTLA4抗体(例如,伊匹单抗)、抗PD1抗体(例如,纳武单抗或派姆单抗)、PD-L1抗体(例如,阿特珠单抗、阿维单抗或德瓦鲁单抗)、LAG3抗体(瑞拉利单抗)、PD1-LAG3双特异性抗体或TIGIT抗体(替瑞利尤单抗)。在进一步方面,提供了如本文所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽,其用于在治疗癌症中使用,其中抗原结合分子或IFNG变体多肽与阻断PD-L1/PD-1相互作用的药剂组合施用。在一个方面,阻断PD-L1/PD-1相互作用的药剂为抗PD-L1抗体或抗PD1抗体。更特别地,阻断PD-L1/PD-1相互作用的药剂为选自阿特珠单抗、德瓦鲁单抗、派姆单抗和纳武单抗组成的组的抗体。在一个具体方面,阻断PD-L1/PD-1相互作用的药剂为阿特珠单抗(MPDL3280A, RG7446)。在另一方面,阻断PD-L1/PD-1相互作用的药剂为抗PD1抗体,特别是选自派姆单抗或纳武单抗的抗PD1抗体。在另一方面,阻断PD-L1/PD-1相互作用的药剂为抗PD1/抗LAG3双特异性抗体。此类其他药剂适当地以对预期目的有效的量组合存在。此类其他药剂的有效量取决于所用抗原结合分子的量、疾患或治疗的类型,以及上面讨论的其他因素。如本文之前所述的抗原结合分子或IFNG变体多肽通常以与如本文所述相同的剂量和施用途径使用,或以本文所述剂量的约1%至99%使用,或以经验地/临床上确定为合适的任何剂量和任何途径使用。

[0294] 上述此类联合疗法涵盖联合施用(其中两种或更多种治疗剂被包含在同一组合物或分开的组合物中),以及分开施用,在分开施用的情况下,双特异性抗原结合分子的施用可以在施用另外的治疗剂和/或佐剂之前、同时和/或之后进行。

[0295] 制品

[0296] 在本发明的另一方面中,提供了一种制品,其含有可用于治疗、预防和/或诊断上述疾患的物质。该制品包括容器和在该容器上或与该容器相关的标签或包装插页(package insert)。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、静脉注射(IV)溶液袋等。该容器可以由诸如玻璃或塑料等多种材料形成。该容器容纳组合物,该组合物单独或与另一种有效用于治疗、预防和/或诊断该病症的组合物组合,并且该容器可具有无菌入口(例如该容器可以是静脉注射溶液袋或具有可用皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂为如本文所述的抗原结合分子。

[0297] 标签或包装插页指示该组合物用于治疗所选择的病症。此外,制品可包括(a)第一容器,该第一容器中含有组合物,其中该组合物包含如本文所述的抗原结合分子;以及(b)第二容器,该第二容器中含有组合物,其中该组合物包含进一步的细胞毒性剂或其他治疗剂。本发明的该实施例中的制品可进一步包括包装插页,该包装插页指示这些组合物可以用于治疗特定病况。

[0298] 替代性地或另外地,该制品可以进一步包含第二(或第三)容器,该第二(或第三)

容器包含药用缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。该制品可进一步包括从商业和用户角度所期望的其他物质,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0299] 表B(序列):

[0300]	SEQ ID NO:	名称	序列
	1	IFNG C 末端 序列	KRKRP

[0301]

SEQ ID NO:	名称	序列
2	人 IFNG-KRKR	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLG ILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDD QSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKL TNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAGTG KRKR
3	小鼠 IFNG-KRKR	HGTVIESLESLNNYFNSSGIDVEEKSFLDIWR NWQKDGDMLKILQSQIISFYLRLEVLKDNQAI SNNISVIESHLITTFNSKAKKDAFMSIAKFEV NNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLRKRKR
4	FAP(4B9) CDR-H1	SYAMS
5	FAP(4B9) CDR-H2	AIIGSGASTYYADSVKG
6	FAP(4B9) CDR-H3	GWFGGFNY
7	FAP(4B9) CDR-L1	RASQSVTSSYLA
8	FAP(4B9) CDR-L2	VGSRRAT
9	FAP(4B9) CDR-L3	QQGIMLPPT
10	FAP(4B9) VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LTVSS

[0302]

SEQ ID NO:	名称	序列
11	FAP(4B9) VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSY LAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPT FGQGTKVEIK
12	FAP (28H1) CDR-H1	SHAMS
13	FAP (28H1) CDR-H2	AIWASGEQYYADSVKG
14	FAP (28H1) CDR-H3	GWLG NFDY
15	FAP (28H1) CDR-L1	RASQSVSRSYLA
16	FAP (28H1) CDR-L2	GASTRAT
17	FAP (28H1) CDR-L3	QQGQVIPPT
18	FAP(28H1) VH	EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSH AMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWLG NFDYWGQGTLVTVSS
19	FAP(28H1) VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRSY LAWYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTF GQGTKVEIK
20	蛋白酶识别位 点 1	PQARK
21	蛋白酶识别位 点 2	HQARK

[0303]

SEQ ID NO:	名称	序列
22	抗 hu IFNG CDR-H1	SSWIN
23	抗 hu IFNG CDR-H2	RIDPSDGEVHYNQDFKD
24	抗 hu IFNG CDR-H3	GFLPWFAD
25	抗 hu IFNG CDR-L1	KASENVDITYVS
26	抗 hu IFNG CDR-L2	GASNRYT
27	抗 hu IFNG CDR-L3	GQSYNYPFT
28	抗 hu IFNG VH	EVQLVQSGAELKKPGSSVKVSKKASGYIFTSS WINWVKQAPGQCLEWIGRIDPSDGEVHYNQD FKDKATLTVDKSTNTAYMELSSLRSEDITAVY YCARGFLPWFADWGQGTLVTVSS
29	抗 hu IFNG VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASENVDITY VSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPDDFATYYCGQSYNYPF TFGCGTKVEVK
30	抗 mu IFNG CDR-H1	TNSVH
31	抗 mu IFNG CDR-H2	AVWTDGTTDYNALKS
32	抗 mu IFNG CDR-H3	EHVYYGLV
33	抗 mu IFNG CDR-L1	KASQNVGNIA

[0304]

SEQ ID NO:	名称	序列
34	抗 mu IFNG CDR-L2	YASNRFT
35	抗 mu IFNG CDR-L3	QRIFNAPNT
36	抗 mu IFNG VH	QVQLQESGPGLVQASQPLSLTCTVSGFSLTTN SVHWIRQPAGKCLEWMGAVWTDGTTDYN LKSRLTISRDTSKSQVFLEMSSLQTEDVATYY CAREHVYYGLVGWGQGTLVTVSA
37	抗 mu IFNG VL	NIVMTQSPKSMSISVGDRVTMNCASQNVGN NIAWYQQNPGQSPKLLIYYASNRFTGVPDRFT GGGYGTDFTLTINNVTEDAASYCQRIFNAP NTFGCGTKLELK
38	抗 hu IFNG scFv	EVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYIFTSS WINWVKQAPGQCLEWIGRIDPSDGEVHYNQD FKDKATLTVDKSTNTAYMELSSLRSED TAVY YCARGFLPWFADWGQGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCK ASENVDITYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRY TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPD DFATYYC GQSYNYPFTFGCGTKVEVK
39	抗 mu IFNG scFv	QVQLQESGPGLVQASQPLSLTCTVSGFSLTTN SVHWIRQPAGKCLEWMGAVWTDGTTDYN LKSRLTISRDTSKSQVFLEMSSLQTEDVATYY CAREHVYYGLVGWGQGTLVTVSAGGGGSGG GGSGGGGSGNIVMTQSPKSMSISVGDRVTMNC KASQNVGN NIAWYQQNPGQSPKLLIYYASNR FTGVPDRFTGGGYGTDFTLTINNVTEDAASY YCQRIFNAPNTFGCGTKLELK

[0305]

SEQ ID NO:	名称	序列
40	P1AG7568 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNG TLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRD DFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSP AAKTGKRKRPGGGGSGGGGSGGGGPQARKGG GGGGSGGGGGEVQLVQSGAELKKPGSSVKVS CKASGYIFTSSWINWVKQAPGQC LEWIGRIDP SDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTAYMELS SLRSED TAVYYCARGFLPWFADWGQGT LVT SSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASV GDRVITCKASENVD TYVSWYQQKPGKAPKL LIYGASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFLT ISSLQP DDFATYYCGQSYNYPFTFGCGTKVEVK

[0306]

SEQ ID NO:	名称	序列
41	FAP (4B9) 轻 链	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSY LAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0307]

SEQ ID NO:	名称	序列
42	P1AG7571 重 链	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGGGEVQLVQSGAELKKPGSSVKV SCKASGY IFTSSWINWVKQAPGQC LEWIGRIDPSDGEVH YNQDFKDKATLTVDKSTNTAYMELSSLRSED TAVYYCARGFLPWFADWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRV ITCKASENVD TYVSWYQQKPGKAPKLLIYGAS NRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPDDFAT YYCGQSYNYPFTFGCGTKVEVKGGGSGGGG SGGGPQARKGGGGGSGGGGGQDPYVKEAE NLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEES DRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETI KEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLN VQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKR

[0308]

SEQ ID NO:	名称	序列
43	P1AG3766 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSH AMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWLGNFDYWGGQGLVTVSSAKTTPPSV YPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTV TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVP SSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCG CKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTKP REEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRV NSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKE QMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQP AENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWE AGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGKGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGHG TVIESLESLNNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNW QKDGMKILQSQIISFYLRRLFVLKDNQAISNN ISVIESHLITTFNSKAKKDAFMSIAKFEVNNP QVQRQAFNELIRVVHQLLPESSLRKRKRPGGG GSGGGGSGGGPQARKGGGGGGSGGGGGQVQ LQESGPGLVQASQPLSLTCTVSGFSLTNSVH WIRQPAGKCLEWMGAVWTDGTTDYN SALKS RLTISRDTSKSQVFLEMSSLQTEDVATYYCAR EHVYYGLVGWGGQGLVTVSAGGGGSGGGGS GGGGSNIVMTQSPKSMSISVGDRV TMNCKAS QNVGNNAWYQQNPGQSPKLLIYYASNRFTG VPDRFTGGGYGTDFTLTINNVQTEDAASYC QRIFNAPNTFGCGTKLELK

[0309]

SEQ ID NO:	名称	序列
44	FAP (28H1) mu 轻链	EIVLTQSPGTL _{SL} SPGERATL _{SC} RASQSVSRSY LAWYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTF GQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINV _{KW} KIDG _{SER} QNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTL _{TL} TKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

[0310]

SEQ ID NO:	名称	序列
45	P1AG3755 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSH AMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWLG NFDYWGQGTLVTVSSAKTTPPSV YPLAPGSAAQTNSMVT LGCLVKGYFPEPVTV TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVP SSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCG CKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTKP REEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRV NSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKE QMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQP AENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLN VQKSNWE AGNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGKGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGQV QLQESGPGLVQASQPLSLTCTVSGFSLTNSV HWIRQPAGKCLEWMGAVWTDGTTDYN SALK SRLTISRDTSKSQVFLEMSSLQTEDVATYYCA REHVYYGLVGWQGTLVTVSAGGGGSGGGG SGGGG SNIVMTQSPKSMSISVGDRVTMNCKA SQNVGN NIAWYQQNPGQSPKLLIYYASNRFT GVPDRFTGGGYGTDFTLTINNVQTEDAASY CQRIFNAPNTFGCGTKLELKG GGGSGGGGSG GGPQARKGGGGGGSGGGGGHGT VIESLESLN NYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNWQKD GDMKIL QSQIISFYLR LFEVLKDNQAISNNISVIESHLITT FFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFN ELIRVVHQLLPESSLRKRKRP

[0311]

SEQ ID NO:	名称	序列
46	人 FAP, UniProt Q12884	MKTWVKIVFG VATSAVLALL VMCIVLRPSR VHNSEENTMR ALTCLKDILNG TFSYKTFFPN WISGQEYLHQ SADNNIVLYN IETGQSYTIL SNRTMKSVNA SNYGLSPDRQ FVYLESDYSK LWRYSYTATY YIYDLSNGEF VRGNELPRPI QYLCWSPVGS KLAYVYQNNI YLKQRPGDPP FQITFNGREN KIFNGIPDWV YEEEMLATKY ALWWSPNGKF LAYAEFNDDT IPVIAYSYYG DEQYPRITINI PYPKAGAKNP VVRIFIIDTT YPAYVGPQEV PVPAMIASSD YYFSWLTWVT DERVCLQWLK RVQNVSVLSI CDFREDWQTW DCPKTQEHIE ESRTGWAGGF FVSTPVFSYD AISYYKIFSD KDGYKHIHYI KDTVENAIQI TSGKWEAINI FRVTQDSLFI SSNEFEEYPG RRNIYRISIG SYPPSKKCVT CHLRKERCQY YTASFSDYAK YYALVCYGP IPISTLHDGR TDQEIKILEE NKELENALKN IQLPKEEIKK LEVDEITLWY KMILPPQFDR SKKYPLLIQV YGGPCSQSVR SVFAVNWISY LASKEGMVIA LVDGRGTAFQ GDKLLYAVYR KLGVEVEDQ ITAVRKFIEM GFIDEKRIAI WGWSYGGYVS SLALASGTGL FKCGIAVAPV SWEYYSASVY TERFMGLPTK DDNLEHYKNS TVMARAEYFR NVDYLLIHGT ADDNVHFQNS AQIAKALVNA QVDFQAMWYS DQNHGLSGLS TNHLYTHMTH FLKQCFSLSLSD

[0312]

SEQ ID NO:	名称	序列
47	小鼠 FAP, UniProt P97321	MKTWLKTVFG VTTLAALALV VICIVLRPSR VYKPEGNTKR ALTLDILNGTFSYKTYFPN WISEQEYLHQ SEDDNIVFYN IETRESYIIL SNSTMKSVNA TDYGLSPDRQ FVYLESYDYSK LWRYSYTATY YIYDLQNGEF VRGYELPRPI QYLCWSPVGS KLAYVYQNNI YLKQRPGDPP FQITYTGREN RIFNGIPDWV YEEEMLATKY ALWWSPDGKF LAYVEFNDS IPHAYSYYG DGQYPRITNI PYPKAGAKNP VVRVFIVDTT YPHHVGPM EV PVPEMIASSD YFWSWLTWVS SERVCLQWLK RVQNVSVLSI CDFREDWHAW ECPKNQEHVE ESRTGWAGGF FVSTPAFSQD ATSYYKIFSD KDGYKHIHYI KDTVENAIQI TSGKWEAIYI FRVTQDSLFI SSNEFEGYPG RRNIYRISIG NSPPSKKCVT CHLRKERCQY YTASFYSYKAK YYALVCYGP LPISTLHDGR TDQEIQVLEE NKELENSLRN IQLPKVEIKK LKDGGGLTFWY KMILPPQFDR SKKYPLLIQV YGGPCSQSVK SVFAVNWITY LASKEGIVIA LVDGRGTAFQ GDKFLHAVYR KLGVEVEEDQ LTAVRKFIEM GFIDEERIAI WGWSYGGYVS SLALASGTGL FKCGIAVAPV SWEYYSIY SERFMGLPTK DDNLEHYKNS TVMARAEYFR NVDYLLIHGT ADDNVHFQNS AQIAKALVNA QVDFQAMWYS DQNHGISSGR SQNHLYTHMT HFLKQCFSLS D

[0313]

SEQ ID NO:	名称	序列
48	CH1 结构域	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KV
49	CH1 连接子 C 末端	EPKSC
50	铰链全	DKTHTCPXCP, X 为 S 或 P
51	铰链中	HTCPXCP, X 为 S 或 P
52	铰链短	CPXCP, X 为 S 或 P
53	CH2 结构域	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVW DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QESTYRWSVLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAK
54	CH3 结构域	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
55	Fc IgG1, 白种人同种异型	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK

[0314]

SEQ ID NO:	名称	序列
56	Fc IgG1, 非裔美国人同种异型	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
57	Fc IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKT VERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI SVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

[0315]

SEQ ID NO:	名称	序列
58	Fc IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDK RVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRC PEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENN YNTTPPMLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNI FSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
59	Fc IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKR VESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK

[0316]

SEQ ID NO:	名称	序列
60	人 IFNG	MKYTSYILAFQLCIVLGS LGCYCQDPYVKEAE NLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEES DRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETI KEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLN VQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQML FRGRRASQ
61	小鼠 IFNG, Uniprot P01580	MNATHCILALQLFLMAVSGCYCHGTVIESLES LNNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNWQKD GDM KILQSQIISFYLR LFEVLKDNQAISNNISVIESHL ITTFFSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQA FNELIRVVHQLLPESSLRKRKR SRC
62	肽接头 (G4S)	GGGGS
63	肽接头 (G4S) ₂	GGGGS GGGGS
64	肽接头 (SG4) ₂	SGGGGS GGGG
65	肽接头 G4(SG4) ₂	GGGGS GGGGS GGGG
66	(G4S) ₃ 肽接头	GGGGS GGGGS GGGGS
67	(G4S) ₄ 肽接头	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
68	(G4S) ₅ 肽接头	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
69	(G4S) ₅ GGGG G 肽接头	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGG
70	PQARK 接头	GGGGS GGGGS GGGPQARK GGGGGSGGGG
71	HQARK 接头	GGGGS GGGGS GGGHQARK GGGGGSGGGG
72	肽接头	GGGSGGG
73	肽接头 A	LEVLFQG
74	肽接头 B	GGGSGGGGS GGGGS GGGGS GLEVLFQGP GG GGGSGGGG
75	肽接头 C	QARK

[0317]

