

双特异性多功能融合多肽

相关申请的交叉引用

本公开要求于 2021 年 4 月 22 日提交中国专利局的申请号为“202110436970.6”名称为“抗体或其功能片段”、2021 年 7 月 30 日提交中国专利局的申请号为“202110871320.4”名称为“抗体或其功能片段”、2021 年 9 月 24 日提交中国专利局的申请号为“202111121937.0”名称为“双特异性多功能融合多肽”、2022 年 3 月 10 日提交中国专利局的申请号为“202210240917.3”名称为“双特异性多功能融合多肽”的共 4 件中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本公开中。

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体而言，涉及一种包含配体和受体的双特异性融合多肽和/多功能融合多肽。

背景技术

为了拓宽蛋白类药物的临床疗效，全球生物技术科研工作者一直在努力开发不同结构、类型的生物大分子药物。双特异性抗体是目前临床上最热门的新型生物大分子药物结构。双特异性抗体（Bispecific Antibodies, BsAb）是指可以同时结合两个不同抗原或一个抗原不同表位的抗体，可通过特有的作用方式，发挥单抗无法实现的生物学功能。

随着重组蛋白表达和基因工程技术的进步，双特异性抗体形式越来越多样化，截止目前，已有超过 20 种的双特异性抗体形式开发成技术平台。

在 IgG 型双抗的组装过程中，两条天然重链和两条天然轻链可随机产生 10 种可能的组合，其中只有一种是目标双抗产物。10 种不同双抗产物的生化特性类似，从中分离出目标双抗的难度极大，导致目标双抗产率低、纯度低，增加成本影响疗效。

双抗技术平台的核心价值在于解决重链和重链错配、轻链和重链错配的问题，解决重链与重链错配的技术平台主要有：Knob-into-Holes (KiH)、ART-Ig、链交换工程结构域（SEED）技术、XmAb。

解决重链与轻链错配的技术平台主要有：

1. 共同轻链技术：由 Genentech 于 2006 年开发，从针对多种抗原的噬菌体展示筛选中发现的抗体通常共享相同的 VL 结构域，这反映了噬菌体文库中轻链库的大小非常有限。公共轻链策略的使用简化了工业生产中的抗体工程和纯化过程。优势：解决了 LC/HC 和 HC/HC 错配的问题。不足：需要在噬菌体展示筛选中发现抗体共享的 VL，难度较大，专利申请 WO2008027236。

2. CrossMab 技术：2007 年由罗氏研发，通过交换 Fab 片段的重链和轻链结构域序列来解决轻链问题，通常有三种方式实现：交换 VH 和 VL、交换 CH1 和 CL 或交换 VH 和 VL 以及 CH1 和 CL，优势：同时结合 KiH 结构可以解决轻重链错配的问题，保留了原始抗原的亲和力，不足：表达量比较低，专利申请 WO2009080251。

解决重链与重链错配的技术已相对成熟，解决轻链与重链错配的技术仍有改进空间，有鉴于此，特提出本发明。

发明内容

本发明旨在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。

发明人提出了一种新的双特异性抗体开发思路，利用配体和受体的特异性亲和力，替换抗体或其功能片段中的 CH1 和 CL，从而避免或减少重链和轻链发生错配；进一步地，所述替换可同时或独立地选自 CH2、CH3 以及任选地 CH4，从而促进重链异二聚体地形成。另一方面，本发明提出地双特异性抗体是一种多功能融合蛋白，所述多功能融合蛋白不仅能发挥双靶点特异性，且能发挥配受体传导地生物学活性。

在一个方面，本发明提供一种双特异性融合多肽，其包含第一抗原结合部分，所述第一抗原结合部分包含：

第一多肽，所述第一多肽自 N 末端至 C 末端包含第一抗体的第一重链可变结构域 VH1，其可操作性地连接至第一缀合片段，和

第二多肽，所述第二多肽自 N 末端至 C 末端包含第一抗体的第一轻链可变结构域 VL1，其可操作地连接至第二缀合片段，

所述第一缀合片段和所述第二缀合物片段能够特异性结合；

其中，所述第一缀合物片段为受体，所述第二缀合片段为配体；或者所述第一缀合物片段为配体，所述第二缀合片段为受体。

在一些实施方式中，还包括第二抗原结合部分，所述第二抗原结合部分不同于所述第一抗原结合部分；

所述第二抗原结合部分包括：

第三多肽, 所述第三多肽自 N 末端至 C 末端包含第二抗体的第二重链可变结构域 VH2, 其可操作性地连接至第三缀合片段, 和

第四多肽, 所述第四多肽自 N 末端至 C 末端包含第二抗体的第二轻链可变结构域 VL2, 其可操作性地连接至第四缀合片段;

其中, 所述第三缀合片段和所述第四缀合物片段能够特异性结合; 所述第三缀合物片段为受体, 所述第四缀合片段为配体; 或者所述第三缀合物片段为配体, 所述第四缀合片段为受体; 和

所述第三缀合片段和/或所述第四缀合物片段与所述第一缀合物片段和/或所述第二缀合物片段选自不同的受体和配体。

在一些实施方式中, 还包括第二抗原结合部分, 所述第二抗原结合部分不同于所述第一抗原结合部分; 所述第二抗原结合部分包括:

第三多肽, 所述第三多肽自 N 末端至 C 末端包含第二抗体的第二重链可变结构域 VH2, 其可操作性地连接至抗体重链恒定区 CH1, 和

第四多肽, 所述第四多肽自 N 末端至 C 末端包含第二抗体的第二轻链可变结构域 VL2, 其可操作性地连接至抗体轻链恒定区 CL。

在一些实施方式中, 所述受体仅包含识别并结合配体的活性部位, 不包含产生应答反应的功能活性部位。

在一些实施方式中, 所述受体和配体之间包含至少一个非天然的链间键, 所述非天然链间键能够增强受体和配体间的特异性结合力; 在一些实施方式中, 所述非天然链间键形成于受体包含的第一突变残基和配体包含的第二突变残基之间; 在一些实施方式中, 所述第一和所述第二突变残基中的至少一个为半胱氨酸残基; 在一些实施方式中, 所述非天然链间键为二硫键。

在一些实施方式中, 其中至少一个天然糖基化位点在所述受体和/或配体中不存在。

在一些实施方式中, 所述受体及其配体选自白细胞介素及其受体。

在一些实施方式中, 所述白细胞介素及其受体立体构像为托举型, 选自 IL15/IL15R、IL2/IL2R、IL4/IL-4R α +R γ 、IL-6/IL-6R、IL-11/IL-11R、IL-13/IL-13R1、IL-20/IL20R α +IL20R β 和/或 IL24/IL20R α +IL20R β 。

在一些实施方式中, 所述白细胞介素及其受体立体构像为钳型, 选自 IL7/IL7R、IL21/IL21R、IL23A/IL12B。在一些实施方式中, 所述配体和受体选自 IL15 和 IL15R α 。

在一些实施方式中, 所述 IL15 第 90 位的 E 突变为 C, 且所述 IL15R α 第 67 位的 P 突变位 C。

在一些实施方式中, 所述第一重链可变结构域 VH1 与第一轻链可变结构域 VL1 之间存在非天然二硫键, 优选地, 所述第一重链可变结构域 VH1 与第一轻链可变结构域 VL1 包含以下任一突变组合:

组合	VH	VL
1	37C	95C
2	44C	100C
3	44C	101C
4	44C	105C
5	45C	87C
6	45C	98C
7	100C	50C
8	100bC	49C
9	98C	46C
10	101C	46C
11	105C	43C
12	106C	57C
13	108C	43C

在一些实施方式中, 所述 IL15 第 61 位的 D 突变为 N, 第 64 位的 E 突变为 Q, 和/或第 65 位的 N 突变位 D。

在一些实施方式中, 所述 IL15 至少一个 N 糖基化位点不存在, 优选地, 所述 N 糖基化位点选自 N71、N79 和/或 N112; 优选地, 所述 IL15 包含以下氨基酸突变: N71Q、N79Q 和/或 N112Q。

在一些实施方式中, 所述 IL15R α 至少一个 O 糖基化位点不存在, 优选地, 所述 O 糖基化位点选自 T2、T81 和/或 T86; 优选地, 所述 IL15R α 包含以下氨基酸突变: T2A、T81A 和/或 T86A。

在一些实施方式中, 所述配体和受体选自 IL2 和 IL2R α 。

在一些实施方式中, 所述 IL2 第 75 位的 S 突变为 C, 且所述 IL2R α 的 N 端延伸两个或三个氨基酸。

优选地, 所述 IL2R α 的 N 端延伸两个氨基酸时, 延伸的第 2 位氨基酸为半胱氨酸, 延伸的第 1 位氨基酸为非极性脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸、R 基不带电荷的氨基酸、R 基带正电荷的氨基酸或 R 基带负电荷的氨基酸中的任一种。

优选地,所述 IL2R α 的 N 端延伸三个氨基酸时,延伸的第 2 位氨基酸为半胱氨酸,延伸的第 1 位和第 3 位氨基酸为非极性脂肪酸氨基酸、芳香族氨基酸、R 基不带电荷的氨基酸、R 基带正电荷的氨基酸或 R 基带负电荷的氨基酸中的任一种。

在一些实施方式中,所述双特异性融合多肽包含抗体 Fc 恒定区;在一些实施方式中,所述抗体 Fc 恒定区是异源二聚体;在一些实施方式中,所述抗体 Fc 恒定区为基于 KiH、疏水相互作用、静电相互作用、亲水相互作用和/或增加的柔性而缔合成为异源二聚体;在一些实施方式中,所述抗体 Fc 恒定区包含 CH2、CH3 以及任选的 CH4,所述 CH2、CH3 和/或任选的 CH4 被替换成所述受体及其配体。

在一些实施方式中,所述第一抗原结合部分与所述第二抗原结合部分结合不同的抗原或者结合同一抗原的不同表位;在一些实施方式中,所述第一抗原结合部分靶向免疫细胞,所述第二抗原结合部分靶向肿瘤细胞;在一些实施方式中,所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分均靶向肿瘤细胞;在一些实施方式中,所述第一抗原结合部分与所述第二抗原结合部分均靶向免疫细胞。在一些实施方式中,与所述第一抗原与所述第二抗原结合后能够衔接 T 细胞和肿瘤抗原;在一些实施方式中,与所述第一抗原与所述第二抗原结合后能够衔接 NK 细胞和肿瘤抗原;在一些实施方式中,与所述第一抗原与所述第二抗原结合后能够协同抑制信号通路;在一些实施方式中,与所述第一抗原与所述第二抗原结合后能够形成蛋白复合物。

本发明还涉及分离的核酸,其编码如上所述的双特异性融合多肽。

本发明还涉及含有如上所述核酸的载体。

本发明还涉及含有如上所述核酸或者如上所述载体的宿主细胞。

本发明还涉及制备双特异性融合多肽的方法,包括:

用如上所述的载体转化宿主细胞;

培养所转化的宿主细胞;和

收集宿主细胞中表达的双特异性融合多肽。

本发明还涉及药物组合物,其包含如上所述的双特异性融合多肽,和药学上可接受的载体,赋形剂,或稳定剂。

本发明还涉及如上所述的双特异性融合多肽在制备用于治疗疾病的药物中的应用。

附图说明

图 1 为 4 种经典的双抗平台;图 1A 为 KiH 异源二聚 Fc 改造技术;图 1B 为 CrossMab 双特异性抗体技术;

图 1C 为武汉友芝友 YBody 双抗技术(非对称型 scFv 双抗);图 1D 为对称型 scFv 双抗;

图 2 为本发明提供的一种新型双特性抗体 FiBody,由具有特异性亲和力的配受体替换一侧 Fab 的 CH1、CL;

图 3 为示例性的展示 FiBody 的 4 中可行方案;图 3-1 为改造的配受体,配受体之间具有非天然存在的链间键;图 3-2 为两侧 Fab 的 CH1、CL 均被受体、配体取代,两侧选自不同的配受体;图 3-3 为抗体除一侧 Fab 的 CH1、CL 被配受体替换,Fc 二聚体中 CH3 段也被配受体替换;图 3-4 为抗体除一侧 Fab 的 CH1、CL 被配受体替换,Fc 二聚体中 CH2 也被配受体替换;其他的可行性改造方式还有很多;

图 4 为示例性的当本发明的双特异性抗体用于治疗肿瘤时,双特异性抗体的抗原结合部分的靶向结合包括示例性的 3 种类型;图 4-A 第一抗原结合部分靶向 T 细胞,第二抗原结合部分靶向肿瘤细胞;图 4-B 第一抗原结合部分和第二抗原结合部分均靶向肿瘤细胞;图 4-C 第一抗原结合部分与第二抗原结合部分均靶向 T 细胞;图 4-D 示例性的体现本发明双特性抗体可选的为三功能融合蛋白,除发挥不同的抗原结合,还能激活配受体通路,激发配受体生物学活性;

图 5 为白细胞介素及其受体的立体构像图,可以分为四类:A 类为托举型,B 类为蝴蝶结型,C 类为棒球手型,D 类为钳型;

图 6 为四类立体构像的白介素及其受体的举例,A 类托举型为 IL2/IL2R,B 类蝴蝶结型为 IL22/IL22R,C 类蝴蝶结型为 IL18/IL18R,D 类钳型为 IL21/IL21R;

图 7 为本发明实施例中基于 IL15(配体)与 IL15RA(受体)FiBody 设计,第二抗原结合区 VH 与 IL15RA 相连,第二抗原结合区 VL 与 IL15 相连;

图 8 为二硫键改造优化结构示意图;

图 9 为 IL15/IL15RA 与 IL2/IL2R β / γ C 复合物相互作用立体结构示意图;

图 10 为本发明实施例中错配分子 R1042/R1124 结构示意图;

图 11 为本发明实施例中样品 R0951 的 HPLC-SEC 检测结果;

图 12 为本发明实施例中样品 R1042 的 HPLC-SEC 检测结果;

图 13 为本发明实施例中样品 R0809 的 HPLC-SEC 检测结果;

图 14 为本发明实施例中样品 R1110 的 HPLC-SEC 检测结果;

图 15 为本发明实施例中样品 R1262 的 HPLC-SEC 检测结果。

图 16 为本发明实施例中 FCM 法检测双抗 TIGIT 端与 CHO-Tigit 细胞结合活性 (R0950、R0951、R0952、R0954、R0955、R0960)；

图 17 为本发明实施例中 FCM 法检测双抗 TIGIT 端与 CHO-Tigit 细胞结合活性 (R1123/R1119/ R1120/ R1124)；

图 18 为本发明实施例中 FCM 法检测双抗 TIGIT 端与 CHO-Tigit 细胞结合活性 (R1042/R1043)；

图 19 为本发明实施例中 FCM 法检测双抗 TIGIT 端与 CHO-Tigit 细胞结合活性 (R0810)；

图 20 为本发明实施例中 FCM 法检测双抗 TIGIT 端与 CHO-Tigit 细胞结合活性 (R1262)；其中，hIgG1 为亚型对照抗体。

图 21 为本发明实施例中 FCM 法检测双抗 PD-L1 端与 CHO-PD-L1 细胞结合活性 (R0950、R0951、R0952、R0954、R0955、R0960)；

图 22 为本发明实施例中 FCM 法检测双抗 PD-L1 端与 CHO-PD-L1 细胞结合活性 (R1072、R1115-R1120、R1123-R1124)；

图 23 为本发明实施例中 FCM 法检测双抗 PD-L1 端与 CHO-PD-L1 细胞结合活性 (R0950、R1042、R1043)；

图 24 为本发明实施例中 FCM 法检测双抗 PD-L1 端与 CHO-PD-L1 细胞结合活性 (R1072、R1081-R1086)；

图 25 为本发明实施例中 FCM 法检测双抗 PD-L1 端与 CHO-PD-L1 细胞结合活性 (R1072、R1109-R1111)；

图 26 为本发明实施例中 FCM 法检测双抗 PD-L1 端与 CHO-PD-L1 细胞结合活性 (R1262)；

图 27 为本发明实施例中 R1262 对配体与靶向区结合力的阻断检测结果；

图 28 为本发明实施例中样品受配体复合物 (IL15/IL15R) 的结合活性 (R0950、R0951、R0952、R0954、R0955、R0960)；

图 29 为本发明实施例中样品受配体复合物 (IL15/IL15R) 的结合活性 (R1042、R1043)；

图 30 为本发明实施例中二硫键改造优化样品凝胶电泳检测结果 (R1072、R1081、R1082、R0954、R1084-R1086)；

图 31 为本发明实施例 9 制备得到的 FiBody 样品 (实施例 8 对应构建的二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 1 和 2、IL2/IL2R α 复合物 3) 和实施例 2 的 R1115 的凝胶电泳检测结果；其中，复合物 1 和 2 为二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物，复合物 3 为现有报道的 IL2/IL2R α 复合物，复合物 4 为二硫键未改造 IL2/IL2R α 复合物 (样品 R1115)。

图 32 为本发明实施例 14 中制备的纯化后的二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 5、6、7、8 以及复合物 1 的凝胶电泳检测结果，二硫键未改造 IL2/IL2R α 复合物 4 作为对照。

图 33 为本发明实施例 14 中制备的纯化后的二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 9、10、11、12、13 以及复合物 1 的凝胶电泳检测结果，二硫键未改造 IL2/IL2R α 复合物 4 作为对照。

具体实施方式

现将详细地提供本发明实施方式的参考，其一个或多个实例描述于下文。提供每一实例作为解释而非限制本发明。实际上，对本领域技术人员而言，显而易见的是，可以对本发明进行多种修改和变化而不背离本发明的范围或精神。例如，作为一个实施方式的部分而说明或描述的特征可以用于另一实施方式中，来产生更进一步的实施方式。在本发明中引用的所有文献，包括公开出版物、专利和专利申请，都通过引用的方式全文并入本文。

除非另有定义，本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的，不是旨在限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

术语解释：

术语“抗原结合部分”或“抗原结合结构域”意指对抗原决定簇赋予其结合特异性的抗原结合分子的部分。在一些实施方案中，所述“抗原结合部分”为抗体功能片段。

术语“氨基酸”意指由 DNA 和 RNA 编码的 20 个天然存在的氨基酸之一。

非极性脂肪族氨基酸的单字母缩写分别为甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)；芳香族氨基酸的单字母缩写分别为苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)；R 基不带电荷的氨基酸的单字母缩写分别为丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、半胱氨酸(C)、脯氨酸(P)、天冬氨酸(N)、谷氨酰胺(Q)；R 基带正电荷的氨基酸的单字母缩写分别为赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H)；R 基带负电荷的氨基酸的单字母缩写分别为天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)。

术语“野生型或 WT”意指在自然界发现的氨基酸序列或核苷酸序列，包含等位变异。WT 蛋白质具有未经过有意修饰的氨基酸序列或核苷酸序列。

术语“抗体”涵盖任意可结合某特定抗原的免疫球蛋白、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体、双特异性(双价)抗体或双特异性融合多肽。一个天然的完整抗体包含两条重链和两条轻链。每条重链由一个

可变区(“HCVR”)以及第一、第二和第三恒定区(分别为CH1、CH2、CH3)组成,而每条轻链由一个可变区(“LCVR”)以及一个恒定区(CL)组成。哺乳动物的重链可分为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ,哺乳动物的轻链可分为 λ 或 κ 。

抗体呈“Y”型,主干由两条重链的第二(CH2)、第三(CH3)以及任选地第四恒定区(CH4)组成,其通过二硫键结合。“Y”型结构的每条臂包含其中一条重链的可变区(VH)和第一恒定区(CH1),其与一条轻链的可变区(VL)和恒定区(CL)结合。轻链和重链的可变区负责抗原的结合。每条链的可变区均含有三个高变区,称互补决定区(CDR)(轻(L)链的CDR包含LCDR1、LCDR2、LCDR3,重(H)链的CDR包含HCDR1、HCDR2、HCDR3。其中,三个CDR由被称为框架区(FR)的侧面连续部分间隔开,框架区比CDR更加高度保守并形成一个支架支撑超变环。HCVR和LCVR各包含4个FR,并且CDR和FR自氨基端至羧基端依以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

