(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115003693 A
(43)申请公布日 2022.09.02

(21)申请号 202080094676.5

(22)申请日 2020.12.18

(30)优先权数据
62/951,701 2019.12.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.07.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2020/051753 2020.12.18

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/119832 EN 2021.06.24

(71)申请人 加拿大商木曾路生物科技公司
地址 加拿大魁北克

(72)发明人 R·沃加查克 A·古普塔 L·达克鲁兹 D·S·杨 N·莫金 姚书刚

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 陈晶晶

(51)Int.Cl.
C07K 16/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
C12P 21/00(2006.01)

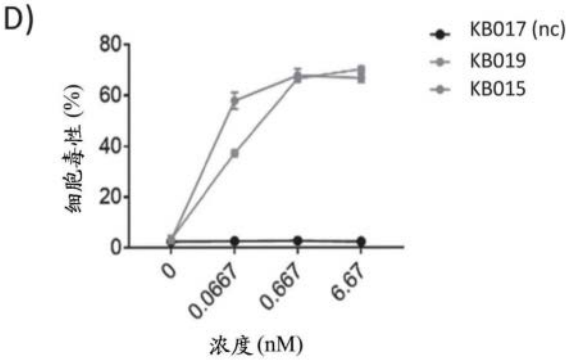
权利要求书10页 说明书85页
序列表66页 附图25页

(54)发明名称

多肽、蛋白质复合物及其制造方法

(57)摘要

本发明大体上系关于多肽，该等多肽包含一或多个抗原结合域及允许将至少两个多肽链组装成多价和/或多特异性蛋白质复合物的二聚域。本发明之该等多肽及蛋白质复合物具有抗肿瘤活性。



CN 115003693 A

1.一种多肽,其以N端至C端方式包含式Ib之氨基酸序列:

$X-[(Ab_a)-(L_b)]_m-(DD)-[(L_c)-(Ab_d)]_n-Y$

其中m为0、1或大于1之整数;

其中n为2或大于2之整数;

其中Ab_a、Ab_d各独立地包含抗原结合域,该抗原结合域包含抗体之一或多个互补决定区(complementarity determining region;CDR);

其中X或Y独立地存在或不存在且包含氨基酸序列;

其中L_b、L_c各独立地包含一或多个连接子;

其中L_c不包含可裂解连接子;

且其中DD包含二聚域。

2.如权利要求1的多肽,其中该二聚域包含CH2域、CH3域或其组合。

3.如权利要求1或2的多肽,其中该二聚域包含CH3域,该CH3域包含一或多个根据EU编号在对应于D399、D/E356和/或K370的位置处之突变。

4.如权利要求3的多肽,其中该CH3域进一步包含一或多个根据EU编号在对应于Y349、T350、L351、P352、S354、R/Q355、T394和/或P395之位置处的突变。

5.如权利要求3或4的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q及K370E。

6.如权利要求4的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及S354K。

7.如权利要求4的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351W。

8.如权利要求4的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及S354M。

9.如权利要求4的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350I。

10.如权利要求4的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350V。

11.如权利要求4的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352R。

12.如权利要求4的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352E。

13.如权利要求1或2的多肽,其中该二聚域包含CH3域,该CH3域包含一或多个根据EU编号在对应于D399、E357和/或K439的位置处之突变。

14.如权利要求13的多肽,其中该CH3域进一步包含一或多个根据EU编号在对应于Y349、T350、L351、P352、S354、R/Q355、T394和/或P395之位置处的突变。

15.如权利要求13或14的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E357Q及K439E。

16.如权利要求14的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399Q、E357Q、K439E、Y349D及S354D。

17.如权利要求14的多肽，其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R。

18.如权利要求14的多肽，其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351Y。

19.如权利要求14的多肽，其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350I。

20.如权利要求14的多肽，其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350V。

21.如权利要求2的多肽，其中该CH3域为包含选自由以下组成之群之突变的CH3域：

a.突变D399N、D/E356Q、K370E；

b.突变D399N、K439E、E357Q；

c.突变D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及S354K；

d.突变D399N、D/E356Q、K370E及L351W；

e.突变D399N、D/E356Q、K370E及S354M；

f.突变D399N、D/E356Q、K370E及T350I；

g.突变D399N、D/E356Q、K370E及T350V；

h.突变D399N、D/E356Q、K370E及P352R；

i.突变D399N、D/E356Q、K370E及P352E；

j.突变D399Q、D/E356Q及K370E；

k.突变D399N、D/E356Q、K370E及L351Y；

l.突变D399N、D/E356Q、K370E及L351H；

m.突变D399N、D/E356Q、K370E及R355K；

n.突变D399N、D/E356Q、K370E及Q355K；

o.突变D399N、D/E356Q、K370E及S354K；

p.突变D399N、D/E356Q、K370E及T350L；

q.突变D399N、D/E356Q、K370E及T394N；

r.突变D399N、D/E356Q、K370E及P352Y；

s.突变D399N、D/E356Q、K370E及P352V；

t.突变D399N、D/E356Q、K370E及P352T；

u.突变D399N、D/E356Q、K370E及P352L；

v.突变D399N、D/E356Q、K370E及P352G；

w.突变D399N、D/E356Q、K370E及P352C；

x.突变D399N、D/E356Q、K370E及L351T；

y.突变D399N、D/E356Q、K370E及L351A；

z.突变D399Q、E357Q、K439E、Y349D及S354D；

aa.突变D399N、E357Q、K439E及L351R；

bb.突变D399N、E357Q、K439E及L351Y；

cc.突变D399N、E357Q、K439E及T350I；

dd.突变D399N、E357Q、K439E及T350V；

ee.突变D399Q、K439E、E357Q；

ff.突变D399N、K439E、E357Q、S354K；

gg.突变D399N、K439E、E357Q、S354W；

hh.突变D399N、K439E、E357Q、Y349R；

ii.突变D399N、K439E、E357Q、T350L；

jj.突变D399N、K439E、E357Q、R355W；

kk.突变D399N、K439E、E357Q、Q355W；

ll.突变D399N、K439E、E357Q、P395I；

mm.突变D399N、K439E、E357Q、P395G；

nn.突变D399N、K439E、E357Q、P395E；

oo.突变D399N、K439E、E357Q、P352K；

pp.突变D399N、K439E、E357Q、P352D;及

qq.突变D399N、K439E、E357Q、L351D。

22.一种多肽,其以N端至C端方式包含式Ic之氨基酸序列：

$X-[(Ab_a)-(L_b)]_m-(DD)-[(L_c)-(Ab_d)]_n-Y$

其中m为0、1或大于1之整数；

其中n为0、1或大于1之整数,其限制条件为m及n不同时为0；

其中Ab_a、Ab_d各独立地包含抗原结合域,该抗原结合域包含抗体之一或多个互补决定区(CDR)；

其中X或Y独立地存在或不存在且包含氨基酸序列；

其中L_b、L_c各独立地包含一或多个连接子；

其中DD包含二聚域,该二聚域包含

包含一或多个根据EU编号在对应于D399、D/E356和/或K370的位置处之突变的CH3域；

或

包含一或多个根据EU编号在对应于D399、E357和/或K439的位置处之突变的CH3域。

23.如权利要求22的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E356Q及K370E。

24.如权利要求22的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E357Q及K439E。

25.如权利要求22至24中任一项的多肽,其中该CH3域进一步包含一或多个根据EU编号在对应于Y349、T350、L351、P352、S354、R/Q355、T394和/或P395之位置处的突变。

26.如权利要求25的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及S354K。

27.如权利要求25的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351W。

28.如权利要求25的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及S354M。

29.如权利要求25的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350I。

30.如权利要求25的多肽,其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350V。

31.如权利要求25的多肽，其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352R。

32.如权利要求25的多肽，其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352E。

33.如权利要求25的多肽，其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399Q、E357Q、K439E、Y349D及S354D。

34.如权利要求25的多肽，其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R。

35.如权利要求25的多肽，其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351Y。

36.如权利要求25的多肽，其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350I。

37.如权利要求25的多肽，其中该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350V。

38.如前述权利要求中任一项的多肽，其中当m为2或大于2之整数时，该等[(Ab_a)-(L_b)]单元相同。

39.如权利要求1至37中任一项的多肽，其中当m为2或大于2之整数时，该等[(Ab_a)-(L_b)]单元不同。

40.如权利要求1至37中任一项的多肽，其中当m为大于2之整数时，该等[(Ab_a)-(L_b)]单元包含相同及不同单元。

41.如前述权利要求中任一项的多肽，其中当n为2或大于2之整数时，该等[(L_c)-(Ab_d)]单元相同。

42.如权利要求1至40中任一项的多肽，其中当n为2或大于2之整数时，该等[(L_c)-(Ab_d)]单元不同。

43.如权利要求1至40中任一项的多肽，其中当n为2或大于2之整数时，该等[(L_c)-(Ab_d)]单元包含相同及不同单元。

44.如前述权利要求中任一项的多肽，其中该一或多个连接子包含抗体或其抗原结合片段之铰链区。

45.如权利要求44的多肽，其中该铰链区系来自IgG1、IgG2或IgG4。

46.如前述权利要求中任一项的多肽，其中该一或多个连接子中之每一者的长度独立地为至少5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸残基。

47.如权利要求46的多肽，其中该一或多个连接子中之每一者独立地为柔性连接子、螺旋状连接子或刚性连接子。

48.如权利要求47的多肽，其中该一或多个连接子包含柔性连接子和/或刚性连接子。

49.如前述权利要求中任一项的多肽，其中L_c为刚性连接子。

50.如权利要求47至49中任一项的多肽，其中该柔性连接子包含GS连接子。

51.如权利要求47至50中任一项的多肽，其中该柔性连接子包含SEQ ID NO:7中所阐述之氨基酸。

52.如权利要求51的多肽，其中该柔性连接子包含SEQ ID NO:7中所阐述之氨基酸序

列，且其中n为2、3、4、5或大于5之整数。

53.如权利要求47至52中任一项的多肽，其中该刚性连接子包含多个PA重复。

54.如权利要求53的多肽，其中该刚性连接子系选自PAPAPKA(SEQ ID NO:8)；APAPAPAPAPKA(SEQ ID NO:9)；APAPAPAPAPAPAPAPAPKA(SEQ ID NO:10)；或其组合。

55.如权利要求47的多肽，其中该螺旋状连接子包含SEQ ID NO:15中所阐述之氨基酸序列。

56.如权利要求55的多肽，其中该螺旋状连接子系选自AEAAAKEAAAKA(SEQ ID NO:12)；AEAAAKEAAAKEAAAKA(SEQ ID NO:13)；AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA(SEQ ID NO:14)；或其组合。

57.如前述权利要求中任一项的多肽，其中该二聚域包含与SEQ ID NO:27至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％一致的氨基酸序列。

58.如前述权利要求中任一项的多肽，其中该二聚域进一步包含与SEQ ID NO:29至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％一致的氨基酸序列。

59.如前述权利要求中任一项的多肽，其中m为2、3、4、5或大于5之整数。

60.如前述权利要求中任一项的多肽，其中n为3、4、5或大于5之整数。

61.如前述权利要求中任一项的多肽，其中该多肽系选自由以下组成之群：

$X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y$(式II)；

$X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$(式III)；

$X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y$(式IV)；

$X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$(式V)$X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y$(式VI)；

$X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$(式VII)；

$X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y$(式VIII)。

62.如权利要求61的多肽，其中L_{c1}、L_{c2}和/或L_{c3}为刚性连接子。

63.如前述权利要求中任一项的多肽，其中该抗原结合域系选自由以下组成之群：单域抗体(sdAb)、重链可变区(VH或VHH)、轻链可变区(VL或VLL)、单链可变片段(ScFv)、V_{NAR}片段及其组合。

64.如权利要求63的多肽，其中该抗原结合域包含sdAb。

65.如权利要求63的多肽，其中该抗原结合域包含VHH。

66.如权利要求64或65的多肽，其中该sdAb或VHH系来自骆驼科抗体或软骨鱼抗体。

67.如权利要求66的多肽，其中该骆驼科抗体系来自单峰驼、骆驼、骆马或羊驼。

68.如权利要求66的多肽，其中该软骨鱼抗体为鲨鱼抗体。

69.如前述权利要求中任一项的多肽，其中各个别抗原结合域结合于不同抗原决定基。

70.如前述权利要求中任一项的多肽，其中各个别抗原结合域结合于不同抗原。

71.如前述权利要求中任一项的多肽，其中各个别抗原结合域结合于不同蛋白质。

72.如前述权利要求中任一项的多肽，其中该多肽包含一或多个结合于以下各者之抗原结合域：CD36、DRD1、DRD2、DRD3、DRD4、DRD5、PD-L1、TROP2、CD147、MCT1、IL1RAP、AMIGO2、

PTK7、MCT2、MCT4、NHE1、H+/K+-ATP酶、LAP、HLA-IA2、CD73、CD98、CEACAM5/6、ICAM-1、MCSP、纤维结合蛋白、β1整合素、四跨膜蛋白8(Tetraspanin 8)、CD164、CD59、CD63、CD44、CD166、cWF、TNF、IL-17A、IL17-F、IL-6R、BCMA、TNF、RANKL、ADAMTS5、VEGF、Ang2、CX_3CR1、CXCR4、TfR1(CD71)、CXCR2、CD3、PD1、PDL-1、CTLA-4、CD8、LAG-3、OX40、CD27、CD122/IL2RB、TLR8/CD288、TIM-3、ICOS/CD278、NKG2A、A2AR、B7-H3、GITR/TNFRSF18、4-IBB/CD137、KIR2DL1、KIR3DL2、SIRPα、CD47、VISTA、CD40、CD112、CD96、TOGOT、BTLA、TIGIT、LAG-3、CD4、VEGFR2、CD19、IGFR1、EpCAM、EGFR、DLL3、CGRP、CD79b、CD28、CCR5、ErbB3、ErbB2、TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3、TGFβR1、TGFpR2、IDO1、IDO2、TLR-4、TLR-7、TLR-8、TLR-9、SARS-CoV-1刺突蛋白、SARS-CoV-2刺突蛋白或其组合。

73.如前述权利要求中任一项的多肽,其中该多肽包含至少一个结合于由肿瘤表达的蛋白质的抗原结合域、至少一个结合且募集免疫细胞的抗原结合域。

74.如前述权利要求中任一项的多肽,其中该多肽包含至少一个结合于由肿瘤表达的蛋白质的抗原结合域、至少一个结合于免疫检查点蛋白的抗原结合域及至少一个结合且募集免疫细胞的抗原结合域。

75.如权利要求73或74的多肽,其中该免疫细胞为T细胞。

76.如前述权利要求中任一项的多肽,其中该多肽包含结合于受体之抗原结合域。

77.如权利要求76的多肽,其中该受体为G蛋白偶合受体。

78.如权利要求77的多肽,其中该G蛋白偶合受体为多巴胺受体。

79.如权利要求78的多肽,其中该多巴胺受体为多巴胺受体D1(DRD1)、多巴胺受体D2(DRD2)、多巴胺受体D3(DRD3)、多巴胺受体D4(DRD4)或多巴胺受体D5(DRD5)。

80.如前述权利要求中任一项的多肽,其中该多肽包含结合于肿瘤抗原之抗原结合域及结合于免疫调节剂之抗原结合域。

81.如权利要求80的多肽,其中该结合于肿瘤抗原之抗原结合域系在该二聚域之N端,且该结合于免疫调节剂之抗原结合域系在该二聚域之C端。

82.如权利要求80或81的多肽,其中该免疫调节剂为免疫检查点蛋白、细胞因子、趋化因子或免疫受体或辅助受体。

83.如前述权利要求中任一项的多肽,其中该多肽包含一或多个在该二聚域之N端的抗原结合域,其结合于CD36、DRD1、DRD2、DRD3、DRD4、DRD5、PD-L1、TROP2、CD147、MCT1、IL1RAP、AMIGO2、PTK7、MCT2、MCT4、NHE1、H+/K+-ATP酶、LAP、HLA-IA2、CD73、CD98、CEACAM5/6、ICAM-1、MCSP、纤维结合蛋白、β1整合素、四跨膜蛋白8、CD164、CD59、CD63、CD44、CD166、cWF、TNF、IL-17A、IL17-F、IL-6R、BCMA、TNF、RANKL、ADAMTS5、VEGF、Ang2、CX3CR1、CXCR4、TfR1(CD71)、CXCR2或其组合。

84.如权利要求83的多肽,其中该多肽包含一或多个在该二聚域之N端的抗原结合域,其结合于CD36、DRD1、DRD2、PD-L1或TROP2。

85.如前述权利要求中任一项的多肽,其中该多肽包含一或多个在该二聚域之C端的抗原结合域,其结合于CD3、PD1、PDL-1、CTLA-4、CD8、LAG-3、OX40、CD27、CD122/IL2RB、TLR8/CD288、TIM-3、ICOS/CD278、NKG2A、A2AR、B7-H3、GITR/TNFRSF18、4-IBB/CD137、KIR2DL1、KIR3DL2、SIRPα、CD47、VISTA、CD40、CD112、CD96、TOGOT、BTLA、TIGIT、LAG-3、CD4或其组合。

86.如权利要求85的多肽,其中该多肽包含一或多个在该二聚域之C端的抗原结合域,

其结合于CD3、PD1、CTLA-4、CD8、LAG-3、OX40、CD27、CD122/IL2RB、TLR8/CD288、Tim3、ICOS/CD278、NKG2A、A2AR、B7-H3、GITR/TNFRSF18、4-IBB/CD137、KIR2DL1、KIR3DL2、SIRPα、CD47、VISTA、CD40、CD112、CD96、TOGOT、BTLA或CD4。

87.如权利要求86的多肽，其中该一或多个在该二聚域之C端的抗原结合域分别结合于CD3及PD1。

88.如前述权利要求中任一项的多肽，其中一或多个抗原结合域经人类化。

89.如前述权利要求中任一项的多肽，其中X或Y系独立地选自由以下组成之群：连接子、细胞因子、趋化因子、标签、掩蔽域、噬菌体鞘蛋白(pIII、pVI、pV、pVII或pIX)、抗原结合域或其组合。

90.如前述权利要求中任一项的多肽，其中该多肽系与治疗部分、可侦测部分或允许延长半衰期之蛋白质结合或系连接于纳米粒子。

91.一种医药组合物，其包含如前述权利要求中任一项的多肽及医药学上可接受的载剂。

92.一种核酸，其编码如前述权利要求中任一项的多肽。

93.一种载体，其包含如权利要求92的核酸。

94.一种细胞，其表达如权利要求1至90中任一项的多肽。

95.一种细胞，其包含如权利要求92的核酸或如权利要求93的载体。

96.一种试剂盒，其包含如权利要求1至90中任一项的多肽。

97.一种试剂盒，其包含如权利要求92的核酸，或如权利要求93的载体，或如权利要求94或95的细胞。

98.一种蛋白质复合物，其包含如前述权利要求中任一项的第一多肽及如前述权利要求中任一项的第二多肽，其中该第一及第二多肽相同或不同。

99.一种蛋白质复合物，其包含

第一多肽，其包含一或多个抗原结合域及第一二聚域(DD_1)，该第一二聚域包含有包含一或多个根据EU编号在对应于D399、D/E356和/或K370的位置处之突变的CH3域；

及

第二多肽，其包含一或多个抗原结合域及第二二聚域(DD_2)，该第二二聚域包含有包含一或多个根据EU编号在对应于D399、E357和/或K439的位置处之突变的CH3域，

其中该第一及第二多肽形成二聚体。

100.如权利要求99的蛋白质复合物，其中该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q及K370E的CH3域，且其中该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q及K439E的CH3域。

101.如权利要求99或100的蛋白质复合物，其中该第一二聚域(DD_1)和/或第二二聚域(DD_2)包含进一步包含CH3域，该CH3域根据EU编号在对应于Y349、T350、L351、P352和/或S354的位置处之突变。

102.如权利要求101的蛋白质复合物，其中该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及S354K的CH3域，且其中该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、E357Q、K439E、Y349D及S354D的CH3域。

103.如权利要求101的蛋白质复合物，其中该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号

之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351W的CH3域，且其中该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。

104.如权利要求101的蛋白质复合物，其中该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及S354M的CH3域，且其中该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351Y的CH3域。

105.如权利要求101的蛋白质复合物，其中该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350I的CH3域，且其中该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350I的CH3域。

106.如权利要求101的蛋白质复合物，其中该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350V的CH3域，且其中该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350V的CH3域。

107.如权利要求101的蛋白质复合物，其中该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352R的CH3域，且其中该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。

108.如权利要求101的蛋白质复合物，其中该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352E的CH3域，且其中该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。

109.如权利要求98至108中任一项的蛋白质复合物，其中该第一及第二多肽各独立地以N端至C端之方式包含式I之氨基酸序列：

$X-[(Ab_a)-(L_b)]_m-(DD)-[(L_c)-(Ab_d)]_n-Y$

其中m为0、1或大于1之整数；

其中n为0、1或大于1之整数，其限制条件为m及n不同时为0；

其中Ab_a、Ab_d各独立地包含有包含抗体之一或多个互补决定区(CDR)的抗原结合域；

其中X或Y独立地存在或不存在且包含氨基酸序列；

其中L_b、L_c各独立地包含一或多个连接子；且

其中DD为该第一多肽中之该第一二聚域(DD_1)及该第二多肽中之该第二二聚域(DD_2)。

110.如权利要求109的蛋白质复合物，其中L_c为刚性连接子。

111.如权利要求98至110中任一项的蛋白质复合物，其中该第一及第二多肽各独立地为如权利要求1至83中任一项的多肽。

112.如权利要求98至111中任一项的蛋白质复合物，其中该第一及第二多肽各独立地为具有式III的多肽。

113.如权利要求98至111中任一项的蛋白质复合物，其中该第一多肽具有式II且该第二多肽具有式III。

114.如权利要求98至113中任一项的蛋白质复合物，其中该蛋白质复合物为多特异性的。

115.如权利要求114的蛋白质复合物，其中该蛋白质复合物为双特异性、三特异性或四特异性的。

116.如权利要求115的蛋白质复合物，其中该第一及第二多肽具有相同价数及特异性。

117.如权利要求115的蛋白质复合物，其中该第一及第二多肽具有不同价数及特异性。

118.如权利要求115的蛋白质复合物,其中该蛋白质复合物为双特异性抗体。

119.如权利要求118的蛋白质复合物,其中该第一及第二多肽各为抗体重链。

120.如权利要求119的蛋白质复合物,其中该双特异性抗体进一步包含第一抗体轻链及第二抗体轻链。

121.一种组合物,其包含如权利要求98至120中任一项的蛋白质复合物。

122.如权利要求121的组合物,其中该组合物包含单体、二聚体及其混合物。

123.如权利要求121的组合物,其中该第一及第二多肽超过70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%系以二聚体之形式存在。

124.如权利要求121的组合物,其中该第一及第二多肽超过70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%系以同二聚体之形式存在。

125.如权利要求121的组合物,其中该第一及第二多肽超过70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%系以异二聚体之形式存在。

126.一种治疗病症或疾病的方法,其包含投与如权利要求1至90中任一项的多肽或如权利要求98至120中任一项的蛋白质复合物或如权利要求121至125中任一项的组合物。

127.如权利要求126的方法,其中该病症或疾病为癌症。

128.如权利要求126的方法,其中该病症或疾病为感染。

129.如权利要求126的方法,其中该病症或疾病为免疫失调。

130.一种制造如权利要求98至120中任一项的蛋白质复合物的方法,该方法包含用一或多种包含如权利要求92之核酸的载体转化细胞。

131.一种试剂盒,其在同一个或分开的小瓶中包含一或多个编码人类抗体之二聚域之核酸、一或多个编码抗原结合域之核酸及视情况存在之一或多个编码连接子之核酸。

132.如权利要求131的试剂盒,其中各核酸为载体。

133.如权利要求131的试剂盒,其中各核酸为DNA区段,其包含允许在独特位置组装至用于编码多肽链之DNA构筑体中的独特突出端。

134.一种试剂盒,其包含一或多个编码二聚域之核酸,该二聚域包含具有根据EU编号之位置D/E356、E357、K370、D399和/或K439处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域。

135.如权利要求134的试剂盒,其在同一个或分开之小瓶中包含:

a.编码二聚域之DNA区段,该二聚域包含具有根据EU编号之位置D/E356、K370及D399处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域;

b.编码二聚域之DNA区段,该二聚域包含具有位置E357、D399及K439处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域;

c.一或多个编码一或多个抗原结合域之DNA区段;和/或

d.视情况存在之一或多个编码一或多个连接子之DNA区段;

其中各核酸为DNA区段,其包含允许在独特位置组装至用于编码多肽链之DNA构筑体中的独特突出端。

136.如权利要求134或135的试剂盒,其中该二聚域进一步包含一或多个根据EU编号在对应于Y349、T350、L351、P352和/或S354之位置处的突变。

137.如权利要求134至136中任一项的试剂盒,其中该试剂盒系用于组装编码式Ia、式Ib或式Ic之多肽链的DNA构筑体。

138.如权利要求134至136中任一项的试剂盒，其中该试剂盒系用于组装编码式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII或式VIII之多肽链的DNA构筑体。

139.一种制备编码如权利要求1至88中任一项的多肽之核酸的方法，该方法包含共价组装一或多个编码人类抗体之二聚域的DNA区段及一或多个编码抗原结合域之DNA区段以及视情况存在之一或多个编码连接子之DNA区段，其中各DNA区段包含允许在独特位置处组装至用于编码多肽链之DNA构筑体中的独特突出端。

140.如权利要求139的方法，其中至少一个DNA区段编码天然抗体之二聚域。

141.如权利要求139的方法，其中至少一个DNA区段编码包含CH3域之突变二聚域，该CH3域包含有利于异二聚体形成之氨基酸取代。

142.如权利要求141的方法，其中根据EU编号，该等氨基酸取代包含位置D/E356、K370及D399处之氨基酸取代或位置E357、D399及K439处之氨基酸取代。

143.如权利要求141或142的方法，其中该二聚域进一步包含一或多个根据EU编号在对应于Y349、T350、L351、P352和/或S354之位置处的突变。

144.如权利要求139至143中任一项的方法，其中该核酸包含至少两个编码抗原结合域之DNA区段。

145.如权利要求139至143中任一项的方法，其中该核酸包含至少三个编码抗原结合域之DNA区段。

146.如权利要求139至143中任一项的方法，其中该核酸包含至少四个编码抗原结合域之DNA区段。

147.如权利要求139至146中任一项的方法，其中该核酸包含至少一个在编码二聚域之DNA区段之5'端及3'端中之每一者处编码抗原结合域的DNA区段。

148.如权利要求139至147中任一项的方法，其中该方法系用于组装编码式Ia、式Ib或式Ic之多肽链的核酸。

149.如权利要求139至146中任一项的方法，其中该方法系用于组装编码式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII或式VIII之多肽链的核酸。

150.一种制造如权利要求1至90中任一项的多肽或如权利要求98至120中任一项的蛋白质复合物的方法，该方法包含用藉由包含以下的方法制得之核酸转化细胞：共价组装一或多个编码人类抗体之二聚域的DNA区段及一或多个编码抗原结合域之DNA区段以及视情况存在之一或多个编码连接子之DNA区段，其中各DNA区段包含允许在独特位置处组装至用于编码多肽链之DNA构筑体中的独特突出端。

151.如权利要求150的方法，其中该DNA区段中之一或多者编码二聚域，该二聚域包含a)具有根据EU编号之位置D/E356、K370及D399处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域，或b)具有位置E357、D399及K439处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域。

152.如权利要求151的方法，其中一个DNA区段编码包含具有根据EU编号之位置D/E356、K370及D399处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域的二聚域，且另一DNA区段编码具有位置E357、D399及K439处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域。

153.如权利要求151或152的方法，其中该二聚域进一步包含一或多个根据EU编号在对应于Y349、T350、L351、P352和/或S354之位置处的突变。

多肽、蛋白质复合物及其制造方法

技术领域

[0001] 本发明大体上系关于多肽，该等多肽包含一或多个抗原结合域及允许将至少两个多肽链组装成多价和/或多特异性蛋白质复合物的二聚域。本发明之该等多肽及蛋白质复合物具有抗肿瘤活性。

背景技术

[0002] 骆驼及软骨鱼天然产生由功能性同二聚重链抗体(HCAb)构成之抗体(Hamers-Casterman等人,1993;Muyldermans及Smider,2016)。HCAb之重链缺乏第一恒定域(CH1)且与经典抗体之不同之处仅在于轻链配对通常涉及之一些氨基酸取代(Muyldermans等人,1994;Vu等人,1997)。此等取代(Val37Phe/Tyr、Gly44Glu、Leu45Arg及Trp47Gly)存在于构架区2(FR2)中。HCAb之抗原结合片段称作单域抗体(sdAb)、VHH或nanobody®。VHH具有约15kDa之分子量，使得其适于需要增强之组织渗透或快速清除的应用，诸如基于放射性同位素之成像。然而，对于治疗性应用，通常需要增加VHH半衰期以便将肾清除率降至最低及优化治疗功效(De Vlieger等人,Antibodies8(1),1-22,2019)。尽管已采用增加VHH半衰期之方法，诸如聚乙二醇化、N-糖基化、HSA或其他载体蛋白融合，但此类构筑体可引入免疫原性或成功率有限。

[0003] 已将VHH用作构筑嵌段来制得双特异性及多特异性抗体。在一些研究中，已显示二价构筑体具有相较于单价形式增加之亲合力或亲和力(Conrath等人,2001;Coppieters等人,2006;Hmila等人,2008;Simmons等人,2006及Hultberg等人,2011、Jähnichen等人(2010)、Fridy等人,2014)。

[0004] 多种基于VHH之治疗剂目前正处于研究后期或已受FDA批准。此等治疗剂包括针对抗原vWF的经批准用于血栓性血小板减少性紫癜(Thrombotic thrombocytopenic purpura)的二价单特异性抗体卡普拉珠单抗(Caplacizumab)(Duggan,2018)。针对RSV之三价纳米抗体复合物ALX-0171处于针对呼吸道合胞病毒感染之研发后期(Detallea等人,2015)。ALX-0061为针对抗原IL-6R但与HSA纳米抗体连接以延长半衰期的单价抗体，且处于针对RA及SLE适应症之临床研发阶段(Van Roy等人,2015)。研究性药物ALX-0761含有针对抗原IL-17A、IL-17F及HAS之三种纳米抗体且正研发用于牛皮癣(Svecova等人,2019)。抗RANKL ALX-0141为针对抗原RANKL之二价抗体且连接于HSA以延长半衰期(Schoen等人,2013)。奥利珠单抗(Ozoralizumab)为针对抗原TNFα之二价纳米抗体且连接于HSA以延长半衰期(Fleischmann等人,2012)。

[0005] 尽管有此等研发，仍需要结合多个目标且产生有效免疫反应之抗体样分子。

发明内容

[0006] 本申请人已产生多肽，其包含抗原结合域及允许组装两个多肽链以形成多价和/或多特异性蛋白质复合物的二聚域。

[0007] 本发明的多肽系由不同模块构成且包括针对其结合特异性目标之能力而选择的

抗原结合域。亦可针对其活体内和/或活体外功能特性或生物效应，包括例如其调节细胞过程(诸如基因表达、信号转导、细胞生长、细胞活力及其类似者)的能力来选择抗原结合域。

[0008] 抗原结合域经工程改造成单一多肽链以便用单个部分靶向不同细胞组分或不同细胞类型。多肽链可组装成蛋白质复合物，诸如二聚体，以强化其生物效应。因此可藉由投与单一多肽或蛋白质复合物物种来调节若干细胞过程。另外，同一分子内存在多个目标特异性抗原结合域可在由各抗原结合域定位之所有细胞聚集在一起时确保该等细胞最终经递送至同一位置。额外益处为以及时方式或几乎同时触发各种生物效应。

[0009] 此表示优于投与分开之抗体的显著优势，因为藉由单个部分考虑影响此类投与之结果的若干参数，包括剂量、投与时程、投与途径、药效学、药物动力学，而非分开地考虑各部分。如此，投与分开之抗体未必总是达成所需生物效应。

[0010] 此外，多肽链及蛋白质复合物适于与治疗剂或可侦测部分结合。

[0011] 本文揭示之多肽及蛋白质复合物之另一益处在于各种抗原结合域与其目标之结合可以协同方式发生。举例而言，给定单域抗体与其目标之结合可有助于其他各者之结合。

[0012] 基于本发明，本申请人已产生多肽及蛋白质复合物，其由靶向肿瘤和/或调节免疫检查点和/或募集免疫细胞之各种单域抗体构成。举例而言，在一些实施例中，该等多肽部分及蛋白质复合物系由靶向肿瘤之各种单域抗体构成。在一些实施例中，该等多肽部分及蛋白质复合物系由调节免疫检查点之各种单域抗体构成。在一些实施例中，该等多肽部分及蛋白质复合物系由募集免疫细胞之各种单域抗体构成。在一些实施例中，该等多肽部分及蛋白质复合物系由靶向肿瘤、调节免疫检查点及募集免疫细胞之各种单域抗体构成。

[0013] 本申请人证实本发明之多肽链单独或与化学疗法组合促进活体内临床前模型之肿瘤消退。

[0014] 另一优势在于本发明之多肽链有效地表达于细胞中。本文中所揭示之多肽链之型式允许达成公克/公升之范围内的蛋白质复合物产量。

[0015] 本申请人亦出人意料地发现一种制备具有优于单价多肽之各种有利特性的模块化、多功能、多特异性和/或多价多肽的方法，该等有利特性包括例如细胞靶向的增加之亲合力及增加之特异性。

[0016] 并入本发明之多肽中的VHH、单域Ab结合部分不需要用于抗原结合之轻链，相较于需要轻链之结合部分，其降低分子量、大小、复杂度及二硫键数目。此又具有各种优势，例如简化适合于抗癌疗法之量的制造。并入本发明之多肽中的CH2-CH3域适用于标准抗体纯化制程且赋予比VHH蛋白之半衰期长的全尺寸抗体半衰期。本发明之多肽之各链之不同大小简化异二聚体与同二聚体之间的区别且有助于简化此等抗体之制造。另一所需特性为在本发明之多肽之不同位置处使用的连接子。藉由选择未特别设计以易于由蛋白酶裂解的连接子，本发明克服多特异性抗体被破坏成否则将缺乏多特异性益处的其组分部分。

[0017] 本发明之多肽之另一优势为多肽之结构。此优势包括例如经由连接子及抗体优化克服当结合部分位于多肽之C端时的较低结合亲和力限制。额外优势包括例如CH2-CH3域与免疫系统之各种受体接合且强加结合部分之空间组织。空间组织克服端对端线性配置之结合部分之限制，在该限制下，随着结合部分数目增加，中间之分子之特性的控制变得更加困难。

[0018] 于多肽链内且甚至在将多肽链组装成二聚体蛋白质复合物后仍保留单域抗体之

功能特性。此外,即使在位于二聚域(例如Fc)之C端或如本文中所描述之其他模块之间时,仍保留单域抗体之功能特性。因此,在一些实施例中,当位于二聚域之C端时,本文中所描述之单域抗体保留功能。在一些实施例中,在位于模块之间时,本文中所描述之单域抗体保留功能。

[0019] 二聚域系基于天然抗体之CH2-CH3域或含有有利于异二聚体形成的独特CH3突变集合。

[0020] 因此产生的蛋白质复合物可包含至少三个、四个、五个、六个及更多个各自具有所需特异性之抗原结合域。在一些实施例中,多肽或蛋白质复合物之各抗原结合域能够呈单链结合其目标。

[0021] 此外,本申请人能够鉴别正面影响多肽或蛋白质复合物之活性的连接子及多肽构形。

[0022] 本申请人亦提供一种用于制造本发明之多肽的模块化系统。

[0023] 本文中所揭示之模块化系统系由各种DNA区段构成,该等DNA区段各自包含允许在独特位置组装至编码多肽链之DNA构筑体中的独特突出端。此系统之独特特征允许用户更换一或多个模块,以选择最佳候选者。

[0024] 因此,在一些态样及实施例中,本发明系关于一种多肽,其以N端至C端方式包含具有式Ia中所阐述之构形的氨基酸序列:

[0025] $X-[(Ab_a)-(L_b)]_m-(DD)-[(L_c)-(Ab_d)]_n-Y$

[0026] 其中m可为0、1或大于1之整数;

[0027] 其中n可为0、1或大于1之整数,其限制条件为m及n不同时为0;

[0028] 其中Ab_a、Ab_d可各独立地包含有包含抗体之一或多个互补决定区(CDR)的抗原结合域;

[0029] 其中X或Y可独立地存在或不存在且可包含氨基酸序列;

[0030] 其中L_b、L_c可各独立地包含一或多个连接子;且

[0031] 其中DD包含二聚域。

[0032] 在其他态样及实施例中,本发明系关于一种多肽,其以N端至C端方式包含具有式Ib中所阐述之构形的氨基酸序列:

[0033] $X-[(Ab_a)-(L_b)]m-(DD)-[(L_c)-(Ab_d)]_n-Y$

[0034] 其中m为0、1或大于1之整数;

[0035] 其中n为2或大于2之整数;

[0036] 其中Ab_a、Ab_d各独立地包含有包含抗体之一或多个互补决定区(CDR)的抗原结合域;

[0037] 其中X或Y独立地存在或不存在且包含氨基酸序列;

[0038] 其中L_b、L_c各独立地包含一或多个连接子;

[0039] 其中L_c不包含可裂解连接子;且

[0040] 其中DD包含二聚域。

[0041] 在一些实施例中,该多肽之该二聚域包含CH2域、CH3域或其组合。

[0042] 在一些实施例中,该二聚域包含天然IgG1 CH3域。

[0043] 在其他实施例中,该二聚域包含天然IgG4 CH3域。

[0044] 在其他实施例中，该二聚域包含相较于天然IgG之CH3域包含一或多个突变的CH3域。

[0045] 在一些实施例中，该二聚域为突变IgG1 CH3域。

[0046] 在其他实施例中，该二聚域为突变IgG4 CH3域。

[0047] 在一些实施例中，该二聚域为如本文中所定义之第一二聚域(DD_1)。因此，在一些实施例中，该二聚域为具有本文中所揭示之氨基酸序列的第一二聚域(DD_1)。

[0048] 在一些实施例中，该二聚域为如本文中所定义之第二二聚域(DD_2)。因此，在一些实施例中，该二聚域为具有本文中所揭示之氨基酸序列的第二二聚域(DD_2)。

[0049] 在一些实施例中，该二聚域包含有包含一或多个根据EU编号在对应于399、356和/或370的位置处之突变的CH3域。在其他实施例中，该二聚域包含有包含一或多个根据EU编号在对应于399、357和/或439的位置处之突变的CH3域。

[0050] 因此，在一些实施例中，该二聚域包含有包含一或多个根据EU编号在对应于D399、D/E356和/或K370的位置处之突变的CH3域。在其他实施例中，该二聚域包含有包含一或多个根据EU编号在对应于D399、E357和/或K439的位置处之突变的CH3域。

[0051] 在一些实施例中，该CH3域可包含位置356处的氨基酸取代。

[0052] 在一些实施例中，该CH3域可包含位置357处的氨基酸取代。

[0053] 在一些实施例中，该CH3域可包含位置370处的氨基酸取代。

[0054] 在一些实施例中，该CH3域可包含位置399处的氨基酸取代。

[0055] 在一些实施例中，该CH3域可包含位置439处的氨基酸取代。

[0056] 在一些实施例中，该二聚域包含具有位置399及356处之氨基酸取代的突变CH3域。在一些实施例中，该二聚域包含具有位置399及357处之氨基酸取代的突变CH3域。在一些实施例中，该二聚域包含具有位置399及370处之氨基酸取代的突变CH3域。在一些实施例中，该二聚域包含具有位置399及439处之氨基酸取代的突变CH3域。在一些实施例中，该二聚域包含具有位置356及370处之氨基酸取代的突变CH3域。在一些实施例中，该二聚域包含具有位置357及439处之氨基酸取代的突变CH3域。

[0057] 在一些实施例中，该二聚域包含具有位置D399、D/E356和/或K370或D399、E357和/或K439处之氨基酸取代及一或多个其他氨基酸取代的突变CH3域。

[0058] 在一些实施例中，根据EU编号，该突变CH3域中之该一或多个其他氨基酸取代可位于涵盖氨基酸残基349至355之区域中。

[0059] 在一些实施例中，根据EU编号，该突变CH3域中之该一或多个其他氨基酸取代可位于涵盖氨基酸残基394至395之区域中。

[0060] 在一些实施例中，根据EU编号，该突变CH3域中之该一或多个其他氨基酸取代可位于涵盖氨基酸349至355之区域中和/或涵盖氨基酸394至395之区域中。