SEQ ID NO:	名称	序列
76	铰链 1	TCPPCP
77	铰链 2	PCP
78	KRKR 补片	KRKR
79	P1AG3768 重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQMLFR G

[0318]

SEQ ID NO:	名称	序列
80	P1AG3769 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTG

[0319]

SEQ ID NO:	名称	序列
81	P1AF3570 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQ

[0320]

SEQ ID NO:	名称	序列
82	P1AF3571 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSL

[0321]

SEQ ID NO:	名称	序列
83	P1AF3574 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRP

[0322]

SEQ ID NO:	名称	序列
84	P1AF3575 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKP

[0323]

SEQ ID NO:	名称	序列
85	P1AF3576 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRP

[0324]

SEQ ID NO:	名称	序列
86	P1AF3577 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKP

[0325]

SEQ ID NO:	名称	序列
87	P1AF3578 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSP

[0326]

SEQ ID NO:	名称	序列
88	P1AF9470 重 链	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKSP

[0327]

SEQ ID NO:	名称	序列
89	P1AF3580 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRSP

[0328]

SEQ ID NO:	名称	序列
90	P1AF3581 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKSP

[0329]

SEQ ID NO:	名称	序列
91	P1AF9464 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGSRKRP

[0330]

SEQ ID NO:	名称	序列
92	P1AF9469 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKSKRP

[0331]

SEQ ID NO:	名称	序列
93	P1AF9465 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRSRP

[0332]

SEQ ID NO:	名称	序列
94	P1AF9470 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKSP

[0333]

SEQ ID NO:	名称	序列
95	P1AF9475 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGPRKRP

[0334]

SEQ ID NO:	名称	序列
96	P1AF9476 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKPKRP

[0335]

SEQ ID NO:	名称	序列
97	P1AF9477 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRPRP

[0336]

SEQ ID NO:	名称	序列
98	P1AF9478 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKPP

[0337]

SEQ ID NO:	名称	序列
99	P1AF9483 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGERKRP

[0338]

SEQ ID NO:	名称	序列
100	P1AF9484 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKEKRP

[0339]

SEQ ID NO:	名称	序列
101	P1AF9485 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRERP

[0340]

SEQ ID NO:	名称	序列
102	P1AF9486 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKEP

[0341]

SEQ ID NO:	名称	序列
103	P1AF9473 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGSRSRP

[0342]

SEQ ID NO:	名称	序列
104	P1AF9481 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGPRPRP

[0343]

SEQ ID NO:	名称	序列
105	P1AF9489 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGERERP

[0344]

SEQ ID NO:	名称	序列
106	P1AF9474 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKSKSP

[0345]

SEQ ID NO:	名称	序列
107	P1AF9482 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKPKPP

[0346]

SEQ ID NO:	名称	序列
108	P1AF9490 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKEKEP

[0347]

SEQ ID NO:	名称	序列
109	P1AF9471 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGSSKRP

[0348]

SEQ ID NO:	名称	序列
110	P1AF9479 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGPPKRP

[0349]

SEQ ID NO:	名称	序列
111	P1AF9487 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGEEKRP

[0350]

SEQ ID NO:	名称	序列
112	P1AF9472 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRSSP

[0351]

SEQ ID NO:	名称	序列
113	P1AF9480 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRPPP

[0352]

SEQ ID NO:	名称	序列
114	P1AF9488 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSQDPYVKEAENL KKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKS VETIKE DMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHELIQVMAELSPA AKTGKREEP

[0353]

SEQ ID NO:	名称	序列
115	P1AG7567 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNG TLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRD DFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSP AAKTGKRKRPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGGEVQLVQSGAELKKPGSSVKVS CKASGYIFTSSWINWVKQAPGQC LEWIGRIDP SDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTAYMELS SLRSED TAVYYCARGFLPWFADWGQGT LVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASV GDRVITITCKASENVD TYVSWYQQKPGKAPKL LIYGASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFLT ISSLQP DDFATYYCGQSYNYPFTFGCGTKVEVK

[0354]

SEQ ID NO:	名称	序列
116	P1AG7570 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGEVQLVQSGAELKKPGSSVKVSKKASGY IFTSSWINWVKQAPGQCLEWIGRIDPSDGEVH YNQDFKDKATLTVDKSTNTAYMELSSLRSED TAVYYCARGFLPWFADWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRV ITCKASENVDITYVSWYQQKPGKAPKLLIYGAS NRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPD FATYYCGQSYNYPFTFGCGTKVEVKGGGSGGGG SGGGSGGGGSGGGGSGGGGGQDPYVKEAE NLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEES DRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETI KEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLN VQRKAIHELIQVMAELSPAAGTKGRKRP

[0355]

SEQ ID NO:	名称	序列
117	P1AG1310 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNG TLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRD DFEKL TNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSP AAKTGKRKRP

[0356]

SEQ ID NO:	名称	序列
118	P1AG9672 重 链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSH AMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSAKTTPPSV YPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTV TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVP SSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCG CKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTKP REEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRV NSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKE QMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQP AENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWE AGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGKGG GGSGGGGSGGGGGHGTVIESLESLNNYFNSSG IDVEEKSLFLDIWRNWQKDGDMMKILQSQIISFY LRLFVCLKDNQAISNNISVIESHLITFFSNSKA KKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVH QLLPESSLRKRKRP

[0357]

SEQ ID NO:	名称	序列
119	P1AG8692 重 链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKD TYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYV PKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNG TLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRD DFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSP AAKTGKRKRPGGGGSGGGTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0358]

SEQ ID NO:	名称	序列
120	P1AG8693 重 链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKD TYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYV PKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNG TLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRD DFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSP AAKTGKRKRPLEVLFQGPTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0359]

SEQ ID NO:	名称	序列
121	P1AG8694 重 链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKD TYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYV PKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNG TLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRD DFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSP AAKTGKRKRPLEVLFQGPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MH EALHNHYTQKSLSLSPGK

[0360]

SEQ ID NO:	名称	序列
122	P1AG8695 重 链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKD TYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYV PKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNG TLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRD DFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSP AAKTGKRKRPLEVLFQGPAPAAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

[0361]

SEQ ID NO:	名称	序列
123	P1AG8696 重 链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKD TYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYV PKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNG TLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRD DFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSP AAKTGKRKRPPQARKTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK

[0362]

SEQ ID NO:	名称	序列
124	P1AG8697 重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHVVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGLEVLFQGPGGGGSGGGGGQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRP
125	P1AF3568 IFNG C 末端	AKTGKRKRSQMLFRG
126	P1AF3569 IFNG C 末端	AKTG
127	P1AF3570 IFNG C 末端	AKTGKRKRSQ
128	P1AF3571 IFNG C 末端	AKTGKRKRSL
129	P1AF3574 IFNG C 末端	AKTGKRKRP
130	P1AF3575 IFNG C 末端	AKTGKRKP
131	P1AF3576 IFNG C 末端	AKTGKRP

[0363]

SEQ ID NO:	名称	序列
132	P1AF3577 IFNG C 末端	AKTGKP
133	P1AF3578 IFNG C 末端	AKTGKRKRSP
134	P1AF9470 IFNG C 末端	AKTGKRKSP
135	P1AF3580 IFNG C 末端	AKTGKRSP
136	P1AF3581 IFNG C 末端	AKTGKSP
137	P1AF9464 IFNG C 末端	AKTGSRKRP
138	P1AF9469 IFNG C 末端	AKTGKSKRP
139	P1AF9465 IFNG C 末端	AKTGKRSRP
140	P1AF9475 IFNG C 末端	AKTGPRKRP
141	P1AF9476 IFNG C 末端	AKTGKPKRP
142	P1AF9477 IFNG C 末端	AKTGKRPRP
143	P1AF9478 IFNG C 末端	AKTGKRPPP
144	P1AF9483 IFNG C 末端	AKTGERKRP
145	P1AF9484 IFNG C 末端	AKTGKEKRP

[0364]

SEQ ID NO:	名称	序列
146	P1AF9485 IFNG C 末端	AKTGKRERP
147	P1AF9486 IFNG C 末端	AKTGKRKEP
148	P1AF9473 IFNG C 末端	AKTGSRSRP
149	P1AF9481 IFNG C 末端	AKTGPRPRP
150	P1AF9489 IFNG C 末端	AKTGERERP
151	P1AF9474 IFNG C 末端	AKTGKSKSP
152	P1AF9482 IFNG C 末端	AKTGKPKPP
153	P1AF9490 IFNG C 末端	AKTGKEKEP
154	P1AF9471 IFNG C 末端	AKTGSSKRP
155	P1AF9479 IFNG C 末端	AKTGPPKRP
156	P1AF9487 IFNG C 末端	AKTGEEKRP
157	P1AF9472 IFNG C 末端	AKTGKRSSP
158	P1AF9480 IFNG C 末端	AKTGKRPPP
159	P1AF9488 IFNG C 末端	AKTGKREEP

[0365]

SEQ ID NO:	名称	序列
160	IFNG C 末端 缩短 1 个氨基酸	AKTGKRKRSQMLFR
161	IFNG C 末端 缩短 2 个氨基酸	AKTGKRKRSQMLF
162	IFNG C 末端 缩短 3 个氨基酸	AKTGKRKRSQML
163	IFNG C 末端 缩短 4 个氨基酸	AKTGKRKRSQM
164	IFNG C 末端 缩短 8 个氨基酸	AKTGKRK
165	IFNG C 末端 缩短 9 个氨基酸	AKTGKR
166	IFNG C 末端 缩短 10 个氨基酸	AKTGK

[0366] 以下段落(段)为本发明的各方面:

[0367] 1. 一种抗原结合分子, 其包含

[0368] (i) 与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体, 以及

[0369] (ii) 干扰素 γ (IFNG) 变体多肽的同二聚体, 其中 IFNG 变体多肽的特征在于 C 末端氨基酸序列 KRKRP (SEQ ID NO:1)。

[0370] 2. 根据段落1所述的抗原结合分子, 其中所述 IFNG 变体多肽包含 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或由其组成。

[0371] 3. 根据段落1或2所述的抗原结合分子, 其中与肿瘤相关抗原特异性结合的所述抗体为与成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 特异性结合的抗体。

[0372] 4. 根据段落1至3中任一项所述的抗原结合分子, 其中与 FAP 特异性结合的所述抗体包含

[0373] (a) 重链可变区 (V_H FAP), 所述重链可变区包含: 重链互补决定区 (CDR-H1), 其包含

SEQ ID NO:4的氨基酸序列;CDR-H2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;和CDR-H3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L FAP),所述轻链可变区包含:轻链互补决定区(iv)CDR-L1,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;或者

[0374] (b) 重链可变区(V_H FAP),所述重链可变区包含:CDR-H1,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;CDR-H2,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;和CDR-H3,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L FAP),所述轻链可变区包含:CDR-L1,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0375] 5. 根据段落1至4中任一项所述的抗原结合分子,其中与FAP特异性结合的所述抗体包含:重链可变区(V_H FAP),其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L FAP),其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;或者所述抗体包含:重链可变区(V_H FAP),其包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L FAP),其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0376] 6. 根据段落1至5中任一项所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含IgG1 Fc结构域或IgG4 Fc结构域,并且其中所述Fc结构域包含一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代降低所述抗体与Fc受体的结合亲和力和/或效应子功能。

[0377] 7. 根据段落1至6中任一项所述的抗原结合分子,其中所述Fc结构域属于人IgG1亚类,其具有氨基酸突变L234A、L235A和P329G(根据Kabat EU索引的EU编号)。

[0378] 8. 根据段落1至5中任一项所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子为蛋白酶可活化的并且包含蛋白酶识别位点和掩蔽部分。

[0379] 9. 根据段落8所述的抗原结合分子,其中所述蛋白酶识别位点为用于matrilysin的底物。

[0380] 10. 根据段落8或9所述的抗原结合分子,其中所述蛋白酶识别位点包含PQARK(SEQ ID NO:20)或HQARK(SEQ ID NO:21),特别是PQARK(SEQ ID NO:20),或由其组成。

[0381] 11. 根据段落8至10中任一项所述的抗原结合分子,其中所述蛋白酶识别位点为将所述掩蔽部分与所述IFNG变体多肽连接的可切割肽接头的一部分。

[0382] 12. 根据段落8至11中任一项所述的抗原结合分子,其中所述掩蔽部分在其N末端经由所述可切割肽接头融合到所述IFNG变体多肽的C末端。

[0383] 13. 根据段落8至11中任一项所述的抗原结合分子,其中所述掩蔽部分在其N末端经由稳定的接头融合到所述Fc结构域的C末端,并且在其C末端经由所述可切割肽接头融合到所述IFNG变体多肽的N末端。

[0384] 14. 根据段落8至13中任一项所述的抗原结合分子,其中所述掩蔽部分为与IFNG特异性结合的抗体或抗体片段。

[0385] 15. 根据段落8至14中任一项所述的抗原结合分子,其中所述掩蔽部分为与IFNG特异性结合的scFv。

[0386] 16. 根据段落8至15中任一项所述的抗原结合分子,其中与IFNG特异性结合的所述scFv包含

[0387] (a) 重链可变区(V_H IFNG),所述重链可变区包含:CDR-H1,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;CDR-H2,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;和CDR-H3,其包含SEQ ID NO:24

的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L IFNG),所述轻链可变区包含:轻链互补决定区(iv)CDR-L1,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;或者

[0388] (b) 重链可变区(V_H IFNG),该重链可变区包含:CDR-H1,其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;CDR-H2,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;和CDR-H3,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L IFNG),该轻链可变区包含:CDR-L1,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列;CDR-L2,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列;和CDR-L3,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0389] 17. 根据段落1至16中任一项所述的双特异性抗原结合分子,其中与IFNG特异性结合的scFv包含

[0390] (a) 重链可变区(V_H IFNG),其包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L IFNG),其包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;或者

[0391] (b) 重链可变区(V_H IFNG),其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L IFNG),其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[0392] 18. 一种含有IFNG变体多肽的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子包含

[0393] (i) 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的两条重链,以及包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的两条轻链;或者

[0394] (ii) 包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的两条重链,以及包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的两条轻链;或者

[0395] (iii) 包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的两条重链,以及包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的两条轻链;或者

[0396] (iv) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的两条重链,以及包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的两条轻链。

[0397] 19. 一种干扰素 γ (IFNG) 变体多肽,其中所述IFNG变体多肽的特征在于C末端氨基酸序列KRKRP (SEQ ID NO:1)。

[0398] 20. 根据段落19所述的IFNG变体多肽,其中所述IFNG变体多肽包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成。

[0399] 21. 一种或多种分离的多核苷酸,其编码根据段落1至18中任一项所述的抗原结合分子或根据权利要求19或20所述的IFNG变体多肽。

[0400] 22. 一种表达载体,其包含根据段落21所述的一种或多种分离的多核苷酸。

[0401] 23. 一种原核或真核宿主细胞,其包含根据段落21所述的一种或多种分离的多核苷酸或根据段落22所述的表达载体。

[0402] 24. 一种产生抗原结合分子或IFNG变体多肽的方法,其包括以下步骤:a) 在适合表达所述抗原结合分子或IFNG变体多肽的条件下培养根据段落23所述的原核或真核宿主细胞,以及b) 任选地回收所述抗原结合分子或IFNG变体多肽。

[0403] 25. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至18中任一项所述的抗原结合分子或根据段落19或20所述的IFNG变体多肽以及药用赋形剂。

[0404] 26. 根据段落1至17中任一项所述的抗原结合分子或根据段落19或20所述的IFNG变体多肽,其用作药物。

[0405] 27. 根据段落1至17中任一项所述的抗原结合分子或根据段落19或20所述的IFNG变体多肽,其用于在治疗癌症中使用。

[0406] 28. 根据段落1至17中任一项所述的抗原结合分子或根据段落19或20所述的IFNG变体多肽,其用于在治疗癌症中使用,其中所述抗原结合分子或所述IFNG变体多肽用于与化学治疗剂、放射和/或用于在癌症免疫疗法中使用的其他药剂组合施用。

[0407] 29. 根据段落1至17中任一项所述的抗原结合分子或根据段落19或20所述的IFNG变体多肽在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

[0408] 30. 一种治疗个体的疾病的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的呈药用形式的根据段落1至17中任一项所述的抗原结合分子或根据段落19或20所述的IFNG变体多肽。

[0409] 31. 根据段落30所述的方法,其中所述疾病为癌症。

[0410]

[0411] 实例

[0412] 以下是本发明的方法和组合物的实例。应当理解,鉴于本文提供的一般说明,可以实践各种其他实施例。

[0413] 重组DNA技术和测序

[0414] 使用标准方法来操纵DNA,如在Sambrook等人,Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述。根据制造商的说明来使用分子生物学试剂。关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息在以下参考文献中给出: Kabat, E. A. 等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, NIH公开号91-3242。通过双链测序确定DNA序列。

[0415] 基因合成

[0416] 期望的基因区段通过使用适当模板进行PCR生成,或通过自动化基因合成从合成寡核苷酸和PCR产物通过GenScript (中国) 来合成。将侧接有单个限制性内切酶切割位点的基因区段克隆到标准克隆/测序载体中。从转化的细菌中纯化出质粒DNA,并通过紫外光谱法确定浓度。通过DNA测序来确认亚克隆基因片段的DNA序列。设计具有合适限制性位点的基因区段,以允许亚克隆到相应的表达载体中。所有构建体均设计有5'端DNA序列,该序列编码前导肽,该前导肽靶向真核细胞分泌的蛋白。

[0417] 细胞培养技术

[0418] 使用如在Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J. B., Lippincott-Schwartz, J. 和 Yamada, K. M. (编辑), John Wiley & Sons, Inc. 中所述的标准细胞培养技术。