重链和轻链的恒定区不参与抗原结合,但具有多种效应功能。抗体依据重链恒定区的氨基酸序列可以分成几类。根据是否含有 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链,抗体可分别分为五个主要的分类或异形体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。几个主要的抗体分类还可分为亚类,如IgG1(γ 1重链)、IgG2(γ 2重链)、IgG3(γ 3重链)、IgG4(γ 4重链)、IgA1(α 1重链)或IgA2(α 2重链)等。

高变区通常包含来自轻链可变区中约氨基酸残基24-34(LCDR1;“L”表示轻链)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)以及重链可变区中约31-35B(HCDR1;“H”表示重链)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3)的氨基酸残基;Kabat等人,《免疫学相关蛋白质的序列(SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST)》,第5版,马里兰州贝塞斯达美国国家卫生研究院公共卫生服务部(Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)(1991)和/或那些形成高变环的残基(例如轻链可变区中的残基26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和91-96(LCDR3)以及重链可变区中的26-32(HCDR1)、53-55(HCDR2)和96-101(HCDR3);Chothia和Lesk(1987)《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.》196: 901-917。

在一些实施方式中,所述抗体为双特异抗体(BiAb)。术语“双特异性”在本文中是指两种不同抗原,或甚至当这两者是相同抗原时,它们每一个都具有针对不同表位的结合特异性。所述表位可以源自不同抗原或相同抗原。术语“双特异性融合多肽”和“双特异性抗体”在本文中是指所有制得的具有全长抗体或带抗原结合位点的片段的产物。所述抗体可以是人抗体,非人抗体(如小鼠来源抗体),人源化抗体,或嵌合抗体(如人-小鼠嵌合抗体或不同亚型抗体的嵌合)。在一些情况下,抗体的变体是在本发明所提供的抗体序列上发生保守修饰或保守置换或取代所得到的。“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸,使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓,一般而言,多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性(参见例如Watson等(1987)Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co.,第224页,(第4版))。另外,结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。所属领域技术人员将能够使用熟知的技术确定如本文所阐明的抗原结合分子的合适变体。对于核苷酸和氨基酸序列,术语“同一性”表明当具有适当的插入或缺失的情况下最佳比对和比较时两个核酸或两个氨基酸序列之间的同一性程度。

术语“Fab”为免疫球蛋白中不含或含一小部分残余Fc片段的Fab片段,例如,Fab片断包括重链和轻链的可变区、以及所有或部分的第一恒定域。出于简单,后文中的术语“Fab”也可指诸如F(ab)2这样的片段。

术语“Fc”或“Fc区”或“Fc结构域”意指包含抗体的恒定区,在一些情况下排除第一恒定区免疫球蛋白结构域(例如CH1)或其一部分的全部或一部分,并且在一些情况下进一步排除铰链的全部或一部分的多肽。因此,Fc可指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域(例如CH2和CH3),IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域,以及任选地这些结构域的柔性铰链N端的全部或一部分。对于IgA和IgM,Fc可以包含J链。对于IgG来说,Fc结构域包含免疫球蛋白结构域CH2和CH3(C γ 2和C γ 3)以及位于CH1(C γ 1)与CH2(C γ 2)之间的较低铰链区。尽管Fc区的边界可以变化,但是人类IgG重链Fc区通常被定义为包括其羧基端的残基E216、C226或A231,其中编号根据如Kabat中的EU索引。在一些实施方案中,如下文更全面地描述,对Fc区进行氨基酸修饰,例如所述Fc为异源二聚体。

本文的“修饰”是指多肽序列中的氨基酸取代、插入和/或缺失或与蛋白质化学连接的部分的改变。本文的“氨基酸修饰”是指多肽序列中的氨基酸取代、插入和/或缺失。为清楚起见,除非另外指出,否则氨基酸修饰始终是由DNA编码的氨基酸,例如在DNA和RNA中具有密码子的20个氨基酸。

“表位”在本文中意指与特定抗原结合结构域,例如抗体分子的可变区(称为互补位)相互作用的决定子。表位是例如氨基酸或糖侧链的分子的分组,并且通常具有特定的结构特征以及特定的电荷特征。单个分子可具有超过一个表位。表位可以包含直接参与结合的氨基酸残基(也称为表位的免疫显性组分)和不直接参与结合的其它氨基酸残基,例如被特异性抗原结合肽有效阻断的氨基酸残基;换句话说,氨基酸残基在特异性抗原结合肽的覆盖面积内。表位可以是构形的也可以是线性的。构形表位是由来自线性多肽链的不同

区段的氨基酸空间并置而产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。构形和非构形表位的区别可以在于在变性溶剂存在下，与前者而非后者的结合丧失。表位通常包括独特空间构象中的至少 3 个，并且更通常至少 5 个或 8-10 个氨基酸。识别相同表位的抗原结合分子可以在简单的免疫分析中验证，显示一种抗原结合分子阻断另一种抗原结合分子与靶抗原结合的能力。如下所概述，本发明不仅包括本文中所列举的抗原结合分子和抗原结合结构域，还包括与所列举的抗原结合分子或抗原结合结构域结合的表位竞争结合的抗原结合分子和抗原结合结构域。

术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异地结合”是指有指向的、能被相应物质竞争阻断的某种配基在体外或体内与特异结构位点相互作用的生物结合过程。如抗原和抗体或受体和配体之间的结合。

特异性结合的强度或亲和力可以根据相互作用的解离常数(KD)表示，其中较小的 KD 表示较大的亲和力，并且较大的 KD 表示较低的亲和力。例如 KD 为至少约 10^{-4} M、至少约 10^{-5} M、至少约 10^{-6} M、至少约 10^{-7} M、至少约 10^{-8} M、至少约 10^{-9} M、替代地至少约 10^{-10} M、至少约 10^{-11} M、至少约 10^{-12} M、或更大的抗原结合力来展现。结合特性可以通过所属领域众所周知的方法，例如生物层干涉测量法和基于表面等离子共振的方法来确定。一种这样的方法需要测量抗原结合位点/抗原或受体/配体复合物缔合和解离的速率，其中速率取决于复合物搭配物的浓度、相互作用的亲和力以及在两个方向上同等地影响速率的几何参数。因此，可以确定缔合速率(k_a)和解离速率(k_d)，并且 k_d/k_a 的比例等于解离常数 KD(《自然(Nature)》361: 186-187(1993)和 Davies 等人(1990)《生物化学年鉴(Annual RevBiochem)》59: 439-473)。

术语“免疫细胞”包括参与保护机体抵抗传染性疾病和外来物质二者的免疫系统的细胞。免疫细胞可以包括例如嗜中性粒细胞，嗜酸性粒细胞，嗜碱性粒细胞，淋巴细胞，如 B 细胞和 T 细胞，和单核细胞。T 细胞可以包括例如，CD4+、CD8+、T 辅助细胞、细胞毒性 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、调节性 T 细胞、抑制性 T 细胞和天然杀伤细胞。

术语“多功能融合多肽”意指设计来靶向两个或更多个抗原的非天然存在的结合分子。本文所述的“多功能融合多肽”通常是遗传工程化的融合蛋白，其经设计以将两个不同的所需的生物学功能带入单个结合分子。例如，多功能融合多肽可以是多功能结合分子。

术语“FiBody”，是利用配体及其受体特异性亲和力取代双特异性抗体部分或全部恒定区，从而得到的双特异性融合多肽或多功能融合蛋白。

本发明中提到的“YBody”技术由武汉友芝友公司于 2012 年开发，该技术是在“Knob-into-Holes”技术的基础上，形成异源二聚体的其中一条为正常重链，另外一条为 Fc 功能区的 N 端链接 scFv，形成了不对称的双特异性抗体。

术语“约”或“大约”是指与参照定量、水平、值、数量、频率、百分比、维度、大小、量、重量或长度相差 30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1% 的定量、水平、值、数量、频率、百分比、维度、大小、量、重量或长度。在特定实施方式中，当术语“约”或“大约”位于数值之前时，表示所述值加上或减去 15%、10%、5% 或 1% 的范围。

除非上下文另有规定，词语“包含”、“包括”和“含有”将被理解为表示包括所述的步骤或要素或一组步骤或要素，但不排除任何其他步骤或要素或一组步骤或要素。“由……组成”所表示的是包括并且限于短语“由……组成”所接的内容。因此，短语“由……组成”表示所列出的要素是需要的或必需的，并且没有其他要素可存在。“基本由……组成”所表示的是包括列于此短语之后的任意要素，并且限于有助于或不妨碍所列出的要素的如在本发明中详述的活性或作用的其他要素。因此，短语“基本由……组成”表示所列出的要素是需要的或必需的，但其他要素是可选地并可取决于其是否影响所列出的要素的活性或作用而存在或不存在。

在本发明全文中提及的“一个实施方式”、“实施方式”、“特定实施方式”、“相关实施方式”、“某种实施方式”、“另外的实施方式”或“进一步的实施方式”或其组合表示所描述的与所述实施方式相关的特定特征、结构或特性包含于本发明的至少一个实施方式中。因此，在本说明书全文各处出现前述用语未必都指同一实施方式。此外，所述特定特征、结构或特性可在一个或多个实施方式中以任意适宜方式组合。

术语“任选地”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性。由此，限定有“任选地”的特征可以明示或者隐含地包括或不包括该特征。

在说明书和权利要求中的术语“第一”、“第二”用于区分相似元素，而不一定用于描述顺序或时间次序。应当理解，如此使用的术语在合适环境下是可互换的，并且本文描述的本发明的实施方案能够以与本文描述或举例说明不同的其他顺序操作。

双特异性融合多肽

本发明提供了新的双特异性融合多肽，其包含配体（或其片段）及其受体（或其片段），所述配体（或其片段）及其受体（或其片段）分别独立地替换抗体一侧 Fab 的 CH1 和 CL，具体地，所述双特异性融合多肽包含第一抗原结合部分，所述第一抗原结合部分包含：第一多肽，所述第一多肽自 N 末端至 C 末端包

含第一抗体的第一重链可变结构域 VH1，其可操作性地连接至第一缀合片段；

第二多肽，所述第二多肽自 N 末端至 C 末端包含第一抗体的第一轻链可变结构域 VL1，其可操作性地连接至第二缀合片段，

其中，所述第一缀合物片段为受体，所述第二缀合片段为配体；或者所述第一缀合物片段为配体，所述第二缀合片段为受体。

所述双特异性融合多肽还包含第二抗原结合部分，所述第二抗原结合部分与第一抗原结合部分不同。对于第二抗原结合部分可选的多肽融合方式包括选自：

1. 抗体另一侧 Fab 的 CH1 和 CL 被另一种配体（或其片段）及其受体（或其片段）替换，即

所述第二抗原结合部分包括：第三多肽，所述第三多肽自 N 末端至 C 末端包含第二抗体的第二重链可变结构域 VH2，其可操作性地连接至第三缀合片段，和

第四多肽，所述第四多肽自 N 末端至 C 末端包含第二抗体的第二轻链可变结构域 VL2，其可操作性地连接至第四缀合片段；

所述第三缀合物片段为受体，所述第四缀合片段为配体；或者所述第三缀合物片段为配体，所述第四缀合片段为受体；和

所述第三缀合片段和/或所述第四缀合物片段与所述第一缀合物片段和/或所述第二缀合物片段选自不同的受体和配体。

2. 抗体另一侧 Fab 保留原来的 CH1 和 CL，即，

所述第二抗原结合部分包括：第三多肽，所述第三多肽自 N 末端至 C 末端包含第二抗体的第二重链可变结构域 VH2，其可操作性地连接至抗体重链恒定区 CH1，和

第四多肽，所述第四多肽自 N 末端至 C 末端包含第二抗体的第二轻链可变结构域 VL2，其可操作性地连接至抗体轻链恒定区 CL。

本发明利用配体及其受体本身特有的特异性结合力，将其创造性地与抗原结合区（抗体可变区）可操作性地连接，所述连接包括与其中之一抗原结合区连接，另一抗原结合区仍与 CH1 和 CL 连接；或者两种抗原结合区都与配受体连接，只是两种抗原结合区连接不同种类地配受体，从而避免不同抗原结合区发生错配。

在一些实施方式中，本发明提供的双特异性融合多肽是一种多功能融合多肽，其包含抗体 Fab，所述 Fab 包含两种不同的抗原结合部分，第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，其特征在于，所述 Fab 一侧的 CH1 和 CL 独立地被配体及其受体所取代，所述 Fab 的另一侧 CH1 和 CL 未被取代，所述受体既包含识别并结合配体的活性部位，也包含产生应答反应的功能活性部位；所述第一抗原结合部分的轻链不会与所述第二抗原结合部分的重链错配。在一些实施方式中，所述 Fab 的另一侧 CH1 和 CL 独立地被第二配体及其受体取代，所述第一配体及其受体与所述第二配体及其受体不同。

所述多功能融合蛋白不仅能发挥双靶点特异性，且能发挥配受体传导地生物学活性。例如，在某个特定的实施方式中，所述配体及其受体为 IL15 和 IL15R α ，所述多功能融合多肽除具有双靶点靶向作用外，IL15R α 还能将 IL-15 递呈给 IL-2/15R $\beta\gamma$ 二聚体形成三元复合物，激活 JAK 和 STAT 信号通路，促进靶细胞增殖与活化、IFN- γ 、TNF- α 分泌水平提升；JAK/STAT，Ras/MAPK—增强增殖信号；Bcl-2、Bcl-XL(抗凋亡蛋白)的上调、Bim、Puma(促凋亡蛋白)的下调--减弱凋亡信号。

i. 配体和受体

“受体 (receptor)”是细胞膜上或细胞内能识别生物活性分子并与之结合的物质，能与受体结合的生物活性物质统称为“配体 (ligand)”。

根据受体在细胞中的位置，将其分为细胞表面受体和细胞内受体两大类。受体本身至少含有两个活性部位：一个是识别并结合配体的活性部位；另一个是负责产生应答反应的功能活性部位，这一部位只有在与配体结合形成二元复合物并变构后才能产生应答反应，由此启动一系列的生化反应，最终导致靶细胞产生生物效应。

受体一般为糖蛋白，野生型受体与配体之间的结合不通过共价键介导，主要靠离子键、氢键、范德华力和疏水作用而相互结合。受体在与配体结合时，具有饱和性、高亲和性、专一性等特性。

互相配合的受体和配体具有相对特异结合的亲和力，以及任选的生物学效应。在一些实施方式中，所述受体仅包含识别并结合配体的活性部位，不包含产生应答反应的功能活性部位（例如激活下游信号通路的生物学效应的功能）。在一些实施方式中，所述受体和/或配体为天然的受配体结构，所述受体既包含识别结合配体的活性部位，又包含负责产生应答反应的功能活性部位，能够发挥相应的生物学功能，所述双特异性融合蛋白是一种多功能融合蛋白，不仅具有双特异性，而且能发挥配受体功能。

在一些实施方式中，所述受体和/或配体在天然序列的基础上做了修饰，所述修饰包括但不限于：截短、插入和/或突变；这些修饰的目的包括但不限于：增加或降低配体和受体的结合力；增强、降低或消除配体受体的生物学功能；增加、减少或消除受体和/或配体蛋白中的糖基化位点；降低或消除受配体毒性。

在一些实施方式中,所述受体和/或配体的氨基酸序列各自独立地由 10~1000 个氨基酸组成;在一些实施方式中,所述受体和/或配体的氨基酸序列各自独立地由 20~800 个氨基酸组成;在一些实施方式中,所述受体和/或配体的氨基酸序列各自独立地由 30~600 个氨基酸组成;在一些实施方式中,所述受体和/或配体的氨基酸序列各自独立地由 40~400 个氨基酸组成;在一些实施方式中,所述受体和/或配体的氨基酸序列各自独立地由 50~300 个氨基酸组成;在一些实施方式中,所述受体和/或配体的氨基酸序列各自独立地由 55~260 个氨基酸组成。例如,受体和/或配体的氨基酸序列也可以独立地选自 20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900 个氨基酸。

在一些实施方式中,所述受体和/或配体分子量各自独立地选自 1KD~100KD;在一些实施方式中,所述受体和/或配体分子量各自独立地选自 2KD~80KD;在一些实施方式中,所述受体和/或配体分子量各自独立地选自 3KD~70KD;在一些实施方式中,所述受体和/或配体分子量各自独立地选自 4KD~60KD;在一些实施方式中,所述受体和/或配体分子量各自独立地选自 4KD~50KD;在一些实施方式中,所述受体和/或配体分子量各自独立地选自 4KD~40KD;在一些实施方式中,所述受体和/或配体分子量各自独立地选自 5KD~30KD。例如,受体和/或配体的分子量可以独立地选自 1KD、2KD、3KD、4KD、4.5KD、5KD、6KD、7KD、8KD、9KD、10KD、11KD、15KD、18KD、20KD、25KD、30KD、35KD、40KD、45KD、50KD、60KD、70KD、80KD、90KD、100KD。

受体(或其片段)和其相应的配体(或其片段)的结合方式可以是共价结合、非共价相互作用或其组合;非共价键的例子包括,但不限于,氢键、疏水键、离子键、和范德华键。在一些实施方式中,当被插入或替换的缀合片段之间的亲和力低于预期时(例如不能拉近抗原结合部分中的两个可变区以使其获得特异性识别抗原的功能,或者不能防止 2 个或多个重链恒定区之间的重链错配,或者不能防止抗原结合部分之间错配以实现特定 VL-VH 部分的组合),可以通过对抗体所述配体和/或受体进行改造以增加亲和力。在一些实施方式中,所述受体和配体之间包含至少一个非天然的链间键,所述非天然链间键能够增强受体和配体间的特异性结合力;在一些实施方式中,所述非天然链间键形成于受体包含的第一突变残基和配体包含的第二突变残基之间;在一些实施方式中,所述第一和所述第二突变残基中的至少一个为半胱氨酸残基;在一些实施方式中,所述非天然链间键为二硫键。

在一些实施方式中,其中至少一个天然糖基化位点在所述受体和/或配体中不存在。

在一些实施方式中,所述受体和配体选自白细胞介素及其受体。

发明人对大量的白细胞介素及其受体进行了立体构像研究,发现大量的白细胞介素或 IFN 类分子立体构像可以分为 4 类: A 类-托举型、B 类-蝴蝶结型、C-棒球手型、D 类-钳型,如表 3 所示:

表 3

白细胞介素名称	立体构像分类	配体	配体大小	受体	受体大小
白细胞介素 1 α		IL-1 α	160a.a.	IL-1R	310a.a.
白细胞介素 1 β	C	IL-1 β	155a.a.	IL1R1+IL1R2	310a.a.
白细胞介素 2	A	IL-2	133a.a.	IL-2R α +IL2R β +R γ	220 a.a.
白细胞介素 3	C	IL-3	132a.a.	IL-3R	286a.a.
白细胞介素 4	A	IL-4	128 a.a.	IL-4R α +R γ	206a.a.
白细胞介素 5	D	IL-5	115a.a.	IL-5R	321a.a.
白细胞介素 6	A	IL-6	182a.a.	IL-6R	345a.a.
白细胞介素 7	D	IL-7	152a.a.	IL-7R	218a.a.
白细胞介素 8		IL-8/CXCL8	77a.a.	IL-8RA/ IL-8RB	350a.a./ 360a.a.
白细胞介素 9		IL-9	136a.a.	IL-9R	230a.a.
白细胞介素 10	B	IL-10	160a.a.	IL-10R1	224a.a.
白细胞介素 11	A	IL-11	178a.a.	IL-11R	346a.a.
白细胞介素 12		IL-12 α /p35	197a.a.	IL-12 β	306a.a.
白细胞介素 12		IL-12 β /p40	306a.a.	IL23A+IL23R+IL12RB1	
白细胞介素 13	A	IL-13	122a.a.	IL-13R1	321a.a.
白细胞介素 15	A	IL-15	114a.a.	IL-15R α	175a.a.
白细胞介素 17		IL-17/CTLA8	132a.a.	IL-17R+IL-17RA	287a.a.
白细胞介素 18	C	IL-18	157a.a.	IL18R1	164a.a.
白细胞介素 19		IL-19	177 a.a.	IL20R α +IL20R β	
白细胞介素 20	A	IL-20	152a.a.	IL20R α +IL20R β	
白细胞介素 21	D	IL-21	138a.a.	IL21R	213 a.a.

