(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109152835 B
(45)授权公告日 2022.12.20

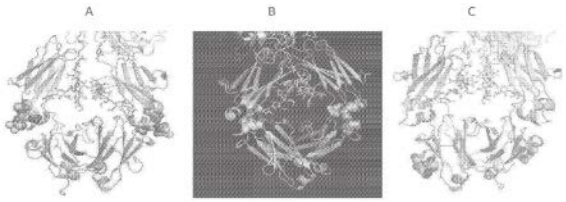
(21)申请号 201780027207.X
(22)申请日 2017.05.05
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109152835 A
(43)申请公布日 2019.01.04
(30)优先权数据
62/332788 2016.05.06 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.11.01
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/031356 2017.05.05
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/193032 EN 2017.11.09
(73)专利权人 免疫医疗有限责任公司
地址 美国马里兰州
(72)发明人 S.卡斯图里兰根 高长寿 G.赖尼 M.莫罗 C.L.多布森 S.德拉比奇 D.肖菲尔德 G.卡尔森 K.波利兹 Y.马佐尔 M.奥伯斯特 S.A.哈蒙德 B.罗波 P.马尼克瓦 J.西曼
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 梁谋 罗文锋
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
(56)对比文件
CN 104987421 A,2015.10.21
WO 2014209804 A1,2014.12.31
CN 104974253 A,2015.10.14
审查员 王艳丽
权利要求书1页 说明书89页
序列表101页 附图113页

(54)发明名称

双特异性结合蛋白及其用途

(57)摘要

本披露总体上提供了如下蛋白,该蛋白结合两个表位(例如,第一和第二表位)并且是二价的,用于结合该第一和第二表位中的每一个。本披露还提供了与靶标蛋白结合的特异性结合蛋白,包括抗体。本披露还提供了包含此类蛋白的组合物、编码此类蛋白的核酸分子以及制备此类蛋白的方法。本披露提供了在受试者中诱导免疫应答的方法,以及通过向该受试者给予蛋白、核酸分子和/或组合物用于治疗或预防该受试者中的癌症的方法。



CN 109152835 B

1.一种结合PD-1和CTLA-4的双特异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列所示的第一重链、SEQ ID NO: 7的氨基酸序列所示的第一轻链、SEQ ID NO: 12的氨基酸序列所示的第二重链、和SEQ ID NO: 4的氨基酸序列所示的第二轻链。

2.如权利要求1所述的蛋白,所述蛋白包含Fc区,其中该Fc区是未糖基化的。

3.如权利要求1所述的蛋白,所述蛋白包含Fc区,其中该Fc区是去糖基化的。

4.如权利要求1所述的蛋白,所述蛋白包含Fc区,其中该Fc区具有减少的岩藻糖基化或是未岩藻糖基化的。

5.一种组合物,其包含如权利要求1-4中任一项所述的蛋白和药学上可接受的载体。

6.一种核酸分子,其由编码根据权利要求1所述的蛋白的核苷酸序列组成,其由以下组成:SEQ ID NO:10的核苷酸序列所示的编码第一重链的核苷酸序列;SEQ ID NO:8的核苷酸序列所示的编码第一轻链的核苷酸序列;SEQ ID NO:13的核苷酸序列所示的编码第二重链的核苷酸序列;和SEQ ID NO:11的核苷酸序列所示的编码第二轻链的核苷酸序列。

7.一种载体,其包含如权利要求6所述的核酸分子。

8.一种分离的宿主细胞,其包含如权利要求7所述的载体。

9.权利要求1-4中任一项所述的蛋白在制备用于治疗或预防个体的癌症的方法中的药物中的用途,其中该癌症是卵巢癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、膀胱癌、头颈癌、黑色素瘤、胰腺癌、肾细胞癌、和肺癌中的一种或多种。

双特异性结合蛋白及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年5月6日提交的美国临时申请号 62/332,788的优先权和权益,将其披露内容通过引用以其全文并入本 文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请连同电子格式的序列表一起提交。该序列表被提 供为创建于2017年5月2日的、标题为IOBS_100_ST25.txt的文件, 其大小是244kb。将电子格式的序列表的信息通过引用以其全文并入 本文。

背景技术

[0005] 癌症仍然是主要的全球健康负担。尽管在癌症的治疗方 面有所进展,但对于更有效且毒性更小的治疗仍然存在未满足的医疗 需求,尤其对于患有对现有治疗具有抗性的晚期疾病或癌症的那些患 者。

[0006] 免疫系统,特别是T细胞介导的细胞毒性在肿瘤控制中 的作用是公认的。有越来越多的证据表明T细胞在癌症患者中控制肿 瘤生长和存活,无论是在该疾病的早期和晚期阶段。然而,肿瘤特异 性T细胞应答很难在癌症患者中上升和维持。当与利用非特异性化学疗法和/或放射的疗法相比,刺激或增强对抗癌症的先天免疫应答的癌 症免疫疗法的持续进展和成功使得这类疗法成为有吸引力的治疗选 择。

[0007] 已经鉴定了许多分子靶标的作为对抗癌症的免疫肿瘤 学(IO)疗法的潜在效用。一些分子靶标(正在研究其在免疫肿瘤疗 法领域的治疗潜力)包括细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4或 CD152)、程序性死亡配体1(PD-L1或B7-H1或CD274)、程序性 死亡-1(PD-1)、OX40(CD134或TNFRSF4)和T细胞抑制性受体 T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子3(TIM3)。虽然这些靶标中的一些在 治疗上已经被成功地利用(例如,PD-1和CTLA-4),但是许多患者对已经开发的疗法无应答。并且,虽然可以考虑包括更高剂量和/或免 疫疗法的组合的治疗方案,但是这类疗法可能与副作用的风险增加相 关,其中副作用随着更高的剂量和累积暴露而增加,并且当与联合免 疫疗法组合使用时似乎是加成的。一些常见的副作用包括下垂体炎、 甲状腺炎、肾上腺功能不全、小肠结肠炎、皮炎、肺炎、肝炎、胰腺 炎、运动和感觉神经病、以及关节炎。此外,由于免疫疗法典型地与 高成本相关,因此包括免疫疗法组合的疗法对于患者来说可能是成本 过高的。

[0008] 因此,仍然需要继续鉴定IO疗法的候选靶标,开发针 对现有靶标的新疗法,并开发治疗策略以避免目前使用的免疫疗法的 缺点,包括缺乏患者应答和增加的联合治疗涉及的副作用风险。对于 靶标分子的组合是双特异性的IO疗法(例如,结合蛋白),特别是 当与对单独的单特异性结合蛋白的组合的结合亲和力相比时对靶标 分子展现出更大结合亲和力的那些,代表一类在治疗潜力方面特别令 人希望的分子。

发明内容

[0009] 本发明提供了如下双特异性分子或蛋白,该双特异性分 子或蛋白结合两个表位

(例如,第一和第二表位)并且是二价的,用 于结合该第一和第二表位中的每一个。本发明还提供了在受试者中诱 导免疫应答的方法,以及通过向该受试者给予蛋白、核酸分子和/或组 合物用于治疗或预防该受试者(例如,人类受试者)中的癌症的方法。

[0010] 在一个方面,本发明提供了一种蛋白,所述蛋白含有:结合第一表位的第一结合结构域(BD1)、结合第二表位的第二结合 结构域(BD2)、和具有C_H2和C_H3结构域的Fc区;其中该Fc区包 括在C_H2结构域中的、在C_H3结构域中的、或在C_H2和C_H3结构域 的界面处的溶剂暴露环处的BD2;并且其中该蛋白是二价的,用于结 合该第一和第二表位中的每一个。

[0011] 在另一个方面,本发明提供了含有根据本文任何方面的 蛋白或抗体和药学上可接受的载体的组合物。

[0012] 在另一个方面,本发明提供了治疗或预防受试者中的癌 症的方法,该方法涉及给予该受试者(例如,人类受试者)根据本文 任何方面的蛋白或抗体。在各种实施例中,该癌症是卵巢癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、膀胱癌、头颈癌、黑色素瘤、胰腺癌、肾细胞癌、和肺癌中的一种或多种。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了在受试者中诱导免疫应答 的方法,该方法涉及给予该受试者(例如,人类受试者)根据本文任 何方面的蛋白或抗体。

[0014] 在另一个方面,本发明提供了具有编码根据本文任何方 面的蛋白或抗体的核苷酸序列的核酸分子。

[0015] 在另一个方面,本发明提供了含有根据本文任何方面的 核酸分子的载体。

[0016] 在另一个方面,本发明提供了含有根据本文任何方面的 载体的宿主细胞。

[0017] 在一个方面,本发明提供了结合PD-1和CTLA-4的双 特异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:1的氨 基酸序列的第一肽和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的第二肽。

[0018] 在另一个方面,本发明提供了结合PD-1和CTLA-4的 双特异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的第一肽和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的第二肽。

[0019] 在另一个方面,本发明提供了结合PD-1和CTLA-4的 双特异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的第一肽和具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的第二肽。

[0020] 在一个方面,本发明提供了结合PD-1和CTLA-4的双 特异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:9的氨 基酸序列的第一重链、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一轻链、具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的第二重链、和具有SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的第二轻链。

[0021] 在一个方面,本发明提供了结合PD-L1和CTLA-4的双 特异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:14的 氨基酸序列的第一肽和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第二肽。

[0022] 在另一个方面,本发明提供了结合PD-L1和CTLA-4的 双特异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的第一肽和具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的第二 肽。

[0023] 在另一个方面,本发明提供了结合PD-L1和CTLA-4的 双特异性结合蛋白,该双特

异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的第一肽和具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的第二 肽。

[0024] 在一个方面,本发明提供了结合PD-1和TIM3的双特 异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:22的氨 基酸序列的第一肽和具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的第二肽。

[0025] 在另一个方面,本发明提供了结合PD-1和TIM3的双 特异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:24或 SEQ ID NO:91的氨基酸序列的第一肽和具有SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:92的氨基酸序列的第二肽。

[0026] 在另一个方面,本发明提供了结合PD-1和TIM3的双 特异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:9的氨 基酸序列的第一重链、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一轻链、具有或SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:30的氨基酸序列的第二重链、和具有SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:28的氨基酸序列的第二轻链。

[0027] 在一个方面,本发明提供了结合OX40和PD-L1的双特 异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:34的氨 基酸序列的第一肽和具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的第二肽。

[0028] 在另一个方面,本发明提供了结合OX40和PD-L1的双 特异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:35的 氨基酸序列的第一肽和具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的第二肽。

[0029] 在另一个方面,本发明提供了结合OX40和PD-L1的双 特异性结合蛋白,该双特异性结合蛋白具有:具有SEQ ID NO:36或 SEQ ID NO:94的氨基酸序列的第一肽和具有SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:93的氨基酸序列的第二肽。

[0030] 在一个方面,本发明提供了结合TIM3的抗体或其抗原 结合片段,该抗体或其抗原结合片段具有:具有CDR1、CDR2、和 CDR3的重链和具有CDR1、CDR2、和CDR3的轻链,其中该重链 CDR1包含SEQ ID NO:88,重链CDR2包含SEQ ID NO:80,重链 CDR3包含SEQ ID NO:81,且该轻链CDR1包含SEQ ID NO:82,轻 链CDR2包含SEQ ID NO:83,轻链CDR3包含SEQ ID NO:84。

[0031] 在其他方面,本发明提供了具有双特异性结合蛋白和药 学上可接受的载体的组合物、具有编码双特异性结合蛋白的核苷酸序 列的核酸分子、通过给予双特异性结合蛋白治疗或预防受试者中的癌 症的方法、和通过给予双特异性结合蛋白增强受试者中的免疫应答的 方法。

[0032] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该Fc区包含 在该C_H2结构域中的、在该C_H3结构域中的、或在该C_H2和C_H3结 构域的界面处的氨基酸序列中的溶剂暴露环处的BD2。

[0033] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该溶剂暴露环 包括来自该C_H2结构域的氨基酸序列。在具体的实施例中,该溶剂暴 露环包括氨基酸序列ISRTP(SEQ ID NO:39)。

[0034] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该溶剂暴露环 包括来自该C_H3结构域的氨基酸序列。在具体的实施例中,该溶剂暴 露环包括氨基酸序列SNG。

[0035] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该溶剂暴露环 包括来自C_H2结构域和C_H3结构域的界面的氨基酸序列。在具体的实 施例中,如权利要求7所述的蛋白,其中该溶剂暴露环包含氨基酸序 列AKGQP(SEQ ID NO:40)。

[0036] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,BD2是或包括 单链可变片段(scFv)。

[0037] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,BD1是或包括 结合结构域,该结合结构域是Fab结构域、scFv、单结构域抗体、和 抗体可变结构域中的一种或多种。在具体的实施例中,BD1包括Fab 结构域。

[0038] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该Fab结构域 经由抗体铰链区与Fc区连接。在某些实施例中,该Fc区是或包括如 下结构域,该结构域是来自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、 IgE、或IgD的Fc区中的一种或多种。在具体的实施例中,该Fc区 包含变体Fc区。在一些实施例中,该Fc区是未糖基化的、去糖基化 的、和/或是未岩藻糖基化的或具有减少的岩藻糖基化。

[0039] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该蛋白进一步 包括BD2和该Fc区之间的蛋白接头L1。在本文描述的任何方面的各 种实施例中,该蛋白进一步包括BD2和该Fc区之间的第一蛋白接头 L1和第二蛋白接头L2。在本文描述的任何方面的各种实施例中,BD2 经由蛋白接头L1与Fc区缔合。在本文描述的任何方面的各种实施例 中,BD2经由蛋白接头L1和L2与Fc区缔合。在某些实施例中,L1 和L2独立地选自$(G_4S)_2$(SEQ ID NO:41)、$(G_4S)_3$(SEQ ID NO:42)、和$(G_4S)_4$(SEQ ID NO:43)。

[0040] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该蛋白包括嵌 合重链,该嵌合重链包含以下多肽结构域,从N-末端到C-末端:V_H1-C_H1-C_H2(N-末端)-BD2-C_H2(C-末端)-C_H3;并且BD1包括 Fab结构域;其中V_H1包括Fab结构域的重链可变结构域,且C_H1包 括Fab的重链恒定结构域1。

[0041] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该蛋白包括嵌 合重链,该嵌合重链包含以下多肽结构域,从N-末端到C-末端:V_H1-C_H1-C_H2-BD2-C_H3;并且BD1包括Fab结构域;其中V_H1包含 Fab结构域的重链可变结构域,且C_H1包括Fab的重链恒定结构域1。

[0042] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该蛋白包括嵌 合重链,该嵌合重链包含以下多肽结构域,从N-末端到C-末端:V_H1-C_H1-C_H2-C_H3(N-末端)-BD2-C_H3(C-末端);并且BD1包括 Fab结构域;其中V_H1包括Fab结构域的重链可变结构域,且C_H1包 括Fab的重链恒定结构域1。

[0043] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,BD2是或包括 scFv。在具体的实施例中,该scFv包括,从N-末端到C-末端:V_H2- 多肽接头-V_L2或V_L2-多肽接头-V_H2;其中V_H2包括scFv的重链可变 结构域,且V_L2包括scFv的轻链可变结构域。

[0044] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该蛋白进一步 包括BD2和该Fc区之间的蛋白接头L1。在本文描述的任何方面的各 种实施例中,该蛋白进一步包括BD2和该Fc区之间的第一蛋白接头 L1和第二蛋白接头L2。

[0045] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该BD2经由接 头(L1)与Fc区的C_H2结构域、C_H2结构域、或C_H2和C_H3结构域 的界面缔合。

[0046] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该BD2经由两 个蛋白接头L1和L2,与Fc区的C_H2结构域、C_H3结构域、或C_H2 和C_H3结构域的界面缔合。在各种实施例中,L1和L2独立地选自长 度为1-25个氨基酸的蛋白接头。在具体的实施例中,L1和L2独立地 选自$(G_4S)_2$(SEQ ID NO:41)、$(G_4S)_3$(SEQ ID NO:42)、和$(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:43)。

[0047] 在本文描述的任何方面的各种实施例中,该第一和第二 表位是不同的。在本文描

述的任何方面的各种实施例中，该第一和第 二表位是相同的。

附图说明

[0048] 出于说明本披露的目的，在附图中描绘了本披露的某些 方面。然而，本披露不限于附图中所描绘的方面的精确安排和手段。

[0049] 图1A-1F描绘了本文描述的某些示例性蛋白的一般示 意图。使用PyMOL在图1A-1C中示出了CH2和CH3区，并将溶剂 暴露表面环区鉴定为球体。图1A描绘了CH2区中的环；图1B描绘 了CH2-CH3界面中的环；且图1C描绘了CH3区中的环。示例性构 建体示出于图1D-1F中，这些图包括代表性BD1和BD2结构域分别 作为Fab和scFv结构域。图1D描绘了附接在铰链区处的BD1和附 接在该CH2区中的溶剂暴露环处的BD2。图1E描绘了附接在铰链区 处的BD1和附接在该CH2-CH3界面中的溶剂暴露环处的BD2。图1F 描绘了附接在铰链区处的BD1和附接在该CH3区中的溶剂暴露环处 的BD2。

[0050] 图2A-2C提供了如本文所述的CH2中、CH2-CH3界面 处、和CH3中的溶剂可及环序列的展开图。掺入BD2(scFv)的构建 体的实例包括在图2A-2C中的每一幅中。图2A示出了在CH2-CH3 界面上游的CH2环中被鉴定的代表性环序列ISRTP(SEQ ID NO:39)。图2B示出了在CH2-CH3界面中的代表性环序列AKGQP(SEQ ID NO: 40)。图2C示出了在CH2-CH3界面下游的CH3区中的代表性环序 列SNG。

[0051] 图3证明了靶向PD-1和CTLA-4的BiS2、BiS3、和BiS5 构建体的并行结合。迹线A9显示了BiS2 PD-1/CTLA-4、迹线B9显 示了Bis3 PD-1/CTLA-4、且迹线C9显示了Bis5 PD-1/CTLA-4。

[0052] 图4显示了所提出的PD-1/CTLA-4阻断的机制的示意 图。

[0053] 图5示出了octet结合测定的结果，其证明了靶向PD-1 和CTLA-4的DuetMab构建体的并行结合。

[0054] 图6A-D显示了PD-1/CTLA-4双特异性结合蛋白在报告 基因测定中抑制PD-1和CTLA-4途径。图6A描绘了经由PD-1阻断 的T细胞活化。图6B描绘了经由CTLA-4阻断的T细胞活化。图6C 显示了PD-1报告物测定的结果。图6D显示了CTLA-4报告物测定的 结果。

[0055] 图7显示了SEB测定的结果，该结果显示，PD-1/CTLA-4 DuetMab和BiS5Ab在葡萄球菌肠毒素B(SEB)测定中具有等效的 活性。

[0056] 图8A-B显示了与同种型和亲本mAb对照相比，在SEB 测定中PD-1/CTLA-4 DuetMab的活性。

[0057] 图9A-B显示了在SEB测定中与PD-1/CTLA-4 DuetMab 相比，PD-1/CTLA-4 BiS5 Ab的活性。

[0058] 图10A-C显示了PD-1/CTLA-4 DuetMab和BiS5Ab在混 合淋巴细胞反应(MLR)测定中具有等效的活性。图10A是该测定的 示意图(n＝4个供体；2个独立的实验)。

[0059] 图11A-D显示了与同种型对照(n＝2个供体；1个实验) 相比，MLR测定中PD-1/CTLA-4 DuetMab的活性。

[0060] 图12A-D显示了与亲本mAb对照(n＝2个供体；1个 实验)相比，MLR测定中PD-1/CTLA-4 DuetMab的活性。

[0061] 图13A-D显示了与竞争抗体(n＝2个供体；1个实验) 相比，MLR测定中PD-1/CTLA-4

DuetMab的活性。

[0062] 图14显示了食蟹猴中的单剂量药代动力学/药效学 (PK/PD)研究的研究设计。

[0063] 图15A-B显示了,在食蟹猴中PD-1/CTLA-4 DuetMab 显示了清楚的药效学(PD)。

[0064] 图16A-B显示了被给药PD-1/CTLA-4 DuetMab (MEDI5752)和PD-1/CTLA-4 BiS5Ab (MEDI8500)的食蟹猴中的T 细胞依赖性抗体应答(TDAR)。

[0065] 图17显示了用来研究PD-1/CTLA-4双特异性分子的模 型系统,其中稳定的CHO细胞表达不同水平的人类PD-1和/或 CTLA-4。

[0066] 图18A-C显示了,PD-1/CTLA-4 DuetMab在相同细胞表 面并行地结合PD-1和CTLA-4。

[0067] 图19A-C显示了一种实验,以确定在表达过量PD-1的 细胞上的CTLA-4饱和时,协同结合是否区分抗PD-1和抗CTLA-4 抗体的组合。

[0068] 图20A-D显示了,PD-1和CTLA-4亲本单克隆抗体结 合并占据其靶标受体而对非靶向受体没有重大影响。

[0069] 图21A-D显示了与单克隆抗体的组合相比，PD-1/CTLA-4 DuetMab以低约250倍的浓度使表达过量PD-1的CHO 细胞上的CTLA-4饱和。

[0070] 图22A-F显示了与仅表达CTLA-4的细胞相比，PD-1/CTLA-4 DuetMab以低约500倍的浓度使表达过量PD-1的CHO 细胞上的CTLA-4饱和。

[0071] 图23A-B显示了PD-1/CTLA-4 DuetMab优先地以顺式 结合相同细胞表面上的PD-1和CTLA-4。图23B中的曲美木单抗是 CTLA-4 mAb。

[0072] 图24A-D显示了PD-1/CTLA-4 DuetMab和亲本单克隆 抗体与培养的T细胞的结合和内化。PD-1/CTLA-4 DuetMab具有曲美 木单抗的内化特性。

[0073] 图25A显示了内化测定的示意图。图25B显示了，PD-1/CTLA-4 DuetMab在表达10倍过量PD-1的稳定的CHO细胞中 具有曲美木单抗的内化特性。

[0074] 图26证明了靶向PD-L1和CTLA-4的BiS2、BiS3、和 BiS5构建体的并行结合。迹线A11显示了Bis2 PD-L1CTLA-4、迹线 B11显示了Bis3 PD-L1/CTLA-4、且迹线C11显示了Bis5 PD-L1/CTLA-4。

[0075] 图27A证明了靶向PD-1和TIM3(克隆62,野生型) 的BiS3构建体的并行结合。图27B证明了靶向PD-1和TIM3(克隆 62,野生型)的DuetMab构建体的并行结合。

[0076] 图28A-28C提供了细胞杀伤测定中单特异性TIM3和双特异性 PD-1_TIM3PD-1双特异性构建体的细胞杀伤活性的总结。图28A显 示了在18hr时共培养孔的明视野图像。抗TIM-3+抗PD1或 TIM-3/PD-1双特异性形式的组合增强肿瘤细胞死亡并增加T细胞活 化,如通过减少粘附细胞和增强的T细胞爆破(聚集)所评估的。图 28B显示了与黑色素瘤特异性CD8+T细胞共培养18hr后对肿瘤细胞 摄取活性染料的评估。图28C显示了共培养18hr后的IFNγ分泌。双 特异性构建体一般展示出更好的杀伤活性,其中DuetMab形式展现出 最强键的杀伤活性。

[0077] 图29证明了具有TIM3臂序列的PD-1/TIM3 DuetMab 构建体的并行结合,该TIM3臂序列是克隆62的亲和力成熟变体。

[0078] 图30显示了PD-1/TIM3双特异性抗体(包括BiS3、BiS5、和DuetMab)与过表达人类TIM3或人类PD1的CHO细胞的结合。PD-1和TIM3表达数据示出于插图中。

[0079] 图31显示了活化的T细胞克隆(DMF4)上的TIM3和 PD-1表达数据。

[0080] 图32A-C描绘了来自CMV抗原回忆测定(recall assay) 的结果,该结果显示了,PD-1/TIM3双特异性抗体(包括BiS3、BiS5、 和DuetMab)与同种型治疗(3个供体(每次处理/每个供体中1-2个 重复),1个实验)相比展示出增强的活性。

[0081] 图33A-D显示了,PD-1/TIM3双特异性抗体(包括BiS3、 BiS5、和DuetMab)在混合淋巴细胞反应(MLR)测定(每次处理/1 个供体对/2个独立的实验中的1个中2-4个重复孔)中增强浓度高于 8nM的干扰素(IFNγ)。

[0082] 图34A-C显示了使用PD-1/TIM3双特异性抗体(包括 BiS3、BiS5、和DuetMab)的PD-1报告物测定(双细胞系统)的结 果,所有双特异性形式展示出与亲本LO115 IgG1类似的活性(每次 处理3-5个独立的实验/3个生物学重复的编译)。

[0083] 图35显示了使用BiS2和BiS3 OX40/PD-L1双特异性分 子的octet测定的结果。

[0084] 图36A-B显示了使用BiS2和BiS3 OX40/PD-L1双特异 性分子的SEB测定的结果。

[0085] 图37显示了使用BiS2和BiS3 OX40/PD-L1双特异性分 子的PD-L1报告物测定的结果。

[0086] 图38显示了使用BiS2和BiS3 OX40/PD-L1双特异性分 子的CMV Ag回忆测定的结果。

[0087] 图39显示了octet结合测定的结果,该测定证明了靶向 PD-L1和OX40的OX40(SLR)/PD-L1 BiS5构建体的并行结合。

[0088] 图40A-F显示了靶向PD-L1和OX40的双特异性构建体 与表达人类或食蟹猴OX40和PD-L1/B7H1的CHO细胞的结合。

[0089] 图41A-B显示了通过流式细胞术(HyperCyt)测量的靶 向PD-L1和OX40的双特异性构建体与Jurkat OX40报告细胞、NCI H358、CHOK1 B7H1(PD-L1)/OKT3细胞、和HEK CD32a细胞的 结合。

[0090] 图42A-B显示了使用OX40/PD-L1双特异性分子的 PD-L1报告物测定的结果。

[0091] 图43A-B显示了使用OX40/PD-L1双特异性分子在HEK CD32a细胞中进行的OX40报告物测定的结果。

[0092] 图44A-B显示了使用OX40/PD-L1双特异性分子在过表 达CHOKPD-L1的细胞中进行的OX40报告物测定的结果。

[0093] 图45A-B显示了使用OX40/PD-L1双特异性分子用肿瘤 细胞进行PD-L1介导的OX40激动作用。

[0094] 图46A-D显示了如下结果,该结果表明在针对OX40/ 肿瘤细胞测定的对照中使用OX40/PD-L1双特异性分子,用NCI H358 PD-L1 KO细胞未检测到激动作用。

[0095] 图47A-D显示了使用OX40/PD-L1双特异性分子的SEB 测定的结果。

[0096] 图48A显示了用于测试OX40/PD-L1双特异性分子的 Treg抑制测定实验的示意图。图48B-C显示了基于双特异性分子结合 的Treg抑制。

[0097] 图49描绘显示了使用OX40/PD-L1双特异性分子的 Treg抑制测定的结果。

[0098] 图50描绘显示了使用OX40/PD-L1双特异性分子的 Treg抑制测定的结果。

[0099] 图51A-B显示了用以测试OX40/PD-L1双特异性分子的 混合的白细胞反应(MLR)测定实验的设计。

[0100] 图52A-E显示了使用OX40/PD-L1双特异性分子的 MLR测定的结果。

[0101] 图53A-B显示了,BiS2和BiS5 OX40/PD-L1双特异性 分子介导对抗表达PD-L1或OX40的CHO细胞的天然杀伤(NK)细 胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)。

[0102] 图54显示了,BiS2和BiS5 OX40/PD-L1双特异性分子 介导对抗表达PD-L1和OX40的CHO细胞的NK细胞的抗体依赖性 细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)。

[0103] 图55显示了,BiS2和BiS5 OX40/PD-L1双特异性分子 在抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)中增加对抗表达 PD-L1和OX40的CHO细胞的NK细胞的CD107a动员。

[0104] 图56显示了BiS2和BiS5 OX40/PD-L1双特异性分子介 导对抗活化的同种异体T细胞的NK细胞的抗体依赖性细胞介导的细 胞毒性作用(ADCC)。

[0105] 图57A-B显示了,BiS5 OX40/PD-L1在抗体依赖性细胞 介导的细胞毒性作用(ADCC)中增加了对抗活化的同种异体T细胞 的来自两个不同供体的NK细胞的CD107a动员。

[0106] 图58显示了用以比较OX40/PD-L1双特异性分子的 PK/PD的研究设计。

[0107] 图59显示了食蟹猴中PD-L1/OX40双特异性分子的血 清浓度时间曲线的比较。

[0108] 图60显示了PD-L1/OX40双特异性分子在血清中耗竭 可溶的PD-L1。

[0109] 图61A-F提供了PD-L1/OX40双特异性分子的药效学数 据的总结。基线定义为第5天和第0天给药前的平均值。

[0110] 图62描绘了PD-1/OX40 BiS2 IgG4P单克隆抗体(mAb) 的示意图。

[0111] 图63描绘了PD-1/OX40 BiS2 mAb的潜在作用机制。

[0112] 图64描绘了两个不同批号的PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb对PD1-His和人类OX40-Fc的并行结合活性。

[0113] 图65A描绘了OX40报告物测定的示意图。图65B显示 了使用PD1 LO115 mAb、OX40 mAb、对照mAb和PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb的OX40报告物测定的结果。

[0114] 图66A描绘了PD-1/PD-L1报告物测定的示意图。图66B 显示了使用PD1 LO115 mAb、OX40 mAb、对照mAb和PD1(LO115) /OX40 BiS2 mAb的PD1/PD-L1报告物测定的结果。

[0115] 图67显示了使用PD-1(LO115)/OX40双特异性分子 和对照的BiS2变体的SEB测定的结果。

[0116] 图68显示了使用PD-1(LO115)/OX40双特异性分子 和对照的BiS2变体的CMV抗原回忆测定的结果。

[0117] 图69显示了使用PD-1(AMP514)/OX40双特异性分 子和对照的BiS2和BiS3变体的CMV抗原回忆测定的结果。

[0118] 图70显示了在食蟹猴中单次静脉内给药后PD1 (LO115)/OX40 BiS2 mAb的血清浓度-时间曲线。数据代表3个男 性/组的平均值±标准偏差。LLOQ(5ng/mL)用虚线示出。PKC-药代 动力学浓度;LLOQ=定量下限。

[0119] 图71显示了在食蟹猴中单次静脉内给予PD-1(LO115) /OX40 BiS2 mAb后的Ki67阳性CD4+和CD8+记忆T细胞百分比。 数据代表3个男性/组的平均值±标准偏差。左图A代表CD4+记忆T 细胞,且右图显示CD8+记忆T细胞。IV=静脉内。

[0120] 图72显示了用于定量食蟹猴血清中PD-1/OX40的代表 性标准曲线。

[0121] 图73A-73E提供了相对于不同pH值的不同BiS形式 (“BiS4”)的本文公开的双特异性结合蛋白(“BiS5”)的说明性 DSC热谱图。图73A阐明了pH对BiS4热稳定性的影响。图73B

阐 明了pH对BiS5热稳定性的影响。图73C描绘了具有$T_{起始}$、T_m1、T_m2、和T_m3的BiS4的代表性曲线拟合的DSC热谱图。图73D描绘了具有 $T_{起始}$、T_m1、T_m2、和T_m3的BiS5的代表性曲线拟合的DSC热谱图。 图73E描绘了代表pH对针对BiS4和BiS5形式的$T_{起始}$、T_m1、T_m2、 和T_m3的影响的图。

[0122] 图74A和74B描绘了在40℃储存4周之前和之后在pH 7.5的样品的HP-SEC分析。图74A提供了在热应激之前和之后的BiS4 和BiS5的SEC色谱图的覆盖图,实线对应于时间零时的BiS4和BiS5 样品(无应激),并且虚线对应于在40℃孵育4周的BiS4和BiS5 样品(应激的)。图74B提供了条形图,其代表pH 7.5对BiS4和BiS5 的不同种类(单体、片段、和聚集体)的影响,如在40℃在第零天 和4周后测量的。

[0123] 图75A-75C提供了动力学图,其显示了pH 7.5对BiS4 (三角迹线)和BiS5(圆形迹线)在40℃的加速和短期储存稳定性 的影响。图75A显示了如通过HP-SEC在4周的时间内测量的单体剩 余百分比。图75B显示了如通过HP-SEC在4周的时间内测量的片段 化百分比。图75C显示了如通过HP-SEC在4周的时间内测量的聚集 百分比。提出的数据来自单一小瓶分析。

[0124] 图76A-76C描绘了BiS4(三角形)和BiS5(圆形)的 pH速率曲线图。图76A显示了在40℃不同pH条件对单体损失速率 的影响。图76B显示了在40℃不同pH条件对片段化速率的影响。图 76C显示了在40℃不同pH条件对聚集速率的影响。

[0125] 图77A和77B描绘了BiS4和BiS5片段化的另外的分析。图77A显示了在pH 7.5和40℃时(在时间＝0时),两种分子均未 展现出可感知的片段化。图77B显示了,在与图77A相同的条件下, 但在40℃储存2周后,观察到BiS4的可感知的片段化和BiS5的最 低片段化。

[0126] 图78描绘了随pH变化的BiS4和BiS5片段化(左图) 和聚集(右图)的分析。两种形式在较低(5.5)pH下都具有减少的 片段化和聚集,而BiS5在两种pH值下均具有更优异的片段化和聚集 性能。

[0127] 图79描绘了针对构建体(左图)A、B、C、和D,以 及(右图)E、F、G、和H本文披露的几种BiS5双特异性结合蛋白 的DSC热谱图。构建体A和E包括IS-RTP处的scFv;B和F包括 AK-GQP处的scFv;C和G包括S-NG处的scFv;且D和H包括SN-G 处的scFv。针对构建体A、B、C、和D的scFv是2F4(IgG是LC10), 而针对E、F、G、和H的scFv是LC10(IgG是2F4)。各种T_M值 与以下结构域相关,T_M1＝CH2/scFv;T_M2＝Fab;T_M3＝CH3。

[0128] 图80描绘了与本文披露的双特异性结合蛋白(构建体D 和H)结合的FcRn的代表性数据集。scFv在CH2-CH3结构域中的位 置(即,在ISTRP环内)可以对FcRn结合活性产生影响。

[0129] 图81描绘了与本文披露的双特异性结合蛋白结合的 FcγR(具有FcγRIIIa-158V的构建体E、G、和H)的代表性数据集。 插图反映了与主图相同的数据,该数据在FcγRIIIa-158V注射时重归 一化。基于scFv结构域的位置,所有构建体能够结合具有可观察到的 亲和力差异的FcγR。

[0130] 图82显示了完整的ISRTP环对于说明性双特异性结合 构建体(例如,A和E)的FcRn结合是重要的。引入N3环不能补偿 ISRTP环(BiS5E+N3)的中断。引入插入IgG1 Fc的N3环中的scFv 使IgG不能结合FcRn。x轴中的时间以秒测量。

[0131] 图83描绘了每种BiS1、BiS2、BiS3、BiS4、和BiS5构 建体的一般示意性结构形式。

“k1”和“k2”符号指示如在实例3中 讨论的动力学分析中使用的片段化模式。

[0132] 图84描绘了每种BiS1、BiS2、BiS3、BiS4、和BiS5的 片段化速率随pH而变化。

[0133] 图85描绘了每种BiS1、BiS2、BiS3、BiS4、和BiS5的 聚集速率随pH而变化。

[0134] 图86描绘了每种BiS1、BiS2、BiS3、BiS4、和BiS5的 单体损失速率随pH而变化。

[0135] 图87描绘了针对每种BiS1、BiS2、BiS3、BiS4、和BiS5 的片段化模式和与HPSEC色谱图上的峰的对应关系的图示。

[0136] 图88描绘了在还原条件下片段化模式的代表性分析。

[0137] 图89描绘了BiS5在还原和非还原条件下的结构排列。

[0138] 图90描绘了SEB测定形式。

具体实施方式

[0139] 在继续进一步详细描述本披露之前,应当理解的是,本 披露并不局限于特定的组合物或方法步骤,因为这些组合物或方法步 骤可以改变。必须注意的是,除非上下文中另外清楚地指出,如在本 说明书及所附权利要求中所使用,单数形式“一种/一个(a/an)”和“该”包括复数指示物。

[0140] 除非另外定义,否则在本文使用的所有技术和科学术语 具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。例如, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology[简明生物医 学和分子生物学词典],Juo,Pei-Show,第2版,2002,CRC出版社; The Dictionary of Cell and Molecular Biology[细胞与分子生物学词典] 第3版,1999,学术出版社(Academic Press);以及Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology[牛津生物化学和分子生物学 词典],修订版,2000,牛津大学出版社(Oxford University Press)为 技术人员提供了本发明中使用的许多术语的通用词典。

[0141] 氨基酸可以在此通过它们的通常已知的三字母符号或 通过由IUPAC-IUB生物化学命名委员会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母符号来提及。同样,核苷酸 可以通过它们的通常接受的单字母代码来提及。

[0142] 除非另有表明,否则抗体的可变结构域、互补决定区 (CDR)以及框架区(FR)中的氨基酸编号遵循卡巴特(Kabat)定 义,该定义如列出于卡巴特等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学重要性的蛋白序列],第5版,美国 国立卫生研究院,公共卫生事业部,马里兰州贝塞斯达市(1991)。使用这个编号系统,实际的线性氨基酸序列可以含有对应于可变结构 域的FR或CDR的缩短或插入该FR或CDR中的较少的或另外的氨 基酸。例如,重链可变结构域可以包含在H2的残基52之后的单个氨 基酸插入(根据卡巴特,残基52a)以及在重链FR残基82之后的插 入残基(例如,根据卡巴特,残基82a、82b、以及82c等)。可以通 过抗体序列与“标准”卡巴特编号序列在同源区的比对而对给定的抗 体确定残基的卡巴特编号。框架残基的最大比对常常需要在编号系统 中的有待用于Fv区的“间隔”残基插入。另外,由于种间或等位基 因差异,在任何给定的卡巴特位点编号处的某些单独残基的身份在抗 体链之间可以不同。

[0143] 如本文所用,术语“抗体(antibody和antibodies)”也 被称为免疫球蛋白,涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克 隆抗体、由至少两个不同表位结合片段形成的多特异抗体(例如,多 特异抗体,如PCT公开WO 2009018386、PCT申请号PCT/US 2012/045229,将

其通过引用以其全文并入本文)、BiSAb、人类抗体、 人源化抗体、骆驼化抗体、单链Fv(scFv)、单链抗体、单结构域抗 体、结构域抗体、Fab片段、F(ab')2片段、展现出所希望的生物活性 的抗体片段(例如,抗原结合部分)、二硫键连接的Fv(dsFv),以 及抗独特型(抗Id)抗体(包括,例如,针对本发明的抗体的抗Id 抗体)、细胞内抗体,以及上述任一者的表位结合片段。具体地说, 抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段,即,含有至少一个抗原结合位点的分子。抗体还包括与抗体或其部分的肽融 合物(例如与Fc结构域融合的蛋白质)。免疫球蛋白分子可以具有 任何同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、亚同种型 (例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或同种异型(例 如,Gm,例如G1m(f、z、a或x)、G2m(n)、G3m(g、b或e)、Am、 Em、和Km(1、2或3))。抗体可以源自任何哺乳动物,包括但不限 于人、猴、猪、马、兔、狗、猫、小鼠等等,或其他动物,如鸟类(例 如鸡)。

[0144] CTLA-4

[0145] 细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)在活化的T 细胞上表达,并随着CD28介导的T细胞活化作为共抑制剂以抑制T 细胞应答。CTLA-4被认为在TCR接合之后调节初试和记忆性T细胞 的早期活化幅度,并且是影响抗肿瘤免疫和自身免疫两者的中央抑制 途径的一部分。CTLA-4仅在T细胞上表达,并且其配体CD80(B7.1) 和CD86(B7.2)的表达主要限于抗原呈递细胞、T细胞、和其他免疫 介导的细胞。据报道阻断CTLA-4信号通路的拮抗性抗CTLA-4抗体 增强T细胞活化。一个这样的抗体易普利姆玛在2011年被FDA批准 用于转移性黑色素瘤的治疗。已经提出使用抗CTLA-4抗体来治疗感 染和肿瘤并上调适应性免疫应答(参见,美国专利号6,682,736、 7,109,003、7,132,281、7,411,057、7,824,679、8,143,379、7,807,797、 8,491,895、8,883,984和美国公开号20150104409,通过引用以其全文 并入本文)。

[0146] PD-L1

[0147] 程序性死亡配体1(PD-L1)也是涉及控制T细胞活化 的受体和配体的复杂系统的一部分。在正常组织中,PD-L1在T细胞、 B细胞、树突细胞、巨噬细胞、间充质干细胞、骨髓源性肥大细胞以 及不同非造血细胞上表达。它的正常功能是通过与它的两个受体程序 性死亡1(又称为PD-1或CD279)和CD80(又称为B7-1或B7.1) 的相互作用来调节T细胞活化与耐受之间的平衡。PD-L1还通过肿瘤 来表达并且在多个部位上起作用以帮助肿瘤避开由宿主免疫系统进 行的检测和消除。PD-L1在宽范围的癌症中高频率地表达。在一些癌 症中,PD-L1的表达与存活降低和不利预后相关联。阻断PD-L1与它 的受体之间的相互作用的抗体能够在体外解除PD-L1依赖性免疫抑 制效应并且增强抗肿瘤T细胞的细胞毒性活性。杜伐鲁单抗是针对人 类PD-L1的能够阻断PD-L1与PD-1和CD80受体两者的结合的人类 单克隆抗体。已经提出使用抗PD-L1抗体来治疗感染和肿瘤并增强适 应性免疫应答(参见,美国专利号8,779,108和9,493,565,通过引用 以其全文并入本文)。

[0148] PD-1

[0149] 程序性死亡-1("PD-1")是T细胞调节子的扩展的 CD28/CTLA-4家族的大约31kD I型膜蛋白成员(参见Ishida,Y.等人 (1992)"Induced Expression Of PD-1,A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily,Upon Programmed Cell Death[程序性细胞死亡诱导的PD-1(免疫球蛋白基因超家族的新成员)的表达]" EMBO J.[欧洲分子生物学组织杂志]11:3887-3895)。

[0150] PD-1在活化的T细胞、B细胞、和单核细胞上表达(Agata, Y.等人(1996)“Expression of the PD-1 Antigen on the Surface of Stimulated Mouse T andB Lymphocytes[在受到刺激的小鼠T和B淋巴 细胞的表面上表达PD-1抗原]”,Int.Immunol[国际免疫学]8(5): 765-772;Martin-Orozco,N.等人(2007)“Inhibitory Costimulation and Anti-Tumor Immunity[抑制性共刺激和抗肿瘤免疫]”Semin.Cancer Biol.[癌症生物学研究会]17(4):288-298)。PD-1是在通过PDL-1或 PDL-2的结合活化后负责下调免疫系统的受体(Martin-Orozco,N.等人 (2007)“Inhibitory Costimulation and Anti-Tumor Immunity[抑制性 共刺激和抗肿瘤免疫]”,Semin.CancerBiol.[癌症生物学研究会]17(4): 288-298)并且作为细胞死亡诱导物发挥作用(Ishida,Y.等人(1992) “Induced Expression Of PD-1,A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily,Upon Programmed Cell Death[程序 性细胞死亡诱导的PD-1(免疫球蛋白基因超家族的新成员)的表达]” EMBO J.[欧洲分子生物学组织杂志]11:3887-3895;Subudhi,S.K.等人 (2005)“The Balance of Immune Responses:Costimulation Verse Coinhibition[免疫应答的平衡:共刺激与共同抑制]”,J.Molec.Med. [分子医学杂志]83:193-202)。经由PD-L1的过表达在许多肿瘤中利 用该过程,导致免疫应答受到抑制。

[0151] PD-1是肿瘤学中免疫介导疗法的充分验证的靶标,其中 临床试验在治疗黑色素瘤和非小细胞肺癌(NSCLC)等其他方面具有 阳性结果。拮抗性抑制PD-1/PD-L-1相互作用增加T细胞活化,增强 宿主免疫系统对肿瘤细胞的识别和消除。已经提出使用抗PD-1抗体来治疗感染和肿瘤并增强适应性免疫应答(参见,美国专利号 7,521,051、7,563,869、7,595,048)。

[0152] OX40

[0153] OX40(CD134;TNFRSF4)是主要存在于活化的$CD4^+$和$CD8^+$T细胞、调控性T(Treg)细胞和自然杀伤(NK)细胞上的 肿瘤坏死因子受体(Croft等人,2009,ImmunolRev[免疫学评论]229: 173-91)。OX40具有一种已知的内源性配体,OX40配体(OX40L; CD152;TNFSF4),其以三聚体形式存在并且可聚集OX40,从而产 生T细胞内的有效细胞信号传导事件。同前。在活化的$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞上通过OX40信号传导导致增强的细胞因子产生、颗粒酶和穿 孔素释放、以及效应和记忆T细胞池的扩增(Jensen等人,2010,Semin Oncol[肿瘤学研讨会],37:524-32)。此外,Treg细胞上的OX40信 号传导抑制Treg的扩增,停止Treg的诱导并且阻断Treg抑制功能 (Voo等人,2013,J Immunol.[免疫学杂志]191:3641-50;Vu等人, 2007,Blood.[血液]110:2501-10)。

[0154] 免疫组织化学研究和早期流式细胞术分析显示,OX40 在浸润广泛的人类癌症的T细胞上表达(Baruah等人,2011, Immunobiology[免疫生物学]217:668-675;Curti等人,2013,Cancer Res.[癌症研究]73:7189-98;Ladanyi等人,2004,Clin Cancer Res.[临 床癌症研究]10:521-30;Petty等人,2002,Am J Surg.[美国外科学杂 志]183:512-8;Ramstad等人,2000,Am J Surg[美国外科学杂志]179: 400-6;Sarff等人,2008,Am J Surg[美国外科学杂志]195:621-5;讨 论625;Vetto等人,1997,Am J Surg[美国外科学杂志]174:258-65)。虽然不希望受理论束缚,肿瘤浸润淋巴细胞上的OX40表达与几种人 类癌症中更长的存活相关,从而表明OX40信号可在建立抗肿瘤免疫 应答中发挥作用(Ladanyi等人,2004,Clin Cancer Res[临床癌症研 究]10:521-30;Petty等人,2002,Am J Surg[美国

外科学杂志]183: 512-8)。

[0155] 在各种非临床小鼠肿瘤模型中,OX40的激动剂(包括 抗体和OX40配体融合蛋白)已成功使用,具有有希望的结果 (Kjaergaard等人,2000,Cancer Res[癌症研究]60:5514-21;Ndhlovu 等人,2001,J Immunol.[免疫学杂志]167:2991-9;Weinberg等人, 2000,J Immunol.[免疫学杂志]164:2160-9)。共刺激T细胞通过OX40 促进抗肿瘤活性在一些情况下是持久的,从而针对随后的肿瘤激发提 供持久的保护(Weinberg等人,2000,J Immunol.[免疫学杂志]164: 2160-9)。Treg细胞抑制和效应T细胞的共刺激被证明对于OX40激 动剂的肿瘤生长抑制是必要的(Piconese等人,2008,JExp Med[实 验医学杂志]205:825-39)。已经探索了许多策略和技术,以通过与疫 苗、化学疗法、放射疗法和免疫疗法组合来增强OX40激动剂治疗的 抗肿瘤影响(Jensen等人,2010,Semin Oncol[肿瘤学研讨会]37: 524-32;Melero等人,2013,Clin Cancer Res[临床癌症研究]19: 997-1008)。已经提出使用抗OX40抗体来治疗感染和肿瘤并上调适 应性免疫应答(参见,美国公开号20160137740,通过引用以其全文 并入本文)。

[0156] TIM3

[0157] T细胞抑制性受体Tim-3(T细胞免疫球蛋白粘蛋白分 子3)在调节抗肿瘤免疫中发挥作用,因为它在产生IFN-γ的CD4+ 辅助细胞1(Th1)和CD8+T细胞毒性1(Tc1)T细胞上表达。它最 初被鉴定为T细胞抑制性受体,充当免疫检查点受体,其特异性地发 挥功能以限制Th1和Tc1 T细胞应答的持续时间和幅度。另外的研究 已经鉴定Tim-3途径可以与PD-1途径协作以促进癌症中CD8+T细胞 中的严重功能障碍表型的发展。它也在某些癌症中的调节性T细胞 (Treg)中表达。鉴于TIM3途径涉及在某些癌症中被免疫抑制的关 键免疫细胞群,它代表了免疫肿瘤学疗法的有吸引力的候选者。参见, Anderson,A.C.,Cancer Immunol Res.[癌症免疫学研究],(2014)2: 393-398;和Ferris,R.L.等人,J Immunol.[免疫学杂志](2014)193: 1525-1530。

[0158] A.双特异性结合蛋白

[0159] 将多个结合位点添加到对单个结合结构域具有特异性 的分子可以极大地增强分子的能力(例如,治疗、诊断能力等)。例 如,双特异性抗体可以结合相同靶标生物分子的多于一个区,赋予比 仅结合靶标上的一个表位的单特异性多肽更高的特异性。可替代地, 双特异性抗体可以结合多个靶标生物分子,例如在复合物中存在的靶 标,或希望螯合和/或聚集的靶标。在第三种情况下,相同的双特异性 抗体可以在任何给定时间进行不同的功能,这取决于其靶标分子的定 位和/或表达。

[0160] 本文描述的是新颖的结合蛋白。这些新颖的结合蛋白的 一种这样的构型被称为“DuetMab”。DuetMab具有以下基本结构:具有修饰的重链的Fc区,其中修饰的重链的CH1区具有天然半胱氨 酸至非半胱氨酸氨基酸的取代,和天然非半胱氨酸氨基酸至半胱氨酸 氨基酸的取代;修饰的对应的轻链,其中该修饰的轻链的CL区还具 有天然半胱氨酸至非半胱氨酸氨基酸的取代,和天然非半胱氨酸氨基 酸至半胱氨酸氨基酸的取代;具有第二重链的第二Fc区;和第二对 应的修饰轻链,其中该修饰的重链与对应的修饰的轻链直接连接,并且在单独的靶标结合臂上,该第二重链与第二对应的轻链直接连接, 并且其中因该天然非半胱氨酸氨基酸被取代为半胱氨酸氨基酸而产 生的修饰的重链中的取代的半胱氨酸、以及因该天然非半胱氨酸氨基 酸被取代为半胱氨酸氨基酸而产生的修饰的相应轻链中的取

代的半 胱氨酸可以形成二硫键。与DuetMab相关的披露内容可以在例如美国 专利号9,527,927中找到,其通过引用以其全文并入本文。

[0161] 这些新颖的结合蛋白的另外的示例性构型被称为 “BiSAb”或“BiSAbs”。本文提供了示例性BiSAb的示意图,以及 特定BiSAb的具体实例。更一般地,BiSAb是含有两个结合单位的多 肽,这两个结合单位中的每一个结合表位(例如,结合单位1结合第 一表位,并且结合单位2结合第二表位)。碱性BiSAb对于结合这两 个表位中的每一个是二价的(例如,多肽包含两个结合单位1(“BD1” 或“BU1”)和两个结合单位2(“BD2”或“BU2”))。因此,当 结合单位1和2结合不同的表位时,BiSAb具有常规双特异性抗体的 多特异性和常规抗体分子的二价性。在结合单位1和2结合相同表位 的实施例中,BiSAb具有常规抗体的单特异性,但是是四价的。除结 合单位外,BiSAb还包括接头多肽和Fc部分。本披露内容涉及广泛 组的双特异性结合蛋白,例如BiSAb和包含BiSAb核心的蛋白,所述 结合蛋白靶向调节免疫应答的分子。一般地,本文所述的新颖结合蛋 白平台和示例性双特异性结合蛋白(BiSAb)包含结合单位/结构域、接头多肽和Fc部分。本披露内容还提供了编码此类BiSAb的核酸分 子以及包含此类核酸并且可用于生产和使用此类BiSAb的方法中的 载体和宿主细胞。本文更详细地描述了BiSAb、包含BiSAb核心的结 合蛋白、和BiSAb的各种部分。

[0162] 在一些方面,BiSAb可包含衍生自特异性结合蛋白(即, 抗体)的两个重-轻链对,其中重链和轻链各自包含可变区(例如, VL和VH),它们一起形成第一结合单位,并且其中该重链各自进一 步包含第二结合单位(例如,与Fc或Fab附接的scFv结构域)。在 第一和第二结合单位结合不同表位的情况下,每个重-轻链对是双特异 性的,并且这两对在一起对于每个表位是二价的。当第一和第二结合 单位结合相同的表位的情况下,每个重-轻链对是单特异性的,并且这 两对在一起对于该表位是四价的。在一些方面,这两个重-轻链对是相 同的。在一些方面,这两个重-轻链对是不相同的。

[0163] 在具体的实施例中,BiSAb的结构域可以基于已知的免 疫球蛋白结构域。免疫球蛋白分子(例如单克隆抗体(mAb))广泛 用作诊断和治疗剂,并且用于工程化mAb的结合片段的方法是本领 域熟知的。与所有免疫球蛋白分子一样,单克隆抗体由重链和轻链肽 亚基组成,每个亚基包括赋予结合特异性(可变结构域)和同种型(恒 定结构域)的可变和恒定结构域。

[0164] 本文披露的BiSAb可具有与常规抗体类似的总体结构, 但是可以通过另外的结合单位的存在来区分,该另外的结合单位附接 在Fab结构域内的位置处、附接于远离Fab结构域的位置处、和在铰 链或Fc区内(例如,在CH2、CH3、或CH4区内,或在例如CH2-CH3 界面的这些区的界面处)。因此,与对结合单个表位来说是二价的常 规抗体不同,BiSAb对于结合两个表位是二价的。然而,如本文所述, BiSAb仍可保持常规抗体的许多希望的特性,例如结合FcRn的能力 和结合C1q和Fe γ受体的能力(例如,指示介导抗体和补体依赖性细 胞毒性的能力)。

[0165] 本文所述的结合结构域可包含仅含有部分的mAb分子 的抗原结合片段,例如Fab、$F(ab')_2$、Fab’、scFv、di-scFv、sdAb片段, 因为这些片段已被发现用作诊断或治疗剂。另外,可以改变可变结构 域中的特定残基以改进抗体和抗体片段的结合特异性和/或稳定性。可 以替换不直接参与抗原结合的其他残基,以便“人源化”非人类抗体 区并降低mAb的免疫原性。

[0166] 尽管BiSAb与常规抗体不同，例如，他们对于结合两个 不同的表位是二价的(或者对于结合单个表位是四价的)，但是BiSAb 的许多部分衍生自或类似于部分的常规抗体。本领域已知的任何mAb 结构域和/或片段可用于本文所述的BiSAb。特别地，BiSAb可包含 Fab和/或scFv片段或其变体。scFv的示例性非限制性变体包括但不 限于串联di-scFv、串联tri-scFv、双抗体、和三抗体。

[0167] 本披露总体上涉及新颖的结合蛋白，其中BiSAb是说明 性实例。另外的实例是包含BiSAb核心的结合蛋白以及包含扩展的 BiSAb核心的一种或多种另外的结合单位和/或结合蛋白。应当理解， 无论何时在本文中描述BiSAb或BiSAb的特征，这种描述一般适用于本披露的新颖的结合蛋白，无论这种结合蛋白是否包括两个结合单位 或多于两个结合单位。因此，术语BiSAb是本文所述的结合蛋白的示 例，并且在背景允许的情况下，任何此类对BiSAb的提及也可用于描 述包含BiSAb核心的结合蛋白。

[0168] 新颖的BiSAb结构平台。

[0169] 在一个方面，本披露提供了具有结构平台的BiSAb结合 蛋白，所述结构平台包含一般由图1A-1F中的示意图阐明的结构域。 这些图是说明性的，并因此在另外的残基之间的插入也在披露的结合 蛋白的范围内。图1A-1C描绘了使用PyMOL模仿的IgG1的CH2-CH3界面处的抗体的Fc区，并且阐明了本披露的几种示例性BiSAb。在 CH2-CH3界面处或附近鉴定出三个表面暴露环，其可能能够承受第二 结合部分(例如，scFv)的插入而不损害IgG或第二结合部分的结构 完整性或稳定性。图1A是在CH2-CH3界面附近的CH2区中鉴定的 一个这样的代表性环ISRTP(SEQ ID NO:39)的示意图。图1D还显 示了代表性构建体IS-scFv-RTP，其中scFv插入ISRTP环的S和R之 间。图1B是在CH2-CH3界面处鉴定的代表性环AKGQP(SEQ ID NO: 40)的示意图。图1E显示了代表性构建体AK-scfv-GQP，其中scFv 插入AKGQP环的K和G之间。图1C是在CH2-CH3界面下游的CH3 区中鉴定的代表性环SNG的示意图。图1F还显示了代表性构建体 S-scfv-NG，其中scFv插入SNG环的S和N之间。本文的实例提供 了定向为SN-scFv-G的构建体的说明，其中scFv插入SNG环的N和 G之间。

[0170] 因此，本披露的一个方面涉及包含两个相同的重-轻链对 的BiSAb，其中每个重-轻链对是双特异性的，并且两个相同的对在一 起对于每个表位是二价的。每个重-轻链对包含结合结构域(BD)， 该结合结构域可以包含结合第一表位(结合单位1)的Fab结构域、结合第二表位(或结合单位2，其可以是例如scFv)的第二结合结构 域(BD2)和Fc区。在一些实施例中，该第二结合结构域可以与Fab 结构域缔合。在一些实施例中，该BiSAb的Fc区可以与结合第二表 位(结合单位2;在图1D-1F中描绘为scFv)的第二结合结构域(BD2) 缔合。

[0171] 在一些实施例中，本披露提供了具有一般平台结构的 BiSAb，该一般平台结构包含两个嵌合重链，每个重链包含重链可变 区(VH1)、重链恒定区(CH1)、铰链或多肽接头区、包含CH2结 构域和CH3结构域的Fc区，其中任选地在一侧或两侧与多肽接头(L1 和/或L2)侧接的第二结合结构域(BD2)与(i)CH2区、(ii)CH2和 CH3区的界面、或(iii)CH3区的序列中的Fc区中的溶剂暴露环缔合。 本披露的该方面的BiSAb还包含两个常规抗体轻链，每个轻链包含轻 链可变区(VL1)和轻链恒定区(CL)，其形成第一结合结构域(BD1) 的一部分。图1D-1F中阐明的特定BiSAb的结合结构域(BD2)是scFv。

[0172] 图1D-1F提供了BiSAb的有用示意图，BiSAb在本文中 也可以称为BiSAb“核心”。如图1D示出的多肽链包含重链，该重 链具有:VH1结构域、CH1结构域、铰链/接头、部分N-末端

CH2结 构域、任选的接头(本文中称为L1或第一多肽接头)、结合单位2 (例如scFv的VL2和VH2)、另一个任选的接头(例如,L2或第二 多肽接头)、剩余的C-末端CH2结构域、和CH3结构域。因为此重 链可以包括具有可替代的结合蛋白和/或传统轻链区的BD2,所以在本 文中该重链被称为嵌合重链。BiSAb包含两个这样的嵌合重链,并且 它们可以相同或不同。应注意用于结合单位1的可变重链结构域(VH) 被称为VH1。在某些方面,这是结合第一表位的Fab的可变重链。类 似地,用于结合单位1的可变轻链结构域(VL)被称为VL1。在某些 方面,这是结合第一表位的Fab的可变轻链。相反,用于结合单位2 的结构域用数字"2"表示,例如VH2和VL2,其中结合单位2是结 合第二表位的scFv。

[0173] 类似地,如图1E示出的多肽链包含重链,该重链具有: VH1结构域、CH1结构域、铰链/接头、CH2结构域、任选的接头(本 文中被称为L1或第一多肽接头)、结合单位2(例如scFv的VL2和 VH2)、另一个任选的接头(例如,L2或第二多肽接头)、和CH3 结构域。在该实施例中,该BiSAb包含第二结合结构域,其图示为在 CH2和CH3区的界面处的序列处与Fc缔合的scFv。

[0174] 如图1F示出的多肽链包含重链,该重链具有:VH1结 构域、CH1结构域、铰链/接头、CH2结构域、部分CH3结构域、任 选的接头(本文中被称为L1或第一多肽接头)、结合单位2(例如 scFv的VL2和VH2)、另一个任选的接头(例如,L2或第二多肽接 头)、CH3结构域。

[0175] 在这些实施例中,BiSAb典型地包括嵌合重链序列中的 典型的或经修饰的抗体铰链区。含有铰链区的氨基酸序列的非限制性 实例包括:EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:44)、EPKSCDKT(SEQ ID NO:45)、EPKSCGKT(SEQ ID NO:46)、EPKSC(SEQ ID NO: 47)。

[0176] 已经描述了与本文披露的某些BiSAb分子的特定结构 平台相关的方面的一般格式,下面更详细地描述了所披露的BiSAb的 各种部分和示例性功能特性。在其他实施例中,本披露考虑并提供了 其他BiSAb结合蛋白,该其他BiSAb结合蛋白包含在本文以及其他披露中简要描述的可替代的结构形式和排列(参见,例如,美国公开号 20090155275和美国专利号9,580,509),其通过引用并入本文。

[0177] 1.结合单位

[0178] 本披露的BiSAb包含至少两个结合单位或结合结构域 (结合单位/结构域1和结合单位/结构域2)。在某些方面,每个结合 单位结合不同的表位,位于相同靶标分子上的不同表位或不同靶标上 的表位。因为BiSAb的每个结合单位作为一对存在(有两个结合单位 1和两个结合单位2),所以BiSAb展现出与每个表位的二价结合。从本文的教导中可以理解,当每个结合单位结合相同的表位时,BiSAb 将展现出与该表位的四价结合。

[0179] 在某些方面,该第一结合单位是Fab片段,例如常规的 单克隆抗体的Fab片段,或重组产生的抗原结合片段,其包含可变轻 链(VL1)、恒定轻链(CL)、可变重链(VH1)和恒定重链部分(CH1)。 任选地,Fab的轻链和重链可以经由一个或多个二硫键,例如经由合 适的抗体铰链区互连。该Fab与第一表位结合。

[0180] 在某些方面,该Fab衍生自或基于常规的单克隆抗体(例 如常规的鼠类、人源化或人类抗体)的序列。在某些方面,含有衍生 自或基于常规的单克隆抗体的序列的Fab的BiSAb保留常规抗体的一 种或多种功能活性(例如保留至少80%或更多(80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%)的功能活性)。例如,在某些方面, 含有这种Fab的BiSAb保留对抗原的亲和力、抑制性活性、免疫系统 调节活性、免疫应答的活化或诱导、和/或常规

抗体的细胞(例如,癌 细胞)杀伤活性中的一种或多种。

[0181] 在某些方面,本披露的BiSAb包含结合单位2,并且结 合单位2包含结合第二表位的结合结构域。该结合单位2(或结合结 构域2(BD2))可以使用任何合适的策略与BiSAb缔合。如本文所 用,与BiSAb“缔合”的BD2(例如,在一些实施例中,在Fc区内, 在其他实施例中,在Fab区内)意指这两个分子之间具有相互作用, 使得BD2保留与Fc部分或与BiSAb结构的Fab部分靶标结合和缔合 的取向。此类相互作用的实例包括经由氨基酸接头的共价键合;通过 在Fab区内,铰链区内,或在CH2、CH3、或CH2和CH3的界面、或CH4区处的Fc区内的BD2的重组表达的共价键合;和那些相同区 内的非共价相互作用(例如范德华力)和氢键合相互作用。落入本披 露范围内的结合结构域(或“BD”或“结合单位”)的非限制性实例 包括抗体可变区、抗体片段、scFv、单链双抗体、或本领域已知的其 他结合结构域。结合结构域还包括双特异性单链双抗体,或设计用于 结合两个不同表位的单链双抗体。在一个方面,可用于构建本披露的 多特异性表位结合结构域的表位结合结构域示例于US 20100298541和US 20130079280中,其出于所有目的通过引用并入本文。

[0182] 在某些方面,该BiSAb可包含包括scFv的结合结构域。 因此,在某些方面,结合单位2包含scFv。应当理解,该scFv包括 多肽链,该多肽链包含通过柔性多肽接头与可变轻链结构域(VL)连 接的可变重链结构域(VH)。图1D-1F显示了示例性BiSAb的示意 图,其中该BD(在此,描绘为结合单位2)是具有如本文所述的结构 域的scFv,该结构域可以指定为VL2和VH2。在一些方面,VH2和 VL2之间的多肽接头包含蛋白酶切割位点。scFv的VH和VL结构域可以来自相同或不同的抗体。在一些方面,该scFv的VH或VL可包 含一个或多个结合至感兴趣的靶标的CDR,而VH或VL结构域的其 余部分衍生自不同的抗体或是合成的。在一些方面,scFv包含抗体的 至少一个CDR,例如,本领域已知的结合感兴趣的靶标的抗体。在一 些方面,该scFv包含给定抗体的至少两个CDR。在一些方面,该scFv 包含给定抗体的至少三个CDR。在一些方面,该scFv包含给定抗体 的至少四个CDR。在一些方面,该scFv包含给定抗体的至少五个 CDR。在一些方面,该scFv包含给定抗体的至少六个CDR。

[0183] 在某些方面,BD可包含受体的配体结合结构域或配体 的受体结合结构域。在一些方面,BD包含如上所述对在选自下组的 靶标上的一个或多个表位具有结合亲和力的序列,该组由以下组成:CTLA-4、PD-1、PD-L1、OX40、和TIM3。在一些实施例中,该结合 结构域对选自下组的靶标展示出特异性结合活性,该组由以下组成:CTLA-4、PD-1、PD-L1、OX40、和TIM3。本文披露的BiSAb可包 含对本文披露的分子靶标具有结合亲和力或特异性结合活性的结合 结构域的任何组合。例如,本文披露的BiSAb可以包含允许与靶标双 特异性结合的结合结构域的组合,该靶标包括:CTLA-4和PD-1、 CTLA-4和PD-L1、CTLA-4和TIM3、PD-1和PD-L1、PD-L1和OX40、 PD-1和TIM3、PD-L1和TIM3、和TIM3。包括结合特定靶标组合的 结合结构域的BiSAb在实例中阐明,并包括PD-1/CTLA-4、 PD-L1/CTLA-4、PD-1/OX40、PD-L1/OX40、和PD-1/TIM3的非限制 性组合。

[0184] 在一些另外的实施例中,BiSAb对至少一种靶标分子展 现出结合活性(例如,结合亲和力和/或结合特异性),该结合活性比 用于产生BiSAb的亲本单特异性结合序列的结合活性更高。在类似的 实施例中,BiSAb可以对两种靶标分子展现出结合活性(例如,结合 亲和力和/或结合特异性),该结合活性比用于产生BiSAb的两种亲 本单特异性结合序列的结合活性更高。在又另外的实施例中,BiSAb 可以对两种靶标分子展现出结合活性(例如,结

合亲和力和/或结合特 异性)，该结合活性比用于产生BiSAb的亲本单特异性结合序列的组合的结合活性更高。相对于单独或组合的亲本单特异性结合序列，BiSAb的结合特性的增强相对于使用靶向相同分子的单特异性疗法提 供了意想不到的优点(即使当组合使用时)。

[0185] 在一些实施例中，本披露涉及结合选自下组的靶标的抗 体或其抗原结合片段，该组由以下组成：CTLA-4、PD-1、PD-L1、 OX40、和TIM3。在此类实施例中，抗体或其抗原结合片段可包含重 链序列和轻链序列、或包含重链和轻链序列的CDR1、CDR2、和CDR3 序列的重链序列和轻链序列的一部分。在其他实施例中，抗体或其抗 原结合片段可包含重链可变(HCv)区序列和轻链可变(LCv)区序 列，或包含重链和轻链序列的CDR1、CDR2、和CDR3序列的HCv 和LCv的一部分。在又其他实施例中，抗体或其抗原结合片段可包含 重链和轻链序列的CDR1、CDR2、和CDR3序列。在一些实施例中， 该抗体可以是嵌合的、人源化的、或人类抗体。在一些实施例中，该 抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。在另外的实施例中，该抗体是 单克隆抗体。

[0186] 在一些实施例中，包含如上所述的此类“亲本”抗体的 全部或部分抗原结合区的结构域可用于产生本文披露的双特异性结 合蛋白(BiSAb)。实例中阐明的非限制性实施例提供了关于如何能 够鉴定和组合抗体序列以产生展现出与分子靶标组合的双特异性结合的BiSAb的说明。

[0187] 可以单独或组合使用几种方法以改进包含scFv分子的 BiSAb的稳定性。可单独使用或与一种或多种本文所述其他方法组合 使用的一种潜在的方法是工程化连接scFv结构域的接头的长度和/或 组成以稳定scFv部分。

[0188] 可以使用的另一种潜在的方法是将至少两个氨基酸取 代(也指修饰或突变)引入scFv的VH和/或VL结构域以促进二硫键 形成(参见例如Brinkmann等人，1993，PNAS[美国科学院院报]， 90:7538-42；Zhu等人，1997，Prot.Sci.[蛋白科学]6:781-8；Reiter 等人，1994，Biochem.[生物化学]33:5451-9；Reiter等人，1996，Nature [自然]14:1239-45；Luo等人，1995，J.Biochem.[生物化学杂志]118: 825-31；Young等人，1995，FEBS Let.[欧洲生化学会联合会快报]377: 135-9；Glockshuber等人，1990，Biochem[生物化学]29:1362-7)。此方法可以单独使用或与本文描述的一种或多种其他方法组合使用。

[0189] 在某些方面，可以将一个或多个突变引入scFv的VH和 VL结构域的每一个中，以在包含scFv的BiSAb表达时促进VH和 VL结构域之间的链间二硫键形成。在另一个方面，将两个突变引入 链的相同结构域中。在某个方面，将两个突变引入不同的链中。在某 些方面，引入多个互补突变以促进多个二硫键的形成或其他稳定化相 互作用。在某些方面，引入半胱氨酸以促进二硫键形成。可以突变为 半胱氨酸的示例性氨基酸包括VH2的氨基酸43、44、45、46、47、 103、104、105和106，以及VL2的氨基酸42、43、44、45、46、98、 99、100和101。上述编号基于卡巴特编号，其鉴定仅相对于scFv的 VH2和VL2的位置(而不是相对于本文提供的BiSAb或SEQ ID NO 的全长序列中氨基酸的位置)。可以突变为半胱氨酸残基的氨基酸位置的示例性组合包括：VH44-VL100、VH105-VL43、VH105-VL42、 VH44-VL101、VH106-VL43、VH104-VL43、VH44-VL99、VH45-VL98、 VH46-VL98、VH103-VL43、VH103-VL44、和VH103-VL45。在一些 方面，将VH的氨基酸44和VL的氨基酸100突变为半胱氨酸。

[0190] 可单独使用或与本文所述的一种或多种其他方法组合 使用的另一个方法是选择

scFv的结构域的顺序。在某些方面，相对于 VL结构域的VH结构域的取向被优化以达到稳定性。在某些方面， 该scFv处于VH-接头-VL取向。在某些方面，该scFv处于VL-接头 -VH取向。在涉及本文披露的新颖BiSAb形式的实施例中，scFv中结 构域的定向可确定scFv如何与BiSAb的Fc部分缔合。虽然下面在多 肽接头的背景下更详细地描述了这一点。然而，简言之，鉴于BD(例 如，scFv)通过任选的多肽接头(L1)和(L2)与CH2、CH3、或 CH2和CH3的界面处互连，结构域的顺序确定了scFv的哪个部分与 L1互连和scFv的哪个部分与L2互连。

[0191] 可以单独使用或与本文所述的其他方法组合使用的另 外的方法是通过突变scFv的一个或多个表面残基来引入一个或多个 稳定性突变。在一些方面，将一个、两个、三个、四个、五个、六个 或多于六个残基在scFv的VH和/或VL结构域的一者或两者中突变。 在某些方面，仅在scFv的VH结构域中进行改变。在某些方面，仅在 scFv的VL结构域中进行改变。在某些方面，在scFv的VH和VL结 构域中进行改变。可以在每个结构域中进行相同数量的改变，或者可 以在每个结构域中进行不同数量的改变。在某些方面，一个或多个变 化是来自未修饰的母体scFv中存在的残基的保守氨基酸取代。在其他 方面，一个或多个变化是来自未修饰的母体scFv中存在的残基的非保 守氨基酸取代。当进行了多个取代时，在scFv的VH或VL结构域的 一者或两者中，每个取代独立地是保守取代或非保守取代。在某些方 面，所有取代是保守取代。在某些方面，所有取代是非保守的。在某 些方面，至少一个取代是保守的。在某些方面，至少一个取代是非保 守的。

[0192] 可以单独使用或与其他方法组合使用的又另一种方法 是通过突变在scFv的VH和/或VL结构域中存在的一个或多个残基来 引入一个或多个氨基酸取代以匹配最常见的在已知抗体的VH和/或 VL结构域的共有序列的所述特定位置处的残基。在某些方面，在scFv 的VH结构域和/或VL结构域的一者或两者中的一个、两个、三个、 四个、五个、六个或多于六个位置处引入取代。可以在每个结构域中 进行相同数量的改变，或者可以在每个结构域中进行不同数量的改 变。在某些方面，与给定共有序列匹配的序列中的一个或多个变化是 来自未修饰的VH和/或VL序列中存在的残基的保守氨基酸取代。在 其他方面，一个或多个变化表示来自未修饰的VH和/或VL序列中存 在的残基的非保守氨基酸取代。当进行了多个取代时，在scFv的VH 或VL结构域的一者或两者中，每个取代独立地是保守取代或非保守 取代。在某些方面，所有取代是保守取代。在某些方面，所有取代是 非保守取代。在某些方面，至少一个取代是保守的。在某些方面，至 少一个取代是非保守的。

[0193] 应当注意，描述为可用于修饰或稳定scFv部分的任何修 饰可用于修饰Fab部分。例如，可以修饰BiSAb的Fab部分的可变结 构域以改进稳定性，抗原结合等。此外，可以修饰Fab或scFv部分以 降低免疫原性。

[0194] 在某些方面，结合单位2(BD)是scFv，例如，衍生自 常规单克隆抗体(包含通过柔性接头(例如甘氨酸-丝氨酸接头)互连 的可变轻链(VL2)和可变重链(VH2))的scFv。任选地，scFv的 可变轻链和可变重链可以经由一个或多个二硫键进一步互连，并且如 上所述，可以包括一个或多个突变或变异。scFv与第二表位结合。在 某些方面，第二表位与通过结合单位1结合的第一表位不同。在其他 方面，第二表位与通过结合单位1结合的第一表位相同。在某些方面， scFv衍生自或基于常规单克隆抗体(例如常规的鼠类、人源化或人类 抗体)的序列。在某些方面，含有衍生自或基于常规的单克隆抗体的 序列的scFv的BiSAb保留常规抗体的一种或多种功能活性(例如保 留至少80％或更多(80％、85％、90％、95％、

97％、98％、99％或100％）的功能活性）。例如，在某些方面，含有这种scFv的BiSAb保留对抗原的亲和力、抑制性活性、或常规抗体的细胞杀伤活性中的一种或 多种。

[0195] 在某些方面，BiSAb包含本文所述的任何结合单位1和 结合单位2，包括结合单位1和结合单位2的任何组合。例如，在某 些方面，本披露提供了包含Fab的多肽，该Fab结合特定靶标（例如， 结合特定靶标上的表位），例如包含特定氨基酸序列或由特定核苷酸 序列编码的Fab和/或与特定靶标结合（例如，与特定靶标上的表位结 合）的scFv，例如包含特定氨基酸序列或由特定核苷酸序列编码的 scFv。

[0196] 如上文详细描述的，结合单位1和结合单位2可以经由 接头多肽1（L1，L2）经由共价键与BiSAb缔合。一般地，连接经由 BiSAb的嵌合重链实现，使得该互连经由重链C_H2结构域、重链C_H3 结构域实现，或在重链C_H2结构域和C_H3结构域的界面处，或者在一 些实施例中，在铰链区或Fab结构域内。L1和L2的长度和顺序可以 彼此各自不同，并且本文描述了示例性构型。本披露考虑了包含结合 单位和接头多肽的任何组合的BiSAb，包括结合一种或多种所希望的 靶标的特异性结合单位和本文所述的特异性L1和L2多肽接头的任何 组合。

[0197] 2.Fc区

[0198] 如本文所用，“Fc区”涵盖衍生自免疫球蛋白（优选地 人类免疫球蛋白）恒定区的结构域，包括该恒定区的片段、类似物、 变体、突变体或衍生物。合适的免疫球蛋白包括IgG1、IgG2、IgG3、 IgG4和其他类别，例如，IgA、IgD、IgE和IgM。Fc区可以是天然序 列Fc区或改变的Fc区。免疫球蛋白的Fc区一般包含两个恒定结构 域，C_H2结构域和C_H3结构域，并且任选地包含C_H4结构域。本披露 的BiSAb包括包含C_H2结构域和C_H3结构域的Fc区。

[0199] a.改变的Fc区

[0200] 改变的Fc区（本文中也称为“变体Fc区”）可用于改 变本披露的BiSAb的效应子功能和/或半衰期。可以在Fc区中进行一 个或多个改变以改变分子的功能和/或药代动力学特性。此类改变可以 导致C1q结合和补体依赖的细胞毒性（CDC）或者对于IgG的Fc γ R 结合以及抗体依赖的细胞的细胞毒性（ADCC）、或者抗体依赖的细 胞介导的吞噬作用（ADCP）的减少或增加。本披露涵盖BiSAb，其 中已经进行改变以便微调效应子功能，通过增强或减少功能或提供所 希望的效应子功能。因此，在本披露的一个方面，BiSAb包含变体Fc 区（即，如下所述已经改变的Fc区）。包含变体Fc区的BiSAb在本 文中也称为“Fc变体BiSAb”。如在此使用的，“天然的”是指未修 饰的亲本序列，并且包含天然Fc区的BiSAb在此被称为“天然Fc BiSAb”。Fc变体BiSAb可以通过本领域已熟知的多种方法产生。非 限制性实例包括分离抗体编码区（例如，从杂交瘤）以及在Fc区中 进行一个或多个所希望的取代。可替代地，可以将BiSAb的抗原结合 部分（例如，可变区）亚克隆到编码变体Fc区的载体中。在一个方面，与天然Fc区相比，变体Fc区展现出相似的诱导效应子功能的水 平。在另一个方面，与天然Fc相比，变体Fc区展现出更高的效应子 功能诱导。在另一个方面，如与天然Fc相比，变体Fc区展现出较低 的效应子功能的诱导作用。在下文详述了变体Fc区的一些具体方面。 用于测量效应子功能的方法在本领域是熟知的。

[0201] 一般地，通过Fc区的变化而修饰抗体的效应子功能， 这些变化包括但不限于氨基酸取代、氨基酸添加、氨基酸缺失以及对 于Fc氨基酸的翻译后修饰（例如，糖基化）的变化。以下所述的方 法可以用于微调本披露的BiSAb的效应子功能、Fc区对于FcR的结 合特性（例如，亲和力和特异性）的比率，从而产生具有所希望特性 的BiSAb。

[0202] 应理解,如在此使用的Fc区包括含有抗体分子的除第 一恒定区免疫球蛋白结构域之外的恒定区的多肽。因此,Fc是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域,以及IgE和IgM的 最后三个恒定区免疫球蛋白结构域、以及任选地,这些结构域的N- 末端的柔性铰链的全部或部分。对于IgA和IgM,Fc可以包括J链。对于IgG,Fc包含免疫球蛋白结构域Cγ2和Cγ3(Cγ2和Cγ3)以及 任选地Cγ1(Cγ1)与Cγ2(Cγ2)之间的下铰链的一部分。尽管Fc 区的边界可以变化,但如本文所用,人类IgG重链Fc区包含其羧基 末端的残基A231,其中编号根据如卡巴特中列出的EU索引进行。Fc 可以是指分离中的这个区或者在抗体、抗体片段、或Fc融合蛋白背 景下的这个区。已在多个不同Fc位置处观察到多态性,包括但不限 于如由EU索引编号的IgG1的位置270、272、312、315、356、以及 358,并且因此所表示的序列与现有技术序列之间可能存在略微的差 异。

[0203] 在一个方面,本披露涵盖Fc变体BiSAb,其相对于天 然Fc BiSAb具有改变的针对Fc配体(例如,Fc受体,C1q)的结合 特性。结合特性的实例包括但不限于结合特异性、平衡解离常数(K_d)、解离和缔合速率(分别为k_{off}和k_{on})、结合亲和力和/或亲合力。在本 领域已知的是平衡解离常数(K_d)被定义为k_{off}/k_{on}。在某些方面,包 含具有低K_d的Fc变体区的BiSAb可能比具有高K_d的BiSAb是更希 望的。然而,在一些情况下,与K_d的值相比,k_{on}或k_{off}的值可能更加 有意义。本领域技术人员可以确定哪个动力学参数对于给定的应用来 说是最重要的。例如,减少与一种或多种正调节子(例如,FcγRIIIA) 的结合和/或增强与抑制性Fc受体(例如,FcγRIIB)的结合的修饰合 适于降低ADCC活性。因此,对不同受体的结合亲和力的比率(例如, 平衡解离常数(K_d)的比率)可表明本披露的Fc变体BiSAb的ADCC 活性是否增强或降低。另外,减少与C1q的结合的修饰将合适于减少 或消除CDC活性。

[0204] 在一个方面,与天然Fc BiSAb相比,Fc变体BiSAb展 现出对一种或多种Fc受体的改变的结合亲和力,这些Fc受体包括但 不限于FcRn、FcγRI(CD64)(包括同种型FcγRIA、FcγRIB、和 FcγRIC);FcγRII(CD32,包括同种型FcγRIIA、FcγRIIB、和FcγRIIC); 和FcγRIII(CD16,包括同种型FcγRIIIA和FcγRIIIB)。

[0205] 在某些方面,Fc变体BiSAb具有增加的对Fc配体的亲 和力。在其他方面,Fc变体BiSAb相对于天然Fc BiSAb具有减少的 对Fc配体的亲和力。

[0206] 在具体的方面,Fc变体BiSAb对Fc受体FcγRIIIA具有 增强的结合。在另一个具体方面,Fc变体BiSAb对Fc受体FcγRIIB 具有增强的结合。在另外的具体方面,Fc变体BiSAb对Fc受体 FcγRIIIA和FcγRIIB两者具有增强的结合。在某些方面,与天然Fc BiSAb相比,对FcγRIIIA具有增强的结合的Fc变体BiSAb在结合 FcγRIIB受体方面不具有伴随的增加。在具体的方面,Fc变体BiSAb 对Fc受体FcγRIIIA具有降低的结合。在另外的具体方面,Fc变体 BiSAb对Fc受体FcγRIIB具有降低的结合。在另一个具体的方面, Fc变体BiSAb对Fc受体FcRn具有增强的结合。在仍另一个具体的 方面,对FcγRIIIA和/或FcγRIIB展现出改变的亲和力的Fc变体BiSAb 对Fc受体FcRn具有增强的结合。在又另一个具体的方面,相对于天 然Fc BiSAb,对FcγRIIIA和/或FcγRIIB展现出改变的亲和力的Fc变 体BiSAb对C1q具有改变的结合。

[0207] 在另一个方面,相对于天然Fc BiSAb,Fc变体BiSAb 展现出增加或降低的对C1q的亲和力。在仍另一个具体的方面,对 C1q展现出改变的亲和力的Fc变体BiSAb对Fc受体FcRn具有增强 的结合。在又另一个具体的方面,相对于天然Fc BiSAb,对C1q展现 出改变的亲

和力的Fc变体BiSAb具有对FcγRIIIA和/或FcγRIIB的改 变的结合。

[0208] 认识到的是抗体能够通过在本领域中共同称为抗体效 应子功能的多种方法引导靶标抗原的攻击和破坏。被称为“抗体依赖 性细胞介导的细胞毒性作用”或“ADCC”的这些方法之一指的是细 胞毒性作用的一种形式,其中结合到存在于某些细胞毒性细胞(例如,天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞、以及巨噬细胞)上的FcγR受体 (FcγR)上的分泌的Ig使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性地结合 带有抗原的靶标细胞并且随后用细胞毒素杀伤该靶标细胞。针对靶细 胞表面的特异性高亲和力IgG抗体“武装”细胞毒性细胞并且是这种 杀伤所需要的。靶标细胞的裂解是细胞外的,要求直接的细胞与细胞 接触,并且不涉及补体。术语效应子功能所涵盖的另一种方法是补体 依赖性细胞毒性(下文称为“CDC”),该方法指的是通过补体系统 进行的抗体介导的靶标细胞破坏的生物化学事件。补体系统是在正常 血浆中发现的一种蛋白质复合系统,该系统与抗体组合以消灭病原菌 以及其他外源细胞。术语效应子功能所涵盖的仍然另一种方法是抗体 依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP),该方法指的是细胞介导的反 应,其中表达一种或多种效应配体的非特异性细胞毒性细胞识别靶标 细胞上的结合抗体并且随后引起靶标细胞的吞噬作用。

[0209] 考虑的是,通过用于确定一种或多种FcγR介导的效应 细胞功能的体外功能测定来表征Fc变体BiSAb。在某些方面,Fc变 体BiSAb具有相似的结合特性,并且效应细胞如在基于体外测定中那 样在体内模型(例如在此描述和披露的那些)中起作用。然而,本披 露不排除在基于体外的测定中未展现出所希望的表型但在体内展现 出所希望的表型的Fc变体BiSAb。

[0210] 可通过增加Fc区对FcRn的结合亲和力来增加包含Fc 区的蛋白的血清半衰期。如本文所用的术语“抗体半衰期”意指抗体 的药代动力学特性,它是抗体分子在它们的给予之后的平均存活时间 的度量。抗体半衰期可以表示为从患者(或其他哺乳动物)的身体或其特定区室(例如,如在血清中测量的,即循环半衰期),或在其他 组织中消除50%已知量的免疫球蛋白所需要的时间。从一种免疫球蛋 白或免疫球蛋白类别到另一种免疫球蛋白或免疫球蛋白类别,半衰期 可能不同。一般地,抗体(或BiSAb)半衰期的增加导致循环中所给 予BiSAb的平均停留时间(MRT)的增加。

[0211] 半衰期的增加允许供给患者的药物量的减少以及给予 频率的减少。为了增加BiSAb的血清半衰期,可以例如将补救受体结 合表位并入到BiSAb(尤其是抗体片段)中,如在美国专利号5,739,277 中所描述的。如本文所用,术语“补救受体结合表位”是指引起IgG分子的体内血清半衰期的增加的IgG分子(例如,IgG1、IgG2、IgG3 或IgG4)的Fc区的表位。可替代地,具有延长的半衰期的本披露的 BiSAb可以通过对鉴别为参与Fc与FcRn受体之间的相互作用的氨基 酸残基进行修饰而产生(参见,例如,美国专利号6,821,505和 7,083,784)。另外,可利用本领域中广泛使用的技术通过与PEG或白 蛋白轭合来使本披露的BiSAb的半衰期增加。

[0212] 考虑到将另外的结合结构域插入如本文所述的Fc区和/ 或随后通过抗原结合可影响Fc活性。例如,结合抗原可以增加或降 低对FcgR、C1q、和FcRn的结合亲和力和活性。这将产生抗原依赖 性转换以调节各种抗体依赖性过程。在一个方面,抗原结合可以减少 与FcRn的相互作用,允许游离的BiSAb与FcRn相互作用并具有正 常的半衰期,但允许BiSAb-Ag复合物的快速清除/细胞内化。此外, 这可以允许BD2-抗原介导的相互作用对BD1结合的

抗原的清除产生 影响。在另外的方面,BiSAb可包含直接插入BD2的Fc区(Fc-BD2)。

[0213] 在一个方面,本披露提供了Fc变体,其中该Fc区包含 在选自下组的一个或多个位置处的修饰(例如,氨基酸取代、氨基酸 插入、氨基酸缺失),该组由以下组成:如通过如在卡巴特中列出的 EU索引来编号的221、225、228、234、235、236、237、238、239、 240、241、243、244、245、247、250、251、252、254、255、256、 257、262、263、264、265、266、267、268、269、279、280、284、 292、296、297、298、299、305、308、313、316、318、320、322、 325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、339、341、 343、370、373、378、392、416、419、421、428、433、434、435、 436、440、以及443。任选地,该Fc区可以包含在本领域技术人员已 知的另外的和/或可替代的位置处的修饰(参见例如美国专利 5,624,821、6,277,375、6,737,056、7,083,784、7,317,091、7,217,797、 7,276,585、7,355,008)。另外,有用的氨基酸位置以及特定取代在 US 6,737,056的表2以及表6-10、US 2006/024298的图41中表示的表、US 2006/235208的图5、12以及15中表示的表、US 2006/0173170的 图8、9以及10中表示的表、以及WO 09/058492的图8-10、13以及 14中表示的表中举例说明。

