



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114206941 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 02

(21) 申请号 202080054005.6

(22) 申请日 2020.07.27

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114206941 A

(43) 申请公布日 2022.03.18

(30) 优先权数据  
62/878,951 2019.07.26 US  
63/024,608 2020.05.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2022.01.26

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/KR2020/009871 2020.07.27

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02021/020846 EN 2021.02.04

(73) 专利权人 柳韩洋行  
地址 韩国首尔特别市

(72) 发明人 郑惠真 龙睿聆 朴庚秀 朴银英

郑义静 李良顺 金恩廷 孙镛圭  
孙源峻 安世原 廉东勋 李灿茂  
洪庭铉 宋武泳 李珉贞 李娜来  
朴永奉 李垠政 金台旺

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243  
专利代理师 钟海胜 宋琴芝

(51) Int.Cl.  
C07K 16/46 (2006.01)  
G12N 15/13 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 109310739 A, 2019.02.05  
US 2014178368 A1, 2014.06.26

审查员 姚进孝

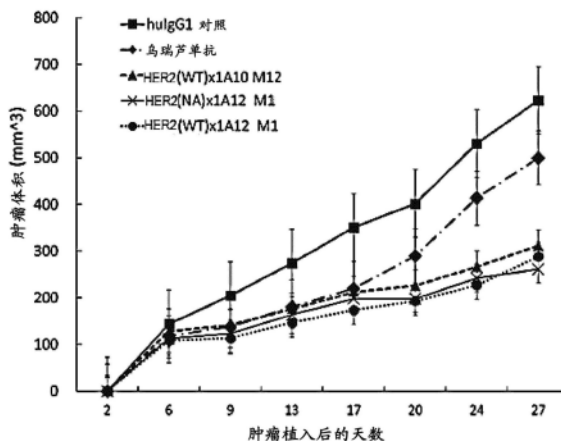
权利要求书3页 说明书49页  
序列表85页 附图19页

(54) 发明名称

抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体及其用途

(57) 摘要

提供了一种抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体、药物组合物及使用其治疗和/或预防癌症的方法。



1. 一种抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其包含:

(a) 抗4-1BB抗体或其抗原结合片段,和

(b) 抗HER2抗体或其抗原结合片段,

其中,所述抗4-1BB抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的H-CDR1,由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的H-CDR2,由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的H-CDR3,由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的L-CDR1,由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的L-CDR2,以及由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的L-CDR3;

(2) 由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的H-CDR1,由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的H-CDR2,由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的H-CDR3,由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的L-CDR1,由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的L-CDR2,以及由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的L-CDR3;

(3) 由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的H-CDR1,由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的H-CDR2,由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的H-CDR3,由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的L-CDR1,由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的L-CDR2,以及由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的L-CDR3;

(4) 由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的H-CDR1,由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的H-CDR2,由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的H-CDR3,由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的L-CDR1,由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的L-CDR2,以及由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的L-CDR3;或

(5) 由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的H-CDR1,由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的H-CDR2,由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的H-CDR3,由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成的L-CDR1,由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的L-CDR2,以及由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的L-CDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其中,所述抗4-1BB抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 重链可变区,其由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成,或

重链可变区,其由SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成;

(2) 重链可变区,其由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由SEQ ID NO:30或31的氨基酸序列组成,或

重链可变区,其由SEQ ID NO:25的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由SEQ ID NO:33或34的氨基酸序列组成;

(3) 重链可变区,其由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由SEQ ID NO:30或31的氨基酸序列组成,

(4) 重链可变区,其由SEQ ID NO:21的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成,

重链可变区,其由SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由SEQ ID NO:31

的氨基酸序列组成;

重链可变区,其由SEQ ID NO:27的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成,或

重链可变区,其由SEQ ID NO:28的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由SEQ ID NO:34的氨基酸序列组成;或

(5)重链可变区,其由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由SEQ ID NO:32的氨基酸序列组成,或

重链可变区,其由SEQ ID NO:29的氨基酸序列组成;和轻链可变区,其由SEQ ID NO:88的氨基酸序列组成。

3.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其中,所述抗4-1BB抗体或其抗原结合片段包含:

(1)重链,其由SEQ ID NO:56的氨基酸序列组成;和轻链,其由SEQ ID NO:62的氨基酸序列组成;

(2)重链,其由SEQ ID NO:57的氨基酸序列组成;和轻链,其由SEQ ID NO:62或63的氨基酸序列组成;

(3)重链,其由SEQ ID NO:58的氨基酸序列组成;和轻链,其由SEQ ID NO:62或63的氨基酸序列组成;

(4)重链,其由SEQ ID NO:59的氨基酸序列组成;和轻链,其由SEQ ID NO:62的氨基酸序列组成,或

重链,其由SEQ ID NO:60的氨基酸序列组成;和轻链,其由SEQ ID NO:63的氨基酸序列组成;或

(5)重链,其由SEQ ID NO:61的氨基酸序列组成;和轻链,其由SEQ ID NO:64的氨基酸序列组成。

4.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其中,所述抗4-1BB抗体或其抗原结合片段为抗4-1BB抗体的抗4-1BB scFv。

5.根据权利要求4所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其中,所述抗4-1BB scFv还包含所述重链可变区和所述轻链可变区之间的肽接头。

6.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其中,所述抗HER2抗体是曲妥珠单抗、帕妥珠单抗或曲妥珠单抗-美坦新偶联物(T-DM1)。

7.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其中,所述抗HER2抗体或其抗原结合片段包含:

H-CDR1,其由SEQ ID NO:65的氨基酸序列组成;

H-CDR2,其由SEQ ID NO:66的氨基酸序列组成;

H-CDR3,其由SEQ ID NO:67的氨基酸序列组成;

L-CDR1,其由SEQ ID NO:68的氨基酸序列组成;

L-CDR2,其由SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成;和

L-CDR3,其由SEQ ID NO:70的氨基酸序列组成。

8.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其中,所述抗HER2抗体或其抗原结合片段包含:

重链可变区,其由SEQ ID NO:71的氨基酸序列组成;和  
轻链可变区,其由SEQ ID NO:72的氨基酸序列组成。

9.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其中,所述抗HER2抗体或其抗原结合片段包含:

重链,其由SEQ ID NO:73或74的氨基酸序列组成;和  
轻链,其由SEQ ID NO:75的氨基酸序列组成。

10.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其中,所述抗HER2抗体或其抗原结合片段为抗HER2抗体的抗HER2 scFv。

11.根据权利要求10所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其中,所述抗HER2 scFv包含:

重链可变区,包含:由SEQ ID NO:65的氨基酸序列组成的H-CDR1、由SEQ ID NO:66的氨基酸序列组成的H-CDR2、和由SEQ ID NO:67的氨基酸序列组成的H-CDR3;和

轻链可变区,包含:由SEQ ID NO:68的氨基酸序列组成的L-CDR1、由SEQ ID NO:69的氨基酸序列组成的L-CDR2、和由SEQ ID NO:70的氨基酸序列组成的L-CDR3。

12.根据权利要求11所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其中,所述抗HER2 scFv还包含所述重链可变区和所述轻链可变区之间的肽接头。

13.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其包含:  
抗HER2抗体的全长形式,和  
抗4-1BB抗体的scFv。

14.根据权利要求1所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体,其包含:  
抗4-1BB抗体的全长形式,和  
抗HER2抗体的scFv。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体和药学上可接受的载体在制备用于治疗或预防癌症的药物组合物中的用途,其中,所述癌症是选自由乳腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌、急性白血病和骨髓瘤组成的组中的一种或多种。

16.根据权利要求15所述的用途,其中,所述癌症的特征在于HER2表达。

17.根据权利要求15所述的用途,其中,所述药物组合物增强免疫应答。

## 抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体及其用途

### 技术领域

[0001] 提供了一种抗4-1BB/抗HER2双特异性抗体、药物组合物及使用其治疗和/或预防癌症的方法。

### 背景技术

[0002] 4-1BB蛋白是TNF受体超家族 (TNFRSF) 的成员并且是一种共刺激分子,其在免疫细胞(固有免疫细胞和适应性免疫细胞两者)活化后表达。4-1BB在调节各种免疫细胞的活性中起重要作用。4-1BB激动剂增强免疫细胞的增殖和存活、细胞因子的分泌以及CD8 T细胞的细胞溶解活性。许多其他研究显示,4-1BB的活化增强了免疫应答,从而消除了小鼠体内的肿瘤。因此,提示4-1BB是癌症免疫学中有希望的靶分子。尽管抗4-1BB抗体具有抗肿瘤功效,但它们在临床应用中可引起严重的肝毒性。

[0003] HER2蛋白是表皮生长因子受体 (EGFR) 家族的成员,参与到与肿瘤相关的多种机制。HER2是一种典型的受体酪氨酸激酶 (RTK),存在于细胞表面,从而诱导癌细胞的增殖和渗透、血管生成等。

[0004] 同时,针对两种或更多种抗原的多特异性抗体已经开发出各种种类和形式,并预期作为与单克隆抗体相比具有优异治疗效果的新药抗体。

[0005] 因此,需要开发一种能够识别一种存在于癌细胞上而另一种存在于诸如免疫细胞的其他细胞上的两种不同抗原的多特异性抗体,以用于更有效的癌症治疗。

### 发明内容

[0006] 一种实施方式提供了抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体,该双特异性抗体包含:

[0007] (1) 作为HER2靶向部分的抗HER2抗体或其抗原结合片段,其能够特异性识别和/或结合HER2蛋白;和

[0008] (2) 作为4-1BB靶向部分的抗4-1BB抗体或其抗原结合片段,其能够特异性识别和/或结合4-1BB蛋白。

[0009] 另一种实施方式提供了包含该双特异性抗体的药物组合物。该药物组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。该药物组合物可用于治疗和/或预防癌症和/或用于增强免疫应答。

[0010] 另一种实施方式提供了用于治疗 and/或预防癌症和/或用于增强免疫应答的药物组合物,该组合物包含双特异性抗体。

[0011] 另一种实施方式提供了一种在有需要的受试者中治疗和/或预防癌症的方法,该方法包括将药学有效量的双特异性抗体或药物组合物施用至受试者。该方法可以进一步包括在施用步骤之前鉴定需要治疗和/或预防癌症的受试者的步骤。

[0012] 另一种实施方式提供了一种在有需要的受试者中增强免疫应答的方法,该方法包括将药学有效量的双特异性抗体或药物组合物施用至受试者。该方法可以进一步包括在施用步骤之前鉴定需要增强免疫应答的受试者的步骤。

[0013] 另一种实施方式提供了双特异性抗体或药物组合物用于治疗 and/或预防癌症的用途。另一种实施方式提供了双特异性抗体在制备用于治疗 and/或预防癌症的药物中的用途。

[0014] 另一种实施方式提供了双特异性抗体或药物组合物用于增强免疫应答的用途。另一种实施方式提供了双特异性抗体在制备用于增强免疫应答的药物中的用途。

[0015] 一种实施方式提供了编码双特异性抗体的多核苷酸。

[0016] 一种实施方式提供了包含多核苷酸的重组载体。重组载体可用作编码双特异性抗体的多核苷酸的表达载体。

[0017] 另一种实施方式提供了包含编码双特异性抗体的多核苷酸的细胞。细胞可以是用包含多核苷酸的重组载体转染的重组细胞。

[0018] 另一种实施方式提供了制备双特异性抗体的方法,包括在细胞中表达多核苷酸。表达多核苷酸的步骤可以通过在允许多核苷酸表达的条件下培养包含多核苷酸(例如该多核苷酸在重组载体中)的细胞来进行。

[0019] 解决技术问题的技术方案

[0020] 本公开涉及双特异性抗体及其用途,所述双特异性抗体中的每一种都包括对肿瘤相关抗原(TAA;HER2)特异的抗体和对4-1BB特异的抗体。这些双特异性抗体仅在存在HER2表达细胞的情况下活化4-1BB信号传导并增强免疫细胞。由于特异性HER2介导的免疫应答,预计与4-1BB单克隆抗体相比,使用双特异性抗体的肝毒性要小得多。

[0021] 在本公开中,提供了抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体及其用途,其中该抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体可以包含:

[0022] (1) 作为HER2靶向部分的抗HER2抗体或其抗原结合片段,其能够特异性识别和/或结合HER2蛋白;和

[0023] (2) 作为4-1BB靶向部分的抗4-1BB抗体或其抗原结合片段,其能够特异性识别和/或结合4-1BB蛋白。

[0024] 在下文中,将更详细地描述本发明。

[0025] 定义

[0026] 如本文所用,“由序列组成”、“基本上由序列组成”或“包含序列”可以指包含该序列的任何情况,但它可能不旨在排除包含除了该序列之外的其他序列的情况。

[0027] 如本文所用,术语“包含由SEQ ID NO识别的氨基酸序列或由其组成的蛋白质或多肽”和“包含由SEQ ID NO识别的核酸序列或由其组成的基因或多核苷酸”可以指基本上由该氨基酸序列或核酸序列组成,或与该氨基酸序列或核酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性并保持其固有的活性和/或功能的蛋白质(或多肽)或基因(或多核苷酸)。

[0028] 如本文所用,术语“抗体”可以涵盖可以在生化上区别的各类多肽。本领域技术人员将理解,重链被分类为 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 或 $\epsilon$ 及一些子类(例如 $\gamma$  1至 $\gamma$  4),轻链则被分类为 $\kappa$ 或 $\lambda$ 。该链的性质决定了抗体的“类别”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5等已被很好地表征,并且已知赋予功能专门化。

[0029] 完整的抗体包括两条全长轻链和两条全长重链,其中每条轻链通过二硫键连接到重链。该抗体具有重链恒定区和轻链恒定区。重链恒定区是 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 或 $\epsilon$ 型,可进一步分类为 $\gamma$  1、 $\gamma$  2、 $\gamma$  3、 $\gamma$  4、 $\alpha$ 1或 $\alpha$ 2。轻链恒定区是 $\kappa$ 或 $\lambda$ 类型。

[0030] 术语“重链”是指全长重链或其片段,包括足以提供对抗原的特异性的氨基酸序列的可变区VH、以及三个恒定区CH1、CH2和CH3、以及铰链。术语“轻链”是指全长轻链或其片段,包括足以提供对抗原的特异性的氨基酸序列的可变区VL、以及恒定区CL。

[0031] 术语“互补决定区(CDR)”是指在免疫球蛋白的重链或轻链的高可变区发现的氨基酸序列。重链和轻链可以分别包括三个CDR(CDRH1、CDRH2和CDRH3;以及CDRL1、CDRL2和CDRL3)。CDR可以提供在抗体与抗原或表位结合中起重要作用的残基。术语“特异性结合”或“特异性识别”为本领域普通技术人员所熟知,并且表示抗体和抗原彼此特异性相互作用以产生免疫活性。

[0032] 在本公开中,抗体可以包括但不限于多克隆抗体或单克隆抗体;和/或人抗体、人源化抗体、动物(例如,小鼠、兔等)源性抗体、或嵌合抗体(例如小鼠-人嵌合抗体)。

[0033] 通过用所需抗原对动物进行免疫而产生的动物源性抗体在施用于人以用于治疗目的时通常会引发免疫排斥反应,已经开发了嵌合抗体来抑制这种免疫排斥反应。嵌合抗体是通过使用基因工程方法将引起抗同种型反应的动物源性抗体的恒定区替换为人抗体的恒定区而形成的。与动物源性抗体相比,嵌合抗体的抗同种型反应显著改善,但动物源性氨基酸仍然存在于其可变区,因此它仍然含有由抗独特型反应引起的潜在副作用。因此人源化抗体已被开发用于改善此类副作用。这是通过将嵌合抗体可变区中的在抗原结合中起重要作用的CDR(互补决定区)移植到人抗体框架中而制造的。

[0034] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指衍生自完整免疫球蛋白结构的片段,该片段包括能够结合抗原的部分,例如CDR。例如,抗原结合片段可以是scFv、(scFv)<sub>2</sub>、Fab、Fab'或F(ab')<sub>2</sub>,但不限于此。在本公开中,抗原结合片段可以是衍生自抗体的片段,包括至少一个互补决定区,例如选自scFv、(scFv)<sub>2</sub>、scFv-Fc、Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>。

[0035] 在抗原结合片段中,Fab是具有轻链可变区和重链可变区、轻链恒定区和重链第一恒定区(CH1)的结构,其具有一个抗原结合位点。

[0036] Fab'与Fab的不同之处在于它在重链CH1域的C端具有包含一个或多个半胱氨酸残基的铰链区。F(ab')<sub>2</sub>抗体是通过Fab'铰链区的半胱氨酸残基的二硫键形成的。

[0037] Fv是仅具有重链可变区和轻链可变区的最小抗体片段,并且用于产生Fv片段的重组技术在相关领域中是众所周知的。双链Fv可以具有重链可变区与轻链可变区通过非共价键连接的结构,单链Fv(scFv)通常具有二聚体结构,如双链Fv,其中重链可变区和轻链可变区通过肽接头共价连接或它们在其C端彼此直接连接。

[0038] 抗原结合片段可以使用蛋白酶获得(例如,整个抗体用木瓜蛋白酶消化得到Fab片段,用胃蛋白酶消化得到F(ab')<sub>2</sub>片段),可以通过基因重组技术制备。

[0039] 本公开的免疫球蛋白(例如人免疫球蛋白)或抗体分子可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、IgY等)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5、IgA1、IgA2等)。

[0040] 在抗体或抗体片段中,除了CDR或可变区之外的部分(例如恒定区)可以衍生自人抗体,特别地,它们可以衍生自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM或IgY,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0041] 抗体或抗原结合片段可以是化学或重组合成的(非天然存在的)。

[0042] 4-1BB靶向部分

[0043] 抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体可以包含抗4-1BB抗体或其抗原结合片段作为4-

1BB靶向部分。

[0044] 术语“4-1BB”，也称为CD137或TNFRSF9(TNF受体超家族成员9)，是TNF受体超家族(TNFRSF)的成员，并且是一种共刺激分子，其在免疫细胞(固有免疫细胞和适应性免疫细胞两者)活化后表达。4-1BB在调节各种免疫细胞的活性中起重要作用。如本文所用，4-1BB可以源自哺乳动物，例如智人(Homo sapiens)(人)(NCBI登录号NP\_001552.2)。例如，人4-1BB蛋白(NP\_001552.2)可以由氨基酸序列(SEQ ID NO:89)表示，如下所示：

[0045] 1 mgnscyniva tlllvtlfer trslqpcsn cpagtfcdnn rnqicspcpp nsfssaggqr  
 [0046] 61 tcdicrqckg vfrtrkecss tsnaecdctp gfhclgagcs mceqdckqgq eltkkgckdc  
 [0047] 121 cfgtfndqkr gicrpwtncs ldgksvlvng tkerdvvcgp spadlspgas svtppapare  
 [0048] 181 pghspqiisf flaltstall flfflfltrf svvkrgrkkl lyifkqpfmr pvqttqeedg  
 [0049] 241 cscrfpeeee ggcel

[0050] 在一种实施方式中，抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含：

[0051] CDR(互补决定区)-H1(H-CDR1)，其包含SEQ ID NO:1、2或3的氨基酸序列；

[0052] H-CDR2，其包含SEQ ID NO:4、5或6的氨基酸序列；

[0053] H-CDR3，其包含SEQ ID NO:7、8、9、10或11的氨基酸序列；

[0054] L-CDR1，其包含SEQ ID NO:12或13的氨基酸序列；

[0055] L-CDR2，其包含SEQ ID NO:14或15的氨基酸序列；和

[0056] L-CDR3，其包含SEQ ID NO:16或17的氨基酸序列。

[0057] 抗4-1BB抗体或抗原结合片段的CDR的氨基酸序列如表1所示：

[0058] [表1]

SEQ ID NO	H-CDR1	SEQ ID NO	H-CDR2	SEQ ID NO	H-CDR3
1	SYDMS	4	WISYSGGSIYY ADSVKG	7	DGQRNSMREFDY
				8	DAQRNSMREFDY
				9	DAQRQSMREFDY
2	GYDMS	5	VIYPDDGNTYY ADSVKG	10	HGGQKPTTKSSSAY GMDG
3	SYWMH	6	EINPGNGHTNY NEKFKS	11	SFTTARAFAY
SEQ ID NO	L-CDR1	SEQ ID NO	L-CDR2	SEQ ID NO	L-CDR3
12	SGSSSNIGNNYVT	14	ADSHRPS	16	ATWDYSLSGYV
13	RASQTISDY LH	15	YASQ SIS	17	QDGHSPPT

[0060] 例如，抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含：

[0061] 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的H-CDR1，含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的H-CDR2，含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的H-CDR3，含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的L-CDR3；

[0062] 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的H-CDR1，含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的H-

CDR2,含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的L-CDR3;

[0063] 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的L-CDR3;

[0064] 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的L-CDR3;

[0065] 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的L-CDR3;

[0066] 含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的L-CDR3;

[0067] 含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的L-CDR3;

[0068] 含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的L-CDR3;

[0069] 含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的L-CDR3;或

[0070] 含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的H-CDR1,含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的H-CDR2,含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的H-CDR3,含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的L-CDR3。

[0071] 另一种实施方式中,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含:重链可变区,包含:含有SEQ ID NO:1、2或3的氨基酸序列的H-CDR1、含有SEQ ID NO:4、5或6的氨基酸序列的H-CDR2和含有SEQ ID NO:7、8、9、10或11的氨基酸序列的H-CDR3;和轻链可变区,包含:含有SEQ ID NO:12或13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14或15的氨基酸序列的L-CDR2

和含有SEQ ID NO:16或17的氨基酸序列的L-CDR3。

[0072] 在另一种实施方式中,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含:重链可变区,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列;和轻链可变区,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:30、31、32、33、34或38的氨基酸序列。

[0073] 抗4-1BB抗体或抗原结合片段的可变区的氨基酸序列如表2所示:

[0074] [表2]

SEQ ID NO	靶向 4-1BB 的重链可变区
18	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNS MREFDYWGQGTLVTVSS
19	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNS MREFDYWGQGTLVTVSS
20	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRQS MREFDYWGQGTLVTVSS
21	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEWVSVIY PDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDA AVYYCAKHGGQK PTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS
22	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEWVSVIY

	PDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQK PTTKSSSAYGMDGWGQGLTVTVSS
23	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGGLEWIGEI NPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARSFTTAR AFAYWGQGLTVTVSS
24	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNS MREFDYWGQGLTVTVSS
25	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNS MREFDYWGQGLTVTVSS
26	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRQS MREFDYWGQGLTVTVSS
27	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIY PDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQK PTTKSSSAYGMDGWGQGLTVTVSS
28	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIY PDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQK PTTKSSSAYGMDGWGQGLTVTVSS
[0076] 29	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQCLEWIGEI NPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARSFTTAR AFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO	<b>靶向 4-1BB 的轻链可变区</b>
30	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSH RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYCATWDYSLSGYVFGGGTKL TVL
31	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSH RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYCATWDYSLSGYVFGGGTKL TVL
32	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIKYASQS ISGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYQCQDGHSPPTFGQGTKLEIKR
33	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSH RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYCATWDYSLSGYVFGCGTKL TVL
34	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSH RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYCATWDYSLSGYVFGCGTKL TVL
88	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIKYASQS ISGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYQCQDGHSPPTFGCGTKLEIKR

[0077] 例如, 抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含:

[0078] 含有SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区;

[0079] 含有SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链可变区;

[0080] 含有SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区；

[0081] 含有SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的轻链可变区；

[0082] 含有SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链可变区；或

[0083] 含有SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列的重链可变区以及含有SEQ ID NO:88的氨基酸序列的轻链可变区。

[0084] 抗4-1BB抗体或抗原结合片段的可变区的框架的氨基酸序列如表3所示：

[0085] [表3]