白细胞介素 23	D	IL-23A/p19	170a.a.	IL12B	306a.a.
白细胞介素 24	A	IL24	155a.a.	IL20R α +IL20R β	
白细胞介素 27		IL-27A/p28	215a.a.	IL-27B	209 a.a.

在一些实施例中,所述配体及其受体选自 A 类白细胞介素及其受体,例如 IL15/IL15R、IL2/IL2R、IL4/IL-4R α +R γ 、IL-6/IL-6R、IL-11/IL-11R、IL-13/IL-13R1、IL-20/IL20R α +IL20R β 、IL24/IL20R α +IL20R β 。

在一些实施例中,所述配体及其受体选自 D 类白细胞介素及其受体,例如 IL7/IL7R、IL21/ IL21R、IL23A/IL12B。

在一些实施方式中,所述白细胞介素及其受体具有如下表氨基酸序列:

细胞因子或其受体	序列
IL2 (人,成熟形式氨基酸序列) -133a.a.	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK HLQCLEEEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYAD ETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO.21)
IL2R α (人, IL2R α 胞外结构域的成熟形式氨基酸序列) -219a.a.	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSSHSS WDNQCQCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREP PPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQP QLICTGEMETSQFPGEKPKASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFT TEYQ (SEQ ID NO.22)
IL2R α (人, IL2R α 胞外结构域的成熟全截短形式氨基酸序列) -166a.a.	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSSHSS WDNQCQCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREP PPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQP QLICTGE (SEQ ID NO.23)
IL2R α (人, IL2R α 胞外结构域的成熟半截短形式氨基酸序列) -191a.a.	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRELCDPPEIPHATFKAMAYKE GTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSSHSSWDNQCQCTSSATRNNTTKQVTP QPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVY YQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKAS PEGRPESETS (SEQ ID NO.24)
IL-15 (人,成熟形式氨基酸序列) -114a.a.	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESG DASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFI NTS (SEQ ID NO.25)
IL-15R α (人,胞外区氨基酸序列) -175a.a.	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH WTPSLKCIKDPALVHQRPAAPPSTVTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAA TTAAIVPGSQLMPSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVY PQHSDTT (SEQ ID NO.26)
IL-15R α sushi (人, sushi domain 氨基酸序列) -77a.a.	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH WTPSLKCIKDPALVHQRPAAPP (SEQ ID NO.27)
IL-15R α sushi (人, sushi domain 氨基酸序列) -65a.a.	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH WTPSLKCIK (SEQ ID NO.28)
IL-15R α sushi (人, sushi domain 氨基酸序列) -73a.a.	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH WTPSLKCIKDPALVHQR (SEQ ID NO.29)
IL-15R α sushi (人, sushi domain 氨基酸序列) -86a.a.	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH WTPSLKCIKDPALVHQRPAAPPSTVTAGVT (SEQ ID NO.30)
IL-15R α sushi (人, sushi domain 氨基酸序列) -102a.a.	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH WTPSLKCIKDPALVHQRPAAPPSTVTAGVTPQPESLSPSGKEPAAS (SEQ ID NO.31)

在一些实施方式中,所述受体-配体的组合选自 IL15 与 IL15R α ,在本发明“IL15R α ”和“IL15RA”可以互换。

在一些实施方式中,所述 IL15 和 IL15R α 包含至少一个非天然的链间键,在一些实施方式中,所述非天然链间键为二硫键,所述 IL15 和/或所述 IL15R α 至少包含一个氨基酸突变为半胱氨酸,在一些实施方式中,所述突变位于 IL-15 和 IL15R α 的接触界面上,在一些实施方式中,所述 IL15 的半胱氨酸突变选自 E90C,所述 IL15R α 的半胱氨酸突变选自 P67C。IL15 所述氨基酸位置参照(SEQ ID NO.26), IL15R α 所述氨基酸

位置参照(SEQ ID NO.27)。

在一些实施方式中,至少一个天然糖基化位点在所述 IL15 或 IL15R α 中不存在,在一些实施方式中,所述糖基化位点为 N 糖基化位点,在一些实施方式中,所述 IL15 至少包含以下之一氨基酸突变: N71Q, N79Q 或 N112Q; 在一些实施方式中,所述糖基化位点为 O 糖基化位点,在一些实施方式中,所述 IL15R α 至少包含以下之一氨基酸突变: T2A、T81A 和/或 T86A。

在一些实施方式中,所述受体-配体的组合选自 IL2 与 IL2R α 。

在一些实施方式中,所述 IL2 和 IL2R α 包含至少一个非天然的链间键,在一些实施方式中,所述非天然链间键为二硫键,所述 IL2 和/或所述 IL2R α 至少包含一个氨基酸突变为半胱氨酸,在一些实施方式中,所述 IL2 第 75 位的 S 突变为 C,且所述 IL2R α 的 N 端延伸两个或三个氨基酸。

在一些实施方式中,所述 IL2R α 的 N 端延伸两个氨基酸时,延伸的第 2 位氨基酸为半胱氨酸,延伸的第 1 位氨基酸为非极性脂肪酸氨基酸、芳香族氨基酸、R 基不带电荷的氨基酸、R 基带正电荷的氨基酸或 R 基带负电荷的氨基酸中的任一种。

在一些实施方式中,所述 IL2R α 的 N 端延伸三个氨基酸时,延伸的第 2 位氨基酸为半胱氨酸,延伸的第 1 位和第 3 位氨基酸为非极性脂肪酸氨基酸、芳香族氨基酸、R 基不带电荷的氨基酸、R 基带正电荷的氨基酸或 R 基带负电荷的氨基酸中的任一种。IL2 所述氨基酸位置参照(SEQ ID NO.21), IL2R α 所述氨基酸位置参照(SEQ ID NO.22 或 SEQ ID NO.23)。

互相配合的受体(或其片段)以及配体(或其片段)的插入或替换位置可以位于,例如:

受体或其片段插入或替换 CL 区,配体或其片段插入或替换 CH1 区;或

受体或其片段插入或替换 CH1 区,配体或其片段插入或替换 CL 区。

ii. 抗原结合部分

本发明提供的双特异性融合多肽,包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分,具有两种抗原特异性,第一抗原结合部分与第二抗原结合部分是不同的,可以是第一抗原结合部分与第二抗原结合部分结合不同的抗原,也可以是第一抗原结合部分与第二抗原结合部分结合相同抗原的不同表位。

在一些实施方式中,所述双特异性融合蛋白针对的靶标是肿瘤。在一些实施方式中,第一抗原结合部分与第二抗原结合部分结合的靶点都在肿瘤细胞表达;在一些实施方式中,第一抗原结合部分结合的靶点在肿瘤细胞,第二抗原结合部分结合的靶点在免疫细胞;在一些实施方式中,第一抗原结合部分与第二抗原结合部分结合的靶点都在免疫细胞。

T 细胞重定向杀伤是许多治疗领域中理想的作用机制。在临床前和临床试验中,各种双特异性抗体形式参与 T 细胞重定向(May C 等人(2012) Biochem Pharmacol, 84 (9): 1105 年至 1112 年,第;弗兰克尔 SR, 和 Baueurle PA, (2013) CURR OPIN 化学生物学,第 17 卷 (3): 385-92, 页)。所有 T 细胞重新靶向的双特异性抗体或其片段已被工程化以具有至少两个抗原结合位点,其中一个位点与靶细胞上的表面抗原结合另一个位点与 T 细胞表面抗原结合。在 T 细胞表面抗原中,源自 TCR 蛋白质复合物的人 CD3 的 ϵ 亚基最常被靶向作为重定向 T 细胞杀伤的靶标。

可被靶向的肿瘤相关抗原包括但不限于: α -胎蛋白(AFP)、 α -辅肌动蛋白-4、A3、对 A33 抗体有特异性的抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、碳酸酐酶 IX、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA-4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、结肠特异性抗原 p(CSAp)、CEA(CEACAM5)、CEACAM6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1(TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、成纤维细胞生长因子(FGF)、Flt-1、Flt-3、叶酸盐受体、G250 抗原、Claudin18.2、GAGE、gp100、GRO- β 、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)和其亚基、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、PAM4 抗原、胰腺粘蛋白、PD-1 受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PlGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活素、存活素-2B、TAC、TAG-72、髓生蛋白、TRAIL 受体、TNF- α 、Tn 抗原、Thomson-Friedenreich 抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B 纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子 C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标记物、bcl-2、bcl-6、Kras、致癌基因标记物以及致癌基因产物(参见,例如 Sensi 等人, Clin Cancer Res2006, 12: 5023-32; Parmiani

等人, JImmunol2007, 178: 1975-79; Novellino 等人 Cancer Immunol Immunother2005, 54: 187-207)。

虽然对于效应 T 细胞具有特异性的抗体或其它结合分子优选地结合至 CD3 抗原,但是在效应 T 细胞上表达的其它抗原是已知的并且可由 T-细胞重定向复合物靶向。示例性 T-细胞抗原包括但不限于, CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD69 和 CD90。

免疫检查点是免疫系统中的抑制途径,其对维持自身耐受性和调节外周组织中生理性免疫应答的持续时间和幅度以使附带组织损伤最小化至关重要。在一些实施方式中,第一抗原结合部分与第二抗原结合部分结合的靶点均为免疫检查点或其配体,所述免疫检查点分子包括但不限于: TIGIT、PD-1、TIM-3、LAG3、GTLA4、BTLA、BTN1A1、VISTA、LAIR、CD96、PVRIG、LILRA3、LILRA4、LILRB1、LILRB2、LILRB3、LLRB4、NKG-2A、CD47、CD200R1、CD300、Dectin-1、ICOS、Nkp30、CD28、CD28H、CRTAM、DNAM-1、4-1-BB、BAFF、CD27、CD30、CD40、DR3、GITR、HVEM、LIGHT、OX40、TACI、2B4、CD2、CD48、CD229、SLAM、SLAMF5、GRAAC、TIM1、TIM4、CD7、DPPIV。

在一些实施方式中,第一抗原结合部分结合的靶点为 PD-1,第二抗原结合部分结合的靶点为 PD-L1;在一些实施方式中,第一抗原结合部分结合的靶点为 PD-1,第二抗原结合部分结合的靶点为 TIGIT;在一些实施方式中,第一抗原结合部分结合的靶点为 PD-1,第二抗原结合部分结合的靶点为 GTLA4;在一些实施方式中,第一抗原结合部分结合的靶点为 PD-1,第二抗原结合部分结合的靶点为 LAG3;在一些实施方式中,第一抗原结合部分结合的靶点为 PD-1,第二抗原结合部分结合的靶点为 TIM-3;在一些实施方式中,第一抗原结合部分结合的靶点为 PD-1,第二抗原结合部分结合的靶点为 CD47;在一些实施方式中,第一抗原结合部分结合的靶点为 PD-1,第二抗原结合部分结合的靶点为 GTLA4;在一些实施方式中,第一抗原结合部分结合的靶点为 PD-1,第二抗原结合部分结合的靶点为 4-1-BB;在一些实施方式中,第一抗原结合部分结合的靶点为 PD-L1,第二抗原结合部分结合的靶点为 4-1-BB;在一些实施方式中,第一抗原结合部分结合的靶点为 PD-L1,第二抗原结合部分结合的靶点为 TIGIT。

在一些实施方式中,第一抗原结合部分靶向肿瘤相关抗原,第二抗原结合部分靶向免疫检查点。在一些实施方式中,第一抗原结合部分靶向 HER2,第二抗原结合部分靶向 PD-1;在一些实施方式中,第一抗原结合部分靶向 VEGF,第二抗原结合部分靶向 PD-L1;在一些实施方式中,第一抗原结合部分靶向 Claudin18.2,第二抗原结合部分靶向 PD-L1;在一些实施方式中,第一抗原结合部分靶向 HER2,第二抗原结合部分靶向 CTLA-4;在一些实施方式中,第一抗原结合部分靶向 CD20,第二抗原结合部分靶向 CD47;在一些实施方式中,第一抗原结合部分靶向 HER2,第二抗原结合部分靶向 CD47。

在一些实施方式中,第一抗原结合部分和第二抗原结合部分同时靶向肿瘤异质性。用于肿瘤的示例性共同靶标包括但不限于 HGF 和 VEGF,IGF-1R 和 VEGF,Her2 和 VEGF,CD19 和 CD3,CD20 和 CD3,Her2 和 CD3,CD19 和 FcγRIIIa,CD20 和 FcγRIIIa,Her2 和 FcγRIIIa。本发明的双特异性融合多肽能够结合 VEGF 和磷脂酰丝氨酸; VEGF 和 ErbB3; VEGF 和 PLGF; VEGF 和 ROBO4; VEGF 和 BSG2; VEGF 和 CDCP1; VEGF 和 ANPEP; VEGF 和 c-MET; HER-2 和 ERB3; HER-2 和 BSG2; HER-2 和 CDCP1; HER-2 和 ANPEP; EGFR 和 CD64; EGFR 和 BSG2; EGFR 和 CDCP1; EGFR 和 ANPEP; IGF1R 和 PDGFR; IGF1R 和 VEGF; IGF1R 和 CD20; CD20 和 CD74; CD20 和 CD30; CD20 和 DR4; CD20 和 VEGFR2; CD20 和 CD52; CD20 和 CD4; HGF 和 c-MET; HGF 和 NRP1; HGF 和磷脂酰丝氨酸; ErbB3 和 IGF1R; ErbB3 和 IGF1,2; c-Met 和 Her-2; c-Met 和 NRP1; c-Met 和 IGF1R; IGF1,2 和 PDGFR; IGF1,2 和 CD20; IGF1,2 和 IGF1R; IGF2 和 EGFR; IGF2 和 HER2; IGF2 和 CD20; IGF2 和 VEGF; IGF2 和 IGF1R; IGF1 和 IGF2; PDGFRa 和 VEGFR2; PDGFRa 和 PLGF; PDGFRa 和 VEGF; PDGFRa 和 c-Met; PDGFRa 和 EGFR; PDGFRb 和 VEGFR2; PDGFRb 和 c-Met; PDGFRb 和 EGFR; RON 和 c-Met; RON 和 MTSP1; RON 和 MSP; RON 和 CDCP1; VGFR1 和 PLGF; VGFR1 和 RON; VGFR1 和 EGFR; VEGFR2 和 PLGF; VEGFR2 和 NRP1; VEGFR2 和 RON; VEGFR2 和 DLL4; VEGFR2 和 EGFR; VEGFR2 和 ROBO4; VEGFR2 和 CD55; LPA 和 S1P; EPHB2 和 RON; CTLA4 和 VEGF; CD3 和 EPCAM; CD40 和 IL6; CD40 和 IGF; CD40 和 CD56; CD40 和 CD70; CD40 和 VEGFR1; CD40 和 DR5; CD40 和 DR4; CD40 和 APRIL; CD40 和 BCMA; CD40 和 RANKL; CD28 和 MAPG; CD80 和 CD40; CD80 和 CD30; CD80 和 CD33; CD80 和 CD74; CD80 和 CD2; CD80 和 CD3; CD80 和 CD19; CD80 和 CD4; CD80 和 CD52; CD80 和 VEGF; CD80 和 DR5; CD80 和 VEGFR2; CD22 和 CD20; CD22 和 CD80; CD22 和 CD40; CD22 和 CD23; CD22 和 CD33; CD22 和 CD74; CD22 和 CD19; CD22 和 DR5; CD22 和 DR4; CD22 和 VEGF; CD22 和 CD52; CD30 和 CD20; CD30 和 CD22; CD30 和 CD23; CD30 和 CD40; CD30 和 VEGF; CD30 和 CD74; CD30 和 CD19; CD30 和 DR5; CD30 和 DR4; CD30 和 VEGFR2; CD30 和 CD52; CD30 和 CD4; CD138 和 RANKL; CD33 和 FTL3; CD33 和 VEGF; CD33 和 VEGFR2; CD33 和 CD44; CD33 和 DR4; CD33 和 DR5; DR4 和 CD137; DR4 和 IGF1,2; DR4 和 IGF1R; DR4 和 DR5; DR5 和 CD40; DR5 和 CD137; DR5 和 CD20; DR5 和 EGFR; DR5 和 IGF1,2; DR5 和 IGF2, DR5 和 IGF1R, DR5 和 HER-2,以及 EGFR 和 DLL4。其他靶标组合包括 EGF/erb-2/erb-3 家族的一个或多个成员。

此外,用于自身免疫病症和炎性病症的示例性共同靶标包括但不限于 IL-1 和 TNF α , IL-6 和 TNF α , IL-6 和 IL-1, IgE 和 IL-13, IL-1 和 IL-13, IL-4 和 IL-13, IL-5 和 IL-13, IL-9 和 IL-13, CD19 和 Fc γ RIIb, 以及 CD79 和 Fc γ RIIb。

用于治疗炎性疾病的示例性靶点包括但不限于: TNF 和 IL-17A; TNF 和 RANKL; TNF 和 VEGF; TNF 和 SOST; TNF 和 DKK; TNF 和 α V β 3; TNF 和 NGF; TNF 和 IL-23p19; TNF 和 IL-6; TNF 和 SOST; TNF 和 IL-6R; TNF 和 CD-20; IgE 和 IL-13; IL-13 和 IL-23p19; IgE 和 IL-4; IgE 和 IL-9; IgE 和 IL-9; IgE 和 IL-13; IL-13 和 IL-9; IL-13 和 IL-4; IL-13 和 IL-9; IL-13 和 IL-9; IL-13 和 IL-4; IL-13 和 IL-23p19; IL-13 和 IL-9; IL-6R 和 VEGF; IL-6R 和 IL-17A; IL-6R 和 RANKL; IL-17A 和 IL-1 β ; IL-1 β 和 RANKL; IL-1 β 和 VEGF; RANKL 和 CD-20; IL-1 α 和 IL-1 β ; IL-1 α 和 IL-1 β 。

参与类风湿性关节炎(RA)的靶点包括但不限于: TNF 和 IL-18; TNF 和 IL-12; TNF 和 IL-23; TNF 和 IL-1 β ; TNF 和 MIF; TNF 和 IL-17; 和 TNF 和 IL-15。

治疗系统性红斑狼疮(SLE)的靶点包括但不限于: CD20, CD22, CD19, CD28, CD4, CD24, CD37, CD38, CD40, CD69, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CD80, CD81, CD83, CD86, IL-4, IL-6, IL10, IL4, IL11, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFRSF8, C5, TNFRSF7, TNFSF5, TNFSF6, TNFSF7, BLR1, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, ICOSL, IGBP1, MS4A1, RGS1, SLA2, IFNB1, AICDA, BLNK, GALNA C4S-6ST, INHA, INHBA, KLF6, DPP4, FCER2, R2, ILIR2, ITGA2, ITGA3, MS4A1, ST6GAL1, CDIC, CHST10, HLA-A, HLA-DRA, NTSE, CTLA4, B7.1, B7.2, BlyS, BAFF, IFN- α 和 TNF- α 。

用于治疗多发性硬化症(MS)的靶点,包括但不限于: IL-12, TWEAK, IL-23, CXCL13, CD40, CD40L, IL-18, VEGF, VLA-4, TNF, CD45RB, CD200, IFN γ , GM-CSF, FGF, C5, CD52 和 CCR2。

