



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114437227 A

(43) 申请公布日 2022.05.06

(21) 申请号 202111306428.5	A61P 29/00 (2006.01)
(22) 申请日 2021.11.05	A61P 31/00 (2006.01)
(66) 本国优先权数据	A61P 35/00 (2006.01)
202011232115.5 2020.11.06 CN	A61P 35/02 (2006.01)

(71) 申请人 百奥泰生物制药股份有限公司  
 地址 510530 广东省广州市广州高新技术产业开发区科学城开源大道11号A6栋第五层

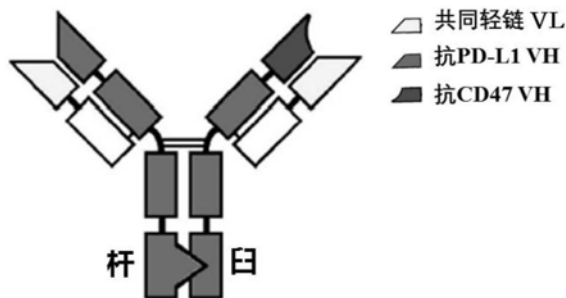
(72) 发明人 陈奕藩 梁秋莲 裴树军 俞金泉  
 李胜峰

(51) Int. Cl.  
 C07K 16/46 (2006.01)  
 C12N 15/13 (2006.01)  
 A61K 39/395 (2006.01)  
 A61P 37/02 (2006.01)

权利要求书3页 说明书59页  
 序列表46页 附图11页

(54) 发明名称  
 双特异抗体及其应用

(57) 摘要  
 本发明提供了双特异抗体及其应用,本发明的双特异抗体或抗原结合片段可以结合两个或更多个抗原,或同一抗原的两个或更多个表位。本发明抗体或抗原结合片段可以用于治疗各种疾病,比如炎症性疾病、自身免疫性疾病、癌症或脊髓损伤,也可以用于相关疾病的诊断和预后。



1. 一种双特异抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段包含特异性结合PD-L1的可变区a;其中,所述可变区a包含(a)-(f)中一种或多种氨基酸序列:

- (a) VHa CDR1,其包含如SEQ ID NO:4-8中任一项所示的氨基酸序列;
- (b) VHa CDR2,其包含如SEQ ID NO:9-18中任一项所示的氨基酸序列;
- (c) VHa CDR3,其包含如SEQ ID NO:19或20所示的氨基酸序列;
- (d) VL a CDR1,其包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;
- (e) VL a CDR2,其包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;
- (f) VL a CDR3,其包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述可变区a包含所述VHa CDR1、VHa CDR2、VHa CDR3、VL a CDR1、VL a CDR2和VL a CDR3。

3. 如权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;所述VHa CDR2包含如SEQ ID NO:9-14中任一项所示的氨基酸序列;所述VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列;或

所述VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;所述VHa CDR2包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列;所述VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列;所述VL a CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列;所述VL a CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列;所述VL a CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段还包含特异性结合CD47的可变区b;其中,所述可变区b包含(g)-(l)中一种或多种氨基酸序列:

- (g) VHb CDR1,其包含如SEQ ID NO:21-23中任一项所示的氨基酸序列;
- (h) VHb CDR2,其包含如SEQ ID NO:24-28中任一项所示的氨基酸序列;
- (i) VHb CDR3,其包含如SEQ ID NO:29-35中任一项所示的氨基酸序列;
- (j) VLb CDR1,其包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;
- (k) VLb CDR2,其包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;
- (l) VLb CDR3,其包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列。

5. 如权利要求4所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述可变区b包含所述VHb CDR1、VHb CDR2、VHb CDR3、VLb CDR1、VLb CDR2和VLb CDR3。

6. 如权利要求4所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述VHb CDR1包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列;所述VHb CDR2包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;所述VHb CDR3包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列;所述VLb CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列;所述VLb CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列;所述VLb CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述VL a CDR1与所述VLb CDR1包含相同的氨基酸序列,所述VL a CDR2与所述VLb CDR2包含相同的氨基酸序列,和/或所述VL a CDR3与所述VLb CDR3包含相同的氨基酸序列。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述可变区a包含重链可变区VHa和轻链可变区VL a;其中,

所述VHa包含如SEQ ID NO:49-63中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:49-63

中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;和/或

所述VL<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

9.如权利要求1-8中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,

所述VH<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;和/或

所述VL<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

10.如权利要求1-9中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述可变区b包含重链可变区VH<sub>b</sub>和轻链可变区VL<sub>b</sub>;其中,

所述VH<sub>b</sub>包含如SEQ ID NO:64-74中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64-74中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;和/或

所述VL<sub>b</sub>包含如SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

11.如权利要求1-9中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述VH<sub>b</sub>包含如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;和/或

所述VL<sub>b</sub>包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

12.如权利要求1-11任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述VL<sub>a</sub>与所述VL<sub>b</sub>包含相同的氨基酸序列。

13.如权利要求1-12任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段还包含重链恒定区a和重链恒定区b,所述重链恒定区a和所述重链恒定区b分别与重链可变区a和重链可变区b连接,所述重链恒定区a和/或所述重链恒定区b包含如下一种或多种氨基酸突变,其中氨基酸位置为Eu编号:

Y349C、S354C、T366W、T366S、L368A以及Y407V;

可选的还包含如下氨基酸突变:N297A。

14.如权利要求13所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述重链恒定区a和重链恒定区b之一包含如下一种或多种氨基酸突变:

N297A、S354C以及T366W;和/或

另一个重链恒定区包含如下一种或多种氨基酸突变:

N297A、Y349C、T366S、L368A以及Y407V。

15.如权利要求13所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述其中一个重链恒定区包含如SEQ ID NO:81、83或85所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、83或85所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;和/或另一个重链恒定区包含如SEQ ID NO:81、84或86所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、84或86所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

16.一种双特异抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段包含一条重链a、一条重链b以及两条相同的轻链;所述重链a和一条所述轻链配对形成PD-L1抗原结

合位点,所述重链b和另一条所述轻链配对形成CD47抗原结合位点。

17. 如权利要求16所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述重链a包含如SEQ ID NO:92或94所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:92或94所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;所述重链b包含如SEQ ID NO:93或95所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:93或95所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;所述轻链包含如SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

18. 一种多聚核苷酸,其特征在于,所述多聚核苷酸编码如权利要求1-15任一项所述的抗体或抗原结合片段;或,

一种表达载体,其特征在于,所述表达载体包含编码如权利要求1-17任一项所述的抗体或抗原结合片段的多聚核苷酸;或,

一种细胞,其特征在于,所述细胞包含编码如权利要求1-17任一项所述的抗体或抗原结合片段的多聚核苷酸。

19. 一种组合物,其特征在于,所述组合物包含如权利要求1-17任一项所述的抗体或抗原结合片段、如权利要求18所述的多聚核苷酸、表达载体或细胞,以及药学上可接受的载体。

20. 权利要求1-17任一项所述的抗体或抗原结合片段、如权利要求18所述的多聚核苷酸、表达载体或细胞或如权利要求19所述的组合物在制备治疗疾病的药物中的应用。

## 双特异抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,尤其涉及双特异抗体及其应用。

### 背景技术

[0002] 癌症免疫疗法是近年来癌症治疗上的革命性突破,是生物科学领域的研究热潮,随着更多的抗体新药批准上市,已将癌症治疗的前景从传统疗法的补充要素转变为中心和标准的癌症治疗方案。在以免疫检查点(Checkpoint)为靶点,激活T细胞功能,从而提高获得性免疫系统能力来攻克癌症这一道路上,围绕PD-L1/PD-1途径开发抗体疗法,已成为本领域的热点。当机体发生炎症或是受到感染时,程序性死亡配体1(Programmed death-ligand 1,PD-L1)能够被诱导表达在造血、内皮或上皮细胞上,通过结合到表达于T细胞、B细胞和单核细胞上的程序性死亡受体1(Programmed death 1,PD-1)来抑制免疫应答。PD-1胞质区含有两个基于酪氨酸的信号转导结构域ITIM(免疫受体酪氨酸抑制基序)和ITSM(免疫受体酪氨酸转换基序)。PD-L1在许多癌症中过表达,所述癌症包括多种多样的实体瘤以及血液瘤,诸如膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、胃癌、甲状腺癌、原发性纵膈大B细胞淋巴瘤和典型霍奇金淋巴瘤。过表达在肿瘤细胞上的PD-L1,与T细胞上的PD-1结合,激活PD-1的ITIM结构域,导致T细胞功能障碍和衰竭,阻止细胞毒性T细胞有效地靶向肿瘤细胞,向免疫系统发出“don't find me”信号,使肿瘤细胞获得适应性免疫耐受,从而促进肿瘤侵袭,造成不良的预后。

[0003] 固有免疫系统是抵御感染和恶性细胞转化的第一道非特异性防线。在固有免疫系统中,单核细胞、巨噬细胞以及树突状细胞通过吞噬作用(phagocytosis),起抗原提呈细胞(antigen presenting cells,APCs)的作用。而APCs通过吞噬作用吞没肿瘤细胞的能力是连接先天免疫和适应性免疫不可或缺的桥梁。靶向调节吞噬作用的检查点(Phagocytosis checkpoints,如CD47-SIRPα),提供了一条开发癌症免疫疗法的新途径。CD47(integrin associated protein,IAP,CD47)在正常细胞表面广泛表达,通过与巨噬细胞表面的SIRPα(Signal regulatory proteinα,SIRPα)结合,释放一种“don't eat me”的信号,从而保护健康细胞不被巨噬细胞“吃掉”。癌细胞利用这一机制,在其表面过量表达CD47,使巨噬细胞把它们当作“正常细胞”,从而逃脱固有免疫的监控,逃避巨噬细胞介导的吞噬攻击。已有研究证实,几乎所有的肿瘤细胞都高表达CD47,诸如甲状腺癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫颈癌、膀胱癌、头颈癌、胃癌、急性髓细胞性白血病、B细胞和T细胞急性白血病、非霍奇金淋巴瘤等,且CD47过表达与临床预后差有关。

[0004] 单抗免疫疗法为部分患者带来了持久的生存益处,实现了患者治愈的希望。随着对癌症和其他多种疾病的深入研究,认识到疾病的发生和发展由多种信号通路和机制参与,而单抗单一的刺激或抑制无法达到彻底杀伤肿瘤的效果,使得单药治疗响应率有限。双特异抗体(bispecific monoclonal antibody,BsAb)能够同时结合两个抗原或一个抗原的两个不同表位,阻断或激活不同的信号通路,更有效地介导免疫细胞对肿瘤细胞杀伤,因此可能会获得比单抗甚至联合用药更好的治疗效果。随着抗体药物研发技术的飞速发展,双

特异抗体也迎来研发热潮,已有多个双特异抗体处于临床开发阶段,有3个双特异抗体已获批上市。2009年,欧盟批准了第一个治疗性双特异抗体——Catumaxomab(靶向CD3和EpCAM),其结构为Triomab,用于治疗癌性腹水。与单抗相比,双特异抗体具有特异性高、靶向性强、用量少等优点,不仅在肿瘤的临床治疗中意义重大,在炎症性疾病治疗中也取得突破,具有非常广阔的应用前景。

[0005] 根据已有知识可知,PD-L1与CD47蛋白同时过表达在肿瘤细胞上,通过PD-L1/PD1与CD47/SIRP $\alpha$ 通路,逃避固有免疫系统监控,获得适应性免疫耐受。因此,同时阻抗PD-L1/PD1和CD47/SIRP $\alpha$ 通路,激活固有免疫和适应性免疫系统,将可能发挥更好的抑制肿瘤效果。

## 发明内容

[0006] 本发明提供了多价和多特异抗体或抗原结合片段及其应用。本发明提供了新的与PD-L1的结合更优且成药性好的抗PD-L1抗体。此外,本发明提供了新的不与人红细胞结合,不引起人红细胞凝集,具有良好的靶点特异性,且副作用较小的抗CD47抗体。此外,本发明采用了具有共同轻链的“杆入臼”(Knobs-into-holes)对称IgG样双特异抗体结构,实现不同重链以及轻链的正确装配,增加双特异抗体的产率,易于在体外的培养细胞中稳定表达,不需要复杂的生产工艺。此外,本发明采用的双特异抗体结构能够保持各抗原结合位点与相应的不同表位结合的亲和力,且在结合不同表位的时候不会互相干扰结合,具有好的成药性。进一步地,本发明的双特异抗体具有稳定的物理和生物学性质,这允许该抗体具有更好的生产性和可开发性。

[0007] 在一些实施方案中,本发明提供了双特异抗体或抗原结合片段。本发明提供的抗体或抗原结合片段可以结合两个或更多个抗原,或同一抗原的两个或更多个表位,或同一表位的两个或更多个拷贝。

[0008] 在一些实施方案中,本发明提供了一种双特异抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含特异性结合PD-L1的可变区a;其中,所述可变区a包含(a)-(f)中一种或多种氨基酸序列:

[0009] (a) VHa CDR1,其包含如SEQ ID NO:4-8中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4-8任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0010] (b) VHa CDR2,其包含如SEQ ID NO:9-18中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9-14中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0011] (c) VHa CDR3,其包含如SEQ ID NO:19或20所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19或20所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0012] (d) VL $\alpha$  CDR1,其包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0013] (e) VL $\alpha$  CDR2,其包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0014] (f) VL $\alpha$  CDR3,其包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ

ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方案中,所述可变区a包含重链可变区a(VHa),所述重链可变区a包含VHa CDR1、VHa CDR2、VHa CDR3;其中VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4-8中任一项所示的氨基酸序列;VHa CDR2包含如SEQ ID NO:9-18中任一项所示的氨基酸序列;VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19或20所示的氨基酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,所述可变区a包含轻链可变区a(VLa),所述轻链可变区a包含VLa CDR1、VLa CDR2和VLa CDR3;其中VLa CDR1包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;VLa CDR2包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;VLa CDR3包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方案中,所述可变区a包含VHa和VLa;所述VHa包含VHa CDR1、VHa CDR2、VHa CDR3;所述VLa包含VLa CDR1、VLa CDR2和VLa CDR3。其中,VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4-8中任一项所示的氨基酸序列;VHa CDR2包含如SEQ ID NO:9-18中任一项所示的氨基酸序列;VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19或20所示的氨基酸序列;VLa CDR1包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;VLa CDR2包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;VLa CDR3包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,所述VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VHa CDR2包含如SEQ ID NO:9-14中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9-14中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0019] 在一些实施方案中,所述VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VHa CDR2包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0020] 在一些实施方案中,所述VLa CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VLa CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VLa CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,所述VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VHa CDR2包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代

的氨基酸序列;所述VL<sub>a</sub> CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VL<sub>a</sub> CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VL<sub>a</sub> CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,所述VH<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:49-63中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:49-63中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:49-63中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方案中,所述VH<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施方案中,所述VL<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0025] 在一些实施方案中,所述VL<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0026] 在一些实施方案中,所述可变区a包含VH<sub>a</sub>和VL<sub>a</sub>。所述VH<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VL<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0027] 在一些实施方案中,本发明提供的一种双特异抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段还包含轻链恒定区a (CL<sub>a</sub>),以及重链恒定区a (CH<sub>a</sub>)。

[0028] 在一些实施方案中,所述CH<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:81、83-86中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、83-86中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、83-86中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,所述CL<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0030] 在一些实施方案中,本发明提供的一种双特异抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含一条本文所述重链a、一条重链x以及一条轻链a和一条轻链x;所述重链a和所述轻链a配对形成PD-L1抗原结合位点,所述重链x和所述轻链x配对形成其它抗原结合位点。在一些实施方案中,所述重链a包含本文所述的VH<sub>a</sub> CDR1、VH<sub>a</sub> CDR2、VH<sub>a</sub> CDR3。在一



些实施方案中,所述重链a包含本文所述的VHa。在一些实施方案中,所述重链a包含本文所述的VHa及CHa。在一些实施方案中,所述轻链a包含本文所述的VL<sub>a</sub> CDR1、VL<sub>a</sub> CDR2和VL<sub>a</sub> CDR3。在一些实施方案中,所述轻链a包含本文所述的VL<sub>a</sub>。在一些实施方案中,所述轻链a包含本文所述的VL<sub>a</sub>及CL<sub>a</sub>。在一些实施方案中,所述重链x与本文所述重链b相同。在一些实施方案中,所述轻链x与所述轻链a相同。

[0031] 在一些实施方式中,所述其它抗原为CD47、LAG3、TGFβ、CTLA-4、4-1BB、PD1、TIGIT、KIR、c-Met、VISTA或BCMA。在一些实施方式中,所述其它抗原为CD47。

[0032] 在一些实施方式中,所述重链x的CDR选自Magrolimab、A0-176 (Arch Oncology)、TJC4 (天境生物)、AK117 (康方生物) 或IBI188 (信达生物) 等中的重链CDR。在一些实施方式中,所述重链x的可变区选自Magrolimab、A0-176 (Arch Oncology)、TJC4 (天境生物)、AK117 (康方生物) 或IBI188 (信达生物) 等中的重链可变区。在一些实施方式中,所述轻链x的CDR选自Magrolimab、A0-176 (Arch Oncology)、TJC4 (天境生物)、AK117 (康方生物) 或IBI188 (信达生物) 等中的轻链CDR。在一些实施方式中,所述轻链x的可变区选自Magrolimab、A0-176 (Arch Oncology)、TJC4 (天境生物)、AK117 (康方生物) 或IBI188 (信达生物) 等中的轻链可变区。在一些实施方案中,所述轻链x与所述轻链a相同。

[0033] 在一些实施方案中,所述重链a包含如SEQ ID NO:92或94所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:92或94所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:92或94所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0034] 在一些实施方式中,本发明提供的双特异抗体或抗原结合片段与PD-L1的亲合力指数 $KD \leq 10nM$ 。在一些实施方式中,本发明提供的双特异抗体或抗原结合片段与PD-L1的亲合力指数 $KD \leq 1nM$ 。在一些实施方式中,本发明提供的双特异抗体或抗原结合片段与PD-L1的亲合力指数 $KD \leq 0.5nM$ 。

[0035] 另一方面,本发明提供了一种双特异抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含特异性结合CD47的可变区b;其中,所述可变区b包含(g) - (l) 中一种或多种氨基酸序列:

[0036] (g) VH<sub>b</sub> CDR1,其包含如SEQ ID NO:21-23中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:21-23中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0037] (h) VH<sub>b</sub> CDR2,其包含如SEQ ID NO:24-28中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24-28中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0038] (i) VH<sub>b</sub> CDR3,其包含如SEQ ID NO:29-35中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:29-35中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0039] (j) VL<sub>b</sub> CDR1,其包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0040] (k) VL<sub>b</sub> CDR2,其包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序

列；

[0041] (1) VLb CDR3,其包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0042] 在一些实施方案中,所述可变区b包含重链可变区b (VHb),所述重链可变区b包含 VHb CDR1、VHb CDR2、VHb CDR3;其中VHb CDR1包含如SEQ ID NO:21-23中任一项所示的氨基酸序列;VHb CDR2包含如SEQ ID NO:24-28中任一项所示的氨基酸序列;VHb CDR3包含如SEQ ID NO:29-35中任一项所示的氨基酸序列。

[0043] 在一些实施方案中,所述可变区b包含轻链可变区b (VLb),所述轻链可变区b包含 VLb CDR1、VLb CDR2和VLb CDR3;其中VLb CDR1包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;VLb CDR2包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;VLb CDR3包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列。

[0044] 在一些实施方案中,所述可变区b包含VHb和VLb;所述VHb包含VHb CDR1、VHb CDR2、VHb CDR3;所述VLb包含VLb CDR1、VLb CDR2和VLb CDR3。其中,VHb CDR1包含如SEQ ID NO:21-23中任一项所示的氨基酸序列;VHb CDR2包含如SEQ ID NO:24-28中任一项所示的氨基酸序列;VHb CDR3包含如SEQ ID NO:29-35中任一项所示的氨基酸序列;VLb CDR1包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;VLb CDR2包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;VLb CDR3包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列。

[0045] 在一些实施方案中,所述VHb CDR1包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VHb CDR2包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VHb CDR3包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0046] 在一些实施方案中,所述VLb CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VLb CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VLb CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0047] 在一些实施方案中,所述VHb CDR1包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VHb CDR2包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VHb CDR3包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VLb CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VLb CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VLb CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序

列,或与SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0048] 在一些实施方案中,所述VHb包含如SEQ ID NO:64-74中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64-74中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64-74中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0049] 在一些实施方案中,所述VHb包含如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0050] 在一些实施方案中,所述VLb包含如SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0051] 在一些实施方案中,所述VLb包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0052] 在一些实施方案中,所述可变区b包含VHb和VLb。所述VHb包含如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VLb包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0053] 在一些实施方案中,本发明提供一种双特异抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段还包含轻链恒定区b (CLb),以及重链恒定区b (CHb)。

[0054] 在一些实施方案中,所述CHb包含如SEQ ID NO:81、83-86中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、83-86中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、83-86中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0055] 在一些实施方案中,所述CLb包含如SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0056] 在一些实施方案中,本发明提供一种双特异抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含一条本文所述重链b、一条重链y以及一条本文所述轻链b和一条轻链y;所述重链b和所述轻链b配对形成CD47抗原结合位点,所述重链y和所述轻链y配对形成其它抗原结合位点。在一些实施方案中,所述重链b包含本文所述的VHb CDR1、VHb CDR2、VHb CDR3。在一些实施方案中,所述重链b包含本文所述的VHb。在一些实施方案中,所述重链b包含本文所述的VHb及CHb。在一些实施方案中,所述轻链b包含本文所述的VLb CDR1、VLb CDR2和VLb CDR3。在一些实施方案中,所述轻链b包含本文所述的VLb。在一些实施方案中,所述轻链b包含本文所述的VLb及CLb。在一些实施方案中,所述轻链y与所述轻链b相同。

[0057] 在一些实施方式中,所述其它抗原为PD-L1、PD-1、BCMA、MSLN、CD19、CD20或VEGF。在一些实施方式中,所述其它抗原为PD-L1。

[0058] 在一些实施方式中,所述重链y的CDR选自Atezolizumab、Avelumab、Durvalumab、Envafolimab或Cosibelimab中的重链CDR。在一些实施方式中,所述重链y的可变区选自Atezolizumab、Avelumab、Durvalumab、Envafolimab或Cosibelimab中的重链可变区。在一些实施方式中,所述轻链y的CDR选自Atezolizumab、Avelumab、Durvalumab、Envafolimab或Cosibelimab中的轻链CDR。在一些实施方式中,所述轻链的可变区选自Atezolizumab、Avelumab、Durvalumab、Envafolimab或Cosibelimab中的轻链可变区。在一些实施方案中,所述重链y与本文所述重链a相同。在一些实施方案中,所述轻链y与所述轻链b相同。

[0059] 在一些实施方案中,所述重链b包含如SEQ ID NO:93或95所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:93或95所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:93或95所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0060] 在一些实施方式中,本发明提供的双特异抗体或抗原结合片段与CD47的亲合力指数 $KD \leq 30nM$ 。在一些实施方式中,本发明提供的双特异抗体或抗原结合片段与CD47的亲合力指数 $KD \leq 10nM$ 。在一些实施方式中,本发明提供的双特异抗体或抗原结合片段与CD47的亲合力指数 $KD \leq 5nM$ 。

[0061] 在一些实施方式中,本发明提供的双特异抗体或抗原结合片段不引起红细胞凝集。

[0062] 另一方面,本发明提供一种双特异抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含特异性结合PD-L1的可变区a,以及特异性结合CD47的可变区b。

[0063] 其中,所述可变区a包含(a)-(f)中一种或多种氨基酸序列:

[0064] (a) VH<sub>a</sub> CDR1,其包含如SEQ ID NO:4-8中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4-8中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0065] (b) VH<sub>a</sub> CDR2,其包含如SEQ ID NO:9-18中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9-18中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0066] (c) VH<sub>a</sub> CDR3,其包含如SEQ ID NO:19或20所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19或20所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0067] (d) VL<sub>a</sub> CDR1,其包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0068] (e) VL<sub>a</sub> CDR2,其包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0069] (f) VL<sub>a</sub> CDR3,其包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0070] 所述可变区b包含(g)-(l)中一种或多种氨基酸序列:

[0071] (g) VH<sub>b</sub> CDR1,其包含如SEQ ID NO:21-23中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:21-23中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序

列;

[0072] (h) VHb CDR2,其包含如SEQ ID NO:24-28中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24-28中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0073] (i) VHb CDR3,其包含如SEQ ID NO:29-35中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:29-35中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0074] (j) VLb CDR1,其包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0075] (k) VLb CDR2,其包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;

[0076] (l) VLb CDR3,其包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0077] 在一些实施方案中,所述可变区a包含重链可变区a(VHa),所述重链可变区a包含VHa CDR1、VHa CDR2、VHa CDR3;其中VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4-8中任一项所示的氨基酸序列;VHa CDR2包含如SEQ ID NO:9-18中任一项所示的氨基酸序列;VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19或20所示的氨基酸序列;所述可变区b包含重链可变区b(VHb),所述重链可变区b包含VHb CDR1、VHb CDR2、VHb CDR3;其中VHb CDR1包含如SEQ ID NO:21-23中任一项所示的氨基酸序列;VHb CDR2包含如SEQ ID NO:24-28中任一项所示的氨基酸序列;VHb CDR3包含如SEQ ID NO:29-35中任一项所示的氨基酸序列。

[0078] 在一些实施方案中,所述可变区a包含轻链可变区a(VLa),所述轻链可变区a包含VLa CDR1、VLa CDR2和VLa CDR3;其中VLa CDR1包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;VLa CDR2包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;VLa CDR3包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列;所述可变区b包含轻链可变区b(VLb),所述轻链可变区b包含VLb CDR1、VLb CDR2和VLb CDR3;其中VLb CDR1包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;VLb CDR2包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;VLb CDR3包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列。

[0079] 在一些实施方案中,所述可变区a包含VHa和VLa;所述可变区b包含VHb和VLb。所述VHa包含VHa CDR1、VHa CDR2、VHa CDR3;所述VLa包含VLa CDR1、VLa CDR2和VLa CDR3。其中,VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4-8中任一项所示的氨基酸序列;VHa CDR2包含如SEQ ID NO:9-18中任一项所示的氨基酸序列;VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19或20所示的氨基酸序列。所述VHb包含VHb CDR1、VHb CDR2、VHb CDR3;所述VLb包含VLb CDR1、VLb CDR2和VLb CDR3。其中,VHb CDR1包含如SEQ ID NO:21-23中任一项所示的氨基酸序列;VHb CDR2包含如SEQ ID NO:24-28中任一项所示的氨基酸序列;VHb CDR3包含如SEQ ID NO:29-35中任一项所示的氨基酸序列;VLb CDR1包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;VLb CDR2包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;VLb CDR3包含如SEQ ID NO:45-

48中任一项所示的氨基酸序列。VL<sub>a</sub> CDR1和VL<sub>b</sub> CDR1包含独立的选自如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;VL<sub>a</sub> CDR2和VL<sub>b</sub> CDR2包含独立的选自如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;VL<sub>a</sub> CDR3和VL<sub>b</sub> CDR3包含独立的选自如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列。

[0080] 在一些实施方案中,所述VH<sub>a</sub> CDR1包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>a</sub> CDR2包含如SEQ ID NO:9-14中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9-14中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>a</sub> CDR3包含如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>b</sub> CDR1包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>b</sub> CDR2包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>b</sub> CDR3包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0081] 在一些实施方案中,所述VH<sub>a</sub> CDR1包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>a</sub> CDR2包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>a</sub> CDR3包含如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>b</sub> CDR1包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>b</sub> CDR2包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>b</sub> CDR3包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0082] 在一些实施方案中,所述VL<sub>a</sub> CDR1或VL<sub>b</sub> CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VL<sub>a</sub> CDR2或VL<sub>b</sub> CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VL<sub>a</sub> CDR3或VL<sub>b</sub> CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0083] 在一些实施方案中,所述VH<sub>a</sub> CDR1包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>a</sub> CDR2包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>a</sub> CDR3包含如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>b</sub> CDR1包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>b</sub> CDR2包含

如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VHb CDR3包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。所述VL<sub>a</sub> CDR1或VL<sub>b</sub> CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VL<sub>a</sub> CDR2或VL<sub>b</sub> CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VL<sub>a</sub> CDR3或VL<sub>b</sub> CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0084] 在一些实施方案中,所述VL<sub>a</sub> CDR1与所述VL<sub>b</sub> CDR1包含相同的氨基酸序列。

