



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201930353 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：107138607

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 31 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2017/11/01

歐洲專利局

17199542.6

(71)申請人：瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

瑞士

(72)發明人：貝卡克 瑪莉娜 BACAC, MARINA (IT)；葛洛 瑞秋 珊卓 GRAU-RICHARDS, SANDRA (DE)；克雷恩 克里斯俊 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；山姆 喬翰尼斯 SAM, JOHANNES (DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)；藍 賽嬪 LANG, SABINE (DE)；阿曼 瑪麗亞 AMANN, MARIA (DE)；品洽 慕帝塔 PINCHA, MUDITA (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：38 項 圖式數：35 共 341 頁

(54)名稱

使用經靶向之 OX40 促效劑的組合療法

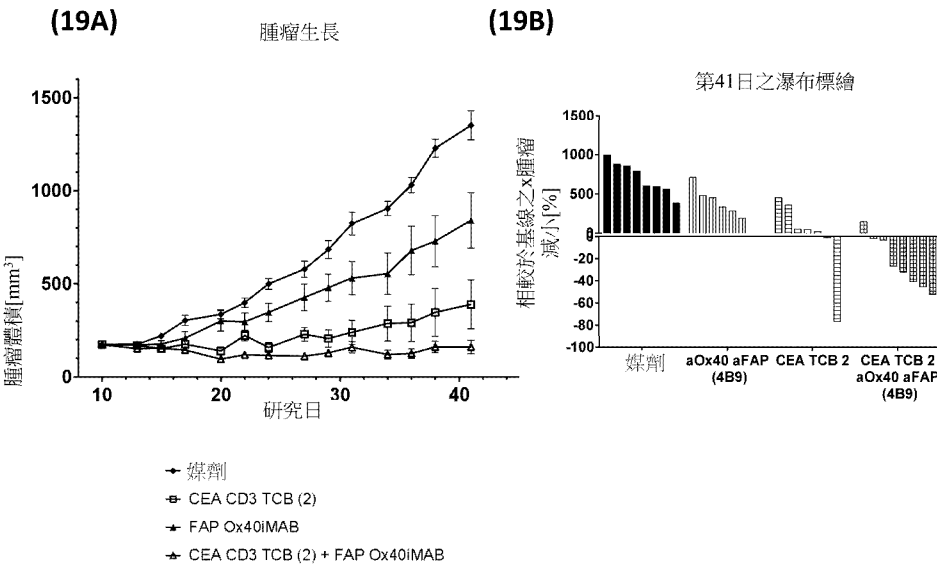
COMBINATION THERAPY WITH TARGETED OX40 AGONISTS

(57)摘要

本發明係關於採用腫瘤靶向之雙特異性 OX40 抗體(尤其係抗 FAP/抗 OX40 抗體)與對腫瘤相關抗原具有特異性之 T 細胞活化抗 CD3 雙特異性抗體組合的組合療法、此等組合療法用於治療癌症的用途及使用該等組合療法的方法。

The present invention relates to combination therapies employing tumor targeted bispecific OX40 antibodies, in particular anti-FAP/anti-OX40 antibodies in combination with T-cell activating anti-CD3 bispecific antibodies specific for a tumor-associated antigen, the use of these combination therapies for the treatment of cancer and methods of using the combination therapies.

指定代表圖：



【圖19】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

使用經靶向之OX40促效劑的組合療法

【英文發明名稱】

COMBINATION THERAPY WITH TARGETED OX40 AGONISTS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於採用腫瘤靶向之抗CD3雙特異性抗體及包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的經靶向之OX40促進劑(尤其係雙特異性OX40抗體)的組合療法、此等組合療法用於治療癌症的用途及使用該等組合療法的方法。亦包括採用包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的OX40促進劑與腫瘤靶向之抗CD3雙特異性抗體及阻斷PD-L1/PD-1相互作用的試劑(特別是PD-L1抗體)的組合療法。

【先前技術】

【0002】 癌症為世界範圍內死亡之主要原因之一。儘管在治療選擇方面有所進展，但患有晚期癌症的患者之預後仍然較差。因此，對於增加癌症患者之存活期而不引起不可接受之毒性的最佳療法存在持久且緊急的醫療需要。來自臨床試驗之近期結果已展示免疫療法(特定言之免疫檢查點抑制劑)可延長癌症患者之總存活期且引起持久反應。不管該等有前景的結果如何，當前基於免疫之療法僅對一部分患者有效，且需要組合策略以改良治療效益。

【0003】 使患者自身之免疫系統恢復以對抗癌症的一種方式為使用T細胞雙特異性抗體(TCB)。此等分子由對T細胞上之T細胞受體(TCR)具

有特異性之促效抗CD3單元及對獨特癌抗原具有特異性之靶向部分構成。舉例而言，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體為靶向腫瘤細胞上表現之CEA及呈現於T細胞上之CD3 ϵ 鏈(CD3 ϵ)的分子。TCB再導向多株T細胞以裂解在其細胞表面上表現各別靶抗原之癌細胞。在此類靶抗原不存在的情況下不會發生T細胞活化。在CEA陽性癌細胞存在下，無論係循環或組織駐存的，藥理學活性劑量將觸發T細胞活化及相關細胞介素釋放。與腫瘤細胞衰竭並行，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體在第一次投與之後24小時內引起末梢血液中的T細胞之暫時減少且引起細胞介素釋放之高峰，繼之以72小時內的迅速T細胞恢復及細胞介素位準至基線之恢復。因此，為了達成腫瘤細胞之完全消除，需要保持T細胞活化及對癌細胞之免疫反應的額外試劑。

【0004】 TCR之觸發增加，其係視此初級刺激之強度及持續時間、協同刺激分子(例如OX40)之表現而定，OX40係腫瘤壞死因子受體(TNFR)總科之成員。此受體藉由其各別配體之伴隨性促效接合又提昇標誌T細胞效應物功能，如某些促炎性細胞介素(IFN- γ 、IL-2、TNF- α)之增殖、存活及分泌，同時亦抑制遏制機制，例如，FoxP3之表現及IL-10之分泌(M. Croft等人，Immunol. Rev. 2009, 229(1), 173-191, I. Gramaglia等人，J. Immunol. 1998, 161(12), 6510-6517; S. M. Jensen等人，Seminars in Oncology 2010, 37(5), 524-532)。需要此協同刺激以便尤其在弱腫瘤抗原激活之環境中使T細胞抵抗腫瘤細胞之全部潛力升高並考慮到保護記憶形成而在第一次攻擊之後保持抗腫瘤反應。

【0005】 然而，某些腫瘤中之免疫抑制微環境在共抑制性信號(例如，PD-L1)方面較高，但缺乏足夠的OX40配體表現。在此環境中對T細

胞之持久激活會導致T細胞活化之衰減、免疫監視之窮竭及逃避(Sharpe等人，Nat Rev 2002) (Keir ME等人，2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677)。

【0006】 一種特異性恢復腫瘤微環境中之OX40協同刺激的方式為雙特異性抗體，其由腫瘤相關抗原(例如，腫瘤基質中之纖維母細胞活化蛋白(FAP))之至少一個抗原結合域及OX40之至少一個抗原結合域構成。舉例而言，已在WO 2017/055398 A2及WO 2017/060144 A1中描述此類雙特異性抗體。藉由細胞表面FAP對此類雙特異性分子之交聯及表面固定化產生用於OX40陽性T細胞之高促效基質，其中該基質支援NF κ B介導之效應物功能且可替換OX40配體進行之接合。針對大量人類腫瘤指示報導在腫瘤細胞本身上抑或在免疫抑制癌症相關纖維母細胞(CAF)上之高FAP表現。

【0007】 在具有強免疫抑制或廢表型之某些患者中，僅多株但腫瘤特異性T細胞募集(信號1)與腫瘤限制性陽性協同刺激(信號2)之組合可能促進充分抗腫瘤功效及延長的自適應免疫保護。此可持久驅動腫瘤微環境朝向較多免疫活化狀態及較少免疫抑制狀態。OX40之FAP依賴性協同刺激亦可促進在將允許全身暴露及相關副作用之減少的較低瘤內濃度下對腫瘤細胞之TCB介導之殺滅。此外，治療間隔可能因為較低TCB濃度可能仍為活性的而延長。

【0008】 在本專利申請案中，提供用於TCB (抗CEA/抗CD3雙特異性抗體及抗FolR/抗CD3雙特異性抗體)與雙特異性抗FAP/抗OX40抗體之活體外及活體內資料，其支援將T細胞募集劑與腫瘤靶向之OX40促效劑組合以改良抗腫瘤反應之數量及品質的基本原理。

【發明內容】

【0009】 本發明係關於包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體(特定言之，抗纖維母細胞活化蛋白(FAP)/抗OX40雙特異性抗體)及其與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合之用途，尤其係關於其在用於治療或延遲癌症之進展，更特別地係用於治療或延遲實體腫瘤之進展之方法中的用途。已發現，本文中所描述之組合療法在抑制腫瘤生長及消除腫瘤細胞方面比單獨使用抗CD3雙特異性抗體之治療更加有效。

【0010】 在一個態樣中，本發明提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體，其供在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合使用。在一個態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體，其供在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體與對另一腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合使用。在一個態樣中，對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體為抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體。特定而言，對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體為抗CEA/抗CD3雙特異性抗體。

【0011】 在另一態樣中，包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至

少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體係用於如前文所描述之方法中，其中將包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體及對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體以單一組合物之形式一起投與或以兩種或更多種不同組合物的形式分別投與。

【0012】 在另一態樣中，包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體係用於如前文所描述之方法中，其中包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體協同作用。

【0013】 在另一態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體，其供在用於治療或延遲癌症之進展的方法中使用，其中包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體係與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體同時、之前或之後投與。

【0014】 特定言之，包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體為抗纖維母細胞活化蛋白(FAP)/抗OX40雙特異性抗體。在一個態樣中，抗FAP/抗OX40抗體為OX40促效劑。在一個態樣中，抗FAP/抗OX40抗體為包含Fc域之抗原結合分子。在特定態樣中，抗FAP/抗OX40抗體為包含具有減少Fc γ 受體結合及/或效應物功能之修飾的Fc域的抗原結合分子。藉由腫瘤相關抗原之交聯使得有可能避免非特異性Fc γ R介導之交聯，且因此可投與相較於普通OX40抗體更高且更有效劑量之抗FAP/抗OX40抗體。

【0015】 在一個態樣中，本發明提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體係與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合使用，且其中該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於FAP的至少一個抗原結合域，該至少一個抗原結合域包含：

(a)重鏈可變區(V_H FAP)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_L FAP)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列之CDR-L3，或 (b)重鏈可變區(V_H FAP)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_L FAP)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之CDR-L3。

【0016】 在另一態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所定義之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體包含：能夠特異性結合於FAP之至少一個抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之重鏈可變區(V_H FAP)及含有SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_L FAP)；或

能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及含有SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。在特定態樣中，雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於FAP之至少一個抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。在另一態樣中，雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於FAP之至少一個抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【0017】 在另一態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所定義之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於OX40的至少一個抗原結合域，該至少一個抗原結合域包含：(a)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列之CDR-L3，或 (b)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、

(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列之CDR-L3，或 (c)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之CDR-L3，或 (d)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列之CDR-L3，或 (e)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列之CDR-L3，或 (f)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR-L1，(v)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列之CDR-L3，或 (g)重鏈可變區

(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之CDR-L1，(v)包含SEQ ID NO: 33之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之CDR-L3。

【0018】 更特定而言，雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於OX40之至少一個抗原結合域，該至少一個抗原結合域包含：(a)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1，(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列之CDR-L3。

【0019】 在另一態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於OX40的至少一個抗原結合域，該至少一個抗原結合域包含：(a)包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 41之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或 (b)包含SEQ ID NO: 42之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或 (c)包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含

SEQ ID NO: 45之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或 (d)包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 47之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或 (e)包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 49之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或 (f)包含SEQ ID NO: 50之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或 (g)包含SEQ ID NO: 52之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 53之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)。

【0020】 在特定態樣中，雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於OX40之至少一個抗原結合域，該至少一個抗原結合域包含：(a)包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 41之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)。

【0021】 在一個態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體為抗原結合分子，其進一步包含由能夠進行穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc域。特定言之，雙特異性OX40抗體為抗原結合分子，其包含IgG Fc域，具體言之IgG1 Fc域或IgG4 Fc域。更特定言之，雙特異性OX40抗體為包含Fc域之抗原結合分子，該Fc域包含減少與Fc受體之結合及/或效應物功能之一或多個胺基酸取代。在特定態樣中，雙特異性OX40抗體包含IgG1 Fc域，該IgG1 Fc域包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G。

【0022】 在本發明之另一態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展的方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體包含與腫瘤相關標靶之單價結合及與OX40之至少二價結合。在一個態樣中，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體包含與腫瘤相關標靶之單價結合及與OX40之二價結合。在特定態樣中，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體包含與腫瘤相關標靶之單價結合及與OX40之四價結合。

【0023】 在另一態樣中，本發明提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展的方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於OX40之第一Fab片段，其在CH1域之C端處融合至能夠特異性結合於OX40之第二Fab片段之VH域，及能夠特異性結合於OX40之第三Fab片段，其在CH1域之C端處融合至能夠特異性結合於OX40之第四Fab片段之VH域。

【0024】 在一個態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展的方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體包含 (i)包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 55之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈，或 (ii)包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈，或 (i)包含SEQ ID NO: 59

之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈，或 (ii)包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈。

【0025】 在另一態樣中，本發明提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體係與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合使用，且其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體為抗CEA/抗CD3雙特異性抗體。

【0026】 在一個態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含第一抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_H CD3)及輕鏈可變區(V_L CD3)，及第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_H CEA)及輕鏈可變區(V_L CEA)。

【0027】 在另一態樣中，本發明提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含：重鏈可變區(V_H CD3)，其包含SEQ ID NO:63之CDR-H1序列、SEQ ID NO:64之CDR-H2序列及SEQ ID NO:65之CDR-H3序列；及/或輕鏈可變區(V_L CD3)，其包含SEQ ID NO:66之

CDR-L1序列、SEQ ID NO:67之CDR-L2序列及SEQ ID NO: 68之CDR-L3序列。

【0028】 在另一態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含：重鏈可變區(V_H CD3)，其包含SEQ ID NO:69之胺基酸序列；及/或輕鏈可變區(V_L CD3)，其包含SEQ ID NO:70之胺基酸序列。在一個態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體，其供在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含第二抗原結合域，該第二抗原結合域包含：(a)重鏈可變區(V_H CEA)，其包含SEQ ID NO: 71之CDR-H1序列、SEQ ID NO: 72之CDR-H2序列及SEQ ID NO: 73之CDR-H3序列；及/或輕鏈可變區(V_L CEA)，其包含SEQ ID NO: 74之CDR-L1序列、SEQ ID NO: 75之CDR-L2序列及SEQ ID NO: 76之CDR-L3序列，或 (b)重鏈可變區(V_H CEA)，其包含SEQ ID NO: 79之CDR-H1序列、SEQ ID NO: 80之CDR-H2序列及SEQ ID NO: 81之CDR-H3序列；及/或輕鏈可變區(V_L CEA)，其包含SEQ ID NO: 82之CDR-L1序列、SEQ ID NO: 83之CDR-L2序列及SEQ ID NO: 84之CDR-L3序列。

【0029】 在特定態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含第二抗原結合域，

其包含含有SEQ ID NO:77之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCEA)及/或含有SEQ ID NO:78之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCEA)，或第二抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO:85之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCEA)及/或含有SEQ ID NO:86之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCEA)。

【0030】 在另一態樣中，本發明進一步提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展的方法中使用，其中抗CEA/抗CD3雙特異性抗體進一步包含結合於CEA之第三抗原結合域。特定言之，第三抗原結合域包含：(a)重鏈可變區(V_HCEA)，其包含SEQ ID NO:71之CDR-H1序列、SEQ ID NO:72之CDR-H2序列及SEQ ID NO:73之CDR-H3序列，及/或輕鏈可變區(V_LCEA)，其包含SEQ ID NO:74之CDR-L1序列、SEQ ID NO:75之CDR-L2序列及SEQ ID NO:76之CDR-L3序列；或(b)重鏈可變區(V_HCEA)，其包含SEQ ID NO:79之CDR-H1序列、SEQ ID NO:80之CDR-H2序列及SEQ ID NO:81之CDR-H3序列，及/或輕鏈可變區(V_LCEA)，其包含SEQ ID NO: 82之CDR-L1序列、SEQ ID NO:83之CDR-L2序列及SEQ ID NO:84之CDR-L3序列。更特定言之，第三抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:77之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCEA)及/或包含SEQ ID NO:78之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCEA)，或其中第二抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:85之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCEA)及/或包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCEA)。

【0031】 在另一態樣中，T細胞活化抗CD3雙特異性抗體為抗CEA/抗CD3雙特異性抗體，其中第一抗原結合域為其中Fab重鏈及輕鏈之可變

域或恆定域交換之互換Fab分子，且若存在，則第二及第三抗原結合域為習知Fab分子。

【0032】 在另一態樣中，T細胞活化抗CD3雙特異性抗體為抗CEA/抗CD3雙特異性抗體，其中(i)第二抗原結合域在Fab重鏈之C端處融合至第一抗原結合域之Fab重鏈之N端，第一抗原結合域在Fab重鏈之C端處融合至Fc域之第一次單元之N端，且第三抗原結合域在Fab重鏈之C端處融合至Fc域之第二次單元之N端，或(ii)第一抗原結合域在Fab重鏈之C端處融合至第二抗原結合域之Fab重鏈之N端，第二抗原結合域在Fab重鏈之C端處融合至Fc域之第一次單元之N端，且第三抗原結合域在Fab重鏈之C端處融合至Fc域之第二次單元之N端。

【0033】 在一個態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含結合於CEA之第三抗原結合域。在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含由能夠進行穩定締合之第一及第二次單元構成之Fc域。特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含IgG Fc域，具體言之IgG1 Fc域或IgG4 Fc域。更特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含Fc域，該Fc域包含減少與Fc受體之結合及/或效應物功能之一或多個胺基酸取代。在特定態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含IgG1 Fc域，該IgG1 Fc域包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G。

【0034】 在另一態樣中，本發明提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗

OX40雙特異性抗體)，其供在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體係與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合使用，且其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體為抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體。

【0035】 在一個態樣中，本發明提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含：包含重鏈可變區(V_H CD3)之第一抗原結合域、包含重鏈可變區(V_H FolR1)之第二抗原結合域及共同輕鏈可變區。

【0036】 在本發明之另一態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含：第一抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO:95之CDR-H1序列、SEQ ID NO:96之CDR-H2序列及SEQ ID NO:97之CDR-H3序列之重鏈可變區(V_H CD3)；第二抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO:98之CDR-H1序列、SEQ ID NO:99之CDR-H2序列及SEQ ID NO:100之CDR-H3序列之重鏈可變區(V_H FolR1)；及共同輕鏈，其包含SEQ ID NO:101之CDR-L1序列、SEQ ID NO:102之CDR-L2序列及SEQ ID NO:103之CDR-L3序列。

【0037】 在另一態樣中，本發明提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展

之方法中使用，其中T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含：第一抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO:104之序列之重鏈可變區(V_HCD3)；及第二抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO:105之序列之重鏈可變區(V_HFolR1)；且其中共同輕鏈包含SEQ ID NO:106之序列。

【0038】 在一個態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體包含結合於FolR1之第三抗原結合域。

【0039】 在另一態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體包含含有SEQ ID NO:107之胺基酸序列之第一重鏈、含有SEQ ID NO:108之胺基酸序列之第二重鏈及SEQ ID NO:109之共同輕鏈。

【0040】 在另一態樣中，本發明提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體係與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合使用，且其中該組合係以約一週至三週之間隔投與。

【0041】 在又另一態樣中，本發明提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/

抗OX40雙特異性抗體)，其供在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體係與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合且與阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑組合使用。特定言之，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為抗PD-L1抗體或抗PD1抗體。更特定言之，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑選自由以下組成之群：阿特珠單抗(atezolizumab)、德瓦魯單抗(durvalumab)、帕博利珠單抗(pembrolizumab)及納武單抗(nivolumab)。在一特定態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為阿特珠單抗。

【0042】 在另一態樣中，本發明提供一種用於疾病之經組合、循序或同時治療，尤其是用於治療癌症之醫藥產品，其包含：(A)第一組合物，該第一組合物包含作為活性成分之雙特異性OX40抗體及醫藥學上可接受的賦形劑，該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域，特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體；及(B)第二組合物，該第二組合物包含作為活性成分的對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體)及醫藥學上可接受的賦形劑。

【0043】 在另一態樣中，提供一種醫藥組合物，其包含：包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體，特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體；及對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體，特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體。在一個態樣中，醫藥組合物進一步包含阻斷PD-L1/PD-1相互作用。特定言之，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為抗PD-L1抗體或抗PD1抗體。更特定言之，阻斷PD-L1/PD-1相

互作用之試劑選自由以下組成之群：阿特珠單抗、德瓦魯單抗、帕博利珠單抗及納武單抗。在一特定態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為阿特珠單抗。在一個特定態樣中，該醫藥組合物係用於治療實體腫瘤。

【0044】 在一額外態樣中，本發明提供用於治療或延遲受試者之癌症之進展的套組，其包含封裝，該封裝包含：(A)第一組合物，該第一組合物包含作為活性成分之雙特異性OX40抗體及醫藥學上可接受的賦形劑，該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域，特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體；(B)第二組合物，該第二組合物包含作為活性成分的對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體)及醫藥學上可接受的賦形劑；及(C)用於在組合療法中使用該等組合物之說明書。在一個態樣中，提供用於治療或延遲受試者之癌症之進展的套組，其包含封裝，該封裝包含：(A)第一組合物，該第一組合物包含作為活性成分之雙特異性OX40抗體及醫藥學上可接受的賦形劑，該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域，特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體；(B)第二組合物，該第二組合物包含作為活性成分的對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體)及醫藥學上可接受的賦形劑；及(C)第三組合物，其包含作為活性成分之阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑(特定言之，阿特珠單抗)及醫藥學上可接受的賦形劑；及(D)用於在組合療法中使用該等組合物之說明書。

【0045】 在另一態樣中，本發明係關於包含能夠特異性結合於腫瘤

相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體)之組合在製造用於治療或延遲增生性疾病(特定言之，癌症)之進展的藥劑中的用途。

【0046】 特定言之，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之T雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體)之組合在製造用於治療選自由以下組成之群之疾病的藥劑中的用途：結腸癌、肺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、胰臟癌、子宮內膜癌、乳癌、腎癌、食道癌或前列腺癌。

【0047】 在另一態樣中，本發明提供一種治療或延遲受試者之癌症之進展的方法，其包含：向受試者投與有效量之包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之T雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)及對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體)。在另一態樣中，提供一種治療或延遲受試者之癌症之進展的方法，其包含：向受試者投與有效量之包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之T雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)、對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體)及阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑(特定言之，抗PD-

L1抗體或抗PD1抗體)。

【0048】 在另一態樣中，提供用於在治療或延遲癌症之進展之方法中使用的抗FAP/抗OX40雙特異性抗體，其中該抗FAP/抗OX40雙特異性抗體係與阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑組合使用。特定言之，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為抗PD-L1抗體或抗PD1抗體。更特定言之，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑選自由以下組成之群：阿特珠單抗、德瓦魯單抗、帕博利珠單抗及納武單抗。在一特定態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為阿特珠單抗。

【圖式簡單說明】

【0049】 圖1A及圖1B分別展示如實例中所使用之特定抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及特定抗CEA/抗CD3雙特異性抗體。此等分子分別更詳細地描述於實例1及實例2中。粗黑點表示杵-臼修飾。*表示CH1及CL域中之胺基酸修飾(所謂的帶電殘基)。圖1A展示與OX40四價結合且與FAP單價結合之特定抗FAP/抗OX40雙特異性抗體(4+1型式，FAP VH及VL融合至Fc域之C端)。分子在本文中被稱作FAP OX40 iMab。在圖1B中，展示呈2+1型式之例示性雙特異性抗CEA/抗CD3抗體(被命名為CEACAM5 CD3 TCB)。圖1C中展示呈2+1型式之另一抗CEA/抗CD3抗體(被稱作CEA CD3 TCB)。

【0050】 圖2中展示MKN45 NucLight Red腫瘤細胞藉由各種人類免疫細胞製劑之TCB介導溶解(實例3)。在CEACAM5 CD3 TCB (CEA CD3 TCB (2))之連續稀釋列存在下與MKN45 NucLight Red細胞及經輻射NIH/3T3 huFAP共培養不同人類免疫效應細胞製劑(靜息PBMC、CD4或CD8 T細胞)48小時。在37°C及5% CO₂下於48小時內每隔3小時使用

Incucyte Zoom系統(Essenbioscience, HD相差, 綠色螢光及紅色螢光, 10×物鏡)藉由螢光顯微鏡術高含量壽命成像對活的腫瘤細胞之量進行定量。一式三份的正常腫瘤細胞之綜合紅色螢光($\text{RCU} \times \mu\text{m}^2/\text{影像}$) (中值)用於計算比溶胞率, 對照所用TCB濃度標繪該比溶胞率以展示T細胞之溶胞潛力。

【0051】 圖3A至圖3D展示TCB刺激後OX40在T細胞上之表現。在CEACAM5 CD3 TCB (CEA CD3 TCB (2))之連續稀釋列存在下與MKN45 NucLight Red細胞及經輻射NIH/3T3 huFAP共培養不同人類免疫效應細胞製劑(靜息PBMC、CD4或CD8 T細胞)48小時。藉由流動式細胞測量術在 CD4^+ 及 CD8^+ T細胞上判定OX40之表現。針對CD4陽性T細胞(圖3A及圖3B)及CD8陽性T細胞(圖3C及圖3D)對照所用TCB濃度標繪一式三份的陽性細胞(圖3A及圖3C)及MFI (圖3B及圖3D)之百分比(中值)。誤差條指示SEM。TCB介導OX40在 CD4^+ T細胞上及在 CD8^+ T細胞上之劑量依賴性細胞表面表現, 雖然在 CD4^+ T細胞上之程度較高。

【0052】 在圖4A至圖4C中, 其展示OX40協同刺激不會影響FolR1 CD3 TCB之溶胞潛力。在FolR1 CD3 TCB之連續稀釋列存在下在含有(圖4B)或不含(圖4A)固定濃度之FAP OX40 iMAB的情況下與HeLa NucLight Red細胞及經輻射NIH/3T3 huFAP共培養靜息CD4 T細胞48小時。在37°C及5% CO_2 下於42小時內每隔3小時使用Incucyte Zoom系統(Essenbioscience, HD相差, 綠色螢光及紅色螢光, 10×物鏡)藉由螢光顯微鏡術高含量壽命成像對活的腫瘤細胞之量進行定量。在各個時間點對照所用TCB濃度標繪一式三份的正常腫瘤細胞之綜合紅色螢光($\text{RCU} \times \mu\text{m}^2/\text{影像}$) (中值), 以展示T細胞之溶胞潛力。誤差條指示SEM。計算每一時

間點之曲線下面積作為細胞毒性之度量且對照時間點標繪。為了比較，在圖4C中對照時間標繪單獨FolR1 CD3 TCB及與FAP OX40 iMAB組合之AUC值，其展示FAP OX40 iMab之添加對FolR1 CD3 TCB之溶胞潛力無影響。

【0053】 圖5A至圖5C展示OX40協同刺激不會影響CEACAM5 CD3 TCB (CEA CD3 TCB (2))之溶胞潛力。在CEACAM5 CD3 TCB之連續稀釋列存在下在含或不含固定濃度之FAP OX40 iMab之情況下與MKN-45 NucLight Red細胞及經輻射NIH/3T3 huFAP共培養不同人類免疫效應細胞製劑(圖5C中之靜息PBMC、圖5A中之CD4 T細胞及圖5B中之CD8 T細胞)48小時。在37°C 及5% CO₂下於48小時內每隔3小時使用Incucyte Zoom系統(Essenbioscience, HD相差，綠色螢光及紅色螢光，10×物鏡)藉由螢光顯微鏡術高含量壽命成像對活的腫瘤細胞之量進行定量。一式三份的正常腫瘤細胞之綜合紅色螢光(RCU×μm²/影像) (中值)用於計算比溶胞率，對照所用TCB濃度標繪該比溶胞率以展示T細胞之溶胞潛力。此處，例示性展示42小時之時間點。誤差條指示SEM。

【0054】 在圖6A至圖6D中，展示FAP OX40 iMAB協同刺激確實會增加FolR1 CD3 TCB介導之TNF-α分泌且取決於促效TCR刺激。在FolR1 CD3 TCB之連續稀釋列存在下在含有或不含固定濃度之FAP OX40 iMAB的情況下與經輻射TNF-α感測細胞、NIH/3T3 huFAP及HeLa NucLight Red細胞共培養靜息CD4 T細胞48小時。在37°C 及5% CO₂下在42小時內每隔3小時使用Incucyte Zoom系統(Essenbioscience，HD相差，綠色螢光及紅色螢光，10×物鏡)藉由螢光顯微鏡術高含量壽命成像根據TNF-α感測細胞中之GFP誘導對TNF-α之量進行定量。對照所用TCB濃度標繪一式三

份的TNF- α 感測信號之綜合綠色螢光(GCU $\times\mu\text{m}^2$ /影像)，以對T細胞之TNF- α 分泌進行定量。誤差條指示SEM。在圖6A中(在無協同刺激的情況下)及圖6C中(在具有FAP OX40 iMAB協同刺激的情況下)展示FolR1 CD3 TCB之結果，而圖6B及圖6D展示關於陰性對照CD3 TCB之結果。

【0055】 圖7A至圖7D中展示FAP OX40 iMAB協同刺激確實增加CEA CD3 TCB或CEACAM5 CD3 TCB介導之TNF- α 分泌。分別在CEA CD3 TCB及CEACAM5 CD3 TCB之連續稀釋列存在下在含或不含固定濃度之FAP OX40 iMAB的情況下與經輻射TNF- α 感測細胞、NIH/3T3 huFAP及MKN-45 NLR細胞共培養靜息CD4 T細胞48小時。藉由如上文所描述之螢光顯微鏡術高含量壽命成像根據TNF- α 感測細胞中之GFP誘導對TNF- α 的量進行定量。對照所用TCB濃度標繪一式三份的TNF- α 感測細胞之綜合綠色螢光(GCU $\times\mu\text{m}^2$ /影像)(中值)以對T細胞之TNF- α 分泌進行定量。誤差條指示SEM。在圖7A中(在無協同刺激的情況下)及圖7C中(在具有FAP OX40 iMAB協同刺激的情況下)展示CEACAM5 CD3 TCB (CEA CD3 TCB(2))之結果。在圖7B中(在無協同刺激的情況下)及圖7D中(在具有FAP OX40 iMAB協同刺激的情況下)展示CEA CD3 TCB之結果。

【0056】 圖8A至圖8D分別概述對於不同TCB或不同細胞株發現之效應。在FolR CD3 TCB (圖8B及圖8D)、CEA CD3 TCB (圖8C)或CEACAM5 CD3 TCB (圖8A)之連續稀釋列存在下在含或不含固定濃度之FAP OX40 iMab之情況下與TNF- α 感測細胞、經輻射NIH/3T3 huFAP及不同標靶細胞株HeLa NucLight Red細胞(圖8B)、MKN-45 NucLight Red細胞(圖8A及圖8C)或Skov-3細胞(圖8D)共培養靜息CD4 T細胞48小時。藉由螢光顯微鏡術高含量壽命成像2根據TNF- α 感測細胞中的GFP誘導對

TNF- α 之量進行定量。針對各條件及時間點計算GFP之AUC，且對照各時間點對其進行標繪以對T細胞之TNF- α 分泌進行定量。OX40協同刺激確實增加CEA CD3 TCB、CEACAM5 CD3 TCB及FolR CD3 TCB介導之TNF- α 釋放。

【0057】圖9A至圖9D中展示OX40協同刺激確實調節CEACAM5 CD3 TCB介導之細胞介素分泌。在CEACAM5 CD3 TCB之連續稀釋列存在下在含有或不含固定濃度之FAP OX40 iMAB的情況下與MKN-45 NucLight Red細胞及經輻射NIH/3T3 huFAP共培養靜息CD4 T細胞48小時。使用流式細胞珠粒陣列技術於在48小時端點處對TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-10、IL-9及IL-17A之分泌量進行定量。對照TCB濃度標繪各別細胞介素濃度。促炎性細胞介素TNF- α (圖9A)、IFN- γ (圖9C)及IL-2 (圖9B)之異常分泌藉由OX40協同刺激增強，而免疫抑制IL-10 (圖9D)之異常分泌減少。

【0058】圖10A至圖10D中展示OX40協同刺激確實調節CEA CD3 TCB介導之細胞介素分泌。在CEA CD3 TCB之連續稀釋列存在下在含有或不含固定濃度之FAP OX40 iMAB之情況下與MKN-45 NucLight Red細胞及經輻射NIH/3T3 huFAP共培養靜息CD4 T細胞48小時。使用流式細胞珠粒陣列技術於48小時端點處對TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-10 (圖10D)、IL-9及IL-17A之分泌量進行定量。對照TCB濃度標繪各別細胞介素濃度。促炎性細胞介素TNF- α (圖10A)、IFN- γ (圖10C)及IL-2 (圖10B)之異常分泌藉由OX40協同刺激增強。

【0059】圖11A至圖11D中展示OX40協同刺激確實調節FolR1 CD3 TCB介導之細胞介素分泌。在FolR1 CD3 TCB之連續稀釋列存在下在含

有或不含固定濃度之FAP OX40 iMAB的情況下與HeLa NucLight Red細胞及經輻射NIH/3T3 huFAP共培養靜息CD4 T細胞48小時。使用流式細胞珠粒陣列技術於48小時端點處對TNF- α 、IFN- γ 、IL-2及IL-10之分泌量進行定量。對照TCB濃度標繪各別細胞介素濃度。促炎性細胞介素TNF- α (圖11A)、IFN- γ (圖11C)及IL-2 (圖11B)之異常分泌藉由OX40協同刺激增強，而免疫抑制IL-10 (圖11D)之異常分泌劇烈減少。

【0060】 圖12A至圖12D展示與圖11A至圖11D中所示相同的實驗的結果，但此處用Skov-3細胞置換HeLa NucLight Red細胞。在此實驗中，OX40協同刺激並未過多改變促炎性細胞介素TNF- α (圖12A)、IFN- γ (圖12C)及IL-2 (圖12B)以及IL-10 (圖12D)之分泌。

【0061】 圖13中呈現圖9A至圖9D、圖10A至圖10D、圖11A至11D及圖12A至圖12D中所示之結果的概述。以百分比計算細胞介素濃度之變化，從而將具有或不具有FAP OX40 iMab協同刺激之情況下之各別樣本視為100%。變化程度取決於腫瘤細胞株及所用之各別TCB。

【0062】 將FAP OX40 iMab協同刺激在靜息CD4 T細胞(圖14A至圖14H)中、在靜息CD8 T細胞(圖15A至圖15H)中及在靜息人類PMBC (圖16A至圖16H)中調節CEACAM5 CD3 TCB介導之細胞介素分泌之能力進行比較。曲線圖展示細胞介素IL-2 (圖14A、圖15A及圖16A)、IFN- γ (圖14B、圖15B及圖16B)、TNF- α (圖14C、圖15C及圖16C)、IL-4 (圖14D、圖15D及圖16D)、IL-9 (圖14E、圖15E及圖16E)、MIP-1 α (圖14F、圖15F及圖16F)、IL-17A (圖14G、圖15G及圖16G)及IL-10 (圖14H、圖15H及圖16H)之分泌量。在CEACAM5 CD3 TCB (CEA CD3 TCB (2))之連續稀釋列存在下在含有或不含固定濃度之FAP Ox40 iMAB

的情況下與MKN-45 NucLight Red細胞及經輻射NIH/3T3 huFAP共培養靜息CD4或CD8 T細胞或PBMC 72小時。使用流動式細胞珠粒陣列技術於48小時端點處對TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-10、IL-9、IL-4、Mip-1 α 及IL-17A之分泌量進行定量。對照TCB濃度標繪各別細胞介素濃度。

【0063】圖17中展示由FAP OX40 iMAB協同刺激引起之細胞介素濃度之增加與TCB最高濃度的比較。

【0064】圖18A及圖18B展示在如實例4.4中所描述之活體內實驗1中的治療第一週期間的經注射化合物之藥物動力學概況。在第一次治療之後10分鐘、6小時、24小時、96小時及7天對每組的2個小鼠進行抽血，且分析所注射化合物之暴露。將血液加工為血清且執行夾心ELISA以測定FAP OX40 iMab (圖18A)及CEACAM5 CD3 TCB (圖18B)在第一週內的暴露。對於接受單一療法之小鼠或對於接受組合療法之小鼠，全身暴露係類似的。

【0065】圖19A展示相比所有其他組僅CEACAM5 CD3 TCB與FAP(4B9) OX40 iMab之組合介導皮下腫瘤之消退。此可清楚地自如圖19B中所示之瀑布圖中可見。幹細胞人類化NOG小鼠係經s.c.注射有MKN45胃腫瘤細胞與3T3huFAP纖維母細胞在基質膠中之混合物。在第10天，針對腫瘤尺寸及人類T細胞計數對小鼠進行隨機分組，其中平均T細胞計數/ μ l血液為140且平均腫瘤尺寸為170 mm³。在隨機分組當天，向小鼠i.v.注射媒劑、CEACAM5 CD3 TCB (CEA CD3 TCB (2))、FAP OX40 iMAB或其組合，每週一次，連續5週。一週三次量測腫瘤體積且對照研究時間將其進行標繪。誤差條展示每組6至8個動物之標準誤差(圖19A)。計算各動物在實驗第41天之腫瘤體積相較於在治療開始時之腫瘤體積的百

分比變化且將其標繪為瀑布圖(圖19B)。

【0066】 圖20A及圖20B展示在如實例4.5中所描述之活體內實驗2中的治療第一週期間的經注射化合物之藥物動力學概況。在第一次治療之後10分鐘、6小時、24小時、96小時及7天對每組的2個小鼠進行抽血，且分析所注射化合物之暴露。將血液加工成血清且執行夾心ELISA，以測定第一週期間不同劑量之FAP OX40 iMab及其與CEACAM5 CD3 TCB之組合的暴露(圖20A)以及CEACAM5 CD3 TCB及其與不同劑量之FAP OX40 iMab之組合的暴露(圖20B) 在圖20A中可見不同劑量之FAP OX40 iMab之明顯劑量依賴性。對於接受單一療法之小鼠或對於接受組合療法之小鼠，CEACAM CD3 TCB之係類似的。

【0067】 圖21A至圖21C展示，僅CEACAM5 CD3 TCB與最高劑量之FAP(4B9) OX40 iMab (12.5 mg/Kg，圖21C)之組合示出在腫瘤生長抑制方面相比所有其他組之經改良功效。幹細胞人類化NOG小鼠係經s.c.注射有MKN45胃腫瘤細胞與3T3huFAP纖維母細胞在基質膠中之混合物。在第26天，針對腫瘤尺寸及人類T細胞計數對小鼠進行隨機分組，平均T細胞計數/ μ l血液為115且平均腫瘤尺寸為490mm³。在隨機分組後一天，向小鼠i.v.注射媒劑、CEACAM5 CD3 TCB (CEA CD3 TCB(2))及不同劑量之FAP OX40 iMab (分別為12.5 mg/kg、4.2 mg/kg及1.4 mg/kg)或OX40 靶向分子與CEACAM5 CD3 TCB之組合，持續4週。一週三次量測腫瘤體積且對照研究時間將其進行標繪。誤差條展示每組8至10個動物之標準誤差。圖21A展示藉由1.4 mg/Kg FAP OX40 iMab獲得之腫瘤消退，且圖21B及圖21C中分別展示藉由4.2 mg/Kg FAP OX40 iMab或藉由12.5 mg/Kg FAP OX40 iMab觀測到的腫瘤消退。

【0068】圖22概述CEACAM5 CD3 TCB與不同量之FAP(4B9) OX40 iMab之組合之抗腫瘤功效的劑量依賴性。計算各動物在實驗2之第35個治療日之腫瘤體積相較於在治療開始時之腫瘤體積的百分比變化且將其標繪為瀑布圖。

【0069】圖23A至圖23D展示CEACAM5 CD3 TCB與FAP(4B9) OX40 iMab之組合相比所有單一療法顯著增加瘤內白細胞之數目。在實例4.5中所描述之實驗2之第50天，分離腫瘤浸潤性淋巴細胞且藉由流式細胞測量術評估其是否存在人白細胞及T細胞。將活的人白細胞(DAPI-、CD45+)、非CD3白細胞(DAPI-、CD45+、CD3-)、CD4及CD8 T細胞(DAPI-、CD45+、CD3+、CD4或CD8+)閘控、進行正規化計數(每個腫瘤或 μ g腫瘤)計算且針對個別處理組標繪其值：圖23A，針對活的人白細胞；圖23B，針對非CD3白細胞；圖23C，針對CD4 T細胞；且圖23D，針對CD8 T細胞。誤差條展示每組5至8個動物之標準誤差。

【0070】圖24A及圖24B中展示FAP OX40 iMAB協同刺激及CEACAM5 CD3 TCB(2)起腫瘤特異性作用且不會改變脾臟(圖24A)中及血液(圖24B)中之全身白細胞計數。

【0071】相較於所有單一療法，CEACAM5 CD3 TCB與FAP(4B9) OX40 iMab之組合顯著增加瘤內T細胞及CD8 T細胞之數目。如藉由huCD3免疫組織化學過程偵測之CD3陽性T細胞之數目展示於圖25A中且如藉由huCD8免疫組織化學過程偵測之CD8陽性T細胞之數目展示於圖25B中。對4 μ m石蠟切片執行HuCD8及HuCD3免疫組織化學過程。