[0214] 在具体的方面,本披露提供了Fc变体,其中该Fc区包 含至少一个选自下组的取代,该组由以下组成:如通过如在卡巴特中 列出的EU索引来编号的221K、221Y、225E、225K、225W、228P、 234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、2341、234V、234F、 235A、235D、235R、235W、235P、235S、235N、235Q、235T、235H、 235Y、2351、235V、235E、235F、236E、237L、237M、237P、239D、 239E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、240A、240T、 240M、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L、243Y、243R、 243Q、244H、245A、247L、247V、247G、250E、250Q、251F、252L、 252Y、254S、254T、255L、256E、256F、256M、257C、257M、257N、 2621、262A、262T、262E、2631、263A、263T、263M、264L、2641、 264W、264T、264R、264F、264M、264Y、264E、265A、265G、265N、 265Q、265Y、265F、265V、2651、265L、265H、265T、2661、266A、 266T、266M、267Q、267L、268E、269H、269Y、269F、269R、270E、 280A、284M、292P、292L、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、 296L、2961、296H、296G、297S、297D、297E、298A、298H、2981、 298T、298F、2991、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、 3051、308F313F、316D、318A、318S、320A、320S、322A、322S、 325Q、325L、3251、325D、325E、325A、325T、325V、325H、326A、 326D、326E、326G、326M、326V、327G、327W、327N、327L、328S、 328M、328D、328E、328N、328Q、328F、3281、328V、328T、328H、 328A、329F、329H、329Q、330K、330G、330T、330C、330L、330Y、 330V、3301、330F、330R、330H、331G、331A、331L、331M、331F、 331W、331K、331Q、331E、331S、331V、3311、331C、331Y、331H、 331R、331N、331D、331T、332D、332S、332W、332F、332E、332N、 332Q、332T、332H、332Y、332A、333A、333D、333G、333Q、333S、 333V、334A、334E、334H、334L、334M、334Q、334V、334Y、339T、 370E、370N、378D、392T、396L、416G、419H、421K、428L、428F、 433K、433L、434A、424F、434W、434Y、436H、440Y以及443W。任选地,该Fc区可以包含本领域的技术人员已知的另外的和/或可替 代的氨基酸取代,这些氨基酸取代包括但不限于在US 6,737,056的表 2以及表6-10、US 2006/024298的图41中表示的表、US 2006/235208 的图5、图12以及图15中表示的表、US 2006/0173170的图8、图9 以及图10中表示的表、以及US 20090041770的图8、图9以及图10 中表示的表中举例说明的那些,其所有通过引用以其全文并入本文。

[0215] 在具体的方面,本披露提供了Fc变体BiSAb,其中该 Fc区包含在选自下组的一个或多个位置处的至少一个修饰(例如,氨 基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失),该组由以下

组成:如通过如 在卡巴特中列出的EU索引来编号的228、234、235以及331。在一 个方面,该修饰是选自下组的至少一个取代,该组由以下组成:如通 过如在卡巴特中列出的EU索引来编号的228P、234F、235E、235F、 235Y、以及331S。

[0216] 在另一个具体的方面,本披露提供了Fc变体BiSAb, 其中该Fc区是IgG4 Fc区并且包含在选自下组的一个或多个位置处的 至少一个修饰,该组由以下组成:如通过如在卡巴特中列出的EU索 引来编号的228和235。在仍另一个具体的方面,该Fc区是IgG4 Fc 区,并且这些非天然存在的氨基酸选自下组,该组由以下组成:如通 过如在卡巴特中列出的EU索引编号的228P、235E以及235Y。

[0217] 在另一个具体的方面,本披露提供了Fc变体BiSAb, 其中该Fc区包含在选自下组的一个或多个位置处的至少一个非天然 存在的氨基酸,该组由以下组成:如通过如在卡巴特中列出的EU索 引来编号的239、330以及332。在一个方面,该修饰是选自下组的至 少一个取代,该组由以下组成:如通过如在卡巴特中列出的EU索引 来编号的239D、330L、330Y以及332E。参见美国专利号7,317,091, 将其通过引用以其全文并入本文。

[0218] 在具体的方面,本披露提供了Fc变体BiSAb,其中该 Fc区包含在选自下组的一个或多个位置处的至少一个非天然存在的 氨基酸,该组由以下组成:如通过如在卡巴特中列出的EU索引来编 号的252、254以及256。在一个方面,该修饰是选自下组的至少一个 取代,该组由以下组成:如通过如在卡巴特中列出的EU索引来编号 的252Y、254T以及256E。参见美国专利号7,083,784,将其通过引用 以其全文并入本文。

[0219] 在某些方面,本披露提供了Fc变体BiSAb,其中该Fc 区包含位置428(如通过如在卡巴特中列出的EU索引来编号)处的 非天然存在的氨基酸。在一个方面,位置428处的修饰选自下组,该 组由以下组成:如通过如在卡巴特中列出的EU索引来编号的428T、 428L、428F、以及428S。参见美国专利号7,670,600,将其通过引用 以其全文并入本文。在另一个方面,Fc变体BiSAb可进一步包含位 置434(如通过如在卡巴特中列出的EU索引来编号)处的非天然存 在的氨基酸。在一个方面,位置434处的修饰选自下组,该组由以下 组成:如通过如在卡巴特中列出的EU索引来编号的434A、434S、以 及434F。在其他方面,本披露提供了Fc变体BiSAb,其中该Fc区包 含位置428和434(如通过如在卡巴特中列出的EU索引来编号)处 的非天然存在的氨基酸。在具体的方面,该Fc区包含428L、434S。 参见美国专利号8,088,376。

[0220] 在某些方面,由IgG抗体引发的效应子功能很大程度上 取决于连接至该蛋白的Fc区的碳水化合物部分(Claudia Ferrara等人, 2006,Biotechnology and Bioengineering[生物技术与生物工程]93: 851-861)。因此,可以修饰Fc区的糖基化以便提高或降低效应子功 能(参见例如,Umana等人,1999,Nat.Biotechnol[自然生物技术]17: 176-180;Davies等人,2001,Biotechnol Bioeng[生物技术和生物工 程]74:288-294;Shields等人,2002,J Biol Chem[生物化学杂志]277: 26733-26740;Shinkawa等人,2003,JBiol Chem[生物化学杂志]278: 3466-3473;美国专利号6,602,684、6,946,292、7,064,191、7,214,775、 7,393,683、7,425,446、7,504,256,POTELLIGENT™技术(Biowa有 限公司(Biowa,Inc.)普林斯顿,新泽西州);GLYCOMAB™糖基化 工程技术(格黎卡特生物技术股份公司(GLYCART biotechnology AG),苏黎世,瑞士))。因此,在一个方面,本披露的BiSAb的 Fc区包含氨基酸残基的改变的糖基化。在另一个方面,氨基酸残基的 改变的糖基化导致降低的

效应子功能。在另一个方面，氨基酸残基的 改变的糖基化导致增加的效应子功能。在具体的方面，该Fc区具有 减少的岩藻糖基化。在另一个方面，该Fc区是未岩藻糖基化的(参 见，例如，美国专利申请公开号2005/0226867)。在一个方面，具有 增加的效应子功能(尤其是ADCC)的这些BiSAb在宿主细胞(例如， CHO细胞，浮萍(Lemna minor))中产生，其被工程化来产生具有 ADCC的高度去岩藻糖基化的多肽，该ADCC比通过亲本细胞产生的 多肽高出100倍以上(Mori等人，2004，Biotechnol Bioeng[生物技术 与生物工程]88:901-908；Cox等人，2006，Nat Biotechnol[自然生物 技术]24:1591-7)。

[0221] 向IgG分子上的低聚糖添加唾液酸可以增强他们的抗炎 症活性并且改变他们的细胞毒性(Keneko等人，Science[科学]，2006， 313:670-673；Scallon等人，Mol.Immuno.[分子免疫学]2007年3月； 44(7):1524-34)。以上参考的研究论证了具有增加的唾液酸化的IgG 分子具有抗炎症特性，而具有降低的唾液酸化的IgG分子具有提高的 免疫刺激特性(例如，提高ADCC活性)。因此，对于具体应用，BiSAb 可以被修饰为具有适当的唾液酸化性质(美国公开号2009/0004179和 国际公开号WO 2007/005786)。

[0222] 在一个方面，与天然Fc区相比，本披露的BiSAb的Fc 区包含改变的唾液酸化特征。在一个方面，与天然Fc区相比，本披 露的BiSAb的Fc区包含增加的唾液酸化特征。在另一个方面，与天 然Fc区相比，本披露的BiSAb的Fc区包含降低的唾液酸化特征。

[0223] 在一个方面，本披露的Fc变体可以与其他已知的Fc变 体组合，这些其他已知的Fc变体如在Ghetie等人，1997，Nat Biotech. [自然生物技术]15:637-40；Duncan等人，1988，Nature[自然]332: 563-564；Lund等人，1991，J.Immunol[免疫学杂志]147:2657-2662；Lund等人，1992，Mol Immunol[分子免疫学]29:53-59；Alegre等人， 1994，Transplantation[移植]57:1537-1543；Hutchins等人，1995，Proc Natl.Acad Sci USA[美国国家科学院院刊]92:11980-11984；Jefferis 等人，1995，Immunol Lett.[免疫学快报]44:111-117；Lund等人，1995， Faseb J[美国实验生物学学会联合会杂志]9:115-119；Jefferis等人， 1996，Immunol Lett[免疫学快报]54:101-104；Lund等人，1996，J Immunol 157:4963-4969；Armour等人，1999，Eur J Immunol[欧洲免 疫学杂志]29:2613-2624；Idusogie等人，2000，J Immunol[免疫学杂 志]164:4178-4184；Reddy等人，2000，J Immunol[免疫学杂志]164: 1925-1933；Xu等人，2000，Cell Immunol[细胞免疫学]200:16-26； Idusogie等人，2001，J Immunol[免疫学杂志]166:2571-2575；Shields 等人，2001，J Biol Chem[生物化学杂志]276:6591-6604；Jefferis等 人，2002，Immunol Lett[免疫学快报]82:57-65；Presta等人，2002， Biochem Soc Trans[生物化学学会汇刊]30:487-490)；美国专利号 5,624,821、5,885,573、5,677,425、6,165,745、6,277,375、5,869,046、 6,121,022、5,624,821、5,648,260、6,528,624、6,194,551、6,737,056、 7,122,637、7,183,387、7,332,581、7,335,742、7,371,826、6,821,505、 6,180,377、7,317,091、7,355,008中披露的那些。Fc结构域的其他修 饰和/或取代和/或添加和/或缺失将易于对本领域技术人员显而易见。

[0224] 值得注意的是，以包含天然Fc的BiSAb形式存在的多 肽保留结合FcRn和C1q以及介导ADCC的能力，如实例中示出的。 因此，在某些方面，BiSAb保留结合FcRn和/或C1q和/或一种或多种 Fcγ受体(FcγR)的能力。例如，在某些方面，与结合至与BiSAb结 合的表位之一的常规抗体相比，BiSAb保留了至少70％、75％、80％、 85％、90％、95％、96％、97％、

98％、99％、或100％的结合FcRn和 /或C1q和/或一个或多个Fc γR的能力。在某些方面，从一种或两种常 规抗体的结合结构域产生BiSAb，并且对这些常规抗体中的一种或两 种进行活性比较。

[0225] 改变的Fc区也可用于产生重链异二聚体，产生包含两 个不同重-轻链对的BiSAb。为了促进异二聚体的形成，工程化一对 Fc区之间的界面以最大化从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百 分比。在某些方面，该界面包含C_H3结构域的至少一部分。在此方法 中，“突起”通过用较大的侧链(例如，酪氨酸或色氨酸)替换来自 第一抗体分子的界面的一个或多个小的氨基酸侧链来产生。大小与一 个或多个大侧链相同或相似的补偿“空腔”通过用较小侧链(例如， 丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链来在第二抗体分子的界面上产生。这提供一种机制用于提高异二聚体超出其他不想要的最终产物如 同二聚体的产率。CH3修饰包括例如，一个重链上的 Y407V/T366S/L368A和另一个重链上的T366W；一个重链上的 S354C/T366W和另一个重链上的Y349C/Y407V/T366S/L368A。导致 一个链上产生突起和另一个链上产生空腔的另外的修饰描述于U.S. 7,183,076、US 2014/0348839以及Merchant等人，1998，Nat.Biotech[自 然生物技术]16:677-681中。表1a中给出了可以导致突起-空腔排列 的修饰的一些非限制性实例。可以用于产生异二聚体的其他修饰包括 但不限于改变整个Fc二聚体界面的电荷极性以使得静电匹配的Fc区 的共表达导致异二聚化的那些。改变电荷极性的修饰包括但不限于下 文表1b中表示的那些(还参见US 20090182127；Gunasekaran等人， 2010，JBC[生物化学杂志]285:19637-46)。此外，Davis等人(2010， Prot.Eng.Design&Selection[蛋白工程设计与选择]23:195-202)描述 了使用链交换工程化结构域(SEED)CH3区的异二聚体的Fc平台， 这些CH3区是人类IgG和IgA CH3结构域的衍生物(还参见WO 2007/110205)。

[0226] 表1a.异二聚化的CH3修饰(突起-空腔)

[0227]

一个重链中的一种或多种修饰	其他重链中的一种或多种修饰
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
T366Y	Y407T
T394W	F405A
T366Y/F405A	T394W/Y407T
T366W/F405W	T394S/Y407A
F405W	T394S
D399C	K392C
T366W	T366S/L368A/Y407V
T366W/D399C	T366S/L368A/K392C/Y407V
T366W/K392C	T366S/D399C/L368A/Y407V
S354C/T366W	Y349C/T366S//L368A/Y407V
Y349C/T366W	S354C/T366S//L368A/Y407V
E356C/T366W	Y349C/T366S//L368A/Y407V
Y349C/T366W	E356C/T366S//L368A/Y407V
E357C/T366W	Y349C/T366S//L368A/Y407V
Y349C/T366W	E357C/T366S//L368A/Y407V

[0228] 表1b.用于异二聚化的CH3修饰

[0229]

一个重链中的一种或多种修饰	其他重链中的一种或多种修饰
K370E/D399K/K439D	D356K/E357K/K409D
K409D	D399K
K409E	D399K
K409E	D399R

[0230]

K409D	D399R
D339K	E356K
D399K/E356K	K409D/K392D
D399K/E356K	K409D/K439D
D399K/E357K	K409D/K370D
D399K/E356K/E357K	K409D/K392D/K370D
D399K/E357K	K409D/K392D
K392D/K409D	D399K
K409D/K360D	D399K

[0231] 本领域技术人员将理解,在一些方面,由于包含Fc区 的分子的同源二聚体性质,Fc融合蛋白可以形成二聚体。在一些方面 中,结合蛋白(例如,BiSAb)的Fc区可以用突变有差别性地工程化 以便:促进和/或保持异源二聚体化(例如,嵌合突变、互补突变、停 靠和锁定突变、突起入孔(knobs into holes)突变、链交换工程化结 构域(SEED)突变等,参见例如,美国专利号7,183,076;Merchant 等人,(1998)Nat.Biotech[自然生物技术]16:677-

681;Ridgway等 人,(1996)Protein Engineering[蛋白工程]9:617-621;Davis等人,(2010)Prot.Eng.Design&Selection[蛋白工程设计与选择]23: 195-202;WO 2007/110205、WO 2007/147901;Gunasekaran等人, (2010)JBC[生物化学杂志]285:19637-46,全部通过引用并入本文)。因此,可以工程化结合蛋白以形成异二聚体,该异二聚体包含例如与 第一Fc区或其片段融合的第一结合蛋白、结合结构域、或BiSAb, 和与第二Fc区或片段融合的第二(即,不同的)结合蛋白、结合结 构域、或BiSAb,其中该第一和第二Fc区或其片段已经被工程化以 异二聚化。

[0232] 3.糖基化

[0233] 除了糖基化以改变多肽的效应子功能的能力之外,在可 变区中的经修饰的糖基化还可以改变抗体(或BiSAb)对于靶抗原的 亲和力。在一个方面,在本发明BiSAb的可变区中的糖基化模式被修 饰。例如,可以制备未糖基化的BiSAb(即,BiSAb缺乏糖基化)。糖基化可以被改变为例如增加BiSAb对于靶标抗原的亲和力。此类碳 水化合物修饰可以通过例如改变在BiSAb序列之内的一个或多个糖 基化位点来完成。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,这导致一 个或多个可变区框架糖基化位点的消除,由此消除在那个位点的糖基化。这种未糖基化可以增加BiSAb对抗原的亲和力。这种方法在美国 专利号5,714,350和6,350,861中更详细地描述。还可以进行一个或多 个氨基酸取代,这导致存在于Fc区中的糖基化位点(例如,IgG的天 冬酰胺297)的消除。此外,未糖基化的BiSAb可以在缺乏必要的糖基化机器的细菌细胞中产生。

[0234] 4.多肽接头

[0235] 接头可用于将BiSAb嵌合重链的结构域/区连接成连续 分子。如本文所述,BiSAb可包括一个、两个、或更多个接头多肽(例 如,L1和L2)。另外地,BiSAb可以包括另外的接头,例如互连scFv 的可变重链和轻链的柔性接头。另外地,BiSAb可以包括另外的接头, 例如互连scFv的可变重链和轻链的柔性接头以及将其他结合单位连 接到BiSAb核心结构的其他接头。

[0236] 接头的示例性非限制性实例是包含至少4个残基的多肽 链。这些接头中的部分可以是柔性的、亲水的并且具有很少或没有它 们自身的二级结构(接头部分或柔性接头部分)。在分子组装后,至 少4个氨基酸的接头可用于连接位置彼此靠近的结构域和/或区。也可 以使用更长或更短的接头。因此,接头在长度上可以是大约1、2、3、 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、 25、30、35、40、45、或大约50个残基。当多个接头用于互连部分 的分子时,这些接头可以是相同或不同的(例如,相同或不同的长度 和/或氨基酸序列)。

[0237] 接头可以是可切割的接头,其含有至少一个可以被切割 试剂选择性切割的键。可切割接头可用于促进全部或部分的接头序列 的去除。可以将接头工程化成含有蛋白酶切割位点,使得切割发生在 接头的中间或接头的至少一端。例如,可以在接头的两个侧翼末端中 的每一个处工程化凝血酶位点。取决于所用接头的类型,切割也可以 由例如TCEP、TFA、和DTT的试剂介导。可以设计接头以使切割试 剂从切割产物中去除接头上的所有残余物。其他示例性非限制性接头 包括前药接头,这些前药接头的键可以在体内条件下选择性地被切 割,例如,在内源酶或其他内源因子的存在下,或简单地在存在于体 内或体内细胞中的水性流体中。当BiSAb含有多于一种多肽接头时, 每个接头可以是不同的,或者至少一

个接头可以与其他接头不同。在 一些方面，BiSAb包含可切割的接头。在具体的方面，该BiSAb包含 scFv，其中该scFv包含VH2和VL2之间的可切割接头。

[0238] 该接头(一个或多个)促进所希望的结构的形成。这些 接头可以包含$(Gly\text{-}Ser)_n$残基，其中一些Glu或Lys残基分散各处以增 加溶解度。可替代地或另外地，接头可以不包含任何丝氨酸残基，当 接头经历O-连接的糖基化时，这种接头可能是优选的。在一些方面，接头可以含有半胱氨酸残基，例如，如果接头的二聚化用于使BiSAb 的结构域进入其正确折叠的构型。在一些方面，该BiSAb包含至少两 个连接该多肽的结构域的多肽接头。在其他方面，该BiSAb包含至少 三个多肽接头。在其他方面，该BiSAb包含四个或更多个多肽接头。

[0239] 在一些方面，该多肽接头包含Fc部分的一部分。例如， 在一些方面，该多肽接头可包含IgG1、IgG2、IgG3、和/或IgG4抗体 的免疫球蛋白铰链结构域的一部分。在一些方面，该多肽接头包含 IgG1、IgG2、IgG3、和/或IgG4的突变的免疫球蛋白铰链结构域的一 部分。在一些方面，该多肽接头包含IgG1、IgG2、IgG3、和/或IgG4 抗体的免疫球蛋白铰链区/结构域的至少5、7、8、或15个氨基酸残 基。在一些方面，该多肽接头包含IgG1、IgG2、IgG3、和/或IgG4抗 体的修饰的免疫球蛋白铰链区/结构域的至少5、7、8、或15个氨基 酸残基。

[0240] 该多肽接头可包含天然含有三个半胱氨酸的铰链区的 全部或部分。在某些方面，相对于完整和/或天然存在的铰链区，所选 择的铰链区被截短或者以另外方式改变或取代，使得仅剩余一个或两 个半胱氨酸残基。类似地，在某些其他方面，该多肽接头可以包含铰 链区的突变的或以另外方式改变的部分，其中半胱氨酸残基的数量通 过氨基酸取代或缺失而减少，例如突变的或以另外方式改变的铰链区 含有如本文所述的零个、一个或两个半胱氨酸残基。

[0241] 因此，突变的或以另外方式改变的铰链结构域可以由 (或使用)含有一个或多个半胱氨酸残基的野生型免疫球蛋白铰链结 构域衍生或构建。在某些方面，铰链区的突变或以另外方式改变的部 分可含有零个或仅一个半胱氨酸残基，其中该突变的或以另外方式改 变的铰链区是野生型免疫球蛋白铰链区或已经从其衍生，其分别含有 一个或多个或者两个或更多个半胱氨酸残基。在铰链区的突变或以另 外方式改变的部分中，野生型免疫球蛋白铰链区的半胱氨酸残基优选 地缺失或被不能形成二硫键的氨基酸取代。在一些方面，铰链区的突 变或以另外方式改变的部分是人类IgG野生型铰链区或已经从其衍 生，其可以包括四种人类IgG同种型亚类中的任何一种：IgG1、IgG2、 IgG3、或IgG4。

[0242] 在一些方面，该多肽接头包含铰链区的一部分，该铰链 区包含与免疫球蛋白轻链形成二硫键的半胱氨酸残基(EU残基220)。 在一些方面，该多肽接头包含铰链区的改变部分，该铰链区包含在EU 残基C220处的氨基酸取代。在一些方面，该多肽接头包含氨基酸取代C220V。

[0243] 在一些方面，该多肽接头包含防止铰链相关的自发自切 割的氨基酸取代。在一些方面，该多肽接头包含在EU位置D221处 的位置处的氨基酸取代。在一些方面，该多肽接头包含氨基酸取代 D221G。在一些方面，该多肽接头缺乏氨基酸D221。

[0244] 如上所述，一些实施例包括一个或多个包含gly-ser接头 或由其组成的多肽接头。如本文所用，术语“gly-ser接头”是指由甘 氨酸和丝氨酸残基组成的肽。示例性gly-ser接头包含式$(Gly_4Ser)n$的 氨基酸序列，其中n是正整数(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、 或10)。gly-ser接头的一些优选和非限制性实例包括$(Gly_4Ser)_2$(SEQ ID NO:41)和

$(Gly_4Ser)_4$(SEQ ID NO:42)以及$(Gly_4Ser)_3$(SEQ ID NO: 43)。在又其他方面,两个或更多个gly-ser接头在多肽接头中串联并 入。在一些方面,该多肽接头包含至少一部分的铰链区(例如,衍生 自IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4分子)和一系列gly-ser氨基酸残基(例 如,gly-ser接头,例如$(Gly_4Ser)n$,其中n是2、3、或4)。

[0245] 在某些方面,接头(例如,L1和/或L2和/或L3等)包 括铰链部分和接头部分(例如包含gly-ser接头的接头部分)二者。在 其他方面,L1和/或L2仅包括铰链部分或仅包括接头部分,例如gly-ser 接头。在其他方面,L1和L2包括gly-ser接头部分。在某些方面,BiSAb内的gly-ser接头长度相同,而在其他方面,BiSAb内的gly-ser接头 部分(例如,L1和L2)是不同的长度。当BiSAb包含scFv时,scFv 的重链和轻链可以通过柔性接头与BiSAb(例如,BD1、Fab、Fc等) 连接。该柔性接头一般不包括铰链部分,而是gly-ser接头或其他柔性 接头。可以容易地选择和优化互连scFv结构域的柔性接头的长度和氨 基酸序列(例如,$(Gly_4Ser)n$(SEQ ID NO:48),其中n是2、3、或 4或更多)。

[0246] 无论用于互连各种结合单位元和结构域的多肽接头如 何(例如,在结合结构域/单位元(例如,Fab-scFv)之间,或结合结 构域/单位与Fc(例如,经由L1和L2的scFv)),BiSAb可任选地 包含另外的多肽接头。独立地选择这类另外的多肽接头的长度和序 列。例如,BiSAb可以进一步包含互连scFv的可变重链和轻链的柔性 多肽接头。该柔性多肽接头可包含gly-ser接头。一般地,该接头不包 括铰链部分。

[0247] 这里考虑变化BD2侧翼的接头的长度可以影响BD2抗 原结合位点的定向和相对于BiSAb分子的其余部分的间隔。例如,短 的N-末端接头和长的C-末端接头可以产生其中结合位点以一个方向 构象的定向,而长的N-末端和短的C-末端接头可以赋予相反的构象 定向。因此,可以调节接头长度以定向BD2抗原结合位点,并且对于 产生或避免BD1和BD2和/或BD2与结合Fc或其他结构域中的抗体 分子的其他实体之间的位阻效应具有重要影响。

[0248] 5.BiSAb的具体构型

[0249] 如上所述,本披露的一个方面涉及BiSAb结构排列(平 台),该排列包含两个重-轻链对(图1A-1F中所阐明的)。在该方 面的一些实施例中,BiSAb嵌合重链的多肽序列可包含含有抗体重链 可变结构域(VH1)的多肽序列、含有抗体重链恒定结构域1(CH1) 的多肽序列、一部分的Fc结构域、含有第一多肽接头(L1)的多肽 序列、含有结合结构域(BD2)的多肽序列、含有第二多肽接头(L2) 的多肽序列、和含有Fc结构域的其余部分的多肽序列。在一些方面, 该Fc结构域包含C_H2结构域和C_H3结构域。因此,某些实施例提供 了BiSAb嵌合重链,该嵌合重链可以包含呈以下定向的多肽序列,从 N-末端到C-末端:VH1-C_H1-C_H2(N-末端)-L1-BD2-L2-C_H2(C-末端) -C_H3、VH1-C_H1-C_H2-L1-BD2-L2-C_H3、以及VH1-C_H1-C_H2-C_H3(N-末 端)-L1-BD2-L2-C_H3(C-末端)。BiSAb轻链的多肽序列可包含轻链 可变结构域(VL1)和轻链恒定结构域(CL)。因此,BiSAb轻链可 以包含呈以下定向的多肽序列,从N-末端到C-末端:VL1-CL。注意 将VH1、VL1和CL用于表示结合第一表位的“结合单位1”(BD1) 的部分。将BD2用于表示结合第二表位的“结合单位2”的部分。

[0250] 在其中结合结构域是scFv的方面中,该BiSAb嵌合重 链可以包含含有抗体重链可变结构域(VH1)的多肽序列、含有抗体 重链恒定结构域1(CH1)的多肽序列、含有第一多肽接头(L1)的 多肽序列、含有抗体轻链可变结构域(VL2)的多肽序列、含有柔性 接头的多肽序列、含有抗体重链可变结构域(VH2)的多肽序列、含 有第二多肽接头(L2)的多肽序列、和

含有抗体Fc结构域的多肽序 列。因此,包含scFv作为BD2的BiSAb的嵌合重链可以包含呈以下 定向的多肽序列,从N-末端到C-末端:VH1-CH1-CH2(N-末端) -L1-VL2-L3-VH2-L2-CH2(C-末端)-CH3、VH1-CH1-CH2-L1-VL2-L3-VH2-L2-CH3、VH1-CH1-CH2-CH3(N-末 端)-L1-VL2-L3-VH2-L2-CH3(C-末端)、VH1-CH1-CH2(N-末端) -L1-VH2-L3-VL2-L2-CH2(C-末端)-CH3、VH1-CH1-CH2-L1-VH2-L3-VL2-L2-CH3、以及VH1-CH1-CH2-CH3 (N-末端)-L1-VH2-L3-VL2-L2-CH3(C-末端)。

[0251] 该嵌合重链是包含氨基酸序列(例如,每个多肽结构域 的氨基酸序列)的多肽链。该嵌合重链是包含氨基酸序列(例如,每 个多肽结构域的氨基酸序列)的多肽链。注意将VH1、VL1、和CL 用于表示结合单位1的部分,其中VH1和VL1表示结合第一表位的 部分。将VH2和VL2用于表示结合第二表位的结合单位2的部分。 在某些方面,另外的scFv结合结构域存在于构成BiSAb核心的多肽 的N-末端和/或C-末端(其中该BiSAb核心进一步包含结合单位(BD) 3和/或4和/或5)。在某些方面,BiSAb核心内存在多于一个scFv 结合结构域。每个另外的scFv包含表示为VH3、VH4、VH5的抗体 重链可变区和表示为VL3、VL4、VL5的相应抗体轻链可变区。

[0252] 6.标记物、轭合物和部分

[0253] 在某些特征中,药物和其他分子可以经由位点特异性轭 合靶向BiSAb。例如,BiSAb可以包含工程化半胱氨酸结构域(包括 至结合单位和/或Fc结构域的一个或多个半胱氨酸),这导致用于轭 合反应的游离巯基。在某些方面,将BiSAb工程化以掺入特异性轭合 位点。在一些方面,本披露提供了Fc变体BiSAb,其中该Fc区包含 在如由EU索引编号的位置239、282、289、297、312、324、330、 335、337、339、356、359、361、383、384、398、400、440、422、 和442中的一个或多个处的氨基酸取代。在一些方面,该Fc区包含 在下组中的一个或多个位置处的取代:a)289和440、b)330和440、 c)339和440、d)359和440、e)289和359、f)330和359、g)339和 359、h)289和339、i)330和339、j)289和330、k)339和442、1)289、 339、和442、m)289、330、和339、n)330、339、和442、和o)289、 330、和442。在其他方面,本披露提供了BiSAb,其中Fab臂的CH1 结构域包含在如由EU索引进行编号的位置131、132、134、135、136 和139中的一个或多个处的取代。在一个方面,该取代包含对选自半 胱氨酸、赖氨酸、酪氨酸、组氨酸、硒代半胱氨酸、和硒代甲硫氨酸 的氨基酸的取代。在具体的方面,该取代是半胱氨酸。用于产生稳定 的半胱氨酸工程化抗体的方法描述于U.S.7,855,275、U.S.20110033378 和US 20120213705中,其内容通过引用以其全文并入本文。

[0254] 7.示例性靶标

[0255] 尽管可以产生与本文描述的各种DuetMab和BiSAb平 台相关的方面和实施例以结合任何期望的一种或多种靶标,但本文披 露的BiSAb优选地靶向特异性靶标分子对(例如,结合单位1结合这 些靶标中之一并且结合单位2结合其他靶标)。如上所述并且如以下 说明性实例中举例说明的,将本文披露的抗体,DuetMab和BiSAb靶 向调节接受者受试者或培养物中免疫细胞中的免疫应答的分子。在一 些实施例中,该结合结构域对选自下组的靶标展示出特异性结合活 性,该组由以下组成:CTLA-4、PD-1、PD-L1、OX40、和TIM3。DuetMab和BiSAb可以包含呈各种顺序和定向的不同结合结构域的组 合,其中这些结构域对本文披露的靶标具有结合亲和力或与其特异性 结合。例如,本文披露的DuetMab和BiSAb可以包含允许与如下靶 标双特异性结合的结合结构域的组合,这些靶标包括:CTLA-4和 PD-1、CTLA-4

和PD-L1、和CTLA-4、CTLA-4和TIM3、PD-1和PD-L1、 PD-L1和OX40、PD-1和TIM3、PD-L1和TIM3。包括结合特定靶标 组合的结合结构域的DuetMab和BiSAb在实例中阐明，并包括 PD-1/CTLA-4、PD-L1/CTLA-4、PD-1/TIM3、和PD-L1/OX40的非限 制性组合。在某些实施例中，相对于用于产生BiSAb的组合的单独单 特异性结合蛋白的结合特性，BiSAb具有增强的结合特性。

[0256] 在某些方面，本披露的DuetMab或BiSAb结合相同靶 标上的两个不同表位(例如，结合单位1结合靶标上的第一表位，并 且结合单位2结合相同靶标上的第二表位)。

[0257] 在一些方面，本披露的DuetMab或BiSAb的多聚体性 质赋予将标记或治疗剂靶向特异性细胞类型或分子靶标的能力。例 如，DuetMab或BiSAb中的一个功能结构域可以结合细胞表面处的靶 标，而相同DuetMab或BiSAb中的另一个功能结构域结合可用于检 测的半抗原或标记剂。类似地，一个功能结构域可以结合至细胞靶标， 而第二功能结构域结合毒素。由于两个结合反应均通过单个分子来介 导，所以毒素可以放置在影响细胞毒性功能的细胞靶附近。

[0258] B.编码BiSAb的核酸分子

[0259] 本披露提供了编码BiSAb的核酸分子。本披露的一个方 面提供了编码本披露的BiSAb中任一个的核酸分子。核酸分子可以编 码在本文中披露的BiSAb分子中的任一个的重链和/或轻链，以及在 本文中披露的单独结合结构域(例如，scFv)。本领域技术人员将理解，如本领域一般已知的，考虑到核酸密码子简并性以及特定生物的 密码子频率，此类多核苷酸分子的核苷酸序列可以不同。

[0260] C.用于产生BiSAb和随后纯化的载体和宿主细胞

[0261] 本披露涉及用于产生BiSAb的方法。在某些方面，编码 本文披露的全部或部分BiSAb的重组核酸分子可以与表达构建体中 的一个或多个调节性核苷酸序列可操作地连接。编码BiSAb轻链和嵌 合重链的核酸序列能以任何方向(例如，轻链在重链前面，或反之亦 然)克隆在相同的表达载体中，或者可以克隆在两种不同的载体中。 如果使用一种载体进行表达，则两种编码基因可以具有他们自己的遗 传元件(例如，启动子、RBS、前导序列、终止、polyA等)，或者 他们可以用一组遗传元件克隆，但与顺反子元件相连。调控核苷酸序列通常适合用于表达的宿主细胞。用于多种主宿主胞的许多类型的适 当的表达载体和适合的调控序列是本领域已知的。典型地，所述一个 或多个调控核苷酸序列可以包括但不限于启动子序列、前导序列或信 号序列、核糖体结合位点、转录起始序列和终止序列、翻译起始和终 止序列、以及增强子或活化序列。本披露期望如本领域已知的组成型 或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子或组合一个以上启 动子组分的杂合启动子。表达构建体可以存在于细胞中的附加体(例 如质粒)上，或表达构建体可以插入染色体中。

[0262] 在某些方面，表达载体含有选择标记基因以允许转化的 宿主细胞的选择。选择标记基因在本领域是熟知的并且将随着使用的 宿主细胞而变化。在某些方面，本披露涉及包含核苷酸序列的表达载 体，所述核苷酸序列编码多肽并且可操作地连接至至少一个调控序 列。调控序列是本领域公认的并且被选择为指导编码的多肽的表达。 因此，术语调控序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件。示例 性的非限制性调控序列描述于Goeddel，Gene Expression Technology: Methods in Enzymology[基因表达技术:酶学中的方法]，Academic Press [学术出版社]，圣地亚哥，加利福尼亚州(1990)中。应当理解的是， 表达

载体的设计可以取决于这样的因素，如将要转化的宿主细胞的选 择和/或希望表达的蛋白质的类型。而且，还应当考虑特定载体的拷贝 数、控制该拷贝数的能力和由该载体编码的任何其他蛋白(例如抗生 素标记)的表达。

[0263] 本披露进一步涉及产生本披露的BiSAb的方法。例如用 一种或多于一种编码BiSAb的表达载体(例如，编码嵌合重链和轻链 的单一载体或两个载体，一个编码嵌合重链并且一个编码轻链)转染 的宿主细胞可以在适当的条件下培养以允许多肽的表达发生。可以从 含有多肽的细胞和培养基的混合物中分泌和分离BiSAb。可替代地， BiSAb可以保留在细胞质或细胞膜部分中并且收获、裂解细胞并分离 蛋白。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其他副产物。适合的用于 细胞培养的培养基是本领域熟知的。可以使用本领域已知的用于纯化 蛋白的技术从细胞培养基、宿主细胞或二者中分离BiSAb，这些技术 包括离子交换色谱、凝胶过滤色谱、超滤、电泳和免疫亲和纯化。在 某些方面，BiSAb被制成含有促进其纯化的结构域的融合蛋白。

[0264] 可以通过将克隆基因或其部分连接至载体来产生重组 核酸，该载体合适在原核细胞、真核细胞(酵母、鸟类、昆虫或哺乳 动物)或两者中表达。用于产生重组多肽的表达载体包括质粒和其他 载体。例如，合适的载体包括以下类型的质粒：用于在原核细胞，例 如大肠杆菌中表达的pBR322-衍生的质粒、pEMBL-衍生的质粒、pEX- 衍生的质粒、pBTac-衍生的质粒以及pUC-衍生的质粒。在某些方面， 哺乳动物表达载体含有促进载体在细菌中增殖的原核序列、以及在真 核细胞中表达的一个或多个真核转录单位。pcDNAI/amp、 pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、 pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg衍生的载体为适合用于 转染真核细胞的哺乳动物表达载体的实例。这些载体中的一些用来自 细菌质粒(例如pBR322)的序列修饰，以促进在原核细胞和真核细 胞中的复制和抗药性选择。可替代地，可以使用病毒的衍生物用于在 真核细胞中暂时表达蛋白质，这些病毒如牛乳头状瘤病毒(BPV-1) 或Epstein-Barr病毒(pHEBo、pREP衍生的和p205)。在这些质粒的 制备和宿主生物的在转化中使用的多种方法是本领域已知的。对于用 于原核和真核细胞两者的其他适合的表达系统、以及通用重组程序， 参见Molecular Cloning A Laboratory Manual[分子克隆实验指南]，第 二版，Sambrook、Fritsch和Maniatis编，Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社]，1989，第16和17章。在一些情况下，通过使用杆状病毒表达系统表达重组多肽可能是所希望的。这样的杆 状病毒表达系统的实例包括pVL衍生的载体(例如pVL1392、pVL1393 和pVL941)、pAcUW衍生的载体(例如pAcUW1)和pBlueBac衍 生的载体(例如含有β-gal的pBlueBac III)。

[0265] 一旦已经产生分子，就可以通过本领域中已知的用于纯 化蛋白、免疫球蛋白分子、或其他多聚体分子的任何方法，例如，使 用技术，如色谱法(例如，离子交换色谱、亲和色谱(特别是通过对 于特定抗原蛋白A或蛋白G的亲和力色谱)、以及尺寸柱色谱(sizing column chromatography))、离心、差别溶解度、或者通过用于纯化 蛋白的任何其他标准技术将其纯化。此外，本文披露的分子可以与如 常规用于促进纯化的异源多肽序列(例如，亲和标签)融合。

[0266] 无论如何产生和纯化BiSAb，可以进行结合测定，例如 双重ELISA测定(纯化之前和/或之后)，以确认BiSAb的功能性结 合活性。此类结合测定在本领域通常是已知的。

[0267] D.药用配制品

[0268] 在某些方面，本披露提供药物组合物。这类药物组合物 可以是包含编码BiSAb的核酸分子的组合物。这类药物组合物还可以 是包含DuetMab、BiSAb、DuetMab的组合、或BiSAb的组合、以及 药学上可接受的赋形剂的组合物。在某些方面，将本披露的药物组合物用作药剂。

[0269] E.用途

[0270] 如本文所讨论的，DuetMab和BiSAb可用于结合与可能 对免疫疗法有应答的癌症和细胞增殖性疾病或障碍相关的靶标，例 如，通过抑制免疫抑制活性和/或通过诱导与一个或多个靶标分子相关 的免疫应答。例如，异常信号传导和/或抑制的免疫应答可能导致不需 要的细胞增殖和癌症。因此，DuetMab、BiSAb和本文披露的抗体可 用于治疗与靶向癌症的受抑制的、减少的、或不足的免疫应答相关的 不需要的细胞增殖和/或癌症。特别地，肿瘤的肿瘤生长曲线和/或肿 瘤的体积可以通过给予诱导和/或刺激受试者(例如，患有癌症的人类 患者)中的免疫应答的BiSAb的DuetMab来降低。

[0271] 因此，本披露还涉及各种包含将本文披露的结合蛋白给 予对其有需要的受试者的方法。在一个方面，本披露涉及用于在患有 癌症或有发展癌症风险的受试者中诱导免疫应答的方法，该方法包括 向该受试者给予本文披露的结合蛋白。在一些实施例中，该方法活化 对抗受试者中的癌症的免疫应答。在一些实施例中，该方法增强对抗 受试者中的癌症的免疫应答。在一些实施例中，该方法活化在该受试 者中被抑制的免疫应答途径，其中该活化增加靶标该受试者中的癌症 的免疫应答。在一些实施例中，该方法增强靶标该受试者中的癌症的 免疫应答途径。

[0272] 在另一个方面，本披露涉及在对其有需要的受试者中治 疗癌症的方法，该方法包括向该受试者给予本文披露的结合蛋白。在 一个实施例中，治疗癌症的方法包括停止或减缓该受试者中癌症的生 长。在一个实施例中，治疗癌症的方法包括停止或减缓该受试者中的 癌症转移至其他区域。在一个实施例中，治疗癌症的方法包括杀死该 受试者中的癌细胞。在一个实施例中，治疗癌症的方法包括停止该受 试者中癌细胞的增殖和/或扩散。

[0273] 在以上方面的不同实施例中，这些方法涉及治疗受试者 的肿瘤疾病和/或癌症疾病。在实施例中，该癌症选自对该受试者中诱 导的免疫应答敏感的癌症组。在一些实施例中，该癌症是卵巢癌、乳 腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、膀胱癌、头颈癌、黑色素瘤、胰腺癌、肾细胞癌、或肺癌中的一种或多种。在 一些实施例中，该癌症选自消化道或胃肠道癌症(例如，肛门癌；胆 管癌；肝外胆道癌；阑尾癌；类癌瘤，胃肠癌；结肠癌；结肠直肠癌， 包括儿童结肠直肠癌；食道癌，包括儿童食道癌；胆囊癌；胃癌，包 括儿童胃癌；肝细胞癌(hepatocellular cancer)(例如，肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma))，包括成人(原发性)肝细胞癌和儿童 肝细胞癌；胰腺癌，包括儿童胰腺癌；肉瘤，横纹肌肉瘤；胰岛细胞 胰腺癌；直肠癌；和小肠癌)；肺癌(例如，非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌(SCLC))；头颈癌(例如，唇及口腔癌；口腔癌， 包括儿童口腔癌；下咽癌；喉癌，包括儿童喉癌；具隐匿性原发灶的 转移性鳞状颈癌；口癌；鼻腔和鼻窦癌；鼻咽癌，包括儿童鼻咽癌； 口咽癌；甲状旁腺癌；鼻咽癌；唾液腺癌，包括儿童唾液腺癌；咽喉 癌；和甲状腺癌)；卵巢癌和乳腺癌。

[0274] 在上述方法中，给予该受试者的结合蛋白的量有效诱导 免疫应答、增加免疫应答、停止或减缓癌症的生长、停止或减缓癌症 的转移、杀死癌细胞、和/或减缓或阻止癌细

胞在该受试者中增殖和/ 或扩散。

[0275] 在上述方法的实施例中,该结合蛋白包含如本文披露的 DuetmAb或BiSAb。在上述方法的一些实施例中,该结合蛋白包含如 本文披露的抗体或其抗原结合片段。

[0276] 如本文所用,术语“受试者”旨在包括人类和非人类动 物,具体地哺乳动物。受试者的实例包括人类受试者,例如具有障碍 (例如,本文描述的障碍,如癌症)的人类患者或者正常受试者。“非 人类动物”包括所有脊椎动物,例如非哺乳动物(例如鸡、两栖动物、爬行动物)和哺乳动物(例如非人类灵长动物),驯化的和/或农业上 有用的动物(例如绵羊、狗、猫、母牛、猪等),以及啮齿动物(例 如小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠等)。在具体实施例中,该受试者是人类 患者。

[0277] “治疗(treatment或treat)”是指治疗性治疗和防止性 (prophylactic或preventative)措施两者。对治疗有需要的那些受试者 包括已经患有障碍的那些连同易于患有障碍的那些或者其中障碍有 待预防的那些。当关于疾病或需要治疗的受试者使用时,术语相应地 包括但不限于与未治疗的受试者相比,疾病进展的停止或减缓、疾病 的缓解、症状的预防、疾病和/或症状严重程度的减轻、或疾病长度的 减少。在实施例中,治疗方法可以减轻正在治疗的特定疾病的一个或 多个临床指征。

[0278] 提供以下实施例以阐明上面提供的本披露的特定方面 和实施例,并且不应该被解释为限制说明书的范围或所附要求保护的 主题。

[0279] 实例

[0280] 材料与方法

[0281] 免疫应答调节测定

[0282] 巨细胞病毒(CMV)抗原回忆测定用于评价由本文所述 的某些免疫治疗分子诱导的潜在免疫应答。该测定的试剂包括:

[0283] -CMV反应性冷冻外周血单核细胞(PBMC);

[0284] -AIM V®培养基(生命技术公司(Life Technologies),目录号 12055-091);

[0285] -磷酸盐缓冲盐水(PBS,生命技术公司(Life Technologies), 目录号20012-043);

[0286] -PepTivator®,CMVpp65肽池,(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec),目录号130-093-438,50μg/ml);

[0287] -卵白蛋白,(赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific)目录号 77120,1mg/ml);

[0288] -Costar,无TC处理的96孔板(科宁公司(Corning),目录号 3788);和

[0289] -免疫治疗分子。

[0290] 一般测定方案:

[0291] 在进行测定前一天,将冷冻的PBMC在温热的AIM V 培养基中解冻。在科斯塔公司(Costar)96圆孔板中洗涤细胞两次。将细胞浓度调节至1×10^6个细胞/mL的浓度。

[0292] 将等分试样(100μL)的细胞分配到单独孔中,使得板 的外部柱和各行留空。允许这些细胞静止过夜。

[0293] 第二天,向这些孔中添加100μL的含有2X PepTivator CMV肽池(0.1μg/ml-0.05μg/ml终浓度)和2X免疫治疗分子的AIMV 培养基。

[0294] 72小时后,将来自每个孔的25μL上清液转移至预封闭 和洗涤的MSD板(抗人类IFN

γ)。添加标准品后,将板在室温孵育 2小时。孵育期后,将MSD板洗涤三次。洗涤后,添加25μL SULFO-TAG检测抗体,并允许在室温反应1小时。再次洗涤板,并 在提取读数之前添加150μL 2X MSD读取缓冲液。

[0295] 葡萄球菌肠毒素A/B(SEA/SEB)测定方案

[0296] 用于SEB或SEA测定方案以确定DuetMab或BiSAb对 IL-2免疫应答的影响的试剂包括:

[0297] -白细胞锥(NHSBT代码NC24;来自阿登布鲁克斯医院 (Addenbrookes Hospital));

[0298] -50ml Falcon试管(BD 352070);

[0299] -菲可帕克加(Ficoll-Paque PLUS)(GE医疗集团(GE Healthcare)17-1440-02);

[0300] -抗CD3(克隆OKT3;1mg/ml;e生物科学公司(eBioscience); 目录号:16-0037-85);

[0301] -氯化铵溶液(干细胞技术公司(Stemcell Technologies)07850);

[0302] -葡萄球菌肠毒素A(SEA;Sigma(西格玛公司),S-9399)或 葡萄球菌肠毒素B(SEB;Sigma(西格玛公司),S-4881)储备溶液, 1mg/ml,储存于-20℃;

[0303] -培养基(均来自生命科技公司(Life Technologies)):具有 glutamax的RPMI1640(61870),补充有10%v/v热灭活的FCS (90005M)和100U/ml青霉素+100μg/ml链霉素(15140-122);

[0304] -V型底板(格雷纳生物公司(Greiner BioOne)651201);

[0305] -96孔平底板(康宁科斯塔公司(Corning Costar)7107)。

[0306] 用于IL-2DELFIA ELISA的试剂包括:

[0307] -FLUONUNC Maxisorp ELISA板(能肯公司(Nunc)437958);

[0308] -铕标记的链霉亲和素,SA-Eu(珀金埃尔默(Perkin-Elmer) 1244-360);

[0309] -DELFIA®测定缓冲液(珀金埃尔默(Perkin-Elmer), #4002-0010);

[0310] -DELFIA®增强溶液(珀金埃尔默(Perkin-Elmer)4001-0010); 在使用前在室温下;

[0311] -测定稀释剂:DELFIA洗涤缓冲液(0.05%吐温-20,20mM Tris, 150mM NaCl,pH 7.2-7.4),补充有0.1%BSA,经无菌过滤;

[0312] -奶粉(Marvel;第一食品公司(Premier Foods));

[0313] -样品稀释剂(如上所述的RPMI1640+10%FCS+1%青霉素/ 链霉素);

[0314] -PBS(赛默飞世尔公司(ThermoFisher)14190235);

[0315] -PBS-吐温(PBS中0.01%吐温-20);

[0316] -人类IL-2 ELISA试剂盒(Duoset DY202,R&D系统公司(R&D Systems));

[0317] -具有自动板加载器(Biostack)的Biotek洗板器(EL406)。

[0318] 一般测定方案

[0319] 使用密度梯度离心(菲可帕克加(Ficoll-Paque PLUS); GE医疗集团(GE Healthcare))从人类血液白细胞锥(NHS血液与 移植服务代码NC24)分离PBMC,然后在氯化铵溶液(干细胞技术 公司(Stemcell Technologies))中裂解红细胞。将抗人类CD3(PBS 中

0.5μg/ml的克隆OKT3;e生物科学公司(eBioscience))在平底 96孔板(康宁科斯塔公司(Corning Costar)7107)中于37℃包被2 小时。然后,每孔添加在培养基(补充有10%v/v热灭活的牛血清和 100U/100μg/ml链霉素/青霉素(分别地)的RPMI1640-Glutamax,生 命科技公司(Life Technologies))中的PBMC的0.2×10^6个细胞。通过添加0.0088μg/mL-0.1μg/mL范围内的葡萄球菌肠毒素A或B (SEB;西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))进一步刺激PBMC，并将候选DuetMab或BiSAb添加至最终测试浓度。在37℃和5%CO_2培养3天后,从细胞和根据制造商的说明书(R&D系统公司(R&D Systems)Duoset产品代码DY202)使用商业ELISA确定的IL-2分泌 中去除上清液。参见图90。

[0320] 混合白细胞反应(MLR)测定方案(新鲜血液)

[0321] 基于MLR细胞的测定还用于提供应答于本文披露的 DuetMab和BiSAb的T细胞功能的体外相关性。用于从新鲜血液样品 中进行MLR测定的试剂包括：

[0322] -8mL CPT肝素试管；

[0323] -AIM-V培养基(无血清)Gibco#12055-091,无添加剂；

[0324] -50ml锥形试管；

[0325] -2ml低温保存小瓶；

[0326] -ACK裂解缓冲液(Gibco#A10492-01)；

[0327] -96孔组织培养处理的U型底板BD falcon#3077；

[0328] -PHA(罗氏公司(Roche)1mg/ml(10μg/mL终浓度),作为 阳性对照。

[0329] 一般测定方案

[0330] 从抽取到CPT肝素试管中的血液样品制备PBMC。将试 管在2700rpm下离心20min,而不在25℃下制动。吸出顶层血清。轻轻吸移剩余的材料,并且收集CPT试管塞上方的所有物质并置于 50ml锥形试管中。向细胞中添加AIM-V培养基以洗涤细胞(在1500 rpm下3次,制动开启,在25℃持续5分钟)。使用红细胞裂解缓冲 液裂解任何剩余的红细胞(例如,约5min,用约3ml缓冲液)。将 剩余的细胞用AIM-V培养基洗涤两次(1500rpm,制动开启,在25℃ 持续5分钟)。如果需要,将沉淀物合并到单试管中并重悬于AIM-V 培养基中,并进行细胞计数。

[0331] 为了进行MLR测定,将细胞在AIM-V培养基中以每孔 每个供体200,000个细胞接种于96孔板中,每个供体50μl(总共 400,000/100μl)。向稀释于无血清AIM-V培养基中的每孔添加(4x) 50μl候选分子。72小时后,对平板成像,并去除30μl上清液用于人 类TH1/TH2(MSD)细胞因子测定。

[0332] 人类TH1/TH2 MSD 10-丛方案

[0333] 该测定用于确定存在于应答于本文披露的DuetMab和 BiSAb的给予的培养物上清液中的细胞因子的量。为了进行测定,通 过将200mg阻断剂B溶解在每个板的20ml PBS中来制备阻断剂。向每个孔中添加150μl溶解的阻断剂。将板密封并在室温振荡2小时 或在4℃振荡过夜。用PBST缓冲液洗涤孔3x。通过将冷冻的校准物 共混物(10μl)稀释到1ml的稀释剂中来制备校准物,并进一步连续 稀释4倍。向分离的孔中添加25μl校准物(标准品)和25μl样品。将孔在室温伴随振荡孵育2小时。孵育后,将孔用PBST洗涤3x。

[0334] 制备检测抗体并稀释至必要的浓度,并将其添加至每个 孔中。在室温伴随振荡孵育2小时后,将孔在PBST中洗涤(3x)。在MSD机器上读数之前,向每个孔中添加读取缓冲液。

[0335] 肿瘤特异性杀伤测定方案

[0336] 具有对抗人类$gp100_{209-217}$肽的反应性的人类CD8+T细 胞系(JR6C12)由Steven Rosenberg博士(国家癌症研究所(National Cancer Institute),贝塞斯达,马里兰州)友情提供。将JR6C12细胞 与CFSE(CellTrace CFSE增殖试剂盒,赛默飞世尔公司(ThermoFisher))标记的人类黑色素瘤系(Mel624)在37℃,在96 孔平底板中以1:1的比率(20,000JR6C12+20,000Mel624)共培养 18小时。在共培养的时间0时以69nM的浓度添加候选分子。18小 时后,通过明视野显微镜观察这些孔。收集上清液用于MSD分析, 并且在活力染色(Zombie UV可固定活力试剂盒,生物传奇公司 (Biolegend))之前用胰蛋白酶消化粘附细胞并在PBS中洗涤(2x)。 通过LSRFortessa(BD)上的流式细胞术评估CFSE标记细胞的活力 染料摄取。

[0337] 实例1.鉴定用于结合结构域附接的候选Fc位置

[0338] 使用开源软件PyMOL分子可视化系统,在CH2和CH3 区以及CH2-CH3界面处或附近研究抗体结构,以鉴定用于结合结构 域附接的候选区,例如暴露的表面环。这些区可允许插入第二结合结 构域(例如,scFv)而不损害IgG或第二结合结构域本身的结构完整 性或稳定性。根据分析,鉴定了三个区(在图1A-1C中表示为球体)。 图1D、1E、和1F描绘了结合蛋白的实施例,显示了分别在图1A、 1B、和1C中鉴定的每个环中第二结合结构域的附接(为了阐明的目 的具有scFv)。

[0339] 图2A提供了在CH2-CH3界面附近的CH2区中鉴定的 并且包含序列ISRTP(SEQ ID NO:39)的鉴定的代表性环之一的氨基 酸序列的更详细的示意图。可以在该氨基酸序列内插入结合结构域以 产生任何数量的代表性构建体,例如插入如实例中所阐明的scFv结构域(例如,I-scFv-SRTP、IS-scFv-RTP、ISR-scFv-TP、或ISRT-scFv-P scFV-ISRTP、和ISRTP-scFV,其中“-scFv-”鉴定该结合结构域可能 与之缔合的天然环序列中的点。图2B是类似的示意图,其代表在 CH2-CH3界面中鉴定的并且包含氨基酸序列AKGQP(SEQ ID NO: 40)的环。本文描述的代表性构建体可包括与本文所述的该环序列附 接的结合结构域(例如,scFv结构域),包括A-scFv-KGQP、 AK-scFv-GQP、AKG-scFv-QP、AKGQ-scFv-P、scFV-AKGQ、AKGQ-scFV,其中“-scFv-”鉴定该结合结构域可能与之缔合的天然 环序列中的点。图2C提供了在CH3区内在CH2-CH3界面下游鉴定 的并包含氨基酸序列SNG的代表性环的示意图。根据上述其他两个 环区的说明性实施例所讨论的,该环序列的代表性构建体包括 scFV-SNG、S-scFv-NG SN-scFv-G和SNG-scFV。

[0340] 实例2.产生和表征一系列亲本抗体和双特异性结合蛋白(包括 结合单位的组合)

[0341] 开发并表征一系列单克隆抗体。使用衍生自这些“亲本” 抗体的抗原结合序列(例如,CDR、HCv、LCv、HC、LC)的组合, 产生一系列双特异性结合蛋白,并显示出对组合的靶抗原具有双特异 性结合活性。设计双特异性结合蛋白以具有在本文中披露的特定结构 平台基序(即“BiS5”)。

[0342] 亲本抗体序列描述于下表中:

[0343] 表2a.亲本抗体序列

[0344] PD-1

[0345]

说明/靶标	序列
PD-1 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMY WYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO: 23）
PD-1 LCv	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMY WYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIK（SEQ ID NO: 49）
PD-1 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVR QAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDrAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO: 50）
PD-1 HCv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVR QAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYWGQ GTTVTVSS（SEO ID NO: 51）

[0346] CTLA-4

[0347]

说明/靶标	序列

[0348]

CTLA-4 HCv	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMD VWGQGTTVTVSS（SEQ ID NO: 52）
CTLA-4 HC	GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWYDGSNKY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDPRGATLYYYYY GMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVH（SEQ ID NO: 53）
CTLA-4 LCv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTLSSLQP EDFATYYCQQYYSTPFTFGPGTKVEIK（SEQ ID NO: 54）
CTLA-4 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO: 55）

[0349] PD-L1

[0350]

说明/靶标	序列
PD-L1（AMP714）HCv	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGYTFPDYYMN WVRQAPGKGLEWVGDIDPNYGGTTYNASVKGRFTI SVDRSKSIAYLQMSSLKTEDTAVYYCARGALTDWG QGTMVTVSS（SEQ ID NO: 56）
PD-L1（AMP714）LC	QIQLTQSPSILSASVGDRVTITCRASSSVSYIYWFQQ KPGKAPKPLIYATFNLASGVPSRFSGSGSGTSYTLTI SSLQPEDFATYYCQQWSNNPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（SEQ ID NO: 57）
PD-L1（AMP714）LCv	QIQLTQSPSILSASVGDRVTITCRASSSVSYIYWFQQ KPGKAPKPLIYATFNLASGVPSRFSGSGSGTSYTLTI SSLQPEDFATYYCQQWSNNPLTFGQGTKVEIK（SEQ ID NO: 58）

[0351]

PD-L1（MEDI4736）HCv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWF GELAFDYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO: 59）
PD-L1（MEDI4736）LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC（SEQ ID NO: 33）
PD-L1（MEDI4736）LCv	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK（SEQ ID NO: 60）

[0352] TIM3

说明/靶标	序列
TIM3（WT）#62 LC	QTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQQKP GQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVEA GDEADYYCQVLDRRSDHWLFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVA PTECS（SEQ ID NO: 61）
TIM3（WT）#62 LCv	QTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQQKP GQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVEA GDEADYYCQVLDRRSDHWLFGGGTKLTVL（SEQ ID NO: 62）
TIM3（WT）#62 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGR GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

[0354]

	PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO: 63）
TIM3（WT）#62 HCv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGR GTLVTVSS（SEQ ID NO: 64）
TIM3（种系化的）#62 LC	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQK PGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEA GDEADYYCQVLDRRSDHWLFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS（SEQ ID NO: 65）
TIM3（种系化的）#62 LCv	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQK PGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEA GDEADYYCQVLDRRSDHWLFGGGTKLTVL（SEQ ID NO: 66）
TIM3（种系化的）#62 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO: 67）
TIM3（种系化的）#62 HCv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGT YYGNYFEYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO: 68）

[0355] 0X40

[0356]

说明/靶标	序列

[0357]

OX40 HCv	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWNWIR KHPGKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRITINRDTSKNQY SLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQG TLVTVSS（SEQ ID NO: 69）
OX40 LCv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQP EDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIK（SEQ ID NO: 70）
OX40 HC	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWNWIR KHPGKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRITINRDTSKNQY SFQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO: 71）
OX40 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQP EDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRG EC（SEQ ID NO: 72）

[0358] 表2b.抗原序列

[0359]

说明/靶标	序列
PD-1 人类	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTF SPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQT DKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPT AHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVIC SRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQW REKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADG PRSAQPLRPEDGHCSWPL（SEQ ID NO: 73）

[0360]

PD-L1 人类	MRIFAVFTFMTYWHLLNAPYNKINQRILVVDPVTSEHEL TCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFN VTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAH PPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKC GIQDTNSKKQSDTHLEET（SEQ ID NO: 74）
CTLA-4 人类	MACLGFQRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAM HVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQ ADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNL TIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDP EPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRS PLTTGVYVKMPPTEPEC EKQFQPYFIPIN（SEQ ID NO: 75）
TIM3 人类	MFSHLPFDCVLLLLLLLLTRSSEVEYRAEVGQNAYLPCF YTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDVN YWTSRYWLNGDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIP GIMNDEKFNLKLVIKPAKVTPAPTRQRDFTAAFPRMLTT RGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRD SGATIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQ NLSLISLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIEENVYEVEE PNEYYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP（SEQ ID NO: 76）
OX40 人类	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPS NDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVV SSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQ PLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK HTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPT EAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPL AILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADA HSTLAKI（SEQ ID NO: 78）

[0361] 实例2(a)PD-1/CTLA-4双特异性结合蛋白

[0362] 不被理论所束缚,对于PD-1和CTLA-4阻断的组合具 有充足的临床和临床前基本原理。因此,希望最大化PD-1和CTLA-4 组合的风险/效益比率(图4)。

[0363] 使用以上表2中鉴定的亲本序列产生以下结合PD-1和 CTLA-4的双特异性结合蛋白。用下文鉴定的序列产生鉴定为Bis2、Bis3、和Bis5的蛋白,并使用如下所讨论的Octet结合测定评估并行 抗原结合活性。

[0364] 表3.用于PD-1/CTLA-4的BiS构建体

[0365]

说明	序列
Bis2 PD-1/CTLA-4 HC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGCGTKVEIKG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWV AVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDV WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLE WVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYYFDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO: 1）
Bis2 PD-1/CTLA-4 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSR HMYWYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC（SEQ ID NO: 2）

[0366]

Bis3 PD-1/CTLA-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGM HWVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPN SFYEYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI NSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGC GTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVES GGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAP GKCLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYY YYGMDVWGQGTTVTVSS（SEQ ID NO: 3）
Bis3 PD-1/CTLA-4 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSR HMYWYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC（SEQ ID NO: 6）
Bis5 PD-1/CTLA-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGM HWVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPN SFYEYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG

[0367]

	VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYS TPFTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKCLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPR GATLYYYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK （SEQ ID NO: 5）
Bis5 PD-1/CTLA-4 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSR HMYWYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC（SEQ ID NO: 6）

[0368] Octet结合测定(BiS2、BiS3、和BiS5)

[0369] 为了评价本文披露的双特异性结合分子的结合,使用配 备有Ni-NTA生物传感器尖端和10X动力学缓冲液的Octet QK (ForteBio公司,门洛帕克(Menlo Park),加利福尼亚州)。对于 该特定系列的双特异性结合蛋白,His标记的PD-L1-Fc、his标记的 PD-1-Fc和CTLA-4-Fc(人类重组蛋白)购自R&D系统公司(R&D Systems)(明尼阿波利斯,明尼苏达州)。所有结合测定均在25℃ 进行。

[0370] 在分析之前,以1000rpm搅拌样品板。将Ni-NTA生物 传感器尖端在1X动力学缓冲液中预湿润5分钟。该1X动力学缓冲液 也用作基线确定的运行缓冲液以及抗原和双特异性抗体的稀释缓冲 液。将Ni-NTA生物传感器尖端浸入100nM his标记的PD-L1-Fc(参 见下文(b))或his标记的PD-1-Fc中用于抗原捕获,持续约1分钟。将抗原包被的生物传感器尖端各自浸入10μg/ml双特异性抗体中约5 分钟,并且然后移入含有100nM CTLA-4-Fc抗原的孔柱中持续2分 钟。结合结果示于图3中。

[0371] 使用以上表2中鉴定的亲本序列产生呈DuetMab形式的 结合PD-1和CTLA-4的双特异性结合蛋白。用下表4中的序列产生 PD-1/CTLA-4 DuetMab,并如下所讨论的进行评估,包括与 PD-1/CTLA-4 Bis5比较。

[0372] 表4.用于PD-1/CTLA-4的DuetMab构建体

[0373]

说明	序列
DuetMab PD-1（LO115）LC 氨基酸	QYVLTQSPATLSLSPGERATLSC***SASSKHTNLYWSR HMYWY***QQKPGQAPRLLIY***LTSNRAT***GIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYC***QQWSSNP***FTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC（SEQ ID NO: 7）
DuetMab PD-1（LO115）LC 核酸	CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTC CCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGC TCCGCCTCCTCCAAGCACACCAACCTGTACTGGTC CCGGCACATGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGC CAGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACCTGACCTCTAA CCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGC TCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTC CAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTAC TGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCTTCACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTG GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGT GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGT（SEQ ID NO: 8）
DuetMab PD-1（LO115）HC 氨基酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFTFSDYGMH*** WVRQAPGKGLEWVA***YISSGSYTIYSADSVFGR***FTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR***RAPNSFT EYYFDY***WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS

[0374]

	GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO: 9）
DuetMab PD-1（LO115） HC 核酸	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCCGGCGGAGGACTG GTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCG CCGCCTCCGGCTTCACATTCTCCGACTACGGCATG CACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGAAAGGGCCTGG AATGGGTGGCCTACATCTCCTCCGGCTCCTACACC ATCTACTCCGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTA CCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACA GCCGTGTACTACTGTGCCAGACGGGCCCCTAACT CCTTCTACGAGTACTACTTCGACTACTGGGGCCA GGGCACCACCGTGACCGTGTCCTCTGCTAGCACC AAAGGTCCGAGCGTTTTTCCGCTGGCACCGAGCA GCAAAAGCACCTCTGGTGGCACCGCAGCACTGGG TTGTCTGGTGAAAGATTATTTTCCGGAACCGGTTA CCGTTTCTTGGAATAGCGGTGCACTGACCAGCGG TGTTCATACCTTTCCGGCAGTTCTGCAGAGCAGCG GTCTGTATAGCCTGTCTAGCGTTGTTACCGTTCCG AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTTGCA ATGTGAATCATAAACCGAGCAATACAAAAGTTGA TAAACGCGTTGAACCGAAAAGCTGTGACAAAACT CACACGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAGTTCG GAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCCCAGCCAGATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG

		GTCTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGAGCTGCGCGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCGTTAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA（SEQ ID NO: 10）
	DuetMab CTLA-4 LC 氨基酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***RASQSINSYLD***WYQ QKPGKAPKLLIY***AASSLQS***GVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYC***QQYYSTP***FTFGPGTKVEIKGQPK AAPSVTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTEVS（SEQ ID NO: 4）
[0375]	DuetMab CTLA-4 LC 核酸	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC CGGGCAAGTCAGAGCATTAACAGCTATTTAGATT GGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACT CCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGG GTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGTATTA CAGTACTCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAA GTGGAAATCAAAGGTCAGCCCAAGGCGGCCCCCT CGGTCACTCTGTTCCCGCCCTGCTCTGAGGAGCTT CAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAA GTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTG GAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGT GGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAA CAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACG CCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCT GCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGA AGACAGTGGCCCCTACAGAAGTGTCA（SEQ ID NO: 11）

[0376]

DuetMab CTLA-4 HC 氨基酸	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS***GFTFSSYGMH*** WVRQAPGKGLEWVA***VIWYDGSNKYYADSVKG***RFT PSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR***DPFGAT LYYYYGMDV***WGQGTTVTVSSASTKGPSVCPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPEFEGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO: 12）
DuetMab CTLA-4 HC 核酸	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGG TCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATG CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG AGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAA TAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCGAGGGGA GCTACCCTTTACTACTACTACGGTATGGACGT CTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA GCGTCGACCAAAGGTCCGAGCGTGTGCCCGCTGG CACCGAGCAGCAAAAGCACCTCTGGTGGCACCGC AGCACTGGGTTGTCTGGTGAAAGATTATTTTCCG GAACCGGTTACCGTTTCTTGGAATAGCGGTGCAC TGACCAGCGGTGTTCATACCTTTCCGGCAGTCCTG CAGAGCAGCGGTCTGTATAGCCTGTCTAGCGTTG TTACCGTTCCGAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGAC CTATATTTGCAATGTGAATCATAAACCGAGCAAT ACCAAAGTTGATAAACGCGTTGAACCGAAAAGCG TGGACAAAACTCACACGTGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAGTTCGAGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGA CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA

[0377]

	CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCagCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTCTACACCCTGCCCCCATGCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGT GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCTTAAGCCTGTCTCCGG GTAAA（SEQ ID NO: 13）

[0378] Octet结合测定(DuetMab)

[0379] 通过Octet分析对两种不同的抗原进行并行结合研究。将生物素化的人类PD-1加载到链霉亲和素传感器上,然后按顺序首 先与DuetMab PD-1/CTLA-4相互作用,并且然后与可溶的CTLA-4抗 原相互作用。将链霉亲和素(SA)生物传感器(ForteBio)用于在PBS pH 7.2、3mg/ml BSA、0.05％(v/v)吐温20(测定缓冲液)中以5μg/ml 捕获生物素化的人类PD-1。在洗涤步骤之后,使加载的生物传感器首 先与携带133nM的DuetMab PD-1/CTLA-4双特异性抗体的样品孔，并且然后与携带200nM的人类CTLA-4抗原的孔进行连续的缔合和 解离相互作用。结合结果示于图5中。

[0380] 还经由BiaCore评估PD-1/CTLA-4 DuetMab双特异性抗 体的内在动力学。使用BIAcore T200仪器(BIAcore)进行结合实验。为了捕获抗体,将小鼠抗huIgG-Fab固定在CM5芯片上至靶标应答为 2000RU。使100nM的DuetMab或mAb以20μL/min流动5min以 获得大约100个应答单位的捕获抗体。然后以50μl/min的流速连续注 射抗原5min。使用BIAevaluation 4.1软件从非线性拟合计算动力学参 数(k_{on}和k_{off})和解离常数(KD)。结合结果示于表5中。

[0381] 表5.PD-1/CTLA-4的BiaCore数据

[0382]

	捕获表面	PD1	CTLA4	kon	koff	K_D	Chi^2
				(x E+5 $M^{-1}s^{-1}$)	(x E-4 s^{-1})	(nM)	
抗 PD-1（LO1155）IgG	mu-抗 huIgG	hu		3.02	2.37	0.79	0.08
	mu-抗 huIgG	cyno		3.46	2.38	0.69	0.06
	mu-抗 huIgG	mu		1.49	665	447	0.13
抗 CTLA-4 IgG	mu-抗 huIgG		hu	6.33	3.04	0.48	0.27
	mu-抗 huIgG		cyno	11.47	6.74	0.59	0.47
PD-1/CTLA-4 DuetMab	mu-抗 huIgG	hu		2.95	2.36	0.81	0.03
	mu-抗 huIgG	cyno		4.90	2.15	0.44	0.03
	mu-抗 huIgG	mu		1.40	693	496	0.12
	mu-抗 huIgG		hu	6.84	4.21	0.42	0.08
	mu-抗 huIgG		cyno	11.43	6.34	0.55	0.18

[0383] 报告基因测定

[0384] 来自报告基因测定的结果显示了PD-1/CTLA-4双特异 性结合蛋白抑制PD-1和CTLA-4途径(图6A-D)。与亲本相比,BiS5 结合蛋白保留了PD-1效力,但与抗CTLA-4 IgG相比效力降低约3 倍。DuetMab抗体的PD-1效力降低约9倍,并且CTLA-4效力降低 约16倍(与IgG4P相比)。本领域需要具有降低的CTLA-4靶标作 用但保留功能活性的分子(例如,如下文SEB测定中示出的)。因此, PD-1/CTLA-4双特异性结合蛋白具有为患者提供安全益处的潜力。

[0385] 葡萄球菌肠毒素B(SEB)测定

[0386] 来自SEB测定的结果显示了DuetMab和BiS5Ab在SEB 初级免疫细胞测定中具有等效的活性(图7),并且与DummyDuet 对照组相比,DuetMab显示了更高的活性(图8A)。DuetMab显示 了与亲本分子的组合大约等效的活性,并且与LO115或CTLA-4抗体 MEDI1123(曲美木单抗)相比,具有更高的活性(图8B)。最后, 与新的同种型对照的组合相比,BiS5和DuetMab显示了更高的活性 (图9A-B)。从两个独立的实验的四个供体获得数据,并且这些特 定测定需要使用IFNγ。

[0387] 混合白细胞反应(MLR)测定

[0388] 进行MLR测定以测试PD-1/CTLA-4双特异性分子。PD-1/CTLA-4 DuetMab和BiS5Ab在混合淋巴细胞反应(MLR)测定 中具有等效的活性(图10A-C)。与DummyDuet/同种型对照组的组 合相比,PD-1/CTLA-4 DuetMab具有更高的活性(图11A-D)。与亲 本抗体对照的组合相比,PD-1/CTLA-4 DuetMab具有大约等效的活性 (图12A-D)。最后,与竞争者PD-1/CTLA-4组合相比,PD-1/CTLA-4 DuetMab具有大约等效的活性,并且比单独的抗PD-1(例如,派姆单 抗(pembrolizumab)和纳武单抗(nivolumab))具有更高的活性(图 13A-D)。

[0389] 药代动力学和药效学(PK/PD)研究

[0390] 进行了一项研究以检查食蟹猴中的单剂量药代动力学/ 药效学(PK/PD)。研究设计示出于图14中。DuetMab在食蟹猴中显 示了明显的药效学(PD),并且观察到两种分子的

稳健的PD应答(图 15A-B)。因此,证实了PD-1/CTLA-4双特异性结合蛋白在体内环境 中的活力。

[0391] T细胞依赖性抗体应答(TDAR)

[0392] 用指定剂量(0.5mg/kg、5mg/kg、50mg/kg)的DuetMab 或BiS5双特异性分子静脉内给药(隐静脉或头静脉)食蟹猴。在无 菌条件下用适量的无菌水注射来重建钥孔虫戚血兰素(KLH)蛋白。 在两种情况下(第1天和第29天)在每个动物的背部皮下给予低剂 量KLH溶液。从所有动物获得用于进一步分析的血液样品。进行KLH 特异性IgM和IgG抗体滴度的评估。使用ELISA检测猴血清中的抗 KLH抗体。

[0393] 在给药PD-1/CTLA-4 DuetMab(图16A)和PD-1/CTLA-4 BiS5Ab(图16B)的食蟹猴中看到T细胞依赖性抗体应答(TDAR)。

[0394] 表达不同水平的人类PD-1和/或CTLA-4的CHO细胞

[0395] 使用表达不同水平的人类PD-1和/或CTLA-4的稳定的 CHO细胞来开发模型系统以研究PD-1/CTLA-4双特异性分子(图17)。 使用荧光标记的可溶的PD-1和CTLA-4蛋白通过流式细胞术检测细 胞结合的DuetMab上的游离抗原结合臂。该测定结果显示了 PD-1/CTLA-4 DuetMab在相同细胞表面并行结合PD-1和CTLA-4(图 18A-C)。

[0396] CTLA-4被连续内吞到网格蛋白包被的小窝中,导致在 任何给定时间只有一小部分受体在细胞表面表达。细胞-表面CTLA-4 的再循环是快速的,其中超过80%的表面CTLA-4在5分钟内被内化。 因此,进行了一项实验来解决在表达过量PD-1的细胞上的CTLA-4 饱和时,协同结合是否区分PD-1/CTLA-4 DuetMab与抗PD-1和抗 CTLA-4抗体的组合(图19A-C)。使用标记的抗PD-1和抗CTLA-4 mAb独立地确定每种靶标抗原的受体占有率。

[0397] 发现亲本单克隆抗体结合并占有其靶标受体而对非靶 标受体没有重大影响(图20A-D)。与单克隆抗体的组合相比, PD-1/CTLA-4 DuetMab以低约250倍的浓度使表达过量PD-1的CHO 细胞上的CTLA-4饱和(图21A-D)。与仅表达CTLA-4的细胞相比, PD-1/CTLA-4 DuetMab以低约500倍的浓度使表达过量PD-1的CHO 细胞上的CTLA-4饱和(图22A-F)。PD-1/CTLA-4 DuetMab优先地 顺式结合相同细胞表面上的PD-1和CTLA-4,如通过定量总预混合的 CHO群内的双峰形成所确定的(图23A-B)。然而,PD-1/CTLA-4 DuetMab也可以反式结合单表达细胞。PD-1/CTLA-4 DuetMab具有亲 本抗CTLA-4抗体曲美木单抗的内化特性(图24A-D)。不被理论所 束缚,该分子示出的作用具有诱导PD-1下调的潜力。在表达10倍过 量PD-1的稳定CHO细胞中也看到PD-1/CTLA-4 DuetMab的内化特 性(图25B)。

[0398] 实例2(b)PD-L1/CTLA-4双特异性结合蛋白

[0399] 使用以上表2中鉴定的亲本序列产生以下结合PD-L1和 CTLA-4的双特异性结合蛋白。用下表6中的序列产生鉴定为Bis2、Bis3、和Bis5的蛋白,并使用如以上在部分2(a)中所述的Octet结合 测定评估下文鉴定的序列的并行抗原结合活性(图26)。

[0400] 表6.用于PD-L1/CTLA-4的BiS构建体

[0401]

说明	序列
Bis2 PD-L1/CTLA-4 HC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGCGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQ DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK（SEQ ID NO: 14）
Bis2 PD-L1/CTLA-4 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （SEQ ID NO: 15）

[0402]

Bis3 PD-L1/CTLA-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWF GELAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGCGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGT TVTVSS（SEQ ID NO: 16）
Bis3 PD-L1/CTLA-4 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （SEQ ID NO: 17）
Bis5 PD-L1/CTLA-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWF GELAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGGGG SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINS YLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS

[0403]

	GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGCGTKV EIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLE WVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDV WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO: 18）
Bis5 PD-L1/CTLA-4 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （SEQ ID NO: 19）

[0404] 实例2(c)PD-1/TIM3双特异性结合蛋白

[0405] 使用以上表2中鉴定的亲本序列产生以下结合PD-1和 TIM3的双特异性结合蛋白(表7)。用以下鉴定的序列产生鉴定为 Bis3、Bis5、和DuetMab的蛋白，并通过Octet分析评估并行结合研 究。简言之，将链霉亲和素(SA)生物传感器(ForteBio)用于在PBS pH 7.2、3mg/ml BSA、0.05％(v/v)吐温20(测定缓冲液)中以2μg/ml 捕获生物素化的人类TIM3-IgV结构域。在洗涤步骤之后，使加载的 生物传感器首先与携带200nM的双特异性抗体的样品孔，然后与携 带200nM的PD-1抗原的孔进行连续的缔合和解离相互作用。将生物 素化的人类TIM3-IgV结构域加载到链霉亲和素传感器上，然后按顺 序首先与双特异性分子相互作用，并且然后与PD-1抗原相互作用。结合结果示出于图27A-27B中。

[0406] 表7.用于PD-1/TIM3的BiS构建体

[0407]

说明	序列
TIM3 WT #62 scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTY YGNYFEYWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG

[0408]

	GGGSQTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSV HWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGN TATLTIHRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHWLFGCGT KLTVL（SEQ ID NO: 20）
PD-1 重链 +TIM3（WT #62）scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMH WVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFY EYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYG NYFEYWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSQTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHW YQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTA TLTIHRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHWLFGCGTKL TVL（SEQ ID NO: 21）
BiS5 PD-1 重链 +TIM3（WT #62）scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMH WVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFY EYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGGGG SGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG SYGTYYGNYFEYWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSQTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNI

[0409]

	GGKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFS GSNSGNTATLTIHRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHW LFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO: 22）
BiS5 PD-1 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRH MYWYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC（SEQ ID NO: 23）
BiS3 PD-1 重链+TIM3（WT #62）scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMH WVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFY EYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYG NYFEYWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSQTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHW YQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTA TLTIHRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHWLFGCGTKL TVL（SEQ ID NO: 24）
BiS3 PD-1 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRH MYWYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC（SEQ ID NO: 23）
DuetMab	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMH

[0410]

PD-1 重链	WVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFY EYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO: 25）
DuetMab TIM3 LC	QTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQ QKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTATLT IHRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHWLFGGGTKLTV LGQPKAAPSVTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEVS （SEQ ID NO: 26）
DuetMab TIM3 HC 突起	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTY YGNYFEYWGRGTLVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO: 27）

[0411] 肿瘤特异性杀伤活性测定

[0412] Rosenberg克隆黑色素瘤杀伤测定。

[0413] 使用Rosenberg克隆:JR6C12和黑色素瘤细胞系：Mel324测试TIM3/PD-1双特异性结合分子和亲本TIM3抗体的一般细 胞杀伤活性。

[0414] 一般测定方案

[0415] JR6C12细胞作为效应子起作用,并且是从黑色素瘤患 者扩增的并对gp100-黑色素瘤抗原具有特异性的人类CD8+T细胞 系。为了评估治疗潜力,将Mel624肿瘤细胞荧光标记并与效应子 (JR6C12)和结合TIM3和或PD-1的候选抗体一起添加。将细胞共 培养16小

时。图28A中的多个图提供了添加与抗PD1组合或作为 PD-1/TIM3双特异性分子的TIM362(如表7中所述)增强T细胞活 化和肿瘤杀伤的视觉表示。

[0416] 此外,如图28B-28C示出的,PD-1/TIM3双特异性分子 相对于抗TIM3、抗PD-1或同种型对照单一疗法展示出最大的肿瘤杀 伤效力,如通过(b)肿瘤细胞活力染料摄取和(c)IFN-γ分泌评估的。

[0417] 除了克隆62之外,使用上文表2中鉴定的亲本序列产 生另一种呈DuetMab形式的结合PD-1和TIM3的双特异性结合蛋白。用下表8中的序列产生PD-1/TIM3 DuetMab。TIM3臂的序列获得自 O13-1(其是克隆62的亲和力成熟变体),并且抗PD-1臂的序列获 得自LO115(其与用于上述PD-1/CTLA-4 DuetMab双特异性抗体的 PD-1臂相同)。如下所讨论地评估PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) 双特异性抗体,包括与PD-1/TIM3 BiS3和BiS5比较。

[0418] 表8.用于PD-1/TIM3的DuetMab构建体

[0419]

说明	序列
DuetMab PD-1 (LO115) LC 氨基酸	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRH MYWYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC (SEQ ID NO: 7)

[0420]

DuetMab PD-1（LO115）LC 核酸	CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTC CCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGC TCCGCCTCCTCCAAGCACACCAACCTGTACTGGTC CCGGCACATGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGC CAGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACCTGACCTCTAA CCGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGC TCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTC CAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTAC TGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCTTCACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTG GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGT GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGT（SEQ ID NO: 8）
DuetMab PD-1（LO115）HC 氨基酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMH WVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFY EYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO: 9）

[0421]

DuetMab PD-1（LO115）HC 核酸	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCCGGCGGAGGACTG GTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCG CCGCCTCCGGCTTCACATTCTCCGACTACGGCATG CACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGAAAGGGCCTGG AATGGGTGGCCTACATCTCCTCCGGCTCCTACACC ATCTACTCCGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTA CCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACA GCCGTGTACTACTGTGCCAGACGGGCCCCTAACT CCTTCTACGAGTACTACTTCGACTACTGGGGCCA GGGCACCACCGTGACCGTGTCCTCTGCTAGCACC AAAGGTCCGAGCGTTTTTCCGCTGGCACCGAGCA GCAAAAGCACCTCTGGTGGCACCGCAGCACTGGG TTGTCTGGTGAAAGATTATTTTCCGGAACCGGTTA CCGTTTCTTGGAATAGCGGTGCACTGACCAGCGG TGTTCATACCTTTCCGGCAGTTCTGCAGAGCAGCG GTCTGTATAGCCTGTCTAGCGTTGTTACCGTTCCG AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTTGCA ATGTGAATCATAAACCGAGCAATACAAAAGTTGA TAAACGCGTTGAACCGAAAAGCTGTGACAAAACT CACACGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAGTTCG AGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCCCAGCCAGCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTCTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAGCTGCGCGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTCGTTAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA（SEQ ID NO: 10）

[0422]

DuetMab TIM3（O13-1）LC 氨基酸	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWY QQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATL TISRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHFLFGGGTKLTV LGQPKAAPSVTLFPPCSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEVS（SEQ ID NO: 28）
DuetMab TIM3（O13-1）LC 核酸	AGCTACGTGCTGACGCAGCCGCCGTCAGTGTCAG TGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGG GGGAGACAACATTGGAGGTAAAAGTGTTCACTGG TACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGTTGG TCATCTATTATGATAGTGACCGGCCCTCAGGCATC CCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACA CGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGG GGATGAGGCCGATTATTACTGTCAGGTGTTGGAT CGTCGTAGTGATCATTTCCTGTTCGGCGGAGGGA CCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCGGC GCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTGCTCTGAGG AGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCT CATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTG GCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCG GGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGC AACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCC TGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTA CAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTG GAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAAGTGTCA（SEQ ID NO: 29）
DuetMab TIM3（O13-1）HC 氨基酸	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTY YGNYFEYWGQGTLVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK（SEQ ID NO: 30）

[0423]

BiS3 PD-1（LO115）/TIM3（O13 -1）HC 氨基酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMH WVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFY EYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSG GGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSY GTYYGNYFEYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGG KSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHFLFGC GTKLTVL（SEQ ID NO: 89）
BiS3 PD-1（LO115）/TIM3（O13-1）LC 氨基酸	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRH MYWYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC（SEQ ID NO: 90）
BiS5 PD-1（LO115）/TIM3（O13-1）HC 氨基酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMH WVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFY EYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTY

[0424]

	YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGSYGTYYGNYFEYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITC GGDNIGGKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGI PERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVLDRR SDHFLFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO: 91）
BiS5 PD-1 （LO115） /TIM3（O13-1） LC 氨基酸	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRH MYWYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC（SEQ ID NO: 92）
DuetMab TIM3（O13-1） HC- 核酸	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG TACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGC ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTA TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTCCTATGGTA CCTACTACGGAAACTACTTTGAATACTGGGGCCA GGGCACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCGTCGACC AAAGGTCCGAGCGTGTGCCCGCTGGCACCGAGCA GCAAAAGCACCTCTGGTGGCACCGCAGCACTGGG TTGTCTGGTGAAAGATTATTTTCCGGAACCGGTTA CCGTTTCTTGGAATAGCGGTGCACTGACCAGCGG TGTTCATACCTTTCCGGCAGTCCTGCAGAGCAGC GGTCTGTATAGCCTGTCTAGCGTTGTTACCGTTCC GAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTTGC AATGTGAATCATAAACCGAGCAATACCAAAGTTG ATAAACGCGTTGAACCGAAAAGCGTGGACAAAA CTCACACGTGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAGTT CGAGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG

[0425]

	CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCAGCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTCTACACCCTGCCCCCATGCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCTTAAGCCTGTCTCCGGGTAAA （SEQ ID NO: 31）

[0426] Octet结合测定(DuetMab,TIM3臂亲和力成熟变体)

[0427] 通过Octet分析对两种不同的抗原,PD-1和TIM3,进 行并行结合研究。将生物素化的人类TIM3加载到链霉亲和素传感器 上,然后按顺序首先与PD-1/TIM3 DuetMab相互作用,并且然后与可 溶的PD-1抗原相互作用。将链霉亲和素(SA)生物传感器(ForteBio) 用于在PBS pH 7.2、3mg/ml BSA、0.05％(v/v)吐温20(测定缓冲 液)中以5μg/ml捕获生物素化的人类TIM3。在洗涤步骤之后,使加 载的生物传感器首先与携带具有TIM3臂(O13-1)(其是以200nM 加载的克隆62TIM3抗体的亲和力成熟变体)的DuetMab PD-1/CTLA-4双特异性抗体的样品孔,并且然后与携带200nM的人 类PD-1抗原的孔进行连续的缔合和解离相互作用。结合结果示出于 图29中。

[0428] 还经由BiaCore评估PD-1/TIM3 DuetMab双特异性抗体 的内在动力学。使用BIAcore T200仪器(BIAcore)进行结合实验。为了捕获抗体,将小鼠抗hulgG-Fab固定在CM5芯片上至靶标应答为 2000RU。使100nM的DuetMab或mAb以20μL/min流动5min以 获得大约100个应答单位的捕获抗体。然后以50μl/min的流速连续注 射抗原5min。使用BIAevaluation 4.1软件从非线性拟合计算动力学参 数(k_{on}和k_{off})和解离常数(KD)。结合结果示出于表9。

[0429] 表9.PD-1/TIM3的BiaCore数据

[0430]

捕获	TIM3	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	K_D (nM)	捕获	PD-1	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	K_D (nM)
O13-1 IgG1-TM	人类	1.88E+06	7.52E-03	**4.01**	LO115 IgG1-TM	人类	3.02E+05	2.37E-04	**0.79**
DuetMab	人类	1.96E+06	8.13E-03	**4.15**	DuetMab	人类	2.95E+05	2.36E-04	**0.69**
O13-1 IgG1-TM	Cyno	2.79E+06	7.18E-02	**25.69**	LO115 IgG1-TM	Cyno	3.46E+05	2.38E-04	**0.81**
DuetMab	Cyno	2.98E+06	7.61E-02	**25.57**	DuetMab	Cyno	4.90E+05	2.15E-04	**0.44**

[0431] PD-1/TIM3双特异性抗体(包括BiS3、BiS5、和DuetMab) 与过表达人类TIM3或人类PD-1(图30和表25)的CHO细胞结合，PD-1和TIM3表达(DMF4)示出于图31中。

