



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111356477 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 30

(21) 申请号 201880062833.7
 (22) 申请日 2018.08.01
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111356477 A
 (43) 申请公布日 2020.06.30
 (30) 优先权数据
 62/539,970 2017.08.01 US
 62/654,112 2018.04.06 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.03.26
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2018/044778 2018.08.01
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/028125 EN 2019.02.07
 (73) 专利权人 AB工作室有限公司
 地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 刘跃 蔡文燕 史家栋
 (74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 11105
 专利代理师 张文辉
 (51) Int.Cl.
 A61K 39/395 (2006.01)
 C07K 19/00 (2006.01)
 C12N 15/09 (2006.01)
 C12N 15/13 (2006.01)
 C12N 15/62 (2006.01)
 C07K 16/46 (2006.01)
 (56) 对比文件
 US 2010331527 A1, 2010.12.30
 US 2016229924 A1, 2016.08.11
 US 2016368988 A1, 2016.12.22
 审查员 王艳丽

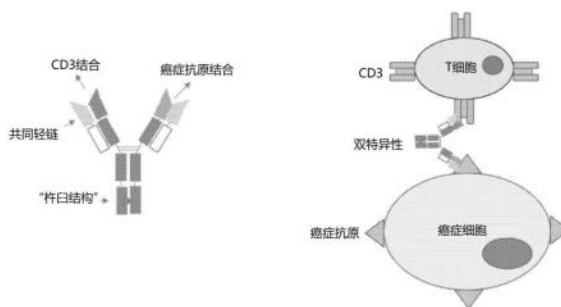
权利要求书1页 说明书45页
 序列表35页 附图35页

(54) 发明名称

双特异性抗体及其用途

(57) 摘要

本公开涉及双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段以不同的结合亲和力特异性结合两种不同抗原。



1. 一种制备双特异性抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括:

(a) 选择第一抗原和第二抗原,并鉴定与所述第一抗原结合的第一抗体或其抗原结合片段以及与所述第二抗原结合的第二抗体或其抗原结合片段,其中所述第一抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区VHa和第一轻链可变区VL_a,并且所述第二抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区VH_b和第二轻链可变区VL_b;

(b) 确定VHa、VL_a、VH_b和VL_b的氨基酸序列;

(c) 比对VL_a和VL_b的氨基酸序列,并确定VL_a和VL_b之间的序列同源性大于80%;

(d) 基于VHa、VL_a、VH_b和VL_b的3D结构来设计共同的轻链可变区VL_c,其中当VL_c与VHa缔合时,所述VL_c保持对所述第一抗原的亲合力,并且所述VL_c-VH_b与所述第二抗原的结合亲合力降低,其中步骤(d)进一步包括:

(i) 如果所述VL_a中的氨基酸鉴定为当与VH_b配对时对结合所述第二抗原重要,而当与VHa配对时不涉及与所述第一抗原的结合,则将VL_a中的氨基酸更改为VL_b中的相应氨基酸;并且

(ii) 重复步骤(i)直到获得所述VL_c;

(e) 使用计算机建模工具重新设计VHa和VH_b序列,从而获得VHa'和VH_b',以增加第一蛋白质和第二蛋白质之间的等电点的差异,其中所述第一蛋白质包含两个各自含有VHa'的多肽和两个各自含有VL_c的多肽,并且所述第二蛋白质包含两个各自含有VH_b'的多肽和两个各自含有VL_c的多肽;并且

(f) 产生具有两个轻链可变区和两个重链可变区的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述两个轻链可变区各自包含VL_c,并且所述两个重链可变区分别包含VHa'和VH_b',其中VHa'和VL_c彼此缔合,形成与所述第一抗原特异性结合的第一抗原结合区,并且VH_b'和VL_c彼此缔合,形成与所述第二抗原特异性结合的第二抗原结合区,其中所述第一抗原结合区与所述第一抗原结合时的结合亲合力至少比所述第二抗原结合区与所述第二抗原结合时的结合亲合力大100倍。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法进一步包括:

(g) 开发缓冲液系统以纯化所述双特异性抗体或其抗原结合片段。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述第一抗原是CD20,并且所述第二抗原是CD3。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述第一抗原是PD-L1并且所述第二抗原是CD55。

双特异性抗体及其用途

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求2017年8月1日提交的美国临时申请序列号No.62/539,970和2018年4月6日提交的美国临时申请序列号62/654,112的权益。前述的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及双特异性抗体或其抗原结合片段。

背景技术

[0004] 双特异性抗体是可以同时结合两种不同类型的抗原或两种不同表位的人工蛋白质。这种双重特异性打开了广泛的应用领域,包括将T细胞重定向至肿瘤细胞,同时阻断两个不同的信号传导途径,双重靶向不同的疾病介体以及将药物(payload)递送至靶向部位。卡妥索单抗(catumaxomab)(抗EpCAM和抗CD3)和博纳吐单抗(blinatumomab)(抗CD19和抗CD3)的批准已成为开发双特异性抗体的重要里程碑。

[0005] 由于双特异性抗体具有各种应用,因此需要继续开发基于双特异性抗体的各种治疗剂。

发明内容

[0006] 本公开涉及不平衡的双特异性抗体或抗原结合片段,其中双特异性抗体或抗原结合片段以不同的结合亲和力特异性结合两种不同抗原。

[0007] 在一些方面,本公开涉及一种双特异性抗体或抗原结合片段,包括:第一重链可变区、第二重链可变区、第一轻链可变区、和第二轻链可变区,其中,所述第一重链可变区和所述第一轻链可变区彼此缔合,形成第一抗原结合区,所述第一抗原结合区以大于 10^7M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、 10^9M^{-1} 、 10^{10}M^{-1} 、 10^{11}M^{-1} 、或 10^{12}M^{-1} 的结合亲和力特异性结合第一抗原,并且所述第二重链可变区和所述第二轻链可变区彼此缔合,形成第二抗原结合区,所述第二抗原结合区以小于 10^9M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、 10^7M^{-1} 、 10^6M^{-1} 、 10^5M^{-1} 、或 10^4M^{-1} 的结合亲和力特异性结合第二抗原。

[0008] 在一些实施方案中,所述第二抗原结合区以大于 10^7M^{-1} 、 10^6M^{-1} 、 10^5M^{-1} 、或 10^4M^{-1} 的结合亲和力特异性结合所述第二抗原。

[0009] 在一些实施方案中,所述第一抗原结合区结合所述第一抗原时的结合亲和力比所述第二抗原结合区结合所述第二抗原时的结合亲和力大至少100倍、1000倍或10000倍。

[0010] 在一些实施方案中,所述第一轻链可变区和所述第二轻链可变区至少90%、95%、99%或100%相同。

[0011] 在一些方面,本公开涉及一种双特异性抗体或抗原结合片段,包括:包含第一重链可变区和第一轻链可变区的第一臂,包含第二重链可变区和第二轻链可变区的第二臂;其中所述第一臂以大于 10^7M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、 10^9M^{-1} 、 10^{10}M^{-1} 、 10^{11}M^{-1} 、或 10^{12}M^{-1} 的结合亲和力特异性结合第一抗原,并且所述第二臂以小于 10^9M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、 10^7M^{-1} 、 10^6M^{-1} 、 10^5M^{-1} 、或 10^4M^{-1} 的结合亲和力特异性结合第二抗原。

[0012] 在一些实施方案中,所述第二臂以大于 10^7M^{-1} 、 10^6M^{-1} 、 10^5M^{-1} 、或 10^4M^{-1} 的结合亲和力特异性结合所述第二抗原。

[0013] 在一些实施方案中,所述第一臂结合所述第一抗原时的结合亲和力比所述第二臂结合所述第二抗原时的结合亲和力大至少100倍、1000倍或10000倍。

[0014] 在一些实施方案中,所述第一轻链可变区和所述第二轻链可变区至少90%、95%、99%或100%相同。

[0015] 在一些方面,本公开涉及一种双特异性抗体或抗原结合片段,其包含:含有第一重链可变区的第一重链、含有第二重链可变区的第二重链、含有第一轻链可变区的第一轻链、和含有第二轻链可变区的第二轻链,其中,所述第一重链可变区和所述第一轻链可变区彼此缔合,形成第一抗原结合区,所述第一抗原结合区以大于 10^7M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、 10^9M^{-1} 、 10^{10}M^{-1} 、 10^{11}M^{-1} 、或 10^{12}M^{-1} 的结合亲和力特异性结合第一抗原,并且所述第二重链可变区和所述第二轻链可变区彼此缔合,形成第二抗原结合区,所述第二抗原结合区以小于 10^9M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、 10^7M^{-1} 、 10^6M^{-1} 、 10^5M^{-1} 、或 10^4M^{-1} 的结合亲和力特异性结合第二抗原。

[0016] 在一些实施方案中,所述第二抗原结合区以大于 10^7M^{-1} 、 10^6M^{-1} 、 10^5M^{-1} 、或 10^4M^{-1} 的结合亲和力特异性结合所述第二抗原。

[0017] 在一些实施方案中,所述第一抗原结合区结合所述第一抗原时的结合亲和力比所述第二抗原结合区结合所述第二抗原时的结合亲和力大至少100倍、1000倍或10000倍。

[0018] 在一些实施方案中,所述第一轻链和所述第二轻链至少90%、95%、99%或100%相同。

[0019] 在一些实施方案中,所述第一重链和第二链通过杆臼结构的方式彼此缔合。

[0020] 在一些实施方案中,所述第一抗原是癌症特异性抗原,并且所述第二抗原是CD3。

[0021] 在一些实施方案中,所述第一抗原是CD20,并且所述第二抗原是CD3。

[0022] 在一些实施方案中,所述第一重链可变区包含与SEQ ID NO:1至少80%、85%、90%或95%相同的序列,所述第二重链可变区包含与SEQ ID NO:2至少80%、85%、90%或95%相同的序列,并且所述第一和第二轻链可变区包含与SEQ ID NO:3至少80%、85%、90%或95%相同的序列。

[0023] 在一些实施方案中,所述第一抗原是癌症特异性抗原,并且所述第二抗原是癌症相关抗原。

[0024] 在一些实施方案中,所述第一抗原是PD-L1,所述第二抗原是CD55。

[0025] 在一些实施方案中,所述第一重链可变区包含与SEQ ID NO:4至少80%、85%、90%或95%相同的序列,所述第二重链可变区包含与SEQ ID NO:5至少80%、85%、90%或95%相同的序列,并且所述第一和第二轻链可变区包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7至少80%、85%、90%或95%相同的序列。

[0026] 在一些方面,本公开涉及一种制备双特异性抗体或抗原结合片段的方法,该方法包括:选择第一抗原和第二抗原,并鉴定与所述第一抗原结合的第一抗体或其抗原结合片段以及与所述第二抗原结合的第二抗体或其抗原结合片段,其中所述第一抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区(VHa)和第一轻链可变区(VLa),并且所述第二抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区(VHb)和第二轻链可变区(VLb);确定VHa、VLa、VHb和VLb的氨基酸序列;比对VLa和VLb的氨基酸序列,并确定VLa和VLb之间的序列同源性大于80%;设计共

同的轻链可变区 (VLc), 其中当 VLc 与 VHa 缔合时, 所述 VLc 保持对所述第一抗原的亲合力; 重新设计 VHa 和 VHb 序列, 从而获得 VHa' 和 VHb', 以增加第一蛋白质和第二蛋白质之间的生物化学或生物物理特征的差异, 其中所述第一蛋白质包含两个各自含有 VHa' 的多肽和两个各自含有 VLc 的多肽, 并且所述第二蛋白质包含两个各自含有 VHb' 的多肽和两个各自含有 VLc 的多肽; 产生具有两个轻链可变区和两个重链可变区的双特异性抗体或其抗原结合片段, 其中所述两个轻链可变区各自包含 VLc, 并且所述两个重链可变区分别包含 VHa' 和 VHb'。

[0027] 在一些实施方案中, 在步骤 (d) 中, VLc-VHb 与所述第二抗原的结合亲和力可以降低。

[0028] 在一些实施方案中, 该方法进一步包括开发缓冲液系统以纯化所述双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0029] 在一些方面, 本公开涉及一种制备双特异性抗体或抗原结合片段的方法, 该方法包括: 选择第一抗原和第二抗原, 并鉴定与所述第一抗原结合的第一抗体或其抗原结合片段以及与所述第二抗原结合的第二抗体或其抗原结合片段, 其中所述第一抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区 (VHa) 和第一轻链可变区 (VLa), 并且所述第二抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区 (VHb) 和第二轻链可变区 (VLb); 确定 VHa、VL a 和 VLb 的氨基酸序列; 比对 VL a 和 VLb 的氨基酸序列, 并确定 VL a 和 VLb 之间的序列同源性小于 80%; 用 VL a 替换噬菌体展示抗体文库中的所有轻链可变区, 并针对所述第二抗原进行淘选以获得第三重链可变区 (VHc); 重新设计 VHa 和 VHc 序列, 从而获得 VHa' 和 VHc', 以增加第一蛋白质和第二蛋白质之间的生物化学或生物物理特征的差异, 其中所述第一蛋白质包含两个各自含有 VHa' 的多肽和两个各自含有 VL a 的多肽, 并且所述第二蛋白质包含两个各自含有 VHc' 的多肽和两个各自含有 VL a 的多肽; 产生具有两个轻链可变区和两个重链可变区的双特异性抗体或其抗原结合片段, 其中所述两个轻链可变区各自包含 VL a, 并且所述两个重链可变区分别包含 VHa' 和 VHc'。

[0030] 在一些实施方案中, 该方法进一步包括开发缓冲液系统以纯化所述双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0031] 在一些方面, 本公开涉及一种制备双特异性抗体或抗原结合片段的方法, 该方法包括: 选择第一抗原和第二抗原, 并鉴定与所述第一抗原结合的第一抗体或其抗原结合片段以及与所述第二抗原结合的第二抗体或其抗原结合片段, 其中所述第一抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区 (VHa) 和第一轻链可变区 (VL a), 并且所述第二抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区 (VHb) 和第二轻链可变区 (VLb); 确定 VHa、VL a、VHb 和 VLb 的氨基酸序列; 比对 VL a 和 VLb 的氨基酸序列, 并确定 VL a 和 VLb 之间的序列同源性小于 80%; 用多个轻链可变区替换噬菌体展示抗体文库中的所有轻链可变区, 其中所述轻链可变区与 VL a 或 VLb 至少 80%、85%、90%、95% 或 99% 相同; 针对所述第二抗原进行淘选; 选择共同的轻链可变区 (VLc) 和第三重链可变区 (VHc), 其中 VHa-VLc 以期望的亲合力结合所述第一抗原并且 VHc-VLc 以期望的亲合力结合所述第二抗原; 重新设计 VHa 和 VHc 序列, 从而获得 VHa' 和 VHc', 以增加第一蛋白质和第二蛋白质之间的生物化学或生物物理特征的差异, 其中所述第一蛋白质包含两个各自含有 VHa' 的多肽和两个各自含有 VLc 的多肽, 并且所述第二蛋白质包含两个各自含有 VHc' 的多肽和两个各自含有 VLc 的多肽; 产生具有两个轻链可变区和两个重链可变区的双特异性抗体或其抗原结合片段, 其中所述两个轻链可变区各自包含

VLc,并且所述两个重链可变区分别包含VHa'和VHc'。

[0032] 在一些实施方案中,在步骤(d)中,所述多个轻链可变区是通过易错PCR产生的。

[0033] 在一些实施方案中,该方法进一步包括开发缓冲系统以纯化所述双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0034] 一方面,本公开提供了制备双特异性抗体或其抗原结合片段的方法。该方法涉及以下一个或多个步骤:

[0035] (a) 选择第一抗原和第二抗原,并鉴定与所述第一抗原结合的第一抗体或其抗原结合片段以及与所述第二抗原结合的第二抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述第一抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区(VHa)和第一轻链可变区(VLa),并且所述第二抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区(VHb)和第二轻链可变区(VLb);

[0036] (b) 确定VHa、VLa、VHb和VLb的氨基酸序列;

[0037] (c) 比对VLa和VLb的氨基酸序列,并确定VLa和VLb之间的序列同源性小于80%;

[0038] (d) 用多个轻链可变区替换噬菌体展示抗体文库中的所有轻链可变区。在一些实施方案中,所述轻链可变区与VLa或VLb至少80%、85%、90%、95%或99%相同;

[0039] (e) 针对所述第二抗原进行淘选;

[0040] (f) 选择共同的轻链可变区(VLc)和第三重链可变区(VHc)。在一些实施方案中,VHc-VLc以期望的亲合力与所述第二抗原结合;

[0041] (g) 确定VLa与VLc之间的同源性大于80%;

[0042] (h) 设计共同的轻链可变区(VLd)。在一些实施方案中,当所述VLd与VHa缔合时,所述VLd保持对所述第一抗原的亲合力,而且当所述VLd与VHc缔合时,所述VLd对所述第二抗原具有期望的亲合力;

[0043] (i) 任选地,重新设计VHa和VHc序列,从而获得VHa'和VHc',以增加第一蛋白质和第二蛋白质之间的生物化学或生物物理特征的差异,其中所述第一蛋白质包含两个各自含有VHa'的多肽和两个各自含有VLd的多肽,并且所述第二蛋白质包含两个各自含有VHc'的多肽和两个各自含有VLd的多肽;并且

[0044] (j) 任选地,产生具有两个轻链可变区和两个重链可变区的双特异性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述两个轻链可变区各自包含VLd,并且所述两个重链可变区分别包含VHa'和VHc'。

[0045] 一方面,本公开提供了制备双特异性抗体或其抗原结合片段的方法。该方法涉及以下一个或多个步骤:

[0046] (a) 选择第一抗原和第二抗原,并鉴定与所述第一抗原结合的第一抗体或其抗原结合片段以及与所述第二抗原结合的第二抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述第一抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区(VHa)和第一轻链可变区(VLa),并且所述第二抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区(VHb)和第二轻链可变区(VLb);

[0047] (b) 确定VHa、VLa、VHb和VLb的氨基酸序列;

[0048] (c) 比对VLa和VLb的氨基酸序列,并确定VLa和VLb之间的序列同源性大于80%;

[0049] (d) 设计共同的轻链可变区(VLc)。在一些实施方案中,当所述VLc与VHa缔合时,所述VLc保持对所述第一抗原的亲合力;并且

[0050] (e) 任选地,产生具有两个轻链可变区和两个重链可变区的双特异性抗体或其抗

原结合片段。在一些实施方案中,所述两个轻链可变区各自包含VLc,并且所述两个重链可变区分别包含VHa和VHb。

[0051] 一方面,本公开还提供了制备双特异性抗体或其抗原结合片段的方法。该方法涉及以下一个或多个步骤:

[0052] (a) 选择第一抗原和第二抗原,并鉴定与所述第一抗原结合的第一抗体或其抗原结合片段以及与所述第二抗原结合的第二抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述第一抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区(VHa)和第一轻链可变区(VLa),并且所述第二抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区(VHb)和第二轻链可变区(VLb);

[0053] (b) 确定VHa、VLa和VLb的氨基酸序列;

[0054] (c) 比对VLa和VLb的氨基酸序列,并确定VLa和VLb之间的序列同源性小于80%;

[0055] (d) 用所述VLa替换噬菌体展示抗体文库中的所有轻链可变区,并针对所述第二抗原进行淘选,以获得第三重链可变区(VHc);并且

[0056] (e) 任选地,产生具有两个轻链可变区和两个重链可变区的双特异性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述两个轻链可变区各自包含VLa,并且所述两个重链可变区分别包含VHa和VHc。

[0057] 一方面,本公开进一步提供了制备双特异性抗体或其抗原结合片段的方法。该方法涉及以下一个或多个步骤:

[0058] (a) 选择第一抗原和第二抗原,并鉴定与所述第一抗原结合的第一抗体或其抗原结合片段以及与所述第二抗原结合的第二抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述第一抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区(VHa)和第一轻链可变区(VLa),并且所述第二抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区(VHb)和第二轻链可变区(VLb);

[0059] (b) 确定VHa、VLa、VHb和/或VLb的氨基酸序列;

[0060] (c) 比对VLa和VLb的氨基酸序列,并确定VLa和VLb之间的序列同源性小于80%;

[0061] (d) 用多个轻链可变区替换噬菌体展示抗体文库中的所有轻链可变区。在一些实施方案中,所述轻链可变区与VLa或VLb至少80%、85%、90%、95%或99%相同;

[0062] (e) 针对所述第一和/或第二抗原进行淘选;

[0063] (f) 选择共同的轻链可变区(VLc)和第三重链可变区(VHc)。在一些实施方案中,VHa-VLc以期望的亲合力结合所述第一抗原,并且VHc-VLc以期望的亲合力结合所述第二抗原;并且

[0064] (g) 任选地,产生具有两个轻链可变区和两个重链可变区的双特异性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述两个轻链可变区各自包含VLc,并且所述两个重链可变区分别包含VHa和VHc。

[0065] 在另一方面,本公开内容提供了与CD3结合的抗体或其抗原结合片段,包括:包含互补决定区(CDR)1、2和3的重链可变区(VH),其中VH CDR1区包含与选定的VH CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,VH CDR2区包含与选定的VH CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且VH CDR3区包含与选定的VH CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;以及包含CDR 1、2和3的轻链可变区(VL),其中VL CDR1区包含与选定的VL CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,VL CDR2区包含与选定的VL CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且VL CDR3区包含与选定的VL CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基

酸序列;其中所述选定的VH CDR 1、2和3氨基酸序列和所述选定的VL CDR 1、2和3氨基酸序列为以下中的一者:所述选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:22-24所示,并且所述选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:28-30所示。

[0066] 在一些实施方案中,所述VH包含具有分别如SEQ ID NO:22、23、24所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且所述VL包含具有分别如SEQ ID NO:28、29、30所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0067] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人CD3。

[0068] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是双特异性抗体。

[0069] 在另一方面,本公开还提供了与PD-L1结合的抗体或其抗原结合片段,其包括:包含互补决定区(CDR)1、2和3的重链可变区(VH),其中VH CDR1区包含与选定的VH CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,VH CDR2区包含与选定的VH CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且VH CDR3区包含与选定的VH CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;以及包含CDR 1、2和3的轻链可变区(VL),其中VL CDR1区包含与选定的VL CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,VL CDR2区包含与选定的VL CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且VL CDR3区包含与选定的VL CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;其中所述选定的VH CDR 1、2和3氨基酸序列以及所述选定的VL CDR 1、2和3氨基酸序列是以下之一:

[0070] (1)所述选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:41-43所示,并且所述选定的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:53-55所示;

[0071] (2)所述选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:41-43所示,并且所述选定的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:59-61所示。

[0072] 在一些实施方案中,所述VH包含具有分别如SEQ ID NO:41-43所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且所述VL包含具有分别如SEQ ID NO:59-61所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0073] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段与人CD3特异性结合。

[0074] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是双特异性抗体。

[0075] 在另一方面,本公开内容提供了与CD55结合的抗体或其抗原结合片段,其包括:

[0076] 包含互补决定区(CDR)1、2和3的重链可变区(VH),其中VH CDR1区包含与选定的VH CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,VH CDR2区包含与选定的VH CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且VH CDR3区包含与选定的VH CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;以及包含CDR 1、2和3的轻链可变区(VL),其中VL CDR1区包含与选定的VL CDR1氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,VL CDR2区包含与选定的VL CDR2氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列,并且VL CDR3区包含与选定的VL CDR3氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列;其中所述选定的VH CDR 1、2和3氨基酸序列以及所述选定的VL CDR 1、2和3氨基酸序列是以下之一:

[0077] (1)所述选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:47-49所示,并且所述选定的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:53-55所示;

[0078] (2)所述选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:47-49所示,并且所述选定的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:59-61所示。

[0079] 在一些实施方案中,所述VH包含具有分别如SEQ ID NO:47-49所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3,并且所述VL包含具有分别如SEQ ID NO:59-61所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0080] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段与人CD3特异性结合。

[0081] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是双特异性抗体。

[0082] 在一个方面,本公开内容提供了一种核酸,该核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含:包含含有CDR 1、2和3的VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述CDR 1、2和3分别包含如SEQ ID NO:53-55所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,当所述VL与如包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的VH配对时,所述VL结合PD-L1,和/或当所述VL与包含如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的VH配对时,所述VL结合CD55。

[0083] 在一个方面,本公开内容提供了一种核酸,其包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含:包含含有CDR 1、2和3的VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述CDR 1、2和3分别包含如SEQ ID NO:59-61所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,当所述VL与如包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的VH配对时,所述VL结合PD-L1,和/或当所述VL与包含如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的VH配对时,所述VL结合CD55。

[0084] 在一些实施方案中,所述核酸编码双特异性抗体。在一些实施方案中,核酸是cDNA。

[0085] 一方面,本公开提供了包含一种或多种本文所述核酸的载体。

[0086] 一方面,本公开提供了一种包含本文所述载体的细胞。在一些实施方案中,该细胞是CHO细胞。

[0087] 一方面,本公开提供了一种细胞,其包含本文所述的一种或多种核酸。

[0088] 在一个方面,本公开内容提供了与CD20和CD3结合的双特异性抗体或其抗原结合片段,包含:含有第一重链可变区(VH)的第一多肽,所述第一重链可变区包含与SEQ ID NO:1至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;含有第二重链可变区(VH)的第二多肽,所述第二重链可变区包含与SEQ ID NO:2至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;含有第一轻链可变区(VL)的第三多肽,所述第一轻链可变区包含与SEQ ID NO:3至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;含有第二轻链可变区(VL)的第四多肽,所述第二轻链可变区包含与SEQ ID NO:3至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0089] 在一些实施方案中,所述第一重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:1;所述第二重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:2;所述第一轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:3;并且所述第二轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:3。

[0090] 在一些实施方案中,所述第一多肽包含与SEQ ID NO:34、35或36至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;所述第二多肽包含与SEQ ID NO:37、38或39至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;所述第三多肽包含与SEQ ID NO:40至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且所述第四多肽包含与SEQ ID NO:40至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0091] 在一些实施方案中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列;并且所述第二多肽包含SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列。

[0092] 在一个方面,本公开内容提供了一种结合PD-L1和CD55的双特异性抗体或其抗原结合片段,其包含:含有第一重链可变区(VH)的第一多肽,所述第一重链可变区包含与SEQ ID NO:4至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;含有第二重链可变区(VH)的第二多肽,所述第二重链可变区包含与SEQ ID NO:5至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;含有第一轻链可变区(VL)的第三多肽,所述第一轻链可变区包含与SEQ ID NO:6或7至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;含有第二轻链可变区(VL)的第四多肽,所述第二轻链可变区包含与SEQ ID NO:6或7至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0093] 在一些实施方案中,所述第一重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:4;所述第二重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:5;所述第一轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:7;并且所述第二轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:7。

[0094] 在一些实施方案中,所述第一多肽包含与SEQ ID NO:65至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;所述第二多肽包含与SEQ ID NO:66至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;所述第三多肽包含与SEQ ID NO:67或68至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且所述第四多肽包含与SEQ ID NO:67或68至少90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0095] 在一些实施方案中,所述第一多肽包含SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列;所述第二多肽包含SEQ ID NO:66所示的氨基酸序列;所述第三多肽包含SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列;并且所述第四多肽包含SEQ ID NO:68所示的氨基酸序列。

[0096] 一方面,本公开提供了抗体-药物缀合物,其包含与治疗剂共价结合的本文所述的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,治疗剂是细胞毒性剂或细胞抑制剂。

[0097] 一方面,本公开提供了一种治疗患有癌症的受试者的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的包含本文所述的抗体或其抗原结合片段的组合物或本文所述的抗体-药物缀合物。在一些实施方案中,受试者患有实体瘤。在一些实施方案中,癌症是黑色素瘤、胰腺癌或血液系统恶性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是非霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤或慢性淋巴细胞性白血病。

[0098] 一方面,本公开提供了一种降低肿瘤生长速率的方法。该方法包括:对于受试者,使肿瘤细胞接触有效量的包含本文所述的抗体或其抗原结合片段的组合物或者本文所述的抗体-药物缀合物。

[0099] 一方面,本公开提供了一种杀伤肿瘤细胞的方法。该方法包括:对于受试者,使肿瘤细胞接触有效量的包含本文所述的抗体或其抗原结合片段的组合物或者本文所述的抗体-药物缀合物。

[0100] 一方面,本公开提供了一种药物组合物,其包含本文所述的抗体或其抗原结合片段,以及药学上可接受的载体。

[0101] 一方面,本公开提供了一种药物组合物,其包含本文所述的抗体药物缀合物和药学上可接受的载体。

[0102] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。本文描述了用于本发明的方法和材料;也可以使用本领域已知的其他合适方法和材料。材料、方法和示例仅是说明性的,并不旨在限制。本

文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献均通过引用全文并入本文。在发生冲突的情况下,以本说明书包括定义为准。

[0103] 根据以下详细描述和附图以及权利要求,本发明的其他特征和优点将变得显而易见。

附图说明

[0104] 图1A是显示实施例1中重新设计的抗体A结合表达CD20的Raji细胞的图。

[0105] 图1B是显示实施例1中重新设计的抗体B结合表达CD3的Jurkat细胞的图。

[0106] 图2A为来自CD20+Raji细胞结合测定的结果。

[0107] 图2B为CD3+Jurkat细胞结合测定的结果。

[0108] 图3为T细胞活化测定(图中的CD20/3是CD20/CD3 BsMab;A10和A11表示不同的洗脱级分;同种型是IgG1抗体,其用作对照)。

[0109] 图4为不同抗体的T细胞活化滴定曲线。

[0110] 图5为在外周血单核细胞(PBMC)存在下的抗体介导的CD20+Raji细胞杀伤。

[0111] 图6为在PBMC存在下抗体介导的CD20+Raji细胞杀伤作用,其中T细胞被IL-2和CD3/CD28磁珠激活4天。

[0112] 图7为在PBMC存在下抗体介导的CD20+Raji细胞杀伤作用,其中T细胞被IL-2和CD3/CD28磁珠激活7天。

[0113] 图8为在PBMC存在下抗体介导的CD3+Jurkat细胞杀伤作用。

[0114] 图9为在PBMC存在下抗体介导的CD3+Jurkat细胞杀伤作用,其中T细胞被IL-2和CD3/CD28磁珠激活4天。

[0115] 图10为在PBMC存在下抗体介导的CD3+Jurkat细胞杀伤作用,其中T细胞被IL-2和CD3/CD28磁珠激活7天。

[0116] 图11为抗体诱导的在PBMC中活化T细胞的衰竭(depletion)。

[0117] 图12为抗体诱导的在PBMC中灭活T细胞的衰竭。

[0118] 图13为由FACS确定的补体依赖性细胞毒性(CDC)介导的Raji细胞裂解。

[0119] 图14为由钙黄绿素释放确定由CDC介导的Raji细胞裂解。

[0120] 图15为通过FACS确定的CDC介导的Jurkat细胞裂解(A1和B3是不同的洗脱级分)。

[0121] 图16为在富含人补体的血清中的PBMC中的T细胞衰竭。

[0122] 图17-19为通过T细胞活化介导的利妥昔单抗耐药细胞裂解,基于来自3个不同供体的PBMC。

[0123] 图20为用于评估纯化的抗体的T细胞活化。

[0124] 图21A为注射磷酸盐缓冲盐水PBS(G1)、CD20/CD3 BsMab(G2;“BIS”)或利妥昔单抗(G3;“RTX”)后的每组小鼠的平均体重。

[0125] 图21B为注射磷酸盐缓冲盐水PBS(G1)、CD20/CD3 BsMab(G2;“BIS”)或利妥昔单抗(G3;“RTX”)后的每组荧光素酶标记的Raji细胞的平均成像强度。

[0126] 图22A为纯化的CD20/CD3双特异性抗体样品的还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠(Re-CE-SDS)结果。

[0127] 图22B为纯化的CD20/CD3双特异性抗体样品的非还原CE(Non-Re-CE-SDS)结果。

[0128] 图23A为阿维鲁单抗(PD-L1 wt)和设计的PD-L1单二聚体IgG抗体(PD-L1 V1)的结合亲和力,所述PD-L1 V1包含针对PD-L1(SEQ ID NO:4)的VHa和共同VL(SEQ ID NO:6)。

[0129] 图23B为亲本抗CD55抗体(CD55 wt)和设计的CD55单二聚体IgG抗体(CD55 V1)的结合亲和力,所述CD55 V1包含对CD55(SEQ ID NO:5)的VHb和共同VL(SEQ ID NO:6)。

[0130] 图24为BsMab v1的共同轻链(SEQ IN NO:67)和BsMab v2的共同轻链(SEQ ID NO:68)的比对。

[0131] 图25A为阿维鲁单抗(PD-L1 wt)和重新设计的PD-L1单二聚体IgG抗体(PD-L1 V2)的结合亲和力,所述PD-L1 V2包含针对PD-L1(SEQ ID NO:4)的VHa和共同VL v2(SEQ ID NO:7)。

[0132] 图25B为亲本抗CD55抗体(CD55 wt)和重新设计的CD55单二聚体IgG抗体(CD55 V2)的结合亲和力,其中包含针对CD55的VHb(SEQ ID NO:5)和共同VL v2(SEQ ID NO:7)。

[0133] 图26A-26B为抗体介导的MDA231细胞中的CDC。

[0134] 图27A为使用MDA231细胞进行抗体内化分析的结果。

[0135] 图27B为SIHA细胞的抗体内化测定结果。

[0136] 图28为显示结合CD3和癌症抗原(例如,癌症特异性抗原)的双特异性抗体如何识别和杀伤肿瘤细胞的示意图。

[0137] 图29是显示结合癌症特异性抗原和癌症相关抗原的双特异性抗体如何识别和杀伤肿瘤细胞的示意图。

具体实施方式

[0138] 双特异性抗体或其抗原结合片段是可以同时结合两种不同类型抗原的人工蛋白质。在一些实施方案中,双特异性抗体或其抗原结合片段可具有两个臂(臂A和B)。每个臂具有一个重链可变区和一个轻链可变区。

[0139] 双特异性抗体或其抗原结合片段可以是IgG样和非IgG样。IgG样双特异性抗体可以具有两个Fab臂和一个Fc区,并且两个Fab臂结合不同的抗原。非IgG样双特异性抗体或抗原结合片段可以是例如化学连接的Fab(例如,两个Fab区化学连接)和单链可变片段(scFV)。例如,scFV可具有两个重链可变区和两个轻链可变区。

[0140] 在不平衡的双特异性抗体或其抗原结合片段中,两个臂(臂:A和B)或两个抗原结合区(抗原结合区:A和B)可以以不同的亲和力结合各自的靶抗原。结合亲和力可以用缔合常数(Ka)表示:

[0141] $Ka = [\text{抗体-抗原}] / [\text{抗体}][\text{抗原}]$

[0142] 具有高亲和力的抗体通常具有 $Ka > 10^7 M^{-1}$ 。一个臂或一个抗原结合区的Ka可以大于 $10^5 M^{-1}$ 、 $10^6 M^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、或 $10^{12} M^{-1}$ 。在一些实施方案中,Ka可小于 $10^5 M^{-1}$ 、 $10^6 M^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、或 $10^{12} M^{-1}$ 。

[0143] 第一臂或第一抗原结合区(A)的结合亲和力可以大于第二臂或第二抗原结合区(B)的结合亲和力。具有不平衡亲和力的双特异性抗体可以具有多种优势。例如,具有不平衡亲和力的双特异性抗体可以用于靶向癌细胞上的癌症特异性抗原和T细胞上的CD3。在这种情况下,对癌症特异性抗原的高亲和力可导致T细胞更好地捕获癌细胞,而对CD3的低亲和力可避免通过CD3触发T细胞信号传导(图28)。只有当双特异性抗体被靶癌细胞以多价方

式呈递给T细胞时,T细胞才能被激活并杀伤靶癌细胞。此外,具有不平衡亲和力的双特异性抗体也可以用于靶向癌症特异性抗原和癌症相关抗原(图29)。在这种情况下,双特异性抗体仅弱结合表达低水平的癌症相关抗原的非癌细胞,而强烈结合低表达癌症特异性抗原和高水平癌症相关抗原的癌细胞。

[0144] 对于亲和力不平衡的双特异性抗体,第一臂或第一抗原结合区(A)的 K_a 可以大于 0^7M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、 10^9M^{-1} 、 $10^{10}M^{-1}$ 、 $10^{11}M^{-1}$ 、或 $10^{12}M^{-1}$ 。在一些实施方案中,第一臂或第一抗原结合区(A)的 K_a 可以比第二臂或第二抗原结合区(B)的 K_a 大10、100、1000、10000或100000倍。因此,在一些实施方案中,第二臂或第二抗原结合区(B)的 K_a 可以小于 10^5M^{-1} 、 10^6M^{-1} 、 10^7M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、或 10^9M^{-1} 。在一些实施方案中,第二臂或第二抗原结合区(B)的 K_a 仍以合理的亲和力,例如大于 10^4M^{-1} 、 10^5M^{-1} 、或 10^6M^{-1} ,特异性结合靶抗原。