[0086]

SEQ ID NO	H-FR1	SEQ ID NO	H-FR2	SEQ ID NO	H-FR3	SEQ ID NO	H-FR4
35	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFS	37	WVRQA PGKGLE WVS	41	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAR	45	WGQ GTL VTV SS
35	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFS	37	WVRQA PGKGLE WVS	42	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDAAV YYCAK	45	WGQ GTL VTV SS
35	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA	37	WVRQA PGKGLE	43	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV	45	WGQ GTL

	SGFTFS		WVS		YYCAK		VTV SS
36	QVQLQQSGAEVI KPGASVKLSCKA SGYTFS	38	WVRQA PGQGLE WIG	44	RATLTGDTSTSTVY MELSSLRSED TAVY YCAR	45	WGQ GTL VTV SS
35	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFS	39	WVRQA PGKCLE WVS	41	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRA EDTAV YYCAR	45	WGQ GTL VTV SS
35	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFS	39	WVRQA PGKCLE WVS	42	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRA EDAAV YYCAK	45	WGQ GTL VTV SS
35	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFTFS	39	WVRQA PGKCLE WVS	43	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRA EDTAV YYCAK	45	WGQ GTL VTV SS
[0087] 36	QVQLQQSGAEVI KPGASVKLSCKA SGYTFS	40	WVRQA PGQCLE WIG	44	RATLTGDTSTSTVY MELSSLRSED TAVY YCAR	45	WGQ GTL VTV SS
<b>SEQ ID NO</b>	<b>L-FR1</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>L-FR2</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>L-FR3</b>	<b>SEQ ID NO</b>	<b>LFR4</b>
46	QSVLTQPPSASGT PGRRVTISC	49	WYQQLP GTAPKL LIY	51	GVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEA DYIC	53	FGG GTK LTVL
47	QSVLTQPPSASGT PGQRTVISC	49	WYQQLP GTAPKL LIY	51	GVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEA DYIC	53	FGG GTK LTVL
48	DIVMTQSPAFLSV TPGEKVTITC	50	WYQQK PDQAPK LLIK	52	GIPSRFSGSGSGTD FTFTISSLEAEDAA TYIC	54	FGQ GTK LEIK R
46	QSVLTQPPSASGT PGRRVTISC	49	WYQQLP GTAPKL LIY	51	GVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEA DYIC	55	FGC GTK LTVL
47	QSVLTQPPSASGT PGQRTVISC	49	WYQQLP GTAPKL LIY	51	GVPDRFSGSKSGTS ASLAISGLRSEDEA DYIC	55	FGC GTK LTVL

[0088] 在另一种实施方式中,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含:重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:56、57、58、59、60或61的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:62、63或64的氨基酸序列。例如,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可包含:

[0089] 重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:56、57、58、59、60或61的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:62的氨基酸序列;

[0090] 重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:56、57、58、59、60或61的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:63的氨基酸序列;或

[0091] 重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:56、57、58、59、60或61的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:64的氨基酸序列。

[0092] 在另一种实施方式中,抗4-1BB抗体或其抗原结合片段可以是scFv(单链可变片段),所述scFv包括:

[0093] 重链可变区,包含:含有SEQ ID NO:1、2或3的氨基酸序列的H-CDR1、含有SEQ ID NO:4、5或6的氨基酸序列的H-CDR2、和含有SEQ ID NO:7、8、9、10或11的氨基酸序列的H-CDR3;和

[0094] 轻链可变区,包含:含有SEQ ID NO:12或13的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:14或15的氨基酸序列的L-CDR2、和含有SEQ ID NO:16或17的氨基酸序列的L-CDR3,

[0095] 其中重链可变区和轻链可变区可以以任何顺序直接(即,无接头地)或通过肽接头彼此连接。

[0096] 例如,抗4-1BB scFv可包括:

[0097] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29的氨基酸序列;和

[0098] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:30、31、32、33、34或88的氨基酸序列或基本上由SEQ ID NO:30、31、32、33、34或88的氨基酸序列组成,

[0099] 其中重链可变区和轻链可变区可以以任何顺序直接或通过肽接头彼此连接。

[0100] 例如,抗4-1BB scFv可包括:

[0101] 重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:24、25、26、27、28或29的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:33的氨基酸序列;

[0102] 重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:24、25、26、27、28或29的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:34的氨基酸序列;或

[0103] 重链可变区,包含SEQ ID NO:24、25、26、27、28或29的氨基酸序列;以及轻链可变区,包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列,

[0104] 其中重链可变区和轻链可变区可以以任何顺序直接或通过肽接头彼此连接。

[0105] 在本公开中,抗4-1BB scFv以任意顺序包含重链可变区和轻链可变区。例如,抗4-1BB scFv可以在从N端到C端的方向上包含轻链可变区和重链可变区。可替代地,抗4-1BB scFv可以在从N端到C端的方向上包含重链可变区和轻链可变区。

[0106] HER2靶向部分

[0107] 抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体可以包含抗HER2抗体或其抗原结合片段作为HER2靶向部分。

[0108] “HER2(人表皮生长因子受体2)”由ERBB2基因编码,是表皮生长因子受体(EGFR/ErbB)的成员。已知HER2在调节细胞增殖和分化中起重要作用。特别是,当与细胞外生长因子结合时,它具有与其他HER受体一起组装成同源和/或异源二聚体的强烈趋势,这导致数种形式的信号转导通路的活化并诱导细胞凋亡、存活或细胞增殖。例如,HER2蛋白可以是以GenBank登录号NP\_004439.2、NP\_001005862.1等保藏的多肽,其分别由以GenBank登录号NM\_004448.4、NM\_001005862.3等保藏的核苷酸序列(mRNA)编码。

[0109] 在一种实施方式中,抗HER2抗体可以选自由曲妥珠单抗、帕妥珠单抗和曲妥珠单抗-美坦新偶联物(Trastuzumab emtansine) (T-DM1)组成的组。

[0110] 将HER2识别为抗原的抗HER2抗体的抗原结合区可以是选自由曲妥珠单抗、帕妥珠单抗和曲妥珠单抗-美坦新偶联物(T-DM1)组成的组中的抗HER2抗体的scFv、(scFv)<sub>2</sub>、Fab、Fab'或F(ab')<sub>2</sub>。

[0111] 抗HER2抗体或其抗原结合片段可以是抗HER2抗体或其包含曲妥珠单抗、帕妥珠单抗或曲妥珠单抗-美坦新偶联物(T-DM1)的6个CDR的抗原结合片段。

[0112] 在一种实施方式中,抗HER2抗体或其抗原结合片段可以是曲妥珠单抗或其抗原结合片段,或其变体。

[0113] 例如,抗HER2抗体或其抗原结合片段可包含:

[0114] H-CDR1,其包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列;

[0115] H-CDR2,其包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列;

[0116] H-CDR3,其包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列;

[0117] L-CDR1,其包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列;

[0118] L-CDR2,其包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;和

[0119] L-CDR3,其包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0120] 抗HER2抗体或抗原结合片段的CDR的氨基酸序列如表4所示:

[0121] [表4]

SEQ ID NO	VH_CDR1	SEQ ID NO	VH_CDR2	SEQ ID NO	VH_CDR3
65	DTYIH	66	RIYPTNGYTRYADSVKG	67	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO	L-CDR1	SEQ ID NO	L-CDR2	SEQ ID NO	L-CDR3
68	RASQDVNTAVA	69	SASFLYS	70	QQHYTTPPT

[0123] 另一种实施方式中,抗HER2抗体或其抗原结合片段可包含:重链可变区,包含:含有SEQ ID NO:65的氨基酸序列的H-CDR1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的H-CDR2和含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的H-CDR3;和轻链可变区,包含:含有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的L-CDR2和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的L-CDR3。在另一种实施方式中,抗HER2抗体或其抗原结合片段可包含:重链可变区,包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列或基本上由SEQ ID NO:71的氨基酸序列组成;和轻链可变区,包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列或基本上由SEQ ID NO:72的氨基酸序列组成。

[0124] 抗HER2抗体或抗原结合片段的可变区的氨基酸序列如表5所示:

[0125] [表5]

[0126]	SEQ ID NO	靶向 HER2 的重链可变区
	71	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDKYIHVVRRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTLVTVS
	SEQ ID NO	靶向 HER2 的轻链可变区
	72	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA SFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKV EIKR

[0127] 在另一种实施方式中,抗HER2抗体或其抗原结合片段可包含:重链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:73或74的氨基酸序列;和轻链,包含以下或基本上由以下组成:SEQ ID NO:75的氨基酸序列。在另一种实施方式中,抗HER2抗体或其抗原结合片段可以是scFv(单链可变片段),所述scFv包括:

[0128] 重链可变区,包含:含有SEQ ID NO:65的氨基酸序列的H-CDR1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的H-CDR2、和含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的H-CDR3;和

[0129] 轻链可变区,包含:含有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的L-CDR1、含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的L-CDR2、和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的L-CDR3,

[0130] 其中重链可变区和轻链可变区可以以任何顺序直接(即,无接头地)或通过肽接头彼此连接。

[0131] 在另一种实施方式中,抗HER2抗体或其抗原结合片段可以是scFv(单链可变片段),所述scFv包括:

[0132] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列或基本上由SEQ ID NO:71的氨基酸序列组成;和

[0133] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列或基本上由SEQ ID NO:72的氨基酸序列组成,

[0134] 其中重链可变区和轻链可变区可以以任何顺序直接或通过肽接头彼此连接。

[0135] 在本公开中,抗HER2 scFv以任意顺序包含重链可变区和轻链可变区。例如,抗HER2 scFv可以在从N端到C端的方向上包含轻链可变区和重链可变区。可替代地,抗HER2 scFv可以在从N端到C端的方向上包含重链可变区和轻链可变区。

[0136] 双特异性抗体

[0137] 本公开提供了抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体,该抗体包含:

[0138] (1) 作为HER2靶向部分的抗HER2抗体或其抗原结合片段,其能够特异性识别和/或结合HER2蛋白;和

[0139] (2) 作为4-1BB靶向部分的抗4-1BB抗体或其抗原结合片段,其能够特异性识别和/或结合4-1BB蛋白。

[0140] 抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体可仅在与表达HER2的肿瘤细胞交联时活化4-1BB信号传导。此外,双特异性抗体中所包含的抗4-1BB抗体或其抗原结合片段的特征可以是,仅在肿瘤微环境(TME)中定位和/或激活,和/或与现有的抗4-1BB抗体相比显著地降低肝脏毒性,同时维持免疫应答增强和/或肿瘤治疗的功效。

[0141] 在一种实施方式中,双特异性抗体可以包含全长抗HER2抗体和抗4-1BB抗体的抗原结合片段(例如,scFv),其中抗4-1BB抗体的抗原结合片段可以直接或通过肽接头与全长抗HER2抗体的N-末端、C-末端或其两者连接。在另一种实施方式中,双特异性抗体可以包含全长抗4-1BB抗体和抗HER2抗体的抗原结合片段(例如,scFv),其中抗HER2抗体的抗原结合片段可以直接或通过肽接头与全长抗4-1BB抗体的N-末端、C-末端或其两者连接。

[0142] 在一种实施方式中,双特异抗体中所包含的scFv可以任意顺序包含重链可变区和轻链可变区。例如,双特异性抗体中所包含的scFv可以在从N端到C端的方向上包含轻链可变区和重链可变区,以及任选地包含在它们之间的肽接头,或者可替代地,双特异性抗体中所包含的scFv可以在从N端到C端的方向上包含重链可变区和轻链可变区,以及任选地包含在它们之间的肽接头。

[0143] 当双特异性抗体包括全长抗HER2抗体和抗4-1BB scFv时,双特异性抗体可以包括:

[0144] (i) 第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:

[0145] 抗HER2抗体的重链,

[0146] 任选地,肽接头(第一肽接头),和

[0147] 抗4-1BB scFv;和

[0148] (ii) 第二多肽,包含抗HER2抗体的轻链,

[0149] 其中抗4-1BB scFv可在从N端到C端的方向上包含:

[0150] 抗4-1BB抗体的轻链可变区,

[0151] 任选地,肽接头(第二肽接头),和

[0152] 抗4-1BB抗体的重链可变区。

[0153] 可替代地,双特异性抗体可包括:

[0154] (i) 第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:

[0155] 抗4-1BB scFv,

[0156] 任选地,肽接头(第一肽接头),和

[0157] 抗HER2抗体的重链;和

[0158] (ii) 第二多肽,包含抗HER2抗体的轻链,

[0159] 其中抗4-1BB scFv可在从N端到C端的方向上包含:

[0160] 抗4-1BB抗体的轻链可变区,

[0161] 任选地,肽接头(第二肽接头),和

[0162] 抗4-1BB抗体的重链可变区。

[0163] 可替代地,双特异性抗体可包括:

[0164] (i) 第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:

[0165] 抗HER2抗体的重链,

[0166] 任选地,肽接头(第一肽接头),和

[0167] 抗4-1BB scFv;和

[0168] (ii) 第二多肽,包含抗HER2抗体的轻链,

[0169] 其中抗4-1BB scFv可在从N端到C端的方向上包含:

[0170] 抗4-1BB抗体的重链可变区,

- [0171] 任选地,肽接头(第二肽接头),和
- [0172] 抗4-1BB抗体的轻链可变区。
- [0173] 可替代地,双特异性抗体可包括:
- [0174] (i) 第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:
- [0175] 抗4-1BB scFv,
- [0176] 任选地,肽接头(第一肽接头),和
- [0177] 抗HER2抗体的重链;和
- [0178] (ii) 第二多肽,包含抗HER2抗体的轻链,
- [0179] 其中抗4-1BB scFv可在从N端到C端的方向上包含:
- [0180] 抗4-1BB抗体的重链可变区,
- [0181] 任选地,肽接头(第二肽接头),和
- [0182] 抗4-1BB抗体的轻链可变区。
- [0183] 当双特异性抗体包括全长抗4-1BB抗体和抗HER2 scFv时,双特异性抗体可以包括:
- [0184] (i) 第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:
- [0185] 抗4-1BB抗体的重链,
- [0186] 任选地,肽接头(第一肽接头),和
- [0187] 抗HER2 scFv;和
- [0188] (ii) 第二多肽,包含抗4-1BB抗体的轻链,
- [0189] 其中抗HER2 scFv可在从N端到C端的方向上包含:
- [0190] 抗HER2抗体的轻链可变区,
- [0191] 任选地,肽接头(第二肽接头),和
- [0192] 抗HER2抗体的重链可变区。
- [0193] 可替代地,双特异性抗体可包括:
- [0194] (i) 第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:
- [0195] 抗HER2 scFv,
- [0196] 任选地,肽接头(第一肽接头),和
- [0197] 抗4-1BB抗体的重链;和
- [0198] (ii) 第二多肽,包含抗4-1BB抗体的轻链,
- [0199] 其中抗HER2 scFv可在从N端到C端的方向上包含:
- [0200] 抗HER2抗体的轻链可变区,
- [0201] 任选地,肽接头(第二肽接头),和
- [0202] 抗HER2抗体的重链可变区。
- [0203] 可替代地,双特异性抗体可包括:
- [0204] (i) 第一多肽,在从N端到C端的方向上包含:
- [0205] 抗4-1BB抗体的重链,
- [0206] 任选地,肽接头(第一肽接头),和
- [0207] 抗HER2 scFv;和
- [0208] (ii) 第二多肽,包含抗4-1BB抗体的轻链,

- [0209] 其中抗HER2 scFv可在从N端到C端的方向上包含：
- [0210] 抗HER2抗体的重链可变区，
- [0211] 任选地，肽接头(第二肽接头)，和
- [0212] 抗HER2抗体的轻链可变区。
- [0213] 可替代地，双特异性抗体可包括：
- [0214] (i) 第一多肽，在从N端到C端的方向上包含：
- [0215] 抗HER2 scFv，
- [0216] 任选地，肽接头(第一肽接头)，和
- [0217] 抗4-1BB抗体的重链；和
- [0218] (ii) 第二多肽，包含抗4-1BB抗体的轻链，
- [0219] 其中抗HER2 scFv可在从N端到C端的方向上包含：
- [0220] 抗HER2抗体的重链可变区，
- [0221] 任选地，肽接头(第二肽接头)，和
- [0222] 抗HER2抗体的轻链可变区。
- [0223] 第一肽接头和第二肽接头可以在双特异性抗体中独立地存在或不存在，并且彼此相同或不同。
- [0224] 在另一种实施方式中，双特异性抗体中所包含的HER2靶向部分和4-1BB靶向部分两者都可以是全长抗体或包含直接或通过肽接头相互连接的重链CDR、轻链CDR或其组合的抗原结合片段。
- [0225] 假设每种抗体都可以结合4-1BB(例如人4-1BB)和HER2(例如人HER2)两者，可以将本文所公开的CDR序列或 $V_H$ (重链可变区)和 $V_L$ (轻链可变区)序列“混合并匹配”以产生其他的抗HER2/抗4-1BB结合双特异性分子。
- [0226] 肽接头
- [0227] 对于高纯度抗体，双特异性抗体可以包含在第一多肽中的重链和scFv之间的肽接头(第一肽接头)，和/或在scFv中的重链可变区和轻链可变区之间的肽接头(第二肽接头)。
- [0228] 如本文所用，术语“肽接头”可以指包括1至100个氨基酸，特别是2至50个氨基酸的寡肽，每个氨基酸可以是任何种类的氨基酸，而没有任何限制。可以在有或没有适当修饰的情况下使用任何常规的肽接头以符合特定目的。在具体的实施方式中，肽接头可包含例如Gly、Asn和/或Ser残基，和/或包含中性氨基酸如Thr和/或Ala。适用于肽接头的氨基酸序列可以是相关领域已知的。肽接头的长度可以在不影响多肽和/或scFv功能的限度内适当确定。例如，肽接头可通过包括总共约1至约100个氨基酸、约2至约50个氨基酸或约5至约25个(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个)氨基酸而形成，每个氨基酸独立地选自自由Gly、Asn、Ser、Thr和Ala组成的组。在一种实施方式中，肽接头可以表示为(GmS1) $n$ ( $m$ 、 $l$ 和 $n$ 分别是“G”、“S”和“(GmS1)”的数量，并且独立地选自约1至约10，特别是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。在一种实施方式中，肽接头可以是(GGGGS) $2$ 、(GGGGS) $3$ 、(GGGGS) $4$ 或(GS) $9$ 的氨基酸，但不限于此。
- [0229] 医学用途
- [0230] 提供了双特异性抗体用于增强免疫应答和/或治疗和/或预防癌症的医学用途。
- [0231] 更具体地，一实施方式提供了包含双特异性抗体作为活性成分的药物组合物。该

药物组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。该药物组合物可用于增强免疫应答,和/或用于治疗 and/或预防癌症。

[0232] 另一种实施方式提供了用于治疗 and/或预防癌症的药物组合物,所述组合物包含双特异性抗体作为活性成分。

[0233] 另一种实施方式提供了一种在有需要的受试者中治疗和/或预防癌症的方法,该方法包括将药学有效量的双特异性抗体或药物组合物施用至受试者。该方法可以进一步具有在施用步骤之前鉴定需要治疗和/或预防癌症的受试者的步骤。

[0234] 另一种实施方式提供了双特异性抗体或药物组合物用于治疗 and/或预防癌症的用途。另一种实施方式提供了双特异性抗体在制备用于治疗 and/或预防癌症的药物中的用途。

[0235] 在一些实施方式中,癌症的特征可以是HER2表达或HER2过表达(与正常相比)。

[0236] 另一种实施方式提供了用于增强免疫应答的药物组合物,所述组合物包含双特异性抗体作为活性成分。

[0237] 另一种实施方式提供了一种在有需要的受试者中增强免疫应答的方法,该方法包括将药学有效量的双特异性抗体或药物组合物施用至受试者。该方法可以进一步包括在施用步骤之前鉴定需要增强免疫应答的受试者的步骤。

[0238] 另一种实施方式提供了双特异性抗体或药物组合物用于增强免疫应答的用途。另一种实施方式提供了双特异性抗体在制备用于增强免疫应答的药物中的用途。

[0239] 在一些实施方式中,双特异性抗体或药物组合物可以在存在HER2的条件下增强免疫应答。例如,在增强免疫应答的方法中,受试者可以具有表达HER2或过表达HER2的细胞(例如,表达HER2或过表达HER2的癌细胞)。

[0240] 双特异性抗体或药物组合物所预防和/或治疗的癌症可能与4-1BB和/或HER2,尤其是HER2表达或HER2过表达的癌症有关。癌症可以选自实体癌和血癌。所述癌症可以是但不限于选自由乳腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌(例如,肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌)、腹膜癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、皮肤或眼球黑色素瘤、直肠癌、肛门附近的癌症、食道癌、小肠肿瘤、内分泌腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、肝癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞腺瘤、大肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺肿瘤、肾癌、宫颈癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、头颈部癌、脑癌、胆道癌、胆囊癌等组成的组中的一种或多种。癌症可以是原发性癌症或转移性癌症。

[0241] 如本文所用,术语“癌症的预防和/或治疗”可以指癌细胞死亡、癌细胞增殖的抑制、与癌症相关的症状的缓解、癌症转移的抑制等。

[0242] 如本文所用,术语“免疫应答的增强”可以指4-1BB信号激活、与4-1BB相关的任何免疫应答的增强,例如4-1BB诱导的信号活化(例如,4-1BB诱导的NF- $\kappa$ B信号活化)、细胞因子释放增加、诸如T细胞的免疫细胞杀伤靶细胞等,但不限于此。在一些实施方式中,本公开提供的双特异性抗体对免疫应答的增强可以在HER2的存在下发生。

[0243] 除了作为活性成分的双特异性抗体之外,药物组合物还可包含药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂。药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂可以是选自常用于配制抗体的那些中的任何一种。例如,药学上可接受的载体可以是选自由乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡

咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油组成的组中的一种或多种,但不限于此。

[0244] 药物组合物还可包含选自由润滑剂、润湿剂、甜味剂、增味剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂等组成的组中的一种或多种。

[0245] 双特异性抗体或药物组合物可以口服或经非胃肠道施用至受试者。非胃肠道施用可以是静脉内注射、皮下注射、肌肉注射、腹膜内注射、内皮施用、局部施用、鼻内施用、肺内施用或直肠施用。由于口服施用导致蛋白质或肽被消化,因此必须将用于口服施用的组合物中的活性成分包衣或配制以防止在胃中消化。另外,可以使用使活性成分能够递送至靶细胞(例如癌细胞)的任选装置来施用组合物。

[0246] 如本文所用,术语“药学有效量”可以指活性成分双特异性抗体可以在预防或治疗癌症中发挥药学上有意义的作用的量。双特异性抗体的药学有效量,或由双特异性抗体的量指示的药物组合物的合适剂量,可以取决于各种因素以各种方式规定,例如患者的年龄、体重、性别、病理状况、饮食、排泄速度和/或反应敏感性、剂型、施用时间、施用途径、施用方式等。例如,双特异性抗体的药学有效量或药物组合物的成人合适剂量可以在每天约0.001至约1000mg(双特异性抗体的量)/kg(体重)、约0.01至约100mg/kg、或0.1至50mg/kg的范围内。

[0247] 施用双特异性抗体或药物组合物的受试者可以是选自哺乳动物中的一种,例如人、猴、大鼠、小鼠、狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛等,或由其获得的细胞或组织,但不限于此,它可以是患有癌症的受试者。

[0248] 药物组合物可以与药学上可接受的载体和/或赋形剂通过本领域技术人员容易实施的方法配制成单位剂型或多次剂型。剂型可以是油溶液或水性介质、混悬剂、糖浆、乳化溶液、提取物、粉剂、颗粒剂、片剂或胶囊剂,并且可以进一步包括分散剂或稳定剂。