用于治疗脓毒症的靶点包括但不限于: TNF, IL-1, MIF, IL-6, IL-8, IL-18, IL-12, IL-10, IL-23, FasL, LPS, Toll-样受体, TLR-4, 组织因子, MIP-2, ADORA2A, IL-1B, CASP1, CASP4, NF κ B1, PROC, TNFRSF1A, CSF3, CCR3, IL1RN, MIF, NF κ B1, PTAFR, TLR2, TLR4, GPR44, HMOX1, 中期因子, IRAK1, NF κ B2, SERPINA1, SERPINE1, 和 TREM1。

为了形成本发明的双特异性融合蛋白,可以制备针对这些抗原的任意组合的抗体;即,这些抗原中的每一个可以任选地和独立地被根据本发明的多特异性抗体包括或不包括。

在一些实施方式中,第一抗原结合部分和第二抗原结合部分靶向同一抗原的不同表位。

在一些实施方式中,至少一个两个抗原结合片段还可以包括分泌信号序列。

分泌信号序列是指,通过连接至编码序列位于细胞膜外侧或细胞外侧的N端而诱导所表达的蛋白或肽的分泌的序列,所述信号序列可以由约18-30个氨基酸组成的肽序列。所有能转运到细胞膜外侧的蛋白有不同的信号序列,所述信号序列被细胞膜上的信号肽酶切割。通常,对于并非宿主细胞天然表达的外来蛋白而言,可以采用将该蛋白分泌到细胞周质或培养基中的分泌信号序列,或采用修饰的序列。

iii. 异二聚体Fc融合蛋白

在一些实施方式中,其包含重链恒定区Fc,所述Fc恒定区是异源二聚体(异二聚体Fc融合蛋白)。

所述Fc包括但不限于如下组合:

CH2;

CH2+CH3;

CH2+CH3+CH4;

所述Fc恒定区引入突变以避免重链错配。

在一些实施方式中,所述Fc恒定区引入突变为基于KiH技术(Knob-into-Holes),即在其中Fc恒定区一条重链中引入氨基酸突变,引入的氨基酸体积大于最初氨基酸残基体积,形成一个突起的类似“杆”的型结构(Knob),在Fc恒定区另一条链区引入另一突变,引入的氨基酸体积小于最初氨基酸残基体积,形成一个凹陷,类似“白”的结构(Hole),从而凸型重链更倾向和凹型重链配对,从而避免重链发生错配。该技术由基因泰克研发,记载于专利申请WO1996027011中,该专利全文引入本发明。

在一些实施方式中,所述Fc恒定区引入突变为基于静电相互作用,例如ART-Ig技术,该技术由罗氏子公司Chugai开发,特异性的改变Fc恒定区结构域的电荷,促进异源重链的配对,相当于电荷版的KiH技术,该技术记载于专利申请WO2006106905中,该专利全文引入本发明。

在一些实施方式中,所述Fc恒定区引入突变为基于SEED技术,SEED异二聚化是另一种基于空间突变的设计策略,该策略利用了从IgG和IgA CH3域(也称为AG SEED CH3和GA SEED CH3)衍生的交替序列的互补性。IgG和IgA CH3衍生物产生互补序列,因此在组装两个互补的重链异源二聚体的同时,排除了缺乏互补性的同源二聚体的组装。该技术记载于专利申请WO2007110205中,该专利全文引入本发明。

在一些实施方式中,所述Fc恒定区引入突变为基于等电点改变,便于提高异源二聚体形成率以及保持Fc区域稳定性的改造,该技术记载于WO2014145806,该专利全文引入本专利。

在一些实施方式中,所述Fc恒定区基于亲水相互作用或增加的柔性而缔合成为异源二聚体。

在一些实施方式中,所述Fc恒定区基于以上技术的任意组合缔合成为异源二聚体,例如,在一些实施方式中,所述Fc恒定区基于KIH和静电相互作用的组合进行了突变。例如,XmAb双特异性平台方法可以通过结合静电相互作用,CH3域构象和氢键提高双特异性抗体的热稳定性。具体的,该策略将天然IgG1的Fc侧链突变交换为S364K和K370S异二聚体,以在两者之间形成氢键,然后进行L368D/K370S取代驱动盐桥相互作用以促进异二聚体的形成,专利申请WO2014145907,该专利全文引入本专利。

在一些实施方式中,所述CH2、CH3或CH4区域的全长或部分被插入或替换成受体及其配体。

在一些实施方式中,被插入或替换的区域独立地位于CH2、CH3或CH4区,或任意像个相邻的区之间的位置(如CH1-CH2交界处、CH2-CH3交界处、CH3-CH4交界处);

在一些实施方式中,当上述任意两个恒定区(例如CL-CH1、CH2-CH2、CH3-CH3或CH4-CH4区之任一项)被插入或替换时,替换区域两个互相配合的缀合片段之间的亲和力, $K_D < 1 \times 10^{-3}$ (M),例如如 $x \times 10^{-4}$ (M)、 $x \times 10^{-5}$ (M)、 $x \times 10^{-6}$ (M)、 $x \times 10^{-7}$ (M)、 $x \times 10^{-8}$ (M)、 $x \times 10^{-9}$ (M)、 $x \times 10^{-10}$ (M)、 $x \times 10^{-11}$ (M); x的值可选自1~9,例如2、3、4、5、6、7、8。

在一些实施方式中,所述缀合片段的N端和/或C端通过连接肽与所述抗原结合片段连接。

在一些实施方式中,所述连接肽的氨基酸数目为1~30个;可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个;优选5~20个。

在一些实施方式中,所述连接肽的氨基酸是不具有除连接以外的额外功能(例如蛋白定位、酶切位点等)的无意义多肽。

在一些实施方式中,所述连接肽为柔性连接肽;

在一些实施方式中,所述连接肽的氨基酸序列选自Gly、Ser、Pro、Ala以及Glu中的一种或多种。

在一些实施方式中,所述连接肽的氨基酸序列选自(GGGGS)_n、(GGGS)_n、(GGS)_n、(GS)_n或(G)_n,其中n选自1、2、3、4、5或6。

连接肽通常是柔性的,可以减少融合蛋白与目的蛋白之间的空间位阻,从而更有利于蛋白正确折叠。

在另外的实施方案中,连接肽是刚性接头肽;即相对非柔性肽接头。刚性连接肽不要求完全缺乏柔性,而是比柔性接头肽如富甘氨酸肽接头柔性少。由于其相对缺乏柔性,刚性连接肽降低通过刚性连接肽连接在一起的两个蛋白结构域(在当前情况下是稳定剂蛋白和热稳定逆转录酶)的运动。提供有序链(例如 α 螺旋结构)的连接肽可提供刚性接头肽。例如,精氨酸、亮氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺和甲硫氨酸都显示出相对高的螺旋接头结构倾向。然而,包含许多脯氨酸残基的非螺旋接头也可表现显著的刚性。刚性连接肽的实例包括聚赖氨酸和聚-DL-丙氨酸聚赖氨酸。刚性肽接头的进一步描述由Wriggers等,Biopolymers, 80, 第736-46页(2005)提供。此外,刚性接头肽在由George等,Protein Engineering, 15, 第871-79页(2003)描述的接头数据库中描述。优选地,刚性连接肽也是非可切割接头肽,即非可切割刚性连接肽。

分离的核酸

本发明还涉及分离的核酸,其编码如上所述的双特异性融合多肽或多功能融合蛋白。

术语“分离的核酸”在本文中是指以单链或双链形式存在的脱氧核糖核酸或核糖核酸聚合物。所述分离的核酸包括RNA基因组序列,DNA(gDNA和cDNA)或从DNA转录的RNA序列,而且,除非特别指明,所述多肽还包括天然多核苷酸、糖、或碱基改变的类似物。根据本发明一个方面,所述多核苷酸是轻链多核苷酸。

所述分离的核酸包括编码蛋白复合物氨基酸序列的核苷酸序列,也包括与其互补的核苷酸序列。所述互补序列包括完全互补的序列和基本上互补的序列,这是指能在本领域已知的严谨条件下与编码蛋白复合物氨基酸序列的核苷酸序列杂交的序列。

而且,编码蛋白复合物氨基酸序列的核苷酸序列可以被改变或突变。所述改变包括添加、缺失、或非保守取代或保守取代。编码蛋白复合物氨基酸序列的多核苷酸可以被解释为,包括相对于该分离的核酸有实质性同一性的核苷酸序列。所述实质性同一性将该核苷酸序列与另外的随机序列以使得它们最大对应的方式进行比对,当用本领域常见的算法分析所比对的序列时,所述序列可显示大于80%的同源性,大于90%的同源性,或大于95%的同源性。

载体

本发明还涉及含有如上所述核酸的载体。

术语“载体(vector)”是指,可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时,载体称为表达载体。载体可以通过转化,转导或者转染导入宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的,包括但不限于:质粒;噬菌粒;柯斯质粒;人工染色体,例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC);噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于,逆转录酶病毒(包

括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如 SV40)。所述载体可以包含选择标记(例如便于富集的标签,例如 his tag; 或便于被检测的标签,例如 GFP), 以及与所述克隆载体所指定的细胞类型相匹配的复制起点, 而表达载体则包含对于影响指定靶细胞中的表达必要的调节元件例如增强子、启动子、内部核糖体进入位点(IRES)和其他表达控制元件(例如转录终止信号, 或者多腺苷酸化信号和多聚 U 序列等)。所述载体可以是克隆载体与表达载体。在表达或是制备抗体或片段时, 常涉及原核表达载体和真核表达载体, 原核表达载体常用 PET 系列、pGEX 系列, 真核表达载体常用 pcDNA3.1、pcDNA3.4、pcDNA4、pEGFP-N1、pEGFP-N1、pSV2 等。

在本发明中, 载体可以为组合物, 例如为多种质粒的混合物, 不同质粒负载抗体或其片段的一部分。

宿主细胞

本发明还涉及含有如上所述核酸或者如上所述载体的宿主细胞。

可以使用的多种培养的宿主细胞包括, 例如, 原核细胞、真核细胞、细菌细胞(如大肠杆菌或嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*))、真菌细胞(如酿酒酵母或毕赤酵母)、昆虫细胞(如包括草地夜蛾细胞在内的鳞翅目昆虫细胞)或哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0 细胞、小仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞、Hela 细胞、人肝细胞癌细胞或 293 细胞等等)。

制备双特异性融合多肽或多功能融合蛋白的方法

可采用本领域任何已知的方法制备本发明的双特异性融合多肽或多功能融合蛋白。

例如: 用如上所述的载体转化宿主细胞;

培养所转化的宿主细胞; 和

收集宿主细胞中表达的双特异性融合多肽或多功能融合蛋白。

特别的, 可采用如下方法。

早期构建双特异性抗体的方法有化学交联法或杂合杂交瘤或四价体瘤法(例如, Staerz UD 等, *Nature*, 314:628-31, 1985; Milstein C 等, *Nature*, 305:537-540, 1983; Karpovsky B 等, *J. Exp. Med.*, 160:1686-1701, 1984)。化学偶联法是将 2 个不同的单克隆抗体用化学偶联的方式连接在一起, 制备出双特异性单克隆抗体。例如两种不同单克隆抗体的化学结合, 或例如两个抗体片段如两个 Fab 片段的化学结合。杂合—杂交瘤法是通过细胞杂交法或者三元杂交瘤的方式产生双特异性单克隆抗体, 这些细胞杂交瘤或者三元杂交瘤是通过建成的杂交瘤融合, 或者建立的杂交瘤和从小鼠得到的淋巴细胞融合而得到的。虽然这些技术用于制造 BiAb, 但各种产生问题使得此类复合物难以使用, 诸如产生含有抗原结合位点的不同组合的混合群体、蛋白质表现方面的困难、需要纯化目标 BiAb、低产率、生产费用高等。

最近的方法利用经过基因工程改造的构建体, 其能够产生单一 BiAb 的均质产物而无需彻底纯化以去除不需要的副产物。此类构建体包括串联 scFv、二抗体、串联二抗体、双可变结构域抗体和使用诸如 Ch1/Ck 结构域或 DNLTm 的基元的异源二聚(Chames & Baty, *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.*, 12:276-83, 2009; Chames & Baty, *mAbs*, 1:539-47)。相关纯化技术是公知的。

还可以使用单淋巴细胞抗体方法通过克隆和表达由选择用于产生特异性抗体的单个淋巴细胞产生的免疫球蛋白可变区 cDNA 来产生抗体, 例如由 Babcook J 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7843-7848, 1996; WO 92/02551; WO 2004/051268 和 WO 2004/106377 所述的方法。

用于产生例如用于免疫宿主或用于淘选诸如用于噬菌体展示(或酵母细胞或细菌细胞表面表达)的抗体的抗原多肽可以通过本领域熟知的方法从包含表达系统的遗传工程改造的宿主细胞制备, 或者它们可以从天然生物来源回收。例如, 可将编码双特异性抗体的一条或两条多肽链的核酸通过多种已知的方法(如转化、转染、电穿孔、用核酸包被的微粒轰击等)引入培养的宿主细胞。在一些实施方案中, 编码双特异性抗体的核酸在被引入宿主细胞前可先插入至适于在宿主细胞中表达的载体中。典型的所述载体可包含使插入的核酸能够在 RNA 和蛋白质水平上表达的序列元件。

本发明的双特异性抗体, 或其部分可通过常规的免疫学分析方法, 例如酶联免疫吸附试验(ELISA), 放射免疫分析(RIA)或组织免疫组织化学用于检测任一或所有这些抗原(例如在生物样品, 如血清或血浆中)。本发明提供检测生物样品中的抗原的方法, 该方法包括: 使所述生物样品与本发明的可特异识别所述抗原的双特异性抗体, 或抗体部分抗原相接触, 并检测与抗原结合的抗体(或抗体部分), 或非结合抗体(或抗体部分), 由此检测所述生物样品中的所述抗原。所述抗体用可检测的物质进行直接或间接的标记, 以便于检测结合或非结合抗体。合适的可检测物质包括多种酶, 修复基团, 荧光物质, 发光物质和放射性物质。合适的酶的例子包括, 辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶, 乙酰胆碱酯酶; 合适的修复基团复合物的例子包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素; 合适的荧光物质的例子包括 7-羟基香豆素, 荧光素, 荧光素异硫氰酸盐, 硷性蕊香红 B, 二氯三嗪基胺荧光素, 丹磺酰氯或藻红蛋白; 发光物质的例子包括 3-氨基邻苯二甲酰环肽; 合适的放射性物质的例子包括 I^{125} 、 I^{131} 、 ^{35}S 或 ^3H 。

药物组合物

本发明的双特异性融合多肽或多功能融合蛋白或编码其的核酸可以应用于制备药物组合物或无菌组

合物,例如,将双特异性融合多肽或多功能融合蛋白与药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合。药物组合物可包括一种或组合的(如两种或更多不同的)本发明的抗体或其功能片段。例如,本发明的药物组合物可包含与靶抗原上的不同表位结合的具有互补活性的抗体或抗体片段(或免疫缀合物)的组合。治疗和诊断剂的制剂可通过以例如冻干粉末、浆液、水性溶液或悬浮液的形式与药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备。

药物组合物中的双特异性融合多肽或多功能融合蛋白可以是与第二种激活剂(功能分子)结合的形式。所述第二种激活剂可以是能预防或治疗目标疾病的随机功能分子,可包括化合物,肽,多肽,核酸,碳水化合物,脂质,或无机粒子。在所述药物组合物中,双特异性融合多肽或多功能融合蛋白可以本身具有治疗活性;但它可以发挥将所述第二种激活剂靶向特异性疾病区的功能。所述疾病区可以是与抗原特异性结合的双特异性抗体所聚集和分布的那些器官,组织,或细胞。靶向所述疾病区的药物以高浓度存在,使得药物效应相比注射的量增加。因此,药物组合物可以用于治疗耐药性肿瘤,并可以减少因非特异性药物分布所致的副作用和不利的药物反应。

药物组合物中包含双特异性融合多肽或多功能融合蛋白的激活剂可以容纳在微胶囊中,或容纳在胶体性质的药物运送系统(如脂质体,白蛋白小球体,微乳剂,纳米颗粒及纳米胶囊)中,或者容纳在大乳剂(macroeulsions)中,所述微胶囊可以通过诸如凝聚(coacervation)技术或界面聚合作用来制备,例子分别有羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(异丁烯酸甲酯)微胶囊。

医药用途与治疗方法

本发明还涉及如上所述的双特异性融合多肽或多功能融合蛋白在制备用于治疗疾病的药物中的应用。

根据本发明一个方面,所述疾病可以是例如,癌症、免疫性疾病、代谢性疾病以及微生物感染。

术语“癌症”是指以体内异常细胞的不受控生长为特征的一大类疾病。“癌症”包括良性和恶性癌症以及休眠肿瘤或微转移。

在一些实施方式中,微生物感染中微生物可以是外源病原体或带有外源病原体例如病毒的细胞群体。本发明适用于诸如细菌、真菌、病毒、支原体和寄生虫的外源病原体。可以用本发明治疗的病原体可以是任何本领域熟知的在动物体内致病的感染性生物,包括诸如以下的生物:革兰氏阴性或革兰氏阳性球菌或杆菌的细菌、DNA病毒和RNA病毒,包括但不限于诸如乳头瘤病毒、细小病毒、腺病毒、疱疹病毒和痘苗病毒的DNA病毒,以及诸如沙粒病毒、冠状病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒、流感病毒、细小核糖核酸病毒、副粘病毒、呼肠孤病毒、逆转录病毒和弹状病毒的RNA病毒。特别感兴趣的是抗生素抗性细菌,例如抗生素抗性链球菌(*Streptococcus species*)和葡萄球菌(*Staphylococcus species*),或者是对抗生素敏感但引起用抗生素治疗的复发性感染、以致最终产生抗性生物的细菌。这类生物可以用本发明的配体-免疫原缀合物与低于正常给予患者的剂量的抗生素联合治疗,以避免产生这些抗生素抗性细菌菌株。本发明也适用于任何真菌、支原体种、寄生虫或在动物中致病的其它感染性生物。可以用本发明方法治疗的真菌的实例包括生长为霉或酵母样的真菌,包括例如引起诸如以下疾病的真菌:癣、组织胞浆菌病、芽生菌病、曲霉病、隐球菌病、孢子丝菌病、球孢子菌病、类球孢子菌病和念珠菌病。本发明可以用来治疗寄生虫感染,包括但不限于由以下寄生虫引起的感染:体绦虫、血吸虫、组织蛔虫、变形虫和疟原虫属(*Plasmodium*)、锥虫属(*Trypanosoma*)、利什曼原虫属(*Leishmania*)和弓形体属(*Toxoplasma*)种。特别感兴趣的寄生虫是表达叶酸受体并结合叶酸的寄生虫;然而,在文献中关于对感染性生物表现出高亲和性的配体有大量的参考文献。例如,已知其抗生素活性并且与细菌细胞壁前体特异性结合的青霉素和头孢菌素同样可以用作制备按照本发明使用的配体-免疫原缀合物的配体。本发明的配体-免疫原缀合物也可以针对带有内源病原体的细胞群体,其中所述病原体特异性抗原优先在带有所述病原体的细胞表面表达,并且用作与所述抗原特异性结合的配体的受体。

本发明还涉及一种预防和/或治疗和施用治疗有效量的药物组合物以预防和/或治疗如上所述疾病的方法。

本发明的方法可以用于人类临床医学和兽医学应用。因此,带有致病生物群体并且用配体-免疫原缀合物治疗的宿主动物可以是人类,或者在兽医学应用的情况下,可以是实验室动物、农用动物、驯养动物或野生动物。本发明可以适用于包括但不限于以下的宿主动物:人类;实验室动物,诸如啮齿动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠等)、兔、猴、黑猩猩;驯养动物,例如狗、猫和兔;农用动物,例如牛、马、猪、绵羊、山羊;和关养的野生动物,例如熊、熊猫、狮、虎、豹、大象、斑马、长颈鹿、大猩猩、海豚和鲸。