【0072】圖26A至圖26C中展示CEACAM5 CD3 TCB與FAP(4B9) OX40 iMab之組合相比所有單一療法顯著增加瘤內細胞介素之濃度。在周

邊中未偵測到顯著變化。在實驗2之第50天，對腫瘤、脾臟及血液取樣並速凍。使用Bio-Plex Pro™人細胞介素17-plex分析測定均質物中之細胞介素濃度。藉由BCA蛋白分析套組分析全蛋白含量且將濃度正規化至樣本之蛋白含量。每處理組4個動物之中值細胞介素濃度在圖26A係針對腫瘤描繪，在圖26B中係針對脾臟描繪且圖26C中係針對血液描繪。

【0073】 圖27A至圖27F展示瘤內細胞介素濃度而非瘤內白細胞計數與經FAP OX40 iMab與CEACAM5 CD3 TCB之組合處理之動物的腫瘤生長進展負相關。在經CEACAM5 CD3 TCB單一療法處理之動物中未觀測到此情況。各開符代表經CEACAM5 CD3 TCB單一療法處理之個別動物且各填充符代表經該組合處理之個別動物。在圖27A中，對照腫瘤體積變化[%]標繪T細胞之計數，亦對照腫瘤體積變化[%]標繪TNF-a (圖27B)、IFN-g (圖27C)、MCP-1 (圖27D)、IL-8 (圖27E)及IL-6 (圖27F)之濃度。

【0074】 圖28A及圖28B展示CEA CD3 TCB與抗PD-L1及與FAP OX40 iMab之組合相較於所有其他療法介導在腫瘤生長抑制方面的經改良功效(實例5)。圖28A及圖28B將隨時間變化之腫瘤生長分別展示為腫瘤體積之平均值或腫瘤體積之平均倍數變化。

【0075】 圖29A、圖29B及圖29C展示在如實例5中所描述之活體內實驗中的治療第一週期間的經注射化合物之藥物動力學概況。在第一次及第三次治療之後1小時及72小時對每組的2個小鼠進行抽血，且分析所注射化合物之暴露。將血液加工成血清且執行夾心ELISA以測定FAP OX40 iMab結合CEACAM5 CD3 TCB或三重組合(圖29A)之暴露、CEA CD3 TCB與其不同組合(圖29B)之暴露及CEA CD3 TCB結合抗PD-L1或三重組

合(圖29C)之暴露。對於接受單一療法之小鼠或對於接受組合療法之小鼠，所有三種化合物之暴露係類似的。

【0076】 CEACAM5 CD3 TCB與抗PD-L1及FAP(4B9) OX40 iMab之組合相比所有單一療法或雙重療法顯著增加瘤內T細胞及CD8 T細胞的數目。如藉由huCD3免疫組織化學過程偵測之CD3陽性T細胞之數目展示於**圖30A**中且如藉由huCD8免疫組織化學過程偵測之CD8陽性T細胞之數目展示於**圖30B**中。對4 μ m石蠟切片執行HuCD8及HuCD3免疫組織化學過程。

【0077】 **圖31至圖35**係關於測試CEA CD3 TCB與FAP OX40iMab之組合以及CEA CD3 TCB及FAP-4-1BBL與抗PD-L1抗體(阿特珠單抗)之三重組合的功効的活體外分析之結果。在MKN45-PD-L1及NIH/3T3-huFAP細胞以及T細胞活化劑CEA CD3 TCB、檢查點抑制劑a-PD-L1 (阿特珠單抗)及免疫調節劑FAP OX40 iMab之不同組合的存在下將PBMC培育四天。在第4天(實驗終點)，針對表面或胞內標記物將細胞染色且儲存上清液以用於細胞介素分析。各符號指示個別供體(一式三份地測試各組)，各色彩/圖案指示特定治療組合，條柱指示具有SEM之均值。針對6個不同供體分別展示組合相較於單一組分與其組合對CD25於CD4 T細胞(**圖31A**)及CD8 T細胞(**圖31B**)上之表面表現、於CD4 T細胞(**圖32A**)及CD8 T細胞(**圖32B**)上之增殖及T-bet於CD4 T細胞(**圖33A**)及CD8 T細胞(**圖33B**)上以及顆粒酶B於CD4 T細胞(**圖33C**)及CD8 T細胞(**圖33D**)上之胞內表現的作用。使用雙向ANOVA (杜凱氏多重比較測試)計算不同處理組之間的統計顯著性，其中計算關於實驗每組一式三份之6個供體之平均值。曲線圖中展示之星號(*)指示p值，*指示p值<0.05，**指示p值

<0.01, ***指示p值<0.001。

【0078】 圖31A及圖31B展示與100 nM CEA CD3 TCB及2 nM FAP OX40 iMAB之組合處理或與抗PD-L1抗體之三重組合處理增加CD25表現CD4 T細胞(圖31A)及CD8 T細胞(圖31B)的百分比。

【0079】 圖32A及圖32B展示與100 nM CEA CD3 TCB及2 nM FAP OX40 iMAB之組合處理或與80 nM抗PD-L1抗體之三重組合處理增加增殖CD4 T細胞(圖32A)及CD8 T細胞(圖32B)的百分比。在實驗開始前用增殖染料CFSE標記PBMC且藉由使用FACS稀釋CFSE染料來量測增殖。

【0080】 圖33A及圖33B展示與100 nM CEA CD3 TCB及2 nM FAP OX40 iMAB之組合處理或與80 nM抗PD-L1抗體之三重組合處理增加T-bet表現CD4 T細胞(圖33A)之百分比及T-bet於CD8 T細胞(圖33B)上之MFI (平均螢光強度)。圖33C及圖33D展示與100 nM CEA CD3 TCB及2nM FAP OX40 iMAB之組合處理增加顆粒酶B表現CD4 T細胞(圖33C)及顆粒酶B表現CD8 T細胞(圖33D)之百分比。相較於CEA CD3 TCB與FAP OX40 iMAb組合處理，與抗PD-L1抗體之三重組合進一步增加顆粒酶B表現CD4及CD8 T細胞之百分比，具有統計意義。在根據製造商的說明使用流式細胞珠粒陣列培育4天後，分析上清液中之經分泌細胞介素IFN γ 、GM-CSF、TNF α 、IL-2、IL-8、顆粒酶B及IL-10。各符號指示一個供體(一式三份地對各組實驗進行混合)，各色彩/圖案指示特定治療組合，條柱指示具有SEM之均值。

【0081】 圖34A、圖34B及圖34C展示與100 nM CEA CD3 TCB及2 nM FAP OX40 iMAB之組合處理增加IFN γ (圖34A)、顆粒酶B (圖34B)及IL-8 (圖34C)之分泌。與aPD-L1之三重組合顯著增加上述所有三種細胞介

素的分泌。

【0082】 圖35A、圖35B及圖35C展示如與在用CEA CD3 TCB與aPD-L1組合處理進行治療後之細胞介素(被視為基線)相比較在用CEA CD3 TCB、FAP OX40 iMAb及a-PD-L1之三重組合進行治療後之6個供體中之細胞介素的倍率增加。黑色實線指示2倍變化。展示IFN γ (圖35A)、顆粒酶B (圖35B)及IL-8 (圖35C)之倍率增加。

【實施方式】

定義

【0083】 除非以其他方式定義，否則本文所使用之技術及科學術語具有與本發明所屬領域中通常所使用相同之含義。出於解釋本說明書之目的，將應用以下定義且只要合適，以單數形式使用之術語亦將包括複數且反之亦然。

【0084】 如本文所用，術語「**抗原結合分子**」在其最廣泛的意義上係指特異性結合抗原決定子的分子。抗原結合分子之實例係抗體、抗體片段及骨架抗原結合蛋白。

【0085】 術語「**抗體**」在本文中以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構，包括但不限於單株抗體、多株抗體、單特異性及多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其呈現所需抗原結合活性即可。

【0086】 如本文所使用之術語「**單株抗體**」係指自實質上均質抗體之群體獲得之抗體，亦即，除了可能的變異抗體(例如含有天然產生之突變或在單株抗體製劑之製造期間產生)以外，包含該群體之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定基，此類變體通常少量存在。相比於通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑，單株抗體製劑中

之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。

【0087】如本文所使用之術語「**單特異性**」抗體表示具有一或多個結合位點之抗體，該一或多個結合位點中之每一者結合於相同抗原之相同抗原決定基。術語「**雙特異性**」意謂抗原結合分子能夠特異性結合於至少兩個不同的抗原決定子。通常，雙特異性抗原結合分子包含兩個抗原結合位點，其中每一者對不同抗原性決定子具有特異性。在某些實施例中，雙特異性抗原結合分子能夠同時結合兩個抗原決定子，特定言之兩個不同細胞上所表現的兩個抗原決定子。

【0088】如本申請案中所使用之術語「價」表示抗原結合分子中存在指定數目之結合位點。同樣，術語「二價」、「四價」及「六價」分別表示抗原結合分子中存在兩個結合位點、四個結合位點及六個結合位點。

【0089】術語「全長抗體」、「完整抗體」及「完全抗體」在本文中可互換使用，其係指具有與原生抗體結構實質上類似之結構的抗體。「**天然抗體**」係指具有不同結構的天然存在之免疫球蛋白分子。舉例而言，原生IgG類抗體係約150,000道爾頓(dalton)之雜四聚體糖蛋白，其由二硫鍵鍵結之兩個輕鏈及兩個重鏈構成。自N端至C端，各重鏈具有可變區(VH)，亦稱為可變重鏈域或重鏈可變域，之後為三個恆定域(CH1、CH2及CH3)，亦稱為重鏈恆定區。類似地，自N端至C端，各輕鏈具有可變區(VL)，亦稱為可變輕鏈域或輕鏈可變域，之後為輕鏈恆定域(CL)，亦稱為輕鏈恆定區。抗體之重鏈可指定為五種類型之一，該五種類型稱為 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)或 μ (IgM)，其中一些可以進一步分成亞型，例如 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3)、 $\gamma 4$ (IgG4)、 $\alpha 1$ (IgA1)及 $\alpha 2$ (IgA2)。抗體之輕鏈可基於其恆定域之胺基酸序列歸為兩種類型中之

一種，稱為卡帕(kappa) (κ)及拉姆達(lambda) (λ)。

【0090】 「**抗體片段**」係指不同於完整抗體，包含完整抗體之一部分，結合完整抗體所結合之抗原的分子。抗體片段之實例包括但不限於Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、互換Fab片段；線性抗體；單鏈抗體分子(例如scFv)；及單域抗體。關於某些抗體片段之綜述，參見Hudson等人, Nat Med 9, 129-134 (2003)。關於scFv片段之綜述，參看例如Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenberg及Moore編, Springer-Verlag, New York, 第269-315頁 (1994)；亦參看WO93/16185；及美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。關於包含救助受體結合抗原決定基殘基及具有延長之活體內半衰期之Fab及F(ab')₂片段的論述，參見美國專利第5,869,046號。雙功能抗體為具有兩個抗原結合位點之抗體片段，其可為二價或雙特異性，參見例如EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson等人, Nat Med 9, 129-134 (2003)；及Hollinger等人, Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993)。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人, Nat Med 9, 129-134 (2003)中。單域抗體為包含抗體之重鏈可變域之全部或一部分或輕鏈可變域之全部或一部分的抗體片段。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；參看例如美國專利第6,248,516B1號)。抗體片段可藉由各種技術製得，包括但不限於完整抗體之蛋白分解以及藉由重組宿主細胞(例如，大腸桿菌或噬菌體)之製造，如本文所描述。

【0091】 完整抗體之番木瓜蛋白酶消化產生兩個相同的抗原結合片段，稱為「Fab」片段，其各自含有重鏈及輕鏈可變域以及輕鏈之恆定域

及重鏈之第一恆定域(CH1)。如本文所用，因此，術語「**Fab**片段」係指包含有包含輕鏈之VL域及恆定域(CL)之輕鏈片段，及重鏈之VH域及第一恆定域(CH1)的抗體片段。**Fab'**片段與**Fab**片段之不同之處在於，在包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸之重鏈CH1域的羧基端處添加幾個殘基。**Fab'**-SH為其中恆定域之半胱胺酸殘基帶有游離硫醇基之**Fab'**片段。胃蛋白酶處理產生F(ab')₂片段，其具有兩個抗原結合位點(兩個**Fab**片段)及Fc區之一部分。

【0092】術語「**互換Fab**片段」或「**xFab**片段」或「交換型**Fab**片段」係指其中重鏈及輕鏈之可變區或恆定區交換之**Fab**片段。交換型**Fab**分子之兩種不同鏈組成係可能的且包含於本發明之雙特異性抗體中：一方面，**Fab**重鏈及輕鏈之可變區經交換，亦即交換型**Fab**分子包含由輕鏈可變區(VL)及重鏈恆定區(CH1)構成之肽鏈以及由重鏈可變區(VH)及輕鏈恆定區(CL)構成之肽鏈。此交換型**Fab**分子亦稱為交換**Fab**_(VLVH)。另一方面，當**Fab**重鏈及輕鏈之恆定區交換時，交換型**Fab**分子包含由重鏈可變區(VH)及輕鏈恆定區(CL)組成之肽鏈，及由輕鏈可變區(VL)及重鏈恆定區(CH1)組成之肽鏈。此交換型**Fab**分子亦稱為互換**Fab**_(CLCH1)。

【0093】「單鏈**Fab**片段」或「**scFab**」係由抗體重鏈可變域(VH)、抗體恆定域1 (CH1)、抗體輕鏈可變域(VL)、抗體輕鏈恆定域(CL)及連接子組成之多肽，其中該抗體域及該連接子按N端至C端方向之次序具有以下中之一者：a) VH-CH1-連接子-VL-CL，b) VL-CL-連接子-VH-CH1，c) VH-CL-連接子-VL-CH1或d) VL-CH1-連接子-VH-CL；且其中該連接子係至少30個胺基酸，較佳32與50個胺基酸之間的多肽。該等單鏈**Fab**片段經由CL域與CH1域之間的天然雙硫鍵穩定化。此外，此等單鏈

Fab分子可能藉由經由插入半胱胺酸殘基(例如，根據Kabat編號之可變重鏈中之位置44及可變輕鏈中之位置100)產生鏈間二硫鍵而進一步穩定化。

【0094】「交換型單鏈Fab片段」或「**x-scFab**」為由抗體重鏈可變域(VH)、抗體恆定域1 (CH1)、抗體輕鏈可變域(VL)、抗體輕鏈恆定域(CL)及連接子組成之多肽，其中該等抗體域及該連接子按N端至C端方向之次序具有以下中之一者：a) VH-CL-連接子-VL-CH1及b) VL-CH1-連接子-VH-CL；其中VH及VL共同形成抗原結合位點，其特異性結合於抗原且其中該連接子為具有至少30個胺基酸之多肽。此外，此等x-scFab分子可能藉由經由插入半胱胺酸殘基(例如，根據Kabat編號之可變重鏈中之位置44及可變輕鏈中之位置100)產生鏈間二硫鍵而進一步穩定化。

【0095】「單鏈可變片段(scFv)」係用具有十至約25個胺基酸之短連接肽連接的抗體之重鏈(V_H)及輕鏈(V_L)可變區之融合蛋白。連接子通常富含甘胺酸以具有可撓性，以及絲胺酸或蘇胺酸以具有可溶性，且可使V_H之N端與V_L之C端連接，或反之亦然。儘管移除恆定區且引入連接子，但此蛋白質保留初始抗體之特異性。scFv抗體例如描述於Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96)中。此外，抗體片段包含單鏈多肽，其具有VH域(亦即能夠與VL域一起組裝成功能性抗原結合位點)或VL域(亦即能夠與VH域一起組裝成功能性抗原結合位點)之特徵，且藉此提供全長抗體之抗原結合性質。

【0096】「骨架抗原結合蛋白」在此項技術中已知，例如纖維結合蛋白及經設計錨蛋白重複蛋白質(DARPin)已用作抗原結合域之替代骨架，參見例如Gebauer及Skerra, *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol* 13:245-255

(2009)及Stumpp等人, Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today 13: 695-701 (2008)。在本發明之一個態樣中，骨架抗原結合蛋白係選自由以下組成之群：CTLA-4 (Evibody)；脂質運載蛋白(Anticalin)；蛋白質A衍生之分子，諸如蛋白質A之Z域(Affibody)；A域(Avimer/Maxibody)；血清運鐵蛋白(反式體)；經設計之錨蛋白重複蛋白質(DARPin)；抗體輕鏈或重鏈之可變域(單域抗體，sdAb)；抗體重鏈之可變域(奈米抗體，aVH)；V_{NAR}片段；纖維結合蛋白(AdNectin)；C型凝集素域(Tetranectin)；新型抗原受體 β -內醯胺酶之可變域(V_{NAR}片段)；人類 γ -晶狀體球蛋白或泛素(Affilin分子)；人類蛋白酶抑制劑之孔尼茲(kunitz)型域，微體，諸如來自knottin家族之蛋白質、肽適體及纖維結合蛋白(adnectin)。

【0097】 脂質運載蛋白為細胞外蛋白質之家族，其傳遞小型疏水性分子，諸如類固醇、後色膽素、類視黃素及脂質。其具有剛性 β -片狀第二結構，其在圓錐結構之開放端具有許多環，其可經工程改造以結合於不同標靶抗原。抗運載蛋白之尺寸在160-180個胺基酸之間，且來源於脂質運載蛋白。關於其他細節，參見Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000)、US7250297B1及US20070224633。

【0098】 經設計之錨蛋白重複蛋白質(DARPin)來源於錨蛋白，其為介導整合膜蛋白質與細胞骨架之連接的蛋白質之家族。單一錨蛋白重複為由兩個 α 螺旋及 β 回旋(beta-turn)組成之33殘基主結構。其可藉由隨機化各重複之第一個 α 螺旋及 β 回旋中之殘基而經工程改造以結合不同標靶抗原。可藉由增加模組數目來增加其結合界面(親和力成熟方法)。關於其他細節，參見J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705

(2003)及J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007)以及US20040132028A1。

【0099】單域抗體為由單一單體可變抗體域組成之抗體片段。第一個單域來源於來自駱駝之抗體重鏈之可變域(奈米抗體或V_HH片段)。此外，術語單域抗體包括自主人類重鏈可變域(aVH)或來源於鯊魚之V_{NAR}片段。

【0100】與參考分子「結合於相同抗原決定基之抗原結合分子」係指一種抗原結合分子，其在競爭分析中阻斷參考分子與其抗原之結合達50%或更大，且相反，參考分子在競爭分析中阻斷抗原結合分子與其抗原之結合達50%或更大。

【0101】術語「**抗原結合域**」係指抗原結合分子之一部分，其包含特異性結合於一部分或全部抗原且與其互補之區域。當抗原較大時，抗原結合分子可僅結合於抗原之特定一部分，該部分稱為抗原決定基。抗原結合域可由例如一或多個可變域(亦稱為可變區)提供。較佳地，抗原結合域包含抗體輕鏈可變區(VL)及抗體重鏈可變區(VH)。

【0102】如本文所用，術語「**抗原決定子**」與「抗原」及「抗原決定基」同義且係指多肽大分子上與抗原結合部分結合、形成抗原結合部分-抗原複合物的位點(例如鄰近胺基酸區段或由非鄰近胺基酸之不同區域組成的構形組態)。適用的抗原決定子可發現於例如腫瘤細胞表面上、病毒所感染細胞之表面上、其他病變細胞表面上、免疫細胞表面上、游離於血清中及/或細胞外基質(ECM)中。除非另外指示，否則在本文中可用作抗原之蛋白質可以為來自任何脊椎動物來源，包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)的任何天然形式之蛋白質。在特定實施例中，抗原為人類蛋白質。在本文中提及特定蛋白質的情況下，

該術語涵蓋「全長」的未經處理之蛋白質，以及由細胞中之處理所產生的任何形式之蛋白質。該術語亦涵蓋天然存在之蛋白質變異體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。

【0103】「**特異性結合**」意謂結合對於抗原而言具選擇性且可與非所需或非特異性相互作用區分。抗原結合分子結合於特異性抗原之能力可經由酶聯結免疫吸附分析(ELISA)或熟習此項技術者熟悉之其他技術(例如表面電漿子共振(SPR)技術(在BIAcore儀器上分析)(Liljeblad等人, Glyco J 17, 323-329 (2000))及傳統結合分析(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))量測。在一個實施例中，抗原結合分子與不相關蛋白質之結合程度低於如例如藉由SPR量測之抗原結合分子與抗原之結合的約10%。在某些實施例中，結合於抗原之分子之解離常數(Kd)為 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例如， 10^{-8} M 或更小，例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M ，例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M)。

【0104】「**親和力**」或「**結合親和力**」係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用之總和的強度。除非另外指明，否則如本文所使用之「**結合親和力**」係指反映結合對(例如抗體與抗原)成員之間的1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y的親和力一般可由解離常數(Kd)表示，解離常數係解離速率常數與締合速率常數(分別係koff及kon)之比率。因此，等效親和力可包含不同速率常數，只要速率常數之比率保持相同即可。可藉由此項技術中已知之常用方法(包括本文所描述之彼等方法)來量測親和力。一種用於量測親和力之特定方法為表面電漿子共振(SPR)。

【0105】術語「**腫瘤相關抗原(TAA)**」意謂由腫瘤細胞高度表現或

在腫瘤基質中表現的任何抗原。術語腫瘤相關指示TAA對腫瘤完全不具特异性，而是相反過度表現於腫瘤或其基質上。特定腫瘤相關抗原為CEA或FAP，亦為其他靶標，諸如葉酸受體(FolR1)、MCSP、EGFR族(HER2、HER3及EGFR/HER1)、VEGFR、CD20、CD19、CD22、CD33、PD1、PD-L1、TenC、EpCAM、PSA、PSMA、STEAP1、MUC1 (CA15-3) MUC16 (CA125)及5T4 (滋胚層糖蛋白)。特定TAA包括FAP、CEA及FolR1。

【0106】除非另有指示，否則術語「**纖維母細胞活化蛋白質(FAP)**」，亦稱為脯胺醯基內肽酶FAP或Seprase (EC 3.4.21)，係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠))之任何原生FAP。該術語涵蓋「全長」的未經處理之FAP以及由細胞中之處理產生的任何形式之FAP。該術語亦涵蓋FAP之天然存在之變體，例如剪接變體或對偶基因變異體。在一個實施例中，本發明之抗原結合分子能夠特异性結合於人類、小鼠及/或食蟹獼猴FAP。人類FAP之胺基酸序列展示於UniProt (www.uniprot.org)寄存編號Q12884 (版本149，SEQ ID NO:120)或NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/)RefSeq NP_004451.2中。人類FAP之細胞外域(ECD)自胺基酸位置26延伸至胺基酸位置760。His標記之人類FAP ECD之胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 121中。小鼠FAP之胺基酸序列展示於UniProt寄存編號P97321 (版本126，SEQ ID NO: 122)或NCBI RefSeq NP_032012.1中。小鼠FAP之細胞外域(ECD)自胺基酸位置26延伸至胺基酸位置761。SEQ ID NO: 123展示His標記之小鼠FAP ECD之胺基酸序列。SEQ ID NO: 124展示His標記之食蟹獼猴FAP ECD之胺基酸序列。較

佳地，本發明之抗FAP結合分子較佳結合於FAP之細胞外域。例示性抗FAP結合分子描述於國際專利申請案第WO 2012/020006 A2號中。

【0107】除非另有指示，否則術語「**癌胚抗原(CEA)**」，亦稱為癌胚抗原相關細胞黏附分子5 (CEACAM5)，係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠))之任何原生CEA。人類CEA之胺基酸序列展示於UniProt寄存編號P06731 (版本151，SEQ ID NO: 125)中。長期將CEA鑑別為腫瘤相關抗原(Gold及Freedman, J Exp Med., 121:439-462, 1965；Berinstein N. L., J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002)。最初歸類為僅表現於胎兒組織中之蛋白質，現今在若干正常成年人組織中發現CEA。此等組織之來源主要為上皮，包括胃腸道、呼吸道及尿道之細胞，及結腸、子宮頸、汗腺及前列腺之細胞(Nap等人, Tumour Biol., 9(2-3):145-53, 1988；Nap等人, Cancer Res., 52(8):2329-2333, 1992)。上皮來源之腫瘤以及其癌轉移含有CEA作為腫瘤相關抗原。儘管存在CEA本身並不指示轉型成癌細胞，但表明CEA之分佈。在正常組織中，CEA通常表現於細胞之頂端表面上(Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999))，使其不可接近血流中之抗體。與正常組織相反，CEA傾向於在癌細胞之整個表面上表現(Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999))。此表現模式之變化使得CEA可實現癌細胞中之抗體結合。此外，CEA表現在癌細胞中增加。此外，增加之CEA表現促進增加之細胞間黏附，其可引起癌轉移(Marshall J., Semin Oncol., 30 (增刊8):30-6, 2003)。多種腫瘤實體中之CEA表現之發生率通常極高。根據公開之資料，組織樣本中進行之自身分析證實其高發生率，在結腸直腸

癌(CRC)中為約95%，在胰臟癌中為90%，在胃癌中為80%，在非小細胞肺癌(NSCLC，其中其與HER3共表現)中為60%且在乳癌中為40%；在小細胞肺癌及神經膠母細胞瘤中發現低表現。

【0108】 CEA易於自細胞表面裂解且自腫瘤直接或經由淋巴管進入血流。由於此性質，已使用血清CEA之含量作為用於診斷癌症及篩檢癌症(特定言之結腸直腸癌)復發之臨床標記物(Goldenberg D M., The International Journal of Biological Markers, 7:183-188, 1992；Chau I.等人, J Clin Oncol., 22:1420-1429, 2004；Flamini等人, Clin Cancer Res; 12(23):6985-6988, 2006)。

【0109】 術語「FolR1」係指葉酸類受體 α 且已經鑑別為多種癌症中之潛在預後及治療標靶。除非另有指示，否則其係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)的任何原生FolR1。人類FolR1之胺基酸序列展示於UniProt寄存號P15328 (SEQ ID NO:126)中，鼠類FolR1具有UniProt寄存號P35846 (SEQ ID NO:127)之胺基酸序列，且獼猴FolR1具有如UniProt寄存號G7PR14 (SEQ ID NO:128)中所展示之胺基酸序列。FolR1為表現在細胞之質膜上的N-糖基化蛋白。FolR1具有與葉酸及若干經還原葉酸衍生物之高親和力且介導生理學葉酸鹽5-甲基四氫葉酸至細胞內部的輸送。FOLR1為FOLR1引導癌症療法之所需標靶，因為其在絕大部分卵巢癌以及許多子宮癌、子宮內膜癌、胰臟癌、腎癌、肺癌及乳癌中過度表現，而FOLR1在正常組織上之表現受限於腎臟近端小管、肺之肺泡細胞、膀胱、睪丸、脈絡叢及甲狀腺中的上皮細胞之頂端膜。近期研究已鑑別，FolR1表現在三陰性乳癌中尤其高(Necela等人，

PloS One 2015, 10(3), e0127133)。

【0110】術語「MCSP」係指黑素瘤相關硫酸軟骨素蛋白聚糖，亦稱為硫酸軟骨素蛋白聚糖4 (CSPG4)。除非另有指示，否則其係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)的任何原生FolR1。人類MCSP之胺基酸序列展示於UniProt寄存編號Q6UVK1 (SEQ ID NO:129)中。MCSP為表現在細胞膜上的由N連接280 kDa糖蛋白組分及450-kDa硫酸軟骨素蛋白聚糖組分組成的高度糖基化整合膜硫酸軟骨素蛋白聚糖(Ross等人,*Arch. Biochem. Biophys.*1983, 225: 370-38)。MCSP更廣泛地分佈於許多正常及經轉型細胞中。特定言之，在表皮之幾乎所有基底細胞中發現MCSP。MCSP有差別地表現於黑素瘤細胞中，且發現其表現於所分析的超過90%之良性痣及黑素瘤病變中。亦發現MCSP表現於非黑素細胞來源之腫瘤(包括基底細胞癌、神經脊來源之多種腫瘤及乳癌)中。

【0111】如本文所用之「**T細胞抗原**」係指呈現於T淋巴細胞、特定言之細胞毒性T淋巴細胞之表面上的抗原決定子。

【0112】如本文所用之「**T細胞活化治療劑**」係指能夠在受試者內誘導T細胞活化之治療劑，特定言之經設計用於在受試者內誘導T細胞活化的治療劑。T細胞活化治療劑之實例包括特異性結合活化T細胞抗原(諸如CD3)及標靶細胞抗原(諸如CEA或葉酸類受體)的雙特異性抗體。

【0113】如本文所用之「**活化T細胞抗原**」係指由T淋巴細胞、特定言之細胞毒性T淋巴細胞表現之抗原決定子，其能夠在與抗原結合分子相互作用時誘導或提高T細胞活化。具體而言，抗原結合分子與活化T細胞

抗原的相互作用可藉由觸發T細胞受體複合物之信號傳導級聯來誘導T細胞活化。例示性活化T細胞抗原為CD3。

【0114】 除非另有指示，否則術語「**CD3**」係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)的任何原生CD3。該術語涵蓋「全長」的未經處理之CD3以及由細胞中之處理產生的任何形式之CD3。該術語亦涵蓋天然存在之CD3之變體，例如剪接變體或對偶基因變體。在一個實施例中，CD3為人類CD3，特定言之人類CD3之 ϵ 次單元(CD3 ϵ)。人類CD3 ϵ 之胺基酸序列展示於UniProt (www.uniprot.org)寄存編號P07766 (版本144)或NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_000724.1中。亦參見SEQ ID NO: 130。獼猴[食蟹猴] CD3 ϵ 之胺基酸序列展示於NCBI GenBank第BAB71849.1號中。亦參見SEQ ID NO: 131。

【0115】 術語「**可變區**」或「**可變域**」係指抗體重鏈或輕鏈中涉及抗原結合分子與抗原之結合的域。原生抗體之重鏈及輕鏈(分別為VH及VL)可變域通常具有類似的結構，其中各域包含四個保守性構架區(FR)及三個高變區(HVR)。參看例如Kindt等人, Kuby Immunology, 第6版, W.H. Freeman and Co., 第91頁 (2007)。單一VH或VL域可足以賦予抗原結合特异性。如本文所用，術語「**高變區**」或「HVR」係指抗體可變域中在序列上具有高變性及/或形成結構上定義之環(「高變環」)的各區域。通常，原生四鏈抗體包含六個HVR；三個位於VH中(H1、H2、H3)，且三個位於VL中(L1、L2、L3)。HVR一般包含來自高變環及/或來自「互補決定區」(CDR)的胺基酸殘基，後者具有最高的序列可變性及/或與抗原識別

相關。例示性高變環出現在胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處。(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)。) 例示性CDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)出現在L1之胺基酸殘基24-34、L2之胺基酸殘基50-56、L3之胺基酸殘基89-97、H1之胺基酸殘基31-35B、H2之胺基酸殘基50-65及H3之胺基酸殘基95-102處(Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。高變區(HVR)亦稱為「互補決定區」(CDR)，且此等術語在本文中、在提及形成抗原結合區之可變區之一部分時可互換使用。此特定區域已由Kabat等人，U.S. Dept. of Health and Human Services，「Sequences of Proteins of Immunological Interest」(1983)描述，且由Chothia等人，*J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)描述，其中定義包含當彼此相比較時胺基酸殘基之重疊或子組。然而，涉及抗體或其變體之CDR之任何定義的應用意欲處於如本文中所定義及所用之術語的範疇內。涵蓋以上所引用參考文獻中之每一者所定義的CDR的適當胺基酸殘基如下闡述於表B中作為比較。涵蓋特定CDR的確切殘基數目將視CDR序列及大小而變。在抗體之可變區胺基酸序列指定的情況下，熟習此項技術者可以常規方式判定哪些殘基包含特定CDR。

表A. CDR定義¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹表A中之所有CDR定義之編號皆依據Kabat等人所闡述之編號約定(參見下文)。

²如表A中所使用的含有小寫字母「b」的「AbM」係指如藉由Oxford Molecular之「AbM」抗體建模軟體所定義的CDR。

【0116】 Kabat等人亦定義適用於任何抗體的可變區序列之編號系統。一般技術者可針對任何可變區序列明確地指定此「Kabat編號」系統，而不依賴於超過序列本身的任何實驗資料。如本文所使用，「Kabat編號」係指Kabat等人, U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」(1983)所闡述之編號系統。除非另外說明，否則提及抗體可變區中之特異性胺基酸殘基位置的編號係根據Kabat編號系統。

【0117】 除VH中之CDR1以外，CDR通常包含形成高變環之胺基酸殘基。CDR亦包含「特異性決定殘基」或「SDR」，其為接觸抗原之殘基。SDR含於簡稱為-CDR或a-CDR之CDR區域內。例示性CDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)出現在L1之胺基酸殘基31-34、L2之胺基酸殘基50-55、L3之胺基酸殘基89-96、H1之胺基酸殘基31-35B、H2之胺基酸殘基50-58及H3之胺基酸殘基95-102處。(參見Almagro及Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008).)除非另外指示，否則在本文中，根據Kabat等人之前述文獻對可變域中之HVR殘基及其他殘基(例如FR殘基)進行編號。

【0118】 如本文所使用，在抗原結合分子(例如抗體)之情形下，術語「**親和力成熟**」係指來源於參考抗原結合分子(例如藉由突變)之抗原結合分子，其結合於與參考抗體相同的抗原，較佳結合於相同的抗原決定

基；且與參考抗原結合分子相比對抗原具有較高親和力。親和力成熟通常涉及抗原結合分子之一或多個CDR中一或多個胺基酸殘基之修飾。通常，親和力成熟抗原結合分子結合於與初始參考抗原結合分子相同的抗原決定基。

【0119】「**構架**」或「FR」係指除高變區(HVR)殘基以外的可變域殘基。可變域之FR通常由四個域組成：FR1、FR2、FR3及FR4。因此，在VH (或VL)中，HVR及FR序列一般依以下序列呈現：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0120】出於本文之目的，「**接受體人類構架**」為包含來源於如下所定義之人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之輕鏈可變域(VL)構架或重鏈可變域(VH)構架之胺基酸序列的構架。「來源於」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之接受體人類構架可包含人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之相同胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在一些實施例中，胺基酸變化之數目為10個或更少、9個或更少、8個或更少、7個或更少、6個或更少、5個或更少、4個或更少、3個或更少或2個或更少。在一些實施例中，VL接受體人類構架序列與VL人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架在序列上一致。

【0121】術語「**嵌合**」抗體係指重鏈及/或輕鏈之一部分衍生自特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分衍生自不同來源或物種之抗體。

【0122】抗體之「**類別**」係指其重鏈所具有之恆定域或恆定區的類型。存在五種主要類別之抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等類別中之若干者可進一步分成子類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、

IgA₁及IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

【0123】「**人類化**」抗體係指包含來自非人類HVR之胺基酸殘基及來自人類FR之胺基酸殘基之嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含實質上所有至少一種及通常兩種可變域，其中所有或實質上所有HVR (例如CDR)對應於非人類抗體之彼等者，且所有或實質上所有FR對應於人類抗體之彼等者。人類化抗體視情況可包含來源於人類抗體之抗體恆定區的至少一部分。抗體(例如非人類抗體)之「**人類化形式**」係指已經歷人類化之抗體。本發明涵蓋之「人類化抗體」之其他形式為其中恆定區已經額外修飾或自原始抗體發生變化以產生根據本發明之特性(尤其在C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合方面)之抗體。

【0124】「**人類**」抗體係胺基酸序列對應於由人類或人類細胞產生或來源於利用人類抗體譜系或其他人類抗體編碼序列之非人類來源之抗體之胺基酸序列的抗體。人類抗體之此定義特別排除包含非人類抗原結合殘基之人源化人類化抗體。

【0125】術語「**Fc域**」或「**Fc區**」在本文中用於定義抗體重鏈中含有恆定區之至少一部分的C末端區。該術語包括原生序列Fc區及變異型Fc區。IgG Fc區包含IgG CH₂及IgG CH₃域。人類IgG Fc區之「CH₂域」通常自約位置231處之胺基酸殘基延伸至約位置340處之胺基酸殘基。在一個實施例中，碳水化合物鏈連接至CH₂域。本文中，CH₂域可為原生序列CH₂域或變異型CH₂域。「CH₃域」包含殘基在Fc區中自C端至CH₂域之延伸(亦即，自IgG之約位置341處之胺基酸殘基至約位置447處之胺基酸殘基延伸)。在本文中，CH₃區可為原生序列CH₃域或變異型CH₃域(例如，

在其一個鏈中具有所引入「隆凸」(「杵」)及在其另一鏈中具有對應引入之「凹腔」(「臼」)之CH3域；參見以引用之方式明確併入本文中之美國專利第5,821,333號)。此類變異型CH3域可用於促進如本文中所描述之兩個非一致抗體重鏈之雜二聚化。在一個實施例中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或自Pro230延伸至重鏈之羧基端。然而，Fc區之C端離胺酸(Lys447)可存在或可不存在。除非本文另外說明，否則Fc區或恆定區中之胺基酸殘基之編號係依據EU編號系統，亦稱為EU索引，如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版中所述。美國公共衛生署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, Md., 1991中所述。

【0126】「杵臼」技術描述於例如US 5,731,168；US 7,695,936；Ridgway等人, *Prot Eng* 9, 617-621 (1996)及Carter, *J Immunol Meth* 248, 7-15 (2001)中。一般而言，方法涉及在第一多肽之界面處引入隆凸(「杵」)及在第二多肽之界面處引入相應凹腔(「臼」)，使得隆凸可定位於凹腔中以便促進雜二聚體形成且阻礙均二聚體形成。藉由用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換第一多肽界面中之小胺基酸側鏈來構築隆凸。大小與隆凸相同或類似之補償性凹腔藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈而形成於第二多肽之界面中。隆凸及凹腔可藉由改變編碼多肽之核酸，例如藉由定點突變誘發或藉由肽合成產生。在一個特定實施例中，杵修飾包含Fc域之兩個次單元中之一者中之胺基酸取代T366W，且臼修飾包含Fc域之兩個次單元中之另一者中的胺基酸取代T366S、L368A及Y407V。在另一特定實施例中，包含杵修飾之Fc域之次單元另外包含胺基酸取代S354C，且包含臼修飾之Fc域之次單元另外包含胺基酸取代Y349C。引入此等兩個半胱胺酸殘基使得Fc區之兩個次單元之

間形成二硫橋鍵，由此進一步穩定二聚體(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。

【0127】「與免疫球蛋白之Fc區等效之區」意欲包括免疫球蛋白之Fc區之天然存在之對偶基因變體以及具有變化之變體，該等變化產生取代、添加或缺失，但不實質上降低免疫球蛋白介導效應物功能(諸如抗體依賴性細胞毒性)之能力。舉例而言，免疫球蛋白之Fc區之N端或C端可缺失一或多個胺基酸而不實質性損失生物功能。此類變體可根據此項技術中已知的一般法則選擇以對活性具有最小影響(參見例如Bowie, J. U.等人, Science 247:1306-10 (1990))。

【0128】術語「效應物功能」係指可歸因於抗體之Fc區之彼等生物活性，其因抗體同型而異。抗體效應物功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)、Fc受體結合、抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞噬菌作用(ADCP)、細胞介素分泌、免疫複合物介導之抗原呈遞細胞對抗原之吸收、細胞表面受體(例如B細胞受體)之下調及B細胞活化。

【0129】「活化Fc受體」為一種Fc受體，其與抗體之Fc區接合之後，引發信號傳導事件，其刺激攜帶受體之細胞執行效應物功能。活化Fc受體包括FcγRIIIa (CD16a)、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32)及FcαRI (CD89)。特定活化Fc受體為人類FcγRIIIa (參見UniProt寄存編號P08637，版本141)。

【0130】術語「肽連接子」係指包含一或多個胺基酸(通常約2至20個胺基酸)的肽。肽連接子在此項技術中已知或描述於本文中。適合的非免疫原性連接肽為例如(G₄S)_n、(SG₄)_n或G₄(SG₄)_n肽連接子，其中「n」一

般為介於1與10之間，通常介於2與4之間，特定言之為2之數字，亦即，肽選自由以下組成之群：GGGGS (SEQ ID NO:132)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:133)、SGGGGSGGGG (SEQ ID NO:134)及GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO:135)，而且包括序列GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:136)、(G4S)₃ (SEQ ID NO:137)、(G4S)₄ (SEQ ID NO:138)、GSGSGSGS (SEQ ID NO:139)、GSGSGNGS (SEQ ID NO:140)、GGSGSGSG (SEQ ID NO:141)、GGSGSG (SEQ ID NO:142)、GGSG (SEQ ID NO:143)、GGSGNGSG (SEQ ID NO:144)、GGNGSGSG (SEQ ID NO:145)及GGNGSG (SEQ ID NO:146)。尤其受關注之肽連接子為(G4S) (SEQ ID NO:132)、(G4S)₂ (SEQ ID NO:133)、(G4S)₃ (SEQ ID NO:137)及(G4S)₄ (SEQ ID NO:138)。

【0131】如本申請案內所用之術語「**胺基酸**」表示天然產生之羧基 α -胺基酸之群，其包含丙胺酸(三字母代碼：ala，一字母代碼：A)、精胺酸(arg，R)、天冬醯胺(asn，N)、天冬胺酸(asp，D)、半胱胺酸(cys，C)、麩醯胺酸(gln，Q)、麩胺酸(glu，E)、甘胺酸(gly，G)、組胺酸(his，H)、異白胺酸(ile，I)、白胺酸(leu，L)、離胺酸(lys，K)、甲硫胺酸(met，M)、苯丙胺酸(phe，F)、脯胺酸(pro，P)、絲胺酸(ser，S)、蘇胺酸(thr，T)、色胺酸(trp，W)、酪胺酸(tyr，Y)及纈胺酸(val，V)。

