



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113831417 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 01

(21) 申请号 202111362860.6

徐红 余伊莎 龙凯

(22) 申请日 2018.05.08

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

专利代理师 黄益澍

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113831417 A

(51) Int. Cl.

G07K 19/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.12.24

(66) 本国优先权数据

201710317926.7 2017.05.08 CN

201711269620.5 2017.12.05 CN

(56) 对比文件

CN 106146670 A, 2016.11.23

CN 106519036 A, 2017.03.22

(62) 分案原申请数据

201810430371.1 2018.05.08

审查员 冯娟

(73) 专利权人 上海津曼特生物科技有限公司

地址 200032 上海市徐汇区枫林路380号10层1002室

(72) 发明人 宋利平 崔笑添 王健 吴海洋

贾佳娜 范艺 张甘良 李涛

权利要求书3页 说明书49页

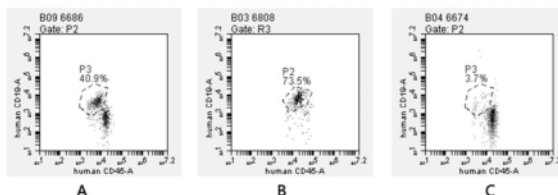
序列表48页 附图18页

(54) 发明名称

双特异性重组蛋白及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种双特异性重组蛋白,其包含高亲和靶向肿瘤的臂和低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白,其中高亲和靶向肿瘤的臂所对应的抗体不结合CD47,其对肿瘤细胞上靶抗原的结合亲和力是低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白所对应的单体融合蛋白同二聚体对肿瘤细胞上CD47结合亲和力的至少6倍,其中低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SIRP α 胞外截短体。还公开了编码重组蛋白的核酸分子及所述重组蛋白和核酸分子在制备治疗肿瘤的药物中的用途。本发明的双特异性重组蛋白显著提高具有调节巨噬细胞功能重组蛋白的肿瘤靶向饱和结合丰度并且降低非肿瘤靶向的副作用,在临床上有很大的应用价值。



1. 一种双特异性重组蛋白,其特征在于,其中所述双特异性重组蛋白包含高亲和靶向肿瘤的臂和低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白,

所述高亲和靶向肿瘤的臂不结合CD47,且所述高亲和靶向肿瘤的臂对应的抗体对肿瘤细胞上靶抗原的结合亲和力是低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白所对应的单体融合蛋白同二聚体对肿瘤细胞上CD47结合亲和力的至少6倍;

所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白对CD47的结合亲和力不高于含SIRP α 胞外截短体的单体融合蛋白的同二聚体对CD47的结合亲和力;所述SIRP α 胞外截短体包含人源SIRP α 野生型胞外截短体或CD47非高亲和突变的人源SIRP α 胞外截短体;

所述双特异性重组蛋白具有相对设置的左、右两臂结构,其中所述的高亲和靶向肿瘤的臂位于左臂的位置,所述的低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白位于右臂的位置;所述左臂为免疫球蛋白的Fab或Fab'形式,所述右臂为SIRP α 胞外截短体;

所述高亲和靶向肿瘤的臂靶向选自下列的靶标:CD20、EGFR、HER2、PD-L1;所述高亲和靶向肿瘤的臂包含选自如下任意一组的氨基酸序列:1) SEQ ID NO: 16和SEQ ID NO: 17; 2) SEQ ID NO: 18和SEQ ID NO: 4; 3) SEQ ID NO: 22和SEQ ID NO: 23; 4) SEQ ID NO: 20和SEQ ID NO: 21; 5) SEQ ID NO: 19和SEQ ID NO: 8; 6) SEQ ID NO: 24和SEQ ID NO: 13; 7) CN104356236A中的SEQ ID NO: 10和CN104356236A中的SEQ ID NO: 20; 8) CN104356236A中的SEQ ID NO: 2和CN104356236A中的SEQ ID NO: 12;

所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SIRP α 胞外截短体,所述SIRP α 胞外截短体包含选自如下a1) -a3)任意一种的氨基酸序列:a1) SEQ ID No:30;a2) SEQ ID No:31; a3) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列第80位经过丙氨酸到天冬酰胺的置换获得的氨基酸序列;

所述的双特异性重组蛋白还包含Fc区。

2. 如权利要求1所述的双特异性重组蛋白,其特征在于,

当所述靶标为CD20、EGFR或PD-L1时,所述SIRP α 胞外截短体选择a1) 或其第80位经过丙氨酸到天冬酰胺的置换获得的氨基酸序列;当所述靶标为HER2时,所述SIRP α 胞外截短体选择a1或a2) 或上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列第80位经过丙氨酸到天冬酰胺的置换获得的氨基酸序列。

3. 如权利要求1或2所述的双特异性重组蛋白,其特征在于,其中高亲和靶向肿瘤的臂与低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白通过分子间作用力结合,或通过共价键结合,或通过盐键结合,或通过上述结合方式中的两种或三者的组合而结合。

4. 如权利要求3所述的双特异性重组蛋白,其特征在于,所述共价键为链间二硫键。

5. 如权利要求3所述的双特异性重组蛋白,其特征在于,所述Fc区包含Fc区天然序列或Fc非天然序列。

6. 如权利要求5所述的双特异性重组蛋白,其特征在于,所述Fc区为人Fc区。

7. 如权利要求6所述的双特异性重组蛋白,其特征在于,其中高亲和靶向肿瘤的臂与低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白的结合是通过knobs-into-holes结合的。

8. 如权利要求7所述的双特异性重组蛋白,其特征在于,所述高亲和靶向肿瘤的臂为半抗体。

9. 如权利要求8所述的双特异性重组蛋白,其特征在于,所述半抗体为IgG1抗体的半抗

体。

10. 如权利要求8所述的双特异性重组蛋白,其特征在于,所述半抗体为人鼠嵌合的半抗体、人源化的半抗体或全人源的半抗体。

11. 如权利要求10所述的双特异性重组蛋白,其特征在于,所述半抗体为人源化或全人源的IgG1抗体的半抗体。

12. 如权利要求5~11任一项所述的双特异性重组蛋白,其特征在于,其中低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含选自如下b1)-b3)任意一种的氨基酸序列:b1) SEQ ID No:26;b2) SEQ ID No:27; b3) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列第99位经过丙氨酸到天冬酰胺的置换获得的氨基酸序列。

13. 编码如权利要求1~12任一项所述的双特异性重组蛋白的核酸分子。

14. 如权利要求13所述的核酸分子,其特征在于,其中编码所述高亲和靶向肿瘤的臂的核酸分子与编码所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白的核酸在同一条DNA链中,或编码所述高亲和靶向肿瘤的臂的核酸分子与编码所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白的核酸在不同的DNA链中。

15. 包含如权利要求13或14所述的核酸分子的表达载体。

16. 包含如权利要求15所述的表达载体的宿主细胞。

17. 双特异性重组蛋白的制备方法,其使用如权利要求16所述的细胞表达所述重组蛋白。

18. 如权利要求1~12任一项所述的双特异性重组蛋白在制备治疗血液肿瘤和实体瘤的药物中的用途。

19. 如权利要求18所述的用途,其特征在于,所述血液肿瘤和实体瘤选自乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、食管癌、子宫内膜癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌癌、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、基底细胞皮肤癌、鳞状细胞皮肤癌、皮肤纤维肉瘤突出症、梅克尔细胞癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、肉瘤、间皮瘤和骨髓发育不良综合征。

20. 用于体外评价如权利要求1-12任一项所述的双特异性重组蛋白的早期免疫安全性的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

a) 提供如权利要求1-12任一项所述的双特异性重组蛋白;

b) 检测所述双特异性重组蛋白的ADCC活性;

c) 评价所述双特异性重组蛋白的早期免疫安全性。

21. 如权利要求20所述的方法,其特征在于,所述方法在步骤a)和b)之间还包括以下步骤:

a1) 制备效应细胞;

a2) 使效应细胞与所述双特异性重组蛋白接触。

22. 如权利要求21所述的方法,其特征在于,所述效应细胞不限于人NK92MI-CD16a效应细胞。

23. 如权利要求21所述的方法,其特征在于,所述a1)中,将收获的效应细胞重悬至细胞密度为 1×10^5 个细胞/ml至 5×10^6 个细胞/ml;所述a2)中,将梯度稀释的所述双特异性重组蛋白与a1)中制备获得的效应细胞孵育,孵育时间为0.5-5h;所述b)中,测定LDH活性,计算

细胞裂解率;和/或,所述c)中,根据细胞裂解率评价所述双特异性重组蛋白的早期免疫安全性,其中导致较低细胞裂解率的所述双特异性重组蛋白的免疫安全性高。

24. 用于体内评价如权利要求1-12任一项所述的双特异性重组蛋白的早期免疫安全性的方法,其特征在于,该方法包括:

- a) 提供如权利要求1-12任一项所述的双特异性重组蛋白;
- b) 提供Hu-NSG鼠;
- c) 将所述双特异性重组蛋白与Hu-NSG鼠接触;
- d) 评价所述双特异性重组蛋白在所述Hu-NSG鼠中的早期免疫安全性。

25. 如权利要求24所述的方法,其特征在于,所述c)中,施用24-96h后,取小鼠静脉血,裂解红细胞,其余细胞用荧光标记的抗人CD45、抗人CD19或抗人CD3的抗体共孵育15-60min,进行流式细胞术检测;所述d)中,根据细胞清除率评价所述双特异性重组蛋白的早期免疫安全性,其中导致较低免疫细胞清除率的所述双特异性重组蛋白的免疫安全性高。

双特异性重组蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种重组蛋白及其用途。

背景技术

[0002] 随着对肿瘤治疗领域研究的深入,肿瘤分子靶向性治疗药物的研发与应用受到了越来越广泛的关注。基于靶向性强、副作用小、疗效显著等优点,抗体药物迅速成为肿瘤靶向治疗领域的热点药物。目前已有数十种靶向肿瘤的抗体药物经过批准应用于临床,并取得了显著的疗效,所述抗体药物例如针对CD20靶分子的美罗华Rituxan®(利妥昔单抗,美国第一个被允许用于治疗癌症的单抗,最初用于治疗非霍奇金淋巴瘤,Roche出品)、Zevalin®(ibritumomab tiuxetan,其最初被美国FDA批准用于治疗对美罗华耐药的低分化非何杰金氏淋巴瘤,IDEC Pharmaceuticals出品)、Bexxar®(tositumomab and iodine I 131 tositumomab,GSK出品)、Arzerra®(ofatumumab,GSK出品)等,针对Her2靶分子的赫塞汀Herceptin®(曲妥珠单抗,著名的治疗乳腺癌的药物,Genentech出品)、Perjeta®(帕妥珠单抗,Roche出品)、Kadcyla®(ado-trastuzumab emtansine,Roche出品)等,针对VEGF或其受体靶分子的阿瓦斯汀Avastin®(贝伐单抗,Genentech/Roche出品)、Cyramaza®(ramucirumab,EliLilly出品)等,针对EGFR靶点的爱必妥Erbix®(西妥昔单抗,全球十大畅销抗癌药之一,最初批准用于治疗直肠癌,Eli Lilly出品)、Vectibix®(帕尼单抗,治疗结直肠癌的药物,Amgen出品)等,针对PD-L1靶分子的Tecentriq®(atezolizumab,Roche出品)等(曹睿等,肿瘤靶向治疗抗体药物的研究进展,《中国生化药物杂志》,2016,36(6):15-18)。

[0003] 临床上应用的靶向肿瘤细胞的抗肿瘤抗体药物(未偶联的裸抗体),其抗肿瘤作用机制主要通过抗体的两种功能实现。首先,抗体的第一种功能是亲和性,即抗体与肿瘤表面靶抗原特异性结合后发挥其效应功能,杀伤肿瘤细胞。抗体分子通过与靶抗原结合,能够阻断肿瘤生长因子信号通路、诱导细胞凋亡或抑制肿瘤微环境中新生血管的形成。其次,抗体的第二种功能是借助于免疫系统实现的,即对肿瘤细胞的杀伤作用也可以依靠免疫系统来介导细胞死亡,如抗体恒定区介导的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,ADCC)、补体依赖的细胞毒作用(complement dependent cytotoxicity,CDC)以及抗体依赖的细胞吞噬作用(Antibody dependent cellular phagocytosis,ADCP)。越来越多的数据显示,抗体介导的免疫杀伤活性是抗体发挥抗肿瘤功效的重要作用机制(有关综述可参见Barnhart BC, et al. Role of Fc-Fc γ R interactions in the antitumor activity of therapeutic antibodies. Immunology and Cell Biology, 2017, 95:340-346)

[0004] 近年来研究证实,肿瘤细胞可凭借诸如对自身表面抗原修饰及改变肿瘤组织周围微环境等途径来逃避机体免疫系统的监控、识别与攻击而继续分裂生长,即所谓的肿瘤免疫逃逸。例如肿瘤细胞通过高表达CD47,与巨噬细胞表面的抑制性受体信号调节蛋白 α (signal regulatory protein α ,SIRP α)相互结合抑制巨噬细胞的免疫功能,显著地抑制免疫细胞活性。同时,肿瘤细胞高表达CD47抑制Fc受体介导的吞噬作用,最终影响抗体药物的

肿瘤靶向治疗效果(Willingham SB, et al. The CD47-signal regulatory protein Alpha (SIRP α) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012, 109 (17): 6662-6667)。

[0005] CD47是一种广泛表达的膜糖蛋白,其与SIRP α 互为受体和配体,并可以形成CD47-SIRP α 信号复合体,介导凋亡、增殖、免疫等一系列的反应。2000年,Oldenborg等人证实CD47是细胞表面调节巨噬细胞吞噬作用的一个重要信号(Oldenborg PA, et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. Science, 2000, 288(5473): 2051-2054)。CD47通过释放“别吃我”的信号,可以与巨噬细胞表面SIRP α 结合,磷酸化其免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM),随后招募含有SH2的蛋白酪氨酸磷酸酶SHP1(SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1)蛋白,产生一系列的级联反应抑制巨噬细胞的吞噬作用。年轻的红细胞表达较高的CD47向巨噬细胞释放“自己人,别吃我”的信号,而衰老的红细胞CD47表达下调,最终被巨噬细胞所清除。

[0006] 因CD47广泛表达于各类癌细胞表面,因此该靶点可以用于治疗各类癌症,且小鼠异体肿瘤移植模型已说明了CD47阻断的有效性,因此CD47已成为癌症免疫检查点疗法的新靶点(Vonderheide R H. CD47 blockade as another immune checkpoint therapy for cancer. Nature Medicine, 2015, 21(10): 1122-1123)。抗CD47抗体、SIRP α -Fc融合蛋白等在研药物,通过阻断CD47-SIRP α 信号通路,解除CD47对免疫细胞的抑制作用,展现出一定的抗肿瘤活性。但是,因为红细胞也大量表达CD47蛋白,所以与CD47蛋白高亲和力结合的抗CD47抗体治疗会产生红细胞凝集、贫血等毒副作用(Mccracken MN, et al. Molecular Pathways: Activating T Cells after Cancer Cell Phagocytosis from Blockade of CD47 “Don’t Eat Me” Signals. Clinical Cancer Research, 2015, 21(16): 3597-3601),这导致抗CD47抗体药物的临床开发难度巨大,迄今尚无抗CD47抗体药物进入III期临床;而野生型SIRP α -Fc融合蛋白则由于其与CD47的亲和力低,因此药效不显著;也有研究者对野生型SIRP α 进行高亲和力突变,并获得了亲和力增强上千倍的SIRP α 突变体,并展现出较好的抗肿瘤药效(Weiskopf K, et al. Engineered SIRP α variants as immunotherapeutic adjuvants to anticancer antibodies. Science, 2013, 341(6141): 88-91),但多点突变是否对融合蛋白在人体的安全性、免疫原性、稳定性乃至靶点特异性等方面产生影响都还有待临床观察考证。

[0007] 另一方面,研究显示,抗CD47抗体通过与其他肿瘤靶向治疗抗体联合使用,能显著提高抗肿瘤药效,如CD47+CD20、CD47+Her2联合用药(Chao MP, et al. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. Cell, 2010, 142(5): 699-713; Zhao XW, et al. CD47-signal regulatory protein- α (SIRP α) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011, 108(45): 18342-18347)。但是,抗CD47抗体能否上市、何时能上市具有很大的不确定性;上市后,肿瘤靶向抗体药物联合使用也导致患者难以承受其非常昂贵的联合治疗费用。

[0008] 因此,需要开发新的肿瘤靶向药物,该肿瘤靶向药物能够特异性靶向治疗肿瘤,同

时激活并增强患者体内的免疫功能,在保证安全性的前提下显著提高肿瘤治疗的效果,同时降低患者用药成本。

[0009] 此外,鉴于靶向CD47的单价或多价的抗体或重组蛋白存在潜在的安全性风险(如贫血、红细胞凝集、CD47阳性的非肿瘤靶细胞杀伤等),同时,由于人源SIRP α 与人源CD47的结合存在种属特异性,而人血的使用受到了伦理、遗传资源等限制,因此亟待开发一种早期体内/体外的免疫安全性评价方法,用于评价靶向CD47的抗体或重组蛋白的免疫安全性。

发明内容

[0010] 本发明提供一种双特异性重组蛋白及其应用,其显著提高具有调节巨噬细胞功能重组蛋白的肿瘤靶向饱和结合丰度,并且能显著降低非肿瘤靶向的副作用。

[0011] 在一个方面,本发明提供一种双特异性重组蛋白,其中所述双特异性重组蛋白包含高亲和靶向肿瘤的臂和低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白。

[0012] 在一个实施方案中,所述高亲和靶向肿瘤的臂不结合CD47,且所述高亲和靶向肿瘤的臂对应的抗体对肿瘤细胞上靶抗原的结合亲和力是低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白所对应的单体融合蛋白同二聚体对肿瘤细胞上CD47结合亲和力的至少6倍,任选地6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍,或更高的倍数,或其间的任意数值;

[0013] 所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白对CD47的结合亲和力不高于含SIRP α 胞外截短体的单体融合蛋白同二聚体对CD47的结合亲和力。所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SIRP α 胞外截短体。

[0014] 在一个实施方案中,SIRP α 胞外截短体包含人源SIRP α (野生型或CD47非高亲和突变体)的胞外氨基酸序列的部分或全部。

[0015] 在又一个实施方案中,SIRP α 胞外截短体是人源SIRP α 胞外截短体。在具体的实施方案中,SIRP α 胞外截短体包含选自如下a1)-a4)任意一种的氨基酸序列:a1) SEQ ID No: 30;a2) SEQ ID No:31;a3) SEQ ID No:32;a4) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或保守性置换至少一个氨基酸残基例如1-5个氨基酸残基获得的氨基酸序列,其单体具有对CD47蛋白的结合亲和力并且该结合亲和力不高于a1)、a2)或a3)单体对CD47蛋白的结合亲和力的氨基酸序列。

[0016] 在一个实施方案中,所述双特异性重组蛋白具有相对设置的左、右两臂结构,其中所述的高亲和靶向肿瘤的臂位于左臂的位置,所述的低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白位于右臂的位置;较佳地,所述左臂为免疫球蛋白的Fab或Fab'形式,所述右臂为SIRP α 胞外截短体。其中,本发明所述的“具有相对设置的左、右两臂结构”是参照免疫球蛋白的常规“Y”型结构的描述,此种情形下,本发明双特异性重组蛋白的左、右两侧具有不同靶向的特异性功能蛋白;该结构描述主要是区别于两个特异性功能蛋白可以通过C末端与N末端连接形成上、下结构。因此,本发明所述左、右臂的空间位置不是对双特异性重组蛋白结构的具体限定,仅是为了将双特异性重组蛋白的两个臂结构与上述C末端与N末端连接形成的上、下结构进行区分,当一个位于一侧时,另一个相应地位于相对的另一侧;显然二者左、右空间位置可以互换。

[0017] 在另一个实施方案中,所述右臂的长度与左臂需结合的抗原空间表位距离靶细胞

膜表面的远近相适配。优选地,当所述高亲和靶向肿瘤的臂需结合靶细胞近膜端的表位时,所述SIRP α 胞外截短体选择含a1) ~ a4) 中较短的氨基酸序列。

[0018] 在一个实施方案中,所述高亲和靶向肿瘤的臂靶向选自下列的靶标:5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR- α 、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、NaPi2b、结合素-4、Notch 2、Notch 1、PD-L1、PD-L2、PDGFR- α 、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138。

[0019] 较佳地,当所述靶标为CD20、EGFR或PD-L1时,所述SIRP α 胞外截短体选择a1);当所述靶标为HER2时,所述SIRP α 胞外截短体选择a1) 或a2)。

[0020] 在一个实施方案中,高亲和靶向肿瘤的臂与低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白通过分子间作用力结合,或通过共价键例如链间二硫键结合,或通过盐键结合,或通过上述结合方式中的两种或三种的组合而结合。

[0021] 在又一个实施方案中,高亲和靶向肿瘤的臂与低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白还包含Fc区。通常,本发明的Fc区包含Fc区天然序列。然而,本发明的Fc区可以在Fc区天然序列中具有一个或多个已存在的氨基酸序列改变或修饰,例如,Fc区的C1q结合活性得到改变的氨基酸序列改变或修饰。

[0022] 在另一个实施方案中,低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白为包含SIRP α 胞外截短体和用于结合所述臂的结合序列的融合蛋白,SIRP α 胞外截短体和用于结合所述臂的结合序列任选通过接头序列连接,所述用于结合所述臂的结合序列任选地包含Fc区。

[0023] 在另一个实施方案中,本发明的Fc区是概念上的,即虽然它实际上可能并不存在,但可根据所需Fc区变体的氨基酸序列实施抗体工程改造,产生含此序列的多肽或融合蛋白或编码所需Fc区变体氨基酸序列的DNA。

[0024] 在另一实施方案中,所述Fc区可为Fc区变体。本文所使用的“Fc区变体”是指对Fc天然氨基酸序列进行一个或多个氨基酸残基的修饰所获得Fc区。修饰的方法是本领域技术人员熟知的,包括但不限于对编码Fc区的DNA序列进行定点诱变,例如使用PCR诱变和盒式诱变来制备Fc区变体。例如,为了提高与FcR的结合,可以缺失Fc区的一个或多个氨基酸残基。例如,在一个实施方案中,为了改变Fc区的效应功能,可以制备氨基酸插入型Fc区变体。

[0025] 在一个实施方案中,例如可以在一个或多个鉴定为影响FcR结合的Fc区位点附近引入至少一个氨基酸残基(例如1-2个氨基酸残基,通常不超过10个氨基酸残基)。“附近”是指距所鉴定的影响FcR结合的Fc区位点的1-2个氨基酸残基之内。这类Fc区变体可以呈现增强或降低的FcR结合和/或ADCC活性。为了制备这类插入型变体,可评估含FcR结合区(例如靶FcR的细胞外结构域)的多肽与待插入氨基酸残基的Fc区的共结晶结构,以便涉及具有,例如增强的FcR结合能力的Fc区变体。这类插入通常被置于Fc区的环中。

[0026] 在一个实施方案中,通过在天然Fc区中引入适当的氨基酸序列修饰,能够制备在人效应细胞存在的条件下比含有天然Fc区的重组蛋白更有效地介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和/或以更强地亲和力结合Fc γ 受体(Fc γ R)的Fc区变体。本发明的Fc区变体通常在Fc区中包括至少一个氨基酸修饰。优选组合多个氨基酸修饰。例如,Fc区变体

可包括2、3、4、5个或更多个氨基酸残基的取代,如在所鉴定的特异性FcR结合位点中。

[0027] 所述天然Fc区优选人Fc区,例如人IgG1(A或非A同种型)、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区天然序列。

[0028] 在另一个实施方案中,所述高亲和靶向肿瘤的臂与低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白的结合是通过knobs-into-holes结合的。例如,所述knobs-into-holes为由T366W突变形成突出的“knobs”型,和1个氨基酸突变(Y407V)形成凹陷的“holes”型或3个氨基酸突变(T366S,L368A和Y407V)形成凹陷的“holes”型。突变根据Kabat编号方案[Eu numbering scheme of Kabat et al. (1991)],其从左至右分别显示为原氨基酸残基、突变位点和取代氨基酸残基,例如T366W中,T为原氨基酸残基、366为突变位点和W为取代T的氨基酸残基。

[0029] 在一个实施方案中,所述高亲和靶向肿瘤的臂为靶向选自下列靶标的半抗体:5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR- α 、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、NaPi2b、结合素-4、Notch 2、Notch 1、PD-L1、PD-L2、PDGFR- α 、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138;优选地为IgG1抗体的半抗体,任选地为人鼠嵌合的半抗体、人源化的半抗体、全人源的半抗体;更优选地为人源化或全人源的IgG1抗体的半抗体。

[0030] 在一个实施方案中,低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含选自如下b1)-b4)任意一种的氨基酸序列:b1) SEQ ID No:26;b2) SEQ ID No:27;b3) SEQ ID No:28;b4) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或保守性置换至少一个氨基酸残基例如1-5个氨基酸残基获得的氨基酸序列,其二聚体具有对CD47蛋白的结合亲和力并且该结合亲和力不高于b1)、b2)或b3) 二聚体对CD47蛋白的结合亲和力的氨基酸序列。上述序列中所包含的信号肽区域序列、接头序列、铰链区、Fc区和/或结合序列可根据本领域技术人员所熟知的方式或常用信号肽序列、接头序列、铰链区、Fc区和/或结合序列任意替换。

[0031] 在另一个实施方案中,所述双特异性重组蛋白包含以下序列:

[0032] 其中高亲和靶向肿瘤的臂靶向CD20时,所述高亲和靶向肿瘤的臂包含SEQ ID No:16和SEQ ID No:17,所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SEQ ID No:26或SEQ ID No:27或SEQ ID No:28;

[0033] 其中高亲和靶向肿瘤的臂靶向EGFR时,所述高亲和靶向肿瘤的臂包含SEQ ID No:19和SEQ ID No:8,所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SEQ ID No:26或SEQ ID No:27或SEQ ID No:28;

[0034] 其中高亲和靶向肿瘤的臂靶向Her2时,所述高亲和靶向肿瘤的臂包含SEQ ID No:20和SEQ ID No:21,或SEQ ID No:22和SEQ ID No:23,所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SEQ ID No:26或SEQ ID No:27或SEQ ID No:28;或,

[0035] 其中高亲和靶向肿瘤的臂靶向PD-L1时,所述高亲和靶向肿瘤的臂包含SEQ ID No:24和SEQ ID No:13,所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SEQ ID No:

26或SEQ ID No:27或SEQ ID No:28。

[0036] 在一个方面,本发明提供编码双特异性重组蛋白的核酸分子。优选地,其中编码所述高亲和靶向肿瘤的臂的核酸分子与编码所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白的核酸在同一条DNA链中,或编码所述高亲和靶向肿瘤的臂的核酸分子与编码所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白的核酸在不同的DNA链中。

[0037] 在另一方面,本发明提供包含核酸分子的表达载体。

[0038] 在一个方面,本发明提供包含表达载体的细胞。

[0039] 在另一方面,本发明还提供制备双特异性重组蛋白的方法,其包括:1)提供高亲和靶向肿瘤的臂;2)提供低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白;3)使高亲和靶向肿瘤的臂与低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白接触形成所述重组蛋白。

[0040] 在一个实施方案中,制备重组蛋白的方法包括使包含表达载体的宿主细胞表达该重组蛋白,所述表达载体包含编码重组蛋白的核酸分子。

[0041] 在另一个方面,本发明还提供肿瘤靶向治疗的方法。

[0042] 在一个实施方案中,肿瘤选自乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、食管癌、子宫内膜癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌癌、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、基底细胞皮肤癌、鳞状细胞皮肤癌、皮肤纤维肉瘤突出症、梅克尔细胞癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、肉瘤、间皮瘤或骨髓发育不良综合征等血液肿瘤和实体瘤。

[0043] 在又一个方面,本发明还提供一种药物组合物,其包含本发明的重组蛋白或融合蛋白以及任选的佐剂、赋形剂或药学上可接受的载体。组合物可以含有药学上可接受的载体。组合物可以以任意形式的药物制剂存在,包括但不限于注射剂、粉剂、冷冻干燥粉末等。该药物制剂形式的药物组合物,可以按照制剂学常规技术制备,包括将药物活性成分,本发明的重组蛋白或融合蛋白与药物载体融合,按照制剂学常规技术制成所需要的剂型。

[0044] 在一个实施方案中,本发明还提供一种药物组合物,包含编码本发明重组蛋白或融合蛋白的核酸分子的表达载体和任选的可药用的载体。

[0045] 在另一个方面,本发明还提供一种治疗肿瘤的方法,包括向患者或受试者施用治疗有效量的本发明所述药物组合物。所述肿瘤表达额外的靶标分子,所述靶标包括但不限于5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR- α 、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、NaPi2b、结合素-4、Notch 2、Notch 1、PD-L1、PD-L2、PDGFR- α 、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138。

[0046] 在又一个方面,本发明还提供一种体内基因疗法,包括向患者或受试者引入治疗有效量的编码本发明重组蛋白或融合蛋白的核酸分子或其衍生物。

[0047] 在另一个方面,本发明还提供一种用于体外评价靶向CD47且具有ADCC活性的重组蛋白/抗体的早期免疫安全性的方法,该方法包括:a)提供靶向且具有ADCC活性的重组蛋白/抗体(包括单价或多价);b)检测所述重组蛋白/抗体的ADCC活性;c)评价所述重组蛋白/抗体(包括单价或多价)的早期免疫安全性。

[0048] 在一个实施方案中,本发明提供用于体外评价靶向CD47且具有ADCC活性的重组蛋白/抗体的早期免疫安全性的方法,包括:a)制备效应细胞,例如但不限于人NK92MI-CD16a效应细胞;b)使效应细胞与重组蛋白/抗体接触;c)检测重组蛋白/抗体的ADCC活性;d)根据ADCC活性结果,评价重组蛋白/抗体的早期免疫安全性。

[0049] 在另一个实施方案中,本发明提供用于体外评价靶向CD47且具有ADCC活性的重组蛋白/抗体的早期免疫安全性的方法,包括:a)收获生长良好的人NK92MI-CD16a效应细胞,将收获的效应细胞重悬至细胞密度为 1×10^5 个细胞/ml至 5×10^6 个细胞/ml;b)将梯度稀释的重组蛋白/抗体与a)中制备获得的效应细胞孵育,孵育时间为0.5-5h;c)孵育完成后,测定LDH活性,计算细胞裂解率;d)根据细胞裂解率评价重组蛋白/抗体的早期免疫安全性,其中导致较低细胞裂解率的重组蛋白/抗体的免疫安全性高。

[0050] 在又一个方面,本发明还提供一种用于体内评价靶向CD47的重组蛋白/抗体(包括单价或多价)的早期免疫安全性的方法,该方法包括:a)提供靶向CD47重组蛋白/抗体(包括单价或多价);b)提供Hu-NSG鼠;c)将所述重组蛋白/抗体与Hu-NSG鼠接触;d)评价所述重组蛋白/抗体在所述Hu-NSG鼠中的早期免疫安全性。

[0051] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于体内评价靶向CD47的重组蛋白/抗体(包括单价或多价)的早期免疫安全性的方法,该方法包括:a)提供Hu-NSG小鼠;b)施用重组蛋白/抗体(包括单价或多价);c)施用24-96h后,取小鼠静脉血,裂解红细胞,其余细胞用荧光标记的抗人CD45、抗人CD19或抗人CD3的抗体共孵育15-60min,进行流式细胞术检测;d)根据细胞清除率评价重组蛋白/抗体的早期免疫安全性,其中导致较低免疫细胞(靶细胞除外)清除率的重组蛋白/抗体的免疫安全性高。

[0052] 本发明的有益效果:

[0053] 本发明通过低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白,减少了本发明的重组蛋白与非肿瘤细胞(如红细胞、NK细胞、T细胞等)上的CD47靶点的结合,从而提高本发明所述重组蛋白的安全性(如避免抗CD47抗体/重组蛋白,如Hu5F9-G4,所引起的贫血、红细胞凝集、CD47阳性的非肿瘤靶细胞杀伤,降低由高亲和突变的SIRP α -Fc融合蛋白引起的潜在安全性、免疫原性、稳定性等不确定因素所带来的风险等)。

[0054] 在本发明中意外发现,通过高亲和靶向肿瘤细胞的臂与低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用,可非常显著地提高本发明的重组蛋白与肿瘤细胞的结合亲和力,从而介导高效杀伤肿瘤细胞的作用(包括但不限于抗体与肿瘤表面靶抗原特异性结合后发挥的效应功能、巨噬细胞的靶向吞噬作用)。

[0055] 本发明的重组蛋白通过高亲和靶向肿瘤的臂(例如不限于半抗体)和低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白实现双靶点作用,并且本发明的结果显示,本发明的重组蛋白借助于高亲和靶向肿瘤的臂与低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白二者之间多种作用,通过多种机制发挥抗肿瘤作用,药效更高。

[0056] 本发明的重组蛋白与两个分开的靶向抗体联用相比,具有成本更低、使用更加方便等优势,因而可解决在抗体联用情况下患者依从性低、治疗费过高等问题。

[0057] 本发明的重组蛋白与经典的双特异性抗体(由2个半抗体组成)相比,由于阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白分子量小于经典双特异性抗体的单臂(半抗体),因此,重组蛋白的组织透过率优于经典的双特异性抗体,药效更高。

[0058] 本发明的低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含不同长度的SIRP α 胞外截短体,可以与高亲和靶向肿瘤的臂(例如不限于半抗体)快速进行优化配对,避免常规双功能抗体在同步结合两个靶抗原时可能受到两个靶抗原空间结构影响(特别是两个靶抗原的抗体识别位点距离细胞膜长短差异较大时,肿瘤靶向抗原与CD47抗原的同步结合难的问题)的情况,使得所获得的重组蛋白与肿瘤细胞有更佳的结合,从而发挥更好的肿瘤杀伤效力。

[0059] 本发明提供了新的靶向CD47的免疫治疗药物体外安全性评价方法。常规抗CD47抗体早期安全性评价一般采用检测药物对红细胞凝集的作用来进行评价。然而,由于人源SIRP α 与CD47的结合存在种属特异性,因此在评价靶向CD47的重组蛋白/抗体是否在人体内存在红细胞凝集的安全性问题时必须使用人血,而人血的使用受到了伦理、遗传资源等方面的限制。此外,红细胞凝集的实验无法早期评价药品的免疫安全性。本发明使用优化后的ADCC活性检测的方法(早期体外免疫安全性评价实验)替代传统的人红细胞凝集实验,用于评价靶向CD47且具有ADCC活性的重组蛋白/抗体(包括单价或多价)的早期免疫安全性,该评价方法简单快捷且不受血源的限制。

[0060] 本发明提供了新的靶向CD47的免疫治疗药物体内安全性评价方法。临床前的药物体内免疫安全性评价一般使用非人灵长类,所需样品数量较大,增加早期样品制备的难度和成本。其他种属尚无成熟的早期体内免疫安全性评价方法,因此导致药品在未来临床研究中巨大的安全隐患,带来研发投入的浪费。本发明提供Hu-NSG鼠,其中在Hu-NSG鼠上开展的早期安全性评价实验能模拟药物在人体免疫系统的安全性情况,相比于临床前或临床研究,其制备难度和成本降低,具有检测费用低、检测效率高等优势,降低肿瘤免疫治疗药物研发的风险。