[0061] 在一些实施例中，根据EU编号，该突变CH3域中之该一或多个其他氨基酸取代可处于对应于349、350、351、352、354、355、394和/或395的位置。

[0062] 在一些实施例中，根据EU编号，该突变CH3域中之该一或多个其他氨基酸取代可处于对应于Y349、T350、L351、P352、S354、R355或Q355、T394或P395之位置。

[0063] 在一些实施例中，该其他氨基酸取代系处于位置Y349。

[0064] 在一些实施例中，该其他氨基酸取代系处于位置T350。

[0065] 在一些实施例中,该其他氨基酸取代系处于位置L351。

[0066] 在一些实施例中,该其他氨基酸取代系处于位置P352。

[0067] 在一些实施例中,该其他氨基酸取代系处于位置S354。

[0068] 在一些实施例中,该其他氨基酸取代系处于位置R355。

[0069] 在一些实施例中,该其他氨基酸取代系处于位置Q355。

[0070] 在一些实施例中,该其他氨基酸取代系处于位置T394。

[0071] 在一些实施例中,该其他氨基酸取代系处于位置P395。

[0072] 在一些实施例中,该等其他氨基酸取代系处于位置Y349及S354。

[0073] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、D/E356、K370及Y349处之氨基酸取代。

[0074] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、D/E356、K370及T350处之氨基酸取代。

[0075] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、D/E356、K370及L351处之氨基酸取代。

[0076] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、D/E356、K370及P352处之氨基酸取代。

[0077] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、D/E356、K370及S354处之氨基酸取代。

[0078] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、D/E356、K370及R355处之氨基酸取代。

[0079] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、D/E356、K370及Q355处之氨基酸取代。

[0080] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、D/E356、K370及T394处之氨基酸取代。

[0081] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、D/E356、K370、Y349及S354处之氨基酸取代。

[0082] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、K439、E357及Y349处之氨基酸取代。

[0083] 在一些实施例中,该CH3域包含位置D399、E357、K439及T350处之氨基酸取代。

[0084] 在一些实施例中,该CH3域包含位置D399、E357、K439E及L351处之氨基酸取代。

[0085] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、K439、E357及P352处之氨基酸取代。

[0086] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、K439、E357及S354处之氨基酸取代。

[0087] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、K439、E357及R355处之氨基酸取代。

[0088] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、K439、E357及Q355处之突变。

[0089] 在一些实施例中,该CH3域可包含位置D399、K439、E357及P395处之氨基酸取代。

[0090] 在一些实施例中,该CH3域包含位置D399、E357、K439、Y349及S354处之氨基酸取代。

[0091] 在一些实施例中,位置Y349处之该氨基酸取代系选自Y349K、Y349D或Y349R。更特定言之,在一些实施例中,位置Y349处之该氨基酸取代为Y349K。在其他实施例中,位置Y349处之该氨基酸取代为Y349D。

[0092] 在一些实施例中,位置S354处之该氨基酸取代系选自S354K、S354D、S354W或S354M。更特定言之,在一些实施例中,位置S354处之该氨基酸取代为S354K。在其他实施例中,位置S354处之该氨基酸取代为S354D。在其他实施例中,位置S354处之该氨基酸取代为S354M。

[0093] 在一些实施例中,位置L351处之该氨基酸取代为L351Y、L351W、L351H、L351R、L351D、L351A、L351T。更特定言之,在一些实施例中,位置L351处之该氨基酸取代为L351Y。在其他实施例中,位置L351之该氨基酸取代为L351W。在其他实施例中,位置L351处之该氨基酸取代为L351R。

[0094] 在一些实施例中，位置T350处之该氨基酸取代为T350L、T350I或T350V。更特定言之，在一些实施例中，位置T350处之该氨基酸取代为T350I。在其他实施例中，位置T350处之该氨基酸取代为T350V。

[0095] 在一些实施例中，位置P352处之该氨基酸取代为P352Y、P352V、P352R、P352T、P352L、P352G、P352E、P352C、P352K或P352D。更特定言之，在一些实施例中，位置P352处之该氨基酸取代为P352R。在其他实施例中，位置P352处之该氨基酸取代为P352E。

[0096] 在一些实施例中，位置T394处之该氨基酸取代为T394N。

[0097] 在一些实施例中，位置P395处之该氨基酸取代为P395I。在其他实施例中，位置P395处之该氨基酸取代为P395G。在其他实施例中，位置P395处之该氨基酸取代为P395E。

[0098] 在一些实施例中，位置R355处之该氨基酸取代为R355K。在其他实施例中，位置R355处之该氨基酸取代为R355W。

[0099] 在一些实施例中，位置Q355处之该氨基酸取代为Q355K。在其他实施例中，位置Q355处之该氨基酸取代为Q355W。

[0100] 在其他态样及实施例中，本发明系关于一种多肽，其以N端至C端方式包含具有式Ic中所阐述之构形的氨基酸序列：

[0101] $X-[(Ab_a)-(L_b)]_m-(DD)-[(L_c)-(Ab_d)]_n-Y$

[0102] 其中m为0、1或大于1之整数；

[0103] 其中n为0、1或大于1之整数，其限制条件为m及n不同时为0；

[0104] 其中Ab_a、Ab_d各独立地包含有包含抗体之一或多个互补决定区(CDR)的抗原结合域；

[0105] 其中X或Y独立地存在或不存在且包含氨基酸序列；

[0106] 其中L_b、L_c各独立地包含一或多个连接子；

[0107] 其中DD包含二聚域，该二聚域包含：a)包含一或多个根据EU编号在对应于D399、D/E356和/或K370之位置处之突变的CH3域；或b)包含一或多个根据EU编号在对应于D399、E357和/或K439之位置处之突变的CH3域。

[0108] 在一些实施例中，该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E356Q及K370E。

[0109] 在其他实施例中，该CH3域包含根据EU编号之突变D399N、E357Q及K439E。

[0110] 在一些实施例中，该CH3域可包含突变D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及S354K。

[0111] 在一些实施例中，该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及L351W。

[0112] 在一些实施例中，该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及S354M。

[0113] 在一些实施例中，该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及T350I。

[0114] 在一些实施例中，该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及T350V。

[0115] 在一些实施例中，该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及P352R。

[0116] 在一些实施例中，该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及P352E。

[0117] 在一些实施例中，该CH3域可包含突变D399Q、D/E356Q及K370E。

[0118] 在一些实施例中，该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及L351Y。

[0119] 在一些实施例中，该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及L351H。

[0120] 在一些实施例中，该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及R355K。

[0121] 在一些实施例中，该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及Q355K。

[0122] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及S354K。

[0123] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及T350L。

[0124] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及T394N。

[0125] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及P352Y。

[0126] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及P352V。

[0127] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及P352T。

[0128] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及P352L。

[0129] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及P352G。

[0130] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及P352C。

[0131] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及L351T。

[0132] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、D/E356Q、K370E及L351A。

[0133] 在一些实施例中,该CH3域包含突变D399Q、E357Q、K439E、Y349D及S354D。

[0134] 在一些实施例中,该CH3域包含突变D399N、E357Q、K439E及L351R。

[0135] 在一些实施例中,该CH3域包含突变D399N、E357Q、K439E及L351Y。

[0136] 在一些实施例中,该CH3域包含突变D399N、E357Q、K439E及T350I。

[0137] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、E357Q、K439E及T350V。

[0138] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399Q、K439E、E357Q。

[0139] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、K439E、E357Q、S354K。

[0140] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、K439E、E357Q、S354W。

[0141] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、K439E、E357Q、Y349R。

[0142] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、K439E、E357Q、T350L。

[0143] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、K439E、E357Q、R355W。

[0144] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、K439E、E357Q、Q355W。

[0145] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、K439E、E357Q、P395I。

[0146] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、K439E、E357Q、P395G。

[0147] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、K439E、E357Q、P395E。

[0148] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、K439E、E357Q、P352K。

[0149] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、K439E、E357Q、P352D。

[0150] 在一些实施例中,该CH3域可包含突变D399N、K439E、E357Q、L351D。

[0151] 在一些实施例中,该多肽包含至少两个或至少三个抗原结合域及允许组装两个多肽链以形成多价和/或多特异性蛋白质复合物的二聚域。

[0152] 在一些实施例中,Lc包含不可裂解连接子。在其他实施例中,Lc由不可裂解连接子组成。

[0153] 在其中m为2或大于2之整数的一些实施例中,该等[(Ab_a)-(L_b)]单元相同。

[0154] 在其中m为2或大于2之整数的其他实施例中,多肽或蛋白质复合物之该等[(Ab_a)-(L_b)]单元不同。

[0155] 在其中m为大于2之整数的其他实施例中,多肽或蛋白质复合物之该等[(Ab_a)-(L_b)]单元可包含相同及不同单元。

[0156] 在其中n为2或大于2之整数的一些实施例中,该等[(L_c)-(Ab_d)]单元相同。

[0157] 在其中n为2或大于2之整数的其他实施例中，该等[(L_c)-(Ab_d)]单元不同。

[0158] 在其中n为2或大于2之整数的其他实施例中，该等[(L_c)-(Ab_d)]单元包含相同及不同单元。

[0159] 在实施例中，该一或多个连接子包含抗体或其抗原结合片段之铰链区。

[0160] 在一些实施例中，该铰链区系来自IgG1。

[0161] 在其他实施例中，该铰链区系来自IgG2。

[0162] 在其他实施例中，该铰链区系来自IgG4。

[0163] 在一些实施例中，该一或多个连接子中之每一者的长度独立地为至少5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸残基。

[0164] 在一些实施例中，该一或多个连接子中之每一者独立地为柔性连接子、螺旋状连接子或刚性连接子。

[0165] 在一些实施例中，该连接子Lc为刚性连接子。

[0166] 在一些实施例中，该一或多个连接子包含柔性连接子和/或刚性连接子。

[0167] 在一些实施例中，该柔性连接子为GS连接子。

[0168] 在一些实施例中，该柔性连接子包含GGGGS之一或多个单元。

[0169] 在一些实施例中，该柔性连接子包含GGGGS之至少2、3、4、5或更多个单元。

[0170] 在一些实施例中，该刚性连接子包含多个PA重复。

[0171] 在一些实施例中，该刚性连接子系选自PAPAPKA(SEQ ID NO:8)；APAPAPAPAPKA(SEQ ID NO:9)；APAPAPAPAPAPA PAPAPAPKA(SEQ ID NO:10)；或其组合。

[0172] 在一些实施例中，该螺旋状连接子包含EAAAK之一或多个单元。

[0173] 在一些实施例中，该螺旋状连接子系选自AEAAAKEAAAKA(SEQ ID NO:12)；AEAAAKEAAAKEAAAKA(SEQ ID NO:13)；AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA(SEQ ID NO:14)；或其组合。

[0174] 在一些实施例中，该二聚域包含与SEQ ID NO:27至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％一致的氨基酸序列。

[0175] 在一些实施例中，该二聚域进一步包含与SEQ ID NO:29至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％一致的氨基酸序列。

[0176] 在一些实施例中，m为2。

[0177] 在其他实施例中，m为3。

[0178] 在其他实施例中，m为4。

[0179] 在其他实施例中，m为5。

[0180] 在其他实施例中，m为大于5之整数。

[0181] 在一些实施例中，n为2。

[0182] 在其他实施例中，n为3。

[0183] 在额外实施例中，n为4。

[0184] 在其他实施例中，n为5。

[0185] 在其他实施例中，n为大于5之整数。

[0186] 在一些实施例中，该多肽包含式II：

[0187] X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y(式II)。

[0188] 在一些实施例中,该多肽包含式III:

[0189] X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式III)。

[0190] 在一些实施例中,该多肽包含式IV:

[0191] X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y(式IV)。

[0192] 在一些实施例中,该多肽包含式V:

[0193] X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式V)。

[0194] 在一些实施例中,该多肽包含式VI:

[0195] X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y(式VI)。

[0196] 在一些实施例中,该多肽包含式VII:

[0197] X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式VII)。

[0198] 在一些实施例中,该多肽包含式VIII:

[0199] X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y(式VIII)。

[0200] 在一些实施例中,L_{c1}为刚性连接子。

[0201] 在一些实施例中,L_{c2}为刚性连接子。

[0202] 在一些实施例中,L_{c3}为刚性连接子。

[0203] 在一些实施例中,L_{c1}及L_{c2}为刚性连接子。

[0204] 在一些实施例中,L_{c1}、L_{c2}及L_{c3}为刚性连接子。

[0205] 在实施例中,该抗原结合域为单域抗体(sdAb)。

[0206] 在实施例中,该抗原结合域为重链可变区(VH或VHH)。

[0207] 在一些实施例中,该VHH系来源于人类、小鼠、大鼠等。

[0208] 在一些实施例中,该VHH系来自能够表达骆驼化小鼠或大鼠VHH、来自其他物种(例如人类等)之VHH或来自其他物种之骆驼化VHH(例如骆驼化人类VHH等)的转殖基因小鼠或大鼠。

[0209] 在实施例中,该抗原结合域为轻链可变区(VL或VLL)。

[0210] 在实施例中,该抗原结合域为单链可变片段(ScFv)。

[0211] 在实施例中,该抗原结合域为V_{NAR}片段。

[0212] 在其他实施例中,该多肽之该等抗原结合域包含单域抗体(sdAb)、重链可变区(VH或VHH)、轻链可变区(VL或VLL)、单链可变片段(ScFv)和/或V_{NAR}片段之任何组合。

[0213] 在一些实施例中,该sdAb或VHH系来自骆驼科抗体。

[0214] 在实施例中,该骆驼科抗体系来自单峰驼、骆驼、骆马、羊驼等。

[0215] 在其他实施例中,该sdAb或VHH系来自软骨鱼抗体。

[0216] 在实施例中,该软骨鱼抗体为鲨鱼抗体。

[0217] 在一些实施例中,各个别抗原结合域特异性结合于不同抗原决定基。

[0218] 在其他实施例中,各个别抗原结合域特异性结合于不同抗原。

[0219] 在其他实施例中,各个别抗原结合域特异性结合于不同蛋白质。

[0220] 在一些实施例中,该多肽包含至少一个结合于由肿瘤表达之蛋白质的抗原结合

域。在其他实施例中，该多肽包含至少一个结合于由肿瘤表达且调节其活性之蛋白质的抗原结合域。

[0221] 在一些实施例中，该多肽包含至少一个结合于免疫检查点蛋白之抗原结合域。在其他实施例中，该多肽包含至少一个结合于免疫检查点蛋白且调节其活性的抗原结合域。

[0222] 在一些实施例中，该多肽包含至少一个结合于免疫细胞蛋白质之抗原结合域。在其他实施例中，该多肽包含至少一个结合于免疫细胞蛋白质且调节其活性的抗原结合域。在其他实施例中，该多肽包含至少一个结合于或接合且募集或重引导免疫细胞的抗原结合域。

[0223] 在一些实施例中，该多肽包含至少一个结合于周边血液单核细胞(PBMC)的抗原结合域。在其他实施例中，该多肽包含至少一个结合于PBMC且调节其活性的抗原结合域。在其他实施例中，该多肽包含至少一个结合于PBMC且募集或重引导PBMC的抗原结合域。

[0224] 在一些实施例中，该多肽包含至少一个结合于T细胞蛋白质之抗原结合域。在其他实施例中，该多肽包含至少一个结合于T细胞蛋白质且调节其活性的抗原结合域。在其他实施例中，该多肽包含至少一个结合于T细胞蛋白质且募集或重引导T细胞的抗原结合域。

[0225] 在一些实施例中，该多肽包含至少一个结合于由肿瘤表达之蛋白质的抗原结合域及至少一个结合且募集或重引导免疫细胞的抗原结合域。

[0226] 在一些实施例中，该多肽包含至少一个结合于由肿瘤表达之蛋白质的抗原结合域、至少一个结合于免疫检查点蛋白之抗原结合域及至少一个结合且募集或重引导免疫细胞的抗原结合域。

[0227] 在一些实施例中，该多肽包含至少一个调节免疫检查点抑制剂的抗原结合域。

[0228] 在一些实施例中，该多肽包含至少一个结合于肿瘤抗原的抗原结合域、至少一个结合于免疫检查点蛋白的抗原结合域及至少一个结合于T细胞的抗原结合域。

[0229] 在一些实施例中，该多肽包含至少一个结合于肿瘤抗原的抗原结合域、至少一个结合于免疫检查点蛋白的抗原结合域及至少一个结合于CD3的抗原结合域。

[0230] 在一些实施例中，该多肽包含至少一个调节CD3功能的抗原结合域。

[0231] 在一些实施例中，该多肽包含特异性结合于受体的抗原结合域。

[0232] 在实施例中，该受体为G蛋白偶合受体。

[0233] 在实施例中，该G蛋白偶合受体为多巴胺受体。

[0234] 在一些实施例中，该多巴胺受体为多巴胺受体D1(DRD1)、多巴胺受体D2(DRD2)、多巴胺受体D3(DRD3)、多巴胺受体D4(DRD4)或多巴胺受体D5(DRD5)。

[0235] 在一些实施例中，该多肽包含特异性结合于肿瘤抗原的抗原结合域及特异性结合于免疫调节剂的抗原结合域。

[0236] 在一些实施例中，特异性结合于肿瘤抗原之该抗原结合域在该二聚域之N端，且特异性结合于免疫调节剂之该抗原结合域在该二聚域之C端。

[0237] 在一些实施例中，该免疫调节剂为免疫检查点蛋白、细胞因子、趋化因子或免疫受体或辅助受体。

[0238] 在一些实施例中，该多肽包含一或多个特异性结合于以下之抗原结合域：CD36、DRD1、DRD2、DRD3、DRD4、DRD5、PD-L1、TROP2、CD147、MCT1、IL1RAP、AMIGO2、PTK7、MCT2、MCT4、NHE1、H+/K+-ATP酶、LAP、HLA-I A2、CD73、CD98、CEACAM5/6、ICAM-1、MCSP、纤维结合蛋白、β1

整合素、四跨膜蛋白8(Tetraspanin 8)、CD164、CD59、CD63、CD44、CD166、cWF、TNF、IL-17A、IL17-F、IL-6R、BCMA、TNF、RANKL、ADAMTS5、VEGF、Ang2、CX_3CR1、CXCR4、TfR1(CD71)、CXCR2、CD3、PD1、PDL-1、CTLA-4、CD8、LAG-3、OX40、CD27、CD122/IL2RB、TLR8/CD288、TIM-3、ICOS/CD278、NKG2A、A2AR、B7-H3、GITR/TNFRSF18、4-IBB/CD137、KIR2DL1、KIR3DL2、SIRPα、CD47、VISTA、CD40、CD112、CD96、TOGOT、BTLA、TIGIT、LAG-3、CD4、VEGFR2、CD19、IGFR1、EpCAM、EGFR、DLL3、CGRP、CD79b、CD28、CCR5、ErbB3、ErbB2、TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3、TGFβR1、TGFβR2、IDO1、IDO2、TLR-4、TLR-7、TLR-8、TLR-9、SARS-CoV-1刺突蛋白、SARS-CoV-2刺突蛋白或其组合。

[0239] 在一些实施例中,该多肽包含一或多个在二聚域N端的抗原结合域,其特异性结合于CD36、DRD1、DRD2、DRD3、DRD4、DRD5、PD-L1、TROP2、CD147、MCT1、IL1RAP、AMIGO2、PTK7、MCT2、MCT4、NHE1、H+/K+-ATP酶、LAP、HLA-I A2、CD73、CD98、CEACAM5/6、ICAM-1、MCSP、纤维结合蛋白、β1整合素、四跨膜蛋白8、CD164、CD59、CD63、CD44、CD166、cWF、TNF、IL-17A、IL17-F、IL-6R、BCMA、TNF、RANKL、ADAMTS5、VEGF、Ang2、CX_3CR1、CXCR4、TfR1(CD71)、CXCR2、VEGFR2、CD19、IGFR1、EpCAM、EGFR、DLL3、CGRP、CD79b、CD28、CCR5、ErbB3、ErbB2、TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3、TGFβR1-TGFβR2、IDO1、IDO2、TLR-4、TLR-7、TLR-8、TLR-9或其组合。

[0240] 在一些实施例中,多肽包含一或多个在二聚域N端的抗原结合域,其特异性结合于CD36、DRD1、DRD2、PD-L1或TROP2。

[0241] 在一些实施例中,该多肽包含一或多个在二聚域C端的抗原结合域,其特异性结合于CD3、PD1、PDL-1、CTLA-4、CD8、LAG-3、OX40、CD27、CD122/IL2RB、TLR8/CD288、TIM-3、ICOS/CD278、NKG2A、A2AR、B7-H3、GITR/TNFRSF18、4-IBB/CD137、KIR2DL1、KIR3DL2、SIRPα、CD47、VISTA、CD40、CD112、CD96、TOGOT、BTLA、TIGIT、LAG-3、CD4或其组合。

[0242] 在一些实施例中,该多肽包含一或多个在二聚域C端的抗原结合域,其特异性结合于CD3、PD1、CTLA-4、CD8、LAG-3、OX40、CD27、CD122/IL2RB、TLR8/CD288、Tim3、ICOS/CD278、NKG2A、A2AR、B7-H3、GITR/TNFRSF18、4-IBB/CD137、KIR2DL1、KIR3DL2、SIRPα、CD47、VISTA、CD40、CD112、CD96、TOGOT、BTLA或CD4。

[0243] 本文中应理解,给定抗原结合域可结合于存在于不同蛋白质中之抗原决定基。如此,在一些实施例中,抗原结合域或多肽或包含多肽之蛋白质复合物可结合于超过一种蛋白质。在一些实施例中,抗原结合域或多肽或包含多肽之蛋白质复合物可对超过一种蛋白质具有亲和力。

[0244] 在一些实施例中,多肽包含一或多个结合病毒抗原之抗原结合域。在一些实施例中,该病毒抗原包括来自包膜病毒之蛋白质。在一些实施例中,该病毒抗原包括病毒糖蛋白。在一些实施例中,该病毒抗原包括刺突蛋白。

[0245] 在一些实施例中,该多肽包含一或多个结合SARS-CoV蛋白之抗原结合域。举例而言,该多肽可包含一或多个结合于SARS-CoV-1刺突蛋白之抗原结合域。举例而言,该多肽可包含一或多个结合于SARS-CoV-2刺突蛋白之抗原结合域。

[0246] 在一些实施例中,该多肽包含至少两个在二聚域C端的抗原结合域,其分别特异性结合于CD3及PD1。

[0247] 在一些实施例中,该等抗原结合域中之一或多者经人类化。

[0248] 在一些实施例中,X或Y系独立地选自由以下组成之群:连接子、细胞因子、趋化因

子、标签、掩蔽域、噬菌体鞘蛋白(pIII、pVI、pV、pVII或pIX)、抗原结合域或其组合。

[0249] 在一些实施例中,该多肽系与治疗部分、可侦测部分或允许延长半衰期之蛋白质结合或系连接于纳米粒子。

[0250] 本发明之其他态样及实施例系关于一种医药组合物,其包含本文中所揭示之多肽及医药学上可接受之载剂。

[0251] 本发明之其他态样及实施例系关于一种核酸,其编码本文中所揭示之多肽或多肽链。

[0252] 在其他态样及实施例中,本发明系关于一种核酸,其编码包括本文中所揭示之抗原结合域、二聚域、连接子或其组合的个别模块。该核酸可呈如本文中所揭示之DNA区段形式。

[0253] 本发明之额外态样及实施例系关于一种载体,其包含本文中所揭示之核酸。

[0254] 本发明之其他态样及实施例系关于一种细胞,其表达本文中所揭示之多肽。

[0255] 本发明之额外态样及实施例系关于一种细胞,其包含本文中所揭示之核酸或载体。

[0256] 本发明之其他态样及实施例系关于一种试剂盒,其包含本文中所揭示之多肽。

[0257] 本发明之其他态样及实施例系关于一种试剂盒,其包含本文中所揭示之核酸、载体或细胞。

[0258] 在其他态样及实施例中,本发明系关于一种蛋白质复合物,其包含本文中所揭示之第一多肽链及第二多肽链。在一些实施例中,该第一及第二多肽相同或不同。在一些实施例中,该第一及第二多肽包含相同或不同氨基酸序列。

[0259] 在一些实施例中,该蛋白质复合物系由多肽链制得,该等多肽链包括一个在二聚域之N端之抗原结合域及一个或两个在C端之抗原结合域。

[0260] 本发明之蛋白质复合物可包含两个靶向不同免疫调节剂之抗原结合域。

[0261] 在一些实施例中,该等多肽链包括一个肿瘤靶向抗原结合域及两个结合不同免疫调节剂之抗原结合域,从而产生六价及三特异性蛋白质复合物。当两个此类多肽链包含有助于异二聚体形成之CH3域时,可获得六价及六特异性蛋白质复合物。

[0262] 在其他态样及实施例中,本发明系关于一种蛋白质复合物,其包含:a)第一多肽,该第一多肽包含一或多个抗原结合域及第一二聚域(DD_1),该第一二聚域包含有包含一或多个根据EU编号在对应于399、356和/或370之位置处之突变的CH3域;及b)第二多肽,该第二多肽包含一或多个抗原结合域及第二二聚域(DD_2),该第二二聚域包含有包含一或多个根据EU编号在对应于399、357和/或439之位置处之突变的CH3域,其中该第一及第二多肽形成二聚体。

[0263] 在其他态样及实施例中,本发明系关于一种蛋白质复合物,其包含:a)第一多肽,该第一多肽包含一或多个抗原结合域及第一二聚域(DD_1),该第一二聚域包含有包含一或多个根据EU编号在对应于D399、D/E356和/或K370之位置处之突变的CH3域,及b)第二多肽,该第二多肽包含一或多个抗原结合域及第二二聚域(DD_2),该第二二聚域包含有包含一或多个根据EU编号在对应于D399、E357和/或K439之位置处之突变的CH3域,其中该第一及第二多肽形成二聚体。

[0264] 在一些实施例中,该第一二聚域(DD_1)和/或第二二聚域(DD2)包含有包含根据EU

编号在对应于349、350、351、352、354、355、394和/或395之位置处之其他突变的CH3域。

[0265] 在其他实施例中，该第一二聚域(DD_1)和/或第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号在对应于Y349、T350、L351、P352、S354、R355或Q355、T394和/或P395之位置处之其他突变的CH3域。

[0266] 在一些实施例中，该其他突变系在第一二聚域中之位置Y349处。

[0267] 在一些实施例中，该其他突变系在第一二聚域中之位置T350处。

[0268] 在一些实施例中，该其他突变系在第一二聚域中之位置L351处。

[0269] 在一些实施例中，该其他突变系在第一二聚域中之位置P352处。

[0270] 在一些实施例中，该其他突变系在第一二聚域中之位置S354处。

[0271] 在一些实施例中，该其他突变系在第一二聚域中之位置R355处。

[0272] 在一些实施例中，该其他突变系在第一二聚域中之位置Q355处。

[0273] 在一些实施例中，该等其他突变系在第一二聚域中之位置Y349及S354处。

[0274] 在一些实施例中，该其他突变系在第二二聚域中之位置Y349处。

[0275] 在一些实施例中，该其他突变系在第二二聚域中之位置T350处。

[0276] 在一些实施例中，该其他突变系在第二二聚域中之位置L351处。

[0277] 在一些实施例中，该其他突变系在第二二聚域中之位置P352处。

[0278] 在一些实施例中，该其他突变系在第二二聚域中之位置S354处。

[0279] 在一些实施例中，该其他突变系在第二二聚域中之位置R355处。

[0280] 在一些实施例中，该其他突变系在第二二聚域中之位置Q355处。

[0281] 在一些实施例中，该其他突变系在第二二聚域中之位置P395处。

[0282] 在一些实施例中，该等其他突变系在第二二聚域中之位置Y349及S354处。

[0283] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q及K370E的CH3域，且第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q及K439E的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q及K370E的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q及K439E的CH3域。

[0284] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及S354K的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、E357Q、K439E、Y349D及S354D的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及S354K的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、E357Q、K439E、Y349D及S354D的CH3域。

[0285] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351W的CH3域，且第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351W的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。

[0286] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及S354M的CH3域，且第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、

E357Q、K439E及L351Y的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及S354M的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351Y的CH3域。

[0287] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350I的CH3域，且第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350I的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350I的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350I的CH3域。

[0288] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350V的CH3域，且第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350V的CH3域。在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350V的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350V的CH3域。

[0289] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352R的CH3域，且第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352R的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。

[0290] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352E的CH3域，且第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352E的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。

[0291] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、D/E356Q及K370E的CH3域，且第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、E357Q及K439E的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、D/E356Q及K370E的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、E357Q及K439E的CH3域。

[0292] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351Y的CH3域，且第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及S354K的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351Y的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及S354K的CH3域。

[0293] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351H的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及S354W的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351H的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及S354W的CH3域。

[0294] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/

E356Q、K370E及R355K的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及Y349R的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及R355K的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及Y349R的CH3域。

[0295] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及Q355K的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及Y349R的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及Q355K的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及Y349R的CH3域。

[0296] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及S354K的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350L的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及S354K的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350L的CH3域。

[0297] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350L的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及R355W的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350L的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及R355W的CH3域。

[0298] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350L的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及Q355W的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350L的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及Q355W的CH3域。

[0299] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T394N的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P395I的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T394N的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P395I的CH3域。

[0300] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T394N的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P395G的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T394N的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P395G的CH3域。

[0301] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T394N的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P395E的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T394N的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P395E的CH3域。

[0302] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352Y的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352Y的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。

[0303] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352V的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352V的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。

[0304] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352T的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352T的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。

[0305] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352R的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352R的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。

[0306] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352R的CH3域，且第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352D的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352R的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352D的CH3域。

[0307] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352L的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352L的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。

[0308] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352G的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352G的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。

[0309] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352C的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352C的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域

(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。

[0310] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352C的CH3域，且第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352D的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352C的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352D的CH3域。

[0311] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351T的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351T的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及P352K的CH3域。

[0312] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351A的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351A的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。

[0313] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352Y的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q及K439E的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352Y的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q及K439E的CH3域。

[0314] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及S354K的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q及K439E的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及S354K的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q及K439E的CH3域。

[0315] 在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及S354K的CH3域，且该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、E357Q、K439E及L351R的CH3域。因此，在一些实施例中，该第一二聚域(DD_1)包含有包含根据EU编号之突变D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及S354K的CH3域。在一些实施例中，该第二二聚域(DD_2)包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。

[0316] 在一些实施例中，该蛋白质复合物可由第一多肽及第二多肽构成，该第一多肽包含具有本文中所揭示之任一氨基酸序列的第一二聚域(DD_1)，该第二多肽包含具有本文中所揭示之任一氨基酸序列的第二二聚域(DD_2)。

[0317] 在一些实施例中，蛋白质复合物之第一及第二多肽各独立地以N端至C端方式包含式Ia之氨基酸序列：

[0318] $X-[(Ab_a)-(L_b)]_m-(DD)-[(L_c)-(Ab_d)]_n-Y$

[0319] 其中m为0、1或大于1之整数；

[0320] 其中n为0、1或大于1之整数，其限制条件为m及n不同时为0；

[0321] 其中Ab_a、Ab_d各独立地包含有包含抗体之一或多个互补决定区(CDR)的抗原结合域；

[0322] 其中X或Y独立地存在或不存在且包含氨基酸序列；

[0323] 其中L_b、L_c各独立地包含一或多个连接子；且

[0324] 其中DD为该第一多肽中之该第一二聚域(DD_1)及该第二多肽中之该第二二聚域(DD_2)。

[0325] 在一些实施例中，第一及第二多肽各独立地为本文中所揭示之多肽。

[0326] 在一些实施例中，第一及第二多肽各独立地为具有式III之多肽，且二聚域为天然二聚域。

[0327] 在一些实施例中，第一及第二多肽各独立地为具有式III之多肽，且二聚域为突变二聚域。

[0328] 在一些实施例中，第一多肽包含式II且第二多肽包含式III，且二聚域为天然二聚域。

[0329] 在一些实施例中，第一多肽包含式II且第二多肽包含式III，且二聚域为突变二聚域。

[0330] 在一些实施例中，蛋白质复合物为多特异性的。

[0331] 在一些实施例中，蛋白质复合物为双特异性、三特异性或四特异性的。

[0332] 在一些实施例中，蛋白质复合物之第一及第二多肽具有相同价数及特异性。

[0333] 在一些实施例中，蛋白质复合物之第一及第二多肽具有不同价数及特异性。

[0334] 在一些实施例中，蛋白质复合物为双特异性抗体，且视情况，第一及第二多肽各为抗体重链。

[0335] 在一些实施例中，双特异性抗体进一步包含第一抗体轻链及第二抗体轻链。

[0336] 在其他态样及实施例中，本发明系关于一种组合物，其包含本文中所揭示之蛋白质复合物。

[0337] 在其他态样及实施例中，本发明系关于一种组合物，其包含单体、二聚体及其混合物。

[0338] 在一些实施例中，超过70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％之第一及第二多肽以二聚体之形式存在于组合物中。

[0339] 在一些实施例中，超过70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％之第一及第二多肽以同二聚体之形式存在于组合物中。

[0340] 在一些实施例中，超过70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％之第一及第二多肽以异二聚体之形式存在于组合物中。

[0341] 在额外态样及实施例中，本发明系关于一种治疗病症或疾病的方法，其包含投与本文中所揭示之多肽。

[0342] 在其他态样及实施例中，本发明系关于一种治疗病症或疾病的方法，其包含投与本文中所揭示之蛋白质复合物。

[0343] 在其他态样及实施例中，本发明系关于一种治疗病症或疾病的方法，其包含投与本文中所揭示的组合物。

[0344] 在一些实施例中，该病症或疾病为癌症。

[0345] 在一些实施例中，该病症或疾病为感染。

[0346] 在一些实施例中，该病症或疾病为免疫失调。

[0347] 在其他态样及实施例中，本发明系关于一种制造蛋白质复合物的方法，该方法包含用一或多个包含本文中所揭示之核酸之载体转化细胞。

[0348] 在一些实施例中，该方法可进一步包含自杂质分离和/或纯化多肽复合物。

[0349] 在其他实施例中，该方法可进一步包含自单体和/或同二聚体分离和/或纯化异二聚体。

[0350] 在其他实施例中，该方法可进一步包含自单体和/或异二聚体分离和/或纯化同二聚体。

[0351] 在其他态样及实施例中，本发明系关于一种试剂盒，其在同一个或分开之小瓶中包含一或多种编码本文中所揭示之二聚域的核酸、一或多种编码抗原结合域之核酸及视情况存在之一或多种编码连接子之核酸。在一些实施例中，该二聚域系来自人类抗体。

[0352] 在一些实施例中，各核酸为载体。

[0353] 在其他实施例中，各核酸为DNA区段，其包含允许在独特位置组装至用于编码多肽链之DNA构筑体中的独特突出端。

[0354] 在一些实施例中，一或多种编码二聚域之核酸包含具有根据EU编号之位置356、357、370、399和/或439处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域。

[0355] 在一些实施例中，二聚域包含具有位置356、357、370、399和/或439处之氨基酸取代及对应于349、350、351、352、354、355、394和/或395之位置处之其他氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域。

[0356] 在一些实施例中，二聚域包含具有位置D/E356、E357、K370、D399和/或K439处之氨基酸取代及在对应于Y349、T350、L351、P352、S354、R355或Q355、T394和/或P395之位置处之其他氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域。

[0357] 更特定言之，在一些例示性实施例中，二聚域包含具有位置D/E356、E357、K370、D399和/或K439处之氨基酸取代及在对应于Y349、T350、L351、P352和/或S354之位置处之其他氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域。

[0358] 在一些实施例中，核酸各自为DNA区段，且试剂盒在同一个或分开之小瓶中包含：

[0359] a)编码二聚域之DNA区段，该二聚域包含具有根据EU编号之位置356、370及399处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域；

[0360] b)编码二聚域之DNA区段，该二聚域包含具有位置357、399及439处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域；

[0361] c)一或多个编码一或多个抗原结合域之DNA区段；及

[0362] d)视情况存在之一或多个编码一或多个连接子之DNA区段；

[0363] 其中各核酸为DNA区段，其包含允许在独特位置组装至用于编码多肽链之DNA构筑体中的独特突出端。

[0364] 在一些实施例中，该试剂盒系用于组装编码式Ia、式Ib或式Ic之多肽链的DNA构筑体。

[0365] 在其他实施例中，该试剂盒系用于组装编码式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII或式VIII之多肽链的DNA构筑体。

[0366] 在其他态样及实施例中，本发明系关于一种制造编码本文中所揭示之多肽之核酸的方法，该方法包含共价组装一或多个编码人类抗体之二聚域的DNA区段及一或多个编码抗原结合域之DNA区段以及视情况存在之一或多个编码连接子之DNA区段，其中各DNA区段包含允许在独特位置处组装至用于编码多肽链之DNA构筑体中的独特突出端。

[0367] 在一些实施例中，至少一个DNA区段编码天然抗体之二聚域。

[0368] 在一些实施例中，至少一个DNA区段编码包含CH3域之突变二聚域，该CH3域包含有助于异二聚体形成之氨基酸取代。

[0369] 在一些实施例中，至少一个DNA区段编码如本文中所描述之二聚域(DD)。

[0370] 在一些实施例中，至少一个DNA区段编码具有本文中所揭示之氨基酸序列的第一二聚域(DD_1)。

[0371] 在一些实施例中，至少一个DNA区段编码具有本文中所揭示之氨基酸序列的第二二聚域(DD_2)。

[0372] 在一些实施例中，该氨基酸取代包含位置356、370及399处之氨基酸取代。

[0373] 在一些实施例中，该氨基酸取代包含根据EU编号之位置357、399及439处的氨基酸取代。

[0374] 在一些实施例中，该DNA区段编码包含位置356、370及399处之氨基酸取代及视情况存在之选自349、350、351、352、354、355、394和/或395之位置处之其他突变的突变二聚域。因此，在一些实施例中，该DNA区段编码包含位置356处之氨基酸取代的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码包含位置370处之氨基酸取代的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码包含位置399处之氨基酸取代的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码包含位置356、370及399处之氨基酸取代的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置349处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置350处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置351处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置352处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置354处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置355处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置394处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置395处之突变的突变二聚域。

[0375] 在一些实施例中，该DNA区段编码包含位置357、399及439处之氨基酸取代及视情况存在之选自349、350、351、352、354、355、394和/或395之位置处之其他突变的突变二聚域。

[0376] 因此，在一些实施例中，该DNA区段编码包含位置357处之氨基酸取代的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码包含位置399处之氨基酸取代的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码包含位置439处之氨基酸取代的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码包含位置357、399及439处之氨基酸取代的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置349处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置350处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置351处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置352处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置354处之突变的突变

二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置355处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置394处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置395处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该核酸包含至少两个编码抗原结合域之DNA区段。

[0377] 在一些实施例中，该核酸包含至少三个编码抗原结合域之DNA区段。

[0378] 在一些实施例中，该核酸包含至少四个编码抗原结合域之DNA区段。

[0379] 在一些实施例中，该核酸包含至少一个在编码二聚域之DNA区段之5'端及3'端中之每一者处编码抗原结合域的DNA区段。

[0380] 在其他态样及实施例中，本发明系关于一种制造本文中所揭示之多肽或蛋白质复合物的方法，该方法包含用藉由包含以下之方法制得之核酸转化细胞：共价组装一或多个编码人类抗体之二聚域的DNA区段及一或多个编码抗原结合域之DNA区段以及视情况存在之一或多个编码连接子之DNA区段，其中各DNA区段包含允许在独特位置处组装至用于编码多肽链之DNA构筑体中的独特突出端。

[0381] 在一些实施例中，DNA区段中之一或多者编码二聚域，该二聚域包含a)具有根据EU编号之位置356、370及399处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域或b)具有位置357、399及439处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域。

[0382] 在一些实施例中，一个DNA区段编码包含具有根据EU编号之位置356、370及399处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域的二聚域，且另一DNA区段编码具有位置357、399及439处之氨基酸取代的人类IgG1之突变CH3域。

[0383] 在一些实施例中，突变CH3域包含一或多个选自349、350、351、352、354、355、394和/或395之位置处的其他氨基酸取代。因此，在一些实施例中，突变CH3域包含位置349处之其他氨基酸取代。在一些实施例中，突变CH3域包含位置350处之其他氨基酸取代。在一些实施例中，突变CH3域包含位置351处之其他氨基酸取代。在一些实施例中，突变CH3域包含位置352处之其他氨基酸取代。在一些实施例中，突变CH3域包含位置354处之其他氨基酸取代。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置355处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置394处之突变的突变二聚域。在一些实施例中，该DNA区段编码进一步包含位置395处之突变的突变二聚域。