[0085] 在一些实施方案中,所述VL<sub>a</sub> CDR2与所述VL<sub>b</sub> CDR2包含相同的氨基酸序列。

[0086] 在一些实施方案中,所述VL<sub>a</sub> CDR3与所述VL<sub>b</sub> CDR3包含相同的氨基酸序列。

[0087] 在一些实施方案中,所述VL<sub>a</sub> CDR1与所述VL<sub>b</sub> CDR1包含相同的氨基酸序列,所述VL<sub>a</sub> CDR2与所述VL<sub>b</sub> CDR2包含相同的氨基酸序列,以及所述VL<sub>a</sub> CDR3与所述VL<sub>b</sub> CDR3包含相同的氨基酸序列。

[0088] 在一些实施方案中,所述可变区a包含重链可变区VH<sub>a</sub>和轻链可变区VL<sub>a</sub>;其中,所述VH<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:49-63中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:49-63中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;和/或所述VL<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

[0089] 在一些实施方案中,所述可变区a包含重链可变区VH<sub>a</sub>和轻链可变区VL<sub>a</sub>;其中,所述VH<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;和/或所述VL<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

[0090] 在一些实施方案中,所述可变区b包含重链可变区VH<sub>b</sub>和轻链可变区VL<sub>b</sub>;其中,所述VH<sub>b</sub>包含如SEQ ID NO:64-74中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64-74中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;和/或所述VL<sub>b</sub>包含如SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

[0091] 在一些实施方案中,所述可变区b包含重链可变区VH<sub>b</sub>和轻链可变区VL<sub>b</sub>;其中,所述VH<sub>b</sub>包含如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;和/或所述VL<sub>b</sub>包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

[0092] 在一些实施方案中,所述VH<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:49-63中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:49-63中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:49-63中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VH<sub>b</sub>包含如SEQ ID NO:64-74中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64-74中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64-74中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0093] 在一些实施方案中,所述VHa包含如SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VHb包含如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0094] 在一些实施方案中,所述VL<sub>a</sub>和VL<sub>b</sub>包含独立的选自如SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0095] 在一些实施方案中,所述VL<sub>a</sub>和VL<sub>b</sub>包含独立的选自如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0096] 在一些实施方案中,所述可变区a包含VHa和VL<sub>a</sub>;所述可变区b包含VHb和VL<sub>b</sub>。所述VHa包含如SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。所述VHb包含如SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:64所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。所述VL<sub>a</sub>或VL<sub>b</sub>包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0097] 在一些实施方案中,所述VL<sub>a</sub>与所述VL<sub>b</sub>包含相同的氨基酸序列。

[0098] 在一些实施方案中,本文所述抗体或抗原结合片段还包含轻链恒定区a (CL<sub>a</sub>),以及重链恒定区a (CH<sub>a</sub>),轻链恒定区b (CL<sub>b</sub>),以及重链恒定区b (CH<sub>b</sub>)。

[0099] 在一些实施方案中,所述CH<sub>a</sub>为IgG1亚型。在一些实施方案中,所述CH<sub>b</sub>为IgG1亚型。

[0100] 在一些实施方案中,所述CH<sub>a</sub>和/或CH<sub>b</sub>包含如下一种或多种氨基酸突变的IgG1亚型:Y349C、S354C、T366W、T366S、L368A以及Y407V,其中氨基酸位置为Eu编号。

[0101] 在一些实施方案中,所述CH<sub>a</sub>和/或CH<sub>b</sub>包含如下氨基酸突变的IgG1亚型:N297A,其中氨基酸位置为Eu编号。

[0102] 在一些实施方案中,所述CH<sub>a</sub>和CH<sub>b</sub>中的一个重链恒定区包含如下一种或多种氨基酸突变:N297A、Y349C、T366S、L368A以及Y407V。

[0103] 在一些实施方案中,所述CH<sub>a</sub>和CH<sub>b</sub>中的另一个重链恒定区包含如下一种或多种氨基酸突变:N297A、S354C以及T366W。

[0104] 在一些实施方案中,所述CH<sub>a</sub>包含如SEQ ID NO:81、83-86中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、83-86中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、83-86中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述CH<sub>b</sub>包含如SEQ ID NO:81、83-86中任一项所示



的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、83-86中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、83-86中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0105] 在一些实施方案中,所述CHa包含如SEQ ID NO:81、83或85所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、83或85所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、83或85所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0106] 在一些实施方案中,所述CHb包含如SEQ ID NO:81、84或86所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、84或86所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、84或86所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0107] 在一些实施方案中,所述CHa包含如SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列,所述CHb包含如SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述CHa包含如SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列,所述CHb包含如SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述CHa包含如SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列,所述CHb包含如SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述CHa包含如SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列,所述CHb包含如SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列。

[0108] 在一些实施方案中,所述CLa包含如SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述CLb包含如SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0109] 在一些实施方案中,所述重链a包含如SEQ ID NO:92或94所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:92或94所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:92或94所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述重链b包含如SEQ ID NO:93或95所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:93或95所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:93或95所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述轻链a和轻链b均包含如SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

[0110] 在一些实施方式中,本发明提供的双特异抗体或抗原结合片段与PD-L1的亲合力指数 $KD \leq 10nM$ 。在一些实施方式中,本发明提供的双特异抗体或抗原结合片段与PD-L1的亲合力指数 $KD \leq 1nM$ 。在一些实施方式中,本发明提供的双特异抗体或抗原结合片段与CD47的亲合力指数 $KD \leq 30nM$ 。在一些实施方式中,本发明提供的双特异抗体或抗原结合片段与CD47的亲合力指数 $KD \leq 10nM$ 。在一些实施方式中,本发明提供的双特异抗体或抗原结合片段与CD47的亲合力指数 $KD \leq 5nM$ 。

[0111] 另一方面,本发明提供了一种双特异抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含特异性结合PD-L1的可变区a,特异性结合CD47的可变区b,轻链恒定区,以及重链恒定区;所述重链恒定区为IgG1亚型,或包含如下一种或多种氨基酸突变的IgG1亚型:Y349C、S354C、T366W、T366S、L368A以及Y407V,其中氨基酸位置为Eu编号。

[0112] 在一些实施方案中,所述重链恒定区还包含如下氨基酸突变的IgG1亚型,其中氨基酸位置为Eu编号:N297A。

[0113] 在一些实施方案中,所述重链恒定区包含第一重链恒定区和第二重链恒定区,所述第一重链恒定区包含如下一种或多种氨基酸突变:

[0114] N297A、S354C以及T366W;和/或

[0115] 所述第二重链恒定区包含如下一种或多种氨基酸突变:

[0116] N297A、Y349C、T366S、L368A以及Y407V。

[0117] 在一些实施方案中,所述第一重链恒定区包含如SEQ ID NO:81、83或85所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、83或85所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;和/或所述第二重链恒定区包含如SEQ ID NO:81、84或86所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:81、84或86所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

[0118] 在一些实施方案中,所述可变区a中的VHa与所述第一重链恒定区连接,所述可变区b中的VHb与所述第二重链恒定区连接;或,所述可变区a中的VHa与所述第二重链恒定区连接,所述可变区b中的VHb与所述第一重链恒定区连接。

[0119] 在一些实施方案中,所述轻链恒定区包含如SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

[0120] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含本文所述的可变区a,和本文所述的可变区b。

[0121] 另一方面,本发明提供了一种双特异抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含一条重链a、一条重链b以及两条相同的轻链。

[0122] 在一些实施方案中,所述轻链的可变区(VL)包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;其中VL CDR1,其包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;VL CDR2,其包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;VL CDR3,其包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列。

[0123] 在一些实施方案中,所述VL CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VL CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;所述VL CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0124] 在一些实施方案中,所述VL包含如SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0125] 在一些实施方案中,所述VL包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0126] 在一些实施方案中,所述轻链包含如SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:96所示的氨

基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0127] 在一些实施方案中,所述重链a和一条所述轻链配对形成PD-L1抗原结合位点,所述重链b和另一条所述轻链配对形成CD47、LAG3、TGF $\beta$ 、CTLA-4、4-1BB、PD-1、TIGIT、KIR、c-Met、VISTA或BCMA抗原结合位点。在一些实施方案中,所述重链a和一条所述轻链配对形成PD-L1、PD-1、BCMA、MSLN、CD19、CD20或VEGF抗原结合位点,所述重链b和另一条所述轻链配对形成CD47抗原结合位点。

[0128] 在一些实施方案中,所述重链a和一条所述轻链配对形成PD-L1抗原结合位点,所述重链b和另一条所述轻链配对形成CD47抗原结合位点。

[0129] 在一些实施方案中,所述重链a包含如SEQ ID NO:92或94所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:92或94所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;所述重链b包含如SEQ ID NO:93或95所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:93或95所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列;所述轻链包含如SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列至少有90%同源性的氨基酸序列。

[0130] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段与PD-L1的亲和力指数KD $\leq$ 1nM。

[0131] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段与CD47的亲和力指数KD $\leq$ 10nM。

[0132] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段与CD47的亲和力指数KD $\leq$ 30nM。

[0133] 另一方面,本发明提供了一种多聚核苷酸,所述多聚核苷酸编码上述的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,所述多聚核苷酸为分离的多聚核苷酸。

[0134] 另一方面,本发明提供了一种表达载体,所述表达载体包含如上述的多聚核苷酸。在一些实施方案中,所述表达载体为分离的表达载体。

[0135] 另一方面,本发明提供了一种宿主细胞,所述细胞包含上述的多聚核苷酸,或上述的表达载体。在一些实施方案中,所述宿主细胞为分离的宿主细胞。在一些实施方案中,所述细胞为CHO细胞、HEK细胞(如HEK293F细胞)、BHK细胞、Cos1细胞、Cos7细胞、CV1细胞或鼠L细胞。

[0136] 另一方面,本发明提供了制备本文所述的抗体或抗原结合片段的方法,包含在培养基中培养上述宿主细胞以产生抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,所述方法还包括从所述宿主细胞或所述培养基回收所述抗体或抗原结合片段。

[0137] 另一方面,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含如上述的抗体或抗原结合片段、上述的多聚核苷酸,或上述的表达载体、或上述的细胞,以及药学上可接受的载体。

[0138] 另一方面,本发明提供了上述的抗体或抗原结合片段、上述的多聚核苷酸、或上述的表达载体、上述的细胞或上述的组合物在制备治疗疾病的药物中的应用。

[0139] 在一些实施方案中,所述疾病是自身免疫病、急性和慢性炎症性疾病、感染性疾病(例如,慢性传染病或败血症)、癌症。在一些实施方案中,所述疾病是与PD-L1和CD47相关的病症。在一些实施方案中,所述疾病是与PD-L1和CD47相关的病症包括但不限于各种血液病和实体瘤,如急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、多发性骨髓瘤(MM)、淋巴瘤、乳腺癌、胃癌、肺癌、食管癌、肠癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、胰腺癌、膀胱癌、神经胶质瘤、黑素瘤和其他实体瘤。在一个实施方案中,所述癌症是胃肠道癌,如结肠癌。

[0140] 另一方面,本发明提供了一种治疗疾病的方法,包括向需要治疗的患者施用有效

剂量的上述的双特异抗体或抗原结合片段、上述的多聚核苷酸、或上述的表达载体、上述的细胞或上述的组合物。

[0141] 在一些实施方案中,所述疾病是自身免疫病、急性和慢性炎性疾病、感染性疾病(例如,慢性传染病或败血症)、癌症。在一些实施方案中,所述疾病是与PD-L1和CD47相关的病症。在一些实施方案中,所述疾病是与PD-L1和CD47相关的病症包括但不限于各种血液病和实体瘤,如急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、多发性骨髓瘤(MM)、淋巴瘤、乳腺癌、胃癌、肺癌、食管癌、肠癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、胰腺癌、膀胱癌、神经胶质瘤、黑素瘤和其他实体瘤。在一个实施方案中,所述癌症是胃肠道癌,如结肠癌。

[0142] 在一些实施方案中,本发明涉及试剂盒或制品,其包含上述的双特异抗体或抗原结合片段、上述的多聚核苷酸或上述的表达载体。

[0143] 本发明提供了双特异抗体或抗原结合片段及其应用,本发明的双特异抗体或抗原结合片段可以结合两个或更多个抗原,或同一抗原的两个或更多个表位。本发明抗体或抗原结合片段可以用于治疗或预防各种疾病,比如自身免疫病、急性和慢性炎性疾病、感染性疾病、癌症,也可以用于相关疾病的诊断和预后。

## 附图说明

[0144] 图1示例本发明双特异抗体的结构。

[0145] 图2为组图,图2A和图2B分别显示了SEC检测的两种抗PD-L1/CD47双特异抗体BsAb-46和BsAb-71的纯度。

[0146] 图3抗PD-L1 scFv与PD-L1-His-Biotin抗原蛋白的结合力,其中克隆编号表示表达相应的抗PD-L1 scFv的阳性酵母克隆。

[0147] 图4显示了基于MOA法检测的以R2-4为轻链,与不同抗PD-L1的VH组成的抗PD-L1抗体,以及作为阴性对照的IgG1抗体(IgG-Isotype)对PD-1/PD-L1信号转导通路的影响。

[0148] 图5显示了基于MOA法检测的不同轻链的抗PD-L1抗体以及作为阴性对照的IgG1抗体(IgG-Isotype)对PD-1/PD-L1信号转导通路的影响。

[0149] 图6显示了不同轻链的抗CD47抗体、阳性对照抗体Hu5F9-G4和IgG1对照抗体(IgG-Isotype)对红细胞凝集的影响;其中Hu5F9代表Hu5F9-G4。外观显示红细胞团流成一条线的为不引起血凝反应,轻微凝聚的为一个点,凝集明显的为整个孔模糊一团。

[0150] 图7显示了抗CD47抗体以及作为阳性对照抗体Hu5F9-G4促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力;其中Hu5F9代表Hu5F9-G4。

[0151] 图8为组图,分别显示了抗PD-L1/CD47双特异抗体与PDL1和CD47的结合能力。图8A先结合PD-L1-His,后结合CD47-His;图8B先结合CD47-His,后结合PD-L1-His;图8C显示了抗PD-L1/CD47双特异抗体BsAb-71-N297A的结合能力,上部分图为先结合PD-L1-His,后结合CD47-His,下部分图为先结合CD47-His,后结合PD-L1-His;图中hPDL1-His代表PD-L1-His,hCD47-His代表CD47-His。

[0152] 图9为组图,图9A和图9C显示了通过FACS检测的示例的抗PD-L1/CD47双特异抗体、作为亲本的抗PD-L1抗体,以及作为阴性对照的抗CD47抗体47-R2-4与过量表达PD-L1的CHO细胞的结合。图9B和图9D显示了通过FACS检测的示例的抗PD-L1/CD47双特异抗体、作为亲

本的抗CD47抗体47-R2-4、以及作为阴性对照的抗PD-L1抗体L1-R2-4-71与过量表达CD47的CHO细胞的结合。图中横轴表示抗体浓度、纵轴表示平均荧光强度(MFI)。

[0153] 图10为组图,显示了基于MOA法检测的本发明示例的抗PD-L1/CD47双特异抗体,作为亲本的抗PD-L1抗体L1-R2-4-71以及作为阴性对照的IgG1抗体(IgG-Isotype)对PD-1/PD-L1信号转导通路的影响。图10A为抗PD-L1/CD47双特异抗体BsAb-36、BsAb-46、BsAb-47、BsAb-71的结果,图10B为抗PD-L1/CD47双特异抗体BsAb-71-N297A的结果。

[0154] 图11显示了示例的抗PD-L1/CD47双特异抗体、抗CD47的阳性抗体Hu5F9-G4、抗CD47的亲本抗体47-R2-4和IgG1对照抗体(IgG-Isotype)对红细胞凝集的影响;其中Hu5F9代表Hu5F9-G4。

[0155] 图12显示了示例的抗PD-L1/CD47双特异抗体、抗CD47的亲本抗体47-R2-4和IgG1对照抗体(IgG-Isotype)促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力。

[0156] 图13为组图,图13A显示了通过FACS检测的示例的抗PD-L1/CD47双特异抗体、抗CD47的阳性抗体Hu5F9-G4、作为亲本的抗CD47抗体47-R2-4、以及作为阴性对照的抗PD-L1抗体L1-R2-4-71与人红细胞细胞的结合。图13B显示了通过FACS检测的示例的抗PD-L1/CD47双特异抗体、抗CD47的阳性抗体Hu5F9-G4、作为亲本的抗CD47抗体47-R2-4、以及作为阴性对照的抗PD-L1抗体L1-R2-4-71与人T淋巴细胞白血病Jurkat细胞的结合。图中横轴表示抗体浓度、纵轴表示平均荧光强度(MFI)。

[0157] 图14抗PD-L1/CD47双特异抗体对外源刺激下的PBMC释放IL2细胞因子的影响。

[0158] 图15显示了,与IgG1对照抗体相比,抗PD-L1抗体L1-R2-4-71、抗CD47抗体47-R2-4、抗PD-L1抗体L1-R2-4-71与抗CD47抗体47-R2-4联合用药、抗PD-L1/CD47双特异抗体BsAb-71-N297A在MC38-hCD47(Tg)/C57BL/6-hSIRP $\alpha$ 小鼠模型中的肿瘤抑制活性。

## 具体实施方式

[0159] 除非另作说明,否则下列的每一个术语应当具有下文所述的含义。除非本文中另外说明,否则恒定区中的氨基酸残基的编号根据如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述的EU编号体系。

[0160] 定义

[0161] 应当注意的是,术语“一种”实体是指一种或多种该实体,例如“一种抗体”应当被理解为一种或多种抗体,因此,术语“一种”(或“一个”)、“一种或多种”和“至少一种”可以在本文中互换使用。

[0162] “约”或“大约”指相关技术领域技术人员容易知道的相应数值的常规误差范围。在一些实施方式中,本文中提到的“约”或“大约”指所描述的数值以及其 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 或 $\pm 0.1\%$ 的范围。

[0163] 术语“多肽”旨在涵盖单数的“多肽”以及复数的“多肽”,并且是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的氨基酸单体组成的分子。术语“多肽”是指两个或更多个氨基酸的任何单条链或多条链,并且不涉及产物的特定长度。因此,“多肽”的定义中包括肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指两个或多个氨基酸链的任何其他术语,并且术语“多肽”可以用来代替上述任何一个术语,或者与上述任何一个术语交替使用。术语“多肽”

也意在指多肽表达后修饰的产物,包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割或非天然发生的氨基酸修饰。多肽可以源自天然生物来源或通过重组技术产生,但其不必从指定的核酸序列翻译所得,它可能以包括化学合成的任何方式产生。

[0164] “氨基酸”是指既含氨基又含羧基的有机化合物,比如 $\alpha$ -氨基酸,其可直接或以前体的形式由核酸编码。单个氨基酸由三个核苷酸(所谓的密码子或碱基三联体)组成的核酸编码。每一个氨基酸由至少一个密码子编码。相同氨基酸由不同密码子编码称为“遗传密码的简并性”。氨基酸包括天然氨基酸和非天然氨基酸。天然氨基酸包括丙氨酸(三字母代码:Ala,一字母代码:A)、精氨酸(Arg,R)、天冬酰胺(Asn,N)、天冬氨酸(Asp,D)、半胱氨酸(Cys,C)、谷氨酰胺(Gln,Q)、谷氨酸(Glu,E)、甘氨酸(Gly,G)、组氨酸(His,H)、异亮氨酸(Ile,I)、亮氨酸(Leu,L)、赖氨酸(Lys,K)、甲硫氨酸(Met,M)、苯丙氨酸(Phe,F)、脯氨酸(Pro,P)、丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、色氨酸(Trp,W)、酪氨酸(Tyr,Y)和缬氨酸(Val,V)。

[0165] “保守氨基酸取代”是指一个氨基酸残基被另一个含有化学性质(例如电荷或疏水性)相似的侧链(R基团)的氨基酸残基所取代。一般而言,保守氨基酸取代不大会在实质上改变蛋白质的功能性质。含有化学性质相似侧链的氨基酸类别的实例包括:1)脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸。

[0166] 本发明中关于细胞、核酸、多肽、抗体等所使用的术语“分离的”,例如“分离的”DNA、RNA、多肽、抗体是指分别于细胞自然环境中的其它组分如DNA或RNA中的一种或多种所分离的分子。本发明使用的术语“分离的”还指当通过重组DNA技术产生时基本上不含细胞材料、病毒材料或细胞培养基的核酸或肽,或化学合成时的化学前体或其他化学品。此外,“分离的核酸”意在包括不以天然状态存在的核酸片段,并且不会以天然状态存在。术语“分离的”在本发明中也用于指从其他细胞蛋白质或组织分离的细胞或多肽。分离的多肽意在包括纯化的和重组的多肽。分离的多肽、抗体等通常通过至少一个纯化步骤制备。在一些实施方案中,分离的核酸、多肽、抗体等的纯度至少为约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%,或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括终点)或其中任何值。

[0167] 术语“重组”涉及多肽或多聚核苷酸,意指天然不存在的多肽或多聚核苷酸的形式,不受限制的实施例可以通过组合产生通常并不存在的多聚核苷酸或多肽。

[0168] “同源性”或“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。可以通过比较每个序列中可以比对的位置来确定同源性。当被比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则分子在该位置是同源的。序列之间的同源程度是由序列共有的匹配或同源位置的数目组成的一个函数。

[0169] “至少80%同一性”为约80%同一性、约81%同一性、约82%同一性、约83%同一性、约85%同一性、约86%同一性、约87%同一性、约88%同一性、约90%同一性、约91%同一性、约92%同一性、约94%同一性、约95%同一性、约98%同一性、约99%同一性,或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括终点)或其中任何值。

[0170] “至少90%同一性”为约90%同一性、约91%同一性、约92%同一性、约93%同一性、约95%同一性、约96%同一性、约97%同一性、约98%同一性、约99%同一性,或这些数

值中的任何两个值之间的范围(包括终点)或其中任何值。

[0171] 多聚核苷酸或多聚核苷酸序列(或多肽或抗体序列)与另一序列有具有一定百分比(例如90%、95%、98%或者99%)的“同一性或序列同一性”是指当序列比对时,所比较的两个序列中该百分比的碱基(或氨基酸)相同。可以使用目测或本领域已知的软件程序来确定该比对和同一性百分比或序列同一性,比如Ausubel et al.eds.(2007)在Current Protocols in Molecular Biology中所述的软件程序。优选使用默认参数进行比对。其中一种比对程序是使用默认参数的BLAST,例如BLASTN和BLASTP,两者使用下列默认参数:Geneticcode=standard;filter=none;strand=both;cutoff=60;expect=10;Matrix=BLOSUM62;Descriptions=50sequences;sortby=HIGHSCORE;Databases=non-redundant;GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBankCDStranslations+SwissProtein+SPupdate+PIR。生物学上等同的多聚核苷酸是具有上述指定百分比的同一性并编码具有相同或相似生物学活性的多肽的多聚核苷酸。

[0172] 多聚核苷酸是由四个核苷酸碱基的特定序列组成:腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T),或当多聚核苷酸是RNA时胸腺嘧啶换为尿嘧啶(U)。“多聚核苷酸序列”可以以多聚核苷酸分子的字母表示。该字母表示可以被输入到具有中央处理单元的计算机中的数据库中,并用于生物信息学应用,例如用于功能基因组学和同源性搜索。

[0173] 术语“多聚核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用,是指任何长度的核苷酸的聚合形式,无论是脱氧核糖核苷酸还是核糖核苷酸或其类似物。多聚核苷酸可以具有任何三维结构并且可以执行已知或未知的任何功能。以下是不受限制的多聚核苷酸的实施例:基因或基因片段(例如探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核糖酶、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、重组多聚核苷酸、分支的多聚核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多聚核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在该修饰,则对核苷酸的结构修饰可以在组装多聚核苷酸之前或之后进行。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。聚合后可以进一步修饰多聚核苷酸,例如通过与标记组分缀合。这个术语也指双链和单链分子。除另有说明或要求外,本公开的任何多聚核苷酸的实施例包括双链形式和已知或预测构成双链形式的两种可互补单链形式中的每一种。

[0174] 术语“编码”应用于多聚核苷酸时,是指被称为“编码”多肽的多聚核苷酸,在其天然状态或当通过本领域技术人员公知的方法操作时,经转录和/或翻译可以产生该多肽和/或其片段。

[0175] “抗体”、“抗原结合片段”是指特异性识别和结合抗原的多肽或多肽复合物。抗体可以是完整的抗体及其任何抗原结合片段或其单链。因此术语“抗体”包括分子中含有具有与抗原结合的生物学活性的免疫球蛋白分子的至少一部分的任何蛋白质或肽。抗体和抗原结合片段包括但不局限重链或轻链或其配体结合部分的互补决定区(CDR)、重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)、重链恒定区(CH)、轻链恒定区(CL)、框架区(FR)或其任何部分,或结合蛋白的至少一部分。CDR区包括轻链的CDR区(VLCDR1-3)和重链的CDR区(VH CDR1-3)。本发明所述抗体或抗原结合片段为双特异抗体,包含特异性结合抗原a、抗原b的抗体片段。在一些实施方案中,第一多肽链包含结构VHa-CHa,第二多肽链包含结构VL a-CL a,第三多肽链包含结构VHb-CHb,第四多肽链包含结构VL b-CL b。在一些实施方案中,第二多肽链与第四多

肽链的氨基酸序列相同。

[0176] 术语“抗体片段”或“抗原结合片段”指抗体的一部分，本发明抗体片段的组成形式可类似于单特异性抗体片段中的 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、Fab'、Fab、Fv、scFv等。不管其结构如何，抗体片段与被完整抗体识别的同一抗原结合。术语“抗体片段”包括适体、镜像异构体和双价抗体。术语“抗原结合片段”还包括通过与特定抗原结合形成复合物起抗体作用的任何合成或基因工程蛋白质。

[0177] “单链可变片段”或“scFv”是指免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)的可变区的融合蛋白。在一些方面，这些区域与10个至约25个氨基酸的短接头肽连接。接头可以富含甘氨酸以增加柔韧性，以及富含丝氨酸或苏氨酸以增加溶解性，并且可以连接VH的N端和VL的C端，反之亦然。尽管该蛋白质被除去了恒定区和引入了接头，但其保留了原始免疫球蛋白的特异性。ScFv分子通常是本领域中已知的，例如在美国专利5,892,019中有相关描述。

[0178] 术语“抗体”包括可以在生物化学上区分各种广泛种类的多肽。本领域技术人员将会理解，重链的类别包括gamma、mu、alpha、delta或epsilon( $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ )，其中还有一些亚类(例如 $\gamma 1$ - $\gamma 4$ )。该链的性质决定了抗体的“种类”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等已被充分表征并且赋予的功能特异性也已知。所有的免疫球蛋白种类都在本发明公开的保护范围内。在一些实施方案中，免疫球蛋白分子为IgG种类。这四条链通过二硫键以“Y”构型连接，其中轻链从“Y”口开始并延续通过可变区包围重链。

[0179] 本发明公开的抗体、抗原结合片段或衍生物包括但不限于多克隆、单克隆、多特异性、全人源、人源化、灵长类化、嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段(例如类Fab、类Fab'和类 $F(ab')_2$ )、类单链Fvs(scFv)。

[0180] 轻链可以分为kappa( $\kappa$ )或lambda( $\lambda$ )。每个重链可以与 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链结合。一般来说，当由杂交瘤、B细胞或基因工程宿主细胞生产免疫球蛋白时，其轻链和重链通过共价键结合，两条重链的“尾巴”部分通过共价二硫键或非共价键结合。在重链中，氨基酸序列从Y构型的叉状末端的N末端延伸至每条链底部的C末端。免疫球蛋白 $\kappa$ 轻链可变区为 $V_\kappa$ ；免疫球蛋白 $\lambda$ 轻链可变区为 $V_\lambda$ 。

[0181] 轻链和重链都分成结构和功能同源性的区域。术语“恒定的”和“可变的”根据功能被使用。轻链(VL)和重链(VH)部分的可变区决定了抗原识别和特异性。轻链和重链的恒定区赋予重要的生物学性质，如分泌、经胎盘移动、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例，恒定区的编号随着它们变得更远离抗体的抗原结合位点或氨基末端而增加。N端部分是可变区，C端部分是恒定区；CH3和CL结构域分别包含重链和轻链的羧基端。