[0145] 结合亲和力也可以由解离常数(K_d)表示。

[0146] $K_d = [\text{抗体}][\text{抗原}] / [\text{抗体-抗原}]$

[0147] K_d 可以小于 $10^{-5}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 、或 $10^{-12}M$ 。在一些实施方案中, K_d 可以大于 $10^{-5}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 、或 $10^{-12}M$ 。

[0148] 在一些实施方案中,第一臂或第一抗原结合区(A)的结合亲和力大于第二臂或第二抗原结合区(B)的结合亲和力。例如,第二臂或第二抗原结合区(B)的 K_d 可以比第一臂或第一抗原结合区(A)的 K_d 大10、100、1000、10000或100000倍(因此亲和力较小)。因此,在一些实施方案中,第一臂或第一抗原结合区(A)的 K_d 可以小于 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 、或 $10^{-12}M$;第二臂或第二抗原结合区(B)的 K_d 可以大于 $10^{-5}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、或 $10^{-9}M$ 。

[0149] 在一些实施方案中,双特异性抗体或其抗原结合片段包含两条轻链和两条重链。两条轻链中的每条具有一个轻链可变区(VL)和一个轻链恒定区(CL)。

[0150] 两个重链中的每一个都具有一个重链可变区(VH)和三个重链恒定区(CH1、CH2和CH3)。在一些实施例中,臂A和臂B的两条轻链是相同的。因此,两条轻链的VL中的CDR可以相同。在一些实施方案中,双特异性抗体或其抗原结合片段中的两条重链是不同的。因此,两条重链的VH中的CDR不同。

[0151] 制备双特异性抗体时,可以使用各种方法来确保相同的重链不相互结合。例如,“杵臼结构”(Knobs-into-holes)的方法引入了一个重链上侧链较大的氨基酸的突变,以及另一条重链上侧链较小的氨基酸的突变。因此,相同的重链相互关联的可能性较小,而两条不同的重链相互关联的可能性较高。例如,在Ridgway、John BB、Leonard G.Presta和Paul Carter的“Knobs-into-holes’ engineering of antibody CH3domains for heavy chain heterodimerization.”*Protein Engineering, Design and Selection* 9.7(1996)中所描述的,其通过引用整体并入本文。

[0152] 结合T细胞特异性抗原和癌症抗原的不平衡的双特异性抗体

[0153] 已经广泛研究了具有可募集并激活T细胞的T细胞特异性抗原(例如CD3、CD4或CD8)结合臂的双特异性抗体(BsAb或BsMab)。但是,出于安全考虑,许多这些双特异性抗体的效应子功能被消除了。由于已显示抗体的效应子功能(例如ADCC和CDC)在癌细胞杀伤中起关键作用,因此“安全”地维持抗体的效应子功能将扩大治疗性抗体的作用机制并改善抗体的癌症杀伤功能。为了“安全”地维持效应子功能并扩展这些双特异性抗体的应用,已经基于计算抗体设计开发了一种不平衡的双特异性抗体技术平台。

[0154] 在此设计中,第一抗原结合区靶向癌症特异性抗原,第二抗原结合区靶向T细胞特异性抗原(例如CD3、CD4或CD8)以募集T细胞以癌症特异性抗原攻击癌症(图28)。

[0155] 如本文所用,术语“癌症特异性抗原”是指在癌细胞表面上特异性表达的抗原。这些抗原可用于鉴定肿瘤细胞。正常细胞很少表达癌症特异性抗原。一些示例性癌症特异性抗原包括,例如,CD20、PSA、PSCA、PD-L1、Her2、Her3、Her1、 β -连环蛋白、CD19、CEACAM3、EGFR、c-Met、EPCAM、PSMA、CD40、MUC1和IGFIR等。PSA主要在前列腺癌细胞上表达,而Her2主要在乳腺癌细胞上表达。

[0156] 在本公开中提供了结合CD20和CD3的双特异性抗体。该双特异性抗体可以用于靶向多种CD20阳性癌症,例如CD20阳性的非霍奇金淋巴瘤(NHL),因此可以用于治疗受试者的非霍奇金淋巴瘤。由于双特异性抗体与单独靶向CD20的治疗性抗体相比具有不同的作用机制来治疗癌症,因此它可以用作CD20阳性癌症的补充疗法,尤其是对于那些对当前CD20疗法反应不佳的CD20阳性癌症(例如具有耐利妥昔单抗的NHL)。

[0157] 对CD3具有高亲和力的抗体会触发T细胞信号传导,并引起不良的免疫反应。因此,需要降低对CD3的低亲和力(例如, K_a 可以小于 $10^5 M^{-1}$ 、 $10^6 M^{-1}$ 、或 $10^7 M^{-1}$)。CD3触发T细胞信号传导,同时“安全”维持抗体效应子功能的风险。如本文所用,术语“安全维持抗体的效应子功能”是指抗体在正常细胞(例如,非癌细胞)上不诱导ADCC或CDC。当多种双特异性抗体出现在靶癌细胞上(例如,成簇)并桥接癌细胞和T细胞之间的相互作用时,这些双特异性抗体可以通过CD3以多价方式触发T细胞信号传导,并激活T细胞然后会杀伤目标癌细胞。

[0158] 因此,本公开提供了包含两个重链可变区和两个轻链可变区的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中第一重链可变区包含与SEQ ID NO:1至少80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,or 99%相同的序列,第二重链可变区包含与SEQ ID NO:2至少80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,or 99%相同的序列,并且所述第一和第二轻链可变区包含与SEQ ID NO:3至少80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,or 99%相同的序列。

[0159] 在一些实施方案中,用于结合CD20的CDR序列包括如Kabat编号所定义的重链可变域的CDR,SEQ ID NO:16-18,以及轻链可变域的CDR,SEQ ID NO:28-30。在Chothia编号下,重链可变域的CDR序列在SEQ ID NO:19-21中列出,而轻链可变域的CDR在SEQ ID NO:31-33中列出。

[0160] 在一些实施方案中,用于结合CD3的CDR序列包括如Kabat编号所定义的重链可变域的CDR,SEQ ID NO:22-24,以及轻链可变域的CDR,SEQ ID NO:28-30。在Chothia编号下,重链可变域的CDR序列在SEQ ID NO:25-27中列出,而轻链可变域的CDR在SEQ ID NO:31-33中列出。

[0161] 在一些实施方案中,双特异性抗体或其抗原结合片段包含第一重链氨基酸序列,其与SEQ ID NO:34、35或36至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同;第二重链氨基酸序列,其与SEQ ID NO:37、38或39至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同;第一轻链氨基酸序列,其与SEQ ID NO:40至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同;以及第二轻链氨基酸序列,其与SEQ ID NO:40至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同。在一些实施方案中,第一轻链氨基酸序列和第二

轻链氨基酸序列是相同的。

[0162] 与癌症特异性抗原和癌症相关抗原结合的不平衡的双特异性

[0163] 本公开还提供了不平衡的双特异性抗体,其第一抗原结合区靶向癌症特异性抗原,并且第二抗原结合区靶向癌症相关抗原。

[0164] 如本文所用,术语“癌症相关抗原”是指在癌细胞上以相对高水平表达但在正常细胞上以相对低水平表达的抗原。CD55、CD59、CD46和许多粘附分子(例如N-钙粘着蛋白、VE-钙粘着蛋白、NCAM、Me1-CAM、ICAM、NrCAM、VCAM1、ALCAM、MCAM等)都是与癌症相关的抗原。尽管癌症特异性抗原和癌症相关抗原均在癌细胞表面表达,但癌症特异性抗原与癌症相关抗原之间的差异在于,癌症相关抗原也在正常细胞上表达,但相比于癌细胞的水平相对较低。相反,癌症特异性抗原很少在正常细胞上表达,即使其在正常细胞上表达,其量也极低。针对癌症特异性抗原的抗体通常不会诱导对正常细胞的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)。相反,以高亲和力靶向癌症相关抗原的抗体可能在正常细胞之间引起细胞毒性作用。因此,重要的是双特异性抗体以相对低的亲和力与癌症相关抗原结合(图29)。

[0165] 实施例中提供了结合PD-L1和CD55的双特异性抗体。该抗体可用于通过ADCC或CDC治疗具有PD-L1和CD55阳性癌症的受试者,以及阻断PD-L1/PD1相互作用以激活T细胞依赖性免疫应答并降低CD55对CDC的抑制。此外,由于癌细胞可能变得对PD-L1抗体具有抗性,因此癌细胞的第二臂和CD 55之间的结合可以提供额外的治疗效果。

[0166] 因此,本公开提供了包含两个重链可变区和两个轻链可变区的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中第一重链可变区包含与SEQ ID NO:4至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同的序列,第二重链可变区包含与SEQ ID NO:5至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同的序列,并且第一和第二轻链可变区包含与SEQ ID NO:6或7至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同的序列。

[0167] 在一些实施方案中,用于结合PD-L1的CDR序列包括由Kabat编号定义的重链可变域的CDR,SEQ ID NO:41-43,和轻链可变域的CDR,SEQ ID NO:53-55或59-61。在Chothia编号下,重链可变域的CDR序列在SEQ ID NO:44-46中列出,而轻链可变域的CDR在SEQ ID NO:56-58或62-64中列出。

[0168] 在一些实施方案中,用于结合CD55的CDR序列包括由Kabat编号定义的重链可变域的CDR,SEQ ID NO:47-49,和轻链可变域的CDR,SEQ ID NO:53-55或59-61。在Chothia编号下,重链可变域的CDR序列在SEQ ID NO:50-52中列出,而轻链可变域的CDR在SEQ ID NO:56-58或62-64中列出。

[0169] 在一些实施方案中,双特异性抗体或其抗原结合片段包含第一重链氨基酸序列,其与SEQ ID NO:65至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同;第二重链氨基酸序列,其与SEQ ID NO:66至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同;第一轻链氨基酸序列,其与SEQ ID NO:67或68至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同;以及第二轻链氨基酸序列,其第一轻链氨基酸序列,其与SEQ ID NO:67或68至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同。在一些实施方案中,第一

轻链氨基酸序列和第二轻链氨基酸序列是相同的。

[0170] 制备不平衡的双特异性抗体或抗原或其抗原结合片段

[0171] 双特异性抗体或抗原或其抗原结合片段可以通过以下方法制备：

[0172] 1) 选择两个目标抗原，并确定与第一抗原结合的抗体（抗体A）的重链可变区序列（VHa）和轻链可变区序列（VLa），然后确定与第二抗原结合的抗体（抗体B）的重链可变区序列（VHb）以及轻链可变区序列（VLb）。

[0173] 2) 比对VLa和VLb，如果序列同源性超过80%，则使用计算机建模工具（例如来自Schordinger, Cambridge, MA的BioLuminate）设计通用的VL。在设计过程中，尝试保持VLa的亲合力，但在一定程度上会牺牲VLb的亲合力。常见的VL可以是VLa、VLb本身，也可以是其序列与VLa和VLb具有高度同源性的新VLc。VLa和VLb的3D结构可以例如根据结构模型或晶体结构来确定。该过程可以从VLa的序列开始。如果基于3D结构，则轻链中的氨基酸被认为对结合第二抗原很重要（例如，当它与VHb配对时），而不涉及与第一抗原的结合（例如，当它与VHa配对时），则可以将VLa中的氨基酸更改为VLb中的相应氨基酸。重复此过程几次后，可以获得共同的VLc。

[0174] 3) 如果VLa和VLb的同源性小于80%，则通过用抗体A的VL替换现有人源性幼稚ScFV文库的VL来制备人ScFV或Fab噬菌体文库，然后使用易错PCR诱导少于20%的核酸突变成VL，淘选针对抗体B的抗原，得到一个新的以VLa或其同源物（>80%同源性）作为VL的抗体B'。如果VL不是VLa，而是VLa同源物（例如，具有>80%的同源性），则重复步骤2)以设计共同的VL。

[0175] 4) 使用计算机建模工具分别重新设计VHa和VHb序列，以增加A和B的生物化学和生物物理特性（例如3D等电点（PI））之间的差异。在此过程中，不能降低A的亲合力，而B的亲合力可以降低到一定程度。

[0176] 5) 开发缓冲系统以纯化不平衡的双特异性抗体。

[0177] 肽的等电点（PI）是特定分子在统计平均值中不携带净电荷时的pH值。组成肽的氨基酸本质上可以是正、负、中性或极性，并共同为蛋白质提供总电荷。但是，蛋白质中的某些氨基酸被掩埋在蛋白质中，并且不会与其周围的溶液发生相互作用。3D PI考虑了蛋白质的3D结构，并提供了对pH值的更好估计，当蛋白质正确折叠时，在该pH值的统计平均值中不携带净电荷。（我们使用了出版物中的梯度pH缓冲液，因此该缓冲液不是我们的发明。但是我们仍然需要优化纯化过程）。

[0178] 在一些实施方案中，双特异性抗体或抗原或其抗原结合片段也可以通过以下方法制备：

[0179] (a) 选择第一抗原和第二抗原，并鉴定与第一抗原结合的第一抗体或其抗原结合片段以及与第二抗原结合的第二抗体或其抗原结合片段，其中第一抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区（VHa）和第一轻链可变区（VLa），第二抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区（VHb）和第二轻链可变区（VLb）；

[0180] (b) 确定VHa、VLa和VLb的氨基酸序列；

[0181] (c) 比对VLa和VLb的氨基酸序列，并确定VLa和VLb之间的序列同源性小于80%；

[0182] (d) 用VLa替换噬菌体展示抗体文库中的所有轻链可变区，并针对第二种抗原进行淘选以获得第三重链可变区（VHc）；

[0183] (e) 重新设计VHa和VHc序列,从而获得VHa'和VHc',以增加第一蛋白质和第二蛋白质之间的生物化学或生物物理特征的差异,其中所述第一蛋白质包含两个各自含有VHa'的多肽和两个各自含有VL a的多肽,并且所述第二蛋白质包含两个各自含有VHc'的多肽和两个各自含有VL a的多肽;并且

[0184] (f) 产生具有两个轻链可变区和两个重链可变区的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中两个轻链可变区各自包含VL a,并且两个重链可变区分别包含VHa'和VHc'。

[0185] 在一些实施方案中,双特异性抗体或抗原或其抗原结合片段也可以通过以下方法制备:

[0186] (a) 选择第一抗原和第二抗原,并鉴定与第一抗原结合的第一抗体或其抗原结合片段和与第二抗原结合的第二抗体或其抗原结合片段,其中第一抗体或其抗原结合片段包含第一重链可变区(VHa)和第一轻链可变区(VL a),第二抗体或其抗原结合片段包含第二重链可变区(VHb)和第二抗体轻链可变区(VL b);

[0187] (b) 确定VHa、VL a、VHb和VL b的氨基酸序列;

[0188] (c) 比对VL a和VL b的氨基酸序列,并确定VL a和VL b之间的序列同源性小于80%;

[0189] (d) 用多个轻链可变区替换噬菌体展示抗体文库中的所有轻链可变区,其中所述轻链可变区与VL a或VL b至少80%、85%、90%、95%或99%相同;

[0190] (e) 针对第一和/或第二抗原(例如,第二抗原)进行淘选;

[0191] (f) 选择共同的轻链可变区(VL c)和第三重链可变区(VHc),其中VHa-VL c以期望的亲和力结合所述第一抗原并且VHc-VL c以期望的亲和力结合所述第二抗原;

[0192] 重新设计VHa和VHc序列,从而获得VHa'和VHc',以增加第一蛋白质和第二蛋白质之间的生物化学或生物物理特征的差异,其中所述第一蛋白质包含两个各自含有VHa'的多肽和两个各自含有VL c的多肽,并且所述第二蛋白质包含两个各自含有VHc'的多肽和两个各自含有VL c的多肽;并且

[0193] (h) 产生具有两个轻链可变区和两个重链可变区的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述两个轻链可变区各自包含VL c,并且所述两个重链可变区分别包含VHa'和VHc'。

[0194] 在一些实施方案中,如果VHa-VL c不能以期望的亲和力结合至第一抗原,则可以执行另外的步骤。例如,如果VL c与VL a至少有80%相同,则可以设计一条新的普通轻链。在一些实施方案中,该过程以VL a开始,并且可以基于本文所述的方法(例如,基于VL a和VL c的3D结构)将氨基酸突变为VL c中的氨基酸。

[0195] 在一些实施方案中,设计共同的轻链可变区涉及比对VL a和VL b,并研究在相同kabat位置上VL a和VL b之间的不同残基。如果VL b上的不同残基不接触B Fv结构上的CDR、界面残基、规范残基或游标区残基,则VL b上的残基会突变为VL a上相同kabat位置的残基。否则,将保留VL b上的残基。

[0196] 在一些实施方案中,重新设计重链可变区涉及使用BioLuminate计算Fv A和Fv B的3D PI,并突变非CDR、非规范、非界面和非游标区残基,从而使具有较高3D PI的Fv更高并使具有较低3D PI的Fv甚至更低。

[0197] 可以在例如BioLuminate的用户指南中找到如何使用BioLuminate的参考,该指南通过引用整体并入本文。

[0198] 抗体和抗原结合片段

[0199] 本公开内容提供了抗体及其抗原结合片段,其包含本文所述的互补决定区(CDR)、重链可变区、轻链可变区、重链或轻链。在一些实施方案中,抗体及其抗原结合片段是不平衡的双特异性抗体及其抗原结合片段。

[0200] 通常,抗体(也称为免疫球蛋白)由两类多肽链组成:轻链和重链。本公开的一种非限制性抗体可以是完整的四个免疫球蛋白链抗体,其包含两个重链和两个轻链。抗体的重链可以是任何同种型,包括IgM、IgG、IgE、IgA或IgD,也可以是包括IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgE1、IgE2等的亚型。轻链可以是 κ 轻链或 λ 轻链。抗体可以包含轻链的两个相同拷贝和/或重链的两个相同拷贝。各自包含一个可变结构域(或可变区,VH)和多个恒定结构域(或恒定区)的重链在其恒定结构域内通过二硫键彼此结合以形成抗体的“茎”。各自包含一个可变结构域(或可变区,VL)和一个恒定结构域(或恒定区)的轻链各自通过二硫键结合至一条重链。每个轻链的可变区与它所结合的重链的可变区对齐。轻链和重链的可变区都包含三个高变区,它们夹在更保守的框架区(FR)之间。

[0201] 这些高变区称为互补决定区(CDR),形成包含抗体主要抗原结合表面的环。四个构架区主要采用 β -折叠构象,并且CDR形成连接并且在某些情况下形成 β -折叠结构的一部分的环。每条链中的CDR都被框架区紧密相连,并且与另一条链中的CDR一起有助于形成抗原结合区。

[0202] 通过分析抗体的氨基酸序列来鉴定抗体的CDR区的方法是众所周知的,并且CDR的许多定义是常用的。Kabat定义基于序列变异性,Chothia定义基于结构环区域的位置。这些方法和定义描述于例如Martin,“Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains,”Antibody engineering, Springer Berlin Heidelberg, 2001.422-439;Abhinandan等,“Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains,”Molecular immunology 45.14(2008):3832-3839;Wu,T.T.和Kabat,E.A.(1970)J.Exp.Med.132:211-250;Martin等,Methods Enzymol.203:121-53(1991);Morea等,Biophys Chem.68(1-3):9-16(1997年10月);Morea等,J Mol Biol.275(2):269-94(1998年1月);Chothia等,Nature342(6252):877-83(1989年12月);Ponomarenko和Bourne,BMC Structural Biology 7:64(2007);这些文献中的每一个均通过引用整体并入本文。除非在本公开中特别指出,否则在本公开中默认使用Kabat编号。

[0203] CDR对于识别抗原表位很重要。如本文所用,“表位”是能够被抗体的抗原结合结构域特异性结合的靶分子的最小部分。表位的最小大小可能约为3、4、5、6或7个氨基酸,但这些氨基酸不必位于抗原一级结构的连续线性序列中,因为表位可能取决于基于抗原的二级和三级结构的抗原三维构型。

[0204] 在一些实施方案中,抗体是完整的免疫球蛋白分子(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgD、IgE、IgA)。IgG亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)是高度保守的,它们的恒定区不同,特别是它们的铰链和上部CH2域。IgG亚类的序列和差异是本领域已知的,并且例如描述于Vidarsson等,“IgG subclasses and allotypes:from structure to effector functions.”Frontiers in immunology 5(2014);Irani等,“Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic

monoclonal antibodies against infectious diseases.”Molecular immunology 67.2 (2015):171-182;Shakib,Farouk编著,The human IgG subclasses:molecular analysis of structure,function and regulation.Elsevier,2016;这些文献中的每一个均通过引用整体并入本文。

[0205] 抗体也可以是衍生自任何物种(例如人、啮齿动物、小鼠、大鼠、骆驼科动物)的免疫球蛋白分子。本文公开的抗体还包括但不限于多克隆、单克隆、单特异性、多特异性抗体和包括与另一多肽融合的免疫球蛋白结合结构域的嵌合抗体。术语“抗原结合结构域”或“抗原结合片段”是保留完整抗体特异性结合活性的抗体的一部分,即能够特异性结合完整抗体靶标分子的表位的抗体的任何部分。它包括例如Fab、Fab’、F(ab’)₂以及这些片段的变体。因此,在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以是例如scFv、Fv、Fd、dAb、双特异性抗体、双特异性scFv、双抗体、线性抗体、单链抗体分子、由抗体片段形成的多特异性抗体,以及任何包含与抗体结合域相同或与其同源的结合域的多肽。抗原结合结构域的非限制性实例包括,例如,完整抗体的重链和/或轻链CDR、完整抗体的重链和/或轻链可变区、完整抗体的全长重链或轻链或来自完整抗体重链或轻链的单个CDR。

[0206] 在一些实施方案中,scFV具有两个重链可变域和两个轻链可变域。在一些实施方案中,scFV具有两个抗原结合区(抗原结合区:A和B),并且两个抗原结合区可以以不同的亲和力结合各自的靶抗原。

[0207] 在一些实施方案中,抗原结合片段可以形成嵌合抗原受体(CAR)的一部分。在一些实施方案中,嵌合抗原受体是如本文所述的单链可变片段(scFv)的融合物,其融合至CD3- ζ 跨膜-和内结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体还包含来自多种共刺激蛋白受体的细胞内信号传导域(例如,CD28、41BB、ICOS)。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含多个信号传导域,例如CD3 ζ -CD28-41BB或CD3 ζ -CD28-0X40,以增加效力。因此,一方面,本公开进一步提供表达如本文所述的嵌合抗原受体的细胞(例如,T细胞)。

[0208] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以结合两种不同的抗原或两种不同的表位。

[0209] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包含选自表1、表2、表11和表12的一个、两个或三个重链可变区CDR。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包含选自表3、表13和表14的一个、两个或三个轻链可变区CDR。

[0210] 在一些实施方案中,抗体可以具有包含互补决定区(CDR)1、2、3的重链可变区(VH),其中CDR1区包含与选定的VH CDR1氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成;CDR2区包含与选定的VH CDR2氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成;CDR3区包含与选定的VH CDR3氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成;以及包含互补决定区(CDR)1、2、3的轻链可变区(VL),其中CDR1区包含与选定的VL CDR1氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成;CDR2区包含与选定的VL CDR2氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成;CDR3区包含与选定的VL CDR3氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的氨基酸序列或由其组成。所述选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列显示于表1、表2、表11和表12,并且所述选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列显示于表3、表13、表14。

[0211] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含重链可变域,其包含选自表1、表2、表11和表12的一个、两个或三个CDR,其中具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代。

[0212] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含轻链可变域,其包含选自表3、表13、表14的一个、两个或三个CDR,其中具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代。

[0213] 所述插入、缺失和取代可以在CDR序列内,或在CDR序列的一个或两个末端。

[0214] 可以在Fc区中修饰本公开的抗体和抗体片段以提供所需的效应子功能或血清半衰期。

[0215] 抗体的多聚化可以通过抗体的天然聚集或通过本领域已知的化学或重组连接技术来实现。例如,一定百分比的纯化的抗体制品(例如,纯化的IgG1分子)自发形成包含抗体同二聚体和其他更高阶抗体多聚体的蛋白质聚集体。

[0216] 本文所述的任何抗体或抗原结合片段可以与稳定分子(例如,增加抗体或其抗原结合片段在受试者或溶液中的半衰期的分子)缀合。稳定分子的非限制性例子包括:聚合物(例如聚乙二醇)或蛋白质(例如血清白蛋白,例如人血清白蛋白)。稳定分子的缀合可以在体外(例如,在组织培养中或当以药物组合物形式存储时)或在体内(例如,在人体中)延长抗体或抗原结合片段的半衰期或延长其抗体或抗原结合片段的生物学活性。

[0217] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段(例如,双特异性抗体)可以与治疗剂缀合。包含抗体或其抗原结合片段的抗体-药物缀合物可以共价或非共价结合治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂(例如,细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替诺泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽醌、美登木素生物碱(如DM-1和DM-4)、二酮、丝氨酸、丝裂霉素D、1-脱氢睾酮激素、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、表柔比星和环磷酰胺及其类似物)。

[0218] 抗体特性

[0219] 本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如,双特异性抗体)可以增加免疫反应。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可以使T细胞(例如CD3⁺细胞、CD8⁺和/或CD4⁺细胞)的免疫应答、活性或数量增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、或20倍。

[0220] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可将T细胞的活性或数量降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、或20倍。

[0221] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段在正常细胞(例如,非肿瘤细胞)中或在不存在肿瘤细胞的情况下不诱导免疫应答。

[0222] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段(例如,双特异性抗体)可以结合PD-L1或PD-L2。因此,本文所述的抗体或其抗原结合片段可以阻断PD-1和PD-L1之间的结合和/或PD-1和PD-L2之间的结合。在一些实施方案中,通过结合PD-L1或PD-L2,抗体可以抑制PD-1信号传导途径并上调免疫应答。因此,在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段是PD-1拮抗剂。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是PD-1激动剂。

[0223] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段(例如,双特异性抗体)可以结合CD3。因此,本文所述的抗体或其抗原结合片段可将T细胞募集至靶细胞。

[0224] 在一些实施方案中,抗体(或其抗原结合片段)以小于 $0.1s^{-1}$ 、小于 $0.01s^{-1}$ 、小于 $0.001s^{-1}$ 、小于 $0.0001s^{-1}$ 、或小于 $0.00001s^{-1}$ 的解离速率(koff)特异性结合抗原(例如人蛋白、猴蛋白和/或小鼠蛋白)。在一些实施方案中,解离速率(koff)大于 $0.01s^{-1}$ 、大于 $0.001s^{-1}$ 、大于 $0.0001s^{-1}$ 、大于 $0.00001s^{-1}$ 、或大于 $0.000001s^{-1}$ 。在一些实施方案中,动力学缔合速率(kon)大于 $1 \times 10^2/Ms$ 、大于 $1 \times 10^3/Ms$ 、大于 $1 \times 10^4/Ms$ 、大于 $1 \times 10^5/Ms$ 、或大于 $1 \times 10^6/Ms$ 。在一些实施方案中,动力学缔合速率(kon)小于 $1 \times 10^5/Ms$ 、小于 $1 \times 10^6/Ms$ 、或小于 $1 \times 10^7/Ms$ 。

[0225] 可以从动力学速率常数的商($Kd = koff/kon$)推导亲和力。在一些实施方案中, Kd 小于 $1 \times 10^{-4}M$ 、小于 $1 \times 10^{-5}M$ 、小于 $1 \times 10^{-6}M$ 、小于 $1 \times 10^{-7}M$ 、小于 $1 \times 10^{-8}M$ 、小于 $1 \times 10^{-9}M$ 、或小于 $1 \times 10^{-10}M$ 。在一些实施方案中, Kd 小于50nM、30nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、或1nM。在一些实施方案中, Kd 大于 $1 \times 10^{-4}M$ 、大于 $1 \times 10^{-5}M$ 、大于 $1 \times 10^{-6}M$ 、大于 $1 \times 10^{-7}M$ 、大于 $1 \times 10^{-8}M$ 、大于 $1 \times 10^{-9}M$ 、大于 $1 \times 10^{-10}M$ 、大于 $1 \times 10^{-11}M$ 、或大于 $1 \times 10^{-12}M$ 。此外,可以通过公式 $Ka = 1/Kd$ 从 Kd 推导出 Ka 。

[0226] 用于测量抗体对抗原的亲合力的通用技术包括例如ELISA、RIA和表面等离子共振(SPR)。

[0227] 在一些实施例中,确定热稳定性。本文所述的抗体或抗原结合片段的 Tm 可以大于60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、或95°C。

[0228] 由于IgG可以描述为多结构域蛋白,因此解链曲线有时显示两个转变或三个转变,具有第一变性温度 $Tm D1$ 和第二变性温度 $Tm D2$,以及任选的第三变性温度 $Tm D3$ 。

[0229] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段的 $Tm D1$ 大于60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、或95°C。在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段的 $Tm D2$ 大于60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、或95°C。在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段的 $Tm D3$ 大于60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、或95°C。

[0230] 在一些实施例中, Tm 、 $Tm D1$ 、 $Tm D2$ 、 $Tm D3$ 小于60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、或95°C。

[0231] 在一些实施方案中,当温度小于60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、或95°C时,本文所述的抗体或抗原结合片段不会开始形成聚集。在一些实施例中, $Tagg266$ 或 $Tagg473$ 小于60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、或95°C。

[0232] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段的 pI 大于7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、

9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、或9.9。在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段的pI小于7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、或9.9。

[0233] 在一些实施方案中,抗体具有大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、或200%的肿瘤生长抑制百分比(tumor growth inhibition, TGI%)。在一些实施方案中,抗体具有小于60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、或200%的肿瘤生长抑制百分比。可以在例如治疗开始后的3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、或30天或者治疗开始后的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或12个月测定所述TGI%。如如本文所用,使用以下公式计算肿瘤生长抑制百分比(TGI%):

[0234] $TGI(\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$

[0235] T_i 是第*i*天治疗组的平均肿瘤体积。 T_0 是治疗组在第0天的平均肿瘤体积。 V_i 是第*i*天对照组的平均肿瘤体积。 V_0 是对照组在第0天的平均肿瘤体积。

[0236] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以使补体依赖性细胞毒性(CDC)增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、或20倍。

[0237] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可将抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、或20倍。

[0238] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以将内化率增加10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、或20倍。

[0239] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以将吞噬作用速率增加10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、或20倍。

[0240] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以例如通过增加效应子T细胞增殖和/或增加效应子T细胞的 γ 干扰素产生来增强T细胞功能(例如,与之前用抗体或抗原结合片段治疗的增殖和/或细胞因子产生相比)。

[0241] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段例如通过增加CD4+效应T细胞增殖和/或通过CD4+效应T细胞增加 γ 干扰素产生来增强CD4+效应T细胞功能(例如,与在使用抗体或抗原结合片段治疗之前的增殖和/或细胞因子产生相比)。在一些实施方案中,细胞因子是 γ 干扰素。在一些实施方案中,例如,抗体或抗原结合片段增加肿瘤内(浸润)CD4+效应T细胞的数量(例如,CD4+效应T细胞的总数,或例如CD45+细胞中CD4+细胞的百分比)。在用抗体或抗原结合片段治疗之前,对肿瘤内(浸润)CD4+T细胞进行检测。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段增加表达 γ 干扰素的肿瘤内(浸润)CD4+效应T细胞的数量(例如,总的表达 γ 干扰素的CD4+细胞,或例如表达 γ 干扰素的CD4+细胞在总CD4+细胞中的百分比),例如,与治疗前表达 γ 干扰素的肿瘤内(浸润)CD4+T细胞的数量相比。

[0242] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段增加肿瘤内(浸润)CD8+效应T细胞的数量(例如,CD8+效应T细胞的总数,或例如CD45+细胞中CD8+的百分比),例如,与治疗前的肿瘤内(浸润)CD8+T效应细胞相比。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段增加表达 γ 干扰

素的肿瘤内(浸润)CD8+效应T细胞的数量(例如总的CD8+细胞中表达 γ 干扰素的CD8+细胞的百分比),例如,与使用抗体治疗前的表达 γ 干扰素的肿瘤内(浸润)CD8+T效应细胞相比。

[0243] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段例如通过增加记忆T细胞增殖和/或增加记忆细胞产生的细胞因子(例如, γ 干扰素)来增强记忆T细胞功能。

[0244] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段具有功能性Fc区。在一些实施方案中,功能性Fc区的效应子功能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一些实施方案中,功能性Fc区的效应子功能是吞噬作用。在一些实施方案中,功能性Fc区的效应子功能是ADCC和吞噬作用。在一些实施方案中,Fc区是人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4。

[0245] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以诱导凋亡。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段不具有功能性Fc区。例如,抗体或抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。

[0246] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是人源化抗体。人源化百分比是指与国际免疫遗传学信息系统(IMG)数据库中的人抗体序列相比,重链或轻链可变区序列的同一性百分比。在一些实施方案中,人源化百分比大于80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、或95%。关于如何确定人源化百分比的详细描述是本领域已知的,并且例如在Jones, Tim D.等, "The INNs and outs of antibody nonproprietary names." MAbs. 第8卷, 第1期, Taylor&Francis, 2016年中描述,其全部内容通过引用合并于此。高的人源化百分比通常具有各种优势,例如,在人类中更安全、更有效、更可能被人类受试者耐受和/或更少地具有副作用。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是人抗体。

[0247] 重组载体

[0248] 本公开还提供了重组载体(例如表达载体),其包括本文公开的分离的多核苷酸(例如编码本文公开的多肽的多核苷酸),将重组载体引入宿主细胞(即使得宿主细胞包含多核苷酸和/或包含多核苷酸),以及通过重组技术生产重组抗体多肽或其片段。

[0249] 如本文所用,“载体”是能够递送一个或多个的任何构建体。当将载体引入宿主细胞时,宿主细胞感兴趣的一种或多种多核苷酸。“表达载体”能够在已引入表达载体的宿主细胞中递送和表达一种或多种目的多核苷酸作为编码的多肽。因此,在表达载体中,通过与载体内或基因组内的调控元件如启动子、增强子和/或poly-A尾巴可操作地连接,将目的多核苷酸定位在载体中表达,不管在载体内或者在宿主细胞的基因组内的感兴趣的多核苷酸的插入位点或其附近或其侧接处,使得感兴趣的多核苷酸将在引入表达载体的宿主细胞中翻译。

[0250] 可以通过本领域已知的方法将载体引入宿主细胞,例如电穿孔、化学转染(例如DEAE-葡聚糖)、转化、转染、和感染和/或转导(例如重组病毒)。因此,载体的非限制性实例包括病毒载体(可用于产生重组病毒)、裸露的DNA或RNA、质粒、粘粒、噬菌体载体以及与阳离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体。

[0251] 在一些实施方式中,使用病毒表达系统(例如牛痘或其他痘病毒、逆转录病毒或腺病毒)引入本文公开的多核苷酸(例如,编码本文公开的多肽的多核苷酸),这可能涉及使用非致病性的(有缺陷的)可复制病毒,或可使用复制缺陷病毒。在后一种情况下,病毒繁殖通常只会在相容的病毒包装细胞中发生。合适的系统公开于例如Fisher-Hoch等, 1989,

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:317-321;Flexner等,1989,Ann.N.Y.Acad.Sci.569:86-103; Flexner等,1990,Vaccine,8:17-21;U.S.专利号4,603,112、4,769,330、和5,017,487; W089/01973;U.S.专利号4,777,127;GB 2,200,651;EP 0,345,242;WO 91/02805;Berkner-Biotechniques,6:616-627,1988;Rosenfeld等,1991,Science,252:431-434;Kolls等, 1994,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91:215-219;Kass-Eisler等,1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:11498-11502;Guzman等,1993,Circulation,88:2838-2848; 以及Guzman等,1993,Cir.Res.,73:1202-1207。将DNA合并至这种表达系统的技术是本领域 普通技术人员众所周知的。DNA也可以是“裸露”的,例如Ulmer等,1993,Science,259:1745- 1749,以及Cohen,1993,Science,259:1691-1692中所述的。裸露的DNA的摄取可以通过将 DNA涂覆在可生物降解的珠子上来增加,该珠子可以有效地转运到细胞中。

[0252] 为了表达,可以将包含本文公开的编码抗体或编码多肽的多核苷酸的DNA插入物 可操作地连接至合适的启动子(例如异源启动子),例如噬菌体 λ PL启动子,大肠杆菌lac、 trp和tac启动子,SV40早期和晚期启动子以及逆转录病毒LTR的启动子,仅举几例。其他合 适的启动子是技术人员已知的。表达构建体可以进一步包含用于转录起始、终止的位点,并 且在转录区域中包含用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的成熟转录物的编码部分 可以包括在起始处起始的翻译和适当地位于待翻译多肽末端的终止密码子(UAA、UGA或 UAG)。

