

(21)申請案號：102128385

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 07 日

(51)Int. Cl.：

C07K19/00 (2006.01)

C07K16/40 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P1/00 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

(30)優先權：2012/08/08

歐洲專利局

12179709.6

(71)申請人：羅齊克雷雅公司 (瑞士) ROCHE GLYCART AG (CH)

瑞士

(72)發明人：朵恩娜 琳蒂亞 潔絲敏 DUERNER, LYDIA JASMIN (DE)；伊恩瑞奇 湯瑪士 EMRICH, THOMAS (DE)；費雪 傑斯 FISCHER, JENS (DE)；荷斯 羅夫 HOSSE, RALF (DE)；摩斯那 依哈德 MOESSNER, EKKEHARD (DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)；徐 黛珍 XU, DAIGEN (CA)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：50 項 圖式數：16 共 175 頁

(54)名稱

介白素-10 融合蛋白及其用途

INTERLEUKIN-10 FUSION PROTEINS AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明概言之係關於抗體與介白素-10(IL-10)之融合蛋白。另外，本發明係關於編碼此等融合蛋白之聚核苷酸以及包含此等聚核苷酸之載體及宿主細胞。本發明進一步係關於產生本發明融合蛋白之方法及使用其治療疾病之方法。

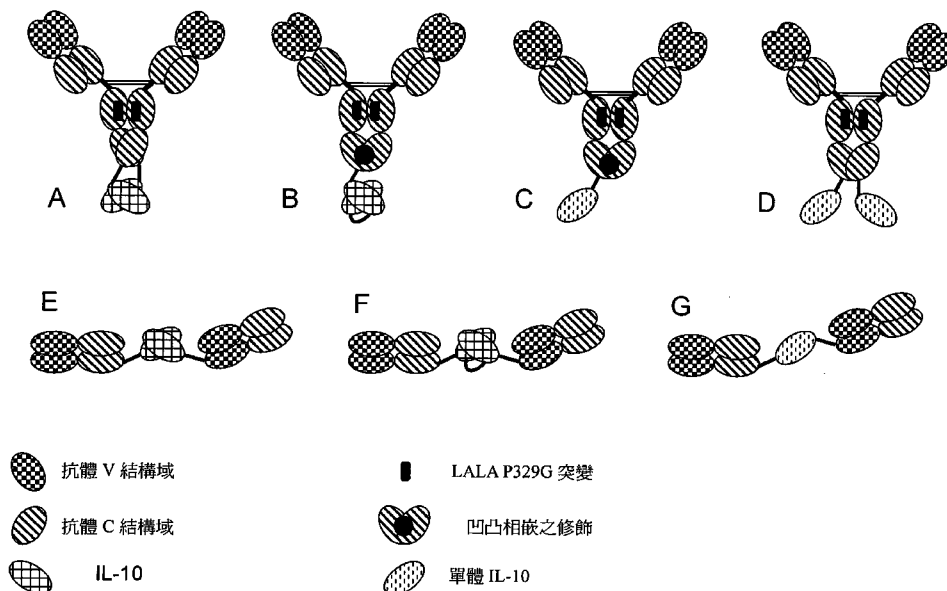


圖 1

(21)申請案號：102128385

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 07 日

(51)Int. Cl.：

C07K19/00 (2006.01)

C07K16/40 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P1/00 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

(30)優先權：2012/08/08

歐洲專利局

12179709.6

(71)申請人：羅齊克雷雅公司 (瑞士) ROCHE GLYCART AG (CH)

瑞士

(72)發明人：朵恩娜 琳蒂亞 潔絲敏 DUERNER, LYDIA JASMIN (DE)；伊恩瑞奇 湯瑪士 EMRICH, THOMAS (DE)；費雪 傑斯 FISCHER, JENS (DE)；荷斯 羅夫 HOSSE, RALF (DE)；摩斯那 依哈德 MOESSNER, EKKEHARD (DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)；徐 黛珍 XU, DAIGEN (CA)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：50 項 圖式數：16 共 175 頁

(54)名稱

介白素-10 融合蛋白及其用途

INTERLEUKIN-10 FUSION PROTEINS AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明概言之係關於抗體與介白素-10(IL-10)之融合蛋白。另外，本發明係關於編碼此等融合蛋白之聚核苷酸以及包含此等聚核苷酸之載體及宿主細胞。本發明進一步係關於產生本發明融合蛋白之方法及使用其治療疾病之方法。

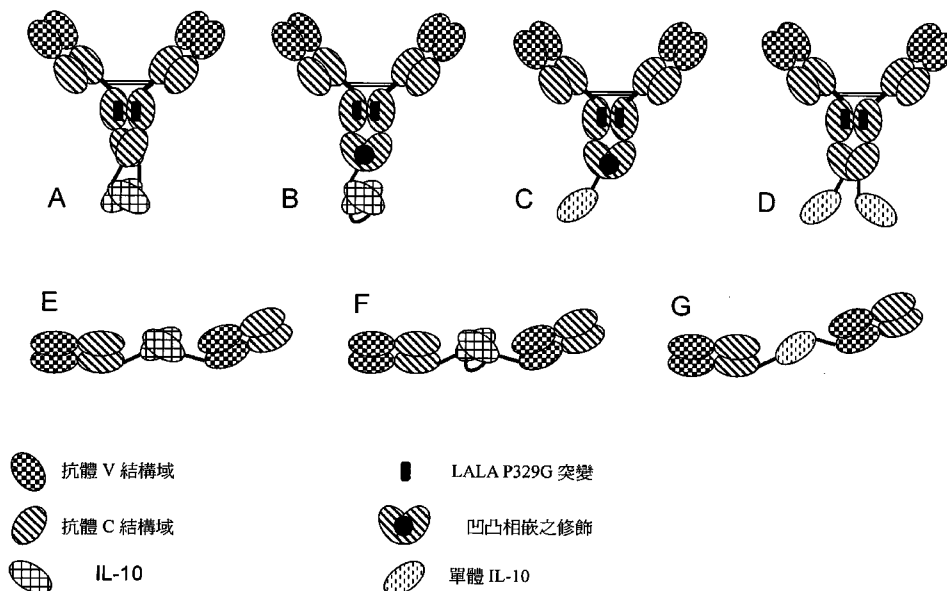


圖 1

發明摘要

※ 申請案號：102178385

※ 申請日：102.8.7

※IPC 分類：C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

【發明名稱】

介白素-10融合蛋白及其用途

INTERLEUKIN-10 FUSION PROTEINS AND USES THEREOF

【中文】

○ 本發明概言之係關於抗體與介白素-10 (IL-10)之融合蛋白。另外，本發明係關於編碼此等融合蛋白之聚核苷酸以及包含此等聚核苷酸之載體及宿主細胞。本發明進一步係關於產生本發明融合蛋白之方法及使用其治療疾病之方法。

【英文】

The present invention generally relates to fusion proteins of antibodies and interleukin-10 (IL-10). In addition, the present invention relates to polynucleotides encoding such fusion proteins, and vectors and host cells comprising such polynucleotides. The invention further relates to methods for producing the fusion proteins of the invention, and to methods of using them in the treatment of disease.

○

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

介白素-10融合蛋白及其用途

INTERLEUKIN-10 FUSION PROTEINS AND USES THEREOF

【技術領域】

本發明概言之係關於抗體與介白素-10 (IL-10)之融合蛋白。另外，本發明係關於編碼此等融合蛋白之聚核苷酸以及包含此等聚核苷酸之載體及宿主細胞。本發明進一步係關於產生本發明融合蛋白之方法及使用其治療疾病之方法。

【先前技術】

IL-10之生物學功能

IL-10係表現為約37 kDa之非共價連接之同源二聚體的 α 螺旋細胞介素。其在耐受性之誘導及維持中發揮關鍵作用。其顯著抗炎性質已為人所知很長時間。IL-10抑制促炎性細胞介素(如TNF α 、IL-1、IL-6、IL-12以及諸如IL-2及INF γ 等Th1細胞介素)之分泌並控制巨噬細胞、B細胞及T細胞之分化及增殖(Glocker, E.O.等人，Ann. N.Y. Acad. Sci. 1246, 102-107 (2011)；Moore, K.W.等人，Annu. Rev. Immunol. 19, 683-765 (2001)；de Waal Malefyt, R.等人，J. Exp. Med. 174, 915-924 (1991)；Williams, L.M.等人，Immunology 113, 281-292 (2004)。此外，其係抗原呈遞之有效抑制劑，抑制MHC II表現以及協同刺激分子CD80及CD86之上調(Mosser, D.M.及Yhang, X., Immunological Reviews 226, 205-218 (2008))。

然而，亦已報導免疫刺激性質。IL-10可協同刺激B細胞活化，延長B細胞存活並促成B細胞中之類別轉換。此外，其可協同刺激天然

殺手(NK)細胞增殖及細胞介素產生並用作生長因子來刺激某些CD8⁺T細胞亞組之增殖(Mosser, D.M.及Yhang, X., *Immunological Reviews* 226, 205-218 (2008); Cai, G.等人, *Eur. J. Immunol.* 29, 2658-2665 (1999); Santin, A.D. 等人, *J. Virol.* 74, 4729-4737 (2000); Rowbottom, A.W.等人, *Immunology* 98, 80-89 (1999); Groux, H.等人, *J. Immunol.* 160, 3188-3193 (1998))。重要的是, 人類中之高劑量IL-10 (分別為20 µg/kg及25 µg/kg)可使INF γ 之產生增加(Lauw, F.N.等人, *J. Immunol.* 165, 2783-2789 (2000); Tilg, H.等人, *Gut* 50, 191-195 (2002))。

IL-10藉助由IL-10受體1 (IL-10R1)及IL-10R2中每一者之兩個拷貝組成的兩受體複合物發出信號。IL-10R1以相對高之親和力(約35-200 pM)結合IL-10 (Moore, K.W.等人, *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683-765 (2001)), 且將IL-10R2募集至受體複合物對配體結合之作用很小。然而, 此第二受體咬合至複合物使得能夠在配體結合後進行信號轉導。因此, 功能受體係由IL-10R1與IL-10R2之異源二聚體之二聚體組成。多數造血細胞組成性地表現低量IL-10R1, 且受體表現通常可受到各種刺激物顯著上調。非造血細胞(例如纖維母細胞及上皮細胞)亦可藉由上調IL-10R1而對刺激物有反應。相反, IL-10R2在多數細胞上表現。IL-10結合至受體複合物活化分別與IL-10R1及IL-10R2相關之Janus酪胺酸激酶JAK1及Tyk2, 以磷酸化受體之胞質尾。此導致STAT3募集至IL-10R1。STAT3之同源二聚化導致其自受體釋放及磷酸化STAT同源二聚體易位至細胞核中, 其中其結合至各種基因之啟動子中之STAT3-結合元件。該等基因中之一者係IL-10本身, 其受到STAT3正調節。STAT3亦活化控制STAT活化之品質及量之細胞介素信號傳導3 (SOCS3)抑制劑。SOCS3係由IL-10誘導並施加對各種細胞介素基因之負調節效應(Mosser, D.M.及Yhang, X., *Immunological*

Reviews 226, 205.218 (2008))。

遺傳連鎖分析及候選基因定序揭示IL-10R1及IL-10R2之突變與早發性小腸結腸炎(發炎性腸病(IBM)之一種形式)之間之直接關係(Glocker, E.O.等人, N. Engl. J. Med. 361(21), 2033-2045 (2009))。最近數據表明, 早發性IBM甚至可能具有單基因性。IL-10細胞介素或其受體之突變導致IL-10功能損失並造成嬰兒及幼童之嚴重小腸結腸炎(Glocker, E.O.等人, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1246, 102-107 (2011))。此外, 患有嚴重形式之克隆氏病(Crohn's disease)之患者之全血細胞培養物及單核球源樹突細胞中的IL-10產生不足(Correa, I.等人, J. Leukoc. Biol. 85(5), 896-903 (2009))。IBM影響美國約1百40萬人及歐洲2百20萬人(Carter, M.J.等人, Gut 53 (Suppl. 5), V1-V16 (2004); Engel, M.A.及Neurath, M.F., J. Gastroenterol. 45, 571 - 583 (2010))。

使用IL-10之治療方法

已在I期及II期臨床試驗中評價重組IL-10在發炎性病徵及自體免疫性疾病中之治療益處, 該等臨床試驗研究在各種環境中經靜脈內或經皮下投與之單劑量或多劑量對健康志願者以及特定患者群體的安全性、耐受性、藥物代謝動力學、藥物效應動力學、免疫學及造血效應(Moore, K.W.等人, Annu. Rev. Immunol. 19, 683-765 (2001); Chernoff, A.E.等人, J. Immunol. 154, 5492-5499 (1995); Huhn, R.D.等人, Blood 87, 699-705 (1996); Huhn, R.D.等人, Clin. Pharmacol. Ther. 62, 171-180 (1997))。在至多25 µg/kg之劑量下, IL-10之耐受性良好, 無嚴重副作用, 且在至多100 µg/kg之劑量下, 僅在一部分接受者中觀察到輕度至中度流感樣症狀(Moore, K.W.等人, Annu. Rev. Immunol. 19, 683-765 (2001); Chernoff, A.E.等人, J. Immunol. 154, 5492-5499 (1995))。朝向臨床改良之傾向性最通常地見於牛皮癬(臨床研究彙編可參見Mosser, D.M.及Yhang, X., Immunological Reviews

226, 205-218 (2008))、克隆氏病 (Van Deventer S.J. 等人, *Gastroenterology* 113, 383-389 (1997) ; Fedorak, R.N. 等人, *Gastroenterology* 119, 1473-1482 (2000) ; Schreiber, S. 等人, *Gastroenterology* 119, 1461-1472 (2000) ; Colombel J.F.等人, *Gut* 49, 42-46 (2001))及類風濕性關節炎(Keystone, E.等人, *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 24, 629 - 639 (1998) ; Mosser, D.M. 及 Yhang, X., *Immunological Reviews* 226, 205-218 (2008))。

總之，臨床結果不令人滿意且對除胺基端之甲硫胺酸殘基外與內源性人類 IL-10 相同之重組人類 IL-10 的臨床研發 (ilodecakin, TENOVIL, Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ) 因缺乏功效而中斷。最近對重組人類 IL-10 誘導克隆氏病之緩解之功效及耐受性的系統性綜述發現對於完全或臨床緩解而言在 IL-10 與安慰劑之間沒有統計學顯著差異，且闡明，相對於安慰劑，用 IL-10 治療之患者明顯更有可能因不良事件而退出研究 (Buruiana, F.E. 等人, *Cochrane Database Syst. Rev.* 11, CD005109 (2010))。對於克隆氏病之而言，已對該等不令人滿意之結果之若干原因進行論述 (Herfarth, H. 及 Schölmerich, J., *Gut* 50, 146-147 (2002))：1) 腸道中之局部細胞介素濃度過低而不能介導持續性抗炎效應，2) 系統性地投與之 IL-10 之劑量級聯因副效應而受限，及 3) IL-10 對 B 細胞及對 CD4⁺、CD8⁺ 及/或天然殺手細胞產生 INF γ 之免疫刺激性質抵消其免疫抑制性質 (Asadullah, K. 等人, *Pharmacol. Rev.* 55, 241-269 (2003) ; Tilg, H. 等人, *Gut* 50, 191-195 (2002) ; Lauw, F.N. 等人, *J. Immunol.* 165, 2783-2789 (2000))。

IL-10 因其導致快速腎臟清除之約 37 kDa 之較小大小而展現極短血漿半衰期。實際上，其在系統性隔室中之半衰期係 2.5 h，此限制黏膜生物利用度 (Baat, H. 等人, *Expert Opin. Biol. Ther.* 3(5), 725-731

(2003)。爲了改良循環時間、暴露、功效及減少腎攝取，若干出版物報導了此細胞介素之聚乙二醇化(Mattos, A.等人, J. Control Release 162, 84-91 (2012); Mumm, J.B.等人, Cancer Cell 20(6), 781-796 (2011); Alvarez, H.M.等人, Drug Metab. Dispos. 40(2), 360-373 (2012))。然而，聚乙二醇化非靶向IL-10之較長系統性半衰期可加劇此分子之已知不良事件。

已清楚，使用重組人類IL-10進行系統性治療並不充分有效且必須集中於細胞介素之局部遞送。有若干方式來達成此目標：1)免疫細胞之IL-10基因療法，2)遺傳修飾之非致病性IL-10表現細菌及3)抗體-IL-10融合蛋白，以將細胞介素靶向發炎組織並使細胞介素在發炎組織中累積。

免疫細胞之IL-10基因療法已在實驗性結腸炎中顯示有效性，但臨床試驗由於對此方法用於非致命性疾病之安全性之擔憂而受到阻礙(Braat, H.等人, Expert Opin. Biol. Ther. 3(5), 725-731 (2003))。表現IL-10之轉基因細菌(乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*))代表替代遞送途徑，且已公佈之克隆氏病之I期試驗結果聲稱因局部遞送至黏膜隔室而可避免全身性副效應，且係生物包含的(Braat, H.等人, Gastroenterol. Hepatol. 4, 754-759 (2006); Steidler, L.等人, Science 289, 1352-1355 (2000))。用以在患有中度活動性潰瘍性結腸性之患者中評估分泌人類IL-10之經遺傳修飾乳酸乳球菌(AG011, ActoGeniX)之安全性、耐受性、藥物效應動力學及功效的IIa期隨機化安慰劑對照之雙盲多中心劑量級聯研究耐受性良好且安全。然而，與安慰劑相比，接受AG011之患者並沒有顯著改良黏膜發炎，如藉由經修改Baron評分或臨床症狀所量測(Vermeire, S.等人, abstract 46 presented at the Digestive Disease Week Annual Meeting in New Orleans, 2010年5月2日)。

抗體-細胞介素融合蛋白(亦稱為免疫細胞介素)在藥物遞送及藥物本身形式方面提供若干優點。細胞介素(例如IL-10)之局部遞送係藉由融合至對適宜疾病標記物具有特異性之抗體或其片段來達成。因此，可降低系統性副效應且可達成化合物於發炎部位之局部累積及保留。此外，端視所用融合形式及抗體或抗體片段而定，可改良如血漿半衰期、穩定性及可研發性等性質。儘管已係腫瘤學中之公認方法，但其只是最近才適於治療發炎性病徵及自體免疫性。若干細胞介素(特定而言為IL-10)及光敏劑藉由融合至對纖維連蛋白之額外結構域B具有特異性之scFv抗體片段來靶向牛皮癬病灶(Trachsel, E.等人, J. Invest. Dermatol. 127(4), 881-886 (2007))。此外，在臨床前使用對纖維連蛋白(F8, DEKAVIL, Philogen SpA)-IL-10融合蛋白之額外結構域A具有特異性之抗體片段來抑制所建立之膠原誘導性關節炎之惡化(Trachsel, E.等人, Arthritis Res. Ther. 9(1), R 9 (2007); Schwager, K.等人, Arthritis Res. Ther. 11(5), R142 (2009))且其進入臨床試驗。最近，在同基因小鼠模型中使用相同F8-IL-10融合蛋白來靶向子宮內膜異位病灶且其與鹽水對照組相比減小平均病灶大小(Schwager, K.等人, Hum. Reprod. 26(9), 2344-2352 (2011))。

本發明之IgG-IL-10融合蛋白相對於已知基於抗體片段(例如scFv、二鏈抗體、Fab)之IL-10融合蛋白具有若干優點(包括改良之可產生性、穩定性、血清半衰期)且令人吃驚地在結合至靶抗原後顯著增加生物學活性。

【發明內容】

在一個態樣中，本發明提供IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白，其中融合蛋白包含兩條相同的重鏈多肽及兩條相同的輕鏈多肽。在一個實施例中，該等重鏈多肽中之每一者包含IgG類別抗體重鏈及IL-10單體。在更具體實施例中，該IL-10單體於其N端視情況經由肽

連接體融合至該IgG類別抗體重鏈之C端。在一個實施例中，該等重鏈多肽各自基本上係由IgG類別抗體重鏈、IL-10單體及視情況肽連接體組成。在一個實施例中，該等輕鏈多肽中之每一者包含IgG類別抗體輕鏈。在一個實施例中，該等輕鏈多肽各自基本上係由IgG類別抗體輕鏈組成。

在一些實施例中，該IL-10單體係天然IL-10單體，特定而言為天然人類IL-10單體。在具體實施例中，該IL-10單體包含多肽SEQ ID NO: 1之序列。在一個實施例中，包含在該等重鏈多肽中之該等IL-10單體形成功能性同源二聚體IL-10分子。

在其他實施例中，該IL-10單體係經修飾IL-10單體，特定而言為經修飾人類IL-10單體。在一個實施例中，該經修飾IL-10單體呈單體形式在pH 7.0、37°C下穩定。在一個實施例中，該經修飾IL-10單體與天然IL-10單體相比在pH 7.0、37°C下具有經改良穩定性。在具體實施例中，該IL-10單體包含SEQ ID NO: 5之多肽序列。在一個實施例中，包含在該等重鏈多肽中之該等IL-10單體不與彼此同源二聚體化。

在一個實施例中，該IgG類別抗體與無降低抗體與Fc受體之結合親和力之修飾之相應IgG類別抗體相比包含該修飾。在具體實施例中，該Fc受體係Fc γ 受體，特定而言為人類Fc γ 受體。在一個實施例中，該Fc受體係活化Fc受體，特定而言為活化Fc γ 受體。在具體實施例中，該Fc受體係選自Fc γ RIIIa (CD16a)、Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIa (CD32)及Fc α RI (CD89)之群。在甚至更具體之實施例中，該Fc受體係Fc γ IIIa，特定而言為人類Fc γ IIIa。在一個實施例中，該修飾降低IgG類別抗體之效應子功能。在具體實施例中，該效應子功能係抗體依賴性細胞介導細胞毒性(ADCC)。在一個實施例中，該修飾係在該IgG類別抗體之Fc區、特定而言CH2區中。在一個實施例中，該IgG類別抗

體包含抗體重鏈之329位(EU編號)之胺基酸取代。在具體實施例中，該胺基酸取代係P329G。在一個實施例中，該IgG類別抗體包含抗體重鏈之234位及235位(EU編號)之胺基酸取代。在具體實施例中，該等胺基酸取代係L234A及L235A (LALA)。在特定實施例中，該IgG類別抗體在抗體重鏈中包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G (EU編號)。

在一個實施例中，該IgG類別抗體係IgG₁子類抗體。在一個實施例中，該IgG類別抗體係全長抗體。在一個實施例中，該IgG類別抗體係人類抗體。在一個實施例中，該IgG類別抗體係單株抗體。

在一個實施例中，該IgG類別抗體能夠特異性結合至纖維母細胞活化蛋白(FAP)。在具體實施例中，當在25°C下藉由表面電漿共振(SPR)量測時，融合蛋白能夠以小於1 nM、特定而言小於100 pM之親和力常數(K_D)結合至FAP。在一個實施例中，該FAP係人類、小鼠及/或食蟹獼猴FAP。在具體實施例中，該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 37之重鏈CDR (HCDR) 1、SEQ ID NO: 41之HCDR 2、SEQ ID NO: 49之HCDR 3、SEQ ID NO: 53之輕鏈CDR (LCDR) 1、SEQ ID NO: 57之LCDR 2及SEQ ID NO: 61之LCDR 3。在甚至更具體之實施例中，該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 63之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 65之輕鏈可變區(VL)。在另一特定具體實施例中，該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 37之HCDR 1、SEQ ID NO: 43之HCDR 2、SEQ ID NO: 47之HCDR 3、SEQ ID NO: 51之LCDR 1、SEQ ID NO: 55之LCDR 2及SEQ ID NO: 59之LCDR 3。在甚至更具體之實施例中，該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 67之VH及SEQ ID NO: 69之VL。

在一個實施例中，當在25°C下藉由SPR量測時，融合蛋白能夠以小於1 nM、特定而言小於100 pM之親和力常數(K_D)結合至IL-10受體-1 (IL-10R1)。在具體實施例中，該IL-10R1係人類IL-10R1。在一個實

施例中，當在25℃下藉由SPR量測時，該結合至IL-10R1之親和力常數(K_D)約等於或大於該結合至FAP之親和力常數(K_D)。在具體實施例中，該結合至IL-10R1之 K_D 大於該結合至FAP之 K_D 的約一半。

在特定實施例中，本發明提供IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白，其中融合蛋白包含兩條相同的重鏈多肽及兩條相同的輕鏈多肽；且其中

(i)該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 37之重鏈CDR (HCDR) 1、SEQ ID NO: 43之HCDR 2、SEQ ID NO: 47之HCDR 3、SEQ ID NO: 51之輕鏈CDR (LCDR) 1、SEQ ID NO: 55之LCDR 2及SEQ ID NO: 59之LCDR 3，或包含SEQ ID NO: 67之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 69之輕鏈可變區(VL)；

(ii)該IgG類別抗體在抗體重鏈中包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G (EU編號)；

(iii)該IL-10分子包含SEQ ID NO: 1之序列；且

(iv)該等重鏈多肽各自包含IgG類別抗體重鏈及IL-10單體，該IL-10單體於其N端經由肽連接體融合至該IgG類別抗體重鏈之C端。

在另一實施例中，本發明提供IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白，其中融合蛋白包含兩條相同的重鏈多肽及兩條相同的輕鏈多肽；且其中

(i)該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 37之重鏈CDR (HCDR) 1、SEQ ID NO: 41之HCDR 2、SEQ ID NO: 49之HCDR 3、SEQ ID NO: 53之輕鏈CDR (LCDR) 1、SEQ ID NO: 57之LCDR 2及SEQ ID NO: 61之LCDR 3，或包含SEQ ID NO: 63之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 65之輕鏈可變區(VL)；

(ii)該IgG類別抗體在抗體重鏈中包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G (EU編號)；

(iii)該IL-10分子包含SEQ ID NO: 1之序列；且

(iv)該等重鏈多肽各自包含IgG類別抗體重鏈及IL-10單體，該IL-10單體於其N端經由肽連接體融合至該IgG類別抗體重鏈之C端。

本發明進一步提供編碼本發明融合蛋白之聚核苷酸。進一步提供包含本發明聚核苷酸之載體、特定而言表現載體。在另一態樣中，本發明提供包含本發明聚核苷酸或載體之宿主細胞。本發明亦提供產生本發明融合蛋白之方法，其包含以下步驟：(i)在適於表現融合蛋白之條件下培養本發明宿主細胞及(ii)回收該融合蛋白。亦提供藉由該方法產生之IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白。

在一個態樣中，本發明提供包含本發明融合蛋白與醫藥上可接受之載劑之醫藥組合物。亦提供本發明之融合蛋白或醫藥組合物用作藥劑及用於治療或預防發炎性疾病、具體而言發炎性腸病或類風濕性關節炎、最具體而言發炎性腸病。進一步提供本發明融合蛋白用於製造用以為有此需要之個體治療疾病之藥劑的用途及治療個體之疾病方法，該方法包含向該個體投與治療有效量之包含呈醫藥上可接受之形式之本發明融合蛋白的組合物。在一個實施例中，該疾病係發炎性疾病。在更具體之實施例中，該發炎性疾病係發炎性腸病或類風濕性關節炎。在甚至更具體之實施例中，該發炎性疾病係發炎性腸病。在一個實施例中，該個體係哺乳動物，特定而言為人類。

【圖式簡單說明】

圖1. 各種抗體-IL-10融合形式之示意圖示。圖(A)至(D)顯示基於IgG抗體之形式，圖(E)至(G)顯示基於Fab片段之形式。(A)「IgG-IL-10」，具有一個IL-10分子(野生型人類IL-10細胞介素序列)融合至每一IgG重鏈之C端(同一IgG分子內兩條重鏈上之IL-10分子二聚體化)之人類IgG (具有經改造Fc區以避免效應子功能，例如藉由胺基酸取代L234A L235A (LALA) P329G達成)。重鏈與IL-10之間之連接物：例如

(G₄S)₄ 20聚體。(B) 「IgG-單鏈(sc) IL-10」，具有單鏈IL-10二聚體(scIL-10)融合至一條IgG重鏈之C端之人類IgG (具有經改造Fc區以避免效應子功能；及一條「結節(knob)」重鏈與一條「孔洞(hole)」重鏈之組合以促進該兩者之異源二聚體化)。重鏈與單鏈IL-10之間之連接物：例如(G₄S)₃ 15聚體。(C) 「IgG-IL-10M1」，具有經改造單體IL-10分子融合至一條IgG重鏈之C端之人類IgG (具有經改造Fc部分以避免效應子功能；及一條「結節」重鏈與一條「孔洞」重鏈之組合以促進該兩者之異源二聚體化)。重鏈與單體IL-10之間之連接物：例如(G₄S)₃ 15聚體。(D) 「IgG-(IL-10M1)₂」，具有一個IL-10單體融合至每一IgG重鏈之C端(任一重鏈上之單體IL-10分子皆不二聚體化)之人類IgG (具有經改造Fc部分以避免效應子功能)。重鏈與IL-10之間之連接物：例如(G₄S)₃ 15聚體連接體。(E) 「Fab-IL-10」，具有一個IL-10分子(野生型人類IL-10細胞介素序列)融合至Fab重鏈之C端(該等融合物中之兩者藉由經由IL-10部分二聚體化形成同源二聚體活性分子)之Fab片段。重鏈與IL-10之間之連接物：例如(G₄S)₃ 15聚體。(F) 「Fab-scIL-10-Fab」，由單鏈IL-10二聚體隔開之串聯Fab片段(即，兩個IL-10分子由例如(G₄S)₄ 20聚體連接體連接並插入第一Fab重鏈(HC1)之C端與第二Fab重鏈(HC2)之N端之間，從而產生包含HC1-IL-10-IL-10-HC2之單一肽鏈)。兩條輕鏈(其可與用於其他構築體之輕鏈相同)與該兩條重鏈配對。(G) 「Fab-IL-10M1-Fab」，由經改造單體IL-10分子隔開之串聯Fab片段。除單體IL-10部分以外，此形式與(F)相同。

圖2. 靶向FAP之基於4B9之IgG-IL-10構築體(參見SEQ ID NO 25及27)之純化。(A)蛋白質A純化步驟之溶析曲線。(B)尺寸排除層析步驟之溶析曲線。(C)最終產物之分析型SDS-PAGE (還原(R)：NuPAGE Novex Bis-Tris Mini凝膠，Invitrogen，MOPS運行緩衝液；非還原

(NR)：NuPAGE Tris-乙酸鹽，Invitrogen，Tris-乙酸鹽運行緩衝液)。
M：尺寸標記物。(D)最終產物在Superdex 200管柱上之尺寸分析型尺寸排除層析。單體含量為99.8%。

圖3. 靶向FAP之基於4G8之IgG-scIL-10構築體(參見SEQ ID NO 7、11及13)之純化。(A)蛋白質A純化步驟之溶析曲線。(B)尺寸排除層析步驟之溶析曲線(虛線方框指示期望產物)。(C)最終產物之分析型SDS-PAGE (還原(R)：NuPAGE Novex Bis-Tris Mini凝膠，Invitrogen，MOPS運行緩衝液；非還原(NR)：NuPAGE Tris-乙酸鹽，Invitrogen，Tris-乙酸鹽運行緩衝液)；非還原凝膠上之另一低分子量帶可代表由一條重鏈及一條輕鏈組成之半分子。(D)最終產物在TSKgel G3000 SW XL管柱上之分析型尺寸排除層析。單體含量為80.6%。

圖4. 靶向FAP之基於4G8之IgG-IL-10M1構築體(參見SEQ ID NO 7、13及15)之純化。(A)蛋白質A純化步驟之溶析曲線。(B)尺寸排除層析步驟之溶析曲線。(C)最終產物之分析型SDS-PAGE (還原(R)：NuPAGE Novex Bis-Tris Mini凝膠，Invitrogen，MOPS運行緩衝液；非還原(NR)：NuPAGE Tris-乙酸鹽，Invitrogen，Tris-乙酸鹽運行緩衝液)。(D)最終產物在Superdex 200管柱上之分析型尺寸排除層析。單體含量為98.2%。

圖5. 靶向FAP之基於4B9之IgG-(IL-10M1)₂構築體(參見SEQ ID NO 25及29)之純化。(A)蛋白質A純化步驟之溶析曲線。(B)尺寸排除層析步驟之溶析曲線。(C)最終產物之LabChip GX (Caliper)分析。(D)最終產物在TKSgel G3000 SW XL管柱上之分析型尺寸排除層析。單體含量為100%。

圖6. 靶向FAP之基於4B9之Fab-IL-10構築體(參見SEQ ID NO 25及31)之純化。(A)蛋白質A純化步驟之溶析曲線。(B)尺寸排除層析步驟之溶析曲線。(C)最終產物之分析型SDS-PAGE (還原(R)：NuPAGE

Novex Bis-Tris Mini凝膠，Invitrogen，MOPS運行緩衝液；非還原(NR)：NuPAGE Tris-乙酸鹽，Invitrogen，Tris-乙酸鹽運行緩衝液)。(D)最終產物在Superdex 200管柱上之分析型尺寸排除層析。單體含量為92.9%。

圖7. 靶向FAP之基於4G8之Fab-scIL-10-Fab構築體(參見SEQ ID NO 7及21)之純化。(A)蛋白質A純化步驟之溶析曲線。(B)尺寸排除層析步驟之溶析曲線。(C)最終產物之分析型SDS-PAGE (還原(R)：NuPAGE Novex Bis-Tris Mini凝膠，Invitrogen，MOPS運行緩衝液；非還原(NR)：NuPAGE Tris-乙酸鹽，Invitrogen，Tris-乙酸鹽運行緩衝液)。(D)最終產物在Superdex 200管柱上之分析型尺寸排除層析。單體含量為100%。

圖8. 靶向FAP之基於4G8之Fab-IL-10M1-Fab融合物(參見SEQ ID NO 7及23)之純化。(A)蛋白質A純化步驟之溶析曲線。(B)尺寸排除層析步驟之溶析曲線。(C)最終產物之分析型SDS-PAGE (還原(R)：NuPAGE Novex Bis-Tris Mini凝膠，Invitrogen，MOPS運行緩衝液；非還原(NR)：NuPAGE Tris-乙酸鹽，Invitrogen，Tris-乙酸鹽運行緩衝液)。(D)最終產物在Superdex 200管柱上之分析型尺寸排除層析。單體含量為100%。

圖9. ProteOn XPR36上之SPR分析設置。(A)藉由胺偶合在GLM晶片上共價固定抗五His IgG (捕獲劑)，之後捕獲FAP (配體)且隨後注射抗FAP抗體-IL-10融合構築體(分析物)。(B)在中性抗生物素蛋白(neutravidin)衍生感測器晶片(NLC)上固定生物素化人類IL-10R1 (配體)，之後注射抗FAP抗體-IL-10融合構築體(分析物)。

圖10. 不同的抗體-IL-10融合蛋白對單核球產生促炎性細胞介素之抑制。(A-C)在塗覆有重組人類FAP之細胞培養板上固定4G8 Fab-IL-10 (參見SEQ ID NO 7及19)或4G8 IgG-IL-10 (參見SEQ ID NO 7及

9)，然後添加單核球及作為刺激物之100 ng/ml LPS並保持24 h。隨後量測(n=2)上清液中IL-6 (A)、IL-1 β (B)及TNF α (C)之濃度。(D-F)將單核球與0-200 nM 4G8 Fab-IL-10或4G8 IgG-IL-10 (存於溶液中)及作為刺激物之100 ng/ml LPS一起培育24 h。隨後量測(n=2)上清液中IL-6 (D)、IL-1 β (E)及TNF α (F)之濃度。

圖11. 使用兩種不同血液供體再現圖1中所示結果。(A)在塗覆有重組人類FAP之細胞培養板上固定4G8 Fab-IL-10或4G8 IgG-IL-10，然後添加單核球及作為刺激物之100 ng/ml LPS並保持24 h。隨後量測上清液中IL-6 (左)、IL-1 β (中)及TNF α (右)之濃度(每一列代表一種血液供體)。(B)將單核球與0-200 nM 4G8 Fab-IL-10、4G8 IgG-IL-10或野生型人類IL-10 (存於溶液中)及作為刺激物之100 ng/ml LPS一起培育24 h。隨後量測上清液中IL-6 (左)、IL-1 β (中)及TNF α (右)之濃度(每一列代表一種血液供體)。

圖12. 不同抗體-IL-10融合蛋白對單核球產生IL-6之抑制。(A-C)在塗覆有重組人類FAP之細胞培養板上固定4G8 Fab-IL-10、4G8 IgG-IL-10或相應未靶向構築體，然後添加單核球及作為刺激物之100 ng/ml LPS並保持24 h。隨後量測上清液中IL-6之濃度。(D-F)將單核球與0-200 nM 4G8 Fab-IL-10、4G8 IgG-IL-10、相應未靶向構築體或野生型人類IL-10 (存於溶液中)及作為刺激物之100 ng/ml LPS一起培育24 h。隨後量測上清液中IL-6之濃度。

