



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117321079 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 29

(21) 申请号 202280009724.5

朴成敏 吴妍智

(22) 申请日 2022.01.11

(74) 专利代理机构 北京知元同创知识产权代理
事务所(普通合伙) 11535

(30) 优先权数据

63/135,812 2021.01.11 US

专利代理师 吕少楠

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.07.11

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2022/000009 2022.01.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/149050 EN 2022.07.14

(71) 申请人 优特力克斯有限公司

地址 韩国首尔衿川区加山数码1路58号408
室08591

(72) 发明人 权炳世 李汉娜 朴振成 韩胜熙
孙贤泰 金孙宇 朴赫俊 柳恩惠

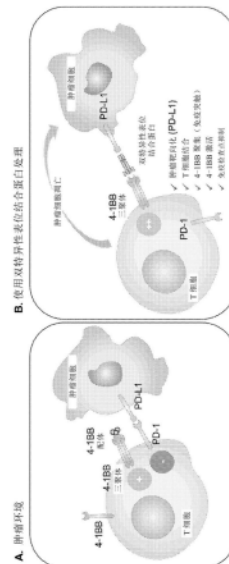
权利要求书3页 说明书35页
序列表52页 附图22页

(54) 发明名称

包含抗4-1BB抗体及PD-1蛋白或其片段的双
特异性表位结合蛋白及其用途

(57) 摘要

本发明提供包含与抗4-1BB激动剂
(agonist) 抗体及PD-L1以高亲和力结合的PD-1
蛋白或其片段的双特异性表位结合蛋白。双特异
性表位结合蛋白在与表达PD-L1的肿瘤细胞结合
的同时,与上调4-1BB的T细胞,尤其与效应CD8+T
细胞结合,即,同时独立地与4-1BB及PD-L1结合。
这样的相互作用在小鼠模型中阻断PD-1/PD-L1
介导的抑制信号传导并激活4-1BB介导的共刺激
信号传导,从而诱导抗肿瘤效应CD8+T细胞的细
胞毒性活性的强力激活。与各单独的成分相比,
这样的双特异性表位结合蛋白具有更为强力的
溶瘤 (oncolytic) 效果。



1. 一种双特异性表位结合蛋白, 包含 (VH)、(VL)、(X)、(VH)_n、(VL)_n、(X)_n、(VH)_n-Y、(VL)_n-Y、(VH-VL)_n-Y、(VL-VH)_n-Y、(X)_n-Y、Y-(VH)_m、Y-(VL)_m、Y-(VH-VL)_m、Y-(VL-VH)_m和/或Y-(X)_m的组合, 其特征在于,

上述VH及VL分别表示与4-1BB结合的抗体或其抗原结合片段的重链可变区及轻链可变区,

上述X为与PD-L1结合的PD-1蛋白或其片段,

上述Y表示包含选自由CL、CH1、CH2以及CH3组成的组中的一个以上结构域的重链恒定区或轻链恒定区的片段,

上述n及m分别为1至5的整数。

2. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白, 其特征在于, 在存在上述(VH)、(VL)、(VH)_n-Y、(VL)_n-Y、(VH-VL)_n-Y、(VL-VH)_n-Y、(X)_n-Y、Y-(VH)_m、Y-(VL)_m、Y-(VH-VL)_m、Y-(VL-VH)_m和/或Y-(X)_m的情况下, 它们能够从N-末端向C-末端以任意顺序出现。

3. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白, 其特征在于,

上述双特异性表位结合蛋白为具有An-A'n'-B-Cm-C'm'的结构的双特异性表位结合蛋白,

其中,

A、A'、C、C'为VH、VL、VH-VL、VL-VH或X,

B为Y,

上述VH、VL、X、Y、n以及m如上所定义, 各个VH、VL、X、Y直接或通过接头和/或铰链连接,

上述n'及m'独立地为1至5的整数。

4. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白, 其特征在于,

上述双特异性表位结合蛋白为具有An-B-Cm的结构的双特异性表位结合蛋白,

其中,

A或C为VH-VL、VL-VH或X,

B为Y,

上述VH、VL、X、Y、n以及m如上所定义, 各个VH、VL、X、Y直接或通过接头和/或铰链连接。

5. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白, 其特征在于, 上述CH1结构域在C-末端直接或通过铰链和/或接头与(VH-VL)_n、(VL-VH)_n或(X)_n连接, 上述CH2/CH3结构域在N-末端直接或通过铰链和/或接头与(VH-VL)_m、(VL-VH)_m、(X)_m连接, 上述VH、VL、X、n以及m如上所定义。

6. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白, 其特征在于,

上述双特异性表位结合蛋白包含:

重链, 包含直接或通过接头和/或铰链与CH2连接的VH-VL、VL-VH、X和/或VH-CH1, CH3独立地直接或通过接头和/或铰链与VH-VL、VL-VH或X连接; 以及

轻链, 包含直接或通过接头和/或铰链与CL连接的VL,

上述VH、VL以及X如上所定义, 各个VH、VL、X、CH1、CH2、CH3以及CL直接或通过接头和/或铰链连接。

7. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白, 其特征在于,

上述双特异性表位结合蛋白为包含(任意顺序的VH及VL)_n-Y和/或Y-(X)_m的双特异性

表位结合蛋白，

上述Y独立地为CH2或CH3结构域，上述VH、VL与CH2和/或CH3，或者CH2和/或CH3与X直接或通过铰链和/或接头连接，

上述VH、VL、X、n以及m如上所定义。

8. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，

上述双特异性表位结合蛋白为包含(X)^m-Y和/或Y⁻（任意顺序的VH及VL）ⁿ的双特异性表位结合蛋白，

上述Y独立地为CH2或CH3结构域，上述VH、VL与CH2和/或CH3，或者CH2和/或CH3与X直接或通过铰链和/或接头连接，

上述VH、VL、X、n以及m如上所定义。

9. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，上述4-1BB结合抗体或其抗原结合片段包含序列23的VH。

10. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，上述4-1BB结合抗体或其抗原结合片段包含序列25的VL。

11. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，上述4-1BB结合抗体或其抗原结合片段包含序列23的VH及序列25的VL。

12. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，上述PD-1蛋白或其片段包含序列27的序列。

13. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，

上述4-1BB结合抗体或其抗原结合片段包含序列23的VH及序列25的VL，

上述PD-1蛋白或其片段包含序列27的序列。

14. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，

上述双特异性表位结合蛋白具有选自自由序列1至序列10及序列14组成的组中的序列，或者

上述双特异性表位结合蛋白与具有选自自由序列1至序列10及序列14组成的组中的序列的双特异性表位结合蛋白具有至少80%的序列同一性，并对4-1BB及PD-L1具有双特异性结合亲和力。

15. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，上述双特异性表位结合蛋白具有选自自由序列1至序列10及序列14组成的组中的序列。

16. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，上述双特异性表位结合蛋白与具有选自自由序列1至序列10及序列14组成的组中的序列的双特异性表位结合蛋白具有至少80%的序列同一性，并对4-1BB及PD-L1具有双特异性结合亲和力。

17. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，上述双特异性表位结合蛋白具有序列3的序列。

18. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，上述双特异性表位结合蛋白与具有序列3的序列的双特异性表位结合蛋白具有至少80%的序列同一性，并对4-1BB及PD-L1具有双特异性结合亲和力。

19. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，还包含信号肽。

20. 根据权利要求19所述的双特异性表位结合蛋白，其特征在于，上述信号肽为包含12

个至40个氨基酸的N-末端信号肽。

21. 根据权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白,其特征在于,上述PD-1蛋白或其片段的亲和力成熟。

22. 一种核酸分子,其特征在于,编码权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白。

23. 一种重组载体,其特征在于,包含权利要求22所述的核酸分子。

24. 一种细胞,其特征在于,包含权利要求22所述的核酸分子。

25. 一种双特异性表位结合蛋白的生产方法,其特征在于,包括:

在生产双特异性表位结合蛋白的充分条件下的培养基中培养权利要求22所述的细胞的步骤;以及

从细胞和/或培养基中回收双特异性表位结合蛋白的步骤。

26. 一种药物组合物,其特征在于,包含权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白及药学上可接受的载体。

27. 一种在需要治疗癌症的对象中治疗癌症的方法,其特征在于,包括向对象给药包含或输送有效量的权利要求1所述的双特异性表位结合蛋白的组合物的步骤。

28. 根据权利要求27所述的在需要治疗癌症的对象中治疗癌症的方法,其特征在于,上述对象患有癌症。

29. 根据权利要求27所述的在需要治疗癌症的对象中治疗癌症的方法,其特征在于,上述对象具有罹患癌症的风险。

30. 根据权利要求27所述的在需要治疗癌症的对象中治疗癌症的方法,其特征在于,上述癌症包括膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、大肠癌、子宫内膜癌、食管癌、输卵管癌、胆囊癌、胃肠道癌、头颈部癌、血液癌、喉癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、原发性腹膜癌、唾液腺癌、肉瘤、胃癌、甲状腺癌、胰腺癌、肾细胞癌、胶质细胞瘤、前列腺癌以及它们的组合。

包含抗4-1BB抗体及PD-1蛋白或其片段的双特异性表位结合蛋白及其用途

技术领域

[0001] 有关本申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年1月11日申请的美国临时申请第63/135812

[0003] 号的优先权,该专利申请的全部内容在此引入本申请作为参考。

[0004] 有关序列表的引用

[0005] 根据37CFR§1.52(e)(5),本说明书将名称为

[0006] “540469W0_ST25.txt”的.txt文件以电子方式提交的序列表作为参照。.txt文件生成于2022年1月10日,大小为120095字节。序列表的全部内容引入并包括在本申请中来形成本申请公开内容的必需部分。

[0007] 本发明的技术背景

[0008] 本发明提供包含抗4-1BB激动剂(agonist)抗体及以高亲和力与PD-L1结合的PD-1蛋白或其片段的双特异性表位结合蛋白。双特异性表位结合蛋白在与表达PD-L1的肿瘤细胞的同时,与上调4-1BB的T

[0009] 细胞,尤其与效应CD8⁺T细胞结合,即,同时独立地与4-1BB及PD-L1

[0010] 结合。在小鼠模型中,上述相互作用阻断PD-1/PD-L1介导的抑制信号传导并激活4-1BB介导的共刺激信号传导,从而诱导抗肿瘤效应CD8⁺

[0011] T细胞的细胞毒性活性的强力激活。与各单独的成分相比,上述双特异性表位结合蛋白具有更为强力的溶瘤(oncolytic)效果。

背景技术

[0012] 癌症仍是全世界的主要死亡原因之一。根据最近的统计,世界人口的13%因癌症死亡。根据国际癌症研究机构(IARC:International

[0013] Agency for Research on Cancer)的估计,2020年全世界新发1930万例癌症病例,1000万人因癌症死亡。预计至2030年,全世界会因人口增加、人口老龄化、吸烟、对健康有害的饮食以及缺乏运动的危险因素而新发2170万例病例并因癌症导致1300万人的死亡。并且,由于癌症治疗的痛苦和治疗费用,患者及其家属的生活质量也将大打折扣。因此,为了应对日益增加的癌症危机,有必要扩增治疗专家能够用来对抗癌症的武器库。

[0014] 4-1BB为在免疫反应中在T细胞和抗原呈递细胞的表面表达的共刺激分子中的一种,已知为作为细胞膜蛋白的肿瘤坏死因子(TNF:tumor necrosis factor)受体组中的一种。4-1BB的表达在抗原或丝裂原诱导剂或后在CD4⁺及CD8⁺T细胞的表面被迅速诱导。4-1BB为55kDa的同源二聚体,在小鼠的T细胞株、胸腺细胞、成熟的T细胞等多个部位表达,已知被ConA、植物血凝素(PHA:phytohemagglutinin)、肌霉素、抗CD3抗体或分子等激活。并且,4-1BB的一部分存在于细胞内部并与蛋白激酶之一的p56^{lck}结合,因此可以推断细胞外信号通过4-1BB向细胞内传导。

[0015] 程序性细胞死亡蛋白1(PD-1:Programmed cell death protein 1)为在例如恶性

黑色素瘤、非小细胞肺癌以及肾细胞癌等多种癌症的治疗中作为有关癌症免疫疗法的优秀靶向蛋白的免疫检查点受体。PD-1为存在于T细胞表面上的受体,属于免疫球蛋白超级家族。在PD-1与程序性死亡受体1(PD-L1:programmed death ligand 1)或程序性死亡受体2(PD-L2)结合的情况下,与PD-1相关的信号传导被激活,抑制T细胞增殖、 γ 干扰素及白细胞介素2的生成以及T细胞受体信号传导,从而抑制T细胞激活。已知多种癌细胞通过表达PD-L1来使T细胞丧失功能,这就以癌细胞回避免疫系统的攻击的机制来起作用。

[0016] 与4-1BB/4-1BBL(4-1BB配体)提供刺激信号相反,PD-1/PD-L1向T淋巴细胞提供抑制信号。有关4-1BB的多种形态的激动剂或有关PD-L1的拮抗剂主要在CD8+T细胞的调节中表现出抗肿瘤活性。因此,可以通过结合4-1BB的激动剂与PD-L1拮抗剂来实现协同或附加的抗肿瘤效果。

[0017] 在上述技术背景下,本申请的发明人通过考虑治疗候选物质的整体大小并测试抗体与蛋白质的多种组合来筛选表现出最佳抗肿瘤活性的双特异性表位结合蛋白,从而开发出本发明。

发明内容

[0018] 技术问题

[0019] 与4-1BB/4-1BBL提供刺激信号相反,PD-1/PD-L1向T淋巴细胞提供抑制信号。有关4-1BB的多种形态的激动剂或有关PD-L1的拮抗剂主要在CD8+T细胞的调节中表现出强力的抗肿瘤活性。因此,预想可以通过结合4-1BB的激动剂与PD-L1拮抗剂来实现协同或附加的抗肿瘤效果。

[0020] 从上述观点考虑,本申请的发明人通过考虑治疗候选物质的整体大小并测试抗体与蛋白质的多种组合来筛选表现出最佳抗肿瘤活性的双特异性表位结合蛋白,从而开发出本发明。

[0021] 本发明的目的在于,提供表现出优秀抗肿瘤活性的双特异性表位结合蛋白。

[0022] 技术方案

[0023] 为了实现上述目的,本发明提供双特异性表位结合蛋白,包含(VH)、(VL)、(X)、(VH)_n、(VL)_n、(X)_n、(VH)_n-Y、(VL)_n-Y、(VH-VL)_n-Y、(VL-VH)_n-Y、(X)_n-Y、Y-(VH)_m、Y-(VL)_m、Y-(VH-VL)_m、Y-(VL-VH)_m和/或Y-(X)_m的组合。在本发明中,结构域可以存在于单一的多肽,或者“重链”及“轻链”可以存在不同的多肽中。

[0024] 在上述内容中,VH、VL和/或X可以直接或通过N-末端侧面或C-末端侧面的铰链和/或接头与Y连接。

[0025] 在上述内容中,VH及VL分别指与4-1BB结合的抗体或其抗原结合片段的重链可变区及轻链可变区。

[0026] 在上述内容中,X包括修饰的或工程化的、亲和力成熟的和/或突变的PD-1蛋白或其片段,为与PD-L1结合的PD-1蛋白或其片段。

[0027] 在上述内容中,Y是指重链恒定区或轻链恒定区的片段。重链恒定区的片段可以包含3个恒定区结构域CH1、CH2及CH3以及它们片段中的一种以上。轻链恒定区的片段可以包含恒定区结构域CL或其片段。在本发明的实施形态中,Y为包含CH2或CH3结构域的片段。在本发明的实施形态中,Y为包含CH1的片段。在本发明的实施形态中,Y为包含CL结构域的片

段。

[0028] 在上述内容中n及m各自独立地为包括1、2、3、4或5等所有整数在内的1至5的整数。

[0029] 本发明的双特异性表位结合蛋白可以含有N-末端信号肽。本发明中能够使用的信号肽的长度通常为12个至40个、15个至35个或16个至30个氨基酸,具有使蛋白质向细胞细胞,通常是向细胞膜移动的功能。用在本发明中的信号肽的具体序列不受特别限制,例如,可以包含任意公知的信号肽序列。适当的N-末端信号肽的非限制例具有如下序列:MEWSWVFLVTLLNGIQC(序列(SEQ ID NO:)29)。虽然不是优选,但信号肽也可以位于C-末端。

[0030] 本发明的双特异性表位结合蛋白的例为序列1至序列10及序列14(S01-S10)。在优选实施形态中,本发明的双特异性表位结合蛋白具有序列3(S03)的序列。

[0031] 关于已确认例示性的双特异性表位结合蛋白,应该理解的是,保有双特异性结合的一个序列的变异也是可接受的。因此,本发明的序列保有对4-1bb和pd-1a的双特异性结合亲和力,其保有至少约30%至40%的整体序列同一性,优选地,保有至少约50%、60%、70%、80%或85%以上的序列同一性,更优选地,保有至少约90%、95%、96%、97%、98%或99%以上的序列同一性。

[0032] 在一部分实施形态中,本发明的双特异性表位结合蛋白为人源化的抗体。

[0033] 在一部分实施形态中,为表达本发明的双特异性表位结合蛋白的多核苷酸、包含多核苷酸的载体以及含有本发明的多核苷酸或载体的细胞。

[0034] 本申请提供包含如下成分的药物组合物:双特异性表位结合蛋白、本申请中记述的核酸分子中的任一种、本申请中记述的重组载体中的任一种或本申请中记述的细胞中的任一种;以及药学上可接受的载体。

[0035] 本申请提供包含本申请中记述的药物组合物中的任一种的试剂盒。

[0036] 本申请提供生产双特异性表位结合蛋白的方法,上述方法包括如下步骤:在生产双特异性表位结合蛋白的充分的条件下在培养基中生产本申请记述的细胞中的任一种的步骤;以及从细胞和/或培养基中回收双特异性表位结合蛋白的步骤。

[0037] 本申请提供治疗需要治疗的对象的方法,上述方法包括如下步骤:向对象给药包含或传递本申请中记述的双特异性表位结合蛋白中的任一种、本申请中记述的核酸分子中的任一种、本申请中记述的重组载体中的任一种或本申请中记述细胞中的任一种的组合物来治疗疾病或状态的步骤。在一部分实施形态中,对象患有癌症或者具有患癌的风险。在一部分实施形态中,癌症包括膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、大肠癌、子宫内膜癌、食管癌、输卵管癌、胆囊癌、胃肠道癌、头颈部癌、血液癌、喉癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、原发性腹膜癌、唾液腺癌、肉瘤、胃癌、甲状腺癌、胰腺癌、肾细胞癌、胶质细胞瘤、前列腺癌以及它们的组合。

[0038] 发明的效果

[0039] 上述目的强调本发明的特定实施方式。本发明的追加的目的、实施方式及实施形态将在本发明的下述详细说明中得以确认。

附图说明

[0040] 通过以下的详细说明以及参照以下的附图,将更有助于获得对本发明及与之相伴的优点的理解。

[0041] 图1示出双特异性表位结合蛋白的有关T细胞接合器及检查点抑制剂的双重功能的作用方式。

[0042] 图2示出实施例1中记述的有关双特异性表位结合蛋白S01至S11的设计。

[0043] 图3示出在非还原及还原条件下对双特异性表位结合蛋白S01至S11进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析(参照实施例2)的结果。

[0044] 图4示出双特异性表位结合蛋白S01至S11的体积排阻色谱(size-exclusion chromatography)(参照实施例3)的结果。

[0045] 图5a示出有关PD-L1与人PD1-Fc结合的表面等离子体共振技术分析的结果。图5b示出有关PD-L1与S03结合的表面等离子体共振技术分析的结果(参照实施例4)。

[0046] 图6a示出有关实施例5中单一抗原结合酶联免疫吸附测定(ELISA)的分析方法。图6b示出与4-1BB结合的双特异性表位结合蛋白S01至S11的结果。图6c示出与PD-L1结合的双特异性表位结合蛋白S01至S11的结果。图6d示出双特异性表位结合蛋白S03及null变异体S12(4-1BB null)及S13(PD-L1 null)的双特异性抗体设计。图6e示出与4-1BB结合的双特异性表位结合蛋白S03以及null变异体S12及S13的结果。图6f示出与PD-L1结合的双特异性表位结合蛋白S03以及null变异体S12及S13的结果。

[0047] 图7a示出有关实施例6的双抗原结合酶联免疫吸附测定的分析方法。图7b示出有关双特异性表位结合蛋白S01至S11的双抗原结合酶联免疫吸附测定的结果。图7c示出有关双特异性表位结合蛋白S03、null变异体S12(4-1BB null)及S13(PD-L1null)的双抗原结合酶联免疫吸附测定的结果。

[0048] 图8示出实施例7的细胞结合分析结果。具体地,图8示出分析所使用的多种细胞株中的4-1BB及PD-L1的表达水平。

[0049] 图9a(MDA-MB-231-Luc)及图9b(FaDu)示出有关具有PD-L1阳性细胞株的双特异性表位结合蛋白变异体的流式细胞荧光分选技术(FACS)分析结果。图9c示出有关具有4-1BB阳性细胞株的双特异性表位结合蛋白变异体的流式细胞荧光分选技术分析结果。图9d(MCF-7)示出有关具有PD-L1及4-1BB阴性细胞株的双特异性表位结合蛋白变异体的流式细胞荧光分选技术分析结果(参照实施例7)。

[0050] 图10示出在实施例8中对双特异性表位结合蛋白S01至S11进行4-1BB生物分析的结果。

[0051] 图11a示出实施例9中记述的4-1BB/PD-1组合生物分析。图11b示出通过比较抗4-1BB抗体(94kvt-工程化的IgG1,序列14及序列21)、抗PD-1抗体(派姆单抗,默沙东公司(MSD))、抗PD-L1抗体(阿替珠单抗,罗氏集团(Roche))以及euPD-1Fc(序列22)、抗4-1BB抗体与euPD-1Fc的特定组合来对双特异性表位结合蛋白S03进行4-1BB/PD-1组合生物分析的结果。

[0052] 图12a示出试验PD-L1及PD-L2与PD1-Fc的结合的酶联免疫吸附测定分析结果。图12b示出试验PD-L1与双特异性表位结合蛋白S03、抗PD-L1抗体以及抗PD-L2抗体的结合的酶联免疫吸附测定分析结果。图12c示出试验PD-L2与双特异性表位结合蛋白S03、抗PD-L1抗体以及抗PD-L2抗体的结合的酶联免疫吸附测定分析结果(参照实施例10)。

[0053] 图13示出实施例11的细胞毒性分析结果。

[0054] 图14示出实施例12的 γ 干扰素(IFN- γ)分析结果。

[0055] 图15a示出实施例13的有关4-1BB阳性细胞株的抗体依赖细胞细胞毒性分析结果。图15b示出实施例13的有关PD-L1阳性细胞株的抗体依赖细胞细胞毒性分析结果。

[0056] 图16示出实施例14的补体依赖细胞毒性分析结果。

[0057] 图17a示出实施例15所述的使用h4-1BB敲入 (knock-in) 小鼠的有关S03、S05及S07的生物体内功效的分析。图17b示出与肿瘤大小相关的使用h4-1BB敲入小鼠的S03、S05及S07的生物体内功效研究结果。

[0058] 图18a示出实施例16所述的与肿瘤大小相关的使用h4-1BB敲入小鼠的S03的生物体内功效研究结果。图18b示出有关血液内T细胞集团的使用h4-1BB敲入小鼠的S03的生物体内功效研究结果。

[0059] 图19示出实施例17所述的有关肿瘤大小的使用h4-1BB及hPD-1双敲入小鼠的S03的生物体内功效研究结果。

具体实施方式

[0060] 若无其他定义,则申请中使用的所有技术及科学术语具有与本发明所属技术领域(例如酶学、生物化学、细胞生物学、分子生物学及医疗科学领域)的普通技术人员理解的相同的含义。通常,本申请中使用的命名法为本发明所属技术领域中为人熟知且通常使用的。

[0061] 与本申请中记述的相似或等同的所有方法及材料都可以在本发明的实施及试验中使用,适当的方法及材料记录在本申请中。本申请中提及的所有刊物,专利申请、专利及其他参考文献都引用并包括在本申请中。若有冲突,则优先采用包括定义的本说明书。并且,材料、方法及例仅为例示,若无其他说明,则不是处于限制本发明的意图。

[0062] 本发明提供包含(VH)、(VL)、(X)、(VH)_n、(VL)_n、(X)_n、(VH)_n-Y、(VL)_n-Y、(VH-VL)_n-Y、(VL-VH)_n-Y、(X)_n-Y、Y-(VH)_m、Y-(VL)_m、Y-(VH-VL)_m、Y-(VL-VH)_m和/或Y-(X)_m的组合的**丕**双特异性表位结合蛋白。在本发明中,结构域可以存在于单一多肽中,或者“重链”及“轻链”可以存在于不同的多肽中。

[0063] 在上述内容中,VH、VL和/或X可以直接或通过N-末端侧面或C-末端侧面的铰链和/或接头与Y连接。例如,VH、VL和/或X直接或者通过铰链或接头与CH2连接,独立地,CH3直接或者通过铰链或接头与VH、VL和/或X连接。

[0064] 在上述内容中,VH及VL分别指与4-1BB结合的抗体或其抗原结合片段的重链可变区及轻链可变区。

[0065] 在上述内容中,X包括修饰的或工程化的、亲和力成熟的和/或突变的PD-1蛋白或其片段,为与PD-L1结合的PD-1蛋白或其片段。

[0066] 在上述内容中,Y是指重链恒定区或轻链恒定区的片段。重链恒定区的片段可以包含3个恒定区结构域CH1、CH2及CH3以及它们片段中的一种以上。轻链恒定区的片段可以包含恒定区结构域CL。在本发明的实施形态中,Y为包含CH2或CH3结构域的片段。在本发明的实施形态中,Y为包含CH1的片段。在本发明的实施形态中,Y为包含CL结构域的片段。

[0067] 在本发明的实施形态中,Y由人IgG抗体诱导而来。

[0068] 关于3个恒定区结构域CH1、CH2及CH3及其片段,有关包含CH1、CH2以及CH3结构域的各IgG1(序列32)、IgG2(序列34)、IgG3(序列35)以及IgG4(序列36)的重链恒定区是本发明所属技术领域中广为人知的。在本发明中,可以使用3个恒定区结构域CH1、CH2及CH3及

其片段中的一种以上。为此, Y (包含一个以上恒定区结构域CH1、CH2及CH3以及其片段) 可以任意地从序列32、序列34、序列35或序列36或者与它们具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%以上的序列同一性的序列诱导而来。在优选实施形态中, Y (包含一个以上恒定区结构域CH1、CH2及CH3以及其片段) 从具有序列32的序列或具有与序列32至少具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%以上的序列同一性的序列的IgG1重链恒定区诱导而来, 其中, 上述变异体包括附加、缺失和/或取代。修饰的重链恒定区的例为可以诱导用于在本发明中使用的恒定区结构域CH1、CH2及CH3以及其片段中的一种以上的序列33。

[0069] 关于恒定区CL及其片段, 有关免疫球蛋白 κ (序列37)、免疫球蛋白 λ 1 (序列38) 以及免疫球蛋白 λ 2 (序列39) 的轻链恒定区是本发明所属技术领域中广为人知的。为此, Y可以任意地从序列37至序列39或者与它们具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%以上的序列同一性的序列诱导而来。在优选实施形态中, Y从具有序列37的序列或具有与序列37具有至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%以上的序列同一性的序列的免疫球蛋白 κ 轻链恒定区诱导而来, 其中, 上述变异体包括附加、缺失和/或取代。

