



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115279403 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 01

(21) 申请号 202180013446.6

(22) 申请日 2021.02.16

(30) 优先权数据

62/980,000 2020.02.21 US

63/104,685 2020.10.23 US

63/147,565 2021.02.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.08.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/018177 2021.02.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/167885 EN 2021.08.26

(71) 申请人 宏观基因有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 A·Y·贝列日诺 君朵·迪瑞希

保罗·A·摩尔 埃兹奥·泊韦尼

K·沙哈

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

专利代理师 吕艳英 贾慧娜

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

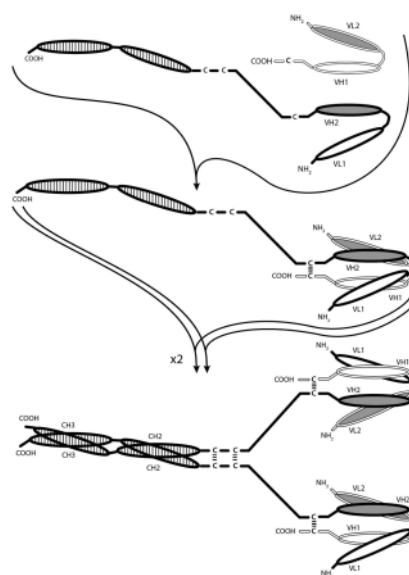
G12P 21/08 (2006.01)

(54) 发明名称

CD137结合分子及其用途

(57) 摘要

本发明涉及具有对CD137的表位特异性一个或多个表位结合位点的结合分子,包括抗体、以及包括其表位结合片段的分子。本发明进一步涉及包括对CD137的表位特异性一个或多个表位-结合位点和对肿瘤抗原(“TA”)的表位特异性一个或多个表位-结合位点的多特异性结合分子(例如“CD137x TA结合分子”)。



1. 一种CD137结合分子,其包括与CD137的表位免疫特异性结合的第一结合位点,其中所述第一结合位点包括第一轻链可变结构域和第一重链可变结构域,所述第一轻链可变结构域包括CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3,所述第一重链可变结构域包括CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3;并且其中:

(A) 所述第一轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是CD137MAB-6VL1 (SEQ ID NO:50) 的轻链CDR;和

(B) 所述第一重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是CD137MAB-6VH1 (SEQ ID NO:46) 的重链CDR。

2. 根据权利要求1所述的CD137结合分子,其中所述第一重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hCD137 MAB-6VH1 (SEQ ID NO:46)。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的CD137结合分子,其中所述第一轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:

(A) hCD137 MAB-6VLx (SEQ ID NO:54);

(B) hCD137 MAB-6VL1 (SEQ ID NO:50);

(B) hCD137 MAB-6VL2 (SEQ ID NO:55);或

(C) hCD137 MAB-6VL3 (SEQ ID NO:56)。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的CD137结合分子,其中,

(A) 所述第一重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hCD137 MAB-6VH1 (SEQ ID NO:46);和

(B) 所述第一轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hCD137 MAB-6VL3 (SEQ ID NO:56)。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的CD137结合分子,其中,其中所述分子是双特异性分子,其包括免疫特异性结合肿瘤抗原(TA)的第二结合位点,并且其中所述第二结合位点包括第二轻链可变结构域和第二重链可变结构域,所述第二轻链可变结构域包括CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3,所述第二重链可变结构域包括CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3。

6. 根据权利要求5所述的CD137结合分子,其中,所述TA选自表1-2中所呈现的抗原。

7. 根据权利要求5所述的CD137结合分子,其中,其中所述TA是PD-L1,并且其中:

(A) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hPD-L1MAB-2VLx (SEQ ID NO:63) 的轻链CDR;和

(B) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1MAB-2VHx (SEQ ID NO:59) 的重链CDR。

8. 根据权利要求7所述的CD137结合分子,其中,

(A) (1) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hPD-L1 MAB-2VL1 (SEQ ID NO:58) 的轻链CDR;或者

(2) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hPD-L1 MAB-2VL2 (SEQ ID NO:72) 的轻链CDR;和

(B) (1) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2VH1 (SEQ ID NO:57) 的重链CDR;

(2) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2VH2 (SEQ ID NO:67)

的重链CDR;

(3) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2VH3 (SEQ ID NO:68) 的重链CDR;

(4) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2VH2 (SEQ ID NO:69) 的重链CDR;

(5) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2VH2 (SEQ ID NO:70) 的重链CDR;或

(6) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2VH2 (SEQ ID NO:71) 的重链CDR。

9. 根据权利要求8所述的CD137结合分子, 其中所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:

(A) hPD-L1 MAB-2VH1 (SEQ ID NO:57);

(B) hPD-L1 MAB-2VH2 (SEQ ID NO:67);

(C) hPD-L1 MAB-2VH3 (SEQ ID NO:68);

(D) hPD-L1 MAB-2VH4 (SEQ ID NO:69);

(E) hPD-L1 MAB-2VH5 (SEQ ID NO:70);或

(F) hPD-L1 MAB-2VH6 (SEQ ID NO:71)。

10. 根据权利要求8或9中任一项所述的CD137结合分子, 其中所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:

(A) hPD-L1 MAB-2VL1 (SEQ ID NO:58);或

(B) hPD-L1 MAB-2VL2 (SEQ ID NO:72)。

11. 根据权利要求5所述的CD137结合分子, 其中所述TA为5T4, 并且其中:

(A) (1) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是5T4 MAB-1VL (SEQ ID NO:93) 的轻链CDR;和

(2) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是5T4 MAB-1VH (SEQ ID NO:92) 的重链CDR;或

(B) (1) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是5T4MAB-2VL (SEQ ID NO:95) 的轻链CDR;和

(2) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是5T4MAB-2VH (SEQ ID NO:96) 的重链CDR。

12. 根据权利要求11所述的CD137 x TA结合分子, 其中所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:5T4MAB-1VH (SEQ ID NO:92)。

13. 根据权利要求11或12所述的CD137 x TA结合分子, 其中所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:5T4 MAB-1VL (SEQ ID NO:93)。

14. 根据权利要求5所述的CD137结合分子, 所述TA是HER2, 并且其中:

(A) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hHER2-MAB-1VLx (SEQ ID NO:79) 的轻链CDR;和

(B) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hHER2-MAB-1VHx (SEQ ID NO:78) 的重链CDR。

15. 根据权利要求14所述的CD137结合分子, 其中:

(A) (1) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hHER2-MAB-1VL1 (SEQ ID NO: 83) 的轻链CDR;

(2) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hHER2-MAB-1VL2 (SEQ ID NO: 84) 的轻链CDR; 或

(3) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hHER2-MAB-1VL3 (SEQ ID NO: 85) 的轻链CDR; 和

(B) (1) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hHER2-MAB-1VH1 (SEQ ID NO: 80) 的重链CDR;

(2) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hHER2-MAB-1VH2 (SEQ ID NO: 81) 的重链CDR; 或

(3) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hHER2-MAB-1VH3 (SEQ ID NO: 82) 的重链CDR。

16. 根据权利要求15所述的CD137结合分子, 其中所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:

(A) hHER2-MAB-1VH1 (SEQ ID NO: 80);

(B) hHER2-MAB-1VH2 (SEQ ID NO: 81); 或

(C) hHER2-MAB-1VH3 (SEQ ID NO: 82)。

17. 根据权利要求15或16中任一项所述的CD137结合分子, 其中所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:

(A) hHER2-MAB-1VL1 (SEQ ID NO: 83);

(B) hHER2-MAB-1VL2 (SEQ ID NO: 84); 或

(C) hHER2-MAB-1VL3 (SEQ ID NO: 85)。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的CD137结合分子, 其是抗体或双特异性四价具有Fc的双抗体或双特异性三价分子。

19. 根据权利要求1-17中任一项所述的CD137结合分子, 其中所述分子是双特异性和四价的, 并且包括第一、第二、第三和第四多肽链, 其中所述多肽链形成共价结合的复合物。

20. 根据权利要求1-17中任一项所述的CD137结合分子, 其中所述分子是双特异性和三价的, 并且包括第一、第二、第三和第四多肽链, 其中所述多肽链形成共价结合的复合物。

21. 根据权利要求19所述的CD137结合分子, 其中所述TA是PD-L1, 并且其中:

(A) 所述第一和第三多肽链包括SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 118或SEQ ID NO: 120的氨基酸序列; 和

(B) 所述第二和第四多肽链包括SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 121、SEQ ID NO: 122、SEQ ID NO: 123、SEQ ID NO: 124、SEQ ID NO: 125、SEQ ID NO: 126或SEQ ID NO: 139的氨基酸序列。

22. 根据权利要求21所述的CD137结合分子, 其中所述分子包括:

(A) SEQ ID NO: 116和SEQ ID NO: 117;

(B) SEQ ID NO: 118和SEQ ID NO: 119;

- (C) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:119;
- (D) SEQ ID NO:118和SEQ ID NO:121;
- (E) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:121;
- (F) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:122;
- (G) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:123;
- (H) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:124;
- (I) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:125;
- (J) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:126;或
- (K) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:139。

23. 根据权利要求20所述的CD137结合分子,其中所述TA是PD-L1,并且其中:

- (A) 所述第一多肽链包括氨基酸序列SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:133或SEQ ID NO:135;
- (B) 所述第二多肽链包括氨基酸序列SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:134或SEQ ID NO:136;
- (C) 所述第三多肽链包括氨基酸序列SEQ ID NO:129或SEQ ID NO:131;和
- (D) 所述第四多肽链包括氨基酸序列SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:132。

24. 根据权利要求23所述的CD137结合分子,其中所述分子包括:

- (A) SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:129和SEQ ID NO:130;
- (B) SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:131和SEQ ID NO:132;
- (C) SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:131和SEQ ID NO:132;或
- (D) SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:131和SEQ ID NO:132。

25. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1-24中任一项所述的CD137结合分子和生理学上可接受的载体。

26. 权利要求6-24中任一项所述的CD137结合分子或权利要求25所述的药物组合物在治疗与所述TA的表达有关或以所述TA的表达为特征的疾病或病症中的用途。

27. 一种PD-L1结合分子,其包括包含CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3的轻链可变结构域,以及包含CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3的重链可变结构域;其中:

(A) 所述轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hPD-L1MAB-2VL2 (SEQ ID NO:72) 的轻链CDR;

和

(B) (1) 所述重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2VH2 (SEQ ID NO:67) 的重链CDR;

(2) 所述重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2VH3 (SEQ ID NO:68) 的重链CDR;

(3) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2VH4 (SEQ ID NO:69) 的重链CDR;

(4) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2VH5 (SEQ ID NO:70) 的重链CDR;或

(5) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2VH6 (SEQ ID NO:71) 的重链CDR。

28. 权利要求27所述的PD-L1结合分子, 其中所述重链可变结构域包括以下氨基酸序列:

- (A) hPD-L1 MAB-2VH2 (SEQ ID NO:67);
- (B) hPD-L1 MAB-2VH3 (SEQ ID NO:68);
- (C) hPD-L1 MAB-2VH4 (SEQ ID NO:69);
- (D) hPD-L1 MAB-2VH5 (SEQ ID NO:70); 或
- (E) hPD-L1 MAB-2VH6 (SEQ ID NO:71)。

29. 权利要求27-28中任一项所述的PD-L1结合分子, 其中所述轻链可变结构域包括hPD-L1 MAB-2VL2 (SEQ ID NO:72) 的氨基酸序列。

30. 权利要求27-29中任一项所述的PD-L1结合分子, 其中所述分子为抗体或其抗原结合片段。

31. 一种药物组合物, 其包括权利要求27-30中任一项所述的PD-L1结合分子和生理学上可接受的载体。

32. 权利要求27-30中任一项所述的PD-L1结合分子或权利要求31所述的药物组合物在治疗与免疫系统抑制有关或以PD-L1表达为特征的疾病或病症中的用途。

33. 根据权利要求32所述的用途, 其中所述与免疫系统抑制有关或以PD-L1的表达为特征的疾病或病症为癌症。

34. 权利要求26或33所述的用途, 其中所述癌症选自: 膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胆囊或胆管癌、胃癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、黑色素瘤、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌 (NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)、胃癌、睾丸癌、胸腺癌和子宫癌。

35. 一种增强肿瘤靶向剂活性的方法, 该方法包括与权利要求1-24中任一项所述的CD137结合分子、权利要求27-30中任一项所述的PD-L1结合分子或权利要求25或31中任一项所述的药物组合物组合施用所述肿瘤靶向剂。

36. 一种治疗与免疫系统抑制有关或以TA的表达为特征的疾病或病症的方法, 该方法包括向有此需要的受试者施用权利要求1-24中任一项所述的CD137结合分子、权利要求27-30中任一项所述的PD-L1结合分子或权利要求25或31所述的药物组合物。

37. 权利要求36所述的方法, 其中与免疫系统抑制有关或以所述TA的表达为特征的所述病症是癌症。

38. 权利要求36或37所述的方法, 其进一步包括施用肿瘤靶向剂。

39. 权利要求35或38所述的方法, 其中, 所述肿瘤靶向剂是抗体、抗体的表位结合片段或介导T细胞复位向杀伤靶细胞的试剂。

40. 权利要求36-38中任一项所述的方法, 其中所述癌症选自: 膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胆囊或胆管癌、胃癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、黑色素瘤、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌 (NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)、胃癌、睾丸癌、胸

腺癌和子宫癌。

41. 编码权利要求1-24中任一项所述的CD137结合分子或权利要求27-30中任一项所述的PD-L1结合分子的核酸。

42. 一种表达载体,其包括权利要求41所述的核酸。

43. 一种细胞,其包括权利要求41所述的核酸或权利要求42所述的表达载体。

44. 权利要求43所述的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

CD137结合分子及其用途

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求美国专利申请号62/980,000 (在2020年2月21日提交;未决)、63/104,685 (2020年10月23日提交;未决) 和63/147,565 (2021年2月9日提交) 的权益,出于所有目的,其每一篇通过引用以其整体并入本文。

序列表的引用

[0002] 本申请包含序列表,该序列表已经以ASCII格式电子提交,并且通过引用以其全部内容合并于此。所述ASCII副本创建于2021年2月12日,名为MAC-0111-PC_SL.txt,大小为224,061字节,该文件以其整体通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本技术涉及**CD137结合分子**,例如单特异性抗体,以及包含其表位结合片段的分子,其能够结合CD137的表位。该技术进一步涉及能够与CD137的表位和第二抗原的表位两者结合的多特异性**CD137结合分子**(例如,双特异性抗体、双特异性双抗体、BiTE、三价结合分子等),第二抗原尤其是肿瘤抗原(“**TA**”)(例如“**CD137 x TA结合分子**”)。该技术也提供了能够与PD-L1的表位结合的新颖的**PD-L1结合分子**例如单特异性抗体,以及包括其表位结合片段的分子,及其衍生物和其用途。本技术还涉及包含这种分子的药物组合物。该技术也包括在疾病的治疗中这种分子的用途,特别是癌症或与存在免疫系统抑制有关或以存在免疫系统抑制为特征的疾病或病症。

【背景技术】

[0004] CD137(也称为4-1BB和“TNF受体超家族成员9”(“TNFRSF9”))是肿瘤坏死因数受体超家族的共刺激受体成员,介导CD28依赖性和独立的T细胞共刺激(Vinay,D.S.和Kwon,B.S.(1998)“Role of 4-1BB in immune responses,”Semin Immunol.10:481-489;Croft,M.(2009)“The Role Of TNF Superfamily members In T-Cell Function And Diseases,”Nat.Rev.Immunol.9:271-285)。CD137由T细胞、自然杀伤(NK)细胞、树突状细胞(DC)、B细胞和免疫系统的其他细胞诱导表达。CD137与其配体CD137L(4-1BBL;TNFSF9)或激动剂抗体的连接会诱发各种T细胞应答,例如细胞扩增、细胞因子分泌增加以及启动诱导的细胞死亡的预防。因此,刺激CD137的抗体可以诱导T细胞的存活和增殖,从而增强抗肿瘤免疫应答。这种认识导致了这样的建议,即可以使用对CD137是免疫特异性的抗体来启动免疫系统,从而为癌症提供治疗(Li,S.Y.等人,(2013)“Immunotherapy Of Melanoma With The Immunocostimulatory Monoclonal Antibodies Targeting CD137,”Clin.Pharmacol.5:47-53;Bartkowiak,T.等人,(2015)“4-1BB Agonists:Multi-Potent Potentiators Of Tumor Immunity,”Frontiers Oncol.5:117)。已经描述了抗CD137抗体utomilumab和乌瑞鲁单抗,但是它们的临床发展因疗效低(utomilumab)或严重的肝毒性(乌瑞鲁单抗)而受阻。

发明内容

[0005] 提供了改进的组合物,其能够更加有力地刺激和引导人体的免疫系统攻击癌细胞,同时避免与在没有交联的情况下展示出高活性的抗体相关的毒性。因为尽管适应性免疫系统可以是对癌症和疾病的有效防御机制,但由CD137的共刺激活性降低/不存在,它常常受到肿瘤微环境中免疫抑制/逃避机制的阻碍。此外,肿瘤环境中肿瘤细胞、免疫细胞和基质细胞表达的共抑制分子可以显著减弱针对癌细胞的T细胞应答。

[0006] 提供了CD137结合分子,特别是能够与CD137的表位和肿瘤抗原的表位二者结合的CD137 x TA结合分子。这样的双特异性分子能够结合在肿瘤细胞表面上表达的肿瘤抗原,并且能够将表达CD137的免疫细胞共定位于这样的肿瘤细胞。这种共定位上调免疫细胞,从而促进免疫系统的启动或持续启动(例如,刺激针对肿瘤细胞的细胞毒性T细胞应答)。这些特性使得这种双特异性分子在刺激免疫系统,特别是在癌症的治疗中具有效用。本技术针对这些和其他目标。

[0007] 因此,在某些方面,提供了能够与CD137的表位结合的**CD137 结合分子**,例如单特异性抗体,以及包含其表位结合片段的分子。本发明进一步涉及能够与CD137的表位和第二抗原的表位两者结合的多特异性**CD137 结合分子**(例如,双特异性抗体、双特异性双抗体、BiTE、三价结合分子等),第二抗原尤其是肿瘤抗原(“TA”)(例如“**CD137 x TA 结合分子**”)。本发明还提供了能够与PD-L1的表位结合的新颖的**PD-L1 结合分子**,例如单特异性抗体,以及包含其表位结合片段的分子,及其衍生物和其用途。本发明还涉及包含这种分子的药物组合物。本发明还包括在疾病的治疗中这种分子的用途,特别是在癌症或与存在免疫系统抑制有关或以存在免疫系统抑制为特征的疾病或病症中。

[0008] 本发明提供了新颖的**CD137 结合分子**,其展示出期望的特点,特别是当并入多特异性分子中时。本发明还涉及多特异性**CD137 x TA 结合分子**,其包括彼此缔合以形成两个结合位点的多肽链,每个结合位点对于CD137的表位是特异性的,并且两个结合位点各自对于TA的表位是特异性的。本发明的这种**CD137 x TA 结合分子**被称为“**双特异性四价**”。本发明还涉及**CD137 x TA 结合分子**,其包括彼此缔合以形成两个结合位点的多肽链,每个结合位点对CD137的表位是特异的并且一个结合位点对TA的表位是特异的。本发明的这种**CD137 x TA 结合分子**被称为“**双特异性三价**”。本发明的结合分子(例如,**CD137 结合分子**)有时包括第一结合位点,而不包括免疫特异性结合与第一结合位点所结合的抗原不同的抗原的第二结合位点。因此,本发明的结合分子有时仅包含第一结合位点和第一轻链可变结构域和第一重链可变结构域,而不包括结合与第一结合位点不同的抗原的第二结合位点、第二轻链可变结构域或第二重链可变结构域,并且这种结合分子的非限制性示例包括scFv、抗体和Fab结合分子。

[0009] 本发明提供了包含四条多肽链(“第一”、“第二”、“第三”和“第四”多肽链)的**CD137 x TA 结合分子**,其中第一和第二多肽链彼此共价结合,第三和第四多肽链彼此共价结合,并且第一和第三多肽链彼此共价结合。还提供了包括五条多肽链(“第一”、“第

二”、“第三”、“第四”和“第五”多肽链)的本发明的**CD137 x TA 结合分子**,其中第一和第二多肽链彼此共价结合,第三和第四多肽链彼此共价结合,第三和第五多肽链彼此共价结合,第一和第三条肽链彼此共价结合。

[0010] 详细地,本发明提供了**CD137 结合分子**,其包括与CD137的表位免疫特异性结合的第一结合位点,其中所述第一结合位点包括第一轻链可变结构域和第一重链可变结构域,所述第一轻链可变结构域包括CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3,所述第一重链可变结构域包含CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3;并且其中

(A) 第一轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是**CD137 MAB-6 VL1 (SEQ ID NO: 50)**的轻链CDR;和

(B) 第一重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是**CD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO: 46)**的重链CDR。

[0011] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中第一重链可变结构域包括以下氨基酸序列:**hCD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO: 46)**。

[0012] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中第一轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:

(A) **hCD137 MAB-6 VLx (SEQ ID NO:54);**

(B) **hCD137 MAB-6 VL1 (SEQ ID NO:50);**

(B) **hCD137 MAB-6 VL2 (SEQ ID NO:55);**或

(C) **hCD137 MAB-6 VL3 (SEQ ID NO:56)。**

[0013] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中:

(A) 第一重链可变结构域包括以下氨基酸序列:**hCD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO: 46)**;和

(B) 第一轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:**hCD137 MAB-6 VL3 (SEQ ID NO: 56)**。

[0014] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的所有以上实施方式,其中所述分子是双特异性分子,其包括免疫特异性结合**TA**的第二结合位点,并且其中所述第二结合位点包括第二轻链可变结构域和第二重链可变结构域,所述第二轻链可变结构域包括CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3,以及所述第二重链可变结构域包括CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3。

[0015] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中**TA**选自**表 1-2**中所示的肿瘤抗原。

[0016] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中**TA**是PD-L1,并且其中:

(A) 第二轻链可变结构域 CDR_L1 、 CDR_L2 和 CDR_L3 是 **hPD-L1 MAB-2 VLx (SEQ ID NO: 63)** 的轻链CDR;和

(B) 第二重链可变结构域 CDR_H1 、 CDR_H2 和 CDR_H3 是 **hPD-L1 MAB-2 VHx (SEQ ID NO: 59)** 的重链CDR。

[0017] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中:

(A) (1) 第二轻链可变结构域 CDR_L1 、 CDR_L2 和 CDR_L3 是 **hPD-L1 MAB-2 VL1 (SEQ ID NO: 58)** 的轻链CDR;或者

(2) 第二轻链可变结构域 CDR_L1 、 CDR_L2 和 CDR_L3 是 **hPD-L1 MAB-2 VL2 (SEQ ID NO: 72)** 的轻链CDR;和

(B) (1) 第二重链可变结构域 CDR_H1 、 CDR_H2 和 CDR_H3 是 **hPD-L1 MAB-2 VH1 (SEQ ID NO: 57)** 的重链CDR;

(2) 第二重链可变结构域 CDR_H1 、 CDR_H2 和 CDR_H3 是 **hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO: 67)** 的重链CDR;

(3) 第二重链可变结构域 CDR_H1 、 CDR_H2 和 CDR_H3 是 **hPD-L1 MAB-2 VH3 (SEQ ID NO: 68)** 的重链CDR;

(4) 第二重链可变结构域 CDR_H1 、 CDR_H2 和 CDR_H3 是 **hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO: 69)** 的重链CDR;

(5) 第二重链可变结构域 CDR_H1 、 CDR_H2 和 CDR_H3 是 **hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO: 70)** 的重链CDR;或

(6) 第二重链可变结构域 CDR_H1 、 CDR_H2 和 CDR_H3 是 **hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO: 71)** 的重链CDR。

[0018] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:

(A) **hPD-L1 MAB-2 VH1 (SEQ ID NO: 57)** ;

(B) **hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO: 67)** ;

(C) **hPD-L1 MAB-2 VH3 (SEQ ID NO: 68)** ;

(D) **hPD-L1 MAB-2 VH4 (SEQ ID NO: 69)** ;

(E) **hPD-L1 MAB-2 VH5 (SEQ ID NO: 70)** ;或

(F) **hPD-L1 MAB-2 VH6 (SEQ ID NO: 71)** 。

[0019] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:

(A) hPD-L1 MAB-2 VL1 (SEQ ID NO: 58);或

(B) hPD-L1 MAB-2 VL2 (SEQ ID NO: 72)。

[0020] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中TA为5T4,并且其中:

(A) (1) 第二轻链可变结构域 CDR_L1 、 CDR_L2 和 CDR_L3 是**5T4 MAB-1 VL (SEQ ID NO: 93)**的轻链CDR;和

(2) 第二重链可变结构域 CDR_H1 、 CDR_H2 和 CDR_H3 是**5T4 MAB-1 VH (SEQ ID NO: 92)**的重链CDR;或

(B) (1) 第二轻链可变结构域 CDR_L1 、 CDR_L2 和 CDR_L3 是**5T4 MAB-2 VL (SEQ ID NO: 95)**的轻链CDR;和

(2) 第二重链可变结构域 CDR_H1 、 CDR_H2 和 CDR_H3 是**5T4MAB-2VH (SEQ ID NO: 96)**的重链CDR。

[0021] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:**5T4MAB-1VH (SEQ ID NO: 92)**。

[0022] 本发明还涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:**5T4 MAB-1 VL (SEQ ID NO: 93)**。

[0023] 本发明进一步涉及这样的**CD137 结合分子**,其中所述TA是HER2,并且其中:

(A) 第二轻链可变结构域 CDR_L1 、 CDR_L2 和 CDR_L3 是**hHER2-MAB-1 VLx (SEQ ID NO:79)**的轻链CDR;和

(B) 第二重链可变结构域 CDR_H1 、 CDR_H2 和 CDR_H3 是**hHER2-MAB-1 VHx (SEQ ID NO:78)**的重链CDR;

[0024] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中:

(A) (1) 第二轻链可变结构域 CDR_L1 、 CDR_L2 和 CDR_L3 是**hHER2-MAB-1 VL1 (SEQ ID NO:83)**的轻链CDR;

(2) 第二轻链可变结构域 CDR_L1 、 CDR_L2 和 CDR_L3 是**hHER2-MAB-1 VL2 (SEQ ID NO:84)**的轻链CDR;或

(3) 第二轻链可变结构域 CDR_L1 、 CDR_L2 和 CDR_L3 是**hHER2-MAB-1 VL3 (SEQ ID NO:85)**的轻链CDR;

和

(B) (1) 第二重链可变结构域 CDR_H1 、 CDR_H2 和 CDR_H3 是**hHER2-MAB-1 VH1 (SEQ ID NO:80)**的重链CDR;

(2) 第二重链可变结构域 CDR_H1 、 CDR_H2 和 CDR_H3 是

hHER2-MAB-1 VH2 (SEQ ID NO:81)的重链CDR;或

(3) 第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是

hHER2-MAB-1 VH3 (SEQ ID NO:82)的重链CDR。

[0025] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:

- (A) **hHER2-MAB-1 VHx (SEQ ID NO:78);**
- (B) **hHER2-MAB-1 VH1 (SEQ ID NO:80);**
- (C) **hHER2-MAB-1 VH2 (SEQ ID NO:81);**或
- (D) **hHER2-MAB-1 VH3 (SEQ ID NO:82)。**

[0026] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:

- (A) **hHER2-MAB-1 VLx (SEQ ID NO:79);**
- (B) **hHER2-MAB-1 VL1 (SEQ ID NO:83);**
- (C) **hHER2-MAB-1 VL2 (SEQ ID NO:84);**或
- (D) **hHER2-MAB-1 VL3 (SEQ ID NO:85)。**

[0027] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的所有以上实施方式,其中所述分子是抗体、具有双特异性四价Fc的双抗体或双特异性三价分子。

[0028] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中所述分子是双特异性和四价的,并且包括第一、第二、第三、第四和任选地第五多肽链,其中所述多肽链形成共价结合的复合物。

[0029] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中所述分子是双特异性和三价的,并且包括第一、第二、第三和第四多肽链,其中所述多肽链形成共价结合的复合物。

[0030] 本发明另外涉及所有这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中所述分子包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的Fc区,并且任选地,其中所述分子还包含铰链结构域。

[0031] 本发明另外涉及所有这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中Fc区为变体Fc区,其包括一个或多个氨基酸修饰,所述氨基酸修饰降低了变体Fc区对Fc γ R的亲和力和/或增强了血清半衰期,并且更特别地,其中所述修饰包括选自由下述组成的组中的至少一种氨基酸置换:

- (A) L234A;L235A;
- (B) L234A和L235A;
- (C) M252Y;M252Y和S254T;
- (D) M252Y和T256E;

(E) M252Y, S254T和T256E;或

(F) K288D和H435K;

其中编号是Kabat中EU索引的编号。

[0032] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中**TA**是PD-L1,并且其中:

(A) 第一和第三多肽链包括氨基酸序列**SEQ ID NO:116**、**SEQ ID NO:118**、**SEQ ID NO:120**;和

(B) 第二和第四多肽链包括氨基酸序列**SEQ ID NO:117**、**SEQ ID NO:119**、**SEQ ID NO:121**、**SEQ ID NO:122**、**SEQ ID NO:123**、**SEQ ID NO:124**、**SEQ ID NO:125**、**SEQ ID NO:126**、或**SEQ ID NO:139**。

[0033] 本发明进一步涉及这种CD137结合分子的实施方式,其中所述分子包括:

(A) **SEQ ID NO:116**和**SEQ ID NO:117**;

(B) **SEQ ID NO:118**和**SEQ ID NO:119**;

(C) **SEQ ID NO:120**和**SEQ ID NO:119**;

(D) **SEQ ID NO:118**和**SEQ ID NO:121**;

(E) **SEQ ID NO:120**和**SEQ ID NO:121**;

(F) **SEQ ID NO:120**和**SEQ ID NO:122**;

(G) **SEQ ID NO:120**和**SEQ ID NO:123**;

(H) **SEQ ID NO:120**和**SEQ ID NO:124**;

(I) **SEQ ID NO:120**和**SEQ ID NO:125**;

(J) **SEQ ID NO:120**和**SEQ ID NO:126**;或

(K) **SEQ ID NO:120**和**SEQ ID NO:139**。

[0034] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中**TA**是PD-L1,并且其中:

(A) 第一多肽链包括氨基酸序列**SEQ ID NO:127**、**SEQ ID NO:133**或**SEQ ID NO:135**;

(B) 第二多肽链包括氨基酸序列**SEQ ID NO:128**、**SEQ ID NO:134**或**SEQ ID NO:136**;

(C) 第三多肽链包括氨基酸序列**SEQ ID NO:129**或**SEQ ID NO:131**;和

(D) 第四多肽链包括氨基酸序列**SEQ ID NO:130**、**SEQ ID NO:132**。

[0035] 本发明进一步涉及这种**CD137 结合分子**的实施方式,其中所述分子包括:

(A) **SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:129 和 SEQ ID NO:130;**

(B) **SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:131 和 SEQ ID NO:132;**

(C) **SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:131 和 SEQ ID NO:132;**或

(D) **SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:131 和 SEQ ID NO:132。**

[0036] 本发明另外涉及一种药物组合物,其包含任意上述 **CD137 结合分子**和生理学上可接受的载体。

[0037] 本发明另外涉及这样的 **CD137 结合分子**或这样的药物组合物在治疗以 **TA** 表达为特征的癌症中的用途。

[0038] 本发明另外涉及一种 **PD-L1 结合分子**,其包括包含CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3的轻链可变结构域以及包含CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3的重链可变结构域;其中:

(A) 轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2、和CDR_L3是**hPD-L1**

MAB-2 VL2 (SEQ ID NO:72)的轻链CDR;

和

(B) (1) 重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2、和CDR_H3是**hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO:67)**的重链CDR;

(2) 重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2、和CDR_H3是**hPD-L1 MAB-2 VH3 (SEQ ID NO:68)**的重链CDR;

(3) 第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是**hPD-L1 MAB-2 VH4 (SEQ ID NO:69)**的重链CDR;

(4) 第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是**hPD-L1 MAB-2 VH5 (SEQ ID NO:70)**的重链CDR;或

(5) 第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是**hPD-L1 MAB-2 VH6 (SEQ ID NO:71)**的重链CDR。

[0039] 本发明进一步涉及这种 **PD-L1 结合分子**的实施方式,其中重链可变结构域包括以下氨基酸序列:

(A) **hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO:67);**

(B) **hPD-L1 MAB-2 VH3 (SEQ ID NO:68);**

(C) **hPD-L1 MAB-2 VH4 (SEQ ID NO:69);**

(D) **hPD-L1 MAB-2 VH5 (SEQ ID NO:70)**;或

(E) **hPD-L1 MAB-2 VH6 (SEQ ID NO:71)**。

[0040] 本发明进一步涉及这种 **PD-L1 结合分子**的实施方式,其中轻链可变结构域包括 **hPD-L1 MAB-2 VL2 (SEQ ID NO: 72)**的氨基酸序列。

[0041] 本发明进一步涉及这种 **PD-L1 结合分子**的实施方式,其中所述分子为抗体或其抗原结合片段。

[0042] 本发明另外涉及药物组合物,其包括任意上述 **PD-L1 结合分子**和生理学上可接受的载体。

[0043] 本发明另外涉及这种 **PD-L1 结合分子**或这种药物组合物在治疗与免疫系统抑制有关或以PD-L1的表达为特征的疾病或病症中的用途。

[0044] 本发明进一步涉及这样的用途,其中与免疫系统抑制有关或以PD-L1的表达为特征的病症是癌症。

[0045] 本发明另外涉及所有这种用途的实施方式,其中所述癌症选自:膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胆囊或胆管癌、胃癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、黑素瘤、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、胃癌、睾丸癌、胸腺癌和子宫癌。

[0046] 本发明进一步涉及增强肿瘤靶向剂活性的方法,该方法包括与任何上述 **CD137 结合分子**、任何上述 **PD-L1 结合分子**、或任何上述药物组合物联合施用肿瘤靶向剂。

[0047] 本发明另外涉及一种治疗与免疫系统抑制有关或以 **TA** 的表达为特征的疾病或病症的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用上述 **CD137 结合分子**、任何上述 **PD-L1 结合分子**或任何上述药物组合物。

[0048] 本发明进一步涉及这样的方法,其进一步包括施用肿瘤靶向剂。

[0049] 本发明进一步涉及这样的方法,其中与免疫系统抑制有关或以肿瘤TA的表达为特征的病症为癌症。

[0050] 本发明进一步涉及这种方法的所有上述实施方式,其中所述肿瘤靶向剂是抗体、抗体的表位结合片段或介导T细胞复位向杀伤靶标细胞的试剂。

[0051] 本发明还涉及这样的方法的实施方式,其中所述癌症选自:膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胆囊或胆管癌、胃癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、黑素瘤、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌(NSCLC),卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、胃癌、睾丸癌、胸腺癌和子宫癌。

[0052] 本发明另外涉及编码任何以上实施方式的 **CD137 结合分子**或任何以上实施

方式的 **PD-L1 结合分子** 的核酸。

[0053] 本发明进一步涉及包含此类核酸的表达载体。

[0054] 本发明另外涉及一种细胞,其包括根据任何以上实施方式的核酸或任何以上实施方式的表达载体。

[0055] 本发明进一步涉及这样的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

图式简单说明

[0056] **图 1A-1D** 提供了示出包括 Fc 区的代表性共价结合的双抗体的示意图。

图 1A-1D 示出了包括两对多肽链(即,总共四条多肽链)的具有四个表位-结合位点的四价双抗体。每对的一个多肽具有 CH2 和 CH3 结构域,以使缔合的链形成 Fc 区的全部或部分。识别相同表位的 VL 和 VH 结构域使用相同的阴影或填充模式示出。两对多肽链可以相同。在 VL 和 VH 结构域识别不同表位的实施方式中(如 **图 1A-1B** 所示),所得分子具有四个表位结合位点,并且对于每个结合的表位是双特异性和二价的。在其中 VL 和 VH 结构域识别相同的表位(例如,在两条链上使用相同的 VL 结构域 CDR 和相同的 VH 结构域 CDR)这样的实施方式中,所得分子具有四个表位结合位点并且相对于单个表位是单特异性和四价的。可选地,两对多肽可以不同。在其中每对多肽的 VL 和 VH 结构域识别不同的表位(如 **图 1C** 所示)这样的实施方式中,所得分子具有四个表位结合位点,并且相对于每个结合的表位是四特异性和单价的。**图 1A** 示出了 Fc 双抗体,其包含含有半胱氨酸残基的肽异质二聚体促进结构域。

图 1B 示出了包括两对多肽链的 Fc 双抗体,每对多肽链具有 E-螺旋或 K-螺旋异质二聚体促进结构域(即,总共四条多肽链)。在提供了结合分子结构域的示意图的该图和所有图中的波浪线(WWW)表示存在的一个或多个任选的异质二聚体促进结构域。如所示,半胱氨酸残基可存在于接头中(主图)和/或异质二聚体促进结构域中(框内)。每对的一条多肽链具有包括半胱氨酸的接头(该接头可以包括铰链区的全部或一部分)和 CH2 和 CH3 结构域,使得缔合的链形成 Fc 区的全部或部分。**图 1C** 示出了包含 Fc 区的双抗体,其包含抗体 CH1 和 CL 结构域。**图 1D** 示出了代表性的共价结合的双抗体分子,其包括三条多肽链的具有两个表位-结合位点。两条多肽链具有 CH2 和 CH3 结构域,以使缔合的链形成 Fc 区的全部或部分。包括 VL 和 VH 结构域的多肽链进一步包括异质二聚体促进结构域,在此显示为包括半胱氨酸残基。

[0057] **图 2** 提供了包括五条多肽链的具有四个表位-结合位点的代表性共价结合的结合分子的示意图。两条多肽链具有包含半胱氨酸的接头(该接头可以包含铰链区的全部或一部分)以及 CH2 和 CH3 结构域,从而使缔合的链形成包括 Fc 区的全部或部分的 Fc 区。包含连接的 VL 和 VH 结构域的多肽链还包括接头和异质二聚体促进结构域(在 **图 1B** 中进一步描述)。识别相同表位的 VL 和 VH 结构域使用相同的阴影或填充模式显示。可以选择可变结构域以产生所得的 **CD137×TA 结合分子**,其具有两个对 **TA** 特异性的非双抗体型结合结构域和两个对 CD137 特异性的双抗体型结合结构域。可选地,可以选择可变结构域以产生所得的 **CD137×TA 结合分子**,其具有两个对 CD137 特异性的非双抗体型结合结构和两个对

TA特异性的双抗体型结合结构域。这种分子是双特异性的,并且具有两个对CD137的结合位点(其可以结合相同或不同的CD137表位)和两个对**TA**的结合位点(其可以结合相同或不同的**TA**表位)。

[0058] **图 3A-3C**提供了具有三个表位结合位点的代表性的含有Fc区的三价结合分子的示意图。**图 3A**示意性地示出了三价结合分子的结构域,其包含通过接头/异质二聚体促进结构域(在**图 1B**中进一步描述)共价结合的两个双抗体型结合结构域和Fab型结合结构域,其中结合结构域在Fc区的N末端。**图 3A**中的分子包含四条链。**图 3B-3C**分别示意性地示出了包括两个双抗体型结合结构域以及其中轻链和重链通过多肽间隔子连接或包括scFv型结合结构域的Fab型结合结构域的三价结合分子的结构域。**图 3B-3C**中的三价结合分子包括三条链。识别相同表位的VL和VH结构域使用相同的阴影或填充模式显示。

[0059] **图 4**示出了**CD137 x TA 结合分子 DART-A、TRIDENT-A**、比较分子**TRIDENT-2**和阴性对照**hIgG1**与工程化CHO细胞表面上表达的CD137结合的能力。

[0060] **图 5A-5B**示出了**CD137 x TA 结合分子 DART-A、TRIDENT-A、hPD-L1 MAB-2 (1.1)**和阴性对照**hIgG1**与工程化CHO细胞的细胞表面上表达的PD-L1结合的能力(**图 5A**),以及在PD-L1报告试验中阻断PD-L1/PD-1相互作用的能力(**图 5B**)。

[0061] **图 6**示出了**CD137 x TA 结合分子 DART-A、TRIDENT-A**、比较分子:**DART-2**和**TRIDENT-2、DART-3、r-乌瑞鲁单抗**以及阴性对照:**DART-1**和**hIgG1**在CD137报告试验中介导靶依赖性信号转导的能力。

[0062] **图 7A-7B**示出了**CD137 x TA 结合分子 DART-A、TRIDENT-A**、比较分子:**DART-2**和**TRIDENT-2、DART-3、r-乌瑞鲁单抗**以及阴性对照:**DART-1**和**hIgG1**在原代T细胞因子释放试验中介导细胞因子INF- γ (**图 7A**)和IL-2(**图 7B**)的靶依赖性释放的能力。

[0063] **图 8A-8C**示出了**CD137 x TA 结合分子 TRIDENT-A**的血清水平和对免疫细胞增殖的诱导。绘制了用**TRIDENT-A**以1 mg/kg(实心圆)或10 mg/kg(空心圆)治疗的食蟹猴的药代动力学(血清清除率)(**图 8A**)、CD8⁺T细胞增殖(**图 8B**)、NK细胞增殖(**图 8C**)直至第20-24天。

[0064] **图 9A-9B**示出了包括**hPD-L1 MAB-2 (1.1)**的去免疫/优化变体的Fab的结合活性。绘制了Fab变体**hPD-L1 MAB-2B、hPD-L1 MAB-2D**和**hPD-L1 MAB-2F**(**图 9A**)和**hPD-L1 MAB-2A、hPD-L1 MAB-2C**和

hPD-L1 MAB-2E (图9B)的ELISA结合曲线。

[0065] 图10A-10B示出了包括去免疫化或优化的PD-L1结合结构域的**CD137 x TA 结合分子**与工程化CHO细胞的细胞表面上表达的PD-L1结合的能力。绘制了**DART-A1、DART-A4**和抗PD-L1抗体**hPD-L1 MAB-2 (1.1)** (图 10A)、**TRIDENT-A、TRIDENT-A4**和阴性对照**hIgG1** (图 10B)的结合曲线。

[0066] 图 11A-11C 示出了包括去免疫化和/或优化的PD-L1结合结构域的**CD137 x TA 结合分子**在PD-L1报告试验中阻断PD-L1/PD-1相互作用的能力。绘制了**DART-A1、DART-A4**和抗PD-L1抗体**hPD-L1 MAB-2 (1.1)** (图 11A)、**TRIDENT-A、TRIDENT-A4**和阴性对照**hIgG1** (图 11B)、**DART-A4、DART-A7、DART-A8、DART-A9**和阴性对照**hIgG1** (图 11C)的活性曲线。

[0067] 图12A-12B示出了包括去免疫化的CD137结合结构域和/或去免疫化/优化的PD-L1结合结构域的**CD137 x TA 结合分子**与工程化CHO细胞的表面上表达的CD137结合的能力。绘制了**DART-A4、DART-A5、DART-A6** (图 12A)、**TRIDENT-A4、TRIDENT-A5、TRIDENT-A6** (图 12B)的结合曲线。在两个图上还绘制了比较物**r-乌瑞鲁单抗**和阴性对照**hIgG1**。

[0068] 图13A-13B示出了在用低PD-L1表达的N87靶细胞(图 13A)或中等PD-L1表达的JIMT-1靶细胞(图 13B)进行的CD137报告试验中,包括去免疫化的CD137结合结构域和/或去免疫化/优化的PD-L1结合结构域的**CD137 x TA 结合分子**介导靶依赖性信号转导的能力。绘制了**DART-A4、DART-A5、DART-A6、TRIDENT-A4、TRIDENT-A5、TRIDENT-A6**、比较剂**r-乌瑞鲁单抗**和阴性对照**hIgG1**的活性。

[0069] 图14A-14B示出了在原发性T细胞细胞因子释放试验中包括去免疫化的CD137结合结构域和去免疫化/优化的PD-L1结合结构域的**CD137 x TA 结合分子**介导细胞因子INF- γ (图 14A)和IL-2 (图 14B)的靶标依赖性释放的能力。绘制了**DART-A4、DART-A5、DART-A6、TRIDENT-A4、TRIDENT-A5、TRIDENT-A6**、比较物**r-乌瑞鲁单抗**和阴性对照**hIgG1**的活性。

[0070] 图 15A-15B 示出了包括亲本的或去免疫化/优化的PD-L1和/或CD137结合结构域的**CD137 x TA 结合分子**结合在工程化CHO细胞的细胞表面表达的PD-L1(图 15A)

和CD137(图 15B)的能力。绘制了

DART-A、DART-A4、DART-A6、DART-A7、DART-A10、抗PD-L1抗体hPD-L1 MAB-2 (1.1)和r-阿替利珠单抗以及阴性对照**hIgG1 (图 15A)、DART-A、DART-A4、DART-A6、DART-A7、DART-A10、r-乌瑞鲁单抗**和阴性对照**hIgG1 (图 15B)**的结合曲线。

[0071] 图 16A-16B 示出了在PD-L1报告试验中,包括亲本或去免疫化/优化的PD-L1和/或CD137结合结构域的**CD137 x TA 结合分子**阻断PD-L1/PD-1相互作用的能力。四价分子**DART-A、DART-A4、DART-A6、DART-A7、DART-A10**的结果绘制在图 16A中,三价分子**TRIDENT-A、TRIDENT-A4 和 TRIDENT-A6**的结果绘制在图16B中。在两个图上还绘制了抗PD-L1抗体**hPD-L1 MAB-2F**和**r-阿替利珠单抗**以及阴性对照**hIgG1**。

[0072] 图 17A-17B 示出了存在中等PD-L1表达的JIMT-1靶细胞(图 17A)或在不存在靶细胞(图 17B)中进行的CD137报告试验中,包括亲本的或去免疫化/优化的PD-L1和/或CD137结合结构域的**CD137 x TA 结合分子**介导靶依赖性信号转导的能力。绘制了**DART-A、DART-A4、DART-A6、DART-A7、DART-A10、TRIDENT-A、TRIDENT-A4、TRIDENT-A6、比较物r-乌瑞鲁单抗**和阴性对照**hIgG1**的活性。

[0073] 图 18A-18B 示出了包含亲本或去免疫化/优化的PD-L1和/或CD137结合结构域的**CD137 x TA 结合分子**介导细胞因子INF- γ (图 18A)和IL-2(图 18B)的靶依赖性释放的能力。绘制了**DART-A、DART-A4、DART-A6、DART-A7、DART-A10、TRIDENT-A、TRIDENT-A4、TRIDENT-A6、r-阿替利珠单抗和r-乌瑞鲁单抗**的组合(r-atezo+r-ure combo)和阴性对照**hIgG1**的活性。

[0074] 图 19A-19C 示出了在鼠PBMC重构异种移植模型中,相对于单独的**TA x CD3**双特异性分子或媒介物对照,几种代表性的**PD-L1 x CD137**双特异性分子:**DART-A (图 19A)、TRIDENT-A (图 19B)或 TRIDENT-A4 (图 19C)**,与代表性的**TA x CD3**双特异性分子(**5T4 x CD3**双抗体)组合在体内预防或抑制RK0结肠癌细胞的肿瘤生长或发育的能力。

[0075] 图 20A-20B 示出了在鼠PBMC重构异种移植模型中,相对于单独的**TA x CD3**双特异性分子或媒介物对照,几种代表性的**PD-L1 x CD137**双特异性分子:**DART-A6 (图 20A)或 TRIDENT-A6 (图 20B)**,与代表性**TA x CD3**双特异性

分子(**5T4 x CD3 双抗体**)组合在体内预防或抑制RK0结肠癌细胞的肿瘤生长或发育的能力。

[0076] **图 21A-21B**示出了在鼠PBMC重构异种移植模型中,相对于媒介物对照,几种代表性的**PD-L1 x CD137**双特异性分子:**TRIDENT-A**、包括**CD137 MAB-6**结合结构域的VH/VL的**TRIDENT-A6**或比较分子:**TRIDENT-2**、包括不同CD137结合结构域的VH/VL的DUO-1,与代表性的**TA x CD3**双特异性分子(**5T4 x CD3**双抗体)组合在体内预防或抑制RK0结肠癌细胞的肿瘤生长或发育的能力。来自第一项研究的代表性资料绘制在**图 21A**中,而来自第二项研究的代表性资料绘制在**图 21B**中。

[0077] **图 22A-22B**示出了在以中等HER2表达的JIMT-1细胞(**图 22A**)或高HER2表达的N87靶细胞(**图 22B**)进行的CD137报告试验中,包括CD137结合结构域和HER2结合结构域的**CD137 x TA 结合分子**介导靶依赖性信号转导的能力(**图 22A**)。绘制了**DART-B1、DART-B2、TRIDENT-B1、TRIDENT-B2**、亲本的hHER2 MAB-1 (1.3)和CD137 MAB-6 (1.1)抗体以及阴性对照**DART-4、DART-5、TRIDENT-3、TRIDENT-4**的活性。

[0078] **图 23A-23D**示出了在用中等HER2表达的JIMT-1细胞(**图 22A 和 23C**)或高HER2表达的N87靶细胞(**图 22B 和 23D**)进行的原代T细胞细胞因子释放试验中,包括CD137结合结构域和HER2结合结构域的**CD137 x TA 结合分子**介导细胞因子INF- γ (**图 23A 和 23B**)和IL-2(**图 23C 和 23D**)的靶标依赖性释放的能力。绘制了DART-B1、DART-B2、TRIDENT-B1、TRIDENT-B2、亲本的hHER2 MAB-1 (1.3)和CD137 MAB-6 (1.1)抗体以及阴性对照DART-4、DART-5、TRIDENT-3、TRIDENT-4的活性。详细描述

[0079] 本发明涉及能够结合CD137的表位的**CD137结合分子**,例如单特异性抗体以及包括其表位结合片段的分子。本发明进一步涉及能够与CD137的表位和第二抗原的表位两者结合的多特异性**CD137结合分子**(例如,双特异性抗体、双特异性双抗体、BiTE、三价结合分子等),第二抗原特别是肿瘤抗原(“TA”)(例如“**CD137 x TA 结合分子**”)。本发明还提供了能够与PD-L1的表位结合的新颖的**PD-L1结合分子**,例如单特异性抗体以及包括其表位结合片段的分子,及其衍生物和用途。本发明还涉及包含这种分子的药物组合物。本发明也包括这种分子在疾病的治疗中的用途,特别是在癌症或与存在免疫系统抑制有关或以存在免疫系统抑制为特征的疾病或疾病中的用途。

I. 抗体和其他结合分子

[0080] 本发明的**CD137 x TA 结合分子**可以是抗体或者可以衍生自抗体(例如,通过抗体多肽的片段化、切割等,或者通过使用抗体分子的氨基酸序列或编码此类多核苷酸的多核苷酸(或其序列)的氨基酸序列等)。

A. 抗体

[0081] **抗体**是能够通过至少一个位于免疫球蛋白分子的可变区的“**表位-结合位点**”特异性结合至分子(例如是碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等(“抗原”))的靶区域(“表位”)的免疫球蛋白分子。如本文使用的,术语“**抗体**”(“**antibody**”)和“**多种抗体**”(“**antibodies**”)是指单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、合成抗体、嵌合抗体、多克隆抗体、骆驼源化抗体、单链Fv(scFv)、单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的双特异性Fvs(sdFv)、胞内抗体和任何上述的表位结合片段。特别地,术语“抗体”包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子(即含有表位结合位点的分子)的免疫活性片段。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂)或子类。由于在这样的分子上存在特别的结构域或部分或构象(“**表位**”),抗体能够与多肽或蛋白质或非蛋白质分子“**免疫特异性结合**”。如本文使用的,“抗体的表位结合片段”旨在表示能够与表位免疫特异性结合的抗体的一部分。如本文使用的,该术语涵盖片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂ Fv)和单链(scFv)以及双抗体的表位-结合结构域。如本文使用的,抗体或其表位结合片段被认为“**免疫特异性**”结合另一个分子的区域(即**表位**),条件是相对于可选的表位该抗体或其表位结合片段以更频繁、更快速、更长持续时间和/或以更高的亲和力或亲合力与该表位反应或缔合。通过阅读该定义还应理解,例如,免疫特异性结合第一靶目标抗体或其**表位结合片段**可以或可以不特异性结合或优先结合第二靶标。含有表位的分子可具有免疫原活性,从而在动物中引发抗体生成应答。这样的分子被称为“**抗原**”。天然抗体仅能结合一个表位种类(即它们是“**单特异性的**”),尽管它们可以结合该种类的多个拷贝(即显示“**二价**”或“**多价**”)。

[0082] 术语“**单克隆抗体**”是指均质抗体群体,其中单克隆抗体包括参与抗原的选择性结合的氨基酸(天然存在或非天然存在)。单克隆抗体针对单个表位(或抗原性位点)具有高度特异性。术语“单克隆抗体”不仅涵盖完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体,还包括其片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂ Fv)、单链(scFv)、其突变体,包含抗体部分的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体和包括具有结合抗原的所需特异性和能力的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰构型。关于抗体的来源或制备方式(例如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等),不旨在受到限制。该术语包括完整的免疫球蛋白以及上文在“抗体”的定义下描述的片段等。制备单克隆抗体的方法是本领域已知的。可以采用的一种方法是Kohler,G.等人的方法(1975)“Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Preddefined Specificity,”Nature 256:495-497或其修改。典型地,在小鼠、大鼠或兔子中产生单克隆抗体。通过用免疫原量的含有所需表位的细胞、细胞提取物或蛋白质制剂对动物进行免疫来产生抗体。免疫原可以是但不限于原代细胞、培养的细胞系、癌细胞、蛋白质、肽、核酸或组织。可选地,可以通过本领域已知的任何方法对现有的单克隆抗体和对所需病原性表位具有免疫特异性的任何其他等效抗体进行测序和重组产生。在一个实施方式中,对这样的抗体测序,然后将多核苷酸序列克隆到载体中以表达或增殖。可以将编码感兴趣的抗体的序列保持在宿主细胞的载体中,然后可以将该宿主细胞扩增并冷冻以备将来使用。此类抗体的多核苷酸序列可用于基因操纵以产生本发明的单

特异性或多特异性(例如双特异性、三特异性和四特异性)分子以及亲和力优化的嵌合抗体、人源化抗体和/或骆驼化抗体以改善抗体的亲和力或其他特点。人源化抗体的一般原理涉及保留抗体的表位结合部分的基本序列,同时用人抗体序列交换抗体的非人剩余部分。

[0083] 在过去的几十年中,人们对抗体的治疗潜力重新产生了兴趣,并且抗体已成为生物技术衍生药物的主要类别之一。超过200种基于抗体的药物已被批准使用或正在开发中。

1. 抗体的一般结构特性

[0084] 天然存在的免疫球蛋白(例如,IgG)的基本结构单元是包括与两条较长的“**重链**”复合的两条较短的“**轻链**”的四聚体,通常表示为约150,000Da的糖蛋白。每条链包括含有“**可变结构域**”的氨基末端(“**N 末端**”)部分和含有至少一个“**恒定结构域**”的羧基末端(“**C 末端**”)部分。IgG轻链包括单个“**轻链可变结构域**”(“**VL**”)和单个“**轻链恒定结构域**”(“**CL**”)。因此,IgG分子的轻链的结构是**n-VL-CL-c**(其中n和c分别表示多肽的N-末端和C-末端)。IgG重链包括单个“**重链可变结构域**”(“**VH**”)、三个“**重链恒定结构域**”(“**CH1**”、“**CH2**”和“**CH3**”)和位于**CH1**和**CH2**结构域之间的“**铰链**”区域(“**H**”)。因此,IgG重链的结构是**n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c**(其中n和c分别代表多肽的N-末端和C-末端)。完整的、未修饰的抗体(例如IgG抗体)结合抗原的表位的能力取决于可变结构域的存在和序列。

a) 恒定结构域

(1) 轻链恒定结构域

[0085] 代表性的CL结构域是人IgG CL κ 结构域。代表性人CL κ 结构域的氨基酸序列为(**SEQ ID NO: 1**):

```
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG  
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK  
SFNRGEC
```