圖13. 不同抗體-IL-10融合蛋白對單核球產生IL-6之抑制。在塗覆有不同濃度之重組人類FAP之細胞培養板上固定4G8 Fab-IL-10 (下列)或4G8 IgG-IL-10 (上列)，然後添加單核球及作為刺激物之100 ng/ml LPS並保持24 h。隨後量測上清液中IL-6之濃度。

圖14. 不同抗體-IL-10融合蛋白對單核球產生IL-6之抑制。在塗覆有不同濃度之重組人類FAP之細胞培養板上固定4G8 Fab-IL-10 (B)

或4G8 IgG-IL-10 (A)，然後添加單核球及作為刺激物之100 ng/ml LPS並保持24 h。隨後量測上清液中IL-6之濃度。繪製與圖13中相同之數據，但進行不同比較。

圖15. 不同抗體-IL-10融合蛋白對單核球產生IL-6之抑制。(A)在塗覆有重組人類FAP之細胞培養板上固定4B9 Fab-IL-10 (參見SEQ ID NO 25及31)或4B9 IgG-IL-10 (參見SEQ ID NO 25及27)構築體，然後添加單核球及作為刺激物之100 ng/ml LPS並保持24 h。隨後量測上清液中IL-6之濃度。(B)將單核球與0-200 nM 4B9 Fab-IL-10或4B9 IgG-IL-10構築體(存於溶液中)及作為刺激物之100 ng/ml LPS一起培育24 h。隨後量測上清液中IL-6之濃度。

圖16. Fab-IL-10及IgG-IL-10形式之尺寸排除層析(SEC)曲線之比較。箭頭指示期望之二聚體產物，虛線圓指示聚集物，且實線圓指示單體。與Fab-IL-10形式相比，IgG-IL-10形式因其重鏈發生二硫鍵連接之共價同源二聚化而不產生單體或「半分子」。

【實施方式】

定義

除非下文另有定義，否則本文所用之術語具有業內通用含義。

除非另有說明，否則「纖維母細胞活化蛋白」(縮寫為FAP，亦稱作Seprase (EC 3.4.21))係指來自任一脊椎動物來源之任一天然FAP，該來源包括哺乳動物，例如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴)及齧齒類動物(例如小鼠及大鼠)。該術語涵蓋「全長」未處理FAP以及自處理細胞產生之任一形式之FAP。該術語亦涵蓋FAP之天然變體，例如，剪接變體或等位基因變體。在一個實施例中，本發明抗體能夠特異性結合至人類、小鼠及/或食蟹獼猴FAP。人類FAP之胺基酸序列示於UniProt (www.uniprot.org)登錄號Q12884 (128版)或NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2

中。人類FAP之細胞外結構域(ECD)自胺基酸位置26延伸至760。帶His標籤之人類FAP ECD之胺基酸及核苷酸序列分別示於SEQ ID NO 81及82中。小鼠FAP之胺基酸序列示於UniProt登錄號P97321 (107版)或NCBI RefSeq NP_032012.1中。小鼠FAP之細胞外結構域(ECD)自胺基酸位置26延伸至761。SEQ ID NO 83及84分別顯示帶His標籤之小鼠FAP ECD之胺基酸及核苷酸序列。SEQ ID NO 85及86分別顯示帶His標籤之食蟹獼猴FAP ECD之胺基酸及核苷酸序列。

「人類IL-10R1」意指UniProt登錄號Q13651 (115版)中所述之蛋白質，特定而言該蛋白質自全序列之胺基酸位置22延伸至胺基酸位置235之細胞外結構域。SEQ ID NO 87及88分別顯示融合至人類Fc區之人類IL-10R1 ECD之胺基酸及核苷酸序列。

本文所用術語「融合蛋白」係指包含抗體及IL-10分子之融合多肽分子，其中融合蛋白之組份藉由肽鍵直接或經由肽連接體與彼此連接。為清楚起見，融合蛋白之抗體組份之個別肽鏈可例如藉由二硫鍵非共價連接。

「融合」係指藉由肽鍵直接或經由一或多個肽連接體連接之組份。

「特異性結合」意指該結合對抗原具有選擇性且可區別於不欲或非特異性相互作用。抗體與特定抗原結合之能力可經由酶聯免疫吸附分析(ELISA)或熟習此項技術者熟悉之其他技術(例如表面電漿共振技術(在BIAcore儀器上分析)(Liljeblad等人，Glyco J 17, 323-329 (2000))及傳統結合分析(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)))來量測。在一個實施例中，抗體與無關蛋白質之結合程度小於抗體與抗原之結合之約10%，如例如藉由SPR所量測。在某些實施例中，結合至抗原之抗體之解離常數(K_D)為 $\leq 1 \mu M$ 、 $\leq 100 nM$ 、 $\leq 10 nM$ 、 $\leq 1 nM$ 、 $\leq 0.1 nM$ 、 $\leq 0.01 nM$ 或 $\leq 0.001 nM$ (例如 $10^{-8} M$ 或更

小，例如 10^{-8} M至 10^{-13} M，例如 10^{-9} M至 10^{-13} M)。

「親和力」或「結合親和力」係指分子(例如，抗體)之單一結合位點與其結合配偶體(例如，抗原)間之非共價相互作用的總強度。除非另有說明，否則本文所用「結合親和力」係指反映結合對成員(例如，抗體及抗原)間之1:1相互作用的固有結合親和力。分子X對其配偶體Y之親和力通常可由解離常數(K_D)表示，解離常數係解離速率常數與締合速率常數(分別為 k_{off} 及 k_{on})之比率。因此，等效親和力可包含不同速率常數，只要速率常數之比率保持相同即可。可藉由業內已知之常見方法(包括彼等闡述於本文中者)來量測親和力。量測親和力之特定方法係表面電漿共振(SPR)。

「減少結合」(例如減少與Fc受體之結合)係指各別相互作用之親和力降低，如例如藉由SPR所量測。為清楚起見，該術語亦包括親和力降低至0 (或低於分析方法之檢測限)，即，完全消除相互作用。反之，「增加結合」係指各別相互作用之結合親和力之增加。

本文所用術語「單鏈」係指包含藉由肽鍵線性連接之胺基酸單體之分子。

術語「抗體」在本文中係以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現期望之抗原結合活性。

「抗體片段」係指除完整抗體外之分子，其包含完整抗體中結合完整抗體所結合之抗原的一部分。抗體片段之實例包括(但不限於)Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、雙鏈抗體、直鏈抗體、單鏈抗體分子(例如scFv)及單結構域抗體。關於某些抗體片段之綜述，參見Hudson等人Nat Med 9, 129-134 (2003)。關於scFv片段之綜述，例如參見Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷，Rosenburg及Moore編輯，Springer-Verlag, New York, 第269-315

頁(1994)；亦參見 WO 93/16185 及美國專利第 5,571,894 號及第 5,587,458 號。關於包含補救受體結合表位殘基且具有增加之活體內半衰期之 Fab 及 F(ab')₂ 片段的論述，參見美國專利第 5,869,046 號。雙鏈抗體係具有兩個抗原結合位點之可為二價或雙特異性之抗體片段。例如，參見 EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson 等人，Nat Med 9, 129-134 (2003)；及 Hollinger 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1993)。三鏈抗體及四鏈抗體亦闡述於 Hudson 等人，Nat Med 9, 129-134 (2003) 中。單結構域抗體係包含抗體中重鏈可變結構域之全部或一部分或輕鏈可變結構域之全部或一部分的抗體片段。在某些實施例中，單結構域抗體係人類單結構域抗體(Domantis 公司，Waltham, MA；例如，參見美國專利第 6,248,516 B1 號)。可藉由各種技術來製備抗體片段，包括(但不限於)蛋白水解消化完整抗體以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌或噬菌體)來產生，如本文所述。

術語「全長抗體」、「完整抗體」及「完全抗體」在本文中可互換使用，係指結構實質上類似於天然抗體結構之抗體。

「天然抗體」係指具有不同結構之天然免疫球蛋白分子。例如，天然 IgG 類別抗體係約 150,000 道爾頓(dalton)之異源四聚體糖蛋白，其由二硫鍵鍵結之兩條輕鏈及兩條重鏈構成。自 N 端至 C 端，每一重鏈依次具有可變區(VH)(亦稱為可變重鏈結構域或重鏈可變結構域)及三個恆定結構域(CH1、CH2 及 CH3，亦稱為重鏈恆定區)。類似地，自 N 端至 C 端，每一輕鏈依次具有可變區(VL)(亦稱為可變輕鏈結構域或輕鏈可變結構域)及輕鏈恆定結構域(CL)(亦稱為輕鏈恆定區)。可將抗體之重鏈指派為 5 種類型中之一者，稱為 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG) 或 μ (IgM)，其中一些可進一步劃分為亞型，例如 γ_1 (IgG₁)、 γ_2 (IgG₂)、 γ_3 (IgG₃)、 γ_4 (IgG₄)、 α_1 (IgA₁) 及 α_2 (IgA₂)。基於抗體恆定結構域之胺基酸序列，可將該抗體之輕鏈指派為兩種類型中之

一者，稱為卡帕(kappa)(κ)及拉姆達(lambda)(λ)。

本文所用「Fab片段」係指包含以下之抗體片段：包含輕鏈之VL結構域及恆定結構域(CL)之輕鏈片段以及重鏈之VH結構域及第一恆定結構域(CH1)。

抗體或免疫球蛋白之「類別」係指其重鏈所具有之恆定結構域或恆定區之類型。存在5大類抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且該等類別中之若干種可進一步分成亞類(同種型)，例如，IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白之重鏈恆定結構域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

「IgG類別抗體」係指具有天然免疫球蛋白G (IgG)分子之結構之抗體。IgG類別抗體之抗體重鏈具有結構域結構VH-CH1-CH2-CH3。IgG類別抗體之抗體輕鏈具有結構域結構VL-CL。IgG類別抗體基本上係由經由免疫球蛋白鉸鏈區連接之兩個Fab片段及一個Fc結構域組成。

術語「可變區」或「可變結構域」係指抗體重鏈或輕鏈中參與使抗體與抗原結合之結構域。天然抗體之重鏈及輕鏈之可變結構域(分別為VH及VL)通常具有類似結構，其中每一結構域皆包含4個保守框架區(FR)及3個超變區(HVR)。例如，參見Kindt等人，Kuby Immunology，第6版，W.H. Freeman and Co.，第91頁(2007)。單一VH或VL結構域可足以賦予抗原結合特異性。

本文所用術語「超變區」或「HVR」係指抗體可變結構域區中序列具有超變性及/或形成結構上經界定之環(「超變環」)中的每一者。通常，原始四鏈抗體包含6個HVR；3個位於VH中(H1、H2、H3)，且3個位於VL中(L1、L2、L3)。HVR通常包含來自超變環及/或來自「互補決定區」(CDR)之胺基酸殘基，後者具有最高序列可變性及/或涉及抗原識別。實例性超變環發生於胺基酸殘基26-32 (L1)、50-

52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3) (Chothia 及Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987))。實例性CDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)出現於胺基酸殘基L1之24-34、L2之50-56、L3之89-97、H1之31-35B、H2之50-65及H3之95-102處(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。除VH中之CDR1外, CDR通常包含形成超變環之胺基酸殘基。CDR亦包含「特異性決定殘基」或「SDR」, 其係接觸抗原之殘基。SDR含於CDR中稱為縮短-CDR (abbreviated-CDR)或a-CDR之區域內。實例性a-CDR (a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2及a-CDR-H3)出現於胺基酸殘基L1之31-34、L2之50-55、L3之89-96、H1之31-35B、H2之50-58及H3之95-102處(參見Almagro及Fransson, *Front. Biosci* 13, 1619-1633 (2008))。除非另有說明, 否則在本文中根據Kabat等人(參見上文, 稱生物體「Kabat編號」)來編號可變結構域中之HVR殘基及其他殘基(例如, FR殘基)。

「框架」或「FR」係指除超變區(HVR)殘基外之可變結構域殘基。可變結構域之FR通常由4個FR結構域FR1、FR2、FR3及FR4組成。因此, HVR及FR序列通常出現於VH (或VL)中之以下序列中: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

「人類抗體」係具有對應於如下抗體之胺基酸序列的胺基酸序列者: 其由人類或人類細胞產生或源自利用人類抗體譜或其他編碼人類抗體之序列之非人類來源。此人類抗體之定義明確排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

本文所用術語「單株抗體」係指自實質上同源抗體群獲得之抗體, 即, 包含該群之個別抗體相同及/或結合相同表位, 可能之變體抗體除外, 例如, 含有天然存在之突變或在產生單株抗體製劑期間產

生，該等變體通常以較小量存在。與通常包括針對不同決定簇(表位)之不同抗體的多株抗體製劑不同，單株抗體製劑之每一單株抗體針對抗原上之單個決定簇。因此，修飾語「單株」指示自抗體之實質上同源群體獲得之抗體之特徵，且不應理解為需要藉由任一特定方法產生該抗體。例如，用於本發明中之單株抗體可藉由各種技術製得，包括(但不限於)雜交瘤方法、重組DNA方法、噬菌體展示方法、及利用含有所有或一部分人類免疫球蛋白基因座之轉基因動物的方法，製備單株抗體之該等方法及其他實例性方法闡述於本文中。

術語「Fc結構域」或「Fc區」在本文中用於定義抗體重鏈中含有至少一部分恆定區之C端區。該術語包括天然序列Fc區及變體Fc區。IgG Fc區包含IgG CH₂及IgG CH₃結構域。人類IgG Fc區之「CH₂結構域」通常自約231位之胺基酸殘基延伸至約340位之胺基酸殘基。在一個實施例中，碳水化合物鏈附接至CH₂結構域。CH₂結構域在本文中可為天然序列CH₂結構域或變體CH₂結構域。「CH₃結構域」包含Fc區中CH₂結構域之C端殘基伸展部分(即，自IgG之約341位之胺基酸殘基至約447位之胺基酸殘基)。CH₃區在本文中可為天然序列CH₃結構域或變體CH₃結構域(例如在其一條鏈中具有經引入「凸起」(「結節」)且在其另一鏈中具有相應之經引入「凹穴」(「孔洞」)之CH₃結構域；參見美國專利第5,821,333號，其以引用方式明確地併入本文中)。此等變體CH₃結構域可用於促進兩條如本文所述不相同抗體重鏈之異源二聚體化。在一個實施例中，人類IgG重鏈Fc區自重鏈之Cys226或自Pro230延伸至羧基端。然而，可存在或可不存在Fc區之C端離胺酸(Lys447)。除非在本文中另外指出，否則Fc區或恆定區中胺基酸殘基之編號係根據亦稱為EU指數之EU編號系統獲得，如Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所

述。

術語「效應子功能」係指彼等可歸因於抗體Fc區之生物學活性，其隨抗體同種型而變化。抗體效應子功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)、Fc受體結合、抗體依賴性細胞介導細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)、細胞介素分泌、免疫複合介導之抗原呈遞細胞對抗原之攝取、細胞表面受體(例如B細胞受體)之下調及B細胞活化。

「活化Fc受體」係在由抗體之Fc區咬合後誘發刺激具有受體之細胞實施效應子功能之信號傳導事件的Fc受體。活化Fc受體包含FcγRIIIa (CD16a)、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32)及FcαRI (CD89)。特定活化Fc受體係人類FcγRIIIa (參見UniProt登錄號P08637 (141版))。

「天然IL-10」(亦稱為「野生型IL-10」)意指與「經修飾IL-10」相比已自天然IL-10修飾(例如改變一或多種性質，例如穩定性)之天然IL-10。經修飾IL-10分子可例如包含胺基酸序列之修飾，例如胺基酸取代、缺失或插入。單體形式具有增加之穩定性之特定經修飾IL-10分子闡述於Josephson等人(J Biol Chem 275, 13552-13557 (2000))中。

天然IL-10係由兩個α螺旋單體結構域構成之同源二聚體。天然人類IL-10單體結構域之序列示於SEQ ID NO: 1中。因此，「IL-10單體」係與天然IL-10之單體結構域具有實質上類似之序列及/或結構之蛋白質。

在參照蛋白質使用時，「穩定」或「穩定性」意指保持蛋白質(例如其二級結構)之結構完整性。

在參照蛋白質使用時，「功能」意指蛋白質能夠介導生物學功能、特定而言自然界中發生之相應蛋白質(例如天然IL-10)將介導之生

物學功能。在IL-10之情況下，生物學功能在表現IL-10受體之細胞(例如單核球)中可包括IL-10受體信號傳導之活化、促炎性細胞介素(例如TNF α 、IL-1、IL-6、IL-12、IL-2及/或INF γ)分泌之抑制、MHC II表現之抑制及協同刺激分子(例如CD80及/或CD86)之上調。

術語「肽連接體」係指包含一或多個胺基酸(通常為約2-20個胺基酸)之肽。肽連接體為業內已知或闡述於本文中。適宜之非免疫原性連接體肽包括(例如) $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 或 $G_4(SG_4)_n$ 肽連接體。「n」通常係介於1與10之間、通常介於2與4之間之數字。

「凹凸相嵌之修飾(knob-into-hole modification)」係指CH3結構域中兩條抗體重鏈之間之界面內之修飾，其中i)在一條重鏈之CH3結構域中，胺基酸殘基經具有較大側鏈體積之胺基酸殘基置換，藉此在一條重鏈之CH3結構域中之界面內生成可定位於另一重鏈之CH3結構域中之界面內之凹穴(「孔洞」)的凸起(「結節」)，且ii)在另一重鏈之CH3結構域中，胺基酸殘基經具有較小側鏈體積之胺基酸殘基置換，藉此在第二CH3結構域中之界面內生成凹穴(「孔洞」)，位於第一CH3結構域中之界面內之凸起(「結節」)可定位於該凹穴中。在一個實施例中，「凹凸相嵌之修飾」包含一條抗體重鏈中之胺基酸取代T366W及視情況胺基酸取代S354C以及另一抗體重鏈中之胺基酸取代T366S、L368A、Y407V及視情況Y349C。凹凸相嵌之技術闡述於(例如) US 5,731,168；US 7,695,936；Ridgway等人，Prot Eng 9, 617-621 (1996)及Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)中。通常，該方法涉及在第一多肽之界面處引入凸起(「結節」)且在第二多肽之界面處引入相應凹穴(「孔洞」)，使得該凸起可定位於凹穴中以促進異源二聚體形成並阻止同源二聚體形成。藉由使用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換來自第一多肽界面之較小胺基酸側鏈來構築體凸起。藉由使用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換較大胺基酸側鏈在第

二多肽之界面上產生尺寸與凸起相同或類似之補償性凹穴。分別在S354位及Y349位處引入兩個半胱氨酸殘基可在兩條重鏈之間之Fc區中形成二硫橋鍵，從而進一步穩定二聚體(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。

胺基酸「取代」係指多肽中之一個胺基酸經另一胺基酸置換。在一個實施例中，胺基酸經具有類似結構及/或化學性質之另一胺基酸置換，例如，保守胺基酸置換。可基於所涉及殘基之極性、電荷、溶解性、疏水性、親水性及/或兩親性之相似性進行「保守」胺基酸取代。例如，非極性(疏水性)胺基酸包括丙氨酸、白氨酸、異白氨酸、纈氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸及甲硫氨酸；極性中性胺基酸包括甘氨酸、絲氨酸、蘇氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺及麩酰胺；帶正電(鹼性)胺基酸包括精氨酸、離氨酸及組氨酸；且帶負電(酸性)胺基酸包括天冬氨酸及麩氨酸。非保守取代將使得需要將該等類別中一者之成員交換為另一類別。例如，胺基酸取代亦可導致一個胺基酸經具有不同結構及/或化學性質之另一胺基酸置換，例如，來自一個群(例如，極性)之胺基酸經來自不同群(例如，鹼性)之另一胺基酸置換。可使用業內熟知之遺傳或化學方法生成胺基酸取代。遺傳方法可包括定點誘變、PCR、基因合成及諸如此類。預計亦可使用藉由除遺傳改造外之方法來改變胺基酸之側鏈基團的方法，例如化學修飾。各種命名在本文中可指示相同胺基酸取代。例如，抗體重鏈329位之脯氨酸至甘氨酸之取代可指示為329G、G329、G₃₂₉、P329G或Pro329Gly。

「對於參照多肽序列而言，「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列並引入空位(若需要)以達到最大序列一致性百分比後候選序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基一致之胺基酸殘基的百分比，且不將任何保守取代視為序列一致性之一部分。出於測定胺基酸

序列一致性百分比目的之比對可以熟習此項技術者所熟知之各種方式來達成，例如使用可公開獲得之電腦軟體，例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。彼等熟習此項技術者可確定用於比對序列之適當參數，包括在所比較序列之全長範圍內達成最大比對所需要之任何算法。然而，對於本文目的而言，核酸序列一致性百分比值係使用序列比較電腦程式ALIGN-2來生成。ALIGN-2序列比較電腦程式係藉由Genentech公司編輯，且原始碼與用戶文件已一起編入美國版權局，Washington D.C., 20559，其中其以美國版權註冊號TXU510087註冊。ALIGN-2程式可通過Genentech公司，South San Francisco, California公開獲得，或可自源代碼編譯。所編譯ALIGN-2程式應適於在UNIX操作系統(包括數位UNIX V4.0D)上使用。所有序列比較參數皆由ALIGN-2程式設定且並不改變。當使用ALIGN-2進行胺基酸序列比較時，給定胺基酸序列A相對於(to)、與(with)或對(against)給定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性百分比(另一選擇為，可表達為相對於、與或對給定胺基酸序列B給定胺基酸序列A所具有或包含之給定胺基酸序列一致性百分比)如下所述來計算：

100乘以分數X/Y

其中X系在A與B之程式比對中由序列比對程式ALIGN-2評定為一致性匹配之胺基酸殘基數，且其中Y係B中胺基酸殘基之總數。應瞭解，在胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度時，A相對於B之胺基酸序列一致性百分比不等於B相對於A之胺基酸序列一致性百分比。除非另外明確說明，否則本文所用之所有胺基酸序列一致性百分比值皆如前面緊接段落中所述使用ALIGN-2電腦程式來獲得。

可在本文中互換使用之「聚核苷酸」或「核酸」係指任何長度之核苷酸之聚合物，且包括DNA及RNA。核苷酸可為去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾核苷酸或鹼基及/或其類似物或可藉由DNA

或RNA聚合酶或藉由合成反應納入聚合物中之任何受質。聚核苷酸可包含經修飾核苷酸，例如甲基化核苷酸及其類似物。核苷酸之序列可雜有非核苷酸組份。聚核苷酸可包含在合成後進行之修飾，例如偶聯至標記。

術語「修飾」係指肽主鏈(例如胺基酸序列)之任何操縱或多肽之轉譯後修飾(例如糖基化)。

本文所用術語「載體」係指能夠轉運與其連接之另一核酸之核酸分子。該術語包括呈自我複製核酸結構形式之載體以及納入引入其之宿主細胞之基因組中的載體。某些載體能夠引導與其可操作地連接之核酸之表現。此等載體在本文中稱作「表現載體」。

術語「宿主細胞」、「宿主細胞系」及「宿主細胞培養物」可互換使用且係指引入外源性核酸之細胞，包括該等細胞之子代。宿主細胞包括「轉化體」及「轉化細胞」，其包括原代轉化細胞及與傳代數量無關之自其衍生之子代。子代與親代細胞之核酸含量可能並不完全相同，但可含有突變。本文包括經篩選或選擇用於原始轉化細胞中之具有相同功能或生物活性的突變子代。宿主細胞係可用於生成本發明融合蛋白之任何細胞系統類型。宿主細胞包括經培養細胞，例如哺乳動物培養細胞，例如CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓瘤細胞、P3X63小鼠骨髓瘤細胞、PER細胞、PER.C6細胞或雜交瘤細胞、酵母細胞、昆蟲細胞及植物細胞，僅舉幾個例子，且亦包括轉基因動物、轉基因植物或培養植物或動物組織中所含細胞。

藥劑之「有效量」係指在投與該藥劑之細胞或組織中產生生理學變化所需之量。

藥劑(例如，醫藥組合物)之「治療有效量」係指在所需時間內以所需劑量有效達成期望治療或預防結果之量。例如，治療有效量之藥劑消除、降低、延遲、最小化或防止疾病之不良效應。

「個體(individual或subject)」係哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)家養動物(例如，牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如，人類及非人類靈長類動物，例如猴子)、兔及齧齒類動物(例如，小鼠及大鼠)。特定而言，個體係人類。

術語「醫藥組合物」係指一種製劑之呈現形式允許其中所含活性成份之具有有效生物活性，且不含對接受投與該組合物之個體具有不可接受毒性的其他組份。

「醫藥上可接受之載劑」係指醫藥組合物中除活性成份外對個體無毒之成份。醫藥上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

本文所用「治療」(及其語法變化形式，例如「treat」或「treating」)係指嘗試改變所治療個體之自然疾病過程的臨床干預，且可出於預防性目的或在臨床病理學過程期間實施。治療之期望效應包括(但不限於)防止疾病發生或復發、減輕症狀、減弱疾病之任何直接或間接病理結果、防止轉移、降低疾病進展速率、改善或緩和疾病狀態及緩解或改良預後。在一些實施例中，使用本發明抗體來延遲疾病發生或減緩疾病進展。

本發明融合蛋白

本發明提供具有特別有利之性質(例如可製造性、穩定性、結合親和力及生物學活性)之新穎抗體-IL-10融合蛋白。

在第一態樣中，本發明提供IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白，其中融合蛋白包含兩條相同的重鏈多肽及兩條相同的輕鏈多肽。在一個實施例中，該等重鏈多肽中之每一者包含IgG類別抗體重鏈及IL-10單體。在更具體實施例中，該IL-10單體於其N端視情況經由肽連接體融合至該IgG類別抗體重鏈之C端。在一個實施例中，該等重鏈多肽各自基本上係由IgG類別抗體重鏈、IL-10單體及視情況選用之

肽連接體組成。在一個實施例中，該等輕鏈多肽中之每一者包含IgG類別抗體輕鏈。在一個實施例中，該等輕鏈多肽各自基本上係由IgG類別抗體輕鏈組成。與基於抗體片段之融合蛋白相比，IgG類別抗體之存在賦予本發明融合蛋白有利之藥物代謝動力學性質，包括延長之血清半衰期(因經由結合至FcRn而再循環，且分子大小遠高於腎過濾臨限值)。IgG類別抗體之存在亦使得能夠藉由例如蛋白質A親和層析法進行融合蛋白之簡單純化。令人吃驚地，如實例中所示，比較本發明之基於IgG之IgG-IL-10融合蛋白與相應基於Fab片段之融合蛋白(Fab-IL-10)，當結合至其靶抗原時，IgG類別抗體之存在亦改良融合蛋白之生物學活性。使用相同重(及輕)鏈多肽允許簡單產生融合蛋白，從而避免形成不期望之副產物並消除對促進不相同重鏈之異源二聚體化之修飾(例如結節成孔洞修飾)之需要。

在一些實施例中，該IL-10單體係天然IL-10單體，特定而言為天然人類IL-10單體。在具體實施例中，該IL-10單體包含SEQ ID NO: 1之多肽序列。在一個實施例中，包含在該等重鏈多肽中之該等IL-10單體形成功能性同源二聚體IL-10分子。此融合蛋白形式特別有利，此乃因兩個IL-10單體形成完全功能之生物活性IL-10二聚體。此外，與基於抗體片段之融合蛋白不同，在本發明融合蛋白中，二聚體化不僅發生在IL-10單體之間，且亦發生在與該等單體融合之抗體重鏈之間。因此，與本文所述Fab-IL-10融合蛋白相比，減少包含在本發明融合蛋白中之IL-10二聚體拆分成兩個單體之傾向性(參見圖16)。重要的是，此融合蛋白形式在生物學活性方面亦優於本文所述其他融合蛋白形式。

在其他實施例中，該IL-10單體係經修飾IL-10單體，特定而言為經修飾人類IL-10單體。在一個實施例中，該經修飾IL-10單體呈單體形式在pH 7.0、37°C下穩定。在一個實施例中，該經修飾IL-10單體與

天然IL-10單體相比在pH 7.0、37℃下具有經改良穩定性。經修飾之適宜IL-10單體闡述於Josephson等人，J Biol Chem 275, 13552-13557 (2000)中，該文獻亦闡述量測IL-10單體之穩定性之方法。在具體實施例中，該IL-10單體包含SEQ ID NO: 5之多肽序列。在一個實施例中，包含在該等重鏈多肽中之該等IL-10單體不與彼此同源二聚體化。此融合蛋白形式包含兩個單獨經修飾之IL-10單體，而非IL-10二聚體。如實例中所示，此融合蛋白形式與包含IL-10二聚體之融合蛋白具有類似之對IL-10受體1之結合親和力(親合力)。此外，其可特別適於生產，具有高表現產率及低聚集傾向性。

在一個實施例中，該IgG類別抗體係IgG₁子類抗體。在一個實施例中，該IgG類別抗體係人類抗體，即，其包含人類可變區及恆定區。實例性人類IgG₁重鏈及輕鏈恆定區之序列分別示於SEQ ID NO 79及80中。在一個實施例中，IgG類別抗體包含人類Fc區，特定而言人類IgG Fc區，更特定而言人類IgG₁ Fc區。在一個實施例中，該IgG類別抗體係全長抗體。在一個實施例中，該IgG類別抗體係單株抗體。

儘管IgG類別抗體之Fc結構域賦予融合蛋白有利之藥物代謝動力學性質(包括促成在靶組織中之良好累積之長血清半衰期及有利之組織-血液分佈比例)，但其同時可導致融合蛋白不期望地靶向表現Fc受體之細胞而非較佳具有抗原之細胞。此外，Fc受體信號傳導途徑之活化可導致細胞介素釋放，從而導致(促炎性)細胞介素受體活化及全身性投與後之嚴重副效應。因此，在一個實施例中，該IgG類別抗體與無降低抗體與Fc受體之結合親和力之修飾之相應IgG類別抗體相比包含該修飾。在具體實施例中，該Fc受體係Fc γ 受體，特定而言為人類Fc γ 受體。可容易地藉由(例如) ELISA或藉由表面電漿共振(SPR)使用標準儀錶(例如BIAcore儀器(GE Healthcare))來測定對Fc受體之結合親和力，且Fc受體(例如)可藉由重組表現獲得。用於量測結合親和力之

特定說明性及實例性實施例闡述於下文中。根據一個實施例，藉由表面電漿共振使用BIACORE® T100機器(GE Healthcare)在25℃下使用固定於CM5晶片上之配體(Fc受體)來量測對Fc受體之結合親和力。簡言之，根據供應商說明書，使用N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)來活化羧甲基化之右旋糖酐生物感測器晶片(CM5, GE Healthcare)。用10 mM乙酸鈉(pH 5.5)將重組配體稀釋至0.5-30 µg/ml，然後以10 µl/分鐘之流速注射以達成大約100-5000個反應單位(RU)之偶合蛋白。注射配體之後，注射1 M乙醇胺以封阻未反應基團。對於動力學量測而言，在25℃下以大約30-50 µl/min之流速在HBS-EP+(GE Healthcare, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05%表面活性劑P20, pH 7.4)中注射抗體之3倍至5倍連續稀釋液(在約0.01 nM至300 nM範圍內)。使用簡單一對一Langmuir結合模型(BIACORE ® T100, 評估軟體1.1.1版)藉由同時擬合締合及解離感測圖來計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。平衡解離常數(K_D)計算為比率 k_{off}/k_{on} 。例如，參見Chen等人, J. Mol Biol 293, 865-881 (1999)。另一選擇為，抗體對Fc受體之結合親和力可使用已知表現特定Fc受體之細胞系(例如表現FcγIIIa受體之NK細胞)評估。

在一個實施例中，修飾包含一或多個降低抗體對Fc受體之結合親和力之胺基酸突變。在一個實施例中，胺基酸突變係胺基酸取代。通常，相同之一或多個胺基酸突變存在於兩條抗體重鏈中之每一者中。在一個實施例中，該胺基酸突變將抗體對Fc受體之結合親和力降低至多1/2、至多4/5或至多9/10。在存在一個以上降低抗體對Fc受體之結合親和力之胺基酸突變之實施例中，該等胺基酸突變之組合可將抗體對於Fc受體之結合親和力降低至多9/10、至多19/20或甚至至多49/50。在一個實施例中，與無該修飾之相應IgG類別抗體相比，該

IgG類別抗體展現小於20%、特定而言小於10%、更特定而言小於5%之對Fc受體之結合親和力。

在一個實施例中，該Fc受體係活化Fc受體。在具體實施例中，該Fc受體係選自FcγRIIIa (CD16a)、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32)及FcαRI (CD89)之群。在一個具體實施例中，Fc受體係Fcγ受體，更具體而言為FcγRIIIa、FcγRI或FcγRIIa受體。較佳地，對該等受體中之每一者之結合親和力降低。在甚至更具體之實施例中，該Fc受體係FcγRIIIa，特定而言為人類FcγRIIIa。在一些實施例中，對補體組份之結合親和力、特定而言對C1q之特異性結合親和力亦降低。在一實施例中，對新生Fc受體(FcRn)之結合親和力並未降低。實質上類似之與FcRn之結合(即，保存抗體對該受體之結合親和力)係在抗體展現大於未經修飾形式之抗體對FcRn之結合親和力之約70%時達成。包含在本發明融合蛋白中之IgG類別抗體可展現大於約80%且甚至大於約90%之此親和力。

在一個實施例中，該降低抗體對Fc受體之結合親和力之修飾係在IgG類別抗體之Fc區、特定而言CH2區中。在一個實施例中，該IgG類別抗體包含抗體重鏈之329位(EU編號)之胺基酸取代。在更具體實施例中，該胺基酸取代係P329A或P329G、特定而言P329G。在一個實施例中，該IgG類別抗體包含抗體重鏈之234位及235位(EU編號)之胺基酸取代。在具體實施例中，該等胺基酸取代係L234A及L235A (LALA)。在一個實施例中，該IgG類別抗體包含抗體重鏈之329位(EU編號)之胺基酸取代及抗體重鏈之選自以下之位置之另一步胺基酸取代：228位、233位、234位、235位、297位及331位。在更具體實施例中，另一胺基酸取代係S228P、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在特定實施例中，該IgG類別抗體包含抗體重鏈之P329位、L234位及L235 (EU編號)之胺基酸取代。在更特定實

施例中，該IgG類別抗體包含抗體重鏈中之胺基酸取代L234A、L235A及P329G (LALA P329G)。此胺基酸取代組合幾乎特別有效地消除人類IgG類別抗體之Fc γ 受體結合，如PCT公開案第WO 2012/130831號中所述，該公開案之全文以引用方式併入本文中。PCT公開案第WO 2012/130831號亦闡述製備此經修飾抗體之方法及確定其性質(例如Fc受體結合或效應子功能)之方法。

抗體重鏈中之修飾之抗體可藉由胺基酸缺失、取代、插入或修飾使用業內熟知之遺傳或化學方法製備。遺傳方法可包括編碼DNA序列之位點特異性誘變、PCR、基因合成及諸如此類。可藉由(例如)定序來證實正確之核苷酸變化。

與相應未經修飾之抗體相比，包含減少Fc受體結合之修飾之抗體通常具有降低之效應子功能，特定而言降低之ADCC。因此，在一個實施例中，該降低IgG類別抗體對Fc受體之結合親和力的修飾降低IgG類別抗體之效應子功能。在具體實施例中，該效應子功能係抗體依賴性細胞介導細胞毒性(ADCC)。在一個實施例中，ADCC降低至小於由無該修飾之相應IgG類別抗體誘導之ADCC的20%。抗體之效應子功能可藉由業內已知方法量測。用以評價所關注分子之ADCC活性之活體外分析之實例闡述於美國專利第5,500,362號；Hellstrom等人Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)及Hellstrom等人，Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)；美國專利第5,821,337號；Bruggemann等人，J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)中。另一選擇為，可採用非放射性分析方法(例如，參見用於流式細胞術之ACTITM非放射性細胞毒性分析(CellTechnology公司，Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI))。可用於此等分析之效應子細胞包括周邊血單核球(PBMC)及天然殺手(NK)細胞。另一選擇為或另外，可在活體內，例如在動物模型(例如

Clynes等人，Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)中所揭示者)中評價所關注分子之ADCC活性。在一些實施例中，亦減少IgG類別抗體與補體組份、具體而言與C1q之結合。因此，亦可降低補體依賴性細胞毒性(CDC)。可實施C1q結合分析以確定抗體是否能夠結合C1q且因此具有CDC活性。例如，參見WO 2006/029879及WO 2005/100402中之C1q及C3c結合ELISA。爲了評價補體活化，可實施CDC分析(例如，參見Gazzano-Santoro等人，J Immunol Methods 202, 163 (1996)；Cragg等人，Blood 101, 1045-1052 (2003)；及Cragg及Glennie，Blood 103, 2738-2743 (2004))。

除上文及PCT公開案第WO 2012/130831號中所述之IgG類別抗體外，Fc受體結合及/或效應子功能減少之抗體亦包括彼等具有Fc區殘基238、265、269、270、297、327及329中一或多者之取代者(美國專利第6,737,056號)。此等Fc突變體包括在胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或更多者處具有取代之Fc突變體，包括殘基265及297取代成丙胺酸之所謂的「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