药物组合物可通过多种途径注射至实体中,所述实体包括大鼠、小鼠、家养动物、和/或人类。所有注射方法都可以预期,例如,口服,直肠,静脉,鼻,腹部,皮下,或局部注射都是有可能的。组合物可以用本领域已知的其它方法来注射。

“治疗有效量”在本文中是指,根据合理的益损比来看,能治疗疾病的足够量。治疗有效量可以因患者引起的多种原因而有不同,所述原因例如,疾病类型、严重程度、发作、实体的年龄、体重、排泄速度、反应易感性、健康状态、和/或并发症;和/或药物活性、注射途径、注射周期和注射次数、和/或药物组合;

也可以由本领域普通技术人员根据治疗目的进行适当选择。例如，注射量可以随机分为多次，使得该量为约 0.001-100mg/kg 成人体重。

本发明的双特异性融合多肽或多功能融合蛋白或编码本发明抗体的核酸或多核苷酸还可与例如标准癌症治疗(例如，手术、放射和化学疗法)组合施用。例如，使用本发明的组合物和/或装备了这些组合物的效应细胞的抗肿瘤疗法与化学疗法联合使用。本发明抗体组合治疗的非限制性实例包括手术、化疗、放疗、免疫疗法、基因疗法、DNA 疗法、RNA 疗法、纳米疗法、病毒疗法、辅助疗法及其组合。

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。

实施例 1、FiBody 设计

在一些实施例中，FiBody 是利用配体及其受体之间特异性亲和力，取代双特异性抗体一侧的 CL 和 CH1，重组获得的双特异性抗体，其能够避免或减少双特异性抗体轻链与重链发生错配。

本实施例以白细胞介素及其受体为例构建 FiBody，根据白细胞介素及其受体的立体构像将其分为四类，见图 5：

立体构像	分类编号	白细胞介素及其受体
托举型	A	IL15/IL15R、IL2/IL2R、IL4/IL-4R α +R γ 、IL-6/IL-6R、IL-11/IL-11R、IL-13/IL-13R1、IL-20/IL20R α +IL20R β 、IL24/IL20R α +IL20R β
蝴蝶结型	B	IL10/IL10R1、IL22/IL22R
棒球手型	C	IL1 β /ILR1、IL3/IL3R、IL5/IL5R、IL18/IL18R1
钳型	D	IL7/IL7R、IL21/IL21R、IL23A/IL12B

基于以上 4 类白细胞介素及其受体分别构建双特异性抗体。

实施例 2、基于白细胞介素及其受体 FiBody 的构建

选取靶向第一抗体的 VH 通过 Linker 连接在受体蛋白上，再通过 Hinge 与抗体的 Fc 连接；靶向第一抗体的 VL 通过 Linker 连接在配体蛋白上，以降低或避免轻链与重链发生错配；另一端为靶向第二抗体(抗 TIGIT 抗体)的完整 Fab 结构，组成第一抗体的 Fc 与组成第二抗体的 Fc 具有常规的 KiH 改造，以降低或避免重链发生错配。或

选取靶向第一抗体的 VH 通过 Linker 连接在配体蛋白上，再通过 Hinge 与抗体的 Fc 连接；靶向第二抗体的 VL 通过 Linker 连接在受体蛋白(IL15)上，以降低或避免轻链与重链发生错配；另一端为靶向第一抗体的完整 Fab 结构，组成第一抗体的 Fc 与组成第二抗体的 Fc 具有常规的 KiH 改造，以降低或避免重链错配。

分子编号	分子名称	抗体结构替换方式		立体构像分类
		重链 CH1 被替换	轻链 CL 被替换	
分子 1	R0950	IL15RA	IL15	A
分子 2	R0951	IL15RA	IL15	A
分子 3	R0952	IL15	IL15RA	A
分子 4	R1115	IL2RA	IL2	A
分子 5	R1116	IL2	IL2RA	A
分子 6	R1117	IL22RA_D1D2	IL22	B
分子 7	R1118	IL22RA_D1	IL22	B
分子 8	R1119	IL18R1_D1D2	IL18	C
分子 9	R1120	IL18R1_D1D2D3	IL18	C
分子 10	R1123	IL21R	IL21	D

一些具体的实施示例如下表：

分子 1	R0950: PD-L1_VH_IL15RA/PD-L1_VL_IL15/TIGIT-Fab(图 7)
第一多肽	@PD-L1_VH_IL15RA_Fc-Kaob(SEQ ID NO.1) EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTVDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGI TCPPMMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAIVHQR PAPPSTVITAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTT AKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPRGPTIKPCPPCKCAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCV VVDVSEDDPDVQISWFWNNVEVHTAQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPI ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLWCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYDNTPEVLDSGD SYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSTRTPGK
第二多肽	@PD-L1_VL_IL15(SEQ ID NO.2) QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNT ASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTRVFGTGTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGNWVNVISDLKKI

	EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCK ECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
第三多肽	@TIGIT_VH_CH1_Fc-Hole(SEQ ID NO.3) QVQLESEGGFLFKPTDILTCTVSGSSLSSSYMSWVRQAPGKGLEWIGHGSNGNTYYANWAKGRFTISKTS TTVELKITSPTTEDTATYFCARGGYRTSGMDPWGPGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLV KGYFPEPVTLTWNSSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPT IKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQQTTHRE DYNSTLRVVSALPIQH QDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTL TCRVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLSKDSGSYFmaskLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN HHHTKSFSRTPGK
第四多肽	@TIGIT_VL_CL (SEQ ID NO.4) DIVMTQTPASVEVAVGGTVTIKQASQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDALKLASGVPSRFSGSGSGTEYTL TISGVESADAATYYCQEHSGVGNVDNVFGGGTEVVVKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPK DINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
分子 2	R0951: TIGIT_VH_IL15RA/ TIGIT_VL_IL15/ PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL15RA_Fc-Knob(SEQ ID NO.5) QVQLESEGGFLFKPTDILTCTVSGSSLSSSYMSWVRQAPGKGLEWIGHGSNGNTYYANWAKGRFTISKTS TTVELKITSPTTEDTATYFCARGGYRTSGMDPWGPGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGSGGITCPPPM SVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRAGTSSLTCEVLNKATNVAHWTPSLKCIKRDPAVHQRAPPSTV TTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATAAIVPGSQLMPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWEL TASASHQPPGVYPQGHSDTTEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSE DDPDVQISWVFNNEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISK KGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLWCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYDNTEPVLDSDGSYFMY DLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHHTKSFSRTPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL15 (SEQ ID NO.6) DIVMTQTPASVEVAVGGTVTIKQASQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDALKLASGVPSRFSGSGSGTEYTL TISGVESADAATYYCQEHSGVGNVDNVFGGGTEVVVKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGNWVNVISDLKK IEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESG KECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Hole(SEQ ID NO.7) EVQLESGLVQPGSLRLSCAASGFTSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTVDYWGQGLTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSS VTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDDK KIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHT AQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE MTKKQVTLTCRVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLSKDSGSYFmaskLRVEKKNWVERNSYSCS VVHEGLHNHHHTKSFSRTPGK
第四多肽	@PD-L1_VL_CL (SEQ ID NO.8) QSALTQPASVSGSPQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSGSGNT ASLTISGLQAEDEADYYCSSYSSSTRVFGTGKTVTLRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPK DINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
分子 3	R0952: TIGIT_VH_IL15/ TIGIT_VL_IL15RA/ PD-L1-Fab (图 7)
第一多肽	@TIGIT_VH_IL15_Fc-Knob(SEQ ID NO.9) QVQLESEGGFLFKPTDILTCTVSGSSLSSSYMSWVRQAPGKGLEWIGHGSNGNTYYANWAKGRFTISKTS TTVELKITSPTTEDTATYFCARGGYRTSGMDPWGPGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGNWVNV SDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGN TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLS PIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMMSGKEFKCKVNNK DLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLWCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYDNTEPV LSDGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHHTKSFSRTPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL15RA (SEQ ID NO.10) DIVMTQTPASVEVAVGGTVTIKQASQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDALKLASGVPSRFSGSGSGTEYTL TISGVESADAATYYCQEHSGVGNVDNVFGGGTEVVVKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGITCPPMSVEHA DIWVKSYSLSRERYICNSGFKRAGTSSLTCEVLNKATNVAHWTPSLKCIKRDPAVHQRAPPSTVTTAGV TPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATAAIVPGSQLMPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASAS HQPPGVYPQGHSDTT
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Hole(SEQ ID NO.7)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL (SEQ ID NO.8)
分子 4	R1115: TIGIT_VH_IL2RA/ TIGIT_VL_IL2 / PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL2RA_Fc-Hole(SEQ ID NO.32)

	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTI TVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGG LCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSSHSSWDNQCTSSATRNNTTKQ VTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGP AESVCKMTHGKTRWTPQQLICTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFF LASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL2(SEQ ID NO.33) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSNLAWYQOKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDYSL TISSLQPEDFATYYCQHFWGTPRTFGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGAPSSSTKKTKQLQLEHL LLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFMPPKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.34) EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVYGDSTISGYWNWIRKPPGKGLGYISYTGSTYQNP SLKSRITFSRDT SKNQYYLKLSSVTAADTATYYCARSRWIRTYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPVFLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSTLTQTYICNVNHNKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSV MEALHNHYTQKSLSLSPGK
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.35) EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSVSSSISSNLHWYQOKPDQSPKLLIYGTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLT INSLEAEDAATYYCQWSSYPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
分子 5	R1116: TIGIT_VH_IL2 / TIGIT_VL_IL2RA / PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL2_Fc-Hole(SEQ ID NO.39) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTI TVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGG PTSSSTKKTKQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFMPPKATELKHLCLEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTLEPKSSDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCRVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL PGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL2RA(SEQ ID NO.40) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSNLAWYQOKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDYSL TISSLQPEDFATYYCQHFWGTPRTFGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGELCDDDPPEIPHATFKAM MAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSSHSSWDNQCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKERKTTE MQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTR WTQPQLICTG
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.34)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.35)
分子 6	R1117: TIGIT_VH_IL22RA_D1D2 / TIGIT_VL_IL22 / PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL22RA_D1D2_Fc-Hole(SEQ ID NO.41) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTI TVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGG QSTHESLKQRVQFQSRNFHNLQWQPGRALTGNSVYFVQYKIMFSCSMKSSHQKPSGCWQHISCNFPGC RTLAKYGRQWKNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPTFTPWETKIDEP KSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVME ALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL22(SEQ ID NO.42) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSNLAWYQOKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDYSL TISSLQPEDFATYYCQHFWGTPRTFGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGAPISSHCRDLKSNFQQP YITNRTFMLAKEASLADNNTDVRIGELKFLHGVMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVPF LARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAGELDLLFMSLRNACI
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.34)

第四多肽	@PD-L1 VL CL(SEQ ID NO.35)
分子 7	R1118: TIGIT_VH_IL22RA_D1/TIGIT_VL_IL22 / PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL22RA_D1_Fc-Hole (SEQ ID NO.43) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTI TVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGT QSTHESLKPQVRVQFQSRNFHNLQWQPGRALTGNSVYFVQYKIMFEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPKPCKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLIHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPPVLSKSGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNIHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL22(SEQ ID NO.42)
第三多肽	@PD-L1 VH CH1 Fc-Knob(SEQ ID NO.34)
第四多肽	@PD-L1 VL CL(SEQ ID NO.35)
分子 8	R1119: TIGIT_VH_IL18R1_D1D2/TIGIT_VL_IL18/ PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL18R1_D1D2_Fc-Hole : (SEQ ID NO.44) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTI TVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGC TSRPHITVVEGEPFYLKHCSCSLAHEIETTTKSWYKSSGSQEHVELNPRSSSRIALHDCVLEFWPVELNDTGS YFFQMKNYTKQWKLNVIRRNKHSCFTEQVTSKIVEVKKFFQITCENSYYQTLVNSTSLYKNCKKLLLENN KNPTIKKNAEFEDQGYYSVHFLHHNGKLFNITKTFNITIVEDRSNIVEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF LFPKPCKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLIHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPPVLSKSGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNIHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL18(SEQ ID NO.45) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSLAWYQQKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDYSL TISSLQPEDFATYYCQHFWGTPRTFGQGTLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGYFGKLESKLSVIRNLN DQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFISMYKDSQPRGMVAVTISVKCEKISTLSCENKHSFKEMNPPD NIKDTKSDIHFQSRVPGHDNKMQFESSYEGYFLACEKERDLFLKLLKKEDELGDRSIMFTVQNE
第三多肽	@PD-L1 VH CH1 Fc-Knob(SEQ ID NO.34)
第四多肽	@PD-L1 VL CL(SEQ ID NO.35)
分子 9	R1120: TIGIT_VH_IL18R1_D1D2D3/TIGIT_VL_IL18/ PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL18R1_D1D2D3_Fc-Hole(SEQ ID NO.46) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTI TVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGC TSRPHITVVEGEPFYLKHCSCSLAHEIETTTKSWYKSSGSQEHVELNPRSSSRIALHDCVLEFWPVELNDTGS YFFQMKNYTKQWKLNVIRRNKHSCFTEQVTSKIVEVKKFFQITCENSYYQTLVNSTSLYKNCKKLLLENN KNPTIKKNAEFEDQGYYSVHFLHHNGKLFNITKTFNITIVEDRSNIVPVLGPKLNHVAELGKNVRLNCS ALLNEEDVITYWMFGEENGSDPNHIEEKEMRIMTPEGKWHASKVLRINIGESNLNVLYNCTVASTGGTDTK SFIEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLSKSGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHREALHNIHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL18(SEQ ID NO.45)
第三多肽	@PD-L1 VH CH1 Fc-Knob(SEQ ID NO.34)
第四多肽	@PD-L1 VL CL(SEQ ID NO.35)
分子 10	R1123: TIGIT_VH_IL21R/TIGIT_VL_IL21/ PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL21R_Fc-Hole(SEQ ID NO.47) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTI TVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGC PDLVCYTDYLTQVTCILEMWNLHPSTLTLTWQDQYEELKDEATSCSLHRSAHNATHATYCHMDVHFHMA DDIFSVQITDQSGQYQECGSFLAESIKPAPFPDVTFTSGQYQISWRSYEDPAFYMLKGKQLQYELQYRN RGDPWAVSPRRKLISVDSRSVSLPLEFRKDSSYELQVRAGPMPGSSYQGTWSEWSDPVIFQTQSEELKEEP KSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLSKSGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH REALHNIHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL21(SEQ ID NO.48) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSLAWYQQKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDYSL TISSLQPEDFATYYCQHFWGTPRTFGQGTLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGHKSSSQGQDRHMIRM QLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQAQLKSANTGNNERIINVSIIKLLKRPPTNA GRRQKHRLTCPCSDSYEKKPPKEFLERFKSLLOKMIHQHLSRTHGSEDS

第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.34)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.35)

实施例3 具有二硫键改造的双特异性抗体

3.1 为了进一步改善双特异性抗体稳定性并且延长双特异性抗体的半衰期，对双特异性抗体进行二硫键改造，见图8。

配受体二硫键改造：选取靶向第二抗体（抗TIGIT）的VH通过Linker连接在受体蛋白（IL15RA）上，再通过Hinge与抗体的Fc连接；靶向第二抗体的VL通过Linker连接在配体蛋白（IL15）上；另一端为靶向第一抗体的完整Fab结构，组成第一抗体的Fc与组成第二抗体的Fc具有常规的KIH改造，以避免重链错配。同时，对受体、配体蛋白进行突变，目的形成分子间二硫键，进一步提高分子的稳定性，具体例如：

分子编号	R0954: TIGIT_VH_IL15RA (D96+C97) / TIGIT_VL_IL15 (E87C) / PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL15RA (D96+C97) _Fc-Knob(SEQ ID NO.13) QVQLESEGGLFKPTDITLTCTVSGSSLSYMSWVRQAPGKGLEWIGHISNGNTYYANWAKGRFTISKTS TTVELKITSPITTEDTATYFCARGGYRTSGMDPWGPGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGITCPPPM SVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKICIRDPALVHQRPAAPPSTV TTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWEL TASASHQPPGVYPQGHSDTTEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSE DDPDVQISWVFNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKP KGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLWCMVTDMPEDIYVEWNTNNGKTELNYDNTPEVLDSGGSYFMY'S DLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL15 (E87C) (SEQ ID NO.14) DIVMTQTPASVEVAVGGTVTIKQASQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDALKLASGVPSRFSGSGSGTEYTL TISGVESADAATYCYCQEHSGVGNVDNVFGGGTEVVVKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGNWVNVISDLKK IEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKTAMKCFLEELQVISLESGLDASHIDTVENLILANNSLSNGNVTESGC KCCEELEENIKFELQSFVHIVQMFINTS
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Hole(SEQ ID NO.7)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.8)
分子编号	R1085: TIGIT_VH_IL15RA (P67C) / TIGIT_VL_IL15 (E90C) / PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL15RA (P67C) _Fc-Knob(SEQ ID NO.49) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTI TVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGI TCPPPMSEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKICIRDCALVHQR PAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTT AKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDVLNGKEYCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSKSGS FFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL15 (E90C) (SEQ ID NO.50) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDYSL TISSLQPEDFATYYCQHFWGTPRTFGQGTLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGNWVNVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHPSCVKTAMKCFLEELQVISLESGLDASHINTVQDLILANNSLSNGNVTESGCKECC LEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.51) QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVYGDSTISGYWNWIRKPPGKGLEWIGYISYTGSTYQNPSLKSRTMSRDT SKNQYYLKLSSVTAADTAAYYCARSRAWIRTYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDVLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.52) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSVSSSISSNLHWYQQKPGKAPKPVWYGTSLNLSGVPSRFSGSGSGTDYT LTISLQPEDFATYYCQWSSYPLTFGQGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
分子编号	R1086: TIGIT_VH_IL15RA (R35C) / TIGIT_VL_IL15 (E93C) / PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL15RA (R35C) _Fc-Knob(SEQ ID NO.65) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTI TVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGI TCPPPMSEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKICIRDPALVHQR PAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTT

	AKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGS FFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL15 (E93C) (SEQ ID NO.12) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSNLAWYQKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDYSL TISSLQPEDFATYYCQHFVGTPTFTFGQGTLEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGGNWVNVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHNTVQDLILANNLSNNGNVTESGCKECEE LECKNIKEFLQSFVHIVQMFINIS
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.51)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.52)

3.2 在 VH、VL 之间设计二硫键改造，形成 dsFv，帮助非共价设计的受配体重、轻链之间形成共价二硫键链接。二硫键改造位置包括但不限于以下突变位点：

组合	VH	VL
1	37C	95C
2	44C	100C
3	44C	101C
4	44C	105C
5	45C	87C
6	45C	98C
7	100C	50C
8	100bC	49C
9	98C	46C
10	101C	46C
11	105C	43C
12	106C	57C
13	108C	43C

具体例如：

分子编号	R1081: TIGIT_VH (G44C) _IL15RA/ TIGIT_VL(Q100C) _IL15/ PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH (G44C) _IL15RA_Fc-Knob (SEQ ID NO.53) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSTSYWMNWVRQAPGQCLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTI TVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGI TCPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAIVHQR PAPPSTVTTAGVTPQPELSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTT AKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGS FFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL (Q100C) _IL15 (SEQ ID NO.54) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSNLAWYQKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDYSL TISSLQPEDFATYYCQHFVGTPTFTFGQGTLEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGGNWVNVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHNTVQDLILANNLSNNGNVTESGCKECEE LEEKNKEFLQSFVHIVQMFINIS
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.51)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.52)
分子编号	R1082: TIGIT_VH (W108C) _IL15RA/ TIGIT_VL(S43C) _IL15/ PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH (W108C) _IL15RA_Fc-Knob (SEQ ID NO.55) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTI TVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYCGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGI CPPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAIVHQR PAPPSTVTTAGVTPQPELSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTT AKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGS FFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL (S43C) _IL15 (SEQ ID NO.56) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSNLAWYQKPGKCPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDYSL TISSLQPEDFATYYCQHFVGTPTFTFGQGTLEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGGNWVNVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVISLESGLDASIHNTVQDLILANNLSNNGNVTESGCKECEE