[0182] 在天然存在的抗体中，假设抗体在含水环境中呈现其三维构型时，存在于每个抗原结合域中的六个“互补决定区”或“CDR”是形成抗原结合结构域的短的、非连续的与抗原特异性结合的氨基酸序列。抗原结合结构域中被称为“构架”区域的剩余其它氨基酸显示出较小的分子间可变性。构架区大部分采用 $\beta$ -折叠构象，CDR形成与之连接的环状结构，或在某些情况下形成 $\beta$ 折叠结构的一部分。因此，构架区通过形成支架从而通过链间非共价相互作用使CDR定位在正确的方位上。具有特定位置的CDR的抗原结合域形成了与抗原上的表位互补的表面，该互补表面促进抗体和其抗原表位的非共价结合。对于给定的重链或轻链可变区，本领域普通技术人员都可以通过已知方法鉴定出包含CDR和构架区的氨基酸(参见



Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest, (1983) 和 Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987)。

[0183] 同一抗体的可变区的CDR的边界,根据不同的指派系统,可能有所差异。因此,在涉及用本发明定义的具体CDR序列限定抗体时,所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体:其可变区序列包含本发明的CDR序列,但是由于应用了不同的方案而导致其所声称的CDR边界与本发明所定义的具体CDR边界不同。根据Kabat和Chothia定义的CDR包括相互比较时的氨基酸残基的重叠或子集。尽管如此,应用任一定义来指代抗体或其变体的CDR都在本发明范围内。

[0184] Kabat等人还定义了适用于任何抗体的可变区序列的编号系统。本领域普通技术人员可以不依赖于序列本身以外的其他实验数据将该“Kabat编号”系统应用到任何可变区序列。“Kabat编号”是指由Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services在“Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983) 提出的编号系统。抗体还可以用EU或Chothia编号系统。

[0185] 本发明公开的抗体可以来源于任何动物,包括鸟类和哺乳动物。较佳地,抗体是来源、鼠源、驴源、兔源、山羊源、骆驼源、美洲驼源、马源或鸡源抗体。在另一实施方案中,可变区可以是软骨鱼纲(condricthoid)来源(例如来自鲨鱼)。

[0186] 重链恒定区包括CH1结构域、铰链(例如上、中和/或下铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域,或变体或片段中的至少一种。抗体的重链恒定区可以来源于不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链恒定区可以包括源自IgG1分子的CH1结构域和源自IgG3分子的铰链区。在另一实施方案中,重链恒定区可以包括部分源自IgG1分子和部分源自IgG3分子的铰链区。在另一实施方案中,部分重链可以包括部分源自IgG1分子和部分源自IgG4分子的嵌合铰链区。

[0187] “轻链恒定区”包括来自抗体轻链的一部分氨基酸序列。较佳地,轻链恒定区包含恒定 $\kappa$ 结构域或恒定 $\lambda$ 结构域中的至少一个。“轻链-重链对”是指可通过轻链的CL结构域和重链的CH1结构域之间的二硫键形成二聚体的轻链和重链的集合。

[0188] “VH结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变结构域,“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一个恒定区。CH2结构域不与其它结构域紧密配对,而是在完整的天然IgG分子的两个CH2结构域之间插入两个N-连接的分支碳水化合物链。CH3结构域从CH2结构域开始延伸到IgG分子的C-末端,大约包含108个残基。“铰链区”包括连接CH1结构域和CH2结构域的部分重链区域。所述铰链区包含约25个残基并且是有韧性的,从而使得两个N端抗原结合区能够独立移动。铰链区可以被细分为三个不同的结构域:上、中和下铰链结构域(Roux et al., J. Immunol 161:4083 (1998))。

[0189] “二硫键”指两个硫原子之间形成的共价键。半胱氨酸的硫醇基团可以与第二个硫醇基团形成二硫键或桥接。在大多数天然存在的IgG分子中,CH1和CL区通过二硫键连接。

[0190] “嵌合抗体”指其可变区从第一个物种中获得或衍生,而其恒定区(可以是完整的、部分的或修饰过的)来源于第二个物种的任何抗体。某些实施方案中,可变区来自非人源(例如小鼠或灵长类动物),而恒定区来自人源。

[0191] “特异性结合”通常是指抗体或抗原结合片段与特定抗原通过其抗原结合结构域

与表位互补性结合形成相对稳定的复合物。“特异性”可以用抗体或抗原结合片段与特定抗原或表位结合的相对亲和力表达。例如,如果抗体“A”比抗体“B”与同一抗原的相对亲和力大,可以认为抗体“A”比抗体“B”对该抗原具有更高的特异性。特异性结合可以用平衡解离常数(KD)来描述,较小的KD意味着较紧密的结合。确定两个分子是否特异性结合的方法是本领域内众所周知的,并包括例如平衡透析、表面等离子共振、生物膜层光学干涉测量法等。“特异性结合”抗原a的抗体包括与抗原a平衡解离常数KD小于或等于约100nM、小于或等于约10nM、小于或等于约5nM、小于或等于约1nM或小于或等于约0.5nM的抗体。

[0192] “EC<sub>50</sub>”即半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect, EC<sub>50</sub>)是指能引起50%最大效应的浓度。

[0193] “双特异”抗体指具有两个抗原结合位点的抗体,所述两个抗原结合位点可以是相同抗原的不同表位,也可以是不同抗原的不同表位。

[0194] 术语“共同轻链”指的是该轻链能够同时与不同的重链组装成具有相应功能的完全抗体;该轻链可以用于表达双特异抗体中,也可以用于表达含有两种抗体的混合物中。

[0195] 术语“效应子功能”指归因于免疫球蛋白Fc区的那些生物学活性。免疫球蛋白效应子功能的例子包括:C1q结合和补体依赖的细胞毒性(CDC)、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP)、细胞因子分泌、Fc受体结合作用、免疫复合物介导的抗原呈递细胞摄取抗原、下调细胞表面受体(例如B细胞受体)和B细胞活化。

[0196] “治疗”是指治疗性治疗和预防性或防治性措施,其目的是预防、减缓、改善或停止不良的生理改变或紊乱,例如疾病的进程,包括但不限于以下无论是可检测还是不可检测的结果,症状的缓解、疾病程度的减小、疾病状态的稳定(即不恶化)、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善、缓和、减轻或消失(无论是部分还是全部)、延长与不接受治疗时预期的生存期限等。需要治疗的患者包括已经患有病症或紊乱的患者,容易患有病症或紊乱的患者,或者需要预防该病症或紊乱的患者,可以或预期从施用本发明公开的抗体或药物组合物用于检测、诊断过程和/或治疗中受益的患者。

[0197] “患者”指需要诊断、预防、预后或治疗的任何哺乳动物,包括人类、狗、猫、兔子、鼠、马、牛等。

[0198] 双特异抗体

[0199] 双特异抗体与单克隆抗体相比具备更强特异性、靶向肿瘤细胞和降低脱靶毒性等显著优势。双特异抗体与单克隆抗体相比增加了一个特异性抗原结合位点,在治疗方面表现出了以下优势:(1)两个抗原结合位点分别可以结合肿瘤细胞和免疫细胞,将T免疫细胞聚集到肿瘤细胞周围,增强对肿瘤的杀伤力;(2)可以同时阻断两种不同介质通路而发挥独特的或重叠的功能,介导多种免疫信号通路从而增强细胞杀伤毒性;(3)两种不同的细胞表面抗原结合后,相对而言可能潜在地增加结合特异性,降低脱靶等副作用。因此,双特异抗体在肿瘤免疫治疗和炎症治疗中展现了广阔的应用前景。

[0200] 由于在肿瘤免疫中,靶向多个靶点的治疗方案能够相互协同,对于防止肿瘤的免疫逃逸是有利的,目前靶向肿瘤免疫中的不同靶点的抗体的共施用也进入了临床试验中。但是,共施用需要注射两个独立的抗体产品或需要单次注射两种不同抗体的联合制剂。尽管两次注射允许给药量和时程的灵活性,但是它造成了患者不便依从和疼痛。另外,尽管联合制剂可能提供在给药量方面的某种灵活性,但通常难以找到在溶液中允许两种抗体的化

学和物理稳定性的配制条件,原因在于两种抗体的分子特征不同。何况共施用和联合制剂两种不同抗体的疗法可能增加患者和/或付款人的额外花费,因此,需要治疗肿瘤的备选免疫疗法,并且优选地这类备选免疫疗法涉及双特异抗体。

[0201] 1) 双特异抗体中与PD-L1结合的部分

[0202] 在一些实施方案中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段可特异性结合PD-L1。在一些实施方案中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段可特异性结合哺乳动物PD-L1。在一些实施方案中,PD-L1为人PD-L1。在一些实施方案中,抗体分子与PD-L1的一个或多个胞外结构域结合。

[0203] 在一些实施方案中,抗体结合亲和力是使用表面等离子共振技术(例如Biacore亲和测量)进行测定的。

[0204] 在一些实施方案中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段具有以下一种或多种性质:

[0205] (a) 本发明的双特异抗体或抗原结合片段以高亲和力结合PD-L1(如人PD-L1),例如,以以下平衡解离常数(KD)与PD-L1结合,所述KD小于约12nM,如小于或等于约10nM,小于或等于约5nM,小于或等于约4nM、3nM、2nM或1nM。在一些实施方案中,所述KD小于或等于约0.9nM、或0.5nM。

[0206] (b) 本发明的双特异抗体或抗原结合片段结合表达人PD-L1的细胞,在一些实施方案中,例如,其EC50小于或等于大约2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、或0.5nM。在一些实施方案中,所述结合用流式细胞术(例如FACS)测定。在一些实施方案中,表达人PD-L1的细胞为表达人PD-L1的CHO细胞。

[0207] (c) 在一些实施方案中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段阻断PD-L1/PD-1的相关活性,例如其EC50小于或等于大约6 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、4 $\mu$ g/ml、3 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml、或1 $\mu$ g/ml。在一些实施方案中,PD-L1的相关活性是PD-L1与PD-1的结合。在一些实施方案中,本发明的抗体或其片段在MOA测定中以小于或等于大约小于或等于大约6 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、4 $\mu$ g/ml、3 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml、或1 $\mu$ g/ml的EC50,或以大约0.1-3 $\mu$ g/ml、0.1-0.4 $\mu$ g/ml或0.1-0.3 $\mu$ g/ml的EC50抑制PD-L1与PD-1的结合。在一些实施方案中,细胞为过表达人PD-L1的CHO细胞。

[0208] (d) 本发明的双特异抗体或抗原结合片段能够诱发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0209] (e) 本发明的双特异抗体或抗原结合片段抑制PD-L1的一种或多种活性,例如,导致以下一者或多者:肿瘤浸润型淋巴细胞增加、T细胞受体介导的增殖增加、或癌细胞的免疫逃避减少。在一些实施方案中,双特异抗体或抗原结合片段能够抑制肿瘤的增殖,肿瘤是肿瘤免疫逃逸。在一些实施方案中,肿瘤是胃肠道肿瘤(例如癌症),例如结肠癌。

[0210] 在一些实施方案中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段包含特异性结合PD-L1的重链可变区a(VHa),和轻链可变区a(VLa)。其中VHa包含3个CDR(VHa CDR1、VHa CDR2、VHa CDR3),VLa包含3个CDR(VLa CDR1、VLa CDR2、VLa CDR3)。在一些实施方式中,VHa的CDR选自Atezolizumab、Avelumab、Durvalumab、Envafolimab或Cosibelimab中的重链CDR。在一些实施方式中,VHa选自Atezolizumab、Avelumab、Durvalumab、Envafolimab或Cosibelimab中的重链可变区。在一些实施方式中,VLa的CDR选自Atezolizumab、Avelumab、Durvalumab、Envafolimab或Cosibelimab中的轻链CDR。在一些实施方式中,VLa选自Atezolizumab、

Avelumab、Durvalumab、Envafolimab或Cosibelimab中的轻链可变区。

[0211] 在一些实施方式中,VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4-8中任一项所示的氨基酸序列;VHa CDR2包含如SEQ ID NO:9-18中任一项所示的氨基酸序列;VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19或20所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;VHa CDR2包含如SEQ ID NO:9-14中任一项所示的氨基酸序列;VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;VHa CDR2包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列;VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列。

[0212] 在一些实施方式中,VLa CDR1包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;VLa CDR2包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;VLa CDR3包含如SEQ ID NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,VLa CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列;VLa CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列;VLa CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列。

[0213] 在一些实施方式中,VHa CDR1包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;VHa CDR2包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列;VHa CDR3包含如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列;VLa CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列;VLa CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列;VLa CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列。

[0214] 在一些实施方式中,VHa包含如SEQ ID NO:49-63中任一项所示的氨基酸序列;在一些实施方式中,VLa包含如SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列。

[0215] 在一些实施方式中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段包括由氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示的VHa和氨基酸序列如SEQ ID NO:75所示的VLa组成的可变区a。

[0216] 在一些实施方式中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段包括由氨基酸序列如SEQ ID NO:51所示的VHa和氨基酸序列如SEQ ID NO:75所示的VLa组成的可变区a。

[0217] 在一些实施方式中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段包括由氨基酸序列如SEQ ID NO:52所示的VHa和氨基酸序列如SEQ ID NO:75所示的VLa组成的可变区a。

[0218] 在一些实施方式中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段包括由氨基酸序列如SEQ ID NO:54所示的VHa和氨基酸序列如SEQ ID NO:75所示的VLa组成的可变区a。

[0219] 2) 双特异抗体中与CD47结合的部分

[0220] 在一些实施方案中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段可特异性结合CD47。在一些实施方案中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段可特异性结合哺乳动物CD47。在一些实施方案中,CD47为人CD47。在一些实施方案中,抗体分子与CD47的一个或多个胞外结构域结合。

[0221] 在一些实施方案中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段具有以下一种或多种性质:

[0222] (a) 本发明的双特异抗体或抗原结合片段以高亲和力结合CD47(例如人CD47),例如,以以下平衡解离常数(KD)与CD47结合,所述KD小于约700nM,如小于或等于约30nM,小于或等于约10nM,小于或等于约5nM。

[0223] (b) 本发明的双特异抗体或抗原结合片段不会导致显著的细胞凝集,例如本发明的双特异抗体或抗原结合片段不会导致显著的红细胞血凝反应。在一些实施方案中,如

果与抗CD47阳性对照抗体Hu5F9-G4存在时的凝集水平相比,本发明的双特异抗体或抗原结合片段存在时的凝集水平下降了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%,则说明本发明的双特异抗体或抗原结合片段未导致显著的凝集水平。在抗体浓度介于400pM和800nM之间时,本发明的双特异抗体或抗原结合片段不会导致显著的细胞凝集。

[0224] (c) 本发明的双特异抗体或抗原结合片段不会与人红细胞结合。在一个实施方案中,如果与抗CD47阳性对照抗体Hu5F9-G4存在时的人红细胞结合水平相比,本发明的双特异抗体或抗原结合片段存在时的人红细胞结合水平下降了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%,则说明本发明的双特异抗体或抗原结合片段未明显地与人红细胞结合。优选地,在抗体浓度介于200pM和100nM之间时,本发明的双特异抗体或抗原结合片段不会明显地与人红细胞结合。

[0225] (d) 在一些实施方案中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段是阻断性抗体,阻断CD47与SIRP $\alpha$ 的结合。在一些实施方案中,本发明的CD47抗体存在时巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力升高了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%。

[0226] (e) 本发明的双特异抗体或抗原结合片段能够诱发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0227] (f) 本发明的双特异抗体或抗原结合片段抑制CD47的一种或多种活性,例如,导致肿瘤浸润型巨噬细胞的吞噬能力增加和/或癌细胞的免疫逃避减少。在一些实施方案中,双特异抗体或抗原结合片段能够抑制肿瘤的增殖,肿瘤是肿瘤免疫逃逸。在一些实施方案中,肿瘤是胃肠道肿瘤(例如癌症),例如结肠癌。

[0228] 在一些实施方案中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段包含特异性结合CD47的重链可变区b(VHb),和轻链可变区b(VLb)。其中VHb包含3个CDR(VHb CDR1、VHb CDR2、VHb CDR3),VLb包含3个CDR(VLb CDR1、VLb CDR2、VLb CDR3)。在一些实施方式中,VHb的CDR选自Magrolimab、A0-176(Arch Oncology)、TJC4(天境生物)、AK117(康方生物)或IBI188(信达生物)等中的重链CDR。在一些实施方式中,VHb选自Magrolimab、A0-176(Arch Oncology)、TJC4(天境生物)、AK117(康方生物)或IBI188(信达生物)等中的重链可变区。在一些实施方式中,VLb的CDR选自Magrolimab、A0-176(Arch Oncology)、TJC4(天境生物)、AK117(康方生物)或IBI188(信达生物)等中的轻链CDR。在一些实施方式中,VLb选自Magrolimab、A0-176(Arch Oncology)、TJC4(天境生物)、AK117(康方生物)或IBI188(信达生物)等中的轻链可变区。

[0229] 在一些实施方式中,VHb CDR1包含如SEQ ID NO:21-23中任一项所示的氨基酸序列;VHb CDR2包含如SEQ ID NO:24-28中任一项所示的氨基酸序列;VHb CDR3包含如SEQ ID NO:29-35中任一项所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,VHb CDR1包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列;VHb CDR2包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;VHb CDR3包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列。

[0230] 在一些实施方式中,VLb CDR1包含如SEQ ID NO:36-40中任一项所示的氨基酸序列;VLb CDR2包含如SEQ ID NO:41-44中任一项所示的氨基酸序列;VLb CDR3包含如SEQ ID

NO:45-48中任一项所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,VLb CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列;VLb CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列;VLb CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列。

[0231] 在一些实施方式中,VHb CDR1包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列;VHb CDR2包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列;VHb CDR3包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列;VLb CDR1包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列;VLb CDR2包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列;VLb CDR3包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列。

[0232] 在一些实施方式中,VHb包含如SEQ ID NO:64-74中任一项所示的氨基酸序列;在一些实施方式中,VLb包含如SEQ ID NO:75-80中任一项所示的氨基酸序列。

[0233] 在一些实施方式中,本发明的双特异抗体或抗原结合片段包括由氨基酸序列如SEQ ID NO:64所示的VHb和氨基酸序列如SEQ ID NO:75所示的VLb组成的可变区b。

[0234] 3) 抗PD-L1/CD47双特异抗体

[0235] 固有免疫系统是抵御感染和恶性细胞转化的第一道非特异性防线。在固有免疫系统中,单核细胞、巨噬细胞以及树突状细胞通过吞噬作用,起抗原提呈细胞(APCs)的作用。而APCs通过吞噬作用吞没肿瘤细胞的能力是连接先天免疫和适应性免疫不可或缺的桥梁。由于肿瘤细胞被APCs的摄取减少,间接导致了T细胞活化下降,参见,例如,Avicé MN等人,Role of CD47 in the induction of human naive T cell anergy,Journal of Immunology,167(5):2459-2468(2001)。已有研究证实,PD-L1与CD47蛋白的表达,都受到转录因子MYC的调控,同时过表达在肿瘤细胞上,参见,例如,Stephanie C等,MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1,Science,352(6282):227-31(2016)。肿瘤细胞通过PD-L1/PD1与CD47/SIRP $\alpha$ 通路,逃避固有免疫系统监控,获得适应性免疫耐受。

[0236] 在一些实施方案中,本发明提供抗PD-L1/CD47双特异抗体或抗原结合片段,其可特异性结合PD-L1和CD47。在一些实施方案中,本发明的抗体或其片段结合哺乳动物PD-L1和CD47,如人PD-L1和CD47。例如,抗体分子与PD-L1和CD47上的表位(例如,线性或构象表位)特异性结合。在一些实施方案中,抗体分子与PD-L1和CD47的一个或多个胞外结构域结合。

[0237] 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体或抗原结合片段具有以下一种或多种性质:

[0238] (a) 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体能够同时与PD-L1和CD47结合,且维持了亲本抗体的亲和力常数,由此,能够阻断PD1/PD-L1信号传导通路和阻断SIRP $\alpha$ /CD47信号传导通路;

[0239] (b) 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体能够以超高的亲和力(例如,KD=0.174nM)与PD-L1结合,以高亲和力(例如,KD=3.78nM)或中等亲和力(例如,KD=27.8nM)与CD47结合;通过与肿瘤细胞上PD-L1的特异性结合促进了本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体对肿瘤细胞的选择性结合,避免了与许多正常组织中表达的CD47结合,减少副作用;通过当与CD47的亲和力远低于与PD-L1的亲和力,可显著扩大本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体的有效剂量范围;

[0240] (c) 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体,设计了能够避免非相

关重链和轻链配对的共同轻链；

[0241] (d) 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体,设计了能够稳定四链抗体结构和有利于各条链之间的正确偶合或配对的氨基酸残基。在一些实施方案中,本发明的双特异抗体各自的Fc结构域中分别包含Y349C和S354C或者分别包含S354C和Y349C;本发明的双特异抗体各自的Fc结构域中分别包含凸起(“杆(knob)”)或空穴(“臼(hole)”),并且第一多肽链Fc结构域中的所述凸起或空穴可分别置于第三多肽链Fc结构域中的所述空穴或凸起中,由此所述第一多肽链和第三多肽链彼此形成“杆入臼(knob-in-hole)”的稳定缔合;其中,第一多肽链包含结构VHa-CHa,可特异性识别并结合PD-L1;第三多肽链包含结构VHb-CHb,可特异性识别并结合CD47。

[0242] (e) 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体,具有易于在体外的培养细胞中稳定表达,热稳定性好,抗体产率和纯度高,不需要复杂的生产工艺等优点;

[0243] (f) 本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体或其片段结合表达人PD-L1的细胞,在一些实施方案中,例如,以小于或等于大约2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM的EC50结合表达人PD-L1的细胞。在一些实施方案中,所述结合用流式细胞术(例如FACS)测定。在一些实施方案中,表达人PD-L1的细胞为表达人PD-L1的CHO-S细胞。

[0244] (g) 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体或其片段阻断PD-L1/PD-1的相关活性,例如以小于或等于大约0.3 $\mu$ g/ml的EC50,或以大约0.1-3 $\mu$ g/ml的EC50阻断PD-L1/PD-1的相关活性。在一些实施方案中,PD-L1/PD-1的相关活性,是指PD-L1与PD-1结合后,激活PD1胞内区的抑制信号。在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体或其片段在MOA测定中以小于或等于大约小于或等于大约0.3 $\mu$ g/ml或以大约0.1-3 $\mu$ g/ml的EC50抑制PD-L1与PD-1的结合。在一些实施方案中,细胞为过表达人PD-L1的CHO细胞。

[0245] (h) 本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体不会导致显著的细胞凝集,例如本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体不会导致显著的血红细胞血凝反应。在一些实施方案中,如果与抗CD47阳性对照抗体Hu5F9-G4存在时的凝集水平相比,本发明的抗PD-L1/CD47双特异存在时的凝集水平下降了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%,则说明本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体未导致显著的凝集水平。优选地,在抗体浓度介于400pM和800nM之间时,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体不会导致显著的细胞凝集。

[0246] (i) 本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体不会与人红细胞结合。在一个实施方案中,如果与抗CD47阳性对照抗体Hu5F9-G4存在时的人红细胞结合水平相比,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体存在时的人红细胞结合水平下降了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%,则说明本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体未明显地与人红细胞结合。优选地,在抗体浓度介于200pM和100nM之间时,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体不会明显地与人红细胞结合。

[0247] (j) 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体是阻断性抗体,阻断CD47与SIRP $\alpha$ 的结合。在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体存在时巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力升高了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%。

[0248] (k) 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体或其片段能够诱发抗

体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。在一个实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体或其片段具有减少的诱发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 的能力。在一个实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体或其片段不能够诱发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。

[0249] (1) 本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体或其片段协同抑制PD-L1和CD47的一种或多种活性。在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体能够抑制肿瘤的增殖,肿瘤是肿瘤免疫逃逸。在一些实施方案中,肿瘤是胃肠道肿瘤(例如癌症),例如结肠癌。

[0250] 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体具有四条肽链,分别为两条重链和两条轻链。一条重链包含VHa,另一条重链包含VHb,一条轻链包含VL a,另一条轻链包含VL b;其中VHa、VL a构成的可变区a特异性结合PD-L1,VHb、VL b构成的可变区b特异性结合CD47。在一些实施方案中,两条轻链为相同的轻链。

[0251] 在一些实施方案中,本发明的双特异抗体使用了“杆入臼”(Knobs-into-Holes)技术(参见,例如,John B.B.Ridgway等人,‘Knobs-into-holes’ engineering of antibody CH3domains for heavy chain heterodimerization,Protein Engineering,9(7):p.617-21(1996);Shane Atwell等人,Stable heterodimers form remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library,J.Mol.Biol,270:p.26-35(1997);Paul Carter,Bispecific human IgG by design,Journal of Immunological Methods,248,7-15(2001);专利US8216805B2)。该技术可在本发明双特异抗体的不同链之间改造界面,以促进本发明双特异抗体的各条链正确缔合。通常,该技术涉及在一条链的界面引入“凸起”(“杆(knobs)”),在欲与之配对的另一条链的界面引入相应的“空穴”(“臼(holes)”),使得凸起可置于空穴中。可通过将来自一条链的重链恒定结构域的CH3结构域的界面的氨基酸侧链替换为较大的侧链(如氨基酸置换T366W(Eu编号))来构建凸起。通过将大氨基酸侧链替换为较小的侧链(例如氨基酸置换T366S、L368A和Y407V(Eu编号)),在欲配对的另一条链的重链恒定结构域的CH3结构域的界面构建与凸起相同或相似大小的补偿性空穴。在一些实施方案中,一条重链Fc结构域中包含Y349C,T366S,L368A和Y407V,另一条重链Fc结构域中包含S354C和T366W,形成“杆入臼(knob-in-hole)”的稳定缔合。

[0252] 在一些实施方案中,本发明双特异抗体的Fc区包含对Fc受体的结合亲和力的修饰。在一些实施方案中,所述Fc受体是Fc $\gamma$ 受体,特别地是人Fc $\gamma$ 受体。在一个实施方案中,所述Fc受体是活化性Fc受体。在一些实施方案中,所述修饰减少本发明双特异抗体的效应子功能。在一些实施方案中,所述效应子功能是抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一些实施方案中,所述修饰在所述免疫球蛋白分子Fc区内,特别地在其CH2区内。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白分子包含在免疫球蛋白重链第297位置(Eu编号)处的氨基酸置换。在一个具体实施方案中,所述氨基酸置换是N297A(参见,例如,J.Lund等,Oligosaccharide-protein interactions in IgG can modulate recognition by Fc gamma receptors,FASEB.J.9,115-119(1995))。

[0253] 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体的重链还包含信号肽序列,例如MEFGLSWVFLVAILKGVQC(SEQ ID NO:90)。在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体的轻链还包含信号肽序列,例如MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC(SEQ ID NO:91)。



[0254] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:49-63中任一项所示的VHa,如SEQ ID NO:64-74中任一项所示的VHb,以及如SEQ ID NO:75-80中任一项所示的VL a和VL b。

[0255] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:49所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:75所示的VL a和VL b。

[0256] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:49所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:76所示的VL a和VL b。

[0257] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:49所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:77所示的VL a和VL b。

[0258] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:49所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:78所示的VL a和VL b。

[0259] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:49所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:79所示的VL a和VL b。

[0260] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:49所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:80所示的VL a和VL b。

[0261] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:50所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:75所示的VL a和VL b。

[0262] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:50所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:76所示的VL a和VL b。

[0263] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:50所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:77所示的VL a和VL b。

[0264] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:50所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:78所示的VL a和VL b。

[0265] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:50所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:79所示的VL a和VL b。

[0266] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:50所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:80所示的VL a和VL b。

[0267] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:51所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:75所示的VL a和VL b。

[0268] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:51所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:76所示的VL a和VL b。

[0269] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:51所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:77所示的VL a和VL b。

[0270] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:51所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:78所示的VL a和VL b。

[0271] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:51所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:79所示的VL a和VL b。

[0272] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:51所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:80所示的VL a和VL b。

- [0273] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:52所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:75所示的VL a和VL b。
- [0274] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:52所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:76所示的VL a和VL b。
- [0275] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:52所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:77所示的VL a和VL b。
- [0276] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:52所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:78所示的VL a和VL b。
- [0277] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:52所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:79所示的VL a和VL b。
- [0278] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:52所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:80所示的VL a和VL b。
- [0279] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:53所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:75所示的VL a和VL b。
- [0280] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:53所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:76所示的VL a和VL b。
- [0281] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:53所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:77所示的VL a和VL b。
- [0282] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:53所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:78所示的VL a和VL b。
- [0283] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:53所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:79所示的VL a和VL b。
- [0284] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:53所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:80所示的VL a和VL b。
- [0285] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:54所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:75所示的VL a和VL b。
- [0286] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:54所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:76所示的VL a和VL b。
- [0287] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:54所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:77所示的VL a和VL b。
- [0288] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:54所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:78所示的VL a和VL b。
- [0289] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:54所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:79所示的VL a和VL b。
- [0290] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:54所示的VHa,如SEQ ID NO:64所示的VHb,以及如SEQ ID NO:80所示的VL a和VL b。
- [0291] 在一些实施方案中,重链恒定区为IgG1亚型(SEQ ID NO:81)。在一些实施方案中,重链恒定区包含如下一种或多种氨基酸突变:N297A、Y349C、S354C、T366W、T366S、L368A以及Y407V。

