



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I853809 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：108112817

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 04 月 12 日

(51)Int. Cl.：

*C07K16/28 (2006.01)**C07K16/32 (2006.01)**C07K14/52 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)*

(30)優先權：2018/04/13

歐洲專利局

18167147.0

(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：伏拉拉 寇勒 克勞蒂亞 FERRARA KOLLER, CLAUDIA (CH)；強提拉 提姆
塔帕尼 JUNTILA, TEEMU TAPANI (FI)；克雷恩 克里斯俊 KLEIN, CHRISTIAN
(DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)；克勞斯 克莉絲汀娜 CLAUS,
CHRISTINA (DE)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 9758582B2

US 2016/0200833A1

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：16 共 271 頁

(54)名稱

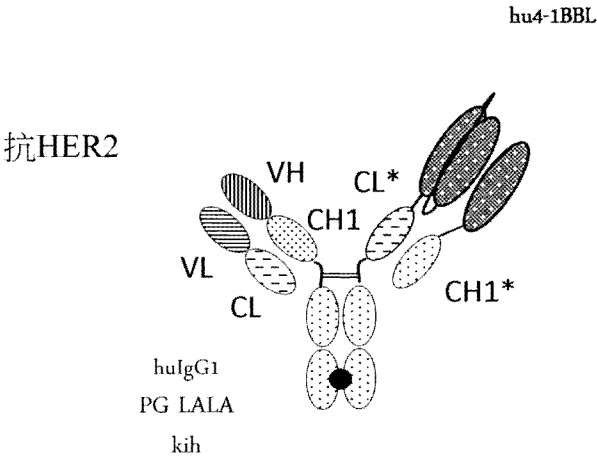
包含 4-1BBL 之靶向 HER2 的抗原結合分子

(57)摘要

本發明係關於靶向 Her2 之 4-1BB 促效劑，尤其係關於包含至少一個能夠特異性結合於 Her2 之抗原結合域的含有 4-1BBL 三聚體之抗原結合分子，及其用於治療癌症之用途以及其與 T 細胞活化抗 CD3 雙特異性抗體之組合的用途。

The invention relates to Her2 targeting 4-1BB agonists, in particular 4-1BBL trimer-containing antigen binding molecules comprising at least one antigen binding domain capable of specific binding to Her2 and their use in the treatment of cancer as well as their use in combination with T-cell activating anti-CD3 bispecific antibodies.

指定代表圖：



【圖2A】



公告本

I853809

【發明摘要】

【中文發明名稱】

包含4-1BBL之靶向HER2的抗原結合分子

【英文發明名稱】

HER2-TARGETING ANTIGEN BINDING MOLECULES
COMPRISING 4-1BBL

【中文】

本發明係關於靶向Her2之4-1BB促效劑，尤其係關於包含至少一個能夠特異性結合於Her2之抗原結合域的含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，及其用於治療癌症之用途以及其與T細胞活化抗CD3雙特異性抗體之組合的用途。

【英文】

The invention relates to Her2 targeting 4-1BB agonists, in particular 4-1BBL trimer-containing antigen binding molecules comprising at least one antigen binding domain capable of specific binding to Her2 and their use in the treatment of cancer as well as their use in combination with T-cell activating anti-CD3 bispecific antibodies.

【指定代表圖】

圖2A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

包含4-1BBL之靶向HER2的抗原結合分子

【英文發明名稱】

HER2-TARGETING ANTIGEN BINDING MOLECULES
COMPRISING 4-1BBL

【技術領域】

【0001】 本發明係關於靶向Her2之4-1BB促效劑，尤其係關於包含能夠特異性結合於Her2之抗原結合域的含4-1BBL三聚體之抗原結合分子及其用於治療癌症之用途。本發明亦係關於此等分子之製備方法及其使用方法。

【先前技術】

【0002】 4-1BB (CD137) (TNF受體超家族之成員)首先鑑別為由活化之T細胞表現的誘導性分子(Kwon及Weissman, 1989, Proc Natl Acad Sci USA 86, 1963-1967)。後續研究表明許多其他免疫細胞亦表現4-1BB，包含NK細胞、B細胞、NKT細胞、單核球、嗜中性白血球、肥大細胞、樹突狀細胞(DC)及非造血源之細胞(諸如內皮細胞及平滑肌細胞)(Vinay及Kwon, 2011, Cell Mol Immunol 8, 281-284)。4-1BB在不同細胞類型中之表現主要為誘導性的及由各種刺激信號驅動，諸如T細胞受體(TCR)或B細胞受體觸發以及經由促炎性細胞激素之協同刺激分子或受體誘發的信號傳導(Diehl等人, 2002, J Immunol 168, 3755-3762; Zhang等人, 2010, Clin Cancer Res 13, 2758-2767)。

【0003】 已 於1993年 鑑 別4-1BB配 位 體(4-1BBL或

CD137L)(Goodwin等人, 1993, Eur J Immunol 23, 2631-2641)。已展示4-1BBL之表現限定於專門的抗原呈遞細胞(APC), 諸如B細胞、DC及巨噬細胞上。4-1BBL之誘導性表現為T細胞(包括 $\alpha\beta$ 及 $\gamma\delta$ T細胞子集兩者)及內皮細胞之特徵(Shao及Schwarz, 2011, J Leukoc Biol 89, 21-29)。

【0004】經由4-1BB受體(例如藉由4-1BBL連接)之協同刺激活化T細胞內之多個信號級聯($CD4^+$ 及 $CD8^+$ 子集兩者), 從而大大加強T細胞活化(Bartkowiak及Curran, 2015)。與TCR觸發組合, 促效4-1BB特異性抗體增強T細胞之增殖、刺激淋巴激素分泌及降低T淋巴細胞對活化誘導之細胞死亡的靈敏度(Snell等人, 2011, Immunol Rev 244, 197-217)。此機理在癌症免疫療法中作為第一概念驗證而進一步經推進。在臨床前模型中, 對抗4-1BB之促效抗體在負載腫瘤小鼠中之投與引起有效抗腫瘤效應(Melero等人, 1997, Nat Med 3, 682-685)。之後, 累積證據指示4-1BB通常僅在與其他免疫調節化合物、化學治療藥劑、腫瘤特異性接種疫苗或放射線療法組合投與時展現其作為抗腫瘤劑之效能(Bartkowiak及Curran, 2015, Front Oncol 5, 117)。

【0005】TNFR超家族之信號傳導需要三聚配位體之交聯以與受體接合, 4-1BB促效抗體同樣需要野生型Fc結合(Li及Ravetch, 2011, Science 333, 1030-1034)。然而, 全身性投與具有功能活性Fc域之4-1BB特異性促效抗體引起與肝臟毒性相關的 $CD8^+$ T細胞之流入(Dubrot等人, 2010, Cancer Immunol Immunother 59, 1223-1233), 此在小鼠體內無功能性Fc受體存在下減弱或顯著改善。在臨床中, Fc勝任型4-1BB促效Ab (BMS-663513) (NCT00612664)引起導致試驗終止的4級肝炎(Simeone及Ascierto, 2012, J Immunotoxicol 9, 241-247)。因此, 需要有效且更安全

的4-1BB促效劑。

【0006】 人類表皮生長因子受體-2 (Her2 ; ErbB2)為受體酪胺酸激酶及跨膜受體之表皮生長因子受體(EGFR)家族之成員。Her2在一系列腫瘤類型中過度表現，且已牽涉到疾病引發及進展。其與不良預後相關聯。舉例而言，在大致30%之人類乳癌中觀測到Her2之過度表現，且其牽涉到與此等腫瘤相關之侵襲性生長及不佳臨床結果(Slamon等人(1987) Science 235:177-182)。

【0007】 人類化抗Her2單株抗體曲妥珠單抗(CAS 180288-69-1，HERCEPTIN®，huMAb4D5-8，rhuMAb Her2，Genentech)靶向HER-2之細胞外域(US 5677171；US 5821337；US 6054297；US 6165464；US 6339142；US 6407213；US 6639055；US 6719971；US 6800738；US 7074404；Coussens等人(1985) Science 230:1 132-9；Slamon等人(1989) Science 244:707-12；Slamon等人(2001) New Engl. J. Med. 344:783-792)。已顯示曲妥珠單抗抑制過表達HER-2之人類腫瘤細胞的增殖，且為抗體依賴性細胞毒性ADCC的介體(Hudziak等人(1989) Mol Cell Biol 9:1 165-72；Lewis等人(1993) Cancer Immunol Immunother; 37:255-63；Baselga 等人(1998) Cancer Res. 58:2825-2831；Hotaling等人(1996) [摘要]. Proc. Annual Meeting Am Assoc Cancer Res; 37:471；Pegram MD等人(1997) [摘要]. Proc Am Assoc Cancer Res; 38:602；Sliwkowski等人(1999) Seminars in Oncology 26(4), 增刊12:60- 70；Yarden Y.及Sliwkowski, M. (2001) Nature Reviews: Molecular Cell Biology, Macmillan Magazines, Ltd., 第2卷:127-137)。

【0008】 在1998年，批准HERCEPTIN® (曲妥珠單抗，Genentech

Inc.)用於治療患有過度表現Her2之轉移性乳癌的患者(Baselga等人(1996) J. Clin. Oncol. 14:737-744)。在2006年，FDA批准HERCEPTIN®作為含有小紅莓、環磷醯胺及太平洋紫杉醇之治療方案之一部分，用於輔助治療患有Her2陽性、結節陽性乳癌之患者。

【0009】 帕妥珠單抗(亦稱為重組人類化單株抗體2C4、rhuMAb 2C4、PERJETA®，Genentech, Inc, South San Francisco)為靶向Her2之另一抗體治療。帕妥珠單抗為Her二聚化抑制劑(HDI)，且用於抑制Her2與其他Her受體(諸如EGFR/Her 1、Her2、Her3及Her4)形成活性雜二聚體或均二聚體之能力。參見例如Harari及Yarden Oncogene 19:6102-14 (2000)；Yarden及Sliwkowski. Nat Rev Mol Cell Biol 2:127-37 (2001)；Sliwkowski, Nat Struct Biol 10:158-9 (2003)；Cho等人 Nature 421:756-60 (2003)；及Malik等人, Pro Am Soc Cancer Res 44:176-7 (2003)；US 7560111。在2012年，首先批准PERJETA®與曲妥珠單抗及多烯紫杉醇組合用於治療患有晚期或後期(轉移性) Her2陽性乳癌之患者。同時，亦批准使用曲妥珠單抗及帕妥珠單抗之組合療法，用於新輔助(手術前)治療Her2陽性、局部晚期、發炎性或早期乳癌，及用於輔助(手術後)治療處於高復發風險下之Her2陽性早期乳癌(EBC)。咸信帕傑它(Perjeta)及賀癌平(Herceptin)之作用機制彼此互補，因為兩者均與Her2受體結合，但結合於不同位置。認為帕傑它及賀癌平之組合提供對HER信號傳導路徑之更全面的雙重阻斷，因此預防腫瘤細胞生長及存活。

【0010】 針對人類ErbB2之域II、III及IV之雙特異性二價Her2抗體揭示於WO 2012/143523中。包含抗體rhuMab 2C4及hu4D5之最佳化變體之雙特異性HER-2抗體(稱為Herceptarg)已描述於WO 2015/091738中。

【0011】 儘管充分證實了曲妥珠單抗在乳癌中之治療功效，但因為耐藥性仍有許多患者不能自曲妥珠單抗獲益。鑒於缺乏表現低水準之Her2之特定癌症的有效抗Her2療法、對目前療法之耐受性及Her2相關癌症的發病率，需要新療法來治療此類癌症。

【0012】 本發明之新抗原結合分子將抗Her2抗原結合域與能夠形成協同刺激4-1BB配位體三聚體且足夠穩定以在醫藥學上適用之部分組合。包含針對CD137之結合特異性及針對Her2/neu之結合特異性的融合蛋白揭示於WO 2016/177802中。此等分子為抗體-脂質運載蛋白突變蛋白融合多肽，意謂具有針對CD137之結合特異性的脂質運載蛋白突變蛋白融合至抗Her2抗體。脂質運載蛋白突變蛋白(抗運載蛋白)為非抗體骨架且將此類模態轉化為分化藥物具挑戰性(Vazquez-Lombardi等人 2015, Drug Discovery Today 20, 1271-1283)。相比於抗體，挑戰可鑒於不同血清半衰期、組織穿透性及免疫原性而產生。因此，仍需要基於抗體技術或人類樣蛋白的具有改良特性之候選藥物。

【發明內容】

【0013】 本發明之新抗原結合分子將抗Her2抗原結合域與能夠形成協同刺激4-1BBL三聚體且足夠穩定以在醫藥學上適用之部分組合。出人意料地，本發明之抗原結合分子提供一種三聚合且因此具生物活性的人類4-1BB配位體，但三聚4-1BBL胞外域中之一者位於與分子之其他兩個4-1BBL胞外域不同的另一多肽上。由抗Her2抗原結合域靶向，本發明之抗原結合分子對腫瘤位點具有增加之活性，包含天然人類4-1BB配位體且因此應相比於習知4-1BB促效抗體或更人工的融合蛋白強加較少安全性問題。

【0014】 在一個態樣中，本發明提供一種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

- (a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，
- (b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含藉由肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其片段，及在於第二多肽包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，及

- (c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成。

【0015】 在一特定態樣中，本發明提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中4-1BBL之胞外域或其片段包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7及SEQ ID NO:8，特定言之胺基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5。

【0016】 在另一態樣中，本發明提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

- (a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，
- (b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含選自由SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群的胺基酸序列，及在於第二多肽包含選自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:3及SEQ ID NO:4組成之群的胺基酸序列，及

- (c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成。

【0017】 在一個態樣中，Fc域為IgG，尤其為IgG1 Fc域或IgG4 Fc

域。更特定言之，Fc域為IgG1 Fc域。在一個特定態樣中，Fc域包含可促進Fc域之第一及第二次單位之締合的修飾。在特定態樣中，本發明提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中Fc域包含杵-臼(knob-into-hole)修飾，其促進Fc域之第一及第二次單位的締合。在一特定態樣中，本發明提供一種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中Fc域之第一次單位包含胺基酸取代S354C及T366W (根據Kabat EU索引編號)且Fc域之第二次單位包含胺基酸取代Y349C、T366S、L368A及Y407V (根據Kabat EU索引編號)。

【0018】 在另一態樣中，本發明係關於如前文所定義之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成之Fc域，其中Fc域包含一或多個降低與Fc受體，尤其與Fcγ受體之結合的胺基酸取代。特定言之，Fc域包含IgG重鏈之位置234及235 根據Kabat之EU編號)及/或329 根據Kabat之EU編號)處之胺基酸取代。特定言之，提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中Fc域為包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G (根據Kabat EU索引編號)之IgG1 Fc域。

【0019】 在一個態樣中，含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子為一者，其中能夠特異性結合於Her2之抗原結合域為能夠特異性結合於Her2之Fab分子。在另一態樣中，能夠特異性結合於Her2之抗原結合域為能夠特異性結合於Her2之交叉Fab分子或scFV分子。

【0020】 在一個態樣中，本發明提供如前文所描述之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含一個能夠特異性結合於Her2之Fab域，意謂其包含與Her2之單價結合。