[0086] 可选地,代表性的CL结构域是人IgG CL λ 结构域。代表性的人CL λ 结构域的氨基酸序列为(**SEQ ID NO: 2**):

```
QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA  
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP  
TECS
```

(2) 重链CH1结构域

[0087] 代表性的CH1结构域是人IgG1 CH1结构域。代表性的人IgG1 CH1结构域的氨基酸序列为(**SEQ ID NO: 3**):

```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV
```

[0088] 代表性的CH1结构域是人IgG2 CH1结构域。代表性的人IgG2 CH1结构域的氨基酸序列为(**SEQ ID NO: 4**):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDPHKPS NTKVDKTV

[0089] 代表性的CH1结构域是人IgG3 CH1结构域。代表性的人IgG3 CH1结构域的氨基酸序列为(**SEQ ID NO: 5**) :

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNPKPS NTKVDKRV

[0090] 代表性的CH1结构域是人IgG4 CH1结构域。代表性的人IgG4 CH1结构域的氨基酸序列为(**SEQ ID NO: 6**) :

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVDPHKPS NTKVDKRV

(3) 重链铰链区

[0091] 代表性铰链区是人IgG1铰链区。代表性人IgG1铰链区的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:7**):

EPKSCDKTHT CPPCP

[0092] 另一代表性铰链区是人IgG2铰链区。代表性人IgG2铰链区的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:8**):

ERKCCVECPP CP

[0093] 另一代表性铰链区是人IgG3铰链区。代表性人IgG3铰链区的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:9**):

ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP
PPCPRCPEPK SCDTPPPCPR CP

[0094] 另一代表性铰链区是人IgG4铰链区。代表性人IgG4铰链区的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:10**):

E SKYGPPC PS CP

[0095] 如本文描述的, IgG4铰链区可包括稳定化突变比如S228P替换(如通过Kabat中的EU索引所编号)。代表性的稳定化的IgG4铰链区的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:11**):

ESKYGPPCPP CP

(4) 重链CH2和CH3结构域

[0096] 两条重链的CH2和CH3结构域相互作用以形成由细胞 **Fc受体** 识别的IgG抗体的“**Fc区**”, **Fc受体**包括但不限于Fcγ受体(**FcγR**)。如本文使用的, 术语“**Fc区**”用于限定IgG重链的C-末端区。Fc区的一部分(包括涵盖完整的Fc区的部分)在本文中称为“**Fc结构域**”。如果Fc区的氨基酸序列相对于其他IgG同种型与该同种型最同源, 则认为Fc结构域是特定的IgG同种型、类别或亚类的。除了其在诊断中的已知用途外, 已显示抗体可用作治疗剂。

[0097] 代表性人IgG1的CH2-CH3结构域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:12**):

```
231      240      250      260      270      280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

      290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

      340      350      360      370      380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

      390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

      440      447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

由Kabat中列出的EU索引编号,其中,**X**是赖氨酸(K)或不存在。

[0098] 代表性人IgG2的CH2-CH3结构域的氨基酸序列是**(SEQ ID NO:13)**:

```
231      240      250      260      270      280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD

      290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA

      340      350      360      370      380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE

      390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

      440      447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

由Kabat中列出的EU索引编号,其中,**X**是赖氨酸(K)或不存在。

[0099] 代表性人IgG3的CH2-CH3结构域的氨基酸序列是**(SEQ ID NO:14)**:

```
231      240      250      260      270      280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

      290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

      340      350      360      370      380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

      390      400      410      420      430
WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE

      440      447
ALHNRFTQKS LSLSPGX
```

由Kabat中列出的EU索引编号,其中,**X**是赖氨酸(K)或不存在。

[0100] 代表性人IgG4的CH2-CH3结构域的氨基酸序列是(**SEQ ID NO:15**):

```

231      240      250      260      270      280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

      290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

      340      350      360      370      380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

      390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME

      440      447
ALHNHYTQKS LSLSLGX

```

由Kabat中列出的EU索引编号,其中,**X**是赖氨酸(K)或不存在。

[0101] 遍及本说明书,IgG重链的恒定区中的残基的编号是如Kabat等的SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST,第5版,公共卫生署,NH1,MD(1991)(**“Kabat”**)中的EU索引的编号,其通过引用明确地并入本文。术语“Kabat中的EU索引”指人IgG1 EU抗体的恒定结构域的编号。

[0102] 在抗体恒定区内许多不同位置(例如,Fc位置,包括但不限于通过Kabat列出的EU索引所编号的位置270、272、312、315、356和358)已经观察到多态性,并且因此在所展示出的序列和现有技术中的序列之间可存在轻微差异。已经很好地表征了人免疫球蛋白的多态性形式。目前,18 Gm同种异型是已知的:G1m(1、2、3、17)或G1m(a、x、f、z)、G2m(23)或G2m(n)、G3m(5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28)或G3m(b1、c3、b3、b0、b3、b4、s、t、g1、c5、u、v、g5)(Lefranc等,“The Human IgG Subclasses:Molecular Analysis Of Structure,Function And Regulation.”Pergamon,Oxford,pp.43-78(1990);Lefranc,G.等1979,Hum.Genet.:50,199-211)。具体地,考虑本发明的抗体可并入任何免疫球蛋白基因的任何同种异型(allotype)、异种型(isoallotype)或单体型(haplotype),并且不限于本文提供的序列的同种异型、异种型或单体型。而且,在一些表达系统中,CH3结构域的C-末端氨基酸残基(上文粗体)可在翻译后去除。相应地,本发明的分子中,CH3结构域的C-末端残基是任选的氨基酸残基。具体地,本发明涵盖的是缺少CH3结构域的C-末端残基的本发明分子。同样具体地,本发明涵盖的是包括CH3结构域的C-末端赖氨酸残基的这种分子。

b) 可变结构域

[0103] IgG分子的可变结构域由三个“互补决定区”(“CDR”)以及称为“框架区”(“FR”)的间插非CDR区段组成,CDR含有抗体的将与表位接触的氨基酸残基,FR大体上维持CDR环的结构和确定CDR环的定位,以允许这种接触(尽管某些框架残基也可接触表位)。因此,VL和VH结构域具有结构n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c。CDR的氨基酸序列确定抗体是否将能够结合特定的表位。抗体轻链与抗体重链的相互作用,并且具体地,它们的VL和VH结构域的相互作用形成抗体的表位结合位点。

[0104] 来自免疫球蛋白的成熟重链和轻链的可变结构域的氨基酸是通过链中氨基酸的位置命名。Kabat(SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST,第5版,公共卫生

署,NH1,MD(1991))描述了抗体的许多氨基酸序列、鉴定了每个亚组的氨基酸共有序列并且为每个氨基酸指定了残基编码,并且鉴定CDR和FR,如通过Kabat定义(应理解,通过Chothia,C.&Lesk,A.M.((1987)“Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins,”J.Mol.Biol.196:901-917)定义的CDR_H1以较早的五个残基开始)。Kabat的编号方案可通过参照保守氨基酸将考虑的抗体与Kabat中的共有序列之一比对而扩展至不包括在其纲要中的抗体。用于指定残基编号的该方法在本领域中已经变成了标准,并且易于鉴定在包括嵌合或人源化变体的不同抗体中在等同位置处的氨基酸。例如,在人抗体轻链的位置50处的氨基酸占据与小鼠抗体轻链的位置50处的氨基酸等同的位置。因此,很好地定义了其CDR开始和结束处的VL和VH结构域内的位置并且可通过VL和VH结构域的序列检查确定(参见,例如,Martin,C.R.(2010)“Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains,”In:ANTIBODY ENGINEERING VOL.2(Kontermann,R.and Dübel,S.(eds.),Springer-Verlag Berlin Heidelberg,第3章(第33-51页))。

[0105] 是(或可用作)抗体轻链的第一、第二和第三CDR的多肽在本文中分别命名为:CDR_L1结构域、CDR_L2结构域和CDR_L3结构域。类似地,是(或可用作)抗体重链的第一、第二和第三CDR的多肽在本文中分别命名为:CDR_H1结构域、CDR_H2结构域和CDR_H3结构域。因此,术语CDR_L1结构域、CDR_L2结构域、CDR_L3结构域、CDR_H1结构域、CDR_H2结构域和CDR_H3结构域涉及这种多肽,当并入到蛋白质中时,引起该蛋白质能够结合特定表位,而无论是否这种蛋白质是具有轻链和重链的抗体或者是双抗体或单链结合分子(例如,scFv、BiTe等),或者是另一类型蛋白质。因此,如本文使用的,术语“表位结合片段”表示能够与表位免疫特异性结合的分子的片段。表位结合片段可含有抗体的任何1个、2个、3个、4个或5个CDR结构域,或可含有抗体的全部6个CDR结构域,并且,尽管能够免疫特异性结合至这种表位,但对不同于这种抗体的表位的这种表位可展示出免疫特异性、亲和力或选择性。典型地,然而,表位结合片段将含有这种抗体的全部6个CDR结构域。抗体的表位结合片段可以是单条多肽链(例如,scFv),或者可以包含两条或更多条多肽链,每条多肽链具有氨基末端和羧基末端(例如,双抗体、Fab片段、Fab2片段等)。除非特别指出,否则本文描述的蛋白质分子的结构域的顺序是在“N-末端至C-末端”方向上。

[0106] 表位结合位点可包括融合至恒定结构域的完全的可变结构域或仅接枝至合适的框架区的这种可变结构域的互补决定区(CDR)。表位结合位点可以是野生型或通过一个或多个氨基酸替换来修饰。

c) 抗体的人源化

[0107] 本发明特别地涵盖包括人源化抗体的VL和/或VH结构域的结合分子(包括抗体和双抗体)。术语“人源化”抗体指通常使用重组体技术制备的嵌合分子,其具有来自非人物种的免疫球蛋白的表位结合位点和基于人免疫球蛋白的结构和/或序列的分子的剩余免疫球蛋白结构。这种抗体的可变结构域的多核苷酸序列可用于遗传操纵以产生这种衍生物并且改善这种抗体的亲和力或其他特征。已知重链和轻链二者的可变结构域含有三个CDR,其根据讨论的抗原而变化并且确定结合能力,两侧为四个FR,其在给定物种中相对保守并且其假定为CDR提供了支架。当针对特定抗原制备非人抗体时,可变结构域可“重塑”或“人源化”。使抗体人源化的一般原则涉及保留抗体的表位结合部分的基本序列,同时用人抗体序

列交换该抗体的非人剩余部分。使单克隆抗体人源化有四个常规步骤。这些是：(1) 确定起始抗体轻链和重链可变结构域的核苷酸和预测的氨基酸序列，(2) 设计人源化抗体或犬源化抗体，即决定在人源化或犬源化过程期间使用哪个抗体框架区，(3) 实际的人源化或犬源化方法/技术和(4) 人源化抗体的转染和表达。参见，例如，U.S. 专利号4,816,567;5,807,715;5,866,692;以及6,331,415。

[0108] 已经描述了许多包含源自非人免疫球蛋白的表位-结合位点的人源化抗体分子，其包括具有啮齿动物或修饰的啮齿动物可变结构域的嵌合抗体及其与人恒定结构域融合的缔合的CDR (参见，例如，Lobuglio等，(1989) “Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 4220-4224 (1989))。其他参考文献描述了在与合适的人抗体恒定结构域融合之前接枝至人支持框架区 (FR) 的啮齿动物CDR (参见，例如，Riechmann, L. 等 (1988) “Reshaping Human Antibodies for Therapy,” Nature 332:323-327; 和 Jones 等 (1986) “Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse,” Nature 321:522-525)。另一参考文献描述了由重组修饰的啮齿动物框架区域支持的啮齿动物CDR。参见，例如，欧洲专利公开号519,596。这些“人源化”分子被设计为将对啮齿动物抗人抗体分子的不想要的免疫应答降至最低，这限制了这些部分在人类受体中治疗性应用的持续时间和有效性。也可以使用的人源化抗体的其他方法公开在Daugherty等的 (1991) “Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins,” Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 和 U.S. 专利号6,180,377;6,054,297 和 5,997,867 中。在一些实施方式中，人源化抗体保留全部CDR序列 (例如，包含来自小鼠抗体的全部六个CDR的人源化小鼠抗体)。在其他实施方式中，人源化抗体相对于原始抗体具有序列不同的一个或多个CDR (一个、两个、三个、四个、五个或六个)。

2. CD137结合结构域

[0109] 本发明涉及能够与CD137的表位结合的CD137结合分子，例如单特异性抗体，以及包含其表位结合片段的分子。下文提供了新颖的人单克隆抗体“CD137 MAB-6”的CD137结合结构域。本发明具体包括并涵盖CD137结合分子和多特异性CD137结合分子 (例如，双特异性抗体、双特异性双抗体、BiTE、三价结合分子等)，例如包括VL和/或VH结构域和/或CD137 MAB-6的VL区域CDR_L的1、2或全部3个和/或CD137 MAB-6的VH结构域的CDR_H的1、2或全部3个的CD137 x TA结合分子，或以下提供的其任何变体。

a) 人CD137 MAB-6

[0110] CD137MAB-6是新型的人类单克隆抗体。CD137 MAB-6 (CD137 MAB-6 VH1) 的VH结构域的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:46) (CDR_H残基用底线显示)。

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGR
IYTSGSTNYN PSLKSRVTMS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDDGW
YDEDYNYGYM DVWGQGTITVT VSS

[0111] CD137 MAB-6VH1的CDR_H的氨基酸序列为：

CDR_H1 (SEQ ID NO:47) :SYYWS

CDR_H2 (SEQ ID NO:48) :RIYTSGSTNYNPSLK

CDR_H3 (SEQ ID NO:49) : DGWYDEDYNYGMDV

[0112] CD137MAB-6 (CD137MAB-6VL1) 的VL结构域的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:50) (CDR_L 残基用底线显示) :

EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
 QGTKVEIK

[0113] CD137 MAB-6 VL1的CDR_L的氨基酸序列为:

CDR_L1 (SEQ ID NO:51) : RASQSVSSNYLS

CDR_L2 (SEQ ID NO:52) : GASTRAT

CDR_L3 (SEQ ID NO:53) : QQDYDLPWT

b) 去免疫化的CD137 MAB-6

[0114] 如以下示例中所述,将CD137 MAB-6的VL结构域去免疫化以产生具有氨基酸序列 SEQ ID NO:54的VL结构域,命名为“CD137 MAB-6 VL_x” (CDR_L残基用底线显示) :

EIVMTQSPAT LSLX₁PGERAT LSCRASQSVS SNYLSWX₂QQX₃ PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
 QGTKVEIK

其中:X₁、X₂和X₃被独立选择,并且

其中:X₁为S或T;X₂是F或Y;X₃是I或K。

[0115] 在特定实施方式中

a) X₁是S;X₂是Y;X₃是K;或者

b) X₁是S;X₂是F;X₃是K。

[0116] 下文给出了命名为CD137 MAB-6 VL2和CD137 MAB-6 VL3的CD137 MAB-6 VL结构域变体的氨基酸序列。任何变体VL结构域都可以与VH结构域配对。包括CD137 MAB-6 VH/VL结构域的特定组合的分子是通过参考具体的VH/VL结构域来提及的,例如,包括结合结构域CD137 MAB-6 VH1和CD137 MAB-6 VL3的分子具体称为“CD137 MAB-6 (1.3)”。

[0117] 变体CD137 MAB-6 VL2的氨基酸序列为 (SEQ ID NO:55) (CDR_L残基显示为底线) :

EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWYQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
 QGTKVEIK

[0118] 变体CD137 MAB-6 VL3的氨基酸序列为 (SEQ ID NO:56) (CDR_L残基显示为底线) :

EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
 QGTKVEIK

[0119] 任何这样的完全人的和/或变体VH和VL CD137 MAB-6结构域的CDR、VL结构域和/或VH结构域,包括在以上呈现的CD137 MAB-6 VL结构域的通用序列内包含的任何结构域,可以用于形成能够结合CD137的抗体、双抗体或结合分子。在某些实施方式中,本发明的CD137结合分子,包括CD137 x TA结合分子,包含CD137 MAB-6 VH1和CD137 MAB-6 VL3。

B. 双特异性抗体、多特异性双抗体和三价分子

如上所述,天然抗体仅能够结合一个表位种类,尽管它们可以结合该种类的多个拷贝。抗体结合抗原的表位的能力取决于抗体VL和VH结构域的存在和氨基酸序列。抗体的

轻链和重链的相互作用,特别地,其VL和VH结构域的相互作用形成了天然抗体(例如IgG)的两个表位结合结构域之一。天然抗体仅能结合一个表位种类(即它们是单特异性的),尽管它们可以结合该种类的多个拷贝(即展示二价或多价)。

抗体的官能度可以通过产生可同时结合两个分开且不同的抗原(或相同抗原的不同表位)的多特异性基于抗体的分子和/或通过产生对相同表位和/或抗原具有更高价态(即,多于两个结合结构域)的基于抗体的分子来增强。

[0120] 为了提供比天然抗体具有更大能力的分子,已经开发了多种重组双特异性抗体形式以产生这种双特异性抗体。

[0121] 大多数此类方法使用连接体肽来将进一步结合结构域(例如,scFv、VL、VH等)融合至抗体核(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)或抗体核内,或将多个抗体结合部分(例如,两个Fab片段或scFv)融合。可替代的形式使用连接体肽来将结合蛋白(例如,scFv、VL、VH等)融合至二聚化结构域比如CH2-CH3结构域或可替代的多肽(WO 2005/070966、WO 2006/107786A、WO 2006/107617A、WO 2007/046893)。PCT公开号WO 2013/174873、WO 2011/133886和WO 2010/136172公开了其中CL和CH1结构域从它们各自的天然位置转换的多特异性抗体,WO 2008/027236和WO 2010/108127公开了其中VL和VH结构域已经被多样化以允许它们结合一种以上的抗原的抗体。PCT公开号WO 2010/028797、WO2010028796和WO 2010/028795公开了已经用另外VL和VH结构域取代其Fc区的重组抗体,以便形成三价结合分子。PCT公开号WO 2003/025018和WO2003/012069公开了单个链含有scFv结构域的重组双抗体。PCT公开号WO 2013/006544公开了作为单条多肽链合成的并且然后进行蛋白水解以产生异源二聚化结构的多价Fab分子。因此,这些档中公开的分子将介导效应子功能的全部或部分能力换成结合另外抗原种类的能力。PCT公开号WO 2014/022540、WO 2013/003652、WO 2012/162583、WO 2012/156430、WO 2011/086091、WO 2008/024188、WO 2007/024715、WO 2007/075270、WO 1998/002463、WO 1992/022583和WO 1991/003493公开了将另外结合结构域或官能团添加至抗体或抗体部分(例如,将双抗体添加至抗体的轻链,或将另外VL和VH结构域添加至抗体的轻链和重链,或添加异源融合蛋白或彼此链接多个Fab结构域)。

[0122] 本领域还已注意到产生在能够结合两种或更多种不同的表位种类方面与天然抗体不同的双抗体的能力(即,除了二价或多价外,还展示出双特异性或多特异性)(参见,例如,Holliger等人,(1993)“Diabodies’:Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,”Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)90:6444-6448;US 2004/0058400(Hollinger等人);US 2004/0220388(Mertens等人);Alt等人,(1999)FEBS Lett.454(1-2):90-94;Lu, D.等人(2005)“A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,”J.Biol.Chem.280(20):19665-19672;Olafsen,T.等人(2004)“Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,”Protein Eng Des Sel.17(1):21-27;Baeuerle,P.A.等人,(2009)“Bispecific T cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy,”Cancer Res.69(12):4941-4944)。

[0123] 供应非单特异性“双抗体”提供了优于抗体的显著优势:共连接和共定位表达不同表位的细胞的能力。因此,双特异性双抗体具有广泛的应用,包括治疗和免疫诊断。双特异

性使双抗体在各种应用中的设计和工程化具有极大的灵活性,从而提供了对多聚抗原的增强亲和力、不同抗原的交联,并依赖于两种靶抗原的存在定向靶向特定的细胞类型。

[0124] 这样的非单特异性双抗体的形成需要两个或更多个独特且不同多肽的成功组装(即,这种形成需要通过不同多肽链种类的异质二聚化来形成双抗体)。面对这一挑战,本领域已成功开发出稳定的、共价结合的异质二聚体非单特异性双抗体,(参见,例如Chichili, GR等人(2015)“A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia:Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates,”*Sci.Transl.Med.*7 (289):289ra82;Veri,M.C.等人(2010)“Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIB(CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,”*Arthritis Rheum.*62 (7):1933-1943;Moore,P.A.等人(2011)“Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T cell Killing Of B-Cell Lymphoma,”*Blood* 117 (17):4542-4551;US专利公开号2007/0004909;2009/0060910;2010/0174053;20130295121;2014/0099318;2015/0175697;2016/0017038;2016/0194396;2016/0200827;和2017/0247452)。这样的双抗体包括两个或更多个共价复合的多肽,并且涉及将一个或多个半胱氨酸残基工程化至每个所采用的多肽种类。例如,已经显示在这样的构建体的C末端添加半胱氨酸残基允许多肽链之间的二硫键结合,稳定所得的异质二聚体而不会干扰二价分子的结合特点。

C.本发明的代表性CD137 x TA结合分子的组分

[0125] 本发明的CD137 x TA结合分子包括多肽,并且可以包括两条、三条、四条或更多于四条的多肽链。如本文所用,术语“包括”旨在是开放式的,使得包括两条多肽链的本发明的CD137 x TA结合分子可以具有另外的多肽链。这样的链可以具有与结合分子的另一多肽链相同的序列,或者可以与结合分子的任何其他多肽链在序列上是不同的。

1.代表性的“接头”肽

[0126] 本发明的CD137 x TA结合分子的多肽包括结构域,所述结构域在另一结构域之后、之前和/或通过“接头”肽例如接头1、接头2、接头3等彼此连接。尽管本发明利用某些特定的“接头”肽,但根据本文提供的教导,可以容易地鉴定和采用可选的接头以实现CD137 x TA结合分子。

[0127] 选择分开多肽链的VL和VH结构域的接头1的长度以基本上或完全防止这样的VL和VH结构域彼此结合(例如,长度为12个或更少的氨基酸残基)。因此,第一多肽链的VL1和VH2结构域基本上或完全不能彼此结合,并且不形成能够基本上结合第一或第二抗原的表位结合位点。同样地,第二多肽链的VL2和VH1结构域基本上或完全不能彼此结合,并且不形成能够基本上结合第一或第二抗原的表位结合位点。代表性的间插接头肽(接头1)具有氨基酸序列(SEQ ID NO:16):GGGSGGGG,其太短以至于不能使同一多肽链的VL和VH结构域复合在一起(与用于产生scFv分子的较长的间插接头肽(例如GGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:17)不同)。

[0128] 接头2的一个目的是将多肽链的VH结构域与该多肽链的任选存在的异质二聚体-促进结构域分开。可以将各种接头中的任一种用于接头2的目的。此类接头2的代表性序列包含氨基酸序列:GGCGGG(SEQ ID NO:18),其具有半胱氨酸残基,该半胱氨酸残基可用于经

由源自IgG CH1结构域的二硫键或ASTKG (SEQ ID NO:19) 将第一和第二多肽链彼此共价地结合。由于接头2,ASTKG (SEQ ID NO:19) 不具有这样的半胱氨酸,因此此类接头2的使用通常与含半胱氨酸的异质二聚体促进结构域(例如SEQ ID NO:39的E螺旋或SEQ ID NO:40的K螺旋)的使用相关联(见下文)。

[0129] 接头3的一个目的是将多肽链的异质二聚体-促进结构域与该多肽链的Fc结构域分开。第二个目的是提供含半胱氨酸的多肽结构域。可以将多种接头中的任一种用于接头3。此类接头3的代表性序列包含氨基酸序列:DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:20)。接头3的另一个代表性序列包括氨基酸序列:GGGGDKHTCPPCP (SEQ ID NO:21)。接头3的其他代表性序列包括氨基酸序列:LEPKSADKHTCPPCP (SEQ ID NO:30) 或LEPKSSDKHTCPPCP (SEQ ID NO:31)。

[0130] 接头4的一个目的是将Fc区(“Fc结构域”)的CH 2-CH 3结构域的C末端与VL结构域的N末端分开。可以将多种接头中的任一种用于接头4。此类接头4的代表性序列包括氨基酸序列:APSSS (SEQ ID NO:22) 或氨基酸序列APSSSPME (SEQ ID NO:23)、氨基酸序列GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:24) 或氨基酸序列GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:25)。

[0131] 本发明的含有Fc区的分子可以包括另外的间插接头肽(接头),通常这样的接头将被并入异质二聚体-促进结构域(例如E-螺旋或K-螺旋)和CH2-CH3结构域和/或CH2-CH3结构域和可变结构域(即VH或VL)之间。典型地,另外的接头将包括3-20个氨基酸残基,并且可以任选地包含全部或部分的IgG铰链区(优选地,IgG铰链区的含有半胱氨酸的部分)。可以在本发明的双特异性含Fc区的双抗体分子中采用的接头包括:GGC、GGG、ASTKG (SEQ ID NO:19),DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:20),APSSS (SEQ ID NO:22),APSSSPME (SEQ ID NO:23),GGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO:24),GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:25),LGGGSG (SEQ ID NO:26),GGGS (SEQ ID NO:27),LEPKSS (SEQ ID NO:28),VEPKSADKHTCPPCP (SEQ ID NO:29),LEPKSADKHTCPPCP (SEQ ID NO:30) 和LEPKSSDKHTCPPCP (SEQ ID NO:31)。为了易于克隆,可以使用LEPKSS (SEQ ID NO:28) 代替GGG或GGC。另外,氨基酸GGG或LEPKSS (SEQ ID NO:28) 可以紧随其后的是DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:20),以形成可替代的接头:GGGKHTCPPCP (SEQ ID NO:21);和LEPKSSDKHTCPPCP (SEQ ID NO:31)。本发明的双特异性含Fc区的分子可以并入IgG铰链区,例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体的IgG铰链区或其一部分。

2. 代表性的异质二聚体促进结构域

[0132] 如上所述,本发明的CD137 x TA结合分子的形成涉及两个或更多个不同多肽链的组装(即,异质二聚化)。第一和第二多肽链的异质二聚体的形成可以通过包含“异质二聚体-促进结构域”来驱动。异质二聚体促进结构域可以是一条多肽链上的IgG的铰链区的结构域(或衍生自铰链区的多肽,例如,GVEPKSC (SEQ ID NO:32)、VEPKSC (SEQ ID NO:33) 或AEPKSC (SEQ ID NO:34)) 和另一条多肽链上的CL结构域(或衍生自CL结构域的多肽,例如GFNRGEC (SEQ ID NO:35) 或FNRGEC (SEQ ID NO:36)) (US2007/0004909)。

[0133] 可选地,本发明的异质二聚体-促进结构域将包括串联重复的相反电荷的螺旋结构域,例如“E-螺旋”螺旋结构域(**SEQ ID NO: 37: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK)**,其谷氨酸残基将在pH 7时形成负电荷,而另一个异质二聚体促进结构域将包括四个串联的“K-螺旋”结构域(**SEQ ID NO: 38: KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK)**,其赖氨酸残基将在pH 7时形成正电荷。此类带电结构域的存在促进了第一多肽和第二多肽之

间的缔合,从而促进了异质二聚化。在另一个实施方式中,利用了异质二聚体-促进结构域,其中SEQ ID NO:37的四个串联“E-螺旋”螺旋结构域之一已被修饰为包含半胱氨酸残基:

EVAACEK-EVAALEK- EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39)。相似地,在另一个实施方式中,利用了异质二聚体-促进结构域,其中SEQ ID NO:38的四个串联“K-螺旋”螺旋结构域之一已被修饰为包含半胱氨酸残基:

KVAACKE-KVAALKE-

KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)。

3. 多肽链的共价结合

[0134] 对本发明的CD137 x TA结合分子进行工程化,以使其多肽链对通过沿其长度定位的一个或多个半胱氨酸残基彼此共价结合,以产生共价缔合的分子复合物。可以将此类半胱氨酸残基引入将多肽的VL和VH结构域分开的间插接头中。任选地或可选地,接头2或接头3,或可选的接头可含有半胱氨酸残基。任选地或可选地,含螺旋的异质二聚体-促进结构域的一个或多个螺旋结构域将包括氨基酸置换,该氨基酸置换并入了如SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:40中的半胱氨酸残基。

4. 代表性的Fc结构域

[0135] 本发明的具有Fc的CD137 x TA结合分子的Fc结构域可以包括完整的Fc区(例如,完整的IgG Fc区)或仅完整的Fc区的片段。因此,本发明的具有Fc的CD137 x TA结合分子的Fc结构域可包括完整Fc区的一些或全部CH2结构域和/或一些或全部CH3结构域,或可包括变体CH2和/或变体CH3序列(其可包括例如相对于完整Fc区的CH2或CH3结构域的一个或多个插入和/或一个或多个缺失)。本发明的双特异性Fc双抗体的Fc结构域可包括非Fc多肽部分,或可包括非天然完整Fc区的部分,或可包括CH2和/或CH3结构域的非天然存在的定向(比如,例如,两个CH2结构域或两个CH3结构域,或在N末端至C末端的方向上,CH3结构域连接到CH2结构域等)。

[0136] 尽管本发明的具有Fc的CD137 x TA结合分子的Fc结构域可以包括天然存在的Fc结构域的氨基酸序列,可期望形成此类Fc结构域的CH2-CH3结构域包含一个或多个置换,从而使所得的Fc结构域展示减少(例如,如果具有含有天然存在的Fc区的氨基酸序列的Fc结构域,则为该分子展示的结合的小于50%、小于40%、小于30%、小于20%或小于10%)或基本上无法检测到与Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a)或Fc γ RIIB (CD16b)结合(相对于野生型Fc区展示的结合)。能够介导这种改变的结合的Fc变体和突变体形式是本领域众所周知的,并且包括在选自以下的一个或多个位置处的氨基酸置换:234、235、265和297,其中所述编号是在Kabat中的EU索引的编号(例如,参见美国专利号5,624,821)。在一个实施方式中,本发明的具有Fc的分子的第一和/或第三多肽链的CH2-CH3结构域包括置换:L234A、L235A、D265A、N297Q和N297G中的任何1、2、3或4个。可选地,利用这样的天然存在的Fc区的CH2-CH3结构域,其固有地展示与Fc γ RIIIA (CD16a)的结合降低(或基本没有)和/或效应子功能降低(相对于野生型IgG1 Fc区 (SEQ ID NO:12)展示的结合和效应子功能)。在一个具体的实施方式中,本发明具有Fc的分子包括IgG2 Fc区 (SEQ ID NO:13)或IgG4 Fc区 (SEQ ID NO:15)。当使用IgG4 Fc区时,本发明还涵盖稳定突变的引入,例如上述的铰链区S228P置换(参见,例如,SEQ ID NO:11)。

[0137] 在代表性的实施方式中,本发明的所采用的具有Fc的CD137 x TA结合分子的IgG1

CH2-CH3结构域包括在位置234处被丙氨酸置换和在位置235处被丙氨酸置换,其中所述编号是在Kabat中的EU索引的编号(SEQ ID NO:41):

APE**AA**GGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

其中,X是赖氨酸(K)或不存在。

[0138] 可以通过增加Fc区对FcRn的结合亲和力来增加包括Fc区的蛋白质的血清半衰期。如本文使用的,术语“半衰期”是指分子的药代动力学性质,其是施用分子后分子的平均存活时间的量度。半衰期可以表达为从受试者的身体(例如,人患者或其他哺乳动物)或其具体的隔室中消除分子的已知量的百分之五十(50%)所需的时间,例如,在血清中测量的,即循环半衰期,或在其他组织中测量的。一般而言,半衰期的增加导致所施用分子在循环中平均停留时间(MRT)的增加。

[0139] 在一些实施方式中,本发明的具有Fc的CD137 x TA结合分子包括变体Fc区,其中所述变体Fc区包括相对于野生型Fc区的至少一种氨基酸修饰,使得所述分子具有增加的半衰期(相对于包括野生型Fc区的分子)。在一些实施方式中,本发明的具有Fc的CD137 x TA结合分子包括变体IgG Fc区,其中所述变体Fc区包括半衰期延长的氨基酸置换。能够增加具有Fc的分子的半衰期的许多氨基酸置换在本领域中是已知的,例如参见美国专利号6,277,375、7,083,784、7,217,797、8,088,376;美国公开号2002/0147311、2007/0148164和2011/0081347中所描述的氨基酸置换。具有增强的半衰期的具有Fc的CD137 x TA结合分子可以包括选自以下的两个或更多个置换:T250Q、M252Y、S254T、T256E、K288D、T307Q、V308P、A378V、M428L、N434A、H435K和Y436I,其中所述编号与Kabat中的EU索引的编号相同。

[0140] 特别地,所采用的CH 2-CH 3结构域可以包含置换:

- (A) M252Y,S254T和T256E;
- (B) M252Y和S254T;
- (C) M252Y和T256E;
- (D) T250Q和M428L;
- (E) T307Q和N434A;
- (F) A378V和N434A;
- (G) N434A和Y436I;
- (H) V308P和N434A;
- (I) K288D和H435K;或
- (J) M428L和N434S,

其中所述编号是Kabat中的EU索引的编号。

[0141] CH2和CH3结构域的代表性序列包含三重氨基酸置换:M252Y/S254T/T256E(YTE),其明显增强了血清半衰期(Dall'Acqua,WF等人,(2006) Properties of Human IgGs Engineered for Enhanced Binding to the Neonatal Fc Receptor (FcRn),” J.Biol.Chem.281(33):23514-23524),如SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:43(其是IgG1 CH2-CH3结构域的变体)中,或如SEQ ID NO:44(其是IgG4 CH2-CH3结构域的变体)中:

SEQ ID NO:42:

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX

其中,X是赖氨酸(K)或不存在。

SEQ ID NO:43:

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX

其中,X是赖氨酸(K)或不存在。

SEQ ID NO:44:

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHE
ALHNHYTQKS LSLSLGX

其中,X是赖氨酸(K)或不存在。

[0142] 本发明也涵盖具有Fc的CD137 x TA结合分子,其包括展示出改变的效应子功能、改变的血清半衰期、改变的稳定性、改变的对细胞酶敏感性或改变的效应子功能的Fc结构域,如在NK依赖性巨噬细胞依赖性测定中测定的。被鉴定为改变效应子功能的Fc结构域修饰是本领域已知的,包括增加与启动受体(例如Fc γ RIIA (CD16A))的结合并减少与抑制性受体(例如Fc γ RIIB (CD32B))的结合的修饰(参见,例如Stavenhagen, JB等人(2007) “Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fc γ Receptors,” Cancer Res. 57 (18) :8882-8890)。具有减少的与CD32B的结合和/或增加的与CD16A的结合的人IgG1 Fc结构域的代表性变体包含L235V、F243L、R292P、Y300L、V305I或P296L置换。这些氨基酸置换可以以任何组合存在于人IgG1 Fc结构域中。在一个实施方式中,人IgG1 Fc结构域变体包含F243L、R292P和Y300L置换,其中所述编号是如Kabat中的EU索引的编号。在另一个实施方式中,人IgG1 Fc结构域变体包含F243L、R292P、Y300L、V305I和P296L置换,其中所述编号是如Kabat中的EU索引的编号。在另一个实施方式中,人IgG1 Fc结构域变体包含L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L置换,其中所述编号是如Kabat中的EU索引的编号。

[0143] 本发明的CD137 x TA结合分子的CH2和/或CH3结构域不必在序列上相同,并且有利地被修饰以促进两个具有CH2-CH3的多肽链之间的异质二聚化。例如,可以将氨基酸置换(优选地,用包含形成“杵(knob)”的庞大侧基的氨基酸例如色氨酸的取代)引入CH2或CH3结构域,使得空间干扰将防止与类似突变的结构域的相互作用,并将使突变的结构域与已经设计了互补或适应性突变的结构域配对,即“臼(hole)”(例如,用甘氨酸的置换)。可以将这

样的突变组工程化成任何对的包括双特异性具有Fc双抗体分子的多肽,并且进一步工程化成所述对的多肽链的任何部分。蛋白质工程化以相对于同源二聚化支持异质二聚化的方法在本领域是众所周知的,尤其是在免疫球蛋白样分子的工程化方面,并且包括在本文中(参见,例如,Ridgway等人(1996)“‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,”Protein Engr.9:617-621,Atwell等人(1997)“Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,”J.Mol.Biol.270:26-35,and Xie等人(2005)“A New Format Of Bispecific Antibody:Highly Efficient Heterodimerization,Expression And Tumor Cell Lysis,”J.Immunol.Methods 296:95-101;在此通过引用将每个文献的全部内容并入本文。在一个实施方式中,把杵工程化到第一多肽链的CH2-CH3结构域中,而臼被工程化到第三多肽链的CH2-CH3结构域中。因此,杵将有助于防止第一多肽链的两个分子通过其CH2和/或CH3结构域同源二聚化。由于该实施方式的第三多肽链包含臼置换,它将具有与第一多肽链异质二聚化以及与自身同源二聚化的能力(但是,这种同源二聚化不形成具有表位结合位点的分子)。通过修饰天然IgG Fc结构域以包含修饰T366W来形成代表性杵,其中所述编号是如Kabat中的EU索引的编号。通过修饰天然IgG Fc结构域以包含修饰T366S、L368A和Y407V来产生代表性臼,其中所述编号是如Kabat中的EU索引的编号。为了帮助从包括第一和第三多肽链的异质二聚体的最终双特异性具有Fc的双抗体中纯化第三条肽链同源二聚体,第三多肽链的CH2和CH3结构域的蛋白A结合位点优选通过位置435处的氨基酸置换(H435R)被突变,其中所述编号是与Kabat中相同的EU索引的编号。因此,第三多肽链同源二聚体将不结合蛋白A,而适当装配的双特异性具有Fc的双抗体将保持其通过第一多肽链上的蛋白A结合位点结合蛋白A的能力。

[0144] SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:146和SEQ ID NO:147提供了可在本发明的CD137 x TA结合分子中使用的“具有杵的”CH2和CH3结构域的代表性序列:

SEQ ID NO:45:

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSL**WCL**VK GFYPDSIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFL**Y**SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHN**H**YTQKS LSLSPG**X**

其中,X是赖氨酸(K)或不存在,,

SEQ ID NO:146:

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT **LYITRE**PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSL**WCL**VK GFYPDSIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNH**Y**TQKS LSLSPG**X**

其中,X是赖氨酸(K)或不存在,,

SEQ ID NO:147:

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKS LSLSLGX

其中,X是赖氨酸(K)或不存在,

[0145] SEQ ID NO:148、SEQ ID NO:149和SEQ ID NO:150提供了可用于本发明的CD137 x TA结合分子的“具有白的”CH2和CH3结构域的代表性序列:

SEQ ID NO:148:

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQOG NVFSCSVMHE
 ALHNRYTQKS LSLSPGX

其中,X是赖氨酸(K)或不存在。

SEQ ID NO:149:

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQOG NVFSCSVMHE
 ALHNRYTQKS LSLSPGX

其中,X是赖氨酸(K)或不存在。

SEQ ID NO:150:

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
 ALHNRYTQKS LSLSLGX

其中,X是赖氨酸(K)或不存在。

[0146] 如将注意到的,SEQ ID NO:47和50的CH2-CH3结构域是IgG4结构域,而SEQ ID NO:45、146、148和149的CH2-CH3结构域是IgG1结构域。SEQ ID NOs:45、146、148和149包括在位置234处以丙氨酸的置换和在位置235处以丙氨酸的置换,因此形成Fc结构域,该结构域展示出与Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a)或Fc γ RIIB (CD16b)结合的减少(或基本上没有)(相对于野生型Fc区(SEQ ID NO:12)展示的结合)。本发明具体地涵盖CD137 x TA结合分子,其包括来自包括本文所述的置换(例如,M252Y/S254T/T256E;T366W;T366S/L368A/Y407V;和/或H435R)的任何类别的人IgG的CH2-CH3结构域。此外,本发明具体包括的是缺少上述C末端赖氨酸残基的CD137 x TA结合分子构建体。

[0147] 在上述实施方式中,第一多肽链将具有“具有杵的”CH2-CH3序列,比如SEQ ID NO:45、146和147的CH2-CH3序列,而第三条肽链将具有“具有白的”CH2-CH3序列,例如SEQ ID

N0:148、149和150的CH2-CH3序列。但是,如将认识到的,可以在第一多肽链中使用“具有白的”CH2-CH3结构域(例如,SEQ ID N0:48),在这种情况下,在第三多肽链中将采用“具有杵的”CH2-CH3结构域(例如,SEQ ID N0:45)。

5、代表性肿瘤抗原(TA)和代表性可变结构域

[0148] 本发明的CD137 x TA结合分子包括至少一种对肿瘤抗原的表位具有特异性的表位-结合位点。可以被本发明的CD137 x TA结合分子结合的代表性肿瘤抗原(“TA”)包括但不限于表1中给出的那些,并且在本文中可以用通用名称、简称和/或基因名称来提及。

表 1.代表性肿瘤抗原		
蛋白质肿瘤抗原	基因名称(s)	详见, 例如, UniProtKB ID 号
α -N-乙酰半乳糖胺 α -2,6-唾液酸转移酶 6	ST6GALNAC6; CA19-9	Q969X2
5,6-二羟基吡啶-2-羧酸氧化酶	TYRP1; gp75	P17643
启动的白细胞粘附分子	ALCAM; CD166	Q13740

表 1.代表性肿瘤抗原

蛋白质肿瘤抗原	基因名称(s)	详见, 例如, UniProtKB ID 号
α -1,4-N-乙酰葡萄糖氨基转移酶	A4GNT	Q9UNA3
B 黑素瘤抗原 1	BAGE; CT2.1	Q13072
Basigin	BSG; CD147	P35613
B 细胞抗原受体复合物-相关的蛋白 α 链	CD79A	P11912
B 细胞抗原受体复合物-相关的蛋白 β 链	CD79B	P40259
B-细胞受体 CD22	BL-CAM; CD22	P20273
B-淋巴细胞抗原 CD19	CD19	P15391
B-淋巴细胞抗原 CD20	MS4A1; CD20	P11836
骨髓基质抗原 2	BST2; CD317	Q10589
坎帕斯(campath)-1 抗原	CD52	P31358
碳酸酐酶 14	CA14	Q9ULX7
羧肽酶 M	CPM	P14384
癌胚抗原-相关的细胞粘附分子 5	CEACAM5; CD66e	P06731
癌胚抗原-相关的细胞粘附分子 6	CEACAM6; CD66c	P40199
连环蛋白 β -1	CTNNB1; β -连环蛋白	P35222
CD27 抗原	CD27	P26842
CD276 抗原	CD276; B7-H3	Q5ZPR3
CD40 配体	CD40LG; CD154	P29965
细胞表面 A33 抗原	GPA33	Q99795
硫酸软骨素蛋白聚糖 4	CSPG4	Q6UVK1
C 型凝集素结构域家族成员 4C	CLEC4C; BDCA2; CD303	Q8WTT0
细胞周期蛋白依赖性激酶 4	CDK4	P11802
细胞毒性 T 淋巴细胞蛋白 4	CTLA4	P16410
含有解聚素和金属蛋白酶结构域的蛋白质 9	ADAM-9	Q13443

表 1.代表性肿瘤抗原

蛋白质肿瘤抗原	基因名称(s)	详见, 例如, UniProtKB ID 号
肝配蛋白 A 型受体 2	EPHA2	P29317
表皮生长因子受体	EGFR; ERBB1; HER1	P00533
上皮细胞粘附分子	EPCAM; CD326	P16422
G 抗原 1	GAGE1; CT4.1	Q13065
G 抗原 2A	GAGE2A	Q6NT46
G 抗原 2B/C	GAGE2B	Q13066
G 抗原 2D	GAGE2D	Q9UEU5
G 抗原 2E	GAGE2E	Q4V326
G2 /有丝分裂特异性细胞周期蛋白 B1	CCNB1	P14635
GDP-L-岩藻糖合酶	TSTA3	Q13630
谷氨酸羧肽酶 2	FOLH1; PSMA	Q04609
透明质酸酶-2	HYLA2; LUCA2	Q12891
非活性酪氨酸-蛋白激酶跨膜受体 ROR1	ROR1, NTRKR1	Q01973
整联蛋白 α -E	ITGAE; CD103	P38570
整联蛋白 β -6	ITGB6	P18564
白细胞介素-13 受体亚基 α -2 (CD123 的亚基, 白细胞介素-3 受体)	IL13RA2; CD213a2	Q14627
白细胞介素-2 受体亚基 α	IL2RA; CD25	P01589
连接黏附分子 C	JAM3	Q9BX67
角蛋白, II 型细胞骨架 8	CK-8; KRT8	P05787
乳凝集素	MFGE8	Q08431
低亲和力免疫球蛋白 ϵ Fc 受体	FCER2; CD23	P06734
黑素细胞蛋白 PMEL	PMEL; gp100	P40967
T 细胞识别的黑素瘤抗原 1	MLANA; MART1	Q16655
黑素瘤相关抗原 1	MAGEA1; MAGE1	P43355

表 1.代表性肿瘤抗原

蛋白质肿瘤抗原	基因名称(s)	详见, 例如, UniProtKB ID 号
黑素瘤相关抗原 3	MAGEA3; MAGE3	P43357
黑素转铁蛋白	MELTF; MAAp97; CD228	P08582
膜辅助因子蛋白	CD46	P15529
间皮素	MSLN	Q13421
粘蛋白-1	MUC1; PEM	P15941
粘蛋白-16	MUC16; CA-125	Q8WXI7
骨髓细胞表面抗原 CD33	CD33	P20138
神经细胞粘附分子 1	NCAM1; CD56	P13591
制癌蛋白-M	OSM	P13725
制癌蛋白-M-特异性受体亚基 β	OSMR; IL31RB	Q99650
血小板糖蛋白 4	CD36	P16671
程序性细胞死亡 1 配体 1	CD274	Q9NZQ7
前列腺素受体 GPR37	GPR37	O15354
前列腺特异性抗原	KLK3; PSA	P07288
前列腺酸磷酸酶	ACPP	P15309
蛋白质 PML	PML; TRIM19; Myl	P29590
包含 PWWP 结构域的 DNA 修复因子 3A	PWWP3A; MUM1	Q2TAK8
受体酪氨酸-蛋白激酶 erbB-2	ERBB2; HER2; CD340	P04626
受体酪氨酸-蛋白激酶 erbB-3	ERBB3; HER3	P21860
受体酪氨酸-蛋白激酶 erbB-4	ERBB4; HER4	Q15303
受体型酪氨酸-蛋白磷酸酶 C	PTPRC; CD45	P08575
T-细胞表面糖蛋白 CD5	CD5	P06127
T-细胞特异性表面糖蛋白 CD28	CD28	P10747
转铁蛋白受体蛋白 1	TFRC; CD71	P02786

表 1.代表性肿瘤抗原

蛋白质肿瘤抗原	基因名称(s)	详见, 例如, UniProtKB ID 号
跨膜 4 L6 家族成员 1	TM4SF1; TAAL6	P30408
滋养层糖蛋白	TPBG; 5T4	Q13641
肿瘤坏死因数受体超家族成员 10B	TNFRSF10B; DR5; CD262	O14763
肿瘤坏死因数受体超家族成员 1A	TNFRSF1A; TNFR1; CD120a	P19438
肿瘤坏死因数受体超家族成员 1B	TNFRSF1B; TNFR2; CD120b	P20333
肿瘤坏死因数受体超家族成员 3	LTBR; TNFR3	P36941
肿瘤坏死因数受体超家族成员 5	CD40	P25942
肿瘤坏死因数受体超家族成员 6	TNFR6; Apo-1; Fas; CD95	P25445
泛素结合酶 E2 K	UBE2K	P61086
泛素蛋白连接酶 E3A	UBE3A	Q05086
血管内皮生长因子 A	VEGFA	P15692
血管内皮生长因子 B	VEGFB	P49765
血管内皮生长因子受体 1	FLT1; VEGFR1	P17948
血管内皮生长因子受体 2	KDR; VEGFR2; CD309	P35968
血管内皮生长因子受体 3	FLT4; VEGFR3	P35916
锌指蛋白 354C	ZNF354C; KID3	Q86Y25
其他肿瘤抗原	详见例如, 引文	
3-岩藻糖基-N-乙酰氨基乳糖	Gooi, H.C. (1983), "Marker of peripheral blood granulocytes and monocytes of man recognized by two monoclonal antibodies VEP8 and VEP9 involves the trisaccharide 3-fucosyl-N-acetyllactosamine," Eur. J. Immuno. 13(4):306-12.	
血型 A 抗原	Gooi, H.C.等人, (1983), "Monoclonal antibody reactive with the human epidermal-	

表 1.代表性肿瘤抗原

蛋白质肿瘤抗原	基因名称(s)	详见, 例如, UniProtKB ID 号
	growth-factor receptor recognizes the blood-group-A antigen," Biosci. Rep. 3(11):1045-52.	
双岩藻糖基 1 型链(Aleb) 双岩藻糖基 2 型链(ALey)	Dohi, T. 等人, (1989), "Immunohistochemical Study of carbohydrate antigen expression in gastric carcinoma," Gastroenterol Jpn. 24(3): 239-45; Yazawa, S. 等人 (1993), "Aberrant alpha1->2Fucosyltransferases Found in Human Colorectal Carcinoma Involved in the Accumulation of Leb and Y Antigens in Colorectal Tumors," Jpn. J. Cancer Res. 84:989-995	
神经节苷脂抗原 4.2	Nudelman, E. 等人, (1982), "Characterization of a human melanoma-associated ganglioside antigen defined by monoclonal antibody, 4.2," J. Biol. Chem. 257(21): 12752-6	
神经节苷脂抗原 D1.1	Levine, J.M., 等人, (1984), "The D1.1 antigen: a cell surface marker for germinal cells of the central nervous system," J. Neurosci. 4(3):820-31	
神经节苷脂 GD2/GD3/GM2/GM3	Krengel, U. and Bousquet P.A. (2014), "Molecular Recognition of Gangliosides and Their Potential for Cancer Immunotherapies," Front. Immuno. 5(325):1-11	
乳糖神经酰胺	Symington, F.W. (1984), "Monoclonal Antibody Specific for Lactosylceramide," J. Biol. Chem. 259(9):6008-6012	
Rh 抗原 (D、C、c、E 或 e)	Avent, N.D.和 Reid, M.E. (2000), "The Rh blood group system: a review," Blood 95:375-387	
唾液酸-Tn	Holmberg, L.A. (2001) "Theratope 疫苗 (STn-KLH)," Expert Opin. Biol. Ther. 1(5):881-91	

[0149] 识别TA的抗体是本领域已知的,或者可以使用包括本文所述的那些众所周知的方法来产生。表2中列出了代表性抗体,其包含能够结合TA的VL和VH结构域,因此其序列或多肽链可用于构建本发明的CD137 x TA结合分子。结合几种肿瘤抗原的抗体的代表性VH和VL结构域如下所示。

表 2

抗体名称	肿瘤抗原	治疗性靶向应用
阿巴伏单抗	CA-125	卵巢癌
Adecatumumab	Epcam	前列腺癌和乳腺癌
阿托珠单抗	CD20	淋巴瘤
阿珠单抗	VEGFR2	癌症
阿妥莫单抗	CEA	结直肠癌
阿麦妥昔单抗	间皮蛋白	癌症
麻安莫单抗	TAG-72	非小细胞肺癌
Anifrolumab	干扰素 A/B 受体	系统性红斑狼疮
Anrukinzumab	IL-13	癌症
Apolizumab	HLA-DR	血液癌症
阿西莫单抗	CEA	胃肠癌
阿替奴单抗	RTN4	癌症
贝妥莫单抗	CD22	非霍奇金淋巴瘤 (检测)
贝利木单抗	BAFF	非霍奇金淋巴瘤
贝伐单抗	VEGF-A	转移癌症, 早产儿视网膜病
比伐单抗	CD44 V6	鳞状细胞癌
兰妥莫单抗	CD19	癌症
本妥昔单抗	CD30 (TNFRSF8)	血液系统癌症
坎妥珠单抗	MUC1	癌症
莫坎妥珠单抗	粘蛋白 Canag	结直肠癌
卡普塞珠单抗	VWF	癌症
卡罗单抗	前列腺癌细胞	前列腺癌(检测)
卡鲁单抗	MCP-1	肿瘤学/免疫指标
卡妥索单抗	Epcam, CD3	卵巢癌, 恶性腹水, 胃癌

表 2

抗体名称	肿瘤抗原	治疗性靶向应用
西妥昔单抗	EGFR	转移性结直肠癌和头颈癌
西他妥珠单抗	Epcam	卵巢癌和其他实体瘤
西妥木单抗	IGF-1 受体	实体瘤
克立瓦妥珠单抗	MUC1	胰腺癌
可那妥木单抗	TRAIL-R2	癌症
达西妥珠单抗	CD40	血液学癌症
达洛妥珠单抗	胰岛素样生长因子 I 受体	癌症
达拉妥木单抗	CD38	癌症
德美西珠单抗	DLL4	癌症
Denintuzumab	CD19	急性淋巴细胞白血病和 B 细胞非霍奇金淋巴瘤
地莫单抗	B-淋巴瘤细胞	淋巴瘤
卓齐妥单抗	DR5	癌症
度利戈妥单抗	HER3	癌症
杜斯吉妥单抗	ILGF2	癌症
依美昔单抗	GD3 神经节苷脂	恶性黑素瘤
依决洛单抗	上皮细胞粘附分子	结直肠癌
依洛妥珠单抗	SLAMF7	多发性骨髓瘤
艾西莫单抗	IL-6	癌症
依纳伐妥珠单抗	TWEAK 受体	癌症
恩莫单抗	ICAM-1 (CD54)	癌症
依诺妥珠单抗	B7-H3	癌症
依诺替库单抗	DLL4	癌症
恩西妥昔西单抗	5AC	癌症
西-依匹妥莫单抗	上皮唾液蛋白 (Episialin)	癌症

表 2

抗体名称	肿瘤抗原	治疗性靶向应用
依帕珠单抗	CD22	癌症, SLE
厄马索单抗	HER2, CD3	乳腺癌
埃达珠单抗	整联蛋白 $\text{A}_\alpha\beta_3$	黑素瘤、前列腺癌、卵巢癌
Faralimomab	干扰素受体	癌症
法勒珠单抗	叶酸受体 1	卵巢癌
法西奴单抗	HNGF	癌症
Fbta05 (Bi20)	CD20	慢性淋巴细胞白血病
芬克拉妥珠单抗	HGF	癌症
芬妥木单抗	IGF-1 受体	肾上腺皮质癌、非小细胞肺癌
弗拉伏妥单抗	TYRP1 (糖蛋白 75)	黑素瘤
Flotetuzumab	CD123	急性髓系白血病
夫苏木单抗	TGF-B	癌症
弗妥昔单抗	EGFR	癌症
加利昔单抗	CD80	B 细胞淋巴瘤
甘尼妥单抗	IGF-I	癌症
吉姆单抗奥佐米星	CD33	急性骨髓性白血病
吉瑞妥昔单抗	碳酸酐酶 9 (CA-IX)	透明细胞肾细胞癌
格列姆巴妥木单抗维多汀	GPNMB	黑素瘤, 乳腺癌
替伊莫单抗	CD20	非霍奇金淋巴瘤
伊克芦库单抗	VEGFR-1	癌症
英加妥珠单抗	EGFR	癌症
英克勒库单抗	Selectin P	癌症
英达妥昔单抗拉夫坦辛	SDC1	癌症
伊诺妥珠单抗奥佐米星	CD22	癌症
英特妥木单抗	CD51	实体瘤(前列腺癌、黑素瘤)