[0292] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:83所示的CHa和如SEQ ID NO:84所示的CHb;以及如SEQ ID NO:82所示的CLa和CLb。

[0293] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:84所示的CHa和如SEQ ID NO:83所示的CHb;以及如SEQ ID NO:82所示的CLa和CLb。

[0294] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:85所示的CHa和如SEQ ID NO:86所示的CHb;以及如SEQ ID NO:82所示的CLa和CLb。

[0295] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含如SEQ ID NO:86所示的CHa和如SEQ ID NO:85所示的CHb;以及如SEQ ID NO:82所示的CLa和CLb。

[0296] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含两条不同的重链和两条相同的轻链,重链a如SEQ ID NO:92所示,重链b如SEQ ID NO:93所示,轻链如SEQ ID NO:96所示。

[0297] 在一些实施方案中,抗PD-L1/CD47双特异抗体包含两条不同的重链和两条相同的轻链,重链a如SEQ ID NO:94所示,重链b如SEQ ID NO:95所示,轻链如SEQ ID NO:96所示。

[0298] 恒定区及全长序列如下:

[0299] SEQ ID NO:	序列

[0300]

81	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
82	RTVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
83	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
84	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
85	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
86	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
92	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWV GWISPYGGSTYYADSYRSRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA RRHWPGGFDYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ

	KSLSLSPGK
93	QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGGSLDNYYWSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGNTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARG GRFLERYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
[0301] 94	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWV GWISPYGGSTYYADSYRSRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA RRHWPGGFYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTPPVLDSDGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
95	QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGGSLDNYYWSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGNTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARG GRFLERYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK
96	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSPQLLIYA ASTLQSGVPSRFRSGSGGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYYSTPRTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

[0302] 本领域普通技术人员还应当理解,本发明所公开抗体或抗原结合片段序列是可以被替换的,替换后其氨基酸序列不同于该抗体的天然存在的氨基酸序列。例如,替换后的氨基酸序列可以是与起始序列相似的,比如与起始序列具有一定比例的同源性,比如它可以与起始序列的同源性是约80%、约85%、约90%、约95%、约98%或约99%,或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括终点)或其中任何值。

[0303] 在某些实施方案中,抗体包含的氨基酸序列具有一个或多个修饰基团。例如,本发明公开的双特异抗体可以被修饰以添加功能性基团(例如PEG、药物、毒素或标签)。

[0304] 本发明公开的抗体、抗原结合片段包括被修饰的衍生物,即通过任何类型的分子与抗体的共价连接进行修饰,其中共价连接不会阻止抗体与表位结合。包括但不限于以下

实例,抗体可以被糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、连接至细胞配体或其他蛋白质等。众多化学修饰中的任一种修饰可以通过现有技术进行,包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。

[0305] 在一些实施方案中,抗体可以与治疗剂、药物前体、肽、蛋白质、酶、病毒、脂类、生物反应调节剂、药剂或PEG缀合。

[0306] 抗体可以与治疗剂缀合或融合,所述治疗剂可包括可检测标记(如放射性标记)、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸、光敏治疗剂、诊断剂、药物或毒素的细胞毒性剂、超声增强剂、非放射性标记物及其组合物,和本领域已知的其它此类试剂。

[0307] 抗体可通过将其偶联至化学发光化合物来被可检测地标记。然后通过检测在化学反应过程中出现的发光从而确定化学发光标记的抗体的存在。化学发光标记化合物的实例包括鲁米诺、异鲁米诺、芳香吡啶酯、咪唑、吡啶盐和草酸酯。

[0308] 抗体和编码抗体的多聚核苷酸的制备方法

[0309] 本发明还公开了编码本发明所述抗体、抗原结合片段、及其衍生物的多聚核苷酸或核酸分子。本发明公开的多聚核苷酸可以编码VHa、VHb、VLa、VLb、CHa、CHb、CLa、CLb、Fc区、重链a、重链b、轻链等。制备抗体的方法是本领域公知的并且在本发明中有所描述。在某些实施方案中,本发明公开的抗体、抗原结合片段包括的可变区和恒定区都是全人源的。全人源抗体和抗原结合片段可以使用本领域中公开的技术和本发明所述的技术制备。例如,针对特定抗原的全人源抗体可以通过将抗原施用于转基因动物中来制备,所述转基因动物已经被改良过以响应抗原攻击而产生全人源抗体。可用于制备这类抗体的示例性技术参见美国专利6,458,592;6,420,140,其全部内容通过引用并入本文。本发明中所述双特异抗体是将特异性结合抗原a、抗原b的片段进行融合,双特异抗体中部分片段可参见上述结合单个抗原的抗体的制备方法。

[0310] 在一些实施方案中,制备的抗体不会在待治疗的动物(例如人类)中引起有害的免疫应答。在一实施方案中,本发明公开的抗体、抗原结合片段、或衍生物使用本领域公认的技术修饰以降低其免疫原性。例如,抗体可以被人源化、灵长类化、去免疫化或者可以制备嵌合抗体。这些类型的抗体来源于非人抗体,通常是鼠类或灵长类抗体,其保留或基本保留亲本抗体的抗原结合特性但在人体中免疫原性较低。其可以通过多种方法来实现,包括(a)将整个非人源的可变区移植到人源的恒定区以产生嵌合抗体;(b)将一个或多个非人类互补决定区(CDR)的至少一部分移植到人源的框架和恒定区中,保留或不保留关键的框架残基;或(c)移植整个非人源的可变区,但通过用类人源的部分置换表面残基从而“隐藏”它们。通常人框架区中的框架残基将被来自CDR供体抗体的相应残基取代,比如能够改善抗原结合的残基。这些框架替换可以通过本领域公知的方法鉴定,例如通过模拟CDR和框架残基的相互作用以鉴定对抗原结合起重要作用的框架残基和通过序列对比以鉴定特定位置上异常的框架残基。(参考美国专利5,585,089;其全部内容通过引用并入本文)。可以使用本领域公知的多种技术使抗体人源化,例如CDR移植(EP 239,400;WO 91/09967;美国专利5,225,539,5,530,101和5,585,089),修复或者表面重排(EP592,106;EP519,596;),以及链的重排(美国专利5,565,332),其全部内容通过引用并入本文。

[0311] 去免疫化也可用于降低抗体的免疫原性。在本发明中,术语“去免疫化”包括改变

抗体以修饰T细胞表位(参见例如WO/9852976A1和WO/0034317A2)。例如,分析来自起始抗体的重链可变区序列和轻链可变区序列,并产生来自每个可变区的人T细胞表位“图谱”,显示表位相对于互补决定区(CDRs)和序列内其它关键残基的位置。分析来自T细胞表位图的单个T细胞表位,以鉴定具有较低改变抗体活性风险的可选择的氨基酸取代。设计包含氨基酸取代组合的一系列可选的重链可变区序列和轻链可变区序列,随后将这些序列掺入到一系列结合多肽中。然后将包含修饰过的可变区和人类恒定区的完整重链和轻链的基因克隆到表达载体中,随后将质粒转入细胞系以产生完整的抗体。然后利用合适的生物化学和生物学实验中比较抗体,鉴定出最佳的抗体。

[0312] 本发明公开的双特异抗体或抗原结合片段的结合特异性可以通过体外实验,例如免疫共沉淀、放射免疫实验(RIA)或酶联免疫吸附实验(ELISA)来检测。

[0313] 或者,本发明双特异抗体中scFv可参见生产单链单元的技术(美国专利4,694,778)。通过氨基酸桥接Fv区的重链和轻链片段形成单链单元,产生单链融合肽。也可以使用在大肠杆菌中组装功能性Fv片段的技术(Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988))。可以采用酵母展示scFv,酵母展示载体可以为pYD1载体(Addgene),宿主酿酒酵母可以为酿酒酵母EBY100(Invitrogen)。

[0314] 可用于生产单链Fv(scFv)和抗体的技术的实例包括如美国专利4,946,778和5,258,498中所述。对于包括在人体内使用抗体和体外检测实验的某些用途,可以使用嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。嵌合抗体是抗体的不同部分源自不同动物物种的一类分子,例如具有鼠源单克隆抗体的可变区和人源免疫球蛋白恒定区的抗体。生产嵌合抗体的方法是本领域已知的,参见美国专利5,807,715、4,816,567和4,816,397,其全部内容通过引用并入本文。

[0315] 此外,在Newman, Biotechnology 10:1455-1460 (1992)中公开了另一种生产重组抗体的高效方法,特别地,该技术能产生含有猴可变区和人恒定区序列的灵长类抗体,该参考文献的全部内容通过引用并入本文。此外,该技术也在共同转让的美国专利5,658,570、5,693,780和5,756,096中有所提及,每个专利的全部内容通过引用并入本文。

[0316] 抗体可以通过本领域已知的多种方法制备,包括使用来自免疫球蛋白序列的抗体文库进行的噬菌体展示方法。也可参考美国专利4,444,887和4,716,111,以及PCT公布文本WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735和WO 91/10741,每个专利的全部内容通过引用并入本文。

[0317] 识别选择性表位的全人源抗体可以使用被称为“引导选择”的技术来生产。在该方法中,使用选择的非人单克隆抗体(例如小鼠抗体)来引导识别相同表位的全人源抗体的筛选(参见美国专利5,565,332,其全部内容通过引用并入本文)。

[0318] 在另一实施方案中,使用常规方法(例如使用能够特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针),可以分离编码所需单克隆抗体的DNA并对其进行测序。分离的和亚克隆的杂交瘤细胞可以作为此类DNA的来源。一旦分离出来,DNA可以被置于表达载体中,然后被转染到原核或真核宿主细胞如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不产生其他免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中。分离的DNA(如本文所述可以是合成的)也可用于制备抗体的恒定区和可变区的序列,如美国专利5,658,570中所述,其全部内容通过引用并入本文。该方法从所选细胞中提取RNA并转化成cDNA,然后使用Ig特异性引物

通过PCR技术进行扩增。适于此目的的合适的探针在美国专利5,658,570中也有所提及。

[0319] 此外,使用常规重组DNA技术,可将本发明的抗体的一个或多个CDR插入框架区,例如插入到人类框架区以构建人源化非全人源抗体。框架区可以是天然存在的或共有的框架区,优选人类框架区(参见Chothia et al.,*J.Mol.Biol.*278:457-479(1998),其列出一系列人类框架区)。一些多核苷酸可以编码框架区和CDR组合产生的与目标抗原的至少一个表位特异性结合的抗体。在框架区内可以进行一个或多个氨基酸取代,可以选择能够改善抗体与其抗原结合的氨基酸取代。另外,可用此法进行参与链间二硫键形成的一个或多个可变区中半胱氨酸残基的取代或缺失,从而产生缺少一个或多个链间二硫键的抗体分子。本领域技术范围内的对多核苷酸进行的其他改变也涵盖于本发明中。

[0320] 抗体可以通过使用常规重组DNA技术制备。使用本领域技术人员公知的技术可以选择、构建和培养生产抗体的载体及细胞系等。这些技术在各种实验室手册和主要出版物中均有描述,例如*Recombinant DNA Technology for Production of Protein Therapeutics in Cultured Mammalian Cells*,D.L.Hacker,F.M.Wurm,in Reference Module in Life Sciences,2017,其全部内容包括补充内容通过引用并入全文。

[0321] 在一些实施方案中,可以按常规方法根据本文所述抗体氨基酸序列设计合成编码抗体的DNA,将其置入表达载体中,然后转染宿主细胞,在培养基中培养被转染的宿主细胞产生抗体。表达抗体重链轻链的DNA可以置入同一载体中或置入不同载体中;若置入不同载体中,表达抗体重链的载体和轻链的载体可以以适当比例转染宿主细胞(如Tihomir S.Dodev et al.,*A tool kit for rapid cloning and expression of recombinant antibodies*,*Scientific Reports* volume 4,Article number:5885(2014);Stefan Schlatter et al.,*On the Optimal Ratio of Heavy to Light Chain Genes for Efficient Recombinant Antibody Production by CHO Cells*,*Biotechnol Progress*, 21:122-133(2005);Hadi Bayat et al.,*Evaluation of different vector design strategies for the expression of recombinant monoclonal antibody in CHO cells*,*Preparative Biochemistry&Biotechnology*,48(8):822-829(2018)。在一些实施方案中,表达抗体载体包括至少一个启动子元件,抗体编码序列,转录终止信号和polyA尾。其他元件包括增强子,Kozak序列及插入序列两侧RNA剪接的供体和受体位点。可以通过SV40的前期和后期启动子,来自逆转录病毒的长末端重复序列如RSV、HTLV1、HIVI及巨细胞病毒的早期启动子来获得高效的转录,也可应用其它一些细胞的启动子如肌动蛋白启动子。合适的表达载体可包括pIRES1neo,pRetro-Off,pRetro-On,PLXSN,或者Plncx,pcDNA3.1(+/-),pcDNA/Zeo(+/-),pcDNA3.1/Hygro(+/-),PSVL,PMSG,pRSVcat,pSV2dhfr,pBC12MI和pCS2等。常使用的哺乳动物细胞包括293细胞,Cos1细胞,Cos7细胞,CV1细胞,鼠L细胞和CHO细胞等。

[0322] 在一些实施方案中,插入基因片段需含有筛选标记,常见的筛选标记包括二氢叶酸还原酶,谷氨酰胺合成酶,新霉素抗性,潮霉素抗性等筛选基因,以便于转染成功的细胞的筛选分离。将构建好的质粒转染到无上述基因的宿主细胞,经过选择性培养基培养,转染成功的细胞大量生长,产生想要获得的目的蛋白。

[0323] 双特异抗体制备方法在文献中有广泛记载,例如Qiong Wang,et al.,*Design and Production of Bispecific Antibodies*,*Antibodies*,8,43(2019);Zhuang Zuo,et al.,



An efficient route to the production of an IgG-like bispecific antibody, Protein Engineering, Design and Selection, 13(5):361-367 (2000); Matthias Mack, et al., A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity, Proc. Natl. Acad. Sci., 92:7021-7025, (1995); Rodrigo Vazquez-Lombardi, et al., Transient expression of human antibodies in mammalian cells, Nature Protocols 13(1):99-117 (2018); Elisa Corsiero, Monoclonal Antibodies: Expression and Purification in a Basic Research Laboratory, Mater Methods, 6:1481 (2016)。

[0324] 此外,可以使用本领域技术人员已知的标准技术在编码本发明所述抗体的核苷酸序列中引入突变,包括但不限于导致氨基酸取代的定点突变和PCR介导的突变。变体(包括衍生物)编码相对于原重链可变区VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3和轻链可变区VL CDR1、VL CDR2或VL CDR3来说少于50个氨基酸的取代、少于40个氨基酸的替换、少于30个氨基酸的取代、少于25个氨基酸的取代、少于20个氨基酸的取代、少于15个氨基酸的取代、少于10个氨基酸的取代、少于5个氨基酸的取代、少于4个氨基酸的取代、少于3个氨基酸的取代或少于2个氨基酸的取代。或者可以沿着全部或部分编码序列时随机引入突变,例如通过饱和突变,以及可以筛选所得突变体的生物活性以鉴定保留活性的突变体。

[0325] 在一些实施方案中,本文所述取代为保守氨基酸取代。

[0326] 治疗方法

[0327] 本发明还提供了治疗方法和用途。在一些实施方案中,提供了用于治疗或改善各种类型的癌症、肿瘤或感染等相关疾病的方法,所述方法包括向患者施用有效剂量的所述的双特异抗体。在一些实施方案中,提供了所述的双特异抗体在用于治疗或改善癌症、肿瘤或感染等相关疾病中的应用。在一些实施方案中,提供了所述的双特异抗体在制备用于治疗或改善癌症、肿瘤或感染等相关疾病的药物中的应用。

[0328] 本发明涉及治疗以PD-L1和/或CD47为治疗靶点的相关疾病的方法;涉及可以通过消除、抑制或降低PD-L1与PD1的结合和/或CD47与SIRP $\alpha$ 的结合而改善、减缓、抑制或预防的任何疾病或病症的方法;涉及提供治疗受试者癌症或者肿瘤的方法、缓解受试者癌症或者肿瘤症状的方法、避免受试者肿瘤或者癌症复发的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本文所述的任何抗PD-L1/CD47双特异抗体或其片段。

[0329] 本发明提供的抗体及其抗原结合片段和包含其的药物组合物可以用作治疗剂,用于诊断、预后、监控、治疗、缓解和/或预防受试者中异常PD-L1和/或CD47的表达、活性和/或信号传递相关的疾病和病症。通过使用标准方法鉴定受试者中存在异常PD-L1或CD47的表达、活性和/或信号传递相关的疾病和病症时,可以给药本发明公开的单克隆抗体、双特异抗体及其抗原结合片段和包含其的药物组合物。

[0330] 鉴于现有技术中公开的多数CD47抗体能够引起人红细胞的血凝反应,目前仍然迫切需要获得不仅能够有效促进巨噬细胞的吞噬作用且不导致细胞凝集的新的抗CD47抗体。本申请公开的抗PD-L1/CD47双特异抗体满足了这方面的需求,其不仅可以有效促进吞噬作用,不会导致显著的红细胞凝集,更优地,不会明显地与人红细胞结合。

[0331] 在一些实施方案中,本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体能够以超高的亲和力与PD-L1结合,以高亲和力或中亲和力与CD47结合;通过与肿瘤细胞上PD-L1的特异性结合促

进了本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体对肿瘤细胞的选择性结合,避免了与许多正常组织中表达的CD47结合,减少副作用;通过当与CD47的亲合力远低于与PD-L1的亲合力,可显著扩大本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体的有效剂量范围。

[0332] 在一些实施方案中,用本发明所述的抗体治疗和/或预防的癌症包括但不限于实体瘤、血液学癌(例如,白血病、淋巴瘤、骨髓瘤,例如,多发性骨髓瘤)及转移性病灶。在一个实施方案中,癌是实体瘤。实体瘤的例子包括恶性肿瘤,例如,多个器官系统的肉瘤和癌,如侵袭肺、乳房、卵巢、淋巴样、胃肠道的(例如,结肠)、肛门、生殖器和生殖泌尿道(例如,肾、膀胱上皮、膀胱细胞、前列腺)、咽、CNS(例如,脑、神经的或神经胶质细胞)、头颈、皮肤(例如,黑素瘤)、鼻咽(例如,分化或未分化的转移性或局部复发性鼻咽癌)和胰腺的那些癌。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。在一个实施方案中,肿瘤是肿瘤免疫逃逸。在一些实施方案中,肿瘤是胃肠道肿瘤(例如癌症),例如结肠癌。

[0333] 对于任何特定患者的具体剂量和治疗方案将取决于各种因素,包括所使用的特定抗体或衍生物、患者的年龄和体重、一般健康状况、性别和饮食,以及给药时间、排泄频率、药物组合,以及所治疗的特定疾病的严重程度。由包括在本领域普通技术人员范围内的医疗护理人员对这些因素进行判断。所述剂量还将取决于待治疗的个体患者、给药途径、制剂类型、所用化合物的特性、疾病的严重程度以及所需的效果。所用剂量可以通过本领域熟知的药理学和药代动力学原理确定。在一些实施方案中,有效剂量的范围为从约0.01mg/kg到约100mg/kg,可以是例如每周两次(BIW)或至每月一次。

[0334] 抗体或衍生物的施用方法包括但不限于真皮内、肌肉、腹腔、静脉、皮下、鼻腔、硬脊膜外和口服注射。药物组合物可以通过任何方便的途径施用,例如通过输注或推注,通过上皮或皮肤粘膜(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以与其他生物活性剂共同施用。因此,含有本发明抗体的药物组合物可以口服给药、直肠给药、肠胃外给药、脑池内给药、阴道内给药、腹腔内给药、外敷(如通过粉末,软膏,滴剂或透皮贴剂)、口腔给药或通过口服或鼻腔喷雾给药。

[0335] 本发明使用的术语“肠胃外”是指包括静脉内、肌肉内、腹腔内、胸骨内、皮下和关节内注射和输注的施用方式。

[0336] 施用方式可以是全身施用或局部施用。此外,可能需要通过任何合适的途径将本发明的抗体引入中枢神经系统,包括脑室内和鞘内注射;脑室内注射可以通过脑室内导管连接到如贮液囊(可以是Ommaya贮液囊)来辅助注射。也可以通过肺部给药,例如通过使用吸入器或喷雾器,以及使用雾化的制剂。

[0337] 本发明抗体可以局部施用于需要治疗的区域;可以通过但不限于以下方式:手术期间局部输注,例如与手术后伤口敷料联合的局部应用,通过注射,通过导管,借助栓剂或借助植入物来实现,所述植入物是多孔的、无孔的或凝胶状的材料,包括膜(例如硅橡胶膜)或纤维。优选地,当施用本发明的蛋白质(包括抗体)时,必须注意使用不吸收蛋白质的材料。

[0338] 通常在进行体外测试用于治疗疾病的方法,包括施用本发明所述抗体或衍生物,然后在可接受的动物模型中体内测试期望的治疗性或预防性活性,最后施用于人体。合适的动物模型(包括转基因动物)是本领域普通技术人员所公知的。例如,用于证明本发明所述抗体、抗原结合片段的治疗用途的体外测定包括抗体对细胞系或患者组织样品的影响。

抗体对细胞系和/或组织样品的作用可以利用本领域技术人员已知的技术进行检测,例如本发明其他部分公开的技术。根据本发明的内容,可用于确定是否施用特异性抗体的体外测定实验包括体外细胞培养实验,其中患者组织样品在培养物中培养,并暴露于或以其他方式施用化合物,并观察这种化合物对组织样品的影响。

[0339] 各种已知输送系统可用于施用本发明抗体或衍生物或编码其的多核苷酸,例如包封于脂质体、微粒、微胶囊、能够表达所述化合物的重组细胞、受体介导的内吞作用(参见例如Wu andWu,1987,J.Biol.Chem.262:4429-4432)、作为逆转录病毒或其它载体的一部分的核酸的构建等。

[0340] 联合疗法

[0341] 在一些实施方案中,本发明抗体可以结合其它治疗或预防方案,包括施用一种或多种本发明抗体以及一种或多种其它治疗剂或方法一起使用或组合使用。对于组合治疗,抗体可以与其它治疗剂可同时或分开施用。当分开施用时,可以在施用另一种其它治疗剂之前或之后施用本发明抗体。

[0342] 在一些实施方案中,在向患者施用本发明的双特异抗体时,还可以向患者联合施用本文公开的抗体分子或药物组合物或免疫缀合物,以及一种或多种其它疗法,例如治疗方式和/或其它治疗剂(例如化疗剂、放疗剂或生物大分子药物)。

[0343] 此类组合疗法涵盖组合施用(其中两种或更多种治疗剂包含在同一配制剂或分开的配制剂中),和分开施用,在该情况中,可以在施用别的疗法,例如治疗方式和/或治疗剂之前,同时,和/或之后发生本发明的抗体的施用。抗体分子和/或其他疗法,例如治疗剂或治疗方式可以在活动性疾病期间或在缓解或活动度更小的疾病期间施用。抗体分子可以在其他治疗前、与其他治疗同时、治疗后或在疾病缓解期间施用。

[0344] 在一些实施方案中,本发明双特异抗体与化疗剂组合施用。在一些实施方案中,可与本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体一起施用的化疗剂包括但不限于抗生素衍生物(例如阿霉素、博来霉素、柔红霉素和放线菌素D)、抗雌激素药(如他莫昔芬)、抗代谢物(如氟尿嘧啶、5-FU、甲氨蝶呤、氟尿苷、干扰素 $\alpha$ -2b、谷氨酸、光神霉素,巯基嘌呤和6-巯基鸟嘌呤)、细胞毒性剂(如卡莫司汀、BCNU、洛莫司汀、CCNU、阿糖胞苷、环磷酰胺、雌莫司汀、羟基脲、甲基苄肼、丝裂霉素、白消安、顺铂和硫酸长春新碱)、激素(如甲羟孕酮、雌莫司汀磷酸钠、炔雌醇、雌二醇、醋酸甲地孕酮、甲睾酮、己烯雌酚二磷酸、氯烯雌醚和睾内酯)、氮芥衍生物(例美法仑、苯丁酸氮芥、二氯甲基二乙铵(氮芥)和噻替哌)、类固醇及其组合(如倍他米松磷酸钠),以及其它化合物(如氮烯唑胺、天冬酰胺酶、米托坦、硫酸长春新碱、硫酸长春碱和依托泊苷)。

[0345] 在一些实施方案中,本发明抗体与细胞因子联合施用。可以与本发明抗体一起施用的细胞因子包括但不限于IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、和IL-15等。

[0346] 在一些实施方案中,本发明双特异抗体与生物大分子药物联合施用。生物大分子药物的实例包括免疫治疗剂,包括但不限于适用于治疗患者的治疗性抗体。治疗性抗体的一些实例包括辛妥珠单抗、阿巴伏单抗、阿德卡妥姆单抗、阿富妥珠单抗、阿仑单抗、阿妥莫单抗、阿马妥昔单抗、阿纳妥姆单抗、阿西莫单抗、巴维妥昔单抗、贝妥莫单抗、贝伐单抗、比伐单抗、布莱纳妥姆单抗、布伦妥昔单抗、坎妥珠单抗、卡妥马索单抗、西妥昔单抗、西妥珠

单抗、西妥木单抗、克里瓦妥珠单抗、克那妥姆单抗、达拉妥姆单抗、乔奇妥单抗、杜利戈妥单抗、杜西吉妥单抗、地莫单抗、达塞妥珠单抗、达洛妥珠单抗、埃克洛莫昔单抗、埃洛妥珠单抗、恩西妥昔单抗、厄妥马索单抗、伊他拉昔珠单抗、法勒妥珠单抗、菲可拉妥珠单抗、菲吉妥姆单抗、弗兰沃妥单抗、富妥昔单抗、加尼妥单抗、吉妥珠单抗、吉伦妥昔单抗、格兰巴妥姆单抗、替伊莫单抗、伊戈伏单抗、伊姆加妥珠单抗、英达妥昔单抗、伊诺妥珠单抗、因替妥姆单抗、伊匹单抗、伊拉妥姆单抗、拉贝妥珠单抗、来沙木单抗、林妥珠单抗、洛沃妥珠单抗、卢卡妥姆单抗、玛帕妥姆单抗、玛妥珠单抗、米拉妥珠单抗、明瑞莫单抗、米妥姆单抗、莫斜妥姆单抗、纳那妥单抗、纳妥姆单抗、内吉妥姆单抗、尼莫妥珠单抗、诺费妥单抗、奥卡妥珠单抗、奥法木单抗、奥拉妥珠单抗、奥那妥珠单抗、奥泼妥珠单抗、奥戈伏单抗、帕尼单抗、帕萨妥珠单抗、帕崔妥单抗、彭妥姆单抗、帕妥珠单抗、平妥姆单抗、普拖木单抗、拉蔻妥姆单抗、拉吉妥姆单抗、里洛妥姆单抗、利妥昔单抗、洛巴妥姆单抗、沙妥莫单抗、思布妥珠单抗、思妥昔单抗、索力图单抗、塔卡妥珠单抗、塔普利妥珠单抗、特纳妥姆单抗、特普洛妥姆单抗、提咖妥珠单抗、拖西莫单抗、曲妥珠单抗、图库图珠单抗、尤不理妥昔单抗、维尔妥珠单抗、沃思妥珠单抗、伏妥莫单抗和扎鲁妥姆单抗等。

[0347] 在一些实施例中，本发明抗体可以与免疫检查点抑制剂一起使用。在一些实施方案中，本发明抗体与其它治疗或预防方案联合施用，例如放射性疗法。

[0348] 药物组合物

[0349] 本发明还提供了药物组合物。这样的组合物包含有效剂量的抗体或抗原结合片段以及药学上可接受的载体。在一些实施方案中，药物组合物还包含抗癌剂（例如免疫检查点抑制剂）。