#### [0249] 多核苷酸、重组载体和抗体的制备

[0250] 一种实施方式提供了编码双特异性抗体的多核苷酸。例如,多肽可包含:编码直接连接或通过肽接头连接的本文所述的抗HER2抗体的重链和本文所述的抗4-1BB抗体的scFv的第一多核苷酸;以及编码抗HER2抗体的轻链的第二多核苷酸。可替代地,多肽可包含:编码直接连接或通过肽接头连接的本文所述的抗4-1BB抗体的重链和本文所述的抗HER2抗体的scFv的第一多核苷酸;以及编码抗4-1BB抗体的轻链的第二多核苷酸。

[0251] 另一种实施方式提供了包含多核苷酸的载体。例如,重组载体可以包含一起在一个载体中或分别在两个载体中的第一多核苷酸和第二多核苷酸。另一种实施方式提供了包含第一多核苷酸和第二多核苷酸的重组细胞。例如,重组细胞可以用重组载体转染的细胞。

[0252] 另一种实施方式提供了制备双特异性抗体的方法,包括在细胞中表达多核苷酸,例如第一多核苷酸和第二多核苷酸。表达多核苷酸的步骤可以通过在允许多核苷酸表达的条件下培养包含多核苷酸(例如该多核苷酸在重组载体中)的细胞来进行。该方法可以进一步包括在表达或培养步骤之后,从细胞培养物中分离和/或纯化抗4-1BB抗体或其抗原结合片段。

[0253] 术语“载体”是指用于在宿主细胞中表达靶基因的工具,例如质粒载体、粘粒载体和病毒载体,例如噬菌体载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体和腺相关病毒载体。重组载体

可以由本领域常用的质粒(例如pSC101、pGV1106、pACYC177、ColE1、pKT230、pME290、pBR322、pUC8/9、pUC6、pBD9、pHC79、pIJ61、pLAFR1、pHV14、pGEX系列、pET系列和pUC19)、噬菌体(例如 $\lambda$ gt4 $\lambda$ B、 $\lambda$ -Charon、 $\lambda$   $\Delta$  z1和M13)或通过操纵病毒(例如SV40等)来构建。

[0254] 在重组载体中,多核苷酸可以可操作地连接至启动子。术语“可操作地连接”旨在涉及靶核苷酸序列与表达调节序列(例如,启动子序列)之间的功能性连接。当“可操作地连接”时,调节元件可以控制靶核苷酸的转录和/或翻译。

[0255] 通常可以将重组载体构建为克隆载体或表达载体。对于重组表达载体,可以使用相关领域通常可用于在植物、动物或微生物细胞中表达外源蛋白质的载体。本领域熟知的各种方法可用于构建重组载体。

[0256] 为了在宿主如原核或真核细胞中使用,可以相应地构建重组载体。例如,当将载体构建为用于原核宿主中的表达载体时,该载体通常包括用于转录的强启动子(例如pL $\kappa$ 启动子,CMV启动子, trp启动子, lac启动子, tac启动子, T7启动子等),用于起始翻译的核糖体结合位点以及转录/翻译终止序列。另一方面,用于真核宿主的表达载体包括真核细胞中可操作的复制起点,例如f1复制起点、SV40复制起点、pMB1复制起点、腺病毒复制起点(adeno origin of replication)、AAV复制起点和BBV复制起点,但不限于此。另外,表达载体通常包括源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、巨细胞病毒启动子和HSV的tk启动子)以及作为转录终止序列的聚腺苷酸化序列。

[0257] 可以通过将重组载体导入合适的宿主细胞中来制备重组细胞。在本公开中可以使用本领域已知的任何宿主细胞,只要该细胞允许以稳定的方式顺序克隆和表达重组载体。可用于本公开的原核宿主细胞的实例选自大肠杆菌、芽孢杆菌属、例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*),以及肠杆菌科菌株例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)和各种假单胞菌属物种。可用于转化的真核宿主细胞可选自但不限于啤酒酵母(*Saccharomyce cerevisiae*)、昆虫细胞和动物细胞,例如Sp2/O、CHO(中国仓鼠卵巢)-K1、CHO DG44、PER.C6、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、Huh7、3T3、RIN和MDCK。

[0258] 可以使用相关领域熟知的方法将多核苷酸或携带该多核苷酸的重组载体导入(转染)到宿主细胞中。例如,当宿主细胞是原核细胞时,可以使用CaCl<sub>2</sub>或电穿孔方法进行此转染。对于真核宿主细胞,可以使用但不限于显微注射、磷酸钙沉淀、电穿孔、脂质体介导的转染或颗粒轰击来实现遗传导入。

[0259] 为了选择转化的宿主细胞,可以根据本领域熟知的方法利用与选择标记相关的表型。例如,当选择标记是赋予对特定抗生素抗性的基因时,宿主细胞可以在培养基中存在抗生素的情况下生长,从而选择了目的转化体。

[0260] 另一种实施方式提供了生产双特异性抗体的方法,该方法包括在宿主细胞中表达多核苷酸或重组载体的步骤。在一种实施方式中,生产方法可包括培养携带有多核苷酸或重组载体的重组细胞,并任选地从培养基中分离和/或纯化抗体。

[0261] 有益效果

[0262] 本公开涉及双特异性抗体及其用途,所述双特异性抗体中的每一种都包括对肿瘤相关抗原(TAA;HER2)特异的抗体和对4-1BB特异的抗体。这些双特异性抗体仅在存在HER2

表达细胞的情况下活化4-1BB信号传导并增强免疫细胞。由于特异性HER2介导的免疫应答,预计与4-1BB单克隆抗体相比,使用双特异性抗体的肝毒性要小得多。

#### 附图说明

[0263] 图1a是显示通过ELISA测量的抗4-1BB抗体的抗原(人4-1BB)结合活性的图。

[0264] 图1b是显示通过ELISA测量的抗4-1BB抗体的细胞结合活性的图。

[0265] 图2a是显示通过ELISA测量的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的抗原(人HER2)结合活性的图。

[0266] 图2b是显示通过ELISA测量的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的抗原(人HER2)结合活性的图。

[0267] 图3a是显示通过ELISA测量的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的抗原(人4-1BB)结合活性的图。

[0268] 图3b是显示通过ELISA测量的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的抗原(人4-1BB)结合活性的图。

[0269] 图4a是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在NCI-N87细胞系(HER2高表达细胞)中的4-1BB信号活化水平的图。

[0270] 图4b是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在MDA-MB-231细胞系(HER2阴性细胞)中的4-1BB信号活化水平的图。

[0271] 图5a是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在表达HER2的NCI-N87细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0272] 图5b是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在表达HER2的Ca1u-3细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0273] 图5c是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在表达HER2的HCC1954细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0274] 图5d是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在表达HER2的JIMT1细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0275] 图5e是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在表达HER2的ZR-75-1细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0276] 图5f是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在不表达HER2的A431细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0277] 图5g是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在不表达HER2的MCF-7细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0278] 图5h是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在不表达HER2的MDA-MB231细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0279] 图5i是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在不表达HER2的BxPC-3细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0280] 图6a是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在表达HER2的Ca1u-3细胞系中的4-1BB信号活化水平的图。

[0281] 图6b是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在表达HER2的HCC1954细胞系中的4-

1BB信号活化水平的图。

[0282] 图7是显示不同细胞系中抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的HER2 sABC和4-1BB诱导的NF- $\kappa$ B信号传导之间的相关性的图。

[0283] 图8a-8d是显示用抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体处理的表达HER2的HCC1954细胞释放的IFN- $\gamma$ 水平的图。

[0284] 图9a-9d是显示用抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体处理的表达HER2的HCC1954细胞的存活率百分比的图。

[0285] 图10是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在携带HCC1954的hPBMCM移植小鼠中的体内抗肿瘤活性的图。

[0286] 图11是显示用抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体处理的携带HCC1954的hPBMCM移植小鼠中淋巴细胞标志物阳性细胞计数的图。

[0287] 图12是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在携带人HER2/MC38肿瘤的4-1BB敲入小鼠中的体内抗肿瘤活性的图。

[0288] 图13是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在经抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体治愈、并用人HER2/MC38肿瘤细胞和B16 F10肿瘤细胞再次攻击的小鼠中的体内抗肿瘤活性的图。

[0289] 图14是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 效果的图。

[0290] 图15a是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的Fc  $\gamma$  RI Ib依赖性4-1BB生物测定结果的图。

[0291] 图15b是显示抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的Fc  $\gamma$  RI Ib非依赖性4-1BB生物测定结果的图。

## 具体实施方式

[0292] 在下文中,将通过实施例详细描述本发明。

[0293] 以下实施例仅用于举例说明本发明,并不被解释为对本发明的限制。

### [0294] 实施例1. 抗4-1BB抗体

[0295] 1.1制备针对4-1BB的完整人类克隆抗体

[0296] 通过针对4-1BB的噬菌体文库免疫管淘选,筛选全长IgG形式的完整人单克隆抗4-1BB抗体。为了淘选针对靶分子的噬菌体文库(获自KBio Health和CUREBIO),使用4-1BB (NCBI登录号NP\_001552.2) 包被的免疫管共进行4轮淘选。

[0297] 将来自三轮淘选过程的细菌菌落在SB-羧苄青霉素(Biomatik cat#A2311-5g)的96深孔板中生长直至混浊,此时将 $10^{11}$  pfu的VCSM13辅助噬菌体(K-Bio Health)添加到每个孔中。在37°C下轻轻摇动(80rpm)感染1小时后,添加70 $\mu$ g/mL卡那霉素,并将细胞在30°C下以200rpm摇动培养过夜。

[0298] 第二天,将板离心并将含有噬菌体的上清液添加至用在PBST(含吐温20的磷酸盐缓冲盐水)中的3% (v/v) BSA(牛血清白蛋白)封闭的4-1BB抗原包被的ELISA板中。在室温下温育1小时后,将板用PBST洗涤3次,并添加抗M13抗体(Sino Biological cat#11973-MM05)。将板温育1小时,用PBST洗涤3次,并使用四甲基联苯胺(TMB)测量结合活性。

[0299] 扩增4-1BB特异性结合物以用于质粒DNA测序。分析轻链和重链可变区 (VL和VH) 序列以鉴定独特序列并确定序列多样性,如表6至表13所示(下划线依次为:CDR1、CDR2和CDR3)。以BMUR (BMS的乌瑞芦单抗,美国专利第7,288,638号) 表示的抗4-1BB抗体用于比较以下实施例中的激动活性。

[0300] [表6]

1A10	氨基酸序列 (N'→C')
[0301] 重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLE WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVY YCARDGQRNSMREFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTYTCNVDPKPKNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 56)

[0302] 重链 可 变 区 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLE WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVY YCARDGQRNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 18)
H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DGQRNSMREFDY (SEQ ID NO: 7)
[0302] 轻链	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL GYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 62)
[0302] 轻链 可 变 区 (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL GYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0303] [表7]

1A10 M4	氨基酸序列 (N'→C')
重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLE WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDAQRNSMREFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 57)
重链 可变区 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLE WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDAQRNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 19)
H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DAQRNSMREFDY (SEQ ID NO: 8)
轻链	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL GYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAACS (SEQ ID NO: 62)
轻链 可变区 (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL GYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0304]

[0305]

[0306] [表8]

	<b>1A10 M11</b>	<b>氨基酸序列 (N'→C')</b>
	重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLE WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDAQRQSMREFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTP E VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 58)
[0307]	重链 可 变 区 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLE WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDAQRQSMREFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 20)
	H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
	H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
	H-CDR3	DAQRQSMREFDY (SEQ ID NO: 9)
	轻链	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL GYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 62)
	轻链 可 变 区 (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL GYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
[0308]	L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
	L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
	L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0309] [表9]

1A10 M12	氨基酸序列 (N'→C')
重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLE WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDAQRNSMREFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 57)
重链 可 变 区 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLE WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDAQRNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 19)
[0310]	H-CDR1 SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DAQRNSMREFDY (SEQ ID NO: 8)
轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL GYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 63)
轻链 可 变 区 (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL GYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
[0311]	L-CDR3 ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0312] [表10]

<b>1A10 M13</b>	<b>氨基酸序列 (N'→C')</b>
重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLE WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDAQRQSMREFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 58)
重链 可 变 区 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLE WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDAQRQSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 20)
H-CDR1	SYDMS (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 4)
H-CDR3	DAQRQSMREFDY (SEQ ID NO: 9)
轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL GYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 63)
轻链 可 变 区 (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL GYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 31)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0313]

[0314] [表11]

[0315]

<b>1A12</b>	<b>氨基酸序列 (N'→C')</b>
-------------	----------------------

[0316]

重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLE WVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAAV YYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 59)
重链 可 变 区 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLE WVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAAV YYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 21)
H-CDR1	GYDMS (SEQ ID NO: 2)
H-CDR2	VIYPDDGNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 5)
H-CDR3	HGGQKPTTKSSSAYGMDG (SEQ ID NO: 10)
轻链	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLS GYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 62)
轻链 可 变 区 (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLS GYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 30)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0317] [表12]

[0318]

1A12 M1	氨基酸序列 (N'→C')
重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLE WVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW

[0319]

	YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 60)
重链 可变区 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLE WVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 22)
H-CDR1	GYDMS (SEQ ID NO: 2)
H-CDR2	VIYPDDGNTYYADSVK (SEQ ID NO: 5)
H-CDR3	HGGQKPTTKSSSAYGMDG (SEQ ID NO: 10)
轻链	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLS GYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 63)
轻链 可变区 (VL)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLS GYVFGGGTKLTVL  (SEQ ID NO: 31)
L-CDR1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 12)
L-CDR2	ADSHRPS (SEQ ID NO: 14)
L-CDR3	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 16)

[0320] [表13]

[0321]

AB41	氨基酸序列 (N'→C')
重链	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLE WIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMELSSLRSED TAVY YCARSF <del>T</del> TARAFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNV <del>D</del> HKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 61)

[0322]	重链可变区 (VH)	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLE WIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVY YCAR <u>SFTTARAFAY</u> WGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 23)
	H-CDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 3)
	H-CDR2	EINPGNGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO: 6)
	H-CDR3	SFTTARAFAY (SEQ ID NO: 11)
	轻链	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLI KYASQISISGIPSRFSGSGSGTDFTFITSSLEAEDAATYYCQDGHSFPPTF GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREKVKQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 64)
	轻链可变区 (VL)	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLI KYASQISISGIPSRFSGSGSGTDFTFITSSLEAEDAATYYCQDGHSFPPTF GQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 32)
	L-CDR1	RASQTISDYLH (SEQ ID NO: 13)
	L-CDR2	YASQIS (SEQ ID NO: 15)
	L-CDR3	QDGHSFPPT (SEQ ID NO: 17)

[0323] 1.2. 针对4-1BB的scFv抗体的制备

[0324] 使用实施例1.1的表6至表13中所示的针对4-1BB的完整人单克隆抗体的可变区, 制备了具有(N')-VL-接头-VH-(C')结构的抗4-1BB scFv抗体, 其中重链可变区第44位的氨基酸残基“G”被“C”取代, 轻链可变区第103位的氨基酸残基“G”被“C”取代。scFv中从“G”到“C”的这种氨基酸取代可有助于增加包含scFv作为一个靶标特异性部分的双特异性抗体的稳定性。表14至表19示出了制备的抗4-1BB scFv的氨基酸序列, 尽管本领域技术人员可以在以下实施方式中应用氨基酸序列的改变或修饰以满足特定目的, 包括应用各种类型的肽接头, 例如(GGGGS)<sub>2</sub>、(GGGS)<sub>3</sub>、(GGGS)<sub>4</sub>或(GS)<sub>9</sub>。

[0325] [表14]

[0326]	1A10 (scFv)	氨基酸序列 (N'→C')
	轻链可变区 (VL)	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKL LIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC <u>ATWDY</u> SLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
[0327]	接头	GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	重链可变区 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLE WVS <u>WISYSGSIYYADSVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDGQRNSMREFDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 24)

[0328] [表15]

[0329]	1A10 (scFv)	M4	氨基酸序列 (N'→C')
	轻链可变区 (VL)		QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL SGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
	接头		GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:87)
	重链可变区 (VH)		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLE WVSWISYSGGSIIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDAQRNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 25)

[0330] [表16]

[0331]	1A10 (scFv)	M12	氨基酸序列 (N'→C')
	轻链可变区 (VL)		QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL SGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
	接头		GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	重链可变区 (VH)		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLE WVSWISYSGGSIIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDAQRNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 25)

[0332] [表17]

[0333]	1A12 (scFv)		氨基酸序列 (N'→C')
	轻链可变区 (VL)		QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL SGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
	接头		GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	重链可变区 (VH)		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLE WVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDAA VYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 27)

[0334] [表18]

[0335]	1A12 (scFv)	M1	氨基酸序列 (N'→C')
	轻链可变区 (VL)		QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNNYVTWYQQLPGTAPKLLI YADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL SGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
	接头		GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 67)
	重链可变区 (VH)		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLE WVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 28)

[0336] [表19]

AB41 (scFv)	氨基酸序列 (N'→C')
轻链可变区 (VL)	DIVMTQSPAFLSVTPGKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLI KYASQSIGIPSRFSGSGSGTDFTFITSSLEAEDAATYYCQDGHSPPTF GCGTKLEIKR (SEQ ID NO: 88)
接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 67)
重链可变区 (VH)	QVQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQCL EWIGEINPGNGHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMESSLRSEDYAV YYCARSFTTARAFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 29)

[0338] 1.3. 与人4-1BB的抗4-1BB抗体(全长IgG形式)的抗原结合能力

[0339] (1) 通过ELISA测量的抗原结合活性

[0340] 为了评估抗原结合活性,将实施例1.1中制备的候选抗体进行ELISA测试。Briefly, microtiter plates were coated with human 4-1BB-Fc protein (Sino Biological) at 0.1 μg/ml in PBS, 100 μl/well at 4°C overnight, and then blocked with 100 μl/well of 5% (v/v) BSA. 将从10 μg/ml开始5倍稀释的人源化抗体(1A10、1A12和AB41)添加到每个孔中,并在室温(RT)下温育1-2小时。将板用PBS/吐温洗涤,然后与缀合有辣根过氧化物酶(HRP) (Thermo)的山羊抗人IgG抗体在(Thermo)室温下温育1小时。洗涤后,将板用TMB底物显影,并通过分光光度计在OD 450至630nm处分析。

[0341] 所获得的结果在图1a中显示。如图1a所示,所有测试的抗4-1BB抗体都显示出4-1BB结合能力。

[0342] (2) 通过FACS测量的细胞结合活性

[0343] 为了评估细胞结合活性,通过荧光激活细胞分选(FACS)分析候选抗体与哺乳动物表达的4-1BB的结合。简而言之,将表面上表达4-1BB的Jurkat细胞,GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat细胞系(Promega; 3x10<sup>5</sup>个细胞)与抗体(1A10和1A12;各10 μg/mL)一起温育。用FACS缓冲液(在PBS中的1% (v/v) BSA)洗涤后,将FITC-抗人IgG抗体(Sigma, F9512, 浓度: 2.0 mg/ml)添加到每个孔中,并在4°C下温育1小时。FITC的平均荧光强度(MFI)由FACSCalibur (BD Biosciences)评估。

[0344] 所获得的结果在图1b中显示。如图1b所示,所测试的所有抗4-1BB抗体显示出与在细胞表面表达的4-1BB的结合能力,并且可以有效地与哺乳动物细胞上表达的4-1BB结合。

[0345] 实施例2. 抗HER2抗体的制备

[0346] 作为抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的HER2靶向部分,使用曲妥珠单抗(Genentech; 以下称为“HER2 (WT)”, DrugBank登录号DB00072; 人IgG1Kappa单克隆抗体)或其抗原结合片段,例如scFv。

[0347] HER2 (WT)的序列总结在下表20中。

[0348] 包含在双特异性抗体中的抗HER2抗体的恒定区可以通过向人IgG1中引入多于一种突变或变化来修饰,下表20中说明了一种示例性实施方式HER2 (NA或N297A):

[0349] [表20]

	<b>HER2(WT)</b>	<b>序列</b>
[0350]	重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 73)
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLL IYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYTPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK

		VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)
	<b>HER2(NA) (N297A)</b>	<b>序列</b>
[0351]	重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLL IYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYTPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0352] 实施例3. 抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的制备

[0353] 以全长IgG (抗HER2抗体) -scFv (抗4-1BB抗体) 形式或以全长IgG (抗4-1BB抗体) -scFv (抗HER2抗体) 形式, 制备各种抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体候选物: 本实施例中, 分别示例性选择实施例2和实施例1.2中制备的抗HER2 IgG和4-1BB scFv克隆, 以制备IgG-scFv融合形式的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体 (一种抗原的scFv抗体片段与另一种抗原的IgG的C端融合)。当HER2被放置在完整的IgG部分时, 使用具有ADCC减少的突变骨架的IgG1 (N297A突变; Cancer Cell, vol.19, issue 1, pp.101-113等), 当4-1BB被放置在完整的IgG部分时, 使用IgG4。

[0354] 将具有编码抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的IgG抗体重链的核苷酸序列的DNA片

段1插入pcDNA 3.4(Invitrogen,A14697;质粒1),和将具有编码抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的IgG抗体轻链的核苷酸序列的DNA片段2插入pcDNA 3.4(Invitrogen,A14697;质粒2)。其后,使用编码由(GGGGS)3组成的具有15个氨基酸长度的接头肽的DNA片段4或使用编码由(GS)9组成的具有18个氨基酸长度的接头肽的DNA片段5,将编码scFv的DNA片段3融合在对应于插入质粒1中的IgG抗体的Fc区的C端的DNA片段1的部分,以构建用于表达双特异性抗体的载体。此外,为了稳定scFv,如实施例1.2中所述,应用附加修饰以产生将合VL103-VH44(VL103:VL在103位具有G→C突变;VH 44:VH在44位具有G→C突变)分别融合到轻链的C-末端和重链的C-末端的二硫键。

[0355] 在制备的双特异性抗体中,用于制备若干示例性双特异性抗体的重链、轻链、scFv和DNA片段的序列示于表21至表29中。为了提高稳定性和效力、降低免疫原性等目的,可以在下面呈现的抗体中应用氨基酸序列中的一个或多个点突变。

[0356] [表21]

HER2 (NA)x1A10 双特异性抗体-1		氨基酸序列 (N'→C')	
重链组件	①抗 HER2 抗体的重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)	
	②接头	GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 85)	
	③抗 4-1 BB 抗体的 scFv	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
		接头	GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR QAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 24)	
重链组件(①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTL	

[0357]

[0358]		<p>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE                  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS                  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA                  PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP                  EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL                  HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ                  VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ                  PENNYKTTTPVLDSGDSFGLYSLKLTVDKSRWQQGNVFC                  SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGS                  QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQL                  PGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS                  EDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGG                  GSGGGSGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASG                  FTFSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSV                  KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQR                  NSMREFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 76)</p>
轻链组 件	抗 HER2 抗体的 轻链	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVTAVAWYQQK                  PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGSRSGTDFTLTISSLQPE                  DFATYYCQGHYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS                  DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN                  SQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT                  HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)</p>

[0359] [表22]

[0360]	HER2 (NA) <sub>x1A10</sub> 双特异性 抗体-2		氨基酸序列 (N'→C')
重链组 件	①抗 HER2 抗体的 重链		<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ                  APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT                  AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLT                  VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE                  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS                  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA                  PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP                  EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL                  HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ                  VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ                  PENNYKTTTPVLDSGDSFGLYSLKLTVDKSRWQQGNVFC                  SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)</p>
	②接头		GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③ 抗 4-1BB 抗 体的	VL	<p>QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQL                  PGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS                  EDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO:</p>

