(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111670051 A
(43)申请公布日 2020.09.15

(21)申请号 201880072546.4

(22)申请日 2018.11.07

(30)优先权数据
62/583,410 2017.11.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2018/114266 2018.11.07

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/091384 EN 2019.05.16

(71)申请人 亚飞(上海)生物医药科技有限公司
地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路780号

(72)发明人 刘源 王海洋 李仁柯 张蕊 刘辰

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 韦东

(51)Int.Cl.
A61K 47/60(2006.01)

权利要求书42页 说明书123页
序列表86页 附图18页

(54)发明名称

生物分子偶联物及其用途

(57)摘要

本发明公开了生物分子偶联物及其应用。所公开的生物分子偶联物含有生物分子和与该生物分子共价连接的功能部分。该功能部分包括阻碍生物分子与其配体或受体相结合的基团、可在疾病微环境中被蛋白水解酶激活或可被酸性激活的可断裂连接臂、可在该可断裂连接臂断裂后自动脱落的基团以及保持或促进生物分子与其配体或受体结合能力的基团。本文的生物分子偶联物能够有效突破个体自身的免疫壁垒，达到病理微环境，并在病理微环境中激活和释放，从而可选择性促进肿瘤或炎症微环境的T细胞等的增值或杀伤作用，实现低自身免疫、高疗效的作用。

CN 111670051 A

1.一个生物分子偶联物有以下结构：

R1-R2-R3-R4-S-Cys-R5

其中，

R5代表一个通过突变诱导一个或多个半胱氨酸残基的生物分子；

Cys代表包含在R5里的半胱氨酸残基；

S代表半胱氨酸残基上的硫原子；

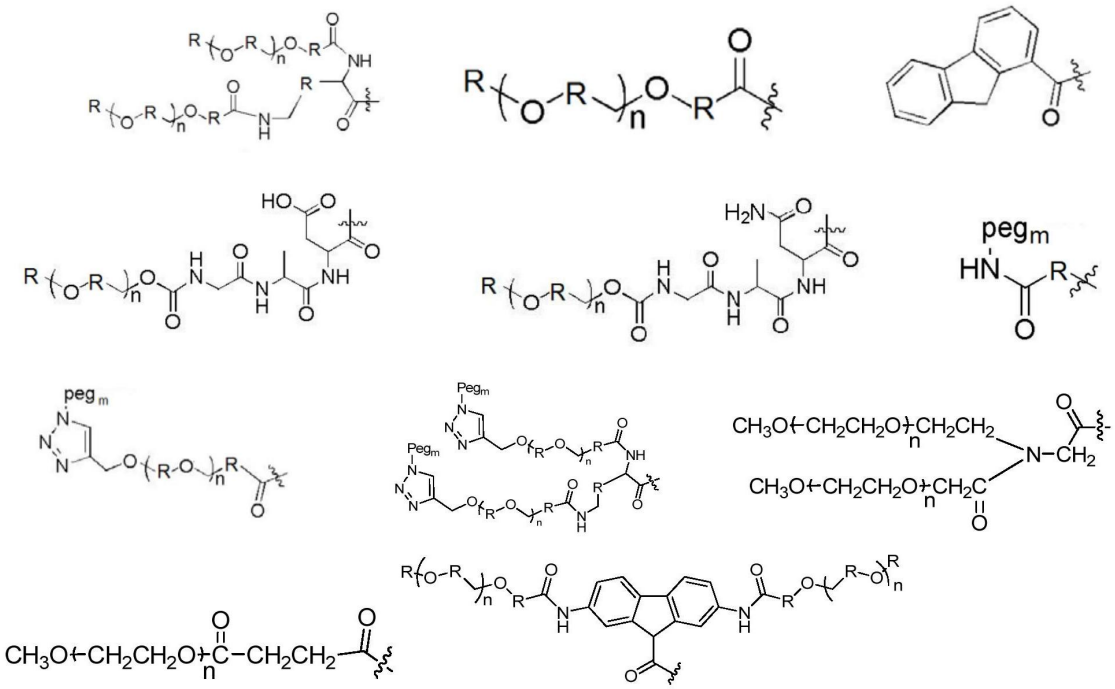
R1是一个阻止R5与它的配体或受体结合的基团；

R2不存在，或者是一个可切割的连接臂，其可以一个或多个蛋白水解酶激活或者是一个可以在病理微环境中被酸性激活的一个化学键；

R3不存在，或者可以说是一个可以自动脱落的连接臂在R2被切割或者R2在病理微环境被酸激活之后；当R2不存在时，R3是一个可以在病理微环境被酸激活的一个化学键；

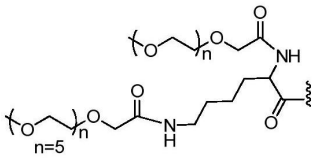
R4是一个可以与R5包含的半胱氨酸残基里的硫原子共价结合的基团，其作用是当R1-R2-R3被切割后，维持或者提高R5与其抗原的结合能力。

2.权利要求1中所描述的生物分子偶联物，其中R1选自包含聚乙二醇-C_{1-5}-烷基羰基的基团，

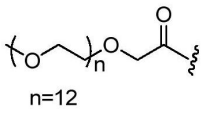


其中每个R独立地是C1-4烷基；每个n独立地是1至30000范围内的整数，例如1至15000，1至5000，1至2000，1至300，1至150，1至50，1至20的整数或3至12；聚乙二醇或Peg_m表示分子量为44至132000的聚乙二醇，例如1000至50000或10000至30000的聚乙二醇；m表示聚乙二醇的分子量；波浪线表示连接R2的R1的位置。

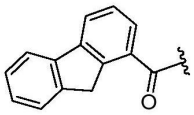
3.据权利要求1所述的生物分子偶联物，其中R1筛选自以下基团：



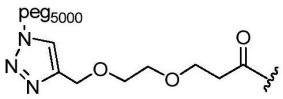
R1-1 ,



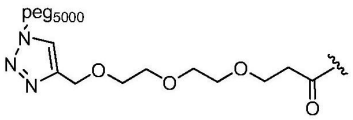
R1-2 ,



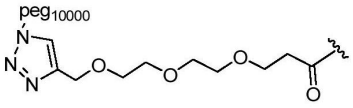
R1-3 ,



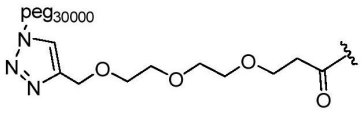
R1-4 ,



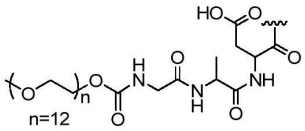
R1-5 ,



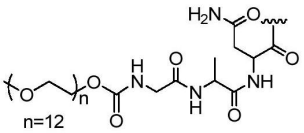
R1-6 ,



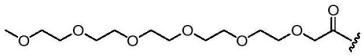
R1-7 ,



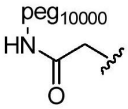
R1-8 ,



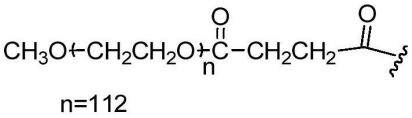
R1-9 ,



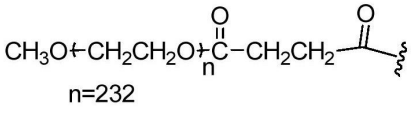
R1-10 ,



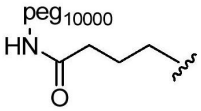
R1-11 ,



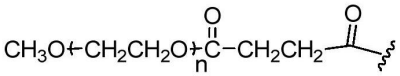
R1-12 ,



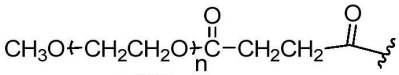
R1-13 ,



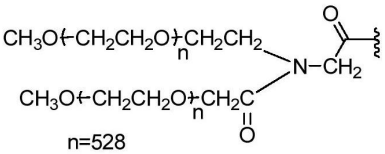
R1-14 ,



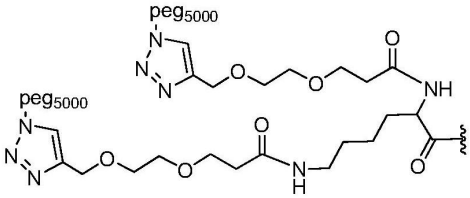
R1-15 ,



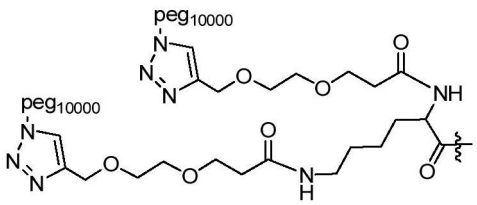
R1-16 ,



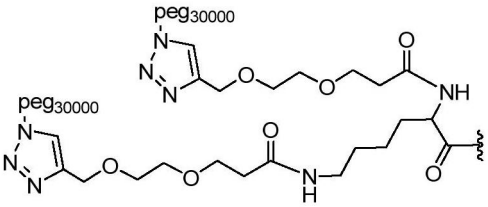
R1-17 ,



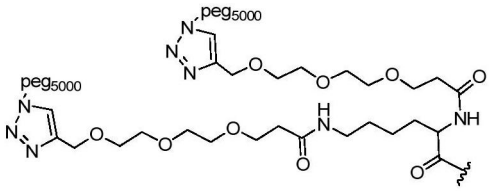
R1-18 ,



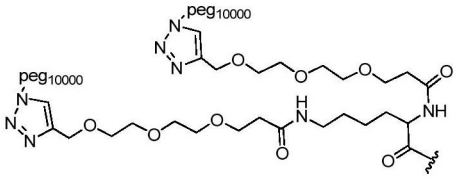
R1-19 ,



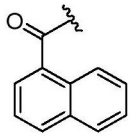
R1-20



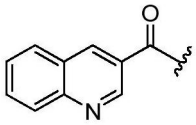
R1-21 ,



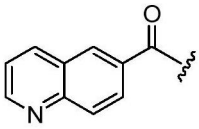
R1-22



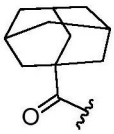
R1-23 ,



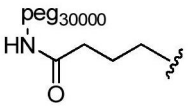
R1-24 ,



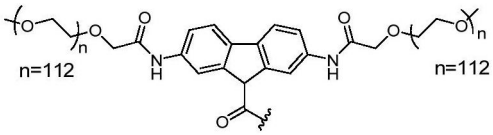
R1-25 ,



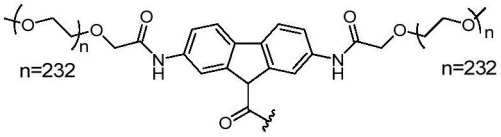
R1-26 ,



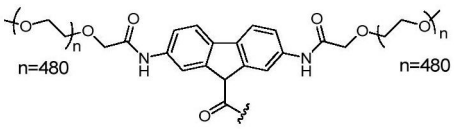
R1-27 ,



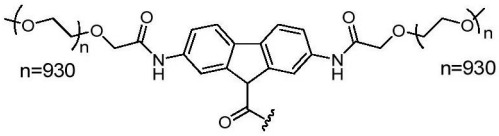
R1-28 ,



R1-29 ,



R1-30 ,



R1-31 。

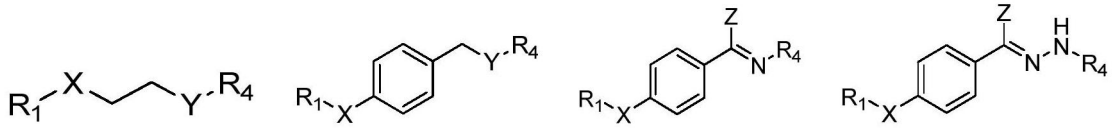
4.根据权利要求5所述的生物分子的偶联物，其中R2是能够被一种或多种蛋白水解酶，蛋白酶或肽酶活化或裂解的肽，其中所述蛋白酶选自半胱氨酸蛋白酶，天冬酰胺蛋白酶，天冬氨酸蛋白酶，谷氨酸蛋白酶，苏氨酸蛋白酶，明胶酶，金属蛋白酶或天冬酰胺肽裂解酶；优选地，R2是能够被至少一种选自下组的酶切割的肽：天冬酰胺内肽酶，颗粒酶，组织蛋白酶B，组织蛋白酶C，组织蛋白酶D，组织蛋白酶E，组织蛋白酶K，组织蛋白酶L，激肽释放酶，hK1，hK10，hK15，纤溶酶，胶原酶，IV型胶原酶，星形胶质素，Xa因子，胰凝乳蛋白酶样蛋白酶，胰蛋白酶样蛋白酶，弹性蛋白酶样蛋白酶，枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶，猕猴桃蛋白酶，菠萝蛋白酶，钙蛋白酶，半胱天冬酶，半胱天冬酶-3，Mirl-CP，木瓜蛋白酶，HIV-1蛋白酶，HSV蛋白酶，CMV蛋白酶，凝乳酶，肽酶，间质蛋白酶，血浆蛋白酶，猪笼草蛋白酶，金属外肽酶，金属内肽酶，基质金属蛋白酶(MMP)，MMP1，MMP2，MMP3，MMP8，MMP9，MMP10，MMP11，MMP12，MMP13，MMP14，ADAM10，ADAM12，尿激酶纤溶酶原激活物(uPA)，肠内激酶，前列腺特异性抗原(PSA，hK3)，白细胞介素-113转换酶，凝血酶，FAP(FAP-a)，跨膜肽酶，二肽基肽酶和二肽基肽酶四

(DPPIV/CD26)。

5.根据权利要求1的生物分子的偶联物，其中R2是由-R2a，-R2b-，-R2a-N-，-R2a-D-，-R2a-AAN-，-R2a-AAD-代表的肽，或-R2a-R2b-；其中R2a是能够通过一种或多种蛋白水解酶在酰胺键上裂解的肽；R2b是在侧链上具有氮的肽，与R3形成氨基甲酸酯，其中氨基甲酸酯能够被一种或多种蛋白水解酶切割；A是丙氨酸；N是天冬酰胺，其侧链中的氮与R3形成氨基甲酸酯，其中氨基甲酸酯是能够的由天冬酰胺内肽酶切断；D是天冬氨酸，其侧链中的氮与R3形成氨基甲酸酯，氨基甲酸酯可被粒酶B裂解；

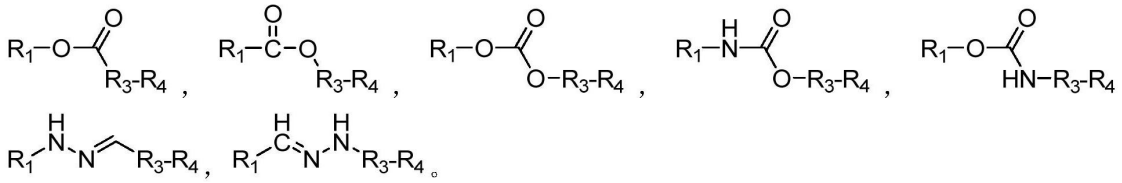
优选地，R2是三肽，其中与R1连接的三肽的第一个氨基酸残基选自Ala，Thr，Val和Ile，中间的第二个氨基酸残基选自Ala，Thr，Val和Asn，以及第三个氨基酸与R3连接的酸残基选自Asn和Asp；其中R2以酰胺，酯，氨基甲酸酯，脲或脲键的连接方式通过第一个氨基酸残基的氨基与R1连接，并通过第三个氨基酸残基的羧基以酰胺，酯，氨基甲酸酯，尿素或脲键连接方式与R3连接；优选地，三肽选自Ala-Ala-Asn和Ala-Ala-Asp。

6.根据权利要求1所述的生物分子的偶联物，其中R2是在病理微环境的酸性条件下可裂解的键，并且选自酰胺，酯，氨基甲酸酯，脲和脲键；优选地，其中R1-R2-R3-R4的结构由下式表示：

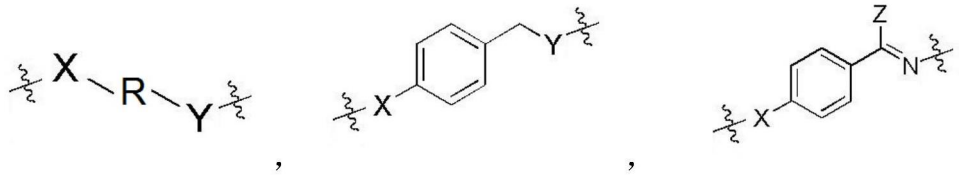


其中X和Y各自独立地为NR'或O，Z为H或C1-10烷基，R'为H或C1-4烷基；R3分别以酰胺，酯，氨基甲酸酯，脲或脲键的连接方式通过X和Y与R1和R4连接。

7.根据权利要求1的生物分子的偶联物，其中R2是在病理微环境的酸性条件下可裂解的键，并且选自酰胺，酯，氨基甲酸酯，脲和脲键，其中R1-R2-R3-R4的结构由下式表示：



8.根据权利要求1的生物分子的偶联物，其中R3选自：

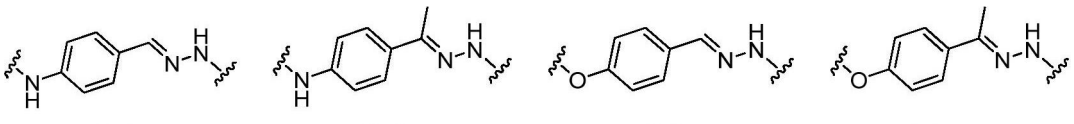


其中X和Y各自独立地为NR'或O，Z为H或C1-10烷基，R为C1-4烷基，R'为H或C1-4烷基；其中R4以酰胺，酯，氨基甲酸酯，脲或脲键的连接方式通过上式中的Y或N与R3连接。

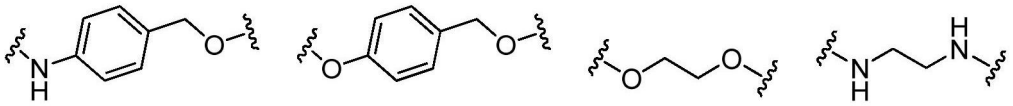
9.根据权利要求8的生物分子的偶联物，其中R3选自-NH-苯基-CH2O-，-NH-苯基-CH＝N-，-NH-苯基-C(CH3)＝N--O-苯基-CH＝N-和-O-苯基C(CH3)＝N-。

10.根据权利要求1的生物分子的偶联物，其中R3选自酰胺，酯，氨基甲酸酯，脲和脲键。

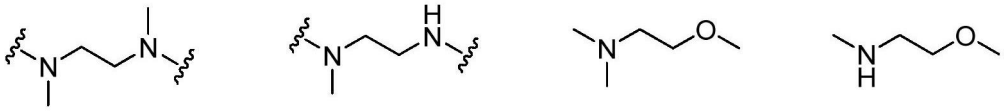
11.根据权利要求1所述的生物分子的偶联物，其中R3选自：



R3-1 , R3-2 , R3-3 , R3-4

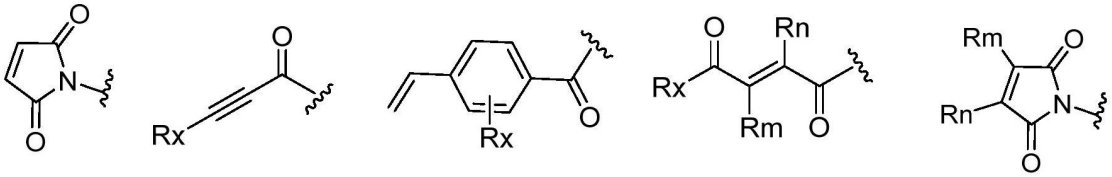


R3-5 , R3-6 , R3-7 , R3-8 ,



R3-9 , R3-10 , R3-11 , R3-12 。

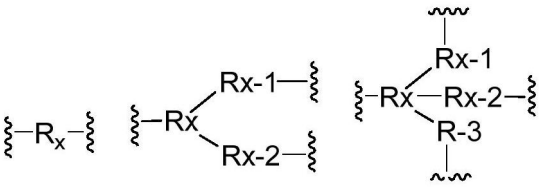
12.根据权利要求1的生物分子的偶联物，其中R4由-R4-a-R4-b-R4-c-表示，其中R4-a选自：



R_{4a-1} , R4a-2 , R4a-3 , R4a-4 , R4a-5

其中Ra和Rb各自独立地选自H和C1-6烷基或C1-6烷氧基；

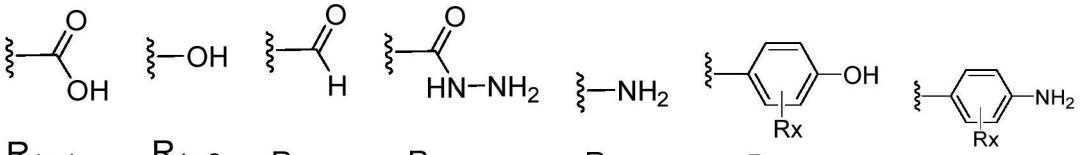
R4-b选自：



R_{4b-1} , R_{4b-2} , R4b-3

其中在式R_{4-b1}中，R_c不存在，或选自C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷氧基-C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷基-C_{3-8}环烷基，(C_{1-4}烷基-O)p-C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷基羰基氨基-(C_{1-4}烷基-O)p-C_{1-12}烷基，苯基-C_{1-12}烷基，C_{3-8}环烷基，C_{1-12}烷基-C_{3-8}环烷基-C_{1-12}烷基和C_{1-12}烷基-苯基-C_{1-12}烷基；在式R_{4-b2}中，R_c是C_{1-12}烷基氨基，其中R_{a-1}和Ra-2在氨基的N原子上被取代，并且在式4-b3中，Rc是C_{1-12}烷基，最后的C原子在末端烷基被Ra-1，Ra-2和R_{a-3}取代，其中R_{a-1}，R_{a-2}和R_{a-3}各自独立地选自C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷基-OH和C_{1-12}烷基-NR"R"'，其中R"和R"'各自独立地选自H和C_{1-12}烷基；其中，在式R_{4-b2}和R_{4-b3}中，R_{4-b}通过R_{a-1}，R_{a-2}和R_{a-3}中的至少一个与R_{4-c}连接；

R4-c选自：

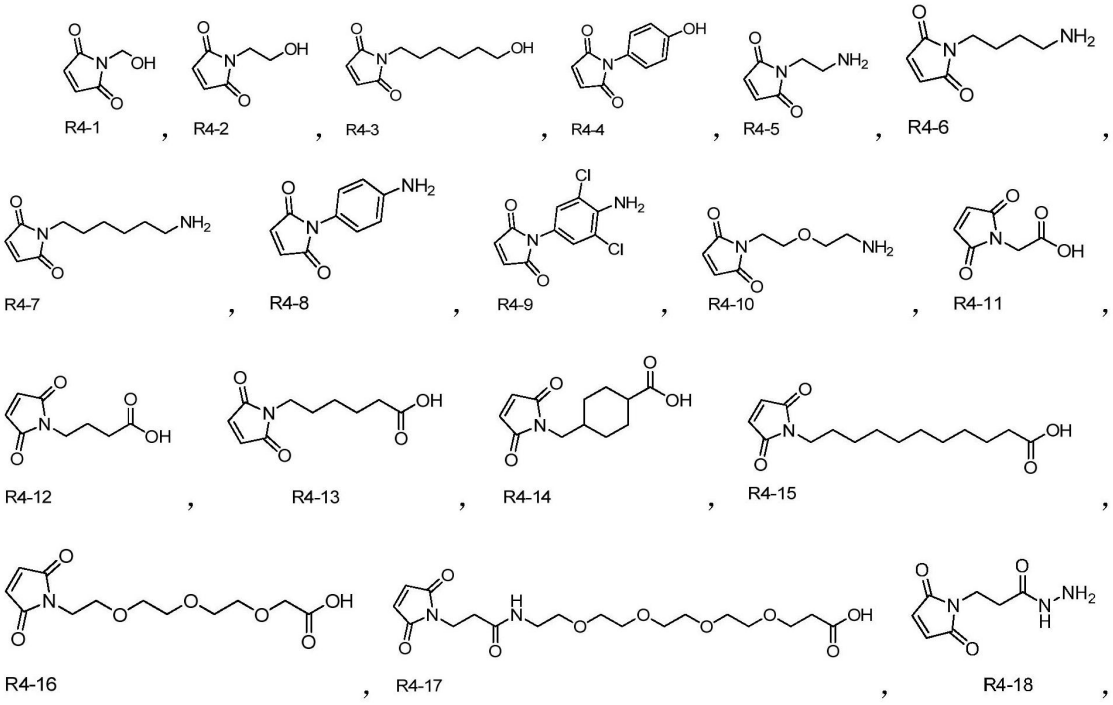


R_{4c-1}，R_{4c-2}，R_{4c-3}，R_{4c-4}，R_{4c-5}，R_{4c-6}，R_{4c-7}

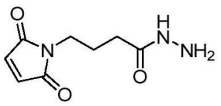
其中R_x选自H，卤素和C_{1-4}烷基；p是1至10的整数，例如1至5的整数；q为1～4的整数，例如1～2的整数；条件是当R_{4-a}选自式R_{4-a2}，R_{4-a3}和R_{4-a4}时，R_{4-c}不存在；

其中R3通过R4的R4-c连接到R4，并且R4-a的每个式中所示的波浪线表示R4-a与R4-b连接的位置。

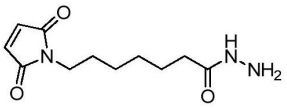
13.根据权利要求1所述的生物分子的偶联物，其中R4选自：



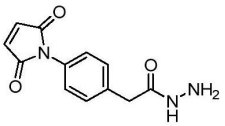
R4-1，R4-2，R4-3，R4-4，R4-5，R4-6，R4-7，R4-8，R4-9，R4-10，R4-11，R4-12，R4-13，R4-14，R4-15，R4-16，R4-17，R4-18，



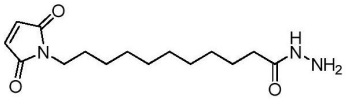
R4-19 ,



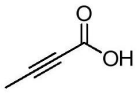
R4-20 ,



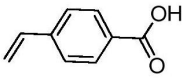
R4-21 ,



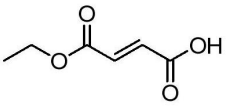
R4-22 ,



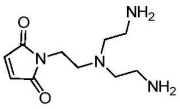
R4-23 ,



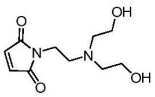
R4-24 ,



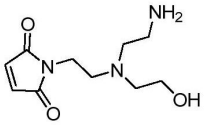
R4-25 ,



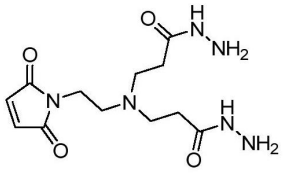
R4-26 ,



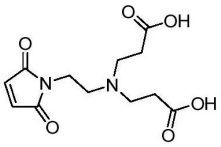
R4-27 ,



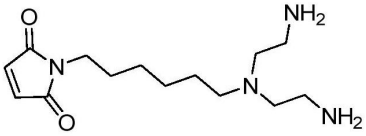
R4-28 ,



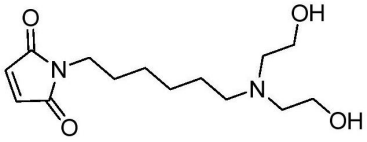
R4-29 ,



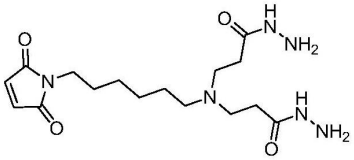
R4-30 ,



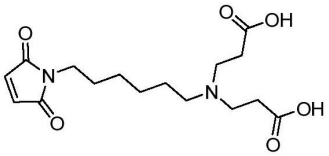
R4-31 ,



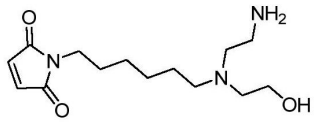
R4-32 ,



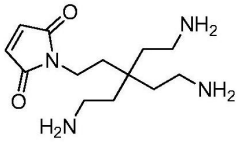
R4-33 ,



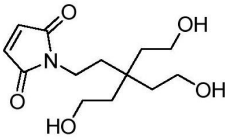
R4-34 ,



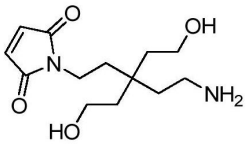
R4-35 ,



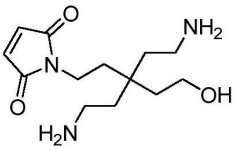
R4-36 ,



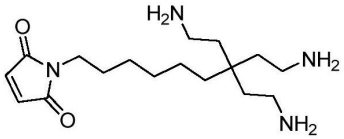
R4-37



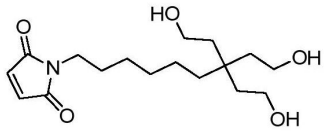
R4-38 ,



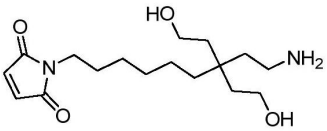
R4-38 ,



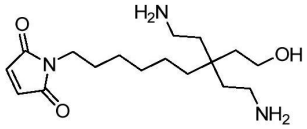
R4-39 ,

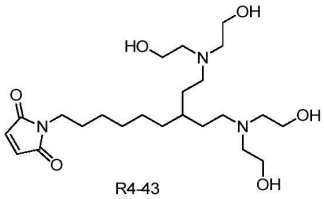


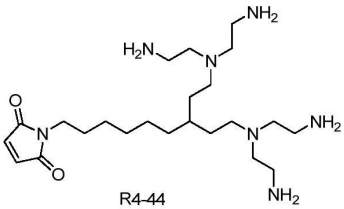
, R4-40 ,

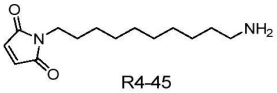


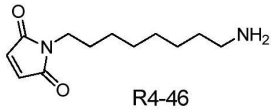
R4-41

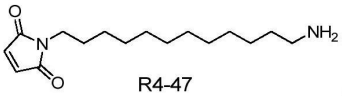

R4-42 ,

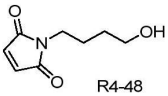

R4-43 ,

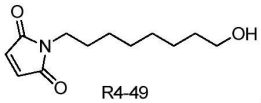

R4-44 ,

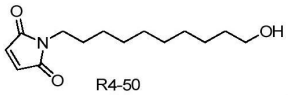

R4-45 ,

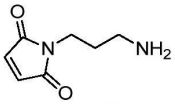

R4-46

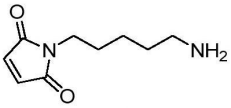

R4-47 ,

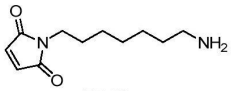

R4-48 ,

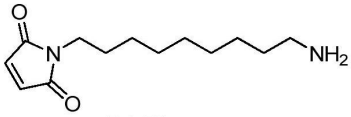

R4-49 ,

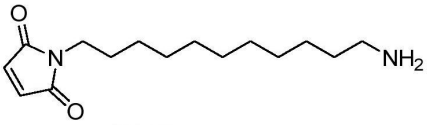

R4-50 ,

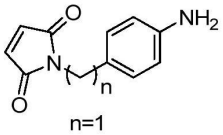

R4-51 ,


R4-52 ,

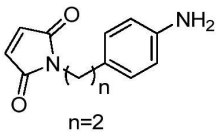

R4-53


R4-54 ,

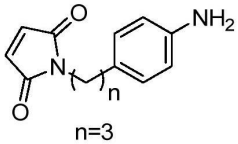

R4-55 ,


n=1

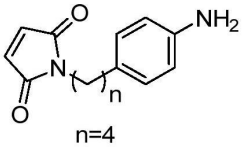
R4-56 ,


n=2

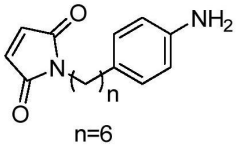
R4-57 ,


n=3

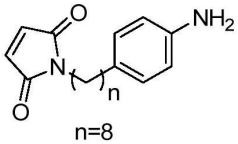
R4-58 ,


n=4

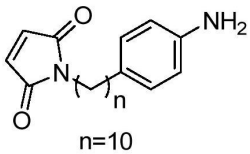
R4-59


n=6

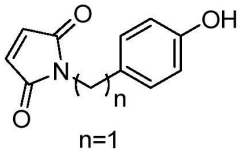
R4-60 ,


n=8

R4-61 ,


n=10

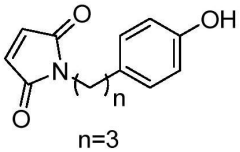
R4-62 ,


n=1

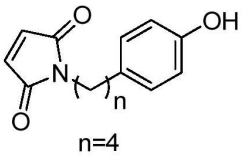
R4-63 ,


n=2

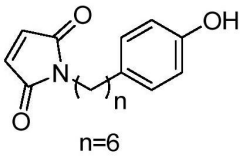
R4-64 ,


n=3

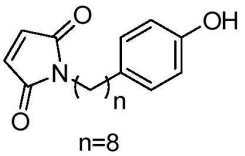
R4-65 ,



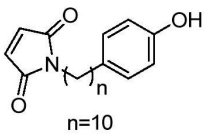
R4-66 ,



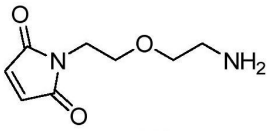
R4-67 ,



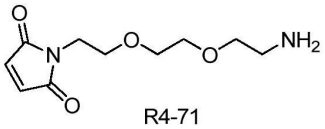
R4-68 ,



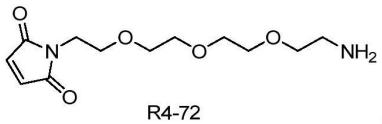
R4-69 ,



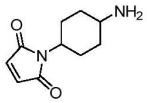
R4-70 ,



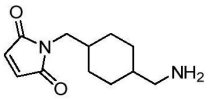
R4-71



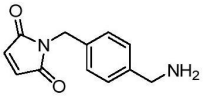
R4-72 ,



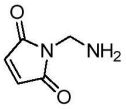
R4-73 ,



R4-74 ,



R4-75 ,



R4-76 。

14.根据权利要求1所述的生物分子的偶联物,其中R5是其一个或多个氨基酸突变为半胱氨酸的蛋白质,并且R5通过半胱氨酸的硫醇基团与R4连接;优选地,R5是其一个或多个氨基酸突变为半胱氨酸的抗体。

15.根据权利要求1所述的生物分子的偶联物,其中R5是抗体,并且所述突变位于抗体分子的可变区的非互补决定区中;优选地,生物分子的偶联物最终通过偶联获得的分子量增加超过200。

16.根据权利要求14的生物分子的偶联物,其中R5代表细胞因子,其蛋白质序列中的一个或多个氨基酸突变为半胱氨酸。

17.根据权利要求14的生物分子的偶联物,其中R5代表在抗体分子的可变区的互补决定区中具有一个或多个突变的抗体,优选地,R5代表具有选定的一个或多个氨基酸残基的抗体;选自由突变为半胱氨酸的互补决定区中的G,A,S,T,L,I,F,E,K,D和Y组成的组。

18.根据权利要求14的生物分子的偶联物,其中R5代表在抗体可变区的非互补决定区中具有一个或多个突变的抗体,优选地,R5代表具有一个或多个氨基酸残基的抗体,所述氨基酸残基选自由G,A,S,T,L,I,F,E,K,D和Y组成的非互补决定区,其突变为半胱氨酸。

19.根据权利要求16所述的生物分子的偶联物,其中所述生物分子是具有一个或多个选自G,A,S,T,L,I,F,E,K,D和Y的氨基酸残基突变为半胱氨酸的细胞因子。

20.根据权利要求14所述的生物分子的偶联物,其中R5代表在所述抗体的可变区的非互补决定区中具有一个或多个突变的抗体,优选地,在VH的非互补决定区中具有Gln3,Ser7,Ser26,Glu46,Thr68,Asp72和在VL的非互补决定区中的Thr5,Tyr49,Arg61,Ser63,Ser65,Ser67,Thr72,Thr74,Ser76,Asp82中的一种或多种突变为半胱氨酸。

21.根据权利要求14所述的生物分子的偶联物,其中在突变之前,R5对应于选自IL-2,IL-7,IL-10,IL-11,IL-12,IL-15,IL-21,IFN-α,IFN-β,IFN-γ,G-CSF,GM-CSF,TNF-α,TRAP和TRAIL的生物分子;

R5对应于选自抗Her2抗体,抗EGFR抗体,抗VEGFR抗体,抗CD20抗体,抗CD33抗体,抗PD-L1抗体,抗PD-1抗体,抗CTLA-4抗体,抗TNFα抗体,抗CD28抗体,抗4-1BB抗体,抗OX40抗体,抗GITR抗体,抗CD27抗体,抗CD40抗体或抗ICOS抗体,抗CD25抗体,抗CD30抗体抗体,抗CD3抗体,抗CD22抗体,抗CCR4抗体,抗CD38抗体,抗CD52抗体,抗补体C5抗体,RSV的抗F蛋白,抗GD2抗体,抗GITR抗体,抗糖蛋白受体lib/Illa抗体,抗ICOS抗体,抗IL2R抗体,抗LAG3抗体,抗整合素α4抗体,抗lgE抗体,抗PDGFRa抗体,抗RANKL抗体,抗SLAMF7抗体,抗LTIGIT抗体,抗TIM-3抗体,抗VEGFR2抗体,抗VISTA抗体的抗体或其功能片段;

R5对应于选自下组的抗体或其功能片段:Utomilumab,Urelumab,ADG106,Poteligeo TM(Mogamulizumab),Poteligeo TM(Mogamulizumab),Bexxar TM(tositumomab),Zevalin TM(ibritumomab tiuxetan),Rituxan TM(利妥昔单抗)),Arzerra™(Ofatumumab),Gazyva™(Obinutuzumab),Besponsa™(Inotuzumab ozogamicin),Zenapax™(daclizumab),Varlilumab,Theralizumab,Adcetris™(Brentuximabvedotin),Myelotarg™(gemtuzumab),Darzalex™(Daratumumab),CDX-1140,SEA-CD40,RO7009789,JNJ-64457107,APX-005M,Chi Lob 7/4,Campath™(alemtuzumab),Raptiva™(efalizumab),Soliris™(依库丽单抗),Yervoy™(ipilimumab),tremelimumab,Erbitux™(西妥昔单抗),Vectibix™(帕尼单抗),Portrazza™(Necitumumab),TheraCIM™(尼妥珠单抗),Synagis™(帕利珠单抗),Unituxin™(Dinutuximab),TRX-518,MK-4166,MK-1248,GWN-323,INCAGN0186,BMS-986156,AMG-228,ReoPro™(abiciximab),Herceptin™(曲妥珠单抗),Perjeta™(Pertuzumab),Kadcyla™(Ado-trastuzumab emtansine),GSK-3359609,JTX-2011,Simulect™(巴利昔单抗),Tysabri™(那他珠单抗),BMS-986016,REGN3767,LAG525,Xolair TM(omalizumab),Tavolimab,PF-04518600,BMS-986178,MOXR-0916,GSK-3174998,INCAGN01949,IBI-101,Keytruda TM(Pembrolizumab),Opdivo TM(Nivolumab),Lartruvo TM(Olaratumab),Tencentriq™(Atezolizumab),BMS-936559,Bavencio™(Avelumab),Imfinzi™(Duralumab),Prolia™(Denosumab),Empliciti™(Elotuzumab),MTIG7192A,TSR-022,MBG-453,Remicade™(英夫利昔单抗),Humira TM(阿达木单抗),Avastin TM(贝伐单抗),Lucentis TM(雷珠单抗),Cyramza TM(Ramucirumab)和JNJ-61610588。

22.如权利要求21所述的生物分子的偶联物,其中:

IL2中的突变位置选自:Lys32,Lys35,Thr37,Met39,Thr41,Lys43,Tyr45,Lys48,Lys49,Lys64,Leu72,Ala73,Ser75,Lys76,Leu94,Thr101,Thr102,Tyr107,Ala108,Thr111,Ala112,Leu12,His16,Leu19,Met23,Gly27,Ser75,Arg81,Leu85,Ser87和Asn88;

IL10中的突变位置选自:Thr6,Ser8,Ser11,Thr13,Gly17,Arg24,Ser31,Arg32,Lys34,Thr35,Lys40,Leu46,Lys49,Ser51,Lys57,Gly58,Ser66,Tyr72,Lys88,His90,Ser93,Lys99,Thr100,Arg104,Lys117,Ser118,Lys119,Lys125,Lys130,Lys134,Gly135,Tyr137,Tyr149,Thr155,Lys157和Arg159;

抗PD-1抗体Pembrolizumab的重链中的突变位置选自:Ser7,Gly8,Gly15,Ala16,Ser17,Ala24,Ser25,Gly26,Tyr27,Thr28,Thr30,Asn31,Tyr32,Tyr33,Tyr35,Ala40,Gly42,Gly44,Leu45,Gly49,Gly50,Ile51,Asn52,Ser54,Asn55,Gly56,Gly57,Thr58,Asn59,Lys63,Lys65,Thr69,Leu70,Thr71,Thr72,Asp73,Ser74,Ser75,Thr76,Thr77,Thr78,Ala79,Leu83,Ser85,Leu86,Thr91,Ala92,Arg99,Asp100,Tyr101,Arg102,Asp104,

Gly106,Gly111,Gly113,Thr114,115Thr,117Thr,Ser119,Ser120,Ala121,Ser122,Thr123,Lys124,Gly125和Ser127;轻链中的突变位置选自:Ile2,Thr5,Ser7,Ala9,Thr10,Leu11,Ser12,Leu13,Ser14,Gly16,Ala19,Thr20,Ala25,Ser26,Lys27,Gly28,Ser30,Thr31,Ser32,Gly33,Tyr34,Ser35,Tyr36,Leu37,Gly45,Ala47,Leu50,Leu51,Ile52,Tyr53,Leu54,Ala55,Ser56,Tyr57,Leu58,Ser60,Gly61,Ala64,Ser67,Gly68,Ser69,Gly70,Ser71,Gly72,Thr73,Ala76,Thr78,Ser80,Ser81,Ser95,Arg96,Asp97,Leu98,Leu100,Thr101,Phe102,Gly104,Ile110,Lys111和K130;

抗PD-1抗体Nivolumab的重链中的突变位置选自:Gln3,Ser7,Gly8,Gly9,Gly10,Gly15,Ser17,Lys23,Ala24,Ser25,Gly26,Ile27,Asn31,Thr28,Ser30,Ser32,Gly33,Ala40,Gly42,Gly44,Leu45,Ala49,Ile51,Tyr53,Asp54,Gly55,Ser56,Lys57,Tyr59,Tyr60,Ala61,Asp62,Ser63,Lys65,Gly66,Thr69,Ile70,Ser71,Arg72,Asp73,Asn74,Ser75,Lys76,Asn77,Thr78,Leu79,Leu81,Ser85,Leu86,Ala88,Thr91,Ala92,Thr98,Asn99,Asp100,Asp101,Tyr102,Gly104,Gly106,Thr107,Leu108,Thr110,Ser112,Ser113,Ala114,Ser115,Thr116,Lys117,Gly118和Ser120;轻链中的突变位置选自:Ile2,Leu4,Thr5,Ser7,Ala9,Thr10,Leu11,Ser12,Leu13,Ser14,Gly16,Ala19,Thr20,Leu21,Ala25,Ser26,Ser28,Ser30,Ser31,Tyr32,Leu33,Ala34,Tyr36,Gly41,Ala43,Leu46,Leu47,Ile48,Tyr49,Asp50,Ala51,Ser52,Asn53,Arg54,Ala55,Thr56,Gly57,Ile58,Ala60,Arg61,Ser63,Gly64,Ser65,Gly66,Ser67,Gly68,Thr69,Thr72,Leu73,Thr74,Ile75,Ser76,Ser77,Leu78,Ala84,Ser91,Ser92,Asn93,Arg96,Thr97,Phe98,Gly99,Gly101,Thr102,Ile106,Lys107,Thr109,Ala111,Ala112,Ser114,Ile117和Ser121;

抗-CTLA-4抗体Ipilimumab的重链中的突变位置选自:Gln3,Arg19,Leu20,Ser25,Gly26,Phe27,Thr28,Phe29,Ser30,Ser31,Tyr32,Thr33,Met34,His35,Gly44,Phe50,Ile51,Ser52,Tyr53,Asp54,Gly55,Asn56,Asn57,Lys58,Tyr59,Tyr60,Thr69,Ser71,Arg72,Asp73,Asn74,Ser75,Lys76,Asn77,Thr99,Gly100,Trp101,Leu102,Gly103和Pro104;轻链中的突变位置选自:Gln6,Arg24,Ala25,Ser26,Gln27,Ser28,Val29,Gly30,Ser31,Ser32,Tyr33,Ile49,Tyr50,Gly51,Ala52,Phe53,Ser54,Arg55,Ala56,Phe53,Ser54,Arg55,Ala56,Thr57,Gly58,Ile59,Pro60,Asp61,Arg62,Ser68,Gly69,Thr70,Gln90,Gln91,Tyr92,Gly93,Ser94,Ser95,Pro96和Trp97;

抗TNFα抗体重链中的突变位置选自:Ser7,Gly8,Gly9,Gly10,Leu11,Gly15,Ser17,Leu18,Leu20,Ala24,Ser25,Gly26,Thr28,Asp30,Asp31,Tyr32,Ala33,Ala40,Gly42,Gly44,Leu45,Ser49,Ala50,Ile51,Thr52,Asn54,Ser55,Gly56,Ile58,Asp59,Tyr60,Ala61,Asp62,Ser63,Glu65,Gly66,Phe68,Thr69,Ile70,Ser71,Asp73,Asn74,Ala75,Lys76,Ser78,Leu79,Tyr80,Leu81,Ser85,Leu86,Ala88,Thr91,Ala92,Lys98,Ser100,Tyr101,Leu102,Ser103,Thr104,Ala105,Ser106,Ser107,Leu108,Asp109,Tyr110,Gly112,Gly114,Thr115,Leu116,thr118,Ser120,Ser121,Ala122,Ser123和Thr124;轻链中的突变位置选自:Asp1,Thr5,Ser7,Ser9,Ser10,Leu11,Ser12,Ala13,Ser14,Gly16,Thr20,Ile21,Ala25,Ser26,Gln27,Gly28,Ile29,Arg30,Asn31,Tyr32,Leu33,Ala34,Tyr36,Lys39,Gly41,Lys42,Ala43,Leu48,Leu47,Ile48,Tyr49,Ala50,Ala51,Ser52,Thr53,Leu54,Gln55,Ser56,Gly57,Ser60,Ser63,Gly64,Ser65,Gly66,Ser67,Gly68,Thr69,Asp70,

Thr72,Leu73,Thr74,Ile75,Ser76,Ser77,Leu78,Ala84,Thr85,Tyr91,Asn92,Arg93,Ala94,Tyr96,Thr97,Phe98,Gly99,Gly101,Thr102,Ile106,Lys107,Thr109和Ala111;

抗CD28抗体重链中的突变位置选自:Ser7,Gly8,Gly15,Ala16,Ser17,Ser21,Ala24,Ser25,Gly26,Tyr27,Thr28,Thr30,Ser31,Tyr32,Ala40,Gly42,Gly44,Gly49,Tyr52,Gly54,Thr58,Ala68,Thr69,Thr71,Thr74,Ser75,Ser77,Thr78,Ala79,Ser84,Leu86,Ser88,Thr91,Ala92,Thr97,Ser99,Tyr101,Gly102,Leu103,Gly113,Thr114,Thr115,Thr117,Ser119,Ser120,Ala121,Ser122和Thr123;轻链中的突变位置选自:Thr5,Ser7,Ser9,Ser10,Ser11,Ser12,Ala13,Ser14,Gly16,Thr20,Thr22,Ala25,Ser26,Ser27,Ile29,Tyr30,Ala43,Leu46,Leu47,Tyr49,Lys50,Ala51,Ser52,Leu54,Thr56,Gly57,Ser60,Ser63,Gly64,Ser65,Gly66,Ser67,Gly68,Thr69,Asp70,Thr72,Thr74,Ser76,Ser77,Ala84,Thr85,Gly91,Thr93,Tyr94,Tyr96,Thr97,Phe98,Gly99,Gly100,Gly101,Thr102,Thr109和Ala111;

抗-4-1BB抗体重链中的突变位置选自:Thr31,Tyr32,Ser35,Lys50,Tyr52,Asp55,Ser56,Tyr57,Thr58,Asn59,Tyr60,Ser61,Gln65,Gly66,Gly99,Tyr100,Gly101,Asp104和Tyr105;轻链中的突变位置选自:Ser23,Gly24,Asp25,Asn26,Gly28,Asp29,Gln30,Tyr31,Gln49,Asp50,Lys51,Asn52,Arg53,Ser55,Gly56,Thr89,Tyr90,Thr91,Gly92,Gly94和Ser95;

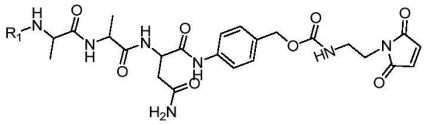
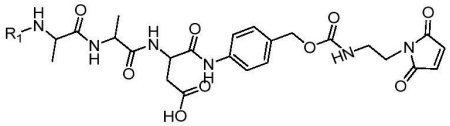
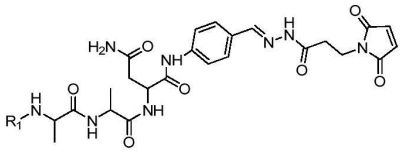
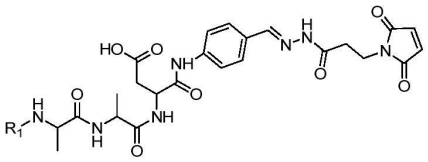
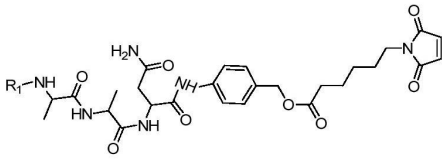
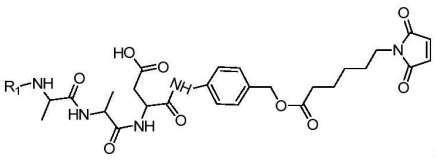
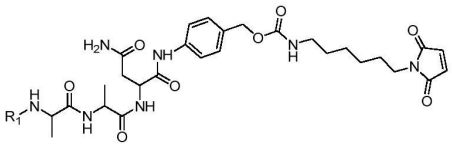
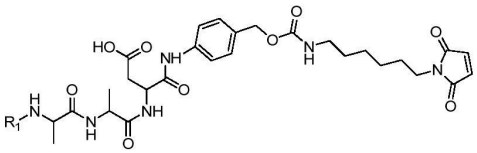
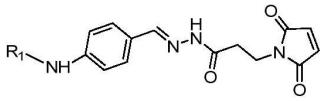
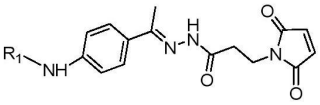
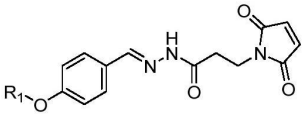
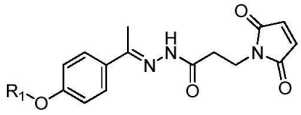
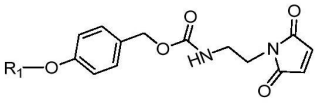
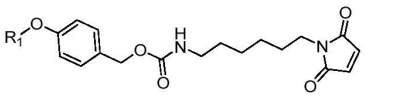
抗Her2抗体重链中的突变位置选自:Arg19,Lys30,Asp31,Tyr33,Arg50,Tyr62,Asn55,Tyr57,Arg59,Tyr60,Asp62,Lys65,Asp102和Tyr105;轻链中的突变位置选自:Asp1,Gln3,Gln27,Asp28,Asn30,Tyr49,Tyr55,Arg66,Asp70和Tyr92;

抗PD-L1抗体Atezolizumab的重链中的突变位置选自:Gln3,Asp31,Tyr54,Tyr59,Tyr60,Asp62,Lys65,Asp73,Lys76,Asn77和Arg99;轻链中的突变位置选自:Arg24,Gln27,Asp28,Tyr49,Tyr55,Asp70,Gln89,Gln90,Tyr91和Tyr93。

23.根据权利要求1所述的生物分子的偶联物,其中R5是含有一个或多个突变为半胱氨酸的氨基酸残基的融合蛋白;优选地,融合蛋白含有抗体的抗原结合结构域和可选的细胞因子;优选地,融合蛋白是双特异性抗体,其含有与选自HER2,CD19,EGFR,CD22,CD3,TROP2,糖蛋白NMB,鸟苷酸环化酶C,CEA,CD79b,PSMA,ENPP3,间皮素,CD138,NaPi2b,CD56,CD74,FOLR1,DLL3,CEACAM5,CD142,SLAMF7,CD25,SLTRK6,CD37,CD70,AGS-22,C4.4A,FGFR2,Ly6E,MUC16,BCMA,pCadherin,Ephrin-A,LAMP1,MUC1,CD19,PDL1,HER2,NY-ESO-1,BCMA,WT1,MUC1,CD20,CD23,ROR1,CD123,CD33,CD44v6,CD174,CD30,CD133,cMet,EGFR,FAP,EphA2,GD2,GPC3,IL-13Ra2,LewisY,间皮素,SS1,CEA,CD171,EGFR,EGFRvIII,VEGFR2,NY-ESO-1,MUC-1和MAGE-A3的抗原结合结构域;优选地,双特异性抗体是单链双特异性抗体;

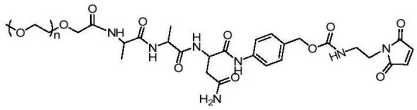
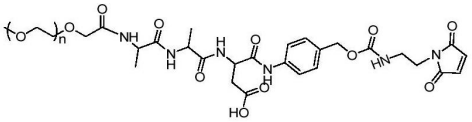
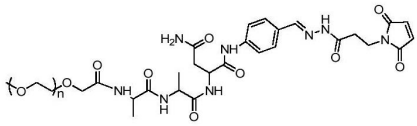
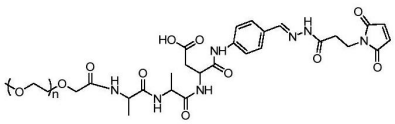
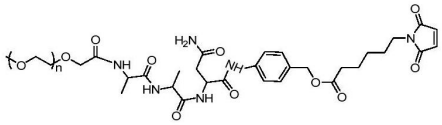
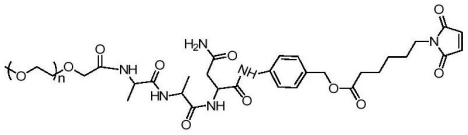
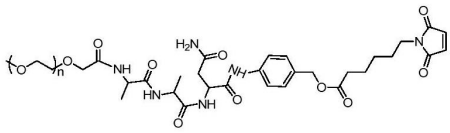
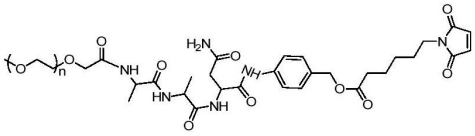
优选地,融合蛋白含有抗体的抗原结合结构域和一个选自IL-2,IL-7,IL-10,IL-11,IL-12,IL-15,IL-21,IFN-α,IFN-β,IFN-γ,G-CSF,GM-CSF,TNF-α,TRAP和TRAIL的细胞因子;优选地,融合蛋白是抗PD-1抗体和IL2的融合蛋白。

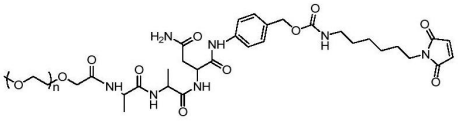
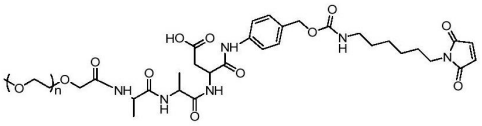
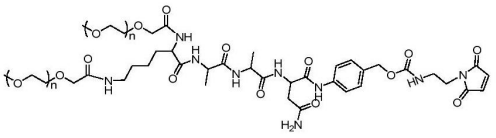
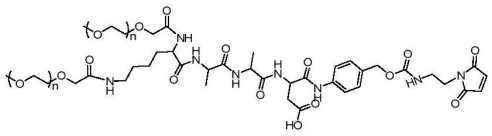
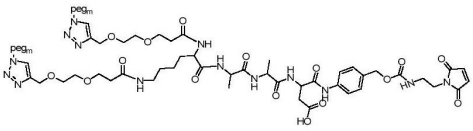
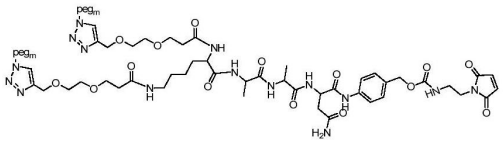
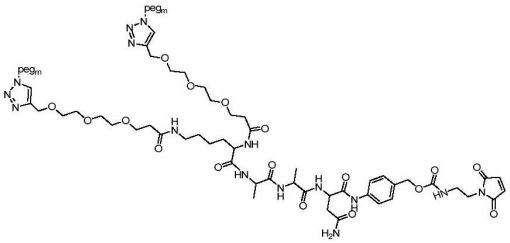
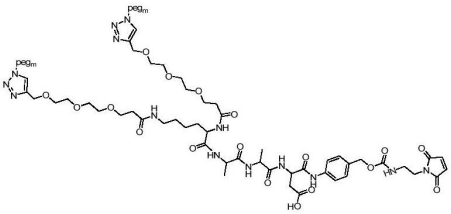
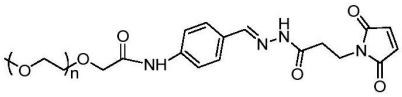
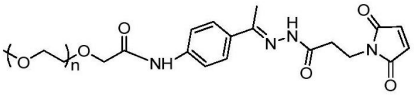
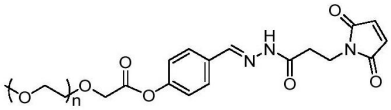
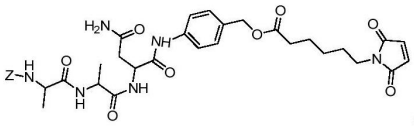
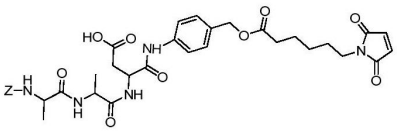
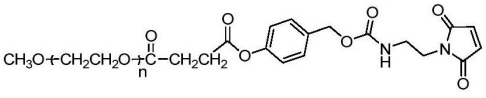
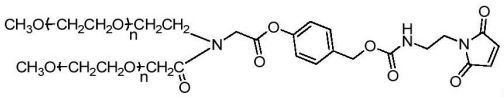
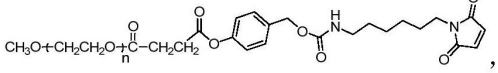
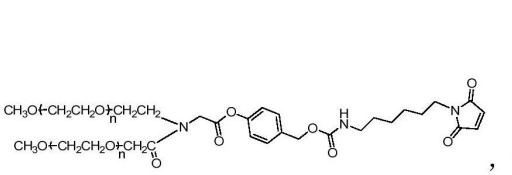
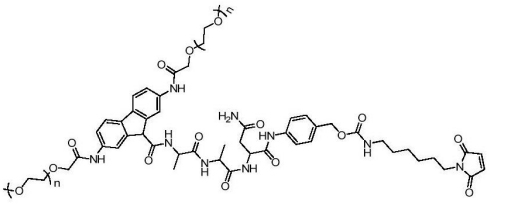
24.根据权利要求1所述的生物分子的偶联物,其中R1-R2-R3-R4可以由以下任何结构表示:


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

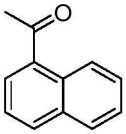
其中R1如权利要求2或3中所定义。

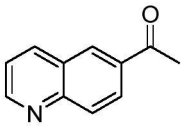
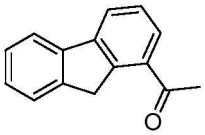
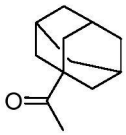
25.根据权利要求1所述的生物分子的偶联物,其中R1-R2-R3-R4由以下任何结构表示：


,

,

,

,

,

,

,

,

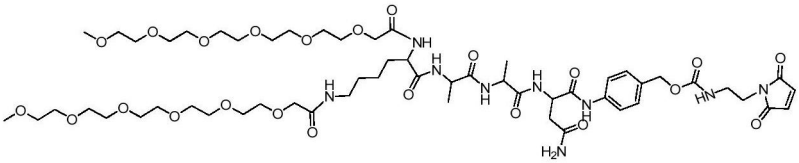

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

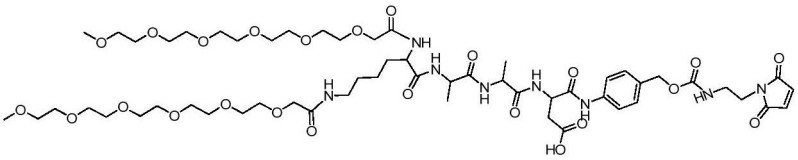
其中peg$_m$是分子量为44-132000的聚乙二醇，例如分子量为1000-50000或10000-30000的聚乙二醇，m代表聚乙二醇的分子量；n为1-30000的整数，例如1-3000，1-500，1-300，1-20或5-12的整数；Z是含有羰基取代基的萘基，喹啉基，芴基或金刚烷基，Z通过其羰基与氨基连接；优选地，Z选自：

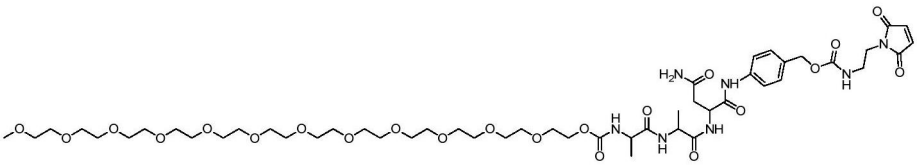

,

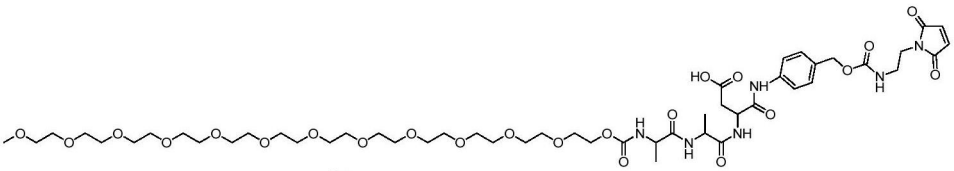
,

,

,

。

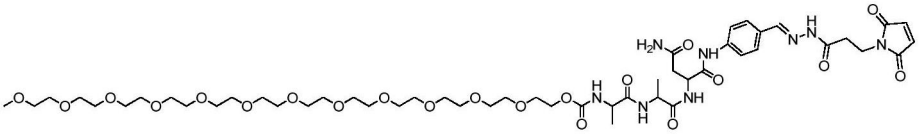
26.根据权利要求1所述的生物分子的偶联物,其中在生物分子的偶联物中,R1-R2-R3-R4选自：