[0384] 本发明之其他范畴、可应用性及优势将自在下文中给出之非限定性详细描述显而易见。然而，应理解，此详细描述虽然指示本发明之例示性实施例，但仅参考随附图式以实例方式给出。

附图说明

[0385] 图1：表示本文中所揭示之例示性多价蛋白质之模块设计及组装的示意图。VHH可经选择且与连接子及二聚域组合形成多价和/或多特异性多肽二聚体。

[0386] 图2A至图2B：表示本发明之包含三个VHH域的多肽之例示性构形的示意图，该等多肽展示为单体(图2A)或呈对称同二聚体形式或异二聚体形式之蛋白质二聚体(图2B)。

[0387] 图3A至图3C：装载有含有多肽KB001(图3A)、KB003及KB004(图3B)或KB005(图3C)之上清液的在还原条件下进行的4-12％Bis-Tris梯度SDS-PAGE凝胶的图像。使用牛血清白蛋白(BSA)之连续稀释液作为内参考物。使用GelCode™染色试剂将凝胶染色以使蛋白质可

视化。

[0388] 图4A至图4B:装载有含有表达于哺乳动物细胞中之多肽KB007及KB008(图4A)或KB009及KB010(图4B)之上清液的在还原条件下进行的4-12%Bis-Tris梯度SDS-PAGE凝胶的图像。使用牛血清白蛋白(BSA)之连续稀释液作为内参考物。使用GelCode™染色试剂将凝胶染色以使蛋白质可视化。

[0389] 图5A及图5B:使用4-12%Bis-Tris梯度SDS-PAGE凝胶的非还原条件下的装载有含有多肽KB012、KB013及KB011之上清液的4-12%Bis-Tris梯度SDS-PAGE凝胶之图像(图5A)。使用牛血清白蛋白(BSA)之连续稀释液作为内参考物。在非还原及还原条件下运行的装载有2μg KB012、KB013及KB011的8%Tris-Glycine SDS-PAGE凝胶之图像(图5B)。使用GelCode™染色试剂将凝胶染色以使蛋白质可视化。

[0390] 图6A及图6B:在非还原条件下(图6A)或在还原条件下(图6B)使用含有2μg经纯化多肽KB001、KB003、KB004或KB005之样本进行的8%Tris-Glycine SDS-PAGE凝胶之图像。使用GelCode™染色试剂将凝胶染色以使蛋白质可视化。

[0391] 图6C:汇总多肽KB001、KB003、KB004或KB005之生产产量、等电点(pI)及分子量(MW)的表格。

[0392] 图6D及图6E:在非还原条件下(图6D)或在还原条件下(图6E)的装载有2μg经纯化多肽KB008、KB009或KB007的8%Tris-Glycine SDS-PAGE凝胶之图像。使用GelCode™染色试剂将凝胶染色以使蛋白质可视化。

[0393] 图6F:汇总多肽KB008、KB009或KB007之生产产量、等电点(pI)及分子量(MW)的表格。

[0394] 图7:表示由KB017多肽(阴性对照)、KB019多肽或KB015多肽制得之二聚体与Jurkat细胞之流动式细胞测量术结合数据的直方图。

[0395] 图8A至图8B:表示获自KB019多肽(图8A)及KB015多肽(图8B)之同二聚体的示意图。

[0396] 图8C至图8D:表示藉由将人类PBMC与OCI-AML3及由KB017及KB019多肽制得之二聚体(图8C)或与由KB017、KB019及KB015多肽制得之二聚体(图8D)一起培育48小时来进行的PBMC依赖性细胞毒性分析之数据的图表。

[0397] 图9A:表示在48小时时分析的在具有由KB015、KB016或KB018多肽制得之二聚体之情况下对OCI-AML3细胞进行之PBMC依赖性细胞毒性分析之数据的曲线图。

[0398] 图9B:表示藉由在由KB074、KB075、KB076及KB078多肽制得之二聚体存在下将人类PBMC与OCI-AML3细胞一起培育48小时而进行的细胞毒性分析之数据第曲线图。

[0399] 图10:表示在具有由KB020、KB021、KB022、KB015、KB023多肽制得之二聚体或具有抗体Fc融合体KB045、KB046及KB033之组合的情况下对THP-1细胞进行的细胞毒性分析之数据的曲线图。

[0400] 图11A:展示经选择用于连接子修饰之位置的示意图。

[0401] 图11B至图11C:展示不同蛋白质二聚体与人类重组蛋白PD-1之结合曲线的直方图及图表。

[0402] 图12A:展示经选择用于连接子修饰之位置的示意图。

[0403] 图12B至图12C:展示不同蛋白质二聚体与重组蛋白PD-1之结合的直方图及图表。

[0404] 图13A:表示由KB001、KB003、KB004、KB005或KB017多肽制得之二聚体与DRD2蛋白脂质体或与空脂质体之结合的曲线图。

[0405] 图13B:表示由KB007、KB008、KB009或KB017多肽制得之二聚体与DRD1蛋白脂质体或与空脂质体之结合的曲线图。

[0406] 图14A至图14B:展示以1:10之比率且在具有浓度为10μg/mL的由KB015、KB018、KB001、KB003、KB004或KB005多肽制得之二聚体的情况下与人类PBMC一起培育的NCI-H510细胞(图14A)或NCI-H69细胞(图14B)之活力的直方图。

[0407] 图14C:展示以1:10之比率且在具有浓度为10μg/mL的由KB015、KB018、KB007或KB008多肽制得之二聚体的情况下与人类PBMC一起培育之NCI-H510细胞之活力的直方图。

[0408] 图15A至图15B:表示在具有由KB017、KB019、KB012或KB013多肽制得之二聚体(图15A)或具有由KB011、KB015、KB017、KB012、KB013或KB014多肽制得之二聚体(图15B)的情况下对OCI-AML3进行48小时的人类PBMC依赖性细胞毒性分析之数据的曲线图。

[0409] 图16A:表示皮下注射有OCI-AML3肿瘤及人类PBMC且用由KB015、KB017或KB019多肽制得之二聚体或用PBS以28mg/kg藉由腹膜内(i.p.)一周处理一次的NOG小鼠随时间推移之肿瘤体积的曲线图。

[0410] 图16B:表示皮下注射有OCI-AML3肿瘤及人类PBMC且用由KB017、KB011多肽制得之二聚体或用KB058或用PBS以28mg/kg一周处理一次的NOG小鼠随时间推移之肿瘤体积的曲线图。

[0411] 图17:表示用KB120或阴性对照sdAb(NC)以16mg/kg一周处理一次的小细胞肺癌NCI-H510A模型之SCID小鼠异种移植之肿瘤进展的曲线图。

[0412] 图18A:表示包含抗PD-1VHH之蛋白质复合物相较于阳性对照或阴性对照抗体与人类PD-1(KB072)之结合的曲线图。

[0413] 图18B:表示包含抗PD-1VHH之蛋白质复合物相较于阳性对照或阴性对照抗体对于人类PD-1(KB072)之CPI功能(免疫检查点抑制)的曲线图。

[0414] 图19:展示用包含靶向DRD2、PD1及T细胞之VHH的蛋白质复合物(KB073)或用阴性对照抗体以28mg/kg之剂量每两周处理一次(总共八个剂量)的NCI-H82 SCLC人类PBMC共植入模型之肿瘤进展的曲线图。

[0415] 图20A:表示由KB047多肽制得之同二聚体的示意图。

[0416] 图20B:表示在具有由KB047、KB015、KB018或KB048多肽制得之二聚体的情况下对OCI-AML3细胞进行之细胞毒性分析之数据的曲线图。

[0417] 图21A:在对二聚体进行SDS-PAGE分析之后进行的Western印迹法之图像,该二聚体藉由与不同比率之编码KB049多肽轻链(泳道1)、KB050多肽重链(泳道2)的DNA共转染细胞或以1:1、3:1及1:3(泳道3至5)之比率与两种质粒(鉴别为KB057)共转染而制得。

[0418] 图21B:汇总由KB050或KB049多肽制得之同二聚体或由KB049及KB050之KB057共转染制得之异二聚体之分子量的表格。

[0419] 图22A:汇总单体、同二聚体或异二聚体之分子量的表格,该等单体、同二聚体或异二聚体藉由用表达KB051、KB052、KB053或KB054多肽之链A及链B的DNA构筑体以及用于链A及链B之共转染之DNA比率来共转染细胞而制得。

[0420] 图22B至图22C:在非还原(图22B)或还原(图22C)下进行且装载有蛋白质二聚体之

SDS-PAGE之后进行的Western印迹法之图像，该等蛋白质二聚体藉由将细胞与表达KB051(泳道1)、KB052(泳道2)、KB053(泳道3)之链A及链B的1:1比率DNA构筑体或表达KB054(泳道4)多肽之链A及链B的1:2比率DNA构筑体一起共转染而制得。

[0421] 发明详述

[0422] 定义

[0423] 除非另有指示，否则指示用于二聚域之氨基酸编号系根据EU编号系统。

[0424] 除非本文另有指示或明显与上下文相矛盾，否则在描述实施例之上下文中(尤其在申请专利范围之上下文中)使用术语「一」及「该」及类似参照词应理解为涵盖单数及复数。

[0425] 除非明确陈述或自上下文显而易见，否则如本文所用之术语「或」应理解为包括性的且涵盖「或」与「及」。

[0426] 本文所使用之术语「和/或」应视为指定特征或组分中之每一者具有或不具有另一者之特定揭示内容。

[0427] 除非另外指出，否则术语「包含」、「具有」、「包括」及「含有」应理解为开放式术语(亦即，意谓「包括但不限于」)。术语「由...组成」被视为封闭式的。

[0428] 术语「治疗」出于本发明之目的系指治疗性治疗及防治性或预防性措施。需要治疗者包括已患该病症者以及倾向于患该病症者;以及有待预防该病症者。

[0429] 关于给定值之术语「约」或「大约」意谓该数值中的变化系经审慎考虑。在一些实施例中，术语「约」或「大约」一般意谓给定值或范围之+/-20％内、+/-10％内、+/-5％内、+/-4％内、+/-3％内、+/-2％内或+/-1％内的范围。

[0430] 提及抗原结合域之术语「功能活性」意谓该抗原结合域能够结合于其目标且视情况，该抗原结合域具有一或多种生物活性。

[0431] 如本文所用，术语「柔性连接子」系指包含至少一个由允许邻近模块相对于彼此移动之柔性氨基酸残基构成之部分的肽。

[0432] 如本文所用，术语「刚性连接子」系指包含至少一个由展现刚性结构且保持两个模块之间的距离之氨基酸构成之部分的肽。

[0433] 如本文所用，术语「螺旋状连接子」意谓由采用α-螺旋状构形之氨基酸残基构成的连接子。

[0434] 如本文所用，术语「可裂解连接子」系指包含对选自由以下组成之群的蛋白酶敏感之酶裂解位点的肽:ADAMS、ADAMTS、天冬氨酸蛋白酶、凋亡蛋白酶、半胱氨酸组织蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、凝血因子蛋白酶、II型跨膜丝氨酸蛋白酶(TTSP)及其组合。

[0435] 在本文中应理解，以诸如「A至B」之格式提及值范围的表述包括各个别值以及此类范围所包含及包括之任何子范围。举例而言，表述「1至10」包括诸如而不限于「2至10」、「2至9」、「3至6」、「5至7」及包含于1与10之间且包括1及10的任何个别值，亦即1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0436] 在本文中应理解，关于给定值之术语「至少」意欲包括该值及上位值。举例而言，术语「至少80％」包括「至少81％」、「至少82％」、「至少83％」、「至少84％」、「至少85％」、「至少86％」、「至少87％」、「至少88％」、「至少89％」、「至少90％」、「至少91％」、「至少92％」、「至少

93%」、「至少94%」、「至少95%」、「至少96%」、「至少97%」、「至少98%」、「至少99%」、「至少99.1%」、「至少99.2%」、「至少99.3%」、「至少99.4%」、「至少99.5%」、「至少99.6%」、「至少99.7%」、「至少99.8%」、「至少99.9%」及100%。

[0437] 多肽

[0438] 编码所需多肽序列的DNA之区段系活体外合成。不同DNA模块以经组织且定向方式组装成单一片段，随后将该片段选殖至表达载体中。因此，所得多肽系由形成单链之不同模块构成。

[0439] 本发明之多肽包括例如而不限于抗原结合域、连接子及促进至少两个多肽链之组装的二聚域。

[0440] 在例示性构形中，一或多个抗原结合域可位于二聚域之N端、C端或每一侧处。

[0441] 在另一例示性构形中，多肽可包含至少一个在二聚域之N端的抗原结合域及至少一个在二聚域之C端的抗原结合域。

[0442] 在另一例示性构形中，多肽可包含一个在二聚域之N端的抗原结合域及至少两个在二聚域之C端的抗原结合域。

[0443] 在又一例示性构形中，多肽可包含两个在二聚域之N端的抗原结合域及两个在二聚域之C端的抗原结合域。

[0444] 在一些实施例中，多肽可以N端至C端方式包含具有式Ia中所阐述之构形的氨基酸序列：

[0445] $X-[(Ab_a)-(L_b)]_m-(DD)-[(L_c)-(Ab_d)]_n-Y$

[0446] 其中m可为0、1或大于1之整数；

[0447] 其中n可为0、1或大于1之整数，其限制条件为m及n不同时为0；

[0448] 其中Ab_a、Ab_d可各独立地包含有包含抗体之一或多个互补决定区(CDR)的抗原结合域；

[0449] 其中X或Y可独立地存在或不存在且可包含氨基酸序列；

[0450] 其中L_b、L_c可各独立地包含一或多个连接子；且

[0451] 其中DD包含二聚域。

[0452] 在一些实施例中，多肽可以N端至C端方式包含具有式Ib中所阐述之构形的氨基酸序列：

[0453] $X-[(Ab_a)-(L_b)]_m-(DD)-[(L_c)-(Ab_d)]_n-Y$

[0454] 其中m可为0、1或大于1之整数；

[0455] 其中n可为2或大于2之整数；

[0456] 其中Ab_a、Ab_d可各独立地包含有包含抗体之一或多个互补决定区(CDR)的抗原结合域；

[0457] 其中X或Y可独立地存在或不存在且可包含氨基酸序列；

[0458] 其中L_b、L_c可各独立地包含一或多个连接子；

[0459] 其中L_c不包含可裂解连接子；且

[0460] 其中DD可包含二聚域。

[0461] 在例示性实施例中，m可为2。在其他例示性实施例中，m可为3。在其他例示性实施例中，m可为4。在额外例示性实施例中，m可为5。在其他例示性实施例中，m可大于5。

[0462] 在例示性实施例中，n可为2。在其他例示性实施例中，n可为3。在其他例示性实施例中，n可为4。在其他例示性实施例中，n可为5。在其他例示性实施例中，n可大于5。

[0463] 在本文中应理解，在本文中所揭示之式Ia、式Ib或式Ic中，当m为2或大于2之整数时，Ab_a、L_b或由$(Ab_a)-(L_b)$定义之各单元中之每一者可相同或不同。

[0464] 在本文中应理解，在本文中所揭示之式Ia、式Ib或式Ic中，当n为2或大于2之整数时，Ab_d、L_c或由$(L_c)-(Ab_d)$定义之各单元中之每一者可相同或不同。

[0465] 多肽之实施例包括例如而不限于具有式II中所阐述之构形、式III中所阐述之构形、式IV中所阐述之构形、式V中所阐述之构形、式VI中所阐述之构形、式VII中所阐述之构形、式VIII中所阐述之构形的多肽。

[0466] $X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y$(式II)；

[0467] $X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(Lc1)-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$(式III)；

[0468] $X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y$(式IV)；

[0469] $X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$(式V)

[0470] $X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y$(式VI)；

[0471] $X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$(式VII)；

[0472] $X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y$(式VIII)。

[0473] 其中X、Y及DD如在式Ia、式Ib或式Ic中所定义；

[0474] 其中Ab_{a1}、Ab_{a2}、Ab_{a3}、Ab_{d1}、Ab_{d2}、Ab_{d3}各独立地包含有包含抗体之一或多个互补决定区(CDR)的抗原结合域；

[0475] 其中L_{b1}包含抗体或其抗原结合片段之一或多个连接子和/或铰链区；且

[0476] 其中L_{b2}、L_{b3}、L_{c1}、L_{c2}及L_{c3}各独立地包含一或多个连接子。

[0477] 本发明之多肽包含呈单链形式或在作为本文中所揭示之蛋白质复合物之部分时具有功能活性的抗原结合域。

[0478] 举例而言，多肽之抗原结合域可结合于其目标且可具有生物活性。

[0479] 在一些实施例中，抗原结合域之生物活性包括例如而不限于阻断目标与其天然受体或配体之结合。或者，抗原结合域之生物活性包括其螯合目标之能力。此外，抗原结合域之生物活性包括其诱导信号传导之能力。

[0480] 包含超过一个抗原结合域之多肽表征为多价的。

[0481] 本发明之多肽可包含在其N端或C端或在两端(在本文中所揭示之式中分别由X及Y定义)的额外氨基酸序列。

[0482] 在一些实施例中，N端(由X定义)之氨基酸序列可包括信号肽，其例示性实施例提供于SEQ ID NO:51中。

[0483] 在一些实施例中，N端(由X定义)或C端(由Y定义)之氨基酸序列可独立地包括连接子、细胞因子、趋化因子、标签(例如His标签(例如SEQ ID NO:52))、掩蔽域、噬菌体鞘蛋白、抗原结合域或其组合。

[0484] 抗原结合域(Ab)

[0485] 本发明之多肽包含一或多个各独立地包含抗体之一或多个互补决定区(CDR)的抗原结合域。

[0486] 因此,本发明之多肽之特异性可由其抗原结合域赋予。

[0487] 在一些实施例中,给定多肽链之所有抗原结合域在呈单链形式与不同模块组合时均能够结合于其目标。

[0488] 本发明之多肽可包含来源于(人类或动物来源之)天然抗体或来源于合成抗体的抗原结合域。

[0489] 在一些实施例中,天然抗体之抗原结合域经工程改造以便形成单链。

[0490] 在一些实施例中,抗原结合域可获自IgG,诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在特定实施例中,抗原结合域来源于人类IgG重链。

[0491] 在一些实施例中,抗原结合域可获自仅含重链之抗体(HCAb)。

[0492] 抗原结合域之例示性实施例包括例如而不限于单域抗体(sdAb)、重链可变区(VH或VHH)、轻链可变区(VL或VLL)、单链可变片段(scFv)、V_{NAR}片段及其组合。

[0493] 在一特定实施例中,本发明之多肽可包含IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c或IgG3或其组合的来源于人类或小鼠或大鼠或来源于转殖基因小鼠或大鼠(其中小鼠或大鼠VHH已骆驼化)的抗原结合域VHH、人类VHH、已骆驼化之人类VHH。抗体可藉由用所关注之抗原使缺乏其重链、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c或IgG3或其组合中之任一者中之功能CH1域或上文所描述之VHH之组合的小鼠或大鼠或转殖基因小鼠或大鼠免疫而获得。

[0494] 在一特定实施例中,本发明之多肽可包含骆驼科抗体之抗原结合域,诸如IgG2或IgG3之VHH。骆驼科抗体可藉由用所关注之抗原使单峰驼、骆驼、骆马或羊驼免疫而获得。

[0495] 在一些实施例中,骆驼科抗体可来源于所谓的旧世界骆驼,诸如双峰骆驼(Camelus bactrianus)、单峰骆驼(Camelus dromaderus),或来自新世界骆驼,诸如小羊驼(Lama pacos)、大羊驼(Lama glama)及瘦驼(Lama vicugna)。

[0496] 在另一特定实施例中,本发明之多肽可包含软骨鱼之抗原结合域,诸如IgNAR之V_{NAR}片段。V_{NAR}片段可来源于鲨鱼抗体。

[0497] 在需要时,非人类抗体之抗原结合域可经人类化。举例而言,非人类VH、VHH或HCAb之构架区可经修饰以便使其更人类化。骆驼科抗体之人类化论述于例如Vincke C.等人(J.Biol Chem.2009,284(5):3273-3284)中,其全部内容以引用之方式并入本文中。人类化骆驼科抗体可例如藉由通用人类化纳米抗体骨架上之CDR光栅获得(例如揭示于Vincke C.等人中之h-NbBcII10$_{FGLA}$)。V_{NAR}抗体可藉由如Kovalenko OV等人(J Biol Chem.2013,288:17408-17419)中所论述将非CDR残基转化成人类生殖系Vκ1序列DPK9之残基来人类化。本发明之多肽因此涵盖人类化抗原结合域。

[0498] 在又一特定实施例中,抗原结合域可包含人类VH(经修饰或未经修饰)。人类VH可例如自合成人类VH文库获得。经修饰人类VH包括其中一些氨基酸残基已经修饰以使得其更加骆驼化(亦即藉由骆驼化)的VH。

[0499] 在本发明之一些态样中,多肽可由皆结合于同一目标及同一抗原决定基的抗原结合域构成。此类多肽可表征为单特异性的。

[0500] 单特异性多肽之例示性实施例包括包含具有一致CDR及构架区之抗原结合域的多肽。单特异性多肽之另一例示性实施例包括包含具有一致CDR及不同构架区之抗原结合域

的多肽。单特异性多肽之另一例示性实施例包括包含其CDR中之一或多者之氨基酸序列不同(例如一或多个CDR中之保守取代)而不影响其结合于同一抗原决定基或抗原之能力的抗原结合域的多肽。

[0501] 在本发明之其他态样中,多肽之抗原结合域可结合于同一抗原之不同抗原决定基或结合于不同抗原。此类多肽可表征为多特异性的且涵盖例如双特异性多肽、三特异性多肽、四特异性多肽、五特异性多肽、六特异性多肽、双互补位多肽、多互补位多肽及其类似物。

[0502] 多特异性多肽之例示性实施例包括包含至少两个其CDR中之一或多者之氨基酸序列不同而使得结合特异性不同的抗原结合域的多肽。

[0503] 更特定言之,当多肽结合于两个不同抗原决定基或抗原时,多肽可表征为双特异性的。当多肽结合于三个不同抗原决定基或抗原时,其可表征为三特异性的。当多肽结合于四个不同抗原决定基或抗原时,其可表征为四特异性的。当多肽结合于五个不同抗原决定基或抗原时,其可表征为五特异性的。当多肽结合于六个不同抗原决定基或抗原时,其可表征为六特异性的。

[0504] 包含两个结合于同一目标上之两个不重迭抗原决定基之抗原结合域的多肽表征为双互补位的。包含结合于同一目标上之三个、四个或更多个抗原决定基之抗原结合域的多肽表征为多互补位的。

[0505] 将基于诸如侦测、诊断和/或治疗用途之预期用途来选择给定多肽之抗原结合域。特定多肽之抗原结合域中之每一者可经选择以便产生加成或协同效应。

[0506] 在一些实施例中,抗原结合域可针对其特异性结合疾病或病况中所涉及之蛋白质的能力而进行选择。

[0507] 举例而言,本发明之多肽可包含至少一个特异性结合于由肿瘤细胞或肿瘤细胞环境表达之抗原的抗原结合域(亦即肿瘤特异性抗原结合域)。

[0508] 因此,本发明之多肽可包含一或多个特异性结合于以下之抗原结合域:CD36、DRD1、DRD2、DRD3、DRD4、DRD5、PD-L1、TROP2、CD147、MCT1、IL1RAP、AMIGO2、PTK7、MCT2、MCT4、NHE1、H+/K+-ATP酶、LAP、HLA-I A2、CD73、CD98、CEA、CEACAM5/6、ICAM-1、MCSP、纤维结合蛋白、β1整合素、四跨膜蛋白8、CD164、CD59、CD63、CD44、CD166、cWF、TNF、IL-17A、IL17-F、IL-6R、BCMA、TNF、RANKL、ADAMTS5、VEGF、Ang2、CX_3CR1、CXCR4、CXCR7、CXCL12、TfR1(CD71)、CXCR2、VEGFR2、CD19、IGFR1、EpCAM、EGFR、DLL3、CGRP、CD79b、CD28、CCR5、ErbB3、ErbB2、TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3、TGFβR1、TGFβR2、IDO1、IDO2、TLR-4、TLR-7、TLR-8、TLR-9等。

[0509] 在一些实施例中,抗原结合域可特异性结合于受体。

[0510] 在一些实施例中,抗原结合域可特异性结合于G蛋白偶合受体,诸如而不限于多巴胺受体。

[0511] 在一些例示性实施例中,多巴胺受体可为多巴胺受体D1(DRD1)。

[0512] 在一些例示性实施例中,多巴胺受体可为多巴胺受体D2(DRD2)。

[0513] 在一些例示性实施例中,多巴胺受体可为多巴胺受体D3(DRD3)。

[0514] 在一些例示性实施例中,多巴胺受体可为多巴胺受体D4(DRD4)。

[0515] 在一些例示性实施例中,多巴胺受体可为多巴胺受体D5(DRD5)。

[0516] 在本发明之其他态样及实施例中,多肽可包含至少一个特异性结合于免疫调节剂

的抗原结合域。

[0517] 举例而言，多肽可包含一或多个结合免疫检查点蛋白、细胞因子、趋化因子或免疫受体或辅助受体等的抗原结合域(例如免疫特异性抗原结合域)。

[0518] 因此，本发明之多肽可包含一或多个特异性结合于以下之抗原结合域：CD3、CD16、PD1、PDL-1、CTLA-4、CD8、LAG-3、OX40、CD27、CD122/IL2RB、TLR8/CD288、TIM-3、ICOS/CD278、NKG2A、A2AR、B7-H3、GITR/TNFRSF18、4-IBB/CD137、KIR2DL1、KIR3DL2、SIRPα、CD47、VISTA、CD40、CD112、CD96、TOGOT、BTLA、TIGIT、LAG-3、CD4等。

[0519] 在一例示性实施例中，本发明之多肽可包含至少一个肿瘤特异性抗原结合域及至少一个免疫特异性抗原结合域。

[0520] 文献中已描述若干单域抗体。因此，本发明之多肽可包含有包含此类单域抗体之CDR、完全序列的抗原结合域。

[0521] 此类单域抗体之例示性实施例包括但不限于靶向以下之单域抗体：CXCR2(US 9328174 B2(2016)、US9688763B2(2017))、CXCR4(US9212226B2(2015))、CXCR7(US9212226 B2(2015)、US8937164B2(2015)、US9758584B2(2017)、US999639B2(2018))、C-MET(US8703135 B2(2014)、US 9346884B2(2016)、US9683045B2(2017))、KRAS(US9663570B2(2017))、TNF-α(US 9546211B2(2017)、US8703131B2(2014)、US9067991B2(2015)、US9371381B2(2016)、US 9745372 B2(2017))、血清白蛋白(US8217140B2(2012)、US8188223 B2(2012)、US9573992 B2(2017))、温韦伯氏因子(von Willebrand Factor)(US7807162 B2(2010)、US8372398 B2(2013)、US9028816B2(2015)、US10112989B2(2018))、RANK-L(US 8623361 B2(2014)、US 9475877 B2(2016)、US 9505840 B2(2016)、US9534055 B2(2017))、IL-6R(US8629244 B2(2014)、US8748581 B2(2014)、US 8962805B2(2015)、US 9181350 B2(2015)、US9273150 B2(2016)、US 9605072 B2(2017)、US 9611326B2(2017)、US 9617341B2(2017)、US10118967B2(2018))、OX40L(US8962807B2(2015)、US9834611B2(2017))、HER2(US8975382B2(2015)、US 9969805B2(2018))、HER3(US9932403B2(2018))、IL-17A及IL-17F(US10017568B2(2018))、EGFR (US9243065 B2(2016))、STAT3(US9695234B2(2017))、类淀粉蛋白β(US9211330B2(2015))、假单胞菌(US10072098 B2(2018))、P2X7受体(US9908935B2(2018))、肝细胞生长因子(US9670275B2(2017)、US10100110 B2(2018))、Notch路径成员(US 8557965 B2(2013))、血管生成素/Tie(US8858940B2(2014)、US9382333B2(2016)、US9822175B2(2017))、趋化因子(US8906680 B2(2014))、G偶合蛋白受体(US 9512236 B2(2016)、清除剂受体(US9034325B2(2015))、细胞内抗原(US9850321B2(2017))、金属蛋白酶(US9156914B2(2015))等。

[0522] 此类单域抗体之特定例示性实施例包括为以下之部分的单域抗体：卡普拉珠单抗(针对vWF之VHH)、奥利珠单抗(Ozoralizumab)(针对TNF之VHH)、ALX/0761/M1095(针对IL-17A、I-17F双特异性之VHH)、沃巴利单抗(Vobarilizumab)(针对IL-6R之VHH)、LCAR-B38M(针对BCMA之VHH)、V565(针对TNF之VHH)、ALX-1141/M6495(针对ADAMTS5之VHH)、BI 836880(针对VEGF、Ang2双特异性之VHH)、BI 655088(针对CX_3CR1之VHH)、AD-214(针对CXCR4之i-body)、TXB4(TfR1之VNAR)、ALX-0141(针对RANK-L之VHH)等。

[0523] 在一些实施例中，本文中所揭示之多肽可包含一或多个在二聚域之N端的肿瘤特异性抗原结合域。

[0524] 在一些实施例中,本文中所揭示之多肽可包含一或多个在二聚域之C端的肿瘤特异性抗原结合域。

[0525] 在一些实施例中,本文中所揭示之多肽可包含一或多个在二聚域之N端及C端的肿瘤特异性抗原结合域。

[0526] 在一些实施例中,本文中所揭示之多肽可包含一或多个在二聚域之N端的免疫特异性抗原结合域。

[0527] 在一些实施例中,本文中所揭示之多肽可包含一或多个在二聚域之C端的免疫特异性抗原结合域。

[0528] 在一些实施例中,本文中所揭示之多肽可包含一或多个在二聚域之N端及C端的免疫特异性抗原结合域。

[0529] 在例示性及非限制性实施例中,多肽可包含两个在二聚域之C端的免疫特异性抗原结合域。在一些实施例中,紧邻二聚域之C端部分的免疫特异性抗原结合域可经由不可裂解连接子连接。

[0530] 二聚域(DD)及蛋白质复合物

[0531] 本发明之多肽包含二聚域。如此,两个多肽(多肽链)可组装形成蛋白质复合物。蛋白质复合物之例示性实施例包括同二聚体及异二聚体。

[0532] 二聚域可包含例如而不限于免疫球蛋白之恒定区,包括例如重链免疫球蛋白之Fc、CH2和/或CH3域。

[0533] 在本发明之某些实施例及态样中,二聚域可具有与天然IgG1、IgG2、IgG3或IgG4恒定区之序列或与其对应CH2和/或CH3域一致的序列。

[0534] 本发明尤其涵盖具有与天然人类抗体之序列一致的序列的二聚域。二聚域之例示性实施例包括例如天然人类重链之CH2-CH3域。

[0535] 当表达于细胞或溶液中时,具有天然抗体之CH2-CH3域的多肽具有形成二聚体之倾向。当蛋白质复合物之两个多肽链由相同氨基酸序列构成时,蛋白质复合物将形成同二聚体。然而,具有天然抗体之CH2-CH3域但氨基酸序列不同对多肽之共表达将产生同二聚体及异二聚体之混合物。存在于混合物中之不同蛋白质复合物可藉由此项技术中已知且包括例如尺寸排阻层析之方法分离。

[0536] 因此,本发明之例示性异二聚体包括具有天然抗体之CH2-CH3域且由两个具有不同序列或构形之多肽链形成的异二聚体。

[0537] 然而,本发明亦系关于包含突变二聚域之多肽。

[0538] 因此,此类多肽可包含相较于天然抗体之序列具有例如一或多个突变的突变二聚域。突变二聚域之例示性实施例包括具有天然CH2域及突变CH3域之二聚域。

[0539] 在一些实施例中,Fc区可经修饰以便预防糖基化,以延长其半衰期,以调节受体结合或效应功能。例示性突变论述于Saunders K.O.(Front.Immunol.10:1296,2019,其全部内容以引用之方式并入本文中)中且包括例如天冬酰胺297(例如N297)之突变。

[0540] 二聚域之例示性实施例提供于SEQ ID NO:16及SEQ ID NO:17中。在SEQ ID NO:16及SEQ ID NO:17中,氨基酸残基1-110对应于天然CH2,且氨基酸残基111-217对应于天然CH3。SEQ ID NO:16及SEQ ID NO:17之第1号氨基酸残基对应于根据EU编号系统之位置231。SEQ ID NO:16及SEQ ID NO:17之第111号氨基酸残基对应于根据EU编号系统之位置341。

[0541] 二聚域之其他例示性实施例提供于SEQ ID NO:25及SEQ ID NO:26中。二聚域之额外例示性实施例提供于SEQ ID NO:48及SEQ ID NO:50中。二聚域之额外例示性实施例提供于SEQ ID NO:47及SEQ ID NO:49中。二聚域之其他例示性实施例提供于表5中。本发明涵盖包含SEQ ID NO:53-91中所阐述之突变Fc域的二聚域。尤其考虑包含SEQ ID NO:92至95中所阐述之突变CH3域的二聚域。

[0542] 更特定言之,在一些实施例中,包含SEQ ID NO:92中所阐述之突变CH3域的多肽可形成具有包含SEQ ID NO:93中所阐述之突变CH3域之多肽的异二聚体。

[0543] 更特定言之,在其他实施例中,包含SEQ ID NO:94中所阐述之突变CH3域的多肽可形成具有包含SEQ ID NO:95中所阐述之突变CH3域之多肽的异二聚体。

[0544] 在一些实施例中,包含SEQ ID NO:55中所阐述之突变Fc域的多肽可形成具有包含SEQ ID NO:56中所阐述之突变Fc域之多肽的异二聚体。

[0545] 在一些实施例中,包含SEQ ID NO:61中所阐述之突变Fc域的多肽可形成具有包含SEQ ID NO:62中所阐述之突变Fc域之多肽的异二聚体。

[0546] 在一些实施例中,包含SEQ ID NO:67中所阐述之突变Fc域的多肽可形成具有包含SEQ ID NO:68中所阐述之突变Fc域之多肽的异二聚体。

[0547] 在一些实施例中,包含SEQ ID NO:71中所阐述之突变Fc域的多肽可形成具有包含SEQ ID NO:72中所阐述之突变Fc域之多肽的异二聚体。

[0548] 在一些实施例中,包含SEQ ID NO:77中所阐述之突变Fc域的多肽可形成具有包含SEQ ID NO:90中所阐述之突变Fc域之多肽的异二聚体。

[0549] 在一些实施例中,包含SEQ ID NO:80中所阐述之突变Fc域的多肽可形成具有包含SEQ ID NO:90所阐述之突变Fc域之多肽的异二聚体。

[0550] 在一些实施例中,包含SEQ ID NO:82中所阐述之突变Fc域的多肽可形成具有包含SEQ ID NO:90中所阐述之突变Fc域之多肽的异二聚体。

[0551] 在一些实施例中,多肽可具有相较于天然或野生型序列包含例如1至30、1至20、1至15、1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3个氨基酸取代的突变二聚域。

[0552] 在例示性实施例中,突变二聚域可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代。氨基酸取代可如表A中所概述为保守的或非保守的。

[0553] 在例示性实施例中,多肽可具有突变二聚域,该突变二聚域具有与天然IgG1、IgG2、IgG3或IgG4恒定区之序列或与CH2和/或CH3域80％至99％一致的序列。本发明涵盖之多肽包括包含突变二聚域之多肽,该突变二聚域与天然IgG1、IgG2、IgG3或IgG4恒定区之序列或与CH2和/或CH3域85％至99％一致、90％至99％一致、95％至99％一致。

[0554] 在一些实施例中,本发明之多肽可包含有包含有助于异二聚体形成之氨基酸取代的突变二聚域。因此,本发明之异二聚体可由包含此类突变之多肽形成。

[0555] 在一些实施例中,突变二聚域可包括位置356、357、370、399和/或439处(根据EU编号系统)之氨基酸取代。

[0556] 在例示性实施例中,给定异二聚体之一个多肽链可包括具有例如位置357、399及439处之氨基酸取代的突变CH3,而异二聚体之另一多肽链可包括具有例如位置356、370及399处之氨基酸取代的突变CH3(根据EU编号系统)。

[0557] 在例示性实施例中,给定异二聚体之一个多肽链可包括具有例如位置357、399及

439处之氨基酸取代的突变CH3，而异二聚体之另一多肽链可包括具有例如位置356、370及399处之氨基酸取代的突变CH3(根据EU编号系统)。给定异二聚体之一个或两个多肽链可视情况进一步包含选自349、350、351、352、354、355、394和/或395之位置处的突变。给定异二聚体之一个多肽链因此可包含具有本文中所揭示之氨基酸序列的第一二聚域(DD_1)，且给定异二聚体之另一多肽链因此可包含具有本文中所揭示之氨基酸序列的第二二聚域(DD_2)。

[0558] 在特定态样及实施例中，本发明之多肽可以N端至C端方式包含具有式Ic中所阐述之构形的氨基酸序列：

[0559] $X-[(Ab_a)-(L_b)]_m-(DD)-[(L_c)-(Ab_d)]_n-Y$

[0560] 其中m可为0、1或大于1之整数；

[0561] 其中n可为0、1或大于1之整数，其限制条件为m及n不同时为0；

[0562] 其中Ab_a、Ab_d可各独立地包含有包含抗体之一或多个互补决定区(CDR)的抗原结合域；

[0563] 其中X或Y可独立地存在或不存在且可包含氨基酸序列；

[0564] 其中L_b、L_c可各独立地包含一或多个连接子；且

[0565] 其中DD可包含二聚域，该二聚域包含a)包含一或多个根据EU编号在对应于D399、D/E356和/或K370之位置处之突变的CH3域或b)包含一或多个根据EU编号在对应于D399、E357和/或K439之位置处之突变的CH3域。

[0566] 在一些实施例中，位置356处之氨基酸可经中性氨基酸置换。在一些实施例中，位置370处之氨基酸可经带正电氨基酸置换。在一些实施例中，位置399处之氨基酸可经中性氨基酸置换。在一些实施例中，位置357处之氨基酸可经中性氨基酸置换。在一些实施例中，位置439处之氨基酸可经带负电氨基酸置换。

[0567] 举例而言，为了有助于异二聚体形成，可藉由a)将位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)置换为中性氨基酸、b)将位置370处之赖氨酸(K)置换为带正电氨基酸及c)将位置399处之天冬氨酸(D)置换为中性氨基酸来使多肽链中之一者突变，同时可藉由a)将位置357处之谷氨酸(E)置换为中性氨基酸、b)将位置399处之天冬氨酸(D)置换为中性氨基酸及c)将位置439处之赖氨酸(K)置换为带负电氨基酸来使另一多肽链突变。

[0568] 本发明之多肽之例示性实施例可包含突变二聚域，该突变二聚域包含其中位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置370处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)且位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)的CH3域。

[0569] 本发明之多肽之另一例示性实施例可包含突变二聚域，该突变二聚域包含其中位置357处之谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)且位置439处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)的CH3域。

[0570] 可藉由共表达多肽链(链A)及多肽链(链B)而制备异二聚体，该链A包含其中位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)变成谷氨酰胺(Q)、位置370处之赖氨酸(K)变成谷氨酸(E)且位置399处之天冬氨酸(D)变成天冬酰胺(N)的CH3域，该链B包含其中位置357处之谷氨酸(E)变成谷氨酰胺(Q)、位置399处之天冬氨酸(D)变成天冬酰胺(N)且位置439处之赖氨酸(K)变成谷氨酸(E)的CH3域。

[0571] 视链A与链B之比而定，亦可在共表达两种此类多肽时形成同二聚体。

[0572] 因此，多肽链A与多肽链B之共表达可产生链A与链B之异二聚体、链A之同二聚体、链B之同二聚体及其混合物。亦可存在链A和/或链B之残余单体。由于单体、异二聚体及同二聚体各含有抗原结合域，混合物之各组分可具有一定水平之活性。

[0573] 因此，本发明涵盖包含本文中所揭示之CH3突变的单体、异二聚体及同二聚体以及此类单体、异二聚体和/或同二聚体之混合物。

[0574] 在其他实施例中，本文中所揭示之多肽链及蛋白质复合物可包含有包含此项技术中已知有助于异二聚体形成之突变的突变二聚域。

[0575] 举例而言，本发明之多肽及蛋白质复合物可包含式Ia、式Ib、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII或式VIII中所阐述之构形及此项技术中已知有助于异二聚体形成之突变。