[0070] 在上述内容中n及m各自独立地为包括1、2、3、4或5等所有整数在内的1至5的整数。

[0071] 在存在上述 (VH)、(VL)、(VH)_n-Y、(VL)_n-Y、(VH-VL)_n-Y、(VL-VH)_n-Y、(X)_n-Y、Y-(VH)_m、Y-(VL)_m、Y-(VH-VL)_m、Y-(VL-VH)_m和/或Y-(X)_m区的情况下, 它们能够从N-末端向C-末端以任意顺序出现。并且, 在存在 (VH)、(VL)、(VH)_n-Y、(VL)_n-Y、(VH-VL)_n-Y、(VL-VH)_n-Y、(X)_n-Y、Y-(VH)_m、Y-(VL)_m、Y-(VH-VL)_m、Y-(VL-VH)_m和/或Y-(X)_m的多个复制模板的情况下, 相对于其他区域, 它们能够以任意顺序存在, 相似种类的区域不必直接相邻。

[0072] 在本发明的实施形态中, 双特异性表位结合蛋白具有An-A'n'-B-Cm-C'm'的结构, 其中, A、A'、C、C'为VH、VL、VH-VL、VL-VH或X, B为Y, VH、VL、X、Y、n以及m如上所定义, 各个VH、VL、X、Y直接或通过接头和/或铰链连接。值'n'及m'各自独立地为包括1、2、3、4或5等所有整数在内的1至5的整数。

[0073] 在本发明的实施形态中, 双特异性表位结合蛋白具有An-B-Cm的结构, 其中, A或C为VH-VL、VL-VH或X, B为Y, VH、VL、X、Y、n以及m如上所定义, 各个VH、VL、X、Y直接或通过接头和/或铰链连接。

[0074] 在本发明的实施形态中, 上述CH1结构域在C-末端直接或通过铰链和/或接头与(VH-VL)_n、(VL-VH)_n或(X)_n连接, 上述CH2/CH3结构域在N-末端直接或通过铰链和/或接头与(VH-VL)_m、(VL-VH)_m、(X)_m连接。并且, 在上述实施形态中, CH1结构域直接或通过接头和/或铰链与CH2/CH3结构域连接。在上述内容中, VH、VL、X、n以及m如上所定义。

[0075] 本发明还包括双特异性表位结合蛋白在不同的多肽上分别具有重链及轻链的实施形态。在上述实施形态中, 重链包含直接或通过接头和/或铰链与CH2连接的VH-VL、VL-VH、X和/或VH-CH1, 独立地, CH3直接或通过接头和/或铰链与VH-VL、VL-VH或X连接。在上述实施形态中, 轻链包含直接或通过接头和/或铰链与CL连接的VL。VH、VL以及X如上所定义, 各个VH、VL、X、CH1、CH2、CH3以及CL直接或通过接头和/或铰链连接。作为上述实施形态的例, 参照S09及S10 (参照图2), 其中, 上述S09具有序列9的重链及序列14的轻链, S10具有序列10的重链及序列14的轻链。

[0076] 优选地, 双特异性表位结合蛋白为scFv形态。

[0077] 在本发明例示性的实施形态中,提供包含(无论VH及VL的顺序) n -Y和/或Y-(X) m 的双特异性表位结合蛋白,其中,Y独立地为CH2或CH3结构域;上述VH、VL与CH2和/或CH3,或者CH2和/或CH3与X直接或通过铰链和/或接头连接;VH及VL分别指与4-1BB结合的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区及重链可变区;X包括修饰的或工程化的、亲和力成熟的和/或突变的PD-1蛋白或其片段,为与PD-L1结合的PD-1蛋白或其片段; n 及 m 各自独立地为包括1、2、3、4或5等所有整数在内的1至5的整数。

[0078] 上述实施形态的特定例为从N-末端向C-末端以(VL-VH) n -CH2-CH3-(X) m 的记载排列的scFv。VL、VH、X、 n 以及 m 如上所定义。在上述例的实施形态中,VL与VH通过接头连接,VH与CH2通过接头连接,CH3与(X) m 通过接头连接,或者CH2与CH3通过接头连接。在上述实施形态中,接头中的一个以上可以尾随或尾随铰链。作为替代方案,前述的连接中的一个以上可以直接连接或者通过铰链来连接。

[0079] 本发明的再一例示性的实施形态为包含(X) m -Y和/或Y-(任意顺序的VH及VL) n 的双特异性表位结合蛋白,其中,Y独立地为CH2或CH3结构域;VH、VL与CH2和/或CH3,或者CH2和/或CH3与X直接或通过铰链和/或接头连接;VH及VL分别指与4-1BB结合的抗体或其抗原结合片段的轻链可变区及重链可变区;X包括修饰的或工程化的、亲和力成熟的和/或突变的PD-1蛋白或其片段,为与PD-L1结合的PD-1蛋白或其片段; n 及 m 各自独立地为包括1、2、3、4或5等所有整数在内的1至5的整数。

[0080] 本实施形态的特定例从N-末端向C-末端以((X) m -CH2-CH3-(VH-VL) n)的记载排列的scFv。VL、VH、X、 n 以及 m 如上所定义。在上述例的实施形态中,(X) m 与CH2通过接头连接,CH3与VH通过接头连接,VH与VL通过接头连接,或者CH2与CH3通过接头连接。在上述实施形态中,接头中的一个以上可以尾随或尾随铰链。作为替代方案,前述的连接中的一个以上可以直接连接或者通过铰链来连接。

[0081] 在本发明的实施形态中, n 及 m 能够以分别具有选自整数1、2、3、4或5的整数值的 n 与 m 的任意组合的方式存在。在存在多个VH、VL和/或X的情况下(即, n 和/或 m 为大于1的值),这可以直接连接,或者复制模板通过铰链和/或接头序列分离。在优选实施形态中,多重复制模板通过接头序列分离。

[0082] 本发明的包含(任意顺序的VH及VL) n -Y和/或Y-(X) m 的双特异性表位结合蛋白为双重特异性治疗剂的第一臂(arm),与作为第二臂的包含相同的(任意顺序的VH及VL) n -Y和/或Y-(X) m 的双特异性表位结合蛋白形成对。在对的第一臂为(X) m -Y和/或Y-(任意顺序的VH及VL) n 的情况下,双特异性表位结合蛋白的第二臂也包含相同的(X) m -Y和/或Y-(任意顺序的VH及VL) n 。即,由本发明的双特异性表位结合蛋白构成的生成的抗体在形成对的另一臂上具有相同的排列。

[0083] VH以、VL与CH2和/或CH3,后者CH2和/或CH3与X可以直接或通过铰链和/或接头连接。为了通过铰链和/或接头连接,半胱氨酸残基可以包含连接部位。在半胱氨酸残基形成二硫键期间,VH、VL与CH2和/或CH3,后者CH2和/或CH3与X可以直接或通过铰链和/或接头连接。

[0084] 在考虑治疗候选物质的整体大小和蛋白质的多种组合时,可以通过抗4-1BB抗体片段以高亲和力与PD-1结合的可溶性PD-1的来表现出最高的抗肿瘤活性。

[0085] 在本发明的实施形态中,VH区包含序列23。在本发明的实施形态中,VL区包含序列

25。在本发明的实施形态中,抗4-1BB抗体片段具有包含序列23的VH区及包含序列25的VL区。

[0086] 在本发明的实施形态中,抗4-1BB抗体片段为scFv形态。

[0087] 在本发明的实施形态中,编码序列23的核酸为序列24的序列。在本发明的实施形态中,编码序列25的核酸为序列26的序列。

[0088] 序列23:QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWIGEINPGNGHTNYN
EKFKSRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSFKTARAFAYWGQGLVTVSS

[0089] 序列24:caggtccagctggtgcagagcggcgccgaagtgaaaaaacctggggcaagtgtcaagctgt
cctgtaaggccagcggttataccttctctcatattggatgcactgggtgaggcaagccctggacaagggtgga
atggatcggtgaaattaatcccggaaatggccatacaaaactacaatgaaaaattcaaaagtcgagtgacatgaca
cgggacacatccacttccactgcatacatggagctttcagagtctgcgctccgaggatacagctgtctattactgcg
cacgcagttttaaaactgccagagcctttgcctactggggtcagggaaacctggtcaccgttagcagc

[0090] 序列25:DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIKYASQSISGIPSR
FSGSGSGTDFFTISSLEAEDAATYYCQDGHSPPTFGQGTKLEIK

[0091] 序列26:gacattgtgatgacacagtcacctgctttctcctgagcgttacaccggcgaaaaggtgacta
tcacatgcagggttagtcagaccatctcagactaccttcattgggtatcaacagaagccagaccaggctcctaagtt
gctgataaagtagcctcccaatccatttccggcatttcttcccgtttttccggctccggctccggcaccgacttt
acgttcaccatctcttctttggaggctgaagacgcagctacctattactgtcaggatggtcacagctggccaccaa
ctttcgggcaaggcaccaagctggagatcaaa

[0092] PD-1蛋白或片段可以在与PD-L1结合的亲和力成熟或者没有亲和力的情况下使用。因此,PD-1蛋白或其片段可以为PD-1或其片段。作为替代方案,PD-1蛋白或其片段可以被修饰或工程化,可以亲和力成熟和/或突变。为了获得在分子层面亲和的PD-1,首先使用在PD-1与PD-L1之间的三维复合物,筛选起到主要作用的PD-1氨基酸,使用筛选的氨基酸构成随机突变,为了筛选使用酵母表面显示技术。将亲和力成熟的PD-1称为euPD-1。关于PD-1蛋白或其片段的突变,对于PD-L1具有特异性结合亲和力的PD-1蛋白或其片段保有至少约30%至40%整体序列同一性,优选地,保有至少约50%、60%、70%、80%或85%以上的序列同一性,更优选地,保有至少约90%、95%、96%、97%、98%或99%以上的序列同一性。

[0093] 在本发明的实施形态中,euPD-1可以包含序列27的序列。与前述说明一贯地,PD-1蛋白或其片段可以具有与序列27的至少约30%至40%的整体序列同一性,优选地,可以具有与序列27的至少约50%、60%、70%、80%或85%以上的序列同一性,更优选地,具有与序列27至少约90%、95%、96%、97%、98%或99%以上的序列同一性,其中,上述PD-1蛋白或其片段保有对PD-L1的特异性结合亲和力。

[0094] 在本发明的实施形态中,编码序列27的核酸为序列28的序列。

[0095] 序列27:FLESPDRPWNAPTFSPALLLVAEGDNATFTCSFSNASESFHVVWHRESPGQTDTLA AFPE
DRSQPGQDHRFRVTRL PNGRDFHMSVVRAQRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR
PAGQFQTLVVG

[0096] 序列28:tttctcgaatcaccggacagacctggaatgcgcccacattctcaccagcacttttctgtg
tagcagagggcgataatgctacattcacgtgttcttcagtaatgcaagcgagtcatttcatgtggtttggcatcg
agagtcacctagtgggcagactgatacacttgccgcattcccgaagatcgctcccagccaggtcaggatcaccgg

ttcagggttaacccgactgccgaatggcgcgatttccatatgagcgttgtccggcgcaacggaacgatagtggaa
catacgtgtgtggcgtaatatccctcgcgtcccaaaatacaataaaggagtctctgagagcagagctgagagtgac
agaacgacggcggaagtcccacggctcatccgtcaccaagtccgcgccccgcaggccaatttcaaacgctcgtc
gtaggc

[0097] 本发明的双特异性表位结合蛋白可以包含信号肽,例如,可以包含N-末端信号肽。本发明中能够使用的信号肽的长度通常为12个至40个、15个至35个或16个至30个氨基酸,具有促使细胞将蛋白质移动,通常是起到向细胞膜移动的功能。用在本发明中的信号肽的具体序列不受特别限制,例如,可以包含任意公知的信号肽序列。适当的N-末端信号肽的非限制例具有如下序列:MEWSWVFLVTLNGIQC(序列29)。虽然不是优选,但信号肽也可以位于C-末端。

[0098] 本发明的双特异性表位结合蛋白的例为序列1至序列10及序列14(S01-S10)。在优选实施形态中,本发明的双特异性表位结合蛋白具有序列3(S03)的序列。

[0099] 关于已确认例示性的双特异性表位结合蛋白,应该理解的是,保有双特异性结合得一个序列的变异也是可接受的。因此,对4-1BB和PD-L1保有双特异性结合亲和力的本发明的序列保有至少约30%至40%的整体序列同一性,优选地,保有至少约50%、60%、70%、80%或85%以上的序列同一性,更优选地,保有至少约90%、95%、96%、97%、98%或99%以上的序列同一性。

[0100] 通过细胞结合及双抗原分析确认到S03(序列3)同时独立地与两个目标结合。

[0101] 4-1BB生物分析的结果,与生物学相关的基于MOA的分析示出通过S03的强力的PD-L1依赖的T细胞激活。

[0102] 在4-1BB敲入小鼠模型中对表达人PD-L1的肿瘤细胞进行试验时,与各个成分单独以及S05或S07等其他候选物质相比,S03表现出显著的更为强力的溶瘤效果。

[0103] 并且,在注入S03的情况下,外周血中的T细胞,尤其是效应CD8+T细胞增加,结果,肿瘤的大小变小。S03促进CD8+T细胞浸润并同时与2个不同的目标4-1BB及PD-L1结合,因此是在肿瘤部位原位激活T细胞的有前途的抗肿瘤剂。

[0104] 结果,S03为包含抗4-1BB抗体及euPD-1的双特异性表位结合蛋白,表现出如下特性:1.通过Fc工程化的减少的ADCC及CDC活性;2.比天然PD-1更为强力的结合亲和力;3.在实验室内的临床前研究中,选择性激活并强化PD-L1阳性肿瘤的指向性T-细胞反应;以及4.比对照组抗体更好的肿瘤消除效果。

[0105] “双特异性(Bispecific)”或“双重特异性(dual specific)”为可以通过与目标特异性结合来调节两个不同目标的活性的蛋白质特性,制备通过与抗体或个目标特异性结合的蛋白质进行,或者保有其片段以及对于其结合的各抗原的一加的两个不同的抗原结合臂(臂:对于两个目标的特异性)。尤其,本发明的双特异性表位结合蛋白涉及与4-1BB及PD-L1的特异性结合或具有对于4-1BB及PD-L1的特异性亲和力。

[0106] 如在本申请中使用的,术语“抗体”是指与4-1BB特异性结合的抗4-1BB抗体。本发明的范畴不仅包括与4-1BB特异性结合的完整的抗体形态,还包括抗体分子的抗原结合片段。

[0107] 术语“PD-1蛋白”包括PD-1蛋白或与PD-L1结合的片段。本发明的范畴不仅包括与PD-L1特异性结合的完整的重组蛋白形态,还包括重组蛋白分子的PD-1-结合片段。并且,如

上所述,PD-1蛋白或片段可以在通过与PD-L1结合的亲和力成熟和/或没有亲和力成熟的情况下使用。因此,PD-1蛋白或其片段可以为天然PD-1或其片段。作为替代方案,与上述说明一致地,PD-1蛋白或其片段可以被修饰或被工程化、亲和力成熟和/或突变。

[0108] 完整的抗体具有由2个全长轻链及2个全长重链构成的机构,各个轻链通过二硫键与重链连接。

[0109] 如在本申请中使用的,术语“重链”是指包含含有具有赋予对抗原的特异性的充分的可变区序列的氨基酸序列的可变区结构域VH以及3个恒定区结构域CH1、CH2及CH3的全长重链以及其片段。并且,如在本申请中使用的,术语“轻链”是指包含含有具有赋予对抗原的特异性的充分的可变区序列的氨基酸序列的可变区结构域VL以及恒定区结构域CL的全长轻链以及其片段。

[0110] 完全(whole)抗体包括IgA、IgD、IgE、IgM及IgG的亚型或变体,尤其,IgG包括IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。重链恒定区具有伽马(γ)、缪(μ)、阿尔法(α)、贝塔(δ)及伊普西龙(ϵ)型以及亚型伽马1(γ 1)、伽马2(γ 2)、伽马3(γ 3)、伽马4(γ 4)、阿尔法1(α 1)及阿尔法2(α 2)。轻链的恒定区包括卡帕(κ)及兰布达(λ)型。

[0111] 抗体的抗原结合片段或抗体片段是指具有抗原结合功能的片段,包括Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv等。在抗体片段中,Fab具有由轻链及重链的可变区、轻链的恒定区及重链的第一恒定区(CH1)构成的结构,具有一个抗原结合部位。Fab'在重链CH1结构域的C-末端具有包含一个以上半胱氨酸残基的铰链区,这一点与Fab不同。Fab'的铰链区中的半胱氨酸残基形成二硫键时形成F(ab')₂片段。

[0112] Fv相当于只具有重链可变区及轻链可变区的最小的抗体片段。在双链Fv(2-链Fv)中,重链可变区与轻链可变区通过非共价键连接,在单链Fv(scFv)中,重链可变区与轻链可变区通过肽接头以共价键连接,或者在C-末端直接连接来形成双链Fv等二聚体的结构。这样的抗体片段可以通过蛋白分解酶制备(例如,使用木瓜蛋白酶有限分解完整的抗体来生成Fab,若使用胃蛋白酶分解,则生成F(ab')₂),或者可以通过基因重组技术制备。

[0113] “Fv”为包含完整的抗体识别及结合部位的抗体片段。这样的区域为连接一个重链可变结构域与一个轻链可变结构域的二聚体。

[0114] “Fab”片段包含轻链的可变及恒定结构域以及重链的可变及第一恒定结构域(CH1)。F(ab')₂抗体片段通常包含在存在于Fab'片段的C-末端的铰链区中通过半胱氨酸以共价键连接的一对Fab'片段。

[0115] “单链Fv(scFv)”抗体片段为由包含抗体的VH及VL结构域的单一多肽链构成的构建体。可以在VH结构域与VL结构域之间包含用于使scFv为抗原结合而形成所希望的结构的多肽接头。

[0116] 本发明中的“铰链”不受特别限制,是本发明所属技术领域广为人知的。铰链是指通过二硫键连接2个链的位于IgG及IgA等免疫球蛋白类的重链中央部分的柔软的氨基酸拉伸物。它富含半胱氨酸和脯氨酸,氨基酸序列非常多样,不与任何其他免疫球蛋白区相似。铰链区的长度可以多种多样,通常为10个至50个氨基酸残基的范围。参照文献[Adlersberg JB,Ric Clin Lab.Jul-Sep 1976;6(3):191-205]的报告。例如,有EPKSCDKTHTCPPCP(序列30)及DKTHTCPPCP(序列31)的铰链序列的记述。

[0117] 使铰链尾随接头序列在本发明中尤为有利。铰链也可以在接头序列前面。

[0118] 本发明的抗体包括单克隆抗体、多特异性抗体、人类抗体、人源化的抗体、嵌合抗体、scFvs、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv(sdFv)及抗独特型(idiotypic)(抗Id)抗体或抗体的表位结合片段等,但不限于此。

[0119] 重链恒定区可以选自伽马(γ)、缪(μ)、阿尔法(α)、贝塔(δ)或伊普西龙(ϵ)中的任一种同种型。例如,恒定区为伽马1(IgG1)、伽马2(IgG2)、伽马3(IgG3)或伽马4(IgG4)。轻链恒定区可以为卡帕或兰布达型。

[0120] 单克隆抗体是指从抗体的实质上均质的集团中获得的抗体。即,是指除抗体中可能少量存在的自然地突以外的相同的抗体。单克隆抗体的特异性高,因此向单一抗体部位诱导。通常,与包含对于不同决定基团(表位)的不同抗体的以往的(多克隆)抗体不同,各单克隆抗体只向抗原的单一决定基团。

[0121] 术语“表位”是指抗体能够特异性结合的蛋白质决定基团。表位通常由氨基酸或糖侧链等化学活性表面分子组构成,通常具有特定的三维结构特性及特定电荷特性。

[0122] “人源化的”形态的非人类(例如,小鼠)抗体为包含源自非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在大部分情况下,人源化的抗体为受体的超可变区的残基取代为保持所希望的特异性、亲和力及能力的小鼠、大鼠、兔或非人灵长类等非人种类的超可变区(供体抗体)的残基的人类免疫球蛋白(受体抗体)。

[0123] 术语“人类抗体”是指包括互补决定区及结构性区域在内的构成抗体的所有氨基酸序列都由人类免疫球蛋白构成的源自人类免疫球蛋白的分子。

[0124] 作为嵌合抗体(免疫球蛋白)及表现出所希望的生物学活性的抗体的片段的化学抗体的重链和/或轻链的一部分源自特定种类,或者与属于特定抗体种类或亚类的抗体相应的序列相同或具有同源性,与之相反,其余的链来自其他种类或者与属于其他特定抗体种类或亚类的抗体相应的序列相同或具有同源性。

[0125] 本申请中使用的抗体的“可变区”是指包含互补决定区(CDR;即,CDR1、CDR2及CDR3)及骨架区(FR)的氨基酸序列的抗体分子的轻链及重链部分。VH是指重链的可变结构域。VL是指轻链的可变结构域。

[0126] 术语“互补决定区(CDR)”是指作为抗原结合所需的实体的抗体可变结构域的氨基酸残基。典型地,各个可变结构域具有确认为CDR1、CDR2及CDR3的3个CDR区。

[0127] “骨架区(FR)”为CDR残基以外的可变结构域残基。可变结构域通常具有4个FR,即,FR1、FR2、FR3及FR4。

[0128] scFv为作为由包含抗体的VH及VL结构域的单多肽链形成的构建体的抗体片段。为了抗原结合,scFv还可以在VH结构域与VL结构域之间包含多肽接头以能够形成所希望的结构。

[0129] 尤其,在本发明的优选实施形态中,双特异性表位结合蛋白为单一多肽。

[0130] 接头可以为肽接头,如引用的内容所示,包括各个整数值在内,可以具有约10aa至25aa、约10aa至20aa或约12aa至19aa的长度。例如,可以包含甘氨酸和/或丝氨酸等亲水性氨基酸,但不限于此。

[0131] 尤其,接头可以包含例如(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n或(GnS)_m(n及m分别为1至10,即,n及m可以各自独立地为任意的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10),接头也可以为例如(G_nS)_m(n及m分别为1至10,即,n及m可以各自独立地为任意的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。特定的参照为

(G₄S)₃ (序列15) 或 (G₄S)₂ (序列16) 接头。并且, 接头可以218接头 (序列17) 或218S接头 (序列18) 的一个以上复制模板。当然, 本发明也考虑前述接头的组合。

[0132] 在实施形态中, 本发明涉及编码双特异性表位结合蛋白的核酸。双特异性表位结合蛋白可以通过分离核酸来以重组的方式生产。即, 编码双特异性表位结合蛋白的核酸、含有编码双特异性表位结合蛋白的核酸的载体以及含有核酸和/或载体的细胞都包括在本发明中。

[0133] “核酸”解释为包括脱氧核糖核酸 (DNA) (基因组脱氧核糖核酸 (gDNA) 及互补脱氧核糖核酸 (cDNA)) 及核糖核酸 (RNA) 分子在内的概念, 作为核酸的基本结构单位的核苷酸解释为不仅包括天然核苷酸, 还包括糖或碱基部位变形的类似物。编码本发明的重链及轻链可变区的核酸的序列可以变形。这样的变形包括核苷酸的附加、缺失或者非保护性或保护性取代。

[0134] 可以使用现有的分子生物学技术轻易分离或合成脱氧核糖核酸, 核酸可以被分离来插入具有复制功能的载体来追加克隆 (脱氧核糖核酸 (DNA) 扩增) 或追加表达。基于此, 本发明涉及其他实施方式的包含核酸的重组表达载体。

[0135] 如在本申请中使用的, 术语“载体”为在宿主细胞中表达目标基因的工具, 包括质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体、腺相关病毒载体等。载体的成分通常包括信号序列、复制起点、一个以上耐抗生素标记物基因、增强子要素、启动子及转录终止序列中的一个以上, 但不限于于此。编码双特异性表位结合蛋白的核酸与启动子、转录终止序列等可操作连接。

[0136] 术语“可操作连接”是指核酸表达调节序列 (例如启动子、信号序列或转录调节子结合部位的阵列) 与其他核酸序列之间的功能性连接, 调节序列可以通过此调节其他核酸序列的转录和/或翻译。

[0137] 在宿主为原核细胞的情况下, 通常包含能够传播转录的强力的启动子 (例如tac启动子、lac启动子、lacUV5启动子、lpp启动子、pLλ启动子、pRλ启动子、rac5启动子、amp启动子、recA启动子、SP6启动子、trp启动子及T7启动子等)、用于翻译启动的核糖体结合部位及转录/翻译终止序列。并且, 例如, 在宿主为真核细胞的情况下, 可以使用源自哺乳动物细胞基因组的启动子 (例如金属硫蛋白启动子、β-肌动蛋白启动子、人血红蛋白启动子及人肌酸启动子) 或源自哺乳动物病毒的启动子 (例如, 腺病毒后期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、巨细胞病毒 (CMV: cytomegalovirus) 启动子、单纯疱疹病毒 (HSV) tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV: mouse mammary tumor virus) 启动子、获得性免疫缺陷病毒 (HIV) LTR启动子、莫罗尼病毒的启动子、EB病毒 (EBV: Epstein-Barr virus) 的启动子及劳氏肉瘤病毒 (RSV: rous sarcoma virus) 的启动子), 通常包含聚腺苷酸化序列作为转录终止序列。

[0138] 根据情况, 载体可以与其他序列融合以便于纯化由其表达的双特异性表位结合蛋白。融合的序列包括例如, 谷胱甘肽S-转移酶 (法玛西亚公司 (Pharmacia), 所在地美国)、麦芽糖结合蛋白 (NEB公司, 所在地美国)、FLAG (IBI公司, 所在地美国)、6x His (六组氨酸; Qiagen公司, 所在地美国) 等。

[0139] 载体包含本发明所属技术领域通常使用的耐抗生素基因作为选择标记物。例如, 它们为对氨苄青霉素、庆大霉素、羧苄青霉素、氯霉素、链霉素、卡那霉素、遗传霉素、新霉素及四环素具有耐性的基因。

[0140] 作为又一实施方式,本发明涉及由重组表达载体转染的宿主细胞。用来生产本发明的双特异性表位结合蛋白的宿主细胞可以为原核细胞、酵母或高等真核细胞,但不限定于此。

[0141] 可以使用包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 及苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 在内的杆菌属菌株、链霉菌 (*Streptomyces*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*) (例如恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*))、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 及葡萄球菌 (*Staphylococcus*) (例如肉葡萄球菌 (*Staphylococcus carnosus*)) 等元和宿主细胞。

[0142] 然而,最关注动物细胞,有效的宿主细胞株的例有MDA-MB-231、MCF-7、FaDu、Jurkat、MC38、COS-7、BHK、CHO、CHOK1、DXB-11、DG-44、CHO/-DHFR、CV1、COS-7、HEK293、BHK、TM4、VERO、HELA、MDCK、BRL 3A、W138、Hep G2、SK-Hep、MMT、TRI、MRC 5、FS4、3T3、RIN、A549、PC12、K562、PER.C6、SP2/0、NS-0、U20S或HT1080,但不限定于此。