表 2

抗体名称	肿瘤抗原	治疗性靶向应用
伊匹单抗	CD152	黑素瘤
伊拉妥木单抗	CD30 (TNFRSF8)	霍奇金淋巴瘤
伊托珠单抗	CD6	癌症
拉贝妥珠单抗	CEA	结直肠癌
兰帕珠单抗	CFD	癌症
来金珠单抗	Il-13	霍奇金淋巴瘤
来沙妥木单抗	TRAIL-R2	癌症
利格珠单抗	IGHE	癌症
林妥株单抗	CD33	癌症
利瑞鲁单抗	KIR2D	癌症
Lorvotuzumab	CD56	癌症
鲁卡妥木单抗	CD40	多发性骨髓瘤，非霍奇金淋巴瘤，霍奇金淋巴瘤
鲁米昔单抗	CD23	慢性淋巴细胞白血病
马帕妥木单抗	TRAIL-R1	癌症
马格妥昔单抗	HER2	HER2 阳性癌症
马妥珠单抗	EGFR	结直肠、肺和胃癌
米拉珠单抗	CD74	多发性骨髓瘤和其他血液学恶性肿瘤
Minretumomab	TAG-72	癌症
Mitumomab	GD3 神经节苷脂	小细胞肺癌
莫加木珠单抗	CCR4	癌症
Morolimumab	恒河因子	癌症
莫西妥莫单抗假单胞菌外毒素	CD22	癌症
他那可单抗	C242 抗原	结直肠癌
那米鲁单抗	CSF2	癌症
他那莫单抗 Estafenatox	5T4	非小细胞肺癌，肾细胞癌

表 2

抗体名称	肿瘤抗原	治疗性靶向应用
纳那妥单抗	RON	癌症
Naxitamab	GD2	成神经细胞瘤, 骨肉瘤
奈昔妥木单抗	EGFR	非小细胞肺癌
Nerelimomab	TNF-A	癌症
耐斯伐库单抗	血管生成素 2	癌症
尼妥珠单抗	EGFR	鳞状细胞癌、头颈癌、鼻咽癌、神经胶质瘤
尼伏鲁单抗	PD-1	癌症
疏诺莫单抗	待定	癌症
奥卡拉妥珠单抗	CD20	癌症
奥法妥木单抗	CD20	慢性淋巴细胞白血病
奥拉妥单抗	PDGF-R A	癌症
奥洛珠单抗	IL6	癌症
Omburtamab	B7-H3	成神经细胞瘤、肉瘤、转移性脑癌
奥纳妥珠单抗	人类散射因子受体 激酶	癌症
Ontuxizumab	TEM1	癌症
奥珠单抗 Monatox	Epcam	癌症
奥戈伏单抗	CA-125	卵巢癌
奥替库单抗	OxIdl	癌症
Otlertuzumab	CD37	癌症
帕尼单抗	EGFR	结直肠癌
Pankomab	MUC1 的肿瘤特异性糖基化	卵巢癌
巴萨妥珠单抗	EGFL7	癌症
帕曲妥单抗	HER3	癌症
培布利珠单抗	PD-1	癌症

表 2

抗体名称	肿瘤抗原	治疗性靶向应用
培妥莫单抗	MUC1	癌症
培拉珠单抗	IL17A	关节炎
帕妥珠单抗	HER2	癌症
皮地珠单抗	PD-1	癌症
皮那妥珠单抗 维多汀	CD22	癌症
平妥莫单抗	腺癌抗原	腺癌
普拉库鲁单抗	人 TNF	癌症
泊拉妥珠单抗 维多汀	CD79B	癌症
普立托昔单抗	大肠杆菌志贺毒素 1 型	癌症
普立妥木单抗	波形蛋白	脑癌
奎利珠单抗	IGHE	癌症
雷妥莫单抗	N-羟乙酸神经氨酸	癌症
雷得妥单抗	纤连蛋白额外结构域-B	癌症
雷莫芦单抗	VEGFR2	实体瘤
利妥木单抗	HGF	实体瘤
利妥昔单抗	CD20	淋巴瘤，白血病，一些自身性免疫失调
罗妥木单抗	IGF-1 受体	癌症
罗度单抗	RHD	癌症
沙马珠单抗	CD200	癌症
沙妥莫单抗 喷地肽	TAG-72	癌症
司里班妥单抗	ERBB3	癌症
Sibrotuzumab	FAP	癌症
司妥昔单抗	IL-6	癌症
索利托单抗	Epcam	癌症

表 2

抗体名称	肿瘤抗原	治疗性靶向应用
松妥珠单抗	上皮唾蛋白	癌症
他巴鲁单抗	BAFF	B 细胞癌症
他卡妥珠单抗 Tetraxetan	α -胎蛋白	癌症
他莫单抗 Paptox	CD19	癌症
Telimomab	待定	癌症
替妥莫单抗	腱生蛋白 C	癌症
替奈昔单抗	CD40	癌症
替妥木单抗	CD221	血液学肿瘤
替昔木单抗	CTLA-4	癌症
替加珠单抗	TRAIL-R2	癌症
托西莫单抗	CD20	滤泡性淋巴瘤
Tovetumab	CD140a	癌症
曲妥珠单抗	HER2	乳腺癌
Trbs07 (Ektomab)	Gd2	黑素瘤
曲美木单抗	CTLA-4	癌症
妥可妥珠单抗 西莫白介素	Epcam	癌症
优利妥昔单抗	MS4A1	癌症
乌瑞鲁单抗	4-1BB	癌症
Vadastuximab	CD33	急性髓系白血病
Vantictumab	卷曲 (Frizzled) 受体	癌症
伐利昔单抗	AOC3 (VAP-1)	癌症
伐特殊单抗	ITGA2	癌症
维妥珠单抗	CD20	非霍奇金淋巴瘤
维森库单抗	NRP1	癌症

表 2

抗体名称	肿瘤抗原	治疗性靶向应用
伏洛昔单抗	整联蛋白 A5β1	实体瘤
伏司妥珠单抗	CD70	癌症
伏妥莫单抗	肿瘤抗原 CTAA16.88	结直肠肿瘤
扎鲁妥木单抗	EGFR	头颈部鳞状细胞癌
扎妥昔单抗	HER1	癌症
齐拉木单抗	CD147	癌症
Zolbetuximab	Cldn18.2	胃肠道腺癌和胰腺肿瘤

a) PD-L1结合结构域

[0150] PD-L1 (也称为CD274和B7-H1) 是一种40kDa的跨膜蛋白,通常在T淋巴细胞、B淋巴细胞、DC、巨噬细胞的表面上和非血液细胞中表达。另外,PD-L1在肿瘤细胞中也显示异常高表达,这被认为是促进肿瘤免疫逃逸能力的主要因素。PD-L1与其受体PD-1在T细胞上的接合启动了递送抑制T细胞增殖、细胞因子生成和释放以及细胞毒性的信号的PD-1受体的下游信号传导。阻断PD-L1/PD-1的抗体会破坏PD-1轴,从而逆转T细胞抑制并增强内源性抗肿瘤免疫力。结合PD-L1的CD137 x TA结合分子可以将表达PD-L1的肿瘤细胞与表达CD137的免疫细胞共连接。不限于任何特定方法,这样的共定位可以刺激免疫细胞,同时还减弱或阻断在PD-L1-PD-1结合时发生的免疫系统抑制。

[0151] 根据本发明可以使用任何抗PD-L1抗体的表位-结合位点,并且相对于PD-L1肿瘤抗原阐明了本发明的原理。结合人PD-L1的代表性抗体包括阿替利珠单抗、阿利库单抗和德瓦鲁单抗,每种抗体最近都被批准用于人类。阿替利珠单抗(销售为 **TECENTRIQ®**;CAS登记号1380723-44-3;参见美国专利号9,873,740)是具有修饰的IgG1和κ恒定区的人源化单克隆抗体。阿利库单抗(销售为 **BAVENCIO®**;CAS登记号1537032-82-8;参见美国专利号9,873,740)是具有IgG1/λ恒定区的完全人单克隆抗体。德瓦鲁单抗(销售为 **IMFINZI®**;CAS登记号1428935-60-7;参见美国专利号8,779,108)是具有修饰的IgG1和κ恒定区的完全人单克隆抗体。阿替利珠单抗的完整重链和轻链的氨基酸序列(WHO药物信息,2015,推荐的INN:清单74,29(3):387),德瓦鲁单抗(WHO药物信息,2015,推荐的INN:清单74,29(3):393-394)和阿利库单抗(WHO药物信息,2016,推荐的INN:List 74,30(1):100-101)是本领域已知的。本文还提供了另外的抗PD-L1抗体,包括人源化的抗PD-L1抗体“hPD-L1 MAB-2”及其优化的变体。

(1) hPD-L1 MAB-2

[0152] hPD-L1 MAB-2 (hPD-L1 MAB-2 VH1) 的VH结构域的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:57) (CDR_H残基用底线显示):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIGGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLKTED TAVYYCARQG
LPYYFDYWGQ GTLVTVSS

[0153] hPD-L1 MAB-2 (hPD-L1 MAB-2 VL1) 的VL结构域的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:58) (CDR_L 残基用底线显示):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPLTFGQ
 GTKVEIK

(2) 去免疫化和优化的hPD-L1 MAB-2

[0154] 如以下示例中所述,将hPD-L1 MAB-2去免疫化并优化结合和表达以产生命名为“hPD-L1 MAB-2 VHx”的变体VH结构域和命名为“hPD-L1 MAB-2 VLx”的VL结构域。下文给出了特定的去免疫化和优化的变体VH和VL结构域的氨基酸序列,在示例中提供了其他变体。

[0155] hPD-L1 MAB-2 VHx的氨基酸序列为 (SEQ ID NO:59) (CDR_H 残基用底线显示):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIX₄GGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNX₅LY LQMNSLX₆X₇ED TAVYYCARX₈G
LPYYX₉DYWGQ GTLVTVSS

其中:X₄、X₅、X₆、X₇、X₈和X₉被独立地选择,和

其中:X₄为G或K;X₅为S或T;X₆为K或R;X₇为A或T;X₈为A或Q;和X₉为F或G。

[0156] 在具体的实施方式中:

- a) X₄为G;X₅为S;X₆为R;X₇为A;X₈为Q;和X₉为F;
- b) X₄为K;X₅为S;X₆为R;X₇为A;X₈为Q;和X₉为G;
- c) X₄为G;X₅为S;X₆为R;X₇为A;X₈为A;和X₉为F;
- d) X₄为K;X₅为S;X₆为R;X₇为A;X₈为A;和X₉为F;
- e) X₄为G;X₅为S;X₆为R;X₇为A;X₈为A;和X₉为G;或
- f) X₄为K;X₅为S;X₆为R;X₇为A;X₈为Q;和X₉为F。

[0157] hPD-L1 MAB-2 VHx的CDR_H的氨基酸序列是:

CDR_H1 (SEQ ID NO:60):SYTMS
 CDR_H2 (SEQ ID NO:61):YISIX₄GGTTYPDTVKG
 CDR_H3 (SEQ ID NO:62):X₈GLPYYX₉DY
 其中:X₄为G或K;X₈为A或Q;和X₉为F或G。

[0158] hPD-L1 MAB-2 VLx的氨基酸序列为 (SEQ ID NO:63) (CDR_L 残基用底线显示):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN X₁₀AVAWYQQKP GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPLTFGQ
 GTKVEIK

其中:X₁₀为E或T。

[0159] 在一个具体的实施方式中,X₁₀为E。

[0160] PD-L1 MAB-2 VLx的CDR_L的氨基酸序列为:

CDR_L1 (SEQ ID NO:64):KASQDVNX₁₀AVA
 CDR_L2 (SEQ ID NO:65):WASTRHT
 CDR_L3 (SEQ ID NO:66):QQHYNTPLT

其中： X_{10} 为E或T。

[0161] 下面给出了在本文中命名为“hPD-L1 MAB-2 VH2”、“hPD-L1 MAB-2 VH3”、“hPD-L1 MAB-2 VH4”、“hPD-L1 MAB-2 VH5”、“hPD-L1 MAB-2 VH6”的五个变体VH结构域和命名为“hPD-L1 MAB-2 VL2”的一个变体VL结构域的氨基酸序列。本文公开的任何变体hPD-L1 MAB-2 VH结构域可以与任何hPD-L1 MAB-2 VL结构域配对。包括PD-L1 MAB-2 VH/VL结构域的特定组合的分子是通过参考特定的VH/VL结构域来提及的，例如，包括结合结构域PD-L1 MAB-2 VH3和hPD-L1 MAB-2 VL2的分子具体称为“PD-L1 MAB-2 (3.2)”。下文提供了变体VH和VL结构域的氨基酸序列，在CDR中相对于VH1或VL1的置换用双底线标出。

[0162] hPD-L1 MAB-2 VH2的氨基酸序列是(SEQ ID NO:67) (CDR_H残基用底线显示)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIGGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQG
LPYYFDYWGQ GTLVTVSS

[0163] hPD-L1 MAB-2 VH3的氨基酸序列为(SEQ ID NO:68) (CDR_H残基用底线表示；置换用双底线表示)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIKGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQG
LPYYGDYWGQ GTLVTVSS

[0164] hPD-L1 MAB-2 VH4的氨基酸序列为(SEQ ID NO:69) (CDR_H残基用底线表示；置换用双底线表示)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIGGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAG
LPYYFDYWGQ GTLVTVSS

[0165] hPD-L1 MAB-2 VH5的氨基酸序列为(SEQ ID NO:70) (CDR_H残基用底线表示)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIKGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAG
LPYYFDYWGQ GTLVTVSS

[0166] hPD-L1 MAB-2 VH6的氨基酸序列为(SEQ ID NO:71) (CDR_H残基用底线表示)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIGGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARAG
LPYYGDYWGQ GTLVTVSS

[0167] hPD-L1 MAB-2 VL2的氨基酸序列为(SEQ ID NO:72) (CDR_L残基用底线表示)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN EAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPLTFGQ
 GTKVEIK

[0168] 应注意，优化的hPD-L1 MAB-2变体的CDR_H2、CDR_H3和CDR_L1的氨基酸序列不同于亲本分子中存在的氨基酸序列。下面总结了不同的CDR，VH1和VL1的区别以双底线示出：

CDR	氨基酸序列	hPD-L1 MAB-2 变体
CDR _{H2}	YISIKGGTTYYPDTVKG (SEQ ID NO:73)	VH3/VH4
CDR _{H3}	QGLPYYG ^u DY (SEQ ID NO:74)	VH3
CDR _{H3}	A ^u GLPYYFDY (SEQ ID NO:75)	VH4/VH5
CDR _{H3}	A ^u GLPYYG ^u DY (SEQ ID NO:76)	VH6
CDR _{L1}	KASQDVNE ^u AVA (SEQ ID NO:77)	VL2

[0169] 本发明具体包括并涵盖CD137 x PD-L1结合分子,其包括任何阿替利珠单抗、阿利库单抗、德瓦鲁单抗、hPD-L1 MAB-2和其变体或本文提供的任何其他抗PD-L1抗体的VL和/或VH结构域和/或VL区域的1、2或全部3个CDR_L和/或VH结构域的1、2或全部3个CDR_H;并且更典型地具有这种抗PD-L1单克隆抗体的VL区域的1、2或全部3个CDR_L和/或VH结构域的1、2个或全部3个CDR_H。

b) HER2结合结构域

[0170] HER2是185kDa的受体蛋白,其最初被鉴定为来自化学治疗大鼠的成神经细胞瘤的转化基因的产物。由于HER2在许多人类癌症(包括乳腺癌和胃癌)中的作用,因此已被广泛研究。

[0171] 根据本发明可以使用任何抗-HER2抗体的表位-结合位点,并且关于HER2肿瘤抗原阐述本发明的原理。结合人HER2的代表性抗体包括马格妥昔单抗(margetuximab)、曲妥珠单抗和帕妥珠单抗。马格妥昔单抗(也称为MGAH22;CAS登记号1350624-75-7,参见,例如,美国专利号8,802,093)是与HER2结合并介导增强的ADCC活性的Fc优化的单克隆抗体。曲妥珠单抗(也称为rhuMAB4D5,并且以赫赛汀®出售;CAS登记号180288-69-1;参见美国专利号5,821,337)是抗体4D5的人源化形式,具有IgG1/κ恒定区。帕妥珠单抗(也称为rhuMAB2C4,并且以PERJET®出售;CAS登记号380610-27-5;参见例如W02001/000245)是具有IgG1/κ恒定区的抗体2C4的人源化形式。马格妥昔单抗(WHO药物信息,2014,推荐的INN:清单70,28(1):93-94)的完整重链和轻链的氨基酸序列和曲妥珠单抗(参见WHO药物信息,2011,推荐的INN:清单65,25(1):89-90,对于曲妥珠单抗emtansine)和帕妥珠单抗(蛋白质数据库登录号.1171i)的Fab结构域是本领域已知的。本文还提供了另外的抗HER2抗体,包括HER2 MAB-1及其人源化变体。

(1) hHER2 MAB-1

[0172] 抗体hHER2 MAB-1是一种人源化抗HER2单克隆抗体,其结合HER2的表位,该表位不同于马格妥昔单抗、曲妥珠单抗和帕妥珠单抗所识别的表位(参见,例如,W0 2018/156740)。

[0173] 人源化抗体(hHER2 MAB-1 VHx)的VH结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:78)(CDR_H残基显示为底线):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTNIGEPTY TEEFKGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARDDX₁
X₂YGNRVSYWG QGTLTVSS

其中,所述X₁为D或E,并且X₂为G或I。

[0174] 这种人源化抗体(hHER2 MAB-1 VLx)的VL结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:79)

(CDR_L残基显示为底线):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIX₃ X₄YLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLX₅X₆GVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
 GTKLEIK

其中,X₃为N或S;X₄为S、T或N;X₅为V或Q并且X₆为D、E或S。

[0175] 分离了三个种变体hHER2 MAB-1 VH结构域:hHER2 MAB-1 VH1、hHER2 MAB-1 VH2和hHER2 MAB-1 VH3。此类变体hHER2 MAB-1 VH结构域的氨基酸序列如下所示。

[0176] hHER2 MAB-1 VH1的氨基酸序列为(SEQ ID NO:80) (CDR_H残基用底线显示;请注意,CDR_H3的第二和第三残基分别为D和G):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTNIGEPTY TEEFKGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARDDD
GYGNRVSYWG QGTLVTVSS

[0177] hHER2 MAB-1 VH2的氨基酸序列为(SEQ ID NO:81) (CDR_H残基用底线显示;请注意,CDR_H3的第二和第三残基分别为E和G):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTNIGEPTY TEEFKGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARDDE
GYGNRVSYWG QGTLVTVSS

[0178] hHER2 MAB-1 VH3的氨基酸序列为(SEQ ID NO:82) (CDR_H残基用底线显示;请注意,CDR_H3的第二和第三残基分别为D和I):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTNIGEPTY TEEFKGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARDDD
IYGNRVSYWG QGTLVTVSS

[0179] 分离了三种变体hHER2 MAB-1 VL结构域:hHER2 MAB-1 VL1、hHER2 MAB-1 VL2和hHER2 MAB-1 VL3。此类变体hHER2 MAB-1 VL结构域的氨基酸序列如下所示。

[0180] hHER2 MAB-1 VL1的氨基酸序列为(SEQ ID NO:83) (CDR_L残基用底线显示;请注意,CDR_L1的第七和第八残基分别为N和S,CDR_L2的第六和第七残基的残基分别为V和D):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLVDGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
 GTKLEIK

[0181] hHER2 MAB-1 VL2的氨基酸序列为(SEQ ID NO:84) (CDR_L残基用底线显示;请注意,CDR_L1的第七和第八残基分别为N和T,CDR_L2的第六和第七残基的残基分别为V和E):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN TYLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLVEGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
 GTKLEIK

[0182] hHER2 MAB-1 VL3的氨基酸序列为(SEQ ID NO:85) (CDR_L残基用底线显示;请注意,CDR_L1的第七和第八残基分别为S和N,CDR_L2的第六和第七残基的残基分别为Q和S):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIS NYLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
 GTKLEIK

[0183] 任何此类人源化的VH和VL hHER2 MAB-1结构域,包括上述hHER2 MAB-1 VH和/或VL结构域通用序列中包含的任何结构域,均可用于形成抗体、双抗体或能够结合Her2的结

合分子。

(2) 其他HER2结合结构域

[0184] 除了以上确定的HER2结合结构域之外,本发明还考虑使用任何以下抗-Her-2结合结构域的任何表位-结合位点:1.44.1;1.140;1.43;1.14.1;1.100.1;1.96;1.18.1;1.20;1.39;1.24;以及1.71.3(美国专利号8,350,011;8,858,942;和PCT专利公开W0 2008/019290);F5和C1(美国专利号7,892,554;8,173,424;8,974,792;和PCT专利公开W0 99/55367);以及美国专利公开2011/0097323、2013/017114、2014/0328836、2016/0130360和2016/0257761以及PCT专利公开W02011/147986的抗HER2抗体的结合结构域)。

[0185] 本发明具体包括并涵盖CD137 x HER2结合分子,其包括任何马格妥昔单抗、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、hHER2 MAB-1或任何本文提供的其他抗HER2抗体的VL和/或VH结构域、和/或VL区域的1、2或全部3个CDR_L和/或VH结构域的1、2或全部3个CDR_H;并且更典型地具有这种抗HER2单克隆抗体的VL区域的1、2或全部3个CDR_L和/或VH结构域的1、2个或全部3个CDR_H。

c) EphA2结合结构域

[0186] 受体酪氨酸激酶、肝配蛋白A型受体2(EphA2)通常在成人上皮组织的细胞间接触位点处表达,然而,最近的研究表明,它在各种类型的上皮癌中也过表达,在转移病灶中观察到EphA2表达水平最高。EphA2的高表达水平已在广泛的癌症和许多肿瘤细胞系中被发现,包括前列腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌和黑素瘤。EphA2似乎不仅是癌症的标志物,而且在许多人类癌症中似乎持续存在被过表达和功能改变。根据本发明,可以使用任何抗EphA2抗体的表位-结合位点。以下呈现的是几种可用于产生本发明分子的代表性抗EphA2抗体。

(1) EphA2 MAB-1

[0187] 抗体EphA2 MAB-1是鼠抗EphA2单克隆抗体。EphA2 MAB-1的VH结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:86)(CDR残基用底线显示):

QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSL **RYSVHWVRQP** PGKGLEWLGM
IWGGGSTDYN **SALKSRLSIS** KDNSKSQVFL KMNSLQTD **DDT** AMYYCARK**KHG**
NYYTMDYWGQ GTSVTVSS

[0188] EphA2 MAB-1的VL结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:87)(CDR残基用底线显示):

DIQMTQTSS LSASLGDRIT ISCRASQDIS **NYLNWYQQKP** DGTVKLLIYY
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFC**QQ** **GYTLYT**FGGG
 TKLEIK

(2) EphA2 MAB-2

[0189] 抗体EphA2 MAB-2是鼠抗EphA2单克隆抗体。EphA2 MAB-2的VH结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:88)(CDR残基用底线显示):

QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGFTFT **NYGMNWVKQA** PGKGLKWMGW
INTYIGEPTY **ADDFKGRFVF** SLETSASTAY LQINNLLKNE **D** MATYFCARE**EL**
GPYYFDYWGQ GTTLTVSS

[0190] EphA2 MAB-2的VL结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:89)(CDR残基用底线显示):

DVVMQTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSSGNTYLHW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
TFGSGTKLEI K

(3) EphA2 MAB-3

[0191] 抗体EphA2 MAB-3是鼠抗EphA2单克隆抗体。EphA2 MAB-3的VH结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:90) (CDR残基用底线显示)：

EVQLVESGGG SVKPGGSLKL SCAASGFTFT DHYMYWVRQT PEKRLEWVAT
ISDGSFSTSY PDSVKGRFTI SRDIAKNNLY LQMSSLKSED TAMYYCTRDE
SDRPFPHYWGQ GTLVTVSS

[0192] EphA2 MAB-3的VL结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:91) (CDR残基用底线显示)：

DIVLTQSHRS MSTSVGDRVN ITCKASQDVT TAVAWYQQKP GQSPKLLIFW
ASTRHAGVPD RFTGSGSGTD FTLTISSVQA GDLALYYCQQ HYSTPYTFGG
 GTKLEIK

(4) 其他EphA2结合结构域

[0193] 除了以上确定的EphA2结合结构域外,本发明还考虑使用任何以下抗EphA2抗体的任何表位结合位点:SPL1、LUCA19、SG5或LUCA40(参见,PCT专利公开WO 2006/084226);B13(参见美国专利号7,101,976);D7(参见美国专利号7,192,698);B-233和EA2(参见PCT专利公开WO 2003/094859)。

[0194] 本发明具体包括并涵盖CD137 x EphA2结合分子,其包括抗EphA2单克隆抗体EphA2 MAB-1、EphA2 MAB-2或EphA2 MAB-3的VL和/或VH结构域,和/或VL区域的1、2或全部3个CDR_L和/或VH结构域的1、2或全部3个CDR_H。

d) 5T4结合结构域

[0195] 癌胚蛋白5T4是显示在许多癌的细胞膜上的肿瘤相关蛋白,所述癌包括肾癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌和急性淋巴细胞白血病。根据本发明,可以使用任何抗5T4抗体的表位-结合位点。下面呈现的是两种代表性抗5T4抗体,人源化的“5T4 MAB-1”和鼠“5T4 MAB-2”。另外的ant-5T4抗体在本领域中有描述(参见,例如,美国专利号:8,084,249;8,409,577;8,759,495;8,409,577;PCT公开号:WO 2013/041687;WO 2014/137931;WO 2016/022939)。

(1) 5T4 MAB-1

[0196] 5T4 MAB-1的VH结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:92) (CDR残基用底线显示)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SFWMHWVRQA PGQGLEWMGR
IDPNRGTEY NEKAKSRVTM TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAGGN
PYYPMDYWGQ GTTVTVSS

[0197] 5T4 MAB-1的VL结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:93) (CDR残基用底线显示)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR
ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ
 GTKLEIK

(2) 5T4 MAB-2

[0198] 5T4 MAB-2的VH结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:94) (CDR残基用底线显示)：

QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYWITWVKQR PGQGLEWIGD
IYPGSGRANY NEKFKSKATL TVDTSSSTAY MQLSSLTSED SAVYNCARYYG
PLFTTVVDPN SYAMDYWGQG TSVTVSS

[0199] 5T4 MAB-2的VL结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:95) (CDR残基用底线显示):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV YSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV
FTFGSGTKLE IK

[0200] 本发明具体包括并涵盖CD137 x 5T4结合分子,其包括抗5T4单克隆抗体5T4 MAB-1或5T4 MAB-2或WO 2007/106744、WO 2013/041687或WO 2015/184203提供的任何抗5T4抗体的VL和/或VH结构域,和/或VL区域的1、2或全部3个CDR_L和/或VH结构域的1、2或全部3个CDR_H。

e) B7-H3结合结构域

[0201] B7-H3是在多种实体瘤类型上过表达的肿瘤抗原,并且是涉及免疫调节的B7家族分子的成员。特别地,几项独立研究表明,人类恶性肿瘤细胞(例如,成神经细胞瘤和胃癌、卵巢癌和非小细胞肺癌的肿瘤细胞)展示B7-H3蛋白表达显著增加,并且这种增加的表达与疾病严重程度增加相关,表明B7-H3被肿瘤用作免疫逃逸途径。

[0202] 根据本发明,可以使用任何抗B7-H3抗体的表位-结合位点。结合人B7-H3的一种代表性人源化抗体是“依诺妥珠单抗”。依诺妥珠单抗(也称为MGA271;CAS登记号1353485-38-7;参见,例如,美国专利号8,802,091)是与B7-H3结合并介导增强的ADCC活性的Fc优化的单克隆抗体。依诺妥珠单抗(WHO药物信息,2017,推荐的INN:清单77,31(1):149)的完整重链和轻链的氨基酸序列在本领域中是已知的。还提供了另外的代表性的抗B7-H3抗体。

(1) hBRCA69D

[0203] 人源化抗B7-H3抗体“hBRCA69D”的代表性VH和VL结构域如下。下面提供了两种人源化的VH结构域hBRCA69D VH1和hBRCA69D VH2;以及两种人源化VL结构域hBRCA69D VL1和hBRCA69D VL2,它们可用于VH/VL的任何组合以产生功能性的人源化结合结构域。

[0204] hBRCA69D VH1的VH结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:96) (CDR_H残基用底线显示):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT
IYPGDGDTRY TQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG
IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS

[0205] hBRCA69D VH2的VH结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:97) (CDR_H残基用底线显示):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT
IYPGGGDTRY TQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG
IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS

[0206] hBRCA69D VL1的VL结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:98) (CDR_L残基用底线显示)。

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
GTKLEIK

[0207] hBRCA69D VL2的VL结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:99) (CDR_L残基用底线显示)。

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQF EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
 GTKLEIK

(2) hPRCA157

[0208] 另一个代表性的人源化抗B7-H3抗体是“hPRCA157”。hPRCA157 VH1的VH结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:100) (CDR_H残基用底线显示):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT
INSGGSNTYY PDSLKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHD
GGAMDYWGQG TTVTVSS

[0209] hPRCA157 VL1的VL结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:101) (CDR_L残基用底线显示):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASESIY SYLAWYQQKP GKAPKLLVYN
 TKTLPEGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQF EDFATYYCQH HYGTPPWTFG
 QGTRLEIK

(3) 其他B7-H3结合结构域

[0210] 除了以上确定的B7-H3结合结构域之外,本发明还考虑使用任何以下抗B7-H3抗体的任何表位结合位点:LUCA1;BLA8;PA20;或SKN2(参见,美国专利号7,527,969;8,779,098和PCT专利公开W0 2004/001381);M30;cM30;M30-H1-L1;M30-H1-L2;M30-H1-L3;M30-H1-L4;M30-H1-L5;M30-H1-L6;M30-H1-L7;M30-H4-L1;M30-H4-L2;M30-H4-L3;M30-H4-L4和M30-H4-L4(参见美国专利公开2013/0078234和PCT专利公开W0 2012/147713;和8H9(参见美国专利号7,666,424;7,737,258;7,740,845;8,148,154;8,414,892;8,501,471;9,062,110;美国专利公开2010/0143245和PCT专利公开W0 2008/116219)。

[0211] 本发明具体包括并涵盖CD137 x B7-H3结合分子,其包括抗人源化的BRCA69D、PRCA157、人源化的PRCA157,或依诺妥珠单抗,或任何本文提供的其他抗B7-H3抗体的VL和/或VH结构域,和/或VL区域的1、2或全部3个CDR_L和/或VH结构域的1、2或全部3个CDR_H;且更通常具有此类抗B7-H3单克隆抗体的VL区域的1、2或全部3个CDR_L和/或VH结构域的1、2或全部3个CDR_H。

f) GpA33结合结构域

[0212] 43kD跨膜糖蛋白A33(gpA33)在所有结直肠癌中表达>95%。根据本发明,可以使用任何抗gpA33抗体的表位-结合位点。代表性的人源化抗gpA33抗体(“gpA33 MAB-1”)如下所示。

[0213] gpA33 MAB-1的VH结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:102) (CDR残基用底线显示):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GSWMNWVRQA PGQGLEWIGR
IYPGDGETNY NGKFKDRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARIY
GNNVYFDVWG QGTTTVTVSS

[0214] gpA33 MAB-1的VL结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:103) (CDR残基用底线显示):

DIQLTQSPSF LSASVGDRVIT ITCSARSSIS FMWYQQKPG KAPKLLIYDT
SNLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSEAE DAATYYCQOW SSYPLTFGQG
 TKLEIK

[0215] 本发明具体包括并涵盖CD137 x gpA33结合分子,其包括抗gpA33单克隆抗体gpA33 MAB-1或W02015/026894中提供的任何抗gpA33单克隆抗体的VL和/或VH结构域,和/或VL区域的1、2或全部3个CDR_L和/或VH结构域的1、2或全部3个CDR_H。

g) CEACAM5和CEACAM6结合结构域

[0216] 已发现癌胚胎抗原相关细胞粘附分子5 (CEACAM5) 和6 (CEACAM6) 与各种类型的癌症相关,包括甲状腺髓样癌、结直肠癌、胰腺癌、肝细胞癌、胃癌、肺癌、头颈癌、尿膀胱癌、前列腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、乳腺癌、造血癌(hematopoietic cancer)、白血病和卵巢癌,尤其是结直肠癌、胃肠道癌、胰腺癌、非小细胞肺癌(NSCL)、乳腺癌、甲状腺癌、胃癌、卵巢癌和子宫癌。根据本发明,可以使用任何抗CEACAM5/CEACAM6抗体的表位-结合位点。以下提供了代表性的抗CEACAM5/CEACAM6抗体。

(1) 16C3

[0217] 人源化抗CEACAM5/CEACAM6抗体16C3 (EP 2585476) 的VH结构域的氨基酸序列为 (SEQ ID NO:104) (CDR残基以底线显示):

QVQLQQSGPE VVRPGVSVKI SCKGSGYTFT DYAMHWVKQS HAKSLEWIGL
ISTYSGDTKY NQNFKGKATM TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCARGD
YSGSRYWFAY WGQGTLVTVS S

[0218] 人源化的抗CEACAM5/CEACAM6抗体16C3 (EP 2585476) 的VL结构域的氨基酸序列为 (SEQ ID NO:105) (CDR残基用底线显示):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCGASENIY GALNWYQRKP GKSPKLLIWG
ASNLADGMPS RFSGSGSGRQ YTLTISSLQP EDVATYYCQN VLSSPYTFGG
 GTKLEIK

(2) hMN15

[0219] 人源化抗CEACAM5/CEACAM6抗体hMN15 (US8,287,865) 的VH结构域的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:106) (CDR残基用底线显示):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSSSGFALT DYYMSWVRQA PGKGLEWLGF
IANKANGHTT DYSPSVKGRF TISRDN SKNT LFLQMDSLRP EDTGVYFCAR
DMGIRWNFDV WGQGTPVTVS S

[0220] 人源化抗CEACAM5/CEACAM6抗体hMN15 (US8,287,865) 的VL结构域的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:107) (CDR残基用底线显示):

DIQLTQSPSS LSASVGDRVIT MTCSASSRVS YIHWYQQKPG KAPKRWIYGT
STLASGVPAR FSGSGSGTDF TFTISSLQPE DIATYYCQOW SYNPPTFGQG
 TKVEIKR

[0221] 本发明具体包括并涵盖CD137 x CEACAM5/CEACAM6结合分子,其包括抗CEACAM5/CEACAM6单克隆抗体16C3或hMN15的VL和/或VH结构域,和/或VL区域的1个,2个或全部3个CDR_L和/或VH结构域的1个、2个或全部3个CDR_H。

h) CD19结合结构域

[0222] CD19 (B淋巴细胞表面抗原B4, Genbank登录号M28170) 是B细胞受体 (BCR) 复合体的组分,并且是B细胞信号传导的正调节物,其调节B细胞启动和体液免疫的阈值。CD19是B细胞系中最普遍表达的抗原之一,并在>95%的B细胞恶性肿瘤中表达,包括急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL) 和非霍奇金淋巴瘤(NHL)。值得注意的是,CD19表达

在对抗CD20治疗变得抗性的B细胞淋巴瘤上得以维持。还已经建议将CD19作为治疗自身免疫疾病的靶标。

[0223] 根据本发明,可以使用任何抗CD19抗体的表位结合位点。结合人CD19并且可以在本发明中使用的代表性人源化抗体是在WO 2016/048938中公开的人源化抗CD19抗体(本文称为“CD19 MAB-1”)。

[0224] CD19 MAB-1的VH结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:108) (CDR_H残基用底线显示):

QVTLR~~ES~~GPA LVKPTQT~~LT~~L TCTFSGF~~SLS~~ TSGMGVGVWIR QPPGKALEWL
AHIW~~WDDDKR~~ YNPALKSR~~LT~~ ISKDTSKNQV FLTMTNMDPV DTATYYCARM
ELWSYYFDYW GQGT~~TV~~TVSS

[0225] CD19MAB-1的VL结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:109) (CDR_L残基用底线显示):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITCRASQSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDA
SNRASGVPSR FSGSGSGTDH TLTISSEAE DAATYYCFQG SVYPFTFGQG
TKLEIK

[0226] 本发明具体包括并涵盖CD137 x CD19结合分子,其包括抗CD19单克隆抗体CD19 MAB-1或美国专利US 7,112,324中公开的任何抗CD19单克隆抗体或存在于兰妥莫单抗(BLINCETO®;在WHO药物信息,2009,推荐的INN:清单62,23(3):240-241中找到的氨基酸序列)和度妥昔珠单抗(aka MGD011;在WHO药物信息,2016年,建议的INN:清单116,30(4):627-629中找到的氨基酸序列)的VL和/或VH结构域,和/或VL区域的1个、2个或全部3个CDR_L和/或VH区域的1个、2个或全部3个CDR_H。

i) CD123结合结构域

[0227] CD123(白细胞介素3受体)包括独特的α链IL-3Ra,其为40kDa分子。白介素3(IL-3)驱动多能干细胞早期分化为红细胞样细胞、骨髓细胞和淋巴祖细胞。已报导,CD123在包括急性髓系白血病(AML)和骨髓增生异常综合症(MDS)在内的各种血液系统恶性肿瘤的恶性细胞上过表达。CD123的过表达与AML预后较差有关。

[0228] 根据本发明,可以使用任何抗CD123抗体的表位结合位点。与人CD123结合并且可以在本发明中采用的代表性人源化抗体是“CD123 MAB-1”(参见,例如,PCT专利公开WO 2015/026892)。

[0229] CD123 MAB-1的VH结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:110) (CDR_H残基用底线显示):

EVQLVQSGAE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYMKWVRQA PGQGLEWIGD
IIPSNGATFY NQKFKGRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSH
LLRASWFAYW GQGT~~LV~~TVSS

[0230] CD123 MAB-1的VL结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:111) (CDR_L残基用底线显示):

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY
PYTFGQGTKL EIK

[0231] 本发明具体包括并涵盖CD137 x CD123结合分子,其包括抗CD123单克隆抗体CD123 MAB-1或公开于US 2017/081424和WO 2016/036937的任何抗CD123抗体或存在于

JNJ-63709178 (Johnson&Johnson, 也参见, WO 2016/036937) 和 XmAb14045 (Xencor, 也请参见, US 2017/081424) 的 VL 和/或 VH 结构域, 和/或 VL 区域的 1 个、2 个或全部 3 个 CDR_L 和/或 VH 结构域的 1 个、2 个或全部 3 个 CDR_H。

j) IL13Rα2

[0232] 白细胞介素-13 受体 α2 (IL13Rα2) 在各种癌症中过表达, 包括胶质母细胞瘤、结直肠癌、宫颈癌、胰腺癌、多发性黑素瘤、骨肉瘤、白血病、淋巴瘤、前列腺癌和肺癌。免疫特异性结合 IL13Rα2 的抗体是商业上可得的并且已经在本领域中进行了描述 (参见, 例如, WO 2008/146911)。结合人 IL13Rα2 的代表性人源化抗体包括 “hu08” (参见, 例如, WO 2014/072888)。

[0233] hu08 的 VH 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:112) 如下所示 (CDR 残基用底线显示):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS** **RNGMSWVRQA** PGKGLEWVA**T**
VSSGGSYIYY **ADSVKGRFTI** SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR**QG**
TTALATRFFD VWGQGTTLTV SS

[0234] hu08 的 VL 结构域的氨基酸序列 (SEQ ID NO:113) 如下所示 (CDR 残基用底线显示):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**KASQDVG** **TAVAWYQQKP** GKAPKLLIY**S**
ASYRSTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC**QH** **HYSAPWT**FGG
 GTKVEIK

[0235] 本发明具体包括并涵盖 CD137 xIL13Rα2 结合分子, 其包括抗 IL13Rα2 单克隆抗体 hu08 的 VL 和/或 VH 结构域和/或 VL 区域的 1、2 或全部 3 个 CDR_L 和/或 VH 结构域的 1、2 或全部 3 个的 CDR_H。

k) ROR1

[0236] 受体酪氨酸激酶样孤儿受体 1 (“ROR1”) 是属于细胞表面受体 ROR 亚科的 I 型膜蛋白。ROR1 是一种癌胚胎抗原, 其在胚胎发生过程中由许多组织表达, 在大多数成熟组织中不存在, 并且在许多血液和实体恶性肿瘤包括卵巢、结肠、肺、淋巴瘤、皮肤、胰腺、睾丸、膀胱、子宫、前列腺、肾上腺、乳腺和 B 细胞恶性肿瘤, 以及在某些癌症干细胞中表达。ROR1 表达与表现出较低分化形态的高级别肿瘤相关, 并与差的临床结果相关。根据本发明, 可以使用任何抗 ROR1 抗体的表位-结合位点。下文在可用于产生本发明分子的代表性人源化/优化抗 ROR1 抗体中提出, 该抗体的变体描述于 WO 2017/142928 中。

(I) 抗 ROR1

[0237] 抗 ROR1 抗体的代表性 VH 的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:114) (CDR 残基用底线显示):

QEQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS** **DYYMSWVRQA** PGKGLEWVA**T**
IYPSSGKTTY **ADSAKGR**LT I SSDNAKDSLY LQMNSLRAED TAVYYCT**DRDS**
YADDAALFDI WGQGTTLTVS S

其中 X 为 I 或 V。

[0238] 抗 ROR1 抗体的代表性 VL 的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:115) (CDR 残基用底线显示):

QLVLTQSPSA SASLGSSVKL TCT**LSSGHKT** **DTIDWYQQQP** GKAPRYLM**KL**
EGSGSYNKGS GVPDRFSGSS SGADWYLTIS SLQSEDEADY YC**GTDYPGNY**
LFGGGTQLTV LG

(2) 其他 ROR1 结合结构域

[0239] 除了以上确定的 ROR1 结合结构域之外, 本发明还考虑使用任何以下抗 ROR1 抗体的

任何表位-结合位点:4A5(参见US 8,212,009);R11,R12和Y31(参见US9,758,586);和A1-A14(参见,例如,US 9,228,023)。

[0240] 本发明具体包括并涵盖CD137 x ROR1结合分子,其包括本文提供的任何抗ROR1单克隆抗体的VL和/或VH结构域和/或VL区域的1、2或全部3个CDR_L和/或VH结构域的1、2或全部3个CDR_H。

D. 本发明的CD137 x TA结合分子

[0241] 本发明特别涉及能够同时结合CD137和TA的具有Fc的四价和三价CD137 x TA结合分子,以及能够同时结合CD137和TA的其他具有Fc的CD137 x TA结合分子。本发明进一步涉及这样的分子在癌症和其他疾病和病况的治疗中的用途。

1. 四价CD137 x TA具有Fc的双抗体

[0242] 本发明特别地涵盖能够同时结合CD137和TA的各种具有Fc的双抗体。代表性的具有Fc的CD137 x TA双抗体描述如下。

[0243] 这样的四价具有Fc的双抗体将包括两条多肽链。此类多肽链中的第一条可在N端至C端方向上包含N端、能够结合“第一”抗原(VL1)(CD137或TA)的表位的抗体的轻链可变结构域(VL)、能够与“第二”抗原(VH2)(如果选择VL1与CD137的表位结合,则为TA;如果选择VL1结合至TA的表位,则为CD137)的表位结合的抗体的重链可变结构域(VH)、含有半胱氨酸的结构域、一个或多个另外的结构域(如下文更详细所述)和C末端。此类多肽链的第二条可以在N末端至C末端方向上包含N末端、能够结合“第二”抗原(VL2)(如果第一个抗原是CD137,则为TA;如果第一个抗原是TA,则为CD137))的表位的抗体的轻链可变结构域(VL)、能够与“第二”抗原(VH2)(如果选择VL2结合CD137的表位,则为TA;如果选择VL2结合TA的表位,则为CD137)的表位结合的抗体的重链可变结构域(VH)、含半胱氨酸的结构域、一个或多个另外的结构域(如下更详细提供)和C-末端。间插接头肽(接头1)将轻链可变结构域(VL1或VL2)与重链可变结构域(VH1或VH2)分开。

[0244] 在某些实施方式中,本发明的具有Fc的双抗体是具有四个表位-结合位点的共价结合的四价双抗体,其包含四条多肽链,并具有图1A所示的一般结构。这种双抗体的第一和第三多肽链在N末端至C末端方向上含有:(i)含VL1的结构域,(ii)含VH2的结构域,(iii)异质二聚体-促进结构域和(iv)含有CH2-CH3序列的结构域。第二和第四多肽链含有:(i)含有VL2的结构域,(ii)含有VH1的结构域和(iii)异质二聚体促进结构域,其中异质二聚体促进结构域促进第一/第三多肽链与第二/第四多肽链的二聚化和共价结合。VH结构域通过间插接头肽(接头2)与异质二聚体-促进结构域连接,所述间插接头肽可以包括半胱氨酸残基。任选地,或另外地,异质二聚体促进结构域可包括半胱氨酸残基。在代表性的具有Fc的CD137 x TA双特异性双抗体的实施方式中,第一多肽链的异质二聚体-促进结构域的C-末端通过间插接头肽(接头3)连接至CH2-CH3结构域。第三和第四多肽链的VL和/或VH结构域,以及第一和第二多肽链的VL和/或VH结构域可以相同或不同,以允许单特异性、双特异性或四特异性的四价结合。在下面的表3中,符号“VL3”和“VH3”分别表示结合这种双抗体的“第三”表位的轻链可变结构域和可变重链结构域。类似地,符号“VL4”和“VH4”分别表示结合这种双抗体的“第四”表位的轻链可变结构域和可变重链结构域。表3提供了本发明的代表性的四链双特异性含Fc区的双抗体的多肽链的一般结构:

表 3

双特异性	第二链	NH ₂ -VL2-VH1- $\odot$ -HPD-COOH
	第一链	NH ₂ -VL1-VH2- $\odot$ -HPD- $\odot$ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第一链	NH ₂ -VL1-VH2- $\odot$ -HPD- $\odot$ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第二链	NH ₂ -VL2-VH1- $\odot$ -HPD-COOH
四特异性	第二链	NH ₂ -VL2-VH1- $\odot$ -HPD-COOH
	第一链	NH ₂ -VL1-VH2- $\odot$ -HPD- $\odot$ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第三链	NH ₂ -VL3-VH4- $\odot$ -HPD- $\odot$ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	第四链	NH ₂ -VL4-VH3- $\odot$ -HPD-COOH

(- $\odot$ -表示具有一个、两个或两个以上半胱氨酸残基的含半胱氨酸的多肽结构域。此表述旨在阐释性而非限制性的。半胱氨酸残基可以存在于另外或可选的结构域中,例如异质二聚体-促进结构域(HPD)中)

[0245] 在某些实施方式中,本发明的CD137 x TA结合分子是双特异性的、四价的(即,具有四个表位结合位点)、具有Fc的双抗体,其包括四条总多肽链(图1A-1C)。本发明的CD137 x TA结合分子是双特异性的、四价的、具有Fc的双抗体,其包括对CD137具有免疫特异性的两个表位-结合位点(其可以能够与CD137的相同表位或CD137的不同表位结合),和对肿瘤抗原具有免疫特异性的两个表位-结合位点(其可以能够与TA的相同表位或TA的不同表位或不同TA的不同表位结合)。

[0246] 在进一步实施方式中,本发明的含有Fc结构域的双抗体可以包括三条多肽链。这种双抗体的第一多肽通常包含三个结构域:(i)含VL1的结构域,(ii)含VH2的结构域和(iii)含CH₂-CH₃序列的结构域。这种双抗体的第二多肽通常含有:(i)含VL2的结构域,(ii)含VH1的结构域,和(iii)促进与双抗体的第一多肽链异源二聚化和共价结合的结构域。这种双抗体的第三条多肽通常包括CH₂-CH₃序列。因此,这种双抗体的第一和第二多肽链通常缔合在一起以形成能够结合第一或第二表位的VL1/VH1表位-结合结构域以及能够与其他此类表位结合的VL2/VH2表位-结合结构域。第一和第二多肽通常通过涉及其各自的第三结构域中的半胱氨酸残基的二硫键彼此结合。值得注意的是,第一和第三多肽链通常彼此复合以通过二硫键形成稳定的Fc结构域。图1D示出了这种双抗体的代表性结构。

[0247] 在上述每个实施方式中,协调选择第一多肽链的轻链可变结构域(VL1),以使其与第二多肽链的重链可变结构域(VH1)相互作用从而形成功能性的表位结合位点,其能够免疫特异性结合第一抗原(即TA或CD137)的表位。相似地,协调选择第二多肽链的轻链可变结构域(VL2),以使其与第一多肽链的重链可变结构域(VH2)相互作用,从而形成功能性表位结合位点,其能够免疫特异性结合第二抗原(即TA或CD137)的表位。因此,协调轻链可变结构域和重链可变结构域的选择,使得两条多肽链共同包括能够结合CD137和TA的表位-结合位点。

[0248] 本发明的另外的具有Fc的双抗体包含5条多肽链,并在图2中描绘。这种双抗体的第一多肽链含有:(i)含VH1的结构域,(ii)含CH1的结构域,以及(iii)含有CH₂-CH₃序列的结构域。第一多肽链可以是含有VH1和重链恒定区的抗体的重链。这种双抗体的第二和/或第五多肽链含有:(i)含VL1的结构域,和(ii)含CL的结构域。这种双抗体的第二和/或第

五多肽链可以是包含与第一/第三多肽链的VH1互补的VL1的抗体的轻链。第一、第二和/或第五条肽链可以与天然存在的抗体分离。可选地，它们可以重组构建。在一个实施方式中，第二和第五多肽链具有相同的氨基酸序列。这种双抗体的第三多肽链含有：(i) 含VH1的结构域，(ii) 含CH1的结构域，(iii) 含CH2-CH3序列的结构域，(iv) 含VL2的结构域，(v) 含VH 3的结构域和(vi) 异质二聚体促进结构域，其中异质二聚体促进结构域促进第三链与第四链的二聚化。这种双抗体的第四多肽含有：(i) 含VL3的结构域，(ii) 含VH2的结构域，和(iii) 促进与双抗体的第三多肽链的异源二聚化和共价结合的结构域。第三和第四多肽链的含有VH3和VH2的结构域的C末端通过间插接头肽(接头2)与异质二聚体促进结构域相连，而第三多肽链的CH2-CH3结构域的C末端通过间插接头肽(接头4)连接至含VL2的结构域。

[0249] 因此，这种双抗体的第一和第二以及第三和第五多肽链缔合在一起以形成能够结合第一表位的两个VL1/VH1结合位点。这种双抗体的第三和第四多肽链缔合在一起形成一个双抗体结合结构域，其包括能够与第二表位结合的VL2/VH2结合位点以及能够与第三表位结合的VL3/VH3结合位点。第一和第三多肽通过在其各自恒定区中涉及半胱氨酸残基的二硫键彼此结合。值得注意的是，第一和第三多肽链彼此复合以形成Fc区。这样的双特异性双抗体具有增强的效力。图2阐释了这种双抗体的结构。应当理解的是，VL1/VH1、VL2/VH2和VL3/VH3结构域可以相同或不同，以允许单特异性、双特异性或三特异性结合。然而，如本文所提供的，选择这些结构域以结合CD137和TA。

[0250] 选择多肽链的VL和VH结构域，以形成对所期望的表位特异性的VL/VH结合位点。由多肽链的缔合形成的VL/VH结合位点可以相同或不同，以允许单特异性、双特异性、三特异性或四特异性的四价结合。特别地，可以选择VL和VH结构域，使得双特异性双抗体可以包括第一表位的两个结合位点和第二表位的两个结合位点，或第一表位的三个结合位点和第二表位的一个结合位点，或第一表位的两个结合位点、第二表位的一个结合位点和第三表位的一个结合位点(如图2所示)。表4提供了本发明的代表性的五链含Fc区的双抗体的多肽链的一般结构：

表 4

双特异性 (2x2)	第二链	$\text{NH}_2\text{-VL1-CL-}\textcircled{\text{C}}\text{-COOH}$
	第一链	$\text{NH}_2\text{-VH1-CH1-}\textcircled{\text{C}}\text{-}\textcircled{\text{C}}\text{-CH2-CH3-COOH}$
	第三链	$\text{NH}_2\text{-VH1-CH1-}\textcircled{\text{C}}\text{-}\textcircled{\text{C}}\text{-CH2-CH3-VL2-VH2-}\textcircled{\text{C}}\text{-HPD-COOH}$
	第五链	$\text{NH}_2\text{-VL1-CL-}\textcircled{\text{C}}\text{-COOH}$
	第四链	$\text{NH}_2\text{-VL2-VH2-}\textcircled{\text{C}}\text{-HPD-COOH}$
双特异性 (3x1)	第二链	$\text{NH}_2\text{-VL1-CL-}\textcircled{\text{C}}\text{-COOH}$
	第一链	$\text{NH}_2\text{-VH1-CH1-}\textcircled{\text{C}}\text{-}\textcircled{\text{C}}\text{-CH2-CH3-COOH}$
	第三链	$\text{NH}_2\text{-VH1-CH1-}\textcircled{\text{C}}\text{-}\textcircled{\text{C}}\text{-CH2-CH3-VL1-VH2-}\textcircled{\text{C}}\text{-HPD-COOH}$
	第五链	$\text{NH}_2\text{-VL1-CL-}\textcircled{\text{C}}\text{-COOH}$
	第四链	$\text{NH}_2\text{-VL2-VH1-}\textcircled{\text{C}}\text{-HPD-COOH}$
三特异性 (2x1x1)	第二链	$\text{NH}_2\text{-VL1-CL-}\textcircled{\text{C}}\text{-COOH}$
	第一链	$\text{NH}_2\text{-VH1-CH1-}\textcircled{\text{C}}\text{-}\textcircled{\text{C}}\text{-CH2-CH3-COOH}$
	第三链	$\text{NH}_2\text{-VH1-CH1-}\textcircled{\text{C}}\text{-}\textcircled{\text{C}}\text{-CH2-CH3-VL2-VH3-}\textcircled{\text{C}}\text{-HPD-COOH}$
	第五链	$\text{NH}_2\text{-VL1-CL-}\textcircled{\text{C}}\text{-COOH}$
	第四链	$\text{NH}_2\text{-VL3-VH2-}\textcircled{\text{C}}\text{-HPD-COOH}$

(- $\textcircled{\text{C}}$ -表示具有一个、两个或两个以上半胱氨酸残基的含半胱氨酸的多肽结构域。

此表述旨在阐释性而非限制性的。半胱氨酸残基可以存在于另外或可选的结构域中,例如异质二聚体-促进结构域(HPD)内)

[0251] 在某些实施方式中,本发明的CD137 x TA结合分子是双特异性的、四价的(即,具有四个表位结合位点)、具有Fc的双抗体,其包括五条总多肽链,具有对CD137免疫特异性的两个表位结合位点(其可以能够与CD137的相同表位或与CD137的不同表位结合),以及对TA具有免疫特异性的两个表位-结合位点(其可以能够与结合到TA的相同表位或TA的不同表位或不同TA的不同表位)。在另一个实施方式中,本发明的CD137 x TA结合分子是双特异性、四价、具有Fc的双抗体,其包含对CD137具有免疫特异性的三个表位-结合位点(其可以能够与CD137的相同表位或CD137的两个或三个不同表位结合)和一个对TA具有特异性的表位-结合位点。

2. 三价CD137 x TA结合分子

[0252] 在一个实施方式中,本发明的CD137 x TA结合分子是三价的,并且将包括第一表位-结合位点(例如,VL1和VH1)、第二表位-结合位点(例如,VL2和VH2)以及第三表位-结合位点(例如VL3和VH3),从而能够与TA的表位、CD137的表位和第三表位结合,第三表位可以是:

- (a) TA的相同或不同的表位;
- (b) CD137的相同或不同表位;或
- (c) 不同TA的表位。

[0253] 在某些实施方式中,本发明的这种“三价CD137 x TA结合分子”将包括用于CD137的表位的两个表位-结合位点(这些表位可以相同或不同)和用于TA表位的一个表位-结合位点。

[0254] 一般而言,本发明的这种三价CD137 x TA结合分子包括三、四、五或多于五条多肽链,这些多肽链借助于这样的多肽对之间的一个或多个二硫键形成共价结合的分子复合物,其包括“双抗体型结合结构域”和“非双抗体型结合结构域”。

[0255] “双抗体型结合结构域”是双抗体,尤其是**DART®**双抗体的表位-结合结构域。上面已经讨论了术语“双抗体”和“**DART®**双抗体”。“非双抗体型”结合结构域旨在表示不具有双抗体型结合结构域的结构结合结构域。典型地,非双抗体型结合结构域为Fab型结合结构域或ScFv型结合结构域。如本文所用,术语“Fab型结合结构域”是指通过免疫球蛋白轻链的VL结构域和免疫球蛋白重链的互补VH结构域相互作用形成的表位-结合结构域。Fab型结合结构域与双抗体型结合结构域的不同之处在于,形成Fab型结合结构域的两条多肽链仅包括单个表位-结合结构域,而形成双抗体型结合结构域的两条多肽链包括至少两个表位-结合结构域。ScFv型结合结构域与双抗体型结合结构域的区别在于同一条多肽链的VL和VH结构域相互作用以形成表位-结合结构域。因此,如本文所用,Fab型结合结构域和ScFv型结合结构域不同于双抗体型结合结构域。

[0256] 因此,本发明的三价CD137 x TA结合分子包括:

- (I) “第一”表位-结合结构域,其能够与“第一”表位免疫特异性结合;
- (II) “第二”表位-结合结构域,其能够与“第二”表位免疫特异性结合;
- (III) “第三”表位-结合结构域,其能够与“第三”表位免疫特异性结合;和
- (IV) 由两个CH2-CH3结构域彼此缔合形成的Fc结构域;

其中:

(A) “第一”表位-结合结构域和“第二”表位-结合结构域均为“双抗体型结合结构域”;

(B) “第三”表位-结合结构域是非双抗体型结合结构域;和

(C) 此类“第一”、“第二”或“第三”表位-结合结构域之一结合TA的表位,而“第一”、“第二”或“第三”表位结合结构域的另一种结合CD137的表位。

[0257] 由剩余的表位-结合结构域结合的表位可以是任何期望的表位,例如CD137的表位。与CD137表位相同或不同的这种表位通过分子的其他表位-结合结构域结合。

[0258] 图3A-3C提供了代表性的三价CD137 x TA结合分子的结构域的图标。图3A示意性地阐释了代表性的三价CD137 x TA结合分子的结构域,其包括四条多肽链的共价复合,并具有一个非双抗体型结合位点(VL3/VH3,因此对于这种表位而言是单价的),和两个双抗体型结合位点(VL1/VH1和VL2/VH2,因此对于每个这样的表位都是单价的)。图3B-3C示意性地阐释了代表性的三价CD137 x TA结合分子的结构域,所述分子包括三条多肽链的共价复合,并具有一个非双抗体型结合位点(VL3/VH3,因此对于这种表位是单价的),和两个双抗体型结合位点(VL1/VH1和VL2/VH2,因此对于每个这样的表位都是单价的)。非双抗体型结合位点是图3A-3B中的Fab型结合结构域,并且是图3C中的scFv型结合结构域。如下提供的,由多肽链的缔合形成的VL/VH结合位点可以相同或不同,以允许单特异性、双特异性或三特异性的三价结合。

II. 代表性的CD137 x TA结合分子

[0259] 本发明提供了CD137 x TA结合分子,其是双特异性四价Fc双抗体,其能够同时且特异性地与CD137和TA结合。如上所述,本发明的CD137 x TA结合分子可包含三、四或五条

多肽链。以下提供了能够与CD137以及与TA、PD-L1或HER2结合的代表性CD137 x TA结合分子的多肽链(称为“DART-A”、“DART-A1”、“DART-A2”、“DART-A3”、“DART-A4”、“DART-A5”、“DART-A6”、“DART-A7”、“DART-A8”、“DART-A9”、“DART-A10”、“DART-B1”和“DART-B2”)。本发明进一步提供了CD137 x TA结合分子,其是能够同时且特异性地与CD137和TA结合的双特异性三价结合分子。如上指出的,本发明的三价CD137 x TA结合分子可包括四条多肽链。代表性三价CD137 x TA结合分子的多肽链能够与CD137和TA、PD-L1或HER2结合(命名为“TRIDENT-A”、“TRIDENT-A4”、“TRIDENT-A5”、“TRIDENT-A6”、“TRIDENT-B1”、“TRIDENT-B1”)。

A. 四价CD137 x TA结合分子

1. DART-A

[0260] DART-A为四价CD137 x CD137 x TA x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和两个用于代表性的TA,PD-L1的结合位点。DART-A包括四条多肽链,其中第一和第三多肽链相同,并且第二和第四多肽链相同(见图1B)。DART-A包括CD137 MAB-6(1.1)和hPD-L1 MAB-2(1.1)的结合结构域。

[0261] DART-A的第一和第三多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VL结构域(VL_{PD-L1})(hPD-L1 MAB-2 VL1(SEQ ID NO:58))、间插接头肽(接头1;GGGSGGG(SEQ ID NO:16))、能够结合CD137的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD137})(CD137 MAB-6 VH1(SEQ ID NO:46))、间插接头肽(接头2;GGCGGG(SEQ ID NO:18))、异质二聚体促进(E-螺旋)结构域(EVAACKEK-EVAALEEK-EVAALEEK-EVAALEEK (SEQ ID NO: 39))、接头(LEPKSADKTHTCPPCP(SEQ ID NO:30))、包括L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E置换的代表性人IgG1的CH2-CH3结构域(SEQ ID NO:43,其中X不存在)和C末端。

[0262] 因此,DART-A的第一和第三多肽链包括:SEQ ID NO:58—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43。

[0263] DART-A的第一和第三多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:116):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPLTFGQ
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ ESGPGLVKPS ETLSLTCTVS GGSISSYYWS
WIRQPPGKGL EWIGRIYTSG STNYPNPSLKS RVTMSVDTSK NQFSLKLSSV
TAADTAVYYC ARDGWYDEDY NYYGMDVWGQ GTTVTVSSGG CGGGEVAACE
KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKLEPKSADK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL
FPPKPKDTLY ITREPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK
TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLS
LSPG
```

[0264] 可以采用可选的DART-A第一和第三多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋)结构域(EVAALEEK-

EVAALEEK-EVAALEEK-EVAALEEK (SEQ ID NO: 37))。这种可选的DART-A第一和第三多肽链包括:SEQ ID NO:58—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—

SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43。可以使用另外可选的DART-A第一和第三多肽链,其中氨基酸残基SEQ ID NO:58 (hPD-L1 MAB-2 VL1) 被SEQ ID NO:72 (hPD-L1 MAB-2 VL2) 的氨基酸残基取代。包括许多这样的多肽链的可选分子描述如下。

[0265] DART-A的第二和第四多肽链在N末端至C末端方向包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137} (CD137MAB-6 VL1 (SEQ ID NO:50))、间插接头肽(接头1; GGGSGGG (SEQ ID NO:16))、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VH结构域(VH_{PD-L1} (hPD-L1 MAB-2 VH1, SEQ ID NO:57))、间插接头肽(接头2; GGCGGG (SEQ ID NO:18))、异质二聚体-促进(K-螺旋)结构域(KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 40) 和C末端。

[0266] 因此,DART-A的第二和第四多肽链包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:57—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0267] DART-A的第二和第四多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:117):

```
EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTVKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSRLRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIG GGTYYPTDV KGRFTISRDN AKNTLYLQMN
SLKTEDTAVY YCARQGLPYY FDYWGQGLTV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE
```

[0268] 可以采用可选的DART-A第二和第四多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(K-螺旋)结构域(例如, KVAALKE-

KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38))。这种可选的DART-A第二和第四多肽链包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:57—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。可以使用另外可选的DART-A第一和第三多肽链,其中SEQ ID NO:50 (CD137 MAB-6 VL1) 的氨基酸残基被SEQ ID NO:55 (CD137 MAB-6 VL2) 或SEQ ID NO:56 (CD137 MAB-6 VL3) 的氨基酸残基代替,和/或SEQ ID NO:57 (hPD-L1 MAB-2 VH1) 的氨基酸残基被SEQ ID NO:67 (hPD-L1 MAB-2 VH2)、SEQ ID NO:68 (hPD-L1 MAB-2 VH3)、SEQ ID NO:69 (hPD-L1 MAB-2 VH4)、SEQ ID NO:70 (hPD-L1 MAB-2 VH5) 或SEQ ID NO:72 (hPD-L1 MAB-2 VH6) 的氨基酸残基代替。可选地,可以用结合PD-L1的不同表位或结合不同TA的TA结合分子的VL/VH结构域代替PD-L1 VL/VH结构域。包括许多这样的多肽链的可选分子描述如下。

2. DART-A1

[0269] DART-A1为四价CD137 x CD137 x TA x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和两个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。DART-A1包括四条多肽链,其中第一和第三多肽链相同,并且第二和第四多肽链相同(见图3B)。DART-A1包括CD137 MAB-6 (1.1) 和hPD-L1 MAB-2 (2.1) 的结合结构域。

[0270] DART-A1的第一和第三多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VL结构域(VL_{PD-L1}) (hPD-L1 MAB-2 VL1 (SEQ ID NO:58))、间插接头肽(接头1; GGGSGGG (SEQ ID NO:16))、能够结合CD137的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD137}) (CD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO:46))、间插接头肽(接头2; GGCGGG (SEQ ID NO:18))、异质二聚体促

进(E-螺旋)结构域(**EVAACKEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK**

(**SEQ ID NO: 39**))、接头(LEPKSADKTHTCPPCP(SEQ ID NO:30))、包括L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E置换的代表性人IgG1的CH2-CH3结构域(SEQ ID NO:43)和C末端。

[0271] 因此,DART-A1的第一和第三多肽链包括:SEQ ID NO:58—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43。

[0272] DART-A1的第一和第三多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:118):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ HYNTPLTFGQ
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ ESGPGLVKPS ETLSLTCTVS GGSISSYYWS
WIRQPPGKGL EWIGRIYTSQ STNYPNLSKS RVTMSVDTSK NQFSLKLSSV
TAADTAVYYC ARDGWYDEYD NYYGMDVWGQ GTTVTVSSGG CGGGEVAACE
KEVAALKEV AALEKEVAAL EKLEPKSADK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL
FPPKPKDTLY ITREPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK
TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLS
LSPGK
```

[0273] DART-A1的第二和第四多肽链在N末端至C末端方向包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}(CD137 MAB-6 VL1(SEQ ID NO:50))、间插接头肽(接头1;GGGSGGG(SEQ ID NO:16))、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VH结构域(VH_{PD-L1}(hPD-L1 MAB-2 VH2,SEQ ID NO:67))、间插接头肽(接头2;GGCGG(SEQ ID NO:18))、异质二聚体-促进(K-螺旋)结构域(**KVAACKE-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK** (SEQ ID NO:40))和C末端。

[0274] 因此,DART-A1的第二和第四多肽链包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:67—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0275] DART-A1的第二和第四多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:119):

```
EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIG GGTYYPDV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
SLRAEDTAVY YCARQGLPYY FDYWGQGLV TVSSGGCGGG KVAACCKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE
```

[0276] 特别考虑的是,可以采用可选的DART-A1第一/第三和第二/第四多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)和

KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK (SEQ ID NO:38))。此类可选的

DART-A1第一/第三多肽链有时包括:SEQ ID NO:58—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43,而这种可选的DART-A1第二/第四链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:67—SEQ ID NO:18—SEQ ID

NO:38。

3.DART-A2

[0277] DART-A2为四价CD137 x CD137 x TA x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和两个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。DART-A2包括四条多肽链,其中第一和第三多肽链相同,第二和第四多肽链相同(见图3B)。DART-A2包括CD137 MAB-6(1.1)和hPD-L1 MAB-2(2.2)的结合结构域。

[0278] DART-A2的第一和第三多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VL结构域(VL_{PD-L1})(hPD-L1 MAB-2 VL2(SEQ ID NO:72))、间插接头肽(接头1;GGSGGGG(SEQ ID NO:16))、能够结合CD137的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD137})(CD137 MAB-6 VH1(SEQ ID NO:46))、间插接头肽(接头2;GGCGGG(SEQ ID NO:18))、异质二聚体-促进(E-螺旋)结构域(**EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 39)**)、接头(LEPKSADKTHTCPPCP(SEQ ID NO:30))、包括L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E置换的代表性人IgG1的CH2-CH3结构域(SEQ ID NO:43)和C末端。

[0279] 因此,DART-A2的第一和第三多肽链包括:SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43。

[0280] DART-A2的第一和第三多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:120):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN EAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPITFGQ
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ ESGPGLVKPS ETLTLTCTVS GGSISSYYWS
WIRQPPGKGL EWIGRIYTSG STNYPNPSLKS RVTMSVDTSK NQFSLKLSSV
TAADTAVYYC ARDGWYDEY NYYGMDVWGQ GTTVTVSSGG CGGGEVAACE
KEVALEKEV AALEKEVAAL EKLEPKSADK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL
FPPKPKDTLY ITREPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK
TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL
LSPGK
```

[0281] DART-A2的第二和第四多肽链与DART-A1的第二和第四多肽链(SEQ ID NO:119)相同。

[0282] 特别考虑的是,可以采用可选的DART-A2第一/第三和第二/第四多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)和

KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38))。此类可选

的DART-A2第一/第三多肽链有时包括:SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43,而这种可选的DART-A2第二/第四链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:67—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

4.DART-A3

[0283] DART-A3为四价CD137 x CD137 x TA x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和两个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。DART-A3包括四条多肽链,其中第一和第三多肽链

相同,第二和第四多肽链相同(见图3B)。DART-A3包括CD137 MAB-6 (1.1)和hPD-L1 MAB-2 (3.1)的结合结构域。

[0284] DART-A3的第一和第三多肽链与DART-A1 (SEQ ID NO:118)的第一和第三多肽链相同。

[0285] DART-A3的第二和第四条肽链在N末端至C末端方向包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}(CD137 MAB-6 VL1 (SEQ ID NO:50))、间插接头肽(接头1;GGGSGGG (SEQ ID NO:16))、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VH结构域(VH_{PD-L1}(hPD-L1 MAB-2 VH3,SEQ ID NO:68)、间插接头肽(接头2;GGCGGG (SEQ ID NO:18))异质二聚体-促进(K-螺旋)结构域(**KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)**和C末端。

[0286] 因此,DART-A3的第二和第四多肽链包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0287] DART-A3的第二和第四多肽链的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:121):

```
EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIK GGTYYPTV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN

SLRAEDTAVY YCARQGLPYY GDYWGQGLTV TVSSGGCGGG KVAACCKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE
```

[0288] 特别考虑的是,可以采用可选的DART-A3第一/第三和第二/第四多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAALKE-EVAALKE-EVAALKE- EVAALKE (SEQ ID NO:37)和

KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE- KVAALKE (SEQ ID NO:38))。此类可选

的DART-A3第一/第三多肽链有时包括:SEQ ID NO:58—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43,而这种可选的DART-A3第二/第四链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

5. DART-A4

[0289] DART-A4为四价CD137 x CD137 x TA x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和两个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。DART-A4包括四条多肽链,其中第一和第三多肽链相同,并且第二和第四多肽链相同(见图3B)。DART-A4包括CD137 MAB-6 (1.1)和hPD-L1 MAB-2 (3.2)的结合结构域。

[0290] DART-A4的第一和第三多肽链与DART-A2 (SEQ ID NO:120)的第一和第三多肽链相同。

[0291] DART-A4的第二和第四多肽链与DART-A3 (SEQ ID NO:121)的第二和第四多肽链相同。

[0292] 特别考虑的是,可以采用可选的DART-A4第一/第三和第二/第四多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)和
KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38))。此类可选的DART-A4第一/第三多肽链有时包括:SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43,而这种可选的DART-A4第二/第四链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

6.DART-A5

[0293] DART-A5为四价CD137 x CD137 x TA x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和两个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。DART-A5包括四条多肽链,其中第一和第三多肽链相同,第二和第四多肽链相同(见图3B)。DART-A5包括CD137 MAB-6(1.2)和hPD-L1 MAB-2(3.2)的结合结构域。

[0294] DART-A5的第一和第三多肽链与DART-A2(SEQ ID NO:120)的第一和第三多肽链相同。

[0295] DART-A5的第二和第四多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}(CD137 MAB-6 VL2(SEQ ID NO:55))、间插接头肽(接头1;GGGSGGG(SEQ ID NO:16))、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VH结构域(VH_{PD-L1}(hPD-L1 MAB-2 VH2,SEQ ID NO:68))、间插接头肽(接头2;GGCGG(SEQ ID NO:18))、异质二聚体-促进(K-螺旋)结构域(**KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE** (SEQ ID NO:40))和C末端。

[0296] 因此,DART-A5的第二和第四多肽链包括:SEQ ID NO:55—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0297] DART-A5的第二和第四多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:122):

```
EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWYQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYQC QDYDLPWTFG
QGTVKEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIK GGTTYPDPTV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
SLRAEDTAVY YCARQGLPYY GDYWGQGLTV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE
```

[0298] 特别考虑的是,可以采用可选的DART-A5第一/第三和第二/第四多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)和
KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38))。此类可选的DART-A5第一/第三多肽链有时包括:SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43,而这种可选的DART-A5第二/第四链有时包括:SEQ ID NO:55—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

7.DART-A6

[0299] DART-A6为四价CD137 x CD137 x TA x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点

和两个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。DART-A6包括四条多肽链,其中第一和第三多肽链相同,并且第二和第四多肽链相同(见图3B)。DART-A6包括CD137 MAB-6(1.3)和hPD-L1 MAB-2(3.2)的结合结构域。

[0300] DART-A6的第一和第三多肽链与DART-A2(SEQ ID NO:120)的第一和第三多肽链相同。

[0301] DART-A6的第二和第四多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}(CD137 MAB-6 VL3(SEQ ID NO:56))、间插接头肽(接头1;GGGSGGG(SEQ ID NO:16))、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VH结构域(VH_{PD-L1}(hPD-L1 MAB-2 VH3,SEQ ID NO:68))、间插接头肽(接头2;GGCGGG(SEQ ID NO:18))、异质二聚体-促进(K-螺旋)结构域(**KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)**和C末端。

[0302] 因此,DART-A6的第二和第四多肽链包括:SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0303] DART-A6的第二和第四多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:123):

```
EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQOK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYCYQ QDYDLPWTFG
QGTEKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSRLRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIK GGTYYPDIV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
SLRAEDTAVY YCARQGLPYY GDYWGQGLV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE
```

[0304] 特别考虑的是,可以采用可选的DART-A6第一/第三和第二/第四多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAALKE-EVAALKE-EVAALKE- EVAALKE (SEQ ID NO:37)和

KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE- KVAALKE (SEQ ID NO:38))。此类可选

的DART-A6第一/第三多肽链有时包括:SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43,而这种可选的DART-A6第二/第四链有时包括:SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

8. DART-A7

[0305] DART-A7为四价CD137 x CD137 x TA x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和两个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。DART-A7包括四条多肽链,其中第一和第三多肽链相同,第二和第四多肽链相同(见图3B)。DART-A7包括CD137 MAB-6(1.1)和hPD-L1 MAB-2(4.2)的结合结构域。

[0306] DART-A7的第一和第三多肽链与DART-A2(SEQ ID NO:120)的第一和第三多肽链相同。

[0307] DART-A7的第二和第四多肽链在N末端至C末端方向包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}(CD137 MAB-6 VL1(SEQ ID NO:50))、间插接头肽(接头1;GGGSGGG(SEQ ID NO:16))、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VH结构域(VH_{PD-L1}(hPD-L1 MAB-2 VH4,SEQ ID NO:69))、间插接头肽(接头2;GGCGGG(SEQ ID NO:18))、异质二聚体-促进

(K-螺旋)结构域(**KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)**)和C末端。

[0308] 因此,DART-A7的第二和第四多肽链包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:69—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0309] DART-A7的第二和第四多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:124):

```
EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYQC QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIG GGTTYYPDTV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
SLRAEDTAVY YCARAGLPYY FDYWGQGLV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE
```

[0310] 特别考虑的是,可以采用可选的DART-A7第一/第三和第二/第四多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAALKE-EVAALKE-EVAALKE- EVAALKE (SEQ ID NO:37)和

KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE- KVAALKE (SEQ ID NO:38))。此类可选

的DART-A7第一/第三多肽链有时包括:SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43,而这种可选的DART-A7第二/第四链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:69—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

9. DART-A8

[0311] DART-A8为四价CD137 x CD137 x TA x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和两个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。DART-A8包括四条多肽链,其中第一和第三多肽链相同,第二和第四多肽链相同(见图3B)。DART-A8包括CD137 MAB-6(1.1)和hPD-L1 MAB-2(5.2)的结合结构域。

[0312] DART-A8的第一和第三多肽链与DART-A2(SEQ ID NO:120)的第一和第三多肽链相同。

[0313] DART-A8的第二和第四多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}(CD137 MAB-6 VL1(SEQ ID NO:50))、间插接头肽(接头1;GGGSGGG(SEQ ID NO:16))、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VH结构域(VH_{PD-L1}(hPD-L1 MAB-2 VH5,SEQ ID NO:70))、间插接头肽(接头2;GGCGGG(SEQ ID NO:18))、异质二聚体-促进(K-螺旋)结构域(**KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)**)和C末端。

[0314] 因此,DART-A8的第二和第四多肽链包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:70—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0315] DART-A8的第二和第四多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:125):

```
EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
```

GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTSSLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
 QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSSYTM
 SWVRQAPGKG LEWVAYISIK GGTTYYPDTV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
 SLRAEDTAVY YCARAGLPYY FDYWGQGTLV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
 ALKEKVAALK EKVAALKE

[0316] 特别考虑的是,可以采用可选的DART-A8第一/第三和第二/第四多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)和

KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38))。此类可选的DART-A8第一/第三多肽链有时包括:SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43,而这种可选的DART-A8第二/第四链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:70—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

10.DART-A9

[0317] DART-A9为四价CD137 x CD137 x TA x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和两个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。DART-A9包括四条多肽链,其中第一和第三多肽链相同,第二和第四多肽链相同(见图3B)。DART-A9包括CD137 MAB-6 (1.1) 和hPD-L1MAB-2 (6.2) 的结合结构域。

[0318] DART-A9的第一和第三多肽链与DART-A2 (SEQ ID NO:120) 的第一和第三多肽链相同。

[0319] DART-A9的第二和第四多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137} (CD137 MAB-6 VL1 (SEQ ID NO:50))、间插接头肽(接头1;GGSGGGG (SEQ ID NO:16))、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VH结构域(VH_{PD-L1} (hPD-L1 MAB-2 VH6, SEQ ID NO:71))、间插接头肽(接头2;GGCGGG (SEQ ID NO:18)),异质二聚体-促进(K-螺旋)结构域(**KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)**)和C末端。

[0320] 因此,DART-A9的第二和第四多肽链包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:71—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0321] DART-A9的第二和第四多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:126):

EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
 GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTSSLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
 QGTKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSSYTM
 SWVRQAPGKG LEWVAYISIG GGTTYYPDTV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
 SLRAEDTAVY YCARAGLPYY GDYWGQGTLV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
 ALKEKVAALK EKVAALKE

[0322] 特别考虑的是,可以采用可选的DART-A9第一/第三和第二/第四多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)和

KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38))。此类可选

的DART-A9第一/第三多肽链有时包括:SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43,而这种可选的DART-A9第二/第四链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:71—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

11.DART-A10

[0323] DART-A10为四价CD137 x CD137 x TA x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和两个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。DART-A10包括四条多肽链,其中第一和第三多肽链相同,并且第二和第四多肽链相同(见图3B)。DART-A10包括CD137 MAB-6(1.3)和hPD-L1 MAB-2(4.2)的结合结构域。

[0324] DART-A10的第一和第三多肽链与DART-A2(SEQ ID NO:120)的第一和第三多肽链相同。

[0325] DART-A10的第二和第四多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}(CD137 MAB-6 VL3(SEQ ID NO:56))、间插接头肽(接头1;GGGSGGGG(SEQ ID NO:16))、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VH结构域(VH_{PD-L1}(hPD-L1 MAB-2 VH4,SEQ ID NO:69))、间插接头肽(接头2;GGCGGG(SEQ ID NO:18))、异质二聚体-促进(K-螺旋)结构域(**KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE** (SEQ ID NO:40))和C末端。

[0326] 因此,DART-A10的第二和第四多肽链包括:SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:69—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0327] DART-A10的第二和第四多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:139):

```
EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYVCQ QDYDLPWTFG
QGKVEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSRLRLSCAA SGFTFSSYTM
SWVRQAPGKG LEWVAYISIG GGTYYPTDV KGRFTISRDN AKNSLYLQMN
SLRAEDTAVY YCARAGLPYY FDYWGQGLTV TVSSGGCGGG KVAACKEKVA
ALKEKVAALK EKVAALKE
```

[0328] 特别考虑的是,可以采用可选的DART-A10第一/第三和第二/第四多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37)和

KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38))。此类可

选的DART-A10第一/第三多肽链有时包括:SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43,而这种可选的DART-A10第二/第四链有时包括:SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:69—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

12.DART-B1

[0329] DART-B1为二价CD137 x TA结合分子,其具有一个CD137结合位点和一个用于代表性TA,HER2的结合位点。DART-B1包括三条多肽链,其中第一、第二和第三条多肽链不同(见图1D)。DART-B1包括CD137 MAB-6(1.1)和hHER2 MAB-1(1.3)的结合结构域。

[0330] DART-B1的第一多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克

隆抗体VL结构域(VL_{CD137} (CD137 MAB-6 VL1 (SEQ ID NO:50))、间插接头肽(接头1;GGGSGGGG (SEQ ID NO:16))、能够结合HER2(的单克隆抗体的VH结构域VH_{HER2} (hHER2 MAB-1 VH1, SEQ ID NO:80))、间插接头肽(接头2;GGCGGG (SEQ ID NO:18))、异质二聚体促进(E-螺旋)结构域(**EVAALE**EK-EVAALE**EK-EVAALE**EK-EVAALE**EK**** (SEQ ID NO:37))、间插接头肽(GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:21))、包括L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E置换的“具有杵的”CH2和CH3结构域(SEQ ID NO:146),以及C末端。******

[0331] 因此,DART-B1的第一多肽链包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:80—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146。

[0332] DART-B1的第一多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:143):

```
EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYQC QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCA SGYTFTNYGM
NWVRQAPGG LEWMGWINTN IGEPTYTEEF KGRVTMTRDT SISTAYMELS
RLRSDDTAVY YCARDGYN RVSYWGQGT VTVSSGGCGG GEVAALEKEV
AALEKEVAAL EKEVAALEKG GGDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
DTLYITREPE VTCVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
```

[0333] DART-B1的第二多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合HER2的单克隆抗体的VL结构域(VL_{HER2} (hHER2 MAB-1 VL3, SEQ ID NO:85))、间插接头肽(接头1;GGGSGGGG (SEQ ID NO:16))、能够结合CD137的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD137} (CD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO:46))、间插接头肽(接头2;GGCGGG (SEQ ID NO:18))、异质二聚体促进(K-螺旋)结构域(**KVAALE**KE-KVAALE**KE-KVAALE**KE-KVAALE**KE**** (SEQ ID NO:38))和C末端。******

[0334] 因此,DART-B1的第二多肽链包括:SEQ ID NO:85—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

[0335] DART-B1的第二多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:144):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIS NYLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
GTKLEIKGGG SGGGGQVQLQ ESGPGLVKPS ETLSTCTVS GGSISSYYWS
WIRQPPGKGL EWIGRIYTS STNYPNLSLKS RVTMSVDTSK NQFSLKLSSV
TAADTAVYYC ARDGWYDEY NYYGMDVWGQ GTTVTVSSGG CGGKVAALK
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE
```

[0336] DART-B1的第三多肽链在N末端至C末端方向上包括接头DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:20) 和包括L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/H435R置换的“具有杵的”CH2和CH3结构域(SEQ ID NO:149)。

[0337] 因此,DART-B1的第三多肽链包括:SEQ ID NO:20—SEQ ID NO:149。

[0338] 如将认识到的,DART-B的第三多肽链不含有任何表位-结合结构域,因此可以在具有图1D所示的双抗体结构的各种CD137 x TA结合分子中采用。

[0339] DART-B1的第三多肽链具有SEQ ID NO:145的氨基酸序列:

DKTHTCPCP APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

13.DART-B2

[0340] DART-B2为四价CD137 x CD137 x TA x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和两个用于代表性TA,HER2的结合位点。DART-B1包括四条多肽链,其中第一和第三多肽链相同,并且第二和第四条多肽链相同(见图1B)。DART-B1包括CD137 MAB-6 (1.1) 和hHER2 MAB-1 (1.3) 的结合结构域。

[0341] DART-B2的第一和第三多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合HER2的单克隆抗体的VL结构域(VL_{HER2} (hHER2 MAB-1 VL3, SEQ ID NO:85))、间插接头肽(接头1; GGGSGGG (SEQ ID NO:16))、能够结合CD137的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD137}) (CD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO:46))、间插接头肽(接头2; GCGGG (SEQ ID NO:18))、异质二聚体促进(E-螺旋)结构域(**EVAACEK-EVAALKE-EVAALKE-EVAALKE (SEQ ID NO:39)**)、接头(LEPKSADKTHCPCP (SEQ ID NO:30))、包括L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E置换的代表性人IgG1的CH2-CH3结构域(SEQ ID NO:43,其中X为不存在)和C末端。

[0342] 因此,DART-B2的第一和第三多肽链包括:SEQ ID NO:85—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43。

[0343] DART-B2的第一和第三多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:151):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIS NYLSWFQQKP GKAPKTLIYR
 ANRLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
 GTKLEIKGGG SGGGQVQLQ ESGPGLVKPS ETLTLTCTVS GGSISYYWS
 WIRQPPGKGL EWIGRIYTSQ STNYPNLSKS RVTMSVDTSK NQFSLKLSSV
 TAADTAVYYC ARDGWYDEY NYYGMDVWGQ GTTVTVSSGG CGGGEVAACE
 KEVAALKEV AALEKEVAAL EKLEPKSADK THTCPCPAP EAAGGPSVFL
 FPPKPKDTLY ITREPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
 PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKG FLYPSDIAVEWE SNGQPENNYK
 TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS
 LSPGK

[0344] DART-B2的第二和第四多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137} (CD137 MAB-6 VL1 (SEQ ID NO:50))、间插接头肽(接头1; GGGSGGG (SEQ ID NO:16))、能够结合HER2的单克隆抗体的VH结构域(VH_{HER2} (hHER2 MAB-1 VH1, SEQ ID NO:80))、间插接头肽(接头2; GCGGG (SEQ ID NO:18))、异质二聚体促进(K-螺旋)结构域(**KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40)**)和C末端。

[0345] 因此,DART-B2的第二和第四多肽链包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:80—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0346] DART-B2的第二和第四多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:152):

EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
 GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
 QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCA SGYTFTNYGM
 NWVRQAPGQG LEWMGWINTN IGEPTYTEEF KGRVTMTRDT SISTAYMELS
 RLRSDDTAVY YCARDGYN RVSYWGQGT VTVSSGGCGG GKVAACKEKV
 AALKEKVAAL KEKVAALKE

[0347] 特别考虑的是,可以采用可选的DART-B2第一/第三和第二/第四多肽链,其包括缺乏半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAALKE-EVAALKE-EVAALKE-EVAALKE (SEQ ID NO:37)和

KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38))。此类可选的DART-B2第一/第三多肽链有时包括:SEQ ID NO:85—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43,而这种可选的DART-B2第二/第四链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:80—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

B. 三价CD137 x TA结合分子

1. TRIDENT-A

[0348] TRIDENT-A为三价CD137 x CD137 x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和一个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。TRIDENT-A包括四条多肽链(见图3A,其中VL1/VH1(位点A)与VL2/VH2(位点B)相同,并结合CD137,而VL3/VH3(位点C)结合PD-L1)。TRIDENT-A包括CD137 MAB-6(1.1)和hPD-L1 MAB-2(1.1)的结合结构域。

[0349] TRIDENT-A的第一多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}) (CD137 MAB-6 VL1((SEQ ID NO:50))、间插接头肽(接头1;GGGSGGGG(SEQ ID NO:16))、能够结合CD137的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD137}) (CD137 MAB-6 VH1(SEQ ID NO:46))、间插接头肽(接头2;GGCGGG(SEQ ID NO:18))、异质二聚体促进(E-螺旋)结构域(**EVAALKE-EVAALKE-EVAALKE-EVAALKE (SEQ ID NO:37))**、间插接头肽(GGGDKHTCPCP(SEQ ID NO:21)),包括L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E置换的“具有杵的”CH2和CH3结构域(SEQ ID NO:146),以及C末端。

[0350] 因此,TRIDENT-A的第一多肽链包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146。

[0351] TRIDENT-A的第一多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:127):

EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
 GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
 QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL QESGPGLVKP SETLSLTCTV SGGSISSYYW
 SWIRQPPGKG LEWIGRIYTS GSTNYPNPSLK SRVTMSVDTN KNQFSLKLSS
 VTAADTAVYY CARDGWYDED YNYYGMDVWG QGTTVTVSSG GCGGGEVAAL
 EKEVAALKE VAALKEVAA LEKGGGDKTH TCPCPAPPA AGGPSVFLFP
 PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT
 PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
 PGK

[0352] TRIDENT-A的第二多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}) (CD137 MAB-6 VL1 ((SEQ ID NO:50))、间插接头肽(接头1; GGGSGGG (SEQ ID NO:16))、能够结合CD137的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD137}) (CD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO:46))、间插接头肽(接头2; GCGGG (SEQ ID NO:18))、异质二聚体促进(K-螺旋)结构域(**KVAAL**KE**-**KVAAL**KE**-**KVAAL**KE**-**KVAAL**KE**** (SEQ ID NO:38))和C末端。******

[0353] 因此,TRIDENT-A的第二多肽链包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

[0354] TRIDENT-A的第二多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:128):

```
EIVMTQSPAT LSLTPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQI PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL QESGPGLVKP SETLSLTCTV SGGSISSYYW
SWIRQPPGKG LEWIGRIYTS GSTNYPNPSLK SRVTMSVDTN KNQFSLKLSS
VTAADTAVYY CARDGWYDED YNYYGMDVWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL
KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE
```

[0355] 可以采用可选的TRIDENT-A第一和第二多肽链,其包括含有半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAACEK**-**EVAAL**EK**-**EVAAL**EK**-**EVAAL**EK**** (SEQ ID NO:39)和******

KVAACEK**-**KVAAL**EK**-**KVAAL**EK**-**KVAAL**EK**** (SEQ ID NO:40))。此类可选的******

TRIDENT-A分子中,第一多肽链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146,并且第二多肽链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。可以采用另外可选的TRIDENT-A第一和第二多肽链,其中SEQ ID NO:50 (CD137 MAB-6 VL1)的氨基酸残基被SEQ ID NO:55 (CD137 MAB-6 VL2)或SEQ ID NO:56 (CD137 MAB-6 VL3)的氨基酸残基取代。还具体地考虑到CD137 VL/VH结构域对可以被TA结合分子的VL/VH对取代。下文描述了包括许多这样的多肽链的可选分子。

[0356] TRIDENT-A的第三多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VH结构域(VH_{PD-L1}) (hPD-L1 MAB-2 VH1 (SEQ ID NO:57))、人IgG1 CH1结构域(SEQ ID NO:3)、人IgG1铰链区(SEQ ID NO:7)以及包括L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/H435R置换(SEQ ID NO:149)的“具有白的”CH2和CH3结构域。

[0357] 因此,TRIDENT-A的第三多肽链包括:SEQ ID NO:57—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149。

[0358] TRIDENT-A的第三多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:129):

```

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIGGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLKTED TAVYYCARQG
LPYYFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
TLYITREPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK

```

[0359] TRIDENT-A的第四多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VL结构域(VL_{PD-L1}) (hPD-L1 MAB-1 VL1 (SEQ ID NO:58))、人IgG CL κ 结构域(SEQ ID NO:1)和C末端。

[0360] 因此,TRIDENT-A的第四多肽链包括:SEQ ID NO:69—SEQ ID NO:1。

[0361] TRIDENT-A的第四多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:130):

```

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPLTTFGQ
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

```

[0362] 可以使用可选的TRIDENT-A第三和第四多肽链,其中SEQ ID NO:57 (hPD-L1 MAB-2 VH1)的氨基酸残基被SEQ ID NO:67 (hPD-L1 MAB-2 VH2)、SEQ ID NO:68 (hPD-L1 MAB-2 VH3)、SEQ ID NO:69 (hPD-L1 MAB-2 VH4)、SEQ ID NO:70 (hPD-L1 MAB-2 VH5)或SEQ ID NO:72 (hPD-L1 MAB-2 VH6)的氨基酸残基取代,和/或SEQ ID NO:58 (hPD-L1 MAB-2 VL1)的氨基酸残基被SEQ ID NO:72 (hPD-L1 MAB-2 VL2)的氨基酸残基取代。可替选的,可以用结合PD-L1的不同表位或结合不同TA的TA结合分子的VL/VH结构域取代PD-L1 VL/VH结构域。还特别考虑了在通过第一和第二多肽链的缔合形成TA结合位点的情况下,第三和第四多肽链的VL/VH结构域可以被本文提供的任何CD137 MAB-6 VL/VH结构域取代。包含几个这样的多肽链的可选分子描述如下。

2. TRIDENT-A4

[0363] TRIDENT-A4为三价CD137 x CD137 x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和一个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。TRIDENT-A4包括四条多肽链(见图3A,其中VL1/VH1(位点A)与VL2/VH2(位点B)相同,并结合CD137,而VL3/VH3(位点C)结合PD-L1)。TRIDENT-A4包括CD137 MAB-6 (1.1)和hPD-L1 MAB-2 (3.2)的结合结构域。

[0364] TRIDENT-A4的第一多肽链与TRIDENT-A (SEQ ID NO:127)的第一多肽链相同。

[0365] TRIDENT-A4的第二多肽链与TRIDENT-A (SEQ ID NO:128)的第二多肽链相同。

[0366] 特别考虑的是,可以采用可选的TRIDENT-A4第一和第二多肽链,其包括含有半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAACKE-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39)和

KVAACKE-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK (SEQ ID NO:40))。在此类可选的TRIDENT-A4分子中,第一多肽链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146,并且第二多

肽链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0367] TRIDENT-A4的第三多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合PD-L1的单克隆抗体的VH结构域(VH_{PD-L1}) (hPD-L1 MAB-2 VH3 (SEQ ID NO:68))、人IgG1 CH1结构域 (SEQ ID NO:3)、人IgG1铰链区 (SEQ ID NO:7) 和包括L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/H435R置换的“具有白的”CH2和CH3结构域 (SEQ ID NO:149)。

[0368] 因此,TRIDENT-A4的第三多肽链包括:SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149。

[0369] TRIDENT-A4的第三多肽链的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:131):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIKGGTTY PDTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARQG
LPYYGDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
TLYITREPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK
```

[0370] TRIDENT-A4的第四多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够与PD-L1结合的单克隆抗体的VL结构域(VL_{PD-L1}) (hPD-L1 MAB-1 VL2 (SEQ ID NO:72))、人IgG CLκ结构域 (SEQ ID NO:1) 和C末端。

[0371] 因此,TRIDENT-A4的第四多肽链包括:SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:1。

[0372] TRIDENT-A的第四多肽链的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:132):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVN EAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYNTPITFGQ
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC
```

3. TRIDENT-A5

[0373] TRIDENT-A5为三价CD137 x CD137 x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和一个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。TRIDENT-A5包括四条多肽链(见图3A,其中VL1/VH1(位点A)与VL2/VH2(位点B)相同,并结合CD137,而VL3/VH3(位点C)结合PD-L1)。TRIDENT-A5包括CD137 MAB-6 (1.2) 和hPD-L1 MAB-2 (3.2) 的结合结构域。

[0374] TRIDENT-A5的第一多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}) (CD137 MAB-6 VL2 ((SEQ ID NO:55))、间插接头肽(接头1;GGGSGGG (SEQ ID NO:16))、能够结合CD137的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD137}) (CD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO:46))、间插接头肽(接头2;GGCGG (SEQ ID NO:18)),异质二聚体促进(E-螺旋)结构域(**EVAALE**EK-EVAALE**EK-EVAALE**EK-EVAALE**EK**** (SEQ ID NO:37))、间插接头肽(GGGDKHTCPCP (SEQ ID NO:21))、包括L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E置换的“具有杵的”CH2和CH3结构域 (SEQ ID NO:146) 以及C末端。******

[0375] 因此,TRIDENT-A5的第一多肽链包括:SEQ ID NO:55—SEQ ID NO:16—SEQ ID

NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146。

[0376] TRIDENT-A5的第一多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:133)：

```
EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWYQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL QESGPGLVKP SETLSLTCTV SGGSISSYYW
SWIRQPPGKG LEWIGRIYTS GSTNYNPSLK SRVTMSVDTS KNQFSLKLSS
VTAADTAVYY CARDGWYDED YNYYGMDVWG QGTTVTVSSG GCGGGEVAAL
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
PGK
```

[0377] TRIDENT-A5的第二多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}) (CD137 MAB-6 VL2((SEQ ID NO:55))、间插接头肽(接头1; GGGSGGG (SEQ ID NO:16))、能够结合CD137的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD137}) (CD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO:46))、间插接头肽(接头2; GCGGG (SEQ ID NO:18))、异质二聚体促进(K-螺旋)结构域(**KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38))和C末端。**

[0378] 因此,TRIDENT-A5的第二多肽链包括:SEQ ID NO:55—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

[0379] TRIDENT-A5的第二多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:134)：

```
EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWYQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL QESGPGLVKP SETLSLTCTV SGGSISSYYW
SWIRQPPGKG LEWIGRIYTS GSTNYNPSLK SRVTMSVDTS KNQFSLKLSS
VTAADTAVYY CARDGWYDED YNYYGMDVWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL
KEKVAALKEK VAALEKEVAA LKE
```

[0380] 特别考虑的是,可以采用可选的TRIDENT-A5第一和第二多肽链,其包括含有半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39)和

KVAACEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK (SEQ ID NO:40))。在此类可选的TRIDENT-A5分子中,第一多肽链有时包括:SEQ ID NO:55—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146,并且第二多肽链有时包括:SEQ ID NO:55—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0381] TRIDENT-A5的第三多肽链与TRIDENT-A4 (SEQ ID NO:131)的第三多肽链相同。

[0382] TRIDENT-A5的第四多肽链与TRIDENT-A4 (SEQ ID NO:132)的第四多肽链相同。

4. TRIDENT-A6

[0383] TRIDENT-A6为三价CD137 x CD137 x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和一个用于代表性TA,PD-L1的结合位点。TRIDENT-A6包括四条多肽链(见图3A,其中VL1/VH1

(位点A)与VL2/VH2(位点B)相同,并结合CD137,而VL3/VH3(位点C)结合PD-L1)。TRIDENT-A6包括CD137 MAB-6(1.3)和hPD-L1 MAB-2(3.2)的结合结构域。

[0384] TRIDENT-A6的第一多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}) (CD137 MAB-6 VL3((SEQ ID NO:56))、间插接头肽(接头1;GGGSGGGG(SEQ ID NO:16))、能够结合CD137的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD137}) (CD137 MAB-6 VH1(SEQ ID NO:46))、间插接头肽(接头2;GGCGGG(SEQ ID NO:18))、异质二聚体促进(E-螺旋)结构域(**EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:37))**)、间插接头肽(GGGDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:21))、包括L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E置换的“具有杵的”CH2和CH3结构域(SEQ ID NO:146)以及C末端。

[0385] 因此,TRIDENT-A6的第一多肽链包括:SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146。

[0386] TRIDENT-A6的第一多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:135):

```
EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTVKVEIKGG GSGGGGQVQL QESGPGLVKP SETLSLTCTV SGGSISSYYW
SWIRQPPGKG LEWIGRIYTS GSTNYNPSLK SRVTMSVDTs KNQFSLKLSS
VTAADTAVYY CARDGWYDED YNYYGMDVWG QGTTVTVSSG GCGGGEVAAL
EKEVAALEKE VAALKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT
PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLs
PGK
```

[0387] TRIDENT-A6的第二多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}) (CD137 MAB-6 VL3((SEQ ID NO:56))、间插接头肽(接头1;GGGSGGGG(SEQ ID NO:16))、能够结合CD137的单克隆抗体的VH结构域(VH_{CD137}) (CD137 MAB-6 VH1(SEQ ID NO:46))、间插接头肽(接头2;GGCGGG(SEQ ID NO:18))、异质二聚体促进(K-螺旋)结构域(**KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:38))**)和C末端。

[0388] 因此,TRIDENT-A6的第二多肽链包括:SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

[0389] TRIDENT-A6的第二多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:136):

```
EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SNYLSWFQQK PGQAPRLLIY
GASTRATGIP ARFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFAVYYCQ QDYDLPWTFG
QGTVKVEIKGG GSGGGGQVQL QESGPGLVKP SETLSLTCTV SGGSISSYYW
SWIRQPPGKG LEWIGRIYTS GSTNYNPSLK SRVTMSVDTs KNQFSLKLSS
VTAADTAVYY CARDGWYDED YNYYGMDVWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL
KEKVAALKEK VAALKEKVAAL LKE
```

[0390] 特别考虑的是,可以采用可选的TRIDENT-A6第一和第二多肽链,其包括含有半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39)和

KVAACCKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40))。在此类可选的 TRIDENT-A6 分子中,第一多肽链有时包括:SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146,并且第二多肽链有时包括:SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0391] TRIDENT-A6 的第三多肽链与 TRIDENT-A4 (SEQ ID NO:131) 的第三多肽链相同。

[0392] TRIDENT-A6 的第四多肽链与 TRIDENT-A4 (SEQ ID NO:132) 的第四多肽链相同。

5. TRIDENT-B1

[0393] TRIDENT-B1 为三价 CD137 x CD137 x TA 结合分子,其具有两个 CD137 结合位点和一个用于代表性 TA, HER2 的结合位点。TRIDENT-B1 包括四条多肽链 (见图 3A, 其中 VL1/VH1 (位点 A) 与 VL2/VH2 (位点 B) 相同,并结合 CD137,而 VL3/VH3 (位点 C) 结合 HER2)。TRIDENT-B1 包括 CD137 MAB-6 (1.1) 和 hHER2 MAB-1 (1.3) 的结合结构域。

[0394] TRIDENT-B1 的第一多肽链与 TRIDENT-A (SEQ ID NO:127) 的第一多肽链相同。

[0395] TRIDENT-B1 的第二多肽链与 TRIDENT-A (SEQ ID NO:128) 的第二多肽链相同。

[0396] 特别考虑的是,可以采用可选的 TRIDENT-B1 第一和第二多肽链,其包括含有半胱氨酸残基的异质二聚体-促进 (E-螺旋和 K-螺旋) 结构域 (例如,

EVAACCKE-EVAALKE-EVAALKE-EVAALKE (SEQ ID NO:39) 和

KVAACCKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:40))。在此类可选的 TRIDENT-B1 分子中,第一多肽链有时包括:SEQ ID NO:85—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146,并且第二多肽链有时包括:SEQ ID NO:85—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0397] TRIDENT-B1 的第三多肽链在 N 末端至 C 末端方向上包括 N 末端、能够结合 HER2 的单克隆抗体的 VH 结构域 (VH_{HER2} (hHER2 MAB-1 VH1, SEQ ID NO:80))、人 IgG1 CH1 结构域 (SEQ ID NO:3)、人 IgG1 铰链区 (SEQ ID NO:7) 和包括 L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/H435R 置换的“具有白的”CH2 和 CH3 结构域 (SEQ ID NO:149)。

[0398] 因此,TRIDENT-B1 的第三多肽链包括:SEQ ID NO:80—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149。

[0399] TRIDENT-B1 的第三多肽链的氨基酸序列是 (SEQ ID NO:153):

```
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTNIGEPTY TEEFKGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARD
GYGNRVSYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVQLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
DSDGSFFLV S KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNRYTQ KSLSLSPGK
```

[0400] TRIDENT-B1 的第四多肽链在 N 末端至 C 末端方向上包括 N 末端、能够结合 HER2 的单

克隆抗体的VL结构域(VL_{HER2} (hHER2 MAB-1 VL3, SEQ ID NO:85))、人IgG CL κ 结构域(SEQ ID NO:1)和C末端。

[0401] 因此,TRIDENT-B1的第四多肽链包括:SEQ ID NO:85—SEQ ID NO:1。

[0402] TRIDENT-B1的第四多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:154):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIS NYLSWFQQKP GKAPKTLIYR
ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HDEFPWTFGQ
GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEK

6. TRIDENT-B2

[0403] TRIDENT-B2为三价CD137 x CD137 x TA结合分子,其具有两个CD137结合位点和一个代表性TA,HER2结合位点。TRIDENT-B1包括四多肽链(见图3A,其中VL1/VH1(位点A)与VL3/VH3(位点C)相同,并结合CD137,而VL2/VH2(位点B)结合HER2)。TRIDENT-B1包括CD137 MAB-6 (1.1) 和hHER2 MAB-1 (1.3) 的结合结构域。

[0404] TRIDENT-B2的第一多肽链与DART-B1 (SEQ ID NO:143) 的第一多肽链相同。

[0405] TRIDENT-B2的第二多肽链与DART-B1 (SEQ ID NO:144) 的第二多肽链相同。

[0406] 特别考虑的是,可以采用可选的TRIDENT-B2第一和第二多肽链,其包括含有半胱氨酸残基的异质二聚体-促进(E-螺旋和K-螺旋)结构域(例如,

EVAACKEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:39)和

KVAACKE-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK (SEQ ID NO:40))。在此类可选的TRIDENT-B2分子中,第一多肽链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146,并且第二多肽链有时包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40。

[0407] TRIDENT-B2的第三多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合能够结合的单克隆抗体的VH结构域CD137 (VH_{CD137}) (CD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO:46))、人IgG1 CH1结构域(SEQ ID NO:3)、人IgG1铰链区(SEQ ID NO:7)和包括L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/H435R置换的“具有白的”CH2和CH3结构域(SEQ ID NO:149)。

[0408] 因此,TRIDENT-B2的第三多肽链包括:SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149。

[0409] TRIDENT-B2的第三多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:155):

QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGGSIS SYWWSWIRQP PGKGLEWIGR
IYTSGSTNYN PSLKSRVTMS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDGW
YDEDYNYGM DVWGQGTMTV VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LSCAVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLVSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN RYTQKSLSL
PGK

[0410] TRIDENT-B2的第四多肽链在N末端至C末端方向上包括N末端、能够结合CD137的单克隆抗体的VL结构域(VL_{CD137}) (CD137 MAB-6 VL1 (SEQ ID NO:50))、人IgG CL κ 域(SEQ ID NO:1)和C末端。

[0411] 因此,TRIDENT-B2的第四多肽链包括:SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:1。

[0412] TRIDENTB2的第四多肽链的氨基酸序列是(SEQ ID NO:156):

EDFAVYYCQQ DYDLPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA
SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

C. 可选的CD137 x TA结合分子

[0413] 如鉴于本公开内容将认识到的,具有任何以上代表性分子的一般结构并且包括可选TA的结合位点的另外的CD137 x TA结合分子可以通过采用可选的肿瘤抗原抗体的VL和VH结构域代替抗PD-L1或抗HER2的VL和VH结构域构建。类似地,如本文所提供的,可选的CD137 x TA结合分子同样可以构建成包含可选的接头和/或异质二聚体促进结构域和/或抗体恒定区(例如CL、CH2-CH3域)。

D. 对照分子

[0414] 为了更有意义地表明本发明的CD137 x TA结合分子的特性,本文中描述了其VL和VH结构域可用于产生对照具有Fc的双抗体和其他比较物和对照结合分子的比较物和对照抗体。

[0415] 帕利珠单抗(参见,例如,蛋白质数据库(PDB) ID No.2HWZ)是针对RSV的F蛋白的A抗原位点中表位的人源化单克隆抗体(IgG),是适当的对照抗体,其VL和VH结构域可用于产生对照双抗体和其他对照结合分子。可选的抗RSV糖蛋白F抗体包括莫他韦单抗(参见,例如,PDB ID No.3IXT)和被工程化以从轻链的CDR 1去除半胱氨酸残基的帕利珠单抗变体。帕利珠单抗的变体用于产生如下所述的阴性对照分子。

[0416] 帕利珠单抗变体的VH结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:137) (CDRH残基用底线显示):

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSL **TSGMSV**GWIR QPPGKALEWL
ADIWDDKKD **YNPSLK**SRLT ISKDTSKNQV VLKVTNMDPA DTATYYCARS
MITNWFFDVW GAGTTVTVSS

[0417] 帕利珠单抗变体的VL结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:138) (CDRL残基用底线显示):

DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITC**RASQ**SVG **YMH**WYQQKPG KAPKLLIYDT
SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYC**FQG** **SGYPFT**FGGG
TKLEIK

[0418] 用于比较的目的,使用包含先前描述的抗CD137抗体的表位-结合位点的几个分子,包括乌瑞鲁单抗(也称为BMS-663513,参见美国专利号8,137,667)和utumilumab(也称为PF-05082566,参见,美国专利号8,337,850)和鼠和人源化的hCD137 MAB-3(参见WO 2018/156740)。乌瑞鲁单抗(WHO药物信息,2011,推荐的INN:清单66,25(3):334)和utumilumab(WHO药物信息,2017,推荐的INN:取代77,31(1):140-141)的完整重链和轻链的氨基酸序列是本领域已知的。WO 2018/156740中提供了本文用作比较物的人源化hCD137 MAB-3(1B.3)的VH和VL结构域的氨基酸序列,参见[00254]和[00261]段。

E.CD137 x TA结合和对照分子的概述

[0419] 表5总结了DART-A-DART-A9、TRIDENT-A和TRIDENT-A4-A6的结构域特性：

表 5					
名称 (链的数量)	亲本的 mAbs	Fc 结构域	链 编号	SEQ ID NO.	其他组分
DART-A (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (1.1) CD137 MAB-6 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	116	E/K 螺旋
			2	117	
			3	116	
			4	117	
DART-A1 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (2.1) CD137 MAB-6 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	118	E/K 螺旋
			2	119	
			3	118	
			4	119	
DART-A2 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (2.2) CD137 MAB-6 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	E/K 螺旋
			2	119	
			3	120	
			4	119	
DART-A3 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (3.1) CD137 MAB-6 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	118	E/K 螺旋
			2	121	
			3	118	
			4	121	
DART-A4 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (3.2) CD137 MAB-6 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	E/K 螺旋
			2	121	
			3	120	
			4	121	
DART-A5 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (3.2) CD137 MAB-6 (1.2)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	E/K 螺旋
			2	122	
			3	120	
			4	122	
DART-A6 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (3.2) CD137 MAB-6 (1.3)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	E/K 螺旋
			2	123	
			3	120	
			4	123	
DART-A7 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (4.2) CD137 MAB-6 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	E/K 螺旋
			2	124	
			3	120	
			4	124	
DART-A8 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (5.2)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	E/K 螺旋
			2	125	