[0361]

	scFv	33)
	接头	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR QAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 24)
重链组件(①+②+③)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSGSGSGSGSGSGSG SQSVLTQPPSASGTGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQ LPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQR NSMREFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 77)	
轻链组件	抗 HER2 抗体的轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGRSGTDFLTISLQPE DFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0362]

[表23]

[0363]

HER2 (NA)x1A10 M4 双特异性抗体		氨基酸序列 (N'→C')
重链组件	①抗 HER2 抗体的重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED

[0364]

		PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)						
	②接头	GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)						
	③抗 4-1 BB 抗体的 scFv	<table border="1"> <tr> <td>VL</td> <td>QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQ PGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)</td> </tr> <tr> <td>接头</td> <td>GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)</td> </tr> <tr> <td>VH</td> <td>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR QAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD AQRNSMREFDYWGQ GLTVTVSS (SEQ ID NO: 25)</td> </tr> </table>	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQ PGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)	接头	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR QAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD AQRNSMREFDYWGQ GLTVTVSS (SEQ ID NO: 25)
VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQ PGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)							
接头	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)							
VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR QAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD AQRNSMREFDYWGQ GLTVTVSS (SEQ ID NO: 25)							
	重链组件(①+②+ ③)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSGSGSGSGSGSGS SGSQSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGS GGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD AQRNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 78)						
轻链组 件	抗 HER2 抗体的轻 链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLP EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)						

[0365] [表24]

[0366]

HER2 (NA)x1A10 M12 双特异性抗体		氨基酸序列 (N'→C')						
重链组件	①抗 HER2 抗体的重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)						
	②接头	GS <sub>4</sub> GS <sub>4</sub> GS <sub>4</sub> GS <sub>4</sub> GS <sub>4</sub> GS <sub>4</sub> (SEQ ID NO: 86)						
	③抗 4-1 BB 抗体的 scFv	<table border="1"> <tr> <td>VL</td> <td>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)</td> </tr> <tr> <td>接头</td> <td>GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)</td> </tr> <tr> <td>VH</td> <td>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR QAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQAQRNSMREFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 25)</td> </tr> </table>	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)	接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR QAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQAQRNSMREFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 25)
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)						
接头	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)							
VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR QAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQAQRNSMREFDYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 25)							
重链组件(①+②+③)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSGSGSGSGSGSGSGSG SGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD AQRNSMREFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 79)							

[0367]	轻链组件 抗 HER2 抗体的轻链	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)
--------	----------------------	--

[0368] [表25]

HER2 (NA)x1A12 双特异性抗体-1		氨基酸序列 (N'→C')
重链组件	①抗 HER2 抗体的重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	②接头	GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 85)
③抗 4-1 BB 抗体的 scFv	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 33)
	接头	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDAAYYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
重链组件(①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGG

[0370]		SQSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQ LPGTAPKLLIY <u>ADSHRPSGVPDR</u> FSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYC <u>CATWDYLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSG</u> GGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYA <u>DSVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQMNSLRAEDA AVYYCAKH <u>GGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 80)	
	轻链组件	抗 HER2 抗体的轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQHYYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0371] [表26]

HER2 (NA)x1A10 双特异性抗体-2		氨基酸序列 (N'→C')	
重链组件	①抗 HER2 抗体的重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALTHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)	
	②接头	GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)	
	③抗 4-1 BB 抗体的 scFv	VL	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQQL PGTAPKLLIY <u>ADSHRPSGVPDR</u> FSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYC <u>CATWDYLSGYVFGCGTKLTVL</u> (SEQ ID NO: 33)
		接头	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVR QAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDA AVYYCAKH <u>GGQKPTTKSSSAYG</u> <u>MDGWGQGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 27)	
重链组件(①+②+③)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT	

[0373]

		AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSGSGSGSGSGSGS SGSQSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWY QQLPGTAPKLLIY <u>ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS</u> GLRSEDEADYYC <u>ATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGS</u> GGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSGYDMS <u>WVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYY</u> <u>ADSVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAK <u>HGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGT</u> LVTVSS (SEQ ID NO: 81)
轻链组件	抗 HER2 抗体的轻链	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGRSGTDFLTISLQP EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0374]

[表27]

[0375]

HER2 (NA) <sub>x1A10</sub> M1 双特异性抗体	氨基酸序列 (N'→C')	
重链组件	①抗 HER2 抗体的重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY LSSVTVPSLGLTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)
	②接头	GS GSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
	③抗 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKL

[0376]

4-1B B 抗 体的 scFv		LIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDY SLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
	接 头	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCL EWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 28)
重链组件(① +②+③)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKSGSGSGSGSG SGSGSGSQSVLTQPPASGTPGQRTVISCSSSSNIGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCATWDY SLSGYVFGCGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLE WVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 82)	
轻 链 组 件	抗 HER2 抗 体的轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0377] [表28]

[0378]

HER2 (WT)x1A10 M12 双特异性抗 体	氨基酸序列 (N'→C')	
重 链 组 件	①抗 HER2 抗体的重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

[0379]

		NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 73)
	②接头	GS <del>SGSGSGSGSGSGSGS</del> (SEQ ID NO: 86)
③抗 4-1B B 抗 体的 scFv	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKL LIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDY SLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
	接 头	GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	VH	EVQLLES <del>GGGLVQPGGSLRLS</del> CAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLE WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARD <del>AQRNSMREFDY</del> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 25)
	重链组件① +②+③)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <del>CAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL</del> WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <del>KEPKSCDKTHTCPP</del> CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGS <del>SGSGSGSGSGS</del> SGSGSGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLS <del>CAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLE</del> WVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARD <del>AQRNSMREFDY</del> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 83)
轻 链 组 件	抗 HER2 抗 体的轻链	DIQMTQSPSSLSASV <del>GDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL</del> LIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV <del>VCLLNNFYPRE</del> AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK <del>DSTYLSSTLTLSKADYEK</del> HKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0380]

[表29]

[0381]

HER2 (WT)x1A10 M1 双特异性抗体	氨基酸序列 (N'→C')
重 链 组 件	①抗 HER2 抗体的重链 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <del>CAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL</del> EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

		GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 73)
	②接头	GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 86)
[0382]	③抗 4-1B B 抗 体的 scFv	VL QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPK LLIY <u>ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATW</u> DYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 34)
	接头	GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 87)
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKC LEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAK <u>HGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO: 28)
	重链组件①+ ②+③)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWWARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGS GSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGN NYVTWYQQLPGTAPKLLIY <u>ADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS</u> GLRSEDEADYYCATW <u>DYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSG</u> GGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMS WVRQAPGKCLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>HGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGLT</u> TVTVSS (SEQ ID NO: 84)
	轻 链 组 件	抗 HER2 抗 体的轻链 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYT TPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNIFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)

[0383] 实施例4双特异性抗体 (BsAbs) 的结合亲和力测试

[0384] 4.1. 与人HER2结合

[0385] 双特异性抗体的HER2结合亲和力参照实施例1.3(1) 通过ELISA进行。简而言之, 将96孔微量滴定板 (Nunc-Immuno Plates, NUNC) 用1µg/ml浓度的人HER2-His蛋白的PBS溶液 (Sino Biological, 10004-H08H) 以100µl/孔在4°C下包被过夜, 然后用封闭缓冲液 (200µl/孔的1%BSA (牛血清白蛋白 (Gibco, 30063572)) 的PBS溶液) 在37°C下封闭2小时。将实施例3中制备的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体和作为对照的抗HER2抗体 (HER2 (NA)) 的系列稀释液 (从0.1µM开始) 添加到每个孔中, 并在37°C温育1小时。用PBS/0.05%吐温20洗涤板, 然后

在37°C下与HRP缀合的Fab抗体 (Pierce, 31414) 温育1小时。洗涤后,将板用TMB (四甲基联苯胺, Sigma, T0440) 底物显影,并通过分光光度计在OD 450-650nm处分析。

[0386] 获得的结果如图2a和图2b所示。如图2a和图2b所示,所有测试的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体均可与人HER2蛋白以高亲和力结合,这与对照抗HER2抗体相似。

[0387] 4.2. 与人4-1BB结合

[0388] 双特异性抗体的4-1BB结合亲和力参照实施例1.3 (1) 通过ELISA进行。简而言之,将96孔微量滴定板 (Nunc-Immuno Plates, NUNC) 用1 $\mu$ g/ml浓度的人4-1BB-His蛋白 (Sino Biological, 10041-H08H) 的PBS溶液以100 $\mu$ l/孔在4°C下包被过夜,然后用封闭缓冲液 (200 $\mu$ l/孔的1% (v/v) BSA (牛血清白蛋白 (Gibco, 30063572)) 的PBS溶液) 在37°C下封闭2小时。将实施例3中制备的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体和作为对照的抗HER2抗体 (HER2 (NA)) 的系列稀释液 (从0.1 $\mu$ M开始) 添加到每个孔中,并在37°C温育1小时。用PBS/0.05%吐温20洗涤板,然后在37°C下与HRP缀合的Fab抗体 (Pierce, 31414) 温育1小时。洗涤后,将板用TMB底物显影,并通过分光光度计在OD450至650nm处分析。

[0389] 获得的结果如图3a和图3b所示。如图3a和图3b所示,所有测试的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体均能以高亲和力与人4-1BB蛋白结合,而抗HER2抗体不与人4-1BB蛋白结合。

[0390] 图2a、图2b、图3a和图3b的结果在下表30中进行了量化和总结:

[0391] [表30]

EC <sub>50</sub> (nM)	HER2	4-1BB
HER2 (NA)	0.134	N/A
HER2 (WT) x1A10M12	0.159	0.027
HER2 (NA) x1A10	0.135	0.033
HER2 (NA) x1A10M4	0.148	0.025
HER2 (NA) x1A10M12	0.161	0.031
HER2 (WT) x1A12M1	0.174	0.051
HER2 (NA) x1A12	0.148	0.043
HER2 (NA) x1A12M1	0.143	0.048

[0393] 如表30所示,所有测试的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体均能以高亲和力结合人HER2和人4-1BB蛋白。

[0394] 4.3. 与各种细胞表面表达的人HER2结合

[0395] 双特异性抗体对表面上表达HER2的各种细胞的结合亲和力参考实施例1.3 (2) 通过FACS分析进行。

[0396] 使用了如表31中所列的各种肿瘤细胞系。将各细胞系解离并在PBS中洗涤后,计数细胞数并设定为2x10<sup>5</sup>个细胞/100 $\mu$ l FACS缓冲液,然后以10 $\mu$ g/mL处理抗HER2抗体和抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体,并在4°C下反应1小时。反应后,将细胞在FACS缓冲液中洗涤,然后将FITC标记的恒定区 (Fc) 特异性抗体 (山羊抗人IgG FITC缀合物, Fc特异性, Sigma, F9512, 浓度:2.0mg/ml) 悬浮于2 $\mu$ l/2x10<sup>5</sup>个细胞/100 $\mu$ l FACS缓冲液中,4°C下反应1小时。反应后,在FACS缓冲液中洗涤细胞,使用FACSCalibur装置进行分析。阴性对照组仅用FITC标记的恒定区 (Fc) 特异性抗体处理。为了比较癌细胞系中HER2的表达程度,将实验组峰移结果除以阴性对照组峰移结果 (平均荧光强度比 = MFI比:测试抗体的MFI/第二抗体的

MFI)。

[0397] 所得结果如下表31所示:

[0398] [表31]

[0399] MFI比

[0400]	细胞系		抗 HER2	HER2x1A1 0	HER2x1A1 2	
	NCI-N87	胃	ATCC, CRL-5822	104	139	145
[0401]	BT-474	乳腺	ATCC, HTB-20	81	102	90
	Calu-3	肺	ATCC, HTB-55	74	82	82
	HCC1954	乳腺	ATCC, CRL-2338	32	40	42
	JIMT1	乳腺	DSMZ, ACC 589	26	27	25
	HT29	结肠	ATCC, HTB-38	6.1	6.0	7.4
	MCF-7	乳腺	ATCC, HTB-22	5.2	4.9	5.8
	MDA-MB231	乳腺	ATCC, HTB-26	1.2	1.4	1.6
	H929	MM	ATCC, CRL-9068	0.9	1.4	1.4
	Jurkat	ALL	ATCC, TIB-152	1.0	1.3	1.6

[0402] (MFI比:第一抗体的MFI/第二抗体的MFI)

[0403] 如表31所示,所有测试的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体都可以结合细胞表面表达的人HER2蛋白。

[0404] 实施例5. BsAbs与4-1BB (SPR) 的结合亲和力

[0405] 在SPR实验中,在其上已通过胺偶联固定了抗人Fab抗体 (GE Healthcare, 28958325) 的 **Biocore**® Series S Sensor Chip CM5 (GE Healthcare, BR100530) 上,在流动池2、3和4上分别捕获抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体,保持流动池1作为参考。重组人4-1BB蛋白 (ACROBiosystems, 41B-H5227) 以400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56和0.78nM的浓度以30 $\mu$ l/min流过芯片300秒,随后进行400秒的解离阶段。用10mM甘氨酸-HCl (pH 2.0) (GE Healthcare, BR100355) 进行再生。

[0406] 所得结果如下表32所示:

[0407] [表32]

[0408] 抗体	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
HER2 (WT) x1A10 M12	2.11E-09	2.55E+05	5.38E-04
HER2 (NA) x1A10M12	2.35E-09	2.69E+05	6.33E-04
HER2 (WT) x1A12M1	1.24E-08	6.57E+04	8.11E-04
HER2 (NA) x1A12M1	1.38E-08	6.74E+04	9.27E-04

[0409] 如表32所示,测试的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体显示高4-1BB结合亲和力。

[0410] 实施例6. 4-1BB信号活化

[0411] 6.1. BsAbs对比单特异性抗体

[0412] 在本实施例中,为了测量4-1BB信号活化,使用经遗传改造以稳定表达人4-1BB和响应元件下游的荧光素酶的GloResponse™ NF $\kappa$ B-luc2/4-1BB Jurkat细胞系 (Promega) 作

为效应细胞,使用表达或不表达HER2的癌细胞作为靶细胞。简而言之,将NCI-N87(表达HER2;  $2.5 \times 10^4$ 个细胞)或MDA-MB-231(不表达HER2;  $2.5 \times 10^4$ 个细胞)作为靶细胞在96孔测定板中铺板并培养过夜。在测定当天,将待测试的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体(实施例3)和效应Jurkat细胞( $2.5 \times 10^4$ 细胞)添加到板中。温育6小时后,添加Bio-Glo™试剂(Promega)并使用酶标仪测量发光。

[0413] 所得结果如下图4a(NCI-N87细胞系)和图4b(MDA-MB-231细胞系)所示。在图4a和图4b中,BMUR(BMS的乌瑞芦单抗,美国专利第7,288,638号)表示用于比较激动活性的抗4-1BB抗体。如图4a和图4b所示,抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体仅在与HER2高表达细胞共培养时才导致4-1BB信号的强烈活化。Fc交联的抗4-1BB单克隆抗体显示出最小的活性。

[0414] 6.2. 各种HER2表达细胞中的4-1BB活化(I)

[0415] 在本实施例中,为了测量4-1BB信号活化,使用经遗传改造以稳定表达人4-1BB和响应元件下游的荧光素酶的GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat细胞系(Promega)作为效应细胞,使用表达或不表达HER2的癌细胞作为靶细胞。简而言之,将表达HER2的癌细胞(NCI-N87、Calu-3、HCC1954、JIMT1, ZR-75-1)或不表达HER2的细胞(MDA-MB231、MCF-7、A431、BxPC-3)作为靶细胞在96孔测定板中铺板并培养过夜。在测定当天,将待测试的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体(实施例3; 15nM, 4倍稀释, 或20nM, 5倍稀释, 或100nM, 5倍稀释)和效应Jurkat细胞( $2.5 \times 10^4$ 细胞/孔)添加到板中。温育6小时后,添加Bio-Glo™试剂并使用酶标仪测量发光。

[0416] 获得的结果如图5a-5i所示。如图5a-5i所示,抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体仅在与HER2表达细胞共培养时才导致4-1BB信号的强烈活化。

[0417] 6.3. 各种HER2表达细胞中的4-1BB活化(II)

[0418] 在本实施例中,为了测量4-1BB信号活化,使用经遗传改造以稳定表达人4-1BB和响应元件下游的荧光素酶的GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat细胞系(Promega)作为效应细胞。简而言之,将HER2表达靶细胞(Calu-3或HCC1954;  $2.5 \times 10^4$ 个细胞/孔)在96孔测定板中铺板并培养过夜。在测定当天,将待测试的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体(实施例3; 20nM, 5倍稀释, 或133nM, 6倍稀释)和效应Jurkat细胞( $2.5 \times 10^4$ 细胞/孔)添加到板中。温育6小时后,添加Bio-Glo™试剂并使用酶标仪测量发光。

[0419] 获得的结果如图6a和图6b所示。如图6a和图6b所示,所有测试的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体仅在与HER2高表达细胞共培养时才导致4-1BB信号的强烈活化。

[0420] 6.4. HER2定量

[0421] 根据制造商的建议,使用QIFIKIT定量试剂盒(Dako)对各种癌细胞系的HER2细胞表面表达水平进行定量。简而言之,细胞用饱和浓度的未标记的抗HER2小鼠单克隆抗体(R&D systems)或纯化的小鼠IgG2b同种型对照(R&D systems)染色。洗涤后,试剂盒中的染色细胞和校准珠同时用试剂盒中的相同FITC缀合的山羊抗小鼠IgG二抗进行标记。在流式细胞仪上分析标记的细胞和校准珠。使用来自校准珠的MFI值进行线性回归。从该回归线外推ABC(抗体结合能力),并且通过用抗HER2抗体的ABC减去同种型对照抗体的ABC来确定sABC(特异性ABC)。

[0422] 所得结果如表33所示。

[0423] [表33]

细胞系		HER2 sABC
NCI-N87	ATCC, CRL-5822	1,755,033
Calu-3	ATCC, HTB-55	734,348
HCC1954	ATCC, CRL-2338	497,805
JIMT1	DSMZ, ACC 589	93,113
ZR-75-1	ATCC, CRL-1500	25,360
A431	ATCC, CRL-1555	13,130
MCF-7	ATCC, HTB-22	8,525
MDA-MB231	ATCC, HTB-26	3,841
BxPC-3	ATCC, CRL-1687	2,013

[0425] 如表33所示,测定了9个癌细胞系的sABC。

[0426] 6.5. HER2 sABC与4-1BB诱导的NF- $\kappa$ B信号传导之间的相关性

[0427] 将实施例6.4中测量的HER2水平标准化为HCC1954表达的HER2水平。在实施例6.2的4-1BB NF- $\kappa$ B萤光素酶报告基因测定中,双特异性抗体的4-1BB活化水平被确定为与对照相比的最大倍数变化水平。共有区域表示线性拟合的置信区间。

[0428] 得到的结果如图7所示。如图7所示,抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体活化4-1BB显示出与HER2细胞表面表达的强相关性。

[0429] 实施例7. T细胞免疫应答

[0430] 7.1. 对细胞因子释放的影响

[0431] 为了测试双特异性抗体刺激人外周血单核细胞(PBMC)反应的能力,测量了上清液中IFN- $\gamma$ 的浓度。在待测试的抗人CD3抗体(BioLegend, 5 $\mu$ g/mL)和双特异性抗体(实施例3; 3 $\mu$ g/mL, 4倍稀释)的存在下,将人PBMC与表达HER2的HCC1954癌细胞共培养。在具有5%CO<sub>2</sub>的湿润室中于37 $^{\circ}$ C培养72小时后,通过人IFN- $\gamma$  Quantikine试剂盒(R&D system, SIF50)测量上清液中IFN- $\gamma$ 的浓度。

[0432] 获得的结果如图8a-8d所示。如图8a-8d所示,在HER2高表达细胞存在下,所有测试的双特异性抗体比每种单克隆抗体的组合诱导更多的细胞因子释放。

[0433] 7.2. 对靶细胞生长的影响

[0434] 为了测试双特异性抗体刺激人PBMC反应的能力,使用了靶细胞裂解测定。在待测试的抗人CD3抗体(BioLegend, 5 $\mu$ g/mL)和双特异性抗体(实施例3; 3 $\mu$ g/mL, 4倍稀释)的存在下,将人PBMC与表达HER2的HCC1954癌细胞共培养。在具有5%CO<sub>2</sub>的湿润室中于37 $^{\circ}$ C培养72小时后,通过细胞计数试剂盒8(Dojindo, CK04-20)测量HCC1954的存活率。

[0435] 获得的结果如图9a-9d所示。如图9a-9d所示,与存在HER2高表达细胞的每种单特异性抗体的组合相比,所有测试的双特异性抗体都显示出优越的癌细胞死亡活性。

[0436] 实施例8. 携带HCC1954的hPBMC移植小鼠中的体内抗肿瘤功效

[0437] 8.1. 抗肿瘤活性

[0438] 为了测试抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的体内抗肿瘤功效,使用了PBMC人源化NSG小鼠。将7周龄NSG小鼠(The Jackson Laboratory)静脉注射 $1 \times 10^7$ 个人PBMC,并将HCC1954癌细胞(在PBS:Matrigel=1:1溶液中的 $1 \times 10^7$ 个细胞/小鼠)接种到小鼠的右肋腹。

在肿瘤植入后第2天,将携带HCC1954的人源化小鼠分配到每个测试组(n=12/组)。每周两次以10mg/kg或7.5mg/kg的剂量对小鼠静脉内施用人IgG1对照抗体、抗4-1BB抗体或抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体,持续4周。每周注射两次抗体,并用数显卡尺测量肿瘤大小。

[0439] 得到的结果如图10所示。如图10所示,所有测试的双特异性抗体均显示出优于基准抗4-1BB抗体(乌瑞芦单抗,BMS)以及对照抗体的抗肿瘤活性。

[0440] 8.2肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的分析

[0441] 为了评估TIL,用抗hCD45抗体(人白细胞标志物,Cell Signaling Technology)、抗hCD4抗体(人类辅助T淋巴细胞标志物,Cell Signaling Technology)、抗hCD8抗体(人类细胞毒性T淋巴细胞标志物,Cell Signaling Technology)和抗hCD16抗体(人类自然杀伤细胞标志物,Cell Signaling Technology)对来自携带HCC1954的hPBMC移植小鼠的福尔马林固定石蜡包埋的肿瘤组织切片进行免疫染色。通过应用抗生物素蛋白-生物素检测试剂盒(Vector Laboratories)进行免疫组织化学技术,以测量每个标志物阳性细胞。简而言之,将福尔马林固定石蜡包埋的肿瘤组织切片脱蜡并再水化。通过将切片置于EDTA缓冲液(pH 9.0)中进行再水化组织切片的抗原修复。用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤并用封闭溶液温育30分钟后,将切片与一抗在4°C下温育过夜。Vectastain Elite ABC试剂盒(Vector Lab)和制造商提供的方案用于免疫染色。然后用苏木精复染切片,使用分级醇和二甲苯脱水,并用Permount固定。

[0442] 得到的结果如图11所示。如图11所示,与BMUR(乌瑞芦单抗)相比,Her2x41-BB双特异性抗体有效增强了包括CD45+细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞和NK细胞在内的免疫细胞向肿瘤组织的浸润。

[0443] 实施例9. 4-1BB敲入小鼠中的体内抗肿瘤功效

[0444] 9.1. 抗肿瘤活性

[0445] 在人HER2/MC38荷瘤4-1BB敲入小鼠(BiocytoGen)中评估了抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的体内抗肿瘤功效。在肿瘤植入后第4天,根据肿瘤体积(约80mm<sup>3</sup>),将荷瘤人源化小鼠随机分配到每个测试组(n=5/组)。人IgG1抗体、曲妥珠单抗(抗HER2抗体)和抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体(HER2(WT)x1A10 M12、HER2(NA)x1A10 M12)以10mg/kg或7.5mg/kg的剂量每周两次经腹膜内施用于小鼠,持续4周。用数显卡尺测量肿瘤大小。