與IgG₁抗體相比，IgG₄子類抗體展現降低之對Fc受體之結合親和力及降低之效應子功能。因此，在一些實施例中，該包含在本發明融合蛋白中之IgG類別抗體係IgG₄子類抗體，特定而言爲人類IgG₄子類抗體。在一個實施例中，該IgG₄子類抗體包含Fc區中於S228位之胺基酸取代、具體而言胺基酸取代S228P。爲進一步降低其對Fc受體之結合親和力及/或其效應子功能，在一個實施例中，該IgG₄子類抗體包含L235位之胺基酸取代、具體而言胺基酸取代L235E。在另一實施例中，該IgG₄子類抗體包含P329位之胺基酸取代、具體而言胺基酸取代P329G。在特定實施例中，該IgG₄子類抗體包含S228、L235及P329之胺基酸取代，具體而言胺基酸取代S228P、L235E及P329G。此等經修

飾之IgG₄子類抗體及其Fc γ 受體結合性質闡述於PCT公開案第WO 2012/130831號中，該公開案之全文以引用方式併入本文中。

本發明抗體組合諸多對於(例如)治療應用特別有利之性質。

在一個實施例中，該IgG類別抗體能夠特異性結合至纖維母細胞活化蛋白(FAP)。已將FAP鑑別為使用本發明融合蛋白治療發炎性疾病之適宜靶標。在具體實施例中，當在25°C下藉由表面電漿共振(SPR)量測時，融合蛋白能夠以小於1 nM、特定而言小於100 pM之親和力常數(K_D)結合至FAP。量測SPR對FAP之結合親和力之方法闡述於本文中。在一個實施例中，在25°C下利用藉由共價偶合至GLM晶片之抗His抗體固定的帶His標籤之FAP抗原藉由SPR使用ProteOn XPR36儀器(Biorad)量測融合蛋白之親和力(K_D)。在實例性方法中，靶蛋白(FAP)係經由其H6-標籤由共價固定之抗五His IgG (Qiagen編號34660，小鼠單株抗體)來捕獲，藉由同時用1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺(EDC)與N-羥基琥珀醯亞胺(sNHS)之新製備混合物活化所有通道5 min且隨後經180 sec注射15 μ g/ml存於10 mM乙酸鈉緩衝液(pH 4.5)中之抗五His將該抗五His IgG以高量(至多約5.000 RU)以30 μ l/min固定至GLM晶片之單獨垂直通道上。使用5-min注射之乙醇胺封阻通道。經60 s沿垂直通道自5 μ g/ml存於運行緩衝液中之稀釋物以30 μ l/min捕獲帶His6標籤之FAP以達成介於約250 RU與600 RU之間之配體密度。在單次(one-shot)動力學分析設置(OSK)中，沿水平通道以100 μ l/min注射在50 nM至0.08 nM範圍內之5倍稀釋系列之融合蛋白作為分析物。締合期記錄持續180 s，解離期為600 s。在展現極緩慢離解速率之相互作用之情況下，離解速率之記錄延長至多1800 s以觀察複合物之解離。沿第6通道注射運行緩衝液(PBST)以提供參照用「線內」空白。使用簡單1:1 Langmuir結合模型(ProteOn Manager軟體2.1版)藉由同時擬合締合感測圖與解離感測圖來計算締合速率(k_{on})

及解離速率(k_{off})。平衡解離常數(K_D)計算為比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。

在一個實施例中，該FAP係人類、小鼠及/或食蟹獼猴FAP。較佳地，包含在本發明融合蛋白中之IgG類別抗體與人類及食蟹獼猴及/或小鼠FAP交叉反應，此使得能夠在人類使用前在食蟹獼猴及/或小鼠中進行(例如)活體內研究。

在具體實施例中，該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 37之重鏈CDR (HCDR) 1、SEQ ID NO: 41之HCDR 2、SEQ ID NO: 49之HCDR 3、SEQ ID NO: 53之輕鏈CDR (LCDR) 1、SEQ ID NO: 57之LCDR 2及SEQ ID NO: 61之LCDR 3。在甚至更具體之實施例中，該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 63之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 65之輕鏈可變區(VL)。在另一特定具體實施例中，該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 37之HCDR 1、SEQ ID NO: 43之HCDR 2、SEQ ID NO: 47之HCDR 3、SEQ ID NO: 51之LCDR 1、SEQ ID NO: 55之LCDR 2及SEQ ID NO: 59之LCDR 3。在甚至更具體之實施例中，該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 67之VH及SEQ ID NO: 69之VL。如實例中所示，該等抗體顯示對人類、小鼠以及食蟹獼猴FAP之特別強之結合親和力/親合力。

在其他具體實施例中，該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 39之HCDR 1、SEQ ID NO: 45之HCDR 2、SEQ ID NO: 49之HCDR 3、SEQ ID NO: 53之輕鏈CDR (LCDR) 1、SEQ ID NO: 57之LCDR 2及SEQ ID NO: 61之LCDR 3。在甚至更具體之實施例中，該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 71之VH及SEQ ID NO: 73之VL。在另一具體實施例中，該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 37之HCDR 1、SEQ ID NO: 41之HCDR 2、SEQ ID NO: 47之HCDR 3、SEQ ID NO: 51之LCDR 1、SEQ ID NO: 55之LCDR 2及SEQ ID NO: 59之LCDR 3。在甚至更具體之實施例中，該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 75之VH及SEQ ID NO: 77之

VL。

在一個實施例中，當在25℃下藉由SPR量測時，融合蛋白能夠以小於1 nM、尤其小於100 pM之親和力常數(K_D)結合至IL-10受體-1 (IL-10R1)。量測SPR對IL-10R1之結合親和力之方法闡述於本文中。在一個實施例中，在25℃下利用藉由中性抗生物素蛋白捕獲固定於NLC晶片上之生物素化IL-10R1藉由SPR使用ProteOn XPR36儀器(Biorad)量測融合蛋白之親和力(K_D)。在實例性方法中，經不同接觸時間在中性抗生物素蛋白衍生晶片矩陣上沿垂直通道以10 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度及30 $\mu\text{l/sec}$ 之流速捕獲介於400 RU與1600 RU之間之IL-10R1。藉由在水平定向上以100 $\mu\text{l/min}$ 注射以6個不同分析物濃度(50 nM、10 nM、2 nM、0.4 nM、0.08 nM、0 nM)來量測與生物素化IL10R1之結合，締合速率記錄持續180 s，解離速率持續600 s。沿第6通道注射運行緩衝液(PBST)以提供參照用「線內」空白。使用簡單1:1 Langmuir結合模型(ProteOn Manager軟體2.1版)藉由同時擬合締合感測圖與解離感測圖來計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。平衡解離常數(K_D)計算為比率 k_{off}/k_{on} 。

在具體實施例中，該IL-10R1係人類IL-10R1。在一個實施例中，當在25℃下藉由SPR量測時，該結合至IL-10R1之親和力常數(K_D)約等於或大於該結合至FAP之親和力常數(K_D)。在具體實施例中，該結合至IL-10R1之 K_D 大於該結合至FAP之 K_D 的約一半。本發明融合蛋白結合至FAP及IL-10R1之KD值之特定比例使其特別適於使IL-10有效靶向表現FAP之組織。不希望受限於理論，本發明融合蛋白因其對FAP之結合親和力至少與其對IL-10R1之結合親和力一樣高而不太可能在到達表現FAP之靶組織之前結合至靶組織外部(例如在循環中)之表現IL-10R1之細胞。

在特定態樣中，本發明提供人類IgG₁子類抗體與IL-10分子之融

合蛋白，該抗體能夠特異性結合至FAP且與無降低該抗體對Fc受體之結合親和力之修飾之相應人類IgG₁子類抗體相比包含該修飾，

其中融合蛋白包含兩條相同的重鏈多肽，各自包含在N端融合至人類IgG₁子類抗體重鏈之C端之天然IL-10單體；及兩條相同的輕鏈。

在具體實施例中，該融合蛋白包含與SEQ ID NO: 9之多肽至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的重鏈多肽及與SEQ ID NO: 7之多肽至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的輕鏈多肽。在另一具體實施例中，該融合蛋白包含與SEQ ID NO: 27之多肽至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的重鏈多肽及與SEQ ID NO: 25之多肽至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的輕鏈多肽。

在又一態樣中，本發明提供人類IgG₁子類抗體與IL-10分子之融合蛋白，該抗體能夠特異性結合至FAP且與無降低該抗體對Fc受體之結合親和力之修飾之相應人類IgG₁子類抗體相比包含該修飾，

其中融合蛋白包含兩條相同的重鏈多肽，各自包含在N端融合至人類IgG₁子類抗體重鏈之C端之經修飾IL-10單體；及兩條相同的輕鏈。

在具體實施例中，該融合蛋白包含與SEQ ID NO: 17之多肽至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的重鏈多肽及與SEQ ID NO: 7之多肽至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的輕鏈多肽。在另一具體實施例中，該融合蛋白包含與SEQ ID NO: 29之多肽至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的重鏈多肽及與SEQ ID NO: 25之多肽至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的輕鏈多肽。

聚核苷酸

本發明進一步提供編碼如本文所述融合物或其抗原結合片段之聚核苷酸。

本發明之聚核苷酸包括彼等與SEQ ID NO 2、6、8、10、18、26、28、30、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78及89 (包含其功能片段或變體) 中所示序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致者。

本發明之編碼融合蛋白之聚核苷酸可表示為編碼整個融合蛋白之單一聚核苷酸或表示為多個(例如，兩個或更多個)共表現之聚核苷酸。由共表現之聚核苷酸編碼之多肽可經由(例如)二硫鍵或其他手段締合以形成功能融合蛋白。例如，抗體之輕鏈部分可由不同於抗體之重鏈部分的單獨聚核苷酸編碼。在共表現時，重鏈多肽會與輕鏈多肽締合形成抗體。

在一個實施例中，本發明係關於編碼IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白或其抗原結合片段之聚核苷酸，其中該聚核苷酸包含編碼如SEQ ID NO 63、65、67、69、71、73、75或77中所示可變區序列之序列。在另一實施例中，本發明係關於編碼IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白或其片段之聚核苷酸，其中該聚核苷酸包含編碼如SEQ ID NO 7、9、17、25、27或29中所示多肽序列之序列。在另一實施例中，本發明進一步係關於編碼IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白或其片段之聚核苷酸，其中該聚核苷酸包含與SEQ ID NO 2、6、8、10、18、26、28、30、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78或89中所示核酸序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之序列。在另一實施例中，本發明係關於編碼IgG類別抗體與IL-10分子之

融合蛋白或其片段之聚核苷酸，其中該聚核苷酸包含SEQ ID NO 2、6、8、10、18、26、28、30、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78或89中所示之核酸序列。在另一實施例中，本發明係關於編碼IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白或其片段之聚核苷酸，其中該聚核苷酸包含編碼與SEQ ID NO 63、65、67、69、71、73、75或77之胺基酸序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之可變區序列的序列。在另一實施例中，本發明係關於編碼IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白或其片段之聚核苷酸，其中該聚核苷酸包含編碼與SEQ ID NO 7、9、17、25、27或29之胺基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之多肽序列之序列。本發明涵蓋編碼IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白或其片段之聚核苷酸，其中該聚核苷酸包含編碼具有保守胺基酸取代之SEQ ID NO 63、65、67、69、71、73、75或77之可變區序列之序列。本發明亦涵蓋編碼IgG類別抗體及IL-10分子之融合蛋白或其片段之聚核苷酸，其中該聚核苷酸包含編碼具有保守胺基酸取代之SEQ ID NO 7、9、17、25、27或29之多肽序列之序列。

在某些實施例中，聚核苷酸或核酸係DNA。在其他實施例中，本發明之聚核苷酸係(例如)呈信使RNA (mRNA)形式之RNA。本發明之RNA可為單鏈或雙鏈。

重組方法

本發明融合蛋白可藉由(例如)固態肽合成(例如Merrifield固相合成)或重組產生獲得。對於重組產生而言，將一或多個(例如)如上所述編碼融合蛋白(片段)之聚核苷酸分離並插入至一或多個載體中以便在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。此聚核苷酸可容易地使用習用程序分離並定序。在一個實施例中，提供包含本發明之一或多個聚核苷酸

之載體、較佳地表現載體。可使用彼等熟習此項技術者熟知之方法來構築含有融合蛋白(片段)之編碼序列以及適當轉錄/轉譯控制信號之表現載體。該等方法包括活體外重組DNA技術、合成技術及活體內重組/遺傳重組。例如，參見闡述於以下文獻中之技術：Maniatis等人，MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) 及 Ausubel 等人，CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989)。表現載體可為質粒、病毒之一部分，或可為核酸片段。表現載體包括表現盒，在該表現盒中，編碼融合蛋白(片段)之聚核苷酸(即編碼區)經選殖與啟動子及/或其他轉錄或轉譯控制元件可操作締合。本文所用「編碼區」係一部分由轉譯成胺基酸之密碼子組成之核酸。儘管「終止密碼子」(TAG、TGA或TAA)並不轉譯成胺基酸，但其可視為編碼區之一部分(若存在)，但任一毗鄰序列(例如啟動子、核糖體結合位點、轉錄終止子、內含子、5'及3'非轉譯區及諸如此類)並非編碼區之一部分。兩個或更多個編碼區可存在於單一聚核苷酸構築體中(例如在單一載體上)或單獨聚核苷酸構築體中(例如在單獨(不同)載體上)。此外，任一載體皆可含有單一編碼區，或可包含兩個或更多個編碼區，例如，本發明載體可編碼一或多個多肽，該一或多個多肽以後轉譯或共轉譯方式經由蛋白水解裂解分離成最終蛋白質。另外，本發明之載體、聚核苷酸或核酸可編碼異源性編碼區，該等異源性編碼區融合或未融合至編碼本發明之融合蛋白(片段)或其變體或衍生物之聚核苷酸。異源性編碼區包括(但不限於)特化元件或基序，例如分泌信號肽或異源性功能結構域。可操作締合係如下情形：以將基因產物之表現置於調節序列之影響或控制下之方式使基因產物(例如多肽)之編碼區與一或多個調節序列締合。兩個DNA片段(例如多肽編碼區及與其有關之啟動子)在以下

情形下「可操作締合」：誘導啓動子功能會引起編碼期望基因產物之 mRNA 之轉錄，且兩個 DNA 片段間之連接性質並不干擾表現調節序列引導基因產物表現之能力或干擾 DNA 模板轉錄之能力。因此，若啓動子能夠實現編碼多肽之核酸之轉錄，則啓動子區與該核酸可操作地締合。啓動子可爲僅在預定細胞中引導 DNA 之實質性轉錄之細胞特異性啓動子。除啓動子外，其他轉錄控制元件(例如增強子、操縱子、抑制子及轉錄終止子信號)可與聚核苷酸可操作地締合以引導細胞特異性轉錄。適宜啓動子及其他轉錄控制區揭示於本文中。各種轉錄控制區已爲彼等熟習此項技術者已知。該等轉錄控制區包括(但不限於)在脊椎動物細胞中發揮作用之轉錄控制區，例如但不限於來自巨細胞病毒(例如立即早期啓動子，與內含子-A連結)、猿猴病毒 40(例如早期啓動子)及反轉錄病毒(例如 Rous 肉瘤病毒)之啓動子及增強子區段。其他轉錄控制區包括彼等衍生自脊椎動物基因(例如肌動蛋白、熱激蛋白、牛生長激素及兔 β 珠蛋白)者、以及能夠控制真核細胞中之基因表現之其他序列。其他適宜轉錄控制區包括組織特異性啓動子及增強子以及誘導型啓動子(例如四環素誘導型啓動子)。類似地，各種轉譯控制元件已爲彼等熟習此項技術者已知。該等轉譯控制元件包括(但不限於)核糖體結合位點、轉譯起始及終止密碼子及衍生自病毒系統之元件(特定而言內核糖體進入位點或 IRES，亦稱爲 CITE 序列)。表現序列盒亦可包括其他特徵，例如複製起點及/或染色體整合元件(例如反轉錄病毒長末端重複(LTR)或腺相關病毒(AAV)反轉末端重複(ITR))。

本發明之聚核苷酸及核酸編碼區可與編碼分泌或信號肽(其引導由本發明之聚核苷酸編碼之多肽之分泌)之其他編碼區締合。例如，若期望融合物之分泌，則編碼信號序列之 DNA 可置於編碼本發明融合蛋白或其片段之核酸上游。根據信號假說，由哺乳動物細胞分泌之蛋白質具有信號肽或分泌前導序列，一旦開始穿過粗糙內質網輸出生長

蛋白鏈，則該信號肽或分泌前導序列自成熟蛋白質裂解。彼等熟習此項技術者應瞭解，由脊椎動物細胞分泌之多肽通常具有融合至多肽之N端之信號肽，該信號肽自轉譯之多肽裂解而產生分泌或「成熟」形式之多肽。在某些實施例中，使用天然信號肽(例如免疫球蛋白重鏈或輕鏈信號肽)，或該序列之功能衍生物，該功能衍生物保留引導與其可操作地締合之多肽之分泌的能力。另一選擇為，可使用異源性哺乳動物信號肽或其功能衍生物。例如，野生型前導序列可經人類組織纖維蛋白溶酶原活化劑(TPA)或小鼠 β 葡萄糖苷酸酶之前導序列取代。實例性分泌信號肽之胺基酸及核苷酸序列分別示於SEQ ID NO 35及36中。

在編碼融合蛋白(片段)之聚核苷酸之內部或末端處可包括編碼短蛋白質序列之DNA，該短蛋白質序列可用於促進後續純化(例如組胺酸標籤)或有助於標記融合蛋白。

在又一實施例中，提供包含本發明一或多個聚核苷酸之宿主細胞。在某些實施例中，提供包含本發明一或多個載體之宿主細胞。聚核苷酸及載體可單獨或組合納入任一本文所述分別與聚核苷酸及載體有關之特徵。在一個此類實施例中，宿主細胞包含含有編碼(一部分)本發明融合蛋白之聚核苷酸之載體(例如已經其轉化或轉染)。本文所用術語「宿主細胞」係指可經改造而生成本發明融合蛋白或其片段之任一類細胞系統。適於複製融合蛋白並支持其表現之宿主細胞為業內所熟知。此等細胞可視需要經特定表現載體轉染或轉導，且可生長大量含有載體之細胞用於接種大規模發酵器以獲得足量用於臨床應用之融合蛋白。適宜宿主細胞包括原核微生物(例如大腸桿菌)或各種真核細胞(例如中國倉鼠卵巢細胞(CHO)、昆蟲細胞或諸如此類)。例如，多肽可在細菌中產生，特定而言在不需要糖基化時產生。表現後，可以可溶性部分形式自細菌細胞膏糊分離多肽且可進一步純化。除原核

生物外，真核微生物(例如絲狀真菌或酵母)係用於編碼多肽之載體之適宜選殖或表現宿主，包括糖基化途徑已「人類化」從而產生具有部分地或完全人類糖基化模式之多肽之真菌及酵母菌株。參見 Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004)及Li等人，Nat Biotech 24, 210-215 (2006)。用於表現(糖基化)多肽之適宜宿主細胞亦源自多細胞有機體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出可結合昆蟲細胞一起使用、特定而言用於轉染草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)細胞之諸多桿狀病毒株。亦可利用植物細胞培養物作為宿主。例如，參見美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(闡述用於在轉基因植物中產生抗體之PLANTIBODIES™技術)。亦可使用脊椎動物細胞作為宿主。例如，可使用適於懸浮生長之哺乳動物細胞系。有用哺乳動物宿主細胞系之其他實例係經SV40 (COS-7)轉化之猴腎CV1細胞系、人類胚腎細胞系(293或293T細胞，如(例如) Graham等人，J Gen Virol 36, 59 (1977)中所述)、幼倉鼠腎細胞(BHK)、小鼠支持細胞(TM4細胞，如(例如) Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)中所述)、猴腎細胞(CV1)、非洲綠猴腎細胞(VERO-76)、人類子宮頸上皮癌細胞(HELA)、犬腎細胞(MDCK)、布法羅大鼠(buffalo rat)肝細胞(BRL 3A)、人類肺細胞(W138)、人類肝細胞(Hep G2)、小鼠乳房腫瘤細胞(MMT 060562)、TRI細胞(如(例如)Mather等人，Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)中所述)、MRC 5細胞及FS4細胞。其他有用哺乳動物宿主細胞系包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括dhfr⁻ CHO細胞(Urlaub等人，Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980))；及骨髓瘤細胞系，例如YO、NS0、P3X63及Sp2/0。關於適於蛋白質產生之某些哺乳動物宿主細胞系之綜述，例如參見Yazaki及Wu，Methods in Molecular Biology，第248卷(B.K.C. Lo編輯，Humana Press, Totowa,

NJ)，第255-268頁(2003)。宿主細胞包括培養細胞(僅舉幾個為例，例如哺乳動物培養細胞、酵母細胞、昆蟲細胞、細菌細胞及植物細胞)，但亦包括包含於轉基因動物、轉基因植物或培養植物或動物組織內之細胞。在一個實施例中，宿主細胞係真核細胞，較佳為哺乳動物細胞，例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、人類胚胎腎(HEK)細胞或淋巴細胞(例如，Y0、NS0、Sp20細胞)。

業內已知在該等系統中表現外源基因之標準技術。表現包含抗體之重鏈或輕鏈之多肽之細胞可經改造，從而亦表現另一抗體鏈，以使得表現產物係具有重鏈與輕鏈二者之抗體。

在一個實施例中，提供產生本發明融合蛋白之方法，其中該方法包含在適於表現融合蛋白之條件下培養包含編碼如本文所提供融合蛋白之聚核苷酸之宿主細胞，及自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收融合蛋白。

在本發明融合蛋白中，組份(IgG類別抗體及IL-10分子)以遺傳方式彼此融合。融合蛋白可經設計以使得其組份直接或經由連接體序列間接彼此融合。連接體之組成及長度可根據業內熟知之方法確定且可測試其功效。若需要，亦可包括其他序列以納入裂解位點從而分離融合蛋白之個別組份，例如內肽酶識別序列。

在某些實施例中，本發明融合蛋白至少包含能夠結合至諸如FAP等抗原之抗體可變區。可變區可形成天然或非天然抗體及其片段之一部分並衍生自該等天然或非天然抗體及其片段。產生多株抗體及單株抗體之方法為業內所熟知(例如，參見Harlow及Lane，「Antibodies, a laboratory manual」，Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。非天然抗體可使用固相肽合成來構築，可以重組方式產生(例如，如美國專利第4,186,567號中所述)或可藉由(例如)篩選包含可變重鏈及可變輕鏈之組合文庫獲得(例如，參見頒予McCafferty之美國專利第5,969,108

號)。

任何動物物種之抗體皆可用於本發明。可用於本發明之非限制抗體可具有鼠類、靈長類動物或人類來源。若意欲將抗體用於人類用途，則可使用嵌合形式之抗體，其中該抗體之恆定區係來自人類。人類化或完全人類形式之抗體亦可根據業內熟知之方法來製備(例如，參見頒予 Winter 之美國專利第 5,565,332 號)。可藉由各種方法來達成人類化，包括(但不限於) (a) 將非人類(例如，供體抗體)CDR 移植至保留或不保留關鍵性框架殘基之人類(例如接受者抗體)框架及恆定區(例如彼等對於保留良好抗原結合親和力或抗體功能較為重要者)，(b) 僅將非人類特異性決定區(SDR 或 a-CDR；對於抗體-抗原相互作用較為關鍵之殘基)移植至人類框架及恆定區上，或(c) 移植整個非人類可變結構域，但使用人類樣部分藉由代替表面殘基將其「覆蓋」。人類化抗體及其製備方法綜述於(例如) Almagro 及 Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008) 中，且進一步闡述於(例如)以下文獻中：Riechmann 等人，*Nature* 332, 323-329 (1988)；Queen 等人，*Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989)；美國專利第 5,821,337 號、第 7,527,791 號、第 6,982,321 號及第 7,087,409 號；Jones 等人，*Nature* 321, 522-525 (1986)；Morrison 等人，*Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984)；Morrison 及 Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988)；Verhoeyen 等人，*Science* 239, 1534-1536 (1988)；Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994)；Kashmiri 等人，*Methods* 36, 25-34 (2005)(闡述 SDR (a-CDR) 移植)；Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991)(闡述「表面重修」)；Dall'Acqua 等人，*Methods* 36, 43-60 (2005)(闡述「FR 重排」)；及 Osbourn 等人，*Methods* 36, 61-68 (2005) 及 Klimka 等人，*Br J Cancer* 83, 252-260 (2000)(闡述 FR 重排之「引導選擇」方式)。本發明之特定抗體係人類抗體。可使用業內已知之各

種技術產生人類抗體及人類可變區。人類抗體概述於van Dijk及van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001)及Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008)中。人類可變區可形成藉由雜交瘤方法製得之人類單株抗體之一部分並衍生自該等人類單株抗體(例如, 參見單株抗體 *Production Techniques and Applications*, 第51-63頁 (Marcel Dekker公司, New York, 1987))。亦可藉由以下方式來製備人類抗體及人類可變區: 將免疫原投與已進行修飾而因應抗原激發產生具有人類可變區之完整人類抗體或完整抗體之轉基因動物(例如, 參見Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005))。亦可藉由分離選自人類源噬菌體展示文庫之Fv純系可變區序列來生成人類抗體及人類可變區(例如, 參見Hoogenboom等人, *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien等人編輯, Human Press, Totowa, NJ, 2001); 及McCafferty等人, *Nature* 348, 552-554; Clackson等人, *Nature* 352, 624-628 (1991))。噬菌體通常展示呈單鏈Fv (scFv)片段或Fab片段形式之抗體片段。藉由噬菌體展示製備抗體之詳細說明可發現於附於WO 2012/020006中之實例, 該案件之全文以引用方式併入本文中。

在某些實施例中, 根據(例如) PCT公開案WO 2012/020006 (參見與親和力成熟相關之實例)或美國專利申請公開案第2004/0132066號(其全部內容以引用方式併入本文中)中所揭示之方法, 改造包含於本發明融合蛋白中之抗體以具有增強之結合親和力。可經由酶聯免疫吸附分析(ELISA)或熟習此項技術者熟悉之其他技術(例如表面電漿共振技術(Liljeblad等人, *Glyco J* 17, 323-329 (2000))及傳統結合分析(Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)))來量測本發明抗體結合至特异性抗原決定簇之能力。可使用競爭分析來鑑別與參照抗體競爭結合至特定抗原之抗體, 例如與4G8抗體競爭結合至FAP之抗體。在某些實施例中, 此一競爭抗體結合至由參照抗體結合之相同表位(例如線

性或構象表位)。對抗體所結合表位作圖之詳細實例性方法提供於 Morris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」, Methods in Molecular Biology, 第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中。在實例性競爭分析中, 將固定抗原(例如FAP)在包含如下抗體之溶液中培育: 結合至抗原之第一經標記抗體(例如4G8抗體)及第二未經標記抗體(測試其與第一抗體競爭結合至抗原之能力)。第二抗體可存在於雜交瘤上清液中。作為對照, 將固定抗原在包含第一標記抗體但不包含第二未經標記抗體之溶液中培育。在允許第一抗體與抗原結合之條件下培育後, 去除過量之未結合抗體, 且量測與固定抗原締合之標記之量。若與固定抗原締合之標記之量相對於對照試樣在測試試樣中實質上減小, 則此指示第二抗體與第一抗體競爭結合至抗原。參見 Harlow 及 Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

可藉由業內已知之技術來純化如本文所述之融合蛋白, 例如高效液相層析、離子交換層析、凝膠電泳、親和層析、尺寸排除層析及諸如此類。用於純化特定蛋白質之實際條件將部分地取決於諸如靜電荷、疏水性、親水性等因素, 且將為彼等熟習此項技術者所明瞭。對於親和層析純化而言, 可使用結合融合蛋白之抗體、配體、受體或抗原。例如, 對於本發明融合蛋白之親和層析純化而言, 可使用具有蛋白質A或蛋白質G之基質。可基本上如實例中所述依序使用蛋白質A或G親和層析及尺寸排除層析來分離融合蛋白。可藉由各種熟知分析方法中之任一者來測定融合蛋白之純度, 包括凝膠電泳、高壓液相層析及諸如此類。例如, 如實例中所述表現之融合蛋白顯示為完整蛋白質且經適當組裝, 如藉由非還原SDS-PAGE所證實(例如, 參見圖2、5)。

組合物、調配物及投與途徑

在又一態樣中，本發明提供(例如)用於任一下文治療方法中之醫藥組合物，其包含任一本文所提供之融合蛋白。在一個實施例中，醫藥組合物包含任一本文所提供之融合蛋白及醫藥上可接受之載劑。在另一實施例中，醫藥組合物包含任一本文所提供之融合蛋白及至少一種其他治療劑，例如，如下文所述。

進一步提供產生呈適於活體內投與之形式之本發明融合蛋白的方法，該方法包含(a)獲得本發明融合蛋白，及(b)用至少一種醫藥上可接受之載劑調配該融合蛋白，其中調配融合蛋白製劑以供活體內投與。

本發明之醫藥組合物包含治療有效量之一或多種溶解或分散於醫藥上可接受之載劑中之融合蛋白。片語「醫藥或藥理學可接受」係指如下分子實體及組合物：在視需要投與諸如人類等動物時在所用劑量及濃度下通常對接受者無毒，即不產生不良、過敏或其他不適反應。彼等熟習此項技術者根據本揭示內容已知含有至少一種融合蛋白及視情況其他活性成份之醫藥組合物之製備，如由 Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，Mack Printing公司，1990 (以引用方式併入本文中)所例示。此外，對於動物(例如，人類)投與而言，應理解，製劑應滿足FDA Office of Biological Standards或其他國家中之相應當局所要求之無菌性、致熱原性、一般安全性及純度標準。較佳組合物係凍乾之調配物或水溶液。本文所用「醫藥上可接受之載劑」包括如熟習此項技術者已知之任一及所有溶劑、緩衝劑、分散介質、包衣、表面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如，抗細菌劑、抗真菌劑)、等滲劑、吸收延遲劑、鹽、防腐劑、抗氧化劑、蛋白質、藥物、藥物穩定劑、聚合物、凝膠、結合劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、矯味劑、染料、此等類似材料及其組合(例如，參見 Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版Mack Printing公司，

1990，第1289-1329頁，以引用方式併入本文中)。除任何與活性成份不相容之習用載劑外，本發明涵蓋其於治療或醫藥組合物中之用途。

組合物可包含不同類型之載劑，此取決於其欲以固體、液體抑或氣溶膠形式投與、及其是否需要無菌來以注射形式用於此等投與途徑。本發明融合蛋白(及任一其他治療劑)可以熟習此項技術者已知之以下方式投與：靜脈內、皮內、動脈內、腹膜內、*病灶內*、顱內、關節內、前列腺內、脾內、腎內、胸膜內、氣管內、鼻內、玻璃體內、陰道內、直腸內、瘤內、肌內、腹膜內、皮下、結膜下、囊內、黏膜、心包內、臍內、眼內、經口、局部(topically、locally)、藉由吸入(例如氣溶膠吸入)、注射、輸注、連續輸注、直接局部灌注浸浴靶細胞、經由導管、經由灌洗、乳霜、脂質組合物(例如脂質體)或藉由其他方法或上述方法之任一組合(例如，參見 Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，Mack Printing公司，1990，其以引用方式併入本文中)。非經腸投與、特定而言靜脈內注射最常用於投與諸如本發明融合蛋白等多肽分子。

非經腸組合物包括彼等經設計用於藉由注射投與者，例如皮下、皮內、*病灶內*、靜脈內、動脈內、肌內、鞘內或腹膜內注射。對於注射而言，本發明融合蛋白可在水溶液中調配，較佳在諸如漢克氏溶液(Hanks' solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理鹽水緩衝液等生理相容性緩衝液中調配。該溶液可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑等調配劑。另一選擇為，融合蛋白可呈粉末形式，在使用前使用適宜媒劑(例如無菌無熱原水)構成。藉由將所需量之本發明融合蛋白與(視需要)下文列枚舉之各種其他成份一起納入適當溶劑中來製備無菌可注射溶液。可容易地藉由(例如)經由無菌過濾膜過濾來達成無菌性。通常，分散液係藉由將各種經滅菌活性成份納入含有基本

分散介質及/或其他成份之無菌媒劑中來製備。在用於製備無菌可注射溶液、懸浮液或乳液之無菌粉末之情況下，較佳製備方法為真空乾燥或冷凍乾燥技術，其由先前經無菌過濾之液體介質產生活性成份及任何其他所欲成份之粉末。液體介質若需要應經適當緩衝且液體稀釋劑在注射之前首先使用足夠鹽水或葡萄糖調節為等滲。組合物必須在製造及存儲條件下穩定，且必須防止諸如細菌及真菌等微生物之污染作用。應瞭解，內毒素污染應最低限制地保持在安全量，例如小於 0.5 ng/mg 蛋白質。醫藥上可接受之適宜載劑包括(但不限於)：緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包含抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲雙銨；氯苄烷銨；氯化苯銨松寧(benzethonium chloride)；苯酚；丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、二糖及其他碳水化合物，包含葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，例如EDTA；糖，例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨醇；鹽形成抗衡離子，例如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子型表面活性劑，例如聚乙二醇(PEG)。水性注射懸浮液可含有增加懸浮液黏度之化合物，例如羧甲基纖維素鈉、山梨醇、右旋糖酐或諸如此類。視情況，懸浮液亦可含有適宜穩定劑或增加該等化合物之溶解性之試劑，從而能夠製備高濃縮溶液。另外，活性化合物之懸浮液可製備成適當之油性注射懸浮液。適宜之親脂性溶劑或媒劑包括脂肪油(例如芝麻油)或合成脂肪酸酯(例如油酸乙酯或甘油三酯)或脂質體。

活性成份可包埋於藉由(例如)凝聚技術或藉由界面聚合製得之微

膠囊中，例如，羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊，該等微膠囊分別呈膠體藥物遞送系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)或粗滴乳液形式。此等技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版，Mack Printing公司，1990)中。可製備緩釋製劑。緩釋製劑之適宜實例包括含有多肽之固體疏水性聚合物之半滲透性基質，該等基質係呈成形物件形式，例如膜或微膠囊。在特定實施例中，可藉由在組合物中使用延遲吸收之試劑(例如，單硬脂酸鋁、明膠或其組合)來延長可注射組合物之吸收。

除上述組合物外，融合蛋白亦可調配成儲積製劑。此等長效調配物可藉由植入(例如，經皮下或肌內)或藉由肌內注射投與。因此，例如，融合蛋白可使用適宜聚合或疏水性材料(例如作為存於可接受油中之乳液)或離子交換樹脂調配，或作為微溶衍生物(例如，作為微溶鹽)。

可藉助習用混合、溶解、乳化、囊封、包埋或凍乾過程來製造包含本發明融合蛋白之醫藥組合物。醫藥組合物可以習用方式使用一或多種生理上可接受且有利於將蛋白質處理成可用於醫藥之製劑的載劑、稀釋劑、賦形劑或輔助劑加以調配。適當調配物端視所選投與途徑而定。

融合蛋白可調配成游離酸或鹼、中性或鹽形式之組合物。醫藥上可接受之鹽係實質上保留游離酸或鹼之生物學活性之鹽。該等鹽包括酸加成鹽，例如，彼等使用蛋白組合物之游離胺基形成者，或使用無機酸(例如，鹽酸或磷酸)或有機酸(例如，乙酸、草酸、酒石酸或苦杏仁酸)形成者。使用游離羧基形成之鹽亦可衍生自諸如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵等無機鹼或諸如異丙胺、三甲胺、組胺酸或普魯卡因(procaine)等有機鹼。醫藥鹽往往較相應

游離鹼形式更易溶於水性及其他質子溶劑中。

治療方法及組合物

本文所提供之任何融合蛋白皆可用於治療方法中。

為用於治療方法中，以與良好醫學實踐一致之方式來調配、給予及投與本發明融合蛋白。在此方面，需考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個體患者之臨床病況、病症起因、藥劑之遞送部位、投與方法、投與時間安排及從業醫師已知之其他因素。

在一個態樣中，提供用作藥劑之本發明融合蛋白。在其他態樣中，提供用於治療疾病之本發明融合蛋白。在某些實施例中，提供用於治療方法中之本發明融合蛋白。在一個實施例中，本發明提供用於為有此需要之個體治療疾病之本文所述的融合蛋白。在某些實施例中，本發明提供用於治療患有疾病之個體之方法的融合蛋白，該方法包含向該個體投與治療有效量之融合蛋白。在某些實施例中，欲治療疾病係發炎性疾病。實例性發炎性疾病包括發炎性腸病(例如克隆氏病或潰瘍性結腸炎)及類風濕性關節炎。在特定實施例中，該疾病係發炎性腸病或類風濕性關節炎，特定而言為發炎性腸病，更特定而言為克隆氏病或潰瘍性結腸炎。在某些實施例中，該方法進一步包含向該個體投與治療有效量之至少一種其他治療劑，例如，若該欲治療疾病係發炎性疾病，則該其他治療劑為抗炎劑。根據任一上述實施例，「個體」係哺乳動物，較佳為人類。