[0143] 在另一实施方式中,本发明涉及包括如下步骤的双特异性表位结合蛋白的之别方法:培养宿主细胞来生成双特异性表位结合蛋白步骤;以及分离机纯化生成的双特异性表位结合蛋白的步骤。

[0144] 可以在多种培养基中培养宿主细胞。可以不受限制地使用市面上出售的培养基作为培养基。可以包含适当浓度的本发明所属技术领域的普通技术人员公知的所有必需的补充剂。本发明所属技术领域的普通技术人员应该自明的是,温度、pH等培养添加已为表达而在选择的宿主细胞中使用。

[0145] 为了回收双特异性表位结合蛋白,可以通过离心分离或超滤去除杂质,产物可以使用亲和层析等方法来纯化。还可以使用阴离子或阳离子交换层析、疏水性相互作用层析、羟基磷灰石层析等其他追加的纯化技术。

[0146] 在又一实施方式中,本发明涉及包含双特异性表位结合蛋白的用于预防或治疗肿瘤或癌症的组合物。

[0147] 术语“预防”不要求具有开创性事例的绝对的消除。因此,术语“预防”是指通过给药本发明的组合物来抑制疾病的临床症状或延迟病程的任意作用,术语“治疗”是指抑制疾病的临床症状的发展,或者缓解或消除临床症状。

[0148] 本发明的组合物所包含的药学上可接受的载体包括剂型中通常使用的乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、海藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、糖浆、甲基纤维素、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、滑石粉、硬脂酸镁、矿物油等,但不限定于此。除上述成分以外,本发明的组合物还可以包含润滑剂、湿润剂、甜味剂、香味剂、乳化剂、助悬剂、保存剂等。

[0149] 本发明的药物组合物可以口服或胃肠外给药,在胃肠外给给药的情况下,可以通过静脉内注射、皮下注射、肌肉内注射、腹腔内注射、皮下给药、局部给药、鼻腔内给药、肺内给药及直肠给药等方式给药。

[0150] 蛋白质或肽在口服给药时会被消化,因此,口服组合物应涂层活性剂或者以保护在胃里被分解的方式来配制。并且,药物组合物可以通过能够将活性物质输送到目标细胞的任意装置来给药。

[0151] 本发明的组合物的适当给药量根据配制方法、给药方式、患者的年龄、体重、性别、

医学状态、饮食、给药时间、给药途径、代谢率及反应敏感度等因素的不同而不同。熟练的一生可以轻易决定并处方在所希望的治疗或预防中有效的给药量。例如,本发明的药物组合物的每日给药量为0.0001mg/kg至100mg/kg,其中,上述“kg”是指对象的体重。每日给药量的下限可以为0.0001mg/kg、0.0005mg/kg、0.001mg/kg、0.005mg/kg、0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg、12.5mg/kg、15mg/kg、17.5mg/kg、20mg/kg、22.5mg/kg、25mg/kg、27.5mg/kg、30mg/kg、32.5mg/kg、35mg/kg、37.5mg/kg以及40mg/kg。每日给药量的上限可以为100mg/kg、97.5mg/kg、95mg/kg、92.5mg/kg、90mg/kg、87.5mg/kg、85mg/kg、82.5mg/kg、80mg/kg、77.5mg/kg、75mg/kg、72.5mg/kg、70mg/kg、67.5mg/kg、65mg/kg、62.5mg/kg、60mg/kg、57.5mg/kg、55mg/kg、52.5mg/kg、50mg/kg、47.5mg/kg、45mg/kg、42.5mg/kg以及40mg/kg。并且,通过前述的下限及上限限定的任意的范围、可以将记述的下限值用作上限的范围(例如,0.01mg/kg至10mg/kg的范围包括在本发明中)及可以将记述的上限值用作下限的范围(例如,45mg/至75mg/kg的范围包括在本发明中)包括在本发明中。如在本申请中使用的,术语“药学上有效的量”是指用来预防或治疗癌症的充分的剂量。

[0152] 本发明的药物组合物可以使用药学上可接受的载体和/或赋形剂来配制为单位剂量,或者可以根据本发明所属技术领域的普通技术人员易于实施的方法装入多剂量容器中来制备。在此情况下,剂型可以为油或水性溶剂、悬混液或乳液中溶液形态,可以为提取物、粉末、栓剂、颗粒、片剂或胶囊剂的形态。还可以包含分散剂或稳定剂。

[0153] 在一部分实施形态中,双特异性表位结合蛋白、单链嵌合多肽或本申请中记述的核酸构建体可以用于治疗有需要的对象。

[0154] 在一部分实施形态中,可以向诊断为患病或具有病例状态的对象的给药包含双特异性表位结合蛋白、单链嵌合多肽及药学上可接受的载体的药物组合物。

[0155] 在一部分实施形态中,对象已患有癌症或具有患癌的风险。

[0156] 在一部分实施形态中,药物组合物可以与包括但不限于离子化放射线、化学治疗剂、治疗抗体及检查点抑制剂的一种以上追加的抗肿瘤疗法联合给药。

[0157] 癌症是指以身体的非正常细胞不受控制地生长为特征的广义的疾病组。不受调节的细胞分裂和生长引起侵犯周围组织的恶性肿瘤的形成,还可以通过淋巴系统或血流转移到身体的其他部分。癌症或癌症组织可以包括肿瘤。

[0158] 适合本公开内容的方法治疗的癌症可以包括膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、大肠癌、子宫内膜癌、食管癌、输卵管癌、胆囊癌、胃肠道癌、头颈部癌、血液癌、喉癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、原发性腹膜癌、唾液腺癌、肉瘤、胃癌、甲状腺癌、胰腺癌以及前列腺癌,但不限于于此。在一部分实施形态中,通过本公开内容的方法治疗的癌症可以包括癌症肿瘤、淋巴瘤(例如,霍奇金淋巴瘤及非霍奇金淋巴瘤)、母细胞瘤、肉瘤及白血病,但不限于于此。在一部分实施形态中,癌症可以包括扁平细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺的扁平细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌、胰腺癌、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞癌、乳腺癌、大肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、白血病及其他淋巴增殖性障碍以及多种类型的头颈部癌。

[0159] 本申请还提供包含本申请中记述的任意双特异性表位结合蛋白、单链嵌合多肽、任意细胞或任意核酸中的至少一种的组合物(例如药物组合物)。在一部分实施形态中,组

合物包含本申请中记述的任意双特异性表位结合蛋白、单链嵌合多肽中的至少一种。在一部分实施形态中,组合物包含任意免疫细胞(例如本申请中记述的任意免疫细胞,例如使用本申请记述的任意方法生产的任意的免疫细胞)。

[0160] 在一部分实施形态中,药物组合物可以配制为不同给药途径(例如静脉内、皮下)用。在一部分实施形态中,药物组合物可以包含药学上可接受的载体(例如使用磷酸盐缓冲的生理盐水)。

[0161] 例如,药物组合物的单一或多次给药能够以对象所需的可接受的给药量以及频度来向有需要的对象提供。剂型应以对状态、疾病或症状有效的方式来提供治疗、预防或改善所需的充分量的活性剂。

[0162] 本申请还提供包含本申请中记述的任意双特异性表位结合蛋白、单链嵌合多肽、组合物、核酸或细胞(例如免疫细胞)的试剂盒。在一部分实施形态中,试剂盒可以包含用于进行本申请中记述的任意方法的说明书。在一部分实施形态中,试剂盒可以包含任意本申请中记述的药物组合物的至少一个剂量。

[0163] 定义

[0164] 约:术语“约”在本申请中与值相关来使用时,是指与所述值相关的相似的值。通常,熟悉文脉的从业者应理解“约”所包含的适当程度的变动程度。例如,在一部分实施形态中,术语“约”包括所述值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或以下以内的值的范围。

[0165] 给药:如在本申请中使用的,术语“给药”典型地是指为实现组合物或组合物所包含的制剂的传输而向对象或系统施予组合物。相关从业者知道用于在适当的情况下能够向对象,例如能够用于向人给药的多种途径。例如,在一部分实施形态中,给药可以为眼球给药、口服给药、胃肠外给药、局部给药等。在一部分特定实施例中,给药可以为支气管(例如支气管点滴)、颊侧、皮肤(例如可以为真皮、皮内(intradermal)、皮间(interdermal)、经皮等的一种以上局部或者可以包括它们)、肠内、动脉内、皮内、胃内、骨髓内、肌肉内、皮墙内、腹腔内、脊髓腔内、静脉内、脑室内、特定器官内(例如肝内)、黏膜、鼻腔、口服、直肠、皮下、舌下、局部、气管(例如通过气管内点滴)、阴道、玻璃体等。在一部分实施形态中,给药可以只包含单一剂量。在一部分实施形态中,给药可以伴随固定的剂量的应用。在一部分实施形态中,给药可以包括间歇(例如,在时间上分离的多个剂量)和/或周期(例如,分离为相同时间间隔的单个剂量)给药的给药。在一部分实施形态中,给药可以包括至少在选择的期间内连续给药(例如灌注)。

[0166] 亲和力:如本发明所属技术领域熟知的,“亲和力”是指特定配体与其结合伙伴结合的强度的尺度。亲和力可以通过多种方法测定。在一部分实施形态中,亲和力通过定量分析法测定。在这样的一部分实施形态中,为了模拟生理学条件,结合伙伴浓度可以固定位超过配体浓度。作为替代方案或者追加方案,在一部分实施形态中,结合伙伴浓度和/或配体浓度可以变化。在这样的一部分实施形态中,亲和力可以在能够比较的条件(例如浓度)中与基准比较。

[0167] 抗体制剂:如在本申请中使用的,术语“抗体制剂”是指与特定抗原特异性结合的制剂。在一部分实施形态中,该术语包括包含足以用来赋予特异性结合的免疫球蛋白结构要素的任意多肽或多肽复合物。例示性的抗体制剂包括单克隆抗体、多克隆抗体及其片段,

但限于此。在一部分实施形态中,抗体制剂可以如本发明所属技术领域中所公知的那样包含人源化、灵长类化、嵌合等一种以上序列要素。在许多实施形态中,术语“抗体制剂”用来在替代方案所述内容中称呼用于利用抗体的结构性及功能性特征的本发明所属技术领域中公知或开发的构建体或形式中的一种以上。例如,在实施形态中,优选地,根据本发明来使用的抗体制剂选自但不限于下述内容:完整的IgA、IgG、IgE或IgM抗体;双或多特异性抗体(例如Zybodies等);例如Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd'片段、Fd片段以及分离的CDR或其组、单链Fv等抗体片段等;单结构域抗体(例如,鲨鱼单结构域抗体、IgNAR或其片段);骆驼抗体;遮蔽抗体(例如前抗体(Probodyes));小型模块化免疫药物(“SMIPsTM”: Small Modular ImmunoPharmaceuticals);单链或串联双抗(TandAb);VHH;Anticalins;纳米抗体(Nanobodies)、迷你抗体;BiTE;锚蛋白重复蛋白或DARPINs;Avimers;DART;TCR样抗体;Adnectins;Affilins;Trans-bodies;Affibodies;TrimerX;微蛋白;Fynomers、Centyrins;以及KALBITOR。在一部分实施形态中,抗体制剂可以缺少自然生成的情况下所具有的共有变形(例如,聚糖的附着)。在一部分实施形态中,抗体制剂可以含有共有变形(例如,聚糖的附着、有效载荷(例如,可检出的部分、治疗部分、酶部分)或其他侧基(例如,聚乙二醇等))。在许多实施形态中,抗体制剂可以为包含一个作为互补决定区的氨基酸序列来作为可被本发明所属技术领域的普通技术人员识别的结构要素的多肽或包含上述多肽。在一部分实施形态中,抗体制剂为包含氨基酸序列与参照康体重变更的实质上相同的至少一个CDR(例如,至少一个重链CDR和/或至少一个轻链CDR)的多肽或包含上述多肽。在一部分实施形态中,与参照CDR相比,所包含的CDR的序列与之相同,或者,从含有1个至5个氨基酸取代的点来看,与参照CDR在实质上相同。在一部分实施形态中,从所包含的CDR表现出与参照CDR的至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的观点来看,与参照CDR在实质上相同。在一部分实施形态中,从所包含的CDR表现出与参照CDR的至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的观点来看,与参照CDR在实质上相同。在一部分实施形态中,与参照CER相比,虽然所包含的CDR内至少有一个氨基酸缺失、附加或取代,但从所包含的CDR与参照CDR不同,具有相同氨基酸序列的观点来看,与参照CDR在实质上相同。在一部分实施形态中,与参照CDR相比,虽然所包含的CDR的1个至5个氨基酸缺失、附加或取代,但从所包含的CDR与参照CDR不同,具有相同氨基酸序列的观点来看,与参照CDR在实质上相同。在一部分实施形态中,与参照CDR相比,虽然所包含的CDR的至少一个氨基酸被取代,但从所包含的CDR与参照CDR不同,具有相同氨基酸序列的观点来看,与参照CDR在实质上相同。在一部分实施形态中,与参照CDR相比,虽然所包含的CDR的1个至5个氨基酸缺失、附加或取代,但从所包含的CDR与参照CDR不同,具有相同氨基酸序列的观点来看,与参照CDR在实质上相同。在一部分实施形态中,抗体制剂为包含作为免疫球蛋白可变结构域的氨基酸序列作为可被本发明所属技术领域的普通技术人员识别的结构要素的多肽或包含上述多肽。在一部分实施形态中,抗体制剂为与免疫球蛋白-结合结构域具有同源性的多肽蛋白或者具有同源性的结合结构域作为替代的多肽蛋白。在一部分实施形态中,抗体制剂为嵌合抗原受体(CAR:chimeric antigen receptor)的至少一部分或者包含上述嵌合抗原受体的至少一部分。

[0168] 抗原:如在本申请中使用的,术语“抗原”是指与抗体制剂结合的制剂。在一部分实

施形态中,抗原可以与抗体制剂结合并在有机体中诱导或不诱导特定的生理学反应。通常,抗原可以为例如小分子、核酸、多肽、碳水化合物、脂质、聚合物(生物学聚合物(例如核酸和/或氨基酸聚合物)及生物学聚合物以外的聚合物(例如,核酸或氨基酸聚合物以外的聚合物))等任意的化学实体或可以包含上述实体。在一部分实施形态中,抗原为多肽或包含上述多肽。在一部分实施形态中,抗原为多糖或包含上述多糖。本发明所属技术领域的普通技术人员能够以分离或纯粹形态提供抗原,应该理解的是,作为替代方案,能够以未纯化的形态来提供(例如与其他物质一同,例如在与细胞提取物一同作为提取物或含抗原供体的其他相对未纯化的制备中)。在一部分特定实施形态中,抗原存在于细胞脉络中(例如,抗原在细胞的表面上表达或者在细胞中表达)。在一部分实施形态中,抗原为重组抗原。

[0169] 抗原结合结构域:如在本申请中使用的,是指与靶向部分或实体特异性结合的抗体制剂或其一部分。典型地,抗原结合结构域与其目标之间的相互作用为非共价键。在一部分实施形态中,靶向部分或实体可以为包括例如碳水化合物、脂质、核酸、金属、多肽或小分子在内的任意的化学分类。在一部分实施形态中,抗原结合结构域可以为多肽(或者其复合物)或者包含上述多肽。在一部分实施形态中,抗原结合结构域为融合多肽的一部分。

[0170] 与~相关的:若两个事件或实体中一个的存在、水平和/或形态与另一个的存在、水平和/或形态相关,则如在本申请中使用的,该术语表示它们之间“相关”。例如,在特定实体(例如多肽、基因特征、代谢产物、微生物等)的存在、水平和/或形态与疾病、障碍或病例状态的发病率和/或对于它们的敏感性相关的情况下(例如在相关人口集团整体中),则启示与特定疾病、障碍或病例状态相关。在一部分实施形态中,若两个以上的实体相互以物理方式接近和/或为保持接近而直接或间接地相互作用,则相互在物理上“相关”。在一部分实施形态中,物理上相关的两个以上的实体以共价键连接;在一部分实施形态中,物理上相关的两个以上实体虽然不以共价键连接,但通过例如氢键结合、范德瓦尔斯相互作用、磁性以及它们的组合来以非共价键相关。

[0171] 结合:如在本申请中使用的,术语“结合”通常理解是指两个以上的实体之间或它们之间的非共价键结合。“直接”结合包括实体或部分之间的物理接触;间接结合包括通过一个以上的中间实体的物理接触的物理相互作用。两个以上实体之间的结合通常包括相互作用的实体或部分被单独研究的结果或更为复杂的系统脉络(例如,与载体实体和/或生物学系统或细胞以共价键或以其他方式结合期间),从而可以在任意的多种脉络中评估。

[0172] 癌症:在本申请中,术语“癌症”、“恶性”、“新生物”、“肿瘤”以及“癌症肿瘤”是指相对不正常的,不受调控或者表现出自主性生长而以显著丧失增殖控制为特征的表现出异常生长表现型的细胞。在一部分实施形态中,肿瘤可以为癌前期(例如,阳性)、恶性、转移前期、转移性和/或非转移性的细胞,或者包含上述细胞。本公开内容具体识别能够尤其与上述解释相关的特定癌症。在一部分实施形态中,相关癌症能够以固体肿瘤为特征。在一部分实施形态中,相关癌症能够以血液肿瘤为特征。通常,本发明所属技术领域中公知的多种类型癌症的例包括:包括例如白血病、淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤及非霍奇金淋巴瘤)、骨髓瘤及骨髓增生性障碍在内的血液癌;肉瘤、黑色素瘤、腺瘤、固体组织的肿瘤、口腔、咽、喉以及肺的扁平细胞癌、肝癌、例如前列腺癌、宫颈癌、膀胱癌、子宫癌、子宫内膜癌及肾细胞癌等泌尿生殖癌症、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、皮肤或眼内黑色素瘤、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、头颈部癌、乳腺癌、胃肠道癌及神经系统癌症、例如乳头瘤等阳性病变等。

[0173] 化学治疗剂:本申请中使用的术语“化学治疗剂”具有一个以上称为细胞凋亡促进剂、细胞增殖抑制剂和/或细胞毒性剂的本发明所属技术领域中的含义,例如,具体包括在有关不希望的细胞增殖相关的疾病、障碍或病理状态的治疗中使用和/或推荐的制剂。在许多实施形态,化学治疗剂在癌症治疗中有效。在一部分实施形态中,化学治疗剂可以为一种以上的烷化剂(例如,双官能烷化剂,例如环磷酰胺(Cyclophosphamide)、氮芥(Mechlorethamine)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil)及美法仑(Melphalan)以及单官能烷化剂,例如达卡巴嗪(Dacarbazine)、亚硝基脲(Nitrosoureas)、替莫唑胺(Temozolomide))、一种以上蒽环类(例如,柔红霉素(Daunorubicin)、THP-阿霉素(Doxorubicin)、表阿霉素(Epirubicin)、伊达比星(Idarubicin)以及米托蒽醌(Mitoxantrone))、戊柔比星(valrubicinone)或其以上的细胞骨架破坏剂(例如微管靶向剂,例如紫杉烷类(taxane)、美登素(maytansine)及它们的类似物,具体的例包括紫杉醇(Paclitaxel)、多西他赛(Docetaxel)、蛋白结合型紫杉醇(Arabaxane)以及泰素帝(Taxotere))、一种以上的埃博霉素(epothilone)、一种以上的组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDAC)、一种以上的一种以上的拓扑异构酶抑制剂(例如,拓扑异构酶I和/或拓扑异构酶II的抑制剂)、一种以上的激酶抑制剂、一种以上的核苷酸类似物或核苷酸前体类似物、一种以上的肽抗生素、一种以上的铂基制剂、一种以上的类视黄醇、一种以上的长春花生物碱和/或一种以上的如下物质中的一种以上的类似物(即,共有相关抗增殖活性)或者包含上述物质。在一部分特定实施形态中,化学治疗剂可以为一种以上的放线菌素(Actinomycin)、全反式维甲酸(All-trans retinoic acid)、澳瑞他汀(Auristatin)、阿扎胞苷(Azacitidine)、硫唑嘌呤(Azathioprine)、博来霉素(Bleomycin)、硼替佐米(Bortezomib)、(Carboplatin)、卡培他滨(Capecitabine)、顺铂(Cisplatin)、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、姜黄素(Curcumin)、阿糖胞苷(Cytarabine)、柔红霉素、多西他赛、去氧氟尿嘧啶(Doxifluridine)、THP-阿霉素、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷(Etoposide)、氟尿嘧啶(Fluorouracil)、吉西他滨(Gemcitabine)、羟基脲(Hydroxyurea)、伊达比星、伊马替尼(Imatinib)、伊立替康(Irinotecan)、美登素和/或其类似物(例如DM1)、氮芥(Mechlorethamine)、巯基嘌呤(Mercaptopurine)、甲氨蝶呤(Methotrexate)、米托蒽醌、美登醇(Maytansinoid)、奥沙利铂(Oxaliplatin)、紫杉醇(Paclitaxel)、培美曲塞(Pemetrexed)、替尼泊苷(Teniposide)、硫鸟嘌呤(Tioguanine)、拓扑替康(Topotecan)、戊柔比星(Valrubicin)、长春花(Vinblastine)、长春碱(Vincristine)、长春新碱(Vindesine)、异长春花碱(Vinorelbine)以及它们的组合或包含上述物质。在一部分实施形态中,化学治疗剂可以在抗体-药物接合体的脉络中使用。在一部分实施形态中,化学治疗剂在选自如下物质组成的组中的抗体-药物接合体中发现:hLL1-THP-阿霉素、hRS7-SN-38、hMN-14-SN-38、hLL2-SN-38、hA20-SN-38、hPAM4-SN-38、hLL1-SN-38、hRS7-Pro-2-P-Dox、hMN-14-Pro-2-P-Dox、hLL2-Pro-2-P-Dox、hA20-Pro-2-P-Dox、hPAM4-Pro-2-P-Dox、hLL1-Pro-2-P-Dox、P4/D10-THP-阿霉素、吉妥珠单抗奥唑米星(gemtuzumab ozogamicin)、维布妥昔单抗(brentuximab vedotin)、恩美-曲妥珠单抗(trastuzumab emtansine)、奥英妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin)、维多汀-格巴妥木单抗(glembatumomab vedotin)、SAR3419、SAR566658、BIIB015、BT062、SGN-75、SGN-CD19A、AMG-172、AMG-595、BAY-94-9343、ASG-5ME、ASG-22ME、ASG-16M8F、MDX-1203、MLN-0264、抗PSMA ADC、RG-7450、RG-7458、RG-7593、RG-7596、RG-7598、RG-7599、RG-7600、RG-7636、ABT-414、IMGN-853、IMGN-529、玛汀沃

瑟托珠单抗(vorsetuzumab mafodotin)以及莫星-洛沃妥珠单抗(lorvotuzumab mertansine)。

[0174] 工程化的:通常,术语“工程化的”是指通过人工来工程化的实施方式。例如,多肽在多肽序列通过人工来操作时看做“操作”的。例如,本发明的在一部分实施形态中,工程化的多肽包含通过人工向参照多肽序列导入的一个以上氨基酸突变、缺失和/或插入的序列。在一部分实施形态中,工程化的多肽包括通过人工与一种以上的追加的多肽融合(即,共价键合)来形成的无法在生物体内自然产生的融合多肽的多肽。相似地,细胞或有机体在以变更遗传信息的目的下操作时,看做“工程化的”(例如,通过例如转化、交配、体细胞杂交、转染、转导或其他机制导入以前不存在的新的遗传物质,或者通过取代或缺失突变或者配对方方案来变更或消除以前存在的物质)。如通常的惯例及本发明所属技术领域的普通技术人员理解的,工程化的多肽或细胞的衍生物和/或后代尽管只是在之前的个体中进行操作,但通常也称为“工程化的”。

[0175] 药物组合物:如在本申请中使用的,术语“药物组合物”是指活性剂与一种以上药学上可接受的载体一同配制的组合物。在一部分实施形态中,组合物适合向人类或动物对象给药。在一部分实施形态中,活性剂在向相关集团给药时存在通过表现出实现预先确定的治疗效果的统计学显著性概率的治疗方法给药时的适当单位的给药量。

[0176] 药学上可接受的载体:在上述例中追加地,如在本申请中使用的,术语“药学上可接受的载体”具有有关为了执行所希望的功能而通过包括例如液体或固体填充剂、稳定剂、分散剂、助悬剂、稀释剂、赋形剂、增稠剂、溶剂或胶囊化物质在内的通常在药学上可接受的物质来向患者内或患者运输或输送本发明的有效化合物的本发明所属技术领域中认可的含义。典型地,这些构建体从一个器官或人体的一部分向其他器官或身体的另一部分运输或输送。在本发明中,从可以与包括有效的化合物在内的剂型的其他成分兼容并且不给患者带来危害的含义出发,各载体应是“可接受”的。如在本申请中使用的,“药学上可接受的载体”还包括与本发明的有效化合物的活性兼容且对患者在生理学上可接受的任意的及所有涂层、抗生素、抗真菌剂以及延迟吸收剂等。术语“药学上可接受的载体”还可以包括本发明的有效化合物的药学上可接受的盐。在本发明的实施中使用的药物组合物中可以包含的其他追加成分记述在例如文献(Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, Pa.))中,这作为引用包括在本申请中。通常,“药学上可接受的载体”与组合物的其他成分具有相容性,在药物组合物的制备中有效应是不给使用人员带来危害并且不应在生理学上或其他方面为非优选的。“药学上可接受的载体”包含一种以上的载体。实施形态包括用于局部、眼球、胃肠外、静脉内、腹腔内、肌肉内、舌下、鼻腔或口服给药的载体。“药学上可接受的载体”还包括用于制备水性分散液以及注射或分散液的灭菌粉末的制剂。

[0177] 药学上可接受的盐:如在本申请中使用的,术语“药学上可接受的盐”具有本发明所属技术领域中通常认可的含义,是指通过将母化合物存在的酸或碱的部分取代为其盐的形态来变形的本发明中提供的化合物的衍生物。药学上可接受的盐的例包括:胺等碱基残基的无机或有机酸盐;羧酸等酸性残基的碱或有机盐,但不限于此。本申请中提供的化合物的药学上可接受的盐包括例如从无毒性的无机酸或有机酸变形的母化合物的通常的无毒性盐。本申请中提供的化合物的药学上可接受的盐可以通过通常的化学方法合成来在母

化合物中含有碱或酸性部分。通常,这样的盐可以通过在水或有机溶剂或两者的混合物中组合化学计量的量的适当的碱或酸的组合来制备该化合物的游离酸或碱的形态;通常可以使用乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈等非水性溶剂。在文献(Remington's Pharmaceutical Sciences,17th ed.,Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1985,p.1418]及文献(Journal of Pharmaceutical Science,66,2(1977))中确认适当的盐的目录,它们作为引用包括在本申请中。

[0178] 赋形剂:如在本申请中使用的,术语“赋形剂”具有本发明所属技术领域通常认可的含义,是指在药物组合物的制备中有效的可兼容的添加剂。药学上可接受的载体及赋形剂的例可以在例如文献(Remington Pharmaceutical Science,16th Ed)中确认。