[0061] 本发明通过提供重组蛋白,通过高亲和靶向肿瘤的臂实现了对肿瘤的高亲和力、特异性靶向,并通过低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白实现了对CD47-SIRP α 相互作用的阻断。

[0062] 本发明的重组蛋白克服了常规双功能抗体目标产物得率低、纯化难的技术问题。在本发明的一个实施方式中,重组蛋白其右臂(Fc knob突变)为单链蛋白,当左臂轻链、左臂重链(Fc hole突变)和右臂(Fc knob突变)三者细胞中共同表达时,表达产物经蛋白A纯化80%以上均为目标蛋白,有效地提高了表达得率。虽有少量左臂二聚体、右臂二聚体或左右臂单体存在,但由于这些产物的分子量、电荷分布等差异明显,容易通过常规纯化手段比如离子交换层析、疏水色谱、分子排阻色谱、亲和层析、盐析法(例如硫酸铵沉淀法)去除,适用于工业化放大生产。

[0063] 本发明的低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白能与高亲和靶向肿瘤的臂(例如但不限于半抗体)普遍形成可拮抗CD47免疫抑制功效的重组蛋白。

[0064] 本发明克服了现有技术已有的SIRP α -Fc融合蛋白由于其与CD47的亲合力低而药效不显著的缺陷,又避免了SIRP α 高亲和力突变体可能带来的免疫原性高、非肿瘤靶向特异性高等诸多不利影响。同时,由于本发明的重组蛋白具有对正常细胞(比如红细胞)表面表达的CD47弱的结合亲和力,从而降低或避免常规抗CD47抗体治疗产生的红细胞凝集、贫血等副作用。

[0065] 本领域技术人员应当理解的是,本发明所保护的范围并不会因为本发明的某一项

技术方案能够实现某一项本发明明示或暗示的有益效果而不能实现或者完全实现另一项有益效果而被不恰当地限制。本领域技术人员应当理解的是,在本发明的保护范围内,任一项产品、方法或者用途只要获得了任意一项本发明明示或暗示的有益效果或者任选地本发明明示或暗示的有益效果的组合即表示其解决了本发明想要解决的技术问题,实现了相应的技术效果。

[0066] 具体地,本发明涉及以下实施方案:

[0067] 实施方案1.双特异性重组蛋白,其包含靶向肿瘤的臂和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白。

[0068] 实施方案2.实施方案1的双特异性重组蛋白,其中阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SIRP α 胞外截短体(包括人源SIRP α 野生型胞外截短体或CD47非高亲和突变的人源SIRP α 胞外截短体)。

[0069] 实施方案3.实施方案2的双特异性重组蛋白,其中SIRP α 胞外截短体包含SIRP α 的胞外氨基酸序列的部分或全部。

[0070] 实施方案4.实施方案1-3任一项的双特异性重组蛋白,其中高亲和靶向肿瘤的臂不结合CD47,且高亲和靶向肿瘤的臂对应的抗体对肿瘤细胞上靶抗原的结合亲和力是低亲和和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白所对应的单体融合蛋白同二聚体对肿瘤细胞上CD47结合亲和力的至少6倍。

[0071] 实施方案5.实施方案1-4任一项的双特异性重组蛋白,其中SIRP α 胞外截短体包括选自如下a1)-a4)任意一种的氨基酸序列:

[0072] a1)SEQ ID No:30;

[0073] a2)SEQ ID No:31;

[0074] a3)SEQ ID No:32;

[0075] a4)上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或保守性置换至少一个氨基酸残基例如1-5个氨基酸残基获得的氨基酸序列,其单体具有对CD47蛋白的结合亲和力并且该结合亲和力不高于a1)、a2)或a3)单体对CD47蛋白的结合亲和力的氨基酸序列。

[0076] 实施方案6.实施方案1-5任一项的双特异重组蛋白,其中双特异性重组蛋白具有相对设置的左、右两臂结构,高亲和靶向肿瘤的臂位于左臂的位置,所述的低亲和和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白位于右臂的位置。

[0077] 实施方案7.实施方案6的双特异重组蛋白,其左臂为免疫球蛋白的Fab或Fab'形式,右臂为SIRP α 胞外截短体。

[0078] 实施方案8.实施方案7的双特异重组蛋白,其右臂的长度与左臂需结合的抗原空间表位距离靶细胞膜表面的远近相适应。

[0079] 实施方案9.实施方案8的双特异重组蛋白,其高亲和靶向肿瘤的臂需结合靶细胞近膜端的表位时,SIRP α 胞外截短体选择含a1)~a4)中较短的氨基酸序列。

[0080] 实施方案10.实施方案1-9任一项的双特异性重组蛋白,其中靶向肿瘤的臂靶向选自下列的靶标:5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、

FR- α 、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、NaPi2b、结合素-4、Notch 2、Notch 1、PD-L1、PD-L2、PDGFR- α 、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138。

[0081] 实施方案11. 实施方案10的双特异性重组蛋白,其中当所述靶标为CD20、EGFR或PD-L1时,SIRP α 胞外截短体选择a1);当所述靶标为HER2时,SIRP α 胞外截短体选择a1或a2)。

[0082] 实施方案12. 实施方案1-11任一项的双特异性重组蛋白,其靶向肿瘤的臂与阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白通过分子间作用力结合,或通过共价键例如链间二硫键结合,或通过盐键结合,或通过上述结合方式中的两种或三种的组合而结合。

[0083] 实施方案13. 实施方案1-12任一项的双特异性重组蛋白,其中靶向肿瘤的臂和/或阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白还包含Fc区。

[0084] 实施方案14. 实施方案13的双特异性重组蛋白,其Fc区包含Fc区天然序列或Fc非天然序列。

[0085] 实施方案15. 实施方案14的双特异性重组蛋白,其Fc区为人Fc区。

[0086] 实施方案16. 实施方案15的双特异性重组蛋白,其高亲和靶向肿瘤的臂与低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白的结合通过knobs-into-holes结合。

[0087] 实施方案17. 实施方案1-16任一项的双特异性重组蛋白,其中靶向肿瘤的臂为靶向选自下列靶标的半抗体:5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR- α 、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、NaPi2b、结合素-4、Notch 2、Notch 1、PD-L1、PD-L2、PDGFR- α 、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138;优选地为IgG1抗体的半抗体,任选地为人鼠嵌合的半抗体、人源化的半抗体、全人源的半抗体;更优选地为人源化或全人源的IgG1抗体的半抗体。

[0088] 实施方案18. 实施方案1-17任一项的双特异性重组蛋白,其中阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白为包含SIRP α 胞外截短体和用于结合所述臂的结合序列的融合蛋白,SIRP α 胞外截短体和用于结合所述臂的结合序列任选通过接头序列连接,所述用于结合所述臂的结合序列任选地为Fc区。

[0089] 实施方案19. 实施方案1-18任一项的双特异性重组蛋白,其中阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包括选自如下b1)-b4)任意一种的氨基酸序列:

[0090] b1) SEQ ID No:26;

[0091] b2) SEQ ID No:27;

[0092] b3) SEQ ID No:28;

[0093] b4) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或保守性置换至少一个氨基酸残基例如1-5个氨基酸残基获得的氨基酸序列,其二聚体具有对CD47蛋白的结合亲和力并且该结合亲和力不高于b1)、b2)或b3) 二聚体对CD47蛋白的结合亲和力的氨基酸序列。

[0094] 实施方案20. 实施方案19的双特异性重组蛋白,其中高亲和靶向肿瘤的臂靶向CD20时,所述高亲和靶向肿瘤的臂包含SEQ ID No:16和SEQ ID No:17,所述低亲和阻断

CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SEQ ID No:26;其中高亲和靶向肿瘤的臂靶向EGFR时,所述高亲和靶向肿瘤的臂包含SEQ ID No:19和SEQ ID No:8,所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SEQ ID No:26;其中高亲和靶向肿瘤的臂靶向Her2时,所述高亲和靶向肿瘤的臂包含SEQ ID No:20和SEQ ID No:21,或SEQ ID No:22和SEQ ID No:23,所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SEQ ID No:26或SEQ ID No:27;或,其中高亲和靶向肿瘤的臂靶向PD-L1时,所述高亲和靶向肿瘤的臂包含SEQ ID No:24和SEQ ID No:13,所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SEQ ID No:26。

[0095] 实施方案21. 编码实施方案1-20任一项的双特异性重组蛋白的核酸分子。

[0096] 实施方案22. 实施方案21的核酸分子, 编码高亲和靶向肿瘤的臂的核酸分子与编码低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白的核酸在同一条DNA链中, 或在不同的DNA链中。

[0097] 实施方案23. 包含实施方案21或22的核酸分子的表达载体。

[0098] 实施方案24. 包含实施方案23的表达载体的细胞。

[0099] 实施方案25. 制备实施方案1-20任一项的双特异性重组蛋白的方法, 其包括:

[0100] 1) 提供靶向肿瘤的臂;

[0101] 2) 提供阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白;

[0102] 3) 使靶向肿瘤的臂与阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白接触形成所述重组蛋白。

[0103] 实施方案26. 实施方案25的制备方法, 其中使实施方案24的细胞表达所述重组蛋白。

[0104] 实施方案27. 实施方案25的制备方法, 其中接触包括通过分子间作用力结合, 或通过共价键例如链间二硫键结合, 或通过盐键结合, 或通过上述结合方式中的两种或三种的组合而结合。

[0105] 实施方案28. 实施方案25-27任一项的制备方法, 其中接触包括通过knobs-into-holes技术结合。

[0106] 实施方案29. 融合蛋白, 其特征在于, 所述融合蛋白包含SIRP α 胞外截短体和用于结合另一多肽的结合序列。

[0107] 实施方案30. 实施方案29的融合蛋白, 其中用于结合另一多肽的结合序列为Fc区; 任选地, 其中Fc区包含holes突变和/或knobs突变。

[0108] 实施方案31. 实施方案29或30的融合蛋白, 其中SIRP α 胞外截短体包含人源SIRP α 野生型及其非高亲和突变体的胞外氨基酸序列的部分或全部。

[0109] 实施方案32. 实施方案31的融合蛋白, 其中SIRP α 胞外截短体包括选自如下a1) - a4) 任意一种的氨基酸序列:

[0110] a1) SEQ ID No:30;

[0111] a2) SEQ ID No:31;

[0112] a3) SEQ ID No:32;

[0113] a4) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或保守性置换至少一个氨基酸残基例如1-5个氨基酸残基获得的氨基酸序列, 其单体具有对CD47蛋白的结合亲和力并且该结合亲和力不高于a1)、a2) 或a3) 单体对CD47蛋白的结合亲和力的氨

基酸序列。

[0114] 实施方案33. 实施方案29-32任一项的融合蛋白,其包括选自如下b1) -b4) 任意一种的氨基酸序列:

[0115] b1) SEQ ID No:26;

[0116] b2) SEQ ID No:27;

[0117] b3) SEQ ID No:28;

[0118] b4) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或保守性置换至少一个氨基酸残基例如1-5个氨基酸残基获得的氨基酸序列,其二聚体具有对CD47蛋白的结合亲和力并且该结合亲和力不高于b1)、b2) 或b3) 二聚体对CD47蛋白的结合亲和力的氨基酸序列。

[0119] 实施方案34. 编码实施方案29-33任一项的融合蛋白的核酸分子。

[0120] 实施方案35. 包含实施方案34的核酸分子的表达载体。

[0121] 实施方案36. 包含实施方案35的表达载体的细胞。

[0122] 实施方案37. 制备实施方案29-33任一项的融合蛋白的方法,其包括:

[0123] 1) 提供SIRP α 胞外截短体;

[0124] 2) 提供用于结合另一多肽的结合序列;

[0125] 3) 使SIRP α 胞外截短体和用于结合另一多肽的结合序列接触形成所述融合蛋白。

[0126] 实施方案38. 制备实施方案29-33任一项的融合蛋白的方法,其中使实施方案32的细胞表达所述融合蛋白。

[0127] 实施方案39. 药物组合物,其包含实施方案1-20任一项的重组蛋白或实施方案29-33任一项的融合蛋白,以及任选的佐剂、赋形剂或药学上可接受的载体。

[0128] 实施方案40. 实施方案39的药物组合物,其为注射剂或冻干粉形式。

[0129] 实施方案41. 药物组合物,其包含编码实施方案1-20任一项的重组蛋白或实施方案29-33任一项的融合蛋白的核酸分子,以及任选的可药用的载体。

[0130] 实施方案42. 实施方案29-33任一项的融合蛋白在用于制备实施方案1-20任一项的重组蛋白中的用途。

[0131] 实施方案43. 实施方案1-20任一项的重组蛋白或实施方案29-33任一项的融合蛋白在用于制备治疗肿瘤的药物中的用途。

[0132] 实施方案44. 实施方案43的用途,其中肿瘤选自乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、食管癌、子宫内膜癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌癌、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、基底细胞皮肤癌、鳞状细胞皮肤癌、皮肤纤维肉瘤突出症、梅克尔细胞癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、肉瘤、间皮瘤或骨髓发育不良综合征等血液肿瘤和实体瘤。

[0133] 实施方案45. 编码实施方案1-20任一项的重组蛋白或实施方案29-33任一项的融合蛋白的核酸分子或其衍生物在制备用于体内基因疗法的药物中的用途。

[0134] 实施方案46. 用于体外评价靶向CD47且具有ADCC活性的重组蛋白/抗体的早期免疫安全性的方法,该方法包括:

[0135] a) 提供靶向且具有ADCC活性的重组蛋白/抗体(包括单价或多价);

[0136] b) 检测所述重组蛋白/抗体的ADCC活性;

- [0137] c) 评价所述重组蛋白/抗体的早期免疫安全性。
- [0138] 实施方案47. 用于体外评价靶向CD47且具有ADCC活性的重组蛋白/抗体的早期免疫安全性的方法, 该方法包括:
- [0139] a) 制备效应细胞, 例如但不限于人NK92MI-CD16a效应细胞;
- [0140] b) 使效应细胞与重组蛋白/抗体(包括单价或多价)接触;
- [0141] c) 检测所述重组蛋白/抗体的ADCC活性;
- [0142] d) 根据ADCC活性结果, 评价所述重组蛋白/抗体的早期免疫安全性。
- [0143] 实施方案48. 实施方案47的评价方法, 包括:
- [0144] a) 收获生长良好的人NK92MI-CD16a效应细胞, 将收获的效应细胞重悬至细胞密度为 1×10^5 个细胞/ml至 5×10^6 个细胞/ml;
- [0145] b) 将梯度稀释的重组蛋白/抗体与a)中制备获得的效应细胞孵育, 孵育时间为0.5-5h;
- [0146] c) 孵育完成后, 测定LDH活性, 计算细胞裂解率;
- [0147] d) 根据细胞裂解率评价重组蛋白/抗体的早期免疫安全性, 其中导致较低细胞裂解率的重组蛋白/抗体的免疫安全性高。
- [0148] 实施方案49. 用于体内评价靶向CD47的重组蛋白/抗体(包括单价或多价)的早期免疫安全性的方法, 该方法包括:
- [0149] a) 提供靶向CD47重组蛋白/抗体(包括单价或多价);
- [0150] b) 提供Hu-NSG鼠;
- [0151] c) 将所述重组蛋白/抗体与Hu-NSG鼠接触;
- [0152] d) 评价所述重组蛋白/抗体在所述Hu-NSG鼠中的早期免疫安全性。
- [0153] 实施方案50. 用于体内评价靶向CD47的重组蛋白/抗体(包括单价或多价)的早期免疫安全性的方法, 该方法包括:
- [0154] a) 提供Hu-NSG小鼠;
- [0155] b) 施用重组蛋白/抗体(包括单价或多价);
- [0156] c) 施用24-96h后, 取小鼠静脉血, 裂解红细胞, 剩余细胞用荧光标记的抗人CD45、抗人CD19或抗人CD3的抗体共孵育15-60min, 进行流式细胞术检测;
- [0157] d) 根据细胞清除率评价重组蛋白/抗体的早期免疫安全性, 其中导致较低免疫细胞清除率(靶细胞除外)的重组蛋白/抗体的免疫安全性高。
- [0158] 本发明还涉及但不限于以下项目:
- [0159] 项目1. 一种双特异性重组蛋白, 其中所述双特异性重组蛋白包含高亲和靶向肿瘤的臂和低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白,
- [0160] 所述高亲和靶向肿瘤的臂不结合CD47, 且所述高亲和靶向肿瘤的臂对应的抗体对肿瘤细胞上靶抗原的结合亲和力是低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白所对应的单体融合蛋白同二聚体对肿瘤细胞上CD47结合亲和力的至少6倍;
- [0161] 所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白对CD47的结合亲和力不高于含SIRP α 胞外截短体的单体融合蛋白的同二聚体对CD47的结合亲和力; 所述SIRP α 胞外截短体包含人源SIRP α 野生型胞外截短体或CD47非高亲和突变的人源SIRP α 胞外截短体。
- [0162] 2. 如项目1所述的双特异性重组蛋白, 所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融

合蛋白包含SIRP α 胞外截短体,所述SIRP α 胞外截短体包含选自如下a1)-a4)任意一种的氨基酸序列:a1) SEQ ID No:30;a2) SEQ ID No:31;a3) SEQ ID No:32;a4) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或保守性置换至少一个氨基酸残基例如1-5个氨基酸残基获得的氨基酸序列,其单体具有对CD47蛋白的结合亲和力并且该结合亲和力不高于a1)、a2) 或a3) 单体对CD47蛋白的结合亲和力的氨基酸序列。

[0163] 3.如项目1或2所述的双特异性重组蛋白,所述双特异性重组蛋白具有相对设置的左、右两臂结构,其中所述的高亲和靶向肿瘤的臂位于左臂的位置,所述的低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白位于右臂的位置;较佳地,所述左臂为免疫球蛋白的Fab或Fab'形式,所述右臂为SIRP α 胞外截短体。

[0164] 4.如项目3所述的双特异性重组蛋白,所述右臂的长度与左臂需结合的抗原空间表位距离靶细胞膜表面的远近相适应;优选地,当所述高亲和靶向肿瘤的臂需结合靶细胞近膜端的表位时,所述SIRP α 胞外截短体选择含a1) ~ a4) 中较短的氨基酸序列。

[0165] 5.如项目1~4任一项所述的双特异性重组蛋白,所述高亲和靶向肿瘤的臂靶向选自下列的靶标:5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR- α 、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、NaPi2b、结合素-4、Notch 2、Notch 1、PD-L1、PD-L2、PDGFR- α 、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138;

[0166] 较佳地,当所述靶标为CD20、EGFR或PD-L1时,所述SIRP α 胞外截短体选择a1);当所述靶标为HER2时,所述SIRP α 胞外截短体选择a1) 或a2)。

[0167] 6.如项目1~5任一项所述的双特异性重组蛋白,其中高亲和靶向肿瘤的臂与低亲和和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白通过分子间作用力结合,或通过共价键例如铈间二硫键结合,或通过盐键结合,或通过上述结合方式中的两种或三种的组合而结合。

[0168] 7.如项目6所述的双特异性重组蛋白,其还包含Fc区;优选地,所述Fc区包含Fc区天然序列或Fc非天然序列;更优选地,所述Fc区为人Fc区;进一步更优选地,其中高亲和靶向肿瘤的臂与低亲和和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白的结合是通过knobs-into-holes结合的。

[0169] 8.如项目7所述的双特异性重组蛋白,所述高亲和靶向肿瘤的臂为靶向选自下列靶标的半抗体:5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR- α 、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、NaPi2b、结合素-4、Notch 2、Notch 1、PD-L1、PD-L2、PDGFR- α 、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138;优选地为IgG1抗体的半抗体,任选地为人鼠嵌合的半抗体、人源化的半抗体、全人源的半抗体;更优选地为人源化或全人源的IgG1抗体的半抗体。

[0170] 9.项目7或8所述的双特异性重组蛋白,其中低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含选自如下b1)-b4)任意一种的氨基酸序列:b1) SEQ ID No:26;b2) SEQ ID No:

27;b3) SEQ ID No:28;b4) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或保守性置换至少一个氨基酸残基例如1-5个氨基酸残基获得的氨基酸序列,其二聚体具有对CD47蛋白的结合亲和力并且该结合亲和力不高于b1)、b2) 或b3) 同二聚体对CD47蛋白的结合亲和力的氨基酸序列。

[0171] 10. 如项目9所述的双特异性重组蛋白,

[0172] 其中高亲和靶向肿瘤的臂靶向CD20时,所述高亲和靶向肿瘤的臂包含SEQ ID No:16和SEQ ID No:17,所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SEQ ID No:26;

[0173] 其中高亲和靶向肿瘤的臂靶向EGFR时,所述高亲和靶向肿瘤的臂包含SEQ ID No:19和SEQ ID No:8,所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SEQ ID No:26;

[0174] 其中高亲和靶向肿瘤的臂靶向Her2时,所述高亲和靶向肿瘤的臂包含SEQ ID No:20和SEQ ID No:21,或SEQ ID No:22和SEQ ID No:23,所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SEQ ID No:26或SEQ ID No:27;或,

[0175] 其中高亲和靶向肿瘤的臂靶向PD-L1时,所述高亲和靶向肿瘤的臂包含SEQ ID No:24和SEQ ID No:13,所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白包含SEQ ID No:26。

[0176] 11. 编码项目1~10任一项的双特异性重组蛋白的核酸分子;优选地,其中编码所述高亲和靶向肿瘤的臂的核酸分子与编码所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白的核酸在同一条DNA链中,或编码所述高亲和靶向肿瘤的臂的核酸分子与编码所述低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白的核酸在不同的DNA链中。

[0177] 12. 包含项目11的核酸分子的表达载体。

[0178] 13. 包含项目12的表达载体的宿主细胞。

[0179] 14. 双特异性重组蛋白的制备方法,其使用项目13所述的细胞表达所述重组蛋白。

[0180] 15. 项目1~10任一项所述的双特异性重组蛋白在制备治疗肿瘤的药物中的用途;优选地,所述肿瘤选自乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、食管癌、子宫内膜癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌、肾癌、宫颈癌、骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、甲状腺癌、子宫癌、膀胱癌、神经内分泌癌、头颈癌、肝癌、鼻咽癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、基底细胞皮肤癌、鳞状细胞皮肤癌、皮肤纤维肉瘤突出症、梅克尔细胞癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、肉瘤、间皮瘤或骨髓发育不良综合征等血液肿瘤和实体瘤。

附图说明

[0181] 图1为本发明的待插入表达载体的插入物的结构示意图。

[0182] 图2为本发明使用的示例性表达载体pCHO-TE2的质粒图谱。

[0183] 图3为作为本发明重组蛋白的示例性实施方案的结构示意图。

[0184] 图4A-4B为重组蛋白经蛋白A纯化后的SDS-PAGE电泳图。图4A的第1-6泳道为还原性样品,分别为:1:Marker,2:Anti-CD20 mAb (Ofatumumab),3:Anti-CD47 mAb (Hu5F9-G4),4:SIRP α D1-Fc,5:Ofa-Fc1-D1-Fc2,6:Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2;图4A的第7-12泳道为非还原性样品,分别为:7:Marker,8:Anti-CD20 mAb (Ofatumumab),9:Anti-CD47 mAb (Hu5F9-G4),10:SIRP α D1-Fc,11:Ofa-Fc1-D1-Fc2,12:Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2。图4B的泳道1为Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2非还原性样品,2为Marker,3为Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2还原性样品。

- [0185] 图5为ELISA测定本发明的重组蛋白与人CD47的结合亲和力结果(蛋白水平)。
- [0186] 图6为流式细胞术测定本发明的重组蛋白与人CD47的结合亲和力结果(细胞水平)。
- [0187] 图7为流式细胞术测定本发明的重组蛋白与对应左臂靶点的结合力结果。Hu5F9-G4、Ofa-Fc1-D1-Fc2、SIRP α D1-Fc对应于样品Hu5F9-G4、Ofa-Fc1-D1-Fc2、SIRP α D1-Fc与未经过抗CD47抗体Hu5F9-G4(Fab)2封闭的Raji细胞结合后的平均荧光强度,而Hu5F9-G4(b)、Ofa-Fc1-D1-Fc2(b)、SIRP α D1-Fc(b)对应于样品Hu5F9-G4、Ofa-Fc1-D1-Fc2、SIRP α D1-Fc与经过抗CD47抗体Hu5F9-G4(Fab)2封闭的Raji细胞结合后的平均荧光强度。
- [0188] 图8为流式细胞术测定本发明的重组蛋白与CD47和左臂靶点双阳性细胞的结合亲和力结果。图8A使用的是Raji细胞(CD20+CD47),图8B使用的是SKBR-3细胞(Her2+CD47),图8C使用的是A431细胞(EGFR+CD47),图8D使用的是NCI-H441细胞(PD-L1+CD47)。
- [0189] 图9为ELISA测定本发明的重组蛋白与SIRP α D1-Fc和抗CD47抗体对CD47的竞争性结合结果。
- [0190] 图10为流式细胞术测定本发明的重组蛋白及其CD47高亲和突变体、抗CD47抗体和抗CD20抗体与人CD47的结合亲和力结果。
- [0191] 图11为本发明的重组蛋白体外免疫安全性评价实验结果。
- [0192] 图12为本发明的重组蛋白在Raji淋巴瘤皮下移植NSG小鼠模型药效实验结果。
- [0193] 图13为相同剂量不同样品对Hu-NSG鼠处理后96小时B细胞含量检测结果。其中,图13A使用的是0.9%生理盐水,图13B使用的是Hu5F9-G4(6.7 μ g/只),图13C使用的是Ofa-Fc1-D1-Fc2(5 μ g/只)。
- [0194] 图14为Ofa-Fc1-D1-Fc2及Ofa-Fc1-D1^m-Fc2在Hu-NSG鼠体内早期安全性评价实验结果(FACS免疫细胞分型检测)。图14A-D均使用了Ofa-Fc1-D1-Fc2(1 μ g/只),其中图14A和图14B为用药前的检测结果图,图14C和图14D为用药72小时后的检测结果图。图14E-H均使用了Ofa-Fc1-D1^m-Fc2(1 μ g/只),其中图14E和图14F为用药前的检测结果图,图14G和图14H为用药72小时后的检测结果图。
- [0195] 图15为高剂量下不同样品对Hu-NSG鼠处理后96小时FACS免疫细胞分型检测。图15A-B为用药后96小时的结果,其中图A使用Hu5F9-G4(200 μ g/只),图15B使用Ofa-Fc1-D1-Fc2高剂量(150 μ g/只)。图15C-D为用药后14天的结果,其中图15C使用Hu5F9-G4(200 μ g/只),图15D使用Ofa-Fc1-D1-Fc2高剂量(150 μ g/只)。
- [0196] 图16为本发明的重组蛋白在SKBR-3中与双靶点(Her2、CD47)的结合情况。图16A为Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2和Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2样品检测结果,图16B为Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2和Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2样品检测结果。
- [0197] 图17A-E为本发明示例蛋白的相应氨基酸序列和DNA序列。
- [0198] 图18A为两种剂量的Ofa-Fc1-D1-Fc2对食蟹猴红细胞数量的影响,图18B为两种剂量的Ofa-Fc1-D1-Fc2对食蟹猴血红蛋白的影响。
- [0199] 图19为两种剂量的Ofa-Fc1-D1-Fc2对食蟹猴B细胞含量检测结果。
- [0200] 图20为Ofa-Fc1-D1-Fc2、美罗华[®]对人B细胞淋巴瘤Daudi皮下移植瘤生长的影响。
- [0201] 图21为Ofa-Fc1-D1-Fc2、美罗华[®]对荷瘤小鼠体重的影响。
- [0202] 图22为Ofa-Fc1-D1-Fc2、美罗华[®]对人B细胞淋巴瘤Daudi皮下移植瘤的疗效的肿

瘤照片。

具体实施方式

[0203] 为了促进对本发明的理解,以下将参考某些实施方式,并且将使用特定语言来描述本发明。然而,应当理解的是,这些具体实施方式不意图限制本发明的范围。所描述的实施方式中的任何改变和进一步的修改,以及本发明的任何进一步应用,均为本领域技术人员通常会想到的。

[0204] 重组蛋白

[0205] 如本文所用,术语“重组蛋白”是指人工设计/构建的蛋白,而不是天然存在的蛋白质。本发明的“重组蛋白”中的“重组”不代表其生产方式,其仅用于表示“重组蛋白”并不天然存在。本发明的重组蛋白可以是表达的蛋白,可以是组装的蛋白。

[0206] 任选地,本发明的重组蛋白包含高亲和靶向肿瘤的臂和低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白。

[0207] 本文所使用的“高亲和靶向肿瘤”是指本发明的重组蛋白对肿瘤的结合亲和力高于或大致相当于现有技术中结合肿瘤的抗体类药物对肿瘤的结合亲和力,现有技术中结合肿瘤的抗体类药物对肿瘤的结合亲和力通常EC50在nM或pM水平。优选地,本发明的重组蛋白中,高亲和靶向肿瘤的臂所对应的抗体对肿瘤细胞上靶抗原的结合亲和力是低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白所对应的单体融合蛋白同二聚体对肿瘤细胞上CD47结合亲和力的至少6倍,任选地6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍,或更高的倍数,或其间的任意数值。任选地,本发明的重组蛋白中,高亲和靶向肿瘤的臂所对应的抗体对肿瘤细胞上靶抗原的结合亲和力是低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白所对应的SIRP α -Fc同二聚体对肿瘤细胞上CD47结合亲和力的至少6倍,任选地6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍,或更高的倍数,或其间的任意数值。

[0208] 本文所使用的“低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用”是指本发明的重组蛋白能够以较低的亲和力阻断CD47与SIRP α 相互作用。优选地,本发明的重组蛋白中低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白对CD47的结合亲和力不高于含SIRP α 胞外截短体的单体融合蛋白的同二聚体对CD47的结合亲和力。更优选地,不高于人源SIRP α -Fc融合蛋白对CD47的结合亲和力。

[0209] 本文所述双特异性重组蛋白,当其高亲和靶向肿瘤的臂所对应的抗体对肿瘤细胞上靶抗原的结合亲和力是其阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白的臂所对应的单体融合蛋白同二聚体对肿瘤细胞上CD47结合亲和力的至少6倍时,即可实现显著提高具有调节巨噬细胞功能重组蛋白的肿瘤靶向饱和结合丰度和降低非肿瘤靶向的副作用的缺陷。

[0210] 本文所使用的结合亲和力的测定方法是本领域技术人员熟知的,包括例如但不限于ELISA法和/或流式细胞术。

[0211] 任选地,本发明所述信号调节蛋白 α 胞外截短体(含野生型胞外截短体及其非高亲和突变体胞外截短体)-Fc融合蛋白与半抗体可以通过改造抗体重链使形成异源二聚体,具体地,比如可以通过Knobs-into-holes连接和/或链间二硫键和/或盐键介导得到重组蛋白。

[0212] 任选地,当“靶向肿瘤的臂”或“半抗体”或“左臂”或“半抗体结构”或“Ig分子单体”

与“靶向CD47的臂”或“右臂”或“信号调节蛋白 α 截短体-Fc融合蛋白”或“SIRP α -Fc”通过 knobs-into-holes连接得到重组蛋白时,所得重组蛋白的结构如图3所示。其中,左臂是肿瘤靶向的半抗体,包括但不限于抗5T4半抗体、抗AGS-16半抗体、抗ALK1半抗体、抗ANG-2半抗体、抗B7-H3半抗体、抗B7-H4半抗体、抗c-fms半抗体、抗c-Met半抗体、抗CA6半抗体、抗CD123半抗体、抗CD19半抗体、抗CD20半抗体、抗CD22半抗体、抗EpCAM半抗体、抗CD30半抗体、抗CD32b半抗体、抗CD37半抗体、抗CD38半抗体、抗CD40半抗体、抗CD52半抗体、抗CD70半抗体、抗CD74半抗体、抗CD79b半抗体、抗CD98半抗体、抗CEA半抗体、抗CEACAM5半抗体、抗CLDN18.2半抗体、抗CLDN6半抗体、抗CS1半抗体、抗CXCR4半抗体、抗DLL-4半抗体、抗EGFR半抗体、抗EGP-1半抗体、抗ENPP3半抗体、抗EphA3半抗体、抗ETBR半抗体、抗FGFR2半抗体、抗FN半抗体、抗FR- α 半抗体、抗GCC半抗体、抗GD2半抗体、抗GPC-3半抗体、抗GPNMB半抗体、抗HER2半抗体、抗HER3半抗体、抗HLA-DR半抗体、抗ICAM-1半抗体、抗IGF-1R半抗体、抗IL-3R半抗体、抗LIV-1半抗体、抗MSLN半抗体、抗MUC16半抗体、抗MUC1半抗体、抗NaPi2b半抗体、抗结合素-4半抗体、抗Notch 2半抗体、抗Notch 1半抗体、抗PD-L1半抗体、抗PD-L2半抗体、抗PDGFR- α 半抗体、抗PS半抗体、抗PSMA半抗体、抗SLTRK6半抗体、抗STEAP1半抗体、抗TEM1半抗体、抗VEGFR半抗体、抗CD25半抗体、抗CD27L半抗体、抗DKK-1半抗体、抗CSF-1R半抗体、抗MSB0010718C半抗体、抗BCMA半抗体、抗CD138半抗体。右臂是SIRP α (包括人源SIRP α 野生型及其非高亲和突变体)胞外截短体通过与IgG抗体的铰链区和Fc区连接形成的融合蛋白。其中右臂Fc区为hole突变体时,对应左臂Fc区为knob突变体;右臂为knob突变体时,对应左臂Fc区为hole突变体。如本领域技术人员所知,Fc区还可以同时做多个holes和/或knobs突变。

[0213] 下表1为重组蛋白的示例性分子结构。

[0214] 表1重组蛋白的分子结构示例

[0215]

序号	左臂	右臂
1	Anti-CD20-Fc1	D1-Fc2
2	Anti-CD20-Fc1	D1-D2-Fc2
3	Anti-CD20-Fc1	D1-D2-D3-Fc2
4	Anti-CD20-Fc1	D1 ^m -Fc2
5	Anti-CD20-Fc1	D1 ^m -D2-Fc2
6	Anti-PD-L1-Fc1	D1-Fc2
7	Anti-PD-L1-Fc1	D1-D2-Fc2
8	Anti-PD-L1-Fc1	D1-D2-D3-Fc2
9	Anti-PD-L1-Fc1	D1 ^m -Fc2
10	Anti-PD-L1-Fc1	D1 ^m -D2-Fc2
11	Anti-EGFR-Fc1	D1-Fc2
12	Anti-EGFR-Fc1	D1-D2-Fc2
13	Anti-EGFR-Fc1	D1-D2-D3-Fc2
14	Anti-EGFR-Fc1	D1 ^m -Fc2
15	Anti-EGFR-Fc1	D1 ^m -D2-Fc2
16	Anti-Her2-Fc1	D1-Fc2

17	Anti-Her2-Fc1	D1-D2-Fc2
18	Anti-Her2-Fc1	D1-D2-D3-Fc2
19	Anti-Her2-Fc1	D1 ^m -Fc2
20	Anti-Her2-Fc1	D1 ^m -D2-Fc2

[0216] D1^m表示SIRP α 胞外截短体D1的高亲和突变体;D1表示人源SIRP α 野生型及其非高亲和和突变体的胞外D1结构域;Fc表示野生型Fc区、Fc1表示具有hole或holes突变的Fc区、Fc2表示具有knob或knobs突变的Fc区