[0576] 此类突变之例示性实施例揭示于例如Ha,J-H等人(Front Immunol,2016;7:394)或Godar M等人(Expert Opinion on Therapeutic patents,2018;28(3):251-276)中，该等文献之全部内容以引用之方式并入；且包括例如臼包杵(第一CH3域突变T366Y及第二CH3域突变Y407T，第一CH3域突变T366W及第二CH3域突变T366S、L368A、Y407V，或第一CH3域突变S354C、T366W及第二CH3域突变Y349C、T366S、L368A、Y407V)、DD/KK突变(第一CH3域突变K409D、K392D，第二CH3域突变D399K、E356K)、不对称再工程改造技术(第一CH3域突变E356K、E357K、D399K及第二CH3域突变K439E、K370E、K409D)、BiMAb突变(第一CH3域突变K249E、K288E，第二CH3域突变E236K、D278K)、XmAb突变(第一CH3域突变S364H、F405A，第二CH3域突变Y349T、T394F)、DuoBody突变(第一CH3域突变F405L，第二CH3域突变K409R)、Azymetric突变(第一CH3域突变T350V、L351Y、S400E、F405A、Y407V，第二CH3域突变T350V、T366L、N390R、K392M、T394W)、Biclonics突变(第一CH3域突变T366K(+L351K)，第二CH3域突变L351D或Y349、L368或Y349+R355处之E或D)、ZW1突变(第一CH3域突变T350V、L351Y、F405A、Y407V，第二CH3域突变T350V、T366L、K392L、T394W)、7.8.60突变(第一CH3域突变K360D、D399M、Y407A，第二CH3域突变E345R、Q347R、T366V、K409V)、EW-RVT突变(第一CH3域突变K360E、K409W及第二CH3域突变Q347R、D399V、F405T)、EW-RVTs-s突变(第一CH3域突变K360E、K409W、Y349C及第二CH3域突变Q347R、D399V、F405T、S354C)、SEED突变(IgG1 CH3上之第一CH3域突变IgA源性之45个残基，及IgA CH3上之第二CH3域突变IgG1源性之57个残基)、A107突变(第一CH3域突变K370E、K409W，第二CH3域突变E357N、D399V、F405T)等。

[0577] 本发明之蛋白质复合物可藉由组装两个具有相同构形(具有相同或不同氨基酸序列)或具有不同构形之多肽链形成，其中相同或不同之构形可选自式Ia、式Ib、式Ic、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII和/或式VIII中所阐述之构形。

[0578] 在一些实施例中，蛋白质复合物之两个多肽链皆可具有式II中所阐述之构形(具有相同或不同氨基酸序列)。

[0579] 在一些实施例中，蛋白质复合物之两个多肽链皆可具有式III中所阐述之构形(具有相同或不同氨基酸序列)。

[0580] 在一些实施例中，多肽链中之一者可具有式II中所阐述之构形，而另一者可具有式III中所阐述之构形。

[0581] 在一些实施例中，多肽链中之一者可具有式II中所阐述之构形，而另一者具有式IV中所阐述之构形。

[0582] 在一些实施例中，多肽链中之一者可具有式III中所阐述之构形，而另一者具有式

IV中所阐述之构形。

[0583] 在一些实施例中，多肽链中之一者可具有式IV中所阐述之构形，而另一者具有式IV中所阐述之构形。

[0584] 由多价多肽链构成之蛋白质复合物在本文中称为多价蛋白质复合物。

[0585] 由两个多特异性多肽链构成之蛋白质复合物在本文中称为多特异性蛋白质复合物。

[0586] 术语「多特异性蛋白质复合物」涵盖「双特异性蛋白质复合物」、「三特异性蛋白质复合物」、「四特异性蛋白质复合物」、「五特异性蛋白质复合物」、「六特异性蛋白质复合物」及其类似物。

[0587] 双特异性蛋白质复合物之例示性实施例包括具有两个多肽的蛋白质复合物，该等两个多肽之各链包含不同肿瘤特异性抗原结合域，同时两个多肽之其他抗原结合域一致或结合于相同抗原或抗原决定基。

[0588] 其他类型之二聚体

[0589] 本文中所揭示之突变二聚域可用于其他类型之多肽链之二聚化。

[0590] 在一些实施例中，本文中所揭示之突变二聚域或CH3域可与结合域融合或引入抗体重链或Fc区内以产生双特异性IgG或IgG样分子。此类双特异性分子之例示性实施例包括双特异性抗体、单链Fv-CH3(scFv-CH3)融合体、串联scFv-CH3(TaFv-CH3)融合体、双功能抗体-CH3(Db-CH3)融合体、串联Db-CH3(TaDb-CH3)融合体、单链Db-CH3融合体(scDb-CH3)、Fab-CH3融合体、单链Fab-CH3融合体、Fab-scFv-CH3融合体、双重亲和力再靶向(DART)-CH3融合体、Fab-DART-CH3融合体、单链Fv-Fc(scFv-Fc)融合体、串联scFv-Fc(TaFv-Fc)融合体、双功能抗体-Fc(Db-Fc)融合体、串联Db-Fc(TaDb-Fc)融合体、单链Db-Fc融合体(scDb-Fc)、Fab-Fc融合体、单链Fab-Fc融合体、Fab-scFv-Fc融合体、双重亲和力再靶向(DART)-Fc融合体、Fab-DART-Fc融合体等。

[0591] 在其他实施例中，本文中所揭示之突变二聚域可引入至可溶诱饵受体陷阱中。

[0592] 因此，本发明系关于一种蛋白质复合物，其包含：a)第一多肽链，该第一多肽链包含有包含如下取代的Fc区、CH3或CH2/CH3域：中性氨基酸对位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)之取代、带正电氨基酸对位置370处之赖氨酸(K)之取代及中性氨基酸对位置399处之天冬氨酸(D)之取代；及b)第二多肽链，该第二多肽链包含有包含以下取代之Fc区、CH3或CH2/CH3域：中性氨基酸对位置357处之谷氨酸(E)之取代、中性氨基酸对位置399处之天冬氨酸(D)之取代及带负电氨基酸对位置439处之赖氨酸(K)之取代。

[0593] 在一些实施例中，第一多肽链可包含其中位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置370处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)且位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)的CH3域，且第二多肽链可包含其中位置357处之谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)且位置439处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)的CH3域。

[0594] 在一些实施例中，第一多肽链和/或第二多肽链可包含有包含根据EU编号在对应于349、350、351、352、354、355、394和/或395之位置处的其他突变的CH3域。

[0595] 在一些实施例中，第一多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及S354K的CH3域，且第二多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399Q、

E357Q、K439E、Y349D及S354D的CH3域。

[0596] 在一些实施例中，第一多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及L351W的CH3域，且第二多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。

[0597] 在一些实施例中，第一多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及S354M的CH3域，且第二多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351Y的CH3域。

[0598] 在一些实施例中，第一多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350I的CH3域，且第二多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350I的CH3域。

[0599] 在一些实施例中，第一多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及T350V的CH3域，且第二多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及T350V的CH3域。

[0600] 在一些实施例中，第一多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352R的CH3域，且第二多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。

[0601] 在一些实施例中，第一多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399N、D/E356Q、K370E及P352E的CH3域，且第二二聚多肽链可包含有包含根据EU编号之突变D399N、E357Q、K439E及L351R的CH3域。

[0602] 亦考虑本文中所揭示之分别包含链A及链B CH3域的第一及第二多肽链之组合。

[0603] 第一多肽及第二多肽链可为抗体重链。

[0604] 因此，本发明尤其系关于一种抗体或其抗原结合片段，其包含：a)包含其中位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置370处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)且位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)之CH3域的第一重链，b)包含其中位置357处之谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)且位置439处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)之CH3域的第二重链，及c)轻链。

[0605] 在一些实施例中，抗体或其抗原结合片段可包含：a)包含其中位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置370处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成谷氨酰胺(Q)、位置349处之酪氨酸(Y)可变成赖氨酸(K)且位置354处之丝氨酸(S)可变成赖氨酸(K)之CH3域的第一重链，b)包含其中位置357处之谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成谷氨酰胺(Q)、位置439处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)、位置349处之酪氨酸(Y)可变成天冬氨酸(D)且位置354处之丝氨酸(S)可变成天冬氨酸(D)之CH3域的第二重链，及c)轻链。

[0606] 在一些实施例中，抗体或其抗原结合片段可包含：a)包含其中位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置370处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)且位置351处之亮氨酸(L)可变成色氨酸(W)之CH3域的第一重链，b)包含其中位置357处之谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)、位置439处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)且位置351处之亮氨酸(L)可变成精氨酸(R)之CH3域的第二重链，及c)轻链。

[0607] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段可包含:a)包含其中位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置370处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)且位置354处之丝氨酸(S)可变成甲硫氨酸(M)之CH3域的第一重链,b)包含其中位置357处之谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)、位置439处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)且位置351处之亮氨酸(L)可变成酪氨酸(Y)之CH3域的第二重链,及c)轻链。

[0608] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段可包含:a)包含其中位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置370处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)且位置350处之苏氨酸(T)可变成异亮氨酸(I)之CH3域的第一重链,b)包含其中位置357处之谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)、位置439处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)且位置350处之苏氨酸(T)可变成异亮氨酸(I)之CH3域的第二重链,及c)轻链。

[0609] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段可包含:a)包含其中位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置370处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)且位置350处之苏氨酸(T)可变成缬氨酸(V)之CH3域的第一重链,b)包含其中位置357处之谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)、位置439处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)且位置350处之苏氨酸(T)可变成缬氨酸(V)之CH3域的第二重链,及c)轻链。

[0610] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段可包含:a)包含其中位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置370处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)且位置352处之脯氨酸(P)可变成精氨酸(R)之CH3域的第一重链,b)包含其中位置357处之谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)、位置439处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)且位置351处之亮氨酸(L)可变成精氨酸(R)之CH3域的第二重链,及c)轻链。

[0611] 在一些实施例中,抗体或其抗原结合片段可包含:a)包含其中位置356处之天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置370处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)且位置352处之脯氨酸(P)可变成谷氨酸(E)之CH3域的第一重链,b)包含其中位置357处之谷氨酸(E)可变成谷氨酰胺(Q)、位置399处之天冬氨酸(D)可变成天冬酰胺(N)、位置439处之赖氨酸(K)可变成谷氨酸(E)且位置351处之亮氨酸(L)可变成精氨酸(R)之CH3域的第二重链,及c)轻链。

[0612] 此类抗体或其抗原结合片段包括双特异性抗体或其双特异性抗原结合片段。

[0613] 连接子(L)

[0614] 本文中所揭示之多肽链之不同模块可经由连接子彼此连接。

[0615] 在一些实施例中,用于连接多肽链之一或多个模块的连接子并非可裂解连接子。

[0616] 在一例示性实施例中,紧邻二聚域之C端定位的连接子(Lc)不包含可裂解连接子。

[0617] 在另一例示性实施例中,位于两个抗原结合域之间的连接子中之至少一者不包含可裂解连接子。

[0618] 在其他实施例中,用于连接多肽链之一或多个模块的连接子可包括不可裂解连接子。

[0619] 在一例示性实施例中，紧邻二聚域之C端定位之连接子为不可裂解连接子。

[0620] 在另一例示性实施例中，位于两个抗原结合域之间的连接子中之至少一者为不可裂解连接子。

[0621] 在另一例示性实施例中，紧邻二聚域之C端定位的连接子及连接位于二聚域之C端之前两个抗原结合域的连接子为不可裂解连接子。

[0622] 在一些实施例中，紧邻二聚域之N端的连接子可较佳地包含抗体之铰链区。

[0623] 在一些实施例中，多肽链之所有模块经由不可裂解连接子连接。

[0624] 不可裂解连接子之例示性实施例包括在蛋白质表达期间或在制造制程期间保持实质上完整的连接子。如本文所用，「实质上完整」意谓以给定溶液或组合物之总多肽含量之20％或更少、15％或更少、10％或更少、7.5％或更少、5％或更少、4％或更少、3％或更少、2％或更少、1％或更少发生连接子裂解。

[0625] 不可裂解连接子之其他例示性实施例亦包括不包含用于存在于人类或动物血液或血清中之一或多种蛋白酶的特定裂解位点的连接子。

[0626] 不可裂解连接子之额外例示性实施例进一步包括在于个体中投与多肽或蛋白质复合物之后，在投与后至少一、二、三、四、五、六、十二、二十四、四十八小时或更长时间保持其完整性的连接子。

[0627] 在其他例示性实施例中，连接子包含不可裂解连接子及可裂解连接子。

[0628] 在一些实施例中，连接子不可裂解。

[0629] 在一些情况下，可裂解连接子可用于活体内释放药物(例如细胞生长抑制分子、细胞毒性分子、化学治疗剂等)或连接至本发明之多肽的标记。

[0630] 可裂解连接子之例示性实施例提供于例如US2019/0010242中，且包括对于蛋白酶之裂解敏感的连接子，该蛋白酶通常为细胞外蛋白酶，诸如由肿瘤或活化免疫效应细胞产生之蛋白酶，且包括具有供选自以下之蛋白酶特异性裂解之位点的连接子：ADAMS、ADAMTS，例如ADAMS；ADAMS；ADAM10；ADAM12；ADAM15；ADAM17/TACE；ADAMDEC1；ADAMTS1；ADAMTS4；ADAMTS5；天冬氨酸蛋白酶，例如BACE或肾素；天冬氨酸组织蛋白酶，例如组织蛋白酶D或组织蛋白酶E；凋亡蛋白酶，例如凋亡蛋白酶1、凋亡蛋白酶2、凋亡蛋白酶3、凋亡蛋白酶4、凋亡蛋白酶5、凋亡蛋白酶6、凋亡蛋白酶7、凋亡蛋白酶8、凋亡蛋白酶9、凋亡蛋白酶10或凋亡蛋白酶14；半胱氨酸组织蛋白酶，例如组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2、组织蛋白酶X/Z/P；半胱氨酸蛋白酶，例如克鲁兹蛋白酶(Cruzipain)；豆荚蛋白(Legumain)；泛素特异性蛋白酶-2(Otubain-2)；KLK，例如KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13或KLK14；金属蛋白酶，例如穿膜肽酶(Meprin)；脑啡肽酶(Neprilysin)；PSMA；BMP-1；MMP，例如MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26或MMP27；丝氨酸蛋白酶，例如活化蛋白C；组织蛋白酶A；组织蛋白酶G；凝乳酶(Chymase)；凝血因子蛋白酶(例如FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa)；弹性蛋白酶(Elastase)；颗粒酶B；胍基苯甲酸蛋白酶(Guanidinobenzoatase)；HtrA1；人类嗜中性球弹性蛋白酶；乳铁蛋白(Lactoferrin)；通道活化蛋白酶(Marapsin)；NS3/4A；PACE4；纤维蛋白溶酶(Plasmin)；PSA；tPA；凝血酶(Thrombin)；类胰蛋白酶(Tryptase)；uPA；II型跨膜丝氨酸蛋白酶(TTSP)，例如DESC1、DPP-4、FAP、第二型穿膜丝氨酸蛋白酶(Hepsin)、间质蛋白酶-2、间质蛋白酶

(Matriptase)、TMPRSS2、TMPRSS3或TMPRSS4;及其任何组合。在一些实施例中,本发明之多肽不包括对应于Lc之位置处的此类连接子。

[0631] 连接子之例示性实施例包括柔性连接子、刚性连接子、螺旋状连接子及其组合。连接子论述于例如Chen X等人(Adv Drug Deliv Rev.2013;65(10):1357-1369),其全部内容以引用之方式并入本文中。

[0632] 在一些实施例中,抗体铰链区或其部分可用于将模块连接至二聚域且在本文中被视为连接子。铰链区可来源于(人类或动物来源之)天然抗体或来源于合成抗体。铰链区可例如自诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之IgG获得。铰链区之例示性实施例提供于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:39及SEQ ID NO:43中。

[0633] 在一些情况下,铰链区可具有与天然IgG1、IgG2、IgG3或IgG4铰链区之序列80%至99%一致的序列。突变铰链之例示性及非限制性实施例包括其中S228经置换为P(EU编号)的IgG4之铰链区(Angal,S.等人,Mol Immunol 30,105-108,1993)。突变铰链之其他例示性实施例提供于SEQ ID NO:32-34、36-38、40-42及44-46中。

[0634] 柔性连接子通常由小极性氨基酸(诸如苏氨酸或丝氨酸及甘氨酸)构成。柔性连接子之例示性及非限制性实施例包括GS连接子(甘氨酸/丝氨酸重复),诸如(GGGS)n(GGGGS)m、(GS)n、(G_4S)n、(GGS)n、(GGGS)n、(GGGGS)n、(GGSG)n、(GGGSS)n,其中n及m可为整数,诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更大整数,诸如15、20或25。

[0635] 柔性连接子之特定例示性及非限制性实施例包括包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所阐述之氨基酸序列或由该氨基酸序列组成的连接子。

[0636] 应理解,SEQ ID NO:7可由式(GGGGS)n表示,其中n为选自1至10之整数;或替代地由式GGGGSX_1示,其中X_1不存在或若存在则为SEQ ID NO:7之氨基酸残基1至5之1至9个重复。

[0637] 本发明之刚性连接子通常由富含脯氨酸之序列(XP)n构成,其中X表示任何氨基酸,较佳地Ala、Lys或Glu,且n为诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10等之整数(Chen X等人,2013)。

[0638] 刚性连接子之特定例示性及非限制性实施例包括包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所阐述之氨基酸序列或由该氨基酸序列组成的连接子。

[0639] 应理解,SEQ ID NO:11可由式$(X(PAPAP))_nKA$表示,其中n为选自1至10之整数,其中X存在抑或不存在,且若存在则为A,或替代地,SEQ ID NO:11可由式(XPAPAP)X_2KA表示,其中X可存在或不存在,且若存在则为A;且其中X_2不存在或若存在则为SEQ ID NO:11之氨基酸残基1至6之1至9个重复。

[0640] 螺旋状连接子有时可表征为刚性的,但在本文中分成相异连接子家族。螺旋状连接子之例示性实施例论述于Chen X等人,2013,且包含例如由带正电及带负电氨基酸残基侧接的丙氨酸残基之重复。

[0641] 螺旋状连接子之特定例示性及非限制性实施例包括包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14及SEQ ID NO:15中所阐述之氨基酸序列或由该氨基酸序列组成的连接子。

[0642] 应理解,SEQ ID NO:15可由式$X(EAAAK)_nX_2$表示,其中n为选自1至10、更佳地2至5之整数,其中X及X_2独立地存在或不存在且若存在则较佳地为A。或者,SEQ ID NO:15可由式X(EAAAK)X_3X_2表示,其中X及X_2独立地存在或不存在,且若存在则较佳地为A;且X_3不存在或若

存在则为SEQ ID NO:15之氨基酸残基2至6之1至9次重复。

[0643] 在一例示性实施例中,紧邻二聚域之C端的连接子(鉴别为表1至表4中或在式II至式VIII中呈L_{c1}形式之连接子2)可包含柔性连接子、刚性连接子或螺旋状连接子。可特定地经选择以占据此位置的连接子包括例如而不限于包含SEQ ID NO:3-12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中所阐述之氨基酸序列或由该氨基酸序列组成的连接子,其中n为1。

[0644] 在一例示性实施例中,连接位于二聚域之C端的前两个抗原结合域的连接子(鉴别为表1至表4中或在式II至式VIII中呈L_{c2}形式之连接子3)可包含柔性连接子、刚性连接子或螺旋状连接子。可特定地经选择以占据此位置的连接子包括例如而不限于包含SEQ ID NO:3-13或SEQ ID NO:15中所阐述之氨基酸序列或由该氨基酸序列组成的连接子,其中n为1。

[0645] 本发明亦提供在SEQ ID NO:3至15中之任一者之N端或C端中之一者或两者处添加1至10个氨基酸(及包含于1与10内之任何范围或值,诸如1至5)的连接子。此等额外氨基酸残基可各独立地选自任何氨基酸残基。此等额外氨基酸残基较佳地形成不可裂解序列。

[0646] 本发明亦提供在SEQ ID NO:3至15中之任一者之N端或C端中之一者或两者处缺失1、2、3、4或5个氨基酸(及包含于1与5内之任何值)的连接子。

[0647] 适合之连接子可包含例如包含约3至约50、约3至约40、约3至约30、约3至约25、约3至约20、约3至约15、约3至约10个氨基酸残基的氨基酸序列。

[0648] 在例示性实施例中,各连接子之长度范围可独立地为约5至约50个氨基酸残基,包括例如约5至约40个氨基酸残基、约10至约40个氨基酸残基、约20至约40个氨基酸残基、约20至约35个氨基酸残基、约25至约30个氨基酸残基及此等范围所包含及包括之任何子范围。

[0649] 在一些实施例中,包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:15中所阐述之氨基酸序列的连接子可具有较佳地1至10、更佳地2至5,包括2、3、4或5的「n」值。

[0650] 变异体

[0651] 本发明亦涵盖本文中所揭示之序列之变异体。

[0652] 本发明涵盖之变异体包括可包含一或多个位置处之一或多个氨基酸残基之插入、一或多个位置处之一或多个氨基酸残基之缺失或一或多个位置处之一或多个氨基酸残基之取代(保守或非保守取代)的变异体。

[0653] 举例而言,基于共同侧链特性将天然存在之残基分组。可藉由将来自下列各组(第1组至第6组)中之一者的一氨基酸更换成同一组之另一氨基酸来进行保守取代。非保守取代将伴有将此等组中之一者之一成员换成另一成员。

[0654] (第1组)疏水性的:正亮氨酸、甲硫氨酸(Met)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)

[0655] (第2组)中性亲水性的:半胱氨酸(Cys)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)

[0656] (第3组)酸性:天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)

[0657] (第4组)碱性:组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)

[0658] (第5组)影响链定向的残基:甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro);及

[0659] (第6组)芳族:色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)

[0660] 保守取代之其他例示性实施例以标题「较佳取代」展示于表A中。若此类取代产生

非所需特性，则可引入更显著变化，在表A中称为「例示性取代」或如下文关于氨基酸类别进一步描述，且筛选产物。

[0661] 熟习此项技术者将认识到，相较于其他氨基酸，某些氨基酸带较小正电、为中性、带负电或具有降低之电荷。可如由氨基酸之等电点所指示基于净电荷分类氨基酸。等电点为氨基酸分子之平均净电荷为零时的pH。当pH>pI时，氨基酸具有净负电荷，且当pH<pI时，氨基酸具有净正电荷。在一些实施例中，抗体之经量测pI值介于约3与9之间(例如3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5及9)及之间的任何值。在一些实施例中，抗体之所量测pI值介于约4与7之间(例如4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0)及之间的任何值。氨基酸之例示性等电点展示于下表A中。一般而言，具有带正电侧链之氨基酸包括例如精氨酸(R)、组氨酸(H)及赖氨酸(K)。具有带负电侧链之氨基酸包括例如天冬氨酸(D)及谷氨酸(E)。具有极性特性之氨基酸包括例如丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)及半胱氨酸、酪氨酸(Y)及色氨酸(W)。非极性氨基酸包括例如丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、甘氨酸(G)及脯氨酸(P)。

[0662] 在一些实施例中，抗体之等电点经由氨基酸取代进行修饰。参见例如US20110076275。在一些实施例中，修饰包含抗体之多肽之等电点使得抗体之半衰期改变。

[0663] 表A:例示性氨基酸取代

[0664]

初始残基	例示性取代	保守取代	pI (等电点)
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val	6.0
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys	10.76

[0665]

Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg, Asp	Gln	5.41
Asp (D)	Glu, Asn	Glu	2.77
Cys (C)	Ser, Ala	Ser	5.07
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn	5.65
Glu (E)	Asp, Gln	Asp	3.22
Gly (G)	Ala	Ala	5.97
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg,	Arg	7.59
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu	6.02
Leu (L)	正亮氨酸, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile	5.98
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg	9.74
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu	5.74
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr	5.48
Pro (P)	Ala	Ala	6.30
Ser(S)	Thr	Thr	5.58
Thr (T)	Ser	Ser	5.60
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr	5.89
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe	5.66
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, 正亮氨酸	Leu	5.96

[0666] 一般而言,本文中使用Blast2序列程序(Tatiana A.Tatusova、Thomas L.Madden (1999),「Blast 2sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences」,FEMS Microbiol Lett.174:247-250)使用预设设定,亦即blastp程序、BLOSUM62矩阵(开放空位11及延伸空位罚分1;空位衰减50,预期10.0,字长3)及经启动滤波器确定可变链之间的类似性及一致性程度。

[0667] 因此,一致性百分比将指示相较于初始肽一致且可占据相同或类似位置的氨基酸。

[0668] 类似性百分比将指示一致之氨基酸及相较于初始肽在相同或类似位置经保守氨基酸取代置换的氨基酸。

[0669] 本发明之变异体因此可包含与初始或参考序列或初始序列之一部分的序列至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的序列。

[0670] 在一些实施例中，变异体可与本文中所揭示之序列具有至少80％序列一致性。在其他实施例中，变异体可与本文中所揭示之序列具有至少85％序列一致性。在其他实施例中，变异体可与本文中所揭示之序列具有至少90％序列一致性。在其他实施例中，变异体可与本文中所揭示之序列具有至少95％序列一致性。在其他实施例中，变异体可与本文中所揭示之序列具有至少99％序列一致性。

[0671] 变异体之例示性实施例包括多肽或蛋白质复合物，其包含来源于天然抗体但包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸差异的铰链、Fc、CH3、CH2/CH3区。

[0672] 在一些实施例中，本发明之多肽因此可包含与天然抗体之铰链区至少80％一致、至少85％一致、至少90％一致、至少95％一致、至少99％一致的铰链区。

[0673] 在一些实施例中，本发明之多肽因此可包含与天然抗体之Fc至少80％一致的Fc部分。

[0674] 在一些实施例中，本发明之多肽因此可包含与天然抗体之CH2域至少80％一致、至少85％一致、至少90％一致、至少95％一致、至少99％一致的CH2域。

[0675] 在一些实施例中，本发明之多肽因此可包含与天然抗体之CH3域至少80％一致、至少85％一致、至少90％一致、至少95％一致、至少99％一致的CH3域。

[0676] 在一些实施例中，本发明之多肽因此可包含与天然抗体之CH2/CH3域至少80％一致、至少85％一致、至少90％一致、至少95％一致、至少99％一致的CH2/CH3域。

[0677] 核酸、载体、试剂盒、细胞及制造多肽之方法

[0678] 本发明之核酸分子可为单股或双股。本文中所揭示之核酸分子可包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰脱氧核糖核苷酸或经修饰核糖核苷酸。本发明之核酸分子可包含例如DNA。

[0679] 尤其提供编码一或多个模块或整个多肽链之DNA区段及载体。

[0680] DNA区段和/或载体可提供于分开之小瓶中且呈试剂盒形式出售。

[0681] 尤其考虑包含允许定向组装并入DNA区段或整个多肽链之模块及选殖载体的序列的DNA区段之集合。

[0682] DNA区段及载体可提供为用于组装能够表达本文中所揭示之多肽或蛋白质复合物之DNA构筑体的试剂盒之部分。

[0683] 试剂盒可至少包含一或多个允许使用者产生包含如本文中所揭示之具有位置356、357、370、399和/或439处之氨基酸取代(根据EU编号系统)之突变二聚域的多肽链的DNA区段或载体。

[0684] 归因于遗传密码之固有简并，可产生及使用编码相同、实质上相同或功能上等效氨基酸序列的DNA序列。本发明之核苷酸序列可使用此项技术中通常已知之方法工程改造以便出于包括但不限于修饰基因产物之选殖、加工和/或表达的各种目的改变核苷酸序列。基因片段及合成寡核苷酸的藉由随机片段化及PCR重组进行之DNA改组可用于对核苷酸序列进行工程改造。举例而言，寡核苷酸介导之定点突变诱发可用于引入产生新限制位点、改变糖基化模式、改变密码子偏好、产生剪接变异体等的突变。本发明涵盖编码本文中所描述之多肽链的经密码子优化之核酸。

[0685] 本文中所揭示之多肽及蛋白质复合物可藉由熟习此项技术者熟悉之各种方法制

得,该等方法包括重组DNA方法或活体外转录/转译。

[0686] 一般而言,本文中所描述之多肽链系由插入至表达载体中之核酸序列表达,该表达载体亦即含有用于所插入编码序列在特定宿主中之转录及转译控制的组件的载体。此等组件可包括诸如强化子、组成型及诱导型启动子之调控序列以及5'及3'非转译区。

[0687] 熟习此项技术者已知之各种表达载体/宿主细胞系统可用于表达本文中所描述之多肽链。在蛋白质复合物由相异多肽链构成的情况下,此类多肽链中之每一者可由单独表达载体或由唯一表达载体提供。根据本发明,蛋白质复合物之两个链可由单一载体或由单独载体(载体集合)编码。

[0688] 多肽通常表达于哺乳动物细胞中。为了长期产生重组蛋白,可使用稳定表达系统,其中DNA区段并入宿主细胞基因体中或藉由使用可选标记物而维持游离型形式。可针对宿主细胞类型调节所插入序列之表达或以所需方式处理所表达多肽的能力来选择该宿主细胞类型。具有针对转译后活性之特定细胞机制及特征机制的不同宿主细胞(例如CHO、HeLa、MDCK、HEK293及W138)可商购及购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection;ATCC),且可经选择以确保对所表达多肽之恰当修饰及处理。

[0689] 可使用其他类型之表达系统。该等表达系统包括例如微生物,诸如经重组噬菌体、质粒或黏粒DNA表达载体转化之细菌;经酵母表达载体转化之酵母;经杆状病毒载体感染之昆虫细胞系统;经病毒或细菌表达载体转化之植物细胞系统;或动物细胞系统。

[0690] 因此,本发明系关于经分离细胞,其经载体、核酸、载体集合、编码本文中所描述之多肽链中之至少一者之核酸之集合转化或转染。因此,本发明亦系关于能够表达或表达本文中所揭示之多肽或蛋白质复合物的经分离细胞。

[0691] 本发明亦系关于一种制造蛋白质复合物的方法。该方法可包含提供细胞(例如哺乳动物细胞)与编码本文中所揭示之多肽链中之一或多者的载体或载体集合,及允许表达。

[0692] 在一些实施例中,藉由细胞产生之多肽和/或蛋白质复合物的效价可为0.1g/L或更大。在一些情况下,藉由细胞产生之多肽和/或蛋白质复合物之效价可为0.5g/L或更大。在一些情况下,藉由细胞产生之多肽和/或蛋白质复合物之效价可为1g/L或更大。在一些情况下,藉由细胞产生之多肽和/或蛋白质复合物之效价可为2g/L或更大。在一些情况下,藉由细胞产生之多肽和/或蛋白质复合物之效价可为3g/L或更大。在一些情况下,藉由细胞产生之多肽和/或蛋白质复合物之效价可为4g/L或更大。通常,藉由用包含编码本文中所揭示之多肽链中之一者之核酸序列的载体转染细胞来制得同二聚体。所收集上清液可含有同二聚体或单体和/或同二聚体之混合物。

[0693] 一般而言,藉由用至少两个类型之载体(载体集合)共转染细胞来制得异二聚体,该等类型各自包含编码两个相异多肽链之核酸序列。链A与链B之适当比率一般视自各个质粒获得之蛋白质表达量而定且可例如在约1:10至约10:1之间变化。大约1:1之DNA比率对于本文中所揭示之一些构筑体尤佳。

[0694] 亦可藉由用编码两个多肽链之单一载体转染细胞来制得异二聚体。所收集上清液可含有异二聚体或单体异二聚体和/或同二聚体之混合物。

[0695] 本发明之制造多肽之方法可进一步包含自包含单体、同二聚体及异二聚体之混合物分离该等单体、同二聚体及异二聚体的步骤。可藉由例如尺寸排阻层析或藉助于标签或藉由熟习此项技术者已知之其他方法来纯化及分离同二聚体或异二聚体。

[0696] 方法亦可包含自杂质分离和/或纯化蛋白质复合物的步骤。

[0697] 因此，本发明之方法将产生包含同二聚体、异二聚体或单体、异二聚体和/或同二聚体之混合物的组合物。

[0698] 在一些例示性实施例中，组合物可主要包含同二聚体。在一例示性实施例中，组合物可包含至少约80％、至少85％、至少90％、至少99％或100％之比例的同二聚体。

[0699] 在其他例示性实施例中，组合物可主要包含异二聚体。在一例示性实施例中，组合物可包含至少约80％、至少85％、至少90％、至少99％或100％之比例的异二聚体。

[0700] 结合物

[0701] 本发明之多肽、多肽链或蛋白质复合物可与例如治疗部分(用于治疗目的)或可侦测部分(亦即用于侦测或诊断性目的)或与允许延长半衰期之蛋白质结合，或系连接至纳米粒子。在一些情况下，治疗性或可侦测部分可连接至多肽之至少一个氨基酸残基。

[0702] 在一例示性实施例中，本发明之多肽、多肽链或蛋白质复合物与诸如但不限于化学治疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、抗癌药(例如小分子)及其类似物之治疗部分结合。

[0703] 治疗部分可包括例如而不限于钇-90、钪-47、铼-186、碘-131、碘-125及许多熟习此项技术者公认之其他治疗部分(例如镥(例如Lu^{177})、铋(例如Bi^{213})、铜(例如Cu^{67}))、5-氟尿嘧啶、阿德力霉素(adriamycin)、伊立替康(irinotecan)、紫杉烷(taxane)、假单胞菌内毒素(pseudomonas endotoxin)、蓖麻毒素(ricin)、奥瑞他汀(auristatin)(例如单甲基奥瑞他汀E、单甲基奥瑞他汀F)、类美登素(maytansinoid)(例如美登素(mertansine))及其他毒素。

[0704] 在另一例示性实施例中，本发明之多肽或蛋白质复合物与包括例如但不限于可藉由光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学和/或其他物理手段侦测之可侦测部分结合。可侦测部分可使用此项技术中熟知之方法直接和/或间接(例如经由键联，诸如但不限于DOTA或NHS键联)与多肽或蛋白质复合物偶合。可使用多种可侦测部分，选择视所需敏感性、结合容易性、稳定性需求及可用仪器而定。适合之可侦测部分包括但不限于荧光标记、放射性标记(例如但不限于^{125}I、In^{111}、Tc^{99}、I^{131}且包括用于PET扫描仪之正电子发射同位素等)、核磁共振活性标记、发光标记、化学发光标记、发色团标记、酶标记(例如但不限于辣根过氧化酶、碱性磷酸酶等)、量子点和/或纳米粒子。可侦测部分可引起和/或产生可侦测信号，从而允许侦测来自可侦测部分之信号。

[0705] 医药组合物

[0706] 本发明亦涵盖包含本发明之多肽或蛋白质复合物之医药组合物。医药组合物亦可包含医药学上可接受之载剂。

[0707] 在一些实施例中，医药组合物包含如本文中所揭示之结合多肽或结合蛋白质复合物。在一些实施例中，医药组合物包含与治疗部分结合之多肽或蛋白质复合物。在一些实施例中，医药组合物包含与可侦测标记结合之多肽或蛋白质复合物。

[0708] 除活性成分以外，医药组合物可含有医药学上可接受之载剂，包含水、PBS、盐溶液、明胶、油、醇及有助于将活性化合物加工成可在医药学上使用之制剂的其他赋形剂及助剂。在其他情况下，可对此类制剂进行灭菌。

[0709] 如本文所用，「医药组合物」意谓治疗有效量之随医药学上可接受之稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载剂一起的药剂。如本文所用之「治疗有效量」系指针对给定

条件及投与方案提供治疗作用的量。此类组合物为液体或经冻干或以其他方式干燥之调配物，且包括具有各种缓冲液含量(例如Tris-HCl.、乙酸盐、磷酸盐)、pH及离子强度之稀释剂、用以预防被表面吸收之诸如白蛋白或明胶的添加剂、清洁剂(例如Tween 20、Tween 80、Pluronic F68、胆酸盐)、增溶剂(例如甘油、聚乙烯甘油)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠)、防腐剂(例如硫柳汞、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯)、膨化物质或张力修饰剂(例如乳糖、甘露糖醇)、诸如聚乙二醇之聚合物与蛋白质之共价连接物、与金属离子之错合物或并入诸如聚乳酸、聚乙醇酸、水凝胶等之聚合化合物之颗粒制剂中或上或并入脂质体、微乳液、微胞、单层或多层囊泡、红血球影或球形质体上之物质。此等组合物将影响物理状态、溶解度、稳定性、活体内释放速率及活体内清除速率。控制或持续释放组合物包括于亲脂性储存物(例如脂肪酸、蜡、油)中之调配物。本发明亦涵盖包覆有聚合物(例如泊洛沙姆(poloxamer)或泊洛沙胺(poloxamine))的颗粒组合物。本发明之组合物之其他实施例并入颗粒形式之保护涂层、蛋白酶抑制剂或渗透强化子以用于各种投与途径，包括非经肠、经肺、经鼻、经口、经阴道、经直肠途径。在一个实施例中，医药组合物系非经肠、癌旁、经黏膜、经皮、肌肉内、静脉内、皮内、皮下、腹膜内、脑室内、颅内及瘤内投与。

[0710] 此外，如本文所用之「医药学上可接受之载剂」或「医药载剂」为此项技术中已知且包括但不限于0.01-0.1M或0.05M磷酸盐缓冲液或0.8％生理盐水。另外，此类医药学上可接受之载剂可为水性或非水性溶液、悬浮液及乳液。非水性溶剂之实例为丙二醇、聚乙二醇、诸如橄榄油之植物油及诸如油酸乙酯之可注射有机酯。水性载剂包括水、醇溶液/水溶液、乳液或悬浮液，包括生理盐水及缓冲介质。非经肠媒剂包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖及氯化钠、乳酸化林格氏溶液或不挥发性油。静脉内媒剂包括流体及营养补充剂、电解质补充剂(诸如基于林格氏右旋糖之彼等补充剂)及类似媒剂。亦可存在防腐剂及其他添加剂，例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体及其类似物。

[0711] 对于任何化合物，治疗有效剂量最初可在细胞培养分析中或在诸如小鼠、大鼠、兔、狗或猪之动物模型中进行估计。动物模型亦可用于确定投与之浓度范围及途径。此类信息随后可用来确定用于在人类中投与的适用剂量及途径。此等技术为熟习此项技术者所熟知，且治疗有效剂量系指改善症状或病况的活性成分之量。治疗功效及毒性可藉由标准医药学程序在细胞培养物或实验动物中测定，诸如藉由计算及对比ED_{50}(在50％群体中治疗上有效之剂量)及LD_{50}(导致50％群体死亡之剂量)。上文所描述之医药组合物中之任一者可应用于任何需要疗法之个体包括但不限于哺乳动物，诸如狗、猫、牛、马、兔、猴及尤其人类。

[0712] 本文中所描述之医药组合物可藉由多种途径投与，包括但不限于经口、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、透皮、皮下、腹膜内、鼻内、经肠、体表、舌下或经直肠方式。

[0713] 使用方法

[0714] 本发明之多肽、多肽链及蛋白质复合物可用于治疗病症或疾病。

[0715] 在一些实施例中，多肽及蛋白质复合物可用于对目标细胞、循环蛋白质或组织之靶向治疗和/或诊断。

[0716] 在一些实施例中，多肽及蛋白质复合物可与治疗部分结合且用于治疗方法。

[0717] 在一些实施例中，多肽及蛋白质复合物可与可侦测部分结合且用于侦测或诊断方法。

[0718] 在一些实施例中，本发明之多肽、多肽链及蛋白质复合物可用于活体内靶向肿瘤。

[0719] 在一些实施例中，多肽、多肽链及蛋白质复合物用于活体内促进肿瘤消退和/或减小肿瘤体积。

[0720] 本发明之多肽、多肽链及蛋白质复合物因此可用于癌症治疗。

[0721] 本发明之方法可包含向有需要之个体投与本文中所揭示之多肽、蛋白质复合物或混合物或包含多肽、蛋白质复合物或混合物之医药组合物的步骤。

[0722] 在一些实施例中，多肽、多肽链及蛋白质复合物系与化学治疗剂组合投与。

[0723] 根据本发明，有需要之个体可为人类。进一步根据本发明，有需要之个体可为动物。

[0724] 在一些实施例中，尤其考虑由新抗原之表达引起或与其相关之病症或疾病的治疗。

[0725] 在一些实施例中，尤其考虑由抗原之表达过度表达引起或与其相关之病症或疾病的治疗。

[0726] 在一些实施例中，病症或疾病可为癌症。

[0727] 在其他实施例中，病症或疾病可为感染。

[0728] 在其他实施例中，病症或疾病可为免疫失调。

[0729] 在其他实施例中，病症或疾病可为代谢失调。

[0730] 本发明之多肽及蛋白质复合物可用于侦测目的。

[0731] 可藉由使含有或疑似含有目标之样本与包含针对特定目标之抗原结合域的多肽或蛋白质复合物接触及使用侦测设备量化与阳性或阴性结合相关之信号来活体外进行此类目标之侦测。