[0253] 如所指示的,表达载体可以包括至少一种选择标记。此类标记包括用于真核细胞 培养的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性,以及用于在大肠杆菌和其他细菌中培养的四环素或 氨苄青霉素抗性基因。合适宿主的代表性实例包括但不限于细菌细胞,例如大肠杆菌、链霉 菌和鼠伤寒沙门氏菌细胞;真菌细胞,例如酵母细胞;昆虫细胞,如果蝇S2和斜纹夜蛾Sf9细 胞;动物细胞,例如CHO、COS、Bowes黑色素瘤和HK 293细胞;和植物细胞。本文所述宿主细胞 的合适培养基和条件是本领域已知的。

[0254] 用于细菌的非限制性载体包括pQE70、pQE60和pQE-9,可从Qiagen获得。pBS载体、 Phagescript载体、Bluescript载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A,可从Stratagene获得; 以及ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5,可从Pharmacia获得。非限制性的真核载 体包括可pWLNE0、pSV2CAT、pOG44、pXT1和pSG,可从Stratagene获得。以及pSVK3、pBPV、pMSG 和pSVL,可从Pharmacia获得。其他合适的载体对于技术人员将是显而易见的。

[0255] 适合使用的非限制性细菌启动子包括大肠杆菌lacI和lacZ启动子、T3和T7启动 子、gpt启动子、 λ PR和PL启动子以及trp启动子。合适的真核启动子包括CMV立即早期启动 子、HSV胸苷激酶启动子、SV40早期和晚期启动子、逆转录病毒LTR的启动子,例如劳斯肉瘤 病毒(RSV)的启动子,以及金属硫蛋白的启动子,例如小鼠金属硫蛋白-I启动子。

[0256] 在酵母酿酒酵母中,可以使用许多含有组成型或诱导型启动子的载体,例如 α 因 子、醇氧化酶和PGH。有关评论请参见Ausubel等(1989)Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,N.Y,以及Grant等,Methods Enzymol.,153:516-544 (1997)。

[0257] 可以通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、 转导、感染或其他方法将构建体引入宿主细胞。在许多标准实验室手册中描述了这样的方 法,例如Davis等,Basic Methods In Molecular Biology(1986),其通过引用整体并入本

文。

[0258] 可以通过将增强子序列插入载体中来增加高级真核生物对编码本公开内容的抗体的DNA的转录。增强子是DNA的顺式作用元件,通常约10到300bp,在给定宿主细胞类型中起增加启动子转录活性的作用。增强子的例子包括SV40增强子,其在复制起点的后侧位于碱基对100至270,巨细胞病毒早期启动子增强子,在复制起点的后侧的多瘤增强子,以及腺病毒增强子。

[0259] 为了将翻译的蛋白质分泌到内质网腔、周质空间或细胞外环境中,可以将适当的分泌信号掺入表达的多肽中。信号可以是多肽的内源信号,也可以是异源信号。

[0260] 多肽(例如抗体)可以修饰形式表达,例如融合蛋白(例如GST-融合物)或具有组氨酸标签,并且不仅可以包括分泌信号,而且可以包括其他异源功能区。例如,可以在多肽的N-末端添加另外的氨基酸区域,特别是带电荷的氨基酸,以改善在纯化期间或在随后的处理和储存期间在宿主细胞中的稳定性和持久性。同样,可以将肽部分添加到多肽中以促进纯化。可以在最终制备多肽之前除去这些区域。向多肽中添加肽部分以引起分泌或排泄,以提高稳定性并促进纯化,这是本领域熟知和常规的技术。

[0261] 本公开还提供了与本文所述的任何核苷酸序列至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%相同的核酸序列,并且提供了与本文所述的任何氨基酸序列至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%相同的氨基酸序列。

[0262] 本公开还提供了与本文所述的任何核苷酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同源性的核酸序列,并且提供了与本文所述的任何氨基酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同源性的氨基酸序列。

[0263] 在一些实施方案中,本公开涉及编码本文所述的任何肽的核苷酸序列,或由本文所述的任何核苷酸序列编码的任何氨基酸序列。在一些实施方案中,核酸序列小于10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150、200、250、300、350、400、500、或600核苷酸。在一些实施方案中,氨基酸序列小于5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、或400氨基酸残基。

[0264] 在一些实施方案中,氨基酸序列(i)包含氨基酸序列;或(ii)由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列是本文所述的任何序列。

[0265] 在一些实施方案中,核酸序列(i)包括核酸序列;或(ii)由核酸序列组成,其中所述核酸序列是本文所述的任何序列。

[0266] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,将序列进行比对以达到最佳比较目的(例如,出于比较的目的,可以在第一和第二氨基酸或核酸序列中的一个或两个中引入缺口,可以忽略最佳比对和非同源序列)。为了比较目的而比对的参考序列的长

度为参考序列的长度的至少80%，并且在一些实施方案中为至少90%、95%或100%。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时，则分子在该位置是相同的（如本文所用，氨基酸或核酸的“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”）。考虑到缺口数和每个缺口的长度，两个序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置的数目的函数，这需要被引入以实现两个序列的最佳比对。为了本发明的目的，两个序列的比较和两个序列之间同一性百分数的确定可以使用Blossum 62评分矩阵来实现，其间隙罚分为12，间隙延伸罚分为4，移码间隙罚分为5。

[0267] 也可以确定序列同源性的百分比（例如，氨基酸序列同源性或核酸同源性）。如何确定序列同源性的百分比是本领域已知的。在一些实施方案中，具有相似理化性质的保守的氨基酸残基（同源性百分比），例如亮氨酸和异亮氨酸，可用于测量序列相似性。具有相似的物理化学性质的氨基酸残基家族已经在本领域中定义。这些家族包括例如具有碱性侧链的氨基酸（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸），酸性侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸），不带电荷的极性侧链（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸）、非极性侧链（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸）、 β 支链侧链（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳香族侧链（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。在许多情况下，同源性百分比高于同一性百分比。

[0268] 制备抗体的方法

[0269] 使用用于多克隆和单克隆抗体制备的标准技术，人蛋白质的分离片段（例如，CD55、CD3、癌症特异性抗原或癌症相关抗原）可以用作免疫原以产生抗体。可以通过多次注射（例如皮下或腹膜内注射）抗原肽或蛋白质在动物中产生多克隆抗体。在一些实施方案中，抗原性肽或蛋白质注射有至少一种佐剂。在一些实施方案中，抗原性肽或蛋白质可以与要免疫的物种中具有免疫原性的试剂缀合。可以不止一次（例如两次、三次或四次）向动物注射抗原肽或蛋白质。

[0270] 可以使用全长多肽或蛋白质或者其抗原肽片段作为免疫原。蛋白质的抗原性肽包含蛋白质的氨基酸序列的至少8个（例如，至少10、15、20或30个）氨基酸残基，并且包含蛋白质的表位，使得针对该肽的抗体产生与蛋白质形成特异性免疫复合物。

[0271] 免疫原通常用于通过免疫合适的受试者（例如表达至少一个人免疫球蛋白基因座的人或转基因动物）来制备抗体。合适的免疫原性制剂可以包含例如重组表达的或化学合成的多肽。该制剂可以进一步包含佐剂，例如弗氏完全或不完全佐剂，或类似的免疫刺激剂。

[0272] 如上所述，可以通过用多肽或其抗原性肽（例如，蛋白质的一部分）作为免疫原对合适的受试者进行免疫来制备多克隆抗体。可以通过标准技术随时间监测免疫对象的抗体滴度，例如使用固定化多肽或肽的酶联免疫吸附测定（ELISA）。如果需要，可以从哺乳动物中（例如从血液中）分离抗体分子，并通过众所周知的技术例如蛋白G层析的蛋白A进一步纯化以获得IgG部分。在免疫后的适当时间，例如，当特异性抗体滴度最高时，可以从受试者获得产生抗体的细胞，并通过标准技术来制备单克隆抗体，例如Kohler等（Nature 256:495-497, 1975）最先描述的杂交瘤技术、人类B细胞杂交瘤技术（Kozbor等，Immunol. Today 4: 72, 1983）、EBV杂交瘤技术（Cole等，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan

R.Liss, Inc., 第77-96页, 1985)、或三联体技术。产生杂交瘤的技术是众所周知的(一般参见, *Current Protocols in Immunology*, 1994, Coligan等(编著), John Wiley&Sons, Inc., New York, NY)。通过筛选杂交瘤培养物上清液中结合目标多肽或表位的抗体, 例如使用标准ELISA测定法, 检测产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0273] 可通过将适当的核苷酸变化引入编码本文所述的人抗体、人源化抗体或嵌合抗体或其抗原结合片段的DNA中, 或通过肽合成来制备本文所述的抗体或其抗原结合片段的变体。此类变体包括例如组成抗体或抗原结合结构域的抗原结合位点的氨基酸序列内的残基的缺失、插入或取代。在这类变体的群体中, 一些抗体或抗原结合片段将对靶蛋白具有增加的亲和力。可以进行缺失、插入和/或组合的任何组合以获得对靶标具有增加的结合亲和力的抗体或其抗原结合片段。引入抗体或抗原结合片段的氨基酸变化也可以改变或将新的翻译后修饰引入抗体或抗原结合片段, 例如改变(例如, 增加或减少)糖基化位点的数量、类型的糖基化位点(例如, 改变氨基酸序列以使细胞中存在的酶附着不同的糖), 或引入新的糖基化位点。

[0274] 本文公开的抗体可以衍生自任何动物物种, 包括哺乳动物。天然抗体的非限制性实例包括源自人、灵长类动物(例如猴子和猿)、牛、猪、马、绵羊、骆驼科动物(例如骆驼和美洲驼)、鸡、山羊和啮齿动物(例如大鼠、小鼠、仓鼠和兔子)的抗体, 包括经过基因工程改造以产生人抗体的转基因啮齿动物。

[0275] 噬菌体展示(淘选)可用于优化具有所需结合亲和力的抗体序列。在这项技术中, 可以将编码单链Fv(包含VH或VL)的基因插入噬菌体外壳蛋白基因, 使噬菌体在其外部“展示”scFv, 同时在其内部包含该蛋白的基因, 从而在基因型和表型之间的联系。然后可以针对靶抗原筛选这些展示的噬菌体, 以便检测展示的抗原结合位点与靶抗原之间的相互作用。因此, 可以在称为体外选择的过程中筛选和扩增大型蛋白质文库, 并可以获得具有所需结合亲和力的抗体序列。

[0276] 人和人源化抗体包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(或具有与衍生自人种系免疫球蛋白序列的氨基酸序列相同的氨基酸序列)的抗体。人抗体可以包括例如在CDR中不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如, 通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0277] 人源化抗体通常具有移植有非人CDR的人框架(FR)。因此, 人源化抗体具有从非人类来源引入的一个或多个氨基酸序列。这些非人氨基酸残基通常被称为“导入”残基, 其通常取自“导入”可变域。人源化基本上可以通过例如用啮齿动物CDR或CDR序列替代人抗体的相应序列来进行。这些方法描述于例如Jones等, *Nature*, 321:522-525(1986); Riechmann等, *Nature*, 332:323-327(1988); Verhoeyen等, *Science*, 239:1534-1536(1988), 其每一个均通过引用整体并入本文。因此, “人源化”抗体是嵌合抗体, 其中基本上少于完整的人V结构域已被来自非人物种的相应序列取代。在实践中, 人源化抗体通常是小鼠抗体, 其中一些CDR残基和一些FR残基被人类抗体类似位点的残基取代。

[0278] 进一步重要的是将抗体人源化, 同时保留对抗原的高特异性和亲和力以及其他有利的生物学特性。为了实现该目标, 可以通过使用亲本和人源化序列的三维模型对亲本序列和各种概念性人源化产物进行分析的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是普遍可获得的并且为本领域技术人员所熟悉。可以使用计算机程序来说明和显示选定的候选

免疫球蛋白序列可能的三维构象结构。对这些显示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可以从受体和供体序列中选择FR残基并进行组合,从而获得所需的抗体特征,例如对靶抗原的亲合力增加。

[0279] 与原始序列的同一性或同源性通常是经比对并引入缺口后(如果有必要)以获得最大百分比序列同一性并且不考虑将任何保守取代作为序列同一性的一部分之后候选序列中存在的与人、人源化或嵌合抗体或片段中存在的序列相同的氨基酸残基的百分比。

[0280] 在一些实施方案中,可以对抗体或其抗原结合片段进行共价修饰。这些共价修饰可通过化学或酶促合成,或通过酶促或化学裂解来进行。通过使抗体或片段的靶向氨基酸残基与能够与所选侧链或N或C端残基反应的有机衍生剂反应,将抗体或抗体片段的其他类型的共价修饰引入分子中。

[0281] 在一些实施方案中,提供了具有碳水化合物结构的抗体变体,该碳水化合物结构缺少(直接或间接)连接至Fc区的岩藻糖。例如,此类抗体中的岩藻糖的量可以为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。岩藻糖的含量是通过计算相对于通过MALDI-TOF质谱法测得的与Asn 297附着的所有糖结构(例如,络合、杂合和高甘露糖结构)的总和的Asn297糖链中岩藻糖的平均含量来确定的,例如在W02008/077546中所述的。Asn297指天冬酰胺残基,其位于Fc区中大约297位(Fc区残基的Eu编号;或Kabat编号中的314位)。然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可位于位置297上游或下游约±3个氨基酸,即在位置294和300之间。这样的岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。在一些实施方案中,为了降低聚糖的异质性,可以进一步改造抗体的Fc区以用丙氨酸(N297A)代替在位置297处的天冬酰胺。

[0282] 在一些实施方案中,为了通过避免Fab臂交换来促进生产效率,将抗体的Fc区进一步工程化以用脯氨酸(S228P)代替IgG4的228位(EU编号)的丝氨酸。关于S228突变的详细描述描述于例如Silva等,“The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation.”*Journal of Biological Chemistry* 290.9(2015):5462-5469,其通过引用整体并入本文。

[0283] 在一些实施方案中,本文描述的方法被设计为制备双特异性抗体。可通过工程化一对抗体分子之间的界面以最大化从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比来制备双特异性抗体。例如,界面可以包含抗体恒定结构域的CH3结构域的至少一部分。在该方法中,将来自第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链替换为较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换较大的氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生了与较大的侧链相同或相似大小的补偿性“腔”。这提供了一种机制,用于提高异二聚体相对于其他不需要的最终产物(如同二聚体)的产量。例如在W0 96/27011中描述了该方法,其通过引用整体并入。

[0284] 在一些实施方案中,IgG的CH3部分中的一个或多个氨基酸残基被取代。在一些实施方案中,一条重链具有取代Y349C和T366W中的一种或多种。另一个重链可以具有一个或多个以下取代:E356C、T366S、L368A和Y407V。此外,还可以在两个取代的IgG的铰链区处引入取代(-ppcpScp-->-ppcpPcp-)。在一些实施方案中,一条重链具有T366Y(杵)取代,而另

一条重链具有Y407T(白)取代。

[0285] 此外,阴离子交换色谱可用于纯化双特异性抗体。阴离子交换色谱法是一种使用含有二乙基氨基乙基(DEAE)等带正电荷基团的离子交换树脂根据物质的电荷分离物质的过程。在溶液中,树脂涂有带正电的抗衡离子(阳离子)。阴离子交换树脂将与带负电荷的分子结合,取代抗衡离子。阴离子交换色谱可用于基于蛋白质的等电点(p_i)纯化蛋白质。等电点定义为蛋白质没有净电荷的pH。当 $pH > p_i$ 时,蛋白质带有净负电荷;当 $pH < p_i$ 时,蛋白质带有净正电荷。因此,在一些实施方案中,可以将不同的氨基酸取代引入两个重链中,使得包含两个臂A的同型二聚体的 p_i 和包含两个臂B的同型二聚体的 p_i 不同。具有臂A和臂B的双特异性抗体的 p_i 将在同二聚体的两个 p_i 之间。

[0286] 因此,两种同型二聚体和双特异性抗体可以在不同的pH条件下释放。本公开显示可以将一些氨基酸残基取代引入重链以调节pI。

[0287] 因此,在一些实施方案中,Kabat编号位置83上的氨基酸残基是赖氨酸、精氨酸或组氨酸。在一些实施方案中,在位置1、6、43、81和105(Kabat编号)中的一个或多个上的氨基酸残基是天冬氨酸或谷氨酸。

[0288] 在一些实施方案中,在位置13和105中的一个或多个(Kabat编号)上的氨基酸残基是天冬氨酸或谷氨酸。在一些实施方案中,在位置13和42中的一个或多个(Kabat编号)上的氨基酸残基是赖氨酸、精氨酸、组氨酸或甘氨酸。

[0289] 双特异性抗体还可以包括例如交联的或“异源缀合”的抗体。例如,异源缀合物中的一种抗体可以与抗生物素蛋白偶联,而另一种与生物素偶联。杂缀合物抗体也可以使用任何方便的交联方法制备。合适的交联剂和交联技术在本领域中是众所周知的,并且在美国专利号4,676,980中公开,该专利在此全文引入作为参考。

[0290] 由抗体片段产生双特异性抗体的方法也是本领域已知的。例如,可以使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan等(Science 229:81,1985)描述了将完整抗体进行蛋白水解切割以生成F(ab')₂片段的方法。这些片段在二硫醇络合剂亚砷酸钠的存在下被还原,以稳定邻位二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的Fab'片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原将Fab' TNB衍生物之一转化为Fab' 硫醇,并与等摩尔量的另一种Fab' TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。

[0291] 治疗方法

[0292] 本文所述的方法包括用于治疗与癌症有关的疾病的方法。通常,该方法包括将治疗有效量的如本文所述的工程化双特异性抗体(例如,不平衡的双特异性抗体)或其抗原结合片段施用给需要或已经确定需要此类治疗的受试者。

[0293] 如本文所用,“治疗”是指改善与癌症有关的病症的至少一种症状。通常,癌症会导致死亡。因此,治疗可导致预期寿命的增加(例如,至少延长1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月,或延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年)。给予治疗有效量的本文所述试剂(例如失衡的双特异性抗体)以治疗与癌症有关的病症将导致癌细胞数量减少和/或症状减轻。

[0294] 如本文所用,术语“癌症”是指具有自主生长能力的细胞,即以迅速增殖的细胞生长为特征的异常状态或状况。该术语旨在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移组织或恶性转化的细胞、组织或器官,而与组织病理学类型或侵入性阶段无关。本文所用的术语“肿瘤”是指癌细胞,例如大量癌性细胞。可以使用本文所述方法治疗或诊断的癌症包括各

种器官系统的恶性肿瘤,例如影响肺、乳腺、甲状腺、淋巴样、胃肠道和生殖泌尿道、以及包括恶性肿瘤(例如大多数结肠)的腺癌癌症、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、肺部非小细胞癌、小肠癌和食道癌。在一些实施方案中,本文所述的药剂被设计用于治疗或诊断受试者中的癌症。术语“癌”是本领域公认的,是指上皮或内分泌组织的恶性肿瘤,包括呼吸系统癌、胃肠道系统癌、泌尿生殖系统癌、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑色素瘤。在一些实施方案中,癌症是肾癌或黑色素瘤。示例性癌包括由子宫颈、肺、前列腺、乳腺癌、头颈癌、结肠癌和卵巢癌组织形成的癌。该术语还包括癌肉瘤,例如,其包括由癌组织和肉瘤组织组成的恶性肿瘤。“腺癌”是指源自腺组织或其中肿瘤细胞形成可识别的腺结构的癌。术语“肉瘤”是本领域公认的,并且是指间充质衍生的恶性肿瘤。

[0295] 在一些实施方案中,所述癌症是利妥昔单抗(Rituxan®)抗性癌症。

[0296] 一方面,本公开内容还提供了用于治疗受试者中的癌症的方法、降低受试者中肿瘤体积随时间增加的速率的方法、降低发生转移的风险的方法或降低在受试者中发生额外转移风险的方法。在一些实施方案中,治疗可以停止、减缓、延迟或抑制癌症的进展。在一些实施方案中,所述治疗可导致受试者中一种或多种癌症的数目、严重性和/或持续时间减少。

[0297] 一方面,本公开的特征在于方法,该方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的本文公开的抗体或其抗原结合片段或抗体药物缀合物,所述受试者例如患有、鉴定或诊断为以下癌症:例如乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、类癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、头颈癌、肝癌、肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、大肠癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、膀胱癌、尿道癌或血液系统恶性肿瘤。

[0298] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”在整个说明书中可互换使用,并且描述了根据本发明的方法提供治疗的动物、人或非人。本发明考虑了兽医和非兽医应用。人类患者可以是成年人类或未成年人(例如18岁以下的人类)。除人类外,患者包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔子、雪貂、猫、狗和灵长类动物(包括例如非人类的灵长类动物,例如猴子、黑猩猩、大猩猩等)、啮齿动物(例如大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、雪貂、兔子)、兔形目、猪(例如猪、微型猪)马、犬、猫、牛和其他家养、农场和动物园的动物。

[0299] 在一些实施方案中,所述癌症是不可切除的黑素瘤或转移性黑素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、膀胱癌或转移性激素难治性前列腺癌。在一些实施方案中,受试者患有实体瘤。在一些实施方案中,所述癌症是头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、肾细胞癌(RCC)、三阴性乳腺癌(TNBC)或结直肠癌。在一些实施方案中,受试者患有霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,该受试者患有三阴性乳腺癌(TNBC)、胃癌、尿路上皮癌、默克尔细胞癌或头颈癌。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤、胰腺癌、间皮瘤、血液系统恶性肿瘤,尤其是非霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病或晚期实体瘤。

[0300] 在一些实施方案中,本文公开的组合物和方法可以用于治疗处于患癌症风险的患者。癌症患者可以通过本领域已知的各种方法来鉴定。

[0301] 如本文所用,“有效量”是指足以产生有益或期望结果的量或剂量,包括停止、减慢、延迟或抑制疾病例如癌症的进展。有效量将根据被施用例如抗体、抗原结合片段、抗体-药物缀合物、抗体编码多核苷酸、包含多核苷酸的载体和/或其组合物的受试者的年龄和体重、症状的严重程度和给药途径而变化,因此可以根据个体确定给药方式。

[0302] 可以一次或多次施用来施用有效量。举例来说,抗体、抗原结合片段或抗体-药物缀合物的有效量是足以改善、停止、稳定、逆转、抑制、减慢和/或延迟受试者的自身免疫性疾病或癌症进展的量,或者是在体外足以改善、停止、稳定、逆转、减慢和/或延迟细胞(例如活检细胞、本文所述的任何癌细胞或细胞系(例如癌细胞系))增殖的量。如本领域所理解的,抗体、抗原结合片段或抗体-药物缀合物的有效量可以变化,这尤其取决于患者的病史以及其他因素,例如所使用的抗体的类型(和/或剂量)。

[0303] 可以凭经验确定施用本文公开的抗体、编码抗体的多核苷酸、抗体-药物缀合物和/或组合物的有效量和用药方案,并且进行这样的确定在本领域技术范围内。本领域技术人员将理解,必须施用的剂量将取决于例如将接受本文公开的抗体、编码抗体的多核苷酸、抗体-药物缀合物和/或组合物的哺乳动物,施用途径,抗体的特定类型,编码抗体的多核苷酸,抗原结合片段,抗体-药物缀合物和/或本文公开的组合物以及将施用于该哺乳动物的其他药物。选择抗体或抗原结合片段的合适剂量的指南可以在关于抗体和抗原结合片段的治疗用途的文献中找到,例如,Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone等编著, Nokes Publications, Park Ridge, N.J., 1985, 第22章, 第303-357页; Smith等, Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber等编著, Raven Press, New York, 1977, 第365-389页。

[0304] 有效量的抗体的典型每日剂量是0.01mg/kg至100mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以小于100mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg或0.1mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以大于10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg或0.01mg/kg。在一些实施方案中,所述剂量为约10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.9mg/kg、0.8mg/kg、0.7mg/kg、0.6mg/kg、0.5mg/kg、0.4mg/kg、0.3mg/kg、0.2mg/kg或0.1mg/kg。

[0305] 在本文所述的任何方法中,至少一种抗体、其抗原结合片段、抗体-药物缀合物或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合片段、抗体-药物缀合物或药物组合物)以及任选地至少一种其他治疗剂可以按照至少每周一次(例如,每周一次、每周两次、每周三次、每周四次、每天一次、每天两次、或每天三次)向受试者施用。在一些实施方案中,在相同组合物(例如液体组合物)中施用至少两种不同的抗体和/或抗原结合片段。在一些实施方案中,至少一种抗体、抗原结合片段、抗体-药物缀合物和至少一种其他治疗剂以相同的组合物(例如液体组合物)施用。在一些实施方案中,至少两种抗体或抗原结合片段和至少一种其他治疗剂以两种不同的组合物施用(例如,包含至少一种抗体或抗原结合片段的液体组合物和包含至少一种其他治疗剂的固体口服组合物)。在一些实施方案中,所述至少一种其他治疗剂以丸剂、片剂或胶囊剂形式施用。在一些实施方案中,所述至少一种其他治疗剂以持续释放的口服制剂给药。

[0306] 在一些实施方案中,可以在施用至少一种抗体、抗原结合抗体片段、抗体-药物缀合物或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合片段、抗体-药物缀合物或药物组合物)之前或之后向受试者施用一种或多种其他治疗剂。在一些实施方案中,将一种或多种其他治疗剂和至少一种抗体、抗原结合抗体片段、抗体-药物缀合物或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合片段、抗体-药物缀合物或药物组合物)施用于受试者,使得该

一种或多种其他治疗剂和至少一种抗体或抗原结合片段(例如,本文所述的任何抗体或抗原结合片段)的生物活性期重叠。

[0307] 在一些实施方案中,可以在一个延长的时间段(例如超过至少1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1年、2年、3年、4年或5年的时间段)向受试者施用至少一种抗体、抗原结合抗体片段、抗体-药物缀合物或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物)。熟练的医疗专业人员可以使用本文所述的任何方法来确定治疗期的长度,以诊断或跟踪治疗的有效性(例如,观察至少一种癌症症状)。如本文所述,熟练的医学专业人员还可以改变施用于受试者的抗体或抗原结合抗体片段、抗体-药物缀合物(和/或一种或多种其他治疗剂)的确认和数量(例如,增加或减少)。并且还可以基于对治疗效果(例如使用本文所述和本领域已知的任何方法)的评估,调整(例如,增加或减少)至少一种抗体或抗原结合抗体片段(和/或一种或多种其他治疗剂)施用于受试者的剂量或频率。

[0308] 在一些实施方案中,可以将一种或多种其他治疗剂施用给受试者。所述其他治疗剂可以包含一种或多种选自以下的抑制剂:B-Raf抑制剂、EGFR抑制剂、MEK抑制剂、ERK抑制剂、K-Ras抑制剂、c-Met抑制剂、间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂、磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)抑制剂、Akt抑制剂、mTOR抑制剂、PI3K/mTOR双重抑制剂、Bruton酪氨酸激酶(BTK)抑制剂、以及异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)和/或异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)抑制剂。在一些实施方案中,所述其他治疗剂是吡啶胺2,3-二加氧酶-1(IDO1)抑制剂(例如依帕卡司他)。

[0309] 在一些实施方案中,其他治疗剂可以包含一种或多种选自以下的抑制剂:HER3抑制剂、LSD 1抑制剂、MDM2抑制剂、BCL2抑制剂、CHK1抑制剂、活化hedgehog信号通路抑制剂、以及选择性降解雌激素受体的药物。

[0310] 在一些实施方案中,所述其他治疗剂可以包含一种或多种选自以下的治疗剂:曲贝替定、纳布紫杉醇、Trebananib、帕唑帕尼、西地尼布、帕博西尼、依维莫司、氟嘧啶、IFL、瑞格非尼、Reolysin、力比泰、塞瑞替尼、索坦、替西罗莫司、阿西替尼、依维莫司、索拉非尼、Votrient、帕唑帕尼、IMA-901、AGS-003、卡博替尼、长春氟宁、Hsp90抑制剂、Ad-GM-CSF、替莫唑胺、IL-2、IFN α 、长春碱、酰胺吡啶、达卡巴嗪、环磷酰胺、来那度胺、氮杂胞苷、来那度胺、硼替佐米、氨柔比星、卡非佐米、普拉曲沙和enzastaurin。

[0311] 在一些实施方案中,其他治疗剂可以包含一种或多种选自以下的治疗剂:佐剂、TLR激动剂、肿瘤坏死因子(TNF) α 、IL-1、HMGB1、IL-10拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-17拮抗剂、HVEM拮抗剂、ICOS激动剂、靶向CX3CL1的治疗剂、靶向CXCL9的治疗剂、靶向CXCL10的治疗剂、靶向CCL5的治疗剂、LFA-1激动剂、ICAM1激动剂和选择素激动剂。

[0312] 在一些实施方案中,将卡铂、纳布紫杉醇、紫杉醇、顺铂、培美曲塞、吉西他滨、FOLFOX或FOLFIRI施用于受试者。

[0313] 在一些实施方案中,所述其他治疗剂是抗OX40抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗LAG-3抗体、抗TIGIT抗体、抗BTLA抗体、抗CTLA-4抗体或抗GITR抗体。

[0314] 药物组合物和给药途径

[0315] 本文还提供了包含本文所述的抗体、抗原结合片段或抗体-药物缀合物中的至少一种(例如,一种、两种、三种或四种)的药物组合物。本文所述的任何抗体、抗原结合片段或抗体-药物缀合物中的两种或更多种(例如,两种、三种或四种)可以以任何组合形式存在于

药物组合中。可以以本领域已知的任何方式配制药剂组合。

[0316] 将药物组合配制成与其预期的给药途径(例如静脉内、动脉内、肌内、皮内、皮下或腹膜内)相容。该组合可以包括无菌稀释剂(例如无菌水或盐水),不挥发油,聚乙二醇,甘油,丙二醇或其他合成溶剂,抗菌剂或抗真菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等,抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠,螯合剂,例如乙二胺四乙酸,缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,等渗剂,例如糖(例如葡萄糖)、多元醇(例如甘露醇或山梨糖醇)或盐(例如氯化钠)或其任意组合。脂质体悬浮液也可用作药学上可接受的载体(参见例如美国专利4,522,811)。可以配制组合的制剂并将其封装在安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。在需要时(例如,在注射制剂中),可通过使用例如卵磷脂或表面活性剂等包衣来保持适当的流动性。通过包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶),可以延长抗体或其抗原结合片段的吸收。或者,可以通过植入物和微囊化的递送系统来实现控释,该系统可以包括可生物降解的生物相容性聚合物(例如,乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸;Alza Corporation和Nova Pharmaceutical, Inc.)。

[0317] 包含本文所述的抗体、抗原结合片段、抗体-药物缀合物中的任何一种或多种的组合可以以剂量单位形式(例如,含有预定量活性化合物的物理分散单位,以便于给药和剂量均匀)配制成肠胃外(例如,静脉内、动脉内、肌内、皮内、皮下或腹膜内)施用。

[0318] 组合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养或实验动物(例如猴子)中的标准药理学方法来确定。可以确定LD50(对50%的人群致死的剂量)和ED50(对50%的人群有效的治疗剂量):治疗指数为LD50:ED50的比率。表现出高治疗指数的药剂是优选的。如果药物表现出不良的副作用,则应注意将潜在的损害降到最低(即减少不良的副作用)。毒性和治疗功效可通过其他标准药物程序确定。

[0319] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制适当剂量的任何给定试剂以用于受试者(例如人)。一种或多种(例如一种、两种、三种或四种)抗体或其抗原结合片段(例如,本文所述的任何抗体或抗体片段)的治疗有效量将是治疗受试者(例如,被鉴定为患有癌症的人类受试者)(例如,杀伤癌细胞)或在被鉴定为有患疾病风险的受试者(例如,先前已患有癌症但现在已经治愈的受试者)中的疾病、降低受试者(例如人)的一种或多种疾病症状的严重性、频率和/或持续时间的量。可以由医疗保健专业人员或兽医专业人员使用本领域已知的方法,以及通过观察受试者(例如,人类)的一种或多种疾病症状,来确定本文所述的任何抗体或抗原结合片段的有效性和剂量。某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时间(例如,疾病或病症的严重程度、先前的治疗、受试者的总体健康和/或年龄以及其他疾病的存在)。

[0320] 示例性剂量包括每千克受试者体重的本文所述的任何抗体或抗原结合片段或抗体-药物缀合物的毫克或微克量(例如,约1 μ g/kg至约500mg/kg;约100 μ g/kg至约500mg/kg;约100 μ g/kg至约50mg/kg;约10 μ g/kg至约5mg/kg;约10 μ g/kg至约0.5mg/kg;或约1 μ g/kg至约50 μ g/kg)。尽管这些剂量涵盖广泛的范围,但本领域普通技术人员将理解,包括抗体及其抗原结合片段的治疗剂的功效不同,并且可以通过本领域已知的方法确定有效量。通常,首先要给予相对较低的剂量,然后就诊的医疗保健专业或兽医专业(在治疗应用中)或研究人员(在仍处于开发阶段时)可以逐渐增加剂量,直到获得适当的响应。另外,应当理解,任何

特定受试者的具体剂量水平将取决于多种因素,包括所用特定化合物的活性、年龄、体重、总体健康状况、性别和受试者饮食、时间、给药方式、给药途径、排泄速率以及抗体或抗体片段在体内的半衰期。

[0321] 药物组合物可以与给药说明书一起包含在容器、包装或分配器中。本公开内容还提供了制备用于本文所述的各种用途的抗体或其抗原结合片段或抗体-药物缀合物的方法。

[0322] 实施例

[0323] 在以下实施例中进一步描述本发明,这些实施例不限制权利要求中描述的本发明的范围。

[0324] 实施例1:方法和材料

[0325] 在以下实施例中使用如下测定。

[0326] 结合测定

[0327] a) 将50 μ l培养基中的 5×10^5 细胞分配到96孔板的每个孔中。

[0328] b) 将不同稀释度的100 μ L抗体加入孔中。

[0329] c) 在室温(RT)下孵育平板60分钟。

[0330] d) 快速离心细胞,并用含0.1牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 $\times 3$ 。

[0331] e) 将细胞沉淀重悬于100 μ L PBS中,该PBS中含有0.1%BSA,其中含有1:500的Cy3偶联的山羊抗人IgG。

[0332] f) 在黑暗中于室温下孵育30分钟。

[0333] g) 洗涤细胞3次,并重悬于荧光激活细胞分选(FACS)缓冲液中。

[0334] h) 在流式细胞仪上分析细胞。

[0335] 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)分析

[0336] a) 在钙黄绿素AM标记之前,用PBS洗涤靶细胞一次。

[0337] b) 使用2.5mM的1:333钙黄绿素AM储备液标记靶细胞。

[0338] c) 避光在37 $^{\circ}$ C下孵育细胞30分钟。

[0339] d) 用PBS洗涤细胞3次。

[0340] e) 将50 μ L的 1×10^4 钙黄绿素AM标记的靶细胞分配到每个孔中。

[0341] f) 在孔中添加100 μ l的稀释的抗体。

[0342] g) 将板在室温下孵育60分钟。

[0343] h) 加入在50 μ L培养基中的 5×10^4 的PBMS(效应细胞)(E/T比为5)。

[0344] i) 将平板在37 $^{\circ}$ C下孵育4小时。

[0345] j) 快速离心细胞,将180 μ l上清液转移入另一个具有半透明底部和黑色壁96孔板中。

[0346] k) 在485激发波长和520发射波长下读取板。

[0347] 补体依赖性细胞毒性(CDC)测定

[0348] a) 收集靶细胞并用钙黄绿素AM作为ADCC染色(仅用于钙黄绿素释放测定)。

[0349] b) 将50 μ L的靶细胞(1×10^5 个细胞)接种在96孔板的孔中。

[0350] c) 将100 μ L抗体以不同浓度添加到孔中。

- [0351] d) 将板在室温下孵育15分钟。
- [0352] e) 将50 μ L 10%补体富集的人血清添加到每个孔中(最终5%)。
- [0353] f) 将板在室温下孵育45分钟。
- [0354] g) 将180 μ L上清液转移到另一个具有半透明底部和黑色壁96孔板中。(仅用于钙黄绿素释放测定)。
- [0355] h) 用含0.1%BSA的PBS洗涤细胞3次。
- [0356] i) 在室温下每孔用2 μ L的7-氨基放线菌素D (7AAD) 在黑暗中染色细胞,持续15分钟。
- [0357] j) 洗涤细胞三遍,并在流式细胞仪上分析细胞。
- [0358] T细胞活化
- [0359] 在某些ADCC实验中使用了预激活的外周血单核细胞(PBMC)。
- [0360] a) 使用Dynabeads(人T激活剂CD3/CD28)激活PBMC。
- [0361] b) 用缓冲液洗涤后,将Dynabeads与30U/mL的白细胞介素-2(IL2)以1:1的比例添加到PBMC中。
- [0362] c) 将细胞混合物孵育足够的时间。
- [0363] d) 孵育结束时,将磁珠通过磁铁移除,然后将活化的PBMC用于ADCC分析。
- [0364] 涉及MDA231细胞的细胞结合测定
- [0365] a) 在培养基中以 1×10^6 细胞/mL的浓度制备MDA231细胞。
- [0366] b) 将抗体样品稀释至适当浓度。
- [0367] c) 将50 μ L细胞转移到96孔V型底板的每个孔中。
- [0368] d) 将50 μ L抗体转移到96孔V型底板的孔中。
- [0369] e) 在室温下孵育细胞混合物60分钟。
- [0370] f) 快速离心细胞,并用FACS缓冲液洗涤两次。
- [0371] g) 在每孔中将细胞重悬于100 μ L FACS缓冲液中,所述缓冲液含有Cy3缀合的山羊抗人(GAH) IgG(1:500)。
- [0372] h) 在室温下孵育30分钟,并用FACS缓冲液洗涤 $\times 2$ 。
- [0373] i) FACS分析。
- [0374] 涉及MDA231和SIHA细胞的内化分析
- [0375] a) 在96孔板的每个孔中加入50 μ L以 1×10^6 /mL的量的悬浮细胞(MDA231或SIHA细胞)。
- [0376] b) 在相应的孔中加入50 μ L Ab。
- [0377] c) 在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。
- [0378] d) 在每个孔中添加100 μ L pHrodo Red标记的GAH IgG,并在37 $^{\circ}$ C下孵育24小时。
- [0379] e) 胰蛋白酶消化并收获细胞,洗涤两次,然后运行FACS。
- [0380] 涉及MDA231细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC)分析
- [0381] a) 靶细胞:MDA231细胞用PBS洗涤两次,然后在PBS中调节至 0.5×10^6 /mL的浓度。
- [0382] b) 将种子细胞置于平底24孔板中,每孔300 μ L。
- [0383] c) 向相应的孔中加入300 μ L的20 μ g/mL的抗体,使最终浓度为10 μ g/mL。
- [0384] d) 将板在37 $^{\circ}$ C下孵育48小时。