[0419] 蛋白质纯化

[0420] 参照标准方案从过滤的细胞培养物上清液中纯化蛋白质。简言之,利用蛋白A亲和色谱法(平衡缓冲液: 20mM柠檬酸钠, 20mM磷酸钠, pH 7.5; 洗脱缓冲液: 20mM柠檬酸钠, pH 3.0) 从经过滤的细胞培养上清液中纯化含Fc的蛋白质。在pH 3.0下实现洗脱,随后立即中和样品的pH。通过离心(Millipore Amicon® ULTRA-15 (Art. Nr.: UFC903096)) 浓缩蛋白质,然后利用尺寸排阻色谱法(Superdex 200, GE Healthcare) 在20mM组氨酸、140mM氯化钠(pH 6.0) 中将聚集蛋白质与单体蛋白质分离。将单体化合物级分合并,使用例如MILLIPORE

Amicon Ultra (30MWC0) 离心浓缩器浓缩(如果需要),冷冻并储存在-80℃下。提供样品的部分以通过CE-SDS、尺寸排阻色谱法(SE-HPLC)和质谱法(LC-MS)来进行后续的蛋白质分析和分析表征。

[0421] 可替代地,将基因合成、克隆、转染和收获工作外包给evitria AG (Schlieren, Switzerland)。使用常规(非基于PCR的)克隆技术将相应的cDNA克隆到evitria的载体系统中。evitria载体质粒是基因合成的。基于阴离子交换色谱法,在低内毒素条件下制备质粒DNA。DNA浓度是通过测量260nm波长处的吸收来确定的。通过桑格测序验证序列的正确性(每个质粒进行两次测序反应)。悬浮调整的CHO K1细胞(最初从ATCC接收并适应evitria悬浮培养中的无血清生长)用于生产。种子在eviGrow培养基中生长,这是一种化学成分明确、无动物成分、无血清的培养基。用eviFect转染细胞,eviFect是evitria定制的专有转染试剂,转染后细胞在eviMake2(一种不含动物成分、无血清培养基)中生长。通过离心和随后的过滤(0.2μm过滤器)收集上清液。

[0422] 可替代地,感兴趣的化合物由WuXi Biologics使用其专有载体系统利用常规(非基于PCR的)克隆技术并使用悬浮适应的HEK293细胞制备。所有基因的表达都受人CMV启动子的控制。对于生产,WuXi Biologics使用市售的化学定义的培养基,并在36.5℃和6%二氧化碳下在转染后培养细胞。通过离心和随后的过滤(0.2μm过滤器)收获上清液,并且通过标准方法从收获的上清液中纯化蛋白质。

[0423] 在具有UV检测器的Agilent HPLC系统上,通过蛋白A-HPLC对上清液中的含Fc的构建体进行定量。将上清液注射在POROS20A (Applied Biosystems)上。对280nm处的洗脱峰面积进行积分,并通过使用校准曲线利用在同一运行中分析的标准物转换为浓度。

[0424] 参照标准方案从过滤的细胞培养物上清液中纯化蛋白质。简言之,通过蛋白A-亲和色谱法从细胞培养物上清液中纯化含Fc的蛋白质。洗脱之后立即中和样品的pH。通过离心(Millipore **Amicon**®ULTRA-15 (Art.Nr.:UFC903096) 浓缩蛋白质,并通过尺寸排阻色谱法(**Äkta** Pure&HiLoad26/600Superdex 200;两者都来自Cytiva)在20mM组氨酸、140mM氯化钠(pH 6.0)中将聚集的蛋白质与单体蛋白质分离。

[0425] 根据Pace等人,Protein Sci.1995,4(11),2411-2423,使用基于氨基酸序列计算得出的质量消光系数通过测量280nm处的吸光度来确定纯化的蛋白质的浓度(Little Lunatic,Unchained labs)。在存在和不存在还原剂的情况下,使用LabChipGXII (Perkin Elmer),通过CE-SDS分析蛋白质的纯度和分子量。使用分析型尺寸排阻柱(TSKgel G3000 SW XL)在25℃下通过HPLC 色谱法确定聚集体含量。

[0426] IgG 样蛋白质的组成分析

[0427] 根据Pace等人,Protein Science,1995,4(11),2411-1423,使用基于氨基酸序列计算得出的质量消光系数通过测量280nm处的吸光度来确定纯化的蛋白质的浓度。根据制造商的方案,在使用或不使用rapidPNGase F进行之前的处理的情况下,在存在和不存在还原剂的情况下,使用LabChipGXII或LabChip GX Touch (Perkin Elmer) (Perkin Elmer),通过CE-SDS分析蛋白质的纯度和分子量。使用在运行缓冲液(200mM KH₂PO₄、250mM KCl pH 6.2、0.02%NaN₃)中平衡的分析型尺寸排阻色谱法(TSKgel G3000 SW XL或UP-SW3000柱)在25℃下通过SE-HPLC色谱法进行聚集体含量的确定。

[0428] 通过ESI-MS进行质量确定

[0429] 为了确定纯化的化合物的完整/去糖基化和去糖基化/还原质量,通过质谱法分析样品。对于具有人Fc和常规Fc糖基化的化合物,用Milli-Q 1型超纯水将25 μ g蛋白质稀释至40 μ L的体积。然后,添加9 μ L 250mM磷酸钠(pH 7.5)和1 μ L PNGase F PRIME™(N-Zyme Scientifics,NZPP550,批号NZ-2019-0123,0.2g/L),并将混合物在37℃下孵育过夜。对于具有非人Fc的蛋白质和/或含有多于常规N-糖基化位点的化合物,使用Milli-Q 1型超纯水将10 μ g蛋白质稀释至8 μ L,并与2 μ L“非还原”缓冲液(Rapid PNGaseF非还原缓冲液,NEB#P0711S,批号10085473,10/21)混合并在70℃下孵育5分钟。然后,添加1 μ L Rapid PNGase F,并在50℃下孵育10分钟。去糖基化后,使用Milli-Q 1型超纯水将样品稀释至20 μ L。为了还原半胱氨酸键,将20 μ L人Fc蛋白与20 μ L新制备的还原剂(7M胍、0.4M Tris pH 8.0、0.5M DTT)混合。对于由rapidPNGase F消化的样品,将7 μ L与7 μ L还原剂混合。对于所有类型的样品,还原和变性在70℃下进行5min。采用反相色谱法在二乙基苯柱(Agilent,PLRP-S 1000 Å,2.1x 150mm,8 μ m,0.7mL/min,75℃,柱上1 μ g)上对样品进行脱盐,并使用QTOF型质谱仪(Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF)记录质谱。在每个样品序列之前对质谱仪进行校准,并应用锁定质量校正以获得高质量精度。对于数据分析,使用Roche MassAnalyzer来总结色谱峰的质谱并解释检测到的质量。然后将确定的质量与计算的理论质量进行比较。

[0430] 可替代地,在NMI Technology Transfer(Reutlingen,Germany)进行LC-MS表征。为了确定完整质量,将每个样品12.5 μ g-25 μ g用rapidPNGase F酶试剂盒(Rapid PNGaseF非还原,NEB#P0711S,批号10085472,10/21)中包含的“非还原”缓冲液按1:4(v/v)稀释,并在80℃下变性2分钟。随后,添加0.3 μ L rapidPNGase F(“非还原”),并在50℃下将化合物去糖基化10分钟。此后,用双蒸水将样品稀释至31.25 μ L-62.5 μ L的最终体积。为了确定还原链的质量,将每个样品12.5 μ g-25 μ g用rapidPNGase F酶试剂盒(Rapid PNGaseF还原,NEB#P0710S,批号10079163 07/21)中包含的“还原”缓冲液按1/4(v/v)稀释,并在80℃下变性2分钟。随后,添加0.3 μ L rapidPNGase F(“还原”),并在50℃下将化合物去糖基化10分钟。此后,用双蒸水将样品稀释至31.25 μ L-62.5 μ L的最终体积。采用反相色谱法在C4柱(Acquity BEH300 C4,1mm 50mm,1.7 μ m Charge 133380461;150 μ L/min,75℃,柱上1.6 μ g)上对样品进行脱盐,并使用QTOF型质谱仪(MAXIS,Bruker Daltonics)记录质谱。在每个样品序列之前对质谱仪进行校准,并应用锁定质量校正以获得高质量精度。通过总结色谱峰的质谱并使用MaxEnt对其进行解卷积来进行数据分析。通过将实验质量与理论质量进行比较来检查同一性和完整性。

[0431] 表面等离子体共振

[0432] 通过表面等离子体共振(SPR)评定IFNG变体对IFNGR1和IFNGR1/2的结合行为。在Biacore 8K装置上在25℃下使用HBS-EP作为运行缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005%表面活性剂P20,Biacore,Freiburg/Germany)进行SPR实验。为了确定IFNG变体与IFNG受体的结合亲和力,在链霉亲和素(SA)传感器芯片的流动池中捕获生物素化的Fc(kih)-IFNG化合物(50nM)(接触时间80秒,流速10 μ L/min)。IFNG突变系列化合物以25nM浓度、80秒接触时间和10 μ L/min固定。使用了高达450共振单位(RU)的固定水平。随后,在120秒内以30 μ L/min的流速注射浓度逐渐降低(800nM-3.13nM)的Fc(kih)-IFNGR1单体或Fc(kih)-IFNGR1/2异二聚体作为第二分析物,并监测解离500秒。通过减去参考流通

池中获得的响应来校正体积折射率差异,其中没有固定蛋白质。亲和常数是拟合至1:1Langmuir结合而由速率常数得出的。

[0433] HEK Blue报告测定

[0434] HEK Blue IFNG报告细胞测定允许特异性测量IFNG的活性。HEK blue检测介质用于检测随时间推移SEAP的生产。HEK-Blue™检测介质是通过将一袋HEK-Blue™Detection的内容物倒入50mL Falcon管中,并将粉末溶解在50mL无内毒素水中来制备。通过涡旋或旋转使溶液均质化。将重构的HEK-Blue™Detection在20min-60min内升温至37℃。将介质无菌过滤(将0.2μm膜放入无菌小瓶/瓶中)。HEK-Blue™检测介质在使用前保持在37℃,并储存在2℃-8℃长达2周。通过剧烈移液分离HEKblue细胞,以产生匀浆的细胞悬浮液,并使用ViCell细胞活力分析仪确定细胞计数和活力。将所需量的HEKblue细胞离心并以0.55Mio/mL重悬于HEKblue检测介质中。根据板方案,每孔分配180μL细胞(对应于100,000个细胞),并向每个孔添加20μL测试化合物(稀释于PBS中)。将板在CO₂孵育箱中于37℃下孵育20小时-24小时,并使用分光光度计在620nm-655nm处分析随时间流逝的SEAP水平。

[0435] 活性测定

[0436] 该测定与HEK blue报告细胞测定组合使用或代替HEK blue报告细胞测定来评定IFNG化合物的活性。响应于用含有可切割接头2(PQARK切割位点)的抗鼠类IFNG scFv掩蔽的FAP-IFNG化合物处理两天,评定在鼠类MC38-huCEA肿瘤细胞系中诱导MHC-I和PD-L1,并与未掩蔽的IgG融合的IFNG的活性进行比较。在处理之前,将构建体与重组matriptase一起在37℃下孵育两小时。当用Matriptase消化PQARK接头时,FAP-IFNG scFv掩蔽的PQARK构建体在肿瘤细胞系中诱导MHC-I和PD-L1。相反,未与重组matriptase一起预孵育的FAP-IFNG scFv掩蔽的构建体不诱导MHC-I或PD-L1上调。

[0437] 将MC38-huCEA细胞在DMEM 10% FCS中培养,并使用细胞解离缓冲液收获。将细胞在DMEM 10% FCS中洗涤,重悬于DMEM 10% FCS中,然后使用Eve细胞计数器评定细胞活力和细胞数量。将细胞在DMEM 10% FCS中稀释至50,000/mL的浓度,并将100μL该细胞悬浮液接种到细胞培养物处理的96F孔板中。将细胞在37℃、5% CO₂下孵育过夜,以确保细胞的粘附性。将选定浓度的FAP-IFNG构建体在有或没有163nM/4.4ng重组matriptase(4735-SE,批号RIK071951,0.44mg/mL)的情况下在matriptase缓冲液(50mM Tris、50mM NaCl、0.01% Tween 20,pH 9.0)中于37℃下消化两小时。孵育后,将消化的的细胞因子Fc融合溶液用DMEM 10% FCS稀释至30nM的浓度,并在100μL DMEM 10% FCS中每孔添加50μL预接种细胞,从而使最终最大浓度为每孔10nM。将细胞因子Fc融合溶液按1:10的比率连续稀释,直至最终最低浓度为每孔0.1pM。将细胞在孵育箱中孵育48小时。48小时后,将细胞用PBS洗涤,然后与50μL胰蛋白酶EDTA一起孵育10分钟。在DMEM 10% FCS中收获分离的细胞,并将其转移至圆底96孔板中。将细胞离心(500g,2min),弃去上清液,并每孔添加150μL PBS,然后离心(500g,2min)。将细胞重悬于含有Zombie近红外可固定活力染料(Invitrogen,L10119)的50μL染色混合物中。然后用FACS缓冲液洗涤细胞,并在4℃下添加50μL含有抗muH-2Kb/H-2D-PE(BioLegend,114608)和抗muCD274-APC(BioLegend,124312)的抗体染色混合物达20min。此后,将细胞用PBS洗涤并重悬于100μL PFA中,并在室温下孵育25min。然后,将细胞用100μL FACS缓冲液洗涤,重悬于100μL FCS缓冲液中,并在BD FACS Canto上测量。

[0438] 实例1

[0439] 1.1工程化IFNG的C末端以调节同质性和活性

[0440] IFNG为用于治疗多种免疫性疾病的关键的免疫调控细胞因子。然而,由于IFNG受体1 (IFNGR1)的分布,其作为抗癌药物的临床应用受到限制,IFNG受体1将IFNG捕获到全身并防止其在肿瘤部位富集。我们观察到的另一个挑战是IFNG C末端对生产细胞系中存在的蛋白酶的固有敏感性,这会导致大量具有截短的C末端序列的部分切割的副产物,从而导致最终产物的异质性(图1A)。为了增加化合物的同质性和稳定性,我们对IFNG C末端应用了序列工程化,并鉴定了具有差异化副产物概况和选择性功能行为的IFNG变体(图1B)。我们最初设计了一系列IFNG C末端缺失变体,以鉴定在信号传导测定中维持功能活性的IFNG的最短C末端序列(表1A)。IFNG的几种C末端变体已经进行了描述,并强调了IFNG的C-末端中KRKR残基的重要性(图1)。KRKR序列(SEQ ID NO:78)的缺失使得IFNG在下游信号传导中失活(Döbeli等人,Journal of Biotechnology 1988,7(3),199-216)。然而,缩短的IFNG变体被证明具有与野生型IFNG相似的活性(Slodowski等人,Eur.J.Biochem.1991,202.1133-1140)。因此,我们将KRKR补片的系统缩短与脯氨酸或丝氨酸-脯氨酸加帽组合,以最大化C末端稳定性和序列同质性,类似于针对IgG的C末端描述的方法(van den Bremer等人,mAbs 2015,7:4,672-680)。期望的候选物应显示出最少数量的副产物和与野生型IFNG相当的信号传导活性。

[0441] 表1A:缺失系列中IFNG融合的化合物的C末端重链序列。使用具有序列GGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:66)的15个氨基酸接头将IFNG变体连接至IgG的C末端。

[0442]

缺失系列			
化合物 ID	SEQ ID Nos:	C 末端 IFNG 序列	说明
P1AF3568	79, 41	...AKTGKRKRSQMLFRG	野生型, 参考
P1AF3569	80, 41	...AKTG	失活变体
P1AF3570	81, 41	...AKTGKRKRSQ	来自 Slodowski 等人, 1991
P1AF3571	82, 41	...AKTGKRKRSL	来自 Slodowski 等人, 1991
P1AF3574	83, 41	...AKTGKRKRP	完整的 KRKR, P 帽
P1AF3575	84, 41	...AKTGKRKP	缩短的 KRKR, P 帽
P1AF3576	85, 41	...AKTGKRP	缩短的 KRKR, P 帽
P1AF3577	86, 41	...AKTGKP	缩短的 KRKR, P 帽
P1AF3578	87, 41	...AKTGKRKRSP	完整的 KRKR, SP 帽
P1AF9470	88, 41	...AKTGKRKSP	缩短的 KRKR, SP 帽
P1AF3580	89, 41	...AKTGKRSP	缩短的 KRKR, SP 帽
P1AF3581	90, 41	...AKTGKSP	缩短的 KRKR, SP 帽

[0443] 第二系列基于来自缺失系列的P1AF3574,并且我们在KRKR序列中引入附加点突

变,目的是进一步增加蛋白水解稳定性(表1B和图1B)。在系统序列变异方法中,我们用丝氨酸、脯氨酸或谷氨酸替换了KRKR序列中的一个或两个位置。选择丝氨酸作为中性氨基酸,引入脯氨酸的目的是在空间上干扰蛋白水解识别序列,并且引入谷氨酸以部分逆转KRKR序列(SEQ ID NO:78)的电荷。

[0444] 表1B:缺失系列中IFNG融合的化合物的C末端重链序列。位置是指KRKR序列(SEQ ID NO:78)。使用具有序列GGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:66)的15个氨基酸接头将IFNG变体连接至IgG的C末端。

[0445]