表 5					
名称 (链的数量)	亲本的 mAbs	Fc 结构域	链 编号	SEQ ID NO.	其他组分
	CD137 MAB-6 (1.1)		3	120	
			4	125	
DART-A9 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (6.2) CD137 MAB-6 (1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	E/K 螺旋
			2	126	
			3	120	
			4	126	
DART-A10 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (4.2) CD137 MAB-6 (1.3)	IgG1 (AA/YTE)	1	120	E/K 螺旋
			2	139	
			3	120	
			4	139	
DART-B1	hHER2 MAB-1 (1.3) CD137 MAB- 6(1.1)	IgG1 (AA/YTE) (杵/臼)	1	143	E/K 螺旋
			2	144	
			3	145	
DART-B2	hHER2 MAB-1 (1.3) CD137 MAB- 6(1.1)	IgG1 (AA/YTE)	1	151	E/K 螺旋
			2	152	
			3	151	
			4	152	
TRIDENT-A (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (1.1) CD137 MAB-6 (1.1)	IgG1 (AA/YTE) (杵/臼)	1	127	CL/CH1 和 E/K 螺旋
			2	128	
			3	129	
			4	130	
TRIDENT-A4 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (3.2) CD137 MAB-6 (1.1)	IgG1 (AA) (杵/臼)	1	127	CL/CH1 和 E/K 螺旋
			2	128	
			3	131	
			4	132	
TRIDENT A5 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (3.2) CD137 MAB-6 (1.2)	IgG1 (AA) (杵/臼)	1	133	CL/CH1 和 E/K 螺旋
			2	134	
			3	131	
			4	132	
TRIDENT-A6	hPD-L1 MAB-2 (3.2) CD137 MAB-6 (1.3)	IgG1 (AA) (杵/臼)	1	135	CL/CH1 和 E/K 螺旋
			2	136	
			3	131	
			4	132	
TRIDENT-B1	hHER2 MAB-1 (1.3) CD137 MAB- 6(1.1)	IgG1 (AA) (杵/臼)	1	127	CL/CH1 和 E/K 螺旋
			2	128	
			3	153	
			4	154	
TRIDENT-B2	hHER2 MAB-1 (1.3) CD137 MAB- 6(1.1)	IgG1 (AA) (杵/臼)	1	143	CL/CH1 和 E/K 螺旋
			2	144	
			3	155	
			4	156	

[0420] 表6显示了另外的DART和TRIDENT分子的特性,这些分子被制备为比较物和阴性对照:

表 6

名称 (链的数量)	亲本的 mAbs	Fc 结构域	其他组分
DART-1 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (1.1) 帕利珠单抗变体	IgG1 (AA/YTE)	与 DART-A 相同, 除了包含帕利珠单抗变体的 VH/VL 代替 CD137 MAB-6 (1.1) 的 VH/VL
DART-2 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (1.1) CD137 MAB-2	IgG1 (AA)	与 DART-A 相同, 除了包含 CD137 MAB-2 的 VH/VL 代替 hCD137 MAB-3 (1B.3) 的 VH/VL
DART-3 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (1.1) VL/VL utomilumab	IgG1 (AA)	与 DART-A 相同, 除了包含 utomilumab 的 VH/VL 代替 hCD137 MAB-6 (1.1) 的 VH/VL
DART-4 (3 条链)	帕利珠单抗变体 CD137 MAB-6(1.1)	IgG1 (AA) (杵/白)	与 DART-B1 相同, 除了包含帕利珠单抗变体的 VH/VL 代替 hHER2 MAB-1 (1.3) 的 VH/VL
DART-5 (4 条链)	帕利珠单抗变体 CD137 MAB-6(1.1)	IgG1 (AA)	与 DART-B2 相同, 除了包含帕利珠单抗变体的 VH/VL 代替 hHER2 MAB-1 (1.3) 的 VH/VL
TRIDENT-2 (4 条链)	hPD-L1 MAB-2 (1.1) hCD137 MAB-3(1B.3)	IgG1 (AA) (杵/白)	与 TRIDENT-A 相同, 除了包含 hCD137 MAB-3 (1B.3) 的 VH/VL 代替 CD137 MAB6 (1.1) 的 VH/VL、针对接头 2 的 SEQ ID NO: 19 和含半胱氨酸的异质二聚体-促进结构域 (完整序列参见 WO 2020/041404 的第[00306]-[00311]段)
TRIDENT-3	帕利珠单抗变体 CD137 MAB-6(1.1)	IgG1 (AA) (杵/白)	与 TRIDENT-B1 相同, 除了包含帕利珠单抗变体的 VH/VL 代替 hHER2 MAB-1 (1.3) 的 VH/VL
TRIDENT-4	帕利珠单抗变体 CD137 MAB-6(1.1)	IgG1 (AA) (杵/白)	与 TRIDENT-B2 相同, 除了包含帕利珠单抗变体的 VH/VL 代替 hHER2 MAB-1 (1.3) 的 VH/VL

III. 生产方法

[0421] 本发明的结合分子可以使用本领域已知的任何方法重组制备并表达。可通过获得编码结合分子的核酸, 并使用该核酸产生可用于在宿主细胞 (例如, CHO 细胞) 中重组表达该分子的载体来重组地制备此类分子。可以采用的另一种方法是在植物 (例如烟草) 或转基因奶中表达分子。

[0422] 含有感兴趣的多核苷酸 (例如, 编码本发明结合分子的多肽链的多核苷酸) 的载体可以通过许多适当方式中的任何一种引入宿主细胞, 包括电穿孔; 微粒轰击; 脂质转染; 和感染 (例如, 载体为致病因数, 如牛痘病毒)。将核酸或载体引入宿主细胞的技术在本领域中是已经建立的, 并且可以采用任何合适的技术。

[0423] 能够过表达异源 DNA 的任何宿主细胞都可以用于表达感兴趣的结合分子 (例如抗体、双抗体、三价结合分子) 的目的。适当的哺乳动物宿主细胞的非限制性示例包括但不限于 COS、NS0、HEK-293、HeLa 和 CHO 细胞。培养宿主细胞的方法是本领域所熟知的。

[0424] 结合分子通常是从宿主细胞、培养基等中分离和/或纯化的。纯化包括抗体结构域 (例如, Fc 结构域) 的重组结合分子的技术是本领域熟知的, 包括: 例如, 使用 HPLC、FPLC 或亲和色谱法 (例如, 使用蛋白质 A 或蛋白质 G)。纯化后, 可以任选地与如下所述的药学上可接受的赋形剂或其他物质一起将本发明的结合分子配制成药物组合物。

IV. 药物组合物

[0425] 本发明的组合物包括可用于制造药物组合物(例如,不纯或非无菌组合物)的原料药组合物和药物组合物(即,适合施用于受试者或患者的组合物),其可以是用于制备单位剂型。此类组合物包括本发明的CD137 x TA结合分子,或此类试剂与药学上可接受的载体的组合。如本文所提供的,本发明的组合物包括预防或治疗有效量的本发明具有Fc的CD137 x TA双特异性双抗体和药学上可接受的载体。

[0426] 本发明还涵盖药物组合物,其包括本发明的CD137 x TA结合分子和有效刺激免疫应答(例如,免疫检查点抑制剂)的一种或多种另外的分子和/或与上述特异性结合对至少一种特定TA特异性的肿瘤抗原(例如,肿瘤特异性单克隆抗体或双抗体)的一种或多种另外的分子组合以及药学上可接受的载体。

[0427] 在一个具体的实施方式中,术语“药学上可接受的”是指由联邦或州政府的监管机构批准或在美国药典或其他普遍认可的药典中列出的用于动物,尤其是人类。术语“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全)、赋形剂或媒介物。此类药物载体可以是无菌液体。当药物组合物静脉内施用,优选水性载体,例如盐溶液、水性右旋糖和甘油溶液。

[0428] 通常,本发明的组合物的成分以单位剂型单独或混合在一起供应,例如,作为干燥的冻干粉末或无水浓缩物,或以液体形式在指示活性剂的量的密闭容器(例如安瓿或小药囊)中。当组合物要通过输注施用时,可以用含有无菌药物级水或盐水的输注瓶分配。在通过注射施用组合物的情况下,可以提供无菌注射用水或盐水的安瓿,以便可以在施用之前将成分混合。

[0429] 本发明还提供了药物包装或试剂盒,其包括一个或多个容器,所述容器包含单独或与其他试剂(例如与药学上可接受的载体)一起含有本发明的CD137xTA结合分子。另外,可用于治疗疾病的一种或多种其他预防或治疗剂也可包括在药物包装或试剂盒中。本发明还提供了一种药物包装或试剂盒,其包括一个或多个装有本发明药物组合物的一种或多种成分的容器。任选地,与此类容器相关的可以是用于规范药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通知,该通知反映了用于人类施用的制造、使用或销售的机构的批准。

[0430] 试剂盒可包括本发明的CD137 x TA结合分子。试剂盒可以在一个或多个容器中进一步包括一种或多种其他用于癌症治疗的预防和/或治疗剂;和/或试剂盒可以进一步包括与一种或多种肿瘤抗原(TA)结合的一种或多种细胞毒素抗体。在某些实施方式中,其他的预防或治疗剂是化学治疗剂。在其他实施方式中,所述预防或治疗剂为生物学或激素治疗剂。

V. 施用方法

[0431] 通过向受试者施用本发明有效量的分子或包括本发明分子的药物组合物,可以提供本发明的组合物以用于治疗、预防和改善与癌症或其他疾病或紊乱相关的一种或多种症状。在一方面,此类组合物是基本上纯化的(即,基本上不含限制其效果或产生不希望的副作用的物质)。在具体的实施方式中,所述受试者是动物。在另一个具体的实施方式中,受试者是哺乳动物,例如非灵长类动物(例如牛科动物、马、猫科动物、犬科动物、啮齿动物等)或灵长类动物(例如,猴,比如,食蟹猴,人等)。在另一个实施方式中,所述受试者为人。

[0432] 施用本发明的分子的方法包括但不限于肠胃外施用(例如,皮内、肌肉、腹膜内、静

脉内和皮下)、硬膜外和粘膜(例如,鼻内和口服途径)。在具体的实施方式中,本发明的CD137 x TA结合分子是肌内、静脉内或皮下施用的。组合物可以通过任何方便的途径施用,例如,通过输注或弹丸注射,通过上皮或粘膜皮肤内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以与其他生物活性剂一起施用。施用可以是全身的,也可以是局部的。

[0433] 本发明还提供了将本发明的CD137 x TA结合分子包装在密封容器中,例如指示分子的量的安瓿或小药囊。在一个实施方式中,本发明的CD137 x TA结合分子作为干燥的无菌冻干粉末或无水浓缩物提供在密闭容器中,并且可以例如用水或盐水重构至适当的浓度以施用于受试者。本发明冻干的CD137 x TA结合分子应在2至8℃的其原始容器中存储,并且分子在重构后应在12小时内、6小时内、5小时内、3小时内或1小时内施用。

[0434] 在可选的实施方式中,本发明的CD137 x TA结合分子以液体形式提供在指示分子、融合蛋白或缀合分子的量和浓度的密闭容器中。在某些实施方式中,本发明的CD137 x TA结合分子的液体形式供应在密闭容器中,并且不需要重构。

[0435] 在治疗、预防或改善与紊乱有关的一种或多种症状方面将是有效的本发明的组合物的量可以通过标准临床技术来确定。制剂中采用的确切剂量将还取决于施用途径和病症的严重性,并且应根据从业者的判断和每个患者的情况来决定。可以从体外或动物模型测试系统得出的剂量响应曲线推断有效剂量。

[0436] 如本文所用,在一个实施方式中,药物组合物的“有效量”是足以产生有益或期望结果的量,包括但不限于临床结果,例如减少由疾病引起的症状、减轻疾病症状(例如,癌细胞的增殖、肿瘤的存在、肿瘤转移等),从而提高了遭受该疾病的人们的生活质量,减少了治疗疾病所需的其他药物的剂量,增强了另一种药物的效果例如通过靶向和/或内化,延迟疾病的进展,和/或延长个体的存活。

[0437] 可以以一种或多种施用方式施用这样的有效量。为了本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效量是足以减少病毒存在的增殖(或效果)并直接或间接地减少和/或延迟疾病(例如,癌症)进展的量。在一些实施方式中,有效量的药物、化合物或药物组合物可以与或不与另一种药物、化合物或药物组合物结合实现。因此,在施用一种或多种另外的试剂(例如化疗剂或被认为是特定病症的治疗标准的其他试剂)的情况下,可以考虑“有效量”,并且如果与一种或多种其他试剂一起可以达到或达到理想的结果,则可以认为单一试剂以有效量提供。尽管个体需求变化,但是测定每种组分的有效量的最佳范围在本领域技术范围内。

[0438] 对于本发明涵盖的CD137 x TA结合分子,可以基于接受受试者的体重(kg)来确定施用至患者的剂量,或者可选地可以基于固定剂量来确定。

[0439] 本发明的CD137 x TA结合分子的施用剂量和频率可以通过修饰(例如脂质化)来增强CD137 x TA结合分子的吸收和组织渗透来降低或改变。

[0440] 可以计算施用至患者的本发明的CD137 x TA结合分子的剂量,以用作单一试剂疗法。可选地,本发明的CD137 x TA结合分子与其他治疗组合物组合使用,使得施用至患者的剂量低于当所述分子用作单一试剂疗法时的剂量。

[0441] 具有治疗或预防有效量的本发明的CD137 x TA结合分子的受试者的治疗可以包括单一治疗、或者可以包括一系列治疗。在一个示例中,受试者每周一次、每两周一次(即每隔一周一次)或每三周一次用本发明的分子治疗约1至52周之间。本发明的药物组合物可以

每天一次、每天两次或每天三次施用。可选地,药物组合物可以每周一次、每周两次、每两周一次、每月一次、每六周一次、每两个月一次、每年两次或每年一次施用。还应当理解,用于治疗的有效剂量可以在特定治疗过程中增加或减少。

VI. 本发明的组合物的用途

[0442] 本发明的CD137 x TA结合分子具有结合T细胞(APC)的能力(例如,通过结合在此类T细胞的表面上表达的CD137)和结合表达TA的肿瘤细胞的能力(例如,通过结合在这种肿瘤细胞的表面上表达的TA)。因此,本发明的CD137 x TA结合分子具有将T细胞共定位于表达TA的肿瘤细胞的能力,因此可以用于治疗与TA的表达相关或以TA表达为特征的任何疾病或病症。因此,非限制的,包括此类分子的药物组合物可用于诊断或治疗表达TA的癌症,包括但不限于:膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胆囊或胆管癌、胃癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、黑素瘤、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、胃癌、睾丸癌、胸腺癌和子宫癌。特别地,此类癌症高度表达TA。

[0443] 本发明的CD137 x TA结合分子可以另外用于制造用于治疗上述病症的药物。

[0444] 在某些实施方式中,本发明的CD137 x TA结合分子与一种或多种其他可用于治疗癌症的预防和/或治疗剂组合使用。在某些实施方式中,其他的预防或治疗剂是化学治疗剂。在其他实施方式中,所述预防或治疗剂为生物或激素治疗剂。在其他实施方式中,生物治疗剂是基于细胞毒素抗体的分子,包括但不限于抗体、抗体的抗原结合片段(例如,scFv、Fab、F(ab)₂等)、TandAb等)、多特异性结合分子(例如,双抗体、双特异性抗体、三价结合分子等),其结合一种或多种肿瘤抗原(TA)。

[0445] 本发明的CD137 x TA结合分子可以增强肿瘤靶向剂的活性。因此,本发明的CD137 x TA结合分子可以另外与其他肿瘤靶向剂组合使用,所述肿瘤靶向剂包括但不限于抗体、抗体的抗原结合片段(例如,scFv、Fab、F(ab)₂等)、TandAb等)、多特异性结合分子(例如,双抗体、双特异性抗体、三价结合分子等),其能够结合所期望的TA。特别考虑的是,肿瘤靶向剂可以结合与在此类组合中使用的CD137 x TA结合分子相同或不同的TA。在特定实施方式中,肿瘤靶向剂是多特异性分子,其与TA和T细胞上表达的表位(包括例如CD3和/或CD8)结合并介导T细胞复位向杀伤。代表性的肿瘤靶向剂包括但不限于与TA和CD3结合分子(“TA x CD3”)。代表性的TA x CD3结合分子(例如,双特异性抗体、**DART®**分子、**BiTe®**分子、TandAbs等和三价分子)及其制备方法(可用于这种组合中)是本领域众所周知的。(例如参见WO 2013/026835、WO 2013/158856、WO 2014/047231、WO 2014/110601、WO 2014/131711、WO 2015/026894、WO 2015/026892、WO 2015/184203、WO 2015/184207、WO 2016/036937、WO 2016/182751、WO 2017091656、WO 2017/142928、WO 2017/118675)。

[0446] 本发明的CD137 x TA结合分子与肿瘤靶向剂(例如,TA x CD3结合分子)的组合使用可导致抑制性免疫调节剂程序性死亡-1(“PD-1”,也称为“CD279”)的上调。PD-1通过结合PD-L1和PD-L2(也称为B7-H1和B7-DC)来介导其对免疫系统的抑制(Flies, DB等人(2007), “The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,” J. Immunother. 30 (3): 251-260; United States Patents Nos. 6,803,192; 7,794,710)。因此,进一步添加抑制PD-1抑制活性的试剂(“PD-1/PD-L1检查点抑制剂”)下调PD-1的表达可进一步增强CD137 x TA和肿瘤靶向剂(例如TA x CD3结合分子)的活性。本发明特别地涵盖PD-1/PD-L1检查点抑制

剂,其包括结合PD-1的抗体的表位-结合位点。

[0447] 相应地,本发明的CD137 x TA结合分子可以另外与其他肿瘤靶向剂组合,进一步与PD-1/PD-L1检查点抑制剂组合使用。PD-1/PD-L1检查点抑制剂包括但不限于抗体、抗体的抗原结合片段(例如scFv、Fab、F(ab)₂等)、TandAb等)、多特异性结合分子(例如,双抗体、双特异性抗体、三价结合分子等),其能够结合PD-1和/或PD-L1。可用于此类组合的代表性PD-1/PD-L1检查点抑制剂及其制备方法是本领域众所周知的。可用于本发明方法中的PD-1结合分子包括:尼伏鲁单抗(CAS注册号:946414-94-4,也称为5C4、BMS-936558、ONO-4538、MDX-1106,并由Bristol-Myers Squibb以 **OPDIVO**® 出售);培布利珠单抗(之前称为 lambrolizumab),CAS注册号:1374853-91-4,也称为MK-3475、SCH-900475,并由Merck以 **KEYTRUDA**® 销售);西米普利单抗(cemiplimab)(CAS注册号:1801342-60-8,也称为 REGN-2810、SAR-439684,并以 **LIBTAYO**® 出售)。尼伏鲁单抗(WHO药物信息,2013,推荐的INN:清单69,27(1):68-69)、培布利珠单抗(WHO药物信息,2014,推荐的INN:清单75,28(3):407)和西米普利单抗(cemiplimab)(WHO药物信息2018,建议的INN:清单119)的完整重链和轻链的氨基酸序列在本领域中是已知的。最近已经鉴定了另外的抗PD-1抗体(例如,hPD-1mAb 7(1.2);其具有在本发明的方法和组合物中有用的独特结合特点(参见,PCT公开号WO 2017/019846))。

[0448] 在采用此类组合的情况下,特别考虑了可以“同时”向受试者施用一种或多种分子(例如,CD137 x TA结合分子可以与TA x CD3结合分子和/或PD-1/PD-L1检查点抑制剂同时施用)和/或可以“顺序”施用一种或多种分子(例如,施用CD137 x TA结合分子,并且稍后施用TA x CD3结合分子和/或PD-1/PD-L1检查点抑制剂,或反之亦然)。

VII. 本发明的实施方式

[0449] 现在已经大体上描述了本发明,通过参考以下编号的实施方式(“E”),将更容易理解本发明,除非另有说明,否则这些实施方式仅作为示例提供,并且不旨在限制本发明。

E1. CD137结合分子,其包括与CD137的表位免疫特异性结合的第一结合位点,其中所述第一结合位点包括:第一轻链可变结构域,其包括CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3;以及第一重链可变结构域,其包括CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3;并且其中:

(A) 所述第一轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是CD137 MAB-6 VL1 (SEQ ID NO:50)的轻链CDR;和

(B) 所述第一重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是CD137MAB-6VH1 (SEQ ID NO:46)的重链CDR。

E2. E1的CD137结合分子,其中所述第一重链可变结构域包括以下氨基酸序列: hCD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO:46)。

E3. E1-E2中任一项的CD137结合分子,其中所述第一轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:

- (A) hCD137 MAB-6 VLx (SEQ ID NO:54);
- (B) hCD137 MAB-6 VL1 (SEQ ID NO:50);
- (C) hCD137 MAB-6 VL2 (SEQ ID NO:55);或
- (D) hCD137 MAB-6 VL3 (SEQ ID NO:56)。

E4. E1-E3中任一项的CD137结合分子,其中:

(A) 所述第一重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hCD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO:46); 和

(B) 所述第一轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hCD137 MAB-6 VL1 (SEQ ID NO:50)。

E5.E1-E3中任一项的CD137结合分子, 其中:

(A) 所述第一重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hCD137 MAB-6 VH1 (SEQ ID NO:46); 和

(B) 所述第一轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hCD137 MAB-6 VL3 (SEQ ID NO:56)。

E6.E1-E5中任一项的CD137结合分子, 其中所述分子为双特异性分子,

其包括免疫特异性结合肿瘤抗原 (TA) 的第二结合位点, 并且其中所述第二结合位点包括含有CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3的第二轻链可变结构域和含有CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3的第二个重链可变结构域。

E7.E6的CD137结合分子, 其中所述TA选自表1-2所示的抗原。

E8.E6的CD137结合分子, 其中所述TA是PD-L1, 并且其中:

(A) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hPD-L1 MAB-2 VLx (SEQ ID NO:63) 的轻链CDR; 和

(B) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VHx (SEQ ID NO:59) 的重链CDR。

E9.E8的CD137结合分子, 其中:

(A) (1) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hPD-L1 MAB-2 VL1 (SEQ ID NO:63) 的轻链CDR; 或

(2) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hPD-L1 MAB-2 VLx (SEQ ID NO:58) 的轻链CDR; 或

(3) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hPD-L1 MAB-2 VL2 (SEQ ID NO:72) 的轻链CDR; 和

(B) (1) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2、和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VH1 (SEQ ID NO:59) 的重链CDR;

(2) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VHx (SEQ ID NO:57) 的重链CDR;

(3) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO:67) 的重链CDR;

(4) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VH3 (SEQ ID NO:68) 的重链CDR;

(5) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO:69) 的重链CDR;

(6) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO:70) 的重链CDR; 或

(7) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID

NO:71)的重链CDR.E10.E9的CD137结合分子,其中所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:

- (A) hPD-L1 MAB-2 VHx (SEQ ID NO:59);
- (B) hPD-L1 MAB-2 VH1 (SEQ ID NO:57);
- (C) hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO:67);
- (D) hPD-L1 MAB-2 VH3 (SEQ ID NO:68);
- (E) hPD-L1 MAB-2 VH4 (SEQ ID NO:69);
- (F) hPD-L1 MAB-2 VH5 (SEQ ID NO:70);或
- (G) hPD-L1 MAB-2 VH6 (SEQ ID NO:71)。

E11.E9或E10中任一项的CD137结合分子,其中所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:

- (A) hPD-L1 MAB-2 VLx (SEQ ID NO:63);
- (B) hPD-L1 MAB-2 VL1 (SEQ ID NO:58);或
- (B) hPD-L1 MAB-2 VL2 (SEQ ID NO:72)。

E12.E10-E11中任一项的CD137结合分子,其中:

(A) 所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VHx (SEQ ID NO:59);和

(B) 所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VLx (SEQ ID NO:63)。

E13.E10-E11中任一项的CD137结合分子,其中:

(A) 所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VH1 (SEQ ID NO:57);和

(B) 所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VLx (SEQ ID NO:63)。

E14.E10-E11中任一项的CD137结合分子,其中:

(A) 所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO:67);和

(B) 所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VLx (SEQ ID NO:63)。

E15.E10-E11中任一项的CD137结合分子,其中:

(A) 所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VH3 (SEQ ID NO:68);和

(B) 所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VLx (SEQ ID NO:63)。

E16.E10-E11中任一项的CD137结合分子,其中:

(A) 所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VH4 (SEQ ID NO:69);和

(B) 所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VLx (SEQ ID NO:63)。

E17.E10-E11中任一项的CD137结合分子,其中

(A) 所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VH5 (SEQ ID NO:70);和

(B) 所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VLx (SEQ ID NO:63)。

E18.E10-E11中任一项的CD137结合分子,其中:

(A) 所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VH6 (SEQ ID NO:71);和

(B) 所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VLx (SEQ ID NO:63)。

E19.E10-E11中任一项的CD137结合分子,其中:

(A) 所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VH1 (SEQ ID NO:57);和

(B) 所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VL1 (SEQ ID NO:58)。

E20.E10-E11中任一项的CD137结合分子,其中:

(A) 所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VH3 (SEQ ID NO:68);和

(B) 所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hPD-L1 MAB-2 VL2 (SEQ ID NO:72)。

E21.E6的CD137结合分子,其中TA是5T4且其中:

(A) (1) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是5T4 MAB-1 VL (SEQ ID NO:93)的轻链CDR;和

(2) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是5T4 MAB-1 VH (SEQ ID NO:92)的重链CDR;或

(B) (1) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是5T4 MAB-2 VL (SEQ ID NO:95)的轻链CDR;和

(2) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是5T4 MAB-2 VH (SEQ ID NO:96)的重链CDR。

E22.E21的CD137结合分子,其中第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:5T4 MAB-1 VH (SEQ ID NO:92)。

E23.E21或E22的CD137 x TA结合分子,其中第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:5T4 MAB-1 VL (SEQ ID NO:93)。

E24.E6的CD137结合分子,其中TA是HER2,并且其中:

(A) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hHER2-MAB-1 VLx (SEQ ID NO:79)的轻链CDR;和

(B) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hHER2-MAB-1 VHx (SEQ ID NO:78)的重链CDR;

E25.E24的CD137结合分子,其中:

(A) (1) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hHER2-MAB-1 VL1 (SEQ ID NO:83) 的轻链CDR;

(2) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hHER2-MAB-1 VL2 (SEQ ID NO:84) 的轻链CDR;或

(3) 所述第二轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hHER2-MAB-1 VL3 (SEQ ID NO:85) 的轻链CDR;

和

(B) (1) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hHER2-MAB-1 VH1 (SEQ ID NO:80) 的重链CDR;

(2) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hHER2-MAB-1 VH2 (SEQ ID NO:81) 的重链CDR;或

(3) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hHER2-MAB-1 VH3 (SEQ ID NO:82) 的重链CDR。E26.E25的CD137结合分子,其中所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:

(A) hHER2-MAB-1 VHx (SEQ ID NO:78) ;

(B) hHER2-MAB-1 VH1 (SEQ ID NO:80) ;

(C) hHER2-MAB-1 VH2 (SEQ ID NO:81) ;或

(D) hHER2-MAB-1 VH3 (SEQ ID NO:82) 。

E27.E25或26中任一项的CD137结合分子,其中所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:

(A) hHER2-MAB-1 VLx (SEQ ID NO:79) ;

(B) hHER2-MAB-1 VL1 (SEQ ID NO:83) ;

(C) hHER2-MAB-1 VL2 (SEQ ID NO:84) ;或

(D) hHER2-MAB-1 VL3 (SEQ ID NO:85) 。

E28.E24-E26中任一项的CD137结合分子,其中:

(A) (1) 所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hHER2-MAB-1 VHx (SEQ ID NO:78) ;和

(2) 所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hHER2-MAB-1 VLx (SEQ ID NO:79) ;

或

(B) (1) 所述第二重链可变结构域包括以下氨基酸序列:hHER2-MAB-1 VH1 (SEQ ID NO:80) ;和

(2) 所述第二轻链可变结构域包括以下氨基酸序列:hHER2-MAB-1 VL3 (SEQ ID NO:85) 。

E29.E1-E29中任一项的CD137结合分子,其是抗体、双特异性抗体、双特异性双价具有Fc的双抗体或双特异性四价具有Fc的双抗体或双特异性三价分子。

E30.E1-E29中任一项的CD137结合分子,其中所述分子是双特异性和二价的,并且包括第一、第二和第三多肽链,其中所述多肽链形成共价结合的复合物。

E31.E1-E29中任一项的CD137结合分子,其中所述分子是双特异性和四价的,并且

包括第一、第二、第三和第四多肽链,其中所述多肽链形成共价结合的复合物。

E32.E1-E29中任一项的CD137结合分子,其中所述分子是双特异性和三价的,并且包括第一、第二、第三和第四多肽链,其中所述多肽链形成共价结合的复合物。

E33.E31的CD137结合分子,其中所述TA是PD-L1,并且其中:

(A) 所述第一和第三多肽链在N末端至C末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:63—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43;

(ii) SEQ ID NO:63—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43;

(iii) SEQ ID NO:58—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43;

(iv) SEQ ID NO:58—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43;

(v) SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43;或

(vi) SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43;

和

(B) 所述第二和第四多肽链在N末端至C末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:59—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;

(ii) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:59—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;

(iii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:57—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;

(iv) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:57—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;

(v) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:67—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;

(vi) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:67—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;

(vii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;

(viii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;

(ix) SEQ ID NO:55—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;

(x) SEQ ID NO:55—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;

(xi) SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;
(xii) SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;
(xiii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:69—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;
(xiv) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:69—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;
(xv) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:70—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;
(xvi) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:70—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;
(xvii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:71—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;
(xviii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:71—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;
(xix) SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:69—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;或
(xx) SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:69—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

E34.E31或E33的CD137结合分子,其中所述TA是PD-L1,并且其中:

(A) 所述第一和第三多肽链包括以下氨基酸序列:SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:118或SEQ ID NO:120;和

(B) 所述第二和第四多肽链包括以下氨基酸序列:SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:126或SEQ ID NO:139。

E35.E34的CD137结合分子,其中所述分子包括:

- (A) SEQ ID NO:116和SEQ ID NO:117;
- (B) SEQ ID NO:118和SEQ ID NO:119;
- (C) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:119;
- (D) SEQ ID NO:118和SEQ ID NO:121;
- (E) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:121;
- (F) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:122;
- (G) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:123;
- (H) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:124;
- (I) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:125;
- (J) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:126;或
- (K) SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:139。

E36.E32的CD137结合分子,其中所述TA是PD-L1,并且其中:

(A) 所述第一多肽链在N-末端至C-末端方向上包括：

(i) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146；

(ii) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146；

(iii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146；

(iv) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146；

(v) SEQ ID NO:55—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146；

(vi) SEQ ID NO:55—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146；

(vi) SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146；或

(vii) SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146；

(B) 所述第二多肽链在N-末端至C-末端方向上包括：

(i) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38；

(ii) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40；

(iii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38；

(iv) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40；

(v) SEQ ID NO:55—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38；

(vi) SEQ ID NO:55—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40；

(vi) SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38；或

(vii) SEQ ID NO:56—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40；

(C) 所述第三多肽链在N-末端至C-末端方向上包括：

(i) SEQ ID NO:59—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149；

(ii) SEQ ID NO:57—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149；

(iii) SEQ ID NO:67—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149；

(iv) SEQ ID NO:68—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149；

(v) SEQ ID NO:69—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149;
(vi) SEQ ID NO:70—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149;或
(vii) SEQ ID NO:71—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149;
和

(D) 所述第四多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:63—SEQ ID NO:1;或
(ii) SEQ ID NO:72—SEQ ID NO:1。

E37.E32的CD137结合分子,其中所述TA是PD-L1,并且其中:

(A) 所述第一多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:59—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146;或
(ii) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:59—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146;

(B) 所述第二多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:63—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;或
(ii) SEQ ID NO:63—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;

(C) 所述第三多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149;
和

(D) 所述第四多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:1;或
(ii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:1。

E38.E32或E36的CD137结合分子,其中所述TA是PD-L1,并且其中:

(A) 所述第一多肽链包括以下氨基酸序列:SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:133或SEQ ID NO:135;

(B) 所述第二多肽链包括以下氨基酸序列:SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:134或SEQ ID NO:136;

(C) 所述第三多肽链包括以下氨基酸序列:SEQ ID NO:129或SEQ ID NO:131;和

(D) 所述第四多肽链包括以下氨基酸序列:SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:132。

E39.E38的CD137结合分子,其中所述分子包括:

(A) SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:129和SEQ ID NO:130;
(B) SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:131和SEQ ID NO:132;
(C) SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:131和SEQ ID NO:132;或
(D) SEQ ID NO:135、SEQ ID NO:136、SEQ ID NO:131和SEQ ID NO:132。

E40.E31的CD137结合分子,其中所述TA是HER2,并且其中:

(A) 所述第一和第三多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:79—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:

39—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43;或

(ii) SEQ ID NO:79—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43;

(iii) SEQ ID NO:85—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43;或

(iv) SEQ ID NO:85—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:30—SEQ ID NO:43;

和

(B) 所述第二和第四多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:78—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;

(ii) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:78—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

(iii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:80—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;或

(iv) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:80—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38。

E41.E32的CD137结合分子,其中所述TA是HER2,并且其中:

(A) 所述第一多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146;

(ii) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146;

(iii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146;或

(iv) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146;

(B) 所述第二多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;

(ii) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;

(iii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;或

(iv) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;

(C) 所述第三多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:78—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149;或

(ii) SEQ ID NO:80—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149;

和

(D) 所述第四多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:79—SEQ ID NO:1;或

(ii) SEQ ID NO:85—SEQ ID NO:1。

E42.E32的CD137结合分子,其中所述TA是HER2,并且其中:

(A) 所述第一多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:78—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146;

(ii) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:78—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146;

(iii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:80—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:37—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146;或

(iv) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:39—SEQ ID NO:21—SEQ ID NO:146;

(B) 所述第二多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:79—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;

(ii) SEQ ID NO:79—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;

(iii) SEQ ID NO:85—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:38;或

(iv) SEQ ID NO:85—SEQ ID NO:16—SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:18—SEQ ID NO:40;

(C) 所述第三多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:46—SEQ ID NO:3—SEQ ID NO:7—SEQ ID NO:149;

和

(D) 所述第四多肽链在N-末端至C-末端方向上包括:

(i) SEQ ID NO:54—SEQ ID NO:1;或

(ii) SEQ ID NO:50—SEQ ID NO:1。

E43.E40-E42中任一项的CD137结合分子,其中所述分子包括:

(A) SEQ ID NO:151和SEQ ID NO:152;

(B) SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128、SEQ ID NO:153和SEQ ID NO:154;或

(C) SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:155和SEQ ID NO:165。

E44.一种药物组合物,其包括E1-43中任一项的CD137结合分子,以及生理学上可接受的载体。

E45.E6-E43中任一项的CD137结合分子或E44的药物组合物在治疗与所述TA的表达有关或以所述TA的表达为特征的疾病或病症中的用途。

E46.一种PD-L1结合分子,其包括轻链可变结构域和重链可变结构域,所述轻链可变结构域包括CDRL1、CDRL2和CDRL3,并且所述重链

可变结构域包括CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3。其中：

(A) 所述轻链可变结构域CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3是hPD-L1 MAB-2 VL2 (SEQ ID NO: 72) 的轻链CDR；

和

(B) (1) 所述重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO: 67) 的重链CDR；

(2) 所述重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VH3 (SEQ ID NO: 68) 的重链CDR；

(3) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VH4 (SEQ ID NO: 69) 的重链CDR；

(4) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VH5 (SEQ ID NO: 70) 的重链CDR；或

(5) 所述第二重链可变结构域CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3是hPD-L1 MAB-2 VH6 (SEQ ID NO: 71) 的重链CDR。E47.E46的PD-L1结合分子，其中所述重链可变结构域包括以下氨基酸序列：

(A) hPD-L1 MAB-2 VH2 (SEQ ID NO: 67) ；

(B) hPD-L1 MAB-2 VH3 (SEQ ID NO: 68) ；

(C) hPD-L1 MAB-2 VH4 (SEQ ID NO: 69) ；

(D) hPD-L1 MAB-2 VH5 (SEQ ID NO: 70) ；或

(E) hPD-L1 MAB-2 VH6 (SEQ ID NO: 71) 。

E48.E46-E47中任一项的PD-L1结合分子，其中所述轻链可变结构域包括以下氨基酸序列：hPD-L1 MAB-2 VL2 (SEQ ID NO: 72) 。

E49.E46-E48中任一项的PD-L1结合分子，其中所述分子为抗体或其抗原结合片段。

E50.E46-E48中任一项的PD-L1结合分子，其中所述分子是多特异性结合分子。

E51.E50的PD-L1结合分子，其中所述分子是双特异性双抗体、双特异性抗体或三价结合分子。

E52.一种药物组合物，其包括E46-E51中任一项的PD-L1结合分子和生理学上可接受的载体。

E53.E46-E51中任一项的PD-L1结合分子或E52的药物组合物在治疗与免疫系统抑制或以PD-L1表达为特征的疾病或病症中的用途。

E54.E53的用途，其中所述与免疫系统抑制有关或以PD-L1表达为特征的疾病或病症为癌症。

E55.E45或E54中任一项的用途，其中所述癌症选自由以下组成的组：膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胆囊或胆管癌、胃癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、黑素瘤、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌 (NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)、胃癌、睾丸癌、胸腺癌和子宫癌。

E56.一种增强肿瘤靶向剂活性的方法，该方法包括与E1-E43中任一项的CD137结

合分子、E46-E51中任一项的PD-L1结合分子或E44或E52中任一项的药物组合物组合施用所述肿瘤靶向剂。

E57.一种治疗与免疫系统抑制有关或以TA表达为特征的疾病或病症的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用E1-E43中任一项的CD137结合分子、E46-E53中任一项的PD-L1结合分子或E44或E53的药物组合物。

E58.E57的方法,其中与免疫系统抑制相关或以TA表达为特征的病症是癌症。

E59.E57或E58的方法,进一步包括施用肿瘤靶向剂。

E60.E56或E59的方法,其中所述肿瘤靶向剂是抗体、抗体的表位结合片段或介导T细胞复位向杀伤靶细胞的试剂。

E61.E57-E60中任一项的方法,其中所述癌症选自以下组成的组:膀胱癌、骨癌、脑和脊髓癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、胆囊或胆管癌、胃癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、肝细胞癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、黑素瘤、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、胃癌、睾丸癌、胸腺癌和子宫癌。

E62.编码E1-E43中任一项的CD137结合分子或E46-E51中任一项的PD-L1结合分子的核酸。

E63.表达载体,其包括根据E62的核酸。

E64.一种细胞,其包括根据E62的核酸或根据E63的表达载体。

E65.根据E64的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

实施例

[0450] 现在已经概括地描述了本发明,通过参考以下示例将更容易理解本发明。下述示例阐释了用于本发明的诊断或治疗方法中的组合物的各种方法。所述实施例旨在说明但绝不限制本发明的范围。

实施例1

方法

[0451] 在基本上如下进行的CD137报告试验(CD137reporter assay)中,使用表达CD137的报告细胞系(Jurkat-NF- κ B-Luc)评估了测试品(例如抗体、双抗体或三价分子)介导NF/ κ B途径的靶向依赖性信号转导的能力:对于双特异性分子,将100 μ L试验培养基(RPMI-1640,10%FBS)中的靶细胞(类型和数量在图中和如下所示)铺入无菌试验微孔板中,并于37 $^{\circ}$ C孵育过夜。在第2天,将过表达CD137的Jurkat-NF- κ B-Luc报告细胞(在50 μ L试验培养基中 4×10^4 到 7.5×10^4 个细胞)和50 μ L连续稀释的测试品添加到每个含有靶细胞的孔中,并快速连续控制没有靶细胞的孔。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育4-5小时。然后将BioGlo底物(Promega)添加到每个孔(50 μ L)中,并将板在室温("RT")下孵育另外的5-10分钟,通过检测发光来测量信号转导,例如使用Perkin Elmer Envision装置),并以发光相对光单位(RLU)作为读数。对于单特异性抗CD137抗体,不使用靶细胞,而是添加四倍过量的山羊抗小鼠或山羊抗人抗体以使抗体交联。

[0452] 基本上按如下进行ELISA试验,以评估测试品与CD137的结合:用可溶性人或食蟹猴CD137(人或食蟹猴CD137的胞外结构域与His标签(shCD137 His或scyCD137 His)或与

人Fc区(shCD137 hFc或scyCD137 hFc融合)涂覆平底maxisorb 96孔板,每个浓度为0.5或1 $\mu\text{g/mL}$ 。所述板用含有0.5%牛血清白蛋白和0.1%Tween20的PBS缓冲液洗涤、封闭,并与测试品(例如细胞上清液或纯化的mAb)一起孵育。对于杂交瘤上清液,以1.0 $\mu\text{g/mL}$ 和六次三倍连续稀释度使用抗CD137抗体。使用山羊抗小鼠IgG-HRP二抗评估与固定化CD137(人或食蟹猴)结合的测试品的量。在酶标仪(Victor 2Wallac,Perkin Elmer)上分析所有样品,并通过非线性回归分析由剂量响应曲线计算EC50值。

[0453] T细胞细胞因子释放试验(在没有靶细胞的情况下使用次优刺激的原代T细胞)基本上如下进行:将50 μL 连续稀释的测试品(抗体(与抗人Fc(Fab')₂的+/-交联))、50 μL 预洗过的 2×10^6 珠/mL的Dynabeads αCD3 (REF 11151D;Thermo Fisher Scientific的Invitrogen,或类似物的)、以及100 μL /孔的 10^6 细胞/mL的人泛T细胞(按照制造商的方案,使用Dynabeads Untouched Human T细胞试剂盒(Invitrogen Cat#11344D)或类似物,从供体PBMC中纯化的)添加到试验板的每个孔中。板上每个孔的最终体积为200 μL 。板上每个孔的最终体积为200 μL 。对于不包含测试品或 αCD3 珠的对照孔,添加试验培养基以使总体积达到200 μL ,并将板在组织培养箱中孵育72小时。然后从每个孔中收集上清液,并根据制造商的说明使用细胞因子ELISA试剂盒(例如,R&D System Human IL-2DuoSet ELISA(Cat: DY202),Human IFN-gamma DuoSet ELISA(Cat: DY285)和Human TNF-alpha DuoSet ELISA(Cat: DY210)或类似的市售试剂)测量IL-2、IL-10、TNF- α 和IFN- γ 的所释放的细胞因子。使用Microsoft Excel和SoftMax Pro进行数据分析以推断细胞因子水平,并用Prism进行绘制。

[0454] 基本上按如下进行FACS分析,以评估测试品与细胞表面CD137的结合:将100 μL 表达CD137的CHO细胞(CHO/CD137)(1.0×10^5 至 1×10^6 细胞/孔)和100 μL 连续稀释的测试品或对照添加到微量试验板的每个孔中,混合并在室温下孵育约30分钟。用FACS缓冲液洗涤细胞,然后将二抗(山羊抗人APC、PE或FITC)添加到每个孔中(1:1000),然后将组分混合,并将这些孔在室温下孵育约30分钟。洗涤细胞并将其重悬于250 μL FACS缓冲液中,并通过流式细胞仪(BD LSR Fortessa或FACSCanto II)分析细胞事件收集。通过FloJo v10进行数据分析。

[0455] 抗CD137抗体和CD137配体之间与CD137结合的竞争是在Octet生物传感器(Pa11 ForteBio)上使用实时、无标签的生物层干涉试验来确定的,基本上如下:将抗CD137抗体固定在抗人Fc生物传感器上,然后与融合至鼠Fc结构域的人CD137(shCD137 mFc;10 $\mu\text{g/mL}$)的胞外结构域缔合30秒。然后将传感器浸入重组人CD137配体(R&D Systems;5 $\mu\text{g/mL}$)30秒,以监测配体是否可以结合至预成型的CD137/抗体复合物或其结合是否被阻断。

[0456] 使用BIAcore™ SPR分析研究了抗CD137抗体(具有人Fc区)的结合动力学。抗CD137抗体被捕获在Fab' 2山羊抗人Fc表面上。监测shCD137 His或scyCD137 His(12.5nM、50nM、200nM)的缔合和解离,并使用1:1结合模型拟合传感图,以计算缔合和解离速率常数并确定KD。

[0457] 基本上按如下进行FACS分析以评估测试品与细胞表面PD-L1的结合:将100 μL 表达PD-L1的CHO细胞(CHO/PD-L1)(1.0×10^5 至 1×10^6 细胞/孔)和100 μL 连续稀释的测试品添加到微量试验板的每个孔中,混合并在室温下孵育约30分钟。用FACS缓冲液洗涤细胞,然后将二抗(山羊抗人FITC、PE或APC)添加到每个孔中,此后,将组分混合并将孔在室温下孵育约

30分钟。洗涤细胞并将其重悬于250μL FACS缓冲液中,并通过流式细胞仪(BD LSR Fortessa或FACSCanto II)分析细胞事件收集。通过FloJo v10进行数据分析。

[0458] 在Jurkat-luc-NFAT/CHO/PD-L1荧光素酶PD-L1报告试验中评估了测试品拮抗PD-1/PD-L1轴(即,阻断PD-1/PD-L1相互作用并防止T细胞应答下调)的能力。基本上按如下进行:将CHO/PD-L1细胞以40,000/孔接种于100μL培养基(DMEM/F12+10%FBS+200μg/mL潮霉素B+250μg/mL G418)中,孵育过夜。第二天,除去培养基,并加入在50μL试验缓冲液(RPMI+2%FBS)中以125,000个细胞/孔的NFAT-luc2/PD-1 Jurkat细胞(Promega)和50μL连续稀释的测试品,并在37℃下孵育6小时。然后将80μL BioGlo底物(Promega)添加到每个孔中,并将板在室温下孵育另外的5-10分钟,通过检测发光(例如使用Perkin Elmer Envision装置)来测量PD-1/PD-L1阻断(blockade),其中发光相对光单位(RLU)作为读数。

[0459] T细胞细胞因子释放试验(在靶细胞存在下使用次优刺激的原代T细胞)基本上如下进行:将人泛T细胞(从供体PBMC中纯化,参见上文)重悬于测定培养基中并置于组织培养箱中过夜。从培养物中获得TA阳性靶细胞(例如,CHO/PD-L1细胞、JIMT-1细胞、N87细胞)和对照TA阴性细胞(例如,CHO细胞)。洗涤后,将靶细胞(图中和以下所示的数字)预先接种在平底明亮的96孔板中,并放置在组织培养箱中过夜。第二天,使用Beckman Coulter Vi-细胞计数器通过苔酚蓝排斥法测量静息的人泛T细胞的密度和活力,并调整为 2×10^6 细胞/mL的密度。第二天,弃去上清液,并将50μL连续稀释的测试品(抗体、双抗体、三价分子等)、50μL预洗的 2.0×10^6 珠/mL的Dynabeads α CD3(REF 11151D; Thermo Fisher Scientific的Invitrogen)、50μL的 2.0×10^6 细胞/mL/孔的人泛T细胞()和50μL试验培养基添加至试验板的每个孔中。板上每个孔的最终体积为200μL。对于不含测试品或 α CD3珠的对照孔,添加试验培养基以使总体积达到200μL,并将板在组织培养箱中孵育72小时。然后从每个孔中收集上清液,并根据制造商的说明使用细胞因子ELISA试剂盒(例如,R&D System(Human IL-2 DuoSet ELISA (Cat: DY202), Human IFN- γ DuoSet ELISA (Cat: DY285)或类似的商业试剂)测量IFN- γ 和IL-2的释放的细胞因子。使用Microsoft Excel和SoftMax Pro进行数据分析以推断细胞因子水平,其用Prism进行绘制。

[0460] 食蟹猴血清中CD137 x TA结合分子的定量基本上如下进行:用2.0μg/mL带有His标签的可溶性人CD137融合蛋白(huCD137)(包含人CD137的胞外部分与含组氨酸的肽融合)涂覆试验板过夜。用含0.1% Tween-20的磷酸盐缓冲盐水(PBS) (PBST)中的0.5%牛血清白蛋白(BSA)封闭非特异性位点后,将板与CD137 x TA结合分子标准校准物、质量对照和测试样品一起孵育。固定化的huCD137-His捕获了标准校准物、质量对照和测试样品中存在的CD137 x TA结合分子。通过添加0.05μg/mL山羊抗人IgG (Fc)-HRP检测捕获的CD137 x TA结合分子。结合的HRP活性使用Thermo Scientific SuperSignal ELISA Pico化学发光底物通过发光产生来定量。通过Victor X4酶标仪测量发光强度,以相对光单位(RLU)表示。通过来自AEX3370标准品的RLU信号与五参数逻辑模型拟合来生成标准曲线。然后从样品的RLU信号和描述标准曲线的方程式中推断出血清样品中CD137 x TA结合分子的浓度。该试验的定量下限(LLoQ)为6.1ng/mL。

[0461] T细胞和NK细胞增殖试验基本上如下进行:将包括CD3、CD4、CD8、CD56和CD159a的泛T细胞和NK细胞标志物抗体添加到样品板孔中,该板孔包含从食蟹猴研究获得的充分混合的抗凝全血样品,使用移液管充分混合,并在环境温度下在黑暗中孵育25-35分钟。然后

将1×BD FACS裂解液添加到每个孔中,并用移液管混合;然后将每个板在环境温度下在黑暗中孵育另外的10-20分钟。将各板以400×g离心5分钟,并弃去上清液。将FACS缓冲液添加到每个孔中,并作为洗涤步骤混合。然后将每个板以400×g离心5分钟,并弃去上清液。用BD Cytotfix/Cytoperm溶液重悬细胞沉淀,并在2-8℃下孵育20-40分钟。孵育结束时,按照之前的洗涤步骤再次洗涤每个板,并将细胞沉淀与Ki67抗体或同种型对照一起重悬,并在2-8℃下孵育30-60分钟。如先前的洗涤步骤中一样再次洗涤每个板,最后将细胞沉淀重悬浮在FACS缓冲液中,并用BD FACSCanto II细胞分析仪分析样品。通过分别监测CD³⁺CD8⁺Ki67⁺和CD56⁺CD159a⁺Ki67⁺群体来定量T-细胞和NK细胞的增殖。

实施例2

人非阻断性抗CD137mAb的分离和表征

[0462] 为了鉴定具有改进特点的CD137结合结构域,特别是当并入至不同的CD137 x TA结合分子时,使用 TRIANNIMOUSE®平台通过使具有His-标签的可溶性人CD137融合蛋白(huCD137)(包含人CD137的胞外部分与含组氨酸的肽融合)的小鼠免疫产生了一组具有对人CD137特异性的完全人可变结构域的单克隆抗体。评估所得杂交瘤的上清液的CD137结合、介导剂量依赖性T细胞信号转导的能力(在CD137报告试验中)以及诱导细胞因子(例如IFN- γ 、TNF- α)从T细胞释放的能力。克隆了几种杂交瘤的VH和VL结构域,并在CHO细胞中作为人IgG1(L234A/L235A)抗体表达,并评估了其结合亲和力、配体阻断活性、与细胞表面上的CD137的结合以及在CD137报告和细胞因子释放试验。这些评估中包括无关的阴性对照抗体和/或先前描述的嵌合抗CD137抗体chCD137 MAB-3(参见WO 2018/156740及以上)。上面提供了用于这种评估的方法。选择了一种名为CD137 MAB-6(1.1)的抗体进行进一步研究。上文提供了VH和VL结构域CD137 MAB-6(1.1)的氨基酸序列,这些评估的代表性结果总结在表7A-D中。

表 7A – 杂交瘤上清液				
抗体(浓度)	报告试验 (RLU)		ELISA (EC50 ng/mL)	
	IgG 浓度		huCD137	cyCD137
	0.02 μ g/mL	0.1 μ g/mL		
CD137 MAB-6 (1.1)	3280	11670	38	49
chCD137 MAB-3	5540	18650	34	44
非特异性 mAb	1020	1240	-	-

表 7B – 杂交瘤上清液								
T 细胞试验– 细胞因子释放								
	IL-2				IL-10			
	供体 1		供体 2		供体 1		供体 2	
(浓度)	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1
抗体	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL
CD137 MAB-6 (1.1)	25	307	172	402	35	393	204	973
chCD137 MAB-3	124	223	313	628	52	63	225	391
非特异性 mAb	16	29	27	29	33	35	45	54
	TNF-α				IFN-γ			
	供体 1		供体 2		供体 1		供体 2	
(浓度)	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1
抗体	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL
CD137 MAB-6 (1.1)	76	908	355	702	116	2901	546	2573
chCD137 MAB-3	275	368	370	508	194	303	287	455
非特异性 mAb	35	113	68	102	33	92	56	99

表 7C – CHO 细胞上清液						
抗体	配体 阻断	SPR			表面结合	
		kon, 1/(Ms)	koff, 1/s	KD, nM	MFI max	EC50 ng/mL
CD137 MAB-6 (1.1)	no	4.2E+5	6.7E-3	16	5745	21
chCD137 MAB-3	yes	6.6E+5	2.5E-2	38	6046	10
非特异性 mAb	-		-	-	149	-

表 7D – CHO 细胞上清液			
	报告试验 (RLU)	原代 T 细胞试验	
		供体 1	
		INF γ	TNF-α
(浓度)	0.08	0.1	0.1
抗体	μg/mL	μg/mL	μg/mL
CD137 MAB-6 (1.1)	8530	174	101
chCD137 MAB-3	9170	63	45
非特异性 mAb	1250	0	6

[0463] 通过交叉竞争研究进行表位binning。这些和配体结合竞争研究的结果表明，CD137 MAB-6结合的表位不同于包括utomilumab可变结构域的比较抗体，包括乌瑞鲁单抗的可变结构域的比较抗体和在WO 2018/156740中描述的包括chCD137 MAB-3的所有抗CD137抗体。总之，这些研究表明，如通过ELISA、FACS和BIAcore™试验所确定的，CD137 MAB-6结合独特的非封闭性表位，并展现出比先前描述的chCD137 MAB-3更好的结合亲和力。

CD137 MAB-6在T细胞细胞因子释放试验中也展示出更高的活性。

实施例3

CD137 x TA结合分子的表征

[0464] 产生了并入CD137 MAB-6 (1.1) 和hPD-1 MAB-2 (1.1) 的VH和VL结构域的能够结合CD137和代表性TA,PD-L1的CD137 x TA结合分子。具体而言,产生了称为“DART-A”的四价双特异性双抗体,其包括两个相同的双特异性双抗体结合结构域,并具有图1B所示的抗体样Y结构;以及称为“TRIDENT-A”的三价结合分子,其包括一个单特异性双抗体型结合结构域和具有图3A所示的结构的非双抗体型结合结构域。这些分子的结构域属性以及具有相同结构的某些双特异性对照和比较分子在上面进行了讨论(例如,参见表5-6)。

[0465] 基本上如上所述进行的,通过FACS分析评估DART-A、TRIDENT-A、比较分子TRIDENT-2(包括hCD137 MAB-3 (1B.3) 的结合结构域) 和阴性对照(hIgG1-不相关的抗体作为同种型对照) 结合细胞表面CD137的能力,以10 μ g/mL和五倍连续稀释使用测试品。图4所示的代表性试验结果显示,所有CD137 $\times$ PD-L1双特异性分子均能够有效结合细胞表面上表达的CD137。在该试验中,比较分子似乎表现出更好的结合。