[0446] 得到的结果如图12所示。如图12所示,与曲妥珠单抗相比,抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体在人HER2/MC38肿瘤中显示出优越的抗肿瘤功效。尤其是所有用HER2(WT)x1A10 M12治疗的小鼠的肿瘤均已治愈。

[0447] 9.2. 对肿瘤特异性记忆T细胞的效果的评价

[0448] 在肿瘤注射后63天,用人HER2/MC38肿瘤细胞(BiocytoGen)和B16 F10肿瘤细胞(ATCC)再次攻击HER2(WT)x1A10 M12治愈的小鼠。在再次攻击研究期间,未给小鼠施用任何药物。用数显卡尺测量肿瘤大小。

[0449] 得到的结果如图13所示。如图13所示,未观察到人HER2/MC38肿瘤发展,而B16 F10肿瘤则在HER2(WT)x1A10 M12治疗治愈的小鼠中生长。

[0450] 实施例10. 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性(NA骨架对比WT)

[0451] 10.1. NK细胞介导的ADCC

[0452] 在本实施例中,使用人外周血来源的CD56+NK细胞作为效应细胞,使用CellTrace

Violet (Thermo Fisher Scientific) 标记的表达HER2的HCC1954细胞作为靶细胞。在37°C下,以5:1的效应物靶标比将细胞与50nM抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体(实施例3)共培养。4小时后,用死活细胞鉴定染料(Fixable Viability Dye) (eBioscience™)对细胞进行染色,然后通过流式细胞术分析死亡靶细胞的比例。

[0453] 得到的结果如下图14所示。如图14所示,抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体的IgG1型(WT)显示出由NK细胞介导的显著ADCC效应。

[0454] 10.2.4-1BB信号活化依赖于Fc  $\gamma$  RIIb参与

[0455] 在本实施例中,将表达Fc  $\gamma$  RIIb (Promega)的CHO-K1细胞铺在96孔测定板中并培养过夜。在测定当天,将Jurkat/4-1BB细胞(Promega)铺在96孔板中。在表达Fc  $\gamma$  RIIb (Promega)的CHO-K1细胞存在(依赖于Fc  $\gamma$  RIIb)或不存在(不依赖于Fc  $\gamma$  RIIb)的情况下,用一定滴度的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体温育细胞。诱导6小时后,添加Bio-Glo™荧光素酶检测试剂并使用SpectraMax L光度计(Molecular Devices)测定发光。用GraphPad Prism®软件进行四参数逻辑曲线分析。

[0456] 所得结果示于下表34 (Fc  $\gamma$  RIIb依赖性4-1BB生物测定)和表35 (Fc  $\gamma$  RIIb非依赖性4-1BB生物测定)以及图15a (Fc  $\gamma$  RIIb依赖性4-1BB生物测定)和图15b (Fc  $\gamma$  RIIb非依赖性4-1BB生物测定)中。

[0457] [表34]

Fc $\gamma$ RIIb 依赖性 4-1BB 生物测定		
	诱导倍数(RLU)	EC <sub>50</sub> (nM)
乌瑞芦单抗	195.5	0.2364
[0458] HER2(WT)X1A10 M12	< 2	不适用
HER2(NA)X1A10 M12	< 2	不适用
HER2(WT)X1A12 M1	< 2	不适用
HER2(NA)X1A12 M1	< 2	不适用

[0459] [表35]

Fc $\gamma$ RIIb 非依赖性 4-1BB 生物测定		
	诱导倍数(RLU)	EC <sub>50</sub> (nM)
乌瑞芦单抗	15.57	0.5196
[0460] HER2(WT)X1A10 M12	< 2	不适用
HER2(NA)X1A10 M12	< 2	不适用
HER2(WT)X1A12 M1	< 2	不适用
HER2(NA)X1A12 M1	< 2	不适用

[0461] 如表34和表35以及图15a和图15b所示,根据Fc  $\gamma$  RIIb CHO-K1细胞的存在,乌瑞芦单抗治疗组显示出顶部RLU的13.5倍的差异和EC<sub>50</sub>的2.3倍差异。与乌瑞芦单抗相比,无论是否存在Fc  $\gamma$  RIIb CHO-K1细胞,四种抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体显示出非常低的RLU。这些数据表明,与临床研究(NCT00309023、NCT00612664、NCT014712210)中具有重度毒性的乌瑞芦单抗相比,所有测试的抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体都具有潜在的益处。

[0462] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利,均以相同的程度通过引

用并入本文,其程度就好像每个参考文献单独且具体地指示通过引用并入并在本文中全文阐述一样。

[0463] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中(特别在后文权利要求上下文中)所使用的术语“一个/一种(a/an)”、“所述(the)”和“至少一个”、“一种或多种”以及类似的指代词应解释为涵盖单数和复数两者。除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则在一个或多个项目的清单之前所使用的术语“至少一个”(或“一种或多种”) (例如,“A和B中的至少一个”)应解释为意指选自所列项目的一个项目(A和B)或者两个或更多个所列项目的任意组合(A和B)。除非另有说明,否则术语“包括”、“具有”、“包含”和“含有”将被解释为开放式术语(即,意思是“包括但不限于”)。除非本文另外指出,否则本文中对数值范围的叙述仅仅旨在用作单独指代落入范围内的各独立数值的一种速记方法,并且各独立数值包含在说明书内,如同其在本文中单独叙述一样。除非本文另有说明或另与上下文明显矛盾,否则可以任意合适的顺序进行本文所述的所有方法。除非另外要求保护,否则本文所提供的任意和所有实施例或者示例性语言(例如,“例如”)的使用仅仅旨在更好地说明本发明而不提出对本发明范围的限制。说明书中任何语言均不应解释为将任何未要求保护的要素表示对实施本发明是必要的。

[0464] 本文描述了本发明的优选实施方式,包括本发明人已知的进行本发明的最佳方式。通过阅读前述说明书,那些优选的实施方式的变体对于本领域技术人员来说会变得明显。本发明人预期本领域技术人员适当使用这些变体,并且本发明人意图使本发明以并不限于本文具体描述的另外方式实施。因此,本发明包括本文所附权利要求中所述的主题的所有修改和等同方案,如适用的法律所允许的。此外,除非本文另有说明或另与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖上述要素以其所有可能的变体的任意组合。

- <110> ABL生物公司  
柳韩洋行
- <120> 抗HER2/抗4-1BB双特异性抗体及其用途
- <130> OPP20202723KR
- <150> 62/878,951  
<151> 2019-07-26
- <150> 63/024,608  
<151> 2020-05-14
- <160> 89
- <170> koPatentIn 3.0
- <210> 1  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0001]
- <220>  
<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-CDR1
- <400> 1  
Ser Tyr Asp Met Ser  
1 5
- <210> 2  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>  
<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-CDR1
- <400> 2  
Gly Tyr Asp Met Ser  
1 5

<210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
 <220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-CDR1

<400> 3  
 Ser Tyr Trp Met His  
 1 5

<210> 4  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
 <220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-CDR2

[0002]

<400> 4  
 Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 5  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
 <220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-CDR2

<400> 5  
 Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-CDR2

<400> 6  
 Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Ser

[0003]

<210> 7  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-CDR3

<400> 7  
 Asp Gly Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-CDR3

<400> 8  
 Asp Ala Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr

	1	5	10
	<210>	9	
	<211>	12	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	合成的_抗4-1BB抗体的H-CDR3	
	<400>	9	
		Asp Ala Gln Arg Gln Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr	
		1	5 10
	<210>	10	
	<211>	18	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0004]	<220>		
	<223>	合成的_抗4-1BB抗体的H-CDR3	
	<400>	10	
		His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser Ser Ala Tyr Gly Met	
		1	5 10 15
		Asp Gly	
	<210>	11	
	<211>	10	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	合成的_抗4-1BB抗体的H-CDR3	
	<400>	11	
		Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr	

	1	5	10
	<210>	12	
	<211>	13	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	合成的_抗4-1BB抗体的L-CDR1	
	<400>	12	
		Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr	
		1	5 10
	<210>	13	
	<211>	11	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0005]	<220>		
	<223>	合成的_抗4-1BB抗体的L-CDR1	
	<400>	13	
		Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr Leu His	
		1	5 10
	<210>	14	
	<211>	7	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	合成的_抗4-1BB抗体的L-CDR2	
	<400>	14	
		Ala Asp Ser His Arg Pro Ser	
		1	5

<210> 15  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-CDR2

<400> 15  
Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
1 5

<210> 16  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-CDR3

[0006]

<400> 16  
Ala Thr Trp Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val  
1 5 10

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-CDR3

<400> 17  
Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro Thr  
1 5

<210> 18  
<211> 121  
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链可变区  
(1A10)

<400> 18

Glu Val Gln Leu Leu 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

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

Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

[0007]

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

Ala Arg Asp Gly Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 19

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链可变区  
(1A10 M4, 1A10 M12)

<400> 19

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu
20	25	30	
Ser	Cys	Ala	Ala
35	40	45	
Asp	Met	Ser	Trp
50	55	60	
Ser	Trp	Ile	Ser
65	70	75	80
Lys	Gly	Arg	Phe
85	90	95	
Leu	Gln	Met	Asn
100	105	110	
Ala	Arg	Asp	Ala
115	120		
Gln	Gly	Thr	Leu
Val	Thr	Val	Ser
Ser	Ser		

[0008]

<210> 20  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链可变区  
 (1A10 M11, 1A10 M13)

<400> 20  
 Glu Val Gln Leu Leu 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  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50                    55                    60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65                    70                    75                    80

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

Ala Arg Asp Ala Gln Arg Gln Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly  
                  100                    105                    110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                  115                    120

<210> 21  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链可变区  
[0009]                    (1A12)

<400> 21  
Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Tyr  
                  20                    25                    30

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

Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                  50                    55                    60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65                    70                    75                    80

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

Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser Ser Ala Tyr

	100	105	110
	Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	125
	<210> 22		
	<211> 127		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> 合成的_抗4-1BB抗体的重链可变区 (1A12M1)		
	<400> 22		
[0010]	Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Tyr		
	20 25 30		
	Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
	Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85 90 95		
	Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser Ser Ala Tyr		
	100 105 110		
	Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115 120 125		

<210> 23  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链可变区  
 (AB41)

<400> 23  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ile Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

[0011]

Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 24  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链可变区  
 (突变的1A10)

&lt;400&gt; 24

Glu Val Gln Leu Leu 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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gly Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

[0012]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链可变区  
 (突变的1A10 M4, 1A10 M12)

&lt;400&gt; 25

Glu Val Gln Leu Leu 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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ala Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链可变区  
(突变的1A10 M11, 1A10 M13)

<400> 26

Glu Val Gln Leu Leu 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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

[0013]

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

Ala Arg Asp Ala Gln Arg Gln Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 27  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链可变区  
(突变的1A12)

[0014] <400> 27  
Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Tyr  
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser Ser Ala Tyr  
100 105 110

Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 28  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链可变区  
 (突变的1A12M1)

<400> 28  
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Tyr  
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

[0015] Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser Ser Ala Tyr  
 100 105 110

Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 29  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链可变区  
(突变的AB41)

<400> 29

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

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

[0016] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 30

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的轻链可变区  
(1A10, 1A10 M4, 1A10 M11, 1A12)

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的轻链可变区  
(1A10 M12, 1A10 M13, 1A12M1)

[0017]

<400> 31  
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 32  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的轻链可变区  
(AB41)

<400> 32  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

[0018] Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr  
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 33  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的轻链可变区  
(突变的1A10, 1A10 M4, 1A10 M11, 1A12)

&lt;400&gt; 33

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

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

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

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

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

[0019] Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Tyr Ser Leu  
85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的轻链可变区  
(突变的1A10 M12, 1A10 M13, 1A12M1)

&lt;400&gt; 34

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

<210> 35  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0020] <220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-FR1

<400> 35  
 Glu Val Gln Leu Leu 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  
 20 25 30

<210> 36  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-FR1

<400> 36  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ile Lys Pro Gly Ala

1            5            10            15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser  
           20            25            30

<210> 37  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-FR2

<400> 37  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
   1            5            10

[0021]

<210> 38  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-FR2

<400> 38  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
   1            5            10

<210> 39  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-FR2

<400> 39  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser

1            5            10

<210> 40  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-FR2

<400> 40  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly  
 1            5            10

<210> 41  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0022]

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-FR3

<400> 41  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1            5            10            15

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

<210> 42  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-FR3

<400> 42  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
 20 25 30

<210> 43  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-FR3

<400> 43  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

[0023]

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

<210> 44  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-FR3

<400> 44  
 Arg Ala Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu  
 1 5 10 15

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

<210> 45  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的H-FR4

<400> 45  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 46  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-FR1

[0024]

<400> 46  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys  
 20

<210> 47  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-FR1

<400> 47  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1            5            10            15

Arg Val Thr Ile Ser Cys  
20

<210> 48  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-FR1

<400> 48  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1            5            10            15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys  
20

[0025]

<210> 49  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-FR2

<400> 49  
Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1            5            10            15

<210> 50  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-FR2

<400> 50  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys  
 1 5 10 15

<210> 51  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-FR3

<400> 51  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

[0026]

<210> 52  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-FR3

<400> 52  
 Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 53

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-FR4

<400> 53  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 1 5 10

<210> 54  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-FR4

[0027] <400> 54  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 55  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的L-FR4

<400> 55  
 Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 1 5 10

<210> 56  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的\_抗4-1BB抗体的重链

&lt;400&gt; 56

Glu Val Gln Leu Leu 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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0028] 85 90 95

Ala Arg Asp Gly Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr 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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly  
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser  
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro  
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
305 310 315 320

[0029] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr  
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 57  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链

<400> 57  
 Glu Val Gln Leu Leu 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

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

Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

[0030]

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Asp Ala Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr 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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His  
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly  
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser  
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro  
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
275 280 285

[0031] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr  
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 58  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链

<400> 58  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

[0032]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Ala Gln Arg Gln Ser Met Arg Glu Phe Asp Tyr 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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His			
195	200	205	
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly			
210	215	220	
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
245	250	255	
[0033]			
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro			
260	265	270	
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr			
325	330	335	
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
340	345	350	
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
355	360	365	
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			

370                    375                    380  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385                    390                    395                    400  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser  
                   405                    410                    415  
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
                   420                    425                    430  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
                   435                    440                    445

<210> 59  
 <211> 454  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0034]

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链

<400> 59  
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Tyr  
                   20                    25                    30  
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45  
 Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                    55                    60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
                   65                    70                    75                    80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95

Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser Ser Ala Tyr  
100 105 110

Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
115 120 125

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser  
130 135 140

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
145 150 155 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
165 170 175

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
180 185 190

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr  
195 200 205

[0035] Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg  
210 215 220

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
225 230 235 240

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
260 265 270

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
325 330 335

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg  
 405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 435 440 445

[0036] Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 450

<210> 60  
 <211> 454  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链

<400> 60  
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Gly Tyr  
 20 25 30

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

Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val



290                    295                    300  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 305                    310                    315                    320  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
                   325                    330                    335  
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
                   340                    345                    350  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn  
                   355                    360                    365  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
                   370                    375                    380  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 385                    390                    395                    400  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg  
                   405                    410                    415  
 [0038] Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
                   420                    425                    430  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
                   435                    440                    445  
 Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
                   450  
  
 <210> 61  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
 <220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的重链  
  
  
 <400> 61  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ile Lys Pro Gly Ala  
   1            5                    10                    15

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala 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

[0039] Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160

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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
355 360 365

[0040] Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
370 375 380

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

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

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

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

<210> 62

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的\_抗4-1BB抗体的轻链

&lt;400&gt; 62

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Arg

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Tyr Ser Leu

85 90 95

[0041]

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

115 120 125

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

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys

145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195 200 205

Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser

210                    215

<210> 63  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的轻链

<400> 63  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
 1            5            10            15

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

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

[0042] Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50            55            60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser  
 210 215

<210> 64  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的轻链

[0043] <400> 64  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro  
 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> 65

<211> 5

<212> PRT

[0044] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的\_抗HER2抗体的H-CDR1

<400> 65

Asp Thr Tyr Ile His

1                    5

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的\_抗HER2抗体的H-CDR2

<400> 66

Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 67  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗HER2抗体的H-CDR3

<400> 67  
 Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

[0045]

<210> 68  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗HER2抗体的L-CDR

<400> 68  
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

<210> 69  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗HER2抗体的L-CDR2

<400> 69  
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser  
 1 5

<210> 70  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗HER2抗体的L-CDR3

<400> 70  
 Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 71  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗HER2抗体的重链可变区

[0046]

<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 Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100                    105                    110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
115

<210> 72  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_抗HER2抗体的轻链可变区

<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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala  
20                    25                    30

[0047] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35                    40                    45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50                    55                    60

Ser Arg 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 Thr Thr Pro Pro  
85                    90                    95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100                    105

<210> 73  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_抗HER2抗体的重链

<400> 73  
 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 Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220

[0048]

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225                    230                    235                    240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
                   245                    250                    255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
                   260                    265                    270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
                   275                    280                    285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
                   290                    295                    300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305                    310                    315                    320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
                   325                    330                    335

[0049] Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
                   340                    345                    350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
                   355                    360                    365

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

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

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

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

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

Gly Lys  
 450

<210> 74  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗HER2抗体(N297A)的重链

<400> 74  
 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 Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 [0050] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

	180	185	190
	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
	195	200	205
	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
	210	215	220
	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
	225	230	235 240
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
	245	250	255
	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
	260	265	270
	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
	275	280	285
	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg		
	290	295	300
[0051]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
	305	310	315 320
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
	325	330	335
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
	340	345	350
	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
	355	360	365
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
	370	375	380
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
	385	390	395 400
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
	405	410	415
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		

	420	425	430
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	435	440	445
	Gly Lys		
	450		
	<210>	75	
	<211>	214	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>		
	<223>	合成的_抗HER2抗体的轻链	
	<400>	75	
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
	1	5	10 15
[0052]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg 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 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
	Ser Arg 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 Thr Thr Pro Pro		
	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> 76

<211> 716

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0053] <220>

<223> 合成的\_双特异性抗体的重链 (HER2(NA)x1A10)

<400> 76

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 Asn Ile Lys Asp Thr  
                   20                    25                    30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205

[0054] Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365

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

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

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

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

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

[0055] Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 450 455 460

Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly  
 465 470 475 480

Arg Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn  
 485 490 495

Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu  
 500 505 510

Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 515 520 525

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu  
 530 535 540

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Tyr Ser  
 545 550 555 560

Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 565 570 575

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
580 585 590

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
595 600 605

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
610 615 620

Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu  
625 630 635 640

Glu Trp Val Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala  
645 650 655

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
660 665 670

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
675 680 685

[0056] Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Arg Asn Ser Met Arg Glu Phe Asp  
690 695 700

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
705 710 715

<210> 77  
<211> 719  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_双特异性抗体的重链 (HER2 (NA)x1A10  
GSLH)

<400> 77  
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 Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140

[0057] Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

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

[0058] Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

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

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

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

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

Gly Ser Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly  
465 470 475 480

Thr Pro Gly Arg Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn  
485 490 495

Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala  
500 505 510

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro  
515 520 525

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile  
530 535 540

Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp  
545 550 555 560

Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr  
565 570 575

Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
580 585 590

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly  
595 600 605

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
610 615 620

[0059] Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
625 630 635 640

Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile  
645 650 655

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
660 665 670

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
675 680 685

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gln Arg Asn Ser Met Arg  
690 695 700

Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
705 710 715

<210> 78  
<211> 719  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的\_双特异性抗体的重链 (HER2 (NA)x1A10 M4)

&lt;400&gt; 78

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 Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

[0060]

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210	215	220	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	325	330	335
[0061]			
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
	370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445
Gly Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser			

450	455	460			
Gly Ser Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly					
465	470	475	480		
Thr Pro Gly Arg Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn					
	485	490	495		
Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala					
	500	505	510		
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro					
	515	520	525		
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile					
	530	535	540		
Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp					
545	550	555	560		
Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr					
	565	570	575		
[0062]					
Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly					
	580	585	590		
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly					
	595	600	605		
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly					
	610	615	620		
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly					
625	630	635	640		
Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile					
	645	650	655		
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn					
	660	665	670		
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp					
	675	680	685		
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Gln Arg Asn Ser Met Arg					

690                      695                      700  
 Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 705                      710                      715  
  
 <210> 79  
 <211> 719  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
 <220>  
 <223> 合成的\_双特异性抗体的重链 (HER2 (NA)x1A10 M12)  
  
 <400> 79  
 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 Asn Ile Lys Asp Thr  
                     20                      25                      30  
  
 [0063] Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                     35                      40                      45  
  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
                     50                      55                      60  
  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
                     65                      70                      75                      80  
  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                     85                      90                      95  
  
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
                     100                      105                      110  
  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
                     115                      120                      125  
  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
                     130                      135                      140  
  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
                     145                      150                      155                      160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

[0064] Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly  
 465 470 475 480

Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn  
 485 490 495

Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala  
 500 505 510

[0065] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro  
 515 520 525

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile  
 530 535 540

Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp  
 545 550 555 560

Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr  
 565 570 575

Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 580 585 590

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly  
 595 600 605

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 610 615 620

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 625 630 635 640

Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile  
 645 650 655

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 660 665 670

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 675 680 685

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Gln Arg Asn Ser Met Arg  
 690 695 700

Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 705 710 715

<210> 80  
 <211> 722  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0066] <220>  
 <223> 合成的\_双特异性抗体的重链 (HER2 (NA)x1A12)

<400> 80  
 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 Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205

[0067] Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

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

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

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

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

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

[0068] Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
450 455 460

Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly  
465 470 475 480

Arg Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn  
485 490 495

Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu  
500 505 510

Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
515 520 525

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu  
530 535 540

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Tyr Ser  
545 550 555 560

Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
565 570 575

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
580 585 590

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
595 600 605

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
610 615 620

Ser Gly Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu  
625 630 635 640

Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala  
645 650 655

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
660 665 670

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ala Ala Val  
675 680 685

[0069] Tyr Tyr Cys Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr Lys Ser Ser  
690 695 700

Ser Ala Tyr Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
705 710 715 720

Ser Ser

<210> 81  
<211> 725  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_双特异性抗体的重链 (HER2 (NA)x1A12  
GSLH)

<400> 81  
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 Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

[0070] Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365

[0071] Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly  
 465 470 475 480

Thr Pro Gly Arg Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn  
 485 490 495

Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala  
500 505 510

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro  
515 520 525

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile  
530 535 540

Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp  
545 550 555 560

Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr  
565 570 575

Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
580 585 590

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly  
595 600 605

[0072] Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
610 615 620

Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
625 630 635 640

Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr  
645 650 655

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
660 665 670

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
675 680 685

Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr  
690 695 700

Lys Ser Ser Ser Ala Tyr Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
705 710 715 720

Val Thr Val Ser Ser  
725

<210> 82  
 <211> 725  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_双特异性抗体的重链 (HER2 (NA)x1A12 M1)

<400> 82  
 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 Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 [0073] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

	180	185	190
	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
	195	200	205
	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
	210	215	220
	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
	225	230	235 240
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
	245	250	255
	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
	260	265	270
	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
	275	280	285
	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg		
	290	295	300
[0074]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
	305	310	315 320
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
	325	330	335
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
	340	345	350
	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
	355	360	365
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
	370	375	380
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
	385	390	395 400
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
	405	410	415
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		

	420	425	430	
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445	
	Gly Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser			
	450	455	460	
	Gly Ser Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly			
	465	470	475	480
	Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn			
	485	490	495	
	Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala			
	500	505	510	
	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro			
	515	520	525	
	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile			
	530	535	540	
[0075]	Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp			
	545	550	555	560
	Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr			
	565	570	575	
	Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
	580	585	590	
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly			
	595	600	605	
	Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly			
	610	615	620	
	Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly			
	625	630	635	640
	Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr			
	645	650	655	
	Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn			