【0021】 在另一態樣中，提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分

子，其中能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含

(a)包含以下之VH域：(i) CDR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:13，(ii) CDR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:14，及(iii) CDR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:15，及包含以下之VL域：(iv) CDR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:16，(v) CDR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:17，及(vi) CDR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:18，或

(b)包含以下之VH域：(i) CDR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:21，(ii) CDR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:22，及(iii) CDR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:23，及包含以下之VL域：(iv) CDR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:24，(v) CDR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:25，及(vi) CDR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:26，或

(c) 包含以下之VH域：(i) CDR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:29，(ii) CDR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:30，及(iii) CDR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:31，及包含以下之VL域：(iv) CDR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:32，(v) CDR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:33，及(vi) CDR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:34。

【0022】 在另一態樣中，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含

(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO:19之VH域及包含胺基酸序列SEQ ID NO:20之VL域，或

(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO:27之VH域及包含胺基酸序列SEQ ID NO:28之VL域，或

(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO:35之VH域及包含胺基酸序列SEQ ID

NO:36之VL域。

【0023】 在另一態樣中，提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

第一重鏈及第一輕鏈，其均包含能夠特異性結合於Her2之Fab分子，

第二重鏈及第二輕鏈，分別地，該第二重鏈包含恆定域及藉由第一肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其片段，在其C端藉由第二肽連接子融合至第二重鏈或輕鏈，

該第二輕鏈包含恆定域及該4-1BBL之一個胞外域或其片段，在其C端藉由第三肽連接子融合至第二輕鏈或重鏈。更特定言之，提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中包含藉由第一肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其片段的第一肽在其C端藉由第二肽連接子融合至作為重鏈之一部分的CL域，且包含該4-1BBL之一個胞外域或其片段之第二肽在其C端藉由第三肽連接子融合至作為輕鏈之一部分的CH1域。

【0024】 在特定態樣中，本發明係關於如上文所定義之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中肽連接子為(G4S)₂，亦即SEQ ID NO:68之肽連接子。在一個態樣中，肽連接子在所有情況下為(G4S)₂。

【0025】 亦提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中在與TNF配位體家族成員相鄰之CL域中，位置123 (EU編號)處之胺基酸已由精胺酸(R)置換且位置124 (EU編號)處之胺基酸已經離胺酸(K)取代，且其中在與TNF配位體家族成員相鄰之CH1域中，位置147 (EU編號)及位置213 (EU編號)處之胺基酸已經麩胺酸(E)取代。

【0026】 在另一態樣中，提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(i)第一重鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:19之VH域，及第一輕鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:20之VL域，或

第一重鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:27之VH域，及第一輕鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:28之VL域，或

第一重鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:35之VH域，及第一輕鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:36之VL域，

(ii)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41及SEQ ID NO:43，及

(iii)第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:44。

【0027】 在一特定態樣中，提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO:45之第一重鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:46之第一輕鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:37之第二重鏈及包含胺基酸序列SEQ ID NO:38之第二輕鏈，或

(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO:47之第一重鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:48之第一輕鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:37之第二重鏈及包含胺基酸序列SEQ ID NO:38之第二輕鏈，或

(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO:49之第一重鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:50之第一輕鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:37之第二重鏈及包含胺基酸序列SEQ ID NO:38之第二輕鏈。

【0028】 根據本發明之另一態樣，提供經分離核酸分子，其編碼如前文所定義之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子。本發明另外提供載

體，特定言之表達載體，其包含本發明之經分離核酸分子，及包含本發明之經分離核酸或載體之宿主細胞。在一些實施例中，宿主細胞為真核細胞，尤其為哺乳動物細胞。

【0029】 在另一態樣中，提供一種產生本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子的方法，其包含在適合於表現含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之條件下培養本發明之宿主細胞，及分離含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子。本發明亦涵蓋藉由本發明之方法產生之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子。

【0030】 本發明另外提供一種醫藥組合物，其包含本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。在另一態樣中，提供一種醫藥組合物，其包含本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑，進一步包含額外治療劑，例如化學治療劑及/或其他用於癌症免疫療法之藥劑。在另一態樣中，提供一種醫藥組合物，其進一步包含T細胞活化抗CD3雙特異性抗體，尤其為抗Her2/抗CD3雙特異性抗體。

【0031】 本發明亦涵蓋本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或本發明之醫藥組合物，其用作藥劑。在一個態樣中，提供本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或本發明之醫藥組合物，其用於治療有需要之個體之疾病。在一特定實施例中，提供本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或本發明之醫藥組合物，其用於治療癌症。在另一態樣中，提供本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或本發明之醫藥組合物，其用於上調或延長細胞毒T細胞活性。在另一態樣中，提供本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或本發明之醫藥組合物，其用於治

療癌症，其中含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子係與另一治療劑，特定言之T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合使用。在一個態樣中，T細胞活化抗CD3雙特異性抗體係與含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子同時、在其之前或在其之後投與。

【0032】亦提供本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之用途，其用於製造供治療有需要之個體之疾病用之藥劑，尤其用於製造供治療癌症用之藥劑，以及治療個體之疾病之方法，其包含向該個體投與治療有效量的組合物，該組合物包含呈醫藥學上可接受之形式的如本文所揭示之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子。在一特定態樣中，疾病為癌症。另外提供本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之用途，其用於製造供治療癌症用之藥劑，其中含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子係與T細胞活化抗CD3雙特異性抗體，特定言之抗Her2/抗CD3抗體組合使用。此外，提供一種治療患有癌症之個體之方法，其包含向個體投與有效量的本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，或其醫藥組合物，及有效量的T細胞活化抗CD3雙特異性抗體，特定言之抗Her2/抗CD3抗體。亦提供上調或延長患有癌症之個體的細胞毒性T細胞活性之方法，其包含向個體投與有效量的本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或本發明之醫藥組合物。在任一上述實施例中，個體較佳為哺乳動物，特定言之人類。

【圖式簡單說明】

【0033】

圖1展示用於組裝單價Her2靶向裂解型三聚4-1BB配位體Fc融合物抗原結合分子之組分。圖1A展示二聚4-1BB配位體，其在C端與具有突變E123R及Q124K (帶電變異體)之人類IgG1-CL域融合，且圖1B展示單體4-

1BB配位體，在其C端與具有突變K147E及K213E (帶電變異體)之人類IgG1-CH1域融合。

圖2A示意性地說明包含CH-CL交換與帶電殘基之單價Her2靶向裂解型三聚4-1BB配位體Fc (kih)融合物抗原結合分子之結構。粗黑點表示杵-臼修飾。*表示CH1及CL域中之胺基酸修飾(所謂的帶電變異體)。**圖2B**說明小鼠替代，亦即雙特異性4-1BB抗體，其對於小鼠4-1BB具有二價結合且對於Her2具有單價結合(抗-4-1BB/抗Her2 moIgG1 DDKK DAPG，稱為mu4-1BB-Her2)。粗黑點表示DD/KK杵-臼修飾。DAPG突變消除融合蛋白經由小鼠Fc γ 受體之交聯或互補序列之結合但允許結合於FcRn，以使得分子保持其抗體樣藥物動力學。

圖3A展示用於本發明之含有Her2靶向裂解型三聚4-1BB配位體之抗原結合分子之同時結合之SPR實驗的設定。Her2 (PER)-4-1BBL (分析物1)與固定人類4-1BB及人類Her2 (分析物2)之同時結合顯示於**圖3B**中。Her2 (aff PER)-4-1BBL與人類4-1BB及人類Her2之同時結合顯示於**圖3C**中。

圖4A至4D展示在細胞表面上藉由人類乳癌細胞株SK-Br3 (圖4A及4C)或人類胃癌細胞株NCI-N87 (圖4B及4D)表現之Her2靶向4-1BB裂解型三聚配位體Fc融合物抗原結合分子與Her2之結合。呈現Her2結合子帕妥珠單抗(PER)或親和力成熟帕妥珠單抗(aff-PER)或融合蛋白Her2 (TRAS)-抗運輸蛋白4-1BB huIgG4 (如專利WO2016/177802中所述)或前述促效抗人類4-1BB抗體抗人類4-1BB純系20H4.9 huIgG4 (US7659384 B2中所述)或抗人類4-1BB純系MOR-7480 huIgG2 (WO 2012/032433中所述)或對照分子(如圖例中所指示)之Her2靶向裂解型4-1BBL抗原結合分

子係與表現Her2之細胞株SK-BR3 (圖4A及4C)或NCI-N87 (圖4B及4D)以如X軸中所指示之不同濃度一起培育。隨後，洗掉過多及未結合分子且用次級結合PE結合之抗人類Fc片段特異性山羊IgG F(ab')₂片段偵測結合分子。螢光強度中值(MFI)係藉由流式細胞測量術來量測且以劑量依賴型方式指示測試分子之親和力(單價結合子)或親合力(二價結合子)。值為藉由減去空白對照(例如僅用第2偵測片段染色)校正之基線，顯示的為平均值 $\pm$ -SEM。

圖5A及5B說明在細胞表面上藉由人類乳癌細胞株KPL-4表現之Her2靶向裂解型三聚4-1BB配位體Fc融合物抗原結合分子與Her2之結合。包含Her2結合子PER、aff-PER或曲妥珠單抗(TRAS)、融合蛋白Her2(TRAS)-抗運載蛋白4-1BB huIgG4 (如專利WO2016/177802中所述)或前述促效抗人類4-1BB抗體20H4.9 huIgG4或MOR-7480 huIgG2或對照分子(如圖例中所指示)之Her2靶向裂解型4-1BBL抗原結合分子係與表現Her2之細胞株KL-4以如X軸中所指示之不同濃度一起培育。隨後，洗掉過多及未結合分子且用次級結合PE結合之抗人類Fc片段特異性山羊IgG F(ab')₂片段偵測結合分子。螢光強度中值(MFI)係藉由流式細胞測量術來量測且以劑量依賴型方式指示測試分子之親和力(單價結合子)或親合力(二價結合子)。值為藉由減去空白對照(例如僅用第2偵測片段染色)校正之基線，顯示的為平均值 $\pm$ -SEM。

圖6顯示說明在表現人類4-1BB之Jurkat報導子細胞株之情況下的NF κ B活化分析之一般原則的流程。表現於報導子細胞上之人類4-1BB之交聯誘導NF κ B活化及NF κ B介導之螢光素酶表現。在細胞溶解之後，螢光素酶可催化螢光素氧化成氧化螢光素。此化學反應與NF κ B介導之螢光素

酶表現之強度正相關且可藉由發光強度(所釋放之光之單元)量測。

Jurkat-hu4-1BB-NF κ B-luc2報導子細胞株中NF κ B介導之螢光素酶活性展示於圖7A至7F中。在96孔盤中，Jurkat-hu4-1BB-NF κ B-luc2報導子細胞與不同濃度(指示於x軸中)之Her2 (PER)-4-1BBL或Her2 (PER)-4-1BBL分子或融合蛋白Her2 (TRAS)-抗運載蛋白4-1BB huIgG4或促效抗人類4-1BB抗體20H4.9 huIgG4或MOR-7480 huIgG2或對照分子(如圖例中所指示)一起培育。不存在Her2+細胞之情況下的結果展示於圖7A及7D中，存在人類Her2+乳癌細胞株SK-Br3之情況下的結果展示於圖7B及7E中，或存在Her2+人類胃癌細胞株NCI-N87之情況下的結果展示於圖7C及7F中。報導子細胞與表現Her2之腫瘤細胞以1:5之比一起培育6小時。隨後，細胞經洗滌，溶解且與螢光素一起在偵測緩衝液中培育。螢光素之螢光素酶催化之氧化係經由光發射以釋放光單位(y軸)形式偵測。顯示的為平均值 $\pm$ SEM。所有值為藉由減去基線光發射校正之基線。

比較Her2 (PER)-4-1BBL與Her2 (TRAS)-4-1BBL之第二實驗之結果展示於圖8A至8H中。在348孔盤中，Jurkat-hu4-1BB-NF κ B-luc2報導子細胞與不同濃度(指示於x軸中)之Her2 (PER)-4-1BBL或Her2 (TRAS)-4-1BBL或融合蛋白Her2 (TRAS)-抗運載蛋白4-1BB huIgG4或促效抗人類4-1BB抗體20H4.9 huIgG4或MOR-7480 huIgG2或對照分子(如圖例中所指示)一起培育。顯示當以報導子細胞株:腫瘤細胞株1:5比率給出時，在不存在(圖8A及8E)或存在人類Her2+乳癌細胞株SK-Br3 (圖8B及8F)之情況下，在存在人類乳癌細胞株KPL-4 (圖8C及8G)或Her2+人類胃癌細胞株NCI-N87 (圖8D及8H)之情況下，Jurkat-hu4-1BB-NF κ B-luc2報導子細胞株中持續6小時之NF κ B介導之螢光素酶表現。細胞經洗滌，溶解且與螢光

素一起在偵測緩衝液中培育。螢光素之螢光素酶催化之氧化係經由光發射以釋放光單位(y軸)形式偵測。顯示的為平均值 $\pm$ SEM。所有值為藉由減去基線光發射校正之基線。

圖9顯示說明如實例3.2.2中所述之人類PBMC之情況下之活化分析之一般原則的流程。T細胞係在表現Her2在胃癌NCI-N87細胞存在下藉由2 nM促效CD3抗體活化且經不同濃度之促效4-1BB分子協同刺激。內含物/孔包含50 Gy輻照之 2×10^4 個NCI-N87細胞、 7.5×10^4 個CFSE標記之人類PBMC、2 nM促效抗人類CD3人類IgG wt (純系V9)及不同濃度之Her2靶向4-1BB促效分子(此處顯示為Her2-4-1BBL)。將細胞培育4天且接著藉由流式細胞測量術測定T細胞活化。

結果在**圖10A至10F**中顯示為CD8⁺ T細胞之活化。自健康供體之白血球層分離之靜息PBMC係在表現Her2之胃癌NCI-N87細胞存在下經2 nM促效CD3抗體活化且經不同濃度之促效4-1BB分子(如x軸及圖例中所指示)協同刺激4天。細胞以活CD8⁺ T細胞門控且分析其CD25⁺ (**圖10A及10D**)、顆粒酶B^高 (**圖10B及10E**)或增殖(低CFSE MFI)CD8⁺ T細胞(**圖10C及10F**)之頻率。顯示的為平均值 $\pm$ SD。

CD4⁺ T細胞之活化顯示於**圖11A至11F**中。自健康供體之白血球層分離之靜息PBMC係在表現Her2之胃癌NCI-N87細胞存在下經2 nM促效CD3抗體活化且經不同濃度之促效4-1BB分子(如x軸中所指示)協同刺激4天。細胞以活CD4⁺ T細胞門控且分析其CD25⁺ (**圖11A及11D**)、顆粒酶B^高 (**圖11B及11E**)或增殖(低CFSE MFI) CD4⁺ T細胞(**圖11C及11F**)之頻率。顯示的為平均值 $\pm$ SD。