突变系列			
化合物 ID	SEQ ID Nos:	C 末端 IFNG 序列	说明
P1AF9464	91, 41	...AKTGSRKRP	S 位于位置 1
P1AF9469	92, 41	...AKTGKSKRP	S 位于位置 2
P1AF9465	93, 41	...AKTGKRSRP	S 位于位置 3
P1AF9470	94, 41	...AKTGKRKSP	S 位于位置 4
P1AF9475	95, 41	...AKTGPRKRP	P 位于位置 1
P1AF9476	96, 41	...AKTGKPKRP	P 位于位置 2
P1AF9477	97, 41	...AKTGKRPRP	P 位于位置 3
P1AF9478	98, 41	...AKTGKRPPP	P 位于位置 4
P1AF9483	99, 41	...AKTGERKRP	E 位于位置 1
P1AF9484	100, 41	...AKTGKEKRP	E 位于位置 2
P1AF9485	101, 41	...AKTGKRERP	E 位于位置 3
P1AF9486	102, 41	...AKTGKRKEP	E 位于位置 4
P1AF9473	103, 41	...AKTGSRSRP	S 位于位置 1 和 3
P1AF9481	104, 41	...AKTGPRPRP	P 位于位置 1 和 3
P1AF9489	105, 41	...AKTGERERP	E 位于位置 1 和 3
P1AF9474	106, 41	...AKTGKSKSP	S 位于位置 2 和 4
P1AF9482	107, 41	...AKTGKPKPP	P 位于位置 2 和 4
P1AF9490	108, 41	...AKTGKEKEP	E 位于位置 2 和 4
P1AF9471	109, 41	...AKTGSSKRP	S 位于位置 1 和 2

[0446]

P1AF9479	110, 41	...AKTGPPKRP	P 位于位置 1 和 2
P1AF9487	111, 41	...AKTGEEKRP	E 位于位置 1 和 2
P1AF9472	112, 41	...AKTGKRSSP	S 位于位置 3 和 4
P1AF9480	113, 41	...AKTGKRPPP	P 位于位置 3 和 4
P1AF9488	114, 41	...AKTGKREEP	E 位于位置 3 和 4

[0447] 1.2IgG融合的IFNG缺失和突变变体的生产和纯化

[0448] 生产、纯化了所有IFNG缺失和突变系列变体,并表征了工程化改变对副产物概况和信号传导活性的影响(实例2)。IFNG序列变体经由甘氨酸-丝氨酸接头融合到对成纤维细胞活化蛋白(FAP)具有特异性的IgG抗体(即抗FAP克隆4B9)(WO 2012/020006 A2中公开)的重链和含有P329G LALA突变的Fc结构域的C末端(Schlothauer等人,Protein Eng Des Sel.2016,29(10),457-466)(图1A)。使用evitria的瞬时CHO表达系统表达化合物。缺失系列的化合物(表1A)达到118mg/L的中位滴度,突变系列的化合物(表1B)以45.5mg/L(中位滴度)表达。表2A和2B列出了每种化合物获得的各个滴度值。接下来,经由MabSelectSure HP捕获该化合物,并用pH梯度洗脱至pH 3.0。中和级分并通过CE-SDS分析其组成,并通过SE-HPLC分析其HMW含量。将单体含量最高的级分合并,并通过SEC进一步纯化。将单体含量最高的SEC级分合并,作为最终批次。通过SE-HPLC确定,缺失系列的化合物的中位单体含量为88.9%,突变系列的化合物被纯化至中位99.8%同质性。LC-MS表征确认了这两个系列的序列同一性。实例2的表3中提供了化合物的详细LC-MS质量概况。每种化合物的表达滴度和单体含量列于表2A和2B中。

[0449] 表2A:缺失系列的纯化的化合物的质量概况。通过蛋白A SE-HPLC确定生产滴度,通过SE-HPLC评定单体含量。LC-MS确认了正确的化合物身份,详细的副产物概况列于表3中。

[0450]

缺失系列				
		SE-HPLC 质量概况		
化合物 ID	滴度 (mg/L)	单体%	HMW %	LMW %
P1AF3568	36.1	98.7	1.3	0
P1AF3569	143.1	99.3	0.7	0
P1AF3570	103.3	87.1	0.2	12.6
P1AF3571	107.2	85.3	0.4	14.4
P1AF3574	76.2	86.7	0.2	13.1
P1AF3575	106.3	88.3	0.2	11.6
P1AF3576	126.5	92.4	0.1	7.5
P1AF3577	119.8	88.9	0.1	11
P1AF3578	116.5	87.6	0.1	12.3
P1AF9470	125.4	90.6	0.4	9.1
P1AF3580	133.8	88.9	0.2	10.9
P1AF3581	135.1	91	0.3	8.8

[0451] 表2B:突变系列的纯化的化合物的质量概况。通过蛋白A SE-HPLC确定生产滴度,通过SE-HPLC评定单体含量。LC-MS确认了正确的化合物身份,详细的副产物概况列于表3中。

[0452]

突变系列				
		SE-HPLC 质量概况		
化合物 ID	滴度 (mg/L)	单体%	HMW %	LMW %
P1AF9464	32.75	99.7	0.3	0
P1AF9469	24.75	99.7	0.3	0
P1AF9465	24.75	99.7	0.3	0
P1AF9470	32.5	99.8	0.2	0

[0453]

P1AF9475	38	99.8	0.2	0
P1AF9476	39	99.7	0.3	0
P1AF9477	38.75	99.8	0.2	0
P1AF9478	16	99.2	0.8	0
P1AF9483	56.1	99.8	0.2	0
P1AF9484	56.7	99.8	0.2	0
P1AF9485	55.6	99.8	0.2	0
P1AF9486	55.6	99.8	0.2	0
P1AF9473	33	99.6	0.4	0
P1AF9481	51.9	99.8	0.2	0
P1AF9489	65.1	99.8	0.2	0
P1AF9474	36.75	99.7	0.3	0
P1AF9482	57.9	99.8	0.2	0
P1AF9490	96	99.9	0.1	0
P1AF9471	35.75	99.7	0.3	0
P1AF9479	57.4	99.8	0.2	0
P1AF9487	67.4	99.8	0.2	0
P1AF9472	35.75	99.7	0.3	0
P1AF9480	57.3	99.8	0.2	0
P1AF9488	62.3	99.8	0.2	0

[0454] 实例2

[0455] 2.1具有改善的质量概况的IFNG的C末端变体的鉴定

[0456] 为了最大化IFNG的C末端的序列完整性,我们鉴定了具有有利的重链副产物概况的IFNG序列。因此,我们将脯氨酸或丝氨酸-脯氨酸加帽与KRKR序列的系统缩短组合(图1B、表1A)。所有化合物均经表达、纯化,并通过LC-MS分析最终批次,以鉴定并定量重链副产物(表3)。包含野生型人IFNG的化合物含有7%完整重链和不同数量的8种截短的重链副产物。已公布的IFNG变体(包括在P1AF3570和P1AF3571中)也因分别产生3种和4种副产物的蛋白水解而表现出重链序列异质性。副产物的数量与IFNG C末端序列的长度相关:C末端的缩短减少了截短重链的数量,并且不含KRKR序列的化合物100%正确。与丝氨酸-脯氨酸加帽的

等效物相比,C末端脯氨酸加帽产生的重链副产物较少(表3)。

[0457] 表3: IFNG基准分子(P1AF3570、P1AF3571)和具有不同C末端序列的缺失系列分子的副产物概况。每个化合物的粗体序列对应于C末端全长序列,并且随后列出了观察到的截短产物。使用质量峰强度来估计每种副产物的相对量(%)。

[0458]

化合物 ID	C 末端 HC 序列	相对量 (%)
P1AF3568	...AKTGKRKRSQMLFRG	7
	...AKTGKRKRSQMLFR	15
	...AKTGKRKRSQMLF	14
	...AKTGKRKRSQML	29
	...AKTGKRKRSQM	5
	...AKTGKRK	16
	...AKTGKR	1
	...AKTGK	11
	...AKTG	1
P1AF3569	...AKTG	100
P1AF3570	...AKTGKRKRSQ	76
	...AKTGKRK	10
	...AKTGK	11
	...AKTG	3
P1AF3571	...AKTGKRKRSL	3
	...AKTGKRK	54
	...AKTGKR	5
	...AKTGK	33
	...AKTG	5

[0459]

P1AF3574	...AKTGKRKRP	95
	...AKTGK	5
P1AF3575	...AKTGKRKRP	100
P1AF3576	...AKTGKRP	100
P1AF3577	...AKTGKP	100
P1AF3578	...AKTGKRKRSP	60
	...AKTGKRK	20
	...AKTGK	17
	...AKTG	3
P1AF9470	...AKTGKRKSP	98
	...AKTGK	2
P1AF3580	...AKTGKRSP	100
P1AF3581	...AKTGKSP	100

[0460] 2.2IFNG缺失变体的信号传导活性

[0461] 使用HEKblue测定,进一步表征基准化合物和缺失系列的其他化合物诱导IFNG信号传导的能力。功能活性与C末端序列的长度相关:仅包含整个KRKR序列的化合物保留了与野生型IFNG相当的活性水平(图2和表4),而KRKR序列的系统缩短逐渐降低功能活性。

[0462] 表4:HEKblue测定中确定的相对于野生型IgG- IFNG的信号传导活性(曲线下面积)

[0463]

化合物 ID	C 末端 HC 序列	相对活性
P1AF3568 野生型	...AKTGKRKRSQMLFRG	100%
P1AF3569	...AKTG	9%
P1AF3570	...AKTGKRKRSQ	81%
P1AF3571	...AKTGKRKRSL	32%
P1AF3574	...AKTGKRKRP	84%
P1AF3575	...AKTGKRKP	35%
P1AF3576	...AKTGKRP	13%
P1AF3577	...AKTGKP	9%

[0464]	P1AF3578	...AKTGKRKRSP	79%
	P1AF9470	...AKTGKRKSP	40%
	P1AF3580	...AKTGKRSP	12%
	P1AF3581	...AKTGKSP	9%

[0465] 与质量数据(表3)组合,观察到终止于KRKRP(P1AF3574)的脯氨酸加帽的IFNG变体具有最佳概况,即最高的活性与最少量的副产物。该化合物含有95%正确的重链、5%截短的副产物,并且与野生型IFNG相比,显示84%的活性。因此,选择该序列作为突变系列中进一步稳定性工程化的基础(实例2.4)。

[0466] 2.3 IFNG-KRKRP和野生型IFNG显示对IFNG受体相当的结合行为

[0467] IFNG是一种组成型同二聚体,其启动与IFNG受体形成信号复合物,从而活化JAK/STAT信号传导通路。该信号传导复合物由两个IFNGR1/2异二聚体的对称排列组成,其中IFNG同二聚体位于中心。每个IFNG单体与一个IFNGR1/2异二聚体相互作用,从而与两个受体亚基接触。建议信号传导复合物组装由IFNG与IFNGR1的初始相互作用触发,这产生了IFNGR2的结合表面(Mendoza等人,Nature 2019,567(7746),56-60)。虽然信号传导复合物的组装主要由IFNG的结构化结构域驱动,但IFNG的非结构化C末端也可能通过与IFNGR1/2中更靠近细胞膜的位点相互作用来促进活性信号传导。然而,确切的结合模式为未知的,并且在可用的晶体结构中也没有得到解决。

[0468] 为了进一步评估野生型IFNG和我们的具有C末端KRKRP(SEQ ID NO:1)的工程化化合物的类似特性,我们通过SPR确定了IFNG变体对IFNG受体的结合亲和力。因此,野生型IFNG(P1AG2651)和IFNG KRKRP(P1AG1550)被生产并纯化为C末端Fc(kih)-融合蛋白,并固定在流动池中。杵臼(kih)突变为Fc结构域中的特定突变(“杵”链中EU编号的突变S354C和T366W以及“臼”链中EU编号的突变Y349C、T366S、L368A和Y410V),其允许两条不同重链的增强的异二聚化(Merchant等人,Nature Biotechnology 1998,16(7),677-681)。作为第二分析物,IFNGR1单体(P1AF7104)或IFNGR1/2异二聚体(P1AF8126)以不同浓度通过流动池,并基于观察到的缔合和解离行为计算解离常数(KD)。Fc(kih)-IFNG KRKRP以154nM的表观 K_D 结合IFNGR1,其与 K_D 为177nM的野生型Fc(kih)-IFNG在相似的范围内。对于IFNGR1/2异二聚体,观察到更高的表观结合亲和力:Fc(kih)-IFNG-KRKRP(P1AG1550)以54.4nM的 K_D 结合,野生型Fc(kih)-IFNG(P1AF2651)以73.8nM的 K_D 结合。

[0469] 2.4 IFNG KRKR序列的突变差异地影响IFNG受体结合和信号传导

[0470] 鉴定了最小C末端序列长度后,我们在KRKR序列中引入附加点突变,以进一步改善对蛋白酶的稳定性。突变系列的所有化合物都被表达并纯化为IgG融合蛋白(参见实例1)。通过LC-MS进行的质量概况的分析确认了C末端脯氨酸加帽的有益效应,因为在此突变系列的化合物中未检测到蛋白水解副产物。

[0471] 通过SPR确定,KRKR序列的突变对受体结合有影响。为了测量结合亲和力,将突变系列的化合物固定在流动池中。作为第二分析物,Fc(kih)-IFNGR1单体或Fc(kih)-IFNGR1/R2异二聚体通过流动池,并基于观察到的缔合和解离常数计算结合亲和力(KD)。与具有C末端KRKRP的化合物相比,单点突变已经降低了对受体的表观结合亲和力。双点突变对受体结

合有附加负面影响。表5中总结了突变系列的化合物对IFNGR1和IFNGR1/2的结合行为。

[0472] 表5:突变系列的化合物对Fc(kih)-IFNGR1单体和Fc(kih)-IFNGR1/2异二聚体的表观结合亲和力

[0473]	化合物 ID	C 末端	Kd IFNGR1 (nM)	Kd IFNGR1/R2 (nM)
	P1AG1310	...KRKRP	475	167
	P1AF9464	...SRKRP	614	459
	P1AF9475	...PRKRP	643	320
	P1AF9483	...EKKRP	3160	1080
	P1AF9469	...KSKRP	708	652
	P1AF9476	...KPKRP	1020	456
	P1AF9484	...KEKRP	3260	1150
	P1AF9465	...KRSRP	597	431
	P1AF9477	...KRPRP	539	312
[0474]	P1AF9485	...KRERP	1200	608
	P1AF9470	...KRKSP	604	535
	P1AF9478	...KRKPP	564	284
	P1AF9486	...KRKEP	1370	598
	P1AF9471	...SSKRP	1730	1420
	P1AF9479	...PPKRP	3600	204
	P1AF9487	...EEKRP	1030000	1750
	P1AF9472	...KRSSP	1080	885
	P1AF9480	...KRPPP	1420	683
	P1AF9488	...KREEP	6220	2870
	P1AF9473	...SRSRP	1100	793
	P1AF9481	...PRPRP	977	486
	P1AF9489	...ERERP	10700	5960
	P1AF9474	...KSKSP	4560	864
	P1AF9482	...KPKPP	2710	950
	P1AF9490	...KEKEP	216000	4750

[0475] 突变系列变体的受损功能在报告细胞测定中甚至更为明显(图3)。功能表征表明,无论单丝氨酸或脯氨酸突变在KRKR序列中的位置如何,单丝氨酸或脯氨酸突变都耐受良好。相反,单谷氨酸突变使得该化合物失活,所有双突变(无论交换的氨基酸如何)也是如此。

[0476] 2.5IFNG KRKR序列中的突变防止被Matriptase蛋白水解

[0477] 为了评定突变对KRKR基序的蛋白水解稳定性的影响,突变系列的所有化合物均用matriptase(根据Cepter Biopartners公布的方案进行定制纯化)以1:3500的酶与底物的摩尔比在37℃下处理1小时。随后,通过LC-MS在去糖基化还原状态下检测和定量主要蛋白水解副产物(在IFNG-K/RKRP之间切割的IgG-IFNG)的释放。位置1或2的点突变对蛋白水解稳定性具有积极影响,在所选条件下未观察到蛋白水解,而对于参考分子,检测到K/RKR基序的35%切割(表6)。位置3或4的丝氨酸、脯氨酸或谷氨酸突变干扰蛋白水解的效率较低,检测到2%-11%的蛋白水解产物。包含位置1或2的双突变也有效地阻止蛋白水解,而位置3和4的双突变是允许的。然而,鉴于在不存在靶标结合的情况下突变系列化合物的功能活性较低,IFNG KRKRP仍然是优选序列并用于产生掩蔽的IFNG化合物(实例3)。

[0478] 表6:KRKR序列基序中位置1和2的突变改善KRKR补片的蛋白水解稳定性。将化合物与matriptase一起孵育,并通过LC-MS分析和定量蛋白水解概况。位置参考KRKR序列 (SEQ ID NO:X)

[0479]

突变类型	1小时后K/RKR蛋白水解的程度
IFNG-KRKRP	35% (参考分子)
S/P/E位于位置1	0%/0%/0%
S/P/E位于位置2	2%/0%/0%
S/P/E位于位置3	6%/9%/3%
S/P/E位于位置4	5%/11%/2%
SS/PP/EE位于位置1和2	0%/0%/0%
SS/PP/EE位于位置3和4	4%/1%/0%
SS/PP/EE位于位置1和3	0%/0%/0%
SS/PP/EE位于位置2和4	0%/0%/0%

[0480] 实例3

[0481] 3.1肿瘤靶向的掩蔽的IFNG化合物的设计

[0482] 为了开发具有更大治疗潜力的IFNG,我们设计了靶向肿瘤的IFNG化合物,其中IFNG特异性掩蔽结构域阻止了IFNG与IFNGR1的结合。我们假设有效的掩蔽将抵消相关的汇效应,并允许化合物在肿瘤部位富集,最终引发期望的下游效应。掩蔽结构域基于IFNG特异性scFv结构域,并在IFNG-KRKRP的C末端(掩蔽释放形式)或N末端(细胞因子释放形式)引入(图1C)。掩蔽化合物被设计为通过连接IFNG及其掩蔽的可切割接头的蛋白水解在肿瘤微环境中被活化。