[0350] 在一些实施方案中，术语“药学上可接受的”是指由政府的监管机构批准的或公认药典中列出的用于动物，特别是用于人类的物质。此外，“药学上可接受的载体”通常指是任何类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或制剂助剂等。

[0351] 术语“载体”是指可以与活性成分一起施用于患者的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。这此类药物载体可以是无菌液体，如水和油，包括石油、动植物或合成来源的油，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物静脉内给药时，水是优选的载体。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体，特别是用于注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如有需要，组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂，或pH缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。抗菌剂如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯、抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠、螯合剂如乙二胺四乙酸，以及调节张力的试剂如氯化钠或右旋葡萄糖也是可以预见的。这些组合物可以采取溶液、悬液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、散剂、缓释制剂等形式。该组合物可以用传统的粘合剂和载体如甘油三酯配制成栓剂。口服制剂可以包括标准载体，例如药物等级的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载体的实例在E. W. Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中有描述，在此通过引用并入本发明。此类组合物将含有临床有效剂量的抗体或抗原结合片段，优选以纯化后的形式，连同合适数量的载体，以提供适合于患者的给药形式。该制剂应该适用于给药模式。亲本制剂可以封装在安瓿瓶、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0352] 在一些实施方案中,根据常规步骤将组合物配制成适合静脉内注射于人体的药物组合物。用于静脉内给药的组合物通常是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂如利多卡因,从而缓解注射部位的疼痛。一般而言,有效成分以单位剂量形式单独供给或混在一起供给,如以干燥的冻干粉末或无水浓缩物的形式装在可指示活性剂份量的密封容器(如安瓿瓶或小袋)中。在通过输注施用组合物的情况下,可以用含有药用级无菌水或盐水的输液瓶来分装组合物。在通过注射施用组合物的情况下,可以使用注射用的无菌水或盐水的安瓿瓶,使得可以在施用之前混合有效成分。

[0353] 本发明的化合物可以配制成中性的或盐的形式。药学上可接受的盐包括衍生自如盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的阴离子形成的盐,以及衍生自如钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的阳离子形成的盐。

[0354] 实施例

[0355] 以下通过具体的实施例进一步说明本发明的技术方案,具体实施例不代表对本发明保护范围的限制。其他人根据本发明理念所做出的一些非本质的修改和调整仍属于本发明的保护范围。

[0356] 实施例1:抗原的制备

[0357] CD47-His抗原制备:在人CD47细胞外结构域(ECD)蛋白质(SEQ ID NO:1)的C-末端添加8×HIS标签(SEQ ID NO:3)构建成CD47重组蛋白。人CD47的ECD区通过基因合成并亚克隆到哺乳动物的表达载体(如pcDNA3.1(+)表达载体)中。在瞬时转染HEK293F细胞之后,获得基于镍的固定化金属亲和层析纯化(GE Healthcare)的CD47-His抗原。

[0358] PD-L1-His抗原制备:在人PD-L1细胞外结构域(ECD)蛋白质(SEQ ID NO:2)C-末端添加8×HIS标签(SEQ ID NO:3)构建成PD-L1重组蛋白。人PD-L1的ECD区通过基因合成并亚克隆到哺乳动物的表达载体(如pcDNA3.1(+)表达载体)中。在瞬时转染HEK293F细胞之后,获得基于镍的固定化金属亲和层析纯化(GE Healthcare)的PD-L1-His抗原。

[0359] CD47-ECD(SEQ ID NO:1):

[0360] MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFD  
GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETI IELKYRVVSWFSP

[0361] PD-L1-ECD(SEQ ID NO:2):

[0362] MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVH  
GEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDP  
VTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAE  
LVIPELPLAHPNER

[0363] 8×HIS(SEQ ID NO:3):

[0364] HHHHHHHH

[0365] 实施例2:抗体制备

[0366] 2.1酵母展示的抗PD-L1 scFv

[0367] 合成编码抗PD-L1抗体的scFv片段(包括重链可变区、轻链可变区以及重轻链可变区的连接子( $G_4S$ )<sub>3</sub>)的核酸序列,插入至载体中,并通过电转仪转进宿主酿酒酵母中获得阳性酵母克隆。将以上获得的阳性酵母克隆挑出,进行单克隆培养。其中,ATE阳性酵母克隆表面表达的scFv中重链可变区、轻链可变区与Atezolizumab是一致的,其他阳性酵母克隆表

面表达的scFv见表1,各VH SEQ ID NO:相应的序列如表2所示,对应的CDR如表3所示。连接子的氨基酸序列为GGGSGGGSGGGGS,其核酸序列为ggtggaggcggttcaggcggaggtggctctggcggtagcgatcg。

[0368] 表1:阳性酵母克隆展示的scFv

[0369]

编号	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:
CP11-27	49	75
CP11-36	50	75
CP11-46	51	75
CP11-47	52	75
CP11-55	53	75
CP11-71	54	75
CP14-16	55	75
CP14-80	56	75
CP21-8	57	75
CP21-47	58	75
CP21-59	59	75
CP22-34	60	75
CP22-40	61	75
CP22-44	62	75
CP22-45	63	75

[0370] 表2:抗PD-L1抗体重链可变区序列

[0371]

名称	可变区序列	SEQ ID NO:
CP11-27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS	49
CP11-36	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADDFRHRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS	50
CP11-46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADSLGDRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS	51
CP11-47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADHLSQRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS	52
CP11-55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADGMRSRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS	53
CP11-71	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADSYRSRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS	54
CP14-16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADPYVGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS	55
CP14-80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADSLKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS	56
CP21-8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADSYRARFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS	57
CP21-47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADYLHGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS	58

[0372]	CP21-59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSFSLKDSWIHWVRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS	59
	CP22-34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGWATRDSWIHWVRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS	60
	CP22-40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGLLPWGQGTLVTVSS	61
	CP22-44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLRPADSWIHWVRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS	62
	CP22-45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASNSHLRDSWIHWVRQAPG KGLEWVGVWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS	63

[0373] 表3:抗PD-L1抗体重链可变区CDR序列

名称	VH CDR1	SEQ ID NO:	VH CDR2	SEQ ID NO:	VH CDR3	SEQ ID NO:	
CP11-27	GFTFSDSWIH	4	GWISPYGGSTYYADSVKG	9	RHWPGGFDY	19	
CP11-36	GFTFSDSWIH	4	GWISPYGGSTYYADDFRH	10	RHWPGGFDY	19	
CP11-46	GFTFSDSWIH	4	GWISPYGGSTYYADSLGD	11	RHWPGGFDY	19	
CP11-47	GFTFSDSWIH	4	GWISPYGGSTYYADHLSQ	12	RHWPGGFDY	19	
CP11-55	GFTFSDSWIH	4	GWISPYGGSTYYADGMRS	13	RHWPGGFDY	19	
[0374] CP11-71	GFTFSDSWIH	4	GWISPYGGSTYYADSYRS	14	RHWPGGFDY	19	
CP14-16	GFTFSDSWIH	4	GWISPYGGSTYYADPYVG	15	RHWPGGFDY	19	
CP14-80	GFTFSDSWIH	4	GWISPYGGSTYYADSLKG	16	RHWPGGFDY	19	
CP21-8	GFTFSDSWIH	4	GWISPYGGSTYYADSYRA	17	RHWPGGFDY	19	
CP21-47	GFTFSDSWIH	4	GWISPYGGSTYYADYLHG	18	RHWPGGFDY	19	
CP21-59	SFSLKDSWIH	5	GWISPYGGSTYYADSVKG	9	RHWPGGFDY	19	
CP22-34	GWATRDSWIH	6	GWISPYGGSTYYADSVKG	9	RHWPGGFDY	19	
CP22-45	NSHLRDSWIH	7	GWISPYGGSTYYADSVKG	9	RHWPGGFDY	19	
CP22-44	GLRPADSWIH	8	GWISPYGGSTYYADSVKG	9	RHWPGGFDY	19	
[0375]	CP22-40	GFTFSDSWIH	4	GWISPYGGSTYYADSVKG	9	RHWPGGLLP	20

[0376] 2.2抗CD47抗体、抗PD-L1抗体及其制备

[0377] 2.2.1抗CD47抗体

[0378] 11种IgG1全抗的VH和VL的组合见表4;VH与CH组成抗体的重链,VL和CL组成抗体的



轻链;CH的序列如SED ID NO:81,CL的序列如SED ID NO:82所示;用“抗体”+抗体编号表示,如抗体17(抗体重链由如SED ID NO:65所示的VH和如SED ID NO:81所示的CH组成,抗体轻链由如SED ID NO:98所示的VL和如SED ID NO:82所示的CL组成)。

[0379] 表4对应的VH和VL序列见表5,其中,重链CDR见表6。

[0380] 表4:抗CD47抗体的可变区组合

抗体编号	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:	抗体编号	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:
L12-6-1	64	97	10	70	98
17	65	98	16	71	98
3-3	66	98	18	72	98
3-6	67	98	24	73	98
3	68	98	25	74	98
6	69	98	L12-6	64	102

[0382] 表5:抗体可变区序列

名称	序列	SEQ ID NO:
L12-6-VH/L12-6-1-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLDNYYWSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGNTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSV TAADTAVYYCARGGRFLERYWGQGLTVTVSS	64
17-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLDNYYWSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGNTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLRLRS VTAADTAVYYCARGGRFLERYWGQGLTVTVSS	65
3-3-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLDNYYWSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGNTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLRLRS VTAADTAVYYCARGGRIFGGYWGQGLTVTVSS	66
3-6-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLDNYYWSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGNTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLRLRS	67

[0384]

	VTAADTAVYYCARGGRIFAGYWGQGLTVTVSS	
3-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLDGYYSWIRQPPG KGLEWIGRIYGNSTTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLRLRSV TAADTAVYYCARGGRIFAGYWGQGLTVTVSS	68
6-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLNDYYYSWIRQPPG KGLEWIGRIYGNBDTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLRLRS VTAADTAVYYCARGGRILAGYWGQGLTVTVSS	69
10-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLDNYYYSWIRQPPG KGLEWIGRIYYNGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLRLRS VTAADTAVYYCARGGRILAGYWGQGLTVTVSS	70
16-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLDNYYYSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLRLRS VTAADTAVYYCARGGRIFSGYWGQGLTVTVSS	71
18-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLDNYYYSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLRLRS VTAADTAVYYCARGGRIFGYWGQGLTVTVSS	72
24-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLDNYYYSWIRQPPG KGLEWIGRIYGD SATNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLRLRSV TAADTAVYYCARGGRIFSGYWGQGLTVTVSS	73
25-VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSLDNYYYSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGNTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLRLRS VTAADTAVYYCARGGRIFGHWGQGLTVTVSS	74
L12-6-1-VL	EIVLTQPPSSLSASVGDRVTIPCRASLSIGSFLNWyQQRPGAP KLLIFAASSLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDFATYYC QQTYYTTPYTFGQGTKVDIK	97
L12-6-VL	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTIPCRASLSIGSFLNWyQQRPGAP KLLIFAASSLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDFATYYC QQTYYTTPYTFGQGTKVDIK	102
17-VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTISCRANQAIGTWLAWYQQKPG KAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQAEDVAV YYCQQYYTTP LTFGGGTKLEIK	98
X-VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTISCRANQAIGTWLAWYQQKPG KAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQAEDVAV YYCQQYYTTP LTFGGGTKLEIK	98

[0385] 注：X-VL代表3-3-VL、3-6-VL、3-VL、6-VL、10-VL、16-VL、18-VL、24-VL、

[0386] 25-VL

[0387] 表6:抗体VH CDR

名称	VH CDR1	SEQ ID NO:	VH CDR2	SEQ ID NO:	VH CDR3	SEQ ID NO:
L12-6-1-VH	DNYYWS	21	YIYYSGNTNYPNPSLKS	24	GGRFLERY	29
17-VH	DNYYWS	21	YIYYSGNTNYPNPSLKS	24	GGRFLERY	29
3-3-VH	DNYYWS	21	YIYYSGNTNYPNPSLKS	24	GGRIFGGY	30
3-6-VH	DNYYWS	21	YIYYSGNTNYPNPSLKS	24	GGRIFAGY	31
[0388] 3-VH	DGYYS	22	RIYGNSTTNYNPSLKS	25	GGRIFAGY	31
6-VH	NDYYWS	23	RIYGNNGDTNYPNPSLKS	26	GGRILAGY	32
10-VH	DNYYWS	21	RIYYNGNTNYPNPSLKS	27	GGRILAGY	32
16-VH	DNYYWS	21	YIYYSGNTNYPNPSLKS	24	GGRIFSGY	33
18-VH	DNYYWS	21	YIYYSGNTNYPNPSLKS	24	GGRIF GY	34
24-VH	DNYYWS	21	RIYGDSATNYPNPSLKS	28	GGRIFSGY	33
25-VH	DNYYWS	21	YIYYSGNTNYPNPSLKS	24	GGRIFGH	35
L12-6-VH	DNYYWS	21	YIYYSGNTNYPNPSLKS	24	GGRFLERY	29

[0389] 抗CD47抗体的阳性对照Hu5F9-G4 (Magrolimab) 是在HEK293F细胞中瞬时表达的人CD47抗体,其序列与美国专利US2015/0183874A1中的抗体“Hu5F9”的序列相同。

[0390] 2.2.2抗PD-L1抗体

[0391] 选取CP11-36、CP11-46、CP11-47、CP11-55、CP11-71制备成IgG1全抗,其中VH和VL如表1所示,CH的序列如SED ID NO:81所示,CL的序列如SED ID NO:82所示;并将上述5个抗PD-L1抗体分别命名为:L1-R2-4-36、L1-R2-4-46、L1-R2-4-47、L1-R2-4-55以及L1-R2-4-71。

[0392] 2.2.3具有共同轻链的抗CD47抗体和抗PD-L1抗体

[0393] 抗体的组装方案如表7所示。可变区组装方案为“VH+VL”,CH的序列如SED ID NO:81,CL的序列如SED ID NO:82所示。轻链可变区序列如表8所示,轻链可变区CDR如表9所示。

[0394] 表7:抗体编号、组装方案

抗 PD-L1 单克隆抗体					抗 CD47 单克隆抗体				
抗体编号	VH	SEQ ID	VL	SEQ ID	抗体编号	VH	SEQ ID	VL	SEQ ID

[0395]

		NO:		NO:			NO:		NO:
L1-R2-4	CP11-27	49	R2-4	75	47-R2-4	L12-6-VH	64	R2-4	75
L1-R2-6	CP11-27	49	R2-6	76	47-R2-6	L12-6-VH	64	R2-6	76
[0396] L1-R2-18	CP11-27	49	R2-18	77	47-R2-18	L12-6-VH	64	R2-18	77
L1-R2-78	CP11-27	49	R2-78	78	47-R2-78	L12-6-VH	64	R2-78	78
L1-R2-85	CP11-27	49	R2-85	79	47-R2-85	L12-6-VH	64	R2-85	79
L1-R2-89	CP11-27	49	R2-89	80	47-R2-89	L12-6-VH	64	R2-89	80

[0397] 表8:抗体轻链可变区序列

名称	可变区序列	SEQ ID NO:
R2-4	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSP QLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQ QYYSTPRTFGQGKVEIK	75
R2-6	EIVLTQSPSSVSASVGDKLTMTQCASQDIGKHLNHWYQQKPGKSP PKLLIYGASNLKTGVPSRFSGTGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYTTPYTFGQGRLEIK	76
R2-18	EIVLTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIGSWLAWYQQKPGKAP SLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQTEDVAVYYCQ QYFSTPYTFGQGKVDIK	77
R2-78	DIQMTQSPSSFSASTGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAP KLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QYYSTPYTFGQGKVDIK	78
R2-85	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIPCRASQGIGKFLAWYQQKPGKA PSLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQTEDVAVYYC QQYFSTPYTFGQGKVDIK	79
R2-89	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKSP PQLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC QYYSTPYTFGQGKVDIK	80

[0399] 表9: 抗体轻链可变区CDR序列

名称	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
R2-4	LASQTIGTWLA	36	AASTLQS	41	QYYSTPRT	45
R2-6	QASQDIGKHLN	37	GASNLKT	42	QQSYTTPYT	46
R2-18	RASQGIGSWLA	38	AASSLQS	43	QQYFSTPYT	47
R2-78	RASQGISSYLA	39	AASRLQS	44	QYYSTPYT	48
R2-85	RASQGIGKFLA	40	AASSLQS	43	QQYFSTPYT	47
R2-89	LASQTIGTWLA	36	AASSLQS	43	QYYSTPYT	48

## [0402] 2.2.4 抗体的制备

[0403] 将编码抗体重链的基因和抗体轻链的基因分别克隆至表达载体中,得到重链表达载体和轻链表达载体。再将重链表达载体和轻链表达载体瞬时转染HEK293F细胞,细胞表达后培养液使用ProteinA柱经由固定化金属亲和层析(IMAC)纯化得到抗体,测序后与预期序列一致。

## [0404] 2.3 抗PD-L1/CD47双特异抗体及其制备

## [0405] 2.3.1 抗PD-L1/CD47双特异抗体

[0406] 抗PD-L1/CD47双特异抗体结构示意图如图1所示,5种抗体可变区氨基酸序列见表10。从图1的结构示意图可见,抗PD-L1/CD47双特异抗体由4条多肽链组成。

[0407] 抗体BsAb-36、BsAb-46、BsAb-47、BsAb-71中,抗PD-L1的VH的C端连接到衍生于人IgG1的恒定区(SEQ ID NO:83)N端,其Fc区包含“杆入臼”突变,以与抗CD47重链稳定缔合;轻链由R2-4(SEQ ID NO:75)和人κ轻链恒定区(SEQ ID NO:82)连接,组成共同轻链;抗CD47的VH的C端连接到衍生于人IgG1的恒定区(SEQ ID NO:84)N端,其Fc区包含“杆入臼”突变,以与抗PD-L1重链稳定缔合。

[0408] 抗体BsAb-71-N297A是在BsAb-71上,Fc区进行N297A突变,以减弱抗体的ADCC效应。即BsAb-71-N297A的抗PD-L1重链如SEQ ID NO:92所示,抗CD47重链如SEQ ID NO:93所示,轻链如SEQ ID NO:96所示。

[0409] 表10:抗体编号,组装方案

抗体编号	可变区序列					
	抗 PD-L1 重链可变区	SEQ ID NO:	抗 CD47 重链可变区	SEQ ID NO:	共同轻链可变区	SEQ ID NO:
[0410] BsAb-36	CP11-36	50	L12-6-VH	64	R2-4	75
BsAb-46	CP11-46	51				
BsAb-47	CP11-47	52				
BsAb-71	CP11-71	54				
BsAb-71-N297A	CP11-71	54				

[0411] 2.3.2抗PD-L1/CD47双特异抗体的制备

[0412] 将编码步骤2.3.1中构建的抗PD-L1/CD47双特异抗体核苷酸序列构建到表达载体中,在HEK293F细胞中进行表达和纯化得到抗PD-L1/CD47抗体,具体如下:

[0413] 将编码抗PD-L1的重链的基因(以BsAb-71-N297A为例,基因序列如SEQ ID NO:99所示)和抗CD47的重链的基因(以BsAb-71-N297A为例,基因序列如SEQ ID NO:100所示)分别克隆至表达载体中,分别得到抗PD-L1重链质粒和抗CD47重链质粒;将编码抗PD-L1/CD47抗体的轻链的基因(以BsAb-71-N297A为例,基因序列如SEQ ID NO:101所示)克隆至表达载体中,得到轻链质粒。将以上构建正确的抗PD-L1重链质粒、抗CD47重链质粒和轻链质粒按照摩尔比1:1:2的比例瞬时转染HEK293F细胞。细胞表达后培养液经由亲和层析和离子交换层析后,获得抗PD-L1/CD47抗体(例如BsAb-71-N297A)。测序后证实抗体序列。

[0414] 利用分子排阻色谱法(size exclusion chromatography;SEC)检测收集的样品纯度。部分示例抗体的SEC结果如图2A和图2B所示,双特异抗体BsAb-46纯度为96.30%,BsAb-71纯度为97.05%。

[0415] 抗PD-L1重链核苷酸序列SEQ ID NO:99如下:

[0416] GAGGTGCAGCTGGTGGAATCCGGCGGAGGGCTGGTGCAGCCAGGTGGCTCTCTGAGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCACCTTTCCGACTCTTGATTCACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGAAAGGGACTGGAGTGGGTCGGTTGGATTTCTCCTTACGGAGGGAGTACATACTATGCCGACTCTTATAGGTCGCGATTCACTATCTCCGCTGATACCTAGCAAAAACACCGCATATCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCAGAAGACACAGCCGTCTACTATTGTGCAAGGCG

GCATTGGCCCGGTGGCTTTGATTACTGGGGTCAGGGTACCCTGGTGACCGTGTCCCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCC  
 TCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCTTCCAAGAGCACCAGCGGGCACCGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATT  
 ACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTCCGGCGCCTGACCTCCGGCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCT  
 GCAGAGCAGCGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTAGCTCCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATC  
 TGTAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCTAAGAGCTGTGACAAGACCCACA  
 CCTGCCCTCCTGTCTGCCCTGAGCTGCTGGGCGGCCATCTGTGTTCCCTGCCCTCCAAGCCCAAGGACAC  
 CCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTT  
 AACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTAC<sub>g<sub>c</sub>c</sub>TCCACCTACA  
 GaGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGAGCAACAA  
 GGCCCTGCCC GCCCTATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGC  
 CCCCCTGCAGAGACGAGCTGACCAAGAATCAGGTGAGCCTGTGGTGCCTGGTGAAGGGCTTACCCCAGCGACATC  
 GCCGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGATAGCGATGGCAG  
 CTTCTTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGATAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTAGCTGTAGCGTGATGC  
 ACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGCAAG

[0417] 其Fc的核酸序列为 (SEQ ID NO:87) :

[0418] GCCTCCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCTTCCAAGAGCACCAGCGGGCACC  
 CGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTCCGGCGCCTGACCTCC  
 GCGTGCACACATTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTAGCT  
 CCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGA  
 GCCTAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCTCCTTGTCTGCCCTGAGCTGCTGGGCGGCCATCTGTGTTT  
 CTGTTCCCTCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGT  
 CCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTTAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAG  
 AGAGGAGCAGTAC<sub>g<sub>c</sub>c</sub>TCCACCTACAGaGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG  
 GAGTACAAGTGAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCCTATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC  
 TAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCCCCTGCAGAGACGAGCTGACCAAGAATCAGGTGAGCCTGTGGTGCCTGG  
 TGAAGGGCTTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACC  
 CCCCCTGTGCTGGATAGCGATGGCAGCTTCTTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGATAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG  
 CAATGTGTTTAGCTGTAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCG  
 GCAAG

[0419] 抗CD47重链核苷酸序列SEQ ID NO:100如下:

[0420] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCTTCCGAGACCCTGTCCCTGACCTGTAC  
 CGTGAGCGGGCAGCCTGGATAACTATTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATC  
 GGCTACATCTACTATTCCGGCAACACCAATTACAACCCTTCCCTGAAGAGCCGGGTGACCATCTCCGTGGACACCA  
 GCAAGAACCAGTTTAGCCTGAAGCTGTCTCCGTGACCGCCGCTGATACCGCGTGTACTACTGTGCCAGGGGCGG  
 CCGGTTCCCTGGAGAGATATTGGGGCCAGGGTACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCTCCGTG  
 TTCCCTCTGGCCCCCTAGCAGCAAGTCCACCAGCGGGCACCGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTTC  
 CTGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACCTCCGGCGCCTGACCTCCGGCGTGCACACATTCCCCGCCGTGCTGCAGTC  
 CTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCAGCGTGGTGACCGTGCCTAGCTCCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAAC  
 GTGAACCACAAGCCCTCCAATACCAAGGTGGATAAGAAGGTGGAGCCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTC

CTCCTTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGAGGACCTTCTGTGTTCTGTTCCCTCCCAAGCCCAAGGACACCCTGAT  
GATCAGCAGAACCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGG  
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTAC<sub>gCtC</sub>CACCTACAGAGTGG  
TGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTG  
CCCCCCCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTGTACCCTGCCTCCCTC  
CAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGG  
AGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCCAGAGAATAATTACAAGACCACCCCCCGTGTGGACAGCGACGGATCTTTCTTT  
CTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGATAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCTGTAGCGTGATGCACGAGGC  
CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGCAAG

[0421] 其Fc的核酸序列为(SEQ ID NO:88) :

[0422] GCCAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGTCCACCAGCGGCGGCACCGC  
CGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTTCTGAGCCCCTGACCGTGTCTGGAATCCGGCGCCCTGACCTCC  
GGCGTGCACACATTCCCCGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCAGCGTGGTACCCTGCCTAGCT  
CCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCTCCAATACCAAGGTGGATAAGAAGGTGGA  
GCCAAGTCTCGCACAAGACCCACACCTGTCTCTTGTCCCGCCCCGAGCTGTGGGAGGACCTTCTGTGTTT  
CTGTTCCCTCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGA  
GCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAG  
AGAGGAGCAGTAC<sub>gCtC</sub>CACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG  
GAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGCCGCCCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCC  
CAGAGAGCCTCAGGTGTGTACCCTGCCTCCCTCCAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGCGCCG  
TGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCCAGAGAATAATTACAAGACCAC  
CCCCCGTGTGGACAGCGACGGATCTTTCTTTCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGATAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG  
CAACGTGTTTAGCTGTAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCG  
GCAAG

[0423] 轻链核苷酸序列SEQ ID NO:101如下:

[0424] GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGC  
CTGGCAAGTCAGACCATTGGTACATGGTTAGCATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTA  
TGCTGCATCCACTTTGCAATCAGGGTCCCATCTCGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCA  
TCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACTCCTCGACGTTCCGGCCAA  
GGGACCAAGGTGGAGATTAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAA  
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATA  
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC  
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTC  
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0425] 其CL的核酸序列为(SEQ ID NO:89) :

[0426] CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCC  
TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC  
GGGTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA  
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG

AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0427] 实施例3:抗PD-L1 scFv与抗原蛋白PD-L1-His-Biotin的结合力

[0428] 采用流式细胞仪检测酵母展示的抗PD-L1 scFv与抗原蛋白PD-L1-His-Biotin的结合力。将实施例2步骤2.1的阳性酵母克隆分别与1nM的PD-L1-His-Biotin抗原蛋白在室温孵育1h,再用pH7.4的PBS洗涤3次,然后再与Streptavidin-PE荧光二抗在室温孵育30min,再用pH7.4的PBS洗涤3次后,加入新的PBS,准备上机检测。

[0429] PD-L1-His-Biotin制备:将纯化得到的PD-L1-His抗原蛋白,按照每1mg蛋白加入26.6 $\mu$ l 10nM DMSO配置的biotin (Sigma-Aldrich, B4501-1G),室温孵育2h后,用pH7.4的PBS进行透析。

[0430] 如图3所示,本发明抗PD-L1 scFv (CP11-36、CP11-46、CP11-71、CP14-16和CP14-80)与PD-L1-His-Biotin抗原蛋白的结合力明显优于阳性对照ATE scFv;与阳性对照ATE scFv相比,本发明抗PD-L1 scFv (CP-11-47、CP-11-55、CP21-8、CP21-47和CP22-34)与PD-L1-His-Biotin抗原蛋白的结合力的基本相同。

[0431] 实施例4:抗CD47抗体的SIRP $\alpha$ 阻断活性

[0432] 采用ELISA竞争法,将11种抗体(抗体L12-6、抗体17、抗体3、抗体3-3、抗体3-6、抗体6、抗体10、抗体16、抗体18、抗体24、抗体25)和阳性对照(抗体Hu5F9-G4)稀释成不同浓度(12、6、3、2、1.5、1.2、0.75、0.375、0.188、0.094 $\mu$ g/ml),与包被在ELISA板上的CD47-His (2 $\mu$ g/ml)抗原室温孵育1小时,PBST洗四遍,再加入SIRP $\alpha$ -Fc-Bio (0.1 $\mu$ g/ml) (参考Thermo Scientific EZ-Link<sup>®</sup>NHS-Biotin Reagents试剂盒制备)配体与CD47-His抗原室温孵育1小时,PBST洗四遍。结合的SIRP $\alpha$ -Fc-Bio与HRP-缀合的链霉亲和素二抗产生化学发光反应,并通过读板机检测OD450值,根据OD450值换算出抗体的IC<sub>50</sub>,从而判断抗体的SIRP $\alpha$ 阻断活性。结果如表11所示。结果表明上述抗CD47抗体均能抑制SIRP $\alpha$ 结合细胞表面CD47。