[0217] 本发明重组蛋白的相应氨基酸序列和DNA序列见图17A-E并见本发明的序列表文件。

[0218] 抗体

[0219] 如本文所用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH),其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0220] 靶向肿瘤的臂

[0221] 如本文所用,术语“靶向肿瘤的臂”或“半抗体”或“左臂”或“半抗体结构”或“Ig分子单体”指由抗体的一条轻链(L)和一条重链(H)组成的异二聚糖蛋白,是构成免疫球蛋白分子的基本结构,在本发明中可以互换使用;其分子量为对应抗体分子量的一半,约75000道尔顿,其中轻链通过一个共价二硫键与重链相连。重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH),其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0222] 如本文所用,术语“靶向肿瘤的臂”、“半抗体”或“左臂”或“半抗体结构”或“Ig分子单体”可以是各种肿瘤靶向的IgG蛋白。肿瘤靶标分子包括但不限于5T4、AGS-16、ALK1、ANG-2、B7-H3、B7-H4、c-fms、c-Met、CA6、CD123、CD19、CD20、CD22、EpCAM、CD30、CD32b、CD37、CD38、CD40、CD52、CD70、CD74、CD79b、CD98、CEA、CEACAM5、CLDN18.2、CLDN6、CS1、CXCR4、DLL-4、EGFR、EGP-1、ENPP3、EphA3、ETBR、FGFR2、FN、FR- α 、GCC、GD2、GPC-3、GPNMB、HER2、HER3、HLA-DR、ICAM-1、IGF-1R、IL-3R、LIV-1、MSLN、MUC16、MUC1、NaPi2b、结合素-4、Notch 2、Notch 1、PD-L1、PD-L2、PDGFR- α 、PS、PSMA、SLTRK6、STEAP1、TEM1、VEGFR、CD25、CD27L、DKK-1、CSF-1R、MSB0010718C、BCMA、CD138。

[0223] “靶向肿瘤的臂”、“半抗体”或“左臂”或“半抗体结构”或“Ig分子单体”的Fc序列可以采用hole或holes突变体和/或knob或knobs突变体。

[0224] 靶向CD47的臂

[0225] 如本文所用,术语“靶向CD47的臂”或“右臂”或“信号调节蛋白 α 截短体-Fc融合蛋白”或“SIRP α -Fc”或“阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白”在本发明中可以互换使用。如本领域技术人员所知晓地,所述“靶向CD47的臂”或“右臂”或“信号调节蛋白 α 截短体-Fc融

合蛋白”或“SIRP α -Fc”或“阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白”分子长度可变。任选地，可以通过SIRP α (包括人源SIRP α 野生型及其非高亲和突变体)的胞外截短体与IgG1抗体的铰链区和Fc区连接，从而形成的多种分子长度不同的“靶向CD47的臂”或“右臂”或“信号调节蛋白 α 截短体-Fc融合蛋白”或“SIRP α -Fc”或“阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白”。IgG1可以是人源IgG1。

[0226] “靶向CD47的臂”或“右臂”或“信号调节蛋白 α 截短体-Fc融合蛋白”或“SIRP α -Fc”或“阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白”的Fc可以采用knob或knobs突变体和/或hole或holes突变体。

[0227] “靶向肿瘤的臂”或“半抗体”或“左臂”或“半抗体结构”或“Ig分子单体”与“靶向CD47的臂”或“右臂”或“信号调节蛋白 α 截短体-Fc融合蛋白”或“SIRP α -Fc”或“阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白”如本领域技术人员所知，可以通过改造Fc片段(区)使形成异源二聚体重组蛋白。具体地，本发明的重组蛋白，可以通过分子间作用力得到，也可以通过共价键例如链间二硫键得到，也可以通过盐键介导得到，也可以通过上述三种技术中的两种或三种的任意组合得到。任选地，本发明的重组蛋白是通过knobs-into-holes技术结合的。

[0228] knobs-into-holes技术

[0229] 如本文所用，术语“knobs-into-holes技术”或“杵臼”技术或“隆突-入-空穴”技术或“纽扣”技术，是利用基因工程技术，在重链两个CH3结构域引入不同的突变来促使重链发生异源二聚化，一条重链上做一个钮(knob)，在另一条重链上做一个扣(hole)，然后两者优先咬合在一起形成不对称抗体(Ridgway JB, et al. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Engineering, 1996, 9 (7) : 617-621)。如本领域技术人员所知，一条重链上可以做多个钮(knob)和/或扣(hole)，对应的，另一条重链上可以做多个扣(hole)和/或钮(knob)。

[0230] SIRP α

[0231] 如本文所用，术语“SIRP α ”是信号调节蛋白 α (Signal Regulatory Protein α)，也称作CD172a。信号调节蛋白(SIRP)是一种穿膜糖蛋白，包括三个家族成员，SIRP α (CD172a)、SIRP β (CD172b)、SIRP γ (CD172g)。这三个成员具有相似的膜外端，但不同的膜内区。膜外端均含有三个免疫球蛋白(Ig)样区域，其中第一个区域属于IgV区，第二、三个区域属于IgC区。SIRP α (CD172a)的膜内区含有两个抑制性信号域，可传递抑制信号，抑制细胞的相应功能。SIRP β (CD172b)和SIRP γ (CD172g)膜内区很短，没有信号传递区域，但SIRP β (CD172b)可通过适配器蛋白(Adaptor protein, 如DAP12)传递激活信号。SIRP蛋白主要表达在巨噬细胞(M ϕ)、树突状细胞(DC)、及神经元细胞。本文特指人源SIRP α 野生型及其CD47非高亲和突变体。

[0232] SIRP α 胞外截短体

[0233] “胞外截短体”是指针对具有跨膜功能的蛋白质。“SIRP α 胞外截短体”，如本文所用，指人源SIRP α 野生型及其CD47非高亲和突变体，选择性地截选其全部或部分位于细胞膜外部空间的氨基酸序列。

[0234] 如本文所用，术语“D1、D2、D3”指SIRP α 胞外的三个Ig样结构域，从蛋白质的氨基端开始依次为D1结构域(Ig可变区样结构域，IgV区)、D2结构域(Ig恒定区样结构域，IgC区)和D3结构域(Ig恒定区样结构域，IgC区)(Lee WY, et al. The Role of cis Dimerization of

Signal Regulatory Protein α (SIRP α) in Binding to CD47. *J Biol Chem*, 2010, 285(49): 37953-37963)。

[0235] SIRP α -Fc融合蛋白

[0236] 如本文所用,术语“SIRP α -Fc融合蛋白”指包含SIRP α 胞外截短体、接头序列和Fc区的融合蛋白。上述序列中所包含的接头序列和/或Fc区可根据本领域技术人员所熟知的方式或常用接头序列和/或Fc区任意替换。

[0237] 为了避免糖基化的影响,本发明对D1进行了由天冬酰胺到丙氨酸的突变(参考文献:Lee W Y, et al. Novel Structural Determinants on SIRP α that Mediate Binding to CD47. *Journal of Immunology*, 2007, 179(11): 7741-7750)。

[0238] 本发明的D1、D2、D3还包括相应的接头序列。

[0239] 接头序列

[0240] 如本文所用,术语“接头序列”是指连接SIRP α 胞外截短体和结合序列的氨基酸序列,任选地,为IgG抗体的铰链区,任选地,包含铰链区与IgG重链CH1结构域。上述序列中所包含的接头序列或铰链区序列可根据本领域技术人员所熟知的方式或常用接头序列或铰链区序列任意替换。

[0241] 结合序列

[0242] 如本文所用,术语“结合序列”是指使高亲和靶向肿瘤的臂与低亲和阻断CD47与SIRP α 相互作用的融合蛋白相结合的序列,任选地,所述结合序列包含铰链区和Fc区,更任选地,所述Fc区包含knob或knobs和/或hole或holes突变。上述序列中所包含的结合序列或铰链区或Fc区序列可根据本领域技术人员所熟知的方式或常用结合序列或铰链区或Fc区序列任意替换。

[0243] CD47

[0244] CD47是一种穿膜糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族成员,在包括红细胞在内的几乎所有细胞表面表达。CD47的配体包括黏附因子(integrin)、凝血酶敏感蛋白1(thrombospondin-1)、以及信号调节蛋白(SIRP)。CD47具有多种生物学功能,包括细胞迁移、T细胞、树突状细胞活化、轴突发育等。除此之外,CD47通过与SIRP α 相互作用可抑制巨噬细胞的吞噬作用。CD47以这种方式传递一种所谓的“不要吃我”(“Don't eat me”)信号,可以保护红细胞、B细胞、T细胞等正常细胞不被巨噬细胞吞噬。

[0245] Ofa

[0246] 如本文所用,术语“Ofa”、“Ofatumumab”、“Anti-CD20 (Ofatumumab)”在本发明中可以互换使用,表示抗CD20抗体Ofatumumab。

[0247] Obi

[0248] 如本文所用,术语“Obi”、“Obinutuzumab”、“Anti-CD20 (Obinutuzumab)”在本发明中可以互换使用,表示抗CD20抗体Obinutuzumab。

[0249] Hu5F9-G4

[0250] 如本文所用,术语“Anti-CD47 mAb”、“抗CD47抗体”、“Hu5F9-G4”在本发明中可以互换使用,表示抗CD47抗体Hu5F9-G4。

[0251] Anti-EGFR mAb

[0252] 如本文所用,术语“Anti-EGFR mAb”、“JMT101”在本发明中可以互换使用,表示抗

EGFR抗体JMT101。JMT101为人源化抗EGFR单克隆抗体,参见ZL201210406288.3专利BA03。

[0253] 曲妥珠单抗

[0254] 如本文所用,术语“曲妥珠单抗”、“Trastuzumab”、“Anti-Her2 (T) mAb”、“Herceptin”在本发明中可以互换使用,表示抗Her2抗体Trastuzumab。

[0255] 帕妥珠单抗

[0256] 如本文所用,术语“帕妥珠单抗”、“Pertuzumab”、“Anti-Her2 (P) mAb”、“Perjeta”在本发明中可以互换使用,表示抗Her2抗体Pertuzumab。

[0257] Atezolizumab

[0258] 如本文所用,术语“Tecentriq”、“Atezolizumab”在本发明中可以互换使用,表示抗PD-L1抗体Atezolizumab。

[0259] SIRP α D1-Fc

[0260] 如本文所用,术语“SIRP α D1-Fc”、“D1-Fc”在本发明中可以互换使用,表示单链融合蛋白SIRP α D1-Fc的二聚体。

[0261] Ofa-Fc1

[0262] 表示具有hole突变的Fc区的Ofatumumab半抗体。

[0263] Anti-Her2 (T) -Fc1

[0264] 表示具有hole突变的Fc区的Transtuzumab半抗体。

[0265] Anti-Her2 (P) -Fc1

[0266] 表示具有hole突变的Fc区的Pertuzumab半抗体。

[0267] Anti-EGFR-Fc1

[0268] 表示具有hole突变的Fc区的抗EGFR半抗体。

[0269] D1-Fc2

[0270] 表示包含SIRP α D1结构域胞外截短体和具有knob突变的Fc区的融合蛋白。

[0271] D1-D2-Fc2

[0272] 表示包含SIRP α D1和D2结构域胞外截短体和具有knob突变的Fc区的融合蛋白。

[0273] D1-D2-D3-Fc2

[0274] 表示包含SIRP α D1、D2和D3结构域胞外截短体和具有knob突变的Fc区的融合蛋白。

[0275] 治疗

[0276] 如本文所用,术语“治疗”、“疗法”和“医治”可以互换使用。术语“治疗”包括控制疾病、病症、病况的进展和相关症状,优选减少疾病、病症、病况或减轻疾病、病症、病况的一种或多种症状的影响。此术语包括治愈疾病或完全消除症状。此术语包括症状得到缓解。此术语还包括但不限于非治愈性的姑息性治疗。术语“治疗”包括给受试者施用治疗有效量的包含本发明的重组蛋白或融合蛋白的药物组合物,以预防或延迟、减轻或缓解疾病、病症、病况的进展或疾病、病症、病况的一种或多种症状的影响。

[0277] 施用

[0278] 如本文所用,术语“施用”是指将治疗有效量的包含本发明的重组蛋白或融合蛋白的药物组合物递送至受试者。施用可以全身施用也可以局部施用。施用可以通过施用装置进行,例如注射器。施用方式包括但不限于包埋、鼻吸、喷雾、注射等。施用途径包括吸入、鼻内、口服、静脉内、皮下或肌内施用等。

[0279] 表2-1序列名称和序列编号的对应关系

序列编号	序列名称
SEQ ID NO: 1	Ofa 重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 2	Ofa 轻链氨基酸序列
SEQ ID NO: 3	Obi 重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 4	Obi/Obi-Fc1 轻链氨基酸序列
SEQ ID NO: 5	Hu5F9-G4 重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 6	Hu5F9-G4 轻链氨基酸序列
SEQ ID NO: 7	JMT101 重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 8	JMT101/Anti-EGFR-Fc1 轻链氨基酸序列
SEQ ID NO: 9	Trastuzumab 重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 10	Trastuzumab 轻链氨基酸序列
SEQ ID NO: 11	SIRP α D1-Fc 氨基酸序列
SEQ ID NO: 12	Atezolizumab 重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 13	Atezolizumab/Anti-PD-L1(Ate)-Fc1 轻链氨基酸序列
SEQ ID NO: 14	D1-Fc2 DNA 序列
SEQ ID NO: 15	D1-D2-Fc2 DNA 序列
SEQ ID NO: 16	Ofa-Fc1 重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 17	Ofa-Fc1 轻链氨基酸序列
SEQ ID NO: 18	Obi-Fc1 重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 19	Anti-EGFR-Fc1 重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 20	Anti-Her2(T)-Fc1 重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 21	Anti-Her2(T)-Fc1 轻链氨基酸序列
SEQ ID NO: 22	Anti-Her2(P)-Fc1 重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 23	Anti-Her2(P)-Fc1 轻链氨基酸序列
SEQ ID NO: 24	Anti-PD-L1(Ate)-Fc1 重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 25	D1-D2-D3-Fc2 DNA 序列
SEQ ID NO: 26	D1-Fc2 氨基酸序列
SEQ ID NO: 27	D1-D2-Fc2 氨基酸序列
SEQ ID NO: 28	D1-D2-D3-Fc2 氨基酸序列
SEQ ID NO: 29	D1 ^m -Fc2 氨基酸序列
SEQ ID NO: 30	D1 氨基酸序列
SEQ ID NO: 31	D1-D2 氨基酸序列
SEQ ID NO: 32	D1-D2-D3 氨基酸序列
SEQ ID NO: 33	D1 ^m 氨基酸序列
SEQ ID NO: 34	Ofa-Fc1 重链 DNA 序列
SEQ ID NO: 35	Ofa-Fc1 轻链 DNA 序列
SEQ ID NO: 36	Obi-Fc1 重链 DNA 序列
SEQ ID NO: 37	Anti-EGFR-Fc1 重链 DNA 序列
SEQ ID NO: 38	Anti-Her2(T)-Fc1 重链 DNA 序列
SEQ ID NO: 39	Anti-Her2(T)-Fc1 轻链 DNA 序列
SEQ ID NO: 40	Anti-Her2(P)-Fc1 重链 DNA 序列
SEQ ID NO: 41	Anti-Her2(P)-Fc1 轻链 DNA 序列

[0280]

[0281]	SEQ ID NO: 42	Anti-PD-L1(Ate)-Fc1 重链 DNA 序列
	SEQ ID NO: 43	D1 ^m -Fc2 DNA 序列
	SEQ ID NO: 44	D1 ^m -D2-Fc2 氨基酸序列

[0282] 表2-2重组蛋白和序列的对应关系

蛋白名称	序列表中对应的序列号
SIRP α D1-Fc	SEQ ID NO: 11
Ofa-Fc1-D1-Fc2	SEQ ID NO: 16 (Ofa-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 17 (Ofa-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 26 (D1-Fc2)
Ofa-Fc1-D1 ^m -Fc2	SEQ ID NO: 16 (Ofa-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 17 (Ofa-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 29 (D1 ^m -Fc2)
Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2	SEQ ID NO: 16 (Ofa-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 17 (Ofa-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 27 (D1-D2-Fc2)
Ofa-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	SEQ ID NO: 16 (Ofa-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 17 (Ofa-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 44 (D1 ^m -D2-Fc2)
Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	SEQ ID NO: 16 (Ofa-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 17 (Ofa-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 28 (D1-D2-D3-Fc2)
Obi-Fc1-D1-Fc2	SEQ ID NO: 18 (Obi-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 4 (Obi-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 26 (D1-Fc2)
Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2	SEQ ID NO: 24 (Anti-PD-L1(Ate)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 10 (Anti-PD-L1(Ate)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 26 (D1-Fc2)
[0283] Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2	CN104356236A SEQ ID NO: 10 (Anti-PD-L1(13G4)-Fc1 重链) + CN104356236A SEQ ID NO: 20 (Anti-PD-L1(13G4)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 26 (D1-Fc2)
Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2	CN104356236A SEQ ID NO: 2 (Anti-PD-L1(12A4)-Fc1 重链) + CN104356236A SEQ ID NO: 12 (Anti-PD-L1(12A4)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 26 (D1-Fc2)
Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2	SEQ ID NO: 19 (Anti-EGFR-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 8 (Anti-EGFR-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 26 (D1-Fc2)
Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2	SEQ ID NO: 20 (Anti-Her2(T)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 21 (Anti-Her2(T)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 26 (D1-Fc2)
Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2	SEQ ID NO: 22 (Anti-Her2(P)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 23 (Anti-Her2(P)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 26 (D1-Fc2)
Obi-Fc1-D1 ^m -Fc2	SEQ ID NO: 18 (Obi-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 4 (Obi-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 29 (D1 ^m -Fc2)
Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1 ^m -Fc2	SEQ ID NO: 24 (Anti-PD-L1(Ate)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 10 (Anti-PD-L1(Ate)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 29 (D1 ^m -Fc2)

[0284]

Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1 ^m -Fc2	CN104356236A SEQ ID NO: 10 (Anti-PD-L1(13G4)-Fc1 重链) + CN104356236A SEQ ID NO: 20 (Anti-PD-L1(13G4)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 29 (D1 ^m -Fc2)
Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1 ^m -Fc2	CN104356236A SEQ ID NO: 2 (Anti-PD-L1(12A4)-Fc1 重链) + CN104356236A SEQ ID NO: 12 (Anti-PD-L1(12A4)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 29 (D1 ^m -Fc2)
Anti-EGFR-Fc1-D1 ^m -Fc2	SEQ ID NO: 19 (Anti-EGFR-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 8 (Anti-EGFR-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 29 (D1 ^m -Fc2)
Anti-Her2(T)-Fc1-D1 ^m -Fc2	SEQ ID NO: 20 (Anti-Her2(T)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 21 (Anti-Her2(T)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 29 (D1 ^m -Fc2)
Anti-Her2(P)-Fc1-D1 ^m -Fc2	SEQ ID NO: 22 (Anti-Her2(P)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 23 (Anti-Her2(P)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 29 (D1 ^m -Fc2)
Obi-Fc1-D1-D2-Fc2	SEQ ID NO: 18 (Obi-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 4 (Obi-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 27 (D1-D2-Fc2)
Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2	SEQ ID NO: 24 (Anti-PD-L1(Ate)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 10 (Anti-PD-L1(Ate)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 27 (D1-D2-Fc2)
Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2	CN104356236A SEQ ID NO: 10 (Anti-PD-L1(13G4)-Fc1 重链) + CN104356236A SEQ ID NO: 20 (Anti-PD-L1(13G4)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 27 (D1-D2-Fc2)
Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2	CN104356236A SEQ ID NO: 2 (Anti-PD-L1(12A4)-Fc1 重链) + CN104356236A SEQ ID NO: 12 (Anti-PD-L1(12A4)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 27 (D1-D2-Fc2)
Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2	SEQ ID NO: 19 (Anti-EGFR-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 8 (Anti-EGFR-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 27 (D1-D2-Fc2)
Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2	SEQ ID NO: 20 (Anti-Her2(T)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 21 (Anti-Her2(T)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 27 (D1-D2-Fc2)
Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2	SEQ ID NO: 22 (Anti-Her2(P)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 23 (Anti-Her2(P)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 27 (D1-D2-Fc2)
Obi-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	SEQ ID NO: 18 (Obi-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 4 (Obi-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 44 (D1 ^m -D2-Fc2)
Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	SEQ ID NO: 24 (Anti-PD-L1(Ate)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 10 (Anti-PD-L1(Ate)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 44 (D1 ^m -D2-Fc2)

Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	CN104356236A SEQ ID NO: 10(Anti-PD-L1(13G4)-Fc1 重链) + CN104356236A SEQ ID NO: 20 (Anti-PD-L1(13G4)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 44 (D1 ^m -D2-Fc2)
Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	CN104356236A SEQ ID NO: 2 (Anti-PD-L1(12A4)-Fc1 重链) + CN104356236A SEQ ID NO: 12 (Anti-PD-L1(12A4)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 44 (D1 ^m -D2-Fc2)
Anti-EGFR-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	SEQ ID NO: 19 (Anti-EGFR-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 8(Anti-EGFR-Fc1 轻链)+ SEQ ID NO: 44(D1 ^m -D2-Fc2)
Anti-Her2(T)-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	SEQ ID NO: 20 (Anti-Her2(T)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 21 (Anti-Her2(T)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 44 (D1 ^m -D2-Fc2)
Anti-Her2(P)-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	SEQ ID NO: 22 (Anti-Her2(P)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 23 (Anti-Her2(P)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 44 (D1 ^m -D2-Fc2)
Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	SEQ ID NO: 18 (Obi-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 4 (Obi-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 28 (D1-D2-D3-Fc2)
[0285]	Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2
Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	CN104356236A SEQ ID NO: 10(Anti-PD-L1(13G4)-Fc1 重链) + CN104356236A SEQ ID NO: 20 (Anti-PD-L1(13G4)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 28 (D1-D2-D3-Fc2)
Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	CN104356236A SEQ ID NO: 2 (Anti-PD-L1(12A4)-Fc1 重链) + CN104356236A SEQ ID NO: 12 (Anti-PD-L1(12A4)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 28 (D1-D2-D3-Fc2)
Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	SEQ ID NO: 19 (Anti-EGFR-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 8 (Anti-EGFR-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 28 (D1-D2-D3-Fc2)
Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	SEQ ID NO: 20 (Anti-Her2(T)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 21 (Anti-Her2(T)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 28 (D1-D2-D3-Fc2)
Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	SEQ ID NO: 22 (Anti-Her2(P)-Fc1 重链) + SEQ ID NO: 23 (Anti-Her2(P)-Fc1 轻链) + SEQ ID NO: 28 (D1-D2-D3-Fc2)

[0286] 实施例1表达载体的构建

[0287] 按照所设计的分子结构,将各组成部分氨基酸序列前后拼接在一起,根据中国仓鼠(*Cricetulus griseus*)对密码子的偏爱性,设计得到最优DNA编码序列,排除基因克隆操作等需要使用的酶切位点,然后在该序列5'端依次添加克隆位点、Kozak序列和信号肽编码序列,在该序列3'端依次添加终止密码子和克隆位点,如图1所示。

[0288] 进行全基因合成,利用5'端和3'端克隆位点将全基因定向克隆到表达载体pCHO-TE2(购自Thermo Fisher)相应的克隆位点之间,经测序验证正确之后,即可获得表达质粒。

5'端和3'端所使用的克隆位点均为EcoRV和PacI位点。图2为表达载体pCHO-TE2的质粒图谱。

[0289] 实施例2表达质粒的制备、细胞转染以及靶蛋白的表达、纯化

[0290] 表达质粒的制备

[0291] 将含有表达质粒的甘油菌(1mL的含有表达质粒的大肠杆菌菌液中加入0.5mL 60%的无菌甘油溶液充分混匀)按1:1000的比例接种进液体LB培养基中。在37℃,220rpm,摇床培养16小时后离心收集菌体。使用无内毒素质粒大提试剂盒(DP117,购自天根生化科技(北京)有限公司),按照试剂盒说明书提供的标准流程抽提得到表达质粒。

[0292] 细胞转染、蛋白表达

[0293] 将所得表达质粒用0.22μm滤膜过滤后,吸取3mg质粒(其中,产物为典型抗体分子,其轻链、重链表达质粒比例为1:1(摩尔比);产物为重组蛋白,其轻链、重链、右臂表达质粒的比例为1:1:1(摩尔比),具体见表3)加入到50mL Opti MEM I Reduced Serum Medium(购自GIBCO)中混匀。吸取6mg转染试剂聚醚酰亚胺(Polyetherimide,PEI,购自Polysciences,以1mg/mL浓度溶于无菌超纯水中)加入到50mL Opti MEM I Reduced Serum Medium中混匀。将得到的PEI溶液加入含有质粒的Opti MEM I Reduced Serum Medium溶液中,混匀。室温静置15分钟后将质粒和PEI的混合物缓慢均匀加入体积为1L,细胞密度为 3×10^6 个细胞/mL的宿主细胞CHO-S(购自Thermo Fisher)悬液中,置于37℃、5%CO₂培养箱培养中培养。4小时后,加入相当于初始体积7%的补料培养基(该补料培养基配方为每升水中溶解有80g CD Efficient FeedC AGT(购自Gibco)、75g 5×00483(购自Kerry))。将培养温度降低至33℃,培养6天后收获。将细胞悬液在10000g、10℃条件下离心30分钟,将离心所得上清即细胞培养收获液用于目的蛋白纯化。

[0294] 蛋白纯化

[0295] 以下方法以Ofa-Fc1-D1-Fc2为例,蛋白A亲和捕获。

[0296] 将上述细胞培养收获液在10000rpm条件下离心30min去除细胞以及其碎片,然后上样蛋白A亲和柱(货号:17-5438-02,GE Healthcare),洗脱收获目标蛋白。SDS-PAGE检测蛋白纯度。

[0297] 蛋白A纯化方法为本领域技术人员熟知的常规蛋白纯化方法,具体试验方法可参考GE Healthcare蛋白A产品使用说明及GE抗体纯化手册。

[0298] SIRPαD1-Fc、Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2四种蛋白的理论分子量分别为:37.8kD、110.7kD、121.7kD和131.4kD。SDS-PAGE蛋白电泳检测结果如图4A和图4B所示。

[0299] 蛋白电泳(SDS-PAGE):结果显示(图4A和图4B),各泳道的目标蛋白都得到了有效表达和纯化,其中Ofa-Fc1-D1-Fc2(图4A泳道11)、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2(图4B泳道1)、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2(图4A泳道12)可见不同程度的左臂二聚体(Ofa-Fc1-Ofa-Fc1)、右臂二聚体(SIRPα-Fc2)和/或多聚体。

[0300] 表3表达质粒比例

[0301]

产物	表达质粒比例	
典型抗体分子/融合蛋白二聚体	Anti-CD20 mAb (Ofatumumab)	轻链、重链表达质粒比例为 1:1
	Anti-CD20 mAb (Obinutuzumab)	
	Anti-EGFR mAb (JMT101)	
	Anti-CD47 mAb (Hu5F9-G4)	
	Anti-Her2(T) mAb (Transtuzumab)	
	Anti-Her2(P) mAb (Pertuzumab)	
	Anti-PD-L1 mAb (Atezolizumab)	
	Anti-PD-L1 mAb (12A4)	
	Anti-PD-L1 mAb (13G4)	
	SIRP α D1-Fc	
产物为重组蛋白	Ofa-Fc1-D1-Fc2	轻链、重链、右臂表达质粒的比例沿用了前述轻链、重链、右臂的比例
	Ofa-Fc1-D1 ^m -Fc2	
	Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2	
	Ofa-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	
	Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	
	Obi-Fc1-D1-Fc2	
	Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2	
	Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2	
	Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2	
	Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2	
	Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2	
	Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2	
	Obi-Fc1-D1 ^m -Fc2	
	Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1 ^m -Fc2	
	Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1 ^m -Fc2	
	Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1 ^m -Fc2	
	Anti-EGFR-Fc1-D1 ^m -Fc2	
	Anti-Her2(T)-Fc1-D1 ^m -Fc2	
	Anti-Her2(P)-Fc1-D1 ^m -Fc2	
	Obi-Fc1-D1-D2-Fc2	
	Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2	
	Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2	
	Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2	
	Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2	
	Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2	
	Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2	
	Obi-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	
	Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	

[0302]	Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	
	Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	
	Anti-EGFR-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	
	Anti-Her2(T)-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	
	Anti-Her2(P)-Fc1-D1 ^m -D2-Fc2	
	Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	
	Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	
	Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	
	Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	
	Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	
	Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	
	Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2	

[0303] 备注:D1^m表示SIRPα胞外截短体D1的高亲和突变体;D1表示人源SIRPα野生型及其非高亲和突变体的胞外D1结构域;Fc为野生型Fc区、Fc1为具有hole或holes突变的Fc区、Fc2为具有knob或knobs突变的Fc区

[0304] 实施例3靶标亲和力、靶标竞争结合活性检测

[0305] 1、CD47、CD20、EGFR、Her2靶标亲和力检测方法

[0306] 重组蛋白Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1^m-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2对靶标CD47以及CD20的结合亲和力通过ELISA法和/或流式细胞术进行测定。以下方法以Ofa-Fc1-D1-Fc2为例,适用于左臂为CD20靶点的重组蛋白的检测。

[0307] 重组蛋白Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2对靶标CD47以及Her2的结合亲和力通过ELISA法和/或流式细胞术进行测定。以下方法以Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2为例,适用于左臂为Her2靶点的重组蛋白的检测。

[0308] 重组蛋白Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2对靶标CD47以及EGFR的结合亲和力通过ELISA法和/或流式细胞术进行测定。以下方法以Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2为例,适用于左臂为EGFR靶点的重组蛋白为例进行检测。

[0309] 重组蛋白Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2对靶标CD47以及PD-L1的结合亲和力通过ELISA法和/或进行测定。以下方法以Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2为例,适用于左臂为PD-L1靶点的重组蛋白为

例进行检测。

[0310] ELISA检测Ofa-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2对靶标CD47的亲合力:

[0311] 用100 μ l 1 μ g/ml CD47-His (12283-H08H-200, Sino Biological) 包被酶标板(货号:9018, Corning) 并4 $^{\circ}$ C放置过夜; PBST溶液(含0.1%浓度的Tween20的PBS)清洗后, 用PBS+1% BSA对酶标板室温封闭2小时; 清洗后, 向包被板中分别加入稀释的Ofa-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2(1000ng/ml起始, 2.5倍稀释, 共11个点), 每孔100 μ l, 25 $^{\circ}$ C孵育1小时; 弃样品并用PBST溶液清洗三次; 加入100 μ l稀释好的小鼠抗人IgG Fc-HRP(1:10000)(Ab7499, abcam)后, 25 $^{\circ}$ C孵育1小时; 弃溶液并用PBST溶液清洗三次; 加入TMB(P0209, beyotime)避光显色约20分钟后, 用H₂SO₄终止反应, 在酶标仪上读取OD(450-650nm)值。

[0312] 试验结果显示, 抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRP α D1-Fc、Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1^m-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2均分别能与CD47结合; Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2对CD47的结合亲和力略弱于抗CD47抗体Hu5F9-G4和/或SIRP α D1-Fc对CD47的结合亲和力。

[0313] 以上试验数据证明, 本发明的重组蛋白在蛋白水平能够特异性靶向肿瘤细胞CD47抗原, 且与CD47的结合亲和力不高于SIRP α D1-Fc融合蛋白对CD47蛋白的结合亲和力; 本发明的重组蛋白能够降低或避免抗CD47抗体治疗产生的红细胞凝集、贫血和/或SIRP α 高亲和突变体治疗产生的非肿瘤靶细胞杀伤等副作用(Petrova PS, et al. TTI-621 (SIRP α Fc): A CD47-Blocking Innate Immune Checkpoint Inhibitor with Broad Antitumor Activity and Minimal Erythrocyte Binding. Clin Cancer Res, 2017, 23(4):1068-1079)。

[0314] 例如, 如图5所示, 除抗CD20抗体Ofatumumab以及抗EGFR抗体JMT101不能结合CD47外, 抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRP α D1-Fc、Ofa-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2均能与CD47结合, 但由于Ofa-Fc1-D1-Fc2和Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2仅有右臂能与CD47抗原结合等原因, 其亲和力($EC_{50}=52.57\text{ng/mL}/EC_{50}=93.86\text{ng/mL}$)弱于抗CD47抗体($EC_{50}=5.439\text{ng/mL}$)和/SIRP α D1-Fc($EC_{50}=6.118\text{ng/mL}$)。

[0315] 流式细胞术检测Ofa-Fc1-D1-Fc2对靶标CD47的亲合力:

[0316] A431细胞(人表皮癌细胞), 收集生长良好的细胞并计数, 离心并用PBS+2%FBS(购自Gibco)重悬细胞至 3×10^6 个细胞/ml的浓度。将细胞以100 μ l/孔加入到96孔板U型板(货号:3799, Corning), 静置至少15分钟; 离心吸出上清并分别加入9个稀释度的Ofa-Fc1-D1-Fc2(从15000ng/ml起始, 5倍梯度稀释, 共9个浓度), 并将96孔板在冰箱中4 $^{\circ}$ C孵育1小时; 用PBS+2%FBS清洗后, 加入山羊抗人IgG Fc-FITC(F9512-2ML, Sigma)4 $^{\circ}$ C孵育1小时; 用PBS+2%FBS清洗重悬后, 通过流式细胞仪(Accuri C6, BD)检测荧光值。

[0317] 由于A431细胞不表达CD20抗原, 不能与Ofatumumab、Obinutuzumab结合, 因此可以在细胞水平上用A431细胞评价Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、

Ofa-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1^m-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2与CD47的结合亲和力。

[0318] 试验结果显示,除抗CD20抗体Ofatumumab、Obinutuzumab不能结合A431外,抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRP α D1-Fc、Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1^m-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2均能与A431细胞结合;Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2对CD47的结合亲和力略弱于抗CD47抗体和/或SIRP α D1-Fc对CD47的结合亲和力,与ELISA的数据趋势相一致。

[0319] 以上试验数据证明,本发明的重组蛋白在细胞水平能够特异性靶向肿瘤细胞CD47抗原,且与CD47的结合亲和力不高于SIRP α D1-Fc融合蛋白对CD47的结合亲和力;本发明的重组蛋白能够降低或避免抗CD47抗体治疗产生的红细胞凝集、贫血和/或SIRP α 高亲和突变体治疗产生的非肿瘤靶细胞杀伤等副作用。

[0320] 例如,如图6所示,抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRP α D1-Fc和Ofa-Fc1-D1-Fc2均能与A431细胞结合。具体地,Ofa-Fc1-D1-Fc2的亲和力略弱于抗CD47抗体和/或SIRP α D1-Fc,与ELISA的数据趋势相一致。

[0321] 流式细胞术检测Ofa-Fc1-D1-Fc2对靶标CD20的亲和力:

[0322] Raji细胞(人B细胞淋巴瘤)(购自上海中科院细胞库),收集生长良好的细胞并计数,离心并用PBS+2%FBS重悬细胞至 3×10^6 个细胞/ml的浓度。将细胞以100 μ l/孔加入到96孔板U型板(货号:3799,Corning),静置至少15分钟;离心吸出上清并加入100 μ L PBS+2%FBS(对照组)或1.5 μ g/ml的抗CD47抗体Hu5F9-G4(Fab)2(实验组)(经胃蛋白酶切除Fc,试剂盒:Thermo Fisher,44988),4 $^{\circ}$ C孵育1小时;PBS+2%FBS清洗后,分别加入7个稀释度的Ofa-Fc1-D1-Fc2、Hu5F9-G4、SIRP α D1-Fc(从6250ng/ml起始,4倍梯度稀释,共7个浓度,图7中为转化后的摩尔浓度),4 $^{\circ}$ C孵育1小时;PBS+2%FBS清洗后,加入山羊抗人IgG Fc-FITC(F9512-2ML,Sigma)4 $^{\circ}$ C孵育1小时;用PBS+2%FBS清洗重悬后,通过流式细胞仪(Accuri C6,BD)检测荧光值。