【0132】「融合」或「連接」意謂組分(例如，4-1BBL之多肽及胞外域)藉由肽鍵直接或經由一或多個肽連接子鍵聯

【0133】相對於參考多肽(蛋白質)序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列且視需要引入間隙以達成最大序列一致性百分比之後，且在不將任何保守性取代視為序列一致性之一部分的情況下，候

選序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基的百分比。出於測定胺基酸序列一致性百分比目地之比對可以使用此項技術範圍內的多種方式例如使用公開可獲得之電腦軟體(諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN.SAWI或Megalign (DNASTAR)軟體)實現。熟習此項技術者可測定用於比對序列之適當參數，包括在所比較序列之全長內達成最大比對所需的任何演算法。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生胺基酸序列一致性%值。ALIGN-2序列比較電腦程式由Genentech, Inc.製作，且原始碼已在U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559申請使用者文檔，其中其係以美國版權註冊第TXU510087號經登記。ALIGN-2程式可公開獲自Genentech, Inc., South San Francisco, California，或可自原始碼編寫。ALIGN-2程式應經編譯可用於UNIX作業系統，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數由ALIGN-2程式設定且沒有變化。在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情形下，給定胺基酸序列A與給定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性% (或者，其可表述為與給定胺基酸序列B具有或包含一定胺基酸序列一致性%的給定胺基酸序列A)如下計算：

100乘以分數 X/Y

其中X為在A與B之比對程式中藉由序列比對程式ALIGN-2評為一致匹配之胺基酸殘基之數目，且其中Y為B中之胺基酸殘基之總數目。應瞭解，在胺基酸序列A之長度與胺基酸序列B之長度不相等之情況下，A相對於B之胺基酸序列一致性%與B相對於A之胺基酸序列一致性%會不相等。除非另外特定陳述，否則本文所用之所有胺基酸序列一致性%值如緊接前述段落中所描述使用ALIGN-2電腦程式獲得。

【0134】 在某些實施例中，涵蓋本文提供之抗原結合分子之胺基酸序列變體。舉例而言，可能需要改良抗原結合分子之結合親和力及/或其他生物特性。抗原結合分子之胺基酸序列變體可藉由將適當修飾引入至編碼分子之核苷酸序列中或藉由肽合成來製備。此類修飾包括例如抗體胺基酸序列內的殘基缺失及/或插入及/或取代。可製造缺失、插入及取代之任一組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所需特徵，例如抗原結合。用於取代性突變誘發之相關位點包括HVR及構架(FR)。保守性取代以標題「較佳取代」提供於表C中且在下文中參考胺基酸側鏈類別(1)至(6)進一步描述。胺基酸置換可經引入至所關注之分子且針對所需活性進行篩檢之產物中，以例如保持/改良抗原結合、減少免疫原性或改良ADCC或CDC。

表B

原始殘基	例示性取代	較佳取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala

原始殘基	例示性取代	較佳取代
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正白胺酸	Leu

【0135】 胺基酸可根據共有側鏈特性進行分組：

- (1)疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2)中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3)酸性：Asp、Glu；
- (4)鹼性：His、Lys、Arg；
- (5)影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；
- (6)芳族：Trp、Tyr、Phe。

【0136】 非保守取代將必然伴有將此等類別中之一者之成員換成另一個類別。

【0137】 術語「**胺基酸序列變體**」包括大量變體，其中在親本抗原結合分子(例如，人類化或人類抗體)之一或多個高變區殘基中存在胺基酸取代。通常，所選擇之用於進一步研究之所得變體與親本抗原結合分子相比將具有某些生物特性之修飾(例如改良) (例如提高之親和力、降低之免疫原性)及/或將實質上保持親本抗原結合分子之某些生物特性。例示性取代型變體係親和力成熟抗體，其可例如宜使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術(諸如本文所述之技術)產生。簡言之，一或多個CDR殘基發生突變且變異型抗原結合分子呈現於噬菌體上且針對特定生物活性(例如結合親和力)進行篩檢。在某些實施例中，取代、插入或缺失可出現於一或多個CDR內，只要此類改變不實質上降低抗原結合分子結合抗原之能力即可。

舉例而言，不實質上降低結合親和力之保守性改變(例如，如本文所提供之保守性取代)可以在CDR中進行。一種適用於鑑別突變誘發可靶向之抗體之殘基或區的方法稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所描述。在此方法中，鑑別殘基或一組靶殘基(例如帶電殘基，諸如Arg、Asp、His、Lys及Glu)且經中性或帶負電胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)置換以判定抗體與抗原之相互作用是否受到影響。可在對初始取代展現功能敏感性之胺基酸位置處引入其他取代。或者或另外，抗原-抗原結合分子複合物之晶體結構用以鑑別抗體與抗原之間的接觸點。此類接觸殘基及鄰近殘基可作為取代候選物之標靶或排除在取代候選物之外。可篩檢變體以判定其是否含有所需特性。

【0138】 胺基酸序列插入包括長度在一個殘基至含有一百個或多於一百個殘基之多肽範圍內的胺基端及/或羧基端融合，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N端甲硫胺醯基殘基之抗原結合分子。分子之其他插入型變體包括N或C端與多肽之融合，此延長抗原結合分子之血清半衰期。

【0139】 在某些實施例中，本文提供之雙特異性抗原結合分子經改變以提高或降低抗體經糖基化之程度。可藉由改變胺基酸序列使得創造或移除之一或多個糖基化位點便利地獲得分子之糖基化變體。在抗原結合分子包含Fc區之情況下，可改變連接於其上之碳水化合物。由哺乳動物細胞產生之原生抗體通常包含分支鏈雙觸角寡糖，其一般藉由N鍵連接於Fc區之CH2域的Asn297。參見例如Wright等人, *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡糖可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及連接於雙觸角寡糖結構之「主幹」中之GlcNAc上

的海藻糖。在一些實施例中，可對抗原結合分子中之寡糖進行修飾以便產生具有某些改良特性之變體。在一個態樣中，提供具有缺乏連接(直接或間接)至Fc區之海藻糖之碳水化合物結構的抗原結合分子之變體。此類海藻糖基化變體可具有改良之ADCC功能，參見例如美國專利公開案第US 2003/0157108號(Presta, L.)或US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。本發明之抗原結合分子之其他變體包括具有平分寡糖之變體，例如其中連接至Fc區之雙觸角寡糖經GlcNAc平分。此類變體可具有降低之海藻糖基化及/或改良之ADCC功能，參見例如WO 2003/011878 (Jean-Mairet等 人)； 美 國 專 利 第6,602,684號(Umana等 人)； 及US 2005/0123546 (Umana等人)。亦提供寡糖中之至少一個半乳糖殘基與Fc區連接之抗體變體。此類抗體變體可具有改良之CDC功能且描述於例如WO 1997/30087 (Patel等 人)；WO 1998/58964 (Raju, S.)； 及WO 1999/22764 (Raju, S.)中。

【0140】 在某些實施例中，可能需要產生本發明之抗原結合分子之**半胱胺酸工程改造之變體**，例如「thioMAbs」，其中分子之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，經取代之殘基存在於分子之可達位點處。藉由用半胱胺酸取代此等殘基，藉此將反應性硫醇基安置於抗體之可達位點處且可用於使抗體與其他部分(諸如藥物部分或連接子-藥物部分)結合以產生免疫結合物。在某些實施例中，以下殘基中之任一或多者可經半胱胺酸取代：輕鏈之V205 (Kabat編號)；重鏈之A118 (EU編號)；及重鏈Fc區之S400 (EU編號)。半胱胺酸工程改造之抗原結合分子可例如美國專利第7,521,541號中所述產生。

【0141】 在某些態樣中，本文所提供之抗原結合分子可進一步經修

飾以含有為此項技術中已知且可容易獲得之額外非蛋白質部分。適合於抗體衍生作用之部分包括(但不限於)水可溶聚合物。水可溶聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧雜環戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯啉酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如，甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其於水中之穩定性而可在製造中具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為分支鏈或未分支鏈。連接至抗體之聚合物的數目可變化，且若連接多於一個之聚合物，則聚合物可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生作用之聚合物之數目及/或類型可基於包括(但不限於)待改良抗體之特定特性或功能、雙特異性抗體衍生物是否將用於限定條件下之療法等考慮因素來判定。在另一態樣中，提供抗體與可藉由暴露於輻射來選擇性地加熱之抗體及非蛋白質部分之結合物。在一個實施例中，非蛋白質部分為碳奈米管(Kam, N.W.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)。輻射可具有任何波長，且包括(但不限於)不損害一般細胞但將非蛋白質部分加熱至殺死抗體-非蛋白質部分近側之細胞之溫度的波長。在另一態樣中，可獲得本文所提供之含4-1BBL抗原結合分子之免疫結合物。「**免疫結合物**」為結合於一或多個異源分子，包括(但不限於)細胞毒性劑之抗體。

【0142】 術語「**聚核苷酸**」係指經分離核酸分子或構築體，例如信使RNA (mRNA)、病毒源性RNA或質體DNA (pDNA)。聚核苷酸可包含習知磷酸二酯鍵或非習知鍵(例如醯胺鍵，諸如肽核酸(PNA)中所發現)。

術語「核酸分子」係指聚核苷酸中存在之任一或多個核酸區段，例如DNA或RNA片段。

【0143】「**經分離**」核酸分子或聚核苷酸意欲係已自原生環境中移除之核酸分子、DNA或RNA。舉例而言，出於本發明之目的，編碼載體中所含之多肽的重組型聚核苷酸視為經分離的。分離之聚核苷酸之其他實例包括異質宿主細胞中所維持的重組聚核苷酸或溶液中經純化(部分或實質上)之聚核苷酸。經分離之聚核苷酸包括通常含有聚核苷酸分子之細胞中所含的聚核苷酸分子，但聚核苷酸分子存在於染色體外或與其天然染色體位置不同之染色體位置處。經分離之RNA分子包括本發明之活體內或活體外RNA轉錄物，以及正股及負股形式，及雙股形式。本發明之經分離之聚核苷酸或核酸進一步包括以合成方式產生的此類分子。另外，聚核苷酸或核酸可為或可包括調節元件，諸如啟動子、核糖體結合位點或轉錄終止子。

【0144】一種核酸或聚核苷酸的核苷酸序列與本發明之參考核苷酸序列至少例如95%「一致」意指該聚核苷酸之核苷酸序列與參考序列一致，但該聚核苷酸序列相對於參考核苷酸序列可每100個核苷酸中包括至多五個點突變。換言之，為了獲得核苷酸序列與參考核苷酸序列至少95%一致的聚核苷酸，參考序列中至多5%的核苷酸可缺失或經另一核苷酸取代，或參考序列中可插入佔參考序列核苷酸總數至多5%的多個核苷酸。參考序列之此等改變可發生於參考核苷酸序列之5'或3'端位置或彼等末端位置之間的任何位置，此等位置個別地穿插於參考序列殘基中或參考序列內的一或多個鄰近基團中。實際上，習知使用已知電腦程式(諸如，上文針對多肽(例如ALIGN-2)論述之電腦程式)判定任何特定多核苷酸序列是

否與本發明之核苷酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。

【0145】術語「**表現卡匣**」係指以重組或合成方式產生之聚核苷酸，其具有允許標靶細胞中之特定核酸發生轉錄的一系列特定核酸元件。重組表現卡匣可併入質體、染色體、粒線體DNA、質體DNA、病毒或核酸片段中。通常，表現載體之重組表現卡匣部分包括待轉錄的核酸序列及啟動子，以及其他序列。在某些實施例中，本發明之表現卡匣包含編碼本發明之雙特異性抗原結合分子或其片段的聚核苷酸序列。

【0146】術語「**載體**」或「表現載體」與「表現構築體」同義且係指用於引入特定基因且引導該基因表現的DNA分子，該DNA分子與該基因在標靶細胞中可操作地連接。該術語包括呈自我複製核酸結構之載體以及併入已引入其之宿主細胞之基因組中的載體。本發明之表現載體包含表現卡匣。表現載體允許大量的穩定mRNA發生轉錄。一旦表現載體進入標靶細胞內，則藉由細胞轉錄及/或轉譯機構產生由該基因編碼的核糖核酸分子或蛋白質。在一個實施例中，本發明之表現載體包含表現卡匣，該表現卡匣包含編碼本發明之雙特異性抗原結合分子或其片段的聚核苷酸序列。

【0147】術語「**宿主細胞**」、「**宿主細胞株**」及「**宿主細胞培養物**」可互換使用且係指已引入外源核酸之細胞，包括此類細胞之後代。宿主細胞包括「**轉型體**」及「**轉型細胞**」，其包括初級轉型細胞及自其衍生之子代(不考慮繼代次數)。後代之核酸含量與母細胞可能不完全相同，但可能含有突變。本文包括針對原始轉型細胞篩檢或選擇具有相同功能或生物活性之突變型後代。宿主細胞為可用於產生本發明之雙特異性抗原結合分子

的任何類型之細胞系統。宿主細胞包括培養細胞，例如哺乳動物培養細胞，諸如CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓瘤細胞、P3X63小鼠骨髓瘤細胞、PER細胞、PER.C6細胞或融合瘤細胞、酵母細胞、昆蟲細胞及植物細胞(僅舉數例)，而且包括轉殖基因動物、轉殖基因植物或培養植物或動物組織內所含的細胞。

【0148】試劑之「**有效量**」係指在所投與之細胞或組織中產生生理變化所需的量。

【0149】本發明之組合療法具有協同效應。兩種化合物之「**協同效應**」係指兩種試劑之組合之效應超過其個別效應之總和且在統計方面不同於對照物及單一藥物。在另一實施例中，本文中所揭示之組合療法具有累加效應。兩種化合物之「**累加效應**」係指兩種試劑之組合之效應為其個別效應之總和且在統計方面不同於對照物及/或單一藥物。

【0150】試劑(例如醫藥組合物)之「**治療有效量**」係指在達成所要治療性或預防性結果所需之劑量及時段下有效的量。舉例而言，治療有效量之試劑消除、減少、延遲、最小化或預防疾病之副作用。

【0151】「個體」或「受試者」為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)馴養動物(例如牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人體及非人類靈長類動物，諸如猴)、家兔及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)。特定言之，個體或受試者係人類。

【0152】術語「**醫藥組合物**」係指呈准許其中所含活性成分之生物活性有效之形式的製劑，且其不含對調配物將投與之受試者具有不可接受毒性之其他組分。

【0153】「**醫藥學上可接受之載劑**」係指醫藥組合物中之除活性成

分之外的對受試者無毒的成分。醫藥學上可接受之賦形劑包括(但不限於)緩衝劑、穩定劑或防腐劑。

【0154】術語「**藥品說明書**」用以指通常包括於治療性產品之商業包裝中的說明，其含有關於與使用此類治療性產品有關之適應症、用法、劑量、投與、組合療法、禁忌及/或警告的資訊。

【0155】如本文所用，「**治療(treatment)**」(及其語法變化形式，諸如「**治療(treat)**」或「**治療(treating)**」)係指臨床介入以試圖改變所治療個體之自然病程，且可以為實現預防或在臨床病理學病程中進行。所需治療作用包括(但不限於)預防疾病發生或復發，緩解症狀，減輕疾病之任何直接或間接病理性結果，預防癌轉移，減緩疾病進展速率，改善或緩和疾病病況及緩解或改良預後。在一些實施例中，本發明之分子用於延遲疾病發展或減慢疾病之進程。

【0156】如本文所用之術語「**癌症**」係指增生性疾病，諸如實體腫瘤或黑素瘤。

用於本發明中之例示性經靶向之OX40促效劑

【0157】特定言之，如與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合使用之經靶向OX40促進劑為包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體。

【0158】特定言之，包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體為抗纖維母細胞活化蛋白(FAP)/抗OX40雙特異性抗體。在一個態樣中，抗FAP/抗OX40抗體為OX40促效劑。在一個態樣中，抗FAP/抗OX40抗體為包含Fc域之抗原結合分子。在特定態樣中，抗FAP/抗OX40抗體為包含具有減少Fc γ 受體結合及/或效應

物功能之修飾的Fc域的抗原結合分子。藉由腫瘤相關抗原之交聯使得有可能避免非特異性FcγR介導之交聯，且因此可投與相較於普通OX40抗體更高且更有效劑量之抗FAP/抗OX40抗體。

【0159】 在一個態樣中，本發明提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體係與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合使用，且其中該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於FAP的至少一個抗原結合域，其包含：(a)重鏈可變區(V_HFAP)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列之CDR-L3，或(b)重鏈可變區(V_HFAP)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之CDR-L3。

【0160】 在另一態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所定義之用於治療或延遲癌症之進展之方

法中使用，其中該雙特異性OX40抗體包含：能夠特異性結合於FAP之至少一個抗原結合域，其包含與SEQ ID NO: 7之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致的重鏈可變區(V_HFAP)及與SEQ ID NO: 8之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致的輕鏈可變區(V_LFAP)；或能夠特異性結合於FAP之抗原結合域，其包含與SEQ ID NO: 15之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之重鏈可變區(V_HFAP)及與SEQ ID NO: 16之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致的輕鏈可變區(V_LFAP)。

【0161】 在特定態樣中，雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於FAP之至少一個抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。在另一態樣中，雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於FAP之至少一個抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【0162】 在另一態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所定義之用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於OX40的至少一個抗原結合域，該至少一個抗原結合域包含：(a)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)

包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列之CDR-L3，或 (b)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列之CDR-L3，或 (c)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之CDR-L3，或 (d)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列之CDR-L3，或 (e)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:

38之胺基酸序列之CDR-L3，或 (f)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR-L1，(v)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列之CDR-L3，或 (g)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之CDR-L1，(v)包含SEQ ID NO: 33之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之CDR-L3。

【0163】 更特定而言，雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於OX40之至少一個抗原結合域，該至少一個抗原結合域包含：(a)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列之CDR-L3。

【0164】 在另一態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中

該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於OX40的至少一個抗原結合域，該至少一個抗原結合域包含：(a)包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 41之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或 (b)包含SEQ ID NO: 42之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或 (c)包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或 (d)包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 47之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或 (e)包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 49之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或 (f)包含SEQ ID NO: 50之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或 (g)包含SEQ ID NO: 52之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 53之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)。

【0165】 在特定態樣中，雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於OX40之至少一個抗原結合域，該至少一個抗原結合域包含：(a)與SEQ ID NO: 40之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致的重鏈可變區(V_HOX40)及與SEQ ID NO: 41之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致的輕鏈可變區(V_LOX40)。

【0166】 更特定言之，雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於OX40之至少一個抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)。

【0167】 在一個態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體為抗原結合分子，其進一步包含由能夠進行穩定締合之第一及第二次單元構成的Fc域。特定言之，雙特異性OX40抗體為抗原結合分子，其包含IgG Fc域，具體言之IgG1 Fc域或IgG4 Fc域。更特定言之，雙特異性OX40抗體為包含Fc域之抗原結合分子，該Fc域包含減少與Fc受體之結合及/或效應物功能之一或多個胺基酸取代。在特定態樣中，雙特異性OX40抗體包含IgG1 Fc域，該IgG1 Fc域包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G。

【0168】 在本發明之另一態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展的方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體包含與腫瘤相關標靶之單價結合及與OX40之至少二價結合。在一個態樣中，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體包含與腫瘤相關標靶之單價結合及與OX40之二價結合。在特定態樣中，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體包含與腫瘤相關標靶之單價結合及與OX40之四價結合。

【0169】 在另一態樣中，本發明提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展的方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於OX40之

第一Fab片段，其在CH1域之C端處融合至能夠特異性結合於OX40之第二Fab片段之VH域，及能夠特異性結合於OX40之第三Fab片段，其在CH1域之C端處融合至能夠特異性結合於OX40之第四Fab片段之VH域。

【0170】 在一個態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如前文所描述之用於治療或延遲癌症之進展的方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體包含 (i)包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 55之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈，或 (ii)包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈，或 (i)包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈，或 (ii)包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈。

【0171】 在一個特定態樣中，提供包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的雙特異性OX40抗體(特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體)，其供在如本文所描述之用於治療或延遲癌症之進展的方法中使用，其中該雙特異性OX40抗體包含：包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 55之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈。

用於本發明中之例示性抗CEA/抗CD3雙特異性抗體

【0172】 本發明係關於經靶向之OX40促進劑及其與對腫瘤相關抗

原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合之用途，尤其係關於其在用於治療或延遲癌症之進展，更特定言之用於治療或延遲實體腫瘤之進展之方法中的用途。特定言之，腫瘤相關抗原為CEA。如本文所用之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體為包含結合於CD3之第一抗原結合域及結合於CEA之第二抗原結合域的雙特異性抗體。

【0173】 因此，如本文所用之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含：包含重鏈可變區(V_H CD3)及輕鏈可變區(V_L CD3)之第一抗原結合域，及包含重鏈可變區(V_H CEA)及輕鏈可變區(V_L CEA)之第二抗原結合域。

【0174】 在一特定態樣中，供組合使用之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含：第一抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_H CD3)，該重鏈可變區(V_H CD3)包含SEQ ID NO:63之CDR-H1序列、SEQ ID NO:64之CDR-H2序列及SEQ ID NO:65之CDR-H3序列；及/或輕鏈可變區(V_L CD3)，該輕鏈可變區(V_L CD3)包含SEQ ID NO:66之CDR-L1序列、SEQ ID NO:67之CDR-L2序列及SEQ ID NO: 68之CDR-L3序列。更特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含與SEQ ID NO:69之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%、或99%一致的重鏈可變區(V_H CD3)及/或與SEQ ID NO:70之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致的輕鏈可變區(V_L CD3)。在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含：包含SEQ ID NO: 69之胺基酸序列之重鏈可變區(V_H CD3)及/或包含SEQ ID NO: 70之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_L CD3)。

【0175】 在一個態樣中，特異性結合於CD3之抗體為全長抗體。在一個態樣中，特異性結合於CD3之抗體為人類IgG類抗體，特定言之人類

IgG₁類抗體。在一個態樣中，特異性結合於CD3之抗體為抗體片段，特定言之Fab分子或scFv分子，更特定言之Fab分子。在特定態樣中，特異性結合於CD3之抗體為其中Fab重鏈及輕鏈之可變域或恆定域交換(亦即，彼此替代)之交換型Fab分子。在一個態樣中，特異性結合於CD3之抗體為人類化抗體。

【0176】 在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含第二抗原結合域，該第二抗原結合域包含：(a)重鏈可變區(V_HCEA)，其包含SEQ ID NO: 71之CDR-H1序列、SEQ ID NO: 72之CDR-H2序列及SEQ ID NO: 73之CDR-H3序列；及/或輕鏈可變區(V_LCEA)，其包含SEQ ID NO: 74之CDR-L1序列、SEQ ID NO: 75之CDR-L2序列及SEQ ID NO: 76之CDR-L3序列，或(b)重鏈可變區(V_HCEA)，其包含SEQ ID NO: 79之CDR-H1序列、SEQ ID NO: 80之CDR-H2序列及SEQ ID NO: 81之CDR-H3序列；及/或輕鏈可變區(V_LCEA)，其包含SEQ ID NO: 82之CDR-L1序列、SEQ ID NO: 83之CDR-L2序列及SEQ ID NO: 84之CDR-L3序列。

【0177】 更特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含第二抗原結合域，該第二抗原結合域包含與SEQ ID NO:77之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之重鏈可變區(V_HCEA)及/或與SEQ ID NO:78之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之輕鏈可變區(V_LCEA)。在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含第二抗原結合域，該第二抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 77之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCEA)及/或包含SEQ ID NO: 78之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCEA)。在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含第二抗原結合域，該第二抗原結合域包含與SEQ ID NO:85之胺基酸序列至

少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之重鏈可變區(V_HCEA)及/或與SEQ ID NO:86之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之輕鏈可變區(V_LCEA)。在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含第二抗原結合域，該第二抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 85之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCEA)及/或包含SEQ ID NO: 86之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCEA)。

【0178】 在另一特定態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含結合於CEA之第三抗原結合域。特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含第三抗原結合域，該第三抗原結合域包含：(a)重鏈可變區(V_HCEA)，其包含SEQ ID NO: 71之CDR-H1序列、SEQ ID NO: 72之CDR-H2序列及SEQ ID NO: 73之CDR-H3序列；及/或輕鏈可變區(V_LCEA)，其包含SEQ ID NO: 74之CDR-L1序列、SEQ ID NO: 75之CDR-L2序列及SEQ ID NO: 76之CDR-L3序列，或(b)重鏈可變區(V_HCEA)，其包含SEQ ID NO: 79之CDR-H1序列、SEQ ID NO: 80之CDR-H2序列及SEQ ID NO: 81之CDR-H3序列；及/或輕鏈可變區(V_LCEA)，其包含SEQ ID NO: 82之CDR-L1序列、SEQ ID NO: 83之CDR-L2序列及SEQ ID NO: 84之CDR-L3序列。

【0179】 更特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含第三抗原結合域，該第三抗原結合域包含與SEQ ID NO: 77之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之重鏈可變區(V_HCEA)及/或與SEQ ID NO: 78之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之輕鏈可變區(V_LCEA)。在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含第三抗原結合域，該第三抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 77之胺基酸

序列之重鏈可變區(V_HCEA)及/或包含SEQ ID NO: 78之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCEA)。在另一特定態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含第三抗原結合域，該第三抗原結合域包含與SEQ ID NO:85之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之重鏈可變區(V_HCEA)及/或與SEQ ID NO:86之胺基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之輕鏈可變區(V_LCEA)。在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含第三抗原結合域，該第三抗原結合域包含：包含SEQ ID NO:85之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCEA)及/或包含SEQ ID NO:86之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCEA)。

【0180】 在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體為雙特異性抗體，其中第一抗原結合域為其中Fab重鏈及輕鏈之可變域或恆定域交換之互換Fab分子，且第二抗原結合域及第三抗原結合域(若存在)為習知Fab分子。

【0181】 在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體為雙特異性抗體，其中(i)第二抗原結合域在Fab重鏈之C端處融合至第一抗原結合域之Fab重鏈之N端，第一抗原結合域在Fab重鏈之C端處融合至Fc域之第一次單元之N端，且第三抗原結合域在Fab重鏈之C端處融合至Fc域之第二次單元之N端，或(ii)第一抗原結合域在Fab重鏈之C端處融合至第二抗原結合域之Fab重鏈之N端，第二抗原結合域在Fab重鏈之C端處融合至Fc域之第一次單元之N端，且第三抗原結合域在Fab重鏈之C端處融合至Fc域之第二次單元之N端。

【0182】 Fab分子可直接或經由包含一或多個胺基酸(通常約2至20個胺基酸)的肽連接子與Fc域融合或彼此融合。肽連接子在此項技術中已

知且描述於本文中。適合的非免疫原性肽連接子包括例如 $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 、 $(G_4S)_n$ 或 $G_4(SG_4)_n$ 肽連接子。「n」一般係1至10，通常2至4之整數。在一個實施例中，該肽連接子具有至少5個胺基酸之長度；在一個實施例中，具有5至100個胺基酸之長度；在另一實施例中，具有10至50個胺基酸之長度。在一個實施例中，該肽連接子為 $(G_xS)_n$ 或 $(G_xS)_nG_m$ ，其中G=甘胺酸，S=絲胺酸，且 $(x=3, n=3、4、5或6, 且m=0、1、2或3)$ 或 $(x=4, n=2、3、4或5且m=0、1、2或3)$ ，在一個實施例中， $x=4$ 且 $n=2$ 或3，在另一實施例中， $x=4$ 且 $n=2$ 。在一個實施例中，該肽連接子為 $(G_4S)_2$ 。特別適用於第一Fab分子與第二Fab分子之Fab輕鏈彼此間融合的肽連接子為 $(G_4S)_2$ 。適合於連接第一及第二Fab片段之Fab重鏈的例示性肽連接子包含序列(D)- $(G_4S)_2$ 。另一種適合的此類連接子包含序列 $(G_4S)_4$ 。另外，連接子可包含免疫球蛋白鉸鏈區(之一部分)。特別是在Fab分子與Fc域次單元N之端融合的情況下，其可在額外肽連接子存在或不存在的情況下經由免疫球蛋白鉸鏈區或其一部分融合。

【0183】 在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含Fc域，該Fc域包含減少與Fc受體之結合及/或效應物功能的一或多個胺基酸取代。特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含IgG1 Fc域，該IgG1 Fc域包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G。

【0184】 在特定態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含與SEQ ID NO:87之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之兩個多肽、與SEQ ID NO:88之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之多肽、與SEQ ID NO:89之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之多肽，及與SEQ ID NO:90之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之多肽。

在另一特定實施例中，雙特異性抗體包含SEQ ID NO:87之兩個多肽、SEQ ID NO:88之多肽、SEQ ID NO:89之多肽及SEQ ID NO:90之多肽(CEA CD3 TCB)。

【0185】 在另一特定態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含與SEQ ID NO:91之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之兩個多肽、與SEQ ID NO:92之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之多肽、與SEQ ID NO:93之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之多肽，及與SEQ ID NO:94之序列至少95%、96%、97%、98%或99%一致之多肽。在另一特定實施例中，雙特異性抗體包含SEQ ID NO:91之兩個多肽、SEQ ID NO:92之多肽、SEQ ID NO:93之多肽及SEQ ID NO:94之多肽(CEACAM5 CD3 TCB)。

【0186】 特定雙特異性抗體描述於PCT公開案第WO 2014/131712 A1號中。

【0187】 在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體亦可包含雙特異性T細胞接合子(BiTE®)。在另一態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體為如WO 2007/071426或WO 2014/131712中所描述之雙特異性抗體。在另一態樣中，雙特異性抗體為MEDI565 (AMG211)。

用於本發明中之例示性抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體

【0188】 本發明係關於抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體及其與經靶向之OX40促效劑組合之用途，尤其係關於其在用於治療或延遲癌症之進展，更特別地係用於治療或延遲實體腫瘤之進展之方法中的用途。如本文所用之抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體為包含結合於CD3之第一抗原結合域及結合於FolR1之第二抗原結合域的雙特異性抗體。特定言之，如本文所

用之抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體包含結合於FolR1之第三抗原結合域。

【0189】 在一個態樣中，T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含：包含重鏈可變區(V_HCD3)之第一抗原結合域、包含重鏈可變區(V_HFolR1)之第二抗原結合域、包含重鏈可變區(V_HFolR1)之第三抗原結合域及三倍共同輕鏈可變區。

【0190】 在另一態樣中，第一抗原結合域包含重鏈可變區(V_HCD3)，該重鏈可變區(V_HCD3)包含SEQ ID NO:95之CDR-H1序列、SEQ ID NO:96之CDR-H2序列及SEQ ID NO:97之CDR-H3序列；第二抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFolR1)，該重鏈可變區(V_HFolR1)包含SEQ ID NO:98之CDR-H1序列、SEQ ID NO:99之CDR-H2序列及SEQ ID NO:100之CDR-H3序列；第三抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFolR1)，該重鏈可變區(V_HFolR1)包含SEQ ID NO:98之CDR-H1序列、SEQ ID NO:99之CDR-H2序列及SEQ ID NO:100之CDR-H3序列；且共同輕鏈包含SEQ ID NO:101之CDR-L1序列、SEQ ID NO:102之CDR-L2序列及SEQ ID NO:103之CDR-L3序列。在另一態樣中，第一抗原結合域包含重鏈可變區(V_HCD3)，該重鏈可變區(V_HCD3)包含SEQ ID NO:104之序列；第二抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFolR1)，該重鏈可變區(V_HFolR1)包含SEQ ID NO:105之序列；第三抗原結合域包含重鏈可變區(V_HFolR1)，該重鏈可變區(V_HFolR1)包含SEQ ID NO:105之序列；且共同輕鏈包含SEQ ID NO:106之序列。

【0191】 在一特定態樣中，抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體包含：包含SEQ ID NO: 107之胺基酸序列之第一重鏈，包含SEQ ID NO:108之胺基酸序列之第二重鏈及SEQ ID NO: 109之三倍共同輕鏈。

用於本發明中之阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑

【0192】 在本發明之一個態樣中，經靶向之OX40促進劑，特定言之包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體，係在用於治療或延遲癌症之進展之方法中使用，其中該等經靶向之OX40促進劑係與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體)組合使用，且另外其與阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑組合。在一個態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為PD-L1結合拮抗劑或PD-1結合拮抗劑。特定言之，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為抗PD-L1抗體或抗PD-1抗體。

【0193】 術語「PD-L1」(亦稱為CD274或B7-H1)係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如，食蟹獼猴)及啮齒動物(例如小鼠及大鼠))之任何原生PD-L1，尤其係指「人類PD-L1」。完整人類PD-L1之胺基酸序列展示於UniProt (www.uniprot.org)寄存編號Q9NZQ7 (SEQIDNO: 110)中。術語「**PD-L1結合拮抗劑**」係指減少、阻斷、抑制、消除或干擾由PD-L1與其結合搭配物中之任一或多者(諸如PD-1、B7-1)之相互相用引起的信號轉導的分子。在一些實施例中，PD-L1結合拮抗劑為抑制PD-L1與其結合搭配物之結合的分子。在特定態樣中，PD-L1結合拮抗劑抑制PD-L1與PD-1及/或B7-1結合。在一些實施例中，PD-L1結合拮抗劑包括減少、阻斷、抑制、消除或干擾由PD-L1與其結合搭配物中之一或多者(諸如PD-1、B7-1)之相互相用引起的信號轉導的抗PD-L1抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽及其他分子。在一個實施例中，PD-L1結合拮抗劑減少藉由或

經由在T淋巴細胞上表現之細胞表面蛋白質介導之負面協同刺激信號(經由PD-L1介導信號傳導)，從而使功能障礙性T細胞不太為功能障礙性(例如，增強對抗原識別之效應反應)。特定言之，PD-L1結合拮抗劑為抗PD-L1抗體。術語「**抗PD-L1抗體**」或「結合於人類PD-L1之抗體」或「特異性結合於人類PD-L1之抗體」或「拮抗性抗PD-L1」係指以 1.0×10^{-8} mol/l或更低之KD值，在一個態樣中，以 1.0×10^{-9} mol/l或更低之KD值之結合親和力特異性結合於人類PD-L1抗原之抗體。結合親和力由標準結合分析，諸如表面電漿共振技術(BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)測定。

【0194】 在一特定態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為抗PD-L1抗體。在一特定態樣中，抗PD-L1抗體選自由以下組成之群：阿特珠單抗(MPDL3280A, RG7446)、德瓦魯單抗(MEDI4736)、阿維魯單抗(avelumab; MSB0010718C)及MDX-1105。在一特定態樣中，抗PD-L1抗體係本文所描述之YW243.55.S70。在另一特定態樣中，抗PD-L1抗體為本文中描述之MDX-1105。在再一特定態樣中，抗PD-L1抗體為MEDI4736 (德瓦魯單抗)。在又一態樣中，抗PD-L1抗體為MSB0010718C (阿維魯單抗)。更特定言之，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為阿特珠單抗(MPDL3280A)。在另一態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為包含SEQ ID NO: 112之重鏈可變域VH(PDL-1)及SEQ ID NO: 113之輕鏈可變域VL(PDL-1)的抗PD-L1抗體。在另一態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為包含SEQ ID NO: 114之重鏈可變域VH(PDL-1)及SEQ ID NO: 115之輕鏈可變域VL(PDL-1)的抗PD-L1抗體。

【0195】術語「**PD-1**」，亦被稱作CD279、PD1或漸進式細胞死亡蛋白1，係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠))之任何原生PD-L1，尤其係指具有如 UniProt (www.uniprot.org)寄存編號Q15116 (SEQ ID NO:111)中所示之胺基酸序列的人類蛋白PD-1。術語「**PD-1結合拮抗劑**」係指抑制PD-1與其配體結合搭配物之結合的分子。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑抑制PD-1與PD-L1之結合。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑抑制PD-1與PD-L2之結合。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑抑制PD-1與PD-L1及PD-L2兩者之結合。特定言之，PD-L1結合拮抗劑為抗PD-L1抗體。術語「**抗PD-1抗體**」或「結合於人類PD-1之抗體」或「特異性結合於人類PD-1之抗體」或「拮抗性抗PD-1」係指以 1.0×10^{-8} mol/l或更低之KD值，在一個態樣中，以 1.0×10^{-9} mol/l或更低之KD值之結合親和力特異性結合於人類PD1抗原之抗體。結合親和力由標準結合分析，諸如表面電漿子共振技術(BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)測定。

【0196】在一個態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為抗PD-1抗體。在一特定態樣中，抗PD-1抗體選自由以下組成之群：MDX 1106 (納武單抗)、MK-3475 (帕博利珠單抗)、CT-011 (皮立珠單抗；pidilizumab)、MEDI-0680 (AMP-514)、PDR001、REGN2810及BGB-108，特定言之帕博利珠單抗及納武單抗。在另一態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為包含SEQ ID NO: 116之重鏈可變域VH(PD-1)及SEQ ID NO: 117之輕鏈可變域VL(PD-1)的抗PD-1抗體。在另一態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為包含SEQ ID NO: 118之重鏈可變

域VH(PD-1)及SEQ ID NO: 119之輕鏈可變域VL(PD-1)的抗PD-1抗體。
用於本發明中之雙特異性抗體之製備

【0197】 在某些態樣中，以組合形式使用之治療劑包含多特異性抗體，例如雙特異性抗體。多特異性抗體為對至少兩個不同位點具有結合特異性之單株抗體。在某些態樣中，該等結合特異性係針對不同抗原。在某些態樣中，該等結合特異性係針對相同抗原上之不同抗原決定基。雙特異性抗體可製備為全長抗體或抗體片段。

【0198】 用於製造多特異性抗體之技術包括(但不限於)具有不同特異性之兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之重組共表現(參見Milstein及Cuello, Nature 305: 537 (1983)), WO 93/08829, 及Traunecker等人, EMBO J. 10: 3655 (1991))及「杵臼」工程改造(參見例如美國專利第5,731,168號)。多特異性抗體亦可如下製造：用於製造抗體Fc-雜二聚分子之工程改造靜電轉向效應(WO 2009/089004A1)；使兩種或更多種抗體或片段交聯(參見例如美國專利第4,676,980號及Brennan等人, Science, 229: 81 (1985))；使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體(參見例如Kostelny等人, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992))；使用用於製造雙特異性抗體片段之「雙功能抗體」技術(參見例如Hollinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993))；及使用單鏈Fv (sFv)二聚體(參見例如Gruber等人, J. Immunol., 152:5368 (1994))；及如例如Tutt等人, J. Immunol. 147: 60 (1991)中所描述製備三特異性抗體。

【0199】 本文亦包括具有三個或更多個功能抗原結合位點之經工程改造之抗體，包括「章魚抗體」(參見例如US 2006/0025576A1)。

【0200】 本文中之抗體或片段亦包括包含結合於兩個不同抗原之抗

原結合位點的「雙作用FAb」或「DAF」(參見例如US 2008/0069820)。本文中亦包括「互換單抗(Crossmab)」抗體(參見例如WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO2009/080253或WO2009/080254)。

【0201】用於製造雙特異性抗體片段之另一技術為「雙特異性T細胞接合子」或BiTE®方法(參見例如WO2004/106381、WO2005/061547、WO2007/042261及WO2008/119567)。此方法利用佈置於單一多肽上之兩個抗體可變域。舉例而言，單一多肽鏈包括兩個單鏈Fv (scFv)片段，各自具有藉由長度足以允許兩個域之間的分子內結合的多肽連接子分離的可變重鏈(VH)域及可變輕鏈(VI)域。此單一多肽進一步包含兩個scFv片段之間的多肽間隔序列。各scFv識別不同抗原決定基，且此等抗原決定基可對不同細胞類型具有特異性，以使得當各scFv與其同源抗原決定基接合時兩個不同細胞類型之細胞接近或經繫栓。此方法之一個特定實施例包括scFv識別連接至另一scFv的由免疫細胞表現之細胞表面抗原，例如T細胞上之CD3多肽，該另一scFv識別由標靶細胞表現之細胞表面抗原，諸如惡性或腫瘤細胞。

【0202】由於其係單一多肽，雙特異性T細胞接合子可使用此項技術中已知之任何原核或真核細胞表現系統(例如CHO細胞株)表現。然而，特定純化技術(參見例如EP1691833)可為分離單體雙特異性T細胞接合子與其他多聚物種所必需，該等其他多聚物種可具有除單體之預期活性外的生物活性。在一個例示性純化方案中，首先對含有所分泌多肽之溶液進行金屬親和力層析法，且用咪唑濃度之梯度溶離多肽。使用陰離子交換層析法進一步純化此溶離液，且使用氯化鈉濃度之梯度溶離多肽。最後，對此溶離液進行尺寸排阻層析法以分離單體與多聚物種。在一個態樣中，用於

本發明中之雙特異性抗體由包含藉由肽連接子彼此融合之兩個單鏈Fv片段(scFv)的單一多肽鏈構成。

降低Fc受體結合及/或效應物功能之Fc域修飾

【0203】 本發明之抗原結合分子之Fc域由包含免疫球蛋白分子之重鏈域的一對多肽鏈組成。舉例而言，免疫球蛋白G (IgG)分子之Fc域為二聚體，其中各次單元包含CH2及CH3 IgG重鏈恆定域。Fc域之兩個次單元彼此間能夠穩定結合。