在又一態樣中，本發明提供本發明融合蛋白在製造或製備藥劑中之用途，該藥劑用於為有此需要之個體治療疾病。在一個實施例中，該藥劑用於治療疾病之方法中，該方法包含向患有疾病之個體投與治療有效量之藥劑。在某些實施例中，欲治療疾病係發炎性疾病。在特定實施例中，該疾病係發炎性腸病或類風濕性關節炎，特定而言

為發炎性腸病，更特定而言為克隆氏病或潰瘍性結腸炎。在一個實施例中，該方法進一步包含向該個體投與治療有效量之至少一種其他治療劑，例如，若該欲治療疾病係發炎性疾病，則該其他治療劑為抗炎劑。根據任一上述實施例，「個體」可為哺乳動物，較佳為人類。

在又一態樣中，本發明提供治療個體之疾病之方法，該方法包含向該個體投與治療有效量之本發明融合蛋白。在一個實施例中，向該個體投與包含呈醫藥上可接受形式之本發明融合蛋白之組合物。在某些實施例中，欲治療疾病係發炎性疾病。在特定實施例中，該疾病係發炎性腸病或類風濕性關節炎，特定而言為發炎性腸病，更特定而言為克隆氏病或潰瘍性結腸炎。在某些實施例中，該方法進一步包含向該個體投與治療有效量之至少一種其他治療劑，例如，若該欲治療疾病係發炎性疾病，則該其他治療劑為抗炎劑。根據任一上述實施例，「個體」可為哺乳動物，較佳為人類。

本發明融合蛋白亦可用作診斷試劑。融合蛋白與抗原決定簇之結合可容易地藉由(例如)藉由附接至融合蛋白之標記或藉由使用對本發明融合蛋白具有特異性之經標記二級抗體來檢測。

在一些實施例中，向細胞投與有效量之本發明融合蛋白。在其他實施例中，向個體投與治療有效量之本發明融合蛋白用於治療疾病。

為預防或治療疾病，本發明融合蛋白之適當劑量(在單獨使用或與一或多種其他治療劑組合使用時)將取決於以下因素：欲治療疾病之類型、投與途徑、患者之體重、融合蛋白之類型、疾病之嚴重程度及進程、投與融合蛋白係用於預防目的抑或治療目的、先前或同時之治療干預、患者之臨床史及對融合蛋白之反應以及主治醫師之決定。在任一情形下，負責投與之從業者將決定組合物中活性成份之濃度及用於個別個體之適當劑量。本文涵蓋各種給予方案，包括(但不限於)

單一投與或在各個時間點多次投與、濃注投與及脈衝輸注。

融合蛋白適於一次性地或經一系列治療投與患者。端視疾病之類型及嚴重程度而定，無論藉由(例如)一或多次分開投與抑或藉由連續輸注，投與患者之融合蛋白之初始候選劑量為約1 $\mu\text{g/kg}$ 至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg - 10 mg/kg)。端視上文所提及之因素而定，一種典型日劑量可在約1 $\mu\text{g/kg}$ 至100 mg/kg 或更高範圍內。經若干天或更長時間重複投與時，端視病況而定，治療通常持續直至對疾病症狀之期望抑制出現為止。融合蛋白之一個實例性劑量在約0.005 mg/kg 至約10 mg/kg 範圍中。在其他非限制性實例中，每次投與之劑量亦可包含約1 $\mu\text{g/kg/體重}$ 、約5 $\mu\text{g/kg/體重}$ 、約10 $\mu\text{g/kg/體重}$ 、約50 $\mu\text{g/kg/體重}$ 、約100 $\mu\text{g/kg/體重}$ 、約200 $\mu\text{g/kg/體重}$ 、約350 $\mu\text{g/kg/體重}$ 、約500 $\mu\text{g/kg/體重}$ 、約1 mg/kg/體重 、約5 mg/kg/體重 、約10 mg/kg/體重 、約50 mg/kg/體重 、約100 mg/kg/體重 、約200 mg/kg/體重 、約350 mg/kg/體重 、約500 mg/kg/體重 至約1000 mg/kg/體重 或更高及其中可導出之任一範圍。在來自本文所列示數值之可導出範圍之非限制性實例中，基於上述數值，可投與約5 mg/kg/體重 至約100 mg/kg/體重 、約5 $\mu\text{g/kg/體重}$ 至約500 mg/kg/體重 等之範圍。因此，可向患者投與一或多個約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、5.0 mg/kg 或10 mg/kg (或其任一組合)之劑量。此等劑量可間歇性地投與，例如每週一次或每三週一次(例如，以使患者接受約兩個至約二十個或(例如)約六個劑量之融合蛋白)。可先投與較高負荷劑量，隨後投與一或多個較低劑量。然而，可使用其他劑量方案。此療法之進展可容易地藉由習用技術及分析來監測。

本發明融合蛋白通常將以有效達成預期目的之量使用。為用於治療或預防病況，本發明融合蛋白或其醫藥組合物係以治療有效量投與或施用。治療有效量之確定為彼等熟習此項技術者所熟知，尤其可根據本文所提供之詳細揭示內容確定。

對於全身性投與而言，最初可自活體外分析(例如細胞培養物分析)來估計治療有效劑量。然後可將劑量調配用於動物模型中以達成循環濃度範圍，該循環濃度範圍包括在細胞培養物中測定之 IC_{50} 。此資訊可用於更準確地確定用於人類之劑量。

亦可自活體內數據(例如，動物模型)使用業內熟知之技術來估計初始劑量。熟習此項技術者可容易地基於動物數據來最佳化在人類中之投與。

可個別地調節劑量及間隔以提供足以維持治療效應之融合蛋白之血漿濃度。用於藉由注射投與之常用患者劑量在約0.1 mg/kg/日至50 mg/kg/日、通常約0.5 mg/kg/日至1 mg/kg/日範圍內。可藉由每天投與多個劑量來達成治療有效之血漿濃度。可藉由(例如) HPLC來量測血漿濃度。

在局部投與或選擇性吸收之情況下，融合蛋白之有效局部濃度可能與血漿濃度無關。熟習此項技術者無需過多實驗即能夠取得最佳之治療有效之局部劑量。

治療有效劑量之本文所述融合蛋白通常將提供治療益處，而不會引起實質毒性。融合蛋白之毒性及治療功效可藉由標準醫藥程序在細胞培養物或實驗動物中測定。可使用細胞培養分析及動物研究來測定 LD_{50} (致死50%群體之劑量)及 ED_{50} (對50%群體治療有效之劑量)。毒性及治療效應之間之劑量比率即為治療指數，其可表示為比率 LD_{50}/ED_{50} 。以展現大治療指數之融合蛋白較佳。在一個實施例中，本發明融合蛋白展現高治療指數。自細胞培養分析及動物研究獲得之數據可用於調配適用於人類之劑量範圍。該劑量較佳地在具有極低毒性或無毒性之循環濃度(包含 ED_{50})的範圍內。該劑量端視例如以下各種要素可在此範圍內變化：所用劑型、所用投與途徑、個體之身體狀況及諸如此類。確切調配物、投與途徑及劑量可由個別醫師根據患者

狀況來選擇(例如，參見Fingl等人，1975，*The Pharmacological Basis of Therapeutics*，第1章，第1頁，其全文以引用方式併入本文中)。

使用本發明融合蛋白治療患者之主治醫師會知曉因毒性、器官功能障礙及諸如此類而終止、間斷或調節投與之方式及時間。反之，若臨床反應不夠(排除毒性反應)，則主治醫師亦應知曉調節治療至更高程度。在所關注病症之管控中，所投與劑量之數量級應隨欲治療病況之嚴重程度、投與途徑及諸如此類而變化。例如，病況之嚴重程度可部分藉由標準預後評估方法來評估。此外，該劑量且(可能)劑量頻率亦應根據個體患者之年齡、體重及反應而變化。

其他藥劑及治療

本發明融合蛋白可於療法中與一或多種其他藥劑組合投與。例如，本發明融合蛋白可與至少一種其他治療劑共同投與。術語「治療劑」涵蓋投與用以治療需要治療之個體之症狀或疾病之任一藥劑。此其他治療劑可包含適用於所治療特定指徵之任一活性成份，較佳為彼等具有不會不利地彼此影響之互補活性者。在某些實施例中，其他治療劑係抗炎劑。

此等其他藥劑適於以對所欲有效之量以組合形式存在。此等其他藥劑之有效量取決於所用融合蛋白之量、病症或治療之類型及上文論述之其他因素。通常以與本文所述相同之劑量及投與途徑或以本文所述劑量之約1%至99%或以根據經驗/在臨床上確定為適當之任一劑量及任一途徑來使用融合蛋白。

上文提及之此等組合療法涵蓋組合投與(其中兩種或更多種治療劑包括於相同或分開之組合物中)及分開投與(在此情況下，本發明融合蛋白之投與可在投與其他治療劑及/或佐劑之前、同時及/或之後進行)。

製品

在本發明之另一態樣中，提供含有用於治療、預防及/或診斷上述病症之材料之製品。該製品包括容器及位於該容器上或與該容器相連之標記或包裝插頁。適宜容器包括(例如)瓶、小瓶、注射器、IV溶液袋等。該等容器可自各種材料(例如玻璃或塑膠)形成。容器容納自身或與另一組合物組合時可有效治療、預防及/或診斷病狀之組合物，且可具有無菌存取通道(例如，該容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。該組合物中至少一種活性劑係本發明融合蛋白。標記或包裝插頁指示該組合物係用於治療所選病況。此外，該製品可包含(a) 其中含有組合物之第一容器，其中該組合物包含本發明融合蛋白；及(b) 其中含有組合物之第二容器，其中該組合物包含又一治療劑。本發明此實施例中之製品可進一步包含指示組合物可用於治療特定病況之包裝插頁。另一選擇為或另外，該製品可進一步包含第二(或第三)容器，該容器包含醫藥上可接受之緩衝液，例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。其可進一步包括自商業及使用者角度考慮所期望之其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

實例

下文為本發明之方法及組合物之實例。應理解，考慮上文提供之一般說明，可實踐各種其他實施例。

重組DNA技術

使用標準方法來操縱DNA，如Sambrook等人，Molecular cloning: A laboratory manual；Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述。根據製造商說明書來使用分子生物學試劑。藉由雙鏈定序來測定DNA序列。關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈之核苷酸序列之一般資訊在以下文獻中給出：Kabat, E.A.等人，(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，

NIH出版物第91-3242號。

基因合成

期望基因區段係藉由PCR使用適當模板來生成，或於Geneart AG (Regensburg, Germany)自合成寡核苷酸及PCR產物藉由自動化基因合成來合成。將側接有單一限制性內切酶裂解位點之基因區段選殖至標準選殖/定序載體中。自經轉化細菌純化質粒DNA並藉由UV光譜測定濃度。藉由DNA定序來確認亞選殖基因片段之DNA序列。基因區段經設計具有適宜限制性位點以允許亞選殖至各別表現載體中。所有構築體經設計具有編碼前導肽(MGWSCIILFLVATATGVHS)之5'-末端DNA序列，該前導肽靶向真核細胞中進行分泌之蛋白質。

抗體-IL-10融合構築體之選殖

將重鏈及輕鏈V結構域之經擴增DNA片段在框架內(in frame)插入含有人類IgG₁或Fab恆定重鏈或人類恆定輕鏈之各別接受者哺乳動物表現載體中。重鏈及輕鏈始終在單獨質粒上編碼。對於基於IgG及基於Fab之IL-10融合構築體而言，編碼輕鏈之質粒係相同的，而對於基於Fab之構築體而言，編碼重鏈之質粒端視形式而含有一或兩個VH-CH1結構域以及各別IL-10部分。在Fab重鏈質粒包含兩個VH-CH1結構域(串聯Fab，由單鏈IL-10二聚體或由經改造單體IL-10隔開)(Josephson等人，J Biol Chem 275, 13552-7 (2000))之情況下，該兩個V結構域必須使用其每一者之限制位點之不同組合在兩步驟選殖程序中插入。該等構築體之IL-10部分始終分別使用Fab或IgG重鏈之C端與細胞介素之N端之間之(G₄S)₃ 15聚體連接體與該等抗體之重鏈在框架內進行選殖。僅IgG-IL-10形式(圖1A)包含IgG重鏈之C端與細胞介素之N端之間之(G₄S)₄ 20聚體連接體。在添加連接物後去除IgG重鏈之C端離胺酸殘基。對於單鏈IL-10而言，將(G₄S)₄ 20聚體連接體插入兩條IL-10鏈之間。在兩條不同IgG重鏈(其中僅一者融合至IL-10)之情

況下，兩個重鏈質粒需要經構築並轉染用於異源二聚體化，該異源二聚體化由IgG CH3結構域中之結節成孔洞修飾促進。連接至IL-10部分之「孔洞」重鏈攜帶CH3結構域中之Y349C、T366S、L368A及Y407V突變，而未融合「結節」重鏈攜帶CH3結構域中之S354C及T366W突變(EU編號)。爲了消除FcγR結合/效應子功能並阻止FcR共活化，將以下突變引入每一IgG重鏈之CH2結構域中：L234A、L235A及P329G(EU編號)。抗體-IL-10融合構築體之表現由MPSV啓動子驅使且轉錄由位於CDS下游之合成聚A信號序列終止。除表現盒外，每一載體亦含有EBV oriP序列以供在EBV-EBNA表現細胞系中自主複製。

抗體-IL-10融合蛋白之製備

關於生成之細節，針對FAP之抗原結合部分之親和力成熟及表徵可發現於附於PCT公開案第WO 2012/020006號中之實例(特定而言實例2-6 (製備)及7-13 (表徵))，該案件之全文以引用方式併入本文中。如其中所述，藉由噬菌體顯示生成針對FAP之各種抗原結合結構域，包括下列實例中所用之命名爲4G8及4B9者。

藉由使用磷酸鈣轉染共轉染指數生長之HEK293-EBNA細胞與哺乳動物表現載體來產生用於實例中之抗體IL-10融合構築體。另一選擇爲，藉由聚乙烯亞胺(PEI)使用表現載體來轉染懸浮生長之HEK293 EBNA細胞。所有基於純系4G8及4B9之靶向FAP之抗體-IL-10融合構築體皆可藉由親和層析使用蛋白質A基質純化。

簡言之，藉由由一個親和層析步驟(蛋白質A)、之後尺寸排除層析(Superdex 200, GE Healthcare)構成之方法來純化融合至IL-10、單鏈(sc) IL-10或IL-10M1之靶向FAP之構築體。在20 mM磷酸鈉、20 mM檸檬酸鈉(pH 7.5)中平衡蛋白質A管柱，加載上清液，且使用20 mM磷酸鈉、20 mM檸檬酸鈉(視情況具有或不具有500 mM氯化鈉)(pH 7.5)洗滌管柱，在上清液中存在FBS之情況下，隨後使用13.3 mM磷酸

鈉、20 mM檸檬酸鈉、500 mM氯化鈉(pH 5.45)洗滌。視情況使用10 mM MES、50 mM氯化鈉(pH 5)實施第三次洗滌。用20 mM檸檬酸鈉、100 mM氯化鈉、100 mM甘胺酸(pH 3)溶析融合構築體。彙集溶析部分並藉由尺寸排除層析在最終調配緩衝液中精純(polished)，該緩衝液係25 mM磷酸鉀、125 mM氯化鈉、100 mM甘胺酸(pH 6.7)或20 mM組胺酸、140 mM NaCl (pH6.0)。

藉由量測280 nm下之光密度(OD)使用根據胺基酸序列計算之莫耳消光係數來測定經純化抗體-IL-10融合構築體中之蛋白質濃度。藉由SDS-PAGE在存在及不存在還原劑(5 mM 1,4-二硫蘇糖醇)來分析融合構築體之純度、完整性及單體狀態並使用考馬斯藍(Coomassie blue)(SimpleBlue™ SafeStain, Invitrogen)染色。根據製造商說明書使用NuPAGE® Pre-Cast凝膠系統(Invitrogen)(4-20% Tris-甘胺酸凝膠或3-12% Bis-Tris)。另一選擇為，根據製造商說明書使用LabChip GX (Caliper)來分析還原及非還原抗體-IL-10融合構築體。使用Superdex 200 10/300GL分析型尺寸排除管柱(GE Healthcare)利用2 mM MOPS、150 mM NaCl、0.02% NaN₃ (pH 7.3)運行緩衝液或使用TSKgel G3000 SW XL管柱在25 mM K₂HPO₄、125 mM NaCl、200 mM精胺酸、0.02% NaN₃ (pH 6.7)運行緩衝液中在25℃下分析免疫偶聯物試樣之聚集物含量。

不同構築體之純化及後續分析之結果示於圖2-8中。IgG-IL-10構築體相對於其他IL-10融合形式展現若干產生優點。首先，與Fab-IL-10形式相比，IL-10同源二聚體係錨定於相同抗體分子內。因此，在產生後，不可能出現如針對Fab-IL-10形式所見之單體IL-10分子，對於Fab-IL-10形式而言，在親和層析後，觀察到單體及二聚體蛋白質物質，其中僅二聚體為期望活性產物(比較圖2B及圖6B)。其次，與包含結節成孔洞修飾之基於IgG之異源二聚體形式(例如IgG-scIL-10及

IgG-IL-10M1)相比，IgG-IL-10構築體包含兩條相同的重鏈。此避免如孔洞-孔洞或結節-結節同源二聚體等不期望之副產物。

藉由SPR測定親和力

藉由表面電漿共振(SPR)使用ProteOn XPR36 (BioRad)儀器利用PBST運行緩衝液(10 mM磷酸鹽、150 mM氯化鈉(pH 7.4)、0.005% Tween 20)在25℃下量測抗體-IL-10融合構築體對來自三個不同物種(人類、鼠類及食蟹獼猴)之FAP及對人類IL-10R1之動力學速率常數(k_{on} 及 k_{off})以及親和力(K_D)。為測定對FAP之親和力，經由H6-標籤藉由共價固定之抗-H6抗體捕獲靶蛋白質(圖9A)。簡言之，藉由同時用1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺(EDC)與N-羥基琥珀醯亞胺(sNHS)之新製備混合物活化所有通道5 min、隨後經180 sec注射15 μ g/ml存於10 mM乙酸鈉緩衝液(pH 4.5)中之抗五His將抗五His IgG (Qiagen編號34660，小鼠單株抗體)以高量(至多約5.000 RU)以30 μ l/min固定至GLM晶片之單獨垂直通道上。使用5-min注射之乙醇胺封阻通道。經60 s沿垂直通道自5 μ g/ml存於運行緩衝液中之稀釋物以30 μ l/min捕獲來自不同物種之帶H6標籤之FAP (參見SEQ ID NO 81、83及85)以達成介於約250 RU與600 RU之間之配體密度。在單次動力學分析設置(OSK)中，沿水平通道以100 μ l/min注射在50 nM至0.08 nM範圍內之5倍稀釋系列之抗體-IL-10融合構築體作為分析物。締合期記錄持續180 s，解離期為600 s。在展現極緩慢離解速率之相互作用之情況下，離解速率之記錄延長至多1800 s以觀察複合物之解離。然而，在一些情形下，仍不可能對該等離解速率進行擬合，因此使用 1×10^{-5} 1/s之估計值來計算 K_D 。沿第6通道注射運行緩衝液(PBST)以提供參照用「線內」空白。使用簡單1:1 Langmuir結合模型(ProteOn Manager軟體2.1版)藉由同時擬合締合感測圖與解離感測圖來計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。平衡解離常數(K_D)計算為比率 k_{off}/k_{on} 。

藉由在水平定向上用10 mM甘胺酸(pH 1.5)及50 mM NaOH以100 μ l/min脈衝兩次持續30s以自所捕獲FAP及經結合抗體-IL-10融合構築體解離抗五His IgG來實施再生。

為量測抗體-IL-10融合構築體與人類IL-10R1之間之相互作用，使用NLC晶片來固定生物素化受體(圖9B)。經不同接觸時間在中性抗生物素蛋白衍生晶片矩陣上沿垂直通道以10 μ g/ml之濃度及30 μ l/sec之流速捕獲介於400 RU與1600 RU之間之人類IL-10R1 (參見SEQ ID NO: 87)。藉由在水平定向上以100 μ l/min注射以6個不同分析物濃度(50 nM、10 nM、2 nM、0.4 nM、0.08 nM、0 nM)來量測與生物素化人類IL10R1之結合，締合速率記錄持續180 s，解離速率持續600 s。沿第6通道注射運行緩衝液(PBST)以提供參照用「線內」空白。使用簡單1:1 Langmuir結合模型(ProteOn Manager軟體2.1版)藉由同時擬合締合感測圖與解離感測圖來計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。平衡解離常數(K_D)計算為比率 k_{off}/k_{on} 。由於人類IL-10R1之再生不可能不損失活性，因此對於每一相互作用逐通道(channel per channel)使用新固定之感測器晶片表面實施配體捕獲及分析物注射之兩個後續步驟。

表1及2分別顯示基於抗FAP純系4G8或4B9之抗體-IL-10融合構築體結合至來自不同物種之FAP及人類IL-10R1之動力學速率及平衡常數的總匯。

表1. 基於抗FAP純系4G8之抗體融合物結合至來自不同物種之FAP及人類IL-10R1之動力學速率及平衡常數的匯總。

4G8	hu IL-10R1 (k_{on} , k_{off} , K_D)	hu FAP (k_{on} , k_{off} , K_D)	mu FAP (k_{on} , k_{off} , K_D)	cyno FAP (k_{on} , k_{off} , K_D)
IgG-IL-10	9.96×10^5 1/Ms 2.46×10^{-5} 1/s 2.47×10^{-11} M	3.04×10^6 1/Ms 1.24×10^{-4} 1/s 4.07×10^{-11} M	1.55×10^6 1/Ms 1.00×10^{-5} 1/s est. 6.45×10^{-12} M	3.66×10^6 1/Ms 1.06×10^{-4} 1/s 2.90×10^{-11} M
IgG-scIL-10	n.d. , 因蛋白質之異質性	n.d. , 因蛋白質之異質性	n.d. , 因蛋白質之異質性	n.d. , 因蛋白質之異質性
IgG-IL-10M1	3.64×10^5 1/Ms 2.96×10^{-4} 1/s 8.15×10^{-10} M	2.26×10^6 1/Ms 7.93×10^{-5} 1/s 3.52×10^{-11} M	1.99×10^6 1/Ms 1.00×10^{-5} 1/s est. 5.03×10^{-12} M	3.75×10^6 1/Ms 1.28×10^{-4} 1/s 3.41×10^{-11} M
IgG-(IL-10M1) ₂	$1.58E+06$ 1/Ms 3.79×10^{-5} 1/s 2.40×10^{-11} M	3.09×10^6 1/Ms 7.76×10^{-5} 1/s 2.51×10^{-11} M	1.70×10^6 1/Ms 1.12×10^{-5} 1/s 6.57×10^{-12} M	3.45×10^6 1/Ms 1.80×10^{-4} 1/s 5.21×10^{-11} M
Fab-IL-10	1.32×10^6 1/Ms 8.23×10^{-5} 1/s 6.24×10^{-11} M	3.24×10^6 1/Ms 1.69×10^{-4} 1/s 5.21×10^{-11} M	1.77×10^6 1/Ms 1.00×10^{-5} 1/s est. 5.65×10^{-12} M	3.55×10^6 1/Ms 1.29×10^{-4} 1/s 3.64×10^{-11} M
Fab-scIL-10-Fab	1.30×10^6 1/Ms 9.55×10^{-5} 1/s 7.33×10^{-11} M	4.01×10^6 1/Ms 2.18×10^{-4} 1/s 5.43×10^{-11} M	1.80×10^6 1/Ms 1.00×10^{-5} 1/s est. 5.56×10^{-12} M	4.03×10^6 1/Ms 2.19×10^{-4} 1/s 5.44×10^{-11} M
Fab-IL-10M1-Fab	3.7×10^5 1/Ms 4.2×10^{-4} 1/s 1.1×10^{-9} M	3.66×10^6 1/Ms 2.04×10^{-4} 1/s 5.57×10^{-11} M	1.52×10^6 1/Ms 1.00×10^{-5} 1/s est. 5.58×10^{-12} M	3.84×10^6 1/Ms 2.42×10^{-4} 1/s 6.29×10^{-11} M

表2. 基於抗FAP純系4B9之抗體融合物結合至來自不同物種之FAP及人類IL-10R1之動力學速率及平衡常數的匯總.

4B9	hu IL-10R1 (k_{on} , k_{off} , K_D)	hu FAP (k_{on} , k_{off} , K_D)	mu FAP (k_{on} , k_{off} , K_D)	cyno FAP (k_{on} , k_{off} , K_D)
IgG-IL-10	8.24×10^5 1/Ms 3.91×10^{-5} 1/s 4.75×10^{-11} M	3.81×10^6 1/Ms 4.03×10^{-5} 1/s 1.06×10^{-11} M	2.12×10^6 1/Ms 1.24×10^{-4} 1/s 5.83×10^{-11} M	5.47×10^6 1/Ms 2.86×10^{-5} 1/s 5.22×10^{-12} M
IgG-(IL-10M1) ₂	1.80×10^6 1/Ms 3.39×10^{-5} 1/s 1.88×10^{-11} M	5.80×10^6 1/Ms 9.73×10^{-5} 1/s 1.68×10^{-11} M	2.97×10^6 1/Ms 1.09×10^{-4} 1/s 3.69×10^{-11} M	6.40×10^6 1/Ms 7.77×10^{-5} 1/s 1.21×10^{-11} M
Fab-IL-10	2.15×10^6 1/Ms 4.57×10^{-5} 1/s 2.12×10^{-11} M	5.47×10^6 1/Ms 5.72×10^{-6} 1/s 1.05×10^{-12} M	2.68×10^6 1/Ms 6.27×10^{-5} 1/s 2.34×10^{-11} M	4.16×10^6 1/Ms 7.27×10^{-5} 1/s 1.75×10^{-11} M
Fab-scIL-10-Fab	1.73×10^6 1/Ms 9.58×10^{-5} 1/s 5.53×10^{-11} M	4.74×10^6 1/Ms 3.11×10^{-5} 1/s 6.56×10^{-12} M	2.45×10^6 1/Ms 7.40×10^{-5} 1/s 3.03×10^{-11} M	4.93×10^6 1/Ms 3.35×10^{-5} 1/s 6.79×10^{-12} M

未融合至抗體但C端帶H6標籤之野生型(wt) IL-10細胞介素顯示對人類IL-10R1之 K_D 為52 pM (k_{on} 2.5×10^6 1/Ms, k_{off} 1.3×10^{-4} 1/s)。對於基於二聚體細胞介素之抗體-IL-10融合構築體而言，對IL-10R1之親合力與未融合細胞介素相當且亦為兩位數pM (在18 pM至73 pM範圍內)。此顯示，此細胞介素耐受至抗體或其片段之N端融合物而不顯著損失對人類IL-10R1之親合力。相反，基於單體細胞介素之抗體-IL-10融合構築體不顯示二聚體IL-10融合物之親合力效應且因此其對該受體之親和性在三位數pM或一位數nM範圍中(分別為815 pM及1.1 nM)。與FAP之結合取決於各別抗體，其中純系4B9顯示對人類及食蟹獼猴FAP之較高親和力/親合力，而純系4G8展現對鼠類FAP之較高親和力/親合力。實際上，4G8抗體對鼠類FAP之親合力過強而不可能在

所施加之條件下測定複合物之解離速率。

IL-10與IL-10R1之間之相互作用具有在約35-200 pM範圍內之高親和力(親合力) (Moore, K.W.等人, *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683-765 (2001))。對於包含二聚體IL-10部分或兩個獨立單體之構築體而言，融合至抗體似乎不會顯著地改變親和力(約19-73 pM)。然而，對於單體IL-10融合構築體而言，此結合強度顯著降低，此最有可能係因無二聚體細胞介素或兩個單體融合至相同IgG時出現之親合力效應所致。理想地，抗體-IL-10融合構築體對靶FAP之親和力應高於高親和力細胞介素受體IL-10R1，以達成對表現FAP之組織之有效靶向。儘管IL-10與IL-10R1之間有高親和力，但基於IgG-IL-10形式之分子展現的對靶FAP之親和力仍然較高：分別為純系4B9 IgG-IL-10 (48 pM (針對IL-10R1)對11 pM (針對人類FAP))及純系4G8 (25 pM (針對IL-10R1)對6 pM (針對鼠類FAP))。該等對IL-10R1以及對FAP之親和力似乎適於達成對FAP-過表現組織之有效靶向且IL-10R1似乎並不代表該等分子之匯點(sink)。

LPS誘導之原代單核球之促炎性細胞介素產生之抑制

對於基於IgG或Fab之靶向FAP之IL-10構築體之間的功能表徵及區別而言，在不同活體外分析中評價該等分子之效能。例如，量測抑制LPS誘導之原代單核球產生促炎性細胞介素之功效。對於此實驗而言，藉由Ficoll Hypaque密度梯度分離200 ml肝素化周邊血(自健康志願者獲得，Medical Services department, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)，之後陰性分離單核球(Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany，編號130-091-153)。將經純化單核球在補加有10%人類血漿、2 mM L-麩醯胺酸[Gibco，編號25030]及Pen/Strep)之培養基(RPMI 1640 [Gibco/Invitrogen, Darmstadt, Germany，目錄編號10509-24]中以 5×10^4 個細胞/孔接種於96孔F細胞

培養板(Costar/Corning Life Sciences, Amsterdam, The Netherlands ; 編號3596)中。

(a)在溶液中及(b)在實驗環境中測試所有抗體-IL-10融合蛋白，其中將重組人類FAP ($c_{fin}=1 \mu\text{g/ml}$)在4°C下塗覆至板上過夜(另一選擇為，在室溫下60-90 min)且藉由結合至所塗覆FAP來固定抗體-IL-10融合蛋白。

對於設置(a)而言，細胞在接種後，在滴定量(通常為0-500 nM)之作爲陽性對照之所示抗體-融合構築體或重組野生型人類IL-10存在或不存在下直接經100 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich/Nunc, Taufkirchen, Germany, 編號L3129)刺激。對於設置(b)而言，在塗覆後去除未結合FAP，且在室溫下用培養基(參見上文)將板封阻1 h，然後與IL-10構築體一起再培育1小時。此後，用培養基洗滌板，然後將單核球與適當刺激物(100 ng/ml LPS)一起添加至培養物中。

對於所有實驗而言，在37°C及5% CO₂下將細胞培育24 h。收集上清液(視情況儲存在-20/-80°C)並使用用於IL-1 β 、IL-6、G-CSF及/或TNF α 之CBA Flex Sets (BD Biosciences, Heidelberg, Germany, 編號558279、編號558276、編號558326及編號558299)測試細胞介素產生。用FACS Array量測板且使用FCAP軟體進行分析(二者皆購自BD)。

如圖10中所示，在設置(a)中，4G8 Fab-IL-10及IgG-IL-10在抑制促炎性細胞介素IL-1 β 、IL-6及TNF α 中之活體外效能相當(圖10 D、E、F)。相反，在設置(b)中，基於IgG之形式顯示優於Fab-IL-10之效能(圖10 A、B、C)。相應EC50值[nM]示於表3中。設置(b)中之IgG-IL-10構築體之EC50值類似於重組wt人類IL-10之EC50值(其僅可在設置(a)中測試)。

表3. 4G8-IgG-IL-10及4G8-Fab-IL-10抑制單核球(供體1)產生細胞

介素之EC50值.

試樣	EC50 [nM]設置(a) (溶液)			EC50 [nM]設置(b) (固定)		
	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α
hu wt IL-10	0.010	0.009	0.002	不適用/未檢測出		
IgG-IL-10	0.054	0.049	0.017	0.002	0.001	0.001
Fab-IL-10	0.083	0.059	0.023	0.103	0.085	0.017

使用兩種不同血液供體在獨立實驗中再現此結果(圖11A及11B，表4及5)。再次在此實驗中，基於IgG之經靶向IL-10構築體在抑制所有所測試三種細胞介素方面顯著優於基於Fab之分子，如藉由設置(b)中獲得之EC50值所指示。在設置(a)中，所有分子相當。

表4. 4G8-IgG-IL-10及4G8-Fab-IL-10抑制單核球(供體2)產生細胞介素之EC50值.

試樣	EC50 [nM]設置(a) (溶液)			EC50 [nM]設置(b) (固定)		
	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α
hu wt IL-10	0.006	0.002	0.002	不適用/未檢測出		
IgG-IL-10	0.039	0.015	0.011	0.001	0.0002	0.0002
Fab-IL-10	0.061	0.030	0.024	0.060	0.023	0.017

表5. 4G8-IgG-IL-10及4G8-Fab-IL-10抑制單核球(供體3)產生細胞介素之EC50值.

試樣	EC50 [nM]設置(a) (溶液)			EC50 [nM]設置(b) (固定)		
	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α
hu wt IL-10	0.004	0.003	0.001	不適用/未檢測出		
IgG-IL-10	0.036	0.020	0.019	0.001	0.0002	0.0002
Fab-IL-10	0.065	0.052	0.052	0.057	0.036	0.025

在又一實驗中，再次評價基於Fab及IgG之IL-10構築體在抑制單核球產生IL-6中之效能，且將其與不結合至FAP之wt IL-10以及未靶向Fab-IL-10及IgG-IL-10構築體進行比較(圖12及表6)。再次發現，4G8-

IgG-IL-10與4G8-Fab-IL-10相比在實驗設置(b)中抑制IL-6產生方面更有效，而未靶向構築體僅在最高濃度下才引起抑制。相反，在設置(a)中，所有構築體之效能相當。

表6. 4G8-IgG-IL-10及4G8-Fab-IL-10抑制單核球(供體4)產生IL-6之EC50值。

試樣	EC50 [nM] IL-6	
	設置(a) (溶液)	設置(b) (固定)
hu wt IL-10	0.007	未測出
IgG-IL-10	0.123	0.002
Fab-IL-10	0.078	0.081
種系IgG-IL-10	0.166	不可計算
種系Fab-IL-10	0.152	不可計算

由於用於在先前分析中塗覆之重組人類FAP之濃度可能影響人工或非生理條件，因此滴定所塗覆FAP之量(c_{fin} 介於0.25 $\mu\text{g/ml}$ 與5 $\mu\text{g/ml}$ 之間)且在實驗設置(b)中評價其對EC50值之影響。

如圖13中所示，總體上，基於IgG-及Fab-之構築體之EC50值的比率沒有顯著差異。在所有濃度下，IgG-IL-10構築體在抑制IL-6誘導方面皆更有效(圖13及表7及8)。然而，所塗覆FAP之濃度確實會影響實驗之結果，因為濃度降低，EC50值通常會增加，此可能反映固定於微量滴定板上之構築體之量(表8；對於基於Fab之構築體而言，在最低FAP濃度下觀察到細胞介素減少，但不能計算EC50)。有趣的是，在高FAP濃度(5 $\mu\text{g/ml}$)下，檢測到所分泌IL-6之總量之增加(圖14)。

表7. 4G8-IgG-IL-10及人類野生型IL-10 (存於溶液中)抑制單核球(供體5)產生IL-6之EC50值.

試樣	hIL-6 EC50 [nM]
4G8-IgG-IL-10	0.066
hu wt IL-10	0.010

表8. 固定於不同濃度之所塗覆FAP上之4G8-IgG-IL-10及4G8-Fab-IL-10抑制單核球(供體5)產生IL-6之EC50值.

	hIL-6 EC50 [nM]	
FAP濃度	4G8-IgG-IL-10	4G8-Fab-IL-10
0.25 µg/ml	0.019	-
0.5 µg/ml	0.001	-
1 µg/ml	0.002	0.029
5 µg/ml	0.0004	0.016

在又一實驗中，測試包含不同FAP靶向結構域之親和力成熟抗FAP抗體變體4B9之IL-10融合構築體。同樣，在實驗設置(a)及(b)中評價構築體在抑制LPS誘導單核球產生IL-6中之活體外效能。

圖15顯示，對於基於4B9之構築體而言，IgG-IL-10分子在實驗設置(a)中抑制IL-6產生方面優於Fab-IL-10構築體(且在設置(b)中相當)。相應EC50值示於表9中。一般而言，4B9及4G8構築體顯示類似效能。

表9. 基於4G8及4B9之IgG-IL-10及Fab-IL-10抑制單核球(供體7)產生IL-6之EC50值.