[0483] 为了产生掩蔽释放形式,IFNG-KRKRP经由甘氨酸-丝氨酸接头(接头1,GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGG,SEQ ID NO:69)融合到为对成纤维细胞活化蛋白(FAP)具有特异性的IgG抗体的靶向抗体(即抗FAP克隆4B9)(WO 2012/020006 A2中公开)和含有P329GLALA突变的Fc结构域的C末端(Schlothauer等人,Protein Eng Des Sel.2016,29(10),457-466)。抗人IFNG scFv掩蔽(基于US 6,329,511B1)经由第二个甘氨酸-丝氨酸接头(接头2,GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGG,SEQ ID NO:69)融合到IFNG-KRKRP的C末端。为了产生细胞因子释放形式,scFv掩蔽经由甘氨酸-丝氨酸接头(接头1)融合到靶向IgG抗体的C末端,并经由第二甘氨酸-丝氨酸接头(接头2)将IFNG-KRKRP连接到C末端。为了使得能够在肿瘤微环境中蛋白水解活化掩蔽的化合物,在两种形式的接头2中引入matriptase

切割位点(PQAR/K, SEQ ID NO:20)。该可切割接头具有氨基酸序列GGGSGGGSGGGPQARKGGGGSGGGG(接头2', PQARK接头, SEQ ID NO:70)。以掩蔽释放形式对接头2'进行蛋白水解,产生IgG融合、未掩蔽的IFNG,而以细胞因子释放形式对接头2'进行蛋白水解,产生游离的IFNG-KRKR同二聚体。

[0484] 表7A:靶向肿瘤的掩蔽的IFNG化合物的标识符及其形式

[0485]

标识符	形式	结构	SEQ ID NO:s
P1AG7568	使用可切割接头的掩蔽释放	FAP 4B9 IgG - 接头 1 - <i>IFNG KRKR</i> - PQARK 接头 - scFv 掩蔽	40, 41
P1AG7571	使用可切割接头的释放细胞因子	FAP 4B9 IgG - 接头 1 - scFv 掩蔽 - PQARK 接头 - <i>IFNG KRKR</i>	42, 41
P1AG7567	使用不可切割接头的掩蔽释放	FAP 4B9 IgG - 接头 1 - <i>IFNG KRKR</i> - 接头 2 - scFv 掩蔽	115, 41
P1AG7570	使用不可切割接头的细胞因子释放	FAP 4B9 IgG - 接头 1 - scFv 掩蔽 - 接头 2 - <i>IFNG KRKR</i>	116, 41
P1AG1310	未掩蔽的	FAP 4B9 IgG - 接头 1 - <i>IFNG KRKR</i>	117, 41

[0486] 3.2掩蔽释放和细胞因子释放形式的生产和纯化

[0487] 使用WuXi Biologics的瞬时表达系统表达和纯化具有可切割接头序列(P1AG7568、P1AG7571)和不可切割接头序列(P1AG7567、P1AG7570)的掩蔽形式。未掩蔽的阳性对照化合物(P1AG1310)在evitria AG表达并在内部纯化。经由MabSelectSure HP捕获所有化合物,并用pH梯度洗脱至pH 3.0。中和级分并通过CE-SDS分析其组成,并通过SE-HPLC分析其HMW含量。将单体含量最高的洗脱的级分合并,并通过SEC进一步纯化。将单体含量最高的SEC级分合并,作为最终批次(表7B)。取决于形式,达到不同的表达滴度和质量概况:观察到未掩蔽的化合物的最高生产滴度(152mg/L)。掩蔽形式以较低水平(6.9mg/L-54.6mg/L)表达。LC-MS确认了正确的链组成,并且未检测到蛋白水解副产物。

[0488] 表7B:纯化的掩蔽的化合物和对照分子的质量概况。通过蛋白A SE-HPLC确定生产滴度,通过SE-HPLC和CE-SDS评定单体含量。LC-MS确认了正确的化合物身份。

	化合物 ID	滴度 (mg/L)	SE-HPLC			CE-SDS
			单体%	HMW %	LMW %	主峰 %
[0489]	P1AG7568	6.9	97.3	2.7	0	97.8
	P1AG7571	20	99.32	0.68	0	100
	P1AG7567	17.7	96.4	3.6	0	100
	P1AG7570	54.6	98.44	1.55	0	100
	P1AG1310	152	99.8	0.2	0	100

[0490] 实例4

[0491] 4.1作为鼠类替代物的掩蔽的鼠类IFNG形式的生成

[0492] 为了评定掩蔽形式体内的治疗潜力,我们转向鼠类替代模型(实例5)。掩蔽结构域基于对鼠类IFNG具有特异性的scFv结构域,并且在鼠类IFNG-KRKRP的C末端(掩蔽释放形式)或N末端(细胞因子释放形式)引入掩蔽(图1,图4A)。至于人类对应物,掩蔽的鼠类化合物被设计为通过连接IFNG及其掩蔽的可切割接头的蛋白水解在肿瘤微环境中被活化。

[0493] 替代分子的设计类似于人掩蔽的化合物:为了产生掩蔽释放形式(P1AG3766),鼠类IFNG-KRKRP经由甘氨酸-丝氨酸-接头(接头1,GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG,SEQ ID NO:69)融合到对成纤维细胞活化蛋白(FAP)具有特异性的靶向IgG抗体(即抗FAP克隆28H1)的鼠类IgG1重链的C末端(WO 2012/020006 A2中公开)。此外,根据例如Baudino等人J.Immunol.(2008),181,6664-6669或WO 2016/030350A1中描述的方法,在重链的恒定区引入DAPG突变以消除与小鼠Fc γ 受体的结合。抗鼠类IFNG scFv掩蔽经由第二甘氨酸-丝氨酸接头(接头2,GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG,SEQ ID NO:69)融合到鼠类IFNG-KRKRP的C末端。为了产生细胞因子释放形式(P1AG3755),scFv掩蔽经由甘氨酸-丝氨酸接头(接头1)融合到靶向IgG的C末端,并经由第二甘氨酸-丝氨酸接头(接头2)将鼠类IFNG-KRKRP连接到C末端。为了使得能够在肿瘤微环境中进行蛋白水解活化,在两种形式的接头2(接头2')中引入matriptase切割位点(PQAR/K)。可切割接头具有氨基酸序列GGGSGGGSGGGPQARKGGGGSGGGG(接头2',PQARK接头,SEQ ID NO:70)。以掩蔽释放形式对接头2'进行蛋白水解,产生IgG融合、未掩蔽的鼠类IFNG-KRKRP,而以细胞因子释放形式对接头2'进行蛋白水解,产生游离的鼠类IFNG-KRKRP同二聚体。作为阳性对照,鼠类IFNG-KRKRP也表达为无掩蔽结构域的C末端IgG融合体(P1AF9672)。

[0494] 表8A:靶向肿瘤的掩蔽的鼠类IFNG化合物的标识符及其形式

[0495]

标识符	形式	结构	SEQ ID NO:s
P1AG3766	使用可切割接头的掩蔽释放	FAP 28H1 muIgG - 接头 1 - <i>muIFNG KRKRP</i> - PQARK 接头 2 - scFv 掩蔽	43, 44
P1AG3755	使用可切割接头的释放细胞因子	FAP 28H1 muIgG - 接头 1 - scFv 掩蔽 - PQARK 接头 2 - <i>muIFNG KRKRP</i>	45, 44
P1AG9672	使用不可切割接头的掩蔽释放	FAP 28H1 muIgG - 接头 1 - <i>muIFNG KRKRP</i>	118, 44

[0496] 4.2鼠类替代物的生产和纯化

[0497] 使用evitria的瞬时CHO表达系统表达所述鼠类替代化合物。收获后立即以0.5x的浓度添加完整的蛋白酶抑制剂混合物(Roche),并使用MabSelectSure HP捕获化合物并用pH梯度洗脱至pH 3.0。中和级分并通过CE-SDS分析其组成,并通过SE-HPLC分析其HMW含量。将单体含量最高的级分合并,并通过SEC进一步纯化。每次SEC纯化后,通过SE-HPLC和CE-SDS分析各自的峰级分。将单体含量最高的SEC级分合并,作为最终批次。SE-HPLC显示两种形式(P1AG3766和P1AG3755)以及未掩蔽的对照(P1AF9672)的单体含量>95%,CE-SDS和LC-MS确认了正确的链组成(表8B)。对于细胞因子释放形式(P1AG3755),LC-MS显示,在10%的化合物中,两个可切割接头中的一个可切割接头已经在预期切割位点(PQAR/K,SEQ ID NO:20)被切割。

[0498] 表8B:纯化的鼠类替代化合物的质量概况。通过蛋白A SE-HPLC确定生产滴度,通过SE-HPLC和CE-SDS评定单体含量。LC-MS确认了正确的化合物身份。

[0499]

化合物 ID	滴度 (mg/L)	SE-HPLC			CE-SDS
		单体%	HMW %	LMW %	主峰 %
P1AG3766	19.7	95.1	4.8	0	96.6
P1AG3755	20.1	96.8	3.1	0	92.0
P1AG9672	94	98.8	1.2	0	81.2

[0500] 4.3鼠类替代物的功能表征

[0501] 为了评定含有可切割接头的FAP靶向的scFv掩蔽的FAP-抗鼠类IFNG化合物的体外活性,用前述替代分子在体外处理MC38-huCEA细胞。将抗鼠类IFNG scFv掩蔽的FAP-muIFNG化合物在不存在或存在163nM重组鼠类matriptase的情况下在37℃下孵育2小时。48小时培养期后,使用流式细胞术对MC38-huCEA细胞上的MHC-I和PD-L1表达进行定量。使用未掩蔽的FAP-muIFNG化合物的处理作为阳性对照,证明MC38-huCEA细胞上的MHC-I和PD-L1表达在处理时被诱导(图4A和4B)。

[0502] 未经重组鼠类matriptase预处理的抗鼠类IFNG scFv掩蔽的FAP-muIFNG分子不会导致MHC-I或PD-L1水平增强(图4A和4B)。通过MC38-huCEA细胞上MHC-I和PD-L1表达增加证

明,抗鼠类IFNG scFv掩蔽的FAP-muIFNG与Matriptase一起预孵育部分恢复了活性(图4A和4B)。

[0503] 实例5

[0504] 5.1鼠类替代分子的体内表征

[0505] 对于体内实验,向表达人CEA的C57B1/6小鼠中一次静脉内注射一剂1.25mg/kg或10mg/kg的P1AG3755,该小鼠携带KPC-4662huCEA肿瘤(排除具有低CD8 T细胞浸润的肿瘤模型),在治疗开始前21天将该肿瘤以细胞悬浮液形式皮下注射(图5)。

[0506] KPC 4662细胞获自宾夕法尼亚大学,并且在内部工程化以表达人CEA。将细胞在DMEM+10%FBS+500μg/ml潮霉素中培养,计数并将300,000个细胞以与RPMI和Matrigel的1:1混合物以100μL的总体积皮下注射到小鼠的侧腹中。使用卡尺每周测量肿瘤生长至少两次,并且按下式计算肿瘤体积:肿瘤体积=(W²/2)×L(W:宽度,L:长度)。

[0507] 小鼠初始肿瘤生长21天后,当肿瘤大小达到约225mm³时,将小鼠随机分为三组,并每周用不同剂量的P1AG3755或组氨酸缓冲液(媒介物)治疗三次。向所有小鼠静脉注射200μL适当的溶液。为了每200μL获得适量的化合物,将储备液用组氨酸缓冲液(20mM组氨酸,140mM NaCl,pH 6.0)稀释。在疗法注射后第3天和第7天,处死至少五只小鼠(第7天=终止)。取出这些小鼠的肿瘤和血液用于下游分析。

[0508] 5.2离体读数

[0509] 将专用于流式细胞术分析的半块肿瘤称重并用Liberase和DNA酶消化。然后用DAPI、Podoplanin PE-Cy7、E-钙粘蛋白BV421、CD45AF700、TCRb PE-Cy5和CD8a BV711等对单细胞悬浮液进行染色,并在BD Fortessa流式细胞仪上进行分析。绘图和统计测试是在GraphPad PRISM 8中完成的。

[0510] 为通过免疫荧光(3DIP)进行组织学分析,将半块肿瘤在按1:4稀释于PBS中的BD Cytofix溶液中固定约20小时。洗涤并且转移至PBS后,将肿瘤包埋于4%低胶凝温度琼脂糖中。使用配备有普通剃刀刀片的Leica VT1200s Vibratome从这些块上切下肿瘤切片(70μm厚)。随后对切片进行透化(TBS+0.3% Triton-X)并且使用BSA和小鼠血清(各1%)阻断两小时,然后使用以下抗体在室温下染色过夜(约15小时):CD8aBV421、E钙粘蛋白CF488、MHCIE。图像采集是在Leica SP8倒置共焦显微镜上完成的。

[0511] 为了进行细胞因子分析,收集每组5只小鼠的血清样本(再次在疗法注射后第3天和第7天)并储存在-20℃直至需要用于测定。在同一日期将每组5只小鼠的一片肿瘤收集在液氮中并储存在-80℃直至进一步使用。使用5μL血清(1/10稀释)和40μg来自肿瘤裂解物的蛋白质进行测定。使用Bio-plex细胞裂解试剂盒(171304012,BioRad)和Precellys进化均质器裂解装置(Bertin instruments)获得肿瘤裂解物。将肿瘤裂解物离心,并保留上清液并随后储存在-80℃。使用Pierce BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific)和ELISA读数器(PerkinElmer,EnVision 2104多标签读数器)确定蛋白质水平。相应地用来自试剂盒的样品稀释剂稀释肿瘤裂解物以获得每个样品40ug蛋白质的最终量。该测定是使用ProcartaPlex Simplex试剂盒(参考号EPX010-26061-901,Thermo Fisher)在Luminex Flexmap 3D仪器上按照制造商的方案进行的。

[0512] 统计分析

[0513] 对于流式细胞术和细胞因子分析,运行单因素Anova测试,对治疗组与媒介物组进

行多重比较分析,并对多重测试进行Dunnet校正。绘图和统计测试是在GraphPad PRISM 8中完成的。

[0514] 5.3观察

[0515] IFNG信号传导的近端生物标记是MHCI和PDL1表达的上调。使用鼠类替代分子治疗KPC4662-huCEA肿瘤(图5),我们可以在疗法施用后3天,在癌细胞和成纤维细胞的高剂量组中,通过流式细胞术容易地观察到MHCI和PDL1上调(图6)。疗法施用后7天还可以观察到MHCI表达增加,而疗法施用后7天时PDL1水平与媒介物组没有统计学上显著差异。

[0516] 接下来,我们经由免疫荧光显微术观察到,肿瘤组织中增加的MHCI表达是非常异质的,并且CD8 T细胞的存在与肿瘤组织中的MHCI阳性区域相关(图7)。

[0517] 虽然通过流式细胞术,治疗组和媒介物组之间的总体CD8 T细胞的存在没有统计学上的显著差异,但我们再次经由成像显示,特别是在治疗后早期,肿瘤的MHCI表达区中存在的CD8 T细胞的量增加(图8)。由于在该肿瘤中,CD8 T细胞也存在于基线和媒介物组中的肿瘤边缘,因此经由流式细胞术的非局部定量无法发现治疗组和媒介物之间的统计学上的显著差异。

[0518] 最后,我们可以观察到,用鼠类替代物治疗导致在疗法施用后7天小鼠血清中CXCL9(T细胞吸引趋化因子)水平增加(图9),显示不仅癌细胞改变和肿瘤免疫环境改变,而且细胞因子环境也受到靶向肿瘤的IFNG 的影响。

[0519] 实例 6

[0520] 6.1空间掩蔽的IFNG的设计

[0521] 鉴于IFNG的物种特异性,还需要物种特异性掩蔽结构域来防止肿瘤微环境外的受体结合。因此,我们探索了与物种无关的掩蔽,并设计了一系列空间掩蔽的靶向的IFNG化合物。基于IFNG信号传导复合物的可用晶体结构(Mendoza等人,Nature 2019,567(7746),56-60),我们假设在组装的复合物中,IFNG的C末端靠近膜定位,并且因此,大结构域与C末端的融合可能会干扰IFNGR1结合。为了产生靶向、掩蔽的分子,我们在IgG1的上铰链区与下铰链区之间插入IFNG结构域。在N末端和C末端,使用甘氨酸-丝氨酸接头连接IFNG。另外,我们探索了几种铰链变体。

[0522] 表9A:靶向肿瘤的掩蔽的鼠类IFNG化合物的标识符及其形式

[0523]	标识符	SEQ ID Nos:	结构
	P1AG8692	119, 41	Fab - 接头 1 - <i>IFNG KRKRP</i> - 接头 2 - 铰链 1 - Fc
	P1AG8693	120, 41	Fab - 接头 1 - <i>IFNG KRKRP</i> - 接头 3 - 铰链 1 - Fc
	P1AG8694	121, 41	Fab - 接头 1 - <i>IFNG KRKRP</i> - 接头 3 - 铰链 2 - Fc
	P1AG8695	122, 41	Fab - 接头 1 - <i>IFNG KRKRP</i> - 接头 3 - Fc
	P1AG8696	123, 41	Fab - 接头 1 - <i>IFNG KRKRP</i> - 接头 5 - 铰链 1 - Fc
	P1AG8697	124, 41	Fab - 接头 4 - <i>IFNG KRKRP</i>

[0524] 不同接头的氨基酸序列如下:接头1为GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG(SEQ ID NO:69),接头2为GGGGSGGG(SEQ ID NO:72),接头3为LEVLFQGP(SEQ ID NO:73),接头4为GG