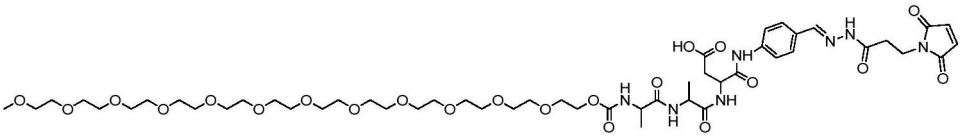

S1
,

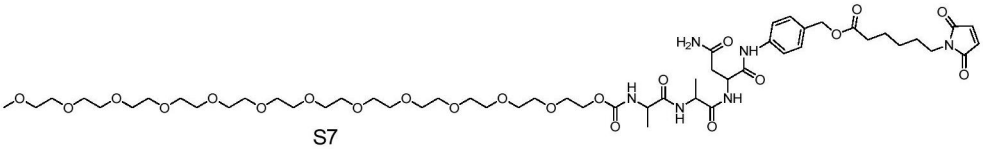

S2
,

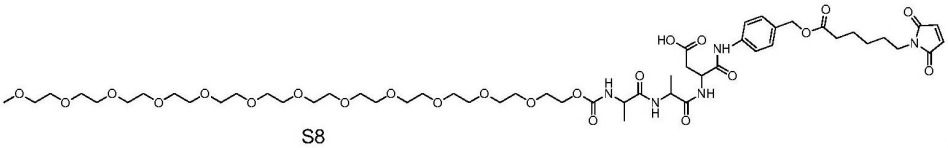

S3
,


S4
,

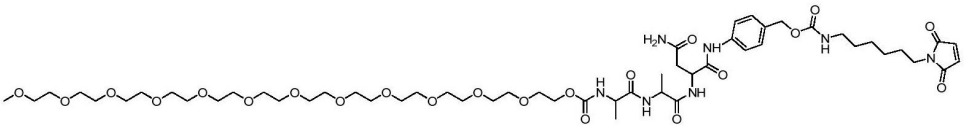

S5
,


S6
,

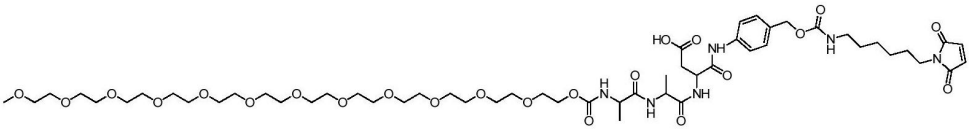

S7



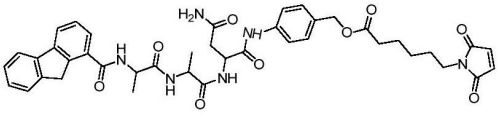
S8 ,



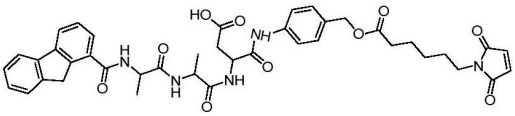
S9 ,



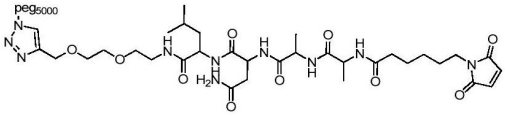
S10 ,



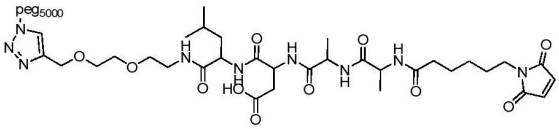
S11 ,



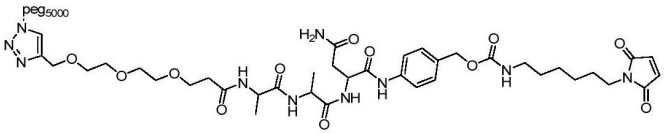
S12 ,



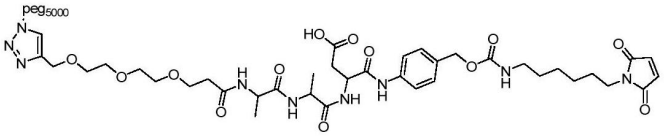
S13 ,



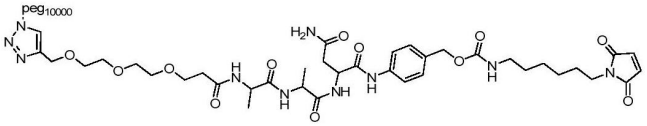
S14 ,



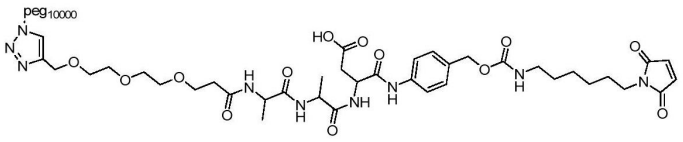
S15 ,



S16 ,

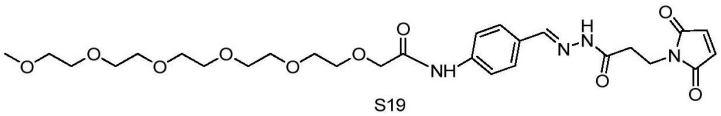


S17 ,



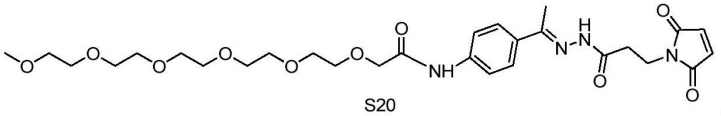
S18

,



S19

,

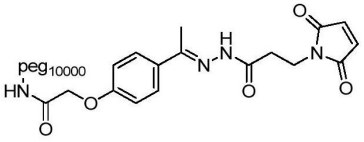


S20

,

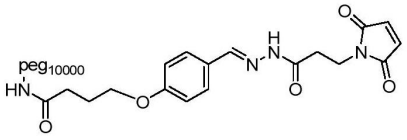
S21

,



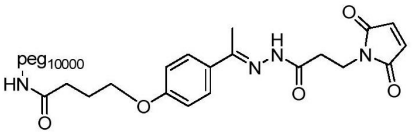
S22

,



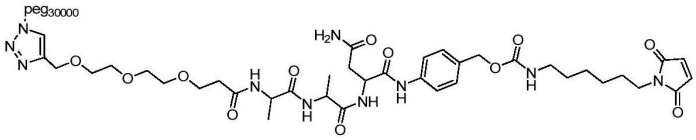
S23

,



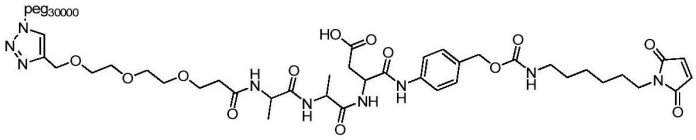
S24

,



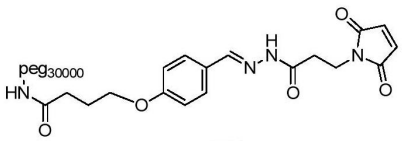
S25

,



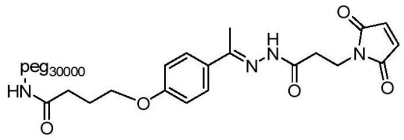
S26

,



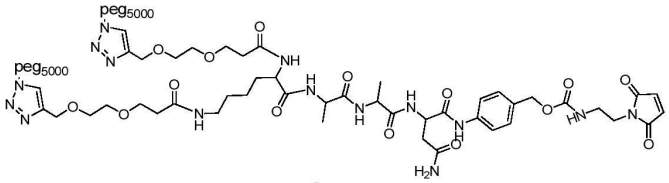
S27

,

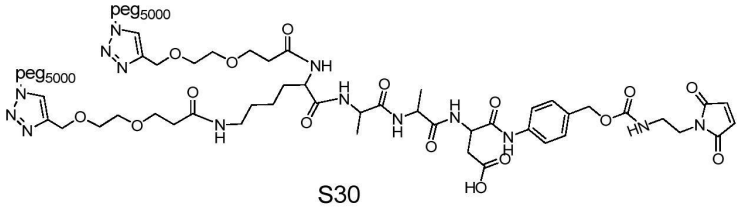


S28

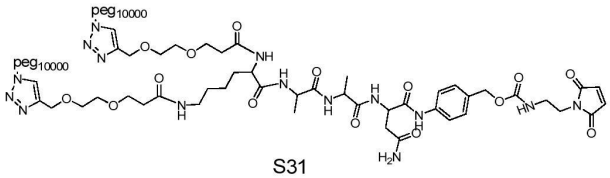
,



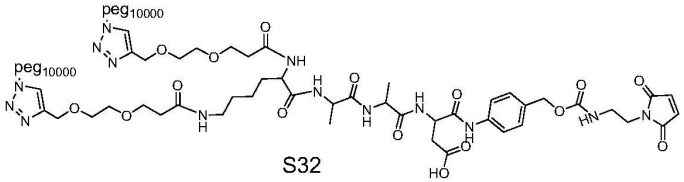
S29 ,



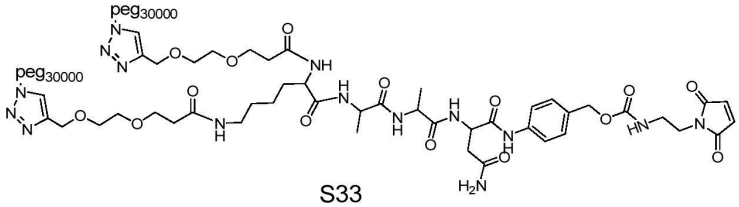
S30 ,



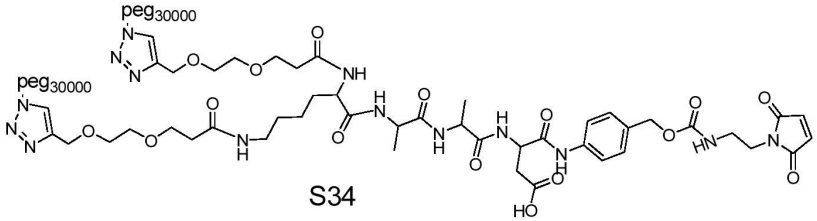
S31 ,



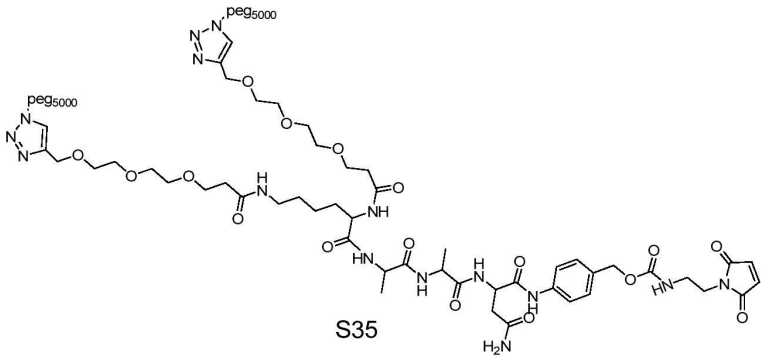
S32 ,



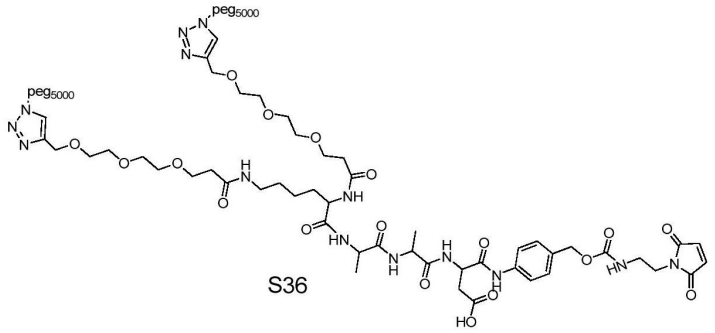
S33 ,



S34 ,

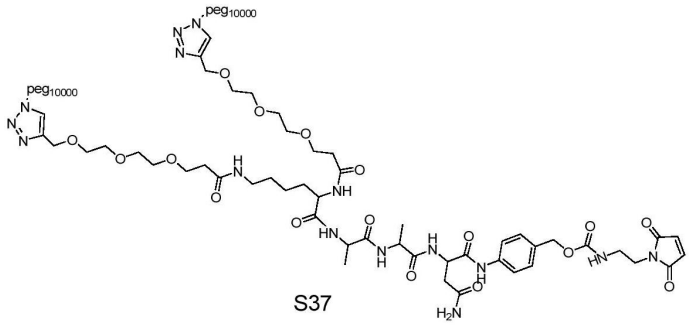


S35 ,



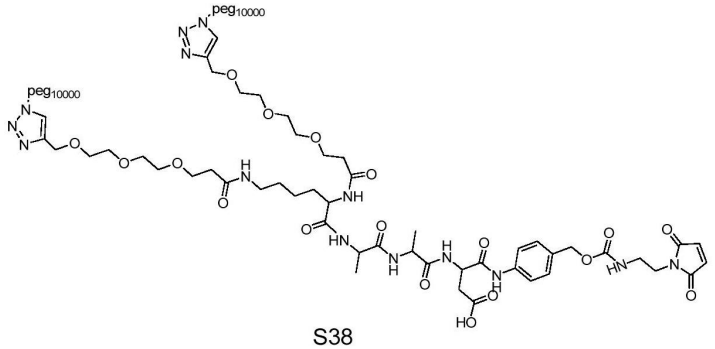
S36

,

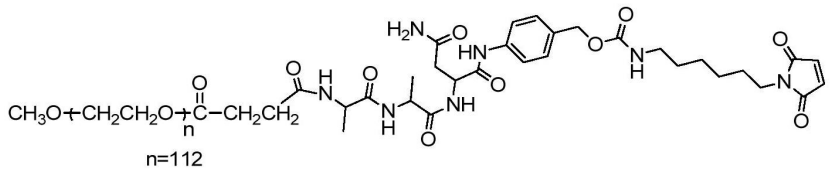


S37

,

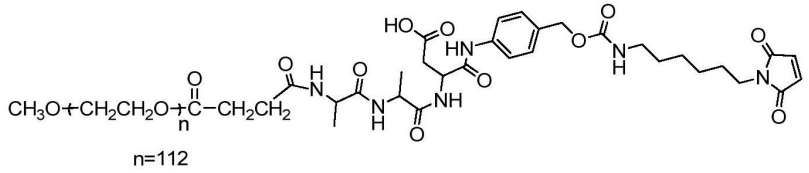


S38



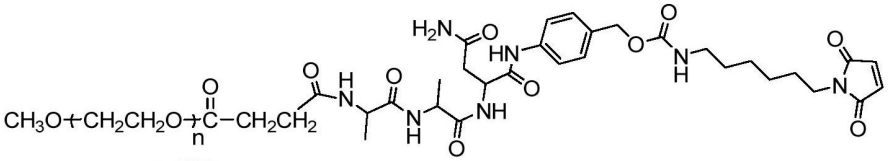
S39

,



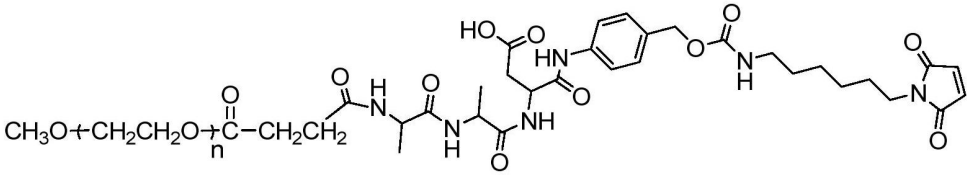
S40

,



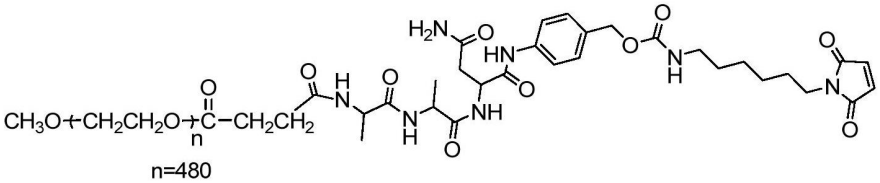
n=232

S41 ,



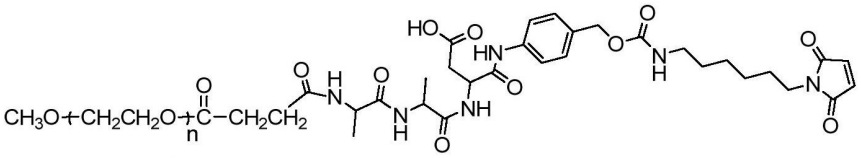
n=232

S42 ,



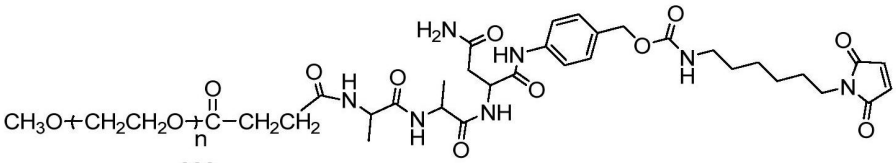
n=480

S43 ,



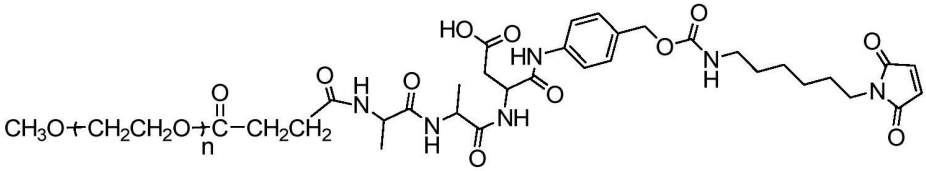
n=480

S44 ,



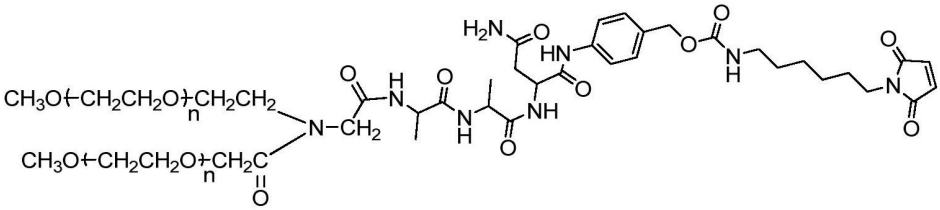
n=930

S45 ,

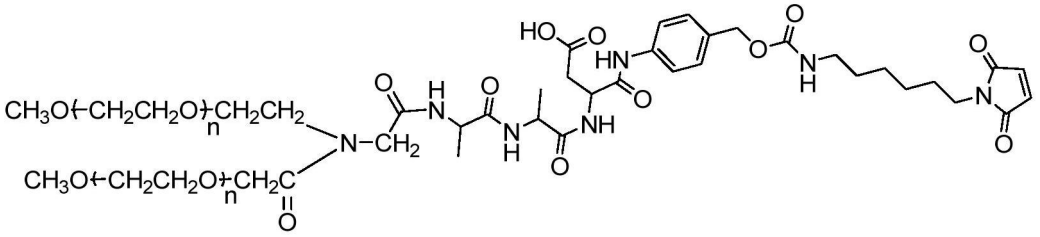


n=930

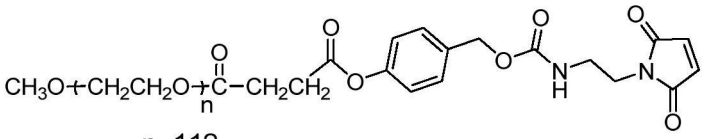
S46 ,



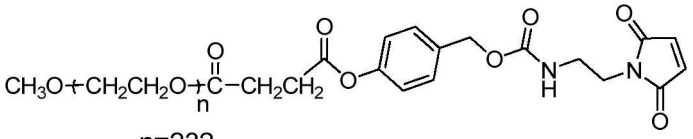
n=528 S47 ,



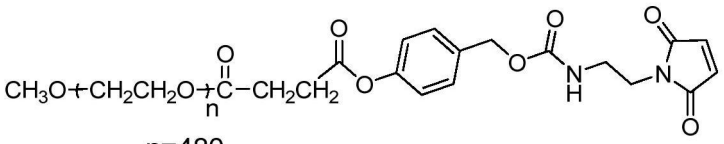
n=528 S48 ,



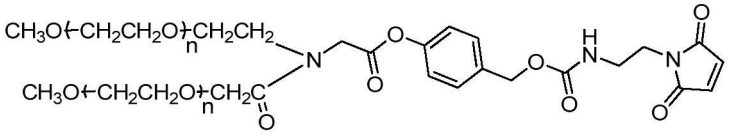
n=112 S49 ,



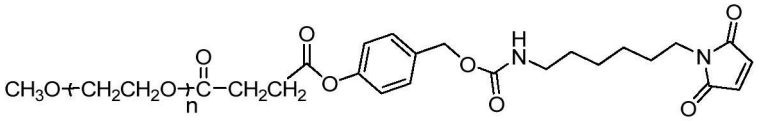
n=232 S50 ,



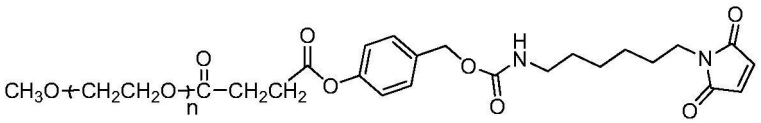
n=480 S51 ,



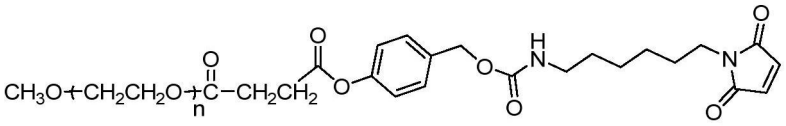
n=528 S52 ,



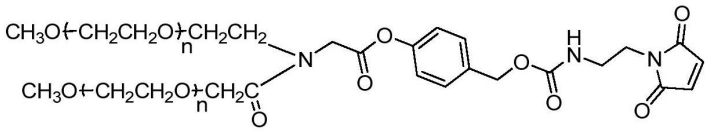
n=112 S53 ,



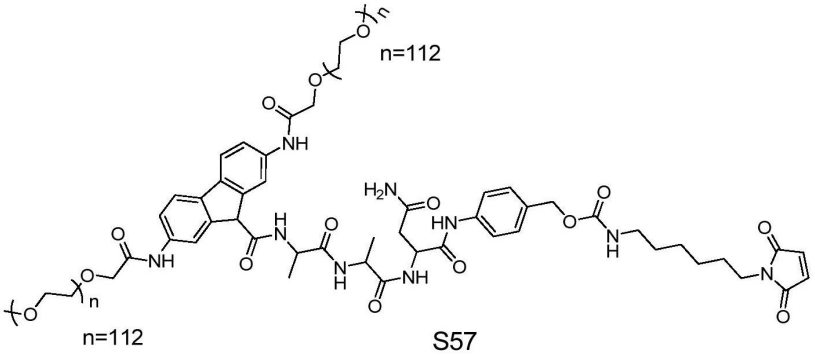
n=232 S54 ,



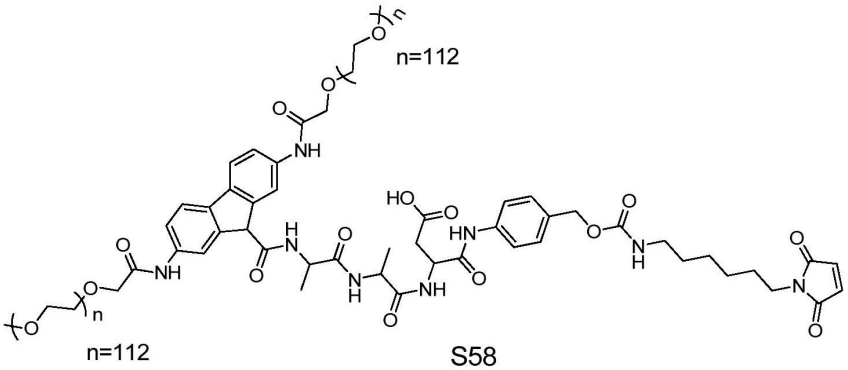
n=480 S55 ,



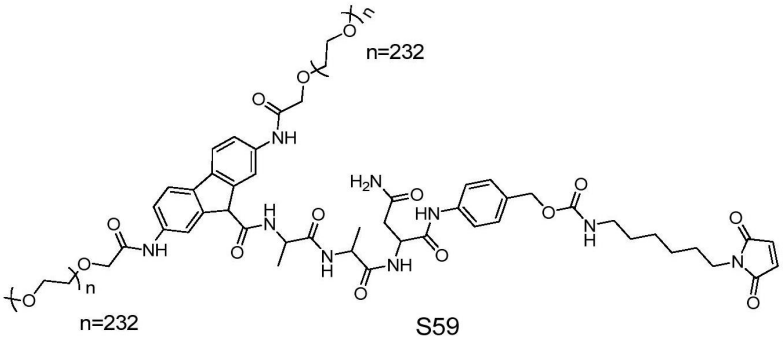
S56 ,



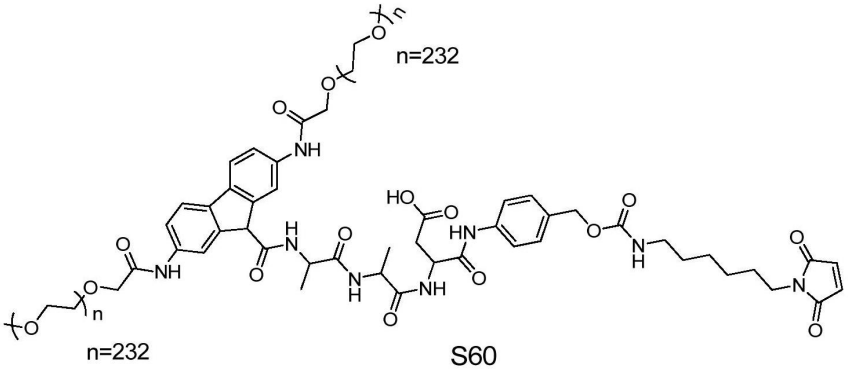
S57 ,



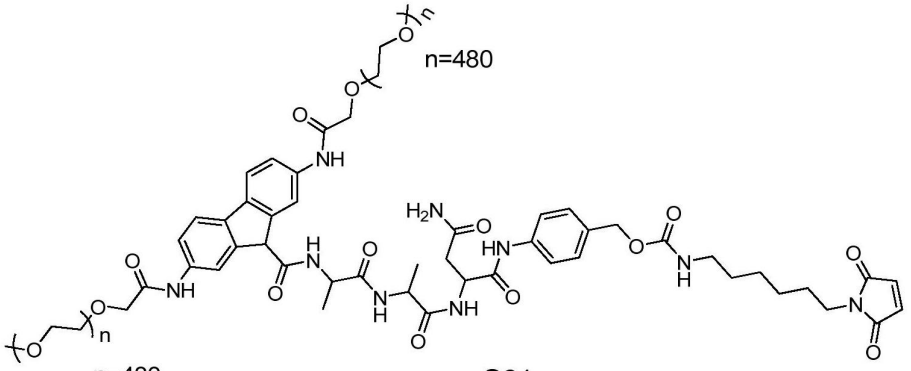
S58 ,



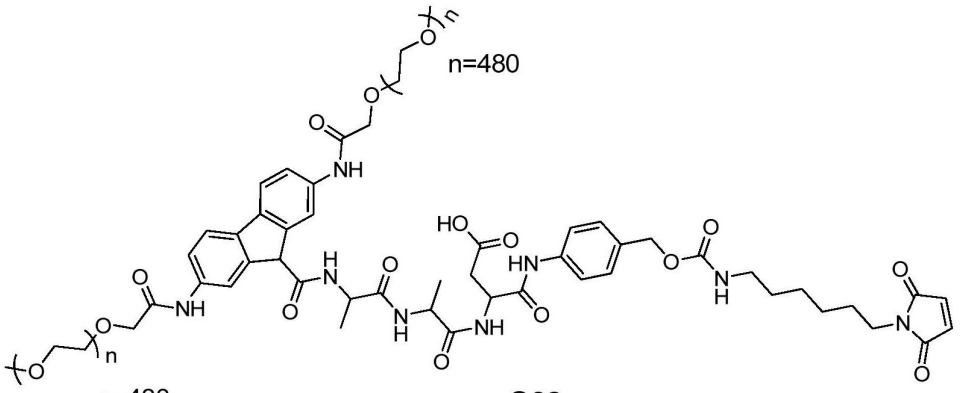
S59 ,



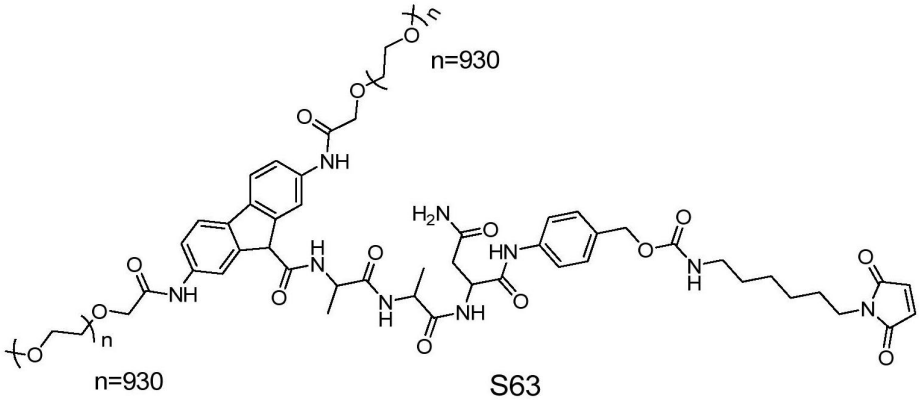
S60 ,



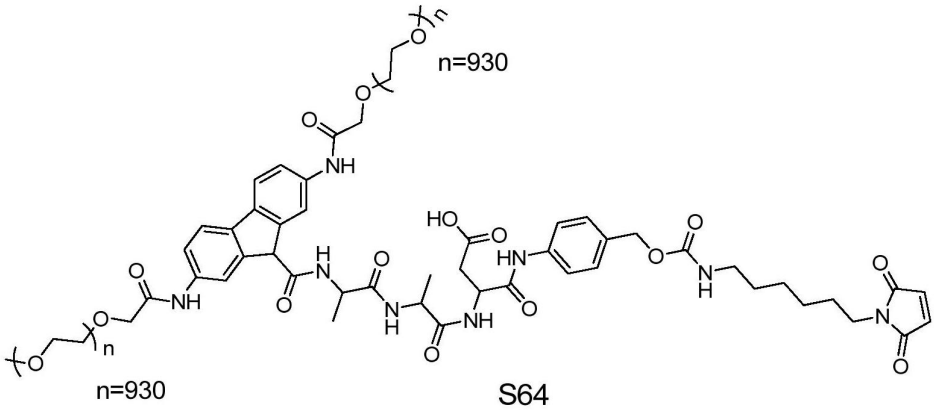
S61，



S62，



S63，

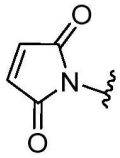
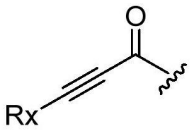
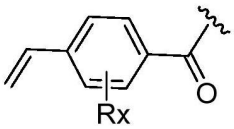
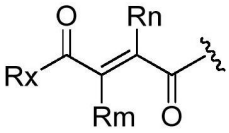
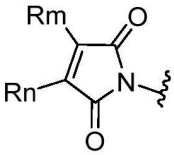


S64。

27.一个偶联物有以下结构：

R4-S-Cys-R5

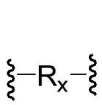
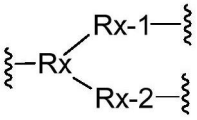
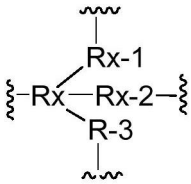
其中，R4由-R4-a-R4-b-R4-c表示，其中R4-a选自：

R_{4a-1} , R4a-2 , R4a-3 , R4a-4 , R4a-5

其中Ra和Rb各自独立地选自H和C1-6烷基或C1-6烷氧基；

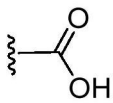
R4-b选自：

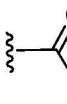
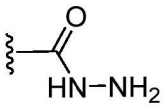




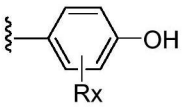
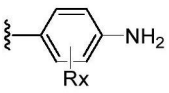
R_{4b-1} , R_{4b-2} , R4b-3

其中在式R_{4-b1}中，R_c不存在，或选自C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷氧基-C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷基-C_{3-8}环烷基，(C_{1-4}烷基-O)p-C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷基羰基氨基-(C_{1-4}烷基-O)p-C_{1-12}烷基，苯基-C_{1-12}烷基，C_{3-8}环烷基，C_{1-12}烷基-C_{3-8}环烷基-C_{1-12}烷基和C_{1-12}烷基-苯基-C_{1-12}烷基；在式R_{4-b2}中，R_c是C_{1-12}烷基氨基，其中R_{a-1}和Ra-2在氨基的N原子上被取代，并且在式4-b3中，Rc是C_{1-12}烷基，最后的C原子在末端烷基被Ra-1，Ra-2和R_{a-3}取代，其中R_{a-1}，R_{a-2}和R_{a-3}各自独立地选自C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷基-OH和C_{1-12}烷基-NR"R"'，其中R"和R"'各自独立地选自H和C_{1-12}烷基；其中，在式R_{4-b2}和R_{4-b3}中，R_{4-b}通过R_{a-1}，R_{a-2}和R_{a-3}中的至少一个与R_{4-c}连接；

R4-c选自：



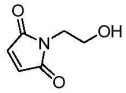
R_{4c-1} , R_{4c-2} , R_{4c-3} , R_{4c-4} , R_{4c-5} , R_{4c-6} , R_{4c-7}

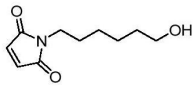
其中R_x选自H，卤素和C_{1-4}烷基；p是1至10的整数，例如1至5的整数；q为1-4的整数，例如1-2的整数；当R_{4-a}选自式R_{4-a2}，R_{4-a3}和R_{4-a4}时，R_{4-c}不存在；

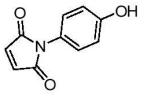
其中R3通过R4的R4-c连接到R4，并且R4-a的每个式中所示的波浪线表示R4-a与R4-b连接的位置。

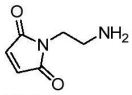
28.根据权利要求27的化合物，其中R4选自：

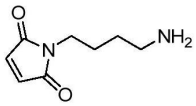

R4-1 ,

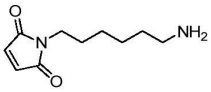

R4-2 ,

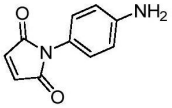

R4-3 ,

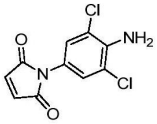

R4-4 ,

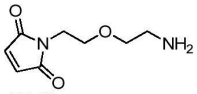

R4-5 ,

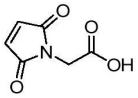

R4-6 ,

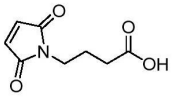

R4-7 ,

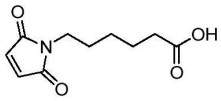

R4-8 ,

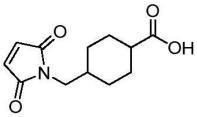

R4-9 ,

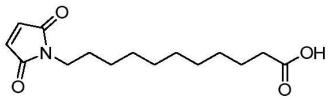

R4-10 ,

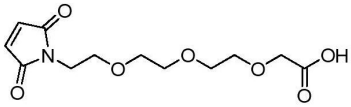

R4-11 ,

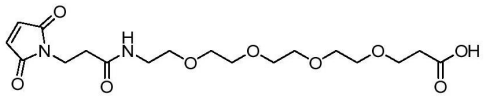

R4-12 ,

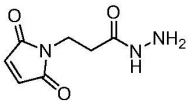

R4-13 ,

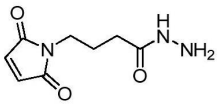

R4-14 ,

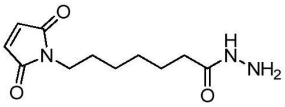

R4-15 ,

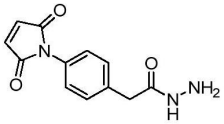

R4-16 ,

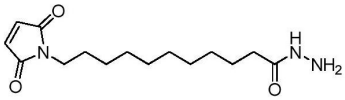

R4-17 ,

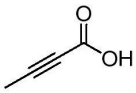

R4-18 ,

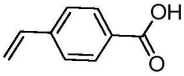

R4-19 ,

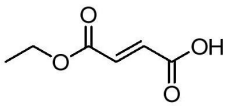

R4-20 ,

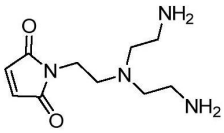

R4-21 ,

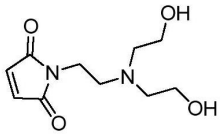

R4-22 ,

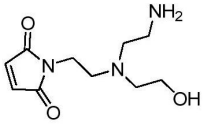

R4-23 ,

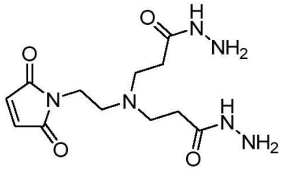

R4-24 ,

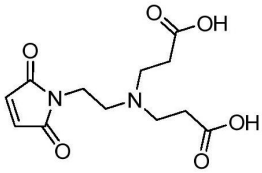

R4-25

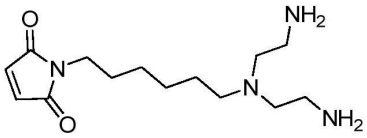

R4-26 ,

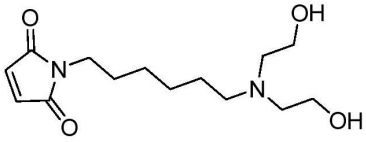

R4-27 ,

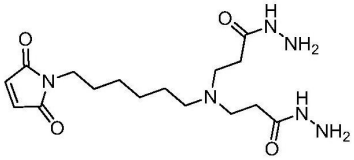

R4-28 ,

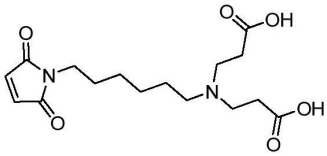

R4-29

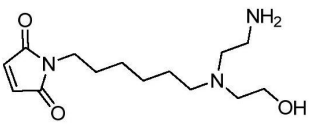

R4-30 ,

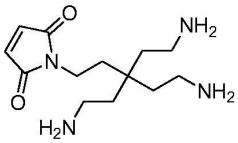

R4-31 ,

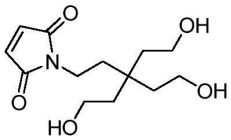

R4-32 ,

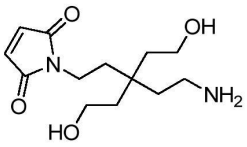

R4-33 ,

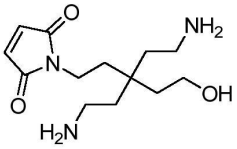

R4-34 ,

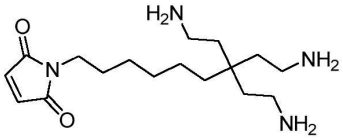

R4-35 ,

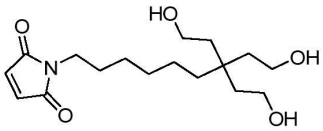

R4-36 ,

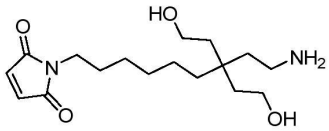

R4-37 ,

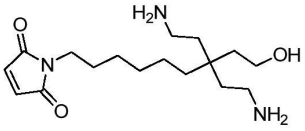

R4-38 ,

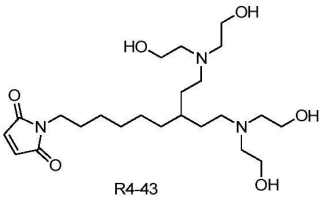

R4-38 ,

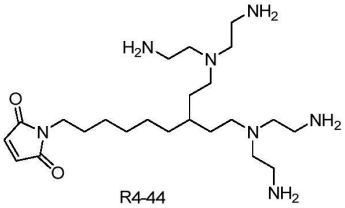

R4-39 ,

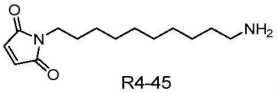

R4-40 ,

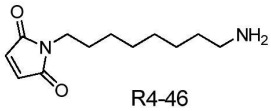

R4-41 ,

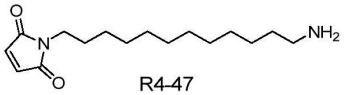

R4-42 ,

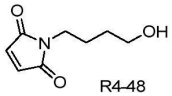

R4-43 ,

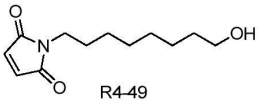

R4-44 ,

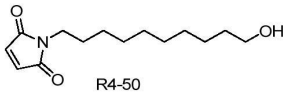

R4-45 ,

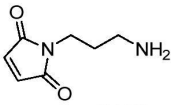

R4-46 ,

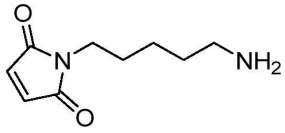

R4-47 ,

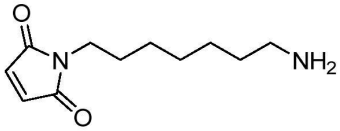

R4-48 ,

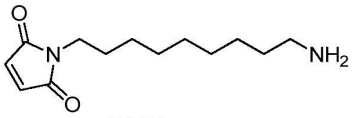

R4-49 ,

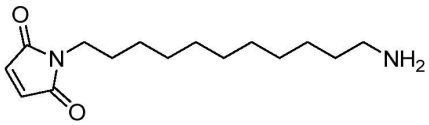

R4-50 ,

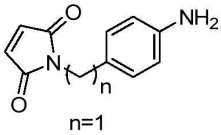

R4-51 ,

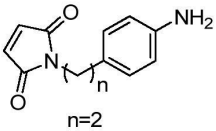

R4-52 ,

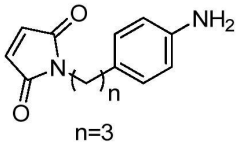

R4-53 ,

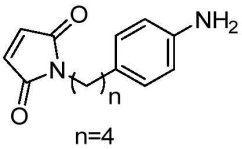

R4-54 ,

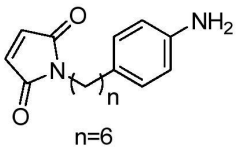

R4-55 ,

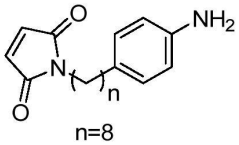

n=1
R4-56 ,

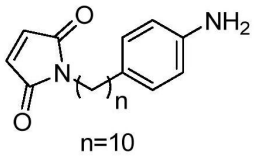
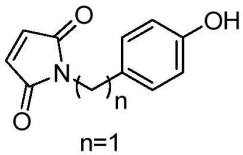
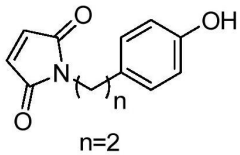
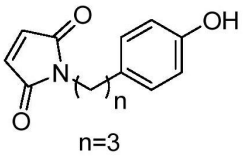
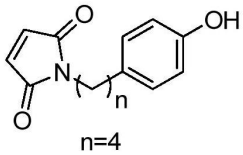
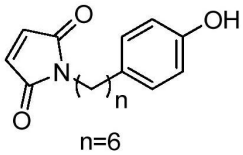
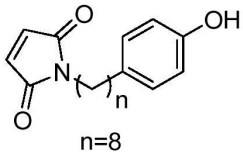
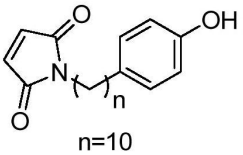
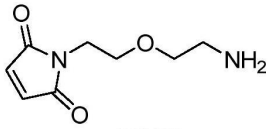
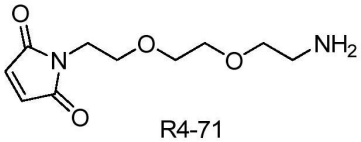
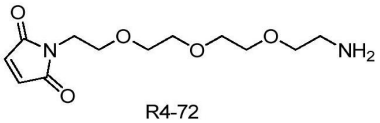
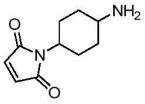
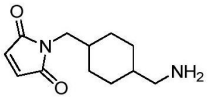
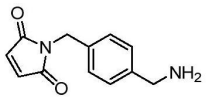
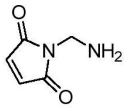

n=2
R4-57 ,


n=3
R4-58 ,


n=4
R4-59 ,


n=6
R4-60 ,


n=8
R4-61 ,


n=10
R4-62 ,

n=1
R4-63 ,

n=2
R4-64 ,

n=3
R4-65 ,

n=4
R4-66 ,

n=6
R4-67 ,

n=8
R4-68 ,

n=10
R4-69 ,

R4-70 ,

R4-71 ,

R4-72 ,

R4-73 ,

R4-74 ,

R4-75 ,

R4-76 。

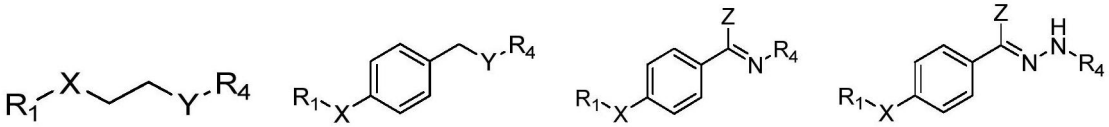
29.一种治疗肿瘤或自身免疫疾病的方法，包括向有此需要的受试者提供治疗有效量的权利要求1-26中任一项的生物分子或权利要求27或28的化合物的偶联物。

30.根据权利要求29所述的方法，其中所述肿瘤是膀胱，脑，乳腺，子宫颈，结肠-直肠，食道，肾，肝，肺，鼻咽，胰腺，前列腺，皮肤，胃，子宫，卵巢，睾丸或血液中的癌症。

31.由R1-R2-R3-R4表示的化合物，其中R1为H或如权利要求1-3中任一项所定义；R2在权利要求1和4-7中任一项中定义；R3在权利要求1和8-11中任一项中定义；并且

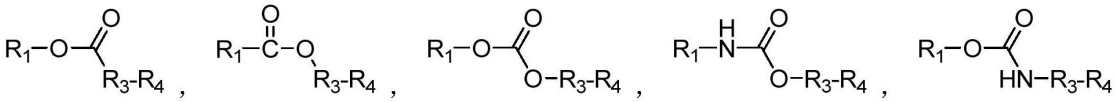
R4在权利要求1和12-13中任一项中定义。

32.根据权利要求31所述的化合物，其中所述化合物由下式表示：



其中X和Y各自独立地为NR'或O，Z为H或C1-10烷基，R'为H或C1-4烷基；其中R1连接X和R4分别以酰胺，酯，氨基甲酸酯，脲或腙键的连接方式与Y或N连接。

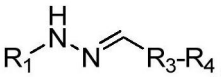
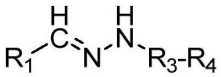
33.根据权利要求31的化合物，其中所述化合物由下式表示：


,

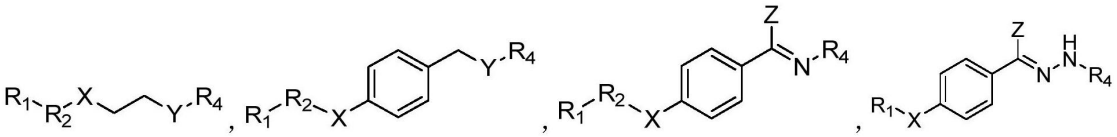
,

,

,

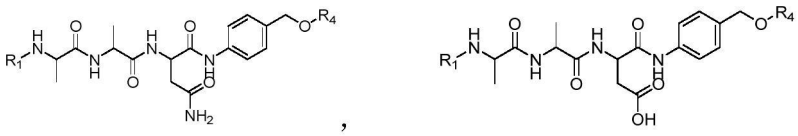

,

。

34.根据权利要求31的化合物，其中所述化合物由下式表示：



其中X和Y各自独立地为NR'或O，Z为H或C1-10烷基，R'为H或C1-4烷基；其中R2连接X和R4分别以酰胺，酯，氨基甲酸酯，脲或腙键的连接方式与Y或N连接。

35.化合物选自：

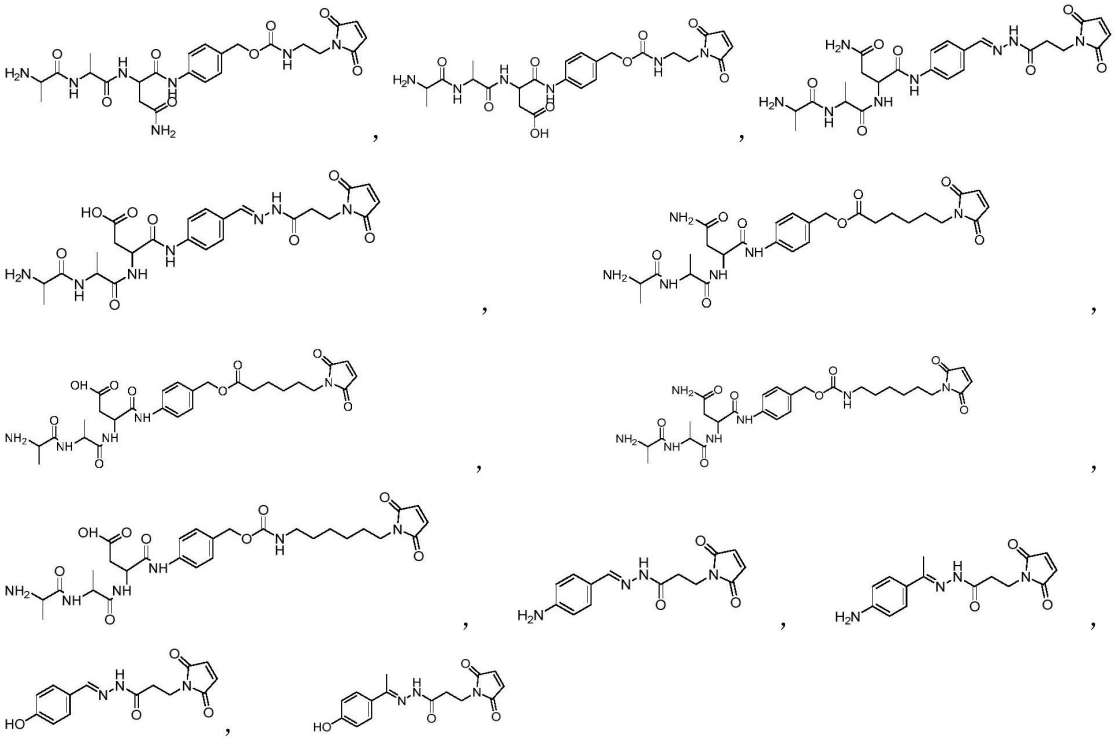


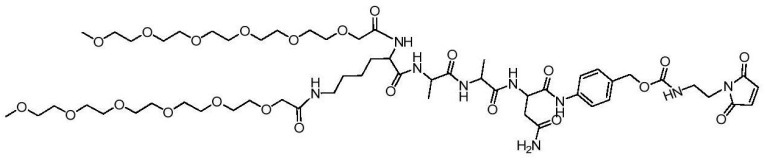
其中，

R1为H，或如权利要求2或3所定义；

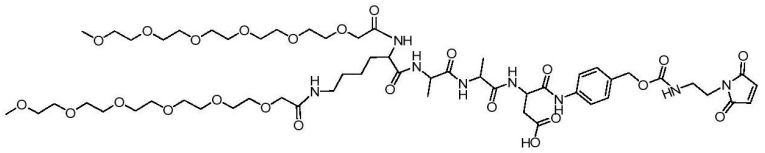
R4如权利要求12-13中任一项所定义。

36.化合物选自：

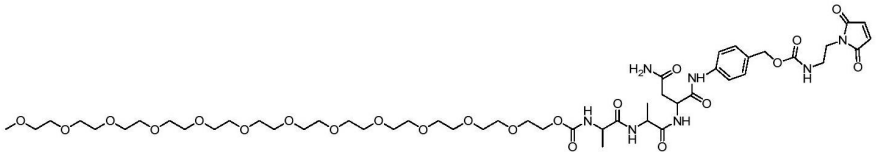




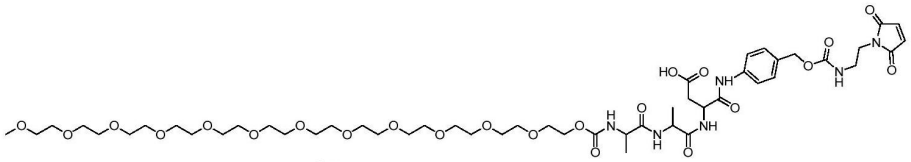
S1 ,



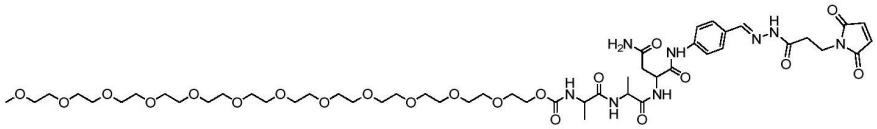
S2 ,



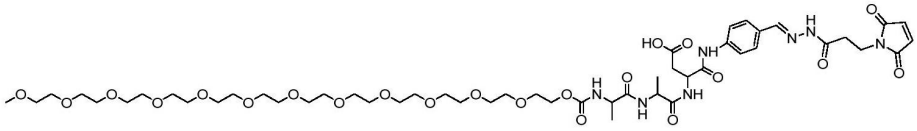
S3 ,



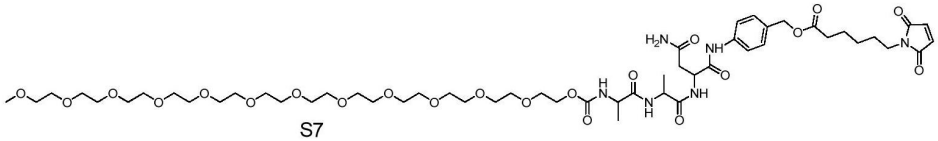
S4 ,



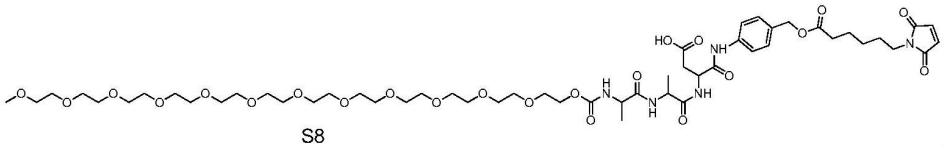
S5 ,



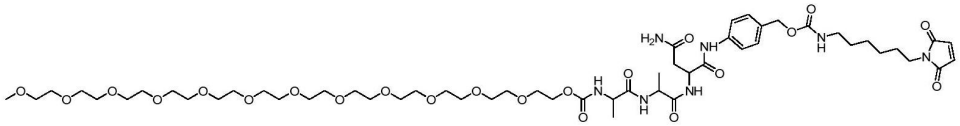
S6 ,



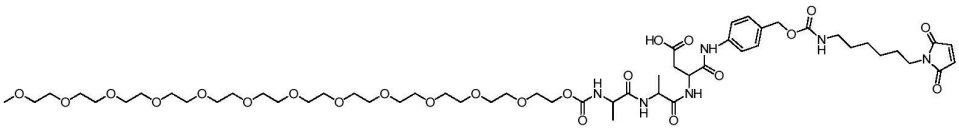
S7



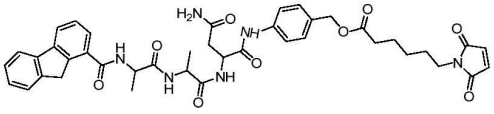
S8 ,



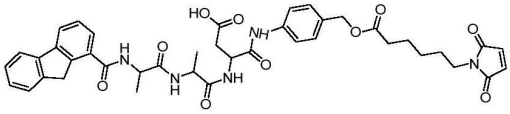
S9 ,



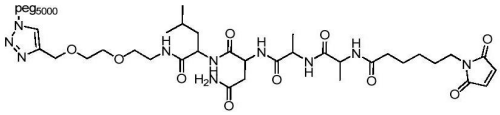
S10 ,



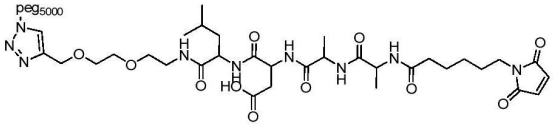
S11 ,



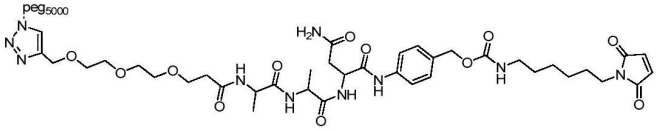
S12 ,



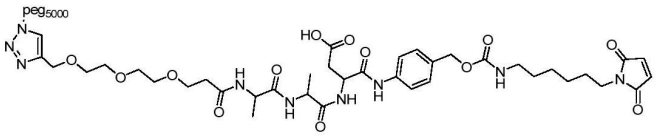
S13 ,



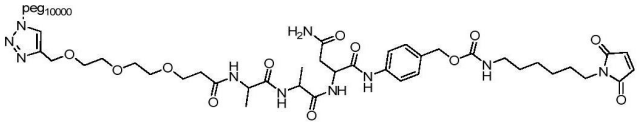
S14 ,



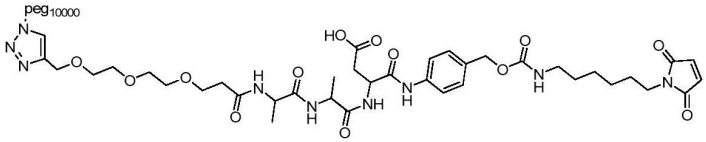
S15 ,



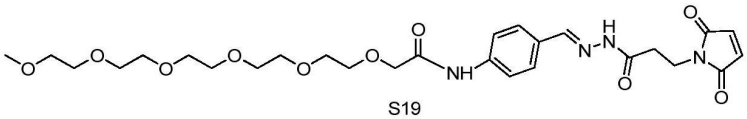
S16 ,



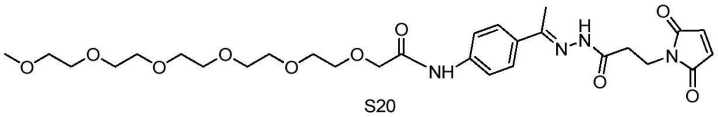
S17 ,



S18 ,

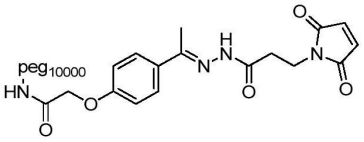


S19 ,

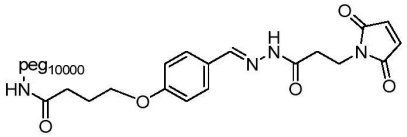


S20 ,

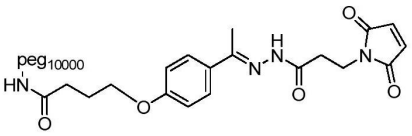
S21 ,



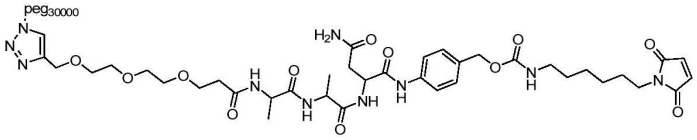
S22 ,



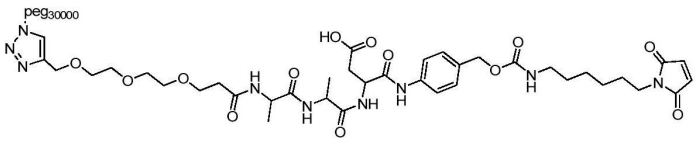
S23 ,



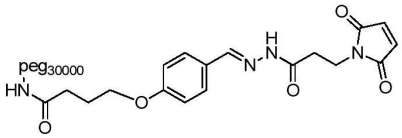
S24 ,



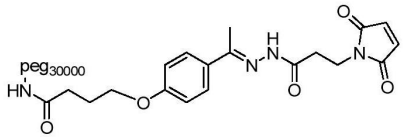
S25 ,



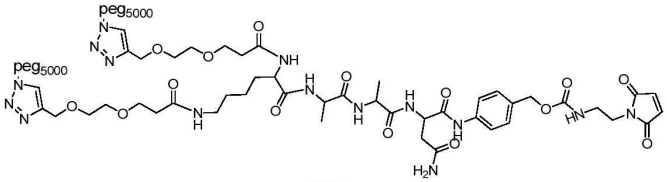
S26 ,



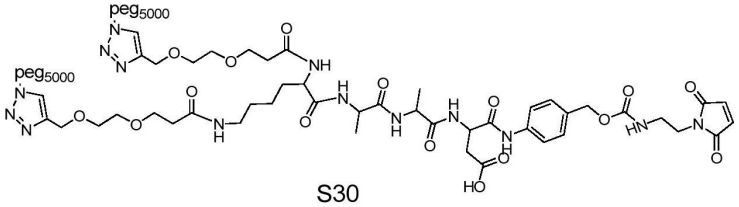
S27 ,



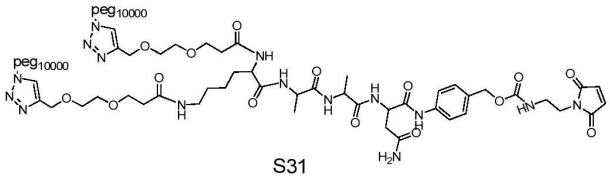
S28 ,



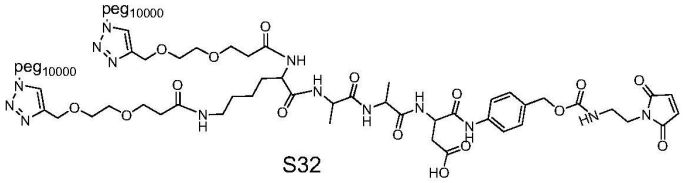
S29 ,



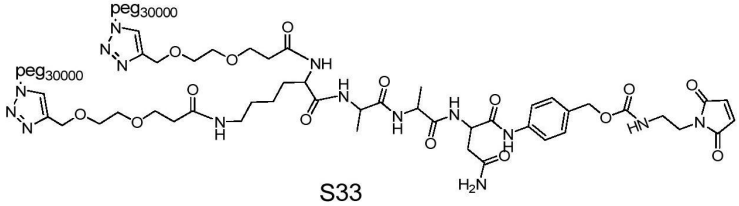
S30 ,



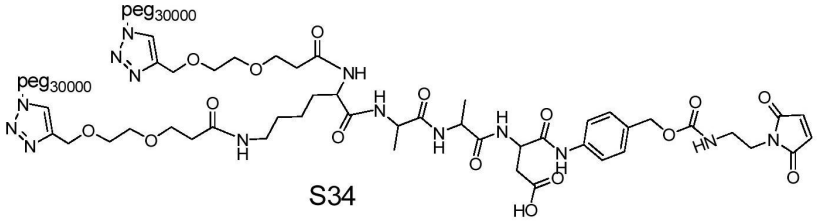
S31 ,



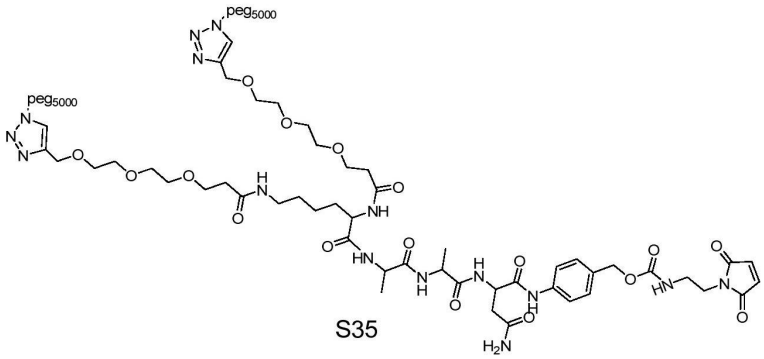
S32 ,



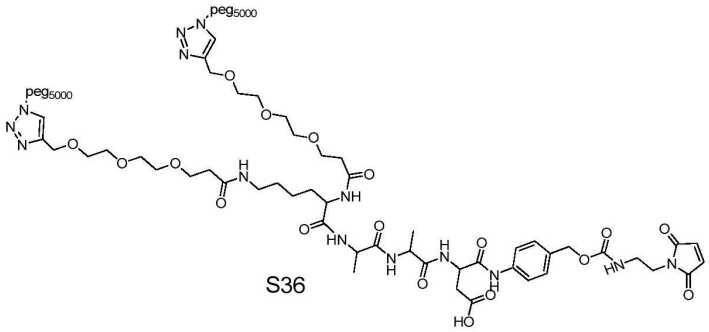
S33 ,



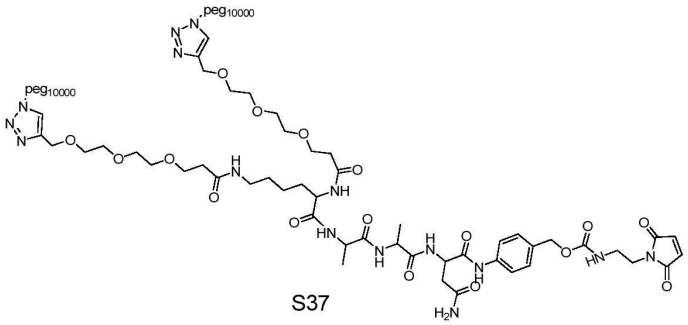
S34 ,



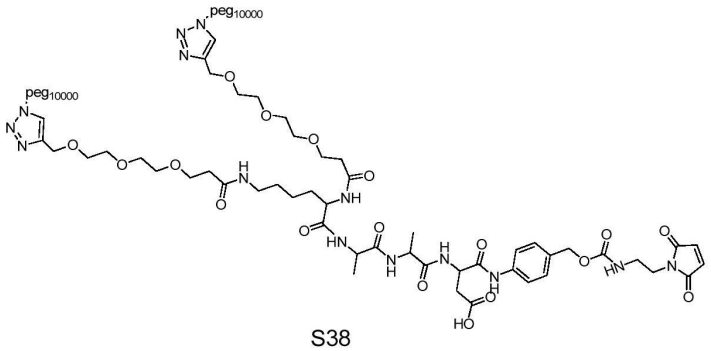
S35 ,



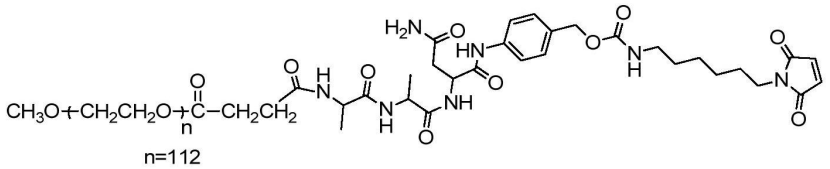
S36 ,



S37 ,

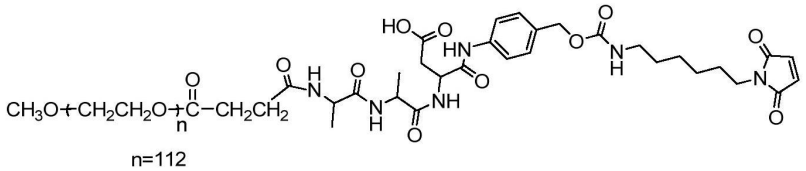


S38



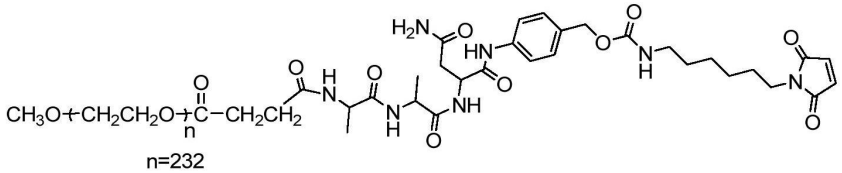
n=112

S39 ,



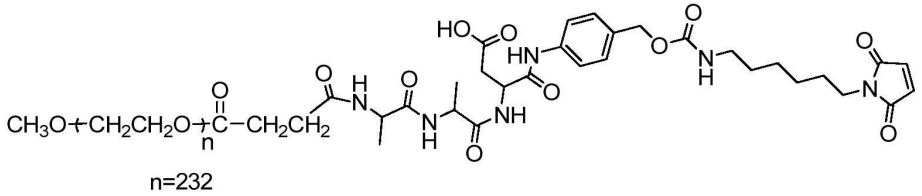
n=112

S40 ,



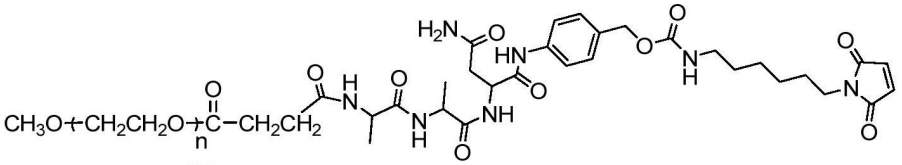
n=232

S41 ,



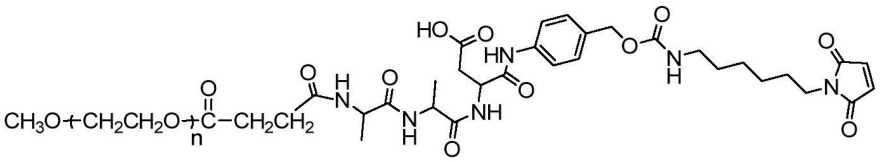
n=232

S42 ,



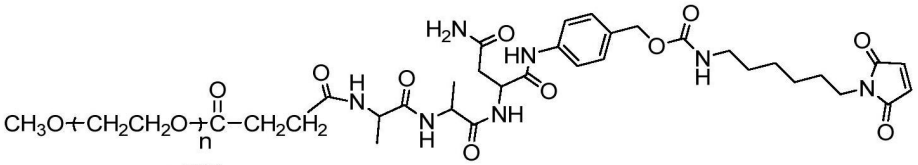
n=480

S43 ,



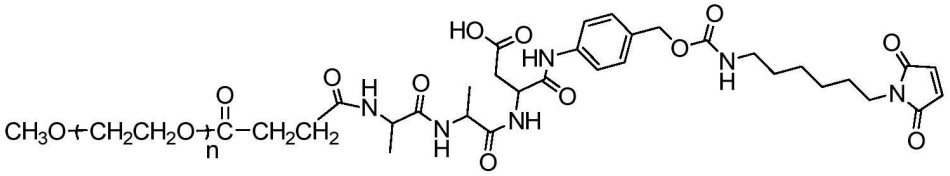
n=480

S44 ,



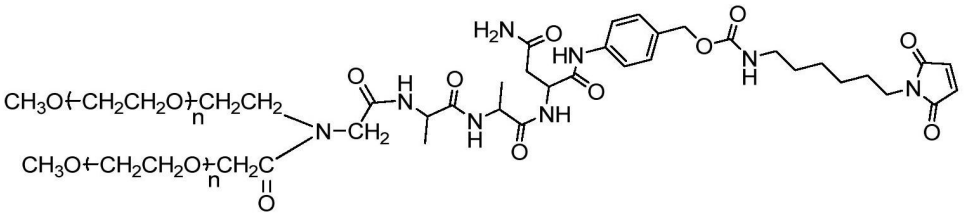
n=930

S45 ,

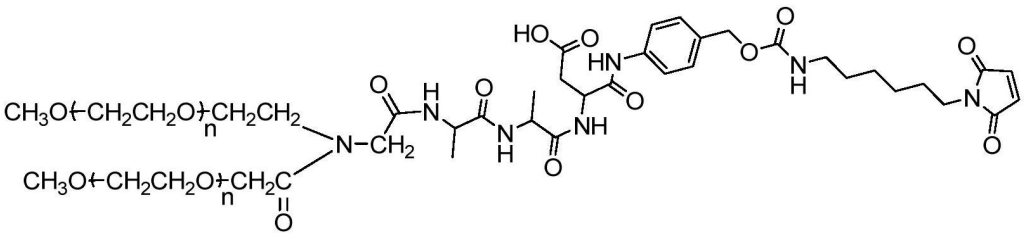


n=930

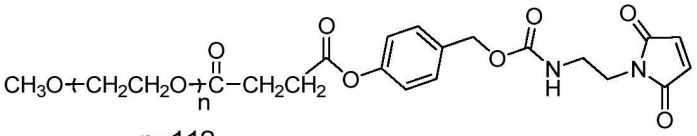
S46 ,



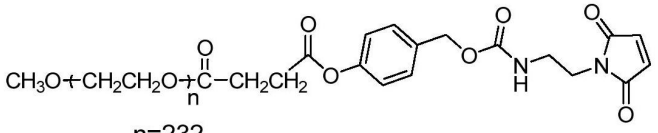
n=528 S47 ,



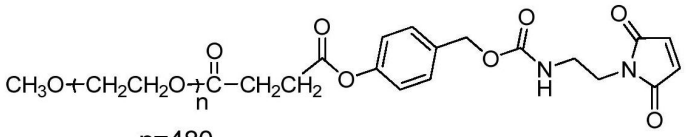
n=528 S48



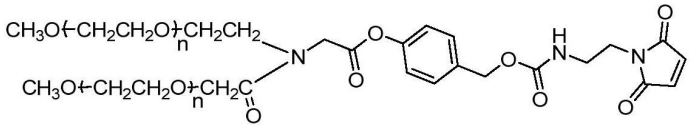
n=112 S49



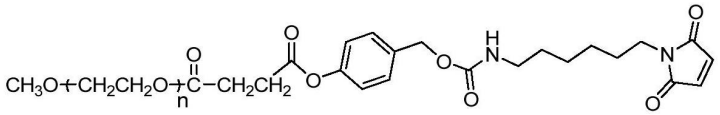
n=232 S50



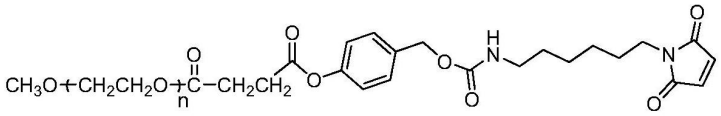
n=480 S51



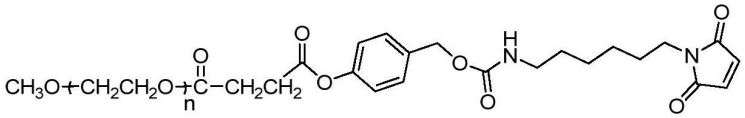
n=528 S52



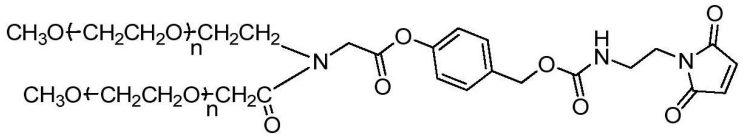
n=112 S53



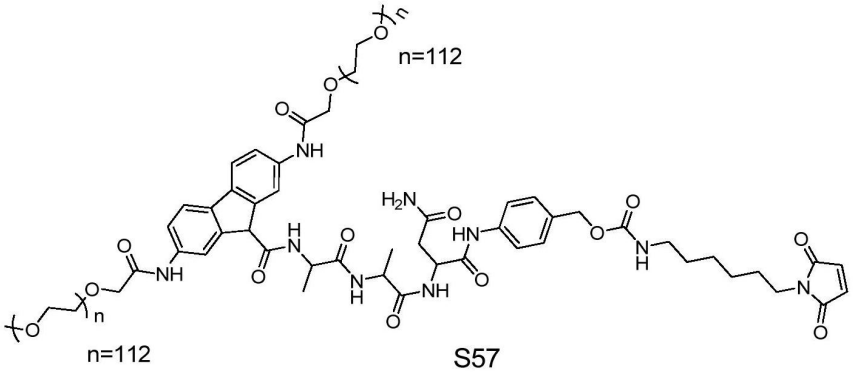
n=232 S54



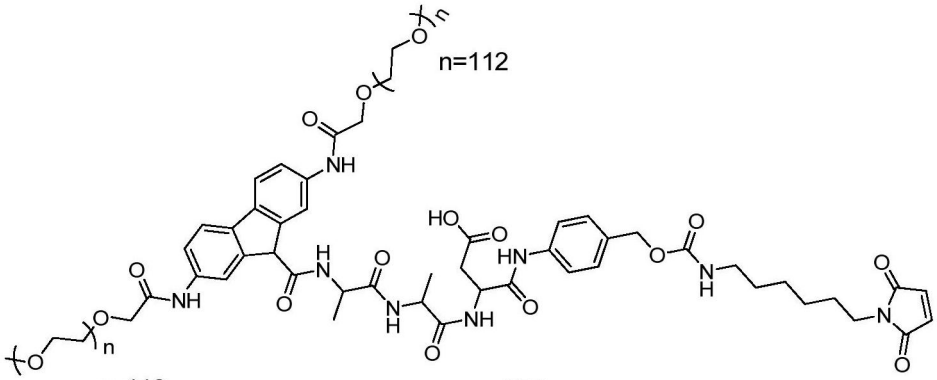
n=480 S55



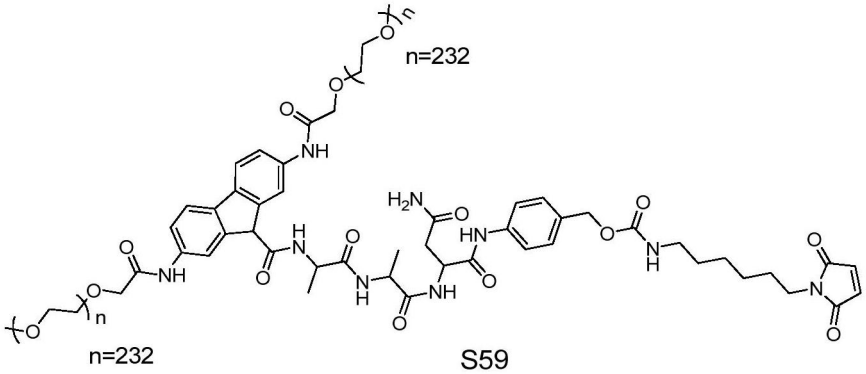
n=528 S56



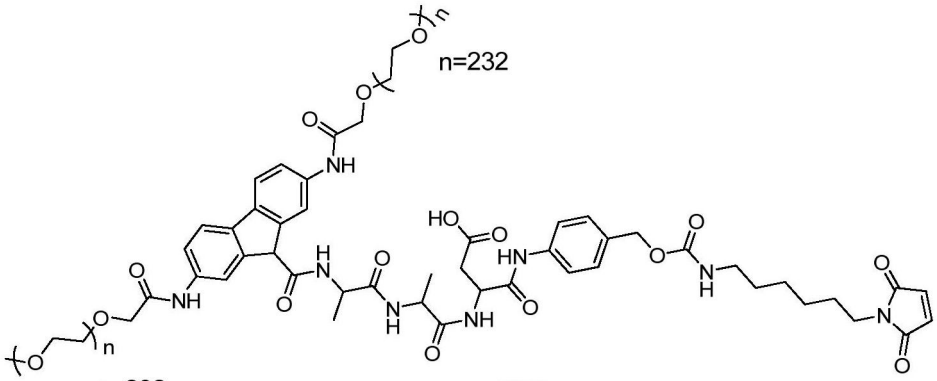
n=112 n=112 S57



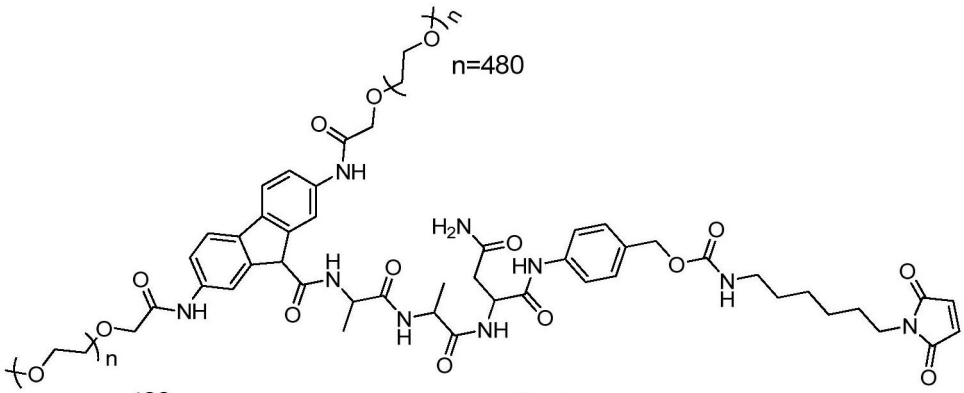
S58



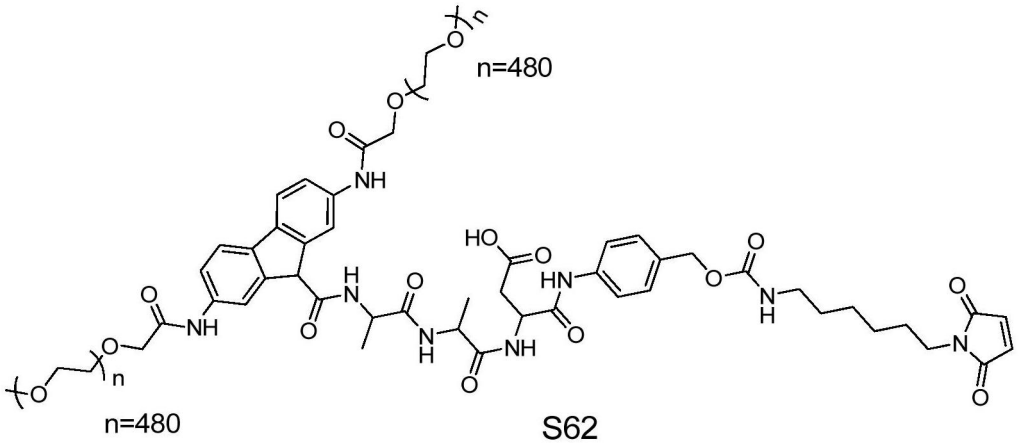
S59



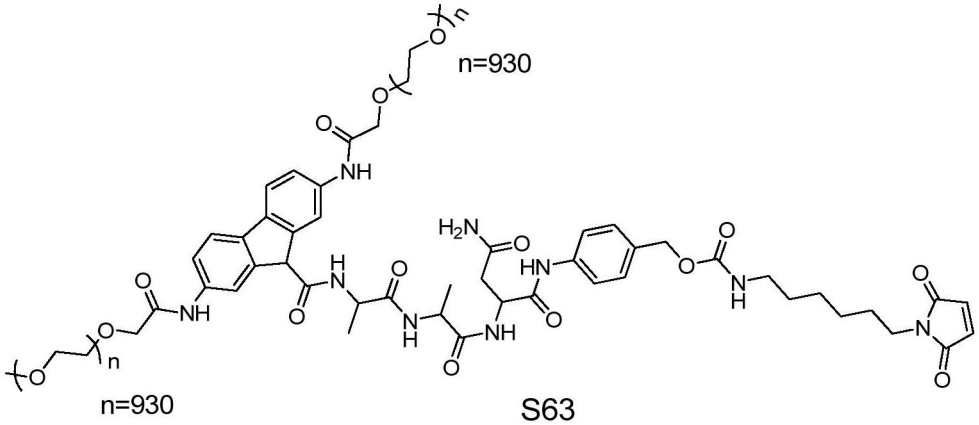
S60



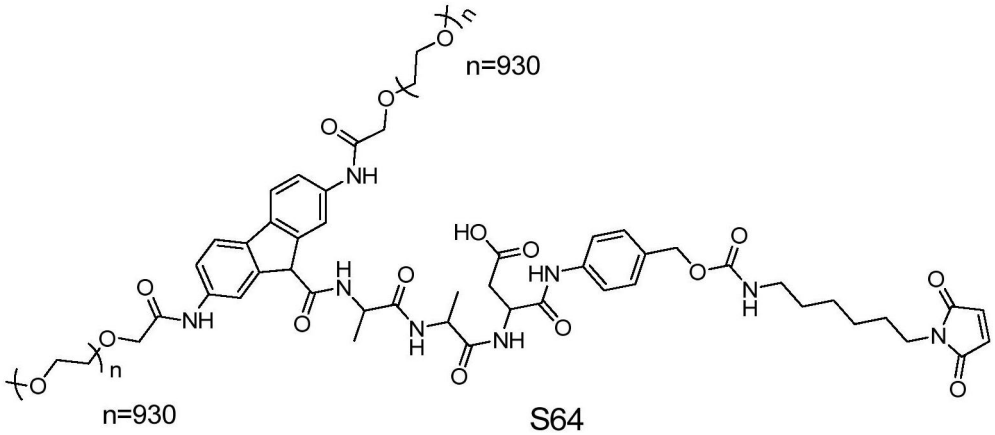
S61



S62



S63



S64。

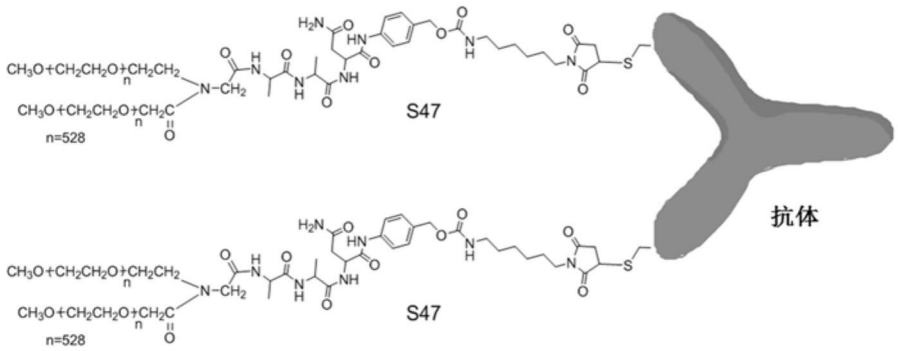
37.在互补决定区中具有一个或多个选自由G,A,S,T,L,I,F,E,K,D和Y组成的组的氨基酸残基的抗体或其功能片段和/或非互补决定区中的一种或多种选自该组的氨基酸残基突变为半胱氨酸;优选地,抗体选自抗Her2抗体,抗EGFR抗体,抗VEGFR抗体,抗CD20抗体,抗CD33抗体,抗PD-L1抗体,抗PD-1抗体,抗-CTLA-4抗体,抗TNFα抗体,抗CD28抗体,抗-4-1BB抗体,抗OX40抗体,抗GITR抗体,抗CD27抗体,抗-CD40抗体或抗-ICOS抗体,抗CD25抗体,抗CD30抗体,抗CD3抗体,抗CD22抗体,抗CCR4抗体,抗CD38抗体,抗CD52抗体,抗补体C5抗体,RSV抗F蛋白,抗GD2抗体,抗GITR抗体,抗糖蛋白受体lib/Illa抗体,抗ICOS抗体,抗IL2R抗体,抗LAG3抗体,抗Integrinα4抗体,抗IgE抗体,抗PDGFRa抗体,抗RANKL抗体,抗-SLAMF7抗体,抗LTIGIT抗体,抗TIM-3抗体,抗VEGFR2抗体,抗VISTA抗体;更优选地,抗体选自Utomilumab,Urelumab,ADG106,Poteligeo™(Mogamulizumab),Poteligeo™