試樣	EC50 [nM] IL-6	
	設置(a)	設置(b)
hu wt IL-10	0,008	未測出
4G8 IgG-IL-10	未測出	0.009
4G8 Fab-IL-10	未測出	0.065
4B9 IgG-IL-10	0.038	0.002
4B9 Fab-IL-10	0.063	不可計算

在又一系列之實驗中，比較基於4G8之IgG-IL-10、Fab-IL-10、Fab-IL-10M1-Fab及IgG-IL-10M1構築體。在實驗設置(a)及(b)中評價LPS誘導之單核球之促炎性細胞介素IL-6、IL-1 β 及TNF α 產生之抑制。該等實驗之結果示於表10-12中(三種不同供體)。如先前實驗中，IgG-IL-10係最有效之構築體，特別在實驗設置(b)中。

表10. 4G8 IgG-IL-10、4G8 Fab-IL-10、4G8 Fab-IL-10M1-Fab及4G8 IgG-IL-10M1融合蛋白抑制單核球(供體1)產生細胞介素之EC50值。

試樣	EC50 [nM]設置(a) (溶液)			EC50 [nM]設置(b) (固定)		
	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α
hu wt IL-10	0.010	0.009	0.002	未測出	未測出	未測出
IgG-IL-10	0.054	0.049	0.017	0.002	0.001	0.001
Fab-IL-10	0.086	0.059	0.023	0.103	0.085	0.017
Fab-IL-10M1-Fab	不可計算	不可計算	不可計算	不可計算	不可計算	不可計算
IgG-IL-10M1	不可計算	不可計算	不可計算	不可計算	不可計算	不可計算

表11. 4G8 IgG-IL-10、4G8 Fab-IL-10、4G8 Fab-IL-10M1-Fab及4G8 IgG-IL-10M1融合蛋白抑制單核球(供體2)產生細胞介素之EC50值。

試樣	EC50 [nM]設置(a) (溶液)			EC50 [nM]設置(b) (固定)		
	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α
hu wt IL-10	0.006	0.002	0.002	未測出	未測出	未測出
IgG-IL-10	0.039	0.015	0.011	0.001	0.0002	0.0002
Fab-IL-10	0.061	0.030	0.024	0.060	0.023	0.017
Fab-IL-10M1-Fab	不可計算	不可計算	不可計算	不可計算	3.339	2.847
IgG-IL-10M1	不可計算	不可計算	不可計算	0.723	0.140	0.059

表12. 4G8 IgG-IL-10、4G8 Fab-IL-10、4G8 Fab-IL-10M1-Fab及4G8 IgG-IL-10M1融合蛋白抑制單核球(供體3)產生細胞介素之EC50值。

試樣	EC50 [nM]設置(a) (溶液)			EC50 [nM]設置(b) (固定)		
	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α
hu wt IL-10	0.004	0.003	0.001	未測出	未測出	未測出
IgG-IL-10	0.036	0.020	0.019	0.001	0.0002	0.0002
Fab-IL-10	0.065	0.052	0.052	0.057	0.036	0.025
Fab-IL-10M1-Fab	不可計算	不可計算	不可計算	不可計算	4.713	不可計算
IgG-IL-10M1	不可計算	2.890	不可計算	0.254	0.117	0.145

在仍又一系列之實驗中，比較基於4G8之Fab-IL-10、Fab-scIL-10-Fab及Fab-IL-10M1-Fab構築體。在實驗設置(a)及(b)中評價LPS誘導之單核球之IL-6、IL-1 β 、TNF α 及G-CSF產生之抑制。該等實驗之結果示於表13-17中(六種不同供體)。結果顯示，包含二聚體IL-10分子之構築體比具有scIL-10或單體IL-10M1分子之構築體更有效。

表13. 4G8 Fab-IL-10、4G8 Fab-scIL-10-Fab及4G8 Fab-IL-10M1-Fab融合蛋白抑制單核球產生細胞介素之EC50值。

試樣	EC50 [nM]設置(a) (溶液)			EC50 [nM]設置(b) (固定)		
	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α	hIL-6	hIL-1 β	hTNF α
hu wt IL-10	0.004	0.004	0.001	未測出	未測出	未測出
Fab-IL-10	0.030	0.020	0.007	0.020	0.003	0.001
Fab-scIL-10-Fab	0.110	0.090	0.060	0.200	0.100	0.030
Fab-IL-10M1-Fab	不可計算	不可計算	不可計算	不可計算	不可計算	不可計算

表14. 4G8 Fab-IL-10、4G8 Fab-scIL-10-Fab及4G8 Fab-IL-10M1-Fab融合蛋白抑制單核球產生IL-6之EC50值.

試樣	EC50 [nM] IL-6抑制(溶液)							
	供 體 編號1	供 體 編號2	供 體 編號3	供 體 編號4	供 體 編號5	供 體 編號6	平 均 值	標 準 偏差
hu wt IL-10	0.004	0.008	0.004	0.003	0.0003	0.004	0.004	0.002
Fab-IL-10	0.030	n.d.	0.070	0.030	0.070	0.260	0.092	0.096
Fab-scIL-10-Fab	0.110	n.d.	0.150	0.110	0.250	0.630	0.250	0.220
Fab-IL-10M1-Fab	不 可 計算	不 可 計算	不 可 計算	不 可 計算	不 可 計算	不 可 計算	-	-

表15. 4G8 Fab-IL-10、4G8 Fab-scIL-10-Fab及4G8 Fab-IL-10M1-Fab融合蛋白抑制單核球產生IL-1 β 之EC50值.

試樣	EC50 [nM] IL-1 β 抑制(溶液)							
	供 體 編號1	供 體 編號2	供體編 號3	供 體 編號4	供 體 編號5	供體編 號6	平 均 值	標準偏 差
hu wt IL-10	0.004	0.006	0.004	0.002	n.d.	0.006	0.004	0.002
Fab-IL-10	0.020	n.d.	0.050	0.020	0.050	0.370	0.102	0.150
Fab-scIL-10-Fab	0.090	n.d.	0.110	0.090	0.270	1.460	0.404	0.595
Fab-IL-10M1-Fab	不 可 計算	不 可 計算	不可計 算	不 可 計算	不 可 計算	不可計 算		

表16. 4G8 Fab-IL-10、4G8 Fab-scIL-10-Fab及4G8 Fab-IL-10M1-Fab融合蛋白抑制單核球產生G-CSF之EC50值。

試樣	EC50 [nM] G-CSF抑制(溶液)							
	供體 編號1	供體 編號2	供體 編號3	供體 編號4	供體 編號5	供體 編號6	平均 值	標準 偏差
hu wt IL-10	0.003	0.006	0.003	0.003	0.0001	0.003	0.003	0.002
Fab-IL-10	0.010	n.d.	0.050	0.010	0.050	260	0.076	0.105
Fab-scIL-10-Fab	0.060	n.d.	0.110	0.060	0.200	1.160	0.318	0.474
Fab-IL-10M1-Fab	不可 計算	不可 計算	不可 計算	不可 計算	不可 計算	不可 計算	-	-

表17. 4G8 Fab-IL-10、4G8 Fab-scIL-10-Fab及4G8 Fab-IL-10M1-Fab融合蛋白抑制單核球產生TNF α 之EC50值。

試樣	EC50 [nM] TNF α 抑制(溶液)							
	供體 編號1	供體 編號2	供體 編號3	供體 編號4	供體 編號5	供體 編號6	平均 值	Std.dev
hu wt IL-10	0.001	0.002	0.001	0.003	n.d.	0.001	0.002	0.001
Fab-IL-10	0.007	n.d.	0.040	0.007	0.040	0.0180	0.055	0.072
Fab-scIL-10-Fab	0.060	n.d.	0.190	0.060	0.080	1.660	0.410	0.701
Fab-IL-10M1-Fab	不可 計算	不可 計算	不可 計算	不可 計算	不可 計算	不可 計算	-	-

最後，比較基於4B9及4G8之Fab-IL-10及IgG-(IL-10M1)₂構築體。在實驗設置(a)及(b)中評價LPS誘導之單核球之IL-6產生之抑制。此實驗之結果示於表19中。結果顯示，包括IgG-(IL-10M1)₂在內之所有構築體在設置(b)中之表現皆優於在設置(a)中之表現。

表18. 4B9 IgG-IL-10, 4G8 IgG-IL-10及4G8 IgG-(IL-10M1)₂融合蛋白抑制單核球產生IL-6之EC50值.

試樣	EC50 [nM]設置(a) (溶液)	EC50 [nM]設置(b) (固定)
	hIL-6	hIL-6
hu wt IL-10	0.006	未測出
4B9 IgG-IL-10	0.035	0.011
4G8 IgG-IL-10	0.028	0.004
IgG-(IL-10M1) ₂	不可計算	0.039

IFN γ -誘導之原代單核球上MHC-II分子之上調之抑制

對於基於IgG及Fab之靶向FAP之IL-10構築體之間之功能表徵及區別而言，評價其抑制IFN γ 誘導之單核球中之MHC-II表現之能力。類似於細胞介素抑制分析，利用存於溶液中(實驗設置(a)；參見上文)或藉由結合至塗覆於細胞培養板上之FAP固定(實驗設置(b)；參見上述)之構築體實施此實驗。原則上，如上文所述分離並培養單核球，但用250 U/ml IFN γ (BD，編號554616)刺激24 h。在刺激前，視情況用重組野生型(wt) IL-10或不同抗體-IL-10融合構築體處理細胞。在培育後，藉由Accutase (PAA，編號L11-007)處理分離細胞且在含有3%人類血清(Sigma，編號4522)之PBS中用抗HLA-DR抗體(BD，編號559866)染色以避免任何非特異性Fc γ R結合，然後經受最終FACS分析。

此實驗之結果示於表19中，顯示對於基於4B9之構築體而言，在實驗設置(b)中，IgG-IL-10分子在下調IFN γ 誘導之原代單核球上之MHC-II表現方面優於Fab-IL-10構築體(且在設置(a)中相當)。

表19. 4B9 IgG-IL-10及4B9 Fab-IL-10下調IFN γ 誘導之原代單核球上之MHC-II表現之EC50值.

試樣	EC50 [nM]設置(a) (溶液)	EC50 [nM]設置(b) (固定)
Fab-IL-10	0.072	不可計算
IgG-IL-10	0.064	0.018
hu wt IL-10	0.004	未測出

IL-10誘導之經分離原代單核球中之STAT3磷酸化

由於IL-10R信號傳導導致STAT3磷酸化，因此在pSTAT3分析中使用新分離之血液單核球在功能上評估若干經靶向IL-10構築體及形式 (Finbloom及 Winestock, J. Immunol. 1995; Moore等人, Annu. Rev. Immunol. 2001; Mosser及 Zhang, Immunological Reviews 2008)。簡言之，如上文所述自健康供體之經Ficoll分離之PBMC無損地分離CD14⁺單核球。通常，將 $3-10 \times 10^5$ 個細胞於300 μ l培養基(RPMI1640 / 10% FCS / L-麩醯胺酸/ pen/strep)中轉移至FACS管中且一般在37°C、5% CO₂下與0-200/500 nM wt人類IL-10或所指示抗體-IL-10融合蛋白一起培育30 min。然後，每管添加300 μ l預熱固定緩衝液I (BD Biosciences, 編號557870)，實施漩渦且在37°C下培育10 min，然後用2 ml PBS / 2% FCS將細胞洗滌一次且以250 $\times$ g離心10 min。隨後，每管添加300 μ l冰冷Perm緩衝液III (BD Biosciences, 編號558050)用於細胞透化且在冰上培育30 min，隨後再次如上文所述洗滌細胞。最後，將細胞再懸浮於100 μ l抗體稀釋物 (抗 Stat-3.A647; BD Biosciences, 編號557815)中且在4°C下培育30 min，然後將細胞洗滌並處理以供FACS分析。

此實驗中針對不同構築體獲得之EC50值示於表20及21中。結果顯示，包含二聚體IL-10分子(基於Fab-或IgG)之構築體之活性大於包含scIL-10分子或單體IL-10M1分子之構築體。

表20. 基於4G8之抗體-IL-10融合蛋白針對IL-10誘導之經分離原代單核球中之STAT3磷酸化之EC50值.

試樣	EC50 [nM] pSTAT3誘導		
	供體1	供體2	供體3
hu wt IL-10	0.029	0.019	0.021
Fab-IL-10	0.154	0.194	0.087
Fab-scIL-10-Fab	0.557	0.430	0.116
Fab-IL-10M1-Fab	8.201	9.012	6.809

表21. 基於4B9之抗體-IL-10融合蛋白針對IL-10誘導之經分離原代單核球中之STAT3磷酸化之EC50值.

試樣	EC50 [nM] pSTAT3誘導
hu wt IL-10	0.017
IgG-IL-10	0.130
IgG-(IL-10M1)2	0.435

靶向FAP及未靶向之抗體-IL-10融合蛋白之生物分佈

在患有達到預定關節炎評分>3 (在第一次免疫後28天)之膠原誘導性關節炎之DBA/1J小鼠中以50 μ g/小鼠測定靶向FAP之經In-111標記之4B9 IgG-IL-10、4G8 IgG-IL-10及未靶向DP47GS IgG-IL 10之組織生物分佈。在5只小鼠/組中在經靜脈內注射放射性標記之偶聯物後72 h實施生物分佈分析。

此實驗之結果示於表22中。未靶向抗體-IL-10融合蛋白DP47GS IgG-IL-10在發炎關節中之攝取顯著低於($p<0.0001$)經靶向IgG-IL-10融合蛋白之攝取，從而指示4B9 IgG-IL-10及4G8 IgG-IL-10之攝取由FAP介導。脾攝取最有可能由IL-10介導，此乃因所有三種構築體皆顯示類似脾累積量。

表22. 抗體構築體之攝取(注射劑量%/克組織).

組織	4B9 IgG-IL-10	4G8 IgG-IL-10	DP47GS IgG-IL-10
發炎關節	20.7 ± 1.1	19.6 ± 1.0	8.6 ± 1.0
脾	6.3 ± 0.4	7.3 ± 0.3	6.7 ± 0.5
血液	4.2 ± 0.5	1.1 ± 0.1	7.3 ± 1.0

爲了研究IL-10對IgG-IL-10之生物分佈之效應，在第二次實驗中，比較經In-111標記之4G8 IgG-IL-10之生物分佈與經In-111標記之4G8 IgG之生物分佈。

此實驗之結果示於表23中。在發炎關節中之累積方面，4G8 IgG與4G8 IgG-IL-10之間沒有顯著差異，從而指示，IL-10並不顯著地影響4G8 IgG對發炎部位之靶向。4G8 IgG-IL-10之脾攝取顯著高於4G8 IgG ($p < 0.0001$)，從而指示，脾中之攝取部分地由IL-10介導。

表23. 抗體構築體之攝取(注射劑量%/克組織).

組織	4G8 IgG	4G8 IgG-IL-10
發炎關節	18.1 ± 1.0	19.6 ± 1.0
脾	2.9 ± 0.2	7.3 ± 0.3
血液	3.9 ± 0.8	1.1 ± 0.1

* * *

儘管已出於理解清晰性之目的藉由說明及實例方式相當詳細地闡述前文之發明，但不應將說明及實例解釋爲限制本發明範圍。本文所引用所有專利及科學文獻之全部揭示內容以引用方式明確地併入本文中。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 瑞士商羅齊克雷雅公司
<120> 介白素-10 融合蛋白及其用途
<130> 31135
<150> EP 12179709.6
<151> 2012-08-08
<160> 89
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 160
<212> PRT
<213> 智人
<400> 1

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1 5 10 15
Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
20 25 30
Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
35 40 45
Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60
Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
100 105 110
Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
115 120 125
Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
130 135 140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
145 150 155 160

<210> 2
<211> 480
<212> DNA
<213> 智人
<400> 2
agcccgggcc agggcaccca gagegagaac agctgcaccc acttccccgg caacctgccc 60
aacatgctgc gggacctgag ggacgccttc agcagagiga aaaccttctt ccagatgaag 120
gaccagctgg acaacctgct gctgaaagag agcctgctgg aagatttcaa gggctacctg 180
ggctgtcagg ccctgagcga gatgatccag ttctacctgg aagaagtgat gccccaggcc 240

gagaaccagg accccgacat caaggccac gtgaacagcc tggcgagaa cctgaaaacc 300
ctgcggctga gactgcggcg gtgccacaga ttctgccct gcgagaacaa gagcaaggcc 360
gtggaacagg tgaagaacgc cttcaacaag ctgcaggaaa agggcatcta caaggccaig 420
tccgagttcg acaatttcac caactacatc gaggcctaca tgacaatgaa aatccgcaat 480

<210> 3
<211> 340
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> scIL-10

<400> 3

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1 5 10 15
Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
20 25 30
Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
35 40 45
Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60
Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
100 105 110
Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
115 120 125
Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
130 135 140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
145 150 155 160
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
165 170 175
Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys
180 185 190
Thr His Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp
195 200 205
Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp
210 215 220

Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu
225 230 235 240

Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val
245 250 255

Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn
260 265 270

Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys
275 280 285

His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val
290 295 300

Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met
305 310 315 320

Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met
325 330 335

Lys Ile Arg Asn
340

<210> 4
<211> 1020
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> scIL-10

<400> 4
agcccgggcc agggcaccca gagcgagaac agctgcaccc acttccccgg caacctgccc 60
aacatgctgc gggacctgag ggacgccttc agcagagtga aaaccttctt ccagatgaag 120
gaccagctgg acaacctgct gctgaaagag agcctgctgg aagatttcaa gggctacctg 180
ggctgtcagg ccttgagcga gatgatccag ttctacctgg aagaagtgat gccccaggcc 240
gagaaccagg accccgacat caaggccac gtgaacagcc tgggcgagaa cctgaaaacc 300
ctgcggctga gactgcggcg gtgccacaga ttctgccct gcgagaacaa gagcaaggcc 360
gtggaacagg tgaagaacgc cttcaacaag ctgcaggaaa agggcatcta caaggccatg 420
tccgagttcg acatcttcat caactacatc gaagcttaca tgaccaatgaa gatcagaaac 480
ggcggaggcg gatctggcgg cgggtggaagt ggaggcggag gatctggggg aggcggaagt 540
agcccgggcc agggcaccca gagcgagaac agctgcaccc acttccccgg caacctgccc 600
aacatgctgc gggacctgag ggacgccttc agcagagtga aaaccttctt ccagatgaag 660
gaccagctgg acaacctgct gctgaaagag agcctgctgg aagatttcaa gggctacctg 720
ggctgtcagg ccttgagcga gatgatccag ttctacctgg aagaagtgat gccccaggcc 780
gagaaccagg accccgacat caaggccac gtgaacagcc tgggcgagaa cctgaaaacc 840
ctgcggctga gactgcggcg gtgccacaga ttctgccct gcgagaacaa gagcaaggcc 900
gtggaacagg tgaagaacgc cttcaacaag ctgcaggaaa agggcatcta caaggccatg 960
tccgagttcg acatcttcat caactacatc gaggcctaca tgacaatgaa aatccgcaat 1020

<210> 5
<211> 166
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-10 單體(IL-10M1)

<400> 5

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1 5 10 15
Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
20 25 30
Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
35 40 45
Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60
Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
100 105 110
Pro Cys Glu Asn Gly Gly Gly Ser Gly Gly Lys Ser Lys Ala Val Glu
115 120 125
Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys
130 135 140
Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met
145 150 155 160
Thr Met Lys Ile Arg Asn
165

<210> 6
<211> 498
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-10 單體(IL-10M1)

<400> 6

tciccaggcc agggcaccca gagcgagaac agctgcaccc acttccccgg caacctgccc 60
aacatgctgc gggacctgag ggacgccttc agcagagtga aaaccttcit ccagatgaag 120
gaccagctgg acaacctgct gctgaaagag agcctgctgg aagatttcaa gggctacctg 180
ggctgtcagg cctgagcgga gatgatccag ttctacctgg aagaagtgat gcccagggcc 240
gagaaccagg accccgacat caaggccac gtgaacagcc tgggcgagaa cctgaaaacc 300

ctgcggctga gactgcggcg gtgccacaga ttctgccct gcgagaacgg cggaggctct 360
ggcggaaagi ccaaggccgt ggaacagggt aagaacgcct tcaacaagct gcaggaaaag 420
ggcatctaca aggccatgag cgagttcgac atcttcatca actacatcga agcttcatg 480
acaatgaaga tacgaaac 498

<210> 7
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 IgG - IL-10 (LC)

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 8
<211> 645
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 IgG - IL-10 (LC)

<400> 8
gagatcgtgc tgaccagtc ccccggcacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
ctgtcctgca gagcctccca gtccgtgtcc cggctctacc tcgcctggta tcagcagaag 120
cccgccagg cccctcggct gctgatcatc ggcgcctcta ccagagccac cggcatccct 180
gaccggttct ccggctctgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctggaa 240
cccaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggccagg tcatccctcc cacccttggc 300
cagggcacca aggtggaaat caagcgtacg gtggccgctc cctccgtgtt catcttccca 360
ccctccgacg agcagctgaa gtccggcacc gcctccgtcg tgtgcctgct gaacaacttc 420
tacccccgcg aggccaaaggt gcagtggag gtggacaacg ccctgcagtc cggcaactcc 480
caggaatccg tcaccgagca ggactccaag gacagcacct actccctgtc ctccaccctg 540
acctgtcca aggccgacta cgagaagcac aagggtgacg cctgcgaagt gaccaccag 600
ggcctgtcca gccccgtgac caagtccttc aaccggggcg agtgc 645

<210> 9
<211> 626
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 IgG - IL-10 (HC P329G LALA + IL-10)

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130

135

140

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His
465 470 475 480

Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe
485 490 495

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu
500 505 510

Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
515 520 525

Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro
530 535 540

Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu
545 550 555 560

Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg
565 570 575

Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
580 585 590

Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
595 600 605

Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile
610 615 620

Arg Asn
625

<210> 10
<211> 1878
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 IgG - IL-10 (HC P329G LALA + IL-10)

<400> 10
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc tiggtagcagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc ttagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggcctggagt ggtctcagct attagtggta gttgtgtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagccagag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtgg 300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtc ccgtctcgag tgctagcacc 360
aagggcccat cggcttcccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420

gcccctgggct gccctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca	480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac	540
tcccicagca gcgtgggtgac cglgcccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc	600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	660
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc	720
ttcctcttcc ccccaaaaacc caaggacacc ctcatgact cccggacccc tgaggtcaca	780
tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggica agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaa ccgcgggagg agcagtaaa cagcacgtac	900
cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	960
tgaagggtc ccaacaaaag cctcggcgcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa	1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag	1080
aaccagggtc gccctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag	1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	1200
gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg	1260
aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1320
ctctccctgt ctccgggttg cggaggggga tctggagggt gcggtccgg aggcggagga	1380
tctgggggag gcggaagtag cccggggccag ggcacccaga gcgagaacag ctgcacccac	1440
ttccccggca acctgcccc catgtctcgg gacctgaggg acgccttcag cagagtgaag	1500
accttcttcc agatgaagga ccagctggac aaacctgtgc tgaagagag cctgctggaa	1560
gatttcaagg gctacctggg ctgtcaggcc ctgagcgaga tgatccagtt ctacctggaa	1620
gaagtgatgc cccaggccga gaaccaggac cccgacatca aggccacgt gaacagcctg	1680
ggcgagaacc tgaanaacct gcggctgaga ctgcggcggg gccacagatt tctgccctgc	1740
gagaacaaga gcaaggccgt ggaacagggt aagaacgct tcaacaagct gcaggaaaag	1800
ggcatctaca aggccatgtc cgagttcgac atcttcatca actacatcga agcttacatg	1860
acaatgaaaa tccgcaat	1878

<210> 11
<211> 801
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 IgG - scIL- 10 (HC 孔洞 P329G LALA + scIL - 10)
<400> 11

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala

355

360

365

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly
450 455 460

Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu
465 470 475 480

Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr
485 490 495

Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser
500 505 510

Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu
515 520 525

Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln
530 535 540

Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys
545 550 555 560

Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu
565 570 575

Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu
580 585 590

Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile
595 600 605

Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn Gly Gly Gly
610 615 620

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
625 630 635 640

Ser Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe
645 650 655

Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser
660 665 670

Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu
675 680 685

Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln
690 695 700

Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln
705 710 715 720

Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly
725 730 735

Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe
740 745 750

Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala
755 760 765

Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe
770 775 780

Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg
785 790 795 800

Asn

<210> 12
<211> 2403
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 IgG - scIL- 10 (HC 孔洞 P329G LALA + scIL - 10)

<400> 12
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttgttacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccittlagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaaggggccg gtccacatc tccagagaca attccaagaa cactgtgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggttg 300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctggta ccgtctcgag tgctagcacc 360
aaggggccat cggctctccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac 540
tcccicagca gcgtgggtgac cgtgcccttc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggica agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	900
cgtgtggtca ggcctctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	960
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag	1080
aaccaggtca gcctctcgtg cgcagicaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	1200
gacggctcct tcttctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1320
ctctccctgt ctccgggtgg cggcggaggc tccggaggcg gaggatctgg gggaggcgga	1380
agtagcccg gccagggcac ccagagcgag aacagctgca cccacttccc cggcaacctg	1440
cccaacatgc tgcgggacct gagggacgcc ttcagcagag tgaaaacctt cttccagatg	1500
aaggaccagc tggacaacct gctgctgaaa gagagcctgc tggaagattt caagggtac	1560
ctgggctgtc aggccctgag cgagatgac cagttctacc tggaagaagt gatgccccag	1620
gccgagaacc aggacccga catcaaggcc cacgtgaaca gcctgggcga gaacctgaaa	1680
acctgcggc tgagactgcg gcggtgccac agatttctgc cctgcgagaa caagagcaag	1740
gccgtggaac aggtgaagaa cgccttcaac aagctgcagg aaaaggcat ctacaaggcc	1800
atgtccgagt tcgacatctt catcaactac atcgaagctt acatgacat gaagatcaga	1860
aacggcggag gcggtctgg cggcggtgga agtggaggcg gaggatctgg gggaggcgga	1920
agtagcccg gccagggcac ccagagcgag aacagctgca cccacttccc cggcaacctg	1980
cccaacatgc tgcgggacct gagggacgcc ttcagcagag tgaaaacctt cttccagatg	2040
aaggaccagc tggacaacct gctgctgaaa gagagcctgc tggaagattt caagggtac	2100
ctgggctgtc aggccctgag cgagatgac cagttctacc tggaagaagt gatgccccag	2160
gccgagaacc aggacccga catcaaggcc cacgtgaaca gcctgggcga gaacctgaaa	2220
acctgcggc tgagactgcg gcggtgccac agatttctgc cctgcgagaa caagagcaag	2280
gccgtggaac aggtgaagaa cgccttcaac aagctgcagg aaaaggcat ctacaaggcc	2340
atgtccgagt tcgacatctt catcaactac atcgaagcct acatgacaat gaaaatccgc	2400
aat	2403

- <210> 13
- <211> 447
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 4G8 IgG - scIL- 10 (HC 結節 P329G LALA)
- <400> 13

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

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

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 1341
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 IgG - scIL- 10 (HC 結節 P329G LALA)

<400> 14
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc ttagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagaciccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtc cgtctcag tgcctagcacc 360
aaggggcccat cggtcttccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
ggcctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac 540
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggacaca 780
tgcggtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtc agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
cgltgtgtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat gccgggatga gctgaccaag 1080
aaccagggtc gcctgtggtg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

igggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg tctggactcc 1200
gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 1260
aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 15
<211> 627
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 IgG - IL- 10M1 (HC 孔洞 P329G LALA + IL- 10M1)

<400> 15

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
 435 440 445
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly
 450 455 460
 Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu
 465 470 475 480
 Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr
 485 490 495
 Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser
 500 505 510
 Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu
 515 520 525

Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln
530 535 540

Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys
545 550 555 560

Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu
565 570 575

Asn Gly Gly Gly Ser Gly Gly Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys
580 585 590

Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser
595 600 605

Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys
610 615 620

Ile Arg Asn
625

<210> 16
<211> 1881
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 IgG - IL- 10M1 (HC 孔洞 P329G LALA + IL- 10M1)

<400> 16
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttgttacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cciccggatt cacctttagc agttaigcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtgg 300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtc ccgtctcgag tgctagcacc 360
aagggcccat cggtcttccc ccctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gcccctgggt gccctggtaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggcgtgcc tacagtcctc aggactctac 540
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag giggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
gacaaaatc acacatgccc accgtgccc gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtc agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggctt ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccagggtca gcctctcgtg cgcagtc aaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
ctctccctgt ctccgggtgg cggcggaggc tccggaggcg gaggaagtgg cggcgggtggc 1380
agctctccag gccagggcac ccagagcgag aacagctgca cccacttccc cggcaacctg 1440
cccaacatgc tgcgggacct gagggacgcc ttcagcagag tga aaacctt cttccagatg 1500
aaggaccagc tggacaacct gctgctgaaa gagagcctgc tggaaagattt caagggtac 1560
ctgggctgtc aggccctgag cgagatgac cagtctacc tggaaagaagt gatgcccag 1620
gccgagaacc aggacccca catcaaggcc cagtgaaaca gcctgggcga gaacctgaaa 1680
acctgcggc tgagactgcg gcggtgccac agatttctgc cctgcgagaa cggcggaggc 1740
cttggcggaa agtccaaggc cgtggaacag gtgaagaacg ccttcaacaa gctgcaggaa 1800
aagggcattt acaaggccat gagcgagttc gacatcttca tcaactacat cgaagcttac 1860
atgacaatga agatacga aa c 1881

<210> 17
<211> 627
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 IgG -(IL-10M1)2 (HC P329G LALA + IL-10M1)

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

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

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
 435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly
450 455 460

Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu
465 470 475 480

Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr
485 490 495

Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser
500 505 510

Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu
515 520 525

Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln
530 535 540

Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys
545 550 555 560

Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu
565 570 575

Asn Gly Gly Gly Ser Gly Gly Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys
580 585 590

Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser
595 600 605

Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys
610 615 620

Ile Arg Asn
625

<210> 18
<211> 1881
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 IgG -(IL-10M1)2 (HC P329G LALA + IL-10M1)

<400> 18
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc ttagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtgg 300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtc ccgtctcgag tgctagcacc 360
aaggggcccat cggctttccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtagac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagltgagcc caaatcttgt 660
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccac gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgaict cccggacccc tgaggtcaca 780
tgctgtggtagc tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtc agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcaaatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
cgtgtgggtc gcgtcttcac cgtctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
tgcaagggtc ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1080
aaccagggtc gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140
tggtgagagc atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcttccgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
ctctccctgt ctccgggttg cggcgagggc lccggaggcg gaggaagtgg cggcgggtggc 1380
agctctccag gccagggcac ccagagcgag aacagctgca cccacttccc cggcaacctg 1440
cccaaatgc tgcgggacct gagggacgcc ttcagcagag tgaacacctt ctccagatg 1500
aaggaccagc tggacaacct gctgctgaaa gagagcctgc tggagaattt caagggtctac 1560
ctgggctgtc aggccctgag cgagatgac cagttctacc tggagaagt gatgccccag 1620
gccgagaacc aggacccga catcaaggcc cacgtgaaca gcctgggcga gaacctgaaa 1680
acctgcggc tgaactgagc gcgggtgccac agatttctgc cctgcgagaa cggcggaggc 1740
tctggcgga agtccaaggc cgtggaacag gtgaagaac ccttcaacaa gctgcaggaa 1800
aagggtatc acaaggccat gagcgagtc gacatcttca tcaactacat cgaagcttac 1860
atgacaatga agatcgaaa c 1881

<210> 19
<211> 396
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 Fab - IL-10 (HC + IL-10)
<400> 19

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

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

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

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

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

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp	Thr Ala Val Tyr	Tyr Cys
85	90	95	
Ala Lys Gly Trp	Leu Gly Asn Phe Asp	Tyr Trp Gly Gln	Gly Thr Leu
100	105	110	
Val Thr Val Ser Ser	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	Val Phe Pro Leu	
115	120	125	
Ala Pro Ser Ser Lys Ser	Thr Ser Gly Gly Thr	Ala Ala Leu Gly Cys	
130	135	140	
Leu Val Lys Asp Tyr	Phe Pro Glu Pro Val	Thr Val Ser Trp Asn Ser	
145	150	155	160
Gly Ala Leu Thr	Ser Gly Val His Thr	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser	
165	170	175	
Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser Val	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser	
180	185	190	
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr	Ile Cys Asn Val Asn His	Lys Pro Ser Asn	
195	200	205	
Thr Lys Val Asp Lys Lys	Val Glu Pro Lys Ser	Cys Asp Gly Gly Gly	
210	215	220	
Gly Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly	Ser Ser Pro Gly Gln	
225	230	235	240
Gly Thr Gln Ser	Glu Asn Ser Cys Thr	His Phe Pro Gly Asn Leu Pro	
245	250	255	
Asn Met Leu Arg Asp	Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val	Lys Thr Phe	
260	265	270	
Phe Gln Met Lys Asp	Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu	Lys Glu Ser Leu	
275	280	285	
Leu Glu Asp Phe Lys Gly	Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met		
290	295	300	
Ile Gln Phe Tyr Leu	Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp		
305	310	315	320
Pro Asp Ile Lys	Ala His Val Asn Ser	Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr	
325	330	335	
Leu Arg Leu Arg	Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro	Cys Glu Asn	
340	345	350	
Lys Ser Lys Ala Val	Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln		
355	360	365	

Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn
370 375 380

Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
385 390 395

<210> 20
<211> 1188
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 Fab - IL-10 (HC + IL-10)

<400> 20
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtagtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat 240
ctgcagatga acagccigag agccgaggac acggccgtat attacigtgc gaaagggtgg 300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctggta ccgtctcgag tgctagcacc 360
aaggggccca gcgtgttcc tctggcccc agcagcaaga gcacaagcgg cggaacagcc 420
gccctgggct gcctgglgaa ggactacttc cccgagcccc tgaccgtgtc ttggaacagc 480
ggagccctga ccagcggcgt gcacaccttt ccagccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 540
agcctgagca gcgtggtagc cgtgcctagc agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgt 660
gatggcggcg gaggctccgg aggcggagga tctgggggag gcggaagtag cccggggccag 720
ggcaccacaga gcgagaacag ctgcacccac tccccggca acctgcccac catgctgcgg 780
gacctgaggg agcccttcag cagagtgaac accctcttcc agatgaagga ccagctggac 840
aaacctgtgc tgaaagagag cctgtctgaa gatitcaagg gctacctggg ctgtcaggcc 900
ctgagcgaga tgatccagtt ctacctgaa gaagtgatgc cccaggccga gaaccaggac 960
cccagacatc agggccacgt gaacagcctg ggcgagaacc tgaaaacctt gcggctgaga 1020
ctgcggcggt gccacagatt tctgccctgc gagaacaaga gcaaggccgt ggaacagggtg 1080
aagaacgcct tcaacaagct gcaggaaaag ggcatctaca aggccatgtc cgagttcgac 1140
atcttcatca actacatcga agcttacctg acaatgaaaa tccgcaat 1188

<210> 21
<211> 812
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 Fab - scIL-10 - Fab (HC + scIL-10 + HC)

<400> 21

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly Gln
 225 230 235 240
 Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu Pro
 245 250 255
 Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe
 260 265 270
 Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu
 275 280 285
 Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met
 290 295 300
 Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp
 305 310 315 320
 Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr
 325 330 335

Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn
 340 345 350
 Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln
 355 360 365
 Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn
 370 375 380
 Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 405 410 415
 Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
 420 425 430
 Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
 435 440 445
 Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
 450 455 460
 Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
 465 470 475 480
 Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
 485 490 495
 Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
 500 505 510
 Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
 515 520 525
 Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
 530 535 540
 Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
 545 550 555 560
 Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
 565 570 575
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 580 585 590
 Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 595 600 605
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 610 615 620
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

[illegible]

<210>	22
<211>	2436
<212>	DNA
<213>	人工序列

<220>
<223> 4G8 Fab - scIL-10 - Fab (HC + scIL-10 + HC)