[0432] 表25

[0433]

	抗 TIM3 LOO131	抗 PD1 LO115	Duetmab	Bis3	Bis 5	Nip228 Hu IgG1TM
EC50	0.003968	NA	0.1036	0.02853	0.01603	NA
复测定系数	0.9951	0.9792	0.9982	0.9964	0.9954	0.9804

[0434] CMVAg回忆测定

[0435] 与同种型治疗相比，PD-1/TIM3双特异性抗体(包括 BiS3、BiS5、和DuetMab)在CMV抗原回忆测定中增强CD8+T细 胞增殖(图32A-C)。

[0436] 混合白细胞反应(MLR)测定

[0437] PD-1/TIM3双特异性抗体(包括BiS3、BiS5、和DuetMab) 在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中增强干扰素(IFNγ)分泌，其活 性倾向高于单一和联合疗法(图33A-D)。PD-1/TIM3双特异性抗体 (包括BiS3、BiS5、和DuetMab)在jurkat NFκB报告系中展示出与 亲本LO115 IgG1类似的活性，该报告系主要表达PD-1(87％PD-1 单阳性)(图34A-C)。

[0438] 总之，针对PD-1/TIM-3产生三种双特异性形式 (DuetMab、Bis3、和Bis5)。所有双特异性形式显示了等效于或优 于抗PD-1的体外功能性，表明这些分子可以为当前的免疫肿瘤学策 略提供优越的优点。

[0439] 实例2(d)OX40/PD-L1双特异性结合蛋白

[0440] 使用以上表2中鉴定的亲本序列产生以下结合PD-L1和 OX40的双特异性结合蛋白。用下表10中的序列产生鉴定为Bis2、 Bis3、和Bis5的蛋白，并使用如下所讨论的Octet结合测定评估并行 抗原结合活性。

[0441] 表10.用于OX40/PD-L1的BiS构建体

[0442]

说明	序列
OX40 LCv κ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWY QQKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （SEQ ID NO: 32）
OX40SLR LCv κ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWY QQKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （SEQ ID NO: 93）

[0443]

BiS2-PD-L1 - OX40 HC - 4P	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGCGTKVEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKCLEWV ANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLT CAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLEYIGYISYNGIT YHNPSLKSRITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVY YCARYKYDYDGGHAMDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK（SEQ ID NO: 34）
BiS3-OX40 HC-4P-PD-L1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWN WIRKHPGKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRITINRD TSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGH AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGG GSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGCGTKVEI KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKCLEW VANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGT

[0444]

	LVTVSS（SEQ ID NO: 35）
BiS5-OX40 HC-4P-PD-L1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWN WIRKHPGKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRITINRD TSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGH AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGG GGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQR VSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFG CGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAP GKCLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDY WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK（SEQ ID NO: 36）
BiS5-OX40SLR HC-G1-N434A-PD-L1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWN WIRKHPGKGLEYIGYISYNAITYHNPSLKSRITINRD TSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYEGGH AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSRYWMSWVRQAPGKCLEWVANIKQDGSEKYY VDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCR ASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIP DRFSGSGSGTDFrLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLP WTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGQPENNYKTTPPV

[0445]

	LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HAHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO: 94）

[0446] Octet结合测定

[0447] 为了评价本文披露的双特异性结合分子的结合，使用配 备有Ni-NTA生物传感器尖端和10X动力学缓冲液的Octet QK (ForteBio公司，门洛帕克(Menlo Park)，加利福尼亚州)。对于 该特定系列的双特异性结合蛋白，His标记的PD-L1-Fc、his标记的 PD-1-Fc和hOX40-Fc(人类重组蛋白)购自R&D系统公司(R&D Systems)(明尼阿波利斯，明尼苏达州)。所有结合测定均在25℃ 进行。

[0448] 在分析之前，以1000rpm搅拌样品板。将Ni-NTA生物 传感器尖端在1X动力学缓冲液中预湿润5分钟。该1X动力学缓冲液 也用作基线确定的运行缓冲液以及抗原和双特异性抗体的稀释缓冲 液。将Ni-NTA生物传感器尖端浸入100nM his标记的PD-L1-Fc(参 见下文(b))或his标记的PD-1-Fc中用于抗原捕获，持续约1分钟。将抗原包被的生物传感器尖端各自浸入10μg/ml双特异性抗体中约5 分钟，然后移入含有100nM hOX40-Fc抗原的孔柱中2分钟。结合结 果显示了BiS2/BiS3 OX40Ab/PD-L1分子与PD-L1-His和hOX40-Fc 二者结合，并且BiS2 OX40Ab/PD-L1以比BiS3 OX40Ab/PD-L1更大 的亲和力结合。将BiS2 PD-1/OX40用作对照(图35)。

[0449] 葡萄球菌肠毒素B(SEB)测定

[0450] 使用上述方案的SEB测定显示了OX40/PD-L1双特异性 分子在呈BiS2和BiS3形式时均有活性(图36A-B)。

[0451] PD-L1报告物测定

[0452] 材料：

[0453] -细胞系和培养条件：

[0454] -人类PD-1JurkatNFAT荧光素酶克隆2报告物

[0455] -表达PD-L1的CHO scFv OKT3(UBC)(所有细胞在37℃在 潮湿的组织培养孵育箱中维持在RPMI 1640培养基加10％FBS和1X pen/strep抗生素(RPMI完全培养基)中)。

[0456] -RPMI-1640，生命技术公司(LifeTechnologies)目录号 A1049101

[0457] -热灭活的新生牛血清(FBS)，生命技术公司(LifeTechnologies) 目录号26010074

[0458] -完全RPMI培养基:RPMI-1640加10％FBS

[0459] -100X青霉素/链霉素，生命技术公司(LifeTechnologies)目录 号15140-122

[0460] -96孔TC处理的平底培养板，科斯塔公司(Costar)3903，VWR 目录号29444-010

[0461] -SteadyGlo荧光素酶测定系统，普洛麦格公司(Promega)，目 录号E2510

[0462] -测试抗体

[0463] -EnVision多标记读板器，珀金埃尔默公司(Perkin Elmer)

[0464] 方法：

[0465] 对于用于中和PD-L1抑制的2-细胞生物活性测定，用胰 蛋白酶消化表达PD-L1的CHO scFv OKT3细胞、用温热的RPMI完 全培养基中和、并收集在50mL锥形试管中。将细胞在室温以380g 沉淀5min，并且然后悬浮在新鲜的RPMI完全培养基中并在Vi细胞 计数器上计数。将表达PD-L1的CHO scFv OKT3细胞调节至 0.4e6/mL，并将每孔25μL(10,000个细胞)铺

板，如板布局示出的。使细胞粘附在板上3小时。此后，将50μL含有RPMI的测试试剂(2X 最终浓度)等分到CHO细胞上并孵育另外1小时。该孵育给测试试 剂时间以与CHO细胞表面上的PD-L1结合。在1小时时，将表达PD-1 的Jurkat NFAT荧光素酶报告细胞收集在50mL锥形试管中，在室温 以380g沉淀5min，并重悬于新鲜的温热的RPMI完全培养基中。将 细胞调节至1.2e6/mL并将25μL(30,000)细胞铺板到具有表达PD-L1 的CHO scFv OKT3细胞和测试品的孔中。

[0466] 将细胞和测试试剂进一步孵育18小时以进行PD-1 Jurkat报告细胞活化。此后，制备SteadyGlo荧光素酶试剂并将100μL 等分至每个孔。通过在室温轻轻振荡(200rpm定轨振荡器上)15min 来实现完全裂解。裂解后，使用US96发光方案在Envision多标记读 板器上测量荧光素酶活性。在Graphpad Prism软件中对荧光素酶RLU 相对log[测试试剂]作图，并且使用非线性回归分析、S形剂量应答 曲线的4-参数拟合确定PD-L1拮抗作用的EC_{50}值。

[0467] 结果：

[0468] 使用起点为100nM的五点剂量滴定(PD-L1)，针对 PD-L1/PD-1亲本和NIP228(G4P)对照测试OX40/PD-L1 BiS2/3。OX40-PD-L1 BisAb均示出具有活性并且具有比PD-L1(4736)亲本 更强的激动作用(图37)。BiS2和BiS3形式以类似方式进行。

[0469] CMV Ag回忆测定

[0470] 在CMV Ag回忆测定中(使用上述方案)，BiS2和BiS3 分子展示出相对于组合的等效活性(图38)。

[0471] 上面讨论的所有结合和免疫应答测定提供了说明性数 据，显示了本文披露的双特异性结合分子展现出对两种靶标分子的特 异性结合-在某些情况下比单独的单特异性亲本结合分子(抗体)的 组合具有更高的结合活性，并且可以诱导或增强免疫应答。此外，显 示了分子具有对抗癌细胞系的细胞杀伤活性。因此，数据显示了这些 分子和双特异性平台结构代表了免疫肿瘤学治疗的优异候选者。

[0472] Octet结合测定(OX40(SLR PD-L1 BiS5))

[0473] 为了评价本文披露的双特异性结合分子的结合，使用配 备有Ni-NTA生物传感器尖端和10X动力学缓冲液的Octet QK (ForteBio公司，门洛帕克(Menlo Park)，加利福尼亚州)。对于 该特定系列的双特异性结合蛋白，His标记的PD-L1-Fc、his标记的 PD-1-Fc和hOX40-Fc(人类重组蛋白)购自R&D系统公司(R&D Systems)(明尼阿波利斯，明尼苏达州)。所有结合测定均在25℃ 进行。结合结果显示了BiS5 OX40Ab/PD-L1分子与PD-L1-His和hOX40-Fc二者结合(图39)。

[0474] PD-L1/OX40 BiS5与表达人类或食蟹猴OX40和 PD-L1/B7H1的CHO细胞结合(图40A-F)。还通过流式细胞术 (HyperCyt)测量PD-L1/OX40 BiS5构建体的结合(图42)。OX40 IgG4P和OX40/PD-L1双特异性物(bispecifics)结合Jurkat OX40报 告细胞。PD-L1 IgG和OX40/PD-L1双特异性物结合NCI H358和 CHOK1 B7H1(PD-L1)/OKT3细胞。所有IgG和双特异性物结合HEK CD32a细胞。

[0475] PD-L1和OX40报告物测定

[0476] 在PD-L1报告物测定中(使用上述方案)，所有含有 PD-L1 scFv的双特异性物和阳性对照IgG都展示出活性(图42A-B)。单臂OX40对照和同种型对照在该测定中未展示出任何活性。EC_{50}值 和希尔(hill)斜率与在之前的针对抗PD-L1亲本对照和PD-L1 Bis2、Bis3

和Bis5构建体的测定中获得的值一致。

[0477] 在使用HEK CD32a细胞的OX40报告物测定中,双特 异性构建体彼此具有相等的活性,并且观察到Fc介导的激动作用(图 43A-B)。OX40/PD-L1 Bis5 N434A IgG1对OX40 IgG4P和MEDI0562 (OX40 IgG1)具有相等的EC_{50}活性。

[0478] 在使用过表达CHOK1 PD-L1的细胞的OX40报告基因 测定中,OX40/PD-L1双特异性显示出相等的激动作用(图44A-B)。OX40/PD-L1 Bis5 N434A IgG1与测试的OX40/PD-L1 Bis5双特异性 Mab的其他Fc变体具有相等的EC_{50}活性。未检测到使用OX40 IgG 或PD-L1 IgG的激动作用。因此,证明了PD-L1介导的OX40激动作 用。

[0479] 检测到使用OX40/PD-L1双特异性分子的PD-L1介导的 使用肿瘤细胞的OX40激动作用(图45A-B)。OX40/PD-L1双特异 性分子在该测定中显示了相等的激动作用-钟形曲线。没有观察到使 用OX40 IgG的激动作用,因此证明了比起OX40 IgG加PD-L1 IgG 组合使用双特异性物的益处。未看到使用NCI H358 PD-L1 KO细胞的 激动作用(图46A-D),显示了使用细胞看到的NCI H358激动作用 是PD-L1特异性的。

[0480] 葡萄球菌肠毒素B(SEB)测定

[0481] 在SEB测定中,OX40/PD-L1双特异性分子比对OX40 和PD-L1的单独抗体的组合具有更高的活性(图47A-D)。特别地, G4P构建体具有比G1构建体更高的活性。野生型、含有YTE的变体 和N434A变体具有相等的活性。

[0482] Treg抑制测定

[0483] 进行Treg抑制测定以测试OX40/PD-L1双特异性分子。OX40/PD-L1双特异性分子仅在PD-L1存在下对CD4+Teff具有活性(图49和50)。不被理论所束缚,这表明OX40反式交联。OX40/PD-L1双特异性分子抑制Treg抑制作用,但仅在通过与板固定的PD-L1结合而交联时。

[0484] 混合白细胞反应(MLR)测定

[0485] 进行MLR测定以测试OX40/PD-L1双特异性分子(图 51A-B)。OX40/PD-L1双特异性分子比针对OX40和PD-L1的单独 抗体的组合具有更高的活性(图52A-E)。

[0486] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)测定

[0487] 进行ADCC测定以测试OX40/PD-L1双特异性分子。ADCC测定使用新鲜分离的NK细胞作为效应细胞以及分别过表达 CHOK1 PD-L1 B7H1和CHOK1 OX40的细胞作为靶细胞,其中效应 子与靶标(E:T)的比率为20:1。在5小时后使用从标记的靶标细 胞释放的铕来分析靶标细胞裂解。在ADCC测定中,OX40/PD-L1 BiS2 和BiS5介导对抗表达PD-L1或OX40的CHO细胞的ADCC(图53A-B 和54)。

[0488] CD107a动员测定是使用新鲜分离的NK细胞作为效应 细胞以及过表达PD-L1和OX40的CHO K1作为靶细胞进行的,其中 E:T的比率为10:1。4小时后通过流式细胞术分析CD107a向NK细 胞的细胞表面的动员。BiS2和BiS5 OX40/PD-L1双特异性分子在抗体 依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)中增加对抗表达PD-L1和 OX40的CHO细胞的NK细胞的CD107a动员(图55)。BiS2和BiS5 OX40/PD-L1双特异性分子增加对抗活化的具有上调的OX40和 PD-L1的同种异体T细胞的NK细胞的CD107a动员(图56)。BiS5 OX40/PD-L1增加来自两个不同的对抗活化的同种异体T细胞的供体 的NK细胞的CD107a动员(图57A-B)。

[0489] 药代动力学和药效学(PK/PD)研究

[0490] 设计了一项研究来比较OX40/PD-L1双特异性分子的 PK/PD(图58)。在食蟹猴中比

较PD-L1/OX40双特异性分子的血清 浓度时间曲线(图59和表11)。Bis5 OX40/PD-L1 IgG1 N434A分子 的平均$T_{1/2}$大于WT Bis5分子;与WT Bis5分子相比,Bis5 OX40/PD-L1 IgG1 N434A分子的清除率更低。两种分子以类似方式降低血清中的 可溶PD-L1,并且引起Ki67+总记忆CD4+T细胞、总记忆CD8+T 细胞和NK细胞的百分比的显著增加。

[0491] 表11.BiS5-OX40/PD-L1-G1的药代动力学参数

[0492]

测试品	动物	AUClast (ng*h/mL)	AUCinf (ng*h/mL)	% AUCExtrap (%)	C0 (ng/mL)	Cmax (ng/mL)
BiS5-OX40/PD-L1-G1 N434A	2028	5490000	6840000	19.8	82900	82300
	2033	6530000	10800000	39.7	77700	79100
	2059	6510000	9260000	29.7	94500	89800
	平均值	**6180000**	**8980000**	**29.7**	**85000**	**83700**
	SD	**597000**	**2000000**	**9.91**	**8610**	**5520**
BiS5-OX40/PD-L1-G1 WT	2032	4260000	4530000	6.08	104000	101000
	2047	3670000	3900000	5.84	131000	105000
	2056	4190000	4340000	3.45	74400	74400

[0493]

测试品	动物	Tmax (h)	Cl (mL/min/kg)	Vss (L/kg)	T1/2 (h)	Rsq
	平均值	**4040000**	**4260000**	**5.13**	**103000**	**93300**
	SD	**320000**	**324000**	**1.45**	**28200**	**16500**
BiS5-OX40/PD-L1-G1 N434A	2028	2	0.0122	0.0773	70	0.836
	2033	6	0.0077	0.0842	128	0.873
	2059	2	0.00899	0.0746	97.1	0.933
	平均值	**3.33**	**0.00963**	**0.0787**	**98.3**	**0.881**
	SD	**2.31**	**0.0023**	**0.00496**	**28.9**	**0.049**
BiS5-OX40/PD-L1-G1 WT	2032	2	0.0184	0.0596	37.9	0.952
	2047	2	0.0214	0.0672	44.6	0.987
	2056	2	0.0192	0.0555	34	0.99
	平均值	**2**	**0.0196**	**0.0608**	**38.9**	**0.976**
	SD	**0**	**0.00154**	**0.00593**	**5.35**	**0.0211**

[0494] OX40/PD-L1双特异性分子将血清可溶PD-L1浓度降低 至低于测定LLOQ(图60)。N434A突变改进了BiS5-OX40/PD-L1-G1 的药代动力学。特别地,CL减少了大约一半;T1/2和AUCinf相应增 加2倍;并且Cmax和Vss没有受到影响。这与之前报道的该突变对 单克隆抗体的PK的作用一致。因此,针对BiS5-OX40/PD-L1-G1 IO BisAb的mAb样PK取得了进展。BiS5-OX40/PD-L1-G1 BiSAb的血 清浓度在2周时低于定量限制(BLOQ),并且可能与ADA相关。

[0495] 将PD-L1 OX40 Bis5组与对照(抗PcrV-Psl对照)Ab 组相比,看到总记忆CD4、总记忆CD8、和NK细胞增殖(Ki67+细 胞百分比)显著增加(图61A-F)。看到PD-1LO115和PD-L1 OX40 Bis5组之间在总记忆CD4、总记忆CD8、和NK细胞增殖(Ki67+) 上的显著差异的趋势。PD-L1 OX40 Bis5 N434A(半衰期扩展的)版 本和G1版本之间在增殖上没有统计学上的显著差异。PD-L1 OX40 Bis5 N434A和IgG1版本是具有生物活性的双特异性分子。

[0496] 实例2(e).OX40/PD-1双特异性结合蛋白

[0497] 使用以上表2中鉴定的亲本序列产生以下结合PD-1和 OX40的双特异性结合蛋白。用下表24中的序列产生鉴定为Bis2和 Bis3的蛋白,并使用如下所述的Octet结合测定评估同时的抗原结合 活性。

[0498] 表24.用于OX40/PD-1的BiS构建体

[0499]

说明	序列
PD1 LCv κ	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRH MYWYQQKPGQAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC（SEQ ID NO: 97）
BiS2-PD-1-OX40 HC-4P	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWY QQKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGCGTKVEIKG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQ TLSLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKCLEYIGYIS YNGITYHNPSLKSRITINRDTSKNQYSLQLNSVTPED TAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSA DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARRAPNSFYEYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTEPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK （SEQ ID NO: 95）

[0500]

BiS3-OX40 HC-4P-PD-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMH WVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFY EYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTL TISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGCGTKVEIKGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQT LSLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKCLEYIGYISY NGITYHNPSLKSRITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDT AVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO: 96）

[0501] PD-1/OX40 BiS2单克隆抗体(mAb)是双特异性抗体(图 62;以灰色描绘的PD-1结合蛋白和以浅灰色描绘的OX40结合蛋白)，其被工程化以与人类和食蟹猴PD-1以及人类和食蟹猴OX40并行结 合。不被理论所束缚,提出的作用机制表明在顺式结合OX40和PD-1 二者之后对T细胞的双重信号传导作用,即T细胞共刺激表面受体 OX40的激动作用和免疫抑制性PD-1的阻断(图63)。

[0502] Octet结合测定

[0503] 显示了两个不同批号的PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb 与PD1-His和人类OX40-Fc的并行结合活性(图64)。

[0504] OX40报告物测定

[0505] PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb显示了与其他OX40 激动剂可比较的活性(图65A-B)。将蛋白储存在4℃并立即使用，冷冻/解冻三次,在4℃储存7天并在40℃储存7天。将活性报告为 相对光单位对mAb浓度。在第0天,在4℃,PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb的EC_{50}为约2nM。

[0506] PD-1/PD-L1报告物测定

[0507] PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb显示了与其他PD-1激 动剂可比较的活性(图66A-B)。将蛋白储存在4℃并立即使用,冷 冻/解冻三次,在4℃储存7天并在40℃储存7天。将活性报告为相 对光单位对mAb浓度。在第0天,在4℃,PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb的EC_{50}为约1nM。已经进行了两组原代人类体外效力测定;使 用葡萄球菌肠毒素B(SEB)的抗原-回忆T细胞测定和T细胞共刺 激。

[0508] 葡萄球菌肠毒素B(SEB)测定

[0509] 在SEB测定中,PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb在培 养物中3天后诱导在细胞上清液中检测到的IL-2水平的增加(图67)。因此,PD-1/OX40 BiS2 mAb可以并行结合其人类靶标抗原并且可以 在体外共刺激T细胞。

[0510] 在抗原-回忆测定中,与亲本mAb和亲本mAb的组合相 比,PD-1/OX40 BiS2 mAb促使干扰素(IFN)-γ的水平增加(图68 和69)。

[0511] CMVAg回忆测定

[0512] CMV Ag回忆测定的结果(使用上述方案),BiS2和 BiS3分子没有展示出相对于组合的相等活性(图70)。数据显示了 PD-1/OX40 BiS2 IgG4P mAb在体外和体内均具有活性。PD-1/OX40 BiS3(其结构与PD1/OX40 BiS2不同)不具有可检测的活性。因此, PD-1/OX40 BiS3(无活性的)不同于BiS2(有活性的)。

[0513] 药代动力学和药效学(PK/PD)研究

[0514] 食蟹猴被考虑是药理学相关的非临床物种,用于测试 PD-1/OX40 BiS2 mAb的功能活性。在食蟹猴的非GLP(良好实验室 实践)研究中评估PD-1/OX40 BiS2 mAb的药代动力学(PK)和药效 学(PD)。在剂量范围为0.1mg/kg至30mg/kg的单次静脉内(IV) 给药后,在食蟹猴(n=3;雄性)中评价PD-1(LO115)/OX40 BiS2 mAb PK和PD(Ki67阳性CD4+和CD8+总记忆T细胞百分比)。在 给药前和给药后第1、8、11和15天收集PBMC,低温保存和解冻, 然后通过流式细胞术分析。总之,PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb展 示近似线性的PK,具有0.6-1.7天的短半衰期(图70;表12)。

[0515] 表12.PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb的药代动力学 参数平均值。

[0516]

剂量 (mg/kg)	C_{max} (ug/mL)	AUC_{last} (天数 *μg/mL)	AUC_{INF} (天数 *μg/mL)	CL (mL/天数/kg)	$T_{1/2}$ (天数)	Vss (mL/kg)
0.1	**2.0** (0.5)	**1.6** (0.3)	**1.7** (0.3)	**60.2** (9.0)	**0.6** (0.1)	**47.4** (18.3)
1	**25.1** (3.1)	**24.8** (7.5)	**25.1** (7.3)	**41.8** (10.4)	**0.9** (0.3)	**43.2** (17.4)
10	**211** (19)	**203** (9.2)	**207** (18.0)	**48.6** (4.2)	**1.7** (0.2)	**72.7** (8.8)
30	**607** (83)	**576** (49)	**577** (61)	**52.3** (5.5)	**1.5** (0.2)	**85.6** (4.3)

[0517] 这些值表示为平均值(标准偏差)。AUC_{last}=浓度时间曲线(一 直到最后一次可测量的浓度)下的面积;AUC_{INF}=浓度时间曲线(一 直到无穷时间)下的面积;C_{max}=最大观察浓度;CL:系统清除率; $T_{1/2}$=半衰期;Vss:终末相分布体积;V_{ss}:稳态分布体积。

[0518] 平均峰浓度(C最大)近似地与剂量成比例增加,从以 0.1mg/kg的2.0μg/mL到以30mg/kg的607μg/mL。AUC∞近似地与 剂量成比例增加,从以0.1mg/kg的1.7μg天/mL到以30mg/kg的577 μg天/mL。平均血清清除率范围为从41.8mL/天/kg至60.2mL/天/kg。稳态分布体积范围为从43.2mL/kg至85.6mL/kg。PD结果(图71) 显示了CD4+总记忆T细胞增殖(Ki67)的剂量依赖性增加和CD8+ 总记忆T细胞增殖(Ki67)的增加。显示了用于定量食蟹猴血清中 PD-1/OX40的代表性标准曲线(图72)。

[0519] 实例3.BiSAb构建体的物理和化学稳定性

[0520] 进行一系列实验以评价和评估如本文所述的BiSAb构 建体相对于其他双特异性结合蛋白结构策略和平台的物理和化学稳 定性。特别地,下面讨论的一系列稳定性研究鉴

定和分析了各种pH 范围对BiSAb稳定性(例如,水解、片段化、聚集、热稳定性)的影 响。如数据所显示的,对于各种BiSAb形式的不同说明性实施例,本 文披露的BiSAb(在下面的研究中被鉴定为“BiS5”,并且呈如表13 中所示出的D/H形式)相对于所有其他BiSAb结构基序展现出意想不 到的和令人惊讶的物理和化学稳定性。

[0521] 表13.BiS5稳定性研究构建体

构建体	序列
D IgG：LC10 scFv：2F4 SN-(scFv)-G 氨基酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHDMH WVRQATGKGLEWVSGIGTAGDTYYPDSVKGRFTIS RENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARDRYSPTG HYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESN*GGGGSGGGGS*EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASQSVSSYLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIP ARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYQNWP LLTFGCGTKLEIK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS*EV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYMMQWV RQAPGKiLEWVSSIWPSGGKTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVRRGGATDY WGQGTLVTVSS*GGGGSGGGGSG*QPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSL SLSPGK（SEQ ID NO: 37） V 区用下划线表示，接头用斜体表示。序列如下： LC10VH、CH1、铰链、CH2、CH3(N-末端)、L1-2F4VL-接头-2F4VH-L2、CH3（C-末端）

[0522]

[0523]

H IgG：2F4 scFv：LC10 SN-(scFv)-G 氨基酸	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYMMQ WVRQAPGKGLEWVSSIWPSGGKTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVRRGGA TDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN*GG GGSGGGGS*DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSI SSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCKQYADYWTFGCG TKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHDMHWVRQATGK CLEWVSGIGTAGDTYYPDSVKGRFTISRENAKNSLY LQMNSLRAGDTAVYYCARDRYSPTGHYYGMDVW GQGTTVTVSS*GGGGAGGGGAG*QPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO: 38） V 区用下划线表示，接头用斜体表示。序列如下：2F4VH、CH1、铰链、CH2、CH3（N-末端）、L1-LC10VL-接头-LC10VH-L2、CH3（C-末端）

[0524] 实例3.1

[0525] 在本文披露的BiS形式(“BiS5”)和另一种BiS形式 (其包括在铰链区处连接(即Fc和Fab区之间)的两个结合结构域 (scFv结构域),被鉴定为“BiS4”)之间进行进一步比较。BiS4 和BiS5蛋白在中国仓鼠卵巢(CHO)中表达,并通过常规色谱方法 纯化。如上所指出,这两种形式具有类似的Fab和scFv序列,它们之 间的主要差异是scFv结构域的位置(对于BiS4,scFv位于铰链区; 对于该特定BiS5,scFv位于C_H3结构域中的SNG环中,如本文所讨论的)。将纯化的BiS分子在PBS缓冲液中提供,并使用NanoDrop ND-1000(赛默飞世尔公司(Thermo Scientific),威尔明顿,特拉华 州)使用1.54$M^{-1}cm^{-1}$的消光系数确定蛋白浓度。

[0526] pH筛选和短期稳定性研究

[0527] 对于pH筛选研究,将BiS4和BiS5抗体浓缩至约12 mg/mL并针对6种不同的pH条件、20mM琥珀酸钠(pH 5.0)、组 氨酸/组氨酸HCl(pH 5.5、6.0、和6.5)、和磷酸钠(pH 7.0和7.5) (均含有240mM蔗糖)透析。通过使用Slide-A-Lyzer透析盒(10kDa 分子量截留(MWCO),赛默飞世尔公司(Thermo Scientific),罗 克福德,伊利诺伊州)进行透析。透析完成后,掺入0.02％聚山梨醇 酯80,并将蛋白的最终浓度调节为约10mg/mL。使用0.22μm过滤器(密理博公司(Millipore),比尔里卡,马萨诸塞州)在预消毒的 层流洁净工作台中对BiS4和BiS5配制品进行灭菌。将1毫升等分试 样分配到3mL的I型硼硅酸盐玻璃小瓶(西部

药物服务公司(West Pharmaceutical Services),艾克斯顿,宾夕法尼亚州)中。将样品储存在40℃并在时间零时并在储存1、2、3、和4周后通过SEC进行 分析。

[0528] 差示扫描量热法(DSC)

[0529] 使用连接到温度调节的自动取样器(马尔文仪器有限公 司(Malvern Instruments Ltd.),斯特伯鲁,马萨诸塞州)的VP-Capillary DSC获得时间零样品的差示扫描量热法热谱图。为了获得热谱图,在 20℃-100℃的温度范围内使用1mg/mL的蛋白浓度以及90℃/h的扫 描速率。从在范围为从5.0至7.5的不同pH条件下的BiS4和BiS5的 热谱图中减去缓冲液并进行基线校正。使用Origin7 SR4软件包的 DSC插件进行数据分析。将实验结果拟合到具有三个转变的多态模型 以计算熔化温度(T_m)值。将第一次热转变的热容量(C_p)值达到500 cal $mol^{-1}℃^{-1}$的点视为起始温度($T_{起始}$)。

[0530] 高效尺寸排阻色谱(HP-SEC)

[0531] 为了基于尺寸从单体中分离聚集体和片段种类,使用安 捷伦(Agilent)高效液相色谱系统分析稳定性样品,该系统具有能够 记录200nm-400nm紫外吸收度光谱的光电二极管阵列检测器,该检 测器具有7.8×30cm^2、5μm、250Å、Tosho TSKgel G3000SWxl(东 曹生物科学公司(TOSOH Biosciences),普鲁士王,宾夕法尼亚州) 和相应的保护柱。为了分离这些种类,使用含有0.1M无水磷酸氢二 钠、0.1M硫酸钠、0.01%叠氮化钠的流动相,pH 6.8和1mL min^{-1}的 流速。注射的蛋白量约为250μg。使用280nm的吸收度光谱监测BiS4 和BiS5的分离。定量可溶的聚集体(多聚体和二聚体)、单体、和 片段的峰面积。然后,计算每个种类的百分比并针对孵育时间绘图以 制作动力学图。通过计算每个动力学图的斜率来建立每月单体损失、片段化和聚集的pH曲线。

[0532] BiS4和BiS5的热稳定性

[0533] 通过分析通过使用毛细管DSC获得的热谱图评价pH对 BiS4和BiS5的热稳定性的影响,并且该影响在六种不同的pH条件 下产生。图74A和74B分别显示了从pH 5.0到7.5的BiS4和BiS5 的DSC热谱图的叠加。如图73示出的,每个热谱图显示了具有转变 温度T_m1、T_m2、和T_m3的三个热解折叠事件。第一个转变(T_m1)可 能与C_H2和scFv结构域的同时解折叠相关,而第二个(T_m2)和第三 个(T_m3)转变与CH3和F_{ab}结构域的解折叠相关。对于这两种形式, 观察到随着pH增加至6.5,$T_{起始}$、T_m1、T_m2和T_m3增加(图73A、 73B、73E和下表14)。对于BiS4和BiS5,在所有pH条件下$T_{起始}$、 T_m2、和T_m3均未观察到差异(图73E和表15),这表明在铰链区或 C_H3结构域中scFv的存在不影响C_H3和F_{ab}的热稳定性。有趣的是, 在所有pH条件下观察到BiS5的T_m1略微增加,这表明当scFv位于 C_H3结构域中时scFv、C_H2、或两者的热稳定性增加。

[0534] 表14:通过毛细管DSC测量的pH对BiS4和BiS5的热起始温 度($T_{起始}$)和热熔化温度(T_m1、T_m2、和T_m3)的影响。

[0535]

	BiS4				BiS5			
pH	$T_{起始}$	T_m1	T_m2	T_m3	$T_{起始}$	T_m1	Tm2	Tm3
5.0	56.3	67.8	81.9	84.1	55.9	69.5	81.8	83.9

[0536]

5.5	56.8	67.8	81.6	83.8	57.0	69.4	81.7	83.7
6.0	59.3	69.3	83.1	85.3	59.4	70.7	83.1	85.2
6.5	60.6	70.3	83.8	86.0	60.6	71.6	83.8	85.9
7.0	60.6	70.2	82.2	84.7	59.9	71.2	81.5	84.3
7.5	60.3	70.0	81.5	84.2	59.6	71.0	81.0	83.9

[0537] BiS4和BiS5的物理和化学稳定性

[0538] 在40℃评价BiS4和BiS5形式在不同pH值(范围从 5.0至7.5)下的物理和化学稳定性,持续长达4周。将在“时间零” 时的HP-SEC色谱图用于比较其他时间点的HP-SEC色谱图的总面积、单体、聚集体、和片段含量。与4周相比,pH 7.5、时间零时的BiS4 和BiS5的代表性色谱图示出于

[0539] 图74A.所有样品主要含有具有低水平可溶聚集体和有或没有片 段的单体。在时间零(实线),大部分样品是单体,没有其他显著差 异,除了两个样品之间的峰高度的小差异可能是由于浓度的略微差异 (图74A)。虚线显示了在40℃储存4周后,在相同pH条件下两种 形式的HP-SEC色谱图的叠加。在加速温度应激条件下,两种形式都 显示出另外的峰、早期洗脱峰(多聚体种类)、单体减少、和片段水 平升高(图74A)。与BiS5相比,由于片段化导致的单体损失在BiS4 中更突出,表明BiS5在化学上更稳定。根据它们的结构、可能的片 段化位点、和保留时间,我们推测小片段峰(RT约10.8min)是Fab, 以及大片段峰(RT约9.8min)和肩峰(RT约8.7min)是具有scFv 的Fab及其相应的分别具有Fab、scFv、和Fc的较高分子量片段 (HMWF)。

[0540] 为了更好地评价scFv位置对BiS4和BiS5的物理和化学 稳定性的影响,将每个种类的总面积百分比针对时间零和4周、在 40℃、针对pH 7.5绘制成条形图(图74B)。如图74B所示,在时间 零,BiS4和BiS5的单体纯度类似。在40℃孵育长达4周的样品显示 了形成的片段的类型和程度的显著差异。对于BiS4样品,分别形成 11.8%、7.2%、和3.5%的肩峰(RT约8.7min)、大片段(RT约9.8min) 和小片段(RT约10.8min)(图74B)。令人惊讶的是,BiS5样品 仅显示了1.4%的小片段(RT约10.8min),这可能是由于将scFv从 结构域两侧束缚至Fc(图89)。

[0541] 图75A-75C显示了在40℃孵育pH 7.5样品时BiS4和 BiS5的聚集、片段化和单体损失的动力学。与BiS5相比,BiS4样品 显示了更快速的单体损失速率(图75A)。在pH 7.5,BiS4和BiS5 的单体损失速率分别为27.4%/月和4.5%/月(图75A)。对于BiS4, 大部分单体损失是由于23.9%/月的片段化和在较小程度上是由于 3.5%/月的聚集(图75B和75C)。有趣的是,对于BiS5,与片段化 速率(1.7%/月)相比,聚集速率似乎略高(2.8%/月)(图75B-75C)。

[0542] 通过将以下值针对6个pH条件作图来进行pH对BiS4 和BiS5形式的物理和化学稳定性,每月单体损失、片段化和聚集的 速率的影响的进一步分析(图76A-76C)。贯穿pH范围为5.0-7.5的 所有六个pH条件,与BiS4相比,BiS5形式的单体损失速率更低(图 76A),这表明本文披露的BiS5形式具有意想不到的优越于其他双特 异性蛋白形式的物理和化学稳定性。对于BiS4,大多数单体降解是由 于即使在较低pH条件下也会片段化(图76B)。在所有测试的pH条 件下,BiS5与BiS4相比显示了更低的片段化速率。令人惊讶的是, 与BiS4相比,BiS5中的片段化速率似乎不变且在更广泛pH范围内 变低。不被任何特定理论所束缚,可能

是BiS5中观察到的较低片段 化速率可能由在将其连接至Fc的scFv的任一末端上的G4S接头引起。连接到Fc的G_4S接头之一上的片段化可能不会释放scFv,因为它可 能仍然经由另一个G_4S接头与Fc连接。在BiS4和BiS5中,贯穿所 有测试的pH条件,聚集速率似乎类似(图76C),表明scFv的位置 对聚集动力学的作用最小,这也得到以下事实的支持:没有观察到如 使用毛细管DSC测量的在所有pH条件下两种形式之间的$T_{起始}$发生变 化(图73E和表14,如上所讨论)。在pH 7.5和40℃(时间=0) 时,两种分子均未展现出可感知的片段化(图77A),但在相同条件 下,在40℃储存2周后,观察到BiS4可感知的片段化和BiS5的最 小片段化(图77B)。BiS4和BiS5在较低(5.5)pH下均具有减少的 片段化和聚集,而BiS5在两种pH值下均具有更优异的片段化和聚集 性能(图78)。该系列实验证明,本文披露的BiS5具有比BiS4更优 异的化学稳定性和与其类似的物理稳定性。

[0543] 实例3.2

[0544] 进行另外的研究以评价在本文中披露的双特异性结合 蛋白的不同实施例的物理和化学稳定性,并鉴定为构建体A-H(参见, 例如,上表13和相关实例)。使用如下DSC、加速储存稳定性以及 FcRn和FcgR结合测定分析这些构建体。

[0545] 差示扫描量热分析

[0546] 使用Microcal VP-DSC扫描微量热计(微量热公司 (Microcal))进行该数据组的DSC实验。在装载到该热量计中之前, 使用0.22μm过滤器过滤并脱气用于DSC的所有溶液和样品。用于 DSC研究的抗体中>98%是单体的,如通过分析型SEC所确定的。 在DSC分析之前,在25mM组氨酸HCl(pH 6.0)中彻底透析(至 少3次缓冲液交换)所有样品。将来自这次透析的缓冲液用作参考缓 冲液以用于随后的DSC实验。在样品测量之前,将基线测量值(缓冲液对缓冲液)从样品测量值中减去。将透析的样品(浓度为1mg/ml) 添加至样品孔(sample well)中并且以1℃/min的扫描速率进行DSC 测量。使用微量热公司所提供的Origin™ DSC软件进行数据分析和去 卷积。使用非2状态模型进行去卷积分析并且使用100个迭代循环来 获得最佳拟合。$T_{起始}$定义为热谱图看起来具有非零斜率时的定性温度, T_m定义为一组中一半分子解折叠时的温度,并计算为对应于热谱图上 每个峰最大值的温度值。

[0547] 不同构建体的结果如图79所示。一般地,与包括LC10 作为scFv的构建体E、G、H相比,包括2F4作为scFv的构建体A、 C、D具有更低的T_MI。不被理论所束缚,T_MI值的差异可能是由于 LC10 scFv结构域相对于2F4可变结构域具有固有地更好的热稳定性。数据表明,具有2F4作为scFv的构建体A-D比具有LC10作为scFv 的构建体E-H的热稳定性低。

[0548] 加速存储稳定性分析

[0549] 将构建体的浓度归一化至1mg/mL。将1mL每种双特 异性构建体或IgG对照等分到1.5ml Eppendorf试管中。将样品在静 态孵育箱中在45℃孵育2周。在第3天、第7天、和第14天分析样 品并评估稳定性。在每个时间点,进行视觉检查以记录任何增加的浊 度或沉淀。使用0.2μm旋转柱过滤样品,并将120μl样品等分到HPLC 小瓶中,确保小瓶底部没有气泡。然后在安捷伦(Agilent)1100系列 HPLC-SEC上测试样品以使用TSK-GEL $G3000SW_{XL}$ (300x7.8mm) 东曹生物科技有限公司(Tosoh Bioscience)柱检测聚集和降解,该柱 具有0.1M磷酸钠、0.1M硫酸钠(pH 6.8)作为运行缓冲液,注射 60μL的样品并以1mL/min的流速运行。捕获单体保留时间(min)、 总峰面积、单体%、聚集体%、片段%、单体损失%并用于分析型SEC 分析。结果总结于表15中。

[0550] 表15:加速的稳定性研究。

[0551]

构建体	Tm1 (°C)	单体%(第0天)	单体%(第0天)	聚集%(第0天)	聚集%(第7天)	降解%(第0天)	降解%(第7天)
A	57.11	97.1	**68.4**	2.2	**30.0**	.64	1.7
C	59.01	80.4	**79.7**	9.7	**20.4**	0.0	0.0
D	58.82	92.2	90.8	7.2	8.6	0.5	0.6
E	65.83	91.3	91.2	1.7	0.0	7.0	8.2
G	68.7	99.3	99.1	0.0	0.0	0.7	0.9
H	67.5	99.4	99.2	0.0	0.0	0.6	0.8

[0552] 如本文所述,scFv结构域在上述构建体中的位置如下 (其中“-”表示scFv):A和E在IS-RTP处、B和F在AK-GQP处、 C和G在S-NG处、以及D和H在SN-G处。各种T_M值与以下结构域相关,T_M1=CH2/scFv;T_M2=Fab;T_M3=CH3。数据倾向于显示, 具有插入到ISRTP(A)和SNG(C)环中的2F4 scFv的构建体A和 C比具有在相同位置处插入LC10 scfv的构建体E和G更易于聚集。该观察结果表明scFv结构域的序列同一性和行为可能对双特异性结 合蛋白构建体的稳定性有影响。此外,从上述可以预测,含有2F4 scFv 的构建体D具有与A和C类似的较低稳定性;然而,似乎将2F4 scFv 插入SNG环可稳定该分子并降低形成聚集体的倾向。总之,这种加 速稳定性研究表明,scFv序列和在Fc区内的位置可以在BiSAb构建 体的稳定性中起重大作用。

[0553] FcRn和FcγR结合分析

[0554] 使用BIAcore 3000仪器(BIAcore)进行结合实验。为 了捕获抗体,将1000RU IsdH(Fab)抗原固定在CM5芯片上。使100 nM的BiSAb构建体或mAb对照以20μL/min流动5min以捕获抗体。使5μM huFcRn或FcγR I、IIa、IIb、IIIa-158V或IIIA158F以5μL/min 流动20min。在PBS+5μM EDTA中在pH 6.0下进行FcRn结合,而 在PBS+5μM EDTA中在pH 7.4下进行FcRn结合。

[0555] 评价构建体A、C、D、E、G和H的FcRn结合。对于 双特异性构建体E和H中的每种,以及对于与FcRn结合的2F4 IgG, 代表性数据显示于图80中。具有CH2-CH3界面下游的scFv的构建 体似乎保留了FcRn结合(例如D&H构建体)。具有位于CH2-CH3 界面上游的ISRTP环内的scFv的构建体似乎去除了可检测的FcRn结 合(例如,A&E构建体)。ISRTP环在Fc中的已知的半衰期扩展的 YTE突变(M252Y/S254T/T256E)区内,已知这些突变对FcRn结合 是重要的。

[0556] 测试构建体A、C、D、E、G、和H与FcγRI、FcγRIIa、 FcγRIIb、FcγRIIIa-158F、和FcγRIIIa-158V的结合。对于与 Fc7RIIIa-158V结合的构建体E、G、和H,代表性数据示出于图81 中。所有测试的构建体保留与FcγR的结合,虽然具有不同的亲和力 (图81,插图)。表16显示了观察到的各种构建体与FcγR的结合趋 势。

[0557] 表16:FcγR结合趋势。

[0558]

FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIIa158F	FcγRIIIa158V
D>C>A	D>C>A	D>C>A	D>C>A	D>C>A
H>G>E	H>G>E	H>G>E	H>G>E	H>G>E

[0559] 在与具有scFv插入CH2-CH3界面上游的ISRTP环中的 构建体(A和E)结合的FcγR中观察到的差异,当与其他具有scFv 插入CH2-CH3界面下游的SNG环中的构建体(C、D、G、和H)相 比时,显示了一致的降低的FcγR结合。

[0560] 通过向Fc区引入半衰期扩展环(N3),尝试评价构建 体A和E中的FcRn结合是否可以改进或恢复。图82是代表数据, 并且显示了对于E构建体,BiS5Ab E和具有引入的N3环的构建体E (BiS5Ab E+N3)都不能结合FcRn。此外,将LC10 scFv插入N3 环(N3 scFv)并保持ISRTP环完整,也将FcRn结合降低至低于可检 测水平。这些数据表明,至少对于E构建体(如果不是对于本文披露 的每种构建体),ISRTP环和N3环(如果存在的话)都需要是完整 的和未修饰的以保留FcRn结合。

[0561] 实例3.3

[0562] 除了BiS4与本文披露的双特异性结合构建体(BiS5) 之间的比较之外,进行了一项研究以评价三种其他BiS结构基序平台 (被鉴定为BiS1、BiS2、和BiS3)(参见图83)。如将参考图83所 理解的,这些平台在这些结合结构域中之一的位置方面有所不同(如 scFv结构域所阐明的)。在五个基序中,仅BiS4和BiS5包括两个接 头部分作为与较大蛋白附接的点,其他(BiS1、BiS2、和BiS3)通过 单个接头附接。

[0563] 简言之,使用以上实例3.1和3.2中讨论的技术分析每 种构建体的代表性分子的稳定性。将每种构建体的样品添加至pH 5.0、 5.5、6.0、6.5、7.0、和7.5的缓冲液中,并在40℃储存两个月的时间 段。然后使用HP-SEC分析样品的片段化速率(图84)、聚集速率(图85)、和单体损失速率(图86)。在这些条件下,分析表明本文披露 的双特异性结合蛋白形式(“BiS5”;和呈如上表13中所示的D/H 形式)在所有pH条件下相对于所有其他形式具有更优异的物理和化 学稳定性。

[0564] SEC数据还用于将各种峰映射到BiS分子的相应片段 (图87)。该映射基于以下假设,包括:在这些分子的铰链和连接区 中发生片段化、片段的尺寸、理论的片段化、以及预期的片段种如何 与呈其他形式的观察到的片段种类比对。虽然呈每种形式的较低分子 量片段(LMWF)之间存在良好的分辨率,但在呈所有形式的单体和 较高分子量片段(HMWF)之间也存在差的或没有分辨率。基于表17 中的信息得出结论,相比单克隆抗体,HP-SEC技术更大程度地低估 了呈BiS形式的片段化。如下所讨论地开发了一种交替分析。

[0565] 表17:片段化分析-SEC低估了BiS形式的片段化速率。

种类	分子量（kDa）	RT*（min）	40°C 的每月片段化%（2 个月）				
			BiS1	BiS2	BiS3	BiS4	BiS5
BiSAb 单体[1]	*200*	7.9	*3.4*	*3.4*	*0.8*	*6.2*	*0.5*
2Fab + 1scFv + Fc[2]	175	7.9	x（k_2）	x（k_2）	x（k_2）		
1Fab + 2scFv + Fc[2]	150	7.9			x（k_1）	x（k_2'）	x（k_1）
1Fab + 1scFv + Fc[3]	125	8.7	1.7（k_1）	0.8（k_1）	-	3.4（k_1'）	-
1Fab + 1scFv	75	9.7	0.9（k_1）	1.0（k_1）	-	1.5（k_1'）	-
1Fab	50	10.6	-	-	0.4（k_1）	1.2（k_2'）	0.5（k_1）
1scFv	25	11.0	0.8（k_2）	0.6（k_2）	0.4（k_2）	-	-

[0566]

[0567] *保留时间

[0568] [1]单体损失仅包括由于片段化导致的损失，并且不包括聚集。

[0569] [2]由于HMWF与单体的共洗脱，可能低估了速率。

[0570] [3]由于下降整合，肩峰的速率可能会变化。

[0571] 为了使用摩尔消光系数计算HMWF的片段化速率，基 于以下假设开发交替分析：(i)在降解期间，如果检测到小片段，那么 还应该存在相应的大片段；(ii)在稳定性研究期间，二次片段化(片 段的片段)不会显著发生；和(iii)片段化发生在接头区和/或铰链区中。片段化速率基于以下关系确定：

[0572] 单体＝LMWF+HMWF

[0573] k_t k_{LMWF} k_{HMWF}

[0574] mEC_m mEC_{LMWF} mEC_{HMWF}

[0575] $$k_{HMWF} = \frac{k_{LMWF}}{mEC_{LMWF}} \times mEC_{HMWF}$$

[0576] 表18：推断的片段化分析。

[0577]

种类	分子量（kDa）	RT（min）	40°C 的每月片段化%（2 个月）				
			BiS1	BiS2	BiS3	BiS4	BiS5
BiSAb 单体[1]	*200*	*7.9*	*3.4*	*3.4*	*0.8*	*6.2*	*0.5*
2Fab +1scFv + Fc[2]	175	7.9	3.6 (k_2)	2.7 (k_2)	1.9 (k_2)		
1Fab + 2scFv + Fc[2]	150	7.9			1.6 (k_1)	4.7 (k_2')	1.8 (k_1)
1Fab + 1scFv + Fc[3]	125	8.7	1.4 (k_1)	1.6 (k_1)	-	2.5 (k_1')	-
1Fab + 1scFv	75	9.7	0.9 (k_1)	1.0 (k_1)	-	1.5 (k_1')	-
1Fab	50	10.6	-	-	0.4 (k_1)	1.2 (k_2')	0.5 (k_1)
1scFv	25	11.0	0.8 (k_2)	0.6 (k_2)	0.4 (k_2)	-	-
总 k_1（铰链）			2.3	2.6	2.0	4.0	2.3
总 k_2（G_4S 接头）			4.4	3.3	2.3	5.9	-
总（$k = k_1 + k_2$）			**6.7**	**5.9**	**4.3**	**9.9**	**2.3**

[0578] [1]单体损失仅包括由于片段化导致的损失，并且不包括聚集。

[0579] [2]由于HMWF与单体的共洗脱，可能低估了速率。

[0580] [3]由于未完全分辨的峰的整合，肩峰的速率可能变化。

[0581] 另外，在还原条件下用构建体进行片段化速率分析，以 鉴定二硫键的形成是否对片段化和稳定性有影响。该测定的代表性数 据表示在(图86)中。在还原条件下，除BiS1外，针对所有BiS格 式都可观察到更高的片段化速率(表19)。得出的结论是，在还原条 件下较高的片段化速率证实了BiS5构建体中的scFv部分被束缚至 CH3区(图89)。

[0582] 表19：片段化分析-还原条件。

[0583]

种类	分子量（kDa）	RT（min）	40°C 的每月片段化%（2 个月）（SEC/Red-GXII）				
			BiS1	BiS2	BiS3	BiS4	BiS5
BiSAb 单体[1]	*200*	*7.9*	*3A/2.3*	*3A/3.9*	*0.8/3.3*	*62/8.8*	*0.5/6.1*
2Fab + 1scFv + Fc^2 1Fab + 2scFv + Fc^2	175 150	7.9 7.9	x (k_2)	x (k_2)	x (k_2) x (k_1)	x (k_2')	x (k_1)
1Fab + 1scFv + Fc^3	125	8.7	1.7 (k_1)	0.8 (k_1)	-	3.4 (k_1')	-
1Fab +1scFv	75	9.7	0.9 (k_1)	1.0 (k_1)	-	1.5 (k_1')	-
1Fab	50	10.6	-	-	0.4 (k_1)	1.2 (k_2')	0.5 (k_1)
1scFv	25	11.0	0.8 (k_2)	0.6 (k_2)	0.4 (k_2)	-	-

[0584] 表20:片段化分析概况。

[0585]

分析方法	40°C 的每月片段化%（2 个月）				
	BiS1	BiS2	BiS3	BiS4	BiS5
标准 HPSEC	3.4	3.4	0.8	6.4	0.5
标准 HPSEC 的交替分析	6.7	5.9	4.3	9.9	2.3
非还原 GXII	3.0	2.7	2.0	6.4	1.2

[0586]

还原 GXII	2.3	3.9	3.3	8.8	6.1
G4S 接头/分子的总数	4	4	4	6	6

[0587] 进一步研究了以上披露的稳定化二硫键的特征。结果显 示在下表23和24中。在具有和不具有scFv中的稳定化二硫键的BiS4 和BiS5(插入SN-G环的scFv)形式中产生对应于两种不同特异性的 双特异性抗体。加速稳定性研究表明,没有稳定化二硫键的BiS4构 建体由于降解(其通过引入稳定化VL-VH二硫键来防止)而具有大 量的单体损失。这些结果表明,去除BiS5构建体中scFv中的稳定化 二硫键对其稳定性没有显著作用。

[0588] 表21

[0589]

抗 EGFR IgG/抗 Her2 scFv	T_M1 (°C)	单体% 第 0 天	单体% 第 14 天	聚集% 第 0 天	聚集% 第 14 天	降解% 第 0 天	降解% 第 14 天
具有 DSB 的 BiS5	71.17	100	100	0.0	0.0	0.0	0.0
不具有 DSB 的 BiS5	69.83	95.1	97.0	4.9	3.0	0.0	0.0
具有 DSB 的 BiS4	72.28	100	984	0.0	0.0	0.0	1.6
不具有 DSB 的 BiS4	69.34	95.7	[illegible]	4.3	2.3	0.0	[illegible]

[0590] 表22

[0591]

D-LC10 IgG/2F4 scFv	T_M1 (°C)	单体% 第 0 天	单体% 第 14 天	聚集% 第 0 天	聚集% 第 14 天	降解% 第 0 天	降解% 第 14 天
具有 DSB 的 BiS5	58.82	92.2	89.6	7.2	9.7	0.5	0.7
不具有 DSB 的 BiS5	54.22	92.4	86.1	4.4	10.1	3.0	3.9

[0592]

具有 DSB 的 BiS4	66.74	99.0	98.2	1.0	0.0	0.0	1.9
不具有 DSB 的 BiS4	56.10	97.7	83.3	2.0	7.7	0.3	[illegible]

[0593] 基于所有上述数据，似乎本文披露的双特异性结合蛋白 形式是所有测试形式中最稳定的。此外，就最小化片段化和聚集二者 而言，BiSAb5在测试的较低pH值(例如，5.0、5.5、和6.0)下似乎 最稳定。因此，本文披露的BisAb的意想不到且令人惊讶的稳定性特 征相对于用于工程化双特异性结合分子的其他结构平台和形式提供 了另外的优点。

[0594] 通过引用并入

[0595] 在此提及的所有公开物和专利特此以其全文通过引用 而结合，如同每个单独的出版物或专利被明确且单独地表明通过引用 而结合。

[0596] 虽然已经讨论了本披露的特定方面，但上述说明是说明 性而非限制性的。通过回顾此说明书和以下权利要求，本披露的多种 变体对于本领域的技术人员而言将变得明显。应通过参考权利要求、连同它们的等效物的全部范围、以及说明书、连同这类变体，确定本披露的全部范围。

[0001] 序列表

[0002] <110> 免疫医疗有限公司(MedImmune, LLC)

[0003] <120> 双特异性结合蛋白及其用途

[0004] <130> IOBS-100

[0005] <150> 62/332,788

[0006] <151> 2016-05-06

[0007] <160> 97

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 711

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工序列

[0013] <220>

[0014] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[0015] <400> 1

[0016] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0017] 1 5 10 15

[0018] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr

[0019] 20 25 30

[0020] Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0021] 35 40 45

[0022] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0023] 50 55 60

[0024] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0025] 65 70 75 80

[0026] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe

[0027] 85 90 95

[0028] Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

[0029] 100 105 110

[0030] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

[0031] 115 120 125

[0032] Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser

[0033] 130 135 140

[0034] Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

[0035] 145 150 155 160

[0036] Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala

[0037] 165 170 175

[0038] Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

[0039] 180 185 190

[0040] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

[0041] 195 200 205

[0042] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0043] 210 215 220
[0044] Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
[0045] 225 230 235 240
[0046] Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
[0047] 245 250 255
[0048] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
[0049] 260 265 270
[0050] Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
[0051] 275 280 285
[0052] Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
[0053] 290 295 300
[0054] Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile
[0055] 305 310 315 320
[0056] Tyr Ser Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
[0057] 325 330 335
[0058] Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
[0059] 340 345 350
[0060] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu
[0061] 355 360 365
[0062] Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0063] 370 375 380
[0064] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
[0065] 385 390 395 400
[0066] Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[0067] 405 410 415
[0068] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[0069] 420 425 430
[0070] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[0071] 435 440 445
[0072] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
[0073] 450 455 460
[0074] Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[0075] 465 470 475 480
[0076] Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[0077] 485 490 495
[0078] Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[0079] 500 505 510
[0080] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[0081] 515 520 525
[0082] Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[0083] 530 535 540

[0084] Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
[0085] 545 550 555 560
[0086] Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[0087] 565 570 575
[0088] Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
[0089] 580 585 590
[0090] Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[0091] 595 600 605
[0092] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
[0093] 610 615 620
[0094] Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[0095] 625 630 635 640
[0096] Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[0097] 645 650 655
[0098] Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0099] 660 665 670
[0100] Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
[0101] 675 680 685
[0102] Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0103] 690 695 700
[0104] Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0105] 705 710
[0106] <210> 2
[0107] <211> 219
[0108] <212> PRT
[0109] <213> 人工序列
[0110] <220>
[0111] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[0112] <400> 2
[0113] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0114] 1 5 10 15
[0115] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
[0116] 20 25 30
[0117] Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
[0118] 35 40 45
[0119] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
[0120] 50 55 60
[0121] Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
[0122] 65 70 75 80
[0123] Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
[0124] 85 90 95
[0125] Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0126] 100 105 110

[0127] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

[0128] 115 120 125

[0129] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

[0130] 130 135 140

[0131] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

[0132] 145 150 155 160

[0133] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

[0134] 165 170 175

[0135] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

[0136] 180 185 190

[0137] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

[0138] 195 200 205

[0139] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0140] 210 215

[0141] <210> 3

[0142] <211> 711

[0143] <212> PRT

[0144] <213> 人工序列

[0145] <220>

[0146] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[0147] <400> 3

[0148] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0149] 1 5 10 15

[0150] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

[0151] 20 25 30

[0152] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0153] 35 40 45

[0154] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val

[0155] 50 55 60

[0156] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

[0157] 65 70 75 80

[0158] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0159] 85 90 95

[0160] Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp

[0161] 100 105 110

[0162] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

[0163] 115 120 125

[0164] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

[0165] 130 135 140

[0166] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

[0167] 145 150 155 160

[0168] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[0169] 165 170 175
[0170] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[0171] 180 185 190
[0172] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
[0173] 195 200 205
[0174] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
[0175] 210 215 220
[0176] Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
[0177] 225 230 235 240
[0178] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[0179] 245 250 255
[0180] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
[0181] 260 265 270
[0182] Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[0183] 275 280 285
[0184] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[0185] 290 295 300
[0186] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[0187] 305 310 315 320
[0188] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
[0189] 325 330 335
[0190] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[0191] 340 345 350
[0192] Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[0193] 355 360 365
[0194] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[0195] 370 375 380
[0196] Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[0197] 385 390 395 400
[0198] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
[0199] 405 410 415
[0200] Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[0201] 420 425 430
[0202] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[0203] 435 440 445
[0204] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
[0205] 450 455 460
[0206] Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
[0207] 465 470 475 480
[0208] Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln
[0209] 485 490 495

[0210] Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser
[0211] 500 505 510
[0212] Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
[0213] 515 520 525
[0214] Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
[0215] 530 535 540
[0216] Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly
[0217] 545 550 555 560
[0218] Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0219] 565 570 575
[0220] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
[0221] 580 585 590
[0222] Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
[0223] 595 600 605
[0224] Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg
[0225] 610 615 620
[0226] Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp
[0227] 625 630 635 640
[0228] Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
[0229] 645 650 655
[0230] Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
[0231] 660 665 670
[0232] Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly
[0233] 675 680 685
[0234] Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
[0235] 690 695 700
[0236] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0237] 705 710
[0238] <210> 4
[0239] <211> 213
[0240] <212> PRT
[0241] <213> 人工序列
[0242] <220>
[0243] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[0244] <400> 4
[0245] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0246] 1 5 10 15
[0247] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr
[0248] 20 25 30
[0249] Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0250] 35 40 45
[0251] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0252] 50 55 60

[0253] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0254] 65 70 75 80

[0255] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe

[0256] 85 90 95

[0257] Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gln Pro Lys Ala

[0258] 100 105 110

[0259] Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Cys Ser Glu Glu Leu Gln Ala

[0260] 115 120 125

[0261] Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala

[0262] 130 135 140

[0263] Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val

[0264] 145 150 155 160

[0265] Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser

[0266] 165 170 175

[0267] Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr

[0268] 180 185 190

[0269] Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala

[0270] 195 200 205

[0271] Pro Thr Glu Val Ser

[0272] 210

[0273] <210> 5

[0274] <211> 721

[0275] <212> PRT

[0276] <213> 人工序列

[0277] <220>

[0278] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[0279] <400> 5

[0280] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0281] 1 5 10 15

[0282] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

[0283] 20 25 30

[0284] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0285] 35 40 45

[0286] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val

[0287] 50 55 60

[0288] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

[0289] 65 70 75 80

[0290] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0291] 85 90 95

[0292] Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp

[0293] 100 105 110

[0294] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[0295] 115 120 125
[0296] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
[0297] 130 135 140
[0298] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[0299] 145 150 155 160
[0300] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[0301] 165 170 175
[0302] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[0303] 180 185 190
[0304] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
[0305] 195 200 205
[0306] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
[0307] 210 215 220
[0308] Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
[0309] 225 230 235 240
[0310] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[0311] 245 250 255
[0312] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
[0313] 260 265 270
[0314] Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[0315] 275 280 285
[0316] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[0317] 290 295 300
[0318] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[0319] 305 310 315 320
[0320] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
[0321] 325 330 335
[0322] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[0323] 340 345 350
[0324] Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[0325] 355 360 365
[0326] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[0327] 370 375 380
[0328] Ser Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
[0329] 385 390 395 400
[0330] Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
[0331] 405 410 415
[0332] Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr
[0333] 420 425 430
[0334] Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser
[0335] 435 440 445

[0336] Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[0337] 450 455 460
[0338] Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
[0339] 465 470 475 480
[0340] Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Cys
[0341] 485 490 495
[0342] Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[0343] 500 505 510
[0344] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val
[0345] 515 520 525
[0346] Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser
[0347] 530 535 540
[0348] Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val
[0349] 545 550 555 560
[0350] Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr
[0351] 565 570 575
[0352] Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
[0353] 580 585 590
[0354] Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
[0355] 595 600 605
[0356] Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg
[0357] 610 615 620
[0358] Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
[0359] 625 630 635 640
[0360] Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[0361] 645 650 655
[0362] Gly Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[0363] 660 665 670
[0364] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
[0365] 675 680 685
[0366] Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[0367] 690 695 700
[0368] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[0369] 705 710 715 720
[0370] Lys
[0371] <210> 6
[0372] <211> 219
[0373] <212> PRT
[0374] <213> 人工序列
[0375] <220>
[0376] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[0377] <400> 6

[0378] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0379] 1 5 10 15
[0380] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
[0381] 20 25 30
[0382] Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
[0383] 35 40 45
[0384] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
[0385] 50 55 60
[0386] Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
[0387] 65 70 75 80
[0388] Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
[0389] 85 90 95
[0390] Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0391] 100 105 110
[0392] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[0393] 115 120 125
[0394] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0395] 130 135 140
[0396] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[0397] 145 150 155 160
[0398] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0399] 165 170 175
[0400] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0401] 180 185 190
[0402] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0403] 195 200 205
[0404] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0405] 210 215
[0406] <210> 7
[0407] <211> 219
[0408] <212> PRT
[0409] <213> 人工序列
[0410] <220>
[0411] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[0412] <400> 7
[0413] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0414] 1 5 10 15
[0415] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
[0416] 20 25 30
[0417] Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
[0418] 35 40 45
[0419] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro

[0420] 50 55 60

[0421] Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

[0422] 65 70 75 80

[0423] Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

[0424] 85 90 95

[0425] Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0426] 100 105 110

[0427] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

[0428] 115 120 125

[0429] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

[0430] 130 135 140

[0431] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

[0432] 145 150 155 160

[0433] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

[0434] 165 170 175

[0435] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

[0436] 180 185 190

[0437] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

[0438] 195 200 205

[0439] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0440] 210 215

[0441] <210> 8

[0442] <211> 657

[0443] <212> DNA

[0444] <213> 人工序列

[0445] <220>

[0446] <223> 人工序列的描述:合成多核苷酸

[0447] <400> 8

[0448] cagatcgtgc tgacccagtc ccctgccacc ctgtccctga gccctggcga gagagccacc 60

[0449] ctgagctgct ccgcctcctc caagcacacc aacctgtact ggtcccggca catgtactgg 120

[0450] tatcagcaga agcccggcca ggcccctcgg ctgctgatct acctgacctc taaccgggcc 180

[0451] accggcatcc ctgccagatt ctccggctct ggctccggca ccgacttcac cctgaccatc 240

[0452] tccagcctgg aacccgagga cttcgccgtg tactactgcc agcagtggtc ctccaacccc 300

[0453] ttcaccttcg gccagggcac caagctggaa atcaagcgta cggtggctgc accatctgtc 360

[0454] ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

[0455] ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

[0456] tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

[0457] agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

[0458] gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

[0459] <210> 9

[0460] <211> 452

[0461] <212> PRT

[0462] <213> 人工序列

[0463] <220>

[0464] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[0465] <400> 9

[0466] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0467] 1 5 10 15

[0468] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

[0469] 20 25 30

[0470] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0471] 35 40 45

[0472] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val

[0473] 50 55 60

[0474] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

[0475] 65 70 75 80

[0476] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0477] 85 90 95

[0478] Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp

[0479] 100 105 110

[0480] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

[0481] 115 120 125

[0482] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

[0483] 130 135 140

[0484] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

[0485] 145 150 155 160

[0486] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

[0487] 165 170 175

[0488] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

[0489] 180 185 190

[0490] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

[0491] 195 200 205

[0492] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser

[0493] 210 215 220

[0494] Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu

[0495] 225 230 235 240

[0496] Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

[0497] 245 250 255

[0498] Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

[0499] 260 265 270

[0500] His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

[0501] 275 280 285

[0502] Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

[0503] 290 295 300

[0504] Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[0505] 305 310 315 320
[0506] Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
[0507] 325 330 335
[0508] Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[0509] 340 345 350
[0510] Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[0511] 355 360 365
[0512] Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[0513] 370 375 380
[0514] Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[0515] 385 390 395 400
[0516] Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
[0517] 405 410 415
[0518] Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[0519] 420 425 430
[0520] Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[0521] 435 440 445
[0522] Ser Pro Gly Lys
[0523] 450
[0524] <210> 10
[0525] <211> 1356
[0526] <212> DNA
[0527] <213> 人工序列
[0528] <220>
[0529] <223> 人工序列的描述:合成多核苷酸
[0530] <400> 10
[0531] gaggtgcagc tggtggaatc cggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60
[0532] tcttgcgccg cctccggctt cacattctcc gactacggca tgcactgggt ccgacaggcc 120
[0533] cctggaaagg gcctggaatg ggtggcctac atctcctccg gctcctacac catctactcc 180
[0534] gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac 240
[0535] ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac acagccgtgt actactgtgc cagacgggcc 300
[0536] cctaactcct tctacgagta ctacttcgac tactggggcc agggcaccac cgtgaccgtg 360
[0537] tcctctgcta gcaccaaagg tccgagcgtt tttccgctgg caccgagcag caaaagcacc 420
[0538] tctggtggca ccgcagcact gggttgtctg gtgaaagatt attttccgga accggttacc 480
[0539] gtttcttgga atagcggtgc actgaccagc ggtgttcata cctttccggc agttctgcag 540
[0540] agcagcggtc tgtatagcct gtctagcgtt gttaccgttc cgagcagcag cctgggcacc 600
[0541] cagacctata tttgcaatgt gaatcataaa ccgagcaata caaaagttga taaacgcgtt 660
[0542] gaaccgaaaa gctgtgacaa aactcacacg tgcccaccgt gcccagcacc tgagttcgag 720
[0543] gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 780
[0544] acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840
[0545] aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900

[0546] tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960
[0547] ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccagcat cgagaaaacc 1020
[0548] atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtct gcaccctgcc cccatcccgg 1080
[0549] gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg agctgcgcgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140
[0550] gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200
[0551] cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctcgttagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
[0552] aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
[0553] tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1356
[0554] <210> 11
[0555] <211> 639
[0556] <212> DNA
[0557] <213> 人工序列
[0558] <220>
[0559] <223> 人工序列的描述:合成多核苷酸
[0560] <400> 11
[0561] gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
[0562] atcacttgcc gggcaagtca gagcattaac agctatttag attggtatca gcagaaacca 120
[0563] gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
[0564] aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
[0565] gaagattttg caacttacta ctgtcaacag tattacagta ctccattcac tttcggccct 300
[0566] gggaccaaag tggaaatcaa aggtcagccc aaggcggccc cctcggtcac tctgttcccg 360
[0567] ccctgctctg aggagcttca agccaacaag gccacactgg tgtgtctcat aagtgacttc 420
[0568] tacccgggag ccgtgacagt ggcctggaag gcagatagca gccccgtcaa ggcgggagtg 480
[0569] gagaccacca caccctccaa acaaagcaac aacaagtacg cggccagcag ctacctgagc 540
[0570] ctgacgcctg agcagtggaa gtcccacaga agctacagct gccaggtcac gcatgaaggg 600
[0571] agcaccgtgg agaagacagt ggcccctaca gaagtgtca 639
[0572] <210> 12
[0573] <211> 455
[0574] <212> PRT
[0575] <213> 人工序列
[0576] <220>
[0577] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[0578] <400> 12
[0579] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
[0580] 1 5 10 15
[0581] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0582] 20 25 30
[0583] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0584] 35 40 45
[0585] Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0586] 50 55 60
[0587] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0588] 65 70 75 80

[0589] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0590] 85 90 95

[0591] Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met

[0592] 100 105 110

[0593] Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

[0594] 115 120 125

[0595] Lys Gly Pro Ser Val Cys Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser

[0596] 130 135 140

[0597] Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

[0598] 145 150 155 160

[0599] Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

[0600] 165 170 175

[0601] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser

[0602] 180 185 190

[0603] Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

[0604] 195 200 205

[0605] Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu

[0606] 210 215 220

[0607] Pro Lys Ser Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

[0608] 225 230 235 240

[0609] Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

[0610] 245 250 255

[0611] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

[0612] 260 265 270

[0613] Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

[0614] 275 280 285

[0615] Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

[0616] 290 295 300

[0617] Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

[0618] 305 310 315 320

[0619] Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

[0620] 325 330 335

[0621] Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

[0622] 340 345 350

[0623] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys

[0624] 355 360 365

[0625] Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

[0626] 370 375 380

[0627] Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

[0628] 385 390 395 400

[0629] Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

[0630] 405 410 415

[0631] Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

[0632] 420 425 430

[0633] Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

[0634] 435 440 445

[0635] Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0636] 450 455

[0637] <210> 13

[0638] <211> 1365

[0639] <212> DNA

[0640] <213> 人工序列

[0641] <220>

[0642] <223> 人工序列的描述:合成多核苷酸

[0643] <400> 13

[0644] caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

[0645] tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

[0646] ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180

[0647] gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

[0648] ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatccg 300

[0649] aggggagcta ccctttacta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360

[0650] gtcaccgtct cctcagcgtc gaccaaaggt ccgagcgtgt gcccgctggc accgagcagc 420

[0651] aaaagcacct ctggtggcac cgcagcactg ggttgtctgg tgaaagatta ttttccggaa 480

[0652] ccggttaccg tttcttggaa tagcggtgca ctgaccagcg gtgttcatac ctttccggca 540

[0653] gtcctgcaga gcagcggtct gtatagcctg tctagcgttg ttaccgttcc gagcagcagc 600

[0654] ctgggcaccc agacctatat ttgcaatgtg aatcataaac cgagcaatac caaagttgat 660

[0655] aaacgcgttg aaccgaaaag cgtggacaaa actcacacgt gcccaccgtg cccagcacct 720

[0656] gagttcgagg ggggaccgtc agtcttcctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg 780

[0657] atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840

[0658] gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900

[0659] gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960

[0660] tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agccagcatc 1020

[0661] gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtcta caccctgccc 1080

[0662] ccatgccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc 1140

[0663] tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200

[0664] accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg 1260

[0665] gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320

[0666] cacaaccact acacgcagaa gagcttaagc ctgtctccgg gtaaa 1365

[0667] <210> 14

[0668] <211> 710

[0669] <212> PRT

[0670] <213> 人工序列

[0671] <220>

[0672] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[0673] <400> 14

[0674] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0675] 1 5 10 15

[0676] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr

[0677] 20 25 30

[0678] Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

[0679] 35 40 45

[0680] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0681] 50 55 60

[0682] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

[0683] 65 70 75 80

[0684] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe

[0685] 85 90 95

[0686] Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

[0687] 100 105 110

[0688] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

[0689] 115 120 125

[0690] Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser

[0691] 130 135 140

[0692] Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

[0693] 145 150 155 160

[0694] Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala

[0695] 165 170 175

[0696] Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

[0697] 180 185 190

[0698] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

[0699] 195 200 205

[0700] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[0701] 210 215 220

[0702] Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

[0703] 225 230 235 240

[0704] Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly

[0705] 245 250 255

[0706] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly

[0707] 260 265 270

[0708] Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

[0709] 275 280 285

[0710] Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

[0711] 290 295 300

[0712] Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys

[0713] 305 310 315 320

[0714] Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
[0715] 325 330 335
[0716] Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
[0717] 340 345 350
[0718] Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu
[0719] 355 360 365
[0720] Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
[0721] 370 375 380
[0722] Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
[0723] 385 390 395 400
[0724] Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
[0725] 405 410 415
[0726] Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
[0727] 420 425 430
[0728] Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
[0729] 435 440 445
[0730] Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
[0731] 450 455 460
[0732] Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
[0733] 465 470 475 480
[0734] Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
[0735] 485 490 495
[0736] Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
[0737] 500 505 510
[0738] Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
[0739] 515 520 525
[0740] Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
[0741] 530 535 540
[0742] Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
[0743] 545 550 555 560
[0744] Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
[0745] 565 570 575
[0746] Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
[0747] 580 585 590
[0748] Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
[0749] 595 600 605
[0750] Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
[0751] 610 615 620
[0752] Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
[0753] 625 630 635 640
[0754] Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
[0755] 645 650 655

[0756] Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
[0757] 660 665 670
[0758] Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
[0759] 675 680 685
[0760] Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
[0761] 690 695 700
[0762] Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0763] 705 710
[0764] <210> 15
[0765] <211> 215
[0766] <212> PRT
[0767] <213> 人工序列
[0768] <220>
[0769] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[0770] <400> 15
[0771] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0772] 1 5 10 15
[0773] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
[0774] 20 25 30
[0775] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
[0776] 35 40 45
[0777] Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
[0778] 50 55 60
[0779] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
[0780] 65 70 75 80
[0781] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
[0782] 85 90 95
[0783] Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
[0784] 100 105 110
[0785] Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
[0786] 115 120 125
[0787] Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
[0788] 130 135 140
[0789] Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
[0790] 145 150 155 160
[0791] Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
[0792] 165 170 175
[0793] Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
[0794] 180 185 190
[0795] Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
[0796] 195 200 205
[0797] Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[0798] 210 215

[0799] <210> 16

[0800] <211> 710

[0801] <212> PRT

[0802] <213> 人工序列

[0803] <220>

[0804] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[0805] <400> 16

[0806] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0807] 1 5 10 15

[0808] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

[0809] 20 25 30

[0810] Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0811] 35 40 45

[0812] Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

[0813] 50 55 60

[0814] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

[0815] 65 70 75 80

[0816] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0817] 85 90 95

[0818] Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly

[0819] 100 105 110

[0820] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

[0821] 115 120 125

[0822] Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

[0823] 130 135 140

[0824] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

[0825] 145 150 155 160

[0826] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

[0827] 165 170 175

[0828] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

[0829] 180 185 190

[0830] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

[0831] 195 200 205

[0832] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

[0833] 210 215 220

[0834] Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

[0835] 225 230 235 240

[0836] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

[0837] 245 250 255

[0838] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

[0839] 260 265 270

[0840] Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[0841] 275 280 285
[0842] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[0843] 290 295 300
[0844] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[0845] 305 310 315 320
[0846] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
[0847] 325 330 335
[0848] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0849] 340 345 350
[0850] Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0851] 355 360 365
[0852] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0853] 370 375 380
[0854] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[0855] 385 390 395 400
[0856] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
[0857] 405 410 415
[0858] Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[0859] 420 425 430
[0860] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0861] 435 440 445
[0862] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
[0863] 450 455 460
[0864] Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
[0865] 465 470 475 480
[0866] Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln
[0867] 485 490 495
[0868] Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu
[0869] 500 505 510
[0870] Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
[0871] 515 520 525
[0872] Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
[0873] 530 535 540
[0874] Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly Thr
[0875] 545 550 555 560
[0876] Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[0877] 565 570 575
[0878] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser
[0879] 580 585 590
[0880] Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
[0881] 595 600 605

[0882] Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln
[0883] 610 615 620
[0884] Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly
[0885] 625 630 635 640
[0886] Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
[0887] 645 650 655
[0888] Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
[0889] 660 665 670
[0890] Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala
[0891] 675 680 685
[0892] Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
[0893] 690 695 700
[0894] Thr Val Thr Val Ser Ser
[0895] 705 710
[0896] <210> 17
[0897] <211> 215
[0898] <212> PRT
[0899] <213> 人工序列
[0900] <220>
[0901] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[0902] <400> 17
[0903] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0904] 1 5 10 15
[0905] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
[0906] 20 25 30
[0907] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
[0908] 35 40 45
[0909] Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
[0910] 50 55 60
[0911] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
[0912] 65 70 75 80
[0913] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
[0914] 85 90 95
[0915] Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
[0916] 100 105 110
[0917] Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
[0918] 115 120 125
[0919] Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
[0920] 130 135 140
[0921] Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
[0922] 145 150 155 160
[0923] Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

[0924] 165 170 175
[0925] Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
[0926] 180 185 190
[0927] Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
[0928] 195 200 205
[0929] Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0930] 210 215
[0931] <210> 18
[0932] <211> 720
[0933] <212> PRT
[0934] <213> 人工序列
[0935] <220>
[0936] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[0937] <400> 18
[0938] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0939] 1 5 10 15
[0940] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
[0941] 20 25 30
[0942] Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0943] 35 40 45
[0944] Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
[0945] 50 55 60
[0946] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0947] 65 70 75 80
[0948] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0949] 85 90 95
[0950] Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
[0951] 100 105 110
[0952] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0953] 115 120 125
[0954] Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
[0955] 130 135 140
[0956] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0957] 145 150 155 160
[0958] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[0959] 165 170 175
[0960] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0961] 180 185 190
[0962] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
[0963] 195 200 205
[0964] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
[0965] 210 215 220

[0966] Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
[0967] 225 230 235 240
[0968] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[0969] 245 250 255
[0970] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
[0971] 260 265 270
[0972] Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[0973] 275 280 285
[0974] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[0975] 290 295 300
[0976] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[0977] 305 310 315 320
[0978] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
[0979] 325 330 335
[0980] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[0981] 340 345 350
[0982] Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[0983] 355 360 365
[0984] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[0985] 370 375 380
[0986] Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
[0987] 385 390 395 400
[0988] Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
[0989] 405 410 415
[0990] Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln
[0991] 420 425 430
[0992] Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser
[0993] 435 440 445
[0994] Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
[0995] 450 455 460
[0996] Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
[0997] 465 470 475 480
[0998] Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Cys Gly
[0999] 485 490 495
[1000] Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[1001] 500 505 510
[1002] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
[1003] 515 520 525
[1004] Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
[1005] 530 535 540
[1006] Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg
[1007] 545 550 555 560

[1008] Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp
[1009] 565 570 575
[1010] Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
[1011] 580 585 590
[1012] Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
[1013] 595 600 605
[1014] Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly
[1015] 610 615 620
[1016] Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
[1017] 625 630 635 640
[1018] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[1019] 645 650 655
[1020] Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[1021] 660 665 670
[1022] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
[1023] 675 680 685
[1024] Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[1025] 690 695 700
[1026] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[1027] 705 710 715 720
[1028] <210> 19
[1029] <211> 215
[1030] <212> PRT
[1031] <213> 人工序列
[1032] <220>
[1033] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1034] <400> 19
[1035] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1036] 1 5 10 15
[1037] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
[1038] 20 25 30
[1039] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
[1040] 35 40 45
[1041] Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
[1042] 50 55 60
[1043] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
[1044] 65 70 75 80
[1045] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
[1046] 85 90 95
[1047] Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
[1048] 100 105 110
[1049] Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

[1050] 115 120 125
[1051] Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
[1052] 130 135 140
[1053] Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
[1054] 145 150 155 160
[1055] Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
[1056] 165 170 175
[1057] Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
[1058] 180 185 190
[1059] Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
[1060] 195 200 205
[1061] Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1062] 210 215
[1063] <210> 20
[1064] <211> 250
[1065] <212> PRT
[1066] <213> 人工序列
[1067] <220>
[1068] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1069] <400> 20
[1070] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1071] 1 5 10 15
[1072] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1073] 20 25 30
[1074] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
[1075] 35 40 45
[1076] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1077] 50 55 60
[1078] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1079] 65 70 75 80
[1080] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1081] 85 90 95
[1082] Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
[1083] 100 105 110
[1084] Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[1085] 115 120 125
[1086] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr
[1087] 130 135 140
[1088] Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala
[1089] 145 150 155 160
[1090] Ser Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp
[1091] 165 170 175

[1092] Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp
[1093] 180 185 190
[1094] Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
[1095] 195 200 205
[1096] Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu
[1097] 210 215 220
[1098] Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His Trp Leu
[1099] 225 230 235 240
[1100] Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1101] 245 250
[1102] <210> 21
[1103] <211> 709
[1104] <212> PRT
[1105] <213> 人工序列
[1106] <220>
[1107] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1108] <400> 21
[1109] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1110] 1 5 10 15
[1111] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[1112] 20 25 30
[1113] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1114] 35 40 45
[1115] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val
[1116] 50 55 60
[1117] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[1118] 65 70 75 80
[1119] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1120] 85 90 95
[1121] Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
[1122] 100 105 110
[1123] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[1124] 115 120 125
[1125] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
[1126] 130 135 140
[1127] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[1128] 145 150 155 160
[1129] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[1130] 165 170 175
[1131] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[1132] 180 185 190
[1133] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

[1134] 195 200 205
[1135] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
[1136] 210 215 220
[1137] Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
[1138] 225 230 235 240
[1139] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[1140] 245 250 255
[1141] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
[1142] 260 265 270
[1143] Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[1144] 275 280 285
[1145] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[1146] 290 295 300
[1147] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[1148] 305 310 315 320
[1149] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
[1150] 325 330 335
[1151] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[1152] 340 345 350
[1153] Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[1154] 355 360 365
[1155] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[1156] 370 375 380
[1157] Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[1158] 385 390 395 400
[1159] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
[1160] 405 410 415
[1161] Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[1162] 420 425 430
[1163] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[1164] 435 440 445
[1165] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
[1166] 450 455 460
[1167] Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
[1168] 465 470 475 480
[1169] Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val
[1170] 485 490 495
[1171] Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
[1172] 500 505 510
[1173] Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
[1174] 515 520 525
[1175] Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser

[1176] 530 535 540
[1177] Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr
[1178] 545 550 555 560
[1179] Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
[1180] 565 570 575
[1181] Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[1182] 580 585 590
[1183] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro
[1184] 595 600 605
[1185] Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly
[1186] 610 615 620
[1187] Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
[1188] 625 630 635 640
[1189] Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser
[1190] 645 650 655
[1191] Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
[1192] 660 665 670
[1193] Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
[1194] 675 680 685
[1195] Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His Trp Leu Phe Gly Cys Gly Thr
[1196] 690 695 700
[1197] Lys Leu Thr Val Leu
[1198] 705
[1199] <210> 22
[1200] <211> 719
[1201] <212> PRT
[1202] <213> 人工序列
[1203] <220>
[1204] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1205] <400> 22
[1206] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1207] 1 5 10 15
[1208] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[1209] 20 25 30
[1210] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1211] 35 40 45
[1212] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val
[1213] 50 55 60
[1214] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[1215] 65 70 75 80
[1216] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1217] 85 90 95

[1218] Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
[1219] 100 105 110
[1220] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[1221] 115 120 125
[1222] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
[1223] 130 135 140
[1224] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[1225] 145 150 155 160
[1226] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[1227] 165 170 175
[1228] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[1229] 180 185 190
[1230] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
[1231] 195 200 205
[1232] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
[1233] 210 215 220
[1234] Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
[1235] 225 230 235 240
[1236] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[1237] 245 250 255
[1238] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
[1239] 260 265 270
[1240] Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[1241] 275 280 285
[1242] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[1243] 290 295 300
[1244] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[1245] 305 310 315 320
[1246] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
[1247] 325 330 335
[1248] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[1249] 340 345 350
[1250] Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[1251] 355 360 365
[1252] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[1253] 370 375 380
[1254] Ser Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
[1255] 385 390 395 400
[1256] Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
[1257] 405 410 415
[1258] Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp
[1259] 420 425 430

[1260] Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser
[1261] 435 440 445
[1262] Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
[1263] 450 455 460
[1264] Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
[1265] 465 470 475 480
[1266] Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser
[1267] 485 490 495
[1268] Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
[1269] 500 505 510
[1270] Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[1271] 515 520 525
[1272] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Leu Thr Gln
[1273] 530 535 540
[1274] Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Ser Ile Ser Cys
[1275] 545 550 555 560
[1276] Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys
[1277] 565 570 575
[1278] Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp Arg Pro
[1279] 580 585 590
[1280] Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala
[1281] 595 600 605
[1282] Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
[1283] 610 615 620
[1284] Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His Trp Leu Phe Gly Cys Gly
[1285] 625 630 635 640
[1286] Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[1287] 645 650 655
[1288] Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
[1289] 660 665 670
[1290] Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
[1291] 675 680 685
[1292] Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
[1293] 690 695 700
[1294] His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[1295] 705 710 715
[1296] <210> 23
[1297] <211> 219
[1298] <212> PRT
[1299] <213> 人工序列
[1300] <220>
[1301] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[1302] <400> 23
[1303] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1304] 1 5 10 15
[1305] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
[1306] 20 25 30
[1307] Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
[1308] 35 40 45
[1309] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
[1310] 50 55 60
[1311] Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
[1312] 65 70 75 80
[1313] Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
[1314] 85 90 95
[1315] Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1316] 100 105 110
[1317] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[1318] 115 120 125
[1319] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[1320] 130 135 140
[1321] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[1322] 145 150 155 160
[1323] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[1324] 165 170 175
[1325] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[1326] 180 185 190
[1327] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[1328] 195 200 205
[1329] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1330] 210 215
[1331] <210> 24
[1332] <211> 709
[1333] <212> PRT
[1334] <213> 人工序列
[1335] <220>
[1336] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1337] <400> 24
[1338] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1339] 1 5 10 15
[1340] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[1341] 20 25 30
[1342] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1343] 35 40 45

[1344] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val
[1345] 50 55 60
[1346] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[1347] 65 70 75 80
[1348] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1349] 85 90 95
[1350] Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
[1351] 100 105 110
[1352] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[1353] 115 120 125
[1354] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
[1355] 130 135 140
[1356] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[1357] 145 150 155 160
[1358] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[1359] 165 170 175
[1360] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[1361] 180 185 190
[1362] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
[1363] 195 200 205
[1364] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
[1365] 210 215 220
[1366] Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
[1367] 225 230 235 240
[1368] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[1369] 245 250 255
[1370] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
[1371] 260 265 270
[1372] Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[1373] 275 280 285
[1374] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[1375] 290 295 300
[1376] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[1377] 305 310 315 320
[1378] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
[1379] 325 330 335
[1380] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[1381] 340 345 350
[1382] Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[1383] 355 360 365
[1384] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[1385] 370 375 380

[1386] Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[1387] 385 390 395 400
[1388] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
[1389] 405 410 415
[1390] Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[1391] 420 425 430
[1392] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[1393] 435 440 445
[1394] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
[1395] 450 455 460
[1396] Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
[1397] 465 470 475 480
[1398] Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val
[1399] 485 490 495
[1400] Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
[1401] 500 505 510
[1402] Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
[1403] 515 520 525
[1404] Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
[1405] 530 535 540
[1406] Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr
[1407] 545 550 555 560
[1408] Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
[1409] 565 570 575
[1410] Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[1411] 580 585 590
[1412] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro
[1413] 595 600 605
[1414] Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly
[1415] 610 615 620
[1416] Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
[1417] 625 630 635 640
[1418] Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser
[1419] 645 650 655
[1420] Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
[1421] 660 665 670
[1422] Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
[1423] 675 680 685
[1424] Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His Trp Leu Phe Gly Cys Gly Thr
[1425] 690 695 700
[1426] Lys Leu Thr Val Leu
[1427] 705

[1428] <210> 25
[1429] <211> 452
[1430] <212> PRT
[1431] <213> 人工序列
[1432] <220>
[1433] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1434] <400> 25

[1435] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1436] 1 5 10 15
[1437] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[1438] 20 25 30
[1439] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1440] 35 40 45
[1441] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val
[1442] 50 55 60
[1443] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[1444] 65 70 75 80
[1445] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1446] 85 90 95
[1447] Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
[1448] 100 105 110
[1449] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[1450] 115 120 125
[1451] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[1452] 130 135 140
[1453] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[1454] 145 150 155 160
[1455] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[1456] 165 170 175
[1457] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[1458] 180 185 190
[1459] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[1460] 195 200 205
[1461] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
[1462] 210 215 220
[1463] Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
[1464] 225 230 235 240
[1465] Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[1466] 245 250 255
[1467] Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[1468] 260 265 270
[1469] His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