[0732] 样本可来源于哺乳动物(例如人类)。样本可为获自哺乳动物之组织样本或细胞培养物上清液。

[0733] 在一些实施例中，样本可为获自哺乳动物之血清样本、血浆样本、血液样本、精液或腹水。

[0734] 可藉由向个体投与包含针对特定目标之抗原结合域的多肽或蛋白质复合物及使用侦测设备量化与阳性或阴性结合相关之信号来活体内进行此类目标之侦测。

[0735] 在侦测目标在样本或个体中之存在后，可向个体投与药物(例如本文中所揭示之抗体、小分子、多肽或蛋白质复合物)。

[0736] 除本发明中所描述及提供之实施例以外，尤其考虑以下非限制性实施例。

实施例1

[0737] 实例1.产生多肽之方法

[0738] 选择VHH

[0739] 例如藉由骆驼或转殖基因动物之免疫接种或自仅含重链之抗体之合成文库产生此类抗体。选择抗原结合域之序列，且例如以VHH-铰链-Fc融合体形式或藉由噬菌体呈现来表达，且活体外和/或活体内测试其生物活性。基于本发明中概述之不同型式将抗原结合域组装至单一多肽链中，且在细胞中产生多肽链或包括同二聚体及异二聚体之蛋白质复合物，且活体外和/或活体内测试其总体生物活性或不同模块之生物活性。

[0740] 构筑体之基因合成及组装

[0741] 使用GeneArt®系统(Thermo Fisher Scientific)合成对应于基因或基因片段(DNA模块)的DNA区段。将DNA模块设计成具有用于II型限制酶BsaI之识别位点,其在用BsaI消化时产生独特突出端。此等突出端之序列引导模块在DNA构筑体中之位置。

[0742] 使用II型限制酶选殖来组装不同DNA模块。必要时,编码最5'端DNA模块之质粒亦可含有编码信号肽之序列。此外,编码肽标签之序列可添加至DNA模块中之一或多者。各DNA模块通常由独特质粒提供以给予设计柔性。图1提供用于本文中所揭示之多肽的各种模块之例示性实施例。

[0743] 表1、表2、表3及表4之多肽由47个DNA模块之组装产生,该等模板各自由独特质粒编码。

[0744] 用NEB®Golden Gate Assembly Mix(NEB1600)进行金闸极反应。藉由使用100ng之先前已选殖至缺乏BsaI限制位点之载体中的每一模块及100ng之载体质粒pNE-B340进行连接来组装最终构筑体。使用热循环仪在同一试管中完成连接反应,其中在37℃下5分钟及在16℃下5分钟循环30次,随后在55℃下培育一次,持续5min。为减少不含有正确最终产物之背景群落,使用BsaI-HFv2(NEBR3733L)限制酶对连接/消化产物再进行消化。

[0745] 使用来自新英格兰生物实验室(NEB)之酶,使用制造商推荐方案进行所有限制酶消化。

[0746] 转化大肠杆菌

[0747] 根据制造商之说明书使用连接反应混合物转化大肠杆菌(NEB®5-α胜任型大肠杆菌,高效)。简言之,将50μl大肠杆菌胜任细胞添加至连接/消化混合物中且在冰上培育5分钟。藉由在42℃下热冲击30秒来处理细胞。藉由添加350μl SOC来回收细胞,且在20分钟之振荡下在37℃进行培育。将百分之十之转化反应物涂铺在含有安比西林(ampicillin)(100μg/mL)之LB培养盘上。

[0748] 筛选群落

[0749] 筛选存在恰当组装之DNA构筑体的群落。简言之,选取5至12个群落且用于接种含安比西林之2ml LB。使培养物在振荡下在37℃下生长隔夜。根据制造商之说明书使用Qiagen小规模纯化试剂盒提取质粒。用50μl溶离缓冲液(10mM Tris)溶离质粒。藉由用HindIII及EcoRI限制消化来定量及分析质粒。

[0750] 在ExpiCHO或Expi293细胞中转染及表达多肽

[0751] 使用ExpiCHO™表达系统(Thermo Fisher,目录号A29133)或Expi293™表达系统(Thermo Fisher,目录号A14635)将蛋白质二聚体(例如同二聚体或异二聚体)表达于来自DNA构筑体之2.5mL或400mL培养体积中。图2示出本文中所揭示之蛋白质二聚体之例示性构形。

[0752] 简言之,在转染之前,使新近解冻之CHO细胞在培养物中恢复以进行两次或更多次继代。随后每3至4天使细胞继代,直至其达至4×10^6至6×10^6个细胞/毫升为止,此时在预温热至37℃的ExpiCHO™表达培养基中将其稀释至2×10^5至3×10^5个细胞/毫升。转染前一天,将细胞稀释至3×10^6至4×10^6个细胞/毫升,且在转染当天,将细胞进一步稀释至6×10^6个细胞/毫升。用低温OptiPRO™培养基(100μL用于2.5mL培养体积;16mL用于400mL培养体积)稀释每毫升培养体积中之1μg DNA。将ExpiFectamine™CHO试剂(8μL用于2.5mL培养体积;

1280μL用于400mL培养体积)添加至含有DNA之培养基中,且在室温下与ExpiFectamine™/DNA复合物一起培育1至5min。随后在涡旋同时将DNA复合物转移至培养物中(6×10^6个细胞/毫升)。在振荡(INFORS HT振荡器,125rpm)下,于8%CO_2及80%湿度下在37℃培育细胞。在转染开始后18-22h,将ExpiCHO™进料(0.6mL用于2.5mL培养体积;96mL用于400mL培养体积)及ExpiCHO™强化子(15μL用于2.5mL培养体积;2.4mL用于400mL培养体积)添加至细胞。将细胞返回至INFORS HT培育箱,该培育箱设定为37℃、8%CO_2及80%湿度,伴随125rpm之振荡(25mm轨道)。转染后8天,藉由以4000×g离心30min使上清液澄清。使用Nalgene™Rapid-Flow™无菌一次性过滤单元1000mL过滤单元(Thermo Scientific,目录号567-0020)将上清液过滤灭菌,且储存于4℃或冷冻供稍后分析。

[0753] 在转染之前,使新近解冻之HEK293细胞在培养物中恢复以进行两次或更多次继代。随后每3至4天使细胞继代,直至其达至3×10^6至5×10^6个细胞/毫升为止,此时在经预热至37℃之Expi293™表达培养基中将其稀释至3×10^5至5×10^5个细胞/毫升。转染前一天,将细胞稀释至2.5×10^6至3×10^6,且在转染当天,将细胞进一步稀释至3×10^6个活细胞/毫升。用Opti-MEM™I减血清培养基稀释每毫升培养体积中之1μg DNA,2.5mL之培养体积得到150μL之最终体积且400mL之培养体积得到24mL之最终体积。将ExpiFectamine™293试剂(8μL用于2.5mL培养体积;1.3mL用于400mL培养体积)添加至Opti-MEM™I减血清培养基(140μL用于2.5mL培养体积;22.5mL用于400mL培养体积)中以在室温下培育5分钟。将经稀释之ExpiFectamine™添加至经稀释DNA中且在室温下培育15分钟。在涡旋同时将ExpiFectamine™/DNA溶液逐滴转移至培养物中(3×10^6个细胞/毫升)。在隔夜振荡(INFORS HT振荡器,125rpm)下,于8%CO_2及80%湿度下在37℃培育细胞。在转染开始后18-22h,将ExpiFectamine™293转染强化子1(15μL用于2.5mL培养体积;2.4mL用于400mL培养体积)及ExpiFectamine™293转染强化子2(50μL用于2.5mL培养体积;24mL用于400mL培养体积)添加至细胞。将细胞返回至INFORS HT培育箱,该培育箱设定为37℃、8%CO_2及80%湿度,伴随125rpm之振荡(25mm轨道)。转染后5天,藉由以4000×g离心30min使上清液澄清。使用Nalgene™Rapid-Flow™无菌一次性过滤单元1000mL过滤单元(Thermo Scientific,目录号567-0020)将上清液过滤灭菌,且储存于4℃或冷冻供稍后分析。

[0754] 纯化

[0755] 视上清液体积而定使用3-mL MabSelect™SuRe™树脂及重力管柱(GE Healthcare,目录号175438-02)或40-mL MabSelect™SuRe™树脂及AKTA PURE(GE Healthcare,Piscataway,NJ)纯化蛋白质。在注入之前将树脂与0.5NaOH一起培育隔夜,且用基于Tris之缓冲液pH 7.4(50mM Tris-HCl,150mM NaCl,pH 7.4)进行平衡。将上清液涂覆于重力管柱上或以5mL/min涂覆于40-mL管柱上。用基于Tris之缓冲液pH 7.4以3CV(管柱体积)以10mL/min之流动速率洗涤树脂管柱。用3CV之0.1M柠檬酸pH 3以10mL/min溶离蛋白质。将用蛋白质自色谱图(280nm之吸亮度)之视觉输出鉴别的溶离份汇集在一起。用1M Tris-HCl pH 9中和汇集之溶离份以达成约5-6之pH,之后转移至由PBS 10×pH 7.2(15mM磷酸二氢钾、1552mM氯化钠、27mM磷酸氢二钠,ThermoFisher,目录号70013073)制备之PBS(磷酸盐缓冲生理盐水)pH 6缓冲液中。

[0756] 藉由用于自重力管柱纯化之蛋白质的样本浓缩器或藉由透析或藉由用于自AKTA PURE纯化之蛋白质的去盐管柱进行缓冲液更换。用样本浓缩器VivaSpin 2,50kDa MWCO(GE

Healthcare,目录号28932257)藉由以3,500至4,000×g在4℃下离心来浓缩自重力管柱纯化之蛋白质,随后用PBS pH 6稀释以达至4倍,且重复稀释直至样本达至200倍为止。使用7kDa分子量截断透析管道(ThermoFisher,目录号68799)在4℃下以4L PBS pH 6隔夜进行透析。另一方面,将去盐管柱与0.5NaOH一起培育隔夜且用PBS pH 6平衡。以0.5mL/min将15mL体积之经中和蛋白质样本装载至HiPrep 26/10去盐管柱(GE Healthcare,目录号17-5087-02)中,随后用2CV之PBS pH 6溶离蛋白质。重复装载及溶离步骤直至没有遗留来自亲和管柱之溶离的经中和蛋白质样本为止。将用蛋白质自色谱图(280nm之吸亮度)之视觉输出鉴别的溶离份汇集在一起。

[0757] 使用Nalgene™Rapid-Flow™无菌一次性过滤单元150mL过滤单元(Thermo Scientific,目录号565-0010)将样本过滤灭菌。藉由Pierce™二喹啉甲酸蛋白质分析试剂盒(ThermoFisher,目录号23227)对最终蛋白质样本进行定量,且用Endosafe®LAL试剂滤筒(Charles River,目录号PTS2005)测试内毒素含量。在还原或非还原条件下在SDS-PAGE凝胶上分析最终蛋白质样本(参见SDS PAGE及Western印迹法部分)。

[0758] SDS PAGE及Western印迹法

[0759] 准备样本以在具有NuPAGE™LDS样本缓冲液(赛默飞世尔,目录号NP0007)及NuPAGE™样本还原剂(ThermoFisher,目录号NP0004)或不具有药剂还原缓冲液之情况下藉由加热在还原或非还原条件下进行SDS-PAGE分析。藉由在70℃下加热10分钟来使样本变性。在BSA标准下,将样本(16μL)装载至3-8%Tris-Acetate微型凝胶(1.5mm,15孔)上。使用X-Cell SureLock™微型凝胶装置以125伏进行电泳约1小时。使用GelCode™染色试剂(Thermo Fisher,目录号24594)将凝胶染色。

[0760] 对于Western印迹分析,根据制造商之说明书使用iBlot™系统(Thermo Fisher,目录号IB301031)将蛋白质转移至硝化纤维素膜。

[0761] 用抗Penta His-HRP抗体进行His抗原决定基标签之侦测。简言之,藉由在振荡下在室温下于20ml Qiagen阻断缓冲液(Qiagen,目录号1018862)中培育1小时,接着在振荡下在室温下在20ml起始Blocking™T20(PBS)阻断缓冲液(Thermo Fisher,目录号37528)中培育1小时来阻断膜。将膜用1×TBS Tween™-20冲洗三次,持续10分钟。在振荡下在室温下将膜与先前在阻断缓冲液中1:2000稀释之抗Penta His-HRP(Qiagen,目录号1014992)一起培育1小时。将膜用1×TBS Tween™-20冲洗三次,持续10分钟。根据制造商之说明书使用Super Signal™West Pico PLUS(Thermo Fisher,目录号34080)观测信号。使用Azure Biosystem成像系统记录影像。

[0762] 实例2:合成及产生多肽及多肽二聚体

[0763] 藉由骆驼或骆马之免疫接种来产生单域抗体或藉由活体外合成获得单域抗体。

[0764] 产生含有包括VHH之抗原结合域的各种DNA模块的DNA构筑体,表达多肽,且使用本文所描述的方法分离及分析多肽或蛋白质二聚体。

[0765] 表1、表2、表3及表4提供藉由组装各种模块来产生之多肽之例示性实施例。

[0766] 表1及表2之多肽含有允许多肽于经转染细胞中之二聚化的天然二聚域(野生型CH2-CH3)。表1及表2之多肽链因此天然地形成包含两个相同臂之同二聚体。

[0767] 表3及表4之多肽含有有助于异二聚体之形成的突变二聚域(野生型CH2及突变CH3)。更特定言之,表3及表4之多肽具有在单独表达时形成同二聚体或在用互补链表达时

形成异二聚体的可能性。特定地藉由转染表3或表4中所列之链集合(链A及链B)来制得异二聚体。

[0768] 在一些实验中,本申请人使用原理论证(POP)抗原结合域,包括抗CD3(α-CD3:SEQ ID NO:20)、抗PD1(α-PD1;SEQ ID NO:21)、抗鸡蛋白溶菌酶(α-HEWL:SEQ ID NO:22)、抗4HEM(α-4HEM:SEQ ID NO:23)或抗PDL1(α-PDL1:SEQ ID NO:24)之抗原结合域。在其他实验中,申请人使用获自针对肿瘤抗原产生之VHH的抗原结合域。

[0769] 如本文中所证实,抗原结合域之序列可基于所需特异性及价数来选择且其在多肽链内之位置可变化。举例而言,抗原结合域中之每一者可由具有不同序列和/或特异性之另一者置换或替换。此外,可在多价蛋白质之N端或C端中之一者或两者添加额外抗原结合域及连接子且延长。

[0770] 本文所用之代号α-DRD2.1、α-DRD2.2、α-DRD2.3及α-DRD2.4、α-DRD1.1、α-DRD1.2、α-DRD1.3及α-DRD1.4或α-CD36.1、α-CD36.2、α-CD36.3及α-CD36.4表示具有不同互补决定区集合的VHH。

[0771] 藉由用表达多肽的质粒转染细胞来产生原理论证同二聚体,该等多肽藉由代号KB015、KB016、KB017、KB018、KB019、KB020、KB021、KB022、KB023、KB024、KB025、KB026、KB027、KB028、KB029、KB030、KB031、KB032、KB033、KB034、KB035、KB036、KB037、KB038、KB039、KB040、KB041、KB042鉴别且包含表1中所指示之氨基酸序列。

[0772] 表1-含有天然抗体之CH2-CH3域的例示性POP多肽

[0773]

模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7

[0774]

代号	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
KB015	PDL1, CD3, PD1	α-PDL1 SEQ ID NO:24	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB070	PDL1, CD3, PD1	α-PDL1 SEQ ID NO:24	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:9	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB016	PDL1, CD3, PD1	α-PDL1 SEQ ID NO:24	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	α-CD3 SEQ ID NO:20
KB071	PDL1, CD3, PD1	α-PDL1 SEQ ID NO:24	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:9	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	α-CD3 SEQ ID NO:20
KB017	4HEM, 4HEM, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB018	HEWL, HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB019	4HEM, CD3, PD1	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB020	PDL1, 4HEM, 4HEM	α-PDL1 SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB021	4HEM, CD3, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:14	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB022	4HEM, 4HEM, PD1	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21

[0775]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
代号	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
KB023	4HEM, 4HEM, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB024	4HEM, PD1, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB025	4HEM, PD1, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:5	a-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB026	4HEM, PD1, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:6	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB027	4HEM, PD1, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:12	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB028	4HEM, PD1, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:13	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB029	4HEM, PD1, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:14	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB030	4HEM, PD1, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:9	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB031	4HEM, PD1, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:10	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB032	4HEM, PD1,	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:8	α-PD1 SEQ ID	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23

[0776]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
代号	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
	4HEM					NO:21		
KB033	PD1	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16				
KB034	4HEM, 4HEM, PD1	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:3	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB035	4HEM, 4HEM, PD1	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB036	4HEM, 4HEM, PD1	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:6	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB037	4HEM, 4HEM, PD1	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:13	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB038	4HEM, 4HEM, PD1	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:14	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB039	4HEM, 4HEM, PD1	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:9	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB040	4HEM, 4HEM, PD1	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:10	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB041	4HEM, 4HEM, PD1	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:7 (n=1)	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB042	4HEM, 4HEM,	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:8	α-PD1 SEQ ID

[0777]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
代号	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
	PD1							NO:21

[0778] 藉由用针对多巴胺受体2(DRD2)、多巴胺受体1(DRD1)或CD36产生之VHH之抗原结合域置换表1之多肽(例如KB015或KB016)之VHH 1部分和/或藉由用IgG4之对应CH2-CH3域置换Fc部分来产生例示性肿瘤特异性多肽。在一些实验中,IgG4之天然CH2CH3二聚域显示亦充当IgG1天然CH2-CH3域。

[0779] 藉由用表达多肽的质粒转染细胞来产生肿瘤特异性同二聚体,该等多肽藉由代号KB001、KB003、KB004、KB005、KB006、KB007、KB008、KB009、KB010、KB011、KB012、KB013、KB014鉴别且包含表2中所指示之氨基酸序列。

[0780] 表2-含有天然抗体之CH2-CH3域的例示性肿瘤特异性多肽

[0781]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
代号	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
KB001	DRD2, CD3, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB059	DRD2, CD3, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:9	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB060	DRD2, PD1, CD3	α-DRD2.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	α-CD3 SEQ ID NO:20
KB061	DRD2, PD1, CD3	α-DRD2.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:9	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	α-CD3 SEQ ID NO:20
KB003	DRD2, CD3, PD1	α-DRD2.2	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB004	DRD2,	α-	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	α-CD3	SEQ ID	α-PD1

[0782]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
代号	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
	CD3, PD1	DRD2.3	NO: 1	NO:16	NO:2	SEQ ID NO:20	NO:4	SEQ ID NO:21
KB005	DRD2, CD3, PD1	α-DRD2.4	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB044	DRD2, PD1, CD3	α-DRD2.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:2	a-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	a-CD3 SEQ ID NO:20
KB043	DRD2, PD1, CD3	α-DRD2.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:2	a-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	a-CD3 SEQ ID NO:20
KB006	PDL1, CD3, PD1	α-PDL1.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB035	DRD1, CD3, PD1	α-DRD1.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB062	DRD1, CD3, PD1	α-DRD1.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:9	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB063	DRD1, PD1, CD3	α-DRD1.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	α-CD3 SEQ ID NO:20
KB064	DRD1, PD1, CD3	α-DRD1.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:9	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	α-CD3 SEQ ID NO:20
KB007	DRD1, CD3, PD1	α-DRD1.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	α-CD3 SEQ ID NO:20

[0783]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
代号	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
KB008	DRD1, CD3, PD1	α-DRD1.2	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB009	DRD1, CD3, PD1	α-DRD1.3	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB010	DRD1, CD3, PD1	α-DRD1.4	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB011	CD36, CD3, PD1	α-CD36.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB065	CD36, CD3, PD1	α-CD36.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:9	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB066	CD36, CD3, PD1	α-CD36.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	α-CD3 SEQ ID NO:20
KB067	CD36, CD3, PD1	α-CD36.1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:9	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	α-CD3 SEQ ID NO:20
KB012	CD36, CD3, PD1	α-CD36.2	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB013	CD36, CD3, PD1	α-CD36.3	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB014	CD36, CD3,	α-CD36.4	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID

[0784]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
代号	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
	PD1					NO:20		NO:21

[0785] 如自图3至图5中呈现之SDS-PAGE分析可见，多肽KB001、KB003、KB004、KB005(图3)、KB007、KB008、KB009、KB010(图4)、KB012、KB013及KB011(图5)成功地表达于哺乳动物细胞中且具有预期分子量。

[0786] 此外，图6A、图6B、图6D及图6E之结果显示，由KB001、KB003、KB004、KB005、KB008、KB009及KB007制得之蛋白质二聚体可根据方法部分中所描述之纯化制程纯化。

[0787] 实例3:体外测试

[0788] 体外细胞毒性

[0789] 在体外实验中评估本发明之多肽及蛋白质二聚体的细胞毒性。

[0790] 简言之，将肿瘤细胞再悬浮于细胞培养基中以得到5×10^6个细胞/毫升。用CellTrace™Violet溶液标记细胞，随后在37℃下培育10分钟。将CellTrace™Violet标记之肿瘤细胞以1:10之比率与PBMC混合。用蛋白质二聚体或对照物以所指示浓度处理细胞。在冰上用染色死细胞之7-胺基-放线菌素D(7-AAD)溶液在4℃下培育细胞10分钟。藉由流动式细胞测量术测定活细胞之数目以比较用7-AAD染色之细胞相对于用CellTrace™Violet标记之细胞之总数目的百分比。结果系以死细胞的百分比呈现。

[0791] Jurkat细胞上之FACS结合分析

[0792] 藉由流动式细胞测量术评估蛋白质二聚体与Jurkat人类肿瘤细胞株之结合。简言之，用抗CD3抗体(OKT3)预先刺激Jurkat细胞隔夜。藉由在4℃下在阻断缓冲液中培育细胞10分钟来阻断非特异性结合。将含有蛋白质二聚体之溶液添加至细胞中且在4℃下培育20分钟。在培育之后，用FACS染色缓冲液洗涤细胞三次。添加靶向多肽之Fc区的荧光标记抗体，且将细胞在暗处于冰上培育20分钟。再次用FACS缓冲液洗涤细胞三次，再悬浮于100ul FACS染色缓冲液中且使用BD FACSCanto™II流式细胞仪(BD Bioscience)分析。

[0793] ELISA结合分析

[0794] 藉由蛋白脂质体-ELISA测定蛋白质二聚体之结合。简言之，在96孔培养盘上涂布含有目标蛋白或肽之蛋白脂质体或空白脂质体。覆盖培养盘且保持在4℃下隔夜。次日，用PBS洗涤培养盘一次且用阻断缓冲液在室温下阻断1小时。以所指示浓度测试蛋白质二聚体，稀释于阻断缓冲液中且在37℃下培育1小时。在培育之后，用PBS洗涤各孔三次。用以1:5000稀释于阻断缓冲液中之抗IgG1-HRP在室温下培育各孔1小时，随后用PBS洗涤三次。用SuperSignal™ELISA Pico化学发光受质产生信号。在SpectraMax™i3x多模式微量培养盘阅读器(分子装置)上读取培养盘。

[0795] 体外活力分析

[0796] 根据制造商之说明使用CellTiter-Fluor™细胞活力分析(Promega)体外评估蛋白质二聚体降低细胞活力之能力，且与阴性对照物及经媒剂处理(PBS)之对照物之活力进行比较。

[0797] POP多肽及蛋白质二聚体之结果

[0798] 图7至图12呈现用POP多肽及同二聚体进行之实验之例示性结果。

[0799] 结合分析

[0800] 如上文所指示藉由流动式细胞测量术评估由多肽KB017(阴性对照)、KB019(靶向CD3及PD1)或KB015(靶向PDL1、CD3及PD1)制得之同二聚体与Jurkat人类肿瘤细胞株的结合。

[0801] 图7中呈现此实验之结果,且结果显示含有抗PD1、抗CD3及抗PDL1 VHH之同二聚体具有比仅具有抗PD1、抗CD3 VHH之多价蛋白质二聚体显著更高之结合。

[0802] 体外细胞毒性

[0803] 使用上文所描述之细胞毒性分析,在肿瘤细胞株OCI-AML3上评估由多肽KB019或KB015制得之同二聚体之抗肿瘤作用。

[0804] 在第一组实验中,用由KB017多肽(阴性对照)制得之同二聚体或由KB019多肽(靶向CD3及PD1,图8A及图8B)制得之同二聚体处理OCI-AML3细胞,最终浓度为0nM、0.0667nM、0.667nM及6.67nM。在培育之后,将细胞染色,且将死细胞之百分比与活细胞之百分比进行比较。

[0805] 图8C呈现此实验之结果,且结果显示由KB019多肽制得之同二聚体有效地靶向及杀死OCI-AML3细胞。因此,靶向CD3及PD1之VHH活体外赋予分子功能活性。

[0806] 在第二组实验中,将由三特异性KB015多肽(靶向PDL1、CD3及PD1:图8B)制得之同二聚体的抗肿瘤作用与由KB019多肽(图8A)制得之同二聚体的抗肿瘤作用进行比较。简言之,用由KB017、KB019或KB015多肽制得之同二聚体处理OCI-AML3细胞,最终浓度为0nM、0.0667nM、0.667nM及6.67nM。在培育之后,将细胞染色,且将死细胞之百分比与活细胞之百分比进行比较。

[0807] 图8C及图8D呈现此实验之结果,且结果显示,由KB017多肽制得之同二聚体有效地靶向及杀死OCI-AML3细胞且添加靶向PDL1之VHH可活体外增强多价蛋白质二聚体之功能活性。

[0808] 在第三组实验中,将由KB015多肽制得之同二聚体的抗肿瘤作用与由含有相同VHH但在不同位置之KB016多肽制得之同二聚体的抗肿瘤作用进行比较。简言之,用每一同二聚体或用由KB018多肽(阴性对照)制得之同二聚体处理OCI-ML3细胞48小时,最终浓度为0nM、0.007nM、0.07nM、0.7nM及7nM。在培育之后,将细胞染色,且将死细胞之百分比与活细胞之百分比进行比较。

[0809] 图9A呈现此实验之结果,且结果显示抗PD-1及抗CD3 VHH之位置变化不影响蛋白质二聚体之细胞毒性。

[0810] 在另一实验中,产生且测试四特异性多肽。此等例示性四特异性多肽包含二聚域之N端处的两个VHH域及二聚域之C端处的两个VHH域。

[0811] 简言之,四特异性多肽经构筑具有四个功能活性域(靶向CD36、PDL1、CD3及PD1:KB078)、三个功能活性域(靶向PDL1、CD3及PD1:KB075)或两个功能活性域(靶向CD3及PD1:KB076)或不具有功能活性域之阴性对照蛋白质(KB077)。将此等分子与一组含有三个功能活性域(靶向PDL1、CD3及PD1)或两个功能活性域(靶向CD3及PD1)之三特异性多肽或不具有功能活性域之阴性对照蛋白质进行比较。

[0812] 简言之,用Cell Trace Violet预先标记目标OCI-AML3肿瘤细胞,随后在四特异性多肽、三特异性多肽存在下用人类PBMC效应细胞处理,最终浓度为0nM、0.0667nM、0.335nM、

0.667nM及1.334nM。在培育之后，将死细胞用7-AAD染色，且以与活OCI-AML3细胞百分比相比较的死细胞百分比来计算细胞毒性。

[0813] 图9B呈现此实验之结果，且结果显示由四特异性多肽制得之二聚体有效地靶向及杀死OCI-AML3细胞。

[0814] 在另一实验中，将由KB015多肽制得之同二聚体之抗肿瘤作用与由含有仅一个活性VHH之多肽(KB020、KB021或KB022)制得之同二聚体或与三个相应单域抗体-Fc蛋白质KB045(抗PDL1VHH-Fc)、KB046(抗CD3 VHH-Fc)、KB033(抗PD1 VHH-Fc)之组合的抗肿瘤作用进行比较。简言之，用同二聚体或用三个VHH-Fc蛋白质之组合或用由KB023多肽制得之阴性对照同二聚体处理THP-1细胞，最终浓度为0nM、0.007nM、0.07nM、0.7nM及7nM。在培育之后，将细胞染色，且将死细胞之百分比与活细胞之百分比进行比较。

[0815] 图10中呈现之结果显示，由KB015多肽制得之同二聚体具有比含有仅一个针对PD-L1、CD3或PD-1之VHH的分子更大之细胞毒性。

[0816] 连接子之分析

[0817] 研究连接子之序列及在多肽中之位置的作用。

[0818] 简言之，测试含有相同VHH以及连接子序列之变化的三价多肽与重组蛋白PD-1的结合。将作为抗PD1 VHH Fc蛋白质的构筑体KB033用作阳性对照。以1μg/ml将重组蛋白PD-1涂布于96孔培养盘中隔夜。将培养盘洗涤3次，之后用1％BSA阻断。将具有不同稀释程度之多肽添加至培养盘中且在室温下培育1小时。在洗涤3次之后，以0.2μg/ml添加二级抗体抗人类IgG1-HRP。1小时后，添加supersignal ELISA Pico化学发光受质以进行侦测。

[0819] 在第一组实验中，在SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14中所阐述之连接子序列当中选择紧邻Fc之C端部分的连接子(图11A)。

[0820] 在第二组实验中，在SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7(n＝1)、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14中所阐述之连接子序列当中选择两个C端VHH之间的连接子(图12A)。

[0821] 图11B及图11C以及图12B及图12C中呈现之实验之此等结果显示，抗PD-1VHH与其目标之结合受蛋白质二聚体中之连接子类型及长度影响。在此情形下，看来刚性及柔性连接子以类似于阳性对照之亲和力的亲和力进行结合。在紧邻Fc之C端部分之位置处存在具有SEQ ID NO:13中所阐述之序列的螺旋状连接子对蛋白质二聚体之结合具有更大影响。两个C端VHH之间存在具有SEQ ID NO:14中所阐述之序列的螺旋状连接子及在较低程度上具有SEQ ID NO:13中所阐述之序列的连接子亦对蛋白质二聚体之结合具有不良影响。在此情形下，刚性连接子看来对于在二聚域之C端及在位于二聚域之C端的两个VHH之间接合VHH而言更佳。

[0822] 肿瘤特异性多肽及蛋白质二聚体之结果

[0823] 图13至图20呈现关于肿瘤特异性多肽及相关蛋白质二聚体进行之实验之例示性结果。

[0824] 结合分析

[0825] 藉由如本文中所描述之蛋白脂质体ELISA测定由含有相异抗DRD2 VHH部分之多肽制得的同二聚体之结合。将含有DRD2蛋白质之蛋白脂质体或空白脂质体用作目标，且以1uM

之浓度测试由KB001、KB003、KB004、KB005或KB017(阴性对照)多肽制得之同二聚体。

[0826] 图13A中呈现之结果显示,由KB001、KB003、KB004及KB005多肽制得之同二聚体选择性结合于DRD2。

[0827] 关于由含有相异抗DRD1 VHH部分之多肽(KB035、KB008、KB009)制得的同二聚体进行类似实验。图13B呈现此实验之结果,且结果显示,至少由KB008及KB009多肽制得之同二聚体选择性结合于DRD1。

[0828] 关于含有抗CD36 VHH部分之同二聚体进行之ELISA实验显示,至少由KB014多肽制得之同二聚体有效地结合于重组人类CD36(数据未展示)。

[0829] 同二聚体与其目标之结合的可变性很可能归因于肿瘤特异性VHH与其抗原决定基之结合亲和力或亲合力的变化。

[0830] 活体外细胞活力及细胞毒性

[0831] 根据制造商之说明书使用CellTiter-FluorTM细胞活力分析(Promega)测试由含有DRD2靶向部分之多肽制得的同二聚体活体外降低NCI-H510A或NCI-H69之活力的能力。简言之,将与由KB001、KB003、KB004及KB005多肽制得之同二聚体(浓度1,000ng/ml)一起培育的NCI-H510A或NCI-H69细胞之活力与由KB018多肽制得之阴性对照同二聚体或PBS媒剂对照进行比较。

[0832] 图14A及图14B呈现结果,且结果显示DRD2特异性同二聚体降低NCI-H510A(图14A)及NCI-H69(图14B)肺癌细胞株之活力。

[0833] 关于由含有相异DRD1靶向部分之多肽(KB035及KB008)制得之同二聚体进行类似实验以测定NCI-H510A细胞之活力。图14C呈现此实验之结果,且结果显示,由KB007及KB008多肽制得之同二聚体有效地降低NCI-H510A肺癌细胞之活力。

[0834] 如上文所指示使用肿瘤细胞株OCI-AML3测试由含有CD36靶向部分之多肽制得之同二聚体的活体外细胞毒性。用由KB017、KB019、KB012或KB013多肽制得之同二聚体处理细胞,最终浓度为0nM、0.0667nM、0.667nM及6.67nM。将细胞在4℃下与7AAD染色溶液一起在冰上培育10分钟。在培育之后,将细胞染色,且将死细胞之百分比与活细胞之百分比进行比较。

[0835] 图15A中呈现之结果显示,添加靶向癌症特异性抗原CD36之VHH可增强同二聚体之功能性细胞毒性活性。

[0836] 关于由KB014及KB011多肽制得之同二聚体进行的单独实验显示,此等构筑体亦有效地诱导OCI-AML细胞毒性(图15B)。

[0837] 实例4:体内测试

[0838] 已建立的肿瘤模型

[0839] 用2百万个人类OCI-AML3白血病肿瘤细胞皮下注射年龄6至8周的四十只雌性NOG小鼠(Taconics),且用100μL人类PBMC腹膜内注射。当肿瘤达至100至200mm^3时再注射PBMC。在PBMC注射之后2至4天开始处理。将小鼠划分成每组10个动物的4个处理组,具有相同平均肿瘤尺寸。治疗由以下组成:约30mg/kg之抗体剂量之多价蛋白质二聚体或媒剂(PBS)对照,每周两次,持续时间3周。

[0840] 肿瘤预防模型

[0841] 用与7百万人类PBMC混合(1:1)的2百万个人类OCI-AML3白血病肿瘤细胞皮下注射

年龄6至8周的四十只雌性NOG小鼠(Taconics)。将小鼠划分成每组10个动物的4个处理组。治疗由以下组成:约30mg/kg之抗体剂量之多价蛋白质二聚体或媒剂(PBS)对照,每周两次,持续时间3周。

[0842] 多肽及蛋白质二聚体之结果

[0843] 在第一组实验中,在预防性活体内肿瘤模型中使用人类人类OCI-AML3白血病肿瘤细胞比较由KB019或KB015多肽制得之同二聚体的抗肿瘤作用。简言之,用与7百万人类PBMC混合的2百万个OCI-AML3肿瘤细胞皮下注射年龄6至8周的雌性NOG小鼠(Taconics)。将小鼠划分成各由10个动物组成的处理组。治疗由以下组成:28mg/kg之剂量的同二聚体(由KB017、KB019、KB015多肽制得)或媒剂(PBS)对照,每周两次,持续时间3周,在此期间量测肿瘤尺寸且计算肿瘤体积。

[0844] 图16A中呈现之结果显示,靶向CD3及PD1之VHH向KB019多肽制得之同二聚体活体内赋予功能活性,且添加针对PDL1之靶向肿瘤之单域抗体增强分子之功能活性(参见关于由KB015多肽制得之同二聚体的结果)。亦在另一免疫缺陷小鼠模型中获得类似结果(使用NCG小鼠(Charles River),数据未显示)。

[0845] 肿瘤特异性多肽及蛋白质二聚体之结果

[0846] 在预防性活体内肿瘤模型中使用人类OCI-AML3白血病肿瘤细胞将由KB011多肽制得之同二聚体之抗肿瘤作用与由KB017多肽制得之同二聚体之抗肿瘤作用及含有相同抗CD36 VHH但呈sdAb形式之构筑体VHH-Fc(KB058)之抗肿瘤作用进行比较。简言之,用与7百万人类PBMC混合的2百万个OCI-AML3肿瘤细胞皮下注射年龄4至6周的雌性NOG小鼠(Taconics)。将小鼠划分成各由10个动物组成的处理组。治疗由以下组成:28mg/kg之剂量之同二聚体(由KB011、KB015、KB058多肽制得)或媒剂(PBS)对照,每周两次,持续时间3周,其后量测肿瘤尺寸且计算肿瘤体积。

[0847] 图16B中呈现之结果显示,由KB011多肽制得之同二聚体在活体内比VHH-Fc对应物(KB058)更有效。亦在NCG(Charles River)免疫缺陷小鼠模型中证实了同二聚体之效率(资料未展示)。

[0848] CB-17 Fox Chase SCID小鼠中之肿瘤模型

[0849] 将含肿瘤细胞(8百万个细胞/小鼠,NCI-H510A)之DPBS皮下注射(s.c.)至小鼠之右侧腹中。在细胞接种后一天,将接种各细胞株之小鼠随机划分成2个实验组(10或5只小鼠/组),且每一组小鼠腹膜内接受16阴性对照或KB120,每周两次,总共八周。使用光标卡尺来量测肿瘤体积,且每周为小鼠称重一次或两次。使用以下公式计算肿瘤体积:

[0850] 1/2(长度×宽度^2)。为了计算肿瘤生长抑制百分比(TGI),将KB120处理组与其各别阴性对照进行比较。藉由以下公式计算TGI:

[0851] $$TGI\,[\%]=100-\frac{\text{平均值}(TV(\text{經處理})_{\text{第z天}}-TV(\text{經處理})_{\text{第x天}})}{\text{平均值}(TV(\text{個別對照})_{\text{第z天}}-TV(\text{個別對照})_{\text{第x天}})}\times 100$$

[0852] TV第z天表示限定研究日(第z天)个别动物之肿瘤体积,且TV第x天表示分级日(第x天)个别动物之肿瘤体积。在癌症异种移植模型中测试DRD2三特异性蛋白质复合物KB073(对DRD2、PD1及CD3具有特异性)。将NCG小鼠接种NCI-H82细胞,其中人类PBMC及NCI-H82细胞以1:5之比率共植入(图19)。

[0853] 藉由student t测试(双尾)进行统计学测试。

[0854] 图17中呈现之结果显示,抗DRD2 VHH充当sdAb(抗DRD2抗原结合域融合于人类铰链之N端且Fc融合于C端)。在NCI-H510A模型以及其他模型中,相较于阴性对照,KB120构筑体减小肿瘤体积。

[0855] 如本文所概述测试由组装包含对DRD2、PD 1和/或CD3具有特异性之VHH的多肽链形成之多肽复合物的活体外及活体内活性。图19之结果显示,例示性DRD2三特异性蛋白质复合物在NCI-H82 SCLC人类PBMC共植入模型中具有抗肿瘤作用。当与诸如顺铂之化学疗法组合投与时,亦增加蛋白质复合物之抗肿瘤作用(数据未展示)。

[0856] PD-1/PD-L1阻断生物分析

[0857] 在第一组实验中,藉由ELISA评估包含抗PD-1VHH之蛋白质复合物在重组人类PD-1上之结合。

[0858] 简言之,将重组蛋白涂布于96孔培养盘上。覆盖培养盘且保持在4℃下隔夜。次日,用PBS洗涤培养盘一次且用阻断缓冲液在室温下阻断1小时。以所指示浓度测试抗体,稀释于阻断缓冲液中,且在37℃下培育1小时。在培育之后,用洗涤缓冲液洗涤培养盘三次。将培养盘与以1:5000稀释之抗人类Fc-HRP在室温下一起培育1小时,随后用PBS-T洗涤缓冲液洗涤三次。用SuperSignal™ELISA Pico化学发光受质产生信号。在SpectraMax™i3x多模式微量培养盘阅读器(分子装置)上读取培养盘。