GGSGGGSGGGSGGGSGGLEVLFGPGGGGGSGGGGG (SEQ ID NO:74) 并且接头5为QARK (SEQ ID NO:75)。铰链1的氨基酸序列为TCPPCP (SEQ ID NO:76), 铰链2为PCP (SEQ ID NO:77)。

[0525] 6.2空间掩蔽的IFNG的生产和纯化

[0526] 使用evitria的瞬时CHO表达系统表达空间掩蔽的化合物, 经由MabSelectSure HP捕获并用pH梯度洗脱至pH 3.0。中和级分并通过CE-SDS分析其组成, 并通过SE-HPLC分析其HMW含量。将单体含量最高的级分合并, 并通过SEC进一步纯化。在一些情况下, 需要第二SEC步骤和第三SEC步骤来去除所有HMW杂质。每次SEC纯化后, 通过SE-HPLC和CE-SDS分析各自的峰级分。将单体含量最高的级分合并, 作为最终批次。所有化合物的中位单体含量>98% (SE-HPLC, 通过CE-SDS为100%), 并且通过LC-MS确认序列同一性。表9B中总结了详细的质量属性。

[0527] 表9B: 纯化的空间掩蔽的化合物的质量概况。通过蛋白A SE-HPLC确定生产滴度, 通过SE-HPLC和CE-SDS评定单体含量。LC-MS确认了正确的化合物身份。

化合物 ID	滴度 (mg/L)	SE-HPLC			CE-SDS
		单体%	HMW %	LMW %	主峰 %
P1AG8692	14.0	98	2	0	100
P1AG8693	13.0	98.1	1.9	0	100
P1AG8694	11.0	98.2	1.8	0	100
P1AG8695	13.0	98.8	1.2	0	100
P1AG8696	41.0	98.9	1.1	0	100
P1AG8697	2.0	99.4	0.6	0	84.7

[0529] 6.3空间掩蔽的IFNG的阻断效率

[0530] 为了评定空间掩蔽的IFNG的体外阻断效率, 分别用未掩蔽的IFNG (用作阳性对照) (P1AG8697) 和空间掩蔽的IFNG分子 (P1AG8692) 刺激HEK Blue IFNG报告细胞达20小时-24小时。使用分光光度计在620nm-655nm处测量响应于IFNG的SEAP报告活性。获得的结果显示, 与阳性对照相比, 空间掩蔽的IFNG具有降低的IFNG活性 (图10B)。

[0531] 尽管为了清楚理解的目的先前已通过举例说明和实例相当详细地描述了本发明, 但是这些描述和实例不应解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容均全文以引用方式明确地并入。

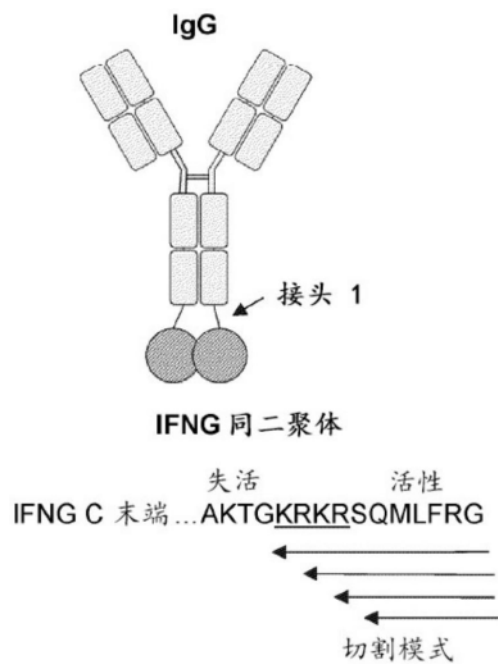


图1A

缺失系列

...AKTGKRKRSQMLFRG

...AKTGKRKR-帽

...AKTGKRK-帽

...AKTGKR-帽

...AKTGK-帽

...AKTG

帽 = P; SP; SQ; SL

图1B

突变系列

单个

XRKRKXKRKRXRKRKX

X = S; P; E

两个

XRXRKXKXXXKRKRXX

图1C

掩模释放形式

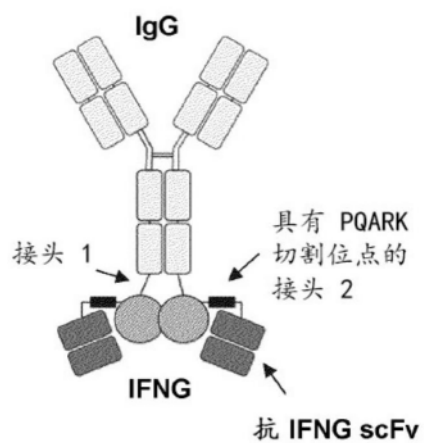


图1D

细胞因子释放形式

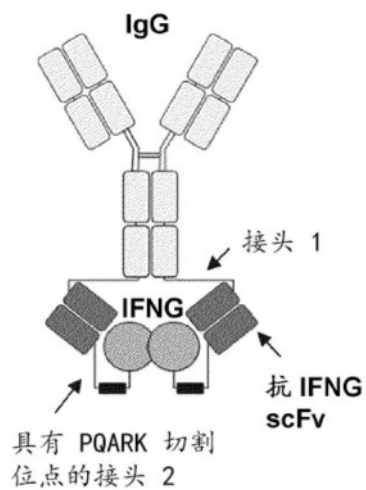
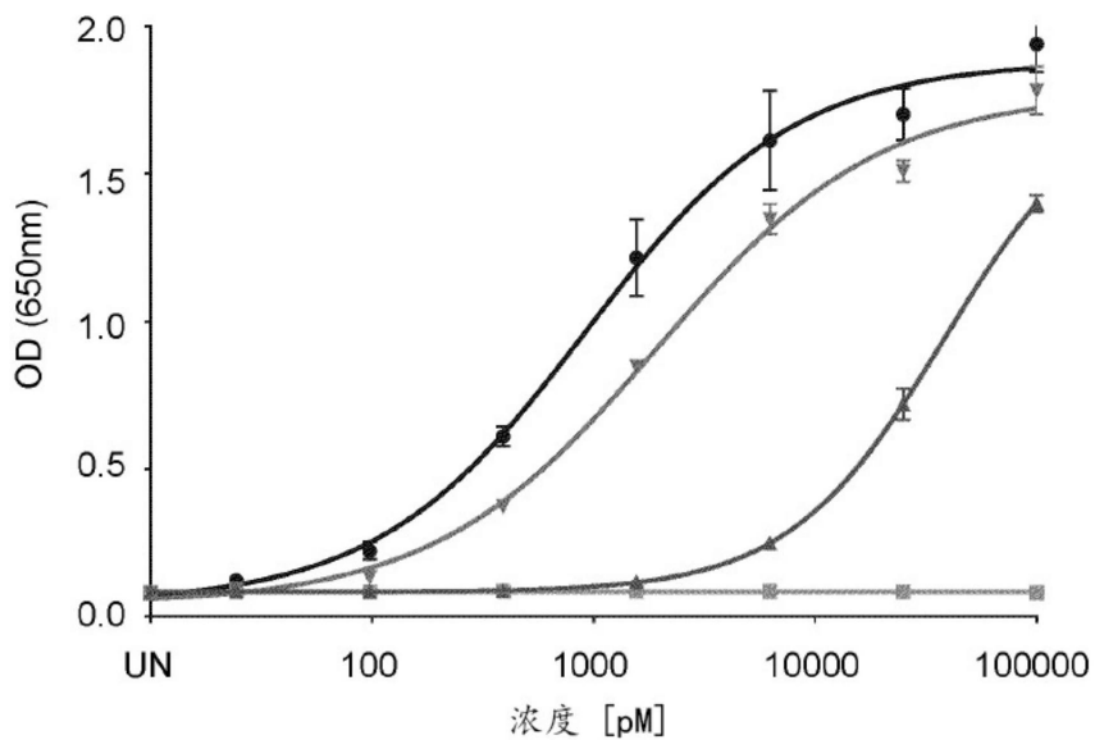


图1E



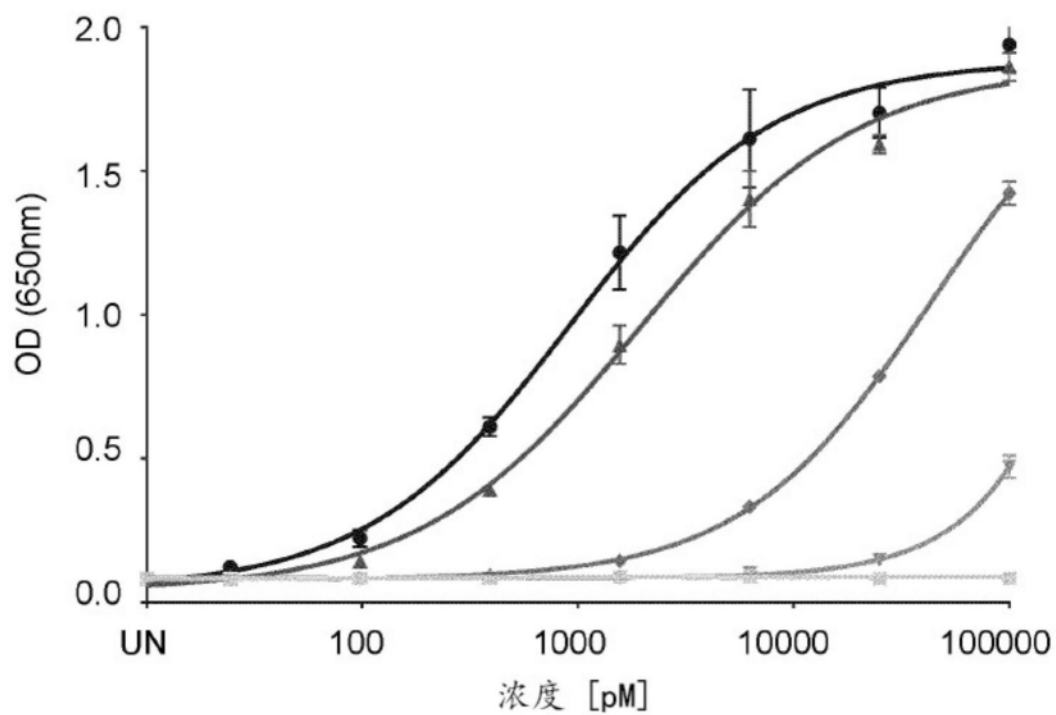
● P1AF3568 野生型 AKTGKRKRSQMLRFG

▼ P1AF3570 C 末端 AKTGKRKRSQ

▲ P1AF3571 C 末端 AKTGKRKRSL

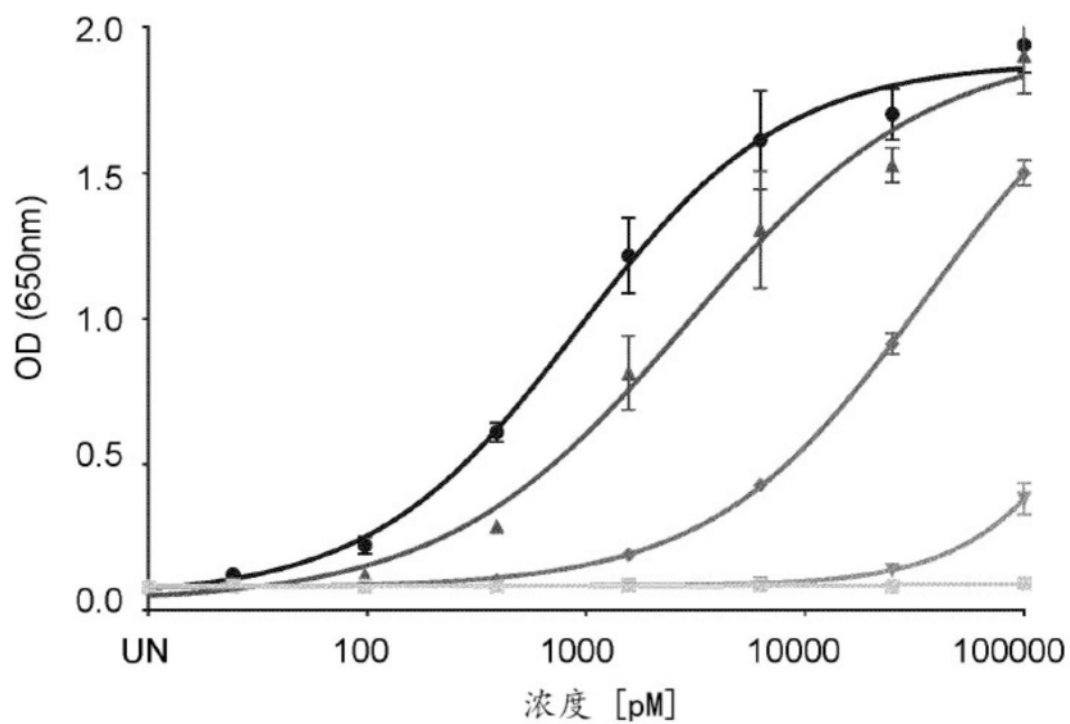
■ P1AF3569 C 末端 AKTG

图2A



- P1AF3568 野生型 AKTGKRKRSQMLRFG
- ▲ P1AF3574 P 帽 AKTGKRKRP
- ◆ P1AF3575 P 帽 AKTGKRKP
- ▼ P1AF3576 P 帽 AKTGKRP
- P1AF3577 P 帽 AKTGKP

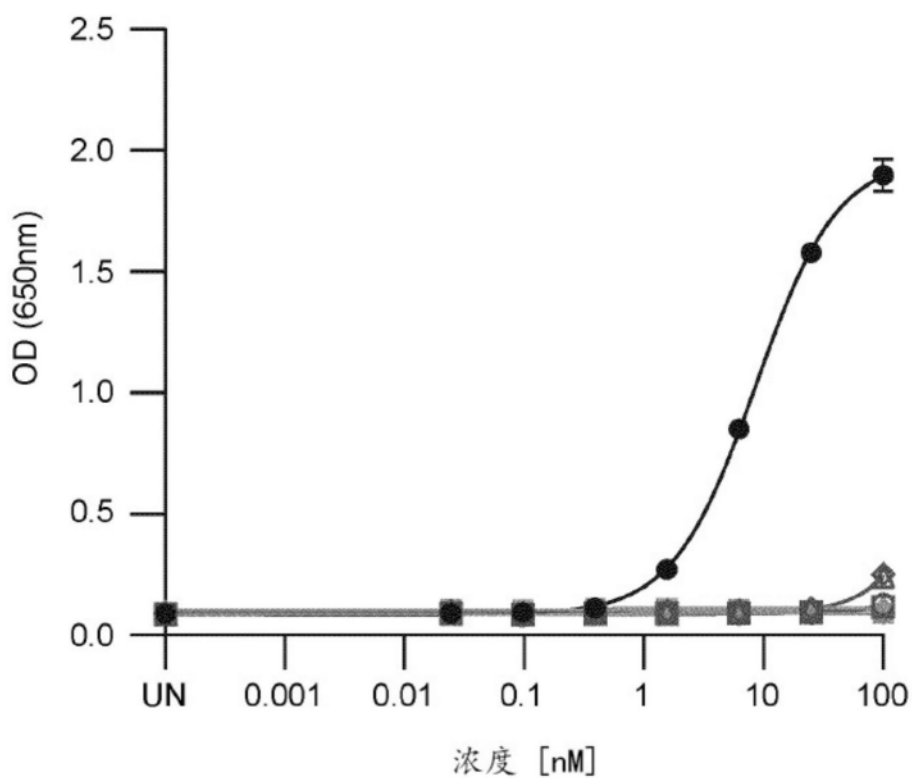
图2B



- P1AF3568 野生型 AKTGKRKRSQMLRFG
- ▲ P1AF3578 SP 帽 AKTGKRKRSP
- ◆ P1AF9470 SP 帽 AKTGKRKSP
- ▼ P1AF3580 SP 帽 AKTGKRSP
- P1AF3581 SP 帽 AKTGKSP

图2C

谷氨酸突变系列



- P1AF3574 FAP-IFN γ (KRKRP)
- P1AF9483 FAP-IFN γ (ERKRP)
- P1AF9484 FAP-IFN γ (KEKRP)
- △ P1AF9485 FAP-IFN γ (KRERP)
- ◇ P1AF9486 FAP-IFN γ (KRKEP)
- P1AF9487 FAP-IFN γ (EEKRP)
- P1AF9488 FAP-IFN γ (KREEP)
- ▲ P1AF9489 FAP-IFN γ (ERERP)
- ◆ P1AF9490 FAP-IFN γ (KEKEP)