	LEEKNKEFLQSFVHIVQMFINTS
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.51)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.52)
分子编号	R1083: TIGIT_VH (L45C)_IL15RA/TIGIT_VL(F98C)_IL15/PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH (L45C)_IL15RA_Fc-Knob (SEQ ID NO.57) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGGQCEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVITITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGITC TCPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIKIRDPALVHQR PAPPSTVTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTT AKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSG FFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL (F98C)_IL15 (SEQ ID NO.58) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSLAWYQQKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDYSL TISSLQPEDFATYYCQHFVWGTPRTCGQGTGLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGNWVNVISDLKKIEDLI QSMHIDATLYTESDVHPSCVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHNTVQDLILANNLSNGNVTESGCKEKE ELEENKEFLQSFVHIVQMFINTS
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.51)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.51)
分子编号	R1084: PD-L1_VH (G44C)_IL15RA/PD-L1_VL(Q101C)_IL15/TIGIT-Fab
第一多肽	@PD-L1_VH (G44C)_IL15RA_Fc-Knob (SEQ ID NO.59) QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVYGDSITSGYWNWIRKPPGKCLEYIGYISYTGSTYQNPSLKSRTMSRDT SKNQYVYLLKSSVTAADTAVYYCARSAWIRTYFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGITC PPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIKIRDPALVHQRPA PPSTVTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTA KNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSG FLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@PD-L1_VL (Q101C)_IL15 (SEQ ID NO.60) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSISSNLHWYQQKPGKAPKRWIYGTSLASGVPSRFSGSGSGTDYSL LTISSLQPEDFATYYCQWSSYPLTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGNWVNVISDLKKIEDLI QSMHIDATLYTESDVHPSCVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHNTVQDLILANNLSNGNVTESGCKEKE ELEENKEFLQSFVHIVQMFINTS
第三多肽	@TIGIT_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.61) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVITITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第四多肽	@TIGIT_VL_CL(SEQ ID NO.62) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSLAWYQQKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDYSL TISSLQPEDFATYYCQHFVWGTPRTCGQGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

实施例 4、消除糖基化的突变改造

Fab-IL15/IL15RA_Fc 的构建方法，具体选取靶向第二抗体（抗 TIGIT）的 VH 通过 Linker 连接在受体蛋白（IL15RA）上，再通过 Hinge 与抗体的 Fc 连接；靶向第二抗体的 VL 通过 Linker 连接在配体蛋白（IL15）上；另一端为靶向第一抗体的完整 Fab 结构，组成第一抗体的 Fc 与组成第二抗体的 Fc 具有常规的 KiH 改造，以避免重链错配。同时，对受体、配体蛋白进行突变，目的形成分子间二硫键，进一步提高分子的稳定性；进一步的，对受体、配体蛋白上的糖基化位点进行改造，目的是消除分子的异质性，具体例如：

分子编号	R1072: TIGIT_VH_IL15RA/TIGIT_VL_IL15/PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL15RA_Fc-Knob(SEQ ID NO.63) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGITC TCPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIKIRDPALV HQRAPPSTVTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTP

	PSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL15(SEQ ID NO.64) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDYSLTISLQPEDFATYYCQHFWGTPRTFGQGTKEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVVISLESQDASIHNTVQDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIQTS
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.51)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.52)
分子编号	R0955: TIGIT_VH_IL15 RA/TIGIT_VL_IL15 (N71Q, N79Q, N112Q) / PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL15RA_Fc-Knob(SEQ ID NO.11) QVQLSEGGGLFKPTDTLTCTVSGSSLSYMSWVRQAPGKGLEWIGIHSNGNTYANWAKGRFTISKSTTVELKITSPPTEDATYFCARGGYRTSGMDPWGPGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGITCPPPMSEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTCSLTCVLNKAATNVAAHWTPSLKCIKDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPELSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPVITCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLWCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYDNTEPVLDSGGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL15 (N71Q, N79Q, N112Q) (SEQ ID NO.15) DIVMTQTTPASVEVAVGGTVTIKQASQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDALKLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISGVESADAATYYCQQEHSGVGNVDNVFGGGTEVVVKGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVVISLESQDASIHNTVENLILAQNSLSSNGQVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIQTS
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Hole(SEQ ID NO.7)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL (SEQ ID NO.8)
分子编号	R1109: TIGIT_VH_IL15 RA (sushi65) / TIGIT_VL_IL15 / PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL15RA (sushi65) _Fc-Knob(SEQ ID NO.66) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGITCPPPMSEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAATNVAAHWTPSLKCIKDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPELSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPVITCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLWCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYDNTEPVLDSGGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL15(SEQ ID NO.64)
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.51)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.52)
分子编号	R1110: TIGIT_VH_IL15 RA (sushi65 T2A) / TIGIT_VL_IL15 / PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL15RA (sushi65 T2A) _Fc-Knob(SEQ ID NO.67) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGIACPPPMSEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAATNVAAHWTPSLKCIKDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPELSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPVITCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLWCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYDNTEPVLDSGGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL15(SEQ ID NO.64)
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.51)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.52)
分子编号	R1111: TIGIT_VH_IL15 RA (sushi65 T2A, T81A, T86A) / TIGIT_VL_IL15 / PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL15RA (sushi65 T2A, T81A, T86A) _Fc-Knob(SEQ ID NO.68) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRVTTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGIACPPPMSEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKAATNVAAHWTPSLKCIKDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPELSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPVITCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLWCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYDNTEPVLDSGGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

	GQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL15(SEQ ID NO.64)
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Knob(SEQ ID NO.51)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL(SEQ ID NO.52)

实施例 5、具有降低 IL15/IL15RA 与 IL2/15Rβ/γC 复合物亲和力改造的 IL15/IL15RA 及其组成的双特异性抗体

在某些应用中,为了避免 IL15/IL15RA 及其组成的双特异性抗体与 IL2/15Rβ/γC 复合物相互作用,引起不需要的非特异性结合,我们对 IL15/IL15RA 及其组成的双特异性抗体进行改造,以降低或完全丧失 IL15/IL15RA 与 IL2/15Rβ/γC 复合物亲和力。通过检查 IL15/IL15RA 与 IL2/15Rβ/γC 复合物作用界面晶体结构,以及使用 Molecular Operating Environment(MOE; Chemical Computing Group, Montreal, Quebec, 加拿大)软件建模,我们预测在 IL15/IL15RA 界面处可以进行氨基酸突变改造以便降低或完全丧失 IL15/IL15RA 与 IL2/15Rβ/γC 复合物亲和力,如图 9 中描绘的。

描述 Fab-IL15/IL15RA_Fc 的构建方法,具体选取靶向第二抗体(抗 TIGIT)的 VH 通过 Linker 连接在受体蛋白(IL15RA)上,再通过 Hinge 与抗体的 Fc 连接;靶向第二抗体的 VL 通过 Linker 连接在配体蛋白(IL15)上;另一端为靶向第一抗体的完整 Fab 结构,组成第一抗体的 Fc 与组成第二抗体的 Fc 具有常规的 KiH 改造,以避免重链错配。同时,对配体蛋白进行突变,目的是降低或失活受、配体复合物的生物学功能,具体例如:

分子编号	R0960: TIGIT_VH_IL15RA/TIGIT_VL_IL15 (D61N、E64Q、N65D) / PD-L1-Fab
第一多肽	@TIGIT_VH_IL15RA_Fc-Knob(SEQ ID NO.5) QVQLESEGGLFKPTDTLTCTVSGSSLSSSYMSWVRQAPGKGLEWIGIIGSNNGNTYYANWAKGRFTISKSTTTVELKITSPITTEDATYFCARGGYRTSGMDPWGPGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRAGTSSLTCEVLNKA TNVAHWTPSLKCI RDPALVHQRPA PSTVTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNNTAATAIVPGSQLMPSPSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTEPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLWCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYDNTEPVLDS DGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_IL15 (D61N、E64Q、N65D) (SEQ ID NO.16) DIVMTQTPASVEVAVGGTVTIKQASQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDALKLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISGVESADAATYYCQQEHSGVGNVDNVFGGGTEVVVKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGNWNVNISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHNTVQDLILANNLSLSSNGNVTESGCKECEEELEKNIKEFLQSFVHIVQMFINITS
第三多肽	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Hole(SEQ ID NO.7)
第四多肽	@PD-L1_VL_CL (SEQ ID NO.8)

实施例 6、构建基于 scFv、CrossMab 结构的双特异性抗体作为实验对照

正如前文所描述,scFv 和 CrossMab 都是常用的双特异性抗体构建技术手段,在这里作为设计对照,跟我们的分子进行对比:

基于 scFv 结构双抗的构建方法,具体选取靶向第二抗体(抗 TIGIT)的 VH 通过 Linker 连接至第二抗体的 VL 上形成 scFv 结构,再通过 Hinge 与抗体的 Fc 连接;另一端为靶向第一抗体的完整 Fab 结构,(此结构与武汉友芝友 Y-Body 相似,命名为 YBody),组成第一抗体的 Fc 与组成第二抗体的 Fc 具有常规的 KiH 改造,以避免重链错配。具体例如:

分子编号	R0809: Y-Body TIGIT_scFv / PD-L1-Fab (图 1-C)
scFv 臂	@TIGIT_scFv_Fc-Knob (SEQ ID NO.17) QVQLESEGGLFKPTDTLTCTVSGSSLSSSYMSWVRQAPGKGLEWIGIIGSNNGNTYYANWAKGRFTISKSTTTVELKITSPITTEDATYFCARGGYRTSGMDPWGPGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPASVEVAVGGTVTIKQASQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDALKLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISGVESADAATYYCQQEHSGVGNVDNVFGGGTEVVVKGAAEPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLWCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYDNTEPVLDS DGSYFMYSDLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
Fab 臂-VH	@PD-L1_VH_CH1_Fc-Hole(SEQ ID NO.7)
Fab 臂-VL	@PD-L1_VL_CL (SEQ ID NO.8)

描述基于 scFv 结构双抗的构建方法,具体选取靶向第二抗体(抗 TIGIT)的 VH 通过 Linker 连接至第二抗体的 VL 上形成 scFv 结构,再通过 Linker 与完整的靶向第一抗体的 Fc 的 C 端连接;组成一个对称的结构。具体例如:

分子编号	R0810: 对称 scFv PD-L1_VH_CH1_Fc @TIGIT_scFv/PD-L1_VL_CL (图 1-D)
重链	@PD-L1_VH_CH1_Fc @TIGIT_scFv (SEQ ID NO.20)

	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTVDYWGQGLTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTG SSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDYLTLSSTVTSSTWPSQITCNVAHPASSTK VDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVDVSEDDPDVQISWVFN EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP PPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLESEGGLFKPTDTLTCTV SGSSLSSYSMSWVRQAPGKGLEWIGIIGSNNGNTYYANWAKGRFTISKSTTTVELKITSPTTETATYFCARG GYRTSGMDPWGPGTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPASVEVAVGGTGTIKCQASQSISSYLN WYQKPGQPPKLLIYDALKLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISGVESADAATYYCQEHVSGNVDNVFGGG TEVVVK
轻链	@PD-L1 VL CL (SEQ ID NO.8)

基于 CrossMab 结构的构建方法，具体选取靶向第二抗体（抗 TIGIT）的 VH 连接至 CL 结构域，再通过 Hinge 与抗体的 Fc 连接，靶向第二抗体（抗 TIGIT）的 VL 连接至 CH1 结构域，形成轻链；另一端为靶向第一抗体的完整 Fab 结构，组成第一抗体的 Fc 与组成第二抗体的 Fc 具有常规的 KiH 改造，以避免重链错配。具体例如：

分子编号	R0959: CrossMab TIGIT_VH_CL/TIGIT_VL_CH1/PD-L1-Fab (图 1-B)
第一多肽	@TIGIT_VH_CL_Fc-Knob(SEQ ID NO.18) QVQLESEGGLFKPTDTLTCTVSGSSLSSYSMSWVRQAPGKGLEWIGIIGSNNGNTYYANWAKGRFTISK STTVELKITSPTTETATYFCARGGYRTSGMDPWGPGTLTVSSLRDAAPTVISFPPSEQLTSGGASVVC FLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTTLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSP VKSFNRNCEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVDVSEDDPDVQISW VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ YVLPPEEEMTKKQVTLWCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYDNTEPVLDSGYSFMYSDLRVEKKN WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
第二多肽	@TIGIT_VL_CH1 (SEQ ID NO.19) DIVMTQTPASVEVAVGGTGTIKCQASQSISSYLNWYQKPGQPPKLLIYDALKLASGVPSRFSGSGSGTEY TLTISGVESADAATYYCQEHVSGNVDNVFGGGTEVVVKAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVK GYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDYLTLSSTVTSSTWPSQITCNVAHPASSTKVDKKI
第三多肽	@PD-L1 VH CH1 Fc-Hole(SEQ ID NO.7)
第四多肽	@PD-L1 VL CL (SEQ ID NO.8)

实施例 7、抗体重-轻链错配测试

轻链错配是双抗平台面临的一个难点问题。为了验证本平台防错配性能，我们专门设计了受体，配体分布在抗体两边的 Fab，故意设计错配的重、轻链结构，并进行表达验证。

描述 Fab-IL15/IL15RA_Fc 错配的构建方法：

R1042：具体选取靶向第一抗体（抗 PD-L1 抗体）的 VH 通过 Linker 连接在受体蛋白（IL15RA）上，再通过 Hinge 与抗体的 Fc 连接；靶向第二抗体（抗 TIGIT 抗体）的 VL 通过 Linker 连接在配体蛋白（IL15）上；另一端为靶向第二抗体的 VH 通过常规序列连接在 CH1，再通过 Hinge 与抗体的 Fc 连接，靶向第一抗体的 VL 通过常规序列连接在 CL，两个 Fc 具有常规的 KiH 改造，以避免重链错配。具体例如：

分子编号	R1042: PD-L1_VH_IL15RA/TIGIT_VL_IL15/TIGIT_VH/PD-L1-VL(图 10 左)
第一多肽	@PD-L1 VH IL15RA_Fc-Knob(SEQ ID NO.1)
第二多肽	@TIGIT_VL_IL15 (SEQ ID NO.6)
第三多肽	@TIGIT_VH_CH1_Fc-Hole (SEQ ID NO.3)
第四多肽	@PD-L1 VL CL (SEQ ID NO.8)

R1043：具体选取靶向第二抗体（抗 TIGIT 抗体）的 VH 通过 Linker 连接在受体蛋白（IL15RA）上，再通过 Hinge 与抗体的 Fc 连接；靶向第一抗体（抗 PD-L1 抗体）的 VL 通过 Linker 连接在配体蛋白（IL15）上；另一端为靶向第一抗体的 VH 通过常规序列连接在 CH1，再通过 Hinge 与抗体的 Fc 连接，靶向第二抗体的 VL 通过常规序列连接在 CL，两个 Fc 具有常规的 KiH 改造，以避免重链错配。

分子编号	R1043: PD-L1_VH_IL15RA/TIGIT_VL_IL15/TIGIT_VH/PD-L1-VL
第一多肽	@TIGIT_VH_IL15RA_Fc-Knob(SEQ ID NO:5)
第二多肽	@PD-L1 VL_IL15 (SEQ ID NO:2)
第三多肽	@PD-L1 VH_CH1_Fc-Hole(SEQ ID NO.7)
第四多肽	@TIGIT_VL_CL (SEQ ID NO.4)

描述 Fab-IL21/IL21R_Fc 错配的构建方法：

选取靶向第二抗体（抗 PD-L1 抗体）的 VH 通过 Linker 连接在受体蛋白（IL21R）上，再通过 Hinge 与抗体的 Fc 连接；靶向第一抗体（抗 TIGIT 抗体）的 VL 通过 Linker 连接在配体蛋白（IL21）上；另一端为靶向第二抗体（抗 PD-L1 抗体）的 VL 连接在 CL 上，靶向结构第一抗体（抗 TIGIT 抗体）的 VH 连

接在 CH1 上, 再通过 Hinge 与抗体的 Fc 连接, 两端的 Fc 具有常规的 KiH 改造。具体例如:

分子编号	R1124: PD-L1_VH_IL21R_TIGIT_VL_IL21/TIGIT_VH/PD-L1-VL (图10右)
第一多肽	@PD-L1_VH_IL21R_Fc-Knob (SEQ ID NO:69) EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVYGDSITSGYWNWIRKPPGKGLGYMGIYSYTGSTYQNPSLKSRTFSR DTSKNQYYLKLSSVTAADTATYYCARSAWIRTYFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GCPDLVCYTDYLTQVICILEMWNHPSTLTLTWQDQYEELKDEATSCSLHRSAHNATHATYTCMDVDFHF MADDIFSQITDQSGQYSQECGSLLAESIKPAPPFDVTVTFSGQYQISWRSDYEDPAFYMLKGKLYELQ YRNRGDPWAVSPRRKLISVDSRSVSLPLEFRKDSYELQVRAGPMPGSSYQGTWSEWSDPVIFQTQSEEL KEEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSKDSGFFLASKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
第二多肽	@TIGIT_VL_IL21 (SEQ ID NO:48)
第三多肽	@TIGIT_VH_CH1_Fc-Hole (SEQ ID NO:70) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQ QGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第四多肽	@PD-L1_VL_CL (SEQ ID NO:35)

实施例 8、具有二硫键改造的双特异性抗体

在 IL2、IL2R α 之间设计二硫键改造 (将野生型白细胞介素 2 的氨基酸序列 (SEQ ID NO.21) 中第 75 位的氨基酸突变为半胱氨酸; 并将白细胞介素 2 受体 α 的氨基酸序列 (SEQ ID NO.22 或 SEQ ID NO.23) 的 N 端延伸两个或三个氨基酸, 其中, 延伸的第 2 位氨基酸为半胱氨酸), 帮助非共价连接的 IL2 和 IL2R α 之间形成共价二硫键连接。

示例性的阐述一种具有二硫键改造的双特异性抗体 (二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物) 的构建方法: 靶向肿瘤细胞或免疫细胞表面抗原的抗体 (例如 TIGIT 抗体) 的重链可变区 (VH) 通过 Linker 连接在 IL2R α 突变体上, 再通过 Hinge (铰链区) 与 hIgG1 抗体的 Fc 连接, 靶向相同抗原的抗体 (TIGIT 抗体) 的轻链可变区 (VL) 通过 Linker 与 IL2 突变体连接; 靶向免疫细胞或肿瘤细胞表面抗原的抗体 (例如 PD-L1 抗体) 的 VH 直接与 hIgG1 抗体的恒定区 (hIgG1) 连接, 靶向相同抗原的抗体 (PD-L1 抗体) 的 VL 直接与人免疫球蛋白轻链 kappa 抗体 (κ -IgLC) 连接, 制备具有靶向性的二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物。

根据以上构建方法, 发明人设计了 2 种二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物, 即二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 1 和二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 2; 而 IL2/IL2R α 复合物 3 为现有报道的复合物, 复合物 4 为二硫键未改造 IL2/IL2R α 复合物; 复合物 1、2、3、4 的具体组成和氨基酸序列如下:

二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 1 (样品 R1262) 的序列结构为: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc、TIGIT VL-IL2 突变体、PD-L1 VH-hIgG1 和 PD-L1 VL- κ -IgLC; 其中, TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.77 所示, TIGIT VL-IL2 突变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO.78 所示, PD-L1 VH-hIgG1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.79 所示, PD-L1 VL- κ -IgLC 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.80 所示。