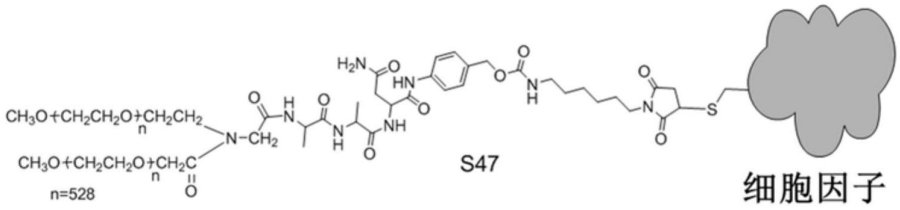
(Mogamulizumab),Bexxar™(托西莫单抗),Zevalin™(ibritumomab tiuxetan),Rituxan™(利妥昔单抗),Arzerra™(Ofatumumab),Gazyva™(Obinutuzumab),Besponsa™(Inotuzumab ozogamicin),Zenapax™(daclizumab),Varlilumab,Theralizumab,Adcetris™(Brentuximabvedotin),Myelotarg™(gemtuzumab),Darzalex™(Daratumumab),CDX-1140,SEA-CD40,RO7009789,JNJ-64457107,APX-005M,Chi Lob 7/4,Campath™(alemtuzumab),Raptiva™(efalizumab),Soliris™(依库丽单抗),Yervoy™(ipilimumab),tremelimumab,Erbitux™(西妥昔单抗),Vectibix™(帕尼单抗),Portrazza™(Necitumumab),TheraCIM™(尼妥珠单抗),Synagis™(帕利珠单抗),Unituxin™(Dinutuximab),TRX-518,MK-4166,MK-1248,GWN-323,INCAGN0186,BMS-986156,AMG-228,ReoPro™(abiciximab),赫赛汀™(曲妥单抗),Perjeta™(帕妥珠单抗),Kadcyla™(ADO-曲妥单抗emtansine),GSK-3359609,JTX-2011,舒莱™(巴利),Tysabri的™(那他珠单抗),BMS-986016,REGN3767,LAG525,Xolair™(omalizumab),Tavolimab,PF-04518600,BMS-986178,MOXR-0916,GSK-3174998,INCAGN01949,IBI-101,Keytruda TM(Pembrolizumab),Opdivo TM(Nivolumab),Lartruvo TM(Olaratumab),Tencentriq TM(Atezolizumab),BMS-936559,Bavencio™(Avelumab),Imfinzi™(Duralumab),Prolia™(Denosumab),Empliciti TM(Elotuzumab),MTIG7192A,TSR-022,MBG-453,Remicade TM(英夫利昔单抗),Humira TM(阿达木单抗),Avastin TM(贝伐单抗),Lucentis TM(雷珠单抗),Cyramza TM(Ramucirumab),和JNJ-61610588;更优选地,抗体或其功能片段含有一个或多个如权利要求22所定义的突变。

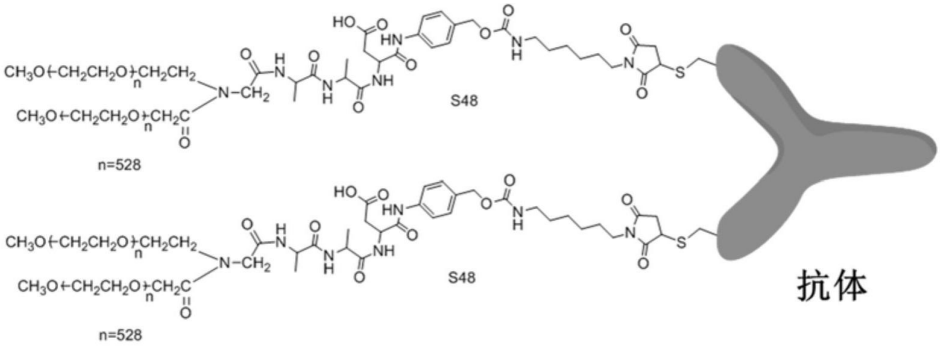
38.一种细胞因子,其具有一个或多个选自G,A,S,T,L,I,F,E,K,D和Y的氨基酸残基,可突变为半胱氨酸;优选地,细胞因子选自IL-2,IL-7,IL-10,IL-11,IL-12,IL-15,IL-21,IFN-α,IFN-β,IFN-γ,G-CSF,GM-CSF,TNF-α,TRAP和TRAIL;

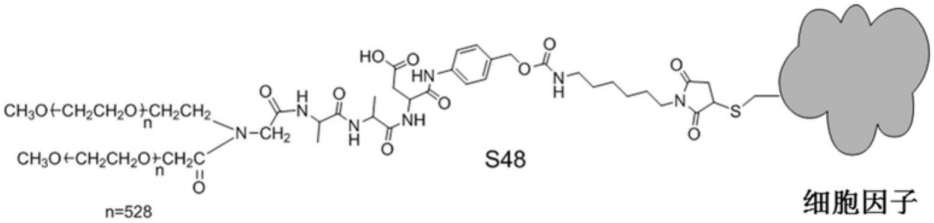
更优选地,细胞因子含有一个或多个如权利要求22所定义的突变。

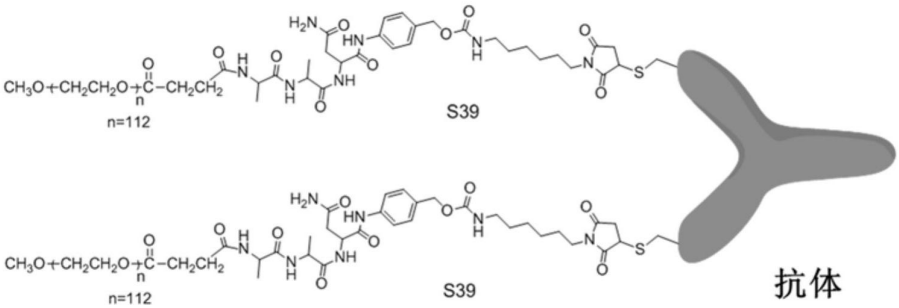
39.由以下任一结构表示的生物分子的偶联物:

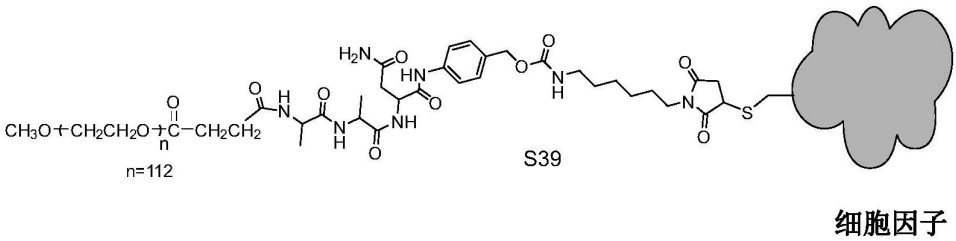


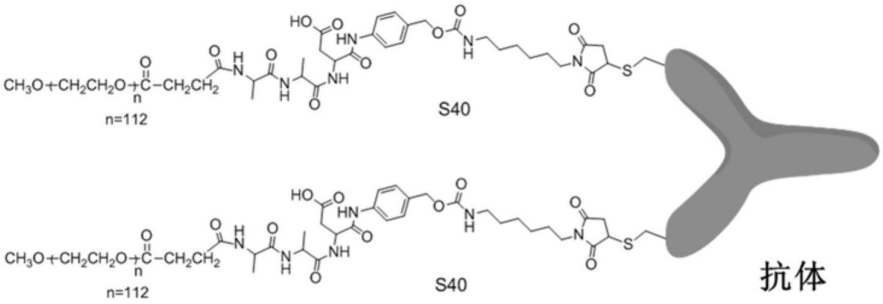

S47
细胞因子
n=528

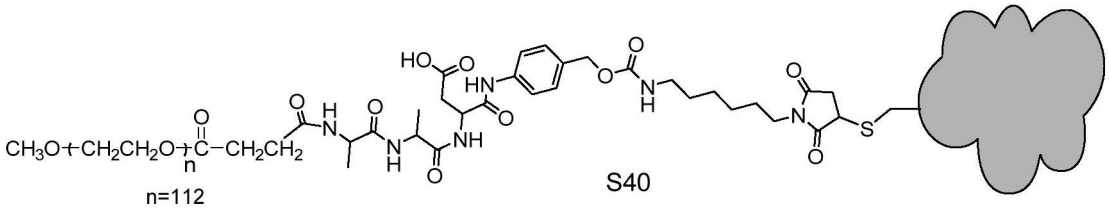

S48
S48
抗体
n=528
n=528


S48
细胞因子
n=528

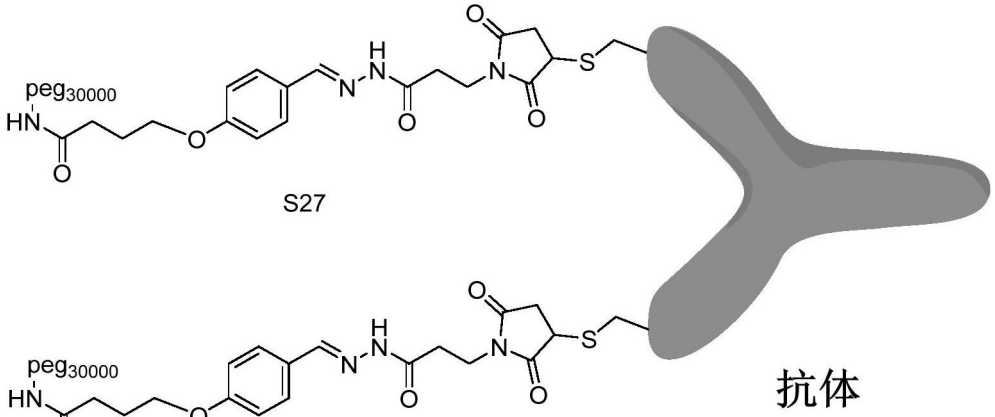

S39
S39
抗体
n=112
n=112

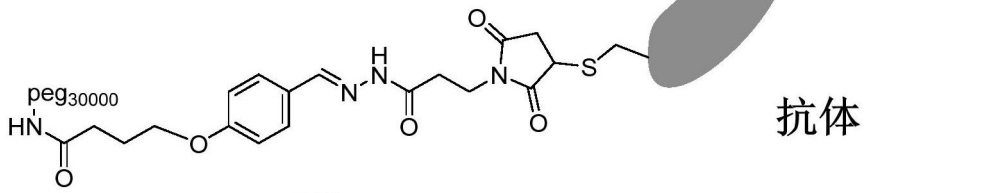

S39
细胞因子
n=112


S40
S40
抗体
n=112
n=112

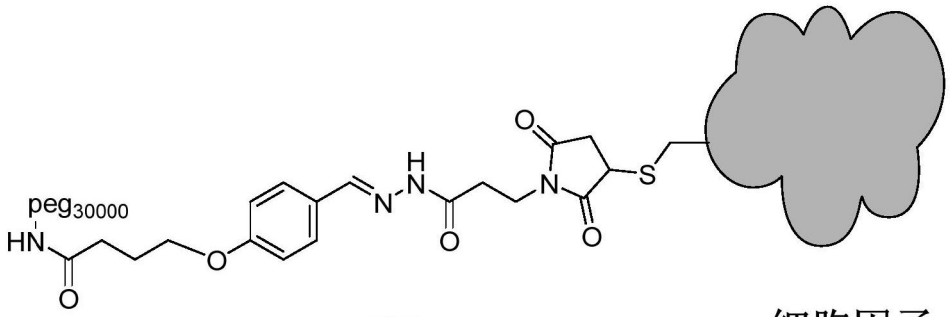


细胞因子

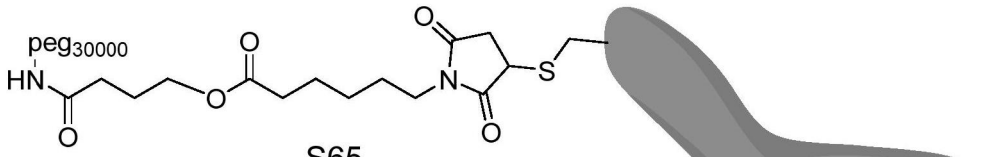


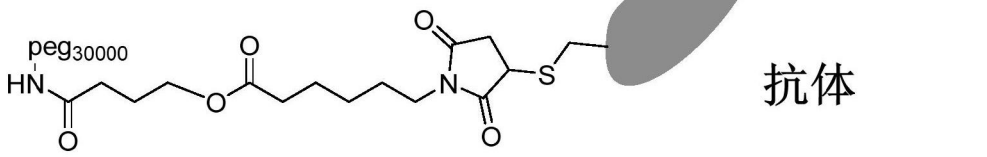


抗体

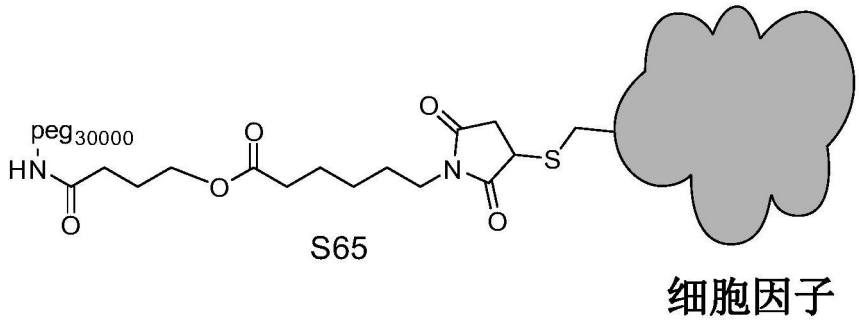


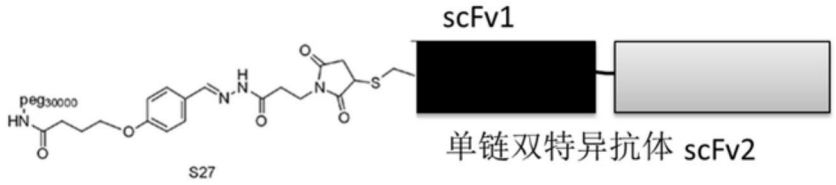
细胞因子

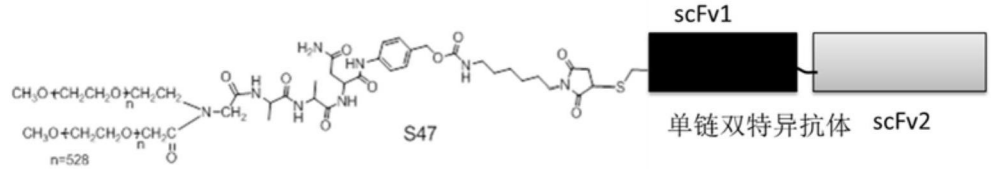


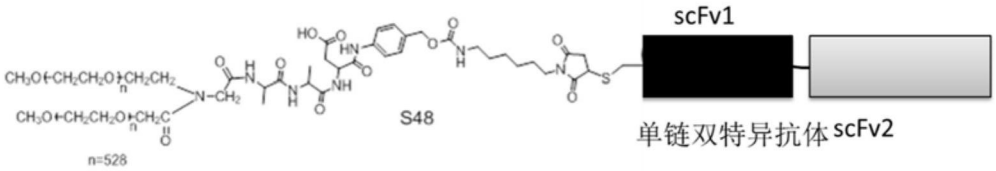


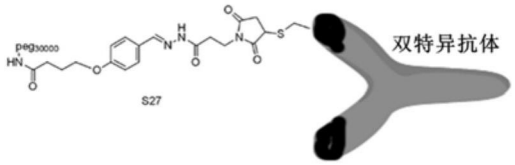
抗体

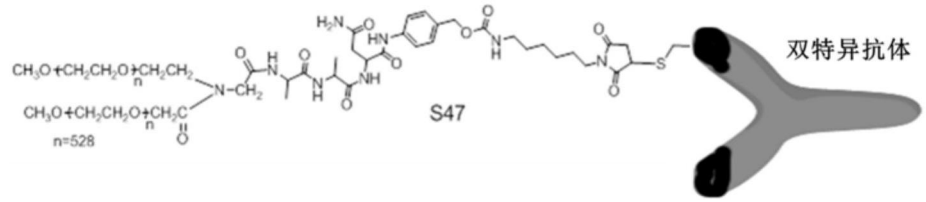

peg30000
HN
O
O
O
O
N
O
S
S65
细胞因子

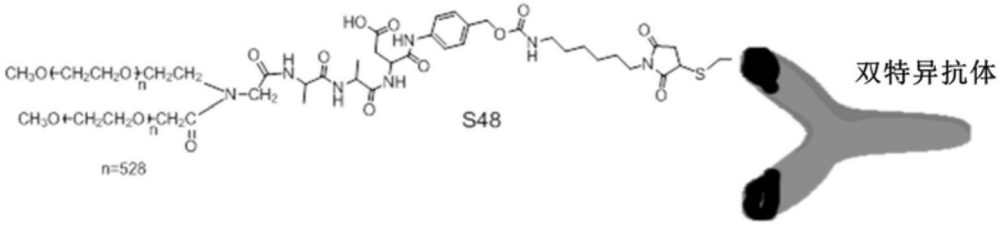

scFv1
peg30000
HN
S27
单链双特异抗体 scFv2

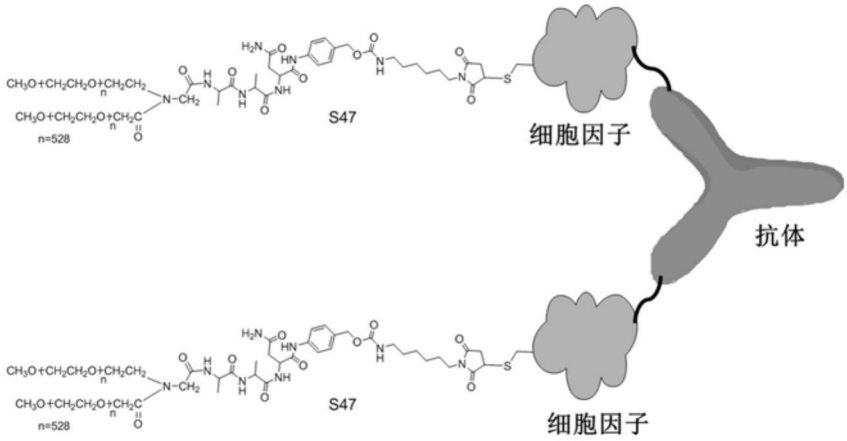

scFv1
S47
单链双特异抗体 scFv2
n=528


scFv1
S48
单链双特异抗体 scFv2
n=528


peg30000
HN
S27
双特异抗体


S47
双特异抗体
n=528


S48
双特异抗体
n=528



其中细胞因子和抗体如权利要求15-23中任一项所定义，优选地，抗体和细胞因子选自SEQ ID NO:1-83中的任一个。

生物分子偶联物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及到一种生物分子偶联物及其用途。

背景技术

[0002] 通过天然胱氨酸将偶联剂与抗体连接的广泛应用已经进一步推广了抗体的使用。诸如毒素或者药物分子已经通过与抗体偶联形成药物-抗体偶联物。通过将可切割的掩蔽肽序列与抗体融合形成可在肿瘤局部激活的前体已经得到应用。但是肽仅限于连接在抗体的末端，且受掩蔽肽的影响，激活序列的激活效率降低，偶联复合物免疫原性升高。

[0003] 目前商业化大分子药物的共同副反应是免疫毒性。包括：免疫抑制、产生免疫原性、过敏症、自动反应、不良免疫刺激。这些副反应主要是由外来大分子引起。进入体内后，异质大分子由于其免疫原性，将在患者中引发免疫应答。在正常组织中，经过大分子药物治疗，还会刺激免疫力并产生自身免疫反应。例如抗体或细胞因子，与抗原或者受体结合。此时对患者来说非常危险。例如，在用目前的PD-1抗体，可瑞达和欧狄沃治疗非小细胞肺癌期间，可能发生严重的肺炎，甚至可能导致患者死亡。在CTLA4抗体(yervoy)，41BB，IL-2，IL-10等的临床应用中也报道了类似的效果。在欧狄沃和Yervoy联合治疗非小细胞肺癌的过程中，55％的患者表现出高达的3-4级AE，36％的患者由于药物毒性而不得不停止药物治疗。

[0004] 因此，该领域需要具有新功能的智能生物分子偶联物，通过阻断血液和正常组织中的药物活性来降低总体毒性和免疫毒性，并增强病理微环境中的活性药物，调节血清中的DMPK和半衰期，降低抗体Fab的免疫原性，调节活性生物分子的亲合力，提高疗效。

发明内容

[0005] 本发明公开了一种具有下列结构的生物分子偶联物：

[0006] R1-R2-R3-R4-S-cys-R5

[0007] R5代表具有通过突变引入的一个或多个半胱氨酸残基的生物分子；

[0008] cys代表R5中含有的半胱氨酸残基；

[0009] S代表半胱氨酸残基的硫原子；

[0010] R1是阻止R5与其抗原，配体或受体结合的基团；

[0011] R2是缺失的，或R2是可切割的连接臂，其能够被一种或多种蛋白水解酶激活或能够在病理微环境中酸活化的化学键；

[0012] R3不存在，或R3是能够在R2被切割后能够自动脱落的连接臂或能够在病理微环境中被酸激活的化学键；条件是当R2不存在时，R3是能够在病理微环境中被酸激活的化学键；

[0013] R4是通过R5中包含的半胱氨酸残基的硫原子与R5共价连接的基团，在部分R1-R2-R3裂解后，维持或促进R5与其抗原，配体或受体的结合能力。

[0014] 在上式中，当R1-R2通过蛋白水解酶或在病理微环境中在酸性条件下从R3-R4-S-cys-R5裂解时，R3-R4-S-cys-R5被释放。随着R3自动脱落，R4-S-cys-R5释放后，R4-S-cys-R5对R5的抗原，配体或受体的结合能力将得到恢复，维持或改良。

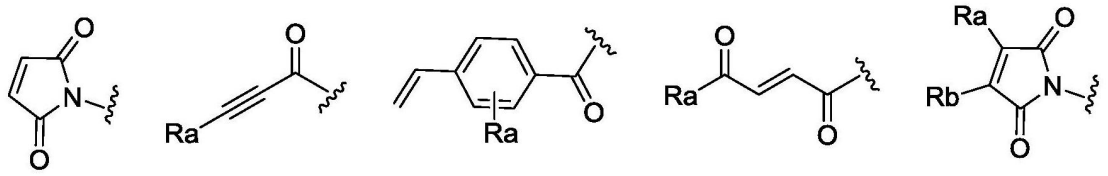
[0015] 在本发明公开的一个或多个具体实施方案中，生物分子的偶联物的R 1，R 2，R 3，R 4和R 5如本发明公开的其他部分中所述。

[0016] 本发明还提供具有以下结构的化合物：

[0017] R4-S-cys-R5

[0018] 上式中，

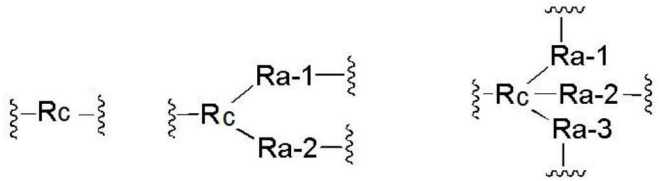
[0019] R4由R_{4-a}-R_{4-b}-R_{4-c}-表示，其中R_{4-a}选自：

[0020] 

R_4-a_1，R_4-a_2，R_4-a_3，R_4-a_4，R_4-a_5；

[0021] 其中Ra和Rb分别独立地选自H和C_{1-6}烷基或C_{1-6}烷氧基；

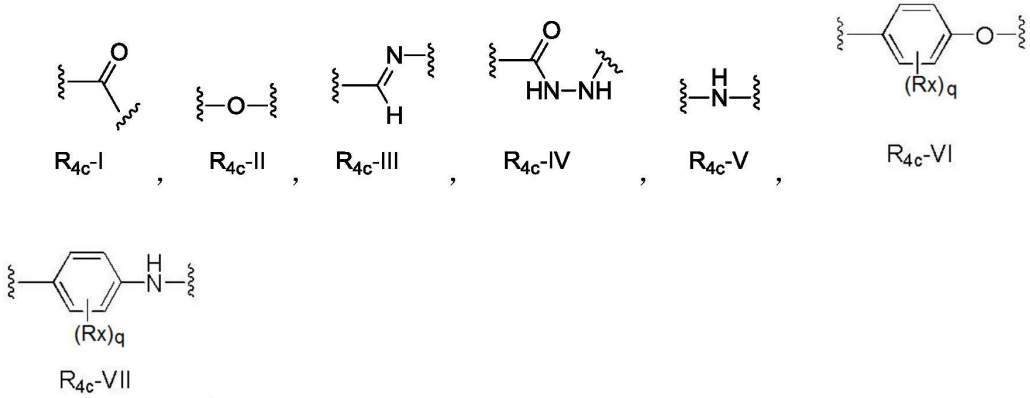
[0022] R_{4-b}选自：

[0023] 

R_{4-b1}，R_{4-b2}，和 R_{4-b3}；

[0024] 在式R_{4b-1}中，R_c不存在，或者选自C_{1-12}烷基，C_{1-12}氧烷基-C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷基-C_{3-8}环烷基，(C_{1-4}烷基-O)$_p$-C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷基羰基氨基-(C_{1-4}烷基-O)p-C_{1-12}烷基，苯基-C_{1-12}烷基，C_{3-8}环烷基，C_{1-12}烷基-C_{3-8}环烷基-C_{1-12}烷基和C_{1-12}烷基-苯基-C_{1-12}烷基；在式R_{4-b2}中，R_c是C_{1-12}烷氨基，其中R_{a-1}和R_{a-2}在氨基的N原子上被取代，并且在式4-b3中，R_c是C_{1-12}烷基，最后的C原子在末端烷基被R_{a-1}，R_{a-2}和R_{a-3}取代，其中R_{a-1}，R_{a-2}和R_{a-3}各自独立地选自C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷基-OH和C_{1-12}烷基-NR”R”’，其中R“和R”’各自独立地选自H和C_{1-12}烷基；其中，在式R_{4-b2}和R_{4-b3}中，R_{4-b}通过R_{a-1}，R_{a-2}和R_{a-3}中的至少一个与R_{4-c}连接；

[0025] R_{4-c}选自：

[0026] 

R_{4c}-I，R_{4c}-II，R_{4c}-III，R_{4c}-IV，R_{4c}-V，R_{4c}-VI，和 R_{4c}-VII；

[0027] 其中Rx选自H，卤素和C1-4烷基；p为1到10的整数，例如1到5；q是1到4的整数，例如1到2；当R4-a选自式R4-a2，R4-a3和R4-a4时，R4-c不存在；

[0028] 当R_3通过R_{4-c}与R_4连接时，R_{4-a}中所示的波浪线显示的是R_{4-a}与R_{4-b}连接的位置。

[0029] 本发明还公开了R1-R2-R3-R4的化合物，其中R1，R2，R3和R4如本发明中任一实施例中所定义

[0030] 本发明公开了生物分子偶联物或上文定义的R4-S-cys-R5的抗肿瘤药物的生产。

[0031] 本发明公开了一种包含上述生物分子偶联物的药物组合物。

[0032] 本发明公开了一种治疗或预防肿瘤的方法，包括向有需要的受试者提供治疗有效量的如本文所述的生物分子或R4-S-cys-R5化合物的偶联物。

[0033] 本发明还公开了包括化合物S1-S64和本发明公开的其他部分中描述的化合物，以及含有如本文所述的突变的抗体和细胞因子。

附图说明

[0034] 图1：抗体轻链的氨基酸序列的比对。

[0035] 图2：Co-IP筛选抗PD1抗体轻链中的点突变。

[0036] 图3：抗体结构

[0037] 图4：可变区的环4序列是保守的。

[0038] 图5：两种抗体的可变区可以来自相同种系的抗体的可变区框架。

[0039] 图6：几种抗体重链氨基酸序列的比对。

[0040] 图7：几种抗体轻链氨基酸序列的比对。

[0041] 图8：PD-1和Ab-C28偶联物。

[0042] 图9：PD-1和Ab-C28偶联物在激活前后与PD1的结合。

[0043] 图10：包含可激活区域且有结合能力的连接臂，可在病理微环境被激活的生物分子偶联物示意图。

[0044] 图11：IFN-γ的分泌。

[0045] 图12：生存曲线。

[0046] 图13：死亡曲线。

[0047] 图14：T细胞的增殖。

[0048] 图15：抗PD1抗体偶联物显示出对小鼠MC38结肠癌模型的肿瘤的抑制。

[0049] 图16：IL2-C41突变体的偶合。

[0050] 图17：IL2-C41偶联物在激活前后与IL-2α受体的结合。

[0051] 图18：IL2突变偶联物(IL2-Thr41Cys，即IL2-C41)对T细胞增殖的影响。

[0052] 图19：IL2偶联物对CD4/CD8增殖的影响。

[0053] 图20：IL2偶联物抑制B16F10肿瘤的生长。

[0054] 图21：IL2偶联物与抗PD1抗体的联用可抑制MC38肿瘤的生长。

[0055] 图22：体外酶切后恢复活性的IL2，IL-2TMEA细胞因子和突变的IL-2的SDS-PAGE结果展示。

[0056] 图23：IL2 TMEA细胞因子与$IL2R_{\alpha}$和$IL2R_{\beta}$在体外酶切前后的结合活性的ELISA结果展示。

[0057] 图24：通过蛋白质印迹检测的IL2-T41C-S47的量和对应的结果。

[0058] 图25：与IL-2相比，体内药代动力学的数据显示IL2 TMEAkine具有更长的半衰期

和更高的血浆暴露。

[0059] 图26:肺的湿重测量和苏木伊红染色显示,IL2 TMEAkine与野生型的IL-2相比具有更低的肺毒性。

[0060] 图27:肺的测量结果显示,IL2-T41C/S87C-S47和IL2-R38D/E61R/S87C-S47几乎没有肺毒性。

[0061] 图28:治疗后的肿瘤体积。

[0062] 图29:肿瘤中激活的IL-2高暴露,与高效抗肿瘤结果一致;肺、心脏中激活的IL2的低暴露,与肺水肿的低毒性一致。

[0063] 图30:还原的SDS-PAGE凝胶结果显示五个位置都以高效率与S13连接子偶联。

[0064] 图31:8种可选择的抗体序列。

[0065] 图32:通过将不同的R4基团与抗体的选定突变位点特异性结合,可以选择性地改变R4基团以进行筛选。

[0066] 图33:与不同位点偶联显示不同程度的结合活性恢复。

[0067] 图34:对人CTLA-4蛋白具有显着降低的结合活性的TMEA体也显示出受体阻断活性的显着降低。

[0068] 图35:对CTLA-4的结合活性降低的TMEA体显示T细胞活化的功能效力受损,蛋白酶介导的活化可以恢复TMEA体的活性。

[0069] 图36:易普利姆玛TMEA体可显著下调肿瘤中的T_{reg},和野生型易普利姆玛有相似功效。

[0070] 图37:TMEAbody在鼠血清中表现出高稳定性,在37℃,96小时也没有显著降解。

[0071] 图38:与野生型的易普利姆玛和CTLA-4前体相比,CTLA-4 TMEA体与S47功能基团的偶联显示出增强的半衰期和暴露。

[0072] 图39:易普利姆玛TMEA体可控制肿瘤大小,其功效与野生型易普利姆玛相当,而对照人IgG未显示任何功效。

[0073] 图40:TMEA体在动物中引起非常低的免疫应答,具有与WT Ipilimumab相当或更低的抗体滴度。

[0074] 图41:与初始的抗体相比,抗CTLA-4 TMEA体偶联物在联合疗法中对免疫系统的保护可降低自身免疫。

[0075] 图42:Niv-se001与R4-7偶联或偶联后的TMEA体被蛋白酶切割40kD后的活性明显增强,为野生型Nivolumab的432%。

[0076] 图43:在与R4-7偶联后,或在蛋白酶切割偶联有40kD官能团的Niv-se005后,Niv-se005的结合活性可以恢复至与野生型Nivolumab的相当水平(WT的125%)。

[0077] 图44:Pembrolizumab和Nivolumab TMEA体以与野生型Pembrolizumab和Nivolumab抗体相当的功效控制肿瘤的大小,而对照人IgG未显示出任何功效。

[0078] 图45:与初始的抗体相比,联合治疗中的抗CTLA4或抗PD1 TMEA体可降低自身免疫。

[0079] 图46:治疗后的肿瘤体积。

具体实施方式

[0080] 应当被理解的是，在本发明公开的范围内，涉及的每个技术特征可以和在后面提到的技术特征，包括在实施例中所列举的技术特征相互结合，来形成解决技术问题的优选技术方案。此外，本发明所公开的内容不限于所描述的特定实施例，因此可以一个或多个变化。也应当理解的是，除非另有定义外，本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义具有相同的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的其他任何方法和材料也可用于本发明的实践或测试，但本文所描述的是优选地方法和材料。本文提及的所有出版物均通过引用并入本文，以公开和描述与所引用的出版物相关的方法和/或材料。

[0081] 必须注意的是，如本文和所附权利要求中所使用的，单数形式“一”，“一个”，“并且”和“该”包括复数指示物，除非上下文另有明确说明。因此，例如，提及“一种抗体”包括多种抗体，并且提及“该抗体”包括提及一种或多种抗体及其本领域技术人员已知的等同物，等等。还应注意的是，可以起草权利要求以排除任何可选要素。因此，本声明旨在作为使用与权利要求元素的叙述相关的“单独”，“仅”等专用术语或使用“否定”限制的先行基础。

[0082] 本发明的目的之一是提供修饰过的生物分子，其仅在病理微环境中激活，例如在肿瘤微环境或者炎性部位。通过在病理部位释放生物分子，即与其配体结合力相当的R5，甚至提高结合力的R5，这样可以提高生物分子的靶向效力，克服药物的耐药性并且可以降低毒性。

[0083] 在本发明公开的范围内，经修饰的生物分子是一个偶联物，其包含一种生物分子和一个通过共价键与生物分子相连的功能基团。适用于本发明的生物分子可以是具有某种生物功能的生物分子或者具有感兴趣的活性的生物分子，包括但不仅限于各种功能的蛋白。感兴趣的生物学功能或活性包括但不仅限于酶学和免疫学中的生物功能或活性。因此，适用于本发明的生物分子包括但不仅限于抗体或者其功能性片段，酶，融合蛋白(例如蛋白-抗体融合物)，抗体药物偶联物，细胞因子和其他任何基因工程化的生物分子。

[0084] 在本文公开的内容中，“抗体”按照最广义使用，并且涵盖了单克隆抗体，多克隆抗体，二聚体，多聚体，多特异性抗体(例如双特异性抗体)，和抗体片段，只要能表现出想要的生物学活性即可(Miller et al(2003)Jour.of Immunology 170:4854-4861)。在上下文和附图中，抗体的缩写以“Ab”代替。

[0085] 基本的抗体结构单元包含由两对相同的多肽链组成的四聚体，每对具有一条轻链和一条重链。每条链的N末端部分包括主要负责抗原识别的约100至110或更多氨基酸的可变区。每条链的C末端部分限定了主要负责效应子功能的恒定区。重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)各自含有3个互补决定区(CDR)，包括HCDR1，HCDR2，HCDR3和LCDR1，LCDR2和LCDR3。这六个CDRs形成了抗体的抗原结合位点。可变区的剩余氨基酸是相对保守的并且被称为框架区(FR)。VH和VL各自含有4个框架区，分别称为FR1，FR2，FR3和FR4。

[0086] 抗体可以是鼠，人，人源化，嵌合或来自其他物种。本发明公开的免疫球蛋白可以是任何类型(例如IgG，IgE，IgM，IgD和IgA)，类别(例如IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgA1和IgA2)或免疫球蛋白分子的亚类。免疫球蛋白可以来自任何物种。然而，一方面，免疫球蛋白来源于人，鼠或兔。

[0087] 抗体片段包含抗体全长的一部分，通常包含抗体的抗原结合区或可变区。优选地，

抗体的片段是一个功能性片段，即保留完整抗体的抗原结合能力。抗体片段或功能片段的实例包括Fab，Fab'，F(ab')2和Fv片段；双体；线性抗体；和单链抗体分子(scFv)；等等。

[0088] 本发明使用的融合蛋白包括含有一种抗体抗原结合区和任选的细胞因子。融合蛋白中的抗原结合结构域可选自：HER2，CD19，EGFR，CD22，CD3，TROP2，糖蛋白NMB，鸟苷酸环化酶C，CEA，CD79b，PSMA，ENPP3，间皮素，CD138，NaPi2b，CD56，CD74，FOLR1，DLL3，CEACAM5，CD142，SLAMF7，CD25，SLTRK6，CD37，CD70，AGS-22，C4。4A，FGFR2，Ly6E，MUC16，BCMA，pCadherin，Ephrin-A，LAMP1，MUC1，CD19，PDL1，HER2，NY-ESO-1，BCMA，WT1，MUC1，CD20，CD23，ROR1，CD123，CD33，CD44v6，CD174，CD30，CD133，cMet，EGFR，FAP，EphA2，GD2，GPC3，IL-13Ra2，LewisY，间皮素，SS1，CEA，CD171，EGFR，EGFRvIII，VEGFR2，NY-ESO-1，MUC-1和MAGE-A3，或者可以选自本发明中提及的任何一种抗体的抗原结合结构域。在一些实施例中，融合蛋白可以是一种双特异性抗体，其包含选自以下抗原的结合结构域：HER2，CD19，EGFR，CD22，CD3，TROP2，糖蛋白NMB，鸟苷酸环化酶C，CEA，CD79b，PSMA，ENPP3，间皮素，CD138，NaPi2b，CD56，CD74，FOLR1，DLL3，CEACAM5，CD142，SLAMF7，CD25，SLTRK6，CD37，CD70，AGS-22，C4。4A，FGFR2，Ly6E，MUC16，BCMA，pCadherin，Ephrin-A，LAMP1，MUC1，CD19，PDL1，HER2，NY-ESO-1，BCMA，WT1，MUC1，CD20，CD23，ROR1，CD123，CD33，CD44v6，CD174，CD30，CD133，cMet，EGFR，FAP，EphA2，GD2，GPC3，IL-13Ra2，LewisY，间皮素，SS1，CEA，CD171，EGFR，EGFRvIII，VEGFR2，NY-ESO-1，MUC-1和MAGE-A3，或者可以选自本发明中提及的任何一种抗体的抗原结合结构域。优选地，双特异性抗体是一种单链双特异性抗体，其包含来自于同一或者不同抗体的两个scFv。

[0089] 在一些实施例中，融合蛋白是一个抗体-细胞因子融合蛋白，其包含一种抗体或者抗体的功能性片段和一种细胞因子，其中细胞因子可选自：IL-2，IL-7，IL-10，IL-11，IL-12，IL-15，IL-21，IFN-α，IFN-β，IFN-γ，G-CSF，GM-CSF，TNF-α，TRAP，和TRAIL。

[0090] 本发明所使用的抗体可以是本领域已知的抗体或其功能性片段。例如，抗体或其功能性片段可选自：抗-Her2抗体，抗-EGFR抗体，抗-VEGFR抗体，抗-CD20抗体，抗-CD33抗体，抗-PD-L1抗体，抗-PD-1抗体，抗-CTLA-4抗体，抗-TNFα抗体，抗-CD28抗体，抗-4-1BB抗体，抗-OX40抗体，抗-GITR抗体，抗-CD27抗体，抗b-CD40抗体，或抗-ICOS抗体，抗-CD25抗体，抗-CD30抗体，抗-CD3抗体，抗-CD22抗体，抗-CCR4抗体，抗-CD38抗体，抗-CD52抗体，抗-补体C5抗体，抗RSV的F蛋白，抗-GD2抗体，抗-GITR抗体，抗-糖蛋白糖蛋白受体lib/Illa抗体，抗-ICOS抗体，抗-IL2R抗体，抗-LAG3抗体，抗-Integrinα4抗体，抗-lgE抗体，抗-PDGFRa抗体，抗-RANKL抗体，抗-SLAMF7抗体，抗-LTIGIT抗体，抗-TIM-3抗体，抗-VEGFR2抗体，抗-VISTA抗体。

[0091] 在优选的实施例中，抗体或者其功能性片段选自：Utomilumab，Urelumab，ADG106，Poteligeo™(Mogamulizumab)，Poteligeo™(Mogamulizumab)，Bexxar™(tositumomab)，Zevalin™(ibritumomab tiuxetan)，Rituxan™(rituximab)，Arzerra™(Ofatumumab)，Gazyva™(Obinutuzumab)，Besponsa™(Inotuzumab ozogamicin)，Zenapax™(daclizumab)，Varlilumab，Theralizumab，Adcetris™(Brentuximab vedotin)，Myelotarg™(gemtuzumab)，Darzalex™(Daratumumab)，CDX-1140，SEA-CD40，RO7009789，JNJ-64457107，APX-005M，Chi Lob 7/4，Campath™(alemtuzumab)，Raptiva™(efalizumab)，Soliris™(eculizumab)，Yervoy™(ipilimumab)，tremelimumab，Erbitux™(cetuximab)，Vectibix™

(panitumumab),Portrazza™(Necitumumab),TheraCIM™(Nimotuzumab),Synagis™(palivizumab),Unituxin™(Dinutuximab),TRX-518,MK-4166,MK-1248,GWN-323,INCAGN0186,BMS-986156,AMG-228,ReoPro™(abiciximab),Herceptin™(trastuzumab),Perjeta™(Pertuzumab),Kadcyla™(Ado-trastuzumab emtansine),GSK-3359609,JTX-2011,Simulect™(basiliximab),Tysabri™(natalizumab),BMS-986016,REGN3767,LAG525,Xolair™(omalizumab),Tavolimab,PF-04518600,BMS-986178,MOXR-0916,GSK-3174998,INCAGN01949,IBI-101,Keytruda™(Pembrolizumab),Opdivo™(Nivolumab),Lartruvo™(Olaratumab),Tencentriq™(Atezolizumab),BMS-936559,Bavencio™(Avelumab),Imfinzi™(Duralumab),Prolia™(Denosumab),Empliciti™(Elotuzumab),MTIG7192A,TSR-022,MBG-453,Remicade™(infliximab),Humira™(adalimumab),Avastin™(bevacizumab),Lucentis™(ranibizumab),Cyramza™(Ramucirumab),和JNJ-61610588。

[0092] 在本发明公开的范围内,细胞因子的含义和结构如本领域的通用定义。它通常涉及一类有广泛生物活性的小蛋白,其合成与分泌通过刺激免疫细胞来完成,例如单核细胞,巨噬细胞,T细胞,B细胞,NK细胞等等,或者非免疫细胞,例如内皮细胞,表皮细胞,纤维母细胞等。细胞因子可以通过与相应的受体结合来调控细胞的增殖,分化,作用及免疫应答。合适的细胞因子包括白介素,干扰素,肿瘤坏死因子,集落刺激因子,趋化因子和生长因子等。

[0093] 示例性细胞因子包括但不仅限于IL-2,IL-7,IL-10,IL-12,IL-15,IL-21,IFN-α,IFN-β,IFN-γ,G-CSF,GM-CSF,TNF-α,TRAP,和TRAIL。

[0094] 在本发明公开的范围内,生物分子的氨基酸序列中的一个或多个(例如5个以内,或者3个以内)氨基酸残基突变成半胱氨酸,且通过半胱氨酸的硫醇键与本公开中的功能基团(R1-R2-R3-R4)共价相连。例如,将感兴趣的生物分子中的一个或者两个感兴趣的氨基酸残基突变成半胱氨酸以与功能基团相连。对于一个抗体,其突变位点可以是可变区的互补决定区或非互补决定区。

[0095] 优选地,突变是通过取代的突变。更优选地,突变发生在抗体轻链的可变区中。通常,可以先制备突变体,然后测试其对相应抗原的结合活性。如果突变体与野生型抗体相比保持70%或更多,优选80%或更多,更优选90%或更多的结合活性,则认为突变位置处的氨基酸残基可突变为半胱氨酸以共价键连接至功能基团。或者,在某些实施方案中,如果通过将突变体与R4连接产生的偶联物保留80%或更多,优选90%或更多,更优选95%或更多的结合活性,则认为突变位置处的氨基酸残基可以突变为半胱氨酸以共价键连接至功能基团。

[0096] 通常,抗体轻链可变区的CDR中的G,A,S,T,L,I,F,E,K,D和Y等中的一个或多个,更优选G,A,S,T,L,I,K和Y中的一个或多个,更优选G,A,T,L和S中的一个或多个,可以突变为半胱氨酸。在一些实施例中,抗体重链可变区的CDR中的G,A,S,T,L,I,F,E,K,D和Y等中的一个或多个,更优选G,A,S,T,L,I,K和Y中的一个或多个,更优选G,A,T,L和S中的一个或多个,可以突变为半胱氨酸。如果突变发生在抗体轻链的非CDR区,则轻链或重链的可变区的非CDR中的G,A,S,T,L,I,F,E,K,D和Y等中的一个或多个,优选G,A,S,T,K,I,Y和L,更优选G,A,T,Y和S中的一个或多个,可以突变为半胱氨酸。在一些实施例中,可以将轻链或重链的可变区的非互补决定区中的S,T,L,I,F,E,K,D,N,Q,R和Y残基等中的一个或多个(例如在FR1,FR2或FR3)突变为半胱氨酸。在一些实施例中,可以将取代突变引入一个或多个以下保守位

点:VH的非互补决定区(FR1,FR2或FR3)中的Gln3,Ser7,Ser26,Glu46,Thr68和Asp72,以及在VL的非互补决定区(FR1,FR2或FR3)中的Thr5,Tyr49,Arg61,Ser63,Ser65,Ser67,Thr72,Thr74,Ser76和Asp82。

[0097] 例如,在本发明公开的一些实施例中,抗PD-1抗体(例如Pembrolizumab)的重链中的突变位点选自:Ser7,Gly8,Gly15,Ala16,Ser17,Ala24,Ser25,Gly26,Tyr27,Thr28,Thr30,Asn31,Tyr32,Tyr33,Tyr35,Ala40,Gly42,Gly44,Leu45,Gly49,Gly50,Ile51,Asn52,Ser54,Asn55,Gly56,Gly57,Thr58,Asn59,Lys63,Lys65,Thr69,Leu70,Thr71,Thr72,Asp73,Ser74,Ser75,Thr76,Thr77,Thr78,Ala79,Leu83,Ser85,Leu86,Thr91,Ala92,Arg99,Asp100,Tyr101,Arg102,Asp104,Gly106,Gly111,Gly113,Thr114,115Thr,117Thr,Ser119,Ser120,Ala121,Ser122,Thr123,Lys124,Gly125和Ser127;轻链中的突变位点选自:Ile2,Thr5,Ser7,Ala9,Thr10,Leu11,Ser12,Leu13,Ser14,Gly16,Ala19,Thr20,Ala25,Ser26,Lys27,Gly28,Ser30,Thr31,Ser32,Gly33,Tyr34,Ser35,Tyr36,Leu37,Gly45,Ala47,Leu50,Leu51,Ile52,Tyr53,Leu54,Ala55,Ser56,Tyr57,Leu58,Ser60,Gly61,Ala64,Ser67,Gly68,Ser69,Gly70,Ser71,Gly72,Thr73,Ala76,Thr78,Ser80,Ser81,Ser95,Arg96,Asp97,Leu98,Leu100,Thr101,Phe102,Gly104,Ile110,Lys111和K130。

[0098] 或者,抗PD-1抗体(例如Nivolumab)的重链中的突变位点选自:Gln3,Ser7,Gly8,Gly9,Gly10,Gly15,Ser17,Lys23,Ala24,Ser25,Gly26,Ile27,Asn31,Thr28,Ser30,Ser32,Gly33,Ala40,Gly42,Gly44,Leu45,Ala49,Ile51,Tyr53,Asp54,Gly55,Ser56,Lys57,Tyr59,Tyr60,Ala61,Asp62,Ser63,Lys65,Gly66,Thr69,Ile70,Ser71,Arg72,Asp73,Asn74,Ser75,Lys76,Asn77,Thr78,Leu79,Leu81,Ser85,Leu86,Ala88,Thr91,Ala92,Thr98,Asn99,Asp100,Asp101,Tyr102,Gly104,Gly106,Thr107,Leu108,Thr110,Ser112,Ser113,Ala114,Ser115,Thr116,Lys117,Gly118和Ser120;轻链中的突变位点选自:Ile2,Leu4,Thr5,Ser7,Ala9,Thr10,Leu11,Ser12,Leu13,Ser14,Gly16,Ala19,Thr20,Leu21,Ala25,Ser26,Ser28,Ser30,Ser31,Tyr32,Leu33,Ala34,Tyr36,Gly41,Ala43,Leu46,Leu47,Ile48,Tyr49,Asp50,Ala51,Ser52,Asn53,Arg54,Ala55,Thr56,Gly57,Ile58,Ala60,Arg61,Ser63,Gly64,Ser65,Gly66,Ser67,Gly68,Thr69,Thr72,Leu73,Thr74,Ile75,Ser76,Ser77,Leu78,Ala84,Ser91,Ser92,Asn93,Arg96,Thr97,Phe98,Gly99,Gly101,Thr102,Ile106,Lys107,Thr109,Ala111,Ala112,Ser114,Ile117和Ser121。

[0099] 抗-CTLA-4抗体重链中的突变位点选自:Ser7,Gly8,Gly9,Gly10,Gly15,Ser17,Leu18,Leu20,Ala24,Ser25,Gly26,Phe27,Thr28,Phe29,Ser30,Ser31,Tyr32,Thr33,Ala40,Gly42,Lys43,Gly44,Leu45,Glu46,Thr49,Phe50,Ile51,Ser52,Tyr53,Asp54,Gly55,Lys58,Tyr59,Tyr60,Ala61,Asp62,Ser63,Lys65,Gly66,Thr69,Ile70,Ser71,Ser75,Lys76,Thr78,Leu79,Leu81,Ser85,Leu86,Ala88,Gly89,Asp90,Thr91,Ala92,Tyr94,Tyr95,Ala97,Phe98,Thr99,Gly100,Leu102,Gly103,Asp106,Tyr107,Gly109,Gly111,Thr112,Leu113,Thr115,Ser117,Ser118,Ala119,Ser120,Thr121和Lys122;轻链中的突变位点选自:Ile2,Leu4,Thr5,Ser7,Gly9,Thr10,Leu11,Ser12,Leu13,Ser14,Gly16,Ala19,Thr20,Leu21,Ala25,Ser26,Ser28,Gly30,Ser31,Ser32,Tyr33,Leu34,Ala35,Tyr37,Lys40,Gly42,Ala44,Leu47,Leu48,Ile49,Tyr50,Gly51,Ala52,Phe53,Ser54,

Ala56,Thr57,Gly58,Ile59,Ser64,Gly65,Ser66,Gly67,Ser68,Gly69,Thr70,Asp71,Thr73,Leu74,Thr75,Ile76,Ser77,Leu79,Ala85,Tyr92,Gly93,Ser94,Ser95,Thr98,Phe99,Gly100,Gly102,Thr103,Lys104,Ile107,Lys108,Thr110,Ala112,Ala113,Ser115,Ser128,Gly129和Thr130。

[0100] 抗CTLA-4抗体Ipilimumab的重链中的突变位点选自:Gln3,Arg19,Leu20,Ser25,Gly26,Phe27,Thr28,Phe29,Ser30,Ser31,Tyr32,Thr33,Met34,His35,Gly44,Phe50,Ile51,Ser52,Tyr53,Asp54,Gly55,Asn56,Asn57,Lys58,Tyr59,Tyr60,Thr69,Ser71,Arg72,Asp73,Asn74,Ser75,Lys76,Asn77,Thr99,Gly100,Trp101,Leu102,Gly103和Pro104;轻链中的突变位点选自:Gln6,Arg24,Ala25,Ser26,Gln27,Ser28,Val29,Gly30,Ser31,Ser32,Tyr33,Ile49,Tyr50,Gly51,Ala52,Phe53,Ser54,Arg55,Ala56,Phe53,Ser54,Arg55,Ala56,Thr57,Gly58,Ile59,Pro60,Asp61,Arg62,Ser68,Gly69,Thr70,Gln90,Gln91,Tyr92,Gly93,Ser94,Ser95,Pro96和Trp97。

[0101] 抗TNFα抗体重链中的突变位点选自:Ser7,Gly8,Gly9,Gly10,Leu11,Gly15,Ser17,Leu18,Leu20,Ala24,Ser25,Gly26,Thr28,Asp30,Asp31,Tyr32,Ala33,Ala40,Gly42,Gly44,Leu45,Ser49,Ala50,Ile51,Thr52,Asn54,Ser55,Gly56,Ile58,Asp59,Tyr60,Ala61,Asp62,Ser63,Glu65,Gly66,Phe68,Thr69,Ile70,Ser71,Asp73,Asn74,Ala75,Lys76,Ser78,Leu79,Tyr80,Leu81,Ser85,Leu86,Ala88,Thr91,Ala92,Lys98,Ser100,Tyr101,Leu102,Ser103,Thr104,Ala105,Ser106,Ser107,Leu108,Asp109,Tyr110,Gly112,Gly114,Thr115,Leu116,thr118,Ser120,Ser121,Ala122,Ser123和Thr124;轻链中的突变位点选自:Asp1,Thr5,Ser7,Ser9,Ser10,Leu11,Ser12,Ala13,Ser14,Gly16,Thr20,Ile21,Ala25,Ser26,Gln27,Gly28,Ile29,Arg30,Asn31,Tyr32,Leu33,Ala34,Tyr36,Lys39,Gly41,Lys42,Ala43,Leu48,Leu47,Ile48,Tyr49,Ala50,Ala51,Ser52,Thr53,Leu54,Gln55,Ser56,Gly57,Ser60,Ser63,Gly64,Ser65,Gly66,Ser67,Gly68,Thr69,Asp70,Thr72,Leu73,Thr74,Ile75,Ser76,Ser77,Leu78,Ala84,Thr85,Tyr91,Asn92,Arg93,Ala94,Tyr96,Thr97,Phe98,Gly99,Gly101,Thr102,Ile106,Lys107,Thr109和Ala111。

[0102] 抗CD28抗体重链中的突变位点选自:Ser7,Gly8,Gly15,Ala16,Ser17,Ser21,Ala24,Ser25,Gly26,Tyr27,Thr28,Thr30,Ser31,Tyr32,Ala40,Gly42,Gly44,Gly49,Tyr52,Gly54,Thr58,Ala68,Thr69,Thr71,Thr74,Ser75,Ser77,Thr78,Ala79,Ser84,Leu86,Ser88,Thr91,Ala92,Thr97,Ser99,Tyr101,Gly102,Leu103,Gly113,Thr114,Thr115,Thr117,Ser119,Ser120,Ala121,Ser122和Thr123;轻链中的突变位点选自:Thr5,Ser7,Ser9,Ser10,Ser11,Ser12,Ala13,Ser14,Gly16,Thr20,Thr22,Ala25,Ser26,Ser27,Ile29,Tyr30,Ala43,Leu46,Leu47,Tyr49,Lys50,Ala51,Ser52,Leu54,Thr56,Gly57,Ser60,Ser63,Gly64,Ser65,Gly66,Ser67,Gly68,Thr69,Asp70,Thr72,Thr74,Ser76,Ser77,Ala84,Thr85,Gly91,Thr93,Tyr94,Tyr96,Thr97,Phe98,Gly99,Gly100,Gly101,Thr102,Thr109和Ala111。

[0103] 抗41BB抗体的重链中的突变位点选自:Thr31,Tyr32,Ser35,Lys50,Tyr52,Asp55,Ser56,Tyr57,Thr58,Asn59,Tyr60,Ser61,Gln65,Gly66,Gly99,Tyr100,Gly101,Asp104和Tyr105;轻链中的突变位点选自:Ser23,Gly24,Asp25,Asn26,Gly28,Asp29,Gln30,Tyr31,

Gln49,Asp50,Lys51,Asn52,Arg53,Ser55,Gly56,Thr89,Tyr90,Thr91,Gly92,Gly94和Ser95。

[0104] 抗Her2抗体(例如曲妥珠单抗)的重链中的突变位点选自:Arg19,Lys30,Asp31,Tyr33,Arg50,Tyr62,Asn55,Tyr57,Arg59,Tyr60,Asp62,Lys65,Asp102和Tyr105;轻链中的突变位点选自:Asp1,Gln3,Gln27,Asp28,Asn30,Tyr49,Tyr55,Arg66,Asp70和Tyr92。

[0105] 抗PD-L1抗体(例如阿特珠单抗)的重链中的突变位点选自:Gln3,Asp31,Tyr54,Tyr59,Tyr60,Asp62,Lys65,Asp73,Lys76,Asn77和Arg99;轻链中的突变位点选自:Arg24,Gln27,Asp28,Tyr49,Tyr55,Asp70,Gln89,Gln90,Tyr91和Tyr93。

[0106] 在一些优选的实施例中,各种抗体的突变位点优先选自表5至19中列出的位置,其在突变后与R4的结合活性保留70%或更多,优选80%或更多,更优选90%或更多。这些突变位点包括CDR区和非CDR区。

[0107] 例如,优选的抗PD-1抗体1的轻链突变位点包括Ala25,Ser26,Gly28,Ser30,Thr31,Ser32,Gly33,Ser35,Tyr36,Leu37,Leu54,Ala55,Ser56,Tyr57,Ser60,Gly61,Ser95,Thr101和Gly104;更优选地,突变位置包括Ser26,Gly28,Ser30,Ser32,Gly33,Ser35,Ala55,Ser56,Ser60,Gly61和Ser95。优选的抗PD-1抗体2的轻链突变位点包括Ala25,Ser26,Ser28,Ser30,Ser31,Ala34,Ala51,Ser52,Ser54,Ala55,Thr56,Gly57,Ile58,Ala60,Ser91,Ser92,Thr97和Gly99;更优选地,突变位置包括Ser26,Ser28,Ser30,Ser31,Ala34,Ser52,Ser54,Thr56,Gly57,Ser91,Ser92,Thr97和Gly99。优选的抗CTLA-4抗体轻链的突变位点包括Ala25,Ser26,Ser28,Gly30,Ser31,Ser32,Leu34,Ala35,Gly51,Ala52,Ser54,Ala56,Thr57,Gly58,Gly93,Ser94,Ser95,Thr98和Gly100;更优选地,突变位点包括Ala25,Ser26,Ser28,Gly30,Ser31,Ser32,Gly51,Ser54,Thr57,Gly58,Gly93,Ser94,Ser95和Gly100。优选的抗CD28抗体的轻链的突变位点包括Ser26,Ile29,Tyr30,Lys50,Ala51,Ser52,Gly91,Thr93,Tyr94,Tyr96,Thr97和Gly99;更优选地,突变位点包括Tyr30,Ala51,Tyr96,Thr97和Gly99。抗TNFα抗体轻链的优选突变位点可包括Ala25,Ser26,Gly28,Ile29,Tyr32,Leu33,Ala34,Ala50,Ala51,Ser52,Thr53,Leu54,Ser56,Gly57,Tyr91,Ala94和Thr97;更优选地,突变位点包括Ser26,Gly28,Ala51,Ser56,Gly57,Tyr91和Ala94。

[0108] 抗PD-1抗体1的重链的优选突变位点包括Thr30,Tyr32,Tyr35,Gly50,Ile51,Ser54,Gly56,Gly57,Thr58,Lys63,Tyr101和Gly106;更优选地,突变位点包括Thr30,Gly50,Ser54,Gly56,Gly57,Thr58,Lys63和Gly106。抗PD-1抗体2的重链的优选突变位点包括Ser30,Ser32,Gly33,Ile51,Tyr53,Asp54,Gly55,Ser56,Lys57,Ala61,Ser63,Lys65,Gly66,Asp101,Gly104,Gly106,Thr107和Leu108;更优选地,突变位点包括Ser30,Ser32,Gly33,Tyr53,Gly55,Ser56,Ser63,Lys65,Gly66,Gly104,Gly106和Thr107。