图3A

脯氨酸突变系列

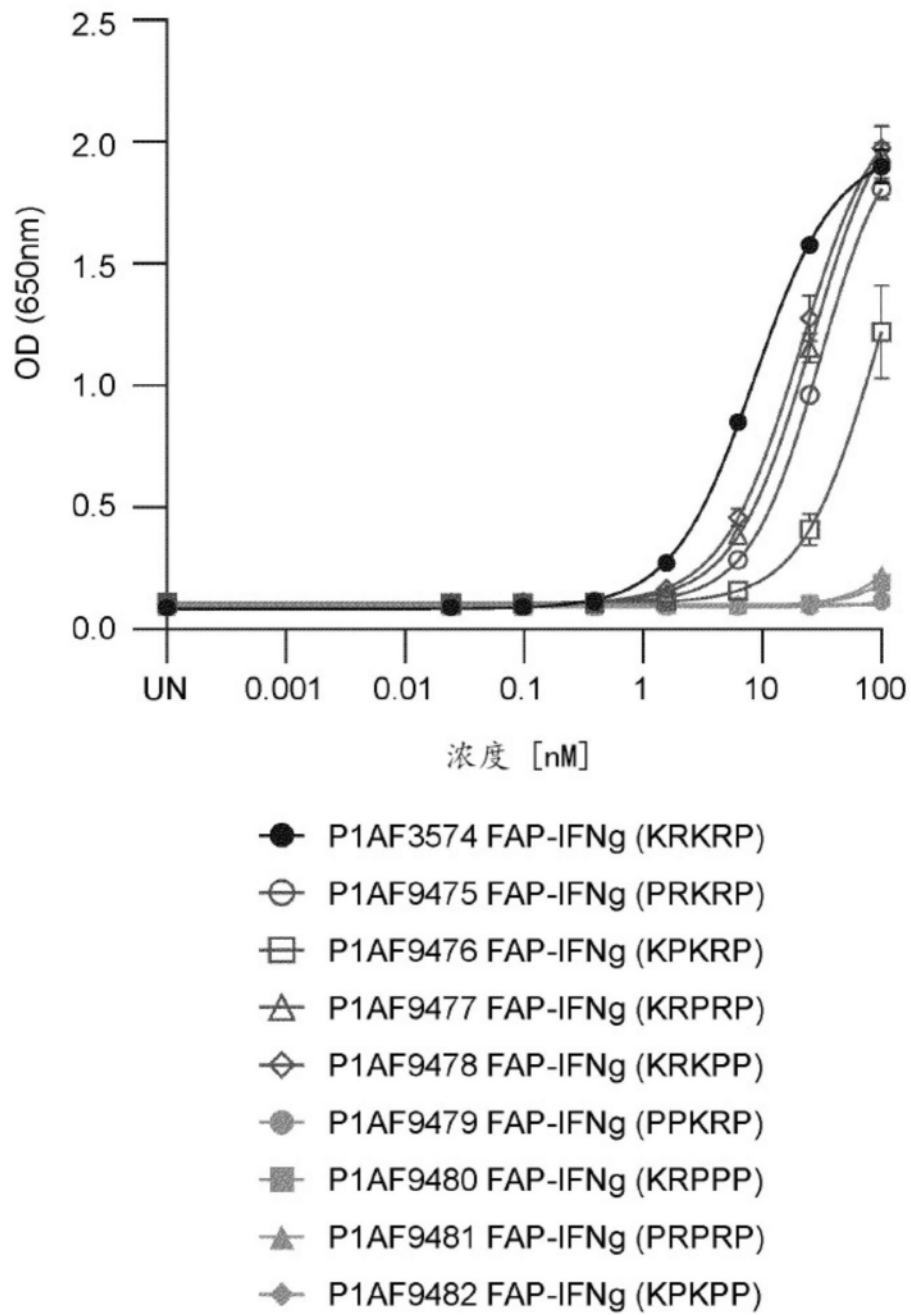


图3B

丝氨酸突变系列

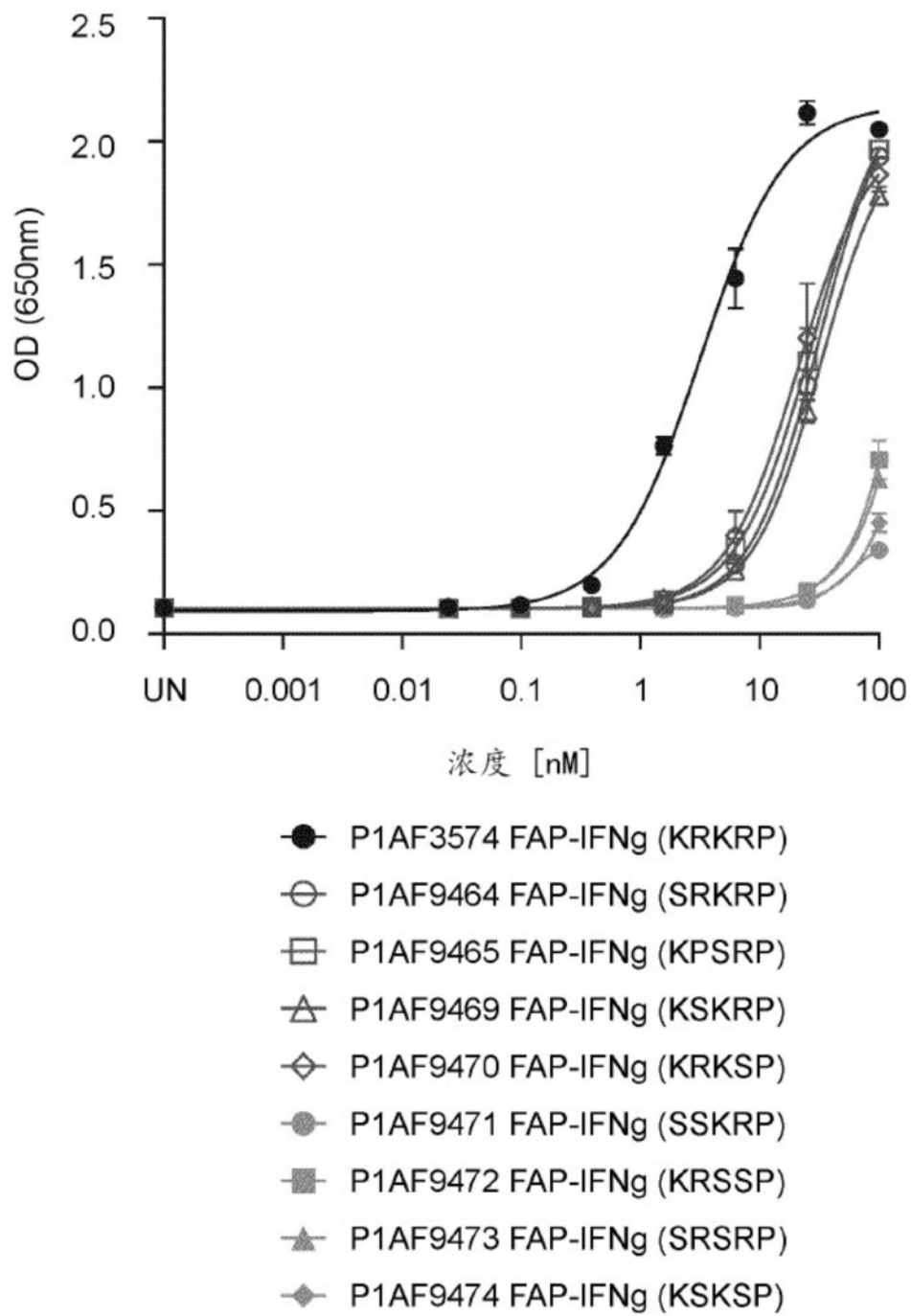


图3C

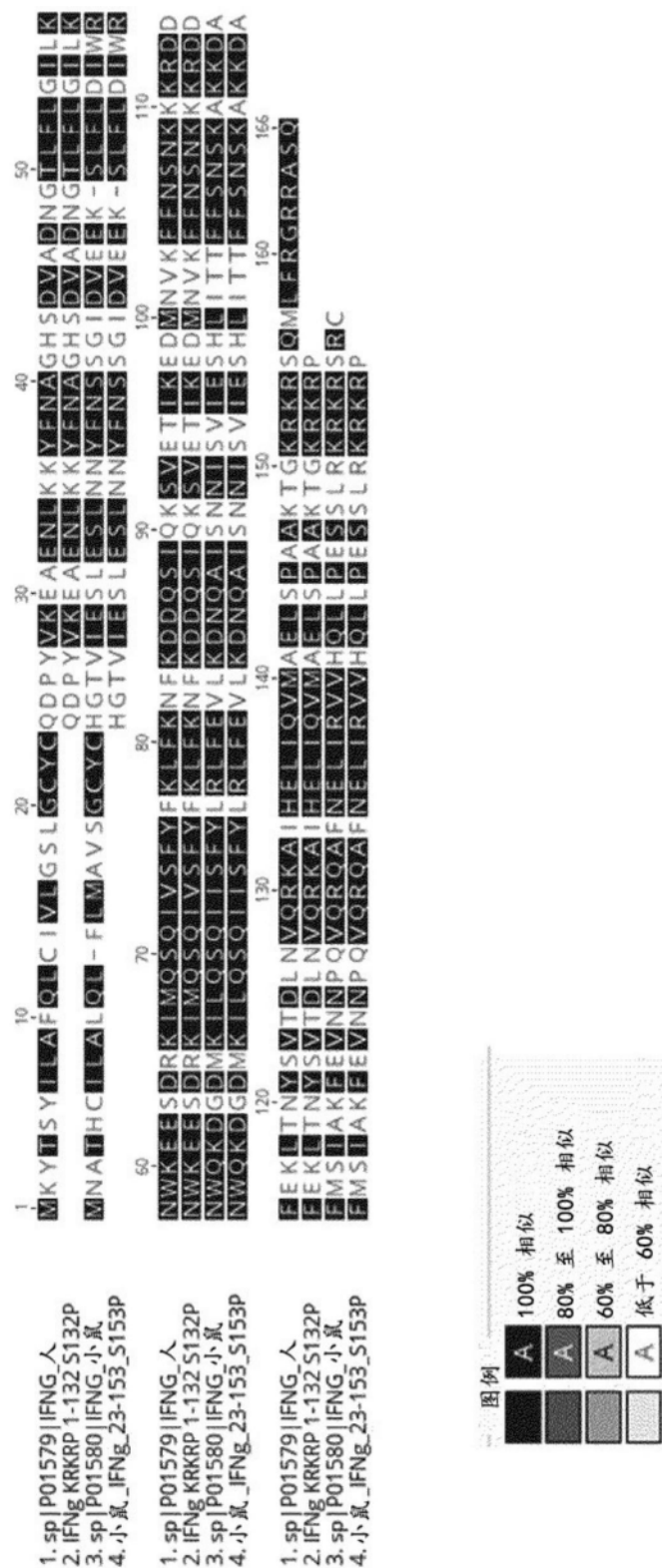


图4A

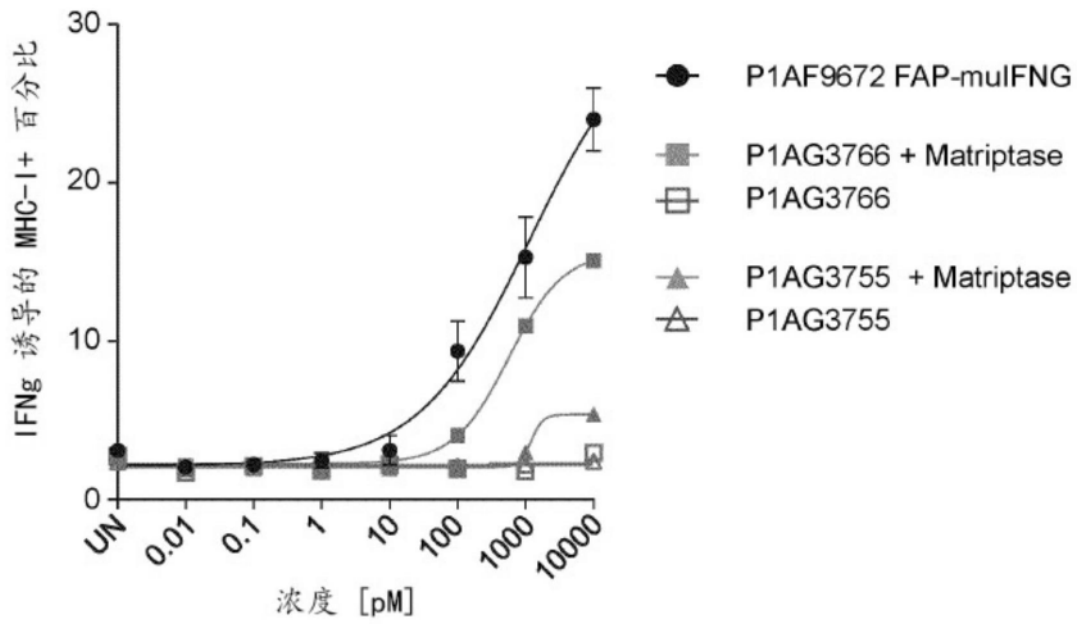


图4B

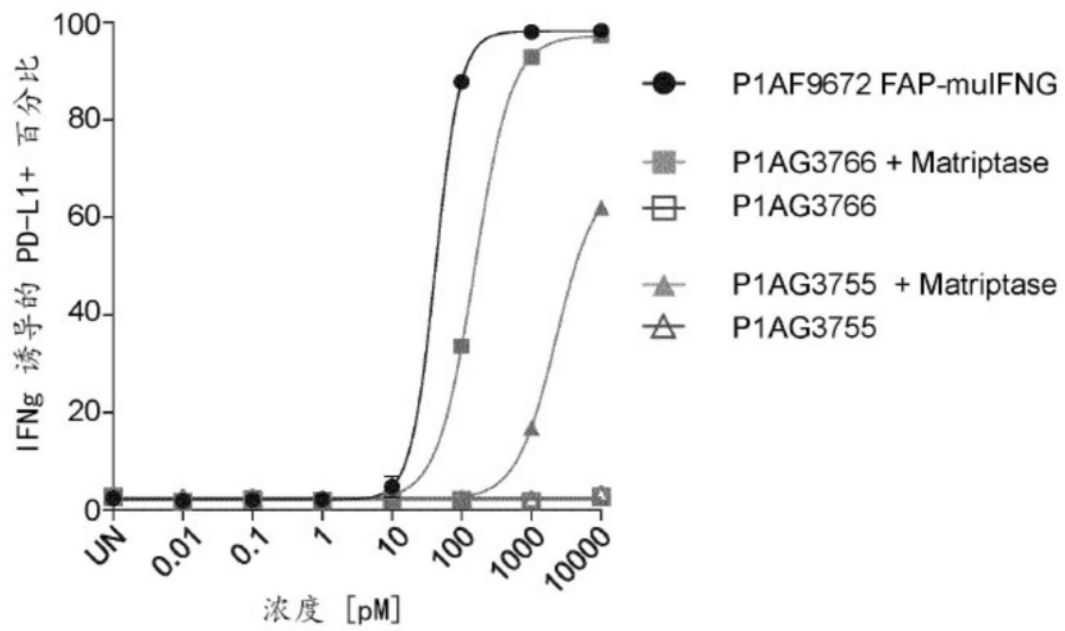


图4C

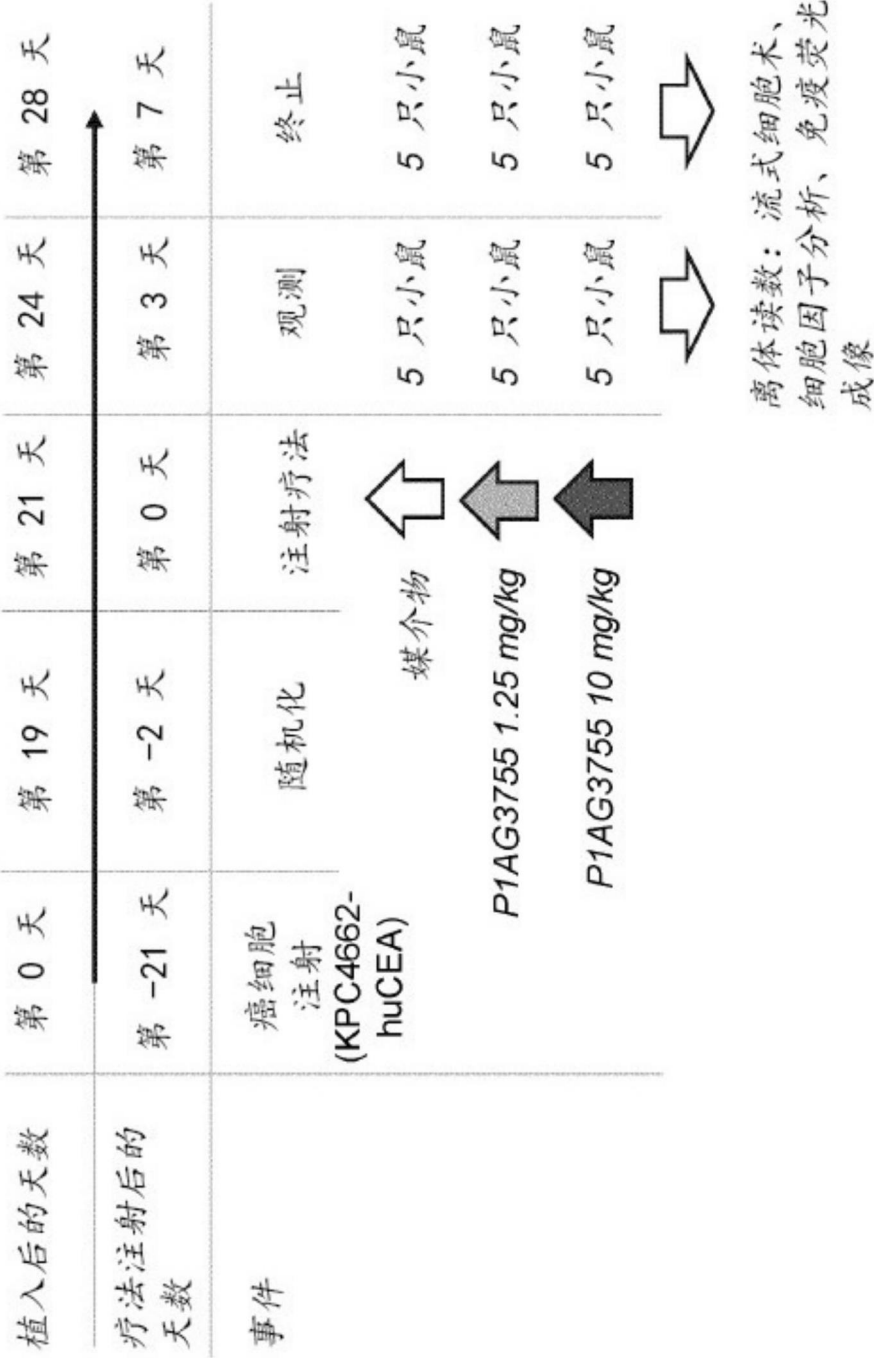


图5

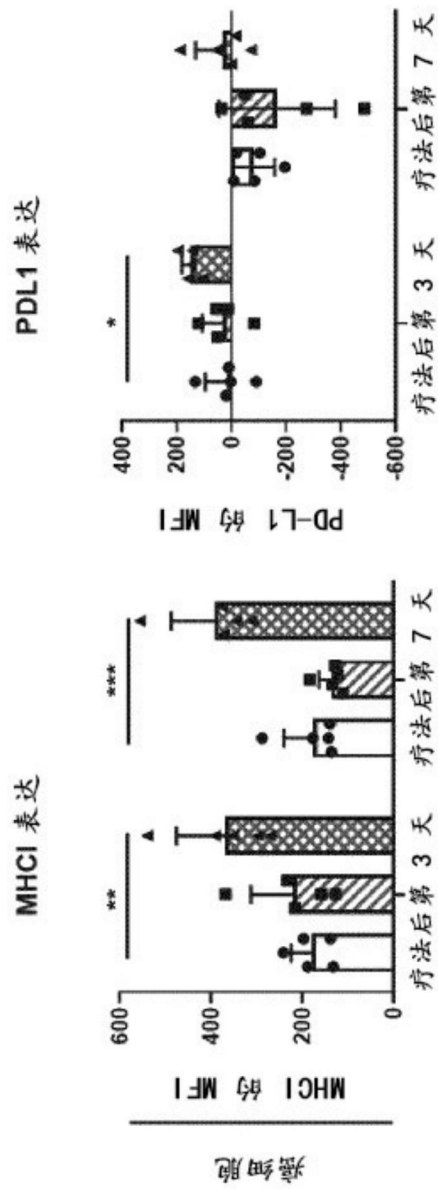


图 6A