圖12顯示說明如實例3.2.3中所述之小鼠脾細胞之情況下之活化分析

之一般原則的流程。T細胞在表現Her2之人類乳癌細胞株KPL-4存在下經0.5 $\mu\text{g/mL}$ (約3.6 nM)促效抗小鼠CD3亞美尼亞倉鼠IgG抗體(純系1452C11)活化且經不同濃度之促效小鼠替代物mu4-1BB-Her2協同刺激。內含物/孔包含50 Gy經輻照之 2×10^4 個KPL-4細胞、 15×10^4 個紫色增殖染料標記之小鼠脾細胞、0.5 $\mu\text{g/mL}$ (約3.6 nM)促效抗小鼠CD3亞美尼亞倉鼠IgG抗體(純系1452C11)及不同濃度之小鼠替代物mu4-1BB-Her2或非靶向對照mu4-1BB muIgG1 DAPG。將細胞培育3天且接著藉由流式細胞測量術測定T細胞活化。

結果在圖13A至13D中顯示為小鼠CD8⁺及CD4⁺ T細胞之活化。自C57BL/6脾分離之靜息小鼠脾細胞係在表現Her2在人類乳癌KPL-4細胞存在下經0.5 $\mu\text{g/mL}$ (約3.6 nM)促效抗小鼠CD3亞美尼亞倉鼠IgG抗體(純系1452C11)活化且經不同濃度之小鼠替代物mu4-1BB-Her2或非靶向對照(如x軸及圖例中所指示)協同刺激3天。細胞以活CD8⁺或CD4⁺ T細胞門控且分析其CD25⁺表現(圖13A及13C)或增殖(低紫色增殖染料MFI)(圖13B及13D)之頻率。顯示的為每點之技術一式三份的平均值 $\pm$ SD。

在圖14A中，顯示抗Her2/抗CD3雙特異性抗體(Her2 TDB)與Her2 (PER)-4-1BBL之組合之T細胞活化及單一藥劑之T細胞活化。藉由單獨的Her2 TDB以及兩種藥劑之組合誘發穩定T細胞活化。抗Her2/抗CD3雙特異性抗體(Her2 TDB)與Her2 (PER)-4-1BBL之組合及單一藥劑之靶細胞殺死顯示於圖14B中。

抗Her2/抗CD3雙特異性抗體(Her2 TDB)與Her2 (PER)-4-1BBL之組合之T細胞增殖分析的結果展示於圖15A及15B中。添加HER2-4-1BBL顯著增強抗HER2/CD3-TDB誘導之活體外T細胞增殖/存活。

圖16A至16D顯示如在植入有表現人類HER2之Fo5腫瘤同種異體移植且用媒劑(圖16A)、單獨的Her2 TDB (圖14B)、單獨的mu 4-1BB-Her2小鼠替代物(圖14C)以及Her2 TDB及mu 4-1BB-Her2之組合(圖14D)治療之免疫勝任型小鼠中觀測到的腫瘤生長動力學(線性標度)。顯示所有治療組之各動物之個別腫瘤生長動力學。CR意謂在研究結束時無可偵測腫瘤，PR意謂相比於第0天觀測到腫瘤縮小至少50%。與mu4-1BB-Her2促效劑組合治療之七隻小鼠中之四隻(57%)在研究結束時無可偵測腫瘤的情況下展示完全反應(CR=57%)。

【實施方式】

【0034】

定義

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。

【0035】 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。

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)。

【0036】如本文所用，術語「**能夠特異性結合於Her2之抗原結合域**」或「**能夠特異性結合於Her2之部分**」係指特異性結合於Her2之多肽分子。在一個態樣中，抗原結合域能夠經由Her2活化或抑制信號傳導。在特定態樣中，抗原結合域能夠將其所連接之實體(例如4-1BBL三聚體)導引至靶位點，例如攜有Her2之特定類型的腫瘤細胞。能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包括如本文進一步所定義之抗體及其片段。關於抗體或其片段，術語「**能夠特異性結合於目標細胞抗原之部分**」係指分子之一部分，其包含特異性結合於一部分或所有抗原且與其互補之區域。可例如藉由一或多個抗體可變域(亦稱為抗體可變區)提供能夠進行特異性抗原結合之部分。特定言之，能夠進行特異性抗原結合之部分包含抗體輕鏈可變區(VL)及抗體重鏈可變區(VH)。

【0037】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，只要其展現所需抗原結合活性即可。

【0038】如本文所用，術語「**單株抗體**」係指獲自基本上均質之抗體群體的抗體，亦即包含群體之個別抗體為相同的及/或結合相同抗原決定基，除了可能的變異抗體，例如含有天然存在之突變或在生產單株抗體製劑期間產生，此類變異體一般少量存在。相比於典型地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。

【0039】如本文所使用，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。典型地，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。

【0040】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。因此，術語「單價」、「二價」、「四價」及「六價」分別表示在抗原結合分子中存在一個結合位點、兩個結合位點、四個結合位點及六個結合位點。

【0041】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大體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)之雜四聚體醣蛋白，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。抗體之重鏈可歸為五種類型之一，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 κ 及 λ 。

【0042】「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、交換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，參見例如Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenberg及Moore編, Springer-Verlag, New York, 第269-315頁 (1994)；亦參見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；參見例如美國專利第6,248,516B1號)。可藉由各種技術製得抗體片段，包括但不限於完整抗體之蛋白水解消化以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌或噬菌體)產生，如本文所述。

【0043】 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攜有游離硫醇基之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。

【0044】術語「**交換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互換之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互換，亦即交換型Fab分子包含由輕鏈可變區(VL)及重鏈恆定區(CH1)構成的肽鏈，及由重鏈可變區(VH)及輕鏈恆定區(CL)構成的肽鏈。此交換型Fab分子亦稱為互換Fab_(VLVH)。另一方面，當Fab重鏈及輕鏈之恆定區互換時，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分子亦稱為交換Fab_(CLCH1)。

【0045】「**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。該單鏈Fab片段經由CL域與CH1域之間的天然雙硫鍵穩定化。另外，此等單鏈Fab分子可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。

【0046】「**互換型單鏈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。另外，此等x-scFab分子可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。

【0047】「單鏈可變片段(scFv)」為抗體之重鏈(V_H)及輕鏈(V_L)之可變區之融合蛋白，其與具有10至約25個胺基酸之短連接肽連接。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域一起組裝至功能性抗原結合位點)或VL域(亦即能夠與VH域一起組裝至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。

【0048】「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(DARPins)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)。CTLA-4 (細胞毒性T淋巴細胞相關抗原4)為表現於大部分CD4⁺ T細胞上之CD28家族受體。其細胞外域具有可變域類Ig摺疊。對應於抗體之CDR之環可經異源序列取代以賦予不同結合特性。經工程改造以具有不同結合特異性之CTLA-4分子亦稱為艾維伯迪(Evibodies)(例如US7166697B1)。艾維伯迪與抗體(例如域抗體)之經分離可變區的尺寸大致相同。關於其他細節，參見Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)。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目標抗原。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。親和抗體為來源於金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)之蛋白A的骨架，其可經工程改造以結合至抗原。域由具有約58個胺基酸之三螺旋束組成。已藉由表面殘基之隨機化產生文庫。關於其他細節，參見Protein Eng. Des. Sel. 2004, 17, 455-462及EP 1641818A1。高親合性多聚體為來源於A-域骨架家族之多域蛋

白質。約35個胺基酸之原生域採用既定二硫鍵鍵結之結構。藉由改組由A-域之家族呈現之天然變化來產生多樣性。關於其他細節，參見Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005)及Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (2007年6月)。運鐵蛋白係單體血清傳遞醣蛋白。運鐵蛋白可藉由在允許的表面環中插入肽序列而經工程改造，以結合不同目標抗原。經工程改造之運鐵蛋白骨架之實例包括反式體。關於其他細節，參見J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)。經設計之錨蛋白重複蛋白質(DARPs)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目標抗原。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。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。纖維結合蛋白為可經工程改造以結合於抗原之骨架。纖連蛋白由III型人類纖維結合蛋白(FN3)之15個重複單元之第10個域之天然胺基酸序列之主鏈組成。 β -夾層結構之一端處的三個環可經工程改造以使纖連蛋白能夠特異性識別相關治療目標。關於其他細節，參見Protein Eng. Des. Sel. 18, 435- 444 (2005)、US20080139791、WO2005056764及US6818418B1。肽適體為組合性識別分子，其由恆定骨架蛋白(通常為硫氧還蛋白(TrxA))組成，該恆定骨架

蛋白含有在活性位點處插入之限制性可變肽環。關於其他細節，參見Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005)。微體來源於天然存在之長度為25-50個胺基酸之微型蛋白質，其含有3-4個半胱胺酸橋，微型蛋白質之實例包括KalataBI及芋螺毒素(conotoxin)及打結素。微型蛋白質具有環，其可經工程改造以包括至多25個胺基酸而不影響微型蛋白質之整體摺疊。關於經工程改造之打結素域之其他細節，參見WO2008098796。

【0049】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目標抗原。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)、Biodrugs 19(5), 279-288 (2005)、US7250297B1及US20070224633。

【0050】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50%以上，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50%以上。

【0051】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。

【0052】 術語「**能夠特異性結合於Her2**」係指能夠以足夠親和力結合於Her2，以使得抗原結合分子適用作靶向Her2之診斷及/或治療劑之抗原結合分子。抗原結合分子包括但不限於抗體、Fab分子、交換型Fab分子、單鏈Fab分子、Fv分子、scFv分子、單域抗體以及VH及骨架抗原結合蛋白。在一個態樣中，抗Her2抗原結合分子與無關、非Her2蛋白質之結合程度小於抗原結合分子與Her2之結合的約10%，如例如藉由表面電漿子共振(SPR)所量測。特定言之，能夠特異性結合於Her2在抗原結合分子具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 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)之解離常數(K_d)。在某些態樣中，抗Her2抗原結合分子結合至來自不同物種之Her2。特定言之，抗Her2抗原結合分子結合於人類及食蟹獼猴Her2。

【0053】 術語「**抗原決定基**」表示抗[[PRO]]抗體所結合之抗原上之蛋白質位點或非蛋白質位點。抗原決定基可由以下方式形成：連續胺基酸伸展(線性抗原決定基)；或包含例如由於抗原之摺疊(亦即藉由蛋白質抗原之三級摺疊)而在空間上鄰近的非連續胺基酸(構形抗原決定基)。線性抗原決定基通常在蛋白質抗原暴露於變性劑之後仍與抗體結合，而構形抗原決定基通常在用變性劑處理之後被破壞。抗原決定基在獨特空間構形

中包含至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個或8-10個胺基酸。

【0054】「抗原決定基4D5」或「4D5抗原決定基」或「4D5」為抗體4D5 (ATCC CRL 10463)及曲妥珠單抗所結合之HER2之細胞外域中的區域。此抗原決定基接近HER2之跨膜域，且在HER2在域IV內。為了篩選結合至4D5抗原決定基之抗體，可進行諸如Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及David Lane (1988)中所述之常規交叉阻斷分析。或者，可進行抗原決定基定位以評估抗體是否結合至HER2之4D5抗原決定基(例如人類HER2 (SEQ ID NO:54)之約殘基550至約殘基610 (包括端點)之區域中之任何一或多個殘基。

【0055】「抗原決定基2C4」或「2C4抗原決定基」為抗體2C4所結合之HER2之細胞外域中之區域。為了篩選與2C4抗原決定基結合之抗體，可進行常規交叉阻斷分析，諸如Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及David Lane (1988)中所描述之彼交叉阻斷分析。或者，可進行抗原決定基定位以評估抗體是否結合至HER2之2C4抗原決定基。抗原決定基2C4包含來自HER2之細胞外域中之域II的殘基。2C4抗體及帕妥珠單抗在域I、II及III之接合點處與HER2之細胞外域結合(Franklin等人，Cancer Cell 5:317-328 (2004))。

【0056】「**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定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，抗原結合分子與無關蛋白質之結合程度小於抗原結合分子與抗原之結合的約10%，如例如藉由SPR所量測。在某些實施例中，結合於抗原之分子具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 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)之解離常數(Kd)。

【0057】「**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)之間的總非共價相互作用的強度。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(分別為 $k_{\text{離}}$ 及 $k_{\text{合}}$)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具體方法為表面電漿子共振(SPR)。

【0058】如本文所用，「**靶細胞抗原**」係指靶細胞(例如T細胞或B細胞，一種腫瘤細胞，諸如癌細胞或腫瘤基質細胞)表面上所呈遞的抗原決定子。在某些態樣中，靶細胞抗原為癌細胞之表面上的抗原。在一個態樣中，靶細胞抗原為Her2。

【0059】術語「**Her2**」，亦稱為「ErbB2」、「ErbB2受體」或「c-Erb-B2」係指任何天然、成熟HER2，其由加工細胞中之HER2前驅蛋白產生。除非另外指示，否則該術語包括來自任何脊椎動物來源，包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類及食蟹獼猴)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)之HER2。該術語亦包括天然存在之HER2變異體，例如剪接變異體或

對偶基因變異體。例示性人類HER2蛋白之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO:54中。

【0060】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。

【0061】如本文所用之「**T細胞活化治療劑**」係指能夠在個體內誘導T細胞活化之治療劑，特定言之經設計用於在個體內誘導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)及目標細胞抗原(諸如CEA或葉酸類受體)的雙特異性抗體。

【0062】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級聯來誘導T細胞活化。例示性活化T細胞抗原為CD3。

【0063】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)及啮齒動物(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CD3之任何形式。該術語亦涵蓋天然存在之CD3之變異體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。在一個實施例中，CD3為人類CD3，特定言之人類CD3之 ϵ 次單位(CD3 ϵ)。人類CD3 ϵ 之胺基酸序列顯示於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:85。食蟹獼猴[*Macaca fascicularis*] CD3 ϵ 之胺基酸序列顯示於NCBI GenBank第BAB71849.1號中。亦參見

SEQ ID NO:86。

【0064】術語「可變域」或「可變區」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。天然抗體之重鏈及輕鏈(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異性。

【0065】如本文所用，術語「高變區」或「HVR」係指抗原結合可變域中序列高變且決定抗原結合特異性之區(例如「互補決定區」(「CDR」))中之每一者。一般而言，抗原結合域包含六個CDR：三個在VH中(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)，且三個在VL中(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。本文中之例示性CDR包括：

(a)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)處之高變環(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))；

(b)出現在胺基酸殘基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)及95-102 (H3)處之CDR (Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版，公共衛生署，美國國家衛生研究院，Bethesda, MD (1991))；及

(c)出現在胺基酸殘基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)及93-101 (H3)處之抗原觸點(MacCallum等人, *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996))。

【0066】除非另外指示，否則CDR係根據Kabat等人，前述測定。熟

習此項技術者應理解，CDR名稱亦可根據Chothia, 前述，McCallum, 前述，或任何其他科學上可接受的命名法確定。Kabat等人亦定義適用於任何抗體的可變區序列編號系統。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。

【0067】如本文所用，在抗原結合分子(例如抗體)之情形下，術語「**親和力成熟**」係指衍生於參考抗原結合分子(例如藉由突變)之抗原結合分子，其與同參考抗體相同的抗原結合，較佳地同相同的抗原決定基結合；且與參考抗原結合分子相比對抗原具有更高親和力。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。