[0109] 抗-CTLA-4抗体重链的优选突变位点包括Ser30,Ser31,Tyr32,Thr33,Ile51,Asp54,Gly55,Lys58,Tyr59,Tyr60,Ala61,Asp62,Ser63,Lys65,Gly66,Gly100,Leu102,Gly103,Asp106和Tyr107;更优选地,突变位点包括Ser30,Ser31,Thr33,Gly55,Tyr60,Ala61,Ser63,Lys65,Gly66,Gly100,and Gly103。抗CD28抗体重链的优选突变位点包括Ser25,Gly26,5Tyr27,Thr28,Thr30,Ser31,Tyr32,Tyr33,Tyr52,Gly54,Thr58,Ser99,Tyr101,Gly102和Leu103;更优选地,突变位点包括Gly26,Tyr27,Thr28,Thr30,Ser31,

Tyr52,Gly54和Leu103。抗TNFα抗体重链的优选突变位点包括Tyr32,Ala33,Ile51,Thr52,Ser55,Gly56,Ile58,Tyr60,Ala61,Ser63,Gly66,Ser100,Tyr101,Leu102,Ser103,Thr104,Ala105,Ser106,Ser107,Leu108和Tyr110;更优选地,突变位点包括Ala33,Ile51,Ala61,Ser63,Gly66,Ser100,Thr104和Ser106。

[0110] 类似地,当突变发生在非CDR区时,即在轻链可变区的框架区中时,各种抗体的突变位点可以优先地选自表7和8中列出的那些在突变后保留80%或更多,优选90%或更多的结合活性。例如,对于本发明公开的抗PD-1抗体1的轻链框架区中的优选突变位点包括hr5,Ser7,Ala9,Thr10,Leu11,Ser12,Leu13,Ser14,Gly16,Ala19,Thr20,Gly45,Ala47,Leu50,Leu51,Ile52,Ala64,Ser67,Gly68,Ser69,Gly70,Ser71,Gly72,Thr73,Ala76,Thr78,Ser80,Ser81,Ile110和Lys111;更优选地,突变位点包括Thr5,Ser7,Ala9,Leu11,Leu13,Ser14,Ala47,Leu50,Ala64,Gly68,Ser69,Ser71,Gly72,Thr73,Ser80和Ile110。对于本文公开的抗PD-1抗体2的重链框架区的优选突变位点包括Ser7,Gly8,Gly9,Gly10,Gly15,Ser17,Ala24,Ser25,Gly26,Thr28,Ser30,Ala40,Gly42,Gly44,Thr68,Ser71,Ser75,Thr78,Thr85,Ala88,Thr91,Ala92,Thr98,Thr110,Ser112,Ser113,Ala114,Ser115,Thr116,Lys117,Gly118和Ser120;更优选地,突变位点包括Ser7,Gly8,Gly9,Ala24,Ser25,Gly26,Gly44,Thr68,Ser75,Thr78,Thr85,Thr110,Ser112,Ser113,Ser115,Thr116,Lys117,Gly118和Ser120。

[0111] 关于其他功能性蛋白质,例如细胞因子,如果其突变体保留野生型蛋白的70%或更多,优选80%或更多,更优选90%或更多的结合活性(例如,与其天然配体的结合能力),那么该位置的氨基酸残基可突变为半胱氨酸以与功能基团连接。例如,IL2的突变位点可选自Lys32,Lys35,Thr37,Met39,Thr41,Lys43,Lys48,Lys49,Lys64,Leu72,Ala73,Ser75,Lys76,Leu94,Thr101,Thr102,Tyr107,Ala108,Thr111和Ala112以阻断α受体;或选自Leu12,His16,Leu19,Met23,Gly27,Ser75,Arg81,Leu85,Ser87,Leu94,Gly98,Ser99,Thr101和Thr133以阻断β受体;或者选自Leu36,Ala50,Thr51,Thr123,Ser126,Ser127和Ser130,以阻断γ受体。在一些实施例中,IL2的突变位点可选自:Lys32,Lys35,Thr37,Thr41,Lys43,Lys48,Lys49,Ala50,Leu72,Ala73,Ser75,Lys76,Leu94,Thr101,Thr102,Ala108,Thr111和Ala112,以阻断IL2的α受体;或者Leu19,Gly27,Ser75,Leu80,Ser87,Leu94,Gly98,Ser99,Thr101和Thr133,以阻断IL2的β受体;或者Leu36,Ala50,Thr51,Thr123,Ser126,Ser127和Ser130,以阻断IL2的γ受体。

[0112] 细胞因子的Ala,Gly,Ser,Thr,Leu,Lys,Tyr,Phe,Asp,Glu和Ile中的一个或多个,例如IL2,IL10和IL15,可以突变为半胱氨酸。优选地,细胞因子的氨基酸序列中的任何Thr,Leu,Ala,Gly和Ser突变为半胱氨酸。

[0113] 在一些实施例中,人IL10中的突变位点选自:Thr6,Ser8,Ser11,Thr13,Gly17,Arg24,Ser31,Arg32,Lys34,Thr35,Lys40,Leu46,Lys49,Ser51,Lys57,Gly58,Ser66,Tyr72,Lys88,His90,Ser93,Lys99,Thr100,Arg104,Lys117,Ser118,Lys119,Lys125,Lys130,Lys134,Gly135,Tyr137,Tyr149,Thr155,Lys157和Arg159。

[0114] 对于本发明公开的融合蛋白,可以将一个或多个半胱氨酸引入融合蛋白的任何蛋白质中。例如,对于双特异性抗体,可以将突变引入scFv的任一或同时两个的CDR或非CDR中,或引入抗原结合域的任一或两个中。对于抗体和细胞因子的融合蛋白,抗体和细胞因子

中的任一种或两种可含有突变。

[0115] 示例性序列可以参考SEQ ID NO:13-83。

[0116] 生物分子的突变,转染,表达和纯化可以通过本领域已知的方法进行。例如,可以直接合成具有突变位置的生物分子的核酸,然后可以将通过酶消化获得的不同片段的核酸分子连接到表达载体中,并将表达载体转化到细菌或真核宿主细胞中。含有半胱氨酸突变的生物分子可以通过宿主细胞中的重组获得。

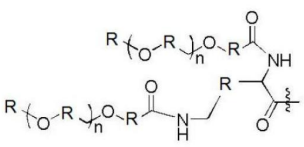
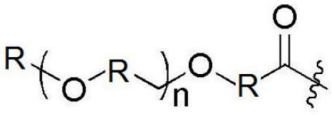
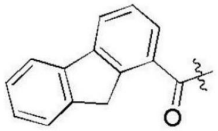
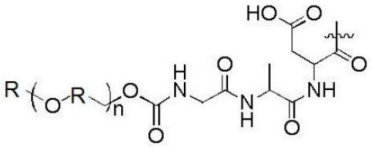
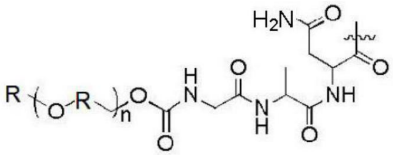
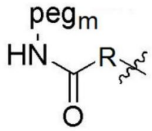
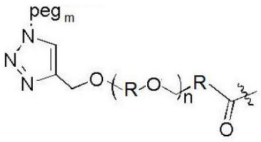
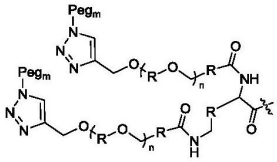
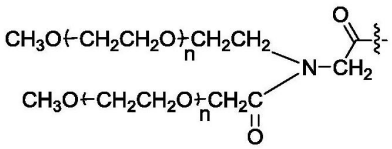
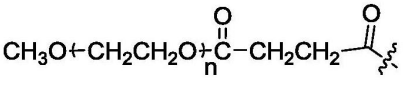
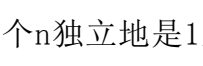
[0117] 适用于本公开的细菌或真核宿主细胞可以是本领域常用的宿主细胞,包括但不限于细菌,酵母和哺乳动物细胞。有用的真核宿主细胞包括CHO细胞,HEK293T细胞或毕赤酵母(Pichia pastoris)。

[0118] 适用于本公开的表达载体可以是本领域已知的基于病毒的表达载体,包括但不限于杆状病毒,猿猴病毒(SV40),逆转录病毒或基于痘苗病毒的载体。含有合适调控元件和选择标记的表达载体可用于制备稳定表达突变体的哺乳动物细胞系。例如,GS真核表达系统(Lonza),DHFR真核表达系统(Invitrogen)和巴斯德毕赤酵母表达系统(Invitrogen)可用于表达和制备。

[0119] 可以通过本领域已知的分离方法纯化本公开的生物分子。这些方法包括但不限于DEAE离子交换,凝胶过滤和羟基磷灰石层析。例如,蛋白G柱可用于分离细胞培养物上清液或细胞质提取物中的生物分子。在一些实施方案中,可以对生物分子进行“工程改造”以使它们含有允许生物分子被捕获到亲和基质的氨基酸序列。例如,一个标记物可用于促进多肽的纯化。标记物包括但不限于c-myc,血原细胞,poly-His(例如,6His)或Flag TM(Kodak)。这种标记物可以插入多肽内的任何位置,包括羧基末端或氨基末端。还可以通过免疫亲和层析纯化本公开的生物分子。

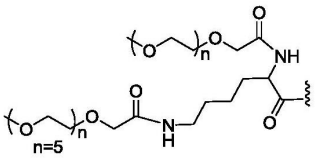
[0120] 适用于本发明的官能部分可由式R1-R2-R3-R4表示。在官能部分中,R 1,R 2,R 3和R 4通过任何合适的连接方式连接在一起,包括但不限于酰胺,酯,氨基甲酸酯,脲或腙。在本发明中,酰胺键可以用“-CO-NH-”表示,酯键可以用“-C(O)O-”表示,氨基甲酸酯键可以用“-NH-C(O)-O-”表示,脲键可以用“-NH-CO-NH-”表示,腙键可以用由“-CH=N-NH-”表示。

[0121] R1是生物分子R5的保护基团。它可以选自能够阻止生物分子与其配体或受体结合的任何基团,以防止其受到其他分子的干扰,例如,在其到达病理性微环境,如肿瘤或炎症微环境之前阻止其与其配体或受体结合的分子。合适的R1可选自聚乙二醇-C_{1-5}烷基羰基,萘基羰基,喹啉基羰基,芴基羰基,金刚烷基羰基,

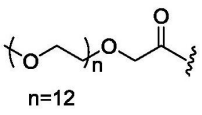
[0122]  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , 

[0123] 其中每个R独立地是C1-4烷基;每个n独立地是1至30000范围内的整数,例如1至15000,1至5000,1至2000,1至300,1至150,1至50,1至20的整数或3至12;聚乙二醇或Peg_m表示分子量为44至132000的聚乙二醇,例如1000至50000或10000至30000的聚乙二醇;m表示聚乙二醇的分子量;波浪线表示连接R2的R1的位置。

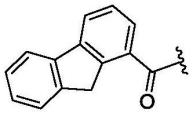
[0124] 在一些实施方案中,R 1选自:



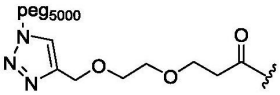
R1-1 ,



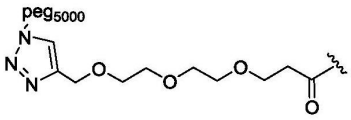
R1-2 ,



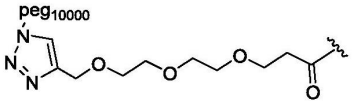
R1-3 ,



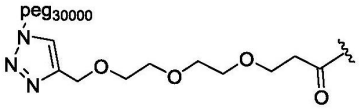
R1-4 ,



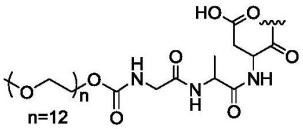
R1-5 ,



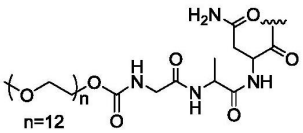
R1-6 ,



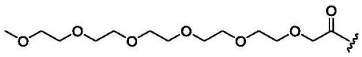
R1-7 ,



R1-8 ,

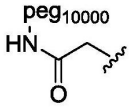


R1-9 ,

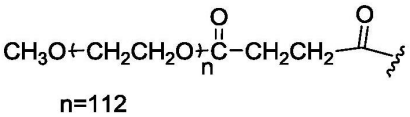


R1-10 ,

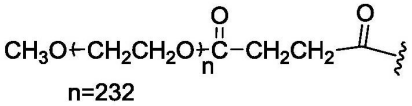
[0125]



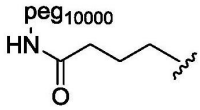
R1-11 ,



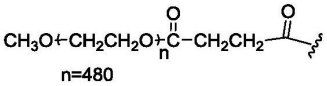
R1-12 ,



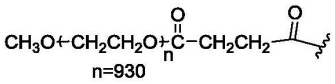
R1-13 ,



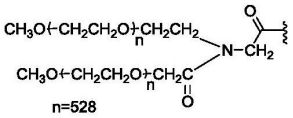
R1-14 ,



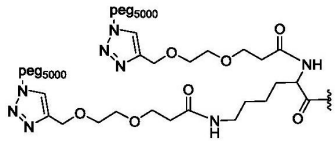
R1-15



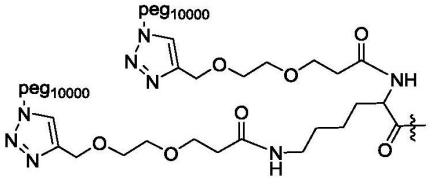
R1-16 ,



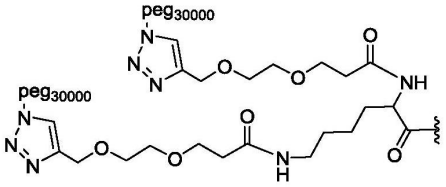
R1-17 ,



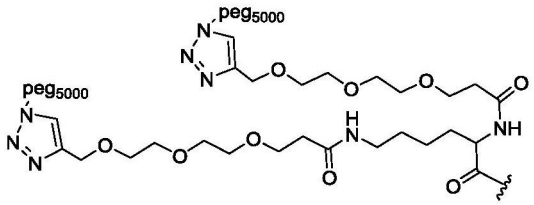
R1-18



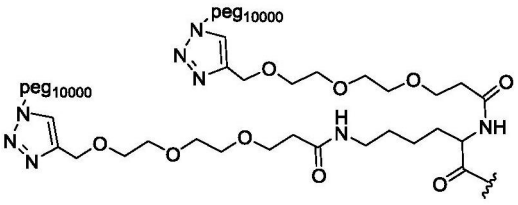
R1-19 ,



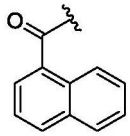
R1-20



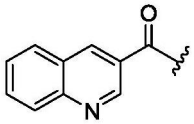
R1-21 ,



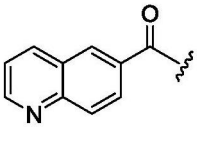
R1-22



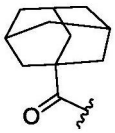
R1-23 ,



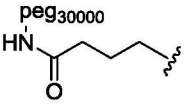
R1-24 ,



R1-25 ,

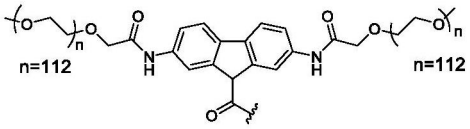


R1-26 ,

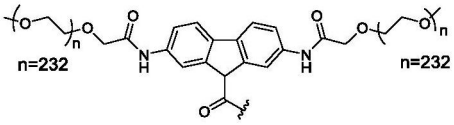


R1-27 ,

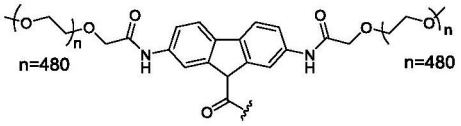
[0126]



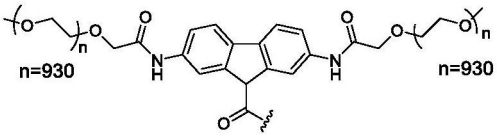
R1-28 ,



R1-29 ,



R1-30 ,



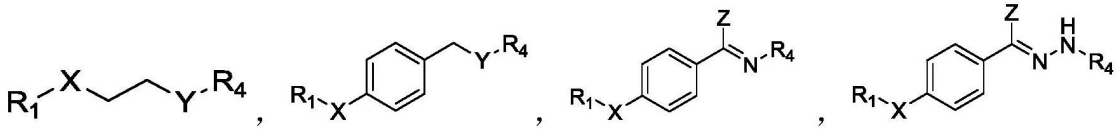
R1-31

[0127] 通常，如果突变位置存在于生物分子的功能结构域中，例如，在抗体的CDR中，则对R1的分子量没有特别限制，R1可以具有相对低的分子量。如果突变位置存在于生物分子的功能结构域之外，例如，在抗体的非CDR中，优选选择R1以使R1-R2-R3-R4的分子量高于200，优选高于500，更优选高于1000，以使生物分子的偶联物的分子量为5000或更高，优选8000或更高，更优选10000或更高，从而更好地防止生物分子在到达病理微环境之前与其配体或受体结合。

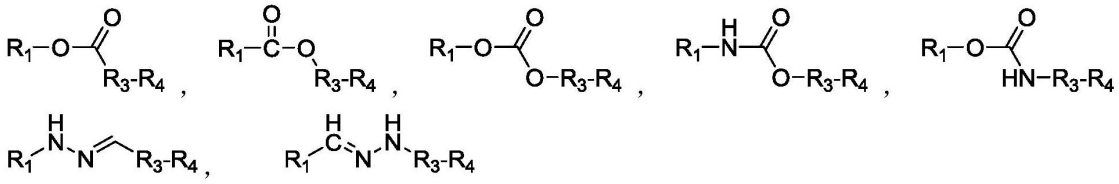
[0128] 在本发明中，R2是可切割的连接臂。它可以是能够被蛋白水解酶，蛋白酶或肽酶活化的肽或能够在病理微环境中被酸活化的化学键。在本公开中，蛋白水解酶，蛋白酶或肽酶可以是存在于病理微环境中的各种蛋白水解酶，蛋白酶或肽酶。例如，蛋白酶可能是半胱氨酸蛋白酶，天冬氨酸蛋白酶，谷氨酸蛋白酶，苏氨酸蛋白酶，明胶酶，金属蛋白酶或天冬酰胺肽裂解酶。在一些实施方案中，R2可以被天冬酰胺内肽酶(Legumain)，组织蛋白酶B，组织蛋白酶C，组织蛋白酶D，组织蛋白酶E，组织蛋白酶K，组织蛋白酶L，激肽释放酶，hK1，hK10，hK15，纤溶酶，胶原酶，IV型胶原酶，星形胶质素，Xa因子，胰凝乳蛋白酶样蛋白酶，胰蛋白酶样蛋白酶，弹性蛋白酶样蛋白酶，枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶，猕猴桃蛋白酶(actinidain)，菠萝蛋白酶，钙蛋白酶，半胱天冬酶，半胱天冬酶-3，Mirl-CP，木瓜蛋白酶，HIV-1蛋白酶，HSV蛋白酶，CMV蛋白酶，凝乳酶，肽酶(pepsm)，间质蛋白酶(matriptase)，天冬酰胺内肽酶，血浆蛋白酶(plasmepsm)，猪笼草蛋白酶(nepenthesin)，金属外肽酶，金属内切蛋白酶(metalloendopepasease)，基质金属蛋白酶(MMP)，MMP1，MMP2，MMP3，MMP8，MMP9，MMP10，

MMP11,MMP12,MMP13,MMP14,ADAM10,ADAM12,尿激酶纤溶酶原激活物(uPA),肠内激酶,前列腺特异性抗原(PSA,hK3),白细胞介素-113转化酶,凝血酶,FAP(FAP-a),跨膜肽酶(meprin),颗粒酶,二肽基肽酶和二肽基肽酶IV(DPPIV/CD26)中的至少一种切割。在优选的实施例中,本发明公开的内容特别涉及天冬酰胺内肽酶,其在肿瘤微环境中主要由肿瘤细胞表达和分泌。通过天冬酰胺内肽酶的表达,肿瘤相关巨噬细胞(M2型)也不同于单核细胞和炎性巨噬细胞(M1型)。在本发明中,多肽是蛋白水解酶的底物,可以被蛋白水解酶识别和切割。本发明的R2可以由-R2a-,-R2b-,-R2a-N-,-R2a-D-,-R2a-AAN-,-R2a-AAD-或-R2a-R2b-表示;其中R2a是能够被一种或多种蛋白水解酶在酰胺键上切割的肽;R2b是一种可以通过侧链中的氨基与R3形成氨基甲酸酯的肽,氨基甲酸酯可被一种或多种蛋白水解酶切割;A是丙氨酸;N是天冬酰胺,其侧链中的氨基与R3形成氨基甲酸酯,氨基甲酸酯可被天冬酰胺内肽酶切割;D是天冬氨酸,其侧链中的氨基与R3形成氨基甲酸酯,且可以被颗粒酶B裂解。R2a和R2b可以通过形成酰胺键而连接。在天冬酰胺内肽酶之后,颗粒酶B裂解R2和R3之间的键(例如氨基甲酸酯),R3可以快速地自动释放,R4基团保留。其他酶可能在酰胺处裂解R2的键,导致连接子中的一些氨基酸残基残留,且R3的不会自动释放。这种R2的实例包括但不限于LTPRLGPAAN(SEQ ID NO:84),GPAAN(SEQ ID NO:85)和LSGRSDN(SEQ ID NO:86)。

[0129] 在一些实施例中,能够被蛋白水解酶活化的合适的多肽可以是三肽。在本领域已知的病理微环境中能够被蛋白水解酶识别和切割(活化)的任何底物肽可以用作本文公开的R2。此类肽具有WO 2016/026458中公开的结构,其主体通过引用并入本公开。在一些实施方案中,在适用于本公开的三肽结构中,与R1连接的氨基酸残基可以选自Ala,Thr,Val和Ile,中间氨基酸残基可以选自Ala,Thr,Val和Asn,与R3连接的氨基酸残基可选自Asn和Asp。通常,R2通过其氨基酸残基的氨基以酰胺,酯,氨基甲酸酯,脲或脲的连接方式与R1连接,并通过其氨基酸残基的羧基以酰胺,酯,氨基甲酸酯,尿素或脲的连接方式与R3连接。在本公开的一些优选实施方案中,三肽选自Ala-Ala-Asn和Ala-Ala-Asp。Ala-Ala-Asn可以被天冬酰胺内肽酶识别和切割,并且Ala-Ala-Asp可以被颗粒酶识别和切割。在一些实施方案中,R 2可以是能够在病理微环境中被酸活化的化学键。这种键包括但不限于酰胺键,酯键,氨基甲酸酯键,脲键或脲键。当R2是化学键时,本文公开的功能部分可以由式R1-R2-R3-R4表示,其中R1通过能够在病理微环境中被酸活化的化学键与R3连接。例如,在一些实施例中,R1-R2-R3-R4的结构可表示如下:

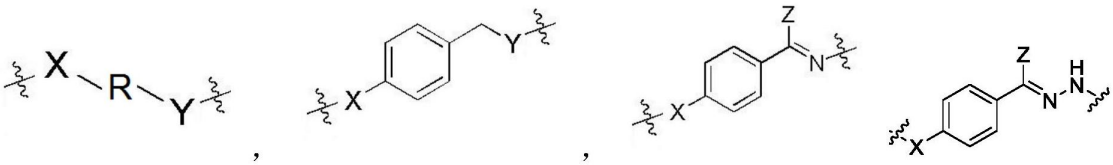
[0130] 

[0131] 其中X和Y各自独立地为NR'或O,Z为H或C1-10烷基,优选为C1-4烷基,且R'为H或C1-4烷基;R3分别通过X和Y以酰胺,酯,氨基甲酸酯,脲或脲键的连接方式与R1和R4连接。在一些实施方案中,R 1-R 2-R 3-R 4的结构可表示如下:

[0132] 

[0133] 在本发明中,R3是切割后可以自脱落的连接臂,其能够在R2被切割后自动脱落以

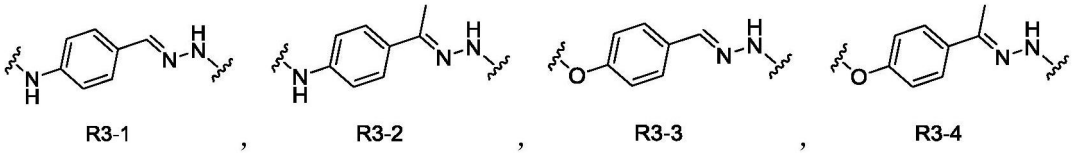
释放R4-S-cys-R5。例如，这种连接臂包括但不限于：

[0134] 

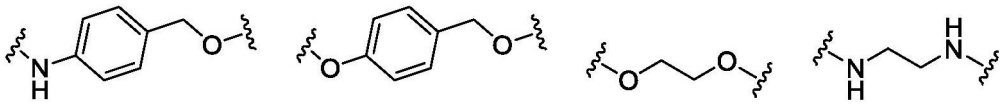
[0135] 其中X和Y各自独立地为NR'或O，Z为H或C1-10烷基，优选C1-4烷基；R是C1-4烷基；R'是H或C1-4烷基；其中R4通过上式中的Y或N以例如酰胺键，酯键，氨基甲酸酯键，脲键和腙键的方式与R3连接。在一些实施例中，R 3选自-NH-苯基-CH_2O-，-NH-苯基-CH＝N-，-NH-苯基-C(CH_3)＝N-，-O-苯基-CH＝N-和-O-苯基-C(CH_3)＝N-。

[0136] 在一些实施例中，R3是能够在病理微环境中被酸活化的化学键。化学键选自酰胺键，酯键，氨基甲酸酯键，脲或者腙键。当R3是能够被酸活化的化学键时，可以不存在R2，使得R1-R3-R4-S-cys-R5仅可以被酸活化。另一方面，当R2不存在时，R3必须是能够被酸活化的化学键。

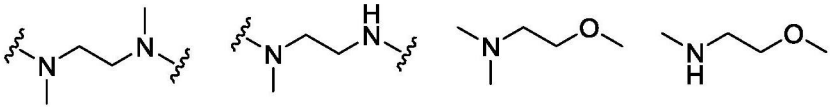
[0137] 在一些实施例中，R3由以下任何结构表示：

[0138] 

R3-1 , R3-2 , R3-3 , R3-4



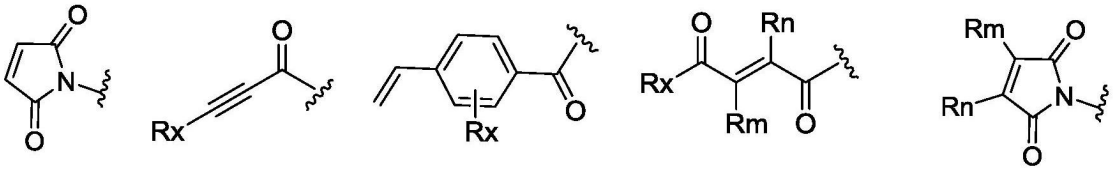
R3-5 , R3-6 , R3-7 , R3-8 ,

[0139] 

R3-9 , R3-10 , R3-11 , R3-12

[0140] 在本发明中，R4是能够在R2和R3被切割或者自脱落后恢复，维持，降低或促进生物分子与其抗原，配体或受体的结合能力的结合基团。在一些实施例中，所得的R4-s-Cys-R5在R2和R3被切割或者自脱落后表现出比天然R5与其抗原，配体或受体>60％的亲合力。

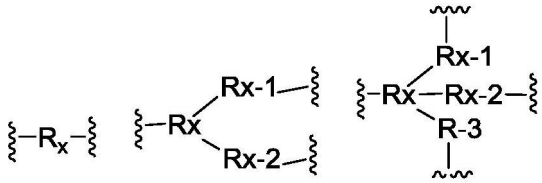
[0141] 合适的R4可以由-R4-a-R4-b-R4-c-表示，其中R4-a选自：

[0142] 

R_{4a}-I , R_{4a}-II , R_{4a}-III , R_{4a}-IV , R_{4a}-V

[0143] 其中Ra和Rb各自独立地选自H和C1-6烷基或C1-6烷氧基；

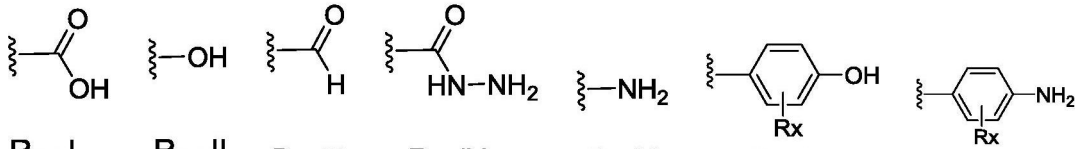
[0144] R4-b选自：

[0145] 

R_{4b}-I , R_{4b}-II , R_{4b}-III

[0146] 其中在式R4-b1中，Rc不存在，或选自C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷氧基-C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷基-C_{3-8}环烷基，(C_{1-4}烷基-O)p-C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷基羰基氨基-(C_{1-4}烷基-O)$_p$-C_{1-12}烷基，苯基-C_{1-12}烷基，C_{3-8}环烷基，C_{1-12}烷基-C_{3-8}环烷基-C_{1-12}烷基和C_{1-12}烷基-苯基-C_{1-12}烷基；在式R4-b2中，Rc是C_{1-12}烷基氨基，其中Ra-1和Ra-2在氨基的N原子上被取代，在式4-b3中，Rc是C_{1-12}烷基，其中烷基末端的最后一个C原子被Ra-1，Ra-2和R2-3取代，其中Ra-1，Ra-2和Ra-3中各自独立地选自C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷基-OH和C_{1-12}烷基-NR"R"'，其中R"和R"'各自独立地选自：H和C_{1-12}烷基；其中，在式R4-b2和R4-b3中，R4-b通过Ra-1，Ra-2和Ra-3中的至少一个与R4-c连接；

[0147] R4-c选自：

[0148] 

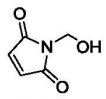
R_{4c}-I , R_{4c}-II , R_{4c}-III , R_{4c}-IV , R_{4c}-V , R_{4c}-VI , R_{4c}-VII

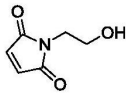
[0149] 其中Rx选自H，卤素和C_{1-4}烷基；p是1至10的整数，例如1至5的整数；q为1～4的整数，例如1～2的整数；条件是当R4-a选自式R4-a2，R4-a3和R4-a4时，R4-c不存在；其中R3通过R4的R4-c连接到R4，并且R4-a的每个式中所示的波浪线表示R4-a与R4-b连接的位置。优选地，在式R4c-III，Rc4-IV，R4c-VI和R4c-VII中，R3与这些基团的碳原子连接。

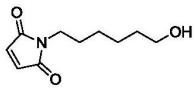
[0150] 通常，R4通过马来酰亚胺(R4-a1)，乙炔(R4-a2)，乙烯基(R4-a3)，单取代的丁烯二酸(R4-a4)或双取代的马来酰亚胺(R4-a4)与R5的半胱氨酸的S原子连接。

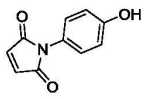
[0151] 在一些实施方案中，R4选自：

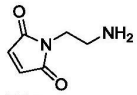
[0152]

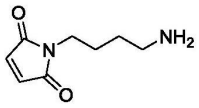

R4-1 ,

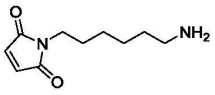

R4-2 ,

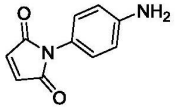

R4-3 ,

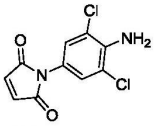

R4-4 ,

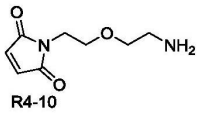

R4-5 ,

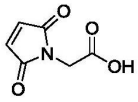

R4-6 ,

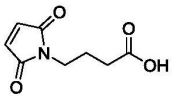

R4-7 ,

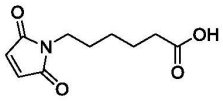

R4-8 ,

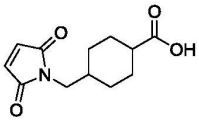

R4-9 ,

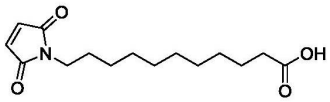

R4-10 ,

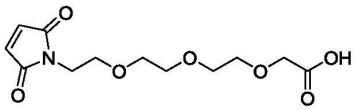

R4-11 ,

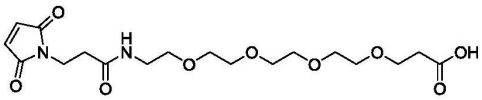

R4-12 ,

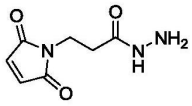

R4-13 ,

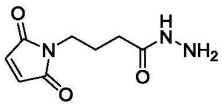

R4-14 ,

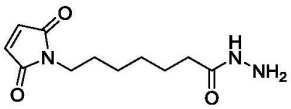

R4-15 ,


R4-16 ,

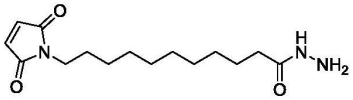

R4-17 ,

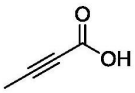

R4-18 ,

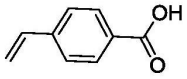

R4-19 ,

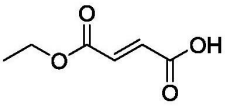

R4-20 ,

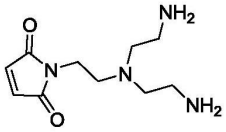

R4-21 ,

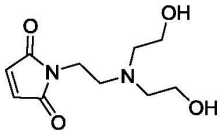

R4-22 ,

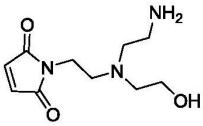

R4-23 ,

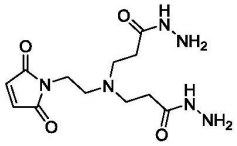

R4-24 ,

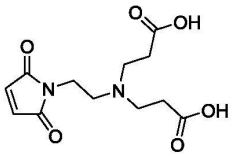

R4-25 ,

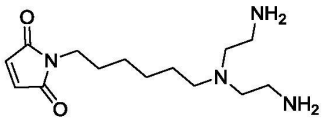

R4-26 ,

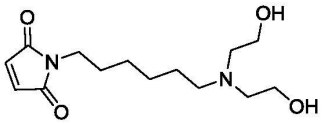

R4-27 ,

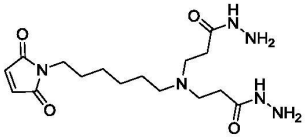

R4-28 ,

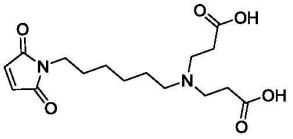

R4-29 ,

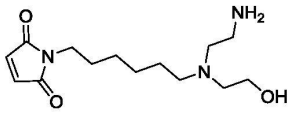

R4-30 ,

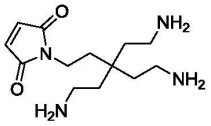

R4-31 ,

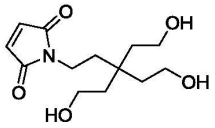

R4-32 ,

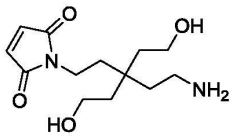

R4-33 ,

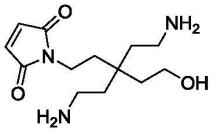

R4-34 ,

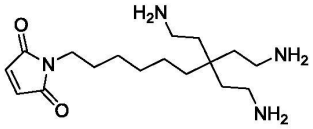

R4-35 ,

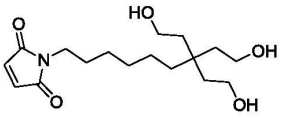

R4-36 ,

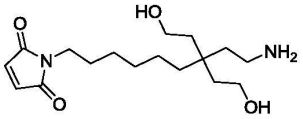

R4-37 ,


R4-38 ,

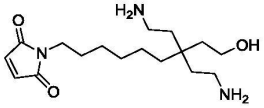

R4-38 ,

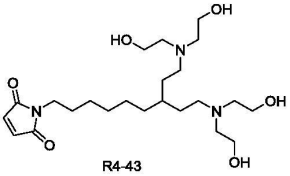

R4-39 ,

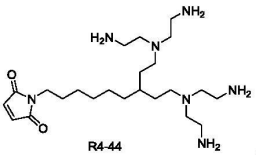

R4-40 ,

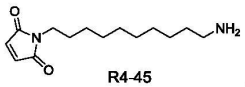

R4-41 ,

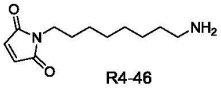
[0153]

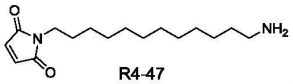

R4-42 ,

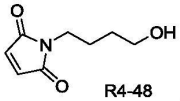

R4-43 ,

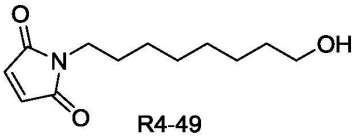

R4-44 ,

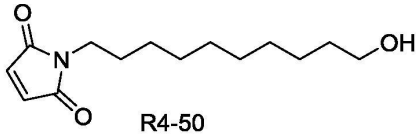

R4-45 ,

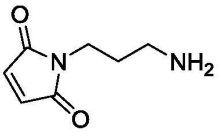

R4-46 ,

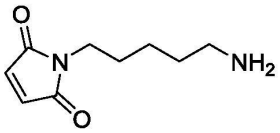

R4-47 ,

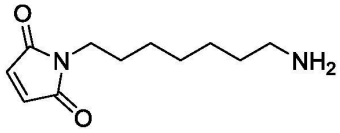

R4-48 ,

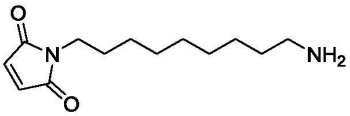

R4-49 ,

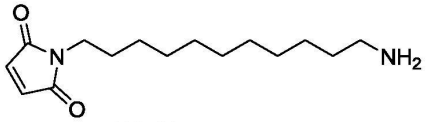

R4-50 ,

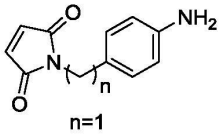

R4-51 ,

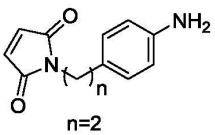

R4-52 ,


R4-53 ,

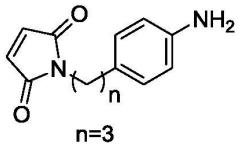

R4-54 ,

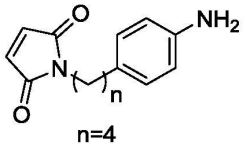

R4-55 ,


n=1
R4-56 ,

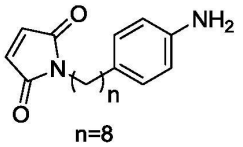

n=2
R4-57 ,

[0154]

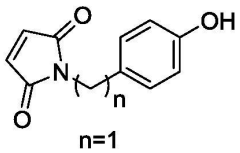

n=3
R4-58 ,

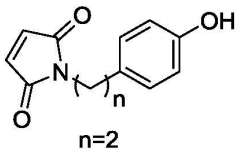

n=4
R4-59 ,

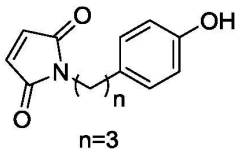

n=6
R4-60 ,


n=8
R4-61 ,

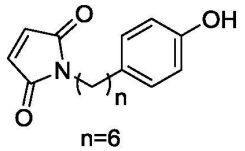

n=10
R4-62 ,

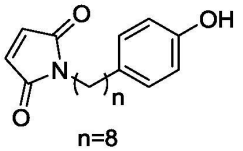

n=1
R4-63 ,


n=2
R4-64 ,

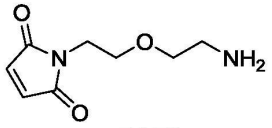

n=3
R4-65 ,

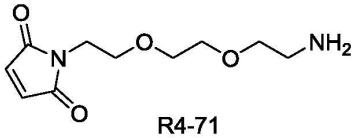

n=4
R4-66 ,

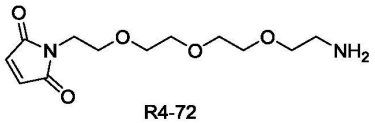

n=6
R4-67 ,

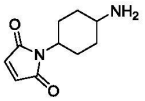

n=8
R4-68 ,

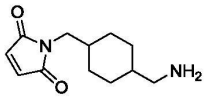

n=10
R4-69 ,

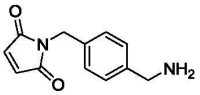

R4-70 ,

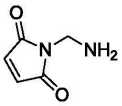

R4-71 ,


R4-72


R4-73 ,

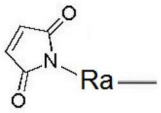

R4-74 ,


R4-75 ,


R4-76

[0155] 其中波浪线表示连接R3的R4的位置。

[0156] 在一些实施例中，R4表示为：

[0157] 

[0158] 其中：Ra选自C_{1-12}烷基，C_{1-12}烷氧基，C_{1-12}烷基羰基，苯氧基或任选被一个或两个卤素取代的苯基氨基，C_{1-12}烷基氨基，C_{1-12}烷氧基-C1-12烷基氨基，C_{1-12}烷基羰基氧基，C_{1-12}烷基-C_{3-8}环烷基羰基氧基，(C_{1-4}烷基-O)p-C_{1-12}烷基羰基氧基，C_{1-12}烷基羰基氨基-(C_{1-4}烷基-O)p-C_{1-12}烷基羰基氧基，C_{1-12}烷基羰基氨基和苯基-C_{1-12}烷基羰基氨基；p是1至10的整数，例如1至5的整数；其中R3通过R4的Ra与R4连接，并通过R4的马来酰亚胺基与R5的半胱氨酸的硫醇基连接。

[0159] 在本发明的偶联物中，R4通过R5中包含的半胱氨酸的S与R5共价连接。R1-R2通过蛋白水解酶或在病理微环境的酸性条件下从R3-R4-S-cys-R5切割，并释放R3-R4-S-cys-R5。然后R3自动脱落，R4-S-cys-R5被释放。R4-S-cys-R5可以恢复或促进R5与其配体或受体的结合能力。

[0160] 应当理解的是，在本发明中，在每个指示的公式中使用的波浪线指示包含波浪线的部分与其他部分的连接位置，以及针对抗体的氨基酸残基提及的氨基酸的所有位置编号

均基于Kabat编号。

[0161] 如上所述,R5代表具有突变为半胱氨酸的一个或多个氨基酸残基的生物分子。事实上,R5是生物分子的一部分,没有引入半胱氨酸的硫醇基团的氢原子。不存在硫醇基团的氢原子允许R5被认为是与本发明的R4连接的基团。

[0162] 本发明的偶联物可以通过包括通过DTT,TCEP或其他还原剂还原突变生物分子的方法来制备;用Cu2SO4,脱氢抗坏血酸或其他氧化剂氧化;然后在液相或固相条件下将氧化的生物分子(R5)与R1-R2-R3-R4结合。最终产物可以在液相中收集。

[0163] 因此,除了偶联物之外,本发明还包含功能部分,即R1-R2-R3-R4;R2-R3-R4;R3-R4-S-CYS-R5;R4-S-CYS-R5;和突变的生物分子;其中R1,R2,R3,R3,R5及其连接方式和突变的生物分子如本发明的任何部分或任何实施方案中所定义。

[0164] 在一些实施方案中,功能部分由S1-S64显示。在本发明中,-S-cys-表示R4通过R5中的突变引入的半胱氨酸的巯基与R5共价连接。R3-R4-S-cys-R5是通过蛋白水解酶裂解R1-R2或在病理微环境的酸性条件下产生的偶联物。通常,在R3与R2分离后,先前与R2连接的R3基团形成羟基(-OH)或氨基(-NH_2)。R4-S-cys-R5是在R3自动脱落后形成的偶联物。通常,在R3自动脱落后,先前与R3连接的R4基团形成羟基(-OH)或氨基(-NH_2)。

[0165] 如本文所述的偶联物,功能部分,R2-R3-R4,R3-R4-S-cys-R5和R4-S-cys-R5可通过本领域已知的方法合成。例如,它们可以根据本申请的实施例1中描述的方法制备。

[0166] 本发明还包括药物制剂,其包含如本文所述的偶联物。药物制剂可进一步包含药学上可接受的载体。载体可以是任何药学上可接受的载体或赋形剂,其可以根据剂型和给药方式而变化。药学上可接受的载体通常是安全且无毒的,并且可包含在制药工业中配制药物组合物中使用的任何已知物质,包括填料,稀释剂,凝结剂,粘合剂,润滑剂,助流剂,稳定剂,着色剂,润湿剂和崩解剂等。药学上可接受的合适的载体包括糖,如乳糖或蔗糖,甘露醇或山梨糖醇;纤维素制剂和/或磷酸钙,如磷酸三钙或磷酸氢钙;淀粉,包括玉米淀粉,小麦淀粉,大米淀粉,马铃薯淀粉,明胶,黄蓍胶,甲基纤维素,羟丙基甲基纤维素,羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮;二氧化硅,滑石粉,硬脂酸或其盐,如硬脂酸镁或硬脂酸钙;和/或聚乙二醇等等。当选择药学上可接受的载体时,主要考虑的是药物剂型的给药方式。这在本领域中是众所周知的。

[0167] 药物组合物可包含治疗或预防有效量的偶联物。“有效量”表示成分的量足以产生所需的反应。具体有效量取决于各种因素,例如待治疗的具体疾病,患者的身体状况,如体重,年龄和性别,治疗的持续时间,共同给药的治疗(如果有的话),以及使用的具体配方。通常,如本文所述的“有效量”是常规量的生物分子。然而,在一些实施方案中,本发明药物组合物中包含的治疗或预防有效量的偶联物可以低于常规量的生物分子但可以产生更好的治疗或预防效果,因为生物分子在到达病理微环境与其配体或受体结合之前受保护基团保护。

[0168] 本发明的药物组合物可以配制成各种合适的剂型,包括但不限于片剂,胶囊,注射剂等,并且可以通过任何合适的途径给药以达到预期目的。例如,它可以肠胃外,皮下,静脉内,肌肉内,腹膜内,透皮,口服,鞘内,颅内,鼻内或外给药。药物的剂量可取决于患者的年龄,健康状况和体重,并行进行的治疗,以及治疗的频率等。本发明的药物组合物可以施用于任何有此需要的受试者,例如作为哺乳动物,尤其是人类。

[0169] 在肿瘤患者中，携带肿瘤抗原的肿瘤细胞或抗原呈递细胞(APC)通过与T细胞结合而部分或完全抑制宿主对肿瘤的免疫杀伤。然而，本发明的偶联物通过蛋白水解酶，尤其是天冬酰胺内肽酶或粒酶，或在酸性条件下，在病理微环境中被活化和释放。例如，本发明的偶联物中的生物分子是IL2，抗CD28抗体或抗PD-1抗体等可以选择性地刺激T细胞的增殖或增强其分泌抗肿瘤细胞因子的功能。

[0170] 因此，本发明的偶联物可以有效地突破个体的免疫屏障，到达病理微环境，然后在病理微环境中被激活和释放。结果，它可以选择性地促进肿瘤或炎症微环境中T细胞等的增殖或杀伤作用，从而实现低自身免疫性和高效力。

[0171] 因此，本公开中公开的每种偶联物R4-S-cys-R5或突变的生物分子可以用于治疗肿瘤或炎症，或者可以用作制备用于治疗肿瘤或炎症的药物的活性成分。本文所述的肿瘤或炎症可以是已知由本文所述的生物分子治疗的任何肿瘤或炎症，包括但不限于膀胱，脑，乳腺，子宫颈，结肠-直肠，食道，肾，肝，肺，鼻咽，胰腺，前列腺，皮肤，胃，子宫，卵巢，睾丸和血液中的癌症等。具体而言，癌症包括膀胱癌，脑癌，乳腺癌，宫颈癌，结直肠癌，食道癌，肾癌，肝癌，肺癌，鼻咽癌，胰腺癌，前列腺癌，皮肤癌，胃癌，子宫癌，卵巢癌，睾丸癌和血癌。

[0172] 还包括用于治疗或预防肿瘤或炎症的方法，其包括向有此需要的受试者施用治疗或预防有效量的如本文所述的偶联物或其药物组合物。该方法可以与任何已知的放射疗法或免疫疗法组合使用。

[0173] 应当理解，本发明中使用的术语“包含”和“包括”或类似表达也意味着“由……组成”等。所有重量百分比或体积百分比的总和应等于100％。除非另有说明，实施例中使用的各种试剂和产品是商业产品。除非另有说明，否则实施例中提到的方法是根据常规技术实施的。以下实施例不旨在限制本发明的范围。

[0174] 序列信息总结如下：

[0175]

SEQ ID 编号	说明	SEQ ID 编号	说明
1	抗 PD-1 抗体的重链	45	具有突变的白细胞介素-2
2	抗 PD-1 抗体的轻链	46	具有突变的白细胞介素-2
3	抗 PD-1 抗体的重链	47	具有突变的白细胞介素-2
4	抗 PD-1 抗体的轻链	48	具有突变的白细胞介素-2
5	抗 CTLA-4 抗体的重链	49	具有突变的白细胞介素-2
6	抗 CTLA-4 抗体的轻链	50	具有突变的白细胞介素-2
7	抗 TNF-α 抗体的重链	51	具有突变的白细胞介素-2
8	抗 TNF-α 抗体的轻链	52	具有突变的白细胞介素-2
9	抗 CD-28 抗体的重链	53	具有突变的白细胞介素-2
10	抗 CD-28 抗体的轻链	54	具有突变的白细胞介素-10
11	野生型 IL2 的氨基酸序列	55	具有突变的白细胞介素-10
12	野生型 IL2 的氨基酸序列	56	具有突变的白细胞介素-10
13	Ipilimumab 重链	57	具有突变的白细胞介素-10
14	Ipilimumab 轻链	58	具有突变的白细胞介素-10
15	Pembrolizumab 重链	59	具有突变的白细胞介素-10
16	Pembrolizumab 轻链	60	抗人 VEGF 抗体重链
17	Nivolumab 重链	61	抗人 VEGF 抗体轻链
18	Nivolumab 轻链	62	抗人 CD20 抗体重链
19	抗人 PD-1 抗体（WO-2017/124050 A1）重链	63	抗人 CD20 抗体轻链
20	抗人 PD-1 抗体（WO 2017/124050 A1）轻链	64	Atezolizumab 的 VH
21	抗小鼠 PD-1 抗体 J43v2 重链	65	Atezolizumab 的 VL
22	抗小鼠 PD-1 抗体 J43v2 轻链	66	具有突变的 Cetuximab 的 VH
23	抗小鼠 CTLA-4 9D9 抗体重链	67	具有突变的 Cetuximab 的 VL
24	抗小鼠 CTLA-4 9D9 抗体轻链	68	具有突变的 Ramucirumab 的 VH
25	抗人 4-1BB 抗体重链	69	具有突变的 Ramucirumab 的 VL

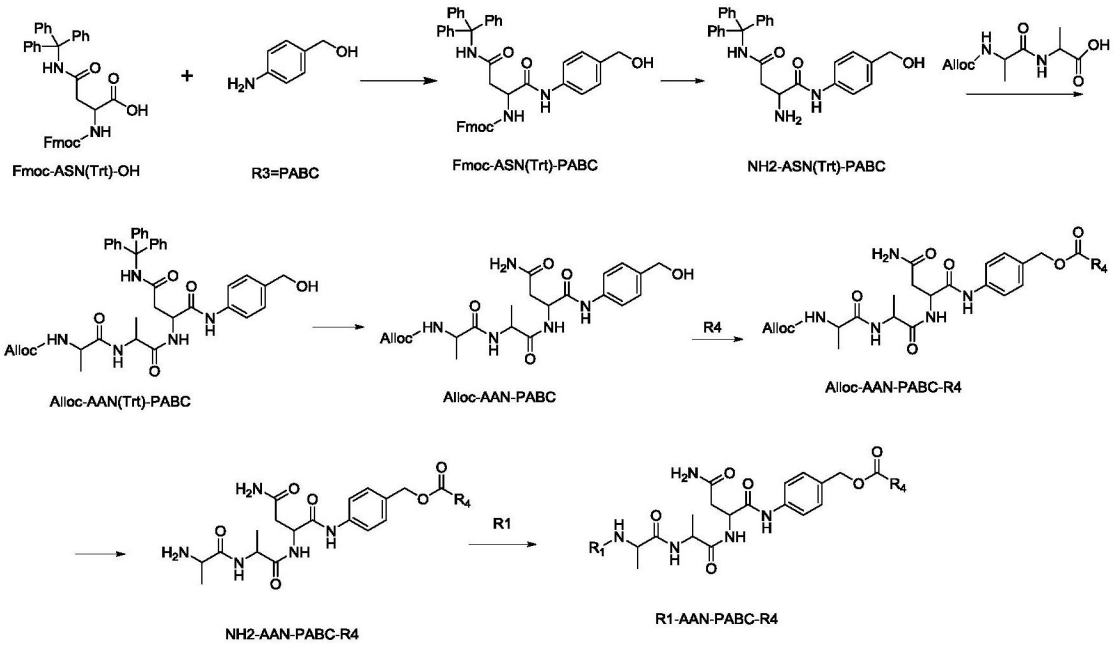
[0176]

26	抗人 4-1BB 抗体轻链	70	具有突变的抗 Her2 抗体 scFv 与 CD3 的融合蛋白
27	Trastuzumab 重链	71	具有突变的抗 Her2 抗体的 VH
28	Trastuzumab 轻链	72	具有突变的抗 Her2 抗体的 VL
29	Adalimumab 重链	73	抗 Her2 抗体的 scFv 与抗 CD3 抗体的融合蛋白
30	Adalimumab 轻链	74	抗 Her2 抗体的 scFv 与抗 CD3 抗体的融合蛋白
31	Atezolizumab 重链	75	抗 CD3 抗体
32	Atezolizumab 轻链	76	Cetuximab 的 VH
33	抗人 CD28 抗体重链	77	Cetuximab 的 VL
34	抗人 CD28 抗体轻链	78	Ramucirumab 的 VH
35	Ipi-se008 轻链	79	Ramucirumab 的 VL
36	Ipi-se010 轻链	80	抗 Her2 抗体的 VH
37	Ipi-se009 轻链	81	Her2 抗体的 VL
38	Pem-se010 轻链	82	具有突变的抗 Her2 抗体 scFvs 与抗 CD3 抗体的融合蛋白
39	Pem-se009 轻链	83	具有突变的抗 Her2 抗体 scFvs 与抗 CD3 抗体的融合蛋白
40	Pem-se007 轻链	84	R2 的序列
41	Niv-se001 重链可变区	85	R2 的序列
42	Niv-se005 轻链	86	R2 的序列
43	Niv-se007 轻链	87	正相引物
44	突变的白细胞介素-2	88	反相引物

[0177] 实施例1：可活化和结合臂的化学结构的合成

[0178] 当R2具有Ala-Ala-Asn的氨基酸序列且R3是PABC(R3-5)时，合成路线如下所示：

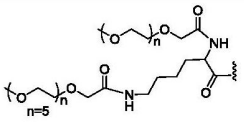
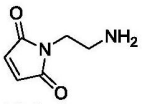
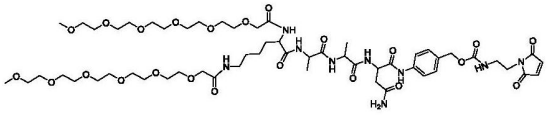
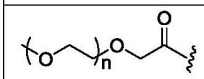
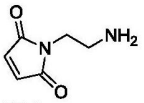
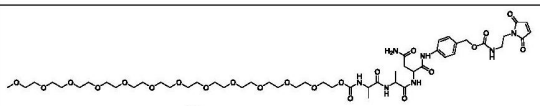
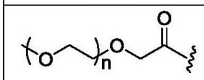
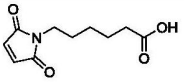
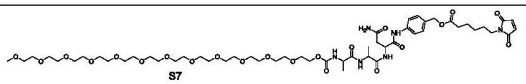
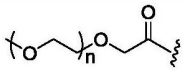
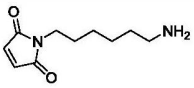
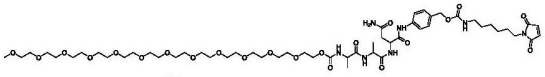
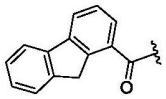
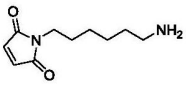
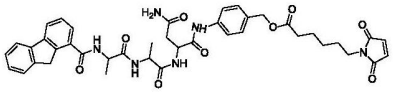
[0179]



[0180] 当R1和R4是不同的取代基时，得到表1中所示的下列化合物。

[0181] 表1

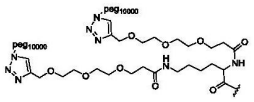
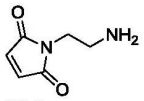
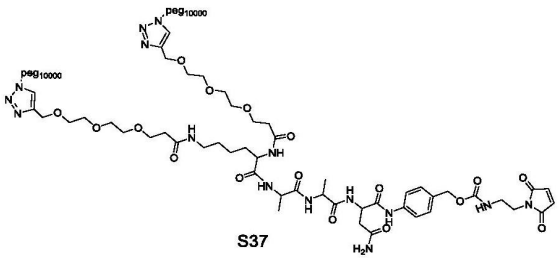
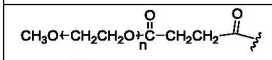
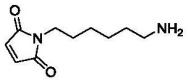
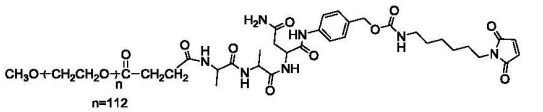
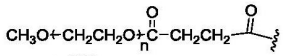
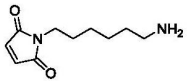
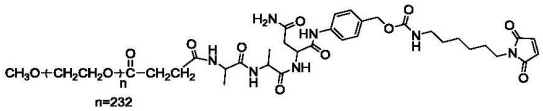
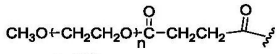
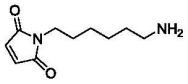
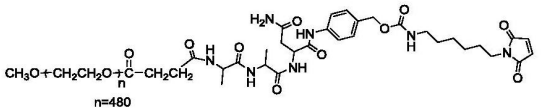
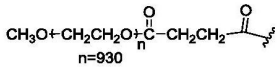
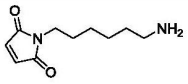
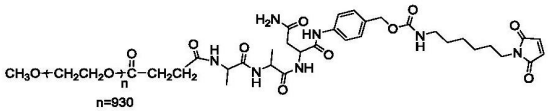
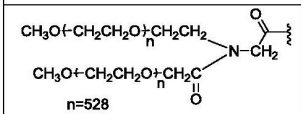
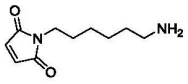
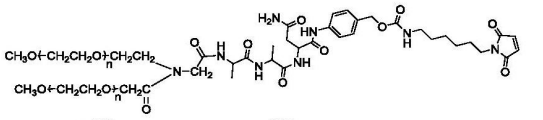
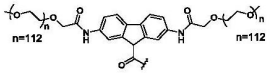
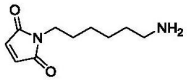
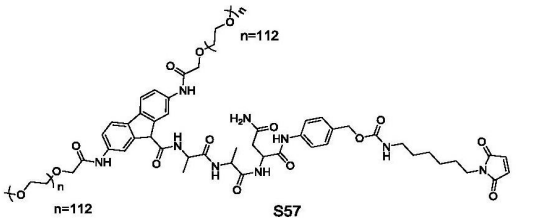
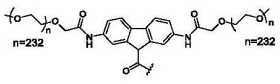
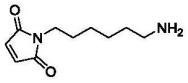
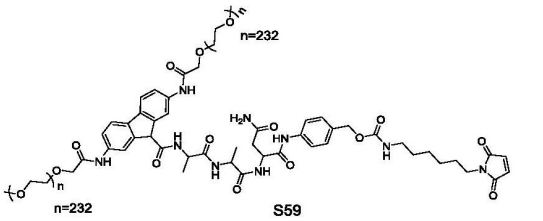
[0182]

R1	R4	化合物
 R1-1	 R4-5	 S1
 n=12 R1-2	 R4-5	 S3
 n=12 R1-2	 R4-13	 S7
 n=12 R1-2	 R4-7	 S9
 R1-3	 R4-7	 S11

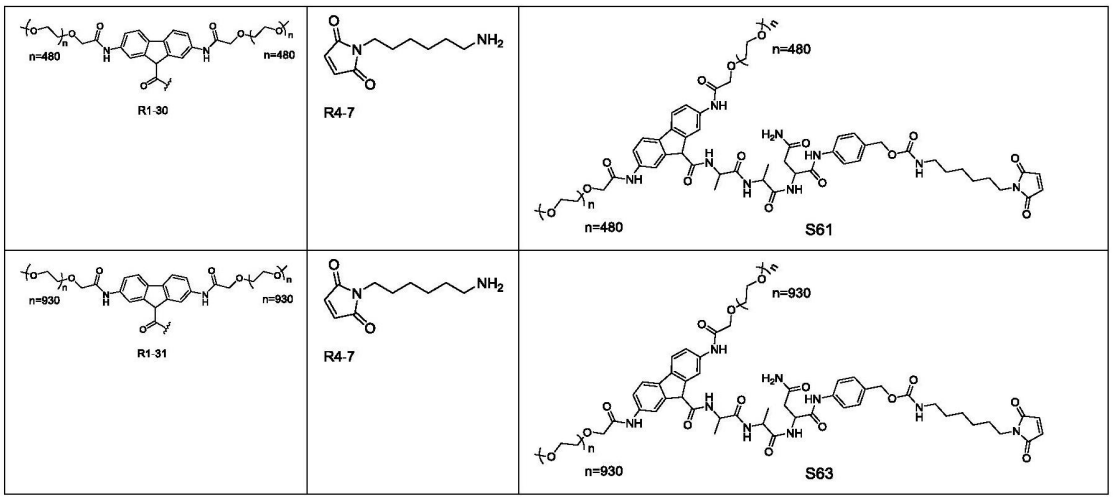
[0183]

R1-4	R4-7	S13
R1-5	R4-7	S15
R1-6	R4-7	S17
R1-7	R4-7	S25
R1-18	R4-5	S29
R1-19	R4-5	S31
R1-20	R4-5	S33
R1-21	R4-5	S35

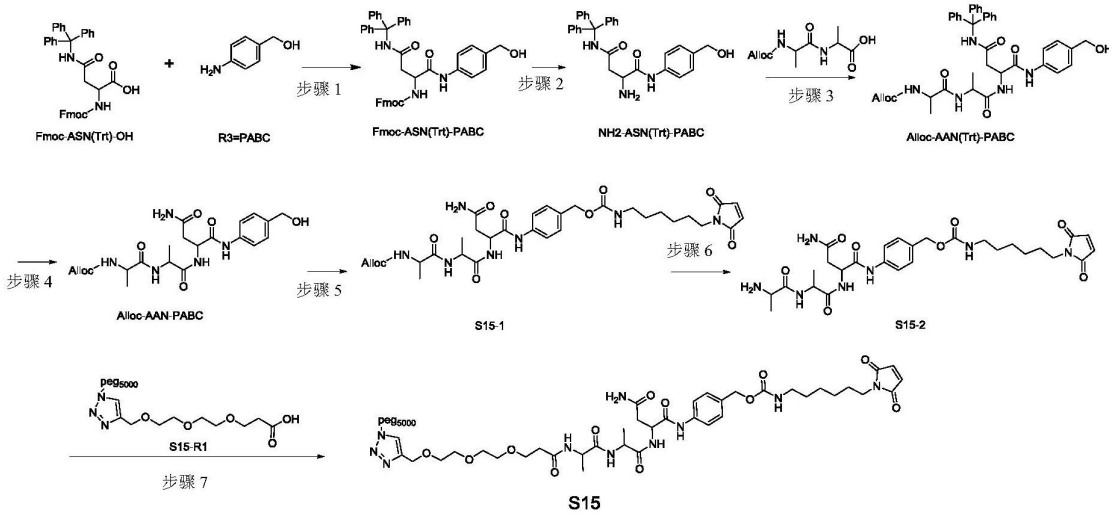
[0184]

 R1-22	 R4-5	 S37
 n=112 R1-12	 R4-7	 n=112 S39
 n=232 R1-13	 R4-7	 n=232 S41
 n=480 R1-15	 R4-7	 n=480 S43
 n=930 R1-16	 R4-7	 n=930 S45
 n=528 R1-17	 R4-7	 n=528 S47
 n=112 n=112 R1-28	 R4-7	 n=112 n=112 S57
 n=232 n=232 R1-29	 R4-7	 n=232 n=232 S59

[0185]



[0186] 如S15所示，具体的合成过程如下所示：



[0187]

[0188] 1)Fmoc-Asn(Trt)-OH(20g,0.03mol)，

[0189] 将2-(7-氮杂苯并三唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HATU)(15g,0.04mol)和DMF(200mL)加入到三口烧瓶中并搅拌30分钟。分别在0℃加入对氨基苯甲醇(4.1g,0.03mol)和N,N-二异丙基乙胺(8.7g,0.06mol)，然后在室温下搅拌3小时。通过旋转蒸发除去大部分DMF。将残余物溶于乙酸乙酯(200mL)中，依次用饱和氯化铵溶液和饱和氯化钠溶液洗涤，用无水硫酸钠干燥，然后过滤。蒸发除去溶剂，打浆粗产物，得到白色固体。

[0190] Fmoc-Asn(Trt)-PABC(21.3g;收率:90%)。

[0191] 2)将Fmoc-Asn(Trt)-PABC(16.0g,22mmol)溶解在N,N-二甲基甲酰胺(80mL)中。加入哌啶(30mL)，然后在室温下搅拌2小时。减压蒸发除去溶剂。将残余物在真空烘箱中在高真空下干燥以除去少量哌啶，得到9.8g淡黄色固体NH 2-Ann(Trt)-PABC，其可不经纯化用于下一步骤。

[0192] 3)将Alloc-Ala-Ala-OH(5.0g,20.4mmol)，苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)(11.6g,30.6mmol)和DMF(50mL)加入到三口烧瓶中，在冰浴中搅拌30分钟。分别在0℃加入NH2-Asn(Trt)-PABC(9.8g,20.4mmol)和N,N-二异丙基乙胺(7.89g,61.2mmol)，然后在室温下搅拌过夜。减压蒸发除去溶剂。将残余物溶于乙酸乙酯(200mL)中，依次用饱和氯化铵溶液和饱和氯化钠溶液洗涤，用无水硫酸钠干燥，然后过滤。蒸发除去溶剂。将所

得粗产物进行重结晶，得到白色固体。

[0193] Alloc-AAN(Trt)-PABC(13.0g;产率:90%)。

[0194] 4)将Alloc-AAN(Trt)-PABC(10.0g,14.2mmol)溶解在二氯甲烷(100±15mL)中。加入三氟乙酸(20mL)，然后在室温下搅拌4小时。用水洗涤和分馏后，有机相用无水硫酸钠干燥。减压蒸发除去溶剂，通过高真空蒸发除去残留的三氟乙酸。粗品通过柱色谱法分离，得到Alloc-AAN-PABC(5.9g;收率:89%)。

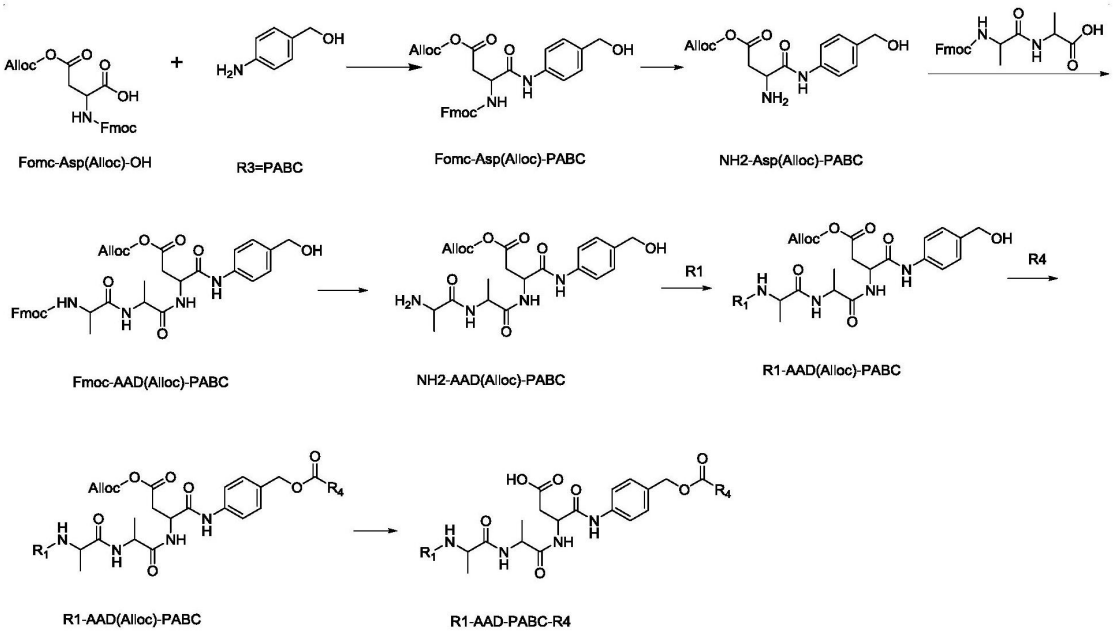
[0195] 5)将溶解在二氯甲烷(10mL)中的Alloc-AAN-PABC(467mg,1.01mmol)加入到三口烧瓶中。在冰浴中并在氮气保护下将二氯甲烷中的4-硝基苯基氯甲酸酯(406mg,2.02mmol)和二氯甲烷中的吡啶(160mg,2.03mmol)分别滴加到烧瓶中，室温下搅拌过夜。将1-(6-氨基己基)-1H-吡咯并2,5-二酮(235mg,1.2mmol)分批加入上述溶液中，并使其在室温下反应4小时。通过旋转蒸发干燥反应溶液。通过硅胶柱色谱法纯化得到的粗产物，得到白色固体S15-1(540mg;收率:80%)。