660                    665                    670  
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
       675                    680                    685  
  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr  
       690                    695                    700  
  
 Lys Ser Ser Ser Ala Tyr Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
       705                    710                    715                    720  
  
 Val Thr Val Ser Ser  
               725  
  
 <210> 83  
 <211> 719  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
 <220>  
 <223> 合成的\_双特异性抗体的重链 (HER2 (WT)x1A10 M12)  
 [0076]  
  
 <400> 83  
 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 Asn Ile Lys Asp Thr  
       20            25            30  
  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
       35            40            45  
  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
       50            55            60  
  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
       65            70            75            80  
  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
       85            90            95  
  
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
       100            105            110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220

[0077] Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

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

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

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

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

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

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

[0078] Gly Ser Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly  
465 470 475 480

Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn  
485 490 495

Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala  
500 505 510

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro  
515 520 525

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile  
530 535 540

Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp  
545 550 555 560

Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr  
565 570 575

Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
580 585 590

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly  
595 600 605

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
610 615 620

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
625 630 635 640

Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Trp Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Ile  
645 650 655

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
660 665 670

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
675 680 685

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Gln Arg Asn Ser Met Arg  
690 695 700

[0079] Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
705 710 715

<210> 84  
<211> 725  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成的\_双特异性抗体的重链 (HER2 (WT)x1A12)

<400> 84  
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 Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
145 150 155 160

[0080] Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

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

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

[0081] Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

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

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

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

Gly Ser Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly  
465 470 475 480

Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn  
485 490 495

Ile Gly Asn Asn Tyr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala  
500 505 510

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Asp Ser His Arg Pro Ser Gly Val Pro  
515 520 525

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile  
530 535 540

Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp  
545 550 555 560

Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr  
565 570 575

Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
580 585 590

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly  
595 600 605

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
610 615 620

Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
625 630 635 640

[0082] Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Pro Asp Asp Gly Asn Thr  
645 650 655

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
660 665 670

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
675 680 685

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Gly Gly Gln Lys Pro Thr Thr  
690 695 700

Lys Ser Ser Ser Ala Tyr Gly Met Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
705 710 715 720

Val Thr Val Ser Ser  
725

<210> 85  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的\_肽接头

<400> 85

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

<210> 86

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的\_肽接头

<400> 86

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

[0083] Gly Ser

<210> 87

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的\_肽接头

<400> 87

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

Gly Gly Gly Ser  
 20

<210> 88

<211> 108

<212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_抗4-1BB抗体的轻链可变区  
 (突变的AB41)

<400> 88  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

[0084] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro  
 85 90 95

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 89  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成的\_人4-1BB(NP\_001552.2)

<400> 89  
 Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu  
 1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

	20	25	30	
	Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys			
	35	40	45	
	Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile			
	50	55	60	
	Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser			
	65	70	75	80
	Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly			
		85	90	95
	Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu			
	100	105	110	
	Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln			
	115	120	125	
[0085]	Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys			
	130	135	140	
	Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro			
	145	150	155	160
	Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala			
	165	170	175	
	Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu			
	180	185	190	
	Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu			
	195	200	205	
	Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe			
	210	215	220	
	Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly			
	225	230	235	240
	Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu			
	245	250	255	