【0068】「**構架**」或「FR」係指除高變區(HVR)殘基之外的可變域殘基。可變域之FR一般由四個FR域組成：FR1、FR2、FR3及FR4。因此，HVR及FR序列一般在VH (或VL)中按以下順序出現：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0069】出於本文之目的，「**接受體人類構架**」為包含來源於如以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。

【0070】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。

【0071】抗體之「**類別**」係指其重鏈所具有之恆定域或恆定區的類型。存在五種主要抗體類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且其中若干者可進一步分成亞類(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 。

【0072】術語「**衍生自人源之恆定區**」或「**人類恆定區**」指示亞類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4之人類抗體之恆定重鏈區及/或恆定輕鏈 κ 或 λ 區。此類恆定區在目前先進技術中為熟知的，且例如由Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)描述(亦參見例如，Johnson, G.,及Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218；Kabat, E.A.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788)。除非本文中另外規定，否則恆定區中之胺基酸殘基之編號係根據EU編號系統，亦稱為Kabat EU索引，如Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National

Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242中所述。

【0073】「**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，人類化抗體將包含基本上全部的至少一個，及通常兩個可變域，其中全部或基本上全部HVR (例如CDR)對應於非人類抗體之彼等，且全部或基本上全部FR對應於人類抗體在彼等。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。

【0074】「**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。

【0075】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端區。該術語包括原生序列Fc區及變異型Fc區。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，宿主細胞所產生之抗體可在重鏈C端經歷一或多個(特定言之，一或兩個)胺基酸之轉譯後裂解。因此，宿主細胞藉由表現編碼全長重鏈之特定核酸分子產生的抗體可包括全長重鏈，或其可包括全長重鏈之裂解變異體。在重鏈之最末兩個C端胺基酸為甘胺酸(G446)及離胺酸(K447，根據Kabat EU索引編號)的情況下，情況可為如此。因此，Fc區

之C端離胺酸(Lys447)或C端甘胺酸(Gly446)及離胺酸(Lys447)可存在或可不存在。若不另外指示，則包括Fc區的重鏈之胺基酸序列在本文中表示為無C端甘胺酸-離胺酸二肽。在一個實施例中，包括如本文指定之Fc區、包含於根據本發明之抗體中的重鏈包含另一C端甘胺酸-離胺酸二肽(G446及K447，根據Kabat EU索引編號)。在一個實施例中，包括如本文指定之Fc區、包含於根據本發明之抗體中之重鏈包含另一C端甘胺酸殘基(G446，根據Kabat EU索引編號)。除非本文另外說明，否則Fc區或恆定區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 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述。IgG Fc區包含IgG CH2及IgG CH3域。人類IgG Fc區之「CH2域」通常自約231位之胺基酸殘基延伸至約340位之胺基酸殘基。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C端至Fc區中之CH2域之伸展(亦即自約位置341處之胺基酸殘基至IgG之約位置447處之胺基酸殘基)。本文中之CH3區可在其一條鏈中為天然序列CH3域或變異型CH3域(例如具有引入之「隆凸」(「杵」)之CH3域且在其另一條鏈中為對應引入之「空腔」(「臼」)；參見明確以引用的方式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。

【0076】「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，方法包括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空腔(「臼」),使得隆凸可定位於空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空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。隆凸及空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,結修飾包含Fc域之兩個次單位中之一者中之胺基酸取代T366W,且孔修飾包含Fc域之兩個次單位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域之次單位另外包含胺基酸取代S354C,且包含臼修飾之Fc域之次單位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區之兩個次單位之間形成二硫橋鍵,由此進一步穩定二聚體(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。編號係根據Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 美國公共衛生署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD, 1991之EU索引。

【0077】 「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異體以及具有變化之變異體,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。此類變異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))。

【0078】 術語「**效應功能**」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之細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)、細胞因子分泌、免疫複合體介導之抗原經抗原呈遞細胞吸收、細胞表面受體(例如B細胞受體)下調及B細胞活化。

【0079】「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)。

【0080】術語「TNF配位體家族成員」或「TNF家族配位體」係指促炎性細胞激素。細胞激素通常(且特定言之TNF配位體家族之成員)在免疫系統之刺激及配位中起重要作用。當前，基於序列、功能性及結構類似性，已發現十九種細胞激素為TNF (腫瘤壞死因子)配位體超家族之成員。所有此等配位體皆為具有C端細胞外域(胞外域)、N端細胞內域及單一跨膜域之II型跨膜蛋白質。C端細胞外域(稱為TNF同源性域(THD))在超家族成員之間具有20-30%胺基酸一致性且負責結合於受體。TNF胞外域亦負責TNF配位體以形成三聚複合物，其由其特異性受體而被識別。TNF配位體家族之成員係選自由以下組成之群：淋巴毒素α (亦稱為LTA或TNFSF1)、TNF (亦稱為TNFSF2)、LTβ (亦稱為TNFSF3)、OX40L (亦稱為TNFSF4)、CD40L (亦稱為CD154或TNFSF5)、FasL (亦稱為CD95L、CD178或TNFSF6)、CD27L (亦稱為CD70或TNFSF7)、CD30L (亦稱為CD153或TNFSF8)、4-1BBL (亦稱為TNFSF9)、TRAIL (亦稱為

APO2L、CD253或TNFSF10)、RANKL (亦稱為CD254或TNFSF11)、TWEAK (亦稱為TNFSF12)、APRIL (亦稱為CD256或TNFSF13)、BAFF (亦稱為CD257或TNFSF13B)、LIGHT (亦稱為CD258或TNFSF14)、TL1A (亦稱為VEGI或TNFSF15)、GITRL (亦稱為TNFSF18)、EDA-A1 (亦稱為外異蛋白A1)及EDA-A2 (亦稱為外異蛋白A2)。除非另有指示，否則該術語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TNF家族配位體。術語「**共刺激性TNF配位體家族成員**」或「**共刺激性TNF家族配位體**」係指TNF配位體家族成員之子群，其能夠共刺激T細胞之增殖及細胞激素產生。此等TNF家族配位體可在與其相應TNF受體相互相用時共刺激TCR信號且與其受體之相互相用可引起TNFR相關因子(TRAF)之募集，其起始可引起T細胞活化之信號級聯。協同刺激TNF家族配位體係選自由以下組成之群：4-1BBL、OX40L、GITRL、CD70、CD30L及LIGHT，更特定言之，協同刺激TNF配位體家族成員為4-1BBL。

【0081】如上文中所描述，4-1BBL為II型跨膜蛋白及TNF配位體家族中之一個成員。已描述具有SEQ ID NO:69之胺基酸序列的完全或全長4-1BBL可形成細胞表面上之三聚體。藉由4-1BBL之胞外域之特異性移動實現三聚體之形成。該等動機在本文中稱為「三聚化區」。人類4-1BBL序列(SEQ ID NO:70)之胺基酸50-254形成4-1BBL之細胞外域，但即使其片段亦能夠形成三聚體。在本發明之特定實施例中，術語「4-1BBL之胞外域或其片段」係指具有選自SEQ ID NO:4 (人類4-1BBL之胺基酸52-254)、SEQ ID NO:1 (人類4-1BBL之胺基酸71-254)、SEQ ID NO:3 (人

類4-1BBL之胺基酸80-254)及SEQ ID NO:2 (人類4-1BBL之胺基酸85-254)之胺基酸序列的多肽或具有選自SEQ ID NO:5 (人類4-1BBL之胺基酸71-248)、SEQ ID NO:8 (人類4-1BBL之胺基酸52-248)、SEQ ID NO:7 (人類4-1BBL之胺基酸80-248)及SEQ ID NO:6 (人類4-1BBL之胺基酸85-248)之胺基酸序列的多肽，但本文中亦包括能夠三聚合之胞外域之其他片段。

【0082】 「胞外域」為膜蛋白中延伸至細胞外空間(亦即靶細胞外之空間)的域。胞外域通常為蛋白質中起始與表面之接觸(其引起信號轉導)之部分。因此，如本文所定義之TNF配位體家族成員之胞外域係指TNF配位體蛋白質中延伸至細胞外空間(細胞外域)之部分，但亦包括負責三聚作用及結合於相應TNF受體之更短部分或其片段。因此，術語「TNF配位體家族成員之胞外域或其片段」係指TNF配位體家族成員之細胞外域，其形成仍能夠結合於受體(受體結合域)之細胞外域或其部分。

【0083】 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。適合之非免疫原性連接肽為例如 $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 或 $G_4(SG_4)_n$ 肽連接子，其中「n」一般為1與10之間，通常1與4之間的數值，尤其為2，亦即選自由以下組成之群的肽：GGGGS (SEQ ID NO:71)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:68)、SGGGGSGGGG (SEQ ID NO:72)、 $(G_4S)_3$ 或GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:73)、GGGGSGGGGSGGGG或 $G_4(SG_4)_2$ (SEQ ID NO:74)，及 $(G_4S)_4$ 或GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:75)，且亦包括序列GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:76)、GSGSGSGS (SEQ ID NO:77)、GSGSGNGS (SEQ ID NO:78)、

GGSGSGSG (SEQ ID NO:79)、GGSGSG (SEQ ID NO:80)、GGSG (SEQ ID NO:81)、GGSGNGSG (SEQ ID NO:82)、GGNGSGSG (SEQ ID NO:83)及GGNGSG (SEQ ID NO:84)。備受關注之肽連接子為 $(G_4S)_1$ 或GGGGS (SEQ ID NO:71)、 $(G_4S)_2$ 或GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:68)及 $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:73)。

【0084】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)。

【0085】如本文所用，「**融合多肽**」或「**融合蛋白**」係指由抗體片段及並非衍生自抗體之肽構成之單鏈多肽。在一個態樣中，融合多肽由融合至一部分抗原結合域或Fc部分之4-1BBL之一或兩個胞外域或其片段構成。融合可藉由經由肽連接子將抗原結合部分在N端或C端胺基酸直接連接至該4-1BBL之胞外域或其片段之C端或N端胺基酸來進行。

【0086】「**融合**」或「**連接**」意謂組分(例如該TNF配位體家族成員之多肽及胞外域)係藉由肽鍵直接連接或經由一或多個肽連接子連接。

【0087】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法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.設計，且原始程式碼已在美國著作權局(U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559申請用戶文檔，其在此註冊在美國版權註冊第TXU510087號下。ALIGN-2程序可公開獲自Genentech, Inc., South San Francisco, California，或可自原始碼編寫。ALIGN-2程式經編譯可用於UNIX操作系統，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數由ALIGN-2程式設定且不變化。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：

$$100 \times \text{分數} X/Y$$

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%將不相等。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。

【0088】 在某些實施例中，涵蓋本文中提供之含有TNF配位三聚體

之抗原結合分子的胺基酸序列變異體。舉例而言，可能需要改良含有TNF配位三聚體之抗原結合分子之結合親和力及/或其他生物特性。含有TNF配位三聚體之抗原結合分子之胺基酸序列變異體可藉由將適合的修飾引入編碼核苷酸序列之分子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B中且在下文中參考胺基酸側鏈分類(1)至(6)進一步描述。胺基酸取代可引入至所關注之分子及產物中，其針對所需活性，例如保留/改良之抗原結合、減少之免疫原性或改良之ADCC或CDC而進行篩選。

表A

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
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

【0089】 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)影響鏈定向之殘基：Gly、Pro；

(6)芳族：Trp、Tyr、Phe。

【0090】 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類別。

【0091】 術語「**胺基酸序列變異體**」包括大量變異體，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，選擇用於進一步研究之所得變異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/或將基本上保留親本抗原結合分子之某些生物特性。例示性取代型變異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)進行篩選。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，基本上不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)可在CDR中進行。一種適用於鑑別突變誘發可靶向之抗體殘基或區域的方法稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所述。在此方法中，殘基或靶殘基組(例如

帶電殘基，諸如Arg、Asp、His、Lys及Glu)經鑑別且經中性或帶負電胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)置換以確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。可篩選變異體以確定其是否含有所需特性。

【0092】 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含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子。分子之其他插入型變異體包括N或C端與多肽之融合，此增加含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之血清半衰期。

【0093】 在某些實施例中，本文提供之含有4-1BBL三聚體之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異體。當含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含Fc區時，可改變與其連接之碳水化合物。由哺乳動物細胞產生之天然抗體通常包含分支鏈雙觸角寡醣，其一般藉由N鍵附接於Fc區之CH2域的Asn297。參見例如Wright等人 *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡醣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，以及附接於雙觸角寡醣結構之「主幹」中之GlcNAc上的岩藻糖。在一些實施例中，可進行含有4-1BBL配位三聚體之抗原結合分子中寡糖之修飾以產生具有某些改良之特性的變異體。在一個態樣中，提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子的

變異體，其具有不含與Fc區連接(直接或間接)之岩藻糖的碳水化合物結構。此類岩藻糖基化變異體可具有改良之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)。本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之其他變異體包括具有平分寡醣之變異體，例如其中連接至Fc區之雙觸角寡醣由GlcNAc平分。此類變異體可具有降低之岩藻糖基化及/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)。亦提供寡醣中之至少一個半乳糖殘基與Fc區連接之抗體變異體。此類抗體變異體可具有改良之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。

【0094】 在某些實施例中，可能需要產生本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之**半胱胺酸工程化變異體**，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)。半胱胺酸工程改化抗原結合分子可如例如美國專利第7,521,541號中所述地產生。

【0095】 在某些態樣中，本文中提供之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子可經進一步修飾以含有此項技術中已知且可容易地獲得之其他非蛋白質部分。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

溶性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、聚葡萄糖、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)及聚葡萄糖或聚(n-乙烯吡咯啉酮)聚乙二醇、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。附接至抗體上之聚合物的數目可變化，且若附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確定。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。

【0096】 在另一態樣中，可獲得本文所提供之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之免疫結合物。「**免疫結合物**」為抗體與一或多個異源分子，包括但不限於細胞毒性劑之結合物。

【0097】 術語「**核酸分子**」或「**聚核苷酸**」包括含核苷酸聚合物之任何化合物及/或物質。各核苷酸由鹼基，特定言之嘌呤或嘧啶鹼基(亦即胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))、糖(亦即脫氧核糖或核糖)及磷酸基構成。通常，核酸分子係用鹼基序列描述，由

此該等鹼基表示核酸分子之一級結構(線性結構)。鹼基序列通常係自5'至3'表示。在本文中，術語核酸分子涵蓋脫氧核糖核酸(DNA)，包括例如互補DNA (cDNA)及基因組DNA；核糖核酸(RNA)，特別是信使RNA(mRNA)；合成形式之DNA或RNA；及包含兩個或兩個以上該等分子之混合聚合物。核酸分子可以為線性或環形的。此外，術語核酸分子包括有義股及反義股，以及單股及雙股形式。另外，本文中描述之核酸分子可含有天然存在或非天然存在之核苷酸。非天然存在之核苷酸之實例包括帶有衍生化糖或磷酸酯主鏈鍵聯或化學修飾之殘基的經修飾核苷酸鹼基。核酸分子亦涵蓋DNA及RNA分子，其適用作在活體外及/或活體內，例如在宿主或患者體內直接表現本發明抗體之載體。此類DNA (例如cDNA)或RNA (例如mRNA)載體可為未修飾或經修飾的。舉例而言，mRNA可經化學修飾以增強RNA載體在穩定性及/或編碼分子之表現，以使得mRNA可注射至個體中以及在活體內產生抗體(參見例如Stadler等人, Nature Medicine 2017, 2017年6月12日在線公佈, doi:10.1038/nm.4356或EP 2 101 823 B1)。