[0433] 表11:抗CD47抗体IC<sub>50</sub>值

抗体	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	抗体	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
抗体 L12-6	0.913	抗体 10	1.056
抗体 17	0.795	抗体 16	0.975
抗体 3	0.844	抗体 18	1.232
抗体 3-3	0.939	抗体 24	1.412
抗体 3-6	1.122	抗体 25	1.31
抗体 6	1.102	阳性对照	1.095

[0435] 实施例5:抗PD-L1抗体的亲和力和对PD-1/PD-L1的阻断活性

[0436] Biacore检测亲和力解离常数(KD)

[0437] 采用Biacore系统(GE公司)通过动力学结合测定法确定本发明实施例2步骤2.2.2的抗体结合相应抗原的平衡解离常数(KD)。按照使用手册的方法,将5 $\mu$ g的抗原蛋白PD-L1-His固定到芯片上,以最高100nM(按照1:2稀释,5个梯度)的抗PD-L1抗体浓度为流动相,进行亲和力测定,并用Biacore T200 Evaluation Software分析结果。其中,阳性对照为ATE抗体(ATE抗体的氨基酸序列与Atezolizumab是一致的,其由HEK293F细胞表达)。表12显示



了示例抗体的KD数据,可见,与ATE抗体相比,本发明抗体L1-R2-4-36、L1-R2-4-46、L1-R2-4-47、L1-R2-4-55和L1-R2-4-71对PD-L1抗原的亲合力更高。

[0438] 表12:通过Biacore动力学结合测定法确定的示例抗体的解离常数 (KD\*)

[0439]	抗体编号	KD (M)
	L1-R2-4-36	$3.41 \times 10^{-10}$
	L1-R2-4-46	$2.82 \times 10^{-10}$
[0440]	L1-R2-4-47	$2.90 \times 10^{-10}$
	L1-R2-4-55	$3.71 \times 10^{-10}$
	L1-R2-4-71	$2.82 \times 10^{-10}$
	ATE	$1.84 \times 10^{-9}$

[0441] 注:\*拟合方式为:1:1Binding。

[0442] 抗PD-L1抗体的生物活性检测方法,对以上所述构建的抗PD-L1抗体对PD-1/PD-L1结合的抑制作用进行检测。

[0443] MOA法检测抗PD-L1抗体对PD-1/PD-L1的阻断活性

[0444] 抗PD-1/PD-L1抗体能够通过阻断PD-1和PD-L1的结合,从而解除对下游NFAT信号通路的抑制作用。采用Promega公司提供的MOA (Mechanisms of Action, MOA) 检测系统 (PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay, Propagation Model, Catalog J1252), 根据说明书提供的方法,通过检测荧光报告基因的表达反应出NFAT信号的激活情况,从而检测实施例2步骤2.2.2的抗体对PD-1/PD-L1结合的抑制作用。其中,阴性对照抗体IgG-Isotype购自北京义翘神州科技股份有限公司(目录号:HG1K)。

[0445] 活性检测前一天铺种CHO-PD-L1细胞(来自上述MOA检测系统):铺CHO-PD-L1前1-2天传代,丢弃培养上清,用无菌PBS洗一遍细胞。加入适量Trypsin (Gibco) 于37°C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中消化3-5min。加入新鲜培养基终止消化,转移细胞至50ml离心管并计数。取所需体积细胞,900rpm离心5min。加入DMEM-F12培养基 (Gibco),重悬细胞至 $4 \times 10^5$ 个细胞/mL。将细胞加入96孔白色细胞培养板 (Corning), 100 $\mu$ l/孔。细胞于37°C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜。

[0446] 检测当天处理Jurkat-PD1细胞(来自上述MOA检测系统):计数后取所需体积细胞,900rpm离心5min。用测定缓冲液(1640培养基 (Gibco) +1%FBS) 重悬细胞至 $1.25 \times 10^6$ 个细胞/ml,待用。将CHO-PD-L1细胞培养板中的培养基上清,吸弃95 $\mu$ l/孔,加入40 $\mu$ l/孔的测试样品(上述抗PD-L1抗体、ATE抗体以及阴性对照HG1K抗体,最高浓度为20 $\mu$ g/ml,2倍稀释在测定缓冲液中,总共9个梯度),再加入40 $\mu$ l Jurkat-PD1细胞,轻微震荡混匀,放置于37°C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养6小时。检测:提前将ONE-Glo™Luciferase Assay System(购自Promega, E6120)融化。6小时后,加入ONE-Glo™试剂,50 $\mu$ l/孔。室温放置5-10min,读数。实验结果如图4所示,本发明抗体L1-R2-4-36、L1-R2-4-46、L1-R2-4-47、L1-R2-4-55和L1-R2-4-71均可以有效阻断PD1/PD-L1的相互作用;与对照抗体ATE相比,抗体(L1-R2-4-36和L1-R2-4-46)具有更强的阻断活性。

[0447] 实施例6:共同轻链抗体亲和力及活性

[0448] Biacore检测亲和力解离常数 (KD)

[0449] 采用实施例5的Biacore检测亲和力和解离常数(KD)的方法测定实施例2步骤2.2.3的抗PD-L1抗体和抗CD47抗体的解离常数。结果如表13所示。

[0450] 表13:通过Biacore动力学结合测定法确定的示例抗体的解离常数(KD\*)

抗 PD-L1 单克隆抗体		抗 CD47 单克隆抗体	
抗体编号	KD (M)	抗体编号	KD (M)
L1-R2-4	$1.67 \times 10^{-9}$	47-R2-4	$3.29 \times 10^{-9}$
L1-R2-6	$1.03 \times 10^{-8}$	47-R2-6	$1.11 \times 10^{-9}$
L1-R2-18	$3.92 \times 10^{-9}$	47-R2-18	$3.12 \times 10^{-10}$
L1-R2-78	$8.99 \times 10^{-9}$	47-R2-78	$6.55 \times 10^{-7}$
L1-R2-85	$1.15 \times 10^{-8}$	47-R2-85	$2.75 \times 10^{-7}$
L1-R2-89	$4.08 \times 10^{-9}$	47-R2-89	$3.61 \times 10^{-10}$

[0452] 注:\*拟合方式为:1:1Binding。

[0453] 通过以上数据可见,本发明的不同轻链,能够同时分别与抗PD-L1和抗CD47的重链组成单克隆抗体,且分别与溶液中的人PD-L1和人CD47蛋白结合。

[0454] MOA法检测抗PD-L1抗体对PD-1/PD-L1的阻断活性

[0455] 采用实施例5的MOA法检测实施例2步骤2.2.3的抗PD-L1抗体对PD-1/PD-L1的阻断活性,实验结果如图5所示,本发明的不同轻链的抗PD-L1抗体,均可以有效阻断PD1/PD-L1的相互作用。

[0456] 抗CD47抗体红细胞凝集实验

[0457] 已知大多数的抗CD47抗体具有促进红细胞凝集的副作用,因而这些抗CD47抗体的治疗应用受到限制。因此,进一步检测本发明实施例2步骤2.2.3的抗CD47抗体的红细胞凝集作用。具体检测方法:采集新鲜人类血液,用生理盐水清洗三次后制备成2%人红细胞悬液,将2%人红细胞悬液与受试抗体(最高终浓度为800nM,两倍系列稀释,总共获得11个稀释后浓度)等体积混合,在37℃孵育4小时,随后评估抗体红细胞凝集情况,将96孔U型板倾斜45°,观察红细胞团的流向,如果呈“一字型”,说明红细胞没有发生凝集。在如以上测定法所述进行的实验中,红细胞凝集反应结果如图6所示。在高浓度情况下,47-R2-89和对照抗体Hu5F9-G4引起红细胞凝集,其它示例抗体不会引起红细胞凝集。可见,本发明的大部分抗CD47抗体,显著地降低红细胞凝集作用,因此在临床治疗中具有显著降低的副作用,可以广泛应用于多种癌症的治疗中。

[0458] 抗CD47抗体促进吞噬作用实验

[0459] 进行体外吞噬作用测定以评估实施例2步骤2.2.3的抗CD47抗体是否增强巨噬细胞对表达CD47的靶细胞的吞噬。简而言之,在抗CD47抗体(0.7nM)的存在下,将RAW264.7巨噬细胞( $2 \times 10^5$ 个/mL)与CFSE(Invitrogen,目录号:C34554)标记的Raji细胞( $4 \times 10^5$ 个/mL)以1:2比率铺板到24-孔底板中,37℃下避光孵育2小时。孵育完成时,用PBS洗涤细胞两次后,再加入100μlAPC-F4/80荧光抗体(eBiosciences),冰上(避光)孵育30分钟,PBS缓冲液洗涤两次并通过流式细胞术进行分析。分析吞噬指数,吞噬指数计算方式为:吞噬指数=CFSE-F4/80双阳性的巨噬细胞数(即吞噬了肿瘤细胞的巨噬细胞数)/每5000个巨噬细胞。

如图7可见,本发明的抗CD47抗体和Hu5F9-G4都可以有效诱导巨噬细胞对靶细胞发挥吞噬作用。

[0460] 实施例7:抗PD-L1/CD47双特异抗体的T<sub>m</sub>值的测定

[0461] 采用DSC(差式扫描热量仪, Malvern Panalytical, MicroCal VP-Capillary)的方法测定示例的双特异抗体以及参考抗体(此处用L1-R2-4-71作为参比品)的T<sub>m</sub>值,并据此初步判断示例的双特异抗体的热稳定性。

[0462] 样品蛋白于1×PBS缓冲液(pH7.4)中,制备成2mg/mL浓度的溶液。自40°C开始,以180°C/hr的速率对样品或空白缓冲液的比热容(C<sub>p</sub>)进行扫描。将样品扫描的结果分别扣除相应缓冲液的结果,利用得到的C<sub>p</sub>值对温度作图,其中,C<sub>p</sub>值明显升高的峰值所对应的温度即为样品的T<sub>m</sub>值。

[0463] 由表14可知,与传统抗体相似,示例的双特异抗体以及L1-R2-4-71参比样品均显示明显的T<sub>m</sub>值,包括70°C左右的CH2溶解温度以及位于85°C左右的CH3的溶解温度。同时可以看出,和L1-R2-4-71相比,双特异抗体的T<sub>m</sub>值略低,但差别并不明显,可以初步判定双特异抗体与单克隆抗体相近,具有良好的热稳定性。

[0464] 表14:抗PD-L1/CD47双特异抗体的T<sub>m</sub>值

升温速率 180°C/hr	T <sub>m</sub> 1 (°C)	T <sub>m</sub> 2 (°C)	T <sub>m</sub> 3 (°C)
	CH2	Fab	CH3
L1-R2-4-71	72.41	82.51	87.23
[0465] BsAb-36	70.64	80.56	84.35
BsAb-46	71.68	81.27	85.92
BsAb-47	71.66	81.61	86.13
BsAb-71	72.41	80.92	85.85

[0466] 实施例8:抗PD-L1/CD47抗体与两种抗原的结合活性

[0467] 使用Octet系统(ForteBio公司)通过动力学结合测定法确定示例的双特异抗体与PD-L1和CD47的结合能力。在实验开始时,将ProA生物传感器AHC传感器(Pa11,1506091)浸泡于PBS缓冲液中于室温平衡10分钟。向96孔黑色聚苯乙烯半量微孔板(Greiner)的孔中分别加入100μl双特异抗体溶液(BsAb-36、BsAb-46、BsAb-47或BsAb-71(20μg/ml))、100μl PD-L1-His抗原溶液(200nM、40nM、8nM、1.6nM、0.32nM和0)和100μl CD47-His抗原溶液(200nM、40nM、8nM、1.6nM、0.32nM和0)。将ProA生物传感器AHC浸没于分别含所述抗体溶液的孔中,在室温浸没120秒上样。随后将传感器在PBS缓冲液中洗涤至达到基线,然后浸没于含100μl PD-L1-His抗原溶液的孔中,随后将传感器在PBS缓冲液中洗涤至达到基线,然后浸没于含100μl CD47-His抗原溶液的孔中,监测抗体与抗原的缔合。转速为1000转/分钟,温度为30°C。结果如图8A所示。

[0468] 在另一个实验中,实验方法同上所述,但将抗体与两种抗原的结合次序与上面的实验调转,将ProA生物传感器AHC浸没于分别含所述抗体溶液的孔中,在室温浸没120秒上样。随后将传感器在PBS缓冲液中洗涤至达到基线,然后浸没于含100μl CD47-His抗原溶液的孔中,随后将传感器在PBS缓冲液中洗涤至达到基线,然后浸没于含100μl PD-L1-His抗

原溶液的孔中,监测抗体与抗原的缔合。结果如图8B所示。

[0469] 在另一个实验中,实验方法同上所述,但双特异抗体为BsAb-71-N297A,检测双特异抗体BsAb-71-N297A与两种抗原的结合活性。结果图8C所示,表明BsAb-71-N297A能够同时和溶液的PD-L1和CD47蛋白结合。

[0470] 通过以上结果可见,本发明示例的双特异抗体能够同时和溶液中的PD-L1和CD47蛋白结合,且在结合不同表位的时候不会互相干扰结合。

[0471] 实施例9:抗PD-L1/CD47双特异抗体的解离常数测定

[0472] 采用实施例5的Biacore检测亲和力解离常数(KD)的方法,对以上所述构建的抗PD-L1/CD47双特异抗体结合人PD-L1-His或人CD47-His抗原的平衡解离常数(KD)进行测定,并采用不同的拟合方式进行结果分析。表15显示了示例抗体的KD数据。

[0473] 表15:通过Biacore动力学结合测定法确定的示例抗体分别对人PD-L1-His或人CD47-His抗原的解离常数(KD)

抗体编号	人 PD-L1-His	人 CD47-His	
	KD (M) *	KD (M) ^	KD (M) *
[0474] BsAb-36	$3.52 \times 10^{-10}$	$4.49 \times 10^{-9}$	$2.80 \times 10^{-8}$
BsAb-46	$3.71 \times 10^{-10}$	$3.95 \times 10^{-9}$	$2.91 \times 10^{-8}$
BsAb-47	$2.23 \times 10^{-10}$	$4.77 \times 10^{-9}$	$2.84 \times 10^{-8}$
BsAb-71	$1.74 \times 10^{-10}$	$3.78 \times 10^{-9}$	$2.78 \times 10^{-8}$

[0475] 注:\*拟合方式为:1:1Binding;^拟合方式为:Two State Reaction。

[0476] 通过以上数据可见,采用1:1Binding的拟合方式,本发明示例的双特异抗体能够和溶液中的人PD-L1-His结合,且维持了亲本抗体的亲和力常数;本发明示例的双特异抗体能够和溶液中的人CD47-His蛋白结合,抗体的亲和力常数比亲本抗体弱,具有中等的抗CD47亲和力。

[0477] 实施例10:抗PD-L1/CD47双特异抗体与过量表达PD-L1或CD47的CHO细胞的结合分析

[0478] 通过流式细胞术测量本发明示例的抗PD-L1/CD47双特异抗体与过量表达人PD-L1或人CD47的CHO细胞的结合。简而言之,将人PD-L1或人CD47 cDNA插入到表达载体中,并转染至中国仓鼠卵巢癌细胞(CHO,Invitrogen),产生过量表达人PD-L1或人CD47的CHO细胞(PD-L1-CHO细胞或CD47-CHO细胞)。将PD-L1-CHO细胞或CD47-CHO细胞分别与不同系列稀释的示例的双特异抗体混匀,冰上孵育1h;用PBS洗涤细胞两次,再加入PE标记的抗人Fc抗体(Invitrogen,12-4998-82)荧光二抗,冰上避光孵育30分钟;PBS洗涤细胞两次后,再用PBS重悬细胞,通过FACS检测抗体与细胞的结合。结果见图9A和图9B。由图9A可见,本发明示例的双特异抗体均能够与细胞表面表达的PD-L1相结合,并维持了亲本抗体的结合EC50。同时,由图9B可见,本发明示例的双特异抗体均能够与细胞表面表达的CD47相结合。

[0479] 另一个实施例中,根据上述方法分析抗PD-L1/CD47双特异抗体BsAb-71-N297A与过量表达PD-L1或CD47的CHO细胞的结合。结果如图9C和图9D所示。由图9C可见,BsAb-71-N297A能够与细胞表面表达的PD-L1相结合,并维持了亲本抗体的结合EC50。同时,由图9D可见,BsAb-71-N297A能够与细胞表面表达的CD47相结合。

[0480] 现有报道已知CD47蛋白在人各种正常组织中,均有不同程度的表达,因而给抗CD47抗体的治疗应用带来一定的阻碍。在本发明中,通过策略性降低双特异抗体与人CD47的亲合力和结合力,预见能够在临床治疗中降低抗体引起的副作用,可以广泛应用于多种癌症的治疗。

[0481] 实施例11:基于MOA法检测本发明示例的双特异抗体的抗PD-L1活性

[0482] 采用实施例5的MOA检测方法,检测本发明示例的双特异抗体(BsAb-36、BsAb-46、BsAb-47、BsAb-71以及BsAb-71-N297A)的抗PD-L1活性。结果如图10A和图10B所示,本发明的双特异抗体可以解除PD-1/PD-L1相互作用对NFAT信号通路的抑制作用,且活性优于作为抗PD-L1抗体的L1-R2-4-71抗体单独使用。

[0483] 实施例12:抗PD-L1/CD47双特异抗体促进红细胞凝集活性的检测

[0484] 如实施例6所述的红细胞凝集实验检测方法,本发明进一步研究抗PD-L1/CD47双特异抗体的红细胞凝集作用。结果如图11所示,本发明示例的双特异抗体不引起红细胞凝集,其促进红细胞凝集的活性明显低于对照组Hu5F9-G4,与亲本抗体47-R2-4保持一致。

[0485] 实施例13:双特异抗体促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力检测(吞噬图)

[0486] 在基于流式细胞术的测定法中测量本发明示例的双特异抗体促进巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的能力。如实施例6所述的抗CD47抗体促进吞噬作用的实验方法,体外评估本发明示例的双特异抗体促进巨噬细胞对靶细胞的吞噬能力。从图12可见,抗PD-L1/CD47双特异抗体可以有效诱导巨噬细胞对靶细胞发挥吞噬作用,其诱导活性和抗CD47单克隆抗体相近。

[0487] 实施例14:双特异抗体与人红细胞的结合分析(RBC binding)

[0488] 现有技术已知只有在肿瘤细胞和红细胞上,阻断CD47-SIRP $\alpha$ 的相互作用会引发吞噬作用。这一机制决定了抗CD47抗体的作用机制,因而治疗引起的红细胞减少造成严重贫血,限制了抗CD47抗体的治疗应用。红细胞结合差异化特性的抗CD47抗体,可以有效规避与正常红细胞结合,降低临床治疗中的副作用。本实施例采用流式细胞术,检测示例的双特异抗体对肿瘤细胞和人红细胞的选择性结合性质。具体方法:采集新鲜人类血液,用生理盐水清洗三次后制备成2%人红细胞悬液,将2%人红细胞悬液与受试抗体(最高终浓度为200nM,两倍系列稀释,总共获得11个稀释后浓度)等体积混合,冰上孵育1h;用PBS洗涤细胞两次,再加入PE标记的抗人Fc抗体(Jackson Invitrogen,12-4998-82)荧光二抗,冰上避光孵育30分钟;PBS洗涤细胞两次后,再用PBS重悬细胞,通过FACS检测抗体与细胞的结合。以上述同样的方法,制备示例的双特异抗体与人T淋巴细胞白血病Jurkat细胞的检测样品。实验结果如图13A和图13B所示,在200nM的抗体浓度下,本发明的双特异抗体与人红细胞只有弱结合,明显弱于亲本抗体47-R2-4以及阳性对照抗体Hu5F9-G4与人红细胞结合;差异化红细胞结合特性并没有影响双特异抗体以及亲本抗体与肿瘤细胞的结合,因此,本发明的双特异抗体具有更高的临床应用安全性和更广泛的治疗适应性。

[0489] 实施例15:抗PD-L1/CD47双特异抗体对外源刺激下的人外周血单个核细胞(PBMC)释放IL2细胞因子的影响

[0490] 本研究将示例抗体和体外培养的、来源于不同供体的PBMC共同孵育,通过检测体系中IL2的表达量,从而反应出不同抗体对T细胞的激活作用。

[0491] PBMC分离:取捐献者(Donor1和Donor2)新鲜抗凝全血,用等体积PBS以1:1比例稀

释全血；在15mL离心管中加入7mL人外周血淋巴细胞分离液(达优,7912011),将7mL稀释后的血样缓慢加到入外周血淋巴细胞分离液(达优,7912011)液面上方,保持两液界面清晰,血样应浮在分离液上方,不能冲破界面；在室温下,水平转子800g离心30min,加速的加速度设为1,降速的加速度设为0；离心结束后,管底是红细胞,中间层是分离液,最上层是血浆/组织匀浆层,血浆层与分离液层之间是一层薄致密的白膜,即PBMC细胞层。小心吸取白膜层到新的离心管中；用PBS将吸出的PBMC稀释到一定体积,颠倒混匀。室温,水平转子,250g离心10min弃上清,重复洗两次；用PBS将细胞重悬计数备用。

[0492] 抗体准备:用PBMC培养液配置抗体BsAb-71-N297A(5 $\mu$ g/ml)、47-R2-4(5 $\mu$ g/ml)、L1-R2-4-71(5 $\mu$ g/ml)、47-R2-4(5 $\mu$ g/ml)+L1-R2-4-71(5 $\mu$ g/ml)。

[0493] PBMC刺激:取适量PBMC,用PBMC培养液重悬至细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/ml；往上述细胞悬液中加入SEE(Toxin Technology,ET404),使SEE浓度为100ng/ml；取一块96孔细胞培养板,将加了SEE的PBMC细胞均匀分到孔中,每孔100 $\mu$ l。将准备好的抗体溶液加入板中,每孔加入100 $\mu$ l,混匀,此时SEE终浓度为50ng/ml,抗体终浓度为2.5 $\mu$ g/ml,每孔中有总数为10万个的PBMC细胞。抗体与细胞于37 $^{\circ}$ C的二氧化碳培养箱中共同培养4天。

[0494] IL-2检测:将准备好的抗IL-2抗体包被96孔板(Costar<sup>®</sup> Assay Plate),每孔加入抗IL-2抗体100 $\mu$ l,4 $^{\circ}$ C孵育过夜；用微孔洗板机洗板2次,设置每次300 $\mu$ l洗涤液。在干净的纸上轻轻拍干,每孔加入200 $\mu$ l封闭液,于37 $^{\circ}$ C电热恒温培养箱孵育2小时；每孔加入75 $\mu$ l实验稀释液和25 $\mu$ l与抗体共孵育4天的PBMC上清液,加入稀释好的IL-2标准品(Human IL-2ELISA development kit(HRP),Mabtech),37 $^{\circ}$ C孵育2小时；用微孔洗板机洗板5次,设置每次300 $\mu$ l洗涤液。在干净的纸上轻轻拍干,每孔加入100 $\mu$ l抗IL-2生物素化抗体,于37 $^{\circ}$ C电热恒温培养箱孵育1小时；每孔加入100 $\mu$ l二抗溶液,于37 $^{\circ}$ C电热恒温培养箱孵育1小时；用微孔洗板机洗板8次,设置每次300 $\mu$ l洗涤液。在干净的纸上轻轻拍干；每孔加入100 $\mu$ l的TMB单组分显色液,于37 $^{\circ}$ C避光孵育10-15min；每孔加入50 $\mu$ l终止液终止显色反应,然后在多功能酶标仪中读数并分析数据,吸光值设定为450nm。

[0495] 实验结果如图14所示,本发明示例的抗PD-L1/CD47双特异抗体BsAb-71-N297A可以在体外有效激活T细胞。

[0496] 实施例16:本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体的体内抗肿瘤作用

[0497] 采用表达人CD47的MC38细胞(MC38-hCD47(Tg),江苏集萃药康生物科技有限公司)在hSIRP $\alpha$ 转基因的C57BL/6-hSIRP $\alpha$ 小鼠测定本发明的抗PD-L1/CD47双特异抗体的抗肿瘤作用。

[0498] 人SIRP $\alpha$ 转基因小鼠:雌性C57BL/6-hSIRP $\alpha$ 小鼠(5-8周龄)(江苏集萃药康生物科技有限公司)。

[0499] 实验细胞:收集对数生长期的小鼠结肠癌细胞MC38-hCD47(Tg),去除培养液并用PBS洗两次后接种；接种量: $1 \times 10^6$ /100 $\mu$ l/只；接种位置:右侧腹部区域位置。

[0500] 分组给药:当肿瘤平均体积在50-100mm<sup>3</sup>左右,对荷瘤小鼠进行随机分组；入组标准:肿瘤体积CV值小于30%；接种当天定义为D0天,并于分组当天,根据实验方案设计开始给药。给药剂量和给药方式如表16所示。细胞接种后,每周常规监测肿瘤对动物正常行为的影响。具体内容:实验动物的活动性,摄食和饮水情况,体重增加或降低情况,眼睛、被毛及其它异常情况。试验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。开始给药后,每周称量

体重两次。每周测量瘤体积两次，瘤体积计算方式为：肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ ) =  $0.5 \times a \times b^2$ ，a为肿瘤长径，b为肿瘤短径。监测至33天后结束。接种后第33天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%)，计算公式如下：TGI% =  $(1 - \text{治疗组平均相对肿瘤体积} / \text{溶媒组平均相对肿瘤体积}) \times 100\%$ 。

[0501] 肿瘤抑制率结果如图15和表17所示：在接种后第33天，与Isotype IgG1组对比，5mg/kg L1-R2-4-71单药肿瘤抑制率为32.25%；5mg/kg 47-R2-4单药肿瘤抑制率为18.90%；5mg/kg L1-R2-4-71与5mg/kg47-R2-4联合用药的肿瘤抑制率为76.73%；10mg/kg抗PD-L1/CD47双特异抗体BsAb-71-N297A的肿瘤抑制率为68.70%，明显优于单药的肿瘤抑制效果，与联合给药组相比没有统计学差异 ( $p > 0.05$ )。对小鼠体重检测的结果是各组小鼠的体重之间无显著性差异。

[0502] 表16:实验设计表

组别	给药组	剂量 (mg/kg)	途径	给药频率/周数
G1	Isotype IgG1 (义翘神州, HG1K)	10	腹腔注射	BIW×5
G2	L1-R2-4-71	5	腹腔注射	BIW×5
G3	47-R2-4	5	腹腔注射	BIW×5
G4	L1-R2-4-71 + 47-R2-4	5 + 5	腹腔注射	BIW×5
G5	BsAb-71-N297A	10	腹腔注射	BIW×5

[0504] 表17: 第33天肿瘤抑制率

组别	给药组	肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ )	肿瘤抑制率 (TGI%)
G1	IsotypeIgG1	1480.47	N/A
G2	L1-R2-4-71	969.32	32.25%
G3	47-R2-4	1264.65	18.90%
G4	L1-R2-4-71+47-R2-4	337.41	76.37%
G5	BsAb-71-N297A	450.76	68.70%