[0323] 试验结果显示,抗CD47抗体Hu5F9-G4(Fab)2可有效地阻断抗CD47抗体Hu5F9-G4和/或SIRP α D1-Fc与Raji细胞上的CD47的结合;但Hu5F9-G4(Fab)2对CD47抗原的封闭作用并没有显著抑制Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2与Raji细胞的结合。

[0324] 以上试验数据证明,在肿瘤细胞表面CD47抗原被封闭、SIRP α -CD47相互结合被阻断的情况下,本发明的重组蛋白仍然能依靠其左臂与肿瘤细胞上对应的抗原特异性结合,且左臂亲和力并未因右臂结合被阻断而受到显著影响。

[0325] 例如,如图7所示,抗CD47抗体Hu5F9-G4(Fab)2可有效地阻断抗CD47抗体Hu5F9-G4和/或SIRP α D1-Fc与Raji细胞上的CD47的结合,但Hu5F9-G4(Fab)2对CD47抗原的封闭作用并没有显著抑制Ofa-Fc1-D1-Fc2与Raji细胞的结合,表明Ofa-Fc1-D1-Fc2在SIRP α -CD47相互结合被阻断后,仍然能依靠其左臂(抗CD20半抗体)与Raji细胞上的CD20抗原特异性结合,且亲和力并未因右臂结合被阻断而受到显著影响。

[0326] 流式细胞术检测与靶标CD20和CD47的双特异性结合情况:

[0327] Raji细胞(人B细胞淋巴瘤)(购自上海中科院细胞库),收集生长良好的细胞并计数,离心并用PBS+2%FBS重悬细胞至 3×10^6 个细胞/ml的浓度。将细胞以 $100 \mu\text{l}$ /孔加入到96孔板U型板(货号:3799,Corning),静置至少15分钟;离心吸出上清并分别加入12个稀释度的Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofatumumab、Hu5F9-G4、SIRP α D1-Fc(50000ng/ml、25000ng/ml、6250ng/ml,然后4倍梯度稀释,共12个浓度,图8A中为转化后的摩尔浓度),4°C孵育1小时;PBS+2%FBS清洗后,加入山羊抗人IgG Fc-FITC(F9512-2ML,Sigma)4°C孵育1小时;用PBS+2%FBS清洗重悬后,通过流式细胞仪(Accuri C6,BD)检测荧光值。

[0328] 由于Raji细胞表面同时表达CD20和CD47抗原,因此,抗CD20抗体Ofatumumab、Obinutuzumab、抗CD47抗体Hu5F9-G4和SIRP α D1-Fc均能与Raji细胞特异性结合,但所能达到的最大平均荧光强度各不相同。

[0329] 试验结果显示,Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1^m-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2也能与Raji细胞结合,且具有更高的最大平均荧光强度。

[0330] 以上试验数据证明,在相同的过饱和蛋白样品浓度环境下,本发明的重组蛋白与抗CD20抗体Ofatumumab、Obinutuzumab和/或抗CD47抗体Hu5F9-G4和/或SIRP α D1-Fc相比,能与肿瘤细胞特异性结合,且表现出显著的分子数量优势。优选的,在相同的过饱和蛋白样品浓度环境下,本发明的重组蛋白与肿瘤细胞的饱和结合丰度大于抗CD20抗体和SIRP α D1-Fc与肿瘤细胞饱和结合丰度之和。

[0331] 表4抗体/重组蛋白和Raji细胞结合的最大平均荧光强度和EC50(nM)

样品	Ofatumumab	Ofa-Fc1-D1-Fc2	Hu5F9-G4	SIRP α D1-Fc
[0332] 最大平均荧光强度	252065.10	690705.90	93784.59	104997.50
EC50(nM)	1.586	14.06	0.258	12.53

[0333] 例如,如图8A和表4所示,抗CD20抗体Ofatumumab、抗CD47抗体Hu5F9-G4和SIRP α D1-Fc均能与Raji细胞特异性结合,但所能达到的最大平均荧光强度各不相同;同时Ofa-Fc1-D1-Fc2也能与Raji细胞结合,且具有更高的最大平均荧光强度,提示Raji细胞在相同的过饱和蛋白样品浓度环境下,能特异性结合的Ofa-Fc1-D1-Fc2蛋白分子数量分别显著高于抗CD20抗体Ofatumumab或抗CD47抗体Hu5F9-G4或SIRP α D1-Fc的分子数量,高于抗CD20抗体Ofatumumab与抗CD47抗体Hu5F9-G4分子数量之和,和高于抗CD20抗体Ofatumumab与SIRP α D1-Fc分子数量之和。

[0334] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,与抗CD47抗体或SIRP α D1-Fc与其他抗肿瘤靶向治疗抗体的联合使用相比,使用本发明能够与肿瘤靶向抗原和CD47抗原同步结合重组蛋白可以更多地结合到肿瘤细胞,从而获得更显著的抗肿瘤功效。

[0335] 流式细胞术检测与靶标Her2和CD47的双特异性结合情况:

[0336] SKBR-3细胞(人乳腺癌细胞)(购自上海中科院细胞库),收集生长良好的细胞并计数,离心并用PBS+2%FBS重悬细胞至 2×10^6 个细胞/ml的浓度。将细胞以 $100 \mu\text{l}$ /孔加入到96孔板U型板(货号:3799,Corning),静置至少15分钟;离心吸出上清并分别加入各自10个稀释度的Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Trastuzumab和Hu5F9-G4(433.2nM起始、4倍梯度稀释,

共10个点),4℃孵育1小时;PBS+2%FBS清洗后,加入山羊抗人IgG Fc-FITC (F9512-2ML, Sigma)4℃孵育1小时;用PBS+2%FBS清洗重悬后,通过流式细胞仪 (Accuri C6,BD) 检测荧光值。

[0337] 由于SKBR-3细胞表面同时表达Her2和CD47抗原,因此,抗Her2抗体Trastuzumab、Pertuzumab、抗CD47抗体Hu5F9-G4和SIRP α D1-Fc均能与SKBR-3细胞特异性结合,但所能达到的最大平均荧光强度各不相同。

[0338] 试验结果显示, Anti-Her2 (P) -Fc1-D1-Fc2, Anti-Her2 (P) -Fc1-D1^m-Fc2, Anti-Her2 (P) -Fc1-D1-D2-Fc2, Anti-Her2 (P) -Fc1-D1^m-D2-Fc2, Anti-Her2 (P) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2, Anti-Her2 (P) -Fc1-D1-Fc2, Anti-Her2 (P) -Fc1-D1^m-Fc2, Anti-Her2 (P) -Fc1-D1-D2-Fc2, Anti-Her2 (P) -Fc1-D1^m-D2-Fc2, Anti-Her2 (P) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2, Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-Fc2, Anti-Her2 (T) -Fc1-D1^m-Fc2, Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-D2-Fc2, Anti-Her2 (T) -Fc1-D1^m-D2-Fc2, Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2, Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-Fc2, Anti-Her2 (T) -Fc1-D1^m-Fc2, Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-D2-Fc2, Anti-Her2 (T) -Fc1-D1^m-D2-Fc2, Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2也能与SKBR-3细胞结合,且具有更高的最大平均荧光强度。

[0339] 以上试验数据证明,在相同的过饱和蛋白样品浓度环境下,本发明的重组蛋白与抗Her2抗体Trastuzumab、Pertuzumab和/或抗CD47抗体Hu5F9-G4和/或SIRP α D1-Fc相比,能与肿瘤细胞特异性结合,且表现出显著的分子数量优势。优选的,在相同的过饱和蛋白样品浓度环境下,本发明的重组蛋白与肿瘤细胞的饱和结合丰度大于对应抗Her2抗体和SIRP α D1-Fc与肿瘤细胞饱和结合丰度之和。

[0340] 表5抗体/重组蛋白和SKBR-3细胞结合的最大平均荧光强度和EC50 (nM)

样品	Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2	Hu5F9-G4	Trastuzumab
[0341] 最大平均荧光强度	3465348.00	213251.50	1841783.00
EC50 (nM)	10.03	0.4557	3.204

[0342] 例如,如图8B和表5所示,抗Her2抗体Trastuzumab和抗CD47抗体Hu5F9-G4均能与SKBR-3细胞特异性结合,但所能达到的最大平均荧光强度各不相同;同时Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-Fc2也能与SKBR-3细胞结合,且具有更高的最大平均荧光强度,提示SKBR-3细胞在相同的过饱和蛋白样品浓度环境下,能特异性结合的Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-Fc2蛋白分子数量分别显著高于抗Her2抗体Trastuzumab或抗CD47抗体Hu5F9-G4的分子数量,且高于抗Her2抗体Trastuzumab和抗CD47抗体Hu5F9-G4分子数量之和。

[0343] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,与抗CD47抗体或SIRP α D1-Fc与其他抗肿瘤靶向治疗抗体的联合使用相比,使用本发明的能够与肿瘤靶向抗原和CD47抗原同步结合的重组蛋白可以更多地结合到肿瘤细胞,从而获得更显著的抗肿瘤功效。

[0344] 流式细胞术检测与靶标EGFR和CD47的双特异性结合情况:

[0345] A431细胞(人表皮癌细胞)(购自中国医学科学院基础医学研究所),收集生长良好的细胞并计数,离心并用PBS+2%FBS重悬细胞至 2×10^6 个细胞/ml的浓度。将细胞以100 μ l/孔加入到96孔板U型板(货号:3799,Corning),静置至少15分钟;离心吸出上清并分别加入各自11个稀释度的Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、JMT101、SIRP α D1-Fc和Hu5F9-G4(216.6nM起始,

4倍梯度稀释,共11个浓度),4℃孵育1小时;PBS+2%FBS清洗后,加入山羊抗人IgG Fc-FITC (F9512-2ML, Sigma) 4℃孵育1小时;用PBS+2%FBS清洗重悬后,通过流式细胞仪 (Accuri C6, BD) 检测荧光值。

[0346] 由于A431细胞表面同时表达EGFR和CD47抗原,因此,抗EGFR抗体JMT101、抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRPαD1-Fc均能与A431细胞特异性结合,但所能达到的最大平均荧光强度各不相同。

[0347] 试验结果显示, Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2也能与A431细胞结合,且具有更高的最大平均荧光强度。

[0348] 以上试验数据证明,在相同的过饱和蛋白样品浓度环境下,本发明的重组蛋白与抗EGFR抗体JMT101和/或抗CD47抗体Hu5F9-G4和/或SIRPαD1-Fc相比,能与肿瘤细胞特异性结合,且表现出显著的分子数量优势。优选的,在相同的过饱和蛋白样品浓度环境下,本发明的重组蛋白与肿瘤细胞的饱和结合丰度大于对应抗EGFR抗体和SIRPαD1-Fc与肿瘤细胞饱和结合丰度之和。

[0349] 表6抗体/重组蛋白和A431细胞结合的最大平均荧光强度和EC₅₀ (nM)

样品	JMT101	Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2	Hu5F9-G4	SIRPα D1-Fc
[0350] 最大平均荧光强度	901868	1511274	686658	429788
EC ₅₀ (nM)	0.598	1.217	0.865	3.677

[0351] 例如,如图8C和表6所述,抗EGFR抗体JMT101、抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRPαD1-Fc均能与A431细胞特异性结合,但所能达到的最大平均荧光强度各不相同,且EC₅₀分别为EC₅₀ (JMT101) = 0.598nM、EC₅₀ (SIRPαD1-Fc) = 3.677nM、EC₅₀ (Hu5F9-G4) = 0.865nM,可见JMT101与A431细胞的结合亲和力是SIRPαD1-Fc与A431细胞的结合亲和力6倍以上;同时Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2也能与A431细胞结合,且具有更高的最大平均荧光强度,提示A431细胞在相同的过饱和蛋白样品浓度环境下,能特异性结合的Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2蛋白分子数量分别显著高于抗EGFR抗体JMT101或SIRPαD1-Fc或抗CD47抗体Hu5F9-G4的分子数量,且高于抗EGFR抗体JMT101和SIRPαD1-Fc的分子数量之和。

[0352] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,与抗CD47抗体或SIRPαD1-Fc与其他抗肿瘤靶向治疗抗体的联合使用相比,使用本发明的能够与肿瘤靶向抗原和CD47抗原同步结合的重组蛋白可以更多地结合到肿瘤细胞,从而获得更显著的抗肿瘤功效。

[0353] 流式细胞术检测与靶标PD-L1和CD47的双特异性结合情况:

[0354] NCI-H441细胞(人肺腺癌细胞)(购自北京北纳创联生物技术研究院),用10ng/ml hIFN-γ (BD,货号:554616)刺激2×10⁷个细胞18h,消化收集细胞并计数,离心并用PBS+2%FBS重悬细胞至3×10⁶个细胞/ml的浓度。将细胞以100μl/孔加入到96孔板U型板(货号:3799, Corning),静置至少15分钟;离心吸出上清并分别加入各自12个稀释度的Anti-PD-L1 (Ate)-Fc1-D1-Fc2和Atezolizumab (433.2nM、216.6nM,然后4倍梯度稀释,共12个浓度),4℃孵育1小时;PBS+2%FBS清洗后,加入山羊抗人IgG Fc-FITC (F9512-2ML, Sigma) 4℃孵育1小时;用PBS+2%FBS清洗重悬后,通过流式细胞仪 (Accuri C6, BD) 检测荧光值。

[0355] 由于NCI-H441细胞表面同时表达PD-L1和CD47抗原,因此,抗PD-L1抗体

Atezolizumab、13G4、12A4、抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRP α D1-Fc能与NCI-H441细胞特异性结合。

[0356] 试验结果显示, Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1^m-Fc2、Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1^m-Fc2、Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1^m-Fc2、Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2也均能与NCI-H441细胞结合, 且具有更高的最大平均荧光强度。

[0357] 以上试验数据证明, 在相同的过饱和蛋白样品浓度环境下, 本发明的重组蛋白与抗PD-L1抗体Atezolizumab、13G4、12A4相比, 能与肿瘤细胞特异性结合, 且表现出一定的分子数量优势。例如, 在相同的过饱和蛋白样品浓度环境下, 本发明的重组蛋白与抗PD-L1抗体Atezolizumab相比, 能更多地结合到肿瘤细胞, 表现出显著的分子数量优势。

[0358] 表7抗体/重组蛋白和NCI-H441细胞结合的最大平均荧光强度和EC₅₀ (nM)

样品	Anti-PD-L1 (Ate)-Fc1-D1-Fc2	Atezolizumab	Hu5F9-G4	SIRP α D1-Fc
[0359] 最大平均荧光强度	156541	64038	100973	83200
EC ₅₀ (nM)	1.565	0.2006	0.3865	1.643

[0360] 例如, 如图8D和表7所示, 抗PD-L1抗体Atezolizumab能与NCI-H441细胞特异性结合; 同时Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-Fc2也能与NCI-H441细胞结合, 且具有更高的最大平均荧光强度, 提示NCI-H441细胞在相同的过饱和蛋白样品浓度环境下, 能特异性结合的Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-Fc2蛋白分子数量高于抗PD-L1抗体Atezolizumab的分子数量。EC₅₀分别为EC₅₀ (Atezolizumab) = 0.2006nM、EC₅₀ (SIRP α D1-Fc) = 1.643nM、EC₅₀ (Hu5F9-G4) = 0.3865nM, 可见Atezolizumab与NCI-H441细胞的结合亲和力是SIRP α D1-Fc与NCI-H441细胞的结合亲和力6倍以上。

[0361] 如本领域技术人员所知, 以上试验结果提示, 与抗CD47抗体与其他抗肿瘤靶向治疗抗体的联合使用相比, 使用本发明的能够与肿瘤靶向抗原和CD47抗原同步结合的重组蛋白可以更多地结合到肿瘤细胞, 从而获得更显著的抗肿瘤功效。

[0362] 2、靶标竞争结合活性检测

[0363] 以下方法以Ofa-Fc1-D1-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2为例, 通过ELISA法对靶标CD47与SIRP α 结合的竞争结合活性进行测定。

[0364] ELISA检测Ofa-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2的竞争结合活性:

[0365] 用100 μ l 1 μ g/ml CD47-His (12283-H08H-200, Sino Biological) 包被酶标板 (9018, Corning) 并4 $^{\circ}$ C放置过夜; PBST清洗后, 用PBS+1% BSA对酶标板室温封闭2h; 清洗后, 向包被板中分别加入稀释的不同浓度 (1000ng/ml起始, 3倍梯度稀释, 共11个浓度) 的Ofa-Fc1-D1-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2和生物素标记的SIRP α D1-Fc (生物素标记试剂盒, 21925, Thermo, 加样浓度为100ng/ml) 混合液, 每孔100 μ l, 25 $^{\circ}$ C孵育1小时; 弃去样品并用PBST溶液清洗三次; 加入100 μ l稀释好的链霉亲和素-HRP (1:10000) (ML-0437P-HRP, ZI501-

1研域化学试剂)后,25℃孵育1小时;弃溶液并用PBST溶液清洗三次;加入TMB(P0209, beyotime)避光显色约20分钟后,用H₂SO₄终止反应,在酶标仪上读取OD(450-650nm)值。

[0366] 试验结果显示,抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRP α D1-Fc、Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2均能不同程度地与生物素标记的SIRP α D1-Fc竞争性结合CD47抗原,发挥竞争结合活性。

[0367] 例如,如图9所示,抗CD47抗体Hu5F9-G4、SIRP α D1-Fc、Ofa-Fc1-D1-Fc2和Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2均能不同程度地与生物素标记的SIRP α D1-Fc竞争性结合CD47抗原,发挥竞争结合活性;Ofa-Fc1-D1-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2与CD47的竞争性结合力分别弱于抗CD47抗体Hu5F9-G4或SIRP α D1-Fc,这与本实施例上文所述的亲和力结果相一致。

[0368] 实施例4重组蛋白早期体外免疫安全性评价实验

[0369] 重组蛋白Ofa-Fc1-D1^m-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1^m-D2-Fc2早期体外免疫安全性评价实验,以下方法以Ofa-Fc1-D1^m-Fc2为例,适用于右臂含SIRP α 胞外截短体高亲和突变体的重组蛋白的检测。

[0370] Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2早期体外免疫安全性评价实验,以下方法以Ofa-Fc1-D1-Fc2为例,适用于右臂含SIRP α 胞外截短体的重组蛋白的检测。

[0371] 流式细胞术检测双抗特异性右臂突变前后与CD47的特异性结合情况:

[0372] NCI-H441细胞(人肺腺癌细胞)(购自北京北纳创联生物技术研究院),消化收集细胞并计数,离心并用PBS+2%FBS重悬细胞至 3×10^6 个细胞/ml的浓度。将细胞以100 μ l/孔加

入到96孔板U型板(货号:3799,Corning),静置至少15分钟;离心吸出上清并分别加入各自12个稀释度的Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-Fc2、Hu5F9-G4、Ofatumumab(433.2nM、216.6nM,然后4倍梯度稀释,共12个浓度),4℃孵育1小时;PBS+2%FBS清洗后,加入山羊抗人IgG Fc-FITC(F9512-2ML,Sigma)4℃孵育1小时;用PBS+2%FBS清洗重悬后,通过流式细胞仪(Accuri C6,BD)检测荧光值。

[0373] 表8流式细胞术检测双抗特异性右臂突变前后与CD47的特异性结合情况

样品	Ofa-Fc1-D1-Fc2	Ofa-Fc1-D1 ^m -Fc2	Hu5F9-G4	Ofatumumab
[0374] 最大平均荧光强度	172944.90	272734.80	120133.40	3497.17
EC50 (nM)	8.680	0.5292	0.2861	NA

[0375] 例如,如图10和表8所示,除抗CD20抗体Ofatumumab不能结合CD47外,抗CD47抗体Hu5F9-G4、Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-Fc2均能与CD47结合,且Ofa-Fc1-D1^m-Fc2($EC_{50} = 0.529nM$)与NCI-H441细胞的结合亲和力高于Ofa-Fc1-D1-Fc2($EC_{50} = 8.68nM$),其中D1^m是SIRP α 在D1区域的高亲和突变体(即CN106519036A的Seq ID No:10)。

[0376] 重组蛋白早期体外免疫安全性评价实验

[0377] (1) 制备人效应细胞悬液:

[0378] 取生长良好的稳定高表达CD16a的人NK92MI-CD16a效应细胞(购于华博生物),离心(201g,5min)弃上清,重新悬浮在5ml MEM(无酚红)基础培养基(购自Gibco,51200-038)中,计数后,用MEM(无酚红)基础培养基调整靶细胞密度至 2.4×10^6 个细胞/ml,用作人效应细胞悬液。

[0379] (2) 效应细胞与抗体的孵育:

[0380] 将MEM(无酚红)基础培养基50 μ l/孔分液至96孔黑色底透培养板的对应孔中,加入稀释好的Ofa-Fc1-D1-Fc2或Ofa-Fc1-D1^m-Fc2双特异性抗体稀释梯度各25 μ l/孔,并设置复孔。加入(1)中制备的人效应细胞悬液25 μ l(60000个细胞/孔)。混匀后Ofa-Fc1-D1-Fc2或Ofa-Fc1-D1^m-Fc2双特异性抗体达到最终浓度梯度(433.2nM起始,4倍梯度稀释,共十个浓度),然后在37℃反应5.5小时,加入裂解缓冲液(来源于Promega的试剂盒,G7891)至对照组孵育0.5h。

[0381] (3) 检测ADCC活性:

[0382] 孵育完成后,将培养板置于安全柜中,开盖自然冷却至室温约15min。将室温平衡30min的LDH底物反应液(来源于Promega的试剂盒,G7891)加入培养板,每孔100 μ l,轻轻混匀后室温孵育15min后,立刻加入终止液(来源于Promega的试剂盒,G7891)50 μ l/孔,混匀后,于酶标仪上读取荧光值。

[0383] 试验结果显示,由于NK细胞上有CD47抗原的表达,因此具有ADCC活性的靶向CD47的重组蛋白和/或抗体会导致NK细胞的相互杀伤作用。因此,相比于含SIRP α 胞外截短体高亲和突变体的Ofa-Fc1-D1^m-Fc2或Ofa-Fc1-D1^m-D2-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1^m-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1^m-D2-Fc2或Anti-Her2(T)-Fc1-D1^m-Fc2或Anti-Her2(T)-Fc1-D1^m-D2-Fc2或Anti-Her2(P)-Fc1-D1^m-Fc2或Anti-Her2(P)-Fc1-D1^m-D2-Fc2或Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1^m-Fc2或Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1^m-D2-Fc2或Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1^m-Fc2或Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1^m-D2-Fc2或Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1^m-Fc2或Anti-PD-L1(12A4)-

Fc1-D1^m-D2-Fc2, Ofa-Fc1-D1-Fc2或Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2或Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Obi-Fc1-D1-Fc2或Obi-Fc1-D1-D2-Fc2或Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2或Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2或Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2或Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2或Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2或Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2因其与CD47抗原的弱亲和作用,明显降低NK细胞所导致的毒副作用,毒副作用至少降低1000倍。

[0384] 例如,如图11所示,当抗体/重组蛋白浓度达到 10^{-1} nM时,Ofa-Fc1-D1^m-Fc2已开始出现细胞裂解,当抗体/重组蛋白浓度达到 10^3 nM时,Ofa-Fc1-D1^m-Fc2其细胞裂解率已达到15.25%,而Ofa-Fc1-D1-Fc2在 10^3 nM时尚未观察到细胞裂解的情况。

[0385] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,本发明所述的具有ADCC活性且低亲和靶向CD47抗原的重组蛋白具有更高的免疫安全性。

[0386] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,使用本发明所述的优化后的ADCC活性检测的方法(即早期体外免疫安全性评价实验),可用于评价靶向CD47且具有ADCC活性的重组蛋白(含单价或多价)或抗体(含单价或多价)的早期免疫安全性,该评价方法简单快捷且不受血源的限制。

[0387] 实施例5重组蛋白体内抑制肿瘤细胞生长实验

[0388] 重组蛋白Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2体内抑制肿瘤细胞生长实验,以下方法以Ofa-Fc1-D1-Fc2为例,适用于右臂含SIRP α 胞外截短体的重组蛋白的检测。

[0389] 以人B细胞淋巴瘤Raji细胞皮下接种雄性NSG小鼠(购自艾德摩),在接种肿瘤细胞后待肿瘤组织达到 80mm^3 - 150mm^3 ,分成以下2组(每组6只小鼠,每组按照标示量分别腹腔注射):1)溶媒对照组(Tris-柠檬酸盐,pH 6.5);2)Ofa-Fc1-D1-Fc2组($150\mu\text{g}/\text{只}$);每周给药2次,共给药2周。分别在给药前(0天)、给药后第3天、第5天、第7天、第10天、第12天、第14天观察肿瘤生长情况,测量肿瘤大小以评价Ofa-Fc1-D1-Fc2的抑瘤作用。

[0390] 试验结果显示,在Raji淋巴瘤皮下移植的NSG小鼠模型上,重组蛋白Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、

Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2通过阻断CD47-SIRP α 信号通路,激活了巨噬细胞的靶向吞噬作用和/或巨噬细胞介导的抗体依赖的细胞吞噬作用(Antibody dependent cellular phagocytosis,ADCP),从而显示出显著的肿瘤抑制效果。

[0391] 例如,如图12所示,横坐标为Raji淋巴瘤皮下移植的NSG小鼠接受药物处理的时间(天),纵坐标为肿瘤体积(mm^3)。图12表明经过一段时间的Ofa-Fc1-D1-Fc2治疗后,较之于溶媒对照组,Ofa-Fc1-D1-Fc2组显示出了显著的肿瘤抑制趋势,其中,第14天时Ofa-Fc1-D1-Fc2组的抑瘤率可达到63.14%。

[0392] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,本发明所述的可以与肿瘤靶向抗原和CD47抗原同步结合的重组蛋白在肿瘤细胞皮下移植的NSG小鼠体内可获得显著抑瘤功效。

[0393] 实施例6重组蛋白体内早期免疫安全性评价实验

[0394] 重组蛋白Ofa-Fc1-D1^m-Fc2、Ofa-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1^m-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1^m-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1^m-D2-Fc2体内早期免疫安全性评价,以下方法以Ofa-Fc1-D1^m-Fc2为例,适用于右臂含SIRP α 胞外截短体高亲和突变体的重组蛋白的检测。

[0395] 重组蛋白Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2体内早期免疫安全性评价,以下方法以Ofa-Fc1-D1-Fc2为例,适用于右臂含SIRP α 胞外截短体的重组蛋白的检测。

[0396] 因B细胞上高表达CD20抗原,本实验通过B细胞含量测定,代表肿瘤细胞杀伤情况。测定靶向其他肿瘤抗原和CD47抗原的重组蛋白体内早期免疫安全性评价时,需在本实施例

所述实验小鼠皮下移植对应的肿瘤细胞。

[0397] 肿瘤特异性靶向作用:

[0398] 选择人CD34⁺HSC移植NSG (Hu-NSG) 雌性小鼠 (购自艾德摩), 分成以下3组 (每组3只小鼠, 每组按照标示量分别静脉注射): 1) 0.9%生理盐水对照组; 2) Hu5F9-G4 (6.7 μ g/只) 组; 3) Ofa-Fc1-D1-Fc2 (5 μ g/只) 组, 给药1次, 给药后96h, 小鼠尾静脉采血80 μ l于含肝素钠的抗凝管中, 采用新鲜配制的裂红液裂解红细胞 (其中裂红液为裂解液 (BD Pharm LyseTM, 货号: 555899): 双蒸水等体积混合配制), 剩余细胞用PBS+2%FBS清洗重悬, 荧光抗体 (PE anti-human CD45 (货号: 304039)/FITC anti-human CD19 (货号: 302206)/APC anti-human CD3 (货号: 300312), 均购自BioLegend) 与细胞共孵育30min, PBS+2%FBS清洗重悬后, 通过流式细胞仪 (AccuriTM C6, BD) 检测。

[0399] 试验结果显示, 在Hu-NSG小鼠模型使用同剂量的Ofa-Fc1-D1-Fc2和抗CD47抗体Hu5F9-G4, 用药96小时后, Ofa-Fc1-D1-Fc2优先清除表达CD20抗原的B细胞 (即靶细胞), 而抗CD47抗体Hu5F9-G4因其与CD47抗原的高亲和作用则优先清除CD47表达丰度较高的非靶细胞, 如T细胞等。

[0400] 例如, 如图13所示, 抗CD47抗体Hu5F9-G4 (图13B) 相比于0.9%生理盐水 (图13A), CD47表达丰度较高的非靶细胞 (如T细胞) 显著被清除 (B细胞, 即CD20抗原靶细胞, 在所有被检测细胞中占比由用药前的40.9%上升至用药96小时后的73.5%); 而重组蛋白Ofa-Fc1-D1-Fc2 (图13C) 相比于0.9%生理盐水 (图13A), B细胞 (即CD20抗原靶细胞) 被显著清除, 即用药后96小时, Ofa-Fc1-D1-Fc2优先清除B细胞 (B细胞在所有被检测细胞中占比由用药前的40.9%下降至用药96小时后的3.7%)。

[0401] 如本领域技术人员所知, 以上试验结果提示, 本发明所述的可以与肿瘤靶向抗原和CD47抗原同步结合的重组蛋白在同剂量条件下优先清除肿瘤靶向抗原所在细胞和/或肿瘤细胞。

[0402] 低剂量下的免疫安全性:

[0403] 选择人CD34⁺HSC移植NSG (Hu-NSG) 雌性小鼠 (购自艾德摩), 分成以下2组 (每组3只小鼠, 每组按照标示量分别静脉注射): 1) Ofa-Fc1-D1-Fc2 (1 μ g/只) 组; 2) Ofa-Fc1-D1^m-Fc2 (1 μ g/只) 组, 给药1次, 给药后72h, 小鼠尾静脉采血80 μ l于含肝素钠的抗凝管中, 采用新鲜配制的裂红液裂解红细胞 (其中裂红液为裂解液 (BD Pharm LyseTM, 货号: 555899): 双蒸水等体积混合配制), 剩余细胞用PBS+2%FBS清洗重悬, 荧光抗体 (PE anti-human CD45 (货号: 304039)/FITC anti-human CD19 (货号: 302206)/APC anti-human CD3 (货号: 300312), 均购自BioLegend) 与细胞共孵育30min, PBS+2%FBS清洗重悬后, Ofa-Fc1-D1-Fc2 (1 μ g/只) 组样品通过流式细胞仪 (AccuriTM C6, BD) 检测, Ofa-Fc1-D1^m-Fc2 (1 μ g/只) 组样品通过流式细胞仪 (NovoCyteTM 3130, ACEA) 检测。

[0404] 试验结果显示, 在Hu-NSG小鼠模型使用低剂量的重组蛋白, 当Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2 (P) -Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2 (P) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2 (P) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-

Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2单次用药72小时后,表达左臂抗原的靶细胞(如肿瘤细胞)被显著清除,而不表达左臂抗原的细胞(如T细胞、其他免疫细胞)则未见明显影响;而含SIRP α 胞外截短体高亲和突变体的Ofa-Fc1-D1^m-D2-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1^m-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1^m-D2-Fc2或Anti-Her2(T) -Fc1-D1^m-Fc2或Anti-Her2(T) -Fc1-D1^m-D2-Fc2或Anti-Her2(P) -Fc1-D1^m-Fc2或Anti-Her2(P) -Fc1-D1^m-D2-Fc2或Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1^m-Fc2或Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1^m-D2-Fc2或Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1^m-Fc2或Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1^m-D2-Fc2或Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1^m-Fc2或Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1^m-D2-Fc2单次用药72小时后,尽管表达左臂抗原的靶细胞(如肿瘤细胞)被显著清除,但不表达左臂抗原的细胞(如T细胞、其他免疫细胞)亦均有明显程度的清除。

[0405] 例如,如图14所示,Ofa-Fc1-D1-Fc2单次给药后72小时(图14C、图14D)相比于给药前(图14A、图14B),B细胞(CD20抗原靶细胞)被显著清除(几乎完全被清除),而不表达CD20抗原的细胞(如T细胞、其他免疫细胞)则未见明显影响。Ofa-Fc1-D1^m-Fc2单次给药后72小时(图14G、图14H)相比于给药前(图14E、图14F),尽管B细胞(CD20抗原靶细胞)被显著清除,但不表达CD20抗原的细胞(如T细胞、其他免疫细胞)亦均有明显程度的清除。

[0406] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,右臂含SIRP α 胞外截短体的重组蛋白,在同剂量条件下,比右臂含SIRP α 胞外截短体高亲和突变体的重组蛋白具有更高肿瘤特异性靶向作用,表现出更高的免疫安全性。

[0407] 高剂量下的免疫恢复作用:

[0408] 选择人CD34⁺HSC移植NSG (Hu-NSG) 雌性小鼠(购自艾德摩),分成以下2组(每组3只小鼠,每组按照标示量分别静脉注射):1)Hu5F9-G4(200 μ g/只)组;2)Ofa-Fc1-D1-Fc2(150 μ g/只)组,给药1次,给药后4天及给药后14天,小鼠尾静脉采血80 μ l于含肝素钠的抗凝管中,采用新鲜配制的裂红液裂解红细胞(其中裂红液为裂解液(BD Pharm LyseTM,货号:555899):双蒸水等体积混合配制),剩余细胞用PBS+2%FBS清洗重悬,荧光抗体(PE anti-human CD45(货号:304039)/FITC anti-human CD19(货号:302206)/APC anti-human CD3(货号:300312),均购自BioLegend)与细胞共孵育30min,PBS+2%FBS清洗重悬后,通过流式细胞仪(AccuriTM C6,BD)检测。

[0409] 试验结果显示,在Hu-NSG小鼠模型使用高剂量的Ofa-Fc1-D1-Fc2或Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2或Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Obi-Fc1-D1-Fc2或Obi-Fc1-D1-D2-Fc2或Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-Her2(P) -Fc1-D1-Fc2或Anti-Her2(P) -Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-Her2(P) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-Her2(T) -Fc1-D1-Fc2或Anti-Her2(T) -Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-Her2(T) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-Fc2或Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1-Fc2或Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-PD-L1

(12A4)-Fc1-D1-Fc2或Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2和抗CD47抗体Hu5F9-G4,单次给药96小时后,Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2和抗CD47抗体Hu5F9-G4均可见B细胞(CD20抗原靶细胞)及非靶细胞(如T细胞及其他免疫细胞)被较大程度的清除现象。14天后,Ofa-Fc1-D1-Fc2或Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2或Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Obi-Fc1-D1-Fc2或Obi-Fc1-D1-D2-Fc2或Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2或Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2或Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2或Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2或Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2或Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2或Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2或Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2组的小鼠,其B细胞(CD20抗原靶细胞)仍然处于被清除的状态,而表达CD47的其他非靶细胞(如T细胞)则显著得到恢复;而抗CD47抗体Hu5F9-G4组的小鼠,无论是B细胞(CD20抗原靶细胞)还是表达CD47的非靶细胞均未恢复。