[0466] 通过FACS分析评估DART-A、TRIDENT-A、hPD-1MAB-2 (1.1) 和阴性对照hIgG1与表达PD-L1的CHO细胞(CHO/PD-L1) 的表面结合的能力,以及它们在Jurkat-luc-NFAT/CHO/PD-L1荧光素酶报告试验中拮抗PD-1/PD-L1轴的能力(即阻断PD-1/PD-L1相互作用并防止T细胞应答的下调),两种试验均基本上如上所述进行。测试品以10 μ g/mL和五倍连续稀释用于FACS分析,并以50 μ g/mL和五倍连续稀释用于PD-L1报告试验。图5A-5B所示的代表性试验结果表明,DART-A和TRIDENT-A能够有效结合细胞表面表达的PD-L1(图5A),并能阻断PD-1/PD-L1相互作用(图5B)。请注意,具有两个PD-L1结合位点的分子(DART-A和hPD-1 MAB-2 (1.1)) 的结合曲线会更快达到饱和,这表明一些分子展示出二价结合(即,结合表面上的两个PD-L1分子)。在CHO/PD-L1细胞上表达高浓度的靶配体存在下,二价结合更可能发生。还观察到,具有两个PD-L1结合位点的分子相对于三价分子展示出更大的PD-L1阻断活性。

[0467] 在存在和不存在表达PD-L1的JIMT-1细胞(每孔10,000个细胞) 的情况下,在基本上如上所述进行的CD137报告试验中评估DART-A、TRIDENT-A、比较分子:DART-2和TRIDENT-2(各自包括hCD137 MAB-3 (1B.3) 的结合结构域)、DART-3(包括utomilumab的结合结构域)、激动的抗CD137 mAb乌瑞鲁单抗(r-乌瑞鲁单抗) 的复制品和阴性对照:DART-1(RSV x PD-L1结合分子) 和hIgG1的功能活性,测试品以1 μ g/mL和五倍连续稀释使用。图6中所所示的代表性试验结果表明,包括结合结构域CD137 MAB-6 (1.1) 的四价和三价CD137 x PD-L1双特异性分子(分别为DART-A和TRIDENT-A) 介导的靶标依赖性信号转导,相反,仅包括hCD137 MAB-3 (1B.3) 的结合结构域的三价分子(TRIDENT-2) 展示活性,而相应的四价分子DART-2在靶细胞存在下不显示任何活性。另外,DART-A展示了所有测试的四价分子中最高的活性。在没有靶细胞的情况下,CD137 x TA双特异性分子均未展示出活性。如预期的那样,在存在和不存在表达PD-L1的靶细胞的情况下,激动剂r-乌瑞鲁单抗展示出活性,而阴性对照则根本没有展示出活性。

[0468] 基本上如上所述进行的,在表达PD-L1的JIMT-1细胞(每孔10,000个细胞) 存在下,在原代T细胞因子释放试验中也评估了的DART-A、TRIDENT-A、比较分子:DART-2、TRIDENT-2、DART-3、r-乌瑞鲁单抗和阴性对照:DART-1和hIgG1的功能活性,测试品以1 μ g/mL和五倍

连续稀释使用。图7A和7B分别显示了代表性细胞因子INF- γ 和IL-2的代表性试验结果。如在CD137报告试验中所见,包括结合结构域CD137 MAB-6 (1.1)的四价和三价CD137 x PD-L1双特异性分子(分别为DART-A和TRIDENT-A)都介导细胞因子释放,而仅包括hCD137 MAB-3 (1B.3)结合结构域的三价分子(TRIDENT-2)展示出活性,而四价分子DART-2则没有展示出活性。再者,DART-A展示了所有测试的四价分子的最高活性,而阴性对照则没有展示出活性。

[0469] 这些研究表明,完全人结合结构域CD137 MAB-6 (1.1)在四价和三价CD137 x TA双特异性分子中均具有活性,并且在不存在表达PD-L1的靶细胞的情况下不展示出激动剂活性。尽管TRIDENT-2展示了与CHO/CD137细胞的更高结合,但是TRIDENT-A和TRIDENT-2的活性相当,而DART-2在两种功能试验中均没有展示活性。实际上,CD137 MAB-6 (1.1)在图1B所示的四价抗体样结构中比包括hCD137 MAB-3 (1B.3)或utomilumab的结合结构域的分子更具活性。

实施例4

CD137 x TA分子的药代动力学

[0470] 三价CD137 x TA双特异性分子TRIDENT-A(包括CD137 MAB-6 (1.1)的结合结构域)和TRIDENT-2(包括hCD137 MAB-3 (1B.3)的结合结构域)的药代动力学在食蟹猴中进行了评估。简而言之,向两只食蟹猴(雌性)输注单剂量的1mg/kg或10mg/kg的每种测试品(四组),并监测动物22天,不进行尸检。监测动物的食物消耗、体重和完整的血液学,并在研究过程中进行临床化学分析。观察到肝酶(ALT、AST和胆红素)的瞬时增加。测试品的耐受性良好,未观察到不良反应。

[0471] 基本上如上所述,随着时间的推移监测分子的血清浓度。 C_{max} 、AUC、 $t_{1/2\beta}$ 和CL值列于表8中,并且表明包括CD137 MAB-6 (1.1)的结合结构域的三价CD137 x TA双特异性分子比包括hCD137 MAB-3 (1B.3)的血清半衰期长约两倍。前10天(240小时)中TRIDENT-A的血清浓度绘制在图8A中。另外,基本上如上所述地检查了CD8⁺T细胞(图8B)和NK细胞(图8C)的增殖。这项研究表明,包括新型抗CD137抗体CD137 MAB-6的CD137结合结构域的代表性的CD137 x TA双特异性分子TRIDENT-A展示出缓慢的清除和施用(其与临时诱导CD8⁺T细胞和NK细胞二者的增殖有关),这表明刺激了这些免疫细胞。此外,如上所述,CD137 MAB-6在四价抗体样结构中更具活性。因此,与先前描述的CD137结合结构域相比,CD137 MAB-6结合结构域提供了多个优点。

表 8: 药代动力学

分子	剂量	动物	Cmax	AUC	t1/2 β	CL
	(mg/kg)	ID	(ug/mL)	(hr*ug/mL)	(hr)	(mL/hr/kg)
TRIDENT-A	1	1F001	28	1598	98	0.48
		1F002	32	1968	148	0.32
TRIDENT-A	10	2F003	242	18752	217	0.30
		2F004	293	21333	167	0.27
TRIDENT-2	1	5F009	31	1227	29	0.81
		5F010	26	945	42	0.97
TRIDENT-2	10	6F011	282	10313	100	0.78
		6F012	293	11486	99	0.69

实施例5

hPD-1 MAB-2 (1.1) 可变结构域的去免疫化和优化

[0472] 使用MAPP试验(由Abzena执行)分析完整的hPD-1 MAB-2 (1.1) 抗体,以鉴定可由抗原呈递细胞呈递的肽簇。随后通过iTope™进对hPD-1 MAB-2 (1.1) 的VH和VL结构域的氨基酸序列进行silico分析,其中肽簇被分为重迭的9-mer肽(相邻肽之间8aa重迭),并预测了9-mer肽与HLA-DR蛋白的结合亲和力,并将9-mer肽针对已实验上显示刺激T细胞应答的肽数据库进行交叉核对。鉴定了hPD-1 MAB-2 VH1的构框架区域2的Kabat残基72-88(对应于SEQ ID NO:57的残基73-92)内的潜在T细胞表位。进一步的分析鉴定了在该区域中根据Kabat编号的三种非种系氨基酸:T77、K83和T84(对应于SEQ ID NO:57的残基T78、K87和T88),并引入了以下置换:T77S、K83R和T84A;或T77S、K83R和T84A,根据Kabat编号的。使用基本上如上文对CD137结合所述的ELISA试验(除了平板以0.5 μ g/mL的shPD-L1涂覆,并且使用山羊抗人IgG-HRP二抗)评估包括这些置换的抗体的结合与融合至His标签的可溶性PD-L1 (shPD-L1)的结合。结果总结在表9中。

表 9: shPD-L1 ELISA 的总结

抗体	结合
hPD-1 MAB-2 VH1	++++
hPD-1 MAB-2 VH1 + T77S	++
hPD-1 MAB-2 VH1 + K83R 和 T84A	+++
hPD-1 MAB-2 VH1 + T77S, K83R 和 T84A	++++

[0473] 所有去免疫化的变体均与shPD-L1结合,该变体包括展示与亲本抗体无法区分的结合的T77S、K83R和T84A置换。包括这些突变的VH命名为hPD-L1 MAB-2 VH2。

[0474] 另外,进行了突变分析以鉴定增强了与shPD-L1的结合的hPD-L1 MAB-2 (1.1) 的VH和/或VL结构域的CDR中的氨基酸取代。在表10中提供了许多引起改进的结合的置换,具有使用Kabat编号系统呈现的置换以及上述序列中相应的氨基酸残基。基本上如上所述,通过ELISA(除了使用了山羊抗人 κ -HRP二抗)评估了包括这些取代的不同组合的Fab片段与

shPD-L1-his的结合。评估的代表性变体总结在表11中,结合曲线示于图9A-9B中。这些研究表明,包括每种变体(绘制在图9A中的hPD-L1 MAB-2B、hPD-L1 MAB-2D和hPD-L1 MAB-2F;绘制在图9B中的hPD-L1 MAB-2A、hPD-L1 MAB-2C和hPD-L1 MAB-2E)的Fab展示出比包括亲本hPD-L1 MAB-2 (1.1)的Fab更高的亲和力。

表 10: CDR 置换			
VH 结构域		VL 结构域	
Kabat*	SEQ ID NO:57^	Kabat*	SEQ ID NO:58^
S31G	31	T31E	31
G53K	54	D28H 或 D28V 或 D28L	28
Q95A 或 Q95G	99	S52E	52
F100aG	105		

*根据Kabat的置换编号

^指示de序列识别号的相应氨基酸残基号

表 11: 包括 CDR 置换的 hPD-L1 MAB-2 变体	
变体	置换*
hPD-L1 MAB-2A	VH(S31G/G53K/Q95A) & VL(D28H)
hPD-L1 MAB-2B	VH(S31G/G53K/Q95G) & VL(D28V)
hPD-L1 MAB-2C	VH(S31G/G53K/F100aG) & VL(D28L)
hPD-L1 MAB-2D	VH(F100aG) & VL(D28L/S52E)
hPD-L1 MAB-2E	VH(G53K/Q95A) & VL(D28L)
hPD-L1 MAB-2F	VH(G53K/F100aG) & VL(T31E)

*根据Kabat的置换编号

[0475] hPD-L1 MAB-2的许多变体VH和/或VL结构域用于产生CD137 x TA双特异性分子(均包含两个CD137 MAB-6 (1.1) 结合位点)。表12中总结了所用的特定hPD-L1 MAB-2 VL和VH变体,这些变体的氨基序列和包含它们的双特异性分子在上面提供。如上所述,包括PD-L1 MAB-2 VH/VL结构域分子是通过参考具体的VH/VL结构域来提及的,例如包括结合结构域PD-L1 MAB-2 VH3和hPD-L1 MAB-2 VL2的分子具体称为“PD-L1 MAB-2 (3.2)”。

表 12: hPD-L1 MAB-2 变体 VH 和 VL 结构域	
变体	置换*
hPD-L1 MAB-2 VH2	T77S/K83R/T84A
hPD-L1 MAB-2 VH3	T77S/K83R/T84A + G53K/F100aG
hPD-L1 MAB-2 VH4	T77S/K83R/T84A + Q95A
hPD-L1 MAB-2 VH5	T77S/K83R/T84A + G53K/Q95A
hPD-L1 MAB-2 VH6	T77S/K83R/T84A + Q95A/ F100aG
hPD-L1 MAB-2 VL2	VL(T31E)

*根据Kabat的置换编号

[0476] 基本上如上所述,通过FACS分析对以下包括两个PD-L1结合位点的分子:DART-A1 (包括hPD-L1 MAB-2 (2.1));DART-A4 (包括hPD-L1 MAB-2 (3.2));hPD-L1 MAB-2 (1.1);以及以下包括一个PD-L1结合位点的分子:TRIDENT-A (如上所述);以及TRIDENT-A4 (包括hPD-L1 MAB-2 (3.2)),评估了在JIMT-1细胞表面上的PD-L1结合,以1 μ g/mL和四倍连续稀释使用测试品。代表性试验的结果显示在图10A-10B中。这些分子在基本上如上所述的PD-L1报告试验中检查了它们阻断PD-1/PD-L1相互作用的能力,25 μ g/mL的测试品和四倍连续稀释。代表性的试验结果显示在图11A-11B中。这些数据表明,包括去免疫化/优化的hPD-L1 MAB-2 (3.2)的结合结构域的CD137 x TA双特异性分子展示出增强的结合(图10A-10B),并且更有效地阻断了PD-1/PD-L1相互作用(图11A-11B)。在包括两个PD-L1结合结构域的四价分子(图10A和11A中的DART-A4)中观察到适度的提高,在仅包括一个PD-L1结合结构域的三价分子(在图10B和11B中的TRIDENT-A4)中观察到活性的较大提高。基本上如上所述,在PD-L1报告试验中评估包括两个PD-L1结合位点的其他分子:DART-A4 (包括hPD-L1 MAB-2 (3.2));DART-A7 (包括hPD-L1 MAB-2 (4.2));DART-A8 (包括hPD-L1 MAB-2 (5.2));和DART-A9 (包括hPD-L1 MAB-2 (6.2))阻断PD-1/PD-L1相互作用的能力,其中1.5 μ g/mL的测试品和两倍的连续稀释。代表性的试验结果显示在图11C中。这项研究表明,与包含hPD-L1 MAB-2 (3.2)的DART-A4相比,包括可选的去免疫化的/优化的hPD-L1 MAB-2 (4.2)、hPD-L1 MAB-2 (5.2)和hPD-L1 MAB-2 (6.2)的CD137 x TA双特异性分子展示出类似或改善的阻断活性。

实施例6

CD137 MAB-6的去免疫化

[0477] 为了最小化免疫原性的可能性,将置换引入CD137 MAB-6的VL结构域的框架区中,以用人种系中存在的那些置换非种系残基。特别地,引入以下置换的组合:T14S、F36Y和I39K,根据Kabat编号(对应于SEQ ID NO:50的残基14、37和40),所得的CD137 MAB-6 VL结构域总结于以下表13中,并用于产生能够与CD137和代表性TA,PD-L1结合的CD137 x TA双特异性分子,以上提供了这些变体的氨基酸序列和包括它们的双特异性分子。

表 13: CD137 MAB-6 变体 VL 结构域	
变体	置换*
CD137 MAB-6 VL2	T14S/F36Y/I39K
CD137 MAB-6 VL3	T14S/I39K

*根据Kabat的置换编号

[0478] 基本上如上所述进行的,通过FACS分析对以下包括两个hPD-L1 MAB-2 (3.2) 结合位点的分子:DART-A4 (包括CD137 MAB-6 (1.1));DART-A5 (包括CD137 MAB-6 (1.2));DART-A6 (包括CD137 MAB-6 (1.3));以下包括一个hPD-L1 MAB-2 (3.2) 结合位点的分子:TRIDENT-A4 (包括CD137 MAB-6 (1.1));TRIDENT-A5 (包括CD137 MAB-6 (1.2));TRIDENT-A6 (包括CD137 MAB-6 (1.3), 乌瑞鲁单抗 (r-乌瑞鲁单抗) 的复制品和阴性对照hIgG1评估与细胞表面CD137的结合能力,其中以3 μ g/mL和四倍连续稀释使用测试品。图12A-12B中所示的代表性试验的结果表明,包括CD137 MAB-6 (1.3) 的结合结构域的四价 (图12A) 和三价 (图12B) CD137 x PD-L1双特异性分子与包括CD137 MAB-6 (1.1) 的结合结构域分子展示了几乎相同的结合性能,而包括CD137 MAB-6 (1.2) 的分子展示出降低的结合。

[0479] 在存在和不存在表达PD-L1的N87靶细胞 (每孔10,000个细胞) 或JIMT-1细胞 (每孔20,000个细胞) 的情况下,在基本上如上所述进行的CD137报告试验中检查了DART-A4、DART-A5、DART-A6、r-乌瑞鲁单抗,TRIDENT-A4、TRIDENT-A5和TRIDENT-A6以及阴性对照hIgG1的功能活性,以1 μ g/mL的浓度和5倍连续稀释使用测试品。图13A-13B所示的代表性试验的结果表明,在存在JIMT-1细胞 (PD-L1⁺⁺,图13B) 的情况下,所有以靶标依赖性方式表现出活性的分子均比在存在N87细胞 (PD-L1⁺,图13A) 的情况下具有更高的活性。包括CD137 MAB-6 (1.3) 的结合结构域的CD137 x PD-L1双特异性分子展示活性特征与包括CD137 MAB-6 (1.1) 的结合结构域的相同分子几乎相同,而包括CD137 MAB-6 (1.2) 的那些展示出降低的活性。在不存在靶细胞的情况下,没有CD137 x PD-L1双特异性分子展示出活性。如预期的那样,在存在和不存在表达PD-L1的靶细胞的情况下,激动剂r-乌瑞鲁单抗展示出活性,而阴性对照则根本没有展示出活性。

[0480] 基本上如上所述进行的,在表达PD-L1的JIMT-1细胞 (每孔10,000个细胞) 存在下在原代T细胞因子释放试验中检查了DART-A4、DART-A5、DART-A6、r-乌瑞鲁单抗、TRIDENT-A4、TRIDENT-A5和TRIDENT-A6以及阴性对照hIgG1的功能活性,测试品以1 μ g/mL和五倍连续稀释使用。图14A和14B分别显示了代表性细胞因子INF- γ 和IL-2的代表性试验的结果。如在CD137报告试验中所看出的,包括CD137 MAB-6 (1.3) 的结合结构域的CD137 x PD-L1双特异性分子展示的活性特征与包括CD137 MAB-6 (1.1) 的结合结构域的相同分子几乎相同或稍好一些。而包括CD137 MAB-6 (1.2) 的那些展示出降低的活性。

实施例7

CD137 x TA分子的另外表征

[0481] 进行了另外的体外研究,以评估以下代表性的包括PD-L1 MAB-2、新型CD137 MAB-6或其去免疫/优化的变体的PD-L1和CD137结合结构域的CD137 x PD-L1双特异性分子:DART-A;DART-A4;DART-A6;DART-A7;TRIDENT-A;TRIDENT-A4;TRIDENT-A6;和另外的四价分

子: DART-A10 (包括两个hPD-L1 MAB-2 (4.2) 结合位点和两个CD137 MAB-6 (1.3) 结合位点) 的活性。这些分子的CD137和PD-L1结合结构域总结在上面的表5中。

[0482] 基本上如上所述, DART-A、DART-A4、DART-A6、DART-A7、DART-A10、阴性对照hIgG1和抗PD-L1抗体阿替利珠单抗(r-阿替利珠单抗)、hPD-L1 MAB-2F或r-乌瑞鲁单抗的复制品通过FACS分析评估与表达PD-L1 (CHO/PD-L1) 或表达CD137 (CHO/CD137) 的CHO细胞的表面结合的能力, 其中以3 μ g/mL的起始浓度和3至4倍的稀释使用测试品。代表性的试验结果显示在图15A-15B中。这些结合研究表明, 与DART-A相比, 包括优化的PD-L1结合结构域的CD137 x TA结合分子(DART-A4、DART-A6、DART-A7、DART-A10) 展示了与PD-L1的改进的结合(图15A)。观察到与JIMT-1 (PD-L1+) 细胞结合的类似的PD-L1结合特征。这些研究还表明, 包括CD137 MAB-6 (1.3) 和CD137 MAB-6 (1.1) 的结合结构域的CD137 x TA结合分子展示出与r-uelumab相比改善的类似的结合(图15B)。

[0483] 基本上如上所述, 在PD-L1报告试验中评估了DART-A、DART-A4、DART-A6、DART-A7、DART-A10、TRIDENT-A、TRIDENT-A4、RIDENT-A6、hPD-L1 MAB-2F、r-阿替利珠单抗和阴性对照hIgG1阻断PD-1/PD-L1相互作用的能力, 其中以3 μ g/mL的测试品和两倍连续稀释。代表性试验的结果显示在图16A-16B中。这些研究再次表明, 包括去免疫/优化的hPD-L1 MAB-2 (3.2) 或hPD-L1 MAB-2 (4.2) 的结合结构域的四价(图16A) 和三价(图16B) CD137 x TA双特异性分子, 展示了与包括亲本结合结构域hPD-L1 MAB-2 (1.1) 的分子相比, PD-1/PD-L1相互作用的更有效的阻断, 增强的活性与CD137结合结构域无关。如上所述, 在此试验中, 在包括一个PD-L1结合结构域的三价分子中观察到了更大的活性改善, 其活性接近抗PD-L1抗体hPD-L1 MAB-2F和r-阿替利珠单抗(每个具有两个PD-L1结合结构域) 观察到的活性。

[0484] 在存在和不存在表达PD-L1的JIMT-1细胞(每孔10,000个细胞) 的情况下, 基本上如上所述进行的, 在CD137报告试验中检查DART-A、DART-A4、DART-A5、DART-A6、TRIDENT-A4、TRIDENT-A5和TRIDENT-A6、r-乌瑞鲁单抗和阴性对照hIgG1的功能活性, 使用1 μ g/mL和5倍连续稀释的测试样品(例如, 图14A的底部所示的量)。代表性试验的结果显示在图17A-17B中, 并且表明在JIMT-1细胞存在的情况下(图17A), 所有二价分子均以靶标依赖方式以高活性水平展示活性, 而在不存在靶细胞的情况下则无活性(图17B)。与包括亲本结构域的那些分子相比, 包括去免疫化/优化的PD-L1和CD137结合结构域的分子表现出更高的活性(例如, TRIDENT-A6和DART-A10)。在该试验中, 三价分子展示出更高的活性, 而三价分子的活性增加更大。

[0485] 基本上如上所述进行的, 在表达PD-L1的JIMT-1细胞(每孔10,000个细胞) 的存在下, 在原代T细胞细胞因子释放试验中还检查了DART-A、DART-A4、DART-A5、DART-A6、r-乌瑞鲁单抗、TRIDENT-A4、TRIDENT-A5和TRIDENT-A6、r-乌瑞鲁单抗和r-阿替利珠单抗的组合以及阴性对照hIgG1的功能活性, 以1 μ g/mL和五倍连续稀释使用测试品(例如, 在图14A的底部所示的量)。图18A和18B分别显示了代表性细胞因子INF- γ 和IL-2的代表性试验的结果。如在CD137报告试验中所见, 包括去免疫化/优化的PD-L1和CD137结合结构域的三价CD137 x PD-L1双特异性分子展示出更高的活性(例如TRIDENT-A6)。

实施例8

鼠异种移植模型

[0486] 可与其它肿瘤靶向剂组合使用本发明的CD137 x TA结合分子。在人PBMC重构鼠异

种移植模型中体内检查了代表性PD-L1 x CD137双特异性分子DART-A4、TRIDENT-A和TRIDENT-A4增强代表性TA x CD3双特异性分子5T4 x CD3双抗体(以下提供序列)的抗肿瘤活性的能力。简而言之,在研究天数(SD) 0时,将新鲜分离的PBMC (8×10^6) 从后眼眶注入MHC I-/-小鼠。在SD7,将RK0结肠癌细胞 (5×10^6) 与Matrigel以1:1的混合物皮下注射。在SD7,小鼠用OKT4治疗。在SD14,开始用5T4 x CD3双抗体进行治疗(IV) (每周两次,0.025mg/kg),并用PD-L1 x CD137双特异性分子进行治疗(每周,1或2mg/kg)。每周用卡尺两次测量肿瘤生长(N=7/组)。如图19A-19C所示,在测试浓度下,TA x CD3仅展示出对肿瘤生长的最小抑制。但是,PD-L1 x CD137双特异性分子和5T4 x CD3双抗体的组合显著抑制了肿瘤生长。这项研究表明,包括新型CD137 MAB-6抗体的结合结构域的PD-L1 x CD137双特异性分子可以在体内与TA x CD3双特异性分子组合抑制肿瘤生长。

[0487] 在另一项研究中,检测了代表性PD-L1x CD137双特异性分子DART-A10和TRIDENT-A6(各自包括两个CD137 MAB-6 (1.3) 结合位点) 增强5T4xCD3双抗体抗肿瘤性活性的能力。基本上如上所述进行研究,不同之处在于,PD-L1xCD137双特异性分子以0.5、1或2.5mg/kg每5天(如果在周末则为4天)施用。每周用卡尺两次测量肿瘤生长(N=8/组)。如图20A-20B所示,DART-A10和TRIDENT-A6与5T4xCD3双抗体组合也抑制了肿瘤生长。这项研究表明,包括去免疫化的CD137 MAB-6抗体的结合结构域的PD-L1 x CD137双特异性分子可以在体内与TA x CD3双特异性分子组合抑制肿瘤生长。

[0488] 在另外的组合治疗研究中,将PD-L1xCD137双特异性分子DART-A6、TRIDENT-A(每个都包括CD137 MAB-6结合结构域的VH/VL) 的活性与TRIDENT-2以及在WO 2019/025545中描述的称为“PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR”的PD-L1 x CD137DUOBODY®双特异性分子(在本文中缩写为DUO-1(下面提供氨基酸序列)) 的活性进行了比较。基本上如上所述进行研究,除了在不同的实验中,PD-L1 x CD137双特异性分子每5天(如果在周末则为4天)以0.1mg/kg至5mg/kg之间的范围的浓度施用。每周用卡尺两次测量肿瘤生长(N=8/组)。两项研究的代表性资料(注意-研究1中,TRIDENT-2仅以1mg/kg给药) 绘制在图21A和21B中,并显示出TRIDENT-A和TRIDENT-A6展示的抗肿瘤活性与TRIDENT-2相当或稍好,并且比DUO-1更具活性。

[0489] 代表性的TA x CD3双特异性分子(即在上述鼠异种移植研究中使用的5T4 x CD3双抗体)是具有对5T4肿瘤抗原的一个结合位点和对CD3的一个结合位点的二价双抗体。该分子具有图1D所示的一般结构,并包括以下三条多肽链:

5T4 x CD3 双抗体链 1	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLLTVSS GGCGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO:140)
5T4 x CD3 双抗体链 2	QAVVTQEPSL TVSPGGT VTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSF WMHWVRQAPG QGLEWMGRID PNRGGTEYNE KAKSRVTMTA DKSTSTAYME LSSLRSEDTA VYYCAGGNPY YPMDYWGQGT TVTVSSGGCG GGKVAALKEK VAALKEKVAA LKEKVAALKE (SEQ ID NO:141)
5T4 x CD3 双抗体链 3	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSTIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO:142)

[0490] 在以上小鼠异种移植研究中使用的PD-L1-547-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR双特异性分子在W0 2019/025545中描述。该分子包括不同于本文提供的PD-L1和CD137结合特异性,并包括以下四条多肽链:

VH_CD137-009-H7 IgG1-FEAR-Fc	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCTASGFSLN DYWMSWVRQA PGKGLEWVG Y IDVGGSLLYYA ASVKGRFTIS RDDSKSIAYL QMNSLKTEDT AVYYCARGGL TYGFDLWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVTPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKHTCPCPP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVAVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO:157)
VL_CD137-009-L2 κ-C	DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASEDIS SYLAWYQQKP GKAPKRLIYG ASDLASGVPS RFSASGSGTD YTFTISSLQP EDIATYYCHY YATISGLGVA FGGGTVKEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQLSSPVT K SFNRGEC (SEQ ID NO:158)
VH-PD-L1-547 IgG1- FEAL-Fc	EVQLLEPGGG LVQPGGSLRL SCEASGSTFS TYAMSWVRQA PGKGLEWVSG FSGSGGFTFY ADSVRGRFTI SRDSSKNTLF LQMSSLRAED TAVYYCAIPA RGYNYGSFQH WGQGTILVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVT SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRV PKSCDKHTC PPCPAPEFEG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVAV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFLL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:159)
VL- PD-L1-547 λ-C	SYVLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD NDRPSGLPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHVVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAFTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS (SEQ ID NO:160)

实施例9

另外的CD137 x TA结合分子的表征

[0491] 产生了能够结合CD137和代表性TA,HER2的CD137 x TA结合分子,其并入了CD137 MAB-6 (1.1)的VH和VL结构域以及hHER2 MAB-1 (1.3)的VH和VL结构域。在这项研究中,检查了许多另外的双特异性构型。特别地,产生称为“DART-B1”的双价双特异性双抗体,其包括双特异性双抗体结构域,并具有图1D所示的不对称结构;以及称为“TRIDENT-B2”的三价结合分子,其包括双特异性双抗体型结合结构域(其中位点A结合CD137,位点B结合TA)和非双

抗体型结合结构域(位点C结合CD137),具有图3A所示的结构。另外,产生了与之前表征的分子具有相同的一般构型的分子。特别地,产生了称为“DART-B2”的四价双特异性双抗体,其包括相同的双特异性双抗体结合结构域并具有图1B所示的抗体样Y结构;和称为“TRIDENT-B1”的三价结合分子,其包括单特异性双抗体型结合结构域(其中位点A和B结合CD137)和非双抗体型结合结构域(位点C结合TA)。这些分子的结构域特性以及具有相同结构的某些双特异性对照和比较分子在上面进行了讨论(参见例如表5-6)。

[0492] 在存在和不存在HER2表达细胞(JIMT-1 (HER2⁺⁺) 或N87 (HER2⁺⁺⁺), 20,000个细胞/孔)的情况下,在基本上如上所述进行的CD137报告试验中评估DART-B1、DART-B2、TRIDENT-B1、TRIDENT-B2、亲本CD137 MAB-6 (1.1) 和HER2 MAB-1 (1.3) 抗体以及阴性对照:DART-4、DART-5、TRIDENT-3和TRIDENT-4 (CD137 x RSV结合分子,具有的结构可与各测试品相当)的功能活性。测试品以1 μ g/mL和五倍连续稀释使用。使用JIMT-1和N87细胞的代表性试验的结果分别显示在图22A和22B中,并证明包括结合结构域CD137 MAB-6 (1.1) 的所有CD137 x HER2双特异性分子均介导了靶向依赖性信号转导,而亲本抗体和阴性对照则没有展示活性。

[0493] 基本如上所述进行的,在HER2表达细胞(JIMT-1和N87,每孔10,000个细胞)的存在下,在原代T细胞细胞因子释放试验中还评估了DART-B1、DART-B2、TRIDENT-B1、TRIDENT-B2、亲本CD137 MAB-6 (1.1) 和HER2 MAB-1 (1.3) 抗体以及阴性对照:DART-4、DART-5、TRIDENT-3和TRIDENT-4的功能活性。测试品以1 μ g/mL和五倍连续稀释使用。使用JIMT-1细胞的代表性试验的结果在图23A (INF- γ) 和23C (IL-2) 中显示,使用N87细胞在图23B (INF- γ) 和23D (IL-2) 中显示。如在CD137报告试验中所见,所有包括结合结构域CD137 MAB-6 (1.1) 的CD137 x HER2双特异性分子均介导靶向依赖性细胞因子释放,尤其是高HER2表达N87细胞,而亲本抗体和阴性对照没有展示活性。

[0494] 这些研究表明,包括结合结构域CD137 MAB-6 (1.1) 的二价、四价和三价CD137 x TA双特异性分子(分别为DART-B1、DART-B2、TRIDENT-B1/B2) 介导靶标依赖性信号转导。应当注意,CD137结合结构域的位置在TRIDENT-B2中相对于TRIDENT-B1是移位的。这项研究表明,CD137 MAB-6当与另外的肿瘤抗原配对时,以多种构型都是功能性的,甚至当以单个结合位点存在时,也具有功能性。

[0495] 本说明书中提及的所有出版物和专利都以相同的程度通过引用并入本文,就好像每个单独的出版物或专利申请被具体地和单独地指示整体地通过引用并入一样。尽管已经结合本发明的具体实施方式对本发明进行了描述,但是应当理解,本发明能够进行进一步的修改,并且本申请旨在覆盖本发明的任何变型、用途或修改,一般而言,本发明的原理以及包括与本公开内容的这种偏离均落入本发明所属领域的已知或惯常实践之内,并且可以应用于上文阐述的基本特征。

序列表

<110> 宏观基因有限公司

<120> CD137结合分子及其用途

<130> PT-FIPC-2200604-CN

<140>

<141>

<150> 63/147,565

<151> 2021-02-09

<150> 63/104,685

<151> 2020-10-23

<150> 62/980,000

<151> 2020-02-21

<160> 160

<170> PatentIn 3.5版本

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 2

<211> 104

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 65 70 75 80
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 85 90 95
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100

<210> 3

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val

<210> 4

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val

<210> 5

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val

<210> 6

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

126

<400> 10

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 11

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 12

<211> 217

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD_RES

<222> (217) .. (217)

<223> 赖氨酸(K) 或不存在

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
 210 215

<210> 13

<211> 216

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD_RES

<222> (216) .. (216)

<223> 赖氨酸 (K) 或不存在

<400> 13

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 65 70 75 80
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
 210 215
 <210> 14
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (217) .. (217)
 <223> 赖氨酸 (K) 或不存在
 <400> 14
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
 210 215
 <210> 15
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (217) .. (217)
 <223> 赖氨酸 (K) 或不存在
 <400> 15
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
210 215

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人
<400> 16

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成构建体
<400> 17

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

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成构建体
<400> 18

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213>人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成构建体
<400> 19

Ala Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 20

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 21

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 22

Ala Pro Ser Ser Ser

1 5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 23

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu

1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 24

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 26

Leu Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 27

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 28

Leu Glu Pro Lys Ser Ser

1 5

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 29

Val Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 30

Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 31

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 31

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 32

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 33

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成构建体
<400> 33
Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5
<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成构建体
<400> 34
Ala Glu Pro Lys Ser Cys
1 5
<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成构建体
<400> 35
Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5
<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列描述:合成构建体
<400> 36
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5
<210> 37
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 37

Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val
1				5					10					15	
Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys				
			20						25						

<210> 38

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 38

Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val
1				5					10					15	
Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu				
			20						25						

<210> 39

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 39

Glu	Val	Ala	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val
1				5					10					15	
Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys				
			20						25						

<210> 40

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 40

Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val
1				5					10					15	
Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu				

137

210 215
 <210> 42
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (217) .. (217)
 <223> 赖氨酸(K) 或不存在
 <400> 42
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa

210 215
 <210> 43
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (217) .. (217)
 <223> 赖氨酸(K) 或不存在
 <400> 43
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa

210 215
 <210> 44
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (217) .. (217)
 <223> 赖氨酸 (K) 或不存在
 <400> 44
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa

210 215
 <210> 45
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (217) .. (217)
 <223> 赖氨酸(K) 或不存在
 <400> 45
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa

<210> 47
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 47
 Ser Tyr Tyr Trp Ser
 1 5
 <210> 48
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 48
 Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT

<213> 智人

<400> 49

Asp Gly Trp Tyr Asp Glu Asp Tyr Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 50

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 50

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Ile Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asp Leu Pro

85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 51

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 52

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 53

Gln Gln Asp Tyr Asp Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 54

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14) .. (14)

<223> 丝氨酸(S)或苏氨酸(T)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (37) .. (37)

<223> 苯丙氨酸(F)或酪氨酸(Y)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (40) .. (40)

<223> 异亮氨酸(I)或赖氨酸(K)

<400> 54

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Xaa Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Xaa Gln Gln Xaa Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asp Leu Pro

85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 55

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 55

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40						45		
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65					70				75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro
				85					90					95	
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100						105						

<210> 56

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 56

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40						45		
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65					70				75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro
				85					90					95	

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 57

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ile Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Gly Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 58

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50	55	60															
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65					70					75					80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Asn	Thr	Pro	Leu		
				85					90						95		
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys							
			100					105									

<210> 59
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (54) .. (54)
 <223> 甘氨酸 (G) 或赖氨酸 (K)
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (78) .. (78)
 <223> 苏氨酸 (T) 或丝氨酸 (S)
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (87) .. (87)
 <223> 赖氨酸 (K) 或精氨酸 (R)
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (88) .. (88)
 <223> 丙氨酸 (A) 或苏氨酸 (T)
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (99) .. (99)
 <223> 丙氨酸 (A) 或谷氨酰胺 (Q)
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (105) .. (105)
 <223> 苯丙氨酸 (F) 或甘氨酸 (G)
 <400> 59
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ala Tyr Ile Ser Ile Xaa Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Xaa Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Xaa Gly Leu Pro Tyr Tyr Xaa Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 60

Ser Tyr Thr Met Ser

1 5

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5) .. (5)

<223> 甘氨酸 (G) 或赖氨酸 (K)

<400> 61

Tyr Ile Ser Ile Xaa Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> 丙氨酸 (A) 或谷氨酰胺 (Q)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7) .. (7)

<223> 苯丙氨酸 (F) 或甘氨酸 (G)

<400> 62

Xaa Gly Leu Pro Tyr Tyr Xaa Asp Tyr

1 5

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31) .. (31)

<223> 谷氨酸 (E) 或苏氨酸 (T)

<400> 63

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Xaa Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8) .. (8)

<223> 谷氨酸 (E) 或苏氨酸 (T)

<400> 64

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

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 65

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 66

Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 67

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 67

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ile Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 68

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ile Lys Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Leu Pro Tyr Tyr Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 69

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 69

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40						45		
Ala	Tyr	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val
			50				55					60			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90				95	
Ala	Arg	Ala	Gly	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100						105				110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										

115

<210> 70

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 70

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40						45		
Ala	Tyr	Ile	Ser	Ile	Lys	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val
			50				55					60			

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Ala Gly Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 71

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 71

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ile Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Ala Gly Leu Pro Tyr Tyr Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 72

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 72

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Lys	Ala Ser Gln Asp	Val Asn Glu Ala
20	25	30	
Val Ala Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro	Gly Lys Ala Pro	Lys Leu Leu Ile
35	40	45	
Tyr Trp Ala Ser	Thr Arg His Thr	Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe Thr	Leu Thr Ile Ser	Ser Leu Gln Pro
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala	Thr Tyr Tyr Cys	Gln Gln His Tyr	Asn Thr Pro Leu
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln	Gly Thr Lys Val	Glu Ile Lys	
100	105		

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 73

Tyr Ile Ser Ile	Lys Gly Gly Thr	Thr Tyr Tyr Pro	Asp Thr Val Lys
1	5	10	15
Gly			

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 74

Gln Gly Leu Pro	Tyr Tyr Gly Asp	Tyr
1	5	

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 75

Ala Gly Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 76

Ala Gly Leu Pro Tyr Tyr Gly Asp Tyr

1 5

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 77

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Glu Ala Val Ala

1 5 10

<210> 78

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<220>

<221> MOD_RES

<222> (100) .. (100)

<223> 天门冬氨酸 (D) 或谷氨酸 (E)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (101) .. (101)

<223> 甘氨酸 (G) 或异亮氨酸 (I)

<400> 78

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ile Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Xaa Xaa Tyr Gly Asn Arg Val Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 79

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30) .. (30)

<223> 天冬酰胺(N)或丝氨酸(S)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31) .. (31)

<223> 丝氨酸(S)或苏氨酸(T)或天冬酰胺(N)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (55) .. (55)

<223> 缬氨酸(V)或谷氨酰胺(Q)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (56) .. (56)

<223> 天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)或丝氨酸(S)

<400> 79

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Xaa Xaa Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Glu Phe Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 80

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 80

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ile Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Asp Gly Tyr Gly Asn Arg Val Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 81

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 81

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ile Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Glu Gly Tyr Gly Asn Arg Val Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 82

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 82

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ile Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Asp Ile Tyr Gly Asn Arg Val Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

83

<211> 107

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工序列描述:合成构建体

<400> 83

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Asp	Glu	Phe	Pro	Trp
				85						90				95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

84

<211> 107

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 人工序列描述:合成构建体

84 <400>

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Thr	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Val	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Glu Phe Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 85

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 85

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Glu Phe Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 86

<211> 118

<212> PRT

<213> 小白鼠

<400> 86

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
 20 25 30

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

Gly Met Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65	70	75	80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95
Arg Lys His Gly Asn Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Ser Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 87			
<211> 106			
<212> PRT			
<213> 小白鼠			
<400> 87			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Ile Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			
	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln			
65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Tyr Thr			
	85	90	95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	
<210> 88			
<211> 118			
<212> PRT			
<213> 小白鼠			
<400> 88			
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu			
1	5	10	15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr			
	20	25	30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met			
	35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe			
	50	55	60

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Asp	His
			20					25					30		
Tyr	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Thr	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val

50	55	60			
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Asn Leu Tyr					
65	70	75	80		
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys					
	85	90	95		
Thr Arg Asp Glu Ser Asp Arg Pro Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr					
	100	105	110		
Leu Val Thr Val Ser Ser					
115					

<210> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> 小白鼠

<400> 91

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser His Arg Ser Met Ser Thr Ser Val Gly					
1	5	10	15		
Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Thr Thr Ala					
	20	25	30		
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile					
	35	40	45		
Phe Trp Ala Ser Thr Arg His Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly					
50	55	60			
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala					
65	70	75	80		
Gly Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Tyr					
	85	90	95		
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	100	105			

<210> 92

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 92

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
1	5	10	15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe					
	20	25	30		

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Asn Arg Gly Gly Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Ala
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Gly Gly Asn Pro Tyr Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 93

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 93

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 94

<211> 127

<212> PRT

<213> 小白鼠

<400> 94

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
20	25	30	
Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe			
50	55	60	
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Asn Cys			
85	90	95	
Ala Arg Tyr Gly Pro Leu Phe Thr Thr Val Val Asp Pro Asn Ser Tyr			
100	105	110	
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
115	120	125	

<210> 95

<211> 112

<212> PRT

<213> 小白鼠

<400> 95

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser			
20	25	30	
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly			
85	90	95	
Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 96

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 96

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25						30	
Trp	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40							45	
Gly	Thr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Phe
			50				55						60		
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90						95
Ala	Arg	Arg	Gly	Ile	Pro	Arg	Leu	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln
			100					105						110	
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

<210> 97

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 97

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25						30	
Trp	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40							45	
Gly	Thr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Phe
			50				55						60		
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90						95
Ala	Arg	Arg	Gly	Ile	Pro	Arg	Leu	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln
			100					105						110	

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 98

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 98

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 99

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 99

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105		

<210> 100

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 100

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Leu			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg His Asp Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr			
	100	105	110
Val Thr Val Ser Ser			
	115		

<210> 101

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 101

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Tyr			
	20	25	30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Pro Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 102

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 102

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 103

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 103

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 104

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 104

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Arg Pro Gly Val
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 105

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 105

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
           20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Trp Gly Ala Ser Asn Leu Ala Asp Gly Met Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ser Pro Tyr
           85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105

```

<210> 106

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 106

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ala Leu Thr Asp Tyr
           20           25           30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
           35           40           45
Gly Phe Ile Ala Asn Lys Ala Asn Gly His Thr Thr Asp Tyr Ser Pro
           50           55           60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65           70           75           80
Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr
           85           90           95

```

Phe Cys Ala Arg Asp Met Gly Ile Arg Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 107

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 107

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

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Tyr Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 108

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 108

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 111

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 111

Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 112

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 112

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Arg	Asn
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40					45			
Ala	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
			50				55				60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95	
Ala	Arg	Gln	Gly	Thr	Thr	Ala	Leu	Ala	Thr	Arg	Phe	Phe	Asp	Val	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
			115				120								

<210> 113

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 113

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Thr	Ala
			20					25					30		
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Ser	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55				60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70				75					80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Tyr	Ser	Ala	Pro	Trp
					85				90					95	

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 114

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<220>

<221> MOD_RES

<222> (37) .. (37)

<223> 缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)

<400> 114

Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Xaa Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asp Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Ala Ala Leu Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 115

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 115

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Lys Thr Asp Thr

165								170				175					
Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln		
180								185				190					
Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr		
195								200				205					
Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Trp	Tyr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Tyr	Gly		
210								215				220					
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly		
225								230				235				240	
Cys	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu		
245								250				255					
Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys		
260								265				270					
Leu	Glu	Pro	Lys	Ser	Ala	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro		
275								280				285					
Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys		
290								295				300					
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val		
305								310				315				320	
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr		
325								330				335					
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu		
340								345				350					
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His		
355								360				365					
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys		
370								375				380					
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln		
385								390				395				400	
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met		
405								410				415					
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro		
420								425				430					
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn		
435								440				445					
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu		
450								455				460					
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val		
465								470				475				480	

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 485 490 495
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 500
 <210> 117
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <400> 117
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Ile Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asp Leu Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 115 120 125
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 130 135 140
 Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 145 150 155 160
 Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ile Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr
 165 170 175
 Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 180 185 190
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala
 195 200 205
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
 210 215 220

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
 245 250 255
 Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 260 265
 <210> 118
 <211> 505
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <400> 118
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 115 120 125
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 130 135 140
 Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 145 150 155 160
 Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
 165 170 175
 Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 180 185 190
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 195 200 205

Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Trp	Tyr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Tyr	Gly	
210						215					220					
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Cys	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	
				245					250					255		
Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	
			260					265					270			
Leu	Glu	Pro	Lys	Ser	Ala	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
			275					280				285				
Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
290						295					300					
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
305					310					315					320	
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
				325					330					335		
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
			340					345					350			
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
		355					360				365					
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
370						375				380						
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
385					390					395					400	
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
				405					410					415		
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
			420					425					430			
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
		435					440				445					
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
450						455					460					
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
465					470					475					480	
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	
				485					490					495		
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
			500					505								

<210> 119

<211> 268

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 119

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55				60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65				70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro
			85					90					95		
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser
			100					105					110		
Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val
		115				120						125			
Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr
	130					135				140					
Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
145				150					155					160	
Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr
			165					170					175		
Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys
			180					185					190		
Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala
		195				200						205			
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp
	210					215						220			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly
225				230					235					240	
Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val
			245					250					255		
Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu				

260	265
<210> 120	
<211> 505	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述:合成构建体	
<400> 120	
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Glu Ala	
20 25 30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu	
85 90 95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly	
100 105 110	
Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys	
115 120 125	
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile	
130 135 140	
Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu	
145 150 155 160	
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro	
165 170 175	
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln	
180 185 190	
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr	
195 200 205	
Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Trp Tyr Asp Glu Asp Tyr Asn Tyr Tyr Gly	
210 215 220	
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly	
225 230 235 240	
Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu	

	245		250		255
Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys					
	260		265		270
Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro					
	275		280		285
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys					
	290		295		300
Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val					
305		310		315	320
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr					
	325		330		335
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu					
	340		345		350
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His					
	355		360		365
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys					
	370		375		380
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln					
385		390		395	400
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met					
	405		410		415
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro					
	420		425		430
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn					
	435		440		445
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu					
	450		455		460
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val					
465		470		475	480
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln					
	485		490		495
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	500		505		

<210> 121

<211> 268

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

〈213〉 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 122

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55				60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65					70				75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro
				85					90					95	
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser
			100					105					110		
Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val
		115				120						125			
Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr
		130				135						140			
Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
145					150				155					160	
Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ile	Lys	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr
				165					170					175	
Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys
			180					185					190		
Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala
		195				200						205			
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Trp
		210				215						220			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly
225					230					235				240	
Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val
				245					250					255	
Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu				
			260					265							

<210> 123

<211> 268

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 123

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40						45		
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55				60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65				70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro
			85					90					95		
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser
			100					105					110		
Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val
	115					120						125			
Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr
	130					135						140			
Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
145				150					155					160	
Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ile	Lys	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr
			165						170					175	
Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys
			180					185					190		
Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala
	195					200						205			
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Trp
	210					215						220			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly
225				230					235					240	
Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val
			245					250					255		
Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu				
			260					265							

<210> 124

<211> 268

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 124

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55				60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65				70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro
			85					90					95		
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser
		100					105					110			
Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val
	115					120						125			
Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr
	130					135				140					
Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
145				150					155					160	
Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr
			165					170					175		
Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys
		180						185				190			
Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala
	195					200						205			
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Gly	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp
	210					215						220			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly
225				230					235					240	
Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val
			245					250					255		

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

<210> 125

<211> 268

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 125

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30
Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Ile Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asp Leu Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
115 120 125
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
130 135 140
Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
145 150 155 160
Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ile Lys Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr
165 170 175
Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
180 185 190
Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
195 200 205
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Gly Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
210 215 220
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
225 230 235 240

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
 245 250 255
 Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 260 265
 <210> 126
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <400> 126
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Ile Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asp Leu Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 115 120 125
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 130 135 140
 Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 145 150 155 160
 Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ile Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr
 165 170 175
 Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 180 185 190
 Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 195 200 205
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Gly Leu Pro Tyr Tyr Gly Asp Tyr Trp
 210 215 220

Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly
225					230					235					240
Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val
				245					250						255
Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu				
			260					265							

<210> 127
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <400> 127

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Gly
1			5					10						15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
			35				40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
			50				55				60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65				70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro
			85					90						95	
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser
			100					105						110	
Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val
			115				120					125			
Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser
			130				135				140				
Ile	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly
145				150					155						160
Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn
				165					170					175	
Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn
			180					185					190		
Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val
			195					200						205	

Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Trp	Tyr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Tyr
210						215				220					
Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
225					230					235					240
Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala
				245					250					255	
Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu
			260					265					270		
Lys	Gly	Gly	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			275				280					285			
Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
			290			295					300				
Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
305					310					315					320
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
				325					330					335	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
			340					345						350	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
			355				360					365			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
			370			375					380				
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
385					390					395					400
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
			405						410				415		
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
			420					425					430		
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
			435				440					445			
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
			450			455					460				
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
465					470					475					480
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
				485					490					495	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
			500												

<210> 128

<211> 273

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 128

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65					70				75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro
				85					90					95	
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser
			100					105						110	
Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val
		115					120					125			
Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser
	130						135					140			
Ile	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly
145					150					155				160	
Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn
				165					170				175		
Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn
			180					185					190		
Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val
		195					200					205			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Trp	Tyr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Tyr
	210					215				220					
Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
225					230					235				240	
Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala
				245					250				255		
Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys

260	265	270
Glu		
<210> 129		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述:合成构建体		
<400> 129		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20 25 30		
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Ala Tyr Ile Ser Ile Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val		
50 55 60		
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65 70 75 80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Arg Gln Gly Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100 105 110		
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115 120 125		
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130 135 140		
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145 150 155 160		
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165 170 175		
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180 185 190		
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195 200 205		
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210 215 220		
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser		
225 230 235 240		

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg															
Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro															
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala															
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val															
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr															
305															
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr															
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu															
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys															
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser															
370															
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp															
385															
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser															
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala															
Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys															
<210> 130															
<211> 214															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 人工序列描述:合成构建体															
<400> 130															
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly															
1															
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala															
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile															

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 131

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 131

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ile Lys Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
				100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
				115					120					125		
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
				130					135					140		
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
				145					150					155		
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				165					170					175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
				180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
				195					200					205		
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
				210					215					220		
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	
				225					230					235		
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	
				245					250					255		
Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
				260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
				275					280					285		
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
				290					295					300		
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
				305					310					315		
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
				325					330					335		
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
				340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	
				355					360					365		
Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
				370					375					380		
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	

385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	420	425	430
Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	435	440	445
<210> 132			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列描述:合成构建体			
<400> 132			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Glu Ala			
	20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
	130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
	180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			

195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 133		
<211> 503		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述:合成构建体		
<400> 133		
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1 5 10 15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn		
20 25 30		
Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35 40 45		
Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser		
50 55 60		
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln		
65 70 75 80		
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asp Leu Pro		
85 90 95		
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser		
100 105 110		
Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val		
115 120 125		
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser		
130 135 140		
Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly		
145 150 155 160		
Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn		
165 170 175		
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn		
180 185 190		
Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val		
195 200 205		
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Trp Tyr Asp Glu Asp Tyr Asn Tyr Tyr		
210 215 220		
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly		

225	230	235	240
Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala			
	245	250	255
Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu			
	260	265	270
Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
	275	280	285
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
	290	295	300
Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
305	310	315	320
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
	325	330	335
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
	340	345	350
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
	355	360	365
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu			
	370	375	380
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
385	390	395	400
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys			
	405	410	415
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
	420	425	430
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
	435	440	445
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
	450	455	460
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser			
465	470	475	480
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
	485	490	495
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	500		
<210> 134			
<211> 273			
<212> PRT			
<213> 人工序列			

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 134

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
	35						40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55				60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65					70				75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro
			85					90					95		
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser
			100					105					110		
Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val
	115					120						125			
Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser
	130					135					140				
Ile	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly
145					150				155					160	
Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn
			165					170					175		
Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn
			180					185					190		
Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val
	195						200					205			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Trp	Tyr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Tyr
	210					215						220			
Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
225					230				235					240	
Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala
			245					250					255		
Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys
			260					265					270		

Glu

<210> 135

<211> 503

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 135

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55				60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65				70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro
			85					90					95		
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser
			100					105					110		
Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val
		115				120						125			
Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser
	130					135					140				
Ile	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly
145				150					155					160	
Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn
			165					170					175		
Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn
		180						185				190			
Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val
		195				200						205			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Trp	Tyr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Tyr
	210					215				220					
Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
225				230					235					240	
Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala
			245					250					255		
Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu

260	265	270
Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
275	280	285
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
290	295	300
Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
305	310	315
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
325	330	335
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
340	345	350
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
355	360	365
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
370	375	380
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
385	390	395
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		
405	410	415
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
420	425	430
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
435	440	445
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
450	455	460
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
465	470	475
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
485	490	495
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
500		
<210> 136		
<211> 273		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述:合成构建体		
<400> 136		
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		

1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn			
20	25	30	
Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35	40	45	
Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln			
65	70	75	80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asp Leu Pro			
85	90	95	
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser			
100	105	110	
Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val			
115	120	125	
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser			
130	135	140	
Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly			
145	150	155	160
Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn			
165	170	175	
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn			
180	185	190	
Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val			
195	200	205	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Trp Tyr Asp Glu Asp Tyr Asn Tyr Tyr			
210	215	220	
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly			
225	230	235	240
Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala			
245	250	255	
Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys			
260	265	270	

Glu

<210> 137

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 137

Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln
1				5				10					15		
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Ala	Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Lys	Lys	Asp	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65					70					75					80
Val	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Ser	Met	Ile	Thr	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

<210> 138

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 138

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Gly	Tyr	Met
			20					25					30		
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
		35					40					45			
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Asp
65					70					75					80
Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Pro	Phe	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys						
			100					105							

<210> 139

<211> 268

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 139

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55				60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65				70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro
			85					90					95		
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser
		100					105					110			
Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val
	115					120						125			
Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr
	130					135				140					
Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
145				150					155					160	
Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ile	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr
			165					170					175		
Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys
		180					185					190			
Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala
	195					200					205				
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Gly	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp
	210					215				220					
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly
225				230					235					240	
Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val
			245					250					255		

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

<210> 140

<211> 504

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 140

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
130 135 140
Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160
Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180 185 190
Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195 200 205
Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210 215 220
Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala		
245	250	255
Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu		
260	265	270
Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
275	280	285
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
290	295	300
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
305	310	315
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
325	330	335
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
340	345	350
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
355	360	365
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
370	375	380
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
385	390	395
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr		
405	410	415
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
420	425	430
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
435	440	445
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
450	455	460
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
465	470	475
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
485	490	495
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
500		

<210> 141

<211> 270

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 141

Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser
			20					25					30		
Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Gly
		35					40					45			
Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Trp	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala
65					70					75				80	
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
			85						90					95	
Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Gly
			100					105					110		
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu
		115					120					125			
Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
		130					135					140			
Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Phe	Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
145					150					155				160	
Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Asn	Arg	Gly	Gly	Thr
				165					170					175	
Glu	Tyr	Asn	Glu	Lys	Ala	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Ala	Asp	Lys
			180					185					190		
Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp
		195					200					205			
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gly	Gly	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Pro	Met	Asp
		210					215					220			
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly
225					230					235				240	
Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu
			245						250					255	
Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu		
			260					265					270		

<210> 142

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 142

```

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1           5           10           15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
          20           25           30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
          35           40           45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
          50           55           60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65           70           75           80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
          85           90           95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
          100          105          110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
          115          120          125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
          130          135          140
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145          150          155          160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
          165          170          175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
          180          185          190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
          195          200          205
His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
          210          215          220