[1470] 275 280 285
[1471] Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[1472] 290 295 300
[1473] Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[1474] 305 310 315 320
[1475] Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
[1476] 325 330 335
[1477] Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1478] 340 345 350
[1479] Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[1480] 355 360 365
[1481] Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1482] 370 375 380
[1483] Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1484] 385 390 395 400
[1485] Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
[1486] 405 410 415
[1487] Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[1488] 420 425 430
[1489] Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[1490] 435 440 445
[1491] Ser Pro Gly Lys
[1492] 450
[1493] <210> 26
[1494] <211> 214
[1495] <212> PRT
[1496] <213> 人工序列
[1497] <220>
[1498] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1499] <400> 26
[1500] Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
[1501] 1 5 10 15
[1502] Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
[1503] 20 25 30
[1504] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
[1505] 35 40 45
[1506] Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
[1507] 50 55 60
[1508] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly
[1509] 65 70 75 80
[1510] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
[1511] 85 90 95

[1512] Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
[1513] 100 105 110
[1514] Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Cys Ser Glu Glu Leu Gln
[1515] 115 120 125
[1516] Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
[1517] 130 135 140
[1518] Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
[1519] 145 150 155 160
[1520] Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
[1521] 165 170 175
[1522] Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
[1523] 180 185 190
[1524] Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
[1525] 195 200 205
[1526] Ala Pro Thr Glu Val Ser
[1527] 210
[1528] <210> 27
[1529] <211> 451
[1530] <212> PRT
[1531] <213> 人工序列
[1532] <220>
[1533] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1534] <400> 27
[1535] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1536] 1 5 10 15
[1537] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1538] 20 25 30
[1539] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1540] 35 40 45
[1541] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1542] 50 55 60
[1543] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1544] 65 70 75 80
[1545] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1546] 85 90 95
[1547] Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
[1548] 100 105 110
[1549] Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[1550] 115 120 125
[1551] Ser Val Cys Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[1552] 130 135 140
[1553] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

[1554] 145 150 155 160
[1555] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[1556] 165 170 175
[1557] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[1558] 180 185 190
[1559] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[1560] 195 200 205
[1561] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
[1562] 210 215 220
[1563] Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
[1564] 225 230 235 240
[1565] Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[1566] 245 250 255
[1567] Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[1568] 260 265 270
[1569] His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[1570] 275 280 285
[1571] Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[1572] 290 295 300
[1573] Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[1574] 305 310 315 320
[1575] Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
[1576] 325 330 335
[1577] Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1578] 340 345 350
[1579] Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[1580] 355 360 365
[1581] Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1582] 370 375 380
[1583] Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1584] 385 390 395 400
[1585] Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[1586] 405 410 415
[1587] Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[1588] 420 425 430
[1589] Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[1590] 435 440 445
[1591] Ser Pro Gly
[1592] 450
[1593] <210> 28
[1594] <211> 214
[1595] <212> PRT

[1596] <213> 人工序列
[1597] <220>
[1598] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1599] <400> 28
[1600] Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
[1601] 1 5 10 15
[1602] Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
[1603] 20 25 30
[1604] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
[1605] 35 40 45
[1606] Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[1607] 50 55 60
[1608] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
[1609] 65 70 75 80
[1610] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
[1611] 85 90 95
[1612] Phe Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
[1613] 100 105 110
[1614] Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Cys Ser Glu Glu Leu Gln
[1615] 115 120 125
[1616] Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
[1617] 130 135 140
[1618] Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
[1619] 145 150 155 160
[1620] Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
[1621] 165 170 175
[1622] Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
[1623] 180 185 190
[1624] Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
[1625] 195 200 205
[1626] Ala Pro Thr Glu Val Ser
[1627] 210
[1628] <210> 29
[1629] <211> 642
[1630] <212> DNA
[1631] <213> 人工序列
[1632] <220>
[1633] <223> 人工序列的描述:合成多核苷酸
[1634] <400> 29
[1635] agctacgtgc tgacgcagcc gccgtcagtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt 60
[1636] acctgtgggg gagacaacat tggaggtaaa agtgttcact ggtaccagca gaagccaggc 120
[1637] caggcccctg tgttggtcat ctattatgat agtgaccggc cctcaggcat ccctgagcga 180

[1638] ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240
[1639] gatgaggccg attattactg tcaggtgttg gatcgtcgta gtgatcattt cctgttcggc 300
[1640] ggagggacca agctgaccgt cctaggtcag cccaaggcgg cgccctcggt cactctgttc 360
[1641] ccgccctgct ctgaggagct tcaagccaac aaggccacac tggtgtgtct cataagtgac 420
[1642] ttctacccgg gagccgtgac agtggcctgg aaggcagata gcagccccgt caaggcggga 480
[1643] gtggagacca ccacaccctc caaacaaagc aacaacaagt acgcggccag cagctacctg 540
[1644] agcctgacgc ctgagcagtg gaagtcccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa 600
[1645] gggagcaccg tggagaagac agtggccccct acagaagtgt ca 642
[1646] <210> 30
[1647] <211> 452
[1648] <212> PRT
[1649] <213> 人工序列
[1650] <220>
[1651] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1652] <400> 30
[1653] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1654] 1 5 10 15
[1655] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1656] 20 25 30
[1657] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1658] 35 40 45
[1659] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1660] 50 55 60
[1661] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1662] 65 70 75 80
[1663] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1664] 85 90 95
[1665] Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
[1666] 100 105 110
[1667] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[1668] 115 120 125
[1669] Ser Val Cys Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[1670] 130 135 140
[1671] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[1672] 145 150 155 160
[1673] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[1674] 165 170 175
[1675] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[1676] 180 185 190
[1677] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[1678] 195 200 205
[1679] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser

[1680] 210 215 220
[1681] Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
[1682] 225 230 235 240
[1683] Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[1684] 245 250 255
[1685] Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[1686] 260 265 270
[1687] His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[1688] 275 280 285
[1689] Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[1690] 290 295 300
[1691] Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[1692] 305 310 315 320
[1693] Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
[1694] 325 330 335
[1695] Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1696] 340 345 350
[1697] Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[1698] 355 360 365
[1699] Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1700] 370 375 380
[1701] Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1702] 385 390 395 400
[1703] Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[1704] 405 410 415
[1705] Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[1706] 420 425 430
[1707] Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[1708] 435 440 445
[1709] Ser Pro Gly Lys
[1710] 450
[1711] <210> 31
[1712] <211> 1356
[1713] <212> DNA
[1714] <213> 人工序列
[1715] <220>
[1716] <223> 人工序列的描述:合成多核苷酸
[1717] <400> 31
[1718] gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
[1719] tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
[1720] ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
[1721] gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

[1722] ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtcc 300
[1723] tatggtacct actacggaaa ctactttgaa tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 360
[1724] tcgagtgcgt cgaccaaagg tccgagcgtg tgcccgctgg caccgagcag caaaagcacc 420
[1725] tctggtggca ccgcagcact gggttgtctg gtgaaagatt attttccgga accggttacc 480
[1726] gtttcttgga atagcggtgc actgaccagc ggtgttcata cctttccggc agtcctgcag 540
[1727] agcagcggtc tgtatagcct gtctagcgtt gttaccgttc cgagcagcag cctgggcacc 600
[1728] cagacctata tttgcaatgt gaatcataaa ccgagcaata ccaaagttga taaacgcgtt 660
[1729] gaaccgaaaa gcgtggacaa aactcacacg tgcccaccgt gcccagcacc tgagttcgag 720
[1730] gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 780
[1731] acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840
[1732] aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900
[1733] tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960
[1734] ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccagcat cgagaaaacc 1020
[1735] atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtct acaccctgcc cccatgccgg 1080
[1736] gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140
[1737] gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200
[1738] cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
[1739] aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
[1740] tacacgcaga agagcttaag cctgtctccg ggtaaa 1356
[1741] <210> 32
[1742] <211> 214
[1743] <212> PRT
[1744] <213> 人工序列
[1745] <220>
[1746] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1747] <400> 32
[1748] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1749] 1 5 10 15
[1750] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[1751] 20 25 30
[1752] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[1753] 35 40 45
[1754] Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1755] 50 55 60
[1756] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1757] 65 70 75 80
[1758] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
[1759] 85 90 95
[1760] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[1761] 100 105 110
[1762] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[1763] 115 120 125

[1764] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[1765] 130 135 140
[1766] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[1767] 145 150 155 160
[1768] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[1769] 165 170 175
[1770] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[1771] 180 185 190
[1772] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[1773] 195 200 205
[1774] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1775] 210
[1776] <210> 33
[1777] <211> 215
[1778] <212> PRT
[1779] <213> 人工序列
[1780] <220>
[1781] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1782] <400> 33
[1783] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1784] 1 5 10 15
[1785] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
[1786] 20 25 30
[1787] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
[1788] 35 40 45
[1789] Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
[1790] 50 55 60
[1791] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
[1792] 65 70 75 80
[1793] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
[1794] 85 90 95
[1795] Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
[1796] 100 105 110
[1797] Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
[1798] 115 120 125
[1799] Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
[1800] 130 135 140
[1801] Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
[1802] 145 150 155 160
[1803] Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
[1804] 165 170 175
[1805] Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

[1806] 180 185 190
[1807] Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
[1808] 195 200 205
[1809] Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1810] 210 215
[1811] <210> 34
[1812] <211> 707
[1813] <212> PRT
[1814] <213> 人工序列
[1815] <220>
[1816] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1817] <400> 34
[1818] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1819] 1 5 10 15
[1820] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
[1821] 20 25 30
[1822] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
[1823] 35 40 45
[1824] Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
[1825] 50 55 60
[1826] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
[1827] 65 70 75 80
[1828] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
[1829] 85 90 95
[1830] Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
[1831] 100 105 110
[1832] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[1833] 115 120 125
[1834] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1835] 130 135 140
[1836] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
[1837] 145 150 155 160
[1838] Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
[1839] 165 170 175
[1840] Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
[1841] 180 185 190
[1842] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[1843] 195 200 205
[1844] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1845] 210 215 220
[1846] Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
[1847] 225 230 235 240

[1848] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[1849] 245 250 255
[1850] Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
[1851] 260 265 270
[1852] Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
[1853] 275 280 285
[1854] Ser Ser Gly Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu
[1855] 290 295 300
[1856] Glu Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro
[1857] 305 310 315 320
[1858] Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
[1859] 325 330 335
[1860] Tyr Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[1861] 340 345 350
[1862] Tyr Cys Ala Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp
[1863] 355 360 365
[1864] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
[1865] 370 375 380
[1866] Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
[1867] 385 390 395 400
[1868] Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
[1869] 405 410 415
[1870] Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
[1871] 420 425 430
[1872] Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
[1873] 435 440 445
[1874] Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
[1875] 450 455 460
[1876] Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
[1877] 465 470 475 480
[1878] Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
[1879] 485 490 495
[1880] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[1881] 500 505 510
[1882] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
[1883] 515 520 525
[1884] Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[1885] 530 535 540
[1886] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
[1887] 545 550 555 560
[1888] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[1889] 565 570 575

[1890] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
[1891] 580 585 590
[1892] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[1893] 595 600 605
[1894] Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
[1895] 610 615 620
[1896] Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[1897] 625 630 635 640
[1898] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[1899] 645 650 655
[1900] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
[1901] 660 665 670
[1902] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[1903] 675 680 685
[1904] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[1905] 690 695 700
[1906] Leu Gly Lys
[1907] 705
[1908] <210> 35
[1909] <211> 707
[1910] <212> PRT
[1911] <213> 人工序列
[1912] <220>
[1913] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[1914] <400> 35
[1915] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[1916] 1 5 10 15
[1917] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
[1918] 20 25 30
[1919] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
[1920] 35 40 45
[1921] Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
[1922] 50 55 60
[1923] Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
[1924] 65 70 75 80
[1925] Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[1926] 85 90 95
[1927] Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
[1928] 100 105 110
[1929] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[1930] 115 120 125
[1931] Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

[1932] 130 135 140
[1933] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[1934] 145 150 155 160
[1935] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[1936] 165 170 175
[1937] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[1938] 180 185 190
[1939] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
[1940] 195 200 205
[1941] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
[1942] 210 215 220
[1943] Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
[1944] 225 230 235 240
[1945] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[1946] 245 250 255
[1947] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
[1948] 260 265 270
[1949] Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[1950] 275 280 285
[1951] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[1952] 290 295 300
[1953] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[1954] 305 310 315 320
[1955] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
[1956] 325 330 335
[1957] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[1958] 340 345 350
[1959] Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[1960] 355 360 365
[1961] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[1962] 370 375 380
[1963] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[1964] 385 390 395 400
[1965] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
[1966] 405 410 415
[1967] Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[1968] 420 425 430
[1969] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[1970] 435 440 445
[1971] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln
[1972] 450 455 460
[1973] Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser

[1974] 465 470 475 480
[1975] Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
[1976] 485 490 495
[1977] Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser
[1978] 500 505 510
[1979] Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
[1980] 515 520 525
[1981] Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val
[1982] 530 535 540
[1983] Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly
[1984] 545 550 555 560
[1985] Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[1986] 565 570 575
[1987] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
[1988] 580 585 590
[1989] Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
[1990] 595 600 605
[1991] Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg
[1992] 610 615 620
[1993] Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp
[1994] 625 630 635 640
[1995] Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
[1996] 645 650 655
[1997] Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
[1998] 660 665 670
[1999] Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Trp
[2000] 675 680 685
[2001] Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[2002] 690 695 700
[2003] Val Ser Ser
[2004] 705
[2005] <210> 36
[2006] <211> 707
[2007] <212> PRT
[2008] <213> 人工序列
[2009] <220>
[2010] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2011] <400> 36
[2012] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[2013] 1 5 10 15
[2014] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
[2015] 20 25 30

[2016] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
[2017] 35 40 45
[2018] Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
[2019] 50 55 60
[2020] Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
[2021] 65 70 75 80
[2022] Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[2023] 85 90 95
[2024] Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
[2025] 100 105 110
[2026] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[2027] 115 120 125
[2028] Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
[2029] 130 135 140
[2030] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[2031] 145 150 155 160
[2032] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[2033] 165 170 175
[2034] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[2035] 180 185 190
[2036] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
[2037] 195 200 205
[2038] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
[2039] 210 215 220
[2040] Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
[2041] 225 230 235 240
[2042] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[2043] 245 250 255
[2044] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
[2045] 260 265 270
[2046] Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[2047] 275 280 285
[2048] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[2049] 290 295 300
[2050] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[2051] 305 310 315 320
[2052] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
[2053] 325 330 335
[2054] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[2055] 340 345 350
[2056] Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[2057] 355 360 365

[2058] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[2059] 370 375 380
[2060] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[2061] 385 390 395 400
[2062] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
[2063] 405 410 415
[2064] Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[2065] 420 425 430
[2066] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[2067] 435 440 445
[2068] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln
[2069] 450 455 460
[2070] Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
[2071] 465 470 475 480
[2072] Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln
[2073] 485 490 495
[2074] Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser
[2075] 500 505 510
[2076] Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
[2077] 515 520 525
[2078] Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val
[2079] 530 535 540
[2080] Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly
[2081] 545 550 555 560
[2082] Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[2083] 565 570 575
[2084] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
[2085] 580 585 590
[2086] Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
[2087] 595 600 605
[2088] Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg
[2089] 610 615 620
[2090] Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Gln Asp
[2091] 625 630 635 640
[2092] Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
[2093] 645 650 655
[2094] Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
[2095] 660 665 670
[2096] Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Trp
[2097] 675 680 685
[2098] Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[2099] 690 695 700

[2100] Val Ser Ser

[2101] 705

[2102] <210> 37

[2103] <211> 718

[2104] <212> PRT

[2105] <213> 人工序列

[2106] <220>

[2107] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[2108] <400> 37

[2109] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[2110] 1 5 10 15

[2111] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His

[2112] 20 25 30

[2113] Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[2114] 35 40 45

[2115] Ser Gly Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

[2116] 50 55 60

[2117] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

[2118] 65 70 75 80

[2119] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[2120] 85 90 95

[2121] Arg Asp Arg Tyr Ser Pro Thr Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

[2122] 100 105 110

[2123] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

[2124] 115 120 125

[2125] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

[2126] 130 135 140

[2127] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

[2128] 145 150 155 160

[2129] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

[2130] 165 170 175

[2131] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

[2132] 180 185 190

[2133] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

[2134] 195 200 205

[2135] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser

[2136] 210 215 220

[2137] Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

[2138] 225 230 235 240

[2139] Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

[2140] 245 250 255

[2141] Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

[2142] 260 265 270
[2143] His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[2144] 275 280 285
[2145] Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[2146] 290 295 300
[2147] Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[2148] 305 310 315 320
[2149] Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
[2150] 325 330 335
[2151] Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[2152] 340 345 350
[2153] Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[2154] 355 360 365
[2155] Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[2156] 370 375 380
[2157] Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
[2158] 385 390 395 400
[2159] Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu
[2160] 405 410 415
[2161] Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu
[2162] 420 425 430
[2163] Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
[2164] 435 440 445
[2165] Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[2166] 450 455 460
[2167] Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu
[2168] 465 470 475 480
[2169] Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Asn Trp Pro Leu Leu
[2170] 485 490 495
[2171] Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
[2172] 500 505 510
[2173] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
[2174] 515 520 525
[2175] Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
[2176] 530 535 540
[2177] Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Tyr Met
[2178] 545 550 555 560
[2179] Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser
[2180] 565 570 575
[2181] Ser Ile Trp Pro Ser Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[2182] 580 585 590
[2183] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

[2184] 595 600 605
[2185] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[2186] 610 615 620
[2187] Arg Val Arg Arg Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
[2188] 625 630 635 640
[2189] Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[2190] 645 650 655
[2191] Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
[2192] 660 665 670
[2193] Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
[2194] 675 680 685
[2195] Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
[2196] 690 695 700
[2197] Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[2198] 705 710 715
[2199] <210> 38
[2200] <211> 716
[2201] <212> PRT
[2202] <213> 人工序列
[2203] <220>
[2204] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2205] <400> 38
[2206] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2207] 1 5 10 15
[2208] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Tyr
[2209] 20 25 30
[2210] Met Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2211] 35 40 45
[2212] Ser Ser Ile Trp Pro Ser Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[2213] 50 55 60
[2214] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[2215] 65 70 75 80
[2216] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2217] 85 90 95
[2218] Ala Arg Val Arg Arg Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[2219] 100 105 110
[2220] Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
[2221] 115 120 125
[2222] Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
[2223] 130 135 140
[2224] Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
[2225] 145 150 155 160

[2226] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
[2227] 165 170 175
[2228] Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
[2229] 180 185 190
[2230] Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
[2231] 195 200 205
[2232] Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
[2233] 210 215 220
[2234] His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
[2235] 225 230 235 240
[2236] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
[2237] 245 250 255
[2238] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
[2239] 260 265 270
[2240] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
[2241] 275 280 285
[2242] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
[2243] 290 295 300
[2244] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
[2245] 305 310 315 320
[2246] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
[2247] 325 330 335
[2248] Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
[2249] 340 345 350
[2250] Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
[2251] 355 360 365
[2252] Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
[2253] 370 375 380
[2254] Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
[2255] 385 390 395 400
[2256] Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
[2257] 405 410 415
[2258] Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln
[2259] 420 425 430
[2260] Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser
[2261] 435 440 445
[2262] Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
[2263] 450 455 460
[2264] Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr
[2265] 465 470 475 480
[2266] Tyr Tyr Cys Lys Gln Tyr Ala Asp Tyr Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr
[2267] 485 490 495

[2268] Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[2269] 500 505 510
[2270] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
[2271] 515 520 525
[2272] Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
[2273] 530 535 540
[2274] Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Asp Met His Trp Val Arg Gln
[2275] 545 550 555 560
[2276] Ala Thr Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Gly Thr Ala Gly
[2277] 565 570 575
[2278] Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
[2279] 580 585 590
[2280] Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
[2281] 595 600 605
[2282] Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Tyr Ser Pro Thr
[2283] 610 615 620
[2284] Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
[2285] 625 630 635 640
[2286] Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gln Pro
[2287] 645 650 655
[2288] Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
[2289] 660 665 670
[2290] Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
[2291] 675 680 685
[2292] Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
[2293] 690 695 700
[2294] Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[2295] 705 710 715
[2296] <210> 39
[2297] <211> 5
[2298] <212> PRT
[2299] <213> 人工序列
[2300] <220>
[2301] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2302] <400> 39
[2303] Ile Ser Arg Thr Pro
[2304] 1 5
[2305] <210> 40
[2306] <211> 5
[2307] <212> PRT
[2308] <213> 人工序列
[2309] <220>

[2310] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2311] <400> 40
[2312] Ala Lys Gly Gln Pro
[2313] 1 5
[2314] <210> 41
[2315] <211> 10
[2316] <212> PRT
[2317] <213> 人工序列
[2318] <220>
[2319] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2320] <400> 41
[2321] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[2322] 1 5 10
[2323] <210> 42
[2324] <211> 15
[2325] <212> PRT
[2326] <213> 人工序列
[2327] <220>
[2328] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2329] <400> 42
[2330] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[2331] 1 5 10 15
[2332] <210> 43
[2333] <211> 20
[2334] <212> PRT
[2335] <213> 人工序列
[2336] <220>
[2337] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2338] <400> 43
[2339] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[2340] 1 5 10 15
[2341] Gly Gly Gly Ser
[2342] 20
[2343] <210> 44
[2344] <211> 15
[2345] <212> PRT
[2346] <213> 人工序列
[2347] <220>
[2348] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2349] <400> 44
[2350] Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
[2351] 1 5 10 15

[2352] <210> 45
[2353] <211> 8
[2354] <212> PRT
[2355] <213> 人工序列
[2356] <220>
[2357] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2358] <400> 45
[2359] Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
[2360] 1 5
[2361] <210> 46
[2362] <211> 8
[2363] <212> PRT
[2364] <213> 人工序列
[2365] <220>
[2366] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2367] <400> 46
[2368] Glu Pro Lys Ser Cys Gly Lys Thr
[2369] 1 5
[2370] <210> 47
[2371] <211> 5
[2372] <212> PRT
[2373] <213> 人工序列
[2374] <220>
[2375] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2376] <400> 47
[2377] Glu Pro Lys Ser Cys
[2378] 1 5
[2379] <210> 48
[2380] <211> 5
[2381] <212> PRT
[2382] <213> 人工序列
[2383] <220>
[2384] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2385] <400> 48
[2386] Gly Gly Gly Gly Ser
[2387] 1 5
[2388] <210> 49
[2389] <211> 112
[2390] <212> PRT
[2391] <213> 人工序列
[2392] <220>
[2393] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[2394] <400> 49
[2395] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[2396] 1 5 10 15
[2397] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
[2398] 20 25 30
[2399] Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
[2400] 35 40 45
[2401] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
[2402] 50 55 60
[2403] Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
[2404] 65 70 75 80
[2405] Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
[2406] 85 90 95
[2407] Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[2408] 100 105 110
[2409] <210> 50
[2410] <211> 449
[2411] <212> PRT
[2412] <213> 人工序列
[2413] <220>
[2414] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2415] <400> 50
[2416] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2417] 1 5 10 15
[2418] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[2419] 20 25 30
[2420] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2421] 35 40 45
[2422] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val
[2423] 50 55 60
[2424] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[2425] 65 70 75 80
[2426] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2427] 85 90 95
[2428] Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
[2429] 100 105 110
[2430] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[2431] 115 120 125
[2432] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
[2433] 130 135 140
[2434] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[2435] 145 150 155 160

[2436] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[2437] 165 170 175
[2438] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[2439] 180 185 190
[2440] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
[2441] 195 200 205
[2442] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
[2443] 210 215 220
[2444] Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
[2445] 225 230 235 240
[2446] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[2447] 245 250 255
[2448] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
[2449] 260 265 270
[2450] Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[2451] 275 280 285
[2452] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[2453] 290 295 300
[2454] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[2455] 305 310 315 320
[2456] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
[2457] 325 330 335
[2458] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[2459] 340 345 350
[2460] Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[2461] 355 360 365
[2462] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[2463] 370 375 380
[2464] Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[2465] 385 390 395 400
[2466] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
[2467] 405 410 415
[2468] Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[2469] 420 425 430
[2470] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[2471] 435 440 445
[2472] Lys
[2473] <210> 51
[2474] <211> 122
[2475] <212> PRT
[2476] <213> 人工序列
[2477] <220>

[2478] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[2479] <400> 51

[2480] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[2481] 1 5 10 15

[2482] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

[2483] 20 25 30

[2484] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[2485] 35 40 45

[2486] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val

[2487] 50 55 60

[2488] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

[2489] 65 70 75 80

[2490] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[2491] 85 90 95

[2492] Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp

[2493] 100 105 110

[2494] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

[2495] 115 120

[2496] <210> 52

[2497] <211> 125

[2498] <212> PRT

[2499] <213> 人工序列

[2500] <220>

[2501] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[2502] <400> 52

[2503] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

[2504] 1 5 10 15

[2505] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

[2506] 20 25 30

[2507] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[2508] 35 40 45

[2509] Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[2510] 50 55 60

[2511] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[2512] 65 70 75 80

[2513] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[2514] 85 90 95

[2515] Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met

[2516] 100 105 110

[2517] Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

[2518] 115 120 125

[2519] <210> 53

[2520] <211> 167
[2521] <212> PRT
[2522] <213> 人工序列
[2523] <220>
[2524] <223> CTLA-4 HC
[2525] <400> 53
[2526] Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
[2527] 1 5 10 15
[2528] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
[2529] 20 25 30
[2530] Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
[2531] 35 40 45
[2532] Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
[2533] 50 55 60
[2534] Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
[2535] 65 70 75 80
[2536] Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu
[2537] 85 90 95
[2538] Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
[2539] 100 105 110
[2540] Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
[2541] 115 120 125
[2542] Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
[2543] 130 135 140
[2544] Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
[2545] 145 150 155 160
[2546] Ala Leu Thr Ser Gly Val His
[2547] 165
[2548] <210> 54
[2549] <211> 107
[2550] <212> PRT
[2551] <213> 人工序列
[2552] <220>
[2553] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2554] <400> 54
[2555] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[2556] 1 5 10 15
[2557] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr
[2558] 20 25 30
[2559] Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[2560] 35 40 45
[2561] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[2562] 50 55 60
[2563] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[2564] 65 70 75 80
[2565] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe
[2566] 85 90 95
[2567] Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2568] 100 105
[2569] <210> 55
[2570] <211> 214
[2571] <212> PRT
[2572] <213> 人工序列
[2573] <220>
[2574] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2575] <400> 55
[2576] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[2577] 1 5 10 15
[2578] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr
[2579] 20 25 30
[2580] Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[2581] 35 40 45
[2582] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[2583] 50 55 60
[2584] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[2585] 65 70 75 80
[2586] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe
[2587] 85 90 95
[2588] Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[2589] 100 105 110
[2590] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[2591] 115 120 125
[2592] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[2593] 130 135 140
[2594] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[2595] 145 150 155 160
[2596] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[2597] 165 170 175
[2598] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[2599] 180 185 190
[2600] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[2601] 195 200 205
[2602] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[2603] 210

[2604] <210> 56
[2605] <211> 114
[2606] <212> PRT
[2607] <213> 人工序列
[2608] <220>
[2609] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2610] <400> 56
[2611] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
[2612] 1 5 10 15
[2613] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Pro Asp Tyr
[2614] 20 25 30
[2615] Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2616] 35 40 45
[2617] Gly Asp Ile Asp Pro Asn Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Ala Ser Val
[2618] 50 55 60
[2619] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Ser Ile Ala Tyr
[2620] 65 70 75 80
[2621] Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2622] 85 90 95
[2623] Ala Arg Gly Ala Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
[2624] 100 105 110
[2625] Ser Ser
[2626] <210> 57
[2627] <211> 213
[2628] <212> PRT
[2629] <213> 人工序列
[2630] <220>
[2631] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2632] <400> 57
[2633] Gln Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Ala Ser Val Gly
[2634] 1 5 10 15
[2635] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
[2636] 20 25 30
[2637] Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
[2638] 35 40 45
[2639] Ala Thr Phe Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
[2640] 50 55 60
[2641] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
[2642] 65 70 75 80
[2643] Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Leu Thr
[2644] 85 90 95
[2645] Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

[2646] 100 105 110
[2647] Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
[2648] 115 120 125
[2649] Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
[2650] 130 135 140
[2651] Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
[2652] 145 150 155 160
[2653] Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
[2654] 165 170 175
[2655] Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
[2656] 180 185 190
[2657] Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
[2658] 195 200 205
[2659] Asn Arg Gly Glu Cys
[2660] 210
[2661] <210> 58
[2662] <211> 106
[2663] <212> PRT
[2664] <213> 人工序列
[2665] <220>
[2666] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2667] <400> 58
[2668] Gln Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Ala Ser Val Gly
[2669] 1 5 10 15
[2670] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
[2671] 20 25 30
[2672] Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
[2673] 35 40 45
[2674] Ala Thr Phe Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
[2675] 50 55 60
[2676] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
[2677] 65 70 75 80
[2678] Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Leu Thr
[2679] 85 90 95
[2680] Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2681] 100 105
[2682] <210> 59
[2683] <211> 121
[2684] <212> PRT
[2685] <213> 人工序列
[2686] <220>
[2687] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[2688] <400> 59
[2689] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2690] 1 5 10 15
[2691] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
[2692] 20 25 30
[2693] Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2694] 35 40 45
[2695] Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
[2696] 50 55 60
[2697] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[2698] 65 70 75 80
[2699] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2700] 85 90 95
[2701] Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
[2702] 100 105 110
[2703] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[2704] 115 120
[2705] <210> 60
[2706] <211> 108
[2707] <212> PRT
[2708] <213> 人工序列
[2709] <220>
[2710] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2711] <400> 60
[2712] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[2713] 1 5 10 15
[2714] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
[2715] 20 25 30
[2716] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
[2717] 35 40 45
[2718] Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
[2719] 50 55 60
[2720] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
[2721] 65 70 75 80
[2722] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
[2723] 85 90 95
[2724] Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2725] 100 105
[2726] <210> 61
[2727] <211> 214
[2728] <212> PRT
[2729] <213> 人工序列

[2730] <220>
[2731] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2732] <400> 61
[2733] Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
[2734] 1 5 10 15
[2735] Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
[2736] 20 25 30
[2737] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
[2738] 35 40 45
[2739] Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
[2740] 50 55 60
[2741] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly
[2742] 65 70 75 80
[2743] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
[2744] 85 90 95
[2745] Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
[2746] 100 105 110
[2747] Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
[2748] 115 120 125
[2749] Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
[2750] 130 135 140
[2751] Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
[2752] 145 150 155 160
[2753] Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
[2754] 165 170 175
[2755] Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
[2756] 180 185 190
[2757] Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
[2758] 195 200 205
[2759] Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[2760] 210
[2761] <210> 62
[2762] <211> 108
[2763] <212> PRT
[2764] <213> 人工序列
[2765] <220>
[2766] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2767] <400> 62
[2768] Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
[2769] 1 5 10 15
[2770] Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
[2771] 20 25 30

[2772] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
[2773] 35 40 45
[2774] Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
[2775] 50 55 60
[2776] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly
[2777] 65 70 75 80
[2778] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
[2779] 85 90 95
[2780] Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[2781] 100 105
[2782] <210> 63
[2783] <211> 449
[2784] <212> PRT
[2785] <213> 人工序列
[2786] <220>
[2787] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2788] <400> 63
[2789] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2790] 1 5 10 15
[2791] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[2792] 20 25 30
[2793] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2794] 35 40 45
[2795] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[2796] 50 55 60
[2797] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[2798] 65 70 75 80
[2799] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2800] 85 90 95
[2801] Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
[2802] 100 105 110
[2803] Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[2804] 115 120 125
[2805] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
[2806] 130 135 140
[2807] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[2808] 145 150 155 160
[2809] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[2810] 165 170 175
[2811] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[2812] 180 185 190
[2813] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

[2814] 195 200 205
[2815] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
[2816] 210 215 220
[2817] Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
[2818] 225 230 235 240
[2819] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[2820] 245 250 255
[2821] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
[2822] 260 265 270
[2823] Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[2824] 275 280 285
[2825] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[2826] 290 295 300
[2827] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[2828] 305 310 315 320
[2829] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
[2830] 325 330 335
[2831] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[2832] 340 345 350
[2833] Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[2834] 355 360 365
[2835] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[2836] 370 375 380
[2837] Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[2838] 385 390 395 400
[2839] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
[2840] 405 410 415
[2841] Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[2842] 420 425 430
[2843] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[2844] 435 440 445
[2845] Lys
[2846] <210> 64
[2847] <211> 122
[2848] <212> PRT
[2849] <213> 人工序列
[2850] <220>
[2851] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2852] <400> 64
[2853] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2854] 1 5 10 15
[2855] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

[2856] 20 25 30
[2857] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2858] 35 40 45
[2859] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[2860] 50 55 60
[2861] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[2862] 65 70 75 80
[2863] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2864] 85 90 95
[2865] Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
[2866] 100 105 110
[2867] Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[2868] 115 120
[2869] <210> 65
[2870] <211> 214
[2871] <212> PRT
[2872] <213> 人工序列
[2873] <220>
[2874] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2875] <400> 65
[2876] Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
[2877] 1 5 10 15
[2878] Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
[2879] 20 25 30
[2880] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
[2881] 35 40 45
[2882] Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[2883] 50 55 60
[2884] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
[2885] 65 70 75 80
[2886] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
[2887] 85 90 95
[2888] Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
[2889] 100 105 110
[2890] Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
[2891] 115 120 125
[2892] Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
[2893] 130 135 140
[2894] Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
[2895] 145 150 155 160
[2896] Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
[2897] 165 170 175

[2898] Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
[2899] 180 185 190
[2900] Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
[2901] 195 200 205
[2902] Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[2903] 210
[2904] <210> 66
[2905] <211> 108
[2906] <212> PRT
[2907] <213> 人工序列
[2908] <220>
[2909] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2910] <400> 66
[2911] Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
[2912] 1 5 10 15
[2913] Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
[2914] 20 25 30
[2915] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
[2916] 35 40 45
[2917] Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[2918] 50 55 60
[2919] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
[2920] 65 70 75 80
[2921] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
[2922] 85 90 95
[2923] Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[2924] 100 105
[2925] <210> 67
[2926] <211> 449
[2927] <212> PRT
[2928] <213> 人工序列
[2929] <220>
[2930] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2931] <400> 67
[2932] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2933] 1 5 10 15
[2934] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[2935] 20 25 30
[2936] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2937] 35 40 45
[2938] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[2939] 50 55 60

[2940] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[2941] 65 70 75 80
[2942] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2943] 85 90 95
[2944] Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
[2945] 100 105 110
[2946] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[2947] 115 120 125
[2948] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
[2949] 130 135 140
[2950] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[2951] 145 150 155 160
[2952] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[2953] 165 170 175
[2954] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[2955] 180 185 190
[2956] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
[2957] 195 200 205
[2958] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
[2959] 210 215 220
[2960] Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
[2961] 225 230 235 240
[2962] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[2963] 245 250 255
[2964] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
[2965] 260 265 270
[2966] Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[2967] 275 280 285
[2968] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[2969] 290 295 300
[2970] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[2971] 305 310 315 320
[2972] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
[2973] 325 330 335
[2974] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[2975] 340 345 350
[2976] Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[2977] 355 360 365
[2978] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[2979] 370 375 380
[2980] Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[2981] 385 390 395 400

[2982] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
[2983] 405 410 415
[2984] Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[2985] 420 425 430
[2986] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[2987] 435 440 445
[2988] Lys
[2989] <210> 68
[2990] <211> 122
[2991] <212> PRT
[2992] <213> 人工序列
[2993] <220>
[2994] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[2995] <400> 68
[2996] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2997] 1 5 10 15
[2998] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[2999] 20 25 30
[3000] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[3001] 35 40 45
[3002] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[3003] 50 55 60
[3004] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[3005] 65 70 75 80
[3006] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3007] 85 90 95
[3008] Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
[3009] 100 105 110
[3010] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3011] 115 120
[3012] <210> 69
[3013] <211> 121
[3014] <212> PRT
[3015] <213> 人工序列
[3016] <220>
[3017] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3018] <400> 69
[3019] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[3020] 1 5 10 15
[3021] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
[3022] 20 25 30
[3023] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile

[3024] 35 40 45
[3025] Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
[3026] 50 55 60
[3027] Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
[3028] 65 70 75 80
[3029] Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[3030] 85 90 95
[3031] Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
[3032] 100 105 110
[3033] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3034] 115 120
[3035] <210> 70
[3036] <211> 107
[3037] <212> PRT
[3038] <213> 人工序列
[3039] <220>
[3040] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3041] <400> 70
[3042] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[3043] 1 5 10 15
[3044] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[3045] 20 25 30
[3046] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[3047] 35 40 45
[3048] Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[3049] 50 55 60
[3050] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[3051] 65 70 75 80
[3052] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
[3053] 85 90 95
[3054] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[3055] 100 105
[3056] <210> 71
[3057] <211> 451
[3058] <212> PRT
[3059] <213> 人工序列
[3060] <220>
[3061] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3062] <400> 71
[3063] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[3064] 1 5 10 15
[3065] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly

[3066] 20 25 30
[3067] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
[3068] 35 40 45
[3069] Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
[3070] 50 55 60
[3071] Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
[3072] 65 70 75 80
[3073] Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[3074] 85 90 95
[3075] Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
[3076] 100 105 110
[3077] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[3078] 115 120 125
[3079] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[3080] 130 135 140
[3081] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[3082] 145 150 155 160
[3083] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[3084] 165 170 175
[3085] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[3086] 180 185 190
[3087] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[3088] 195 200 205
[3089] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
[3090] 210 215 220
[3091] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[3092] 225 230 235 240
[3093] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[3094] 245 250 255
[3095] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[3096] 260 265 270
[3097] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[3098] 275 280 285
[3099] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[3100] 290 295 300
[3101] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[3102] 305 310 315 320
[3103] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[3104] 325 330 335
[3105] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[3106] 340 345 350
[3107] Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

[3108] 355 360 365
[3109] Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[3110] 370 375 380
[3111] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[3112] 385 390 395 400
[3113] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[3114] 405 410 415
[3115] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[3116] 420 425 430
[3117] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[3118] 435 440 445
[3119] Pro Gly Lys
[3120] 450
[3121] <210> 72
[3122] <211> 214
[3123] <212> PRT
[3124] <213> 人工序列
[3125] <220>
[3126] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3127] <400> 72
[3128] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[3129] 1 5 10 15
[3130] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[3131] 20 25 30
[3132] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[3133] 35 40 45
[3134] Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[3135] 50 55 60
[3136] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[3137] 65 70 75 80
[3138] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
[3139] 85 90 95
[3140] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[3141] 100 105 110
[3142] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[3143] 115 120 125
[3144] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[3145] 130 135 140
[3146] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[3147] 145 150 155 160
[3148] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[3149] 165 170 175

[3150] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[3151] 180 185 190
[3152] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[3153] 195 200 205
[3154] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[3155] 210
[3156] <210> 73
[3157] <211> 288
[3158] <212> PRT
[3159] <213> 智人
[3160] <400> 73
[3161] Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
[3162] 1 5 10 15
[3163] Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
[3164] 20 25 30
[3165] Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
[3166] 35 40 45
[3167] Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
[3168] 50 55 60
[3169] Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
[3170] 65 70 75 80
[3171] Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
[3172] 85 90 95
[3173] Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
[3174] 100 105 110
[3175] Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
[3176] 115 120 125
[3177] Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
[3178] 130 135 140
[3179] Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
[3180] 145 150 155 160
[3181] Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
[3182] 165 170 175
[3183] Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
[3184] 180 185 190
[3185] Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
[3186] 195 200 205
[3187] Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
[3188] 210 215 220
[3189] Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
[3190] 225 230 235 240
[3191] Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly

[3192] 245 250 255
[3193] Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
[3194] 260 265 270
[3195] Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
[3196] 275 280 285
[3197] <210> 74
[3198] <211> 176
[3199] <212> PRT
[3200] <213> 智人
[3201] <400> 74
[3202] Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
[3203] 1 5 10 15
[3204] Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
[3205] 20 25 30
[3206] Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
[3207] 35 40 45
[3208] Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
[3209] 50 55 60
[3210] Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
[3211] 65 70 75 80
[3212] Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
[3213] 85 90 95
[3214] Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
[3215] 100 105 110
[3216] Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val
[3217] 115 120 125
[3218] Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
[3219] 130 135 140
[3220] Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile
[3221] 145 150 155 160
[3222] Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr
[3223] 165 170 175
[3224] <210> 75
[3225] <211> 223
[3226] <212> PRT
[3227] <213> 智人
[3228] <400> 75
[3229] Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
[3230] 1 5 10 15
[3231] Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
[3232] 20 25 30
[3233] Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala

[3234] 35 40 45
[3235] Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
[3236] 50 55 60
[3237] Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
[3238] 65 70 75 80
[3239] Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
[3240] 85 90 95
[3241] Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
[3242] 100 105 110
[3243] Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
[3244] 115 120 125
[3245] Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
[3246] 130 135 140
[3247] Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
[3248] 145 150 155 160
[3249] Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
[3250] 165 170 175
[3251] Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
[3252] 180 185 190
[3253] Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
[3254] 195 200 205
[3255] Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
[3256] 210 215 220
[3257] <210> 76
[3258] <211> 301
[3259] <212> PRT
[3260] <213> 智人
[3261] <400> 76
[3262] Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
[3263] 1 5 10 15
[3264] Leu Leu Thr Arg Ser Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln
[3265] 20 25 30
[3266] Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
[3267] 35 40 45
[3268] Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
[3269] 50 55 60
[3270] Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser
[3271] 65 70 75 80
[3272] Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr
[3273] 85 90 95
[3274] Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile
[3275] 100 105 110

[3276] Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val
[3277] 115 120 125
[3278] Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe
[3279] 130 135 140
[3280] Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala
[3281] 145 150 155 160
[3282] Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile
[3283] 165 170 175
[3284] Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu
[3285] 180 185 190
[3286] Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly
[3287] 195 200 205
[3288] Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe
[3289] 210 215 220
[3290] Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile
[3291] 225 230 235 240
[3292] Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu
[3293] 245 250 255
[3294] Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr
[3295] 260 265 270
[3296] Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln
[3297] 275 280 285
[3298] Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
[3299] 290 295 300
[3300] <210> 77
[3301] <211> 278
[3302] <212> PRT
[3303] <213> 智人
[3304] <400> 77
[3305] Met Gly Ser Pro Gly Met Val Leu Gly Leu Leu Val Gln Ile Trp Ala
[3306] 1 5 10 15
[3307] Leu Gln Glu Ala Ser Ser Leu Ser Val Gln Gln Gly Pro Asn Leu Leu
[3308] 20 25 30
[3309] Gln Val Arg Gln Gly Ser Gln Ala Thr Leu Val Cys Gln Val Asp Gln
[3310] 35 40 45
[3311] Ala Thr Ala Trp Glu Arg Leu Arg Val Lys Trp Thr Lys Asp Gly Ala
[3312] 50 55 60
[3313] Ile Leu Cys Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Gly Ser Leu Ser Leu Gly Val
[3314] 65 70 75 80
[3315] Cys Gly Pro Gln Gly Arg Leu Ser Trp Gln Ala Pro Ser His Leu Thr
[3316] 85 90 95
[3317] Leu Gln Leu Asp Pro Val Ser Leu Asn His Ser Gly Ala Tyr Val Cys

[3318] 100 105 110
[3319] Trp Ala Ala Val Glu Ile Pro Glu Leu Glu Glu Ala Glu Gly Asn Ile
[3320] 115 120 125
[3321] Thr Arg Leu Phe Val Asp Pro Asp Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg
[3322] 130 135 140
[3323] Ile Ala Ser Phe Pro Gly Phe Leu Phe Val Leu Leu Gly Val Gly Ser
[3324] 145 150 155 160
[3325] Met Gly Val Ala Ala Ile Val Trp Gly Ala Trp Phe Trp Gly Arg Arg
[3326] 165 170 175
[3327] Ser Cys Gln Gln Arg Asp Ser Gly Asn Ala Phe Tyr Ser Asn Val Leu
[3328] 180 185 190
[3329] Tyr Arg Pro Arg Gly Ala Pro Lys Lys Ser Glu Asp Cys Ser Gly Glu
[3330] 195 200 205
[3331] Gly Lys Asp Gln Arg Gly Gln Ser Ile Tyr Ser Thr Ser Phe Pro Gln
[3332] 210 215 220
[3333] Pro Ala Pro Arg Gln Pro His Leu Ala Ser Arg Pro Cys Pro Ser Pro
[3334] 225 230 235 240
[3335] Arg Pro Cys Pro Ser Pro Arg Pro Gly His Pro Val Ser Met Val Arg
[3336] 245 250 255
[3337] Val Ser Pro Arg Pro Ser Pro Thr Gln Gln Pro Arg Pro Lys Gly Phe
[3338] 260 265 270
[3339] Pro Lys Val Gly Glu Glu
[3340] 275
[3341] <210> 78
[3342] <211> 277
[3343] <212> PRT
[3344] <213> 智人
[3345] <400> 78
[3346] Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
[3347] 1 5 10 15
[3348] Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
[3349] 20 25 30
[3350] Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
[3351] 35 40 45
[3352] Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
[3353] 50 55 60
[3354] Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
[3355] 65 70 75 80
[3356] Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
[3357] 85 90 95
[3358] Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
[3359] 100 105 110

[3360] Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
[3361] 115 120 125
[3362] Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
[3363] 130 135 140
[3364] Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
[3365] 145 150 155 160
[3366] Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
[3367] 165 170 175
[3368] Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
[3369] 180 185 190
[3370] Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
[3371] 195 200 205
[3372] Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
[3373] 210 215 220
[3374] Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
[3375] 225 230 235 240
[3376] Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
[3377] 245 250 255
[3378] Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
[3379] 260 265 270
[3380] Thr Leu Ala Lys Ile
[3381] 275
[3382] <210> 79
[3383] <211> 10
[3384] <212> PRT
[3385] <213> 人工序列
[3386] <220>
[3387] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3388] <400> 79
[3389] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
[3390] 1 5 10
[3391] <210> 80
[3392] <211> 17
[3393] <212> PRT
[3394] <213> 人工序列
[3395] <220>
[3396] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3397] <400> 80
[3398] Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[3399] 1 5 10 15
[3400] Gly
[3401] <210> 81

[3402] <211> 13
[3403] <212> PRT
[3404] <213> 人工序列
[3405] <220>
[3406] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3407] <400> 81
[3408] Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr
[3409] 1 5 10
[3410] <210> 82
[3411] <211> 11
[3412] <212> PRT
[3413] <213> 人工序列
[3414] <220>
[3415] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3416] <400> 82
[3417] Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His
[3418] 1 5 10
[3419] <210> 83
[3420] <211> 7
[3421] <212> PRT
[3422] <213> 人工序列
[3423] <220>
[3424] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3425] <400> 83
[3426] Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser
[3427] 1 5
[3428] <210> 84
[3429] <211> 9
[3430] <212> PRT
[3431] <213> 人工序列
[3432] <220>
[3433] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3434] <400> 84
[3435] Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
[3436] 1 5
[3437] <210> 85
[3438] <211> 122
[3439] <212> PRT
[3440] <213> 人工序列
[3441] <220>
[3442] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3443] <400> 85

[3444] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[3445] 1 5 10 15
[3446] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[3447] 20 25 30
[3448] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[3449] 35 40 45
[3450] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[3451] 50 55 60
[3452] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[3453] 65 70 75 80
[3454] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3455] 85 90 95
[3456] Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
[3457] 100 105 110
[3458] Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3459] 115 120
[3460] <210> 86
[3461] <211> 108
[3462] <212> PRT
[3463] <213> 人工序列
[3464] <220>
[3465] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3466] <400> 86
[3467] Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
[3468] 1 5 10 15
[3469] Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
[3470] 20 25 30
[3471] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
[3472] 35 40 45
[3473] Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
[3474] 50 55 60
[3475] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly
[3476] 65 70 75 80
[3477] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
[3478] 85 90 95
[3479] Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[3480] 100 105
[3481] <210> 87
[3482] <211> 449
[3483] <212> PRT
[3484] <213> 人工序列
[3485] <220>

[3486] <223> 人工序列的描述:合成多肽

[3487] <400> 87

[3488] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[3489] 1 5 10 15
[3490] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[3491] 20 25 30
[3492] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[3493] 35 40 45
[3494] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[3495] 50 55 60
[3496] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[3497] 65 70 75 80
[3498] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3499] 85 90 95
[3500] Ala Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp
[3501] 100 105 110
[3502] Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[3503] 115 120 125
[3504] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
[3505] 130 135 140
[3506] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[3507] 145 150 155 160
[3508] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[3509] 165 170 175
[3510] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[3511] 180 185 190
[3512] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
[3513] 195 200 205
[3514] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
[3515] 210 215 220
[3516] Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
[3517] 225 230 235 240
[3518] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[3519] 245 250 255
[3520] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
[3521] 260 265 270
[3522] Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[3523] 275 280 285
[3524] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[3525] 290 295 300
[3526] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[3527] 305 310 315 320

[3528] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
[3529] 325 330 335
[3530] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[3531] 340 345 350
[3532] Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[3533] 355 360 365
[3534] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[3535] 370 375 380
[3536] Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[3537] 385 390 395 400
[3538] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
[3539] 405 410 415
[3540] Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[3541] 420 425 430
[3542] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[3543] 435 440 445
[3544] Lys
[3545] <210> 88
[3546] <211> 214
[3547] <212> PRT
[3548] <213> 人工序列
[3549] <220>
[3550] <223> 人工序列的描述:合成多肽
[3551] <400> 88
[3552] Gln Thr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
[3553] 1 5 10 15
[3554] Thr Ala Ser Ile Ser Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val
[3555] 20 25 30
[3556] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
[3557] 35 40 45
[3558] Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
[3559] 50 55 60
[3560] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile His Arg Val Glu Ala Gly
[3561] 65 70 75 80
[3562] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His
[3563] 85 90 95
[3564] Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
[3565] 100 105 110
[3566] Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
[3567] 115 120 125
[3568] Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
[3569] 130 135 140

[3570] Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
[3571] 145 150 155 160
[3572] Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
[3573] 165 170 175
[3574] Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
[3575] 180 185 190
[3576] Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
[3577] 195 200 205
[3578] Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[3579] 210
[3580] <210> 89
[3581] <211> 712
[3582] <212> PRT
[3583] <213> 人工序列
[3584] <220>
[3585] <223> BiS3 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) HC
[3586] <400> 89
[3587] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[3588] 1 5 10 15
[3589] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[3590] 20 25 30
[3591] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[3592] 35 40 45
[3593] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val
[3594] 50 55 60
[3595] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[3596] 65 70 75 80
[3597] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3598] 85 90 95
[3599] Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
[3600] 100 105 110
[3601] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[3602] 115 120 125
[3603] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[3604] 130 135 140
[3605] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[3606] 145 150 155 160
[3607] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[3608] 165 170 175
[3609] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[3610] 180 185 190
[3611] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

[3612] 195 200 205
[3613] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
[3614] 210 215 220
[3615] Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
[3616] 225 230 235 240
[3617] Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[3618] 245 250 255
[3619] Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[3620] 260 265 270
[3621] His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[3622] 275 280 285
[3623] Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[3624] 290 295 300
[3625] Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[3626] 305 310 315 320
[3627] Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
[3628] 325 330 335
[3629] Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[3630] 340 345 350
[3631] Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[3632] 355 360 365
[3633] Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[3634] 370 375 380
[3635] Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[3636] 385 390 395 400
[3637] Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[3638] 405 410 415
[3639] Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[3640] 420 425 430
[3641] Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[3642] 435 440 445
[3643] Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
[3644] 450 455 460
[3645] Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
[3646] 465 470 475 480
[3647] Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met
[3648] 485 490 495
[3649] Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Ala
[3650] 500 505 510
[3651] Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
[3652] 515 520 525
[3653] Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

[3654] 530 535 540
[3655] Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
[3656] 545 550 555 560
[3657] Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln
[3658] 565 570 575
[3659] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[3660] 580 585 590
[3661] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val Leu
[3662] 595 600 605
[3663] Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile
[3664] 610 615 620
[3665] Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp Tyr Gln
[3666] 625 630 635 640
[3667] Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser Asp
[3668] 645 650 655
[3669] Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
[3670] 660 665 670
[3671] Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp
[3672] 675 680 685
[3673] Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His Phe Leu Phe Gly
[3674] 690 695 700
[3675] Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[3676] 705 710
[3677] <210> 90
[3678] <211> 219
[3679] <212> PRT
[3680] <213> 人工序列
[3681] <220>
[3682] <223> BiS3 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) LC
[3683] <400> 90
[3684] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[3685] 1 5 10 15
[3686] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
[3687] 20 25 30
[3688] Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
[3689] 35 40 45
[3690] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
[3691] 50 55 60
[3692] Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
[3693] 65 70 75 80
[3694] Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
[3695] 85 90 95

[3696] Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[3697] 100 105 110
[3698] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[3699] 115 120 125
[3700] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[3701] 130 135 140
[3702] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[3703] 145 150 155 160
[3704] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[3705] 165 170 175
[3706] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[3707] 180 185 190
[3708] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[3709] 195 200 205
[3710] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[3711] 210 215
[3712] <210> 91
[3713] <211> 722
[3714] <212> PRT
[3715] <213> 人工序列
[3716] <220>
[3717] <223> BiS5 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) HC
[3718] <400> 91
[3719] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[3720] 1 5 10 15
[3721] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[3722] 20 25 30
[3723] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[3724] 35 40 45
[3725] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val
[3726] 50 55 60
[3727] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[3728] 65 70 75 80
[3729] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3730] 85 90 95
[3731] Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
[3732] 100 105 110
[3733] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[3734] 115 120 125
[3735] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[3736] 130 135 140
[3737] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

[3738] 145 150 155 160
[3739] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[3740] 165 170 175
[3741] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[3742] 180 185 190
[3743] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[3744] 195 200 205
[3745] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
[3746] 210 215 220
[3747] Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
[3748] 225 230 235 240
[3749] Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[3750] 245 250 255
[3751] Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[3752] 260 265 270
[3753] His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[3754] 275 280 285
[3755] Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[3756] 290 295 300
[3757] Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[3758] 305 310 315 320
[3759] Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser
[3760] 325 330 335
[3761] Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[3762] 340 345 350
[3763] Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[3764] 355 360 365
[3765] Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[3766] 370 375 380
[3767] Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
[3768] 385 390 395 400
[3769] Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
[3770] 405 410 415
[3771] Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
[3772] 420 425 430
[3773] Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser
[3774] 435 440 445
[3775] Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[3776] 450 455 460
[3777] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
[3778] 465 470 475 480
[3779] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[3780] 485 490 495
[3781] Arg Gly Ser Tyr Gly Thr Tyr Tyr Gly Asn Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly
[3782] 500 505 510
[3783] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[3784] 515 520 525
[3785] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Val
[3786] 530 535 540
[3787] Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg
[3788] 545 550 555 560
[3789] Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ile Gly Gly Lys Ser Val His Trp Tyr
[3790] 565 570 575
[3791] Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Ser
[3792] 580 585 590
[3793] Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly
[3794] 595 600 605
[3795] Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala
[3796] 610 615 620
[3797] Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Asp Arg Arg Ser Asp His Phe Leu Phe
[3798] 625 630 635 640
[3799] Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[3800] 645 650 655
[3801] Gly Gly Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
[3802] 660 665 670
[3803] Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
[3804] 675 680 685
[3805] Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
[3806] 690 695 700
[3807] Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
[3808] 705 710 715 720
[3809] Gly Lys
[3810] <210> 92
[3811] <211> 219
[3812] <212> PRT
[3813] <213> 人工序列
[3814] <220>
[3815] <223> BiS5 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) LC
[3816] <400> 92
[3817] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[3818] 1 5 10 15
[3819] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
[3820] 20 25 30
[3821] Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

[3822] 35 40 45
[3823] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
[3824] 50 55 60
[3825] Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
[3826] 65 70 75 80
[3827] Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
[3828] 85 90 95
[3829] Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[3830] 100 105 110
[3831] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[3832] 115 120 125
[3833] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[3834] 130 135 140
[3835] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[3836] 145 150 155 160
[3837] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[3838] 165 170 175
[3839] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[3840] 180 185 190
[3841] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[3842] 195 200 205
[3843] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[3844] 210 215
[3845] <210> 93
[3846] <211> 214
[3847] <212> PRT
[3848] <213> 人工序列
[3849] <220>
[3850] <223> OX40SLR LCv kappa
[3851] <400> 93
[3852] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[3853] 1 5 10 15
[3854] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[3855] 20 25 30
[3856] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[3857] 35 40 45
[3858] Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[3859] 50 55 60
[3860] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[3861] 65 70 75 80
[3862] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
[3863] 85 90 95

[3864] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[3865] 100 105 110
[3866] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[3867] 115 120 125
[3868] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[3869] 130 135 140
[3870] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[3871] 145 150 155 160
[3872] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[3873] 165 170 175
[3874] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[3875] 180 185 190
[3876] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[3877] 195 200 205
[3878] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[3879] 210
[3880] <210> 94
[3881] <211> 720
[3882] <212> PRT
[3883] <213> 人工序列
[3884] <220>
[3885] <223> BiS5-OX40SLR HC-G1-N434A-PD-L1
[3886] <400> 94
[3887] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[3888] 1 5 10 15
[3889] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
[3890] 20 25 30
[3891] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
[3892] 35 40 45
[3893] Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Ala Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
[3894] 50 55 60
[3895] Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
[3896] 65 70 75 80
[3897] Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[3898] 85 90 95
[3899] Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Glu Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
[3900] 100 105 110
[3901] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[3902] 115 120 125
[3903] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[3904] 130 135 140
[3905] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

[3906] 145 150 155 160
[3907] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[3908] 165 170 175
[3909] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[3910] 180 185 190
[3911] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[3912] 195 200 205
[3913] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
[3914] 210 215 220
[3915] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[3916] 225 230 235 240
[3917] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[3918] 245 250 255
[3919] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[3920] 260 265 270
[3921] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[3922] 275 280 285
[3923] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[3924] 290 295 300
[3925] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[3926] 305 310 315 320
[3927] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[3928] 325 330 335
[3929] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[3930] 340 345 350
[3931] Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
[3932] 355 360 365
[3933] Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[3934] 370 375 380
[3935] Trp Glu Ser Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
[3936] 385 390 395 400
[3937] Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
[3938] 405 410 415
[3939] Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met
[3940] 420 425 430
[3941] Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Asn
[3942] 435 440 445
[3943] Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
[3944] 450 455 460
[3945] Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
[3946] 465 470 475 480
[3947] Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

[3948] 485 490 495
[3949] Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[3950] 500 505 510
[3951] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[3952] 515 520 525
[3953] Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr
[3954] 530 535 540
[3955] Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
[3956] 545 550 555 560
[3957] Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr
[3958] 565 570 575
[3959] Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser
[3960] 580 585 590
[3961] Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[3962] 595 600 605
[3963] Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
[3964] 610 615 620
[3965] Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys
[3966] 625 630 635 640
[3967] Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[3968] 645 650 655
[3969] Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
[3970] 660 665 670
[3971] Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
[3972] 675 680 685
[3973] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
[3974] 690 695 700
[3975] Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[3976] 705 710 715 720
[3977] <210> 95
[3978] <211> 707
[3979] <212> PRT
[3980] <213> 人工序列
[3981] <220>
[3982] <223> BiS2-PD-1- OX40 HC -4P
[3983] <400> 95
[3984] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[3985] 1 5 10 15
[3986] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[3987] 20 25 30
[3988] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[3989] 35 40 45

[3990] Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[3991] 50 55 60
[3992] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[3993] 65 70 75 80
[3994] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
[3995] 85 90 95
[3996] Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
[3997] 100 105 110
[3998] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
[3999] 115 120 125
[4000] Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr
[4001] 130 135 140
[4002] Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly Tyr
[4003] 145 150 155 160
[4004] Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Cys Leu Glu Tyr Ile Gly
[4005] 165 170 175
[4006] Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser
[4007] 180 185 190
[4008] Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln
[4009] 195 200 205
[4010] Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
[4011] 210 215 220
[4012] Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[4013] 225 230 235 240
[4014] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[4015] 245 250 255
[4016] Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
[4017] 260 265 270
[4018] Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
[4019] 275 280 285
[4020] Asp Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[4021] 290 295 300
[4022] Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp
[4023] 305 310 315 320
[4024] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
[4025] 325 330 335
[4026] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[4027] 340 345 350
[4028] Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp
[4029] 355 360 365
[4030] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
[4031] 370 375 380

[4032] Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
[4033] 385 390 395 400
[4034] Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
[4035] 405 410 415
[4036] Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
[4037] 420 425 430
[4038] Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
[4039] 435 440 445
[4040] Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
[4041] 450 455 460
[4042] Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
[4043] 465 470 475 480
[4044] Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
[4045] 485 490 495
[4046] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[4047] 500 505 510
[4048] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
[4049] 515 520 525
[4050] Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[4051] 530 535 540
[4052] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
[4053] 545 550 555 560
[4054] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[4055] 565 570 575
[4056] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
[4057] 580 585 590
[4058] Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[4059] 595 600 605
[4060] Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
[4061] 610 615 620
[4062] Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[4063] 625 630 635 640
[4064] Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[4065] 645 650 655
[4066] Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
[4067] 660 665 670
[4068] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[4069] 675 680 685
[4070] His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[4071] 690 695 700
[4072] Leu Gly Lys
[4073] 705

[4074] <210> 96
[4075] <211> 707
[4076] <212> PRT
[4077] <213> 人工序列
[4078] <220>
[4079] <223> BiS3-OX40 HC-4P-PD-1
[4080] <400> 96
[4081] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[4082] 1 5 10 15
[4083] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[4084] 20 25 30
[4085] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[4086] 35 40 45
[4087] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Ala Asp Ser Val
[4088] 50 55 60
[4089] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[4090] 65 70 75 80
[4091] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[4092] 85 90 95
[4093] Ala Arg Arg Ala Pro Asn Ser Phe Tyr Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
[4094] 100 105 110
[4095] Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[4096] 115 120 125
[4097] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
[4098] 130 135 140
[4099] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[4100] 145 150 155 160
[4101] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[4102] 165 170 175
[4103] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[4104] 180 185 190
[4105] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
[4106] 195 200 205
[4107] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
[4108] 210 215 220
[4109] Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
[4110] 225 230 235 240
[4111] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[4112] 245 250 255
[4113] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
[4114] 260 265 270
[4115] Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

[4116] 275 280 285
[4117] Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[4118] 290 295 300
[4119] Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[4120] 305 310 315 320
[4121] Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
[4122] 325 330 335
[4123] Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
[4124] 340 345 350
[4125] Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
[4126] 355 360 365
[4127] Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[4128] 370 375 380
[4129] Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[4130] 385 390 395 400
[4131] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
[4132] 405 410 415
[4133] Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[4134] 420 425 430
[4135] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[4136] 435 440 445
[4137] Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
[4138] 450 455 460
[4139] Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
[4140] 465 470 475 480
[4141] Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
[4142] 485 490 495
[4143] Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys
[4144] 500 505 510
[4145] Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
[4146] 515 520 525
[4147] Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
[4148] 530 535 540
[4149] Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly
[4150] 545 550 555 560
[4151] Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[4152] 565 570 575
[4153] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu
[4154] 580 585 590
[4155] Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys
[4156] 595 600 605
[4157] Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Asn Trp Ile Arg

[4158] 610 615 620
[4159] Lys His Pro Gly Lys Cys Leu Glu Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn
[4160] 625 630 635 640
[4161] Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn
[4162] 645 650 655
[4163] Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr
[4164] 660 665 670
[4165] Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr
[4166] 675 680 685
[4167] Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[4168] 690 695 700
[4169] Val Ser Ser
[4170] 705
[4171] <210> 97
[4172] <211> 219
[4173] <212> PRT
[4174] <213> 人工序列
[4175] <220>
[4176] <223> PD1 LCv kappa
[4177] <400> 97
[4178] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[4179] 1 5 10 15
[4180] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Lys His Thr Asn Leu
[4181] 20 25 30
[4182] Tyr Trp Ser Arg His Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
[4183] 35 40 45
[4184] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
[4185] 50 55 60
[4186] Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
[4187] 65 70 75 80
[4188] Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
[4189] 85 90 95
[4190] Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[4191] 100 105 110
[4192] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[4193] 115 120 125
[4194] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[4195] 130 135 140
[4196] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[4197] 145 150 155 160
[4198] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[4199] 165 170 175

[4200] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

[4201] 180 185 190

[4202] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

[4203] 195 200 205

[4204] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

[4205] 210 215

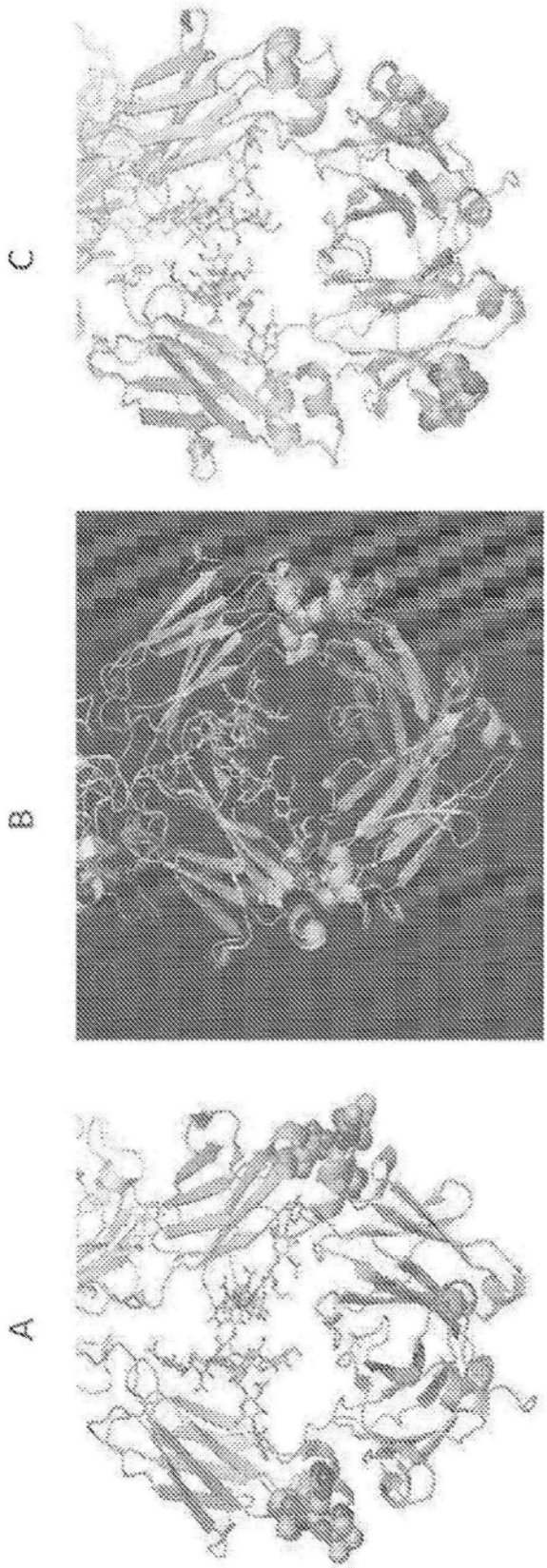


图1

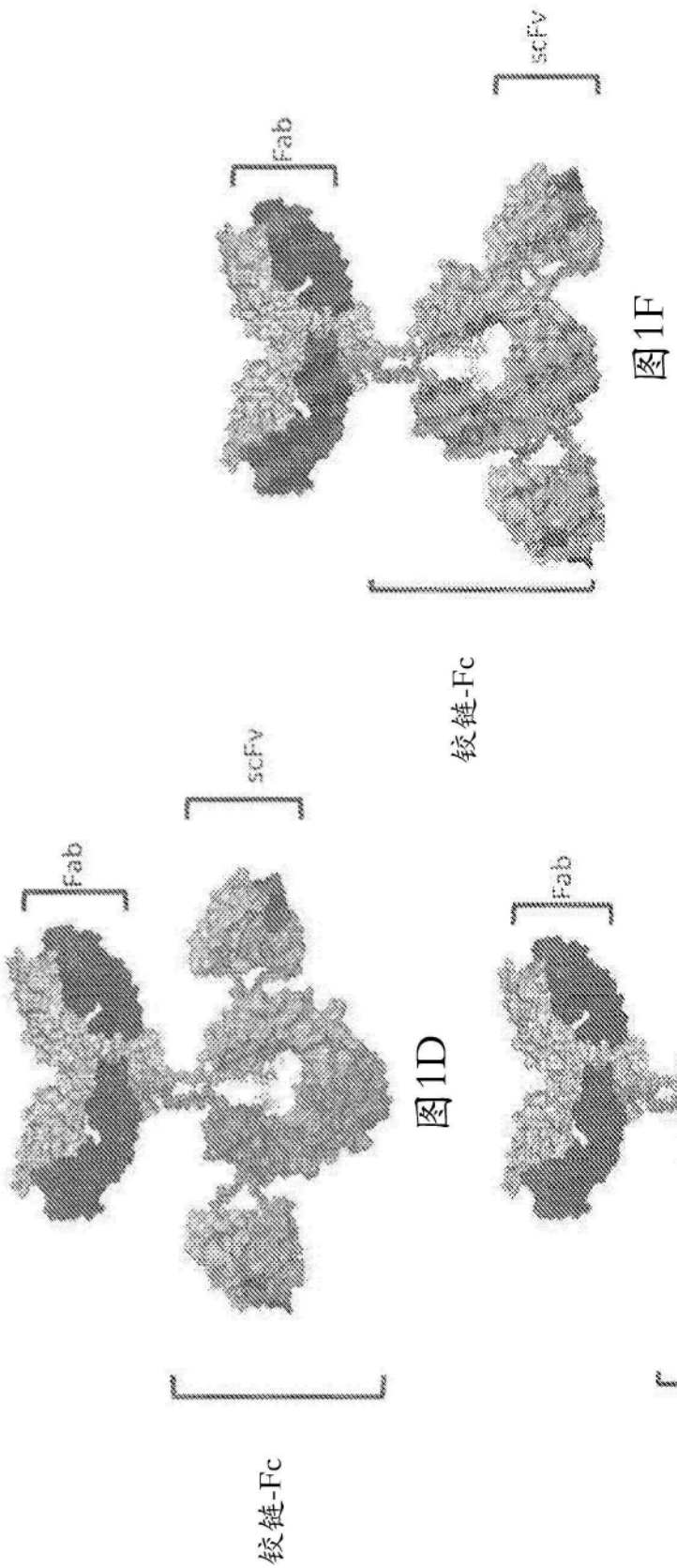


图1D

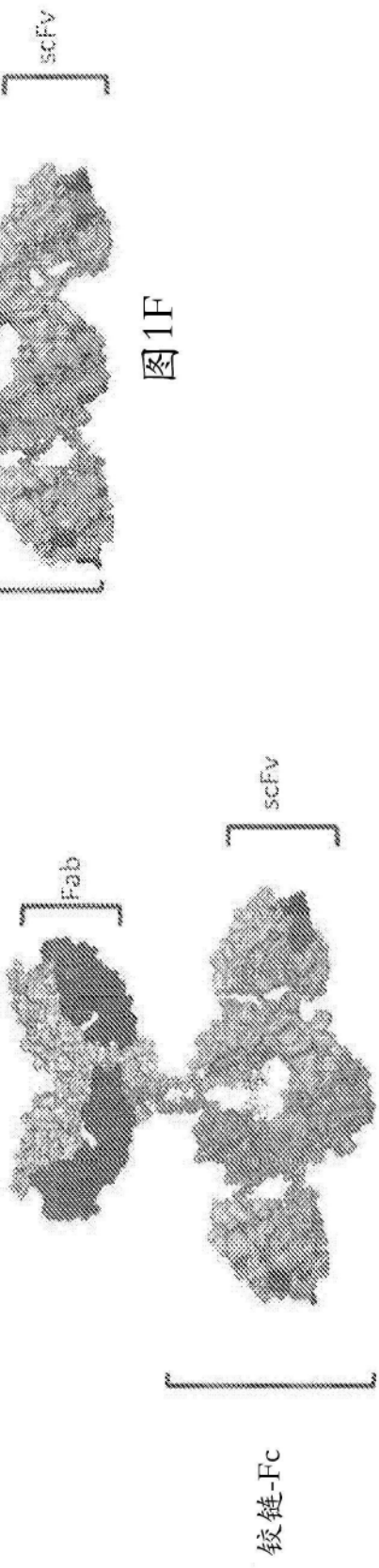


图1E

图1F

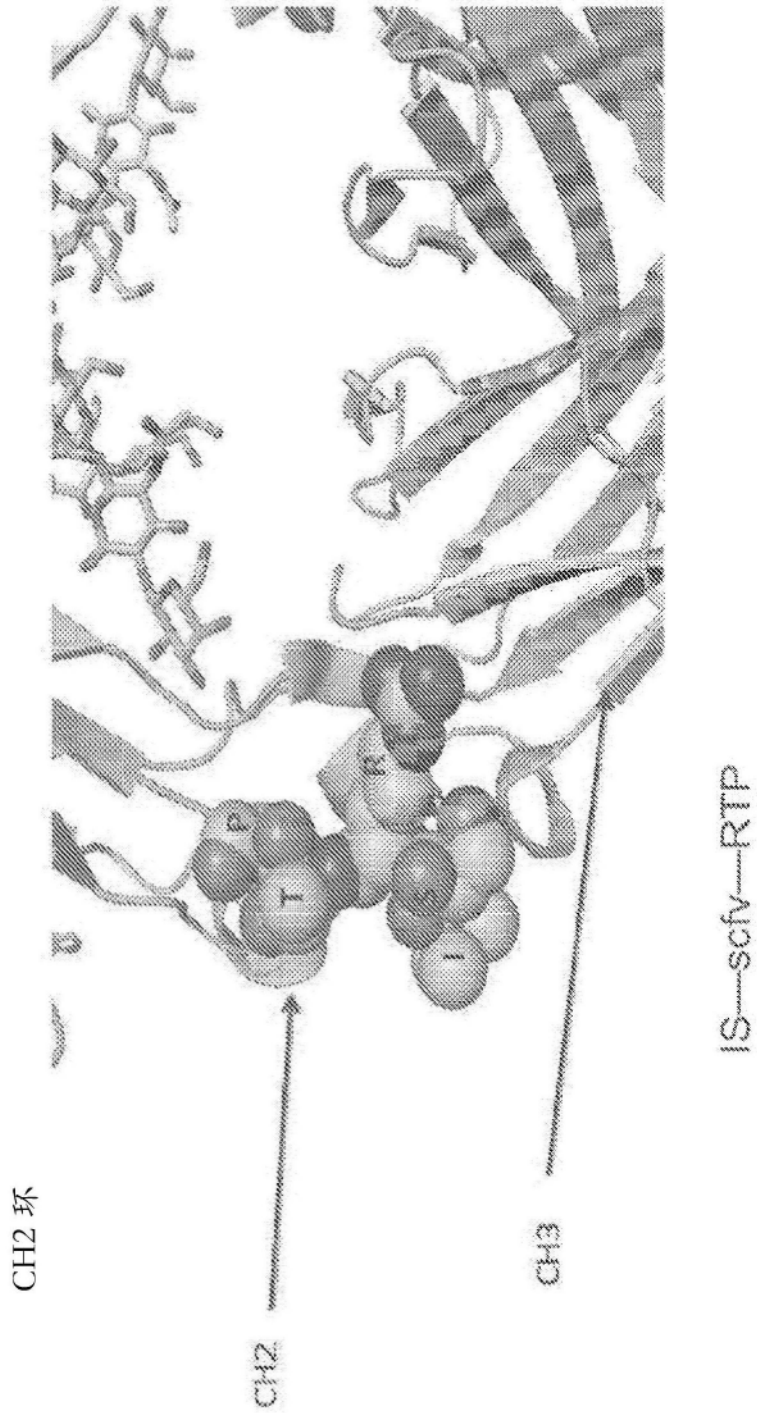


图2A

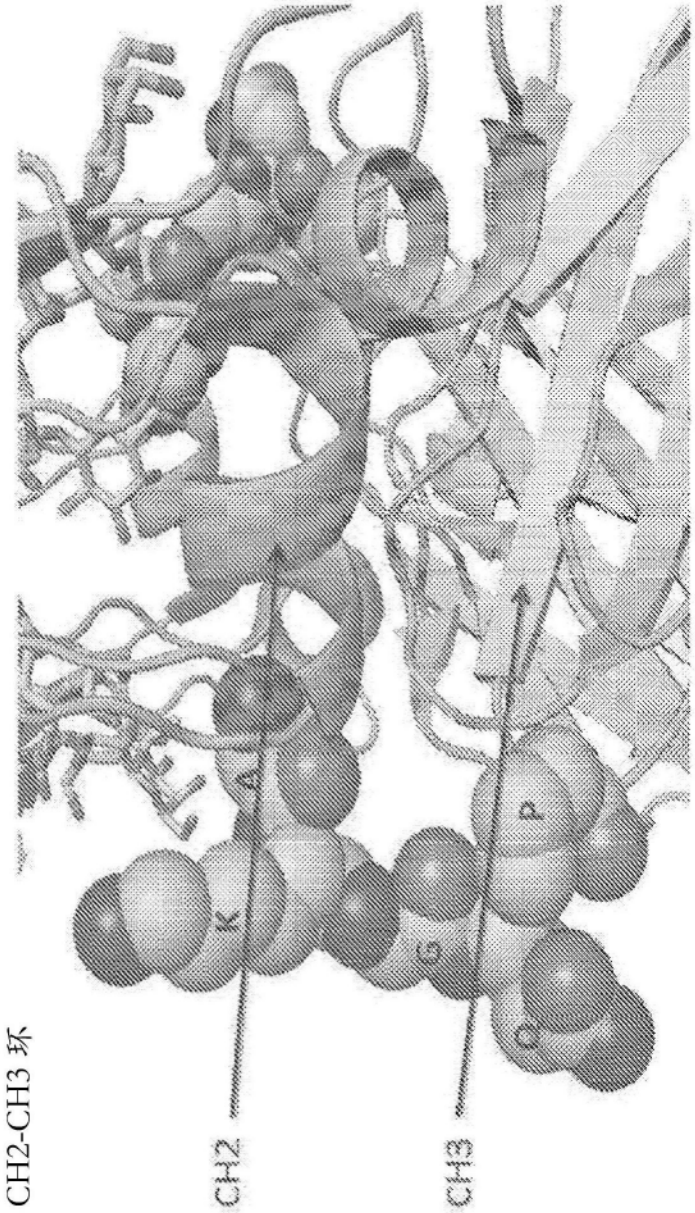


图2B

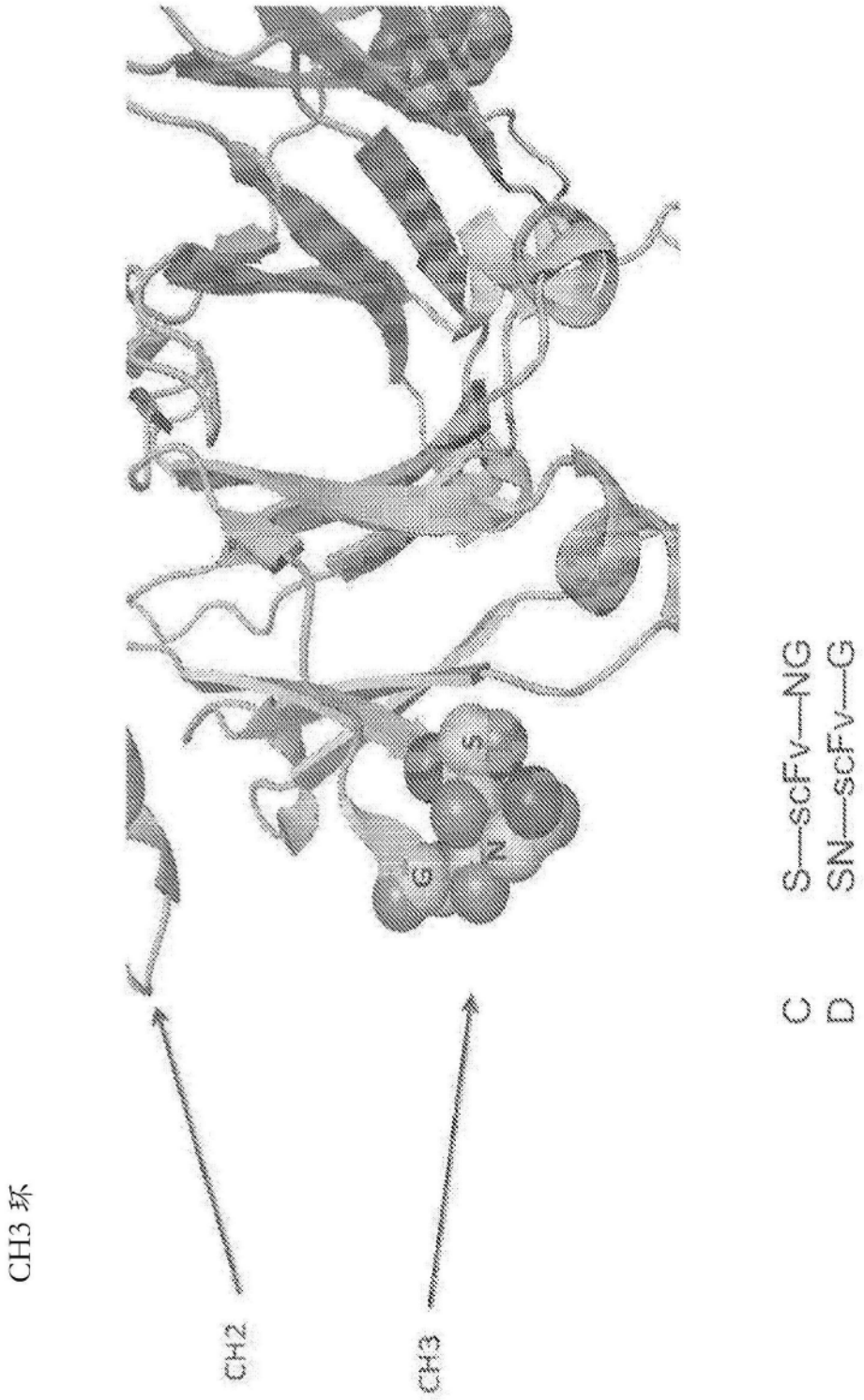


图2C

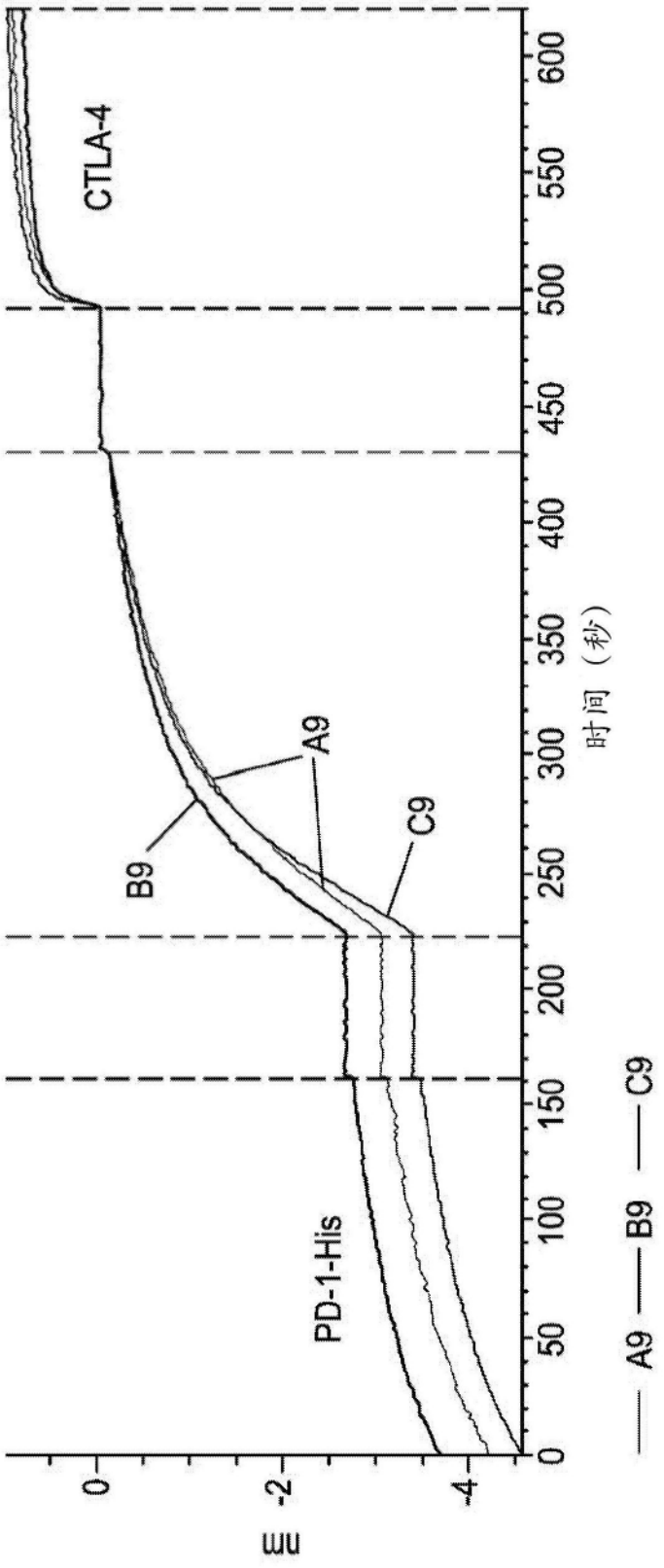

CTLA-4
PD-1-His
A9
B9
C9
nm
时间（秒）
0
-2
-4
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
A9
B9
C9

图3

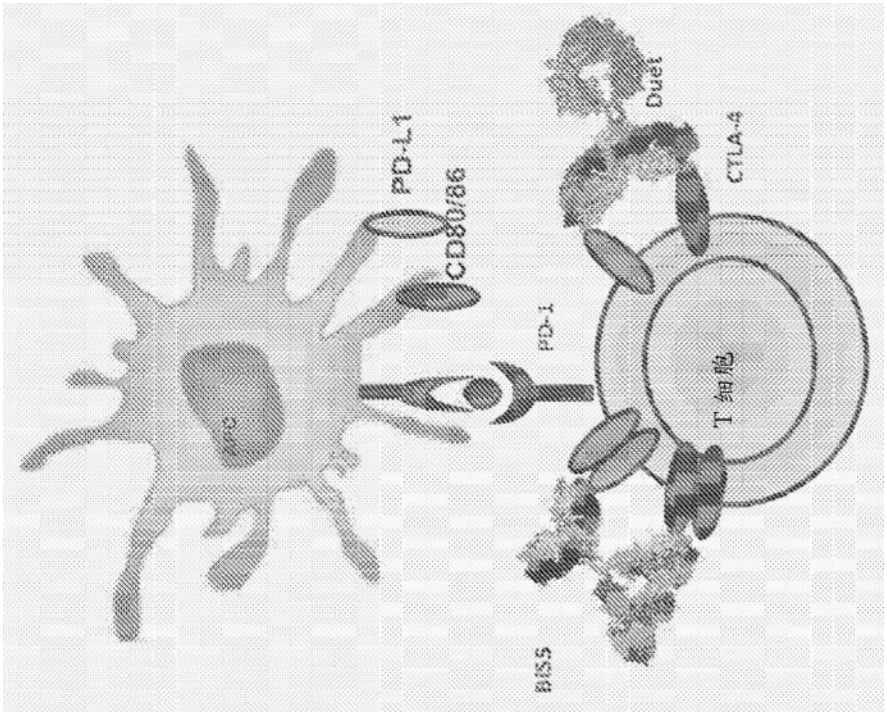


图4

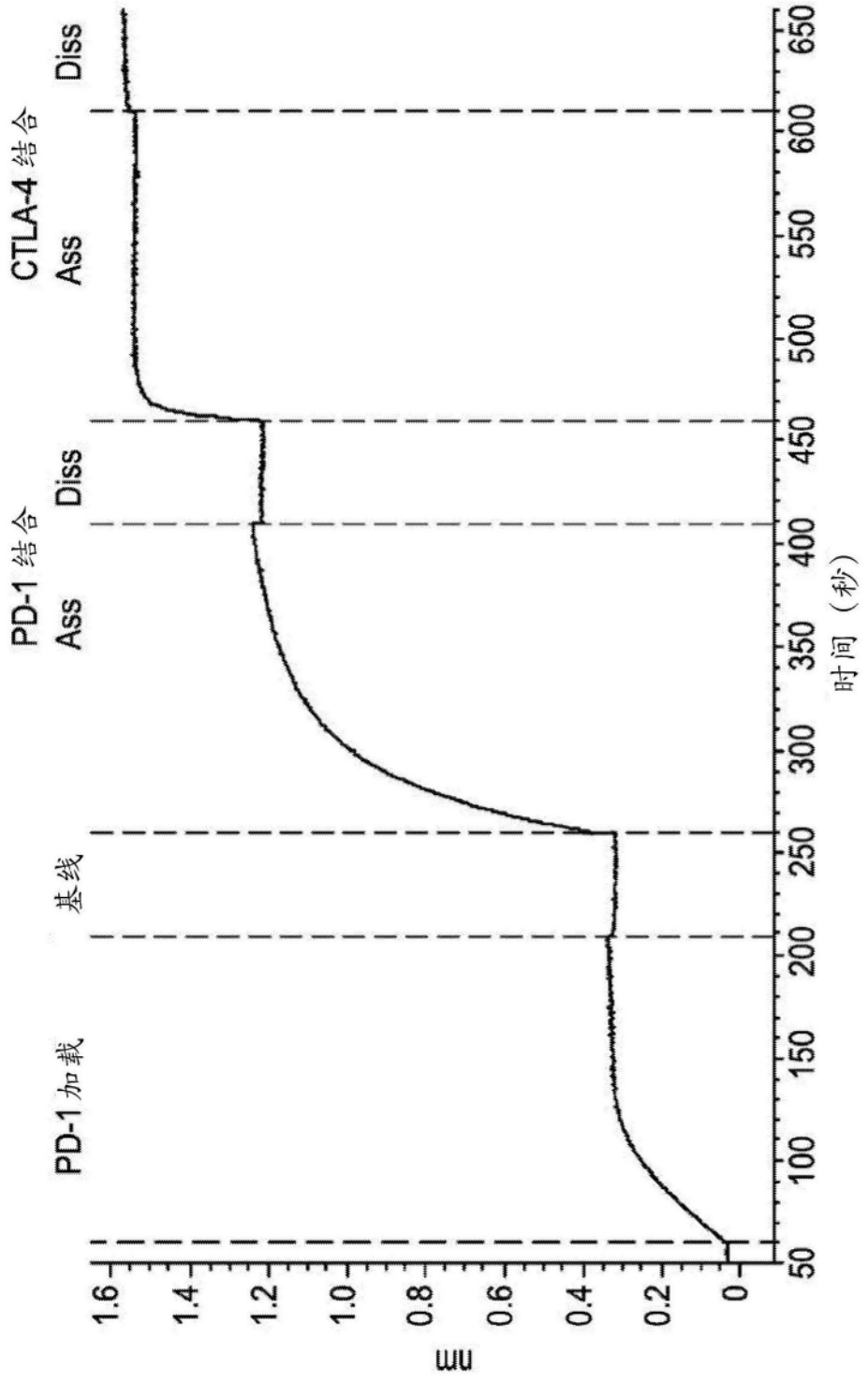

PD-1 加载
基线
PD-1 结合
Ass
Diss
CTLA-4 结合
Ass
Diss
nm
时间（秒）
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
650