【0098】「分離之」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。

【0099】一種核酸或聚核苷酸之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，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%一致可使用已知電腦程式，諸如針對多肽在上文所述之電腦程式(例如ALIGN-2)習知地測定。

【0100】術語「**表現卡匣**」係指以重組或合成方式產生之聚核苷酸，其具有容許特定核酸在靶細胞中發生轉錄的一系列指定核酸元件。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。

【0101】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

因在目標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。

【0102】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)，且亦包括轉殖基因動物、轉殖基因植物或培養植物或動物組織內所含的細胞。

【0103】藥劑之「**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。

【0104】藥劑，例如醫藥組合物之「**治療有效量**」係指在所需劑量下且持續所需時段有效地獲得所需治療或預防結果之量。舉例而言，治療有效量之藥劑可消除、減少、延遲、最小化或預防疾病之副作用。

【0105】「**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(例如人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、兔及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)。特定言之，個體為人類。

【0106】術語「**醫藥組合物**」係指所呈形式允許其中所含活性成分之生物活性有效發揮的製劑，且其不含對調配物將投與之個體具有不可接受毒性之其他組分。

【0107】「**醫藥學上可接受之賦形劑**」係指醫藥組合物中除活性成分以外之對個體無毒的成分。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。

【0108】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。

【0109】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，改善或緩和疾病病狀及緩解或改良預後。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。

【0110】如本文所使用，術語「**癌症**」係指增生性疾病，諸如淋巴瘤、癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤、白血病、淋巴球性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、細支氣管肺泡細胞肺癌、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌、

胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、結腸直腸癌(CRC)、胰臟癌、乳癌、三陰性乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌症、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎臟或輸尿管之癌症、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞癌、膽癌、中樞神經系統(CNS)之贅瘤、脊柱軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、神經鞘瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、腦脊髓膜瘤、鱗狀細胞癌、垂體腺瘤及尤文氏肉瘤(Ewings sarcoma)、黑素瘤、多發性骨髓瘤、B細胞癌(淋巴瘤)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、急性淋巴母細胞白血病(ALL)、毛細胞白血病、慢性骨髓母細胞白血病，包括以上癌症中之任一者之頑抗性形式，或以上癌症中之一或多者之組合。

【0111】 「Her2陽性」癌症包含具有高於正常Her2水準之癌細胞。Her2陽性癌症之實例包括Her2陽性乳癌及Her2陽性胃癌。視情況，Her2陽性癌症具有2+或3+之免疫組織化學(IHC)評分及/或>2.0之原位雜交(ISH)擴增比。

【0112】 術語「早期乳癌(EBC)」或「早期乳癌」在本文中用於指尚未擴散超出乳房或腋淋巴結之乳癌。此包括乳管原位癌及I期、IIA期、IIB期及IIIA期乳癌。

【0113】 將腫瘤或癌症稱為「0期」、「I期」、「II期」、「III期」或「IV期」及此分類內之各種亞期指示使用此項技術中已知之總體期分組或羅馬數字分期方法的腫瘤或癌症分類。儘管癌症之實際期視癌症類型而定，一般而言，0期癌症為原位病變，I期癌症為小的局部腫瘤，II期及III

期癌症為呈現涉及局部淋巴結之局部晚期腫瘤，而IV期癌症表示轉移癌。各腫腫瘤類型之特定期為熟練臨床醫師已知的。

【0114】術語「轉移性乳癌」意謂乳癌狀態，其中藉由血管或淋巴管，癌細胞自初始位點傳輸至體內一或多個其他位點，在除乳房以外之一或多個器官中形成一或多個繼發性腫瘤。

【0115】「晚期」癌症為藉由局部侵襲或癌轉移已在起始位點或器官外部擴散之癌症。因此，術語「晚期」癌症包括局部晚期及轉移性疾病兩者。

【0116】「復發性」癌症為在對初始療法，諸如手術起反應後，在初始位點或遠距離位點處已再生長的癌症。「局部復發性」癌症為治療後在與先前治療之癌症相同的位置處再出現的癌症。「可手術」或「可切除」癌症為被限制於初始器官且適合於手術(切除)的癌症。「不可切除」或「不可切除性」癌症不能夠藉由手術移除(切除)。

【0117】

本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子

本發明提供新穎的含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其具有尤其有利特性，諸如可生產性、穩定性、結合親和力、生物活性、靶向功效、降低之毒性及降低之免疫原性。

【0118】在第一態樣中，本發明提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

- (a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，
- (b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含藉由肽連接子彼此連接

之4-1BBL之兩個胞外域或其片段，及在於第二多肽包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，及

(c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成。

【0119】 在另一態樣中，提供一種如上文所定義之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於

(i)分別地，第一多肽含有CH1或CL域及第二多肽含有CL或CH1域，其中第二多肽藉由CH1域與CL域之間的雙硫鍵連接至第一多肽，且其中第一多肽包含4-1BBL之兩個胞外域或其片段，該等胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH1或CL域，且其中第二多肽包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CL或CH1域，或

(ii)分別地，第一多肽含有CH3域且第二多肽含有CH3域，且其中第一多肽包含4-1BBL之兩個胞外域或其片段，該等胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH3域之C端，且其中第二多肽僅包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CH3域之C端，或

(iii)分別地，該第一多肽含有VH-CL或VL-CH1域且該第二多肽含有VL-CH1域或VH-CL域，其中該第二多肽藉由該CH1與CL域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，且其中該第一多肽包含4-1BBL之兩個胞外域或其片段，該兩個胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至VH或VL，

且其中該第二多肽包含該TNF配位體家族成員之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之VL或VH，及

(c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成。

【0120】 在另一態樣中，提供一種如上文所定義之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於

(i)分別地，第一多肽含有CH1或CL域及第二多肽含有CL或CH1域，其中第二多肽藉由CH1域與CL域之間的雙硫鍵連接至第一多肽，且其中第一多肽包含4-1BBL之兩個胞外域或其片段，該等胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH1或CL域，且其中第二多肽包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CL或CH1域，或

(ii)分別地，第一多肽含有CH3域且第二多肽含有CH3域，且其中第一多肽包含4-1BBL之兩個胞外域或其片段，該等胞外域或其片段藉由肽連接子彼此連接且連接至CH3域之C端，且其中第二多肽僅包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，該胞外域或其片段經由肽連接子連接至該多肽之CH3域之C端，及

(c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成。

【0121】 在一個態樣中，4-1BBL之胞外域包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7及SEQ ID

NO:8，特定言之胺基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5。更特定言之，4-1BBL之胞外域包含胺基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5。最特定言之，4-1BBL之胞外域包含胺基酸序列SEQ ID NO:5。特定言之，提供如上文所定義之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中4-1BBL之所有三個胞外域或其片段相同。

【0122】 在另一態樣中，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含

(a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含選自由SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11及SEQ ID NO:12組成之群的胺基酸序列，及在於第二多肽包含選自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:3及SEQ ID NO:4組成之群的胺基酸序列，及

(c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成。

【0123】 在一個態樣中，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含

(a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含胺基酸序列SEQ ID NO:10及在於第二多肽包含胺基酸序列SEQ ID NO:5，及

(c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成。

【0124】 在另一態樣中，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含

(a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含胺基酸序列SEQ ID NO:9及在於第二多肽包含胺基酸序列SEQ ID NO:1，及

(c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成。

【0125】 在另一態樣中，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含

(a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，

(b)分別地，含有CH1或CL域之第一多肽及含有CL或CH1域之第二多肽，其中該第二多肽藉由該CH1與CL域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，

且其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含4-1BBL之兩個胞外域或其片段，其藉由肽連接子彼此連接及連接至CH1或CL域，及在於第二多肽僅包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，其藉由肽連接子連接至該多肽之CL或CH1域。

【0126】 在一個態樣中，提供一種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，

(b)含有CH1域之第一多肽及含有CL域之第二多肽，其中第二多肽藉由CH1與CL域之間的雙硫鍵連接至第一多肽，

且其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含4-1BBL之兩個胞外域或其片段，其藉由肽連接子彼此連接及連接至CH1域，及在於第二多肽僅包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，其經由肽連接子連接至該多肽之CL

域。

【0127】 在另一態樣中，本發明提供一種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)一個能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含藉由肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其片段，及在於第二多肽包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，及

(c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成。

【0128】 在又一態樣中，本發明提供一種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)超過一個能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含藉由肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其片段，及在於第二多肽包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，及

(c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成。

【0129】 在一個態樣中，本發明提供一種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)兩個能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含藉由肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其片段，及在於第二多肽包含4-1BBL之一個胞

外域或其片段，及

(c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成。

【0130】 在另一態樣中，本發明提供如上文所定義之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於Her2之抗原結合域選自由以下組成之群：抗體、抗體片段及骨架抗原結合蛋白。

【0131】 在一個態樣中，提供如前文所描述之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於Her2之抗原結合域選自由以下組成之群：抗體片段、Fab分子、交換型Fab分子、單鏈Fab分子、Fv分子、scFv分子、單域抗體或aVH及骨架抗原結合蛋白。在一個態樣中，能夠特異性結合於Her2之抗原結合域為aVH或骨架抗原結合蛋白。

【0132】 在特定態樣中，提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於Her2之抗原結合域為能夠特異性結合於Her2之Fab分子或交換型Fab分子。特定言之，能夠特異性結合於Her2之抗原結合域為能夠特異性結合於Her2之Fab。

【0133】 在另一態樣中，提供根據本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中包含藉由第一肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其片段的肽在其C端藉由第二肽連接子融合至重鏈之CH1域，且其中該4-1BBL之一個胞外域或其片段在其C端藉由第三肽連接子融合至輕鏈之CL域。

【0134】 在另一態樣中，提供根據本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中包含藉由第一肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其片段的肽在其C端藉由第二肽連接子融合至重鏈之CL域，且其中該4-1BBL之一個胞外域或其片段在其C端藉由第三肽連接子融合至輕鏈

之CH1域。

【0135】 在另一態樣中，本發明係關於根據本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中包含藉由第一肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其片段的肽在其C端藉由第二肽連接子融合至輕鏈之CL域，且其中該4-1BBL之一個胞外域或其片段在其C端藉由第三肽連接子融合至重鏈之CH1域。

【0136】 在特定態樣中，本發明係關於如上文所定義之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中肽連接子為(G4S)₂。在一個態樣中，第一肽連接子為(G4S)₂ (SEQ ID NO:68)，第二肽連接子為(G4S)₂ (SEQ ID NO:68)且第三肽連接子為(G4S)₂ (SEQ ID NO:68)。

【0137】 在另一態樣中，如上文所定義之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含由能夠穩定結合之第一及第二次單位構成之Fc域。

【0138】 特定言之，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含(a)能夠特異性結合於Her2之Fab分子，其中Fab重鏈在C端融合至Fc域中之CH2域之N端，及(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成之Fc域。

【0139】 在另一態樣中，Fc域為IgG，尤其IgG1 Fc域或IgG4 Fc域。更特定言之，Fc域為IgG1 Fc域。在一個特定態樣中，Fc域包含可促進Fc域之第一及第二次單位之締合的修飾。

【0140】

降低Fc受體結合及/或效應功能之Fc域修飾

本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之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，其中各次單位包含CH2及CH3 IgG重鏈恆定域。Fc域之兩個次單位彼此間能夠穩定締合。

【0141】 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，其促進目標組織中之良好聚集，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受體之細胞並非較佳的攜有抗原之細胞。因此，在特定態樣中，與原生IgG1 Fc域相比，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子的Fc域呈現降低之針對Fc受體之結合親和力及/或降低之效應功能。在一個態樣中，Fc基本上不結合於Fc受體及/或不誘導效應功能。在一個特定態樣中，Fc受體為Fc γ 受體。在一個態樣中，Fc受體為人類Fc受體。在一個特定態樣中，Fc受體為活化人類Fc γ 受體，更特定言之，人類Fc γ RIIIa、Fc γ RI或Fc γ RIIa，最特定言之，人類Fc γ RIIIa。在一個態樣中，Fc域不誘導效應功能。降低之效應功能可包括(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遞細胞攝入抗原、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。

【0142】 在某些態樣中，可將一或多個胺基酸修飾引入至本文中提供之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之Fc區中，由此產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含人類Fc區序列(例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)，其在一或多個胺基酸位置包含胺基酸修飾(例如取代)。

【0143】在特定態樣中，本發明提供一種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

- (a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，
- (b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含藉由肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其片段，及在於第二多肽包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，及

(c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成，其中Fc域包含一或多個降低與Fc受體，尤其與Fc γ 受體之結合的胺基酸取代。

【0144】在一個態樣中，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子的Fc域包含一或多個胺基酸突變，其降低Fc域對Fc受體之結合親和力及/或效應功能。通常，Fc域之兩個次單位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，提供根據本發明之含有三聚TNF家族配位體之抗原結合分子，其包含具有IgG重鏈中之胺基酸取代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受體結合或效應功能)之方法。「EU編號」係指根據Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 美國公共衛生署，美國國家衛

生研究院, Bethesda, MD., 1991之EU索引編號。

【0145】 具有降低之Fc受體結合及/或效應功能之Fc域亦包括Fc域殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者經取代之彼等(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中之兩者或兩者以上之取代的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)。

【0146】 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功能。在更特定態樣中，Fc域為包含位置S228 (Kabat編號)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。

【0147】 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DNA編碼序列之位點特異性突變誘發、PCR、基因合成及類似方法。恰當的核苷酸變化可藉由例如定序來檢驗。

【0148】 與Fc受體的結合可容易測定，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)，且可諸如藉由重組表現來獲得Fc受體。適合的此類結合分析法描述於本文中。或者，Fc域或包含Fc域之細胞活化雙特異性抗原結合分子對Fc受體之結合親和力可使用已知表現特定Fc受體的細胞株(諸如表現Fc γ IIIa受體的人類NK細胞)評價。

【0149】 Fc域或包含Fc域之本發明之雙特異性抗體之效應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。用於評估所關注分子之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)及自然殺手(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估所關注分子之ADCC活性。

【0150】 在一些實施例中，Fc域與補體組分(特定言之，C1q)的結合減少。因此，在其中Fc域經工程改造而具有減少之效應功能的一些實施例中，該減少之效應功能包括降低之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。為了評估補體活化，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))。

【0151】 在一個特定態樣中，Fc域包含可促進Fc域之第一及第二次單位之締合的修飾。

【0152】

促進雜二聚化之Fc域修飾

在一個態樣中，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含(a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含藉由肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其片段，及在於第二多肽包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，及(c)由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成之Fc域。因此，其包含不同部分，與兩個不相同的多肽鏈(「重鏈」)中通常所包含之Fc域之兩個次單位中之一者或另一者融合。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。為了改良重組生產中含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之產率及純度，因此宜在本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之Fc域中引入促進所需多肽之締合的修飾。

【0153】 因此，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之Fc域包含促進Fc域之第一及第二次單位之締合的修飾。人類IgG Fc域中之兩個亞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，該修飾尤其存在於Fc域之CH3域中。