```

Pro Gly Lys

225

<210> 143

<211> 499

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 143

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
			35				40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser
	50					55				60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65					70				75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Asp	Leu	Pro
				85					90					95	
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser
			100					105					110		
Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys
			115				120					125			
Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr
	130						135				140				
Phe	Thr	Asn	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly
145					150				155					160	
Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Asn	Ile	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr
				165					170					175	
Thr	Glu	Glu	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile
			180					185					190		
Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala
			195				200					205			
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Asp	Gly	Tyr	Gly	Asn	Arg	Val	Ser	Tyr
	210					215					220				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly
225					230				235					240	
Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu
				245					250				255		
Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Gly
			260					265					270		
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
	275							280					285		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr

290	295	300
Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
305	310	315
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
325	330	335
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
340	345	350
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
355	360	365
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
370	375	380
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
385	390	395
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
405	410	415
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
420	425	430
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
435	440	445
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
450	455	460
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
465	470	475
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
485	490	495
Pro Gly Lys		
<210> 144		
<211> 272		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述:合成构建体		
<400> 144		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr		
20	25	30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile		
35	40	45

Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50						55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Asp	Glu	Phe	Pro	Trp
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			100					105					110		
Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys
		115				120					125				
Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile
		130				135					140				
Ser	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
145				150					155						160
Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro
				165					170					175	
Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln
			180					185					190		
Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
		195					200					205			
Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Trp	Tyr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Tyr	Gly
		210				215					220				
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly
225					230				235					240	
Cys	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu
				245					250				255		
Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu
			260					265					270		

<210> 145

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 145

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
1				5				10				15			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			20					25				30			

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 Pro Gly Lys
 225
 <210> 146
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (217) .. (217)
 <223> 赖氨酸 (K) 或不存在
 <400> 146
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
20				25				30							
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
35				40				45							
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
50				55				60							
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
65				70				75				80			
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
85				90				95							
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
100				105				110							
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met
115				120				125							
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
130				135				140							
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
145				150				155				160			
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
165				170				175							
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
180				185				190							
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
195				200				205							
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Xaa							
210				215											

<210> 147
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (217) .. (217)
 <223> 赖氨酸(K) 或不存在
 <400> 147

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

Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
20				25				30							
Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr
35				40				45							
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
50				55				60							
Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
65				70				75				80			
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
85				90				95							
Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
100				105				110							
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met
115				120				125							
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
130				135				140							
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
145				150				155				160			
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
165				170				175							
Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val
180				185				190							
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
195				200				205							
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Xaa							
210				215											

<210> 148
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (217) .. (217)
 <223> 赖氨酸(K) 或不存在
 <400> 148

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

Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
20				25				30								
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
35				40				45								
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
50				55				60								
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
65				70				75				80				
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
85				90				95								
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
100				105				110								
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
115				120				125								
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
130				135				140								
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
145				150				155				160				
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
165				170				175								
Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
180				185				190								
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gln	
195				200				205								
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Xaa								
210				215												

<210> 149
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (217) .. (217)
 <223> 赖氨酸(K) 或不存在
 <400> 149

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

Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
20				25				30							
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
35				40				45							
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
50				55				60							
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
65				70				75				80			
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
85				90				95							
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
100				105				110							
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met
115				120				125							
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
130				135				140							
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
145				150				155				160			
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
165				170				175							
Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
180				185				190							
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gln
195				200				205							
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Xaa							
210				215											

<210> 150
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (217) .. (217)
 <223> 赖氨酸(K) 或不存在
 <400> 150

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

Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
20				25				30							
Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr
35				40				45							
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
50				55				60							
Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
65				70				75				80			
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
85				90				95							
Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
100				105				110							
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met
115				120				125							
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
130				135				140							
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
145				150				155				160			
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
165				170				175							
Val	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val
180				185				190							
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gln
195				200				205							
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Xaa							
210				215											

<210> 151

<211> 505

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 151

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1	5				10				15						
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr
20				25				30							
Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile
35				40				45							

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Glu Phe Pro Trp		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly		
100	105	110
Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys		
115	120	125
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile		
130	135	140
Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu		
145	150	155 160
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro		
165	170	175
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln		
180	185	190
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr		
195	200	205
Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Trp Tyr Asp Glu Asp Tyr Asn Tyr Tyr Gly		
210	215	220
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly		
225	230	235 240
Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu		
245	250	255
Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys		
260	265	270
Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
275	280	285
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
290	295	300
Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val		
305	310	315 320
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
325	330	335
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
340	345	350
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		

100	105	110
Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys		
115	120	125
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr		
130	135	140
Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly		
145	150	155
Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ile Gly Glu Pro Thr Tyr		
165	170	175
Thr Glu Glu Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile		
180	185	190
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala		
195	200	205
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asp Gly Tyr Gly Asn Arg Val Ser Tyr		
210	215	220
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly		
225	230	235
Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys		
245	250	255
Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu		
260	265	

<210> 153

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 153

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr		
20	25	30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ile Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Glu Glu Phe		
50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		

85							90							95						
Ala	Arg	Asp	Asp	Gly	Tyr	Gly	Asn	Arg	Val	Ser	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly					
100							105							110						
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe					
115							120							125						
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu					
130							135							140						
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp					
145							150							155						
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu					
165							170							175						
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser					
180							185							190						
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro					
195							200							205						
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys					
210							215							220						
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro					
225							230							235						
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr					
245							250							255						
Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp					
260							265							270						
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn					
275							280							285						
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val					
290							295							300						
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu					
305							310							315						
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys					
325							330							335						
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr					
340							345							350						
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser					
355							360							365						
Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu					
370							375							380						
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu					
385							390							395						
														400						

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 154
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成构建体
 <400> 154
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Glu Phe Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 155		
<211> 453		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述:合成构建体		
<400> 155		
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1 5 10 15		
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr		
20 25 30		
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
35 40 45		
Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys		
50 55 60		
Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu		
65 70 75 80		
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85 90 95		
Arg Asp Gly Trp Tyr Asp Glu Asp Tyr Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val		
100 105 110		
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
115 120 125		
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
130 135 140		
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
145 150 155 160		
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
165 170 175		
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
180 185 190		
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
195 200 205		
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys		
210 215 220		
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala		

225	230	235	240
Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
	245	250	255
Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
	260	265	270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
	275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser			
	290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu			
305	310	315	320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala			
	325	330	335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			
	340	345	350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln			
	355	360	365
Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala			
	370	375	380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr			
385	390	395	400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu			
	405	410	415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser			
	420	425	430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
	435	440	445
Leu Ser Pro Gly Lys			
450			
<210> 156			
<211> 134			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列描述:合成构建体			
<400> 156			
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Asp Leu Pro Trp			
1	5	10	15
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130	135	140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
145	150	155
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
180	185	190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn		
195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
210	215	220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val		
225	230	235
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445