人 4-1BB

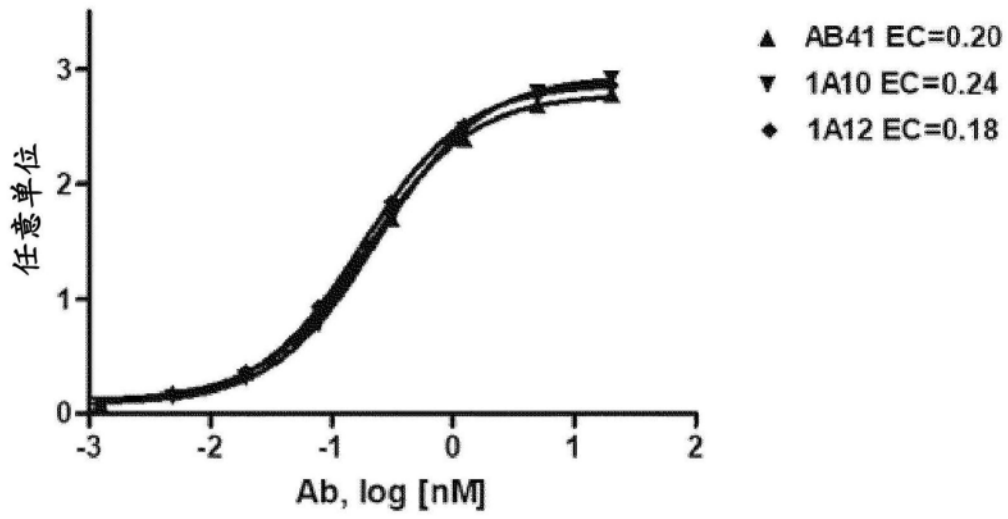


图1a

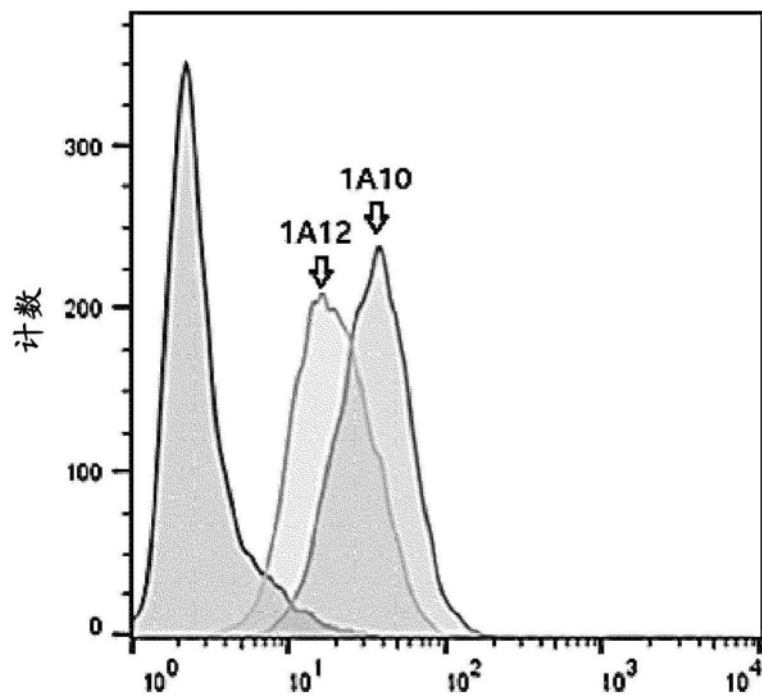


图1b

人 HER2

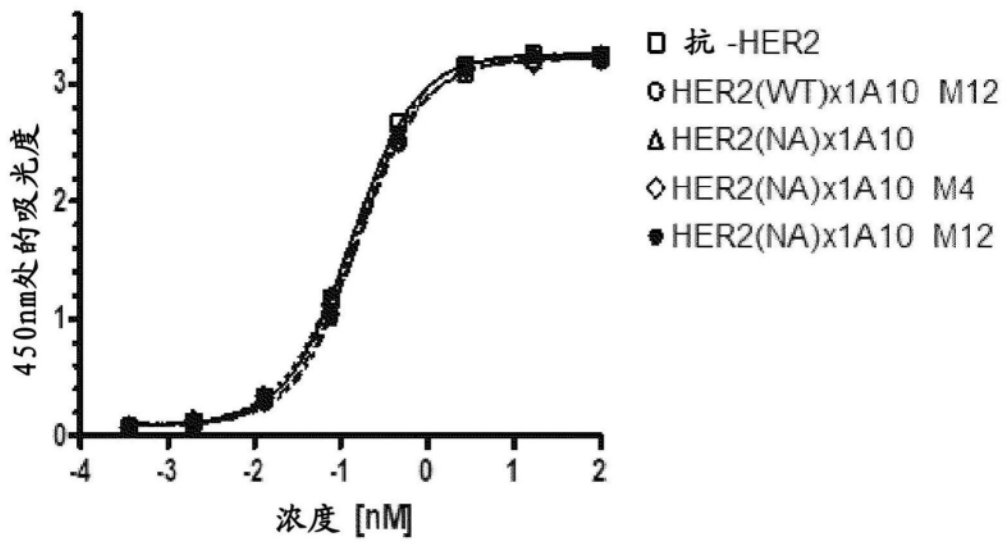


图2a

人 HER2

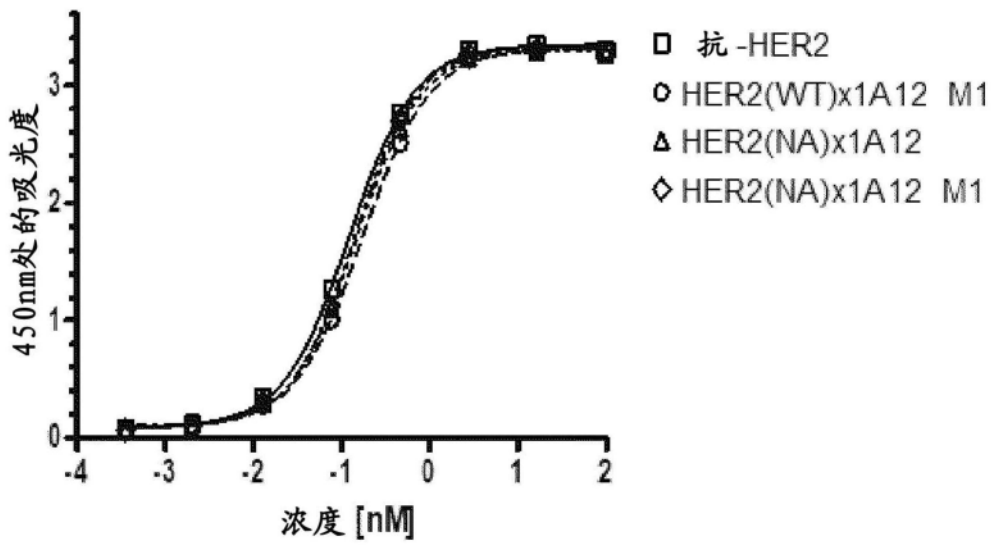


图2b

人 4-1BB

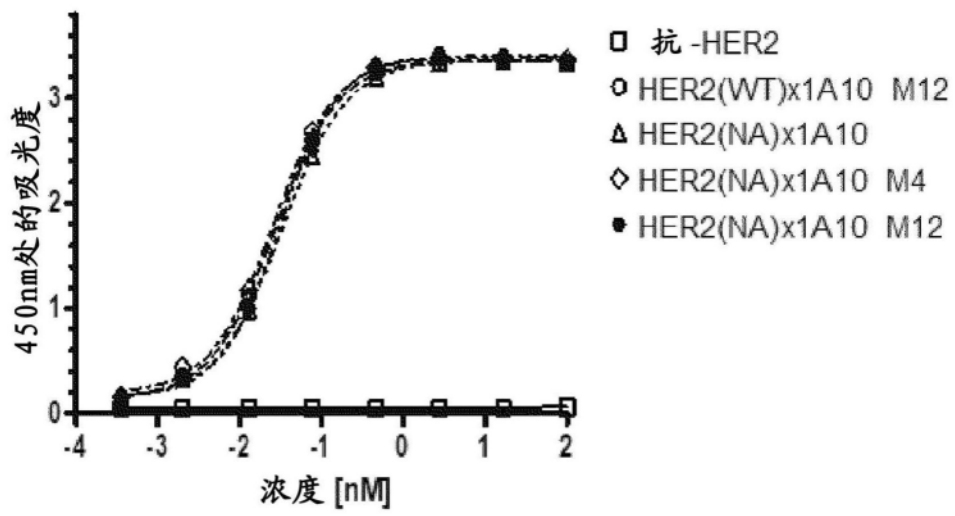


图3a

人 4-1BB

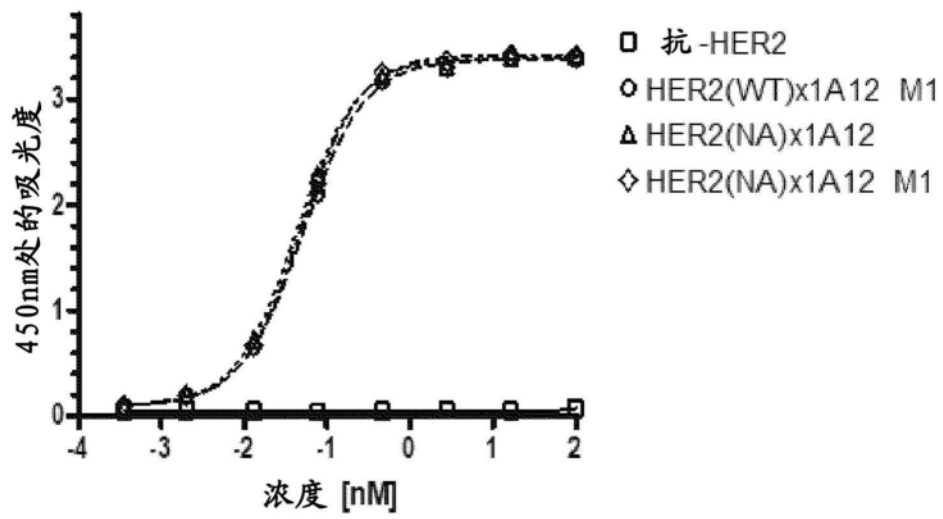


图3b

### NCI-N87 (HER2高表达细胞)

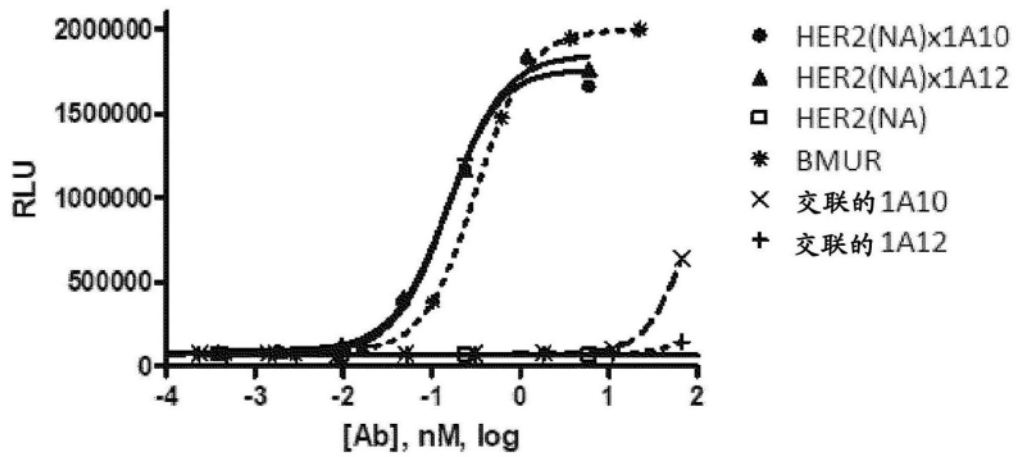


图4a

### MDA-MB231 (HER2阴性细胞)

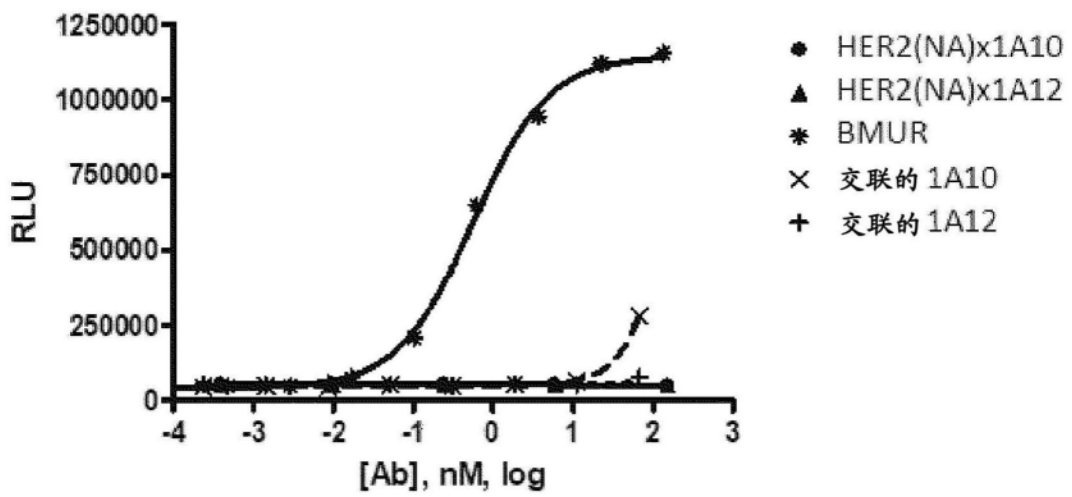


图4b

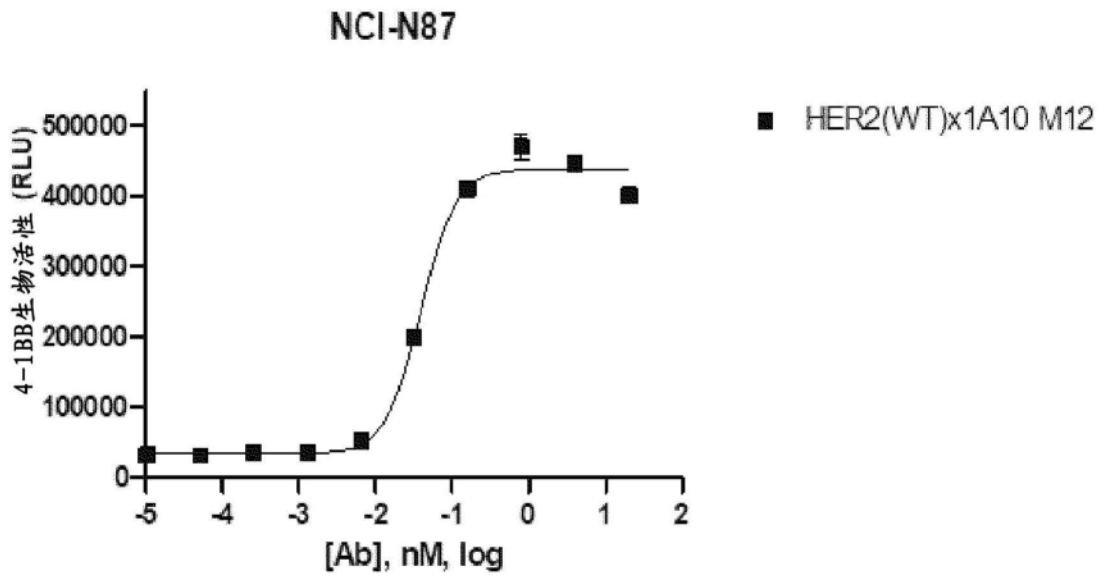


图5a

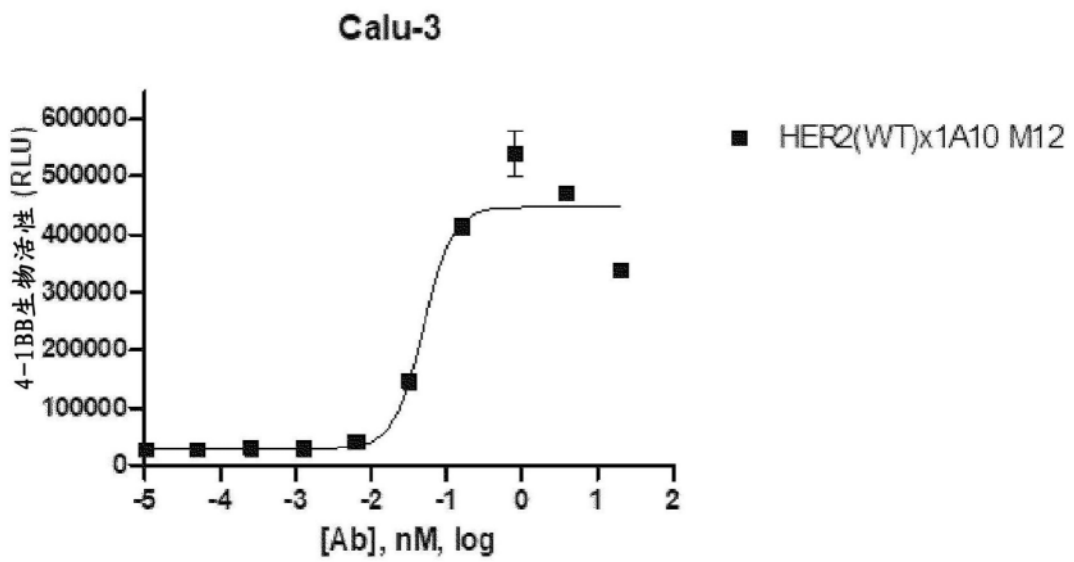


图5b

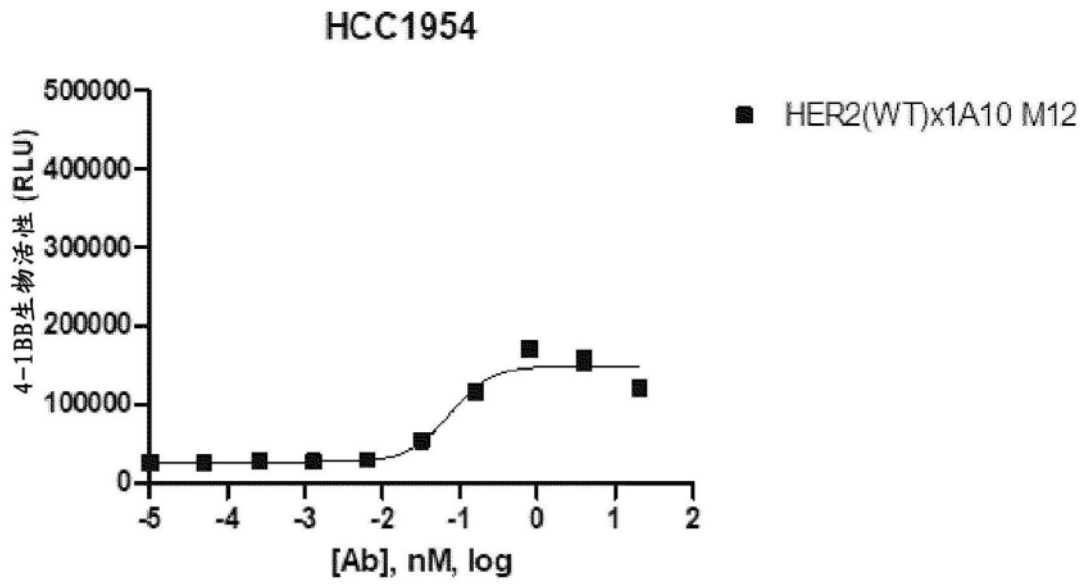


图5c

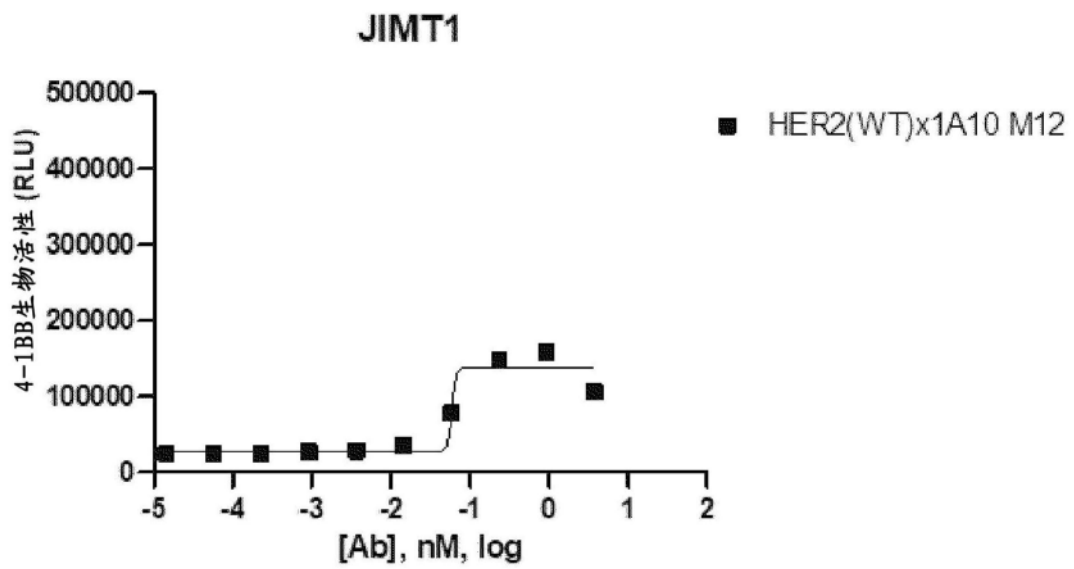


图5d

ZR-75-1

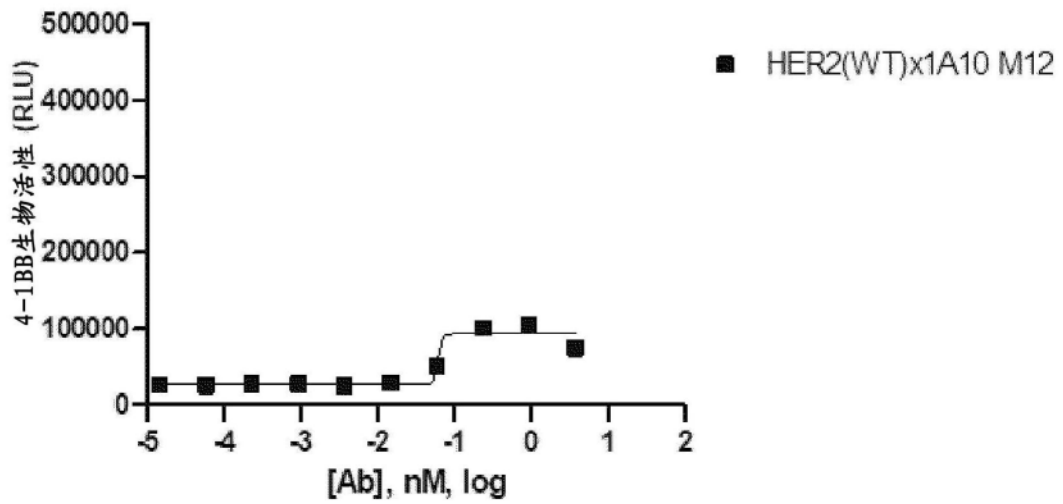


图5e

A431

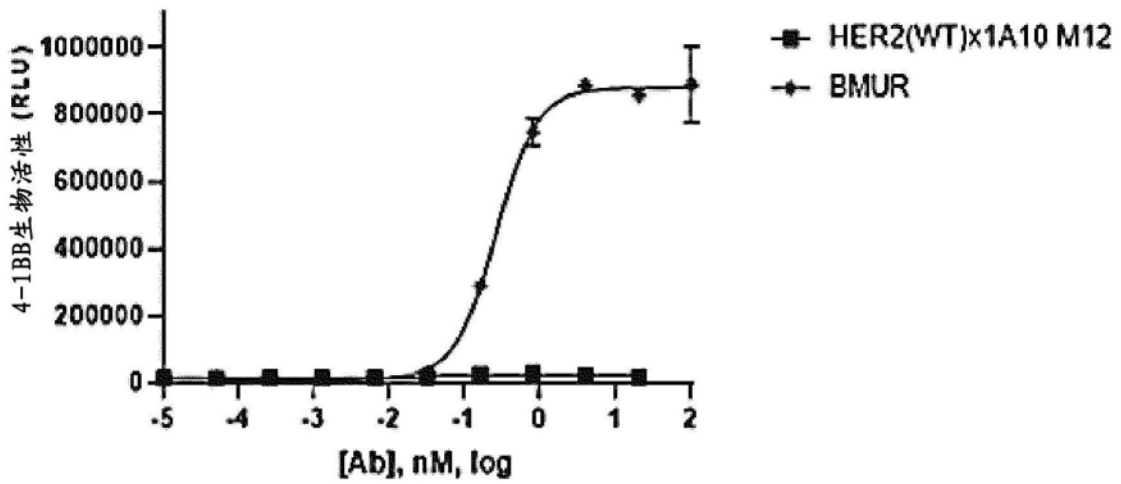


图5f

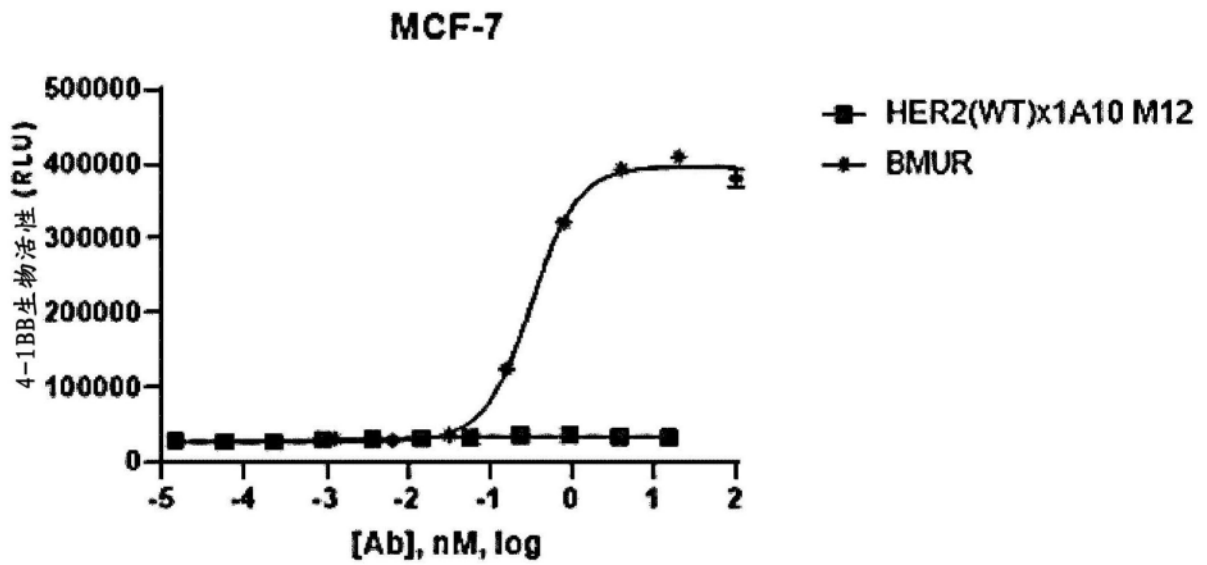


图5g

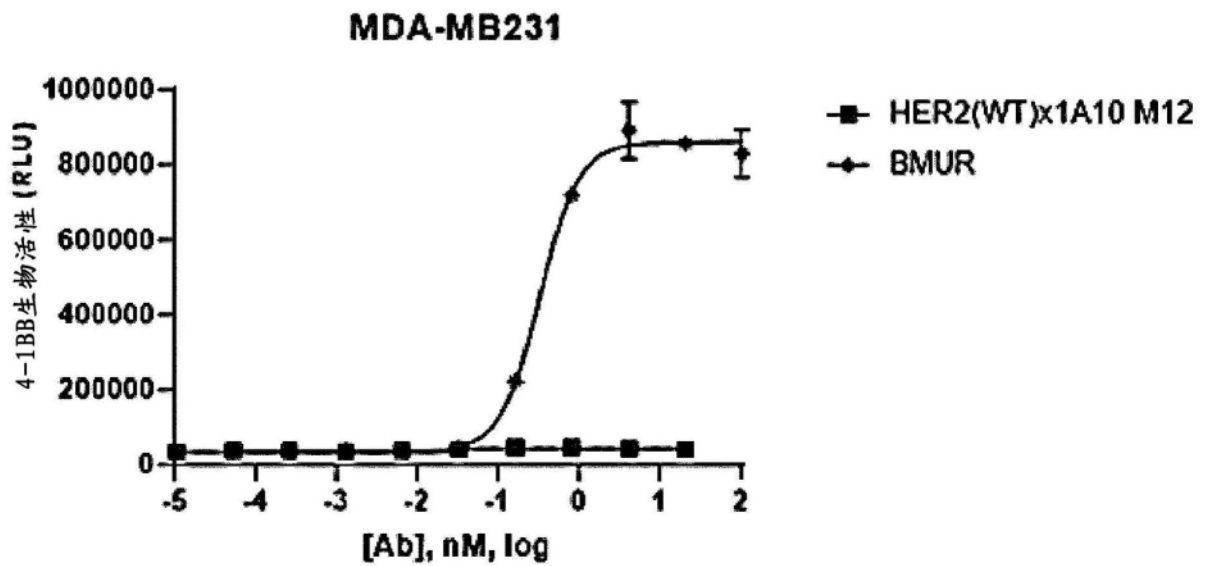


图5h

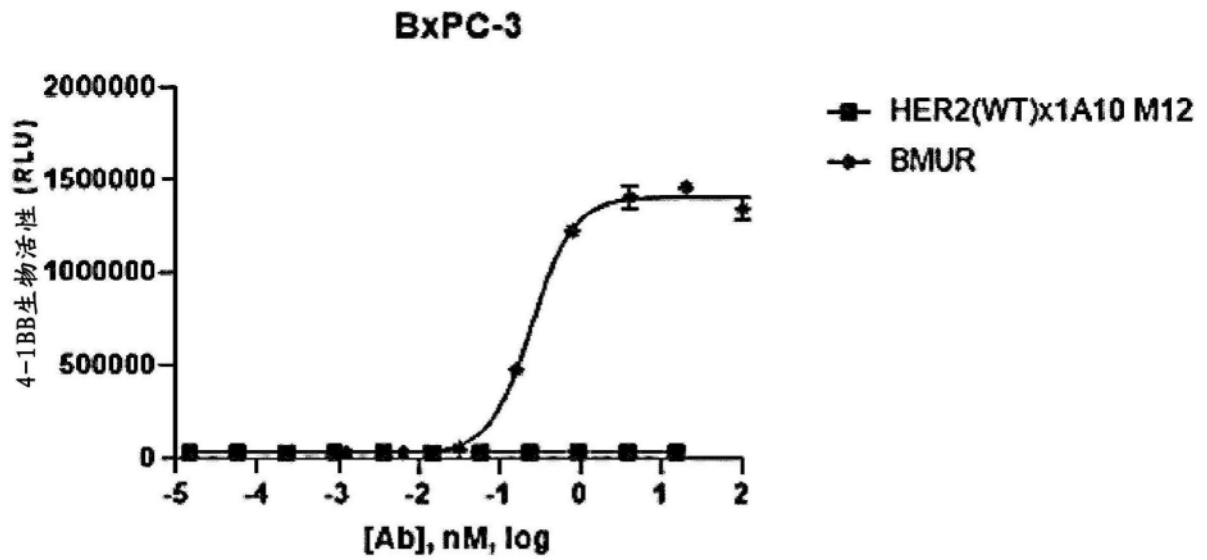


图5i

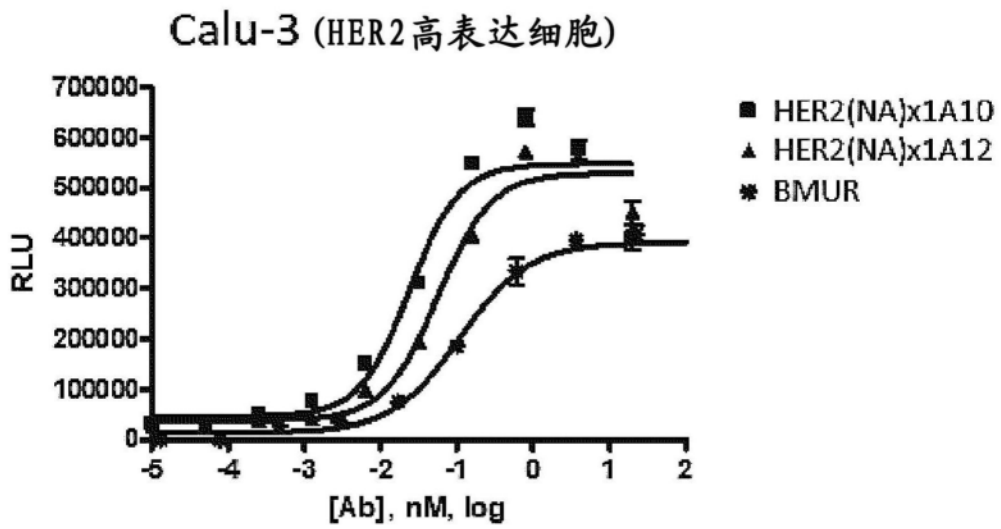