图5

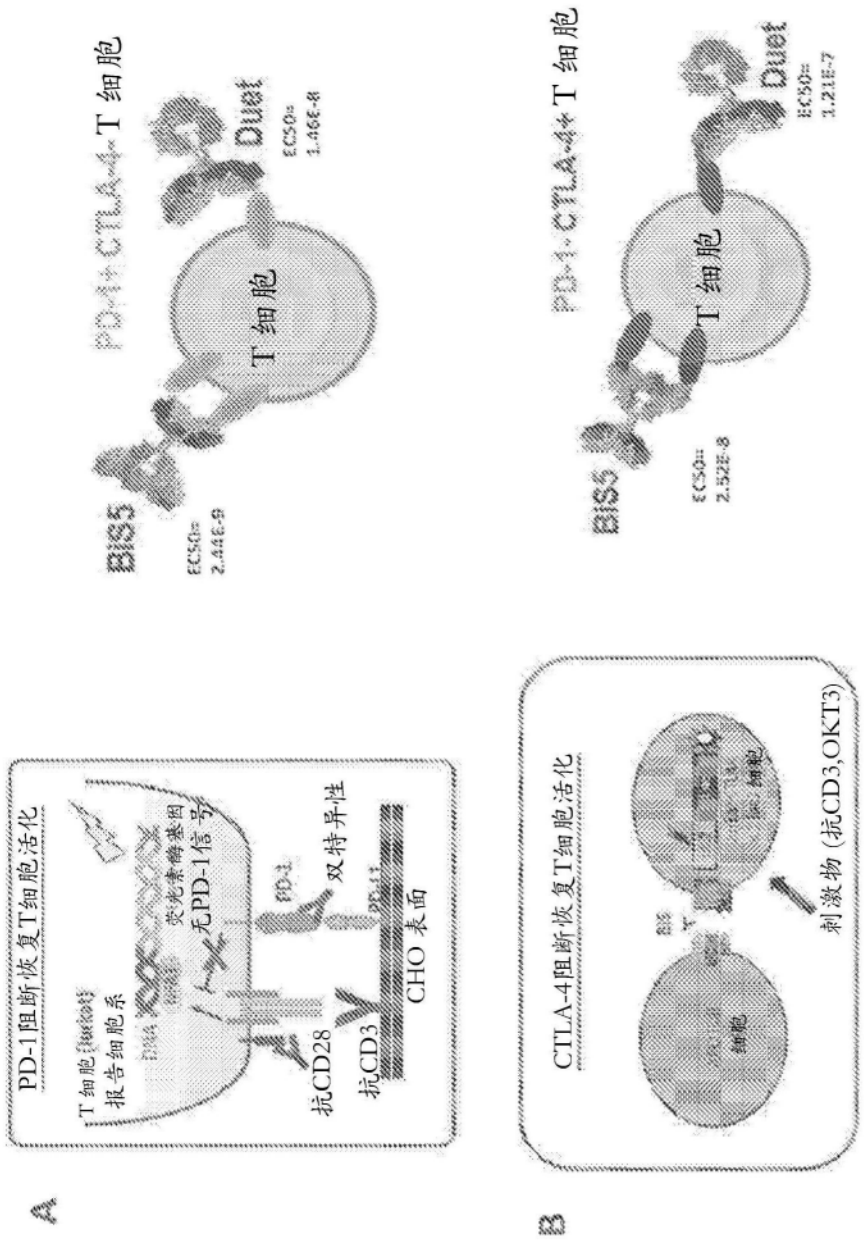

A
PD-1阻断恢复T细胞活化
T细胞
报告细胞系
荧光素酶基因
无PD-1信号
PD-1
双特异性
抗CD28
抗CD3
CHO 表面
B
CTLA-4阻断恢复T细胞活化
刺激物 (抗CD3,OKT3)
PD-1+ CTLA-4+ T 细胞
BiS5
T 细胞
Duet
PD-1- CTLA-4+ T 细胞
BiS5
T 细胞
Duet

图6

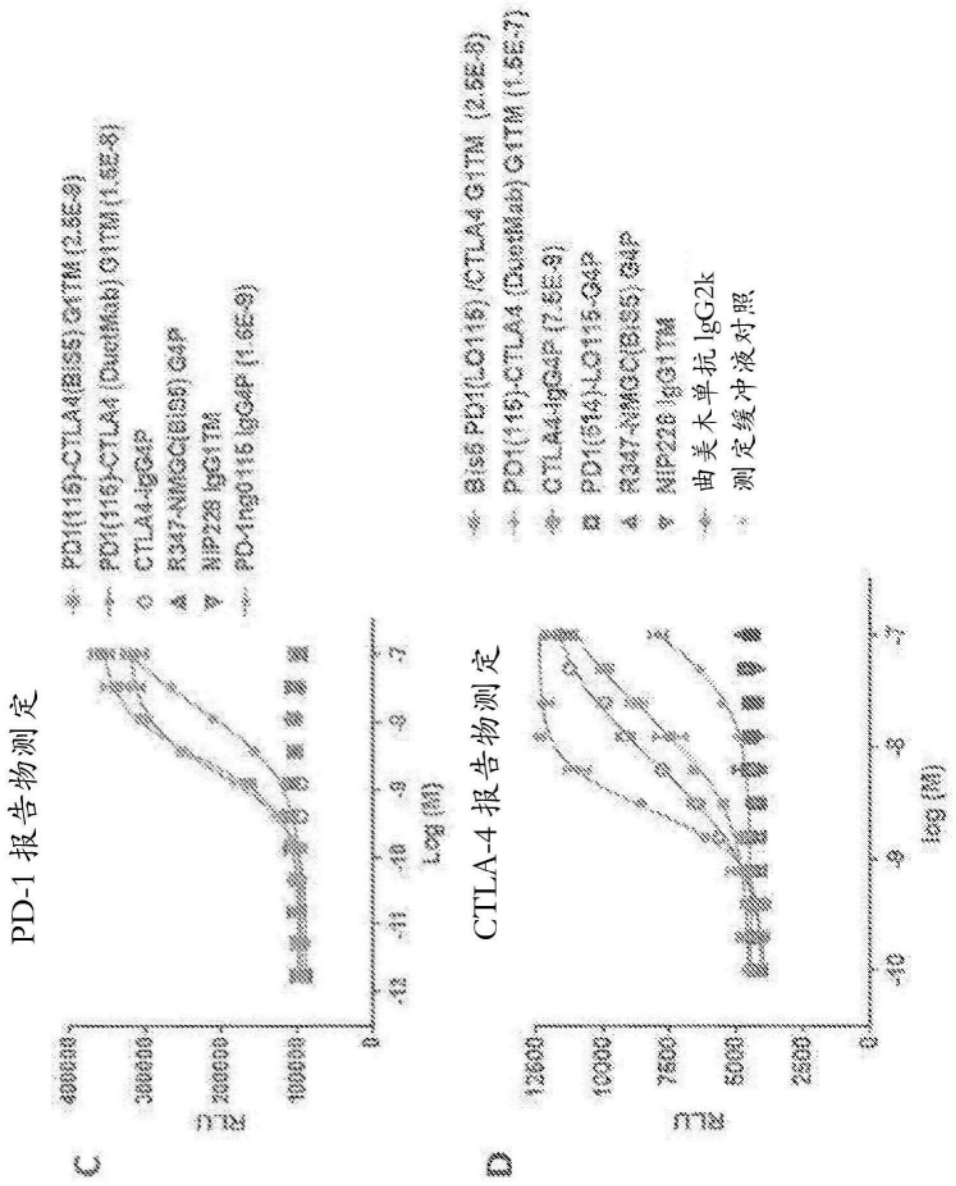

C
PD-1 报告物测定
RLU
Log (M)
PD1(116)-CTLA4(BiS5) G1TM (2.5E-9)
PD1(116)-CTLA4 (DuetMab) G1TM (1.6E-8)
CTLA4-IgG4P
R347-NMGC(BiS5) G4P
MIP228 IgG1TM
PD-1ng0116 IgG4P (1.6E-9)
D
CTLA-4 报告物测定
RLU
Log (M)
Bis5 PD1(LO116) /CTLA4 G1TM (2.5E-8)
PD1(116)-CTLA4 (DuetMab) G1TM (1.6E-7)
CTLA4-IgG4P (7.5E-9)
PD1(514)-LO115-G4P
R347-NMGC(BiS5) G4P
MIP228 IgG1TM
曲美木单抗 IgG2k
测定缓冲液对照

图6续

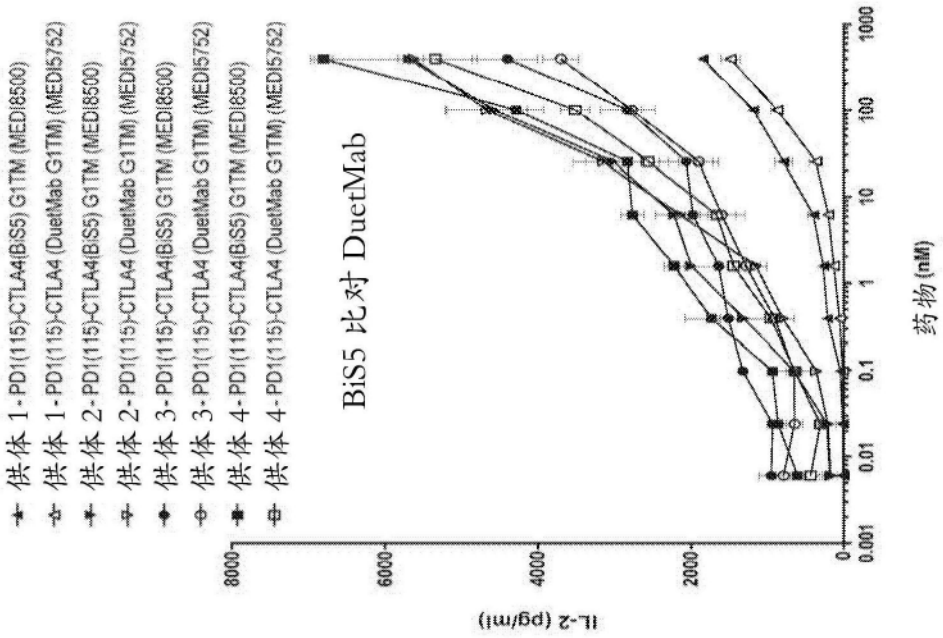

BiS5 比对 DuetMab
供体 1 - PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
供体 1 - PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供体 2 - PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
供体 2 - PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供体 3 - PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
供体 3 - PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供体 4 - PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
供体 4 - PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
IL-2 (pg/ml)
8000
6000
4000
2000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
药物 (nM)

图7

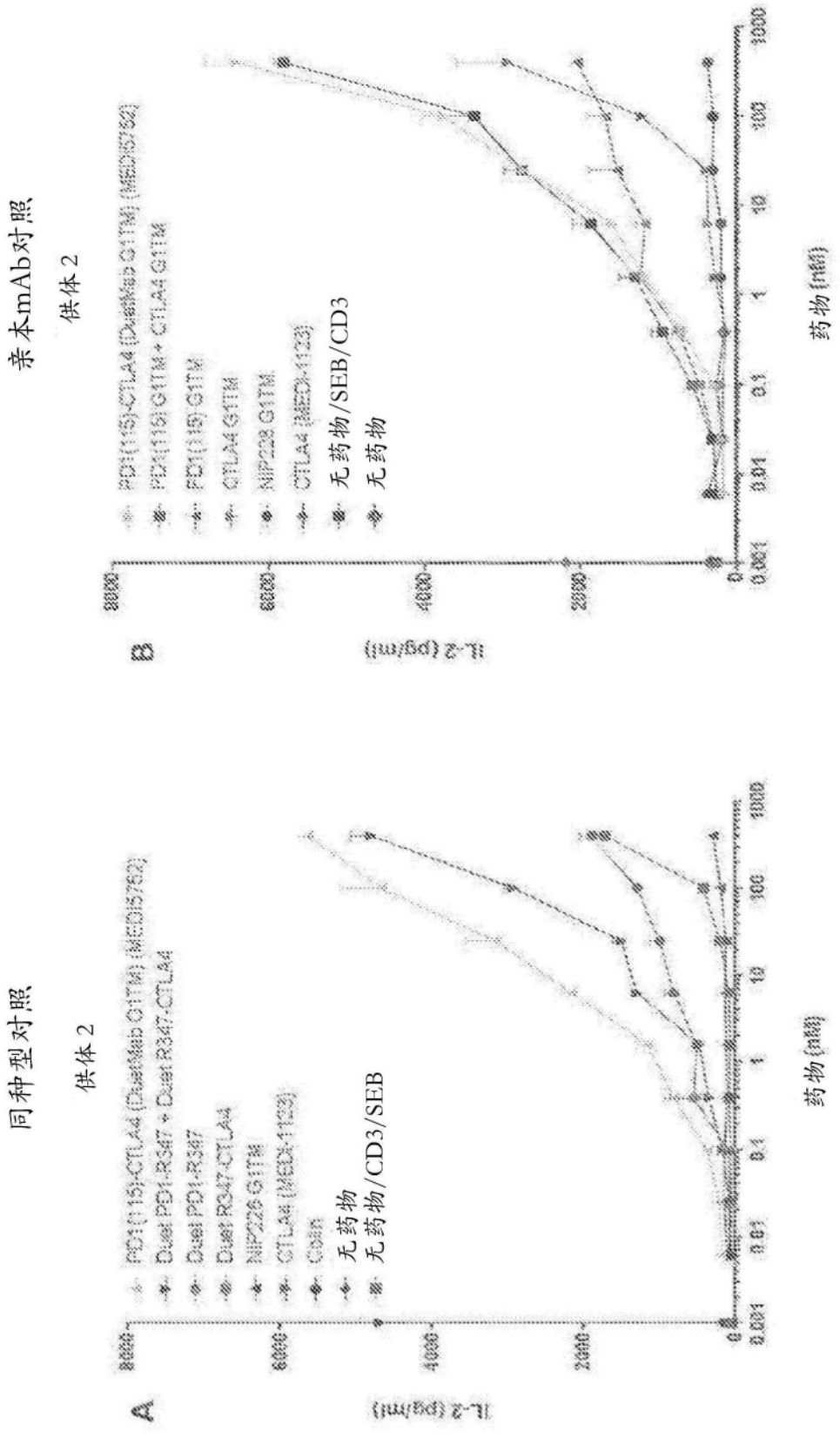

同种型对照
供体 2
A
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
Duet PD1-R347 + Duet R347-CTLA4
Duet PD1-R347
Duet R347-CTLA4
NIP228 G1TM
CTLA4 (MEDI-1123)
Colin
无药物
无药物/CD3/SEB
IL-2 (pg/ml)
药物 (nM)
亲本mAb对照
供体 2
B
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
PD1(115) G1TM + CTLA4 G1TM
PD1(115) G1TM
CTLA4 G1TM
NIP228 G1TM
CTLA4 (MEDI-1123)
无药物/SEB/CD3
无药物
IL-2 (pg/ml)
药物 (nM)

图8

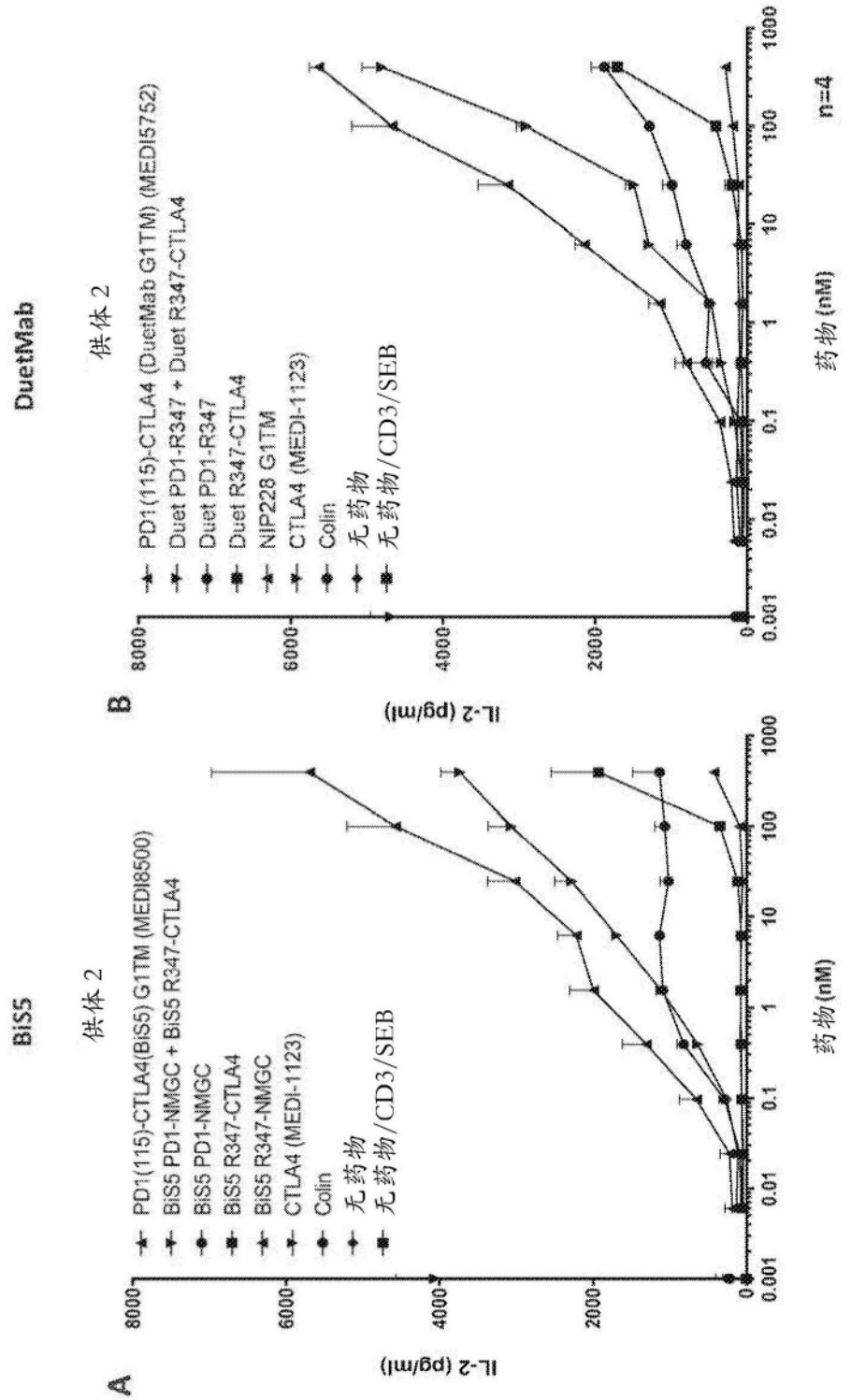

BiS5
DuetMab
供体 2
供体 2
A
B
PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI8500)
BiS5 PD1-NMGC + BiS5 R347-CTLA4
BiS5 PD1-NMGC
BiS5 R347-CTLA4
BiS5 R347-NMGC
CTLA4 (MEDI-1123)
Colin
无药物
无药物/CD3/SEB
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
Duet PD1-R347 + Duet R347-CTLA4
Duet PD1-R347
Duet R347-CTLA4
NIP228 G1TM
CTLA4 (MEDI-1123)
Colin
无药物
无药物/CD3/SEB
IL-2 (pg/ml)
药物(nM)
n=4

图9

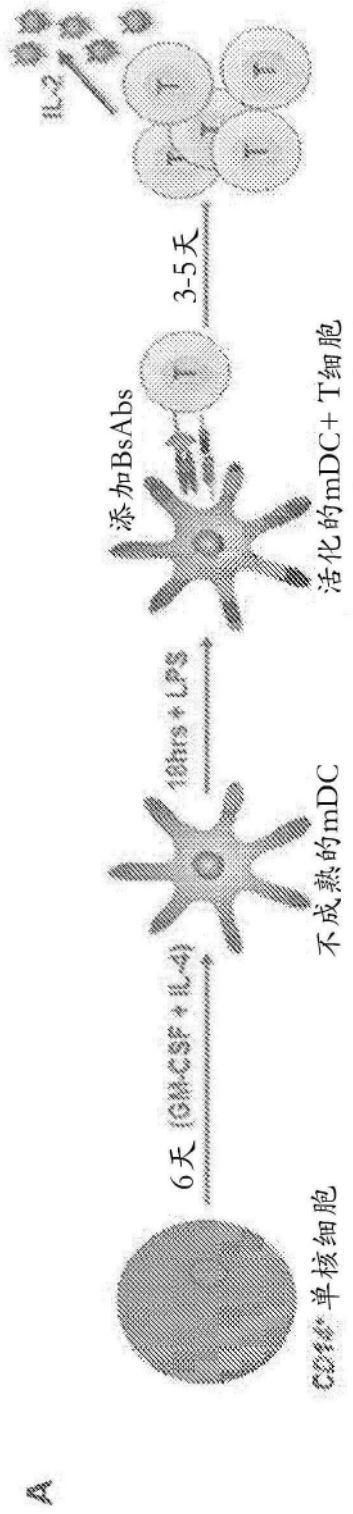

IL-2
T
3-5天
添加BsAbs
活化的mDC+ T细胞
10hrs + LPS
不成熟的mDC
6天 (GM-CSF + IL-4)
CD14+ 单核细胞
A

图10

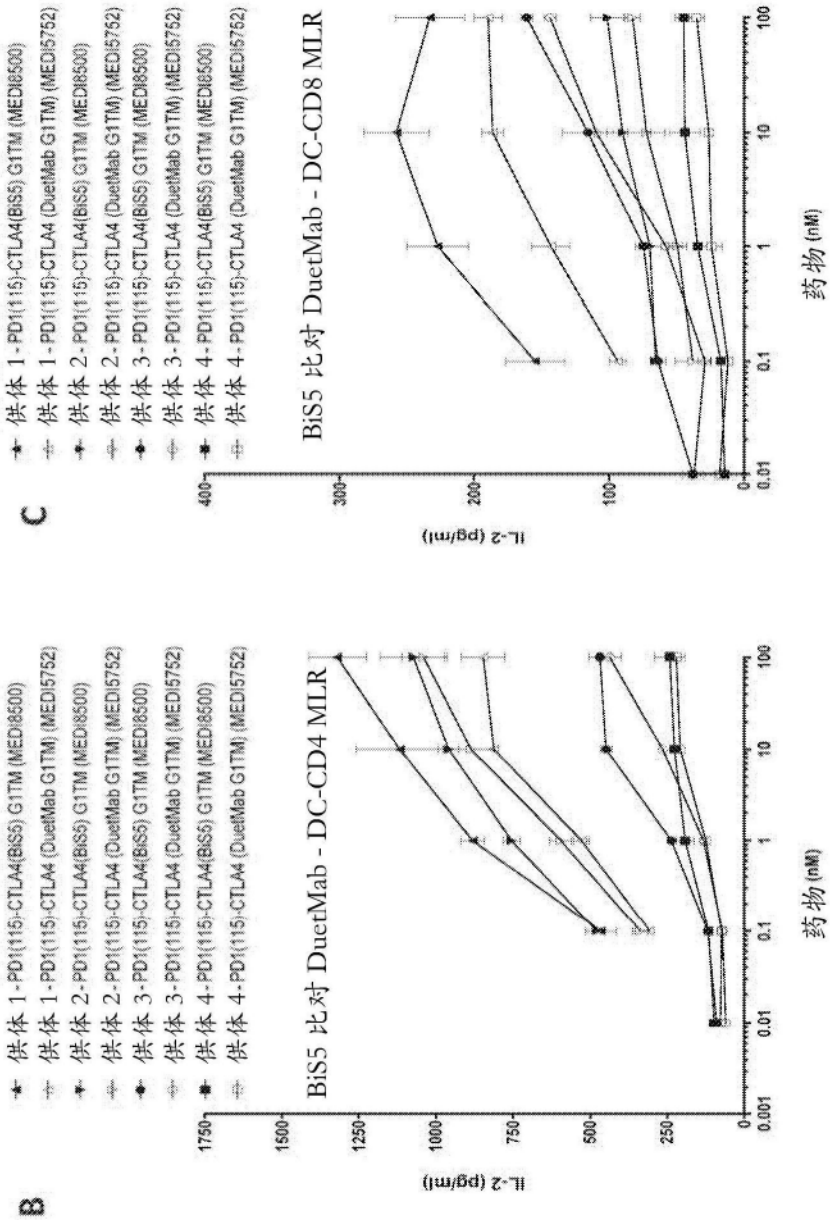

B
供体 1-PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI6500)
供体 1-PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供体 2-PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI6500)
供体 2-PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供体 3-PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI6500)
供体 3-PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供体 4-PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI6500)
供体 4-PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
BiS5 比对 DuetMab - DC-CD4 MLR
IL-2 (pg/ml)
药物 (nM)
C
供体 1-PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI6500)
供体 1-PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供体 2-PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI6500)
供体 2-PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供体 3-PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI6500)
供体 3-PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
供体 4-PD1(115)-CTLA4(BiS5) G1TM (MEDI6500)
供体 4-PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
BiS5 比对 DuetMab - DC-CD8 MLR
IL-2 (pg/ml)
药物 (nM)

图10续

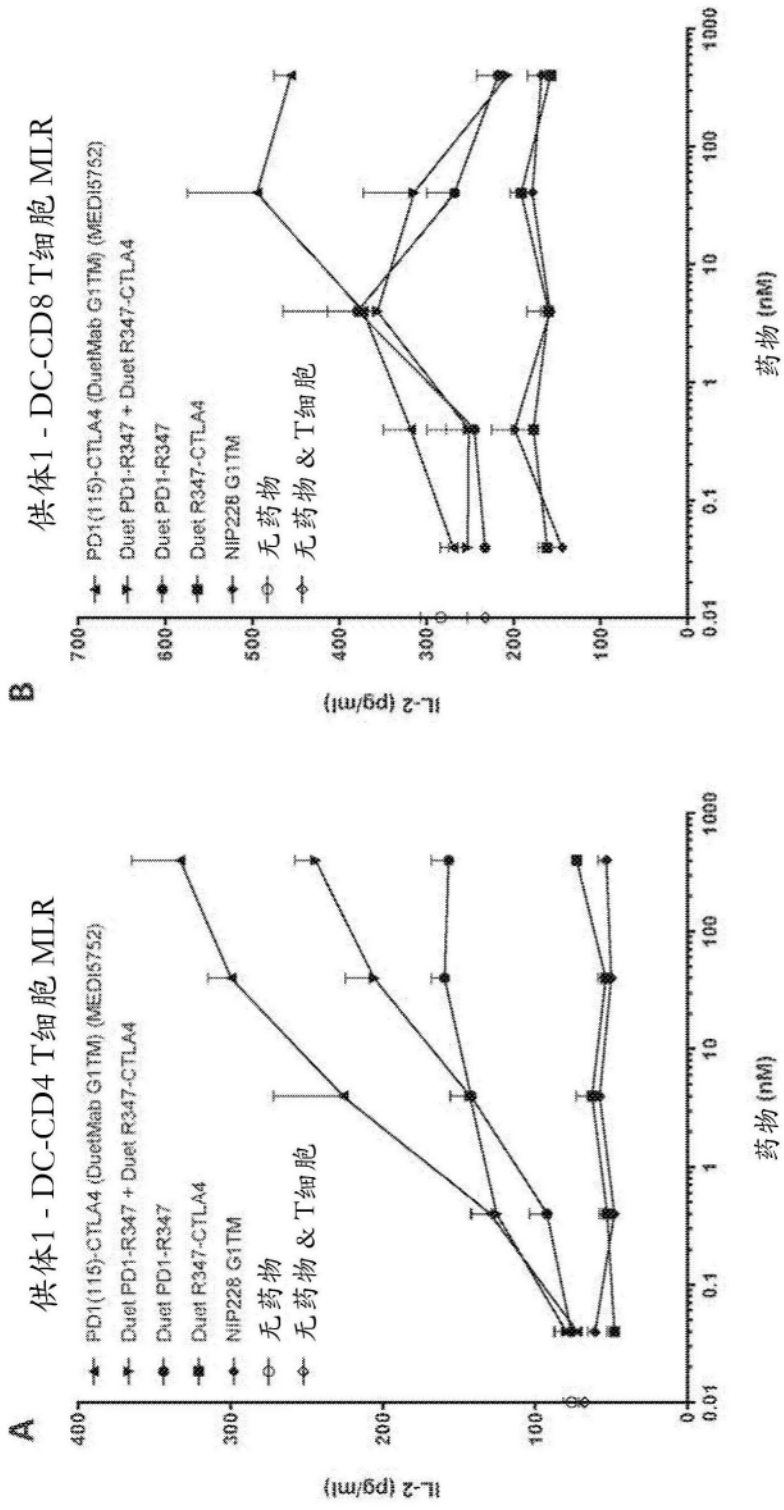

A
供体1 - DC-CD4 T细胞 MLR
B
供体1 - DC-CD8 T细胞 MLR
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
Duet PD1-R347 + Duet R347-CTLA4
Duet PD1-R347
Duet R347-CTLA4
NIP228 G1TM
无药物
无药物 & T细胞
IL-2 (pg/ml)
药物 (nM)

图11

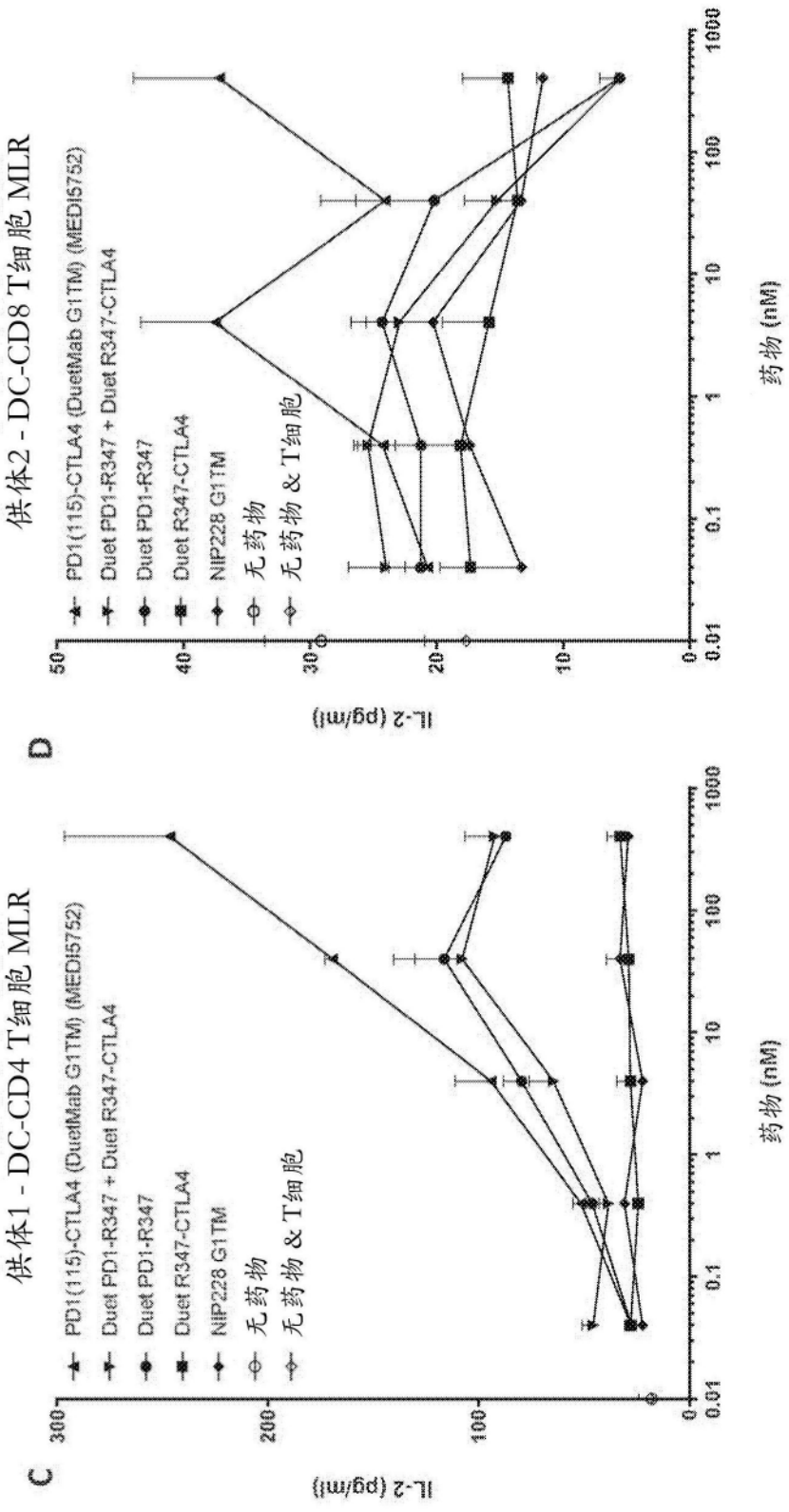

C
供体1 - DC-CD4 T细胞 MLR
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
Duet PD1-R347 + Duet R347-CTLA4
Duet PD1-R347
Duet R347-CTLA4
NIP228 G1TM
无药物
无药物 & T细胞
IL-2 (pg/ml)
药物 (nM)
D
供体2 - DC-CD8 T细胞 MLR
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
Duet PD1-R347 + Duet R347-CTLA4
Duet PD1-R347
Duet R347-CTLA4
NIP228 G1TM
无药物
无药物 & T细胞
IL-2 (pg/ml)
药物 (nM)

图11续

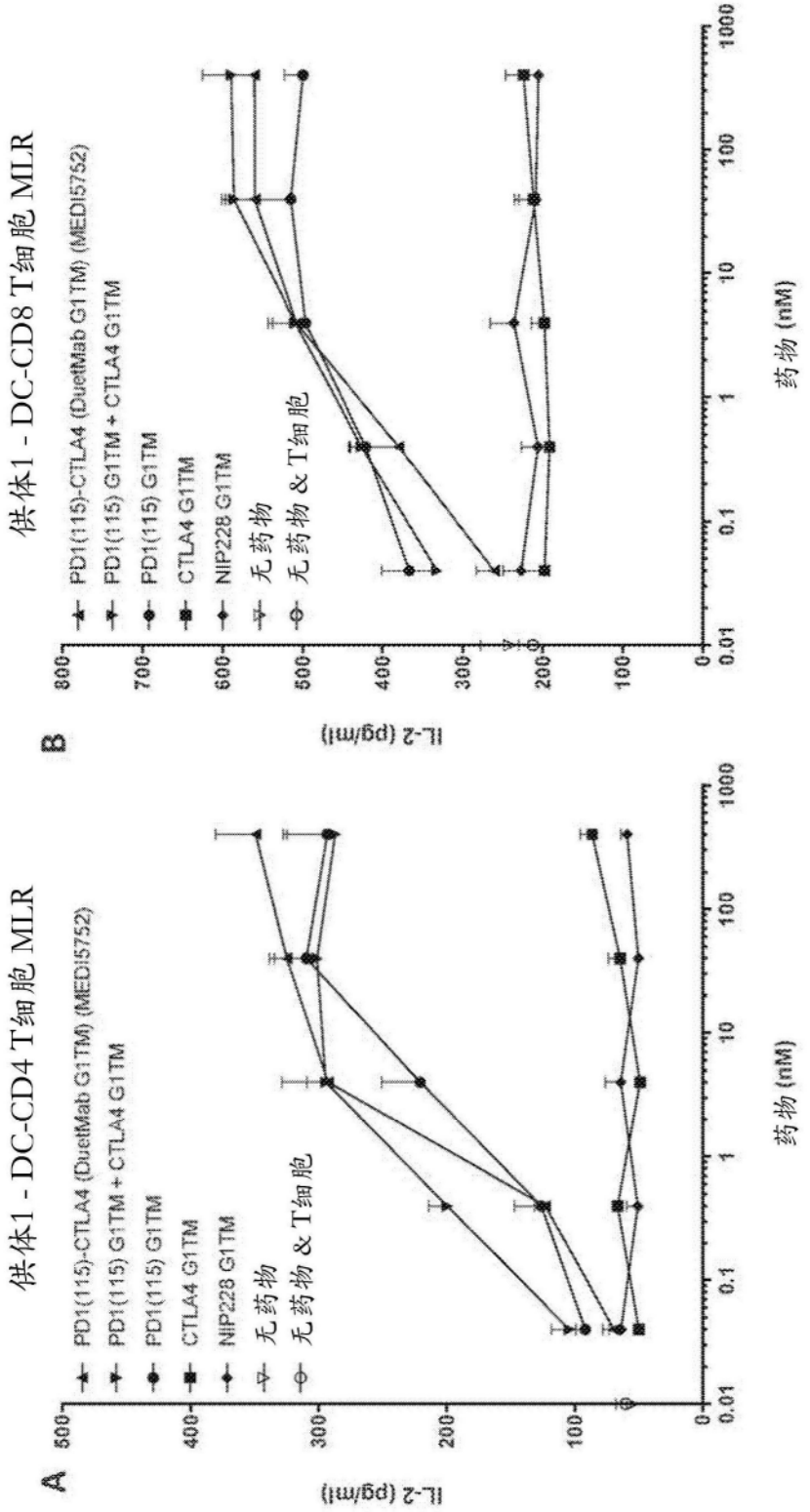

A
供体1 - DC-CD4 T细胞 MLR
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
PD1(115) G1TM + CTLA4 G1TM
PD1(115) G1TM
CTLA4 G1TM
NIP228 G1TM
无药物
无药物 & T细胞
IL-2 (pg/ml)
药物 (nM)
B
供体1 - DC-CD8 T细胞 MLR
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
PD1(115) G1TM + CTLA4 G1TM
PD1(115) G1TM
CTLA4 G1TM
NIP228 G1TM
无药物
无药物 & T细胞
IL-2 (pg/ml)
药物 (nM)

图12

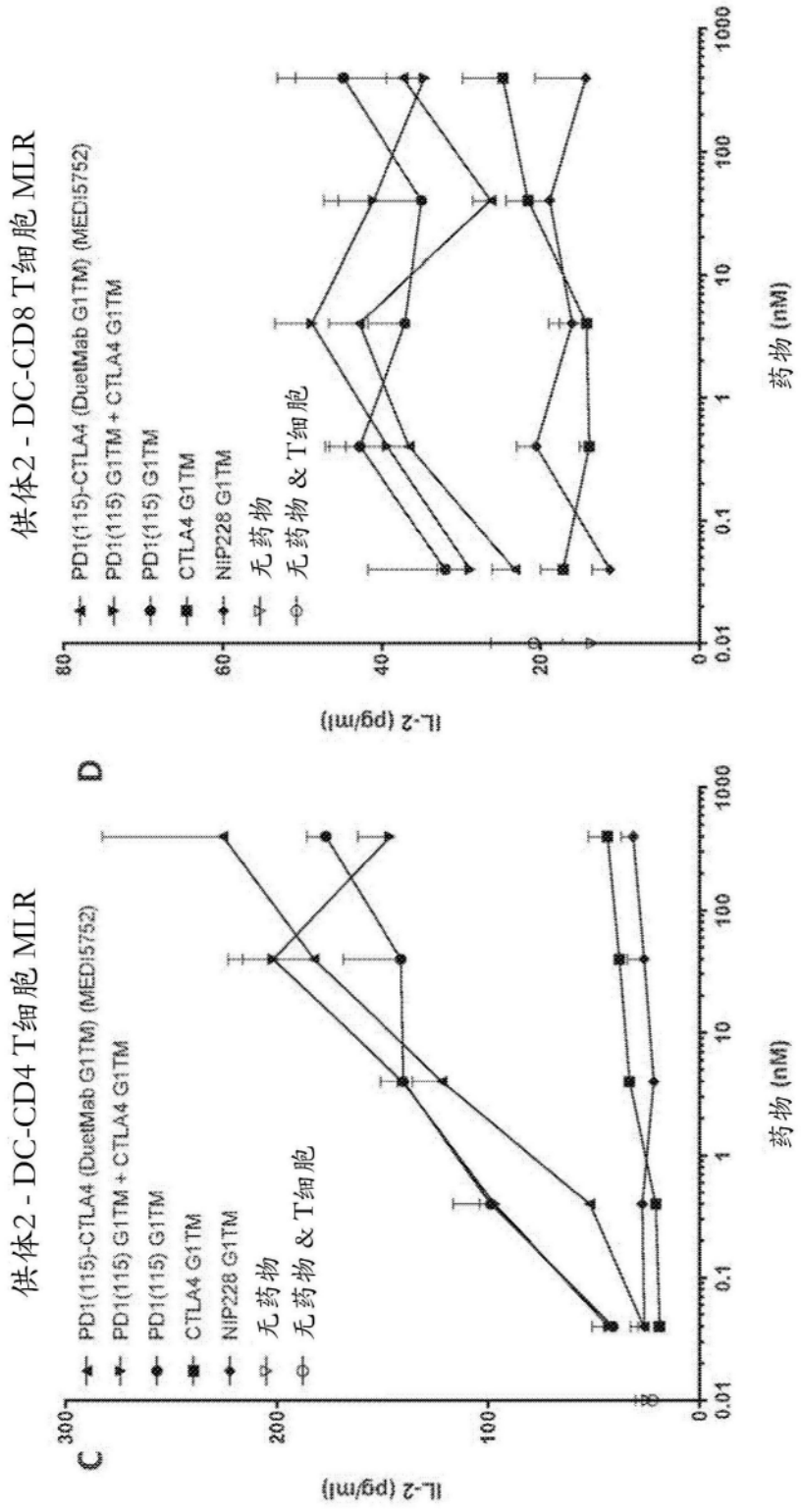

供体2 - DC-CD8 T细胞 MLR
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
PD1(115) G1TM + CTLA4 G1TM
PD1(115) G1TM
CTLA4 G1TM
NIP228 G1TM
无药物
无药物 & T细胞
IL-2 (pg/ml)
药物 (nM)
D
供体2 - DC-CD4 T细胞 MLR
C

图12续

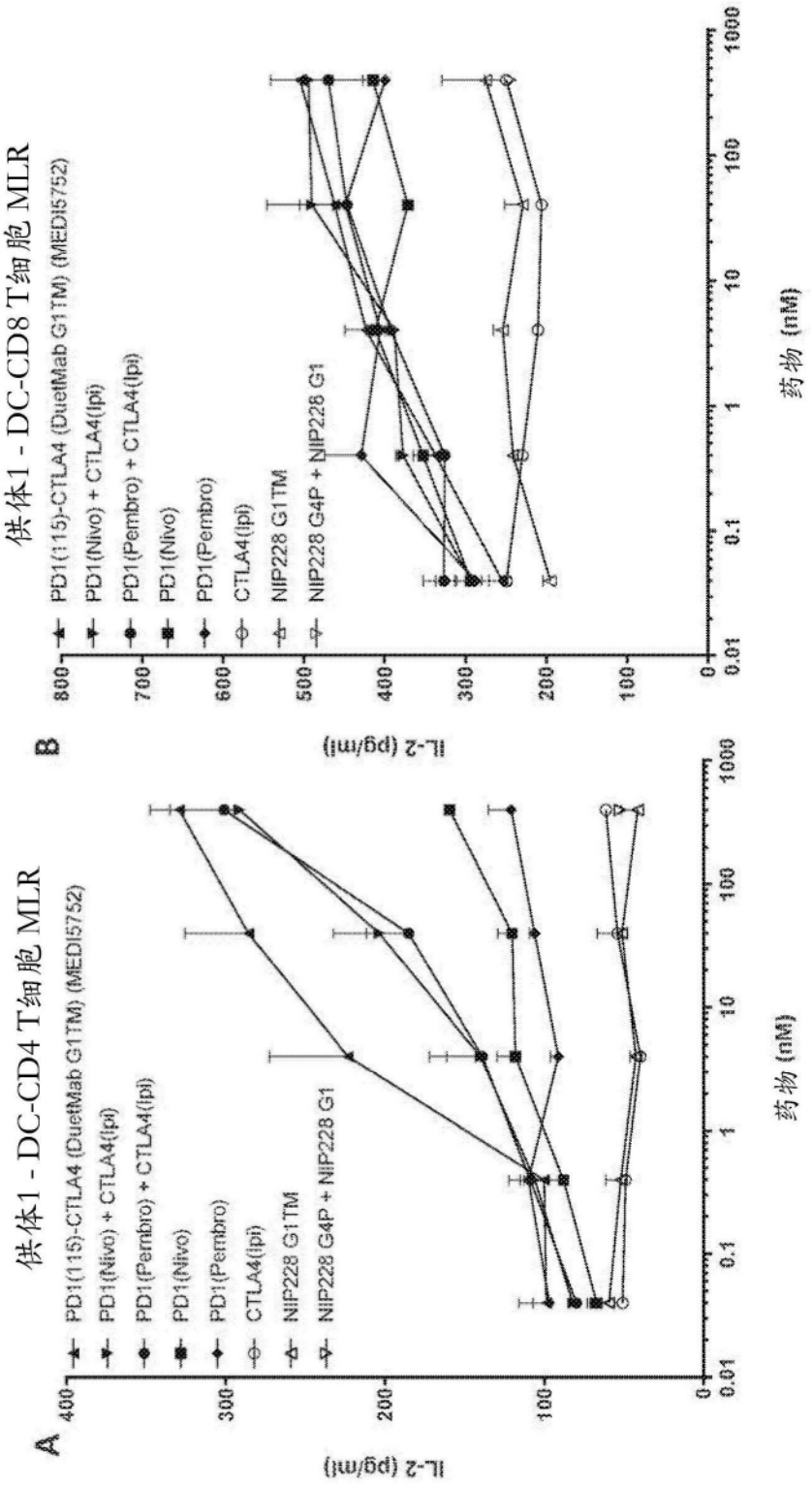

A
供体1 - DC-CD4 T细胞 MLR
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
PD1(Nivo) + CTLA4(ipi)
PD1(Pembro) + CTLA4(ipi)
PD1(Nivo)
PD1(Pembro)
CTLA4(ipi)
NIP228 G1TM
NIP228 G4P + NIP228 G1
IL-2 (pg/ml)
药物 (nM)
B
供体1 - DC-CD8 T细胞 MLR
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
PD1(Nivo) + CTLA4(ipi)
PD1(Pembro) + CTLA4(ipi)
PD1(Nivo)
PD1(Pembro)
CTLA4(ipi)
NIP228 G1TM
NIP228 G4P + NIP228 G1
IL-2 (pg/ml)
药物 (nM)

图13

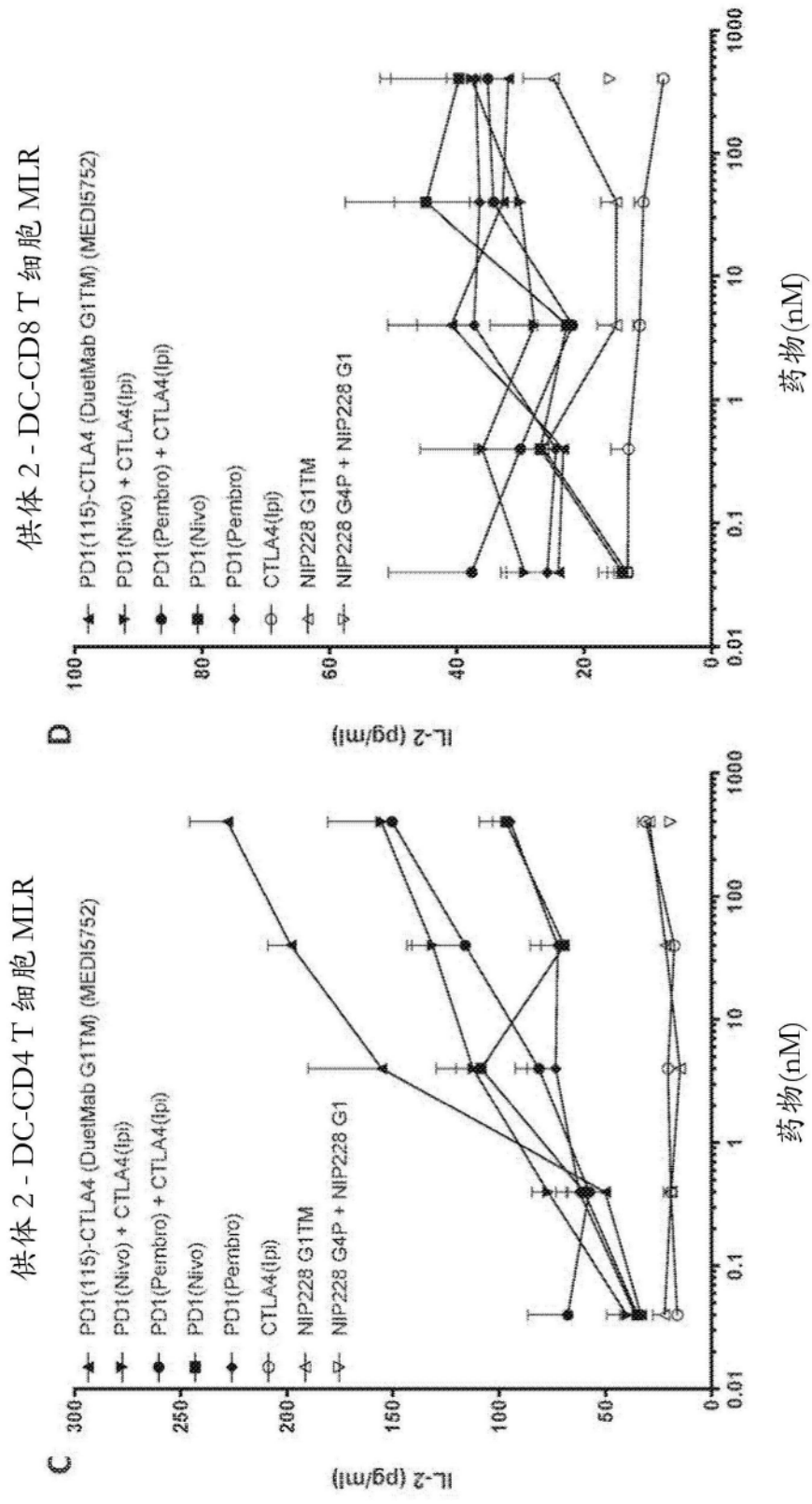

C
供体 2 - DC-CD4 T 细胞 MLR
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
PD1(Nivo) + CTLA4(ipi)
PD1(Pembro) + CTLA4(ipi)
PD1(Nivo)
PD1(Pembro)
CTLA4(ipi)
NIP228 G1TM
NIP228 G4P + NIP228 G1
IL-2 (pg/ml)
药物(nM)
D
供体 2 - DC-CD8 T 细胞 MLR
PD1(115)-CTLA4 (DuetMab G1TM) (MEDI5752)
PD1(Nivo) + CTLA4(ipi)
PD1(Pembro) + CTLA4(ipi)
PD1(Nivo)
PD1(Pembro)
CTLA4(ipi)
NIP228 G1TM
NIP228 G4P + NIP228 G1
IL-2 (pg/ml)
药物(nM)

图13续

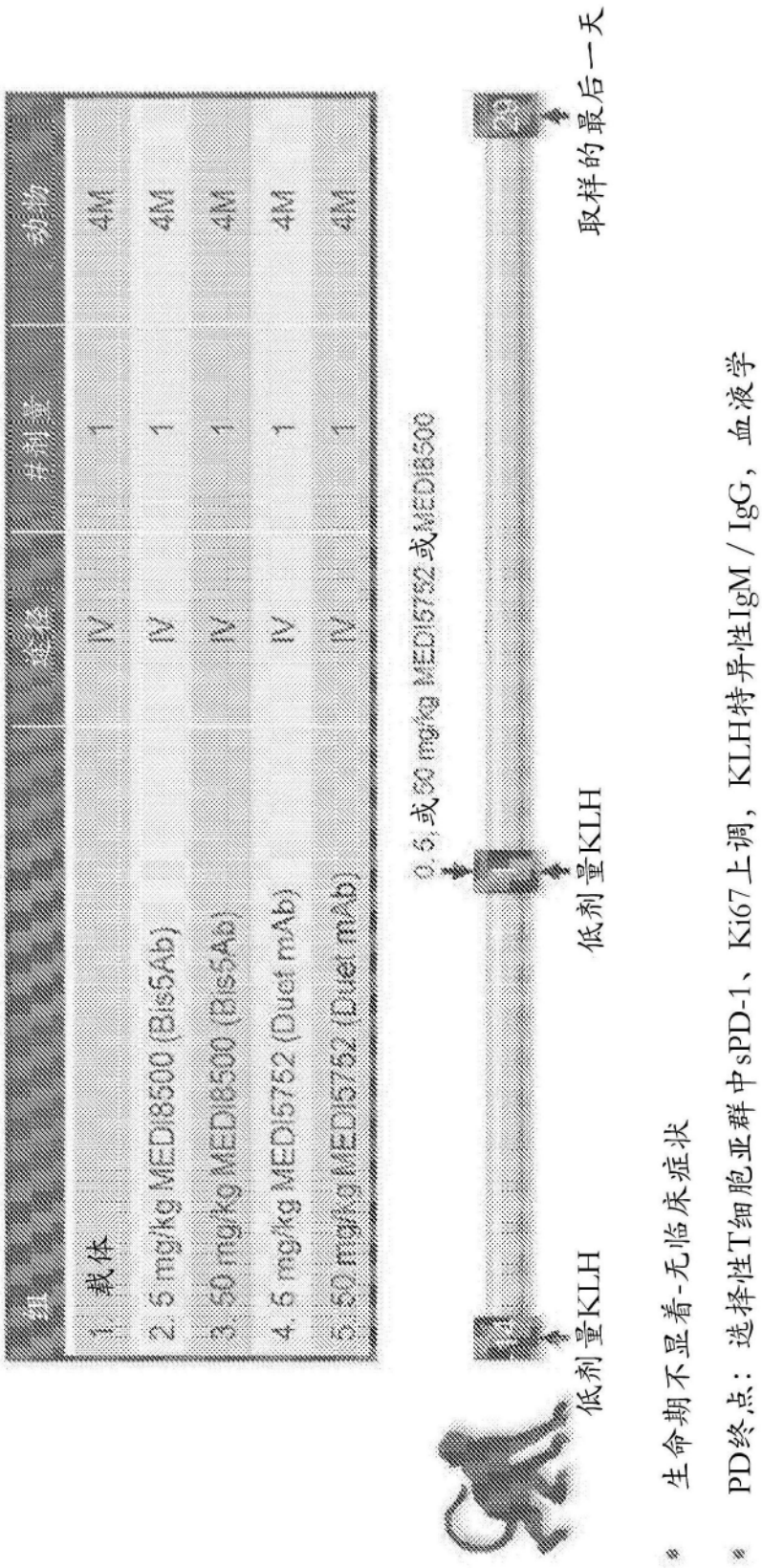

组
途径
剂量
动物
1. 载体
IV
1
4M
2. 5 mg/kg MEDI8500 (Bis5Ab)
IV
1
4M
3. 50 mg/kg MEDI8500 (Bis5Ab)
IV
1
4M
4. 5 mg/kg MEDI5752 (Duet mAb)
IV
1
4M
5. 50 mg/kg MEDI5752 (Duet mAb)
IV
1
4M
0, 5, 或50 mg/kg MEDI5752 或MEDI8500
-21
0
28
低剂量KLH
低剂量KLH
取样的最后一天
生命期不显着-无临床症状
PD终点：选择性T细胞亚群中sPD-1、Ki67上调，KLH特异性IgM / IgG，血液学

图14

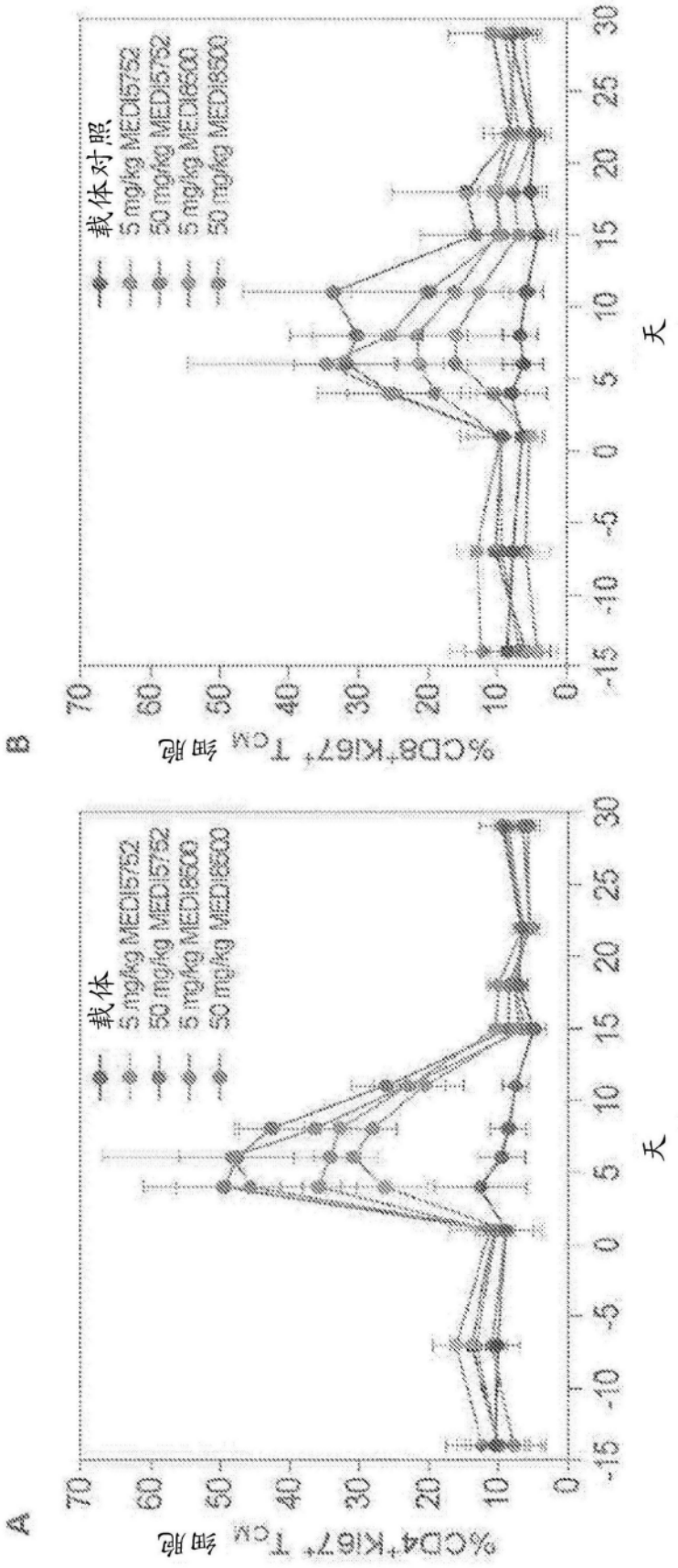

A
B
%CD4+KI67+ TCM 细胞
%CD8+KI67+ TCM 细胞
天
载体
载体对照
5 mg/kg MEDI5752
50 mg/kg MEDI5752
5 mg/kg MEDI8600
50 mg/kg MEDI8600
70
60
50
40
30
20
10
0
-15
-10
-5
0
5
10
15
20
25
30

图15

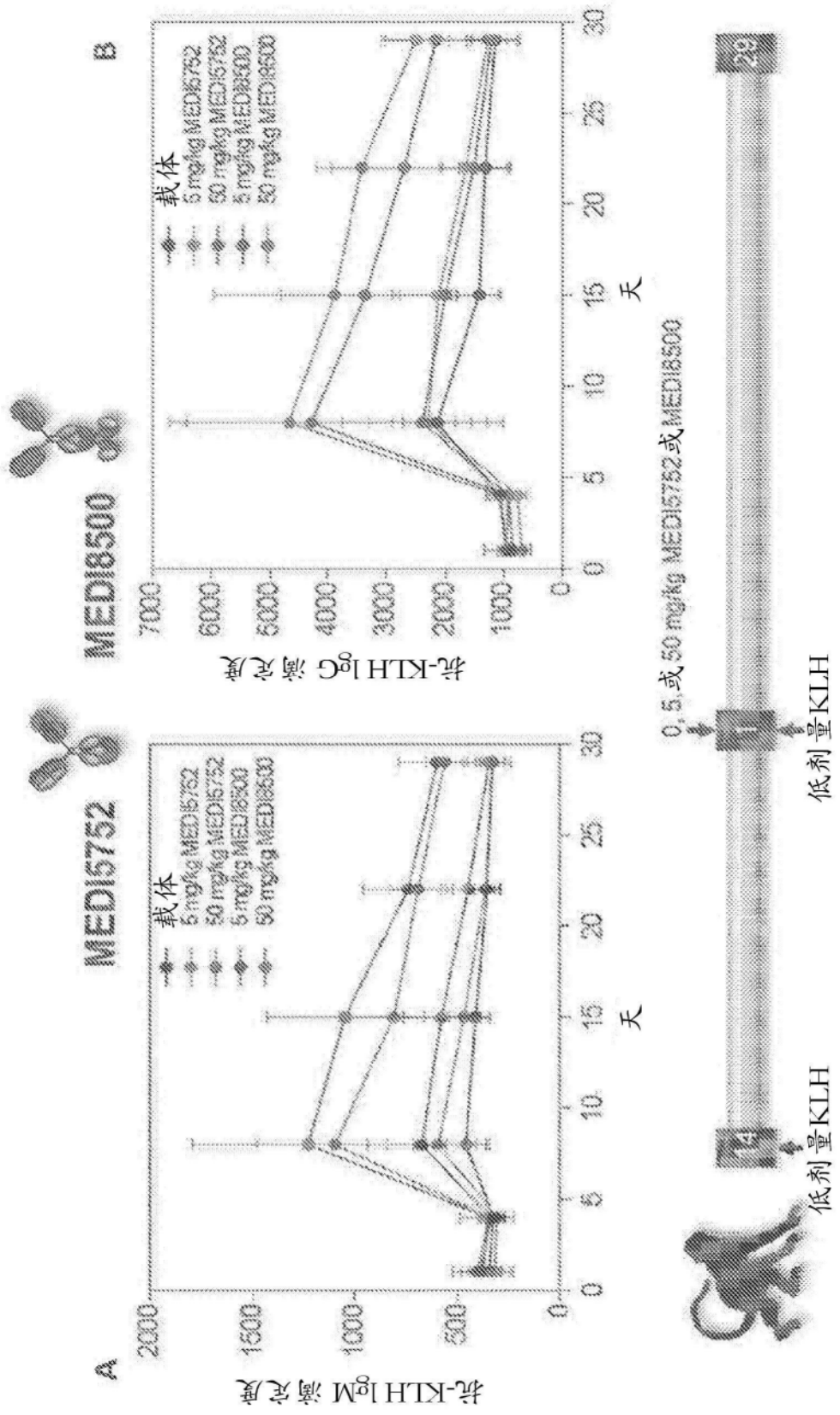

A
MEDI6752
抗-KLH IgM 滴定度
载体
5 mg/kg MEDI6752
50 mg/kg MEDI6752
5 mg/kg MEDI8500
50 mg/kg MEDI8500
天
B
MEDI8500
抗-KLH IgG 滴定度
天
0, 5, 或 50 mg/kg MEDI6752或MEDI8500
低剂量KLH
低剂量KLH

图16

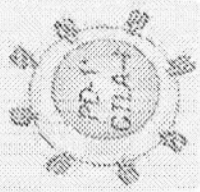
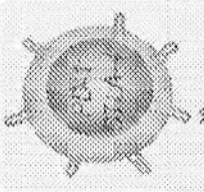
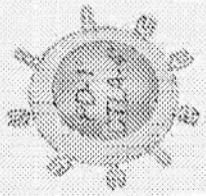
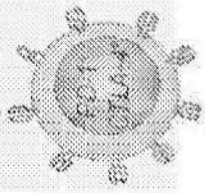
CHO 细胞	PD-1 受体密度	CTLA-4 受体密度	PD-1/CTLA-4比率
	2.4×10^6	-	-
	-	7.3×10^4	-
	7.3×10^5	5.5×10^4	~10:1
	1.4×10^6	3.9×10^4	~40:1

图17

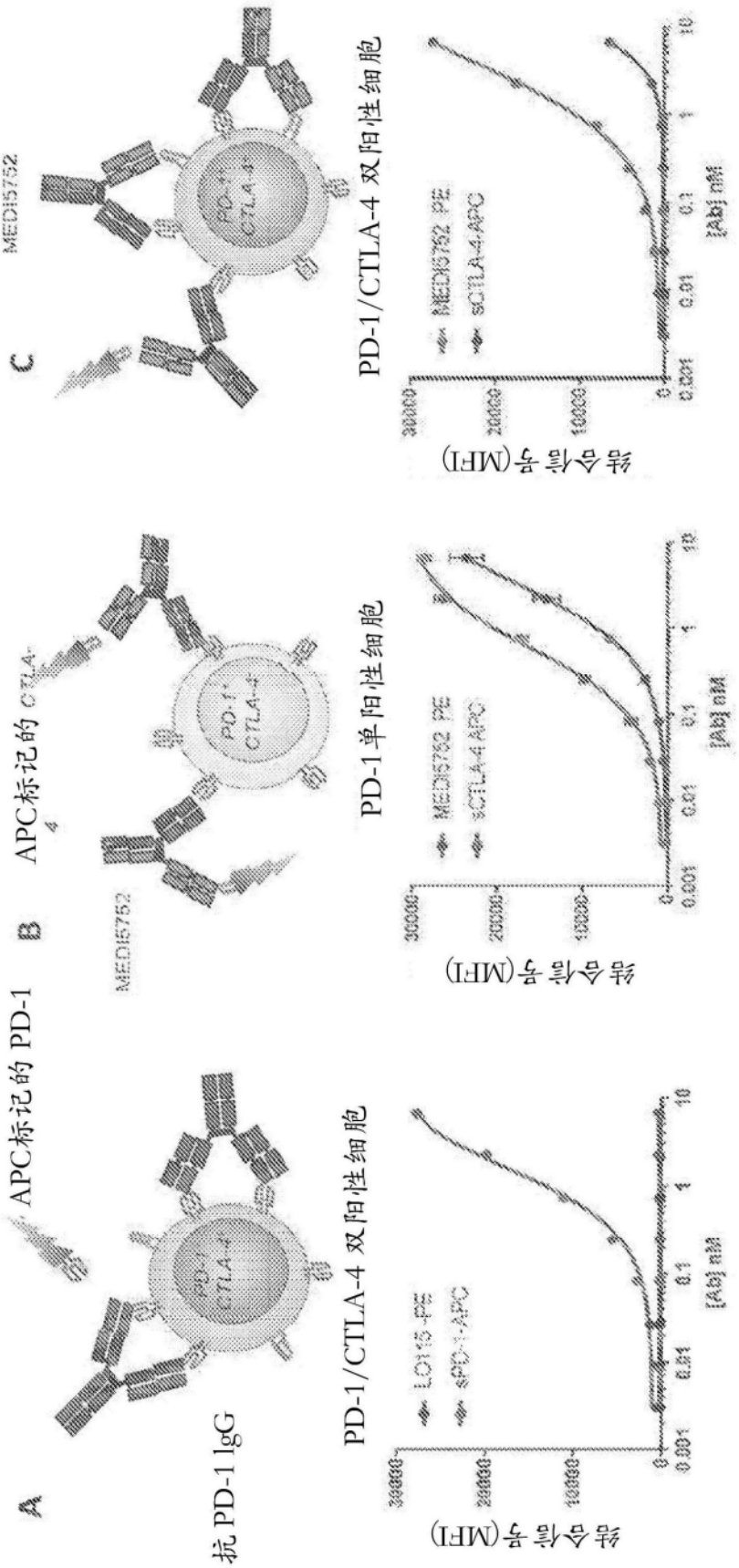

A
APC标记的 PD-1
抗 PD-1 IgG
PD-1
CTLA-4
B
APC标记的 CTLA-4
MEDI5752
C
MEDI5752
PD-1/CTLA-4 双阳性细胞
PD-1单阳性细胞
结合信号(MFI)
MEDI5752 PE
sCTLA-4-APC
LO115-PE
sPD-1-APC
[Ab] nM

图18

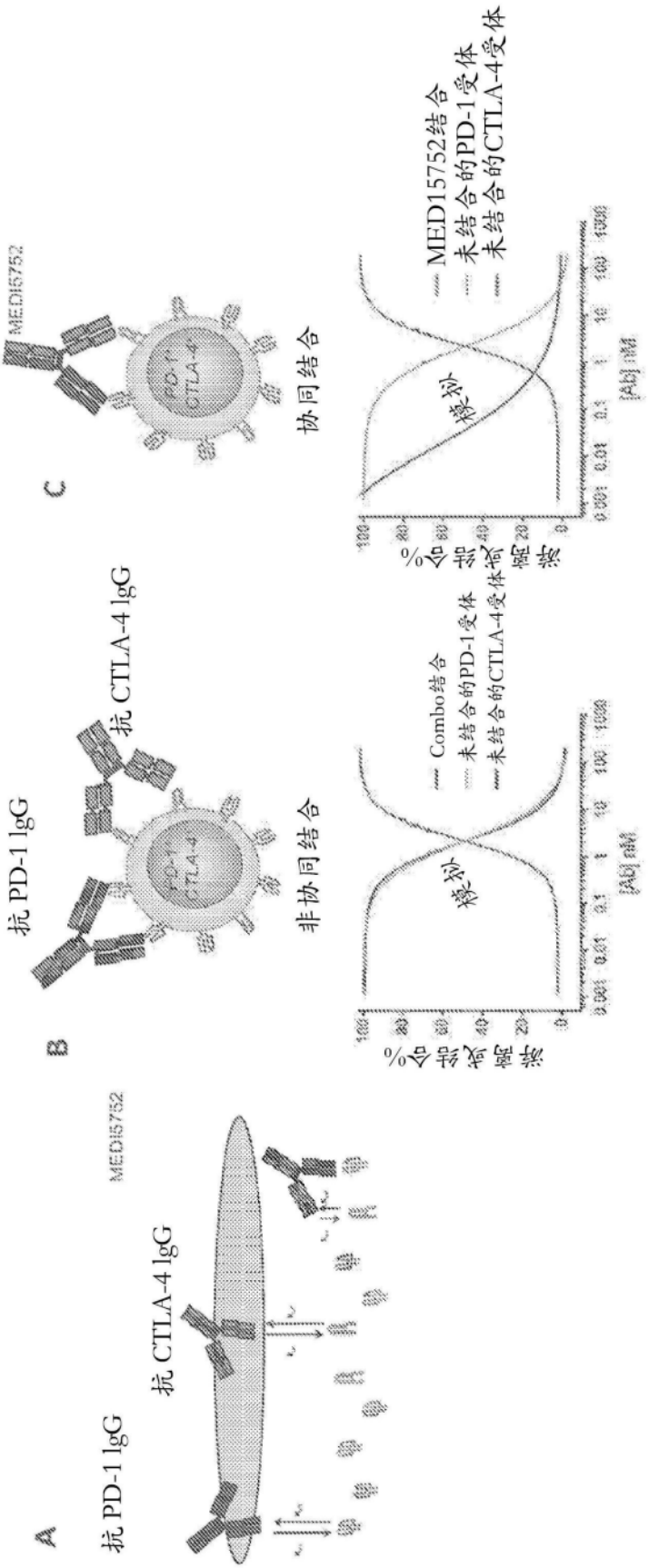

A
抗 PD-1 IgG
抗 CTLA-4 IgG
MED15752
B
抗 PD-1 IgG
抗 CTLA-4 IgG
PD-1
CTLA-4
非协同结合
C
MED15752
PD-1
CTLA-4
协同结合
Combo结合
未结合的PD-1受体
未结合的CTLA-4受体
MED15752结合
未结合的PD-1受体
未结合的CTLA-4受体
[Ab] nM

图19

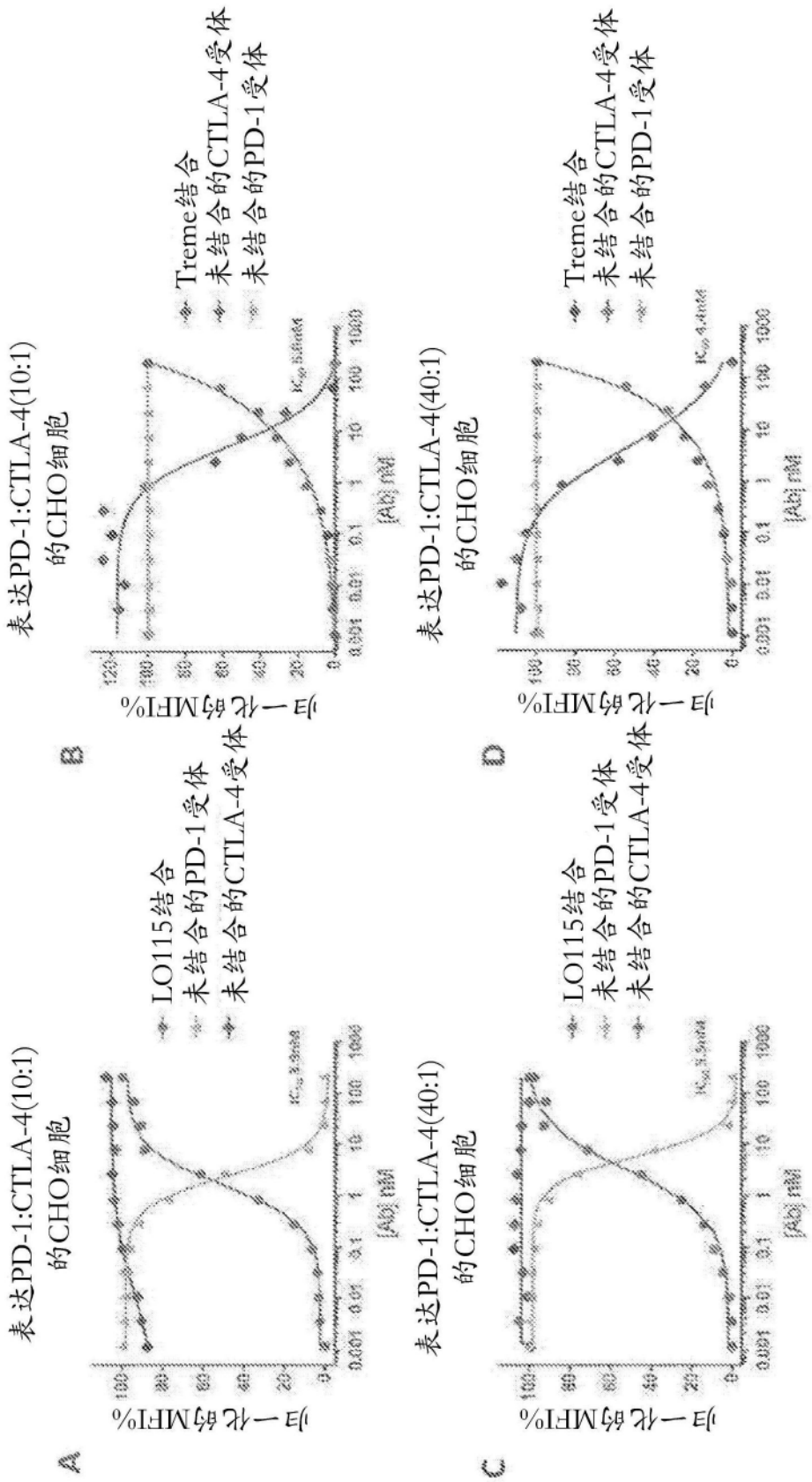

A
表达PD-1:CTLA-4(10:1)
的CHO细胞
LO115结合
未结合的PD-1受体
未结合的CTLA-4受体
B
表达PD-1:CTLA-4(10:1)
的CHO细胞
Treme结合
未结合的CTLA-4受体
未结合的PD-1受体
C
表达PD-1:CTLA-4(40:1)
的CHO细胞
LO115结合
未结合的PD-1受体
未结合的CTLA-4受体
D
表达PD-1:CTLA-4(40:1)
的CHO细胞
Treme结合
未结合的CTLA-4受体
未结合的PD-1受体

图20

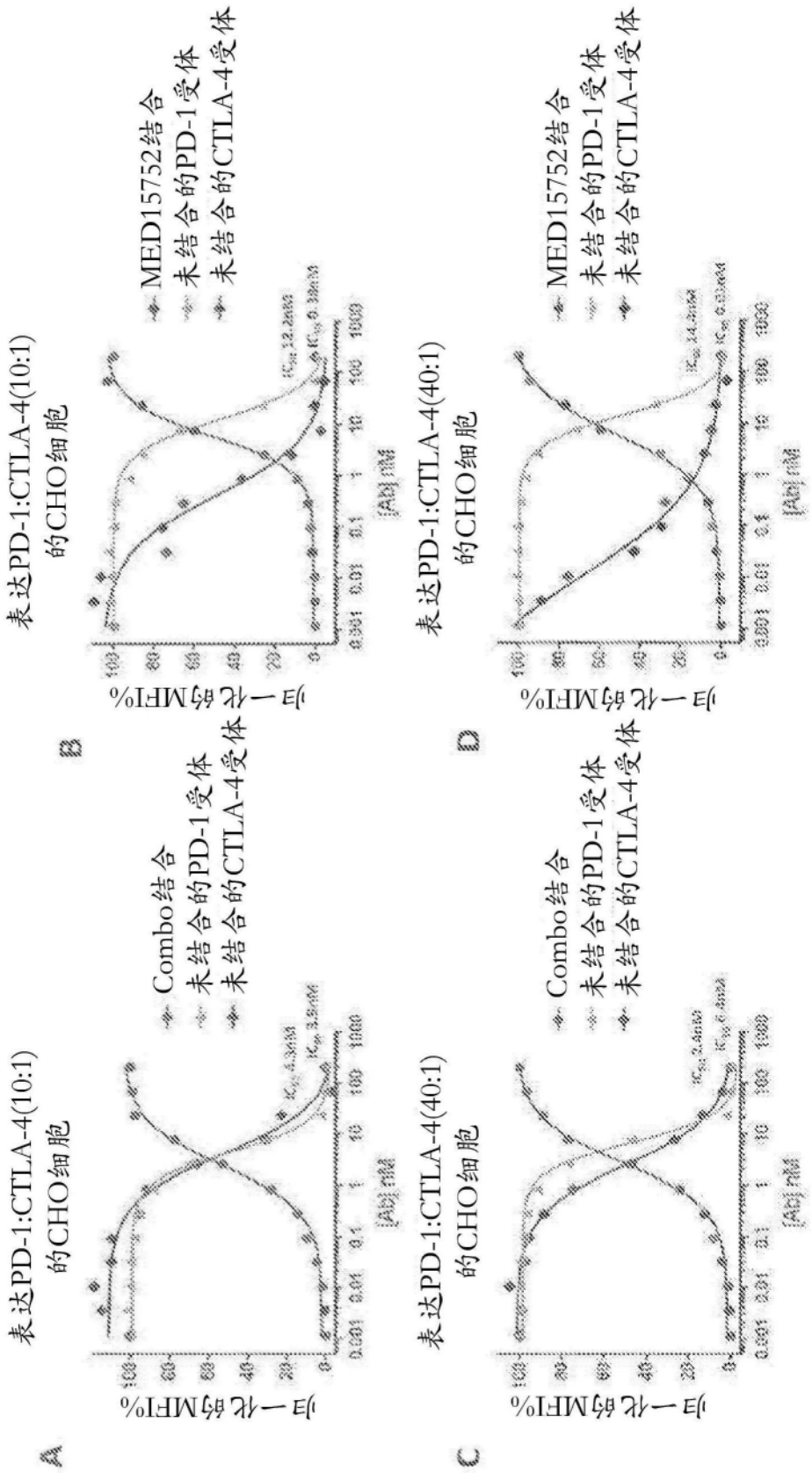

A
表达PD-1:CTLA-4(10:1)
的CHO细胞
Combo结合
未结合的PD-1受体
未结合的CTLA-4受体
B
表达PD-1:CTLA-4(10:1)
的CHO细胞
MED15752结合
未结合的PD-1受体
未结合的CTLA-4受体
C
表达PD-1:CTLA-4(40:1)
的CHO细胞
Combo结合
未结合的PD-1受体
未结合的CTLA-4受体
D
表达PD-1:CTLA-4(40:1)
的CHO细胞
MED15752结合
未结合的PD-1受体
未结合的CTLA-4受体

图21

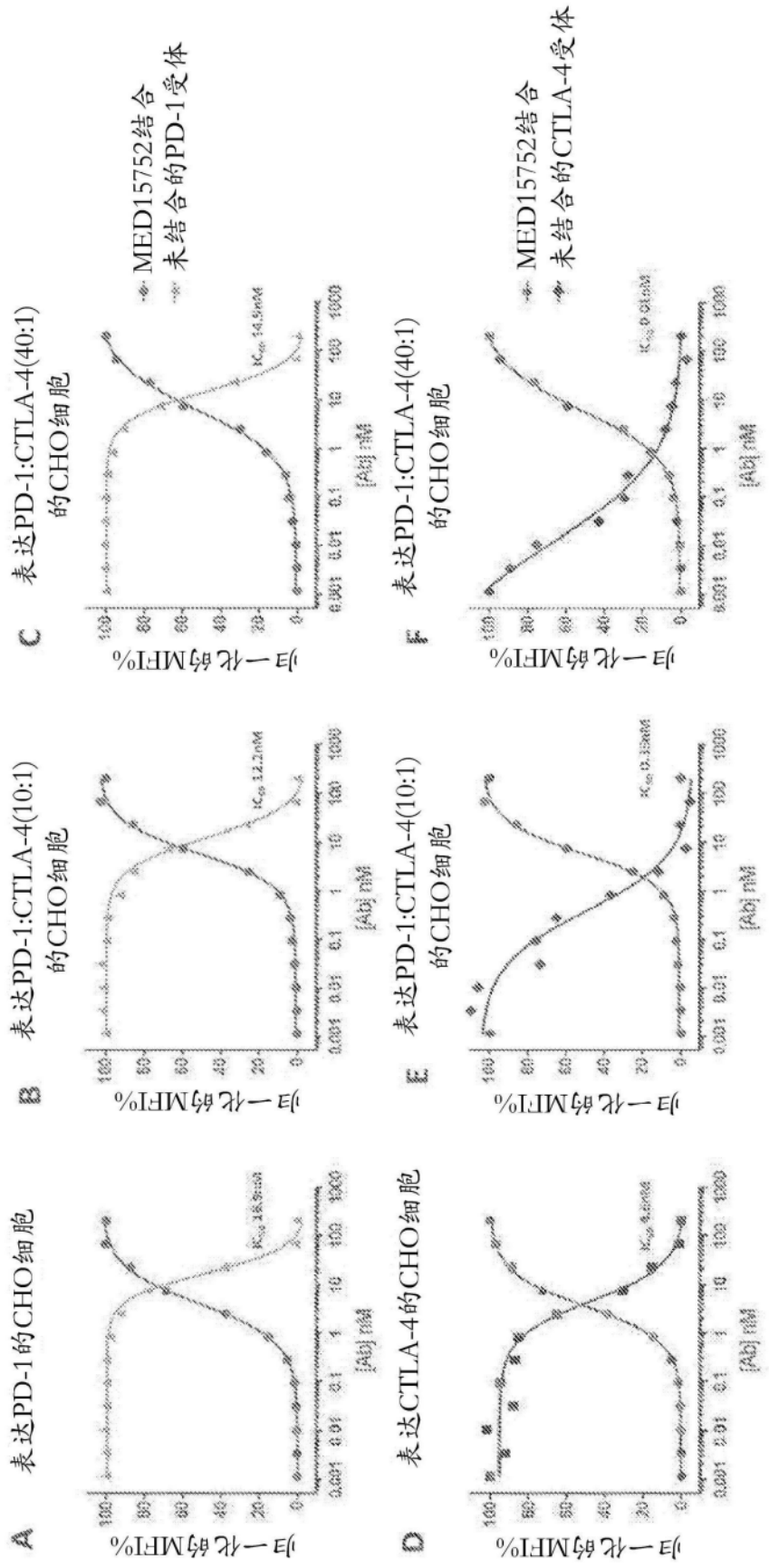

A
表达PD-1的CHO细胞
B
表达PD-1:CTLA-4(10:1)
的CHO细胞
C
表达PD-1:CTLA-4(40:1)
的CHO细胞
MED15752结合
未结合的PD-1受体
D
表达CTLA-4的CHO细胞
E
表达PD-1:CTLA-4(10:1)
的CHO细胞
F
表达PD-1:CTLA-4(40:1)
的CHO细胞
MED15752结合
未结合的CTLA-4受体
结合的MFI%
[Ab] nM

图22

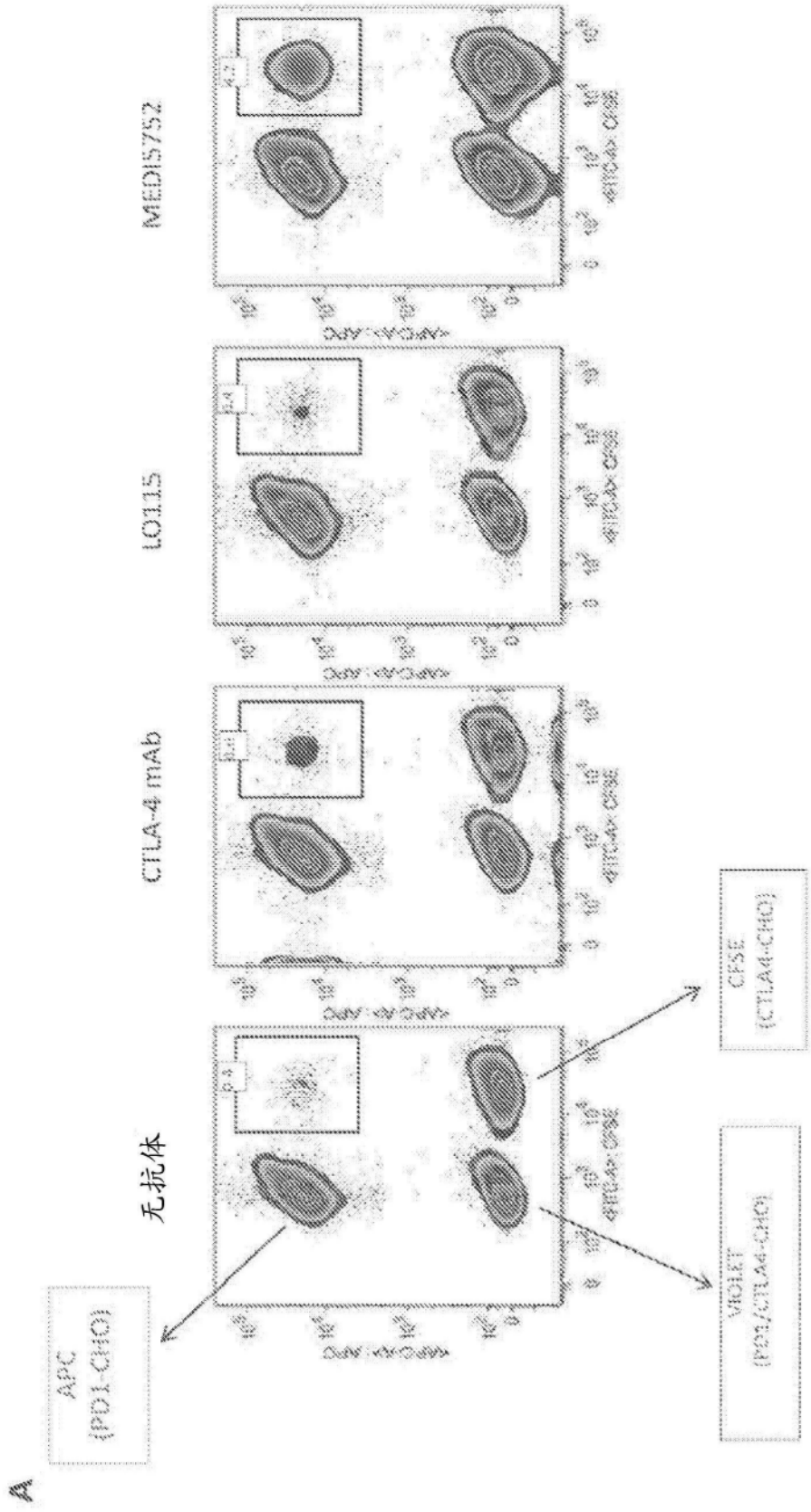

A
无抗体
CTLA-4 mAb
LO115
MEDI5752
APC
(PD1-CHO)
CFSE
(CTLA4-CHO)
VIOLET
(PD1/CTLA4-CHO)