【0154】 在一特定態樣中，該修飾為所謂的「杵-臼」修飾，其包含Fc域之兩個次單位中之一者中的「杵」修飾及Fc域之兩個次單位中之另一者中的「臼」修飾。因此，在一個特定態樣中，本發明係關於如上文中所描述之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含IgG分子，其中第一重鏈之Fc部分包含第一二聚模組且第二重鏈之Fc部分包含第二二聚模

組，從而實現IgG分子之兩個重鏈之雜二聚化，且根據結進孔技術，第一二聚模組包含結且第二二聚模組包含孔。

【0155】 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，方法包括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空腔(「臼」)，使得隆凸可定位於空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空腔係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。

【0156】 因此，在一個特定態樣中，在本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之Fc域之第一次單位之CH3域中，胺基酸殘基經具有較大側鏈體積的胺基酸殘基置換，藉此在第一次單位之CH3域內產生可定位於第二次單位之CH3域內之空腔中的隆凸，且在Fc域之第二次單位之CH3域中，胺基酸殘基經具有較小側鏈體積的胺基酸殘基置換，藉此在第二次單位之CH3域內產生供第一次單位之CH3域內之隆凸可定位於其中的空腔。

【0157】 隆凸及空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。

【0158】 在一個特定態樣中，在Fc域之第一次單位之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域之第二次單位之CH3域中，位置407處之酪胺酸殘基經纈胺酸殘基(Y407V)置換。更特定言之，另外在Fc域之第二次單位中，位置366處之蘇胺酸殘基經絲胺

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。更特定言之，另外在Fc域之第一次單位中，位置354處之絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基(S354C)置換，且另外在Fc域之第二次單位中，位置349處之酪胺酸殘基經半胱胺酸殘基(Y349C)置換。引入此等兩個半胱胺酸殘基可引起在Fc域之兩個次單位之間形成二硫橋鍵。二硫橋鍵進一步使二聚體穩定(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。

【0159】 在一個替代性態樣中，促進Fc域之第一與第二次單位之締合的修飾包含介導靜電轉向作用之修飾，例如PCT公開案WO 2009/089004中所描述。一般而言，此方法涉及用帶電胺基酸殘基置換兩個Fc域次單位之界面處之一或多個胺基酸殘基，使得同二聚體形成在靜電上不利，但同二聚化在靜電上係有利的。

【0160】

CH1/CL域中之修飾

為進一步改良正確配對，含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子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，本發明係關於一種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中在CL域中之一者中，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。

【0161】 更特定言之，本發明係關於含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中在與TNF配位體家族成員相鄰之CL域中，位置123 (EU編號)處之胺基酸由精胺酸(R)置換且位置124 (EU編號)處之胺基酸經離胺酸

(K)取代，且其中在與TNF配位體家族成員相鄰之CH1域中，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。

【0162】 因此，在一特定態樣中，提供一種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)能夠特異性結合於Her2之抗原結合域，

(b)含有包含胺基酸突變E123R及Q124K之CL域的第一多肽及含有包含胺基酸突變K147E及K213E之CH1域的第二多肽，其中第二多肽藉由CH1與CL域之間的雙硫鍵連接至第一多肽，

且其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含4-1BBL之兩個胞外域或其片段，其藉由肽連接子彼此連接及連接至CL域，及在於第二多肽僅包含4-1BBL之一個胞外域或其片段，其經由肽連接子連接至該多肽之CH1域；及

(c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成。

【0163】 在一個態樣中，本發明提供一種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中在與TNF配位體家族成員相鄰之CL域中，位置123 (EU編號)處之胺基酸已經精胺酸(R)置換且位置124 (EU編號)處之胺基酸已經離胺酸(K)取代，且其中在與TNF配位體家族成員相鄰之CH1域中，位置147 (EU編號)及位置213 (EU編號)處之胺基酸已經麩胺酸(E)取代。此等修飾產生具有有利特性之所謂的帶電殘基，其避免不合需要的作用，例如錯配。

【0164】 詳言之，CL域包含胺基酸突變E123R及Q124K且CH1域包含胺基酸突變K147E及K213E。

【0165】

特定含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子

本發明提供包含能夠特異性結合於Her2之抗原結合域的含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子。在特定態樣中，含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含一個能夠特異性結合於Her2之部分，意謂含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子為單價的。在另一態樣中，本發明提供包含兩個能夠特異性結合於Her2的含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，意謂含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子為二價的。

【0166】 在一個態樣中，本發明提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含

(a)包含以下之VH域：(i) CDR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:13，(ii) CDR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:14，及(iii) CDR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:15，及包含以下之VL域：(iv) CDR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:16，(v) CDR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:17，及(vi) CDR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:18，或

(b)包含以下之VH域：(i) CDR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:21，(ii) CDR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:22，及(iii) CDR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:23，及包含以下之VL域：(iv) CDR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:24，(v) CDR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:25，及(vi) CDR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:26，或

(c)包含以下之VH域：(i) CDR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:29，(ii) CDR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:30，及(iii) CDR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:31，及包含以下之VL域：(iv) CDR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:32，(v) CDR-L2，其包含胺基酸序列

SEQ ID NO:33，及(vi) CDR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:34。

【0167】 在一個態樣中，本發明提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含有包含以下之VH域：(i) CDR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:13，(ii) CDR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:14，及(iii) CDR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:15，及包含以下之VL域：(iv) CDR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:16，(v) CDR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:17，及(vi) CDR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:18。

【0168】 在另一態樣中，提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含有包含以下之VH域：(i) CDR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:21，(ii) CDR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:22，及(iii) CDR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:23，及包含以下之VL域：(iv) CDR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:24，(v) CDR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:25，及(vi) CDR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:26。

【0169】 在另一態樣中，提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含有包含以下之VH域：(i) CDR-H1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:29，(ii) CDR-H2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:30，及(iii) CDR-H3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:31，及包含以下之VL域：(iv) CDR-L1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:32，(v) CDR-L2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:33，及(vi) CDR-L3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:34。

【0170】 在另一態樣中，能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含

重鏈可變區，其包含與胺基酸序列SEQ ID NO:19至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列，及輕鏈可變區，其包含與胺基酸序列SEQ ID NO:20至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。

【0171】 在另一態樣中，能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含重鏈可變區，其包含與胺基酸序列SEQ ID NO:27至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列，及輕鏈可變區，其包含與胺基酸序列SEQ ID NO:28至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。

【0172】 在另一態樣中，能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含重鏈可變區，其包含與胺基酸序列SEQ ID NO:35至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列，及輕鏈可變區，其包含與胺基酸序列SEQ ID NO:36至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。

【0173】 在另一態樣中，本發明提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含

(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO:19之VH域及包含胺基酸序列SEQ ID NO:20之VL域，或

(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO:27之VH域及包含胺基酸序列SEQ ID NO:28之VL域，或

(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO:35之VH域及包含胺基酸序列SEQ ID NO:36之VL域。

【0174】 在一個態樣中，提供如前文所定義之含有4-1BBL三聚體

之抗原結合分子，其中能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:19之可變重鏈及包含胺基酸序列SEQ ID NO:20之可變輕鏈，或其中能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:35之可變重鏈及包含胺基酸序列SEQ ID NO:36之可變輕鏈。

【0175】 在特定態樣中，能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:19之重鏈可變區及包含胺基酸序列SEQ ID NO:20之輕鏈可變區。在另一特定態樣中，能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:35之重鏈可變區及包含胺基酸序列SEQ ID NO:36之輕鏈可變區。在一特定態樣中，能夠特異性結合於Her2之抗原結合域包含由胺基酸序列SEQ ID NO:27組成之VH域及由胺基酸序列SEQ ID NO:28組成之VL域。

【0176】 在另一態樣中，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含

(i)第一重鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:19之VH域，及第一輕鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:20之VL域，或

第一重鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:27之VH域，及第一輕鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:28之VL域，或

第一重鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:35之VH域，及第一輕鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:36之VL域，

(ii)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41及SEQ ID NO:43，及

(iii)第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID

NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:44。

【0177】 在一特定態樣中，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子包含

(a)特異性結合於Her2之抗原結合域，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:19之重鏈可變區及包含胺基酸序列SEQ ID NO:20之輕鏈可變區，或包含胺基酸序列SEQ ID NO:27之重鏈可變區及包含胺基酸序列SEQ ID NO:28之輕鏈可變區，或包含胺基酸序列SEQ ID NO:35之重鏈可變區及包含胺基酸序列SEQ ID NO:36之輕鏈可變區，及

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中抗原結合分子之特徵在於第一多肽包含胺基酸序列SEQ ID NO:10且第二多肽包含胺基酸序列SEQ ID NO:5。

【0178】 在特定態樣中，提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(i)第一重鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:19之VH域，及第一輕鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:20之VL域，或

第一重鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:27之VH域，及第一輕鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:28之VL域，或

第一重鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:35之VH域，及第一輕鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:36之VL域，

(ii)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41及SEQ ID NO:43，及

(iii)第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:44。

【0179】 在另一態樣中，本發明提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中抗原結合分子包含

(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO:45之第一重鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:46之第一輕鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:37之第二重鏈及包含胺基酸序列SEQ ID NO:38之第二輕鏈，或

(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO:47之第一重鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:48之第一輕鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:37之第二重鏈及包含胺基酸序列SEQ ID NO:38之第二輕鏈，或

(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO:49之第一重鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:50之第一輕鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:37之第二重鏈及包含胺基酸序列SEQ ID NO:38之第二輕鏈。

【0180】

聚核苷酸

本發明另外提供編碼如本文所述之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或其片段之經分離核酸分子。

【0181】 編碼本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子的經分離聚核苷酸可表現為編碼整個抗原結合分子之單一聚核苷酸或共表現之多個(例如兩個或兩個以上)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。

【0182】 在一些態樣中，經分離核酸分子編碼整個如本文所述之根據本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子。特定言之，經分離聚核

核苷酸編碼如本文所述之根據本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子中所包含之多肽。

【0183】 在一個態樣中，本發明涉及編碼含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子的經分離核酸分子，其中核酸分子包含(a)編碼能夠特異性結合於Her2之抗原結合域的序列，(b)編碼包含藉由肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其片段之多肽的序列，及(c)編碼包含該4-1BBL之一個胞外域或其片段之多肽的序列。

【0184】 在另一態樣中，提供編碼含有4-1BB配位體三聚體之抗原結合分子的經分離聚核苷酸，其中聚核苷酸包含(a)編碼能夠特異性結合於Her2之部分的序列，(b)編碼包含藉由肽連接子彼此連接之4-1BBL之兩個胞外域或其兩個片段之多肽的序列，及(c)編碼包含該4-1BBL之一個胞外域或其片段之多肽的序列。

【0185】 在某些態樣中，聚核苷酸或核酸係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。

【0186】

重組方法

本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子可例如藉由固態肽合成(例如梅裏菲爾德固相合成(Merrifield solid phase synthesis))或重組生產獲得。對於重組生產，一或多個編碼含有4-1BBL三聚體在抗原結合分子或其多肽片段之聚核苷酸(例如如上文所述)經分離及插入至一或多個載體中以進一步選殖及/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定序。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。可使用熟習此項技術者熟知之方法構築含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子(片段)之編碼序列與適當轉錄/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，編碼含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或其多肽片段之聚核苷酸(亦即編碼區)選殖至其中，與啟動子及/或其他轉錄或轉譯控制元件可操作締合。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中，例如單一載體上，或獨立聚核苷酸構築體中，例如獨立(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異源編碼區，其融合或未融合至編碼本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或其多肽片段的聚核苷酸，或其變異體或衍生物。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。可操作締合為如下狀況：基因產物，例如多肽之

編碼區與一或多個調節序列締合，以此方式將基因產物在表現置於調節序列之影響或控制下。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相關聯的啟動子)為「可操作地締合」。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締合。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締合。

【0187】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強化子以及誘導性啟動子(例如啟動子誘導性四環素(tetracyclin))。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)。

【0188】 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，若需要分泌含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或其多肽片段，則可將編碼信號序列之DNA置放於編碼本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或其多肽片段之核酸上游。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，使用天然信號肽，例如免疫球蛋白重鏈或輕鏈信號肽，或該序列之功能衍生物，其保留導引與其可操作締合之多肽分泌的能力。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。

【0189】 編碼可用於促進隨後純化(例如組胺酸標籤)或幫助標記融合蛋白之短蛋白質序列的DNA可包括編碼本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或其多肽片段的聚核苷酸內或末端處。

【0190】 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(例如已經其轉型或轉染)，該載體包含編碼(一部分)本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子的聚核苷酸。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。適用於複製及支持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，尤其在不需要糖基化時。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)。

【0191】 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。其他適用之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Y0、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。

【0192】 在一個態樣中，提供一種產生本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或其多肽片段的方法，其中該方法包含在適合於表現本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或其多肽片段的條件下培養宿主細胞，該宿主細胞包含編碼如本文所提供之本發明之含有4-1BBL三聚

體之抗原結合分子或其多肽片段的多核苷酸，及自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或其多肽片段。

【0193】 在本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子中，該等組分(至少一個能夠特異性結合於靶細胞抗原之部分、一個包含TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段的多肽及一個包含該4-1BBL家族成員之一個胞外域或其片段的多肽)不以遺傳學方式彼此融合。多肽經設計使得其組分(TNF配位體家族成員之兩個胞外域或其片段及其他組分，諸如CH或CL)直接或經由連接子序列彼此融合。連接子之組成及長度可根據此項技術中熟知之方法確定且可測試其功效。本發明之抗原結合分子之不同組分之間的連接子序列之實例見於本文中提供之序列中。亦可包括合併有裂解位點的其他序列以視需要分離融合蛋白中之個別組分，例如內肽酶識別序列。

【0194】 在某些實施例中，形成抗原結合分子之一部分的能夠特異性結合於靶細胞抗原之部分(例如Fab片段)包含至少能夠結合至抗原之免疫球蛋白可變區。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。產生多株抗體及單株抗體之方法為此項技術中熟知的(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來構築，可以重組方式產生(例如，如美國專利第4,186,567號中所描述)或可藉由例如篩選包含可變重鏈及可變輕鏈之組合文庫來獲得(參見例如McCafferty之美國專利第5,969,108號)。

【0195】 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免疫球蛋白之嵌合形式。免疫球蛋白之人類化或全人類形式亦可根據此項技術中熟知之方法製備(參見Winter之例如美國專利第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，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之彼等殘基)；(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之殘基)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」。人類化抗體及其製造方法綜述於例如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產生。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，從而響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))。噬菌體典型地以單鏈Fv (scFv)片段或Fab片段形式呈現抗體片段。

【0196】 在某些態樣中，本發明之抗原結合分子中包含之能夠特異性結合於靶細胞抗原之部分(例如Fab片段)係根據例如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號中所揭示之方法工程化以具有增強之結合親和力。本發明之抗原結合分子結合至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

抗原結合分子結合至與參考抗原結合分子所結合之抗原決定基相同之抗原決定基(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。若與對照樣品相比,測試樣品中與固定抗原相關之標記之量實質上降低,則表明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)。