[0859] 此实验之结果显示,包含抗PD-1VHH之KB072蛋白质复合物与阳性对照一样有效地结合于重组人类PD-1(图18A)。

[0860] 使用PD-1/PD-L1阻断分析在发光NFAT-RE报导系统内评估包含抗PD-1VHH之蛋白质复合物之阻断活性,且与阳性对照进行比较(图18B)。简言之,解冻PD-L1 aAPC/CHO-K1(目标)细胞且以推荐密度接种至96孔培养盘中,使其黏附于培养盘隔夜。第二天,将蛋白质复合物在分析缓冲液(含10%低IgG FBS之哈姆氏F12培养基)中稀释至350nM,且进行八次2.5×连续稀释。倾析来自96孔培养盘之培养基,将40μl经稀释之多肽或蛋白质复合物及40μlJurkat(效应子)细胞添加至培养盘。将培养盘在37℃下培育6小时。合并Bio-Glo萤光素酶分析缓冲液及受质,且将80μl溶液转移至各孔。将培养盘在室温下培育5分钟,且使用培养盘读取器来量测发光。

[0861] 此实验之结果指示,KB072蛋白质复合物之结合显示与阳性对照类似之活性(图18B)。即使在位于「Fc-连接子」组分与「连接子-VHH」组分之间时,抗PD-1VHH仍具功能性。因此,即使位于Fc之C端处,抗PD-1模块仍具功能性。亦藉由FACS分析观测到蛋白质复合物与表达PD-1之细胞的结合(数据未展示)。包含抗PD-1VHH之蛋白质复合物亦增加PBMC介导之细胞毒性(数据未展示)。

[0862] 在人类小细胞肺癌之DRD2阳性NCI-H69及NCI-H82异种移植模型中观测到放射性标记蛋白质复合物在肿瘤组织中之积聚(数据未展示)。

[0863] 实例5:异二聚体

[0864] 异二聚体设计

[0865] 为了产生异二聚体,本申请人在Fc部分之CH3域中引入多个突变以便去除静电相互作用或引入排斥电荷。

[0866] 简言之,产生含有位置356、370及399(根据EU编号系统)处之突变的DNA构筑体。在

一些此等构筑体(链A)中,位置356处之谷氨酸(E)变成谷氨酰胺(Q),位置370处之赖氨酸(K)变成谷氨酸(E)且位置399处之天冬氨酸(D)变成天冬酰胺(N)。此等构筑体含有有助于侦测不为其功能所需之蛋白质的His标签。产生含有位置357、399及439(根据EU编号系统)处之突变的其他DNA构筑体(链B)。更特定言之,在一些此等构筑体中,位置357处之谷氨酸(E)变成谷氨酰胺(Q),位置399处之天冬氨酸(D)变成天冬酰胺(N),且位置439处之赖氨酸(K)经修饰为谷氨酸(E)。

[0867] 当在不存在另一链之情况下表达于细胞中时,包含链A或链B突变之多肽可组装成同二聚体。

[0868] 表3含有突变二聚域之例示性POP多肽

[0869]

	模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
代号	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
KB047 (链B)	PDL1, CD3, PD1	α-PDL1, SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB068 (链B)	PDL1, CD3, PD1	α-PDL1, SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:9	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB048 (链B)	HEWL, HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB050 (链A)	4HEM, 4HEM, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:23
KB049 (链B)	4HEM, 4HEM	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:23	-	-

[0870]

[0871] 表4-含有突变二聚域之例示性肿瘤特异性多肽

[0872]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
代号	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
KB002 (链B)	DRD2, PD1, CD3	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:9	α-PD1 SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	α-CD3 SEQ ID NO:20
KB069 (链B)	DRD2, CD3, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:9	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB051 (链A)	DRD1, CD3	α-DRD1.4	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:14	α-CD3 SEQ ID NO:20	-	-
KB051 (链B)	DRD1, CD3, PD1	α-DRD1.3	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21

[0873]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
代号	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
KB052 (链A)	DRD1, CD3	α-DRD1.3	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:14	α-CD3 SEQ ID NO:20	-	-
KB052 (链B)	DRD1, CD3, PD1	α-DRD1.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB053 (链A)	DRD1, CD3	α-DRD1.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:14	α-CD3 SEQ ID NO:20	-	-
KB053 (链B)	DRD1, CD3, PD1	α-DRD1.3	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO19	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB054 (链A)	DRD2, CD3	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:14	α-CD3 SEQ ID NO:20	-	-
KB054 (链B)	DRD2, CD3, PD1	α-DRD2.4	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO19	SEQ ID NO:2	α-CD3 SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:4	α-PD1 SEQ ID NO:21
KB055 (链B)	DRD2, HEWL, HEWL	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO19	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB056 (链B)	DRD2, HEWL, CD3	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO19	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	α-CD3 SEQ ID NO:20

[0874] 为了测试CH3突变是否影响分子之细胞毒性，制备含有位置357、399及439处之突变的KB015多肽之变异体(亦即KB047多肽)，将其转染至细胞中，且如上文所描述在活体外分析中测试因此产生之蛋白质二聚体的细胞毒性。

[0875] 简言之，用Cell Trace Violet预先标记目标OCI-AML3肿瘤细胞，随后用人类PBMC效应细胞(效应物:目标比率5:1)在由KB015或KB047多肽制得之蛋白质二聚体存在下处理或用由KB018或KB048多肽制得之阴性对照二聚体处理，最终浓度为0nM、0.007nM、0.07nM、0.7nM及7nM。在培育之后，将死细胞用7-AAD染色，且以死细胞与目标OCI-AML3肿瘤细胞之数目相比较的百分比来计算细胞毒性。

[0876] 图20B中呈现此实验之结果，且结果显示由KB047多肽制得之二聚体的细胞毒性作用类似于由KB015多肽制得之二聚体的细胞毒性作用。如此，此等突变看来并未对分子之细胞毒性产生负面影响。

[0877] 形成异二聚体

[0878] 产生包含三个抗4HEM VHH及含突变D399N、K439E、E357Q(根据EU编号系统)之Fc区的DNA构筑体(KB049多肽)。

[0879] 亦产生含有两个抗4HEM VHH及含突变D399N、K370E及E356Q(根据EU编号系统)之Fc区的另一DNA构筑体(KB050多肽)。

[0880] 如上文所描述使用ExpiCHO™表达系统(Thermo Fisher，目录号A29133)表达多肽。

[0881] 简言之，用编码轻链(KB049多肽)、重链(KB050多肽)之质粒转染细胞或用两种质粒(在图21B中鉴别为KB057)以1:1、3:1及1:3之比率共转染。在转染之后八天使上清液澄清，过滤灭菌且储存于4℃或冷冻以供靠后分析。藉由Western印迹法分析异二聚体之产生且使用Penta.His抗体进行侦测。

[0882] 仅含重链之KB050多肽之表达使得形成重同二聚体，而仅含轻链之KB049之表达使得仅产生轻同二聚体。图21中(非还原条件)呈现此实验之结果，且结果显示有效地形成异二聚体，当DNA比率为1比1时发生最佳异二聚体形成。重链及轻链之共表达(KB057)使得成功产生异二聚体(图21)。

[0883] 进行类似实验以检验VHH域变化之影响，其中藉由以1:1之DNA比率共表达KB051、KB052、KB053之链A及链B或以1:2之DNA比率共表达KB054之链A及链B来测试若干变异体，该等变异体具有替代抗原结合域(图22A)。图22中呈现之此等实验之结果显示，异二聚体可有效地自用各种VHH域编码蛋白质的此等构筑体形成。(图22B-非还原条件，图22C-还原条件)。

[0884] 产生额外突变CH3域，且测试突变多肽组装成异二聚体的能力。表5中呈现例示性多肽链。

[0885]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
CH3域ID	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
KB079 (链A)	HEWL, HEWL,	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:22		
KB080 (链B)	HEWL, HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB081 (链A)	HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22		
KB082 (链B)	HEWL, HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB083 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:21		
KB084 (链B)	DRD2, PD1, CD3	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:20
KB085 (链B)	HEWL, HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB086 (链A)	HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22		
KB087 (链B)	HEWL, HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB088 (链A)	HEWL, HEWL	SEQ ID	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22		

[0886]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
CH3域ID	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
		NO:22						
KB089 (链B)	HEWL, HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB090 (链A)	HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22		
KB091 (链B)	HEWL, HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB092 (链A)	HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22		
KB093 (链B)	HEWL, HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB094 (链A)	HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22		
KB095 (链B)	HEWL, HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB096 (链A)	HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22		
KB097 (链B)	HEWL, HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB098	HEWL,	SEQ	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID		

[0887]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
CH3域ID	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
(链A)	HEWL	ID NO:22	NO:1	NO:70	NO:9	NO:22		
KB099 (链B)	HEWL, HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:71	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:22
KB100 (链A)	HEWL, HEWL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:22		
KB101 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:73	SEQ ID NO:9	α-PD1		
KB102 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:9	α-PD1		
KB103 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:9	α-PD1		
KB104 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:9	α-PD1		
KB105 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:9	α-PD1		
KB106 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:9	α-PD1		
KB107 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:9	α-PD1		

[0888]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
CH3域ID	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
KB108 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:9	α-PD1		
KB109 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:9	α-PD1		
KB110 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:82	SEQ ID NO:9	α-PD1		
KB111 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:9	α-PD1		
KB112 (链A)	DRD2, PD1	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:84	SEQ ID NO:9	α-PD1		
KB113 (链B)	DRD2, PD1, CD3	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:9	α-PD1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:20
KB114 (链B)	DRD2, PD1, CD3	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:9	α-PD1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:20
KB115 (链B)	DRD2, PD1, CD3	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:9	α-PD1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:20
KB116 (链B)	DRD2, PD1, CD3	α-DRD2.1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:9	a-PD1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:20
KB117 (链B)	DRD2, PD1,	α-DRD2	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:9	α-PD1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:20

[0889]

		模块1	模块2	模块3	模块4	模块5	模块6	模块7
CH3域ID	特异性	VHH 1	连接子1	Fc	连接子2	VHH 2	连接子3	VHH 3
	CD3	.1						
KB118 (链B)	DRD2, PD1, CD3	α-DRD2 .1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:90	SEQ ID NO:9	α-PD1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:20
KB119 (链B)	DRD2, PD1, CD3	α-DRD2 .1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:9	α-PD1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:20

[0890] 以不同比率共表达选自下表5之表达链A及链B对的载体，且如上文所描述评估异二聚体之形成。选择不利于同二聚体形成和/或有利于异二聚体形成之突变以产生多价和/或多特异性蛋白质复合物。

[0891] 尤其测试以下载体对。

[0892] -将表达包含SEQ ID NO:53中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:54中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0893] -将表达包含SEQ ID NO:55中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:56中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0894] -将表达包含SEQ ID NO:57中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:58中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0895] -将表达包含SEQ ID NO:59中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:60中所阐述之突变CH3域的多肽共转染。

[0896] -将表达包含SEQ ID NO:61中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:62中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0897] -将表达包含SEQ ID NO:63中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:64中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0898] -将表达包含SEQ ID NO:65中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:66中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0899] -将表达包含SEQ ID NO:67中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:68中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0900] -将表达包含SEQ ID NO:69中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:70中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0901] -将表达包含SEQ ID NO:73中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:85中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0902] -将表达包含SEQ ID NO:73中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:86中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0903] -将表达包含SEQ ID NO:73中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:87中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0904] -将表达包含SEQ ID NO:74中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:88中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0905] -将表达包含SEQ ID NO:75中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:88中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0906] -将表达包含SEQ ID NO:76中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:88中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0907] -将表达包含SEQ ID NO:77中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:88中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0908] -将表达包含SEQ ID NO:77中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:89中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0909] -将表达包含SEQ ID NO:77中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:90中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0910] -将表达包含SEQ ID NO:78中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:88中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0911] -将表达包含SEQ ID NO:79中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:88中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0912] -将表达包含SEQ ID NO:80中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:90中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0913] -将表达包含SEQ ID NO:81中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:88中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0914] -将表达包含SEQ ID NO:81中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:89中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0915] -将表达包含SEQ ID NO:82中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:90中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0916] -将表达包含SEQ ID NO:83中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:88中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0917] -将表达包含SEQ ID NO:84中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:90中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0918] -将表达包含SEQ ID NO:74中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:19中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0919] -将表达包含SEQ ID NO:55中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:19中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0920] -将表达包含SEQ ID NO:55中所阐述之突变CH3域之多肽的载体与表达包含SEQ ID NO:90中所阐述之突变CH3域之多肽的载体共转染。

[0921] 此等实验之结果指示,异二聚体主要在共表达选自以下之链A及链B对时形成:包含SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:20中所阐述、SEQ ID NO:92及SEQ ID NO:93中所阐述、SEQ ID NO:94及SEQ ID NO:95中、SEQ ID NO:96及SEQ ID NO:97中所阐述、SEQ ID NO:98及SEQ ID NO:99中所阐述、SEQ ID NO:100及SEQ ID NO:101中所阐述、SEQ ID NO:102及SEQ ID NO:95中所阐述或SEQ ID NO:103及SEQ ID NO:95中所阐述之突变CH3域的链A及链B对。

[0922] 此等实验之结果亦显示,当多肽对包含SEQ ID NO:92及SEQ ID NO:93中所阐述之突变CH3域或SEQ ID NO:94及SEQ ID NO:95中所阐述之突变CH3域时,异二聚体形成之倾向增加。

[0923] 本文中所描述之实施例及实例为说明性的且不意谓限制申请专利范围之范畴。本发明人意欲将前述实施例之变化形式,包括替代方案、修改及等效物涵盖于申请专利范围中。在本申请案中列举之引文以引用之方式并入本文中。

[0924] 参考文献

[0925] 本申请案通篇提及之所有专利、专利申请案及公开案以引用之方式并入本文中。

[0926] Angal,S.等人,A Single Amino Acid Substitution Abolishes the Heterogeneity of Chimeric Mouse/human IgG4 Antibody,Mol Immunol 30,105-108,1993

[0927] Chen X等人,Fusion Protein Linkers:Properties,Design and Functionality,Adv Drug Deliv Rev.2013;65(10):1357-1369。

[0928] Conrath,K.E.等人,Camel Single-Domain Antibodies as Modular Building Units in Bispecific and Bivalent Antibody Constructs.J.Biol.Chem.2001,276,7346-7350。

[0929] Coppieters,K.等人,Formatted Anti-Tumor Necrosis Factor alpha VHH Proteins Derived from Camelids Show Superior Potency and Targeting to Inflamed Joints in a Murine Model of Collagen-induced Arthritis.Arthritis Rheum.2006,54,1856-1866。

[0930] Detallea L,等人,Generation and Characterisation of ALX-0171,a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus infection.Antimicrobial Agents and Chemotherapy 60(1)2015

[0931] De Vlieger等人,Single-domain Antibodies and their Formatting to Combat Viral Infections,Antibodies 8(1),1-22,2019

[0932] Duggan S.Caplacizumab:First Global Approval.Drugs(2018)78:1639-1642

[0933] Fleischmann R,等人,A Novel Individualized Treatment Approach in Open-Label Extension Study of Ozoralizumab(ATN-103)in Subjects with Rheumatoid Arthritis on a Background of Methotrexate.Abstract 1311,ACR/ARHP年度会议(2012)。

[0934] Fridy PC,等人,A Robust Pipeline for Rapid Production of Versatile Nanobody Repertoires.Nat Methods.2014年12月;11(12):1253-1260。

[0935] Godar M等人.Therapeutic Bispecific Antibody Formats:a Patent Applications Review(19942017)Expert Opinion on Therapeutic patents,2018;28(3):251-276

[0936] Ha,J-H等人.Immunoglobulin Fc Heterodimer Platform Technology:From Design to Applications in Therapeutic Antibodies and Proteins,Front Immunol,2016;7:394。

[0937] Hamers-Casterman C,等人,Naturally-occurring Antibodies Devoid of

Light-chains.Nature 1993,363:446-448。

[0938] Hmila,I.等人,VHH,Bivalent Domains and Chimeric Heavy Chain-only Antibodies with High Neutralizing Efficacy for Scorpion Toxin AahI'.Mol.Immunol.2008,45,3847-3856。

[0939] Hultberg,A等人,Llama-derived Single Domain Antibodies to Build Multivalent,Super Potent and Broadened Neutralizing Anti-viral Molecules.PLoS One 2011,数位对象标识符:10.1371/journal.pone.0017665。

[0940] Jähnichen S,等人,CXCR4Nanobodies(VHH-based single variable domains) Potently Inhibit Chemotaxis and HIV-1Replication and Mobilize Stem Cells.Proc Natl Acad Sci USA.(2010)107:20565-20570。

[0941] Kovalenko OV等人Atypical Antigen Recognition Mode of a Shark Immunoglobulin New Antigen Receptor(IgNAR)Variable Domain Characterized by Humanization and Structural Analysis,J Biol Chem.2013,288:17408-17419

[0942] Muyldermans,S及Smider,2016.Distinct Antibody Species:Structural Differences Creating Therapeutic Opportunities.Current Opinion in Immunology2016,40:7-13

[0943] Muyldermans,S等人,1994.Sequence and Structure of VH Domain From Naturally Occurring Camel Heavy Chain Immunoglobulins Lacking Light Chains.Protein Eng.7:1129-1135。

[0944] Saunders K.O.,Conceptual Approach to Modulating Antibody Effector Functions and Circuation Half-Life,Front.Immunol.10:1296,2019。

[0945] Schoen P,等人,Anti-RANKL Nanobody® ALX-0141Shows Sustained Biomarker Inhibition in a Phase I Study in Healthy Postmenopausal Women.数位对象标识符:10.1530/boneabs.1.PP135(2013)

[0946] Simmons,D.P等人,Dimerisation Strategies for Shark IgNAR Single Domain Antibody Fragments.J.Immunol.Methods 2006,315,171-184。

[0947] Svecova D,等人,A Randomized,Double-Blind,Placebo-Controlled Phase 1 Study of Multiple Ascending Doses of Subcutaneous M1095,an Anti-Interleukin-17A/F Nanobody®,in Moderate-to-Severe Psoriasis.J Am Acad Dermatol.2019年3月26日。

[0948] Tatusova,T.A,等人.(1999),BLAST 2Sequences,a New Tool for Comparing Protein and Nucleotide Sequences,FEMS Microbiol Lett.174:247-250)

[0949] Van Roy M,等人,The Preclinical Pharmacology of the High Affinity Anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061Supports its Clinical Development in Rheumatoid Arthritis.Arthritis Research&Therapy(2015)17:135

[0950] Vincke C.等人General Strategy to Humanize a Camelid Single-Domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold,J.Biol Chem.2009,284(5):3273-3284

[0951] Vu,K.B.,等人,1997.Comparison of Llama VH Sequences from Conventional and Heavy Chain Antibodies.Mol.Immunol.34:1121-1131.序列表

[0952] SEQ ID NO:1(人类IgG1铰链)

[0953] EPKSCDKTHTCPPCP

[0954] SEQ ID NO:2(连接子-HL1)

[0955] EPKIPQPQPKPQPQPQPGGSGSAEAAAKAPKAP

[0956] SEQ ID NO:3(柔性连接子-FL2)

[0957] GGGGSGGGGS

[0958] SEQ ID NO:4(柔性连接子-FL18)

[0959] GGGGSGGGGSGGGGS

[0960] SEQ ID NO:5(柔性连接子-FL4)

[0961] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

[0962] SEQ ID NO:6(柔性连接子-FL5)

[0963] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

[0964] SEQ ID NO:7(柔性连接子)

[0965] $(GGGGS)_n$,其中n为选自1至10之整数

[0966] SEQ ID NO:8(刚性连接子-RL5)

[0967] PAPAPKA

[0968] SEQ ID NO:9(刚性连接子-RL7)

[0969] APAPAPAPAPKA

[0970] SEQ ID NO:10(刚性连接子-RL12)

[0971] APAPAPAPAPAPAPAPAPAPKA

[0972] SEQ ID NO:11(刚性连接子)

[0973] $(X(PAPAP))_n$KA其中n为选自1至10之整数,其中X存在抑或不存在且为A

[0974] SEQ ID NO:12(螺旋状连接子-RL1)

[0975] AEAAAKEAAAKA

[0976] SEQ ID NO:13(螺旋状连接子-RL2)

[0977] AEAAAKEAAAKEAAAKA

[0978] SEQ ID NO:14(螺旋状连接子-RL4)

[0979] AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA

[0980] SEQ ID NO:15(螺旋状连接子$X(EAAAK)_nY$其中n为选自1至10、更佳2至5之整数,其中X及Y独立地存在或不存在且较佳地为A

[0981] SEQ ID NO:16人类IgG1恒定区

[0982] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0983] SEQ ID NO:17替代人类IgG1恒定区

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[0984] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0985] SEQ ID NO:18突变人类IgG1恒定区(链A-突变D399N;K370E;E356Q)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[0986] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0987] SEQ ID NO:19突变人类IgG1恒定区(链B-突变D399N;K439E;E357Q)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[0988] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[0989] SEQ ID NO:20抗CD3 VHH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGSRGNNR

[0990] GRTNYADSVKGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTLV TVSS

[0991] SEQ ID NO:21抗PD1 VHH

XVQLVESGGGLVQAGKSLRLSCAASGSIFSIHAMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGITY

[0992] YEDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAADRAESSWYDYWGQGTQVT VSS

[0993] 其中X为E或Q

[0994] SEQ ID NO:22抗HEWL VHH

XVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREGVAALYTHTGNT

[0995] YYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTCGATRKYVPVRFALDQSSYDY WGQGTQVTVSS

[0996] 其中X为E或Q

[0997] SEQ ID NO:23抗4HEM VHH

XVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASESTFSNYAMGWFRQAPGPEREFVATISQTGSHTY

[0998] YRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNMKPEDTAVYYCAAGDNYYYTRTYEYDYWGQ GTQVTVSS

[0999] 其中X为E或Q

[1000] SEQ ID NO:24抗PDL1 VHH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAKCWFRQAPGKEREWVSCISSSDGSTY

[1001] YADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCAARHGGPLTVEYFFDYWGQG TQVTVSS

[1002] SEQ ID NO:25(CH2/CH3 IgG4-3)

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[1004] SEQ ID NO:26(Fc区IgG4-1)

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[1006] SEQ ID NO:27天然人类CH3

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1008] SEQ ID NO:28替代天然人类CH3

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1010] SEQ ID NO:29天然人类CH2

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

[1012] SEQ ID NO:30突变CH3域(链A-突变D399N;K370E;E356Q)

GQPREPQVYTLPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1014] SEQ ID NO:31突变CH3域(链B-突变D399N;K439E;E357Q)

GQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1016] SEQ ID NO:32人类IgG1铰链变异体

[1017] EPKSSDKTHTCPPCP

[1018] SEQ ID NO:33人类IgG1铰链变异体

[1019] EPKSSDKTHTSPPSP

[1020] SEQ ID NO:34人类IgG1铰链变异体

[1021] DKTHTCPPC

[1022] SEQ ID NO:35人类IgG2铰链

[1023] ERKCCVECPPCP

[1024] SEQ ID NO:36人类IgG2铰链变异体

[1025] ERKSSVECPPCP

[1026] SEQ ID NO:37人类IgG2铰链变异体

[1027] ERKSSVESPPCP

[1028] SEQ ID NO:38人类IgG2铰链变异体

[1029] ERKSSVESPPSP

[1030] SEQ ID NO:39人类IgG3铰链

[1031] ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP

[1032] SEQ ID NO:40人类IgG3铰链变异体

[1033] EPKSSDTPPPCPRCP

[1034] SEQ ID NO:41人类IgG3铰链变异体

[1035] EPKSSDTPPPSPRCP

[1036] SEQ ID NO:42人类IgG3铰链变异体

[1037] EPKSSDTPPPSPRSP

[1038] SEQ ID NO:43人类IgG4铰链

[1039] ESKYGPPCPSCP

[1040] SEQ ID NO:44人类IgG4铰链变异体

[1041] ESKYGPPCPPCP

[1042] SEQ ID NO:45人类IgG4铰链变异体

[1043] ESKYGPPSPSCP

[1044] SEQ ID NO:46人类IgG4铰链变异体

[1045] ESKYGPPSPSSP

[1046] SEQ ID NO:47人类IgG1 Fc区变异体

[1047] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[1048] SEQ ID NO:48人类IgG2 Fc区

[1049] APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1050] SEQ ID NO:49人类IgG2变异体

[1051] APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1052] SEQ ID NO:50人类IgG3 Fc区

[1053] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

[1054] SEQ ID NO:51单一肽

[1055] MEWSWVFLFFLSVTTGVHS

[1056] SEQ ID NO:52抗原决定基标签

[1057] HHHHHHSEQ ID NO:53突变Fc(KB081 Fc)

[1058] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLQSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1059] SEQ ID NO:54突变Fc(KB082 Fc)

[1060] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLQSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1061] SEQ ID NO:55突变Fc(KB083 Fc)

[1062] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VKTLPPKRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLQSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1063] SEQ ID NO:56突变Fc(KB084 Fc)

[1064] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VDTLPPDREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLQSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1065] SEQ ID NO:57突变Fc(KB085 Fc)

[1066] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTYPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1067] SEQ ID NO:58突变Fc(KB086 Fc)

[1068] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPKREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1069] SEQ ID NO:59突变Fc(KB087 Fc)

[1070] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTHPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1071] SEQ ID NO:60突变Fc(KB088 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1072] VYTLPPWREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1073] SEQ ID NO:61突变Fc(KB089 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1074] VYTLPPMRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1075] SEQ ID NO:62突变Fc(KB090 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1076] VYTYPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1077] SEQ ID NO:63突变Fc(KB091 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1078] VYTLPPSKQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1079] SEQ ID NO:64突变Fc(KB092 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1080] VRTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1081] SEQ ID NO:65突变Fc(KB093 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1082] VYTLPPKRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1083] SEQ ID NO:66突变Fc(CKB094 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1084] VYLLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1085] SEQ ID NO:67突变Fc(KB095 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[1086] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYILPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1087] SEQ ID NO:68突变Fc(KB096 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[1088] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYILPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1089] SEQ ID NO:69突变Fc(KB097 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[1090] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYLLPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1091] SEQ ID NO:70突变Fc(KB098 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[1092] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSWEQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1093] SEQ ID NO:71突变Fc(KB099 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[1094] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYVLPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1095] SEQ ID NO:72突变Fc(KB100 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[1096] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYVLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1097] SEQ ID NO:73突变Fc(KB101 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[1098] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTNPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1099] SEQ ID NO:74突变Fc(KB102 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1100] VYTLYPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1101] SEQ ID NO:75突变Fc(KB103 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1102] VYTLVPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1103] SEQ ID NO:76突变Fc(KB104 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1104] VYTLTPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1105] SEQ ID NO:77突变Fc(KB105 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1106] VYTLRPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1107] SEQ ID NO:78突变Fc(KB106 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1108] VYTLLPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1109] SEQ ID NO:79突变Fc(KB107 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1110] VYTLGPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1111] SEQ ID NO:80突变Fc(KB108 Fc)

[1112] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
[1113] VYTLEPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1114] SEQ ID NO:81突变Fc(KB109 Fc)

[1115] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLCPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1116] SEQ ID NO:82突变Fc(KB110 Fc)

[1117] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTWPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1118] SEQ ID NO:83突变Fc(KB111 Fc)

[1119] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTTPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1120] SEQ ID NO:84突变Fc(KB112 Fc)

[1121] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTAPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1122] SEQ ID NO:85突变Fc(KB113 Fc)

[1123] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTIPVLNSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1124] SEQ ID NO:86突变Fc(KB114 Fc)

[1125] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTGPVLNSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1126] SEQ ID NO:87突变Fc(KB115 Fc)

[1127] APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTEPVLNSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1128] SEQ ID NO:88突变Fc(KB116 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[1129] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLKPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1130] SEQ ID NO:89突变Fc(KB117 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[1131] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLDPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1132] SEQ ID NO:90突变Fc(KB118 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[1133] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTRPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1134] SEQ ID NO:91突变Fc(KB119 Fc)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[1135] KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTDPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1136] SEQ ID NO:92KB083链A之突变CH3域(突变D399Q;K370E;E356Q,Y349K,S354K)

[1137] GQPREPQVKTLPPKRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLQ
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1138] SEQ ID NO:93)KB084链B之突变CH3域(突变D399Q;K439E;E357Q,Y349D,S354D)

[1139] GQPREPQVDTLPPDREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLQ
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1140] SEQ ID NO:94(KB110链A之突变CH3域(突变D399N;K370E;E356Q;L351W)

[1141] GQPREPQVYTWPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1142] SEQ ID NO:95KB118链B之突变CH3域(突变D399N;K439E;E357Q;L351R)

[1143] GQPREPQVYTRPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1144] SEQ ID NO:96KB089链A之突变CH3域(突变D399N,K370E,E356Q,S354M)

[1145] GQPREPQVYTLPPMRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1146] SEQ ID NO:97KB090链B之突变CH3域(突变D399N,K439E,E357Q,L351Y)

[1147] GQPREPQVYTYPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1148] SEQ ID NO:98KB095链A之突变CH3域(突变D399N,K370E,E356Q,T350I)

[1149] GQPREPQVYILPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1150] SEQ ID NO:99(KB096链B之突变CH3域(突变D399N,K439E,E357Q,T350I)

[1151] GQPREPQVYILPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1152] SEQ ID NO:100(KB099链A之突变CH3域(突变D399N,K370E,E356Q,T350V)

[1153] GQPREPQVYVLPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1154] SEQ ID NO:101KB100链B之突变CH3域(突变D399N,K439E,E357Q,T350V)

[1155] GQPREPQVYVLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

[1156] SEQ ID NO:102KB105链A之突变CH3域(突变D399N,K370E,E356Q,P352R)

[1157] GQPREPQVYTLRPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1158] SEQ ID NO:103KB108链A之突变CH3域(突变D399N,K370E,E356Q,P352E)

[1159] GQPREPQVYTLEPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

序列表

<110> KisoJi Biotechnology Inc.

<120> 多肽、蛋白质复合物及其制造方法

<130> 17500-001-PCT

<160> 103

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类IgG1铰链

<400> 1

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 2

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接子

<400> 2

Glu Pro Lys Ile Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Gln Pro Gln
1 5 10 15
Pro Gly Gly Ser Gly Ser Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala Pro Lys Ala
20 25 30
Pro

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 连接子

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 4

<211> 15

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接子
<400> 4
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
<210> 5
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接子
<400> 5
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25
<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接子
<400> 6
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30
<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接子
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa不存在,或若存在则为氨基酸残基1至5的1至9次重复

<400> 7
Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5
<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接子
<400> 8
Pro Ala Pro Ala Pro Lys Ala
1 5
<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接子
<400> 9
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Lys Ala
1 5 10
<210> 10
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接子
<400> 10
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
1 5 10 15
Ala Pro Ala Pro Lys Ala
20
<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接子
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa不存在或存在,且若存在则为A
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa不存在,或若存在则为氨基酸残基1至6之1至9次重复
<400> 11
Xaa Pro Ala Pro Ala Pro Xaa Lys Ala
1 5
<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接子
<400> 12
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
1 5 10
<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接子
<400> 13
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
Ala
<210> 14
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接子
<400> 14
Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

20 25

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接子
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa存在或不存在,且若存在则较佳为A
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa不存在,或若存在则为胺基酸残基2至6之1至9次重复
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa存在或不存在,且若存在则较佳为A
<400> 15
Xaa Glu Ala Ala Ala Lys Xaa Xaa
1 5
<210> 16
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG1恒定区
<400> 16
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 17
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 备选人类IgG1恒定区
<400> 17

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 18
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变人类IgG1恒定区
<400> 18

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 19
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变人类IgG1恒定区
<400> 19

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 20
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗CD3 VHH
<400> 20

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

<210> 21
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗PD1 VHH
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa是E或Q

<400> 21

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

<210> 22
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗HEWL VHH
<220>
<221> 1MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa是e或Q
<400> 22

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

85 90 95
Gly Ala Thr Arg Lys Tyr Val Pro Val Arg Phe Ala Leu Asp Gln Ser
100 105 110
Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 23
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗4HEM VHH
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa是E或Q
<400> 23
Xaa Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Ser Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Pro Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Gln Thr Gly Ser His Thr Tyr Tyr Arg Asn Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Asn Met Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Asp Asn Tyr Tyr Tyr Thr Arg Thr Tyr Glu Tyr Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 24
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗PDL1 VHH
<400> 24

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

<210> 25
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CH2/CH3 IgG4-3
<400> 25

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 26
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Fc区 IgG4-1
<400> 26

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

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 27
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 天然人类CH3
<400> 27

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

<210> 28
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 备选天然人类CH3
<400> 28

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

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

<210> 29
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 天然人类CH2
<400> 29
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 30

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

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 31

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

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人类IgG1铰链变异体
<400> 32
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15
<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG1铰链变异体
<400> 33
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro
1 5 10 15
<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG1铰链变异体
<400> 34
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5
<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG2铰链
<400> 35
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10
<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG2铰链变异体
<400> 36

Glu Arg Lys Ser Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG2铰链变异体
<400> 37
Glu Arg Lys Ser Ser Val Glu Ser Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG2铰链变异体
<400> 38
Glu Arg Lys Ser Ser Val Glu Ser Pro Pro Ser Pro
1 5 10

<210> 39
<211> 62
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG3铰链
<400> 39
Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45
Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
50 55 60

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

<220>
<223> 人类IgG3铰链变异体
<400> 40
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
1 5 10 15
<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG3铰链变异体
<400> 41
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Cys Pro
1 5 10 15
<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG3铰链变异体
<400> 42
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Thr Pro Pro Pro Ser Pro Arg Ser Pro
1 5 10 15
<210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG4铰链
<400> 43
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10
<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG4铰链变异体
<400> 44

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG4铰链变异体
<400> 45
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Ser Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG4铰链变异体
<400> 46
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Ser Pro Ser Ser Pro
1 5 10

<210> 47
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG1 Fc区变异体
<400> 47
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 48
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG2 Fc区
<400> 48

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

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
130 135 140
Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145 150 155 160
Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 49
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG2 Fc区变异体
<400> 49

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

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 50
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人类IgG3 Fc区
<400> 50

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

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215
<210> 51
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 信号肽
<400> 51
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser
<210> 52
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 表位标签
<400> 52
His His His His His His
1 5
<210> 53
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 53
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Gln Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Gln Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 54
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 54

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

100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Gln Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Gln Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 55
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 55

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

130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Gln Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 56
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 56

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

165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 57
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 57
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Tyr Pro Pro Ser Arg Gln Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 58
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 58

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

<210> 59

<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 59

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

<210> 60
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 突变Fc

<400> 60

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

<210> 61

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变Fc

<400> 61

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

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

<210> 62
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 62

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

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

<210> 63
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 63

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

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Lys Gln Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 64
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 64

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Arg Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Gln Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 65
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 65

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 66
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 66

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 67
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 67

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 68
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 68

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

<210> 69
<211> 217

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 69

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

<210> 70
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc

<400> 70

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

<210> 71
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 71

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

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

<210> 72
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 72
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Gln Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 73

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变Fc

<400> 73

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Gln Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Asn Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 74
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 74
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Tyr Pro Ser Arg Gln Glu Met

115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 75
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 75
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Val Pro Ser Arg Gln Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 76
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 76

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

180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215
<210> 77
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 77
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Arg Pro Ser Arg Gln Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 78
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 78

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

<210> 79
<211> 217
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 79

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

<210> 80
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 80

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

<210> 81
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 81

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

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

<210> 82
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 82

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

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Trp Pro Pro Ser Arg Gln Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 83
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 83

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

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Thr Pro Pro Ser Arg Gln Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 84
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 84

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 85
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 85

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

Tyr Lys Thr Thr Ile Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 86
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 86

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

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 87
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 87

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

<210> 88
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 88

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

<210> 89
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变Fc
<400> 89

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

<210> 90
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 90

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

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

<210> 91
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变Fc
<400> 91

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp Pro Pro Ser Arg Glu Gln Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 92
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 92

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Lys Thr Leu Pro Pro Lys Arg Gln
1 5 10 15

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

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

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Gln Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 93
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 93
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Asp Thr Leu Pro Pro Asp Arg Glu
1 5 10 15
Gln Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Gln Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95
Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 94
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 94
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Trp Pro Pro Ser Arg Gln
1 5 10 15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe
20 25 30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

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

<210> 95
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 95

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

<210> 96
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 96

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Met Arg Gln
1 5 10 15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu Gly Phe

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

<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 97
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Tyr Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15
Gln Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asn Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95
Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 98
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 98

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

<210> 99
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 99

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

<210> 100
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变CH3域
<400> 100

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

<210> 101
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 101

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

<210> 102

<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 102

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

<210> 103
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 突变CH3域
<400> 103

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

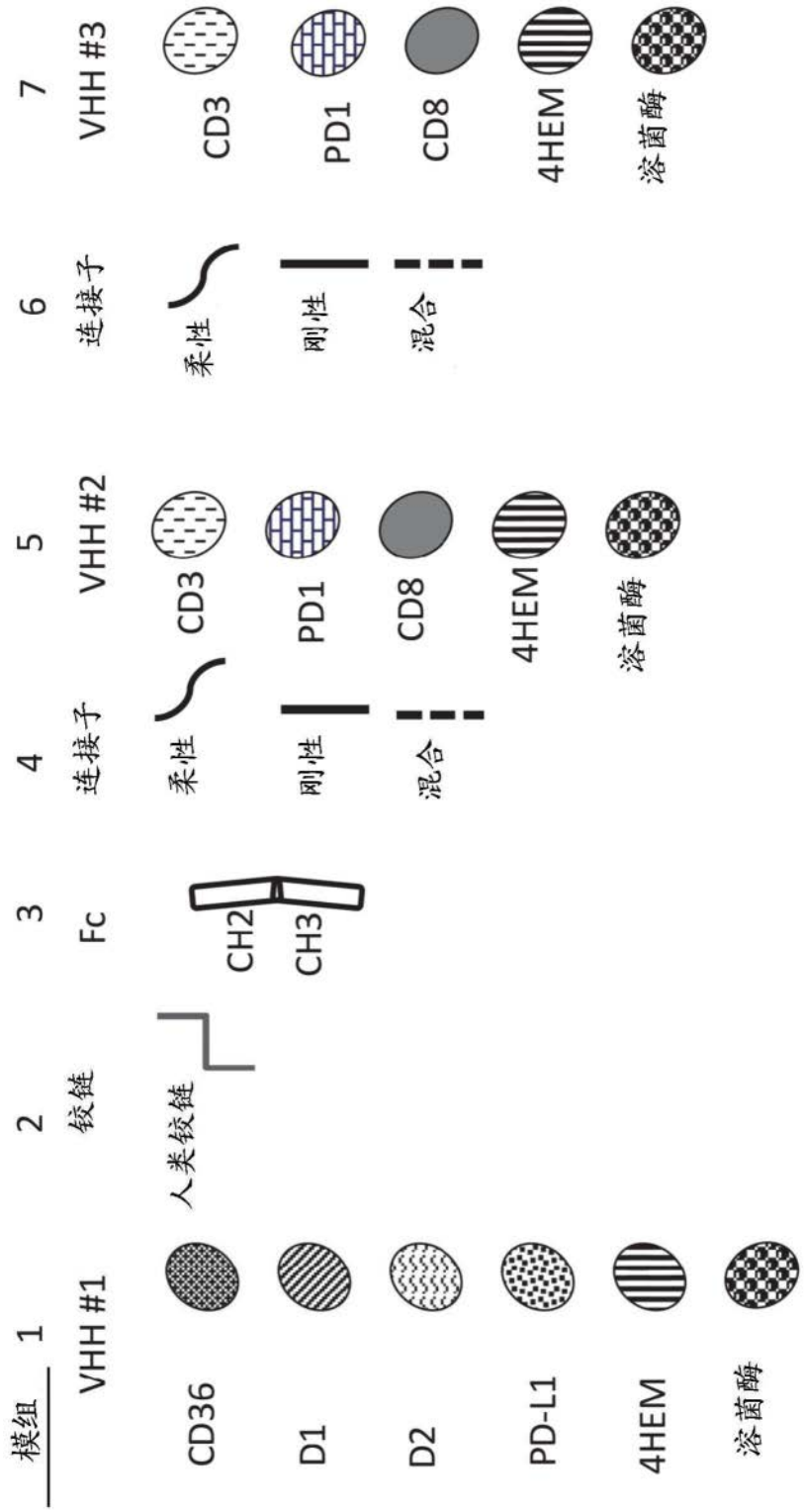

模组
1
VHH #1
CD36
D1
D2
PD-L1
4HEM
溶菌酶
2
铰链
人类铰链
3
Fc
CH2
CH3
4
连接子
柔性
刚性
混合
5
VHH #2
CD3
PD1
CD8
4HEM
溶菌酶
6
连接子
柔性
刚性
混合
7
VHH #3
CD3
PD1
CD8
4HEM
溶菌酶