[0506] 尽管已经出于说明本发明的目的显示了某些代表性实施方案和细节，但是本领域技术人员显而易见的是可以对它们进行多种变化和修改而不脱离主题发明的范围。

## 序列表

<110> 百奥泰生物制药股份有限公司  
百奥泰生物制药股份有限公司

<120> 双特异抗体及其应用

<150> 202011232115.5

<151> 2020-11-06

<160> 102

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 139

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1           5           10           15

```



Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr  
 20 25 30  
 Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu  
 35 40 45  
 Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile  
 50 55 60  
 Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn  
 85 90 95  
 Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr  
 100 105 110  
 Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val  
 115 120 125  
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val  
 130 135 140  
 Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser  
 165 170 175  
 Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn  
 180 185 190  
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr  
 195 200 205  
 Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu  
 210 215 220  
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg  
 225 230 235  
 <210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 3  
 His His His His His His His His  
 1 5  
 <210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His

1                    5                    10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

Ser Phe Ser Leu Lys Asp Ser Trp Ile His

1                    5                    10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

Gly Trp Ala Thr Arg Asp Ser Trp Ile His

1                    5                    10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

Asn Ser His Leu Arg Asp Ser Trp Ile His

1                    5                    10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

Gly Leu Arg Pro Ala Asp Ser Trp Ile His

1                    5                    10

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 9

Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1                    5                    10                    15

Lys Gly

<210> 10  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 10  
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 1                   5                   10                   15  
 Arg His  
 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 11  
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Gly Asp  
 <210> 12  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 12  
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp His Leu  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Gln  
 <210> 13  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 13  
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Gly Met  
 1                   5                   10                   15  
 Arg Ser  
 <210> 14  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 14  
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr  
 1                   5                   10                   15

Arg Ser

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 15

Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Pro Tyr

1                   5                   10                   15

Val Gly

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 16

Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu

1                   5                   10                   15

Lys Gly

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 17

Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr

1                   5                   10                   15

Arg Ala

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 18

Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Tyr Leu

1                   5                   10                   15

His Gly

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 19

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr



<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 25

Arg Ile Tyr Gly Asn Ser Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 26

Arg Ile Tyr Gly Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 27

Arg Ile Tyr Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 28

Arg Ile Tyr Gly Asp Ser Ala Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 29

Gly Gly Arg Phe Leu Glu Arg Tyr

1                   5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 30

Gly Gly Arg Ile Phe Gly Gly Tyr

1                   5

<210> 31  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 31  
Gly Gly Arg Ile Phe Ala Gly Tyr  
1                   5  
<210> 32  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 32  
Gly Gly Arg Ile Leu Ala Gly Tyr  
1                   5  
<210> 33  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 33  
Gly Gly Arg Ile Phe Ser Gly Tyr  
1                   5  
<210> 34  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 34  
Gly Arg Gly Ile Phe Gly Tyr  
1                   5  
<210> 35  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 35  
Gly Gly Arg Ile Phe Gly His  
1                   5  
<210> 36  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 36  
 Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala  
 1                   5                   10  
 <210> 37  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 37  
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Lys His Leu Asn  
 1                   5                   10  
 <210> 38  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 38  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Ser Trp Leu Ala  
 1                   5                   10  
 <210> 39  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 39  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1                   5                   10  
 <210> 40  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 40  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Lys Phe Leu Ala  
 1                   5                   10  
 <210> 41  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 41  
 Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser  
 1                   5  
 <210> 42



<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 42  
Gly Ala Ser Asn Leu Lys Thr  
1                   5  
<210> 43  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 43  
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1                   5  
<210> 44  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 44  
Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser  
1                   5  
<210> 45  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 45  
Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr  
1                   5  
<210> 46  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 46  
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr  
1                   5  
<210> 47  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 47

Gln Gln Tyr Phe Ser Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 48

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 49

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 49

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

Gly 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> 50

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 50

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  
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 50 55 60  
 Arg His 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> 51

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 51

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  
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu  
 50 55 60  
 Gly Asp 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> 52

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 52

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  
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp His Leu  
                     50                    55                    60  
 Ser Gln 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> 53  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 53  
 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  
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Gly Met  
                     50                    55                    60  
 Arg Ser 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> 54  
 <211> 118  
 <212> PRT



<210> 56  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 56  
 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  
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu  
                   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> 57  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 57  
 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  
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr  
                   50                   55                   60  
 Arg Ala 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>	58		
<211>	118		
<212>	PRT		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<400>	58		
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
Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Tyr Leu			
	50	55	60
His 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>	59		
<211>	118		
<212>	PRT		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<400>	59		
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 Ser Phe Ser Leu Lys Asp Ser			
	20	25	30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Gly 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





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	Leu	Leu	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
						100						105				110
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
						115										
<210>	62															
<211>	118															
<212>	PRT															
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)															
<400>	62															
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	Leu	Arg	Pro	Ala	Asp	Ser	
				20						25				30		
Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
				35						40				45		
Gly	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>	63															
<211>	118															
<212>	PRT															
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)															
<400>	63															
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	Asn	Ser	His	Leu	Arg	Asp	Ser	
				20						25				30		

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly 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> 64

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 64

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

<210> 65

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 65

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

1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Asp Asn Tyr			
	20	25	30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys			
	50	55	60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80
Arg Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95
Arg Gly Gly Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
	100	105	110
Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	66		
<211>	116		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<400>	66		
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Asp Asn Tyr			
	20	25	30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys			
	50	55	60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80
Arg Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95
Arg Gly Gly Arg Ile Phe Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
	100	105	110
Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	67		
<211>	116		
<212>	PRT		

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 67

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

<210> 68

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 68

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

<210> 69  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 69  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1                   5                   10                   15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Asn Asp Tyr  
                   20                   25                   30  
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                   40                   45  
 Gly Arg Ile Tyr Gly Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
                   50                   55                   60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65                   70                   75                   80  
 Arg Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                   85                   90                   95  
 Arg Gly Gly Arg Ile Leu Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
                   100                   105                   110  
 Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 70  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 70  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1                   5                   10                   15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Asp Asn Tyr  
                   20                   25                   30  
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                   40                   45  
 Gly Arg Ile Tyr Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
                   50                   55                   60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65                   70                   75                   80  
 Arg Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                   85                   90                   95  
 Arg Gly Gly Arg Ile Leu Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

	100	105	110
Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	71		
<211>	116		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<400>	71		
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Asp Asn Tyr			
	20	25	30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys			
	50	55	60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80
Arg Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95
Arg Gly Gly Arg Ile Phe Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
	100	105	110
Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	72		
<211>	115		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<400>	72		
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Asp Asn Tyr			
	20	25	30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys			
	50	55	60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80



50	55	60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu		
65	70	75
Arg Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		80
	85	90
Arg Gly Gly Arg Ile Phe Gly His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		95
	100	105
Val Ser Ser		110
	115	
<210>	75	
<211>	107	
<212>	PRT	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	75	
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp		15
	20	25
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile		30
	35	40
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		45
	50	55