图23

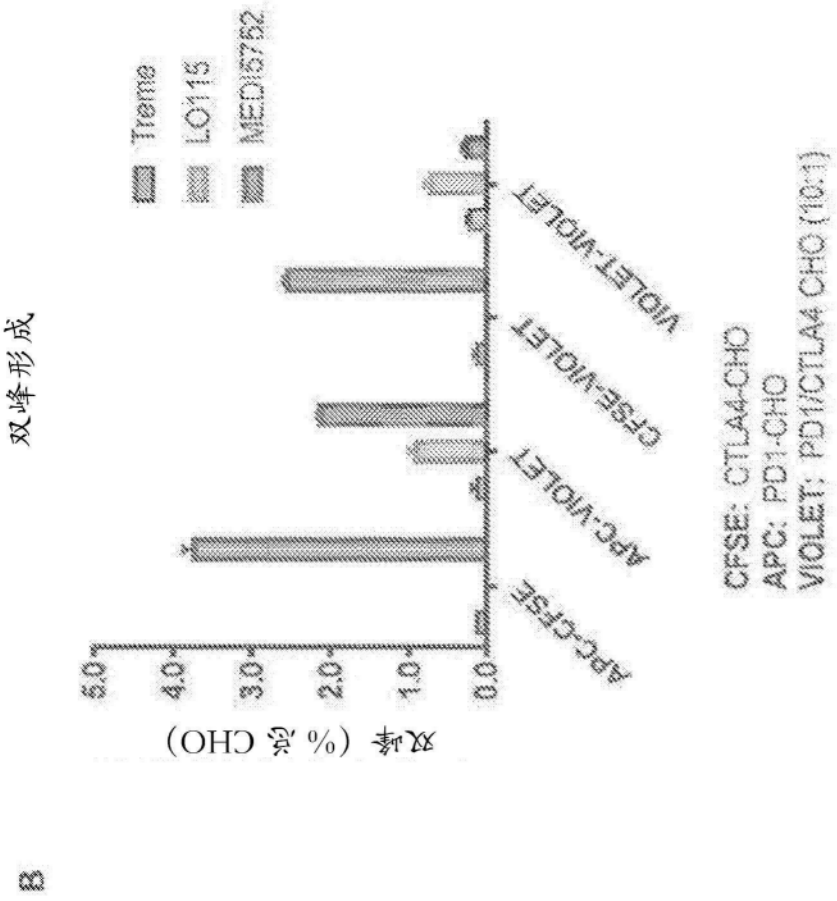

B
双峰形成
双峰（% 总 CHO）
6.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
APC-CFSE
APC-VIOLET
CFSE-VIOLET
VIOLET-VIOLET
Treme
LO115
MED15752
CFSE: CTLA4-CHO
APC: PD1-CHO
VIOLET: PD1/CTLA4 CHO (10:1)

图23续

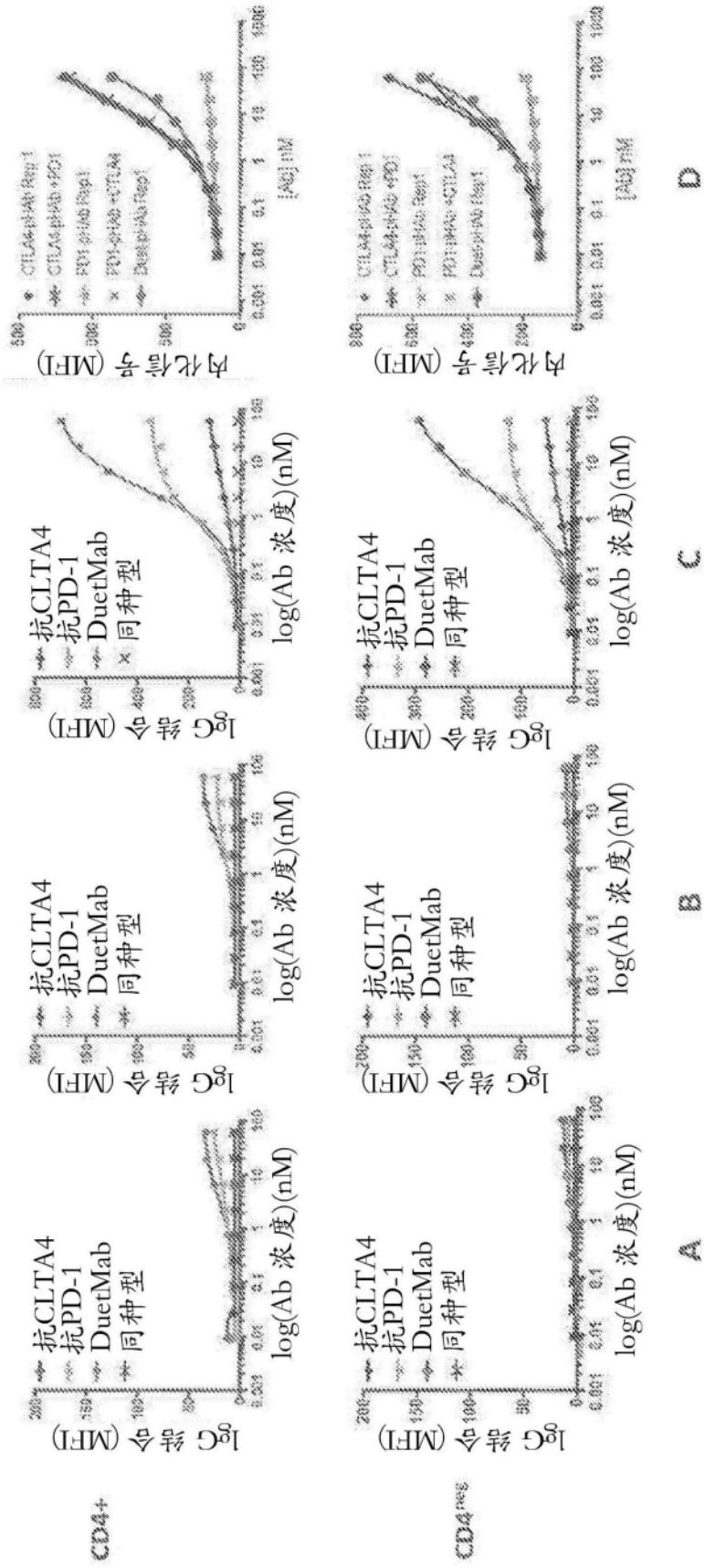

Unstim
抗CD3
抗CD3+抗CD28
内化
CD4+
CD4neg
抗CLTA4
抗PD-1
DuetMab
同种型
IgG 结合 (MFI)
log(Ab 浓度)(nM)
内化信号 (MFI)
A
B
C
D

图24

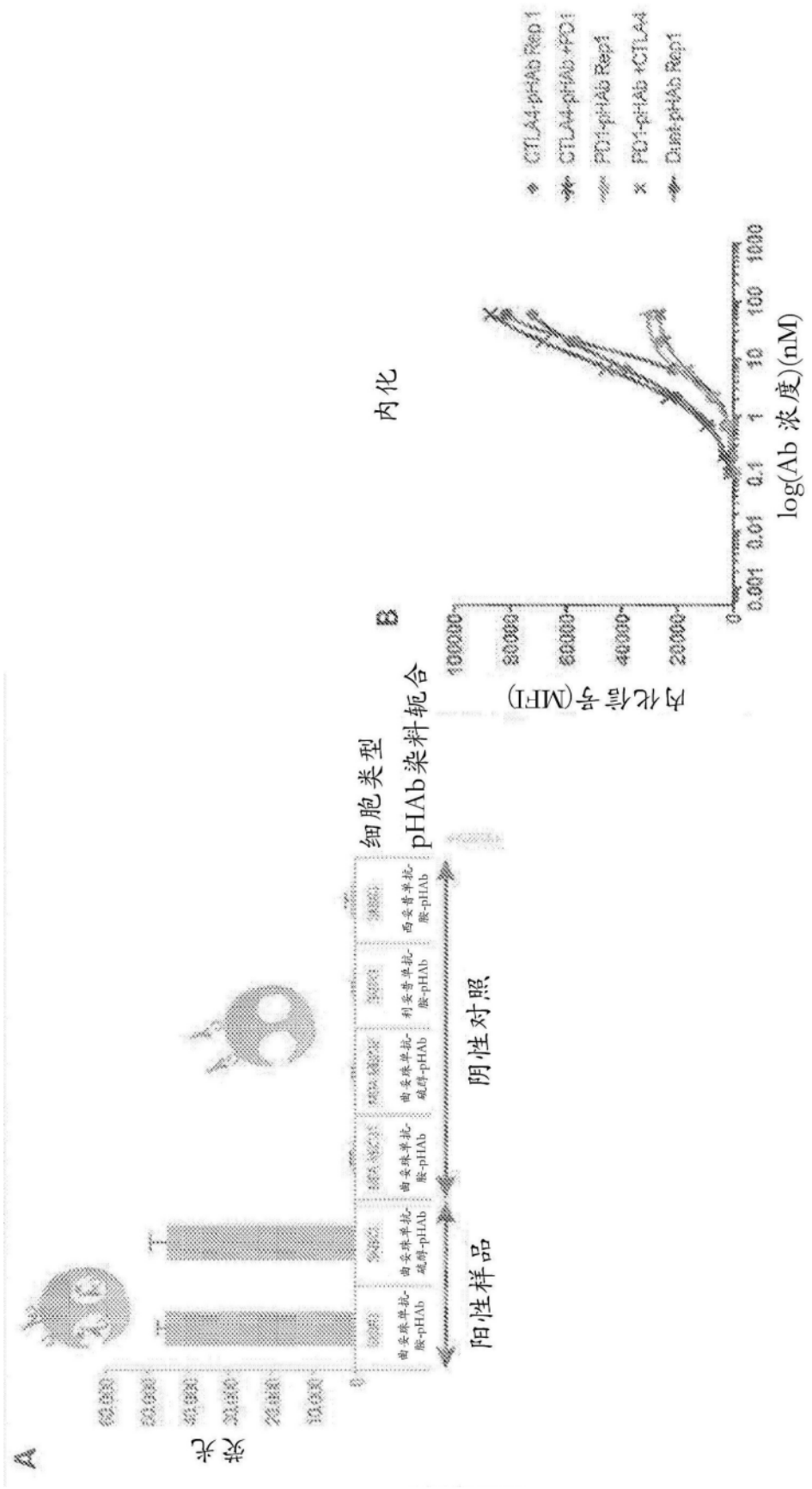

A
荧光
细胞类型
阳性样品
阴性对照
B
内化
pHAb染料轭合
几何信号(MFI)
log(Ab 浓度)(nM)
CTLA4-pHAb Rep1
CTLA4-pHAb +PD1
PD1-pHAb Rep1
PD1-pHAb +CTLA4
Dual-pHAb Rep1

图25

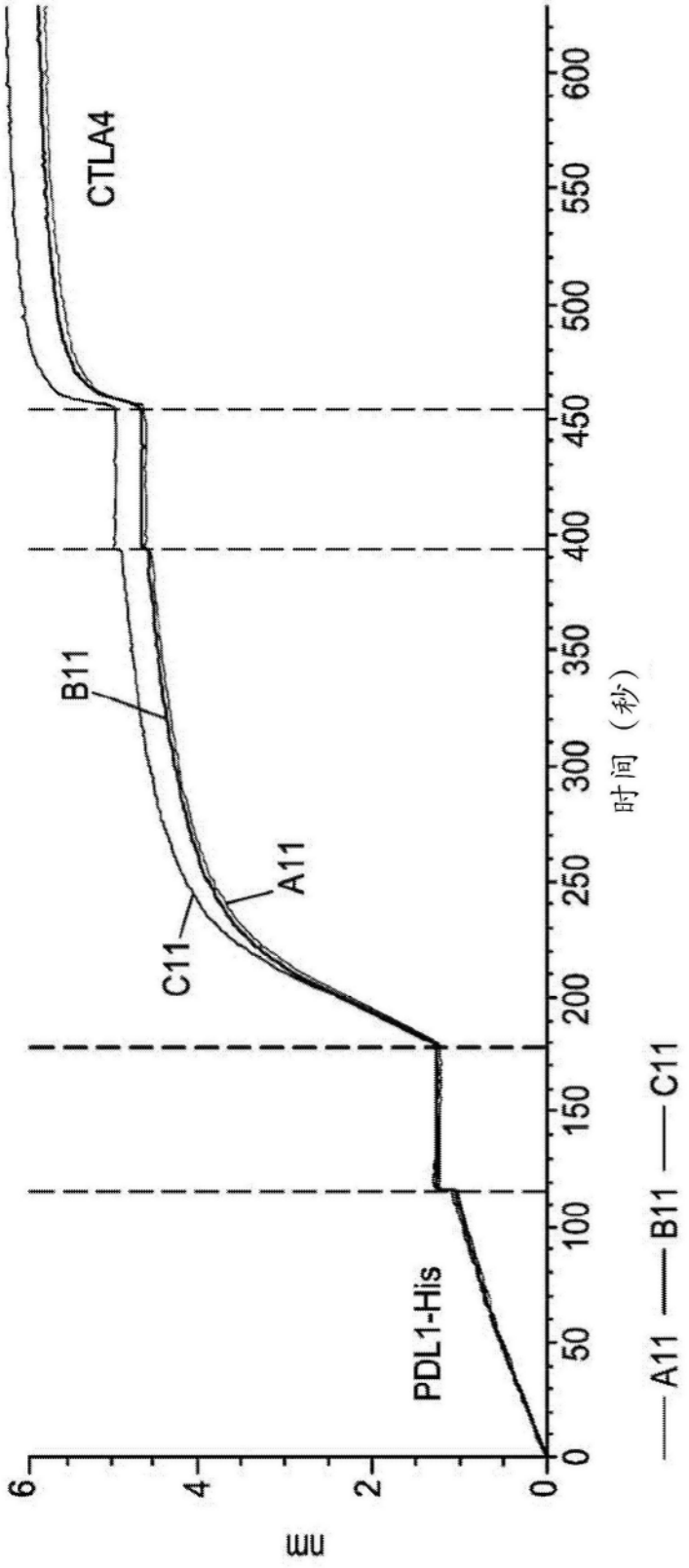

CTLA4
B11
A11
C11
PDL1-His
nm
时间（秒）
A11
B11
C11
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
0
2
4
6

图26

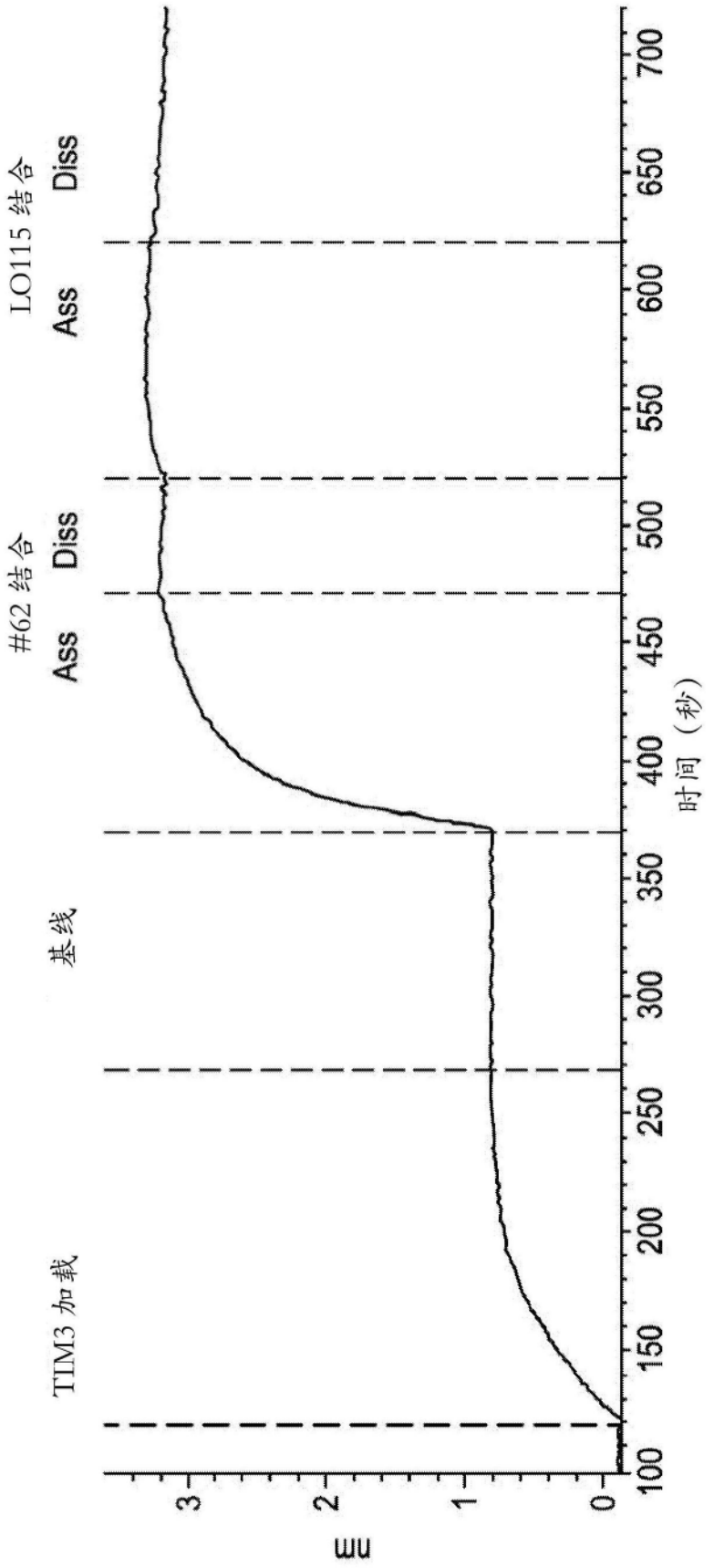

TIM3 加载
基线
#62 结合
Ass
Diss
LO115 结合
Ass
Diss
nm
时间（秒）
0
1
2
3
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700

图27A

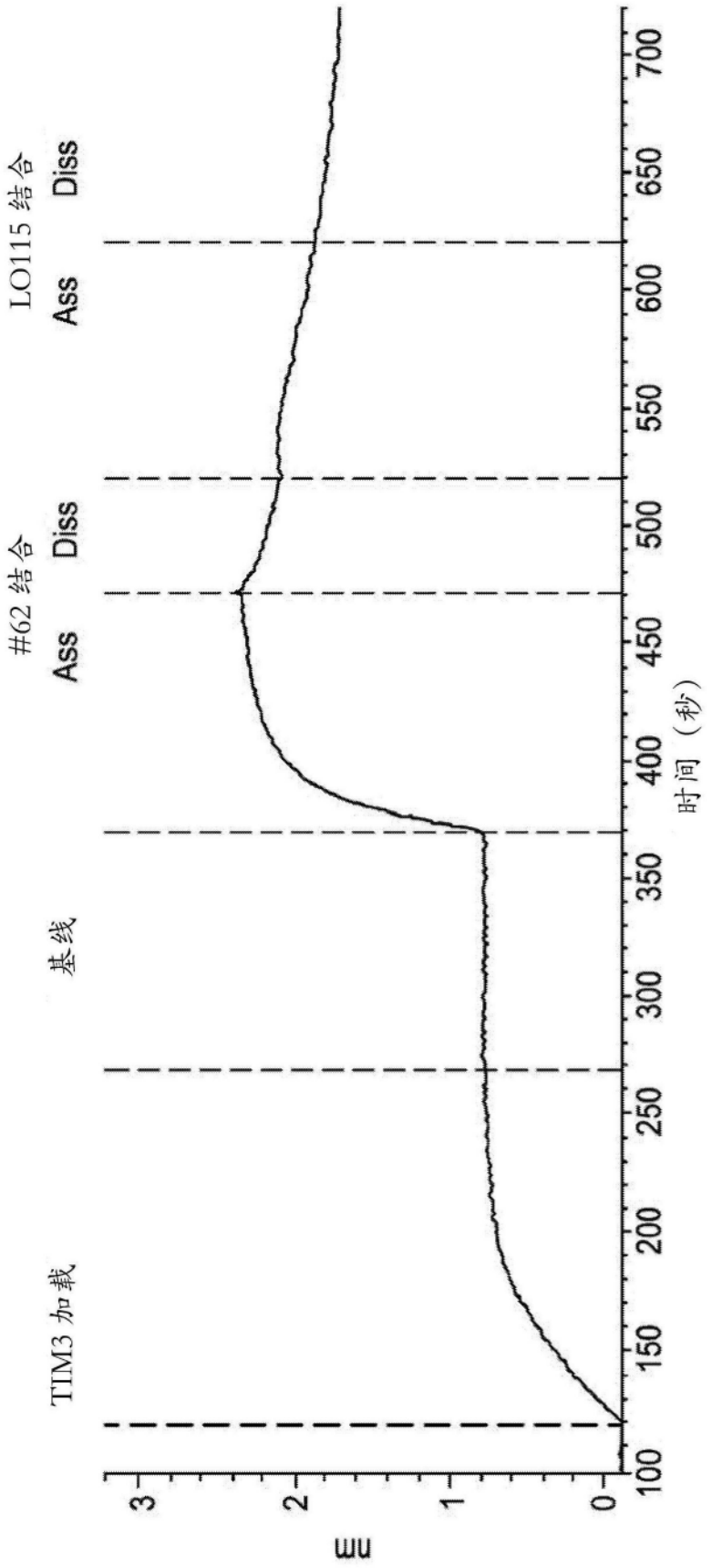

TIM3 加载
基线
#62 结合
Ass
Diss
LO115 结合
Ass
Diss
nm
时间（秒）
0
1
2
3
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700

图27B

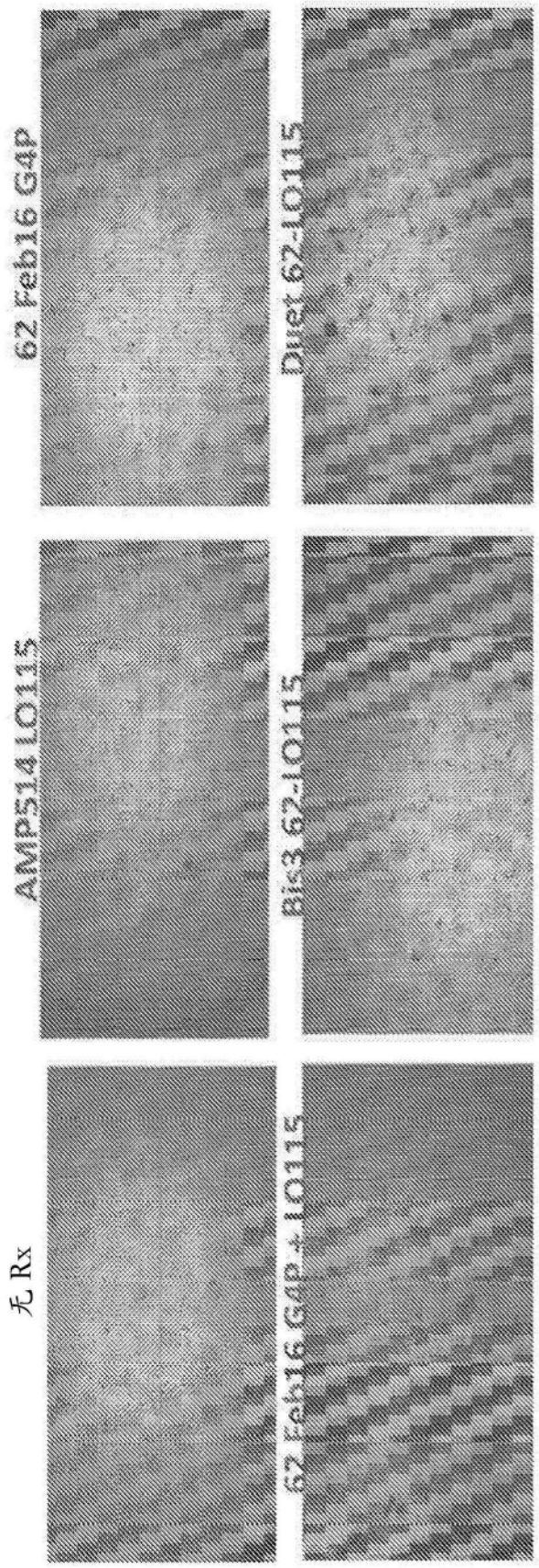

62 Feb16 G4P
Duet 62-IO115
AMP514 IO115
Bis3 62-IO115
无 Rx
62 Feb16 G4P + IO115

图28A

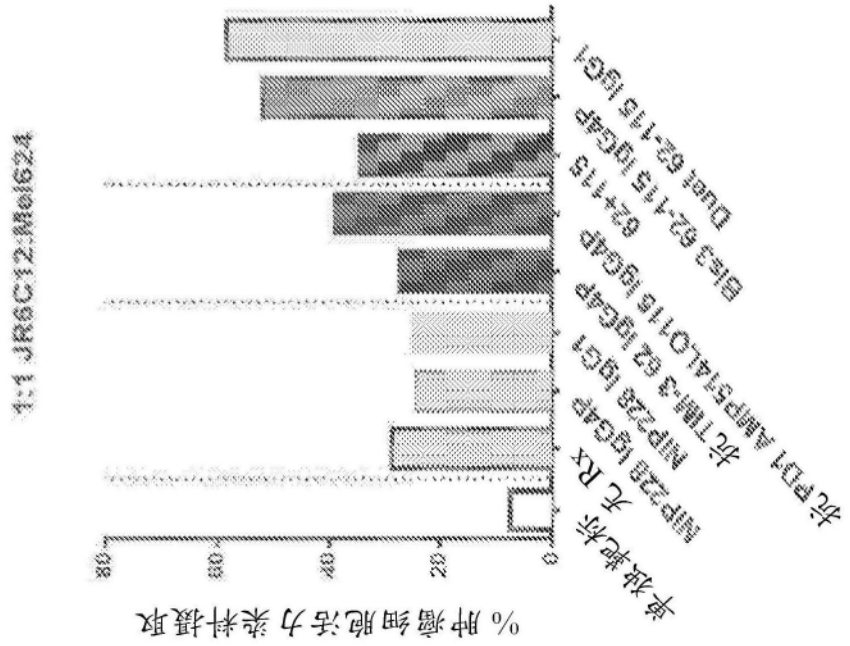

1:1 JR6C12:Mel624
% 肿瘤细胞活力染料摄取
0
20
40
60
80
未处理 无 Rx
NIP-228 IgGAP
NIP-228 IgG1
抗 TIM-3 62 IgG1
抗 TIM-3 62 IgGAP
62+15
Bis-3 62-15 IgGAP
Duet 62-15 IgG1
抗 PD1 AMP514 LO715 IgGAP

图28B

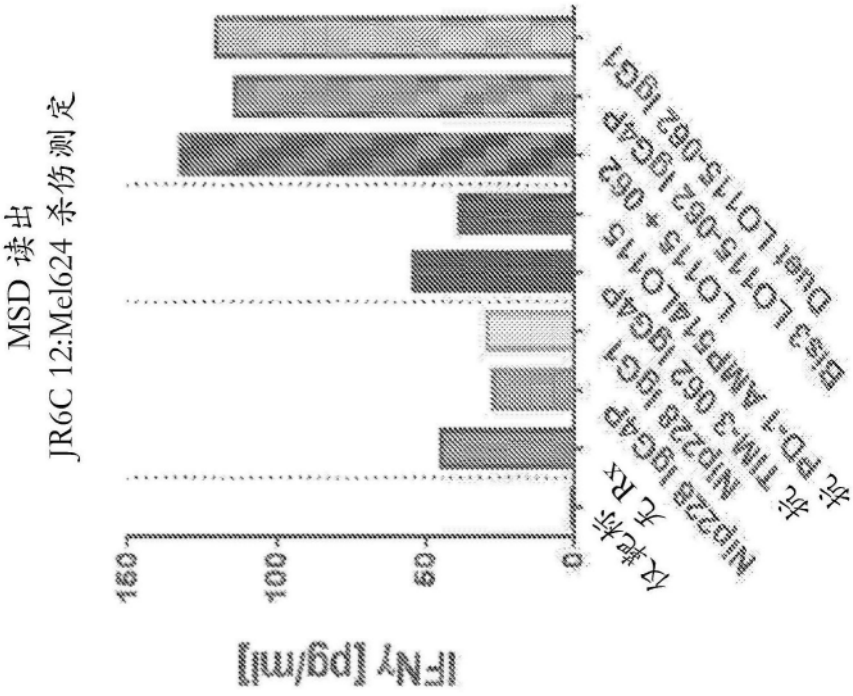

MSD 读出
JR6C 12:Mel624 杀伤测定
IFNγ [pg/ml]
0
60
100
160
无处理
NIP228 IgGAP
NIP228 IgG1
抗 TIM-3 062 IgG1
抗 PD-1 AMP514 LO715
Bis3 LO715-062 IgGAP
Duet LO715-062 IgG1

图28C

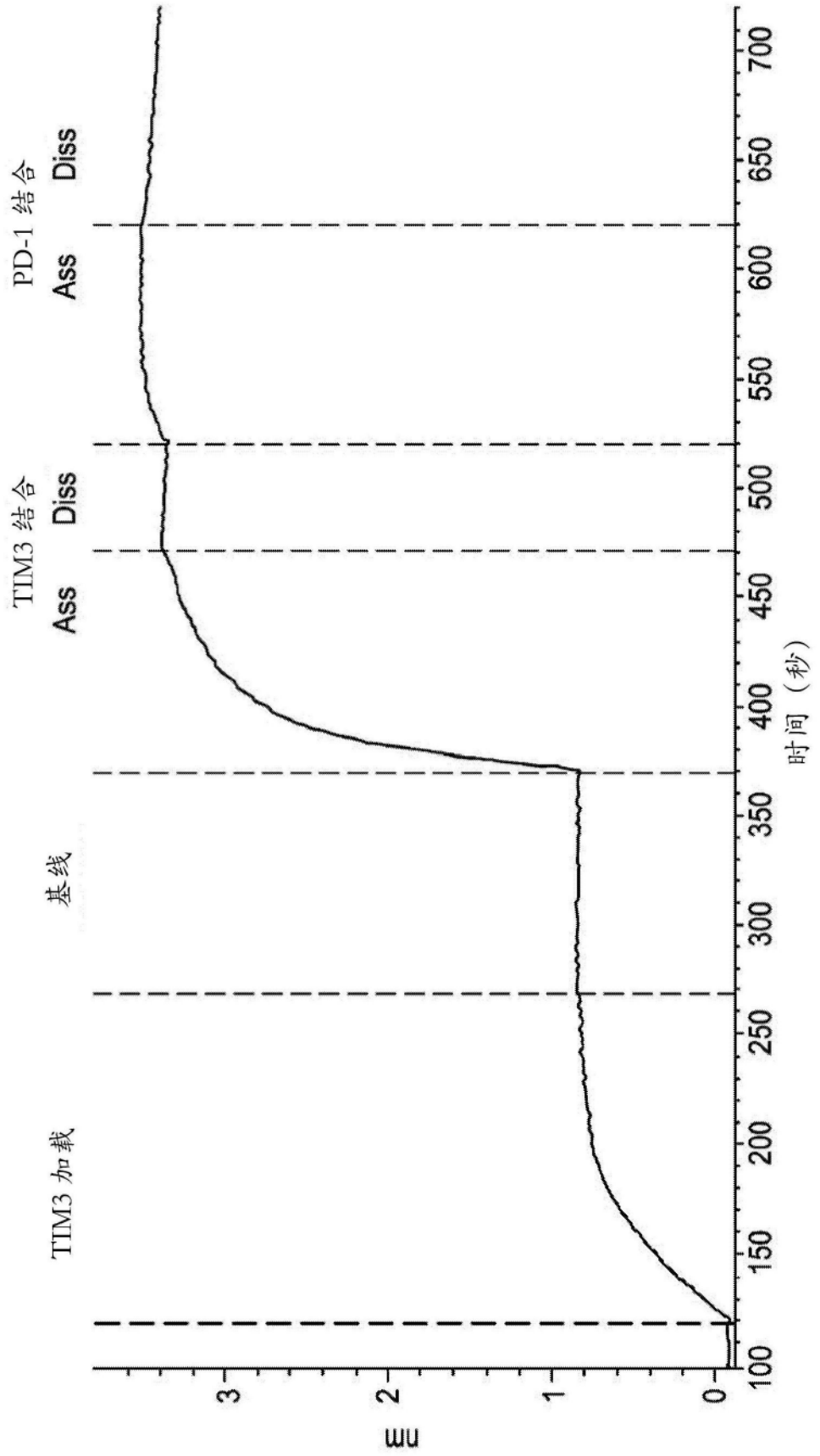

TIM3 加载
基线
TIM3 结合
Ass
Diss
PD-1 结合
Ass
Diss
nm
时间（秒）
0
1
2
3
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700

图29

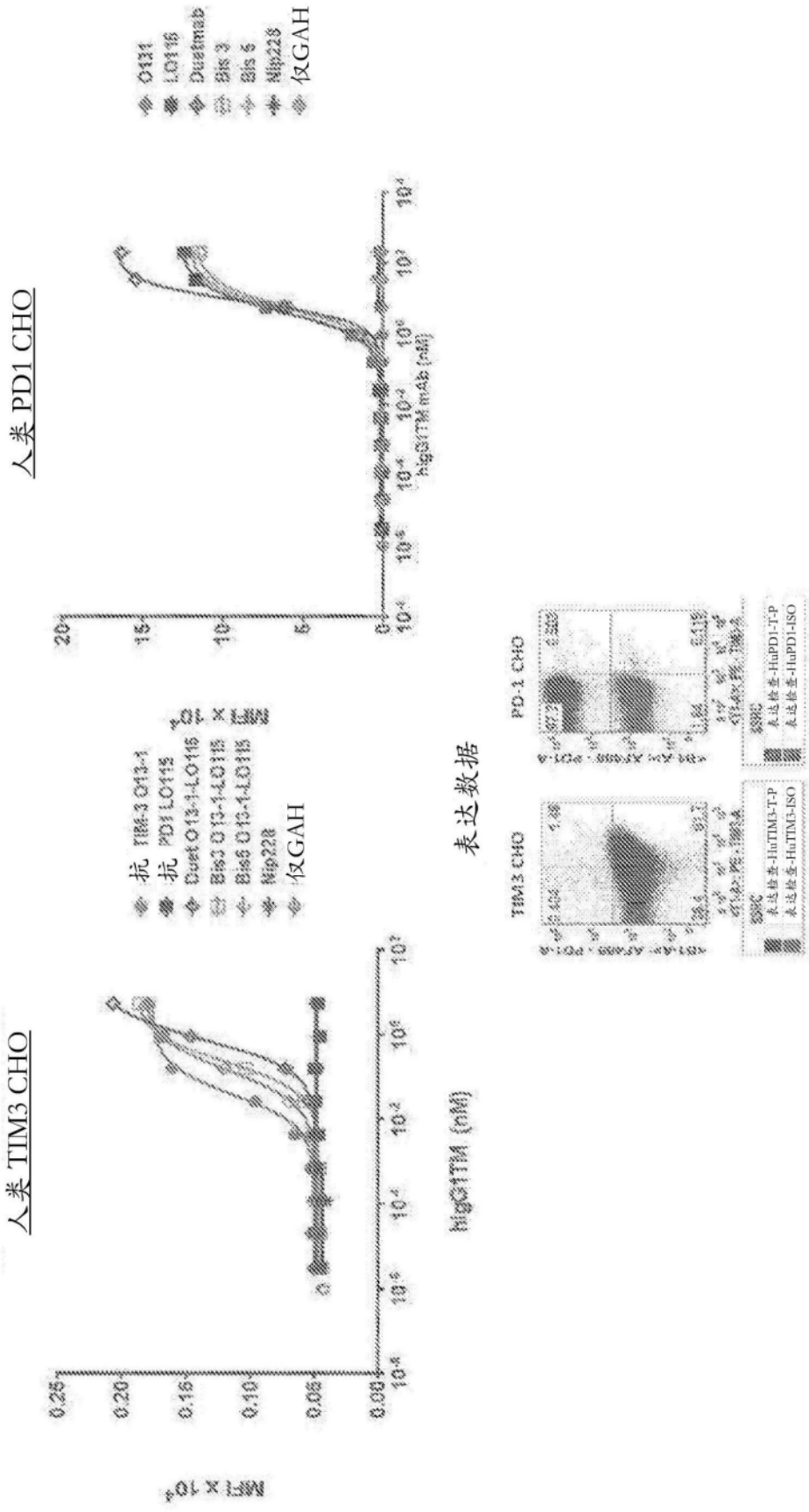

人类 TIM3 CHO
人类 PD1 CHO
抗 TIM-3 O13-1
抗 PD1 LO115
Duet O13-1-LO115
Bis3 O13-1-LO115
Bis6 O13-1-LO115
Nip228
仅GAH
O131
LO115
Duetmab
Bis 3
Bis 5
Nip228
仅GAH
hIgG1TIM (nM)
hIgG1TIM mAb (nM)
表达数据
TIM3 CHO
PD-1 CHO
SSMC
表达检查-HuTIM3-T-P
表达检查-HuTIM3-ISO
SSMC
表达检查-HuPD1-T-P
表达检查-HuPD1-ISO

图30

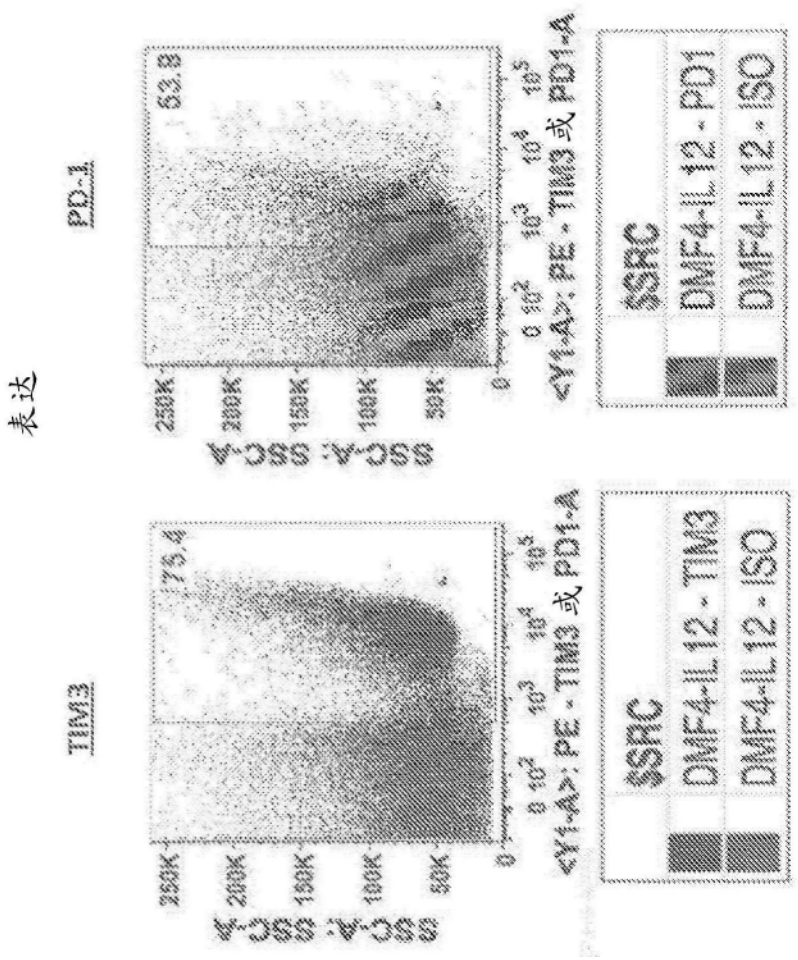

表达
PD-1
TIM3
SSC-A: SSC-A
<Y1-A>: PE - TIM3 或 PD1-A
63.8
75.4
SSRC
DMF4-IL12 - PD1
DMF4-IL12 - ISO
DMF4-IL12 - TIM3
DMF4-IL12 - ISO

图31

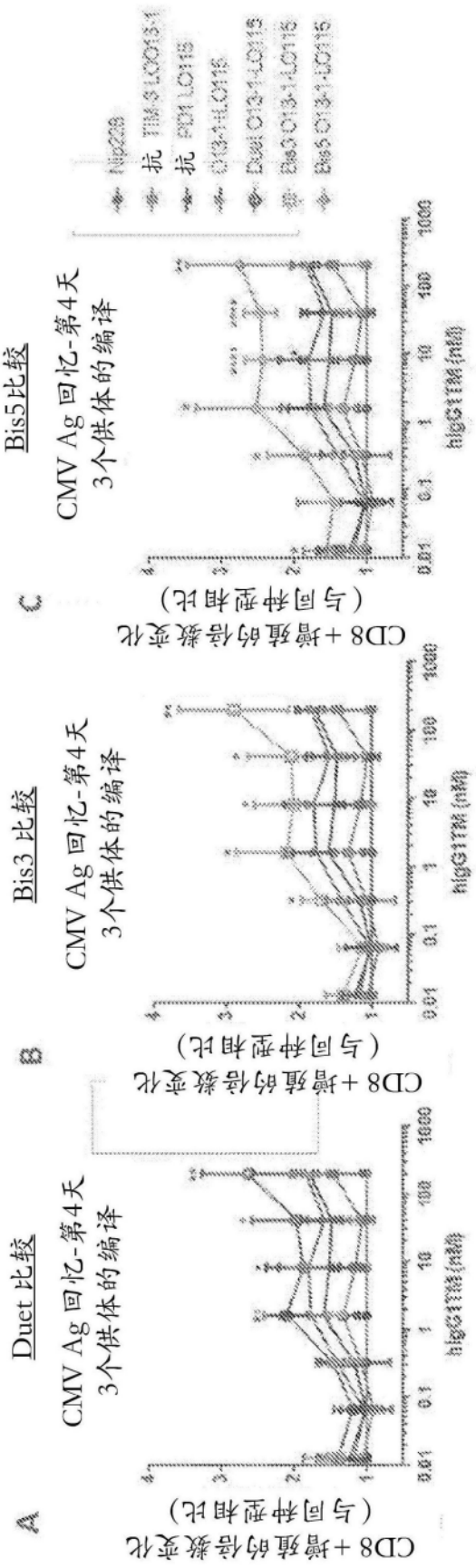

A
Duet 比较
CMV Ag 回忆-第4天
3个供体的编译
CD8＋增殖的倍数变化
（与同种型相比）
B
Bis3 比较
CMV Ag 回忆-第4天
3个供体的编译
CD8＋增殖的倍数变化
（与同种型相比）
C
Bis5比较
CMV Ag 回忆-第4天
3个供体的编译
CD8＋增殖的倍数变化
（与同种型相比）
Nip228
抗 TIM-3 LCO13-1
抗 PD1 LO115
O13-1-LO115
Duet O13-1-LO115
Bis3 O13-1-LO115
Bis5 O13-1-LO115

图32

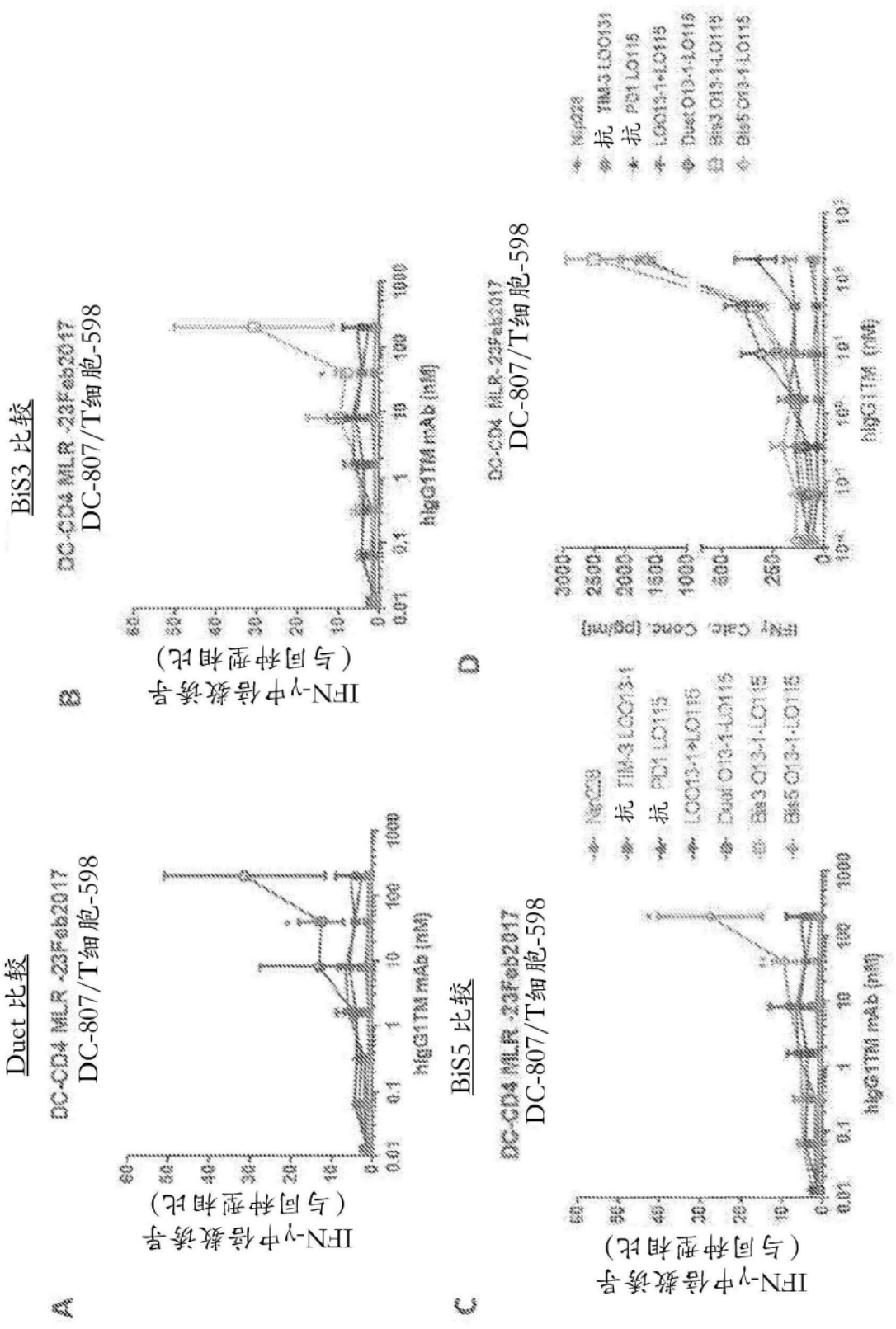

A
Duet 比较
DC-CD4 MLR -23Feb2017
DC-807/T细胞-598
IFN-γ中倍数诱导
(与同种型相比)
hIgG1TIM mAb (nM)
B
BiS3 比较
DC-CD4 MLR -23Feb2017
DC-807/T细胞-598
IFN-γ中倍数诱导
(与同种型相比)
hIgG1TIM mAb (nM)
C
BiS5 比较
DC-CD4 MLR -23Feb2017
DC-807/T细胞-598
IFN-γ中倍数诱导
(与同种型相比)
hIgG1TIM mAb (nM)
NivoG4
抗 TIM-3 LGC013-1
抗 PD1 LO115
LGC013-1+LO115
DuetC13-1+LO115
Bis3 C13-1+LO115
Bis5 C13-1+LO115
D
DC-CD4 MLR -23Feb2017
DC-807/T细胞-598
Conc. (pg/ml)
IFN-γ
hIgG1TIM (nM)

图33

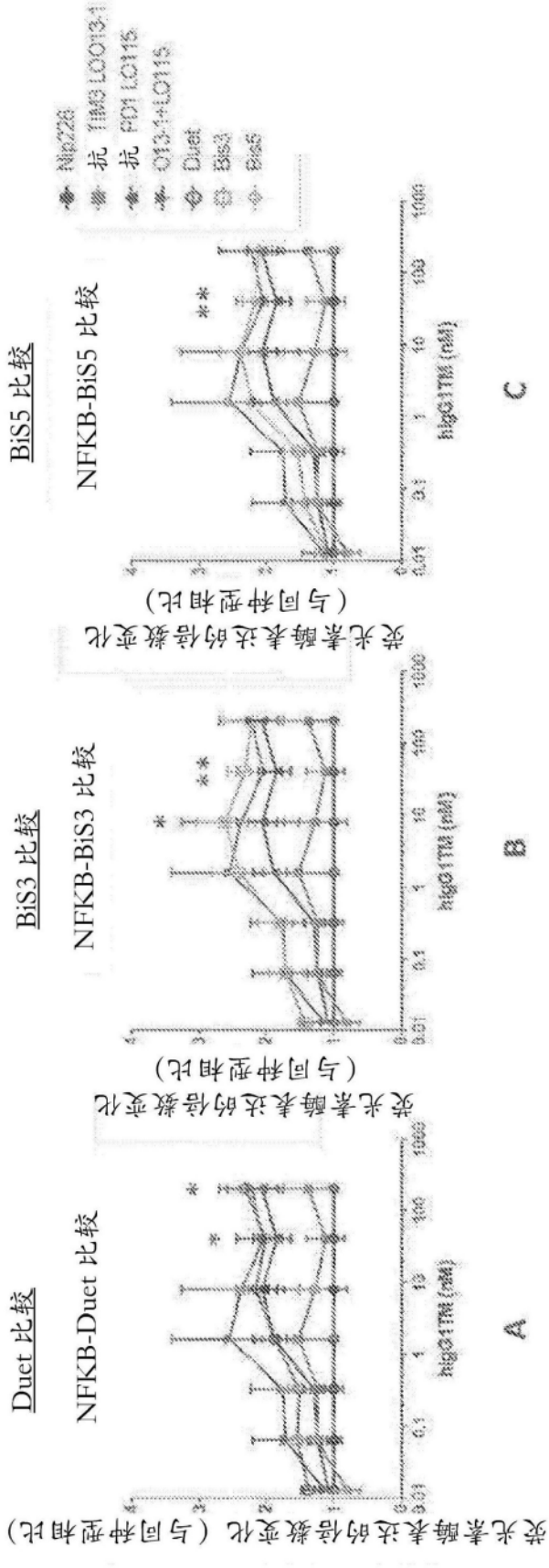

Duet 比较
NFKB-Duet 比较
BiS3 比较
NFKB-BiS3 比较
BiS5 比较
NFKB-BiS5 比较
荧光素酶表达的倍数变化（与同种型相比）
hIgG1TIM3 (nM)
A
B
C
Nip228
抗 TIM3 LO0131
抗 PD1 LO115
O13+LO115
Duet
Bis3
Bis5

图34

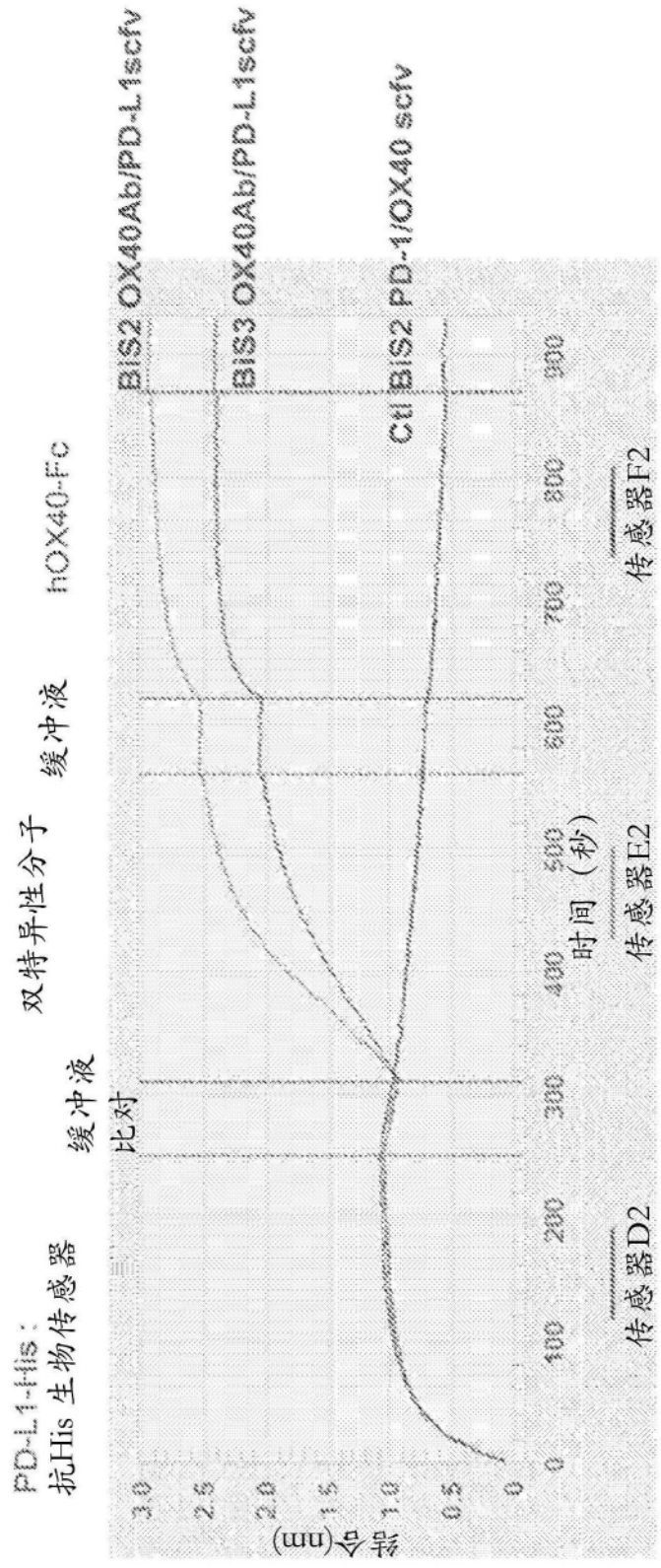

PD-L1-His：
抗His 生物传感器
缓冲液
比对
双特异性分子
缓冲液
hOX40-Fc
BiS2 OX40Ab/PD-L1scfv
BiS3 OX40Ab/PD-L1scfv
Ctl BiS2 PD-1/OX40 scfv
传感器D2
传感器E2
传感器F2
时间（秒）
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0

图35

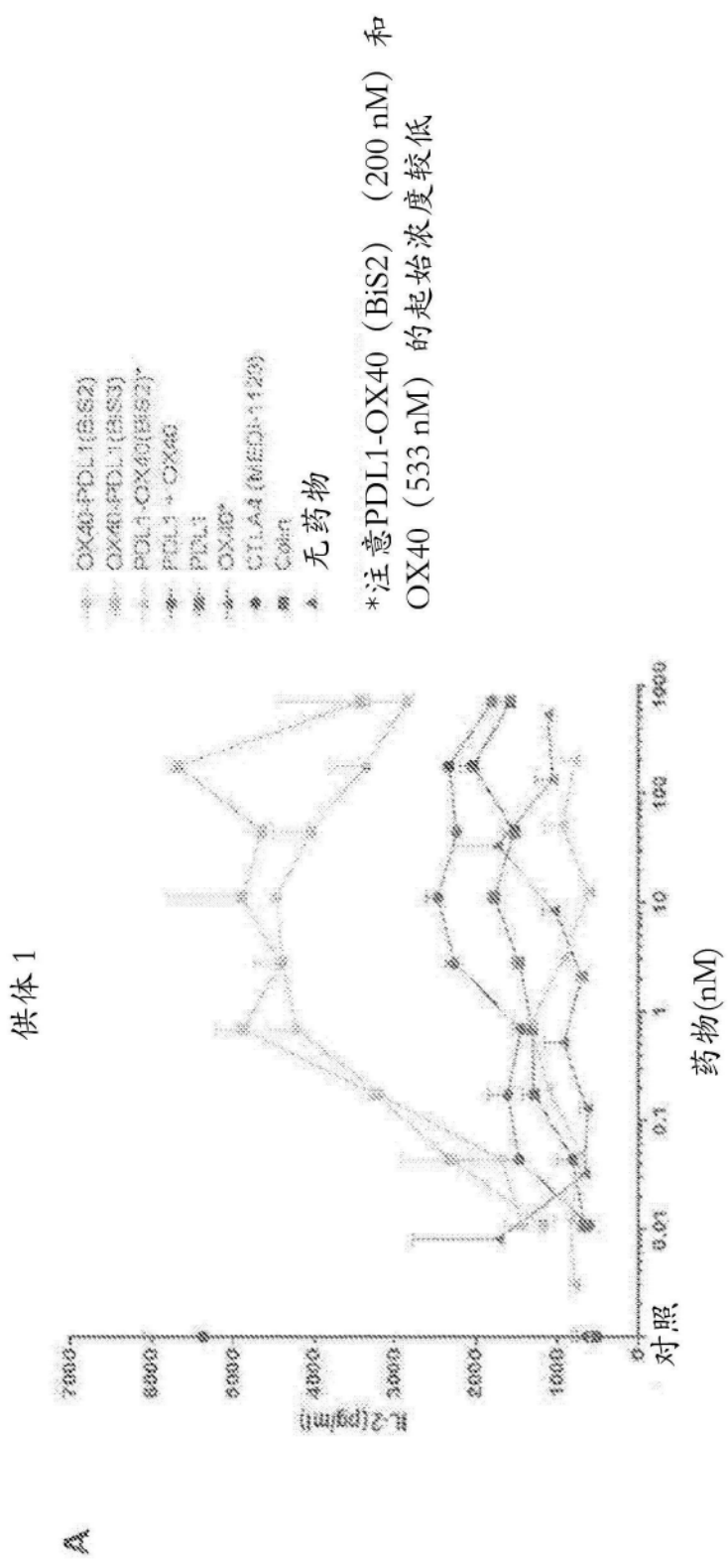

A
供体 1
IL-2(pg/ml)
药物(nM)
对照
0.01
0.1
1
10
100
1000
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
OX40-PDL1(BiS2)
OX40-PDL1(BiS3)
PDL1-OX40(BiS2)*
PDL1 + OX40
PDL1
OX40
CTLA4 (MEDI4736)
Combi
无药物
*注意PDL1-OX40（BiS2）（200 nM）和
OX40（533 nM）的起始浓度较低

图36

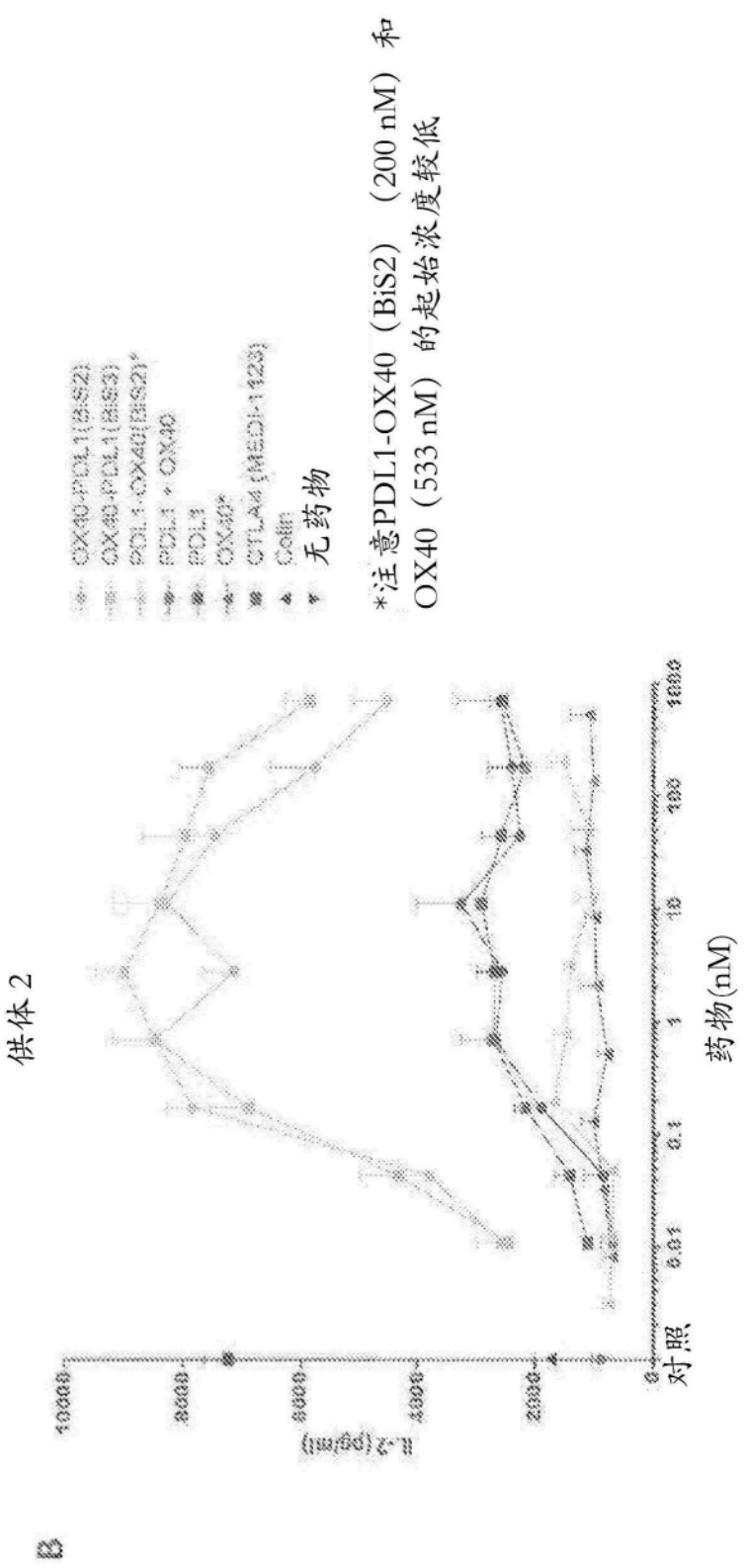

B
供体 2
药物(nM)
对照
0.001
0.1
1
10
100
1000
*注意PDL1-OX40（BiS2）（200 nM）和
OX40（533 nM）的起始浓度较低
无药物

图36续

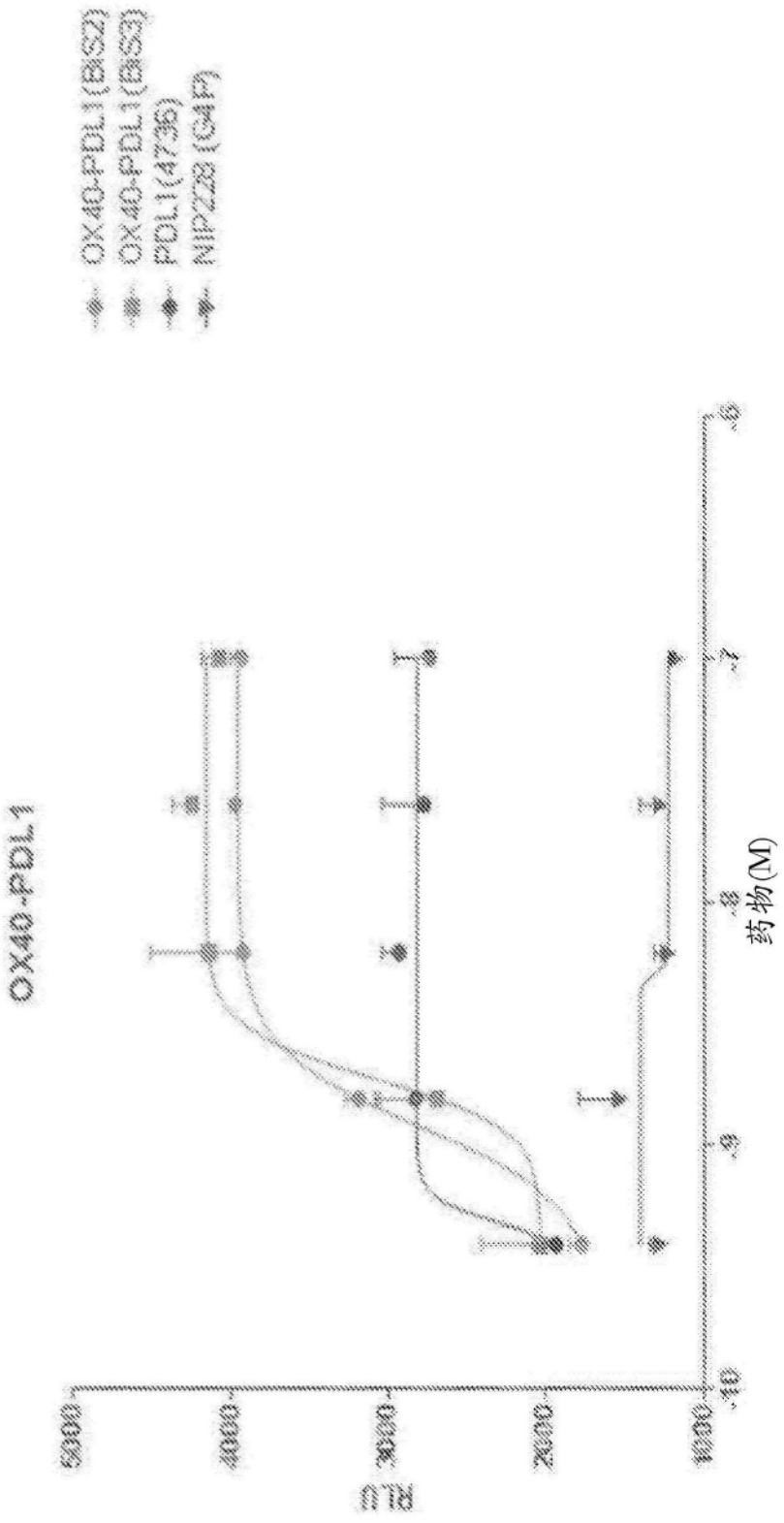

OX40-PDL1(BS2)
OX40-PDL1(BS3)
PDL1(4Z36)
NIP228 (GAP)
OX40-PDL1
RLU
药物(M)

图37

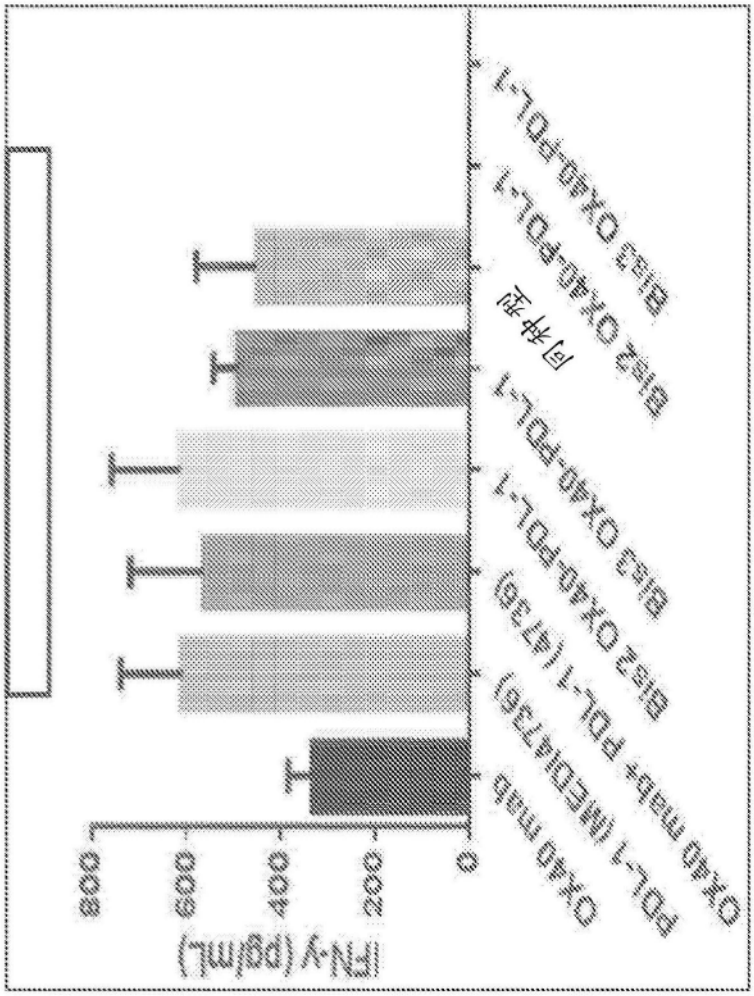

IFN-γ (pg/mL)
0
200
400
600
800
OX40 mAb
PDL-1 (MEDI4736)
OX40 mAb+ PDL-1 (MEDI4736)
Bi-Ab OX40-PDL-1
Bi-Ab OX40-PDL-1
同种型
Bi-Ab OX40-PDL-1
Bi-Ab OX40-PDL-1
Bi-Ab OX40-PDL-1

图38

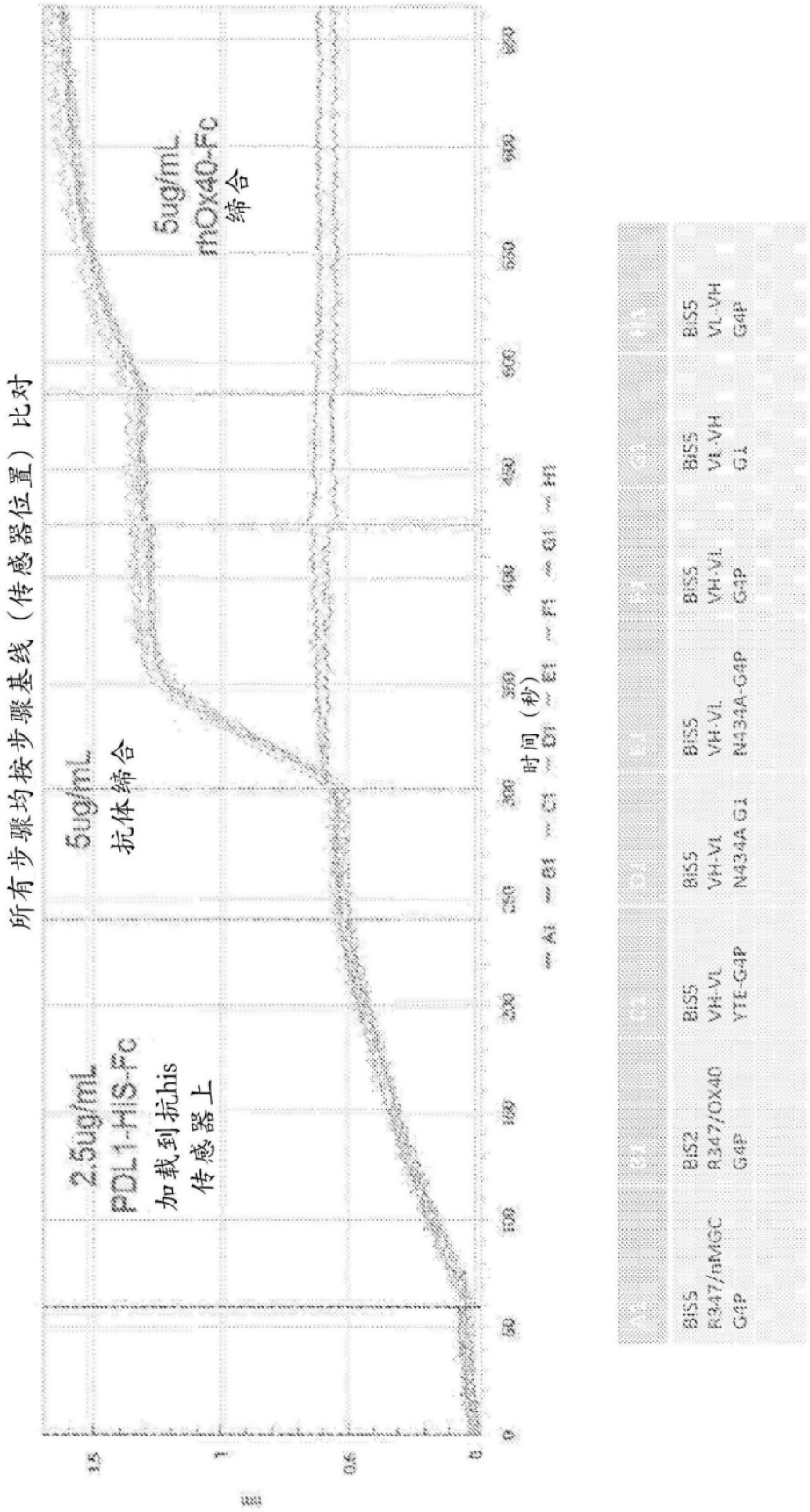

所有步骤均按步骤基线（传感器位置）比对
2.5ug/ml
PDL1-HIS-Fc
加载到抗his
传感器上
5ug/ml
抗体缔合
5ug/ml
mOx40-Fc
缔合
时间（秒）
nm
A1
B1
C1
D1
E1
F1
G1
H1
A1
B1
C1
D1
E1
F1
G1
H1
BiS5
R347/nMGC
G4P
BiS2
R347/OX40
G4P
BiS5
VH-VL
YTE-G4P
BiS5
VH-VL
N434A G1
BiS5
VH-VL
N434A-G4P
BiS5
VH-VL
G4P
BiS5
VL-VH
G1
BiS5
VL-VH
G4P

图39

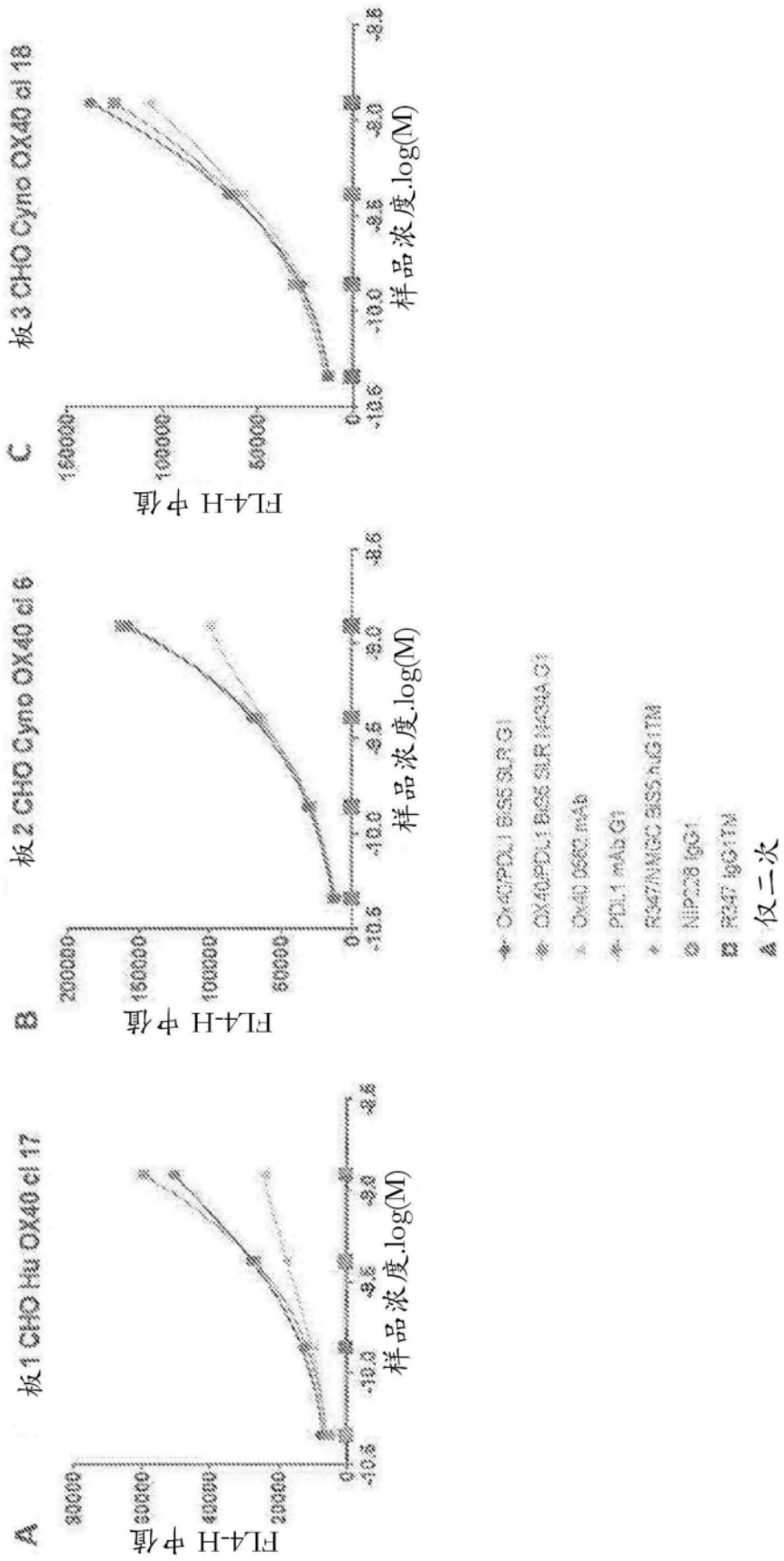

A
板1 CHO Hu OX40 cl 17
B
板2 CHO Cyno OX40 cl 6
C
板3 CHO Cyno OX40 cl 18
FL4-H 中值
样品浓度.log(M)
OX40/PDL1 BiSS SLR G1
OX40/PDL1 BiSS SLR (H434A G1
OX40 0600 mAb
PDL1 mAb G1
R347/NMSC BiSS hIgG1TM
NIP228 IgG1
R347 IgG1TM
仅二次

图40

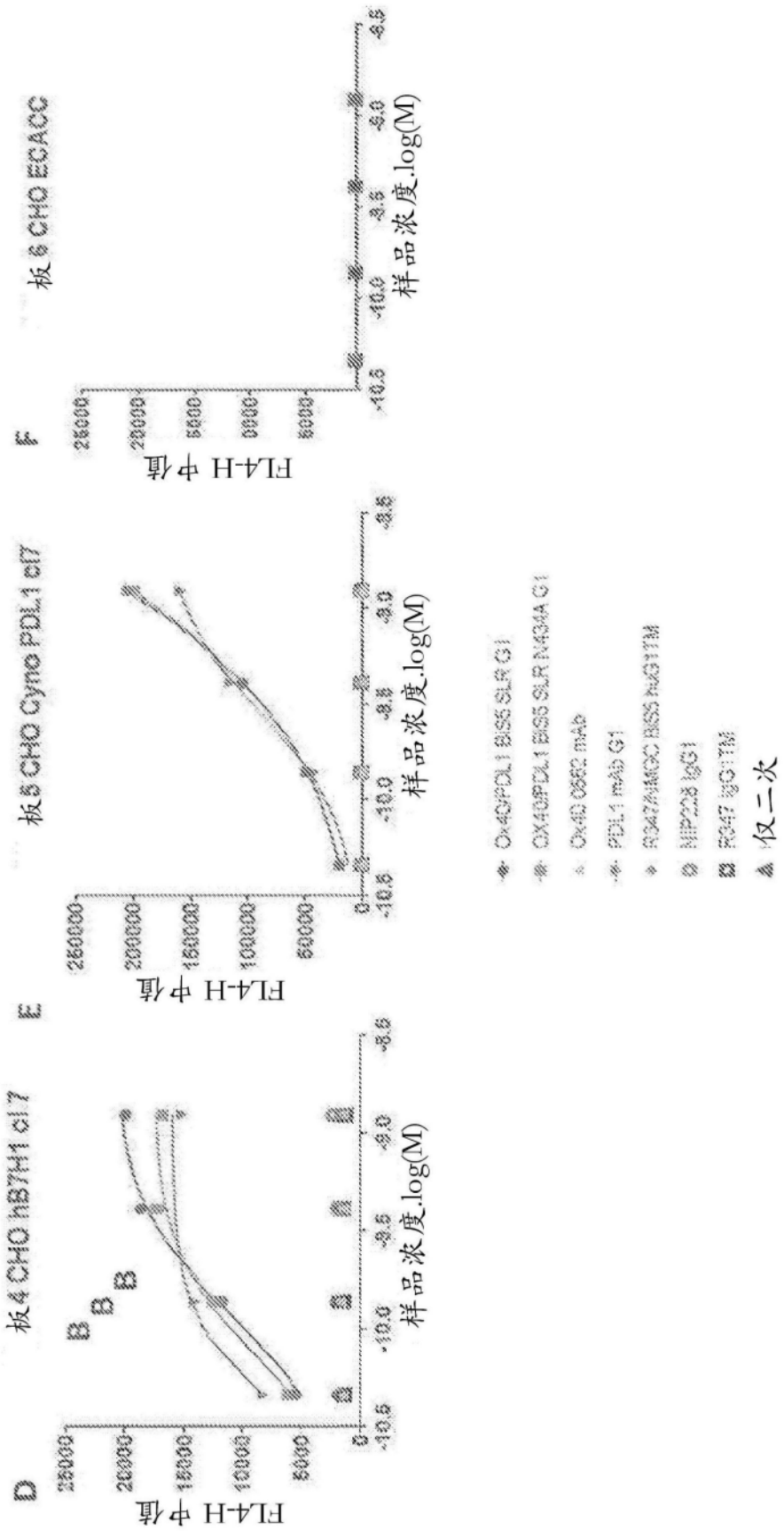

D
板4 CHO hB7H1 cl 7
FL4-H 中值
样品浓度.log(M)
E
板5 CHO Cyno PDL1 cl7
FL4-H 中值
样品浓度.log(M)
F
板 6 CHO ECACC
FL4-H 中值
样品浓度.log(M)
仅二次

图40续

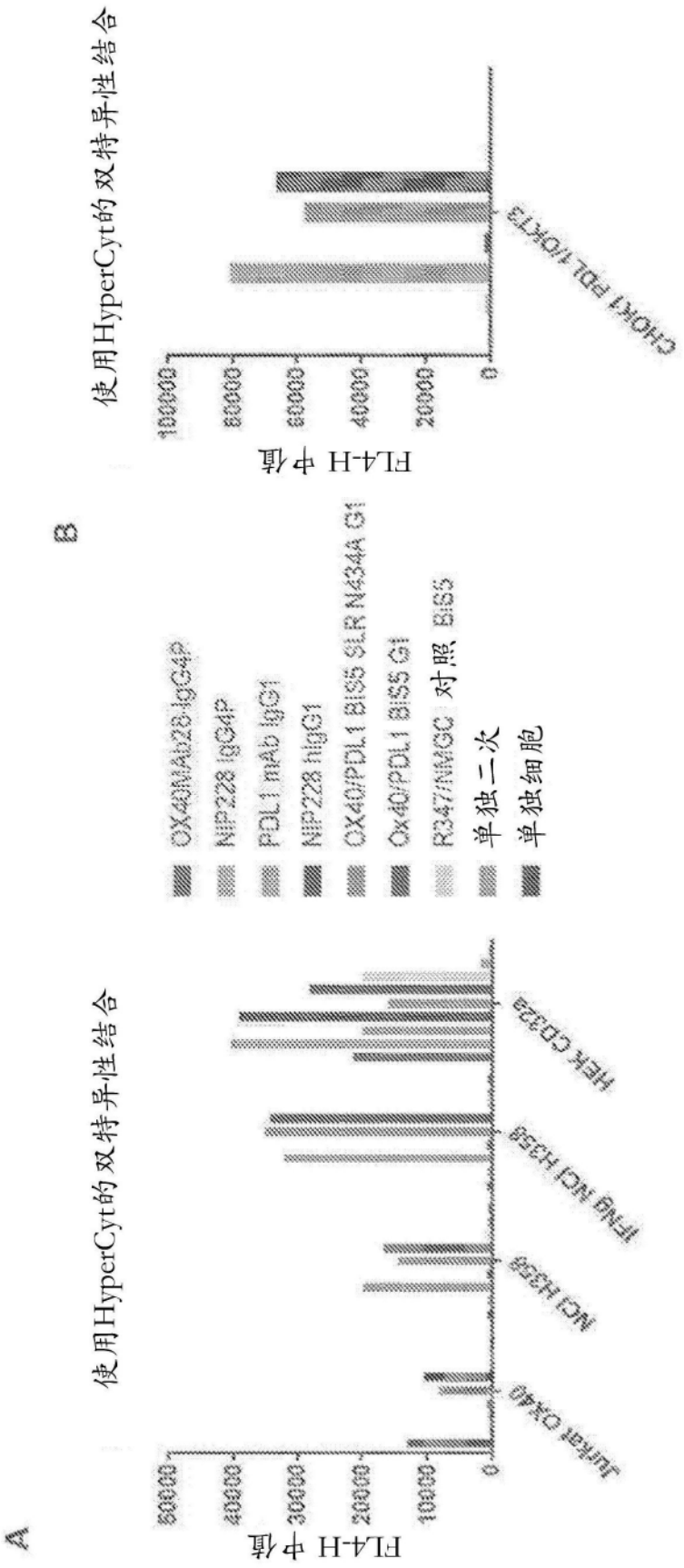

A
使用HyperCyt的双特异性结合
FL4-H 中值
60000
40000
30000
20000
10000
0
Jurkat OX40
MC1 H358
IFNg MC1 H358
HEK CD32a
B
使用HyperCyt的双特异性结合
FL4-H 中值
100000
80000
60000
40000
20000
0
CHOK1 PDL1/OKT3
OX40MAb2B-IgG4P
NIP228 IgG4P
PDL1 mAb IgG1
NIP228 hIgG1
CX40/PDL1 BiSS SLR N434A G1
Cx40/PDL1 BiSS G1
R347/NMGC 对照 BiSS
单独二次
单独细胞

图41

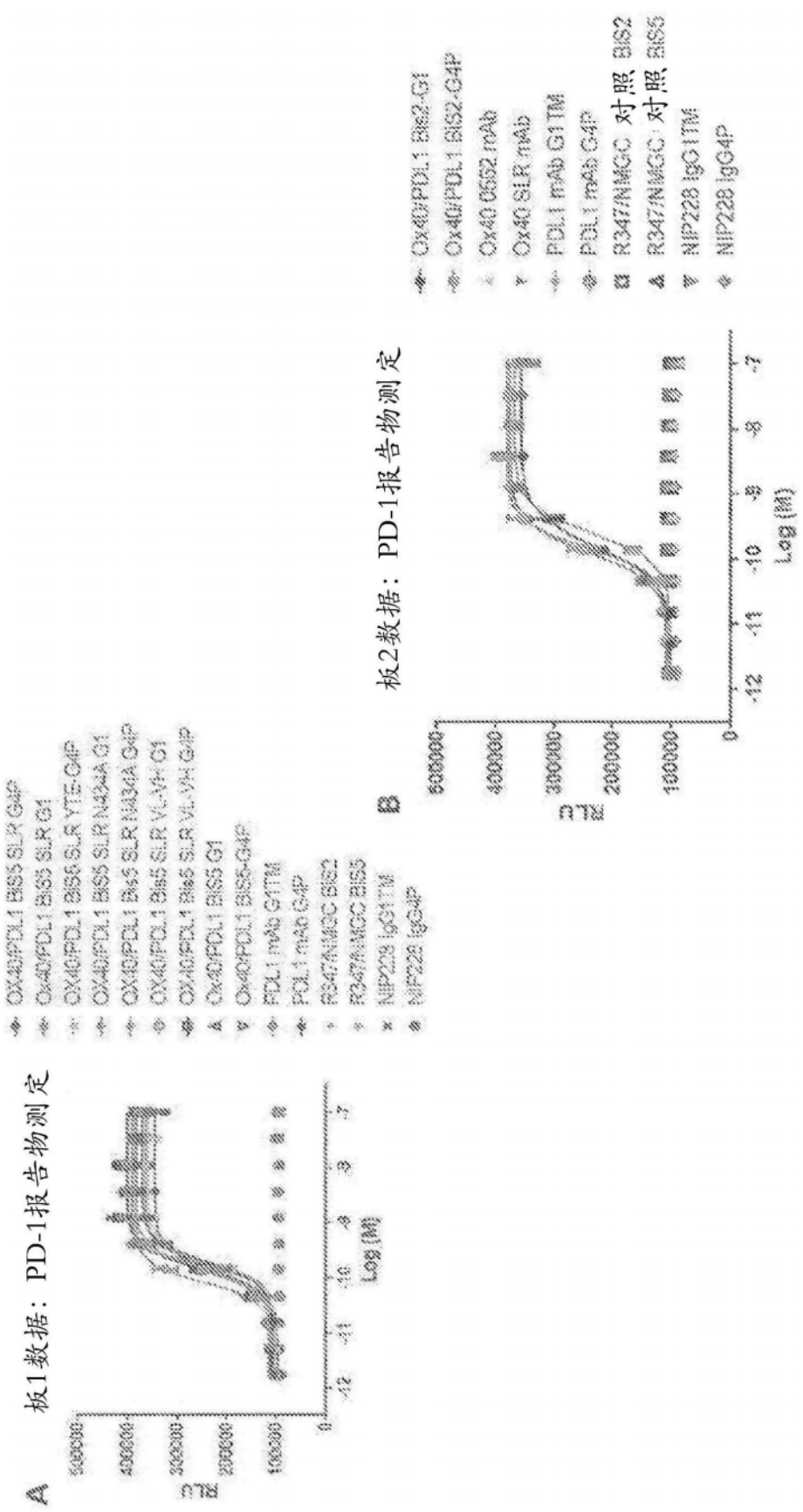

A
板1数据：PD-1报告物测定
OX40/PDL1 BIS5 SLR G4P
Ox40/PDL1 BIS5 SLR G1
OX40/PDL1 BIS6 SLR YTE-G4P
OX40/PDL1 BIS5 SLR N434A G1
OX40/PDL1 Bis5 SLR N434A G4P
OX40/PDL1 Bis5 SLR VL-VH G1
OX40/PDL1 Bis5 SLR VL-VH G4P
A Ox40/PDL1 BIS5 G1
Ox40/PDL1 BIS5-G4P
PDL1 mAb G1TM
PDL1 mAb G4P
R347/NMGC BIS2
R347/NMGC BIS5
NIP228 IgG1TM
NIP228 IgG4P
RLU
Log [M]
B
板2数据：PD-1报告物测定
Ox40/PDL1 Bis2-G1
Ox40/PDL1 BIS2-G4P
Ox40 0652 mAb
Ox40 SLR mAb
PDL1 mAb G1TM
PDL1 mAb G4P
R347/NMGC 对照 BIS2
R347/NMGC 对照 BIS5
NIP228 IgG1TM
NIP228 IgG4P
RLU
Log [M]