[0179] 多肽:如在本申请中使用的,术语“多肽”具有为至少3个氨基酸的聚合物的本发明所属技术领域通常认可的含义。本发明所属技术领域的普通技术人员应该理解的是,术语“多肽”不仅包括本申请中引用的具有完整序列的多肽,还包括表现出上述完整的多肽的功能性片段(即,保持一种以上活性的片段)。进而,本发明所属技术领域的普通技术人员应该理解的是,通常在不破坏蛋白质序列的活性的情况下,允许部分取代。因此,因此,保持活性并具有至少约30%至40%的整体序列同一性,优选地,共有至少约50%、60%、70%、80%或85%以上的序列同一性,并且追加地,通常在一个以上高度保守的区域中具有显著更高的同源性的至少一个区域,优选地,包含至少约90%、95%、96%、97%、98%或99%以上,通常包含至少3个至4个以及经常是包含最大20个以上氨基酸的任意多肽,与相同分类的其他多肽一同都包括在本申请中使用的相关术语“多肽”中。多肽可以包含L-氨基酸、D-氨基酸或者包含二者,可以包含本发明所属技术领域中公知的任意多种氨基酸的变形或类似物。有效的修饰包括例如末端乙酰化、酰胺化、甲基化等。在一部分实施形态中,蛋白质可以包含天然氨基酸、非天然氨基酸、合成氨基酸以及它们的组合。术语“肽”通常用来表示具有约小于100个氨基酸、约小于50个氨基酸、小于20个氨基酸或小于10个氨基酸长度的多肽。在一部分实施形态中,蛋白质为抗体制剂、抗体片段、其生物学活性部分和/或其特征部分。

[0180] 重组:如在本申请中使用的,是指:通过使用向宿主细胞内转染的重组表达载体表达的多肽等重组手段来涉及、操作、制备、表达、生成、制备和/或分离的多肽;从重组、组合人多肽文库中分离的多肽;从转化或者以表达与之不同的指示编码和/或表达多肽或其一种以上的成分、部分、要素或结构域的基因(单个或多个)或基因成分的方式工程化的动物(例如小鼠、兔、羊、鱼类等)分离的多肽;和/或以伴随通过使选择的核酸序列要素相互剪接或嫁接、以化学方式合成选择的序列要素和/或另外生成编码和/或表达多肽或其一种以上的成分、部分、要素或结构域的核酸的任意其他手段制备、表达、生成或分离的多肽在一部分实施形态中,这样的选择的序列要素中的一个以上为自然中发现的。在一部分实施形态中,这样的选择的序列要素中的一个以上为以in silico的方式设计的。在一部分实施形态中,一个以上的上述选择的序列要素从例如感兴趣的供体有机体(例如人类、小鼠等)的生殖系统等天然或合成供体中的公知的序列要素的突变诱发(例如,生物体内或实验室内)中产生。

[0181] 特异性结合:如在本申请中使用的,术语“特异性结合”是指在可能发生结合的环境中区别结合伙伴的能力。在存在其他潜在目标的情况下,与一个特定目标相互作用的结合剂称为与其相互作用的目标“特异性结合”。在一部分实施形态中,特异性结合通过检测

或测定结合剂与其伙伴之间的相关程度来评估；在一部分实施形态中，特异性结合通过检测或测定结合剂-伙伴复合物的解离程度来评估；在一部分实施形态中，特异性结合通过检测或测定结合剂竞争其伙伴与其他实体之间的替代性相互作用的能力来评估。在一部分实施形态中，特异性结合通过在浓度范围内进行上述检测或测定来评估。

[0182] 对象：如在本申请中使用的，术语“对象”是指有机体，典型地，是指哺乳动物（例如人类，在一部分实施形态中包括胎儿期的人类形态）。在一部分实施形态中，对象患有相关疾病、障碍或病理状态。在一部分实施形态中，对象易于患有疾病、障碍或病理状态。在一部分实施形态中，对象表现出疾病、障碍或病理状态的一种以上症状或特征。在一部分实施形态中，对象不表现出疾病、障碍或病理状态的任何症状或特征。在一部分实施形态中，对象具有对疾病、障碍或病理状态敏感性或风险的特征中的一种以上特征。在一部分实施形态中，对象为患者。在一部分实施形态中，对象为正在施予或已施予诊断和/或治疗方法的个体。

[0183] 治疗剂：如在本申请中使用的，语句“治疗剂”通常是指在向有机体给药时诱导所希望的药理效果的任意的制剂。在一部分实施形态中，在制剂在适当的集团中表现出统计学上的显著效果时，将该制剂视作治疗剂。在一部分实施形态中，适当的集团可以为模型有机体的集团。在一部分实施形态中，适当的集团可以通过特定年龄组、性别、遗传背景、基准临床状态等多种基准来定义。在一部分实施形态中，治疗剂为可以在疾病、障碍和/或病理状态的一种以上的症状或特征的缓解、改善、减轻、抑制、预防、发病延迟、疾病严重程度减少和/或发病率减少中使用的物质。在一部分实施形态中，“治疗剂”为在为向人类给药而出售前已得到政府机构认可或应该得到认可的制剂。在一部分实施形态中，“治疗剂”为需要医学处方来向人类给药的制剂。

[0184] 治疗有效量：如在本申请中使用的，术语“治疗有效量”是指为了治疗疾病、障碍和/或病理状态而根据治疗给药方法向患有疾病、障碍和/或病理状态或者对它们敏感的集团给药时充分的量。在一部分实施形态中，治疗有效量为减少疾病、障碍和/或病理状态的一种以上的症状的发病率和/或疾病严重程度并稳定它们的一种以上特征和/或延迟发病的量。本发明所属技术领域的普通技术人员应该理解的是，所谓“治疗有效量”的术语不以实际上在特定个人中实现成功的治疗为必需前提。治疗有效量反倒可以为在向有这样的患者给药时向相当数量的对象提供所希望的药理反应。例如，在一部分实施形态中，术语“治疗有效量”是指在本发明的治疗方法的脉络中，在向需要上述疗法的个体给药时阻断、稳定、弱化或逆转上述个体中发生的癌症支持过程的量，或者提高或增加上述个体中癌症抑制过程的量。在癌症治疗的脉络中，“治疗有效量”为向诊断为癌症的个体给药时预防、稳定、抑制或减少癌症的进一步发展的量。本申请中记述的组合物的尤为优选的“治疗有效量”（治疗性治疗）逆转胰腺癌等恶性肿瘤的发病，或者有助于实现或延长恶性肿瘤的缓解。为治疗癌症而向个体给药的治疗有效量可以与为促进缓解或抑制转移而给药的治疗性有效量相同或不同。与大部分癌症治疗方法相同，本申请中记述的资料方法不应解释为对于癌症的“治疗”，或者限于此，或限于其他形式；与之相反，治疗方法应涉及为了“治疗”癌症，即，为了在患有癌症的个体中引起对健康优选的或有利的变化而使用记述的组合物。这样的优点得到肿瘤学领域中熟练的医疗提供者的认可，包括患者状态的稳定个、肿瘤大小的减少（肿瘤退行）、生命功能的改善（例如癌症组织或器官的功能改善）、追加转移的减少或

抑制、机会感染的减少、存活率的增加、疼痛减少、运动机能改善、认知功能改善、能量感改善(活力、疲劳感减少)、幸福感改善、正常食欲的恢复、健康的体重增加的恢复以及他们的组合,但限于此。追加地,个体的特定肿瘤的退行(例如,作为本申请中记述的治疗的结果)还可以通过从胰腺癌等肿瘤的部位采取癌细胞的样品来评估(例如,在治疗过程中),关于代谢及信号传导标记物的水平,通过测试癌细胞监控癌细胞的状态来在分子水平上确认癌细胞是否退行为轻度的恶性表现型。例如,使用本发明的方法来诱导的肿瘤退行可以通过任意上述论述的血管新生促进标记物的减少、本申请中记述的抗血管新生标记物的增加、代谢途径、细胞间信号传导通路或诊断为癌症的个体中表现出异常活性的细胞内信号传导通路的正常化(即,变更为在未患癌症的个体中发现的状态)的发现来表示。本发明所属技术领域的普通技术人员应该理解的是,在一部分实施形态中,治疗有效量能够以单剂量配制和/或给药。在一部分实施形态中,例如,治疗有效量作为给药疗法的一部分,能够以多剂量来配制和/或给药。

[0185] 变异体:如在本申请中使用的,术语“变异体”是指例如在核酸、蛋白质或小分子的脉络中表现出与参照分子具有相当的结构同一性的分子,例如,是指与参照实体相比,在一个以上的化学部分的存在、不存在或水平中与参照分子在结构上不同的分子。在一部分实施形态中,变异体还与其参照分子在功能上不同。通常,特定分子是否被是当地看做参照分子的“变异体”基于与参照分子的结构同源性的程度。如本发明所属技术领域的普通技术人员理解的,任意的生物学或化学参照分子具有特定特征的结构要素。根据定义,变异体虽然共有一个以上这样的特征性的结构要素,但却是与参照分子至少在一个侧面不同的另外的分子。例如,多肽在线型或三维空间中相互间具有指定的位置和/或具有特定的结构基序和/或起到生物学功能的由多个氨基酸构成的特征性的序列要素;核酸可以具有由在线型或三维空间中相互间具有指定位置的多个核苷酸残基构成的特征性的序列要素。在一部分实施形态中,变异体多肽或核酸作为氨基酸或核苷酸序列的一个以上的不同的结果,可以与参照多肽或核酸不同。在一部分实施形态中,变异体多肽或者表现出与参照多肽或核酸的至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%整体序列同一性。在一部分实施形态中,变异体多肽或核酸与参照多肽或核酸不共有至少一个特征性的序列要素。在一部分实施形态中,参照多肽或核酸具有一种以上的生物学活性。在一部分实施形态中,变异体多肽或核酸共有参照多肽或核酸的生物学活性中的一种以上。

[0186] 载体:如在本申请中使用的,追加地,如上述公开内容中使用的,是指能够输送连接的或其他核酸的核酸分子。载体的一个类型为可以连接追加脱氧核糖核酸部分的表现形式为环形双链脱氧核糖核酸环的“质粒”。另一类型的载体为病毒载体,其中,追加脱氧核糖核酸部分可以与病毒基因组连接。特定载体可以在导入其的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体及附加体哺乳动物载体)。其他载体(例如非附加体哺乳动物载体)可以在导入宿主细胞内时融合入宿主细胞的基因组内,通过这种方式与宿主基因组一同复制。并且,特定载体可以指示可操作连接的基因的表达。这样的载体在本申请中称为“表达载体”。标准技术可以在重组脱氧核糖核酸、寡核苷酸合成、组织培养以及转化(例如电穿孔、脂质转染)中使用。酶反应及纯化技术可以根据生产公司的设计结构或者根据本发明所属技术领域通常实现的或者根据本申请中记载的内容来进行。前述的技术及步骤通常可

以根据本发明所属技术领域中广为人知的方法来进行,本说明书全文中引用的内容多种多样且具普遍性,可以根据更为具体的参考文献中记载的内容来进行。例如,参照文献(Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual 2nd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y. (1989)),该文献作为引用包括在本申请中。

[0187] 在本说明书的脉络中,若无其他说明,则本申请提及的所有刊物、专利申请、专利及其他参考文献的所有内容都作为引用明确包括在本申请中,它们的全部内容应视作本公开内容的一部分。

[0188] 若无其他定义,本申请中使用的所有技术及科学术语具有与本公开内容所属技术领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。若有冲突,则优先使用本说明书中包含的含义。

[0189] 有关本发明的上述记载的说明是为本发明所属技术领域的普通技术人员能够制备及使用来提供制备及使用的方式及过程,尤其,提供构成原来说明的一部分的随附的发明要求保护范围的主题使之成为可能。

[0190] 如在本申请中使用的,语句“选自由~组成的组中的”“选自~的”等包括特定物质的混合物。

[0191] 若本申请中明示数值的界限或范围,则包括终点。并且,数值界限或范围内的所有值及子范围具体包括明确制定的内容。

[0192] 上述说明是为使本发明所属技术领域的普通技术人员能够实施并使用本发明而提供的,在特定适用及要求事项的脉络中提供。本发明所属技术领域的普通技术人员应容易明白对于优选的实施形态的多种修正,本申请中定义的通常的原理可以在不脱离本发明的思想及范围的情况下应用为其他实施形态及应用。因此,本发明不应限定于在此提出的实施形态,而应赋予本申请中提出的原理及特征一致的最广泛的范围。

[0193] 本发明通过下述内容例示,但不局限于特定实施形态。

[0194] (1) 一种双特异性表位结合蛋白,包含(VH)、(VL)、(X)、(VH)_n、(VL)_n、(X)_n、(VH)_n-Y、(VL)_n-Y、(VH-VL)_n-Y、(VL-VH)_n-Y、(X)_n-Y、Y-(VH)_m、Y-(VL)_m、Y-(VH-VL)_m、Y-(VL-VH)_m和/或Y-(X)_m的组合,其中,上述VH及VL分别指与4-1BB结合的抗体或其抗原结合片段的重链可变区及轻链可变区,X为与PD-L1结合的PD-1蛋白或其片段,Y为包含选自CL、CH1、CH2以及CH3组成的组中的一种以上结构域的重链恒定区或轻链恒定区的片段,n及m分别为1至5的整数。

[0195] (2) 在(1)的双特异性表位结合蛋白中,在双特异性表位结合蛋白存在(VH)、(VL)、(VH)_n-Y、(VL)_n-Y、(VH-VL)_n-Y、(VL-VH)_n-Y、(X)_n-Y、Y-(VH)_m、Y-(VL)_m、Y-(VH-VL)_m、Y-(VL-VH)_m和/或Y-(X)_m的情况下,它们能够从N-末端向C-末端以任意顺序出现。

[0196] (3) 在(1)或(2)的双特异性表位结合蛋白中,在双特异性表位结合蛋白存在(VH)、(VL)、(VH)_n-Y、(VL)_n-Y、(VH-VL)_n-Y、(VL-VH)_n-Y、(X)_n-Y、Y-(VH)_m、Y-(VL)_m、Y-(VH-VL)_m、Y-(VL-VH)_m和/或Y-(X)_m的多重复制模板的情况下,相对于其他区域,它们能够以任意顺序存在,不必与相似种类的区域直接相邻。

[0197] (4) 在(1)至(3)中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,双特异性表位结合蛋白为scFv形态。

[0198] (5) 在(1)至(4)中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,上述双特异性表位结合蛋白为具有An-A'n'-B-Cm-C'm'的结构的双特异性表位结合蛋白,其中,A、A'、C、C'为VH、VL、VH-VL、VL-VH或X,B为Y,VH、VL、X、Y、n以及m如上所定义,各个VH、VL、X、Y直接或通过接头和/或铰链连接,n'及m'独立地为1至5的整数。

[0199] (6) 在(1)至(4)中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,上述双特异性表位结合蛋白为具有An-B-Cm的结构的双特异性表位结合蛋白,其中,A或C为VH-VL、VL-VH或X,B为Y,上述VH、VL、X、Y、n以及m如上所定义,各个VH、VL、X、Y直接或通过接头和/或铰链连接。

[0200] (7) 在(1)至(4)中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,CH1结构域在C-末端直接或通过铰链和/或接头与(VH-VL)_n、(VL-VH)_n或(X)_n连接,CH2/CH3结构域在N-末端直接或通过铰链和/或接头与(VH-VL)_m、(VL-VH)_m、(X)_m连接,VH、VL、X、n以及m如上所定义。

[0201] (8) 在(7)所述的双特异性表位结合蛋白中,CH1结构域与CH2/CH3结构域直接或通过铰链和/或接头连接。

[0202] (9) 在(1)至(3)中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,上述双特异性表位结合蛋白包含:重链,包含直接或通过接头和/或铰链与CH2连接的VH-VL、VL-VH、X和/或VH-CH1,CH3独立地直接或通过接头和/或铰链与VH-VL、VL-VH或X连接;以及轻链,包含直接或通过接头和/或铰链与CL连接的VL。其中,上述VH、VL以及X如上所定义,各个VH、VL、X、CH1、CH2、CH3以及CL直接或通过接头和/或铰链连接。

[0203] (10) 在(1)至(4)中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,双特异性表位结合蛋白包含(任意顺序的VH及VL)_n-Y和/或Y-(X)_m,其中,上述Y独立地为CH2或CH3结构域,上述VH、VL与CH2和/或CH3,或者CH2和/或CH3与X直接或通过铰链和/或接头连接,VH、VL、X、n以及m如上所定义。

[0204] (11) 在(1)至(4)及(10)中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,双特异性表位结合蛋白为从N-末端向C-末端记载的(VL-VH)_n-CH2-CH3-(X)_m一样排列的scFv。

[0205] (12) 在(11)双特异性表位结合蛋白中,VL与VH、VH与CH2、CH3与(X)_m和/或CH2与CH3直接或通过接头和/或铰链连接。

[0206] (13) 在(1)至(4)中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,双特异性表位结合蛋白包含(X)_m-Y和/或Y-(任意顺序的VH及VL)_n,其中,上述Y独立地为CH2或CH3结构域,VH、VL与CH2和/或CH3,或者CH2和/或CH3与X直接或通过铰链和/或接头连接,上述VH、VL、X、n以及m如上所定义。

[0207] (14) 在(13)所述的双特异性表位结合蛋白中,双特异性表位结合蛋白为从N-末端向C-末端记载的(X)_m-CH2-CH3-(VH-VL)_n一样排列的scFv。

[0208] (15) 在(14)所述的双特异性表位结合蛋白中,(X)_m与CH2、CH3与VH以及VH与VL和/或CH2与CH3直接或通过接头和/或铰链连接。

[0209] (16) 在(1)至(15)中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,n及m能够以分别具有选自整数1、2、3、4或5的整数值的n与m的任意组合的方式存在。

[0210] (17) 在(1)至(16)中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,在存在多个VH、VL和/或X的情况下(即,n和/或m为大于1的值),这可以直接连接,或者复制模板通过铰链和/或接头序列分离。

[0211] (18) 在(17)所述的双特异性表位结合蛋白中,复制模板通过接头序列分离。

[0212] (19) 在 (5) 至 (18) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,接头包含约10个至25个氨基酸残基、10个至20个氨基酸残基或12个至19个氨基酸残基。

[0213] (20) 在 (5) 至 (19) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,接头为选自 $(GS)_n$ 、 $(GGS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ 或 $(G_nS)_m$ (n 及 m 分别为1至10)、218接头或218S接头的任一种。

[0214] (21) 在 (5) 至 (20) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,接头为 $(G_4S)_3$ 接头、 $(G_4S)_2$ 接头、218接头或218S接头。

[0215] (22) 在 (1) 至 (21) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,4-1BB结合抗体或其抗原结合片段包含序列23的VH。

[0216] (23) 在 (1) 至 (22) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,4-1BB结合抗体或其抗原结合片段包含序列25的VL。

[0217] (24) 在 (1) 至 (21) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,4-1BB结合抗体或其抗原结合片段包含序列23的VH及序列25的VL。

[0218] (25) 在 (1) 至 (24) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,PD-1蛋白或其片段包含序列27的序列。

[0219] (25) 在 (1) 至 (21) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,4-1BB结合抗体或其抗原结合片段包含序列23的VH及序列25的VL,PD-1蛋白或其片段包含序列27的序列。

[0220] (27) 在 (1) 至 (26) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,上述双特异性表位结合蛋白具有选自由序列1至序列10及序列14组成的组中的序列,或者上述双特异性表位结合蛋白与具有选自由序列1至序列10及序列14组成的组中的序列的双特异性表位结合蛋白具有至少80%的序列同一性,并对4-1BB及PD-L1具有双特异性结合亲和力。

[0221] (28) 在 (1) 至 (26) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,上述双特异性表位结合蛋白具有选自由序列1至序列10及序列14组成的组中的序列。

[0222] (29) 在 (1) 至 (26) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,上述双特异性表位结合蛋白与具有选自由序列1至序列10及序列14组成的组中的序列的双特异性表位结合蛋白具有至少80%的序列同一性并对4-1BB及PD-L1具有双特异性结合亲和力。

[0223] (30) 在 (1) 至 (26) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,上述双特异性表位结合蛋白具有序列3的序列。

[0224] (31) 在 (1) 至 (26) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,上述双特异性表位结合蛋白与具有序列3的序列的双特异性表位结合蛋白具有至少80%的序列同一性并对4-1BB及PD-L1具有双特异性结合亲和力。

[0225] (32) 在 (1) 至 (31) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,还包含信号肽。

[0226] (33) 在 (32) 所述的双特异性表位结合蛋白中,上述信号肽为包含12个至40个氨基酸的N-末端信号肽。

[0227] (34) 在 (5) 至 (33) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,铰链具有序列30或序列31的序列。

[0228] (35) 在 (5) 至 (34) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,铰链具有序列31的序列。

[0229] (36) 在 (1) 至 (35) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白中,PD-1蛋白或其片段的亲和力成熟。

- [0230] (37) 一种 (1) 至 (36) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白对, 对的两个结构单元相同。
- [0231] (38) 一种编码 (1) 至 (36) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白的核酸分子。
- [0232] (39) 一种包含 (38) 所述的核酸分子的重组载体。
- [0233] (40) 一种包含 (38) 所述的核酸分子或 (28) 所述的重组载体的细胞。
- [0234] (41) 一种双特异性表位结合蛋白的生产方法, 上述方法包括: 在生产双特异性表位结合蛋白的充分条件下的培养基中培养 (40) 所述的细胞的步骤; 以及从细胞和/或培养基中回收双特异性表位结合蛋白的步骤。
- [0235] (42) 一种药物组合物, 包含 (1) 至 (36) 中任一项所述的双特异性表位结合蛋白、(38) 所述的核酸、(39) 所述的重组载体或 (40) 所述的细胞以及药学上可接受的载体。
- [0236] (43) 一种包含 (42) 所述的药物组合物的试剂盒。
- [0237] (44) 一种在需要治疗的对象中治疗癌症的方法, 上述方法包括向对象给药有效量的包含或输送 (1) 至 (36) 所述的双特异性表位结合蛋白、(37) 所述的核酸、(38) 所述的重组载体或 (40) 所述的细胞的组合物的步骤。
- [0238] (45) 在 (44) 所述的方法中, 对象患有癌症。
- [0239] (46) 在 (44) 所述的方法中, 对象具有患癌的风险。
- [0240] (47) 在 (44) 至 (46) 中任一项所述的方法中, 癌症包括膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、大肠癌、子宫内膜癌、食管癌、输卵管癌、胆囊癌、胃肠道癌、头颈部癌、血液癌、喉癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、原发性腹膜癌、唾液腺癌、肉瘤、胃癌、甲状腺癌、胰腺癌、肾细胞癌、胶质细胞瘤、前列腺癌以及它们的组合。
- [0241] (48) 一种在需要预防的对象中预防癌症的方法, 上述方法包括向对象给药有效量的包含或输送 (1) 至 (36) 所述的双特异性表位结合蛋白、(38) 所述的核酸、(39) 所述的重组载体或 (40) 所述的细胞的组合物的步骤。
- [0242] (49) 在 (48) 所述的方法中, 对象患有癌症。
- [0243] (50) 在 (48) 所述的方法中, 对象具有患癌的风险。
- [0244] (51) 在 (48) 至 (50) 中任一项所述的方法中, 癌症包括膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、大肠癌、子宫内膜癌、食管癌、输卵管癌、胆囊癌、胃肠道癌、头颈部癌、血液癌、喉癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、原发性腹膜癌、唾液腺癌、肉瘤、胃癌、甲状腺癌、胰腺癌、肾细胞癌、胶质细胞瘤、前列腺癌以及它们的组合。
- [0245] (52) 在 (48) 至 (51) 中任一项所述的方法中, 预防为抑制癌症的临床症状的发生。
- [0246] (53) 在 (48) 至 (51) 中任一项所述的方法中, 预防为缓解与癌症相关的临床症状。
- [0247] (54) 在 (47) 至 (50) 中任一项所述的方法中, 预防为消除与癌症相关的临床症状。
- [0248] 已对本发明进行了一般性的说明, 但可以参照特定具体的实施例来得到进一步的理解, 但这些实施例仅以历史的目的在本申请中提供, 除非有明确说明, 否则不是出于限制本发明的目的。
- [0249] 实施例
- [0250] 以下, 将通过不限制发明要求保护范围中记述的公开内容的范围的下述实施例来进一步说明本公开内容。
- [0251] 实施例1: 设计及生产双特异性抗体 (BsAB)

[0252] 在抗4-1BB抗体的情况下,使用94kvt克隆(国际公开第W02018-127787号中记述的EU101,其全部内容作为引用包括在本申请中),在抗PD-L1蛋白的情况下,使用亲和力成熟的PD-1蛋白(euPD-1,美国专利第17/469549号记述的EU131,其全部内容作为引用包括在本申请中)。通过变更排列设计共10个(S01至S10)抗4-1BB抗体×euPD-1变异体(本申请中称为“双特异性表位结合蛋白变异体”(序列1至序列10、序列14;分别为双特异性表位结合蛋白S01-S10及94kvt轻链),将 $(G_4S)_3$ 、 $(G_4S)_2$ 以及218或218S(序列15至序列18)用作用于连接各部分的接头。在94kvt的情况下,使用scFv形态。工程化的IgG1的铰链及Fc部分用来与euPD-1连接。在Fc的情况下,导入点突变(L234A、L235A、K322A、D356E、L358M)来减少ADCC及CDC(图2)。

[0253] 并且,开发在抗体的C-末端附着以scFv形态获得销售许可的抗PD-L1抗体(阿替珠单抗,基因泰克公司(Genentech))的S11(序列11)抗体来用作对照组(图2)。

[0254] 使用Expi293F表达系统(英杰公司(Invitrogen))或ExpiCHO表达系统(赛默飞世尔公司(ThermoFisher scientific))进行生成的双特异性抗体的表达。使用AktaPure(思拓凡公司(cytiva))仪器、蛋白A柱(Hitrap MabSelectSure,思拓凡公司,Cat.no.11003495)及脱盐柱(Hiprep 26/10Desalting,思拓凡公司,Cat.no.17508702)进行纯化。

[0255] 实施例2:双特异性表位结合蛋白变异体的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

[0256] 为了分析双特异性表位结合蛋白变异体,在还原及非还原条件下进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。还原条件为与样品还原剂(赛默飞世尔公司(Thermo),Cat.No.NP0009)一同向LDS样品缓冲液(英杰公司,Cat.No.NP0007)中加入 $1\mu\text{g}$ 的双特异性表位结合蛋白变异体。接着,在 95°C 的温度下加热3分钟。在非还原条件的情况下,只加入LDS样品缓冲液来使用。将TGX免染凝胶(Mini-PROTEAN TGX stain-free gel)上生成的样品上样到凝胶上后,在 $1\times$ Tris/甘氨酸/十二烷基硫酸钠(SDS)缓冲液(伯乐公司(Bio-rad),Cat.No.1610732)中以125V的电压跑30分钟。使用Chemidoc(伯乐公司)分析的结果如图3所示。

[0257] 实施例3:双特异性表位结合蛋白变异体的体积排阻色谱分析

[0258] 并且,使用高效液相色谱(HPLC)仪器(安捷伦公司(Agilent Technologies),1260Infinity II LC系统)及体积排阻柱(东曹公司(Tosoh),TSKgel G3000 SWXL, $7.8\times 300\text{mm}$,Part No.0008541,柱No.004E04320E)来对双特异性表位结合蛋白变异体进行体积排阻(SEC)分析。将凝胶过滤标准(伯乐公司,Cat no.1511901)用作对照组。结果如图4所示。