图1

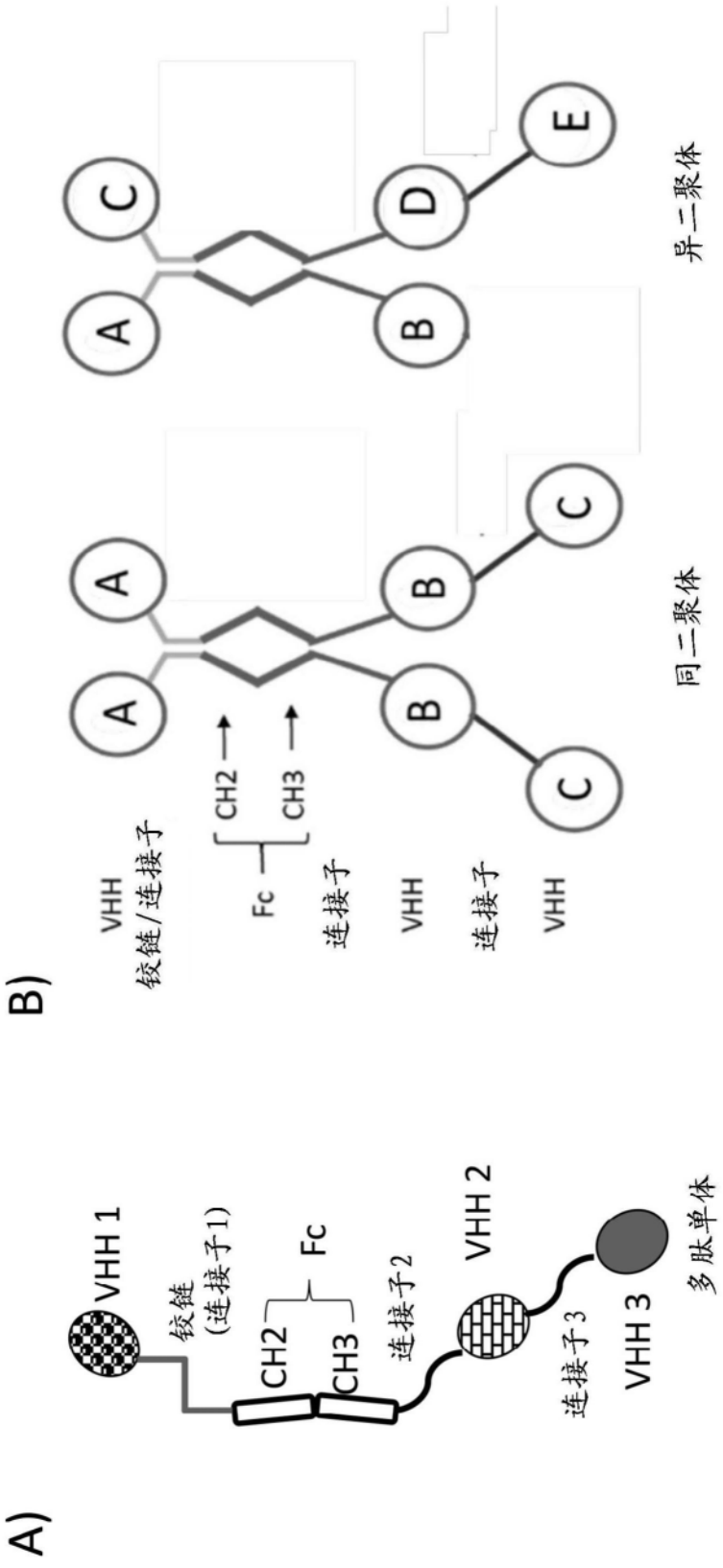

A)
VHH 1
铰链
(连接子1)
CH2
CH3
Fc
连接子2
VHH 2
连接子3
VHH 3
多肽单体
B)
VHH
铰链/连接子
CH2
CH3
Fc
连接子
VHH
连接子
VHH
同二聚体
异二聚体

图2

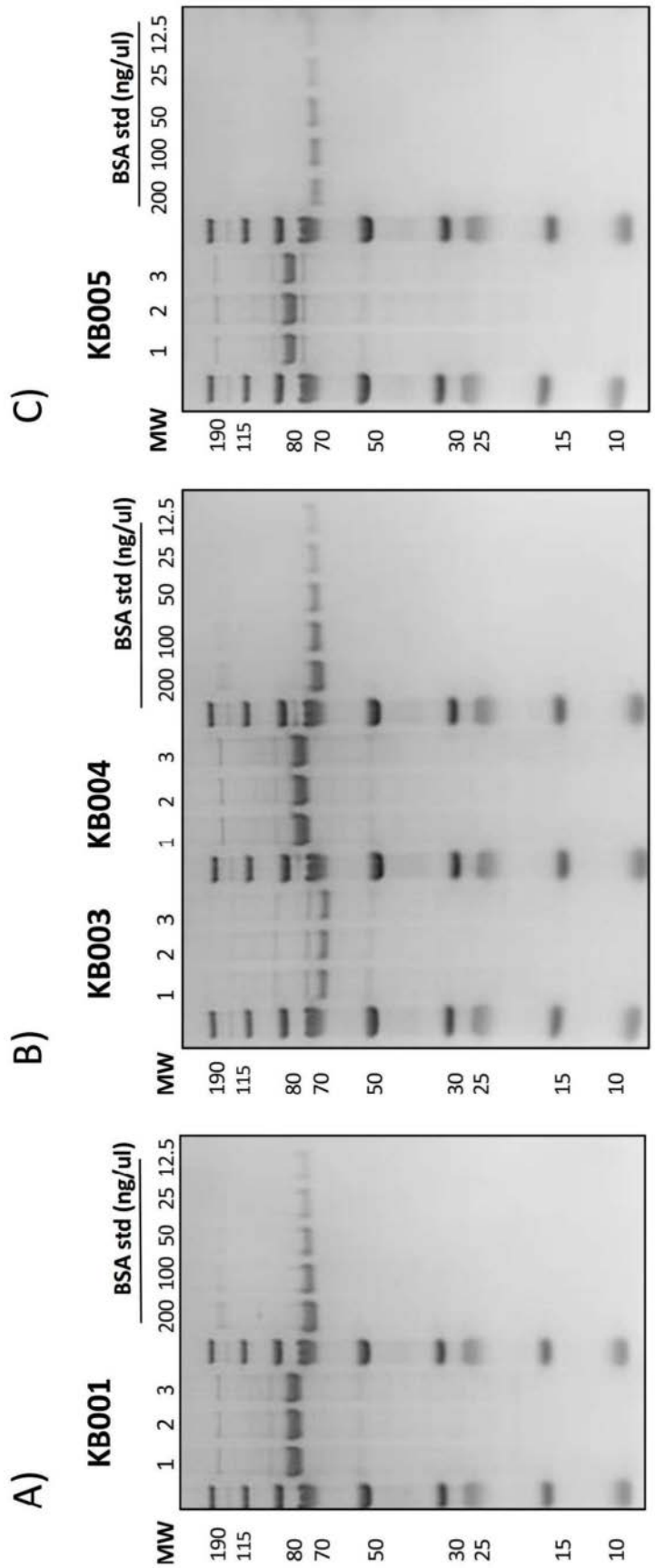

A)
KB001
BSA std (ng/ul)
200 100 50 25 12.5
1 2 3
MW
190
115
80
70
50
30
25
15
10
B)
KB003
KB004
BSA std (ng/ul)
200 100 50 25 12.5
1 2 3 1 2 3
MW
190
115
80
70
50
30
25
15
10
C)
KB005
BSA std (ng/ul)
200 100 50 25 12.5
1 2 3
MW
190
115
80
70
50
30
25
15
10

图3

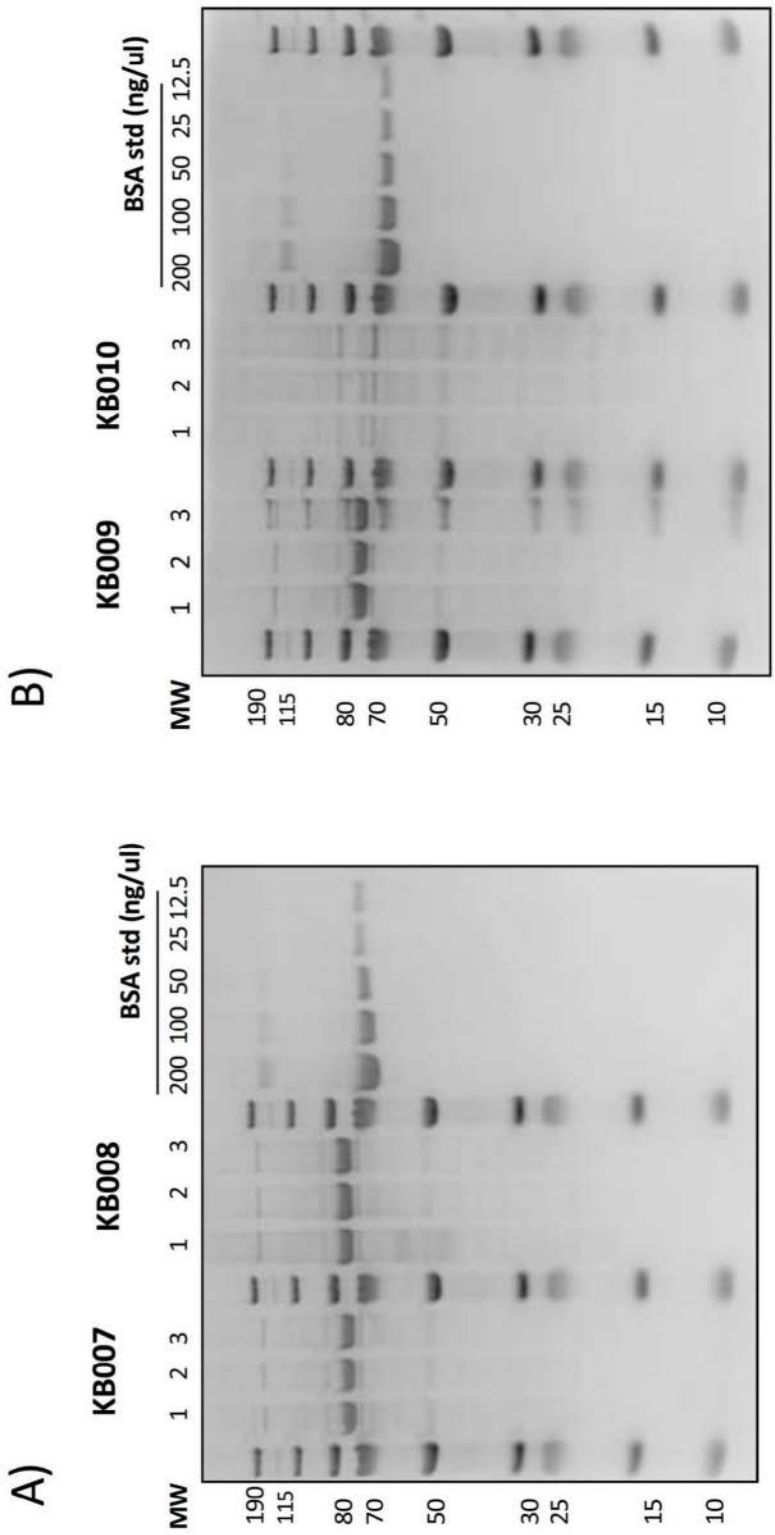

A)
MW
KB007
KB008
1 2 3 1 2 3
BSA std (ng/ul)
200 100 50 25 12.5
190
115
80
70
50
30
25
15
10
B)
MW
KB009
KB010
1 2 3 1 2 3
BSA std (ng/ul)
200 100 50 25 12.5
190
115
80
70
50
30
25
15
10

图4

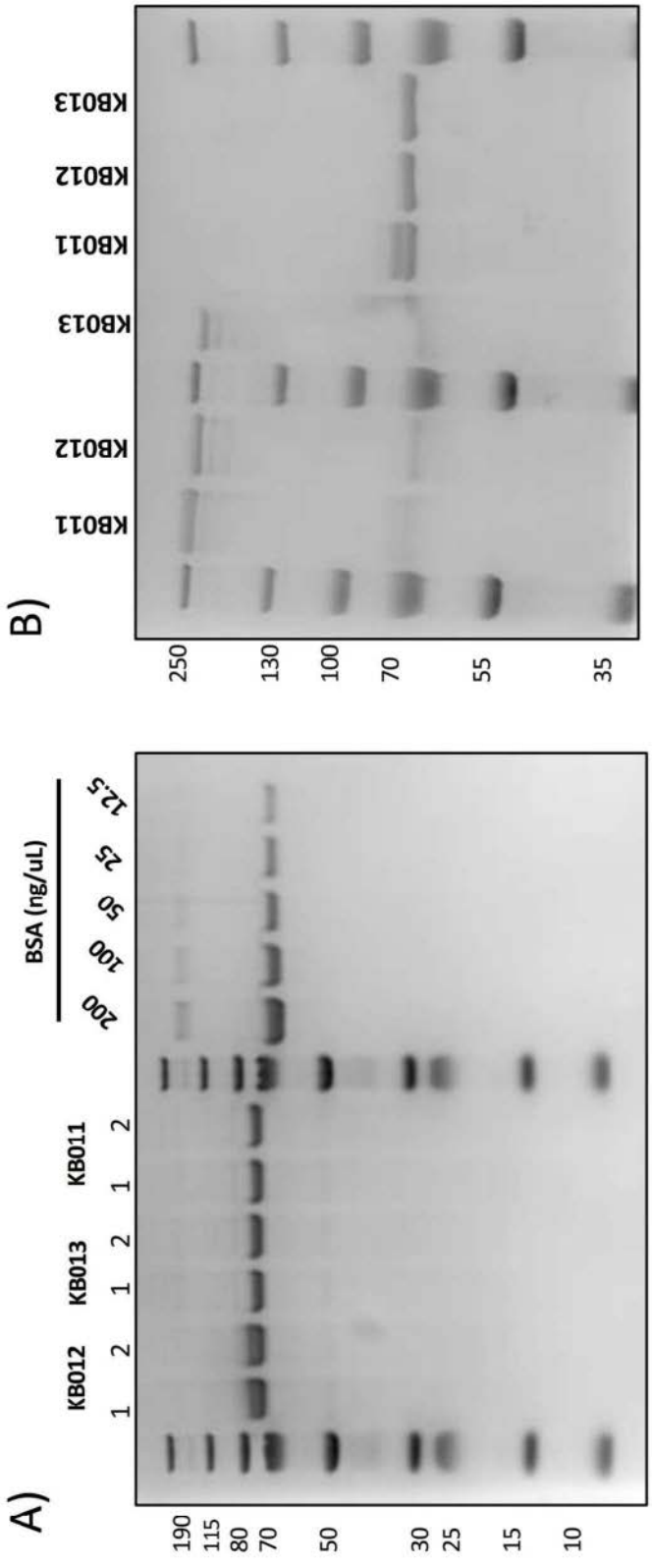
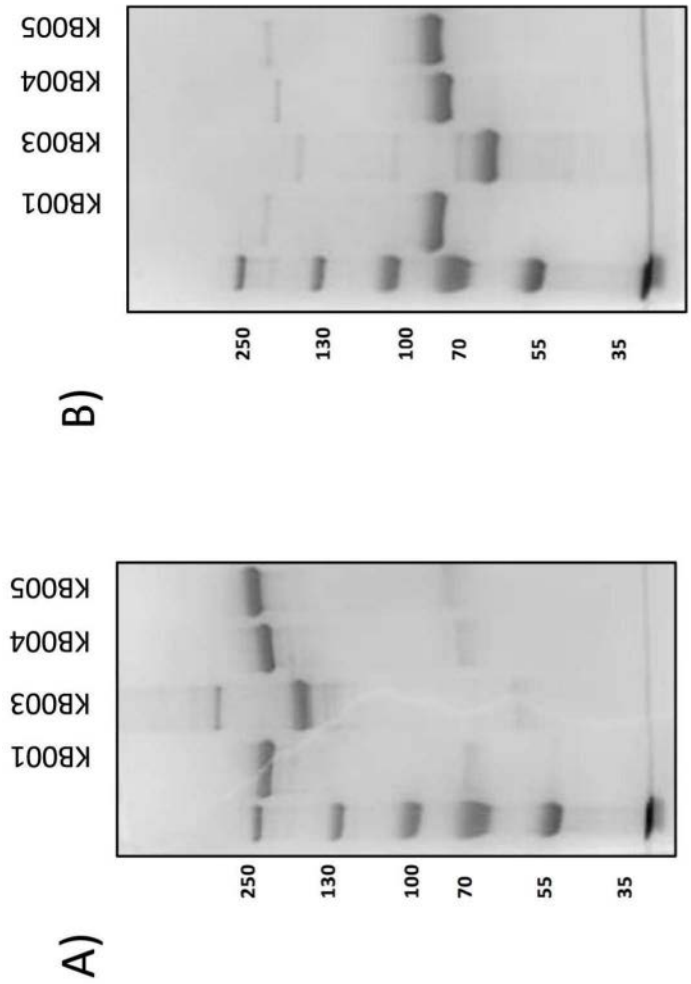

B)
KB011
KB012
KB013
KB011
KB012
KB013
250
130
100
70
55
35
A)
KB012
KB013
KB011
1
2
1
2
1
2
BSA (ng/uL)
200
100
50
25
12.5
190
115
80
70
50
30
25
15
10

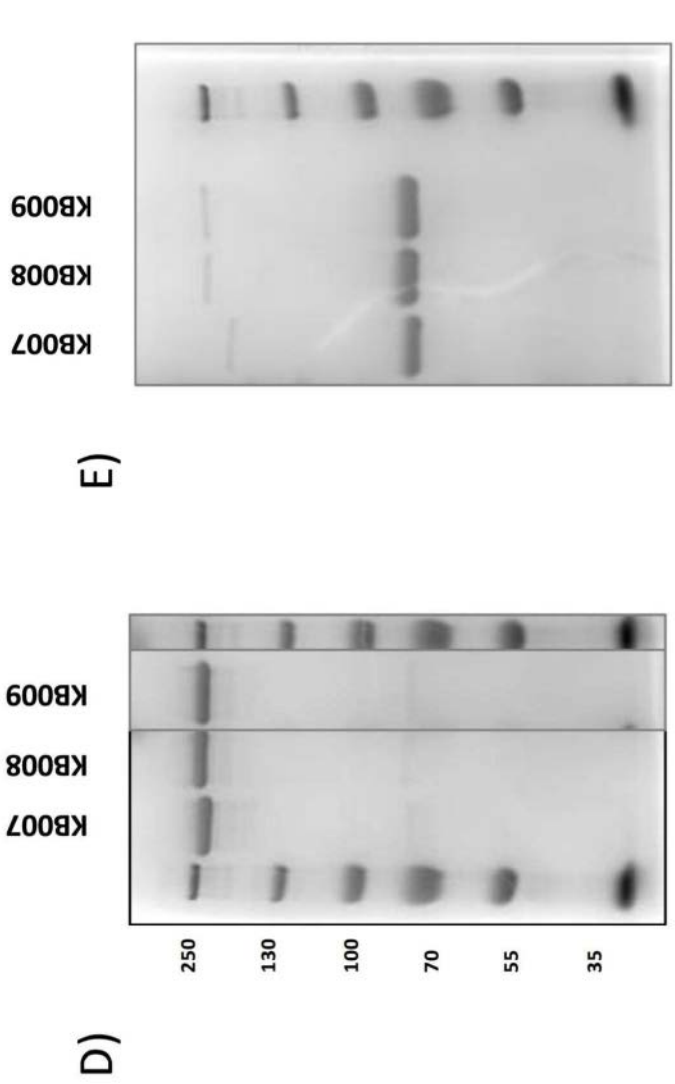
图5



C)

蛋白质ID	KB001	KB003	KB004	KB005
体积培养(L)	1	1	1	1
pI	7.54	7.69	7.87	7.87
MW (kDa)	69.631	69.948	69.743	70.032
最终产物(mg)	730	135	634	450

图6



F)

蛋白质ID	KB007	KB008	KB009
体积培养(L)	1	1	1
pI	7.68	7.55	7.43
MW (kDa)	70.799	70.201	70.233
最终产物：(mg)	**376**	**760**	**730**

图6

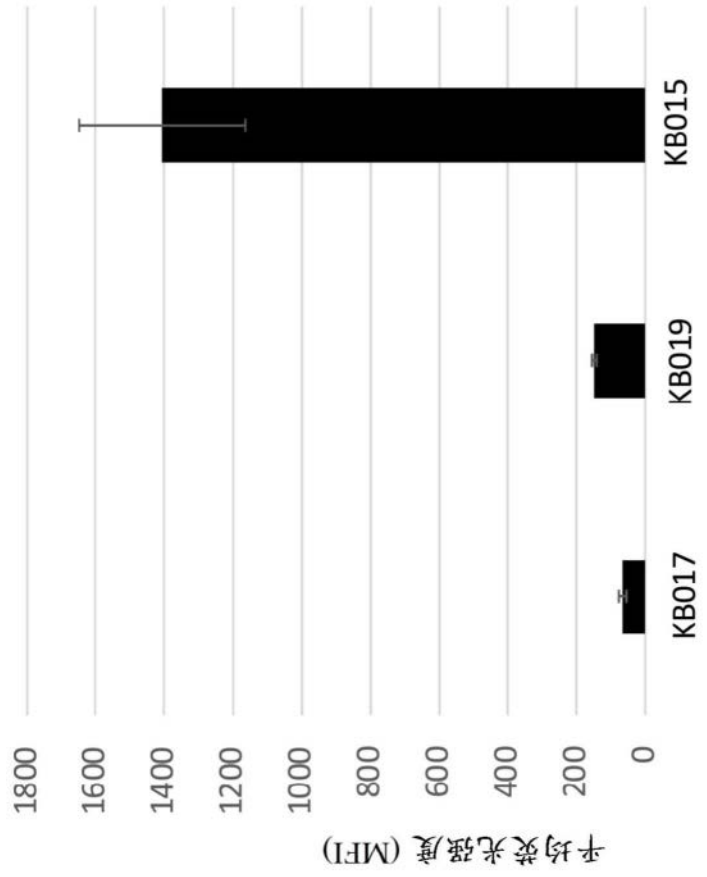

KB015
KB019
KB017
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
平均荧光强度 (MFI)

图7

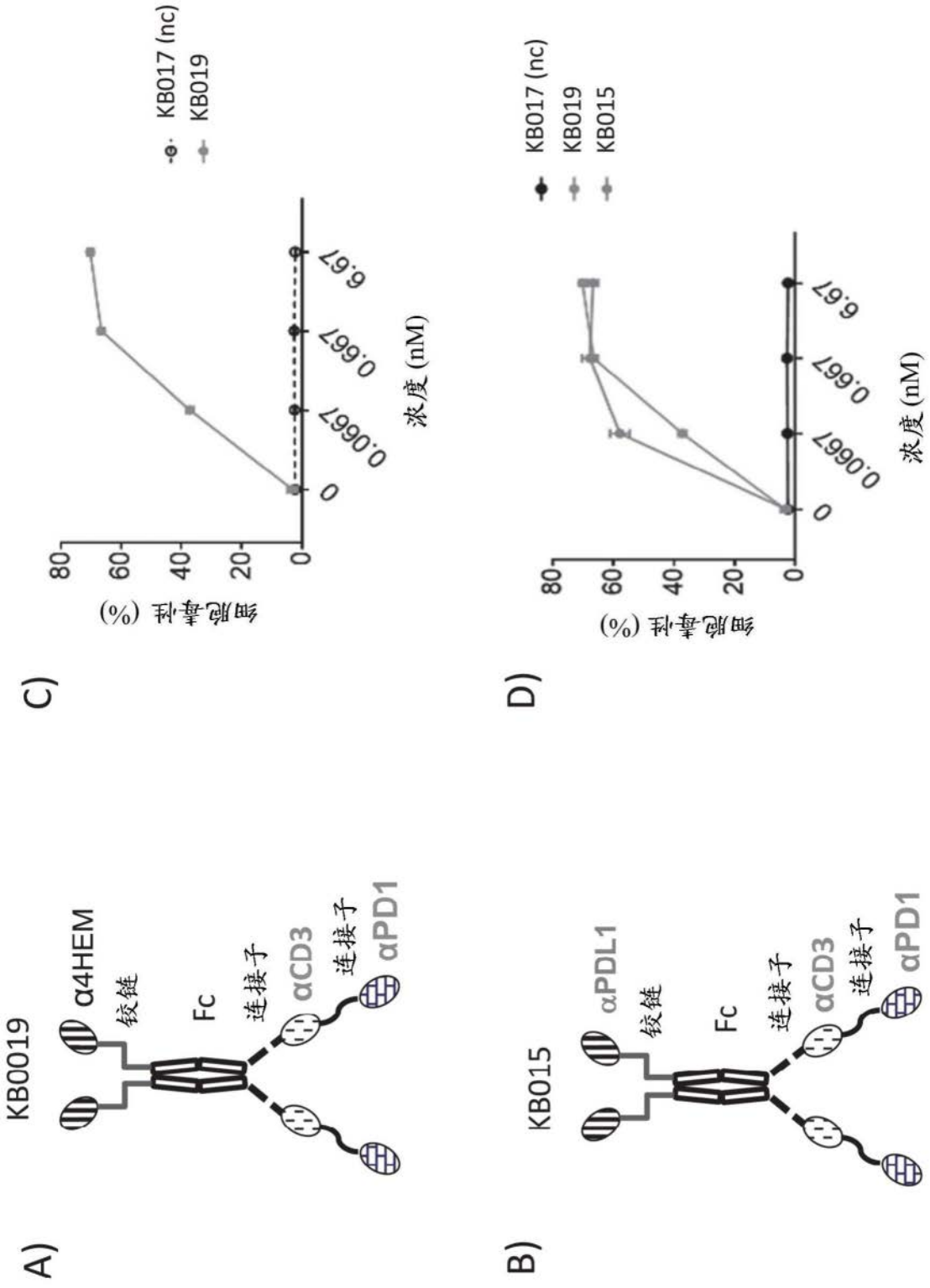

A)
KB0019
α4HEM
铰链
Fc
连接子
αCD3
连接子
αPD1
B)
KB015
αPDL1
铰链
Fc
连接子
αCD3
连接子
αPD1
C)
KB017 (nc)
KB019
细胞毒性 (%)
浓度 (nM)
D)
KB017 (nc)
KB019
KB015
细胞毒性 (%)
浓度 (nM)

图8

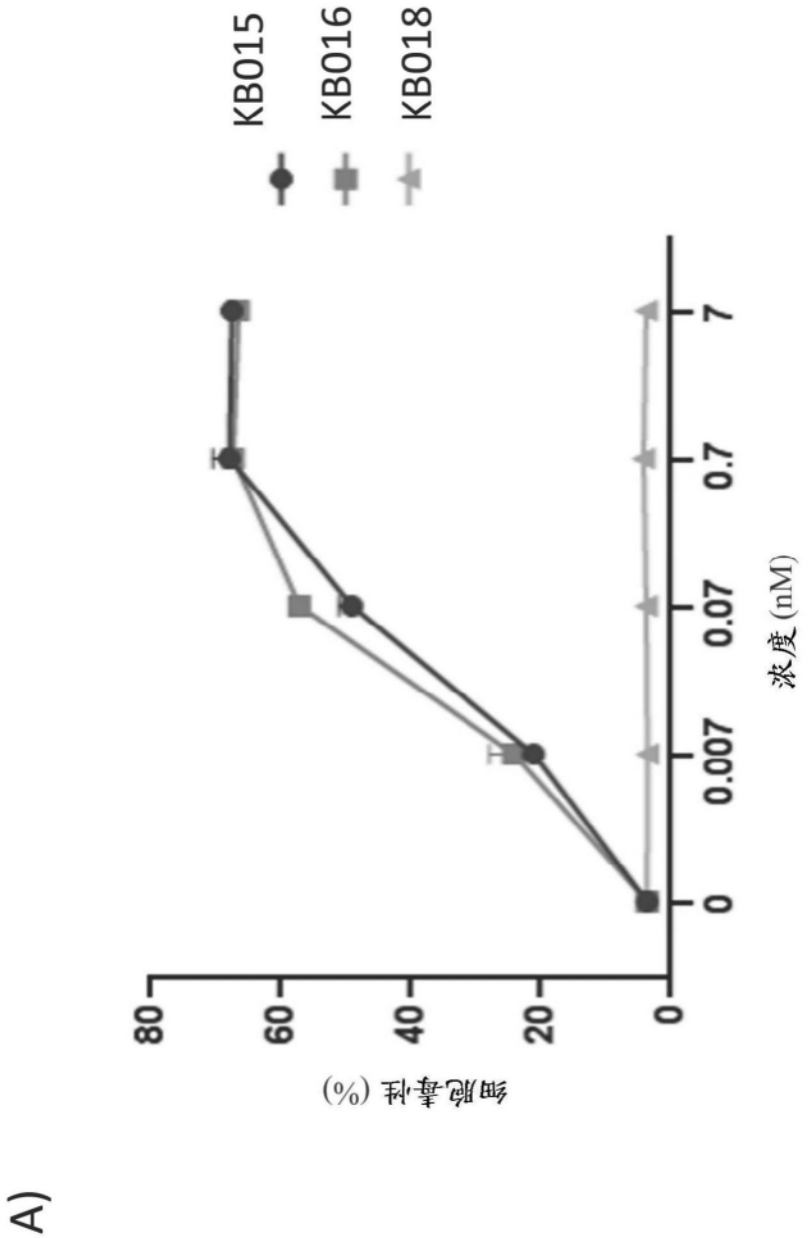
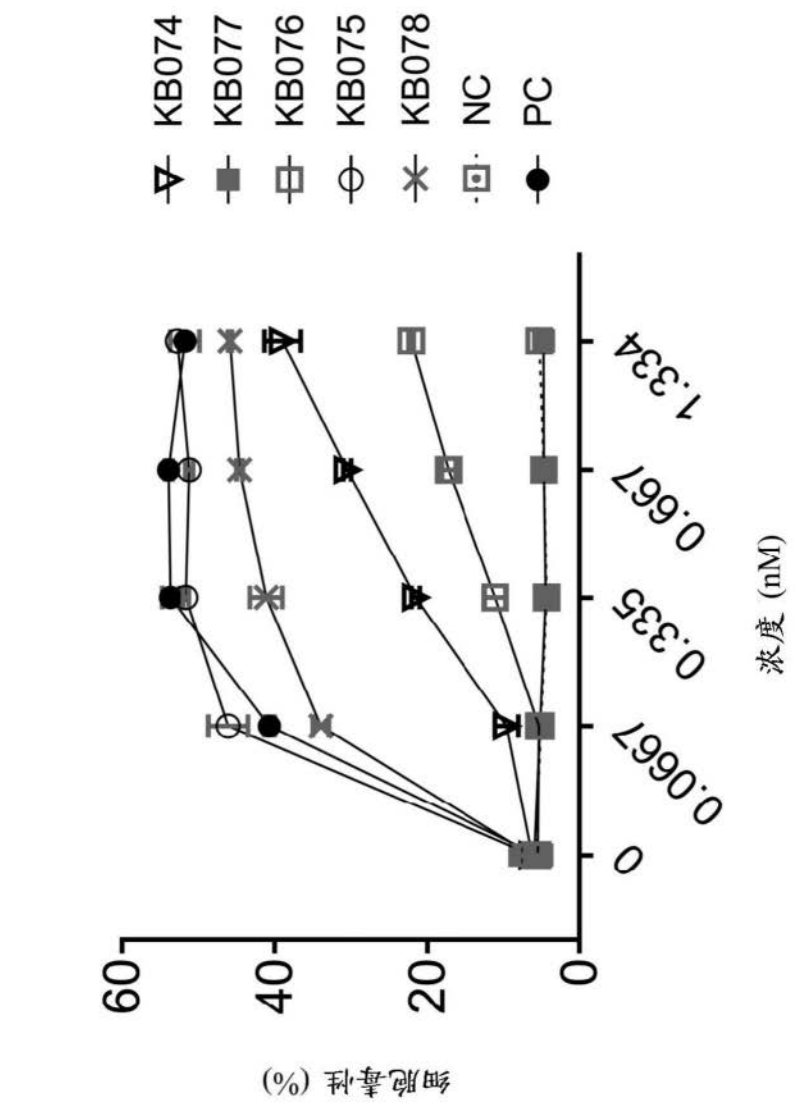


图9


KB074
KB077
KB076
KB075
KB078
NC
PC
60
40
20
0
细胞毒性 (%)
0
0.0667
0.335
0.667
1.334
浓度 (nM)

B)

图9

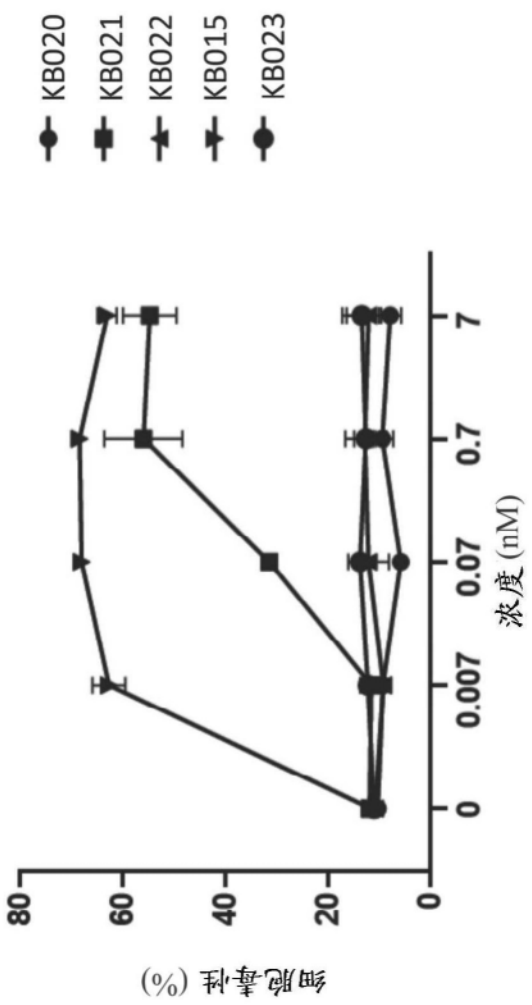

KB020
KB021
KB022
KB015
KB023
细胞毒性 (%)
0
20
40
60
80
0
0.007
0.07
0.7
7
浓度 (nM)

图10

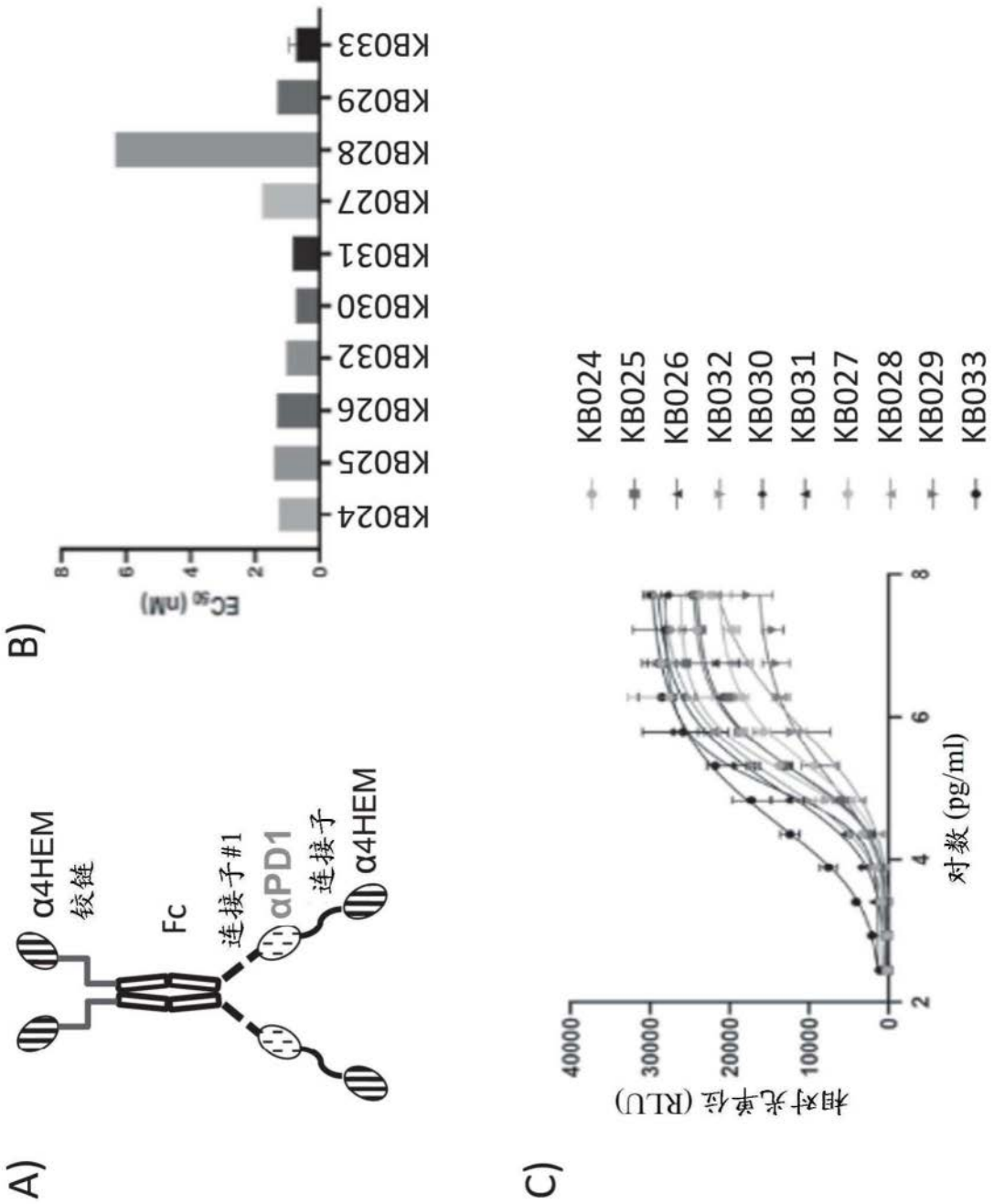

A)
α4HEM
铰链
Fc
连接子#1
αPD1
连接子
α4HEM
B)
KB024
KB025
KB026
KB032
KB030
KB031
KB027
KB028
KB029
KB033
C)
KB024
KB025
KB026
KB032
KB030
KB031
KB027
KB028
KB029
KB033
对数 (pg/ml)