分子编号	R1262: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc/TIGIT VL-IL2 突变体/PD-L1 VH-hIgG1/PD-L1 VL- κ -IgLC
第一多肽	@TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc (SEQ ID NO:77) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG CGELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSSHSSWDNQCTSSATRN TTKQVTPQPEEQKERKTTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV VLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT VL-IL2 突变体 (SEQ ID NO:78) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDY SLTISSLQPEDFATYYCQHFPGTPTFTFGQGTLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGAPTSSSTKKTQLQL EHLILLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLQAQCKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATVEFLNRWITFCQSIHSTLT
第三多肽	@PD-L1 VH-hIgG1 (SEQ ID NO:79) EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVYGDSITSGYWNWIRKPPGKGLGYMGIYSYTGSTYQNPSLKSRTFSR

	DTSKNQYYLKLSSVTAADTATYYCARSAWIRTYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVPEKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLVCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第四多肽	@PD-L1 VL-κ-IgLC (SEQ ID NO.80) EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSVSSSISSNLHWYQQKPKLLIYGTSLASGVPSRFSGSGSGTDFT LTINSLEAEDAATYYCQWSSYPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C

二硫键改造 IL2/IL2Rα 复合物 2 的序列结构为: TIGIT VH-IL2 突变体-Fc、TIGIT VL-IL2Rα 突变体、PD-L1 VH-hIgG1 和 PD-L1 VL-κ-IgLC; 其中, TIGIT VH-IL2 突变体-Fc 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.81 所示, TIGIT VL-IL2Rα 突变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO.82 所示, PD-L1 VH-hIgG1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.79 所示, PD-L1 VL-κ-IgLC 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.80 所示。

分子编号	二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 2: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc/TIGIT VL-IL2 突变体/ PD-L1 VH-hIgG1/PD-L1 VL-κ-IgLC
第一多肽	@TIGIT VH-IL2 突变体-Fc (SEQ ID NO.81) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEV LNLAQCKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIEFLNRWITFCQSIISTLTPKSSDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT VL-IL2R α 突变体 (SEQ ID NO.82) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSLAWYQQKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDY SLTISSLQPEDFATYYCQHFVGTPTFGQGTKEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGELCDDDPPEIPHAT FKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYRALHGRPAESVCKMTH GKTRWTQPQLICTG
第三多肽	@PD-L1 VH-hIgG1 (SEQ ID NO.79)
第四多肽	@PD-L1 VL-κ-IgLC (SEQ ID NO.80)

IL2/IL2Rα 复合物 3 的序列结构为: TIGIT VH-IL2Rα (L42C) -Fc、TIGIT VL-IL2 (F42C)、PD-L1 VH-hIgG1 和 PD-L1 VL-κ-IgLC; 其中, TIGIT VH-IL2Rα (L42C) -Fc 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.83 所示, TIGIT VL-IL2 (F42C) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.84 所示, PD-L1 VH-hIgG1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.79 所示, PD-L1 VL-κ-IgLC 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.80 所示; IL2Rα (L42C) 代表: 将 IL2Rα 的氨基酸序列中第 42 位亮氨酸突变为半胱氨酸, IL2 (F42C) 代表: 将 IL2 的氨基酸序列中第 42 位苯丙氨酸突变为半胱氨酸。

分子编号	二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 3: TIGIT VH-IL2R α (L42C) -Fc /TIGIT VL-IL2 (F42C) / PD-L1 VH-hIgG1/PD-L1 VL-κ-IgLC
第一多肽	@TIGIT VH-IL2Rα (L42C) -Fc (SEQ ID NO.83) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGSCYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRN TTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYR ALHGRPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT VL-IL2 (F42C) (SEQ ID NO.84) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSLAWYQQKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGTDY SLTISSLQPEDFATYYCQHFVGTPTFGQGTKEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGAPTSSSTKKTQLQL EHLHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTCKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLNLQSKNFHLRPRD LISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIEFLNRWITFCQSIISTLT
第三多肽	@PD-L1 VH-hIgG1 (SEQ ID NO.79)
第四多肽	@PD-L1 VL-κ-IgLC (SEQ ID NO.80)

实施例 9、FiBody 样品的制备

蛋白瞬转表达：

将含有目的基因的质粒通过与转染试剂 PEI 形成阳离子复合物后，导入到宿主细胞 Expi293，质粒在细胞内期间，质粒上的外源基因在细胞内发生转录翻译，从而得到目的蛋白。

Expi293 在 37℃、8%二氧化碳、130rpm 条件培养，并在转染前通过细胞计数，将 2E6 的细胞接种至 1L 摇瓶中，培养体系约为 300ml。配制转染复合物准备转染：首先将 750μg 目标质粒加入到含有 15mlOpti-MEM 试剂的 50ml 离心管中，轻轻混匀，标记为 A 管；将 1.5mg 转染试剂 PEI 加入到含有 15mlOpti-MEM 试剂的 50ml 离心管中，轻轻混匀后，室温孵育 5min，标记为 B 管；将 B 管 PEI 稀释液逐滴加入到 A 管 DNA 稀释液中，轻轻混匀后，室温孵育 15min，孵育结束后，将 PEI-目标质粒复合物加入到 Expi293 细胞，置于 37℃摇床中继续培养。直到 D7-D10 后收样。

蛋白纯化：

瞬转细胞表达液经过 9000rpm/20min 离心，收集上清，再经过 0.22μm 滤膜除菌过滤。纯化采用 ProA 亲和层析。过程如下，使用 AKTA avant 150 层析设备，用至少 5CV 平衡缓冲液（10mM PBS）平衡层析柱（如 MabSelectSuRe LX，GE），加载样品至层析柱，使目标蛋白吸附在层析柱上而其他杂质穿透分离。完成上样后使用至少 5CV 平衡缓冲液（10mM PBS）再次冲洗层析柱，随后使用洗脱缓冲液（20mM NaAc，pH=3.4）洗脱目标蛋白，收集管中预先加入中和缓冲液（1M Tris，pH8.0），中和缓冲液的加入体积根据洗脱样品的预估含量而定，一般加入 10%洗脱体积量。

实施例 10、FiBody 理化检测

样品经过一步纯化后通过 HPLC-SEC 进行检测（分析柱 TOSOH，TSKgel G2000）纯度，各个样品的表达量及纯度结果见下表。

双抗类型	样品编号	表达量 mg/L	纯度%
FiBody-A	R0950	25.1	89.2
	R0951	16.1	90.8
	R0952	14.6	84.7
	R1072	122.1	91.7
	R1109	70.2	98.4
	R1115	83.9	
FiBody-C	R1116	89.3	94.0
	R1119	22.9	95.3
FiBody-D	R1120	18.0	50.7
	R1123	49.6	92.9
FiBody-二硫键改造	R0954	17.1	91.0
	R1085	99.6	90.4
	R1086	66.13	56.1
FiBody-糖基化改造	R0955	7.6	90.9
	R1110	98.4	98.6
	R1111	107.6	92.4
FiBody-亲和力改造	R0960	17.0	90.4
ScFv-非对称（Y-Body）	R0809	1.5	36.8
ScFv-对称	R0810	10.0	68.9
CrossMab	R0959	1.4	41.4
FiBody-错配	R1042	12.9	41.9
	R1043	19.5	86.8
	R1124	14.5	65.6

样品 R0951 的 HPLC-SEC 进行检测结果如图 11 所示，样品 R1042 的 HPLC-SEC 进行检测结果如图 12 所示，样品 R0809 的 HPLC-SEC 进行检测结果如图 13 所示，样品 R1110 的 HPLC-SEC 进行检测结果如图 14 所示。

结果显示,相比于非对称 scFv（Y-Body，R0809）、对称 ScFv（R0810）、CrossMab（R0959）结构的双特异性抗体，FiBody 平台制备双特异性抗体（包括各种改造优化抗体）具有更高的表达量和/或更高的纯度。

意外的是具有错误配对形式的双特异性抗体（样品 R1042、R1043、R1124）也能表达并具有类似正常分子的表达量，但是具有明显低的纯度。

R1262 的 HPLC-SEC 检测结果如图 15 所示，结果说明：成功去除了游离轻链，且本发明制备得到的二硫键改造 IL2/IL2Rα 复合物 1 的纯度高。

实施例 11、FiBody 抗原亲和力检测

TIGIT 端结合活性分析

通过 FCM 实验方法检测双抗分子(TIGIT 端)与 CHO-TIGIT 细胞结合活性。配置 3%BSA 缓冲液:称取 4.5 gBSA 到 150mL 1XPBS 中,混匀后放置冰上备用;抗体稀释:将受试抗体、阳性对照用 3%BSA 稀释成初始浓度为 800nM,亚型对照稀释成初始浓度为 20 μ g/mL,体积 300 μ L,3 倍梯度稀释(100+200)共 10 个点;结合活性检测:细胞计数并铺板:将 R0254-3 细胞计数后,按 100 μ L,2E+05/孔分到 96 孔 V 型板中;先将不同浓度抗体 50 μ L 加入到细胞中,2-8 度孵育 0.5h,再加入 50 μ L 配体,2-8 度孵育 0.5h;350xg 离心 5min 后,去掉上清,按 200 μ L/孔 3%BSA;350xg 离心 5min 后,去掉上清,3%BSA 配制荧光抗体 PE Goat anti-human IgG Fc 和 PE Goat anti-mouse IgG Fc(1:500x 稀释),按 100 μ L/孔加入对应的 96 孔板中,2-8 度孵育 30min;350g 离心 5min,去上清,3%BSA 洗一遍细胞;350xg 离心 5min 后,去掉上清,按 100 μ L/孔加入 1XPBS 重悬细胞;按照 CytoFLEX 流式细胞仪标准操作规程上机检测。

R0950、R0951、R0952、R0954、R0955、R0960, R1123/R1119/R1120/R1124, R1042/R1043, R0810 的结果如图 16-图 19 所示;意外的是 R0950 (@TIGIT 在 Fab 端)结合活性低于 R0951~ R0960 (@TIGIT 在 IL15/IL15R 端);R0951~ R0960 结合活性与阳性对照 R0226 (Tigit 单克隆抗体, OMP-313R12, WO2016191643)相近;A 类和 D 类白细胞介素及其受体替换 CH1 和 CL 后,靶向区结合力并未受到影响,与阳性对照(R0226/R0774 (VH 如序列如 SEQ ID NO:73 所示, VL 序列如 SEQ ID NO:74 所示), Tigit 单克隆抗体)表现出了相当的亲和力;C 类分子的替换 CH1 和 CL 后靶向区受到影响,靶向结合力明显低于阳性对照(R0226/R0774, Tigit 单克隆抗体)。

二硫键改造优化样品 R1081、R1085 及糖基化样品改造分子与改造之前分子相比 tigit 端亲和力结果相当。

R1042、R1043 及 R1124 为错配测试分子,其 TIGIT 结合活性显著降低;R0810 是 ScFv 结构分子,结合活性也弱于对照分子 R0226。

R1262 的结果如图 20 所示,结果显示:二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 1 (R1262)与二硫键未改造 IL2/IL2R α 复合物(R1115)的亲和力相当,说明二硫键改造不会影响靶向区的亲和力。

PD-L1 端结合活性分析

通过 FCM 实验方法检测双抗分子(PD-L1 端)与 CHO-PD-L1 细胞结合活性。配置 3%BSA 缓冲液:称取 4.5 gBSA 到 150mL 1XPBS 中,混匀后放置冰上备用;抗体稀释:将受试抗体、阳性对照用 3%BSA 稀释成初始浓度为 800nM,亚型对照稀释成初始浓度为 20 μ g/mL,体积 300 μ L,3 倍梯度稀释(100+200)共 10 个点;结合活性检测:细胞计数并铺板:将 R0254-3 细胞计数后,按 100 μ L,2E+05/孔分到 96 孔 V 型板中;先将不同浓度抗体 50 μ L 加入到细胞中,2-8 度孵育 0.5h,再加入 50 μ L 配体,2-8 度孵育 0.5h;350xg 离心 5min 后,去掉上清,按 200 μ L/孔 3%BSA;350xg 离心 5min 后,去掉上清,3%BSA 配制荧光抗体 PE Goat anti-human IgG Fc 和 PE Goat anti-mouse IgG Fc(1:500x 稀释),按 100 μ L/孔加入对应的 96 孔板中,2-8 度孵育 30min;350g 离心 5min,去上清,3%BSA 洗一遍细胞;350xg 离心 5min 后,去掉上清,按 100 μ L/孔加入 1XPBS 重悬细胞;按照 CytoFLEX 流式细胞仪标准操作规程上机检测。

R0950、R0951、R0952、R0954、R0955、R0960, R1072、R1115-R1120, R1123-R1124, R0950、R1042、R1043, R1072、R1081-R1086, R1072、R1109-R1111 的结果如图 21-图 25 所示,意外的是@PD-L1 放在 IL15 端的活性要好于放在 Fab 端;R1042、R1043 及 R1124 是对应错配分子,活性明显很弱,其他 FiBody 均显示了与阳性抗体(PD-L1 单克隆抗体)相当的亲和力。其中 R0802 为(PD-L1 单抗, 176F9, VH 序列如 SEQ ID NO:36 所示, VL 序列如 SEQ ID NO:37 所示), R0514 为(PD-L1 单抗, Avelumab), R0919 为(PD-L1 单抗, VH 如序列如 SEQ ID NO:75 所示, VL 序列如 SEQ ID NO:76 所示), R0968 为(PD-L1 单抗, VH 如序列如 SEQ ID NO:71 所示, VL 序列如 SEQ ID NO:72 所示)。

R1262 的结果如图 26 所示,结果显示:二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 1 (R1262)与二硫键未改造 IL2/IL2R α 复合物 4 的双抗(R1115)相比,两者亲和力相当,说明二硫键改造不会影响靶向区的亲和力。

TIGIT 端结合阻断分析

通过 FCM 实验方法检测双抗分子(TIGIT 端)阻断配体与 CHO-TIGIT 细胞结合活性。配制 3%BSA 缓冲液:称取 4.5 g BSA 到 150mL 1 $\times$ PBS 中,混匀后放置冰上备用;抗体稀释:将受试抗体(R1262)、阳性对照抗体(R1115)用 3%BSA 稀释成初始浓度为 800nM,亚型对照抗体(hIgG1 抗体)用 3%BSA 稀释成初始浓度为 20 μ g/mL,体积 300 μ L。3 倍梯度稀释(100 μ L +200 μ L)共 10 个浓度;细胞计数并铺板:将 R0254-3 细胞计数后,按 100 μ L, 2E+05/孔分到 96 孔 V 型板中;先将不同浓度抗体 50 μ L 加入到细胞中,2-8 度孵育 0.5h,再加入 50 μ L 配体,2-8 度孵育 0.5h;350 $\times$ g 离心 5min 后,去掉上清,按 200 μ L/孔 3%BSA;350 $\times$ g 离心 5min 后,去掉上清,3%BSA 配制荧光抗体 PE Goat anti-human IgG Fc 和 PE Goat anti-mouse IgG Fc(1:500 $\times$ 稀释),按 100 μ L/孔加入对应的 96 孔板中,2-8 度孵育 30min;350g 离心 5min,去上清,3%BSA 洗一遍细胞;350 $\times$ g 离心 5min 后,去掉上清,按 100 μ L/孔加入 1 $\times$ PBS 重悬细胞;按照 CytoFLEX 流式细胞仪标准操作规程,上机检测。

R1262 检测结果如图 27 所示, 结果显示: 二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 1 (R1262) 与二硫键未改造 IL2/IL2R α 复合物 4 (R1115) 相比, 两者对配体与靶向区结合力的阻断效果相当。

实施例 12、FiBody 受体配体复合物 (IL15/IL15R) 的结合活性

抗体稀释: 用 FACS buffer 将所有分子稀释成初始浓度 400nM, 体积 180 μ L, 3 倍梯度稀释 (60+120), 10 个浓度; 细胞计数并铺板: 将 R0255-2 (CHO-mTigt) /293T-IL15R-28 细胞离心 250g 5min 后弃去上清, 用 FACS buffer 调整细胞密度为 2E+06, 按 100 μ L/管均分到 96 孔 V 型板中; 将上述稀释好的抗体加入到细胞中, 100 μ L/孔, 2-8 度孵育 0.5h; 取出 96 孔板, 250g 离心 5min, 小心去上清后, 加入 FACS buffer 200 μ L/孔, 再次 250g 离心 5min, 小心去上清; 用 FACS buffer 配制 PE 荧光二抗 (1:500 稀释), 按 100 μ L/孔加入对于的 96 孔板中, 重悬细胞, 2-8 度孵育 30min; 取出 96 孔板, 250g 离心 5min, 小心去上清后, 加入 FACS buffer 200 μ L/孔, 再次 250g 离心 5min, 小心去上清; 用 1xPBS 100 μ L/孔重悬, FACS 检测。

结果如图 28、图 29 所示: R0952 (IL15、IL15RA 换位)、R0960 (减活) 分子具有很低的 IL15 受体复合物结合活性; R0955 (去糖基化) IL15 活性下降; R0953、R0954 共价连接后活性与 R0951 类似, 说明对结构影响很小。

错配分子 R1042、R1043 与 R0951 活性相当, 说明没有产生错配, 即使是错误的 Fv 也能表达出来; 其中 R0655 为 (IL15/IL15RFc 融合蛋白, 见 SEQ ID NO:38)

实施例 13、二硫键改造分子电泳检测

对本发明实施例中二硫键改造优化样品 (R1072、R1081、R1082、R0954、R1084-R1086) 进行 SDS-PAGE 电泳检测。

结果如图 30 所示, 未进行二硫键改造的 R1072 分子在分子量 25KD~35KD 之间有条带, 说明存在游离轻链; 配受体二硫键改造分子为 R0954、R1085、R1086, 其中 R0954、R1086 电泳结果显示, 仍有非共价轻链存在 (25KD~35KD 之间有条带), R1085 无非共价轻链存在 (25KD~35KD 之间无条带), 说明 R1085 二硫键改造成功。

轻重链二硫键改造分子为 R1081、R1082、R1084, 电泳结果显示无非共价轻链存在 (25KD~35KD 之间无条带), 说明 R1081、R1082、R1084 二硫键改造成功。

对实施例 9 制备得到的 FiBody 样品 (实施例 8 对应构建的二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 1 和 2、IL2/IL2R α 复合物 3) 和实施例 2 的 R1115 进行 SDS-PAGE 电泳检测。

检测结果如图 31 所示, 其中, R1115 为二硫键未改造分子, 在分子量 25KD~35KD 之间有条带, 说明存在游离轻链; 二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 1 和 2 在分子量 25KD~35KD 之间无条带, 与 IL2/IL2R α 复合物 3 相同, 说明成功去除了游离轻链, 二硫键改造成功。

实施例 14、IL2R α 突变体的氨基酸序列的 N 端延伸的第 1 位和第 3 位氨基酸的种类对 IL2/IL2R α 复合物改造后引入的二硫键形成的影响

当第二抗原结合部分通过接头间接地与 IL2R α 突变体的 N 端相连时, IL2R α 突变体的氨基酸序列的 N 端延伸三个氨基酸; 为了进一步明确 IL2R α 突变体的氨基酸序列的 N 端延伸的第 1 位和第 3 位氨基酸的种类对 IL2/IL2R α 复合物改造后引入的二硫键形成的影响, 进行如下实验:

1、延伸的第 3 位氨基酸的种类对 IL2/IL2R α 复合物改造后引入的二硫键形成的影响

选择延伸的第 3 位氨基酸为芳香族氨基酸 (以苯丙氨酸为例)、R 基不带电荷的氨基酸 (以丝氨酸为例)、R 基带正电荷的氨基酸 (以赖氨酸为例) 或 R 基带负电荷的氨基酸 (以天冬氨酸为例) 中的任一种, 构建并制备二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 5、6、7、8 (简称依次为 R1493、R1494、R1495、R1496), 与二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 1 (IL2/IL2R α 复合物 1 中 IL2R α 突变体的氨基酸序列的 N 端延伸的第 3 位氨基酸为甘氨酸 (非极性脂肪酸氨基酸)) 一起作为实验组, 以二硫键未改造 IL2/IL2R α 复合物 4 为对照组。

二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 5、6、7、8 与实施例 8 中制备二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 1 的过程相同。