【0204】 Fc域賦予本發明之抗原結合分子有利的藥物動力學特性，包括長血清半衰期，其促進標靶組織中之良好聚集，及有利的組織-血液分佈率。然而，其同時可引起本發明之雙特異性抗體不合需要地靶向表現Fc受體之細胞而非較佳的攜有抗原之細胞。因此，在特定態樣中，相較於原生IgG1 Fc域，本發明之抗原結合分子之Fc域展現與Fc受體之降低結合親和力及/或降低效應物功能。在一個態樣中，Fc不實質上結合於Fc受體及/或不誘導效應物功能。在一個特定態樣中，Fc受體係Fcγ受體。在一個態樣中，Fc受體係人類Fc受體。在一個特定態樣中，Fc受體為活化人類Fcγ受體，更特定言之，人類FcγRIIIa、FcγRI或FcγRIIa，最特定言之，人類FcγRIIIa。在一個態樣中，Fc域不誘導效應物功能。降低之效應物功能可包括(但不限於)以下中之一或多者：降低之補體依賴性細胞毒性(CDC)、降低之抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、降低之抗體依賴性細胞吞噬(ADCP)、降低之細胞介素分泌、降低之免疫複合物介導之抗原呈現細胞對抗原的吸收、降低之與NK細胞之結合、降低之與巨噬細胞之結合、降低之與單核球之結合、降低之與多形核細胞之結合、降低之誘導細胞凋亡之直接信號傳導、降低之樹突狀細胞成熟或降低之T細胞活

化。

【0205】 在某些態樣中，可將一或多個胺基酸修飾引入至本文所提供之抗體的Fc區中，從而產生Fc區變體。Fc區變體可包含人類Fc區序列(例如，人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)，其包含在一或多個胺基酸位置處之胺基酸修飾(例如，取代)。

【0206】 在一特定態樣中，本發明提供一種抗體，其中Fc域包含降低與Fc受體、特定言之朝Fc γ 受體之結合的一或多個胺基酸取代。

【0207】 在一個態樣中，本發明之抗體之Fc域包含可降低Fc域對Fc受體之結合親和力及/或效應物功能的一或多個胺基酸突變。通常，Fc域之兩個次單元中之每一者中存在相同的一或多個胺基酸突變。特定言之，Fc域在位置E233、L234、L235、N297、P331及P329 (EU編號)處包含胺基酸取代。特定言之，Fc域包含IgG重鏈之位置234及235 (EU編號)及/或329 (EU編號)處的胺基酸取代。更特定言之，提供本發明之抗體，其包含在IgG重鏈中具有胺基酸取代L234A、L235A及P329G (「P329G LALA」，EU編號)之Fc域。胺基酸取代L234A及L235A係指所謂的LALA突變。胺基酸取代之「P329G LALA」組合幾乎完全消除人類IgG1 Fc域之Fc γ 受體結合且描述於國際專利申請公開案第WO 2012/130831 A1號中，其亦描述製備此類突變型Fc域之方法及測定其特性(諸如Fc受體結合或效應物功能)之方法。

【0208】 具有減少之Fc受體結合及/或效應物功能之Fc域亦包括具有Fc域殘基238、265、269、270、297、327及329之取代之彼等者(美國專利第6,737,056號)。此類Fc突變體包括具有胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或更多者之取代的Fc突變體，包括殘基265及297

取代為丙胺酸的所謂「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

【0209】 在另一態樣中，Fc域為IgG4 Fc域。相較於IgG1抗體，IgG4抗體展現減小之針對Fc受體的結合親和力及減少之效應物功能。在更特定態樣中，Fc域為包含在位置S228 (Kabat編號)處之胺基酸取代(特定言之，胺基酸取代S228P)的IgG4 Fc域。在更特定態樣中，Fc域為IgG4 Fc域，其包含胺基酸取代L235E及S228P及P329G (EU編號)。此類IgG4 Fc域突變體及其Fc γ 受體結合特性亦描述於WO 2012/130831中。

【0210】 突變型Fc域可使用此項技術中熟知之遺傳學或化學方法，藉由胺基酸缺失、取代、插入或修飾來製備。遺傳學方法可包括編碼DNA序列之定點突變誘發、PCR、基因合成及其類似方法。恰當的核苷酸變化可藉由例如定序來檢驗。

【0211】 可以例如藉由ELISA，或藉由表面電漿子共振(SPR)，使用標準儀器，諸如BIAcore儀器(GE Healthcare)容易測定與Fc受體的結合，且可諸如藉由重組表現來獲得Fc受體。替代地，Fc域或包含Fc域之細胞活化抗體對於Fc受體之結合親和力可使用已知表現特定Fc受體之細胞株(諸如表現Fc γ IIIa受體之人類NK細胞)來評估。

【0212】 Fc域或包含Fc域之本發明之雙特異性抗體之效應物功能可藉由此項技術中已知之方法量測。適用於量測ADCC之分析描述於本文中。用於評定所關注分子之ADCC活性的活體外分析之其他實例描述於美國專利第5,500,362號；Hellstrom等人 Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)及Hellstrom等人, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)；美國專利第5,821,337號；Bruggemann等人, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)中。或者，可採用非放射性分析方法(參見例如用於流

動式細胞測量術之ACTI™非放射性細胞毒性分析(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI))。適用於此類分析之效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及天然殺手(NK)細胞。替代地或另外，可以在活體內，例如在動物模型中，諸如Clynes等人, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)中所揭示之動物模型中評定所關注分子之ADCC活性。

【0213】 在一些態樣中，Fc域與補體組分(具體言之C1q)的結合降低。因此，在其中Fc域經工程改造而具有減少之效應物功能的一些實施例中，該減少之效應物功能包括降低之CDC。可進行C1q結合分析以測定本發明之雙特異性抗體是否能夠結合C1q且因此具有CDC活性。參見例如WO 2006/029879及WO 2005/100402中之C1q及C3c結合ELISA。為了評定補體活化，可執行CDC分析(參見例如Gazzano-Santoro等人, J Immunol Methods 202, 163 (1996)；Cragg等人, Blood 101, 1045-1052 (2003)；及Cragg及Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004))。

促進雜二聚化之Fc域修飾

【0214】 本發明之雙特異性抗原結合分子包含融合至Fc域之兩個次單元中之一個或另一個的不同抗原結合位點，因此Fc域之兩個次單元可包含於兩個不相同多肽鏈中。此等多肽之重組型共表現及隨後的二聚化引起兩種多肽之若干種可能的組合。為提高重組製造中本發明之雙特異性抗體的產量及純度，因此將適宜在本發明之雙特異性抗原結合分子的Fc域中引入促進所需多肽結合之修飾。

【0215】 因此，在特定態樣中，本發明係關於雙特異性抗原結合分子，其包含(a)能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域，

(b)能夠特異性結合於OX40之至少一個抗原結合域，及(c)由能夠穩定結合的第一及第二次單元構成的Fc域，其中Fc域包含促進Fc域之第一及第二次單元結合的修飾。人類IgG Fc域中之兩個次單元之間最廣泛蛋白質-蛋白質相互作用的位點存在於Fc域之CH3域中。因此，在一個態樣中，該修飾存在於Fc域之CH3域中。

【0216】 在一特定態樣中，該修飾為所謂的「杵臼」修飾，其包含Fc域之兩個次單元中之一者中的「杵」修飾及Fc域之兩個次單元之另一者中的「臼」修飾。因此，本發明係關於抗原結合分子，其包含(a)能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域，(b)能夠特異性結合於OX40之至少一個抗原結合域，及(c)由能夠穩定結合的第一及第二次單元構成的Fc域，其中根據杵臼方法，Fc域之第一次單元包含杵，且Fc域之第二次單元包含臼。在一特定態樣中，Fc域之第一次單元包含胺基酸取代S354C及T366W (EU編號)，且Fc域之第二次單元包含胺基酸取代Y349C、T366S及Y407V (根據Kabat EU索引編號)。

【0217】 杵臼技術描述於例如US5,731,168；US7,695,936；Ridgway等人, Prot Eng 9, 617-621 (1996)及Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)中。一般而言，方法涉及在第一多肽之界面處引入隆凸(「杵」)及在第二多肽之界面處引入相應凹腔(「臼」)，使得隆凸可定位於凹腔中以便促進雜二聚體形成且阻礙均二聚體形成。藉由用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換第一多肽界面中之小胺基酸側鏈來構築隆凸。大小與隆凸相同或類似之補償性凹腔藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈而形成於第二多肽之界面中。

【0218】 因此，在一個態樣中，在本發明之雙特異性抗原結合分子

的Fc域的第一次單元的CH3域中，胺基酸殘基經置換為具有較大側鏈體積之胺基酸殘基，由此在第一次單元之CH3域內產生隆凸，其可位於第二次單元之CH3域內的凹腔中，且在Fc域之第二次單元的CH3域中，胺基酸殘基經置換為具有較小側鏈體積之胺基酸殘基，由此在第二次單元之CH3域內產生凹腔，第一次單元之CH3域內的隆凸可位於該凹腔中。隆凸及凹腔可藉由改變編碼多肽之核酸，例如藉由定點突變誘發或藉由肽合成產生。在一特定態樣中，在Fc域之第一次單元之CH3域中，位置366處之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基(T366W)置換，且在Fc域之第二次單元之CH3域中，位置407處之酪胺酸殘基經纈胺酸殘基(Y407V)置換。在一個態樣中，在Fc域之第二次單元中，位置366處之蘇胺酸殘基另外經絲胺酸殘基(T366S)置換且位置368處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基(L368A)置換。

【0219】在又一態樣中，在Fc域之第一次單元中，位置354之絲胺酸殘基另外經半胱胺酸殘基(S354C)置換，且在Fc域之第二次單元中，位置349之酪胺酸殘基另外經半胱胺酸殘基(Y349C)置換。引入此等兩個半胱胺酸殘基使得Fc域之兩個次單元之間形成二硫橋鍵，進一步穩定二聚體(Carter (2001), J Immunol Methods 248, 7-15)。在一特定態樣中，Fc域之第一次單元包含胺基酸取代S354C及T366W (EU編號)，且Fc域之第二次單元包含胺基酸取代Y349C、T366S及Y407V (根據Kabat EU索引編號)。

【0220】在替代性態樣中，促進Fc域之第一與第二次單元締合的修飾包含介導靜電轉向效應之修飾，例如PCT公開案WO 2009/089004中所描述。通常，此方法涉及用帶電胺基酸殘基置換兩個Fc域次單元之界面處之一或多個胺基酸殘基，使得均二聚體形成變成在靜電上不利的，但雜二

聚在靜電上為有利的。

【0221】如本文所報導之雙特異性抗體之重鏈的C端可為以胺基酸殘基PGK結束之完整C端。重鏈之C端可為縮短C端，其中已移除一或兩個C端胺基酸殘基。在一個較佳態樣中，重鏈之C端為以PG結束之縮短C端。在如本文所報導之所有態樣之一個態樣中，如本文所規定之包含包括C末端CH3域之重鏈的雙特異性抗體包含C末端甘胺酸-離胺酸二肽(G446及K447，根據Kabat EU索引編號)。在如本文所報導之全部態樣中之一個實施例中，如本文所規定之包含包括C端CH3域之重鏈的雙特異性抗體包含C端甘胺酸殘基(G446，根據KabatEU索引編號)。

Fab域中之修飾

【0222】在一個態樣中，本發明係關於包含至少一個Fab片段之雙特異性抗體，其中可變域VH及VL或恆定域CH1及CL經交換。根據互換單抗(Crossmab)技術製備雙特異性抗體。

【0223】在一個結合臂中具有域置換/交換的多特異性抗體(CrossMabVH-VL或CrossMabCH-CL)詳細描述於WO2009/080252及Schaefer, W.等人, PNAS, 108 (2011) 11187-11191中。其明顯地減少由針對第一抗原之輕鏈與針對第二抗原之錯誤重鏈失配(與沒有此類域交換之方法相比較)而造成的副產物。

【0224】在一個態樣中，本發明係關於包含Fab片段之雙特異性抗原結合分子，其中恆定域CL及CH1彼此置換，以使CH1域為輕鏈之一部分且CL域為重鏈之一部分。

【0225】在另一態樣中，本發明係關於包含Fab片段之雙特異性抗原結合分子，其中可變域VL及VH彼此置換，以使VH域為輕鏈之一部分

且VL域為重鏈之一部分。

【0226】 在另一態樣中，且為進一步改良恰當配對，雙特異性抗原結合可含有不同帶電胺基酸取代(所謂的「帶電殘基」)。將此等修飾引入交叉或非交叉CH1及CL域中。在一特定態樣中，本發明係關於一種雙特異性抗原結合分子，其中在CL域中之至少一者中，位置123 (EU編號)處之胺基酸經精胺酸(R)置換且位置124 (EU編號)處之胺基酸經離胺酸(K)取代，且其中在CH1域中之至少一者中，位置147 (EU編號)及位置213 (EU編號)處之胺基酸經麩胺酸(E)取代。

聚核苷酸

【0227】 本發明進一步提供編碼如本文中所描述之抗體或其片段的分離之聚核苷酸。

【0228】 編碼本發明抗體之經分離聚核苷酸可表現為編碼整個抗原結合分子之單一多核苷酸或表現為共表現之多個(例如兩個或更多個)聚核苷酸。由共表現之聚核苷酸編碼之多肽可經由例如雙硫鍵或其他手段締合，以形成功能性抗原結合分子。舉例而言，免疫球蛋白之輕鏈部分可由來自免疫球蛋白之重鏈部分的單獨聚核苷酸編碼。當共表現時，重鏈多肽與輕鏈多肽結合以形成免疫球蛋白。

【0229】 在一些態樣中，分離之聚核苷酸編碼如本文中所描述之根據本發明之整個抗體。在其他實施例中，分離之聚核苷酸編碼如本文中所描述的根據本發明之抗體中所包含之多肽。

【0230】 在某些實施例中，該聚核苷酸或核酸為DNA。在其他實施例中，本發明之聚核苷酸係RNA，例如呈信使RNA (mRNA)形式。本發明之RNA可為單股或雙股RNA。

重組方法

【0231】 本發明中所使用之雙特異性抗體可例如藉由固態肽合成(例如梅里菲爾德固相合成(Merrifield solid phase synthesis))或重組產生獲得。對於重組產生，分離(例如)如上文所描述之編碼抗體或其多肽片段之一或多個多核苷酸且將其插入一或多個載體中以用於進一步選殖及/或表現於宿主細胞中。此類聚核苷酸可使用習知程序容易地分離及測序。在本發明之一個態樣中，提供包含本發明之聚核苷酸中之一或多者的載體，較佳表現載體。可使用已為熟習此項技術者所熟知之方法來構築含有抗體之編碼序列(片段)連同適當轉錄/轉譯控制信號的表現載體。此等方法包括活體外重組DNA技術、合成技術及活體內重組/基因重組。參見例如 Maniatis 等人, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); 及 Ausubel 等人, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989) 中所描述之技術。表現載體可為質體、病毒之一部分，或可為核酸片段。表現載體包括表現卡匣，其中編碼抗體或其多肽片段(亦即，編碼區)之多核苷酸以可操作地與啟動子及/或其他轉錄或轉譯控制元件結合之方式選殖。如本文所用，「編碼區」為由轉譯成胺基酸之密碼子組成的核酸之一部分。雖然「終止密碼子」(TAG、TGA或TAA)未轉譯成胺基酸，但其可視為編碼區(若存在)之部分，但任何側接序列(例如啟動子、核糖體結合位點、轉錄終止子、內含子、5'及3'未轉譯區及類似序列)不為編碼區之部分。兩個或更多個編碼區可存在於單一聚核苷酸構築體上，例如單一載體上，或存在於單獨多核苷酸構築體中，例如單獨(不同)載體上。此外，任何載體可含

有單一編碼區，或可包含兩個或更多個編碼區，例如本發明之載體可編碼一或多個多肽，其經由蛋白水解分裂而轉譯後或共轉譯分離成最終蛋白質。另外，本發明之載體、聚核苷酸或核酸可編碼融合或未融合至編碼本發明抗體或其多肽片段之聚核苷酸的異源編碼區或其變體或衍生物。異源編碼區包括(但不限於)專用元件或基元，諸如分泌性信號肽或異源功能性域。可操作結合為當基因產物(例如多肽)之編碼區與一或多個調節序列結合之時，其方式為在調節序列之影響或控制下置放基因產物之表現。若誘導啟動子功能導致編碼所要基因產物之mRNA轉錄且若兩個DNA片段之間連接的性質不干擾表現調節序列導引基因產物表現的能力或不干擾DNA模板轉錄的能力，則兩個DNA片段(諸如多肽編碼區及與其結合的啟動子)為「可操作地結合」。因此，若啟動子能夠實現核酸轉錄，則啟動子區域與編碼多肽之核酸可操作地結合。啟動子可為僅導引預定細胞中之DNA實質性轉錄之細胞特異性啟動子。除啟動子以外的其他轉錄控制元件(例如強化子、操縱子、抑制子及轉錄終止信號)可與引導細胞特異性轉錄之聚核苷酸可操作地結合。

【0232】適合的啟動子及其他轉錄控制區揭示於本文中。多個轉錄控制區已為熟習此項技術者所知。此等區域包括(但不限於)在脊椎動物細胞中起作用的轉錄控制區，諸如(但不限於)啟動子及增強子區段，其來自巨細胞病毒(例如，即刻早期啟動子，連同內含子-A)、猴病毒40 (例如早期啟動子)及逆轉錄病毒(諸如勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus))。其他轉錄控制區包括來源於脊椎動物基因(諸如肌動蛋白、熱休克蛋白、牛生長激素及兔 α -血球蛋白)之區域，以及能夠控制真核細胞中之基因表現的其他序列。其他適合轉錄控制區包括組織特異性啟動子及增強子以及誘導

性啟動子(例如啟動子誘導性四環素(tetracyclins))。類似地，多種轉譯控制元件已為一般熟習此項技術者所知。此等元件包括(但不限於)核糖體結合位點、轉譯起始及終止密碼子，以及來源於病毒系統的元件(特定言之，內部核糖體進入位點或IRES，亦稱為CITE序列)。表現卡匣亦可包括其他特徵，諸如複製起點，及/或染色體整合元件，諸如反轉錄病毒長末端重複序列(LTR)，或腺相關聯病毒(AAV)反向末端重複序列(ITR)。

【0233】 本發明之聚核苷酸及核酸編碼區可與編碼分泌性肽或信號肽的其他編碼區結合，從而引導由本發明之聚核苷酸編碼的多肽之分泌。舉例而言，若抗體或其多肽片段之分泌為所需，則編碼信號序列之DNA可置於本發明抗體或其多肽片段之核酸之上游。根據信號假設，哺乳動物細胞所分泌的蛋白質具有自成熟蛋白質裂解(一旦生長蛋白質鏈跨越粗糙內質網輸出已起始)的信號肽或分泌性前導序列。一般熟習此項技術者認識到，脊椎動物細胞分泌的多肽通常具有與多肽之N端融合的信號肽，該信號肽自所轉譯之多肽裂解而產生呈分泌或「成熟」形式的多肽。在某些實施例中，使用原生信號肽，例如免疫球蛋白重鏈或輕鏈信號肽，或該序列之保持引導可操作地與其結合之多肽之分泌的能力的功能衍生物。或者，可使用異源哺乳動物信號肽或其功能衍生物。舉例而言，野生型前導序列可經人類組織纖維蛋白溶酶原活化因子(TPA)或小鼠 β -葡糖醛酸酶之前導序列取代。

【0234】 可用以促進稍後純化(例如組胺酸標記)或幫助標記融合蛋白質之編碼短蛋白質序列之DNA可包括於編碼本發明抗體或其多肽片段之聚核苷酸內或末端處。

【0235】 在本發明之另一態樣中，提供包含一或多種本發明之聚核

苷酸的宿主細胞。在某些實施例中，提供包含一或多種本發明之載體之宿主細胞。聚核苷酸及載體可合併本文分別關於聚核苷酸及載體所述之任一特徵(單個或組合)。在一個態樣中，宿主細胞包含載體(例如，已經該載體轉型或轉染)，該載體包含編碼本發明抗體之(一部分)的聚核苷酸。如本文所用，術語「宿主細胞」係指任何類型之可經工程改造以產生本發明之融合蛋白或其片段的細胞系統。適用於複製及支援抗原結合分子之表現的宿主細胞為此項技術中熟知。此類細胞可視需要經特定表現載體轉染或轉導，且可生長含有大量載體之細胞以用於接種大型發酵槽，以獲得足量的抗原結合分子以用於臨床應用。適合的宿主細胞包括原核微生物，諸如大腸桿菌，或各種真核細胞，諸如中國倉鼠卵巢細胞(CHO)、昆蟲細胞或其類似物。舉例而言，可在細菌中產生多肽，尤其在不需糖基化時。在表現之後，可自可溶性部分之細菌細胞糊狀物分離出多肽且可將該多肽進一步純化。除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適用於編碼多肽之載體的選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已經「人類化」，從而產生具有部分或完全人類糖基化型態之多肽的真菌及酵母菌株。參見 Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004)，及Li等人, Nat Biotech 24, 210-215 (2006)。

【0236】 適用於表現(糖基化)多肽的宿主細胞亦來源於多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出眾多可與昆蟲細胞聯合使用，尤其用於轉染草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞之桿狀病毒株。植物細胞培養物亦可用作宿主。參見例如美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(描述利用轉殖基因植物產生抗體的

PLANTIBODIES™技術)。脊椎動物細胞亦可用作宿主。舉例而言，適於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞株可為適用的。適用哺乳動物宿主細胞株之其他實例為經SV40轉型的猴腎CV1細胞株(COS-7)；人類胚腎細胞株(293或293T細胞，如例如Graham等人, J Gen Virol 36, 59 (1977)中所描述)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠塞特利氏細胞(mouse sertoli cells) (TM4細胞，如例如Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)中所描述)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤細胞(MMT 060562)；TRI細胞(如例如Mather等人, Annals N. Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)中所描述)；MRC 5細胞及FS4細胞。其他適用的哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括dhfr-CHO細胞(Urlaub等人, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如YO、NS0、P3X63及Sp2/0。關於適用於蛋白質製備之某些哺乳動物宿主細胞株之綜述，參見例如Yazaki及Wu, Methods in Molecular Biology, 第248卷(B.K.C. Lo編, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268頁 (2003)。宿主細胞包括經培養細胞，例如經培養之哺乳動物細胞、酵母細胞、昆蟲細胞、細菌細胞及植物細胞(僅舉數例)，而且包括轉殖基因動物、轉殖基因植物或經培養之植物或動物組織中所包含的細胞。在一個實施例中，宿主細胞係真核細胞，較佳係哺乳動物細胞，諸如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、人類胚腎(HEK)細胞或淋巴細胞(例如YO、NS0、Sp20細胞)。此項技術中已知在此等系統中表現外源基因的標準技術。表現包含免疫球蛋白之重鏈或輕鏈之多肽的細胞可經工程改造以亦表現免疫球蛋白鏈中之另一者，使得所表現產物為具

有重鏈及輕鏈的免疫球蛋白。

【0237】 在一個態樣中，提供一種製造本發明抗體或其多肽片段之方法，其中該方法包含培養包含在適合於表現本發明抗體或其多肽片段的條件下編碼如本文所提供之本發明抗體或其多肽片段之聚核苷酸的宿主細胞，及自該宿主細胞(或宿主細胞培養基)復原本發明抗體或其多肽片段。

【0238】 在某些實施例中，能夠特異性結合於形成抗原結合分子之一部分之標靶細胞抗原(例如Fab片段)的部分包含能夠結合於抗原之至少免疫球蛋白可變區。可變區可形成天然或非天然存在之抗體及其片段之一部分且來源於天然或非天然存在之抗體及其片段。製造多株抗體及單株抗體之方法為此項技術中熟知(參見例如Harlow及Lane, 「Antibodies, a laboratory manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。非天然存在之抗體可使用固相肽合成法構築，可以重組方式製造(例如如美國專利第4,186,567號中所述)或可藉由例如篩檢包含可變重鏈及可變輕鏈的組合文庫來獲得(參見例如McCafferty之美國專利第5,969,108號)。

【0239】 本發明中可使用任何動物物種之免疫球蛋白。適用於本發明之非限制性免疫球蛋白可為鼠類、靈長類動物或人類來源。若融合蛋白意欲用於人類用途，則可使用其中免疫球蛋白之恆定區來自人類的嵌合形式之免疫球蛋白。亦可根據此項技術中所熟知之方法製備人類化或全人類形式之免疫球蛋白(參見例如Winter之美國專利第5,565,332號)。人類化可藉由各種方法達成，包括(但不限於) (a)將非人類(例如供體抗體)CDR移植至人類(例如受者抗體)構架區及恆定區上，其中保留或不保留關鍵構架殘基(例如對於保留良好抗原結合親和力或抗體功能而言具有重要作用的彼等殘基)；(b)僅將非人類特異性決定區(SDR或a-CDR；對於抗體-抗原

相互作用而言具有關鍵作用的殘基)移植至人類構架區及恆定區上；或(c)移植整個非人類可變域，但藉由表面殘基置換而用人類類似區段對其進行「遮掩」。人類化抗體及其製備方法綜述於例如Almagro及Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008)中，且進一步描述於例如Riechmann等人, *Nature* 332, 323-329 (1988)；Queen等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989)；美國專利案第5,821,337號、第7,527,791號、第6,982,321號及第7,087,409號；Jones等人, *Nature* 321, 522-525 (1986)；Morrison等人, *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984)；Morrison及Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988)；Verhoeyen等人, *Science* 239, 1534-1536 (1988)；Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994)；Kashmiri等人, *Methods* 36, 25-34 (2005) (描述SDR (a-CDR)移植)；Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (描述「表面重修」)；Dall'Acqua等人, *Methods* 36, 43-60 (2005) (描述「FR改組」)；及Osbourn等人, *Methods* 36, 61-68 (2005)；及Klimka等人, *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (描述FR改組的「導向選擇」方法)中。本發明之特定免疫球蛋白為人類免疫球蛋白。人類抗體及人類可變區可使用此項技術中已知之各種技術製造。人類抗體大體上描述於van Dijk及van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001)及Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008)中。人類可變區可形成藉由融合瘤方法製得之人類單株抗體的一部分且可來源於藉由融合瘤方法製得之人類單株抗體(參見例如*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。人類抗體及人類可變區亦可藉由如下製備：向已經修飾之轉殖基因動物投與免疫原，從而回應於抗

原攻擊而產生完整人類抗體或具有人類可變區之完整抗體(參見例如 Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005))。人類抗體及人類可變區亦可藉由分隔選自人類衍生之噬菌體呈現文庫的Fv純系可變區序列來產生(參見例如Hoogenboom等人, Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O'Brien等人編, Human Press, Totowa, NJ, 2001)；及McCafferty等人, Nature 348, 552-554；Clackson等人, Nature 352, 624-628 (1991))。噬菌體通常以單鏈Fv (scFv)片段或Fab片段形式呈現抗體片段。

【0240】在某些態樣中，抗體根據例如PCT公開案WO 2012/020006 (參見與親和力成熟相關之實例)或美國專利申請公開案第2004/0132066號中所揭示之方法經工程改造為具有經增強之結合親和力。本發明之抗原結合分子結合於特異性抗原決定子之能力可經由酶聯結免疫吸附分析(ELISA)或熟習此項技術者熟悉之其他技術(例如表面電漿子共振(SPR)技術(Liljeblad等人, Glyco J 17, 323-329 (2000))及傳統結合分析(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))量測。可使用競爭分析鑑別與參考抗體競爭結合於特定抗原之抗原結合分子。在某些實施例中，此類競爭的抗原結合分子結合於藉由參考抗原結合分子結合之相同抗原決定基(例如，線性或構形抗原決定基)。抗原結合分子所結合之抗原決定基之定位的詳細例示性方法提供於Morris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」, Methods in Molecular Biology第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中。在例示性競爭分析法中，在包含結合於抗原之第一標記抗原結合分子及測試與第一抗原結合分子競爭結合於抗原之能力的第二未標記抗原結合分子之溶液中培育固定抗原。第二抗原結合分子可存在於融合瘤上清液中。作為對照，在包含第一標記抗原結合分子但不包含第二未

標記抗原結合分子之溶液中培育固定抗原。在允許第一抗體結合至抗原之條件下培育之後，移除過量的未結合抗體，且量測與所固定抗原結合之標記的量。若與對照樣本相比，測試樣本中與固定抗原結合之標記之量實質上降低，則指示第二抗原結合分子與第一抗原結合分子競爭結合於抗原。參見Harlow及Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* 第14章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

【0241】如本文中所描述製備的本發明抗體可藉由此項技術中已知的技術(諸如高效液相層析法、離子交換層析法、凝膠電泳、親和力層析法、尺寸排阻層析法等)純化。用於純化特定蛋白質的實際條件部分地視諸如淨電荷、疏水性、親水性等因素而定，且對於熟習此項技術者而言將為顯而易見的。對於親和層析純化，可使用抗原結合分子結合之抗體、配體、受體或抗原。舉例而言，為了對本發明之雙特異性抗體進行親和層析純化，可使用具有蛋白質A或蛋白質G之基質。可使用序列蛋白質A或G親和層析及尺寸排阻層析來分離實質上如實例中所描述之抗原結合分子。抗原結合分子或其片段之純度可藉由多種熟知分析方法中之任一者測定，包括凝膠電泳、高壓液相層析法及其類似方法。舉例而言，如實例中所描述之雙特異性抗體展示為完整的且適當地組裝，如還原及非還原SDS-PAGE所證實。

分析

【0242】可藉由此項技術中已知之各種分析對本文中提供之抗原結合分子針對其物理/化學特性及/或生物活性進行鑑別、篩檢或表徵。

1. 親和力分析

【0243】本文所提供之雙特異性抗原結合分子對於對應受體之親和

力可根據闡述於實例中之方法(藉由表面電漿子共振(SPR))使用標準儀器(BIAcore儀器(GE Healthcare))測定，且受體或靶蛋白可諸如藉由重組表現獲得。雙特異性抗原結合分子對標靶細胞抗原之親和力亦可藉由表面電漿子共振(SPR)，使用諸如BIAcore儀器(GE Healthcare)之標準儀器測定，且受體或靶蛋白諸如可藉由重組表現獲得。對於FAP-OX40雙特異性抗體，方法已經更詳細地描述於國際專利申請公開案第WO 2017/055398 A2號或第WO 2017/060144 A1號中。根據一個態樣，藉由表面電漿子共振使用BIACORE® T100機器(GE Healthcare)在25°C量測 K_D 。

2. 結合分析及其他分析

【0244】 在一個態樣中，測試如本文所報導之FAP-OX40雙特異性抗體之抗原結合活性，如國際專利申請公開案第WO 2017/055398 A2號或第WO 2017/060144 A1號中更詳細地描述。

3. 活性分析

【0245】 在一個態樣中，提供用於鑑別經靶向之OX40雙特異性抗原結合分子之生物活性的分析。

【0246】 在某些實施例中，測試如本文所報導之抗體之此類生物活性。

醫藥組合物、調配物及投藥途徑

【0247】 在另一態樣中，本發明提供例如供以下治療方法中之任一者中所用之醫藥組合物，其包含：包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體；及本文所提供之對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體，特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體。在一個實施例中，醫

藥組合物包含本文所提供之抗體及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。在另一實施例中，醫藥組合物包含本文所提供之抗體及(例如)如下所描述之至少一種額外治療劑。

【0248】 在一個態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體，特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體。

【0249】 在另一態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含：包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體、對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體及阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑。特定言之，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為拮抗性抗PD-L1抗體或拮抗性抗PD1抗體。更特定言之，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑選自由以下組成之群：阿特珠單抗、德瓦魯單抗、帕博利珠單抗及納武單抗。在一特定態樣中，阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑為阿特珠單抗。

【0250】 本發明之醫藥組合物包含溶解或分散於醫藥學上可接受之賦形劑中的治療有效量之一或多種抗體。片語「醫藥學上或藥理學上可接受」係指分子實體及組合物在所用劑量及濃度下對於接受者而言一般為無毒性的，亦即，當適當時投與至動物(諸如人類)時，不會產生有害的過敏反應或其他不良反應。包含活性成分(例如，包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體、對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體及/或阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑)之醫藥組合物之製備將為熟習此項技術者根據本發明而已

知，如藉由以引用之方式併入本文中的Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版，Mack Printing Company, 1990所例示。特定言之，組合物係凍乾調配物或水溶液。如本文中所使用，「醫藥學上可接受之賦形劑」包括任何及所有溶劑、緩衝液、分散介質、塗料、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗菌劑、抗真菌劑)、等張劑、鹽、穩定劑及其組合，如一般熟習此項技術者將已知。

【0251】非經腸組合物包括為藉由注射(例如皮下、皮內、病灶內、靜脈內、動脈內、肌肉內、鞘內或腹膜內注射)投與所設計的該等組合物。注射時，本發明之抗原結合分子可於水溶液中調配，較佳於生理上相容的緩衝液(諸如漢克氏溶液(Hanks' solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理鹽水緩衝液)中調配。溶液可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。或者，融合蛋白質可呈粉末形式以用於在使用之前用適合的媒劑(例如無菌無熱原質水)復原。藉由將所需量之本發明之融合蛋白併入視需要具有多種下文列舉之其他成分之適當溶劑中來製備無菌可注射溶液。無菌性可容易藉由例如無菌過濾膜過濾來實現。一般而言，分散液係藉由將各種經滅菌之活性成分併入含有基本分散介質及/或其他成分的無菌媒劑中來製備。在用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末情況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術，其利用預先無菌過濾之液體介質產生活性成分與任何其他所需成分之粉末。視需要，液體介質宜經緩衝，且在與足量生理食鹽水或葡萄糖一起注射之前，首先使液體稀釋劑呈等張性。該組合物在製造及儲存條件下必須為穩定的，且必須避免諸如細菌及真菌之微生物的污染作用。應瞭解，內毒素污染應最低限度地保持在安全水準，例如低於0.5 ng/mg蛋白質。適合的醫藥學上可接受之賦形劑

包括(但不限於)：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如，十八烷基二甲基苯甲基氯化銨；氯化六羥季銨；苯紮氯銨；苄索氯銨；酚；丁醇或苯甲醇；對羥苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(低於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、雙糖及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成鹽反離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如，Zn-蛋白錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。水性注射懸浮液可含有增加懸浮液黏度之化合物，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇、聚葡萄糖或其類似物。視情況，懸浮液亦可含有適合穩定劑或增加化合物溶解性之試劑以允許製備高度濃縮之溶液。另外，活性化合物之懸浮液可視需要製備成油性注射懸浮液。適合親脂性溶劑或媒劑包括脂肪油，諸如芝麻油；或合成脂肪酸酯，諸如油酸乙酯或三酸甘油酯；或脂質體。

【0252】 可例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合將活性成分包覆於所製備之微囊中，例如羥甲基纖維素或明膠微囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊分別包覆於膠狀藥物遞送系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米囊劑)或巨乳液中。此類技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版, Mack Printing Company, 1990)中。可製備持續釋放型製劑。持續釋放型製劑之適合實例包括含有多肽之固體疏水性聚合物之半滲透基質，該等基質呈成形物品形式，例如膜或微膠囊。

在特定實施例中，可注射組合物之延長吸收可藉由在組合物中使用延遲吸收劑(諸如單硬脂酸鋁、明膠或其組合)來達成。

【0253】 本文中之例示性醫藥學上可接受之賦形劑進一步包括間質藥物分散劑，諸如可溶性中性活性玻尿酸酶糖蛋白(sHASEGP)，例如人類可溶性PH-20玻尿酸酶糖蛋白，諸如rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)。某些例示性sHASEGP (包括rHuPH20)及使用方法描述於美國專利公開案第2005/0260186號及第2006/0104968號中。在一個態樣中，sHASEGP與一或多種其他葡萄糖胺聚糖酶(諸如軟骨素酶)組合。

【0254】 例示性凍乾抗體調配物描述於美國專利第6,267,958號中。水性抗體調配物包括美國專利案第6,171,586號及WO 2006/044908中所述之調配物，後一者中之調配物包括組胺酸-乙酸鹽緩衝液。

【0255】 除先前描述之組合物以外，活性成分亦可調配成儲槽式製劑。此類長效調配物可藉由植入(例如皮下或肌肉內植入)或藉由肌肉內注射來投與。因此，舉例而言，融合蛋白可用適合的聚合或疏水性材料(例如呈可接受之油中的乳液形式)或離子交換樹脂調配，或調配成微溶性衍生物，例如微溶性鹽。

【0256】 包含本發明之活性成分的醫藥組合物可藉助於習知混合、溶解、乳化、囊封、包覆或凍乾製程製造。醫藥組合物可使用一或多種有利於將蛋白質處理成可在醫藥學上使用之製劑的生理學上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑或助劑以習知方式調配。適當調配物視所選擇之投與途徑而定。

【0257】 本發明抗體可調配成游離酸或鹼、中性或鹽形式之組合

物。醫藥學上可接受之鹽為實質上保留游離酸或鹼之生物活性的鹽。此等鹽包括酸加成鹽，例如與蛋白質組合物之游離胺基形成的鹽，或與無機酸(諸如鹽酸或磷酸)或有機酸(諸如乙酸、乙二酸、酒石酸或杏仁酸)形成的鹽。與自由羧基形成的鹽亦可衍生自無機鹼，諸如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵；或有機鹼，諸如異丙胺、三甲胺、組胺酸或普魯卡因(procaine)。相較於相應的游離鹼形式，醫藥鹽傾向於更可溶於水性及其他質子溶劑中。

【0258】 本文中之組合物亦可含有一種以上為所治療之特定適應症所必需之活性成分，較佳為具有不會對彼此產生不利影響之互補活性的活性成分。此類活性成分宜以有效達成預期目的之量的組合存在。

【0259】 用於活體內投與之調配物通常為無菌的。無菌性可容易藉由例如無菌過濾膜過濾來實現。

抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體)之投與

【0260】 抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體)(兩者在本文中被稱作物質)可藉由任何適合手段的投與，包括非經腸、肺內及鼻內，且在需要局部治療時，病灶內投與。然而，本發明方法對於藉由非經腸(特定言之靜脈內)輸注投與之治療劑尤其適用。

【0261】 非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。可例如藉由任何適合途徑(例如注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥，此部分地視短期或長期投與而定。本文中涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投與或在不同時間點的多次投與、快速投與及脈衝式輸

注。在一個實施例中，治療劑非經腸(特定言之經靜脈內)投與。在一特定實施例中，治療劑藉由靜脈內輸注投與。

【0262】 抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體)兩者係以符合良好藥學規範之方式調配、給藥及投與。在此情形下考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症起因、試劑遞送位點、投與方法、投與時程及醫學從業者已知之其他因素。抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體)兩者不必但視情況經當前用以預防或治療討論中之病症的一或多種試劑調配。此類其他試劑之有效量視存在於調配物中之治療劑之量、病症或治療之類型及上文所論述之其他因素而定。此等試劑一般以相同劑量且以如本文所描述之投與途徑使用，或以本文所描述之劑量之約1%至99%使用，或以任何劑量且以憑經驗/臨床上確定為適當之任何途徑使用。

【0263】 為了預防或治療疾病，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體)(當以其組合方式或與一或多種其他另外治療劑一起使用時)之適當劑量將視待治療疾病之類型、抗FAP/抗OX40雙特異性抗體之類型、疾病之嚴重程度及病程、兩種試劑是否經投與以用於預防性或治療性目的、先前療法、患者之臨床歷史及對治療劑之反應，及主治醫師之判斷而定。一次性或歷經一系列治療向患者適當投與各物質。取決於疾病之類型及嚴重程度，約1 $\mu\text{g/kg}$ 至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg - 10 mg/kg)可為用於投與給受試者之初始候選劑量，無論例如係藉由一或多次

單獨投與抑或藉由連續輸注。視上文所提及之因素而定，一個典型的日劑量係在約1 $\mu\text{g/kg}$ 至100 mg/kg 或更大之範圍內。對於歷經數日或更長時間之重複投與，視病狀而定，治療通常將持續至疾病症狀之所需抑制發生為止。各物質之一個例示性劑量係在約0.05 mg/kg 至約10 mg/kg 範圍內。因此，可向受試者投與約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、4.0 mg/kg 或10 mg/kg (或其任何組合)之一或多個劑量。此類劑量可以間歇方式，例如每週、每兩週或每三週投與(例如，使得受試者接受約兩種或約二十種，或例如約六種劑量之治療劑)。可在最初投與較高起始劑量、繼之以一或多個較低劑量，或最初投與較低劑量、繼之以一或多個較高劑量。例示性給藥方案包含投與約10 mg 之初始劑量、繼之以約20 mg 之治療劑之每兩週劑量。然而，其他給藥方案可為適用的。此療法之進程易於藉由習知技術及分析來監測。

【0264】 在一個態樣中，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體(特定言之，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體)兩者之投與為單次投與。在某些態樣中，治療劑之投與為兩次或兩次以上投與。在一個此類態樣中，每週、每兩週或每三週(特定言之每兩週)投與該等物質。在一個態樣中，以治療有效量投與該物質。在一個態樣中，以約50 $\mu\text{g/kg}$ 、約100 $\mu\text{g/kg}$ 、約200 $\mu\text{g/kg}$ 、約300 $\mu\text{g/kg}$ 、約400 $\mu\text{g/kg}$ 、約500 $\mu\text{g/kg}$ 、約600 $\mu\text{g/kg}$ 、約700 $\mu\text{g/kg}$ 、約800 $\mu\text{g/kg}$ 、約900 $\mu\text{g/kg}$ 或約1000 $\mu\text{g/kg}$ 之劑量投與該物質。在一個實施例中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體之投與劑量高於未投與抗FAP/抗OX40雙特異性抗體之對應治療方案中之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體之劑量。在一個態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體之投與包含：第一劑量之抗

CEA/抗CD3雙特異性抗體之初始投與，及第二劑量之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體之一或多次後續投與，其中第二劑量高於第一劑量。在一個態樣中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體之投與包含：第一劑量之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體之初始投與，及第二劑量之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體之一或多次後續投與，其中第一劑量不低於第二劑量。

【0265】 在一個態樣中，根據本發明之治療方案中的抗CEA/抗CD3雙特異性抗體之投與為首先向受試者投與抗CEA/抗CD3雙特異性抗體(至少在同一療程內)。在一個態樣中，不會在投與抗CEA/抗CD3雙特異性抗體之前進行向受試者投與抗FAP/抗OX40雙特異性抗體。