<400> 22	
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggct cctgagacac	60
tccctgtgcag cctccggatt cacctttagc agtttatgcc tagcttgggt ccgccaggct	120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gttgtggtag cacatactac	180
gcagactccg tgaaggggccg gttcaccatc tccagagaca atlccagaa cacgctgtat	240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg	300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctggtca ccgtctcag tgctagcacc	360
aaggggcccca gcgtgtttcc tctggccccc agcagcaaga gcacaagcgg cggaacagcc	420
gccctggggt gcctgggtgaa ggactacttc ccgagcccc tgaccgtgtc ttggaacagc	480
ggagccctga ccagcggcgt gcacaccttt ccagccgtgc tgcagagcag cggcctgtac	540
agccttagca gcgtggtgac cgtgcctagc agcagccctg gcacccagac ctacatctgc	600

```

aacglgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgt      660
gatggcggcg gaggctccgg aggcggagga tctgggggag gcggaagtag cccggggccag      720
ggcaccacaga gcgagaacag ctgcacccac ttccccggca acctgcccac catgctgcgg      780
gacctgaggg acgccttcag cagagtgaaa accttcttcc agatgaagga ccagctggac      840
aacctgctgc tgaagagag cctgctggaa gatttcaagg gctacctggg ctgicaggcc      900
ctgagcgaga tgatccagti ctacctggaa gaagtgatgc cccaggccga gaaccaggac      960
cccacatca agggccacgt gaacagcctg ggcgagaacc tgaaaaccct gcggctgaga     1020
ctgcggcggt gccacagatt tctgccctgc gagaacaaga gcaaggccgt ggaacaggtg     1080
aagaacgcct tcaacaagct gcaggaaggg ggcatctaca aggccatgtc cgagttcgac     1140
atcttcatca actacatcga agcttacctg accatgaaga tcagaaacgg cggaggcgga     1200
tctggcggcg gtggaagtgg aggcggagga tctgggggag gcggaagtag cccggggccag     1260
ggcaccacaga gcgagaacag ctgcacccac ttccccggca acctgcccac catgctgcgg     1320
gacctgaggg acgccttcag cagagtgaaa accttcttcc agatgaagga ccagctggac     1380
aacctgctgc tgaagagag cctgctggaa gatttcaagg gctacctggg ctgicaggcc     1440
ctgagcgaga tgatccagti ctacctggaa gaagtgatgc cccaggccga gaaccaggac     1500
cccacatca agggccacgt gaacagcctg ggcgagaacc tgaaaaccct gcggctgaga     1560
ctgcggcggt gccacagatt tctgccctgc gagaacaaga gcaaggccgt ggaacaggtg     1620
aagaacgcct tcaacaagct gcaggaaggg ggcatctaca aggccatgtc cgagttcgac     1680
atcttcatca actacatcga ggcttacctg acaatgaaaa tccgcaatgg cgggggagga     1740
tcaggtggag ggggcagcgg tggtaggagga tccgaggtgc aattgttggg gcttggggga     1800
ggcttggtag agcctggggg gtccctgaga ctctctgtg cagcctccgg attcaccttt     1860
agcagttatg ccatgagctg ggtccgccag gtccagggga aggggctgga gtgggtctca     1920
gctattagtg gtagtggtag tagcacatag tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc     1980
atctccagag acaattccaa gaacacgtg taatctgcaga tgaacagcc tgaagccgag     2040
gacacggccc taatattactg tgcgaaaggg tggctgggta atttgacta ctggggccaa     2100
ggaacccctg tcaccgtctc gagtgctagc accaagggcc catcggtctt cccctggca     2160
ccctcccca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac     2220
ttccccgaac cggtagcgtt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc     2280
ttcccggtc tcctacagtc ctcaggatc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc     2340
tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc     2400
aaggtagata agaaagtga gcccaaatct tgtgac      2436

```

<210> 23
 <211> 638
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 4G8 Fab -IL-10M1 - Fab (HC + IL-10M1 + HC)
 <400> 23

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

1	5	10	15
Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Ala	Ser Gly Phe Thr Phe	Ser Ser Tyr
	20	25	30
Ala Met Ser	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Val	
	35	40	45
Ser Ala Ile	Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr	Ala Asp Ser Val	
	50	55	60
Lys Gly Arg	Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn	Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
	65	70	75
Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90	95
Ala Lys Gly	Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	Thr Leu	
	100	105	110
Val Thr Val	Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	Val Phe Pro Leu	
	115	120	125
Ala Pro Ser	Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr	Ala Ala Leu Gly Cys	
	130	135	140
Leu Val Lys	Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr	Val Ser Trp Asn Ser	
	145	150	155
Gly Ala Leu	Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	Leu Gln Ser	
	165	170	175
Ser Gly Leu	Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro	Ser Ser Ser	
	180	185	190
Leu Gly Thr	Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His	Lys Pro Ser Asn	
	195	200	205
Thr Lys Val	Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly		
	210	215	220
Gly Ser Gly	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly Gln		
	225	230	235
Gly Thr Gln	Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn	Leu Pro	
	245	250	255
Asn Met Leu	Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val	Lys Thr Phe	
	260	265	270
Phe Gln Met	Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu	Lys Glu Ser Leu	
	275	280	285
Leu Glu Asp	Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met		
	290	295	300

Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp
 305 310 315 320
 Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr
 325 330 335
 Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn
 340 345 350
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
 355 360 365
 Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
 370 375 380
 Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile
 385 390 395 400
 Arg Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 405 410 415
 Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 420 425 430
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
 435 440 445
 Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 450 455 460
 Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 465 470 475 480
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 485 490 495
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 500 505 510
 Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 515 520 525
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 530 535 540
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 545 550 555 560
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 565 570 575
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 580 585 590
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 595 600 605

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
610 615 620

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
625 630 635

<210> 24
<211> 1914
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8 Fab -IL-10M1 - Fab (HC + IL-10M1 + HC)

<400> 24
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cciccggatt caccttttagc agttatgccg tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaaggggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat 240
ctgcagaiga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctggta ccgtctcag tgctagcacc 360
aaggggcccca gcgtgtttcc tctggccccc agcagcaaga gcacaagcgg cggaacagcc 420
gcccctgggt gcctggtgaa ggactacttc cccgagcccc tgaccgtgtc ttggaacagc 480
ggagccctga ccagcggcgt gcacaccttt ccagccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 540
agcctgagca gcgtggtgac cgtgcctagc agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgt 660
gatggcggcg gaggctccgg aggcggagga agtggcggag gcggcagcag cccaggccag 720
ggcaccagat ctgagaacag ctgcacccac ttcccaggca accctgcctaa catgcttcga 780
gatctccgag atgccttcag cagagtgaag actttctttc aaatgaagga tcagctggac 840
aacttgttgt taaaggagtc ctgtctggag gactttaagg gttacctggg ttgccaagcc 900
ttgtctgaga tgatccagtt ttacctggag gaggtgatgc cccaagctga gaaccaagac 960
ccagacatca aggcgatgt gaactccctg ggggagaacc tgaagacct caggctgagg 1020
ctacggcgct gtcacgatt tcttccctgt gaaaacggcg gaggtcttgg aggcaagagc 1080
aaggccgtgg agcaggtgaa gaacgccttt aataagctcc aagagaaagg catctacaaa 1140
gccatgagtg agtttgacat cttcatcaac tacatagaag cttacatgac aatgaagata 1200
cgaaacggcg gcggaggctc cgttggcgga ggaagtggcg gaggaggatc cgaggtgcaa 1260
ttgttggagt ctgggggagg cttggtacag cctggggggt ccttgagact ctctgtgca 1320
gcctccggat tcacctttag cagttatgcc atgagctggg tccgccaggc tccagggaag 1380
gggctggagt gggcttcagc tattagtggg agtggtggtg gcacatacta cgcagactcc 1440
gtgaagggcc gggttccat ctccagagac aattccaaga acacgtgta tctgcagatg 1500
aacagcctga gagccgagga cacggccgta tattactgtg cgaaaggggt gctgggtaat 1560
tttgactact gggggccaagg aacctggtc accgtctcga gtgctagcac caagggccca 1620
tcggtcttcc ccttggcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 1680
tgcttggta aggactactt ccccgaaacc glgacggtgt cgtggaactc aggcgcctg 1740



accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc 1800
agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat 1860
cacaagccca gcaacaccaa ggtggataag aaagttgagc ccaaatcttg tgac 1914

<210> 25
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B9 IgG - IL-10 (LC)

<400> 25

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 26

<211> 645
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B9 IgG - IL-10 (LC)

<400> 26
gagatcgtgc tgaccagtc ccccggcacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
ctgtcctgca gagcctccca gtccgtgacc tcctcctacc tcgacctgta tcagcagaag 120
cccgccagg cccctcggt gtgatcaac gtgggcagtc ggagagccac cggcatccct 180
gaccggttct cgggtcttgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc cggcttgaa 240
cccaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggcacaa tgctgcccc cacttttggc 300
cagggcacca aggtggaaat caagcgtacg gtggcgcctc cctccgtgtt catcttccca 360
ccctccgacg agcagctgaa gtccggcacc gccctccgtc tgtgacctgt gaacaacttc 420
taccctccg aggcgaaggt gcagtggag gtggacaacg cctgcagtc cggcaactcc 480
caggaatccg tcaccgagca ggactccaag gacagcacct actccctgtc ctccaccctg 540
accctgtcca aggcggacta cgagaagcac aagggtgtac cctgcgaagt gaccaccag 600
ggcctgtcca gccccgtgac caagtccttc aaccggggcg agtgc 645

<210> 27
<211> 626
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B9 IgG - IL-10 (HC P329G LALA + IL-10)

<400> 27
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly

435

440

445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

450455460

Gly Ser Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His

465470475480

Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe

485490495

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu

500505510

Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys

515520525

Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro

530535540

Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu

545550555560

Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg

565570575

Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn

580585590

Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu

595600605

Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile

610615620

Arg Asn

625

<210> 28
<211> 1878
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B9 IgG - IL-10 (HC P329G LALA + IL-10)

<400> 28

gagggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg

60

tcttgcgccg ccagcggcct cacccttcagc agctacgccg tgagctgggt ccgccaggcc

120

cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac

180

gccgacagcg tgaaggggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac

240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg

300

ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc

360

aagggcccat cggctctccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg

420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca

480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac 540
tccctcagca gcgtggigac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
gacaaaatic acacatgccc accgtgcccc gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720
ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgactt cccggacccc tgaggtcaca 780
tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtc agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcataaigc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
cgtgtgggtc gcgtctctac cgtcttcgac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
tgaagggtc ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1080
aaccagggtc gcctgacctg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctccccgt gctggactcc 1200
gacggctctt tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggig gcagcagggg 1260
aacgtcttct catgtctcgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
ctctccctgt ctccgggtgg cggaggggga tctggagggt gcggtctcgg aggcggagga 1380
tctgggggag gcggaagtag cccggggccag ggcaccaga gcgagaacag ctgcaccac 1440
ttccccgga acctgcccc catgtctcgg gacctgaggg acgccctcag cagagtgaag 1500
accttcttcc agatgaagga ccagctggac aacctgtctc tgaagagag cctgctggaa 1560
gatitcaagg gctacctggg ctgtcaggcc ctgagcgaga tgaatcagtt ctacctggaa 1620
gaagtgaatc cccaggccga gaaccaggac cccgacatca aggccacgt gaacagcctg 1680
ggcgagaacc tgaaaacct gcggctgaga ctgcggcggt gccacagatt tctgccctgc 1740
gagaacaaga gcaaggccgt ggaacagggt aagaacgct tcaacaagct gcaggaaaag 1800
ggcatctaca aggcatgtc cgagttcgac atcttcatca actacatcga agcttcatg 1860
acaatgaaaa tccgcaat 1878

<210> 29
<211> 627
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B9 IgG -(IL-10M1)2 (HC P329G LALA + IL-10M1)
<400> 29

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly
450 455 460

Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu
465 470 475 480

Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr
485 490 495

Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser
500 505 510

Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu
515 520 525

Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln
530 535 540

Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys
545 550 555 560

Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu
565 570 575

Asn Gly Gly Gly Ser Gly Gly Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys
580 585 590

Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser
595 600 605

Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys
610 615 620

Ile Arg Asn
625

<210> 30
<211> 1881
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B9 IgG -(IL-10M1)2 (HC P329G LALA + IL-10M1)

<400> 30
gagggtgcagc tgctcgaaaag cggcggaggga ctgggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60
tcttgcgccg ccagcggcctt caccttcagc agctacgcc a tgagctgggt cggccaggcc 120
cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180
gccgacagcg tgaaggggccg gtaccacatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagccttgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300
ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctgggtca cagtgtccag cgctagcacc 360
aaggggcccat cggctcttccc cctggcacc ctcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgttc tacagtcttc aggactctac 540
tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttagacc caaatcttgt 660
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
tgcggtgttg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
cgtgtgtgca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
tgcaagggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1080
aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggig gcagcagggg 1260
aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
ctctccctgt ctccgggttg cggcggaggc tccggaggcg gaggaagtgg cggcgggtggc 1380
agctctccag gccagggcac ccagagcgag aacagctgca cccacttccc cggcaacctg 1440
cccaacatgc tgcgggacct gagggacgcc ttacagcagag tgaaaacctt cttccagatg 1500
aaggaccagc tggacaacct gctgctgaaa gagagcctgc tggaaagatt caagggtac 1560
ctgggctgtc aggccctgag cgagatgac cagttctacc tggaaagaagt gatgccccag 1620
gccgagaacc aggaccccga calcaaggcc cacttgaaca gcctgggcga gaacctgaaa 1680
accctgcggc tgagactgcg gcggtgccac agatttctgc cctgcgagaa cggcggaggc 1740
tctggcgga agtccaaggc cgtggaacag gtgaagaacg ccttcaacaa gctgcaggaa 1800
aagggcactc acaaggccat gagcgagttc gacatcttca tcaactacat cgaagcttac 1860
atgacaatga agatacgaaa c 1881

<210> 31
<211> 396
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 4B9 Fab - IL-10 (HC + IL-10)

<400> 31

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly Gln
 225 230 235 240

Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu Pro
 245 250 255

Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe
 260 265 270

Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu
 275 280 285

Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met
290 295 300

Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp
305 310 315 320

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

Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn
340 345 350

Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln
355 360 365

Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn
370 375 380

Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
385 390 395

<210> 32
<211> 1188
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B9 Fab - IL-10 (HC + IL-10)

<400> 32
gaggatgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60
tcttgcgcgc ccagcggcctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120
cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180
gccgacagcg tgaaggcccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300
ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc 360
aaggggccca gcgtgtttcc tctggccccc agcagcaaga gcacaagcgg cggaacagcc 420
gccctgggct gcctggtgaa ggaclacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ttggaacagc 480
ggagccctga ccagcggcgt gcacaccttt ccagccgtgc tgacagagcag cggccgtac 540
agccagagca gcgtgggtgac cgtgcctagc agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgigaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgt 660
gatggcggcg gaggctccgg aggcggagga tctgggggag gcggaagtag cccggggccag 720
ggcaccaga gcgagaacag ctgcaccac tccccggca acctgccc aaatgctgcgg 780
gacctgaggg acgccttcag cagagtga aaaccttctc agatgaagga ccagctggac 840
aacctgctgc taaaagagag cctgctggaa gatitcaagg gctacctggg ctgtcaggcc 900
ctgagcgaga tgatccagtt ctacctggaa gaagtgaigc cccaggccga gaaccaggac 960
cccgacatca agggccacgt gaacagcctg ggcgagaacc tgaaaacctt gcggctgaga 1020
ctgcggcggt gccacagatt tctgccctgc gagaacaaga gcaaggccgt ggaacaggtg 1080
aagaacgcct tcaacaagct gcaggaaaag ggcattctaca aggcattgtc cgagttcgac 1140

atcttcatca actacatcga agctttacatg acaatgaaaa tccgcaat 1188

<210> 33
<211> 812
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B9 Fab - scIL-10 - Fab (HC + IL-10 + HC)
<400> 33

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu Pro

245

250

255

Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe
 260 265 270

Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu
 275 280 285

Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met
 290 295 300

Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp
 305 310 315 320

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

Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn
 340 345 350

Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln
 355 360 365

Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn
 370 375 380

Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 405 410 415

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
 420 425 430

Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
 435 440 445

Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
 450 455 460

Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
 465 470 475 480

Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
 485 490 495

Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
 500 505 510

Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
 515 520 525

Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
 530 535 540

Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
545 550 555 560

Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
565 570 575

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

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

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

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
625 630 635 640

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
645 650 655

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

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

Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
690 695 700

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
705 710 715 720

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
725 730 735

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
740 745 750

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
755 760 765

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
770 775 780

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
785 790 795 800

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
805 810

<210> 34
<211> 2436
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B9 Fab - scIL-10 - Fab (HC + IL-10 + HC)

<400> 34
 gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60
 tcttgcgccg ccagcggctt caccctcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120
 cctggcaagg gactggaatg gggtgccgcc atcatcggt ctggcgccag caccctactac 180
 gccgacagcg tgaaggggcg gtaccaccatc agccggggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300
 ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctgggtc cagtgctcag cgctagcacc 360
 aaggggcccca gcgtgtttcc tctggccccc agcagcaaga gcacaagcgg cggaacagcc 420
 gccctgggct gccctgtgaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ttggaacagc 480
 ggagccctga ccagcggcgt gcacaccttt ccagccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 540
 agcctgagca gcgtgggtgac cgtgcctagc agcagcctgg gcaccagac ctacatctgc 600
 aacgtgaacc acaagcccg caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgt 660
 gatggcggcg gaggctccgg aggcggagga tctgggggag gcggaagtag cccgggccag 720
 ggcacccaga gcgagaacag ctgcaccac tccccggca acctgcccac catgctgcgg 780
 gacctgaggg acgccttcag cagagtgaac accttcttcc agatgaagga ccagctggac 840
 aacctgctgc tgaagagag cctgctggaa gatitcaagg gctacctggg ctgtcaggcc 900
 ctgagcgaga tgatccagtt ctacctggaa gaagtgatgc cccaggccga gaaccaggac 960
 cccgacatca agggccacgt gaacagcctg ggcgagaacc tgaaccctt gcggctgaga 1020
 ctgcggcggt gccacagatt tctgccctgc gagaacaaga gcaaggccgt ggaacagggtg 1080
 aagaacgcct tcaacaagct gcaggaaaag ggcatctaca aggccatgtc cgagttcgac 1140
 atcttcatca actacatcga agcttacatg accatgaaga tcagaaacgg cggaggcgga 1200
 tctggcggcg gtggaagtgg aggcggagga tctgggggag gcggaagtag cccgggccag 1260
 ggcacccaga gcgagaacag ctgcaccac tccccggca acctgcccac catgctgcgg 1320
 gacctgaggg acgccttcag cagagtgaac accttcttcc agatgaagga ccagctggac 1380
 aacctgctgc tgaagagag cctgctggaa gatitcaagg gctacctggg ctgtcaggcc 1440
 ctgagcgaga tgatccagtt ctacctggaa gaagtgatgc cccaggccga gaaccaggac 1500
 cccgacatca agggccacgt gaacagcctg ggcgagaacc tgaaccctt gcggctgaga 1560
 ctgcggcggt gccacagatt tctgccctgc gagaacaaga gcaaggccgt ggaacagggtg 1620
 aagaacgcct tcaacaagct gcaggaaaag ggcatctaca aggccatgtc cgagttcgac 1680
 atcttcatca actacatcga ggccctacatg acaatgaaaa tccgcaatgg cgggggagga 1740
 tcaggtggag ggggcagcgg tgggtggagga tccgaggtgc aattgcctga aagcggcgga 1800
 ggactggtgc agcctggcgg cagcctgaga ctgtcttgcg ccgccagcgg ttacaccttc 1860
 agcagctacg ccatgagctg ggtccgccag gccctggca agggacatga atgggtgtcc 1920
 gccatcatcg gctctggcgc cagcacctac tacgccgaca gcgtgaaggg ccggttcacc 1980
 atcagccggg acaacagcaa gaacaccctg tacctgcaga tgaacagcct gcgggccgag 2040
 gacaccgccg tgtactactg cgccaaggga tgggtcggcg gcttcaacta ctggggacag 2100
 ggcaacctgg tcacagtgtc cagcgctagc accaagggcc catcggtctt cccctggca 2160
 cctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac 2220

ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc 2280
ttcccggtcgt tcttacagtc ctccaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc 2340
tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc 2400
aagggtggaia agaaagtiga gcccaaatct tgtgac 2436

<210> 35
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導肽

<400> 35

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 36
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導肽

<400> 36
atgggcctggt cctgcatcat cctgtttctg gtcgccacag ccaccggcgt gcactct 57

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR1 (1)

<400> 37

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 38
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR1 (1)

<400> 38
agttatgccca tgagc 15

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR1 (2)

<400> 39

Ser His Ala Met Ser
1 5

<210> 40
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR1 (2)

<400> 40
agtcatgcta tgagc 15

<210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR2 (1)

<400> 41
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 42
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR2 (1)

<400> 42
gctatttagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaag 48

<210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR2 (2)

<400> 43
Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 44
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR2 (2)

<400> 44
gccatcatcg gctctggcgc cagcacctac tacgccgaca gcgtgaag 48

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2 (3)
<400> 45
Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 46
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR2 (3)

<400> 46
gctatttggg ctagtgggga gcaatactac gcagaticcg tgaag 45

<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR3 (1)

<400> 47
Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe Gly
1 5

<210> 48
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR3 (1)

<400> 48
tactgcgcc aaggatgggt cggc 24

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR3 (2)

<400> 49
Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly
1 5

<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR3 (2)

<400> 50
tactgtcga aagggtggct gggt 24

<210> 51
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1 (1)

<400> 51

Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu
1 5 10

<210> 52

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1 (1)

<400> 52

agagcctccc agtccgtgac ctccctcctac ctc 33

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1 (2)

<400> 53

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu
1 5 10

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR1 (2)

<400> 54

agagcctccc agtccgtgtc ccggtcctac ctc 33

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR2 (1)

<400> 55

Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala
1 5

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LCDR2 (1)

<400> 56

aacgigggca gtcggagagc c 21

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR2 (2)

<400> 57

Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala
1 5

<210> 58
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR2 (2)

<400> 58

atcggcgcct ctaccagagc c 21

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR3 (1)

<400> 59

Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro
1 5

<210> 60
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR3 (1)

<400> 60

tgccagcagg gcatcatgct gcccccc 27

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR3 (2)

<400> 61

Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro
1 5

<210> 62
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR3 (2)

<400> 62

tgccagcagg gccaggtcat ccctccc 27

<210> 63
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8; VH

<400> 63

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 64
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8; VH

<400> 64

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtg gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtgg 300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 65
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8; VL

<400> 65
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 66
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4G8; VL
<400> 66
gagatcgtgc tgaccacgac ccccggcacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
ctgtctctga gaggctccca gtccgtgtcc cggctcctacc tcgcctggta tcagcagaag 120
cccgggccagg cccctcggct gctgatcatc ggcgcctcta ccagagccac cggcatccct 180
gaccgggttct ccggctctgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctggaa 240
cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggccagg tcatccctcc cacctitggc 300
cagggcacca aggtggaaat caag 324

<210> 67
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B9; VH
<400> 67
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210>	68
<211>	351
<212>	DNA
<213>	人工序列

<220>
<223> 4B9; VH

<400>	68	
gagggtgcagc	tgctcgaaag	cggcgggagga ctgggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60
tctttgcgcc	ccagcggcct	caccttcagc agctacgcc ttagctgggt ccgccaggcc 120
cctggcaagg	gactggaatg	ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180
gccgacagcg	tgaagggccg	gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga	acagcctcgc	ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300
tlcggcggt	tcaactactg	gggacagggc accctggtca cagtgtccag c 351

<210>	69
<211>	108
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<223> 4B9; VL

<400> 69

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

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

<210> 70
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B9; VL

<400> 70
gagatcgtgc tgaccagtc ccccggcacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
cigtcttgca gagcctccca gtccgtgacc tcctcctacc tcgcctggta tcagcagaag 120
cccggccagg cccctcggct gctgatcaac gtgggcagtc ggagagccac cggcatccct 180
gaccggttct ccggctcttg ctcgggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctggaa 240
cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggcatca tgcctgcccc cacctttggc 300
cagggcacca aggtggaaat caag 324

<210> 71
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 28H1; VH

<400> 71

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

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

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

Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 28H1; VH

<400> 72
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccittagc agtcatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggcctggagtg ggtctcagct atttgggcta gtggggagca atactacgca 180
gactccgtga agggccgggt caccatcicc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
cagatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa aggggtggctg 300
ggtaattttg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgagt 348

<210> 73
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 28H1; VL

<400> 73
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 74
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 28H1; VL

<400> 74
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtcttigt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtc gagtgtagc cgcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcatt ggggcctcca ccagggccac tggcatcca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcacatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtcagg ttattcccc tacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 75
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 3F2; VH

<400> 75

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

<210> 76
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 3F2; VH

<400> 76

gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttgggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtg gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaaggcccg gtaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagaiga acagccigag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtgg 300
tttgggtggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 77
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 3F2(YS); VL

<400> 77

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

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

<210> 78
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 3F2(YS); VL

<400> 78
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtc gagtggtacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
ccggccagg ctccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatcca 180
gacagggtca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
ccgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 79
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 79

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 80

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 81
<211> 748
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 FAP 胞外結構域+聚 lys 標籤+his6 標籤

<400> 81

Arg Pro Ser Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
1 5 10 15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe
20 25 30

Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
35 40 45

Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
50 55 60

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

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
85 90 95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
100 105 110

Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
115 120 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130 135 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
145 150 155 160

Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
 165 170 175
 Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
 180 185 190
 Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
 195 200 205
 Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
 210 215 220
 Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile
 225 230 235 240
 Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
 245 250 255
 Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
 260 265 270
 Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
 275 280 285
 Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
 290 295 300
 Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
 305 310 315 320
 Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile
 325 330 335
 Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
 340 345 350
 Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
 355 360 365
 Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
 370 375 380
 Ser Ser Asn Glu Phe Glu Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
 385 390 395 400
 Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
 405 410 415
 Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr
 420 425 430
 Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
 435 440 445
 Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
 450 455 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
465 470 475 480

Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
515 520 525

Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
530 535 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
565 570 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
580 585 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
705 710 715 720

His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 82
<211> 2244

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 FAP 胞外結構域+聚 lys 標籤+his6 標籤

<400> 82
cgcccttcaa gagttcataa ctctgaagaa aatacaatga gagcattcac actgaaggat 60
atittaaatg gaacattttc ttataaaaca ttttttccaa actggatttc aggacaagaa 120
taicttcaic aatctgcaga taacaalata gtactttata atatigaaac aggacaatca 180
tataccattt tgagtaatag aaccatgaaa agtgtgaaig cttcaaatla cggcttatca 240
ccigalcggc aatttgata tctagaaagt gattattcaa agcttiggag atactcttac 300
acagcaacat attacatcta tgaccttagc aatggagaat ttgtaagagg aaatgagctt 360
cctcgltcaa ttcagtattt atgctggctg ccgttggga gtaaatagc atatgctat 420
caaaacaata tctatttgaa acaaagacca ggagatccac ctttcaaat aacatttaat 480
ggaagagaaa ataaaatatt taatggaatc ccagactggg ttatgaaga ggaatgctt 540
gctacaaaat atgctctctg gtggtctcct aatggaaaat ttttggcata tgcggaattt 600
aatgalacgg atataccagt taitgcctat tcctattatg gcgatgaaca atatcctaga 660
acaataaata ttccataccc aaaggctgga gctaagaatc ccgttgilcg gatatttatt 720
atcgalacca ctaccctgc giatgtaggt cccaggaag tgcctgttcc agcaatgata 780
gcctcaagtg attattattt cagtggctc acgtgggtta ctgatgaacg agtatgttg 840
cagtggctaa aaagagtcca gaatgttgc gtccgtgcta tatgtactt cagggaagac 900
tggcagacat gggattgtcc aaagaccag gagcatatag aagaaagcag aactggatgg 960
gctggiggat tcttgtttc aacaccagt ttcagctatg atgccattc gtactacaaa 1020
atatlttagtg acaaggatgg ctacaaacat attactata tcaaagacac tigtgaaaat 1080
gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccataaata tattcagagt aacacaggat 1140
tcactgtttt attctagcaa tgaattigaa gaataccctg gaagaagaaa catctacaga 1200
attagcattg gaagctatcc tccaagcaag aagtgtgta ctigccaict aaggaaagaa 1260
aggtgccaat attacacagc aagtctcagc gactacgcca agtactatgc acttgtctgc 1320
tacggcccag gcatcccat ttccaccct catgatggac gcactgatca agaaatiaaa 1380
atcctggaag aaaacaagga attgaaaaat gctttgaaaa atatccagct gcctaaagag 1440
gaaattaaga aactgaagt agatgaaatt actttaiggt acaagatgat tcttccicct 1500
caatttgaca gatcaaagaa gtatcccttg ctaattcaag tgtatggtag tccctgcagt 1560
cagagtgtaa ggictgtatt tgcgttlaat tggatatctt atcttgcaag taaggaaggg 1620
atggicattg ccttggtaga tggctgagga acagctttcc aaggtagaaa actccictat 1680
gcagtgtatc gaaagctggg tgtttatgaa gttgaagacc agattacagc tgtcagaaaa 1740
ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaaaaa agaatagccca tatggggctg gtcctatgga 1800
ggatacggtt catcacatggc ccttgcatct ggaactggc ttttcaaatg tggatatgca 1860
gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcgtctgtct acacagagag attcatgggt 1920
ctccaacaa aggatgataa tcttgagcac tataagaatt caactgtgat ggcaagagca 1980
gaatatitca gaaatgtaga ctatctctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040

tttcaaaact cagcacagat tgctaaagct ctggttaatg cacaagtgga tttccaggca 2100
atgtgttact ctgaccagaa ccacggctta tccggcctgt ccacgaacca cttatacacc 2160
cacatgaccc acttcctaaa gcagtgtttc tctttgtcag acggcaaaaa gaaaaagaaa 2220
aagggccacc accatcacca tcac 2244

<210> 83
<211> 749
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠類 FAP 胞外結構域+聚 lys 標籤+his6 標籤
<400> 83

Arg Pro Ser Arg Val Tyr Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu
1 5 10 15
Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Tyr Phe
20 25 30
Pro Asn Trp Ile Ser Glu Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp
35 40 45
Asn Ile Val Phe Tyr Asn Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu
50 55 60
Ser Asn Ser Thr Met Lys Ser Val Asn Ala Thr Asp Tyr Gly Leu Ser
65 70 75 80
Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
85 90 95
Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly
100 105 110
Glu Phe Val Arg Gly Tyr Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
115 120 125
Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130 135 140
Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr
145 150 155 160
Gly Arg Glu Asn Arg Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
165 170 175
Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly
180 185 190
Lys Phe Leu Ala Tyr Val Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile
195 200 205
Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile
 225 230 235 240
 Val Asp Thr Thr Tyr Pro His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val
 245 250 255
 Pro Glu Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
 260 265 270
 Val Ser Ser Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
 275 280 285
 Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp
 290 295 300
 Glu Cys Pro Lys Asn Gln Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
 305 310 315 320
 Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr
 325 330 335
 Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
 340 345 350
 Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
 355 360 365
 Trp Glu Ala Ile Tyr Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
 370 375 380
 Ser Ser Asn Glu Phe Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
 385 390 395 400
 Ile Ser Ile Gly Asn Ser Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
 405 410 415
 Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys
 420 425 430
 Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser
 435 440 445
 Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu
 450 455 460
 Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val
 465 470 475 480
 Glu Ile Lys Lys Leu Lys Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met
 485 490 495
 Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
 500 505 510
 Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala
 515 520 525

Val Asn Trp Ile Thr Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala
530 535 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His
545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr
565 570 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile
580 585 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Ile Leu Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr
705 710 715 720

Thr His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 84
<211> 2247
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠類 FAP 胞外結構域+聚 lys 標籤+his6 標籤

<400> 84
cgtccctcaa gagtttacaa acctgaagga aacacaaaga gagctcttac cttgaaggat 60
attttaaatg gaacattctc atataaaaca tattttccca actggatttc agaacaagaa 120
tatcttcattc aatctgagga tgataacata gtatittata atattgaaac aagagaatca 180
tatacathtt tgagtaalag caccatgaaa agtgtgaatg ctacagatta tggtttgtca 240
cctgatcggc aatttgtgta tctagaaagt gattattcaa agctctggcg atattcatac 300

```

acacgcacat actacatcta cgaccttcag aatggggaat ttglaagagg atacgagctc 360
cctcgtccaa ttcagtatct atgciggtcg cctgttggga gtaaattagc atatgtatat 420
caaaacaata tttatttgaa acaaagacca ggagatccac ctttcaaat aacttatact 480
ggaagagaaa atagaatatt taatggaata ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt 540
gccacaaaat atgctctttg giggctccca gatggaaaat ttttggcata tgtagaattt 600
aatgaticag atataccaat tattgcctat tcttattatg gtgatggaca giatcctaga 660
actataaata ttccatatcc aaaggciggg gctaagaatc cggttggtcg tgtttttatt 720
gttgacacca cctacctca ccacgtgggc ccaatggaag tgccagtcc agaaatgata 780
gccicaagtg actattatit cagctggctc acatgggtgt ccagtgaacg agtatgcttg 840
cagtggtctaa aaagagtgcga gaatgtctca gtctgtctta tatgtatgtt cagggaagac 900
tggcatgcat gggaaatgtc aaagaaccag gagcatgtag aagaaagcag aacaggatgg 960
gctggiggat tctttgttcc gaccaccgt tttagccagg atgccattc ttactacaaa 1020
atatitlagcg acaaggatgg ttacaacat attcactaca tcaaagacac tgtggaaaat 1080
gctatlicaaa ttacaagtgg caagtgggag gccatatata tattccgcgt aacacaggat 1140
tcactgtttt attctagcaa tgaattlgaa ggttaccctg gaagaagaaa catctacaga 1200
attagcatig gaaactctcc tccgagcaag aagtgtgta ctigccaict aaggaaagaa 1260
agggtccaat attacacagc aagtttcagc tacaagcca agtactatgc actcgtctgc 1320
tatggccctg gccctcccat tccaccctc catgatggcc gcacagacca agaaatacaa 1380
gtattagaag aaaacaaaga acttgaaaat tctctgagaa atalccagct gcctaaagig 1440
gagattaaga agctcaaaga cgggggactg actttctggt acaagatgat tctgcctcct 1500
cagtttgaca gatcaaagaa giacccttgg ctaattcaag tgtatgggtg tcttgttagc 1560
cagagtgtta agtctgtgtt tgcgtttaat tggataactt atctcgcaag taaggagggg 1620
ataglcattg ccttggtaga tggctggggc actgcctttcc aaggtagcaa attcctgcat 1680
gccgtgtatc gaaaactggg tgtatataaa gttgaggacc agctcacagc tgtcagaaaa 1740
ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaagaa agaatagccca tatggggctg gtcctacgga 1800
ggttatgttt catccctggc ccttgcatct ggaactggtc ttttcaaatg tggcatagca 1860
gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcatctatct actcagagag attcatgggc 1920
ctccaacaa aggacgacaa tctcgaacac tataaaaatt caactgtgat ggcaagagca 1980
gaatatltca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040
tttcagaact cagcacagat tgctaaagct ttggttaatg cacaagtgga ttccaggcg 2100
atgtggtact ctgaccagaa ccatggatata ttatctgggc gctcccagaa tcattttat 2160
acccacatga cgcacttcct caagcaatgc ttttctttat cagacggcaa aaagaaaaag 2220
aaaaagggcc accaccaatca ccatcac 2247

```

<210> 85
 <211> 748
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 食蟹獼猴 FAP 胞外結構域+聚 lys 標籤+his6 標籤

<400> 85

Arg Pro Pro Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
1 5 10 15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe
20 25 30

Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
35 40 45

Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
50 55 60

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

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
85 90 95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
100 105 110

Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
115 120 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130 135 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
145 150 155 160

Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
165 170 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
180 185 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
195 200 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Phe Val Arg Ile Phe Ile
225 230 235 240

Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
245 250 255

Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260 265 270

Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
290 295 300

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile
325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Asp Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr
420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
435 440 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
450 455 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
465 470 475 480

Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
515 520 525

Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
530 535 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
565 570 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
580 585 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
705 710 715 720

His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 86
<211> 2244
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 食蟹獼猴 FAP 胞外結構域+聚 lys 標籤+his6 標籤(DNA)

<400> 86
cgccctccaa gagttcataa ctctgaagaa aatacaatga gagcactcac actgaaggat 60
attttaaatg ggacattttc ttataaaaca ttttttccaa actggatttc aggacaagaa 120
tatcttcac aatctgcaga taacaatata gtactttata atattgaaac aggacaatca 180
tataccattt tgagtaacag aaccatgaaa agtgtgaatg cttcaaatta tggcttatca 240
cctgatcggc aatttgtata tctagaaagt gattattcaa agctttggag atactcttac 300
acagcaacat attacatcta tgaccttagc aatggagaat ttgtaagagg aaatgagctt 360
cctcgtccaa itcagtattt atgctggctg cctgttggga gtaaattagc atatgtctat 420
caaaacaata tctatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaa at aacattta at 480
ggaagagaaa ataaaatatt taatggaatc ccagactggg tttatgaaga ggaatgctt 540
gctacaaaat atgctctctg gigtctcct aatggaaaat ttttggcata tgcggaattt 600
aatgatacag atataccagt tatgcctat tctattatg gcgatgaaca atatcccaga 660
acaataaata ttccataccc aaaggccgga gctaagaatc cttttgttcg gatatttatt 720
atcgatacca cttacctgc gtagtaggt cccaggaag tgcctgttcc agcaatgata 780

gcctcaagtg attattatit cagttggctc acgtgggtta ctgatgaacg agtatgtttg 840
cagtggtctaa aaagagttca gaattgttcg gtcttgctta tatgtgatit cagggaagac 900
tggcagacat gggattgtcc aaagaccag gagcatatag aagaaagcag aactggatgg 960
gttggtggat tctttgtttc aacaccagtt ttacgtatg atgccatttc atactacaaa 1020
atatittagt acaaggatgg ctacaaacat attactata tcaaagacac tgtggaaaat 1080
gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccataaata taticagagt aacacaggat 1140
tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa gattaccctg gaagaagaaa catctacaga 1200
attagcattg gaagctatcc tccaagcaag aagtgtgta ctigccatct aaggaaagaa 1260
agggtccaat attacacagc aagtttcagc gactacgcca agtactatgc acttgctgc 1320
tatggcccag gcatcccat ttccacctt catgacggac gcactgatca agaaattaaa 1380
atcctggaag aaaacaagga attggaaaat gctttgaaaa atatccagct gcctaaagag 1440
gaaattaaag aacttgaagt agatgaaatt actttatggt acaagatgat tcttctctct 1500
caatttgaca gatcaaagaa gtatcccttg ctaattcaag tglatgggtg tccctgcagt 1560
cagagtgtaa ggtctgtatt tgcgtttaat tggatatctt atcttgcaag taaggaaggg 1620
atggtcattg ccttgggtgga tggtcgggga acagctttcc aaggtagcaa actcctgtat 1680
gcagtgtatc gaaagctggg tglttatgaa gttgaagacc agattacagc tgcagaaaa 1740
ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaaaaa agaatalagcca tatggggctg gtcctatgga 1800
ggatatgttt catcactggc ccttgcatct ggaactggtc ttltcaaatg tgggatagca 1860
giggctccag tctccagctg ggaatattac gcgtctgtct acacagagag attcatgggt 1920
ctcccaacaa aggatgataa tcttgagcac tataagaatt caactgtgat ggcaagagca 1980
gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040
tttcaaaact cagcacagat tgcataagct ctggttaatg cacaagtgga ttccaggca 2100
atgtggtact ctgaccagaa ccacggctta tccggcctgt ccacgaacca cttatacacc 2160
cacatgacct acttcttaaa gcagtgtttc tctttgtcag acggcaaaaa gaaaaagaaa 2220
aagggccacc accatcacca tcac 2244