[0196] 6)向单口烧瓶中依次加入DMF(10ml)，S15-1(208mg,0.31mmol)，乙酸(274mg,4.65mmol)，三苯基膦(72mg,0.062mmol)和三丁基氢化锡(1.17g,4.03mmol)。在用氮气置换烧瓶中的空气后，将混合物在室温下搅拌直至S15-1完全反应。反应完成后，减压蒸发除去DMF。粗产物通过硅胶柱色谱法分离纯化，得到S15-2(白色固体，116mg，收率:62%)。

[0197] 7)将S15-R1(940mg,0.18mmol)，苯并三唑-N,N,N',N'四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)(95mg,0.25mmol)和DMF(10mL)加入三口烧瓶中，然后在冰浴中搅拌30分钟。然后在0℃分别加入化合物S15-2(110mg,0.18mmol)和N,N-二异丙基乙胺(70mg,0.54mmol)，然后在室温下搅拌过夜。减压蒸发除去溶剂。粗产物通过硅胶柱色谱法分离纯化，得到白色固体(418mg;收率:40%)，即为化合物S15。

[0198] 当R2具有Ala-Ala-Asp的氨基酸序列且R3是PABC时，合成路线如下所示：

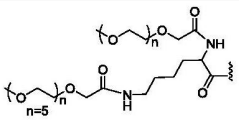
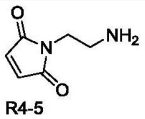
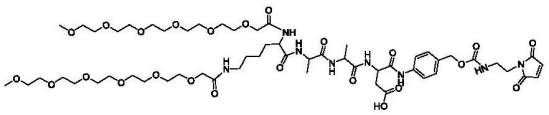
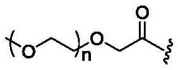
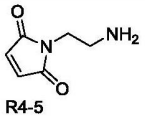
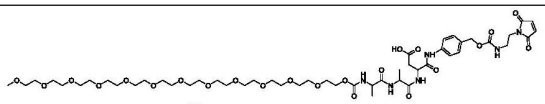
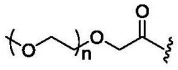
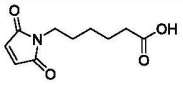
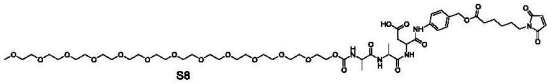
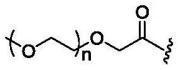
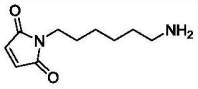
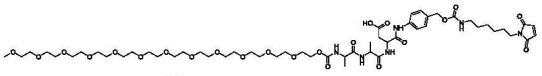
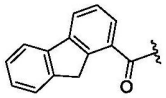
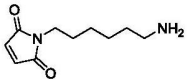
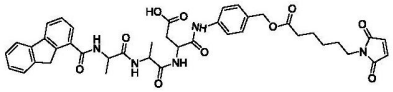
[0199]



[0200] 当R1和R4是不同的取代基时，得到表2中的下列化合物。

[0201] 表2

[0202]

R1	R4	化合物
 R1-1	 R4-5	 S2
 n=12 R1-2	 R4-5	 S4
 n=12 R1-2	 R4-13	 S8
 n=12 R1-2	 R4-7	 S10
 R1-3	 R4-7	 S12

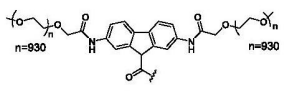
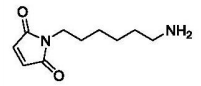
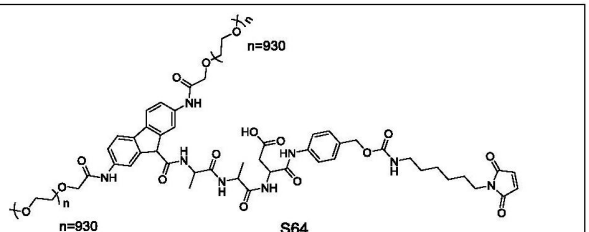
[0203]

R1-4	R4-7	S14
R1-5	R4-7	S16
R1-6	R4-7	S18
R1-7	R4-7	S26
R1-18	R4-5	S30
R1-19	R4-5	S32
R1-20	R4-5	S34
R1-21	R4-5	S36
R1-22	R4-5	S38

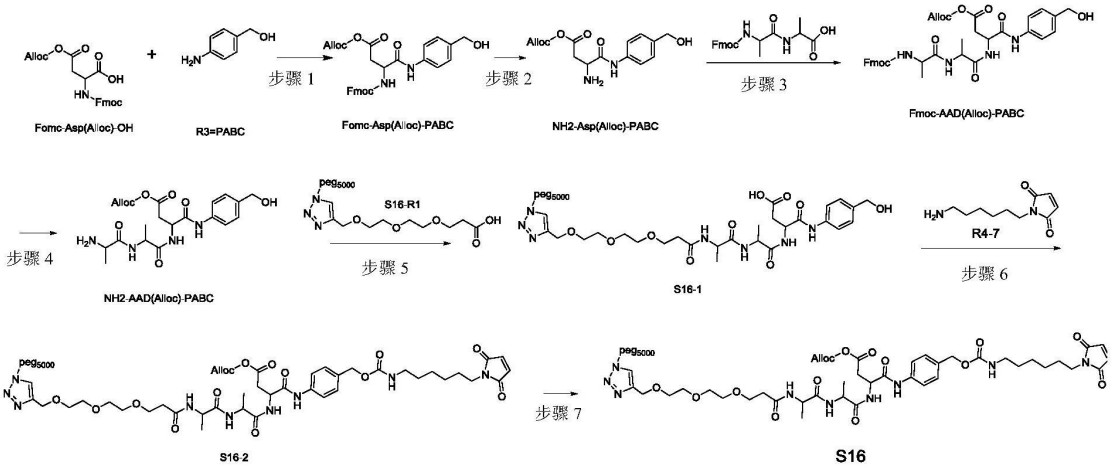
[0204]

n=112 R1-12	R4-7	n=112 S40
n=232 R1-13	R4-7	n=232 S42
n=480 R1-15	R4-7	n=480 S44
n=930 R1-16	R4-7	n=930 S46
n=528 R1-17	R4-7	n=528 S48
n=112 n=112 R1-28	R4-7	n=112 n=112 S58
n=232 n=232 R1-29	R4-7	n=232 n=232 S60
n=480 n=480 R1-30	R4-7	n=480 n=480 S62

[0205]

 R1-31	 R4-7	 S64

[0206] 如S16所示，具体的合成过程如下所示：



[0207]

[0208] Fmoc-Asp(Alloc)-OH(13.2g,0.03mol)，

[0209] 2-(7-氮杂苯并三唑)N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HATU)(15g,0.04mol)和DMF将(200mL)加入三口烧瓶中并搅拌30分钟。分别在0℃加入对氨基苯甲醇(4.1g,0.03mol)和N,N-二异丙基乙胺(8.7g,0.06mol)，然后在室温下搅拌3小时。通过旋转蒸发除去DMF。残余物通过柱色谱法纯化，得到白色固体Fmoc-Asp(Alloc)-PABC(14.7g;产率:89%)。

[0210] 将Fmoc-Asp(Alloc)-PABC(14.0g,25mmol)溶解在N,N-二甲基甲酰胺(80mL)中。加入哌啶(30mL)，然后在室温下搅拌2小时。减压蒸发除去溶剂。残渣在真空烘箱中高真空干燥，得到8.0g浅黄色固体NH 2-Asp(Alloc)-PABC，其可不经纯化用于下一步骤。

[0211] 3)将Fmoc-Ala-Ala-OH(7.8g,20.4mmol)，苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)(11.6g,30.6mmol)和DMF(50mL)加入到三口烧瓶，在冰浴中搅拌30分钟。在0℃分别加入NH 2-Asp(Alloc)-PABC(6.6g,20.4mmol)和N,N-二异丙基乙胺(7.89g,61.2mmol)，然后在室温下搅拌过夜。减压蒸发除去溶剂。残余物通过硅胶柱色谱法纯化，得到白色固体Fmoc-AAD(Alloc)-PABC(12.6g;产率:90%)。

[0212] 4)将Fmoc-AAD(Alloc)-PABC(12g,17.5mmol)溶解在二氯甲烷(80mL)中。加入哌啶(30mL)，然后在室温下搅拌2小时。减压蒸发除去溶剂将残余物在真空烘箱中在高真空下干燥，得到7.0g浅黄色固体，可直接用于下一步骤。

[0213] 5)将中间体S16-R1(522mg,0.1mmol)，2-(7-氮杂苯并三唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(46mg,0.12mmol)，DMF(20mL)加入三口烧瓶中并搅拌30分钟。分别在0℃下加入NH 2-AAD(Alloc)-PABC(46mg,0.1mmol)和N,N-二异丙基乙胺(38.7mg,0.3mmol)，然后在室温下搅拌3小时，通过旋转蒸发除去DMF。残余物通过柱色谱法纯化，得到S16-1(白色固体，251mg,收率:45%)。

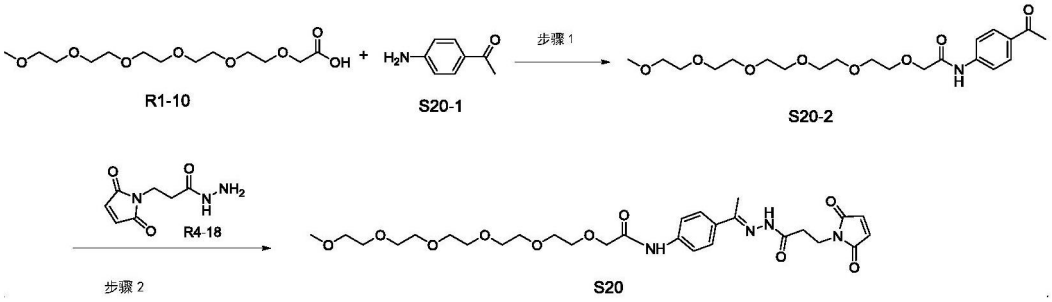
[0214] 6)将溶解在二氯甲烷(10mL)中的S16-1(240mg,0.046mmol)加入到三口烧瓶中。在冰浴中并在氮气保护下,将二氯甲烷中的4-硝基苯基氯甲酸酯(18mg 0.093mmol)和二氯甲烷中的吡啶(7.3mg,0.093mmol)分别滴加到烧瓶中,然后在室温下搅拌过夜。将R4-7(11mg,0.055mmol)加入上述溶液中并使其在室温下反应4小时。反应溶液通过旋转蒸发干燥。所得粗产物通过硅胶柱色谱法纯化,得到白色固体S16-2(96mg;收率:38%)。

[0215] 7)依次向单口烧瓶中加入DMF(10ml),化合物S16-2(96mg,0.016mmol),乙酸(127mg,2.15mmol),三苯基膦(33mg,0.029mmol)和三丁基氢化锡(0.54g,1.86mmol)。用氮气置换烧瓶中的空气后,将混合物在室温下搅拌直至化合物S16-2完全反应。反应完成后,通过减压蒸发除去DMF。粗产物通过硅胶柱色谱法分离纯化,得到白色固体(54mg;收率:62%),为化合物S16。

[0216] 当含有可酸活化的基团时,合成方案如下所示:

[0217] R1 + R3 —缩合反应→ R1-R3 —缩合反应 R4→ R1-R3-R4 如S20所示,具体的合成过程如下所示:

[0218]



[0219] 1)R1-10(3.1g,0.01mol),2-(7-氮杂苯并三唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HATU)(4.56g,0.012mol)和DMF(20mL)加入到三口烧瓶中并搅拌30分钟。在0℃分别加入S20-1(1.35g,0.01mol)和N,N-二异丙基乙胺(3.87g,0.03mol),然后在室温下搅拌3小时。通过旋转蒸发除去DMF。将残渣用硅胶柱色谱法精制,得到淡黄色油状物S20-2(2.5g;收率59%)。

[0220] 2)依次称量S20-2(98mg,0.23mmol)和R4-18(42mg,0.23mmol),并加入50ml单口烧瓶中。加入二氯甲烷(5mL)以溶解S20-2和R4-18,然后加入4A分子筛(81mg)。用氮气置换烧瓶中的空气后,使混合物在室温下反应过夜。反应溶液通过旋转蒸发干燥。粗产物通过硅胶柱色谱法纯化,得到白色固体(81mg;产率:60%),其为化合物S20。

[0221] 当R1,R3和R4是不同的取代基时,得到表3中的下列化合物。

[0222] 表3

[0223]

R1	R3	R4	化合物
n=12	R3-1	R4-18	S5
n=12	R3-1	R4-18	S6
R1-10	R3-1	R4-18	S19
R1-10	R3-2	R4-18	S20
peg10000 R1-11	R3-3	R4-18	S21
peg10000 R1-11	R3-4	R4-18	S22
peg10000 R1-14	R3-3	R4-18	S23
peg10000 R1-14	R3-4	R4-18	S24

[0224]

R1-27	R3-3	R4-18	S27
R1-27	R3-4	R4-18	S28
R1-12	R3-6	R4-18	S49
R1-13	R3-6	R4-18	S50
R1-15	R3-6	R4-18	S51
R1-17	R3-6	R4-18	S52
R1-12	R3-6	R4-7	S53
R1-13	R3-6	R4-7	S54
R1-15	R3-6	R4-7	S55
R1-17	R3-6	R4-7	S56

[0225] 通过质谱(MS)验证化合物S1-64,并且它们的分子量显示在表4中,其与基于它们的结构的计算的分子量一致。

[0226] 表4

[0227]

编号	MS	分子量	性状	产量
S1	1258	1258.37	白色固体	71mg

[0228]

S2	1258	1258.37	白色固体	49mg
S3	1132	1132.21	白色固体	236mg
S4	1133	1133.20	白色固体	93mg
S5	1129	1129.21	白色固体	37mg
S6	1130	1130.20	白色固体	46mg
S7	1159	1159.28	白色固体	158mg
S8	1160	1160.26	白色固体	102mg
S9	1188	1188.32	白色固体	34mg
S10	1189	1189.30	白色固体	28mg
S11	765	764.82	白色固体	18mg
S12	766	765.81	白色固体	31mg
S13	5756	5755.81	白色固体	364mg
S14	5757	5756.80	白色固体	270mg
S15	5800	5799.87	白色固体	418mg
S16	5801	5800.85	白色固体	54mg
S17	10800	10799.87	白色固体	189mg
S18	10801	10800.85	白色固体	167mg
S19	579	578.61	白色固体	102mg
S20	593	592.64	白色固体	81mg
S21	10326	10326.32	白色固体	106mg
S22	10340	10340.35	白色固体	97mg
S23	10354	10354.38	白色固体	139mg
S24	10368	10368.40	白色固体	76mg
S25	30800	30799.87	白色固体	143mg
S26	30801	30800.85	白色固体	125mg
S27	30354	30354.38	白色固体	136mg
S28	30368	30368.40	白色固体	121mg
S29	10982	10982.37	白色固体	223mg
S30	10983	10982.46	白色固体	184mg
S31	20982	20982.28	白色固体	274mg
S32	20983	20982.32	白色固体	231mg
S33	60982	60982.19	白色固体	362mg

[0229]

S34	60983	60983.26	白色固体	284mg
S35	11070	11070.34	白色固体	164mg
S36	11071	11071.41	白色固体	182mg
S37	21070	21070.18	白色固体	155mg
S38	21071	21071.27	白色固体	169mg
S39	5655	5655.37	白色固体	156mg
S40	5656	5656.22	白色固体	231mg
S41	10947	10947.42	白色固体	143mg
S42	10948	10948.36	白色固体	157mg
S43	21883	21883.84	白色固体	241mg
S44	21884	21884.72	白色固体	185mg
S45	41728	41728.86	白色固体	174mg
S46	41729	41729.73	白色固体	169mg
S47	47358	47358.46	白色固体	248mg
S48	47359	47359.39	白色固体	312mg
S49	5353	5343.61	白色固体	254mg
S50	10635	10635.68	白色固体	216mg
S51	21572	21572.47	白色固体	198mg
S52	47047	47047.18	白色固体	183mg
S53	5400	5399.76	白色固体	175mg
S54	10692	10691.74	白色固体	168mg
S55	21628	21628.51	白色固体	156mg
S56	47103	47103.24	白色固体	141mg
S57	10835	10835.22	白色固体	139mg
S58	10836	10836.09	白色固体	145mg
S59	21407	21407.28	白色固体	182mg
S60	21408	21408.17	白色固体	163mg
S61	43256	43256.02	白色固体	196mg
S62	43257	43257.10	白色固体	175mg
S63	81901	81901.07	白色固体	154mg
S64	81902	81902.14	白色固体	139mg

[0230] 实施例2:分析抗体可变区的CDR突变后的结合活性并筛选R4

[0231] 在WO200815712A1中公开的抗PD-1抗体的氨基酸序列以及其DNA序列在宿主中优

化表达与合成(金唯智)。在WO2006121168A2中公开的抗PD-1抗体2的氨基酸序列以及其DNA序列在宿主中优化表达与合成(金唯智)。在US20150283234中公开的抗CTLA-4抗体的氨基酸序列以及其DNA序列在宿主中优化表达与合成(金唯智)。在US009534046中公开的抗TNFα抗体的氨基酸序列以及其DNA序列在宿主中优化表达与合成(金唯智)。在US007939638中公开的抗CD-28抗体的氨基酸序列以及其DNA序列在宿主中优化表达与合成(金唯智)。将合成的DNA酶切后连接到一种修饰的PTT5载体(来源于Biovector)上从而生产出pTT5-抗-PD-1-1,pTT5-抗-PD-1-2,pTT5-抗-CTLA-4,pTT5-抗-TNFα和pTT5-抗-CD28。以pTT5-抗-PD-1-1,pTT5-抗-PD-1-2,pTT5-抗-CTLA-4,pTT5-抗-TNFα和pTT5-抗-CD28为模板引导的半胱氨酸突变,设计引物并用半胱氨酸的密码子替换掉突变位点的密码子,经PCR和酶切,然后将突变片段构建在经修饰的pTT5载体中。

[0232] 表达宿主是HEK293细胞(Life Technologies)。转染之前,HEK293细胞在含有10％FBS完全培养基(Gibico)中于37℃,5％CO2中培养。转染前一天,将细胞以合适的密度接种在15cm的培养盘中,培养基更换为低IgG的FBS。在转染6个小时后或者两天后,培养基更换为Freestyle293(Gibico)。

[0233] 转染当天,当细胞达到一定汇合度时,使用脂质体2000(Life Technologies)和PEI(sigma)将表达目标蛋白的质粒共转染到293T细胞中。表达抗体质粒包含了抗体的重链和轻链。在转染后的第4天和第6天分别更换培养上清。检测蛋白或者抗体的表达与活性,然后纯化蛋白或者抗体。

[0234] 一个抗体重链和轻链可变区中的高变区构成了该抗体的抗原结合位点。又因为抗原结合位点和抗原表位是互补的结构,因此高变区亦称为一个抗体的互补决定区(CDR)。抗PD1抗体1,抗PD1抗体2和CTLA4抗体的轻链可变区序列和它们的CDR如附图1所示。

[0235] 在本发明中,通过ELISA检测与其初始抗体相比具有点突变的每个突变体的活性。

[0236] 特别地,96孔板用抗体对应的抗原孵育过夜,然后用1％BSA阻断剂(ThermoFisher)在37℃阻断2小时,用PBST洗三次。对应的抗体或突变体加入其中并在37℃结合1小时,然后用PBST洗三次。加入与抗人IgG偶联的HRP酶,并在37℃结合1小时,然后用PBST洗三次。加入TMB底物(Solarbio。,Inc。)在450nm检测吸光度。对突变体结合强度的影响通过OD突变后/OD野生型来计算。

[0237] 根据以上方法,检测针对三中抗体中的不同位点突变的突变体结合活性,结果如表5表6所示。在表5和表6中,A代表结合活性在90％-110％,B代表结合活性在70％-90％,该符号↓代表结合活性低于70％。

[0238] 表5:抗体轻链中可变区的CDR中突变位置对结合活性的影响

[0239]

CDR	位点	PD-1 抗体 1	和 PD-1 结合	抗-PD-1 抗体 2	和 PD-1 结合	抗-CTLA-4 抗体	和 CTLA-4 结合
CDR1	25	A	B	A	B	A	A
CDR1	26	S	A	S	A	S	A
CDR1	27	K	↓				
CDR1	28	G	A	S	A	S	A
CDR1	29						
CDR1	30	S	A	S	A	G	A
CDR1	31	T	B	S	A	S	A
CDR1	32	S	A	Y	↓	S	A
CDR1	33	G	A	L	↓	Y	↓
CDR1	34	Y	↓	A	A	L	B
CDR1	35	S	A			A	B
CDR1	36	Y	↓	Y	↓		
CDR1	37	L	B			Y	↓
CDR2	51			A	B	G	A
CDR2	52			S	A	A	↓
CDR2	53	Y	↓				
CDR2	54	L	B	S	A	S	A
CDR2	55	A	B	A	B		
CDR2	56	S	A	T	A	A	B
CDR2	57			G	A	T	A
CDR2	58			I	B	G	A
CDR2	60	S	A	A	B		
CDR2	61	G	A				
CDR3	91			S	A		
CDR3	92			S	A	Y	↓
CDR3	93					G	A
CDR3	94					S	A
CDR3	95	S	A			S	A

[0240]

CDR3	96		↓				
CDR3	97	D	↓	T	A		
CDR3	98	L	↓	F	↓	T	B
CDR3	99		↓	G	A	F	↓
CDR3	100	L	↓			G	A
CDR3	101	T	B	G	↓		
CDR3	102	F	↓				

[0241] 表6:抗体重链中可变区的CDR中突变位置对结合活性的影响

[0242]

CDR	位置	PD-1 抗体 1	与 PD-1 结合	抗 PD-1 抗体 2	和 PD-1 结合	抗 CTLA-4 抗体	和 CTLA-4 结合
CDR1	30	T	A	S	A	S	A
CDR1	31					S	A
CDR1	32	Y	↓	S	A	Y	B
CDR1	33	Y	↓	G	A	T	A
CDR1	35	Y	B				
CDR2	50	G	A				
CDR2	51	I	B	I	B	I	B
CDR2	53			Y	↓	Y	↓
CDR2	54	S	A	D	B	D	B
CDR2	55			G	A	G	A
CDR2	56	G	A	S	A	S	A
CDR2	57	G	A	K	↓		
CDR2	58	T	A			K	↓
CDR2	59			Y	↓	Y	↓
CDR2	60			Y	↓	Y	↓
CDR2	61			A	B	A	A
CDR2	62			D	↓	D	B
CDR2	63	K	B	S	A	S	A
CDR2	65	K	↓	K	↓	K	↓
CDR2	66			G	A	G	A
CDR3	100	D	↓	D	↓		
CDR3	101	Y	↓	D	B	G	A

[0243]

CDR3	102			Y	↓	L	A
CDR3	104			G	A	T	A
CDR3	105					L	B
CDR3	106	G	A	G	A	D	↓
CDR3	107			T	A	Y	B

[0244] 结果显示，在不同抗体的可变区中，与野生型抗体相比，突变G，S和一部分T至C对结合活性的影响较小，其为原始结合活性的90％或更多。突变A，I和T至C的一部分产生结合活性，其为野生型抗体结合活性的70-90％。

[0245] Co-IP筛选抗-PD1抗体1轻链上的突变点的结果显示在附图2中，其中小图a显示了野生型抗体突变对WB检测到的表达的影响，而小图b显示了突变抗体与WB检测到的PD1的结合。

[0246] 分析与R4结合后CDR中具有突变的抗体突变体的结合活性

[0247] 如表格7-16所示，在轻链或者重链CDR区突变的抗体与小分子化合物文库中的R4偶联，然后将偶联体的结合活性与野生型的抗体比较(偶联后的抗体结合活性/野生型的抗体结合活性*100％)，以获得可以提供分子间力并提高结合活性的偶联方式。

[0248] 表7：与R4-1或R4-5偶联后在轻链的CDR中具有突变的抗PD-1抗体1的突变体的结合效应

[0249]

CDR	位置	抗-PD-1抗体1	与R4-1偶联	与R4-5偶联
CDR 1	26	S	93.2％	
CDR 1	30	S	86.9％	
CDR 1	31	T	84.4％	
CDR 1	28	G	104.6％	107.6％
CDR 1	35	S	88.3％	
CDR 1	36	Y	85.4％	
CDR 1	55	A	92.1％	
CDR 2	57	Y	87.7％	
CDR 2	60	S	89.4％	
CDR 3	104	G	83.6％	

[0250] 表8：与R4结合后在重链的CDR中具有突变的抗PD-1抗体1的突变体的结合效应

[0251]

CDR	位点	抗-PD-1 抗体 1	与 R4-1 偶联	与 R4-4 偶联	与 R4-7 偶联
CDR 1	30	T	91.2%		
CDR 1	32	Y		89.5%	

[0252]

CDR 2	50	G	84.4%		
CDR 2	54	S	103.6%		
CDR 2	58	T	93.9%		
CDR 2	63	K			95.2%
CDR 3	101	Y		86.1%	
CDR 3	106	G	95.1%		

[0253] 根据表7和8，在抗-PD-1抗体1至C的CDR中突变A，G，S，Y，T或K并与R4结合后，突变体可保持>80％的结合效率。

[0254] 表9：与R4-1或R4-5偶联后在轻链的CDR中具有突变的抗PD-1抗体2的突变体的结合效应

[0255]

CDR	位点	抗-PD-1抗体2	与R4-1偶联	与R4-5偶联
CDR 1	25	A	26.5％	87.2％
CDR 1	26	S	86.8％	
CDR 1	28	S	88.9％	
CDR 1	30	S	34.4％	
CDR 1	31	S	95.7％	
CDR 1	32	Y	25.6％	
CDR 1	33	L	1.6％	
CDR 1	34	A	1.7％	83.9％
CDR 2	51	A	95.6％	
CDR 2	52	S	34.6％	
CDR 2	55	A	99.5％	
CDR 2	56	T		89.4％
CDR 3	57	G	89.8％	
CDR 3	91	S	93.5％	
CDR 3	92	S	45.5％	
CDR 3	97	T	93.7％	

[0256] 表10：与R4结合后在重链的CDR中具有突变的抗PD-1抗体2的突变体的结合效应

[0257]

CDR	位点	抗 PD-1 抗体 2	与 R4-1 偶联	与 R4-3 偶联	与 R4-4 偶联	与 R4-7 偶联
CDR 1	30	S	107.2%			
CDR 1	32	S	86.8%			

[0258]

CDR 1	33	G	88.9%			
CDR 2	53	Y			91.6%	
CDR 2	55	G	95.7%			
CDR 2	56	S	105.6%			
CDR 2	57	K				89.7%
CDR 2	61	A	87.0%		83.9%	
CDR 2	63	S	95.6%			
CDR 2	65	K				92.1%
CDR 2	66	G	99.5%			
CDR 3	104	G	89.4%			
CDR 3	106	G	91.8%			
CDR 3	107	T	95.7%			
CDR 3	108	L		86.4%		

[0259] 根据表9和10,在抗-PD-1抗体2至C的CDR中突变G,S,A,Y,K,L或T并与R4结合后,突变体可保持>80%的结合效率。

[0260] 表11:偶联至R4-1后轻链CDR中具有突变的抗-CTLA-4抗体突变体的结合效应

[0261]

CDR	位点	抗CTLA-4抗体	与R4-1偶联
CDR 1	25	A	95.40%
CDR 1	26	S	91.00%
CDR 1	28	S	82.00%
CDR 1	30	G	95.30%
CDR 1	31	S	80.90%
CDR 1	32	S	99.00%
CDR 1	34	L	94.90%
CDR 1	35	A	91.50%
CDR 2	51	G	97.00%
CDR 2	52	A	92%
CDR 2	54	S	97.70%
CDR 2	56	A	102.30%
CDR 2	57	T	92.50%
CDR 2	58	G	88.10%
CDR 3	93	G	99.10%
CDR 3	94	S	92.40%
CDR 3	95	S	95.40%
CDR 3	98	T	91.00%

[0262] 表12:与R4结合后具有重链CDR突变的抗-CTLA-4抗体突变体的结合效应

[0263]

CDR	位点	抗CTLA-4抗体	与R4-1偶联	与R4-3偶联	与R4-4偶联	与R4-7偶联
CDR 1	30	S	93.4%			

CDR 1	31	S	109.5%			
CDR 1	33	T	102.3%			
CDR 2	55	G	95.2%			
CDR 2	58	K				87.6%
CDR 2	59	Y			89.1%	
CDR 2	60	Y			91.8%	
CDR 2	65	K				96.2%
CDR 2	66	G	92.7%			
CDR 3	100	G	98.3%			
CDR 3	102	L		83.9%		
CDR 3	103	G	93.8%			
CDR 3	106	D		87.6%		

[0264] 根据表11和12，在抗-CTLA-4抗体的CDR中突变A，G，S，L，T，K，Y或D并与R4结合后，突变体可以保持结合效率>80%。

[0265] 表13：偶联至R4后轻链CDR中具有突变的抗CD28抗体突变体的结合效应

[0266]

CDR	位点	抗CD28抗体	与R4-1偶联	与R4-3偶联	与R4-4偶联	与R4-7偶联
CDR 1	26	S	87.0%			
CDR 1	29	I		88.5%		
CDR 1	30	Y	19.5%		93.6%	
CDR 2	50	K	26.6%			88.9%
CDR 2	51	A	97.7%			
CDR 2	52	S	84.0%			
CDR 3	91	G	88.3%			
CDR 3	93	T	87.0%			
CDR 3	94	Y	20.1%		83.7%	
CDR3	96	Y	14.9%		91.4%	
CDR 3	97	T	95.5%			
CDR 3	99	G	96.6%			

[0267] 表14：偶联至R4后重链CDR中具有突变的抗CD28抗体突变体的结合效应

[0268]

CDR	位点	抗 CD28	与 R4-1	与 R4-3	与 R4-4

[0269]

		抗体	偶联	偶联	偶联
CDR 1	25	S	87.0%		
CDR 1	26	G	89.5%		
CDR 1	27	Y			94.2%
CDR1	28	T	108.6%		
CDR1	30	T	87.3%		
CDR1	31	S	97.5%		
CDR1	32	Y			81.8%
CDR 2	52	Y			91.6%
CDR 2	54	G	97.9%		
CDR 2	58	T	89.3%		
CDR 3	99	S	87.6%		
CDR 3	101	Y			89.3%
CDR 3	102	G	80.1%		
CDR3	103	L	14.9%	94.6%	

[0270] 根据表13和14,通过结合抗CD28抗体的CDR中的G,S,A,I,L,K,Y或T的突变位置,突变体可以保持>80%的结合效率。

[0271] 表15:与R4偶联后在轻链的CDR中具有突变的抗-TNFα抗体的突变体的结合效应

[0272]

CDR	位点	抗 TNFα 抗体	与 R4-1 偶联	与 R4-3 偶联	与 R4-4 偶联
CDR 1	25	A	88.6%		
CDR 1	26	S	97.1%		
CDR 1	28	G	92.3%		
CDR 1	29	I		87.8%	
CDR 1	32	Y			89.1%
CDR 1	33	L		89.4%	
CDR 1	34	A	85.7%		
CDR 2	50	A	85.5%		
CDR 2	51	A	95.1%		
CDR 2	52	S	86.8%		
CDR 2	53	T	89.4%		
CDR 2	54	L		82.2%	
CDR 2	56	S	95.4%		
CDR 2	57	G	95.5%		
CDR 3	91	Y	34.5%		90.1%
CDR 3	94	A	97.5%		

[0273]

CDR 3	97	T	82.5%		

[0274] 表16:与R4偶联后在重链的CDR中具有突变的抗-TNFα抗体的突变体的结合效应

[0275]

CDR	位点	抗TNFα抗体	与R4-1偶联	与R4-3偶联	与R4-4偶联
CDR 1	32	Y			88.6%
CDR 1	33	A	95.1%		
CDR 2	51	I		102.6%	
CDR 2	52	T	82.8%		
CDR 2	55	S	86.9%		
CDR 2	56	G	88.7%		
CDR 2	58	I		86.7%	
CDR 2	60	Y			85.2%
CDR 2	61	A	95.7%		
CDR 2	63	S	96.8%		
CDR 2	66	G	99.4%		
CDR 3	100	S	92.2%		
CDR 3	101	Y			85.4%
CDR 3	102	L		85.5%	
CDR 3	103	S	84.5%		
CDR 3	104	T	97.3%		
CDR 3	105	A	86.5%		
CDR 3	106	S	98.3%		
CDR 3	107	S	87.4%		
CDR 3	108	L		81.4%	
CDR 3	110	Y			82.5%

[0276] 根据表15和16,在针对C的抗-TNFα抗体的CDR中突变A,G,S,L,I,Y或T并与R4结合后,突变体可以保持>80%的结合效率。

[0277] 实施例3:在可变区的非CDR中具有高同源性序列突变的突变体的结合活性的分析和筛选R1

[0278] 一个抗体由4条肽链组成,包括完全相同的两条轻链和完全相同的重链。两条链通过二硫键和非共价键形成一个单体,轻链有两种类型,例如κ和λ,轻链有5种类型,例如μ,δ,γ,ε和α。一个抗体,作为一个整体,被分为恒定区和可变区。可变区位于Y型结构两条臂的末端。人源化或人源的抗体具有一定的普遍性,它们都在Y形结构的两个臂末端(重链或轻链)包含4个环(附图3)。3个环是高度可变的并且可以和抗原直接结合,环中的这些区域被称为CDR区,其中CDR1,CDR2和CDR3分别在这3个环中。在同一侧还存在另一个环,在该环中抗体与三维空间的抗原结合。一些环不仅仅具有保守的结构,还具有保守的序列。

[0279] 附图4分别依次展示了来自于(Tecentriq(Atezolizumab),Yervoy(Ipilimumab),Humira(Adalimumab),Keytruda(Pembrolizumab),Opdivo(Nivolumab),Erbitux(Cetuximab),Rituxan(Rituximab)and Perjeta(Pertuzumab)这8种商业抗体的轻链。每个

轻链可变区的第四个环(GSGSGST)是保守的。

[0280] 在抗PD-1抗体的轻链的CDR的同一侧有4个环,其中3个环是CDR,包括CDR1,CDR2和CDR3。与FDA批准的许多药物相比,剩余的环具有保守的结构和序列。该环的序列是RFSGSGSGT,位于64-72位(附图4)。将抗PD-1抗体1的环4中的每个氨基酸残基突变为Cys并与S9或S13偶联。通过ELISA检测偶联不同长度的R1-R4对突变体与PD-1的结合活性的影响。结果如表17所示。可以发现,通过改变偶联臂的空间结构或长度,可以抑制突变体活性的70%或更多。

[0281] 表17:在轻链可变区的环4中具有突变的抗PD-1抗体1的偶联物的结合活性

[0282]

	位点	残基	结合活性	与S9偶联	与S13偶联
环4	67	S	87.8%	27.2%	17.8%
环4	68	G	93.5%	89.9%	13.2%
环4	69	S	96.1%	90.6%	16.2%
环4	70	G	89.3%	65.2%	17.9%
环4	71	S	99.5%	89.0%	16.0%
环4	72	G	98.3%	92.9%	10.9%
环4	73	T	93.5%	90.2%	10.6%

[0283] 通过体内免疫球蛋白超家族基因的重组产生抗体。针对不同抗原的抗体的某些框架区可以衍生自相同种系抗体的基因或氨基酸序列。例如,赫赛汀(曲妥珠单抗)Her2抗体的重链与Tecentriq(Atezolizumab)(一种抗PD-1抗体)的重链在三个CDR中不同。它们具有相同的非CDR框架序列,该序列衍生自相同的种系抗体(附图5)。与Herceptin和Tecentriq的重链相似,PD-1抗体的Opdivo(Nivolumab)和Keytruda(Pembrolizumab)的轻链在可变区的3个CDR中有所不同。它们的非CDR构架区来自同一种系抗体(附图5)。

[0284] 在许多抗体中发现了类似的情况。如通过FDA批准的重塑抗体(也称为CDR植入的抗体)所示,为了保持其对抗原的特异性并减少异源性,来自鼠源抗体的CDR直接被来自人源抗体的CDR替代。随着人源化技术和基因工程技术的成熟,后来开发的人源化抗体主要是人源化的抗体或人源抗体。然而,即便如此,许多商业化抗体的重链仍然表现出非常高的相似性。例如,附图6依次展示了7种商业化抗体的重链的相似性的比较结果(Avastin(贝伐单抗),Herceptin(曲妥珠单抗),Tecentriq(Atezolizumab),Humira(阿达木单抗),Yervoy(Ipilimumab),Opdivo(Nivolumab)和Perjeta(Pertuzumab)),相似度达到85%或更多。主要的不同是在CDR中,其可变区中的框架区具有相似的序列。

[0285] 甚至,Tecentriq(Atezolizumab)和Herceptin(曲妥珠单抗)的框架结构是相同的(图5)。在比较免疫检查点抗体Opdivo,Keytruda和Yervoy(分别在附图7中依次展示)的轻链可变区后,可以发现它们的同源性为92%。主要的不同之处在于CDR,框架区中的序列彼此接近(附图7)。对于具有保守框架区的抗体,测试了在重链或轻链可变区的框架区(非CDR)中具有突变的突变体及其偶联物的活性。表18和19中所示的每个氨基酸位点是突变为半胱氨酸,并将每个所得突变体与S9或S13偶联。通过ELISA测试偶联至具有不同长度的R1-R4侧链对PD-1的结合活性的影响。结果显示在表18和19中。附图8显示PD1 Ab-C28(PD1-Ab-Gly28Cys)与S13的偶联,附图9显示与S13偶联前后抗PD1-Ab-C28与PD1的结合。

[0286] 表18:在轻链可变区的框架区中具有突变的抗PD-1抗体1的突变体的结合活性及

其偶联物

[0287]

位点	氨基酸残基	突变后的结合活性	与 S9 偶联	与 S13 偶联
5	T	95.3%	67.4%	26.30%
7	S	98.2%	59.5%	34.20%
9	A	96.5%	78.4%	44.60%
10	T	84.3%	65.7%	37.40%
11	L	96.3%	32.50%	
12	S	85.5%	13.50%	
13	L	97.5%	80.2%	42.30%
14	S	97.8%	19.7%	
16	G	89.4%	75.3%	21.70%
19	A	86.4%	49.9%	25.00%
20	T	89.7%	69.7%	32.10%
25	A	83.3%	70.3%	37.20%
41	G	88.5%	17.4%	
43	A	99.3%	82.1%	30.80%
46	L	95.9%	80.2%	37.50%
47	L	81.1%	68.9%	22.90%
48	I	89.5%	23.8%	
51	A	92.1%	82.1%	31.2%

[0288]

55	A	87.3%	72.3%	29.4%
69	T	83.4%	67.9%	20.5%
76	S	90.2%	68.7%	21.9%
77	S	83.8%	69.3%	32.1%
106	I	98.3%	76.7%	26.8%
107	K	87.1%	70.1%	35.6%

[0289] 表19:在重链可变区的框架区中具有突变的抗PD-1抗体2的突变体的结合活性及其偶联物

[0290]

位点	氨基酸残基	突变后的结合活性	与 S9 偶联	与 S13 偶联
7	S	95.3%	65.9%	26.3%
8	G	93.2%	78.3%	34.2%
9	G	97.8%	87.4%	24.6%
10	G	84.3%	69.3%	37.4%
15	G	85.6%	32.50%	21.5%
17	S	85.0%	75.3%	42.4%
24	A	99.6%	45.6%	32.3%
25	S	99.8%	48.7%	27.0%
26	G	95.4%	31.8%	11.7%
28	T	86.4%	29.9%	15.0%
30	S	89.7%	31.8%	15.3%
40	A	85.3%	50.3%	37.2%
42	G	83.4%	63.6%	29.8%
44	G	99.3%	78.3%	30.8%
69	T	95.9%	78.6%	37.5%
71	S	81.4%	56.9%	22.9%
75	S	96.3%	38.7%	14.6%
78	T	92.2%	86.3%	42.4%
85	S	98.8%	69.4%	32.3%
88	A	84.3%	46.8%	27.0%
91	T	86%	48.9%	21.7%
92	A	85.0%	64.6%	15.0%
98	T	89.6%	59.9%	32.1%
110	T	92.1%	78.4%	37.2%
112	S	95.4%	68.6%	29.8%
113	S	96.0%	70.5%	30.8%

[0291]

114	A	89.7%	66.9%	37.5%
115	S	95.3%	70.4%	22.9%
116	T	93.4%	69.5%	14.6%
118	G	99.3%	72.5%	31.3%
120	S	95.9%	68.4%	36.8%

[0292] 对抗体可变区的非CDR区域中具有突变的突变体的结合活性的分析表明，将突变引入非CDR时以及将突变体与小分子S9偶联时，对结合活性没有显著影响。然而，当突变体与S13偶联时，结合活性降低。这表明非CDR中的氨基酸残基可以突变为半胱氨酸，然后突变体可以与具有大分子量或带有特定官能团的R1-R2-R3-R4偶联，以阻断其结合活性。用这种方法，可以抑制突变体的活性。

[0293] 制备在轻链中具有两个或更多个突变的抗PD1抗体并与S13偶联。突变位点选自上

述具有一个突变且对PD1抗原具有95％或更高结合活性的抗PD1抗体的突变位点。验证这些偶联物被酶切或者酸性活化之后的活性，结果如表20所示。

[0294] 表20：在激活前后，抗PD1抗体1的偶联物与PD1的两个或更多个突变的结合活性的对比

[0295]

R1-R2-R3-R4	R5	激活前的结合效率	酶切或酸性活化后的结合效率
S13	PD1 Ab-Ser7/Ser71	18.1％	109.5％
S13	PD1 Ab-Ser12/Gly72	19.6％	95.3％
S13	PD1 Ab-Ser14/Thr73	10.2％	99.8％
S13	PD1 Ab-Ser7/Ser14/Thr73	11.9％	95.1％

[0296] 上述结果证明抗PD1抗体与两个或更多个突变的偶联物在活化后可以保持95％或更多的对PD1的结合活性。

[0297] 实施例4：筛选生物分子R5，与R1，R2-R3-R4的偶联和偶联后的活化

[0298] 在病理微环境中通过蛋白水解酶激活的过程中，激活的连接臂与生物分子结合的位点及其空间构象对激活效率的影响不同。空间位阻和构效关系决定了酶切激活的效率。为了研究实施例3中的偶联物的生物分子构象对病理环境中酶或酸的激活的影响，进行了以下体外激活研究。

[0299] 在活化试验中，将10μg用于活化的蛋白酶加入到1mg/ml Peg1000-R2-R3-R4-S-Cys-R5偶联物中，在37℃下反应1小时。通过HPLC检测活化后产生的化合物Peg1000的浓度计算相对于对照组的活化或切割效率(％)。每种偶联物的切割效率示于下表21中。

[0300] 表21

[0301]

突变体	R1	R2	R3	R4	切割效率
PD-1-Ab-Gly28Cys	Peg1000	-Ala-Ala-Asn-			100% 对照
PD-1-Ab-Gly28Cys	Peg1000	-Ala-Ala-Asn-	R3-1	R4-3	99.5%
PD-1-Ab-Gly28Cys	Peg1000	-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	99.8%
PD-1-Ab-Gly28Cys	Peg1000	-Ala-Ala-Asn-	R3-3	R4-3	98.6%

[0302]

[0303] 如表22和23所示，自动脱落臂R3由于其小的分子量和线性结构对天冬酰胺内肽酶的活化基本上没有影响，R3-2对激活效率的影响最低。

[0304] 表22：抗PD-1抗体1

[0305]

R2	R3	R4	R5	切割效率
-Ala-Ala-Asn-	R3-2			100％对照
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	紫杉醇(2-OH)		42.5
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-5	PD-1-Ab1-Gly28Cys	88.4
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-6	PD-1-Ab1-Gly28Cys	93.5
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-7	PD-1-Ab1-Gly28Cys	99.8
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-8	PD-1-Ab1-Gly28Cys	63.5
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-9	PD-1-Ab1-Gly28Cys	62.4
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-1	PD-1-Ab1-Gly28Cys	83.8

-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	94.5
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-1	PD-1-Ab1-Gly28Cys	86.7
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	97.5

[0306] 表23:抗-CTLA-4抗体

[0307]

酸性激活	R3	R4	R5	切割效率
酰胺键连接	R3-2			100%对照
酰胺键连接	R3-2	R4-2	CTLA-4-Ser26Cys	99.8
酰胺键连接	R3-2	R4-15	CTLA-4-Ser26Cys	99.5
酰胺键连接	R3-2	R4-16	CTLA-4-Ser26Cys	91.7
酰胺键连接	R3-2	R4-17	CTLA-4-Ser26Cys	94.3
酰胺键连接	R3-2	R4-18	CTLA-4-Ser26Cys	93.4
酯键	R3-2			100%对照
酯键	R3-2	R4-4	CTLA-4-Ser26Cys	92.8
酯键	R3-2	R4-19	CTLA-4-Ser26Cys	97.4
酯键	R3-2	R4-20	CTLA-4-Ser26Cys	93.8

[0308]

酯键	R3-2	R4-21	CTLA-4-Ser28Cys	95.4
酯键	R3-2	R4-22	CTLA-4-Ser28Cys	96.4

[0309] 在表22和23中,使用未与生物分子偶联的分子产生的活化效率作为阳性对照,而通过与杂环化合物紫杉醇的2位羟基偶联的分子产生的活化效率用作阴性对照。当与抗体的可变区或非可变区中的突变位点偶联时,R4的长度和侧链基团影响整个偶联物的切割效率。较长链结构的R4可以增强切割效率。如所检测的,在与Ala-Ala-Asn或Ala-Ala-Asp偶联然后与抗体结合后,本发明的R4-1至R4-25均允许突变体保留>60%的活化效率,在酸敏感活化中具有>90%的活化效率。

[0310] R1的选择和测试对结合能力恢复的影响

[0311] PBS(pH7.2)用于将配体分子PD1,TNFα,CTLA-4,CD28分别稀释至1ug/ml。然后将每种稀释的溶液用于固定在96孔板(Nunc)中过夜。使用1X块BSA(Thermo Fisher)将板封闭2小时。分别以相同浓度添加抗PD-1抗体,抗TNFα抗体,抗CTLA-4抗体和抗CD28抗体的相应偶联物,并使其在37℃下结合1小时。将板用PBST洗涤三次。用HRP酶偶联的人抗体作为二抗在37℃反应1小时,然后用PBST洗涤三次。使用通过HRP酶识别的TMB底物(Solarbio.,Inc.)在黑暗中于37℃反应15分钟。使用1/2体积的终止溶液来终止反应。读取吸光度强度(OD450)。通过偶联物的结合效率与活化前后的野生型抗体的结合效率之间的百分比来计算相对结合效率。结果显示在表24-26中。

[0312] 表24:偶联至R1后和激活偶联臂后抗PD-1抗体的结合活性的变化

[0313]

R1	R2	R3	R4	R5	激活前结合效率	酶切或酸激活后结合率
	-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	67.4%	143.5%
S1 的 R1	-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	24.4%	145.3%
S3 的 R1	-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	22.5%	143.4%
S11 的 R1	-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	15.6%	137.4%
S17 的 R1	-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	3.2%	156.3%

[0314] 结果表明与R1偶联抑制抗PD-1抗体的活性，但不影响抗体的活化。没有R1的偶联物与活化前的抗原结合效率是野生型抗体的67.4%。然而，在活化后，偶联物的结合效率提高到野生型抗体的结合效率的143%。将R1与相同的R2-R3-R4和突变的抗体结合后，可以阻止所得的偶联物与其抗原结合。并且阻碍效力随着R1的分子量增加而增加。S17可以完全阻止偶联物与其抗原结合。然而，在天冬酰胺内肽酶切割后结合活性即可恢复。

[0315] 表25：偶联至R1后和激活偶联臂后抗TNFα抗体的结合活性的变化

[0316]

R1	R2	R3	R4	R5	激活前结合效率	酶切或酸活化后的结合效率
	-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-2	TNFα-Ab–Ala50Cys	57.9%	125.6%
S2 的 R1	-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-2	TNFα-Ab–Ala50Cys	28.3%	128.9%
S4 的 R1	-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-2	TNFα-Ab–Ala50Cys	21.9%	127.5%
S12 的 R1	-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-2	TNFα-Ab–Ala50Cys	11.6%	127.4%
S18 的 R1	-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-2	TNFα-Ab–Ala50Cys	0.9%	125.3%

[0317] 结果表明与R1结合抑制抗TNFα抗体的活性，但不影响抗体的活化。在激活前没有R1的偶联物与其抗原的结合效率是野生型抗体的结合效率的57.9%。然而，在活化后偶联物的结合效率是野生型抗体的结合效率的125.6%。将R1与相同的R2-R3-R4和突变的抗体结合后，所得的偶联物不能与其抗原结合，并且阻碍效力随着R1的分子量增加而增加。S18可以完全阻止偶联物与其抗原结合。然而，在天冬酰胺内肽酶切割后结合活性即可恢复。

[0318] 表26：偶联至偶联物后和激活偶联臂后抗-CTLA-4抗体和抗-CD28抗体的结合活性的变化

[0319]

连接臂	R5	激活前结合效率	酶切或酸活化后的结合效率
S7	CD28-Gly44Cys	22.5%	143.4%
S8	CD28-Ala40Cys	15.6%	137.4%
S9	CD28-Thr97Cys	3.2%	156.3%
S10	CTLA-4-Ser26Cys	67.4%	143.5%
S13	CTLA-4-Ser28Cys	24.4%	145.3%
S14	CTLA-4-Tyr92Cys	22.5%	143.4%
S15	CTLA-4-Leu34Cys	15.6%	137.4%
S16	CTLA-4-Gly51Cys	3.2%	156.3%

[0320] 结果显示与R1偶联抑制抗CD28抗体和抗CTLA-4抗体的活性，但不影响抗体的活化。

[0321] 从实施例4可以发现，偶联物的活化效率及其在恢复后对抗原的结合能力在一定程度上受抗体中的突变位置的影响。然而，通过使用R4，可以产生通过酶切后的预期活化效率。至于生物分子与其配体之间的结合，通过活化裂解后产生的R4的暴露基团可以调节抗体突变体的结合能力。不同的暴露基团对不同的突变位置有不同的影响。通过筛选R1和R4，可以发现R1的阻碍功能导致偶联物与其抗原的结合能力完全丧失。然而，在通过酶切激活后，结合能力得以恢复或甚至增强。这种偶联型抗体仅在目的蛋白酶在病理微环境中高度表达或分泌以释放抗体或蛋白质的区域中被激活。因此，这种微环境激活的抗体是新的靶向激活的抗体，如附图10所示

[0322] 实施例5：抗体对免疫指标的促进或抑制。

[0323] 1.抗PD-1抗体促进T细胞分泌IFN-γ

[0324] 将人全血(来自上海瑞金医院)用等量PBS均匀混合稀释。将稀释溶液沿着离心管的壁缓慢转移至包含淋巴细胞分离溶液的另一离心管中，以使稀释溶液在淋巴细胞分离溶液上形成分离层。分层界面清晰。将离心管以2000rpm离心20分钟。离心后，取出离心管。管内的溶液是分层的。将单核细胞层提取到50ml离心管中。加入五倍体积的PBS并均匀混合，将混合物以2000rpm离心10分钟。弃去上清液，用PBS重悬浮沉淀物。然后将所得混合物以1500rpm离心10分钟，并将得到的人外周血单核细胞(PBMC)用含有5％热活化人血清的RPMI1640完全培养基重悬。将人PBMC以每孔1～2×10^5个细胞的浓度接种于96孔板中。用0.1ug/ml SEB刺激细胞3天。收集非粘附细胞(主要是单核细胞)并均匀接种到一个新的96孔板。加入不同浓度的无突变的抗PD-1抗体或PD-1-Ab-Cys28-S-S13偶联物于37℃，5％CO2下培养4天。收集上清液，用ELISA试剂盒检测细胞毒性因子IFN-γ的浓度。结果显示，活化的抗PD-1抗体显示出分泌IFN-γ的活性接近甚至显著改善，如附图11所示。

[0325] 结果表明，抗PD-1抗体偶联物在体外激活后不仅可以恢复抗PD-1抗体对T细胞的刺激，而且切割后产生的其余基团可以为该抗体引入一个或几个新的官能团。其结果是，在活化后，PD-1-Ab-Cys28-S-S13增强了这种激活的T细胞的活性。这种类型的偶联型抗体仅在病理微环境中高度表达或分泌目的蛋白酶的区域中被激活以释放抗体。因此，这种微环境激活的抗体是新的靶向激活的抗体。

[0326] 2.抗PD-1抗体和抗CD28抗体的偶联物减少了身体的自身免疫性

[0327] 如本领域众所周知的，尽管抗PD-1抗体是有效治疗肿瘤的药物，但在目前的临床研究中发现抗PD-1抗体显示出两个主要问题。其中一个问题是患者在施用抗体后会表现出高烧和假阳性进展的副作用，但其机制尚不清楚。我们假设如果抗体被偶联物抑制或阻断并且在到达肿瘤的局部环境后释放，则可以改善这些副作用，从而减少活性药物在非患病环境中的暴露时间或剂量。因此，对患有I型糖尿病(NOD)的小鼠进行了实验。这种小鼠的糖尿病是一种自身免疫疾病，其中自身激活的T淋巴细胞破坏胰岛β细胞，导致胰岛素分泌不足。首先，给10周龄的雌性NOD(北京维塔尔河实验动物技术有限公司)在第0天分别注射对照IgG，低(1mpk)，中(5mpk)或高(15mpk)剂量的抗体或抗体偶联物，每天观察包括尿液中的葡萄糖和两个血糖水平，持续12天，直到没有观察到新的尿糖指示。

[0328] 图12中显示了PD-1-Ab-Cys28-S-S13偶联物对自身免疫的保护，并且图13显示了

CD28-Ab-Cys-S-S13偶联物对自身免疫的保护作用。

[0329] 结果显示,与抗PD-1抗体相比,抗PD-1抗体的偶联物对免疫系统的保护增加了约15倍,与抗CD28抗体相比抗CD28抗体的偶联物对免疫系统的保护增加了大约10倍。因此可以看出,当使用连接部分来阻碍或降低蛋白质或抗体的活性时,共轭蛋白质或抗体与正常组织中的相关配体的结合减少,因为它在患病微环境外的水解酶和生理环境难以激活抗PD-1抗体和抗CD28抗体。因此,与初始的抗体相比,偶联物可以降低自身免疫。

[0330] 3.抗CD28抗体的偶联物特异性激活CD4或CD8细胞。

[0331] 根据试剂盒说明书中提供的具体步骤,用CD8或CD4磁珠(Dynabeads)从人外周血单核细胞中分离CD8+T细胞和CD4+T细胞,根据CFSE规范计数和染色。将细胞以每孔1～2×10^5个细胞的浓度接种于96孔板中。分别加入适量的对照抗CD3/抗CD28抗体,0.3ug/ml抗CD28抗体或抗CD28抗体的偶联物。

[0332] 结果显示在附图14中。根据结果可知,与最初的抗CD28抗体相比,重链偶联物CD28-Ab-Gly44Cys(CD28-Ab-Cys44-S-S13)可选择性激活CD4T细胞,轻链偶联物CD28-Ab-Ser52Cys(CD28-Ab-Cys52-S-S13)可以选择性地激活CD8T细胞。结果表明,当使用连接部分来阻碍或降低蛋白质或抗体的活性时,在抗体或蛋白质到达靶组织之前,与正常组织中的相关抗原结合的抗体与连接部分的结合降低。因为水解酶在病理微环境外以低水平表达,并且很难激活与抗体或蛋白质偶联的连接部分。当与连接部分偶联的抗体到达病理微环境,例如炎性微环境时,偶联的连接部分被Treg表面上表达的天冬酰胺内肽酶活化,从而刺激Treg的增殖并抑制炎症反应。在肿瘤区域中,偶联物的连接基团被CD8细胞表面上表达的Granzym-B激活,从而刺激CD8细胞的增殖并抑制肿瘤的进展。设计的偶联物受微环境中水解酶的调节,仅在偶联的连接部分水解后才激发抗体活性。其结果就是,与连接部分偶联的抗体可以在微环境中极大地富集。最终,可以实现整体效果,即副作用减少和疗效改善。

[0333] 实施例6:在微环境中活化的抗PD-1抗体可以治愈MC38肿瘤

[0334] 将MC38细胞皮下接种到用人PD-1融合蛋白转化的转基因C57BL/6小鼠(上海模拟生物研究中心),每只小鼠2×10^6个细胞。一周后,将植入MC38肿瘤的小鼠随机分成4组。第1组注射10mg/kg抗PD-1抗体Keytruda,第2组注射2mg/kg抗PD-1抗体Keytruda,第3组注射1mg/kg PD-1-Ab-G28C-S13结合物,第4组注射溶剂对照,每周两次2周。每周记录3次小鼠肿瘤体积。结果显示在附图15中。

[0335] 用人PD-1融合蛋白转化的小鼠是转基因小鼠。其内源性PDCD1基因被人PDCD1取代,从而表达人PDCD1蛋白。这种小鼠可以对人抗PD-1抗体起反应并刺激下游免疫。结果表明,10mg/kg抗PD-1抗体可有效抑制MC38肿瘤的生长,一只小鼠被治愈,五只小鼠具有显着的抑制作用,其为80％或更高。1mg/kg PD-1-Ab-G47C-S13偶联物产生比10mg/kg抗PD-1抗体Keytruda更好的抑制效果。结果表明抗-PD-1抗体的偶联物可以增强效应T细胞的活性和抗体在肿瘤微环境中的富集,如实施例5中所证明的。因此,偶联物表现出比原始抗体更高的功效。

[0336] 实施例7a:在微环境中激活的IL2蛋白

[0337] L2的氨基酸序列是天然人IL2蛋白。其DNA序列被优化用于在宿主中表达并合成(金唯智,中国苏州)。将合成的DNA酶切后连接到一种修饰的PTT5载体(来源于Biovector)上以产生pTT5-IL2。用pTT5-IL2为模板构建突变的载体,设计引物并用半胱氨酸的密码子

替换掉突变位点的密码子，经PCR和酶切，然后将突变片段构建在经修饰的pTT5载体中。根据实施例2中描述的方法进行IL2基因的合成，突变和转染。通过IP和ELISA根据突变位置分析其对配体IL2Ra或IL2Rb的结合活性。

[0338] 证实微环境中大分子的活化不限于抗体，而是适用于各种蛋白质，细胞因子IL2用作本文的实例。筛选其突变位置，活性，连接臂和活化后的活性和功能。结果显示在下表27-29中。

[0339] 表27：突变的IL2的活性和连接臂的筛选

[0340]

氨基酸	位点	抑制配体的类型	突变后与 IL2Ra 结合活性	突变后与 IL2Rb 结合活性	与 S3 偶联	与 S13 偶联
Lys	32	α	86.5%	100%	26.1%	
Lys	35	α	87.1%	100%		32.4%
Thr	37	α	98.1%	100%		
Thr	41	α	99.2%	100%	18.7%	
Lys	43	α	89.9%	100%		31.3%
Lys	48	α	88.4%	100%		
Lys	49	α	79.8%	100%		39.4%
Leu	72	α	98.8%	100%		25.5%
Ala	73	α	84.3%	100%	27.9%	
Ser	75	α	86.2%	100%		
Lys	76	α	85.0%	100%		32.2%
Leu	94	α	99.6%	100%		27.2%
Thr	101	α	99.8%	100%		32.0%
Thr	102	α	95.3%	100%		29.6%
Ala	108	α	93.9%	100%		16.9%
Thr	111	α	94.9%	100%		35.3%

[0341]

Ala	112	α	97.3%	100%		41.9%
Leu	19	β	100%	97.5%	39.5%	
Gly	27	β	100%	42.3%		
Ser	75	β	100%	93.3%		31.1%
Leu	80	β	100%	27.0%		
Ser	87	β	100%	31.6%		
Leu	94	β	100%	47.6%		
Gly	98	β	100%	79.5%		16.9%
Ser	99	β	100%	99.2%		18.9%
Thr	101	β	100%	21.7%		
Thr	133	β	100%	96.9%		27.8%
Thr	51	γ	100%	100%	89.70%	91.60%

[0342] 从结果可以发现，与天然IL2相比，突变体对其相应受体保留80％或更多的结合活性，通过调节连接臂的长度可以抑制或阻碍它们的结合受体活性。

[0343] 例如，在将Lys32，Thr41，Ala73或Leu19突变为Cys后，将每个所得突变体与S3偶联可以抑制60％对其相应受体的结合活性；而在将Lys35，Lys43，Leu72，Lys76，Leu94，Thr101，Thr102，Ala108，Thr111，Ala112，Gly98，Ser99，Thr133等突变为Cys后，将每个所得突变体与S13偶联可抑制60％或更多的对其相应受体的结合活性。

[0344] 表28：偶联的IL2的切割效率

[0345]

R2	R3	R4	R5	切割效率
-Ala-Ala-Asp-	R3-2			100％对照
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	紫杉醇(2-OH)		45.5％
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-10	IL2-Thr37	86.5％
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-11	IL2-Thr37	92.7％
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-12	IL2-Thr37	96.7％
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-13	IL2-Thr37	73.9％
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-14	IL2-Thr37	62.4％
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-1	IL2-Thr37	73.8％
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	IL2-Thr37	84.7％
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-1	IL2-Thr41	86.7％
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-3	IL2-Thr41	95.5％

[0346] 结果表明，由于自动脱落臂R3的小分子线性结构，天冬酰胺内肽酶的活化不受影响。

[0347] 表29：在连接臂活化后将IL2与R1a偶联后对其受体的结合效率的变化

[0348]

R1	R5	激活前结合效率	酶或酸活化后的结合效率
S3	IL2-Thr37	28.1%	143.5%
S5	IL2-Ser87	31.6%	145.3%
S6	IL2-Thr-41	99.2%	124.8%
S13	IL2-Leu-19	97.5%	118.7%

[0349] 因此可以看出，偶联物的活化效率及其在恢复后对抗原的结合能力在一定程度上受抗体中的突变位置的影响。然而，通过使用R4，可以产生通过酶切后的预期活化效率。至于生物分子与其配体之间的结合，通过活化裂解后产生的R4的暴露基团可以调节抗体突变体的结合能力。不同的暴露基团对不同的突变位置有不同的影响。通过筛选R1和R4，可以发现R1的阻碍功能导致偶联物与其抗原的结合能力完全丧失。然而，在通过酶切激活后，结合能力得以恢复或甚至增强。这种偶联型抗体仅在目的蛋白酶在病理微环境中高度表达或分泌以释放抗体或蛋白质的区域中被激活。因此，这种微环境激活的蛋白是新的靶向激活的蛋白。

[0350] 制备具有两个或多个突变的IL2突变体并与S13偶联。突变位点选自上述具有一个突变且对其受体具有95％或更高结合活性的IL2突变体的突变位点。激活后这种偶联物的活性验证结果显示在表30中。

[0351] 表30：在激活前后，两个或更多个突变的IL2突变体的偶联物与其受体的结合活性

[0352]

R1-R2-R3-R4	R5	激活前结合效率	酶或酸活化后的结合效率
S13	IL2-Thr37/Leu19	12.1％	113.5％
S13	IL2-Ser37/Thr41	11.6％	98.3％
S13	IL2-Thr-41/Ser87	19.2％	102.8％
S13	IL2-Leu-19/Ser87	17.5％	96.7％
S13	IL2-Leu19/Ser37/Ser87	10.9％	95.9％

[0353] 上述结果表明两个或多个突变的IL2突变体与偶联物在活化后可以保持95％或更高的对应受体的结合活性。

[0354] IL2蛋白的偶联物特异性激活CD4或CD8细胞。

[0355] 根据试剂盒说明书中提供的具体步骤，用CD8或CD4磁珠(Dynabeads)从人外周血单核细胞中分离CD8+T细胞和CD4+T细胞，根据CFSE规范计数和染色。将细胞以每孔1-2×10^5个细胞的浓度接种于96孔板中。分别加入适量的对照抗CD3抗体，0.05ug/ml的IL2蛋白或与S16偶联的偶联物IL2-T41C-S16。附图16显示IL2-T41C(IL2-Thr41Cys)与S16的偶联。附图17显示偶联前后IL2受体α的结合。附图18显示了IL2-C41-S16偶联对活化前后T细胞增殖的影响。天然IL2对CD8和CD4表现出类似的刺激。然而，在偶联至功能基团并在微环境中活化后，IL2-Thr37Cys和IL2-Thr41Cys可特异性激活CD8T细胞的增殖并减少CD4细胞的增殖。CD8细胞和CD4细胞之间的细胞数比率分别从原来的1：1增加到410：1和157：1。IL2-Leu19Cys和IL2-Ser87Cys可特异性激活CD4T细胞的增殖，CD4/CD8的细胞比率分别增加至435：1和126：1。结果显示在附图19中。证明CD8或CD4可以通过将IL2与功能部分偶联来选择

性激活，以控制其对每种受体的结合活性并使其在特定的微环境中被激活。

[0356] IL2蛋白的偶联物有效地抑制黑素瘤B16F10和结肠癌MC38的生长

[0357] 将B16F10细胞皮下接种到C57BL/6小鼠中，每只小鼠的接种浓度为0.5×10^6个细胞。一周后，当肿瘤体积达到$100mm^3$时，将植入黑色素瘤的小鼠随机分成4组，每组6只小鼠。第1组每周注射2.5mg/kg的IL2-T37C-S14蛋白质偶联物。第2组每周注射0.5mg/kg的IL2-Thr37Cys蛋白质偶联物。第3组每周两次注射3mg/kg阿地白介素(对照)。第4组每周两次注射溶剂(对照)。所有组均连续给药3周。每周测量两次小鼠肿瘤体积和小鼠体重。

[0358] 将MC38细胞皮下接种到用人PD-1融合蛋白转化的转基因C57BL/6小鼠中，每只小鼠的接种浓度为0.5×10^6个细胞。一周后，将植入MC38肿瘤的小鼠随机分成4组。第1组注射2mg/kg IL2-T37C-S14蛋白质偶联物。第2组每周两次注射0.5mg/kg的IL2-Thr37Cys偶联物和每次100μg的抗PD-1抗体。第3组每周两次注射3mg/kg阿地白介素(对照)。第4组注入溶剂(对照)每周两次。所有组均连续给药3周。每周测量两次小鼠肿瘤体积和小鼠体重。

[0359] 结果如附图20和21所示，证明IL2-Thr37Cys偶联物不仅降低了使用剂量，而且与现有的IL2产品aldeslekin相比，还显著增强了对B16F10肿瘤的治疗效果。并且在具有抗PD-1抗体的组合治疗组中，有MC38小鼠被治愈。

[0360] 从上述结果可以发现，当使用功能部分来阻碍或降低蛋白质或抗体的活性时，蛋白质与其受体或配体在正常组织中的结合可以在其到达靶组织之前降低。因为通过水解酶和病理微环境外的生理环境激活与蛋白质偶联的功能部分是非常困难的。

[0361] 然而，在病理微环境中，IL2-Thr37Cys和IL2-Thr41Cys等受到病理微环境中的水解酶的影响，并且被CD8细胞的表面上高表达的Granzym-B激活，从而结合CD8表面上的受体，激活CD8细胞。结果就是，与功能部分偶联的蛋白质可降低免疫毒性，同时增强疗效。

[0362] 同理，IL2-Leu19Cys和IL2-Ser87Cys被Treg细胞表面上高度表达的天冬酰胺内肽酶激活，使活化的IL2与Treg细胞表面上的受体结合，从而激活Treg细胞的增殖。

[0363] 实施例7b：肿瘤微环境活化的IL2细胞因子(IL2 TMEAkine)

[0364] 1.突变体IL2细胞因子的表达和纯化

[0365] 将突变体IL2连接到修饰的pTT5载体(Biovector)上，优化其在293T细胞中的表达并合成(金唯智)。进行突变体IL2 DNA的转染。孵育4-7天后，收集含有突变体IL2的上清液。在真核表达中，优化并制备含有突变IL2基因的表达载体pPICZαA(金唯智)。野生型IL2的氨基酸序列描述如下：

[0366] APASSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT(SEQ ID NO：11)。

[0367] 将表达载体pPICZαA转化到大肠杆菌(DH5α)中进行质粒纯化。然后通过电穿孔将pPICZαA转化到GS115中。通过在含有YPD平板的100，300，500，1000，1500，2000μg/mL ZeocinTM上生长后获得生长的菌落来选择转化的菌落。最后选择转化体后，重组GS115菌株在30℃的BMGY培养基中生长，在带挡板的烧瓶中剧烈摇动至OD600为2-6。然后通过离心沉淀细胞并悬浮于BMMY中至OD600为1，每天向其中加入0.5％甲醇以诱导异源蛋白质表达。诱导4天后，通过离心收集含有分泌的突变IL2蛋白的上清液。使用10kDa分子量截止膜通过超滤浓缩上清液中的总蛋白质。将浓缩的蛋白质用缓冲液A(50mM HAc/NaAc，pH4.5)透析超过

24小时，然后加载到用缓冲液A平衡的阳离子交换柱上。用梯度浓度的NaCl从柱上洗脱突变体IL2。收集并浓缩洗脱液。使用20mM Tris-HCl，20mM NaCl，pH7.4作为洗脱缓冲液，在Sephacryl S-100HR凝胶过滤柱上进一步纯化浓缩的样品。