- [0385] e) 孵育结束后,用胰蛋白酶消化细胞,并用普通培养基洗涤两次。
- [0386] f) 将细胞沉淀重悬于100 μ L普通培养基中,并将细胞转移至96孔板中。
- [0387] g) 在每个孔中加入100 μ L的10%补体富集的血清。
- [0388] h) 在37 $^{\circ}$ C下孵育细胞4小时。
- [0389] i) 用FACS缓冲液洗涤细胞两次。
- [0390] j) 通过添加100 μ L胰蛋白酶3分钟来分离细胞。
- [0391] k) 在含有7AAD(1:50稀释度)的FACS缓冲液中重悬细胞沉淀
- [0392] l) 在室温孵育15分钟后,将细胞洗涤两次。
- [0393] m) 运行FACS分析。
- [0394] 实施例2:与CD20和CD3结合的双特异性抗体
- [0395] 设计双特异性抗体以结合CD20和CD3。该双特异性抗体具有两条共同轻链(序列相同)和两条不同的重链。两条重链和共同轻链可变区的序列如下所示。
- [0396] 针对CD20的VHa(从利妥昔单抗VH设计):
- QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGD
- [0397] TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAG
TTVTVSA (SEQ ID NO: 1)
- [0398] 针对CD3的VHb(从MAb 12F6 VH设计):
- EVQLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPGEGLWIGYINPSSGYT
- [0399] KYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWQDYDVFYDWGEGTTL
TVSS (SEQ ID NO: 2)
- [0400] 共同VL(利妥昔单抗的VL)
- QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWVFQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRF
- [0401] SGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 3)
- [0402] 描述了12F6抗体,例如在Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions, Immunology, 116(4), 487-498 (2005) 中,在此通过引用将其全文并入本文。出于比较目的,亲本抗体的序列也显示如下:
- [0403] 亲本CD20VH(利妥昔单抗的VH):
- QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGD
- [0404] TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAG
TTVTVSA (SEQ ID NO: 8)
- [0405] 亲本CD20VL(利妥昔单抗):
- QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWVFQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRF
- [0406] SGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 9)
- [0407] 亲本CD3VH(MAb 12F6 VH):
- QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPQGGLWIGYINPSSGYT
- [0408] KYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWQDYDVFYDWGQGTTL
TVSS (SEQ ID NO: 10)

[0409] 亲本CD3VL (MAb 12F6 VL) :

[0410] QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPA
RFSGSGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLETKR (SEQ ID NO: 11)

[0411] 下表还总结了重新设计的VH和VL的CDR序列:

[0412] 表1. 针对CD20的重链的VHa

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
[0413] Kabat	SYNMH (SEQ ID NO: 16)	AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 17)	STYYGGDWYFNV (SEQ ID NO: 18)
Chothia	GYTFTSY (SEQ ID NO: 19)	YPGNGD (SEQ ID NO: 20)	STYYGGDWYFNV (SEQ ID NO: 21)

[0414] 表2. 针对CD3的重链的VHb

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
[0415] Kabat	SYTMH (SEQ ID NO: 22)	YINPSSGYTKYNQKFKD (SEQ ID NO: 23)	WQDYDVYFDY (SEQ ID NO: 24)
Chothia	GYTFTSY (SEQ ID NO: 25)	NPSSGY (SEQ ID NO: 26)	WQDYDVYFDY (SEQ ID NO: 27)

[0416] 表3. 共同轻链的VL

	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
[0417] Kabat	RASSVSYIH (SEQ ID NO: 28)	ATSNLAS (SEQ ID NO: 29)	QQWTSNPPT (SEQ ID NO: 30)
Chothia	RASSVSYIH (SEQ ID NO: 31)	ATSNLAS (SEQ ID NO: 32)	QQWTSNPPT (SEQ ID NO: 33)

[0418] 利妥昔单抗Fv (VH+VL) 的3D (三维) 等电点 (PI) 为9.9, 而12F6 Fv的3D PI为9.8。重新设计序列后, VHa+共同VL的3D PI为10.0, VHb+共同VL的3D PI为9.1。PI改变不影响对CD20的结合亲和力, 并且第二抗原结合区仍保持对CD3的合理结合亲和力。下表中显示了两条VH链中的突变。

[0419] 表4. VH (CD20) 中的修饰氨基酸

Kabat编号	亲本中的氨基酸	修饰后的氨基酸
83	T	R

[0421] 表5. VH (CD3) 中的修饰氨基酸

Kabat编号	亲本中的氨基酸	修饰后的氨基酸
1	Q	E
6	Q	E
43	Q	E
81	Q	E
105	Q	E

[0423] 参照图1A和1B, 分别测试了重新设计的利妥昔单抗 (抗体A) 和重新设计的12F6 (抗体B) 的抗原结合能力。图1A显示了重新设计的利妥昔单抗 (抗体A) 与CD20阳性Raji细胞结合。抗体A是具有两个VHa (SEQ ID NO:1) 和两个共同VL (SEQ IN NO:3) 的同型二聚体。图1B显示重新设计的12F6 (抗体B) 与CD3阳性Jurkart细胞结合。抗体B也是具有两个VHb (SEQ ID NO:2) 和两个共同VL (SEQ ID NO:3) 的同型二聚体。这些数据表明, 重新设计的利妥昔单抗重链、重新设计的12F6重链和共同轻链可以例如通过“杵臼结构”组合成功能性的双特异性抗体。

[0424] 因此,设计了CD20/CD3“不平衡的双特异性抗体”。杵臼结构的突变也被引入重链的恒定区,以促进双特异性抗体的形成。

[0425] 重链和轻链的全长序列如下所示:

[0426] 针对CD20的重链变体1(野生型IgG1 Fc)的全长:

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGD
TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLRSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAG
TTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP
[0427] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 34)

[0428] 针对CD20的重链变体2(具有Y407T(臼)突变的IgG1 Fc)的全长:

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGD
TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLRSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAG
TTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP
[0429] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLT
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 35)

[0430] 针对CD20的重链变体3(具有T366Y(杵)突变的IgG1 Fc)的全长:

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGD
TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLRSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAG
TTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP
[0431] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 36)

[0432] 针对CD3的重链变体1(野生型IgG1 Fc)的全长:

[0433] EVQLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPGEGLEWIGYINPSSGYT
KYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWQDYDVYFDYWEGGTTL
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQOGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 37)

[0434] 针对CD3的重链变体2(具有T366Y(杵)突变的IgG1 Fc)的全长:
EVQLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPGEGLEWIGYINPSSGYT
KYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWQDYDVYFDYWEGGTTL
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPE
[0435] LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQOGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)

[0436] 针对CD3的重链变体3(具有Y407T(白)突变的IgG1 Fc)的全长:
EVQLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPGEGLEWIGYINPSSGYT
KYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWQDYDVYFDYWEGGTTL
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPE
[0437] LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLTSKLT
VDKSRWQOGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 39)

[0438] 用于共同轻链的全长:
QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWVFQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
[0439] QLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 40)

[0440] 选择具有Y407T(EU编号)(变体2;SEQ ID NO:35)的针对CD20的IgG1重链和具有T366Y(EU编号)突变(变体2;SEQ ID NO:38)的针对CD3的IgG1重链以制备双特异性抗体从而用于进一步的实验。该双特异性抗体也具有两条共同轻链(SEQ ID NO:40)。

[0441] 这种不平衡的双特异性抗体还具有以下特征:(1)CD3结合亲和力显著降低以提高安全性;(2)维持ADCC/CDC效应子功能,以扩大临床应用;(3)区分了CD20结合臂和CD3结合臂的生化和生物物理特征,以便在下游纯化过程中更好地分离双特异性抗体。

[0442] 如以下实施例所示,在存在人PBMC的情况下,该抗体相比于CD20同型二聚体和利

妥昔单抗具有更好的CD20+Raji细胞杀伤功效。同时,该抗体在相同条件下不会杀伤CD3+Jurkat细胞或使正常T细胞衰竭。因此,该抗体比当前的抗CD20癌症疗法具有广阔的应用前景:1)与利妥昔单抗相比,该抗体具有T细胞募集功能;2)与CAR-T/其他T细胞募集疗法相比,该抗体保持功能性效应子功能;3)该抗体在体外没有任何安全隐患。综上所述,本公开中描述的CD20/CD3双特异性抗体和平台可以解决靶向癌症治疗领域的未满足需求。

[0443] 本文公开的双特异性抗体通过两个步骤纯化:使用蛋白A的亲和纯化(第1轮)和使用monoQ5/50的阴离子交换纯化(第2轮)。在第二轮中,使用梯度pH缓冲液(例如PBS)洗脱抗体。进行T细胞活化测定以评估洗脱后的不同级分。在图20中,数字表示不同的级分。只有CD20/CD3双特异性抗体可以激活T细胞,因此T细胞活化分析可以评估每个级分中CD20/CD3双特异性抗体的纯度和含量。结果表明,级分4-7具有相对纯的CD20/CD3双特异性抗体,并证明该CD20/CD3双特异性抗体可以通过本文所述的方法纯化。

[0444] 此外,还已经确定了本文描述的抗体的pI。此信息对于选择合适的pH洗脱很有用。

[0445] 表6

	PI
[0446] CD20/CD3 BsAb 变体 1	8.48
CD20 同二聚体变体 1	8.72
CD3 同二聚体变体 1	8.09
CD20/CD3 BsAb 变体 2	8.48
CD20 同二聚体变体 2	8.73
CD3 同二聚体变体 2	8.09
[0447] CD20/CD3 BsAb 变体 3	8.48
CD20 同二聚体变体 3	8.72
CD3 同二聚体变体 3	8.09
CD20 亲本 Ab	8.66
CD3 亲本 Ab	8.59

[0448] 实施例3:双特异性抗体的结合亲和力

[0449] 经过计算设计,与亲本抗CD20 IgG(亲本CD20)相比,包含设计的VH序列(SEQ ID NO:1)和共同VL序列(SEQ ID NO:3)的CD20同二聚体IgG对CD20的结合能力相似。该细胞结合亲和力测定采用Raji细胞(表达CD20)进行。结合结果示于图2A。

[0450] 与亲本抗CD3 IgG(亲本CD3)相比,包含设计的VH序列(SEQ ID NO:2)和共同VL序列(SEQ ID NO:3)的CD3同二聚体IgG对CD3的结合能力降低。该细胞结合亲和力测定用Jurkat细胞(表达CD3)进行。结合结果示于图2B。

[0451] 实施例4:不平衡的CD20/CD3双特异性抗体激活T细胞

[0452] 仅在存在靶肿瘤细胞的情况下,不平衡的CD20/CD3双特异性单克隆抗体(BsMab)激活T细胞。通过使用Raji细胞作为CD20+靶肿瘤细胞,293细胞作为CD20-对照细胞以及Jurkat细胞作为T细胞模型进行以下实验,以测试CD20/CD3 BsMab是否可以在存在靶肿瘤细胞的情况下激活T细胞,因为由多个同时结合T细胞和靶肿瘤细胞的BsMab形成的簇。相

反,由于一臂与T细胞上CD3的弱结合,CD20/CD3 BsMab在存在CD20-对照细胞的情况下无法激活T细胞。

[0453] 此实施例中使用了以下实验过程:

[0454] 1) 在U型底部96孔板中分别接种Raji和Jurkat, Jurkat和 $293 \ 1 \times 10^5$ 。

[0455] 2) 加入测试抗体并孵育过夜(19小时)。

[0456] 3) 用PBS+0.1%BSA洗涤细胞一次。

[0457] 4) 加入抗人CD69抗体(用PE标记)(1.5ul/孔)并在室温下孵育30分钟。

[0458] 5) 洗涤细胞一次。

[0459] 6) 读出。

[0460] 结果示于图3。图4中显示了在存在具有不同浓度的测试抗体的Raji细胞的情况下的T细胞活化能力。同种型抗体(非特异性IgG1抗体)用作对照。通过在Jurkat细胞表面上表达CD69来测量T细胞活化。

[0461] 实施例5:不平衡的CD20/CD3 BsMab诱导PBMC介导的细胞杀伤

[0462] 与利妥昔单抗和CD20同型二聚体抗体在T细胞活化前后相比,不平衡的CD20/CD3 BsMab诱导的PBMC介导的细胞杀伤作用更好。

[0463] T前细胞激活:将健康供体的新鲜外周血单核细胞(PBMC)在37°C下过夜,并在存在图中所示的不同抗体的情况下与钙黄绿素标记的CD20+Raji细胞孵育4小时。通过钙黄绿素释放来测量细胞死亡率。结果示于图5,

[0464] T细胞活化后(4天):将来自健康供体的新鲜PBMC与重组IL-2和CD3/CD28磁珠孵育4天以活化T细胞,然后与钙黄绿素标记的CD20+Raji细胞和图中所示的不同抗体孵育2小时。通过钙黄绿素释放来测量细胞死亡率。结果示于图6。

[0465] T细胞活化后(7天):将来自健康供体的新鲜PBMC与重组IL-2和CD3/CD28磁珠孵育7天以活化T细胞,然后与钙黄绿素标记的CD20+Raji细胞和图中所示的不同抗体孵育2小时。通过钙黄绿素释放来测量细胞死亡率。结果示于图7。

[0466] 为了解决不平衡的CD20/CD3 BsMab是否也在与PBMC杀伤试验所示条件相同的条件下杀伤CD3+T细胞的安全性问题,对于每个实验,将CD3+Jurkat细胞用作对照。仅测试了最高的抗体浓度(10ug/ml)。T前细胞激活结果示于图8。T细胞活化后(4天)的结果显示在图9中。T细胞活化后(7天)的结果显示在图10中。用PBS处理的组中的Jurkat细胞数被设定为基线。因此,如果Jurkat细胞的数量等于用PBS处理的组的数量,则杀伤百分比将为零。如果细胞数量多于用PBS处理的组,则杀伤百分比为负。

[0467] 结果显示在T细胞活化之前和T细胞活化之后4天未观察到Jurkat细胞杀伤。但是,在T细胞活化后第7天观察到Jurkat杀伤,在这种情况下,利妥昔单抗和CD20同型二聚体IgG没有诱导Raji细胞杀伤。这表明7天Jurkat细胞杀伤可能是由T细胞超活化引起的。为了进一步测试是否在不平衡的CD20/CD3BsMab的存在下也杀伤了7天活化的天然T细胞本身,将相同7天活化的PBMC与图中所示的不同抗体孵育过夜,并检查T细胞的衰竭状态。结果示于图11。图中的LALA是具有L234A和L235A突变(EU编号)的CD20/CD3 BsMab。具有L234A和L235A突变的抗体不具有Fc效应子功能,被用作阴性对照。

[0468] 实施例6:不平衡的双特异性CD20/CD3抗体引起的T细胞衰竭

[0469] 还进行了实验以测试不平衡的CD20/CD3 BsMab是否会使预激活的T细胞衰竭。

[0470] 图12显示过夜孵育后不平衡的CD20/CD3 BsMab未使PBMC中未活化的T细胞衰竭。

[0471] 实施例7:补体依赖性细胞毒性的诱导

[0472] 由于CD20/CD3 BsMab具有以高亲和力结合CD20的臂,因此进行了实验以测试CD20臂结合是否足以诱导补体依赖性细胞毒性。将抗体与富含人补体的血清和CD20+Raji细胞一起孵育。与利妥昔单抗和CD20同型二聚体抗体相比,不平衡的CD20/CD3 BsMab降低了CDC疗效。通过FACS (7AAD) 的检测结果显示于图13。钙黄绿素释放的检测结果显示于图14。

[0473] 实施例8:安全评估

[0474] 还测试了不平衡的CD20/CD3 BsMab是否可以杀伤CD3+Jurkat细胞和正常T细胞。图15显示高剂量的不平衡CD20/CD3 BsMab不会在Jurkat细胞上诱导CDC。

[0475] 图16显示,在共孵育PBMC和富含人补体血清的人血清之后,不平衡的CD20/CD3 BsMab不会诱导T细胞死亡。

[0476] 实施例9:不平衡的CD20/CD3 BsMab能够杀伤耐利妥昔单抗的Raji细胞

[0477] 为了测试不平衡的CD20/CD3 BsMab是否可以杀伤耐利妥昔单抗的Raji细胞(RRCL),将来自三个不同供体的具有7天活化PBMC的RRCL在图中所示的抗体的存在下孵育。在不平衡的CD20/CD3 BsMab存在下观察到明显的RRCL杀伤(图17-19)。

[0478] 实施例10:不平衡的CD20/CD3 BsMab的动物研究

[0479] 进行实验以评估CD20/CD3 BsMab在动物中的作用。

[0480] 将Raji细胞、人PBMC和不平衡的CD20/CD3 BsMab混合,然后通过静脉内注射将其注射到小鼠体内。这些Raji细胞被荧光素酶标记。治疗组中的每只小鼠(B-NDG, Biocytogen, 北京, 目录号201811808)接受 5×10^5 Raji细胞、 2.5×10^6 人PBMC细胞和60 μ g抗体。在第0天、第2天、第3天和第3天后的每三天对小鼠进行成像以追踪Raji细胞的衰竭。

[0481] 在第0天,将荧光素酶标记的Raji细胞和人PBMC细胞与磷酸盐缓冲盐水PBS(G1组;对照组;n=4),CD20/CD3 BsMab(G2组;n=4)或利妥昔单抗(抗CD20抗体;G3组;n=4)。静脉内(i.v.)注射后15分钟首次对小鼠成像,然后在第2天、第3天和第3天后的每3天对小鼠成像。

[0482] 图21A显示CD20/CD3 BsMab和利妥昔单抗没有明显的毒性作用。图21B显示CD20/CD3 BsMab和利妥昔单抗均具有肿瘤抑制作用,并且利妥昔单抗不如CD20/CD3 BsMab有效。从注射后第16天开始观察到肿瘤抑制作用的差异。

[0483] 实施例11:不平衡的双特异性抗体的表征

[0484] 进行实验以表征纯化的CD20/CD3双特异性抗体样品。

[0485] 首先,对纯化的CD20/CD3双特异性抗体样品进行还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠(Re-CE-SDS)。结果显示存在三个主要峰。基于分子大小,峰#1是共同的轻链(LC),峰#2和#3是两个不同的重链(HC)(图22A)。

[0486] 还进行了非还原性CE(Non-Re-CE-SDS)。结果表明,CD20/CD3双特异性IgG存在一个主峰(图22B)。图22A和22B的结果表明CD20/CD3双特异性抗体样品具有良好的纯度。

[0487] 其次,进行差示扫描荧光法(DSF)以测量蛋白质的解链温度(T_m),并进行静态光散射(SLS)以测量在266nm(Tagg 266)和473nm(Tagg 473)处的聚集温度。样品已提交至Uncle系统进行分析。DSF和SLS的监测温度从20 $^{\circ}$ C到95 $^{\circ}$ C进行了1 $^{\circ}$ C/分钟的升温。Uncle在266nm和473nm处测量SLS。使用Uncle分析软件计算和分析 T_m 和Tagg。

[0488] 一些测试抗体具有两个 T_m ,一些具有三个 T_m 。这是因为IgG是多结构域结构,CH2结构域在PBS中的 T_m 通常为约70°C,而CH3更稳定,其 T_m 约为80°C。Fab的 T_m 因其序列差异大而在宽范围内(约50-85°C)。因此,通过各种分析技术测得的 T_m 值通常是“表观”转变温度而不是正式的熔融温度。对于抗体完整IgG,DSF测量中通常会有2-3个 T_m 值。确定哪个 T_m 代表哪个域并不容易。

[0489] 对于这种双特异性抗体,86.7°C T_m 可能仅代表CH3域。其他较低的1个或2个 T_m 表示Fab、CH2或Fab+CH2。

[0490] 对于Tagg,这是SLS开始检测聚集的温度。Tagg266在266nm处测量SLS,它更灵敏并适合检测较小的颗粒。Tagg473的测量波长为473nm,可以更好地检测较大的颗粒。

[0491] DSF和SLS数据均表明CD20/CD3双特异性抗体具有良好的热稳定性。

[0492] 表7

[0493]	温度 °C	DSF			SLS	
		Tm D1	Tm D2	Tm D3	Tagg266	Tagg473
		66.0	80.1	86.7	70.9	71.2

[0494] 第三,动态光散射(DLS)仅检测到一种尺寸(10.15nm)的分子颗粒。结果表明样品中没有聚集。

[0495] 表8

[0496]	DLS	峰#	众数直径(nm)	质量 (%)	PDI
	20 °C		峰 1	10.15	100
		峰 2	n.a.		
		峰 3	n.a.		

[0497] 这些表征数据表明,CD20/CD3双特异性抗体作为治疗性抗体具有良好的可开发性(developability)。

[0498] 实施例12:与PD-L1和CD55结合的双特异性抗体

[0499] 设计了两种形式的双特异性抗体以结合PD-L1和CD55(PD-L1/CD55 BsMab v1和PD-L1/CD55 BsMab v2)。这些双特异性抗体具有两条共同的轻链和两条不同的重链。

[0500] 下面显示了双特异性抗体(PD-L1/CD55 BsMab v1)的第一变体的两条重链和共同轻链的可变区序列。

[0501] 针对PD-L1的VHa(从阿维鲁单抗设计)

EVQLLESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFY

[0502] ADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGEGTLVTV
SS (SEQ ID NO: 4)

[0503] 针对CD55的VHb(从CD55 ScFV设计)

QVKLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSGYGMWIRQTPGKRLEWVATINSGGSYT

[0504] YYSDSVKGRFTISRDNVKNNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARRNGTLYYYLMDYWGRGT
LVTVSS (SEQ ID NO: 5)

[0505] 共同VL(从CD55 ScFV设计)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKRPSG
 [0506] VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSASTRIFGGGTKVTVLR (SEQ ID
 NO: 6)

[0507] CD55 ScFv描述于例如Identification of a human anti-CD55 single-chain Fv by subtractive panning of a phage library using tumor and nontumor cell lines, Cancer Res. 59(11), 2718-2723 (1999), 通过引用将其全部内容并入本文。出于比较目的, 亲本抗体的序列也显示如下:

[0508] 亲本PD-L1 VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITF

[0509] YADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGLVT
 VSS (SEQ ID NO: 12)

[0510] 亲本PD-L1 VL:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG

[0511] VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTRVFGTGKTVTVL (SEQ ID NO:
 13)

[0512] 亲本CD55 VH:

QVKLQESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSGYGMSWIRQTPDKRLEWVATINSGGSYT

[0513] YYSDSVKGRFTISRDNVKNNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARRNGTLYYYLMDYWGRGT
 LVTVSS (SEQ ID NO: 14)

[0514] 亲本CD55 VL:

QSVLTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKFMIDVSKRPSG

[0515] VSNRFSGSKSGNTASLTISGVQAEDEADYYCSSYTSASTVIFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:
 15)

[0516] 阿维鲁单抗Fv (VH+VL) 的3D PI为9.4, 抗CD55 Fv的3D PI为9.8。重新设计序列后, VH_a+共同VL的3D PI为9.9, VH_b+共同VL的3D PI为9.3。下表中显示了两条VH链的突变。

[0517] 表9. VH (PD-L1) 中的修饰氨基酸

Kabat编号	亲本中的氨基酸	修饰后的氨基酸
13	Q	E
105	Q	E

[0519] 表10. VH (CD55) 中的修饰氨基酸

Kabat编号	亲本中的氨基酸	修饰后的氨基酸
13	Q	K
42	D	G

[0521] 实施例13: 对于新设计的PD-L1和CD55抗体的结合亲和力

[0522] 进行实验以确定新设计的PD-L1和CD55抗体的结合亲和力。

[0523] 包含设计的VH序列 (SEQ ID NO: 4) 和共同VL序列 (SEQ ID NO: 6) 的抗PD-L1同型二聚体IgG (PD-L1 v1) 的结合亲和力比亲本抗PD-L1抗体弱 (PD-L1 wt) (图23A)。包含设计的VH序列 (SEQ ID NO: 5) 和共同VL序列 (SEQ ID NO: 6) 的抗CD55同型二聚体IgG (CD55 v1) 与

亲本抗CD55抗体 (CD55wt) 相比具有相似的结合亲和力 (图23B)。

[0524] 由于双特异性抗体应以高亲和力与癌症特异性抗原 (PD-L1) 结合, 而双特异性抗体的另一臂应以低亲和力与癌症相关抗原 (CD55) 结合, 因此抗体 (CD55 v1和PD-L1 v1) 不满足此要求。

[0525] 因此, 双特异性抗体的第二变体被设计为结合PD-L1和CD55 (PD-L1/CD55 BsMab v2)。第二种双特异性抗体的VHa和VHb与第一种双特异性抗体的VHa和VHb相同。然而, 基于本文所述的方法重新设计了共同轻链。重新设计的共同轻链的序列如下所示:

[0526] 共同VL2 (从SEQ ID NO:6重新设计):

[0527] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSK SGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTRIFGGGTKVTVLR (SEQ ID NO:7)

[0528] 共同VL (SEQ IN NO:6) 和共同VL2 (SEQ ID NO:7) 的比对在图24中示出。带下划线的序列是轻链恒定区的序列。

[0529] 这些重新设计的VH和VL的CDR序列如下所示:

[0530] 表11. 针对PD-L1的重链的VHa

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
[0531] Kabat	SYIMM (SEQ ID NO: 41)	SIYPSGGITFYADTVKG (SEQ ID NO: 42)	IKLGTVTTVDY (SEQ ID NO: 43)
Chothia	GFTFSSY (SEQ ID NO: 44)	YPSGGI (SEQ ID NO: 45)	IKLGTVTTVDY (SEQ ID NO: 46)

[0532] 表12针对CD55的重链的VHb

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
[0533] Kabat	GYGMS (SEQ ID NO: 47)	TINSGGSYTYYSDSVKG (SEQ ID NO: 48)	RNGTLYYYLMDY (SEQ ID NO: 49)
Chothia	GFTFSGY (SEQ ID NO: 50)	NSGGSY (SEQ ID NO: 51)	RNGTLYYYLMDY (SEQ ID NO: 52)

[0534] 表13. 针对共同VL的VL变体1

	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
[0535] Kabat	TGTSSDVGNYVVS (SEQ ID NO: 53)	DVSKRPS (SEQ ID NO: 54)	SSYTSASTRI (SEQ ID NO: 55)
[0536] Chothia	TGTSSDVGNYVVS (SEQ ID NO: 56)	DVSKRPS (SEQ ID NO: 57)	SSYTSASTRI (SEQ ID NO: 58)

[0537] 表14. 针对共同VL的VL变体2

	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
[0538] Kabat	TGTSSDVGNYVVS (SEQ ID NO: 59)	DVSNRPS (SEQ ID NO: 60)	SSYTSSTRI (SEQ ID NO: 61)
Chothia	TGTSSDVGNYVVS (SEQ ID NO: 62)	DVSNRPS (SEQ ID NO: 63)	SSYTSSTRI (SEQ ID NO: 64)

[0539] 此外, 由于与人血清中的 κ 轻链相比, λ 轻链不那么常见, 因此在实施例 λ 轻链的恒定区被 κ 轻链的恒定区代替。

[0540] 进行实验以确定第二种抗体的结合亲和力。含有设计的VH序列 (SEQ ID NO:4) 和共同的VL2序列 (SEQ ID NO:7) 的抗PD-L1同二聚体IgG (PD-L1 v2) 与亲本抗PD-L1抗体 (PD-L1 wt) 相比具有相似的结合亲和力 (图25A)。包含设计的VH序列 (SEQ ID NO:5) 和共同VL2序列 (SEQ ID NO:7) 的抗CD55同型二聚体IgG (CD55 v2) 与亲本抗CD 55抗体 (CD55 wt) 相比具有较弱的结合亲和力 (图25B)。因此, 具有重新设计的序列的抗体的结合亲和力满足要

求,并且选择PD-L1/CD55 BsMab v2进行进一步的实验。PD-L1/CD55 BsMab v2具有两条包含SEQ ID NO:7的常见轻链(κ 链),一条IgG1重链包含SEQ ID NO:4,一条IgG1重链包含SEQ ID NO:5。此外,针对PD-L1的重链具有Y407T突变(EU编号),而针对CD55的IgG1重链具有T366Y(EU编号)突变。

[0541] 重链和轻链的全长序列如下所示:

[0542] 针对PD-L1的重链的全长

EVQLLESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFY
ADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGEGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID NO: 65)

[0544] 针对CD55的重链的全长

QVKLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSGYGMWIRQTPGKRLEWVATINSGGSYT
YYSDSVKGRFTISRDNVKNLTYLQMSSLKSEDTAMYYCARRNGTLYYLMDYWGRGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLTS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID NO: 66)

[0546] 针对CD55的共同轻链的变体1

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKRPSG
VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSASTRIFGGGKVTVLRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREKQVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 67)

[0548] 针对CD55的共同轻链的变体2

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG
VSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTRIFGGGKVTVLRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREKQVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 68)

[0550] 此外,本文也确定了所述抗体的pI。此信息对于选择合适的pH洗脱很有用。

[0551] 表15

[0552]

	PI
PDL1/CD55 BsAb变体1	8.64
PDL1同二聚体变体1	8.36

CD55同二聚体变体1	8.83
PDL1/CD55BsAb变体2	8.57
PDL1同二聚体变体2	8.24
CD55同二聚体变体2	8.78
PDL1亲本Ab	8.36
CD55亲本Ab	8.6

[0553] 实施例14:PD-L1/CD55双特异性抗体的补体依赖性细胞毒性 (CDC)

[0554] 进行实验以测试PD-L1/CD55双特异性抗体的补体依赖性细胞毒性。包括其亲本抗体是为了进行比较。基于本文所述的方案在MDA231细胞上进行测定,每种抗体的浓度为10ug/ml。结果示于图26A-26B中。

[0555] 如图所示,抗PD-L1(PD-L1 wt)和抗CD55(CD55 wt)亲本抗体均可诱导CDC。与亲本抗PD-L1抗体(PD-L1 wt)和亲本抗CD55抗体(CD55 wt)相比,PD-L1/CD55双特异性抗体v1具有低得多的CDC。相反,PD-L1/CD55双特异性抗体v2相比于第一变体、亲本抗PD-L1抗体(PD-L1 wt)和亲本抗CD55抗体(CD55 wt)来说具有高得多的CDC。PD-L1/CD55双特异性抗体v2的CDC作用比第一变体的双特异性抗体的CDC作用高约4.5倍。

[0556] 实施例15:由PD-L1/CD55双特异性抗体诱导的内化

[0557] 进行实验以评估由PD-L1/CD55双特异性抗体诱导的内化。

[0558] 进行了PD-L1/CD55双特异性抗体的两个变体及其亲本抗体的内化分析。在第一内化实验中使用MDA231细胞(图27A),在第二内化实验中使用SIHA细胞(图27B)。将细胞与20ug/ml抗体混合,并在37°C下孵育30分钟。然后加入pHrodo标记的二抗,并在37°C下与细胞孵育24小时。然后收集细胞并在FACS上分析。

[0559] CD 55是埃可病毒和柯萨奇B病毒感染的受体,已知是具有内化能力的受体。因此,抗CD55亲本单克隆抗体(CD55 wt)可以触发CD55的快速内化。如图27A所示,在具有相似PD-L1和CD55表达水平的MDA231细胞中,由抗PD-L1抗体触发的内化比CD55慢得多。但是,PD-L1/CD55双特异性抗体v1和v2均可诱导内化,其内化速率可与抗CD55亲本单克隆抗体的内化速率相当。

[0560] 在图27B中,在SIHA细胞中CD55表达高于PD-L1。与亲本抗PD-L1抗体和亲本抗CD55抗体相比,PD-L1/CD55双特异性抗体v1和v2均可诱导更好的内化。尽管如此,鉴于与v1相比,PD-L1/CD55 BsMab v2与CD55的结合减少,因此PD-L1/CD55 BsMab v2在体内应具有更好的功效/安全性平衡,并且应比PD-L1/CD55 BsMab v1更安全。因此,预期PD-L1/CD55 BsMab可以在三种不同水平上诱导靶癌细胞死亡:(1)阻断PD1/PD-L1相互作用;(2)诱导PD-L1内化;3)与药物偶联时,抗体药物偶联物可以杀伤癌细胞。

[0561] 其他实施方式

[0562] 应当理解,尽管已经结合本发明的详细描述描述了本发明,但是前述描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面,优点和修改在所附权利要求的范围内。

[0039] <211> 119
 [0040] <212> PRT
 [0041] <213> 人工序列
 [0042] <220>
 [0043] <223> 人工序列的描述:合成多肽
 [0044] <400> 2
 [0045] Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 [0046] 1 5 10 15
 [0047] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [0048] 20 25 30
 [0049] Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
 [0050] 35 40 45
 [0051] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0052] 50 55 60
 [0053] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0054] 65 70 75 80
 [0055] Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0056] 85 90 95
 [0057] Ala Arg Trp Gln Asp Tyr Asp Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 [0058] 100 105 110
 [0059] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 [0060] 115
 [0061] <210> 3
 [0062] <211> 107
 [0063] <212> PRT
 [0064] <213> 人工序列
 [0065] <220>
 [0066] <223> 人工序列的描述:合成多肽
 [0067] <400> 3
 [0068] Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 [0069] 1 5 10 15
 [0070] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 [0071] 20 25 30
 [0072] His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 [0073] 35 40 45
 [0074] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 [0075] 50 55 60
 [0076] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 [0077] 65 70 75 80

[0078]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
[0079]	85 90 95
[0080]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
[0081]	100 105
[0082]	<210> 4
[0083]	<211> 120
[0084]	<212> PRT
[0085]	<213> 人工序列
[0086]	<220>
[0087]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0088]	<400> 4
[0089]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
[0090]	1 5 10 15
[0091]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0092]	20 25 30
[0093]	Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0094]	35 40 45
[0095]	Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
[0096]	50 55 60
[0097]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0098]	65 70 75 80
[0099]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0100]	85 90 95
[0101]	Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Glu
[0102]	100 105 110
[0103]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0104]	115 120
[0105]	<210> 5
[0106]	<211> 121
[0107]	<212> PRT
[0108]	<213> 人工序列
[0109]	<220>
[0110]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0111]	<400> 5
[0112]	Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0113]	1 5 10 15
[0114]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
[0115]	20 25 30
[0116]	Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val