<210> 87
<211> 474
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 IL-10R1-Fc 融合物+Avi 標籤

<400> 87

His Gly Thr Glu Leu Pro Ser Pro Pro Ser Val Trp Phe Glu Ala Glu
1 5 10 15

Phe Phe His His Ile Leu His Trp Thr Pro Ile Pro Asn Gln Ser Glu
20 25 30

Ser Thr Cys Tyr Glu Val Ala Leu Leu Arg Tyr Gly Ile Glu Ser Trp
35 40 45

Asn Ser Ile Ser Asn Cys Ser Gln Thr Leu Ser Tyr Asp Leu Thr Ala

50

55

60

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

Ala Val Asp Gly Ser Arg His Ser Asn Trp Thr Val Thr Asn Thr Arg
85 90 95

Phe Ser Val Asp Glu Val Thr Leu Thr Val Gly Ser Val Asn Leu Glu
100 105 110

Ile His Asn Gly Phe Ile Leu Gly Lys Ile Gln Leu Pro Arg Pro Lys
115 120 125

Met Ala Pro Ala Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Ile Phe Ser His Phe Arg
130 135 140

Glu Tyr Glu Ile Ala Ile Arg Lys Val Pro Gly Asn Phe Thr Phe Thr
145 150 155 160

His Lys Lys Val Lys His Glu Asn Phe Ser Leu Leu Thr Ser Gly Glu
165 170 175

Val Gly Glu Phe Cys Val Gln Val Lys Pro Ser Val Ala Ser Arg Ser
180 185 190

Asn Lys Gly Met Trp Ser Lys Glu Glu Cys Ile Ser Leu Thr Arg Gln
195 200 205

Tyr Phe Thr Val Thr Asn Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly
210 215 220

Ser Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

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

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

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

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

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

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile
450 455 460

Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
465 470

<210> 88
<211> 1422
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 IL-10R1-Fc 融合物+Avi 標籤

<400> 88
catgggacag agctgcccag ccctccgtct gtgtggtttg aagcagaatt tttccaccac 60
atccctccact ggacacccat cccaaatcag tctgaaagta cctgctatga agtggcactc 120
ctgaggtaatg gaatagagtc ctggaactcc atctccaact gtagccagac cctgtcctat 180
gaccttaccg cagtgtacctt ggacctgtac cacagcaatg gctaccgggc cagagtgcgg 240
gctgtggacg gcagccggca ctccaactgg accgtcacca acaccgcgtt ctctgtggat 300
gaagtgactc tgacagttgg cagtgtgaac ctgagatcc acaatggcgt catcctcggg 360
aagattcagc taccagggcc caagatggcc cccgcaaag acacatatga aagcatcttc 420
agtcacttcc gagagtatga gattgccatt cgcaagggtc cgggaaactt cacgttcaca 480
cacaagaaag taaaacatga aaacttcagc ctctaacct ctggagaagt gggagagttc 540
tgtgtccagg tgaaccatc tgtcgcttcc cgaagtaaca aggggatgtg gtctaaagag 600
gagtgcatct ccttcaccag gcagttattc accgtgacca acgtcgacga acagttatat 660
tttcaggggcg gtcacccaa atctgcagac aaaactcaca catgcccacc gtgccagca 720
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 780
atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 840
gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggagggtc ataatgcaa gacaaagccg 900
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 960
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct ccagccccc 1020

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg	1080
cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggicagcc tgacctgcct ggicaaaggc	1140
ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac	1200
aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc	1260
gtggacaaga gcagggtggca gcaggggaac gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct	1320
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtggcgg gtccggaggc	1380
ctgaacgaca tcttcgaggc ccagaagatt gaatggcacg ag	1422

<210> 89
<211> 15
<212> DNA
<213>

<220>
<223> HCDR Kabat (1)

<400> 89	
agctacgcca tgagc	15

申請專利範圍

1. 一種IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白，其中該融合蛋白包含兩條相同的重鏈多肽及兩條相同的輕鏈多肽。
2. 如請求項1之融合蛋白，其中該等重鏈多肽中之每一者包含IgG類別抗體重鏈及IL-10單體。
3. 如請求項2之融合蛋白，其中該IL-10單體於其N端視情況經由肽連接體融合至該IgG類別抗體重鏈之C端。
4. 如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中該等重鏈多肽各自基本上係由IgG類別抗體重鏈、IL-10單體及視情況選用之肽連接體組成。
5. 如請求項2或3之融合蛋白，其中該IL-10單體係天然IL-10單體，特定而言為天然人類IL-10單體。
6. 如請求項2或3之融合蛋白，其中該IL-10單體包含SEQ ID NO: 1之多肽序列。
7. 如請求項2或3之融合蛋白，其中包含在該等重鏈多肽中之該等IL-10單體形成功能性同源二聚體IL-10分子。
8. 如請求項2或3之融合蛋白，其中該IL-10單體係經修飾IL-10單體，特定而言為經修飾人類IL-10單體。
9. 如請求項8之融合蛋白，其中該經修飾IL-10單體呈單體形式在pH 7.0、37℃下穩定。
10. 如請求項2或3之融合蛋白，其中該IL-10單體包含SEQ ID NO: 5之多肽序列。
11. 如請求項2或3之融合蛋白，其中包含在該等重鏈多肽中之該等IL-10單體不與彼此同源二聚體化。
12. 如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中相較於沒有修飾之之

相應IgG類別抗體，該IgG類別抗體包含降低該抗體與Fc受體之結合親和力之修飾。

13. 如請求項12之融合蛋白，其中該Fc受體係Fc γ 受體，特定而言爲人類Fc γ 受體。
14. 如請求項12之融合蛋白，其中該Fc受體係活化Fc受體。
15. 如請求項12之融合蛋白，其中該Fc受體係選自Fc γ RIIIa (CD16a)、Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIa (CD32)及Fc α RI (CD89)之群。
16. 如請求項12之融合蛋白，其中該Fc受體係Fc γ IIIa，特定而言爲人類Fc γ IIIa。
17. 如請求項12之融合蛋白，其中該IgG類別抗體包含該等抗體重鏈之329位(EU編號)之胺基酸取代。
18. 如請求項17之融合蛋白，其中該胺基酸取代係P329G。
19. 如請求項12之融合蛋白，其中該IgG類別抗體包含該等抗體重鏈之234位及235位(EU編號)之胺基酸取代。
20. 如請求項19之融合蛋白，其中該胺基酸取代係L234A及L235A (LALA)。
21. 如請求項12之融合蛋白，其中該IgG類別抗體包含該等抗體重鏈中之胺基酸取代L234A、L235A及P329G (EU編號)。
22. 如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中該IgG類別抗體係IgG₁子類抗體。
23. 如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中該IgG類別抗體係全長抗體。
24. 如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中該IgG類別抗體係人類抗體。
25. 如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中該IgG類別抗體能夠特異性結合至纖維母細胞活化蛋白(FAP)。

26. 如請求項25之融合蛋白，其中當在25℃下藉由表面電漿共振 (SPR)量測時，該融合蛋白能夠以小於1 nM、特定而言小於100 pM之親和力常數(K_D)結合至FAP。
27. 如請求項25之融合蛋白，其中該FAP係人類、小鼠及/或食蟹獼猴FAP。
28. 如請求項25之融合蛋白，其中該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 37之重鏈CDR (HCDR) 1、SEQ ID NO: 41之HCDR 2、SEQ ID NO: 49之HCDR 3、SEQ ID NO: 53之輕鏈CDR (LCDR) 1、SEQ ID NO: 57之LCDR 2及SEQ ID NO: 61之LCDR 3。
29. 如請求項28之融合蛋白，其中該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 63之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 65之輕鏈可變區(VL)。
30. 如請求項25之融合蛋白，其中該IgG類別抗體包含該SEQ ID NO: 37之HCDR 1、SEQ ID NO: 43之HCDR 2、SEQ ID NO: 47之HCDR 3、SEQ ID NO: 51之LCDR 1、SEQ ID NO: 55之LCDR 2及SEQ ID NO: 59之LCDR 3。
31. 如請求項30之融合蛋白，其中該IgG類別抗體包含SEQ ID NO: 67之VH及SEQ ID NO: 69之VL。
32. 如請求項1至3中任一項之融合蛋白，其中當在25℃下藉由SPR量測時，該融合蛋白能夠以小於1 nM、特定而言小於100 pM之親和力常數(K_D)結合至IL-10受體-1 (IL-10R1)。
33. 如請求項32之融合蛋白，其中該IL-10R1係人類IL-10R1。
34. 如請求項32之融合蛋白，當附屬於請求項26時，其中當在25℃下藉由SPR量測時，該結合至IL-10R1之親和力常數(K_D)約等於或大於該結合至FAP之親和力常數(K_D)。
35. 一種聚核苷酸，其編碼如請求項1至34中任一項之融合蛋白。
36. 一種載體，特定而言表現載體，其包含如請求項35之聚核苷

酸。

37. 一種宿主細胞，其包含如請求項35之聚核苷酸或如請求項36之載體。
38. 一種產生如請求項1至34中任一項之融合蛋白之方法，其包含以下步驟：(i)在適於表現該融合蛋白之條件下培養如請求項37之宿主細胞，及(ii)回收該融合蛋白。
39. 一種IgG類別抗體與IL-10分子之融合蛋白，其係藉由如請求項38之方法產生。
40. 如請求項1至3或39中任一項之融合蛋白，其用作藥劑。
41. 如請求項1至3或39中任一項之融合蛋白，其用於治療或預防發炎性疾病。
42. 如請求項41之融合蛋白，其中該發炎性疾病係發炎性腸病或類風濕性關節炎。
43. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至34或39中任一項之融合蛋白及醫藥上可接受之載劑。
44. 如請求項43之醫藥組合物，其用作藥劑。
45. 如請求項43之醫藥組合物，其用於治療或預防發炎性疾病。
46. 如請求項45之醫藥組合物，其中該發炎性疾病係發炎性腸病或類風濕性關節炎。
47. 一種如請求項1至34或39中任一項之融合蛋白之用途，其用於製造用以為有此需要之個體治療疾病的藥劑。
48. 如請求項47之用途，其中該疾病係發炎性疾病。
49. 如請求項48之用途，其中該發炎性疾病係發炎性腸病或類風濕性關節炎。
50. 如請求項47至49中任一項之用途，其中該個體係哺乳動物，特定而言為人類。

圖式

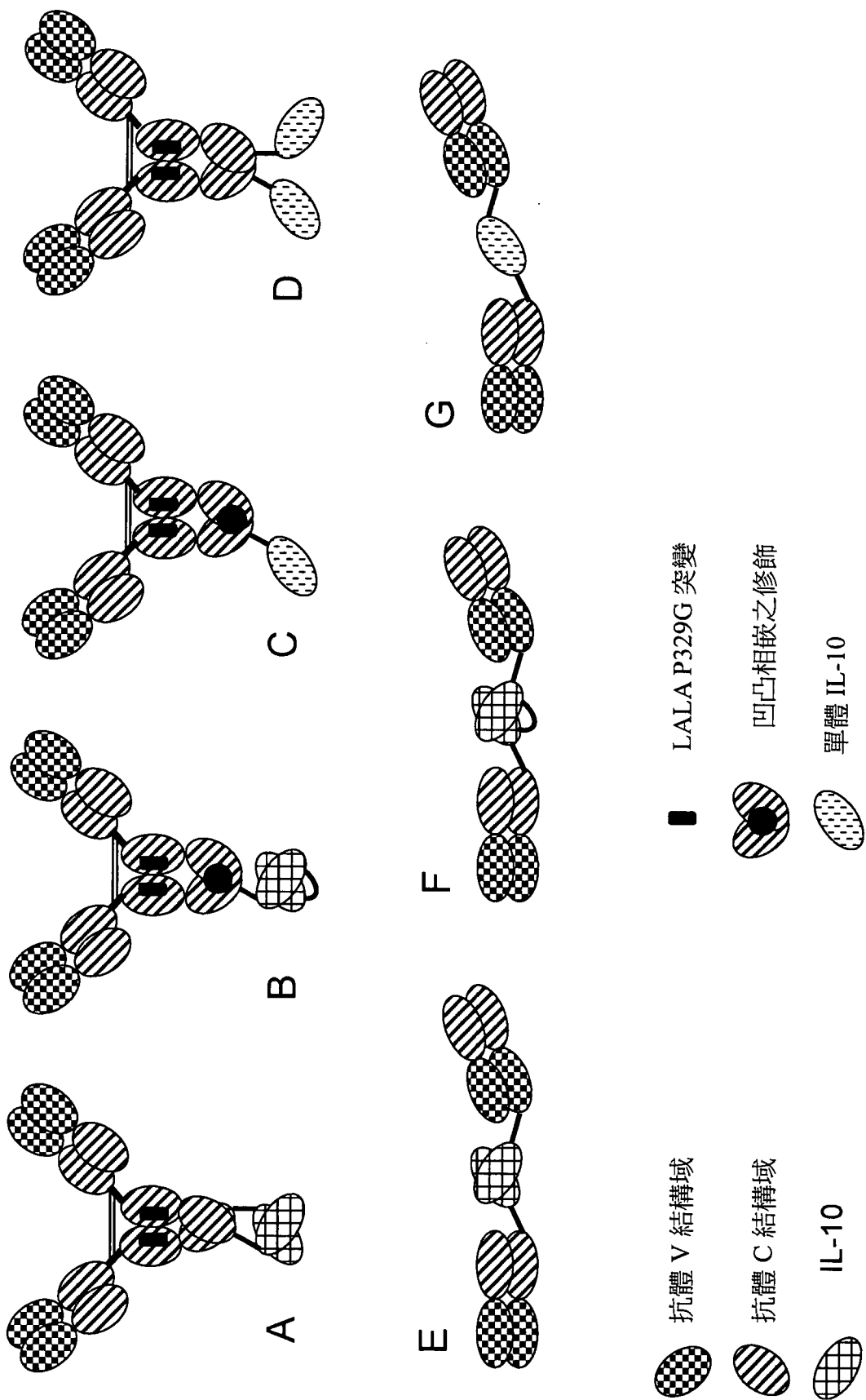


圖 1

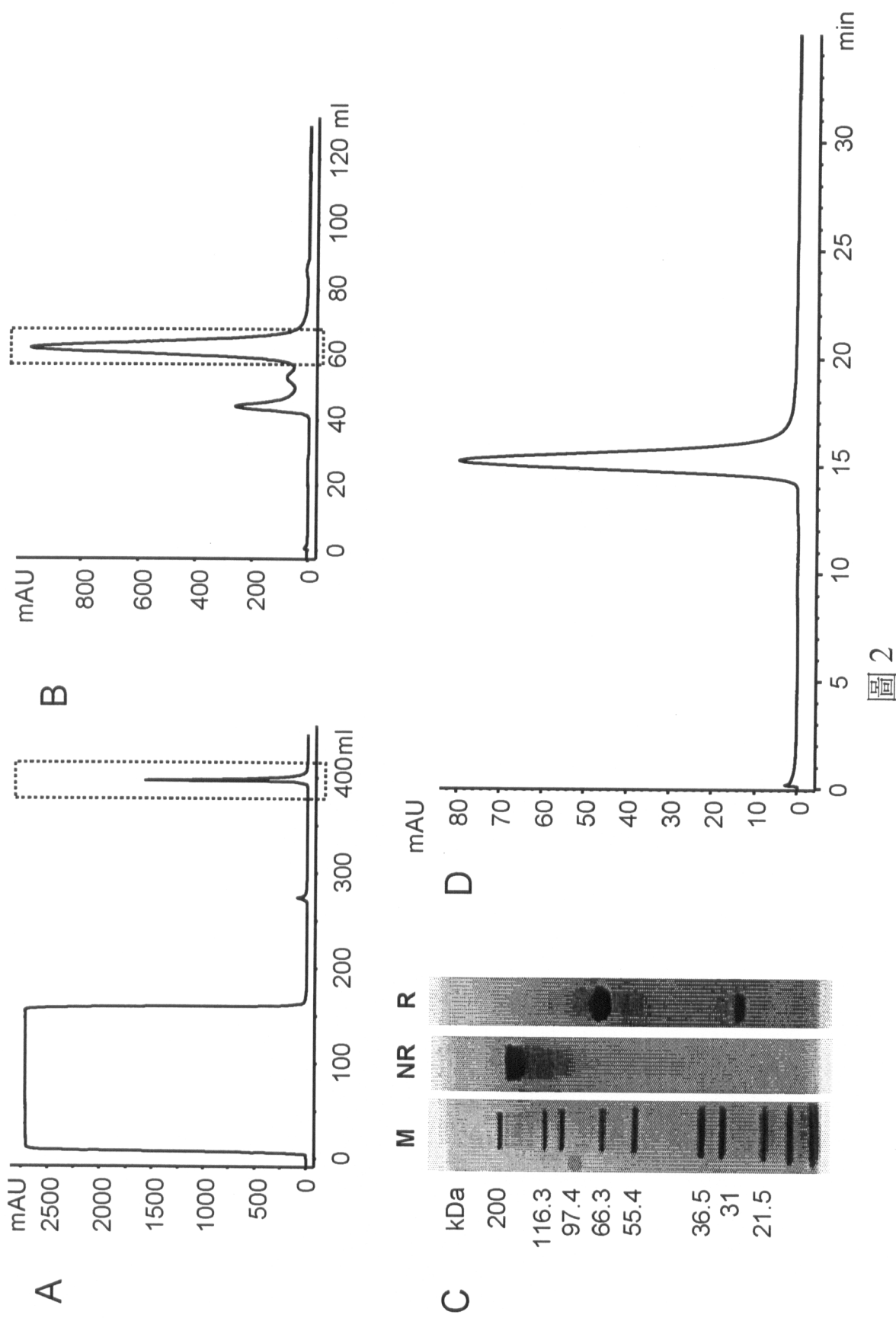
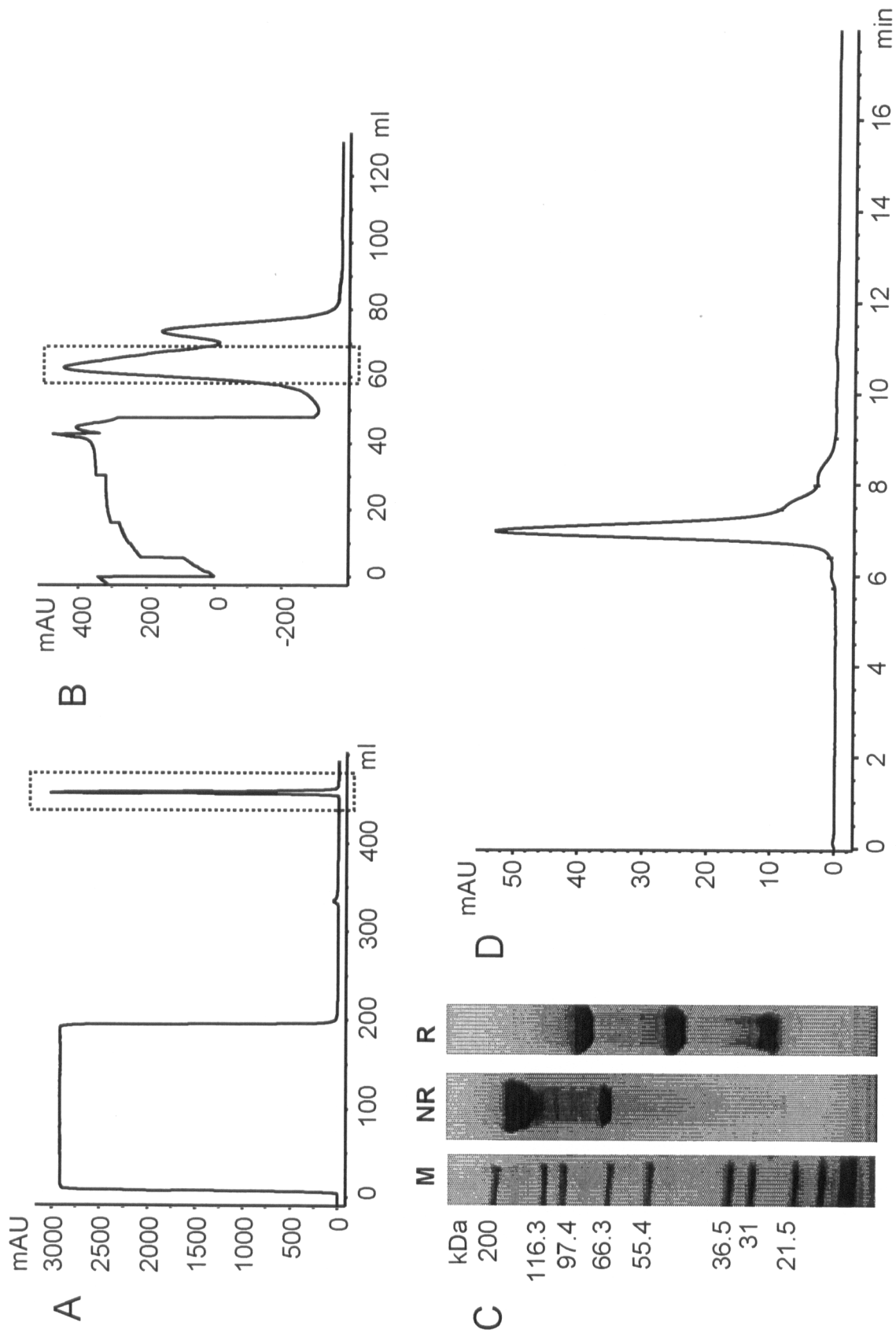