<210> 158

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 158

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
          35           40           45
Tyr Gly Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Tyr Tyr Ala Thr Ile Ser Gly
          85           90           95
Leu Gly Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
          100          105          110
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
          115          120          125
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
          130          135          140
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
          145          150          155          160
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
          165          170          175
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
          180          185          190
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
          195          200          205
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215
```

<210> 159

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成构建体

<400> 159

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Pro	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Gly	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Phe	Thr	Phe	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55				60					
Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90					95		
Ala	Ile	Pro	Ala	Arg	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Gly	Ser	Phe	Gln	His	Trp	Gly
		100						105				110			
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
		115					120					125			
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
	130					135					140				
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
145				150					155					160	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
			165					170					175		
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
		180					185					190			
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
	195				200						205				
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	210				215					220					
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly
225				230					235					240	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			245					250					255		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Ala	Val	Ser	His
		260					265					270			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	275						280					285			

His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
290						295					300				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
305					310					315					320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				325					330					335	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			340					345					350		
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		355					360					365			
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
		370				375					380				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
385					390					395					400
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Leu	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
				405					410					415	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
			420					425					430		
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
		435					440					445			
Pro	Gly	Lys													
		450													
<210>	160														
<211>	214														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	人工序列描述:合成构建体														
<400>	160														
Ser	Tyr	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln
1				5					10					15	
Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val
			20					25					30		
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr
		35					40					45			
Asp	Asp	Asn	Asp	Arg	Pro	Ser	Gly	Leu	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
		50				55					60				
Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly
65					70					75					80

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	His
85				90				95							
Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys
100				105				110							
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln
115				120				125							
Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly
130				135				140							
Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly
145				150				155				160			
Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala
165				170				175							
Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser
180				185				190							
Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val
195				200				205							
Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser										
210															

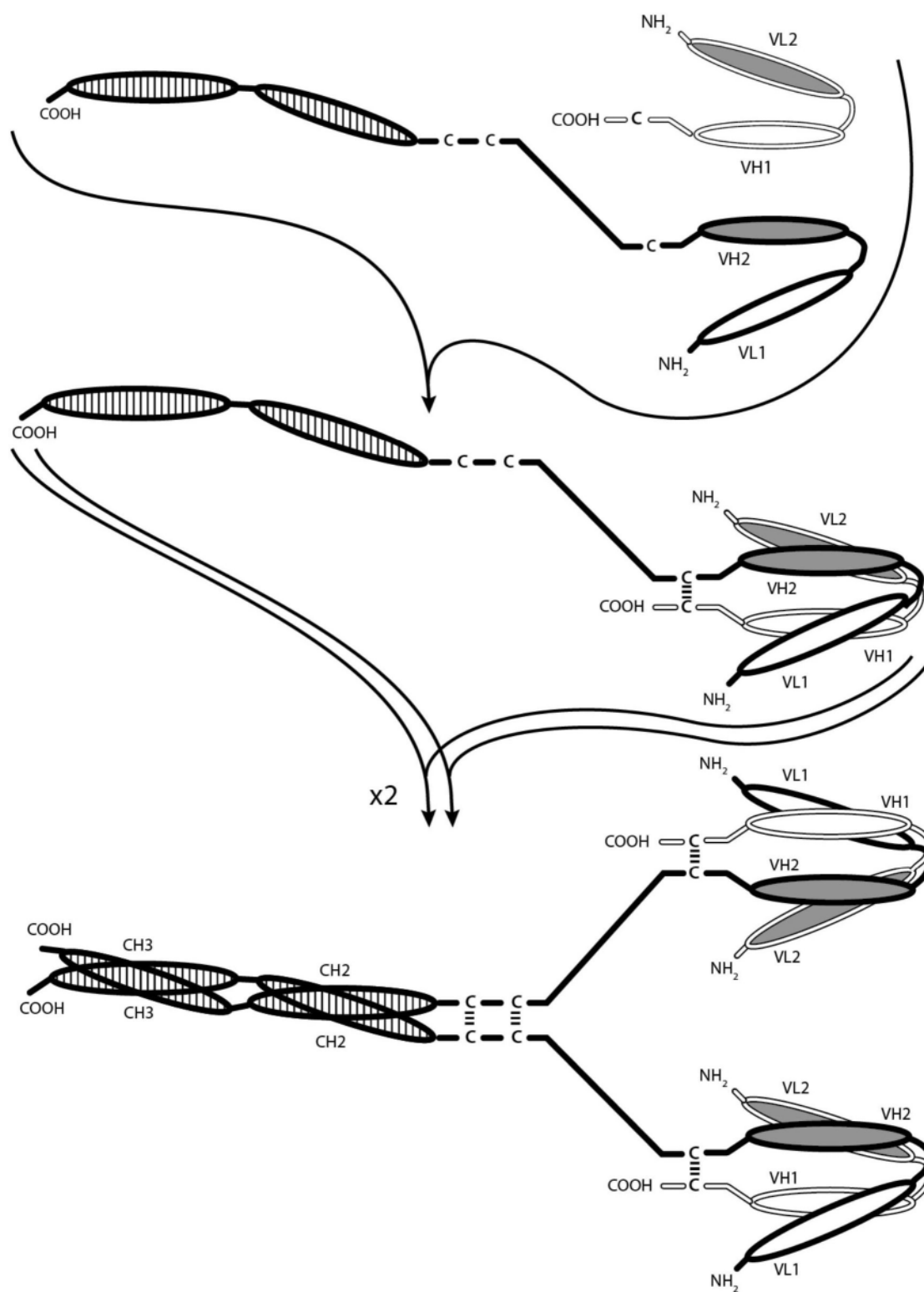


图1A

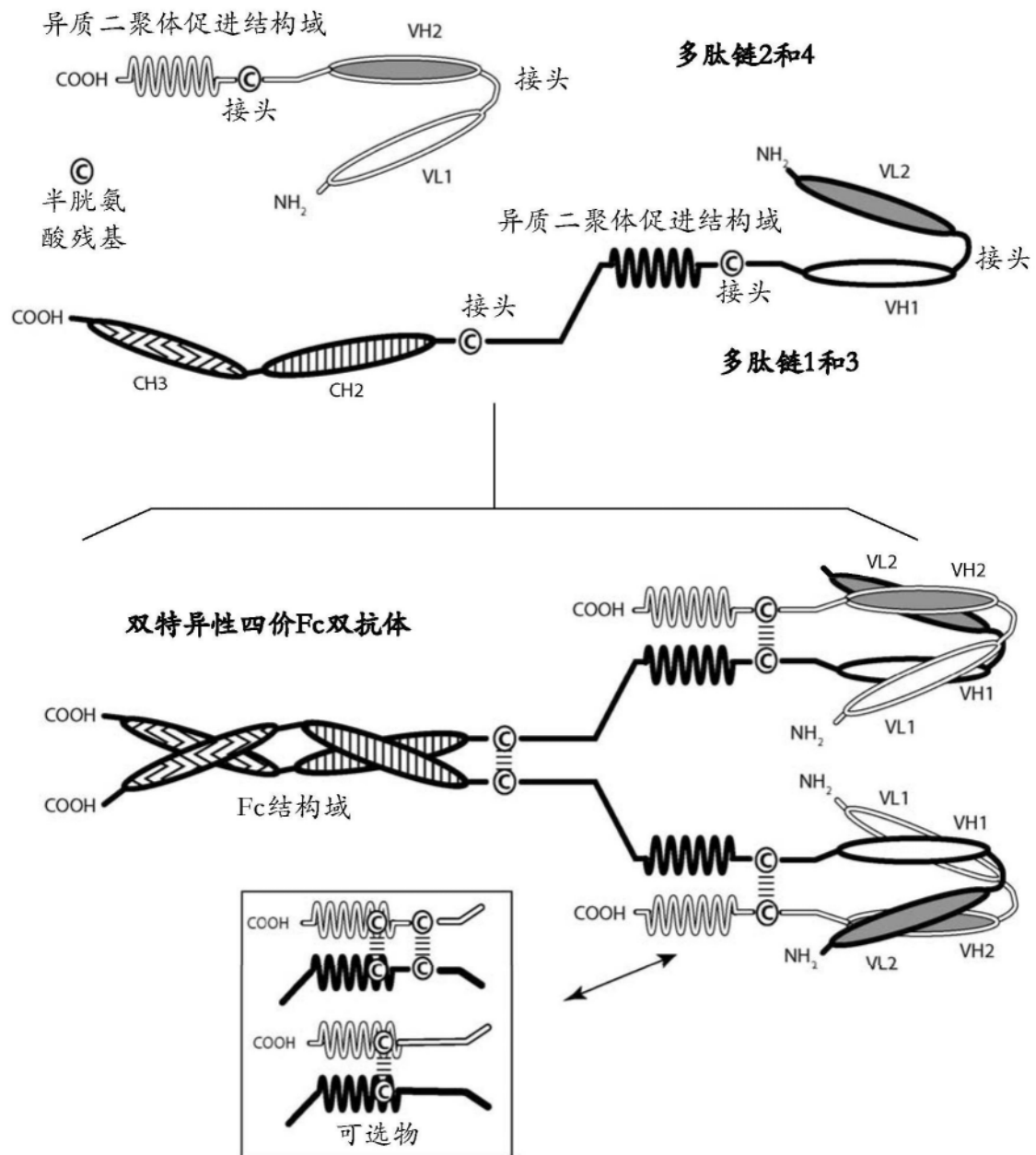


图1B

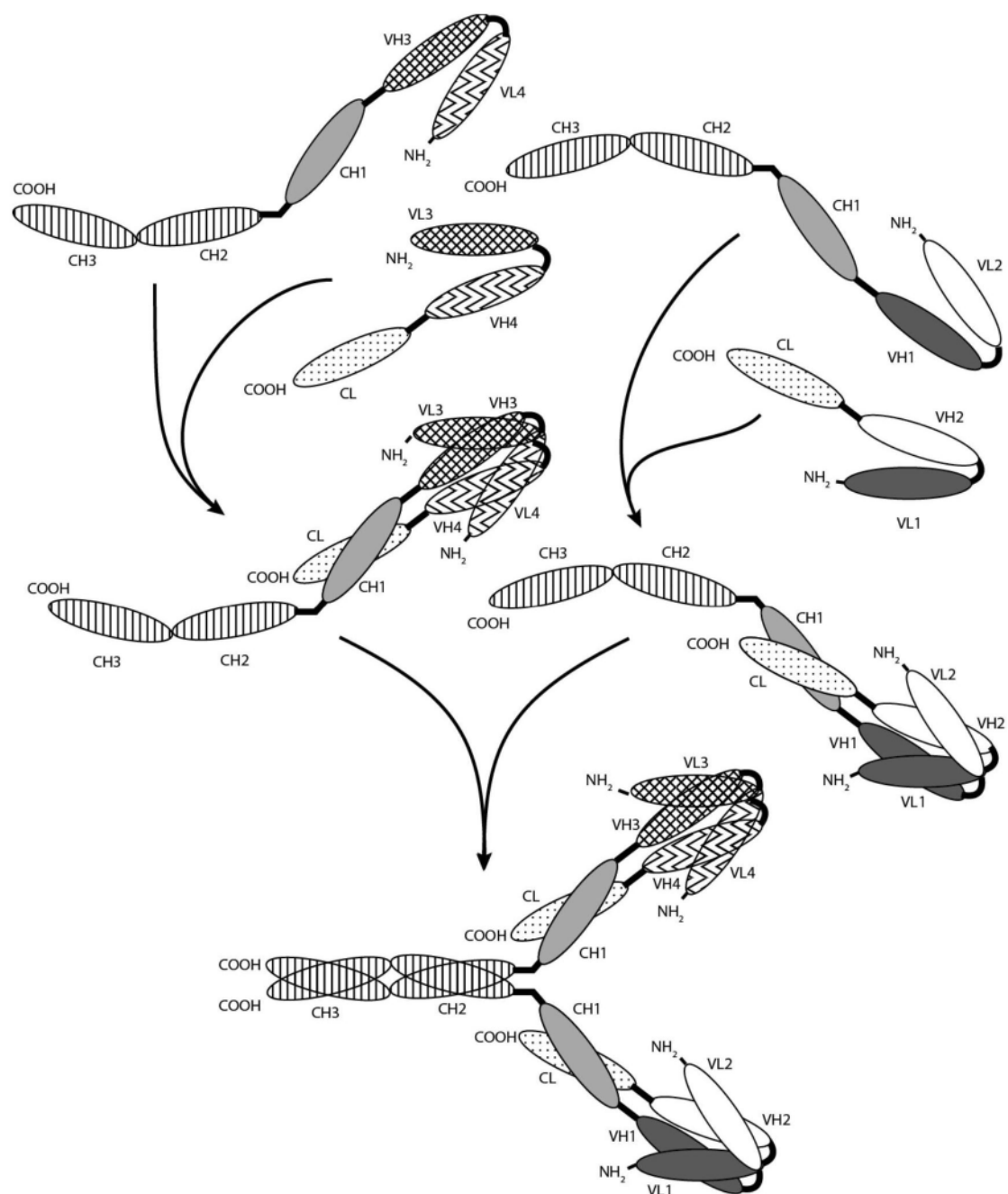


图1C

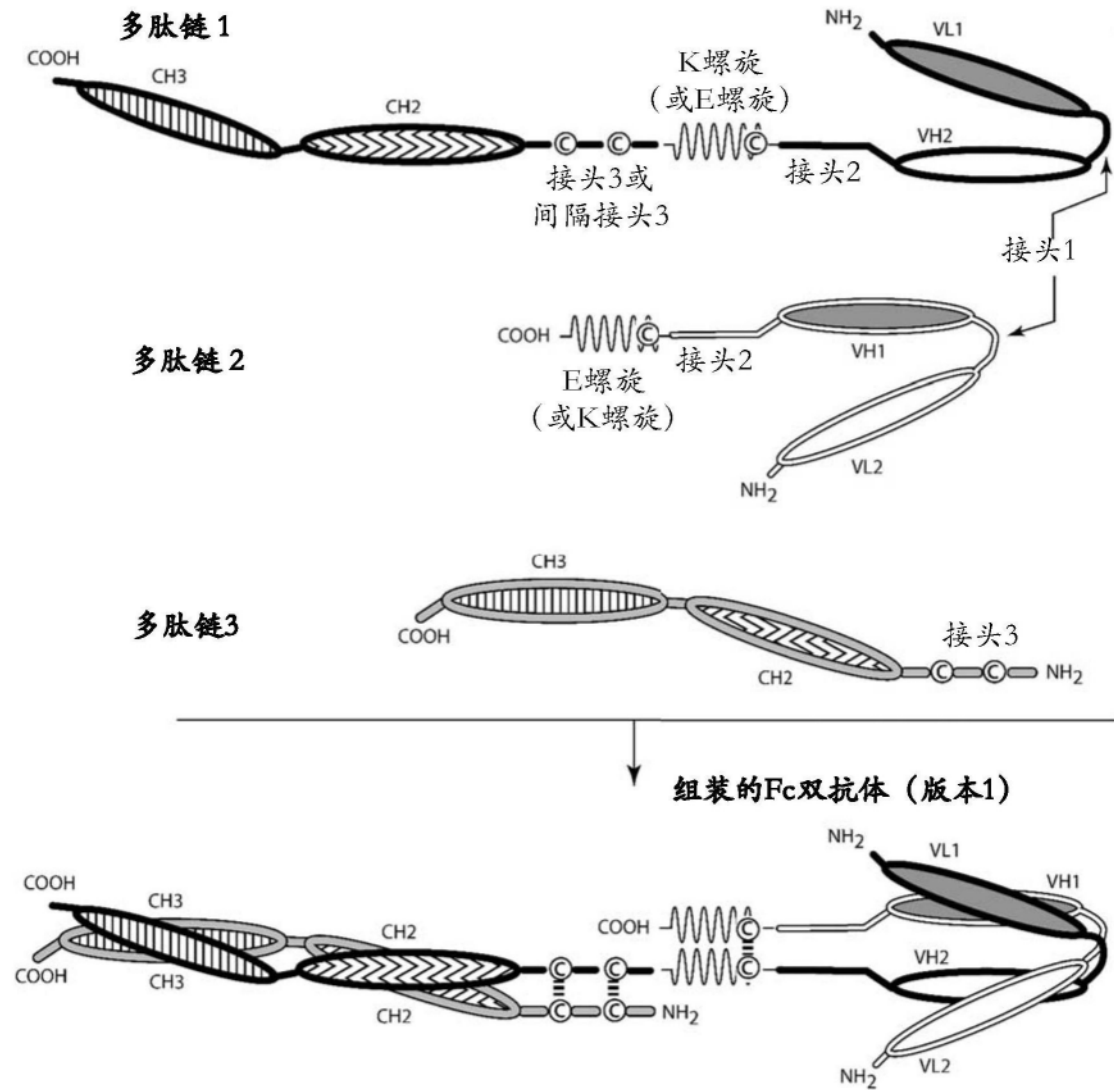


图1D

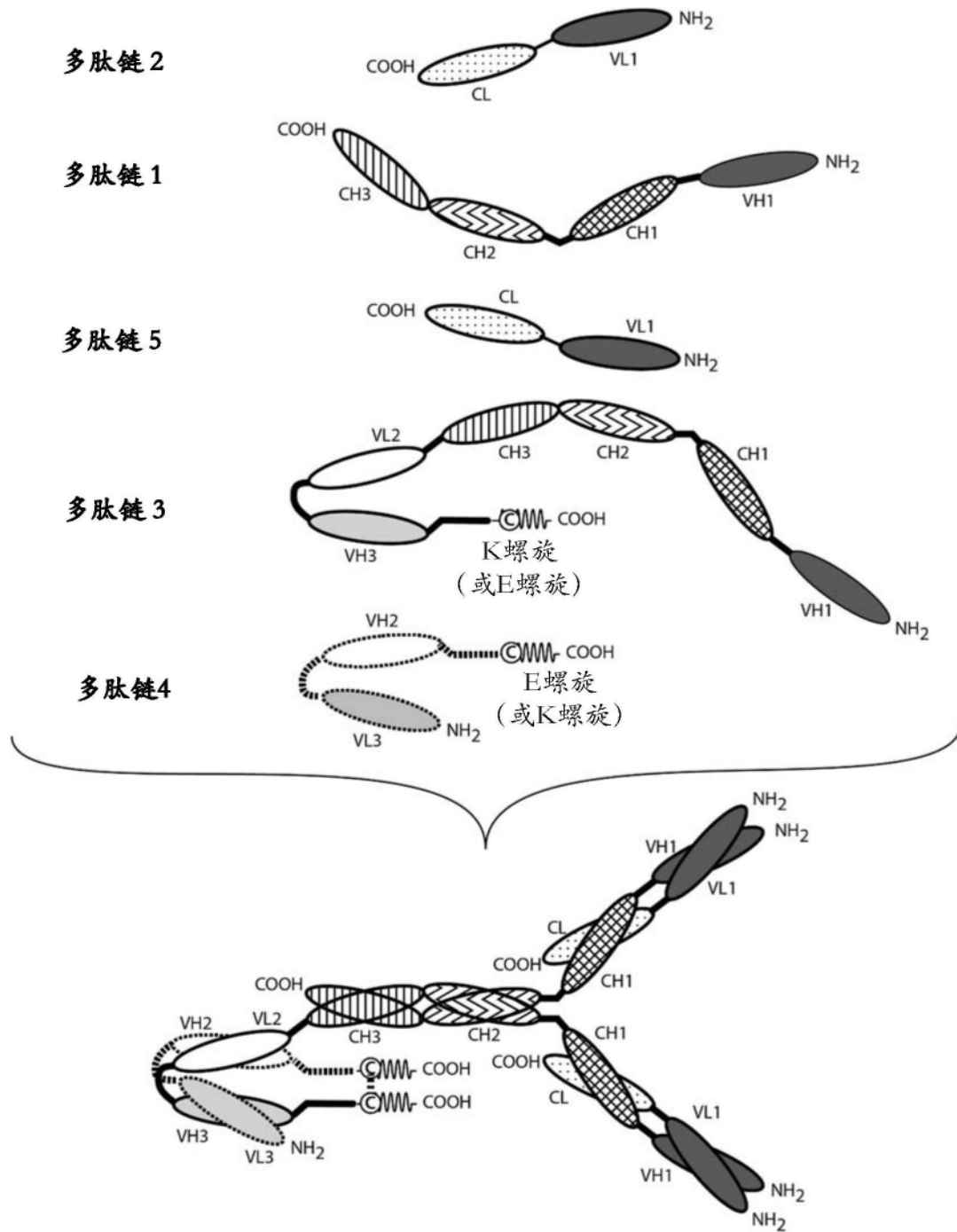


图2

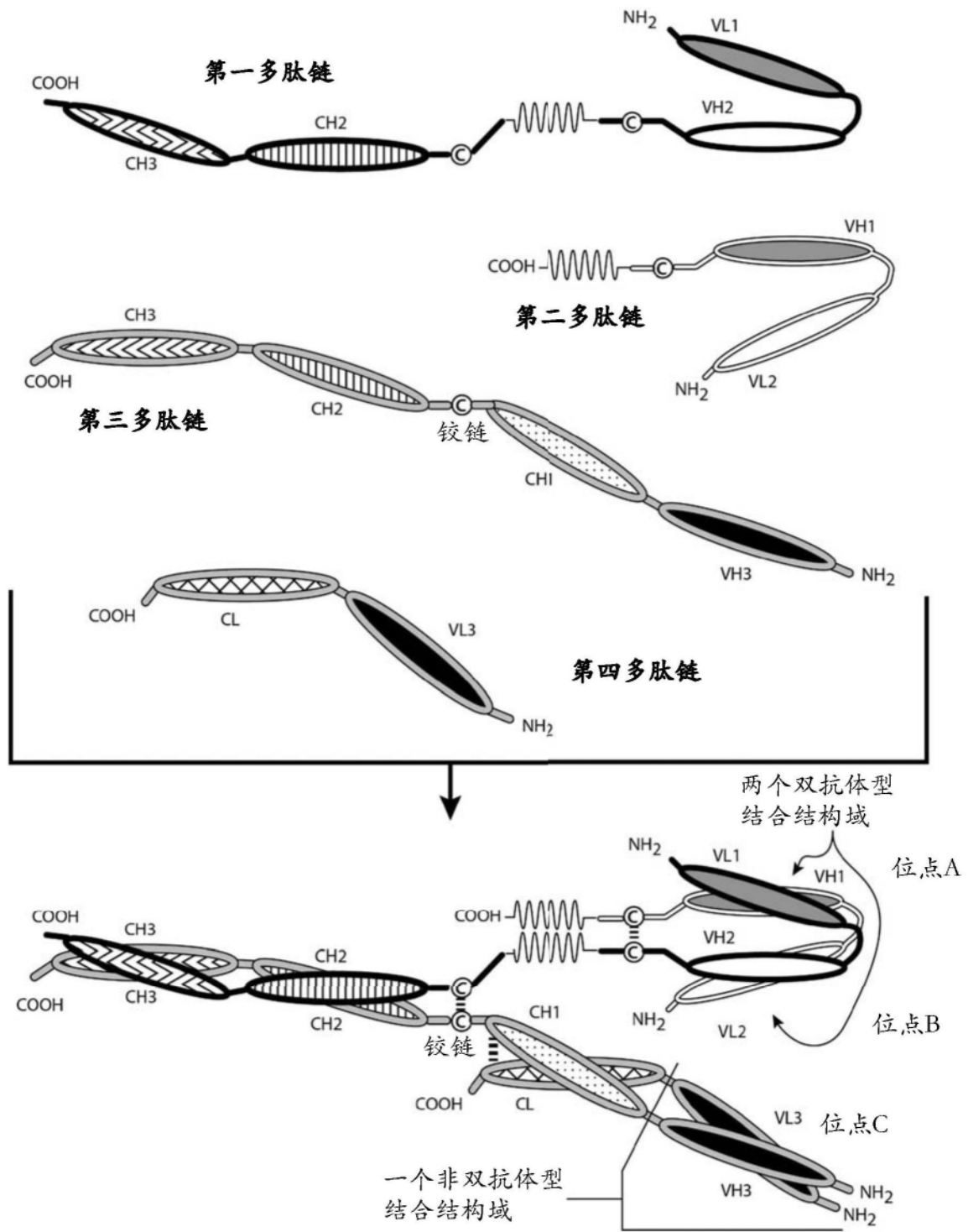


图3A

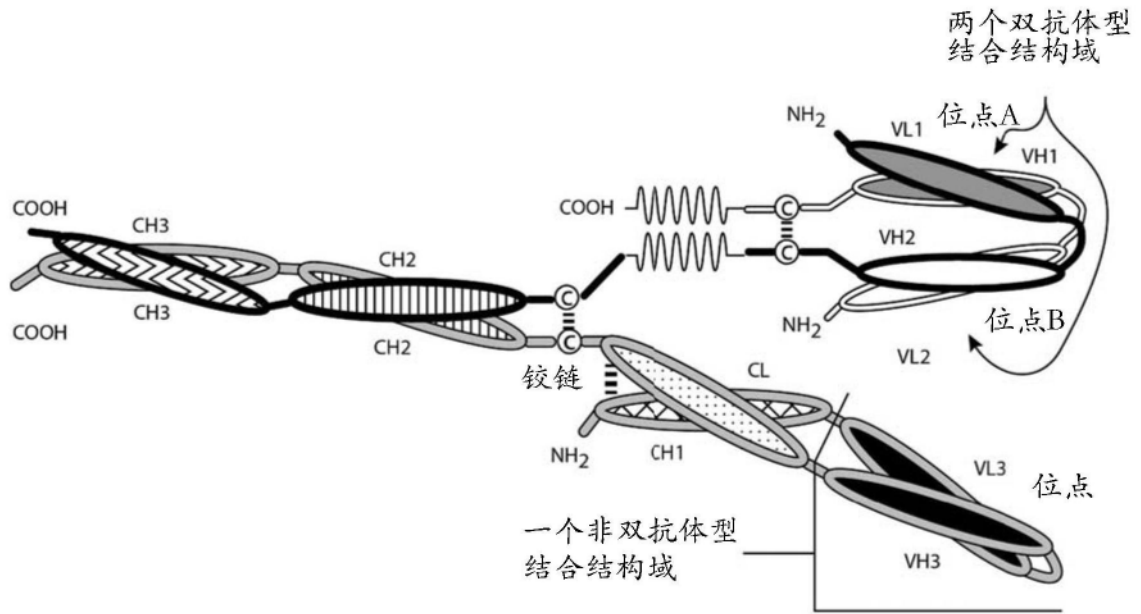


图3B

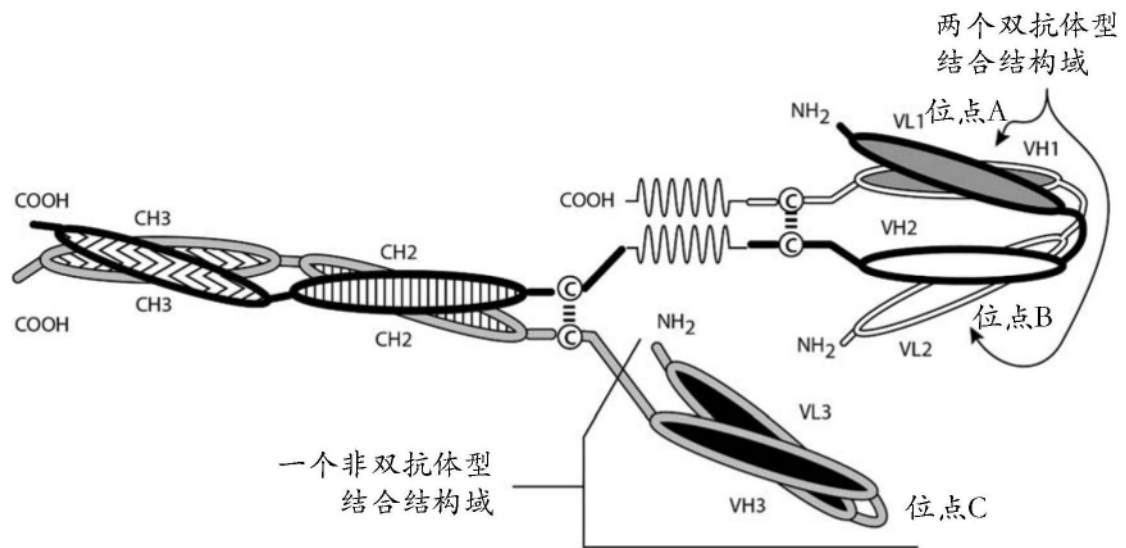


图3C

结合至CHO / CD137

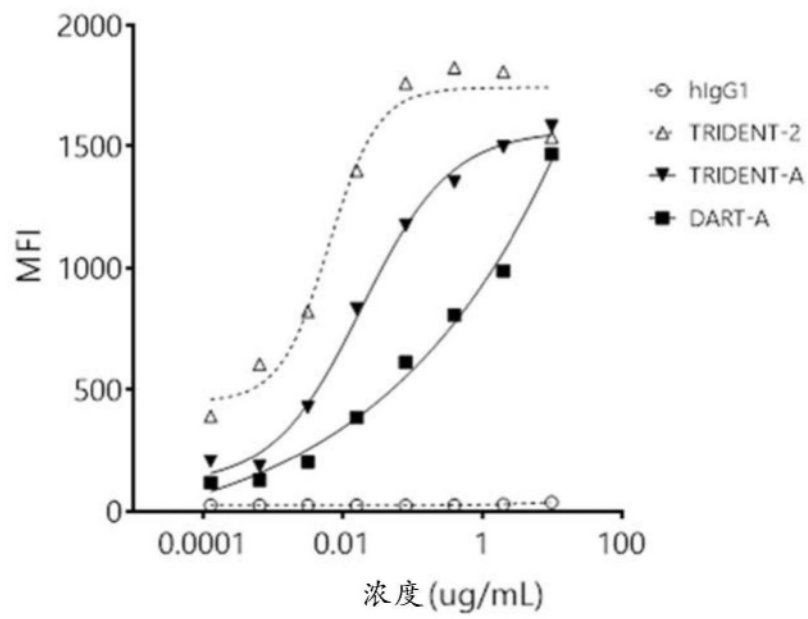


图4

结合至CHO / PD-L1

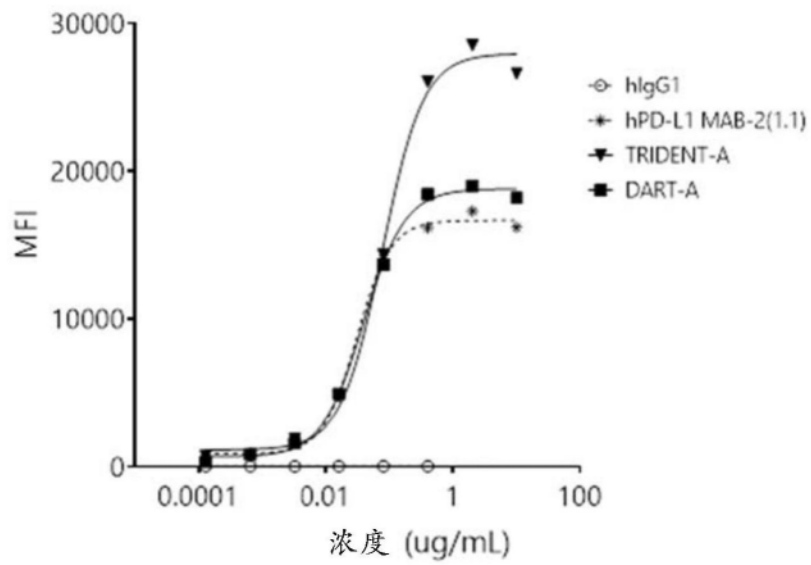


图5A

PD-L1阻断 (报告试验)

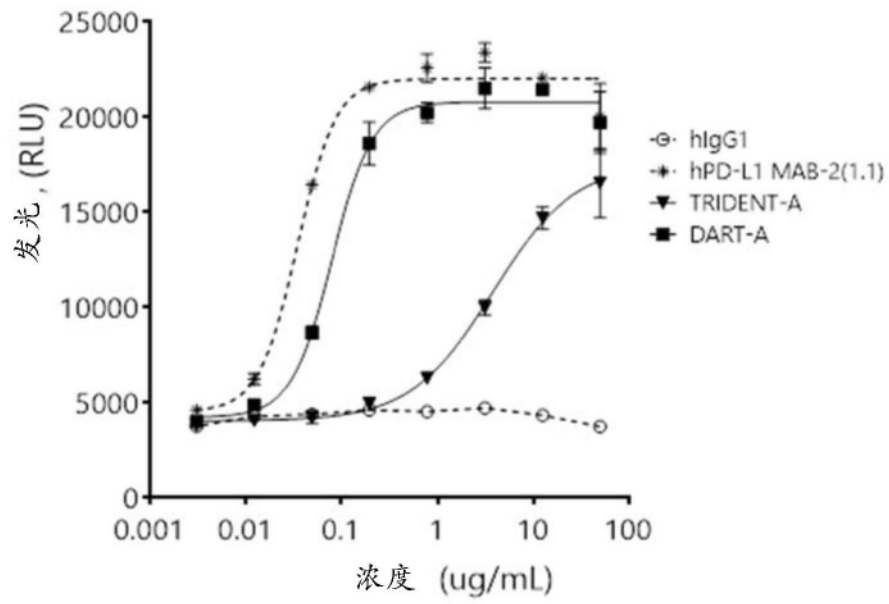


图5B

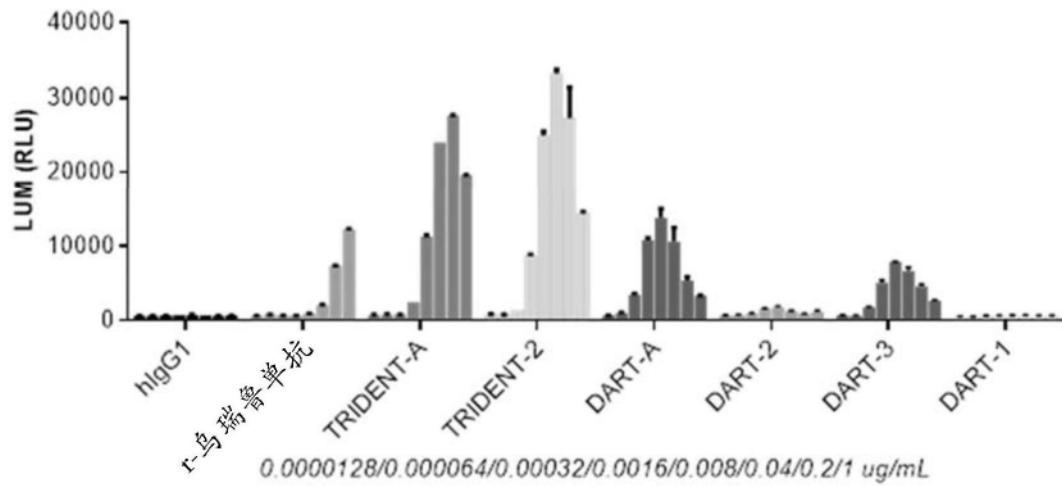
CD137报告试验
+JIMT-1靶细胞 (10K)

图6

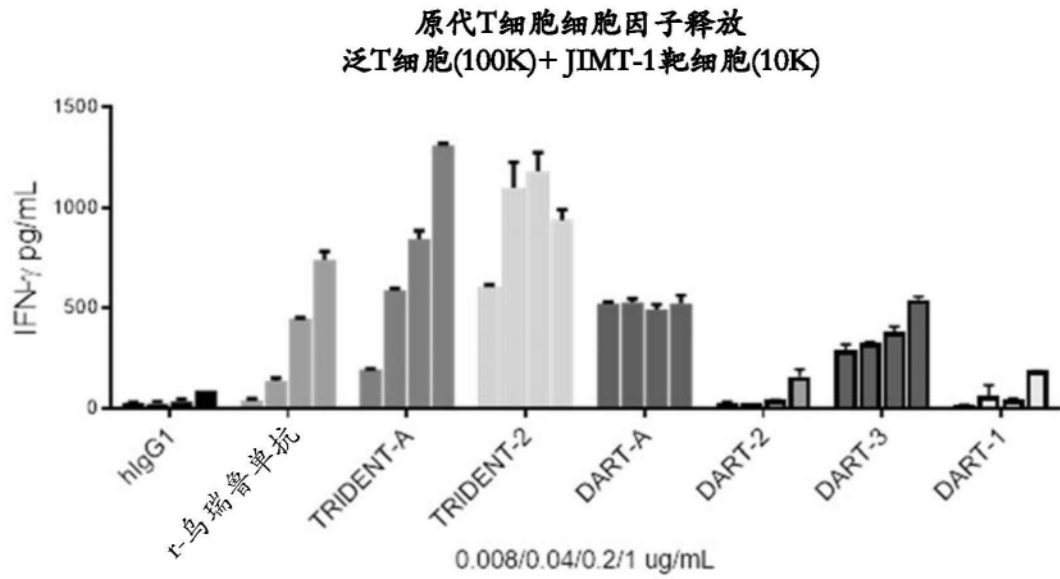


图7A

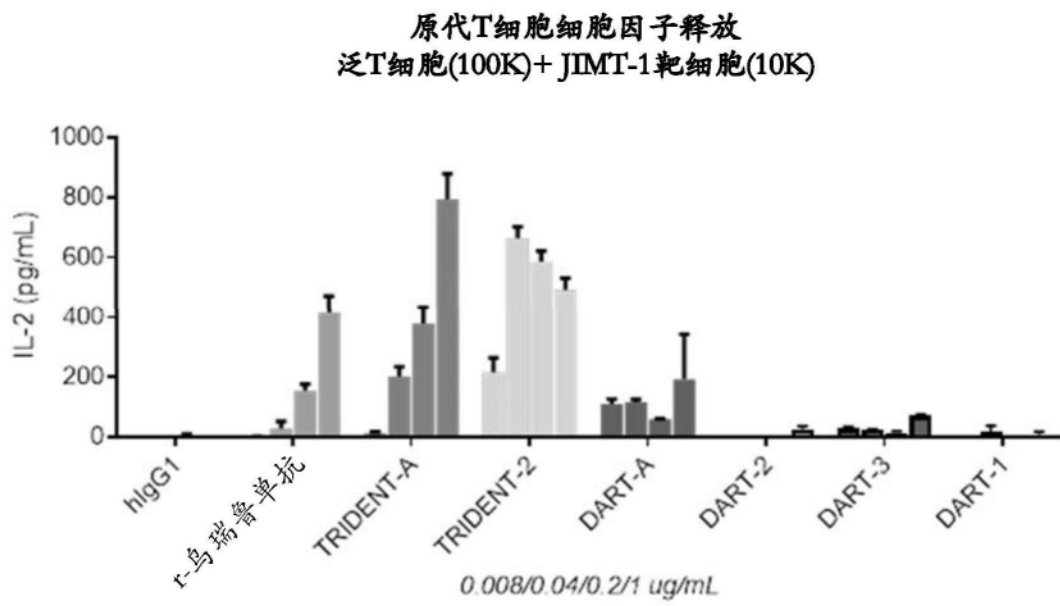


图7B

药代动力学

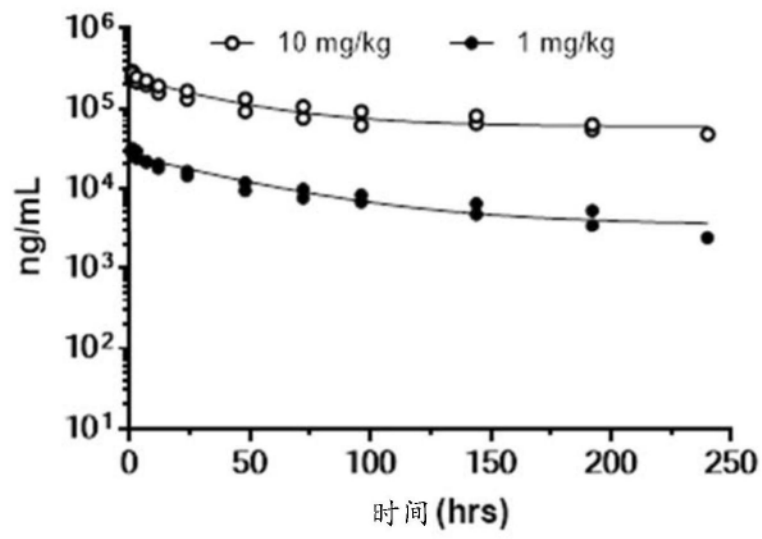


图8A

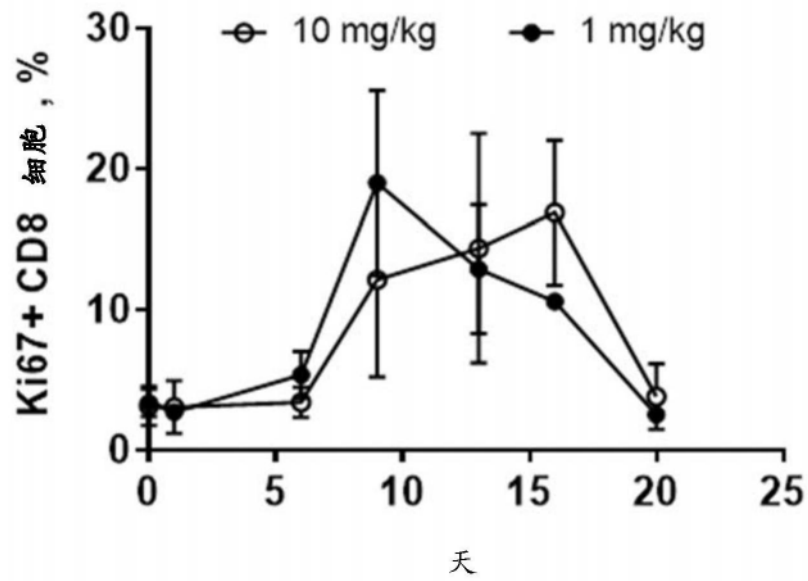
CD8⁺ T细胞增殖

图8B

NK细胞增殖

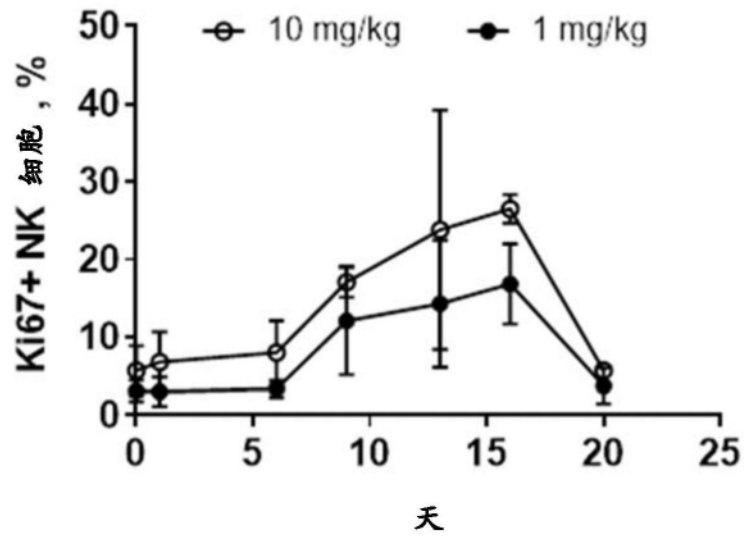


图8C

shPD-L1-his ELISA

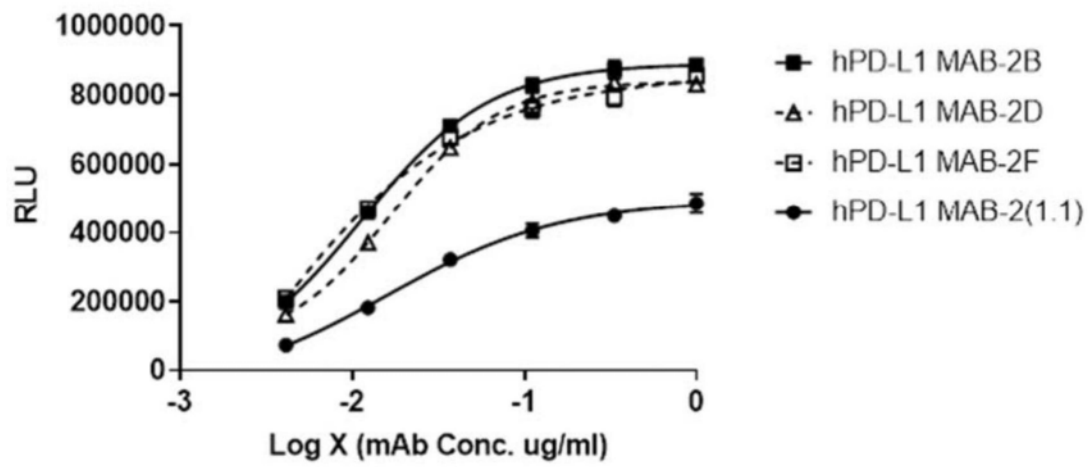


图9A

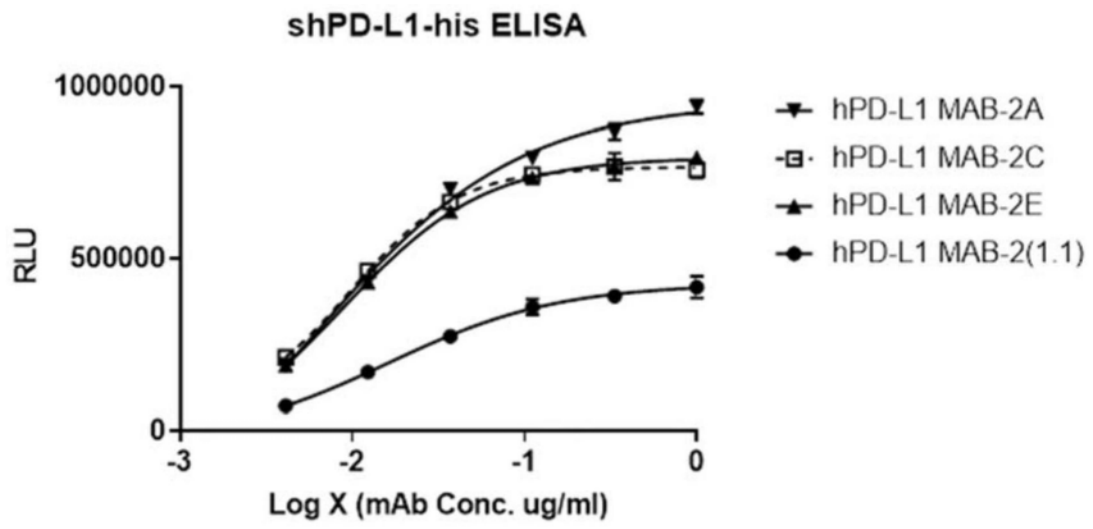


图9B

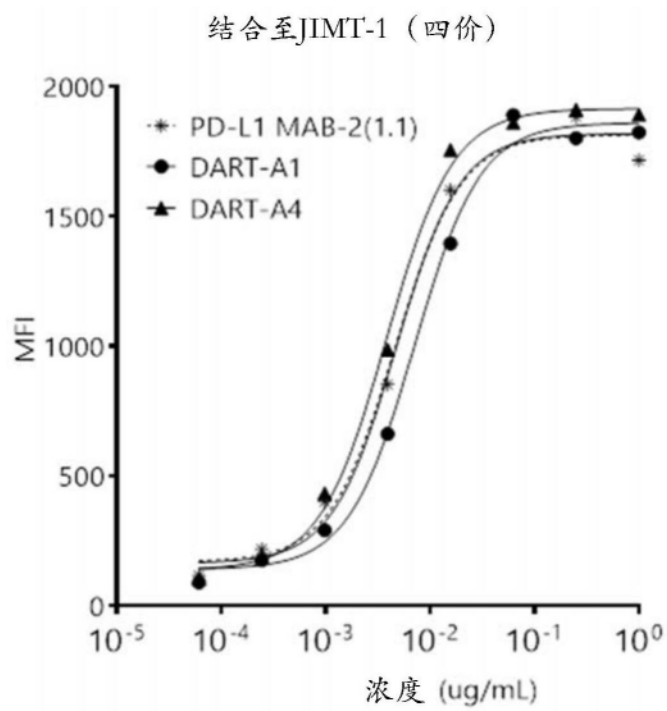


图10A

结合至JIMT-1 (三价)

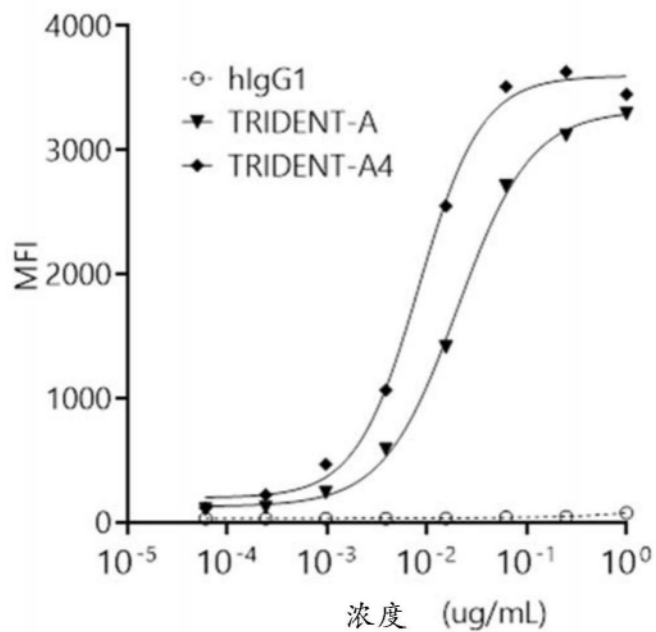


图10B

PD-L1阻断 (四价)

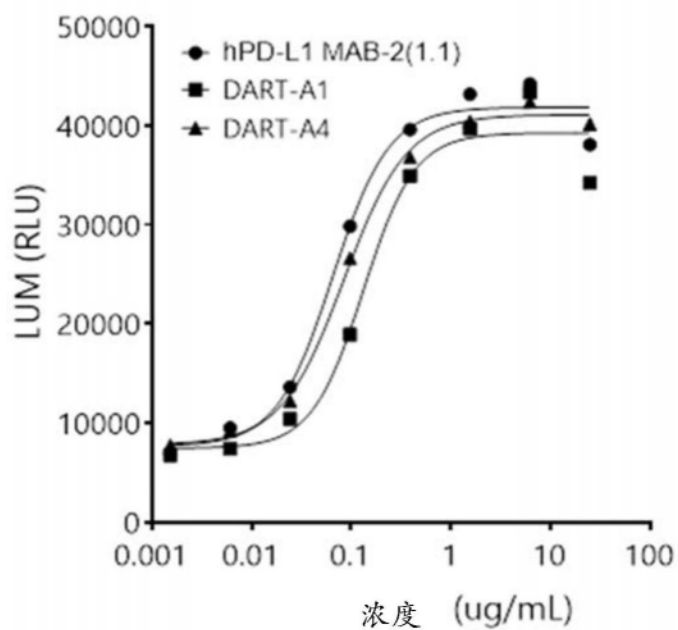


图11A

PD-L1阻断 (三价)

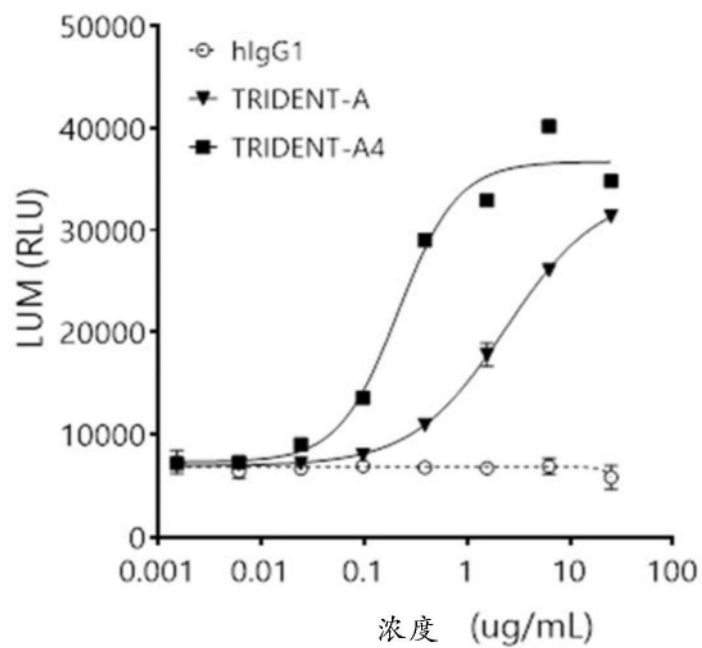


图11B

PD-L1阻断 (四价)

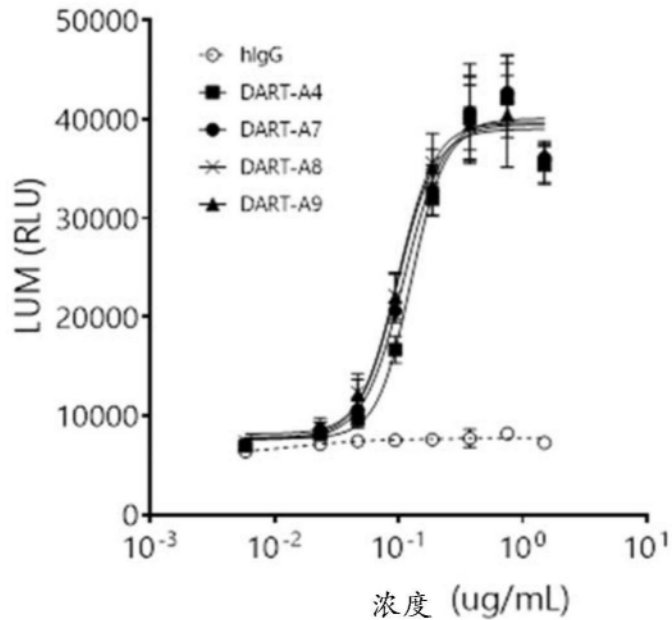


图11C

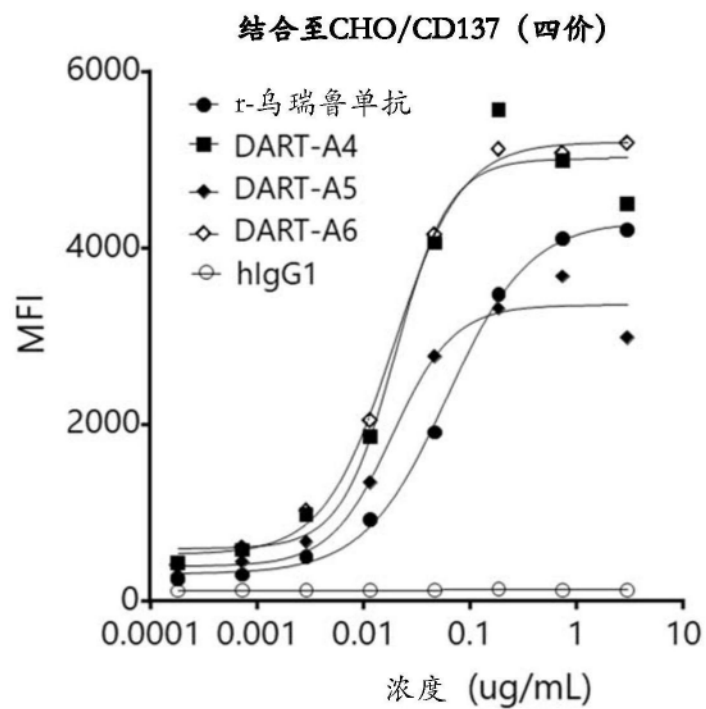


图12A

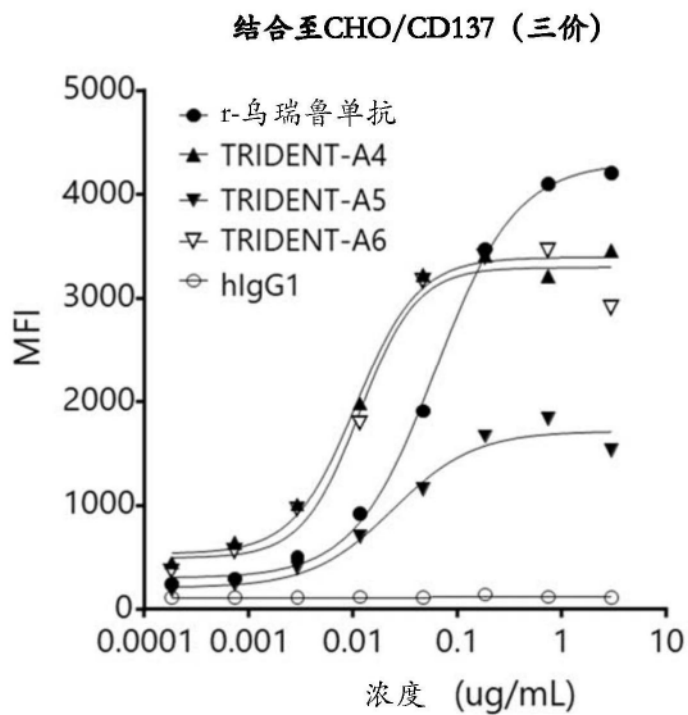


图12B

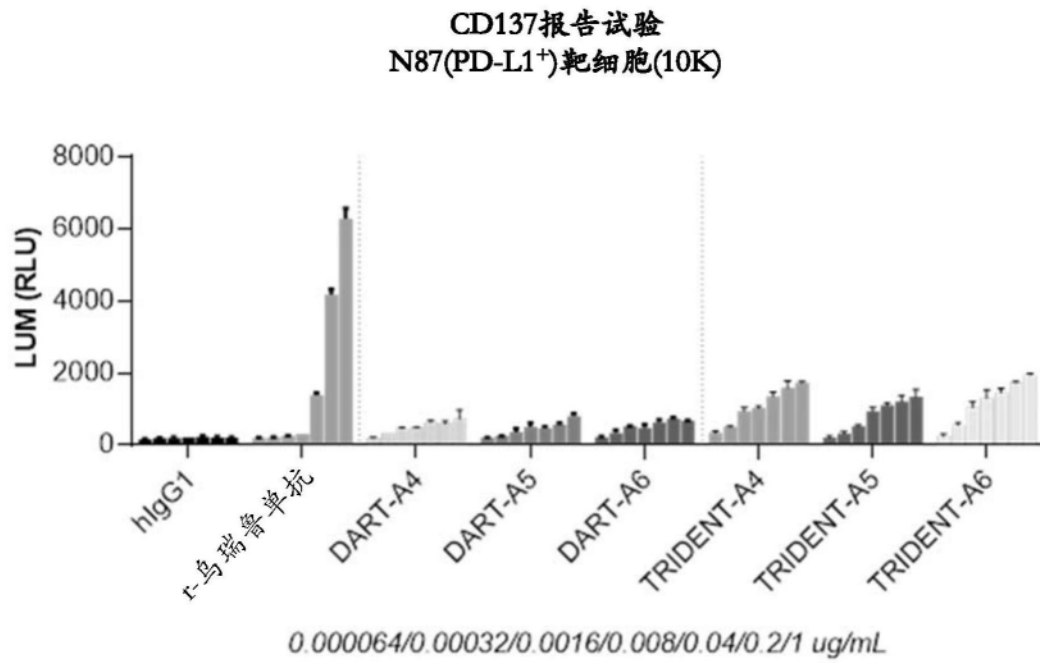


图13A

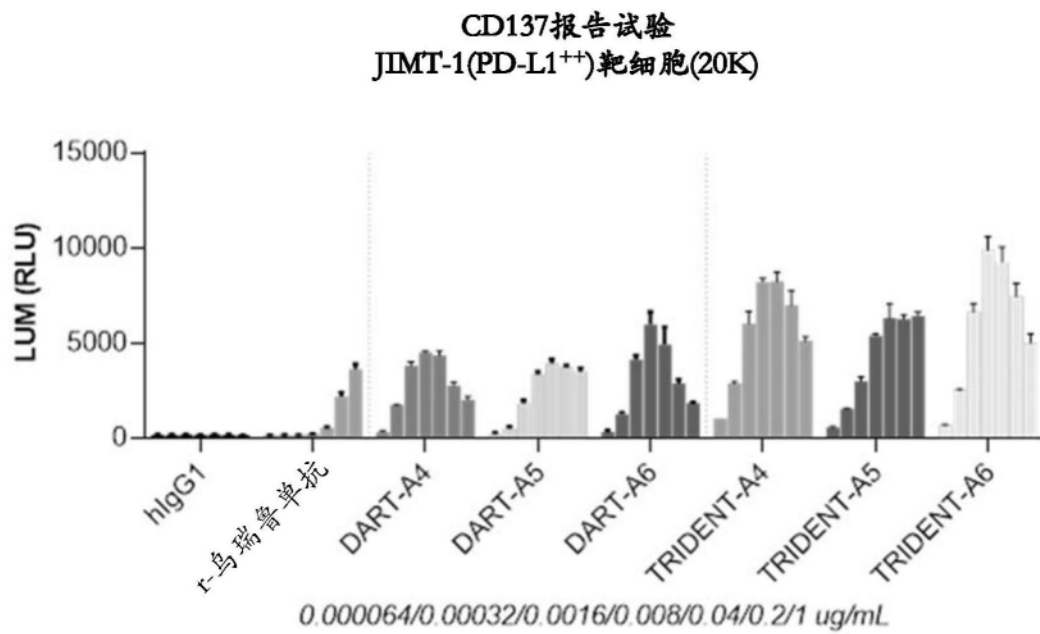


图13B

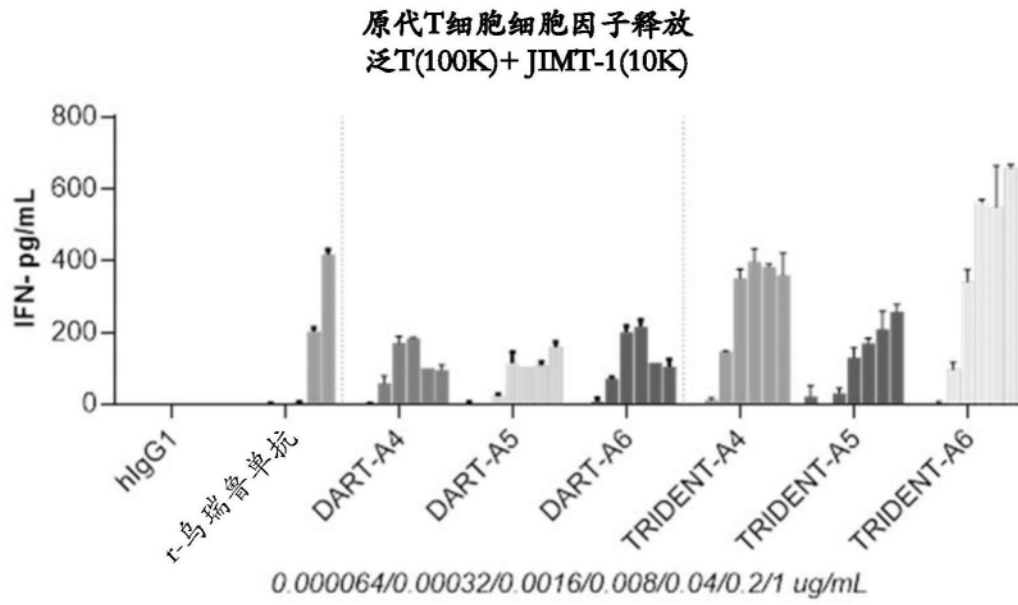


图14A

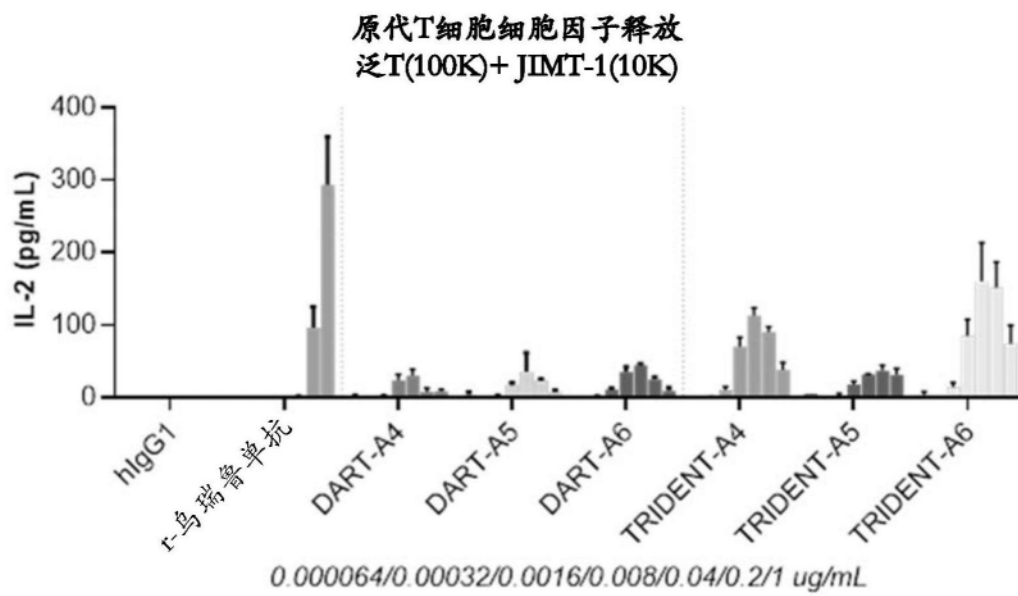


图14B

结合至CHO/PD-L1 (四价)

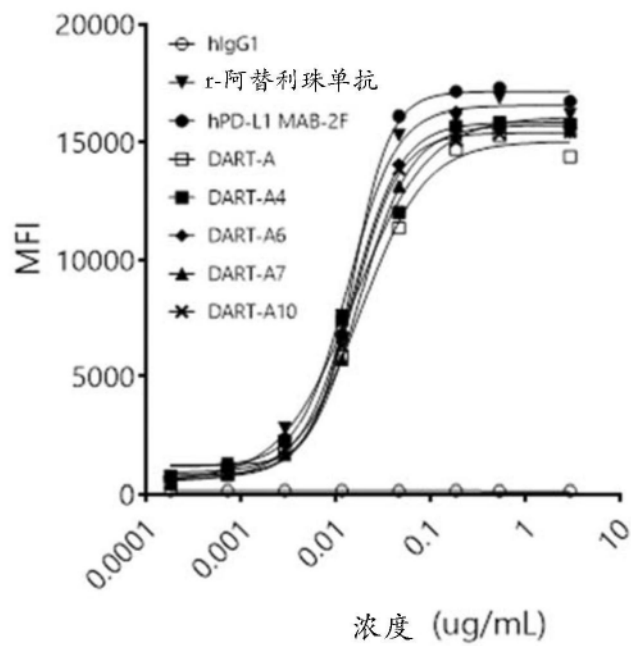


图15A

结合至CHO/CD137 (四价)

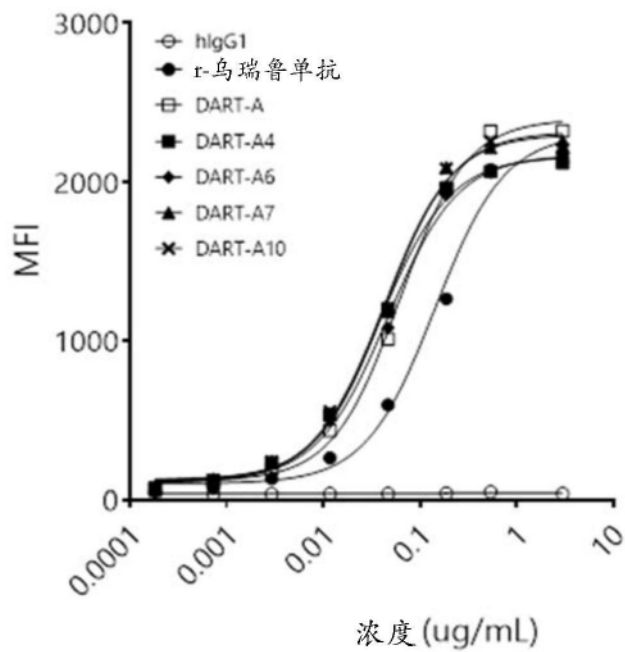


图15B

PD-L1报告试验 (四价)

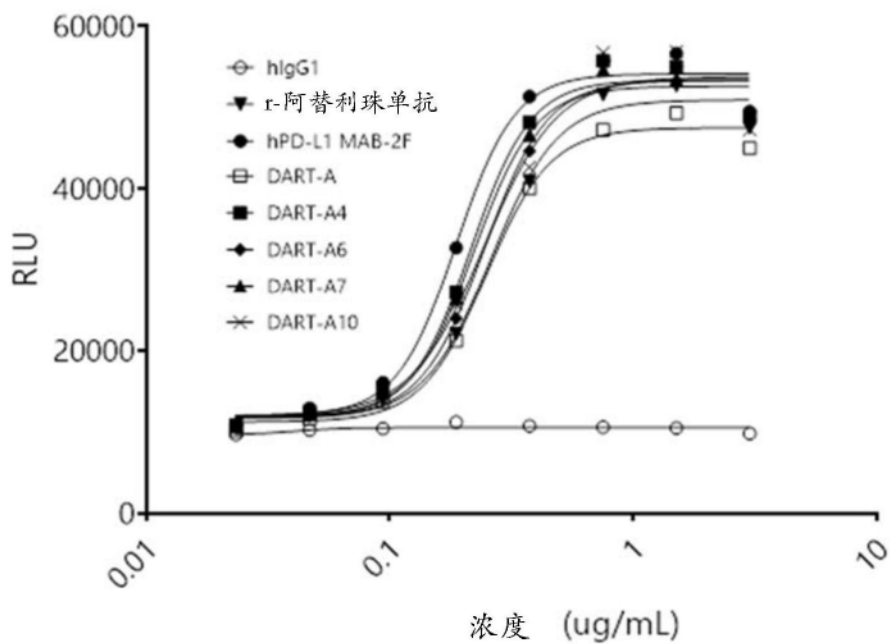


图16A

PD-L1报告试验 (三价)

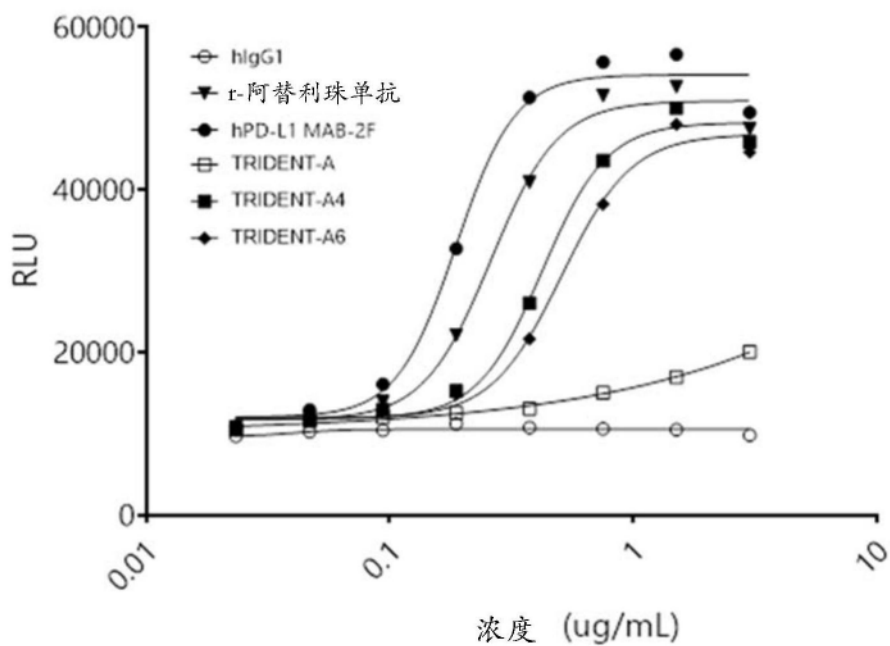


图16B

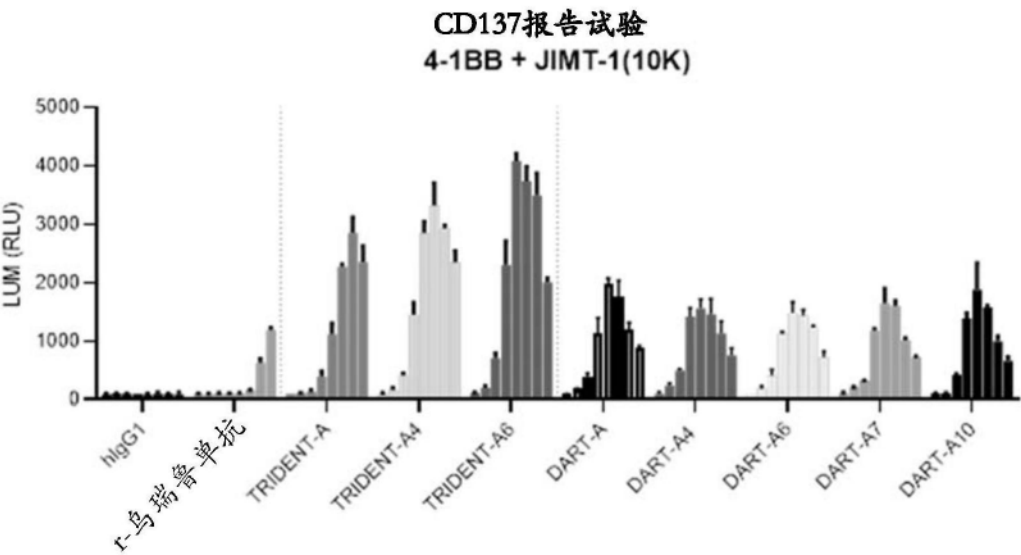


图17A

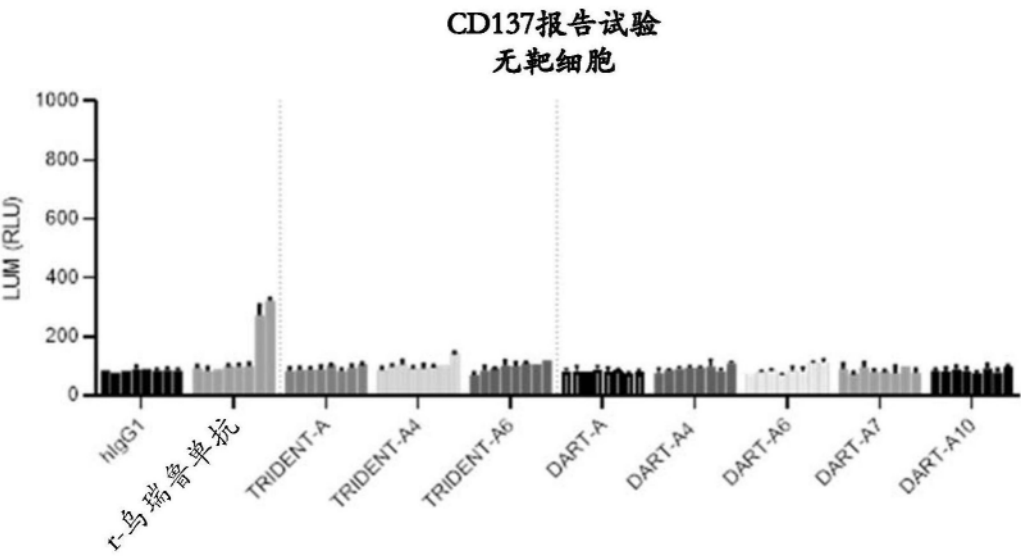


图17B

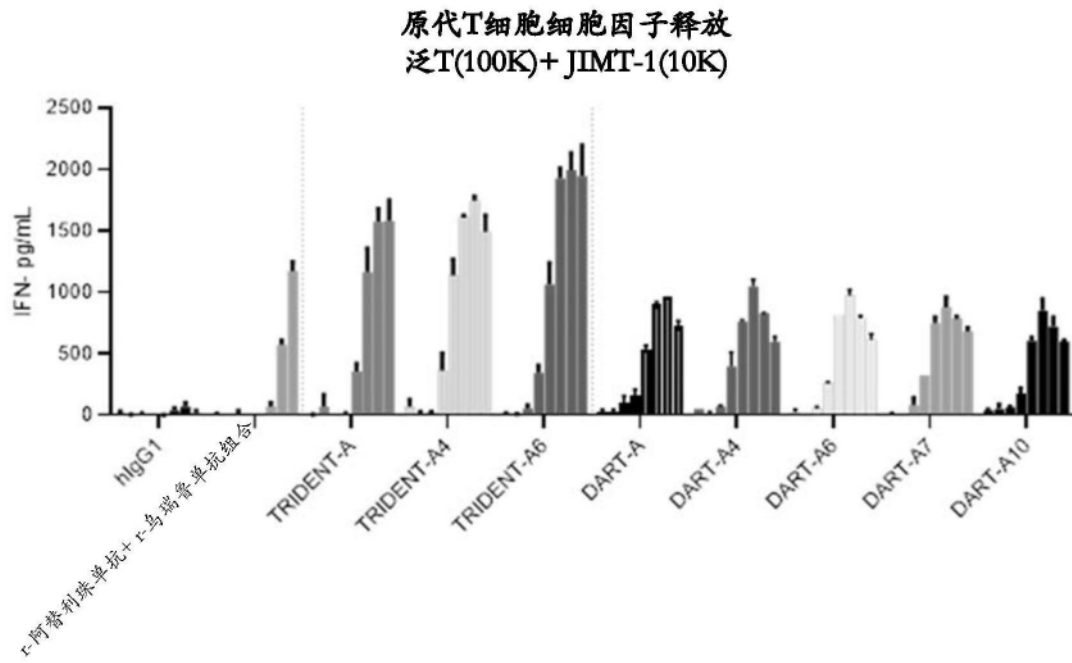


图18A

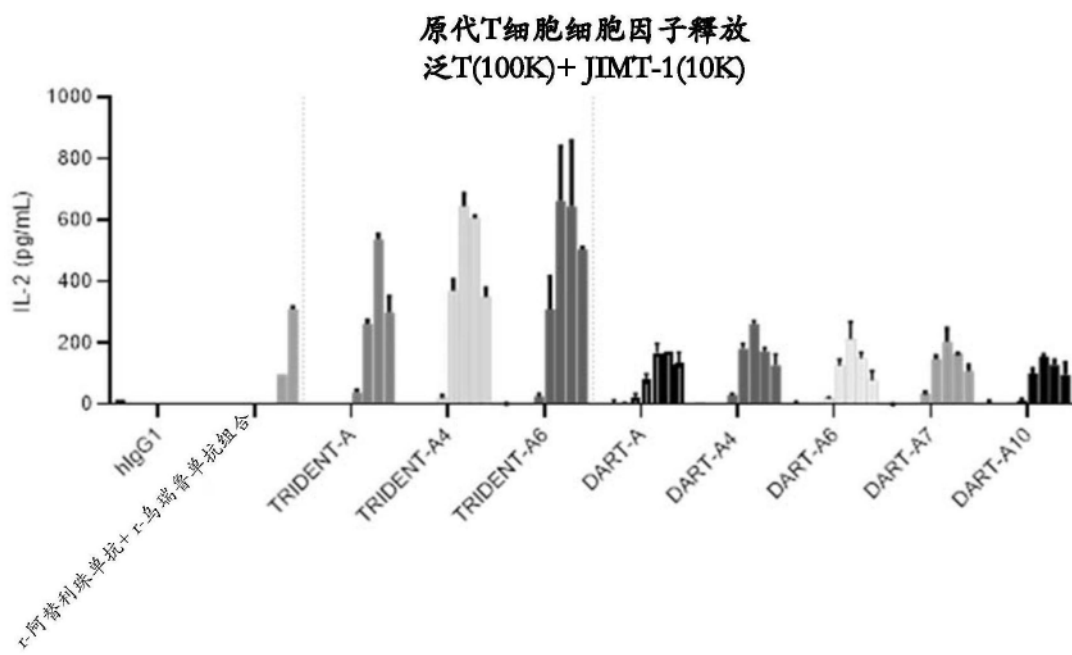


图18B

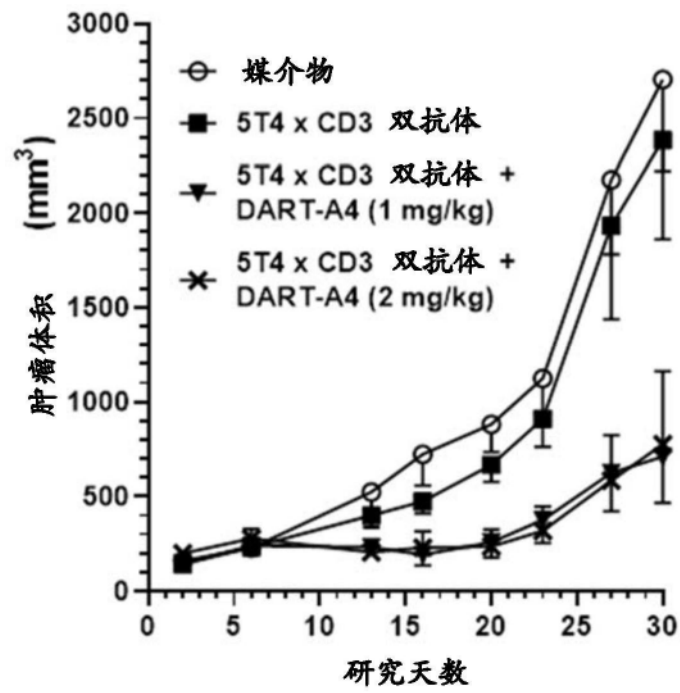


图19A

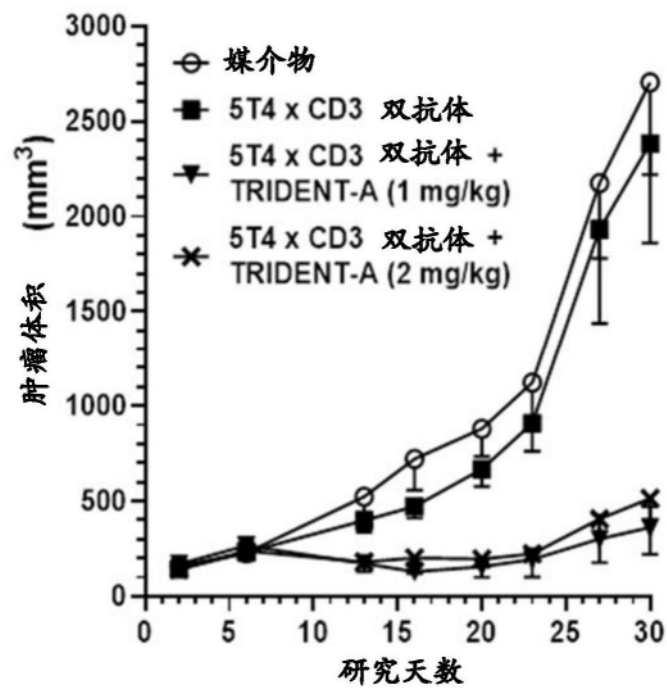


图19B

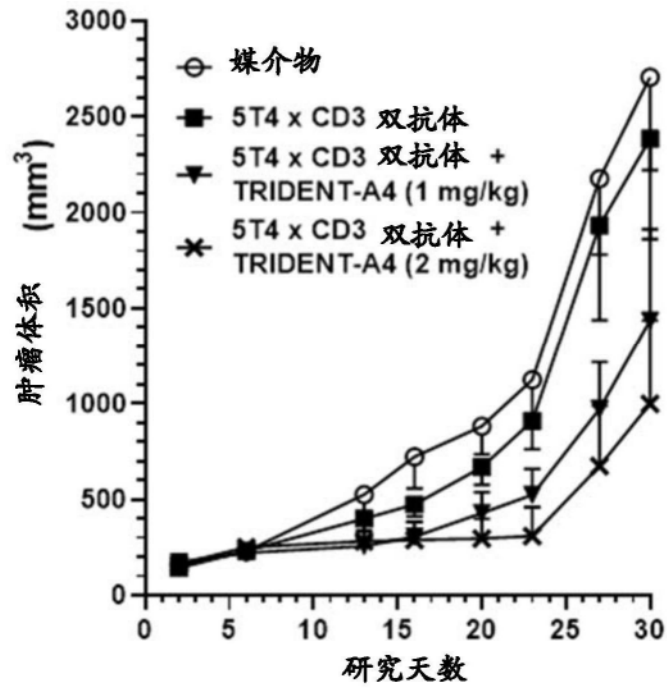


图19C

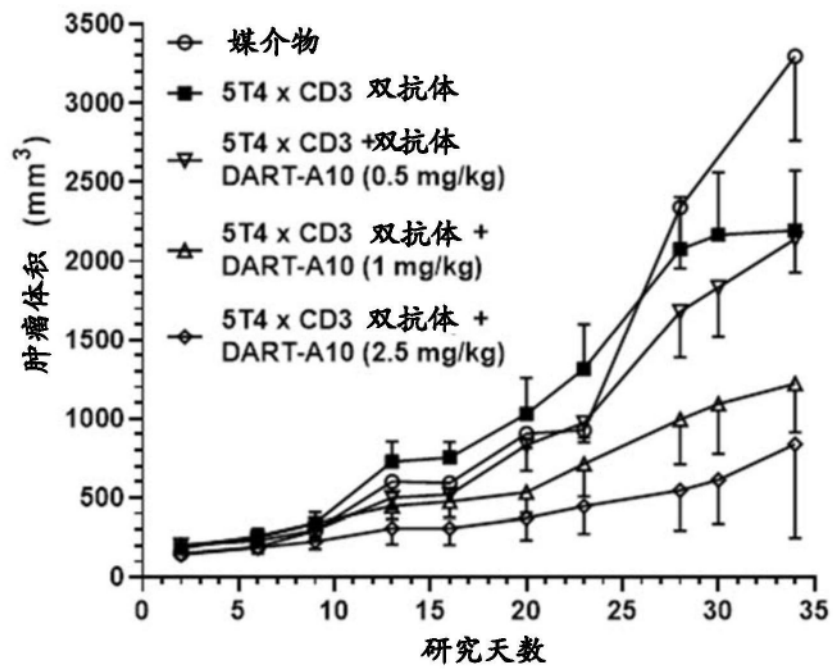


图20A

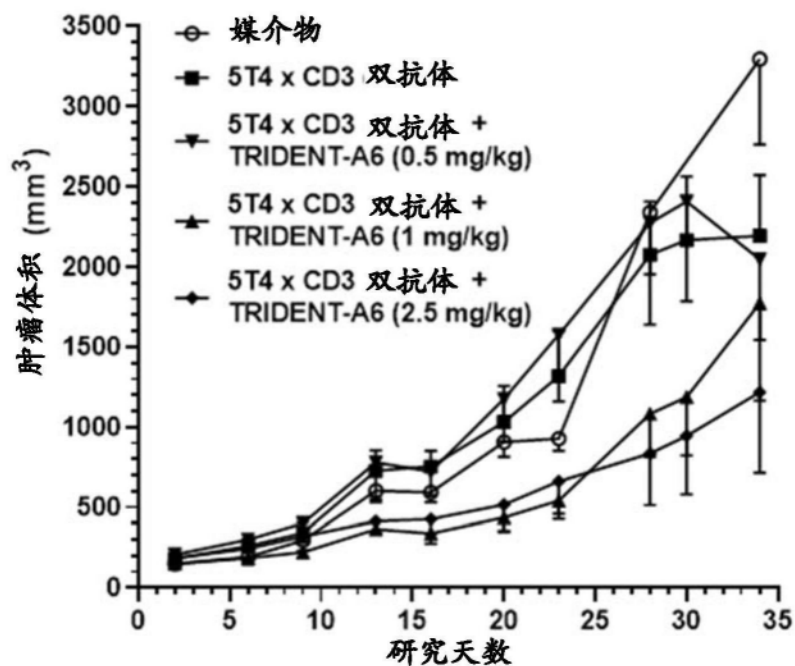


图20B

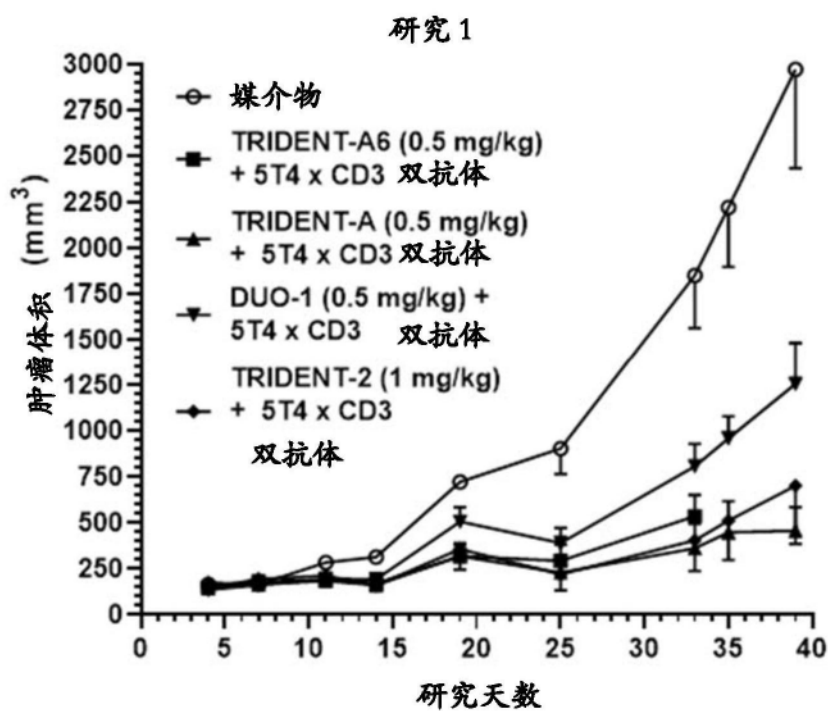


图21A

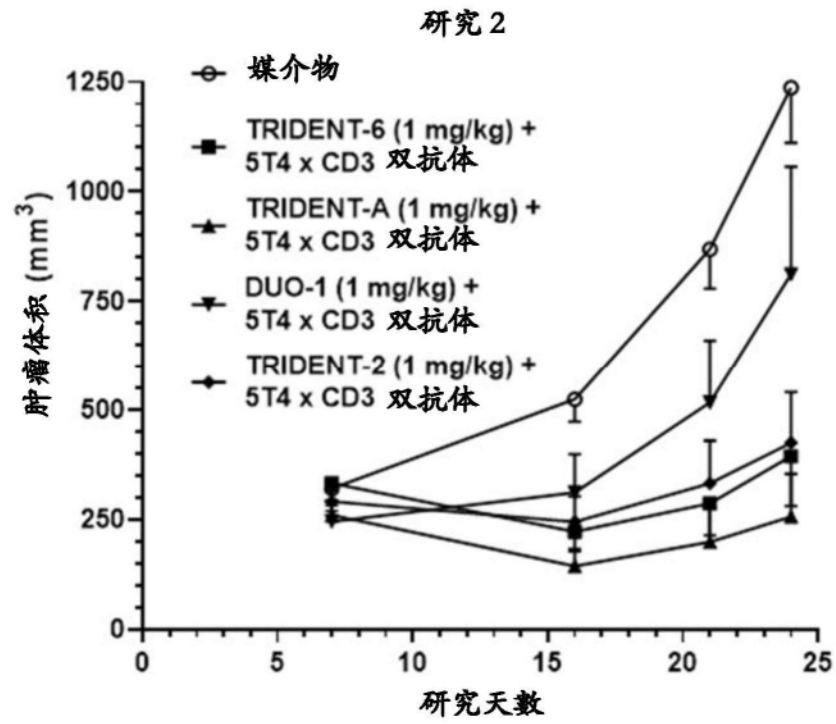


图21B

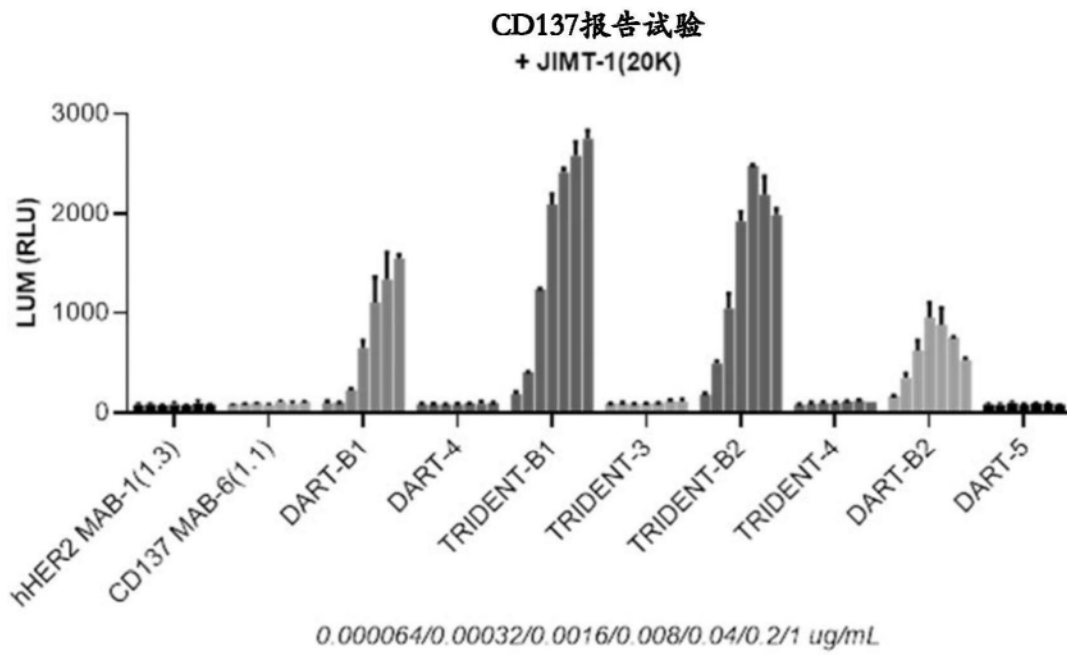


图22A

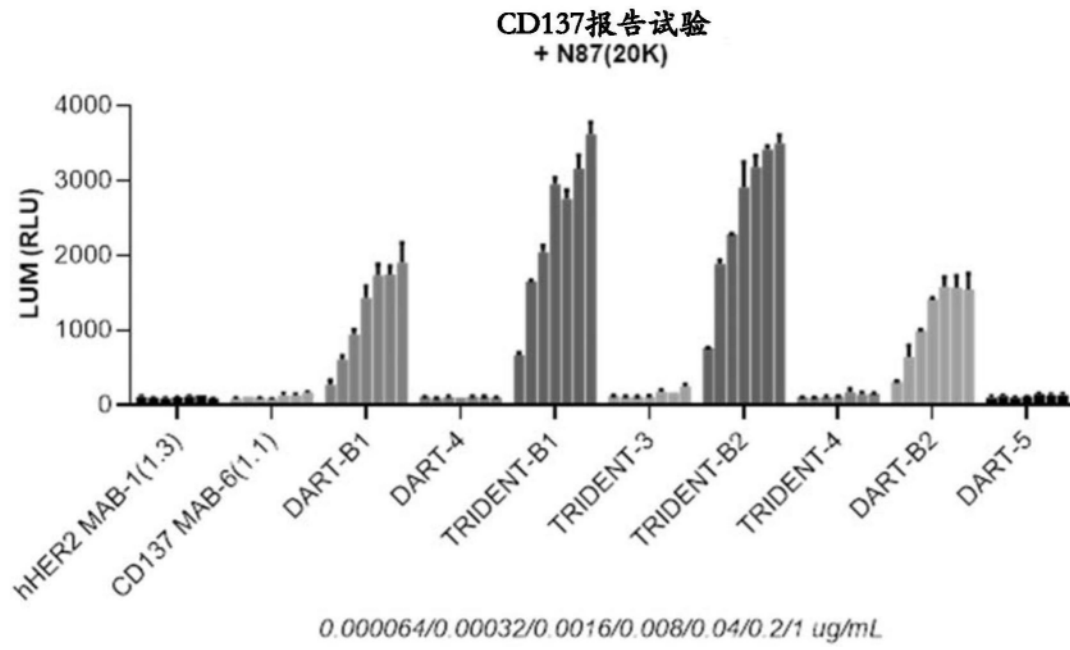


图22B

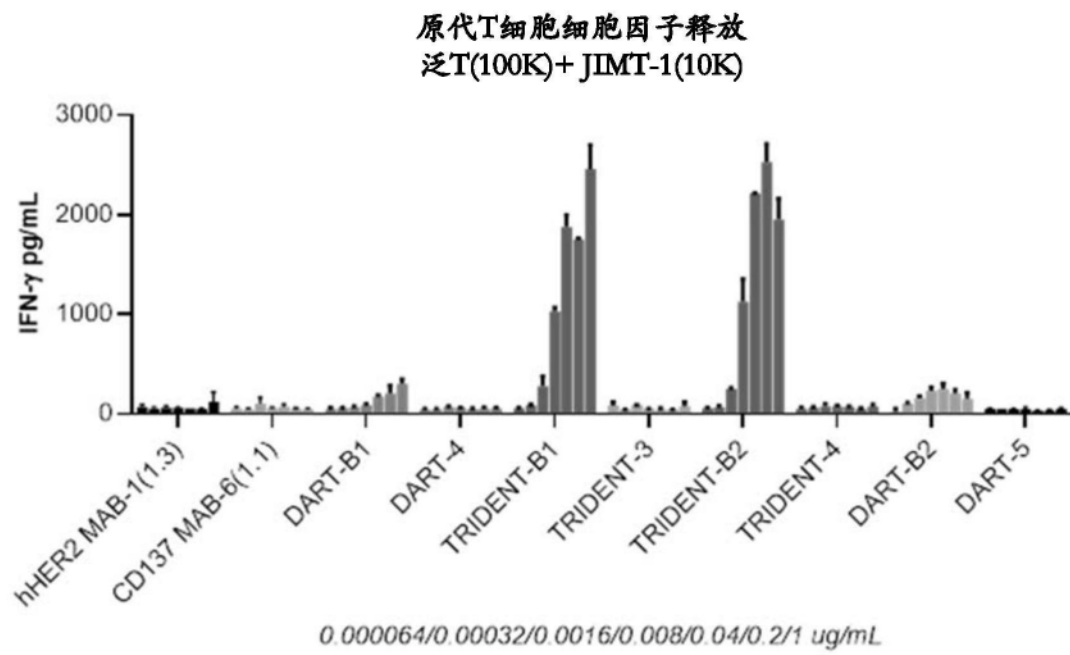


图23A

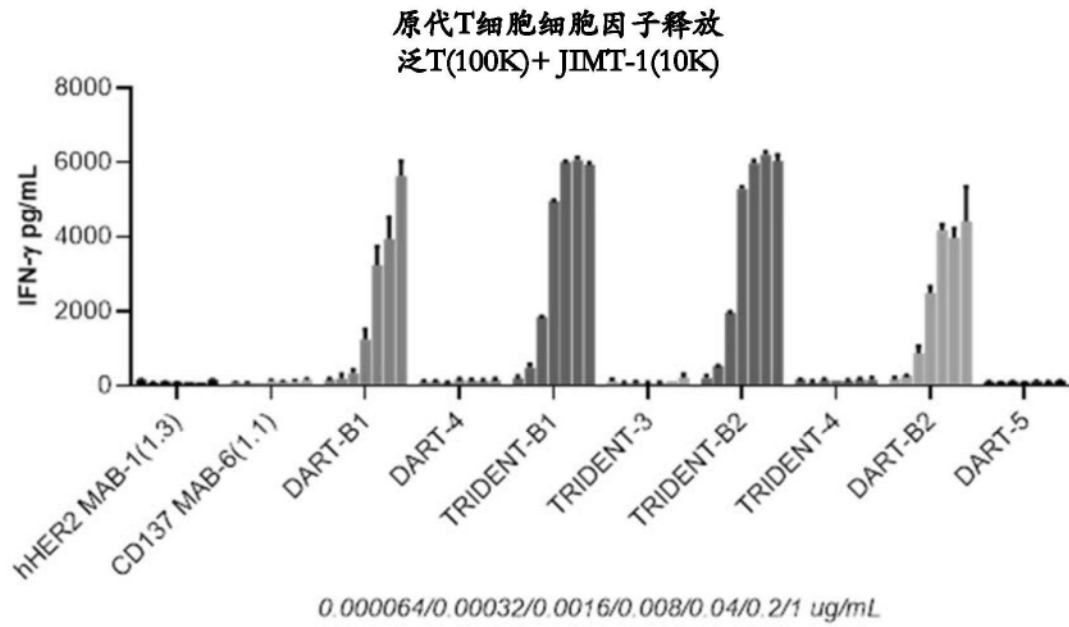


图23B

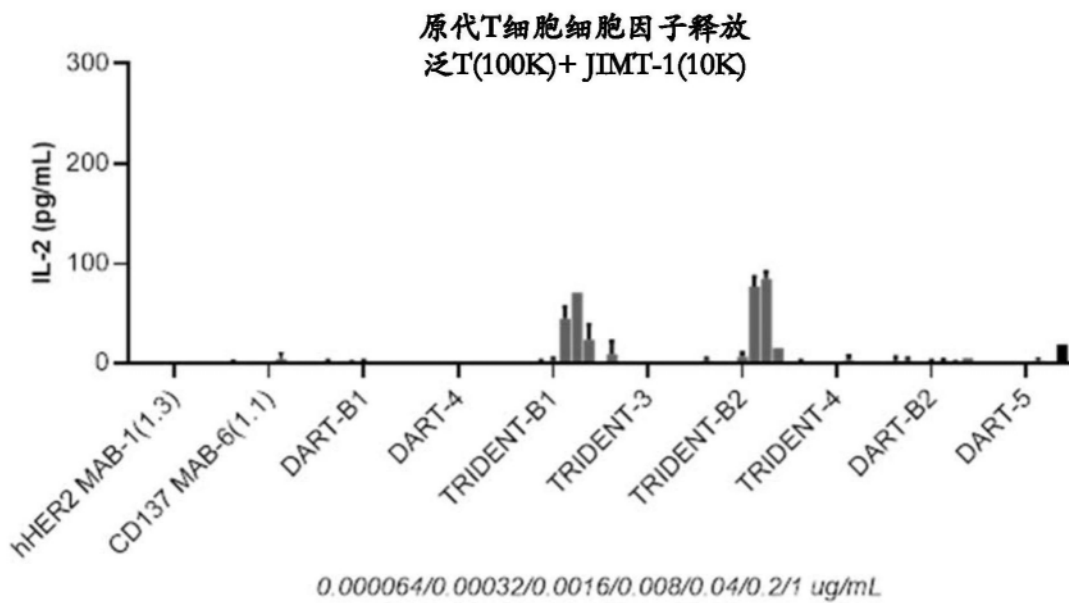


图23C

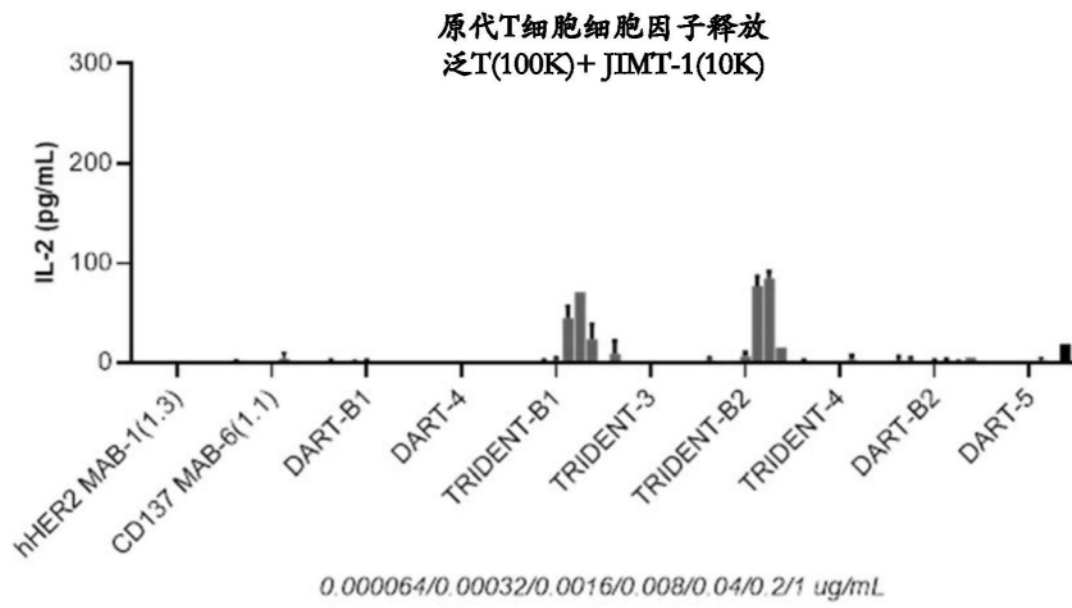


图23D