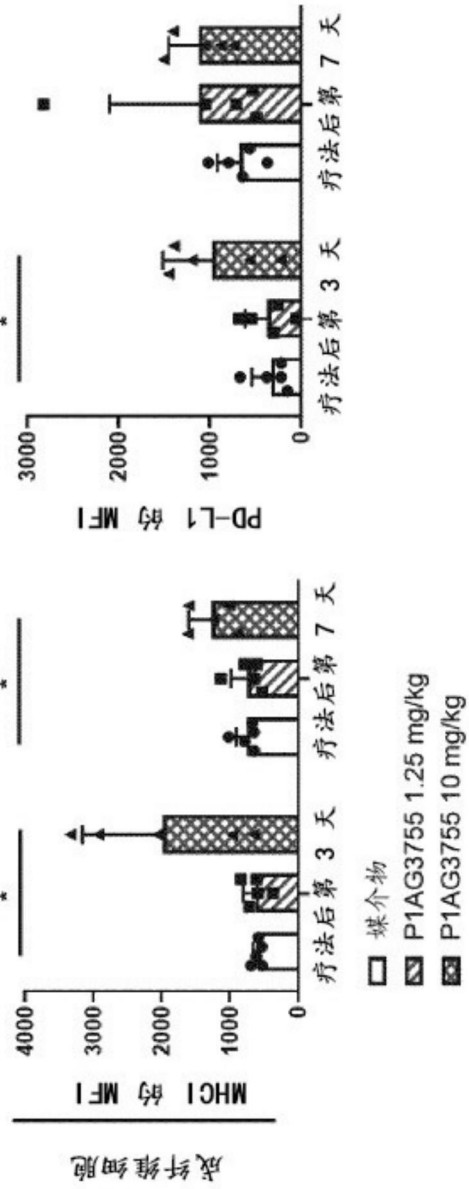


图 6B

图 6C

图 6D

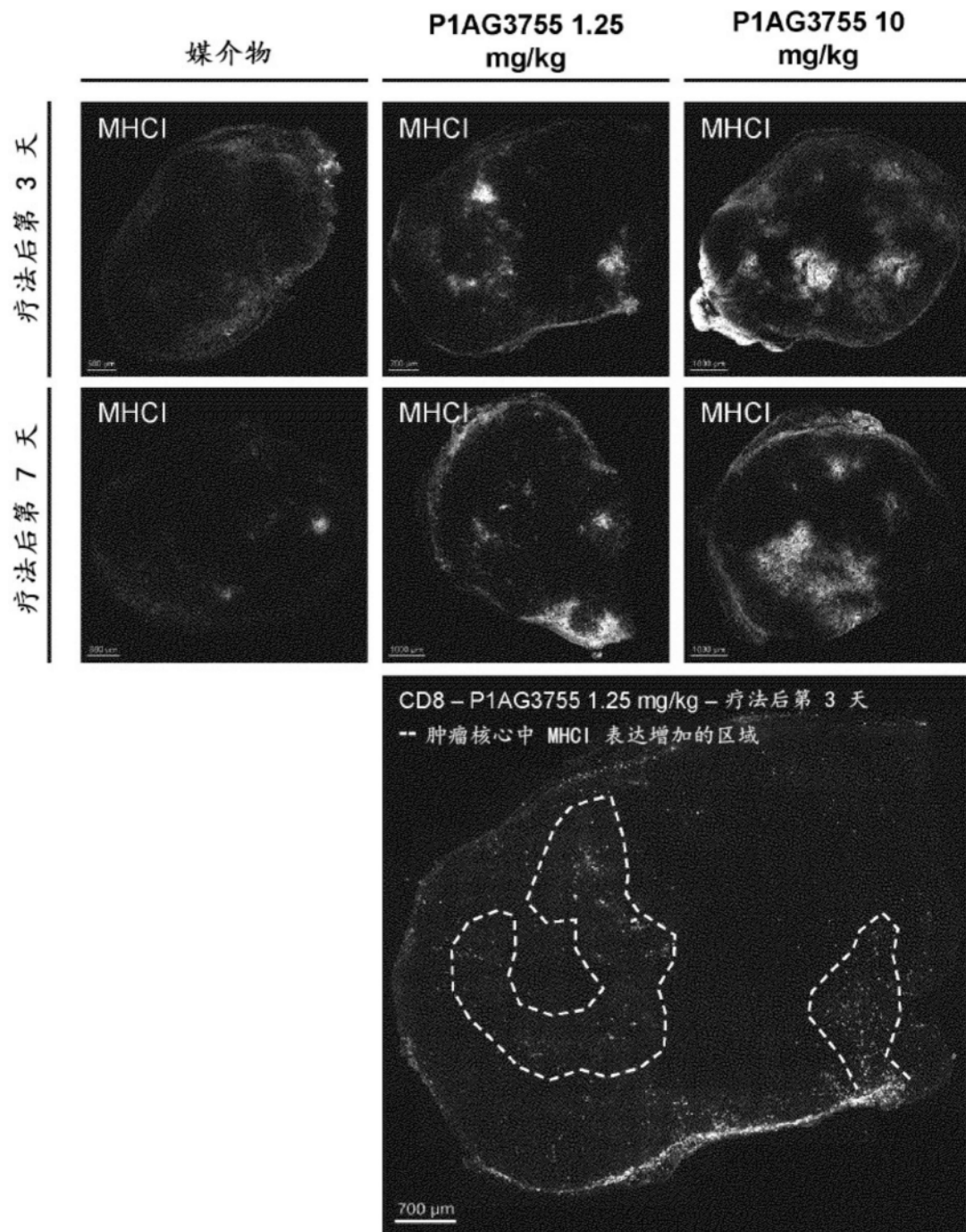


图7

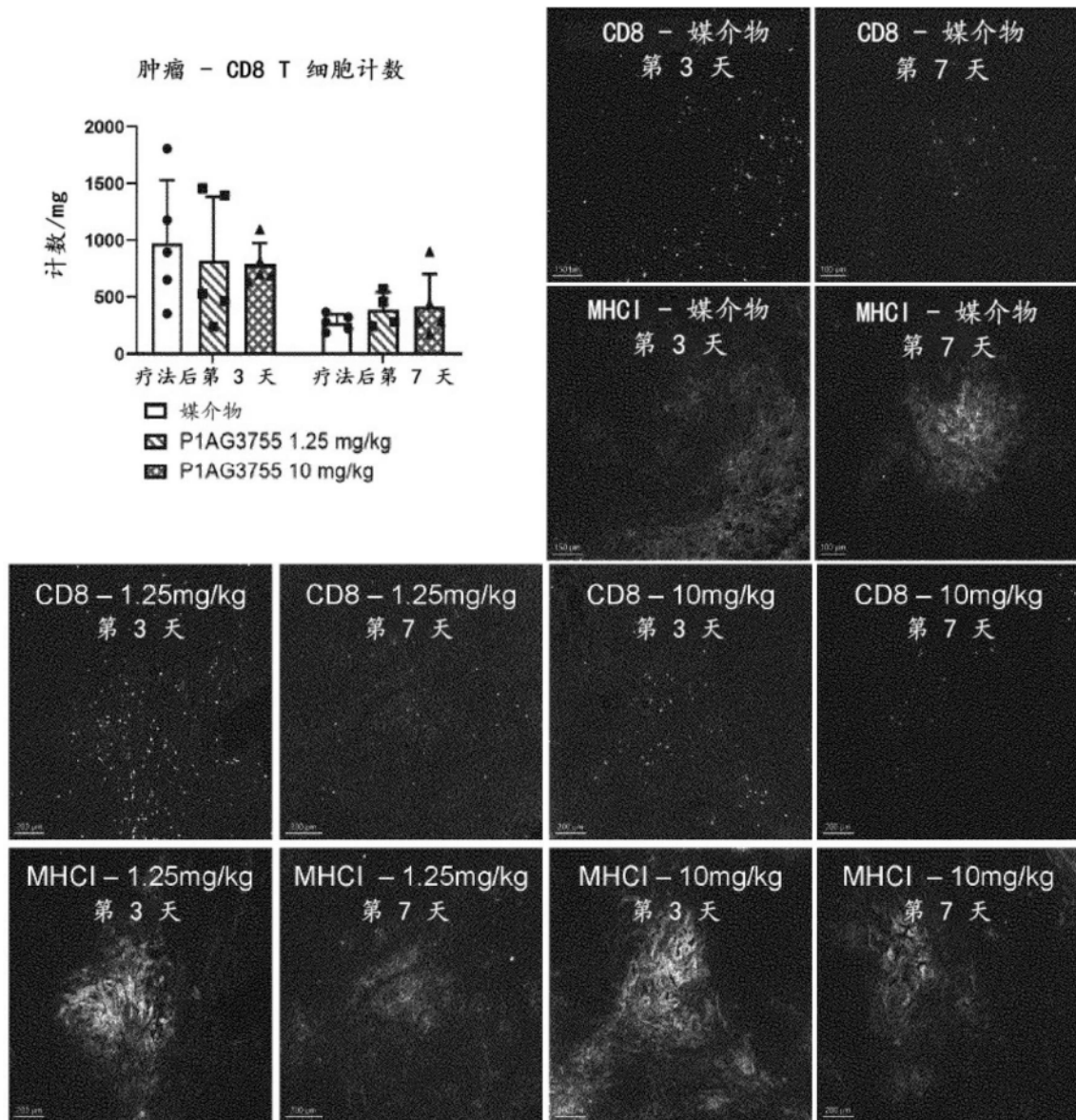


图8

CXCL9 蛋白质测量

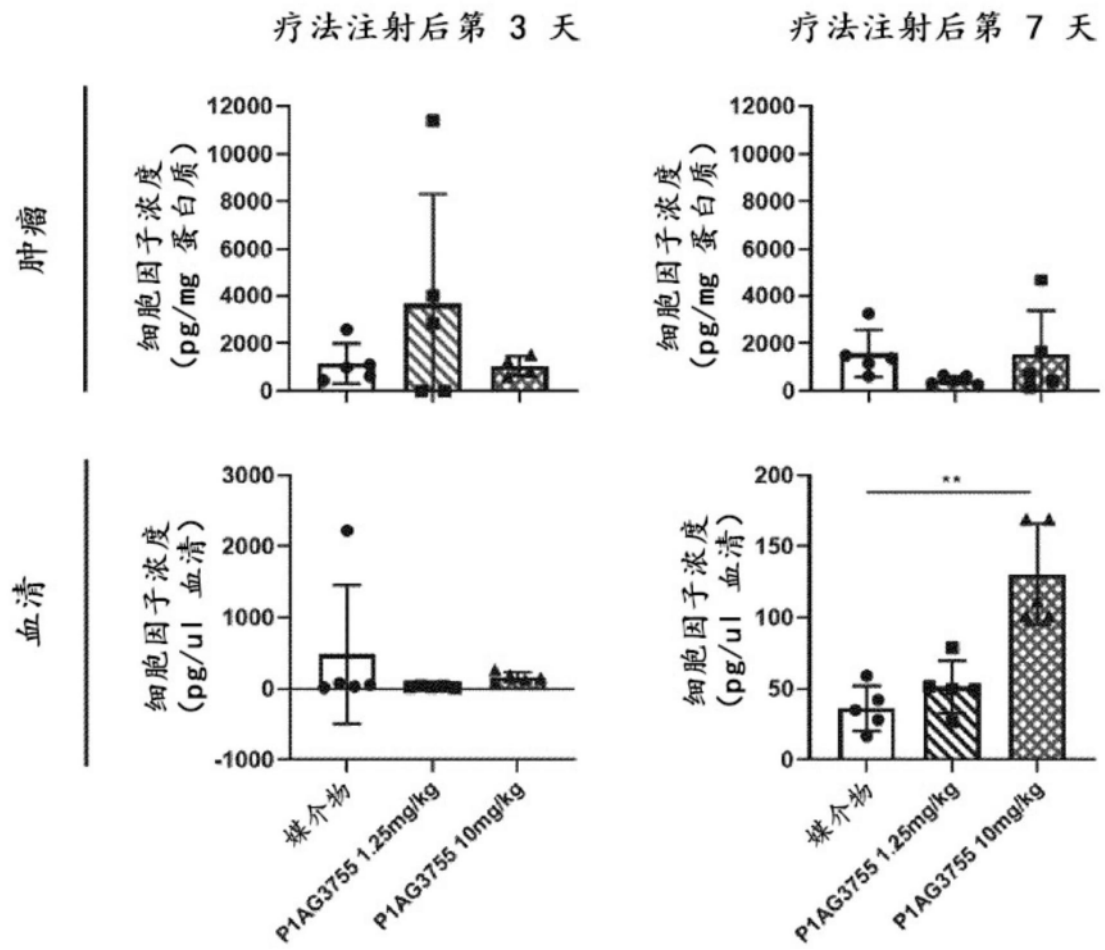


图9

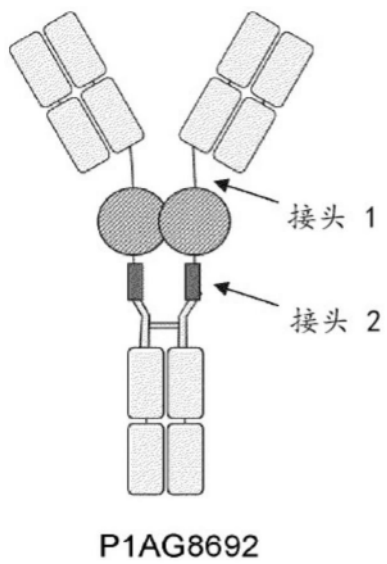


图10A

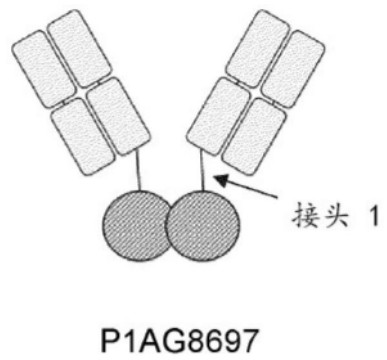


图10B

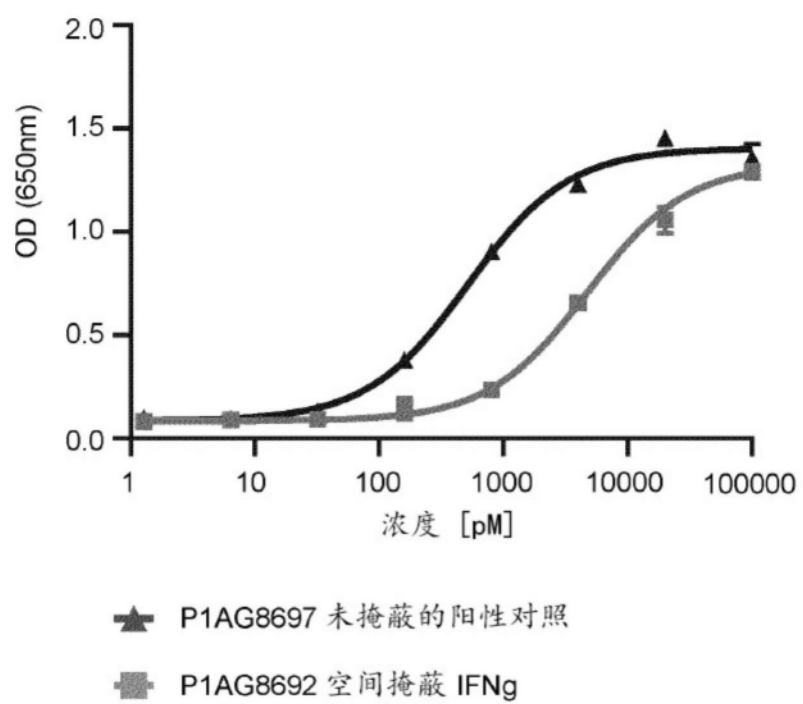


图10C