图11

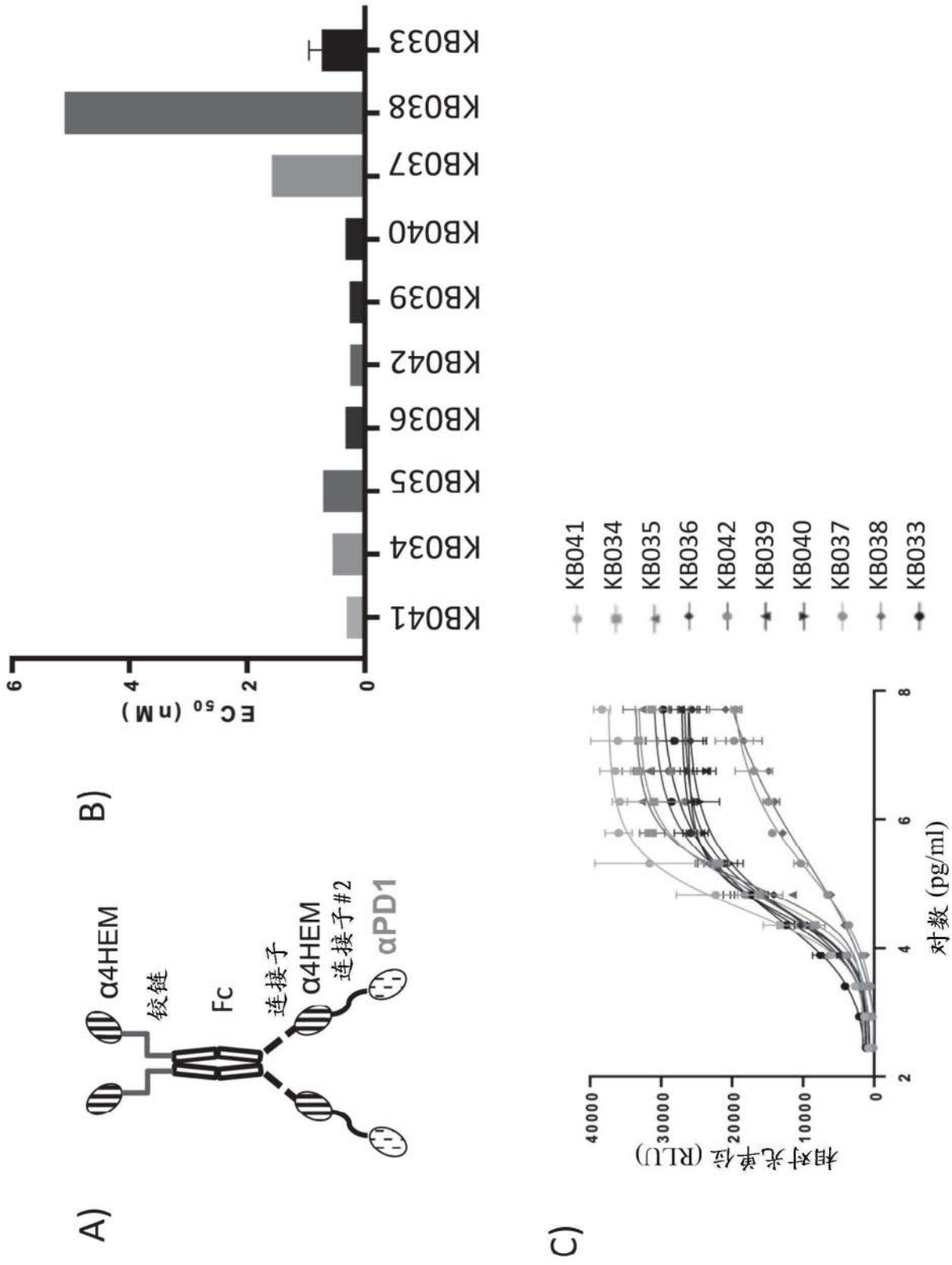

A)
α4HEM
铰链
Fc
连接子
α4HEM
连接子#2
αPD1
B)
EC50 (nM)
0
2
4
6
KB041
KB034
KB035
KB036
KB042
KB039
KB040
KB037
KB038
KB033
C)
相对光单位 (RLU)
0
10000
20000
30000
40000
2
4
6
8
对数 (pg/ml)
KB041
KB034
KB035
KB036
KB042
KB039
KB040
KB037
KB038
KB033

图12

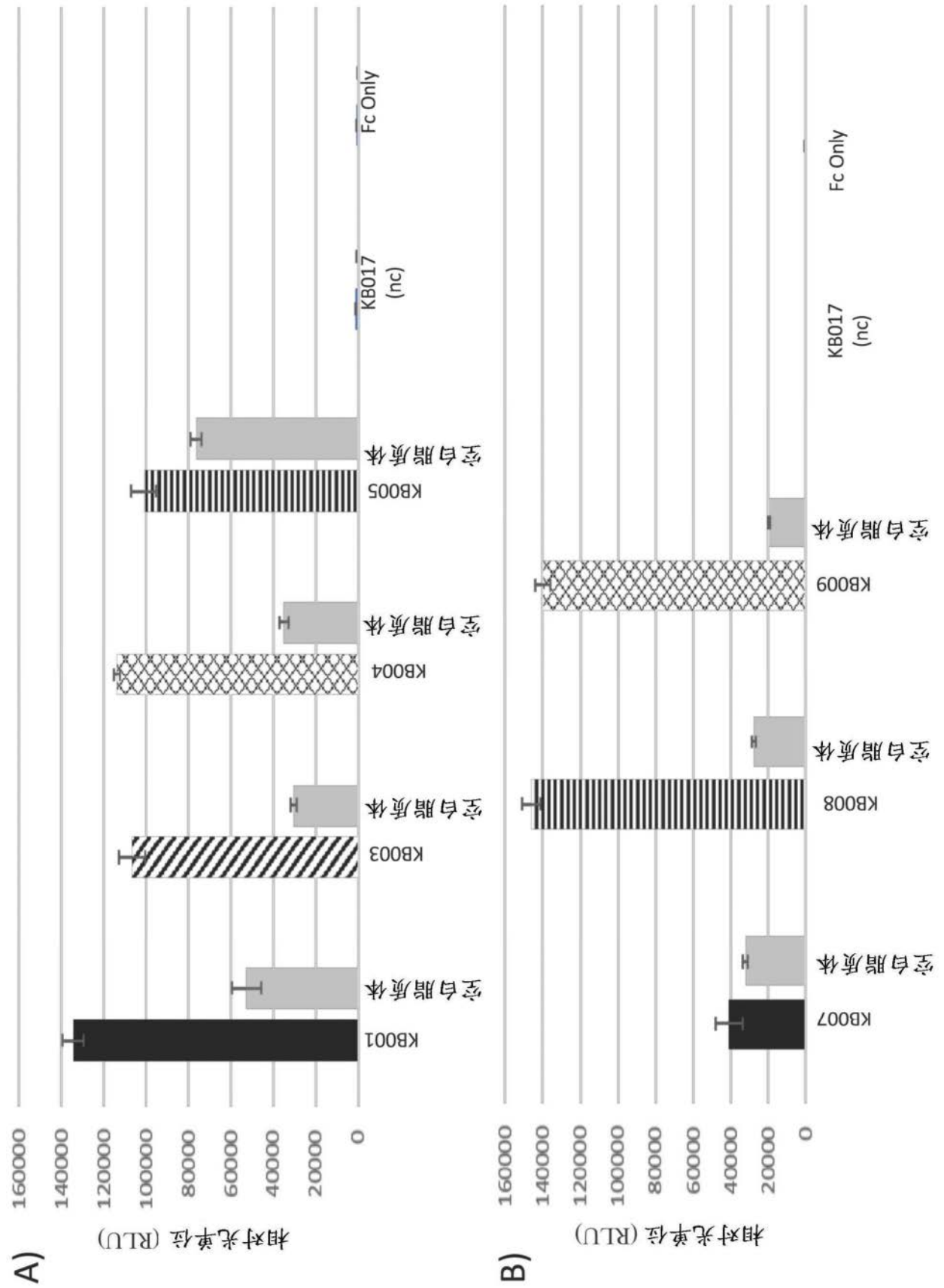

A)
相对光单位 (RLU)
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
KB001
空白脂质体
KB003
空白脂质体
KB004
空白脂质体
KB005
空白脂质体
KB017 (nc)
Fc Only
B)
相对光单位 (RLU)
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
KB007
空白脂质体
KB008
空白脂质体
KB009
空白脂质体
KB017 (nc)
Fc Only

图13

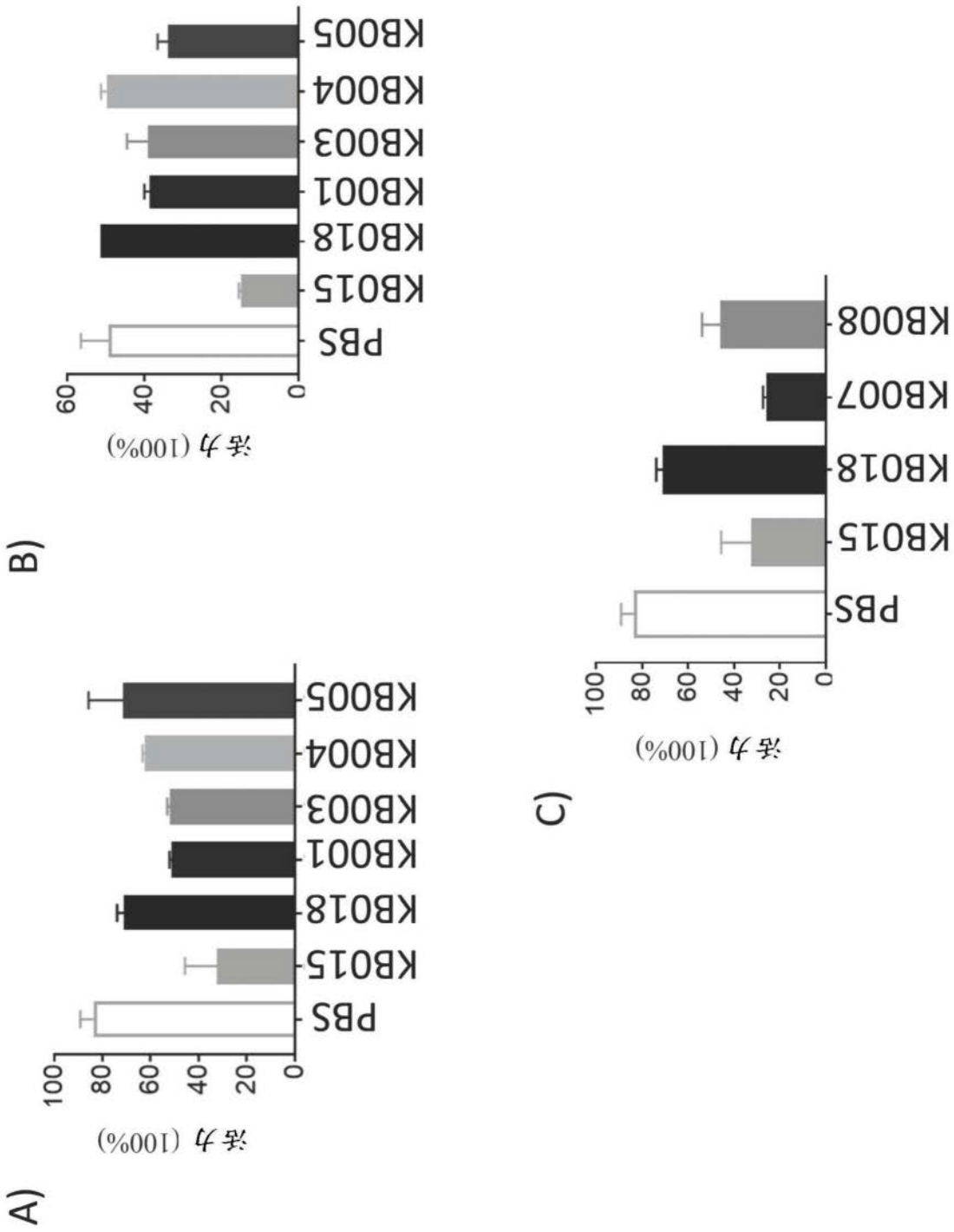

A)
活力 (100%)
0
20
40
60
80
100
PBS
KB015
KB018
KB001
KB003
KB004
KB005
B)
活力 (100%)
0
20
40
60
PBS
KB015
KB018
KB001
KB003
KB004
KB005
C)
活力 (100%)
0
20
40
60
80
100
PBS
KB015
KB018
KB007
KB008

图14

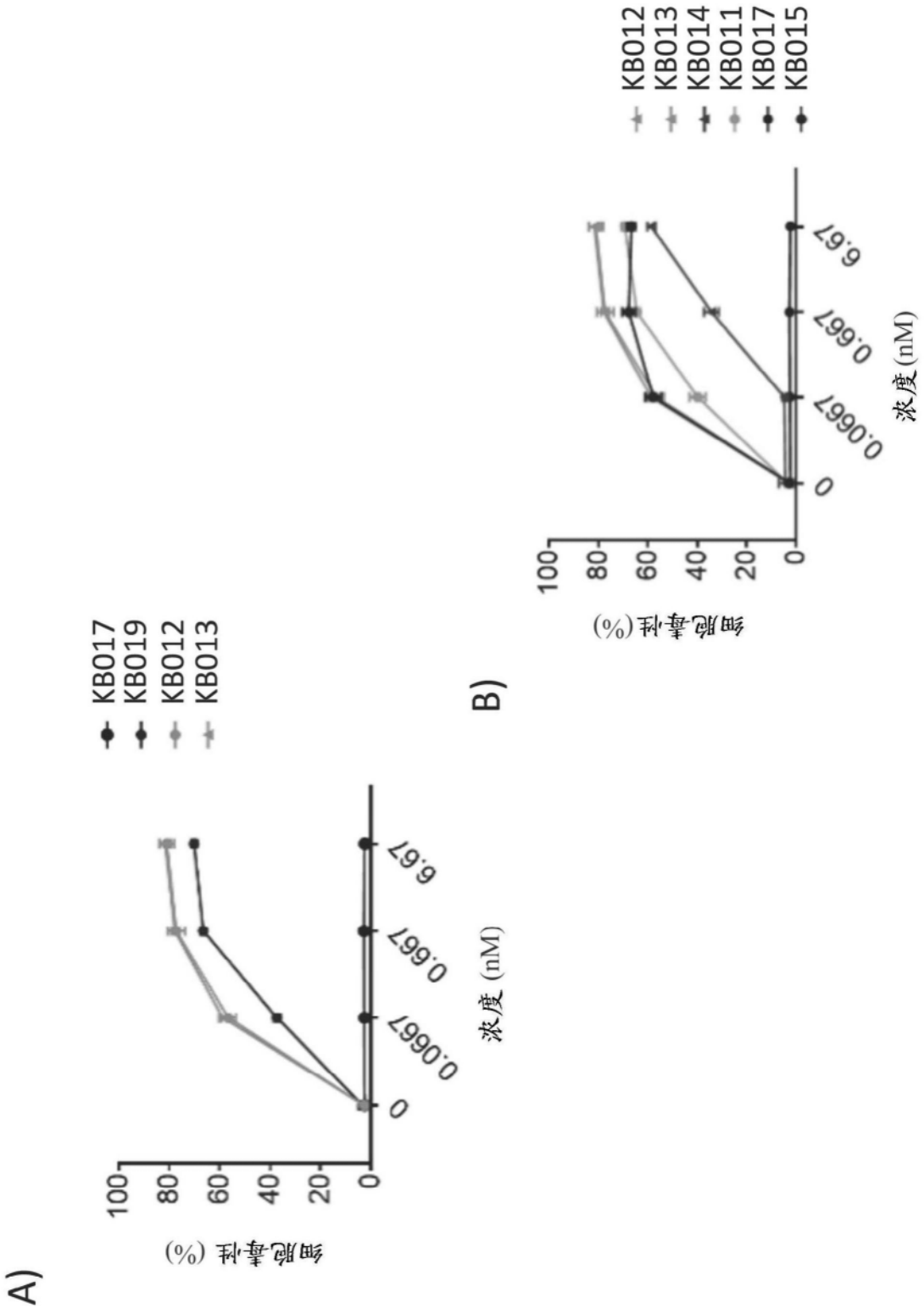

A)
KB017
KB019
KB012
KB013
细胞毒性 (%)
100
80
60
40
20
0
0
0.0667
0.667
6.67
浓度 (nM)
B)
KB012
KB013
KB014
KB011
KB017
KB015
细胞毒性(%)
100
80
60
40
20
0
0
0.0667
0.667
6.67
浓度(nM)

图15

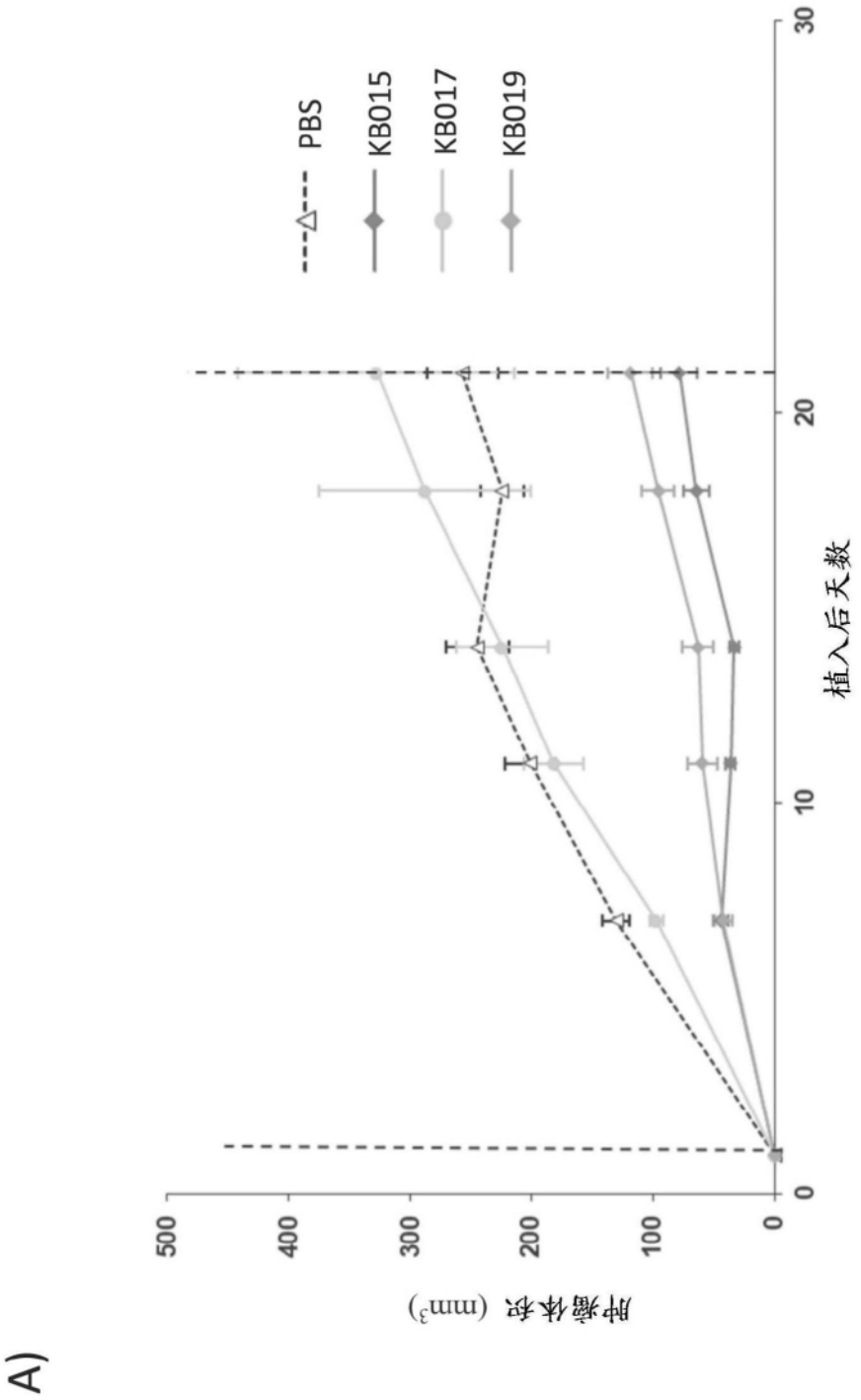

A)
肿瘤体积 (mm³)
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
植入后天数
PBS
KB015
KB017
KB019

图16

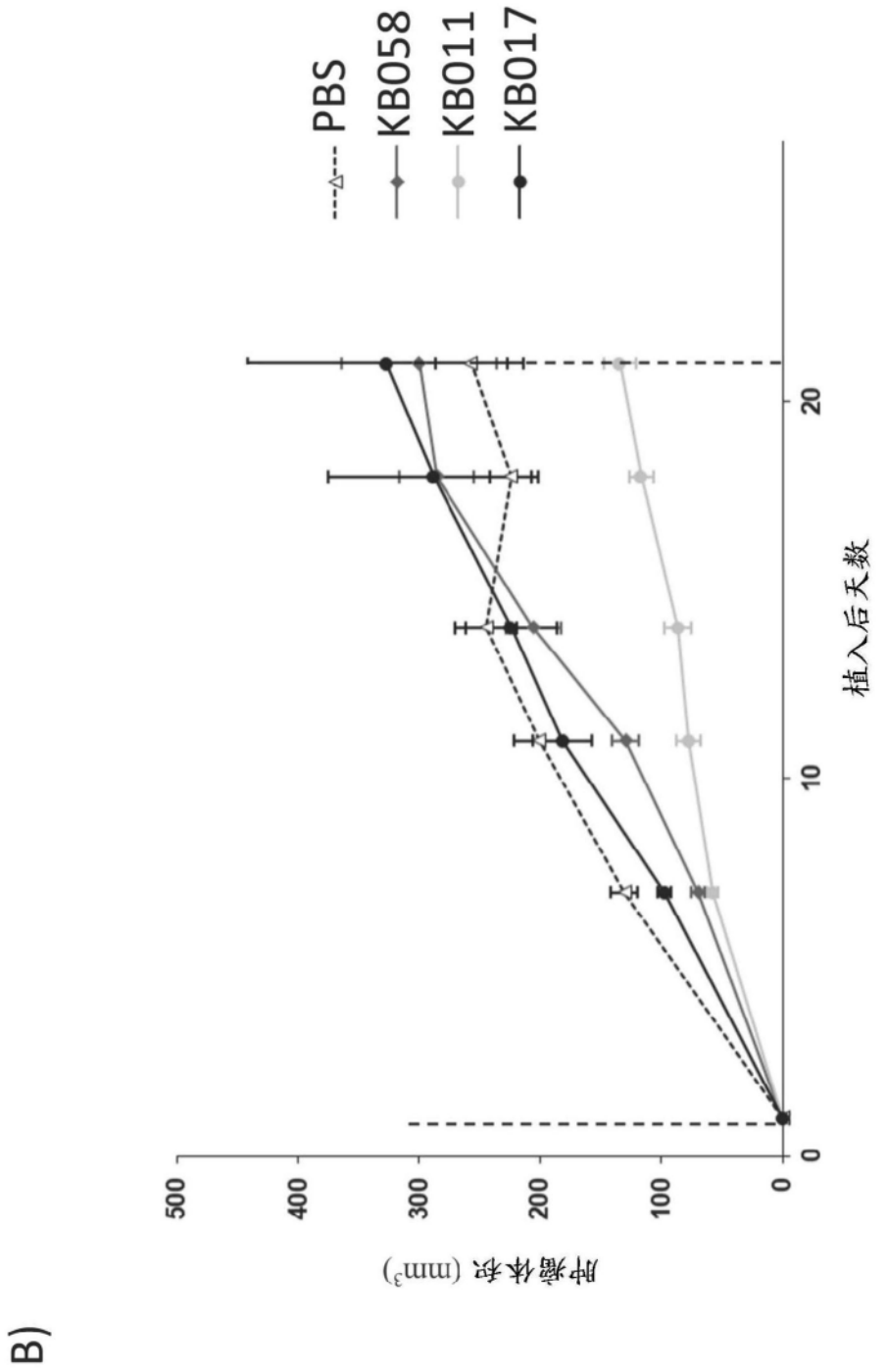

B)
肿瘤体积 (mm³)
500
400
300
200
100
0
0
10
20
植入后天数
PBS
KB058
KB011
KB017

图16

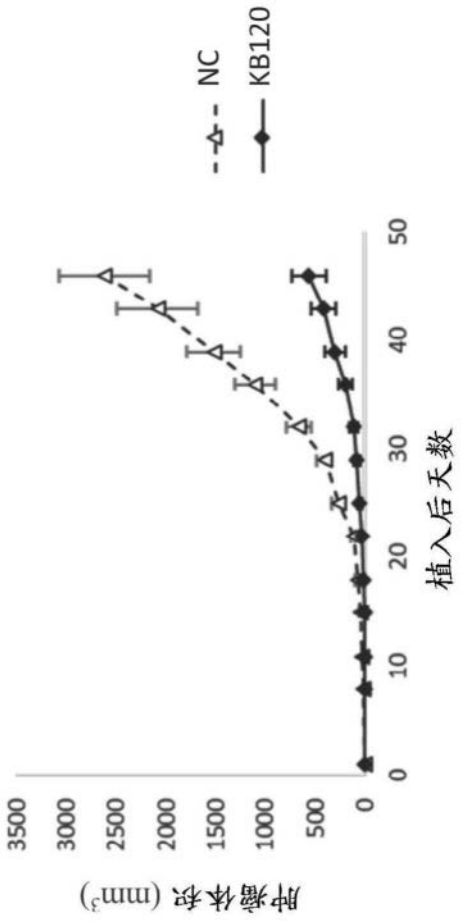

NC
KB120
肿瘤体积 (mm³)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
植入后天数

图17

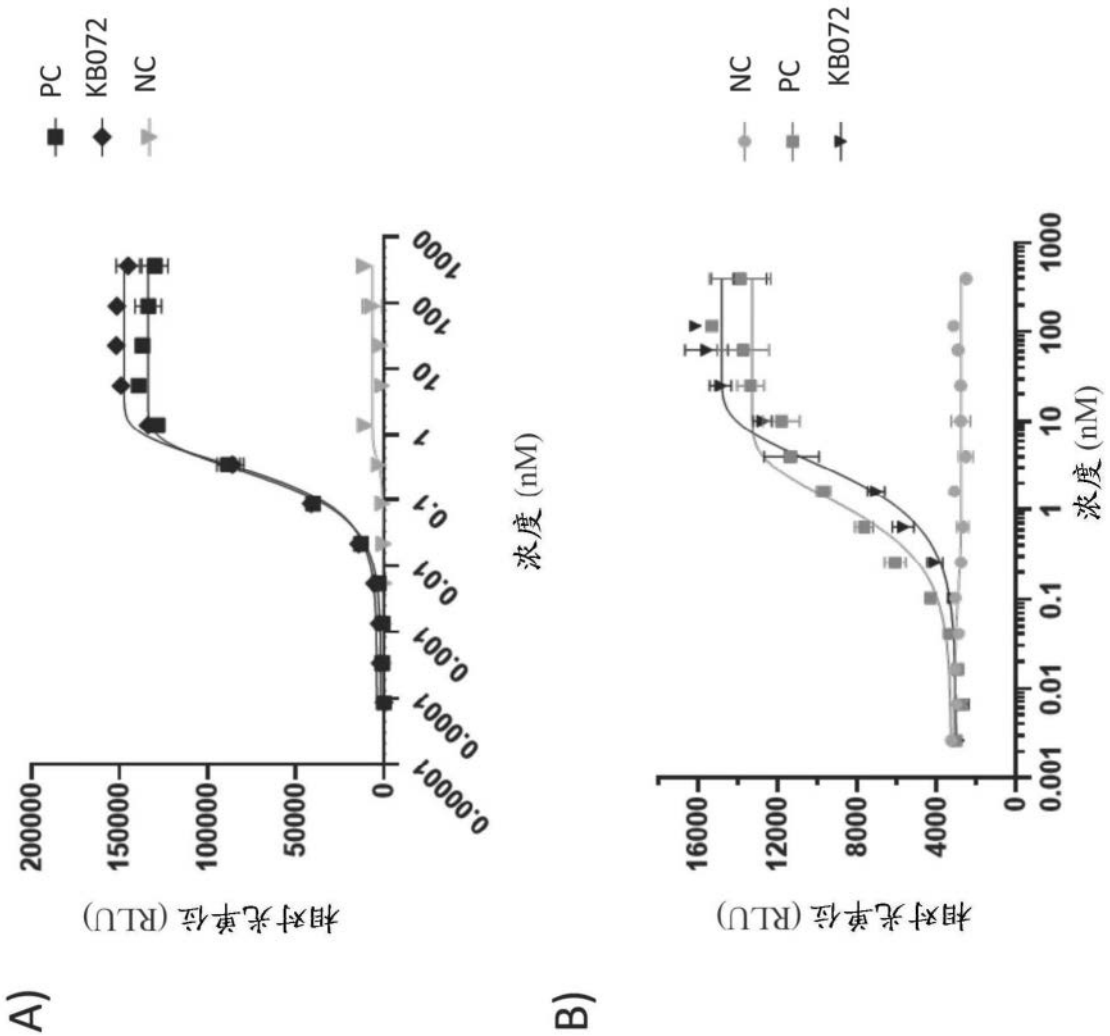

A)
PC
KB072
NC
相对光单位 (RLU)
200000
150000
100000
50000
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)
B)
NC
PC
KB072
相对光单位 (RLU)
16000
12000
8000
4000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图18

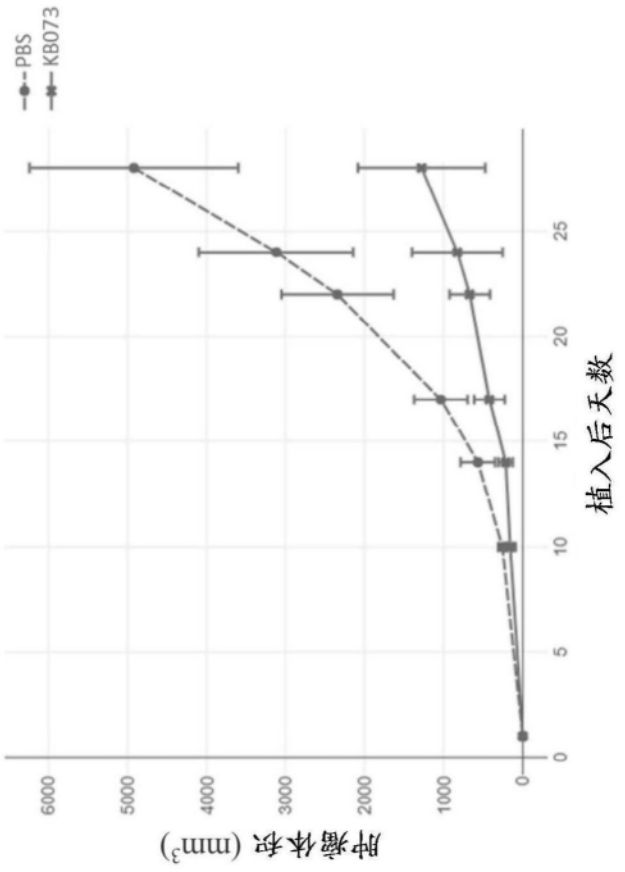

PBS
KB073
肿瘤体积 (mm³)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
植入后天数

图19

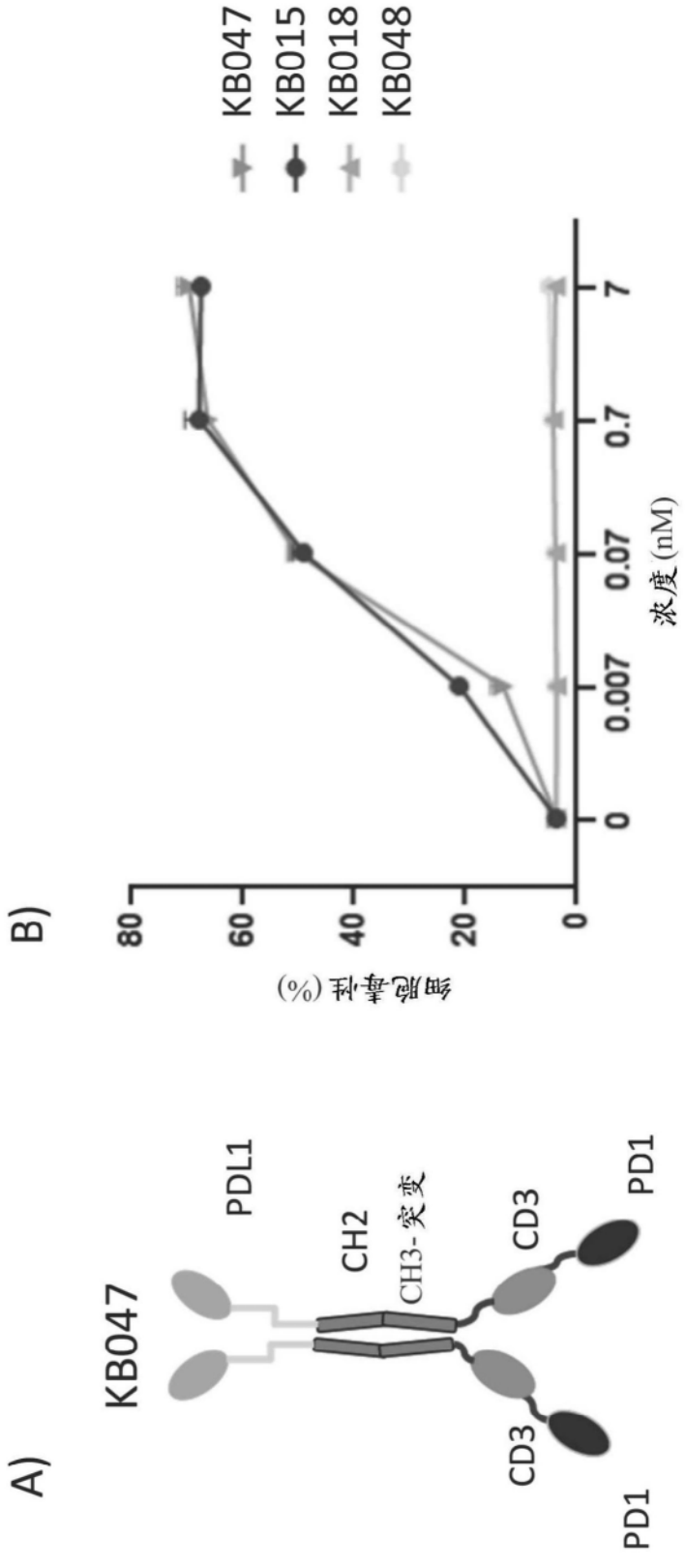
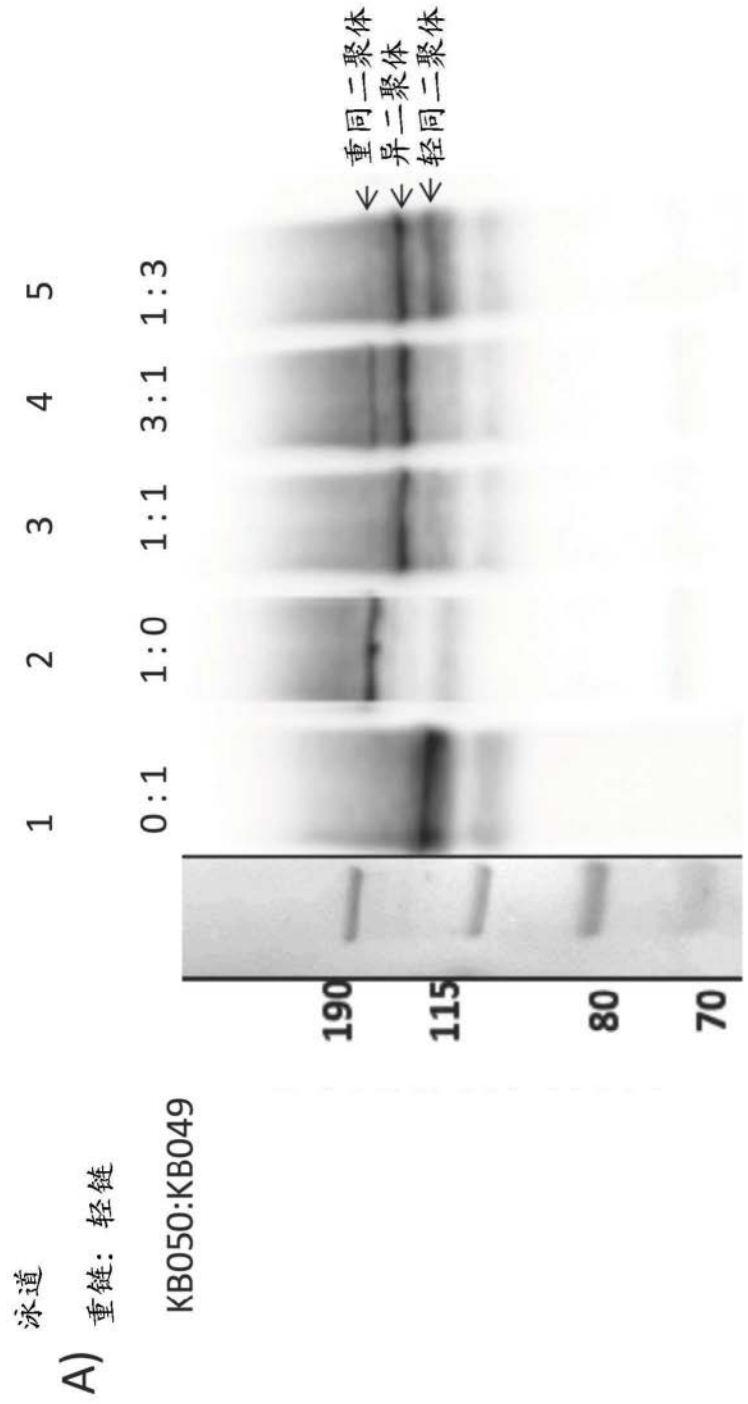

A)
KB047
PDL1
CH2
CH3-突变
CD3
PD1
CD3
PD1
B)
KB047
KB015
KB018
KB048
细胞毒性 (%)
80
60
40
20
0
0
0.007
0.07
0.7
7
浓度 (nM)

图20



B)

蛋白质ID	MW同二聚体(kDa)	MW异二聚体(kDa)
KB050	141.6	
KB049	111.8	
KB057（共转染）		126.5

图21

A)

泳道	蛋白质ID	MW (kDa) - 单体	MW (kDa) - 单体	MW (kDa) - 异二聚体	DNA比率
1	KB051链A及链B	54	70	140	1:1
2	KB052 链A及链B	55	71	142	1:1
3	KB053 链A及链B	55	70	140	1:1
4	KB054 链A及链B	55	70	140	1:2

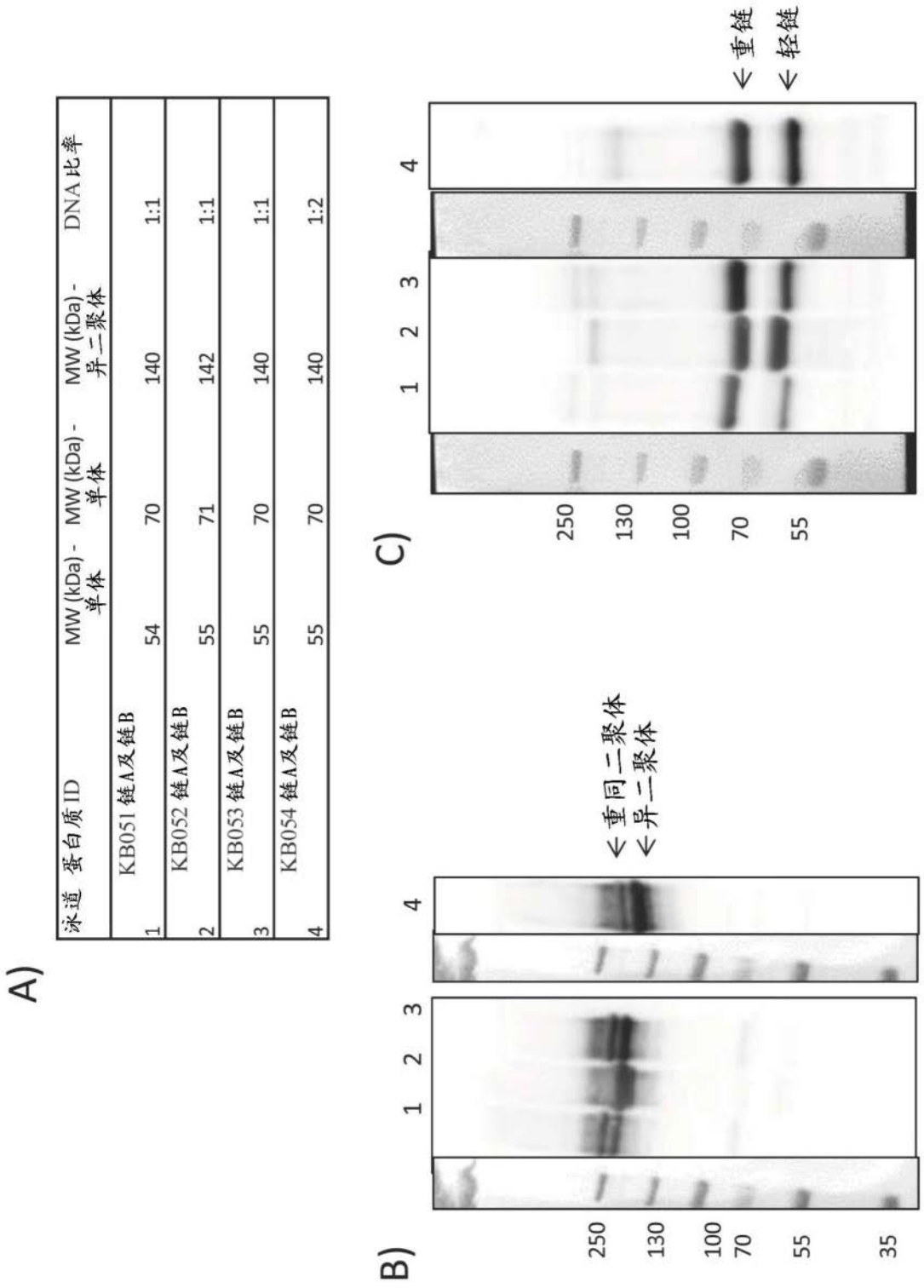


图22