[0368] 在原核表达中，优化并制备含有突变IL2基因的表达载体pET22b(+)(金唯智)。野生型IL2的氨基酸序列描述于SEQ ID NO:12中。选择阳性克隆并在大肠杆菌细胞(BL21DE3)中转化。遵循异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导靶蛋白的标准程序。将诱导的大肠杆菌细胞离心，将细胞沉淀重悬于含有5mM EDTA和1mM PMSF的100mM Tris-HCl缓冲液(pH8.0)中。超声裂解细胞并离心以分离IL2蛋白包涵体(IB)。然后分别用含有5mM EDTA和2%脱氧胆酸盐的100mM Tris-HCl缓冲液(pH8.0)和蒸馏水洗涤IB沉淀。将IB溶解于6M盐酸胍(GuHCl)溶液(在0.1M Tris缓冲液，pH8.0中制备)中，在室温下温育30分钟，轻轻涡旋，然后离心。将上清液用复性缓冲液(0.1M Tris缓冲液，pH8.0，含有10mM还原的和1mM氧化型谷胱甘肽，比例为10:1)稀释，以分别获得0.1mg/mL和2M的蛋白质浓度和GuHCl。随后，将溶液在室温下保持16小时以缓慢重折叠IL2。离心除去不溶性蛋白质。将上清液浓缩并上样到凝胶过滤柱Sephacryl S-100HR上，用含有2M GuHCl的0.1M Tris缓冲液平衡。

[0369] 由转化体产生的野生型IL2氨基酸序列如下所示：PTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT(SEQ ID NO:12)。

[0370] 2.突变后筛选突变体对IL2Rα或IL2Rβ的结合活性

[0371] 各种IL2突变体由293T细胞表达并分泌到培养基中。如第1部分所述，通过离心获得含有IL2突变体的上清液。然后将1μg His标记的IL2Rα或IL2Rβ加入到上述1mL上清液中并在4℃温和搅拌下培养1小时。将50μL预洗涤的Ni-NTA树脂转移到上清液和IL2Rα或IL2Rβ的混合溶液中，并在4℃温和搅拌下培养1小时。将混合物离心，弃去上清液。将得到的沉淀用含有25mM咪唑的500μLPBS洗涤三次。使用IL2抗体和抗His标记的单克隆抗体通过蛋白质印迹显现IL2突变体和IL2R_{α}/R_{β}的量。

[0372] 3.将S47与突变体IL2偶联

[0373] 如本发明第1部分所述产生并纯化突变体IL2蛋白。将纯化的突变体IL2以0.3mg/mL的浓度在含有5mM EDTA的50mM磷酸盐缓冲液(pH7.4)中温育。将TCEP溶液以100:1的摩尔比添加到突变体IL2中将所得混合物在4℃温育4小时，同时轻轻搅拌。然后将混合物用含有150mM NaCl的50mM磷酸盐缓冲液(pH7.4)在4℃透析2小时。然后，立即将S47以20:1的摩尔比加入混合物中，并将所得混合物在25℃温和搅拌16小时。停止反应并除去残留的S47。在酶切割之前，用于IL2-S47(IL2 TMEAkine，肿瘤微环境活化的IL2细胞因子)的偶联物的缓冲液通过透析转变为用于酶的缓冲液。然后将酶加入到IL2 TMEAkine溶液中，将混合物在37℃下保温16小时。附图22展示了SDS-PAGE结果，其中包含突变体IL2，IL2 TMEAkine的胶体蓝染色和IL2体外酶切后的恢复活性。

[0374] 4.筛选IL2 TMEAkine，其阻断与IL2Rα或IL2Rβ的结合并在体外酶切后恢复结合活性

[0375] 将含有1μgIL2Rα-Fc/IL2Rβ-Fc溶液的60μlPBS缓冲液分配到孔中。将密封带施加到板的顶部，然后将板在4℃下培养过夜。培养后，除去胶带以吸出每个孔。用PBST洗涤三次后，通过向每个孔中分配200μl含有2%BSA的PBS缓冲液来封闭平板，然后将平板在室温下

温育2小时。将板洗涤三次，并将60ul连续稀释的样品加入适当的孔中。将板在室温下培养1.5小时。用PBST洗涤三次后，将60μl1μg/mL IL2生物素化抗体溶液分配到每个孔中，并将所得混合物在室温下温育1小时。将板洗涤三次，然后将60ul链霉抗生物素蛋白溶液分配到每个孔中。然后将板在室温下培养30分钟。洗涤三次后，将100μlHRP底物溶液分配到每个孔中，并将板在37℃下温育15分钟。显色后，将50μl终止溶液分配到每个孔中，立即在450nm波长下测量每个孔的吸光度。ELISA结果显示在图23中，表明在体外酶切割之前和之后IL2 TMEAkine与IL2Rα或Rβ的结合活性。与野生型IL2与IL2Rα和IL2Rα的结合活性相比较IL2Rβ，IL2 TMEAkine以低得多的结合亲合力结合IL2Rα，但以几乎相同的结合亲合力结合IL2Rβ。在酶活化后，IL2 TMEAkine与IL2Rα的结合亲合力等于野生型IL2与IL2Rα的结合亲合力。

[0376] 5.各种IL2突变位点的总结

[0377] IL2受体可以在细胞表面结合形成以下异聚体：

[0378] 中间亲和受体：IL2Rβγ至IL2(Kd＝1nM)和低亲合力受体：IL2Rα至IL2(Kd＝10nM)。因为它是低亲合力结合(Kd＝10nM)，所以比抗体的CDR区更容易筛选连接到R4基团的位置以恢复结合亲合力。因为我们不想增加R4-S-IL2和IL2Rα之间的结合亲合力，我们选择具有特异性R4的偶联的IL2，其可以恢复天然亲合力。在某些情况下，有一些R4基团可以增强结合亲合力，但我们没有选择它们作为候选药物。我们更优选R-1，R4-7，R4-5，R4-8和R4-12用于CMC开发中的大规模合成。S47被天冬酰胺内肽酶切割。切割后，其R4-7化学基团保留。为了选择候选药物，我们还在结合IL2Rα和IL2Rβ的结构域中对IL2的所有氨基酸进行筛选表达和S47偶联反应。我们获得了可能的候选药物，结果显示在下表31-33中。

[0379] 表31：突变的IL2的活性和连接臂的筛选

[0380]

位点	氨基酸	抑制的配体类型	R4	结合力恢复(>60%)	与 S47 偶联后与配体结合的减少倍数(>3 倍)
32	K	α	R4-7	100.2%	3 倍
35	K	α	R4-7	85.4%	89 倍
37	T	α	R4-7	98.9%	51 倍
38	R	α	R4-18	81.2%	145 倍
41	T	α	R4-7	99.2%	135 倍
42	F	α	R4-8	82.3%	120 倍
43	K	α	R4-7	89.3%	110 倍
43	K	α	R4-18	109.7%	
44	F	α	R4-8	96.7%	60 倍
45	Y	α	R4-7	96.8%	125 倍
45	Y	α	R4-8	143.6%	
48	K	α	R4-7	100.2%	12 倍
49	K	α	R4-18	100.7%	
60	E	α	R4-12	97.1%	5 倍
61	E	α	R4-12	83.4%	134 倍
62	E	α	R4-12	86.6%	120 倍

[0381]

63	L	α	R4-5	99.3%	13 倍
64	K	α	R4-7	97.1%	
67	E	α	R4-12	99.6%	9 倍
68	E	α	R4-12	95.4%	89 倍
71	N	α	R4-18	98.6%	5 倍
72	L	α	R4-5	90.1%	110 倍
74	Q	α	R4-19	100.0%	3 倍
75	S	α	R4-7	100.0%	4 倍
76	K	α	R4-7	100.0%	3 倍
101	T	α	R4-7	100.0%	5 倍
102	T	α	R4-7	100.0%	4 倍
102	T	α	R4-3	122.5%	
107	Y	α	R4-4	97.7%	78 倍
108	A	α	R4-5	100.0%	10 倍
111	T	α	R4-7	98.9%	20 倍
112	A	α	R4-5	100.0%	5 倍
5	S	β	R4-7	99.8%	3 倍
5	S	β	R4-2	109.5%	
8	K	β	R4-7	66.7%	6 倍
9	K	β	R4-6	97.0%	9 倍
9	K	β	R4-7	124.6%	
12	L	β	R4-5	93.4%	13 倍
13	Q	β	R4-19	85.1%	28 倍
15	E	β	R4-12	81.4%	25 倍
19	L	β	R4-5	92.3%	27 倍
20	D	β	R4-11	87.3%	31 倍
27	G	β	R4-1	100.0%	3 倍
76	K	β	R4-6	100.0%	3 倍
76	K	β	R4-7	130.4%	
80	L	β	R4-2	100.0%	5 倍
81	R	β	R4-18	95.2%	12 倍
84	D	β	R4-11	80.1%	36 倍

[0382]

85	L	β	R4-7	98.4%	9 倍
85	L	β	R4-5	113.6%	
87	S	β	R4-7	99.5%	30 倍
88	N	β	R4-18	82.3%	46 倍
91	V	β	R4-5	94.5%	2 倍
92	I	β	R4-5	89.3%	19 倍
94	L	β	R4-5	99.5%	30 倍
95	E	β	R4-12	60.1%	8 倍
98	G	β	R4-1	98.6%	4 倍
99	S	β	R4-7	100.0%	3 倍
101	T	β	R4-7	100.0%	3 倍
133	T	β	R4-7	100.0%	3 倍

[0383] 表32:在激活前后,两个或更多个突变位点的IL2突变体偶联物与其受体的结合活性

[0384]

TMEAkine	突变位点（与 R_α 结合）	突变位点（与 R_β 结合）	与 S47 偶联后与 α 配体结合的减少倍数	与 S47 偶联后与 β 配体结合的减少倍数	结合力恢复 (>60%)
IL2-Thr37/Thr3	IL2-Thr37		51 倍	N.D.	98.9%
IL2-Thr3/Thr41	IL2-Thr41		135 倍	N.D.	101.8%
IL2-Thr-41/Ser87	IL2-Thr-41	IL2-Ser87	135 倍	30 倍	96.8%
IL2-Thr37/Ser87	IL2-Thr37	IL2-Ser87	51 倍	30 倍	98.4%
IL2-Thr3/Ser87		IL2-Ser87	N。D。	30 倍	99.3%

[0385] 结果证明IL2突变体与两个或更多个突变位点的偶联物在活化后可以保持95％或更高的对应受体的结合活性。

[0386] 在筛选表达,结合活性,偶联物,切割,活性恢复基团和功能基团分析后,我们获得了在R_α结合域上具有一个或多个稳定突变的候选药物和在与R_β的结合域上的一个偶联,如表33所示。与R_α结合的结构域上的稳定突变位点是Arg38和Glu61,其中Arg38突变为Asp,Glu61突变为Arg,影响IL2和IL2Rα的结合活性。因此,这些偶联在肿瘤微环境中切割后在R_α结合域上释放稳定的突变体。

[0387] 表33:在激活前后具有一个或多个稳定突变和一个与其受体偶联的候选物的结合

活性

[0388]

TMEAkine	阻断 R_α 结合的稳定突变	与 S47 偶联的突变位置（R_β 结合）	与 S47 偶联后与 α 配体结合的减少倍数	与 S47 偶联后与 β 配体结合的减少倍数	β 配体的结合恢复率（> 60%）
IL2-Arg38/Ser87	Arg38Asp	Ser87	200 倍	32 倍	99.5%
IL2-Glu61/Ser87	Glu61Arg	Ser87	110 倍	30 倍	99.5%
IL2-Arg38/Glu61/Ser87	Arg38 Asp /Glu61Arg	Ser87	>200 倍	32 倍	96.4%

[0389] 表34：在激活之前和之后具有两个稳定突变体和一个与其受体偶联的候选物的结合活性

[0390]

用于调节 R_α 结合的突变	与 R4-7 偶联物结合的 R_β 的突变体	与 α 配体结合的减少倍数	与 R_β 的结合恢复
Arg38Asp/Glu61Arg		>200 倍	
	Lys9		124.6%
	Lys76		130.4%
Arg38Asp/Glu61Arg	Lys9，Lys76	>200 倍	165.7%

[0391] 结果表明，结合R4文库筛选和突变，我们得到一种新的化学修饰的IL2，与R_α结合减少200倍并且与R_β结合增加1.35倍。

[0392] 6.人血清中的稳定性

[0393] 将IL2-T41C-S47溶液和人血清以1:19(v/v)的比例混合，将混合物分别在37℃下培养0h，8h，24h和48h。然后通过蛋白质印迹检测IL2-T41C-S47的含量，相应的结果显示在附图24中。IL2-T41C-S47在48小时后在人血清中是稳定的，表明IL2-T41C-S47在体外可能比人血清中的IL2稳定得多。表35中显示了IL2突变体的其他偶联物在人血清中的稳定性。

[0394] 表35：人血清中IL2突变体的其他偶联物的稳定性

[0395]

R1-R2-R3-R4	R5	人体血清中的稳定性
S47	IL2-Thr37	100%

[0396]

S47	IL2-Thr41	99.8%
S47	IL2-Ser87	99.2%
S47	IL2-Thr41/Ser87	99.5%
S47	IL2-Ser37/Ser87	99.5%

[0397] 7.小鼠的药代动力学

[0398] 小鼠接受单次静脉内注射IL2-T41C-S47(0.8mg/kg)，每个采样时间3只小鼠。将约

200μL血液收集到K2EDTA涂覆的管中。离心后分离血浆，在-80℃冷冻直至分析。然后使用定量ELISA测量IL2-T41C-S47的浓度。结果显示在附图25中。体内药代动力学研究表明，与IL2相比，IL2TMEAkine具有长的半衰期和在血浆中的高暴露。

[0399] 8.毒性

[0400] C57BL/6小鼠5天内每天腹腔注射PBS或者25微克IL2或者5天内分别注射5种剂量的等摩尔量的IL2-T41C-S47。处死小鼠，用10％福尔马林溶液中固定肺，并将石蜡包埋的切片用苏木精和曙红染色。结果如附图26所示。肺部(湿重)的测量和用苏木精和伊红染色的切片表明IL2 TMEAkine对肺的毒性比野生型IL2低。

[0401] C57BL/6小鼠5天内每天腹腔注射PBS或者25微克IL2-T41C/S87C-S47或者5天内分别注射5种剂量的等摩尔量的IL2-R38D/E61R/S87C-S47。处死小鼠，用10％福尔马林溶液中固定肺，并将石蜡包埋的切片用苏木精和曙红染色。结果如附图27所示。肺部(湿重)的测量和用苏木精和伊红染色的切片表明IL2 IL2-T41C/S87C-S47和IL2-R38D/E61R/S87C-S47几乎没有肺毒性。

[0402] 9.在BALB/C小鼠中，IL2-T41C-S47和IL2-T41C-S47与抗PD-1抗体联合治疗对CT26肿瘤模型的疗效研究

[0403] 实验目的：研究IL2-T41C-S47和IL2-T41C-S47与抗PD-1抗体联合治疗BALB/C小鼠中的CT26肿瘤模型的抗肿瘤疗效。

[0404] 实验药物：IL2-T41C-S47，抗PD-1抗体和IL2注射，给药时用PBS稀释至相应的浓度。

[0405] 方法和结果：

[0406] 1.实验动物：5周龄的BALB/C小鼠，全部为雌性。

[0407] 2.肿瘤模型的生产

[0408] 1)CT26细胞购自美国模式培养物集存库(ATCC)，并根据ATCC提供的说明书鉴定。将细胞在含有10％胎牛血清的RPMI1640培养液中于37℃和5％CO_2培养。细胞每三天传代一次，并使用第9代内的细胞。

[0409] 2)肿瘤模型的产生。将CT26细胞皮下注射到BALB/C小鼠的背部。在小鼠肿瘤生长至约100-200mm^3后随机分组并开始药物治疗。第31天麻醉后处死小鼠。

[0410] 3)治疗过程

[0411] 共有5组，每组6只动物。包括在第0，5和11天治疗的对照组和三个单药治疗组(在第2天，第4天，第7天，第9天，第13天和第15天给抗PD-1抗体治疗，或在第0天，第5天，第11天给IL2治疗，或第0天，第5天，第11天给IL2-T41C-S47治疗)和一个联合免疫治疗组，其中在抗PD-1抗体(在第2，4，7，9，13和15天给予)治疗之前开始IL2-T41C-S47(在第0，5和11天给予)治疗。

[0412] 4)分组和测试结果如表36所示

[0413] 表36：IL2-T41C-S47和IL2-T41C-S47与抗PD-1抗体组合对BALB/C小鼠模型中CT26肿瘤模型的影响

[0414]

组别	肿瘤消退
对照组	0
抗-PD-1抗体	16.79％

IL2	16.79%
IL2-T41C-S47	33%
IL2-T41C-S47和抗-PD-1抗体联合治疗	100%

[0415] 每周监测2-3次肿瘤体积,并显示在附图28中。

[0416] 5)结果和讨论

[0417] 如表36所示,IL2-T41C-S47与抗PD-1抗体联合治疗后,BALB/C小鼠CT26肿瘤的消退得到极大改善,表明IL2-T41C-S47与抗-PD-1抗体联合对CT26肿瘤模型显示出优异的抗肿瘤功效。

[0418] 10.IL2-T41C-S47中激活的IL2在肿瘤,肺和心脏中的生物分布

[0419] 将CT26细胞皮下植入BALB/C小鼠右侧腹部。细胞植入7天后,当肿瘤测量为200mm^3时,给动物施用IL2-T41C-S47(2mg/kg×1)。在24小时,48小时,96小时和192小时后,收取肿瘤,肺和心脏(每个观察时间n=2),在含有蛋白酶抑制剂和0.25%乙酸的冰PBS中匀浆,并离心获得上清液。为了定量IL2-T41C-S47水平,进行ELISA测定,其中将PEG抗体用作捕获抗体并且将IL2生物素化的抗体用作检测抗体。为了定量IL2-T41C-S47和激活的IL2水平,进行了ELISA,其中IL2单克隆抗体用作捕获抗体,IL2生物素化抗体用作检测抗体。结果显示在附图29中,表明激活的IL2在肿瘤中的高暴露,这与高效抗肿瘤和肺和心脏中激活的IL2的低暴露一致,也与肺水肿的低毒性一致。

[0420] 实施例8:筛选化学修饰的接头的部分以获得高活化效率

[0421] 与天然肽序列接头相比,R2-R3是化学修饰的接头,显示出高激活效率。在激活测定中评估R1为5kDa PEG且R4为R4-2和对照接头(表中所示的C1-C4)的不同R2-R3接头的活化。将R1-R2-R3-R4偶联物溶解并稀释10倍至终浓度为0.1mM/ml。在37℃下,将试验化合物加入100μg酸化的人乳腺癌(MDA-MB435)肿瘤组织匀浆(pH6.0)中,浓度为1mg/ml。肿瘤组织匀浆中的酶可以释放R1,可通过HPLC检测,从而比较接头的激活效率。结果如表37-39所示。

[0422] 表37:不同接头的激活效率(%)

[0423]

R2-R3	激活效率(%)
C1:AANL	68.4
C2:AANP	45.9
C3:SDNP	22.7
C4:SANP	32.6
C5:SDNH	23.9
AAN-R3-5	99.6
AAN-R3-6	97.5
AAN-R3-7	73.3
AAN-R3-8	93.3
AAN-R3-9	63.3
AAN-R3-10	55.1
AAN-R3-11	76.3
AAN-R3-12	64.5
AAN-R3-1	99.7

AAN-R3-2	99.5
AAN-R3-3	99.1
AAN-R3-4	98.9

[0424] 表38:不同接头的活化效率(%)

[0425]

R2-R3	活化效率 (%)
C1: AADL	41.7
C2: AADP	37.8
C3: SDDP	46.8
C4: SADP	31.3

[0426]

C5: SDNH	10.7
AAD-R3-5	92.3
AAD-R3-6	90.5
AAD-R3-7	84.6
AAD-R3-8	86.7
AAD-R3-9	73.4
AAD-R3-10	53.6
AAD-R3-11	49.6
AAD-R3-12	57.7
AAD-R3-1	93.7
AAD-R3-2	96.5
AAD-R3-3	90.1
AAD-R3-4	97.9

[0427] 表39:不同接头的活化效率(%)

[0428]

R2-R3(R2不存在)	活化效率(%)
R3-1	43.3
R3-2	65.1
R3-3	46.3
R3-4	60.1
R3-5	8.8
R3-6	79.5

[0429] MDA-MB435肿瘤组织表现出对天冬酰胺内肽酶,Grazym B和MMP2或其他蛋白酶有高活性。在该测定中,证明AAN-R3-5,AAN-R3-6,AAD-R3-5,AAD-R3-6,AAD-3-7和AAD-R3-8具有相对较高的活化效率(大于80%)。当R2不存在时,R3-5在pH6.0稳定,R3-2,R3-4和R3-6是

酸性(pH6.0)激活的连接体,具有相对较高的活化效率(大于60%)。

[0430] 实施例9:不同可激活接头在不同肿瘤微环境中靶向激活的激活效率

[0431] 在不同的人肿瘤组织中检测六种R1-R2-R3-R4偶联物,其中R1是5kDa PEG,R4是R4-2。将R1-R2-R3-R4偶联物各自溶解稀释10倍至0.1mM/ml的浓度。在37℃下,将试验化合物加入100μg不同酸化的人肿瘤组织匀浆(pH6.0)中,浓度为1mg/ml。肿瘤组织匀浆中的酶可以释放R1,可通过HPLC检测释放的R1,从而比较接头的活化效率。结果显示在表40中。

[0432] 表40:来自不同肿瘤组织的匀浆中R3-3,R3-5,R3-6,AAN-R3-5,AAN-R3-6和AAD-R3-5的活化效率(%)

[0433]

肿瘤组织	肿瘤细胞系	激活效率 (%)					
		R3-2	R3-4	R3-6	AAN-R3-5	AAN-R3-6	AAD-R3-5
人纤维肉瘤	HT-1080	63.7	64.7	78.9	87.2	84.5	89.5
乳腺癌	MDA-MB231	66.3	53.7	89.6	97.8	84.7	92.6
卵巢癌	SK-OV-3	56.6	35.7	78.4	99.4	85.8	95.8
结肠癌	HT-29	63.8	56.7	58.8	93.6	83.7	91.5
慢性白细胞病	K562	64.8	53.8	58.3	88.2	84.6	84.8
胰腺癌	Panc-1	46.8	73.8	74.8	96.1	94.8	79.8
非小细胞肺癌	A549	57.8	62.7	74.7	86.2	85.8	96.4
前列腺癌	PC-3	37.8	64.8	89.6	96.5	94.7	89.6
肝癌	Hepg2	46.8	64.5	45.8	87.0	83.6	85.7
肾癌	OS-RC-2	35.7	54.6	75.7	95.7	90.4	88.4
心脏		8.6	3.7	7.4	0.1	0.1	6.8
肺		6.7	6.5	4.9	0.1	0.1	1.8

[0434] 实施例10:化学修饰的接头在被肿瘤组织蛋白酶激活时对不同的生物分子没有空间位阻

[0435] R4-1是示例性R4组中最短的化学基团。将不同的生物分子与R1-R2-R3-R4偶联,其中R1是5kDa PEG,R2-R3如下表所示,R4是R4-1。将偶联物溶解并稀释10倍至终浓度为0.1mM/ml。在37℃下,将偶联物加入100μg不同的酸化人肿瘤组织匀浆(pH6.0)中,浓度为1mg/ml,或加入天冬酰胺内肽酶溶液(0.1ug/ml)或颗粒酶B溶液(0.1ug/ml),肿瘤组织匀浆中的酶可以释放R1。通过HPLC检测释放的R1,从而比较接头的活化效率。结果显示在表41中。

[0436] 表41:不同抗体的接头的活化效率(%)

[0437]

生物分子	激活效率(%)				天冬酰胺内肽酶	颗粒酶 B
	AAN-R3-5	AAN-R3-6	AAD-R3-5	R3-6	AAN-R3-5	AAD-R3-5

[0438]

人 IL2	95.6	94.4	93.4	67.8	99.5	102.8
PD-1	91.4	88.6	82.8	76.4	101.6	94.7
PD-1-O	82.4	92.9	94.6	63.6	103.6	99.5
PD-1-K	87.7	76.3	73.2	67.2	100.6	97.7
Ipi(CTLA-4Ab)	97.8	93.8	94.5	66.1	99.4	102.7
41BB	89.5	92.4	84.4	66.2	96.8	104.4
Ada	100.3	101.4	79.3	76.5	99.1	93.7
抗-CD28	88.7	87.6	76.5	77.0	103.7	95.7

[0439] 结果表明R2中的切割位点远离生物分子(R5)。即使R4-1最短,R2的切割也不受生物分子的影响,并且激活效率不受影响。

[0440] 实施例11:化学修饰的接头在人血清中的稳定性

[0441] 在人血清中测试化学修饰的接头R2-R3的稳定性。制备R1-R2-R3-R4偶联物,其中R1是5kDa PEG(PEG500),R2-R3如下表所示,R4是R4-1。将偶联物溶解并稀释10倍至浓度为0.1mM/ml。将偶联物各自以1mg/ml的浓度在37℃下加入100μg人血清中48小时。可通过ELISA测定检测完整的偶联物。通过比较残留偶联物的浓度,可以计算稳定性。结果显示在表42和43中。

[0442] 表42:不同接头的稳定性百分比(相对于对照)

[0443]

R2-R3	稳定性%(相对于对照)
C1: AANL	97.4
C2: AANP	55.9
C3: SDNP	72.7
C4: SANP	62.6
C5: SDNH	73.9
AAN-R3-5	99.9
AAN-R3-6	99.5
AAN-R3-7	99.3
AAN-R3-8	98.3
AAN-R3-9	97.2
AAN-R3-10	98.7
AAN-R3-11	96.3
AAN-R3-12	97.5
AAN-R3-1	89.7

[0444]

AAN-R3-2	89.5
AAN-R3-3	79.1
AAN-R3-4	88.9

[0445] 表43:不同接头的稳定性百分比(相对于对照)

[0446]

R2-R3(R2不存在)	激活比例%(相对于对照)
R3-1	88.8
R3-2	83.7
R3-3	94.6
R3-4	91.8
R3-5	85.8
R3-6	86.4

[0447] 实施例12:增加的抗体/S13接头的偶联效率增加

[0448] 对于小规模偶联,通过反复离心,将用于不同变体的5-10mg IgG用超滤管(Merck Millipore)交换到含有2mM EDTA的pH7.5,50mM Tris-HCl缓冲液中。然后通过DTT以1:20-1:200的摩尔比在室温下温和地还原抗体4-16h。然后将还原的抗体以50mM Tris-HCl,150mM NaCl,pH7.5透析,并在室温下以1:50-1:200的摩尔比用Cu_2SO_4或脱氢抗坏血酸(DHAA,Sigma)再氧化1-3h。然后将再氧化具有游离巯基的抗体通过S13化学接头以1:10,1:20,1:50或1:100的比例在室温下偶联4小时。通过还原的SDS-PAGE显示偶联效率。如表44所

示,获得了不同的偶联效率。

[0449] 表44:增加的抗体(Ipilimumab,SEQ ID NO:13)/S13接头比率的偶联效率增加

[0450]

抗体/S13接头分子比	偶联效率
1:10	60%
1:20	72%
1:50	89%
1:100	95%

[0451] 在不同位置具有Cys突变的CTLA4-抗体(Ipilimumab,SEQ ID NO:14)与S13连接子在1:100条件下的偶联反应中,突变位点显示在表45中。五个突变位点都与S13连接子高效偶联,如附图30中的还原SDS-PAGE凝胶所示。

[0452] 表45:1:100分子比偶联的不同突变位点

[0453]

突变点 ID	初始氨基酸
1#	S
2#	T

[0454]

3#	Y
4#	K
5#	R

[0455] 实施例13:人源CTLA抗体可变区的框架(非CDR)的偶联效率和亲合力变化

[0456] 我们将CTLA-4抗体的框架区(FR)中的每个非半胱氨酸氨基酸突变为半胱氨酸,以制备用于实验的胱氨酸突变体。一些突变位点显示接近100%的偶联效率。在CTLA4-抗体:S13＝1:100条件下偶联效率高的不同突变体,总结于表46和表47中。一些突变显示非常低的偶联,表明半胱氨酸埋藏在抗体内部。

[0457] 表46:Ipilimumab轻链框架区的偶联效率

[0458]

区域 (Kabat)	Kabat 编号	Ipilimumab VL	与 S13 偶联效率(%)
FR1	L1	E	35
	L2	I	58
	L3	V	99
	L4	L	29
	L5	T	96
	L6	Q	95
	L7	S	87
	L8	P	98
	L9	G	96
	L10	T	95
	L11	L	62
	L12	S	88
	L13	L	16
	L14	S	88
	L15	P	95
	L16	G	64
	L17	E	69
	L18	R	72
	L19	A	10
	L20	T	28
	L21	L	13

[0459]

	L22	S	96
	L23	C	n/d
FR2	L35	W	13
	L36	Y	88
	L37	Q	16
	L38	Q	86
	L39	K	89
	L40	P	19
	L41	G	92
	L42	Q	85
	L43	A	46
	L44	P	63
	L45	R	25
	L46	L	16
	L47	L	18
	L48	I	85
	L49	Y	99
FR3	L57	G	86
	L58	I	95
	L59	P	94
	L60	D	96
	L61	R	86
	L62	F	75
	L63	S	95
	L64	G	95
	L65	S	94
	L66	G	68
	L67	S	88
	L68	G	88
	L69	T	87
	L70	D	94
	L71	F	28

[0460]

	L72	T	95
	L73	L	26
	L74	T	95
	L75	I	16
	L76	S	94
	L77	R	96
	L78	L	13
	L79	E	88
	L80	P	96
	L81	E	85
	L82	D	13
	L83	F	18
	L84	A	10
	L85	V	85
	L86	Y	12
	L87	Y	19
	L88	C	n/d
FR4	L98	F	87
	L99	G	88
	L100	Q	19
	L101	G	86
	L102	T	12
	L103	K	95
	L104	V	8
	L105	E	95
	L106	I	75
	L107	K	92

[0461] 表47:Ipilimumab重链框架区的偶联效率

[0462]

区域 (Kabat)	Kabat No.	Ipilimumab VH	与 S13 的偶联效率 (%)
FR1	H1	Q	68

[0463]

	H2	V	95
	H3	Q	86
	H4	L	86
	H5	V	88
	H6	E	18
	H7	S	68
	H8	G	89
	H9	G	85
	H10	G	84
	H11	V	68
	H12	V	18
	H13	Q	86
	H14	P	85
	H15	G	85
	H16	R	86
	H17	S	78
	H18	L	18
	H19	R	78
	H20	L	8
	H21	S	79
	H22	C	n/d
	H23	A	89
	H24	A	12
	H25	S	86
	H26	G	89
	H27	F	88
	H28	T	n/d
	H29	F	89
	H30	S	89
FR2	H36	W	13
	H37	V	18
	H38	R	19

[0464]

	H39	Q	89
	H40	A	82
	H41	P	98
	H42	G	96
	H43	K	12
	H44	G	96
	H45	L	93
	H46	E	88
	H47	W	18
	H48	V	15
	H49	T	23
FR3	H66	R	26
	H67	F	29
	H68	T	95
	H69	I	18
	H70	S	86
	H71	R	28
	H72	D	83
	H73	N	82
	H74	S	85
	H75	K	92
	H76	N	98
	H77	T	25
	H78	L	26
	H79	Y	95
	H80	L	15
	H81	Q	95
	H82	M	17
FR4	H103	W	68
	H104	G	29
	H105	Q	92
	H106	G	29

[0465]

	H107	T	28
	H108	L	95
	H109	V	88
	H110	T	87
	H111	V	27
	H112	S	90
	H113	S	85

[0466] 将具有高结合效率的突变位点的S13(>80%)与R4-7结合,并基于ELISA的测定EC_{50}比(野生型抗体EC_{50}:突变性抗体与R4-7偶联体EC_{50}*100%)测试相对结合活性。具体地,一个96孔ELISA板(NUNC)用1ug/ml带His标签的CTLA4蛋白包被过夜,然后用1%BSA封闭剂于37℃封闭2小时,用PBST洗3次。加入相应的抗体或与R4-7偶联后的突变体于37℃结合1小时,用PBST洗3次。加入HRP酶偶联的抗人IgG,使其在37℃下结合1小时,然后用PBST洗涤三次。显色底物TMB(Solarbio.,Inc.)用于在450nm测定吸光度。用GraphPad软件进行数据分析,并计算每种抗体或偶联物的EC_{50}。

[0467] 比较FR区结合亲合力R4-7-s-cys-CTLA-4和CTLA-4WT抗体后,我们发现大部分位置对维持结合亲合力均达到良好效果(A组,与野生型抗体相比大于60%)而一些位置(B组,与野生型抗体相比小于60%)表现出较低的结合亲合力,如表48和表49所示。

[0468] 表48:与R4-7偶联后轻链框架突变体的结合活性

[0469]

	Kabat No.	Ipilimumab VL	与 S13 的偶联效率 (%)	与 R4-7 偶联后的结合效率
区 域 (Kabat)	L3	V	99	A
	L5	T	96	A
	L6	Q	95	A
	L7	S	87	A
	L8	P	98	B
	L9	G	96	A
	L10	T	95	A
	L12	S	88	A
	L14	S	88	A
	L15	P	95	B

[0470]

	L16	G	64	A
	L22	S	96	A
	L36	Y	88	A
	L38	Q	86	A
	L39	K	89	A
	L41	G	92	A
	L42	Q	85	A
	L48	I	85	B
	L49	Y	99	A
FR3	L57	G	86	B
	L58	I	95	A
	L59	P	94	B
	L60	D	96	A
	L61	R	86	A
	L63	S	95	A
	L64	G	95	A
	L65	S	94	A
	L67	S	88	A
	L68	G	88	B
	L69	T	87	B
	L70	D	94	B
	L72	T	95	A
	L74	T	95	A
	L76	S	94	A
	L77	R	96	A
	L79	E	88	A
	L80	P	96	B
	L81	E	85	A
	L85	V	85	A
FR4	L98	F	87	A
	L99	G	88	A
	L101	G	86	A

[0471]

	L103	K	95	A
	L105	E	95	A
	L107	K	92	A

[0472] 表49:与R4-7偶联后重链框架突变体的结合活性

[0473]

	Kabat No.	Ipilimumab VH	与 S13 的偶联效率 (%)	R4-7
区域 (Kabat)	H2	V	95	A
	H3	Q	86	A
	H4	L	86	A
	H5	V	88	A
	H8	G	89	A
	H9	G	85	A
	H10	G	84	A
	H13	Q	86	A
	H14	P	85	B
	H15	G	85	A
	H16	R	86	A
	H23	A	89	A
	H25	S	86	A
	H26	G	89	A
	H27	F	88	A
	H29	F	89	A
	H30	S	89	B
	H39	Q	89	A
	H40	A	82	A
	H41	P	98	B
	H42	G	96	A
	H44	G	96	A
	H45	L	93	A
	H46	E	88	A
	H68	T	95	A

[0474]

	H70	S	86	A
	H72	D	83	B
	H73	N	82	B
	H74	S	85	B
	H75	K	92	A
	H76	N	98	A
	H79	Y	95	A
	H81	Q	95	A
	H105	Q	92	A
	H108	L	95	A
	H109	V	88	A
	H110	T	87	A
	H112	S	90	A
	H113	S	85	A

[0475] 对于结合活性小于60％的这些位点(上表中的B类)，我们将它们与不同的化学接头偶联以挽救结合活性。如表50所示，对于它们中的一些，可以通过R4的特定化学修饰来恢复结合活性。这些结果表明这些位点的侧链可能有助于抗体/抗原相互作用，并且特定的化学接头可以模拟轻链结构并提供抗原的分子相互作用，如天然野生型氨基酸。

[0476] 表50：当与R4-7偶联时，R4筛选以恢复具有低活性的位点的活性

[0477]

Kabat No.	初始氨基酸	R4-7	R4 的筛选						
			R4-1	R4-3	R4-4	R4-5	R4-8	R4-11	R4-27
L8	P	B	B	B	B	B	B	A	B
L15	P	B	B	B	B	B	B	B	B
L48	I	B	B	B	B	A	B	B	B
L57	G	B	A	B	B	B	B	B	B
L59	P	B	B	B	B	B	B	B	B
L68	G	B	A	B	B	B	B	B	B
L69	T	B	A	A	B	B	B	B	B
L70	D	B	B	B	B	B	B	A	B
L80	P	B	B	B	B	B	B	B	B
H14	P	B	B	B	B	B	B	B	B

[0478]

H30	S	B	A	A	B	B	B	B	B
H41	P	B	B	B	B	B	B	B	B
H72	D	B	B	B	B	B	B	A	B
H73	N	B	B	B	B	B	B	A	B
H74	S	B	A	B	B	B	B	B	B

[0479] 与S13(5kD官能团)或S47(40kD官能团)化学接头偶联后,所选位点的阻断作用

[0480] 我们选择了与R4-7或其他R4接头偶联后可恢复活性的上述位点作为肿瘤微环境激活抗体(TMEAbody)筛选的候选位点,因为在蛋白酶切割后,结合的抗体将保持与抗体突变体-s-R4形式相同的结构。与实施例1类似,首先通过ELISA测定评估与S13(5kD官能团)偶联后的阻断作用。如表51所示,在与S13接头偶联后,它们中的一些显示出对抗原蛋白的结合活性的显著阻断作用。我们还将这些位点的活性小于30%的分类为A类,其他位点为B类,如表51所示。

[0481] 表51:当与S13(5kD)接头偶联时所选位点的阻断效率

[0482]

Kabat No.	初始氨基酸	与 S13 的偶联效率(%)	S13 (5kD) 阻断后的结合活性
L3	V	99	A
L5	T	96	B
L6	Q	95	B
L7	S	87	B
L9	G	96	B
L10	T	95	B
L12	S	88	B
L14	S	88	B
L22	S	96	A
L36	Y	88	A
L38	Q	86	B
L39	K	89	B
L41	G	92	B
L42	Q	85	B
L49	Y	99	A
L58	I	95	A
L60	D	96	A

[0483]

L61	R	86	B
L63	S	95	B
L64	G	95	B
L65	S	94	A
L67	S	88	A
L69	T	87	A
L70	D	94	A
L72	T	95	B
L74	T	95	B
L76	S	94	B
L77	R	96	B
L79	E	88	B
L81	E	85	B
L85	V	85	B
L98	F	87	B
L99	G	88	B
L101	G	86	B
L103	K	95	B
L105	E	95	B
L107	K	92	B
H2	V	95	A
H3	Q	86	A
H4	L	86	A
H5	V	88	A
H8	G	89	B
H9	G	85	B
H10	G	84	B
H13	Q	86	B
H14	P	85	B
H15	G	85	B
H16	R	86	B
H23	A	89	A

[0484]

H25	S	86	A
H26	G	89	A
H27	F	88	A
H29	F	89	A
H30	S	89	A
H39	Q	89	B
H40	A	82	B
H42	G	96	B
H44	G	96	B
H45	L	93	B
H46	E	88	B
H68	T	95	A
H70	S	86	A
H72	D	83	A
H73	N	82	A
H74	S	85	A
H75	K	92	A
H76	N	98	A
H79	Y	95	A
H81	Q	95	B
H105	Q	92	B
H108	L	95	B
H109	V	88	B
H110	T	87	B
H112	S	90	B
H113	S	85	B

[0485] 我们进一步研究了用更高分子量官能团是否可以提高封闭效率。使用S47(具有40kD官能团)和S64(具有80kD官能团)进行偶联,并且在结合ELISA测定中使用上述方法测量阻断效率。结果总结在表52中,其表明增加的分子量可以显着提高结合活性的阻断效率。当与S64(80kD)官能团偶联时,所有位点显示低于30%的活性。

[0486] 表52:当与S13(5kD),S37(20kD),S47(40kD)或S64(80kD)接头偶联时所选位点的阻断效率

[0487]

Kabat No.	初始氨基酸	与 S13 的偶联效率(%)	S13 (5kD）阻断后的结合活性	S37 (20 kD）阻断后的结合活性	S47 (40 kD）阻断后的结合活性	S64(80 kD）阻断后的结合活性
L3	V	99	A	A	A	A
L5	T	96	B	A	A	A
L6	Q	95	B	A	A	A
L7	S	87	B	A	A	A
L9	G	96	B	B	A	A
L10	T	95	B	B	B	A
L12	S	88	B	A	A	A
L14	S	88	B	A	A	A
L22	S	96	A	A	A	A
L36	Y	88	A	A	A	A
L38	Q	86	B	A	A	A
L39	K	89	B	B	A	A
L41	G	92	B	B	B	A
L42	Q	85	B	A	A	A
L49	Y	99	A	A	A	A
L58	I	95	A	A	A	A
L60	D	96	A	A	A	A
L61	R	86	B	A	A	A
L63	S	95	B	B	B	A
L64	G	95	B	B	B	A
L65	S	94	A	A	A	A
L67	S	88	A	A	A	A
L69	T	87	A	A	A	A
L70	D	94	A	A	A	A
L72	T	95	B	A	A	A
L74	T	95	B	A	A	A
L76	S	94	B	B	A	A
L77	R	96	B	B	B	A

[0488]

L79	E	88	B	B	B	A
L81	E	85	B	B	B	A
L85	V	85	B	B	B	A
L98	F	87	B	B	B	A
L99	G	88	B	B	A	A
L101	G	86	B	B	A	A
L103	K	95	B	A	A	A
L105	E	95	B	A	A	A
L107	K	92	B	A	A	A
H2	V	95	A	A	A	A
H3	Q	86	A	A	A	A
H4	L	86	A	A	A	A
H5	V	88	A	A	A	A
H8	G	89	B	A	A	A
H9	G	85	B	A	A	A
H10	G	84	B	A	A	A
H13	Q	86	B	B	B	A
H14	P	85	B	B	B	A
H15	G	85	B	A	A	A
H16	R	86	B	A	A	A
H23	A	89	A	A	A	A
H25	S	86	A	A	A	A
H26	G	89	A	A	A	A
H27	F	88	A	A	A	A
H29	F	89	A	A	A	A
H30	S	89	A	A	A	A
H39	Q	89	B	A	A	A
H40	A	82	B	A	A	A
H42	G	96	B	B	A	A
H44	G	96	B	B	B	A
H45	L	93	B	A	A	A
H46	E	88	B	A	A	A

[0489]

H68	T	95	A	A	A	A
H70	S	86	A	A	A	A
H72	D	83	A	A	A	A
H73	N	82	A	A	A	A
H74	S	85	A	A	A	A
H75	K	92	A	A	A	A
H76	N	98	A	A	A	A
H79	Y	95	A	A	A	A
H81	Q	95	B	A	A	A
H105	Q	92	B	A	A	A
H108	L	95	B	B	A	A
H109	V	88	B	B	A	A
H110	T	87	B	B	B	A
H112	S	90	B	B	B	A
H113	S	85	B	B	B	A

[0490] 提高R4文库中R4修饰抗体对人CTLA-4抗体和PD-1抗体可变区框架(非CDR)的结合亲合力

[0491] 框架(非CDR)区域是保守序列并且已经用于连接CDR区域以形成不同的抗体。如表51和表52所示,当一些氨基酸的侧链改变时,结合减少(B类),表明氨基酸的侧链可提供相互作用或空间以帮助抗原与CDR结合。通常,框架和抗原之间的相互作用弱于CDR区和抗原之间的相互作用。通过将不同的R4偶联至PD-1抗体(Nivolumab)的所选突变体位置,与野生型抗体相比,我们有机会获得更高的亲合力或维持化学修饰的抗体的亲合力。

[0492] 表53:与保守性FR位点(WT抗体的%)的突变生物分子库偶联的R4与PD-1抗体(Nivolumab)的结合活性

[0493] 结果表明,在不同抗体的FR区,将不同的R4与保守位点结合可以调节结合活性。在代表性的Gly41中,它还有机会通过与R4-1偶联来恢复62.6%的结合亲合力。在保守的Gln3,Ser7,Ser26,Glu46,Thr68,Asp72的VH和Thr5,Tyr49,Arg61,Ser63,Ser65,Ser67,Thr72,Thr74,Ser76,Asp82的框架中,可以筛选出更高亲合力的结合偶联。因为框架序列(FR1,FR2和FR3)在所有种类的人抗体中都是保守的,通过将不同的R4与FR区中的这些保守位点偶联,任何抗体都有机会维持或增加结合亲合力。

[0494] 人种系抗体可变区框架(非CDR)中高同源性序列中突变体的结合活性分析

[0495] 人抗体由4条肽链组成,包括两条相同的轻链(LC)和两条相同的重链(HC)。链通过二硫键和非共价键形成单体。有两种类型的轻链,κ和λ,以及五种类型的重链,即μ,δ,γ,ε和α。抗体作为整体被分成恒定区和可变区。可变区域位于Y形结构的两个臂的末端。人源化或人源抗体具有一定的通用性,即它们在Y形结构的两个臂的末端都含有重链或轻链中的4个环。三个环是高度可变的并且直接参与抗原结合。这些环中的区域称为CDR,其中CDR1,CDR2和CDR3分别存在于这三个环中。

[0496] 通过体内免疫球蛋白超家族基因的重组产生抗体。不同抗原的抗体的一些框架区可以源自基因或相同种系抗体的氨基酸序列。在CDR之间，存在框架序列(FR1，FR2和FR3)，其在所有种类的人抗体中都是保守的。在前导序列的情况下，从V基因外显子(FR1中的残基1)开始到可变区基因外显子之前的起始密码子到最后一个核苷酸的全部显示了可变区的各种人抗体。在VH，VK和VL的情况下，七聚体重组信号序列之前的最后一个核苷酸/氨基酸。选择的8种抗体序列如附图31所示。

[0497] 我们突变了对应于相同保守位置的其他抗体的重链和轻链DNA序列用于表达以比较与FR区域和WT抗体中的其他位点的结合亲合力。在5个抗体序列中，VH中的Gln3，Ser7，Ser26，Glu46，Thr68和Asp72以及VL中的Thr5，Tyr49，Arg61，Ser63，Ser65，Ser67，Thr72，Thr74，Ser76和Asp82的保守位点(选择根据Kabat编号的氨基酸编号)以与R4-7偶联。

[0498] 表54：与保守性FR位点中的突变生物分子文库偶联的R4-7的结合活性％(相对于WT抗体)

[0499]

位点	41BB	Ada	PD-1-k	Ip1	Trast
Gln3	68.3	78.4	73.8	98.3	94.5
Ser7	94.5	87.4	105.6	110.4	110.6
Ser26	87.1	68.4	97.1	74.8	104.6
Glu46	97.4	78.4	69.4	67.8	78.4
Thr68	68.7	97.8	74.7	79.8	87.7
Thr5	86.4	97.4	84.1	67.4	69.7
Gly41	24.8	16.4	8.9	8.4	8.9
Tyr49	79.7	97.8	99.7	112.4	107.8
Arg61	87.9	78.9	67.8	79.8	94.1
Ser63	89.7	69.5	69.1	78.9	97.4
Ser65	69.4	78.9	70.8	69.7	97.8
Ser67	79.7	68.7	69.2	79.0	64.9

[0500]

Thr72	68.5	66.4	72.8	70.9	79.8
Thr74	107.5	97.4	89.4	99.8	95.8
Ser76	69.4	78.9	69.1	78.4	78.4
Asp82	98.5	74.8	68.7	79.4	67.8

[0501] 结果显示，在不同抗体的FR区，将R4-6与VH中的Gln3，Ser7，Ser26，Glu46，Thr68或Asp72的保守位点，以及Thr5，Tyr49，Arg61，Ser63，Ser65，Ser67，Thr72，Thr74结合。与野生型抗体或其他位置相比，VL中的Ser76或Asp82可维持结合活性，其为原始结合活性的60％或更多。在代表性阴性对照Gly41中，其在所有抗体中丧失结合亲合力(小于60％的野生型抗体)。

[0502] 实施例14

[0503] CTLA-4位于肿瘤微环境的T细胞表面。我们突变了其抗体CDR区中的每个氨基酸，以筛选不同的R4，以维持或增加结合亲合力。在某些情况下，有一些R4组可以增强结合亲合力，但我们没有在我们的开发中选择它们作为候选药物。我们更优选R-1，R4-7，R4-5，R4-8和R4-12用于我们药物开发中的大规模合成和稳定性。通过R4文库筛选的化学修饰成熟，具有R4的偶联的CTLA-4抗体可以在一些位置恢复大于60％的结合。

[0504] 表55：偶联至不同R4分子后在CDR区中具有突变的抗-CTLA-4抗体突变体的结合效应

[0505]

区域 (Kabat)	Kabat No.	初始氨基酸	R4	结合活性
CDRL1	L24	R	R4-26	89%
	L25	A	R4-1	95%
	L26	S	R4-1	91%
	L27	Q	R4-11	88%
	L28	V	R4-7	78%
	L29	G	R4-1	95%
	L30	S	R4-1	81%
	L30	S	R4-2	104%
	L30	S	R4-3	96%
	L31	S	R4-1	99%
	L32	Y	R4-7	98%
	L32	Y	R4-8	107%
	L33	L	R4-1	95%
	L34	A	R4-1	92%

[0506]

CDRL2	L50	G	R4-1	97%
	L50	G	R4-3	107%
	L51	A	R4-1	92%
	L52	F	R4-1	72%
	L53	S	R4-1	98%
	L54	R	R4-26	163%
	L55	A	R4-1	102%
	L55	A	R4-3	106%
	L56	T	R4-1	93%
CDRL3	L89	Q	R4-7	96%
	L90	Q	R4-7	75%
	L91	Y	R4-5	95%
	L91	Y	R4-7	105%
	L92	G	R4-1	99%
	L92	G	R4-3	104%
	L93	S	R4-1	92%
	L94	S	R4-1	95%
	L94	S	R4-11	142%
	L95	P	R4-1	62%
	L96	W	R4-4	72%
	L97	T	R4-1	91%
CDRH1	H31	S	R4-1	110%
	H32	Y	R4-7	92%
	H32	Y	R4-18	208%
	H33	T	R4-1	102%
	H34	M	R4-1	65%
	H35	H	R4-5	72%
CDRH2	H50	F	R4-4	73%
	H51	I	R4-4	72%
	H52	S	R4-1	95%
	H52	S	R4-3	107%

[0507]

	H52A	Y	R4-7	93%
	H53	D	R4-11	91%
	H54	G	R4-1	95%
	H55	N	R4-11	96%
	H56	N	R4-11	91%
	H57	K	R4-7	88%
	H58	Y	R4-7	89%
	H59	Y	R4-4	92%
	H59	Y	R4-10	105%
	H60	A	R4-4	65%
	H61	D	R4-11	92%
	H62	S	R4-3	91%
	H63	V	R4-1	68%
	H64	K	R4-7	96%
	H64	K	R4-18	137%
	H65	G	R4-1	93%
CDRH3	H95	T	R4-3	92%
	H95	T	R4-1	152%
	H96	G	R4-1	65%
	H96	G	R4-2	85%
	H97	W	R4-8	92%
	H98	L	R4-3	84%
	H99	G	R4-1	94%
	H100	P	R4-1	69%
	H100A	F	R4-4	84%
	H101	D	R4-3	88%
	H102	Y	R4-7	95%
	H102	Y	R4-5	242%

[0508] 根据结果，在抗CTLA-4抗体的CDR中突变G，A，S，L，T，I，F，E，K，D，N，Q，R或Y并与不同的R4结合，突变体可以保持大于60％的结合效率。

[0509] 在某些情况下，存在一些可以增强结合亲合力的R4基团。我们在药物开发中选择60-100％结合亲合力的R4-s-R5作为候选药物。我们更优选R-1，R4-7，R4-5，R4-8和R4-12用于我们药物开发中的大规模合成和稳定性。S47被天冬酰胺内肽酶切割，并且在切割后保留R4-7化学基团。在S47与CDR的氨基酸偶联后，所有这些偶联物可以阻断CTLA-4结合，降低亲

合力(活性小于野生型CTLA-4的30%)。因此CDR区或突变体中的位置可以成为肿瘤微环境激活抗体的主要候选药物。

[0510] 表56:与S47(40kD)接头偶联的CDR区的阻断效率

[0511]

区域(Kabat)	Kabat No.	初始氨基酸	R4	结合活性	S47(40kD) 阻断后的活性
CDRL1	L24	R	R4-26	89%	28%
	L25	A	R4-1	95%	29%
	L26	S	R4-1	91%	18%
	L27	Q	R4-11	88%	8%
	L27A	S	R4-1	82%	24%
	L28	V	R4-7	78%	25%
	L29	G	R4-1	95%	19%
	L30	S	R4-1	81%	19%
	L31	S	R4-1	99%	12%
	L32	Y	R4-7	95%	13%
	L33	L	R4-1	95%	6%
	L34	A	R4-1	92%	11%
CDRL2	L50	G	R4-1	97%	19%
	L51	A	R4-1	92%	25%
	L52	F	R4-1	72%	16%
	L53	S	R4-1	98%	5%
	L54	R	R4-26	113%	17%
	L55	A	R4-1	102%	20%
	L56	T	R4-1	93%	5%
CDRL3	L89	Q	R4-7	96%	15%
	L90	Q	R4-7	75%	7%
	L91	Y	R4-7	95%	8%
	L92	G	R4-1	99%	16%
	L93	S	R4-1	92%	9%

[0512]

	L94	S	R4-1	95%	12%
	L95	P	R4-1	62%	13%
	L96	W	R4-4	72%	12%
	L97	T	R4-1	91%	16%
CDRH1	H31	S	R4-1	110%	25%
	H32	Y	R4-7	92%	23%
	H33	T	R4-1	102%	26%
	H34	M	R4-1	65%	29%
	H35	H	R4-5	72%	28%
CDRH2	H50	F	R4-4	73%	25%
	H51	I	R4-4	72%	27%
	H52	S	R4-1	95%	5%
	H52A	Y	R4-7	93%	18%
	H53	D	R4-11	91%	11%
	H54	G	R4-1	95%	15%
	H55	N	R4-11	96%	22%
	H56	N	R4-11	91%	8%
	H57	K	R4-7	88%	11%
	H58	Y	R4-7	89%	7%
	H59	Y	R4-4	92%	15%
	H60	A	R4-4	65%	22%
	H61	D	R4-11	92%	19%
	H62	S	R4-3	91%	23%
	H63	V	R4-1	68%	22%
	H64	K	R4-7	96%	26%
	H65	G	R4-1	93%	28%
CDRH3	H95	T	R4-3	92%	18%
	H96	G	R4-1	65%	11%
	H97	W	R4-8	92%	9%
	H98	L	R4-3	84%	6%
	H99	G	R4-1	94%	12%
	H100	P	R4-1	69%	3%

[0513]

	H100A	F	R4-4	84%	16%
	H101	D	R4-3	88%	23%
	H102	Y	R4-7	95%	16%

[0514] 根据结果，在将抗-CTLA-4抗体的CDR中的天然氨基酸突变为胱氨酸并且化学偶联至不同的R4(R4文库筛选)后，突变体可以保持大于60％的结合效率。在S47与CDR的氨基酸偶联反应后，所有这些位置都可以阻断CTLA-4结合，同时降低亲合力(与野生型CTLA-4相比小于30％)。因此，所有S47偶联物都可以成为肿瘤微环境激活抗体的主要候选药物。

[0515] 为了提高抗体的亲合力，在亲合力成熟期间突变CDR环上的氨基酸。事实上，抗体亲合力的优化也可以通过与合适的R4偶联(本文称为抗体的化学成熟)来实现。如附图32所示，通过位点特异性地将不同的R4基团偶联到所选择的抗体突变位点，我们可以选择性地改变R4基团用于筛选。(1)天然氨基酸没有H键或与配体的电荷相互作用。化学成熟可以诱导新的相互作用。(2)天然氨基酸具有弱的H键或与配体的电荷相互作用的距离。化学成熟可以调整距离(通过R4-b)来筛选最佳距离。(3)天然氨基酸具有弱H键或电荷相互作用。化学成熟可以改变相互作用基团以筛选最佳的R4-c基团。(4)化学成熟也可以通过增加$NH2^{+}$或O^{-}来增加电荷。因此，有可能增加H键或电荷相互作用的相互作用，作为一种新的亲合力成熟。

[0516] 我们通过将R4与在相同CTLA-4抗体上具有一个或两个突变的三个突变体结合来进行抗体的化学成熟。结果如表57所示。

[0517] 表57：偶联R4与三种突变体的结合活性

[0518]

	突变体 1	突变体 2	通过与 R4 偶联而结合
R4-18	H32		208%
R4-18		H64	137%
R4-18	H32	H64	356%

[0519] 抗体亲合力的优化也可以通过偶联至合适的R4基团在抗体的CDR环中化学成熟来实现。

[0520] 实施例15构建的CTLA-4 TMEA体的结合ELISA表征

[0521] 在药物开发方面，我们收集了具有最佳阻断效率的位点，并可以恢复活性以利于进一步开发。与S47偶联后，人源抗体成为肿瘤微环境激活抗体，命名为TMEA体。

[0522] 为了评估TMEA体在肿瘤微环境中与人CTLA-4蛋白结合的恢复能力，通过天冬酰胺内肽酶体外消化偶联的TMEA体，并将消化的产物用于评估对人CTLA-4的结合活性恢复能力。为了表征构建的TMEA体与人CTLA-4的结合特性，将0.5μg/ml CTLA-4Fc融合蛋白(R&D系统)在4℃孵育过夜包被在Maxisorp ELISA板(Nunc)上。然后将板用PBST洗涤三次并在室温下用2％BSA封闭2小时。用PBST洗涤三次后，将板与连续浓度的偶联的TMEA体，偶联前的TMEA体(半胱氨酸突变体形式)和对照野生型(WT)Ipilimumab抗体在室温下培养1小时。然后将板用PBST洗涤三次，并通过与HRP(Sigma)偶联的山羊抗人IgG Fab片段以1:5000稀释

在室温下培养1小时。用PBST洗涤三次后，用四甲基联苯胺(TMB，Solarbio)和ELISA终止缓冲液(Solarbio)使板显色。然后通过ELISA板读数器(Biotek)测量450nm处的吸光度。然后通过GraphPad Prism 5软件分析数据。

[0523] 如表58所示，化学连接子与不同突变位点的偶联可以产生不同程度的阻断效率。阻断效率可以通过倍数改变结合曲线的EC50值来计算。阻断效率大于10倍并且恢复的偶联的TMEA体(EC50值小于野生型的2倍)被认为是进一步开发的良好候选者。

[0524] 表58：通过蛋白酶切割后阻断效率和恢复的活性选择的Ipilimumab TMEA体候选物

[0525]

选定的突变ID	重链/轻链	突变位点	位置	Kabat编号	R4	与S47偶联效率	与S47偶联后的阻断效应	蛋白水解酶切割后活性恢复
Ipi-se001	HC	Y	53	H52A	R4-7	95%	20倍	恢复
Ipi-se002	HC	D	54	H53	R4-11	95%	9倍	恢复
Ipi-se003	HC	Y	59	H58	R4-4	94%	15倍	恢复
Ipi-se004	HC	D	73	H72	R4-11	94%	6倍	恢复
Ipi-se005	HC	K	76	H75	R4-7	94%	8倍	恢复
Ipi-se006	HC	P	104	H100	R4-1	96%	30倍	恢复
Ipi-se007	LC	Q	27	L27	R4-11	95%	13倍	恢复
Ipi-se053	LC	Y	50	L49	R4-7	98%	163倍	恢复
Ipi-se009	LC	S	54	L53	R4-1	95%	22倍	恢复
Ipi-se066	LC	S	68	L67	R4-7	97%	3倍	恢复

[0526] 使用如上所述的ELISA方法。如图33所示，与不同位点偶联显示出不同程度的结合活性恢复。一些突变位点在消化后显示与野生型Ipilimumab相当的结合活性(EC50变化倍数小于2，或换句话说，活性大于50％的野生型)。

[0527] 阻断TMEA抗体的抗原结合导致Ipilimumab的受体阻断活性降低

[0528] 然后使用受体阻断活性测定实验(RBA)来证明TMEA抗体与CTLA-4蛋白的结合降低也会降低Ipilimumab对B7-1 CTLA-4相互作用的阻断效力。将0.5μg/ml人CTLA-4Fc融合蛋白(R&D系统)吸附在Maxisorp ELISA板(Nunc)上，然后将板用2％BSA封闭。将具有不同浓度的TMEA体或WT Ipilimumab的0.02μg/ml生物素化的人B7-1或B7-2蛋白与板培养，然后按照标准ELISA的方法，通过用链霉素抗生物蛋白-HRP(ThermoFisher Scientific)，进行TMB反应，测量受体的阻断活性。

[0529] 如图34所示，对人CTLA-4蛋白具有显着降低的结合活性的TMEA体也显示出受体阻断活性的显着降低。IC_{50}的倍数变化可用作评估受体阻断活性降低的定量参数。

[0530] 表59总结了RBA测定的其他候选物的数据

[0531] 表59：Ipilimumab TMEAbody候选物的RBA测定数据总结

[0532]

选定的突变ID	阻断效应(RBA)	在蛋白酶切割后恢复RBA活性
Ipi-se001	15倍	恢复
Ipi-se002	5倍	恢复

Ipi-se003	8倍	恢复
Ipi-se004	7倍	恢复
Ipi-se005	10倍	恢复
Ipi-se006	25倍	减少2.5倍
Ipi-se007	16倍	恢复
Ipi-se053	20倍	恢复
Ipi-se009	18倍	恢复
Ipi-se066	9倍	减少3.5倍

[0533] 阻断TMEA抗体的抗原结合导致SEB诱导的T细胞活化测定中的功能效力降低

[0534] 接下来,为了评估在TMEA体中观察到的降低的抗原结合活性和受体阻断活性是否有助于降低Ipilimumab的功能效力,进行了葡萄球菌肠毒素(SEB)诱导的T细胞活化测定。SEB是一种超抗原,可强烈激活T淋巴细胞并诱导细胞因子分泌。来自健康供体(Allcells)的全PBMC细胞为每孔$1E^5$在1640培养基(GIBCO)中分别以10%FBS(GIBCO),100ng/ml SEB(Toxin Technology)和不同浓度的TMEA体,WT Ipilimumab或同种型人IgG对照。活化96小时后,通过离心收集上清液,用ELISA方法(R&D systems)通过IL2检测试剂盒测量IL2释放。

[0535] 如附图35所示,对CTLA-4具有降低的结合活性的TMEA体显示T细胞活化的功能效力受损,且蛋白酶介导的激活可以恢复TMEA体的活性。

[0536] 还以单一浓度(10ug/ml)对其他TMEA体进行该测定,并计算阻断效率((WT-TMEAbody)/(WT-hIgG)*100%)。结果显示在表60中。

[0537] 表60:TMEA体阻断效率SEB诱导的T细胞活化

[0538]

选定的突变 ID	阻断效率 (SEB)	蛋白水解酶切割后 RBA 活性恢复

[0539]

Ipi-se001	63%	恢复
Ipi-se002	45%	恢复
Ipi-se003	40%	恢复
Ipi-se004	43%	恢复
Ipi-se005	64%	恢复
Ipi-se006	90%	减少 3 倍
Ipi-se007	68%	恢复
Ipi-se053	70%	恢复
Ipi-se009	72%	恢复
Ipi-se066	56%	减少 4 倍

[0540] Ipilimumab TMEAbodies在肿瘤中调节Treg但在外周没有调节Treg的作用

[0541] 进行机制研究以观察TMEA体在肿瘤微环境中是否被特异性激活而在外周淋巴器官中没有被特异性激活。Ipilimumab治疗的一种提议机制是它可以通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)效应下调Treg细胞群,从而激活针对肿瘤的免疫应答。用流式细胞术分别用CD4,CD25和Foxp3标记分析Treg群体。如图36所示,Ipilimumab TMEAbodies在肿瘤中显着下调Treg群体,具有与WT Ipilimumab相似的功效。然而,在脾脏或外周血中,

Ipilimumab TMEA体显示Treg群体非常弱或没有调节。这些结果证明Ipilimumab TMEA体在肿瘤微环境中显示出特异性活性,但在外周淋巴器官或血液中没有。

[0542] TMEAbody在人血浆中是稳定的

[0543] 为了评价TMEA体在血清中的稳定性,将1ug CTLA-4TEMA体(结合S13的Ipi053)置于20ul小鼠血清中,分别在37℃保持2h,4h,24h,48h和96h。然后用抗人Fab HRP抗体(Sigma)制备样品用于Western印迹。用ImageJ软件分析凝胶强度,并通过GraphPad分析相对强度。如下图37所示,TMEA体在小鼠血清中表现出高稳定性,在37℃下96h后没有明显降解。

[0544] 与WT-Ipilimumab和CTLA-4相比,CTLA-4 TMEAbodies通过与S47功能组偶联显示半衰期和暴露增加

[0545] 为了评估化学偶联在调节TMEA体的药代动力学性质中的潜在影响,将单次IV剂量的1mg/kg WT Ipilimumab或IpilimumabTMEAbody注射到Balb/c小鼠中。在0.5h,2h,4h,8h,1d,2d,5d,10d,15d,20d后,收集血浆用于总抗体的ELISA测试和活性抗体浓度测定。对于总抗体浓度测定,将抗人Fc抗体(Invitrogen)包被在ELISA板(NUNC)上,并通过抗人Fab HRP二抗(Invitrogen)检测注射的抗体。对于活性抗体浓度测定,将人CTLA-4蛋白(Sino Biological)包被在ELISA板上。然后通过抗人Fc HRP二抗(Invitrogen)检测活性抗体。标准曲线通过连续稀释WT Ipilimumab或通过四参数拟合建立IpilimumabTEMAbody和标准结合曲线。通过将Y值内插到标准曲线来计算总抗体或活性抗体的浓度。如图38(a)所示,与WT Ipilimumab抗体或Ipilimumab问题(WO2018/085555A1,MY11作为掩蔽肽,2011作为切割部分)相比,与40kd官能团偶联后TMEA体的半衰期增加。此外,如图38(b)所示,CTLA-4TMEAbody在血浆中的活化时间比Ipilimumab的时间短。

[0546] 小鼠肿瘤模型中TMEA体的体内表征

[0547] 为了进一步表征TMEA体在动物模型中治疗肿瘤的体内功效,将Ipilimumab TMEAbodies以及WT Ipilimumab和对照人IgG施用于人CTLA-4敲入C57BL/6小鼠的MC38结肠腺癌肿瘤模型中。将人CTLA-4敲入C57BL/6小鼠皮下注射$2E^6$ MC38细胞至其左下腹象限。在肿瘤生长7天后,将动物以具有相似的平均肿瘤体积分组。给动物分别施用指定的单剂量对照人IgG,WT Ipilimumab或等摩尔TMEA体(抗体浓度,n=6),并监测每只动物的肿瘤体积。如图39所示,Ipilimumab TMEA体以与WT Ipilimumab相当的功效控制肿瘤大小,而对照人IgG未显示任何功效。肿瘤体积抑制率总结在表61中。该结果暗示Ipilimumab TMEA体可以在肿瘤微环境中被激活并且激发抗肿瘤的免疫应答。

[0548] 表61:给药后第17天的肿瘤生长抑制率

[0549]

突变ID	剂量	治愈率	死亡
人IgG	5mg/kg	0	2
WT(Ipi)	5mg/kg	0	0
WT(Ipi)	20mg/kg	33.3	1
S47-Ipi-se053	5mg/kg	16.6%	0
S47-Ipi-se053	20mg/kg	83.3%	0
S47-Ipi-se066	5mg/kg	33.3%	0
S47-Ipi-se066	20mg/kg	83.3%	0

[0550] 如表61所示，与使用相同摩尔浓度的WT(Ipi)处理的组相比，S47-Ipi053和S47-Ipi066对肿瘤生长的抑制和治愈率得到极大改善。

[0551] CTLA-4 TMEA体在动物中显示出低免疫原性

[0552] 为了评估TMEA体的免疫原性，用50μg IpilimumabTMEAbody，WT Ipilimumab或具有完全弗氏佐剂(CFA)的Ipilimumab Probody(WO 2018/085555 A1，MY11作为掩蔽肽，2011作为切割部分)免疫三组Balb/c小鼠(每组n＝5)。

[0553] 初次免疫14天后，用25μgIpilimumabTMEAbody，WT Ipilimumab或具有不完全弗氏佐剂(IFA)的Ipilimumab Probody加强动物。在加强后第7天获得血清，并分别测试针对Ipilimumab TMEAbody，WT Ipilimumab或Ipilimumab Probody的抗体滴度。在血清稀释缓冲液中使用1％人血清来阻断任何针对人IgG恒定区的抗体。如图40所示，TMEA体在动物中引起非常低的免疫应答，具有与WT Ipilimumab相当或更低的抗体滴度。尽管如此，Ipilimumab Probody引起了急剧增加的免疫原性，可能是由于轻链N末端包含的外源序列。

[0554] CTLA-4 TMEA体在体内显示出低毒性

[0555] 本领域众所周知，尽管抗PD-1和抗-CTLA-4抗体的组合对治疗黑素瘤是有效的(ORR)，但在目前的临床研究中发现，组合显示55％TRAEs 3-4级并且30％的患者必须停止治疗。我们假设如果抗体被偶联物抑制或阻断，并且在到达肿瘤的局部环境后释放，则可以改善这些TRAE，从而减少在非患病环境中暴露的活性药物的时间或剂量。因此，对患有I型糖尿病(NOD)的小鼠进行了实验。这种小鼠的糖尿病是一种自身免疫疾病，其中自身激活的T淋巴细胞破坏胰岛β细胞，导致胰岛素分泌不足。首先，给10周龄的雌性NOD(北京维塔尔河实验动物科技有限公司)分别在第0天注射对照IgG，高剂量的(15mpk)抗PD-1和抗-CTLA-4抗体或15mpk剂量的抗-PD-1和抗-CTLA-4 TMEA体(S47-Ipi053)。每天观察糖尿病指标，包括尿液中的葡萄糖和两种血糖水平，持续12天，直到没有观察到新的尿糖指示。