【0266】 在本發明中，抗CEA/抗CD3雙特異性抗體與抗FAP/抗OX40雙特異性抗體之組合可在療法中與其他試劑組合使用。舉例而言，至少一種額外治療劑可共同投與。在某些態樣中，額外治療劑為免疫治療劑。

【0267】 在一個態樣中，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體與抗CEA/抗CD3雙特異性抗體之組合可與PD-1軸結合拮抗劑組合使用。在一個態樣中，PD-1軸結合拮抗劑係選自由以下組成之群：PD-1結合拮抗劑、PD-L1結合拮抗劑及PD-L2結合拮抗劑。在特定態樣中，PD-1軸結合拮抗劑為PD-1結合拮抗劑，特定言之，拮抗性PD-1抗體。在一個態樣中，PD-1軸結合拮抗劑選自MDX 1106 (納武單抗，CAS寄存編號946414-94-4)、MK-3475 (帕博利珠單抗)、CT-011 (皮立珠單抗)、MEDI-0680 (AMP-514)、PDR001、REGN2810及BGB-108。在另一特定態樣中，PD-1軸結合拮抗劑為PD-L1結合拮抗劑，特定言之，拮抗性PD-1抗體。在一個態樣中，PD-1軸結合拮抗劑係選自MPDL3280A (阿特珠單抗)、

YW243.55.S70、MDX-1105、MEDI4736 (德瓦魯單抗)及MSB0010718C (阿維魯單抗)。在一個態樣中，PD-L1拮抗性抗體選自由以下組成之群：阿特珠單抗、德瓦魯單抗及阿維魯單抗。更特定言之，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體與抗CEA/抗CD3雙特異性抗體之組合可與MPDL3280A (阿特珠單抗)組合使用。在一些態樣中，阿特珠單抗以每三週約800 mg至約1500 mg (例如每三週約1000 mg至約1300 mg，例如每三週約1100 mg至約1200 mg)之劑量投與。在一個特定態樣中，阿特珠單抗以每三週約1200 mg之劑量投與。

【0268】 PD-1軸結合拮抗劑之投與與包含抗CEA/抗CD3雙特異性抗體及抗FAP/抗OX40雙特異性抗體之組合療法的投與之間的時間段及劑量經選擇以便在投與組合療法之前有效地使受試者之腫瘤縮小。

【0269】 上文所提及之此類組合療法涵蓋組合投與(其中兩種或兩種以上治療劑包括在同一或單獨調配物中)及單獨投與，在此情況下，治療劑之投與可在投與額外治療劑或藥劑之前、同時及/或之後進行。在一個實施例中，治療劑之投與及額外治療劑之投與彼此在約一個月；或相隔約一週、兩週或三週；或相隔約一天、兩天、三天、四天、五天或六天內進行。

治療方法及組合物

【0270】 識別不同細胞群上之兩個細胞表面蛋白質的雙特異性抗體有希望重導引細胞毒性免疫細胞以破壞標靶病原細胞。

【0271】 在一個態樣中，提供用於治療或延遲受試者之癌症之進展的方法，其包含向受試者投與有效量的抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及抗CEA/抗CD3抗體。

【0272】 在一個此類態樣中，該方法進一步包含向受試者投與有效量之至少一種額外治療劑。在另外的實施例中，本文中提供一種縮小腫瘤之方法，其包含向受試者投與有效量的抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及抗CEA/抗CD3抗體。根據任一上述態樣之「個體」或「受試者」較佳為人類。

【0273】 在其他態樣中，提供用於癌症免疫療法之組合物，其包含抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及抗CEA/抗CD3抗體。在某些實施例中，提供用於癌症免疫療法之方法之組合物，其包含抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及抗CEA/抗CD3抗體。

【0274】 在另一態樣中，本文中提供包含抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及抗CEA/抗CD3抗體之組合物在藥劑之製造或製備中的用途。在一個實施例中，藥劑用於治療實體腫瘤。在另一實施例中，藥劑用於縮小腫瘤之方法中，該方法包含向患有實體腫瘤之個體投與有效量之藥劑。在一個此類實施例中，該方法進一步包含向個體投與有效量之至少一種額外治療劑。在另一實施例中，藥劑用於治療實體腫瘤。在一些態樣中，個體患有CEA陽性癌症。在一些態樣中，CEA陽性癌症為結腸癌、肺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、胰臟癌、子宮內膜癌、乳癌、腎癌、食道癌或前列腺癌。在一些態樣中，乳癌為乳房癌或乳腺癌。在一些態樣中，乳房癌為侵襲性乳腺癌。在一些態樣中，肺癌為肺腺癌。在一些實施例中，結腸癌為結腸直腸腺癌。根據任一以上實施例之「個體」可為人類。

【0275】 上述組合療法涵蓋組合投與(其中兩種或兩種以上治療劑包括在同一或單獨調配物中)及單獨投與，在此情況下，如本文所報導之抗體的投與可在投與額外治療劑或試劑之前、同時及/或之後進行。在一個

態樣中，抗FAP/抗OX40雙特異性抗體與抗CEA/抗CD3抗體之投與及視情況選用之額外治療劑之投與彼此在約一個月；或相隔約一週、兩週或三週；或相隔約一天、兩天、三天、四天、五天或六天內進行。

【0276】 如本文所報導之抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及抗CEA/抗CD3雙特異性抗體兩者(及任何額外治療劑)可藉由任何適合手段投與，包括非經腸、肺內及鼻內，且在需要局部治療時，病灶內投與。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。可例如藉由任何適合途徑(例如注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥，此部分地視短期或長期投與而定。本文中涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投與或在不同時間點的多次投與、快速投與及脈衝式輸注。

【0277】 如本文所報導之抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及抗CEA/抗CD3雙特異性抗體兩者將以符合良好醫學實踐之方式調配、給藥及投與。在此情形下考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症起因、試劑遞送位點、投與方法、投與時程及醫學從業者已知之其他因素。抗體無需但視情況與一或多種當前用於預防或治療所討論病症之試劑一起調配。此類其他試劑之有效量視存在於調配物中之抗體之量、病症或治療之類型及如上文所論述之其他因素而定。此等試劑一般以相同劑量且以如本文所描述之投與途徑使用，或以本文所描述之劑量之約1%至99%使用，或以任何劑量且以憑經驗/臨床上確定為適當之任何途徑使用。

製品(套組)

【0278】 在本發明之另一態樣中，提供一種含有可用於治療、預防及/或診斷上文所描述之病症的物質的套組。套組包含至少一個容器及在

容器上或容器隨附之標記或藥品說明書。適合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可由各種材料形成，諸如玻璃或塑膠。容器容納單獨組合物或與有效治療、預防及/或診斷病狀之另一組合物組合之組合物，且可具有無菌接取口(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。在一個態樣中，套組中之至少兩種活性劑為本發明之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體及抗FAP/抗OX40雙特異性抗體。

【0279】 在特定態樣中，提供用於治療或延遲受試者之癌症之進展的套組，其包含封裝，該封裝包含：(A)第一組合物，該第一組合物包含作為活性成分之抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及醫藥學上可接受的賦形劑；及(B)第二組合物，該第二組合物包含作為活性成分的抗CEA/抗CD3雙特異性抗體及醫藥學上可接受的賦形劑；及(C)用於在組合療法中使用組合物之說明。

【0280】 在另外的一個態樣中，提供用於治療或延遲受試者之癌症之進展的套組，其包含封裝，該封裝包含：(A)第一組合物，該第一組合物包含作為活性成分之抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及醫藥學上可接受的賦形劑；及(B)第二組合物，該第二組合物包含作為活性成分的抗CEA/抗CD3雙特異性抗體及醫藥學上可接受的賦形劑；(C)第三組合物，該第三組合物包含作為活性成分之阻斷PD-L1/PD-1相互作用的試劑及醫藥學上可接受的賦形劑；及(D)用於在組合療法中使用組合物之說明。

【0281】 標記或藥品說明書指示如何將組合物用於治療所選病狀，且提供關於在組合療法中使用組合物的說明。此外，套組可包含(a)其中含有組合物之第一容器，其中該組合物包含本發明之抗FAP/抗OX40雙特

異性抗體；及(b)其中含有組合物之第二容器，其中該組合物包含本發明之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體。另外，套組可包含一或多個其他容器，其包含可以組合形式使用的其他活性成分。本發明之此實施例中之製品可進一步包含指示組合物可用於治療特定病況之藥品說明書。

【0282】 或者或另外，套組可進一步包含第二(或第三)容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。其可進一步包括就商業及使用者觀點而言所需之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

表C (序列)：

SEQ ID NO:	名稱	序列
1	FAP(4B9) CDR-H1	SYAMS
2	FAP(4B9) CDR-H2	AIIGSGASTYYADSVKG
3	FAP(4B9) CDR-H3	GWFGGFNY
4	FAP(4B9) CDR-L1	RASQSVTSSYLA
5	FAP(4B9) CDR-L2	VGSRRAT
6	FAP(4B9) CDR-L3	QQGIMLPPT
7	FAP(4B9) VH	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
8	FAP(4B9) VL	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVTSSY LAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLP PTFGQGTKVEIK
9	FAP (28H1) CDR-H1	SHAMS
10	FAP (28H1) CDR-H2	AIWASGEQYYADSVKG
11	FAP (28H1) CDR-H3	GWLG NFDY
12	FAP (28H1) CDR-L1	RASQSVSR SYLA
13	FAP (28H1) CDR-L2	GASTRAT
14	FAP (28H1) CDR-L3	QQGQVIPPT
15	FAP(28H1) VH	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSS HAMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKGWLG NFDYWGQGTLVTVSS
16	FAP(28H1) VL	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSR SY LAWYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPP TFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:	名稱	序列
17	OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-H1	SYAIS
18	OX40(CLC-563, CLC-564, 17A9) CDR-H1	SYAMS
19	OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-H2	GIIPIFGTANYAQKFQG
20	OX40(CLC-563, CLC-564, 17A9) CDR-H2	AISGSGGSTYYADSVKG
21	OX40(8H9) CDR-H3	EYGWMDY
22	OX40(49B4) CDR-H3	EYYRGPYDY
23	OX40(1G4) CDR-H3	EYGSMDY
24	OX40(20B7) CDR-H3	VNYPYSYWGDFDY
25	OX40(CLC-563) CDR-H3	DVGAFDY
26	OX40(CLC-564) CDR-H3	DVGPFDY
27	OX40(17A9)-CDR-H3	VFYRGGVSM DY
28	OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-L1	RASQSISSWLA
29	OX40(CLC-563, CLC564) CDR-L1	RASQSVSSSYLA
30	OX40(17A9) CDR-L1	QGDSLRSYYAS
31	OX40(8H9,49B4,1G4, 20B7) CDR-L2	DASSLES
32	OX40(CLC-563, CLC564) CDR-L2	GASSRAT
33	OX40(17A9) CDR-L2	GKNNRPS
34	OX40(8H9) CDR-L3	QQYLTYSRFT
35	OX40(49B4) CDR-L3	QQYSSQPYT
36	OX40(1G4) CDR-L3	QQYISYSMLT
37	OX40(20B7) CDR-L3	QQYQAFSLT
38	OX40(CLC-563, CLC-564) CDR-L3	QQYGSSPLT
39	OX40(17A9) CDR-L3	NSRVMPHNRV
40	OX40(49B4) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFS <u>SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIP</u> <u>IFGTANYA</u> <u>QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLR</u> <u>SEDTAV</u> <u>YYCAREYYRGPYDYWGQGTTVT</u> <u>VSS</u>
41	OX40(49B4) VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>RASQSISSW</u> <u>LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLE</u> <u>SGVPSRFS</u> <u>GSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC</u> <u>QQYSSQP</u> <u>YTFGQG</u> <u>GTKVEIK</u>
42	OX40(8H9) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFS <u>SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIP</u> <u>IFGTANYA</u> <u>QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLR</u> <u>SEDTAV</u> <u>YYCAREYGWMDYWGQGTTVT</u> <u>VSS</u>
43	OX40(8H9) VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>RASQSISSW</u> <u>LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLE</u> <u>SGVPSRFS</u> <u>GSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC</u> <u>QQYLTYS</u>

SEQ ID NO:	名稱	序列
		<u>RTFGQG</u> TKVEIK
44	OX40(1G4) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS <u>SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA</u> <u>QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAV</u> YYCAREYGSMDYWGQGTTTVTVSS
45	OX40(1G4) VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSW <u>LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS</u> GSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQYISYS <u>MLTFGQG</u> TKVEIK
46	OX40(20B7) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS <u>SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA</u> <u>QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAV</u> YYCARVNYPYSYWGDFDYWGQGTTTVTVSS
47	OX40(20B7) VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSW <u>LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS</u> GSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQYQAFS <u>LTFGQG</u> TKVEIK
48	OX40(CLC-563) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS <u>YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA</u> VYYCALDVGAFDYWGQ GALVTVSS
49	OX40(CLC-563) VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSY <u>LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS</u> GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP <u>LTFGQG</u> TKVEIK
50	OX40(CLC-564) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS <u>YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA</u> VYYCAFDVGPFDYWGQGTLTVTVSS
51	OX40(CLC-564) VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSY <u>LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS</u> GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP <u>LTFGQG</u> TKVEIK
52	OX40(17A9) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS <u>YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA</u> VYYCARVFYRGGVSM DYWGQGT LTVTVSS
53	OX40(17A9) VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD SLRSYYA <u>SWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSG</u> SSSGNTASLTITGAQA EDEADYYCNSRVM PH <u>NRVFGG</u> TKLTV
54	HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc 杵 VH (4B9)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCAREYYRGPYDYWGQGTTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK

SEQ ID NO:	名稱	序列
		VEPKSCDGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LTVSS
55	HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc 臼 VL (4B9)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIK
56	LC (49B4)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCRASQSISSW

SEQ ID NO:	名稱	序列
		LAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQYSSQP YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
57	HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc杆VH (28H1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREYYRGPYDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSED TAVYYCAREYYRGPYDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES G GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVR QAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKG WLGNF DYWGQGT LTVTVSS
58	HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc臼VL (28H1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREYYRGPYDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSED TAVYYCAREYYRGPYDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCP

SEQ ID NO:	名稱	序列
		APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSP GTLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQ KPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTK VEIK
59	HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc杆VL (4B9)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSED TAVYYCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSP GTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQ KPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT KVEIK
60	HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc杆VH (4B9)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYA QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG

SEQ ID NO:	名稱	序列
		LEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDVAVYYCAREYYRGPYDY WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKG WFGGFNYWGQGTTLTVSS
61	HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc wt杆VH (4B9)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYA QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASGGTFSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDVAVYYCAREYYRGPYDY WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKG WFGGFNYWGQGTTLTVSS
62	HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc wt臼VL (4B9)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYA QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAV

SEQ ID NO:	名稱	序列
		YYCAREYYRGPYDYWGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYRGPYDY WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPG TSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQK PGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTK VEIK
63	CD3-HCDR1	TYAMN
64	CD3-HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
65	CD3-HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
66	CD3-LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN
67	CD3-LCDR2	GTNKRAP
68	CD3-LCDR3	ALWYSNLWV
69	CD3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST YAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYAT YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSS
70	CD3 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTS NYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPA RFGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCAL WYSNLWVFGGGTKLTVL
71	CEA-HCDR1	EFGMN
72	CEA-HCDR2	WINTKTGEATYVEEFKG
73	CEA-HCDR3	WDFAYYVEAMDY
74	CEA-LCDR1	KASAAVGTYVA
75	CEA-LCDR2	SASYRKR
76	CEA-LCDR3	HQYYTYPLFT
77	CEA VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>EFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEAT</u> <u>YVEEFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSD</u>

SEQ ID NO:	名稱	序列
		TAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSS
78	CEA VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASA AVGT YVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS YRKRGVPSR FSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCHQYYT YPLFTFGQGTKLEIK
79	CEA-HCDR1 (CEACAM5)	DTYMH
80	CEA-HCDR2 (CEACAM5)	RIDPANGNSKYVPKFQG
81	CEA-HCDR3 (CEACAM5)	FGYYVSDYAMAY
82	CEA-LCDR1 (CEACAM5)	RAGESVDIFGVGFLH
83	CEA-LCDR2 (CEACAM5)	RASNRAT
84	CEA-LCDR3 (CEACAM5)	QQTNEDPYT
85	CEA VH (CEACAM5)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGFNIK DTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSK YVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGT LTVS S
86	CEA VL (CEACAM5)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFG VGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQT NEDPYTFGQGTKLEIK
87	輕鏈 「CEA _{2F1} 」 (CEA TCB)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASA AVGT YVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS YRKRGVPSR FSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCHQYYT YPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI PP SDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
88	輕鏈人類化 CD3 _{CH2527} (Crossfab, VL-CH1) (CEA TCB)	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLT CGSSTGAVTTS NYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCAL WYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSC
89	CEA _{CH1A1A 98/99} - 人類化 CD3 _{CH2527} (Crossfab VH-Ck)-Fc(杆) P329GLALA (CEA TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT EFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEAT YVEEFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK

SEQ ID NO:	名稱	序列
		VDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLES GG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
90	CEA _{CH1A1A 98/99} (VH-CH1) -Fc(白) P329GLALA (CEA TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT EFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEAT YVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDD TAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
91	CD3 VH-CL (CEACAM5 TCB)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST YAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYAT YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLT VTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
92	人 類 化CEA VH- CH1(EE)-Fc (白, P329G LALA) (CEACAM5 TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIK DTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSK YVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGLTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVED YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

SEQ ID NO:	名稱	序列
		VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
93	人 類 化CEA VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (杵, P329G LALA) (CEACAM5 TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIK DTYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSK YVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED AVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVED YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQE KPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGG KAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS P
94	人類化CEA VL-CL(RK) (CEACAM5 TCB)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFG VGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQT NEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRK LKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
95	(CH2527) CD3-HCDR1	TYAMN
96	(CH2527) CD3-HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
97	(CH2527) CD3-HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
98	(16D5) FcR1-HCDR1	NAWMS
99	(16D5) FcR1-HCDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG
100	(16D5) FcR1-HCDR3	PWEWSWYDY
101	(CH2527-VL7-46-13)-LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN
102	(CH2527-VL7-46-13)-LCDR2	GTNKRAP
103	(CH2527-VL7-46-13)-LCDR3	ALWYSNLWV

SEQ ID NO:	名稱	序列
104	(CH2527) CD3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST YAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYAT YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSS
105	(16D5) FcγR1 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSN AWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTT DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTE DTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGT LTVSS
106	(CH2527-VL7-46-13)VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTS NYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLGGAALTLGAQPEDEAEYYCAL WYSNLWVFGGGTKLT VL
107	(16D5)VH-CH1- (CH2527)VH-CH1 Fc 杵 PGLALA	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSN AWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTT DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTE DTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGT LTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLES GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGT LTVSS ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
108	(16D5)VH-CH1-Fcγ3 PGLALA H435R-Y436F	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSN AWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTT DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTE DTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGT LTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQ

SEQ ID NO:	名稱	序列
		VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK
109	(CH2527-VL7-46-13)VL-CL (共同輕鏈)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTS NYANWVQEKPQAFRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLGGAALTLGAQPEDEAEYYCAL WYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTPSKQSNKYYASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
110	人 類PD-L1 (Uniprot Q9NZQ7)	MRIFAVFIFMTYWHLNFTVTVPKDLYVVE YGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMED KNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQARLLKDQL SLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGAD YKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHEL TCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNS KREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDP EENHTAELVIPLP LAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRK GRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
111	人 類PD-1 (Uniprot Q15116)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPD RPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSE SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQ DCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGT YLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVP T AHPSPSPRPAGQFQTLVVGVGGLLGSLLV VWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSA VPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQT EYATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLR PEDGHCSWPL
112	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD SWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSS
113	VL (PD-L1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYLYHP ATFGQGTKVEIK
114	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSR YWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLLTV VSS
115	VL (PD-L1)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGLSP WTFGQGTKVEIK
116	VH (PD-1)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFT

SEQ ID NO:	名稱	序列
		NYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGT NFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFD DTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVTV SS
117	VL (PD-1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSG YSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLAstyleSGVP ARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHS RDLPLTFGGGTKVEIK
118	VH (PD-1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSN SGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGGQGLVTVSS
119	VL (PD-1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSG SGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQSSNWPR TFGQGTKVEIK
120	人類(hu) FAP	UniProt no. Q12884
121	hu FAP胞外域+聚離胺酸 標記+his ₆ -標記	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTF FPNWISGQEYLHQ SADNNIVLYNIETGQSYTI LSNRTMKSVNASNYGLSPDRQFVYLEDYS KLWRYSYTATYYIYDL SNGEFVRGNELPRPI QYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRP GDPP FQITFNGRENKIFNGIPDWVYEEEMLATKYA LWWSPNGKFLAYAEFN DTDIPVIAYSYYGDE QYPRTINIPYKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYV GPQEVVPAMIASSDYYFSWLTWVTD ERVC LQWLKRVQNVSVLSICDFREDWQ TWDCPKT QEHIEESRTGWAGGFFVSTPVFSYDAISYYKI FSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITSGKWEAI NIFRVTQDSL FYSSNEFEEYPGRRNIYRISIGS YPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKY YALVCYGP GIPISTLHDGRTDQEIKILEENKEL ENALKNIQLPKEEIKLEVDEITLWYKMILPP QFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQS VRSVFAVNW ISYLASKEGMVIALVDGRGTAFQGD KLLYAV YRKLGVYEVEDQITAVRKFIEMGFIDEKRIAI WGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGI AVAPV SSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNS TVMARAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNS AQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGLSGL STNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKKKKKKKGH HHHHH
122	小鼠FAP	UniProt no. P97321
123	鼠類FAP胞外域+聚離胺 酸標記+his ₆ -標記	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYKTY FPNWISEQEYLHQSEDDNIVFYNIETRESYIIL SNSTMKSVNATDYGLSPDRQFVYLEDYSKL WRYSY TATYYIYDLQNGEFVRGYELPRPIQY LCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRP GDPPFQI

SEQ ID NO:	名稱	序列
		TYTGRENRIENGIPDWVYEEEMLATKYALW WSPDGKFLAYVEFNDSDIPIIAYSYYGDGQY PRTINIPYPKAGAKNPVVRVFIVDTTYPHHVG PMEVPVPEMIASSDYYFSWLTWVSSERVCLQ WLKRVQNVSVLSICDFREDWHAWECPKNQE HVEESRTGWAGGFFVSTPAFSQDATSYKIFS DKDGYKHIHYIKDTVENAIQITSGKWEAIYIF RVTQDSLIFYSSNEFEGYPGRRNIYRISIGNSP SKKCVTCHLRKERCQYYTASFYSYKAKYYAL VCYGPGLPISTLHDGRDQEIQVLEENKELE NSLRNIQLPKVEIKKLKDGGTLFWYKMILPP QFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVKSVFAVNW ITYLASKEGIVIALVDGRGTAFQGDKFLHAV YRKLGVYEVEDQLTAVRKFIEMGFIDEERIAI WGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAVAPV SSWEYYASIYSERFMGLPTKDDNLEHYKNST VMARAHEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSA QIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGILSGRS QNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKKKKKKKGH HHHHH
124	食蟹獼猴FAP胞外域+聚 離胺酸標記+his ₆ -標記	RPPRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTF FPNWISGQEYLHQSADNNIVLYNIETGQSYTI LSNRTMKSVNASNYGLSPDRQFVYLES KLWRYSYTATYYIYDLNGEFVRGNELPRPI QYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRP GDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYEEEM LATKYALWWSPNGKFLAYAEFNDDIPVIA SYYGDEQYPRTINIPYPKAGAKNPFVRIF IIDTTPAYVGPQEVVPAMIASSDYYFSW LTWVTDERVC LQWLKRVQNVSVLSICDF REDWQTWDCPKTQEHIIESRTGWAGGFF VSTPVFSYDAISYYKIFSDKDG YKHIHYIKDTVENAIQITSGKWEAI NIFRVTQDSLIFYSSNEFEDYPGRRNIYRIS IGSYPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDY AKYYALVCYGPPISTLHDGRDQEI KILEENKEL ENALKNIQLPKEEIKKLE VDEITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVY GGPCSQSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIA LVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYE VEDQITAVRKFIEMGFIDEKRIAIWGWSY GGYVSSLALASGTGLFKCGIAVAPVSSW EYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNS TVMARAHEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNS AQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGLSGL STNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKKKKKKKGH HHHHH
125	人類CEA	UniProt no. P06731
126	人類FolR1	UniProt no. P15328
127	鼠類FolR1	UniProt no. P35846

SEQ ID NO:	名稱	序列
128	食蟹獼猴FolR1	UniProt no. G7PR14
129	人類MCSP	UniProt no. Q6UVK1
130	人類CD3ε	UniProt No. P07766
131	食蟹獼猴CD3ε	NCBI GenBank no. BAB71849.1 Uniprot Q05LI5
132	G4S肽連接子	GGGGS
133	(G4S)2	GGGGS GGGGS
134	(SG4)2	SGGGGS GGGG
135	肽連接子	GGGGS GGGGS GGGG
136	肽連接子	GSPGSSSSGS
137	(G4S) ₃ 肽連接子	GGGGS GGGGS GGGGS ₃
138	(G4S) ₄ 肽連接子	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
139	肽連接子	GSGSGSGS
140	肽連接子	GSGSGNGS
141	肽連接子	GGSGSGSG
142	肽連接子	GGSGSG
143	肽連接子	GGSG
144	肽連接子	GGSGNGSG
145	肽連接子	GGNGSGSG
146	肽連接子	GGNGSG

【0283】 關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈之核苷酸序列之一般資訊提供於Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中。根據Kabat之編號系統對抗體鏈之胺基酸進行編碼及參考(Kabat, E.A.,等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)), 如上文所定義。

實例

【0284】 以下為本發明之方法及組合物之實例。應理解，考慮到上文所提供之一般說明，可實施各種其他實施例。

重組DNA技術

【0285】 使用標準方法操縱DNA，如Sambrook等人, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所描述。根據製造商之說明，使用分子生物學試劑。關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈之核苷酸序列的總體資訊經給出於：Kabat, E.A.等人，(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版, NIH Publication No 91-3242。

DNA定序

【0286】 藉由雙股定序法測定DNA序列。

基因合成

【0287】 所需基因區段係使用適當模板藉由PCR產生，或藉由自動化基因合成法，藉由Geneart AG (Regensburg, Germany)自合成寡核苷酸及PCR產物合成。在無法獲得確切基因序列的情況下，基於來自最近同源物的序列來設計寡核苷酸引子且藉由RT-PCR自來源於適當組織之RNA分離基因。將側接有單數個限制性核酸內切酶裂解位點的基因區段選殖至標準選殖/定序載體中。自經轉型之細菌純化質體DNA且藉由UV光譜法來測定濃度。經次選殖之基因片段之DNA序列藉由DNA定序來證實。基因區段經設計具有允許次選殖入各別表現載體中的適合限制位點。所有構築體經設計具有5'端DNA序列，該序列編碼靶向真核細胞中分泌之蛋白質的前導肽。

細胞培養技術

【0288】 如Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J.及Yamada, K.M. (編), John Wiley & Sons, Inc.中之現有方案中所描述使用標準細胞培養技術。

蛋白質純化

【0289】 參考標準方案，自經過濾之細胞培養物上清液純化蛋白質。簡言之，將抗體施用於蛋白質A瓊脂糖凝膠管柱(GE Healthcare)且用PBS洗滌。在pH 2.8下實現抗體之溶離，接著立即中和樣本。在PBS或20 mM組胺酸、150 mM NaCl pH 6.0中藉由尺寸排阻層析(Superdex 200, GE Healthcare)自單體抗體分離聚集之蛋白質。將單體抗體部分混合，(視需要)使用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO)離心濃縮器濃縮，冷凍且在-20℃或-80℃下儲存。提供部分樣本用於例如藉由SDS-PAGE、尺寸排阻層析(SEC)或質譜分析進行後續蛋白質分析及分析型表徵。

SDS-PAGE

【0290】 根據製造商說明書使用NUPAGE® Pre-Cast凝膠系統(Invitrogen)。特定言之，使用10%或4%至12% NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast凝膠(pH 6.4)及NuPAGE® MES (還原性凝膠，具有NuPAGE® Antioxidant操作緩衝液添加劑)或MOPS (非還原性凝膠)操作緩衝液。

分析型尺寸排阻層析

【0291】 藉由HPLC層析進行用於測定抗體之聚集及寡聚狀態之尺寸排阻層析(SEC)。簡言之，將蛋白質A純化抗體施用於Agilent HPLC

1100系統上300 mM NaCl、50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄，pH 7.5中之Tosoh TSKgel G3000SW管柱或Dionex HPLC系統上2×PBS中之Superdex 200管柱（GE Healthcare）。藉由UV吸光度及峰值面積之積分來定量溶離之蛋白質。將BioRad Gel過濾標準151-1901用作標準。

質譜

【0292】 此章節描述具有VH/VL交換(VH/VL互換單抗)之多特異性抗體之表徵，其中強調其正確組裝。藉由去糖基化完整互換單抗及去糖基化/纖維蛋白溶酶消化或以其他方式去糖基化/受限LysC消化互換單抗之電噴霧電離質譜分析(ESI-MS)來分析預期主要結構。

【0293】 在蛋白質濃度為1 mg/ml下，VH/VL互換單抗在磷酸鹽或Tris緩衝液中，在37°C下用N-糖苷酶F去糖基化至多17小時。纖維蛋白溶酶或受限LysC (Roche)消化用100 µg去糖基化VH/VL互換單抗在Tris緩衝液pH 8中分別在室溫下進行120小時及在37°C下進行40分鐘。在質譜分析之前，在Sephadex G25管柱(GE Healthcare)上經由HPLC將樣本去鹽。在配備有TriVersa NanoMate來源(Advion)之maXis 4G UHR-QTOF MS系統(Bruker Daltonik)上經由ESI-MS測定總質量。

使用表面電漿子共振(SPR) (BIAcore)測定多特異性抗體與各別抗原之結合及結合親和力

【0294】 使用BIAcore儀器(GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden)藉由表面電漿子共振研究所產生之抗體與各別抗原之結合。簡言之，對於親和力量測，羊抗人IgG、JIR 109-005-098抗體經由胺偶合固定在CM5晶片上以用於針對各別抗原之抗體之呈現。在HBS緩衝液(HBS-P)(10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.005% Tween 20，pH 7.4)

中，在25°C下(或在37°C下)量測結合。在溶液中以多種濃度添加抗原(R&D Systems或內部純化)。藉由80秒至3分鐘之抗原注射來量測結合；藉由用HBS緩衝液洗滌晶片表面3-10分鐘來量測解離且使用1:1朗格繆爾結合模型(Langmuir binding model)來評估KD值。自樣本曲線減去陰性對照資料(例如緩衝液曲線)以用於系統內源性基線偏移之校正及雜訊信號降低。使用各別Biacore Evaluation軟體進行感測器圖譜之分析及親和力資料之計算。

實例1

抗FAP/抗OX40雙特異性抗體之製備、純化及表徵

【0295】 抗FAP/抗OX40雙特異性抗體係如國際專利申請公開案第WO 2017/055398 A2號或第WO 2017/060144 A1號中所描述來製備。

【0296】 特定言之，製造根據WO 2017/060144 A1之實例4.4之分子，其具有與OX40之四價結合及與FAP之單價結合。應用杵臼技術以允許對兩種不同重鏈進行組裝。圖1A中展示4+1型式的雙特異性抗體之示意性方案。

【0297】 在分子A中，第一重鏈(HC 1)包含抗OX40結合子49B4的兩個Fab單元(VHCH1_VHCH1)，隨後為經(G4S)連接子融合至抗FAP結合子4B9之VH域的Fc杵鏈。構築體之第二重鏈(HC 2)包含抗OX40結合子49B4之兩個Fab單元(VHCH1_VHCH1)，隨後為經(G4S)連接子融合至抗FAP結合子4B9之VL域的Fc臼鏈。分子A (FAP OX40 iMAB)由此包含：包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 55之胺基酸序列之第二重鏈及SEQ ID NO: 56之四倍輕鏈。

【0298】 分子B之製備類似於分子A，但FAP結合子4B9由FAP結合

子28H1置換。分子B包含：包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列之第二重鏈及SEQ ID NO: 56之四倍輕鏈。

【0299】 在分子C中，第一重鏈(HC 1)包含抗OX40結合子49B4的兩個Fab單元(VHCH1_VHCH1)，隨後為經(G4S)連接子融合至抗FAP結合子4B9之VL域的Fc杵鏈。構築體之第二重鏈(HC 2)包含抗OX40結合子49B4之兩個Fab單元(VHCH1_VHCH1)，隨後為經(G4S)連接子融合至抗FAP結合子4B9之VH域的Fc臼鏈。分子C包含：包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列之第二重鏈及SEQ ID NO: 56之四倍輕鏈。

【0300】 在所有此等分子中，根據WO 2012/130831中所描述之方法將Pro329Gly、Leu234Ala及Leu235Ala突變引入杵鏈及臼鏈之恆定區中以取消與FC γ 受體之結合，而在分子D中，使用具有杵臼突變之野生型人類IgG1 Fc域。分子D包含：包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列之第二重鏈及SEQ ID NO: 56之四倍輕鏈。

【0301】 分子之製造及表徵詳細描述於WO 2017/060144 A1中。

實例2

T細胞雙特異性(TCB)抗體之製備、純化及表徵

【0302】 已根據描述於WO 2014/131712 A1或WO 2016/079076 A1中之方法製備TCB分子。

【0303】 WO 2014/131712 A1之實例3中描述實驗中使用之抗CEA/抗CD3雙特異性抗體(CEA CD3 TCB或CEA TCB)之製備。CEA CD3

TCB為「2+1 IgG互換單抗」抗體且包含兩個不同重鏈及兩個不同輕鏈(其中之一者兩倍存在於分子中)。引入CH3域中的點突變(「杵臼」)以促進兩個不同重鏈之組裝。進行CD3結合Fab中的VH域與VL域之交換以便促進兩個不同輕鏈之正確組裝。2+1意謂該分子具有兩個對CEA具有特異性之抗原結合域及一個對CD3具有特異性之抗原結合域。CEACAM5 CD3 TCB具有相同型式，但包含另一CEA結合子且在CD3結合子之CH及CL域中包含點突變以便支援輕鏈之正確配對。

【0304】 CEA CD3 TCB包含SEQ ID NO:87之胺基酸序列之兩倍輕鏈、包含SEQ ID NO:88之胺基酸序列之重鏈、包含SEQ ID NO:89之胺基酸序列之重鏈及包含SEQ ID NO:90之胺基酸序列之輕鏈。**圖1C**中展示2+1型式的雙特異性抗體之示意性方案。CEACAM5 CD TCB包含SEQ ID NO:91之胺基酸序列之兩倍輕鏈、包含SEQ ID NO:92之胺基酸序列之重鏈、包含SEQ ID NO:93之胺基酸序列之重鏈及包含SEQ ID NO:94之胺基酸序列之輕鏈。**圖1B**中展示2+1型式的雙特異性抗體之示意性方案。

【0305】 用於實驗中的抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體(FolR1 CD3 TCB或FolR1 TCB)之製備描述於WO 2016/079076 A1中。FolR1 CD3 TCB在WO 2016/079076之圖1D中經展示為「FolR1 TCB 2+1傳統(共同輕鏈)」且由兩個不同重鏈及三倍同一VLCL輕鏈(共同輕鏈)構成。引入CH3域中的點突變(「杵臼」)以促進兩個不同重鏈之組裝。2 +1意謂該分子具有對FolR1具有特異性之兩個抗原結合域及對CD3具有特異性之一個抗原結合域。CD3結合子在Fab重鏈之C端融合至包含杵突變之Fc域的第一次單元之N端。

【0306】 FolR1 CD3 TCB包含：包含SEQ ID NO: 107之胺基酸序

列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 108之胺基酸序列之第二重鏈及SEQ ID NO: 109之三倍共同輕鏈。

實例3

關於人類免疫效應細胞之活體外共培養分析

【0307】在TCB (CEA CD3 TCB、CEACAM5 CD3 TCB及FolR1 CD3 TCB)及FAP OX40 iMab存在下在關於人類免疫效應細胞(靜息PBMC、CD4或CD8 T細胞)、靶抗原陽性腫瘤細胞及FAP陽性纖維母細胞之活體外共培養分析中測試T細胞之免疫功能。所評估之腫瘤細胞株為胃癌細胞株MKN-45、卵巢腺癌細胞株SK-OV-3及宮頸癌細胞系HeLa。將經轉導以表現人類FAP的小鼠胚纖維母細胞細胞株NIH/3T3用作FAP陽性纖維母細胞。效應細胞為靜息人類PBMC及經分離靜息CD4或CD8 T細胞。在一些分析中，添加TNF- α 感測細胞以監測TNF- α 誘導。將腫瘤細胞溶解(動力學高含量壽命成像、端點流動式細胞測量術)、細胞表面活化及成熟標記之表現(端點流動式細胞測量術)及細胞介素分泌(動力學高含量壽命成像、端點流動式細胞珠粒陣列)用於監測藉由TCB誘導且藉由FAP OX40 iMAB (分子A)調節的T細胞功能之程度。

a) 標靶細胞株及纖維母細胞

【0308】SK-OV-3細胞(ATCC，目錄號HTP-77)天然地表現葉酸受體。HeLa NLR細胞((EssenBioscience，目錄號4489)天然地表現葉酸受體且MKN45 NLR細胞天然地表現CEA。兩種細胞株具有Essen CellPlayer NucLight Red慢病毒(Essenbioscience，目錄號4476；EF1 α ，嘌呤黴素)以穩定表現受限於胞核之NucLight Red螢光蛋白。如此使得能夠容易與非螢光效應T細胞或纖維母細胞分離。由於每孔量測之紅色螢光

與紅核之數目成正比且因此與正常腫瘤細胞之數目成正比，有可能藉由高產出率壽命螢光顯微法對腫瘤細胞溶解或增殖進行即時評估。

【0309】 將HeLa NucLight Red (NLR)細胞培養於含有10%胎牛血清(FBS，Gibco，Life Technologies，目錄號16000-044，批號941273，經 γ 輻射，不含黴漿菌，且在56°C下熱滅活35分鐘)、1% GlutaMAX-I (GIBCO，Life Technologies，目錄號35050 038)及1 mM 丙酮酸鈉(sigma，目錄號S8636)之DMEM (GIBCO，目錄號42430-082)中。

【0310】 MKN45 NucLight Red (NLR)細胞天然地表現CEA。將MKN45 NucLight Red細胞培養於含有10%胎牛血清(FBS，Gibco，Life Technology，目錄號16000-044，經 γ 輻射，不含黴漿菌且在56°C下經熱滅活35分鐘)、1% (v/v) GlutaMAX I (GIBCO，Life Technologies，目錄號35050 038)、1 mM丙酮酸鈉(SIGMA，目錄號S8636)及0.5 μ g/mL嘌呤黴素(Sigma-Aldrich，目錄號ant-pr-1)的DMEM (GIBCO，目錄號42430-082)中。遵循製造商之說明在8 μ g/mL凝聚胺存在下以5之MOI (TU/細胞)使用Essen CellPlayer NucLight Red慢病毒試劑(Essenbioscience，目錄號4476；EF1 α ，嘌呤黴素)轉導MKN-45 (DSMZ；ACC409)，以穩定表現受限於細胞核之NucLight Red螢光蛋白。此使得能夠藉由高產出率壽命螢光顯微法容易地自非螢光效應T細胞或纖維母細胞分離及監測腫瘤細胞生長。隨時間之每孔定量因此允許對腫瘤細胞溶解或增殖進行即時評估。

【0311】 FAP結合抗體藉由細胞表面FAP之交聯係由人類纖維母細胞活化蛋白(huFAP)表現NIH/3T3-huFAP純系19提供。此細胞株係藉由使用表現載體pETR4921轉染小鼠胚纖維母細胞NIH/3T3細胞株(ATCC CRL-1658)以表現huFAP而產生。將細胞培養於含有10%小牛血清

(Sigma-Aldrich，目錄號C8056-500ml，經 γ 輻射，不含黴漿菌且在56°C下經熱滅活35分鐘)及1.5 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤黴素(Sigma-Aldrich，目錄號ant-pr-1)的DMEM (GIBCO，目錄號42430-082)中。

b)效應細胞之製備

【0312】 自Zürich血液供給中心獲得白細胞層。為了分離新鮮的末梢血液單核細胞(PBMC)，用相同體積之DPBS (Gibco，Life Technologies，目錄號14190 326)稀釋白血球層。提供50 mL聚丙烯離心管(TPP，目錄號91050)及15 mL Histopaque 1077 (SIGMA Life Science，目錄號10771，聚蔗糖及泛影酸鈉，調節至1.077 g/mL之密度)且將白血球層溶液在Histopaque 1077上分層。在400 $\times$ g下，在室溫下且在低加速度及不破裂情況下將試管離心30分鐘。隨後，自界面收集PBMC，用DPBS洗滌三次且再懸浮於由以下組成之T細胞培養基中：供應有10%胎牛血清(FBS，Gibco，Life Technology，目錄號16000-044，批號941273，經 γ 輻射、不含微漿菌且在56°C下熱滅活35分鐘)、1% (v/v) GlutaMAXI (GIBCO，Life Technologies，目錄號35050 038)、1 mM丙酮酸鈉(SIGMA，目錄號S8636)、1% (v/v) MEM非必需胺基酸(SIGMA，目錄號M7145)及50 μM β -巰基乙醇(SIGMA，M3148)之RPMI 1640培養基(Gibco，Life Technology，目錄號42401-042)。在一些情況下，RPMI1640經FluoroBrite DMEM培養基(GIBCO，Invitrogen，目錄號A18967-01)置換以獲得具有減少之背景螢光的改良高含量實況顯微術。