[0259] 实施例4:双特异性表位结合蛋白变异体的亲和力分析

[0260] 为了分析双特异性表位结合蛋白变异体的亲和力,使用表面等离子体共振技术(SPR)。

[0261] 对于4-1BB的亲和力

[0262] 为了确认4-1BB亲和力,将稀释为 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的双特异性表位结合蛋白变异体利用人类捕捉(human capture)(思凡特公司,Cat.No.BR-1008-39)固定在CM5芯片(思凡特公司, BR-1005-30)上。分别以 100nM 、 50nM 、 25nM 、 12.5nM 、 6.25nM 以及 3.125nM 的浓度注入4-1BB抗

原(爱博泰克公司(abc1on))后,将结合时间设定为150秒钟并将解离时间设定为240秒钟。使用Biacore T200(思凡特公司)作为分析设备。表1为评估4-1BB亲和力的结果。

[0263] 表1.对于4-1BB的亲和力

[0264]	No.	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)
	S01	1.61E+05	5.37E-04	3.34
	S02	1.79E+05	6.58E-04	3.67
	S03	2.08E+05	6.34E-04	3.05
	S04	2.31E+05	6.62E-04	2.87
	S05	1.27E+05	4.66E-04	3.66
	S06	2.45E+05	9.14E-04	3.72
[0265]	S07	6.43E+03	6.76E-04	105.2
	S08	1.12E+05	7.64E-04	6.83
	S09	2.61E+05	5.68E-04	2.17
	S10	2.62E+05	6.01E-04	2.3
	S11	2.06E+05	4.42E-04	2.14

[0266] 对于PD-L1的亲和力

[0267] 为了确定PD-L1亲和力,将稀释为10 μ g/ml的双特异性表位结合蛋白变异体利用人类捕捉固定在CM5芯片上。分别以100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM以及3.125nM的浓度注入PD-L1抗原(义翘神州公司(SinoBiologics),Cat.No.10084-H08H),后续步骤与4-1BB亲和力分析步骤相同。表2为评估PD-L1亲和力的结果。

[0268] 表2.对于PD-L1的亲和力

No.	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)
S01	2.30E+05	1.32E-03	5.73
S02	3.24E+05	1.32E-03	4.06
S03	2.27E+05	1.15E-03	5.07
S04	5.96E+05	1.40E-03	2.34
[0269] S05	1.46E+06	1.69E-03	1.16
S06	8.37E+05	1.86E-03	2.22
S07	1.00E+06	1.58E-03	1.58
S08	8.37E+05	1.86E-03	2.22
S09	2.09E+05	1.31E-03	6.26
S10	3.77E+05	1.41E-03	3.73
[0270] S11	7.11E+04	5.53E-05	0.78

[0271] 为了比较天然PD-1与S03之间的对于PD-L1的结合差异以及小鼠PD-1与人PD-L1的结合,将人PD-1-Fc(义翘神州公司)及小鼠PD-1Fc(义翘神州公司,Cat No.50124-M02H)稀释为15 μ g/ml后,与人类捕捉(human capture)一同固定在CM5芯片上。分别以200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM以及3.125nM的浓度注入PD-L1抗原,后续步骤与4-1BB亲和力分析步骤相同。图5a示出人天然PD1-Fc时的结果,图5b示出S03时的结果。确认到S03比天然PD-1强约93倍地与PD-L1结合。并且,没有确认到小鼠PD-1对人PD-L1的亲和力(参照表3)。

[0272] 表3.对于PD-L1的亲和力

	ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)
[0273] 小鼠PD1-Fc	未检出		
人PD1-Fc	3.13E+05	1.48E-01	471.40
S03	2.27E+05	1.15E-03	5.07

[0274] 实施例5:单一抗原结合酶联免疫吸附测定

[0275] 为了确认双特异性表位结合蛋白变体是否与各目标抗原结合,进行单一抗原结合酶联免疫吸附测定。分析以图6a所示的方法进行。

[0276] 为了确认4-1BB结合,在96孔免疫培养板中用1 μ g/ml的4-1BB抗原(爱博泰克公司(abc1on))在4 $^{\circ}$ C的温度下包被过夜后,使用150 μ l的1x分析缓冲液(BioLegend公司)处理1小时来阻断非特异性结合。将双特异性表位结合蛋白变体从3nM开始以4倍的方式稀释为4个点,以100 μ l处理每孔2小时。然后,将连接辣根过氧化物酶(HRP)的抗人IgG、Fc γ 抗体

(杰克逊免疫研究公司(Jackson ImmunoResearch),Cat.No.10-035-008)稀释2000倍后向每孔加入100 μ l并培养1小时。使用3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色后,使用硫酸停止反应。在除处理3,3',5,5'-四甲基联苯胺后的工序以外的所有工序中使用洗涤缓冲液洗涤3次,除包被工序以外的所有工序都在室温下进行(图6b)。

[0277] 为了确认PD-L1结合,在96孔免疫培养板中用1 μ g/ml的PD-L1抗原(义翘神州公司)在4 $^{\circ}$ C的温度下包被过夜后,使用150 μ l的1x分析缓冲液(BioLegend公司)处理1小时来阻断非特异性结合。将双特异性表位结合蛋白变体从300nM开始以10倍的方式稀释为4个点,以100 μ l处理每孔2小时。之后的其他步骤与4-1BB结合酶联免疫吸附测定的步骤相同(图6c)。

[0278] 并且,为了确认个抗原结合部位的特异性结合与否,进行如下步骤:i)为了防止对于4-1BB的结合,通过将S03的抗4-1BB抗体取代之为人生殖系统抗体(DP47)来制备为S12(序列12);ii)为了防止对于PD-L1的结合,使S03的euPD-1点突变后通过将其取代之为euPD-1n来制备S13(序列13)后,进行对于4-1BB及PD-L1的单一抗原结合酶联免疫吸附测定(图6d)。

[0279] 在4-1BB结合的情况下,将S03、S12、S13从0.5 μ g/ml开始以2倍的方式稀释来在共11个点进行确认。确认到没有抗4-1BB抗体的S12未与4-1BB结合,S03和S13剂量依赖地与4-1BB结合(图6e)。

[0280] 在PD-L1结合的情况下,将S03、S12、S13从100 μ g/ml开始以4倍的方式稀释来在共11个点进行确认。确认到以无法与PD-L1结合的方式点突变的S13未与PD-L1结合,相反,S03及S12剂量依赖地与PD-L1结合(图6f)。

[0281] 实施例6:双抗原结合酶联免疫吸附测定

[0282] 为了确认双特异性表位结合蛋白变体与抗原4-1BB及PD-L1二者都结合,进行双结合分析。

[0283] 以图7a所示的方法进行分析。简要说,在96孔免疫培养板中用1 μ g/ml的PD-L1抗原(义翘神州公司)在4 $^{\circ}$ C的温度下包被过夜后,使用150 μ l的1x分析缓冲液(BioLegend公司)处理1小时来阻断非特异性结合。将双特异性表位结合蛋白变体从10nM开始以5倍的方式稀释为4个点来进行,以100 μ l处理每孔2小时,向各孔加入100 μ l的0.1 μ g/ml浓度的生物素化的4-1BB抗原(义翘神州公司,Cat.No.10041-H08H-B)并培养1小时。然后,将亲和素-辣根过氧化物酶(BioLegend公司,Cat No.79004)稀释为1/1000,向各孔中加入100 μ l来处理30分钟后,使用3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色后,使用硫酸停止反应。在除处理3,3',5,5'-四甲基联苯胺后的工序以外的所有工序中使用洗涤缓冲液洗涤3次,除包被工序以外的所有工序都在室温下进行(图7b)。

[0284] 有关S03、S12及S13的双抗原酶联免疫吸附测定也为确认各抗原结合部分的特异性结合而从100 μ g/ml开始以5倍的方式稀释为12个点来进行。可知没有抗4-1BB抗体的S12和以无法与PD-L1结合的方式点突变的S13为示出双抗原结合,而S03剂量依赖地结合(图7c)。

[0285] 实施例7:细胞结合分析

[0286] 为了分析,使用作为PD-L1阳性细胞株的MDA-MB-231-Luc(人乳腺癌细胞,JCRB公司,JCRB1559)、FaDu(人扁平细胞癌细胞,ATCC公司,HTB-43)、作为4-1BB阳性细胞株的4-1BB Jurkat(自制备)以及作为PD-L1及4-1BB阴性细胞株的MCF-7(人乳腺癌细胞)。图8示出

各细胞株中的4-1BB及PD-L1的表达水平。通过二抗将其确定为几乎没有背景信号的状态。

[0287] 分别以50nM、5nM、0.5nM以及0.05nM的最终浓度向各细胞株的 2×10^5 个细胞处理双特异性表位结合蛋白变体,接着,在4°C的温度下培养20分钟。然后,使用流式细胞荧光分选技术(FACS)洗涤缓冲液进行一次洗涤后,处理 $1 \mu\text{l}$ /试管的抗hFC-488二抗(杰克逊免疫研究公司)20分钟。洗涤2次后,使用流式细胞荧光分选技术(FACSCelesta, BD公司)进行分析。

[0288] 流式细胞荧光分选技术分析结果,查明双特异性表位结合蛋白变体剂量依赖地与PD-L1(图9a至图9b)及4-1BB阳性细胞株(图9c)结合。并且,未与4-1BB及PD-L1二者都不表达的细胞结合(图9d)。

[0289] 实施例8:4-1BB生物分析

[0290] 为了检验4-1BB活性效果,根据激活4-1BB效应细胞就会表达荧光素酶的原理来进行4-1BB生物分析(普洛麦格公司(Promega), J2332)。

[0291] 根据生产公司的说明书进行生物检验及荧光素酶分析。将表达PD-L1的MDA-MB-231细胞接种到96孔白色培养板(科斯塔公司(Costar))中。在37°C的CO₂恒温箱中过夜培养后,处理双特异性表位结合蛋白变体及4-1BB效应细胞。将抗体从100ng/ml开始以2倍的方式稀释来在4个点进行。使用4-1BB效应细胞处理后,在37°C的CO₂恒温箱中培养6小时,使用光度计(Floroskan Ascent FL, 赛默飞世尔公司)测定发光程度。结果如图10所示。

[0292] 实施例9:4-1BB/PD-1组合生物分析

[0293] 为了根据阻断效应细胞对于PD-1及PD-L1的结合后激活4-1BB时表达荧光素酶的原理来检验PD-1与PD-L1的结合抑制效果和4-1BB活性的效果,进行4-1BB/PD-1组合生物分析(普洛麦格公司, CS1978I10)(图11a)。

[0294] 根据生产公司的说明书进行生物分析及荧光素酶分析。将表达PD-L1的PD-L1 aAPC/CHO-K1细胞接种到96孔白色培养板中。将其在37°C的CO₂恒温箱中过夜培养后,处理抗体及效应细胞。使用S03、抗4-1BB抗体(94kvt-工程化的IgG1, 序列14及序列21)、抗PD-1抗体(派姆单抗, MSD公司)、抗PD-L1抗体(阿替珠单抗, 罗氏公司(Roche))以及euPD-1Fc(序列22)。从147nM开始以3倍的方式稀释为7个点来进行。为了处理加入4-1BB效应细胞,在37°C的CO₂恒温箱中培养6小时,使用光度计(Floroskan Ascent FL, 赛默飞世尔公司)测定发光程度。

[0295] 实验结果(图11b),确认到通过能够与PD-L1表达细胞及效应细胞结合的S03检测出强的发光。

[0296] 实施例10:对于PD-L1或PD-L2的亲合力

[0297] 已知PD-1与PD-L1及PD-L2二者都结合。S03含有PD-1的亲合力成熟的形态的euPD-1。通过酶联免疫吸附测定确认S03与PD-L1及PD-L2的结合。

[0298] 对于96孔免疫培养板,用 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的人PD-1-Fc(义翘神州公司, Cat.No.10377-H02H)以每孔 $100 \mu\text{l}$ 在4°C的温度下包被过夜后,使用 $150 \mu\text{l}$ 的1x分析缓冲液(BioLegend公司)处理1小时来阻断非特异性结合。将生物素化的PD-L1(义翘神州公司, Cat.No.10084-H08H-B)及生物素化的PD-L2(义翘神州公司, Cat.No.10292-H08H-B)从 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 开始以3倍的方式稀释为5个点并以 $100 \mu\text{l}$ 处理每孔1小时。然后,将亲和素-辣根过氧化物酶(BioLegend公司, Cat No.79004)稀释为1/1000,以 $100 \mu\text{l}$ 向每孔加入30分钟后,使用3,3',5,5'-四甲基

联苯胺显色后,使用硫酸停止反应。在除处理3,3',5,5'-四甲基联苯胺后的工序以外的所有工序中使用洗涤缓冲液洗涤3次,除抗体包被工序以外的所有工序都在室温下进行。

[0299] 并且,将S03、抗PD-L1抗体(罗氏公司)以及抗PD-L2抗体(义翘神州公司,Cat.No.10292-R018)从0.1 μ g/ml开始以4倍的方式稀释为4个点后,向96孔免疫培养板的每孔中加入100 μ l后在4 $^{\circ}$ C的温度下包被过夜。然后,为了阻断非特异性结合,处理150 μ l的1x分析缓冲液1小时。向各孔以0.1 μ l/ml的浓度处理100 μ l的生物素化的PD-L1及生物素化的PD-L2一小时。之后的其他步骤与人PD-1-Fc酶联免疫吸附测定相同。

[0300] 实验结果,人PD-1-Fc与PD-L1及PD-L2二者都结合(图12a),而用作对照组的抗PD-L1抗体只与PD-L1结合,抗PD-L2抗体只与PD-L2结合。试验物质S03只与PD-L1结合(图12b至图12c)。

[0301] 实施例11:细胞毒性分析

[0302] 为了确认S03对于目标细胞的T细胞介导的细胞毒性效果,进行细胞毒性分析。将从人外周血单核细胞中通过pan T阴性选择(美天旎公司(Miltenyi Biotec),Cat.No.130-096-535)分离的T细胞在包被有抗CD3抗体(OKT3,Bio X Cell公司)的培养板中激活4天。在处理T细胞及抗体的一天前,以 4×10^4 细胞/孔的数量接种PD-L1阳性细胞株MDA-MB-231-GFP(自制备)。将抗4-1BB抗体(94kvt-工程化的IgG1)、抗PD-1抗体(派姆单抗,MSD公司)及S03从1.667nM开始以3倍的方式稀释为4个点来进行。获得激活的T细胞后,以1:1的比例与肿瘤细胞一同处理。使用活细胞分析系统(Incucyte,赛多利斯公司(Sartorius))以1小时的间隔测定GFP信号117个小时。

[0303] 实验结果为相对于1.667nM的数据,确认到与用作对照组的抗4-1BB抗体及抗PD-L1抗体相比,S03的T细胞介导的细胞毒性效果优秀(图13)。

[0304] 实施例12: γ 干扰素分析

[0305] 使用细胞毒性分析(实施例11)中获得的上清液测定T细胞中生成的 γ 干扰素水平。根据生产公司的说明书使用 γ 干扰素酶联免疫吸附测定试剂盒(BioLegend公司,Cat.No.430101),简要说来,向用捕获抗体包被过夜的培养板处理150 μ l的1x分析缓冲液(BioLegend公司)1小时。在标准品的情况下,从500pg/ml开始以2倍的方式稀释为7个点来使用,上清液稀释为50倍后以100 μ l处理每孔2小时。处理100 μ l的检测抗体1小时后,将亲和素-辣根过氧化物酶(BioLegend公司,Cat.No.79004)稀释为1/1000并以100 μ l处理每孔30分钟。使用3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色后,使用硫酸停止反应。在除处理3,3',5,5'-四甲基联苯胺后的工序以外的所有工序中使用洗涤缓冲液洗涤3次,除抗体包被工序以外的所有工序都在室温下进行。

[0306] 实验结果,可以观察到通过T细胞的 γ 干扰素的生产随着抗体处理浓度增加(图14)。

[0307] 实施例13:抗体依赖细胞的细胞毒性分析

[0308] 使用IgG1-Fc来减少双特异性表位结合蛋白变异体的抗体依赖细胞毒性(ADCC)及补体依赖细胞毒性(CDC)。为了确认是否减少ADCC,使用S03进行ADCC生物分析(普洛麦格公司,Cat.No.G701A)。

[0309] 为了确认由S03的抗4-1BB抗体结合引起的ADCC,在白色96孔培养板(科斯塔公司)中接种4-1BB阳性细胞株(4-1BB NF-kB HEK293)后过夜培养。次日,将作为抗4-1BB抗体的

S03(工程化的IgG1、L234A、L235A、K322A、D356E、L358M)、94kvt-IgG1(序列14及序列20)以及94kvt-工程化的IgG1(L234A、L235A、K322A)从294nM开始以3倍的方式稀释为8个点来进行。加入ADCC效应细胞后在37℃的恒温箱中培养6小时。然后,加入Bio-Glo荧光素酶基质后使用光度计(Glo-max,普洛麦格公司)测定发光强度。可以观察到用作阳性对照组的94kvt-IgG1诱导了ADCC,相反,用作阴性对照组的94kvt-工程化的IgG1和S03没有诱导ADCC(图15a)。

[0310] 为了确认由S03的euPD-1引起的ADCC,将PD-L1阳性细胞株(MDA-MB-231)接种到白色96孔培养板(科斯塔公司)后过夜培养。次日,将作为抗PD-L1抗体的S03、阿维单抗(Avelumab)(辉瑞公司(Pfizer),IgG1)以及阿替珠单抗(Atezolizumab)(罗氏公司,工程化的IgG1,N297A)从5.88nM开始以4倍的方式稀释为6个点。加入ADCC效应细胞后在37℃的恒温箱中培养6小时。然后,加入Bio-Glo荧光素酶基质后使用光度计(Glo-max,普洛麦格公司)测定发光强度。可以观察到用作阳性对照组的阿维单抗诱导了ADCC,而作为阴性对照组的阿替珠单抗和S03没有诱导ADCC(图15b)。

[0311] 实施例14:补体依赖细胞毒性分析

[0312] 通过进行C1q酶联免疫吸附测定确认到CDC通过S03中使用的工程化的IgG1被减少。

[0313] 在4℃的温度下使用1x包被缓冲液(BioLegend公司)在96孔免疫培养板(NUNC公司)中过夜包被75nM的S03、阿维单抗、阿替珠单抗后,加入150μl的1×分析缓冲液(BioLegend公司)1小时来阻断非特异性结合。使用生物素化试剂盒(Abcam公司,Cat.No.Ab201795)将生物素化的C1q(艾美捷公司(comp Tech),Cat.No.A099)蛋白从2μg/ml开始以2倍的方式稀释为7个点,以100μl处理每孔2小时。然后,将亲和素-辣根过氧化物酶(BioLegend公司,Cat No.79004)稀释为1/1000,每孔加入100μl来处理1小时后,使用3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色后,使用硫酸停止反应。在除处理3,3',5,5'-四甲基联苯胺后的工序以外的所有工序中使用洗涤缓冲液洗涤3次,除抗体包被工序以外的所有工序都在室温下进行。可以观察到用作阳性对照组的阿维单抗与C1q结合,而S03和作为阴性对照组的阿替珠单抗没有与C1q结合(图16)。

[0314] 实施例15:生物体内功效研究1-4-1BB KI

[0315] 为了检验S03的功效,使用h4-1BB敲入小鼠(背景:C57BL/6,百奥赛图公司(BiocytoGen))来进行生物体内研究。

[0316] 人图17a所示,将表达PD-L1的MC38细胞用作肿瘤细胞,向每个个体皮下给药 5×10^5 个肿瘤细胞。给药1周后,通过测量肿瘤的大小以相似的平均值(100mm³以内)和标准差为基准来分给药组。各组使用5只小鼠。

[0317] 向静脉内注射S03、S05及S07。使用赋形剂杜氏磷酸盐缓冲溶液(DPBS)(Gibco公司)作为阴性对照组。将抗体剂量设定为2mg/kg及5mg/kg。以间隔3天的方式每次给药100μl共给药5次。并且,间隔3天测量肿瘤的大小直至最后给药后的2天。

[0318] 观察肿瘤大小的结果,如图17b所示,确认到与阴性对照组相比,S03、S05、S07都抑制了肿瘤生长,可知其中S03的肿瘤减少效果最为优秀。并且,在试验的康体重观察到剂量依赖反应。

[0319] 实施例16:生物体内功效研究2-4-1BB KI

[0320] 为了检验S03的功效,使用h4-1BB敲入小鼠(背景:C57BL/6,百奥赛图公司)进行生物体内研究。试验方法与图17a所示的方法相同。

[0321] 向静脉内注射S03、抗4-1BB抗体(94kvt-工程化的IgG1)以及抗PD-L1抗体(阿替珠单抗)。使用赋形剂杜氏磷酸盐缓冲溶液(Gibco公司)作为阴性对照组。以S03为基准,将抗体剂量设定为5mg/kg(5.88 μ M),并且给药5.88 μ M的抗4-1BB抗体及抗PD-L1抗体。以间隔3天的方式每次给药100 μ l共给药5次。并且,间隔3天测量肿瘤的大小直至最后给药后的2天。并且,在实验结束当天采取血液使用生化分析仪确认血液内的谷丙转氨酶(ALT,alanine aminotransferase)、谷草转氨酶(AST,aspartate aminotransferase)、血尿素氮(BUN,blood urea nitrogen)的浓度来确认毒性。

[0322] 观察肿瘤大小的结果,如图18a所示,确认到与阴性对照组相比,S03、抗4-1BB抗体以及抗PD-L1抗体都抑制了肿瘤生长,其中,可知S03的肿瘤减少效果(减少约98%)最为优秀。

[0323] 如图18b所示,分析血液内T细胞集团的结果,血液内CD4+T细胞及CD8+T细胞通过S03增加,在CD8+T细胞中观察到效应T细胞的增加。

[0324] 如表4所示,肝毒性指数分析结果,给药组的4个指标都在正常范围(ALT:17U/L至77U/L,AST:54U/L至298U/L,BUN:8mg/dL至33mg/dL)以内,确认到在实验条件下没有肝毒性。

[0325] 表4. 血清中肝细胞毒性

[0326]	ALT(U/L)	AST(U/L)	BUN(mg/dL)
正常范围	17-77	54-298	8-33
NT	26.27 \pm 1.67	97.40 \pm 31.32	24.61 \pm 1.60
S03	40.67 \pm 8.00	59.00 \pm 6.63	23.21 \pm 1.70
抗4-1BB抗体	34.67 \pm 6.93	69.50 \pm 13.40	28.72 \pm 2.51
抗PD-L1抗体	28.37 \pm 9.24	69.50 \pm 19.42	31.27 \pm 8.56

[0327] 实施例17:生物体内功效研究3-h4-1BB/hPD-1DKI

[0328] 为了检验S03的功效,使用h4-1BB及hPD-1双敲入小鼠(背景:C57BL/6,百奥赛图公司)进行生物体内研究。

[0329] 如图17a所示,使用表达PD-L1的MC38细胞作为肿瘤细胞,向每个个体皮下给药5 \times 10⁵个肿瘤细胞。给药1周后,通过测量肿瘤的大小以相似的平均值(约100mm³)和标准差为基准来分给药组。各组使用6只小鼠。

[0330] 向静脉内注射抗体S03、抗4-1BB抗体(94kvt-工程化的IgG1)以及抗PD-L1抗体(阿替珠单抗)。使用赋形剂杜氏磷酸盐缓冲溶液(Gibco公司)作为阴性对照组。以S03为基准,将抗体剂量设定为5mg/kg(5.88 μ M),并且给药5.88 μ M的抗4-1BB抗体及抗PD-L1抗体。以间隔3天的方式每次给药100 μ l共给药5次。并且,间隔3天测量肿瘤的大小直至最后给药后的2天。

[0331] 观察肿瘤大小的结果,如图19所示,确认到与阴性对照组的给药相比,S03、抗4-1BB抗体、抗PD-L1抗体都抑制了肿瘤生长(减少约73%)。

[0332] 所有数据以平均数、标准误、一元方差分析(ANOVA)统计检验来表示为曲线图。所有统计都使用每个动物或每个样品的平均数据来计算。*p \leq 0.05,**p \leq 0.01,***p \leq

0.001。

[0333] 以上,说明了本发明内容的具体部分。本发明所属技术领域的普通技术人员结案应该自明的是,这些具体的说明仅为优选实施形态,本发明的不限定于说明的具体内容。因此,本发明的实际范围应通过随附的发明要求保护范围及其同等物来定义。

序列号

- <110> 优特力克斯有限公司
 <120> 包含抗4-1BB抗体及PD-1蛋白或其片段的双特异性表位结合蛋白及其用途
 <130> 540469W0
 <150> US 63/135,812
 <151> 2021-01-11
 <160> 39
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 641
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Bispecific epitope binding protein S01
 <400> 1

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

	180		185		190
Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe		Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
	195		200		205
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr					
	210		215		220
Cys Gln Asp Gly His Ser Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys					
225		230		235	240
Leu Glu Ile Lys Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser					
	245		250		255
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly					
	260		265		270
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met					
	275		280		285
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His					
	290		295		300
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val					
305		310		315	320
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr					
	325		330		335
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly					
	340		345		350
Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile					
	355		360		365
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val					
	370		375		380
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser					
385		390		395	400
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu					
	405		410		415
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro					
	420		425		430
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val					
	435		440		445
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met					
	450		455		460
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser					
465		470		475	480
Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Leu Glu Ser					
	485		490		495

Pro Asp Arg Pro Trp Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu
 500 505 510
 Val Ala Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala
 515 520 525
 Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser Gly Gln
 530 535 540
 Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln
 545 550 555 560
 Asp His Arg Phe Arg Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His
 565 570 575
 Met Ser Val Val Arg Ala Gln Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Val Cys
 580 585 590
 Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg
 595 600 605
 Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His
 610 615 620
 Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val
 625 630 635 640
 Gly
 <210> 2
 <211> 805
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Bispecific epitope binding protein S02
 <400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 420 425 430
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 435 440 445
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 450 455 460
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 465 470 475 480
 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Leu Glu Ser
 485 490 495
 Pro Asp Arg Pro Trp Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu
 500 505 510
 Val Ala Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala
 515 520 525
 Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser Gly Gln
 530 535 540
 Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln
 545 550 555 560
 Asp His Arg Phe Arg Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His
 565 570 575
 Met Ser Val Val Arg Ala Gln Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Val Cys
 580 585 590
 Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg
 595 600 605
 Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His
 610 615 620
 Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val
 625 630 635 640
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 645 650 655
 Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro
 660 665 670
 Ala Leu Leu Leu Val Ala Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser
 675 680 685
 Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser
 690 695 700
 Pro Ser Gly Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser
 705 710 715 720
 Gln Pro Gly Gln Asp His Arg Phe Arg Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly

	725		730		735
Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Gln Arg Asn Asp Ser Gly					
	740		745		750
Thr Tyr Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys					
	755		760		765
Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val					
	770		775		780
Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln					
785		790		795	800
Thr Leu Val Val Gly					
	805				
<210>	3				
<211>	641				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	Bispecific epitope binding protein S03				
<400>	3				
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly					
1	5		10		15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr					
	20		25		30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile					
	35		40		45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly					
	50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala					
65		70		75	80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Trp Pro Pro					
	85		90		95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly					
	100		105		110
Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln					
	115		120		125
Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys					
	130		135		140
Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met His					
145		150		155	160
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile					