【0197】如本文中所描述製備之本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子可藉由此項技術中已知的技術純化,諸如高效液相層析、離子交換層析、凝膠電泳、親和層析、尺寸排阻層析及其類似技術。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為顯而易見的。關於親和層析純化,可使用與含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子結合之抗體、配位體、受體或抗原。舉例而言,關於本發明之融合蛋白之親和層析純化,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基本上如實例中所描述之抗原結合分子。可藉由多種熟知分析方法

(包括凝膠電泳、高壓液相層析及其類似方法)中之任一者測定含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或其片段的純度。舉例而言，如實例中所述表現之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子顯示為完整的且經適當組裝，如由還原及非還原SDS-PAGE所表明。

【0198】

分析

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、篩選或表徵。生物活性可包括(例如)增強活化及/或增生不同免疫細胞，尤其T細胞之能力。例如，其增強免疫調節細胞介素之分泌。增強或可增強之其他免疫調節細胞介素為例如IL2、粒酶B等。生物活性亦可包括食蟹獼猴結合交叉反應性，以及與不同細胞類型結合。亦提供在活體內及/或活體外具有此類生物活性之抗原結合分子。

【0199】

1. 親和力分析

本文提供之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子對於4-1BB (CD137)之親和力可根據實例中所闡述之方法，藉由表面電漿子共振(SPR)，使用諸如BIAcore儀器(GE Healthcare)之標準儀器及諸如可藉由重組表現獲得之受體或靶蛋白來測定。含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子對於HER2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)之標準儀器及諸如可藉由重組表現獲得之受體或靶蛋白來測定。用於量測結合親和力之特定說明性及例示性實施例描述於實例4中。根據一態樣， K_D 係藉由表面電漿子共振，使用BIAcore® T100機器(GE

Healthcare)在25°C下量測。

【0200】

2. 結合分析及其他分析

本文提供之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子與表現相應受體之細胞的結合可例如藉由流式細胞測量術(FACS)使用表現特定受體或靶抗原之細胞株評估。在一個態樣中，表現4-1BB之新鮮周邊血液單核細胞(PBMC)可用於結合分析中。此等細胞在分離後(未處理PMBC)或在刺激後(經活化之PMBC)直接使用。在另一態樣中，活化小鼠脾細胞(表現4-1BB)可用於展現本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子與4-1BB表現細胞之結合。

【0201】 在另一態樣中，使用表現Her2之細胞株展現抗原結合分子與此靶細胞抗原之結合。

【0202】 在另一態樣中，可使用競爭分析鑑別抗原結合分子，該抗原結合分子分別與特異性抗體或抗原結合分子競爭結合於Her2或4-1BB。在某些實施例中，此類競爭抗原結合分子結合至與特異性抗Her2抗體或特異性4-1BB抗體所結合之抗原決定基相同的抗原決定基(例如線性或構形抗原決定基)。用於對抗體所結合之抗原決定基進行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。

【0203】

3. 活性分析

在一個態樣中，提供鑑別具有生物活性的結合於Her2及4-1BB之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之分析。生物活性可包括例如表現Her2

之癌細胞上經由4-1BB的促效信號傳導。亦提供藉由該等分析鑑別為在活體外具有此類生物活性的含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子。

【0204】 在某些態樣中，測試本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子的此類生物活性。用於偵測本發明之分子之生物活性的分析為實例3中所描述之分析。此外，用於偵測細胞溶解(例如藉由量測LDH釋放)、誘導之細胞凋亡動力學(例如藉由量測卡斯蛋白酶3/7活性)或細胞凋亡(例如使用TUNEL分析)之分析為此項技術中熟知的。此外，此類複合物之生物活性可藉由評估其對多種淋巴細胞子集(諸如NK細胞、NKT細胞或 $\gamma\delta$ T細胞)之存活、增殖及淋巴激素分泌之作用或評估其調節抗原呈現細胞(諸如樹突狀細胞、單核細胞/巨噬細胞或B細胞)之表現型及功能的能力來評估。

【0205】

醫藥組合物、調配物及投藥途徑

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含本文提供之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子中之任一者，例如用於以下治療方法中之任一者中。在一個實施例中，醫藥組合物包含本文提供之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子中之任一者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提供之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子中之任一者及至少一種額外治療劑(例如如下所述)。

【0206】 本發明之醫藥組合物包含治療有效量的一或多種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其溶解或分散於醫藥學上可接受之賦形劑中。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。根據本揭示內容，製備含有至少一個含有4-1BBL三聚體在抗原結合分子及視情況選用之額外活性成分之醫藥組合物將為熟習此項技術者已知，如由以引用的方式併入本文中之Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 Mack Printing Company, 1990所例示。特定言之，組合物為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、塗層、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗菌劑、抗真菌劑)、等滲劑、鹽、穩定劑及其組合，如一般熟習此項技術者已知。

【0207】非經腸組合物包括設計用於藉由注射(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)投與之彼等組合物。關於注射，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子可於水溶液中，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。適合之醫藥學上可接受之賦形劑包括但不限於：緩衝液，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；苜索氯銨；酚、丁醇或苯甲醇；對羥基苯甲酸烷基酯，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(小於約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；單醣、雙醣及其他碳水化合物，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、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬複合物(例如Zn-蛋白質複合物)；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。

【0208】 活性成分可截留於微膠囊中，例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合法所製備之微膠囊，例如分別為羥基甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊；截留於膠態藥物遞送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)中或巨乳液中。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之藥劑(諸如單硬脂酸鋁、明膠或其組合)來達成。

【0209】 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醣蛋白(sHASEGP), 例如人類可溶性PH-20玻尿酸酶醣蛋白, 諸如rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)。某些例示性sHASEGP及使用方法, 包括rHuPH20, 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與一或多種額外葡萄糖胺聚糖酶(諸如軟骨素酶)組合。

【0210】 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第6,171,586號及WO2006/044908中所描述之調配物, 後者之調配物包括組胺酸-乙酸鹽緩衝液。

【0211】 除先前描述之組合物以外, 融合蛋白亦可調配成儲存製劑。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。

【0212】 包含本發明之融合蛋白之醫藥組合物可借助於習知混合、溶解、乳化、封裝、包覆或凍乾方法製造。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。

【0213】 含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子可調配為呈游離酸或鹼、中性或鹽形式之組合物。醫藥學上可接受之鹽為基本上保留游離酸或鹼之生物活性的鹽。此等包括酸加成鹽，例如由蛋白質組合物之游離胺基形成，或由無機酸，諸如氫氯酸或磷酸，或有機酸，諸如乙酸、草酸、酒石酸或杏仁酸形成之彼等。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。

【0214】 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。

【0215】 在一個態樣中，醫藥組合物可包含本文提供之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子中之任一者及至少一種額外治療劑。在一個態樣中，醫藥組合物可包含本文提供之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子中之任一者，及T細胞活化抗CD3雙特異性抗體，特定言之抗Her2/抗CD3抗體。

【0216】 在一個態樣中，抗Her2/抗CD3抗體包含結合於CD3之第一抗原結合域，及結合於Her2之第二抗原結合域。在特定態樣中，結合於Her2之第二結合域結合至Her2上與含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子不同的抗原決定基。

【0217】 在一個態樣中，如本文所用之抗Her2/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_HCD3)，該重鏈可變區包含CDR-H1序列SEQ ID NO:91、CDR-H2序列SEQ ID NO:92及CDR-H3序列SEQ ID NO:93；及/或輕鏈可變區(V_LCD3)，該輕鏈可變區包含CDR-L1序列SEQ ID NO:94、CDR-L2序列SEQ ID NO:95及CDR-L3序列SEQ ID NO:96。更特定言之抗Her2/抗CD3雙特異性抗體包含第一抗原結合域，其包含與胺基酸序列SEQ ID NO:97至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之重鏈可變區(V_HCD3)，及/或與胺基酸序列SEQ ID NO:98至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之輕鏈可變區(V_LCD3)。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性抗體包含重鏈可變區(V_HCD3)，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:97，及/或輕鏈可變區(V_LCD3)，該輕鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:98。

【0218】 在一個態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性抗體包含結合於與抗體4D5 (其人類化型式稱為曲妥珠單抗)相同之抗原決定基的第二抗原結合域。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性抗體包含結合於與抗體2C4 (其人類化型式稱為帕妥珠單抗)相同之抗原決定基的第二抗原結合域。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性抗體包含結合於與抗體7C2 (美國專利第9,518,118號)相同之抗原決定基的第二抗原結合域。

【0219】 在另一態樣中，抗Her2/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_HHer2)，該重鏈可變區包含CDR-H1序列SEQ ID NO:21、CDR-H2序列SEQ ID NO:22及CDR-H3序列SEQ ID NO:23，及/或輕鏈可變區(V_LHer2)，該輕鏈可變區包含CDR-L1序列SEQ ID

NO:24、CDR-L2序列SEQ ID NO:25及CDR-L3序列SEQ ID NO:26，或

(b)重鏈可變區(V_H Her2)，該重鏈可變區包含CDR-H1序列SEQ ID NO:13、CDR-H2序列SEQ ID NO:14及CDR-H3序列SEQ ID NO:15，及/或輕鏈可變區(V_L Her2)，該輕鏈可變區包含CDR-L1序列SEQ ID NO:16、CDR-L2序列SEQ ID NO:17及CDR-L3序列SEQ ID NO:18，或

(c)重鏈可變區(V_H Her2)，該重鏈可變區包含CDR-H1序列SEQ ID NO:99、CDR-H2序列SEQ ID NO:100及CDR-H3序列SEQ ID NO:101，及/或輕鏈可變區(V_L Her2)，該輕鏈可變區包含CDR-L1序列SEQ ID NO:102、CDR-L2序列SEQ ID NO:103及CDR-L3序列SEQ ID NO:104。

【0220】 在一個態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性包含第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_H Her2)，該重鏈可變區與胺基酸序列SEQ ID NO:27至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致，及/或輕鏈可變區(V_L Her2)，該輕鏈可變區與胺基酸序列SEQ ID NO:28至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性包含第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_H Her2)，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:27，及/或輕鏈可變區(V_L Her2)，該輕鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:28。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性包含第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_H Her2)，該重鏈可變區與胺基酸序列SEQ ID NO:19至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致，及/或輕鏈可變區(V_L Her2)，該輕鏈可變區與胺基酸序列SEQ ID NO:20至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性包含第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_H Her2)，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:19，及/或輕鏈可變區(V_L CEA)，該輕

鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:20。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性包含第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_HHer2)，該重鏈可變區與胺基酸序列SEQ ID NO:105至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致，及/或輕鏈可變區(V_LHer2)，該輕鏈可變區與胺基酸序列SEQ ID NO:106至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性包含第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_HHer2)，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:105，及/或輕鏈可變區(V_LCEA)，該輕鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:106。

【0221】 在一個態樣中，抗Her2/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_HCD3)，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:97，及/或輕鏈可變區(V_LCD3)，該輕鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:98，及第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_HHer2)，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:27，及/或輕鏈可變區(V_LHer2)，該輕鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:28。

【0222】 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。

【0223】

治療方法及組合物

本文提供之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子中之任一者可用於治療方法中。

【0224】 為了用於治療方法中，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子可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、藥劑遞送位點、投與方法、投與時程及醫學從業者已知之其他因素。

【0225】 在一個態樣中，提供本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其用作藥劑。在其他態樣中，提供本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其用於治療疾病，尤其用於治療癌症。在某些態樣中，提供本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其用於治療方法中。在一個態樣中，本發明提供如本文所述之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其用於治療有需要之個體的疾病。在某些態樣中，本發明提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其用於治療患有疾病之個體之方法，該方法包含向個體投與治療有效量之融合蛋白。在某些態樣中，待治療之疾病為Her2陽性癌症。Her2陽性癌症之實例包括乳癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、子宮內膜癌、胰臟癌及非小細胞肺癌(NSCLC)。在一個態樣中，Her2陽性癌症為Her2+陽性乳癌，例如早期或局部晚期Her2+陽性乳癌。因此，提供如本文所述之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其用於治療此等癌症。需要治療之個體、患者或「個體」通常為哺乳動物，更特定言之，人類。

【0226】 在另一態樣中，提供如本文所述之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其用於治療感染性疾病，尤其用於治療病毒感染。在另一態樣中，提供如本文所述之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其用於治療自體免疫疾病，諸如狼瘡疾病。

【0227】 在另一態樣中，本發明係關於含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之用途，其用於製造或製備用以治療有需要之個體之疾病的藥劑。在一個態樣中，藥劑用於治療疾病之方法，其包含投與患有疾病之個

體治療有效量之藥劑。在某些實施例中，所治療之疾病為增生性病徵，特定言之，癌症。因此，在一個態樣中，本發明係關於本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之用途，其用於製造或製備用以治療癌症，尤其Her2陽性癌症之藥劑。Her2陽性癌症之實例包括乳癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、子宮內膜癌、胰臟癌及非小細胞肺癌(NSCLC)。在某些態樣中，待治療之癌症為Her2陽性乳癌，尤其為Her2陽性轉移性乳癌。熟習此項技術者可認識到，在一些情況下，含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子可能不提供治癒，而僅可提供部分益處。在一些實施例中，具有一些益處之生理學變化亦視為治療上有利的。因此，在一些態樣中，提供生理學變化之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之量視為「有效量」或「治療有效量」。

【0228】 在另一態樣中，本發明提供一種用於治療個體之疾病之方法，其包含向該個體投與治療有效量之本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子。在一個態樣中，向該個體投與組合物，其包含醫藥學上可接受之形式的本發明之融合蛋白。在某些態樣中，所治療之疾病為增生性病徵。在一個特定態樣中，疾病為癌症。在某些態樣中，該方法進一步包含向該個體投與治療有效量之至少一種額外治療劑，例如抗癌劑(若待治療之疾病為癌症)。根據任一上述實施例之「個體」可為哺乳動物，較佳為人類。

【0229】 為了預防或治療疾病，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子(當單獨或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)之適當劑量將取決於待治療之疾病的類型、投與途徑、患者體重、抗原結合分子之類型、疾病之嚴重度及病程、是否出於預防或治療目的投與融合蛋白、先前

或同時的治療干預、患者之臨床病史及對融合蛋白之反應及主治醫師之判斷。負責投藥的從業者將在任何情況下確定組合物中活性成分之濃度及適用於單獨個體的劑量。本文中涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投藥或在不同時間點的多次投藥、快速投藥及脈衝式輸注。