[0410] 例如,如图15所示,高剂量的抗CD47抗体Hu5F9-G4(图15A)和Ofa-Fc1-D1-Fc2(图15B)虽在给药后96小时均出现了B细胞(CD20抗原靶细胞)和表达CD47的非靶细胞(如T细胞)的大量清除,但14天后,Ofa-Fc1-D1-Fc2(图15D)组小鼠虽B细胞(CD20抗原靶细胞)仍处于被清除的状态,但B细胞(CD20抗原靶细胞)以外表达CD47的非靶细胞(如T细胞)显著得到恢复,而抗CD47抗体Hu5F9-G4(图15C)组小鼠,其B细胞(CD20抗原靶细胞)、表达CD47的非靶细胞(如T细胞)均未有恢复迹象。

[0411] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,本发明所述的可以与肿瘤靶向抗原和CD47抗原同步结合的重组蛋白,其表达CD47的非靶细胞(如T细胞等免疫细胞)在高剂量给药条件下具有可恢复性,该重组蛋白具有更高的免疫安全性。

[0412] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,使用本发明所述的体内早期免疫安全性评价方法,可用于评价靶向CD47重组蛋白(含单价或多价)或抗体(含单价或多价)的早期免疫安全性。

[0413] 实施例7不同截短体对靶标亲和力结合活性的影响

[0414] 重组蛋白Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-

Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2以Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2和Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2为例,适用于左臂相同,右臂采用不同长度的SIRP α 胞外截短体的重组蛋白。

[0415] 流式细胞术检测与靶标Her2和CD47的双特异性结合情况:

[0416] SKBR-3细胞(人乳腺癌细胞)(购自上海中科院细胞库),收集生长良好的细胞并计数,离心并用PBS+2%FBS重悬细胞至 2×10^6 个细胞/ml的浓度。将细胞以 $100 \mu\text{l}$ /孔加入到96孔板U型板(货号:3799,Corning),静置至少15分钟;离心吸出上清并分别加入各自11个稀释度的Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2和Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2(433.2nM起始、4倍梯度连续稀释,共11个浓度),4°C孵育1小时;PBS+2%FBS清洗后,加入山羊抗人IgG Fc-FITC(F9512-2ML,Sigma)4°C孵育1小时;用PBS+2%FBS清洗重悬后,通过流式细胞仪(Accuri C6,BD)检测荧光值。

[0417] 由于Trastuzumab和Pertuzumab分别作用于Her2抗原的不同表位,且2个抗原表位与细胞膜间距离存在较大差异,因此,重组蛋白Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2均能与SKBR-3细胞特异性结合,但结合亲和力以及所能达到的最大平均荧光强度各不相同。

[0418] 试验结果显示,由于Trastuzumab与Her2抗原表位(Pedersen M W, et al.Targeting Three Distinct HER2 Domains with a Recombinant Antibody Mixture Overcomes Trastuzumab Resistance.Molecular Cancer Therapeutics,2015,14(3):669-680)距离细胞膜表面更近,因此Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2与SKBR-3细胞亲和力优于Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2。Pertuzumab与Her2抗原表位(Her2胞外第II结构域)距离细胞膜表面较远,因此Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2较Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2与SKBR-3细胞亲和力相当。

[0419] 以上试验数据证明,右臂不同长度截短体组成的重组蛋白会影响重组蛋白与靶细胞的亲和力。对于结合近膜端表位的左臂,当右臂选择较短的SIRP α 截短体时,能大大提高重组蛋白结合双靶点的能力。但对于结合远膜端表位的左臂,右臂选择较短的SIRP α 截短体就失去了优势,左臂抗原靶点距离细胞膜越远,右臂的SIRP α 截短体就应该越长才能达到最优匹配。

[0420] 例如,如图16所示,Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2($EC_{50}=2.04\text{nM}$)结合SKBR-3细胞的能力明显优于Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2($EC_{50}=25.95\text{nM}$)(图16A)。而Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2结合SKBR-3细胞的能力($EC_{50}=15.22\text{nM}$)则与Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2($EC_{50}=11.03\text{nM}$)相当(图16B)。

[0421] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,根据靶抗原空间表位与靶细胞膜表面的距离,右臂适配性的选择合适长度的人SIRP α 胞外截短体,可有效提高重组蛋白与靶细胞的结合能力。

[0422] 实施例8重组蛋白急性毒性试验

[0423] 重组蛋白Ofa-Fc1-D1-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2的急性毒性试验,以下方法以Ofa-Fc1-D1-Fc2为例,适用于右臂含SIRP α 胞外截短体的重组蛋白的检测。

[0424] 取适量的Ofa-Fc1-D1-Fc2溶液(4.02mg/mL),用注射用Ofa-Fc1-D1-Fc2缓冲液(Tris-柠檬酸盐,pH 6.5)将其分别稀释至0.25和2.5mg/mL,分别用于实验动物第1组和第2组的给药。

[0425] 4只健康雌性食蟹猴,购于广西桂东灵长类开发实验有限公司,年龄为4岁,由广西壮族自治区科学技术厅许可上述实验动物的生产,实验动物生产许可证编号为SCXK桂2016-0001。给药前进行一次详细临床观察和称重,均未见异常。体重范围在给药当天为2.47-2.85kg。

[0426] 表9实验设计

组别	供试品	给药剂量 (mg/kg) *	给药浓度 (mg/mL)	给药体积 (mL/kg)	动物数量	
					雄性	雌性
[0427] 1	Ofa-Fc1-D1-Fc2	0.5	0.25	2	0	2
2	Ofa-Fc1-D1-Fc2	5	2.5	2	0	2

[0428] *通过静脉注射给药

[0429] 将4只雌性食蟹猴分为两组,每组两只,通过静脉注射给药,给药剂量为0.5mg/kg、5mg/kg,给药体积为2mL/kg。实验设计见上表9。给药当天给药一次,给药结束后连续观察28天。食蟹猴饲养于不锈钢移动笼中,每笼1只。每天提供大约各12小时的明暗交替照明。实验猴配合饲料购于北京科澳协力饲料有限公司,试验期间动物自由采食,特定禁食除外。该批饲料由上海谱尼测试技术有限公司(PONY)对其中特定的微生物、重金属和农药残留进行检测。试验期间所有动物通过水瓶自由饮水,所用饮用水为反渗透系统过滤除菌的纯化水,由计量员对饮用水的pH、硬度、重金属和微生物进行检测。

[0430] 试验期间所有试验动物每天进行两次(上、下午各一次)笼边观察,观察内容包括

但不限于发病、损害、死亡和供食供水情况。所有受试动物试验前进行1次详细临床观察。试验过程中所有实验动物给药后每天至少1次进行详细临床观察。观察内容包括但不限于发病、死亡率、损害和供食供水情况,皮肤,毛,眼,耳,鼻,口腔,胸部,腹部,外生殖器,四肢,呼吸及循环系统,自主效应(如流涎),神经系统(如震颤,抽搐,应激反应以及反常行为)。分别于D-1(给药前),D1,D4,D8,D11,D15,D18,D22,D25及解剖前,测定动物体重。分别于D2,D4,D8,D11,D15,D18,D22,D25测定动物24h内(24h±1h)耗食量。D-1,D2,D14,D28进行心电图测定,采用标准II导联(8个导联)进行记录,记录速度50mm/秒。

[0431] 分别在给药前(D-1)、给药后D2、D7、D14和D28进行临床病理学样本采集及血液学、凝血、血液生化和淋巴细胞分型检测;于给药前、给药后第28天采集尿液样本并进行尿液分析。

[0432] 样本采集前所有动物禁食过夜(至少10小时)但不禁水。股静脉采集血样(4.5-6mL),其中大约1.8mL全血于含有枸橼酸钠的抗凝管中用于凝血分析;大约1mL全血置于含有K3-EDTA的抗凝管用于血液学分析;大约2mL全血置于分离胶采血管(无抗凝剂)用于血液生化学分析,根据标准作业程序要求离心分离血清。同时,对给药前D-1、给药后D2分离后的血清样本采用流式细胞仪进行T/B细胞分型检测。

[0433] 在D29对动物进行安乐死,采集并保存心脏、肝脏、脾脏、肺和肾组织,并对肝脏、肺(含主支气管)、肾脏、脾脏、心脏、肾上腺、垂体、甲状腺和甲状旁腺、胸腺、卵巢、子宫(包括子宫颈)、脑等组织进行称重。

[0434] 结果显示,单次静脉注射给予Ofa-Fc1-D1-Fc2,给药剂量分别为0.5、5mg/kg时,给药后连续观察28天,动物未见明显药物作用相关异常,且此期间动物耗食量、体重均在正常范围内波动;给药后与给药前相比,动物凝血、尿液及心电图相关检测数据与给药前相比无显著性变化;动物进行解剖后,所有脏器大体观察均在正常范围内,动物脏器重量、脏体系数、脏脑比也在正常范围内。

[0435] 给药后D2,低、高剂量组动物淋巴细胞计数及淋巴细胞百分比均出现明显下降,D7之后恢复至正常水平,此变化可能与药物作用相关。

[0436] 重组蛋白Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2在同等剂量下与Ofa-Fc1-D1-Fc2上述结果情况类似。

[0437] 表10重组蛋白对食蟹猴红细胞数量(10^{12} 个细胞/L)的影响

组别	平行试验	动物编号	用药前	用药后 2天	用药后 7天	用药后 14天	用药后 28 天
[0438] 1	1	101	4.23	4.15	3.98	5.01	5.66
	2	102	4.67	4.19	4.05	4.7	5.16
2	1	201	5.27	4.69	4.04	4.99	5.59
	2	202	4.71	4.02	4.26	4.99	5.72

[0439] 如图18A及表10所示,0.5mg/kg和5mg/kg两种剂量的0fa-Fc1-D1-Fc2均未对食蟹猴红细胞数量产生影响;如图18B及表10所示,0.5mg/kg和5mg/kg两种剂量的0fa-Fc1-D1-Fc2,均未对食蟹猴血红蛋白产生影响。

[0440] 表11重组蛋白对食蟹猴血红蛋白(g/L)的影响

组别	平行试验	动物编号	用药前	用药后 2 天	用药后 7天	给药后 14天	给药后 28天
[0441] 1	1	101	97	97	89	115	129
	2	102	109	98	93	108	118
2	1	201	126	110	96	115	129
	2	202	107	90	95	112	128

[0442] 重组蛋白0fa-Fc1-D1-D2-Fc2、0fa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、0bi-Fc1-D1-Fc2、0bi-Fc1-D1-D2-Fc2、0bi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2在同等剂量下对食蟹猴红细胞数量以及血红蛋白的影响与0fa-Fc1-D1-Fc2上述结果情况类似。

[0443] 如图19所示,根据T/B细胞分型检测结果显示,0.5mg/kg和5mg/kg两种剂量的0fa-Fc1-D1-Fc2,可导致动物的B细胞(CD20抗原靶细胞)被显著清除。

[0444] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,本发明所述的可以与肿瘤靶向抗原和CD47抗原同步结合的重组蛋白,单次给药后动物未见明显药物作用相关异常,且此期间动物耗食量、体重均在正常范围内波动;给药后与给药前相比,动物凝血、尿液及心电图相关检测数据与给药前相比无显著性变化;动物进行解剖后,所有脏器大体观察均在正常范围内,动物脏器重量、脏体系数、脏脑比也在正常范围内。

[0445] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,本发明所述的可以与肿瘤靶向抗原和CD47抗原同步结合的重组蛋白,单次给药后,未对动物红细胞数量及血红蛋白数量产生影响。

[0446] 如本领域技术人员所知,以上试验结果提示,本发明所述的可以与肿瘤靶向抗原和CD47抗原同步结合的重组蛋白在同等剂量条件下优先清除肿瘤靶向抗原所在细胞和/或肿瘤细胞。

[0447] 实施例9重组蛋白体内抑制肿瘤生长实验

[0448] 重组蛋白0fa-Fc1-D1-Fc2、0fa-Fc1-D1-D2-Fc2、0fa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、0bi-

Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(P)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2(T)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(Ate)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(13G4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1(12A4)-Fc1-D1-D2-D3-Fc2体内抑制肿瘤生长实验,以下方法以Ofa-Fc1-D1-Fc2为例,适用于右臂含SIRP α 胞外截短体的重组蛋白的检测。

[0449] Ofa-Fc1-D1-Fc2:无色澄清液体,浓度1.14-4.02mg/ml, -80℃分装保存;美罗华®(利妥昔单抗注射液):无色澄清液体,规格100mg/10ml,批号H0205,2-8℃避光保存。制剂缓冲液(Tris-柠檬酸盐,pH 6.5):无色澄清液体,2-8℃保存。配制方法:Ofa-Fc1-D1-Fc2、美罗华®均用制剂缓冲液稀释;制剂缓冲液作为溶剂直接给药。

[0450] 细胞:CD20阳性人B细胞淋巴瘤Daudi细胞购自中国科学院细胞库。培养条件为RPMI 1640培养基中加10%胎牛血清以及青、链霉素,于37℃、含5%CO₂空气的培养箱中培养。一周二次传代,当细胞呈指数生长期时,收集细胞,计数,接种。

[0451] 实验动物:雌性NOD-SCID小鼠,6-7周,购自上海灵畅生物科技有限公司。生产许可证号:SCXK(沪)2013-0018;动物合格证号2013001829463、2013001827545。饲养环境:SPF级。本实验动物的使用及福利遵照“国际实验动物评估和认可委员会(AAALAC)”的规定执行。每天监测动物的健康状况及死亡情况,例行检查包括观察受试物和药物对动物日常行为表现的影响如行为活动、体重变化、外观体征等。

[0452] 每只小鼠皮下接种 1.5×10^7 Daudi细胞,接种后第18天当平均肿瘤体积达到100-150mm³时,根据肿瘤体积分组并给药(D0)。小鼠静脉注射(IV)药物;溶剂组注射相同体积的溶剂,注射体积0.1mL/10g体重;给药剂量和给药方案参见表12。

[0453] 每周二次用游标卡尺测量肿瘤直径,肿瘤体积(V)计算公式为:

[0454] 肿瘤体积(V)计算公式为:

[0455] $V = 1/2 \times a \times b^2$

[0456] 其中a、b分别表示长、宽。

[0457] $T/C(\%) = (T - T_0) / (C - C_0) \times 100$

[0458] 其中T、C为实验结束时的肿瘤体积;T₀、C₀为实验开始时的肿瘤体积;T为给药组,C为对照组。

[0459] 抑瘤率(TGI)(%) = 100 - T/C(%)。

[0460] 当肿瘤出现消退时,抑瘤率(TGI)(%) = 100 - (T - T₀) / T₀ × 100

[0461] 如果肿瘤比起始体积缩小,即T < T₀或C < C₀时,即定义为肿瘤部分消退(PR);如果肿瘤完全消失,即定义为肿瘤完全消退(CR)。

[0462] 实验结束后,或当动物的肿瘤体积达到1500mm³的安乐死终点时,二氧化碳麻醉处死动物,随后解剖取瘤并称重拍照。

[0463] 两组肿瘤体积或肿瘤重量之间的比较采用双尾Student's t检验,P < 0.05定义为

有统计学显著性差异。

[0464] Ofa-Fc1-D1-Fc2 (5mg/kg, IV, 每周2次, 共5次) 明显抑制Daudi皮下移植瘤的生长, 抑瘤率为80.8%, 1/6小鼠肿瘤部分消退; 美罗华® (7mg/kg, IV, 每周2次, 共5次) 对Daudi皮下移植瘤的抑瘤率为24.5%。荷瘤小鼠对以上药物总体上能较好耐受 (表12, 图20、21、22)。

[0465] 表12 Ofa-Fc1-D1-Fc2、美罗华® 对人B细胞淋巴瘤Daudi细胞皮下移植瘤的疗效

分组	给药	途径	平均肿瘤体积 (m ³) D0	SEM	平均肿瘤体积 (m ³) D18	SEM	%T /C	抑瘤率 (%)	P 值	部分消退	完全消退	实验开始每组动物数	实验结束每组动物数
[0466] 溶剂	D0, D3, D7, D10, D14	IV	103.3	±1.7	1558.7	±374.6	-	-	-	0	0	6	6
Ofa-Fc1-D1-Fc2	99.4		±1.7	378.8	±97.5	19.2	80.8	0.0124	1	0	6	6	
美罗华® 7mg/kg	101.6		±1.0	1200.8	±175.7	75.5	24.5	0.4089	0	0	6	6	

[0467] 注: 随机分组, 第一次给药时间为D0; IV: 静脉注射。

[0468] 可见, Ofa-Fc1-D1-Fc2和美罗华® 对CD20阳性人B细胞淋巴瘤Daudi细胞皮下移植瘤生长均有不同程度的抑制作用, 其中Ofa-Fc1-D1-Fc2显著优于美罗华®; 荷瘤小鼠对以上药物总体上能较好耐受。

[0469] 重组蛋白Ofa-Fc1-D1-D2-Fc2、Ofa-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Obi-Fc1-D1-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-Fc2、Obi-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2 (P) -Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2 (P) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2 (P) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-Fc2、Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-Her2 (T) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-EGFR-Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1 (13G4) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2、Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1-Fc2、Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1-D2-Fc2、Anti-PD-L1 (12A4) -Fc1-D1-D2-D3-Fc2在同等剂量下对NOD-SCID小鼠体内移植瘤的抑瘤效果及小鼠对重组蛋白的耐受程度与Ofa-Fc1-D1-Fc2上述结果情况类似。

[0470] 如本领域技术人员所知, 以上试验结果提示, 本发明所述的可以与肿瘤靶向抗原和CD47抗原同步结合的重组蛋白在同等剂量条件下相较于靶向肿瘤的抗体, 在小鼠体内有意想不到的显著抑瘤效果。

[0471] 本实验动物的使用及福利遵照“国际实验动物评估和认可委员会 (AAALAC)”的规定执行。每天监测动物的健康状况及死亡情况, 例行检查包括观察受试物和药物对动物日常行为表现的影响如行为活动、体重变化、外观体征等。

[0472] 本文提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅旨在更好地说明本发明,而不对本发明的范围构成限制,除非另有要求。说明书中的语言不应被解释为指示任何未要求保护的元件对于实施本发明是必要的。

[0473] 本说明书中引用的所有出版物和专利申请通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利申请被具体地和单独地指明通过引用并入。此外,本文所述的任何理论、机制、证明或发现旨在进一步增强对本发明的理解,并且不意图以任何方式将本发明限制到这样的理论、机制、证明或发现。尽管已经在附图和前面的描述中详细地示出和描述了本发明,但是本发明应当被认为是说明性的而不是限制性的。

[0042]	Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
[0043]	195 200 205
[0044]	Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
[0045]	210 215 220
[0046]	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
[0047]	225 230 235 240
[0048]	Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[0049]	245 250 255
[0050]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[0051]	260 265 270
[0052]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[0053]	275 280 285
[0054]	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[0055]	290 295 300
[0056]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
[0057]	305 310 315 320
[0058]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[0059]	325 330 335
[0060]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
[0061]	340 345 350
[0062]	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[0063]	355 360 365
[0064]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
[0065]	370 375 380
[0066]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[0067]	385 390 395 400
[0068]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[0069]	405 410 415
[0070]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0071]	420 425 430
[0072]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
[0073]	435 440 445
[0074]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0075]	450 455 460
[0076]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0077]	465 470
[0078]	<210> 2
[0079]	<211> 234
[0080]	<212> PRT
[0081]	<213> Artificial Sequence
[0082]	<220>
[0083]	<223> Ofa轻链氨基酸序列

[0084] <400> 2
 [0085] Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 [0086] 1 5 10 15
 [0087] Asp Ala Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 [0088] 20 25 30
 [0089] Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 [0090] 35 40 45
 [0091] Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 [0092] 50 55 60
 [0093] Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 [0094] 65 70 75 80
 [0095] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 [0096] 85 90 95
 [0097] Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 [0098] 100 105 110
 [0099] Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 [0100] 115 120 125
 [0101] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 [0102] 130 135 140
 [0103] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 [0104] 145 150 155 160
 [0105] Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 [0106] 165 170 175
 [0107] Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 [0108] 180 185 190
 [0109] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 [0110] 195 200 205
 [0111] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 [0112] 210 215 220
 [0113] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [0114] 225 230
 [0115] <210> 3
 [0116] <211> 468
 [0117] <212> PRT
 [0118] <213> Artificial Sequence
 [0119] <220>
 [0120] <223> Obi重链氨基酸序列
 [0121] <400> 3
 [0122] Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 [0123] 1 5 10 15
 [0124] Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 [0125] 20 25 30

[0126]	Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
[0127]	35 40 45
[0128]	Ser Tyr Ser Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
[0129]	50 55 60
[0130]	Glu Trp Met Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn
[0131]	65 70 75 80
[0132]	Gly Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
[0133]	85 90 95
[0134]	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
[0135]	100 105 110
[0136]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp
[0137]	115 120 125
[0138]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[0139]	130 135 140
[0140]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
[0141]	145 150 155 160
[0142]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[0143]	165 170 175
[0144]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[0145]	180 185 190
[0146]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[0147]	195 200 205
[0148]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
[0149]	210 215 220
[0150]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
[0151]	225 230 235 240
[0152]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
[0153]	245 250 255
[0154]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[0155]	260 265 270
[0156]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[0157]	275 280 285
[0158]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[0159]	290 295 300
[0160]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[0161]	305 310 315 320
[0162]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[0163]	325 330 335
[0164]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
[0165]	340 345 350
[0166]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[0167]	355 360 365

[0168]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
[0169]	370 375 380
[0170]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[0171]	385 390 395 400
[0172]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[0173]	405 410 415
[0174]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[0175]	420 425 430
[0176]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[0177]	435 440 445
[0178]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[0179]	450 455 460
[0180]	Ser Pro Gly Lys
[0181]	465
[0182]	<210> 4
[0183]	<211> 239
[0184]	<212> PRT
[0185]	<213> Artificial Sequence
[0186]	<220>
[0187]	<223> Obi/Obi-Fc1轻链氨基酸序列
[0188]	<400> 4
[0189]	Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr
[0190]	1 5 10 15
[0191]	Asp Ala Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
[0192]	20 25 30
[0193]	Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
[0194]	35 40 45
[0195]	Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys
[0196]	50 55 60
[0197]	Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val
[0198]	65 70 75 80
[0199]	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[0200]	85 90 95
[0201]	Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
[0202]	100 105 110
[0203]	Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
[0204]	115 120 125
[0205]	Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
[0206]	130 135 140
[0207]	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
[0208]	145 150 155 160
[0209]	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp

[0210]		165		170		175
[0211]	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp					
[0212]		180		185		190
[0213]	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys					
[0214]		195		200		205
[0215]	Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln					
[0216]		210		215		220
[0217]	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
[0218]		225		230		235
[0219]	<210> 5					
[0220]	<211> 461					
[0221]	<212> PRT					
[0222]	<213> Artificial Sequence					
[0223]	<220>					
[0224]	<223> Hu5F9-G4重链氨基酸序列					
[0225]	<400> 5					
[0226]	Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu					
[0227]	1	5		10		15
[0228]	Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly					
[0229]		20		25		30
[0230]	Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn					
[0231]		35		40		45
[0232]	Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp					
[0233]		50		55		60
[0234]	Met Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys					
[0235]		65		70		80
[0236]	Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala					
[0237]		85		90		95
[0238]	Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr					
[0239]		100		105		110
[0240]	Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr					
[0241]		115		120		125
[0242]	Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro					
[0243]		130		135		140
[0244]	Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly					
[0245]		145		150		160
[0246]	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn					
[0247]		165		170		175
[0248]	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln					
[0249]		180		185		190
[0250]	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser					
[0251]		195		200		205

[0252]	Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
[0253]	210 215 220
[0254]	Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
[0255]	225 230 235 240
[0256]	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
[0257]	245 250 255
[0258]	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
[0259]	260 265 270
[0260]	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
[0261]	275 280 285
[0262]	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
[0263]	290 295 300
[0264]	Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
[0265]	305 310 315 320
[0266]	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
[0267]	325 330 335
[0268]	Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
[0269]	340 345 350
[0270]	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
[0271]	355 360 365
[0272]	Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
[0273]	370 375 380
[0274]	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
[0275]	385 390 395 400
[0276]	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
[0277]	405 410 415
[0278]	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
[0279]	420 425 430
[0280]	Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
[0281]	435 440 445
[0282]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0283]	450 455 460
[0284]	<210> 6
[0285]	<211> 236
[0286]	<212> PRT
[0287]	<213> Artificial Sequence
[0288]	<220>
[0289]	<223> Hu5F9-G4轻链氨基酸序列
[0290]	<400> 6
[0291]	Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu
[0292]	1 5 10 15
[0293]	Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro

[0294]	20	25	30
[0295]	Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr		
[0296]	35	40	45
[0297]	Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gly Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln		
[0298]	50	55	60
[0299]	Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val		
[0300]	65	70	80
[0301]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys		
[0302]	85	90	95
[0303]	Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln		
[0304]	100	105	110
[0305]	Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
[0306]	115	120	125
[0307]	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
[0308]	130	135	140
[0309]	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
[0310]	145	150	160
[0311]	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
[0312]	165	170	175
[0313]	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
[0314]	180	185	190
[0315]	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
[0316]	195	200	205
[0317]	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
[0318]	210	215	220
[0319]	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0320]	225	230	235
[0321]	<210> 7		
[0322]	<211> 466		
[0323]	<212> PRT		
[0324]	<213> Artificial Sequence		
[0325]	<220>		
[0326]	<223> JMT101重链氨基酸序列		
[0327]	<400> 7		
[0328]	Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu		
[0329]	1	5	10
[0330]	Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser		
[0331]	20	25	30
[0332]	Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn		
[0333]	35	40	45
[0334]	Tyr Asp Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
[0335]	50	55	60

[0336]	Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe
[0337]	65 70 75 80
[0338]	Thr Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
[0339]	85 90 95
[0340]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0341]	100 105 110
[0342]	Ala Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[0343]	115 120 125
[0344]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
[0345]	130 135 140
[0346]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
[0347]	145 150 155 160
[0348]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
[0349]	165 170 175
[0350]	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
[0351]	180 185 190
[0352]	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
[0353]	195 200 205
[0354]	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
[0355]	210 215 220
[0356]	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[0357]	225 230 235 240
[0358]	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
[0359]	245 250 255
[0360]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
[0361]	260 265 270
[0362]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
[0363]	275 280 285
[0364]	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
[0365]	290 295 300
[0366]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
[0367]	305 310 315 320
[0368]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
[0369]	325 330 335
[0370]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
[0371]	340 345 350
[0372]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
[0373]	355 360 365
[0374]	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
[0375]	370 375 380
[0376]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
[0377]	385 390 395 400

[0378]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
[0379]	405 410 415
[0380]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
[0381]	420 425 430
[0382]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
[0383]	435 440 445
[0384]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
[0385]	450 455 460
[0386]	Gly Lys
[0387]	465
[0388]	<210> 8
[0389]	<211> 231
[0390]	<212> PRT
[0391]	<213> Artificial Sequence
[0392]	<220>
[0393]	<223> JMT101/Anti-EGFR-Fc1轻链氨基酸序列
[0394]	<400> 8
[0395]	Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu
[0396]	1 5 10 15
[0397]	Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro
[0398]	20 25 30
[0399]	Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr
[0400]	35 40 45
[0401]	Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu
[0402]	50 55 60
[0403]	Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser
[0404]	65 70 75 80
[0405]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu
[0406]	85 90 95
[0407]	Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu Trp Pro
[0408]	100 105 110
[0409]	Thr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
[0410]	115 120 125
[0411]	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
[0412]	130 135 140
[0413]	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
[0414]	145 150 155 160
[0415]	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
[0416]	165 170 175
[0417]	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
[0418]	180 185 190
[0419]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

[0420]	195	200	205
[0421]	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
[0422]	210	215	220
[0423]	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0424]	225	230	
[0425]	<210> 9		
[0426]	<211> 468		
[0427]	<212> PRT		
[0428]	<213> Artificial Sequence		
[0429]	<220>		
[0430]	<223> Trastuzumab重链氨基酸序列		
[0431]	<400> 9		
[0432]	Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu		
[0433]	1	5	10 15
[0434]	Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly		
[0435]	20	25	30
[0436]	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp		
[0437]	35	40	45
[0438]	Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
[0439]	50	55	60
[0440]	Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser		
[0441]	65	70	75 80
[0442]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala		
[0443]	85	90	95
[0444]	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[0445]	100	105	110
[0446]	Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly		
[0447]	115	120	125
[0448]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[0449]	130	135	140
[0450]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
[0451]	145	150	155 160
[0452]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
[0453]	165	170	175
[0454]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
[0455]	180	185	190
[0456]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
[0457]	195	200	205
[0458]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
[0459]	210	215	220
[0460]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys Ser		
[0461]	225	230	235 240

[0462]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
[0463]	245 250 255
[0464]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[0465]	260 265 270
[0466]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[0467]	275 280 285
[0468]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[0469]	290 295 300
[0470]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[0471]	305 310 315 320
[0472]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[0473]	325 330 335
[0474]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
[0475]	340 345 350
[0476]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[0477]	355 360 365
[0478]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[0479]	370 375 380
[0480]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[0481]	385 390 395 400
[0482]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[0483]	405 410 415
[0484]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[0485]	420 425 430
[0486]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[0487]	435 440 445
[0488]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[0489]	450 455 460
[0490]	Ser Pro Gly Lys
[0491]	465
[0492]	<210> 10
[0493]	<211> 231
[0494]	<212> PRT
[0495]	<213> Artificial Sequence
[0496]	<220>
[0497]	<223> Trastuzumab轻链氨基酸序列
[0498]	<400> 10
[0499]	Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu
[0500]	1 5 10 15
[0501]	Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
[0502]	20 25 30
[0503]	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr

[0504]	35	40	45
[0505]	Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu		
[0506]	50	55	60
[0507]	Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser		
[0508]	65	70	75 80
[0509]	Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln		
[0510]	85	90	95
[0511]	Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro		
[0512]	100	105	110
[0513]	Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala		
[0514]	115	120	125
[0515]	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser		
[0516]	130	135	140
[0517]	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu		
[0518]	145	150	155 160
[0519]	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
[0520]	165	170	175
[0521]	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
[0522]	180	185	190
[0523]	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
[0524]	195	200	205
[0525]	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
[0526]	210	215	220
[0527]	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0528]	225	230	
[0529]	<210> 11		
[0530]	<211> 359		
[0531]	<212> PRT		
[0532]	<213> Artificial Sequence		
[0533]	<220>		
[0534]	<223> SIRP α D1-Fc氨基酸序列		
[0535]	<400> 11		
[0536]	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly		
[0537]	1	5	10 15
[0538]	Val His Ser Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val		
[0539]	20	25	30
[0540]	Ser Val Ala Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser		
[0541]	35	40	45
[0542]	Leu Ile Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala		
[0543]	50	55	60
[0544]	Arg Glu Leu Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr		
[0545]	65	70	75 80

[0546]	Thr Val Ser Glu Ser Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser
[0547]	85 90 95
[0548]	Ile Ser Ala Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys
[0549]	100 105 110
[0550]	Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr
[0551]	115 120 125
[0552]	Glu Leu Ser Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[0553]	130 135 140
[0554]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[0555]	145 150 155 160
[0556]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[0557]	165 170 175
[0558]	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[0559]	180 185 190
[0560]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
[0561]	195 200 205
[0562]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[0563]	210 215 220
[0564]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
[0565]	225 230 235 240
[0566]	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[0567]	245 250 255
[0568]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
[0569]	260 265 270
[0570]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[0571]	275 280 285
[0572]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[0573]	290 295 300
[0574]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0575]	305 310 315 320
[0576]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
[0577]	325 330 335
[0578]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0579]	340 345 350
[0580]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0581]	355
[0582]	<210> 12
[0583]	<211> 467
[0584]	<212> PRT
[0585]	<213> Artificial Sequence
[0586]	<220>
[0587]	<223> Atezolizumab重链氨基酸序列

[0588] <400> 12
 [0589] Met Glu Phe Trp Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 [0590] 1 5 10 15
 [0591] Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 [0592] 20 25 30
 [0593] Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 [0594] 35 40 45
 [0595] Ser Asp Ser Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 [0596] 50 55 60
 [0597] Glu Trp Val Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
 [0598] 65 70 75 80
 [0599] Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
 [0600] 85 90 95
 [0601] Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 [0602] 100 105 110
 [0603] Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
 [0604] 115 120 125
 [0605] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 [0606] 130 135 140
 [0607] Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 [0608] 145 150 155 160
 [0609] Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 [0610] 165 170 175
 [0611] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 [0612] 180 185 190
 [0613] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 [0614] 195 200 205
 [0615] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 [0616] 210 215 220
 [0617] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 [0618] 225 230 235 240
 [0619] Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 [0620] 245 250 255
 [0621] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 [0622] 260 265 270
 [0623] Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 [0624] 275 280 285
 [0625] Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 [0626] 290 295 300
 [0627] His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr
 [0628] 305 310 315 320
 [0629] Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

[0630]		325		330		335
[0631]	Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile				
[0632]		340		345		350
[0633]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val					
[0634]		355		360		365
[0635]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser					
[0636]		370		375		380
[0637]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu					
[0638]		385		390		395
[0639]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro					
[0640]		405		410		415
[0641]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val					
[0642]		420		425		430
[0643]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met					
[0644]		435		440		445
[0645]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser					
[0646]		450		455		460
[0647]	Pro Gly Lys					
[0648]	465					
[0649]	<210> 13					
[0650]	<211> 233					
[0651]	<212> PRT					
[0652]	<213> Artificial Sequence					
[0653]	<220>					
[0654]	<223> Atezolizumab/Anti-PD-L1 (Ate) -Fc1轻链氨基酸序列					
[0655]	<400> 13					
[0656]	Met Glu Phe Trp Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly					
[0657]	1	5	10	15		
[0658]	Val Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala					
[0659]		20	25	30		
[0660]	Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val					
[0661]		35	40	45		
[0662]	Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys					
[0663]		50	55	60		
[0664]	Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg					
[0665]		65	70	75		
[0666]	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser					
[0667]		85	90	95		
[0668]	Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr					
[0669]		100	105	110		
[0670]	His Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr					
[0671]		115	120	125		

[0672]	Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
[0673]	130 135 140
[0674]	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
[0675]	145 150 155 160
[0676]	Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
[0677]	165 170 175
[0678]	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
[0679]	180 185 190
[0680]	Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
[0681]	195 200 205
[0682]	Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
[0683]	210 215 220
[0684]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0685]	225 230
[0686]	<210> 14
[0687]	<211> 1092
[0688]	<212> DNA
[0689]	<213> Artificial Sequence
[0690]	<220>
[0691]	<223> D1-Fc2 DNA序列
[0692]	<400> 14
[0693]	atggaatgga gctgggtgtt cctgttcttt ctgtccgtga ccacaggcgt gcattctgaa 60
[0694]	gaggagctgc aggtcatcca gcccgataag agcgtgtccg tggccgcagg agaatctgcc 120
[0695]	atctctgatt gcaccgtgac ctctctgac cccgtgggcc caatccagtg gttcagagga 180
[0696]	gccggaccag ctagagagct gatctacaac cagaaggagg gccacttccc cagagtgaca 240
[0697]	accgtgtccg agtctaccaa gcgggagaac atggacttct ccatctccat ctccgccatc 300
[0698]	acaccagccg acgccggcac ctactattgc gtgaagtcc ggaagggtc cccagatacc 360
[0699]	gagtttaaga gcggcggcg aacagagctg agcgtgcggg ctaagcctga caagaccac 420
[0700]	acctgtcccc cttgtcctgc cctgaaactg ctgggaggac ctccctgtt cctgttcccc 480
[0701]	ccaaagccca aggacacct gatgatctcc cggaccccc aagtgacctg cgtggtggtg 540
[0702]	gatgtgtccc acgaggacc tgaagtgaag ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg 600
[0703]	cacaacgcca agaccaagcc tagagaggaa cagtacaact ccacctaccg ggtggtgtcc 660
[0704]	gtgtgaccg tgctgcacca ggattggtg aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc 720
[0705]	aacaaggccc tgctgtcccc catcgaag accatctcca aggccaagg ccagccccgg 780
[0706]	gaaccccagg tgtacacact gcccctagc agggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc 840
[0707]	ctgtggtgtc tcgtgaaagg cttctacccc tccgacattg ccgtggaatg ggagtccaac 900
[0708]	ggccagcctg agaacaacta caagaccacc ccccctgtgc tggactccga cggctcattc 960
[0709]	ttctgtaca gcaagctgac agtggacaag tcccgtgtgc agcagggcaa cgtgttctcc 1020
[0710]	tgtccctgga tgcacgaggc cctgcacaac cactacacc agaagtcct gtccctgagc 1080
[0711]	cccggcaaat ga 1092
[0712]	<210> 15
[0713]	<211> 1389