				165						170					175				
Asn	Pro	Gly	Asn	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Ser	Arg				
				180						185					190				
Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu				
				195						200					205				
Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser				
				210						215					220				
Phe	Lys	Thr	Ala	Arg	Ala	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val				
225										230					235				240
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser				
				245						250					255				
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly				
				260						265					270				
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met				
				275						280					285				
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His				
				290						295					300				
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val				
305										310					315				320
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr				
				325						330					335				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly				
				340						345					350				
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Ala	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile				
				355						360					365				
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val				
				370						375					380				
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser				
385										390					395				400
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu				
				405						410					415				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro				
				420						425					430				
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val				
				435						440					445				
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met				
				450						455					460				
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser				
465										470					475				480

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Leu Glu Ser
 485 490 495
 Pro Asp Arg Pro Trp Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu
 500 505 510
 Val Ala Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala
 515 520 525
 Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser Gly Gln
 530 535 540
 Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln
 545 550 555 560
 Asp His Arg Phe Arg Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His
 565 570 575
 Met Ser Val Val Arg Ala Gln Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Val Cys
 580 585 590
 Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg
 595 600 605
 Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His
 610 615 620
 Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val
 625 630 635 640
 Gly
 <210> 4
 <211> 805
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Bispecific epitope binding protein S04
 <400> 4
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Trp Pro Pro

				85					90					95			
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly		
				100					105					110			
Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln		
				115					120					125			
Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys		
				130					135					140			
Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	His		
				145					150					155			
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile		
				165					170					175			
Asn	Pro	Gly	Asn	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Ser	Arg		
				180					185					190			
Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu		
				195					200					205			
Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser		
				210					215					220			
Phe	Lys	Thr	Ala	Arg	Ala	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val		
				225					230					235			
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
				245					250					255			
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly		
				260					265					270			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met		
				275					280					285			
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His		
				290					295					300			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val		
				305					310					315			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr		
				325					330					335			
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly		
				340					345					350			
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Ala	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile		
				355					360					365			
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val		
				370					375					380			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser		
				385					390					395			
																	400

145		150		155		160									
Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala
				165					170					175	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				180					185					190	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
				195					200					205	
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
				210					215					220	
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
				225					230					235	
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
				245					250					255	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Ala	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
				260					265					270	
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
				275					280					285	
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
				290					295					300	
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
				305					310					315	
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
				325					330					335	
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
				340					345					350	
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
				355					360					365	
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
				370					375					380	
Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln
				385					390					395	
Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys
				405					410					415	
Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	His
				420					425					430	
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile
				435					440					445	
Asn	Pro	Gly	Asn	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Ser	Arg
				450					455					460	

65	70	75	80
Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Gln Arg Asn Asp Ser Gly			
	85	90	95
Thr Tyr Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys			
	100	105	110
Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val			
	115	120	125
Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln			
	130	135	140
Thr Leu Val Val Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
145	150	155	160
Gly Gly Gly Ser Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Ala Pro			
	165	170	175
Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Ala Glu Gly Asp Asn Ala Thr			
	180	185	190
Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp			
	195	200	205
His Arg Glu Ser Pro Ser Gly Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro			
	210	215	220
Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp His Arg Phe Arg Val Thr Arg			
225	230	235	240
Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Gln Arg			
	245	250	255
Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys			
	260	265	270
Ile Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg			
	275	280	285
Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala			
	290	295	300
Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
305	310	315	320
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
	325	330	335
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
	340	345	350
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
	355	360	365
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
	370	375	380

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln																			
385						390						395							400
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln																			
						405						410							415
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn Lys Ala																			
						420						425							430
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro																			
						435						440							445
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr																			
						450						455							460
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser																			
465						470						475							480
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr																			
						485						490							495
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr																			
						500						505							510
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe																			
						515						520							525
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys																			
						530						535							540
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly																			
545						550						555							560
Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly																			
						565						570							575
Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser																			
						580						585							590
Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp																			
						595						600							605
Ile Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys																			
						610						615							620
Phe Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala																			
625						630						635							640
Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr																			
						645						650							655
Cys Ala Arg Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln																			
						660						665							670
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys																			
						675						680							685
Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln																			

690	695	700
Ser Pro Ala Phe Leu	Ser Val Thr Pro Gly	Glu Lys Val Thr Ile Thr
705	710	715
Cys Arg Ala Ser Gln	Thr Ile Ser Asp Tyr	Leu His Trp Tyr Gln Gln
	725	730
Lys Pro Asp Gln Ala	Pro Lys Leu Leu Ile	Lys Tyr Ala Ser Gln Ser
	740	745
Ile Ser Gly Ile Pro	Ser Arg Phe Ser Gly	Ser Gly Ser Gly Thr Asp
	755	760
Phe Thr Phe Thr Ile	Ser Ser Leu Glu Ala	Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
	770	775
Tyr Cys Gln Asp Gly	His Ser Trp Pro Pro	Thr Phe Gly Gln Gly Thr
785	790	795
Lys Leu Glu Ile Lys		
	805	
<210>	7	
<211>	641	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Bisppecific epitope binding protein S07	
<400>	7	
Phe Leu Glu Ser Pro	Asp Arg Pro Trp Asn	Ala Pro Thr Phe Ser Pro
1	5	10
Ala Leu Leu Leu Val	Ala Glu Gly Asp Asn	Ala Thr Phe Thr Cys Ser
	20	25
Phe Ser Asn Ala Ser	Glu Ser Phe His Val	Val Trp His Arg Glu Ser
	35	40
Pro Ser Gly Gln Thr	Asp Thr Leu Ala Ala	Phe Pro Glu Asp Arg Ser
	50	55
Gln Pro Gly Gln Asp	His Arg Phe Arg Val	Thr Arg Leu Pro Asn Gly
65	70	75
Arg Asp Phe His Met	Ser Val Val Arg Ala	Gln Arg Asn Asp Ser Gly
	85	90
Thr Tyr Val Cys Gly	Val Ile Ser Leu Ala	Pro Lys Ile Gln Ile Lys
	100	105
Glu Ser Leu Arg Ala	Glu Leu Arg Val Thr	Glu Arg Arg Ala Glu Val
	115	120
Pro Thr Ala His Pro	Ser Pro Ser Pro Arg	Pro Ala Gly Gln Phe Gln

130	135	140
Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
145	150	155
Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala		
	165	170
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
	180	185
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
	195	200
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
	210	220
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
225	230	235
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
	245	250
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
	260	265
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
	275	280
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
290	295	300
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
305	310	315
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
	325	330
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
	340	345
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
	355	360
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
	370	375
Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val		
385	390	395
Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly Glu Lys Val		
	405	410
Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp		
	420	425
Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala		
	435	440
		445

Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 450 455 460
 Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala
 465 470 475 480
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Trp Pro Pro Thr Phe Gly
 485 490 495
 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys
 500 505 510
 Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln
 515 520 525
 Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys
 530 535 540
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg
 545 550 555 560
 Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Gly
 565 570 575
 Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Met
 580 585 590
 Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
 595 600 605
 Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Phe Lys Thr
 610 615 620
 Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 625 630 635 640
 Ser
 <210> 8
 <211> 805
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Bispecific epitope binding protein S08
 <400> 8
 Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Leu Val Ala Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser
 20 25 30
 Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser
 35 40 45
 Pro Ser Gly Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser

50	55	60
Gln Pro Gly Gln Asp His Arg Phe Arg Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly		
65	70	75
Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Gln Arg Asn Asp Ser Gly		
	85	90
Thr Tyr Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys		
	100	105
Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val		
	115	120
Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln		
130	135	140
Thr Leu Val Val Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
145	150	155
Gly Gly Gly Ser Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Ala Pro		
	165	170
Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Ala Glu Gly Asp Asn Ala Thr		
	180	185
Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp		
195	200	205
His Arg Glu Ser Pro Ser Gly Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro		
210	215	220
Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp His Arg Phe Arg Val Thr Arg		
225	230	235
Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Gln Arg		
	245	250
Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys		
	260	265
Ile Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg		
	275	280
Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala		
	290	295
Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
305	310	315
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
	325	330
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
	340	345
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
	355	360
		365

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 370 375 380
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 385 390 395 400
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 405 410 415
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn Lys Ala
 420 425 430
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 435 440 445
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 450 455 460
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 465 470 475 480
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 485 490 495
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 500 505 510
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 515 520 525
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 530 535 540
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 545 550 555 560
 Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro
 565 570 575
 Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp
 580 585 590
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu
 595 600 605
 Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser
 610 615 620
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 625 630 635 640
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Trp Pro
 645 650 655
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser
 660 665 670
 Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val

675	680	685
Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val		
690	695	700
Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met		
705	710	715
His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu		
	725	730
Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser		
	740	745
Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu		
	755	760
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg		
	770	775
Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
785	790	795
Val Thr Val Ser Ser		800
	805	

<210> 9

<211> 607

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Bispecific epitope binding protein S09 (HC)

<400> 9

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

115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Leu Glu Ser Pro Asp
 450 455 460

Arg Pro Trp Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Ala
 465 470 475 480

Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala Ser Glu
 485 490 495

Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser Gly Gln Thr Asp
 500 505 510

Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp His
 515 520 525

Arg Phe Arg Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser
 530 535 540

Val Val Arg Ala Gln Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Val Cys Gly Val
 545 550 555 560

Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu
 565 570 575

Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser
 580 585 590

Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly
 595 600 605

<210> 10
 <211> 616
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Bispecific epitope binding protein S10 (HC)
 <400> 10

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

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

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

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

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

385	390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	445
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr			
	450	455	460
Lys Gly Ser Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Ala Pro Thr			
465	470	475	480
Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Ala Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe			
	485	490	495
Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His			
	500	505	510
Arg Glu Ser Pro Ser Gly Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu			
	515	520	525
Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp His Arg Phe Arg Val Thr Arg Leu			
	530	535	540
Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Gln Arg Asn			
545	550	555	560
Asp Ser Gly Thr Tyr Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile			
	565	570	575
Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg			
	580	585	590
Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly			
	595	600	605
Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly			
	610	615	
<210>	11		
<211>	735		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Peptide sequence from S11 antibody		
<400>	11		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr			

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 340 345 350
 Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 355 360 365
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 370 375 380
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 385 390 395 400
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 405 410 415
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 420 425 430
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 435 440 445
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 450 455 460
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 465 470 475 480
 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 485 490 495
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 500 505 510
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His Trp
 515 520 525
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Trp Ile Ser
 530 535 540
 Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 545 550 555 560
 Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn
 565 570 575
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg His
 580 585 590
 Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 595 600 605
 Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly
 610 615 620
 Ser Thr Lys Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 625 630 635 640
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp

	645	650	655
Val Ser Thr Ala	Val Ala Trp Tyr Gln	Gln Lys Pro Gly	Lys Ala Pro
	660	665	670
Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser			
	675	680	685
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
	690	695	700
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu			
705	710	715	720
Tyr His Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	725	730	735
<210>	12		
<211>	639		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Bispecific antigen binding protein S12		
<400>	12		
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 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 Tyr Gly Ala Ser Ser 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 Tyr Gly Ser Ser Pro			
	85	90	95
Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser			
	100	105	110
Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val			
	115	120	125
Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu			
	130	135	140
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met			
145	150	155	160
Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala			

				165					170					175				
Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly			
				180					185					190				
Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln			
				195					200					205				
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys			
				210					215					220				
Pro	Phe	Pro	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val			
225					230					235					240			
Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys			
				245						250					255			
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro			
				260						265					270			
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser			
				275						280					285			
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp			
				290											300			
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn			
305					310					315					320			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val			
				325											330			
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu			
				340											345			
Tyr	Lys	Cys	Ala	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys			
				355											360			
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr			
				370											375			
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr			
385					390										395			
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu			
				405											410			
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu			
				420											425			
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys			
				435											440			
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu			
				450											455			
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly			
465					470										475			
																		480

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Leu Glu Ser Pro Asp
 485 490 495
 Arg Pro Trp Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Ala
 500 505 510
 Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala Ser Glu
 515 520 525
 Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser Pro Ser Gly Gln Thr Asp
 530 535 540
 Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp His
 545 550 555 560
 Arg Phe Arg Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser
 565 570 575
 Val Val Arg Ala Gln Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Val Cys Gly Val
 580 585 590
 Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu
 595 600 605
 Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser
 610 615 620
 Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly
 625 630 635
 <210> 13
 <211> 641
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Bispecific epitope binding protein S13
 <400> 13
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Trp Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly			
	100	105	110
Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln			
	115	120	125
Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys			
	130	135	140
Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met His			
145	150	155	160
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile			
	165	170	175
Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg			
	180	185	190
Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu			
	195	200	205
Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser			
	210	215	220
Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
225	230	235	240
Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	245	250	255
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly			
	260	265	270
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
	275	280	285
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
	290	295	300
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
305	310	315	320
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
	325	330	335
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
	340	345	350
Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
	355	360	365
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	370	375	380
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser			
385	390	395	400
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			

	405		410		415														
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro				
			420						425					430					
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val				
			435						440					445					
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met				
			450						455					460					
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser				
465									470					475					480
Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Leu	Glu	Ser				
									485					490					495
Pro	Asp	Arg	Pro	Trp	Asn	Ala	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu				
									500					505					510
Val	Ala	Glu	Gly	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Asn	Ala				
									515					520					525
Ser	Glu	Ser	Phe	His	Val	Val	Trp	His	Arg	Glu	Ser	Pro	Ser	Gly	Gln				
									530					535					540
Thr	Asp	Ala	Leu	Ala	Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln				
545									550					555					560
Asp	His	Arg	Phe	Arg	Val	Thr	Arg	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His				
									565					570					575
Met	Ser	Val	Val	Arg	Ala	Gln	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Val	Cys				
									580					585					590
Gly	Val	Ala	Ser	Leu	Ala	Pro	Lys	Ile	Gln	Ala	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg				
									595					600					605
Ala	Glu	Leu	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His				
									610					615					620
Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	Arg	Pro	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val				
625									630					635					640
Gly																			
<210>	14																		
<211>	234																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	LC of S09, S10, 94kvt-engineered IgG1																		
<400>	14																		
Met	Asp	Ser	Gln	Ala	Gln	Val	Leu	Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Val	Ser				
1				5					10					15					

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser
 20 25 30
 Val Thr Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr
 35 40 45
 Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His
 100 105 110
 Ser Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> (G4S)3 peptide linker
 <400> 15
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 16
 <211> 10

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

<210> 20

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HC of 94 kv1-IgG1

<400> 20
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 21

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HC of 94kvt-engineered IgG1 (Anti-4-1BB antibody)

<400> 21

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

	100		105		110										
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	115		120		125										
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
	130		135		140										
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145			150		155		160								
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
	165		170		175										
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
	180		185		190										
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
	195		200		205										
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
	210		215		220										
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro
225			230		235		240								
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
	245		250		255										
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
	260		265		270										
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
	275		280		285										
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290		295		300										
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305			310		315		320								
Tyr	Lys	Cys	Ala	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
	325		330		335										
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
	340		345		350										
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
	355		360		365										
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
	370		375		380										
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
385			390		395		400								
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
	405		410		415										

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys
 <210> 22
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> euPD-1 Fc
 <400> 22
 Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu Leu Val Ala Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser
 20 25 30
 Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser
 35 40 45
 Pro Ser Gly Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser
 50 55 60
 Gln Pro Gly Gln Asp His Arg Phe Arg Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly
 65 70 75 80
 Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Gln Arg Asn Asp Ser Gly
 85 90 95
 Thr Tyr Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys
 100 105 110
 Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val
 115 120 125
 Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln
 130 135 140
 Thr Leu Val Val Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asn Thr Lys Val Asp
 145 150 155 160
 Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 165 170 175
 Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 180 185 190
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 195 200 205
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

65	70	75	80	
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85	90	95	
Ala Arg Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly				
	100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
	115			
<210>	24			
<211>	357			
<212>	DNA			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	VH nucleic acid sequence			
<400>	24			
caggtccagc tgggtcagag cggcgccgaa gtgaaaaaac ctggggcaag tgtcaagctg				60
tctgtaaagg ccagcggta taccttctcc tcatattgga tgcactgggt gaggcaagcc				120
cctggacaag ggctggaatg gatcggtgaa attaatcccg gaaatggcca taaaactac				180
aatgaaaaat tcaaaagtcg agtgaccatg acacgggaca catccacttc cactgcatac				240
atggagcttt cgagtctgcg ctccgaggat acagctgtct attactgcgc acgcagtttt				300
aaaactgcca gagcctttgc ctactgggggt caggaacce tggtcaccgt tagcagc				357
<210>	25			
<211>	107			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	VL peptide sequence			
<400>	25			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly				
1	5	10	15	
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr				
	20	25	30	
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile				
	35	40	45	
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly				
	50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala				
65	70	75	80	
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Trp Pro Pro				
	85	90	95	

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100	105
<210> 26	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> VL nucleic acid sequence	
<400> 26	
gacattgtga tgacacagtc cctgctttc ctgagcgta caccggcga aaaggtgact	60
atcacatgca gggctagtca gaccatetca gactacctt attggtatca acagaagcca	120
gaccaggctc ctaagttget gataaagtac gctceccaat ccatttccgg cattccttcc	180
cgtttttccg gctccggctc eggcaccgac tttacgttea ccattcttctc tttggaggct	240
gaagacgcag ctacctatta ctgtcaggat ggteacagct ggccaccaac tttcgggcaa	300
ggcaccaagc tggagatcaa a	321
<210> 27	
<211> 149	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> euPD-1 peptide sequence	
<400> 27	
Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro	
1 5 10 15	
Ala Leu Leu Leu Val Ala Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser	
20 25 30	
Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe His Val Val Trp His Arg Glu Ser	
35 40 45	
Pro Ser Gly Gln Thr Asp Thr Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser	
50 55 60	
Gln Pro Gly Gln Asp His Arg Phe Arg Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly	
65 70 75 80	
Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Gln Arg Asn Asp Ser Gly	
85 90 95	
Thr Tyr Val Cys Gly Val Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ile Gln Ile Lys	
100 105 110	
Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val	
115 120 125	
Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln	

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hinge peptide
 <400> 31
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CH domain (IgG1)
 <400> 32
 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
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
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	
<210> 33		
<211> 329		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Modified CH domain		
<400> 33		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
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
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 Ala Ala 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
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 Ala 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 Glu Glu		
225	230	235
Met 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
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
325		

<210> 34

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH domain (IgG2)

<400> 34

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
1	5	10
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		

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

<210> 35

<211> 377

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CH domain (IgG3)
 <400> 35
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110
 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125
 Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375
 <210> 36
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CH domain (IgG4)
 <400> 36
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CL domain (Immunoglobulin kappa)

<400> 37

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

	35		40		45												
Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn		
	50					55					60						
Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys		
65					70					75					80		
Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val		
				85					90					95			
Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser								
			100					105									

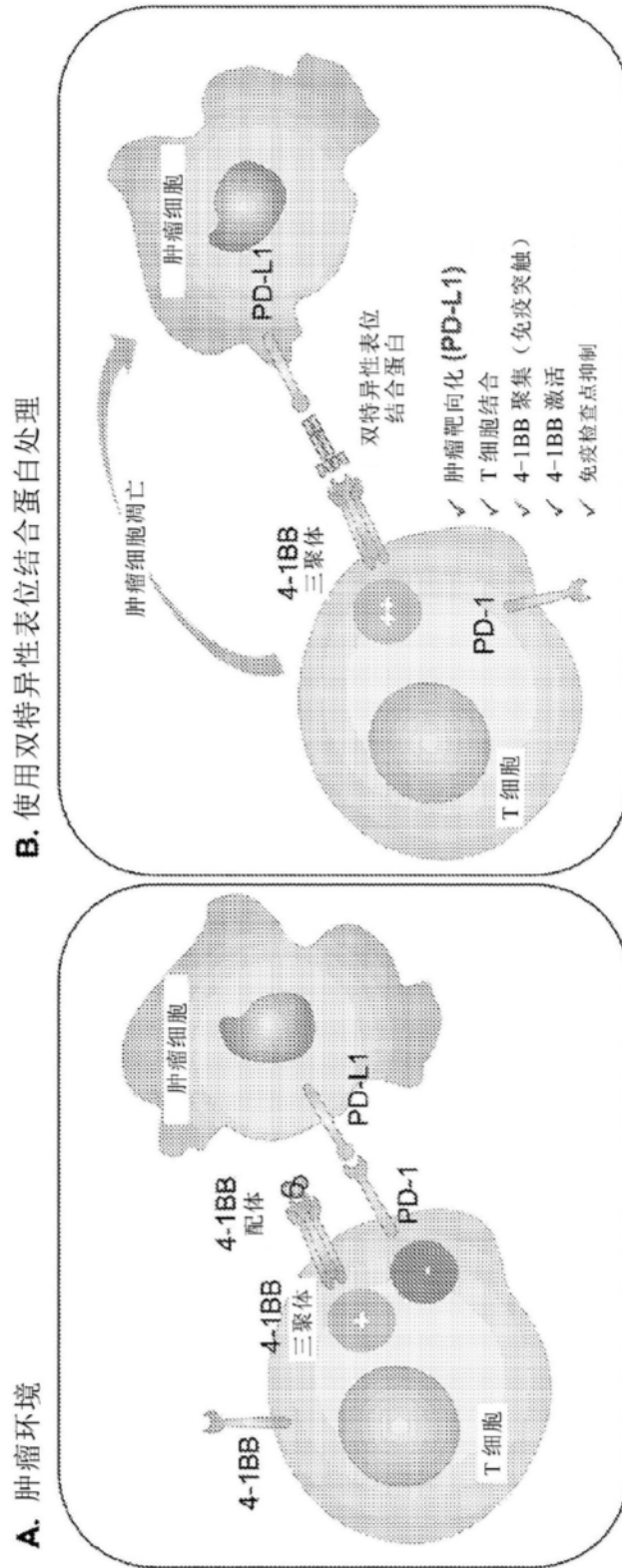
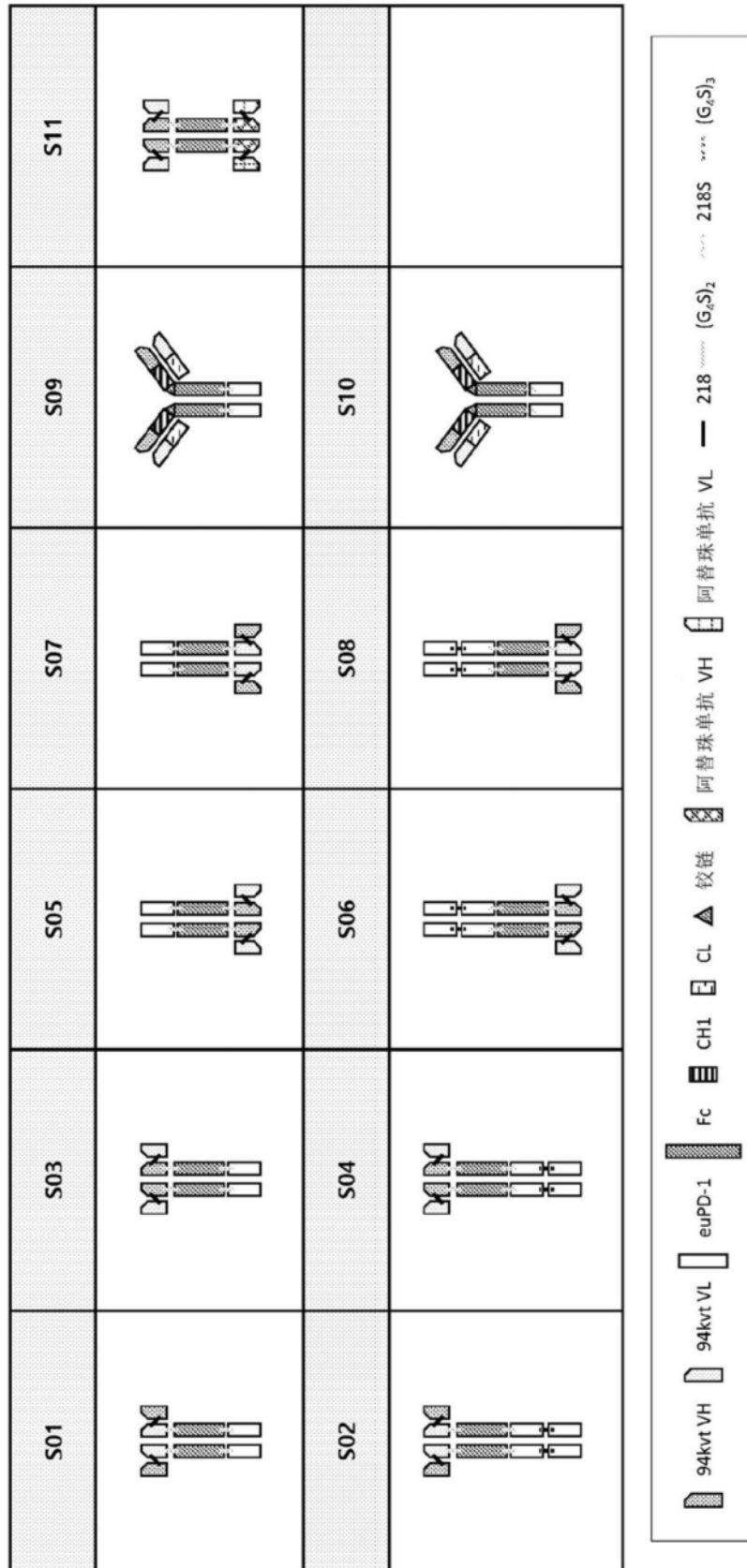