[0556] 偶联物对自身免疫的保护显示在附图41中。结果显示，与初始抗体相比，联合治疗偶联物中抗CTLA4 TMEA体的偶联物对免疫系统的保护可降低自身免疫。

[0557] 实施例16:PD-1 TMEA体(Pembrolizumab)的产生和表征

[0558] 如上述Ipilimumab TMEAbody筛选的实例所示，将抗PD-1抗体(Pembrolizumab)的多个位点突变为半胱氨酸用于位点特异性偶联。抗PD-1抗体(Pembrolizumab)的重链中的突变位置选自(从N末端顺序编号到C末端而不使用Kabat或其他抗体编号系统)：Ser7，Gly8，Gly15，Ala16，Ser17，Ala24，Ser25，Gly26，Tyr27，Thr28，Thr30，Asn31，Tyr32，Tyr33，Tyr35，Ala40，Gly42，Gly44，Leu45，Gly49，Gly50，Ile51，Asn52，Ser54，Asn55，Gly56，Gly57，Thr58，Asn59，Lys63，Lys65，Thr69，Leu70，Thr71，Thr72，Asp73，Ser74，Ser75，Thr76，Thr77，Thr78，Ala79，Leu83，Ser85，Leu86，Thr91，Ala92，Arg99，Asp100，Tyr101，Arg102，Asp104，Gly106，Gly111，Gly113，Thr114，115Thr，117Thr，Ser119，Ser120，Ala121，Ser122，Thr123，Lys124，Gly125和Ser127；轻链中的突变位置选自：Ile2，Thr5，Ser7，Ala9，Thr10，Leu11，Ser12，Leu13，Ser14，Gly16，Ala19，Thr20，Ala25，Ser26，Lys27，Gly28，Ser30，Thr31，Ser32，Gly33，Tyr34，Ser35，Tyr36，Leu37，Gly45，Ala47，Leu50，Leu51，Ile52，Tyr53，Leu54，Ala55，Ser56，Tyr57，Leu58，Ser60，Gly61，Ala64，Ser67，Gly68，Ser69，Gly70，Ser71，Gly72，Thr73，Ala76，Thr78，Ser80，Ser81，Ser95，Arg96，Asp97，Leu98，Leu100，Thr101，Phe102，Gly104，Ile110，Lys111和K130。用人Fc标记的PD-1蛋白

(Sino Biological)进行ELISA表征以鉴定具有良好阻断效率和恢复效率的候选位点。选择具有阻断效率大于5倍(换言之,活性低于20%)和酶消化后恢复活性的位点(EC_{50}变化小于2倍,或者换句话说,活性高于50%)用于进一步开发,如表62中所示。

[0559] 表62:基于阻断和恢复效率选择的抗PD-1 TMEA体(Pembrolizumab)候选物

[0560]

选定的突变 ID	重链/轻链	突变位点	R4	偶联效率	S47 的阻断效率	与 R4 偶联后活性恢复
Pem-se001	重链	Tyr27	R4-7	89%	5 倍	恢复
Pem-se002	重链	Tyr32	R4-7	91%	6 倍	恢复
Pem-se003	重链	Asn55	R4-11	92%	5 倍	恢复
Pem-se004	重链	Lys65	R4-7	88%	7 倍	恢复
Pem-se005	重链	Arg102	R4-26	87%	6 倍	恢复
Pem-se006	轻链	Lys27	R4-7	91%	6 倍	恢复
Pem-se007	轻链	Gly28	R4-1	94%	8 倍	恢复
Pem-se008	轻链	Tyr34	R4-7	90%	10 倍	恢复
Pem-se009	轻链	Tyr36	R4-7	93%	18 倍	恢复
Pem-se010	轻链	Tyr57	R4-7	95%	25 倍	恢复
Pem-se011	轻链	Arg96	R4-26	90%	7 倍	恢复

[0561] 实施例17:抗PD-1 TMEA体(Pembrolizumab)的功能表征

[0562] 将人PBMC(Allcells)以每孔1×10^{5}个细胞的浓度接种在96孔板中。用0.1ug/ml SEB刺激细胞3天。加入不同浓度的WT抗PD-1抗体,TMEA体或活化的TMEA体于37℃,5%CO_2下培养4天。收集上清液,通过ELISA试剂盒(R&D)检测细胞毒性因子IFN-γ的浓度。功能阻断效率和恢复率总结在表63中。

[0563] 表63:抗PD-1 TMEA体(Pembrolizumab)候选物的功能表征

[0564]

选定的突变 ID	重链/轻链	突变位点	在 IFN-γ 测定中 S47 的阻断效率	R4 偶联后恢复的活性
Pem-se001	重链	Tyr27	3 倍	恢复
Pem-se002	重链	Tyr32	4 倍	恢复

[0565]

Pem-se003	重链	Asn55	6 倍	恢复
Pem-se004	重链	Lys65	7 倍	恢复
Pem-se005	重链	Arg102	5 倍	恢复
Pem-se006	轻链	Lys27	7 倍	恢复
Pem-se007	轻链	Gly28	10 倍	恢复
Pem-se008	轻链	Tyr34	9 倍	恢复
Pem-se009	轻链	Tyr36	19 倍	恢复
Pem-se010	轻链	Tyr57	24 倍	恢复
Pem-se011	轻链	Arg96	10 倍	恢复

[0566] 实施例18:PD-1 TMEA体(Nivolumab)的产生和表征

[0567] 如上文Ipilimumab和Pembrolizumab TMEAbody筛选的实例所示,将抗PD-1抗体(Nivolumab)的多个位点突变为半胱氨酸以进行位点特异性偶联。抗PD-1抗体(Nivolumab)的重链中的突变位置选自:Gln3,Ser7,Gly8,Gly9,Gly10,Gly15,Ser17,Lys23,Ala24,Ser25,Gly26,Ile27,Asn31,Thr28,Ser30,Ser32,Gly33,Ala40,Gly42,Gly44,Leu45,Ala49,Ile51,Tyr53,Asp54,Gly55,Ser56,Lys57,Tyr59,Tyr60,Ala61,Asp62,Ser63,Lys65,Gly66,Thr69,Ile70,Ser71,Arg72,Asp73,Asn74,Ser75,Lys76,Asn77,Thr78,Leu79,Leu81,Ser85,Leu86,Ala88,Thr91,Ala92,Thr98,Asn99,Asp100,Asp101,Tyr102,Gly104,Gly106,Thr107,Leu108,Thr110,Ser112,Ser113,Ala114,Ser115,Thr116,Lys117,Gly118和Ser120;轻链中的突变位置选自:Ile2,Leu4,Thr5,Ser7,Ala9,Thr10,Leu11,Ser12,Leu13,Ser14,Gly16,Ala19,Thr20,Leu21,Ala25,Ser26,Ser28,Ser30,Ser31,Tyr32,Leu33,Ala34,Tyr36,Gly41,Ala43,Leu46,Leu47,Ile48,Tyr49,Asp50,Ala51,Ser52,Asn53,Arg54,Ala55,Thr56,Gly57,Ile58,Ala60,Arg61,Ser63,Gly64,Ser65,Gly66,Ser67,Gly68,Thr69,Thr72,Leu73,Thr74,Ile75,Ser76,Ser77,Leu78,Ala84,Ser91,Ser92,Asn93,Arg96,Thr97,Phe98,Gly99,Gly101,Thr102,Ile106,Lys107,Thr109,Ala111,Ala112,Ser114,Ile117和Ser121位点选择具有阻断效率大于5倍并且在酶切后恢复活性(EC50变化小于2倍)以利于进一步开发,如表64所示。

[0568] 表64:基于阻断和恢复效率的选定的抗PD-1 TMEA体(Nivolumab)候选物

[0569]

选定的突变ID	重链/轻链	突变位点	R4	偶联效率	S47的阻断效率	与 R4 偶联后恢复活性
Niv-se001	重链	Lys23	R4-7	95%	15 倍	增加，是 WT 的 432%

[0570]

Niv-se002	重链	Tyr53	R4-7	89%	5 倍	恢复
Niv-se003	重链	Lys57	R4-7	88%	6 倍	恢复
Niv-se004	轻链	Tyr32	R4-7	92%	8 倍	恢复
Niv-se005	轻链	Tyr49	R4-7	94%	85 倍	增加，是 WT 的 125%
Niv-se006	轻链	Arg54	R4-26	93%	7 倍	恢复
Niv-se007	轻链	Ser91	R4-1	95%	25 倍	恢复
Niv-se008	轻链	Arg96	R4-26	93%	23 倍	恢复

[0571] 如附图42所示，Niv-se001在R4-7偶联或蛋白酶切割40kD偶联的TMEA体后显示出增加的活性，其为WT Nivolumab的432%。这可能是由于R4-7提供的结合活性比天然赖氨酸残基增加。当Try49突变成半胱氨酸时，Niv-se005显示失去结合活性。然而，在与R4-7偶联后，或在蛋白酶切割偶联有40kD官能团的Niv-se005后，结合活性恢复的水平与WT Nivolumab相当(WT的125%)，如附图43所示。

[0572] 实施例19：抗PD-1 TMEA体(Nivolumab)的功能表征

[0573] 将人PBMC(Allcells)以每孔1×10^{5}个细胞的浓度接种在96孔板中。用0.1ug/ml SEB刺激细胞3天。加入不同浓度的WT抗PD-1抗体(Nivolumab)，TMEA体(Nivolumab)或活化的TMEA体(Nivolumab)，在37℃，5%CO_2下培养4天。收集上清液，通过ELISA试剂盒(R&D)检测细胞毒性因子IFN-γ的浓度。功能阻断效率和恢复效率总结在表65中。

[0574] 表65：抗PD-1 TMEA体(Nivolumab)候选物的功能表征

[0575]

选定的突变 ID	重链/轻链	突变位点	S47 在 IFN-γ 测定中的阻断效率	R4 偶联后恢复的活性
Niv-se001	HC	Lys23	18 倍	增加，是 WT 的 332%
Niv-se002	HC	Tyr53	3 倍	恢复
Niv-se003	HC	Lys57	7 倍	恢复
Niv-se004	LC	Tyr32	8 倍	恢复
Niv-se005	LC	Tyr49	25 倍	增加，是 WT 的 122%
Niv-se006	LC	Arg54	9 倍	恢复
Niv-se007	LC	Ser91	24 倍	恢复

[0576]

Niv-se008	LC	Arg96	21 倍	恢复

[0577] 实施例20：抗PD-1 TMEA体(Pembrolizumab和Nivolumab)在治疗小鼠肿瘤中的体内表征

[0578] 为了进一步表征抗PD-1 TMEA体在动物模型中治疗肿瘤的体内功效，将抗PD-

1TMEA抗体(Pem-se010 TMEA体基于Pembrolizumab和Niv-se007 TMEA体基于Nivolumab)以及WT PD-1抗体(Pembrolizumab)和对照人IgG施用于人PD-1敲入C57BL/6小鼠的MC38结肠腺癌肿瘤模型中。将$2E^6$ MC38细胞皮下注射至敲入人PD-1的C57BL/6小鼠左下腹象限。在肿瘤生长7天后,将动物以具有相似的平均肿瘤体积分组。给动物施用10mg/kg单剂量的PD-1 TMEA体(无PEG接头的抗体浓度),WT PD-1抗体或对照人IgG,并监测每只动物的肿瘤体积。

[0579] 如附图44所示,Pembrolizumab和Nivolumab TMEA体以与WT Pembrolizumab或Nivolumab抗体相当的功效控制肿瘤大小,而对照人IgG未显示任何功效。有趣的是,Niv-se001 TMEAbody在治疗肿瘤方面表现出比WT Nivolumab更好的疗效,这可能是由于蛋白酶切割后其结合活性增强。结果表明,这些抗PD-1 TMEA体可以在肿瘤微环境中被激活并刺激抗肿瘤免疫应答。

[0580] 实施例21:用于小鼠肿瘤模型中的功效研究的小鼠抗PD-1抗体(J43v2)的产生

[0581] 仓鼠抗小鼠PD-1抗体序列公开于US 20170044259A1。将该抗体的重链重新格式化为小鼠IgG2a,以降低小鼠的免疫原性。作为上述筛选方法,设计了多个位点用于筛选具有高阻断效率的TMEA体。最后,由于其高效阻断(在用小鼠PD-110蛋白的ELISA测定中35倍),选择LC上的Ser95用于TMEA体生成。用10mg/kg单剂量WT J43v2抗体或J43v2 TMEA体(对于每组n＝8)产生SN38小鼠肿瘤模型。在给药后17天,J43v2TMEA体显示75％的肿瘤抑制,具有与WT J43v2抗体相当的抑制效力(83％)。该结果表明PD-1抗体可以被激活并在体内发挥其抗肿瘤活性。

[0582] 实施例22:用于小鼠肿瘤模型中功效研究的抗小鼠CTLA-4抗体(9D9)的产生

[0583] 为了产生小鼠CTLA-4替代TMEA体用于进一步的功能和毒性研究,我们生产并纯化了抗小鼠CTLA-4抗体及其突变体变体(9D9克隆,mIgG2b同种型,序列显示于WO2007/123737A2)。作为上述筛选方法,设计了多个位点用于筛选具有高阻断效率的TMEA体。最后,由于其高效阻断(在用小鼠CTLA-4蛋白的ELISA测定中26倍),选择轻链上的Tyr54用于TMEA体生成。用10mg/kg单剂量的WT 9D9抗体或9D9 TMEA体(对于每组n＝8)产生CT26小鼠肿瘤模型。在给药后17天,9D9 TMEA体显示69％的肿瘤抑制,具有与WT 9D9抗体相当的抑制效力(74％)。该结果表明9D9 TMEA体可以被激活并在体内发挥其抗肿瘤活性。

[0584] 实施例23:小鼠PD-1和CTLA-4 TMEA体显示出比WT抗体降低的毒性

[0585] 在本领域众所周知的是,尽管抗PD-1和抗-CTLA-4抗体的组合对治疗黑素瘤是有效的(ORR),但在目前的临床研究中发现,组合显示55％TRAEs 3-4级并且30％的患者必须停止治疗。我们假设如果抗体被偶联物抑制或阻断,并且在到达肿瘤的局部环境后释放,则可以改善这些TRAE,从而减少在非患病环境中暴露的活性药物的时间或剂量。因此,对患有I型糖尿病(NOD)的小鼠进行了实验。这种小鼠的糖尿病是一种自身免疫疾病,其中自身激活的T淋巴细胞破坏胰岛β细胞,导致胰岛素分泌不足。首先,给10周龄的雌性NOD(北京维塔尔河实验动物科技有限公司)分别在第0天注射对照IgG,高剂量的抗小鼠PD-1(J43v2)和抗小鼠CTLA-4抗体(9D9),或者将这两种抗体中的一种或两种替换为其TMEA体。每天观察糖尿病指标,包括尿液中的葡萄糖和两种血糖水平,持续12天,直到没有观察到新的尿糖指示。

[0586] 附图45显示了偶联物对自身免疫的保护作用。结果显示,与初始抗体相比,联合治疗中的抗-CTLA4或抗-PD1 TMEA体可降低自身免疫。而且,这两个TMEA体的联用毒性非常低,与对照组相当。

[0587] 实施例24:抗PD-1 TMEA体的产生和表征(专利WO 2017/124050 A1)

[0588] 鉴于上述方法,从专利WO2017/124050A1下载抗PD-1抗体序列,并进行位点筛选以鉴定具有良好阻断效率的TMEA体。抗PD-1抗体重链中的突变位置选自:Ser28,Ser31,tyr33,Asn36,Gly50,Tyr51,Ser53,Tyr54,Asp55,Ser57,Lys58,Asn59,Tyr60,Asn61,Lys65,Asn66,Thr69,Thr74,Gly100,Asp105,Tyr106;轻链中的突变位置选自:Lys24,Gln27,Ser28,Asp31,Asp32,Asn33,Asn34,Gln35,Lys36,Asn37,Tyr38,Ser58,Arg60,Glu61,Ser62,Gly63,Gly70,Ser73,Thr75,Gln95,Gln96,Tyr98,Thr100,Tyr102。用Fc标记的人PD-1蛋白(Sino Biological)进行结合ELISA,并选择具有良好阻断效率(EC50变化>5倍)和恢复(EC50变化<2倍)的位点。候选位点总结在表66中。

[0589] 表66:基于阻断和恢复效率的选择的抗PD-1 TMEA体(WO 2017/124050 A1)候选物

[0590]

选定的突变ID	重链/轻链	突变位点	R4	偶联效率	S47的阻断效率	与R4偶联后恢复活性
PD1-se001	HC	Tyr33	R4-7	99%	198倍	恢复
PD1-se002	HC	Ser53	R4-1	95%	9倍	恢复
PD1-se003	HC	Tyr60	R4-7	88%	6倍	恢复
PD1-se004	LC	Tyr38	R4-7	94%	15倍	恢复
PD1-se005	LC	Ser58	R4-1	93%	16倍	恢复

[0591]

PD1-se006	LC	Thr100	R4-3	91%	6倍	恢复

[0592] 实施例25:抗-4-1BB TMEA体的产生和表征

[0593] 从US 2018/0194851 A1(克隆MOR 7480.1)下载41BB抗体序列。抗41BB抗体的重链中的突变位置选自:Thr31,Tyr32,Ser35,Lys50,Tyr52,Asp55,Ser56,Tyr57,Thr58,Asn59,Tyr60,Ser61,Gln65,Gly66,Gly99,Tyr100,Gly101,Asp104,Tyr105;轻链中的突变位置选自:Ser23,Gly24,Asp25,Asn26,Gly28,Asp29,Gln30,Tyr31,Gln49,Asp50,Lys51,Asn52,Arg53,Ser55,Gly56,Thr89,Tyr90,Thr91,Gly92,Gly94,Ser95。将人41BB蛋白质用于ELISA表征以鉴定蛋白酶消化后具有良好阻断效率(EC50变化大于5倍)以及良好恢复(EC50变化小于2倍)的突变位点。所选择的位点总结在表67和68中。

[0594] 表67:基于阻断和恢复效率选择的抗41BB TMEA体候选物

[0595]

选定的突变 ID	重链/轻链	突变位点	R4	偶联效率	S47 的阻断效率	与 R4 偶联后恢复活性
4-1BB-se001	重链	Tyr32	R4-7	95%	23 倍	恢复
4-1BB-se002	重链	Lys50	R4-7	93%	16 倍	恢复
4-1BB-se003	重链	Tyr105	R4-7	94%	9 倍	恢复
4-1BB-se004	轻链	Tyr31	R4-7	94%	18 倍	恢复
4-1BB-se005	轻链	Lys51	R4-7	96%	6 倍	恢复
4-1BB-se006	轻链	Tyr90	R4-7	95%	7 倍	恢复
4-1BB-se007	轻链	Thr91	R4-1	91%	11 倍	恢复

[0596] 表68:基于阻断和恢复效率选择的抗4-1BB TMEA体候选物

[0597]

选定的突变 ID	重链/轻链	突变位点	R4	S27 的阻断效率	S48 的阻断效率	S48 由 Granzyme B 恢复活性	S27 通过 pH6.0 恢复活性
4-1BB-se001	HC	Tyr32	R4-7	23 倍	20 倍	恢复	恢复
4-1BB -se002	HC	Lys50	R4-7	16 倍	12 倍	恢复	恢复
4-1BB -se003	HC	Tyr105	R4-7	9 倍	7 倍	恢复	恢复
4-1BB -se004	LC	Tyr31	R4-7	18 倍	18 倍	恢复	恢复
4-1BB -se005	LC	Lys51	R4-7	6 倍	5 倍	恢复	恢复
4-1BB -se006	LC	Tyr90	R4-7	7 倍	6 倍	恢复	恢复
4-1BB -se007	LC	Thr91	R4-1	11 倍	10 倍	恢复	恢复

[0598] 实施例26:抗Her2 TMEA体的产生和表征(曲妥珠单抗)

[0599] 从药物银行(https://www.drugbank.ca/drugs/DB00072)下载曲妥珠单抗的重链和轻链序列,并进行位点筛选以鉴定具有良好阻断效率的抗Her2 TMEA体。抗Her2抗体(曲妥珠单抗)的重链中的突变位置选自:Arg19,Lys30,Asp31,Tyr33,Arg50,Tyr62,Asn55,Tyr57,Arg59,Tyr60,Asp62,Lys65,Asp102,Tyr105;轻链中的突变位置选自:Asp1,Gln3,Gln27,Asp28,Asn30,Tyr49,Tyr55,Arg66,Asp70,Tyr92。将其标记的Her2蛋白(Sino Biological)用于ELISA。表69总结了具有良好阻断效率和良好恢复效率的所选位点。

[0600] 表69:基于阻断和恢复效率选择的抗Her2 TMEA体候选物

[0601]

选定的突变ID	重链/轻链	突变位点	R4	偶联效率	S47的阻断效率	与 R4 偶联后恢复活性
Trast-se001	HC	Tyr33	R4-7	97%	13 倍	恢复
Trast-se002	HC	Lys65	R4-7	95%	8 倍	恢复
Trast-se003	HC	Tyr105	R4-7	90%	25 倍	恢复
Trast -se004	LC	Gln30	R4-11	89%	16 倍	恢复
Trast -se005	LC	Tyr49	R4-7	91%	20 倍	恢复
Trast -se006	LC	Asp70	R4-11	96%	7 倍	恢复

[0602] 实施例27:抗TNF-α TMEA体的产生和表征(阿达木单抗)

[0603] Adalimumab的重链和轻链序列从DrugBank(https://www.drugbank.ca/drugs/DB00051)下载,并进行位点筛选以鉴定具有良好阻断效率的抗-TNFαTMEA体。抗TNFα抗体重链中的突变位置选自:Ser7,Gly8,Gly9,Gly10,Leu11,Gly15,Ser17,Leu18,Leu20,Ala24,Ser25,Gly26,Thr28,Asp30,Asp31,Tyr32,Ala33,Ala40,Gly42,Gly44,Leu45,Ser49,Ala50,Ile51,Thr52,Asn54,Ser55,Gly56,Ile58,Asp59,Tyr60,Ala61,Asp62,Ser63,Glu65,Gly66,Phe68,Thr69,Ile70,Ser71,Asp73,Asn74,Ala75,Lys76,Ser78,Leu79,Tyr80,Leu81,Ser85,Leu86,Ala88,Thr91,Ala92,Lys98,Ser100,Tyr101,Leu102,Ser103,Thr104,Ala105,Ser106,Ser107,Leu108,Asp109,Tyr110,Gly112,Gly114,Thr115,Leu116,thr118,Ser120,Ser121,Ala122,Ser123和Thr124;轻链中的突变位置选自:Asp1,Thr5,Ser7,Ser9,Ser10,Leu11,Ser12,Ala13,Ser14,Gly16,Thr20,Ile21,Ala25,Ser26,Gln27,Gly28,Ile29,Arg30,Asn31,Tyr32,Leu33,Ala34,Tyr36,Lys39,Gly41,Lys42,Ala43,Leu48,Leu47,Ile48,Tyr49,Ala50,Ala51,Ser52,Thr53,Leu54,Gln55,Ser56,Gly57,Ser60,Ser63,Gly64,Ser65,Gly66,Ser67,Gly68,Thr69,Asp70,Thr72,Leu73,Thr74,Ile75,Ser76,Ser77,Leu78,Ala84,Thr85,Tyr91,Asn92,Arg93,Ala94,Tyr96,Thr97,Phe98,Gly99,Gly101,Thr102,Ile106,Lys107,Thr109和Ala111。将TNFα蛋白(Sino Biological)用于ELISA表征,并且在表70中总结了具有良好阻断效率(EC50变化>5倍)和良好恢复效率(EC50变化<2倍)的选定位点。

[0604] 表70:基于阻断和恢复效率选择的抗-TNFαTMEA体候选物

[0605]

选定的突变ID	重链/轻链	突变位点	R4	偶联效率	S47的阻断效率	与 R4 偶联后恢复活性
Ada-se001	HC	Tyr32	R4-7	95%	11 倍	恢复
Ada-se002	HC	Asp59	R4-11	92%	7 倍	恢复
Ada-se003	HC	Tyr101	R4-7	93%	6 倍	恢复
Ada-se004	LC	Arg30	R4-26	96%	25 倍	恢复
Ada-se005	LC	Tyr32	R4-7	94%	28 倍	恢复
Ada-se006	LC	Gln55	R4-11	91%	32 倍	恢复
Ada-se007	LC	Tyr96	R4-7	92%	9 倍	恢复

[0606] 实施例28:抗PD-L1 TMEA体的产生和表征(Atezolizumab)

[0607] 抗PD-L1抗体(Atezolizumab)的重链和轻链序列从Drug Bank(https://www.drugbank.ca/drugs/DB11595)和网站筛选下载进行鉴定具有良好阻断效率的抗-TNFα TMEA体。抗PD-L1抗体(Atezolizumab)的重链中的突变位置选自:Gln3,Asp31,Tyr54,Tyr59,Tyr60,Asp62,Lys65,Asp73,Lys76,Asn77,Arg99;轻链中的突变位置选自:Arg24,Gln27,Asp28,Tyr49,Tyr55,Asp70,Gln89,Gln90,Tyr91,Tyr93。将Fc标记的人PD-L1蛋白(Sino Biological)用于ELISA表征,并且在表71中总结了具有良好的阻断效率(EC50变化>5倍)和良好恢复效率(EC50变化<2倍)的选定位点。

[0608] 表71:基于阻断和恢复效率选择的抗PD-L1 TMEA体候选物

[0609]

选定的突变ID	重链/轻链	突变位点	R4	偶联效率	S47的阻断效率	与 R4 偶联后恢复活性
Ate-se001	HC	Tyr54	R4-7	98%	15 倍	恢复
Ate-se002	HC	Lys76	R4-7	93%	7 倍	恢复

[0610]

Ate-se003	LC	Asp28	R4-11	91%	10 倍	恢复
Ate-se004	LC	Tyr49	R4-7	96%	13 倍	恢复
Ate-se005	LC	Tyr91	R4-7	92%	23 倍	恢复

[0611] 实施例29:抗CD28 TMEA体的产生和表征

[0612] 从专利US008709414B2下载抗人CD28抗体重链和轻链序列,并进行位点筛选以鉴定具有良好阻断效率的抗CD28 TMEA体。抗CD28抗体重链中的突变位置选自:Ser7,Gly8,Gly15,Ala16,Ser17,Ser21,Ala24,Ser25,Gly26,Tyr27,Thr28,Thr30,Ser31,Tyr32,Ala40,Gly42,Gly44,Gly49,Tyr52,Gly54,Thr58,Ala68,Thr69,Thr71,Thr74,Ser75,Ser77,Thr78,Ala79,Ser84,Leu86,Ser88,Thr91,Ala92,Thr97,Ser99,Tyr101,Gly102,Leu103,Gly113,Thr114,Thr115,Thr117,Ser119,Ser120,Ala121,Ser122和Thr123;轻链中

的突变位置选自:Thr5,Ser7,Ser9,Ser10,Ser11,Ser12,Ala13,Ser14,Gly16,Thr20,Thr22,Ala25,Ser26,Ser27,Ile29,Tyr30,Ala43,Leu46,Leu47,Tyr49,Lys50,Ala51,Ser52,Leu54,Thr56,Gly57,Ser60,Ser63,Gly64,Ser65,Gly66,Ser67,Gly68,Thr69,Asp70,Thr72,Thr74,Ser76,Ser77,Ala84,Thr85,Gly91,Thr93,Tyr94,Tyr96,Thr97,Phe98,Gly99,Gly100,Gly101,Thr102,Thr109和Ala111。Fc标记的人CD28蛋白(Sino Biological)用于ELISA表征,并且具有良好阻断效率(EC50变化>5倍)的选定位点和良好的恢复效率(EC50变化<2倍)总结在表72中。

[0613] 表72:基于阻断和恢复效率选择的抗CD28 TMEA体候选物

[0614]

选定的突变 ID	重链/轻链	突变位点	R4	偶联效率	S47 的阻断效率	与 R4 偶联后恢复活性
CD28-se001	HC	Tyr27	R4-7	95%	6 倍	恢复
CD28-se002	HC	Thr58	R4-1	93%	7 倍	恢复
CD28-se003	HC	Tyr101	R4-7	91%	6 倍	恢复
CD28-se004	LC	Tyr30	R4-7	91%	16 倍	恢复
CD28-se005	LC	Tyr49	R4-7	98%	32 倍	恢复
CD28-se006	LC	Lys50	R4-7	92%	27 倍	恢复
CD28-se007	LC	Tyr96	R4-7	90%	13 倍	恢复

[0615] 实施例30:肿瘤微环境活化的IL-10细胞因子(IL-10TMEAkine)

[0616] 1.突变体IL-10细胞因子的表达和纯化

[0617] 将与修饰的pTT5载体(Biovector)连接的突变体IL-10DNA序列进行优化以在293T细胞中表达并合成(GENEWIZ,Inc.,Suzhou,China)。进行突变体IL-10DNA的转染,并在培养后进行4-7天,收集含有突变体IL-10的上清液。

[0618] 在PichiaPastoris表达中,优化并制备含有突变IL-10基因的表达载体pPICZαA(GENEWIZ,Inc.,Suzhou,China)。突变体IL-10的氨基酸序列描述于SEQ ID NO.1中。将表达载体pPICZαA转化到大肠杆菌(DH5α)中进行质粒纯化。然后通过电穿孔将pPICZαA转化到GS115中。通过在含有YPD平板的100,300,500,1000,1500,2000μg/mL ZeocinTM 15上生长后获得生长的菌落来选择转化的菌落。最后选择转化体后,重组GS115菌株在30℃的BMGY培养基中生长,在带挡板的烧瓶中剧烈摇动至OD600为2-6。然后通过离心沉淀细胞并悬浮于BMMY中至OD600为1,每天向其中加入0.5%甲醇以诱导异源蛋白质表达。诱导4天后,通过离心收集含有分泌的突变体IL-10蛋白的上清液。使用10-kDa分子量超滤膜超滤浓缩上清液中的总蛋白质。浓缩的蛋白质用缓冲液A(20mMBIS-TRIS,0.065M NaCl,pH6。5)透析超过24小时,然后加载到用缓冲液A平衡的阳离子交换柱上。用梯度浓度为0.065-0.4M的NaCl从柱上洗脱突变体IL-10,收集洗脱液并浓缩。在Sephacryl S-100HRgel上进一步纯化浓缩的样品,过滤柱使用10mM Tris-HCl,pH7.4作为洗脱缓冲液。

[0619] 2.将S48与突变体IL-10偶联,称其为IL-10TMEAkine(肿瘤微环境激活的IL-1-细胞因子)的名称

[0620] 如上所述产生并纯化突变IL-10蛋白。在含有2mM EDTA的20mM Tris缓冲液

(pH7.4)中以0.5mg/mL的浓度实施纯化突变体IL-10。将TCEP溶液以100:1的比例添加到突变体IL-10中,温和搅拌并在4℃培养4小时。然后将突变体IL-10溶液用含有150mM NaCl的20mM Tris缓冲液(pH7.4)在4℃透析4小时。然后立即将S48加入突变体IL-10溶液中,比例为20:1,温和搅拌并在25℃培养16小时。通过除去残留的S48终止反应。在酶切之前,通过透析将IL-10TMEAkine缓冲液更换为酶缓冲液。为了激活,将酶加入到IL-10TMEAkine溶液中并在37℃下培养16小时。

[0621] 3.筛选阻断与IL-10R1或R2结合的IL-10TMEAkine,并在体外酶切后恢复结合活性。

[0622] 将含有1μgIL-10R1-Fc/IL-10R2-Fc/His溶液的60μlPBS缓冲液分配到孔中。将密封胶带贴在板的顶部,在4℃下将板孵育过夜。培养后,取出胶带并吸出每个孔。用PBST洗涤三次后,通过向每个孔中分配200μl含有2%BSA的PBS缓冲液来封闭平板,并在室温下培养2小时。将板洗涤三次,并将60ul梯度稀释的样品加入适当的孔中。在室温下培养1.5小时。用PBST洗涤三次后,向每个孔中分配60ul 2ug/mL IL-10生物素化抗体溶液,并在室温下培养1小时。将板洗涤三次并向每个孔中分配60ul链霉抗生物素蛋白溶液。在室温下培养30分钟后,洗涤三次,将100μlHRP底物溶液分配到每个孔中,并在37℃下孵育15分钟。显色后,将50μl终止溶液滴入每个孔中,并立即测量每个孔在450nm波长下的吸光度。

[0623] 4.各种IL-10突变位点的总结

[0624] 细胞表面上的IL-10受体具有两种不同的形式:高亲合力受体:IL-10R1至IL-10(Kd＝50-200pM)和低亲合力受体:IL-10R2至IL10。通过R4文库筛选的化学修饰成熟,偶联的IL-10与R4可以在一些位置恢复大于80%的结合。为了选择候选药物,我们还在结合IL-10R1和IL-10R2的结构域中进行了与IL-10的所有氨基酸的筛选表达和S48偶联反应。

[0625] 我们获得了可能的候选药物,结果如下表73所示。

[0626]

位置	氨基酸	氨基酸	抑制配体的类型	R4	结合恢复 (>60%)	与 S48 偶联后与配体结合的减少倍数 (>3 倍)
6	T	Thr	1	R4-7	101.2%	3 倍
8	S	Ser	1	R4-5	100.0%	3 倍
11	S	Ser	1	R4-7	132.9%	9 倍
13	T	Thr	1	R4-6	99.1%	7 倍
17	G	Gly	1	R4-1	90.2%	15 倍
18	N	Asn	1	R4-18	92.3%	12 倍
19	L	Leu	1	R4-7	95.3%	8 倍
21	N	Asn	1	R4-18	99.7%	7 倍
22	M	Met	1	R4-1	96.8%	5 倍
23	L	Leu	1	R4-6	101.2%	12 倍
24	R	Arg	1	R4-20	90.0%	33 倍
25	D	Asp	1	R4-12	97.1%	3 倍
26	L	Leu	1	R4-6	93.4%	3 倍
27	R	Arg	1	R4-20	86.6%	12 倍
28	D	Asp	1	R4-11	92.3%	30 倍
30	F	Phe	1	R4-8	97.1%	6 倍
31	S	Ser	1	R4-2	124.6%	39 倍
32	R	Arg	1	R4-7	90.4%	13 倍
34	K	Lys	1	R4-7	99.6%	50 倍
35	T	Thr	1	R4-6	90.1%	36 倍
38	Q	Gln	1	R4-19	87.0%	52 倍

[0627]

39	M	Met	1	R4-1	88.0%	62 倍
41	D	Asp	1	R4-11	95.2%	13 倍
42	Q	Gln	1	R4-19	90.0%	18 倍
44	D	Asp	1	R4-11	92.1%	43 倍
45	N	Asn	1	R4-18	97.7%	7 倍
46	L	Leu	1	R4-6	89.6%	22 倍
48	L	Leu	1	R4-7	98.9%	3 倍
49	K	Lys	1	R4-5	114.0%	7 倍
50	E	Glu	1	R4-12	99.8%	4 倍
51	S	Ser	1	R4-7	96.7%	3 倍
53	L	Leu	1	R4-6	99.4%	3 倍
54	L	Leu	1	R4-6	98.4%	3 倍
56	Q	Gln	1	R4-19	95.1%	3 倍
57	E	Glu	1	R4-12	95.4%	10 倍
65	L	Leu	1	R4-6	92.3%	3 倍
69	I	Ile	1	R4-6	97.3%	3 倍
72	Y	Tyr	1	R4-4	109.0%	3 倍
75	V	Val	1	R4-5	98.6%	4 倍
90	H	His	1	R4-19	86.5%	8 倍
91	V	Val	1	R4-5	97.2%	3 倍
93	S	Asp	1	R4-2	100.1%	3 倍
94	L	Leu	1	R4-6	88.4%	5 倍
97	N	Asn	1	R4-18	94.5%	5 倍
100	T	Thr	1	R4-7	99.3%	4 倍
104	R	Arg	1	R4-20	98.5%	3 倍
105	L	Leu	1	R4-6	92.3%	5 倍
107	R	Arg	1	R4-20	99.5%	3 倍
111	F	Phe	1	R4-8	90.1%	12 倍
117	K	Lys	1	R4-7	116.6%	3 倍
118	S	Ser	1	R4-5	100.0%	3 倍
119	K	Lys	1	R4-7	99.0%	3 倍
130	K	Lys	1	R4-7	100.0%	3 倍

[0628]

131	L	Leu	1	R4-6	98.5%	5 倍
134	K	Lys	1	R4-7	128.3%	5 倍
135	G	Gly	1	R4-1	99.5%	3 倍
137	Y	Tyr	1	R4-4	99.1%	5 倍
138	K	Lys	1	R4-7	97.6%	23 倍
140	M	Met	1	R4-1	89.0%	3 倍
141	S	Ser	1	R4-7	112.5%	19 倍
142	E	Glu	1	R4-12	78.0%	13 倍
143	F	Phe	1	R4-8	69.0%	7 倍
144	D	Asp	1	R4-11	90.5%	15 倍
148	N	Asn	1	R418	84.3%	10 倍
149	Y	Tyr	1	R4-4	115.3%	5 倍
151	E	Glu	1	R4-12	82.5%	13 倍
155	T	Thr	1	R4-7	98.1%	3 倍
157	K	Lys	1	R4-7	98.6%	3 倍
158	I	Ile	1	R4-6	81.7%	9 倍
159	R	Arg	1	R4-20	99.0%	3 倍
15	F	Phe	2	R4-8	90.0%	3 倍
18	N	Asn	2	R4-18	99.8%	4 倍
21	N	Asn	2	R4-18	85.3%	6 倍
22	M	Met	2	R4-1	80.0%	6 倍
24	R	Arg	2	R4-20	98.1%	9 倍
25	D	Asp	2	R4-11	91.5%	5 倍
28	R	Arg	2	R4-20	99.0%	6 倍
29	A	Ala	2	R4-5	78.0%	3 倍
31	S	Ser	2	R4-2	87.4%	7 倍
32	R	Arg	2	R4-7	89.6%	9 倍
33	V	Val	2	R4-7	91.4%	3 倍
34	K	Lys	2	R4-7	97.3%	5 倍
35	T	Thr	2	R4-5	123.0%	6 倍
36	F	Phe	2	R4-8	79.6%	3 倍

[0629]

81	E	Glu	2	R4-12	93.6%	3 倍
86	D	Asp	2	R4-11	81.0%	3 倍
87	I	Ile	2	R4-6	95.7%	4 倍
88	K	Lys	2	R4-7	99.0%	3 倍
89	A	Ala	2	R4-1	78.7%	5 倍
90	H	His	2	R4-19	79.0%	7 倍
92	N	Asn	2	R4-18	86.4%	3 倍
96	E	Glu	2	R4-12	98.0%	3 倍
97	N	Asn	2	R4-18	80.7%	4 倍
99	K	Lys	2	R4-7	116.6%	3 倍
100	T	Thr	2	R4-7	90.7%	8 倍
101	L	Leu	2	R4-6	91.0%	3 倍
102	R	Arg	2	R4-20	99.0%	3 倍
103	L	Leu	2	R4-6	89.4%	3 倍
104	R	Arg	2	R4-20	96.6%	6 倍
106	R	Arg	2	R4-7	99.6%	3 倍
107	R	Arg	2	R4-20	84.0%	5 倍
119	K	Lys	2	R4-7	105.9%	4 倍
122	E	Glu	2	R4-12	99.8%	3 倍
123	Q	Gln	2	R4-19	96.5%	3 倍
126	N	Asn	2	R4-18	99.0%	3 倍
130	K	Lys	2	R4-7	99.7%	3 倍

[0630] 5.研究IL10-K34C-S48对BALB/C小鼠模型中4T1肿瘤模型的功效。

[0631] 试验目的:研究IL10-K34C-S48在BALB/C小鼠中治疗4T1肿瘤模型的抗肿瘤效果。

[0632] 试验药物:IL10-K34C-S48和IL-10注射液,测试时用生理PBS稀释至相应浓度。

[0633] 方法和结果:

[0634] 1.实验动物:5周龄的BALB/C小鼠,雌性。

[0635] 2.肿瘤模型的产生

[0636] 1)4T1细胞购自美国模式培养物集存库(ATCC),并根据ATCC提供的说明书进行鉴定。将细胞在含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中于37℃和5%CO_2培养。细胞每三天传代一次,并使用第13代中的细胞。

[0637] 1)将4T1细胞皮下注射到BALB/C小鼠的背部。在肿瘤生长至约100mm^3后随机分组小鼠并开始药物治疗。第28天后麻醉后处死小鼠。

[0638] 2)治疗过程。共有3组,每组6只动物。包括一个对照组每天治疗,和两个单一药剂组(每天1mg/kg IL-治疗或每天IL-10-K34C-S48(1mg/kg IL-10当量剂量)。

[0639] 3)分组和测试结果如表74所示。

[0640] 4)结果和讨论。如表74所示,与IL-10比较,在4T1肿瘤模型上注射IL10-K34C-S48后,BALB/C小鼠4T1肿瘤完全消退比例极大提高,表明IL10-K34C-S48具有良好的抗肿瘤效果。

[0641] 表74:IL10-K34C-S48对BALB/C小鼠模型中4T1肿瘤模型的影响

[0642]

组别	动物数量	完全消退比例
对照组	6	0
IL10-K34C-S48	6	33.33%
IL-10	6	0

[0643] 每周监测肿瘤体积2-3次,并显示在附图46中。

[0644] 实施例31:不同R2对不同组织中靶向活化的活化效率。

[0645] 在不同组织中评价其中R1为S13,R3为R3-5,R4为R4-7和R2为表75中所示各组的结合物的切割效果。将偶联物各自溶解并稀释10倍至浓度为0.1mM/ml。在37℃下,将偶联物各自加入100μg不同的酸化人肿瘤组织匀浆(pH6.0)中,浓度为0.2mg/ml。肿瘤组织匀浆中的酶可以释放R1。通过HPLC检测释放的R1,从而比较连接子的活化效率。

[0646] 结果显示在表75中

[0647] 表75:来自不同肿瘤组织的匀浆中不同R2肽的活化比(%)

[0648]

人体组织	肿瘤细胞系	R2=LTPRLGPAAN	R2=GPAAN	R2=LSGRSDN	R2=AAN
纤维素肉瘤	HT-1080	66.4	47.8	19.8	45.9
乳腺癌	MDA-MB231	71.8	76.7	25.4	68.4
肝癌	HepG2	68.9	58.4	21.8	55.7
心脏		1.6	1.1	4.3	0
肺		1.7	1.5	5.9	0

[0649] 根据结果,延长R2,可以被多种蛋白酶激活且表现出比AAN更高的活化效率。但是被多种蛋白酶激活意味着稳定性的问题,如心脏和肺组织所示。

[0650] 实施例32:抗VEGF TMEA体的产生和表征(贝伐单抗)

[0651] 贝伐单抗的重链和轻链序列从Drug Bank(https://www.drugbank.ca/drugs/DB00112)下载并进行位点筛选以鉴定具有良好阻断效率的抗VEGF TMEA体。抗VEGF抗体(贝伐单抗)的重链中的突变位置选自:Tyr32,Asn35,Tyr54,Tyr60,Lys65,Arg66,Tyr102,Tyr103和Tyr109;轻链中的突变位置选自:Ser24,Ser26,Asp28,Tyr32,Tyr49,Thr51,Tyr91,Ser92和Thr93。将其标记的VEGF蛋白用于ELISA。选择具有良好封闭效率和良好恢复效率的位点。并总结在表76中。

[0652] 表76:基于良好封闭效率和良好恢复效率的选择的抗VEGF TMEA体候选物

[0653]

选定的突变ID	重链/轻链	突变位点	R4	偶联效率	S47的阻断效率	与R4偶联后恢复活性
Beva-se001	重链	Lys65	R4-7	95%	9倍	恢复
Beva-se002	轻链	Ser26	R4-1	91%	16倍	恢复
Beva-se003	轻链	Tyr49	R4-7	95%	26倍	恢复
Beva-se004	轻链	Thr51	R4-1	87%	13倍	恢复

[0654] 实施例33:抗CD20 TMEA体(利妥昔单抗)的产生和表征

[0655] 从DrugBank(https://www.drugbank.ca/drugs/DB00073)下载(Rituximab的重链和轻链序列,并进行位点筛选以鉴定具有良好阻断效率的抗CD20 TMEA体。抗CD20抗体(利妥昔单抗)的重链中的突变位置选自:Tyr32,Asn33,Tyr52,Asn55,Lys63,Lys65,Tyr101,Tyr102和Tyr107;并且轻链中的突变位置选自:Ser26,Ser28,Tyr31,Tyr48,Thr50,Asn52,Thr91和Thr96。将其标记的CD20蛋白用于ELISA。选择具有良好封闭效率和良好恢复效率的位点。并总结在表77中。

[0656] 表77:基于良好封闭效率和良好恢复效率的选择的抗CD20 TMEA体候选物

[0657]

选定的突变ID	重链/轻链	突变位点	R4	偶联效率	S47的阻断效率	与R4偶联后恢复活性
Ritu-se001	重链	Tyr31	R4-7	92%	16倍	恢复
Ritu-se002	重链	Lys63	R4-7	98%	8倍	恢复
Ritu-se003	轻链	Tyr32	R4-7	91%	13倍	恢复
Ritu-se004	轻链	Tyr48	R4-7	92%	15倍	恢复
Ritu-se005	轻链	Thr50	R4-1	89%	21倍	恢复

[0658] 实施例34:阻断和切割用于候选药物的不同R4和R5的筛选

[0659] 评估了偶联物在指定偶联中的阻断和切割效果。将偶联物各自溶解并稀释10倍至浓度为0.1mM/ml。在37℃下,将偶联物各自以1mg/ml的浓度加入到100μgMDA-MB231人肿瘤组织匀浆(pH7)中8小时。通过ELISA检测偶联和释放的生物分子的结合,从而比较接头的活化效率。结果显示在表78中。

[0660]

R1-R2-R3-R4	R5	偶联后结合减少倍数	激活后结合力恢复(%)
S48	SEQ ID:13	34倍	96
S48	SEQ ID:14	25倍	95
S48	SEQ ID:15	18倍	105
S48	SEQ ID:16	42倍	96
S48	SEQ ID:17	67倍	95

S48	SEQ ID:18	32倍	96
S48	SEQ ID:19	67倍	85
S48	SEQ ID:26	24倍	94
S48	SEQ ID:27	54倍	94
S48	SEQ ID:28	14倍	107
S48	SEQ ID:29	18倍	106
S48	SEQ ID:30	9倍	91
S48	SEQ ID:31	13倍	89
S48	SEQ ID:32	14倍	93
S48	SEQ ID:44	75倍	99
S48	SEQ ID:54	24倍	96
S48	SEQ ID:60	16倍	96
S48	SEQ ID:61	19倍	107
S48	SEQ ID:62	74倍	96
S48	SEQ ID:63	34倍	93

[0661] 指定偶联中偶联物的阻断和切割效果在表79中评估。将偶联物各自溶解并稀释10倍至浓度为0.1mM/ml。在37℃时，将偶联物各自加入到MMP2(pH6)中，浓度为1mg/ml，16小时。通过ELISA检测偶联和释放的生物分子的结合，从而比较接头的活化效率。结果显示在表79中。

[0662] 表79：S65与不同生物分子的偶联的阻断和裂解作用

[0663]

R1-R2-R3-R4	R5	偶联后结合减少倍数	激活后结合力恢复(%)
S65	SEQ ID:13	19 倍	96

[0664]

S65	SEQ ID: 14	21 倍	99
S65	SEQ ID: 15	58 倍	95
S65	SEQ ID: 16	124 倍	97
S65	SEQ ID: 17	164 倍	99
S65	SEQ ID: 18	26 倍	95
S65	SEQ ID: 19	35 倍	89
S65	SEQ ID: 26	43 倍	94
S65	SEQ ID: 27	17 倍	95
S65	SEQ ID: 28	12 倍	99
S65	SEQ ID: 29	25 倍	105
S65	SEQ ID: 30	48 倍	101
S65	SEQ ID: 31	75 倍	97
S65	SEQ ID: 32	34 倍	93
S65	SEQ ID: 44	19 倍	96
S65	SEQ ID: 54	25 倍	94
S65	SEQ ID: 60	75 倍	97
S65	SEQ ID: 61	34 倍	93
S65	SEQ ID: 62	19 倍	96
S65	SEQ ID: 63	25 倍	94

[0665] 评估了偶联物在指定偶联中的阻断和切割效果。将偶联物各自溶解并稀释10倍至浓度为0.1mM/ml。在37℃下，将偶联物各自加入100μgMDA-MB231酸化的人肿瘤组织匀浆(pH6.5)中。通过ELISA检测偶联和释放的生物分子的结合，从而比较接头的活化效率。结果显示在表80中。

[0666] 表80：S27与不同生物分子的偶联的阻断和裂解效应

[0667]

R1-R2-R3-R4	R5	偶联后结合减少倍数	激活后结合力恢复(%)
S27	SEQ ID:13	43 倍	91
S27	SEQ ID: 14	11 倍	95
S27	SEQ ID: 15	8 倍	98
S27	SEQ ID: 16	14 倍	95
S27	SEQ ID: 17	19 倍	98

[0668]

S27	SEQ ID: 18	33 倍	95
S27	SEQ ID: 19	45 倍	96
S27	SEQ ID: 26	28 倍	99
S27	SEQ ID: 27	37 倍	95
S27	SEQ ID: 28	36 倍	97
S27	SEQ ID: 29	106 倍	106
S27	SEQ ID: 30	135 倍	102
S27	SEQ ID: 31	75 倍	107
S27	SEQ ID: 32	58 倍	97
S27	SEQ ID: 44	74 倍	99
S27	SEQ ID: 54	35 倍	97

[0669] 根据结果，这些候选药物在指定的活化条件下表现出阻断作用和活化作用。

[0670] 实施例35：在CT26肿瘤免疫模型中与小鼠CTLA-4抗体偶联的指示的S27，S39，S40，S47，S48和S65的功效的研究

[0671] 试验目的：研究与小鼠CTLA-4抗体偶联的S27，S39，S40，S47，S48，S65对免疫治疗的抗肿瘤功效。

[0672] 试验药物：与小鼠CTLA-4抗体(9D9)偶联的S27，S39，S40，S47，S48，S65，均以20mg/kg(等摩尔CTLA-4抗体)使用。

[0673] 生产肿瘤模型：

[0674] 1)CT26肿瘤细胞来自ATCC。将细胞在含有10％胎牛血清的DMEM培养液中于37℃，5％CO_2培养。将细胞每三天传代一次，并使用第15代内的细胞。

[0675] 2)肿瘤免疫。将通过照射杀死的5×10^5个CT26癌细胞(购自ATCC)腹膜内注射给小鼠。小鼠注射3次，每两周一次。免疫后，给小鼠注射肿瘤细胞，每周给药一次，持续4周。

[0676] 3)生产肿瘤。在第32天，将1×10^6个肺肿瘤活细胞皮下注射到通过肿瘤免疫的C57小鼠的背部。当肿瘤生长至0.3-0.4cm时开始治疗。

[0677] 4)肿瘤$CD8^+$T细胞分析。将肿瘤组织匀浆，过滤肿瘤中的各个细胞，分离并用缓冲液洗涤两次，然后在室温下用白细胞共同抗原CD45-PE和CD8-FITC标记的抗体培养1小时。用含有1％胎牛血清的磷酸盐缓冲液洗涤细胞两次，然后通过流式细胞术分析白细胞共同抗原(CD45)阳性细胞中T淋巴细胞抗原(CD8)阳性细胞的比例。比率的增加表明T淋巴细胞增加，因此动物对肿瘤的免疫力得到改善。

[0678] 5)分组和测试结果如表81所示。

[0679] 表81：对小鼠CTLA-4抗体和对照偶联的S27，S39，S40，S47，S48和S65的肿瘤抑制和免疫激活的影响

[0680]

组别	动物数量	肿瘤体积(mm^3)	治愈的老鼠数量	CD8:CD45(%)
		第 28 天	第 28 天	
PBS	8	1887.56±323.4	0	5.2
Mouse CTLA-4 抗 body (WT)	8	74.46± 467.34	2 (2 只死亡)	13.1
S27-Mouse CTLA-4 抗 body (9D9)	8	37.60 ±358.57	6	28.4
S39-Mouse CTLA-4 抗 body (9D9)	8	31.57± 124.45	5	29.7
S40-Mouse CTLA-4 抗 body (9D9)	8	57.63 ± 157.32	6	26.3
S47-Mouse CTLA-4 抗 body (9D9)	8	53 ± 216.47	7	38.4
S48-Mouse CTLA-4 抗 body (9D9)	8	75.78±32.74	4	23.6
S65-Mouse CTLA-4 抗 body (9D9)	8	74.28± 38.45	6	26.7

[0681] 6)结果和讨论:与对照组和WT CTLA-4抗体治疗组相比,与S27,S39,S40,S47,S48和S65偶联的小鼠CTLA-4抗体的治疗效果大大提高。在WT CTLA-4抗体治疗中引起1死亡的WT CTLA-4抗体可能由高剂量治疗中的毒性引起。与小鼠CTLA-4抗体偶联的S27,S39,S40,S47,S48和S65的治疗效果显示出优异的效果并且促进肿瘤组织中的CD8/CD45 T细胞比率。

[0682] 实施例36:在RA小鼠模型中与S27,S47,S48或S65偶联的阿达木单抗(SEQ ID NO:29)的功效的研究

[0683] 使用人TNF/β-珠蛋白(TNFglobin)重组体产生TgTC小鼠基因构建体,其含有一个2.8kb的片段,整个编码区和hTNFα基因的启动子,与一个0.77kb片段融合,其中3'非翻译区(UTR)和人β-珠蛋白的多聚腺苷酸化位点取代了hTNFα基因的片段。然后将该片段显微注射到FVB/J近交系受精卵的原核中。最后,将注射的受精卵植入8周龄雌性假孕ICR小鼠的输卵管中。通过将转基因建立者个体回交至FVB/J近交品系来建立转基因谱系。通过PCR进行基因分型以筛选转基因动物以及常规的尾部基因分型。转基因特异性PCR引物是:

[0684] 5'-GAACTCCCTCGATGTTAACCA-3'(正向引物,SEQ ID NO:87);

[0685] 5'-TTCAATCCCCAAATCCTAGCC-3'(反向引物,SEQ ID NO:88)。

[0686] PCR反应如下进行:94℃4分钟;在95℃下进行35个循环30秒,在57℃下进行40秒,在72℃下进行40秒;72℃,10分钟。

[0687] 将溶解于盐水中的不同抗hTNFα抗体(阿达木单抗2mg/kg)和偶联抗体(2mg/kg等摩尔阿达木单抗)每周腹膜内给予(2mg/kg)TCTC小鼠从第3至第10周,用盐水处理的TgTC小鼠作为对照。临床评估记录断奶后所有四个肢体的每周体重和关节炎评分。每只爪子(手指,骨和脚踝)的关节炎临床严重程度通过将评分范围从0到3进行量化,0:正常;1:轻微发

红和/或肿胀;2:明显水肿肿胀;3:关节畸形和僵硬。每只小鼠的关节炎评分是四肢的平均值。分组和测试结果如表82所示。

[0688] 表82:与阿达木单抗抗体偶联的S27,S47,S48和S65对关节炎抑制的影响

[0689]

组别	动物数量	关节炎评分	关节炎评分
		第 5 天	第 10 天
PBS	4	3	3
Adalimumab	4	3	2
S27-Adalimumab	4	1	1
S47-Adalimumab	4	2	1
S48-Adalimumab	4	1	1
S65-Adalimumab	4	1	1

[0690] 结果显示,与S27,S47,S48和S65偶联的阿达木单抗大大降低了关节炎评分。

[0691] 实施例37:抗Her2/抗CD3双特异性TMEA体的产生和表征

[0692] 从DrugBank(https://www.drugbank.ca/drugs/DB00072)下载曲妥珠单抗的重链和轻链序列,并进行位点筛选以鉴定具有良好阻断效率的抗Her2的scFv形式。重链中的突变位置选自:Asp1,Gln3,Gln27,Asp28,Asn30,Tyr49,Tyr55,Arg66,Asp70和Tyr92。轻链中的突变位置选自Arg19,Lys30,Asp31,Tyr33,Arg50,Tyr62,Asn55,Tyr57,Arg59,Tyr60,Asp62,Lys65,Asp102和Tyr105。上述选择的突变体的scFv形式表达于HEK293,带有C端6His标签,用Ni-NTA柱纯化,并与相应的化学接头偶联。用His标记的人Her2蛋白作为抗原和抗人κ链作为第二抗体进行结合ELISA。阻断效率总结于表84中。

[0693] 表83:基于阻断和恢复效率选择的抗Her2候选物的scFv形式

[0694]

选定的突变 ID	重/轻链	突变	R4	偶联效率	S47 的阻断效率	与 R4 偶联后活
		位点				性恢复

[0695]

Trast-se001scFv	重链	Tyr33	R4-7	95%	15 倍	恢复
Trast-se002scFv	重链	Lys65	R4-7	93%	6 倍	恢复
Trast-se003scFv	重链	Tyr105	R4-7	92%	32 倍	恢复
Trast -se004scFv	轻链	Gln30	R4-11	83%	15 倍	恢复
Trast -se005scFv	轻链	Tyr49	R4-7	93%	43 倍	恢复
Trast -se006scFv	轻链	Asp70	R4-11	91%	13 倍	恢复

[0696] 我们将抗Her2 scFv与选择的半胱氨酸突变(轻链中的Tyr49)融合至含有C末端6His标签的抗人CD3 scFv,以形成靶向肿瘤和T细胞的双特异性抗体。这些Her2/CD3双特异性抗体在HEK293细胞中产生并用Ni-NTA柱纯化。这些具有突变体的Her2/CD3双特异性抗体进一步与S47偶联,获得了对人Her2蛋白的38倍降低的结合活性。用天冬酰胺内肽酶消化后,两种结合活性均恢复。

[0697] 通过将S27,S47或S48偶联至具有抗CD3或其scFv的融合蛋白抗Her2 scFV来产生Her2/CD3 TMEA体的单链,如表84中所示。

[0698] 表84:基于阻断和恢复效率选择的抗Her2候选物的scFv形式

[0699]

双特异性TMEA体	抗-Her2	抗-CD3	SEQ ID NO:	R1-R2-R3-R4
Her2/CD3 TMEAbody1	抗-Her2 scFv	抗-CD3 scFv	70	S27
Her2/CD3 TMEAbody2	抗-Her2 scFv	抗-CD3 scFv	70	S47
Her2/CD3 TMEAbody3	抗-Her2 scFv	抗-CD3 scFv	70	S48
Her2/CD3 TMEAbody4	抗-Her2 scFv	抗-CD3 scFv	82	S27
Her2/CD3 TMEAbody5	抗-Her2 scFv	抗-CD3 scFv	82	S47
Her2/CD3 TMEAbody6	抗-Her2 scFv	抗-CD3 scFv	82	S48
Her2/CD3 TMEAbody7	抗-Her2	抗-CD3	抗-Her2:71和72抗-CD3:75	S27
Her2/CD3 TMEAbody8	抗-Her2	抗-CD3	抗-Her2:71and 72抗-CD3:75	S47
Her2/CD3 TMEAbody9	抗-Her2	抗-CD3	抗-Her2:71and 72抗-CD3:75	S48

[0700] 我们将PD-1抗体或PD-L1抗体与突变体IL-2(IL2-S87C)融合以形成靶向肿瘤相关抗原PD-L1/IL-2TMEAkines或PD-1/IL-2TMEAkines。

[0701] 这些具有IL2-T41C突变体的TMEAkines进一步与S47偶联。获得大于135倍的对人IL-2Rβ的结合活性降低。用天冬酰胺内肽酶消化后,恢复了对IL-2R的结合活性。将具有突变体IL-2(结合IL-2RαS87C的突变体)的融合PD-L1或PD-1抗体进一步与S47偶联,得到天冬酰胺内肽酶激活融合TMEAkine,如表85所示。

[0702] 表85:基于阻断和恢复效率的融合蛋白候选物

[0703]

融合TMEAkine	融合蛋白序列	R1-R2-R3-R4
1	N-末端-IL2(S87C）-GSGS-PD-1(SEQ ID NO:15）	S47
2	N-末端-IL2(S87C）-GSGS-PD-1 (SEQ ID NO:17）	S47
3	N-末端-IL2(S87C）-GSGS-PD-L1(SEQ ID NO:27）	S47
4	N-末端- PD-1(SEQ ID NO:15） -GSGS-IL2(S87C）	S47
5	N-末端- PD-1(SEQ ID NO:17） -GSGS-IL2(S87C）	S47
6	N-末端- PD-L1(SEQ ID NO:27） -GSGS-IL2(S87C）	S47
7	N-末端-EGFR(SEQ ID NO:78&79） -GSGS- -IL2(S87C）	S47
8	N-末端- VEGFR (SEQ ID NO:80&81） -GSGS-IL2(S87C）	S47
9	N-末端- Her2 (SEQ ID NO:82&83） -GSGS-IL2(S87C）	S47
10	PD-1/IL-2 融合蛋白(SEQ ID NO:73）	S47
11	PD-L1/IL-2 融合蛋白(SEQ ID NO:74）	S47

[0704] 在人PBMC转移的小鼠模型中的体内毒性表征

[0705] 试验目的:通过静脉注射研究融合TMEA体的急性毒性。

[0706] 动物:第一类SCID小鼠,体重19-21克,所有小鼠为雌性。

[0707] 方法和结果:SCID小鼠根据体重随机分为21组,每组10只。如表86所示,给小鼠静脉内注射D1,D7和D14一次,剂量为30mg/kg(等摩尔抗体)。通过注射30mg/kg人IgG进行对照

试验。连续21天每天观察动物是否存在以下行为:竖毛,头发蓬乱和乏力,嗜睡,弯腰和易激惹反应,以及体重和死亡如表86所示。

[0708] 表86:接受不同融合TMEA体注射的测试小鼠的死亡率的比较

[0709]

组别	注射	动物数量	死亡动物数量（第 21 天）	死亡率 （%）
1	人 IgG	10	0	0
2	Her2/CD3scFv	10	4	40
3	Her2/CD3 抗体	10	3	30
4	Her2/CD3TMEAbody1	10	0	0
5	Her2/CD3TMEAbody2	10	0	0
6	Her2/CD3TMEAbody3	10	0	0

[0710]

7	Her2/CD3TMEAbody4	10	0	0
8	Her2/CD3TMEAbody5	10	0	0
9	Her2/CD3TMEAbody6	10	0	0

[0711] 结果和讨论:在接受30mg/kg组2,3,10和14的小鼠中未观察到竖毛,头发蓬乱和乏力,嗜睡,弯腰,易激惹反应和死亡。如表86所示,MTD融合蛋白的含量小于30mg/kg,可观察到毒性和死亡率。

[0712] 在人PBMC转移的小鼠模型中的体内毒性表征

[0713] 试验目的:通过静脉注射研究融合TMEA体的急性毒性。

[0714] 动物:第一类SCID小鼠,体重19-21克,所有小鼠为雌性。

[0715] 方法和结果:SCID小鼠根据体重随机分为21组,每组5只。如表88所示,给小鼠静脉内一次性注射30mg/kg(等摩尔抗体)的融合蛋白和融合蛋白与S47偶联物在D1,D7和D14,注射30mg/kg盐水为对照。

[0716] 表87:接受不同融合融合TMEAkine注射的测试小鼠的死亡率的比较

[0717]

融合蛋白序列	死亡数量	与S47偶联后死亡数量
生理盐水	0	0
N-末端-IL2(S87C)-GSGS-PD-1(SEQ ID NO:15)	5	0
N-末端-IL2(S87C)-GSGS-PD-1(SEQ ID NO:17)	3	0
N-末端-IL2(S87C)-GSGS-PD-L1(SEQ ID NO:27)	5	0
N-末端-PD-1(SEQ ID NO:15)-GSGS-IL2(S87C)	2	0
N-末端-PD-1(SEQ ID NO:17)-GSGS-IL2(S87C)	1	0
N-末端-PD-L1(SEQ ID NO:27)-GSGS-IL2(S87C)	4	0
N-末端-EGFR(SEQ ID NO:77&79)-GSGS--IL2(S87C)	3	0
N-末端-VEGFR(SEQ ID NO:80&81)-GSGS-IL2(S87C)	4	0
N-末端-Her2(SEQ ID NO:82&83)-GSGS-IL2(S87C)	5	1
PD-1/IL-2融合蛋白(SEQ ID NO:73)	4	0
PD-L1/IL-2融合蛋白(SEQ ID NO:74)	5	1

[0718] 结果和讨论:在接受30mg/kg所有组融合TMEAkine的小鼠中未观察到竖毛,毛发粗糙和黯淡,嗜睡,弯腰,易激惹反应和死亡。但与S47融合后毒性降低。

[0719] 小鼠肿瘤模型中CD3-Her2 TMEAbody单链的体内表征

[0720] 为了进一步表征CD3-Her2 TMEA体单链在动物模型中治疗肿瘤的体内功效,将CD3-Her2 TMEA体的单链以及单链CD3-Her2抗体施用于肿瘤异种移植物中。为了启动肿瘤异种移植物,将3×10^6个KPL-4细胞原位植入到女性严重联合免疫缺陷(SCID)米色小鼠的右倒数第二个腹股沟乳房脂肪垫中。在开始治疗之前,使肿瘤生长(KPL4为20天)。在研究期间,用指定药物(每周10mg/kg,持续5周)处理具有KPL-4肿瘤($100mm^3$)的小鼠。每周两次测量肿瘤体积和体重。该表88总结了肿瘤体积抑制率。结果表明CD3-Her2 TMEA体的单链可以在肿瘤微环境中被激活并增强CD3-Her2抗体单链的功效。

[0721] 表88:给药后第20天的肿瘤生长抑制率

[0722]

组别	剂量	治愈率(%)	死亡数量
人IgG	10mg/kg	0	0
Her2/CD3 scFv	10mg/kg	16.7	0
Her2/CD3抗体	10mg/kg	33.3	2
Her2/CD3 TMEAbody1	10mg/kg	66.7%	0
Her2/CD3 TMEAbody2	10mg/kg	83.3%	0
Her2/CD3 TMEAbody3	10mg/kg	100%	0
Her2/CD3 TMEAbody4	10mg/kg	100%	0
Her2/CD3 TMEAbody5	10mg/kg	100%	0
CD3-Her2 TMEAbody6	10mg/kg	100%	0
PD-1/IL-2融合蛋白	10mg/kg	100%	2
Fusion TMEAkine1	10mg/kg	83.3%	0
Fusion TMEAkine 2	10mg/kg	100%	0
TMEAkine4	10mg/kg	100%	0
Fusion TMEAkine5	10mg/kg	100%	0
Fusion TMEAkine10	10mg/kg	100%	0
PD-L1/IL-2融合蛋白	10mg/kg	100%	2
FusionTMEAkine3	10mg/kg	83.3%	0
Fusion TMEAkine6	10mg/kg	100%	0
Fusion TMEAkine11	10mg/kg	83.3%	0

[0723] 如表88所示,与通过使用相同摩尔浓度的Her2/CD3 scFv或Her2/CD3抗体治疗的组相比,Her2/CD3 TMEA体对肿瘤生长和治愈率的抑制得到极大改善。通过PD-L1/IL-2TMEAkine或抗体对肿瘤生长和治愈率的抑制显示功效并治愈小鼠。但在PD-L1/IL-2融合抗体组中,毒性导致一些小鼠死亡。

序列表
<110> 亚飞(上海)生物医药科技股份有限公司
<120> 生物分子偶联物及其用途
<130> 174527 1PCWO
<150> US 62/583,410
<151> 2017-11-08
<160> 88
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗PD-1抗体的重链
<400> 1
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445
<210> 2
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗PD-1抗体的轻链

<400> 2
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95
Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 3
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗PD-1抗体的重链
<400> 3
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125
Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190
Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220
Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

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

<210> 4
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗PD-1抗体的轻链
<400> 4
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 5
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗CTLA-4抗体的重链
<400> 5
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

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

<210> 6
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<230> 抗CTLA-4抗体的轻链
<400> 6
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 7
<211> 224
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗TNFα抗体的重链
<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
<210> 8
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗TNFα抗体的轻链
<400> 8
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

<210> 9
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗CD-28抗体的重链
<400> 9
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Cys Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445
<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗CD-28抗体的轻链
<400> 10
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 11
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 野生型IL2的氨基酸序列
<400> 11
Ala Pro Ala Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
20 25 30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
35 40 45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
50 55 60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
85 90 95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
115 120 125
Ser Thr Leu Thr
130
<210> 12
<211> 131
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 野生型IL2的氨基酸序列
<400> 12
Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
1 5 10 15
Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro
20 25 30

Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala
35 40 45
Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
50 55 60
Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro
65 70 75 80
Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly
85 90 95
Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile
100 105 110
Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser
115 120 125
Thr Leu Thr
130
<210> 13
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 易普利姆玛的重链
<400> 13
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445
<210> 14

<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 易普利姆玛的轻链
<400> 14
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 15
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<230> 派姆单抗的重链

<400> 15

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

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

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

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445
<210> 16
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 派姆单抗的轻链
<400> 16
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95
Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 17
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 纳武单抗的重链
<400> 17
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125
Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190
Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220
Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 18
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 纳武单抗的轻链
<400> 18
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 19
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<230> 抗人源 PD-1抗体的重链(WO 2017/124050 A1)

<400> 19

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Phe Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Ile Ile Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Leu Pro Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

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

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

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

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

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

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

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

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

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

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 20
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗人源 PD-1抗体的轻链(WO 2017/124050 A1)
<400> 20
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Leu Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Lys Ala Thr Ile Gln Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Asp
20 25 30
Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Val Glu Ile
100 105 110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 21
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗鼠源 PD-1抗体的J43v2的重链
<400> 21
Glu Val Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Glu Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala His Ile Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ser Gly
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Ser Met
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp Phe Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser
115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val
130 135 140
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu
145 150 155 160
Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr
180 185 190
Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro
195 200 205
Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr
210 215 220
Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
245 250 255
Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
260 265 270
Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
275 280 285
His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
290 295 300
Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
305 310 315 320
Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
355 360 365
Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu
370 375 380
Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
405 410 415
Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
420 425 430
His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 22