[0117]	35	40	45
[0118]	Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val		
[0119]	50	55	60
[0120]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0121]	65	70	75
[0122]	Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys		
[0123]	85	90	95
[0124]	Ala Arg Arg Asn Gly Thr Leu Tyr Tyr Tyr Leu Met Asp Tyr Trp Gly		
[0125]	100	105	110
[0126]	Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0127]	115	120	
[0128]	<210> 6		
[0129]	<211> 111		
[0130]	<212> PRT		
[0131]	<213> 人工序列		
[0132]	<220>		
[0133]	<223> 人工序列的描述:合成多肽		
[0134]	<400> 6		
[0135]	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln		
[0136]	1	5	10
[0137]	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr		
[0138]	20	25	30
[0139]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
[0140]	35	40	45
[0141]	Met Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe		
[0142]	50	55	60
[0143]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu		
[0144]	65	70	75
[0145]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ala		
[0146]	85	90	95
[0147]	Ser Thr Arg Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg		
[0148]	100	105	110
[0149]	<210> 7		
[0150]	<211> 111		
[0151]	<212> PRT		
[0152]	<213> 人工序列		
[0153]	<220>		
[0154]	<223> 人工序列的描述:合成多肽		
[0155]	<400> 7		

[0156]	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
[0157]	1 5 10 15
[0158]	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
[0159]	20 25 30
[0160]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
[0161]	35 40 45
[0162]	Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
[0163]	50 55 60
[0164]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
[0165]	65 70 75 80
[0166]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
[0167]	85 90 95
[0168]	Ser Thr Arg Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg
[0169]	100 105 110
[0170]	<210> 8
[0171]	<211> 121
[0172]	<212> PRT
[0173]	<213> 人工序列
[0174]	<220>
[0175]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0176]	<400> 8
[0177]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0178]	1 5 10 15
[0179]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[0180]	20 25 30
[0181]	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
[0182]	35 40 45
[0183]	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
[0184]	50 55 60
[0185]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0186]	65 70 75 80
[0187]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0188]	85 90 95
[0189]	Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
[0190]	100 105 110
[0191]	Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
[0192]	115 120
[0193]	<210> 9
[0194]	<211> 107

[0195] <212> PRT
 [0196] <213> 人工序列
 [0197] <220>
 [0198] <223> 人工序列的描述:合成多肽
 [0199] <400> 9
 [0200] Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 [0201] 1 5 10 15
 [0202] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 [0203] 20 25 30
 [0204] His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 [0205] 35 40 45
 [0206] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 [0207] 50 55 60
 [0208] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 [0209] 65 70 75 80
 [0210] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 [0211] 85 90 95
 [0212] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 [0213] 100 105
 [0214] <210> 10
 [0215] <211> 119
 [0216] <212> PRT
 [0217] <213> 人工序列
 [0218] <220>
 [0219] <223> 人工序列的描述:合成多肽
 [0220] <400> 10
 [0221] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 [0222] 1 5 10 15
 [0223] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [0224] 20 25 30
 [0225] Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0226] 35 40 45
 [0227] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0228] 50 55 60
 [0229] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0230] 65 70 75 80
 [0231] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0232] 85 90 95
 [0233] Ala Arg Trp Gln Asp Tyr Asp Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[0234]	100	105	110
[0235]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
[0236]	115		
[0237]	<210> 11		
[0238]	<211> 107		
[0239]	<212> PRT		
[0240]	<213> 人工序列		
[0241]	<220>		
[0242]	<223> 人工序列的描述:合成多肽		
[0243]	<400> 11		
[0244]	Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly		
[0245]	1 5 10 15		
[0246]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met		
[0247]	20 25 30		
[0248]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr		
[0249]	35 40 45		
[0250]	Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
[0251]	50 55 60		
[0252]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu		
[0253]	65 70 75 80		
[0254]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr		
[0255]	85 90 95		
[0256]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys Arg		
[0257]	100 105		
[0258]	<210> 12		
[0259]	<211> 120		
[0260]	<212> PRT		
[0261]	<213> 人工序列		
[0262]	<220>		
[0263]	<223> 人工序列的描述:合成多肽		
[0264]	<400> 12		
[0265]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0266]	1 5 10 15		
[0267]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0268]	20 25 30		
[0269]	Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0270]	35 40 45		
[0271]	Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val		
[0272]	50 55 60		

[0273]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0274]	65 70 75 80
[0275]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0276]	85 90 95
[0277]	Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
[0278]	100 105 110
[0279]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0280]	115 120
[0281]	<210> 13
[0282]	<211> 110
[0283]	<212> PRT
[0284]	<213> 人工序列
[0285]	<220>
[0286]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0287]	<400> 13
[0288]	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
[0289]	1 5 10 15
[0290]	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
[0291]	20 25 30
[0292]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
[0293]	35 40 45
[0294]	Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
[0295]	50 55 60
[0296]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
[0297]	65 70 75 80
[0298]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
[0299]	85 90 95
[0300]	Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
[0301]	100 105 110
[0302]	<210> 14
[0303]	<211> 121
[0304]	<212> PRT
[0305]	<213> 人工序列
[0306]	<220>
[0307]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0308]	<400> 14
[0309]	Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0310]	1 5 10 15
[0311]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr

[0312]		20		25		30													
[0313]	Gly	Met	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Thr	Pro	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val			
[0314]		35		40		45													
[0315]	Ala	Thr	Ile	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Val			
[0316]		50		55		60													
[0317]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Val	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr			
[0318]	65			70		75													
[0319]	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys			
[0320]		85		90		95													
[0321]	Ala	Arg	Arg	Asn	Gly	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly			
[0322]		100		105		110													
[0323]	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
[0324]		115		120															
[0325]	<210>	15																	
[0326]	<211>	110																	
[0327]	<212>	PRT																	
[0328]	<213>	人工序列																	
[0329]	<220>																		
[0330]	<223>	人工序列的描述:合成多肽																	
[0331]	<400>	15																	
[0332]	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln			
[0333]	1			5		10													
[0334]	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr			
[0335]		20		25		30													
[0336]	Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Phe			
[0337]		35		40		45													
[0338]	Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe			
[0339]		50		55		60													
[0340]	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Val			
[0341]	65			70		75													
[0342]	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ser	Ala			
[0343]		85		90		95													
[0344]	Ser	Thr	Val	Ile	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu					
[0345]		100		105		110													
[0346]	<210>	16																	
[0347]	<211>	5																	
[0348]	<212>	PRT																	
[0349]	<213>	人工序列																	
[0350]	<220>																		

- [0351] <223> 人工序列的描述:合成肽
 [0352] <400> 16
 [0353] Ser Tyr Asn Met His
 [0354] 1 5
 [0355] <210> 17
 [0356] <211> 17
 [0357] <212> PRT
 [0358] <213> 人工序列
 [0359] <220>
 [0360] <223> 人工序列的描述:合成肽
 [0361] <400> 17
 [0362] Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 [0363] 1 5 10 15
 [0364] Gly
 [0365] <210> 18
 [0366] <211> 12
 [0367] <212> PRT
 [0368] <213> 人工序列
 [0369] <220>
 [0370] <223> 人工序列的描述:合成肽
 [0371] <400> 18
 [0372] Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
 [0373] 1 5 10
 [0374] <210> 19
 [0375] <211> 7
 [0376] <212> PRT
 [0377] <213> 人工序列
 [0378] <220>
 [0379] <223> 人工序列的描述:合成肽
 [0380] <400> 19
 [0381] Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [0382] 1 5
 [0383] <210> 20
 [0384] <211> 6
 [0385] <212> PRT
 [0386] <213> 人工序列
 [0387] <220>
 [0388] <223> 人工序列的描述:合成肽
 [0389] <400> 20

[0390] Tyr Pro Gly Asn Gly Asp
 [0391] 1 5
 [0392] <210> 21
 [0393] <211> 12
 [0394] <212> PRT
 [0395] <213> 人工序列
 [0396] <220>
 [0397] <223> 人工序列的描述:合成肽
 [0398] <400> 21
 [0399] Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
 [0400] 1 5 10
 [0401] <210> 22
 [0402] <211> 5
 [0403] <212> PRT
 [0404] <213> 人工序列
 [0405] <220>
 [0406] <223> 人工序列的描述:合成肽
 [0407] <400> 22
 [0408] Ser Tyr Thr Met His
 [0409] 1 5
 [0410] <210> 23
 [0411] <211> 17
 [0412] <212> PRT
 [0413] <213> 人工序列
 [0414] <220>
 [0415] <223> 人工序列的描述:合成肽
 [0416] <400> 23
 [0417] Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 [0418] 1 5 10 15
 [0419] Asp
 [0420] <210> 24
 [0421] <211> 10
 [0422] <212> PRT
 [0423] <213> 人工序列
 [0424] <220>
 [0425] <223> 人工序列的描述:合成肽
 [0426] <400> 24
 [0427] Trp Gln Asp Tyr Asp Val Tyr Phe Asp Tyr
 [0428] 1 5 10

- [0429] <210> 25
[0430] <211> 7
[0431] <212> PRT
[0432] <213> 人工序列
[0433] <220>
[0434] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0435] <400> 25
[0436] Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[0437] 1 5
[0438] <210> 26
[0439] <211> 6
[0440] <212> PRT
[0441] <213> 人工序列
[0442] <220>
[0443] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0444] <400> 26
[0445] Asn Pro Ser Ser Gly Tyr
[0446] 1 5
[0447] <210> 27
[0448] <211> 10
[0449] <212> PRT
[0450] <213> 人工序列
[0451] <220>
[0452] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0453] <400> 27
[0454] Trp Gln Asp Tyr Asp Val Tyr Phe Asp Tyr
[0455] 1 5 10
[0456] <210> 28
[0457] <211> 10
[0458] <212> PRT
[0459] <213> 人工序列
[0460] <220>
[0461] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0462] <400> 28
[0463] Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
[0464] 1 5 10
[0465] <210> 29
[0466] <211> 7
[0467] <212> PRT

- [0468] <213> 人工序列
[0469] <220>
[0470] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0471] <400> 29
[0472] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
[0473] 1 5
[0474] <210> 30
[0475] <211> 9
[0476] <212> PRT
[0477] <213> 人工序列
[0478] <220>
[0479] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0480] <400> 30
[0481] Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
[0482] 1 5
[0483] <210> 31
[0484] <211> 10
[0485] <212> PRT
[0486] <213> 人工序列
[0487] <220>
[0488] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0489] <400> 31
[0490] Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
[0491] 1 5 10
[0492] <210> 32
[0493] <211> 7
[0494] <212> PRT
[0495] <213> 人工序列
[0496] <220>
[0497] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0498] <400> 32
[0499] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
[0500] 1 5
[0501] <210> 33
[0502] <211> 9
[0503] <212> PRT
[0504] <213> 人工序列
[0505] <220>
[0506] <223> 人工序列的描述:合成肽

[0507] <400> 33
 [0508] Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 [0509] 1 5
 [0510] <210> 34
 [0511] <211> 451
 [0512] <212> PRT
 [0513] <213> 人工序列
 [0514] <220>
 [0515] <223> 人工序列的描述:合成多肽
 [0516] <400> 34
 [0517] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [0518] 1 5 10 15
 [0519] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [0520] 20 25 30
 [0521] Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 [0522] 35 40 45
 [0523] Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0524] 50 55 60
 [0525] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0526] 65 70 75 80
 [0527] Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0528] 85 90 95
 [0529] Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 [0530] 100 105 110
 [0531] Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 [0532] 115 120 125
 [0533] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 [0534] 130 135 140
 [0535] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 [0536] 145 150 155 160
 [0537] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 [0538] 165 170 175
 [0539] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 [0540] 180 185 190
 [0541] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 [0542] 195 200 205
 [0543] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 [0544] 210 215 220
 [0545] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

[0546]	225	230	235	240
[0547]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
[0548]		245	250	255
[0549]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
[0550]		260	265	270
[0551]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
[0552]		275	280	285
[0553]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
[0554]		290	295	300
[0555]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
[0556]	305	310	315	320
[0557]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
[0558]		325	330	335
[0559]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
[0560]		340	345	350
[0561]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser			
[0562]		355	360	365
[0563]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
[0564]		370	375	380
[0565]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
[0566]	385	390	395	400
[0567]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
[0568]		405	410	415
[0569]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
[0570]		420	425	430
[0571]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
[0572]		435	440	445
[0573]	Pro Gly Lys			
[0574]	450			
[0575]	<210> 35			
[0576]	<211> 451			
[0577]	<212> PRT			
[0578]	<213> 人工序列			
[0579]	<220>			
[0580]	<223> 人工序列的描述:合成多肽			
[0581]	<400> 35			
[0582]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
[0583]	1	5	10	15
[0584]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			

[0624]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[0625]	340 345 350
[0626]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
[0627]	355 360 365
[0628]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[0629]	370 375 380
[0630]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[0631]	385 390 395 400
[0632]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val
[0633]	405 410 415
[0634]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[0635]	420 425 430
[0636]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[0637]	435 440 445
[0638]	Pro Gly Lys
[0639]	450
[0640]	<210> 36
[0641]	<211> 451
[0642]	<212> PRT
[0643]	<213> 人工序列
[0644]	<220>
[0645]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[0646]	<400> 36
[0647]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0648]	1 5 10 15
[0649]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[0650]	20 25 30
[0651]	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
[0652]	35 40 45
[0653]	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
[0654]	50 55 60
[0655]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0656]	65 70 75 80
[0657]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0658]	85 90 95
[0659]	Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
[0660]	100 105 110
[0661]	Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0662]	115 120 125

[0663]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[0664]	130 135 140
[0665]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0666]	145 150 155 160
[0667]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[0668]	165 170 175
[0669]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0670]	180 185 190
[0671]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[0672]	195 200 205
[0673]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
[0674]	210 215 220
[0675]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[0676]	225 230 235 240
[0677]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[0678]	245 250 255
[0679]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[0680]	260 265 270
[0681]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[0682]	275 280 285
[0683]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[0684]	290 295 300
[0685]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[0686]	305 310 315 320
[0687]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[0688]	325 330 335
[0689]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[0690]	340 345 350
[0691]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
[0692]	355 360 365
[0693]	Leu Tyr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[0694]	370 375 380
[0695]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[0696]	385 390 395 400
[0697]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[0698]	405 410 415
[0699]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[0700]	420 425 430
[0701]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

[0702]	435	440	445
[0703]	Pro Gly Lys		
[0704]	450		
[0705]	<210> 37		
[0706]	<211> 449		
[0707]	<212> PRT		
[0708]	<213> 人工序列		
[0709]	<220>		
[0710]	<223> 人工序列的描述:合成多肽		
[0711]	<400> 37		
[0712]	Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala		
[0713]	1 5 10 15		
[0714]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
[0715]	20 25 30		
[0716]	Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile		
[0717]	35 40 45		
[0718]	Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0719]	50 55 60		
[0720]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0721]	65 70 75 80		
[0722]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0723]	85 90 95		
[0724]	Ala Arg Trp Gln Asp Tyr Asp Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Glu Gly		
[0725]	100 105 110		
[0726]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
[0727]	115 120 125		
[0728]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
[0729]	130 135 140		
[0730]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
[0731]	145 150 155 160		
[0732]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
[0733]	165 170 175		
[0734]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
[0735]	180 185 190		
[0736]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
[0737]	195 200 205		
[0738]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
[0739]	210 215 220		
[0740]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		

[0741]	225	230	235	240
[0742]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
[0743]		245	250	255
[0744]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
[0745]		260	265	270
[0746]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
[0747]		275	280	285
[0748]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
[0749]		290	295	300
[0750]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
[0751]		305	310	315
[0752]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
[0753]		325	330	335
[0754]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
[0755]		340	345	350
[0756]	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
[0757]		355	360	365
[0758]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
[0759]		370	375	380
[0760]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
[0761]		385	390	395
[0762]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
[0763]		405	410	415
[0764]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
[0765]		420	425	430
[0766]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
[0767]		435	440	445
[0768]	Lys			
[0769]	<210> 38			
[0770]	<211> 449			
[0771]	<212> PRT			
[0772]	<213> 人工序列			
[0773]	<220>			
[0774]	<223> 人工序列的描述:合成多肽			
[0775]	<400> 38			
[0776]	Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala			
[0777]	1	5	10	15
[0778]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
[0779]		20	25	30

[0780]	Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
[0781]	35 40 45
[0782]	Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
[0783]	50 55 60
[0784]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0785]	65 70 75 80
[0786]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0787]	85 90 95
[0788]	Ala Arg Trp Gln Asp Tyr Asp Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
[0789]	100 105 110
[0790]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
[0791]	115 120 125
[0792]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
[0793]	130 135 140
[0794]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
[0795]	145 150 155 160
[0796]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
[0797]	165 170 175
[0798]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
[0799]	180 185 190
[0800]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
[0801]	195 200 205
[0802]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
[0803]	210 215 220
[0804]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
[0805]	225 230 235 240
[0806]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[0807]	245 250 255
[0808]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
[0809]	260 265 270
[0810]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[0811]	275 280 285
[0812]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[0813]	290 295 300
[0814]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[0815]	305 310 315 320
[0816]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
[0817]	325 330 335
[0818]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

[0819]	340	345	350
[0820]	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Tyr		
[0821]	355	360	365
[0822]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
[0823]	370	375	380
[0824]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
[0825]	385	390	395
[0826]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
[0827]	405	410	415
[0828]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
[0829]	420	425	430
[0830]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0831]	435	440	445
[0832]	Lys		
[0833]	<210> 39		
[0834]	<211> 449		
[0835]	<212> PRT		
[0836]	<213> 人工序列		
[0837]	<220>		
[0838]	<223> 人工序列的描述:合成多肽		
[0839]	<400> 39		
[0840]	Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala		
[0841]	1	5	10
[0842]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
[0843]	20	25	30
[0844]	Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile		
[0845]	35	40	45
[0846]	Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0847]	50	55	60
[0848]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0849]	65	70	75
[0850]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0851]	85	90	95
[0852]	Ala Arg Trp Gln Asp Tyr Asp Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Glu Gly		
[0853]	100	105	110
[0854]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
[0855]	115	120	125
[0856]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
[0857]	130	135	140

[0858]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
[0859]	145 150 155 160
[0860]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
[0861]	165 170 175
[0862]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
[0863]	180 185 190
[0864]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
[0865]	195 200 205
[0866]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
[0867]	210 215 220
[0868]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
[0869]	225 230 235 240
[0870]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[0871]	245 250 255
[0872]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
[0873]	260 265 270
[0874]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[0875]	275 280 285
[0876]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[0877]	290 295 300
[0878]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[0879]	305 310 315 320
[0880]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
[0881]	325 330 335
[0882]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[0883]	340 345 350
[0884]	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[0885]	355 360 365
[0886]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[0887]	370 375 380
[0888]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[0889]	385 390 395 400
[0890]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
[0891]	405 410 415
[0892]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[0893]	420 425 430
[0894]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0895]	435 440 445
[0896]	Lys

[0897]	<210>	40
[0898]	<211>	213
[0899]	<212>	PRT
[0900]	<213>	人工序列
[0901]	<220>	
[0902]	<223>	人工序列的描述:合成多肽
[0903]	<400>	40
[0904]	Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly	
[0905]	1	5 10 15
[0906]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile	
[0907]		20 25 30
[0908]	His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr	
[0909]		35 40 45
[0910]	Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser	
[0911]		50 55 60
[0912]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu	
[0913]		65 70 75 80
[0914]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr	
[0915]		85 90 95
[0916]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro	
[0917]		100 105 110
[0918]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr	
[0919]		115 120 125
[0920]	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys	
[0921]		130 135 140
[0922]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu	
[0923]		145 150 155 160
[0924]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser	
[0925]		165 170 175
[0926]	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala	
[0927]		180 185 190
[0928]	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe	
[0929]		195 200 205
[0930]	Asn Arg Gly Glu Cys	
[0931]		210
[0932]	<210>	41
[0933]	<211>	5
[0934]	<212>	PRT
[0935]	<213>	人工序列

- [0936] <220>
- [0937] <223> 人工序列的描述:合成肽
- [0938] <400> 41
- [0939] Ser Tyr Ile Met Met
- [0940] 1 5
- [0941] <210> 42
- [0942] <211> 17
- [0943] <212> PRT
- [0944] <213> 人工序列
- [0945] <220>
- [0946] <223> 人工序列的描述:合成肽
- [0947] <400> 42
- [0948] Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val Lys
- [0949] 1 5 10 15
- [0950] Gly
- [0951] <210> 43
- [0952] <211> 11
- [0953] <212> PRT
- [0954] <213> 人工序列
- [0955] <220>
- [0956] <223> 人工序列的描述:合成肽
- [0957] <400> 43
- [0958] Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr
- [0959] 1 5 10
- [0960] <210> 44
- [0961] <211> 7
- [0962] <212> PRT
- [0963] <213> 人工序列
- [0964] <220>
- [0965] <223> 人工序列的描述:合成肽
- [0966] <400> 44
- [0967] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
- [0968] 1 5
- [0969] <210> 45
- [0970] <211> 6
- [0971] <212> PRT
- [0972] <213> 人工序列
- [0973] <220>
- [0974] <223> 人工序列的描述:合成肽

- [0975] <400> 45
[0976] Tyr Pro Ser Gly Gly Ile
[0977] 1 5
[0978] <210> 46
[0979] <211> 11
[0980] <212> PRT
[0981] <213> 人工序列
[0982] <220>
[0983] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0984] <400> 46
[0985] Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr
[0986] 1 5 10
[0987] <210> 47
[0988] <211> 5
[0989] <212> PRT
[0990] <213> 人工序列
[0991] <220>
[0992] <223> 人工序列的描述:合成肽
[0993] <400> 47
[0994] Gly Tyr Gly Met Ser
[0995] 1 5
[0996] <210> 48
[0997] <211> 17
[0998] <212> PRT
[0999] <213> 人工序列
[1000] <220>
[1001] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1002] <400> 48
[1003] Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
[1004] 1 5 10 15
[1005] Gly
[1006] <210> 49
[1007] <211> 12
[1008] <212> PRT
[1009] <213> 人工序列
[1010] <220>
[1011] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1012] <400> 49
[1013] Arg Asn Gly Thr Leu Tyr Tyr Tyr Leu Met Asp Tyr

[1014]	1	5	10
[1015]	<210>	50	
[1016]	<211>	7	
[1017]	<212>	PRT	
[1018]	<213>	人工序列	
[1019]	<220>		
[1020]	<223>	人工序列的描述:合成肽	
[1021]	<400>	50	
[1022]	Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr		
[1023]	1	5	
[1024]	<210>	51	
[1025]	<211>	6	
[1026]	<212>	PRT	
[1027]	<213>	人工序列	
[1028]	<220>		
[1029]	<223>	人工序列的描述:合成肽	
[1030]	<400>	51	
[1031]	Asn Ser Gly Gly Ser Tyr		
[1032]	1	5	
[1033]	<210>	52	
[1034]	<211>	12	
[1035]	<212>	PRT	
[1036]	<213>	人工序列	
[1037]	<220>		
[1038]	<223>	人工序列的描述:合成肽	
[1039]	<400>	52	
[1040]	Arg Asn Gly Thr Leu Tyr Tyr Tyr Leu Met Asp Tyr		
[1041]	1	5	10
[1042]	<210>	53	
[1043]	<211>	14	
[1044]	<212>	PRT	
[1045]	<213>	人工序列	
[1046]	<220>		
[1047]	<223>	人工序列的描述:合成肽	
[1048]	<400>	53	
[1049]	Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser		
[1050]	1	5	10
[1051]	<210>	54	
[1052]	<211>	7	

- [1053] <212> PRT
[1054] <213> 人工序列
[1055] <220>
[1056] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1057] <400> 54
[1058] Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser
[1059] 1 5
[1060] <210> 55
[1061] <211> 10
[1062] <212> PRT
[1063] <213> 人工序列
[1064] <220>
[1065] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1066] <400> 55
[1067] Ser Ser Tyr Thr Ser Ala Ser Thr Arg Ile
[1068] 1 5 10
[1069] <210> 56
[1070] <211> 14
[1071] <212> PRT
[1072] <213> 人工序列
[1073] <220>
[1074] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1075] <400> 56
[1076] Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
[1077] 1 5 10
[1078] <210> 57
[1079] <211> 7
[1080] <212> PRT
[1081] <213> 人工序列
[1082] <220>
[1083] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1084] <400> 57
[1085] Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser
[1086] 1 5
[1087] <210> 58
[1088] <211> 10
[1089] <212> PRT
[1090] <213> 人工序列
[1091] <220>

- [1092] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1093] <400> 58
[1094] Ser Ser Tyr Thr Ser Ala Ser Thr Arg Ile
[1095] 1 5 10
[1096] <210> 59
[1097] <211> 14
[1098] <212> PRT
[1099] <213> 人工序列
[1100] <220>
[1101] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1102] <400> 59
[1103] Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
[1104] 1 5 10
[1105] <210> 60
[1106] <211> 7
[1107] <212> PRT
[1108] <213> 人工序列
[1109] <220>
[1110] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1111] <400> 60
[1112] Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
[1113] 1 5
[1114] <210> 61
[1115] <211> 10
[1116] <212> PRT
[1117] <213> 人工序列
[1118] <220>
[1119] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1120] <400> 61
[1121] Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Ile
[1122] 1 5 10
[1123] <210> 62
[1124] <211> 14
[1125] <212> PRT
[1126] <213> 人工序列
[1127] <220>
[1128] <223> 人工序列的描述:合成肽
[1129] <400> 62
[1130] Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

[1131]	1	5	10
[1132]	<210>	63	
[1133]	<211>	7	
[1134]	<212>	PRT	
[1135]	<213>	人工序列	
[1136]	<220>		
[1137]	<223>	人工序列的描述:合成肽	
[1138]	<400>	63	
[1139]	Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser		
[1140]	1	5	
[1141]	<210>	64	
[1142]	<211>	10	
[1143]	<212>	PRT	
[1144]	<213>	人工序列	
[1145]	<220>		
[1146]	<223>	人工序列的描述:合成肽	
[1147]	<400>	64	
[1148]	Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Ile		
[1149]	1	5	10
[1150]	<210>	65	
[1151]	<211>	450	
[1152]	<212>	PRT	
[1153]	<213>	人工序列	
[1154]	<220>		
[1155]	<223>	人工序列的描述:合成多肽	
[1156]	<400>	65	
[1157]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly		
[1158]	1	5	10 15
[1159]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[1160]		20	25 30
[1161]	Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1162]		35	40 45
[1163]	Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val		
[1164]		50	55 60
[1165]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1166]		65	70 75 80
[1167]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1168]		85	90 95
[1169]	Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Glu		

[1170]		100		105		110										
[1171]	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
[1172]		115		120		125										
[1173]	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
[1174]		130		135		140										
[1175]	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
[1176]	145			150		155										160
[1177]	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
[1178]				165		170										175
[1179]	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
[1180]				180		185										190
[1181]	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
[1182]				195		200										205
[1183]	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
[1184]				210		215										220
[1185]	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
[1186]	225					230						235				240
[1187]	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
[1188]				245		250										255
[1189]	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
[1190]				260		265										270
[1191]	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
[1192]				275		280										285
[1193]	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
[1194]				290		295										300
[1195]	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
[1196]	305					310						315				320
[1197]	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
[1198]				325		330										335
[1199]	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
[1200]				340		345										350
[1201]	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
[1202]				355		360										365
[1203]	Tyr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
[1204]				370		375										380
[1205]	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
[1206]	385					390						395				400
[1207]	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
[1208]				405		410										415

[1209]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
[1210]	420 425 430
[1211]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
[1212]	435 440 445
[1213]	Gly Lys
[1214]	450
[1215]	<210> 66
[1216]	<211> 451
[1217]	<212> PRT
[1218]	<213> 人工序列
[1219]	<220>
[1220]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[1221]	<400> 66
[1222]	Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[1223]	1 5 10 15
[1224]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
[1225]	20 25 30
[1226]	Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
[1227]	35 40 45
[1228]	Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
[1229]	50 55 60
[1230]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
[1231]	65 70 75 80
[1232]	Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[1233]	85 90 95
[1234]	Ala Arg Arg Asn Gly Thr Leu Tyr Tyr Tyr Leu Met Asp Tyr Trp Gly
[1235]	100 105 110
[1236]	Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[1237]	115 120 125
[1238]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[1239]	130 135 140
[1240]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[1241]	145 150 155 160
[1242]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[1243]	165 170 175
[1244]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[1245]	180 185 190
[1246]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[1247]	195 200 205

[1248]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
[1249]	210 215 220
[1250]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[1251]	225 230 235 240
[1252]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[1253]	245 250 255
[1254]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[1255]	260 265 270
[1256]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[1257]	275 280 285
[1258]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[1259]	290 295 300
[1260]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[1261]	305 310 315 320
[1262]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[1263]	325 330 335
[1264]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[1265]	340 345 350
[1266]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
[1267]	355 360 365
[1268]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[1269]	370 375 380
[1270]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[1271]	385 390 395 400
[1272]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val
[1273]	405 410 415
[1274]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[1275]	420 425 430
[1276]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[1277]	435 440 445
[1278]	Pro Gly Lys
[1279]	450
[1280]	<210> 67
[1281]	<211> 217
[1282]	<212> PRT
[1283]	<213> 人工序列
[1284]	<220>
[1285]	<223> 人工序列的描述:合成多肽
[1286]	<400> 67

[1326]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
[1327]	35 40 45
[1328]	Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
[1329]	50 55 60
[1330]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
[1331]	65 70 75 80
[1332]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
[1333]	85 90 95
[1334]	Ser Thr Arg Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr
[1335]	100 105 110
[1336]	Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
[1337]	115 120 125
[1338]	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
[1339]	130 135 140
[1340]	Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
[1341]	145 150 155 160
[1342]	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
[1343]	165 170 175
[1344]	Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
[1345]	180 185 190
[1346]	Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
[1347]	195 200 205
[1348]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1349]	210 215