- [0714] <212> DNA
 [0715] <213> Artificial Sequence
 [0716] <220>
 [0717] <223> D1-D2-Fc2 DNA序列
 [0718] <400> 15
 [0719] atggaatgga gctgggtggt cctgttcttt ctgtccgtga ccacaggcgt gcattctgaa 60
 [0720] gaggagctgc aggtcatcca gcccgataag agcgtgtccg tggccgcagg agaatctgcc 120
 [0721] atctctgatt gcacctgac ctctctgac cccgtgggcc caatccagtg gttcagagga 180
 [0722] gccgaccag ctagagagct gatctacaac cagaaggagg gccacttccc cagagtgaca 240
 [0723] accgtgtccg agtctaccaa gcgggagaac atggacttct ccatctccat ctccgccatc 300
 [0724] acaccagccg acgccggcac ctactattgc gtgaagtcc ggaagggctc cccagatacc 360
 [0725] gagttaaga gcggcggcg aacagagctg agcgtgcggg ctaagcctc tgctccagtg 420
 [0726] gtgtcaggac cagcagctag agtaccctc cagcacaccg tgtccttca cctgcgagtct 480
 [0727] cacggcttct cccctagaga catcacctc aagtgggtca agaacggcaa cgagctgtcc 540
 [0728] gacttcaga ccaactgga tccagtggc gagagcgtgt ctactccat ccaactccacc 600
 [0729] gccaaagtgg tgctgacaag ggaggacgtg cactcccagg tcatttgca ggtggcacac 660
 [0730] gtgacattgc agggcgacc cctgagggga accgccaact tgagtgaca gaccacacc 720
 [0731] tgtcccctt gtctgcccc tgaactgtg ggcggacctt ccgtgttct gttccccca 780
 [0732] aagcccaagg acacctgat gatctcccg accccgaag tgacctgct ggtggtggat 840
 [0733] gtgtcccacg aggacctga agtgaagttc aattggtac tggacggct ggaagtgcac 900
 [0734] aacgcaaga ccaagcctag agaggaacag tacaactca cctaccgggt ggtgtccgtg 960
 [0735] ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac ggcaaagagt acaagtgcaa ggtgtccaac 1020
 [0736] aaggcctgc ctgccccat cgaaaagacc atctccaagg ccaagggcca gccccggaa 1080
 [0737] cccaggtgt acacctgcc ccctagcagg gacgagctga ccaagaacca ggtgtccctg 1140
 [0738] tgggtctctg tgaaaggctt ctaccctcc gacattgcc tggaatggga gtccaacggc 1200
 [0739] cagcctgaga acaactaaa gaccacccc cctgtgtgg actccgacgg ctctctctc 1260
 [0740] ctgtacagca agctgacagt ggacaagtcc cgggtggcagc agggcaact gttctctgc 1320
 [0741] tccgtgatgc acgaggcct gcacaaccac tacaccaga agtccctgtc cctgagcccc 1380
 [0742] ggcaaatga 1389
 [0743] <210> 16
 [0744] <211> 471
 [0745] <212> PRT
 [0746] <213> Artificial Sequence
 [0747] <220>
 [0748] <223> Ofa-Fc1重链氨基酸序列
 [0749] <400> 16
 [0750] Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 [0751] 1 5 10 15
 [0752] Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 [0753] 20 25 30
 [0754] Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 [0755] 35 40 45

[0756]	Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[0757]	50 55 60
[0758]	Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala
[0759]	65 70 75 80
[0760]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys
[0761]	85 90 95
[0762]	Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
[0763]	100 105 110
[0764]	Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met
[0765]	115 120 125
[0766]	Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
[0767]	130 135 140
[0768]	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
[0769]	145 150 155 160
[0770]	Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
[0771]	165 170 175
[0772]	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
[0773]	180 185 190
[0774]	Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
[0775]	195 200 205
[0776]	Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
[0777]	210 215 220
[0778]	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
[0779]	225 230 235 240
[0780]	Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[0781]	245 250 255
[0782]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[0783]	260 265 270
[0784]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[0785]	275 280 285
[0786]	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[0787]	290 295 300
[0788]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
[0789]	305 310 315 320
[0790]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[0791]	325 330 335
[0792]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
[0793]	340 345 350
[0794]	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[0795]	355 360 365
[0796]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
[0797]	370 375 380

[0798]	Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[0799]	385 390 395 400
[0800]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[0801]	405 410 415
[0802]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
[0803]	420 425 430
[0804]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
[0805]	435 440 445
[0806]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0807]	450 455 460
[0808]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0809]	465 470
[0810]	<210> 17
[0811]	<211> 234
[0812]	<212> PRT
[0813]	<213> Artificial Sequence
[0814]	<220>
[0815]	<223> Ofa-Fc1 轻链氨基酸序列
[0816]	<400> 17
[0817]	Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
[0818]	1 5 10 15
[0819]	Asp Ala Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
[0820]	20 25 30
[0821]	Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
[0822]	35 40 45
[0823]	Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
[0824]	50 55 60
[0825]	Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
[0826]	65 70 75 80
[0827]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[0828]	85 90 95
[0829]	Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
[0830]	100 105 110
[0831]	Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
[0832]	115 120 125
[0833]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[0834]	130 135 140
[0835]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[0836]	145 150 155 160
[0837]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[0838]	165 170 175
[0839]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

[0840]	180	185	190
[0841]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
[0842]	195	200	205
[0843]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
[0844]	210	215	220
[0845]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0846]	225	230	
[0847]	<210> 18		
[0848]	<211> 468		
[0849]	<212> PRT		
[0850]	<213> Artificial Sequence		
[0851]	<220>		
[0852]	<223> Obi-Fc1重链氨基酸序列		
[0853]	<400> 18		
[0854]	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly		
[0855]	1	5	10
[0856]	Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys		
[0857]	20	25	30
[0858]	Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu		
[0859]	35	40	45
[0860]	Ser Asn Tyr Asp Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
[0861]	50	55	60
[0862]	Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr		
[0863]	65	70	75
[0864]	Pro Phe Thr Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln		
[0865]	85	90	95
[0866]	Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr		
[0867]	100	105	110
[0868]	Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp		
[0869]	115	120	125
[0870]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
[0871]	130	135	140
[0872]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
[0873]	145	150	155
[0874]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
[0875]	165	170	175
[0876]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
[0877]	180	185	190
[0878]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
[0879]	195	200	205
[0880]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
[0881]	210	215	220

[0882]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
[0883]	225 230 235 240
[0884]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
[0885]	245 250 255
[0886]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[0887]	260 265 270
[0888]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[0889]	275 280 285
[0890]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[0891]	290 295 300
[0892]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
[0893]	305 310 315 320
[0894]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[0895]	325 330 335
[0896]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
[0897]	340 345 350
[0898]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[0899]	355 360 365
[0900]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
[0901]	370 375 380
[0902]	Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[0903]	385 390 395 400
[0904]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[0905]	405 410 415
[0906]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
[0907]	420 425 430
[0908]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[0909]	435 440 445
[0910]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[0911]	450 455 460
[0912]	Ser Pro Gly Lys
[0913]	465
[0914]	<210> 19
[0915]	<211> 468
[0916]	<212> PRT
[0917]	<213> Artificial Sequence
[0918]	<220>
[0919]	<223> Anti-EGFR-Fc1重链氨基酸序列
[0920]	<400> 19
[0921]	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
[0922]	1 5 10 15
[0923]	Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys

[0924]	20	25	30
[0925]	Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu		
[0926]	35	40	45
[0927]	Ser Asn Tyr Asp Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
[0928]	50	55	60
[0929]	Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr		
[0930]	65	70	75
[0931]	Pro Phe Thr Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln		
[0932]	85	90	95
[0933]	Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr		
[0934]	100	105	110
[0935]	Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp		
[0936]	115	120	125
[0937]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
[0938]	130	135	140
[0939]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
[0940]	145	150	155
[0941]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
[0942]	165	170	175
[0943]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
[0944]	180	185	190
[0945]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
[0946]	195	200	205
[0947]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
[0948]	210	215	220
[0949]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
[0950]	225	230	235
[0951]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
[0952]	245	250	255
[0953]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
[0954]	260	265	270
[0955]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
[0956]	275	280	285
[0957]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
[0958]	290	295	300
[0959]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
[0960]	305	310	315
[0961]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
[0962]	325	330	335
[0963]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
[0964]	340	345	350
[0965]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		

[0966]	355	360	365
[0967]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
[0968]	370	375	380
[0969]	Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
[0970]	385	390	395
[0971]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
[0972]	405	410	415
[0973]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr		
[0974]	420	425	430
[0975]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
[0976]	435	440	445
[0977]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
[0978]	450	455	460
[0979]	Ser Pro Gly Lys		
[0980]	465		
[0981]	<210> 20		
[0982]	<211> 469		
[0983]	<212> PRT		
[0984]	<213> Artificial Sequence		
[0985]	<220>		
[0986]	<223> Anti-Her2(T)-Fc1重链氨基酸序列		
[0987]	<400> 20		
[0988]	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly		
[0989]	1	5	10
[0990]	Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln		
[0991]	20	25	30
[0992]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile		
[0993]	35	40	45
[0994]	Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
[0995]	50	55	60
[0996]	Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala		
[0997]	65	70	75
[0998]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn		
[0999]	85	90	95
[1000]	Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
[1001]	100	105	110
[1002]	Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr		
[1003]	115	120	125
[1004]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
[1005]	130	135	140
[1006]	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
[1007]	145	150	155
			160

[1008]	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
[1009]	165 170 175
[1010]	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
[1011]	180 185 190
[1012]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
[1013]	195 200 205
[1014]	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
[1015]	210 215 220
[1016]	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
[1017]	225 230 235 240
[1018]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
[1019]	245 250 255
[1020]	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
[1021]	260 265 270
[1022]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
[1023]	275 280 285
[1024]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
[1025]	290 295 300
[1026]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
[1027]	305 310 315 320
[1028]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
[1029]	325 330 335
[1030]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
[1031]	340 345 350
[1032]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
[1033]	355 360 365
[1034]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
[1035]	370 375 380
[1036]	Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
[1037]	385 390 395 400
[1038]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
[1039]	405 410 415
[1040]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu
[1041]	420 425 430
[1042]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
[1043]	435 440 445
[1044]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
[1045]	450 455 460
[1046]	Leu Ser Pro Gly Lys
[1047]	465
[1048]	<210> 21
[1049]	<211> 234

[1050] <212> PRT
 [1051] <213> Artificial Sequence
 [1052] <220>
 [1053] <223> Anti-Her2(T)-Fc1轻链氨基酸序列
 [1054] <400> 21
 [1055] Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 [1056] 1 5 10 15
 [1057] Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 [1058] 20 25 30
 [1059] Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
 [1060] 35 40 45
 [1061] Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 [1062] 50 55 60
 [1063] Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 [1064] 65 70 75 80
 [1065] Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 [1066] 85 90 95
 [1067] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
 [1068] 100 105 110
 [1069] Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 [1070] 115 120 125
 [1071] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 [1072] 130 135 140
 [1073] Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 [1074] 145 150 155 160
 [1075] Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 [1076] 165 170 175
 [1077] Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 [1078] 180 185 190
 [1079] Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 [1080] 195 200 205
 [1081] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 [1082] 210 215 220
 [1083] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [1084] 225 230
 [1085] <210> 22
 [1086] <211> 468
 [1087] <212> PRT
 [1088] <213> Artificial Sequence
 [1089] <220>
 [1090] <223> Anti-Her2(P)-Fc1重链氨基酸序列
 [1091] <400> 22

[1092]	Met	Glu	Trp	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Phe	Phe	Leu	Ser	Val	Thr	Thr	Gly
[1093]	1				5						10					15
[1094]	Val	His	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln
[1095]					20						25					30
[1096]	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe
[1097]					35						40					45
[1098]	Thr	Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
[1099]					50						55					60
[1100]	Glu	Trp	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	Asn
[1101]	65										70					75
[1102]	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	Lys	Asn
[1103]					85											90
[1104]	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
[1105]					100											105
[1106]	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp
[1107]					115											120
[1108]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
[1109]					130											135
[1110]	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
[1111]	145															150
[1112]	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
[1113]					165											170
[1114]	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
[1115]					180											185
[1116]	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
[1117]					195											200
[1118]	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
[1119]					210											215
[1120]	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
[1121]	225															230
[1122]	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
[1123]					245											250
[1124]	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
[1125]					260											265
[1126]	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
[1127]					275											280
[1128]	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
[1129]					290											295
[1130]	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
[1131]	305															310
[1132]	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
[1133]					325											330

[1134]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
[1135]	340 345 350
[1136]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[1137]	355 360 365
[1138]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
[1139]	370 375 380
[1140]	Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[1141]	385 390 395 400
[1142]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[1143]	405 410 415
[1144]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
[1145]	420 425 430
[1146]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[1147]	435 440 445
[1148]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
[1149]	450 455 460
[1150]	Ser Pro Gly Lys
[1151]	465
[1152]	<210> 23
[1153]	<211> 234
[1154]	<212> PRT
[1155]	<213> Artificial Sequence
[1156]	<220>
[1157]	<223> Anti-Her2(P)-Fc1 轻链氨基酸序列
[1158]	<400> 23
[1159]	Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
[1160]	1 5 10 15
[1161]	Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
[1162]	20 25 30
[1163]	Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
[1164]	35 40 45
[1165]	Val Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[1166]	50 55 60
[1167]	Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
[1168]	65 70 75 80
[1169]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[1170]	85 90 95
[1171]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
[1172]	100 105 110
[1173]	Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1174]	115 120 125
[1175]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

[1176]	130	135	140
[1177]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
[1178]	145	150	155 160
[1179]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
[1180]		165	170 175
[1181]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
[1182]		180	185 190
[1183]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
[1184]		195	200 205
[1185]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
[1186]	210	215	220
[1187]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[1188]	225	230	
[1189]	<210> 24		
[1190]	<211> 467		
[1191]	<212> PRT		
[1192]	<213> Artificial Sequence		
[1193]	<220>		
[1194]	<223> Anti-PD-L1(Ate)-Fc1重链氨基酸序列		
[1195]	<400> 24		
[1196]	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly		
[1197]	1	5	10 15
[1198]	Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln		
[1199]		20	25 30
[1200]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
[1201]		35	40 45
[1202]	Ser Asp Ser Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
[1203]		50	55 60
[1204]	Glu Trp Val Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala		
[1205]	65	70	75 80
[1206]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn		
[1207]		85	90 95
[1208]	Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
[1209]		100	105 110
[1210]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly		
[1211]		115	120 125
[1212]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[1213]		130	135 140
[1214]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
[1215]	145	150	155 160
[1216]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
[1217]		165	170 175

[1218]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[1219]	180 185 190
[1220]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[1221]	195 200 205
[1222]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[1223]	210 215 220
[1224]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
[1225]	225 230 235 240
[1226]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[1227]	245 250 255
[1228]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[1229]	260 265 270
[1230]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[1231]	275 280 285
[1232]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[1233]	290 295 300
[1234]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[1235]	305 310 315 320
[1236]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[1237]	325 330 335
[1238]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[1239]	340 345 350
[1240]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[1241]	355 360 365
[1242]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[1243]	370 375 380
[1244]	Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[1245]	385 390 395 400
[1246]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[1247]	405 410 415
[1248]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
[1249]	420 425 430
[1250]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[1251]	435 440 445
[1252]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[1253]	450 455 460
[1254]	Pro Gly Lys
[1255]	465
[1256]	<210> 25
[1257]	<211> 1641
[1258]	<212> DNA
[1259]	<213> Artificial Sequence

- [1260] <220>
- [1261] <223> D1-D2-D3-Fc2 DNA序列
- [1262] <400> 25
- [1263] atggaatgga gctgggtgtt cctgttcttt ctgtccgtga ccacaggcgt gcattctgaa 60
- [1264] gaggagctgc aggtcatcca gcccgataag agcgtgtccg tggccgcagg agaatctgcc 120
- [1265] atcctgcatt gcaccgtgac ctctctgac cccgtgggcc caatccagtg gttcagagga 180
- [1266] gccggaccag ctagagagct gatctacaac cagaaggagg gccacttccc cagagtgaca 240
- [1267] accgtgtccg agtctaccaa gcgggagaac atggacttct ccatctccat ctccgccatc 300
- [1268] acaccagccg acgccggcac ctactattgc gtgaagtcc ggaagggtc cccagatacc 360
- [1269] gagttaaga gcggcggcgg aacagagctg agcgtgcggg ctaagcctc tgctccagtg 420
- [1270] gtgtcaggac cagcagctag agtaccct cagcacaccg tgtccttca ctgcgagtct 480
- [1271] cacgcttct ccctagaga catcaccctc aagtggttca agaacggcaa cgagctgtcc 540
- [1272] gacttcaga ccaactgga tccagtggc gagagcgtg cttactccat ccaactccacc 600
- [1273] gccaaagggtg tgctgacaag ggaggacgtg cactcccagg tcatttgca ggtggcacac 660
- [1274] gtgacattgc agggcgaccc cctgagaggc acagcaaact tgagcgagac aattagagtg 720
- [1275] cccccaccc tggaagtta acagcagccc gttagagccg agaaccaggt caacgtcacc 780
- [1276] tgccaggtca gaaagttaa tccacagaga ctgcagctga cctggctcga gaacggaaac 840
- [1277] gtgagcagaa cagagaccgc cagcaccgtg acagagaaca aggacgggac ctacaactgg 900
- [1278] atgagttggc tgctggtgaa cgtcagcgc cacagagacg acgtcaagct gacctgcgac 960
- [1279] aagaccaca cctgtccccc ttgtctgcc cctgaactgc tgggaggacc ttccgtgttc 1020
- [1280] ctgttcccc caaagcccaa ggacaccctg atgatctccc ggacccccga agtgacctgc 1080
- [1281] gtggtggtgg atgtgtcca cgaggaccct gaagtgaagt tcaattgta cgtggacggc 1140
- [1282] gtggaagtgc acaacccaa gaccaagcct agagaggaac agtacaactc cacctaccgg 1200
- [1283] gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gattggctga acggcaaaga gtacaagtgc 1260
- [1284] aaggtgtcca acaagccct gcctgcccc atcgaaaaga ccatctccaa ggccaagggc 1320
- [1285] cagccccggg accccaggt gtacacactg cccctagca gggacgagct gaccaagaac 1380
- [1286] caggtgtccc tgtggtgtct cgtgaaaggc ttctaccct cgcacattgc cgtggaatgg 1440
- [1287] gagtccaacg gccagctga gaacaactac aagaccacc cccctgtgct ggactccgac 1500
- [1288] ggctcattct tctgtacag caagctgaca gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac 1560
- [1289] gtgttctct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccttg 1620
- [1290] tcctgagcc ccgcaaatg a1641
- [1291] <210> 26
- [1292] <211> 363
- [1293] <212> PRT
- [1294] <213> Artificial Sequence
- [1295] <220>
- [1296] <223> D1-Fc2 氨基酸序列
- [1297] <400> 26
- [1298] Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
- [1299] 1 5 10 15
- [1300] Val His Ser Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val
- [1301] 20 25 30

[1302]	Ser Val Ala Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser
[1303]	35 40 45
[1304]	Leu Ile Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala
[1305]	50 55 60
[1306]	Arg Glu Leu Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr
[1307]	65 70 75 80
[1308]	Thr Val Ser Glu Ser Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser
[1309]	85 90 95
[1310]	Ile Ser Ala Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys
[1311]	100 105 110
[1312]	Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr
[1313]	115 120 125
[1314]	Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
[1315]	130 135 140
[1316]	Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
[1317]	145 150 155 160
[1318]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
[1319]	165 170 175
[1320]	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
[1321]	180 185 190
[1322]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
[1323]	195 200 205
[1324]	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
[1325]	210 215 220
[1326]	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
[1327]	225 230 235 240
[1328]	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
[1329]	245 250 255
[1330]	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
[1331]	260 265 270
[1332]	Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
[1333]	275 280 285
[1334]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
[1335]	290 295 300
[1336]	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
[1337]	305 310 315 320
[1338]	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
[1339]	325 330 335
[1340]	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
[1341]	340 345 350
[1342]	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1343]	355 360

[1344] <210> 27
 [1345] <211> 462
 [1346] <212> PRT
 [1347] <213> Artificial Sequence
 [1348] <220>
 [1349] <223> D1-D2-Fc2 氨基酸序列
 [1350] <400> 27
 [1351] Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 [1352] 1 5 10 15
 [1353] Val His Ser Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val
 [1354] 20 25 30
 [1355] Ser Val Ala Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser
 [1356] 35 40 45
 [1357] Leu Ile Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala
 [1358] 50 55 60
 [1359] Arg Glu Leu Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr
 [1360] 65 70 75 80
 [1361] Thr Val Ser Glu Ser Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser
 [1362] 85 90 95
 [1363] Ile Ser Ala Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys
 [1364] 100 105 110
 [1365] Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr
 [1366] 115 120 125
 [1367] Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro
 [1368] 130 135 140
 [1369] Ala Ala Arg Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser
 [1370] 145 150 155 160
 [1371] His Gly Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly
 [1372] 165 170 175
 [1373] Asn Glu Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser
 [1374] 180 185 190
 [1375] Val Ser Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu
 [1376] 195 200 205
 [1377] Asp Val His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln
 [1378] 210 215 220
 [1379] Gly Asp Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Asp Lys Thr His Thr
 [1380] 225 230 235 240
 [1381] Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 [1382] 245 250 255
 [1383] Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 [1384] 260 265 270
 [1385] Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

[1386]	275	280	285
[1387]	Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
[1388]	290	295	300
[1389]	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
[1390]	305	310	315
[1391]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
[1392]		325	330
[1393]	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		335
[1394]		340	345
[1395]	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		350
[1396]		355	360
[1397]	Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val		365
[1398]		370	375
[1399]	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		380
[1400]	385	390	395
[1401]	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		400
[1402]		405	410
[1403]	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		415
[1404]		420	425
[1405]	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		430
[1406]		435	440
[1407]	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		445
[1408]		450	455
[1409]	<210> 28		460
[1410]	<211> 546		
[1411]	<212> PRT		
[1412]	<213> Artificial Sequence		
[1413]	<220>		
[1414]	<223> D1-D2-D3-Fc2 氨基酸序列		
[1415]	<400> 28		
[1416]	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly		
[1417]	1	5	10
[1418]	Val His Ser Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val		15
[1419]		20	25
[1420]	Ser Val Ala Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser		30
[1421]		35	40
[1422]	Leu Ile Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala		45
[1423]		50	55
[1424]	Arg Glu Leu Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr		60
[1425]	65	70	75
[1426]	Thr Val Ser Glu Ser Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser		80
[1427]		85	90
			95

[1428]	Ile Ser Ala Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys
[1429]	100 105 110
[1430]	Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr
[1431]	115 120 125
[1432]	Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro
[1433]	130 135 140
[1434]	Ala Ala Arg Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser
[1435]	145 150 155 160
[1436]	His Gly Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly
[1437]	165 170 175
[1438]	Asn Glu Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser
[1439]	180 185 190
[1440]	Val Ser Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu
[1441]	195 200 205
[1442]	Asp Val His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln
[1443]	210 215 220
[1444]	Gly Asp Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val
[1445]	225 230 235 240
[1446]	Pro Pro Thr Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln
[1447]	245 250 255
[1448]	Val Asn Val Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln
[1449]	260 265 270
[1450]	Leu Thr Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser
[1451]	275 280 285
[1452]	Thr Val Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu
[1453]	290 295 300
[1454]	Leu Val Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Asp
[1455]	305 310 315 320
[1456]	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
[1457]	325 330 335
[1458]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
[1459]	340 345 350
[1460]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
[1461]	355 360 365
[1462]	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
[1463]	370 375 380
[1464]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
[1465]	385 390 395 400
[1466]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
[1467]	405 410 415
[1468]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
[1469]	420 425 430

[1470]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
[1471]	435 440 445
[1472]	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
[1473]	450 455 460
[1474]	Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
[1475]	465 470 475 480
[1476]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
[1477]	485 490 495
[1478]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
[1479]	500 505 510
[1480]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
[1481]	515 520 525
[1482]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
[1483]	530 535 540
[1484]	Gly Lys
[1485]	545
[1486]	<210> 29
[1487]	<211> 369
[1488]	<212> PRT
[1489]	<213> Artificial Sequence
[1490]	<220>
[1491]	<223> D1m-Fc2 氨基酸序列
[1492]	<400> 29
[1493]	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
[1494]	1 5 10 15
[1495]	Val His Ser Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val
[1496]	20 25 30
[1497]	Ser Val Ala Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Ile Thr Ser
[1498]	35 40 45
[1499]	Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala
[1500]	50 55 60
[1501]	Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr
[1502]	65 70 75 80
[1503]	Thr Val Ser Glu Thr Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser
[1504]	85 90 95
[1505]	Ile Ser Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys
[1506]	100 105 110
[1507]	Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr
[1508]	115 120 125
[1509]	Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
[1510]	130 135 140
[1511]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

[1512]	145	150	155	160
[1513]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
[1514]		165	170	175
[1515]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
[1516]		180	185	190
[1517]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
[1518]		195	200	205
[1519]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
[1520]		210	215	220
[1521]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
[1522]		225	230	235
[1523]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
[1524]		245	250	255
[1525]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
[1526]		260	265	270
[1527]	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp			
[1528]		275	280	285
[1529]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
[1530]		290	295	300
[1531]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
[1532]		305	310	315
[1533]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
[1534]		325	330	335
[1535]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
[1536]		340	345	350
[1537]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
[1538]		355	360	365
[1539]	Lys			
[1540]	<210> 30			
[1541]	<211> 117			
[1542]	<212> PRT			
[1543]	<213> Artificial Sequence			
[1544]	<220>			
[1545]	<223> D1 氨基酸序列			
[1546]	<400> 30			
[1547]	Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala			
[1548]	1	5	10	15
[1549]	Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser Leu Ile Pro			
[1550]		20	25	30
[1551]	Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Glu Leu			
[1552]		35	40	45
[1553]	Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser			

[1554]	50	55	60
[1555]	Glu Ser Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Ala		
[1556]	65	70	75 80
[1557]	Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys		
[1558]	85	90	95
[1559]	Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser		
[1560]	100	105	110
[1561]	Val Arg Ala Lys Pro		
[1562]	115		
[1563]	<210> 31		
[1564]	<211> 216		
[1565]	<212> PRT		
[1566]	<213> Artificial Sequence		
[1567]	<220>		
[1568]	<223> D1-D2 氨基酸序列		
[1569]	<400> 31		
[1570]	Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala		
[1571]	1 5 10 15		
[1572]	Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser Leu Ile Pro		
[1573]	20 25 30		
[1574]	Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Glu Leu		
[1575]	35 40 45		
[1576]	Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser		
[1577]	50 55 60		
[1578]	Glu Ser Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Ala		
[1579]	65 70 75 80		
[1580]	Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys		
[1581]	85 90 95		
[1582]	Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser		
[1583]	100 105 110		
[1584]	Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg		
[1585]	115 120 125		
[1586]	Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe		
[1587]	130 135 140		
[1588]	Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu		
[1589]	145 150 155 160		
[1590]	Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr		
[1591]	165 170 175		
[1592]	Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His		
[1593]	180 185 190		
[1594]	Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro		
[1595]	195 200 205		

[1596]	Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser
[1597]	210 215
[1598]	<210> 32
[1599]	<211> 300
[1600]	<212> PRT
[1601]	<213> Artificial Sequence
[1602]	<220>
[1603]	<223> D1-D2-D3 氨基酸序列
[1604]	<400> 32
[1605]	Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala
[1606]	1 5 10 15
[1607]	Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser Leu Ile Pro
[1608]	20 25 30
[1609]	Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Glu Leu
[1610]	35 40 45
[1611]	Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
[1612]	50 55 60
[1613]	Glu Ser Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Ala
[1614]	65 70 75 80
[1615]	Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
[1616]	85 90 95
[1617]	Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
[1618]	100 105 110
[1619]	Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg
[1620]	115 120 125
[1621]	Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe
[1622]	130 135 140
[1623]	Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu
[1624]	145 150 155 160
[1625]	Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr
[1626]	165 170 175
[1627]	Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His
[1628]	180 185 190
[1629]	Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro
[1630]	195 200 205
[1631]	Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro Thr
[1632]	210 215 220
[1633]	Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val
[1634]	225 230 235 240
[1635]	Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp
[1636]	245 250 255
[1637]	Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val Thr

[1638]	260	265	270
[1639]	Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn		
[1640]	275	280	285
[1641]	Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys		
[1642]	290	295	300
[1643]	<210> 33		
[1644]	<211> 123		
[1645]	<212> PRT		
[1646]	<213> Artificial Sequence		
[1647]	<220>		
[1648]	<223> D1m 氨基酸序列		
[1649]	<400> 33		
[1650]	Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala		
[1651]	1	5	10
[1652]	Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro		
[1653]	20	25	30
[1654]	Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Val Leu		
[1655]	35	40	45
[1656]	Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser		
[1657]	50	55	60
[1658]	Glu Thr Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn		
[1659]	65	70	75
[1660]	Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys Phe Arg Lys		
[1661]	85	90	95
[1662]	Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser		
[1663]	100	105	110
[1664]	Val Arg Ala Lys Pro Ser Glu Pro Lys Ser Ser		
[1665]	115	120	
[1666]	<210> 34		
[1667]	<211> 1416		
[1668]	<212> DNA		
[1669]	<213> Artificial Sequence		
[1670]	<220>		
[1671]	<223> Ofa-Fc1重链DNA序列		
[1672]	<400> 34		
[1673]	atggaatgga gctgggtggt cctgttcttt ctgtccgtga ccacaggcgt gcattctgaa 60		
[1674]	gtgcagctgg tggaaatctgg cggcggactg gtgcagcctg gcagatccct gagactgtct 120		
[1675]	tgtgccgect ccggettca cttcaacgac tacgcatgc actgggtgcg acaggccct 180		
[1676]	ggcaaaggcc tggaaatgggt gtccaccatc agctggaact ccggctccat cggctacgcc 240		
[1677]	gactccgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaacg ccaagaagtc cctgtacctg 300		
[1678]	cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccctgtact actgtgcaa ggacatccag 360		
[1679]	tacggcaact actactacgg catggacgtg tggggccagg gcaccacagt gaccgtgtca 420		

[1680]	tctgcttcta ccaagggccc ctccgtgttt cctctggccc cttccagcaa gtccacctct	480
[1681]	ggcggaacag ccgctctggg ctgcctcgtg aaggactact tccccgagcc tgtgaccgtg	540
[1682]	tectggaact ctggcgtctt gacatccggc gtgcacacct tccttctgtt gctgcagtct	600
[1683]	agcggcctgt actccctgtc ctccgtcgtg accgtgcctt ccagctctct gggcaccag	660
[1684]	acctacatct gcaactgaa ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gaaggtggaa	720
[1685]	cccaagtctt gcgacaagac ccacacctgt ccccctgtc ctgcccctga actgctgggc	780
[1686]	ggaccttccg tgttctgtt cccccaaag cccaaggaca ccctgatgat ctccccgacc	840
[1687]	cccgaagtga cctgcgtggt ggtggatgtg tcccacgagg accctgaagt gaagttcaat	900
[1688]	tggtacctgg acggcgtgga agtgacaaac gccaaagacca agcctagaga ggaacagtac	960
[1689]	aactccacct accgggtggt gtccgtcgtg accgtcgtgc accaggattg gctgaacggc	1020
[1690]	aaagagtaca agtgcaaggt gtccaacaag gccctgcctg cccccatcga aaagaccatc	1080
[1691]	tccaaggcca agggccagcc ccgggaacc caggtgtaca cactgcccc tagcagggac	1140
[1692]	gagctgacca agaaccaggt gtccctgagc tgtgcagtga aaggcttcta cccctccgac	1200
[1693]	attgccgtgg aatgggagtc caacggccag cctgagaaca actacaagac cccccccct	1260
[1694]	gtgctggact ccgacggctc attcttctg gtgagcaagc tgacagtgga caagtcccgg	1320
[1695]	tggcagcagg gcaactgtt ctctctctcc gtgatgcac aggccctgca caaccactac	1380
[1696]	accagaagt ccctgtccct gagccccggc aatga	1416
[1697]	<210>	35
[1698]	<211>	705
[1699]	<212>	DNA
[1700]	<213>	Artificial Sequence
[1701]	<220>	
[1702]	<223>	Ofa-Fc1轻链DNA序列
[1703]	<400>	35
[1704]	atgtctgtgc ctaccaggt gctgggactg ctgctcgtgt ggctgacaga cggccgtgt	60
[1705]	gagatcgtgc tgaccagtc tctgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagctacc	120
[1706]	ctgtcctgca gagcctcca gtccgtgtcc tcttacctgg cctggtatca gcagaagccc	180
[1707]	ggccaggctc cccggctgct gatctacgat gcctccaata gagccaccgg catccctgcc	240
[1708]	agattctccg gctctggctc tggcaccgac tttacctga ccatctccag cctggaacce	300
[1709]	gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag cggccaact ggcccatcac ctttggccag	360
[1710]	ggcaccggc tggaatcaa gagaaccgtg gccctccct ccgtgttcat ctccccacct	420
[1711]	tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgct tctgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac	480
[1712]	cccccgagg ccaaggtgca gtggaagtg gacaacgcc tcagtcctgg caactcccag	540
[1713]	gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtctc caccctgacc	600
[1714]	ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc	660
[1715]	ctgtctagcc ccgtgaccaa gtctttcaac cggggcgagt gctga	705
[1716]	<210>	36
[1717]	<211>	1407
[1718]	<212>	DNA
[1719]	<213>	Artificial Sequence
[1720]	<220>	
[1721]	<223>	Obi-Fc1重链DNA序列