【0313】 PBMC在分離後(靜息人類PBMC)直接用作效應細胞，或分別根據製造商之說明使用未使用之人類CD4⁺ T細胞分離套組(Miltenyi，目錄號130-096-533)及未使用之人類CD8⁺ T細胞分離套組

(Miltenyi, 目錄號130-096-495)來分離某些次級分(如靜息CD4 T細胞或CD8 T細胞)。簡言之,在400×g、4℃下將人類PBMC離心8分鐘,且使用MACS緩衝液(PBS + BSA (0.5 % v/w, Sigma-Aldrich, 目錄號A9418) + EDTA ([2nM], Ambion, AM9261))洗滌一次。使用分別提供之抗生蛋白鏈菌素標記之陰性抗體混合物再懸浮離心塊且在4℃下培育5分鐘(每1×10⁷個細胞40 μL MACS緩衝液及10 μL抗體混合物),之後再在4℃下與經生物素標記之磁性捕捉珠粒(每1×10⁷個細胞30 μL MACS緩衝液及20 μL珠粒混合物)培育10分鐘。根據製造商之說明使用LS管柱(Miltenyi, 目錄號130-042-401)藉由磁性分離移除經標記非CD4或非C8 T細胞。如上文所描述離心穿過之分別含有未標記之靜息CD4及CD8 T細胞的管柱流且使用MACS緩衝液洗滌一次。在RPMI1640或Fuorobright DMEM類T細胞培養基中,將細胞調節至2百萬個細胞/毫升。

c) *TNF-α*感測細胞

【0314】 TNF-α感測細胞為在NFκB敏感啟動子元件控制下使用編碼綠色螢光蛋白(GFP)之報導質體pETR14327轉導的HEK 293T細胞(ATCC, 目錄號xxx)。HEK 293T細胞天然地表現TNF受體,由活化T細胞分泌之TNF-α可與該TNF受體結合。此導致NFκB之劑量依賴性活化及至細胞核之易位,其又啟動劑量依賴性GFP產生。可藉由高產出率壽命螢光顯微術隨時間推移定量GFP螢光,且因此允許對於TNF-α分泌進行即時評估。

【0315】 TNF-α感測細胞株係藉由HEK293T細胞(ATCC; CRL-3216)之慢病毒轉導產生。基於慢病毒之病毒載體係藉由使HEK293T細胞經封裝質體之慢病毒及編碼綠色螢光蛋白(GFP)之慢病毒表現載體

(pETR14372)再加上最小巨細胞病毒(mCMV)啟動子結合NFκB共同轉錄反應元件共轉染而產生。根據製造商的說明使用脂染胺LTX (Life Technologies)進行將質體轉染成HEK293T細胞。在轉染前一天接種有 6×10^5 個細胞/孔及2.5 μg質體DNA之6孔盤中完成轉染。在48小時後收集含慢病毒載體之上清液且經由孔大小為0.45 μm的聚醚砜膜過濾。為產生穩定表現細胞株，將HEK293T細胞以 1.0×10^6 個細胞/孔接種於6孔盤中且用1 mL含病毒載體之上清液覆蓋。藉由在Eppendorf離心機5810 (桌上型離心機(Eppendorf))中在 $800 \times g$ 及32°C下螺旋循環30分鐘進行轉導。TNF-α誘導性細胞純系係藉由FACS分類(FACS ARIA, Becton, Dickinson and Company)獲得。

d)細胞毒性及T細胞活化分析

【0316】 在37°C下使用細胞解離緩衝液(Invitrogen，目錄號13151-014)搜集小鼠胚纖維母細胞NIH/3T3-huFAP細胞、TNF-α感測細胞及MKN45 NLR細胞10分鐘。將細胞用DPBS洗滌一次。在xRay輻射器中使用4500 RAD之劑量輻射TNF-α感測細胞或纖維母細胞以防止效應或腫瘤細胞株稍後之過度生長。在37°C及5% CO₂下，在培育箱(Hera Cell 150)中，將標靶細胞株(NIH/3T3-huFAP及在一些分析中TNF-α感測細胞)以 0.1×10^5 個細胞/孔之密度培養於無菌96孔平底黏著組織培養盤(TPP, 目錄號92097)中之T細胞培養基中隔夜。

【0317】 如上文所描述製備靜息人類PBMC、人類CD4 T細胞、人類CD8 T細胞或NLV特異性T細胞，且以 0.5×10^5 個細胞/孔之密度進行添加。將TCB (CEA CD3 TCB或CEA CD3 TCB (2))之連續稀釋列及固定濃度之FAP OX40 iMab (2 nM)添加至總體積200微升/孔。將細胞在培育箱

(Hera Cell 150)中在37°C及5% CO₂下共培養至多72小時。

【0318】 在一些分析中，在37°C及5% CO₂下於至多72小時內每隔3小時使用Incucyte Zoom系統(Essenbioscience, HD相差，綠色螢光及紅色螢光，10×物鏡)藉由螢光顯微術高含量生命成像對培養板進行監測。使用IncucyteZoom軟體對與NLR⁺細胞量/孔成比例的正常腫瘤細胞之積分紅色螢光(RCU×um²/影像)定量以藉由T細胞監測腫瘤細胞生長對比溶解。針對各別時間點及條件與所使用TCB濃度之對照標繪值以分析對T細胞之溶胞潛力的效應。

【0319】 在存在TNF-α感測細胞的一些分析中，使用IncucyteZoom軟體對積分綠色RCU×um²/影像定量以藉由TNF-α感測細胞監測TNF-α誘導之GFP產生。針對各別時間點及條件與所使用TCB濃度之對照標繪值以分析對藉由T細胞之TNF-α分泌的效應。

【0320】 72 小時後，收集上清液以供後續根據製造商之說明使用流動式細胞珠粒陣列分析所選細胞介素。所評估之細胞介素為IL-2 (人類IL-2 CBA Flex-set (Bead A4), BD Bioscience，目錄號558270)、IL-17A (人類IL-17A CBA Flex-set (Bead B5), BD Bioscience，目錄號560383)、TNF-α (人類TNF-α CBA Flex-set (Bead C4), BD Bioscience，目錄號560112)、IFN-γ (IFN-γ CBA Flex-set (Bead E7), BD Bioscience，目錄號558269)、IL-4 (人類IL-4 CBA Flex-set (Bead A5), BD Bioscience，目錄號558272)、IL-10 (人類IL-10 CBA Flex-set (Bead B7), BD Bioscience，目錄號558274)及IL-9 (人類IL-9 CBA Flex-set (Bead B6), BD Bioscience，目錄號558333)。

【0321】 其後，藉由在37°C下與細胞解離緩衝液一起培育10分鐘，

然後在4°C下於400×g下離心而使所有細胞自孔分離。將離心塊用具有BSA (0.1% v/w, Sigma-Aldrich, 目錄號A9418)之冰冷FACS緩衝液(DPBS(Gibco, Life Technologies, 目錄號14190 326)洗滌。在4°C下於FACS緩衝液中使用以下對細胞進行表面染色20分鐘：螢光染料結合抗體抗人類CD4 (純系RPA-T4, BioLegend, 目錄號300532)、CD8 (純系RPa-T8, BioLegend, 目錄號3010441)、CD62L (純系DREG-56, BioLegend, 目錄號304834)、CD127 (純系019D5, BioLegend, 目錄號A019D5)、CD134 (純系Ber-ACT35, BioLegend, 目錄號350008)、CD137 (純系4B4-1, BioLegend, 目錄號309814)、GITR (純系621, BioLegend, 目錄號3311608)及CD25 (純系M-A251, BioLegend, 目錄號356112)。接著，用FACS緩衝液洗滌一次，之後再懸浮於85微升/孔的含有0.2 µg/mL DAPI (Santa Cruz Biotec, 目錄號Sc-3598)的FACS緩衝液中且之後在同一天使用5-雷射LSR-Fortessa (BD Bioscience, DIVA軟體)獲得。對活的CD4及CD8 T細胞進行閘控(DAPI-、NucLight RED-、CD4或CD8+)，且針對各別條件與所使用TCB濃度之對照標繪計數、活化標記物(CD134、CD137、GITR、CD25)或成熟標記物(CD127、CD62L)之平均螢光強度(MFI)或陽性細胞之百分比以分析對T活化之效應。

結果

3.1 T細胞雙特異性抗體誘導OX40於CD8及CD4 T細胞上之劑量依賴性上調

【0322】在CEACAM5 CD3 TCB之連續稀釋列存在下與MKN-45 NucLight Red細胞及經輻射NIH/3T3 huFAP共培養不同人類免疫效應細胞(靜息PBMC、CD4或CD8 T細胞、NLV特異性CD8 T效應記憶細胞)48

小時。使用Incucyte Zoom系統藉由螢光顯微術高含量生命成像對活的腫瘤細胞之量進行定量，且將正常腫瘤細胞之積分紅色螢光用於計算比溶胞率(圖2)。藉由流動式細胞測量術評估OX40在CD4及CD8陽性T細胞上之表現(圖3A至圖3D)。

【0323】 CEACAM5 CD3 TCB能夠誘導MKN45 NucLight Red細胞在所有所使用免疫效應細胞製劑中的溶解，如圖2中針對42小時之時間點所展示。溶解之EC₅₀值及幅度在不同效應細胞製劑之間略有不同且對於經分離之CD8 T細胞而言最高。在腫瘤細胞溶解的同時，T細胞提高包括OX40之活化標記物之表面表現(圖3A至圖3D)。OX40之表面表現於CD4陽性T細胞上最高，但在CD8陽性T細胞上亦以較低程度偵測到該表面表現。OX40表現之程度並不取決於輔助細胞之存在(PBMC中對照CD4或CD8 T細胞之經分離群體中之表現量無差異)。

3.2 FAP靶向之OX40促效劑之存在不影響T細胞之溶胞潛力

【0324】 接下來，吾人評估OX40協同刺激對TCB介導之腫瘤細胞溶解之影響。如3.1中所描述，在CEACAM5 CD3 TCB之連續稀釋列存在下分別在含或不含固定濃度之FAP OX40 iMab的情況下與MKN-45 NucLight Red細胞及經輻射NIH/3T3 huFAP共培養T細胞48小時。

【0325】 使用Incucyte Zoom系統藉由螢光顯微術高含量生命成像每隔3小時對活的腫瘤細胞之量進行定量，且將正常腫瘤細胞之積分紅色螢光用於計算比溶胞率。

【0326】 在所有評估之時間點針對FolR1 CD3 TCB觀測到FAP OX40 iMAB協同刺激對腫瘤細胞溶解程度沒有影響(圖4A至圖4C)。為了更容易隨時間推移而比較，在具有及具有/不具有FAP OX40 iMAB協同刺

激的情況下計算各時間點之曲線下面積(AUC)且對照時間進行標繪。隨著腫瘤細胞在TCB不存在時增殖，AUC隨時間推移而增加，但未在AUC中明顯偵測到協同刺激依賴性差異。

【0327】 OX40協同刺激之存在即不會加速腫瘤細胞溶解，亦不會增加CEACAM5 CD3 TCB進行之腫瘤細胞溶解的幅度，亦不會降低達成腫瘤細胞之一定百分比的溶解所需之TCB濃度(例如，EC₅₀值之變化)。所有評估效應細胞製劑均如此，且其針對圖5A至圖5C中之42小時時間點例示性地展示。

【0328】 使用CEA CD3 TCB獲得類似研究結果(資料未示出)。

3.3 FAP靶向之OX40促效劑之存在的確影響細胞介素之分泌

【0329】 在一些分析中，另外培養TNF- α 感測細胞以達到上文所描述之設定。TNF- α 感測細胞天然地表現TNF- α 受體且在NF κ B敏感啟動子元件之控制下經GFP遺傳修飾。由活化T細胞分泌之TNF- α 之結合引起NF κ B之劑量依賴性活化及隨後引起GFP之表現。可藉由高產出率壽命螢光顯微術隨時間推移定量GFP螢光，且因此允許對TNF- α 分泌進行即時評估。如上文3.1中所描述，分別在固定濃度之FAP OX40 iMAB及CEACAM5 CD3 TCB、FolR1 CD3 TCB及CEA CD3 TCB之連續稀釋列之存在下與作為標靶細胞之MKN-45 NucLight Red細胞及經輻射NIH/3T3 huFAP共培養CD4 T細胞48小時。

【0330】 藉由本發明TCB來活化T細胞引起TNF- α 之劑量依賴性釋放，其引起TNF- α 感測細胞中GFP螢光隨時間推移之劑量依賴性增加。使用FAP OX40 iMab之額外協同刺激進一步增加GFP螢光且因此增加經活化T細胞引起之TNF- α 分泌(圖6A至圖6D及圖7A至圖7D)。此效應主要係在

TCB介導之TNF- α 分泌程度上，但並不會降低誘導TNF- α 分泌之TCB濃度(EC₅₀值之改變)。此外，需要促效TCR刺激來觀測對細胞介素分泌之此正面影響，且在經對照TCB處理之樣本中未偵測到非特異性TNF- α 分泌。

【0331】 為了更容易隨時間推移而比較，在具有及具有/不具有OX40協同刺激的情況下計算各時間點之曲線下面積(AUC)且對照時間進行標繪(圖8A至圖8D)。針對所有測試之TCB (CEA CD3 TCB、FolR1 TCB及CEACAM5 CD3 TCB)且在不同腫瘤細胞株(MKN45 NLR、HeLa NLR red、Skov-3)存在下觀測到增加之AUC。

【0332】 在端點(48小時)使用流動式細胞珠粒陣列系統(BD Bioscience)評估所有樣本之上清液以量化對除TNF- α 以外之若干細胞介素之分泌的效應。所評估之細胞介素係作為用於總體T細胞活化之標記物之IL-2及TNF- α 、用以監測與特定Th子類別之區別的IFN- γ (Th1細胞介素)、IL-4 (Th2細胞介素)、IL-9 (Th9細胞介素)及IL-17A (Th17細胞介素)，以及作為免疫抑制細胞介素之IL-10。

【0333】 在TNF- α 之後藉由本發明TCB活化T細胞引起所有所評估之細胞介素(即IL-2、IL-4、IFN- γ 、IL-17A及IL-10)之劑量依賴性釋放(圖9A至圖9D、圖10A至圖10D、圖11A至圖11D及圖12A至12D)。在使用相同標靶細胞株時，對於TCB而言，此細胞介素釋放之程度有所不同。其可自圖9A至圖9D (CEACAM5 CD3 TCB)與圖10A至圖10D (CEA CD3 TCB)之比較看出。並且當使用相同TCB (FolR CD3 TCB)時，可觀測到使用不同標靶細胞株時的差異。圖11A至圖11D展示使用HeLa NLR細胞之細胞介素釋放，而Skov-3細胞用於圖12A至圖12D中。

【0334】 使用FAP OX40 iMab之額外協同刺激調節劑量依賴性細胞

介素分泌之程度，但不降低細胞介素分泌必需之TCB臨限濃度。由此，觀測到促炎性IL-2、TNF- α 及IFN- γ 分泌之增加，藉此降低免疫抑制性IL-10之濃度。為了更容易比較，相對於無協同刺激之TCB平穩段濃度計算使用OX40協同刺激之樣本中的細胞介素濃度之變化(圖13)。

【0335】 由此，促炎性IL-2、TNF- α 及IFN- γ 分泌之增加係明顯的，藉此僅降低一些標靶細胞/TCB組合中之免疫抑制性IL-10之濃度。存在以下可見趨勢：利用強劑量依賴型細胞介素分泌之更強力T細胞活化亦由OX40協同刺激進行更強調節。尤其，免疫抑制IL-10釋放之降低與強T細胞活化有關。

【0336】 吾人亦測試OX40協同刺激調節靜息CD4及CD8 T細胞及靜息人類PBMC之細胞介素分泌的能力。如3.1中所描述，在CEACAM5 CD3 TCB之連續稀釋列存在下在含有或不含固定濃度之FAP OX40 iMAB的情況下與MKN-45 NucLight Red細胞及經輻射NIH/3T3 huFAP共培養靜息人類PBMC、經分離CD4或CD8 T細胞72小時。如上文所描述使用流動式細胞珠粒陣列(CBA)評估72小時之上清液。

【0337】 OX40協同刺激支援促炎性細胞介素在靜息人類PBMC中之分泌且在最低程度上亦支援在CD8 T細胞上之分泌(劑量依賴性，參見針對靜息CD4 T細胞之圖14A至圖14H、針對靜息CD8 T細胞之圖15A至圖15H及針對靜息PBMC之圖16A至圖16H)。最高TCB濃度之比較展示於圖17中。靜息CD8 T細胞對IL-2及TNF- α 產生的影響尤其顯著。

【0338】 因此，經由OX40之協同刺激不會在活體外細胞毒性分析中48至72小時直接增加T細胞之溶胞潛力，但其增加分泌細胞介素之能力並調節細胞介素微環境。腫瘤中的更促炎性細胞介素環境可使腫瘤微環境

變成更免疫活化及較不免疫抑制之狀態，例如較低含量之IL-10及增加濃度之IFN- γ 可使腫瘤中之骨髓細胞成熟變成Th1及細胞毒性T細胞支援抗原呈現細胞。變成支援性細胞介素網路將在腫瘤實現逃避免疫控制之前恢復成功及持續的腫瘤細胞消除。根據OX40於CD4 T細胞上之較佳表現，觀測到在CD4 T細胞上對照在CD8 T細胞上之細胞介素分泌的更強調節。然而，兩種細胞類型均受影響。

實例4

活體內FAP OX40 iMab與CEACAM5 TCB之組合療法

4.1方法

【0339】 在以下實例中，吾人測試TCB與FAP OX40 iMab之組合相比各別單一療法產生優良的活體內抗腫瘤功效。

【0340】 測試以單一試劑之形式且與人類CEACAM5 CD3 TCB (CEA CD3 TCB(2))組合對抗媒劑及僅經CEACAM5 CD3 TCB處理之動物的人類單價FAP靶向之四價OX40雙特異性抗體(FAP OX40 iMab)。在皮下將人類胃MKN45癌細胞與人類化之NOG小鼠中的小鼠纖維母細胞株(3T3)共移植。

4.2細胞株及腫瘤模型

【0341】 最初自ATCC獲得人類MKN45細胞(人類胃癌)且在擴增之後存放在Glycart內部細胞庫中。在37°C下之含有10% FCS之DMEM中於5% CO₂下在水飽和氛圍中培養細胞。在98%活力下，活體外通道7用於皮下注射。最初自ATCC獲得人類纖維母細胞NIH-3T3，在Roche Nutley處經工程改造以表現人類FAP，且在含有10%小牛血清、1×丙酮酸鈉及1.5 μ g/ml嘌呤黴素之DMEM中培養。分別在98.8%及98.4%之活力下，分

別在第9號活體外通道(實驗1，表1)及第7號活體外通道(實驗2，表2)處使用純系39。

【0342】 使用22G至30G針將與50微升基質膠混合之50微升細胞懸浮液(1×10^6 MKN45細胞+ 1×10^6 3T3-huFAP)皮下注射於經麻醉小鼠之側腹。

4.3 小鼠模型

【0343】 藉由Taconic遞送NOG雌性小鼠且經人類幹細胞內部轉移。根據提交之準則(GV-Solas；Felasa；TierschG)以每天12小時光照/12小時黑暗之循環將小鼠維持在無特定病原體條件下。實驗研究方案由當地政府審查且批准(P ZH193/2014)。動物在到達之後維持一週以使其適應新環境且進行觀察。在常規基礎上進行連續健康監測。

4.4 實驗1之處理及實驗操作

【0344】 測試單一試劑形式及與人類CEACAM5 CD3 TCB組合之與OX40四價結合的人類單價FAP靶向之OX40雙特異性抗體(FAP OX40 iMab，如實例1中所描述之分子A)。用於FAP OX40 iMab構築體之FAP結合子為4B9。在皮下將人類胃MKN45癌細胞與人類化之NOG小鼠中的小鼠纖維母細胞株(3T3)共移植。

【0345】 在細胞注射前7天，對小鼠進行抽血且篩檢血液中的人類T細胞之量。在研究第0天對小鼠皮下注射與 1×10^6 個3T3纖維母細胞混合之 1×10^6 個MKN45細胞。在整個實驗期間藉由測徑規每週量測腫瘤2至3次。在第10天，針對腫瘤尺寸及人類T細胞計數對小鼠進行隨機分組，其中平均T細胞計數/ μ l血液為140且平均腫瘤尺寸為 170 mm^3 。在隨機分組之日，向小鼠i.v.注射媒劑、CEACAM5 CD3 TCB、FAP(4B9) OX40 iMab

或FAP(4B9) OX40 iMab與CEACAM5 CD3 TCB之組合，持續5週。

【0346】 向所有小鼠靜脈內注射200 μ l適當溶液。對媒劑組中之小鼠注射組胺酸緩衝液，且對處理組注射OX40促效構築體、CEACAM5 CD3 TCB或組合。為獲得每200 μ l適當量之化合物，必要時用組胺酸緩衝液稀釋儲備溶液。用於CEACAM5 TCB之劑量及時程為0.5 mg/kg，每週一次，而FAP OX40iMab以12.5 mg/kg之劑量每週一次給予。

【0347】 在第一次治療之後10分鐘、4小時、72小時及168小時對每組的2個小鼠進行抽血，以測定第一週內之化合物之暴露。藉由夾心ELISA、構築體與人類OX40之結合以及huCH1域之偵測來量測FAP OX40 iMab。藉由夾心ELISA、TCB與抗CD3-CDR抗體之結合以及人類Fc之偵測來偵測CEACAM5 CD3 TCB (參見圖18A及圖18B)。

【0348】 在研究第44天終止實驗。將腫瘤、血液及脾臟搜集在PBS中，產生單細胞懸浮液，且染色用於不同免疫細胞標記物，且藉由FACS進行分析。根據製造商之說明在室溫下使用BD Pharm溶解緩衝液(BD，目錄號555899)進行全血樣本之溶血作用3分鐘。藉由經細胞過濾器(耐綸過濾器70 μ m，BD Falcon)進行均質化，接著進行如上文所描述之溶血作用，分離脾細胞。藉由使用gentleMACS解離劑(Miltenyi)及在37°C下用DNase I ([0.025mG/mL], RocheDiagnostics, 目錄號11284932001)及膠原蛋白酶D ([1 mG/mL], RocheDiagnostics, 目錄號11088882001)溶解均質物30分鐘來製備腫瘤單細胞懸浮液。其後，經由細胞過濾器(耐綸過濾器70 μ m，BD Falcon)過濾細胞懸浮液以移除殘渣。用盈餘冰冷FACS緩衝液洗滌所有製劑。在經純化之大鼠抗小鼠CD16/CD32 (純系2.4G2, BD, 目錄號553142)存在下，在4°C下黑暗環境中於FACS緩衝液中使用以下對

細胞進行表面染色30分鐘：螢光染料結合抗體抗小鼠CD4 (純系GK 1.5, BioLegend, 目錄號100422)、CD8 (純系53-6.7, BioLegend, 目錄號100730)、CD45 (純系30-F11, BioLegend, 目錄號103116)及CD3 (純系145-2C11, BioLegend, 目錄號100351)。將樣本再懸浮於含有0.2 µg/mL DAPI (Santa Cruz Biotec, 目錄號Sc-3598)之FACS緩衝液中，之後在同一天使用5-雷射LSR-Fortessa (具有DIVA軟體之BD Bioscience)獲取該等樣本。將活的CD4及CD8 T細胞閘控(DAPI-、CD45+、CD3+、CD4或CD8+)，計算正規化計數(每uL血液、每mg脾臟或每mg腫瘤)且針對各別處理組標繪其值。

表1：用於活體內實驗中之組合物

化合物	劑量 (mg/kg)	調配物緩衝液	濃度 (mg/mL)
FAP(4B9) OX40 iMab (實例1之分子A)	12.5	20 mM組胺酸, 140 mM NaCl, pH 6.0, 0.01% Tween-20	4.41 (=物料濃度)
CEACAM5 CD3 TCB (實例2)	0.5	20 mM組胺酸, 140 mM NaCl, pH 6.0, 0.01% Tween20	1.72 (=物料濃度)

4.5 實驗2之處理及實驗操作

【0349】 測試在3種不同劑量下之呈單一試劑形式及與人類CEACAM5 CD3 TCB組合之人類單價抗FAP(4B9)/抗OX40雙特異性抗體(FAP OX40 iMab)。在皮下將人類胃MKN45癌細胞與如上文所描述之使用人類幹細胞人類化之NOG小鼠中的小鼠纖維母細胞株(3T3)共移植。

【0350】 在細胞注射前7天，對小鼠進行抽血且篩檢血液中的人類T細胞之量。在研究第0天對小鼠皮下注射與1×10⁶個3T3纖維母細胞混合之1×10⁶個MKN45細胞。在整個實驗期間藉由測徑規每週量測腫瘤2至3次。在第26天，針對腫瘤尺寸及人類T細胞計數對小鼠進行隨機分組，其中平

均T細胞計數/ μ l血液為115且平均腫瘤尺寸為490 mm³。在隨機分組後一天，向小鼠i.v.注射媒劑、CEACAM5 CD3 TCB、FAP OX40 iMab或FAP OX40 iMab與CEACAM5 CD3 TCB之組合，持續4週。

【0351】 向所有小鼠靜脈內注射200 μ l適當溶液。對媒劑組中之小鼠注射組胺酸緩衝液，且對處理組注射OX40促效構築體、CEACAM5 CD3 TCB或組合。為獲得每200 μ l適當量之化合物，必要時用組胺酸緩衝液稀釋儲備溶液。用於CEACAM5 CD3 TCB之劑量及時程為0.5 mg/kg，每週一次，而FAP OX40 iMab以12.5 mg/kg、4.2 mg/kg或1.4 mg/kg之劑量每週一次給予。

【0352】 在研究第50天終止實驗。將腫瘤、血液及脾臟搜集在PBS中，產生單細胞懸浮液，且染色用於不同免疫細胞標記物，且藉由FACS進行分析。

【0353】 在終止時藉由流動式細胞測量術分析每組之所有剩餘小鼠的脾臟及腫瘤。使單細胞懸浮液染色CD45、CD3、CD4及CD8，且分析細胞之量。用福馬林固定終止時及在實驗期間來自動物的部分腫瘤，然後包埋於石蠟中。切割樣本且染色CD3及CD8。冷凍血漿以及脾臟及腫瘤的一部分以便經由多倍儀(Multiplex)進行細胞介素分析。用福馬林固定終止時的部分腫瘤，然後包埋於石蠟中。切割樣本且染色CD3及CD8。

表2：用於活體內實驗中之組合物

化合物	劑量 (mg/kg)	調配物緩衝液	濃度 (mg/mL)
FAP(4B9) OX40 iMab (實例1之分子A)	12.5 or 4.2 or 1.4	20 mM組胺酸, 140 mM NaCl, pH 6.0, 0.01% Tween-20	3.2 (=物料濃度)
CEACAM5 CD3 TCB (實例2)	0.5	20 mM組胺酸, 140 mM NaCl, pH 6.0, 0.01% Tween20	3.1 (=物料濃度)

【0354】為測定所注射化合物在第一週內之藥物動力學概況，在第一次治療之後10分鐘、4小時、72小時及7天對每組的2個小鼠進行抽血，且藉由ELISA分析所注射化合物。經由OX40結合偵測OX40 iMAb (A)，而經由與抗CD3 CDR抗體之結合偵測CEACAM5 CD3 TCB (B)。

(A)將經生物素標記之人類OX40、測試樣本、地穀新配質(Digoxigenin)標記之抗huCH1抗體及抗地穀新配質偵測抗體(POD)逐步添加至經抗生蛋白鏈菌素塗佈之96孔微量滴定盤中且在各步驟後於室溫下培育1小時。在各步驟後洗滌培養盤三次以移除未結合之物質。最終，藉由添加ABTS受質溶液形成著色反應產物來使過氧化酶結合之複合物可視化。在405 nm (490 nm下之參考波長)以光度測定反應產物強度且其與血清樣本中之分析物濃度成正比。

(B)將經生物素標記之抗huCD3-CDR抗體、測試樣本、地穀新配質標記之抗huFc抗體及抗地穀新配質偵測抗體(POD)逐步添加至經抗生蛋白鏈菌素塗佈之96孔微量滴定盤中且在各步驟後於室溫下培育1小時。在各步驟後洗滌培養盤三次以移除未結合之物質。最終，藉由添加ABTS受質溶液形成著色反應產物來使過氧化酶結合之複合物可視化。在405 nm (490 nm下之參考波長)下以光度測定反應產物強度且其與血清樣本中之分析物濃度成正比。

4.6 腫瘤、脾臟及血清樣本之細胞介素分析

【0355】在終止時(第50天)，即在最後一次Ab投與後2天，自動物收集血清且搜集皮下腫瘤及脾臟。在研究終止時對20至30 mg急凍脾臟及腫瘤組織進行處理以用於全蛋白質分離。簡言之，藉由使用Tissue Lyser系統及不鏽鋼珠粒於總體積150 μ l之溶解緩衝液網篩處理組織樣本。藉由

離心清除將經網篩樣本且根據製造商的說明藉由BCA蛋白質分析套組 (Fischer Thermo Scientific)分析上清液中之全蛋白質含量。將總共200 μg 之腫瘤及脾臟溶解物之全蛋白以及血清樣本之1:10稀釋液用於遵循製造商之說明藉由Bio-Plex系統(Bio-Plex Pro™人類細胞介素17-plex分析，BioRad)分析不同細胞介素/趨化介素。

4.7 免疫組織化學過程

【0356】 執行對與來源於人類化NOG小鼠中之所指示處理組的3T3鼠類纖維母細胞共移植的人類MKN45胃皮下腫瘤的免疫組織化學分析。在終止日，即最後一次Ab投與後2天，自動物搜集皮下腫瘤，將其固定於10%福馬林(Sigma, Germany)中且稍後處理以用於FFPET (Leica 1020, Germany)。隨後在薄片切片機(Leica RM2235, Germany)中切割4 μm 石蠟切片。遵循製造商之方案在Leica自動染色儀(Leica ST5010, Germany)中使用抗人類CD8 (Cell Marque Corporation, California)及抗人類CD3 (ThermoFischer Scientific, USA)進行HuCD8及HuCD3免疫組織化學過程。使用Definiens軟體(Definiens, Germany)進行huCD3及huCD8陽性T細胞之定量。藉由單向ANOVA與多重比較測試分析統計資料。

4.8 實驗1之結果

【0357】 活體外實驗可能已展示出FAP OX40 iMAb可改變T細胞活化狀態及細胞介素釋放。亦證實，OX40對CD4陽性T細胞之影響似乎比對CD8陽性T細胞的影響大。

【0358】 為測試FAP OX40 iMAb是否亦會在活體內改變免疫狀態而獲得更有益結果，吾人使用將人類幹細胞轉移至有免疫缺陷之小鼠中且由此產生主要由T細胞及B細胞組成之部分人類免疫系統的人類化小鼠模

型。吾人共注射MKN45、CEA表現人類胃癌細胞株及3T3纖維母細胞，其改良腫瘤中之基質組分及FAP表現。由CEACAM5 CD3 TCB靶向CEA，從而使T細胞與腫瘤細胞交聯且誘導腫瘤細胞之T細胞介導殺滅以及T細胞活化。在T細胞活化後上調OX40。FAP OX40 iMAb與FAP表現纖維母細胞及OX40表現T細胞交聯，且因此誘導OX40信號傳導。其引起經改良之T細胞存活及細胞介素釋放。

【0359】 吾人可在此研究中證明，FAP OX40 iMAb與CEACAM5 CD3 TCB之組合療法相比單一療法會帶來經改良之功效。此外，FAP OX40 iMAb單一療法相比媒劑展示出顯著改良之功效。

【0360】 吾人在各別單一療法中及組合組中第一次處理後評估CEACAM5 CD3 TCB以及FAPOx40iMAB之血清濃度，以排除暴露差異導致功效差異的可能性。如圖18A及圖18中所示，所有構築體之暴露在單一療法及組合療法中係類似的。

【0361】 如圖19中所示，經FAP OX40 iMAb單一療法處理之動物展示出腫瘤之進展略有延緩，最明顯的係CEACAM5 CD3 TCB。然而，只有在組合療法中才會實現皮下腫瘤之消退(參見表3)。

表3：研究第41天及第43天的腫瘤生長抑制(TGI)

組	第41天的TGI [%]	第43天的TGI [%]
CEACAM5 CD3 TCB	93.6	92.6
FAP OX40 iMab	55.2	35.9
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab	103.8	103.4

4.9 實驗2之結果

【0362】 在第二研究中，吾人測試呈單一療法形式及與CEACAM5 CD3 TCB (CEA CD3 TCB (2))組合之不同劑量的FAPOX40iMAB。此處，吾人亦推遲開始治療，直至中值腫瘤尺寸相比第一研究中之170 mm³

達到490 mm³。

【0363】 注射化合物之所有組展示不同組(OX40靶向之化合物或TCB)之間分子之類似最大濃度。圖20A及圖20B中展示在第一週期間所注射化合物之藥物動力學概況。

【0364】 如圖21A至圖21C中所標繪，吾人可再次證實該組合相對單一療法之優良抗腫瘤功效。任何所測試劑量下之FAP OX40 iMAb及呈單一療法形式之CEACAM5 CD3 TCB中無一者能夠減緩腫瘤生長進展，該緩腫瘤生長進展最可能係由在治療開始時已有的相當大的腫瘤負荷而引起。僅組合處理會顯著預防在整個研究時間內之腫瘤生長的進展(表4)。在FAP OX40 iMAB之12.5 mg/kg之劑量下觀測到強長期功效，但相比CEACAM5 CD3 TCB單一療法，較低劑量(4.2及1.4 mg/kg)僅能暫時減少進展(圖22)。觀測到明顯的劑量依賴性。如圖20A及圖20中所示，所有構築體之暴露在單一療法及組合療法中係類似的。

【0365】 在研究第40天及第49天計算基於中值的腫瘤生長抑制。該等值可見於下表4中。

表4：研究第40天及第49天的腫瘤生長抑制(TGI)

組	第40天的TGI [%]	第49天的TGI [%]
CEACAM5 CD3 TCB	67.3	36.7
FAP OX40 iMab 1.4 mg/kg	11.2	-6.3
FAP OX40 iMab 4.2 mg/kg	16.2	20.5
FAP OX40 iMab 12.5 mg/kg	38.1	23.9
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab 1.4 mg/kg	55.2	26.7
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab 4.2 mg/kg	55.0	61.9
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab 12.5 mg/kg	108.5	102.3

【0366】 為了測試組均値之顯著差異以用於多重比較，使用鄧尼特氏方法(Dunnett's method)自動產生標準變異數分析(ANOVA)。鄧尼特氏方法測試該等均値是否不同於對照組之均値。

表5：p值：使用鄧尼特氏方法與對照物進行比較(AUC=曲線下之面積)

組	第49天相對媒劑之p值	直至第49天相對媒劑之AUC p值	第49天相對CEA CD3 TCB (2)之p值	直至第49天相對CEA CD3 TCB (2)之AUC p值
媒劑	1	1	0.1051	0.2158
CEACAM5 CD3 TCB	0.1088	0.2158	1	1
FAP OX40iMab 12.5mg/kg	0.5990	0.7234	0.7956	0.9171
FAP OX40iMab 4.2mg/kg	0.8848	0.9178	0.5394	0.7588
FAP OX40iMab 1.4mg/kg	0.9986	0.7666	0.2130	0.8886
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab 12.5mg/kg	<0.0001*	<0.0001*	0.0032*	0.0099*
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab 4.2mg/kg	0.0234*	0.0151*	0.9924	0.8131
CEACAM5 CD3 TCB + FAP OX40 iMab 1.4mg/kg	0.0449*	0.0803	0.9998	0.9970

【0367】 流動式細胞測量術(圖23A至圖23D)及組織病理學(圖25A及圖25B)評估展示人白細胞對腫瘤塊的浸潤增加。已針對CEACAM5 CD3 TCB單一療法觀測到該浸潤增加，但其在CEACAM5 CD3 TCB與4.2或12.5 mg/kg FAP OX40 iMAB之組合中極大增強。FAP OX40 iMAB單一療法本身僅最低程度地增加瘤內白細胞。所偵測之細胞類型為人類CD4以及CD8 T細胞，而且為非T細胞(例如B細胞或髓源性細胞)。有趣的是，組合療法中相比CEACAM5 CD3 TCB單一療法的對於CD4 T細胞的倍數增加比CD8T細胞計數更明顯，其符合主要表現於CD4 T細胞上之OX40的

生物學。在未偵測到細胞數目之顯著更改的末梢區域，強調兩種化合物之腫瘤靶向性質(圖24A及圖24B)。

【0368】 吾人亦評估脾臟、血液及瘤內細胞介素之濃度(Bio-Plex Pro™人類細胞介素17-plex分析, BioRad)。具有最高抗腫瘤功效之組亦展示瘤內細胞介素(例如IL-6、IL-8、IFN- γ 、TNF- α 、MCP-1、MIP-1 β (圖26A至圖26C))之最大總體增加，且係FAP OX40 iMAB (12.5 mg/Kg)與CEACAM5 CD3 TCB之組合。並未在末梢區域(脾臟或血液)中觀測到顯著變化。因此，由FAP OX40 iMAB及CEACAM5 CD3 TCB治療觸發之免疫學變化具有腫瘤特異性，表明人類T細胞之交聯及活化僅發生在CEA表現腫瘤中而不是對CEA為陰性的其他區域中，如血液及脾臟。

【0369】 吾人進一步發現，經組合處理之動物之腫瘤進展與瘤內細胞介素濃度的量之間而非瘤內白細胞計數之間存在直接負相關(圖27A至圖27F)。所存在之細胞介素的量亦不與所有動物之浸潤白細胞的數目密切相關。尤其，當經CEACAM5 CD3 TCB單一療法處理之動物與經組合處理之動物比較時，吾人觀測到，類似白細胞計數不一定意謂相同抗腫瘤功效或所存在之細胞介素含量。此產生以下假設：除了瘤內T細胞之數目增加以外，較高每細胞功能性及分泌瘤內T細胞之細胞介素的潛力係FAP OX40 iMAB與CEACAM5 CD3 TCB之組合的抗腫瘤活性增強的原因。

【0370】 經改良之細胞介素環境在介導抗腫瘤功效中起主要作用。其可將更多淋巴細胞募集至腫瘤，支援增殖且增加彼等T細胞之存活，並預防形成壓抑及疲憊。吾人可展示，FAP OX40 iMAb能夠在活體外將不同腫瘤細胞株、效應群及腫瘤靶標之細胞介素的TCB介導之分泌調節為更具促炎性且較少抑制性的分泌。此外，吾人亦可展示，其在模擬人類免疫

系統之人類化小鼠模型中轉譯成經改良抗腫瘤功效。

實例5

FAP OX40 iMab、TCB及PD-L1抗體之活體內組合療法

5.1 實驗步驟

【0371】 在以下實例中，在人類MKN45胃癌模型中測試以12.5 mg/kg之濃度與人類CEA CD3 TCB及抗PD-L1抗體(a-PD-L1)組合的人類FAP靶向之OX40促效劑FAP OX40 iMab (FAP結合子4B9)。在皮下將MKN45細胞與NSG人類化小鼠中的小鼠纖維母細胞株(3T3)共移植。

【0372】 最初自DSMZ獲得人類MKN45細胞(人類胃癌)且在擴增之後存放在Glycart內部細胞庫中。在37°C下之含有10% FCS之DMEM中於5% CO₂下在水飽和氛圍中培養細胞。在99.1%活力下，活體外通道13用於皮下注射。最初自ATCC獲得人類纖維母細胞NIH-3T3，在Hoffmann-La Roche Inc.處經工程改造以表現人類FAP，且在含有10%小牛血清、1×丙酮酸鈉及1.5 µg/ml嘌呤黴素之DMEM中培養。在第8號活體外通道及97.6%活力下使用純系39。

【0373】 使用22G至30G針將與50微升基質膠混合之50微升細胞懸浮液(1×10^6 MKN45細胞+ 1×10^6 3T3-huFAP)皮下注射於經麻醉小鼠之側腹。根據提交之準則(GV-Solas; Felasa; TierschG)以每天12小時光照/12小時黑暗之循環將自實驗開始起年齡為5週之NSG雌性小鼠(購自Charles River)維持在無特定病原體條件下。實驗研究方案由當地政府當局審查且批准。動物在到達之後維持一週以使其適應新環境且進行觀察。每天進行連續健康監測。

【0374】 為了人類化，對小鼠注射硫酸布他卡因(Busulfan)(20

mg/kg)，24小時後注射100,000人類HSC(購自StemCell Technologies)。

【0375】 在細胞注射前7至14天，對小鼠進行抽血且篩檢血液中的
人類T細胞之量。針對人類T細胞對小鼠進行隨機分組，其中平均T細胞計
數/ μ l血液為131。在研究第0天對小鼠皮下注射與 1×10^6 個3T3纖維母細胞
混合之 1×10^6 個MKN45細胞。在整個實驗期間藉由測徑規每週量測腫瘤2
至3次。在第17天，針對腫瘤尺寸對小鼠進行隨機分組，其中平均腫瘤尺
寸為205 mm^3 。在隨機分組當日，每週向小鼠i.v.注射媒劑、CEA CD3
TCB、CEA CD3 TCB加a-PD-L1、CEA CD3 TCB加FAP OX40 iMAb或
CEA CD3 TCB、a-PD-L1與FAP OX40 iMAb之三重組合，持續至多4
週。向所有小鼠靜脈內注射200 μ l適當溶液。對載劑組中之小鼠注射組胺
酸緩衝液，且對處理組注射CEA CD3 TCB及CEA CD3 TCB及/或FAP
OX40 iMAb之組合。為獲得每200 μ l適當量之化合物，必要時用組胺酸
緩衝液稀釋儲備溶液。用於CEA CD3 TCB之劑量及時程為2.5 mg/kg，每
週兩次，而FAP OX40 iMab以12.5 mg/kg之劑量且a-PD-L1以10 mg/Kg
之劑量每週一次給予(表7)。在研究第44天終止實驗。一些小鼠在實驗期
間因不良健康狀況而不得不得犧牲。