二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 5、6、7、8 的序列结构均为: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc、TIGIT VL-IL2 突变体 (SEQ ID NO: 78)、PDL1 VH-hIgG1 (SEQ ID NO: 79) 和 PDL1 VL- κ -IgLC (SEQ ID NO: 80); 其中, 二硫键改造 IL2/IL2R α 复合物 5、6、7、8 的 TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc 的氨基酸序列如依次 SEQ ID NO: 85、SEQ ID NO: 86、SEQ ID NO: 87、SEQ ID NO: 88 所示 (其中, IL2R α 突变体的氨基酸序列的 N 端延伸的三个氨基酸以粗体示出, 带有下划线的为延伸的第 3 位氨基酸):

分子编号	R1493: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc / TIGIT VL-IL2 突变体 / PD-L1 VH-hIgG1 / PD-L1 VL- κ -IgLC
第一多肽	@TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc (SEQ ID NO:85) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSTSYWMNWVRQAPGGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDIYGHGAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG CGELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCCQTSSATRN TTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPOLICTGEPKSSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPPKPKDITLMISRTPE

	VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT VL-IL2 突变体 (SEQ ID NO.78)
第三多肽	@PD-L1 VH-hlgG1 (SEQ ID NO.79)
第四多肽	@PD-L1 VL-κ-IgLC (SEQ ID NO.80)
分子编号	R1494: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc /TIGIT VL-IL2 突变体/ PD-L1 VH-hlgG1/PD-L1 VL-κ-IgLC
第一多肽	@TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc (SEQ ID NO.86) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSTSYWMNWVRQAPGGGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG CGELCDDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRN TTKQVTPQPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTPQQLICTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT VL-IL2 突变体 (SEQ ID NO.78)
第三多肽	@PD-L1 VH-hlgG1 (SEQ ID NO.79)
第四多肽	@PD-L1 VL-κ-IgLC (SEQ ID NO.80)
分子编号	R1495: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc /TIGIT VL-IL2 突变体/ PD-L1 VH-hlgG1/PD-L1 VL-κ-IgLC
第一多肽	@TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc (SEQ ID NO.87) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSTSYWMNWVRQAPGGGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG CGELCDDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRN TTKQVTPQPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTPQQLICTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT VL-IL2 突变体 (SEQ ID NO.78)
第三多肽	@PD-L1 VH-hlgG1 (SEQ ID NO.79)
第四多肽	@PD-L1 VL-κ-IgLC (SEQ ID NO.80)
分子编号	R1496: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc /TIGIT VL-IL2 突变体/ PD-L1 VH-hlgG1/PD-L1 VL-κ-IgLC
第一多肽	@TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc (SEQ ID NO.88) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSTSYWMNWVRQAPGGGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG CGELCDDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRN TTKQVTPQPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTPQQLICTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT VL-IL2 突变体 (SEQ ID NO.78)
第三多肽	@PD-L1 VH-hlgG1 (SEQ ID NO.79)
第四多肽	@PD-L1 VL-κ-IgLC (SEQ ID NO.80)

将获得的二硫键改造 IL2/IL2Rα 复合物 5、6、7、8 以及复合物 1 进行 SDS-PAGE 电泳检测，二硫键未改造 IL2/IL2Rα 复合物 4 为对照组，以探究白细胞介素 2 受体 α 突变体的氨基酸序列的 N 端延伸的第 3 位氨基酸的种类对 IL2/IL2Rα 复合物改造后引入的二硫键形成的影响，实验结果如图 32 所示，可以看出，与对照组相比，二硫键改造 IL2/IL2Rα 复合物 5、6、7、8 均成功去除了游离轻链，二硫键改造成功；表明延伸的第 3 位氨基酸为非极性脂肪氨基酸、芳香族氨基酸、R 基不带电荷的氨基酸、R 基带正电荷的氨基酸或 R 基带负电荷的氨基酸，均不会影响 IL2/IL2Rα 复合物改造后引入的二硫键的形成。

2、延伸的第 1 位和第 3 位氨基酸组合的种类对 IL2/IL2Rα 复合物改造后的二硫键形成的影响

选择延伸的第 1 位和第 3 位氨基酸为非极性脂肪氨基酸（以甘氨酸为例）、芳香族氨基酸（以苯丙氨酸为例）、R 基不带电荷的氨基酸（以丝氨酸为例）、R 基带正电荷的氨基酸（以赖氨酸为例）或 R 基带负电荷的氨基酸（以天冬氨酸为例）中的任一种组合，构建并制备二硫键改造 IL2/IL2Rα 复合物 9、10、11、12、13（简称依次为 R1662、R1663、R1664、R1665、R1666），与二硫键改造 IL2/IL2Rα 复合物 1 一起作为实验组，以二硫键未改造 IL2/IL2Rα 复合物 4 为对照组。

二硫键改造 IL2/IL2Rα 复合物 9、10、11、12、13 与实施例 8 中制备二硫键改造 IL2/IL2Rα 复合物 1 的过程相同。

二硫键改造 IL2/IL2Rα 复合物 9、10、11、12、13 的序列结构均为：TIGIT VH-IL2Rα 突变体-Fc、TIGIT VL-IL2 突变体（SEQ ID NO: 78）、PDL1 VH-hlgG1（SEQ ID NO: 79）和 PDL1 VL-κ-IgLC（SEQ ID NO: 80）；其中，二硫键改造 IL2/IL2Rα 复合物 9、10、11、12、13 的 TIGIT VH-IL2Rα 突变体-Fc 的氨基酸序

列如依次 SEQ ID NO: 89、SEQ ID NO: 90、SEQ ID NO: 91、SEQ ID NO: 92、SEQ ID NO: 93 所示 (其中, 白细胞介素 2 受体 α 突变体的氨基酸序列的 N 端延伸的三个氨基酸以粗体示出, 带有下划线的为延伸的第 1 位和第 3 位氨基酸);

分子编号	R1662: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc /TIGIT VL-IL2 突变体/ PD-L1 VH-hIgG1/PD-L1 VL-κ-IgLC
第一多肽	@TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc (SEQ ID NO.89) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG <u>C</u> SFELCDDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRN TTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT VL-IL2 突变体 (SEQ ID NO.78)
第三多肽	@PD-L1 VH-hIgG1 (SEQ ID NO.79)
第四多肽	@PD-L1 VL- κ -IgLC (SEQ ID NO.80)
分子编号	R1663: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc /TIGIT VL-IL2 突变体/ PD-L1 VH-hIgG1/PD-L1 VL-κ-IgLC
第一多肽	@TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc (SEQ ID NO.90) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG <u>C</u> DFELCDDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRN TTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT VL-IL2 突变体 (SEQ ID NO.78)
第三多肽	@PD-L1 VH-hIgG1 (SEQ ID NO.79)
第四多肽	@PD-L1 VL- κ -IgLC (SEQ ID NO.80)
分子编号	R1664: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc /TIGIT VL-IL2 突变体/ PD-L1 VH-hIgG1/PD-L1 VL-κ-IgLC
第一多肽	@TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc (SEQ ID NO.91) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG <u>C</u> DFELCDDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRN TTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT VL-IL2 突变体 (SEQ ID NO.78)
第三多肽	@PD-L1 VH-hIgG1 (SEQ ID NO.79)
第四多肽	@PD-L1 VL- κ -IgLC (SEQ ID NO.80)
分子编号	R1665: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc /TIGIT VL-IL2 突变体/ PD-L1 VH-hIgG1/PD-L1 VL-κ-IgLC
第一多肽	@TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc (SEQ ID NO.92) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG <u>C</u> DFELCDDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRN TTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
第二多肽	@TIGIT VL-IL2 突变体 (SEQ ID NO.78)
第三多肽	@PD-L1 VH-hIgG1 (SEQ ID NO.79)
第四多肽	@PD-L1 VL- κ -IgLC (SEQ ID NO.80)
分子编号	R1666: TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc /TIGIT VL-IL2 突变体/ PD-L1 VH-hIgG1/PD-L1 VL-κ-IgLC
第一多肽	@TIGIT VH-IL2R α 突变体-Fc (SEQ ID NO.93) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMFKDRV TITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG <u>C</u> KFELCDDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRN TTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCTRVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLKSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

第二多肽	@TIGIT VL-IL2 突变体 (SEQ ID NO.78)
第三多肽	@PD-L1 VH-hIgG1 (SEQ ID NO.79)
第四多肽	@PD-L1 VL-κ-IgLC (SEQ ID NO.80)

将获得的二硫键改造 IL2/IL2Rα 复合物 9、10、11、12、13 以及复合物 1 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 二硫键未改造 IL2/IL2Rα 复合物 4 为对照组, 以探究白细胞介素 2 受体 α 突变体的氨基酸序列的 N 端延伸的第 1 位和第 3 位氨基酸组合的种类对 IL2/IL2Rα 复合物改造后引入的二硫键形成的影响, 实验结果如图 33 所示, 可以看出, 与对照组相比, 二硫键改造 IL2/IL2Rα 复合物 9、10、11、12、13 均成功去除了游离轻链, 二硫键改造成功; 表明延伸的第 1 位和第 3 位氨基酸为非极性脂肪氨基酸、芳香族氨基酸、R 基不带电荷的氨基酸、R 基带正电荷的氨基酸或 R 基带负电荷的氨基酸的任意组合, 均不会影响 IL2/IL2Rα 复合物改造后引入的二硫键的形成。

以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合, 为使描述简洁, 未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述, 然而, 只要这些技术特征的组合不存在矛盾, 都应当认为是本说明书记载的范围。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式, 其描述较为具体和详细, 但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是, 对于本领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明构思的前提下, 还可以做出若干变形和改进, 这些都属于本发明的保护范围。因此, 本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

序列 36:@PD-L1:VH (SEQ ID NO:36)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARIKLGTVTVDYWGQGTLLTVSS

序列 37:@PD-L1:VL (SEQ ID NO:37)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGS
KSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYSSSTRVFGTGKVTVL

R0655 氨基酸序列: (SEQ ID NO:38)

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFWNNVEV
HTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSEKFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP
PEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSLRVEKKNWVERN
SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGITCPPMSVEHADIWVKSYSLY
SRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAVHQRPAAPPSTVTAGVTPQPELS
SGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPKSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV
YPQGHSDTTSGGGGGGGGGGGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAM
KCFLLELQVISLESGDAIHDTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECELEEKNKEFLQSFVHIVQMFIN
S

R0968PD-L1 VH 氨基酸序列: (SEQ ID NO:71)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVYGDSITSGYWNWIRKPPGKCLEYIGYISYTGSTYQNPSLKSRTIM
SRDTSKNQYYLKLSSVTAADTAVYYCARSRAWIRTYFDYWGQGTLLTVSS

R0968PD-L1 VL 氨基酸序列: (SEQ ID NO:72)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSVSSISSNLHWYQQKPGKAPKRWIYGTSNLSAGVPSRFSGSGSG
TDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSYPLTFGCGTKLEIK

R0774 TIGIT VH 氨基酸序列: (SEQ ID NO:73)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGMIRPSDSETRLNQMF
KDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGIHDYGHGAYWGQGTLLTVSS

R0774 TIGIT VL 氨基酸序列: (SEQ ID NO:74)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYNLAWYQQKPGKSPKLLVYAASHLPDGVPSRFSGSGSGT
DYSLTISLQPEDFATYYCQHFVGTPTFTFGQGTKEIK

R0919 PD-L1 VH 氨基酸序列: (SEQ ID NO:75)

EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVYGDSITSGYWNWIRKPPGKGLEWIMGYISYTGSTYQNPSLKSRTIF
SRDTSKNQYYLKLSSVTAADTATYYCARSRAWIRTYFDYWGQGTLLTVSS

R0919 PD-L1 VL 氨基酸序列: (SEQ ID NO:76)

EIVLTQSPDFQSVPKEKVTITCSVSSISSNLHWYQQKPDQSPKLLIYGTSNLSAGVPSRFSGSGSGT
DFTLTINSLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKEIK

权 利 要 求 书

1. 一种双特异性融合多肽，其包含第一抗原结合部分，所述第一抗原结合部分包括：
第一多肽，所述第一多肽自 N 末端至 C 末端包含第一抗体的第一重链可变结构域 VH1，其可操作性地连接至第一缀合片段，和
第二多肽，所述第二多肽自 N 末端至 C 末端包含第一抗体的第一轻链可变结构域 VL1，其可操作地
5 连接至第二缀合片段，
所述第一缀合片段和所述第二缀合物片段能够特异性结合；
其中，所述第一缀合物片段为受体，所述第二缀合片段为配体；或者所述第一缀合物片段为配体，所述
第二缀合片段为受体。
2. 根据权利要求 1 所述的双特异性融合多肽，还包括第二抗原结合部分，所述第二抗原结合部分不同
10 于所述第一抗原结合部分；
所述第二抗原结合部分包括：
第三多肽，所述第三多肽自 N 末端至 C 末端包含第二抗体的第二重链可变结构域 VH2，其可操作性
地连接至第三缀合片段，和
第四多肽，所述第四多肽自 N 末端至 C 末端包含第二抗体的第二轻链可变结构域 VL2，其可操作地
15 连接至第四缀合片段；
其中，所述第三缀合片段和所述第四缀合物片段能够特异性结合；所述第三缀合物片段为受体，所述
第四缀合片段为配体；或者所述第三缀合物片段为配体，所述第四缀合片段为受体；和
所述第三缀合片段和/或所述第四缀合物片段与所述第一缀合物片段和/或所述第二缀合物片段选自不
同的受体和配体。
20 3. 根据权利要求 1 所述的双特异性融合多肽，还包括第二抗原结合部分，所述第二抗原结合部分不同
于所述第一抗原结合部分；
所述第二抗原结合部分包括：
第三多肽，所述第三多肽自 N 末端至 C 末端包含第二抗体的第二重链可变结构域 VH2，其可操作性
地连接至抗体重链恒定区 CH1，和
25 第四多肽，所述第四多肽自 N 末端至 C 末端包含第二抗体的第二轻链可变结构域 VL2，其可操作地
连接至抗体轻链恒定区 CL。
4. 如上任一项所述的双特异性融合多肽，所述受体和配体之间包含至少一个非天然的链间键，所述非
天然链间键能够增强受体和配体间的特异性结合力。
5. 根据权利要求 4 所述的双特异性融合多肽，所述非天然链间键形成于受体包含的第一突变残基和配
30 体包含的第二突变残基之间。
6. 根据权利要求 4 所述的双特异性融合多肽，所述非天然链间键形成于第一重链可变结构域 VH1 包
含的第一突变残基和第一轻链可变结构域 VL1 包含的第二突变残基之间。
7. 根据权利要求 5 或 6 所述的双特异性融合多肽，所述第一和所述第二突变残基中的至少一个为半胱
氨酸残基。
35 8. 根据权利要求 7 所述的双特异性融合多肽，所述非天然链间键为二硫键。
9. 如上任一项所述的双特异性融合多肽，其中至少一个天然糖基化位点在所述受体和/或配体中不存
在。
10. 如上任一项所述的双特异性融合多肽，所述受体及其配体选自白细胞介素及其受体。
11. 根据权利要求 10 所述的双特异性融合多肽，所述白细胞介素及其受体立体构像为托举型，选自
40 IL15/IL15R、IL2/IL2R、IL4/IL-4Rα+Rγ、IL-6/IL-6R、IL-11/IL-11R、IL-13/IL-13R1、IL-20/IL20Rα+IL20Rβ
和/或 IL24/IL20Rα+IL20Rβ。
12. 根据权利要求 10 所述的双特异性融合多肽，所述白细胞介素及其受体立体构像为钳型，选自
IL7/IL7R、IL21/IL21R、IL23A/IL12B。
13. 根据权利要求 11 所述的双特异性融合多肽，所述配体和受体选自 IL15 和 IL15Rα。
45 14. 根据权利要求 13 所述的双特异性融合多肽，所述 IL15 第 90 位的 E 突变为 C，且所述 IL15Rα 第
67 位的 P 突变位 C。
15. 根据权利要求 13 所述的双特异性融合多肽，所述第一重链可变结构域 VH1 与第一轻链可变结构域
VL1 之间存在非天然二硫键，优选地，第一重链可变结构域 VH1 与第一轻链可变结构域 VL1 包含以下
任一突变组合：

组合	VH	VL
1	37C	95C
2	44C	100C
3	44C	101C

4	44C	105C
5	45C	87C
6	45C	98C
7	100C	50C
8	100bC	49C
9	98C	46C
10	101C	46C
11	105C	43C
12	106C	57C
13	108C	43C

16.根据权利要求 13~15 任一项所述的双特异性融合多肽,所述 IL15 第 61 位的 D 突变为 N,第 64 位的 E 突变为 Q,和/或第 65 位的 N 突变为 D。

17.根据权利要求 13~16 任一项任一项所述的双特异性融合多肽,所述 IL15 至少一个 N 糖基化位点不存在;

5 优选地,所述 N 糖基化位点选自 N71、N79 和/或 N112;优选地,所述 IL15 包含以下氨基酸突变: N71Q、N79Q 和/或 N112Q。

18.根据权利要求 13~17 任一项任一项所述的双特异性融合多肽,所述 IL15Ra 至少一个 O 糖基化位点不存在;

10 优选地,所述 O 糖基化位点选自 T2、T81 和/或 T86;优选地,所述 IL15Ra 包含以下氨基酸突变: T2A、T81A 和/或 T86A。

19.根据权利要求 11 所述的双特异性融合多肽,所述配体和受体选自 IL2 和 IL2Ra。

20.根据权利要求 19 所述的双特异性融合多肽,所述 IL2 第 75 位的 S 突变为 C,且所述 IL2Ra 的 N 端延伸两个或三个氨基酸;

15 所述 IL2Ra 的 N 端延伸两个氨基酸时,延伸的第 2 位氨基酸为半胱氨酸,延伸的第 1 位氨基酸为非极性脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸、R 基不带电荷的氨基酸、R 基带正电荷的氨基酸或 R 基带负电荷的氨基酸中的任一种;

所述 IL2Ra 的 N 端延伸三个氨基酸时,延伸的第 2 位氨基酸为半胱氨酸,延伸的第 1 位和第 3 位氨基酸为非极性脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸、R 基不带电荷的氨基酸、R 基带正电荷的氨基酸或 R 基带负电荷的氨基酸中的任一种。

20 21.如上任一项所述的双特异性融合多肽,其包含抗体 Fc 恒定区。

22.根据权利要求 21 所述的双特异性融合多肽,所述抗体 Fc 恒定区是异源二聚体。

23.根据权利要求 21 或 22 所述的双特异性融合多肽,所述抗体 Fc 恒定区为基于 KiH、疏水相互作用、静电相互作用、亲水相互作用和/或增加的柔性而缔合成为异源二聚体。

25 24.根据权利要求 21 或 22 任一项所述的双特异性融合多肽,所述抗体 Fc 恒定区包含 CH2、CH3 以及任选的 CH4,所述 CH2、CH3 和/或任选的 CH4 被替换成所述受体及其配体。

25.如上任一项所述的双特异性融合多肽,所述第一抗原结合部分与所述第二抗原结合部分结合不同的抗原或者结合同一抗原的不同表位;

优选地,所述第一抗原结合部分靶向免疫细胞,所述第二抗原结合部分靶向肿瘤细胞;

优选地,所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分均靶向肿瘤细胞;

30 优选地,所述第一抗原结合部分与所述第二抗原结合部分均靶向免疫细胞。

26.分离的核酸,其编码权利要求 1~25 任一项所述的双特异性融合多肽。

27.含有权利要求 26 所述核酸的载体。

28.含有权利要求 26 所述核酸或者权利要求 27 所述载体的宿主细胞。

35 29.药物组合物,其包含权利要求 1~25 任一项所述的双特异性融合多肽,和药学上可接受的载体,赋形剂,或稳定剂。

30.权利要求 1~25 任一项所述的双特异性融合多肽在制备用于治疗疾病的药物中的应用。