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		60
65	70	75
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg		80
	85	90
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		95
	100	105
<210>	76	
<211>	107	
<212>	PRT	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	76	
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Lys Leu Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Lys His		15
	20	25
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile		30
	35	40
		45



Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Thr 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 Ser Tyr Thr Thr Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 77

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 77

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

<210> 78

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 78

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ser Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser 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 Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly









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

<210> 84  
<211> 330  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 84

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

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330  
 <210> 85  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 85  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	210	215	220	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	225	230	235	240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	245	250	255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	260	265	270	
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	275	280	285	
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	290	295	300	
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	305	310	315	320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							325	330		
<210> 86																			
<211> 330																			
<212> PRT																			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)																			
<400> 86																			
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	



Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 87

<211> 990

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 87

gcctccacca agggcccctc cgtgttccct ctgcccctt cttccaagag caccagcggc 60  
 ggcaccgccg ctctgggatg tctggtgaag gattactttc cggagcctgt gaccgtgagc 120  
 tggaactccg gcgccctgac ctccggcgtg cacacattcc ctgccgtgct gcagagcagc 180  
 ggccctgtact ccctgagcag cgtggtgacc gtgcctagct ccagcctggg caccagacc 240  
 tacatctgta acgtgaacca caagccttcc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagcct 300  
 aagagctgtg acaagacca cacctgcctt ccttgtcctg ccctgagct gctgggcggc 360  
 ccatctgtgt tctgttccc tcccagccc aaggacacc tgatgatcag cagaaccccc 420  
 gaggtgacct gtgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaggtgaa gtttaactgg 480

tacgtggatg gcgtggaggt gcacaatgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacgcc	540
tccacctaca gagggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaatggcaag	600
gagtacaagt gtaaggtag caacaaggcc ctgcccgcc ctatcgagaa gaccatcagc	660
aaggccaagg gccagcctag ggagcctcag gtgtacaccc tgccccctg cagagacgag	720
ctgaccaaga atcaggtag cctgtggtgc ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagtccaa tggccagcct gagaacaatt acaagaccac cccccctgtg	840
ctggatagcg atggcagctt ctttctgtac agcaagctga ccgtggataa gtccaggtgg	900
cagcagggca atgtgttag ctgtagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa tctactacacc	960
cagaagagcc tgagcctgtc ccccggaag	990

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 990

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 88

gccagcacca agggcccctc cgtgttcct ctggccccta gcagcaagtc caccagcggc	60
ggcaccgccg ctctgggatg tctggtgaag gactacttct ctgagcccgt gaccgtgtcc	120
tggaactccg gcgccctgac ctccggcgtg cacacattcc ccgccgtgct gcagtctctc	180
ggcctgtact ccctgtccag cgtggtgacc gtgcctagct ccagcctggg caccagacc	240
tacatctgta acgtgaacca caagccctcc aataccaagg tggataagaa ggtggagccc	300
aagtctgcg acaagacca cacctgtcct ccttgccccg ccccgagct gctgggagga	360
ccttctgtgt tctgttccc tccaagccc aaggacacce tgatgatcag cagaaccct	420
gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgagc cacgaggacc ctgaggtgaa gttcaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaatgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacgcc	540
tccacctaca gagggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggattggct gaacggcaag	600
gagtacaagt gcaaggtag caataaggcc ctgcccgcc ccatcgagaa gaccatctcc	660
aaggccaagg gccagcccag agagcctcag gtgtgtaccc tgccctcctc caggatgag	720
ctgaccaaga accaggtag cctgagctgc gccgtgaagg gcttctaccc cagcgatctc	780
gccgtggagt gggagtccaa cggccagccc gagaataatt acaagaccac cccccctg	840
ctggacagcg acgatctt ctttctggtg tccaagctga ccgtggataa gtccaggtgg	900
cagcagggca acgtgttag ctgtagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc	960
cagaagtccc tgtccctgag ccccggaag	990

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 89

cgtacggtag ctgcaccatc tgtttctatc ttcccgcct ctgatgagca gttgaaatct	60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag	120
tggaaggtag ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac	180

agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	240									
aaacacaaag	tctacgctg	cgaagtcacc	catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	300									
agcttcaaca	ggggagagtg	t				321									
<210>	90														
<211>	19														
<212>	PRT														
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
<400>	90														
Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly
1				5					10					15	
Val	Gln	Cys													
<210>	91														
<211>	22														
<212>	PRT														
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
<400>	91														
Met	Asp	Met	Arg	Val	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys
1				5						10				15	
Phe	Pro	Gly	Ala	Arg	Cys										
				20											
<210>	92														
<211>	448														
<212>	PRT														
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
<400>	92														
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	
Gly	Trp	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Tyr
				50					55					60	
Arg	Ser	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 Cys Arg Asp Glu Leu 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



	245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
	260	265	270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
	275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
	290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
305	310	315	320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
	325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro			
	340	345	350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val			
	355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly			
	370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp			
385	390	395	400
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp			
	405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His			
	420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	435	440	445
<210> 94			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<400> 94			
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
Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr			
	50	55	60
Arg Ser Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr			



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 Val 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> 95  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 95  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Asp Asn Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Gly Gly Arg Phe Leu Glu Arg 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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu  
 180 185 190  
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
 195 200 205



Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 210 215 220  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270  
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320  
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350  
 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val  
 355 360 365  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415  
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 <210> 96  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 96  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln 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 Gln Tyr Tyr Ser Thr 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> 97  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 97  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Pro Cys Arg Ala Ser Leu Ser Ile Gly Ser Phe  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Phe Ala Ala Ser Ser Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Thr Thr Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
 100 105

<210> 98

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 98

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Asn Gln Ala Ile Gly Thr Trp  
 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Thr Thr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 99

<211> 1344

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 99

gaggtgcagc tgggtggaatc cggcggaggg ctggtgcagc caggtggctc tctgagactg 60  
 agttgcgccg cttcaggatt caccttttcc gactcttggg ttcactgggt gcgccaggcc 120  
 cccgaaaagg gactggagtg ggtcggttgg atttctcctt acggaggag tacatactat 180  
 gccgactctt ataggtcgcg attcactatc tccgtgata ctagcaaaaa caccgcatat 240  
 ctgcagatga actccctgag ggcagaagac acagecgtct actattgtgc aaggcggcat 300  
 tggcccgggtg gctttgatta ctggggtcag ggtaccctgg tgaccgtgtc ctccgctcc 360  
 accaagggcc cctccgtgtt ccctctggcc ccctettcca agagcaccag cggcggcacc 420  
 gccgctctgg gatgtctggt gaaggattac tttcccgagc ctgtgaccgt gagctggaac 480  
 tccggcgccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccctgccg tgctgcagag cagcggcctg 540  
 tactccctga gcagcgtggt gaccgtgcct agctccagcc tgggcacca gacctacatc 600  
 tgtaacgtga accacaagcc ttccaacacc aaggtggaca agaaggtgga gcctaagagc 660

tgtgacaaga cccacacctg ccctccttgt cctgcccctg agctgctggg cggcccatct	720
gtgttcctgt tccctcccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg	780
acctgtgtgg tggatgatgt gtcccacgag gaccctgagg tgaagttaa ctggtacgtg	840
gatggcgtgg aggtgcacaa tgccaagacc aagcccagag aggagcagta cgcctccacc	900
tacagagtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	960
aagtgttaagg tgagcaacaa ggccctgccc gccctatcg agaagacat cagcaaggcc	1020
aagggccagc ctagggagcc tcaggtgtac accctgcccc cctgcagaga cgagctgacc	1080
aagaatcagg tgagcctgtg gtgctgggtg aagggttct accccagcga catgcccgtg	1140
gagtgggagt ccaatggcca gcctgagaac aattacaaga ccaccccc tgtgctggat	1200
agcgatggca gcttctttct gtacagcaag ctgaccgtgg ataagtccag gtggcagcag	1260
ggcaatgtgt ttagctgtag cgtgatgcac gaggcctgc acaatcacta caccagaag	1320
agcctgagcc tgtccccgg caag	1344
<210> 100	
<211> 1338	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 100	
caggtgcagc tgcaggagtc cggccctggc ctggtgaagc cttccgagac cctgtccctg	60
acctgtaccg tgagcggcgg cagcctggat aactattact ggagctggat ccggcagcct	120
cctggcaagg gcctggagtg gatcggctac atctactatt ccggcaacac caattacaac	180
ccttcctga agagccgggt gaccatctcc gtggacacca gcaagaacca gtttagcctg	240
aagctgtcct ccgtgaccgc cgctgatacc gccgtgtact actgtgccag gggcggccgg	300
ttcctggaga gatattgggg ccagggtacc ctggtgaccg tgagcagcgc cagcaccaag	360
ggcccctccg tgttccctct ggcccctagc agcaagtcca ccagcggcgg caccgccgt	420
ctgggatgtc tggatgaagga ctactttcct gagcccgtga ccgtgtcctg gaactccggc	480
gccctgacct ccggcgtgca cacattccc gccgtgctgc agtcctccgg cctgtactcc	540
ctgtccagcg tggatgaccg gcctagctcc agcctgggca ccagaccta catctgtaac	600
gtgaaccaca agccctcaa taccaagggt gataagaagg tggagcccaa gtctgagcag	660
aagaccaca cctgtcctcc ttgccccgcc cccgagctgc tgggaggacc ttctgtgttc	720
ctgttccctc ccaagcccaa ggacacctg atgatcagca gaaccctga ggtgacctgt	780
gtggtggtgg acgtgagcca cgaggacct gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc	840
gtggaggtgc acaatgcca gaccaagccc agagaggagc agtacgctc cacctacaga	900
gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gattggctga acggcaagga gtacaagtgc	960
aaggtgtcca ataaggcct gccgcccc atcagaaga ccatctcaa ggccaagggc	1020
cagcccagag agcctcaggt gtgtacctg cctccctcca gggatgagct gaccaagaac	1080
caggtgtccc tgagctgcgc cgtgaagggc ttctaccca gcgatatgc cgtggagtgg	1140
gagtccaacg gccagcccga gaataattac aagaccacc ccccgtgct ggacagcagc	1200
ggatctttct ttctgggtgc caagctgacc gtggataagt ccaggtggca gcagggaac	1260
gtgttttagct gtagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtcctg	1320

tcctgagcc cggcaag	1338
<210> 101	
<211> 642	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 101	
gaaattgtgc tgactcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc tggcaagtca gaccattggt acatggttag catggtatca gcagaaacca	120
gggaaatctc ctcagtcct gatctatgct gcatecactt tgcaatcagg ggtcccatct	180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat tteactetca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagatgttg caacttatta ctgtcagcaa tattatagta ctctcggac gttcggccaa	300
gggaccaagg tggagattaa acgtacggtg gctgcacat ctgttctcat ctccccgcca	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcttctgaa taacttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt	642
<210> 102	
<211> 107	
<212> PRT	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 102	
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1                    5                    10                    15	
Asp Arg Val Thr Ile Pro Cys Arg Ala Ser Leu Ser Ile Gly Ser Phe	
20                    25                    30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
35                    40                    45	
Phe Ala Ala Ser Ser Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50                    55                    60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro	
65                    70                    75                    80	
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Thr Thr Pro Tyr	
85                    90                    95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys	
100                    105	

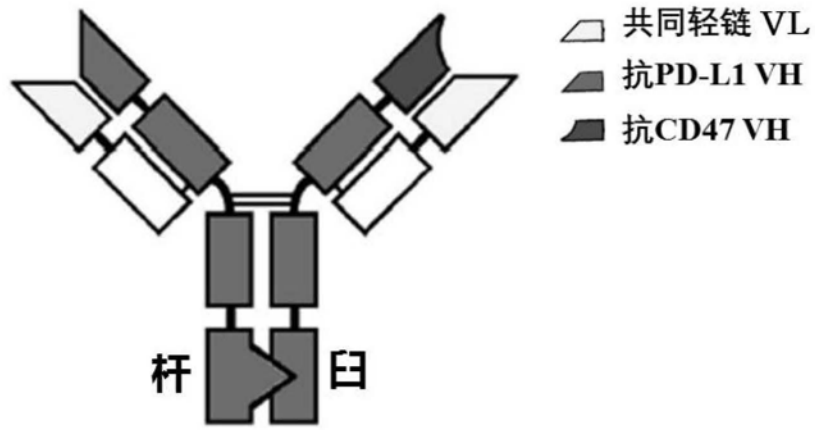


图1

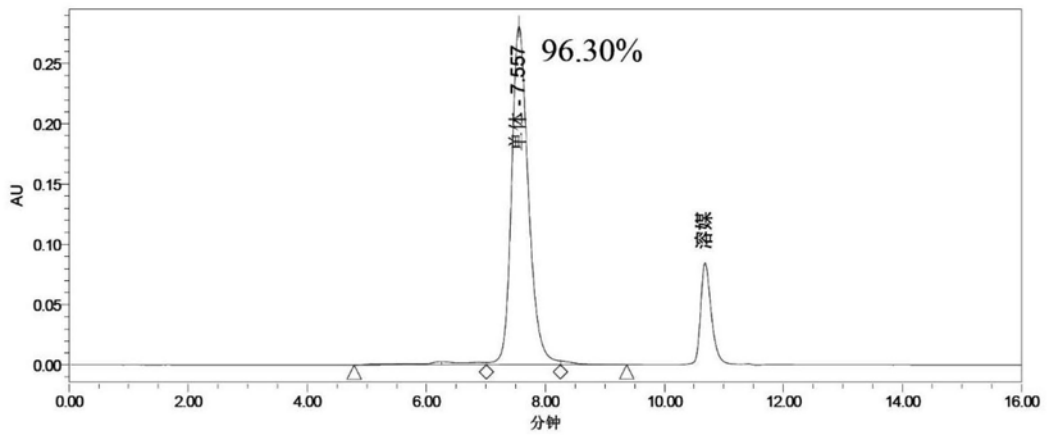


图2A

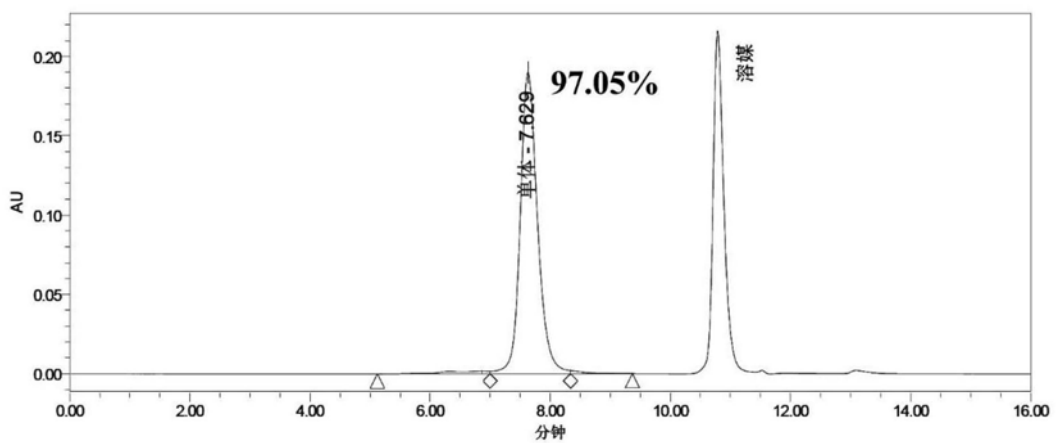


图2B

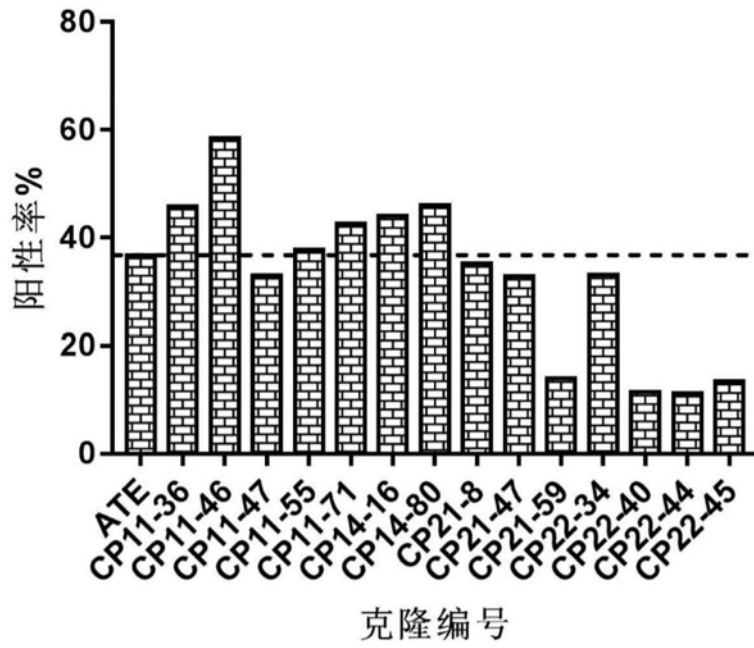


图3

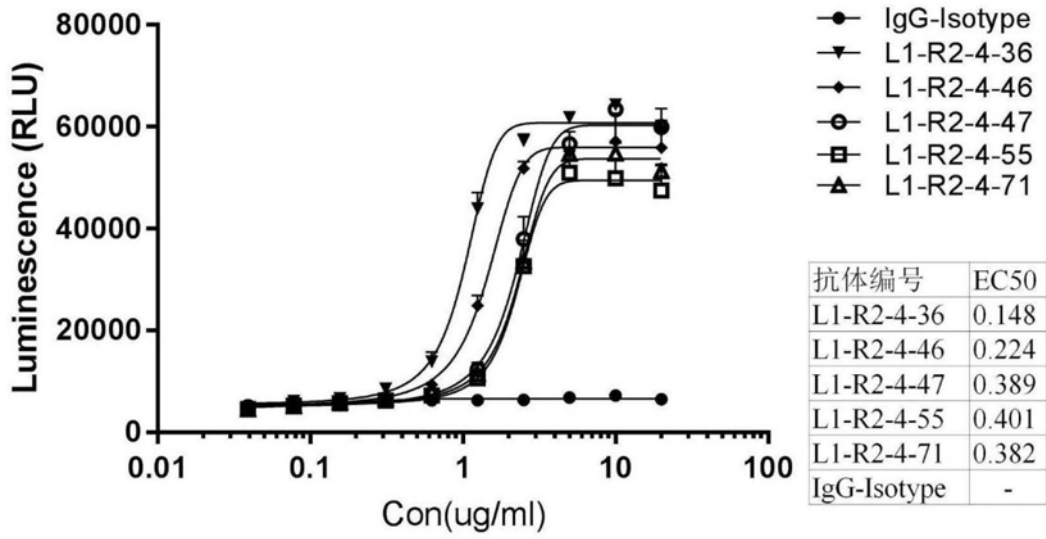


图4

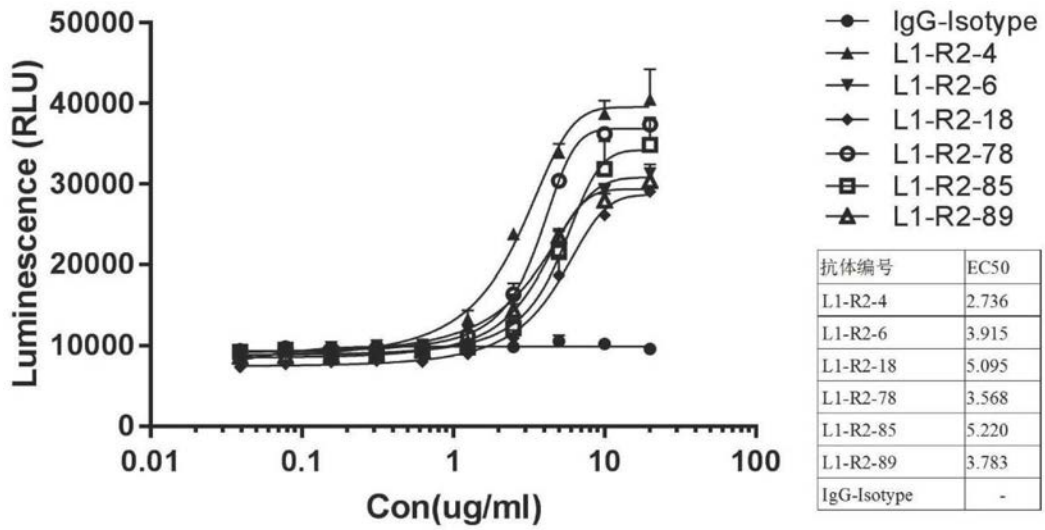


图5

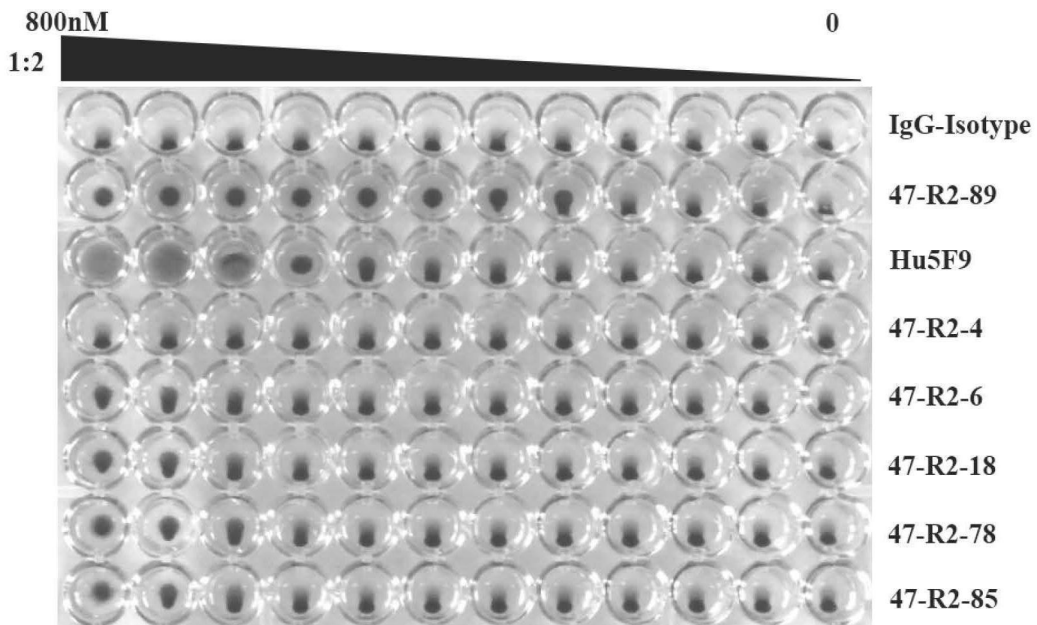


图6



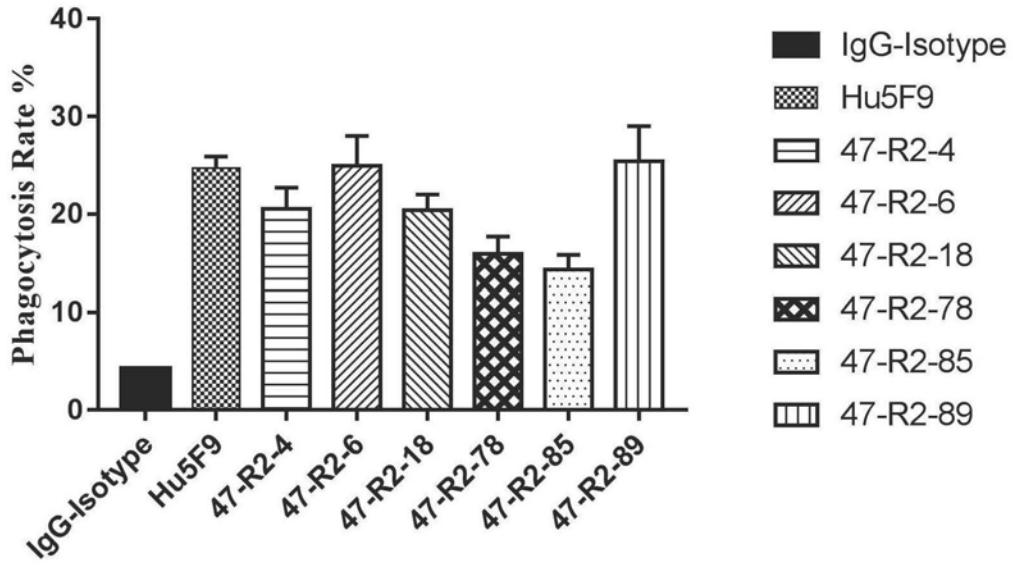


图7

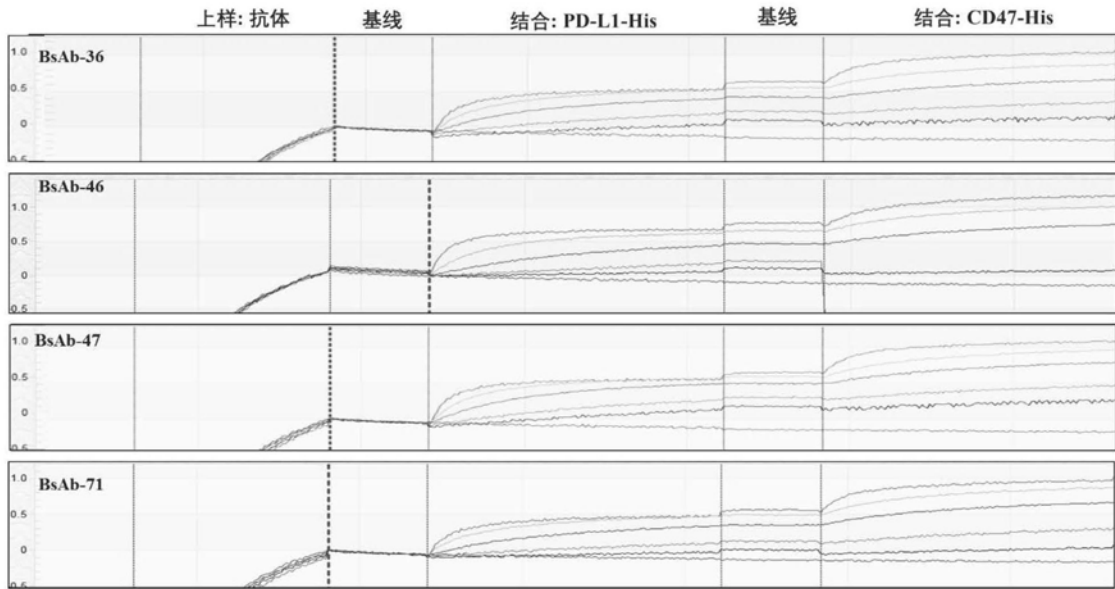


图8A

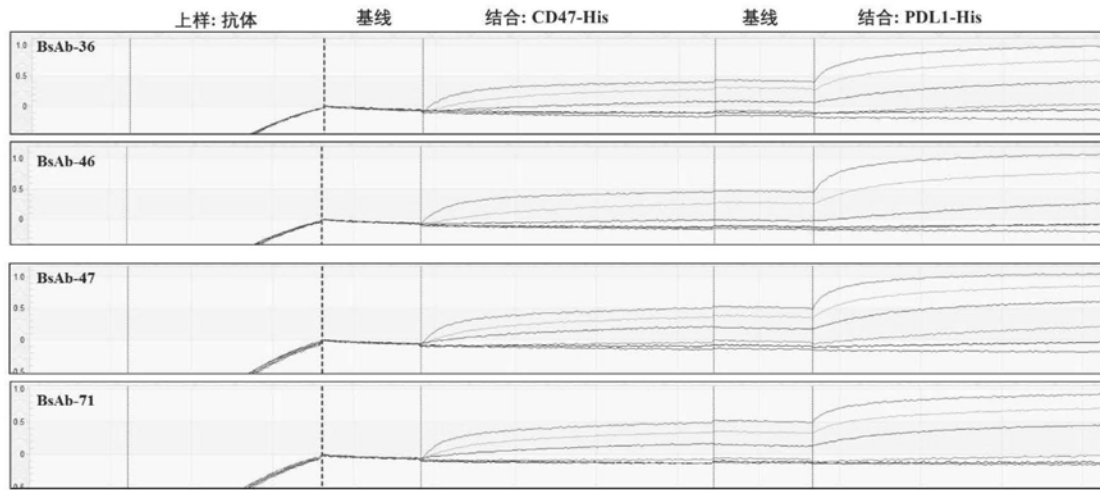


图8B

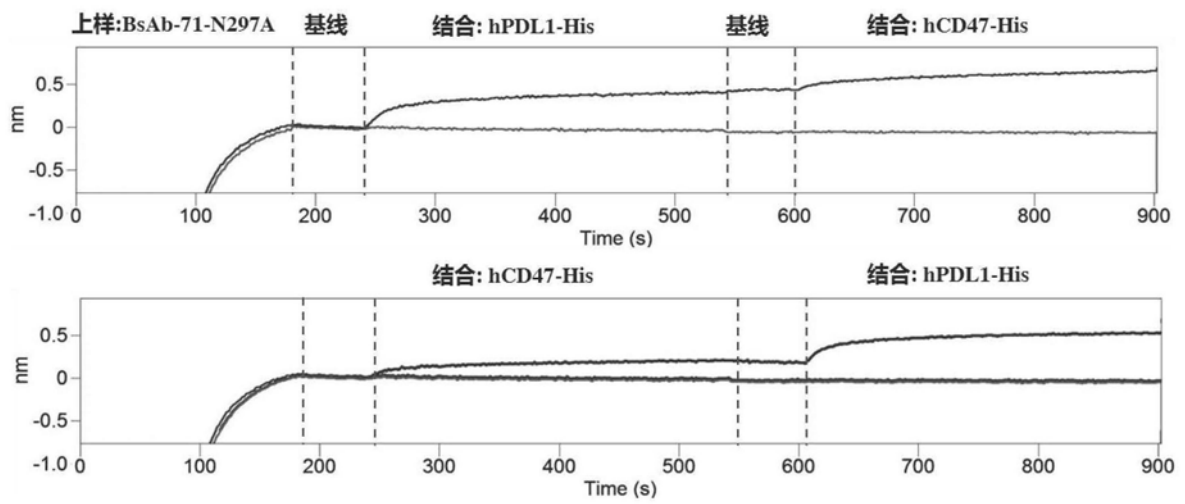


图8C

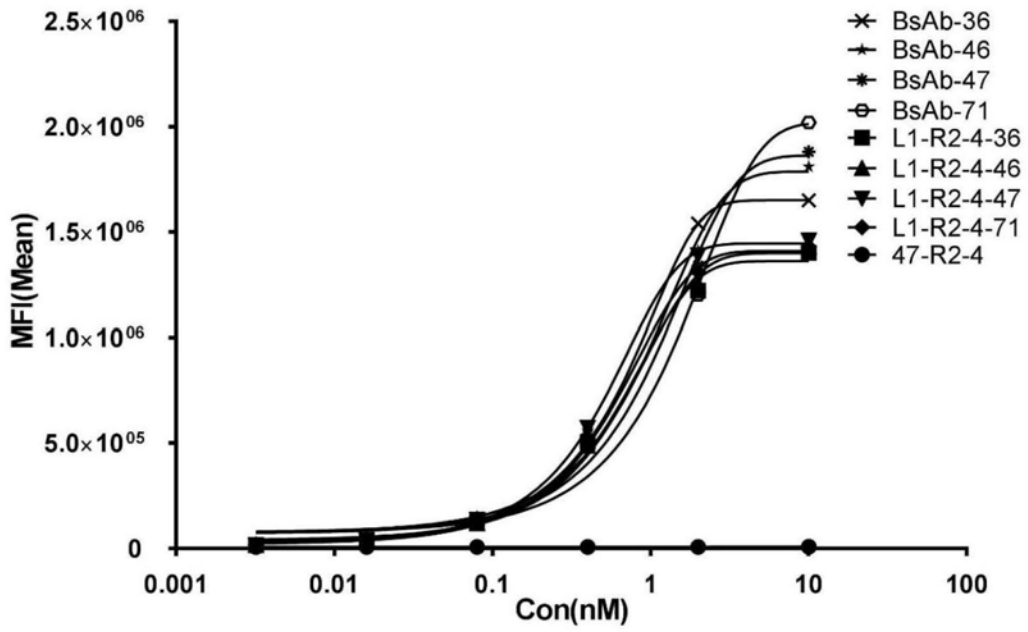


图9A

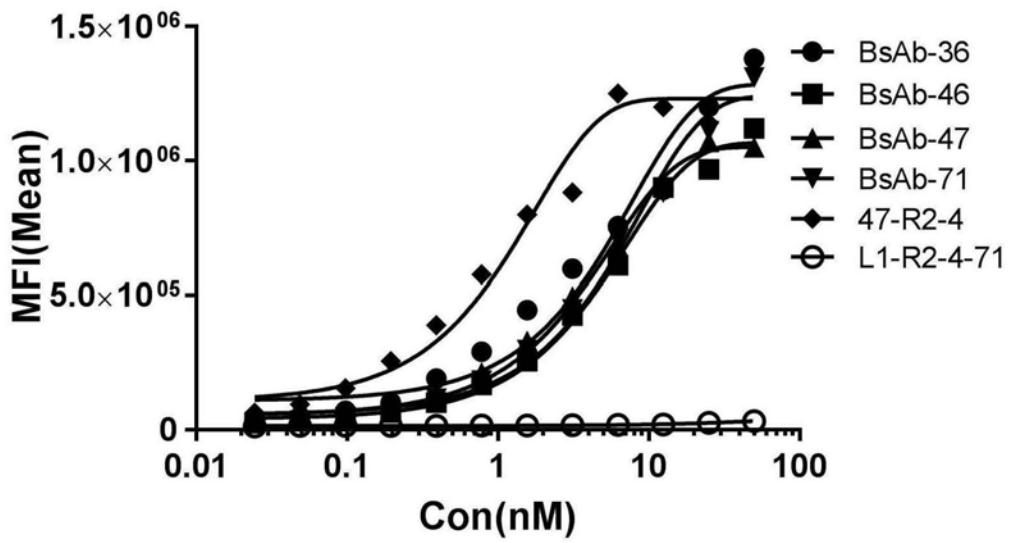


图9B

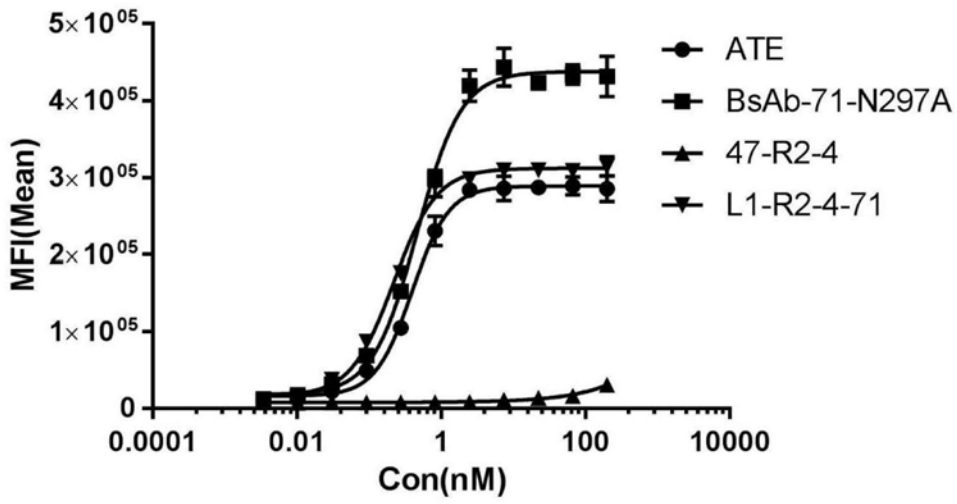


图9C

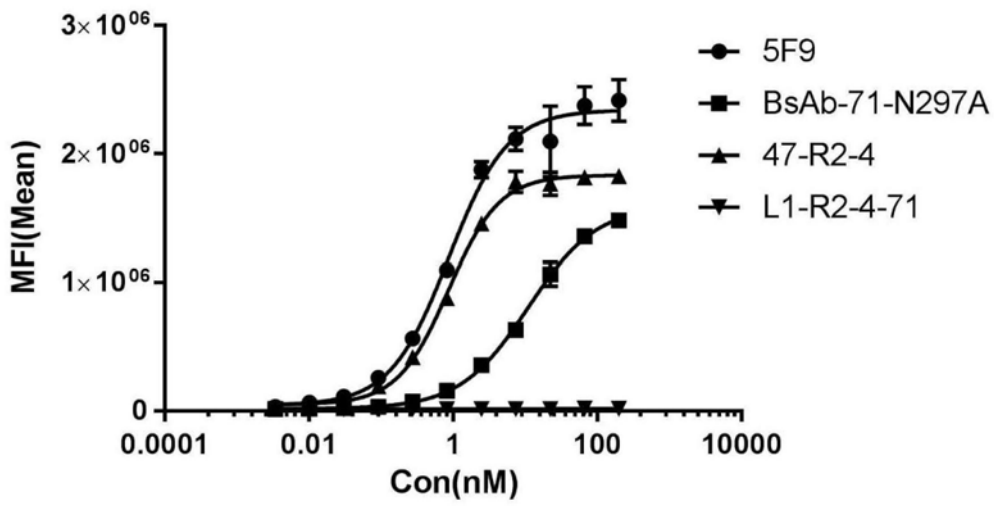


图9D

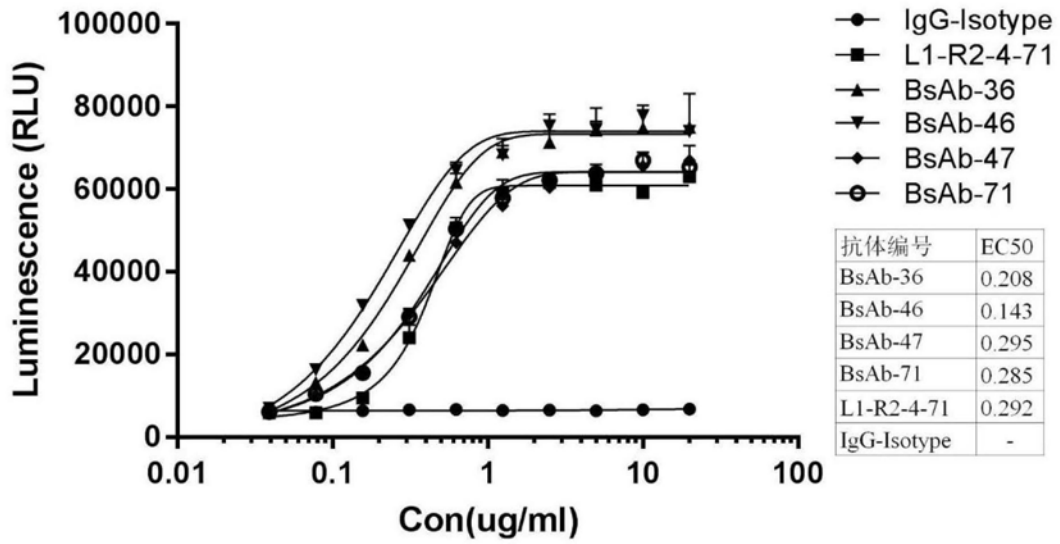


图10A

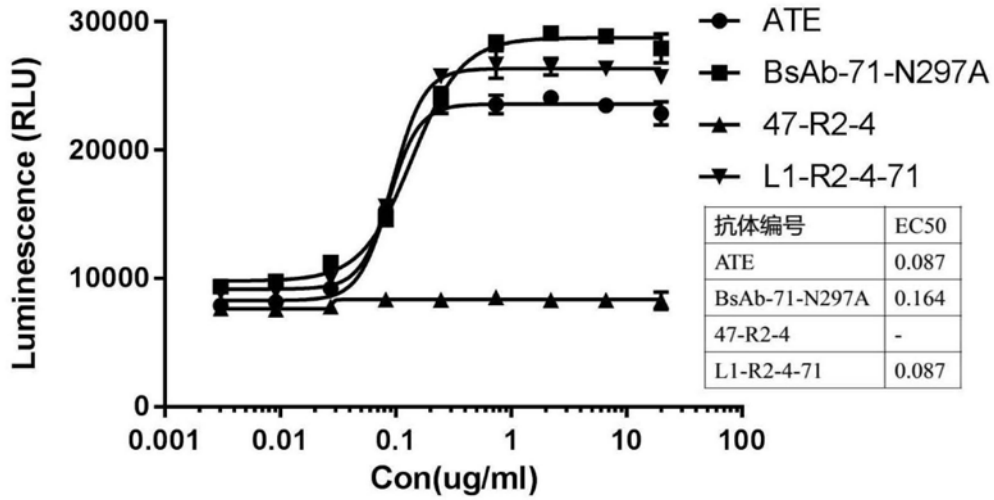


图10B

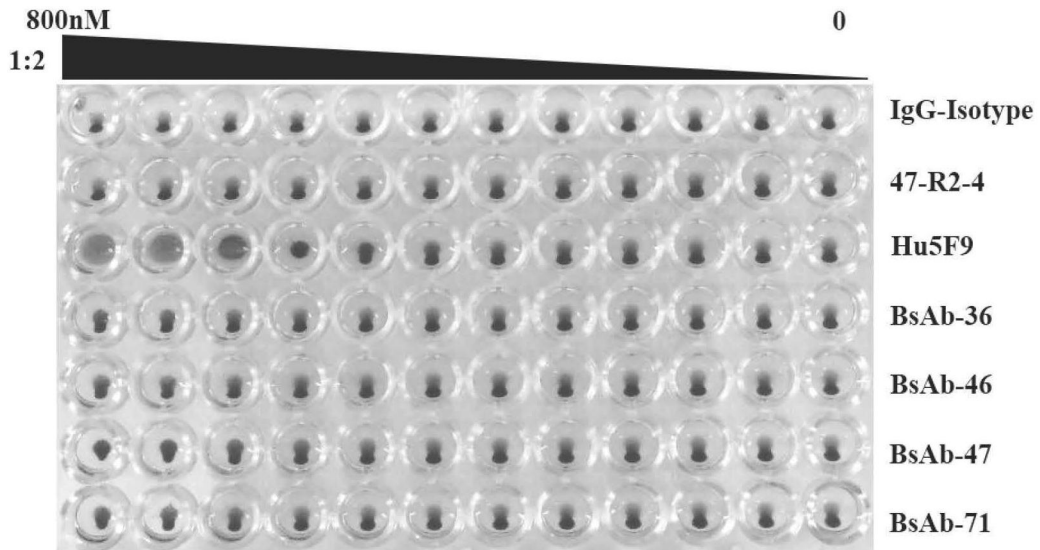


图11

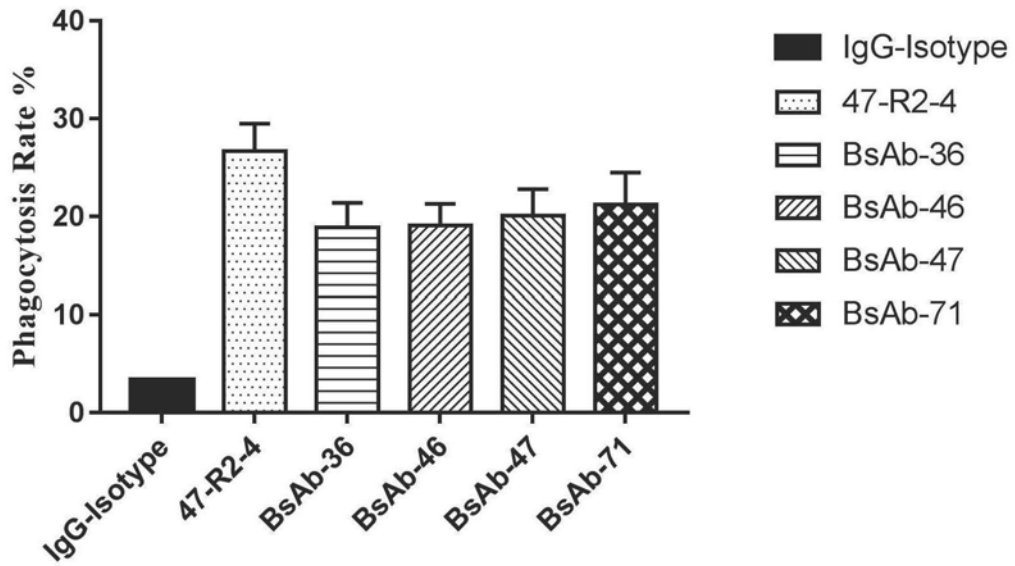


图12

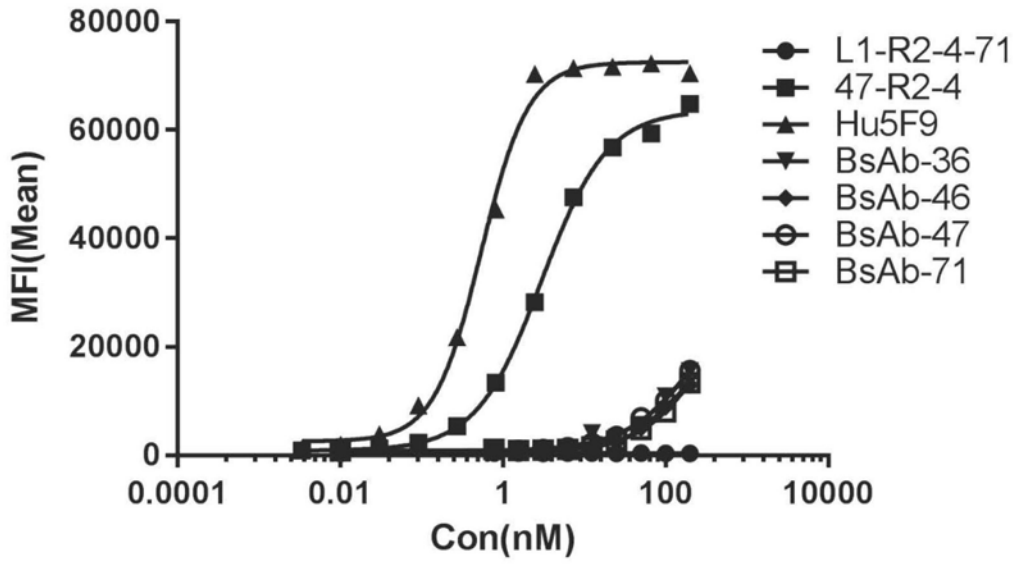


图13A

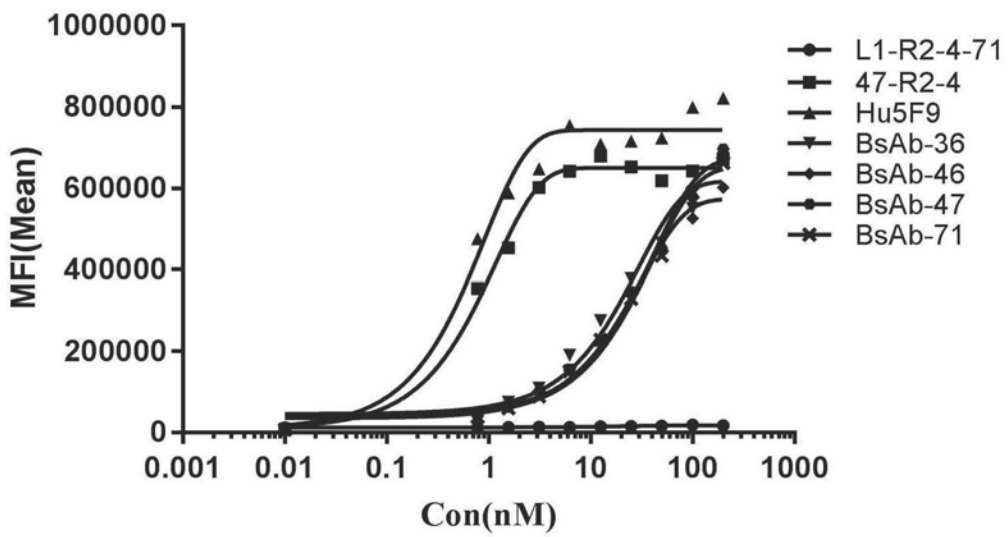


图13B

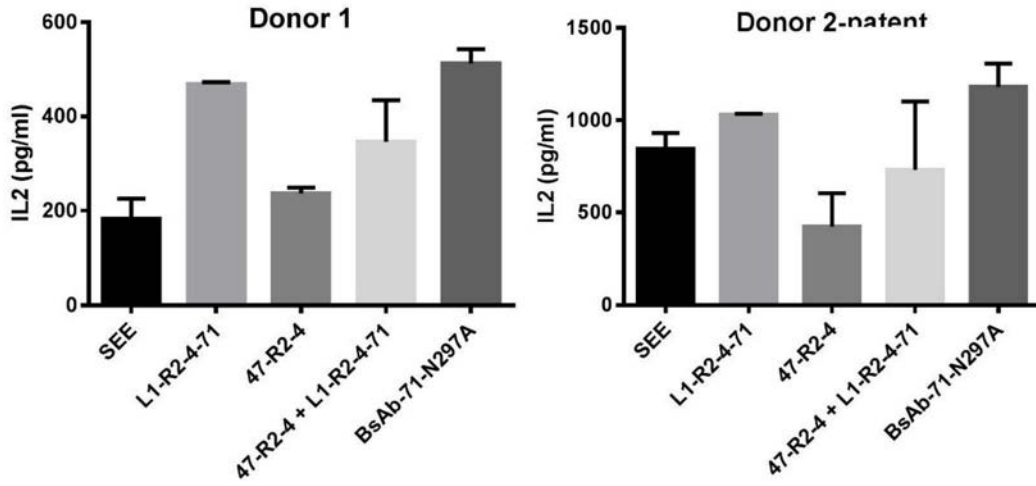


图14

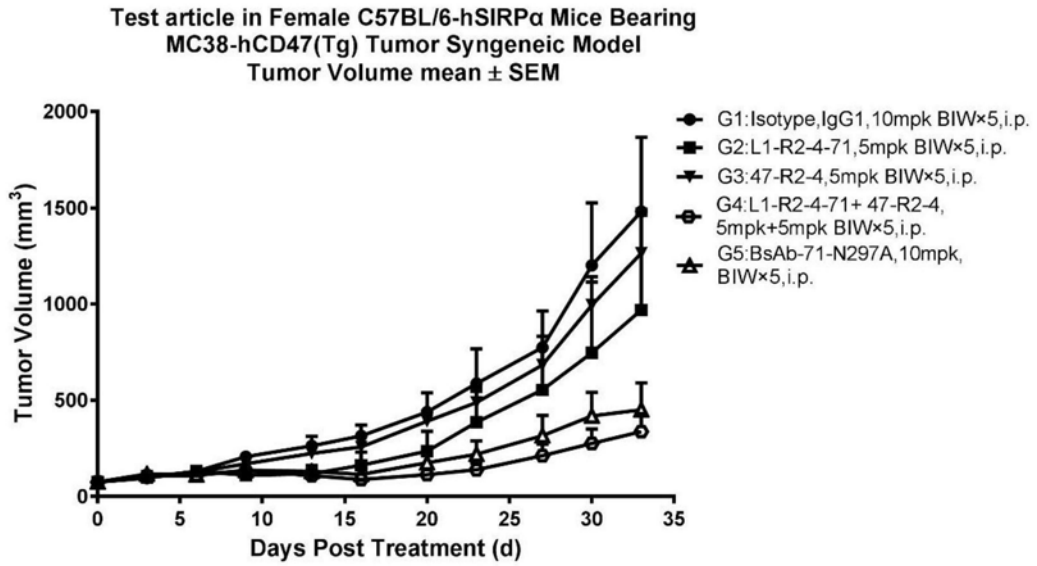


图15