圖 2



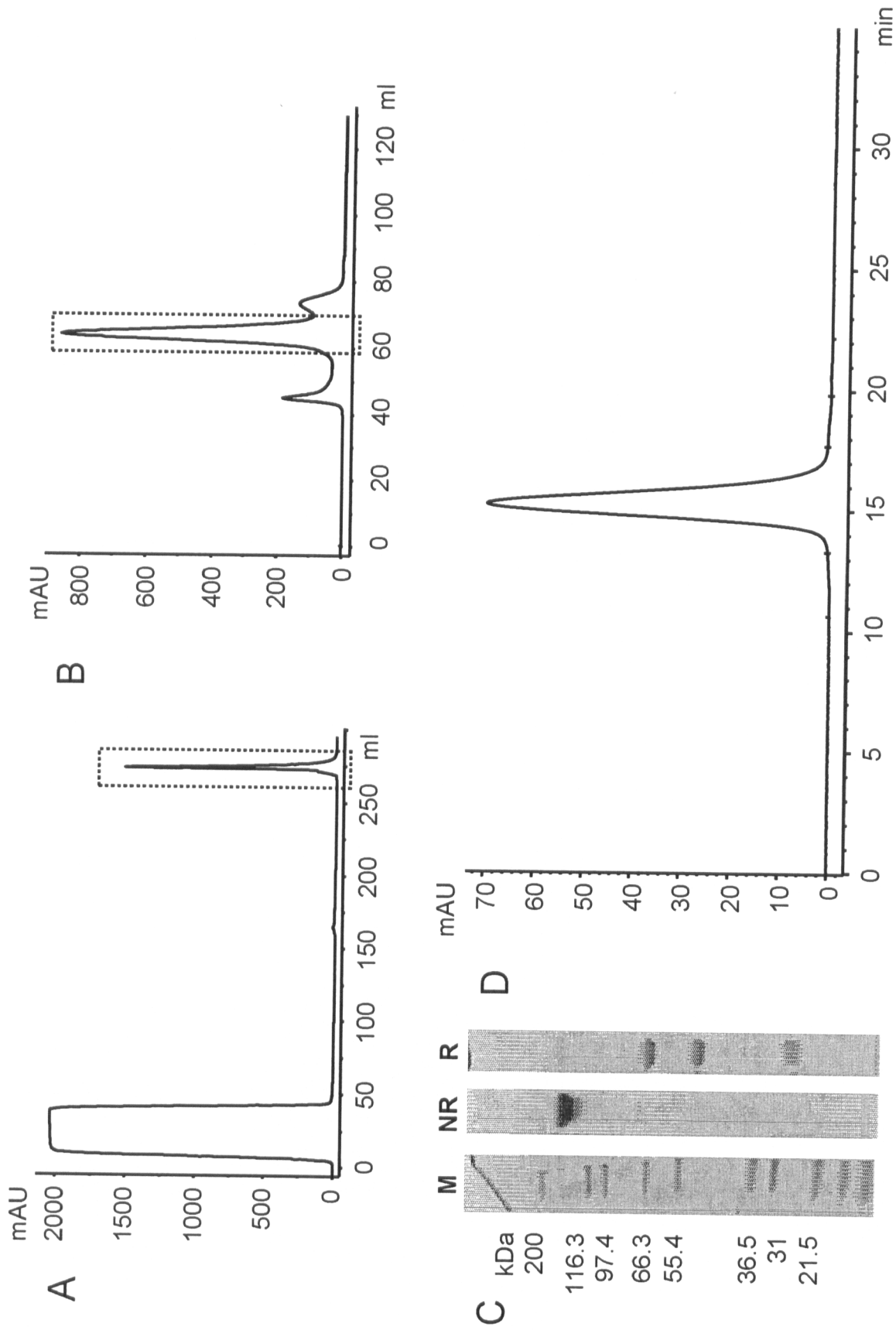


圖 4

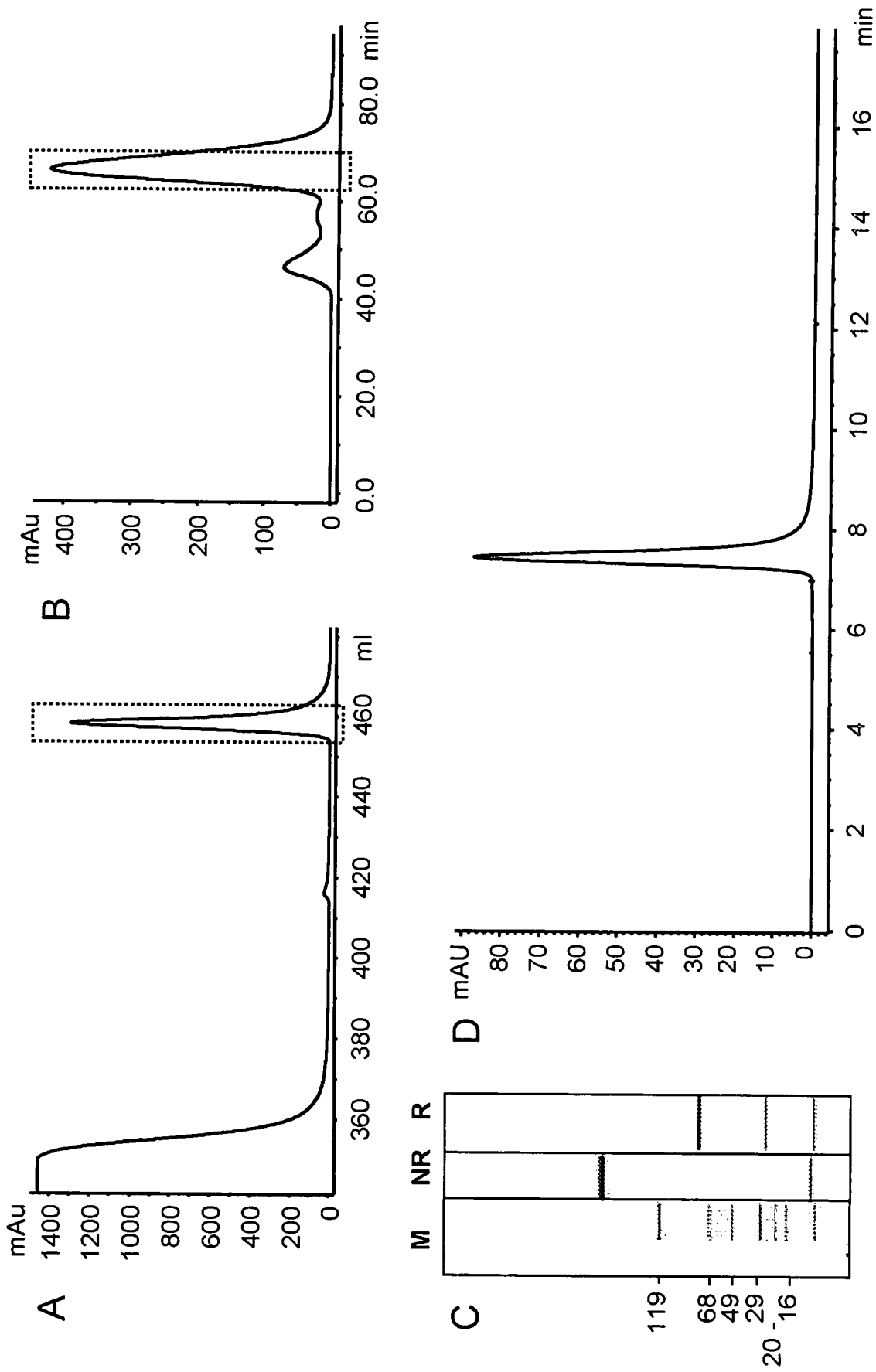


圖 5

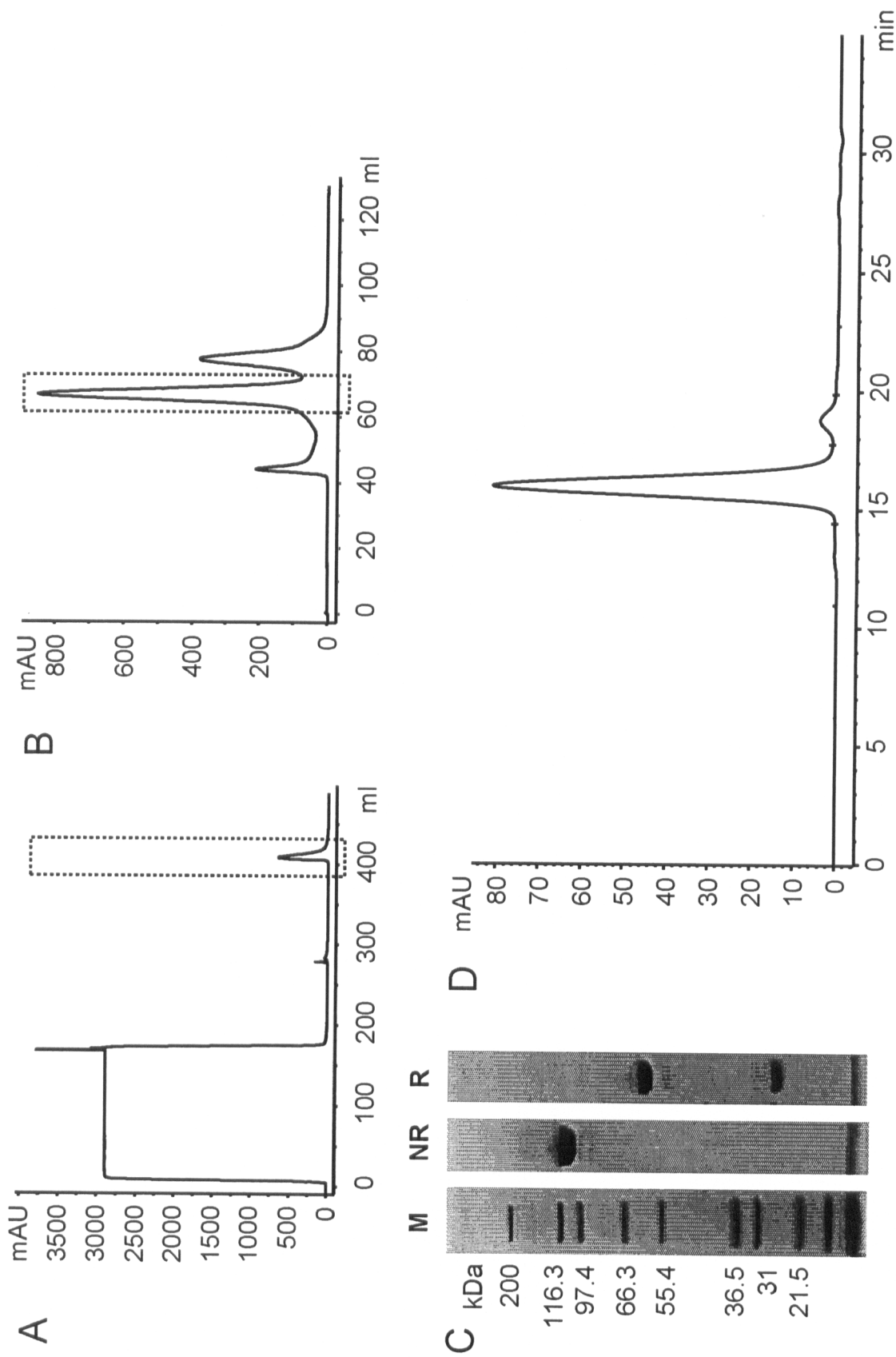


圖 6

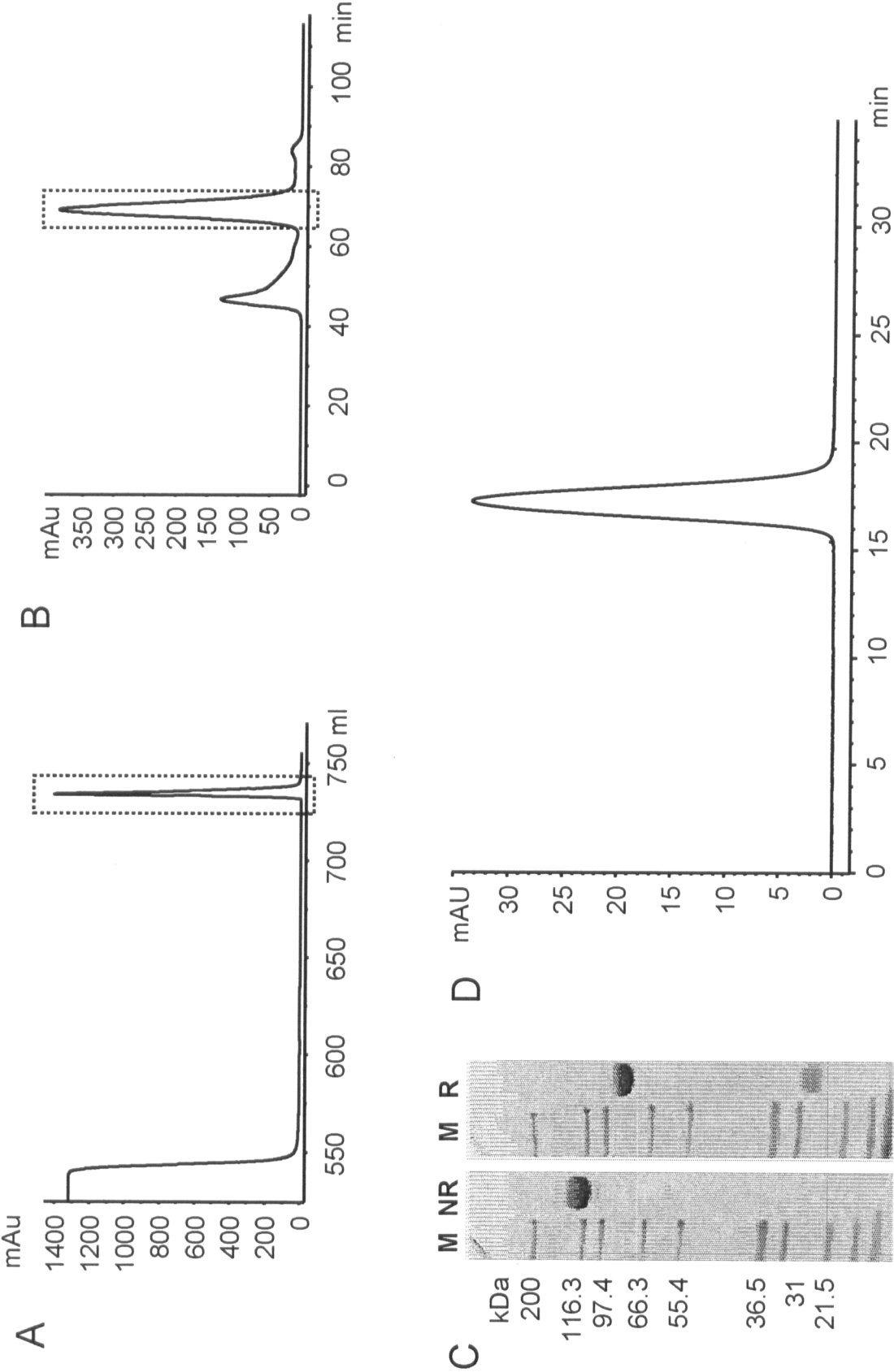


圖 7

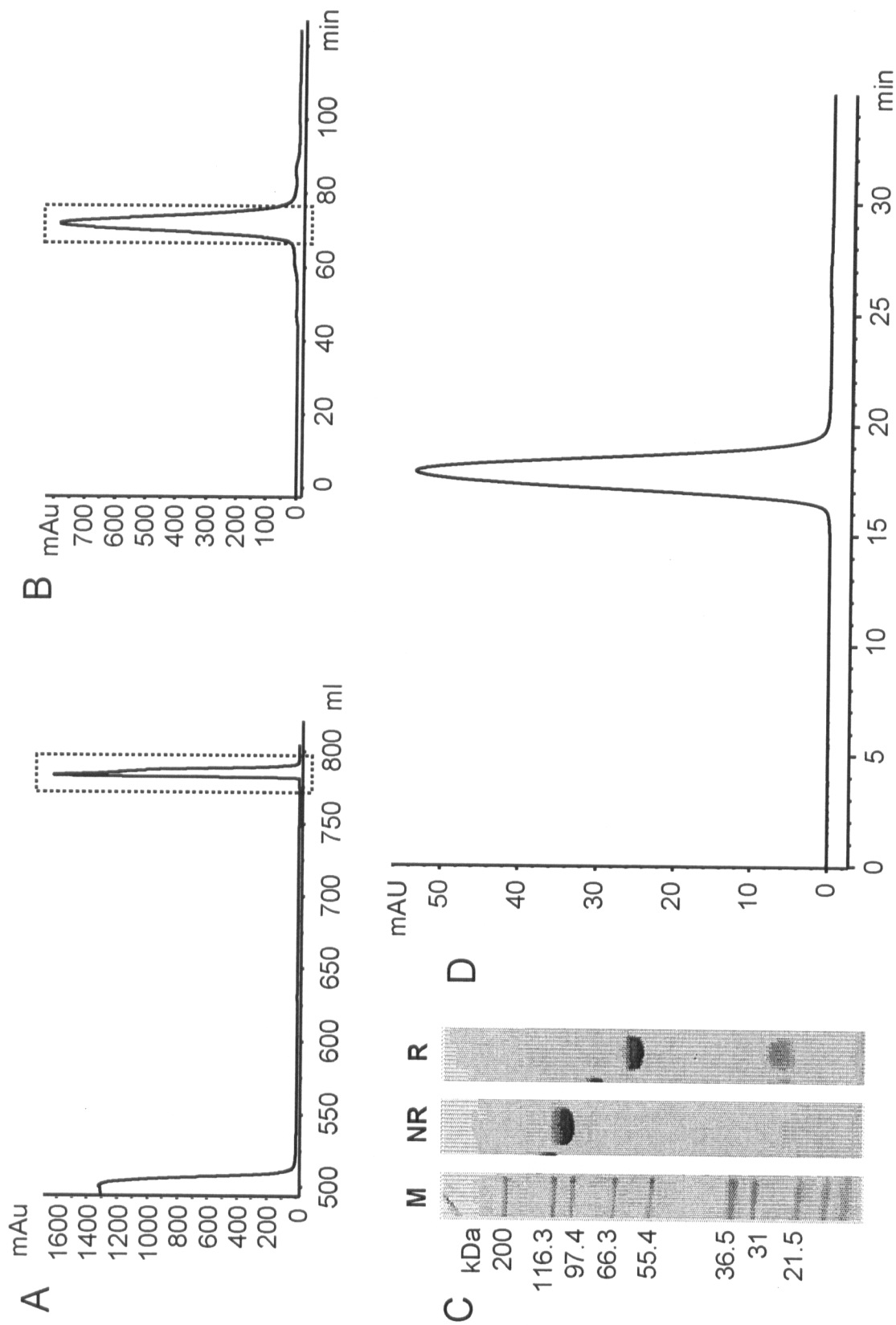


圖 8

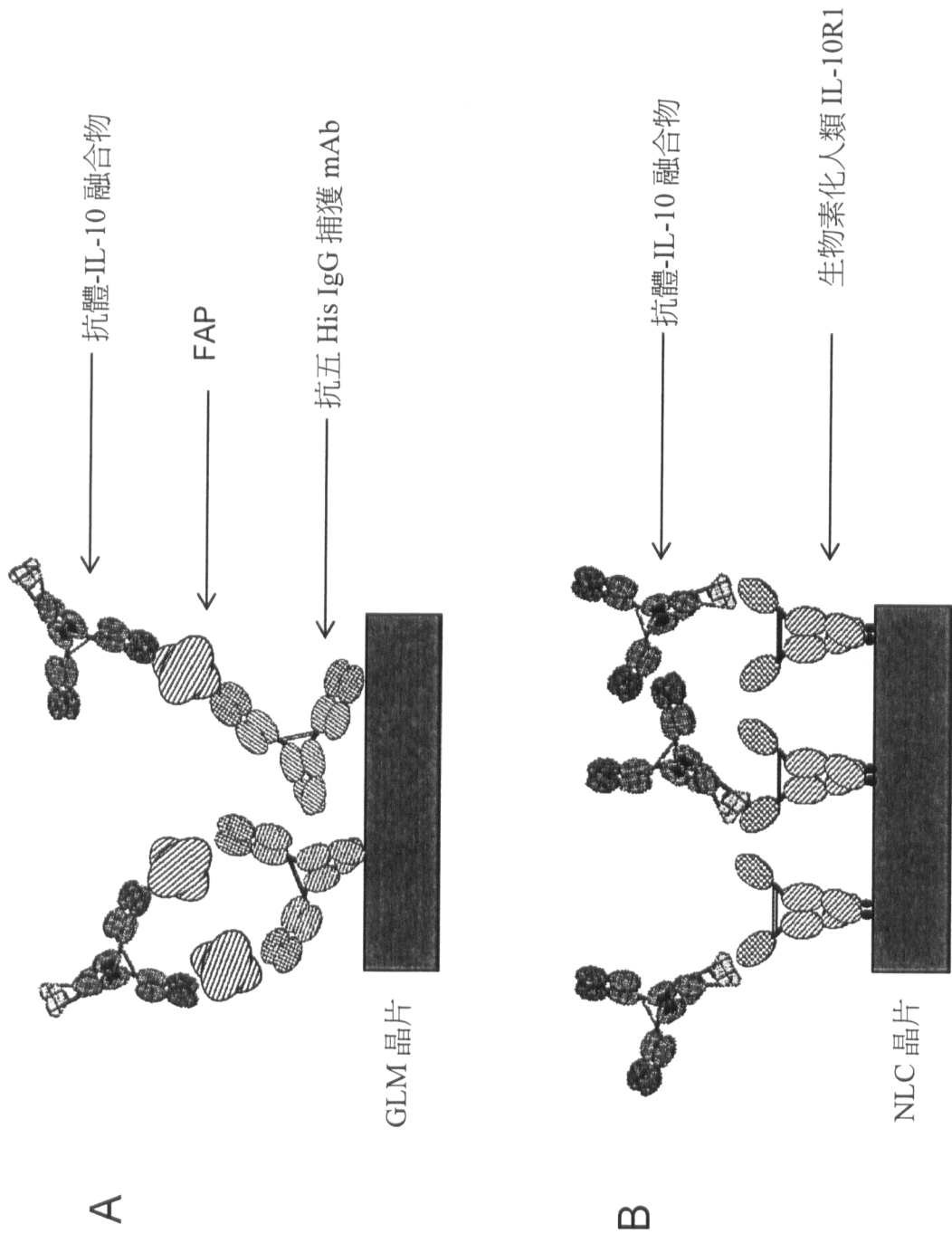


圖 9

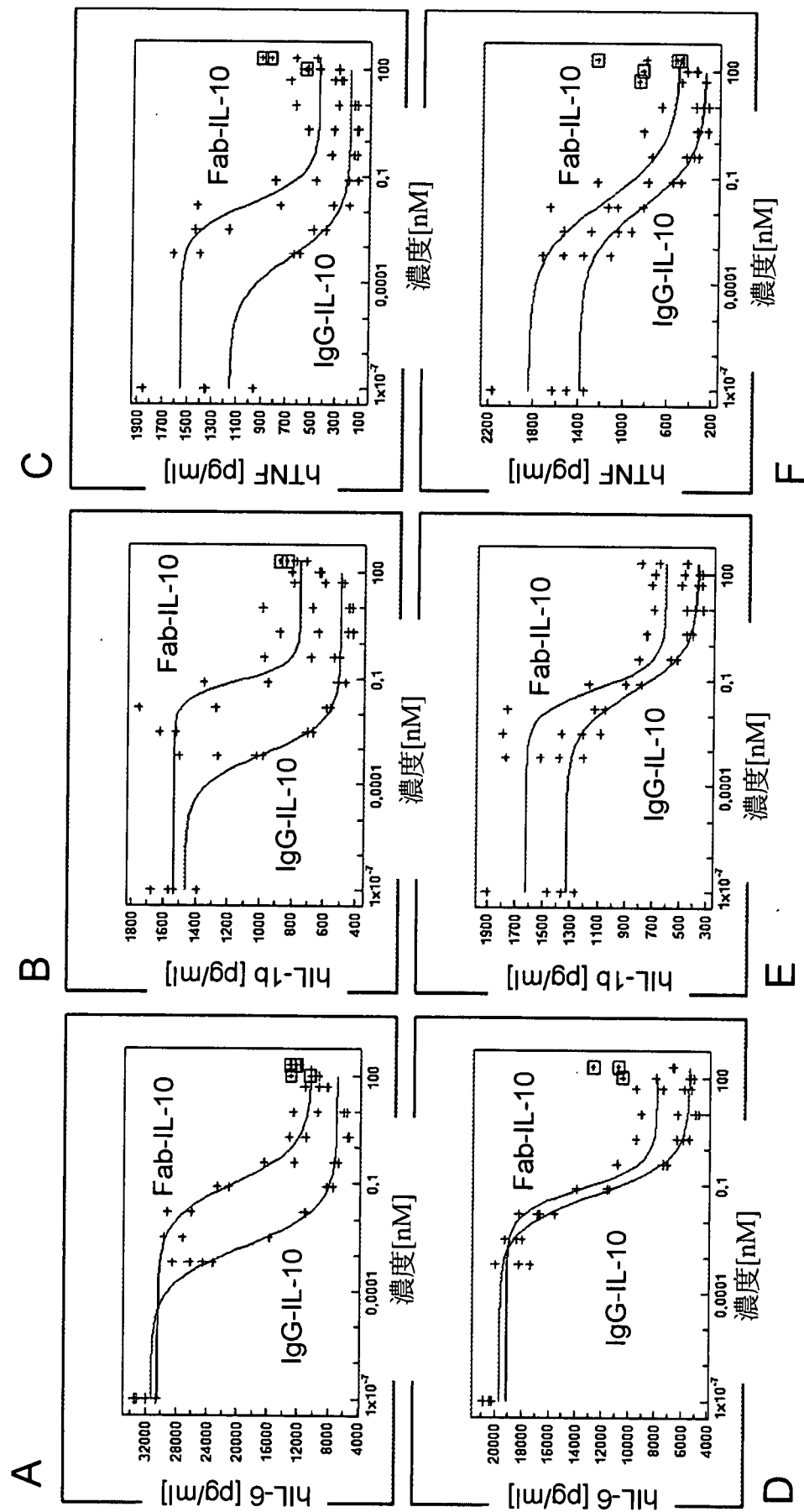


圖 10

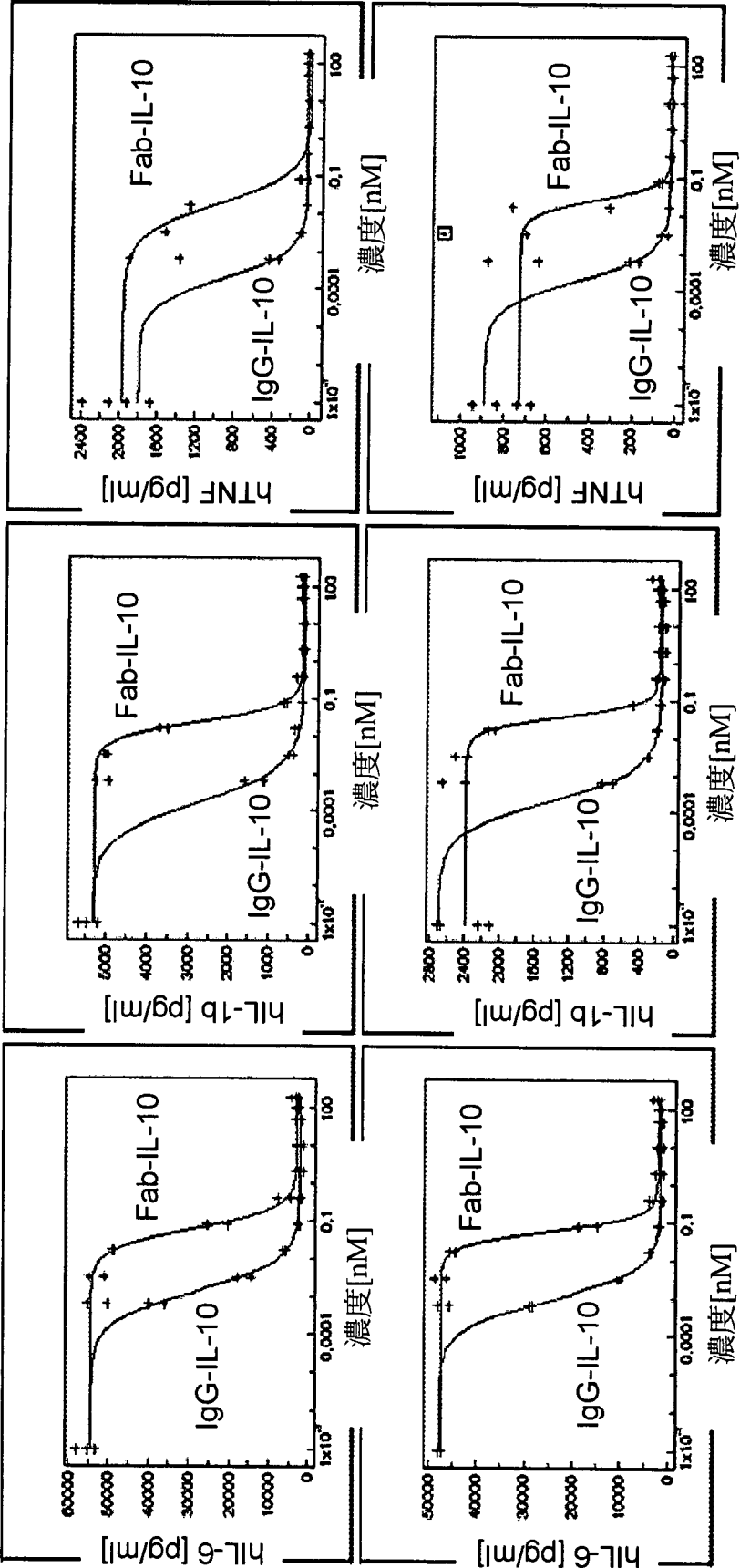


圖 11A

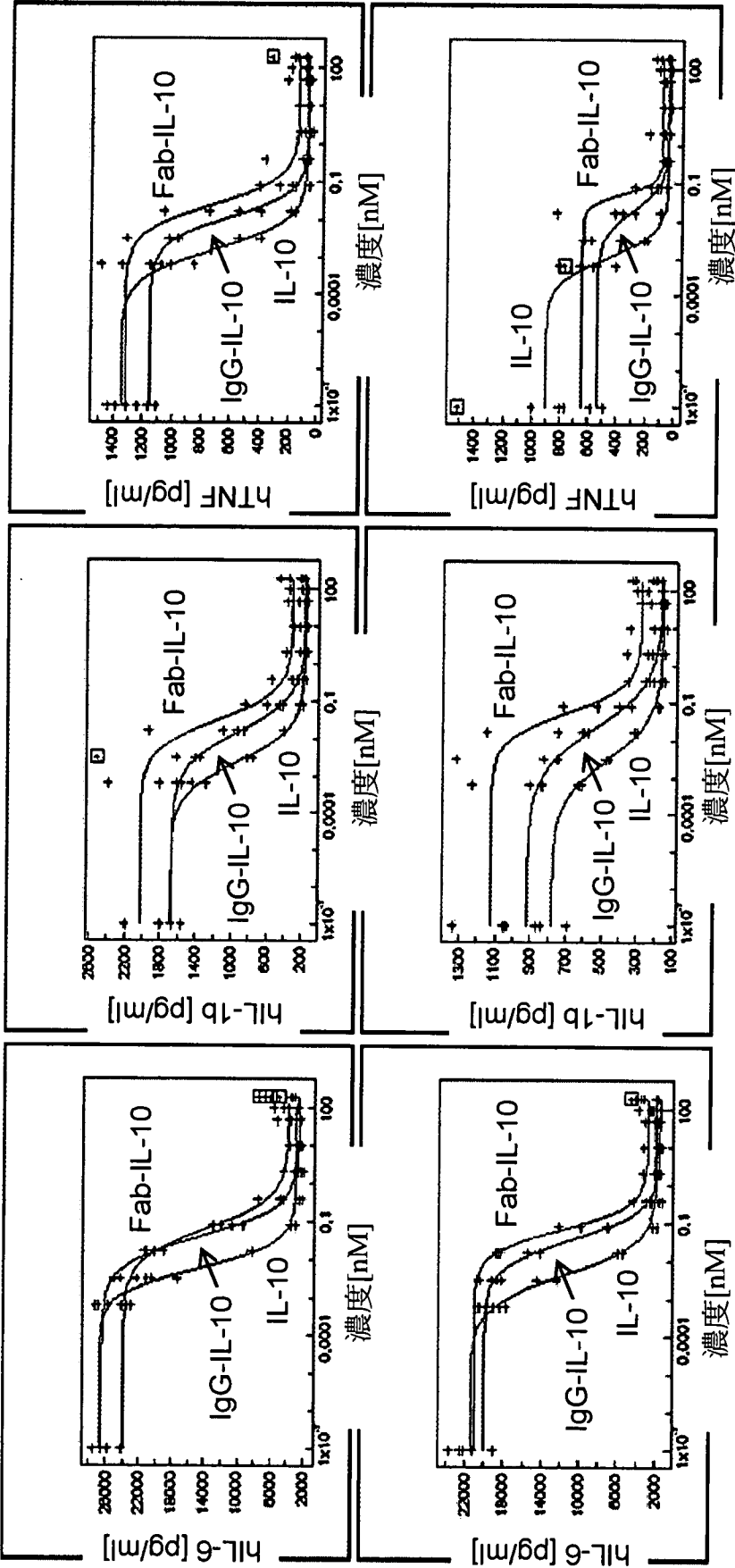


圖 11B

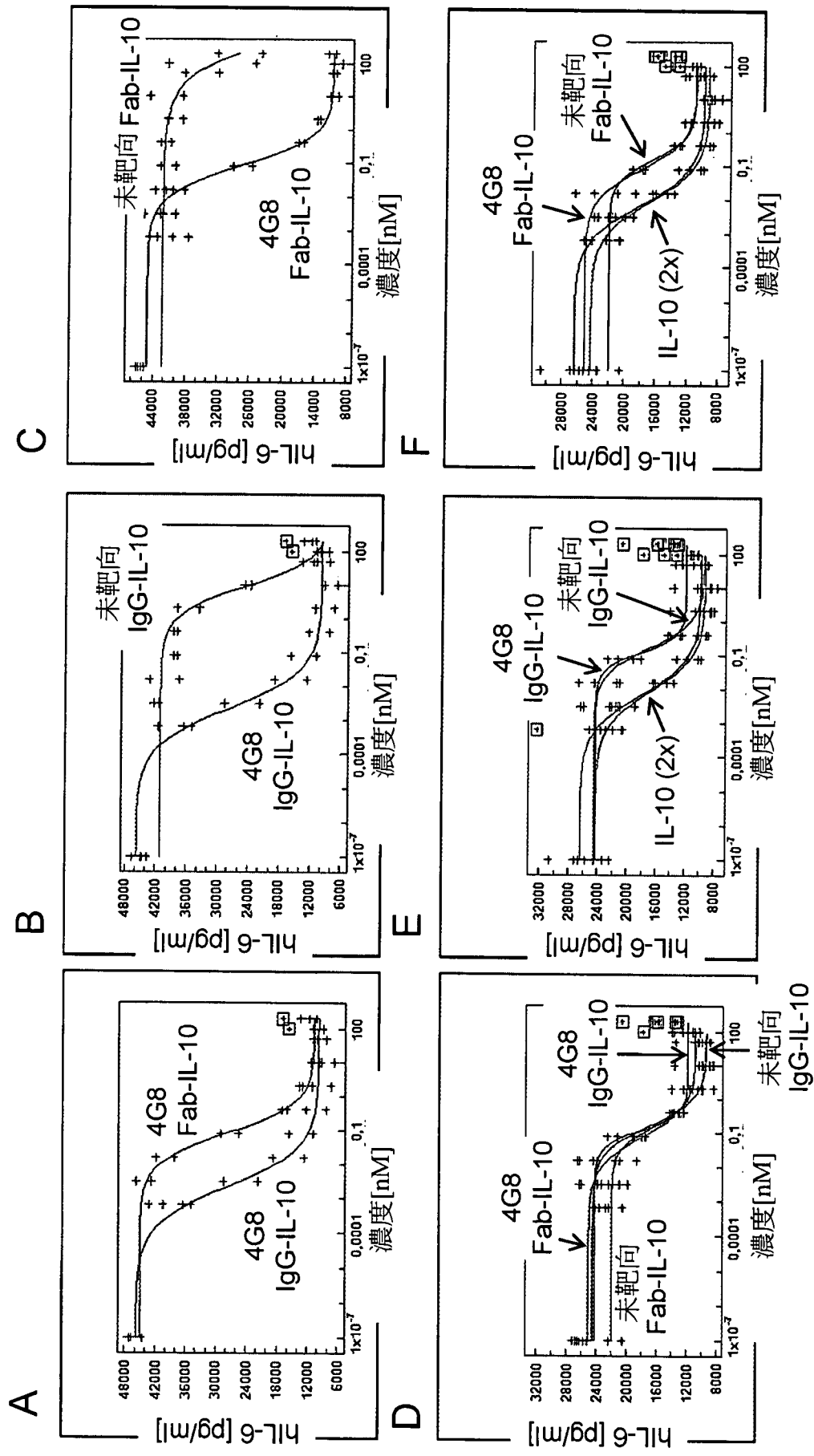
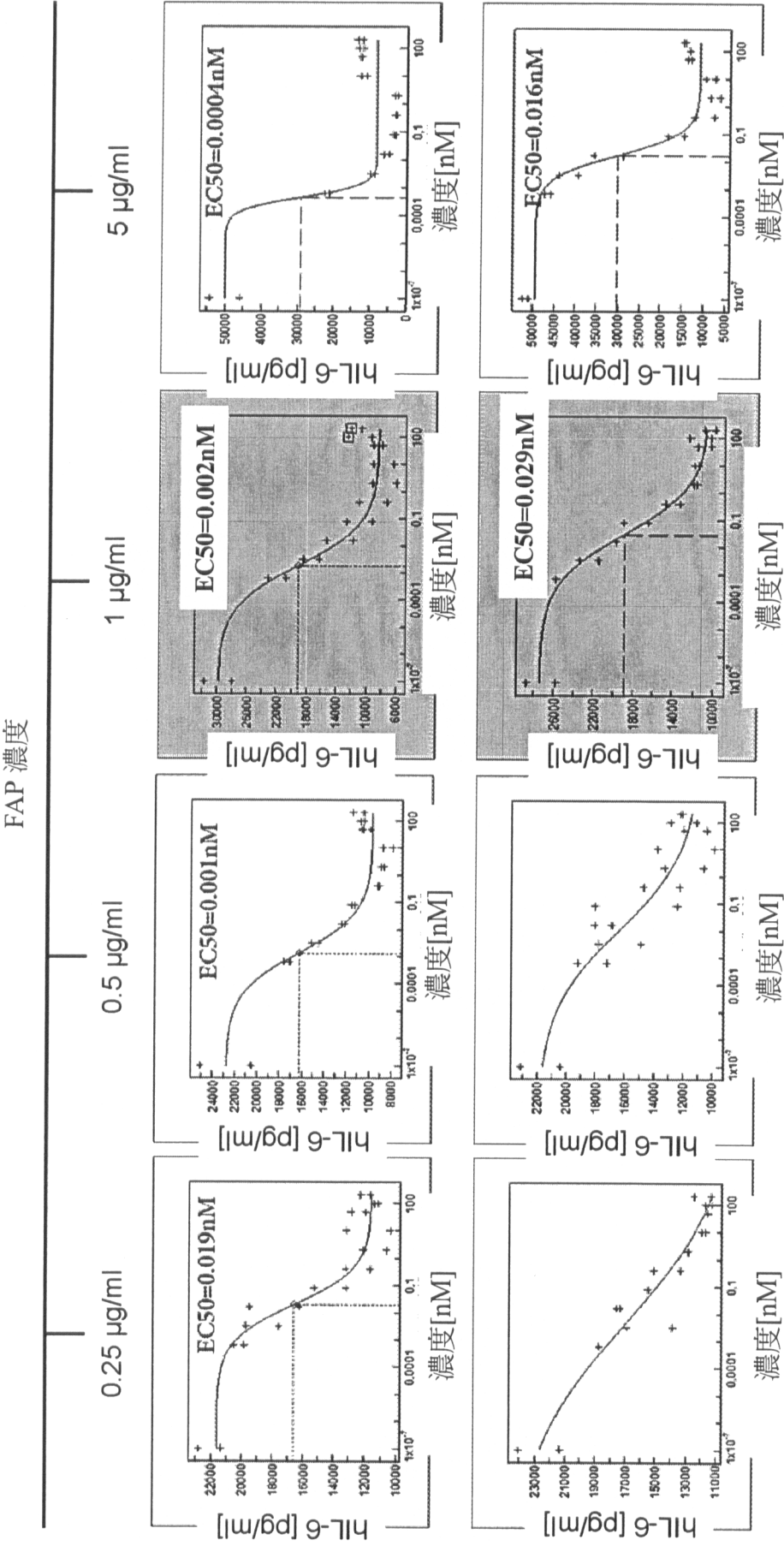


圖 12



標準設置

圖 13

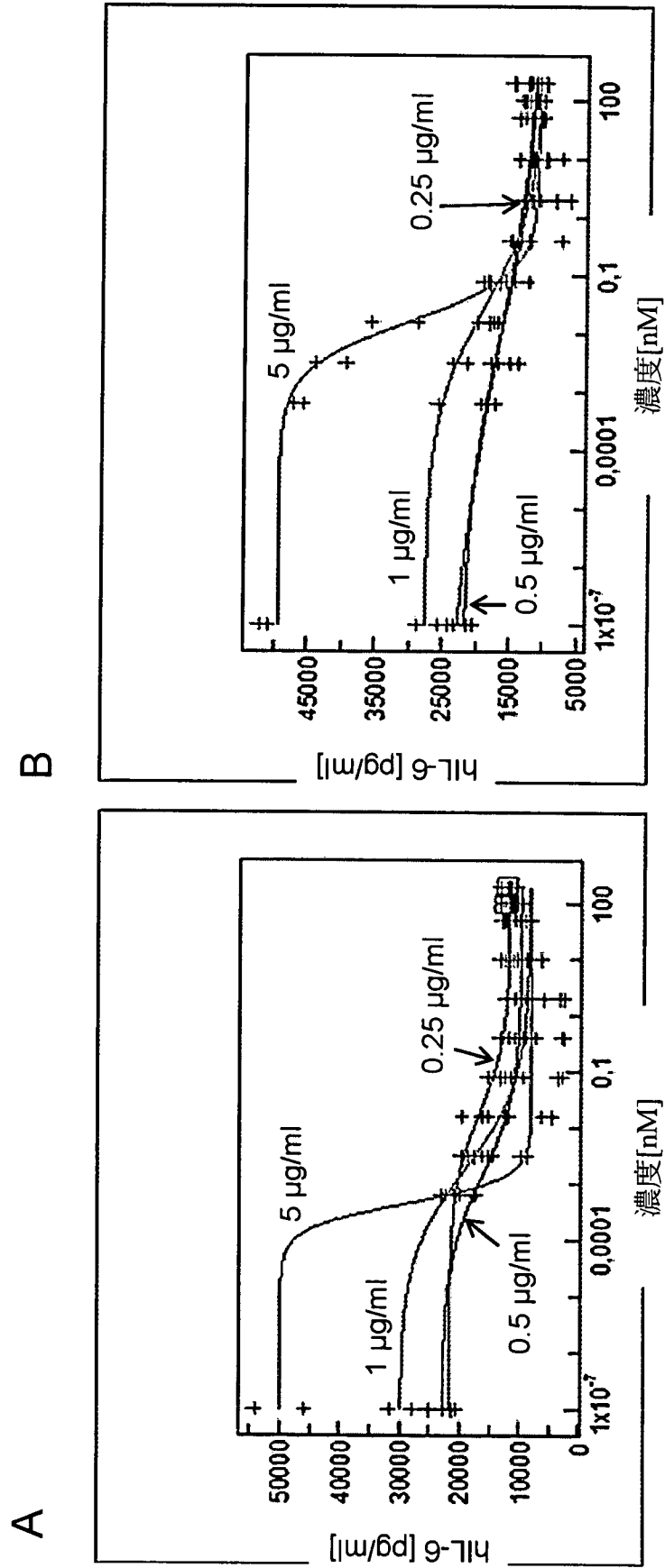


圖 14

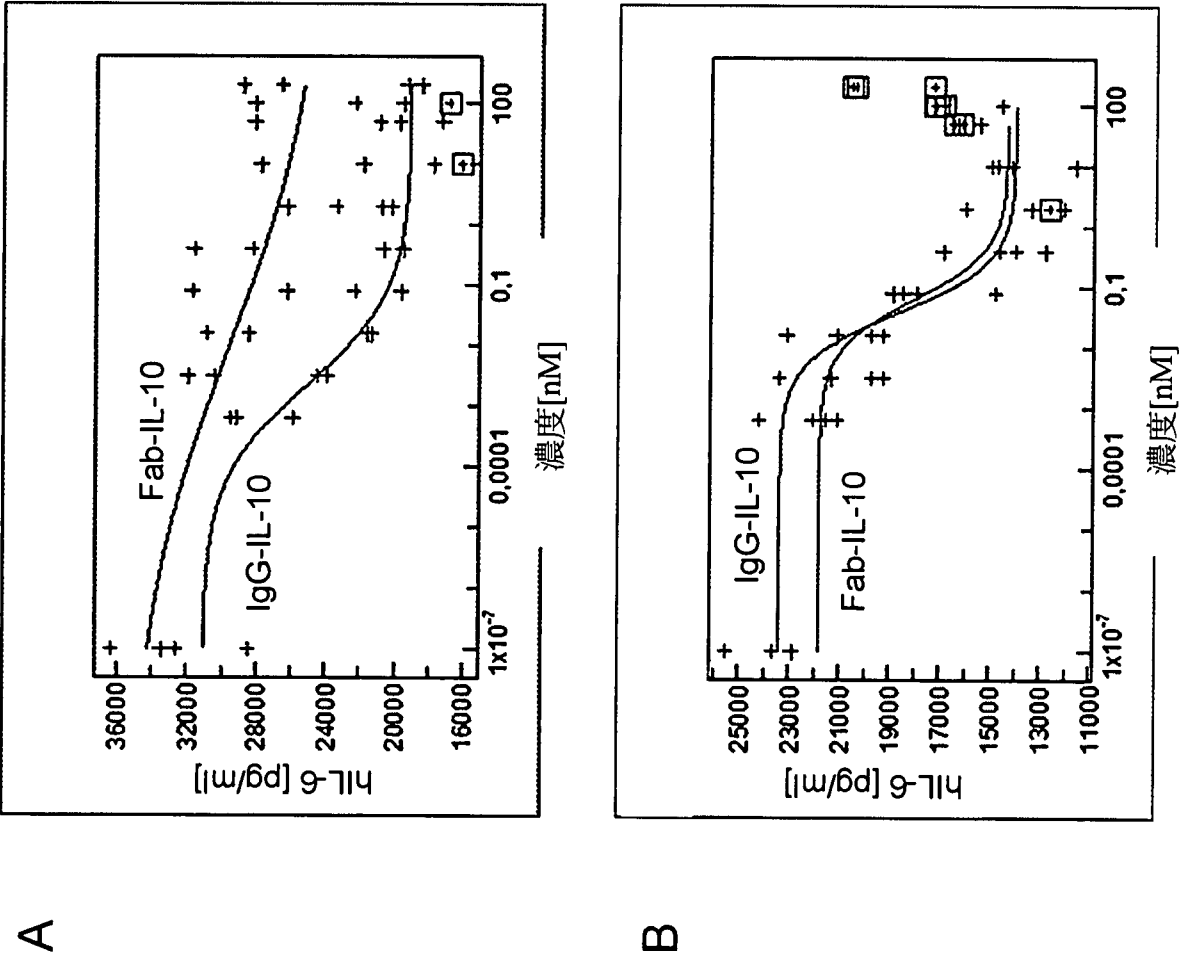


圖 15

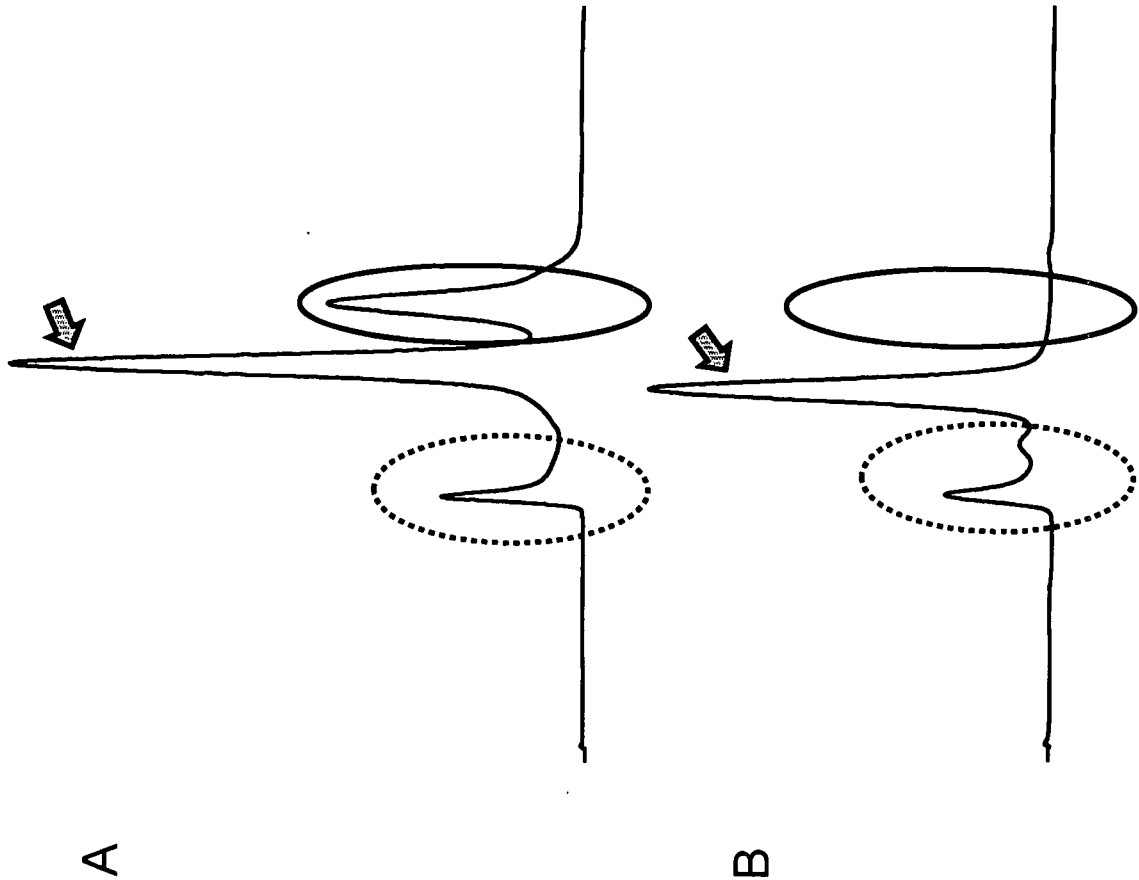


圖 16