结合至Raji细胞

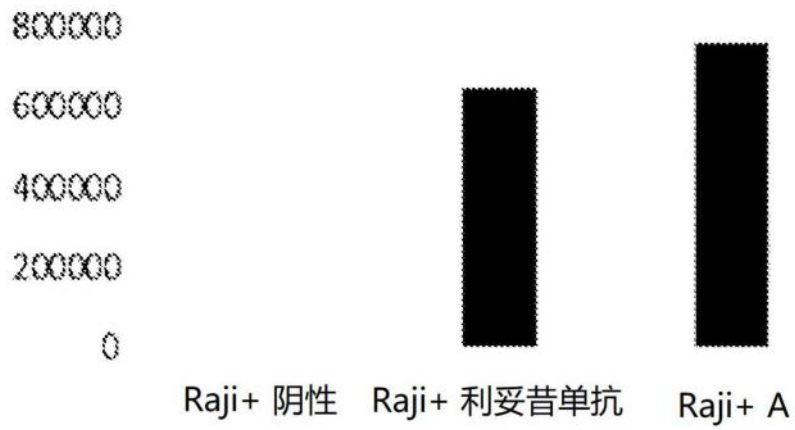


图1A

结合至Jukart细胞

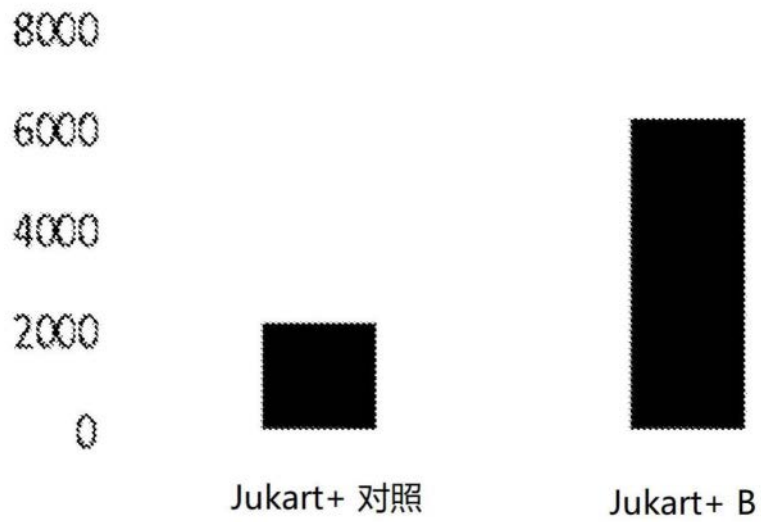


图1B

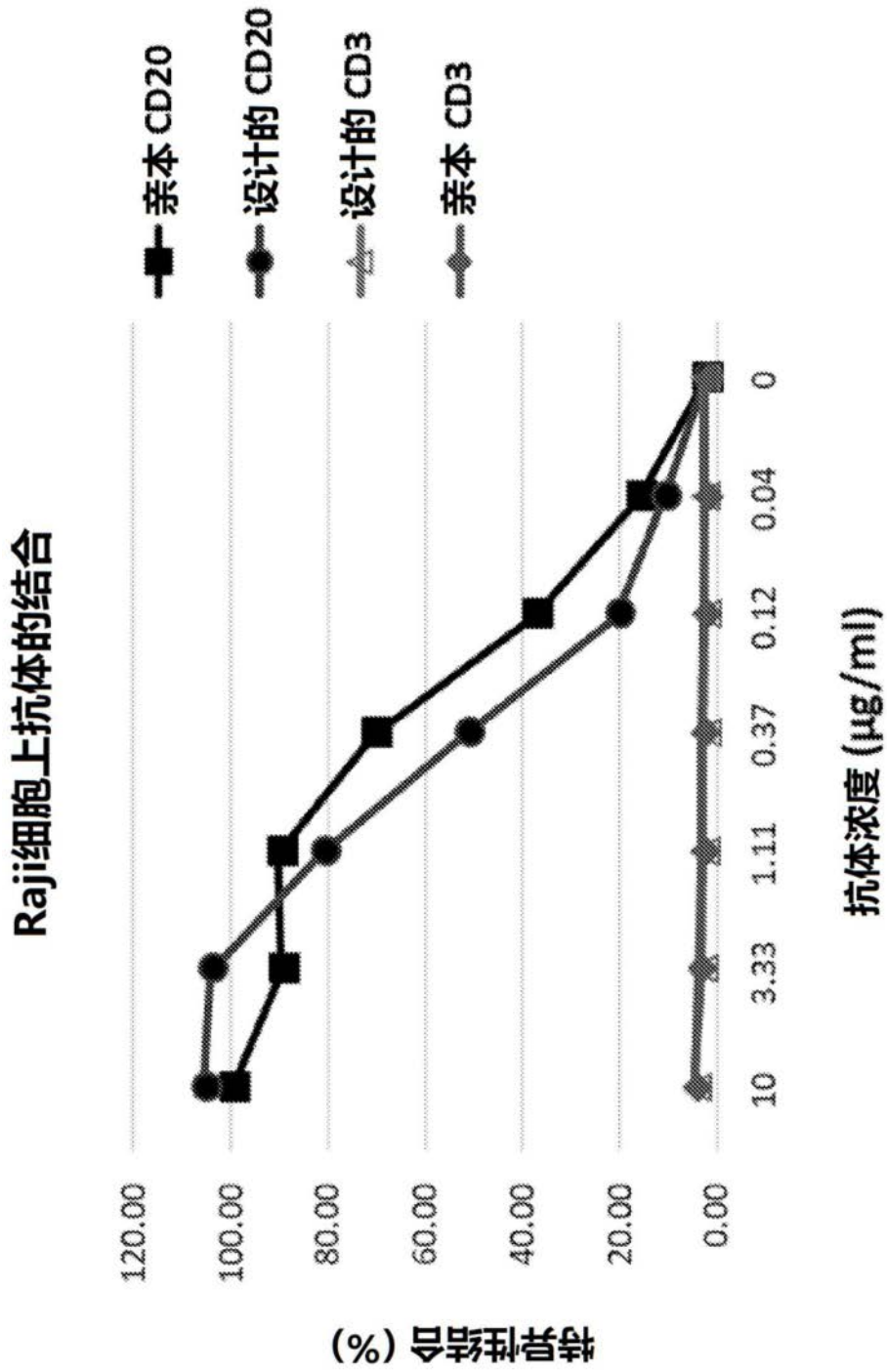


图2A

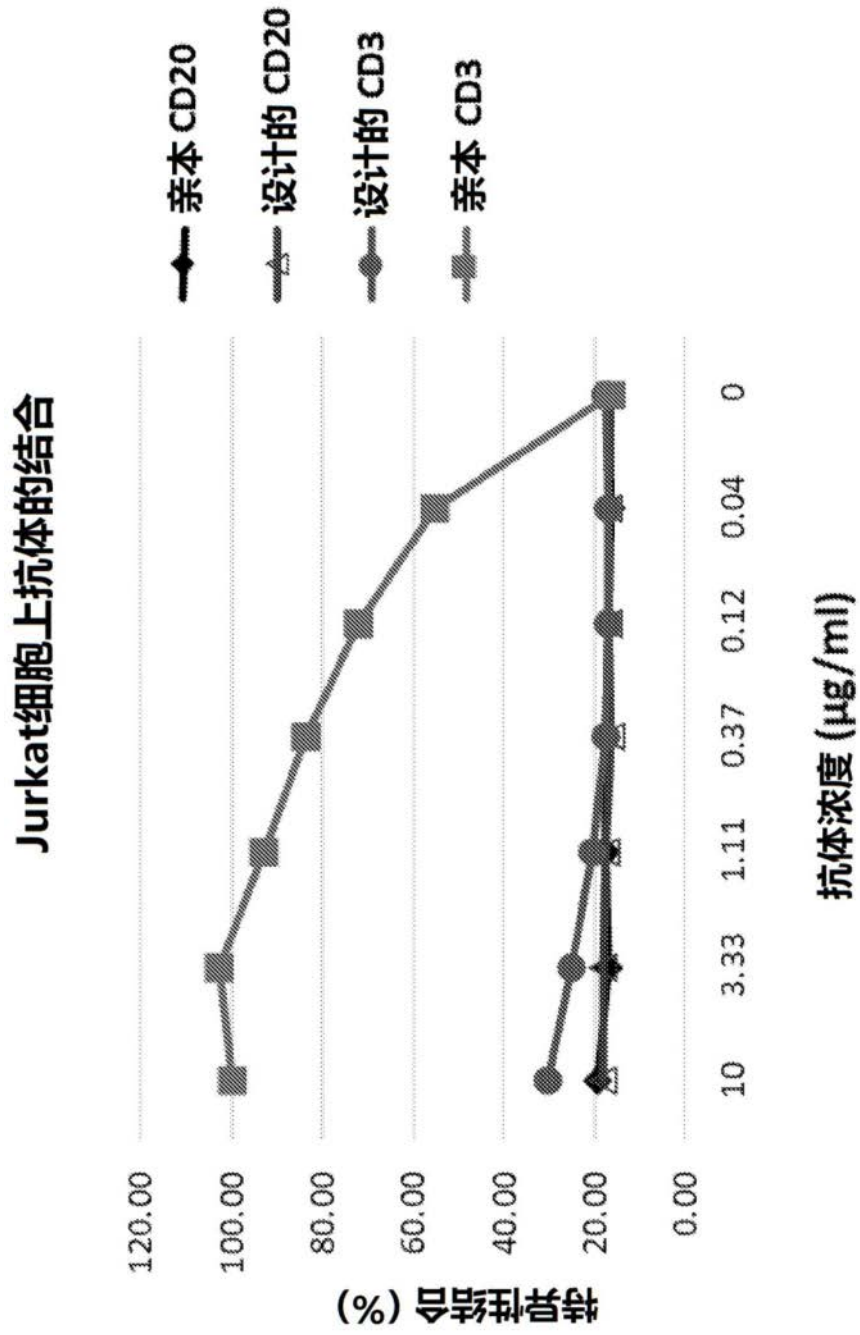


图2B

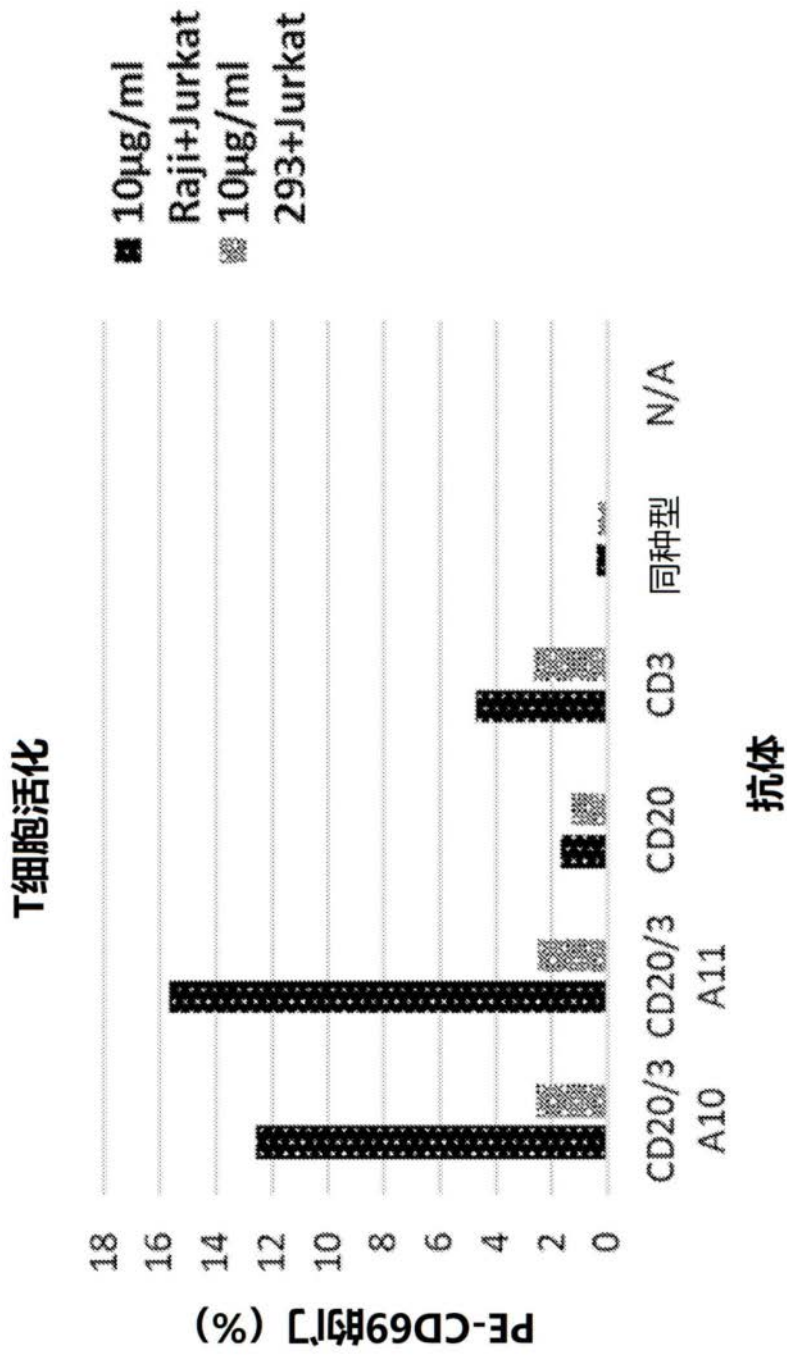


图3

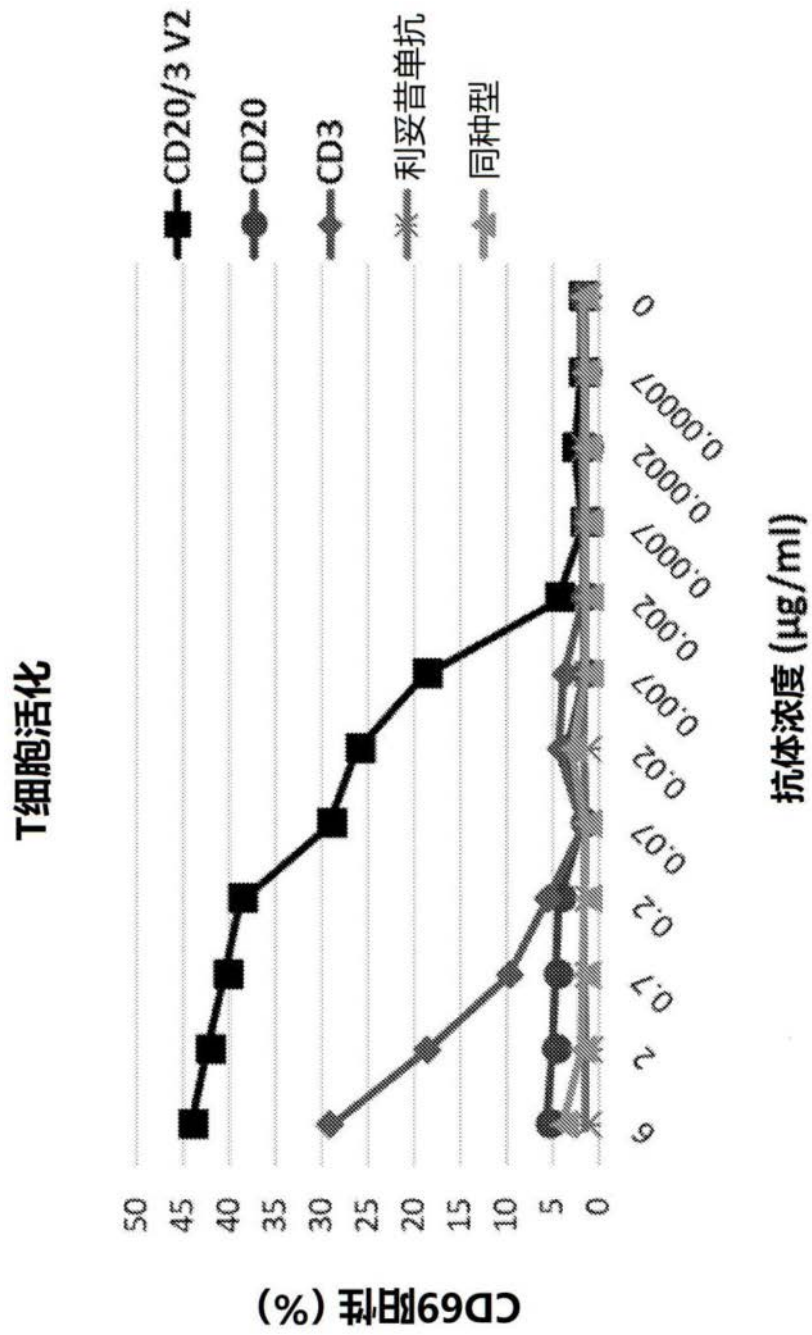


图4

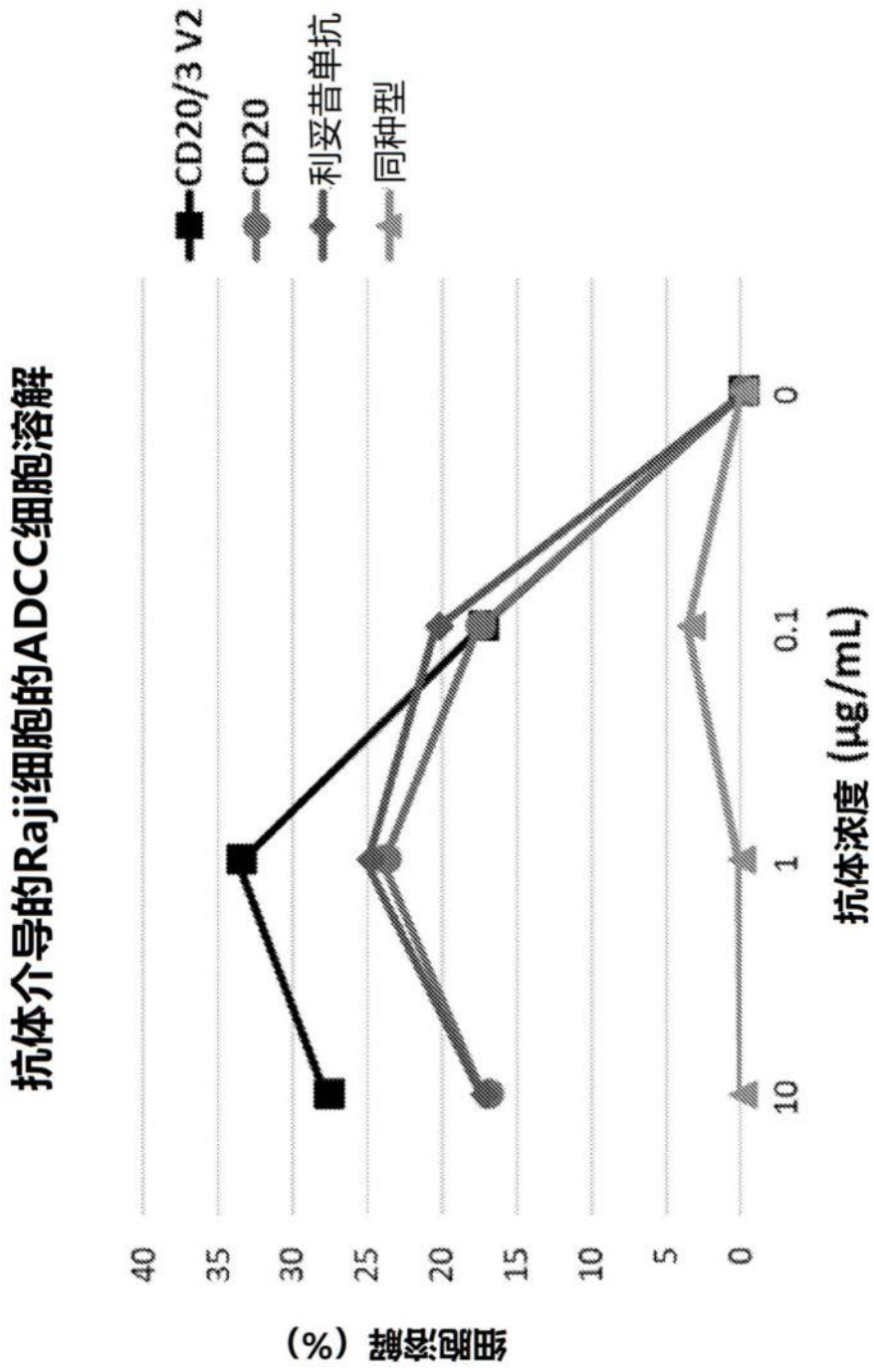


图5

96个小时T细胞活化后的Raji细胞的ADCC细胞溶解

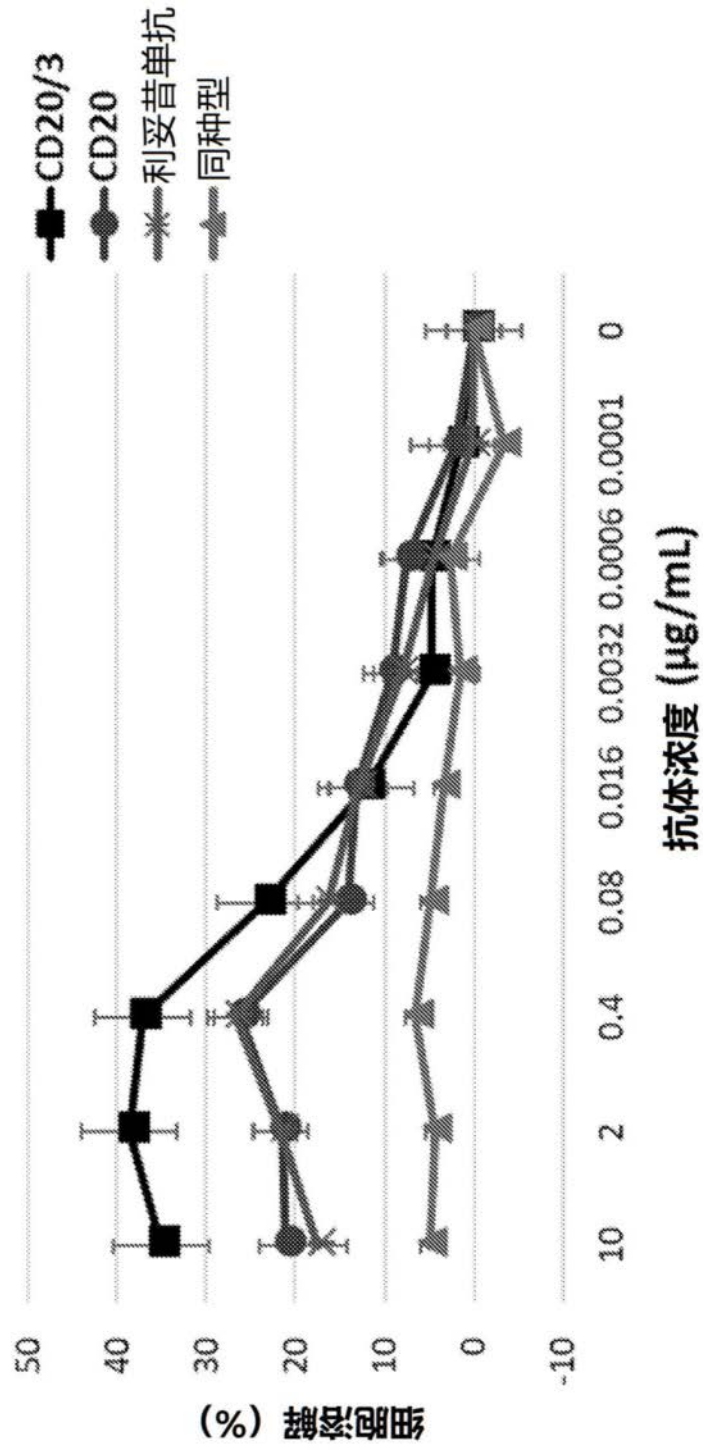


图6

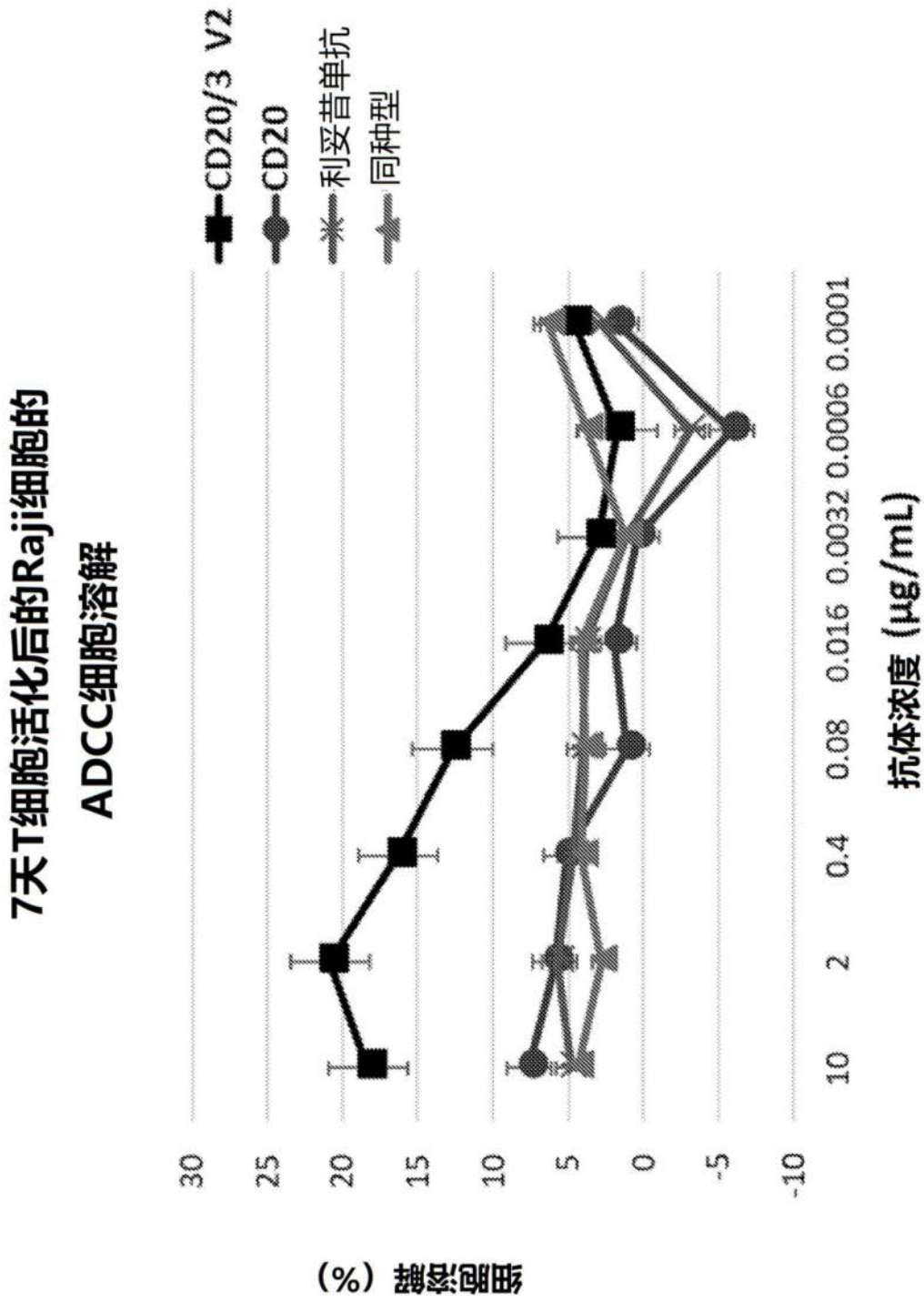


图7

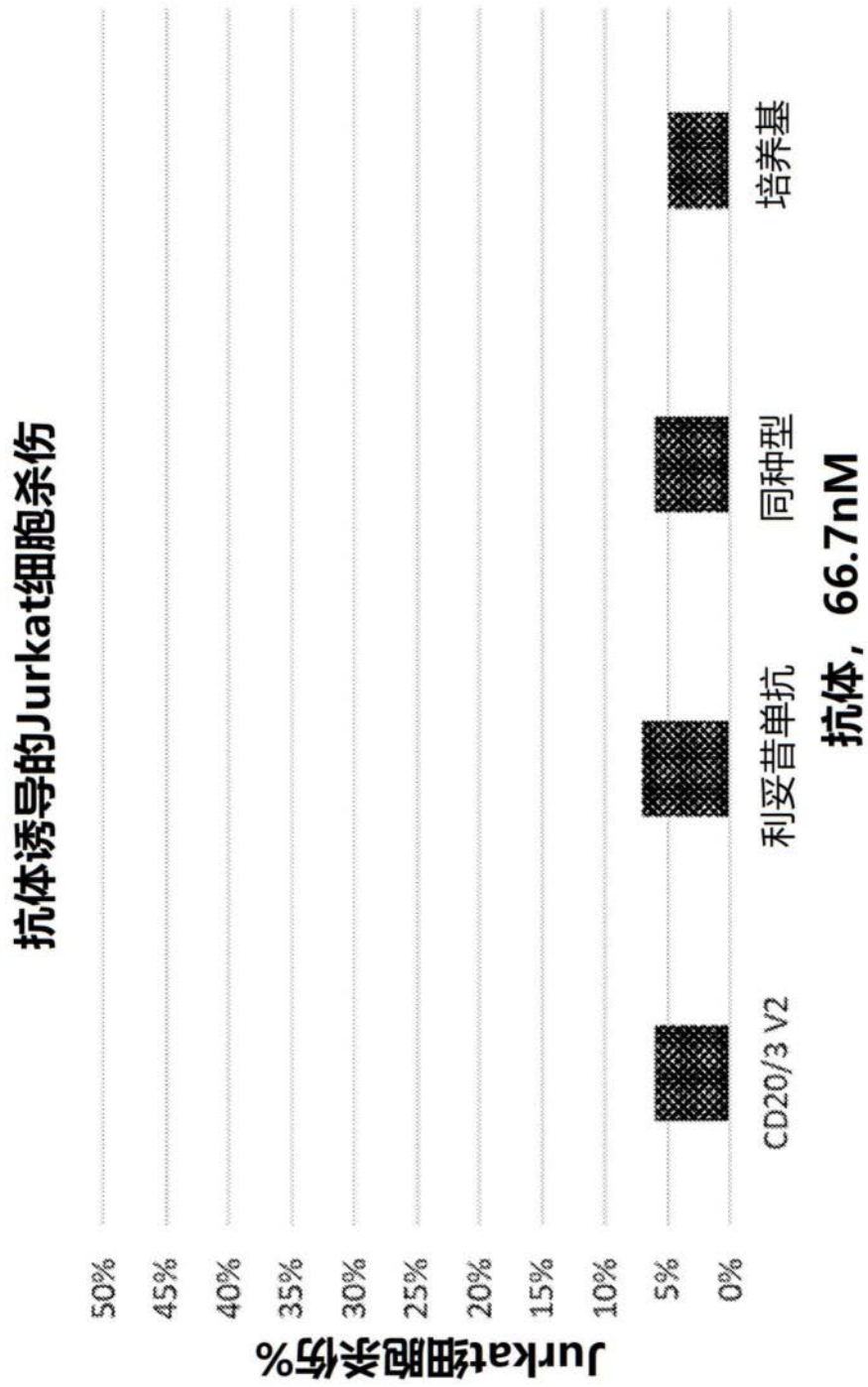


图8

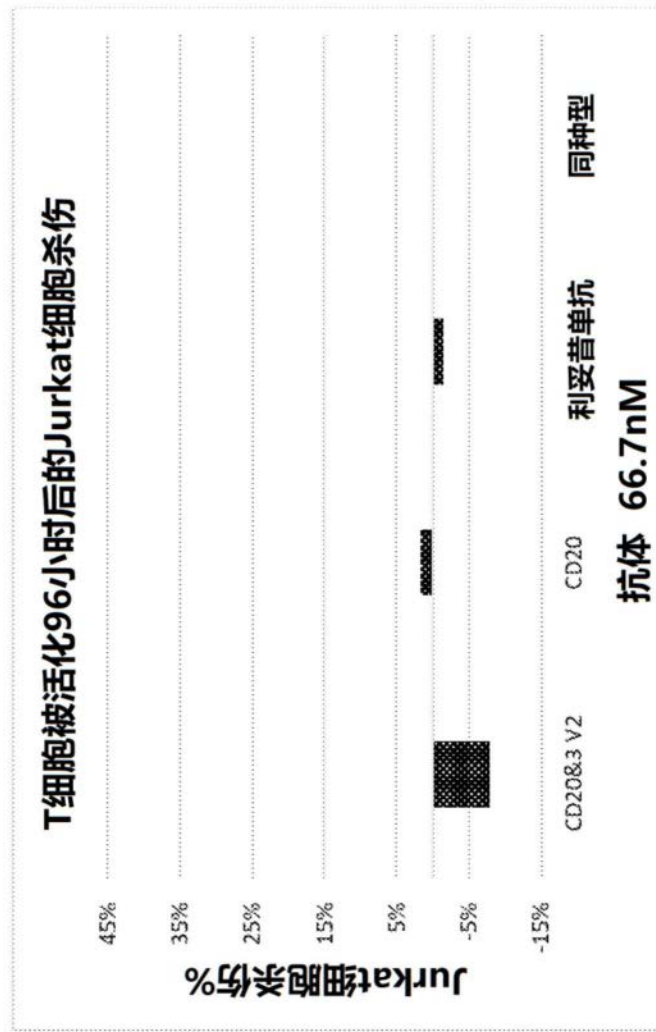


图9

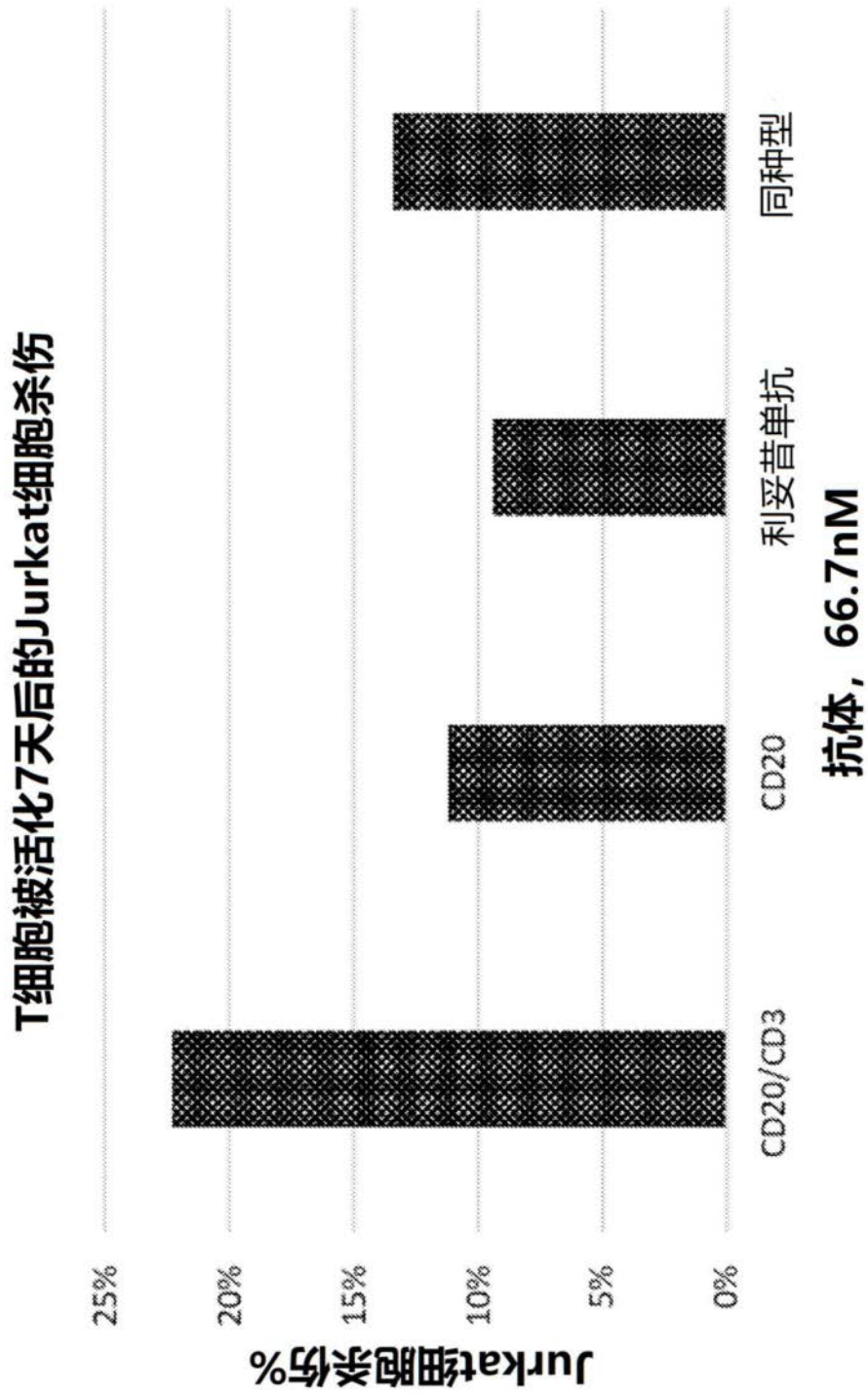


图10