图6a

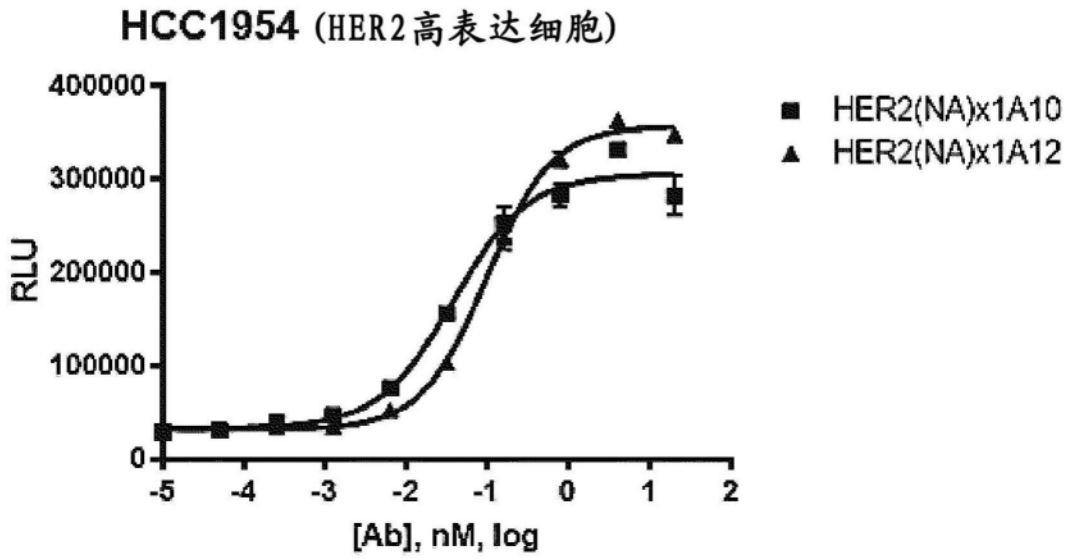


图6b

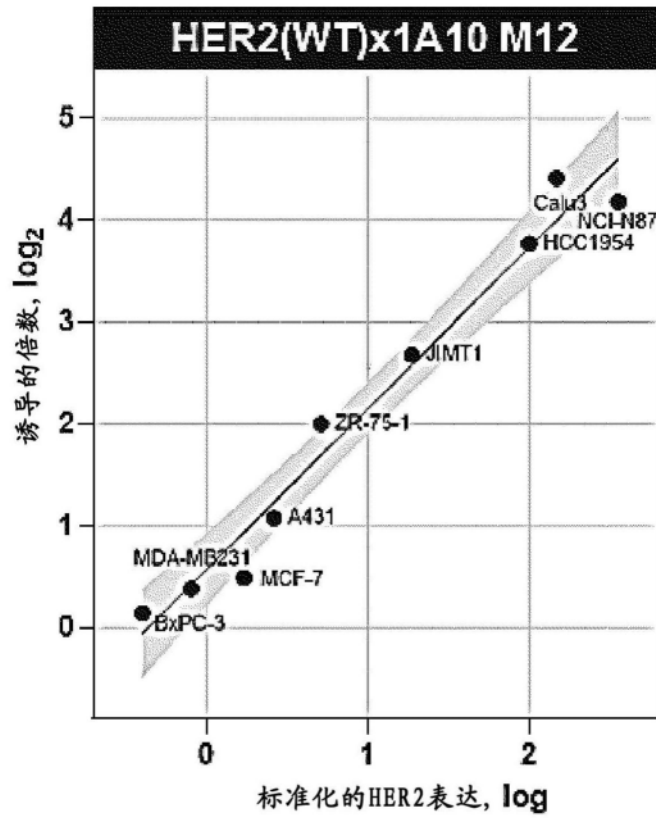


图7

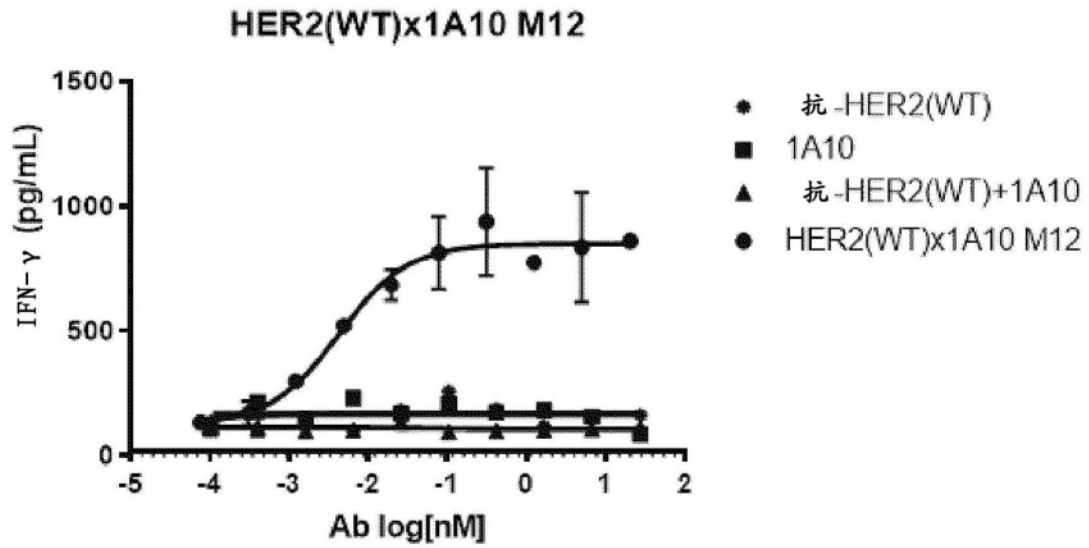


图8a

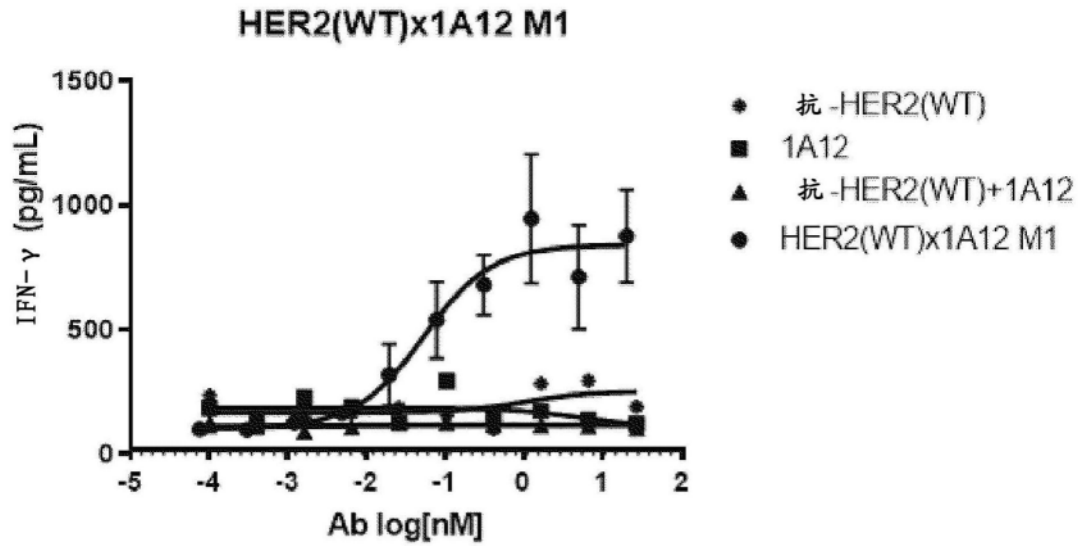


图8b

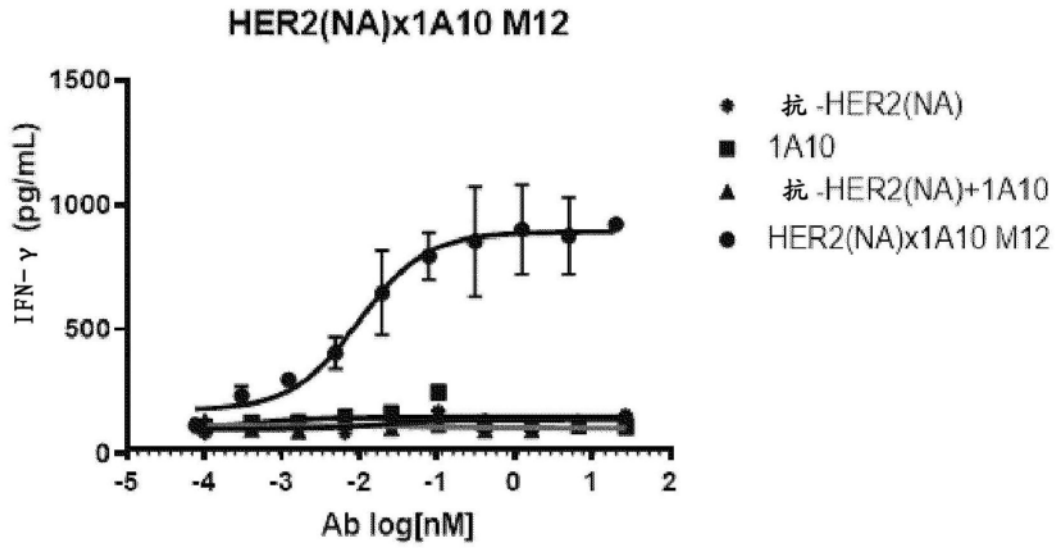


图8c

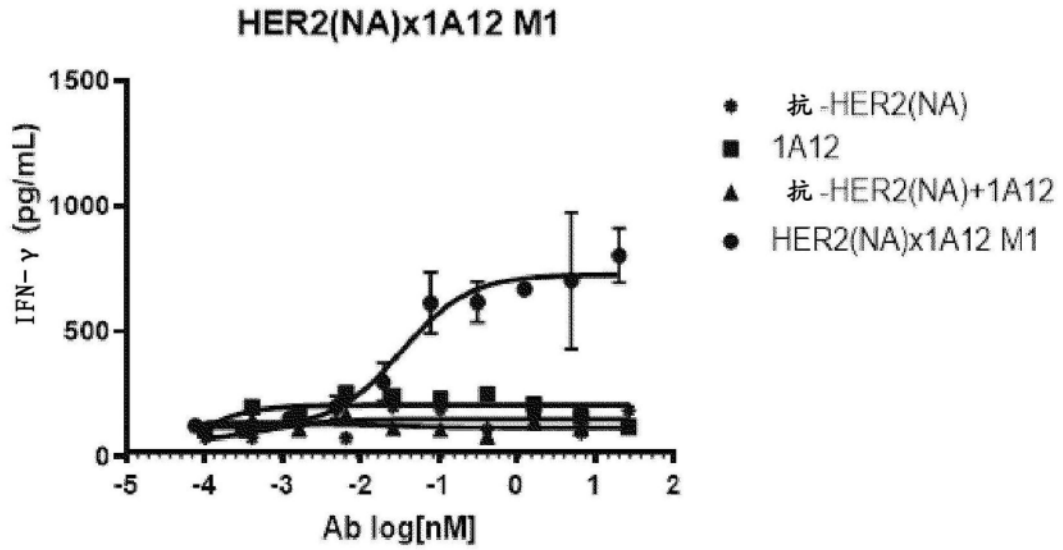


图8d

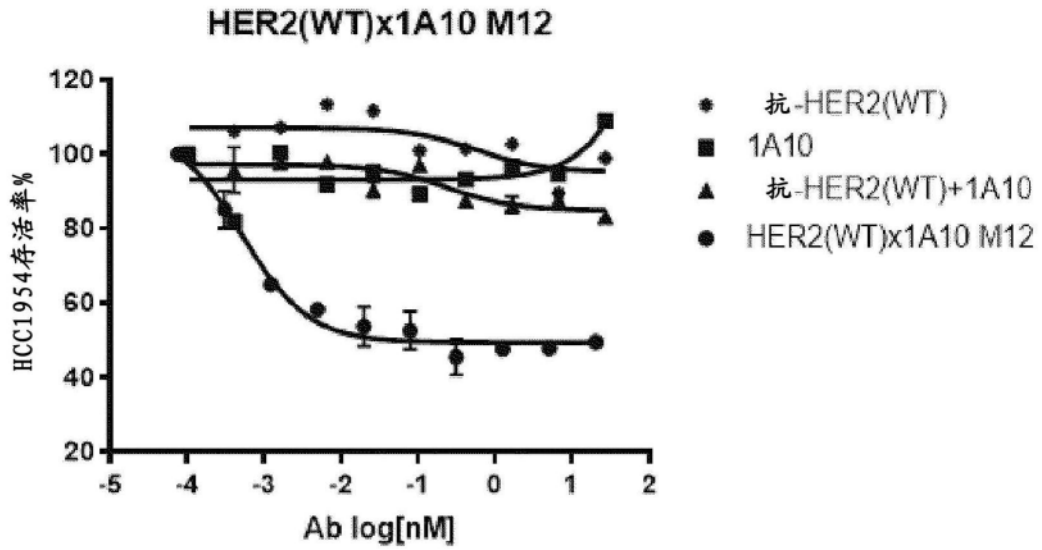


图9a

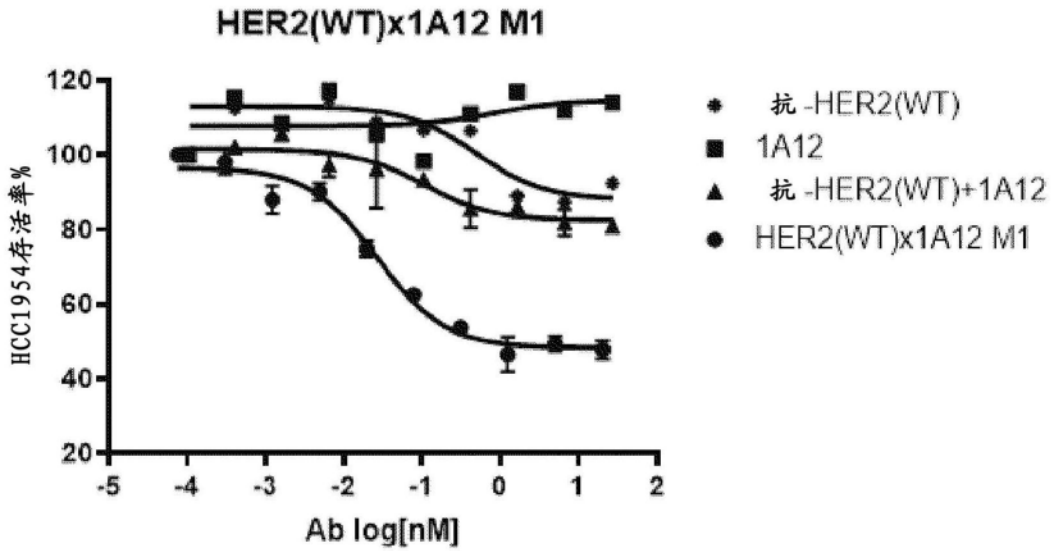


图9b

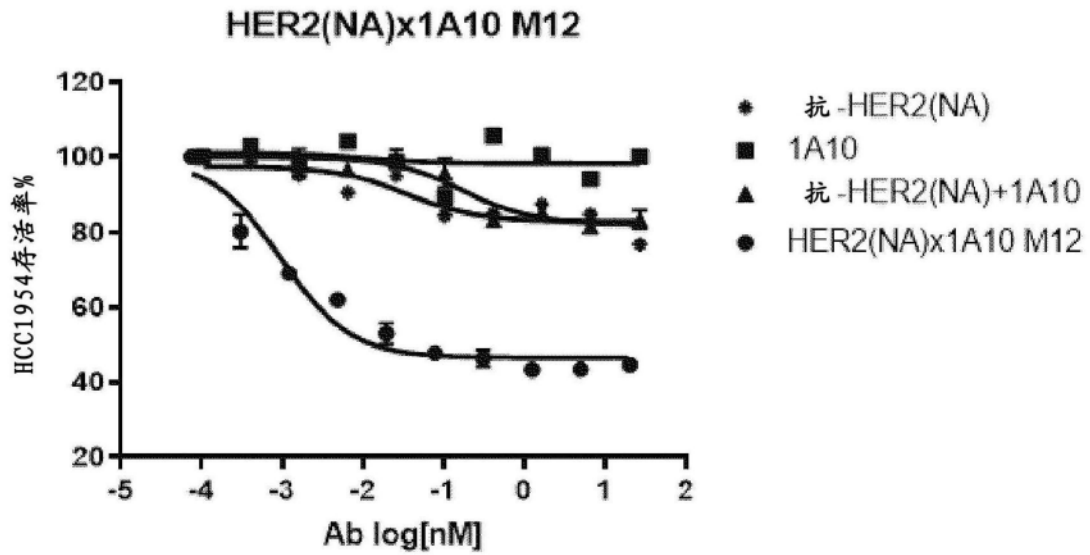


图9c

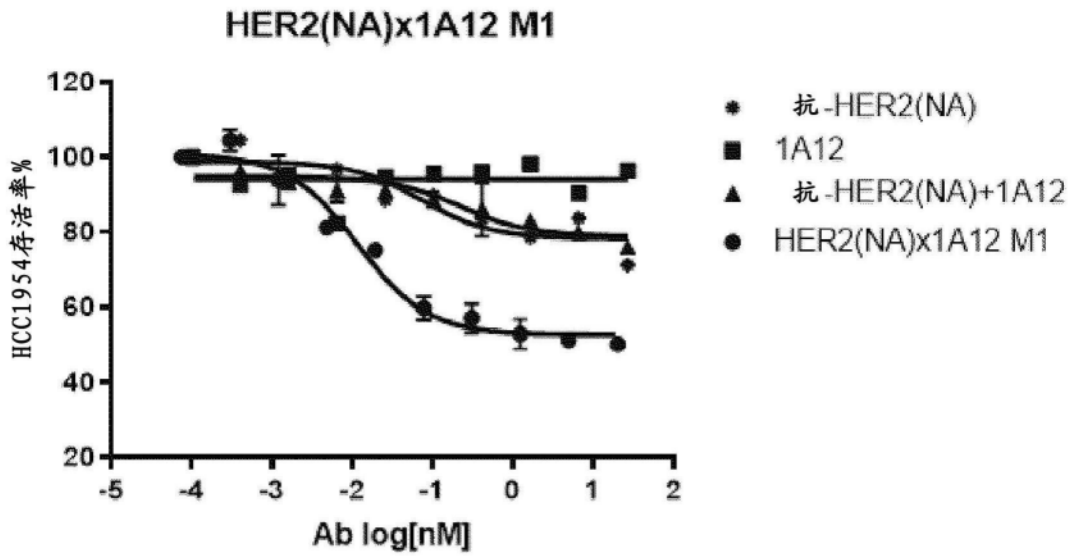


图9d

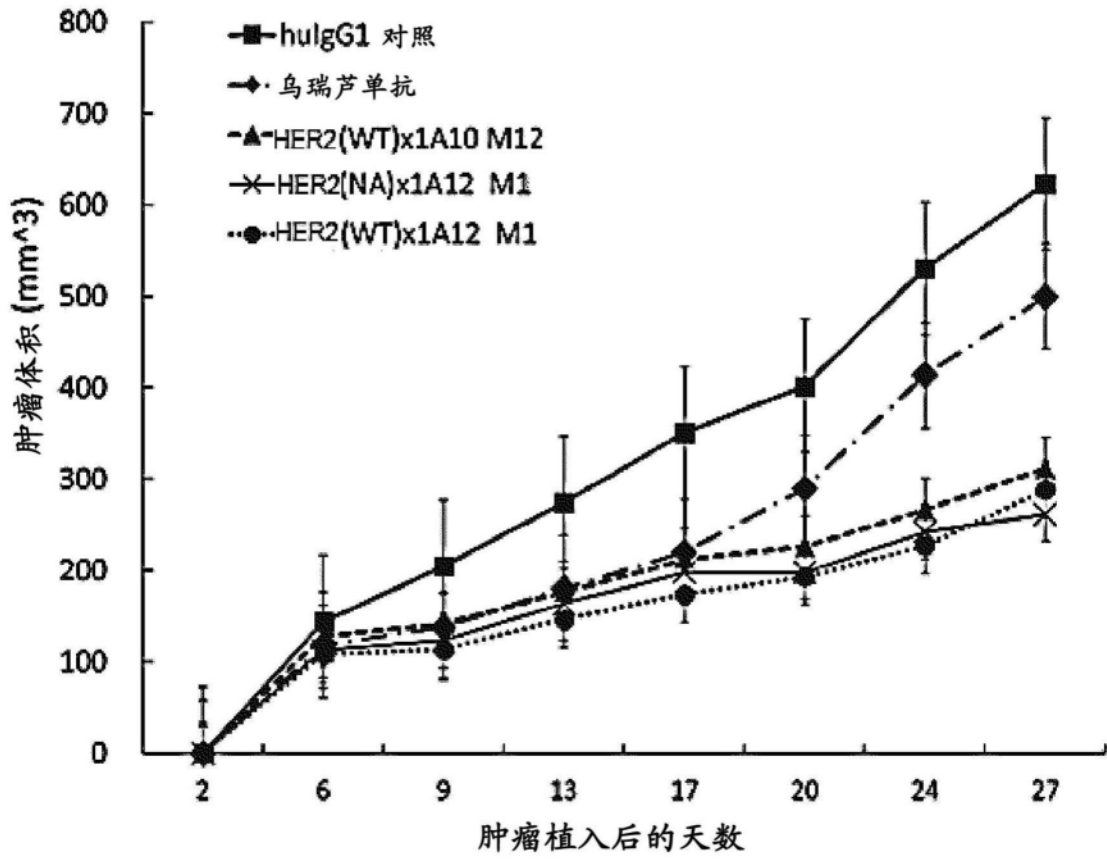


图10

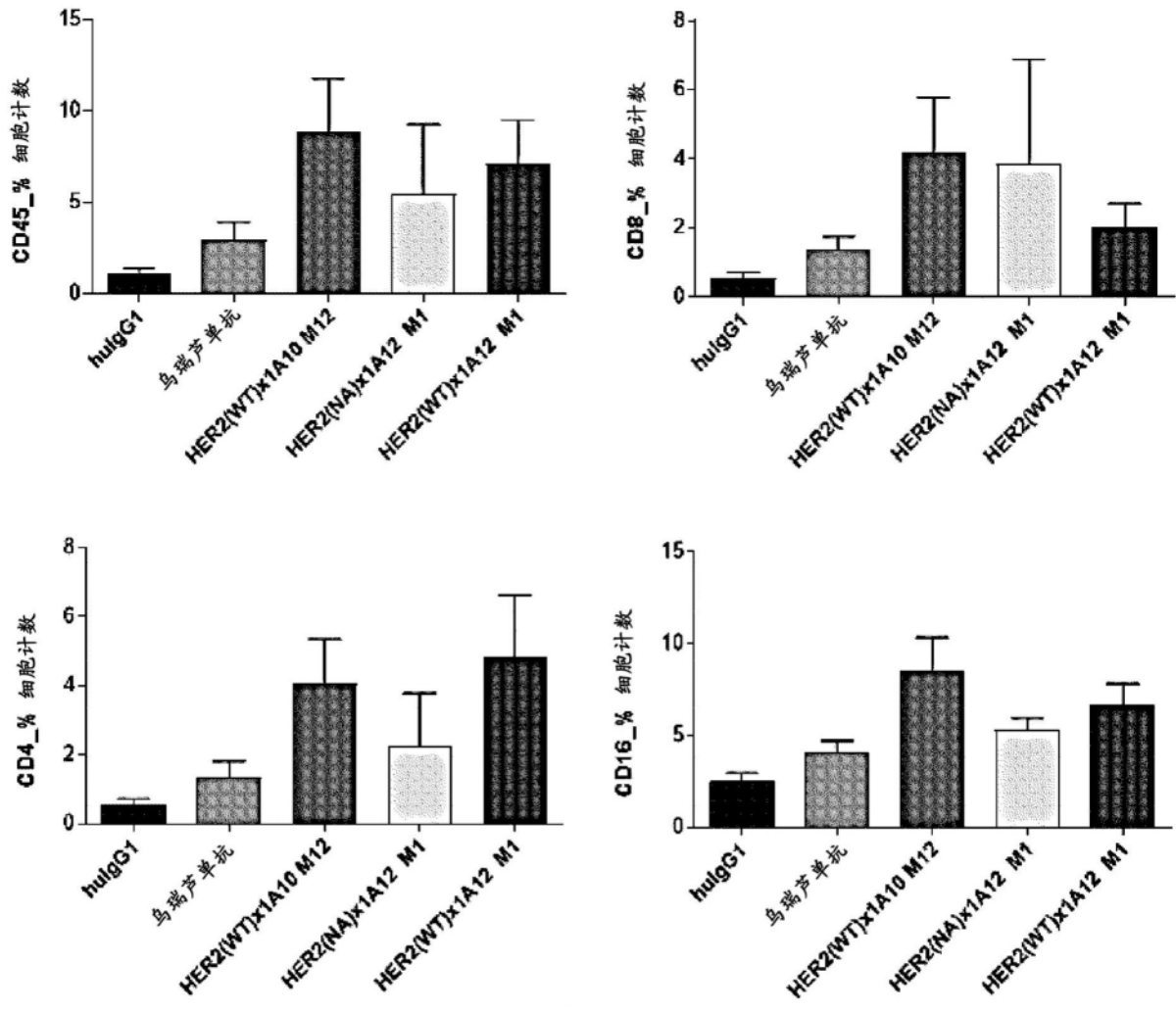
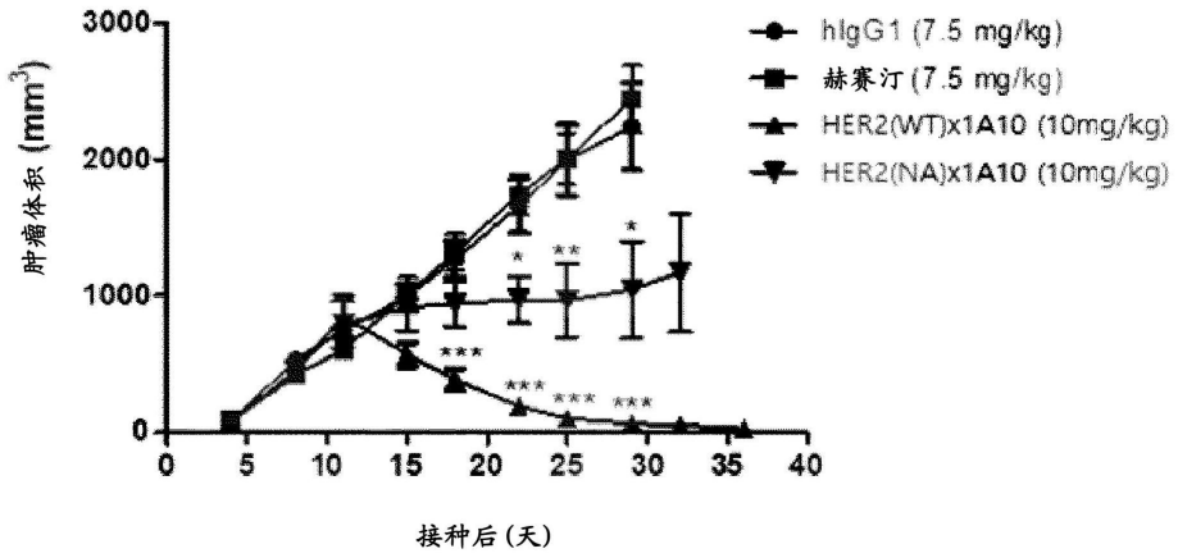


图11



(平均值±SEM (n=5/组), \*; p<0.01, \*\*; p<0.01, \*\*\*; p<0.001 相对于hlgG1对照)

图12

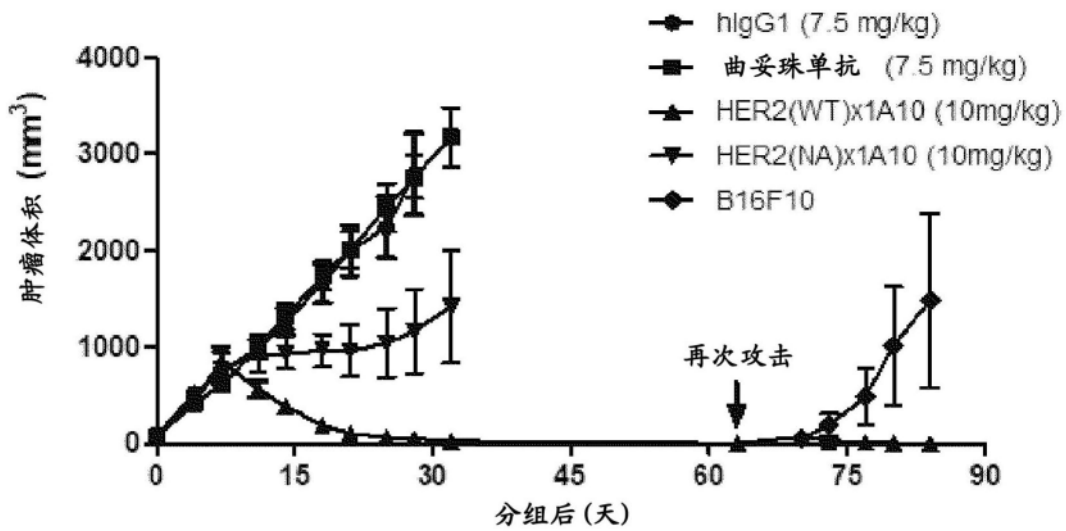


图13

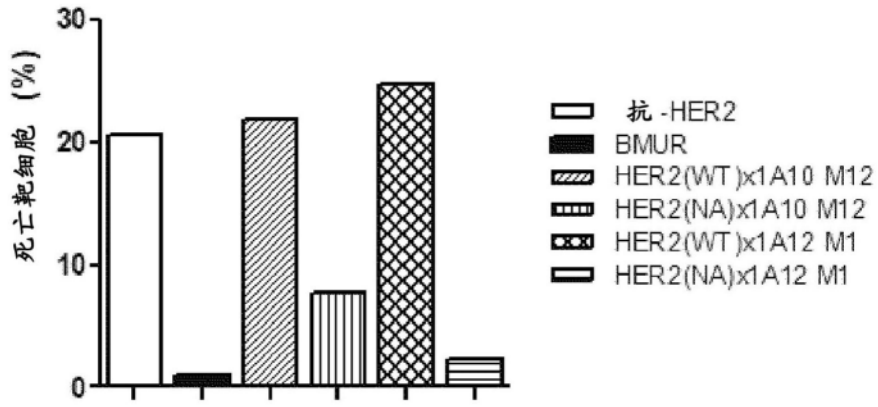


图14

Fc  $\gamma$  RIIB依赖性4-1BB生物测定

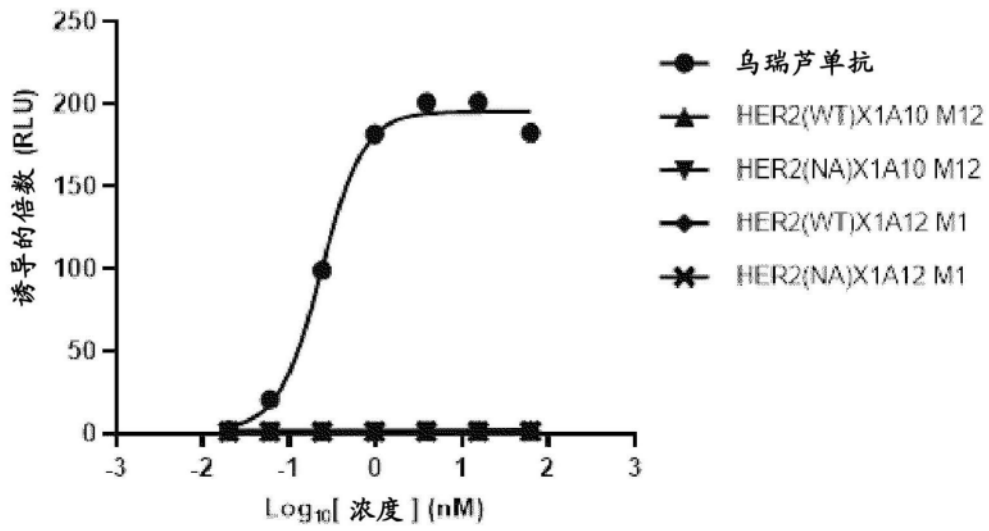


图15a

Fc  $\gamma$  RIIB非依赖性4-1BB生物测定

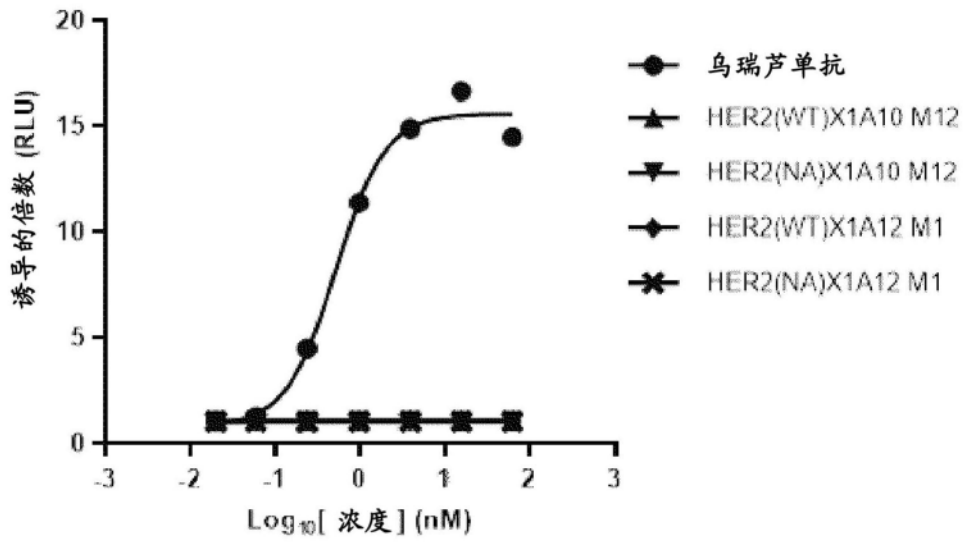


图15b