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<230> 抗鼠源 PD-1抗体的J43v2的轻链

<400> 22

Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu Thr

1 5 10 15

Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Pro Lys Tyr Phe Ala Asp

20 25 30

Trp Phe His Gln Arg Ser Asp Gln Thr Ile Leu Gln Val Ile Tyr Asp

35 40 45

Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser Ser

50 55 60

Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Val Arg Ala Glu Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gly Pro

100 105 110

Lys Ser Ser Pro Lys Val Thr Val Phe Pro Pro Ser Pro Glu Glu Leu

115 120 125

Arg Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Val Asn Asp Phe Tyr Pro

130 135 140

Gly Ser Ala Thr Val Thr Trp Lys Ala Asn Gly Ala Thr Ile Asn Asp

145 150 155 160

Gly Val Lys Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Gly Gln Asn Tyr Met Thr

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Trp Lys Ser His Asn Arg

180 185 190

Val Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Glu Thr Val Glu Lys Ser Leu

195 200 205

Ser Pro Ala Glu Cys Leu

210

<210> 23

<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗鼠源 CTLA-4 9D9抗体的重链
<400> 23
Glu Ala Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Ile Thr Val Ser Thr Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
180 185 190
Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
195 200 205
Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn
210 215 220
Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu
225 230 235 240
Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val
245 250 255
Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

260 265 270
Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
275 280 285
Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
290 295 300
Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
305 310 315 320
Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser
325 330 335
Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro
340 345 350
Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp
355 360 365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser
370 375 380
Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr
385 390 395 400
Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu
405 410 415
Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn
420 425 430
Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser
435 440 445
Arg Ser Pro Gly Lys
450
<210> 24
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗鼠源 CTLA-4 9D9抗体的轻链
<400> 24
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Thr Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180 185 190
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205
Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215
<210> 25
<211> 442
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗人源-41BB抗体的重链
<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220
Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
290 295 300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320
Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440
<210> 26
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗人源-41BB抗体的轻链
<400> 26
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95
Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110
Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125
Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140
Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160
Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175
Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190
Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 27

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<230> 曲妥单抗的重链

<400> 27

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 28
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 曲妥单抗的轻链
<400> 28
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 29
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 阿达木单抗的重链
<400> 29
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys
450
<210> 30
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 阿达木单抗的轻链
<400> 30
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 31
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 阿特珠单抗的重链
<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445
<210> 32
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 阿特珠单抗的轻链
<400> 32
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 33
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗人源CD-28抗体的重链
<400> 33
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

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

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

Thr Arg Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445
<210> 34
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗人源CD-28抗体的轻链
<400> 34
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 35
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> Ipi-se008 轻链
<400> 35
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Cys Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 36
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> Ipi-se010 轻链
<400> 36
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Cys Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 37
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> Ipi-se009 轻链
<400> 37
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Phe Cys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 38
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<230> Pem-se010 轻链
<400> 38
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Cys Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
65 70 75 80
Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg Asp
85 90 95
Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 39
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> Pem-se009 轻链
<400> 39
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

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

<210> 40
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> Pem-se007 轻链
<400> 40
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Cys Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95
Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 41
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> Niv-se001 重链可变区
<400> 41
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Cys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

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

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440
<210> 42
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> Niv-se005 轻链
<400> 42
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Cys Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 43
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> Niv-se007 轻链
<400> 43
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Cys Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 44
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-2
<400> 44
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Cys Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 45
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-2
<400> 45
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Cys Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 46
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-2
<400> 46
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Cys Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 47
<211> 133
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-2
<400> 47
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Cys Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Cys Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 48
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-2
<400> 48
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Cys Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Cys Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 49
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-2
<400> 49
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Cys Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Cys Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 50
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-2

<400> 50
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Asp Met Leu Cys Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Cys Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 51
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-2
<400> 51
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Asp Met Leu Cys Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Arg Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Cys Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 52
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-2
<400> 52
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Cys Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Asp Met Leu Cys Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Arg Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 53
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-2
<400> 53
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Asp Met Leu Cys Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Arg Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Cys Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 54
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-10
<400> 54
Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1 5 10 15
Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
20 25 30
Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
35 40 45
Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60
Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
100 105 110
Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
115 120 125

Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
130 135 140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
145 150 155
<210> 55
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-10
<400> 55
Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1 5 10 15
Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Cys Arg
20 25 30
Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
35 40 45
Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60
Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
100 105 110
Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
115 120 125
Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
130 135 140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
145 150 155
<210> 56
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-10
<400> 56
Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro

1 5 10 15
Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
20 25 30
Val Cys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
35 40 45
Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60
Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
100 105 110
Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
115 120 125
Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
130 135 140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
145 150 155
<210> 57
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-10
<400> 57
Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1 5 10 15
Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
20 25 30
Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Cys Asn Leu Leu Leu
35 40 45
Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60
Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu

100 105 110
Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
115 120 125
Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
130 135 140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
145 150 155
<210> 58
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 突变的IL-10
<400> 58
Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1 5 10 15
Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Cys
20 25 30
Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
35 40 45
Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60
Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
100 105 110
Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
115 120 125
Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
130 135 140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
145 150 155
<210> 59
<211> 159
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<230> 突变的IL-10
<400> 59
Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1 5 10 15
Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
20 25 30
Val Lys Cys Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
35 40 45
Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60
Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95
Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
100 105 110
Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
115 120 125
Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
130 135 140
Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
145 150 155
<210> 60
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗人源VEGF抗体的重链
<400> 60
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

385 390 395 400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445
Leu Ser Pro Gly Lys
450
<210> 61
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗人源VEGF抗体的轻链
<400> 61
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 62
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗人源CD-20抗体的重链
<400> 62
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
100 105 110
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys
450
<210> 63
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗人源CD-20抗体的轻链
<400> 63
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

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

<210> 64
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 阿特珠单抗的VH区
<400> 64
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 65
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 阿特珠单抗的VL区
<400> 65
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Cys Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 66
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 西妥昔单抗的VH突变
<400> 66

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

<210> 67
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 西妥昔单抗的VL,带有突变
<400> 67
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Cys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 68
<211> 116

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 雷莫芦单抗的VH,带有突变
<400> 68
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Val Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115
<210> 69
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 雷莫芦单抗的VL,带有突变
<400> 69
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asp Asn Trp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Cys Asp Ala Ser Asn Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Lys Ala Phe Pro Pro

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105
<210> 70
<211> 496
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗Her2抗体的scFv与CD3的融合蛋白,带有突变
<400> 70
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Cys Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
115 120 125
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
130 135 140
Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
145 150 155 160
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr
165 170 175
Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190
Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp
210 215 220
Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

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

<210> 71
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗Her2 抗体的VH,带有突变

<400> 71
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 72
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗Her2 抗体的VL,带有突变
<400> 72
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Cys Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 73

<211> 590
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗Her2抗体的scFv与抗CD3抗体的融合蛋白
<400> 73
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
115 120 125
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
180 185 190
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220
Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn

260 265 270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320
Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
340 345 350
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
435 440 445
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr
450 455 460
Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met
465 470 475 480
Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met
485 490 495
Leu Cys Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His
500 505 510
Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn
515 520 525
Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser
530 535 540
Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe
545 550 555 560
Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn
565 570 575

Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580 585 590

<210> 74

<211> 595

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<230> 抗Her2抗体的scFv与抗CD3抗体的融合蛋白

<400> 74

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
435 440 445
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Pro
450 455 460
Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
465 470 475 480
Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro
485 490 495
Lys Leu Thr Arg Met Leu Cys Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala
500 505 510
Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
515 520 525
Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro
530 535 540
Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly

545 550 555 560
Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile
565 570 575
Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser
580 585 590
Thr Leu Thr
595
<210> 75
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗 CD3 抗体
<400> 75
Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
115 120 125
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser
130 135 140
Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
145 150 155 160
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
165 170 175
Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
180 185 190
Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser

195 200 205
Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240
Glu Leu Lys
<210> 76
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 西妥昔单抗的VH区
<400> 76
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115
<210> 77
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 西妥昔单抗的VL区
<400> 77
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105
<210> 78
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 雷莫芦单抗的VH区
<400> 78
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Val Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115
<210> 79
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<230> 雷莫芦单抗的VL区
<400> 79
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asp Asn Trp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Lys Ala Phe Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105
<210> 80
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗Her-2单抗的VH区
<400> 80
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 81
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗Her-2单抗的VL区
<400> 81
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 82
<211> 496
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗Her2抗体的scFvs与抗CD3抗体的融合蛋白,带有突变
<400> 82
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
115 120 125
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
130 135 140
Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
145 150 155 160
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr
165 170 175
Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190
Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp
210 215 220
Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225 230 235 240
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala
245 250 255
Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser
260 265 270
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
275 280 285
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
290 295 300
Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp
305 310 315 320
Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
325 330 335
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys
340 345 350
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu
355 360 365
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp
370 375 380
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
385 390 395 400

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
405 410 415
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Cys
420 425 430
Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
435 440 445
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
450 455 460
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
465 470 475 480
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His His His His His
485 490 495
<210> 83
<211> 496
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> 抗Her2抗体的scFvs与抗CD3抗体的融合蛋白,带有突变
<400> 83
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Cys Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
115 120 125
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
130 135 140
Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
145 150 155 160

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

465 470 475 480
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His His His His His
485 490 495
<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> R2的序列
<400> 84
Leu Thr Pro Arg Leu Gly Pro Ala Ala Asn
1 5 10
<210> 85
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> R2的序列
<400> 85
Gly Pro Ala Ala Asn
1 5
<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<230> R2的序列
<400> 86
Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn
1 5
<210> 87
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<230> 正向引物
<400> 87
gaactccctc gatgttaacc a 21
<210> 88

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<230> 反向引物

<400> 88

ttcaatcccc aaatcctagc c 21

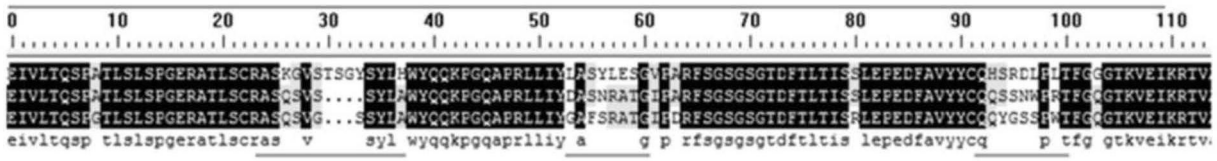

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
eivltqsp tlslspgeratlscras v syl wyqqkpgqaprlliy a g p rfsgsgsgtdftltis lepedfavyycq p tfg gtkveikrtv

图1

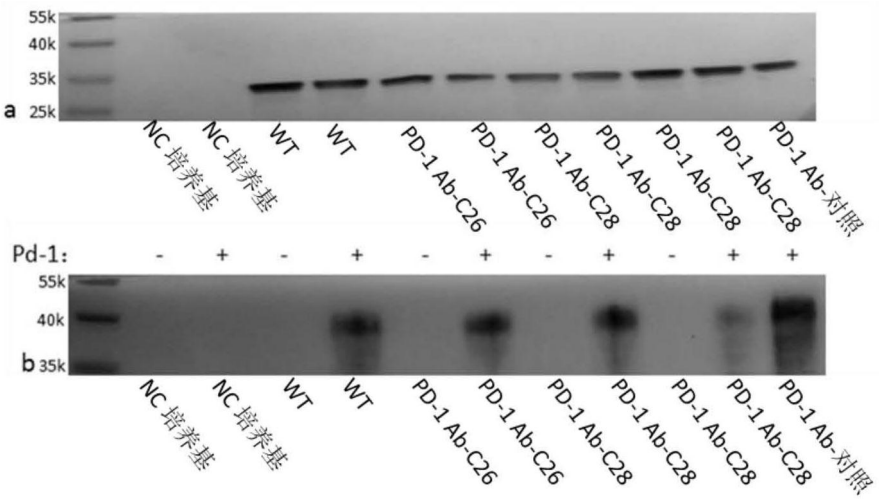

55k
40k
35k
a 25k
NC 培养基
NC 培养基
WT
WT
PD-1 Ab-C26
PD-1 Ab-C26
PD-1 Ab-C28
PD-1 Ab-C28
PD-1 Ab-C28
PD-1 Ab-C28
PD-1 Ab-对照
Pd-1: - + - + - + - + - + +
55k
40k
b 35k
NC 培养基
NC 培养基
WT
WT
PD-1 Ab-C26
PD-1 Ab-C26
PD-1 Ab-C28
PD-1 Ab-C28
PD-1 Ab-C28
PD-1 Ab-C28
PD-1 Ab-对照

图2

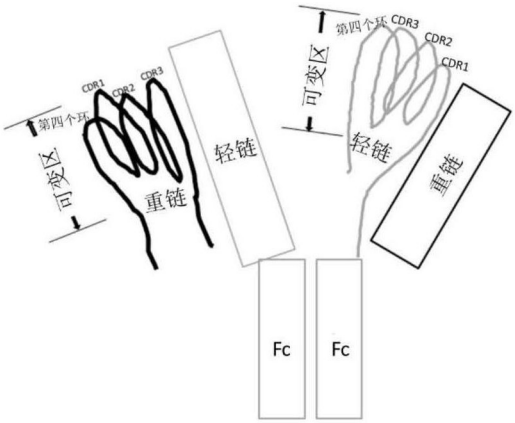

CDR1
CDR2
CDR3
第四个环
可变区
重链
轻链
第四个环
CDR3
CDR2
CDR1
可变区
轻链
重链
Fc
Fc

图3

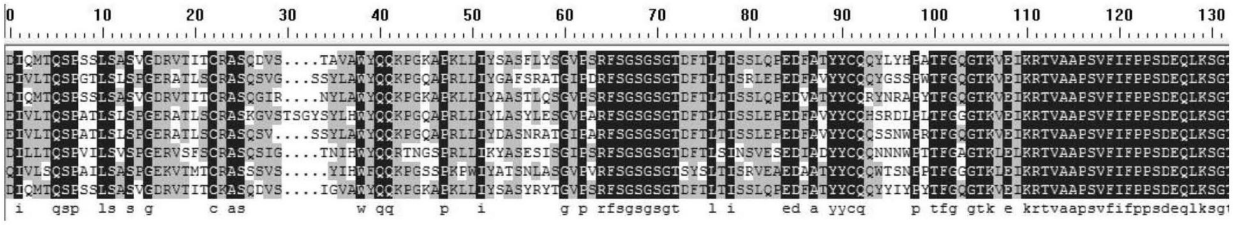


图4

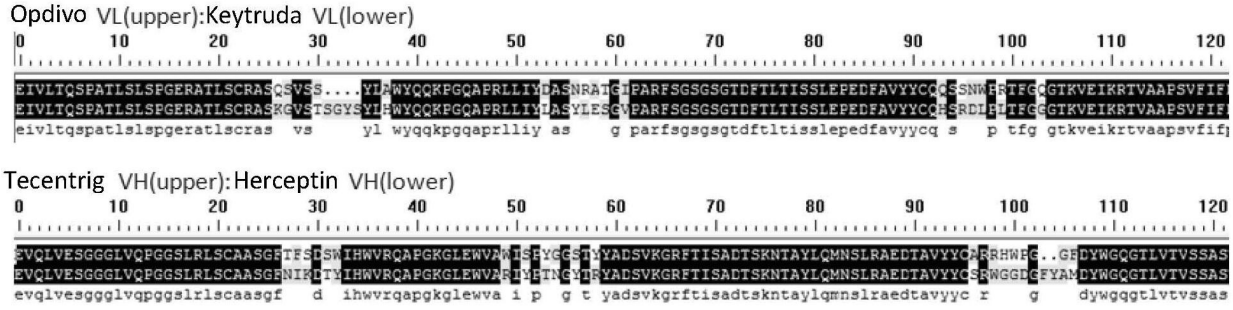

Opdivo VL(upper):Keytruda VL(lower)
Tecentrig VH(upper):Herceptin VH(lower)

图5

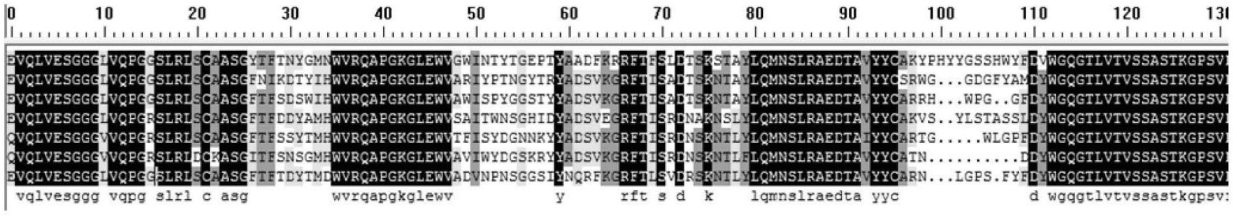


图6

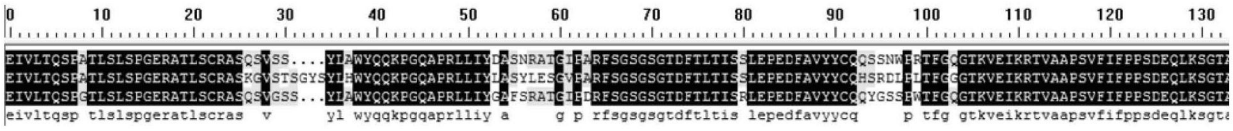


图7

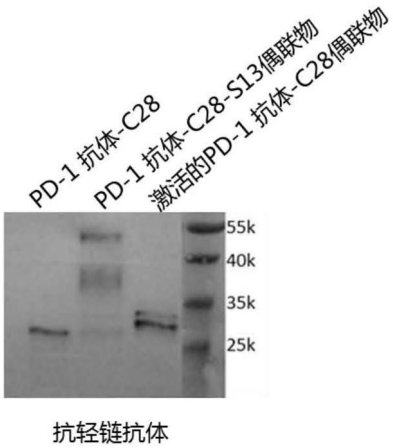

PD-1 抗体-C28
PD-1 抗体-C28-S13偶联物
激活的PD-1 抗体-C28偶联物
55k
40k
35k
25k
抗轻链抗体

图8

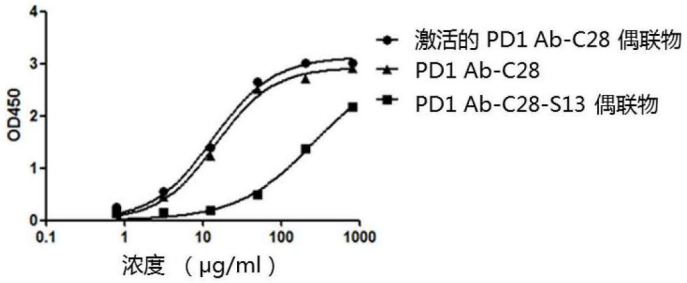

激活的 PD1 Ab-C28 偶联物
PD1 Ab-C28
PD1 Ab-C28-S13 偶联物
OD450
0
1
2
3
4
0.1
1
10
100
1000
浓度 （μg/ml）

图9

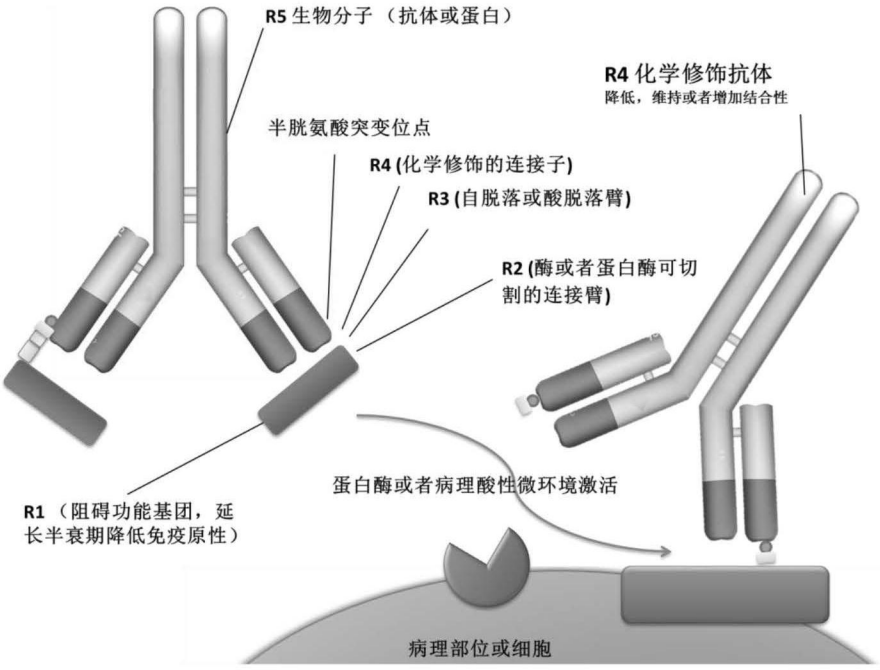

R5 生物分子（抗体或蛋白）
R4 化学修饰抗体
降低，维持或者增加结合性
半胱氨酸突变位点
R4 (化学修饰的连接子)
R3 (自脱落或酸脱落臂)
R2 (酶或者蛋白酶可切割的连接臂)
蛋白酶或者病理酸性微环境激活
R1 （阻碍功能基团，延长半衰期降低免疫原性）
病理部位或细胞

图10

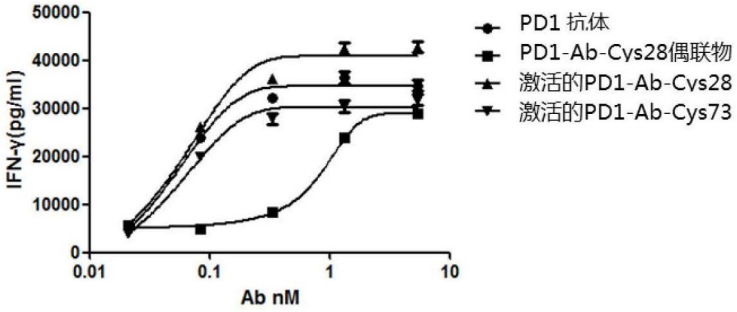

50000
40000
30000
20000
10000
0
IFN-γ(pg/ml)
0.01
0.1
1
10
Ab nM
PD1 抗体
PD1-Ab-Cys28偶联物
激活的PD1-Ab-Cys28
激活的PD1-Ab-Cys73

图11

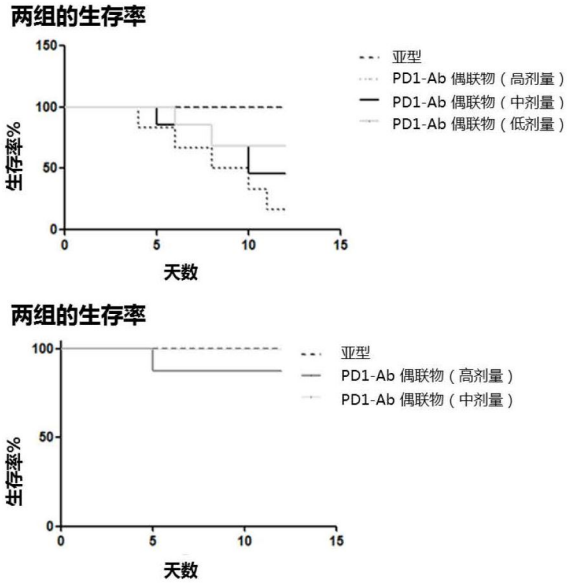

两组的生存率
150
100
50
0
生存率%
0
5
10
15
天数
亚型
PD1-Ab 偶联物（高剂量）
PD1-Ab 偶联物（中剂量）
PD1-Ab 偶联物（低剂量）
两组的生存率
100
50
0
生存率%
0
5
10
15
天数
亚型
PD1-Ab 偶联物（高剂量）
PD1-Ab 偶联物（中剂量）

图12

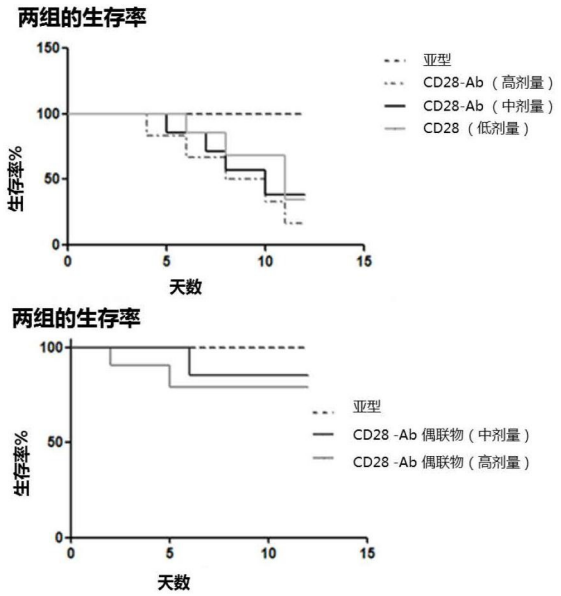

两组的生存率
150
100
50
0
生存率%
0
5
10
15
天数
亚型
CD28-Ab（高剂量）
CD28-Ab（中剂量）
CD28（低剂量）
两组的生存率
100
50
0
生存率%
0
5
10
15
天数
亚型
CD28 -Ab 偶联物（中剂量）
CD28 -Ab 偶联物（高剂量）

图13

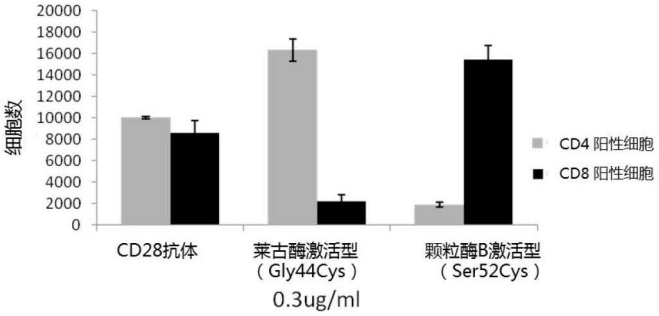

20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
细胞数
CD28抗体
莱古酶激活型
（Gly44Cys）
颗粒酶B激活型
（Ser52Cys）
0.3ug/ml
CD4 阳性细胞
CD8 阳性细胞

图14

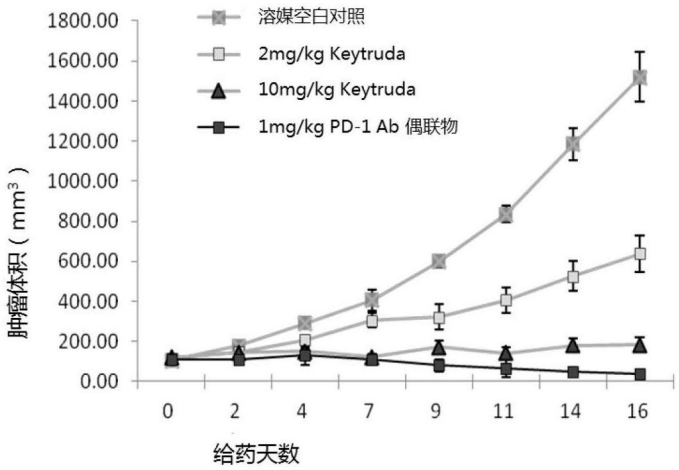

1800.00
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
肿瘤体积（mm³）
0
2
4
7
9
11
14
16
给药天数
溶媒空白对照
2mg/kg Keytruda
10mg/kg Keytruda
1mg/kg PD-1 Ab 偶联物

图15

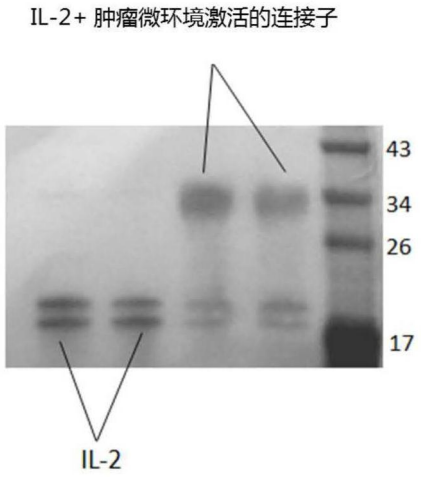

IL-2+ 肿瘤微环境激活的连接子
43
34
26
17
IL-2

图16

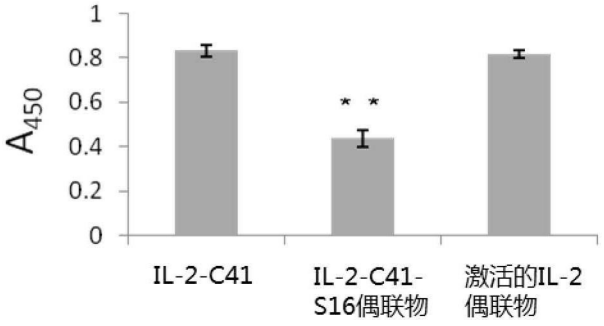

1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
A450
* *
IL-2-C41
IL-2-C41-S16偶联物
激活的IL-2偶联物

图17

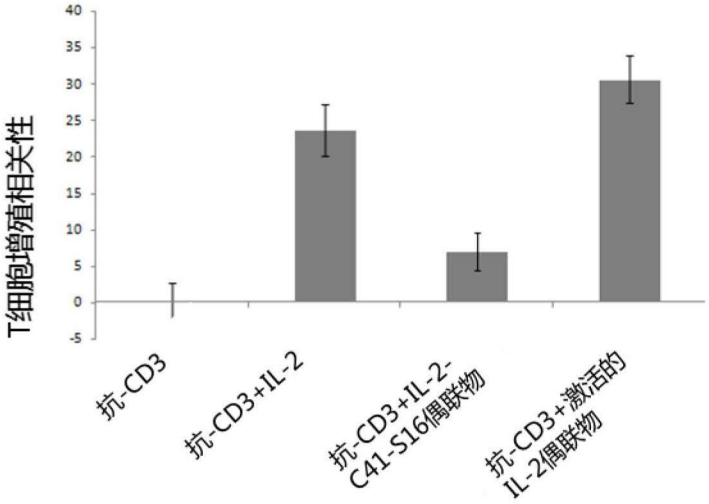

40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
T细胞增殖相关性
抗-CD3
抗-CD3+IL-2
抗-CD3+IL-2-C41-S16偶联物
抗-CD3+激活的IL-2偶联物

图18

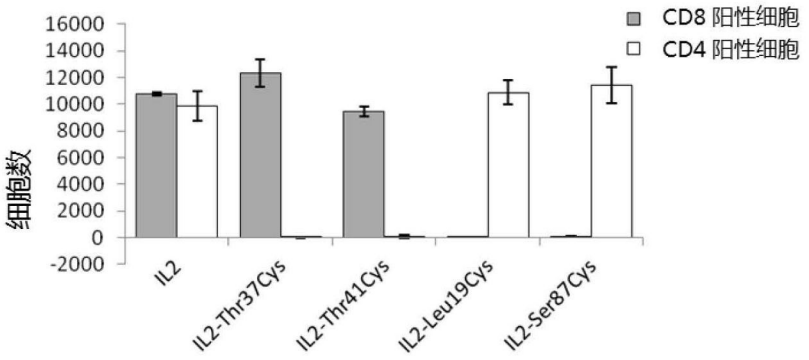

CD8 阳性细胞
CD4 阳性细胞
细胞数
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
IL2
IL2-Thr37Cys
IL2-Thr41Cys
IL2-Leu19Cys
IL2-Ser87Cys

图19

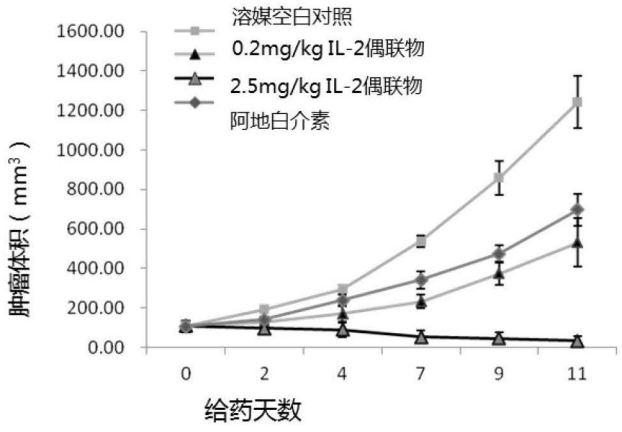

溶媒空白对照
0.2mg/kg IL-2偶联物
2.5mg/kg IL-2偶联物
阿地白介素
肿瘤体积（mm³）
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
0
2
4
7
9
11
给药天数

图20

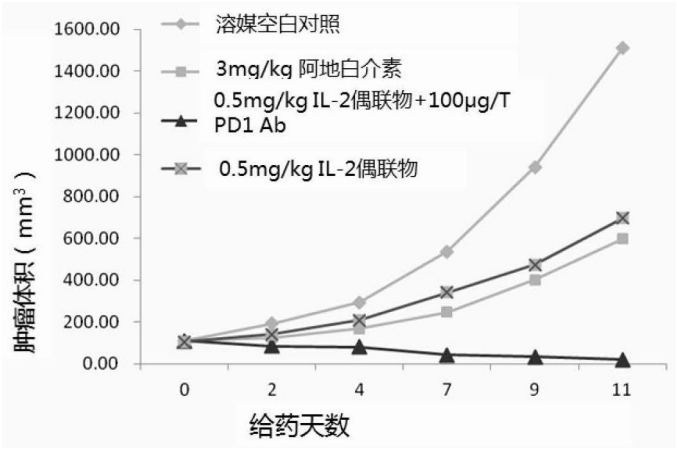

溶媒空白对照
3mg/kg 阿地白介素
0.5mg/kg IL-2偶联物+100μg/T PD1 Ab
0.5mg/kg IL-2偶联物
肿瘤体积（mm³）
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
0
2
4
7
9
11
给药天数

图21

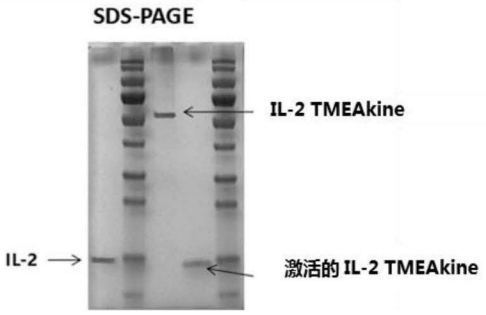

SDS-PAGE
IL-2 TMEAkine
IL-2
激活的 IL-2 TMEAkine

图22

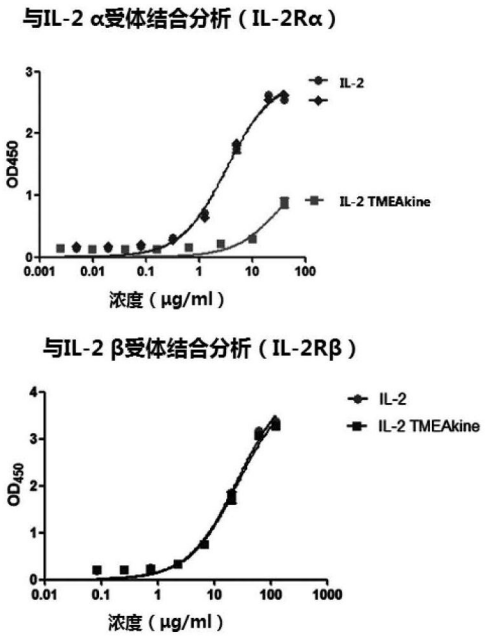

与IL-2 α受体结合分析（IL-2Rα）
OD450
IL-2
IL-2 TMEAkine
浓度（μg/ml）
与IL-2 β受体结合分析（IL-2Rβ）
OD450
IL-2
IL-2 TMEAkine
浓度（μg/ml）

图23

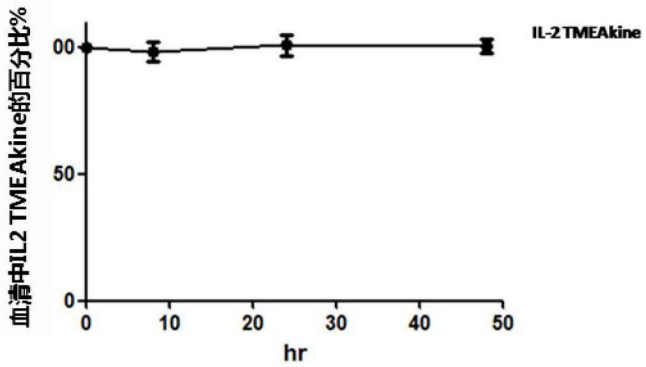

血清中IL2 TMEAkine的百分比%
IL-2 TMEAkine
hr

图24

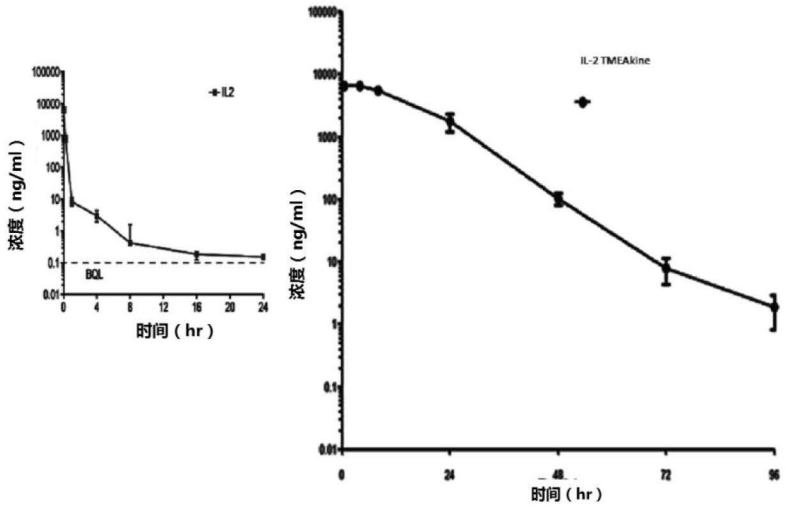

IL2
浓度（ng/ml）
BQL
时间（hr）
IL-2 TMEAkine
浓度（ng/ml）
时间（hr）

图25

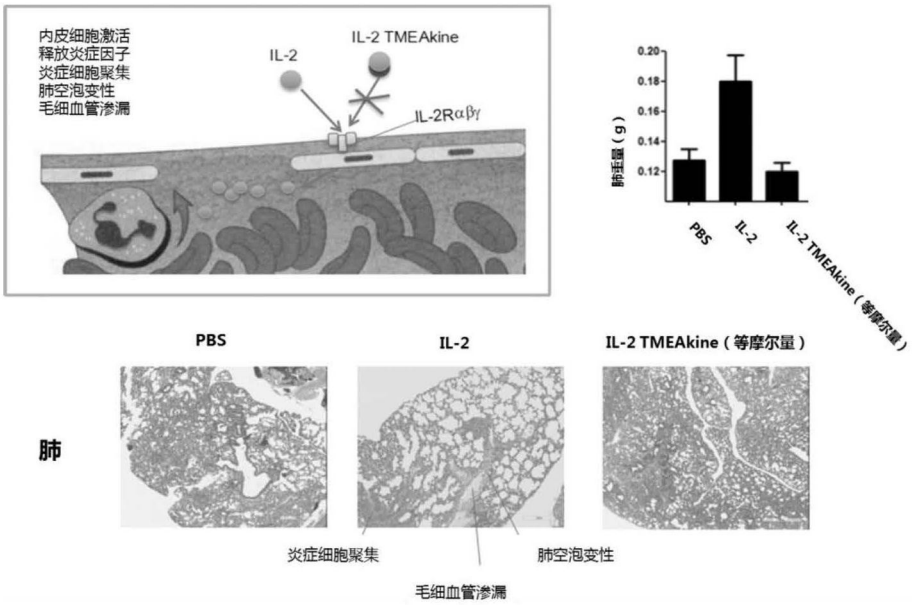

内皮细胞激活
释放炎症因子
炎症细胞聚集
肺空泡变性
毛细血管渗漏
IL-2
IL-2 TMEAkine
IL-2Rαβγ
肺重量（g）
PBS
IL-2
IL-2 TMEAkine（等摩尔量）
PBS
IL-2
IL-2 TMEAkine（等摩尔量）
肺
炎症细胞聚集
肺空泡变性
毛细血管渗漏

图26

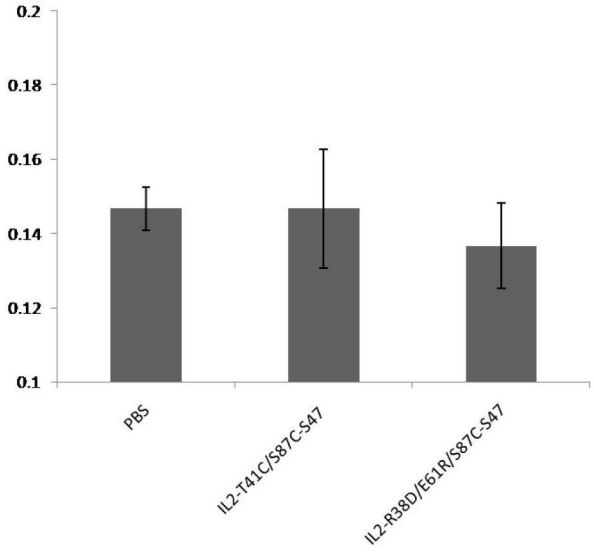
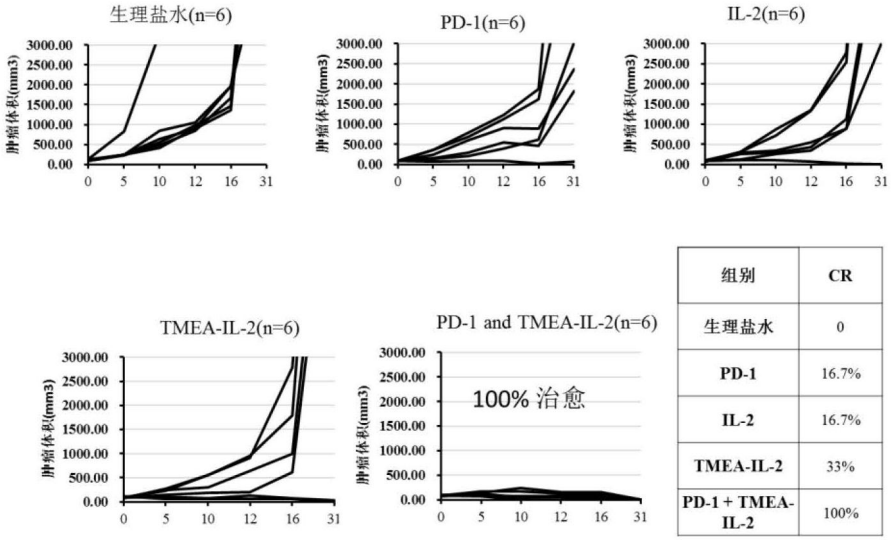


图27



组别	CR
生理盐水	0
PD-1	16.7%
IL-2	16.7%
TMEA-IL-2	33%
PD-1 + TMEA-IL-2	100%

图28

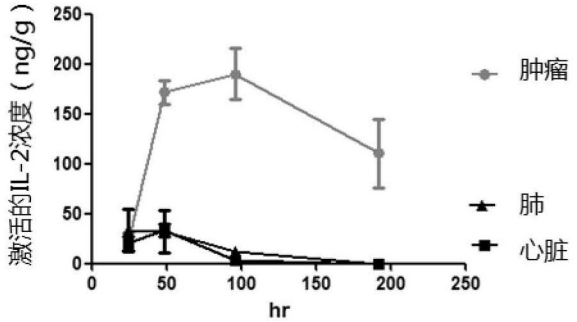


图29

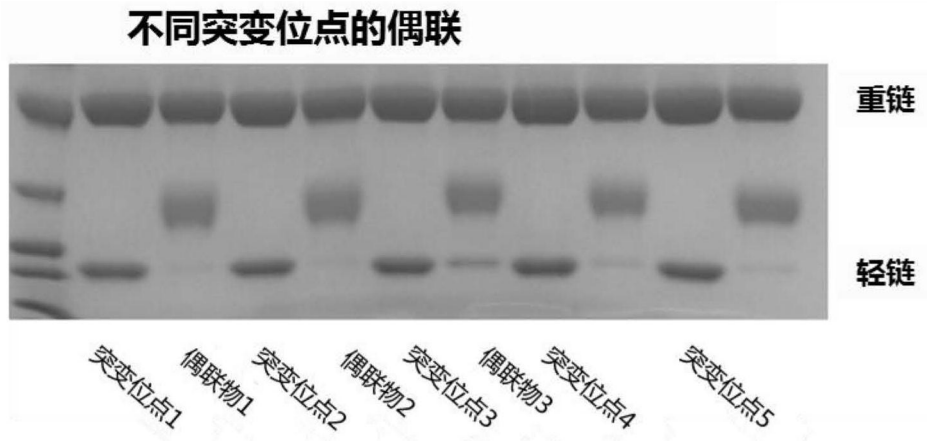

不同突变位点的偶联
重链
轻链
突变位点1
偶联物1
突变位点2
偶联物2
突变位点3
偶联物3
突变位点4
突变位点5

图30

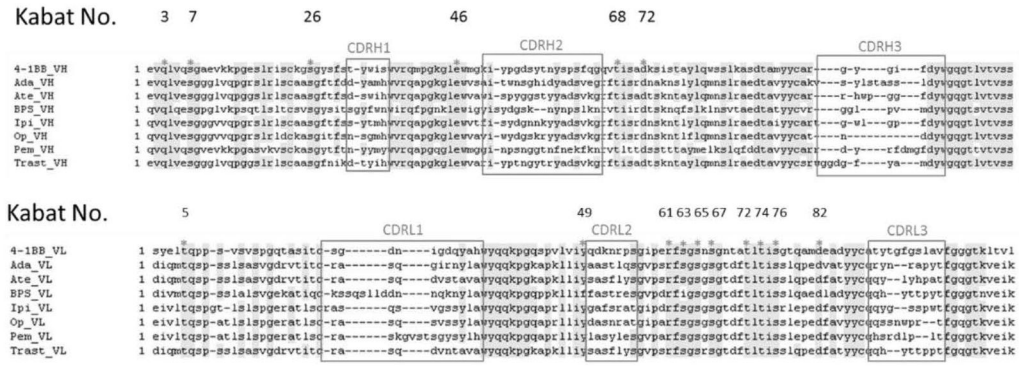

Kabat No.
CDRH1
CDRH2
CDRH3
4-1BB_VH
Ada_VH
Ate_VH
BPS_VH
Ipi_VH
Op_VH
Pem_VH
Trast_VH
Kabat No.
CDRL1
CDRL2
CDRL3
4-1BB_VL
Ada_VL
Ate_VL
BPS_VL
Ipi_VL
Op_VL
Pem_VL
Trast_VL

图31

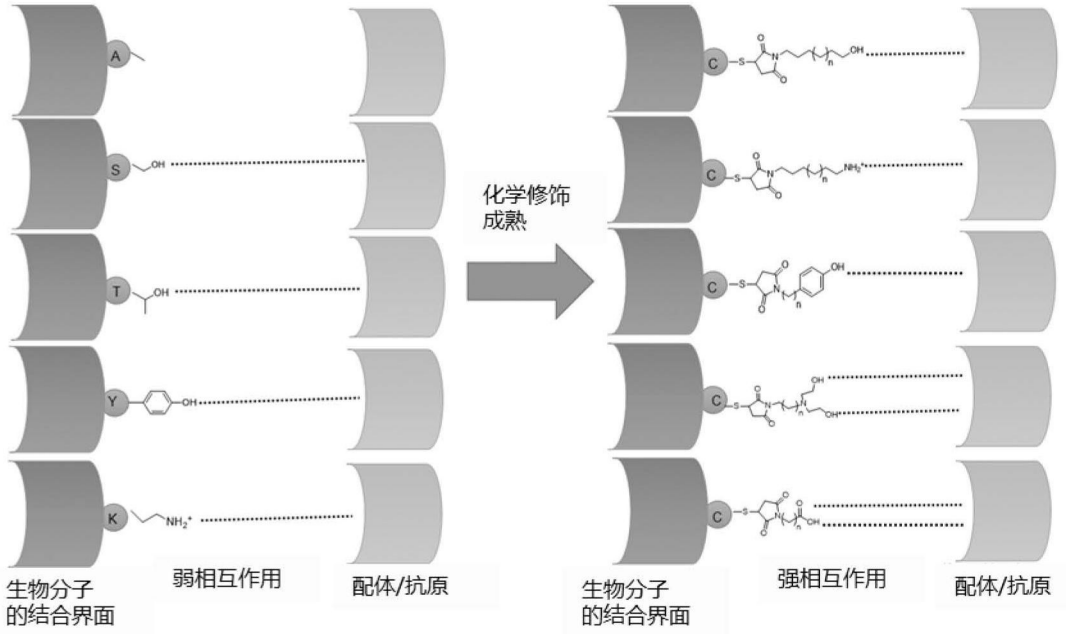

化学修饰
成熟
生物分子
的结合界面
弱相互作用
配体/抗原
生物分子
的结合界面
强相互作用
配体/抗原

图32

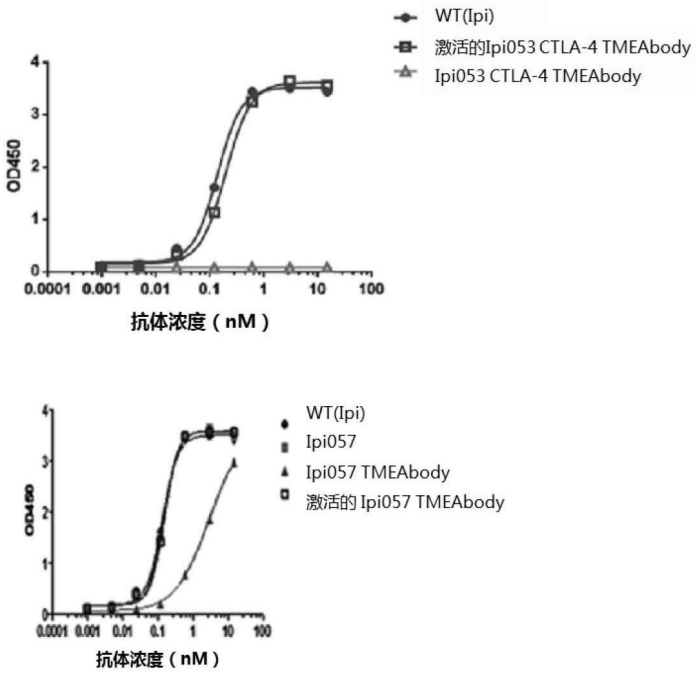

WT(Ipi)
激活的Ipi053 CTLA-4 TMEAbody
Ipi053 CTLA-4 TMEAbody
OD450
抗体浓度（nM）
WT(Ipi)
Ipi057
Ipi057 TMEAbody
激活的 Ipi057 TMEAbody
抗体浓度（nM）

图33

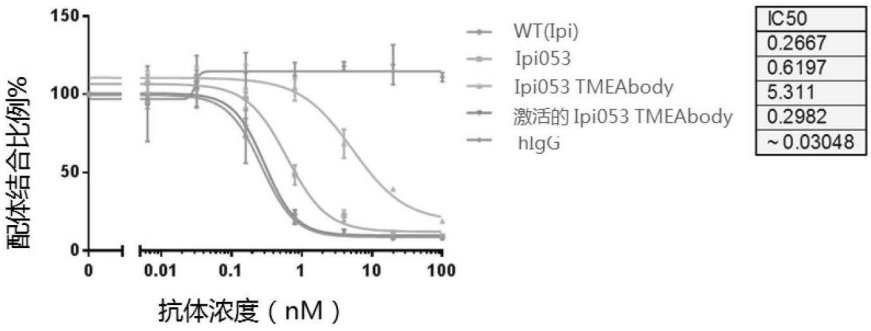

150
100
50
0
配体结合比例%
0
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度（nM）
WT(Ipi)
Ipi053
Ipi053 TMEAbody
激活的 Ipi053 TMEAbody
hIgG
IC50
0.2667
0.6197
5.311
0.2982
~0.03048

图34

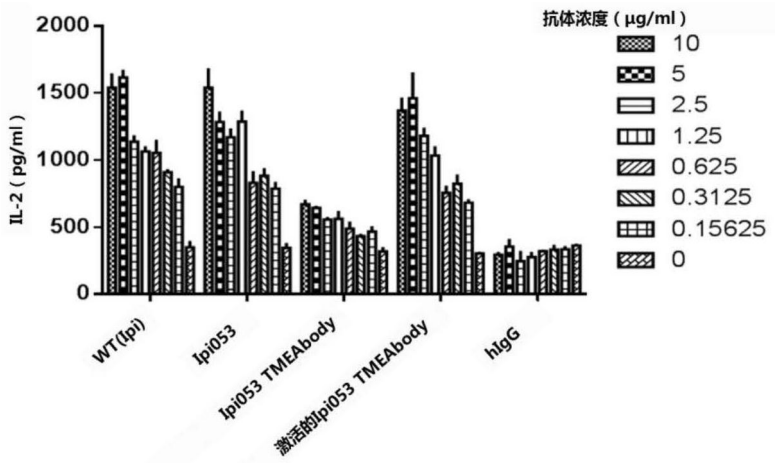

2000
1500
1000
500
0
IL-2（pg/ml）
抗体浓度（μg/ml）
10
5
2.5
1.25
0.625
0.3125
0.15625
0
WT(Ipi)
Ipi053
Ipi053 TMEAbody
激活的Ipi053 TMEAbody
hIgG

图35

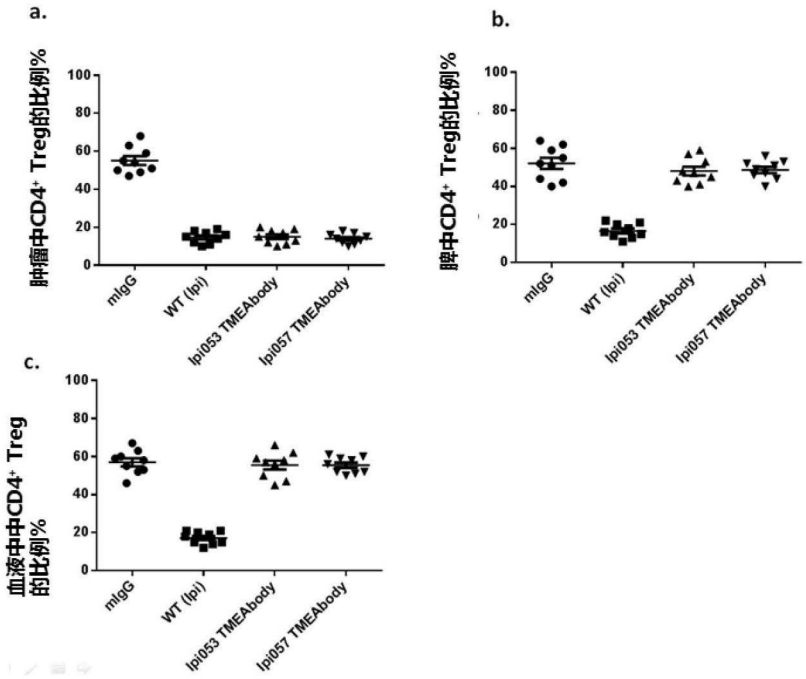

a.
肿瘤中CD4+ Treg的比例%
100
80
60
40
20
0
mIgG
WT (Ipi)
Ipi053 TMEAbody
Ipi057 TMEAbody
b.
脾中CD4+ Treg的比例%
100
80
60
40
20
0
mIgG
WT (Ipi)
Ipi053 TMEAbody
Ipi057 TMEAbody
c.
血液中中CD4+ Treg
的比例%
100
80
60
40
20
0
mIgG
WT (Ipi)
Ipi053 TMEAbody
Ipi057 TMEAbody

图36

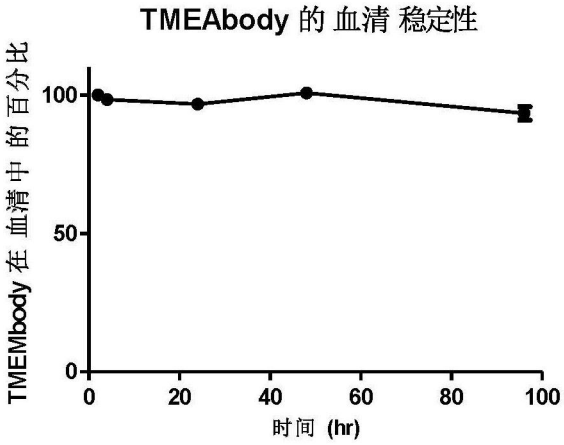

TMEAbody 的 血清 稳定性
TMEMbody 在 血清 中 的 百分比
100
50
0
0
20
40
60
80
100
时间 (hr)

图37

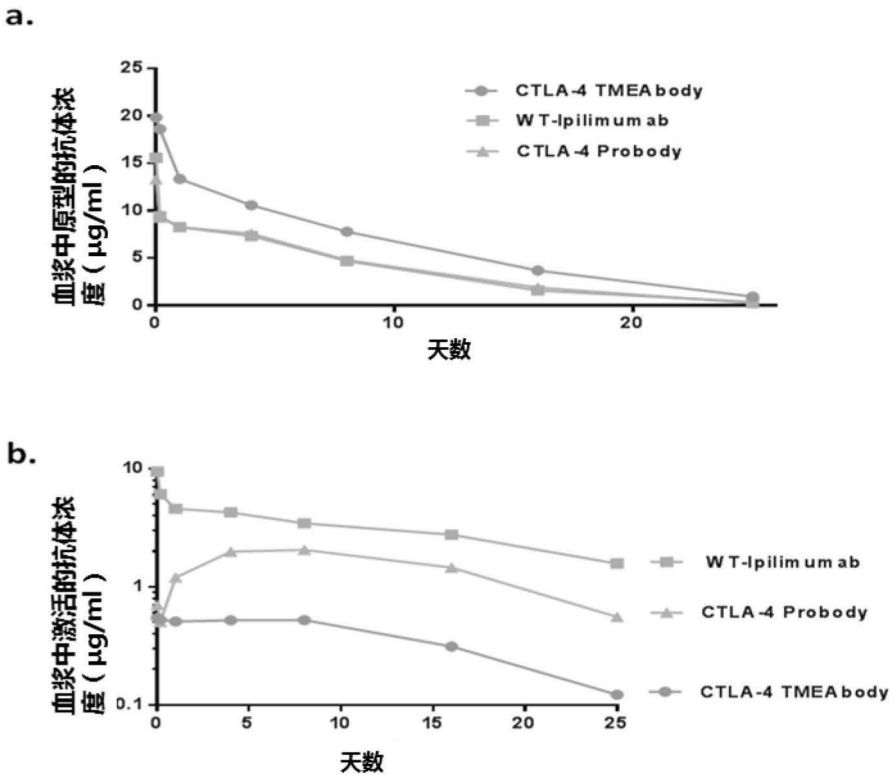

a.
血浆中原型的抗体浓度（μg/ml）
天数
CTLA-4 TMEAbody
WT-Ipilimumab
CTLA-4 Probody
b.
血浆中激活的抗体浓度（μg/ml）
天数
WT-Ipilimumab
CTLA-4 Probody
CTLA-4 TMEAbody

图38

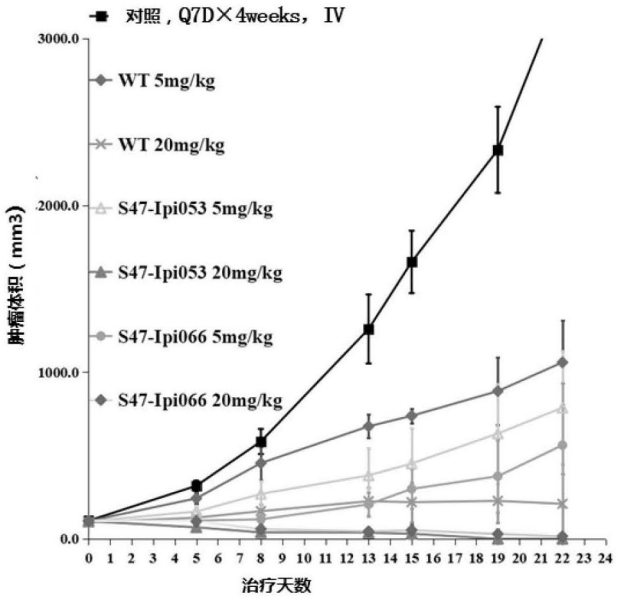

对照，Q7D×4weeks，IV
WT 5mg/kg
WT 20mg/kg
S47-Ipi053 5mg/kg
S47-Ipi053 20mg/kg
S47-Ipi066 5mg/kg
S47-Ipi066 20mg/kg
肿瘤体积（mm3）
治疗天数

图39

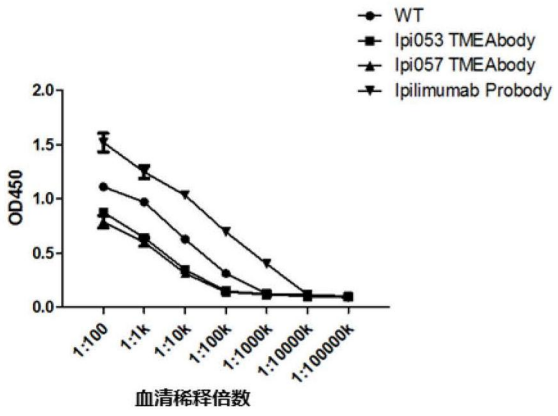

WT
Ipi053 TMEAbody
Ipi057 TMEAbody
Ipilimumab Probody
OD450
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1:100
1:1k
1:10k
1:100k
1:1000k
1:10000k
1:100000k
血清稀释倍数

图40

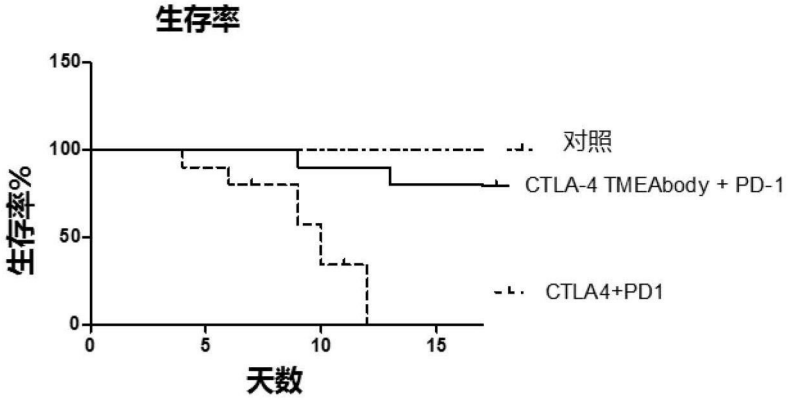

生存率
150
100
50
0
生存率%
对照
CTLA-4 TMEAbody + PD-1
CTLA4+PD1
0
5
10
15
天数

图41

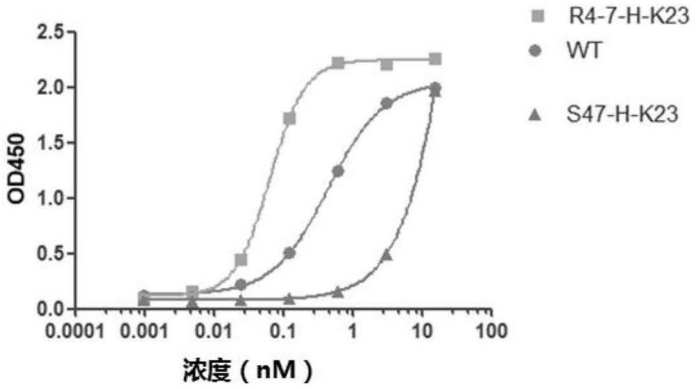

R4-7-H-K23
WT
S47-H-K23
OD450
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度（nM）

图42

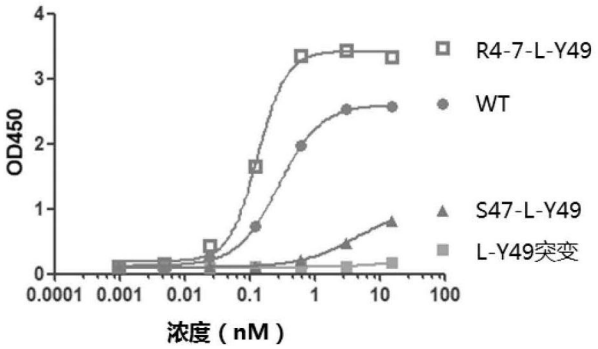

OD450
浓度（nM）
R4-7-L-Y49
WT
S47-L-Y49
L-Y49突变

图43

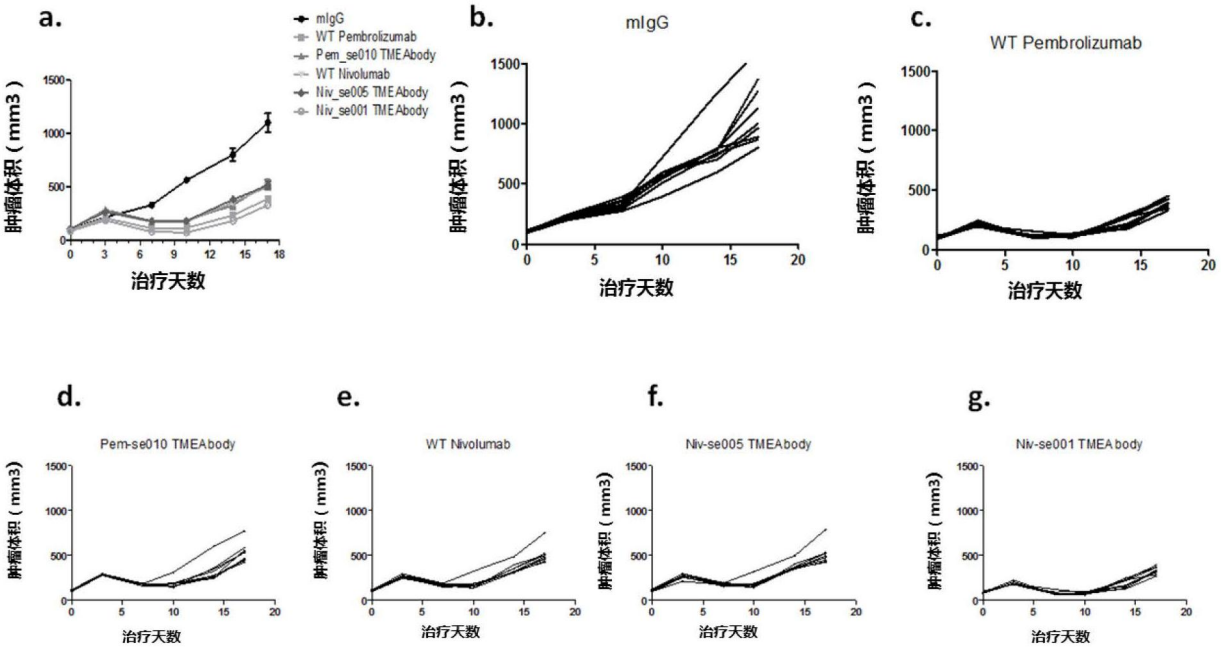

a.
mIgG
WT Pembrolizumab
Pem_se010 TMEAbody
WT Nivolumab
Niv_se005 TMEAbody
Niv_se001 TMEAbody
肿瘤体积（mm3）
治疗天数
b.
mIgG
c.
WT Pembrolizumab
d.
Pem-se010 TMEAbody
e.
WT Nivolumab
f.
Niv-se005 TMEAbody
g.
Niv-se001 TMEAbody

图44

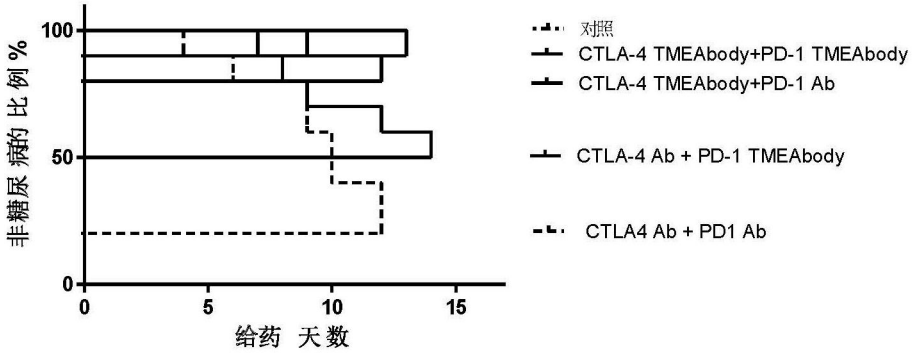

非糖尿病的比例 %
给药 天数
对照
CTLA-4 TMEAbody+PD-1 TMEAbody
CTLA-4 TMEAbody+PD-1 Ab
CTLA-4 Ab + PD-1 TMEAbody
CTLA4 Ab + PD1 Ab

图45

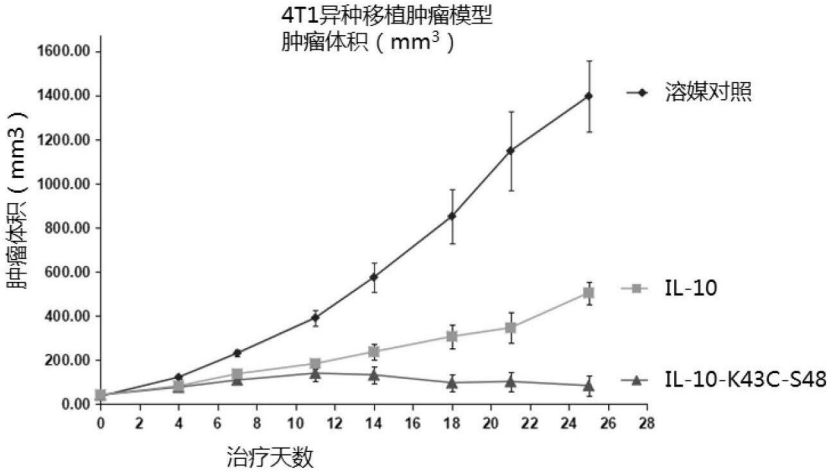

4T1异种移植肿瘤模型
肿瘤体积（mm³）
肿瘤体积（mm3）
1600.00
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28
治疗天数
溶媒对照
IL-10
IL-10-K43C-S48

图46