[1722]	<400> 36	
[1723]	atggaatgga gctgggtgtt cctgttcttt ctgtccgtga ccacaggcgt gcattctcag	60
[1724]	gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gctcctccgt gaaggtgtcc	120
[1725]	tgcaaggctt ccggctacgc cttctcctac tcctggatca actgggtgcg acaggccctt	180
[1726]	ggacagggcc tggaatggat gggcagaatc ttccctggcg acggcgacac cgactacaac	240
[1727]	ggcaagtcca agggcagagt gaccatcacc gccgacaagt ccacctccac cgcctacatg	300
[1728]	gaactgtcct cctgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccgaacgtgttc	360
[1729]	gacggctact ggctggtgta ttggggccag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctctgtttct	420
[1730]	accaagggcc cctccgtgtt tcctctggcc cttccagca agtccacctc tggcggaaaca	480
[1731]	gccgctctgg gctgcctcgt gaaggactac ttccccgagc ctgtgaccgt gtcctggaac	540
[1732]	tctggcgctc tgacatccgg cgtgcacacc ttccctgtctg tgctgcagtc tagcggcctg	600
[1733]	tactccctgt cctccgtcgt gaccgtgctt tccagctctc tgggcacca gacctacatc	660
[1734]	tgcaacgtga accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaaggtgga acccaagtcc	720
[1735]	tgcgacaaga cccacacctg tccccctgt cctgcccctg aactgctggg cggaccttc	780
[1736]	gtgttctctgt tcccccaaaa gcccaaggac accctgatga tctcccggac ccccgaagtg	840
[1737]	acctgcgtgg tggatggatgt gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg	900
[1738]	gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcctagag aggaacagta caactccacc	960
[1739]	taccgggtgg tgtccgtcgt gaccgtgtct caccaggatt ggctgaacgg caaagagtac	1020
[1740]	aagtgcaagg tgtccaacaa ggccctgcct gcccctatcg aaaagaccat ctccaaggcc	1080
[1741]	aaggccagc cccgggaacc ccaggtgtac aactgcccc ctagcagga cgagctgacc	1140
[1742]	aagaaccagg tgtccctgtc ctgtgtctgt aaaggttctt acccctccga cattgccgtg	1200
[1743]	gaatgggagt ccaacggcca gcctgagaac aactacaaga ccaccccc tgtgtctggac	1260
[1744]	tccgacggct cattcttctt ggtgagcaag ctgacagtgg acaagtccc gtggcagcag	1320
[1745]	ggcaacgtgt tctctgtctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag	1380
[1746]	tcctgtccc tgagccccgg caaatga	1407
[1747]	<210> 37	
[1748]	<211> 1407	
[1749]	<212> DNA	
[1750]	<213> Artificial Sequence	
[1751]	<220>	
[1752]	<223> Anti-EGFR-Fc1 重链DNA序列	
[1753]	<400> 37	
[1754]	atggaatgga gctgggtgtt cctgttcttt ctgtccgtga ccacaggcgt gcattctcag	60
[1755]	gtccagctcc aggaaagcgg ccccggctc gtcaaaccct ccgagacct ctccctcaca	120
[1756]	tgacacgtct ccggcttctc cctcagcaac tacgacgtcc actgggtcag acaggcccc	180
[1757]	ggcaaggac tggaatggct cggcgtcatc tggctccggcg gaaacaccga ctacaacacc	240
[1758]	ccattcacct ccaggtcac catctcctgt gacacctcca agaaccagtt ctccctcaaa	300
[1759]	ctgagctccg tgaccgccg cgacaccgct gtctattatt gcgccagagc cctcgactac	360
[1760]	tacgactacg aattcgcta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgtc atctgtttct	420
[1761]	accaagggcc cctccgtgtt tcctctggcc cttccagca agtccacctc tggcggaaaca	480
[1762]	gccgctctgg gctgcctcgt gaaggactac ttccccgagc ctgtgaccgt gtcctggaac	540
[1763]	tctggcgctc tgacatccgg cgtgcacacc ttccctgtctg tgctgcagtc tagcggcctg	600

[1764] tactccctgt cctccgtcgt gaccgtgcct tccagctctc tgggcacca gacctacatc 660
 [1765] tgcaacgtga accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaaggtgga acccaagtcc 720
 [1766] tgcgacaaga cccacacctg tcccccttgt cctgccccctg aactgctggg cggaccttcc 780
 [1767] gtgttcctgt tcccccaaaa gcccaaggac accctgatga tctccccggac ccccgaagtg 840
 [1768] acctgcgtgg tgggtgatgt gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg 900
 [1769] gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcctagag aggaacagta caactccacc 960
 [1770] taccgggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggatt ggctgaacgg caaagagtac 1020
 [1771] aagtgaagg tgtccaacaa ggccctgcct gccccatcg aaaagaccat ctccaaggcc 1080
 [1772] aaggccagc cccgggaacc ccagggttac aactgcccc ctagcagga cgagctgacc 1140
 [1773] aagaaccagg tgtccctgag ctgtgcagtg aaaggcttct acccctccga cattgccgtg 1200
 [1774] gaatgggagt ccaacggcca gcctgagaac aactacaaga ccaccccc tgtgctggac 1260
 [1775] tccgacggt cattcttct ggtgagcaag ctgacagtgg acaagtccc gtggcagcag 1320
 [1776] ggcaacgtgt tctctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1380
 [1777] tcctgtccc tgagccccgg caaatga 1407
 [1778] <210> 38
 [1779] <211> 1410
 [1780] <212> DNA
 [1781] <213> Artificial Sequence
 [1782] <220>
 [1783] <223> Anti-Her2(T)-Fc1 重链DNA序列
 [1784] <400> 38
 [1785] atggaatgga gctgggtgtt cctgttcttt ctgtccgtga ccacaggcgt gcattctgag 60
 [1786] gtgcagttgg tggagagcgg ggggggctg gtgcagcctg gaggaagtt gaggttgagc 120
 [1787] tgtccgcaa gcgggttcaa cattaaggac acatacttc actgggtgag gcaggcacc 180
 [1788] ggaaaggac tggagtgggt ggctaggatc taccaccca acggctacac aaggtacgcc 240
 [1789] gacagtgtga agggccggt caccatttcc gccgacacct ccaagaacac cgcctacctg 300
 [1790] cagatgaaca gcctgagggc cgaggacacc gccgtctact actgctccag gtggggagga 360
 [1791] gacggattct atgctatgga ctactgggga cagggcacc tggtgaccgt gtcattctgt 420
 [1792] tctaccaagg gccctccgt gtttctctg gcccttcca gcaagtccac ctctggcgga 480
 [1793] acagccgctc tgggtgcct cgtgaaggac tacttcccc agcctgtgac cgtgtctctg 540
 [1794] aactctggcg ctctgacatc cggcgtgcac accttccctg ctgtgctgca gtctagcggc 600
 [1795] ctgtactccc tgtcctccgt cgtgaccgtg cttccagct ctctgggcac ccagacctac 660
 [1796] atctgcaacg tgaaccacaa gccctccaac accaaggtgg acaagaaggt ggaaccaag 720
 [1797] tctcgcgaca agaccacac ctgtccccct tgtctgccc ctgaaactgt gggcggacct 780
 [1798] tccgtgttcc tgttcccc aaagccaag gacacctga tgatctccc gacccccgaa 840
 [1799] gtgacctgcg tgggtgtgga tgtgtcccac gaggacctg aagtgaagt caattgttac 900
 [1800] gtggacggcg tggaaagtca caacgccaag accaagccta gagaggaaca gtacaactcc 960
 [1801] acctaccggg tgggttccgt gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag 1020
 [1802] tacaagtgca aggtgtccaa caaggccctg cctgccccca tcgaaaagac catctccaag 1080
 [1803] gccaaaggcc agccccgga accccaggtg tacacactgc ccctagcag ggacgagctg 1140
 [1804] accaagaacc aggtgtccct gagctgtgca gtgaaaggct tctaccctc cgacattgcc 1200
 [1805] gtggaatggg agtccaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1260

- [1806] gactccgacg gctcattctt cctggtgagc aagctgacag tggacaagtc ccggtggcag 1320
- [1807] cagggcaacg tgttctcctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacacccag 1380
- [1808] aagtccctgt ccctgagccc cggcaaatga 1410
- [1809] <210> 39
- [1810] <211> 705
- [1811] <212> DNA
- [1812] <213> Artificial Sequence
- [1813] <220>
- [1814] <223> Anti-Her2(T)-Fc1 轻链DNA序列
- [1815] <400> 39
- [1816] atgtctgtgc ctaccaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgacaga cgcccgtgt 60
- [1817] gacattcaga tgaccagag ccctcctcc ctctccgct ccgtgggaga cagagttacc 120
- [1818] atcacctgca gggcctcca ggacgtgaac accgccgtgg cctggtacca gcagaaacce 180
- [1819] ggcaaagccc ccaaactgct catctactcc gcctcattc tgtacagcg cgtgccctcc 240
- [1820] cgcttctccg gttccagatc cggcaccgac ttcacctga ctatctctc cctccagccc 300
- [1821] gaagacttgc ccacctacta ctgccagcag cactacacca cccccccac cttcgccag 360
- [1822] ggcaaaagg tcgaaatcaa gagaaccgtg gccgctccct ccgtgttcat cttcccacct 420
- [1823] tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgct tctgtcgtgt gcctgctgaa caacttctac 480
- [1824] ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagtccgg caactcccag 540
- [1825] gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtctc caccctgacc 600
- [1826] ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 660
- [1827] ctgtctagcc ccgtgaccaa gtctttcaac cggggcgagt gctga 705
- [1828] <210> 40
- [1829] <211> 1407
- [1830] <212> DNA
- [1831] <213> Artificial Sequence
- [1832] <220>
- [1833] <223> Anti-Her2(P)-Fc1重链DNA序列
- [1834] <400> 40
- [1835] atggaatgga gctgggtgtt cctgttcttt ctgtccgtga ccacaggcgt gcattctgag 60
- [1836] gtgcagttgg tggagagcgg gggggggctg gtgcagcctg gaggaagttt gaggttgagc 120
- [1837] tgtgccgcaa gcgggttcac atttacagac tacacaatgg actgggtgag gcaggcacc 180
- [1838] ggaaagggac tggagtgggt ggctgatgtg aatcccaata gcggagggag catttacaac 240
- [1839] cagagattca aggggcggtt caccttgtcc gtggacagga gcaagaacac actgtacctg 300
- [1840] cagatgaaca gcctgagggc cgaggatacc gccgtctact attgcgccag gaacctcgga 360
- [1841] ccctcttct attttgacta ctggggccag ggaacctgg tgaccgtgc atctgttct 420
- [1842] accaagggcc cctccgtgtt tcctctggcc cttccagca agtccacctc tggcggaaca 480
- [1843] gccgctctgg gctgcctcgt gaaggactac ttccccgagc ctgtgaccgt gtcttggaa 540
- [1844] tctggcgtc tgacatccgg cgtgcacacc ttccctgctg tgctgcagtc tagcggcctg 600
- [1845] tactccctgt cctccgtcgt gaccgtgcct tccagctctc tgggcacca gacctacatc 660
- [1846] tgcaacgtga accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaagtgga acccaagtcc 720
- [1847] tgcgacaaga cccacacctg tccccctgt cctgccctg aactgctggg cggaccttcc 780

[1848] gtgttcctgt tcccccaaa gcccaaggac accctgatga tctccccggac ccccgaaagtg 840
 [1849] acctgcgtgg tggatgatgt gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg 900
 [1850] gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcctagag aggaacagta caactccacc 960
 [1851] taccgggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggatt ggctgaacgg caaagagtac 1020
 [1852] aagtcaagg tgtccaacaa ggccctgcct gccccatcg aaaagaccat ctccaaggcc 1080
 [1853] aaggccagc cccgggaacc ccagggttac aactgcccc ctagcagga cgagctgacc 1140
 [1854] aagaaccagg tgtccctgag ctgtgcagtg aaaggettct acccctccga cattgccgtg 1200
 [1855] gaatgggagt ccaacggcca gcctgagaac aactacaaga ccaccccc tgtgctggac 1260
 [1856] tccgacggct cattcttct ggtgagcaag ctgacagtgg acaagtccc gtggcagcag 1320
 [1857] ggcaacgtgt tctcctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1380
 [1858] tcctgtccc tgagccccg caaatga 1407
 [1859] <210> 41
 [1860] <211> 705
 [1861] <212> DNA
 [1862] <213> Artificial Sequence
 [1863] <220>
 [1864] <223> Anti-Her2(P)-Fc1 轻链DNA序列
 [1865] <400> 41
 [1866] atgtctgtgc ctaccagggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgacaga cgcccgtgt 60
 [1867] gacattcaga tgaccagag cccctctcc ctctccgct ccgtgggaga cagagttacc 120
 [1868] atcacctgca aagccagcca ggacgtgagc atcggcgtgg cctggtacca gcagaaacc 180
 [1869] ggcaaagccc ccaaactgct catttactcc gcctatacc gttacaccgg cgttccctcc 240
 [1870] cgcttcagcg gatccgctc cggaaccgac ttcacctga ctatctctc cctccagccc 300
 [1871] gaagacttcg ccacctacta ctgccagcag tactacattt acccctacac cttcgccag 360
 [1872] ggcaccaagg tggaaatcaa gagaaccgtg gccgctccct ccgtgttcat ctteccacct 420
 [1873] tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgct tctgtcgtgt gcctgctgaa caatttctac 480
 [1874] ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaacgcc tgcagtccgg caactccag 540
 [1875] gaatccgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtctc caccctgacc 600
 [1876] ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgct gcgaagtgac ccaccagggc 660
 [1877] ctgtctagcc ccgtgaccaa gtctttcaac cggggcgagt gctga 705
 [1878] <210> 42
 [1879] <211> 1404
 [1880] <212> DNA
 [1881] <213> Artificial Sequence
 [1882] <220>
 [1883] <223> Anti-PD-L1(Ate)-Fc1 重链DNA序列
 [1884] <400> 42
 [1885] atggaatgga gctgggtgtt cctgttcttt ctgtccgtga ccacaggcgt gcattctgaa 60
 [1886] gtgcagctgg tggaaagcgg cggcgccctg gtgcagccgg gcggcagcct gcgcctgagc 120
 [1887] tgcgcggcga gcggctttac ctttagcgat agctggattc attgggtgcg ccaggcggcg 180
 [1888] ggcaaaggcc tggaaatgggt ggcgtggatt agcccgtatg gcggcagcac ctattatgcg 240
 [1889] gatagcgtga aaggccgctt taccattagc gcggatacca gcaaaaacac cgcgtatctg 300

[1890]	cagatgaaca gcctgcgcgc ggaagatacc gcggtgtatt attgcgcgcg ccgccattgg	360
[1891]	ccgggcggtt ttgattactg gggccagggc accctggtga ccgtgtcctc tgcttctacc	420
[1892]	aaggcccctt ccgtgtttcc tctggcccct tccagcaagt ccacctctgg cggaacagcc	480
[1893]	gctctgggct gcctcgtgaa ggactacttc cccgagcctg tgaccgtgtc ctggaactct	540
[1894]	ggcgtctgca catccggcgt gcacaccttc cctgctgtgc tgcagtctag cggcctgtac	600
[1895]	tcctgtcctt ccgtcgtgac cgtgccttcc agctctctgg gcacccagac ctacatctgc	660
[1896]	aacgtgaacc acaagccctc caacaccaag gtggacaaga aggtggaacc caagtctctc	720
[1897]	gacaagacc acacctgtcc cccttctcct gccctgaac tgctgggcgg accttccgtg	780
[1898]	ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc	840
[1899]	tgctggttgg tggatgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac	900
[1900]	ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtacaa ctccacctac	960
[1901]	cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag	1020
[1902]	tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgcctgcc cccatcgaag agaccatctc caaggccaag	1080
[1903]	ggccagcccc gggaaccca ggtgtacaca ctgcccccta gcaggacga gctgaccaag	1140
[1904]	aaccaggtgt ccctgagctg tgcagtgaaa ggcttctacc cctccgacat tgccgtgga	1200
[1905]	tgggagcca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc	1260
[1906]	gacggctcat tcttctggt gagcaagctg acagtggaca agtcccgtg gcagcagggc	1320
[1907]	aacgtgttct cctgctcctg gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc	1380
[1908]	ctgtccctga gccccgcaa atga	1404
[1909]	<210>	43
[1910]	<211>	1110
[1911]	<212>	DNA
[1912]	<213>	Artificial Sequence
[1913]	<220>	
[1914]	<223>	D1m-Fc2 DNA序列
[1915]	<400>	43
[1916]	atggagtgga gctgggtgtt cttgttcttc ttgtccgtga ccaccgggtg gcacagcgag	60
[1917]	gaggagtgtc agatcatcca gcctgacaag agcgtgagcg tggccgccgg ggagagcgct	120
[1918]	attctgcact gtaccatcac ctccctcttc cccgtgggcc ccattcagtg gttcagggga	180
[1919]	gccgggcccg ccagagttct gatttacaac cagaggcagg gccctttcc ccgggttacc	240
[1920]	actgtctctg agaccaccaa gcgggagaac atggatttca gcatctccat cagcaacatt	300
[1921]	actcccgcg acgccggcac ctactactgc atcaaattca gaaagggtc tcccgcacc	360
[1922]	gaattcaaaa gcggcggcg caccgaactg tccgtgcgag ctaagccctc cgagcccaaa	420
[1923]	tcctcagaca agaccacac ctgtccccct tgtctgccc ctgaaactgt gggcggacct	480
[1924]	tccgtgttcc tgttcccc aaagccaag gacacctga tgatctccc gacccccgaa	540
[1925]	gtgacctgcg tgggtgtgga tgtgtcccac gaggacctg aagtgaagt caattgttac	600
[1926]	gtggacggcg tggaaagtca caacccaag accaagccta gagaggaaca gtacaactcc	660
[1927]	acctaccggg tgggtgtccg gctgacctg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag	720
[1928]	tacaagtgca aggtgtccaa caaggccctg cctgccccca tcgaaaagac catctccaag	780
[1929]	gccaagggcc agccccgga accccaggtg tacacactgc cccctagcag ggacgagctg	840
[1930]	accaagaacc aggtgtccct gtggtgtctc gtgaaaggct tctaccctc cgacattgcc	900
[1931]	gtggaatggg agtccaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg	960

[1932] gactccgacg gctcattctt cctgtacagc aagctgacag tggacaagtc ccggtggcag 1020
 [1933] cagggcaacg tgttctcctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag 1080
 [1934] aagtccctgt ccctgagccc cggcaaatga 1110
 [1935] <210> 44
 [1936] <211> 462
 [1937] <212> PRT
 [1938] <213> Artificial Sequence
 [1939] <220>
 [1940] <223> D1m-D2-Fc2 氨基酸序列
 [1941] <400> 44
 [1942] Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 [1943] 1 5 10 15
 [1944] Val His Ser Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val
 [1945] 20 25 30
 [1946] Ser Val Ala Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Ile Thr Ser
 [1947] 35 40 45
 [1948] Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala
 [1949] 50 55 60
 [1950] Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val Thr
 [1951] 65 70 75 80
 [1952] Thr Val Ser Glu Thr Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser
 [1953] 85 90 95
 [1954] Ile Ser Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile Lys
 [1955] 100 105 110
 [1956] Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr
 [1957] 115 120 125
 [1958] Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Glu Pro Lys Ser Ser Gly Pro
 [1959] 130 135 140
 [1960] Ala Ala Arg Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser
 [1961] 145 150 155 160
 [1962] His Gly Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly
 [1963] 165 170 175
 [1964] Asn Glu Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser
 [1965] 180 185 190
 [1966] Val Ser Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu
 [1967] 195 200 205
 [1968] Asp Val His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln
 [1969] 210 215 220
 [1970] Gly Asp Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Asp Lys Thr His Thr
 [1971] 225 230 235 240
 [1972] Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 [1973] 245 250 255

[1974]	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
[1975]	260 265 270
[1976]	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
[1977]	275 280 285
[1978]	Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
[1979]	290 295 300
[1980]	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
[1981]	305 310 315 320
[1982]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
[1983]	325 330 335
[1984]	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
[1985]	340 345 350
[1986]	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
[1987]	355 360 365
[1988]	Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
[1989]	370 375 380
[1990]	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
[1991]	385 390 395 400
[1992]	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
[1993]	405 410 415
[1994]	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
[1995]	420 425 430
[1996]	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
[1997]	435 440 445
[1998]	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[1999]	450 455 460

5'端克隆位点	Kozak 序列	信号肽编码序列	最优 DNA 编码序列	终止密码子	3'端克隆位点
---------	----------	---------	-------------	-------	---------

图1

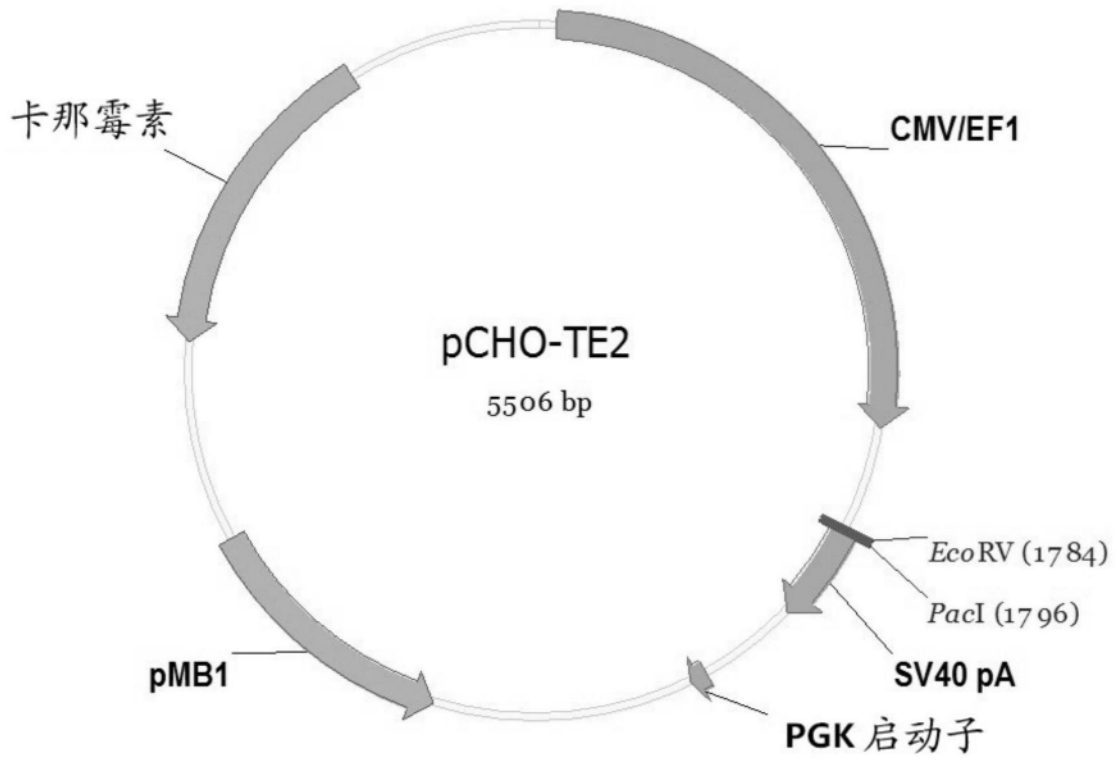


图2

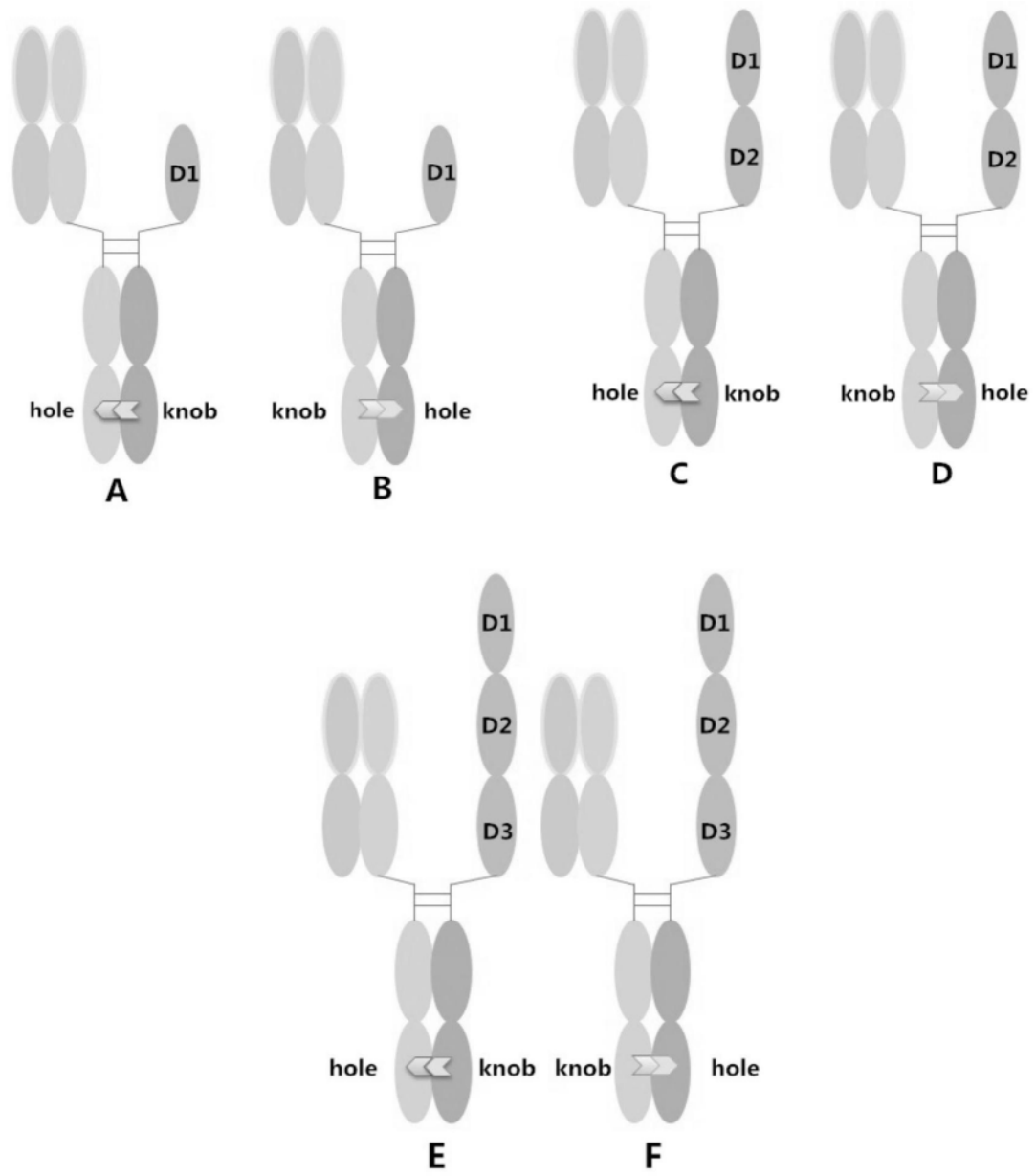


图3

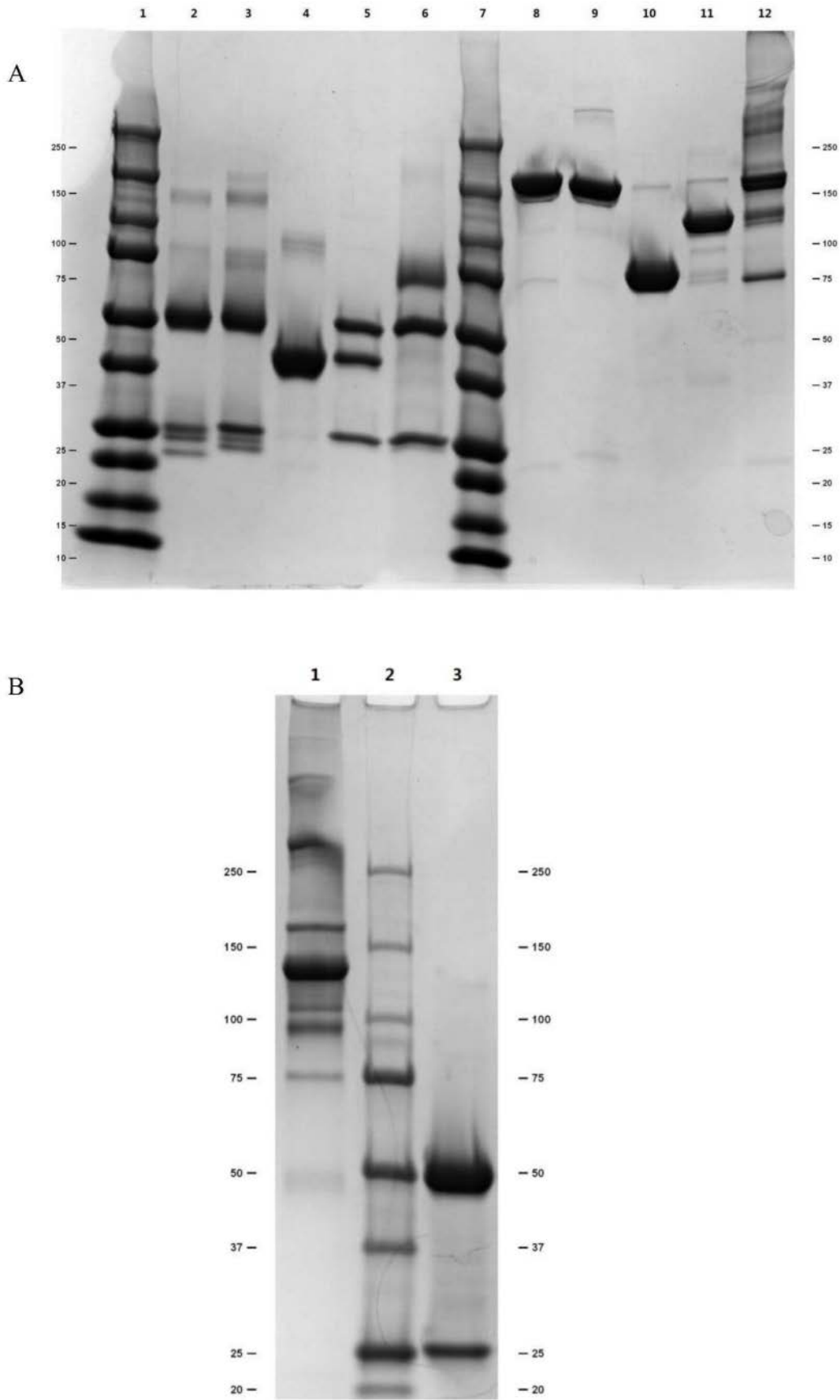


图4

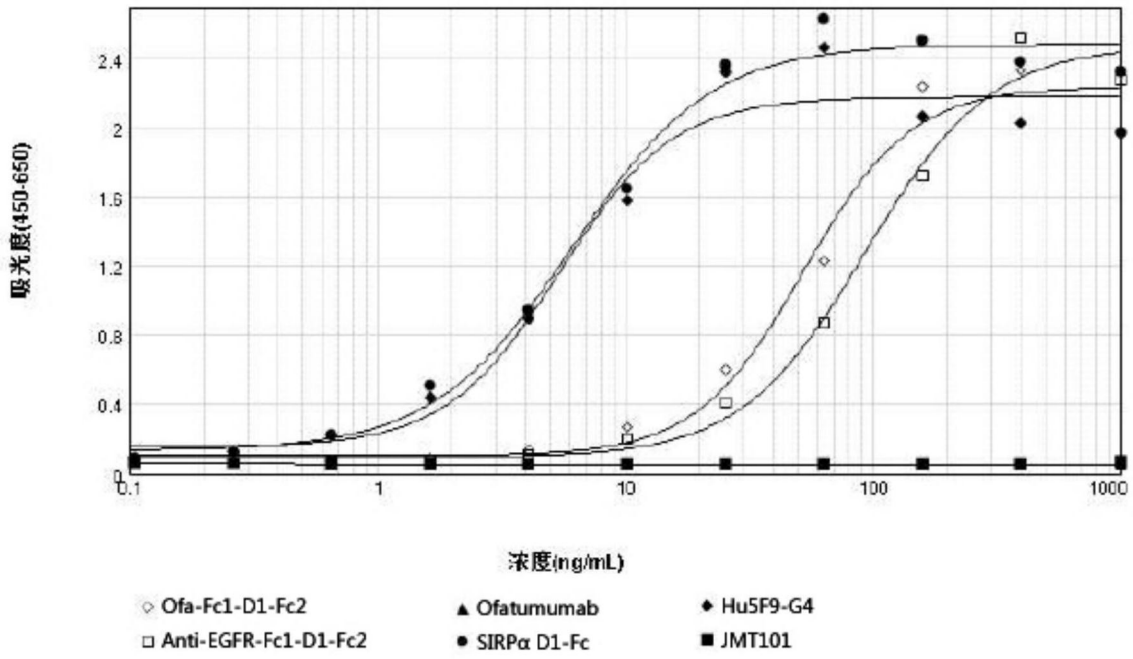


图5

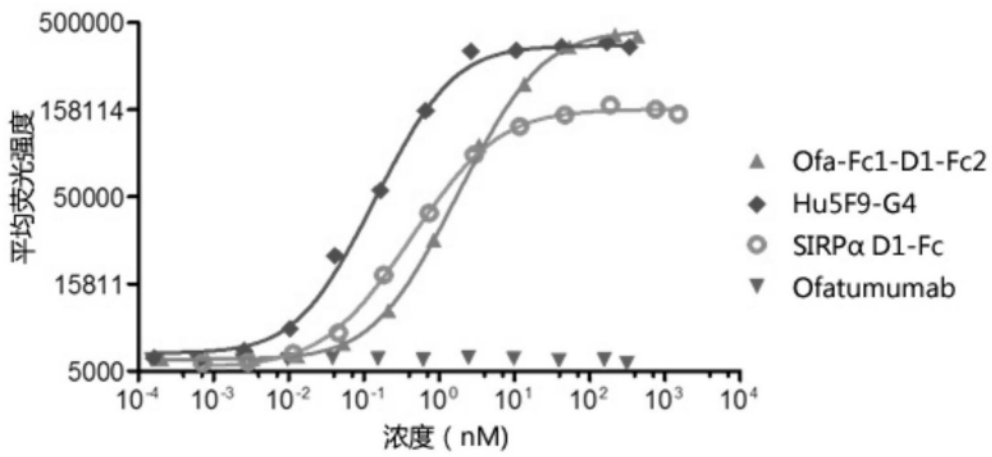


图6

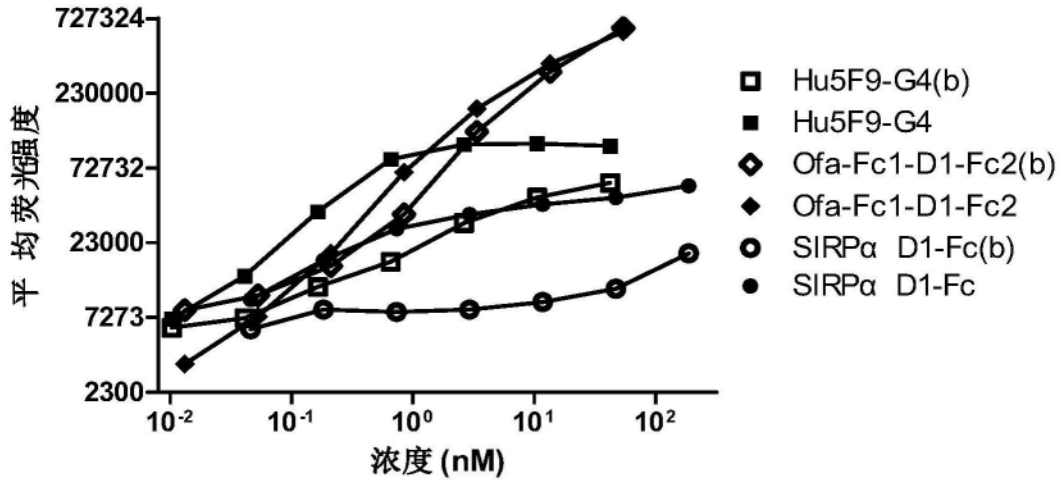
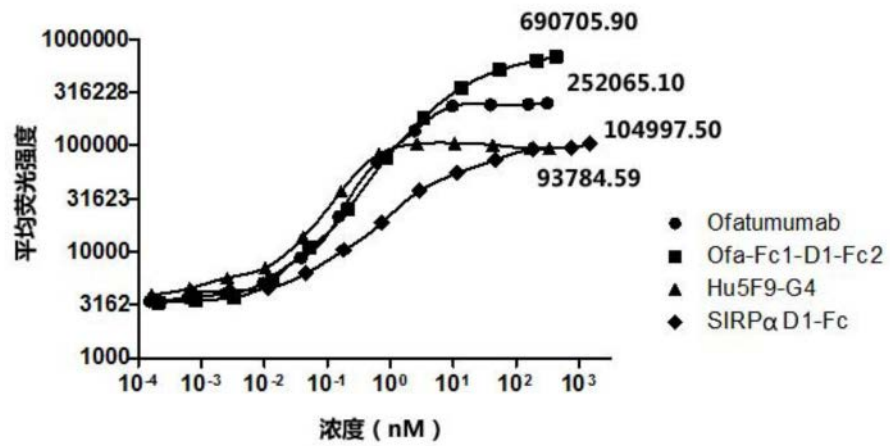
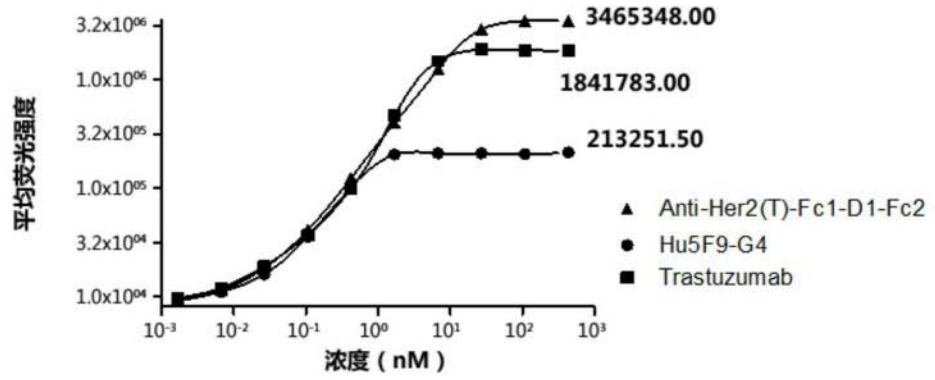