图42

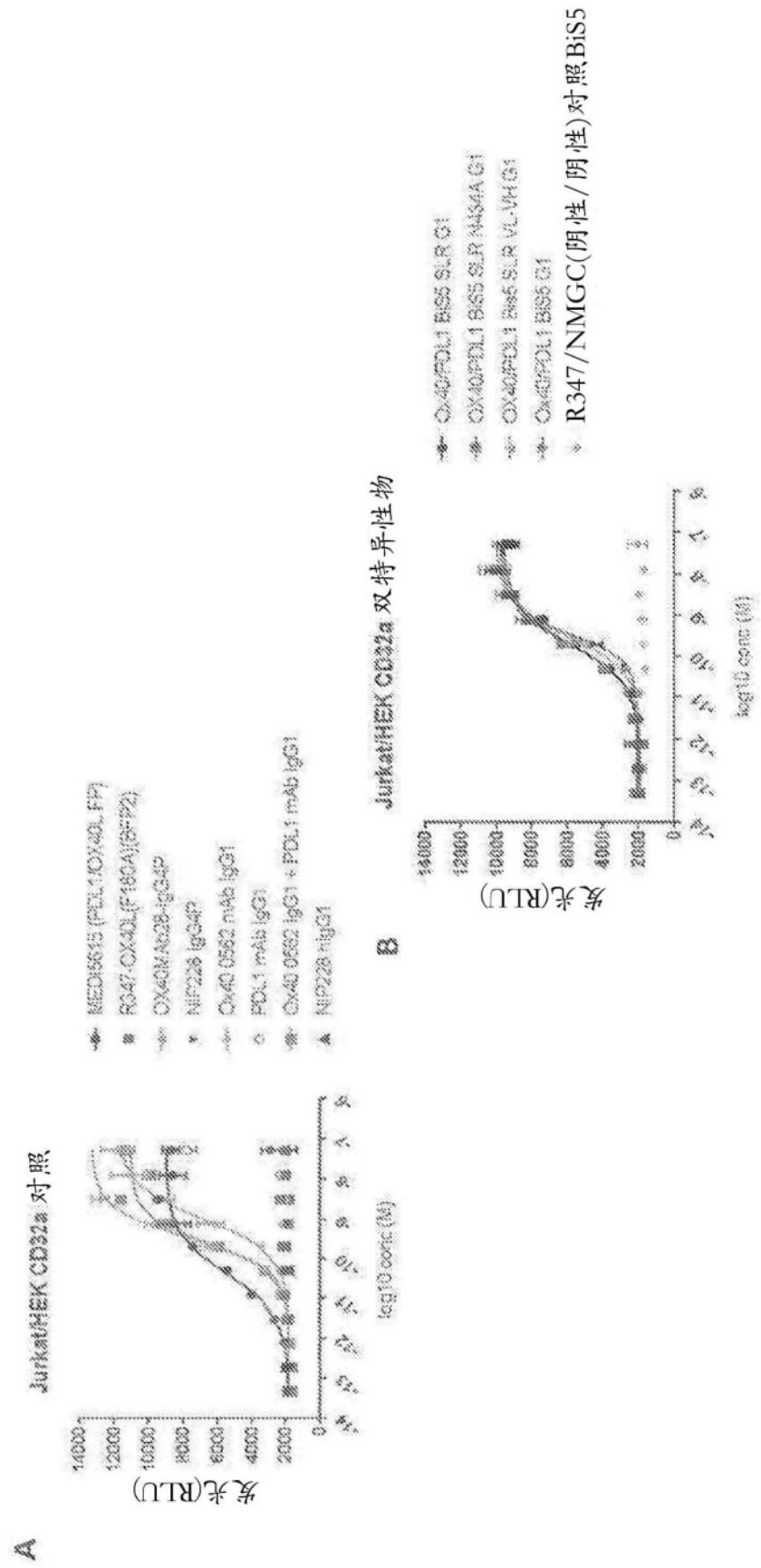

A
Jurkat/HEK CD32a 对照
发光(RLU)
log10 conc (M)
MEDI6515 (PDL1/OX40L FP)
R347-OX40L(F180A)(6FP2)
OX40MAb28-IgG4P
NIP228 IgG4P
Ox40 0562 mAb IgG1
PDL1 mAb IgG1
Ox40 0562 IgG1 + PDL1 mAb IgG1
NIP228 hIgG1
B
Jurkat/HEK CD32a 双特异性物
发光(RLU)
log10 conc (M)
OX40PDL1 BiS5 SLR G1
OX40PDL1 BiS5 SLR N434A G1
OX40PDL1 BiS5 SLR VL-VH G1
Ox40PDL1 BiS5 G1
R347/NMGC(阴性/阴性)对照BiS5

图43

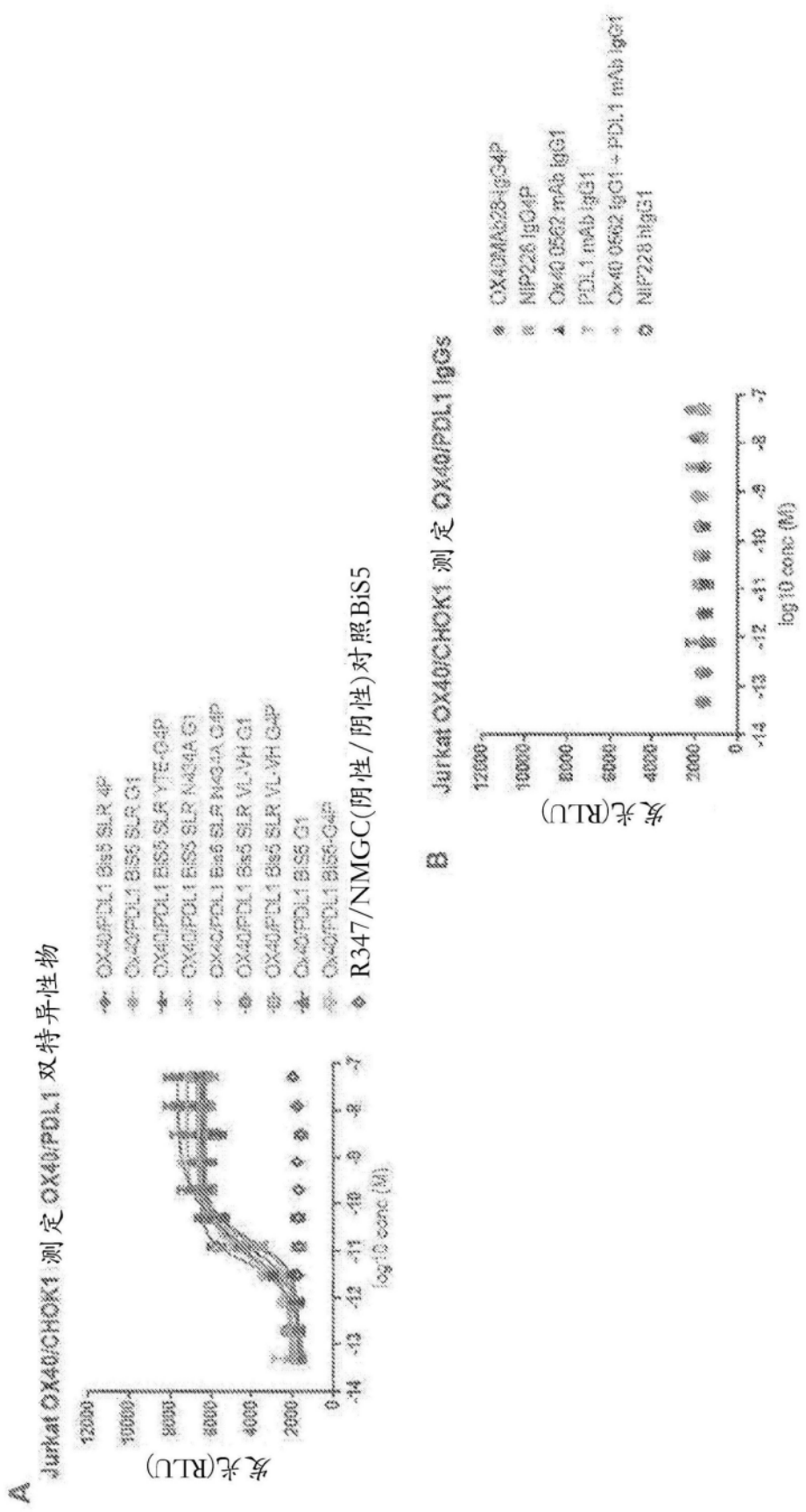

A
Jurkat OX40/CHOK1 测定 OX40/PDL1 双特异性物
发光(RLU)
log10 conc (M)
OX40PDL1 Bis5 SLR 4P
Ox40PDL1 BiS5 SLR G1
OX40PDL1 BiS5 SLR YTE-G4P
OX40PDL1 BiS5 SLR N297A G1
OX40PDL1 Bis5 SLR N297A G4P
OX40PDL1 Bis5 SLR VL-VH G1
OX40PDL1 Bis5 SLR VL-VH G4P
Ox40PDL1 BiS5 G1
Ox40PDL1 BiS5-G4P
R347/NMGC(阴性/阴性)对照BiS5
B
Jurkat OX40/CHOK1 测定 OX40/PDL1 IgGs
发光(RLU)
log10 conc (M)
OX40MAb28-IgG4P
NIP228 IgG4P
Ox40 0562 mAb IgG1
PDL1 mAb IgG1
Ox40 0562 IgG1 + PDL1 mAb IgG1
NIP228 hIgG1

图44

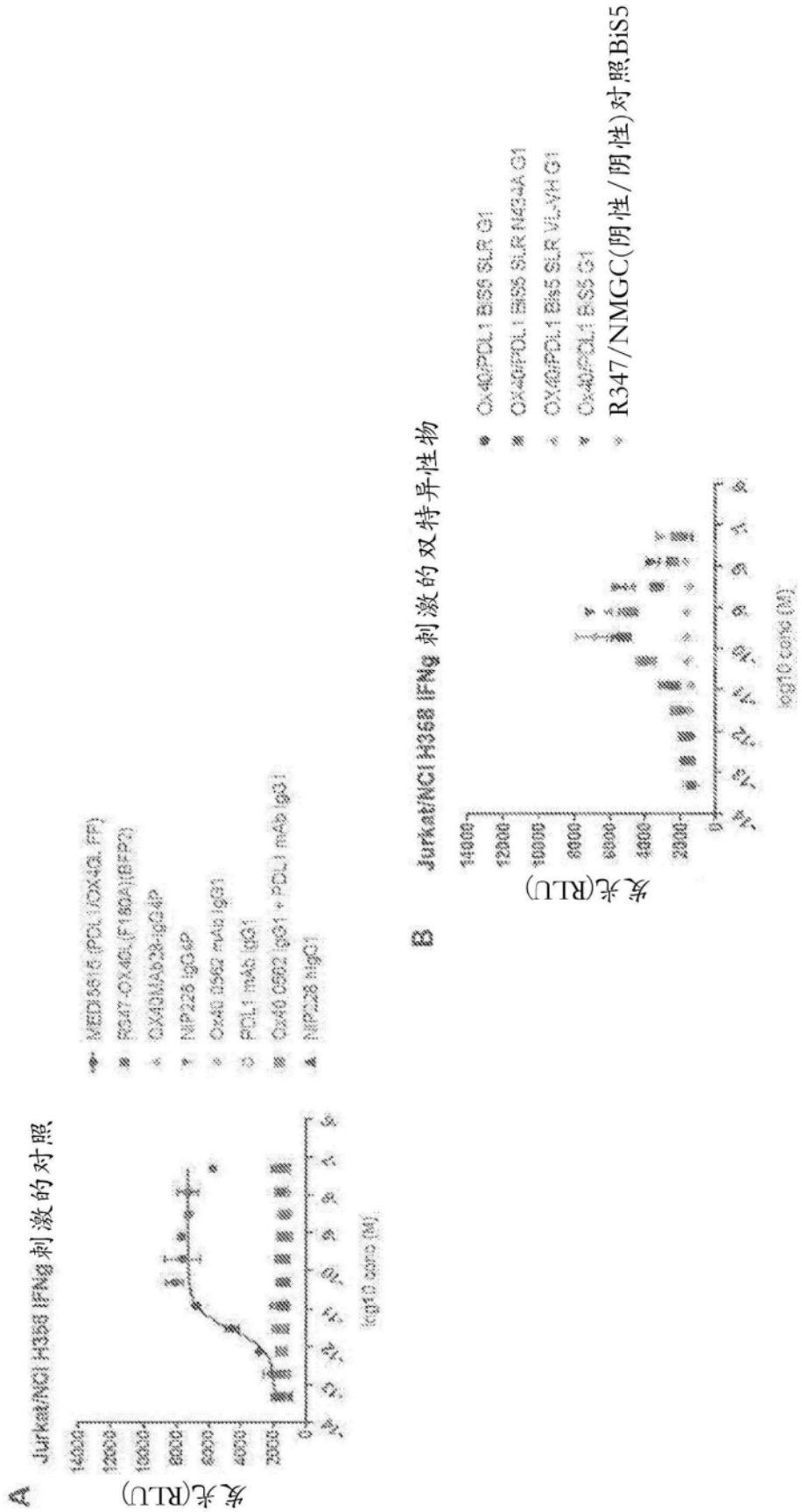

A
Jurkat/NCI H358 IFNg 刺激的对照
发光(RLU)
log10 conc (M)
MEDI5814 (PDL1/OX40L FP)
R347-OX40L (F180A)(H8FP2)
OX40MAb28-IgG4P
NIP228 IgG4P
Ox40 8562 mAb IgG1
PDL1 mAb IgG1
Ox40 8562 IgG1 + PDL1 mAb IgG1
NIP228 hIgG1
B
Jurkat/NCI H358 IFNg 刺激的双特异性物
发光(RLU)
log10 conc (M)
Ox40/PDL1 BiS5 SLR G1
OX40/PDL1 BiS5 SLR H434A G1
OX40/PDL1 BiS5 SLR VL-VH G1
Ox40/PDL1 BiS5 G1
R347/NMGC(阴性/阴性)对照BiS5

图45

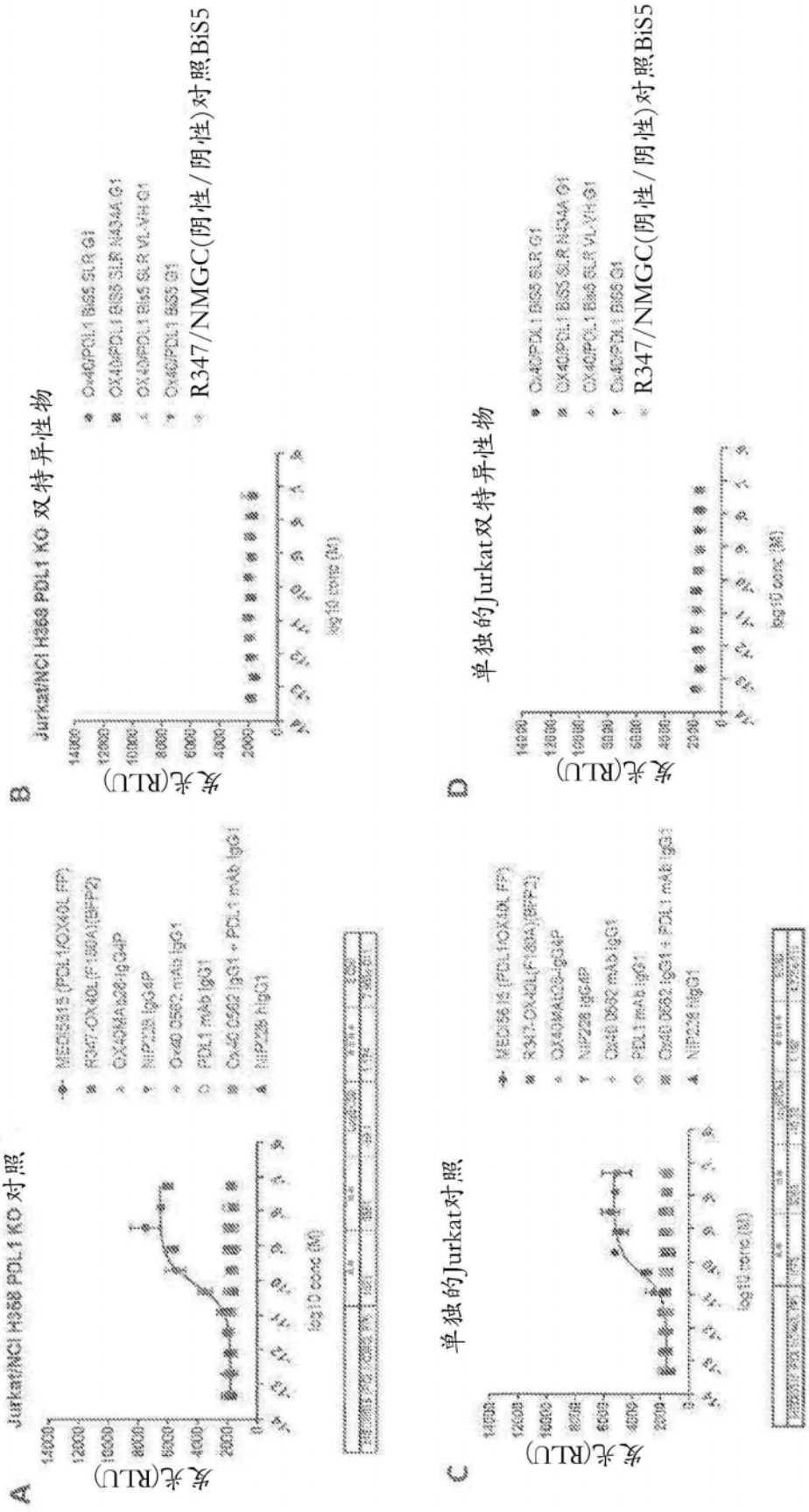

A
Jurkat/NCI H358 PDL1 KO 对照
发光(RLU)
log10 conc (M)
B
Jurkat/NCI H358 PDL1 KO 双特异性物
R347/NMGC(阴性/阴性)对照BiS5
发光(RLU)
log10 conc (M)
C
单独的Jurkat对照
发光(RLU)
log10 conc (M)
D
单独的Jurkat双特异性物
R347/NMGC(阴性/阴性)对照BiS5
发光(RLU)
log10 conc (M)

图46

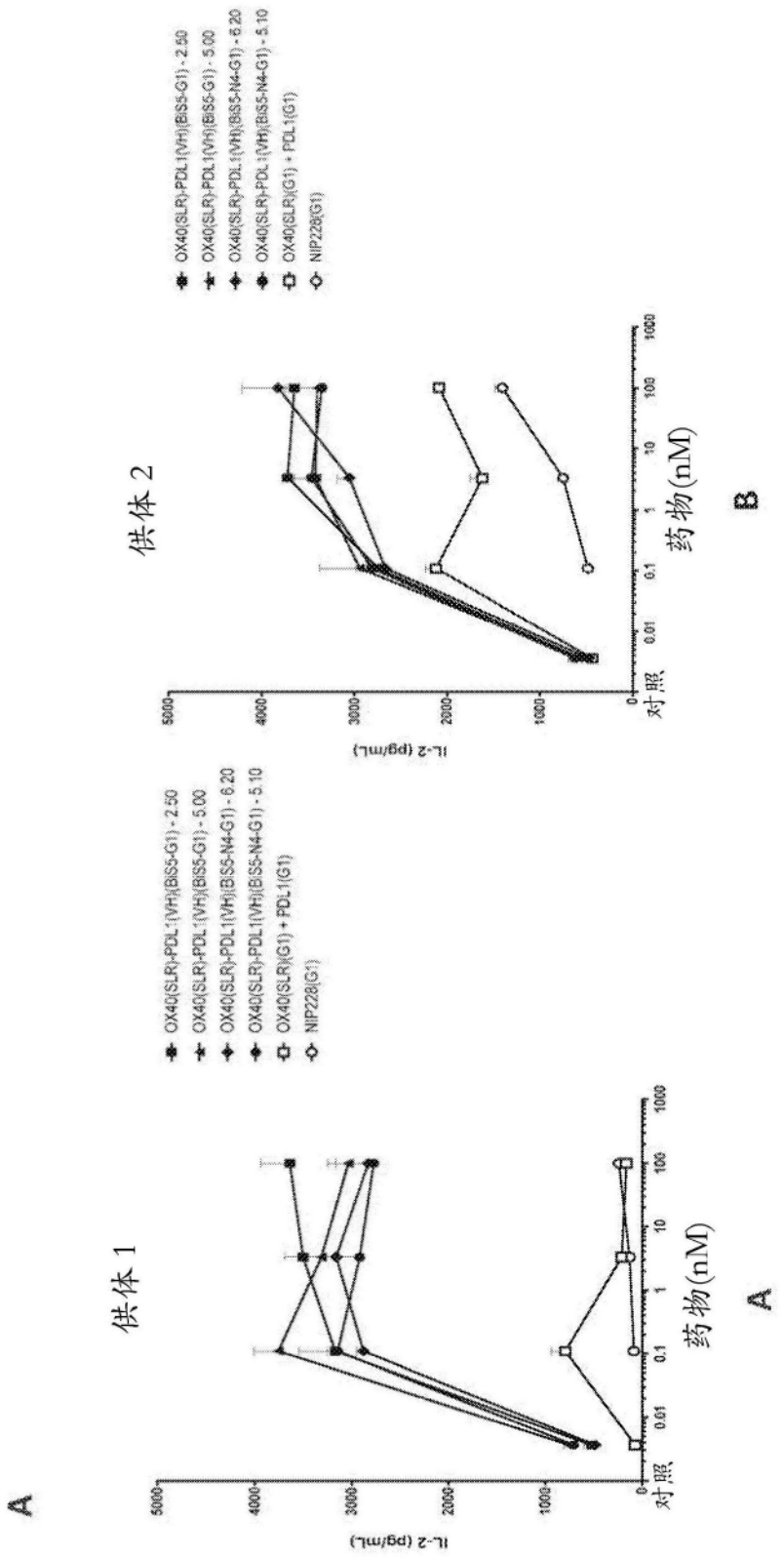

A
供体 1
IL-2 (pg/mL)
药物(nM)
对照
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BIS5-G1) - 2.50
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BIS5-G1) - 5.00
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BIS5-N4-G1) - 6.20
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BIS5-N4-G1) - 5.10
OX40(SLR)(G1) + PDL1(G1)
NIP228(G1)
B
供体 2
IL-2 (pg/mL)
药物(nM)
对照
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BIS5-G1) - 2.50
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BIS5-G1) - 5.00
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BIS5-N4-G1) - 6.20
OX40(SLR)-PDL1(VH)(BIS5-N4-G1) - 5.10
OX40(SLR)(G1) + PDL1(G1)
NIP228(G1)

图47

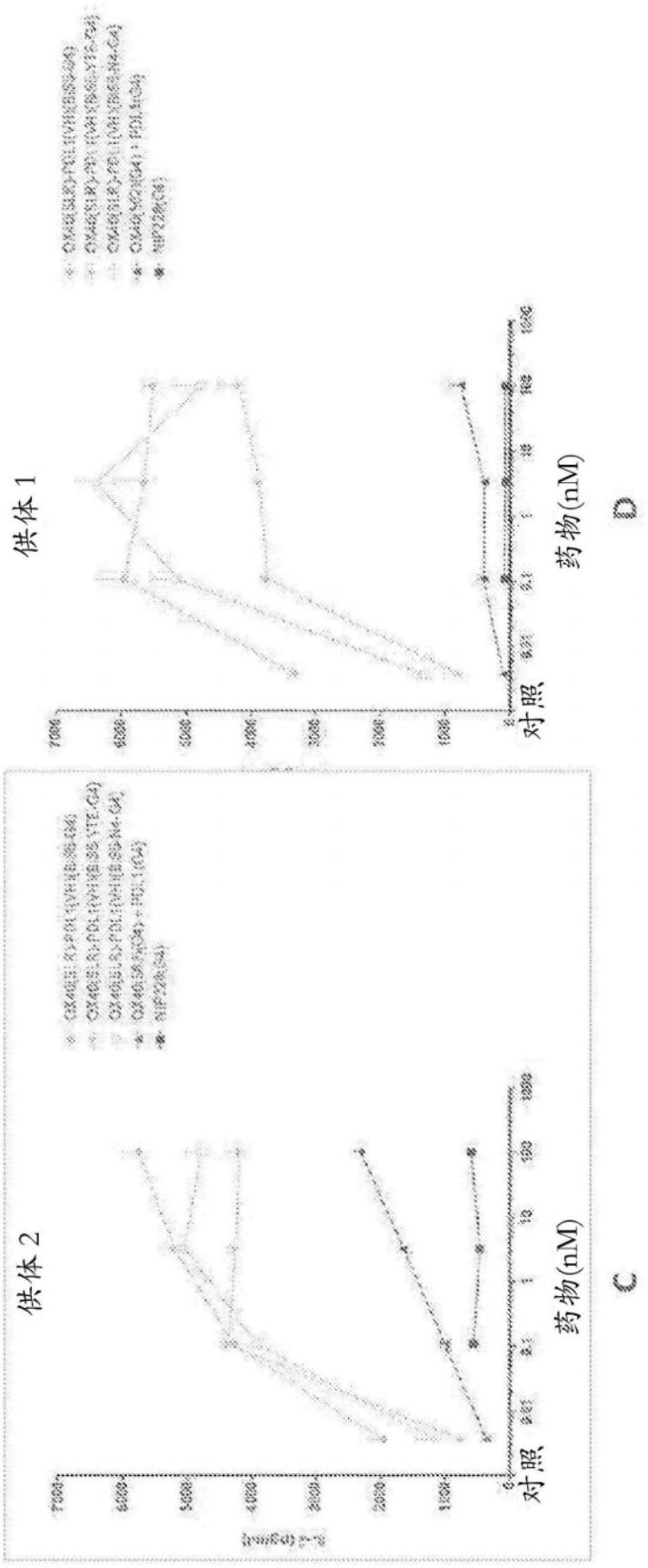
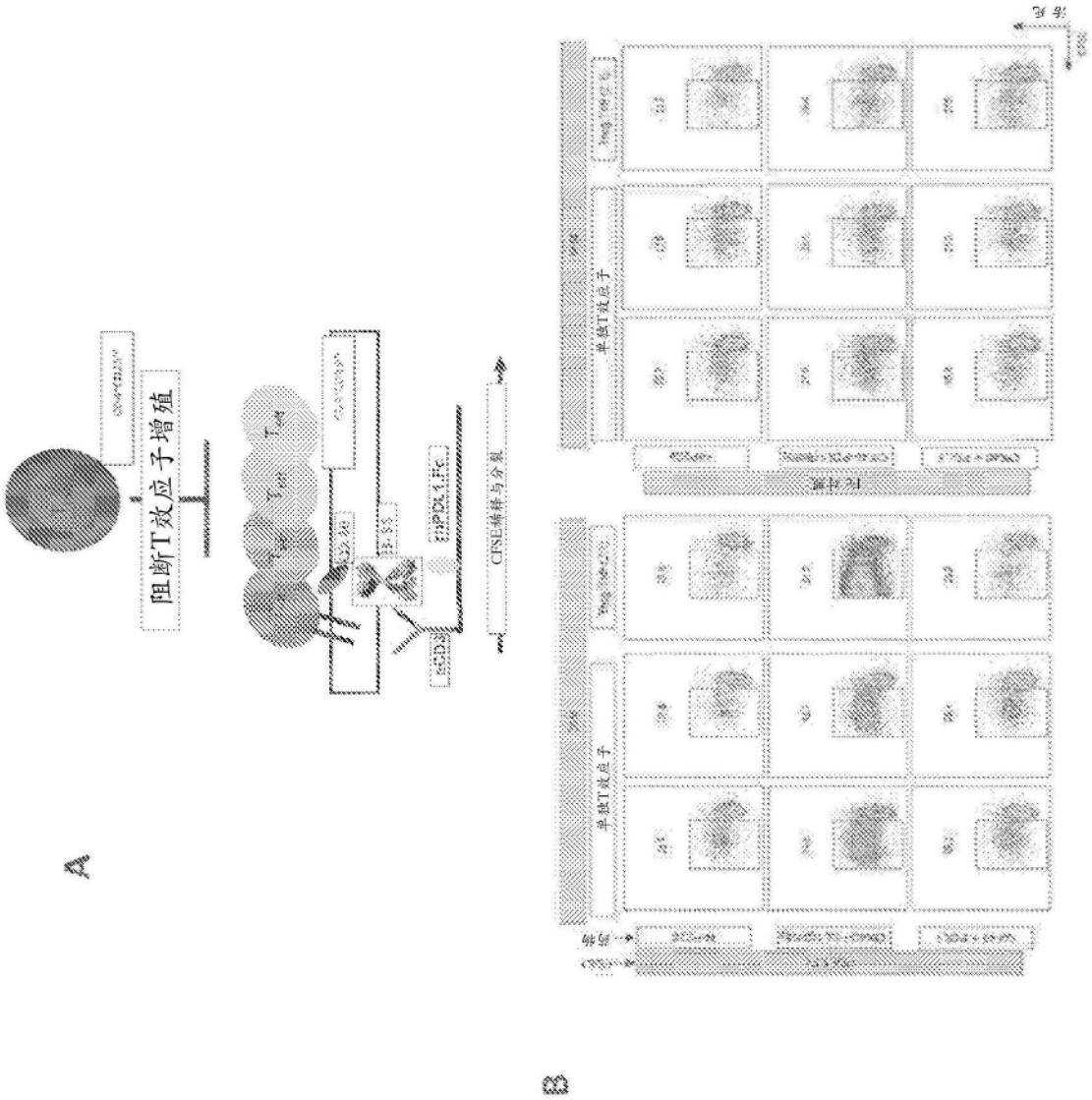


图47续


阻断T效应子增殖
CD8
PD-1
PD-L1
CD28
B7-1/2
CTLA-4
TCR
MHC
CD3
CD4
CD8
CD28
B7-1/2
CTLA-4
PD-1
PD-L1

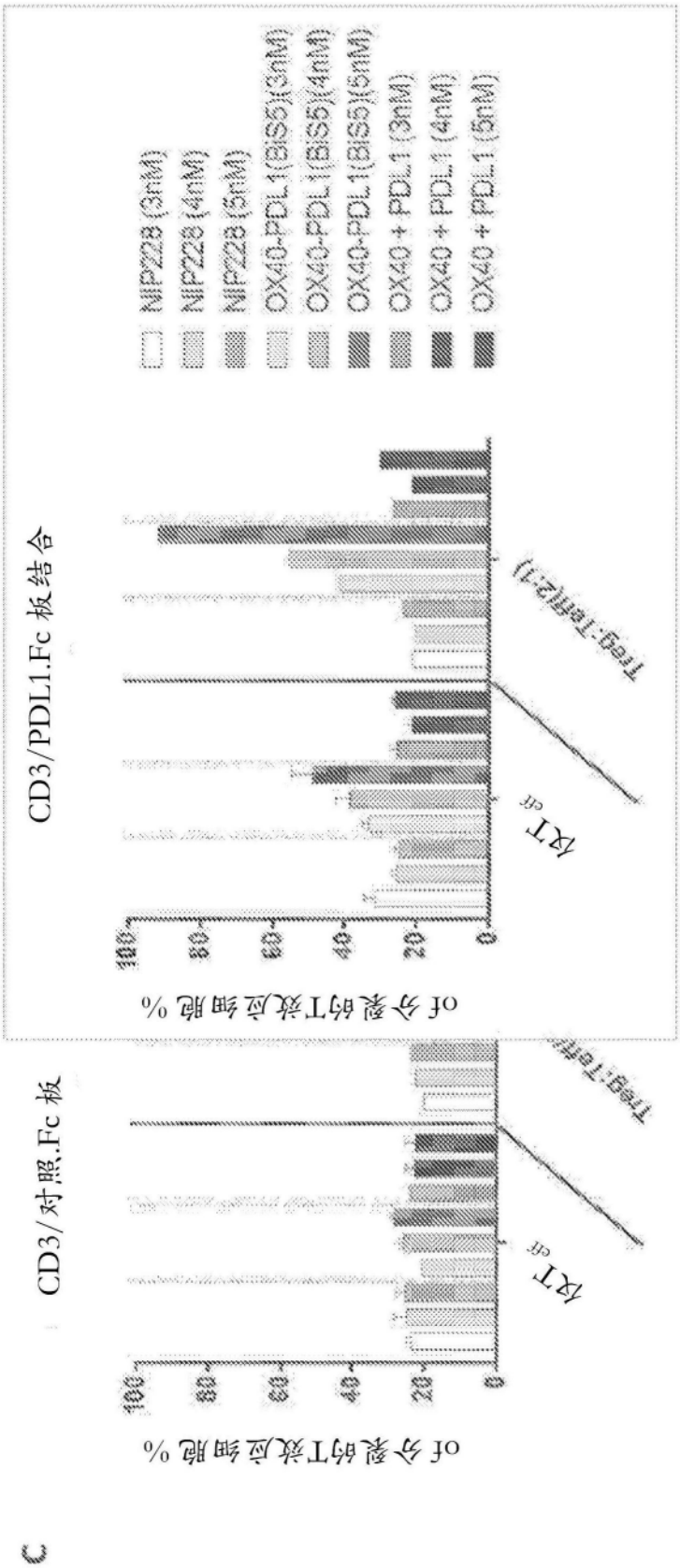

C
CD3/对照.Fc 板
CD3/PDL1.Fc 板结合
of 分裂的T效应细胞 %
100
80
60
40
20
0
NIP228 (3nM)
NIP228 (4nM)
NIP228 (5nM)
OX40-PDL1(BS5)(3nM)
OX40-PDL1(BS5)(4nM)
OX40-PDL1(BS5)(5nM)
OX40 + PDL1 (3nM)
OX40 + PDL1 (4nM)
OX40 + PDL1 (5nM)
CAR T cell
Treg:Teff(2:1)

图48续

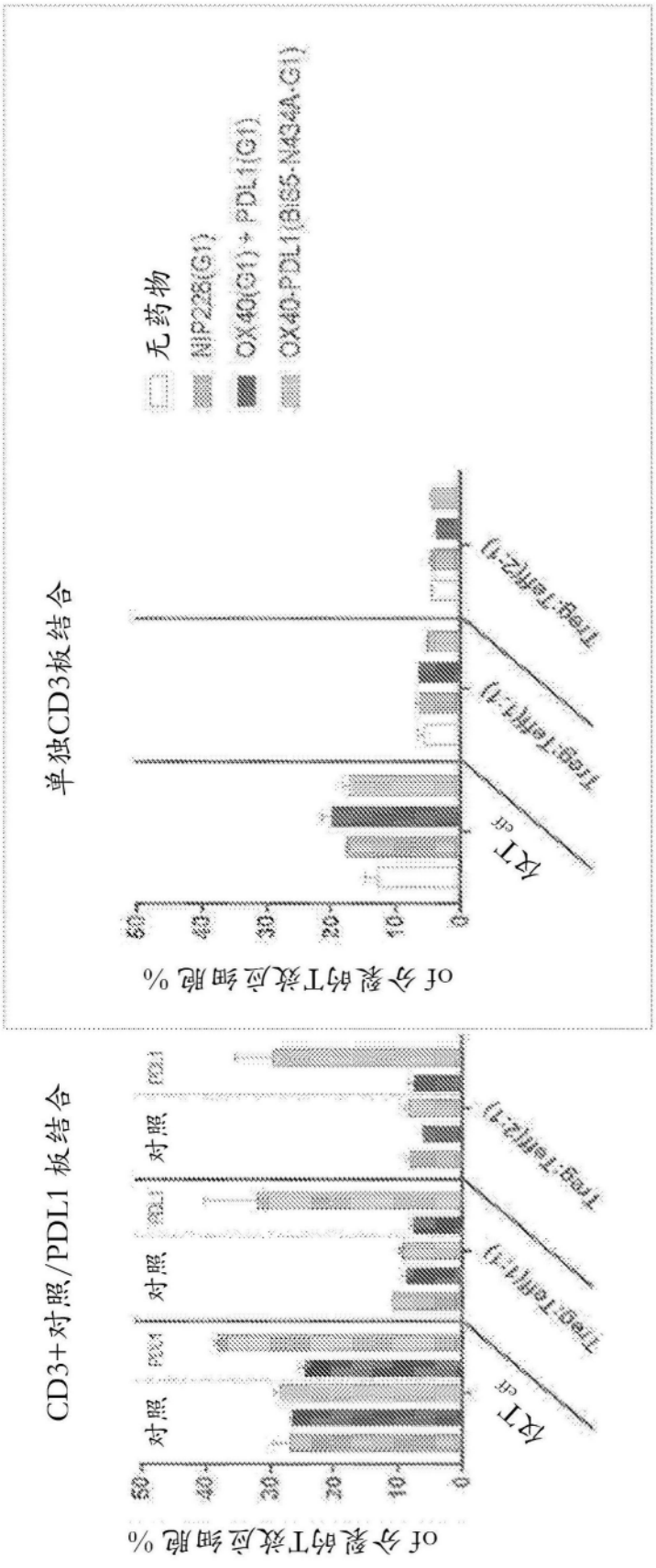

无药物
NIP228(G1)
OX40(G1)+ PDL1(G1)
OX40-PDL1(BiS5-N434A,G1)
单独CD3板结合
of 分裂的T效应细胞 %
50
40
30
20
10
0
对照
PDL1
对照
PDL1
对照
PDL1
CD3+对照/PDL1 板结合
of 分裂的T效应细胞 %
50
40
30
20
10
0
对照
PDL1
对照
PDL1
对照
PDL1

图49

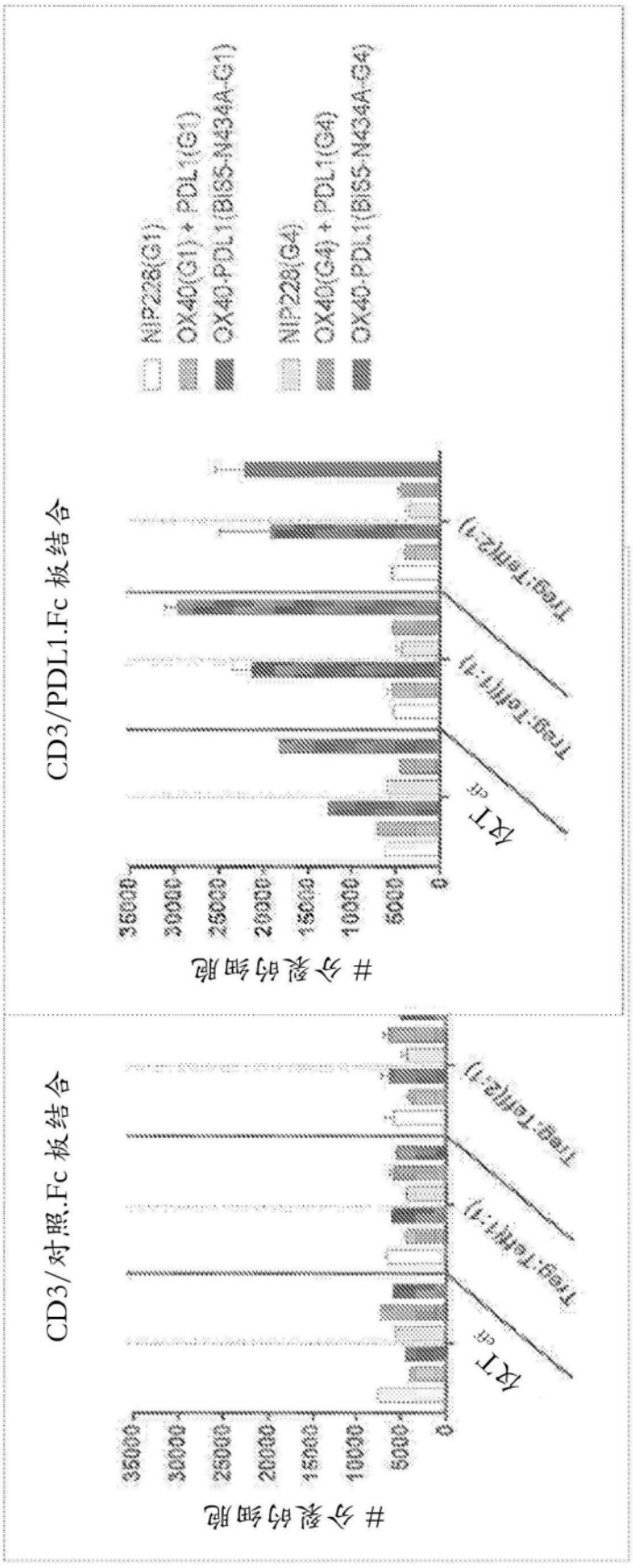

CD3/PDL1.Fc 板结合
CD3/对照.Fc 板结合
分裂的细胞
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
NIP228(G1)
OX40(G1) + PDL1(G1)
OX40-PDL1(BiSS-N434A-G1)
NIP228(G4)
OX40(G4) + PDL1(G4)
OX40-PDL1(BiSS-N434A-G4)
XT cit
Treg:Teff(1:1)
Treg:Teff(2:1)

图50

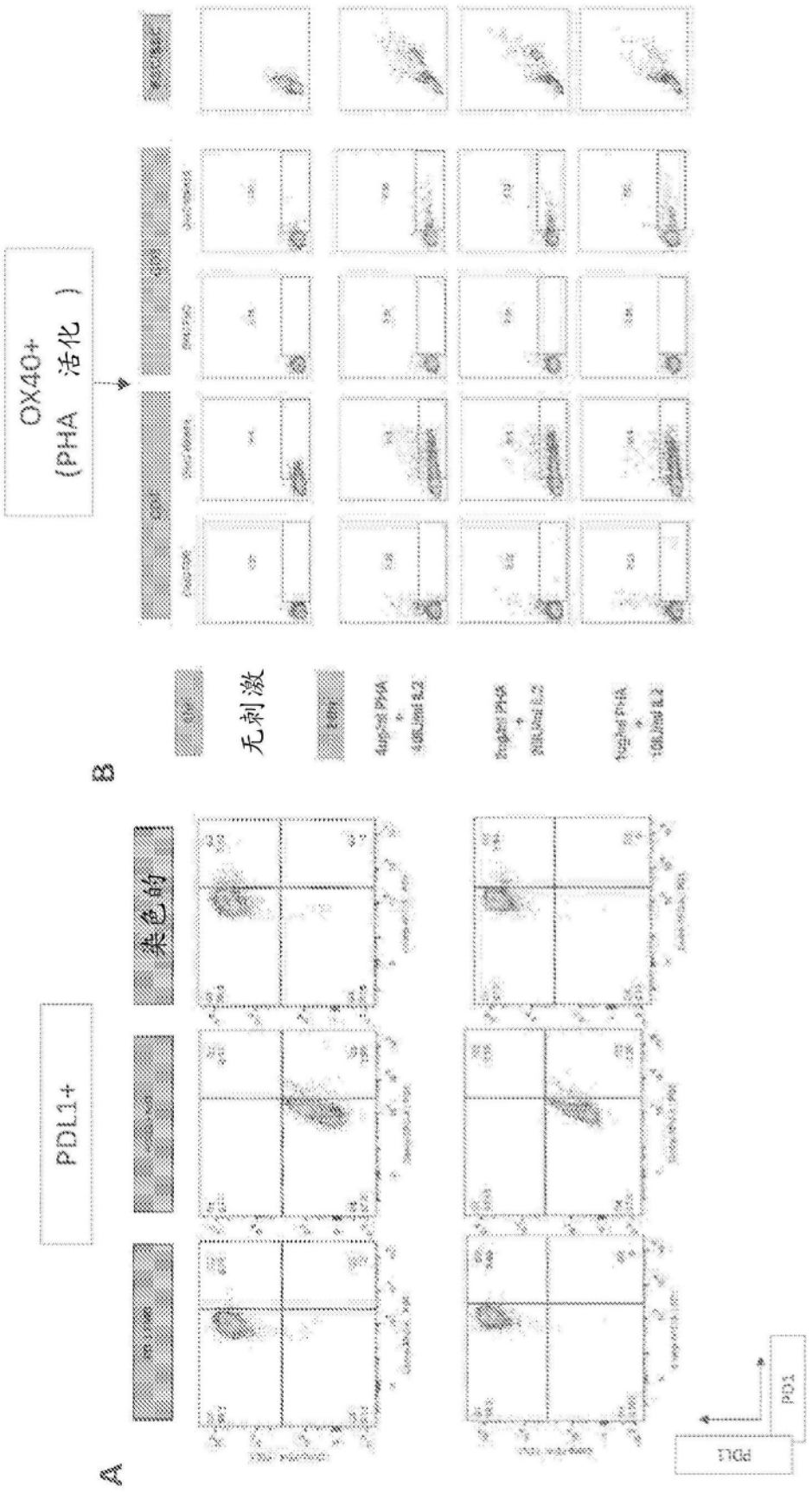


图51

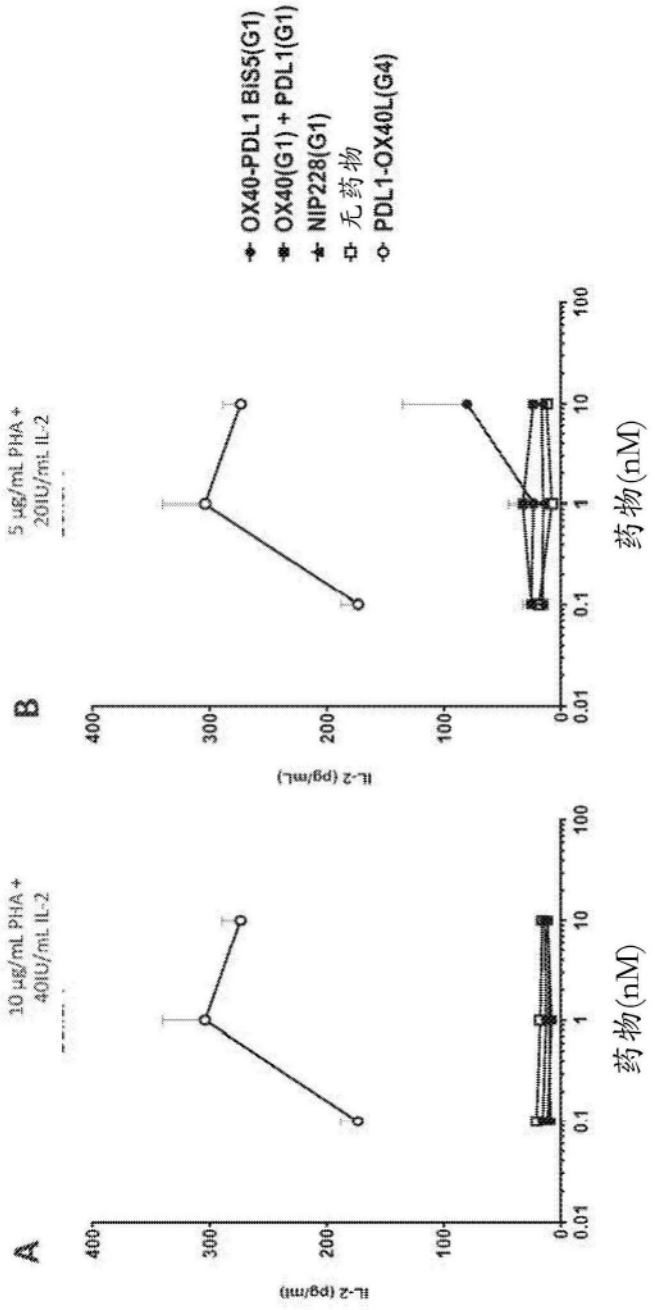

OX40-PDL1 BiS5(G1)
OX40(G1) + PDL1(G1)
NIP228(G1)
无药物
PDL1-OX40L(G4)
A
B
10 μg/mL PHA +
40IU/mL IL-2
5 μg/mL PHA +
20IU/mL IL-2
IL-2 (pg/mL)
药物(nM)
0
100
200
300
400
0.01
0.1
1
10
100

图52

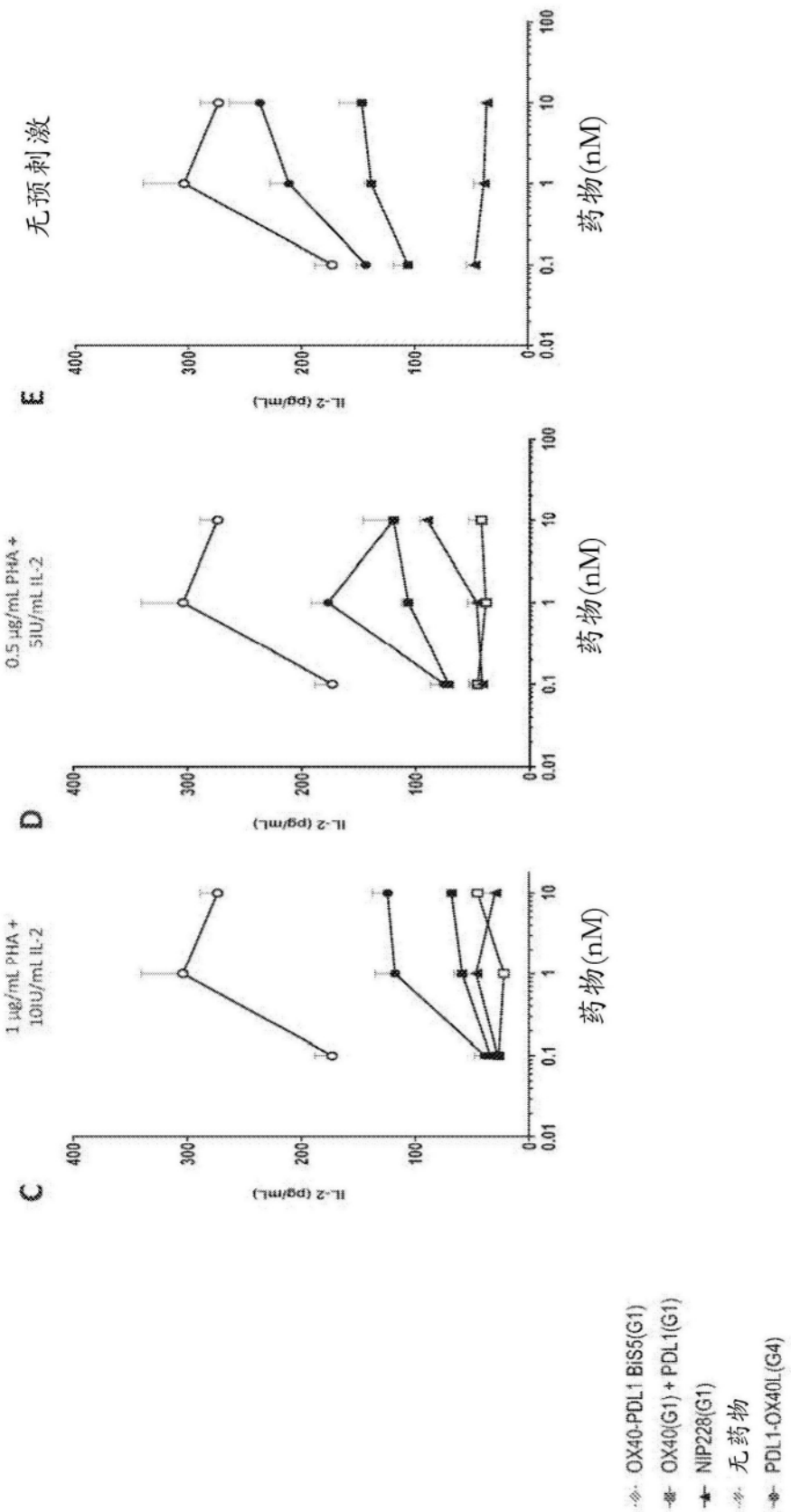

C
1 μg/mL PHA + 10IU/mL IL-2
D
0.5 μg/mL PHA + 5IU/mL IL-2
E
无预刺激
IL-2 (pg/mL)
药物(nM)
OX40-PDL1 BiS5(G1)
OX40(G1) + PDL1(G1)
NIP228(G1)
无药物
PDL1-OX40L(G4)

图52续

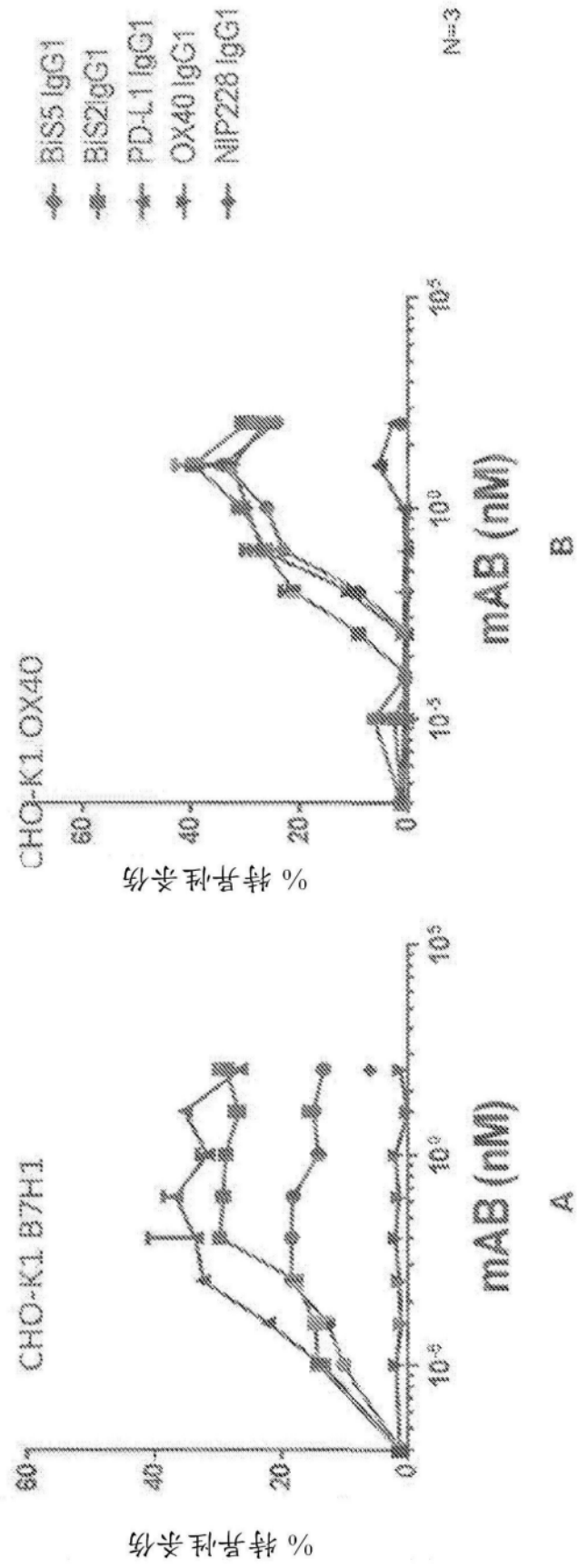

BiS5 IgG1
BiS2IgG1
PD-L1 IgG1
OX40 IgG1
NIP228 IgG1
N=3
CHO-K1 OX40
% 特异性杀伤
mAB (nM)
B
CHO-K1 B7H1
% 特异性杀伤
mAB (nM)
A

图53

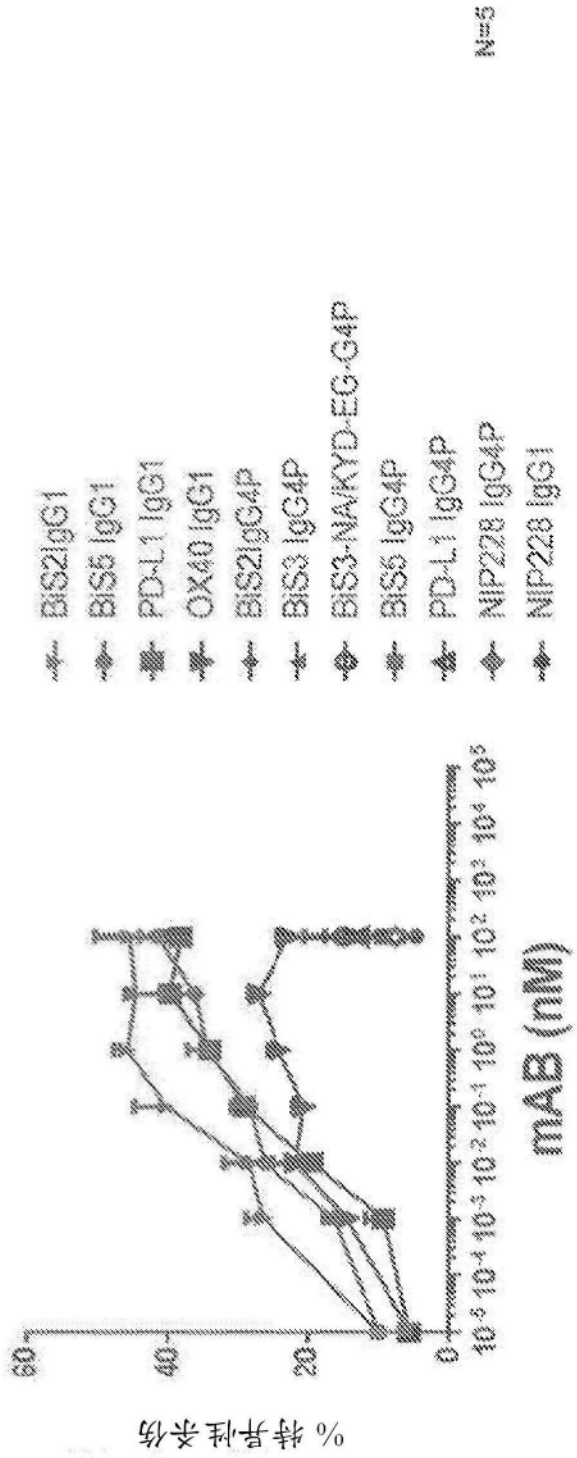

N=3
BiS2IgG1
BiS5 IgG1
PD-L1 IgG1
OX40 IgG1
BiS2IgG4P
BiS3 IgG4P
BiS3-NA/KYD-EG-G4P
BiS5 IgG4P
PD-L1 IgG4P
NIP228 IgG4P
NIP228 IgG1
mAB (nM)
% 特异性杀伤

图54

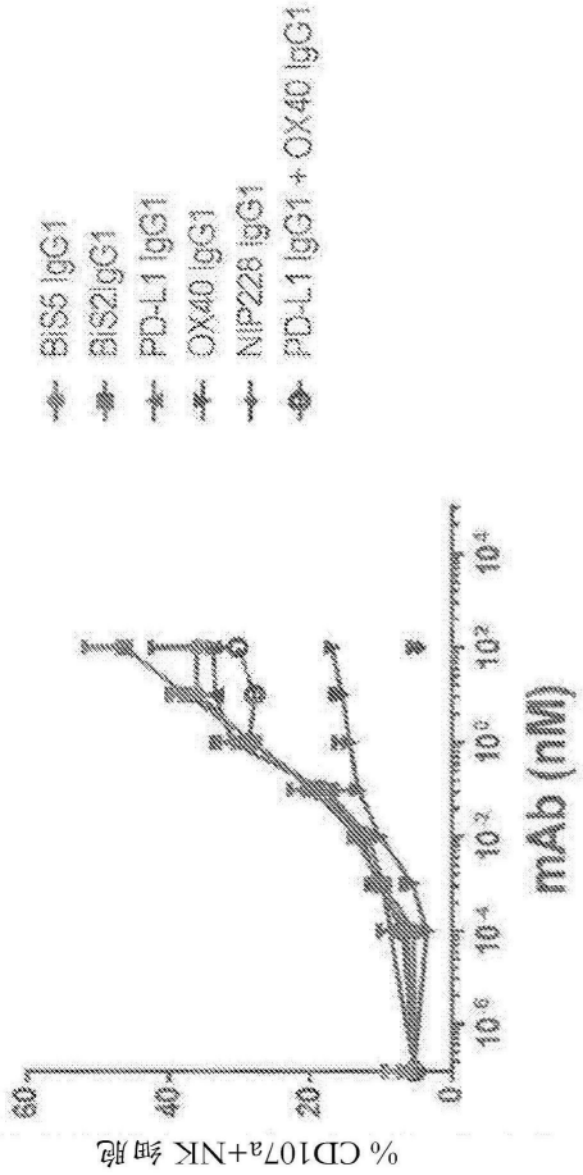

BiS5 IgG1
BiS2IgG1
PD-L1 IgG1
OX40 IgG1
NIP228 IgG1
PD-L1 IgG1 + OX40 IgG1
% CD107a+NK 细胞
0
20
40
60
10-6
10-4
10-2
100
102
104
mAb (nM)

图55

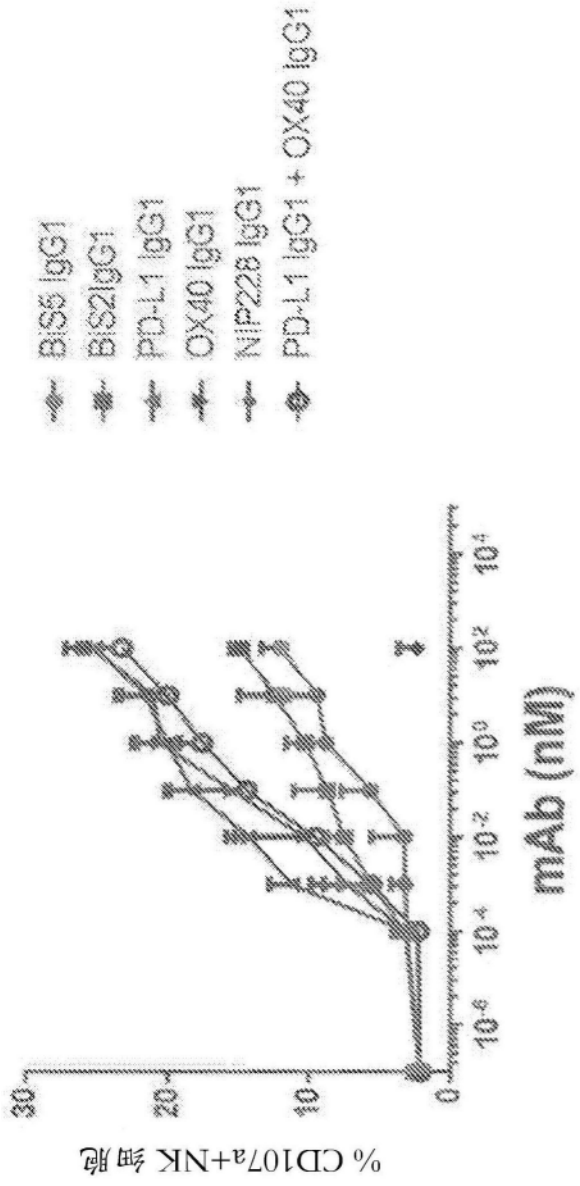

BiS5 IgG1
BiS2IgG1
PD-L1 IgG1
OX40 IgG1
NIP228 IgG1
PD-L1 IgG1 + OX40 IgG1
mAb (nM)
% CD107a+NK 细胞

图56

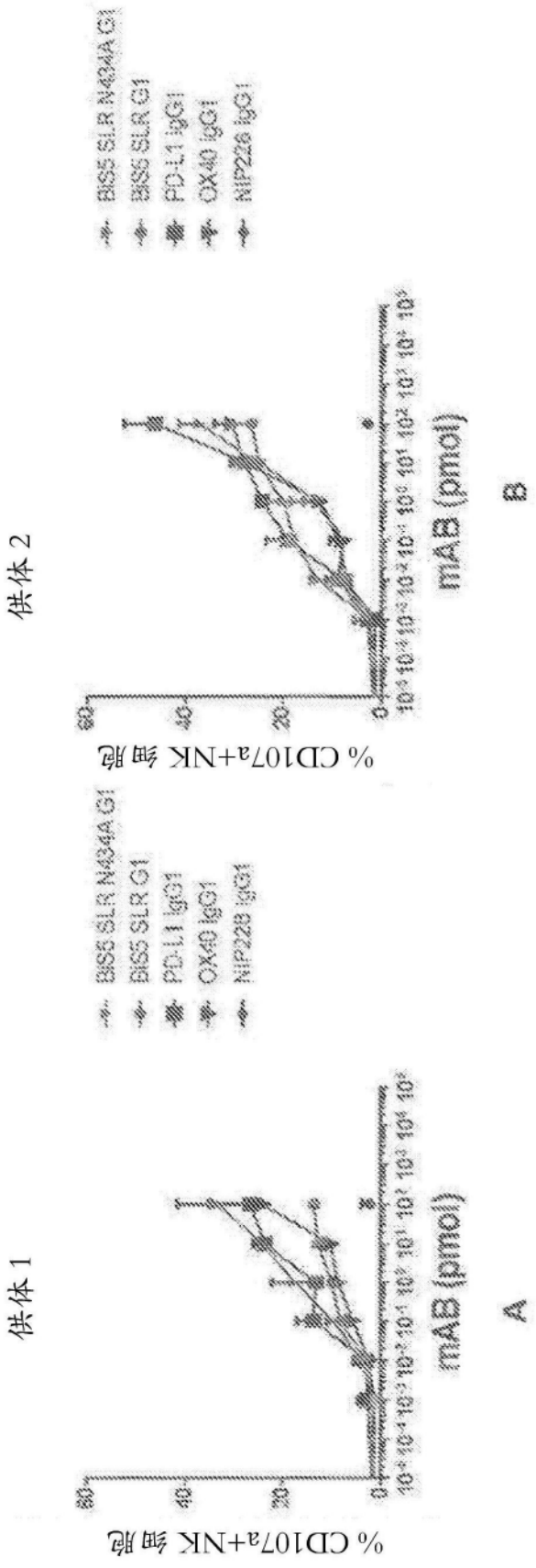

供体 1
供体 2
A
B
mAB (pmol)
% CD107a+NK 细胞
BiS5 SLR N434A G1
BiS5 SLR G1
PD-L1 IgG1
OX40 IgG1
NIP228 IgG1

图57

研究设计

目的：比较OX40/PD-L1 BisAb的PK / PD

- *BiS5-OX40/PD-L1-G1 N434A*（具有半衰期扩展突变）
- *BiS5-OX40/PD-L1-G1 WT (IgG1)*

以5mg / kg（1 ml / kg）单次静脉内注射（缓慢推注）

评价(n=3)

- 活力，临床观察，体检，注射位点，体重，食物消耗
- PK：给药前，2、6、12、24、48、72和168小时给药后，第14、21、28天
- ADA
- 血清 PD：可溶的 PD-L1（复制PK样品）
- 细胞 PD：基于流动的Ki67染色评价

执行：

- 从注射到PK总结50天

图58

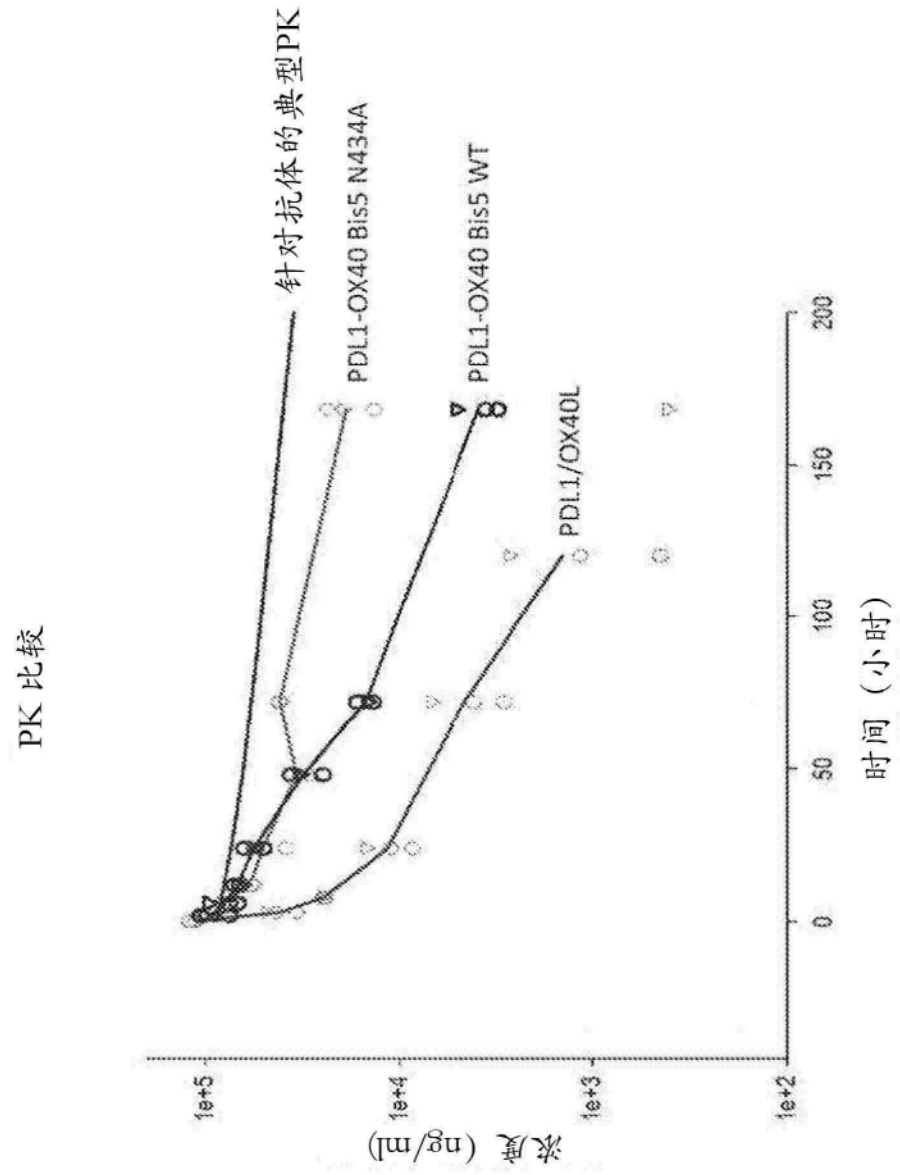

PK 比较
针对抗体的典型PK
PDL1-OX40 Bis5 N434A
PDL1-OX40 Bis5 WT
PDL1/OX40L
浓度 (ng/ml)
1e+5
1e+4
1e+3
1e+2
0
50
100
150
200
时间（小时）

图59

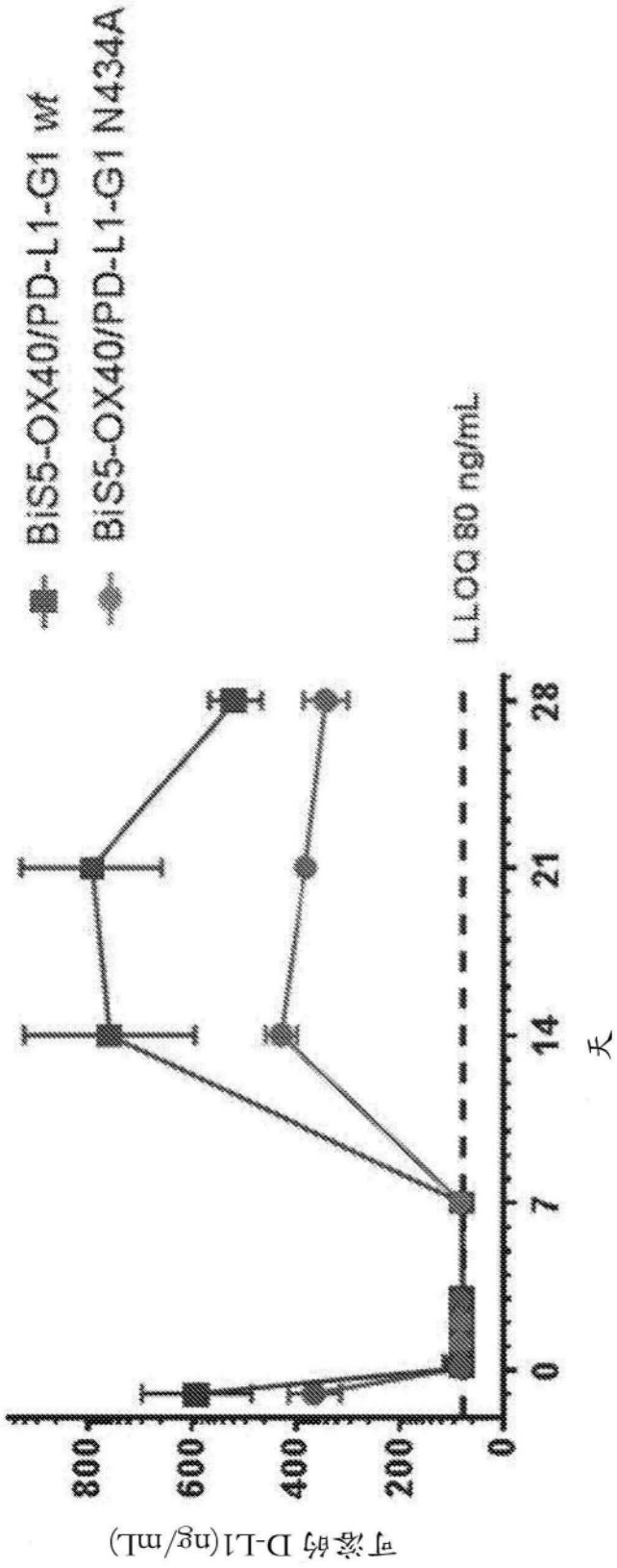

BiS5-OX40/PD-L1-G1 wt
BiS5-OX40/PD-L1-G1 N434A
LLOQ 80 ng/mL
可溶的 D-L1(ng/mL)
800
600
400
200
0
0
7
14
21
28
天

图60

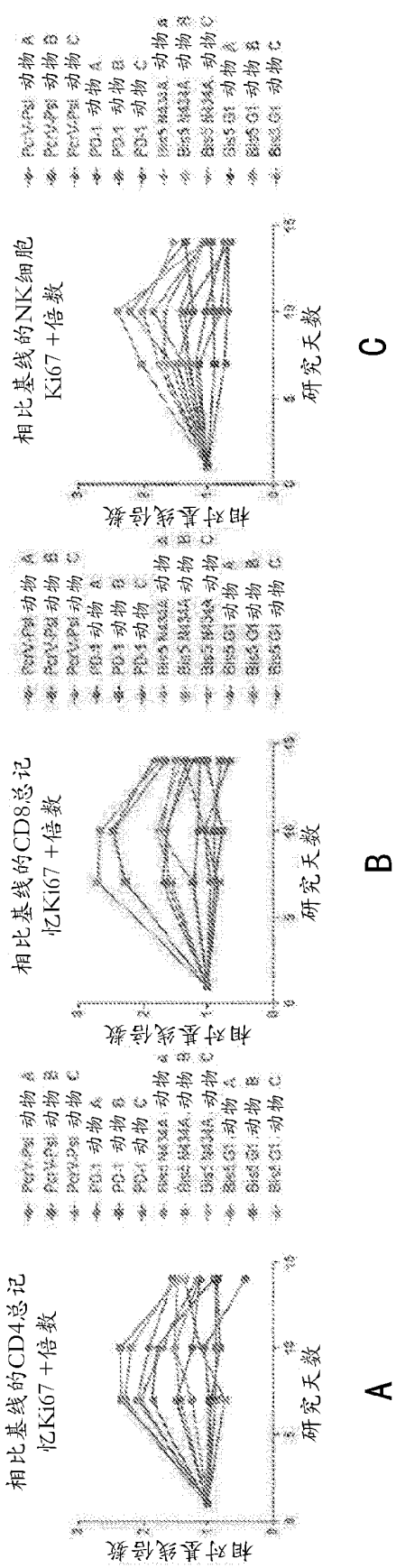

相比基线的CD4总记
忆Ki67 +倍数
相对基线倍数
研究天数
A
相比基线的CD8总记
忆Ki67 +倍数
相对基线倍数
研究天数
B
相比基线的NK细胞
Ki67 +倍数
相对基线倍数
研究天数
C

图 61

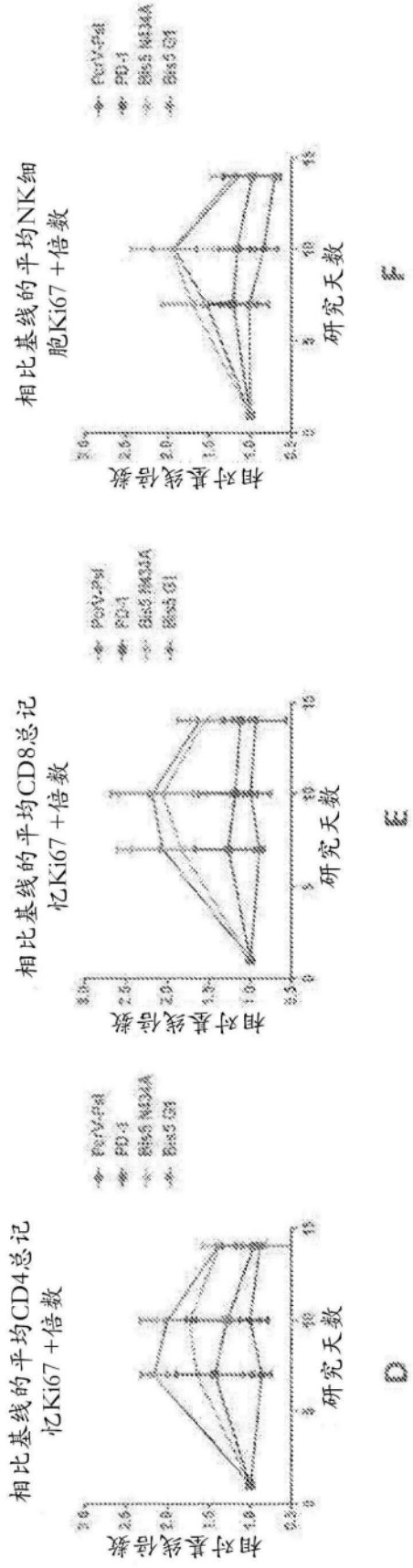

相比基线的平均CD4总记忆Ki67+倍数
相对基线倍数
研究天数
D
相比基线的平均CD8总记忆Ki67+倍数
相对基线倍数
研究天数
E
相比基线的平均NK细胞Ki67+倍数
相对基线倍数
研究天数
F

图61续

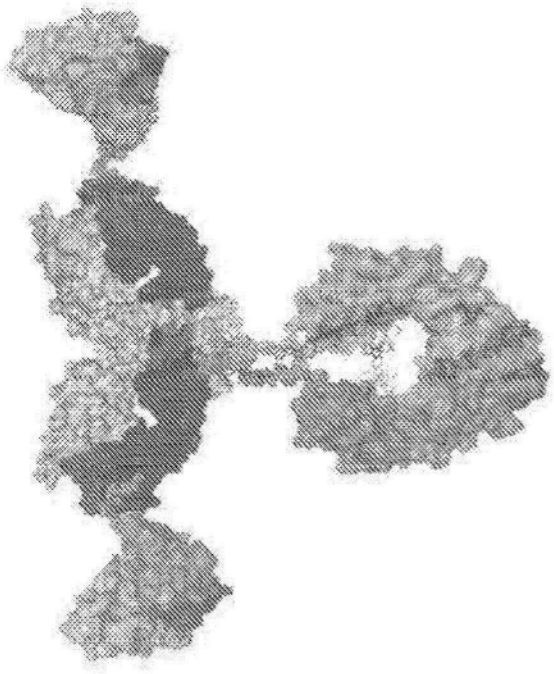


图62

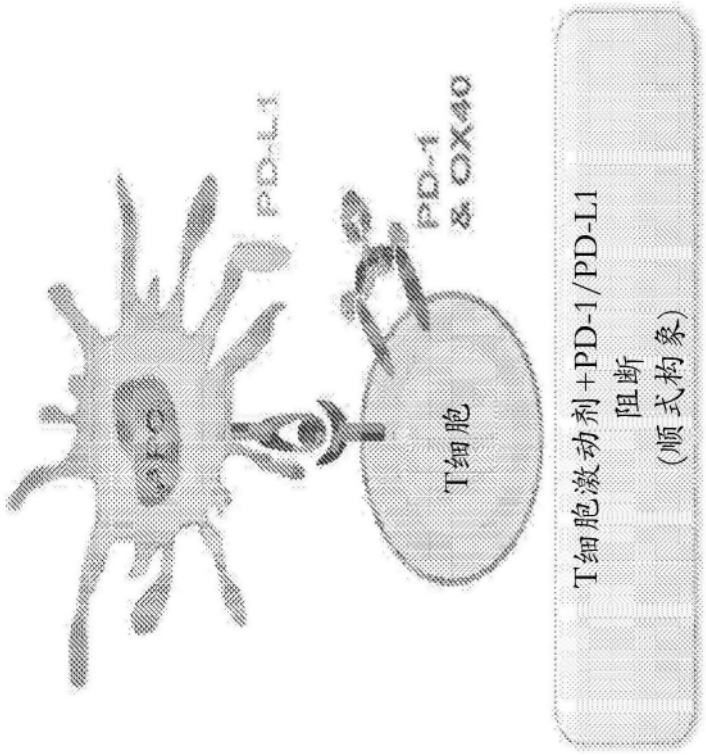


图63

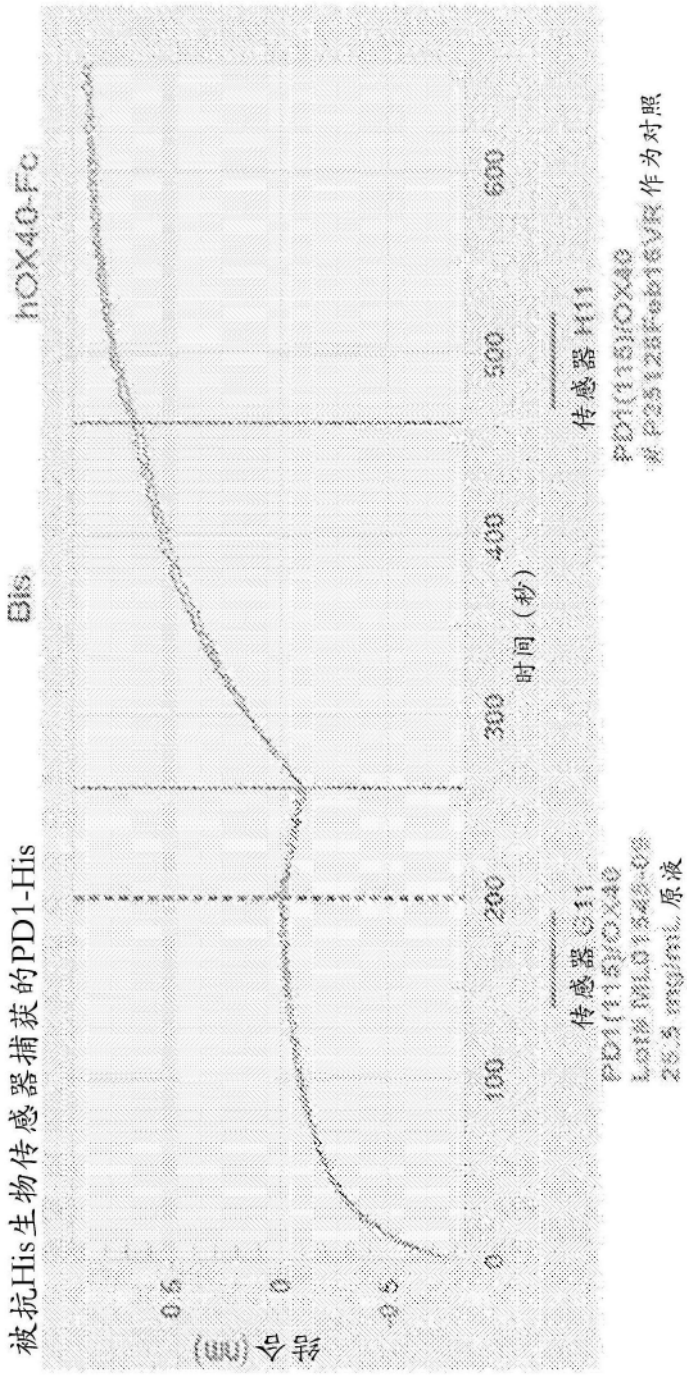

被抗His生物传感器捕获的PD1-His
Bis
hOX40-Fc
响应 (nm)
0.5
0
-0.5
0
100
200
300
400
500
600
时间 (秒)
传感器 G11
PD1(118)hOX40
Lot# 0112340-03
25.3 mg/mL 原液
传感器 H11
PD1(118)hOX40
P2512BF-0107-6VXC 作为对照

图64

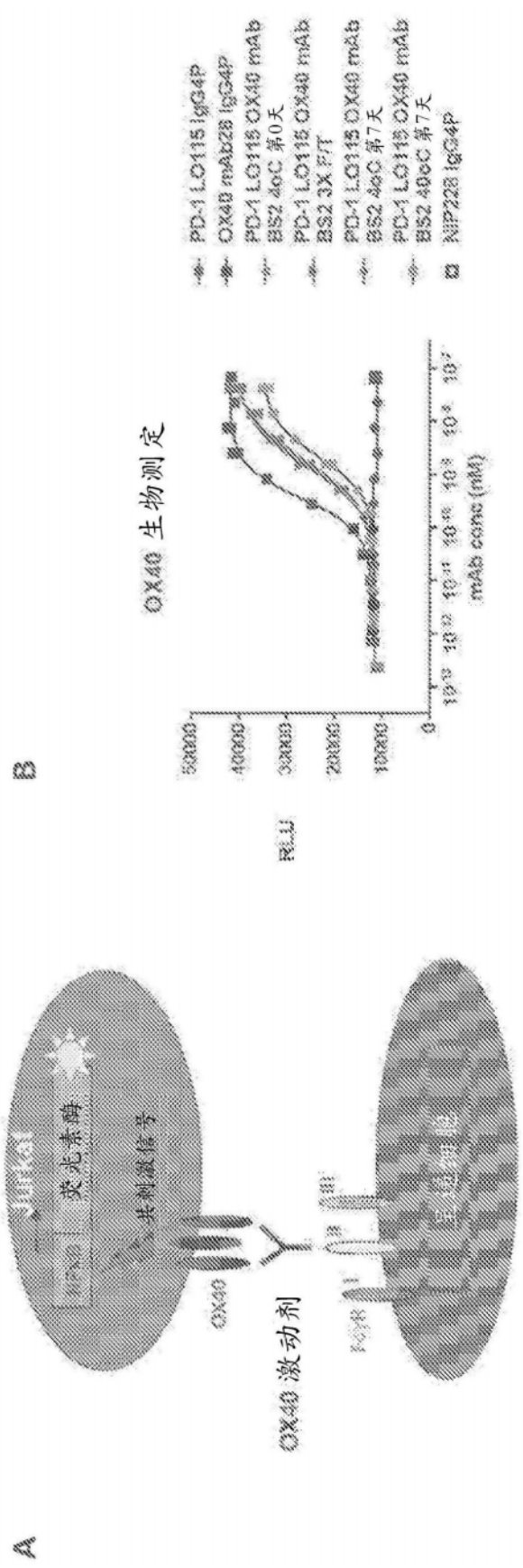

A
Jurkat
荧光素酶
共刺激信号
OX40
OX40 激动剂
B
OX40 生物测定
PD-1 LO115 IgG4P
OX40 mAb28 IgG4P
PD-1 LO115 OX40 mAb
BS2 40C 第0天
PD-1 LO115 OX40 mAb
BS2 3X F/T
PD-1 LO115 OX40 mAb
BS2 40C 第7天
PD-1 LO115 OX40 mAb
BS2 40oC 第7天
NIP228 IgG4P
RLU
mAb conc (nM)