图1



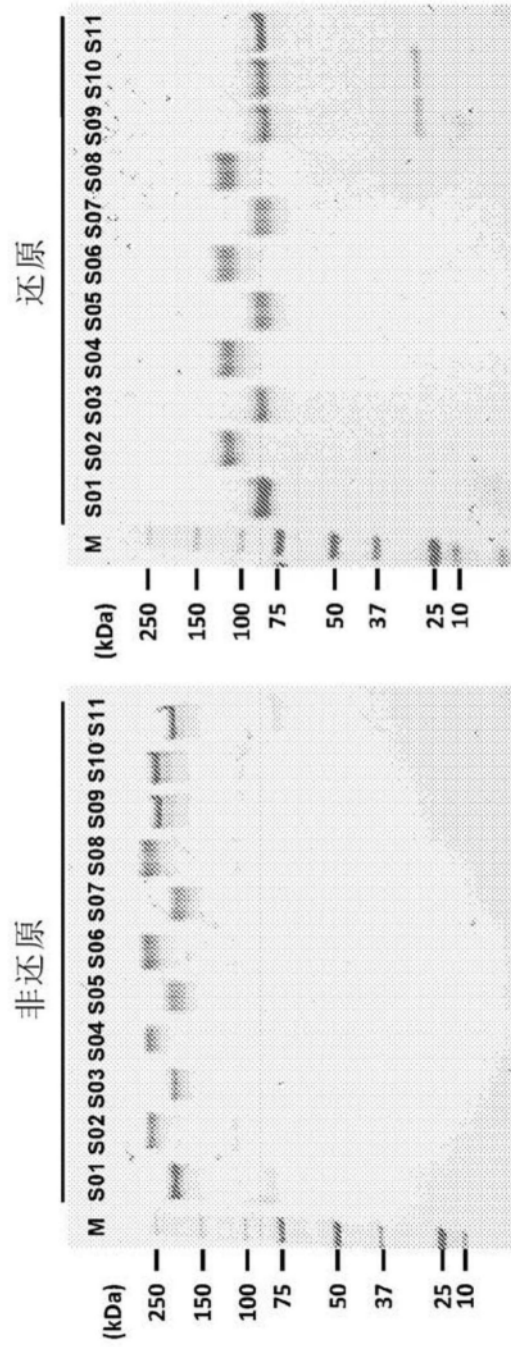


图3

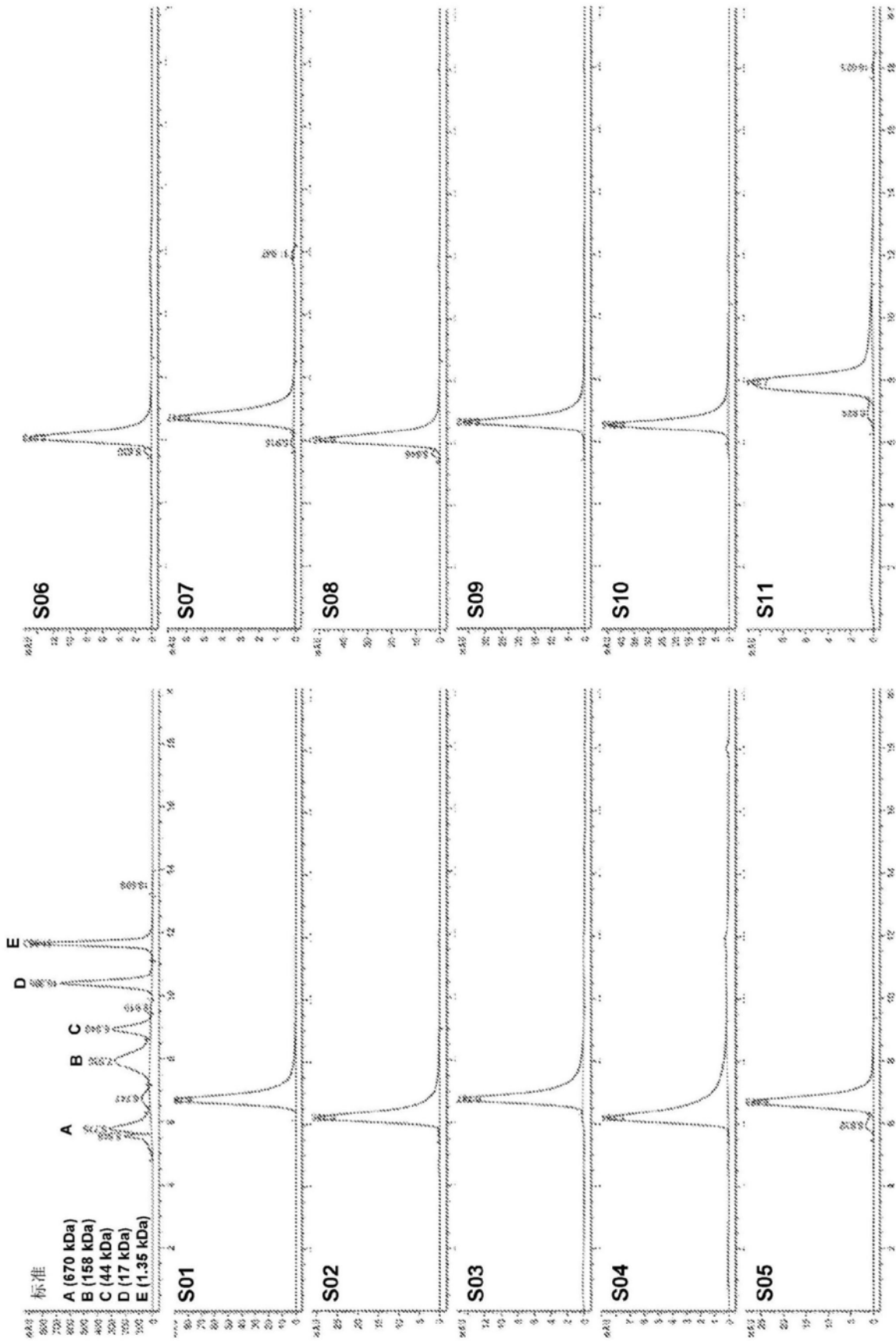


图4

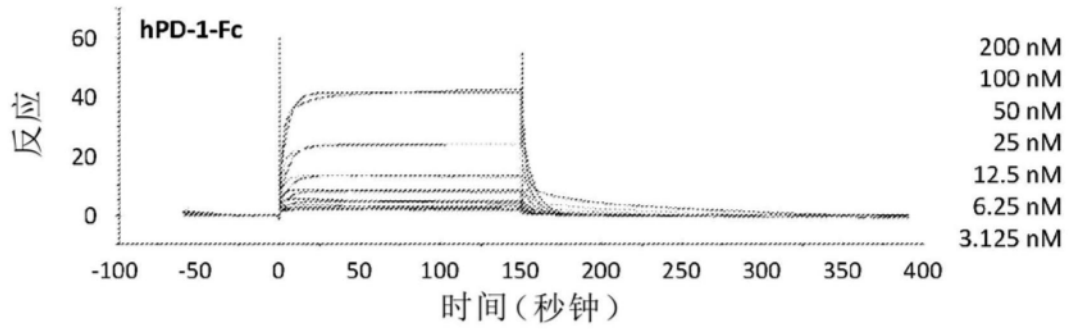


图5a

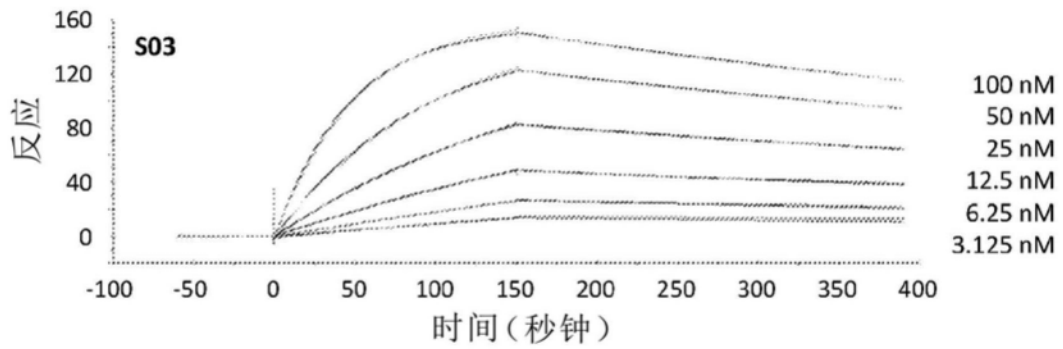


图5b

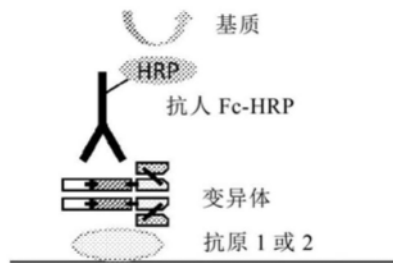


图6a

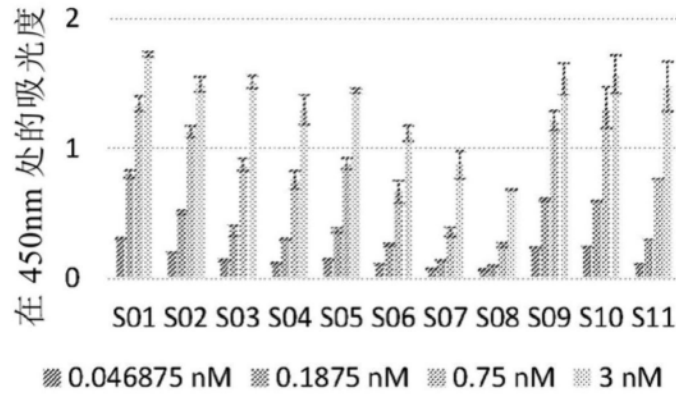


图6b

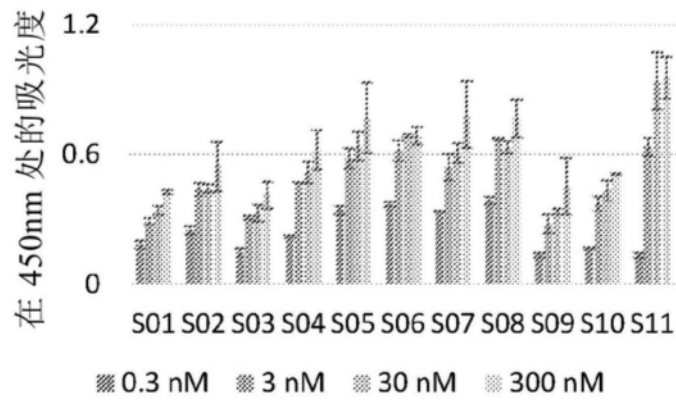


图6c

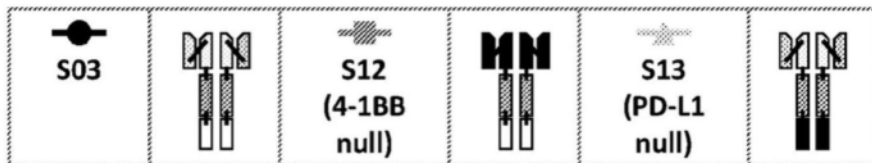


图6d

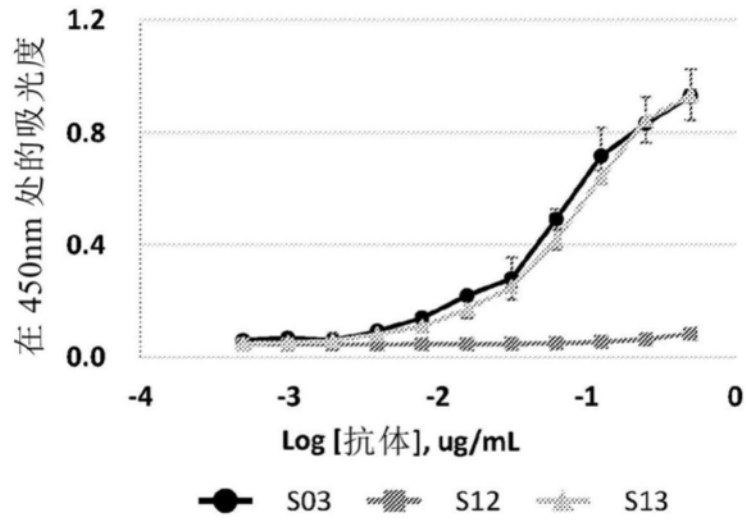


图6e

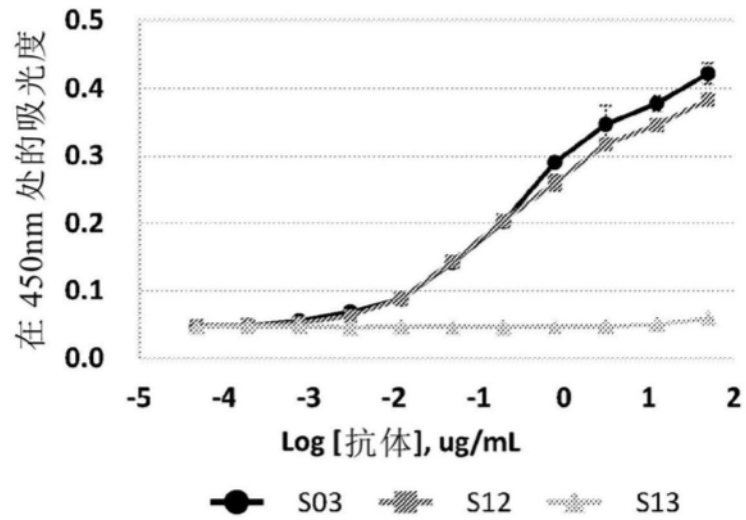


图6f

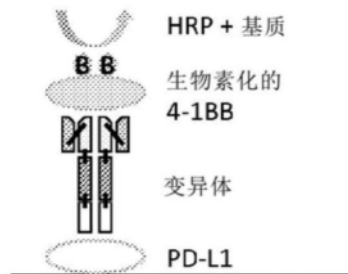


图7a

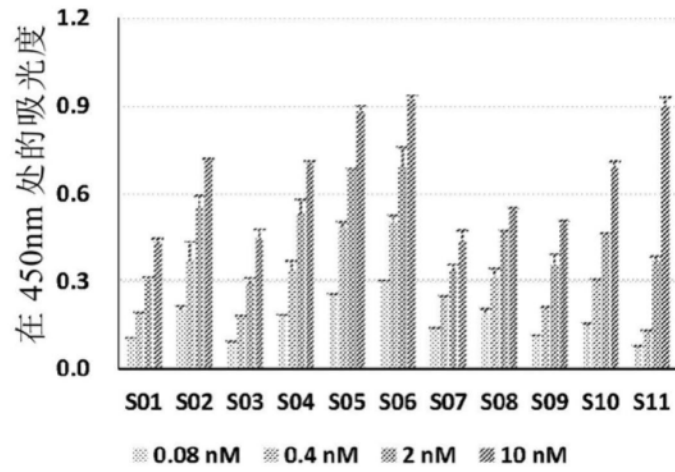


图7b

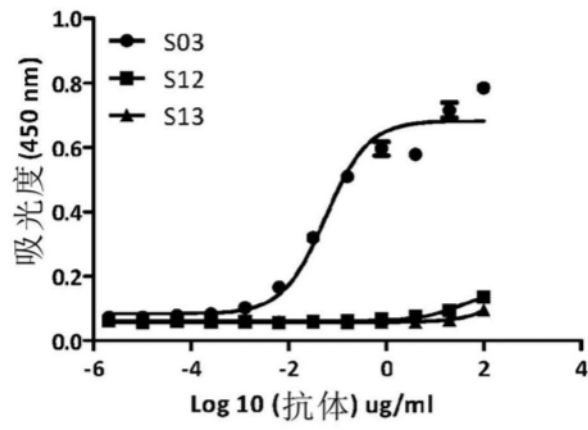


图7c

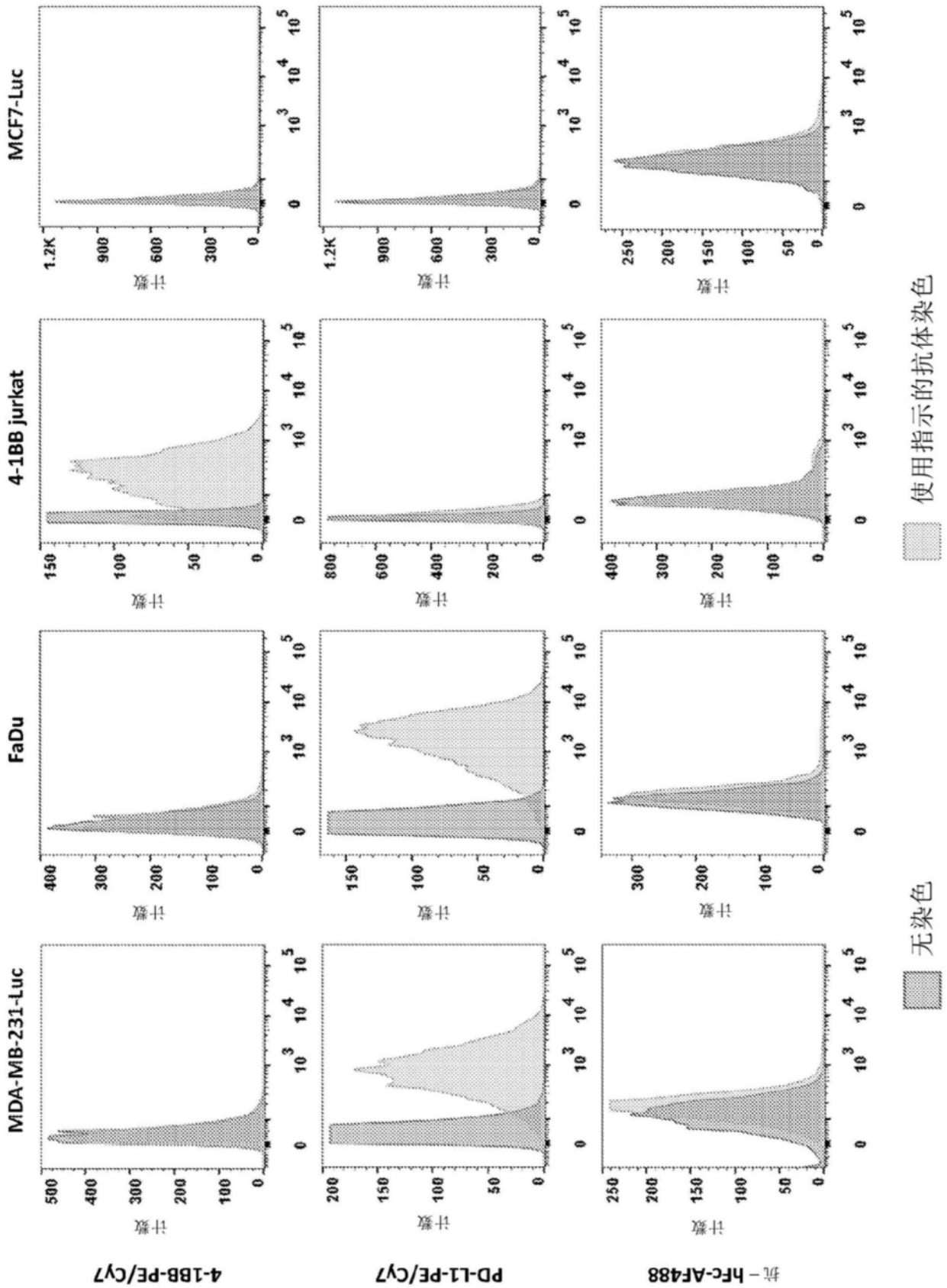


图8

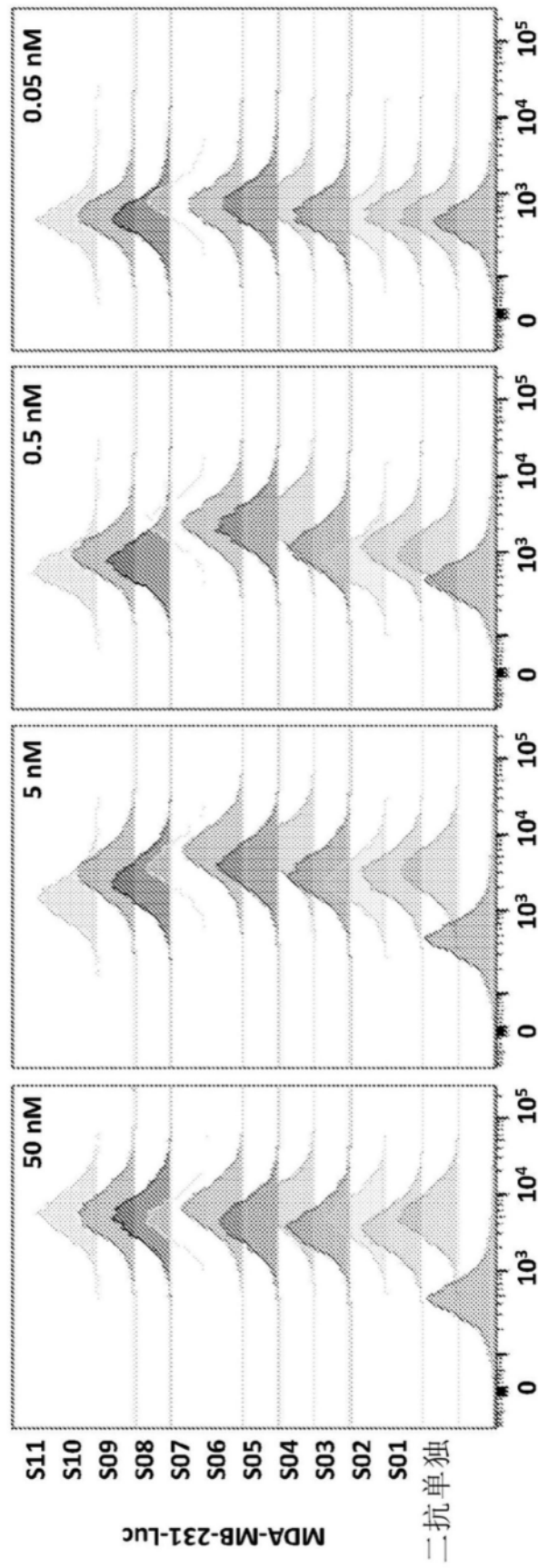


图9a

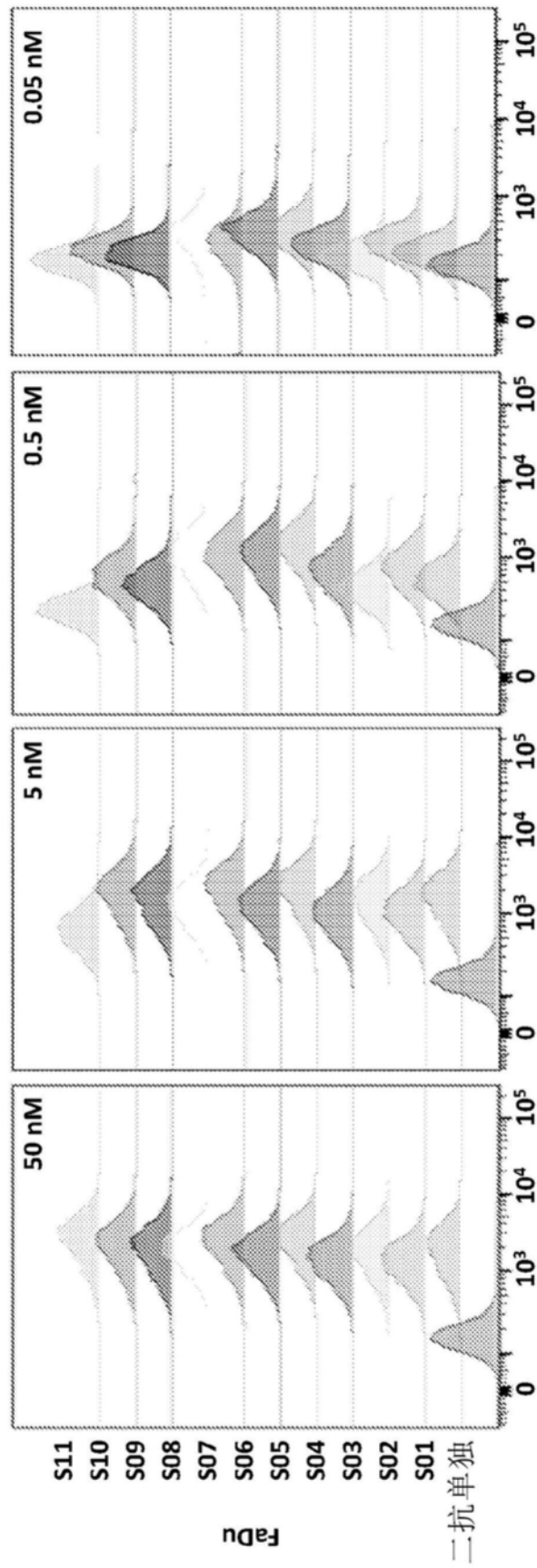


图9b

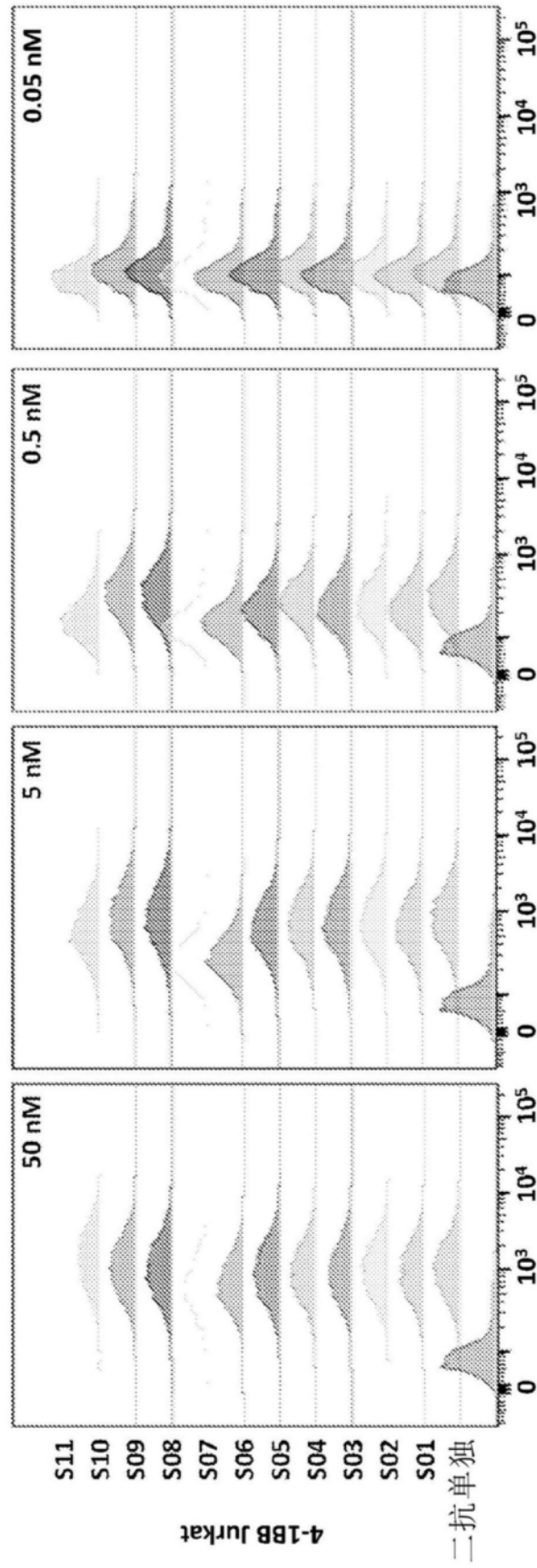


图9c