图7

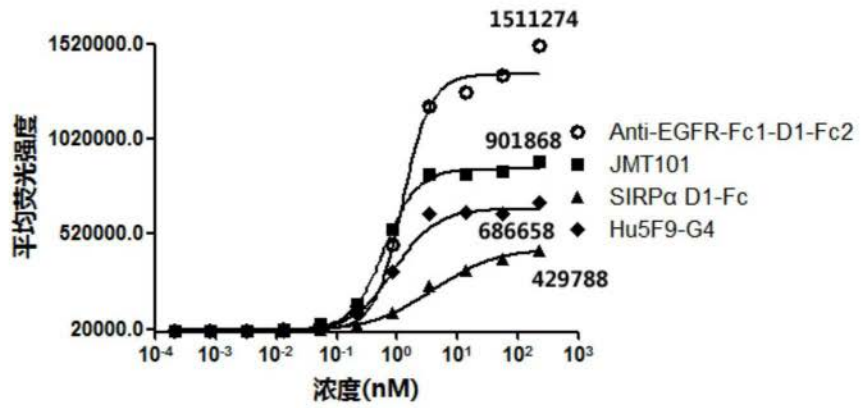
A



B



C



D

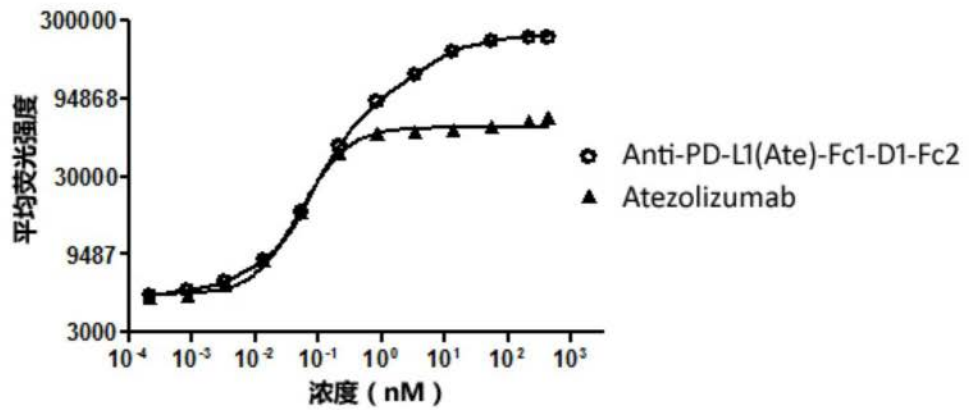


图8

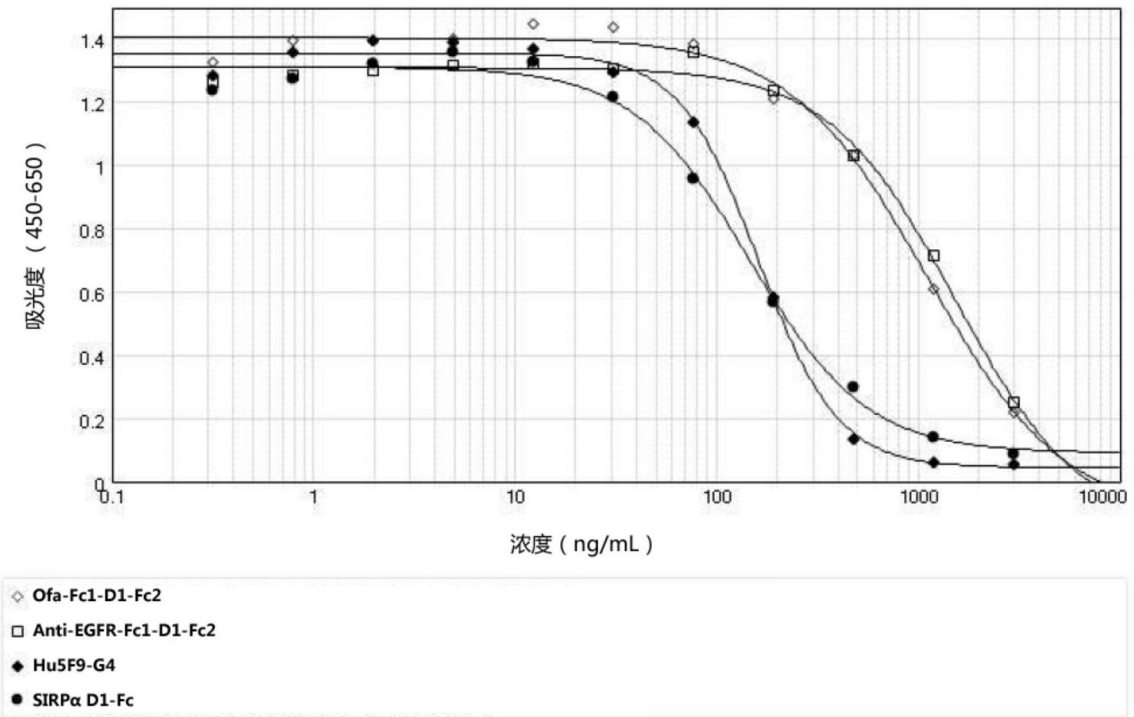


图9

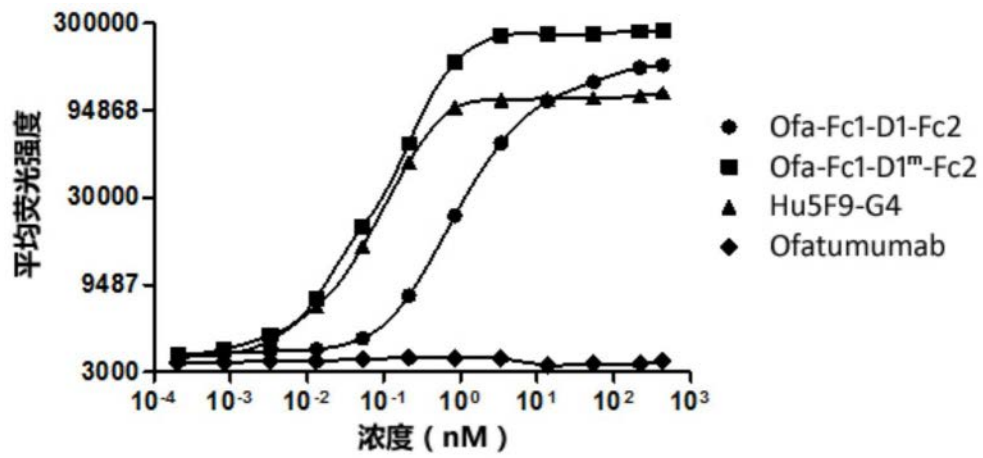


图10

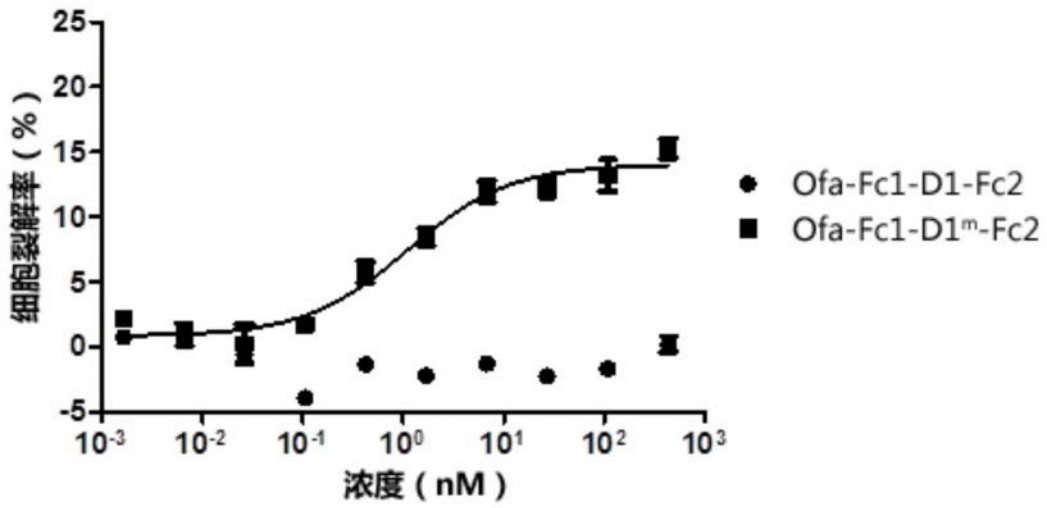


图11

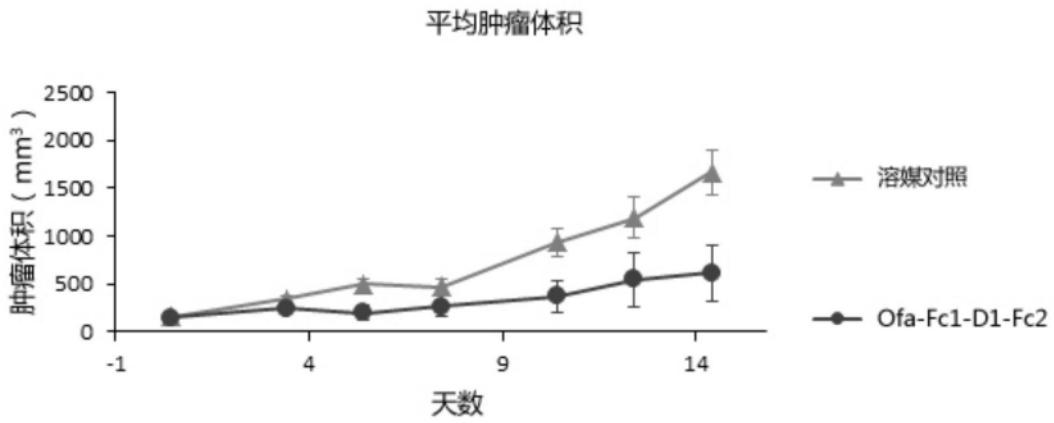


图12

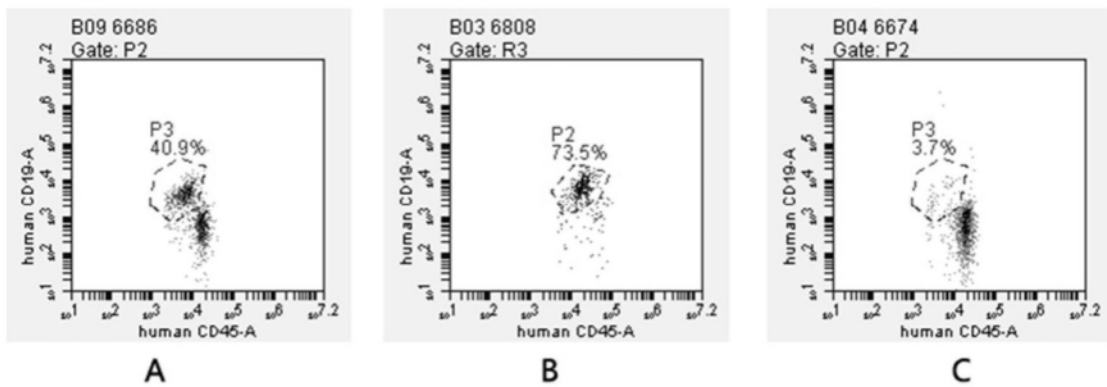


图13

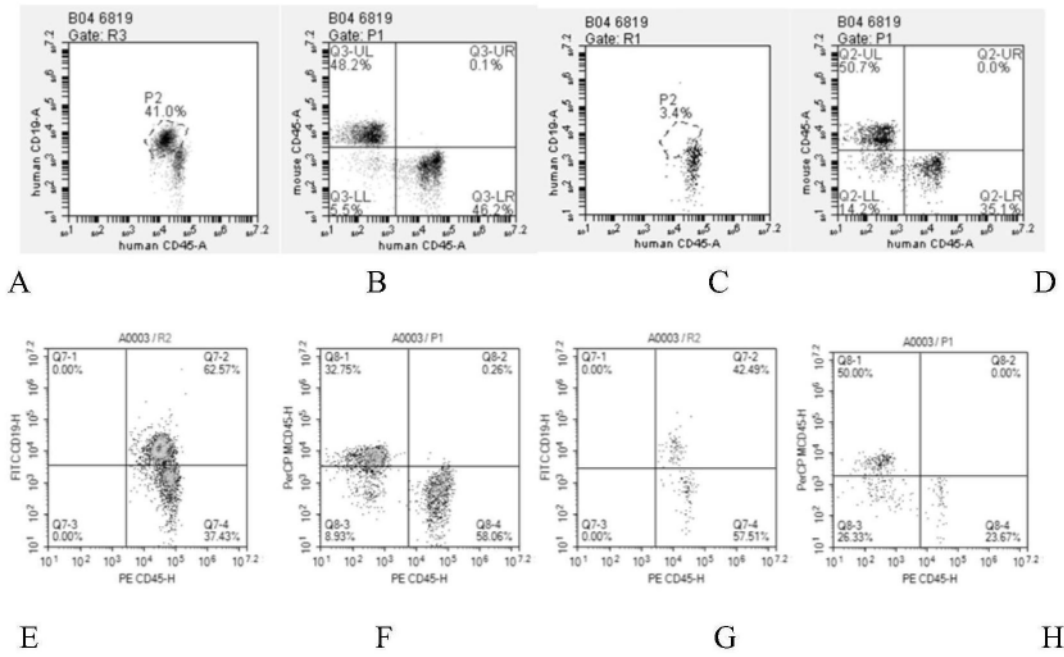


图14

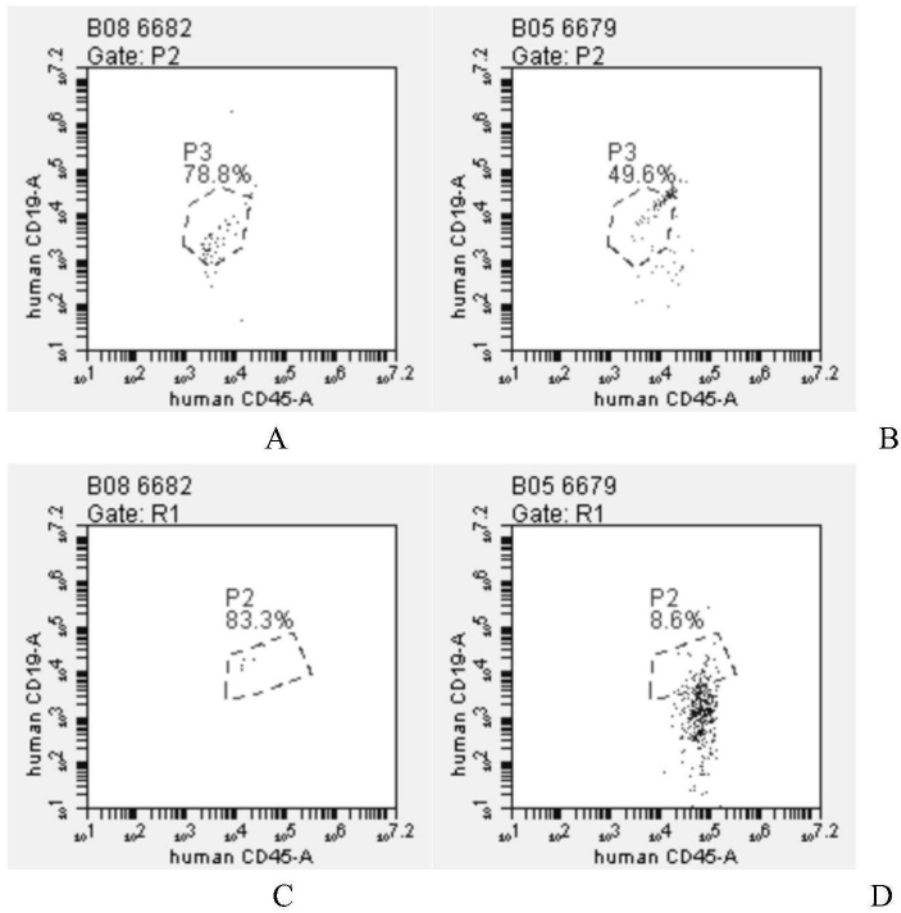


图15

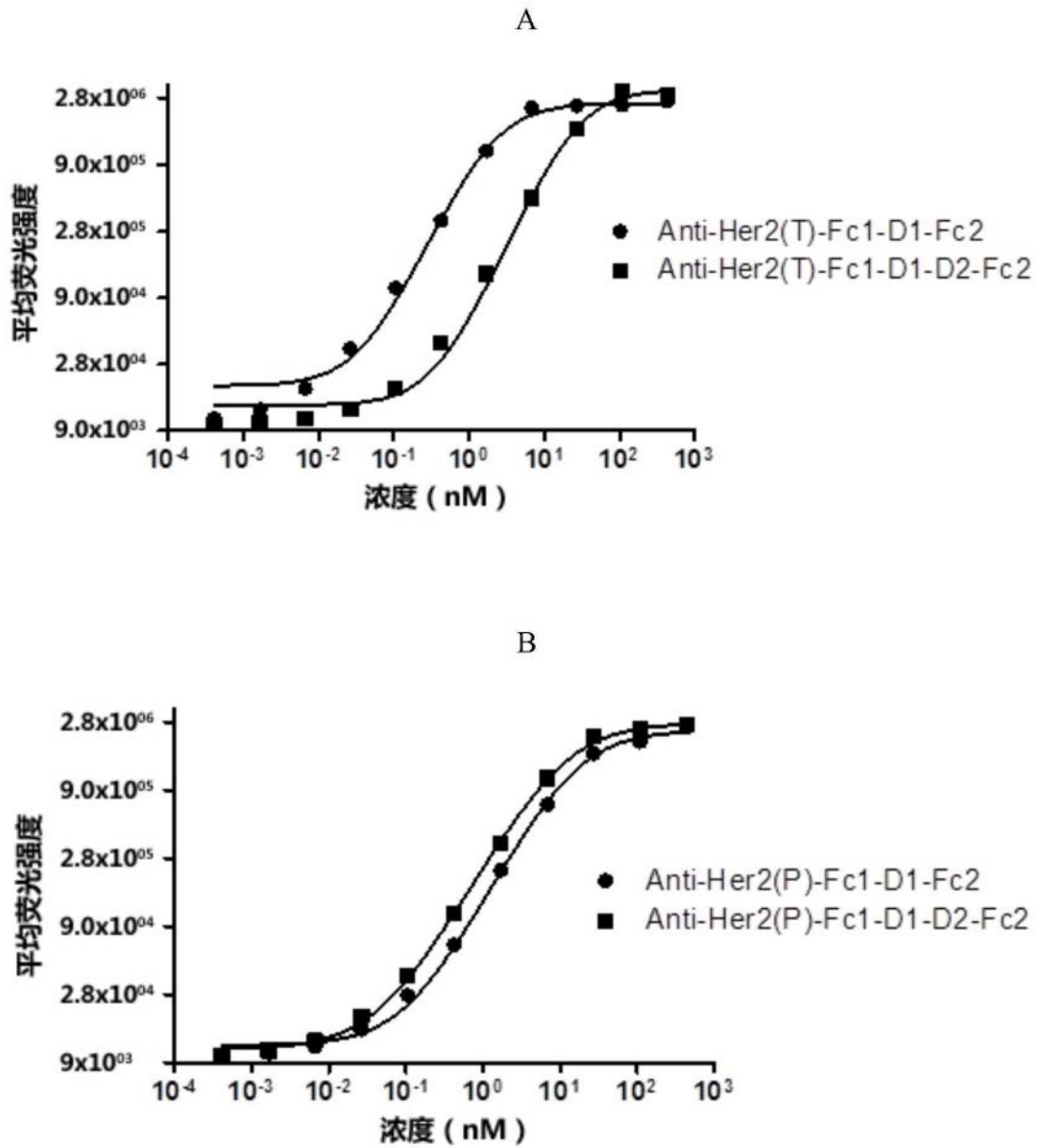


图16

A

编号	序列名称	蛋白序列
1	Ofatumumab重链	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFTFNNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSGIYA DSVKGRFTISRDNNAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNVYYGMDVWQCGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKST GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKS PKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE EWEWSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
2	Ofatumumab轻链	MSVPTQVLGLLLLWLTARCEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTIISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITPGQCTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
3	Obinutuzumab重链	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFTFNNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSGIYA DSVKGRFTISRDNNAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNVYYGMDVWQCGTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKST GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKS PKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE EWEWSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
4	Obinutuzumab轻链	MSVPTQVLGLLLLWLTARCEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTIISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITPGQCTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
5	Hu5F9-G4重链	MRWIFFLLCLAGRALAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGCTFTNVMHWVRQAPGQRLEWMTIYPCNDDTSYNOK FKDRVITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKS PKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE EWEWSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
6	Hu5F9-G4轻链	MRWIFFLLCLAGRALADIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSIYVSNQNTYLCWYLGKPGQSPQLLIYKVSNRFCV PDRFSGSGSGTDFTLTI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEEWEWSNGQPENNYKTT TPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
7	JMT101重链	MRWIFFLLCLAGRALAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGCTFTNVMHWVRQAPGQRLEWMTIYPCNDDTSYNOK FKDRVITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKS PKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE EWEWSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
8	JMT101轻链	MRWIFFLLCLAGRALAEIVLTQSPDFGQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASEISIGIPSRFS GSGSGTDFTLTINSLEAEADAATYYCQQNNEWPTSFQCGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
9	Trastuzumab重链	MRWIFFLLCLAGRALAEVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFTFNNDYAMHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISRADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYANDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGCTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKS PKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE EWSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
10	Trastuzumab轻链	MRWIFFLLCLAGRALADIVMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYASAFLYSGVPS RFGSGSGTDFTLTIISSLPEDFAVYYCQQHYTTPPTPGQCTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	SIRPα D1-Fc	MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEELQVIQPKSVSVAAGEAILHCTVTSIIPVGPQVFRGAGFARELIYNQKEGHFPRVT TVSESTKRENMDFSISISAITPADAGTYVCKFRKGSPTDFEFGAGTELSDVKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEEWSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
12	Atezolizumab重链	MEFWLWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGSLRSCAASGFTFSDSIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYA DSVKGRFTISRADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGCFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGCTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKS PKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE EWSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNYHTQKLSLSLSPGK
13	Atezolizumab轻链	MEFWLWVFLVAILKGVQCDIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYASAFLYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTIISSLPEDFAVYYCQQHYLHPATFGQCTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(接下图)

表 9	表 9 数据	表 9 数据	表 9 数据
表 10	表 10 数据	表 10 数据	表 10 数据
表 11	表 11 数据	表 11 数据	表 11 数据
表 12	表 12 数据	表 12 数据	表 12 数据
表 13	表 13 数据	表 13 数据	表 13 数据
表 14	表 14 数据	表 14 数据	表 14 数据
表 15	表 15 数据	表 15 数据	表 15 数据

E

编号	序列名称	蛋白序列
30	D1	EEELQVIQFDKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKREN MDFSISISAITPADAGTYCCKFRKGGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS
31	D1-D2	EEELQVIQFDKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKREN MDFSISISAITPADAGTYCCKFRKGGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTRDVDHSQV VICEVAHVTLQGDPLRGTA NLS
32	D1-D2-D3	EEELQVIQFDKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKREN MDFSISISAITPADAGTYCCKFRKGGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTRDVDHSQV VICEVAHVTLQGDPLRGTA NLSETIRVPPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFPYQRLQLTWLENGNVSRTEASTVTENKDGTYNWSW LLVNVSAHRDDVKLTC
33	D1 ^h	EEELQIIQFDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFRVTTVSETTKREN MDFSISISNITPADAGTYCCKFRKGGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS
34	D1 ^h -D2-Fc2	MEWSWVFLFVSVTTGVHSEELQIIQFDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGPFRVTTVSETTKRENMDFSISISNITPADAGTYCCKFRKGGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTRDVDHSQV VICEVAHVTLQGDPLRGTA NLSKTHTCPPCPAPELLGCPVSVLFPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDCVEVHNAKTKFREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYVTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPCK

图17

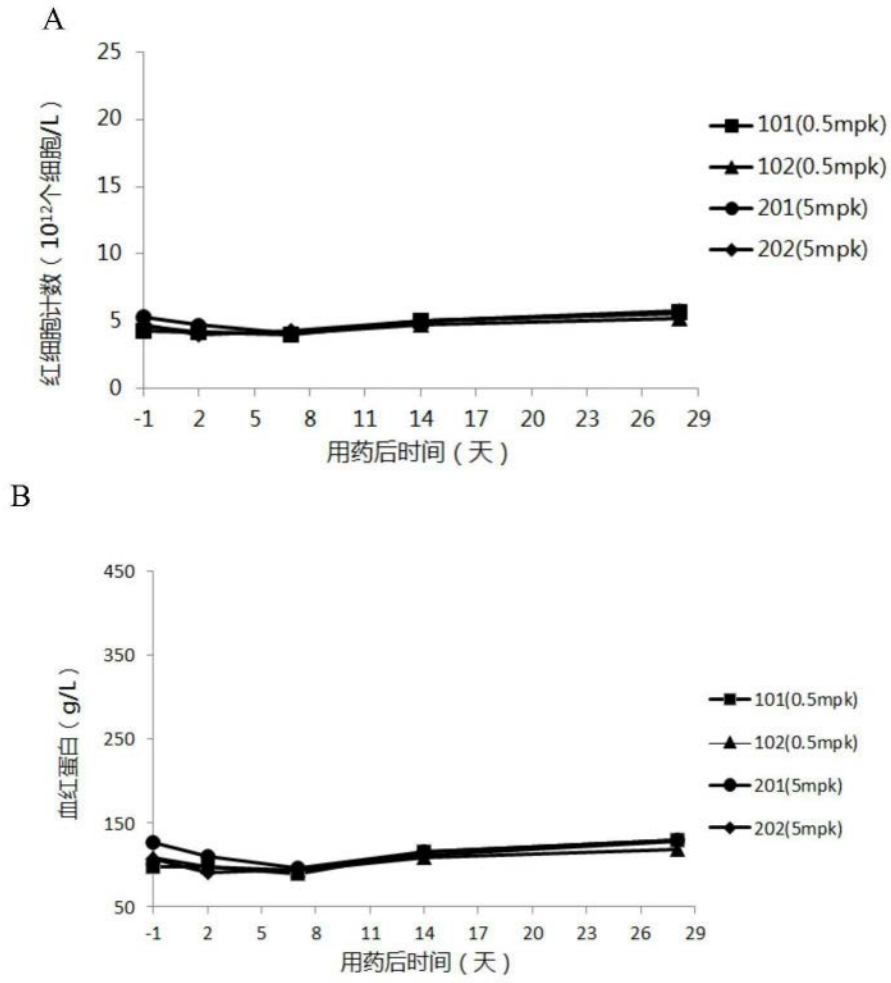


图18

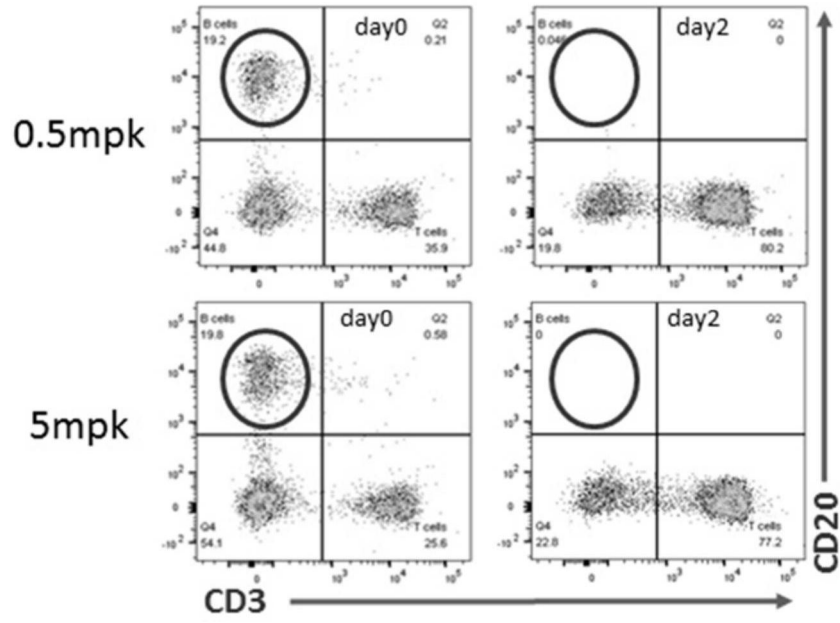


图19

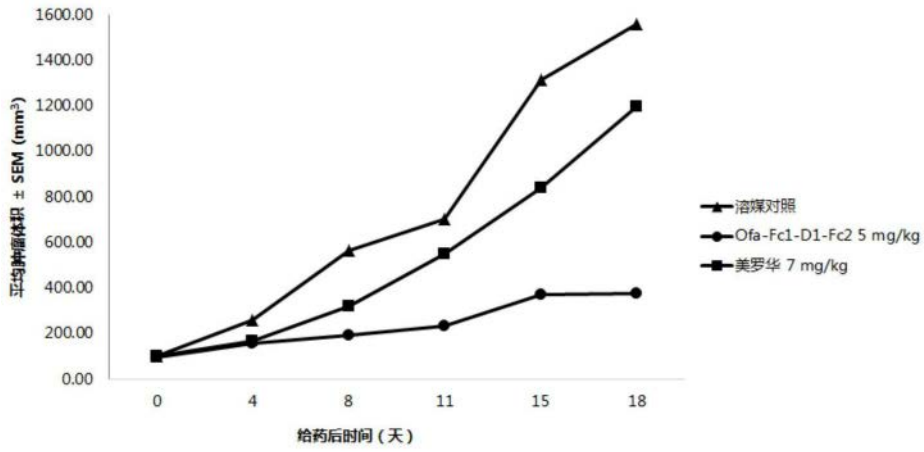


图20

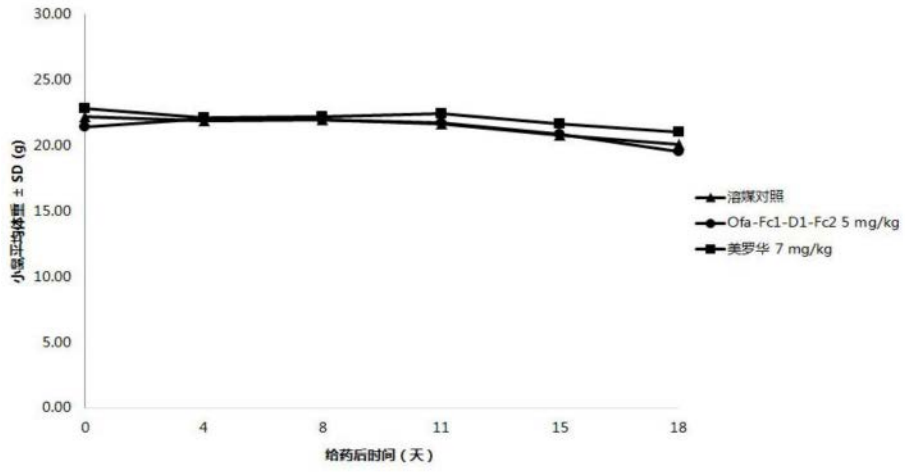


图21

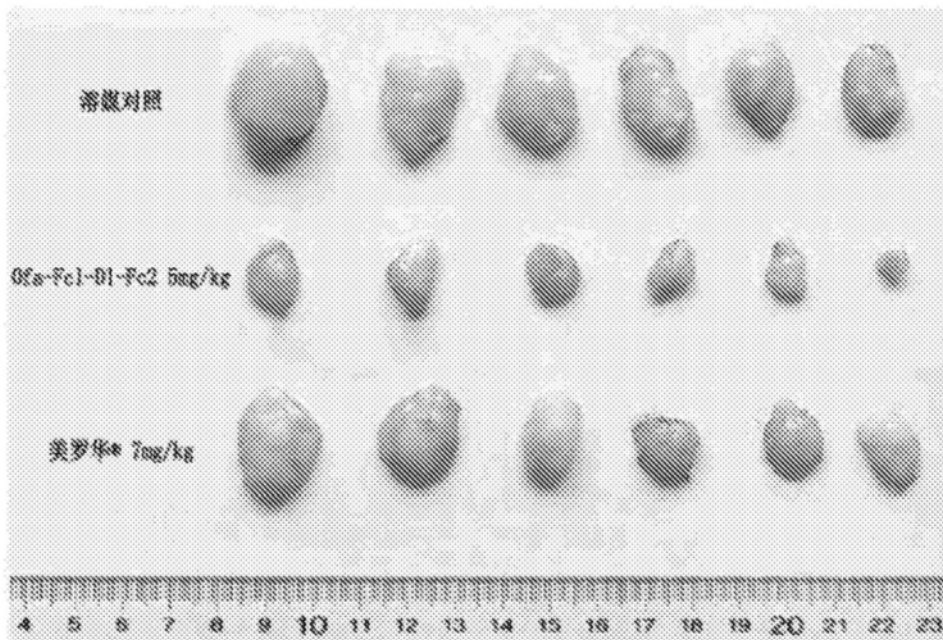


图22