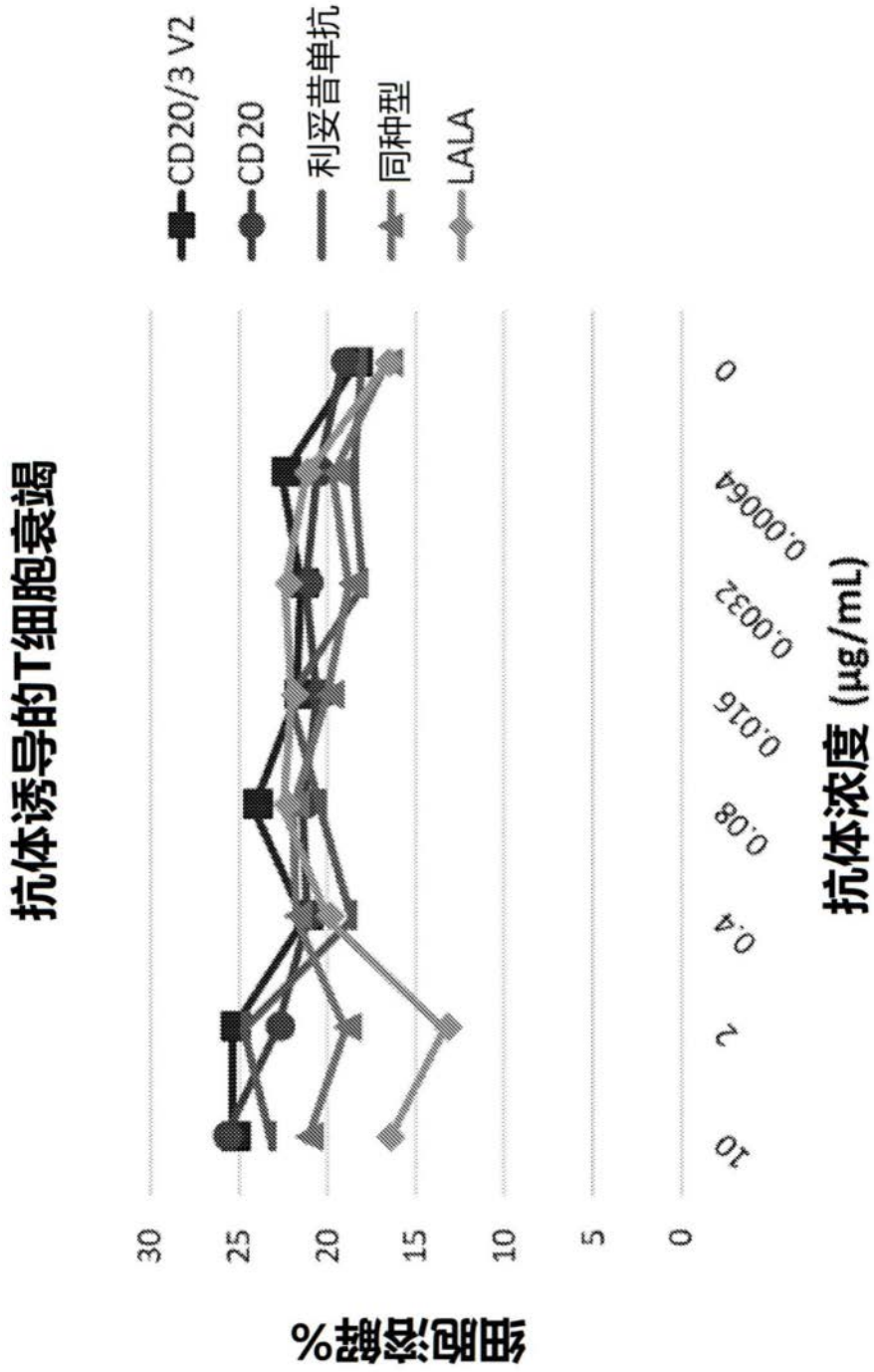


图11

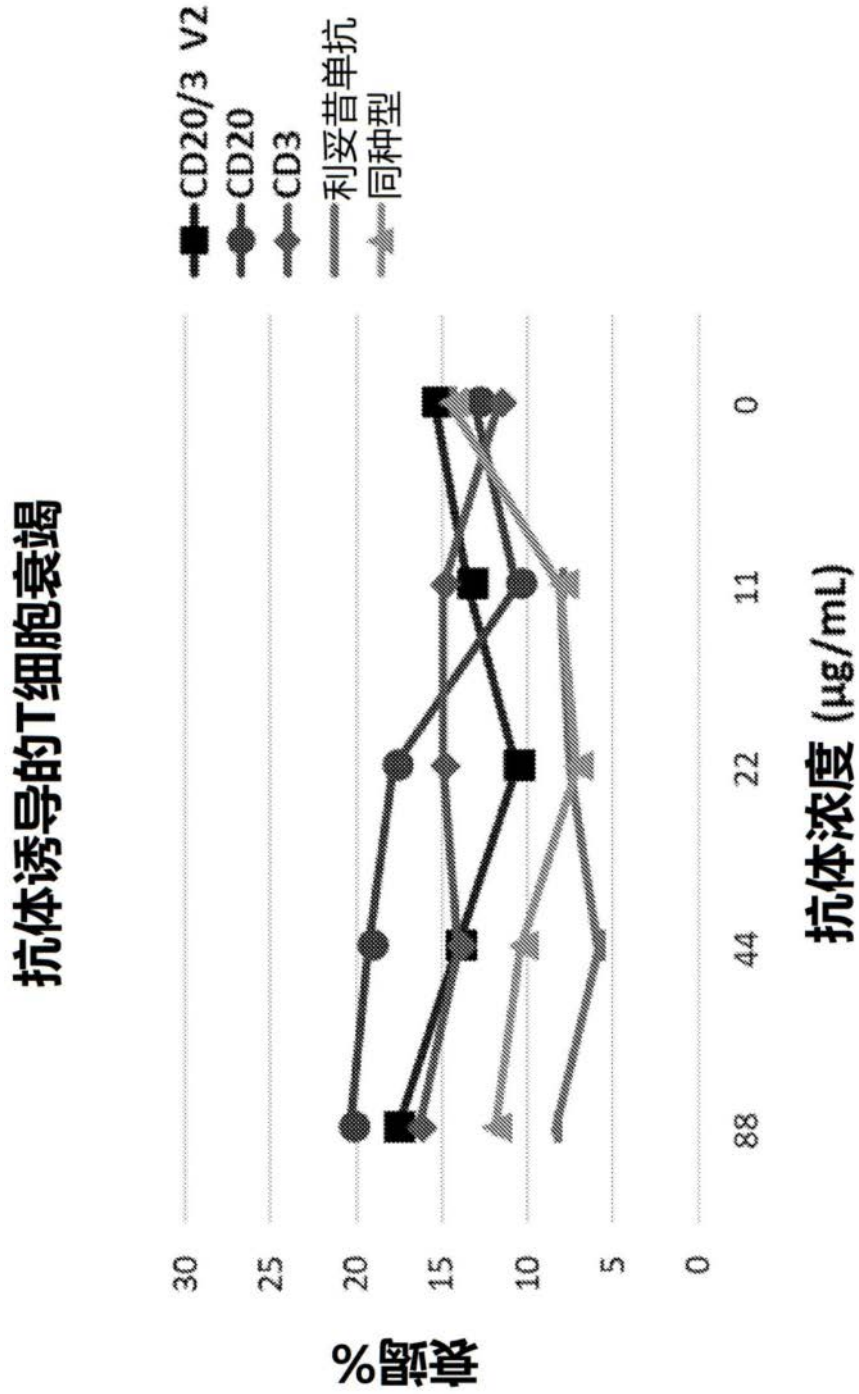


图12

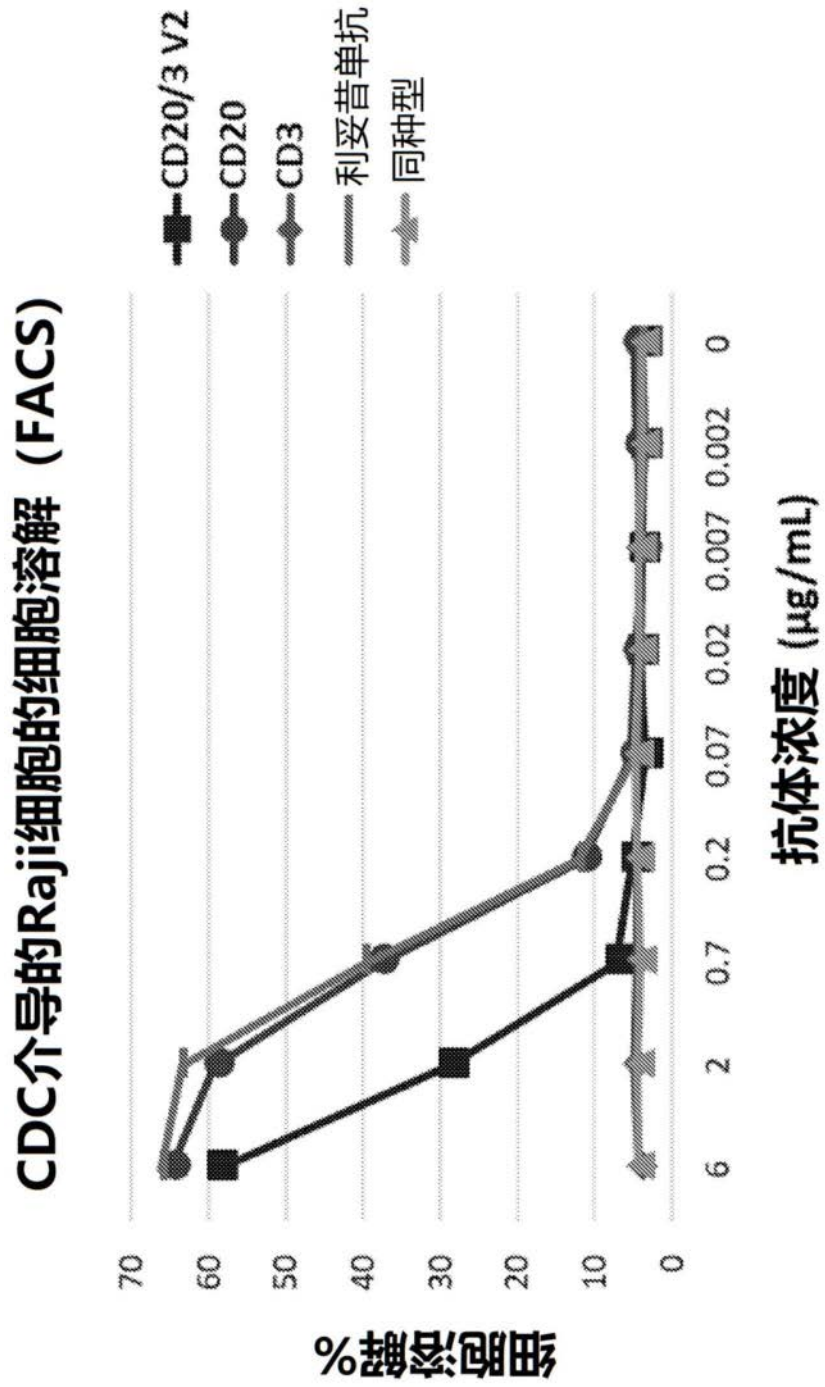


图13

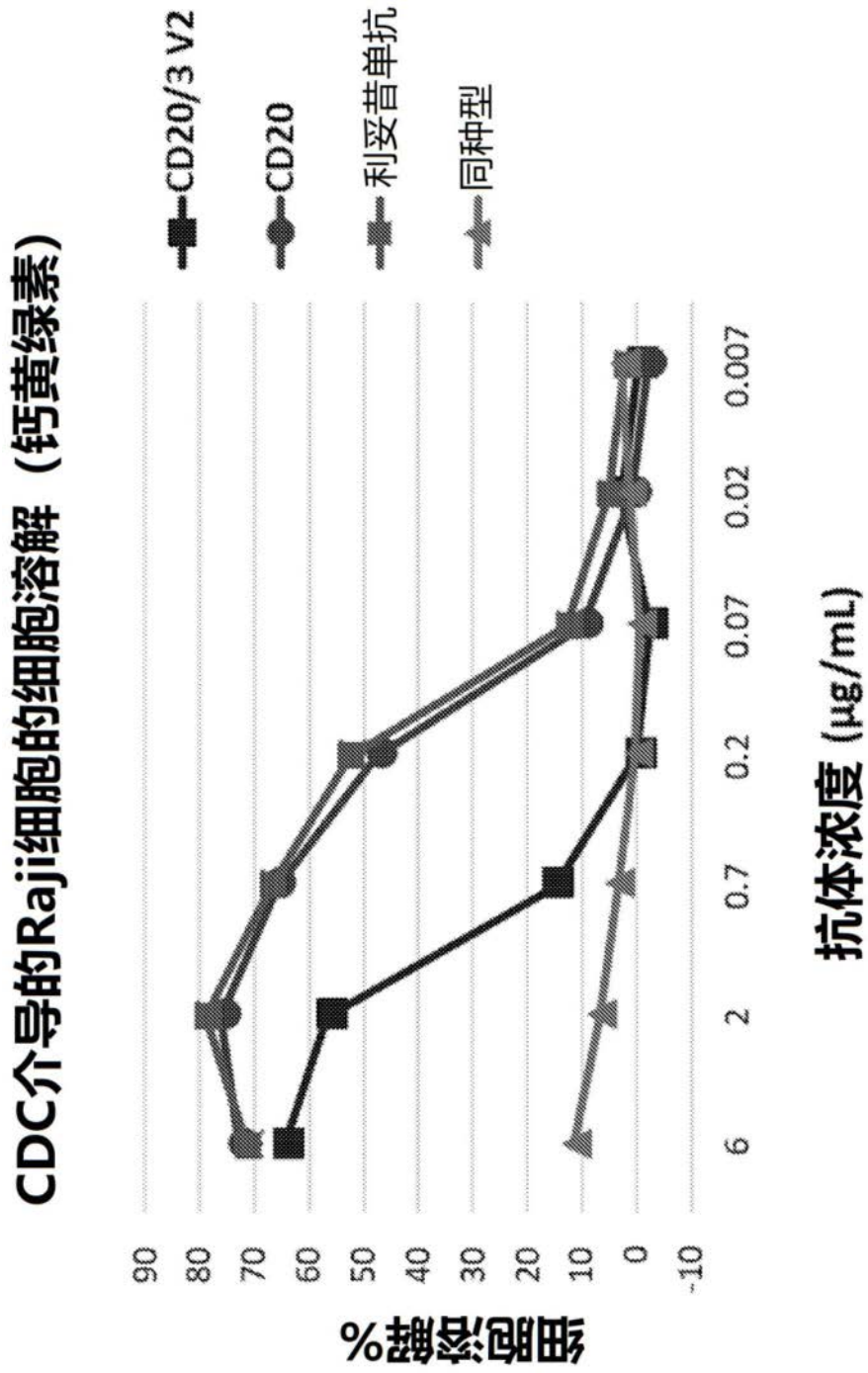


图14

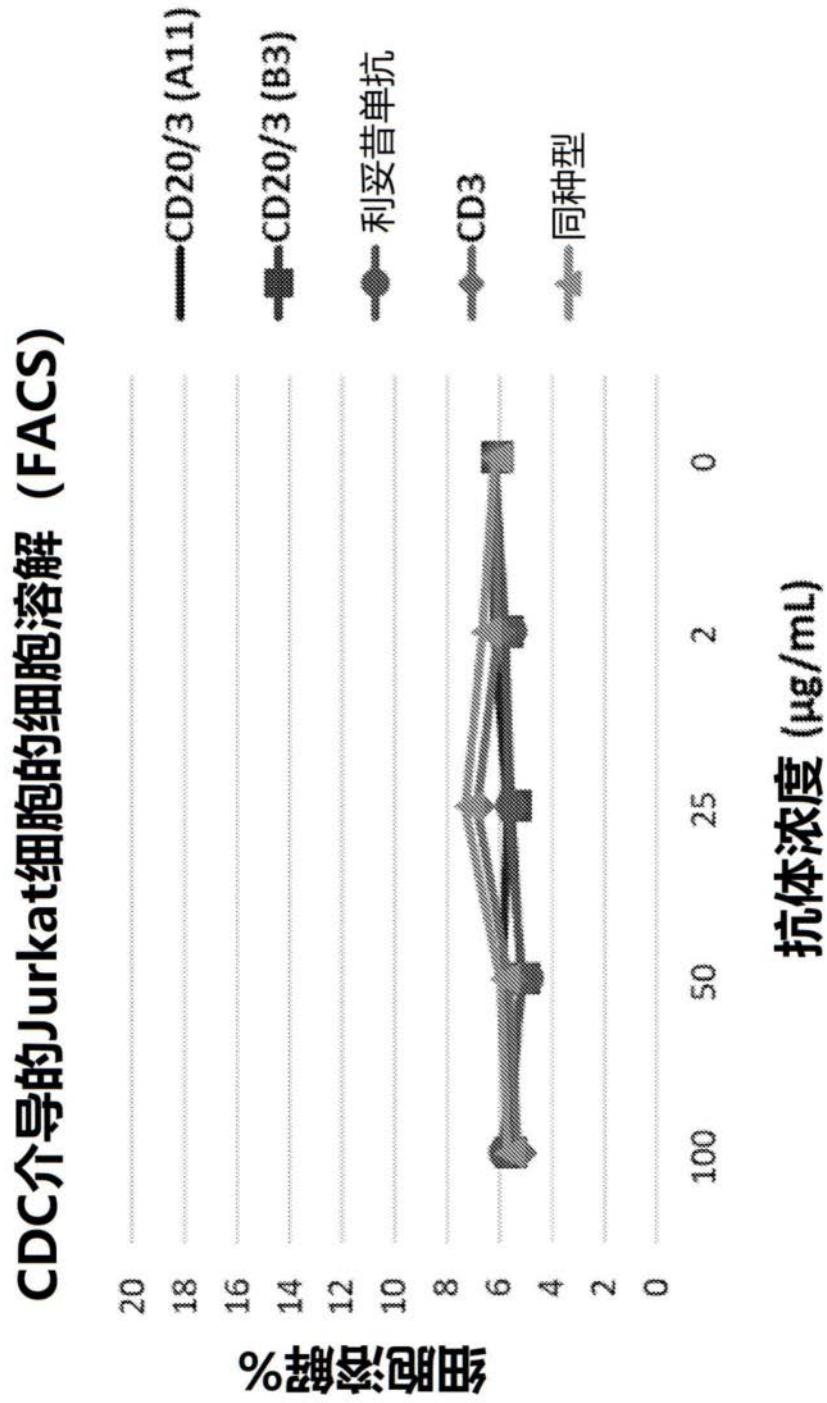


图15

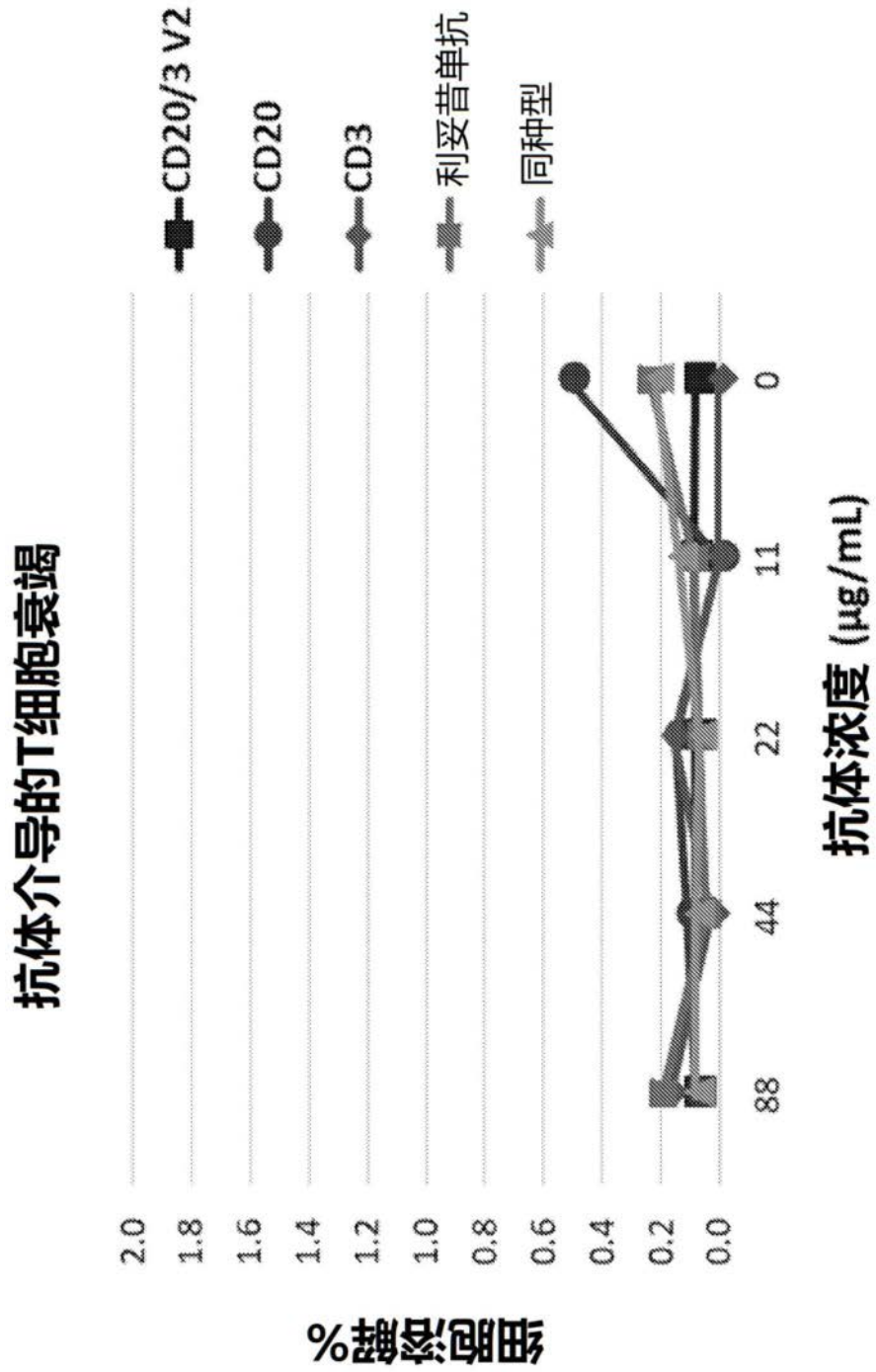


图16

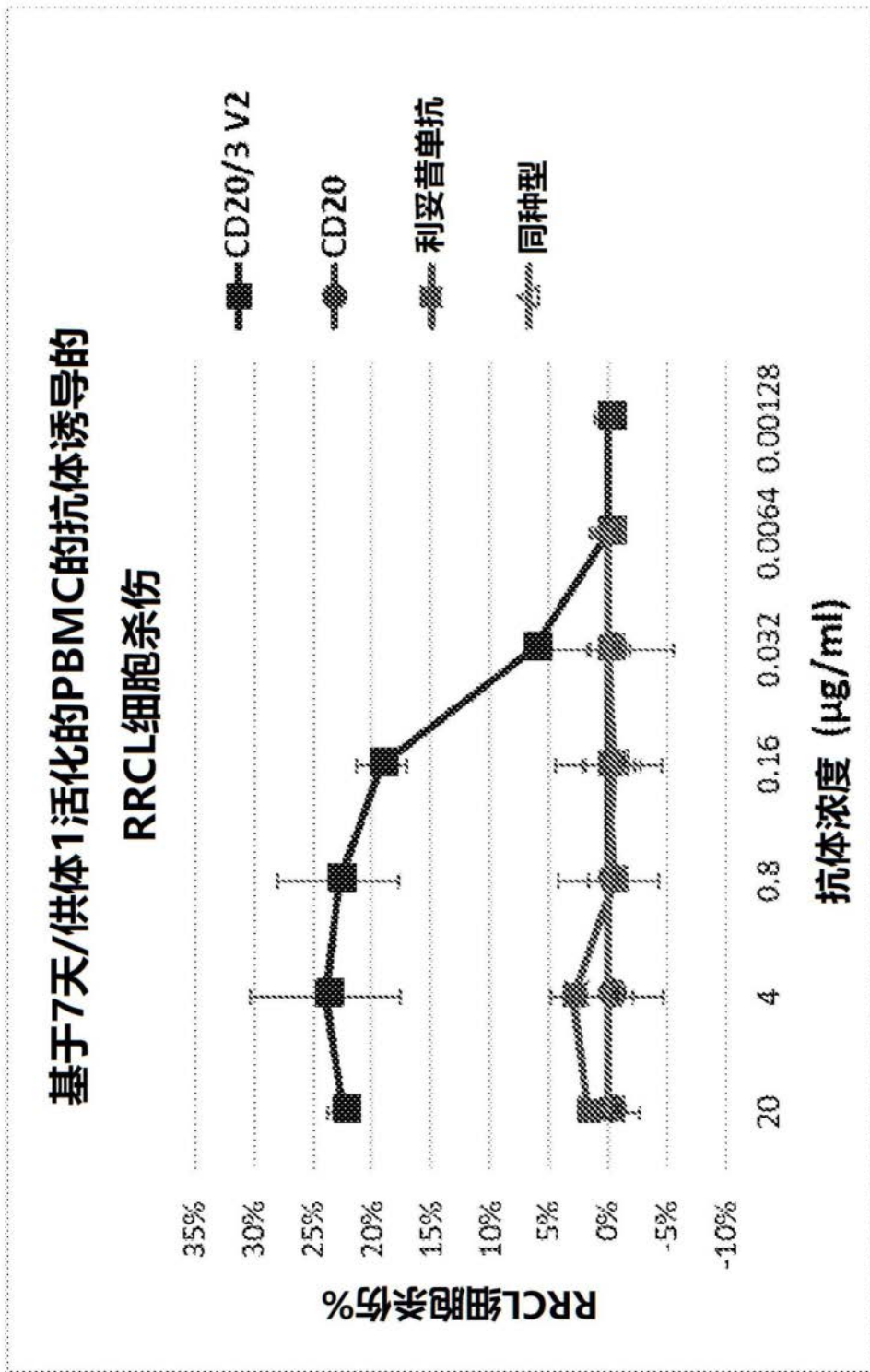


图17

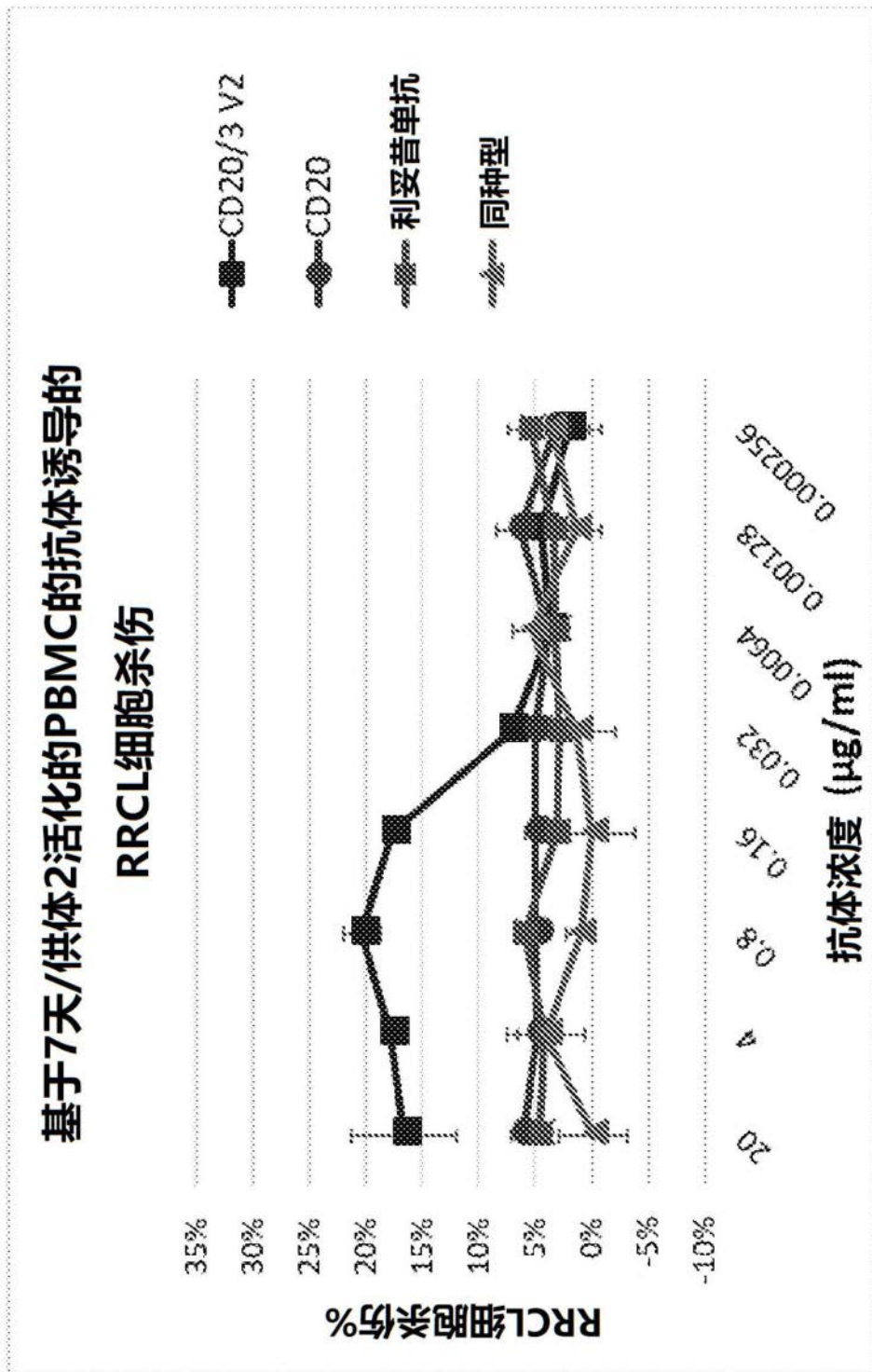


图18

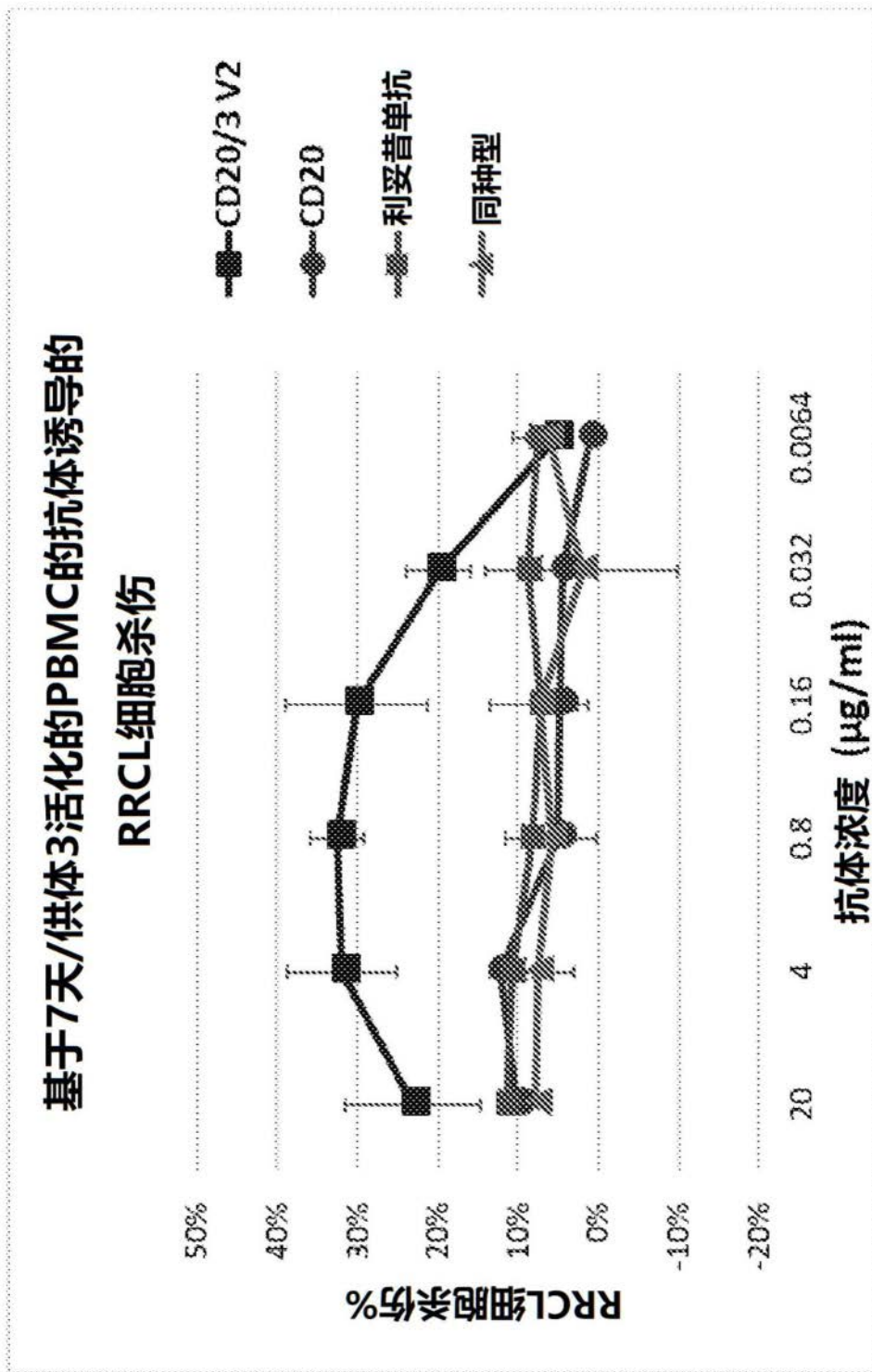


图19

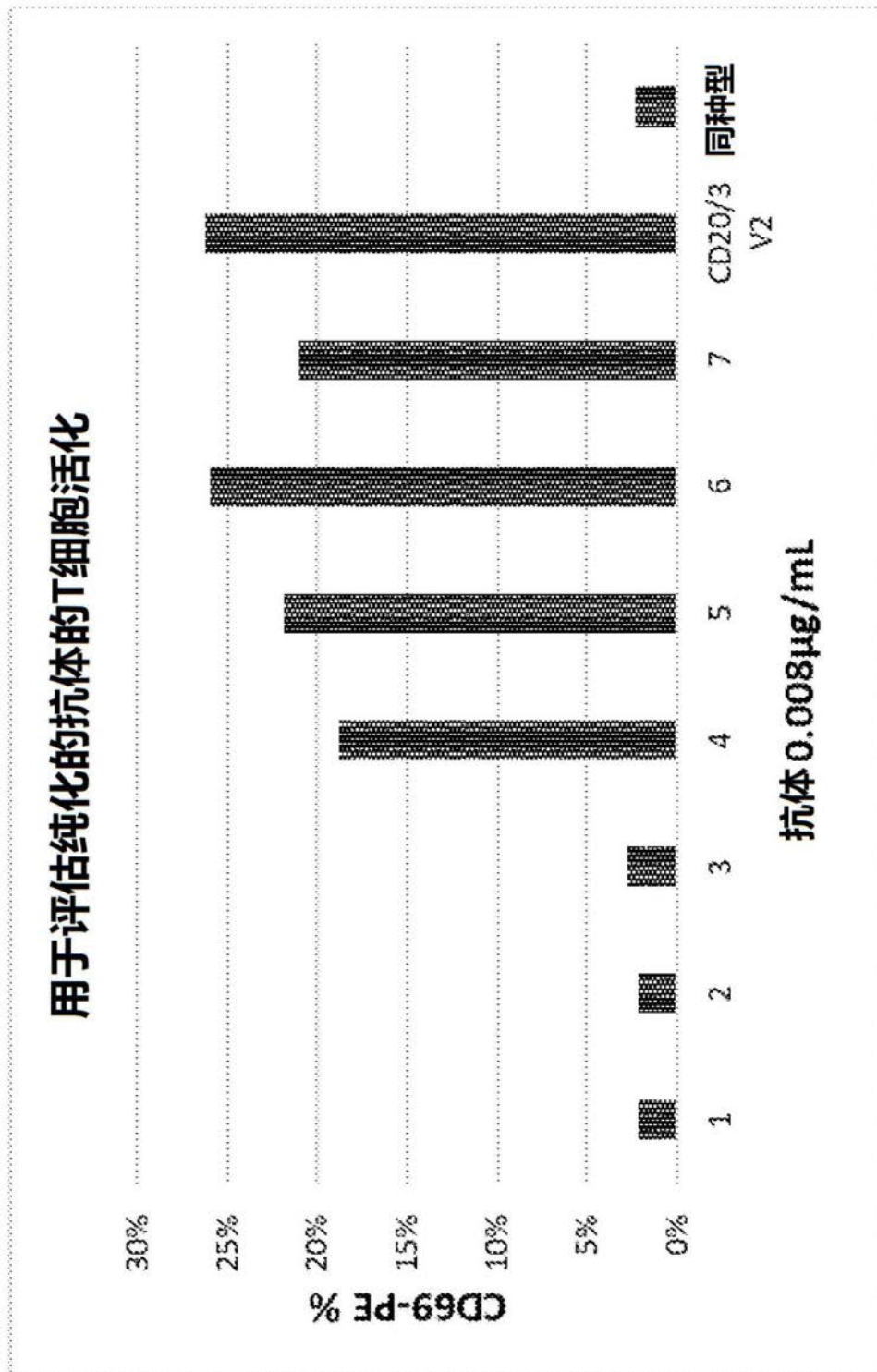


图20

动物体重改变

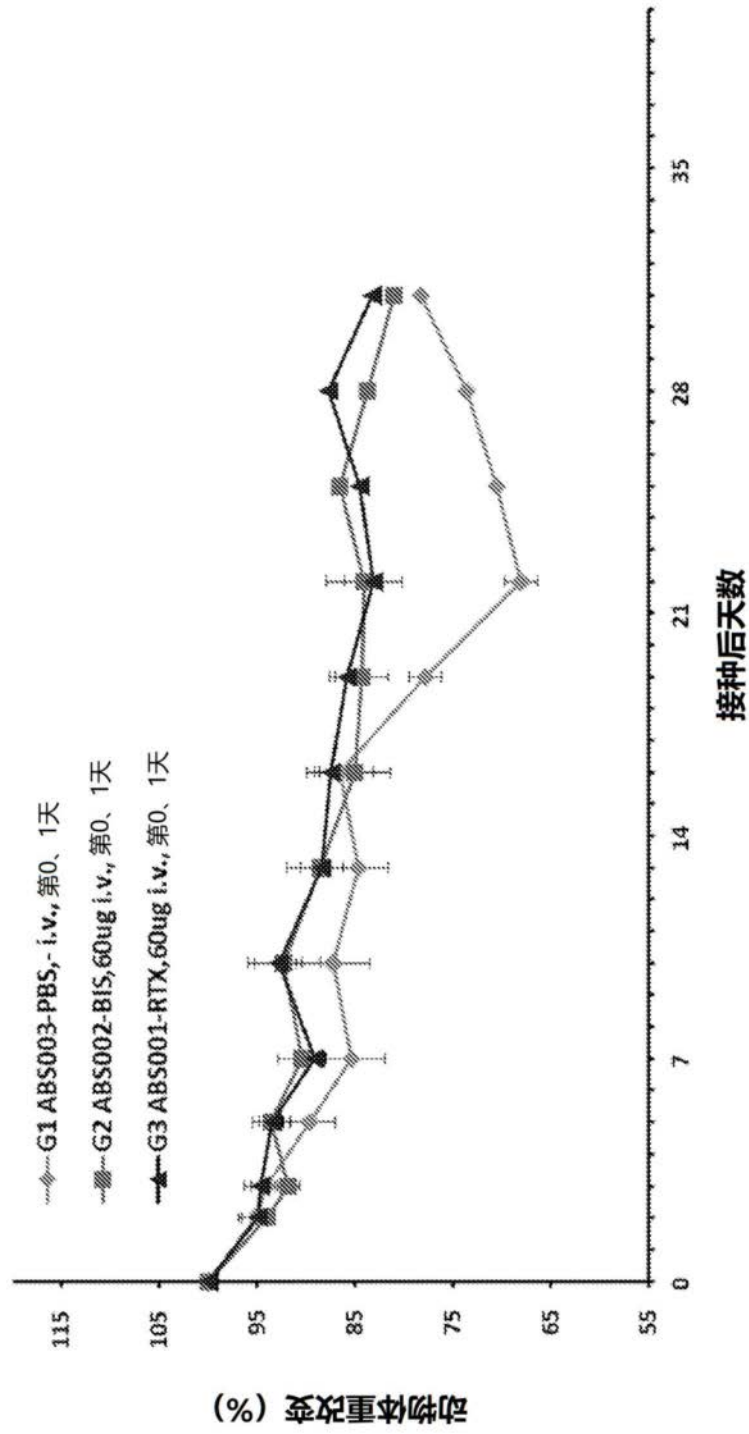


图21A

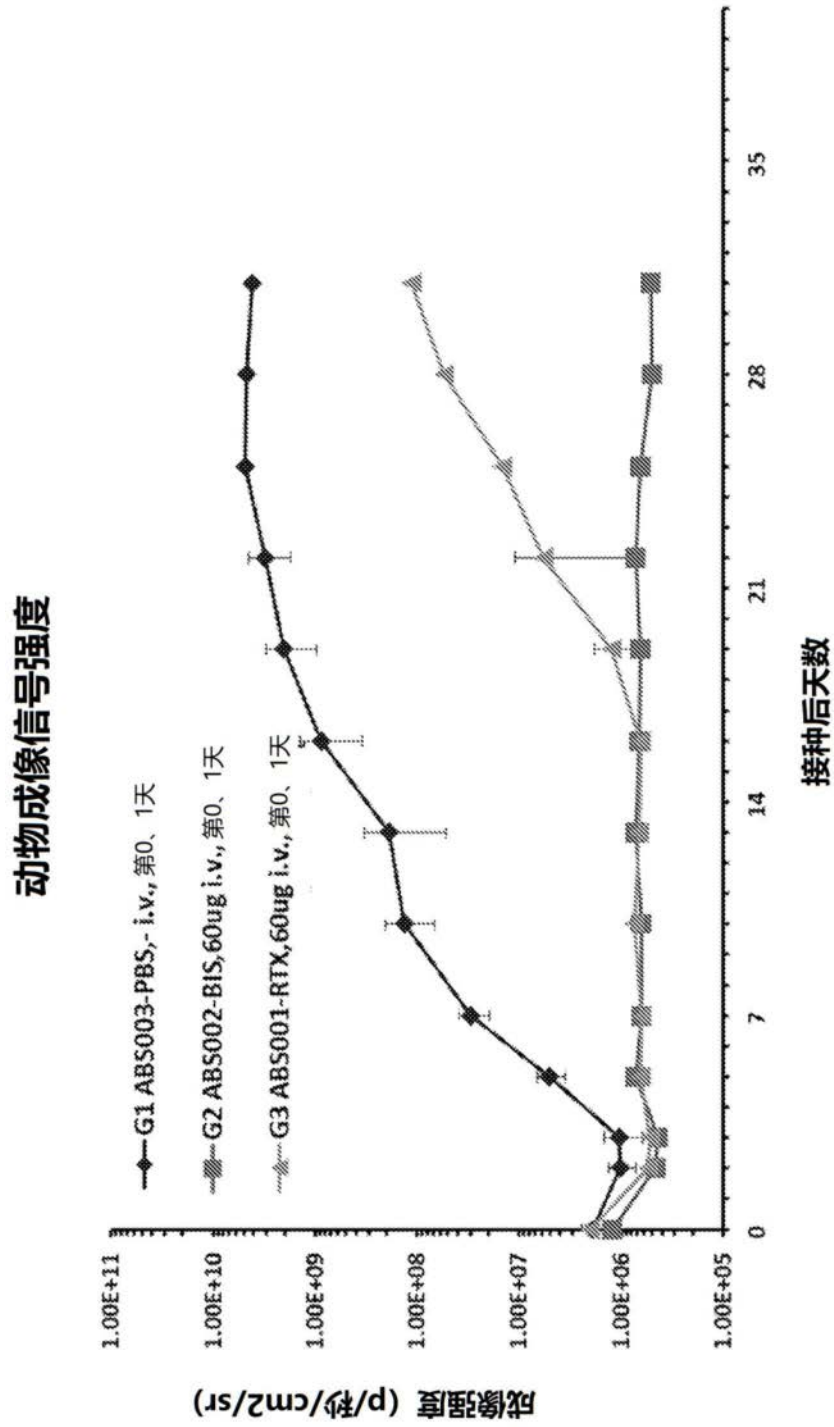


图21B

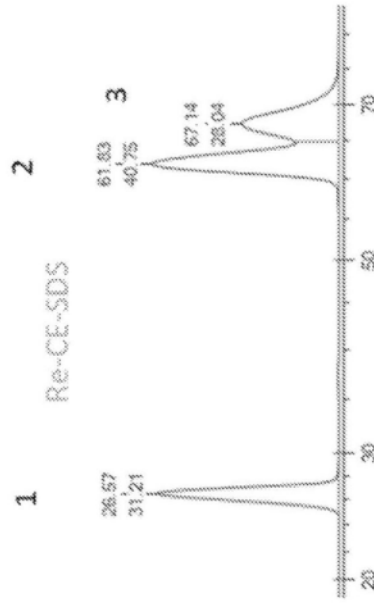