表6：第44天存活之小鼠

組	媒劑	CEA CD3 TCB	CEA CD3 TCB + FAP OX40 iMAb	CEA CD3 TCB + a-PD-L1	CEA CD3 TCB + FAP OX40 iMAb + a-PD-L1
第44天存 活之小鼠	7/9	5/9	5/10	3/9	6/10

【0376】 將腫瘤及血液搜集在PBS中，產生單細胞懸浮液，且染色
用於不同免疫細胞標記物，且藉由FACS進行分析。冷凍血漿以及腫瘤的
一部分以便經由多倍儀進行細胞介素分析。用福馬林固定終止時的部分腫
瘤，然後包埋於石蠟中。切割樣本且染色CD3及CD8。

表7：用於活體內實驗中之組合物

化合物	劑量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	調配物緩衝液
a-PD-L1 (iTME-0005)	10	2.54 (=物料濃度)	20 mM組胺酸, 140 mM NaCl, pH 6.0
CEA CD3 TCB	2.5	4.82 (=物料濃度)	20 mM組胺酸, 140 mM NaCl, 0.01% Tween20, pH 6.0
FAP OX40 iMAb	3.2	4.82 (=物料濃度)	20 mM組胺酸, 140 mM NaCl, pH 6.0

5.2 結果

【0377】 吾人想要在此研究中首次證明，FAP OX40 iMAb可改良由CEA CD3 TCB與a-PD-L1之組合介導之功效。a-PD-L1為免疫檢查點抑制劑且在癌症免疫療法領域中完善。a-PD-L1結合子對小鼠PD-L1具有交叉反應且以鼠類IgG型式產生。CEA CD3 TCB靶向癌細胞上表現之CEA且FAP OX40 iMAb結合於腫瘤基質中之FAP表現纖維母細胞。FAP OX40 iMAb以12.5 mg/kg之劑量且a-PD-L1以10 mg/kg之劑量每週給予，而CEA CD3 TCB以2.5 mg/kg之劑量每週兩次給予。

【0378】 為了測試人類構築體，小鼠系統中必須存在人類免疫細胞且具體言之T細胞。出於此原因，吾人使用意謂經人類幹細胞轉移之小鼠的人類化小鼠。此等小鼠隨時間推移形成主要由T及B細胞組成之部分人類免疫系統。

【0379】 吾人共注射MKN45、CEA表現人類胃癌細胞株及3T3纖維母細胞，其改良腫瘤中之基質組分。由CEA CD3 TCB靶向CEA，從而使T細胞與腫瘤細胞交聯且誘導腫瘤細胞之T細胞介導殺滅以及T細胞活化。在T細胞活化後，上調OX40以及PD-1。FAP OX40 iMAb與FAP表現基質細胞及OX40表現T細胞交聯，且因此誘導OX40信號傳導。此引起T細胞之經改良細胞介素分泌、存活及增殖。PD-L1主要由腫瘤細胞表現，阻斷

PD-L1而防止與PD-1表現T細胞交聯，且因此防止T細胞之PD-1依賴性滅活。

【0380】 吾人在此研究中可展示，CEA CD3 TCB與a-PD-L1及FAP OX40 iMAb組合相比媒劑組介導在腫瘤生長抑制方面之經改良功效(圖28A及圖28B)。在研究第36天、第38天、第41天及第43天計算基於中值的腫瘤生長抑制。經CEA CD3 TCB + a-PD-L1 + FAP OX40iMAb處理之組展示對腫瘤生長之最強抑制。

表8：第36天、第38天、第41天及第43天的腫瘤生長抑制(TGI)

組	第36天	第38天	第41天	第43天
CEA CD3 TCB	62.77	55.13	47.30	32.73
CEA CD3 TCB + FAP OX40 iMAb 12.5mg/kg	36.76	40.63	32.97	19.48
CEA CD3 TCB + a-PD-L1	45.91	55.32	41.35	37.60
CEA CD3 TCB + a-PD-L1 + FAP OX40iMAb	81.28	82.63	71.61	59.21

【0381】 考慮到直至第43天為止之曲線下面積(AUC)，僅CEA CD3 TCB+ a-PD-L1 + FAP OX40iMAb之組合與媒劑單一療法顯著不同。

表9：與媒劑相比直至第43天為止之腫瘤體積之單向分析AUC

使用鄧尼特氏方法與對照物進行均值比較 (sAUC)	P值
對照組 = 媒劑	-
CEA CD3 TCB	0.0563
CEA CD3 TCB + FAP OX40iMAb	0.6395
CEA CD3 TCB + a-PD-L1	0.1318
CEA CD3 TCB + a-PD-L1 + FAP OX40iMAb	0.0079*

表10：與媒劑相比第43天之腫瘤體積之單向分析AUC

使用鄧尼特氏方法與對照物進行比較 (第43天)	P值
對照組 = 媒劑	
CEA CD3 TCB	0.1311
CEA CD3 TCB + FAP OX40iMAb	0.7221
CEA CD3 TCB + a-PD-L1	0.1186
CEA CD3 TCB + a-PD-L1 + FAP OX40iMAb	0.0024*

【0382】 所有其他組(單一療法以及雙重療法)相比媒劑可能不會顯著改良功效。

【0383】 研究所注射化合物在第一週期間的藥物動力學概況，如實例4中所描述。此外，為了偵測a-PD-L1，將經生物素標記之抗人類Fc、PD-L1-huFc、測試樣本及多株抗鼠類IgG (HRP)逐步添加至經抗生蛋白鏈菌素塗佈之96孔微量滴定盤中且在各步驟後於室溫下培育1小時。在各步驟後洗滌培養盤三次以移除未結合之物質。最後，藉由添加ABTS受質溶液形成著色反應產物而使經過氧化酶結合之複合物可視化。在405 nm (490 nm下之參考波長)以光度測定之反應產物強度與血清樣本中之分析物濃度成正比。在第一次及第三次治療之後1小時及72小時對每組的2個小鼠進行抽血，且藉由ELISA分析所注射化合物。注射化合物之所有組展示不同組(FAP OX40 iMAb、CEA CD3 TCB或a-PD-L1)之間分子之類似暴露(參見圖29A、圖29B及圖29C)。

【0384】 在第44天在藉由IHC (免疫組織化學過程)終止時的腫瘤中之T細胞浸潤在三重組合中相比所有其他組顯著增加(參見圖30A及圖30B)。

實例6

FAP OX40 iMAb、TCB及PD-L1抗體之活體外組合療法

6.1 實驗步驟

【0385】 在此分析中，類似於實例5中所描述測試FAP OX40 iMAb在存在或不存在CEA CD3 TCB及阿特珠單抗(Tecentriq，抗人類PD-L1特異性人類化人類IgG1κ抗體)之情況下活化人類PBMC (自白血球層分離、冷凍且儲存於液氮中)的潛力。為模仿腫瘤環境，在存在或不存在2 nM FAP OX40 iMAb及/或100 nM CEA CD3 TCB及/或80 nM阿特珠單抗之情況下將六種不同供體之PBMC與FAP表現NIH/3T3-huFAP纖維母細胞株及

CEA表現MKN45-FolR1-PDL1胃癌細胞株一起培育四天。為測定PBMC活化，藉由流式細胞測量術分析CD4及CD8 T細胞之增殖(CFSE-稀釋)、CD25 (IL-2R α)、4-1BB (CD137)、OX-40 (CD134)、T-bet (T-盒轉錄因子)、Eomes (脫中胚蛋白(Eomesodermin))、顆粒酶B及PD-1表現。藉由多倍儀分析上清液之IFN γ 、TNF α 、GM-CSF、顆粒酶B、IL-2、IL-8及IL-10。

a) PBMC之製備

【0386】自Zürich血液供給中心獲得白細胞層。為了分離新鮮的末梢血液單核細胞(PBMC)，用相同體積之DPBS (Gibco, Life Technologies, 目錄號14190 326)稀釋白血球層。提供50 mL Falcon離心管(TPP, 目錄號91050)及15 mL Histopaque 1077 (SIGMA Life Science, 目錄號10771, 聚蔗糖及泛影酸鈉, 調節至1.077 g/mL之密度)且白血球層溶液覆蓋在15 mL Histopaque 1077上。在400 $\times$ g下, 在室溫下且在低加速度及不破裂情況下將試管離心30分鐘。然後, 將PBMC自界面收集, 用DPBS洗滌次且再懸浮於由90% (v/v)胎牛血清(FBS, Gibco, Life Technology, 目錄號16000-044, 批號941273, 經 γ 輻射, 無黴漿菌, 且在56 $^{\circ}$ C下熱滅活35分鐘)及10% (v/v)的10%二甲亞砷(Sigma, 目錄號D2650)組成之T細胞凍結培養基中。將1 mL快速轉移至無菌冷凍小瓶、轉移至低溫箱且在-80 $^{\circ}$ C下儲存24小時。然後, 將小瓶轉移至液氮容器或氣相容器。

【0387】將來自6個供體之小瓶在37 $^{\circ}$ C下之水浴中解凍且在由RPMI 1640培養基組成之分析培養基中洗滌, 該RPMI 1640培養基經供應有10% (v/v)胎牛血清(FBS)、1% (v/v) GlutaMAX I、1 mM丙酮酸鈉(SIGMA,

目錄號S8636)、1% (v/v) MEM非必需胺基酸(SIGMA, 目錄號M7145)及50 μ M β -巰基乙醇(SIGMA, M3148)。在解凍後, 在37°C及5% CO₂下於細胞培育箱中靜置細胞2小時。對細胞進行計數、用DPBS洗滌且再懸浮於37°C DPBS中達到 1×10^6 個細胞/毫升。添加CFDA-SE達到最終濃度200 nM, 且在37°C下培育10分鐘。然而, 添加FBS, 洗滌細胞且置於分析培養基中達到 2×10^6 個細胞/毫升。

b) 標靶細胞株

【0388】 用DPBS洗滌含有NIH/3T3-huFAP純系19之T150燒瓶, 且在37°C下與無酶素PBS基解離緩衝液一起培育8分鐘。收集細胞, 進行洗滌, 再懸浮於分析培養基中, 且使用X-Ray輻射器RS 2000以50 Gy進行輻射。將細胞置於分析培養基中達到 1×10^6 個細胞/毫升。

【0389】 將含有MKN45-FolR1-PDL1胃癌細胞株之T150燒瓶用DPBS洗滌且在37°C下與無酶素PBS基解離緩衝液一起培育8分鐘。收集細胞, 用DPBS洗滌, 且再懸浮於C稀釋劑中(至少250 μ L, 8×10^7 個細胞/毫升或更低)。相同量之C稀釋劑供應有4 μ L/mL PKH-26染料且充分混合。將此染料溶液添加至細胞, 且立即充分混合。在室溫下培育細胞5 min。然後添加FBS, 在分析中洗滌細胞, 再懸浮於分析培養基中且使用X-Ray輻射器RS 2000 (Rad source)以50 Gy進行輻射。將細胞置於分析培養基中達到 1×10^6 個細胞/毫升。

c) 分析設定

【0390】 對於測試化合物, 由分析培養基中之如下各組分製備母液: 16 nM FAP OX40 iMAB、800 nM CEA CD3 TCB及640 nM阿特珠單抗。細胞及組分以如下量之各物合併於96孔圓底組織培養盤中(TTP,

目錄號92097): 50 μ L PKH-26紅色標記之MKN45-FolR1-PD-L1 (10,000個細胞/孔)、50 μ l NIH/3T3-huFAP純系19 (10,000個細胞/孔)、一個供體之25 μ L PBMC (50,000個細胞/孔)、25 μ L 16 nM FAP OX40 iMAB溶液或分析培養基(最終濃度2 nM)、25 μ L 800 nM CEA CD3 TCB溶液或分析培養基(最終濃度100 nM)及25 μ L 640 nM阿特珠單抗溶液或分析培養基(最終濃度80 nM)。接著在37°C及5% CO₂下於潮濕細胞培育箱中將培養盤培育四天。

【0391】 四天後，移除50 μ L上清液，且儲存於-80°C下以供稍後分析細胞介素含量(參見下文)。為進行對T細胞活化標記物之T細胞增殖及表面表現之流式細胞測量分析，將培養盤離心且用低溫DPBS洗滌一次。在兩個96孔培養盤中將樣本以相同體積分割以用於2個個別染色小組。對於染色小組1，於室溫(RT)下將細胞在經供應有1:800稀釋之LIVE/DEAD Fixable Aqua死細胞染料之50微升/孔DPBS中染色15分鐘。用200微升/孔FACS緩衝液將細胞洗滌一次(離心350 $\times$ g，4分鐘，4°C，去除斑點)。此後，將細胞再懸浮於由含有以下抗體之FACS緩衝液構成的25微升/孔染色緩衝液中：抗人類CD4 (純系A161A1, Biolegend, 目錄號-357410)、CD8 (純系RPA-T8, Biolegend, 目錄號301040)、CD25 (純系BC96, Biolegend, 目錄號302636)、PD-1 (純系EH12.2H7, Biolegend, 目錄號329920)、CD134 (純系Ber-ACT35, Biolegend, 目錄號-350008)、CD137 (純系4B4-1, Biolegend, 目錄號-309814)，且在4°C下培育20分鐘。將細胞用200微升/孔FACS緩衝液洗滌一次(離心350 $\times$ g，4分鐘，4°C，去除斑點)且再懸浮於120微升/孔FACS緩衝液中，隨後在同一天使用4-雷射LSRII (BD Bioscience，DIVA軟體)獲得細胞。

【0392】對於染色小組2，於室溫(RT)下將細胞在經供應有1:800稀釋之LIVE/DEAD Fixable Aqua死細胞染料之50微升/孔DPBS中染色15分鐘，且用200微升/孔FACS緩衝液洗滌一次(離心 $350\times g$ ，4分鐘， 4°C ，去除斑點)。將細胞再懸浮於由含有以下抗體之FACS緩衝液構成的25微升/孔染色緩衝液中：抗人類CD4 (純系RPA-T4, Biolegend, 目錄號3005580)、CD8 (SK-1, Biolegend, 目錄號344710)、CCR7 (純系G043H7, Biolegend, 目錄號353204)、CD45RO (純系BC96, Biolegend, 目錄號304236)，且在 4°C 下培育20分鐘。將細胞用200微升/孔FACS緩衝液洗滌一次(離心 $350\times g$ ，4分鐘， 4°C ，去除斑點)，且藉由將1份Foxp3固著/滲透濃縮物與3份Foxp3固著/滲透稀釋劑(FoxP3/轉錄因子染色緩衝液組，eBiosciences，目錄號-005523-00)混合而於室溫下再懸浮於100微升/孔之Foxp3固著/滲透工作溶液中60分鐘。接著，藉由將1份滲透緩衝液與9份水(FoxP3/轉錄因子染色緩衝液組，eBiosciences，目錄號-005523-00)而將細胞用滲透緩衝工作溶液洗滌一次，且於室溫下再懸浮於由含有以下抗體之滲透緩衝工作溶液構成之50微升/孔染色溶液中40分鐘：抗人類EOMES (純系Dan11mag，eBiosciences，目錄號-25-4857-80)、T-bet (純系4B10，Biolegend，目錄號-644815)及顆粒酶B (純系GB11，Biolegend，目錄號515406)。接著將細胞用200微升/孔滲透緩衝工作溶液洗滌兩次且再懸浮於120微升/孔FACS緩衝液)中，其後在同一天使用4-雷射LSRII (BD Bioscience，DIVA軟體)獲得細胞。使用供PC用之FlowJo v10.3 (FlowJo LLC)、Microsoft Excel (專業加2010)及GraphPad Prism v6.07 (GraphPad Software,Inc)分析資料。將活的CD4及CD8 T細胞進行閘控(Zombie Aqua-，CD4或CD8+)，且針對各條件標繪活化標記物

(CD134、CD137、CD25、PD-1)或成熟標記物(CCR7、CD45RO)或轉錄因子(T-bet, Eomes)或細胞介素(顆粒酶B)之計數、平均螢光強度(MFI)以及陽性細胞之百分比或平均螢光強度(MFI)。

【0393】為分析上清液中釋放之細胞介素，採集先前凍結的樣本且根據製造商的說明使用細胞量測珠粒陣列分析其IFN γ 、GM-CSF、TNF α 、IL-2、顆粒酶B、IL-8及IL-10。所評估之細胞介素為IL-2 (人類IL-2 CBA Flex-set (Bead A4), BD Bioscience, 目錄號558270)、TNF- α (人類TNF- α CBA Flex-set (Bead C4), BD Bioscience, 目錄號560112)、IFN- γ (IFN- γ CBA Flex-set (Bead E7), BD Bioscience, 目錄號558269)、IL-10 (人類IL-10 CBA Flex-set (Bead B7), BD Bioscience, 目錄號558274)、TNF (人類TNF CBA Flex-set (Bead C4), BD Bioscience, 目錄號560112)、IL-8 (人類IL-8 CBA Flex-set (Bead A9), BD Bioscience, 目錄號558277)、顆粒酶B (人類顆粒酶B CBA Flex-set (Bead D7), BD Bioscience, 目錄號560304)。

6.2 結果

6.2.1 CEA CD3 TCB與FAP OX40 iMAb之組合優於與 α -PD-L1之組合

【0394】如圖31A及圖31B中所示，添加100nM CEA CD3 TCB (點線填充之條，實心三角形)而非單獨添加2nM FAP OX40 iMAb (開放條，空心圓)可提高活化標記物CD25之表現及CD4及CD8 T細胞之增殖。FAP OX40 iMAb與CEA CD3 TCB之組合(灰色條，空心方塊)及/或與 α PD-L1之組合(黑色條，灰色填充方塊)相較於與CEA CD3 TCB及 α PD-L1之組合處理(空心條，黑色填充環)引起CD4及CD8 T細胞的最高活化及增殖，如圖31A及圖31B中所示。此外，FAP OX40 iMAB及CEA CD3 TCB組合處

理導致T細胞轉錄因子(T-bet)在CD4 T細胞上之百分比較高及T-bet在CD8 T細胞上之表現較高(圖32A及圖32B)。T-bet表現T輔助細胞1細胞譜系定型，且此等結果展示，FAP OX40 iMAb處理導致驅動Th1 T細胞反應。進一步如圖33A至圖33D中所示，FAP OX40 iMAb與CEA CD3 TCB之組合處理產生較高百分比之顆粒酶B表現CD4及CD8 T細胞，表明T細胞之較高細胞毒素潛力。在實驗結束時分析上清液中之細胞介素展示出在CEA CD3 TCB及FAP OX40 iMAb中相較於CEA CD3 TCB及aPD-L1處理的較高量之促炎性細胞介素IFN- γ 及顆粒酶B，但由於較高的供體間可變性，差異並非係在統計上顯著的。總之，CEA CD3 TCB與FAP OX40 iMAb之組合產生對CD4及CD8 T細胞之優良活化、增殖及Th1分化。

6.2.2 CEA CD3 TCB、FAP OX40 iMAb及PD-L1之三重組合引起最高細胞介素分泌

【0395】如圖34A至圖34C中所示，相比其他處理組，CEA CD3 TCB、FAP OX40 iMAb及PD-L1之三重組合(黑色條，灰色填充方塊)在免疫細胞活化促炎性細胞介素(諸如IFN- γ 、顆粒酶B及IL-8)之釋放中最有效。如圖34C中所示，三重組合處理亦根據量測所分泌細胞介素之結果而使溶胞酵素顆粒酶B在CD4及CD8 T細胞兩者上之胞內表現最高。圖35A至圖35C中展示三重組合與CEA CD3 TCB及aPD-L1之組合比較細胞介素釋放之倍增。儘管不同供體之間的細胞介素分泌量的差異較強，但三重組合仍可在大部分所測試供體中產生高於2倍的差異。觀測IL-8及IFN γ 之最高倍數變化。如圖31A及圖31B中所示，相較於CEA CD3 TCB及FAP OX40 iMAb組合處理，三重組合(黑色條，灰色實心圓)不會導致CD4及CD8 T細胞之增殖及活化的變化。總之，在與CEA CD3 TCB組合時之

FAP OX40 iMAB協同刺激產生在刺激Th1譜系之T細胞活化、增殖及胞內表現從而促進轉錄因子T-bet及顆粒酶B表現方面的強效應。向此組合添加PD-L1藉由胞內及所分泌顆粒酶B及促炎性細胞介素IFN- γ 之表現增加而進一步增強如所見之CD4及CD8 T細胞兩者之細胞毒性潛力。

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司
<120> 使用經靶向之OX40促效劑的組合療法
<130> P34512-WO
<150> EP171995426
<151> 2017-11-01
<160> 146
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(4B9) CDR-H1

<400> 1

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(4B9) CDR-H2

<400> 2

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(4B9) CDR-H3

<400> 3

Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr
1 5

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> FAP(4B9) CDR-L1

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FAP(4B9) CDR-L2

<400> 5

Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FAP(4B9) CDR-L3

<400> 6

Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FAP(4B9) VH

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

85 90 95
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(4B9) VL

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(28H1) CDR-H1

<400> 9

Ser His Ala Met Ser
1 5

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(28H1) CDR-H2

<400> 10
Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(28H1) CDR-H3

<400> 11
Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr
1 5

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(28H1) CDR-L1

<400> 12
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(28H1) CDR-L2

<400> 13
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(28H1) CDR-L3

<400> 14
Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro Thr
1 5

<210> 15

<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(28H1) VH

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20 25 30

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

Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FAP(28H1) VL

<400> 16

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> anti-OX40 CDR-H1

<400> 17

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-H1

<400> 18

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-H2

<400> 19

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-H2

<400> 20

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-H3

<400> 21

Glu Tyr Gly Trp Met Asp Tyr
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-H3

<400> 22

Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr
1 5

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-H3

<400> 23

Glu Tyr Gly Ser Met Asp Tyr
1 5

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-H3

<400> 24

Val Asn Tyr Pro Tyr Ser Tyr Trp Gly Asp Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 25
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-H3

<400> 25

Asp Val Gly Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-H3

<400> 26

Asp Val Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-H3

<400> 27

Val Phe Tyr Arg Gly Gly Val Ser Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-L1

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-L1

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-L1

<400> 30

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-L2

<400> 31

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-L2

<400> 32

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-L2

<400> 33

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-L3

<400> 34

Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Phe Thr
1 5 10

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-L3

<400> 35

Gln Gln Tyr Ser Ser Gln Pro Tyr Thr
1 5

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-L3

<400> 36

Gln Gln Tyr Ile Ser Tyr Ser Met Leu Thr
1 5 10

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-L3

<400> 37

Gln Gln Tyr Gln Ala Phe Ser Leu Thr
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-L3

<400> 38

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗OX40 CDR-L3

<400> 39

Asn Ser Arg Val Met Pro His Asn Arg Val
1 5 10

<210> 40
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 49B4 VH

<400> 40

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 49B4 VL

<400> 41

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 42
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 8H9 VH

<400> 42

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Tyr Gly Trp Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 43
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 8H9 VL

<400> 43
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 44
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 1G4 VH

<400> 44
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Gly Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 1G4 VL

<400> 45

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Ser Tyr Ser Met
85 90 95

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

<210> 46
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 20B7 VH

<400> 46

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Asn Tyr Pro Tyr Ser Tyr Trp Gly Asp Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 20B7 VL

<400> 47

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Ala Phe Ser Leu
85 90 95

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

<210> 48
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CLC-563 VH

<400> 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Leu Asp Val Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 49
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CLC-563 VL

<400> 49

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

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

<210> 50
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CLC-564 VH

<400> 50

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Phe Asp Val Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 51
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CLC-564 VL

<400> 51

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 52
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 17A9 VH
<400> 52

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

<210> 53
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 17A9 VL

<400> 53
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Val Met Pro His Asn Arg
85 90 95
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
100 105

<210> 54
<211> 816
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc杆VH (4B9)

<400> 54
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
225 230 235 240

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
245 250 255

Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala
260 265 270

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly
275 280 285

Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala
290 295 300

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
305 310 315 320

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro
325 330 335

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
340 345 350

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
355 360 365

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

370	375	380
Glu 385	Pro Val Thr Val Ser 390	Trp Asn Ser Gly Ala 395
Leu Thr Ser Gly Val 400		
His Thr Phe Pro 405	Val Leu Gln Ser Ser 410	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser 415
Ser Val Val Thr 420	Val Pro Ser Ser Ser 425	Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile 430
Cys Asn Val 435	Asn His Lys Pro Ser 440	Asn Thr Lys Val Asp 445
Lys Lys Val 450		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp 455	Lys Thr His Thr Cys Pro 460	Pro Cys Pro Ala
Pro Glu Ala Ala Gly 465	Gly Pro Ser Val Phe Leu 475	Phe Pro Pro Lys Pro 480
Lys Asp Thr Leu Met 485	Ile Ser Arg Thr Pro 490	Glu Val Thr Cys Val Val 495
Val Asp Val Ser 500	His Glu Asp Pro Glu 505	Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val 510
Asp Gly Val Glu Val His 515	Asn Ala Lys Thr Lys Pro 520	Arg Glu Glu Gln 525
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg 530	Val Val Ser Val Leu Thr 540	Val Leu His Gln 545
Asp Trp Leu Asn Gly 545	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys 555	Val Ser Asn Lys Ala 560
Leu Gly Ala Pro Ile 565	Glu Lys Thr Ile Ser 570	Lys Ala Lys Gly Gln Pro 575
Arg Glu Pro Gln 580	Val Tyr Thr Leu Pro 585	Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr 590
Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp 595	Cys Leu Val Lys Gly Phe 600	Tyr Pro Ser 605
Asp Ile Ala Val Glu Trp 610	Glu Ser Asn Gly Gln 615	Pro Glu Asn Asn Tyr 620
Lys Thr Thr Pro Pro 625	Val Leu Asp Ser Asp 630	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr 635
		640

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
645 650 655

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
660 665 670

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
675 680 685

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
690 695 700

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
705 710 715 720

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val
725 730 735

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly
740 745 750

Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
755 760 765

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
770 775 780

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe
785 790 795 800

Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
805 810 815

<210> 55
<211> 807
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc 白 VL (4B9)

<400> 55

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

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

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro
325 330 335

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
340 345 350

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
355 360 365

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
370 375 380

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
385 390 395 400

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
405 410 415

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
420 425 430

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
435 440 445

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
450 455 460

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
465 470 475 480

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
485 490 495

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
500 505 510

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
515 520 525

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
530 535 540

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
545 550 555 560

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
565 570 575

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
580 585 590

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
595 600 605

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
610 615 620

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
625 630 635 640

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
645 650 655

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
660 665 670

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
675 680 685

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr
690 695 700

Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
705 710 715 720

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr
725 730 735

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser
740 745 750

Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
755 760 765

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
770 775 780

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln
785 790 795 800

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
805

- <210> 56
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> LC (49B4)
- <400> 56

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

<210> 57
<211> 815
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc杆VH (28H1)

<400> 57

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly
210 215 220
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
225 230 235 240
Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
245 250 255
Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala
260 265 270

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly
275 280 285

Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala
290 295 300

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
305 310 315 320

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro
325 330 335

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
340 345 350

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
355 360 365

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
370 375 380

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
385 390 395 400

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
405 410 415

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
420 425 430

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
435 440 445

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
450 455 460

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
465 470 475 480

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
485 490 495

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
500 505 510

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
515 520 525

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
530 535 540

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
545 550 555 560

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
565 570 575

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
580 585 590

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
595 600 605

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
610 615 620

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
625 630 635 640

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
645 650 655

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
660 665 670

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
675 680 685

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
690 695 700

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
705 710 715 720

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val
725 730 735

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala
740 745 750

Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
755 760 765

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
770 775 780

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly
785 790 795 800

Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
805 810 815

<210> 58
<211> 807
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc蛋白VL (28H1)
<400> 58

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
225 230 235 240

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
245 250 255

Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala
260 265 270

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly
275 280 285

Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala
290 295 300

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
305 310 315 320

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro
325 330 335

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
340 345 350

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
355 360 365

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
370 375 380

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
385 390 395 400

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
405 410 415

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
420 425 430

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
435 440 445

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
450 455 460

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
465 470 475 480

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
485 490 495

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
500 505 510

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
515 520 525

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
530 535 540

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
545 550 555 560

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
565 570 575

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
580 585 590

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
595 600 605

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
610 615 620

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
625 630 635 640

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
645 650 655

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
660 665 670

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
675 680 685

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr
690 695 700

Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
705 710 715 720

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr
725 730 735

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Ile Gly Ala Ser
740 745 750

Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

755

760

765

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
770 775 780

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln
785 790 795 800

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
805

<210> 59
<211> 807
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc杆VL (4B9)

<400> 59

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
225 230 235 240

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
245 250 255

Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala
260 265 270

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly
275 280 285

Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala
290 295 300

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
305 310 315 320

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro
325 330 335

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
340 345 350

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
355 360 365

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
370 375 380

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
385 390 395 400

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
405 410 415

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
420 425 430

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val

435					440					445						
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	
450					455					460						
Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
465					470					475					480	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
485					490					495						
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
500					505					510						
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
515					520					525						
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	
530					535					540						
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	
545					550					555					560	
Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	
565					570					575						
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	
580					585					590						
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
595					600					605						
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	
610					615					620						
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
625					630					635					640	
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	
645					650					655						
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
660					665					670						
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
675					680					685						
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	
690					695					700						

Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
705 710 715 720

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr
725 730 735

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Asn Val Gly Ser
740 745 750

Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
755 760 765

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
770 775 780

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gln
785 790 795 800

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
805

<210> 60
<211> 816
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc 白 VH (4B9)

<400> 60

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
385 390 395 400

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
405 410 415

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
420 425 430

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
435 440 445

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
450 455 460

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
465 470 475 480

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
485 490 495

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
500 505 510

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
515 520 525

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
530 535 540

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
545 550 555 560

Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
565 570 575

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
580 585 590

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
595 600 605

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
610 615 620

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
625 630 635 640

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
645 650 655

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
660 665 670

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
675 680 685

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
690 695 700

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
705 710 715 720

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val
725 730 735

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly
740 745 750

Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
755 760 765

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
770 775 780

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe
785 790 795 800

Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
805 810 815

<210> 61
<211> 816
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HC 1 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc wt杆VH (4B9)

<400> 61

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
225 230 235 240

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
245 250 255

Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala
260 265 270

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly
275 280 285

Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala
290 295 300

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
305 310 315 320

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro
325 330 335

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
340 345 350

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
355 360 365

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
370 375 380

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
385 390 395 400

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
405 410 415

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
420 425 430

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
435 440 445

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
450 455 460

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
465 470 475 480

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
485 490 495

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
500 505 510

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
515 520 525

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
530 535 540

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
545 550 555 560

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
565 570 575

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
580 585 590

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
595 600 605

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
610 615 620

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
625 630 635 640

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
645 650 655

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
660 665 670

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
675 680 685

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
690 695 700

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
705 710 715 720

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val
725 730 735

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly
740 745 750

Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
755 760 765

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
770 775 780

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Phe
785 790 795 800

Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
805 810 815

<210> 62
<211> 807
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HC 2 (49B4) VHCH1_VHCH1 Fc wt白VL (4B9)

<400> 62

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
225 230 235 240

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
245 250 255

Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala
260 265 270

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly
275 280 285

Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala
290 295 300

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
305 310 315 320

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Gly Pro
325 330 335

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
340 345 350

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
355 360 365

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
370 375 380

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
385 390 395 400

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
405 410 415

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
420 425 430

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
435 440 445

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
450 455 460

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
465 470 475 480

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
485 490 495

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
500 505 510

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
515 520 525

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
530 535 540

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

545		550		555		560
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
		565		570		575
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr
		580		585		590
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser
		595		600		605
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
	610			615		620
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
625				630		640
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
		645		650		655
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
		660		665		670
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
	675			680		685
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu
690				695		700
Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser
705				710		715
Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser
		725		730		735
Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala
		740		745		750
Arg	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro
		755		760		765
Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
770				775		780
Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly
785				790		795
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			805			

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3-HCDR1

<400> 63

Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 64
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3-HCDR2

<400> 64

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

Val Lys Gly

<210> 65
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3-HCDR3

<400> 65

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 66
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3-LCDR1

<400> 66

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3-LCDR2

<400> 67

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3-LCDR3

<400> 68

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 69
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3 VH

<400> 69

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 70
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3 VL

<400> 70

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

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA-HCDR1

<400> 71

Glu Phe Gly Met Asn
1 5

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA-HCDR2

<400> 72

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 73

<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA-HCDR3

<400> 73

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA-LCDR1

<400> 74

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA-LCDR2

<400> 75

Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg
1 5

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA-LCDR3

<400> 76

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 77
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA VH

<400> 77

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 78
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA VL

<400> 78

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 79
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA-HCDR1 (CEACAM5)

<400> 79

Asp Thr Tyr Met His
1 5

<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA-HCDR2 (CEACAM5)

<400> 80

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 81
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA-HCDR3 (CEACAM5)

<400> 81

Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr
1 5 10

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA-LCDR1 (CEACAM5)

<400> 82

Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe Gly Val Gly Phe Leu His
1 5 10 15

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CEA-LCDR2 (CEACAM5)

<400> 83

Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CEA-LCDR3 (CEACAM5)

<400> 84

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 85

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CEA VH (CEACAM5)

<400> 85

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CEA VL (CEACAM5)

<400> 86

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 87

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CEA (CEA TCB)

<400> 87

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 88
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CD3 (CEA TCB)

<400> 88

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

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

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160

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

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

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 89
<211> 694
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA CD3 交叉fab VHck fc杆P329GLALA (CEA TCB)

<400> 89

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
225 230 235 240

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
245 250 255

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val
260 265 270

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser
275 280 285

Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
290 295 300

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
305 310 315 320

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His
325 330 335

Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
340 345 350

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
355 360 365

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
370 375 380

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
385 390 400

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
405 410 415

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
420 425 430

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
435 440 445

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
450 455 460

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
465 470 475 480

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
485 490 495

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
500 505 510

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
515 520 525

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
530 535 540

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
545 550 555 560

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
565 570 575

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
580 585 590

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
595 600 605

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
610 615 620

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
625 630 635 640

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
645 650 655

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
660 665 670

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
675 680 685

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690

<210> 90
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEA VHCH1 Fc白P329GLALA (CEA TCB)

<400> 90

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

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

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

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 91
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD3 VH-CL (CEACAM5 TCB)

<400> 91

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 92
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEACAM5 VH-CH1(EE)-Fc (白, P329G LALA)

<400> 92

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

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

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

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro

<210> 93
<211> 674
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEACAM5 VH-CH1(EF)-CD3 VL-CH1-Fc (杵, P329G LALA)

<400> 93

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr
225 230 235 240

Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
245 250 255

Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
260 265 270

Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr
275 280 285

Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu
290 295 300

Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu
305 310 315 320

Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly
325 330 335

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
340 345 350

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
355 360 365

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
370 375 380

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
385 390 395 400

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
405 410 415

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
420 425 430

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
435 440 445

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
450 455 460

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
465 470 475 480

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
485 490 495

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
500 505 510

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
515 520 525

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
530 535 540

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
545 550 555 560

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
565 570 575

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
580 585 590

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
595 600 605

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
610 615 620

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
625 630 635 640

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
645 650 655

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
660 665 670

Ser Pro

<210> 94
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CEACAM5 VL-CL(RK)

<400> 94

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 95
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (CH2527) CD3-HCDR1

<400> 95

Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 96

<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (CH2527) CD3-HCDR2

<400> 96

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

Val Lys Gly

<210> 97
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (CH2527) CD3-HCDR3

<400> 97

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 98
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (16D5) Fo1R1-HCDR1

<400> 98

Asn Ala Trp Met Ser
1 5

<210> 99
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (16D5) Fo1R1-HCDR2

<400> 99

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

Val Lys Gly

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (16D5) Fo1R1-HCDR3

<400> 100

Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr
1 5

<210> 101
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (CH2527-VL7-46-13)-LCDR1

<400> 101

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 102
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (CH2527-VL7-46-13)-LCDR2

<400> 102

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (CH2527-VL7-46-13)-LCDR3

<400> 103

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 104
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (CH2527) CD3 VH

<400> 104

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

202530

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
354045

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
505560

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65707580

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
859095

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100105110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115120125

<210> 105
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (16D5) FolR1 VH

<400> 105

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
202530

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
354045

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
505560

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65707580

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
859095

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100105110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115120

<210> 106
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (CH2527-VL7-46-13)VL

<400> 106
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 107
<211> 689
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (16D5)VH-CH1-(CH2527)VH-CH1 Fc杆PGLALA

<400> 107
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr

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

Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
340 345 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
355 360 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
370 375 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385 390 395 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
405 410 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
420 425 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
435 440 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
450 455 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465 470 475 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
485 490 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
500 505 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
515 520 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
530 535 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545 550 555 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
565 570 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
580 585 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
595 600 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
610 615 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

<210> 108
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (16D5)VH-CH1-Fc白PGLALA H435R-Y436F

<400> 108

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

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

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

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

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

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

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 109
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (CH2527-VL7-46-13)VL-CL

<400> 109

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
100 105 110

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

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 110
<211> 290
<212> PRT
<213> 智人

<400> 110

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

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285

Glu Thr
290

<210> 111
<211> 288
<212> PRT
<213> 智人

<400> 111

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 112
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH (PD-L1)

<400> 112

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

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

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

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

50 55 60

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

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 113
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL (PD-L1)

<400> 113

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 114
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH (PD-L1) 2

<400> 114

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 115
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL (PD-L1) 2

<400> 115

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 116
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH (PD-1)

<400> 116

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 117
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL (PD-1)

<400> 117

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

C216335SEQA.pdf

第 81 頁(序列表)

107138607

表單編號 A0202

1083088955-0

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 118
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH (PD-1) 2

<400> 118

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 119
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL (PD-1) 2

<400> 119

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

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

<210> 120
<211> 760
<212> PRT
<213> 智人

<400> 120

Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val
1 5 10 15

Leu Ala Leu Leu Val Met Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val His
20 25 30

Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
35 40 45

Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe Pro Asn Trp Ile Ser Gly
50 55 60

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn Asn Ile Val Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu Ser Asn Arg Thr Met Lys
85 90 95

Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val
100 105 110

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
115 120 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn
130 135 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
145 150 155 160

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro
165 170 175

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile
180 185 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
195 200 205

Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala
210 215 220

Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225 230 235 240

Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
245 250 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr Tyr Pro
260 265 270

Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met Ile Ala Ser
275 280 285

Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr Asp Glu Arg Val
290 295 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305 310 315 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp Asp Cys Pro Lys Thr Gln
325 330 335

Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
340 345 350

Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
355 360 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
370 375 380

Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Asn Ile
385 390 395 400

Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
405 410 415

Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Ser Tyr
420 425 430

Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
435 440 445

Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
450 455 460

Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
465 470 475 480

Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
485 490 495

Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Lys Leu Glu
500 505 510

Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
515 520 525

Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
530 535 540

Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Ser Tyr
545 550 555 560

Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
565 570 575

Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu
580 585 590

Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
595 600 605

Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
610 615 620

Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
625 630 635 640

Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
645 650 655

Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp

660

665

670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu
725 730 735

Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu
740 745 750

Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

<210> 121
<211> 748
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hu FAP胞外域+聚離胺酸標記+his6標記

<400> 121

Arg Pro Ser Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
1 5 10 15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe
20 25 30

Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
35 40 45

Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
50 55 60

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

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
85 90 95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
100 105 110

Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
115 120 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130 135 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
145 150 155 160

Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
165 170 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
180 185 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
195 200 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile
225 230 235 240

Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
245 250 255

Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260 265 270

Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
290 295 300

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile
325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg

385					390						395					400
Ile	Ser	Ile	Gly	Ser	Tyr	Pro	Pro	Ser	Lys	Lys	Cys	Val	Thr	Cys	His	
				405					410					415		
Leu	Arg	Lys	Glu	Arg	Cys	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Ala	Ser	Phe	Ser	Asp	Tyr	
			420					425					430			
Ala	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Val	Cys	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ile	Pro	Ile	Ser	
		435					440					445				
Thr	Leu	His	Asp	Gly	Arg	Thr	Asp	Gln	Glu	Ile	Lys	Ile	Leu	Glu	Glu	
	450					455					460					
Asn	Lys	Glu	Leu	Glu	Asn	Ala	Leu	Lys	Asn	Ile	Gln	Leu	Pro	Lys	Glu	
465					470					475					480	
Glu	Ile	Lys	Lys	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Ile	Thr	Leu	Trp	Tyr	Lys	Met	
				485					490					495		
Ile	Leu	Pro	Pro	Gln	Phe	Asp	Arg	Ser	Lys	Lys	Tyr	Pro	Leu	Leu	Ile	
			500					505					510			
Gln	Val	Tyr	Gly	Gly	Pro	Cys	Ser	Gln	Ser	Val	Arg	Ser	Val	Phe	Ala	
		515					520					525				
Val	Asn	Trp	Ile	Ser	Tyr	Leu	Ala	Ser	Lys	Glu	Gly	Met	Val	Ile	Ala	
	530					535					540					
Leu	Val	Asp	Gly	Arg	Gly	Thr	Ala	Phe	Gln	Gly	Asp	Lys	Leu	Leu	Tyr	
545					550					555					560	
Ala	Val	Tyr	Arg	Lys	Leu	Gly	Val	Tyr	Glu	Val	Glu	Asp	Gln	Ile	Thr	
				565					570					575		
Ala	Val	Arg	Lys	Phe	Ile	Glu	Met	Gly	Phe	Ile	Asp	Glu	Lys	Arg	Ile	
			580					585					590			
Ala	Ile	Trp	Gly	Trp	Ser	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Val	Ser	Ser	Leu	Ala	Leu	
		595					600					605				
Ala	Ser	Gly	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Cys	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Pro	Val	
	610					615					620					
Ser	Ser	Trp	Glu	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Val	Tyr	Thr	Glu	Arg	Phe	Met	Gly	
625					630					635					640	
Leu	Pro	Thr	Lys	Asp	Asp	Asn	Leu	Glu	His	Tyr	Lys	Asn	Ser	Thr	Val	
				645					650					655		