图65

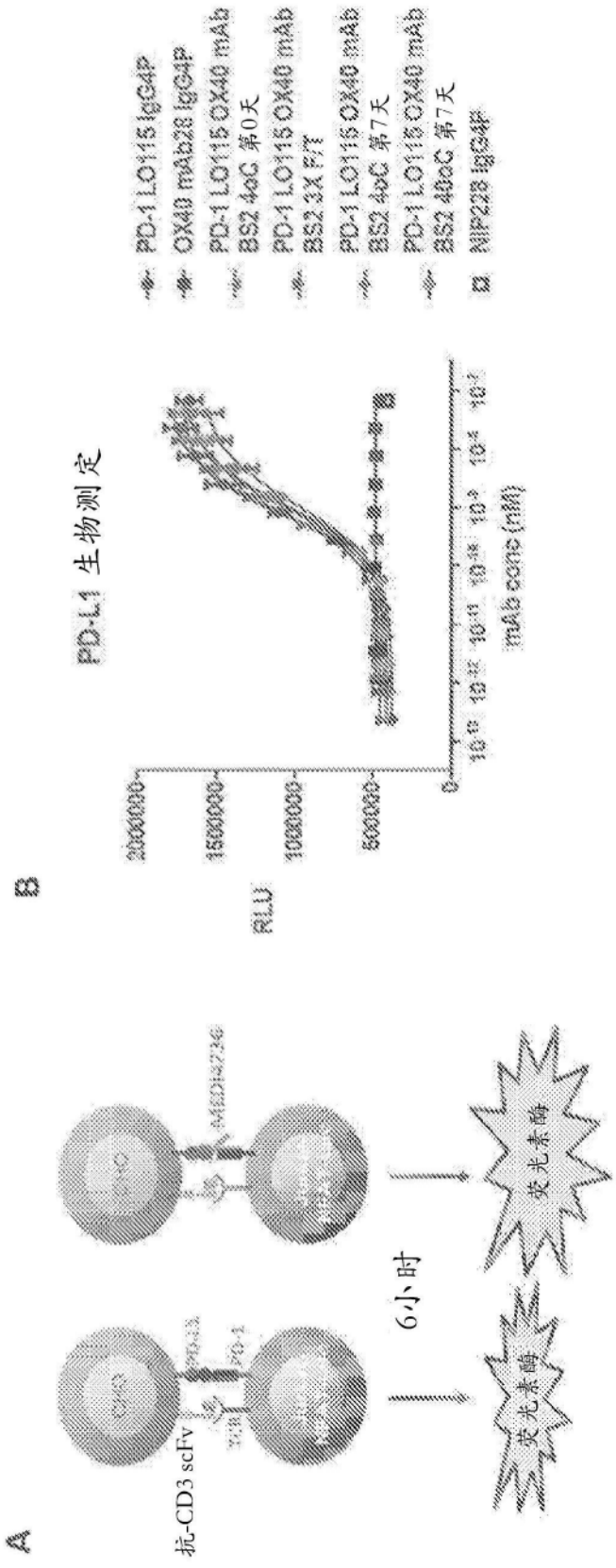

A
抗-CD3 scFv
CD3ε
CD3γ
CD3δ
TCR
PD-L1
PD-1
MEDI4736
6小时
荧光素酶
荧光素酶
B
PD-L1 生物测定
RLU
2000000
1500000
1000000
500000
0
mAb conc (nM)
PD-1 LO115 IgG4P
OX40 mAb28 IgG4P
PD-1 LO115 OX40 mAb
BS2 4aC 第0天
PD-1 LO115 OX40 mAb
BS2 3X F/T
PD-1 LO115 OX40 mAb
BS2 4aC 第7天
PD-1 LO115 OX40 mAb
BS2 4BaC 第7天
NIP228 IgG4P

图66

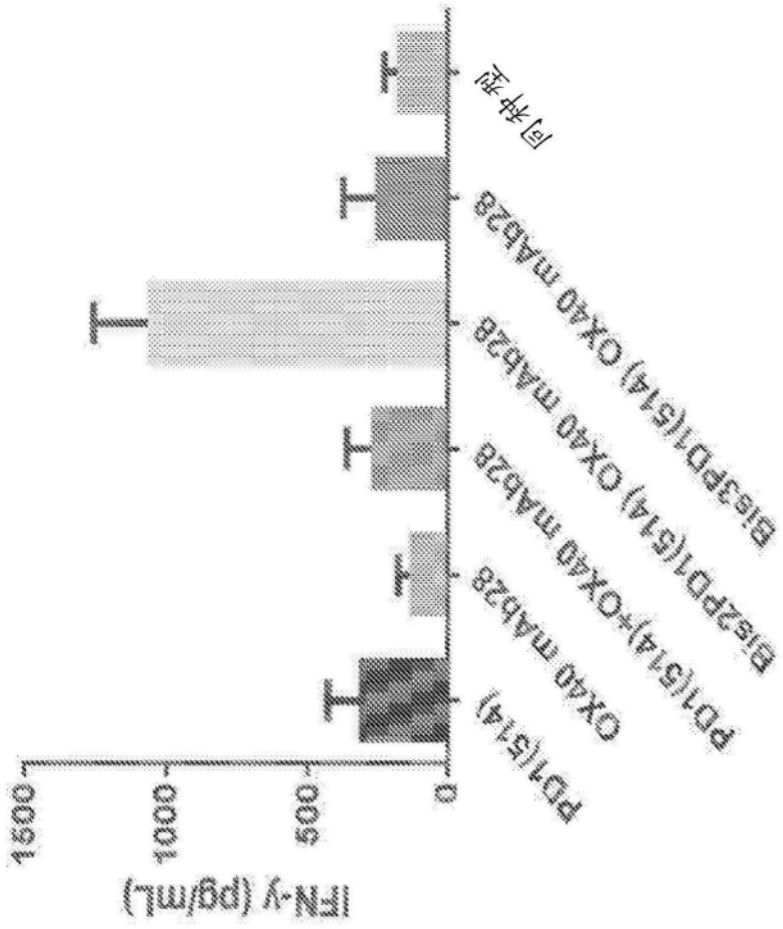

IFN-γ (pg/mL)
1500
1000
500
0
PD1(514)
OX40 mAb28
PD1(514)+OX40 mAb28
Bis2PD1(514) OX40 mAb28
Bis3PD1(514) OX40 mAb28
同种型

图67

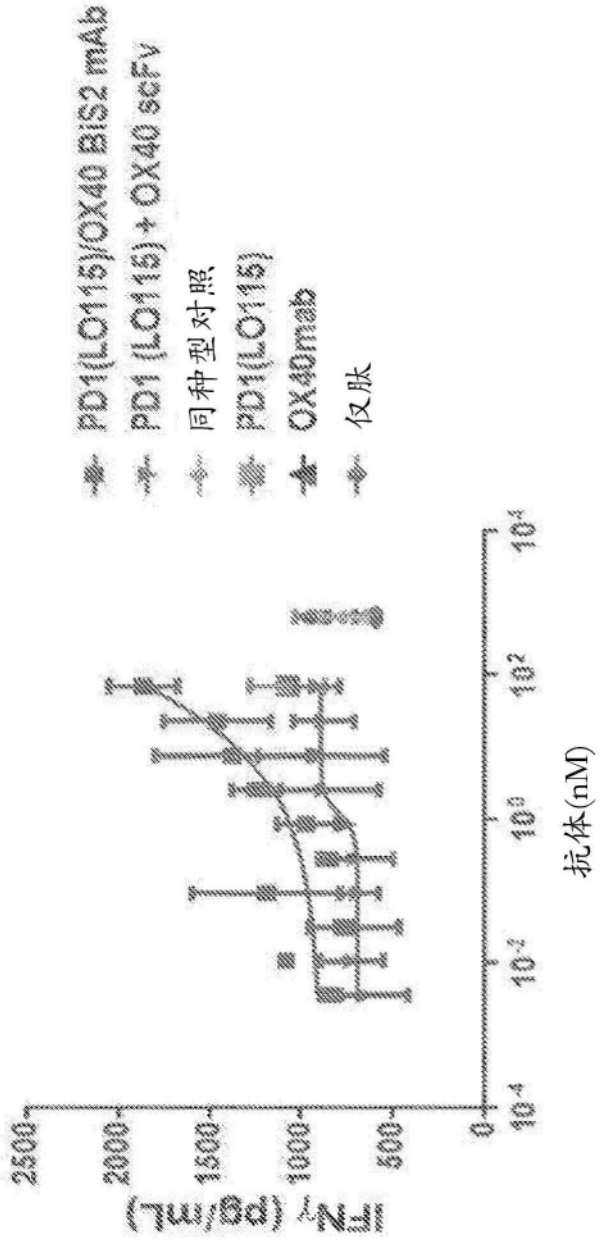

PD1(LO115)/OX40 BIS2 mAb
PD1 (LO115) + OX40 scFv
同种型对照
PD1(LO115)
OX40mab
仅肽
IFNγ (pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
10-4
10-2
100
102
104
抗体(nM)

图68

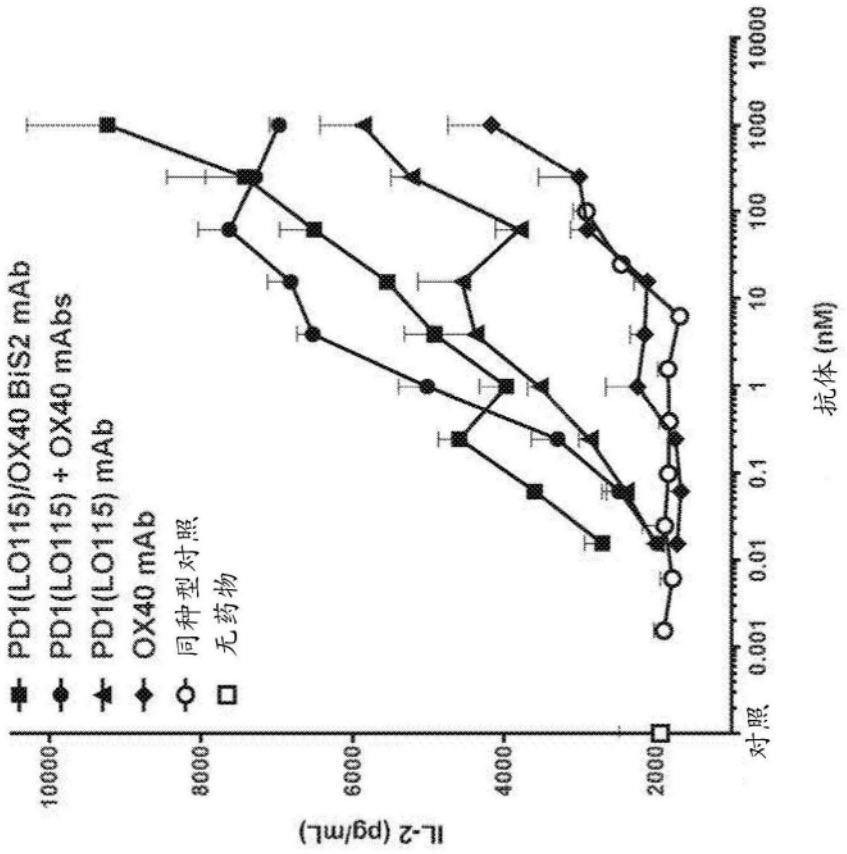

PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb
PD1(LO115) + OX40 mAbs
PD1(LO115) mAb
OX40 mAb
同种型对照
无药物
IL-2 (pg/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
对照
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体 (nM)

图69

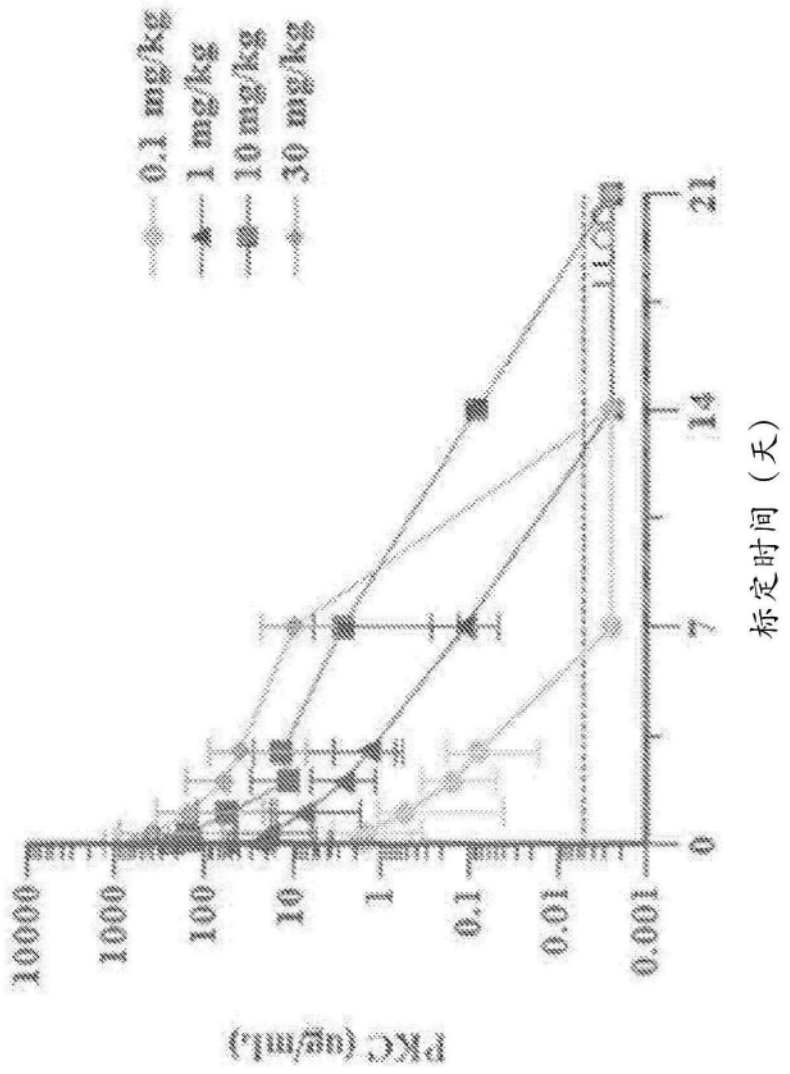
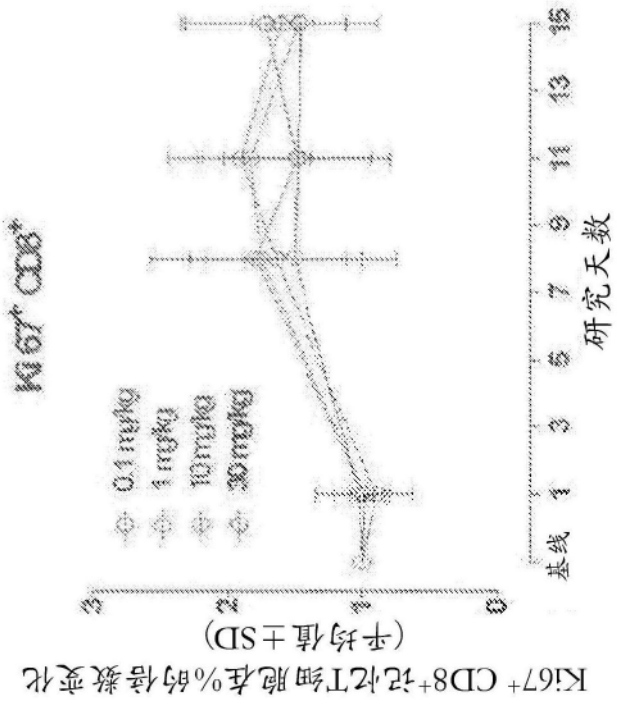
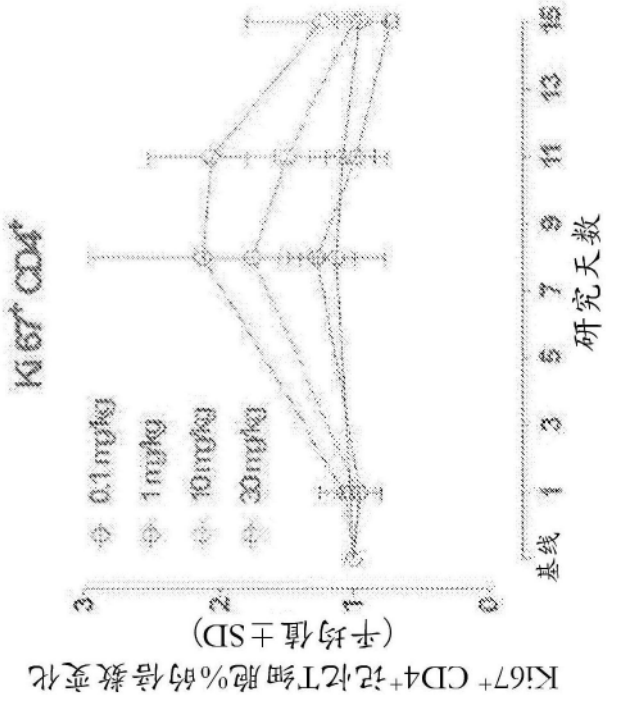

0.1 mg/kg
1 mg/kg
10 mg/kg
30 mg/kg
PKC (ug/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
7
14
21
标定时间（天）

图70



Ki67+ CD8+记忆T细胞%的倍数变化



Ki67+ CD4+记忆T细胞%的倍数变化

图71

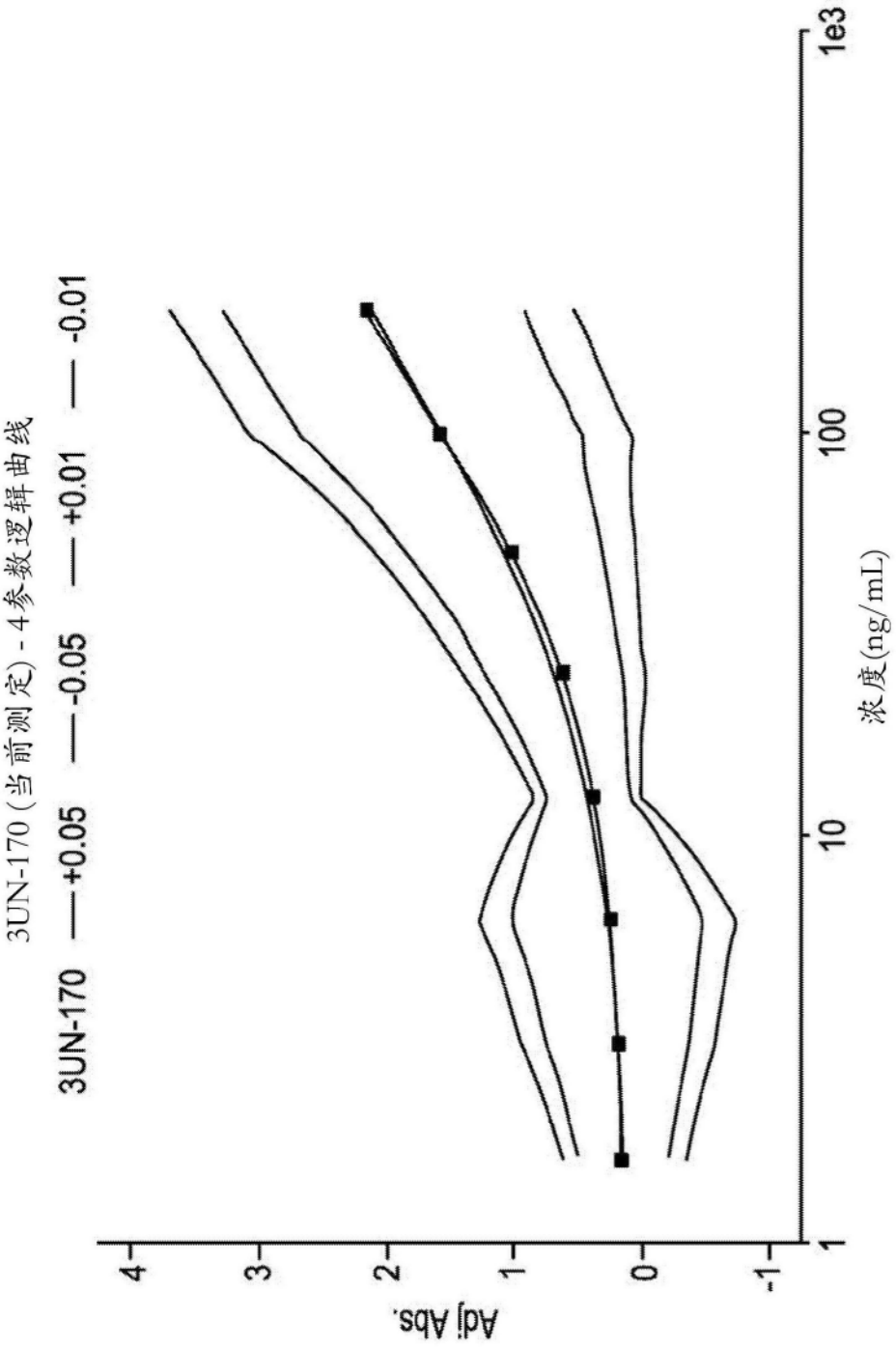

3UN-170 (当前测定) - 4参数逻辑曲线
3UN-170 +0.05 -0.05 +0.01 -0.01
Adj Abs.
浓度(ng/mL)
4
3
2
1
0
-1
1
10
100
1e3

图72

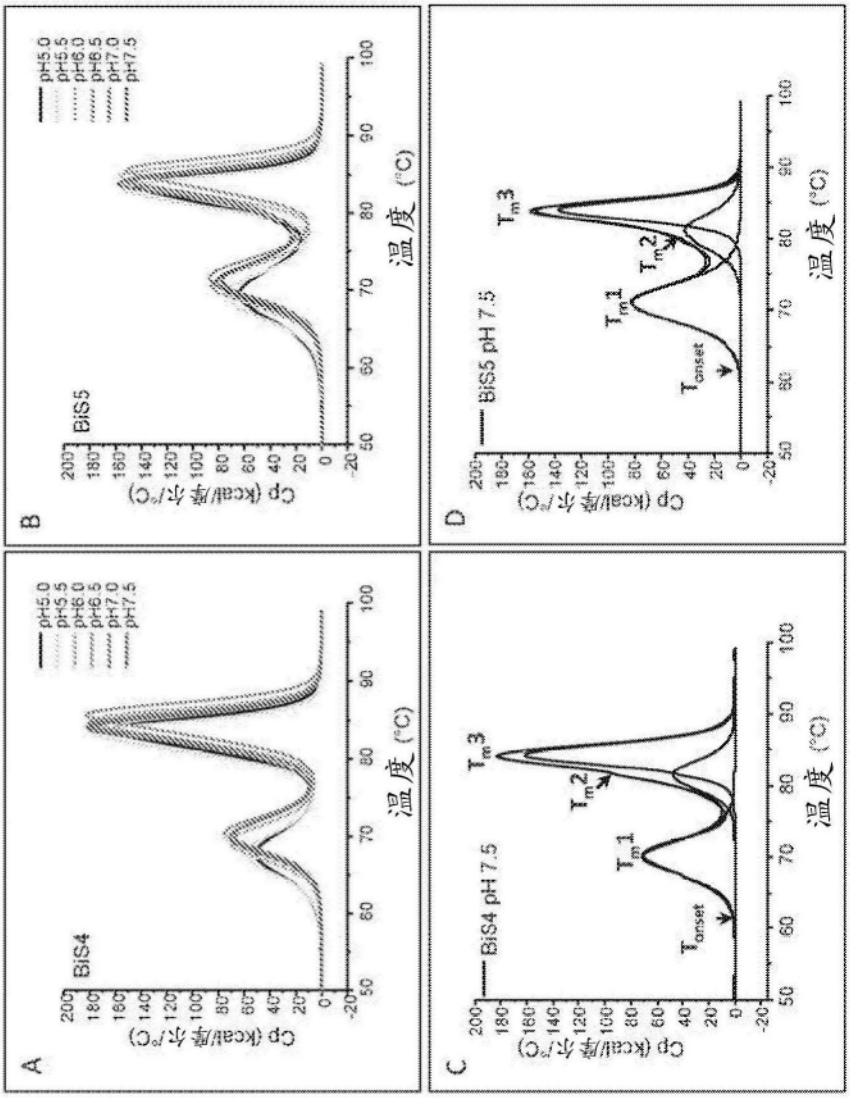

A
BiS4
B
BiS5
C
BiS4 pH 7.5
D
BiS5 pH 7.5
pH5.0
pH5.5
pH6.0
pH6.5
pH7.0
pH7.5
Cp (kcal/摩尔/°C)
温度 (°C)
T_{onset}
T_m1
T_m2
T_m3

图73A-73D

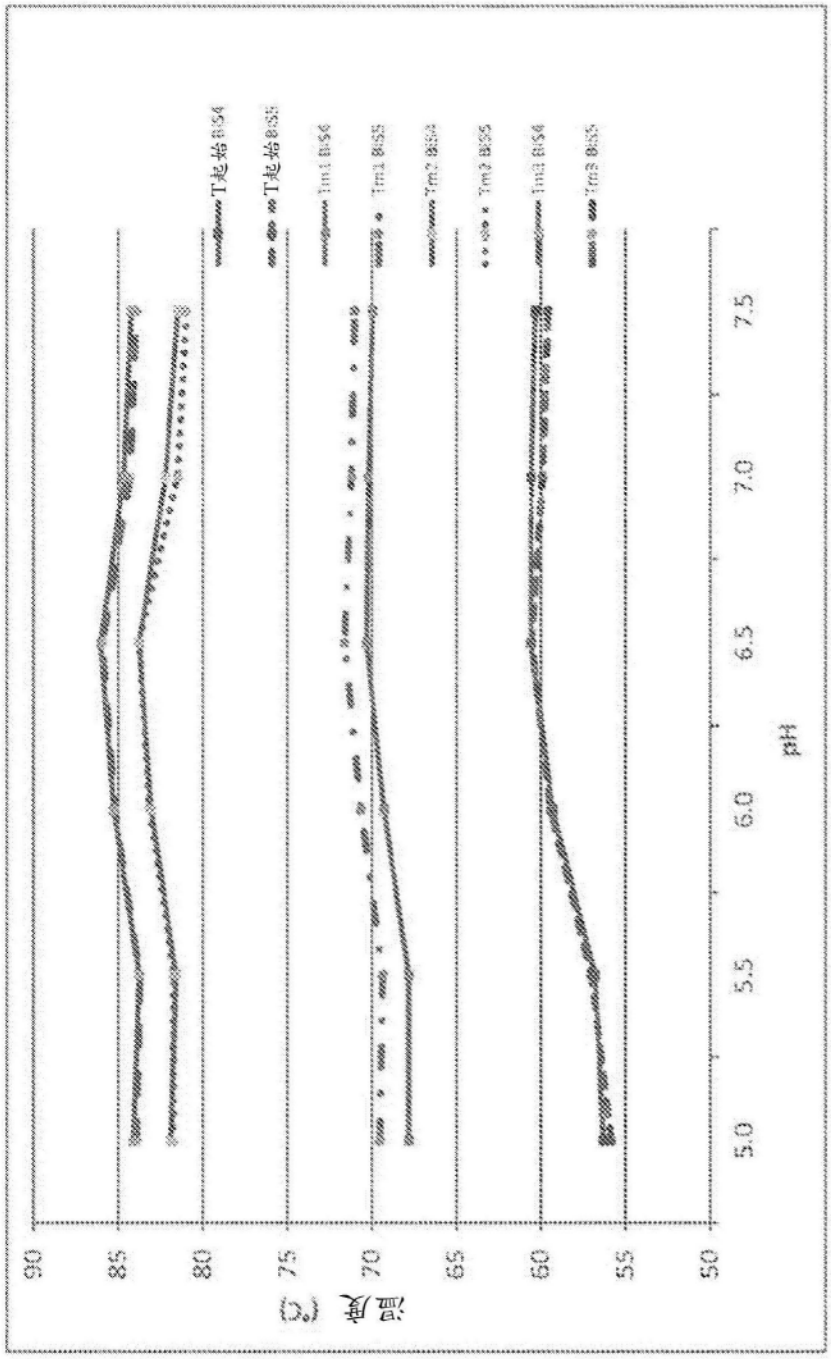

T起始 BS4
T起始 BS5
Tm1 BS4
Tm1 BS5
Tm2 BS4
Tm2 BS5
Tm3 BS4
Tm3 BS5
温度 (℃)
90
85
80
75
70
65
60
55
50
pH
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5

图73E

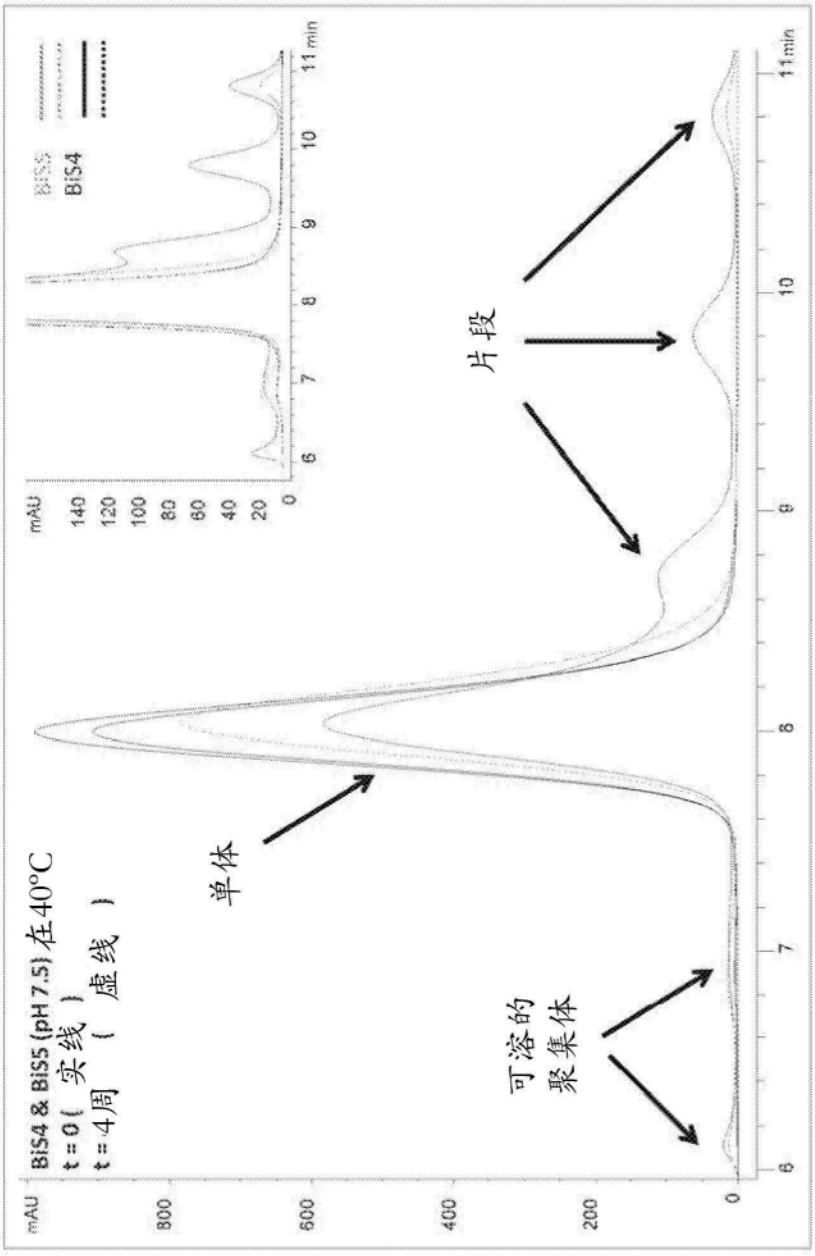

BiS4 & BiS5 (pH 7.5) 在40°C
t = 0 (实线)
t = 4周 (虚线)
mAU
800
600
400
200
0
6
7
8
9
10
11 min
单体
可溶的
聚集体
片段
BiS5
BiS4
mAU
140
120
100
80
60
40
20
0
6
7
8
9
10
11 min

图74A

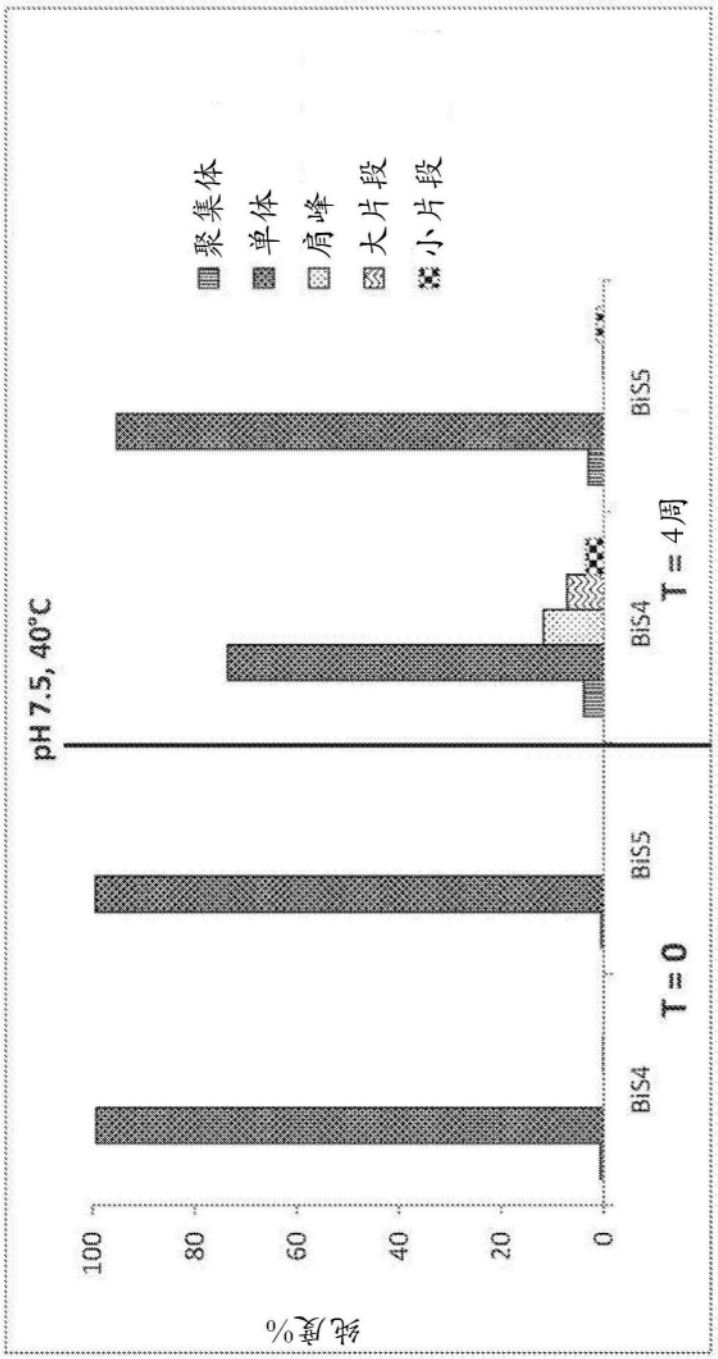

聚集体
单体
肩峰
大片段
小片段
pH 7.5, 40°C
T = 0
T = 4周
BiS4
BiS5
BiS4
BiS5
0
20
40
60
80
100
纯度%

图74B

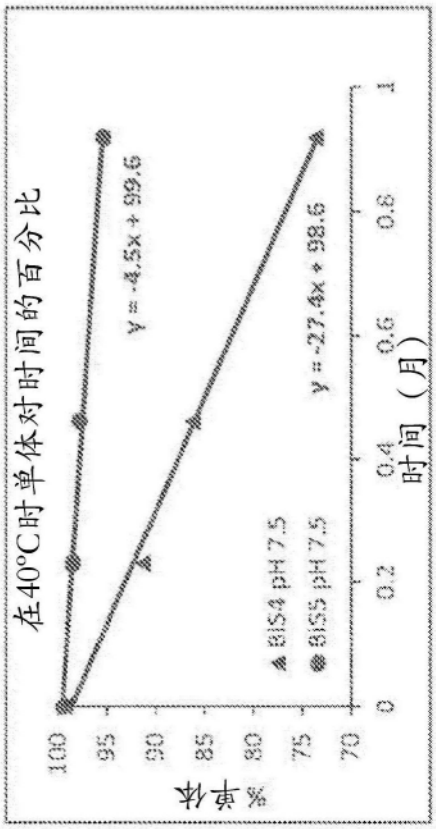

在40°C时单体对时间的百分比
y = -4.5x + 99.6
y = -27.4x + 98.6
BIS4 pH 7.5
BIS5 pH 7.5
% 单体
时间（月）
100
95
90
85
80
75
70
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1

图75A

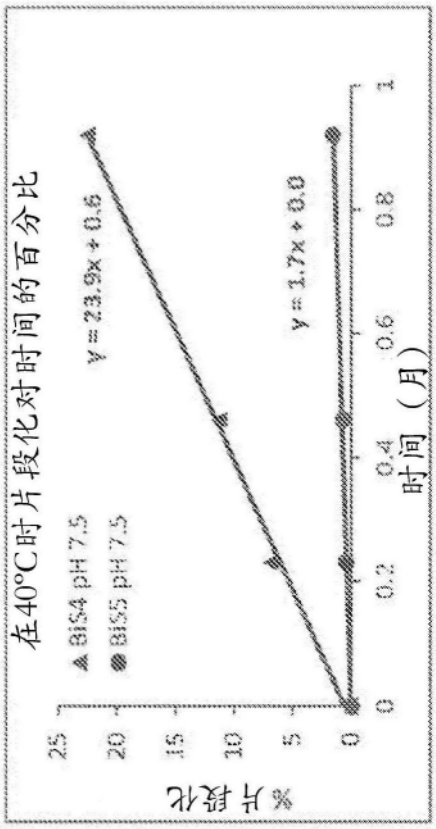

在40°C时片段化对时间的百分比
Bis4 pH 7.5
Bis5 pH 7.5
y = 23.9x + 0.6
y = 1.7x + 0.0
% 片段化
25
20
15
10
5
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
时间（月）

图75B

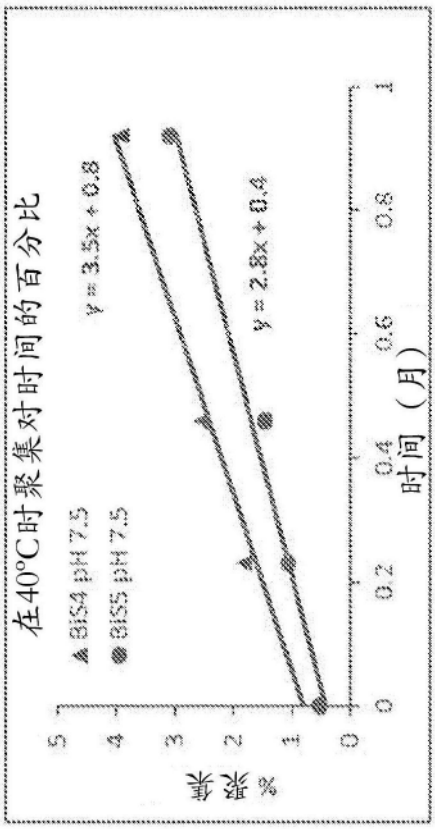

在40°C时聚集对时间的百分比
BIS4 pH 7.5
BIS5 pH 7.5
y = 3.5x + 0.8
y = 2.8x + 0.4
% 聚集
时间（月）
0
1
2
3
4
5
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1

图75C

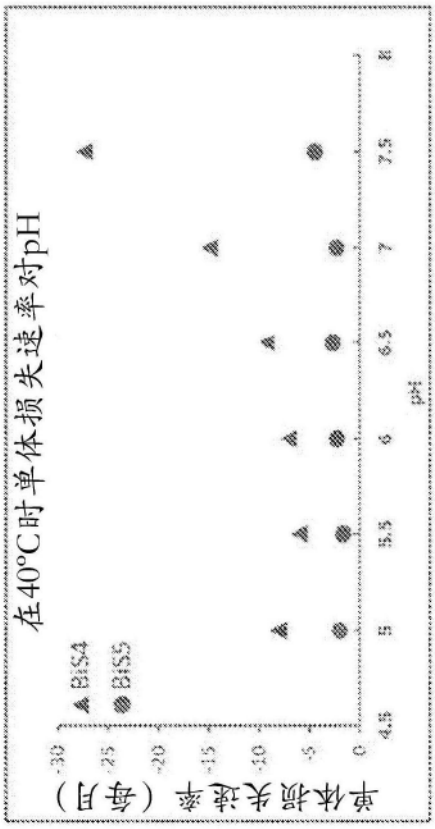

在40°C时单体损失速率对pH
单体损失速率（每月）
BiS4
BiS5
-30
-25
-20
-15
-10
-5
0
4.5
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8
pH

图76A

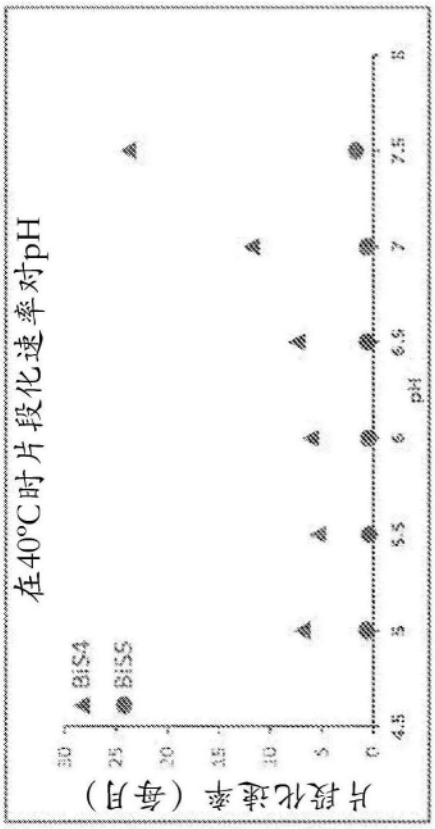

在40°C时片段化速率对pH
片段化速率（每月）
BIS4
BIS5
pH
4.5
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8
0
5
10
15
20
25
30

图76B

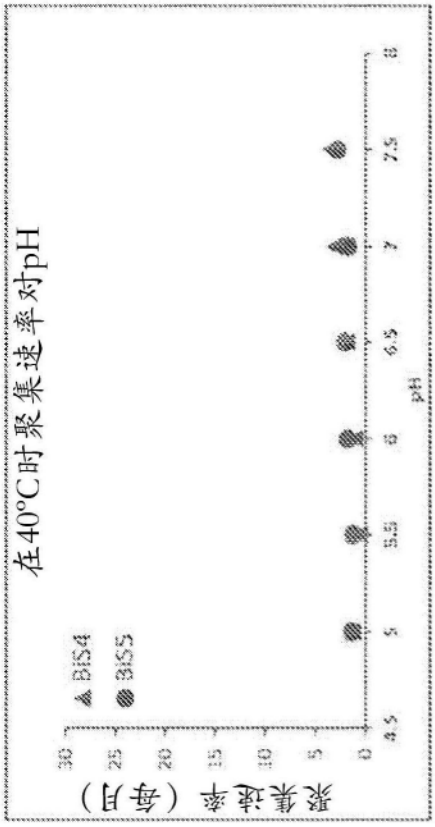


图76C

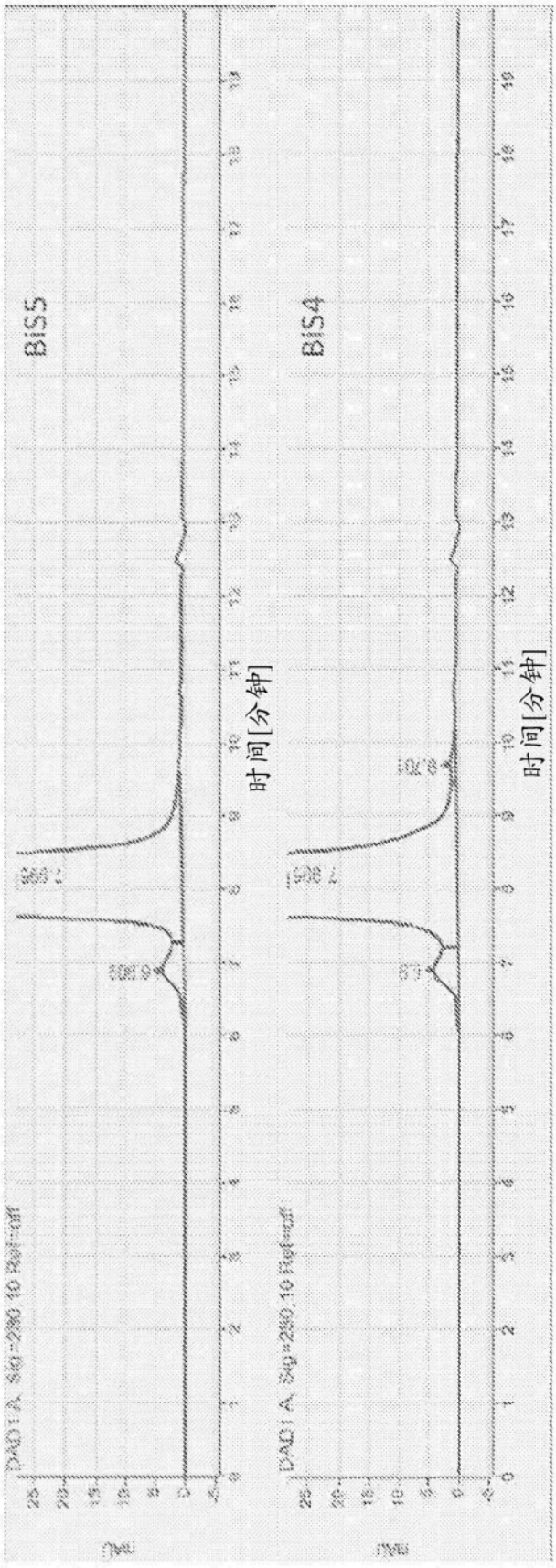


图77A

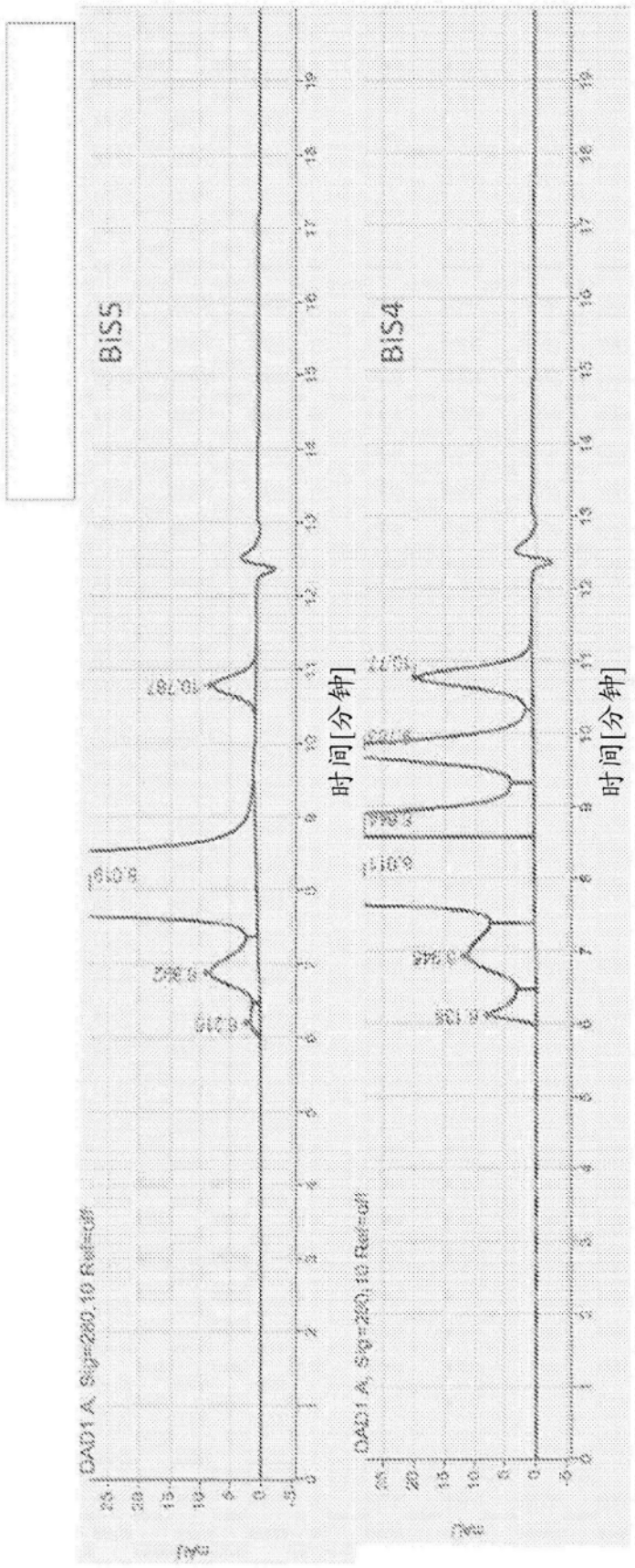


图77B

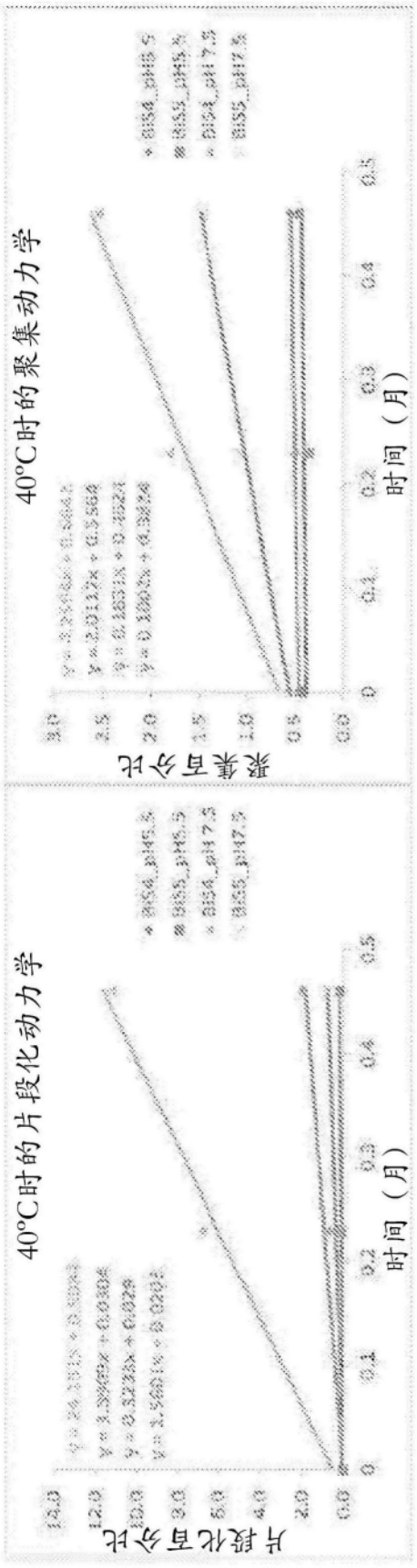
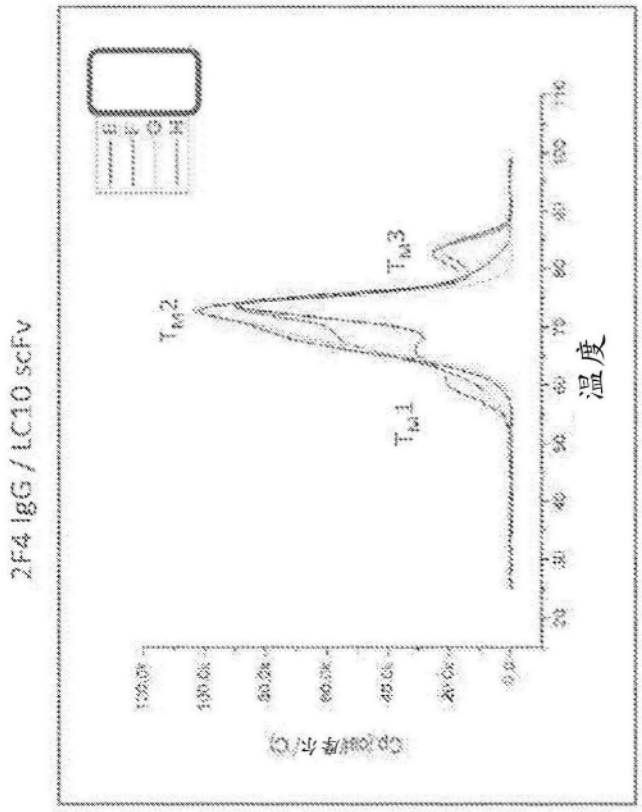


图78


2F4 IgG / LC10 scFv
温度
T_M1
T_M2
T_M3

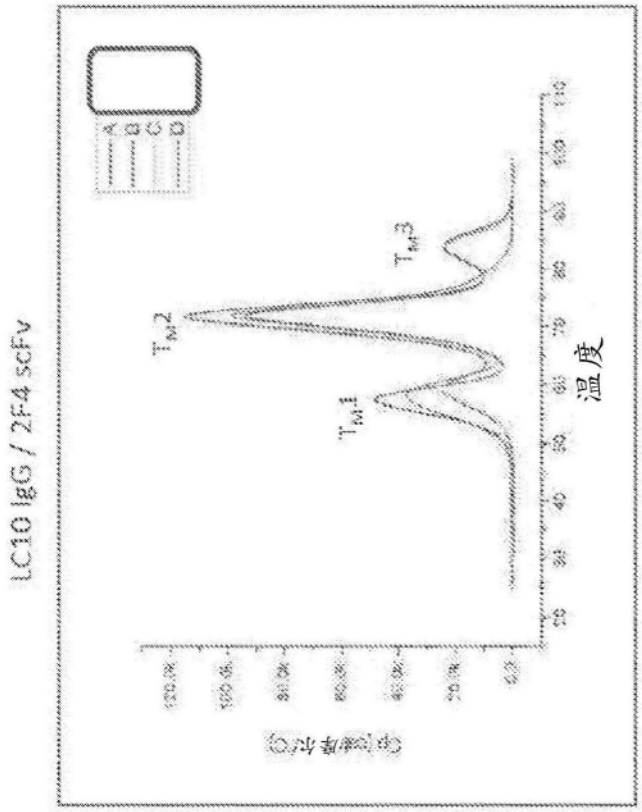

LC10 IgG / 2F4 scFv
温度
T_M1
T_M2
T_M3

图79

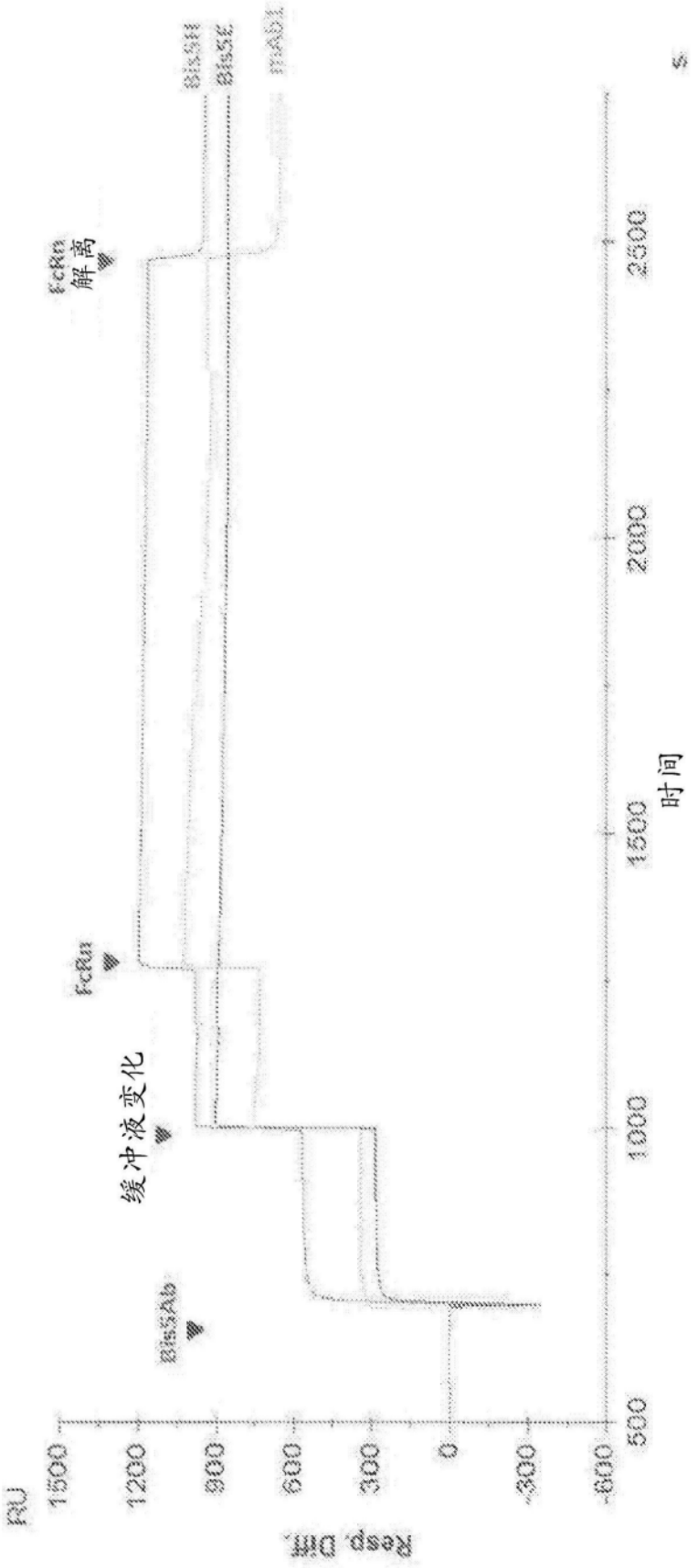

RU
1500
1200
900
600
300
0
-300
-600
Resp. Diff.
500
1000
1500
2000
2500
s
时间
BiS5II
BiS5E
mAb1
FcRn
解离
FcRn
缓冲液变化
BiS5Ab

图80

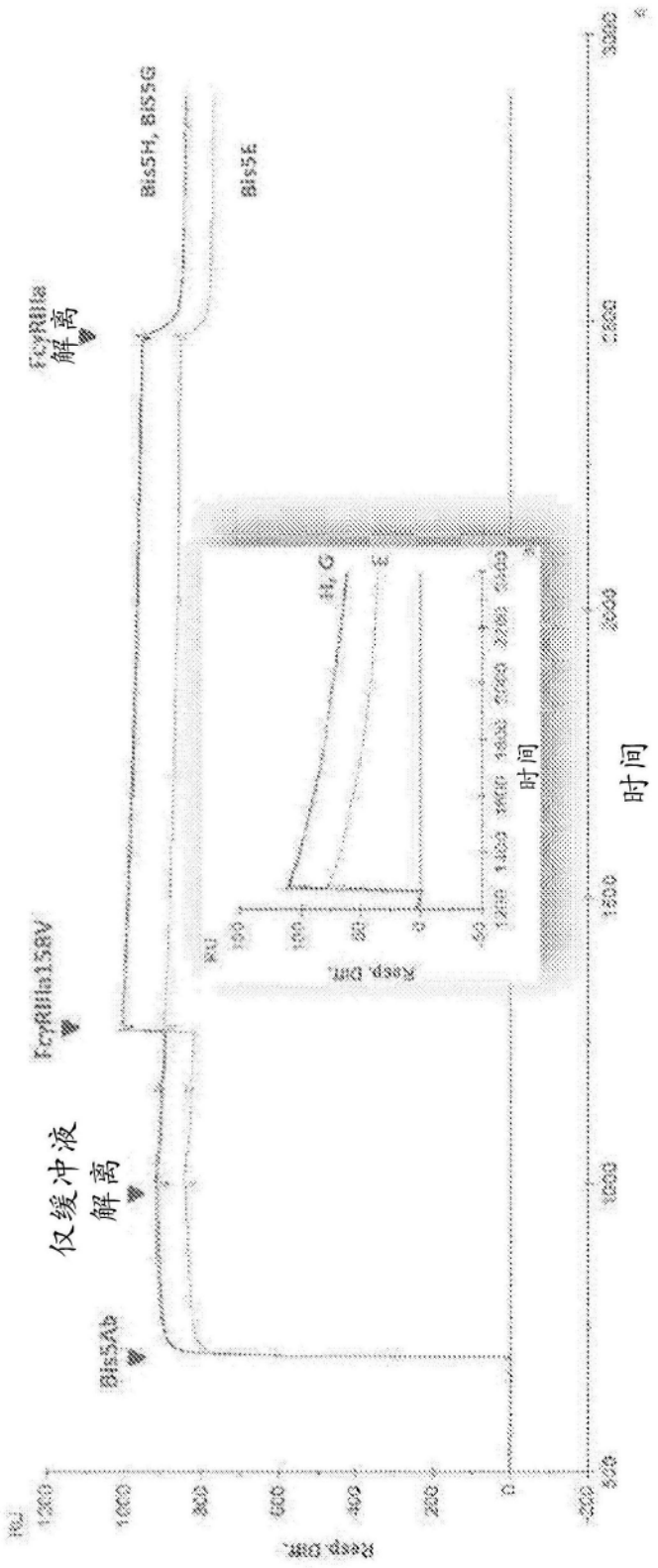

Bis5H, Bis5G
Bis5E
FcγRIIa
解离
FcγRIIa135RV
仅缓冲液
解离
Bis5Ab
时间
Resp Diff.
时间

图81

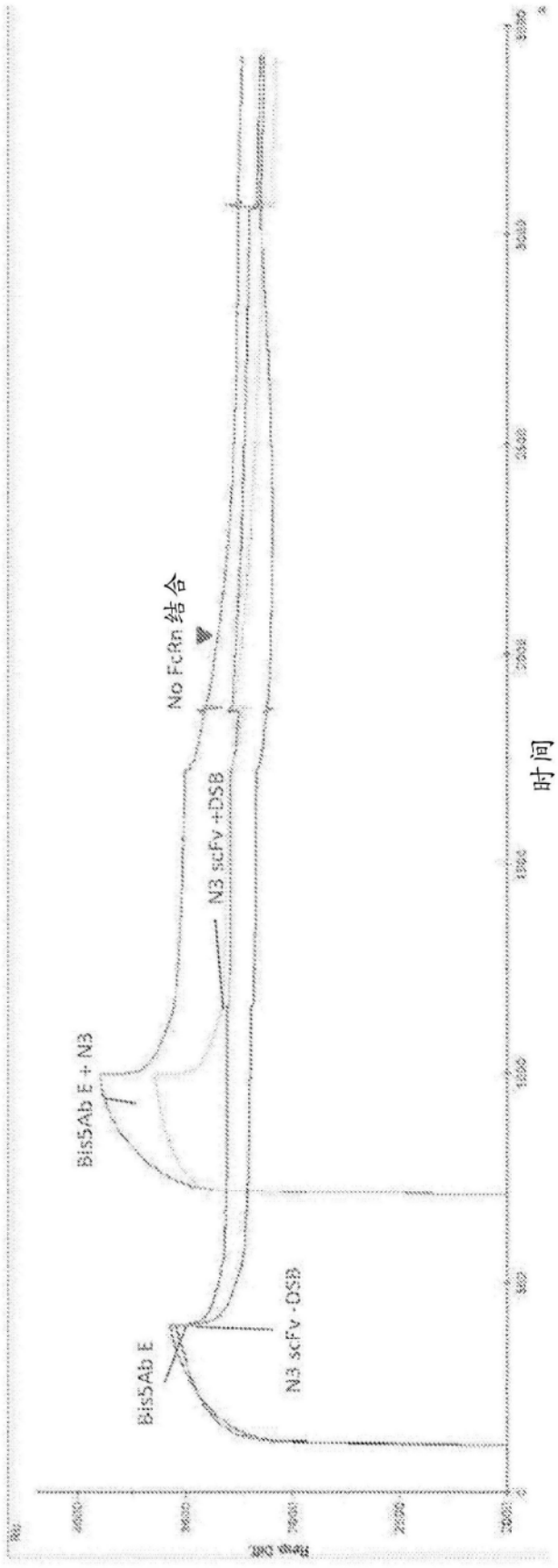


图82

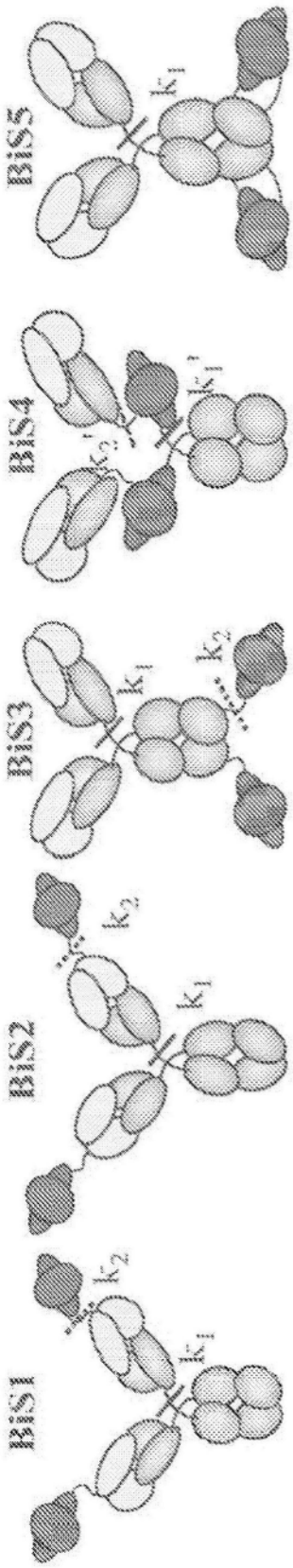


图83

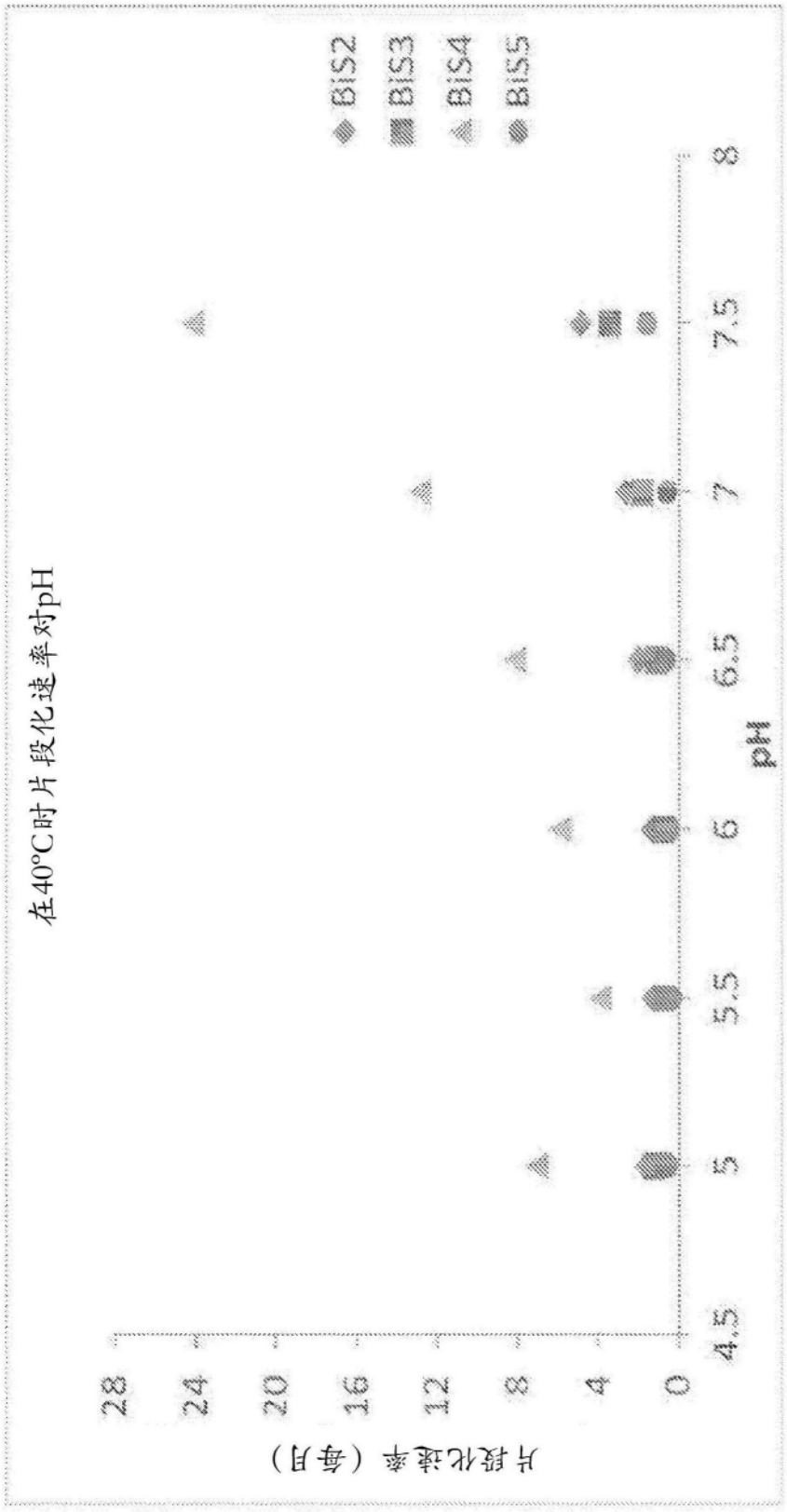

在40°C时片段化速率对pH
片段化速率（每月）
pH
BIS2
BIS3
BIS4
BIS5
28
24
20
16
12
8
4
0
4.5
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8

图84

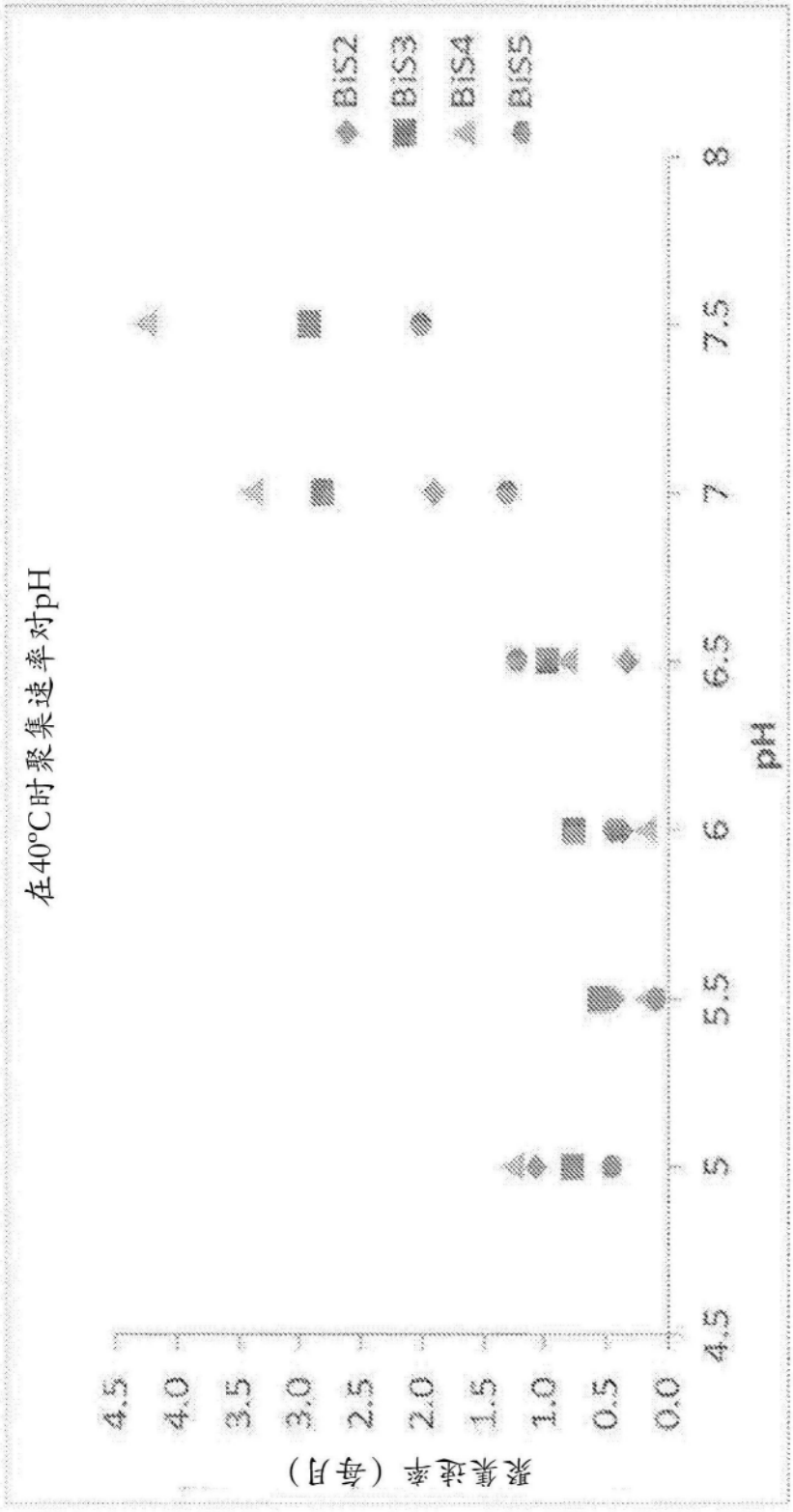

在40°C时聚集速率对pH
聚集速率（每月）
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
4.5
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8
pH
BIS2
BIS3
BIS4
BIS5

图85

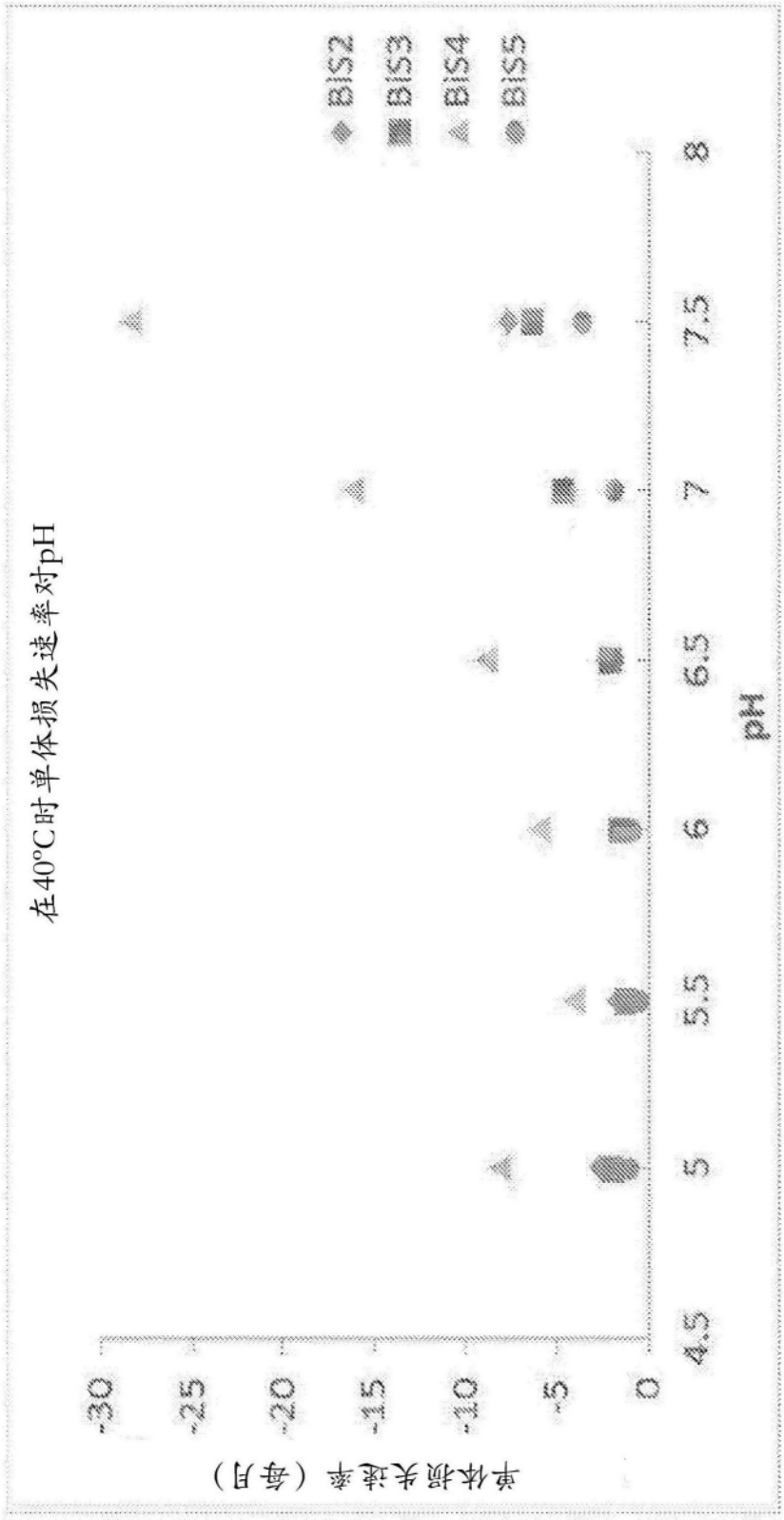

在40°C时单体损失速率对pH
单体损失速率（每月）
-30
-25
-20
-15
-10
-5
0
4.5
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8
pH
BIS2
BIS3
BIS4
BIS5

图86

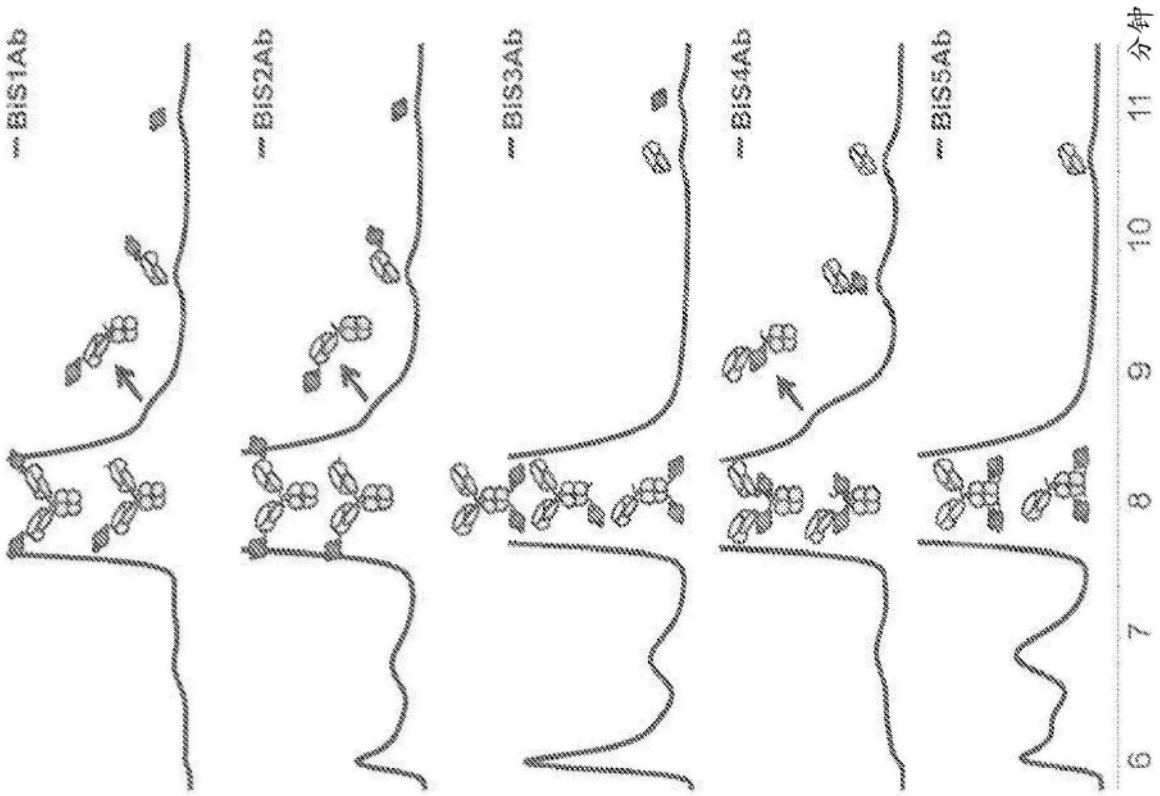


图87

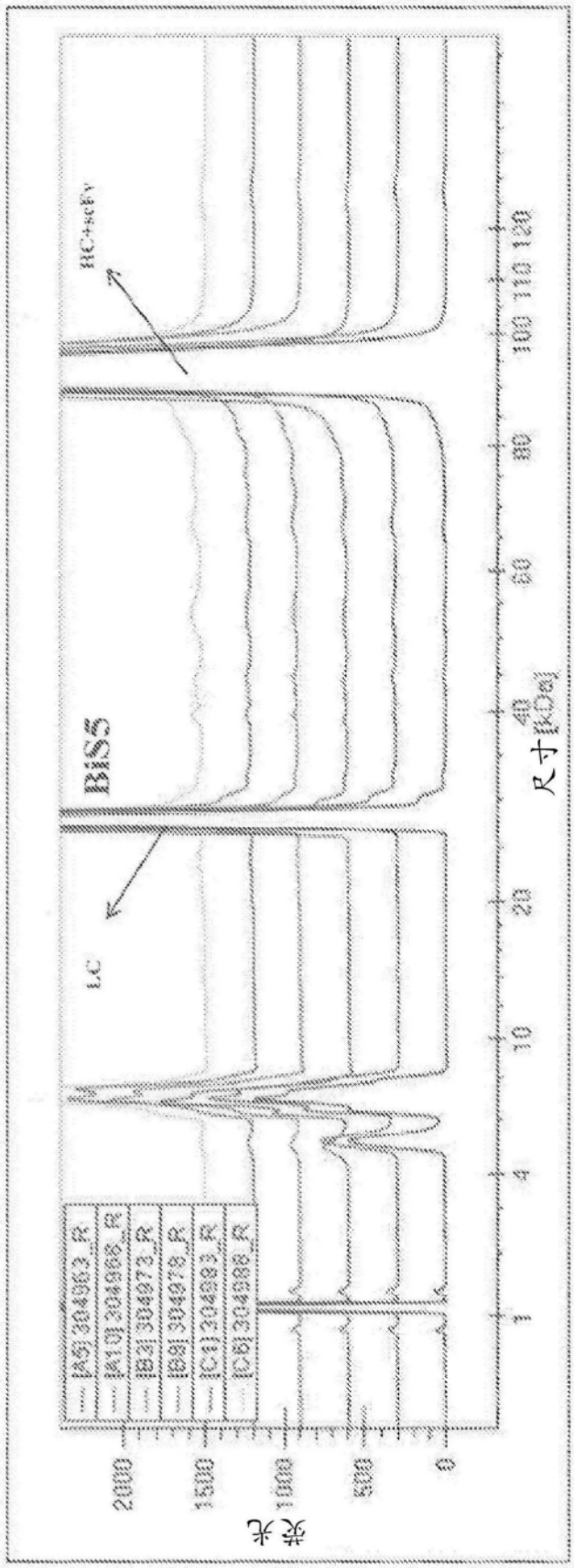

荧光
2000
1500
1000
500
0
1
4
10
20
40
60
80
100 110 120
尺寸[kDa]
LC
BiS5
HC+scFv
[A5] 3049063_R
[A10] 3049068_R
[B3] 3049073_R
[B8] 3049078_R
[C4] 3049083_R
[C8] 3049088_R

图88

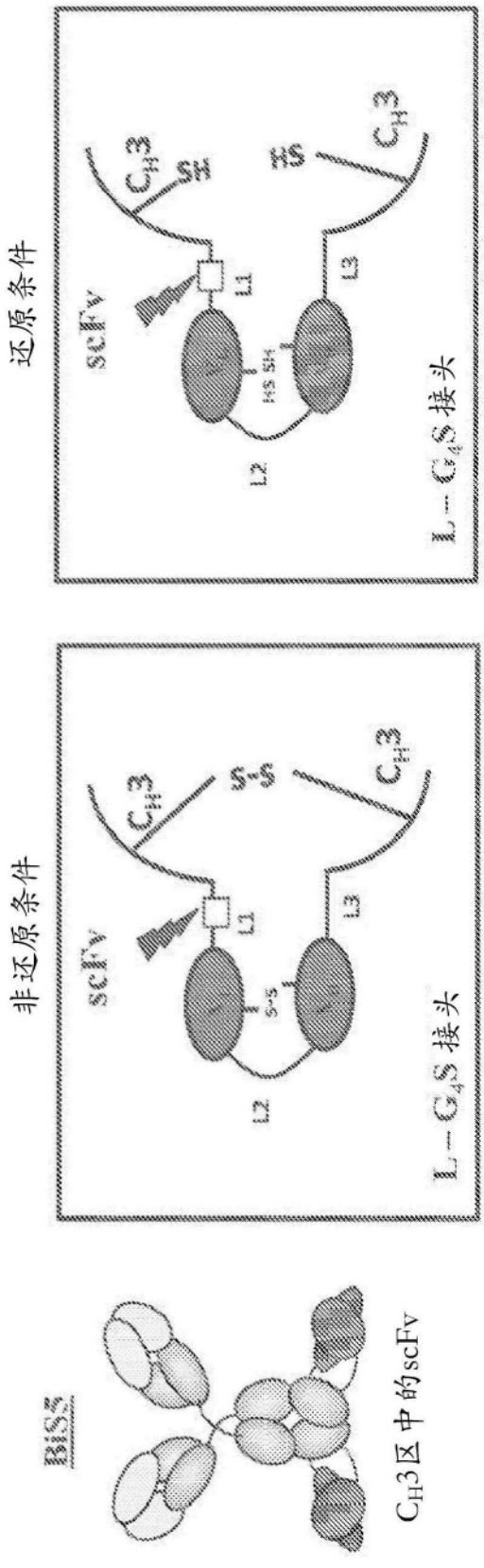

还原条件
scFv
C_H3
SH
SH
C_H3
L1
L2
L3
HS SH
L – G_4S 接头
非还原条件
scFv
C_H3
S-S
C_H3
L1
L2
L3
S-S
L – G_4S 接头
BiSS
C_H3区中的scFv

图89

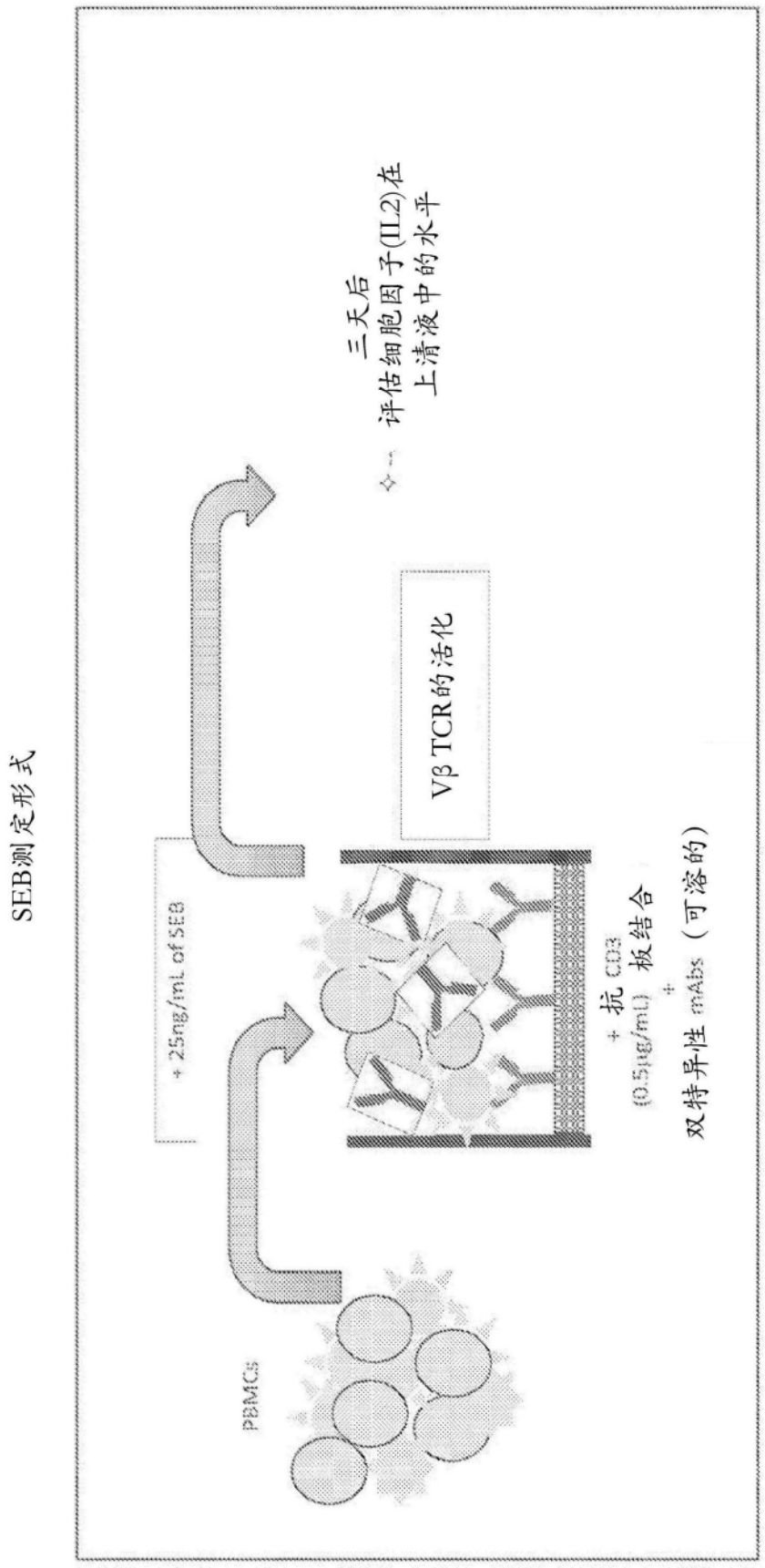

SEB测定形式
PBMCs
+ 25ng/mL of SEB
+ 抗 CD3
(0.5μg/mL) 板结合
+
双特异性 mAbs（可溶的）
Vβ TCR的活化
三天后
评估细胞因子(IL2)在
上清液中的水平

图90