图22A

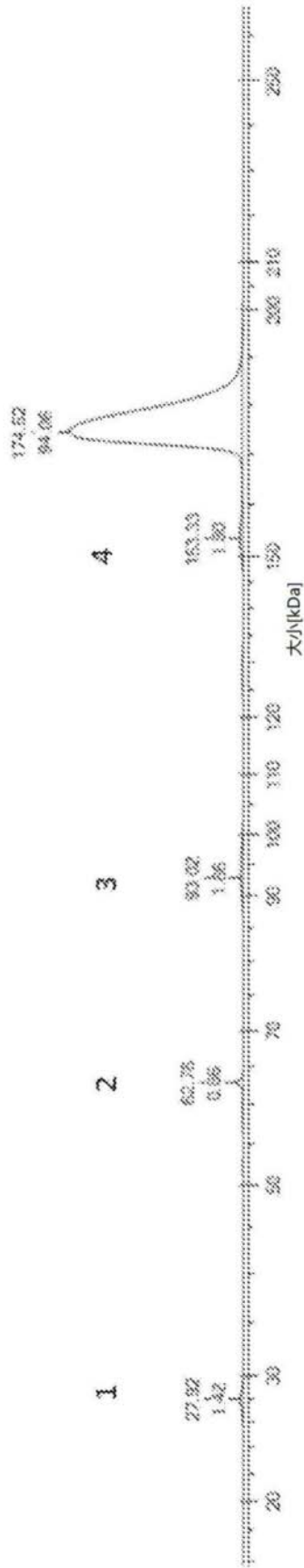


图22B

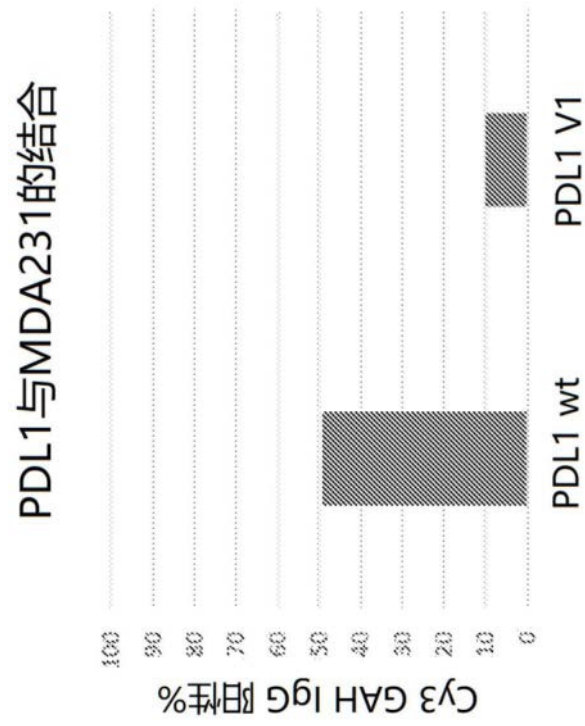


图23A

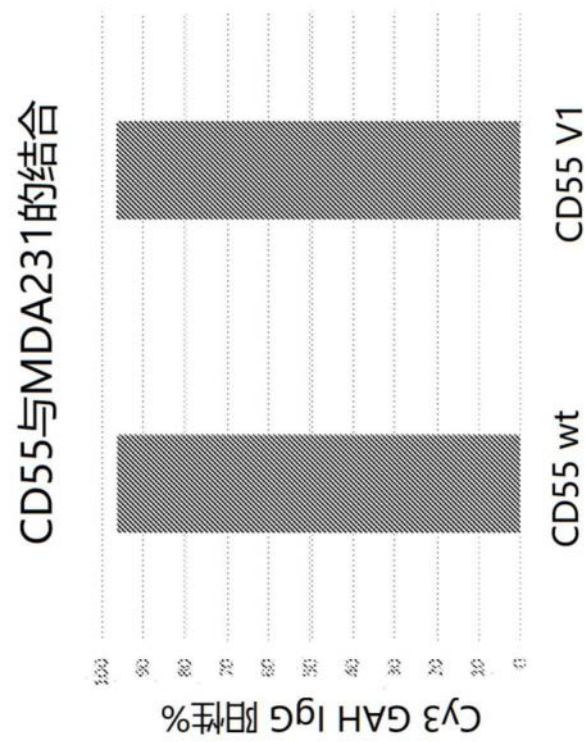


图23B

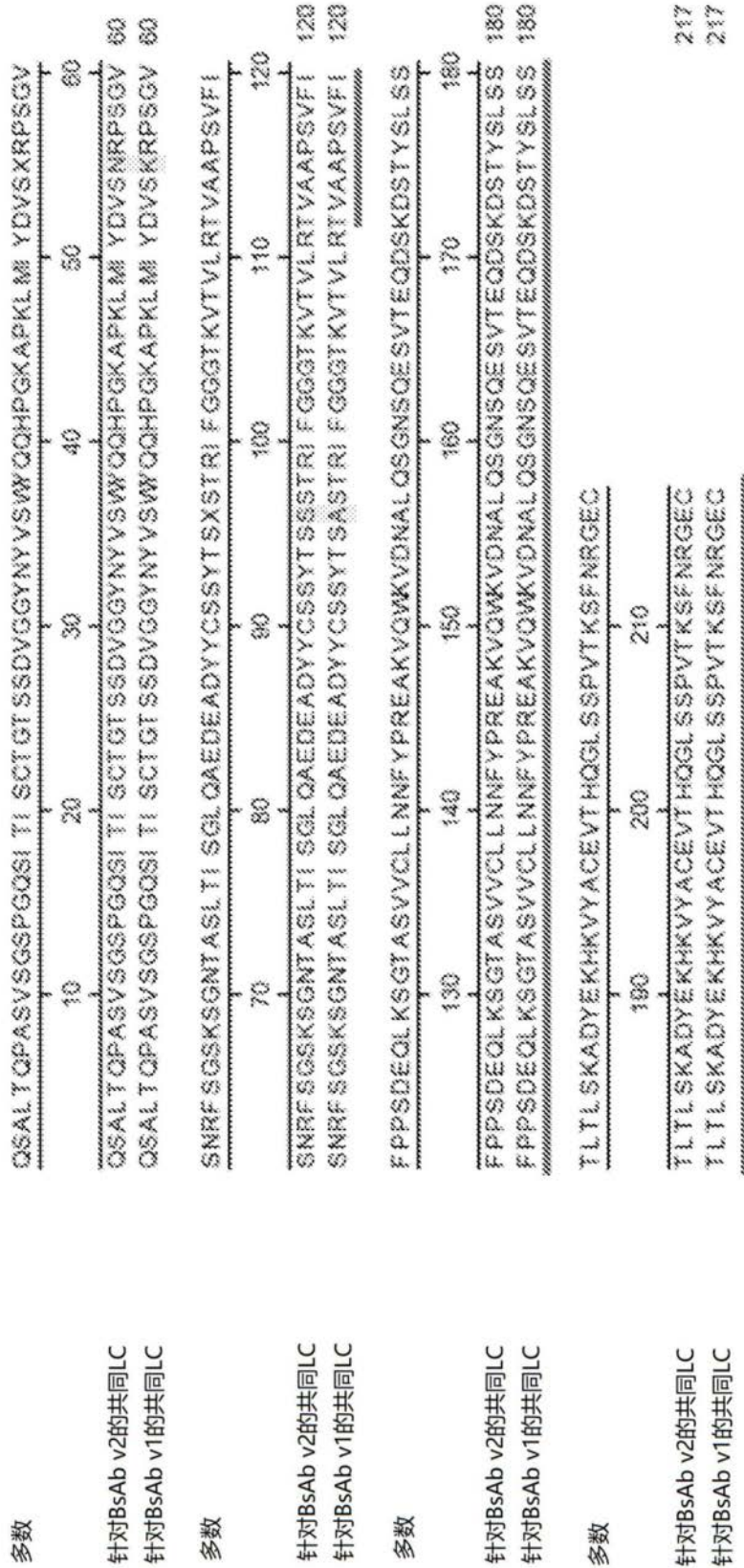


图24

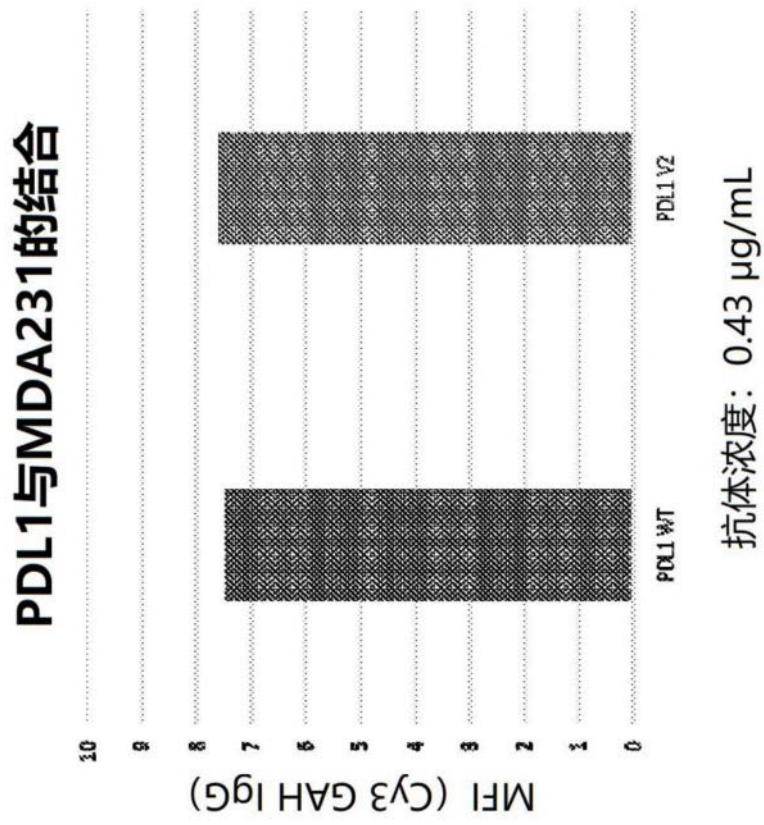


图25A

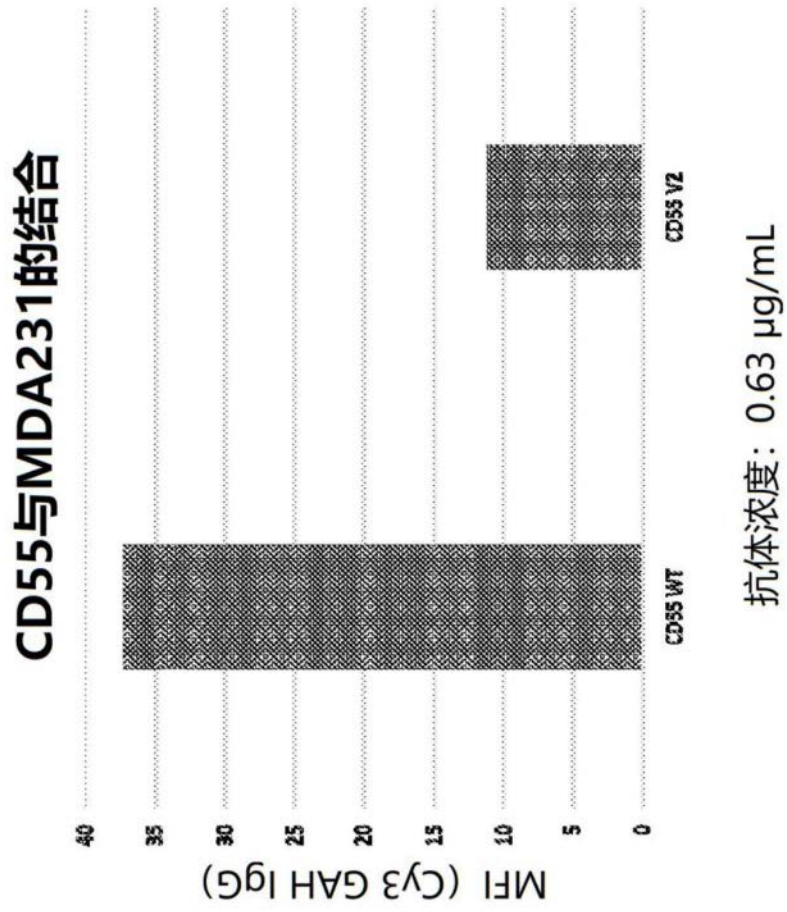


图25B

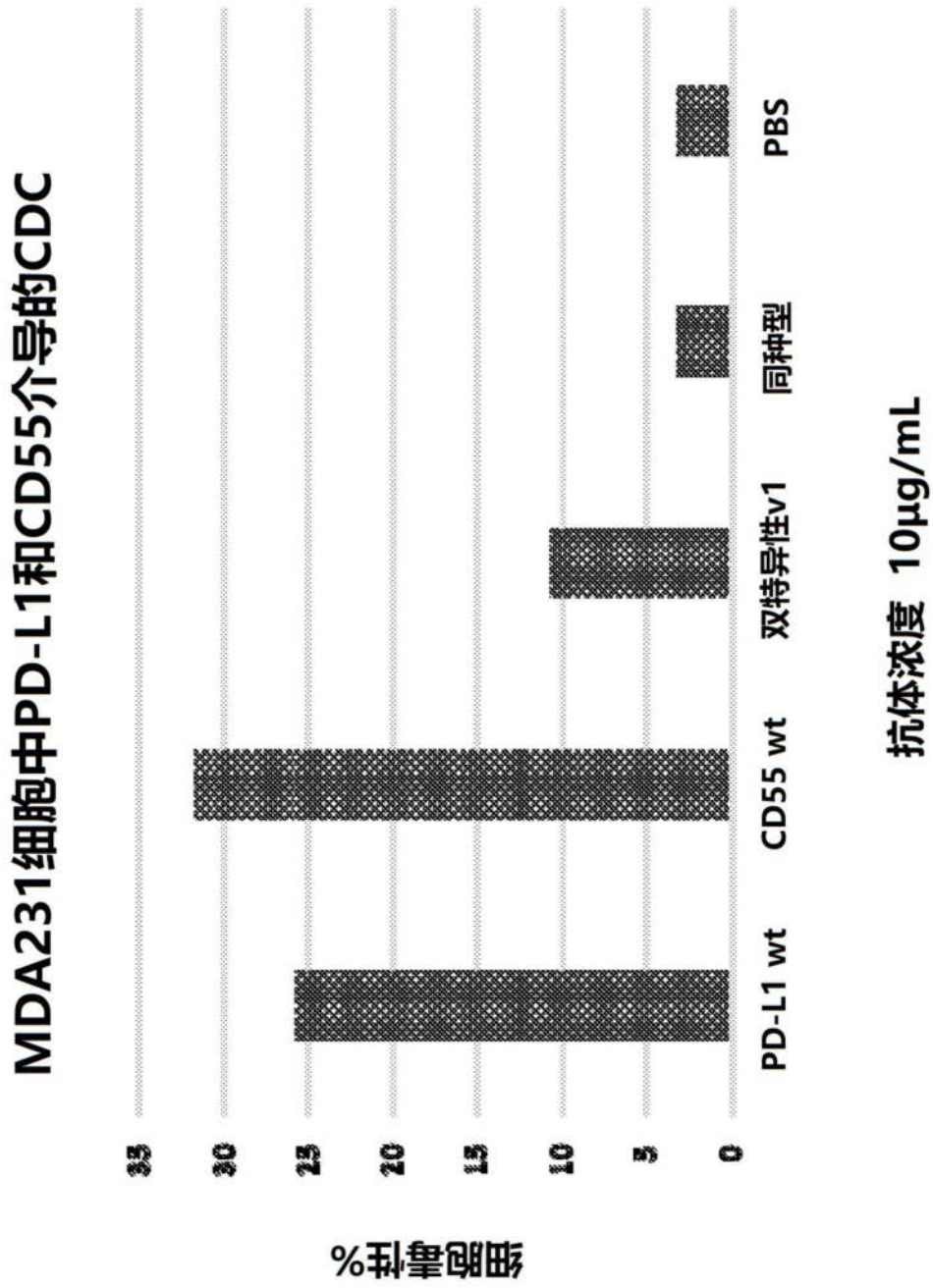


图26A

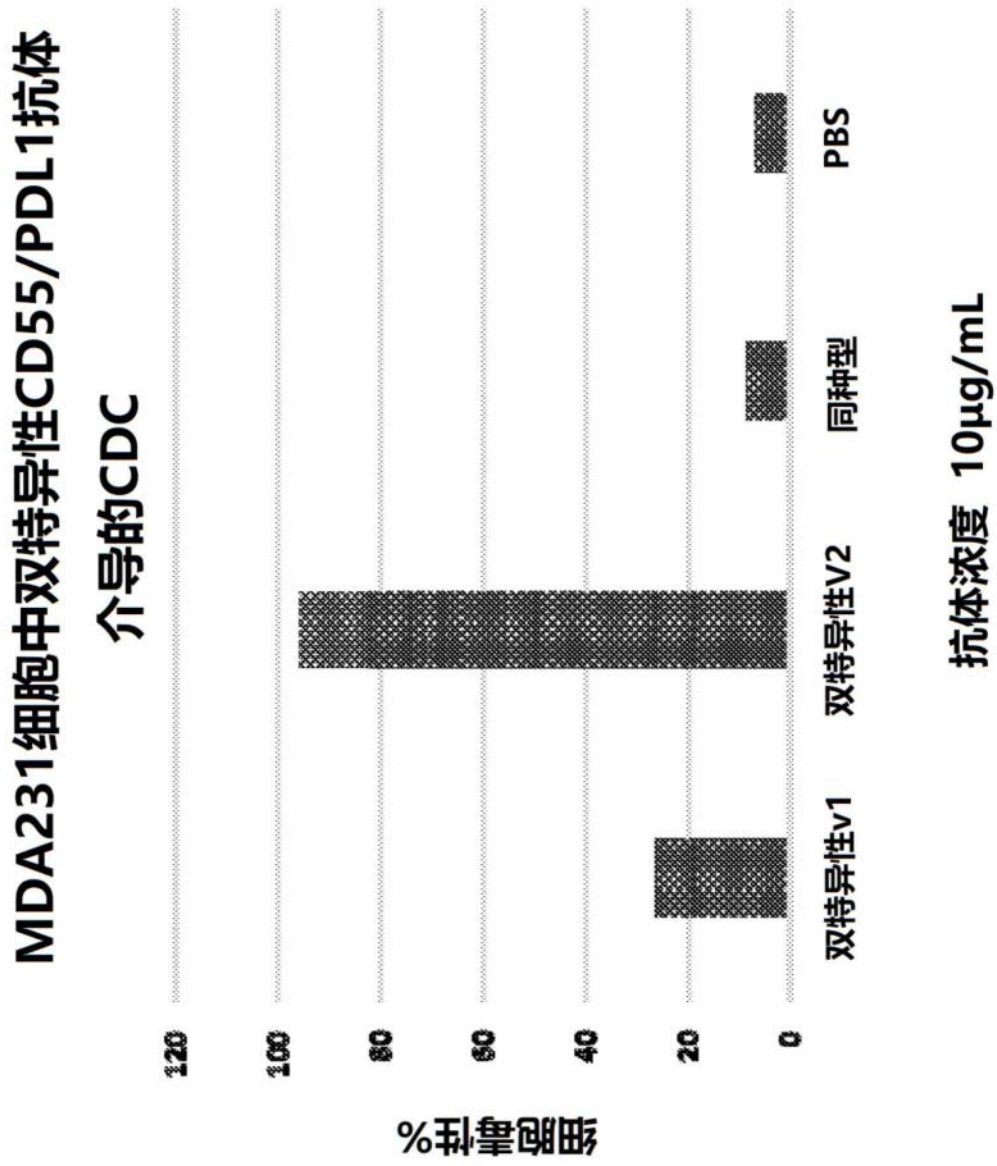


图26B

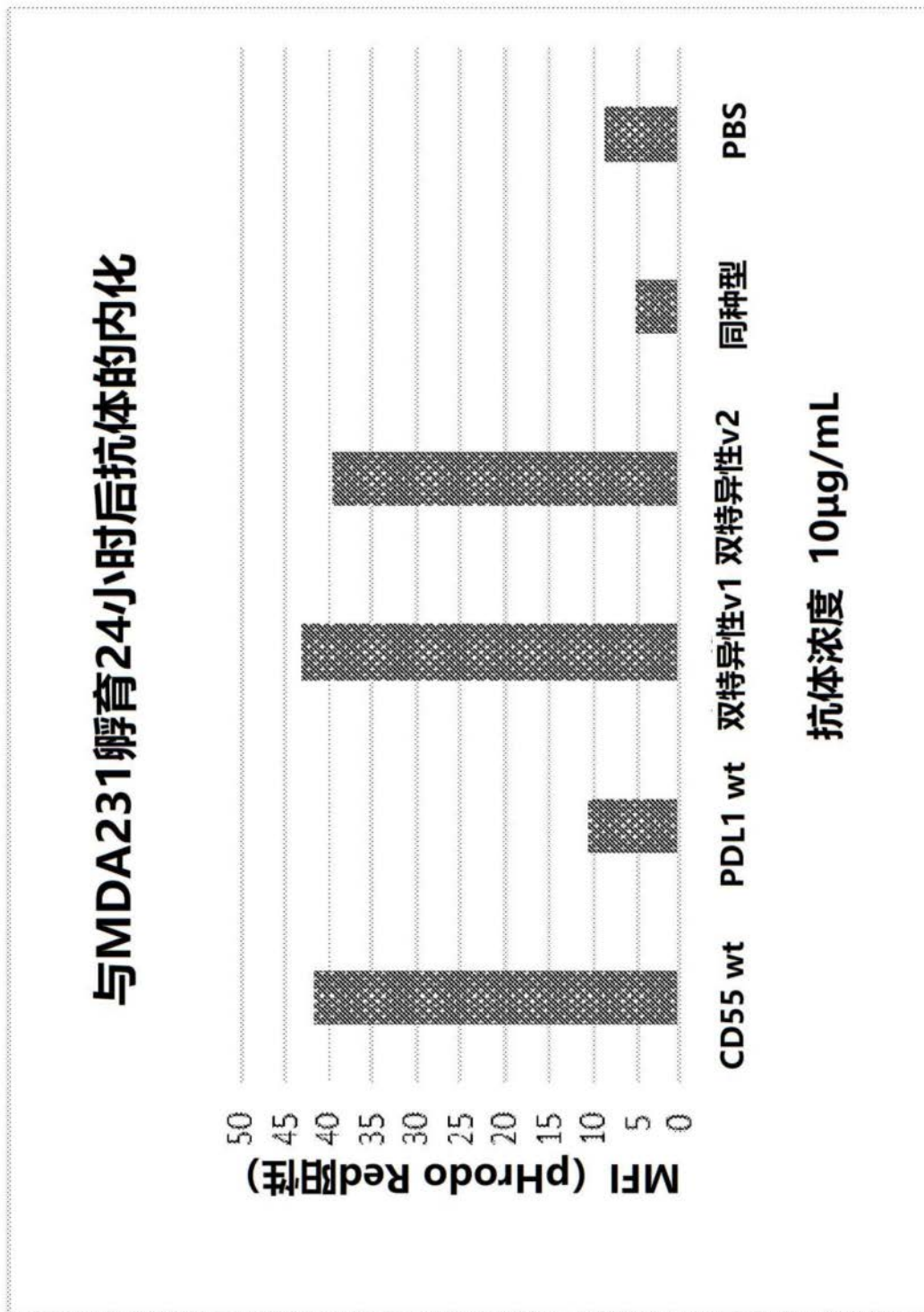


图27A

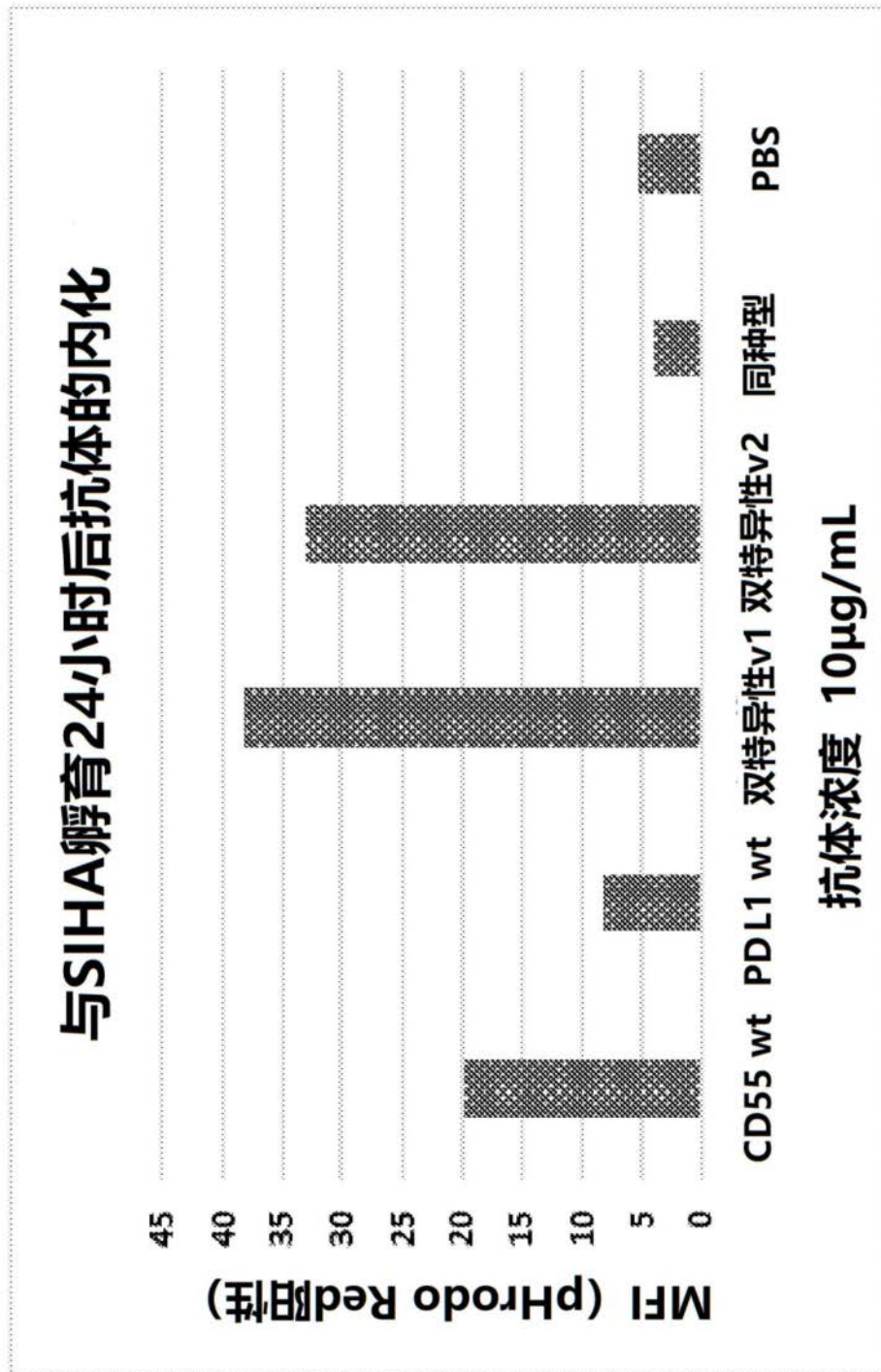


图27B

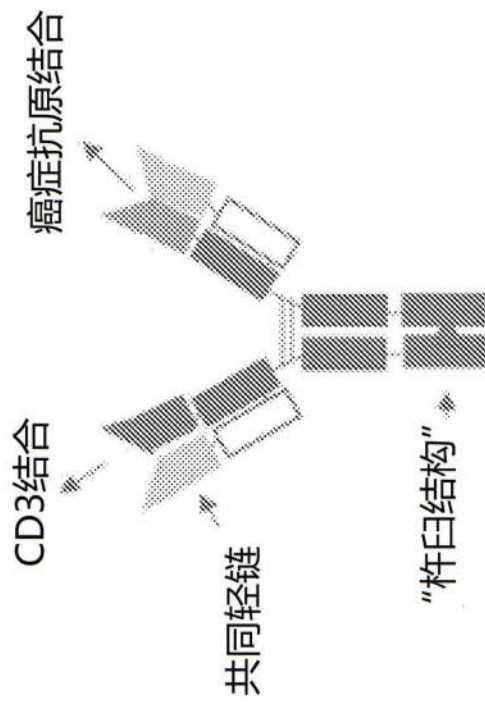
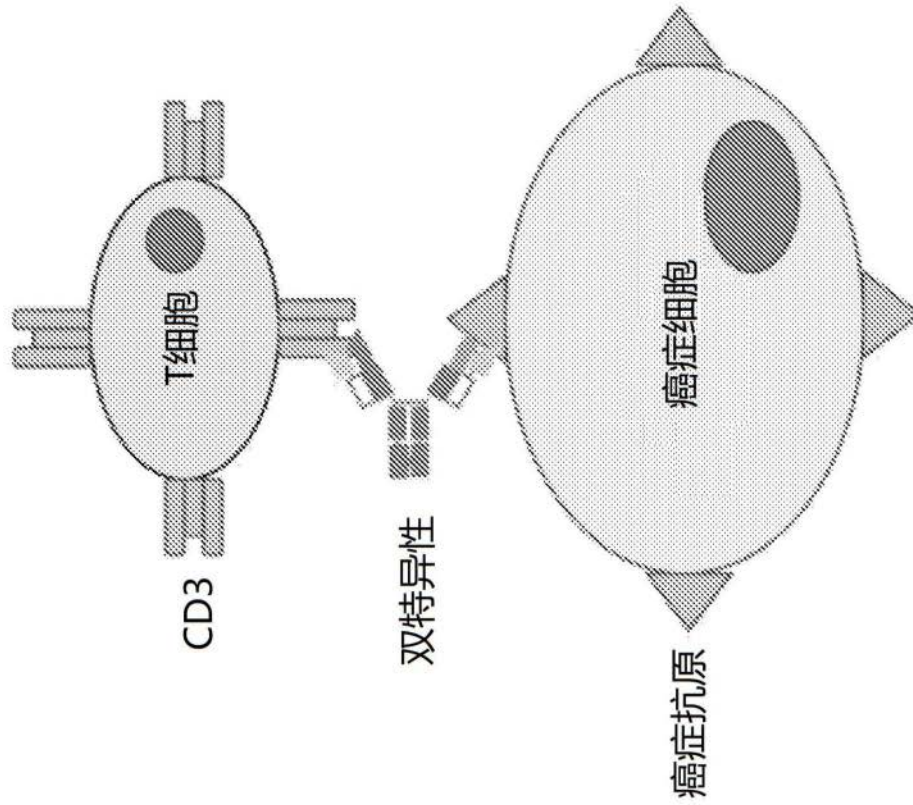


图28

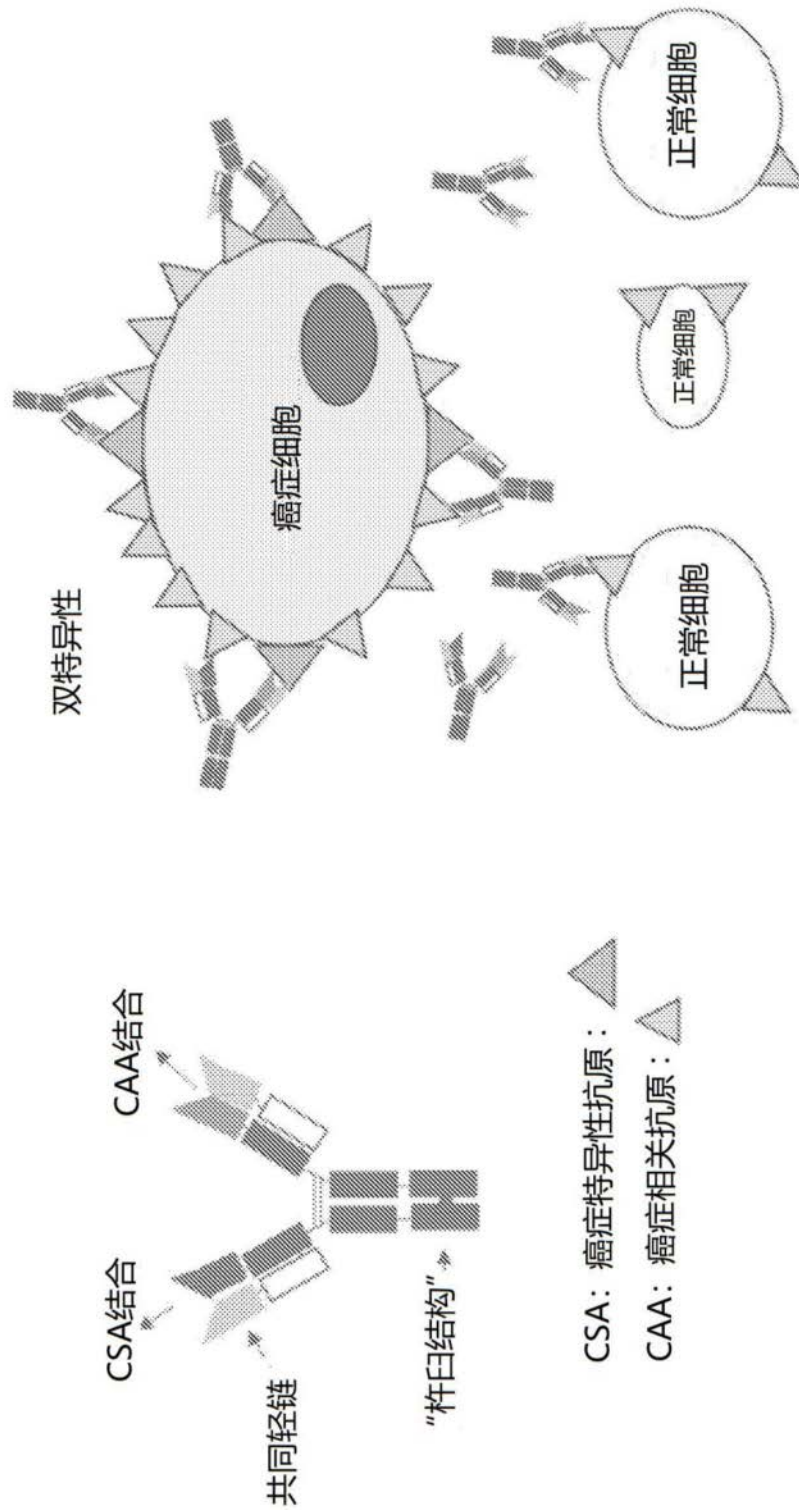


图29