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
705 710 715 720

His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 122
<211> 761
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 122

Met Lys Thr Trp Leu Lys Thr Val Phe Gly Val Thr Thr Leu Ala Ala
1 5 10 15

Leu Ala Leu Val Val Ile Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val Tyr
20 25 30

Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
35 40 45

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

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp Asn Ile Val Phe Tyr Asn
65 70 75 80

Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu Ser Asn Ser Thr Met Lys
85 90 95

Ser Val Asn Ala Thr Asp Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val
100 105 110

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
115 120 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Tyr
130 135 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
145 150 155 160

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro
165 170 175

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Glu Asn Arg Ile
180 185 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
195 200 205

Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Val
210 215 220

Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225 230 235 240

Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
245 250 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile Val Asp Thr Thr Tyr Pro
260 265 270

His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val Pro Glu Met Ile Ala Ser
275 280 285

Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Ser Ser Glu Arg Val
290 295 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305 310 315 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp Glu Cys Pro Lys Asn Gln
325 330 335

Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
340 345 350

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
355 360 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
370 375 380

Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Tyr Ile
385 390 395 400

Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
405 410 415

Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Asn Ser
420 425 430

Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
435 440 445

Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
450 455 460

Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
465 470 475 480

Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
485 490 495

Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val Glu Ile Lys Lys Leu Lys
500 505 510

Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
515 520 525

Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
530 535 540

Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Thr Tyr
545 550 555 560

Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
565 570 575

Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His Ala Val Tyr Arg Lys Leu
580 585 590

Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
595 600 605

Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
610 615 620

Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
625 630 635 640

Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
645 650 655

Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
660 665 670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Ile
725 730 735

Ser Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe
740 745 750

Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

<210> 123
<211> 749
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠類FAP胞外域+聚離胺酸標記+his6標記

<400> 123

Arg Pro Ser Arg Val Tyr Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu
1 5 10 15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Tyr Phe
20 25 30

Pro Asn Trp Ile Ser Glu Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp
35 40 45

Asn Ile Val Phe Tyr Asn Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu
50 55 60

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

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
85 90 95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly
100 105 110

Glu Phe Val Arg Gly Tyr Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
115 120 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130 135 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr
145 150 155 160

Gly Arg Glu Asn Arg Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
165 170 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly
180 185 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Val Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile
195 200 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile
225 230 235 240

Val Asp Thr Thr Tyr Pro His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val
245 250 255

Pro Glu Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260 265 270

Val Ser Ser Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp
290 295 300

Glu Cys Pro Lys Asn Gln Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr
325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365

Trp Glu Ala Ile Tyr Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Asn Ser Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys
420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser
435 440 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu
450 455 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val
465 470 475 480

Glu Ile Lys Lys Leu Lys Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met
485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala
515 520 525

Val Asn Trp Ile Thr Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala
530 535 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His
545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr
565 570 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile
580 585 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala

675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Ile Leu Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr
705 710 715 720

Thr His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His
740 745

<210> 124
<211> 748
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 食蟹猴FAP胞外域+聚離胺酸標記+his6標記

<400> 124

Arg Pro Pro Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
1 5 10 15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe
20 25 30

Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
35 40 45

Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
50 55 60

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

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
85 90 95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
100 105 110

Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
115 120 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130 135 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
145 150 155 160

Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
165 170 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
180 185 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
195 200 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Phe Val Arg Ile Phe Ile
225 230 235 240

Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
245 250 255

Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260 265 270

Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
290 295 300

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile
325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Asp Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr

420					425					430					
Ala	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Val	Cys	Tyr	Gly	Pro	Gly	Ile	Pro	Ile	Ser
		435					440					445			
Thr	Leu	His	Asp	Gly	Arg	Thr	Asp	Gln	Glu	Ile	Lys	Ile	Leu	Glu	Glu
	450					455					460				
Asn	Lys	Glu	Leu	Glu	Asn	Ala	Leu	Lys	Asn	Ile	Gln	Leu	Pro	Lys	Glu
465					470					475					480
Glu	Ile	Lys	Lys	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Ile	Thr	Leu	Trp	Tyr	Lys	Met
				485					490					495	
Ile	Leu	Pro	Pro	Gln	Phe	Asp	Arg	Ser	Lys	Lys	Tyr	Pro	Leu	Leu	Ile
			500					505					510		
Gln	Val	Tyr	Gly	Gly	Pro	Cys	Ser	Gln	Ser	Val	Arg	Ser	Val	Phe	Ala
		515					520					525			
Val	Asn	Trp	Ile	Ser	Tyr	Leu	Ala	Ser	Lys	Glu	Gly	Met	Val	Ile	Ala
	530					535					540				
Leu	Val	Asp	Gly	Arg	Gly	Thr	Ala	Phe	Gln	Gly	Asp	Lys	Leu	Leu	Tyr
545					550					555					560
Ala	Val	Tyr	Arg	Lys	Leu	Gly	Val	Tyr	Glu	Val	Glu	Asp	Gln	Ile	Thr
				565					570					575	
Ala	Val	Arg	Lys	Phe	Ile	Glu	Met	Gly	Phe	Ile	Asp	Glu	Lys	Arg	Ile
			580					585					590		
Ala	Ile	Trp	Gly	Trp	Ser	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Val	Ser	Ser	Leu	Ala	Leu
		595					600					605			
Ala	Ser	Gly	Thr	Gly	Leu	Phe	Lys	Cys	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Pro	Val
	610					615					620				
Ser	Ser	Trp	Glu	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Val	Tyr	Thr	Glu	Arg	Phe	Met	Gly
625					630					635					640
Leu	Pro	Thr	Lys	Asp	Asp	Asn	Leu	Glu	His	Tyr	Lys	Asn	Ser	Thr	Val
				645					650					655	
Met	Ala	Arg	Ala	Glu	Tyr	Phe	Arg	Asn	Val	Asp	Tyr	Leu	Leu	Ile	His
			660					665					670		
Gly	Thr	Ala	Asp	Asp	Asn	Val	His	Phe	Gln	Asn	Ser	Ala	Gln	Ile	Ala
		675					680					685			

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
705 710 715 720

His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 125
<211> 702
<212> PRT
<213> 智人

<400> 125

Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly
50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile
65 70 75 80

Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
85 90 95

Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile
100 105 110

Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp
115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu
130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr
165 170 175

Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn
195 200 205

Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg
210 215 220

Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
225 230 235 240

Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn
245 250 255

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
260 265 270

Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
275 280 285

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser
290 295 300

Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu
325 330 335

Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr
340 345 350

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
355 360 365

Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
370 375 380

Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Lys Leu Ser
385 390 395 400

Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
405 410 415

Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser
435 440 445

Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile
450 455 460

Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn
465 470 475 480

Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
485 490 495

Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro
500 505 510

Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln
515 520 525

Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser
530 535 540

Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn
545 550 555 560

Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser
565 570 575

Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly
580 585 590

Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly
595 600 605

Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln
610 615 620

Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu
625 630 635 640

Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
645 650 655

Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
660 665 670

Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
675 680 685

Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
690 695 700

<210> 126
<211> 257

<212> PRT
<213> 智人

<400> 126

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
100 105 110

Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
115 120 125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
180 185 190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
245 250 255

Ser

<210> 127
<211> 255
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 127

Met Ala His Leu Met Thr Val Gln Leu Leu Leu Val Met Trp Met
1 5 10 15

Ala Glu Cys Ala Gln Ser Arg Ala Thr Arg Ala Arg Thr Glu Leu Leu
20 25 30

Asn Val Cys Met Asp Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu
35 40 45

Asp Asn Leu His Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Thr Asn Ser Cys Cys
50 55 60

Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Tyr
65 70 75 80

Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Thr Met Thr Ser Glu Cys Lys Arg
85 90 95

His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly
100 105 110

Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu
115 120 125

Asp Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Gln Gln Trp Trp Glu Asp Cys
130 135 140

Gln Ser Ser Phe Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp
145 150 155 160

Ser Ser Gly His Asn Glu Cys Pro Val Gly Ala Ser Cys His Pro Phe
165 170 175

Thr Phe Tyr Phe Pro Thr Ser Ala Ala Leu Cys Glu Glu Ile Trp Ser
180 185 190

His Ser Tyr Lys Leu Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile
195 200 205

Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala
210 215 220

Arg Phe Tyr Ala Glu Ala Met Ser Gly Ala Gly Phe His Gly Thr Trp
225 230 235 240

Pro Leu Leu Cys Ser Leu Ser Leu Val Leu Leu Trp Val Ile Ser
245 250 255

<210> 128
<211> 257
<212> PRT
<213> 食蟹猴

<400> 128

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Thr Ala Arg Ala Arg Thr Glu
20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Lys Lys Asn Ala
50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
100 105 110

Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
115 120 125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu
130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Pro Val Gly Ala Ala Cys Gln
165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
180 185 190

Trp Thr Tyr Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
225 230 235 240

Ala Trp Pro Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Thr Leu Leu Trp Leu Leu
245 250 255

Ser

<210> 129
<211> 2322
<212> PRT
<213> 智人

<400> 129

Met Gln Ser Gly Pro Arg Pro Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ala Leu Thr Leu Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe
20 25 30

Phe Gly Glu Asn His Leu Glu Val Pro Val Ala Thr Ala Leu Thr Asp
35 40 45

Ile Asp Leu Gln Leu Gln Phe Ser Thr Ser Gln Pro Glu Ala Leu Leu
50 55 60

Leu Leu Ala Ala Gly Pro Ala Asp His Leu Leu Leu Gln Leu Tyr Ser
65 70 75 80

Gly Arg Leu Gln Val Arg Leu Val Leu Gly Gln Glu Glu Leu Arg Leu
85 90 95

Gln Thr Pro Ala Glu Thr Leu Leu Ser Asp Ser Ile Pro His Thr Val
100 105 110

Val Leu Thr Val Val Glu Gly Trp Ala Thr Leu Ser Val Asp Gly Phe
115 120 125

Leu Asn Ala Ser Ser Ala Val Pro Gly Ala Pro Leu Glu Val Pro Tyr
130 135 140

Gly Leu Phe Val Gly Gly Thr Gly Thr Leu Gly Leu Pro Tyr Leu Arg
145 150 155 160

Gly Thr Ser Arg Pro Leu Arg Gly Cys Leu His Ala Ala Thr Leu Asn
165 170 175

Gly Arg Ser Leu Leu Arg Pro Leu Thr Pro Asp Val His Glu Gly Cys
180 185 190

Ala Glu Glu Phe Ser Ala Ser Asp Asp Val Ala Leu Gly Phe Ser Gly
195 200 205

Pro His Ser Leu Ala Ala Phe Pro Ala Trp Gly Thr Gln Asp Glu Gly
210 215 220

Thr Leu Glu Phe Thr Leu Thr Thr Gln Ser Arg Gln Ala Pro Leu Ala
225 230 235 240

Phe Gln Ala Gly Gly Arg Arg Gly Asp Phe Ile Tyr Val Asp Ile Phe
245 250 255

Glu Gly His Leu Arg Ala Val Val Glu Lys Gly Gln Gly Thr Val Leu
260 265 270

Leu His Asn Ser Val Pro Val Ala Asp Gly Gln Pro His Glu Val Ser
275 280 285

Val His Ile Asn Ala His Arg Leu Glu Ile Ser Val Asp Gln Tyr Pro
290 295 300

Thr His Thr Ser Asn Arg Gly Val Leu Ser Tyr Leu Glu Pro Arg Gly
305 310 315 320

Ser Leu Leu Leu Gly Gly Leu Asp Ala Glu Ala Ser Arg His Leu Gln
325 330 335

Glu His Arg Leu Gly Leu Thr Pro Glu Ala Thr Asn Ala Ser Leu Leu
340 345 350

Gly Cys Met Glu Asp Leu Ser Val Asn Gly Gln Arg Arg Gly Leu Arg
355 360 365

Glu Ala Leu Leu Thr Arg Asn Met Ala Ala Gly Cys Arg Leu Glu Glu
370 375 380

Glu Glu Tyr Glu Asp Asp Ala Tyr Gly His Tyr Glu Ala Phe Ser Thr
385 390 395 400

Leu Ala Pro Glu Ala Trp Pro Ala Met Glu Leu Pro Glu Pro Cys Val
405 410 415

Pro Glu Pro Gly Leu Pro Pro Val Phe Ala Asn Phe Thr Gln Leu Leu
420 425 430

Thr Ile Ser Pro Leu Val Val Ala Glu Gly Gly Thr Ala Trp Leu Glu

435					440					445						
Trp	Arg	His	Val	Gln	Pro	Thr	Leu	Asp	Leu	Met	Glu	Ala	Glu	Leu	Arg	
450					455					460						
Lys	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Gly	Ala	Arg	His	Gly	Glu	
465					470					475					480	
Leu	Glu	Leu	Asp	Ile	Pro	Gly	Ala	Gln	Ala	Arg	Lys	Met	Phe	Thr	Leu	
485					490					495						
Leu	Asp	Val	Val	Asn	Arg	Lys	Ala	Arg	Phe	Ile	His	Asp	Gly	Ser	Glu	
500					505					510						
Asp	Thr	Ser	Asp	Gln	Leu	Val	Leu	Glu	Val	Ser	Val	Thr	Ala	Arg	Val	
515					520					525						
Pro	Met	Pro	Ser	Cys	Leu	Arg	Arg	Gly	Gln	Thr	Tyr	Leu	Leu	Pro	Ile	
530					535					540						
Gln	Val	Asn	Pro	Val	Asn	Asp	Pro	Pro	His	Ile	Ile	Phe	Pro	His	Gly	
545					550					555					560	
Ser	Leu	Met	Val	Ile	Leu	Glu	His	Thr	Gln	Lys	Pro	Leu	Gly	Pro	Glu	
565					570					575						
Val	Phe	Gln	Ala	Tyr	Asp	Pro	Asp	Ser	Ala	Cys	Glu	Gly	Leu	Thr	Phe	
580					585					590						
Gln	Val	Leu	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Glu	Arg	Arg	Asp	Gln	
595					600					605						
Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Thr	Glu	Phe	Ser	Cys	Arg	Glu	Leu	Glu	Ala	Gly	
610					615					620						
Ser	Leu	Val	Tyr	Val	His	Arg	Gly	Gly	Pro	Ala	Gln	Asp	Leu	Thr	Phe	
625					630					635					640	
Arg	Val	Ser	Asp	Gly	Leu	Gln	Ala	Ser	Pro	Pro	Ala	Thr	Leu	Lys	Val	
645					650					655						
Val	Ala	Ile	Arg	Pro	Ala	Ile	Gln	Ile	His	Arg	Ser	Thr	Gly	Leu	Arg	
660					665					670						
Leu	Ala	Gln	Gly	Ser	Ala	Met	Pro	Ile	Leu	Pro	Ala	Asn	Leu	Ser	Val	
675					680					685						
Glu	Thr	Asn	Ala	Val	Gly	Gln	Asp	Val	Ser	Val	Leu	Phe	Arg	Val	Thr	
690					695					700						

Gly Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Gln Lys Gln Gly Ala Gly Gly Val
705 710 715 720

Glu Gly Ala Glu Trp Trp Ala Thr Gln Ala Phe His Gln Arg Asp Val
725 730 735

Glu Gln Gly Arg Val Arg Tyr Leu Ser Thr Asp Pro Gln His His Ala
740 745 750

Tyr Asp Thr Val Glu Asn Leu Ala Leu Glu Val Gln Val Gly Gln Glu
755 760 765

Ile Leu Ser Asn Leu Ser Phe Pro Val Thr Ile Gln Arg Ala Thr Val
770 775 780

Trp Met Leu Arg Leu Glu Pro Leu His Thr Gln Asn Thr Gln Gln Glu
785 790 795 800

Thr Leu Thr Thr Ala His Leu Glu Ala Thr Leu Glu Glu Ala Gly Pro
805 810 815

Ser Pro Pro Thr Phe His Tyr Glu Val Val Gln Ala Pro Arg Lys Gly
820 825 830

Asn Leu Gln Leu Gln Gly Thr Arg Leu Ser Asp Gly Gln Gly Phe Thr
835 840 845

Gln Asp Asp Ile Gln Ala Gly Arg Val Thr Tyr Gly Ala Thr Ala Arg
850 855 860

Ala Ser Glu Ala Val Glu Asp Thr Phe Arg Phe Arg Val Thr Ala Pro
865 870 875 880

Pro Tyr Phe Ser Pro Leu Tyr Thr Phe Pro Ile His Ile Gly Gly Asp
885 890 895

Pro Asp Ala Pro Val Leu Thr Asn Val Leu Leu Val Val Pro Glu Gly
900 905 910

Gly Glu Gly Val Leu Ser Ala Asp His Leu Phe Val Lys Ser Leu Asn
915 920 925

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Glu Val Met Glu Arg Pro Arg His Gly Arg
930 935 940

Leu Ala Trp Arg Gly Thr Gln Asp Lys Thr Thr Met Val Thr Ser Phe
945 950 955 960

Thr Asn Glu Asp Leu Leu Arg Gly Arg Leu Val Tyr Gln His Asp Asp
965 970 975

Ser Glu Thr Thr Glu Asp Asp Ile Pro Phe Val Ala Thr Arg Gln Gly
980 985 990

Glu Ser Ser Gly Asp Met Ala Trp Glu Glu Val Arg Gly Val Phe Arg
995 1000 1005

Val Ala Ile Gln Pro Val Asn Asp His Ala Pro Val Gln Thr Ile
1010 1015 1020

Ser Arg Ile Phe His Val Ala Arg Gly Gly Arg Arg Leu Leu Thr
1025 1030 1035

Thr Asp Asp Val Ala Phe Ser Asp Ala Asp Ser Gly Phe Ala Asp
1040 1045 1050

Ala Gln Leu Val Leu Thr Arg Lys Asp Leu Leu Phe Gly Ser Ile
1055 1060 1065

Val Ala Val Asp Glu Pro Thr Arg Pro Ile Tyr Arg Phe Thr Gln
1070 1075 1080

Glu Asp Leu Arg Lys Arg Arg Val Leu Phe Val His Ser Gly Ala
1085 1090 1095

Asp Arg Gly Trp Ile Gln Leu Gln Val Ser Asp Gly Gln His Gln
1100 1105 1110

Ala Thr Ala Leu Leu Glu Val Gln Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Arg
1115 1120 1125

Val Ala Asn Gly Ser Ser Leu Val Val Pro Gln Gly Gly Gln Gly
1130 1135 1140

Thr Ile Asp Thr Ala Val Leu His Leu Asp Thr Asn Leu Asp Ile
1145 1150 1155

Arg Ser Gly Asp Glu Val His Tyr His Val Thr Ala Gly Pro Arg
1160 1165 1170

Trp Gly Gln Leu Val Arg Ala Gly Gln Pro Ala Thr Ala Phe Ser
1175 1180 1185

Gln Gln Asp Leu Leu Asp Gly Ala Val Leu Tyr Ser His Asn Gly
1190 1195 1200

Ser Leu Ser Pro Arg Asp Thr Met Ala Phe Ser Val Glu Ala Gly
1205 1210 1215

Pro Val His Thr Asp Ala Thr Leu Gln Val Thr Ile Ala Leu Glu
1220 1225 1230

Gly	Pro	Leu	Ala	Pro	Leu	Lys	Leu	Val	Arg	His	Lys	Lys	Ile	Tyr
1235						1240					1245			
Val	Phe	Gln	Gly	Glu	Ala	Ala	Glu	Ile	Arg	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu
1250						1255					1260			
Ala	Ala	Gln	Glu	Ala	Val	Pro	Pro	Ala	Asp	Ile	Val	Phe	Ser	Val
1265						1270					1275			
Lys	Ser	Pro	Pro	Ser	Ala	Gly	Tyr	Leu	Val	Met	Val	Ser	Arg	Gly
1280						1285					1290			
Ala	Leu	Ala	Asp	Glu	Pro	Pro	Ser	Leu	Asp	Pro	Val	Gln	Ser	Phe
1295						1300					1305			
Ser	Gln	Glu	Ala	Val	Asp	Thr	Gly	Arg	Val	Leu	Tyr	Leu	His	Ser
1310						1315					1320			
Arg	Pro	Glu	Ala	Trp	Ser	Asp	Ala	Phe	Ser	Leu	Asp	Val	Ala	Ser
1325						1330					1335			
Gly	Leu	Gly	Ala	Pro	Leu	Glu	Gly	Val	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Val
1340						1345					1350			
Leu	Pro	Ala	Ala	Ile	Pro	Leu	Glu	Ala	Gln	Asn	Phe	Ser	Val	Pro
1355						1360					1365			
Glu	Gly	Gly	Ser	Leu	Thr	Leu	Ala	Pro	Pro	Leu	Leu	Arg	Val	Ser
1370						1375					1380			
Gly	Pro	Tyr	Phe	Pro	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln	Val	Leu
1385						1390					1395			
Glu	Pro	Pro	Gln	His	Gly	Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Asp	Gly	Pro	Gln
1400						1405					1410			
Ala	Arg	Thr	Leu	Ser	Ala	Phe	Ser	Trp	Arg	Met	Val	Glu	Glu	Gln
1415						1420					1425			
Leu	Ile	Arg	Tyr	Val	His	Asp	Gly	Ser	Glu	Thr	Leu	Thr	Asp	Ser
1430						1435					1440			
Phe	Val	Leu	Met	Ala	Asn	Ala	Ser	Glu	Met	Asp	Arg	Gln	Ser	His
1445						1450					1455			
Pro	Val	Ala	Phe	Thr	Val	Thr	Val	Leu	Pro	Val	Asn	Asp	Gln	Pro
1460						1465					1470			
Pro	Ile	Leu	Thr	Thr	Asn	Thr	Gly	Leu	Gln	Met	Trp	Glu	Gly	Ala

1475					1480					1485				
Thr	Ala	Pro	Ile	Pro	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg	Ser	Thr	Asp	Gly	Asp
1490					1495					1500				
Ser	Gly	Ser	Glu	Asp	Leu	Val	Tyr	Thr	Ile	Glu	Gln	Pro	Ser	Asn
1505					1510					1515				
Gly	Arg	Val	Val	Leu	Arg	Gly	Ala	Pro	Gly	Thr	Glu	Val	Arg	Ser
1520					1525					1530				
Phe	Thr	Gln	Ala	Gln	Leu	Asp	Gly	Gly	Leu	Val	Leu	Phe	Ser	His
1535					1540					1545				
Arg	Gly	Thr	Leu	Asp	Gly	Gly	Phe	Arg	Phe	Arg	Leu	Ser	Asp	Gly
1550					1555					1560				
Glu	His	Thr	Ser	Pro	Gly	His	Phe	Phe	Arg	Val	Thr	Ala	Gln	Lys
1565					1570					1575				
Gln	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Lys	Gly	Ser	Gln	Thr	Leu	Thr	Val	Cys
1580					1585					1590				
Pro	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Leu	Ser	Ser	Gln	Thr	Leu	Arg	Ala	Ser
1595					1600					1605				
Ser	Ser	Ala	Gly	Thr	Asp	Pro	Gln	Leu	Leu	Leu	Tyr	Arg	Val	Val
1610					1615					1620				
Arg	Gly	Pro	Gln	Leu	Gly	Arg	Leu	Phe	His	Ala	Gln	Gln	Asp	Ser
1625					1630					1635				
Thr	Gly	Glu	Ala	Leu	Val	Asn	Phe	Thr	Gln	Ala	Glu	Val	Tyr	Ala
1640					1645					1650				
Gly	Asn	Ile	Leu	Tyr	Glu	His	Glu	Met	Pro	Pro	Glu	Pro	Phe	Trp
1655					1660					1665				
Glu	Ala	His	Asp	Thr	Leu	Glu	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Pro	Pro	Ala
1670					1675					1680				
Arg	Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Ser	Phe	Glu	Ala
1685					1690					1695				
Ala	Cys	Pro	Gln	Arg	Pro	Ser	His	Leu	Trp	Lys	Asn	Lys	Gly	Leu
1700					1705					1710				
Trp	Val	Pro	Glu	Gly	Gln	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr	Val	Ala	Ala	Leu
1715					1720					1725				

Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Leu	Ala	Ser	Val	Pro	Ser	Pro	Gln	Arg	Ser
1730						1735					1740			
Glu	His	Asp	Val	Leu	Phe	Gln	Val	Thr	Gln	Phe	Pro	Ser	Arg	Gly
1745						1750					1755			
Gln	Leu	Leu	Val	Ser	Glu	Glu	Pro	Leu	His	Ala	Gly	Gln	Pro	His
1760						1765					1770			
Phe	Leu	Gln	Ser	Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Gln	Leu	Val	Tyr	Ala	His
1775						1780					1785			
Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Gln	Gln	Asp	Gly	Phe	His	Phe	Arg	Ala	His
1790						1795					1800			
Leu	Gln	Gly	Pro	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Gly	Pro	Gln	Thr	Ser
1805						1810					1815			
Glu	Ala	Phe	Ala	Ile	Thr	Val	Arg	Asp	Val	Asn	Glu	Arg	Pro	Pro
1820						1825					1830			
Gln	Pro	Gln	Ala	Ser	Val	Pro	Leu	Arg	Leu	Thr	Arg	Gly	Ser	Arg
1835						1840					1845			
Ala	Pro	Ile	Ser	Arg	Ala	Gln	Leu	Ser	Val	Val	Asp	Pro	Asp	Ser
1850						1855					1860			
Ala	Pro	Gly	Glu	Ile	Glu	Tyr	Glu	Val	Gln	Arg	Ala	Pro	His	Asn
1865						1870					1875			
Gly	Phe	Leu	Ser	Leu	Val	Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Arg
1880						1885					1890			
Phe	Thr	Gln	Ala	Asp	Val	Asp	Ser	Gly	Arg	Leu	Ala	Phe	Val	Ala
1895						1900					1905			
Asn	Gly	Ser	Ser	Val	Ala	Gly	Ile	Phe	Gln	Leu	Ser	Met	Ser	Asp
1910						1915					1920			
Gly	Ala	Ser	Pro	Pro	Leu	Pro	Met	Ser	Leu	Ala	Val	Asp	Ile	Leu
1925						1930					1935			
Pro	Ser	Ala	Ile	Glu	Val	Gln	Leu	Arg	Ala	Pro	Leu	Glu	Val	Pro
1940						1945					1950			
Gln	Ala	Leu	Gly	Arg	Ser	Ser	Leu	Ser	Gln	Gln	Gln	Leu	Arg	Val
1955						1960					1965			
Val	Ser	Asp	Arg	Glu	Glu	Pro	Glu	Ala	Ala	Tyr	Arg	Leu	Ile	Gln
1970						1975					1980			

Gly	Pro	Gln	Tyr	Gly	His	Leu	Leu	Val	Gly	Gly	Arg	Pro	Thr	Ser
1985						1990					1995			
Ala	Phe	Ser	Gln	Phe	Gln	Ile	Asp	Gln	Gly	Glu	Val	Val	Phe	Ala
2000						2005					2010			
Phe	Thr	Asn	Phe	Ser	Ser	Ser	His	Asp	His	Phe	Arg	Val	Leu	Ala
2015						2020					2025			
Leu	Ala	Arg	Gly	Val	Asn	Ala	Ser	Ala	Val	Val	Asn	Val	Thr	Val
2030						2035					2040			
Arg	Ala	Leu	Leu	His	Val	Trp	Ala	Gly	Gly	Pro	Trp	Pro	Gln	Gly
2045						2050					2055			
Ala	Thr	Leu	Arg	Leu	Asp	Pro	Thr	Val	Leu	Asp	Ala	Gly	Glu	Leu
2060						2065					2070			
Ala	Asn	Arg	Thr	Gly	Ser	Val	Pro	Arg	Phe	Arg	Leu	Leu	Glu	Gly
2075						2080					2085			
Pro	Arg	His	Gly	Arg	Val	Val	Arg	Val	Pro	Arg	Ala	Arg	Thr	Glu
2090						2095					2100			
Pro	Gly	Gly	Ser	Gln	Leu	Val	Glu	Gln	Phe	Thr	Gln	Gln	Asp	Leu
2105						2110					2115			
Glu	Asp	Gly	Arg	Leu	Gly	Leu	Glu	Val	Gly	Arg	Pro	Glu	Gly	Arg
2120						2125					2130			
Ala	Pro	Gly	Pro	Ala	Gly	Asp	Ser	Leu	Thr	Leu	Glu	Leu	Trp	Ala
2135						2140					2145			
Gln	Gly	Val	Pro	Pro	Ala	Val	Ala	Ser	Leu	Asp	Phe	Ala	Thr	Glu
2150						2155					2160			
Pro	Tyr	Asn	Ala	Ala	Arg	Pro	Tyr	Ser	Val	Ala	Leu	Leu	Ser	Val
2165						2170					2175			
Pro	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr	Glu	Ala	Gly	Lys	Pro	Glu	Ser	Ser	Thr
2180						2185					2190			
Pro	Thr	Gly	Glu	Pro	Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Ser	Pro	Glu	Pro	Ala
2195						2200					2205			
Val	Ala	Lys	Gly	Gly	Phe	Leu	Ser	Phe	Leu	Glu	Ala	Asn	Met	Phe
2210						2215					2220			
Ser	Val	Ile	Ile	Pro	Met	Cys	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu
2225						2230					2235			

Ile Leu Pro Leu Leu Phe Tyr Leu Arg Lys Arg Asn Lys Thr Gly
2240 2245 2250

Lys His Asp Val Gln Val Leu Thr Ala Lys Pro Arg Asn Gly Leu
2255 2260 2265

Ala Gly Asp Thr Glu Thr Phe Arg Lys Val Glu Pro Gly Gln Ala
2270 2275 2280

Ile Pro Leu Thr Ala Val Pro Gly Gln Gly Pro Pro Pro Gly Gly
2285 2290 2295

Gln Pro Asp Pro Glu Leu Leu Gln Phe Cys Arg Thr Pro Asn Pro
2300 2305 2310

Ala Leu Lys Asn Gly Gln Tyr Trp Val
2315 2320

<210> 130
<211> 207
<212> PRT
<213> 智人

<400> 130

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 131
<211> 198
<212> PRT
<213> 食蟹獼猴

<400> 131

Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys
50 55 60

Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu
65 70 75 80

Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro
85 90 95

Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn
100 105 110

Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
115 120 125

Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
130 135 140

Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
145 150 155 160

Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
165 170 175

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly
180 185 190

Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195

<210> 132
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> G4S肽連接子

<400> 132

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 133
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (G4S)2

<400> 133

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 134
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (SG4)2

<400> 134

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 135
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 135

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 136

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子

<400> 136

Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 137
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子2

<400> 137

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 138
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子3

<400> 138

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 139
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子4

<400> 139

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子5

<400> 140
Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser
1 5

<210> 141
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子6

<400> 141
Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 142
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子7

<400> 142
Gly Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 143
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子8

<400> 143
Gly Gly Ser Gly
1

<210> 144
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子9

<400> 144
Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 145
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子10

<400> 145

Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 146
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子11

<400> 146

Gly Gly Asn Gly Ser Gly
1 5



【發明摘要】

【中文發明名稱】

使用經靶向之OX40促效劑的組合療法

【英文發明名稱】

COMBINATION THERAPY WITH TARGETED OX40 AGONISTS

【中文】

本發明係關於採用腫瘤靶向之雙特異性OX40抗體(尤其係抗FAP/抗OX40抗體)與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合的組合療法、此等組合療法用於治療癌症的用途及使用該等組合療法的方法。

【英文】

The present invention relates to combination therapies employing tumor targeted bispecific OX40 antibodies, in particular anti-FAP/anti-OX40 antibodies in combination with T-cell activating anti-CD3 bispecific antibodies specific for a tumor-associated antigen, the use of these combination therapies for the treatment of cancer and methods of using the combination therapies.

【指定代表圖】

圖19A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域之雙特異性OX40抗體的用途，其係用於供製造治療或延遲癌症進展的藥劑，其中該藥劑係用於與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合。

【第2項】

如請求項1之用途，其中對腫瘤相關抗原具有特異性之該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體為抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體。

【第3項】

如請求項1或2之用途，其中包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的該雙特異性OX40抗體及該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體係以單一組合物之形式一起投與或以兩種或更多種不同組合物的形式分別投與。

【第4項】

如請求項1或2之用途，其中包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的該雙特異性OX40抗體係與該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體協同性地作用。

【第5項】

如請求項1或2之用途，其中包含能夠特異性結合於腫瘤相關抗原之至少一個抗原結合域的該雙特異性OX40抗體為抗纖維母細胞活化蛋白(FAP)/抗OX40雙特異性抗體。

【第6項】

如請求項1或2之用途，其中該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於FAP之至少一個抗原結合域，該至少一個抗原結合域包含：(a)重鏈可變區(V_HFAP)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列之CDR-L3，或(b)重鏈可變區(V_HFAP)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LFAP)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之CDR-L3。

【第7項】

如請求項1或2之用途，其中該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於FAP之至少一個抗原結合域，其包含：包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)，或其中能夠特異性結合於FAP之該抗原結合域包含：包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HFAP)及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LFAP)。

【第8項】

如請求項1或2之用途，其中該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結

合於OX40之至少一個抗原結合域，該至少一個抗原結合域包含：(a)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列之CDR-L3，或 (b)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列之CDR-L3，或 (c)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之CDR-L3，或 (d)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-L1、(v)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列之CDR-L3，或 (e)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 18之胺

基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之CDR-H2，
 及(iii)包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區
 (V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR-L1、
 (v)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:
 38之胺基酸序列之CDR-L3，或 (f)重鏈可變區(V_HOX40)，其包含：(i)包
 含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 20之胺
 基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列之CDR-
 H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)包含SEQ ID NO: 29之胺基
 酸序列之CDR-L1，(v)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2，及
 (vi)包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列之CDR-L3，或 (g)重鏈可變區
 (V_HOX40)，其包含：(i)包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之CDR-H1、
 (ii)包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之CDR-H2，及(iii)包含SEQ ID
 NO: 27之胺基酸序列之CDR-H3；及輕鏈可變區(V_LOX40)，其包含：(iv)
 包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之CDR-L1，(v)包含SEQ ID NO: 33之
 胺基酸序列之CDR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之CDR-
 L3。

【第9項】

如請求項1或2之用途，其中該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結
 合於OX40之至少一個抗原結合域，該至少一個抗原結合域包含：(a)包含
 SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO:
 41之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或

(b)包含SEQ ID NO: 42之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含
 SEQ ID NO: 43之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或

(c)包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或

(d)包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 47之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或

(e)包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 49之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或

(f)包含SEQ ID NO: 50之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)，或

(g)包含SEQ ID NO: 52之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HOX40)及包含SEQ ID NO: 53之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LOX40)。

【第10項】

如請求項1或2之用途，其中該雙特異性OX40抗體包含IgG Fc域，具體言之IgG1 Fc域或IgG4 Fc域。

【第11項】

如請求項1或2之用途，其中該雙特異性OX40抗體包含Fc域，該Fc域包含減少與Fc受體之結合及/或效應物功能之一或多個胺基酸取代。

【第12項】

如請求項1或2之用途，其中該雙特異性OX40抗體包含與腫瘤相關標靶之單價結合及與OX40之四價結合。

【第13項】

如請求項1或2之用途，其中該雙特異性OX40抗體包含能夠特異性結合於OX40之第一Fab片段，其在CH1域之C端處融合至能夠特異性結合於OX40之第二Fab片段之VH域，及能夠特異性結合於OX40之第三Fab片

段，其在CH1域之C端處融合至能夠特異性結合於OX40之第四Fab片段之VH域。

【第14項】

如請求項1或2之用途，其中該雙特異性OX40抗體包含

(i)包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 55之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈，或

(ii)包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈，或

(i)包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈，或

(ii)包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列之第二重鏈及包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之四個輕鏈。

【第15項】

如請求項1或2之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體為抗CEA/抗CD3雙特異性抗體。

【第16項】

如請求項1或2之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含：包含重鏈可變區(V_HCD3)及輕鏈可變區(V_LCD3)之第一抗原結合域，及包含重鏈可變區(V_HCEA)及輕鏈可變區(V_LCEA)之第二抗原結合域。

【第17項】

如請求項1或2之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含：重鏈可變區(V_HCD3)，其包含SEQ ID NO:63之CDR-H1序列、SEQ ID NO:64之CDR-H2序列及SEQ ID NO:65之CDR-H3序列；及/或輕鏈可變區(V_LCD3)，其包含SEQ ID NO:66之CDR-L1序列、SEQ ID NO:67之CDR-L2序列及SEQ ID NO: 68之CDR-L3序列。

【第18項】

如請求項1或2之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含第一抗原結合域，該第一抗原結合域包含：重鏈可變區(V_HCD3)，其包含SEQ ID NO:69之胺基酸序列；及/或輕鏈可變區(V_LCD3)，其包含SEQ ID NO:70之胺基酸序列。

【第19項】

如請求項1或2之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含第二抗原結合域，該第二抗原結合域包含

(a)重鏈可變區(V_HCEA)，其包含SEQ ID NO: 71之CDR-H1序列、SEQ ID NO: 72之CDR-H2序列及SEQ ID NO: 73之CDR-H3序列；及/或輕鏈可變區(V_LCEA)，其包含SEQ ID NO: 74之CDR-L1序列、SEQ ID NO: 75之CDR-L2序列及SEQ ID NO: 76之CDR-L3序列，或

(b)重鏈可變區(V_HCEA)，其包含SEQ ID NO: 79之CDR-H1序列、SEQ ID NO: 80之CDR-H2序列及SEQ ID NO: 81之CDR-H3序列；及/或輕鏈可變區(V_LCEA)，其包含SEQ ID NO: 82之CDR-L1序列、SEQ ID NO: 83之CDR-L2序列及SEQ ID NO: 84之CDR-L3序列。

【第20項】

如請求項1或2之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含第二抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO:77之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCEA)及/或含有SEQ ID NO:78之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCEA)，或第二抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO:85之胺基酸序列之重鏈可變區(V_HCEA)及/或含有SEQ ID NO:86之胺基酸序列之輕鏈可變區(V_LCEA)。

【第21項】

如請求項1或2之用途，其中該抗CEA/抗CD3雙特異性抗體包含結合於CEA之第三抗原結合域。

【第22項】

如請求項1或2之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含Fc域，該Fc域包含減少與Fc受體之結合及/或效應物功能之一或多個胺基酸取代。

【第23項】

如請求項1或2之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體為抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體。

【第24項】

如請求項1或2之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含：包含重鏈可變區(V_HCD3)之第一抗原結合域、包含重鏈可變區(V_HFolR1)之第二抗原結合域及共同輕鏈可變區。

【第25項】

如請求項1或2之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含：

第一抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO:95之CDR-H1序列、SEQ ID NO:96之CDR-H2序列及SEQ ID NO:97之CDR-H3序列之重鏈可變區(V_HCD3)；第二抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO:98之CDR-H1序列、SEQ ID NO:99之CDR-H2序列及SEQ ID NO:100之CDR-H3序列之重鏈可變區(V_HFoIR1)；及共同輕鏈，其包含SEQ ID NO:101之CDR-L1序列、SEQ ID NO:102之CDR-L2序列及SEQ ID NO:103之CDR-L3序列。

【第26項】

如請求項1或2之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體包含：第一抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO:104之序列之重鏈可變區(V_HCD3)；第二抗原結合域，其包含含有SEQ ID NO:105之序列之重鏈可變區(V_HFoIR1)；及共同輕鏈，其包含SEQ ID NO:106之序列。

【第27項】

如請求項1或2之用途，其中該抗FoIR1/抗CD3雙特異性抗體包含結合於FoIR1之第三抗原結合域。

【第28項】

如請求項1或2之用途，其中該抗FoIR1/抗CD3雙特異性抗體包含：包含SEQ ID NO:107之胺基酸序列之第一重鏈、包含SEQ ID NO:108之胺基酸序列之第二重鏈及SEQ ID NO:109之共同輕鏈。

【第29項】

如請求項1或2之用途，其中該藥劑係用於與對腫瘤相關抗原具有特異性之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合及與阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑組合。

【第30項】

如請求項29之用途。其中阻斷PD-L1/PD-1相互作用之該試劑為抗PD-L1抗體或抗PD1抗體。

【第31項】

一種醫藥產品，其包含：(A)第一組合物，該第一組合物包含作為活性成分之抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及醫藥學上可接受的賦形劑；及(B)第二組合物，該第二組合物包含抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體及醫藥學上可接受的賦形劑，該等組合物係以經組合、依序或同時方式用於治療疾病，特定言之，癌症。

【第32項】

一種醫藥組合物，其包含抗FAP/抗OX40雙特異性抗體及抗CEA/抗CD3雙特異性抗體或抗FolR1/抗CD3雙特異性抗體。

【第33項】

如請求項32之醫藥組合物，其進一步包含阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑。

【第34項】

如請求項32或33之醫藥組合物，其用於治療實體腫瘤。

【第35項】

一種抗FAP/抗OX40雙特異性抗體在用於供製造治療或延遲癌症進展之藥劑的用途，其中該藥劑係用於與阻斷PD-L1/PD-1相互作用之試劑組合。

【第36項】

如請求項35之用途。其中阻斷PD-L1/PD-1相互作用之該試劑為抗

PD-L1抗體或抗PD1抗體。

【第37項】

如請求項35或36之用途，其中阻斷PD-L1/PD-1相互作用之該試劑為抗PD-L1抗體。

【第38項】

如請求項35或36之用途，其中阻斷PD-L1/PD-1相互作用之該試劑為阿特珠單抗(atezolizumab)。