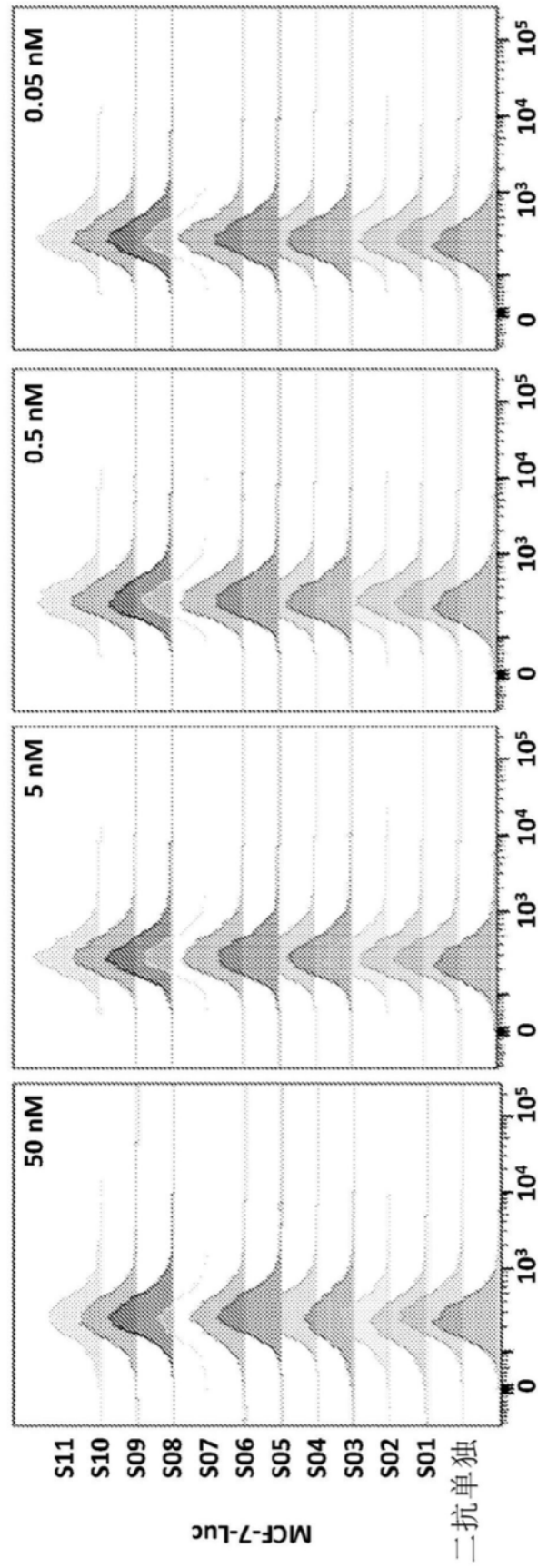


图9d

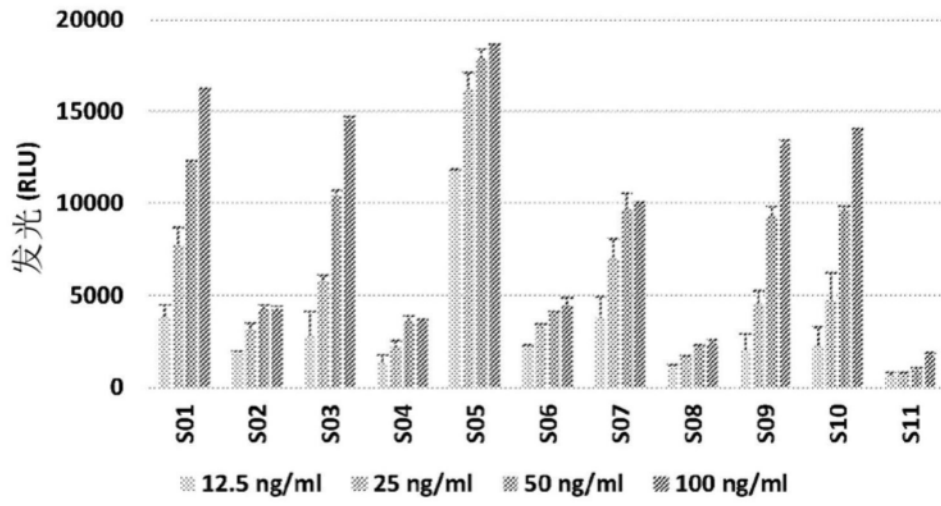


图10

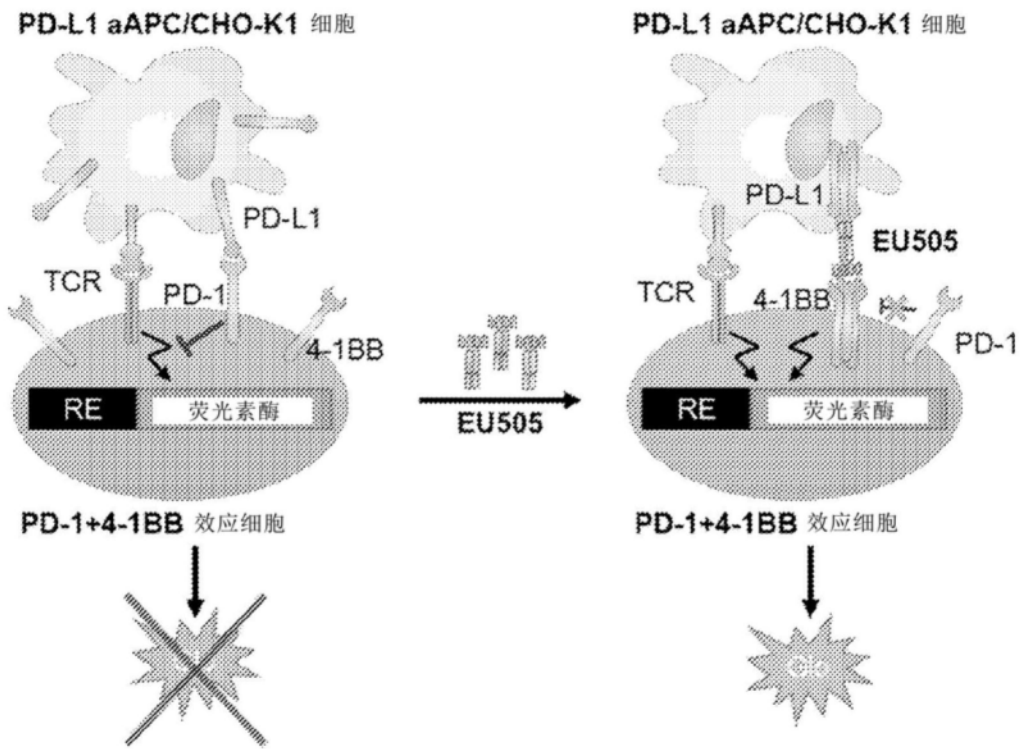


图11a

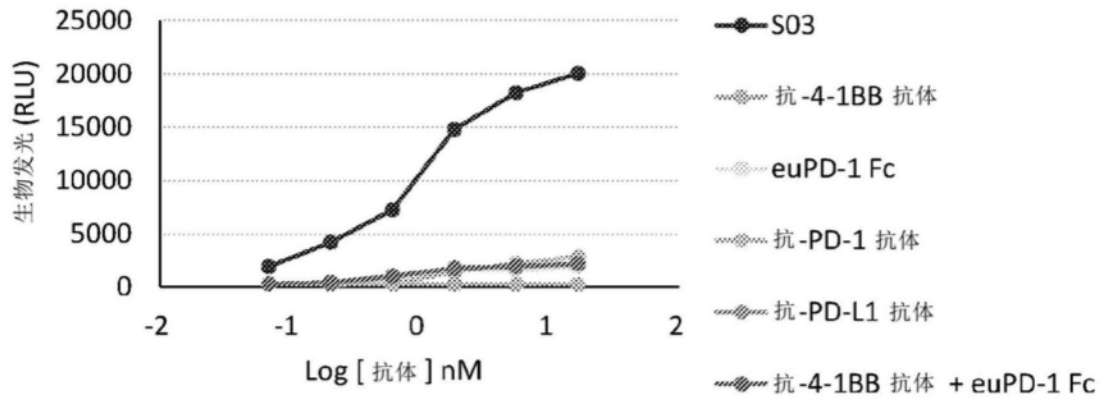


图11b

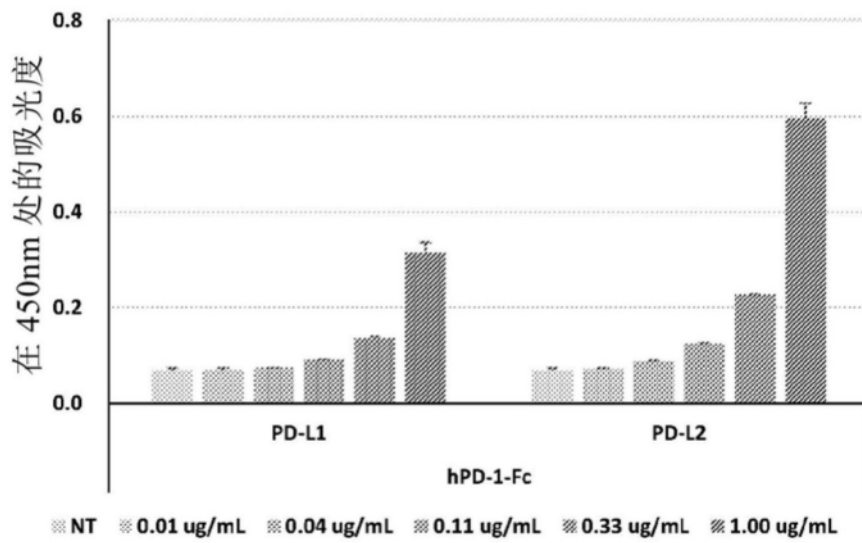


图12a

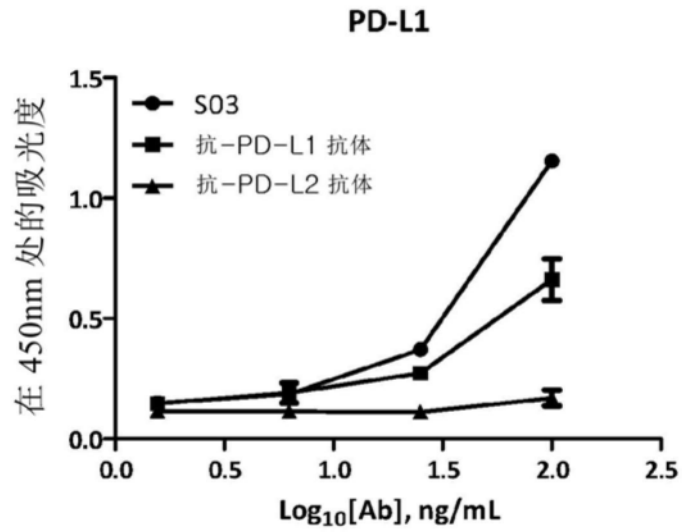


图12b

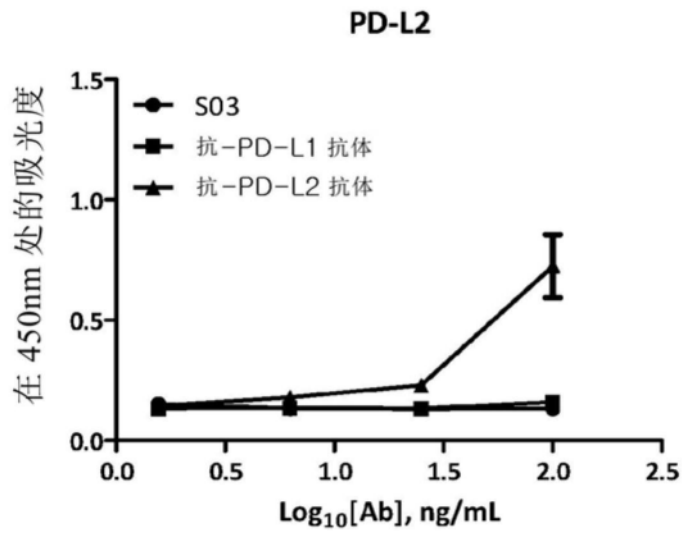


图12c

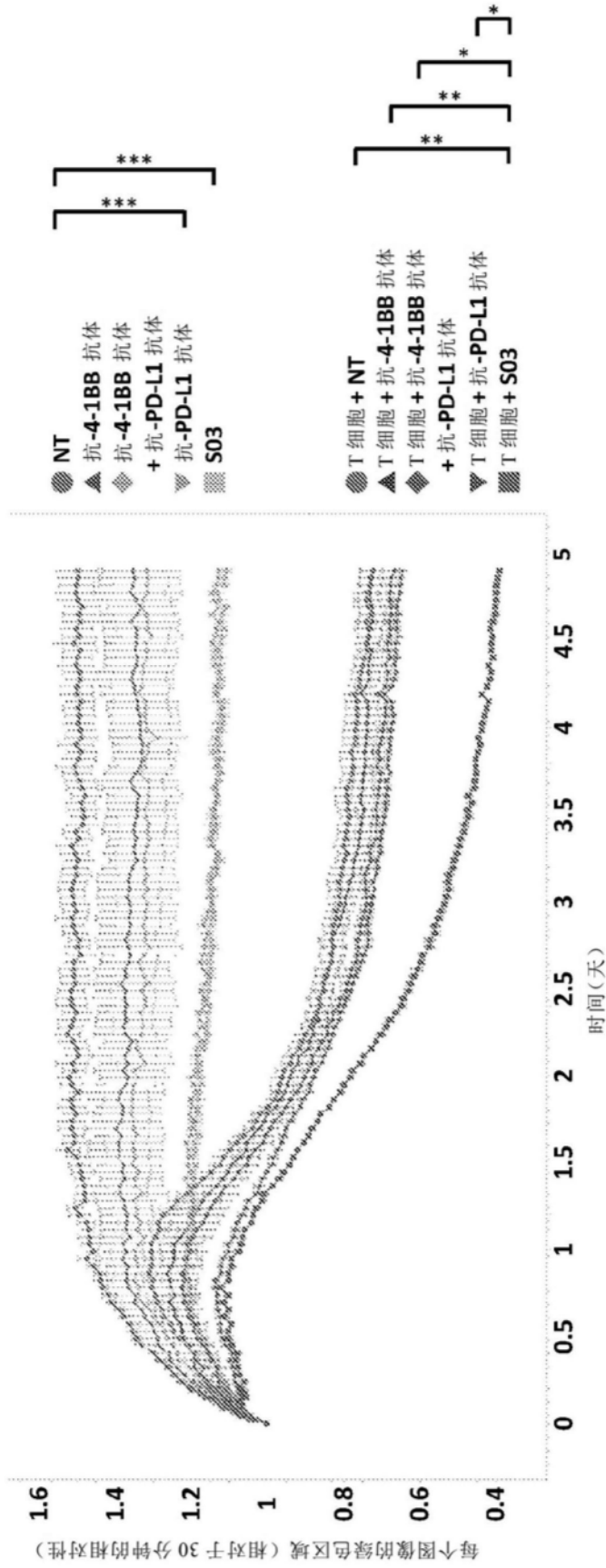


图13

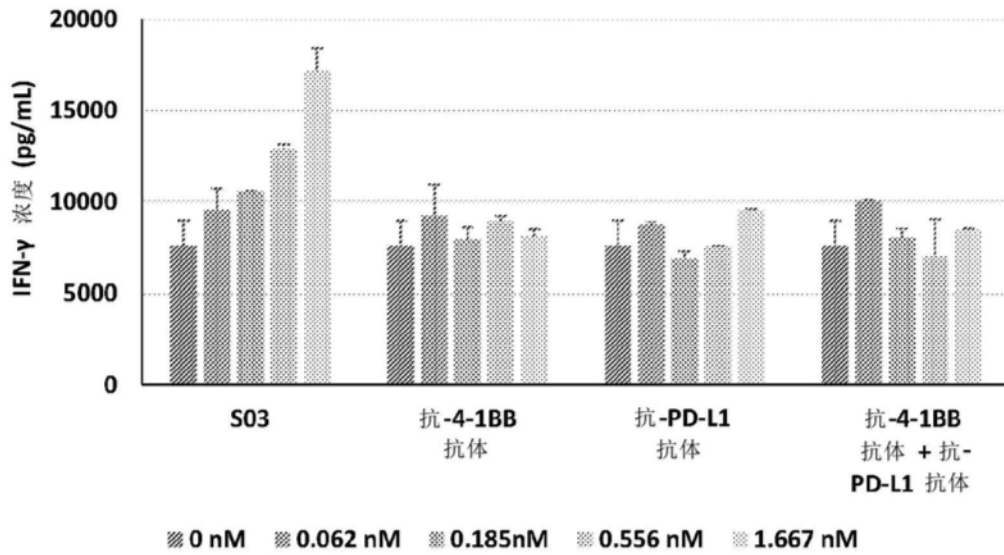


图14

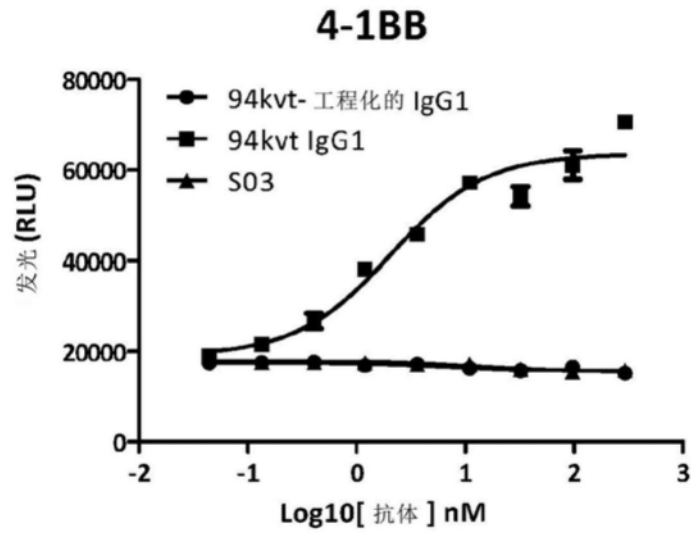


图15a

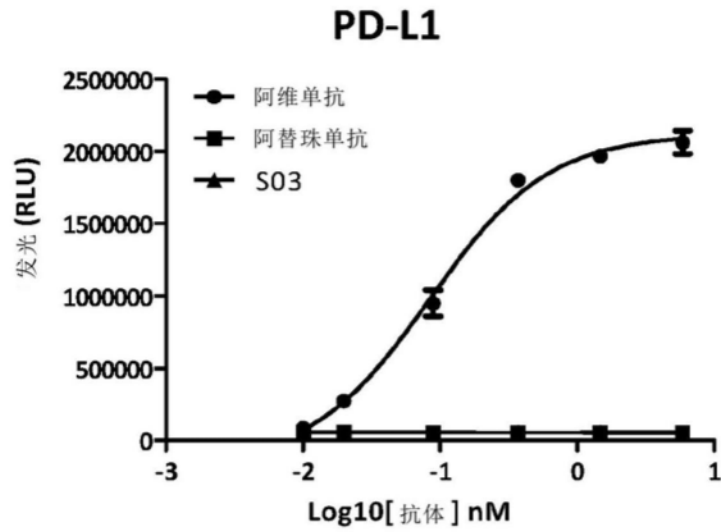


图15b

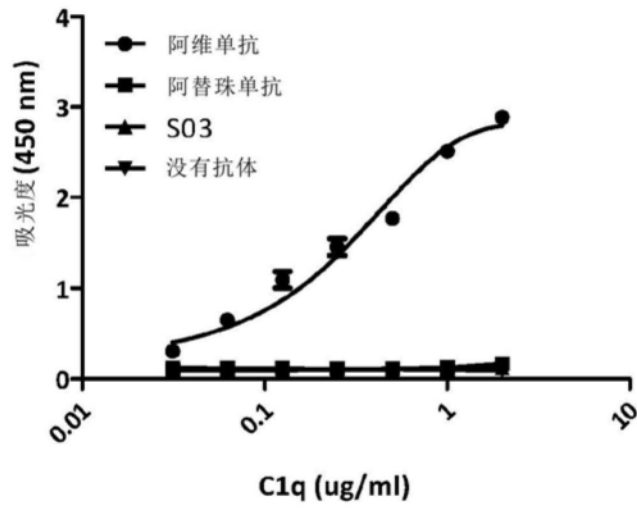


图16

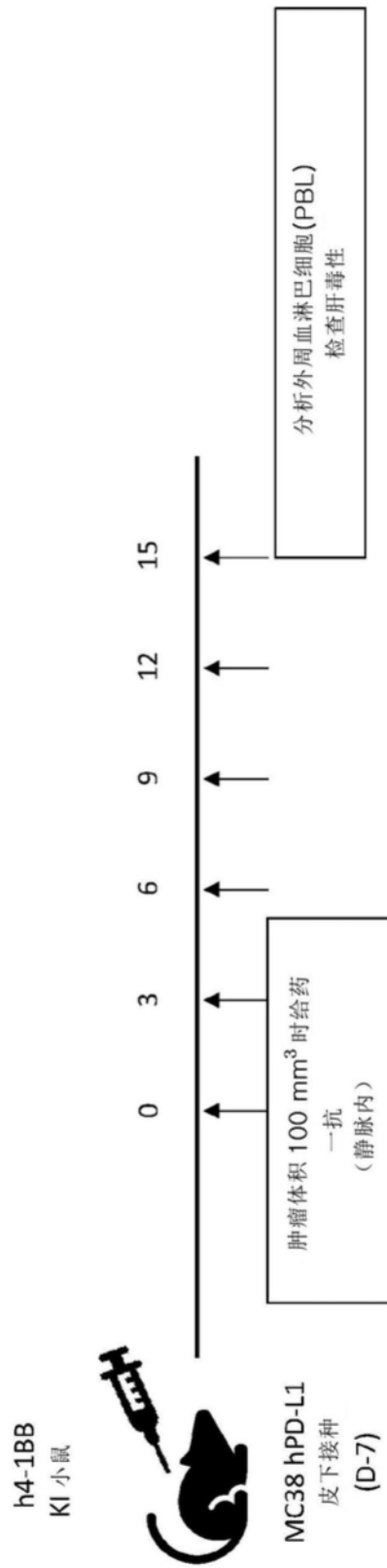


图17a

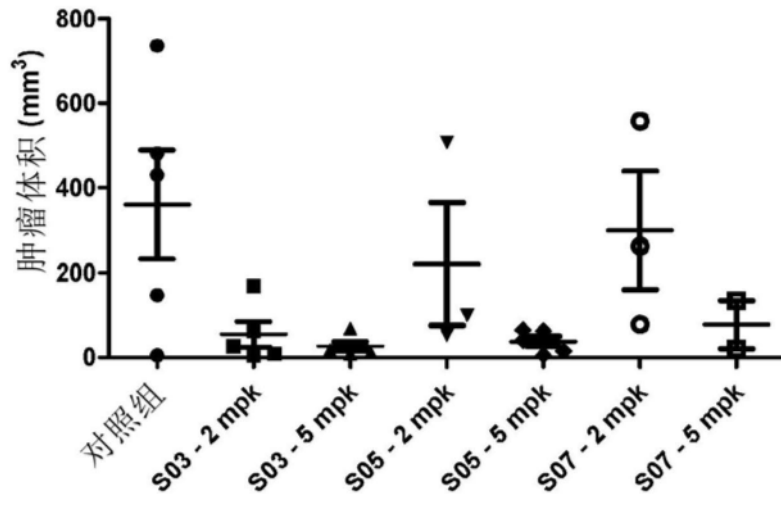


图17b

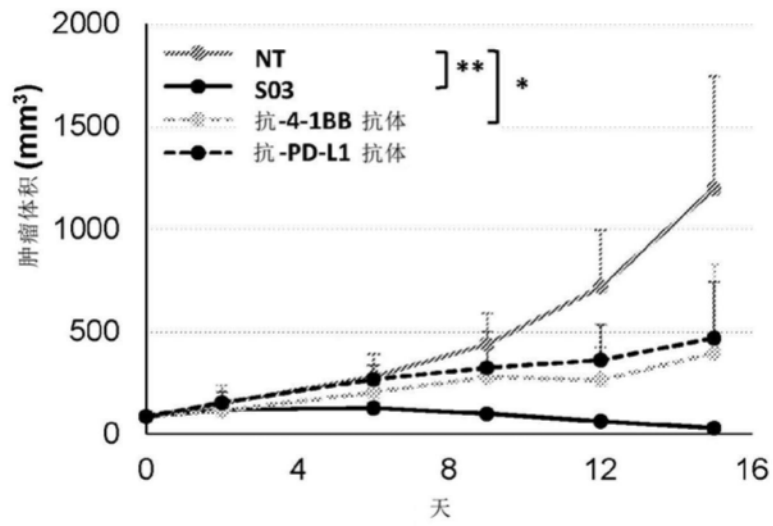


图18a

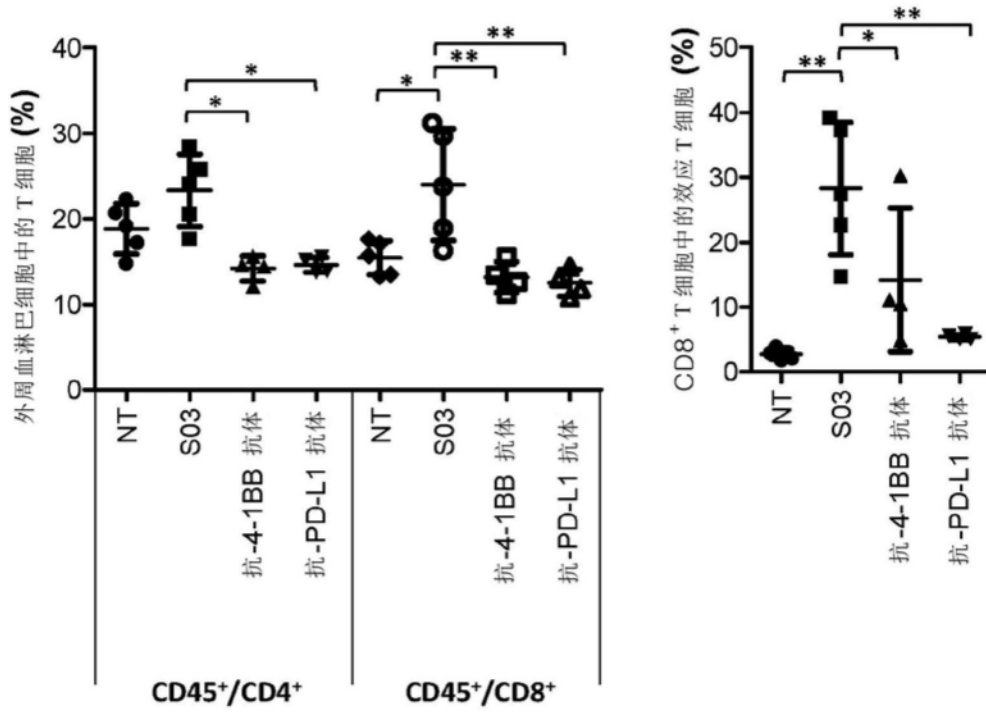


图18b

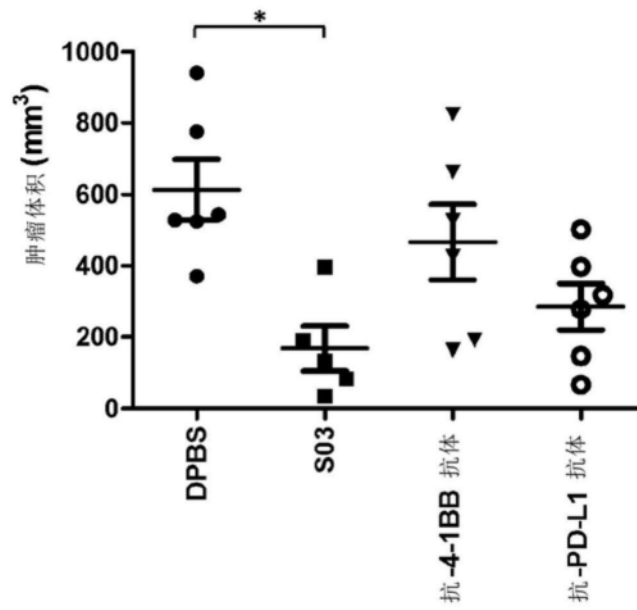


图19