【0230】 含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子宜一次性或經一系列治療來向患者投與。取決於疾病類型及嚴重度，約1 $\mu\text{g/kg}$ 至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg -10 mg/kg)含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子可為向患者投與之初始候選劑量，無論(例如)藉由一或多次獨立投與或藉由連續輸注。視上文所提及之因素而定，一個典型的日劑量的範圍可為約1 $\mu\text{g/kg}$ 至100 mg/kg 或更大。對於歷經數日或更長時間之重複投藥，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。融合蛋白之一種例示性劑量將在約0.005 mg/kg 至約10 mg/kg 範圍內。在其他實例中，劑量亦可包含每次投藥約1 $\mu\text{g/kg}$ 體重、約5 $\mu\text{g/kg}$ 體重、約10 $\mu\text{g/kg}$ 體重、約50 $\mu\text{g/kg}$ 體重、約100 $\mu\text{g/kg}$ 體重、約200 $\mu\text{g/kg}$ 體重、約350 $\mu\text{g/kg}$ 體重、約500 $\mu\text{g/kg}$ 體重、約1 mg/kg 體重、約5 mg/kg 體重、約10 mg/kg 體重、約50 mg/kg 體重、約100 mg/kg 體重、約200 mg/kg 體重、約350 mg/kg 體重、約500 mg/kg 體重至約1000 mg/kg 體重或更大，及其中可衍生之任何範圍。在來自本文中列舉之數值之可衍生範圍之實例中，基於上述數值，可投與約5 mg/kg 體重至約100 mg/kg 體重、約5 $\mu\text{g/kg}$ 體重至約500 mg/kg 體重等之範圍。因此，可向患者投與約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、5.0 mg/kg 或10 mg/kg (或其任何組合)之一或多種劑量。此類劑量可間歇地投與，例如每週或每三週(例如使得患者接受約二個至約二十個，或例如約六個劑量之融合蛋白)。可投與初始較高起始劑量，接著可投與一或多種較低

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。

【0231】 本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子通常以可有效達成預期目的之量使用。用於治療或預防疾病病狀，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子或其醫藥組合物係以治療有效量投與或施用。治療有效量之判定完全在熟習此項技術者之能力範圍內，尤其根據本文所提供之詳細揭示內容。

【0232】 關於全身性投藥，可首先自活體外分析(諸如細胞培養分析)估算治療有效劑量。接著可在動物模型中調配劑量以實現循環濃度範圍，包括如在細胞培養物中測定的IC₅₀。此類資訊可用於更準確地判定適用於人類之劑量。

【0233】 亦可使用此項技術中熟知的技術由活體內資料(例如動物模型)評估初始劑量。一般熟習此項技術者可基於動物資料容易地最佳化人類投藥。

【0234】 可單獨調節劑量及時間間隔以提供足以維持治療作用的含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之血漿含量。常見的患者注射投藥劑量在約0.1至50毫克/公斤/天，通常約0.5至1毫克/公斤/天範圍內。治療有效血漿含量可藉由每日投與多次劑量來達成。血漿含量可藉由例如HPLC量測。

【0235】 在局部投藥或選擇性攝取之情況下，含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之有效局部濃度可能與血漿濃度無關。熟習此項技術者能夠最佳化治療有效局部劑量而無需不當實驗。

【0236】 本文所述之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之治療有

效劑量通常將提供治療效益而不引起實質性毒性。可在細胞培養物或實驗動物中藉由標準醫藥學程序測定融合蛋白之毒性及治療功效。可使用細胞培養分析及動物研究來確定LD₅₀ (50%群體致死劑量)及ED₅₀ (50%群體治療有效劑量)。毒性作用與治療作用之間的劑量比為治療指數，其可表示為比率LD₅₀/ED₅₀。較佳為展現較大治療指數之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子。在一個實施例中，根據本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子展現高治療指數。自細胞培養分析法及動物研究獲得之資料可用於調配適用於人類的劑量範圍。該劑量較佳在循環濃度範圍內，包括毒性極小或無毒性的ED₅₀。劑量可視多種因素而在此範圍內變化，該等因素為例如所用劑型、所用投藥途徑、個體之狀況及其類似因素。精確調配物、投與途徑及劑量可由個別醫師鑒於患者之狀況選擇(參見例如Fingl等人, 1975, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第1章, 第1頁，以全文引用的方式併入本文中)。

【0237】 用本發明之融合蛋白治療之患者之主治醫師將知曉如何及何時由於毒性、器官功能不全及其類似原因而終止、中斷或調節投藥。反之，主治醫師亦已知在臨床反應不充足(排除毒性)時將治療調節至較高水準。管理所關注病症時所投與之劑量的量值將隨待治療之病狀的嚴重度、投藥途徑及其類似因素而變化。病狀之嚴重度可例如部分地藉由標準預後評估方法來評估。此外，劑量及可能的給藥頻率亦將根據個別患者之年齡、體重及反應而變。

【0238】

其他藥劑及治療

本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子可與療法中之一或多種

其他藥劑組合投與。舉例而言，本發明之融合蛋白可與至少一種其他治療劑共同投與。術語「治療劑」涵蓋可投與以用於治療需要此類治療之個體之症狀或疾病的任何藥劑。此類其他治療劑可包含適於治療特定適應症的任何活性成分，較佳為具有互補活性、彼此間無不利影響的彼等活性成分。在某些實施例中，額外治療劑為另一抗癌劑。

【0239】 此類其他藥劑宜以可有效達成預定目的之量組合存在。此類其他藥劑之有效量視所用含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之量、病症或治療之類型及上文所論述之其他因素而定。含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子通常以如本文所述之相同劑量及投藥途徑使用，或以本文所述劑量之約1%至99%，或以憑經驗/臨床上確定為適當的任何劑量及任何途徑使用。

【0240】 上文提及之此類組合療法涵蓋組合投藥(其中相同或不同組合物中包括兩種或更多種治療劑)以及單獨投藥，在此情況下，本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子的投藥可在其他治療劑及/或佐劑之投藥之前、同時及/或之後進行。

【0241】 因此，在一個態樣中，提供如本文所述之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其用於治療癌症，尤其Her2陽性癌症，其中含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子與T細胞活化抗CD3雙特異性抗體，尤其抗Her2/抗CD3雙特異性抗體組合使用。

【0242】 在一個態樣中，抗Her2/抗CD3抗體包含結合於CD3之第一抗原結合域，及結合於Her2之第二抗原結合域。在特定態樣中，結合於Her2之第二結合域結合至Her2上與含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子不同的抗原決定基。

【0243】 在一個態樣中，如本文所用之抗Her2/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_HCD3)，該重鏈可變區包含CDR-H1序列SEQ ID NO:91、CDR-H2序列SEQ ID NO:92及CDR-H3序列SEQ ID NO:93；及/或輕鏈可變區(V_LCD3)，該輕鏈可變區包含CDR-L1序列SEQ ID NO:94、CDR-L2序列SEQ ID NO:95及CDR-L3序列SEQ ID NO:96。更特定言之抗Her2/抗CD3雙特異性抗體包含第一抗原結合域，其包含與胺基酸序列SEQ ID NO:97至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之重鏈可變區(V_HCD3)，及/或與胺基酸序列SEQ ID NO:98至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之輕鏈可變區(V_LCD3)。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性抗體包含重鏈可變區(V_HCD3)，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:97，及/或輕鏈可變區(V_LCD3)，該輕鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:98。

【0244】 在一個態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性抗體包含結合於與抗體4D5 (其人類化型式稱為曲妥珠單抗)相同之抗原決定基的第二抗原結合域。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性抗體包含結合於與抗體2C4 (其人類化型式稱為帕妥珠單抗)相同之抗原決定基的第二抗原結合域。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性抗體包含結合於與抗體7C2 (美國專利第9,518,118號)相同之抗原決定基的第二抗原結合域。

【0245】 在另一態樣中，抗Her2/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_HHer2)，該重鏈可變區包含CDR-H1序列SEQ ID NO:21、CDR-H2序列SEQ ID NO:22及CDR-H3序列SEQ ID NO:23，及/或輕鏈可變區(V_LHer2)，該輕鏈可變區包含CDR-L1序列SEQ ID

NO:24、CDR-L2序列SEQ ID NO:25及CDR-L3序列SEQ ID NO:26，或

(b)重鏈可變區(V_H Her2)，該重鏈可變區包含CDR-H1序列SEQ ID NO:13、CDR-H2序列SEQ ID NO:14及CDR-H3序列SEQ ID NO:15，及/或輕鏈可變區(V_L Her2)，該輕鏈可變區包含CDR-L1序列SEQ ID NO:16、CDR-L2序列SEQ ID NO:17及CDR-L3序列SEQ ID NO:18，或

(c)重鏈可變區(V_H Her2)，該重鏈可變區包含CDR-H1序列SEQ ID NO:99、CDR-H2序列SEQ ID NO:100及CDR-H3序列SEQ ID NO:101，及/或輕鏈可變區(V_L Her2)，該輕鏈可變區包含CDR-L1序列SEQ ID NO:102、CDR-L2序列SEQ ID NO:103及CDR-L3序列SEQ ID NO:104。

【0246】 在一個態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性包含第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_H Her2)，該重鏈可變區與胺基酸序列SEQ ID NO:27至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致，及/或輕鏈可變區(V_L Her2)，該輕鏈可變區與胺基酸序列SEQ ID NO:28至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性包含第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_H Her2)，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:27，及/或輕鏈可變區(V_L Her2)，該輕鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:28。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性包含第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_H Her2)，該重鏈可變區與胺基酸序列SEQ ID NO:19至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致，及/或輕鏈可變區(V_L Her2)，該輕鏈可變區與胺基酸序列SEQ ID NO:20至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性包含第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_H Her2)，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:19，及/或輕鏈可變區(V_L CEA)，該輕

鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:20。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性包含第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_HHer2)，該重鏈可變區與胺基酸序列SEQ ID NO:105至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致，及/或輕鏈可變區(V_LHer2)，該輕鏈可變區與胺基酸序列SEQ ID NO:106至少90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。在另一態樣中，抗Her2/抗CD3雙特異性包含第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_HHer2)，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:105，及/或輕鏈可變區(V_LCEA)，該輕鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:106。

【0247】 在一個態樣中，抗Her2/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_HCD3)，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:97，及/或輕鏈可變區(V_LCD3)，該輕鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:98，及第二抗原結合域，其包含重鏈可變區(V_HHer2)，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:27，及/或輕鏈可變區(V_LHer2)，該輕鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO:28。

【0248】 在另一態樣中，含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子與T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合使用且T細胞活化抗CD3雙特異性抗體與含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子同時、在其之前或在其之後投與。

【0249】 在另一態樣中，提供含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之用途，其用於製造用以治療癌症之藥劑，其中含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子與T細胞活化抗CD3雙特異性抗體，尤其抗Her2/抗CD3雙特異性抗體組合使用。在某些態樣中，待治療之疾病為Her2陽性癌症。Her2陽性癌症之實例包括乳癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、子宮內膜癌、胰臟癌及非小細胞肺癌(NSCLC)。在某些態樣中，待治療之癌症為

Her2陽性乳癌，尤其為Her2陽性轉移性乳癌。

【0250】 在另一態樣中，本發明提供一種治療個體之癌症之方法，其包含向該個體投與治療有效量的本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，及有效量的T細胞活化抗CD3雙特異性抗體，尤其為如上文所定義之抗Her2/抗CD3雙特異性抗體。在某些態樣中，該方法係用於Her2陽性癌症。Her2陽性癌症之實例包括乳癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、子宮內膜癌、胰臟癌及非小細胞肺癌(NSCLC)。在一個態樣中，該方法係用於治療Her2陽性轉移性乳癌。

【0251】

製品

在本發明之另一態樣中，提供含有適用於治療、預防及/或診斷上文所描述之病症之製品。製品包含容器及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。容器容納單獨或與可有效治療、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)。組合物中之至少一種活性劑為本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子。

【0252】 標籤或藥品說明書指示組合物用於治療所選病狀。此外，製品可包含(a)其中含有組合物的第一容器，其中組合物包含本發明之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子；及(b)其中含有組合物的第二容器，其中組合物包含另一種細胞毒性劑或其他治療劑。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狀之藥品說明書。

【0253】 或者或另外，製品可進一步包含第二(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B (序列)：

SEQ ID NO:	描述	序列
1	人類(hu) 4-1BBL (71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSRSE
2	hu 4-1BBL (85-254)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
3	hu 4-1BBL (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSR SE
4	hu 4-1BBL (52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
5	Human (hu) 4-1BBL (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGL
6	hu 4-1BBL (85-248)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL

SEQ ID NO:	描述	序列
7	hu 4-1BBL (80-248)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
8	hu 4-1BBL (52-248)	PWAVSGARASPGSAASPRREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
9	由(G4S) ₂ 連接子連接之二聚hu 4-1BBL (71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSP DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLSPR SE
10	由(G4S) ₂ 連接子連接之二聚hu 4-1BBL (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
11	由(G4S) ₂ 連接子連接之二聚hu 4-1BBL (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLSPR SEGGGGSGGGGSDPAGLLDLRQGMFAQL VAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV

SEQ ID NO:	描述	序列
		AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGLPSRSE
12	由(G4S) ₂ 連接子連接之二聚hu 4-1BBL (52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE GGGGSGGGGSPWAVSGARASPGSAASPR LREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSRSE
13	重鏈CDR-H1，帕妥珠單抗	GFTFTDYTMD
14	重鏈CDR-H2，帕妥珠單抗	DVNPNSGGSIYNQRFKG
15	重鏈CDR-H3，帕妥珠單抗	NLGPSFYFDY
16	輕鏈CDR-L1，帕妥珠單抗	KASQDVSIGVA
17	輕鏈CDR-L2，帕妥珠單抗	SASYRYT
18	輕鏈CDR-L3，帕妥珠單抗	QQYYIYPYT
19	重鏈可變域VH，帕妥珠單抗	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF TDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSG GSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGGQT LTVSS
20	輕鏈可變域VL，帕妥珠單抗	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVS IGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YYIYPYTFGQGTKVEIK
21	重鏈CDR-H1，曲妥珠單抗	GFNIKDTYIH
22	重鏈CDR-H2，曲妥珠單抗	RIYPTNGYTRYADSVKG
23	重鏈CDR-H3，曲妥珠單抗	WGGDGFYAMDY
24	輕鏈CDR-L1，曲妥珠單抗	RASQDVNTAVA
25	輕鏈CDR-L2，曲妥珠單抗	SASFLYS
26	輕鏈CDR-L3，曲妥珠單抗	QQHYTTPPT
27	重鏈可變域VH，曲妥珠單抗	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGY TRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLTVSS
28	輕鏈可變域VL，曲妥珠單抗	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDV NTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGV

SEQ ID NO:	描述	序列
		PSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QHYYTTPPTFGQGTKVEIK
29	重鏈CDR-H1，aff.帕妥珠單抗	GFTFNDYTMD
30	重鏈CDR-H2，aff.帕妥珠單抗	DVNPNSGGSIIVNRRFKG
31	重鏈CDR-H3，aff.帕妥珠單抗	NLGPFYFDY
32	輕鏈CDR-L1，aff.帕妥珠單抗	KASQDVSTAVA
33	輕鏈CDR-L2，aff.帕妥珠單抗	SASFRYT
34	輕鏈CDR-L3，aff.帕妥珠單抗	QQHYTTPPT
35	重鏈可變域VH，aff.帕妥珠單抗	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSG GSIVNRRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARNLGPFYFDYWGGQT LTVSS
36	輕鏈可變域VL，aff.帕妥珠單抗	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVS TAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFRYTGV SRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ HYTTPPTFGQGTKVEIK
37	二聚4-1BB配位體(71-248)-CL* Fc 杵鏈	參見表1
38	單體4-1BB配位體(71-248)-CH1*	參見表1
39	二聚4-1BB配位體(71-248)-CL Fc 杵鏈	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPPEIPAGLGGGGSGG GGSRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP
40	單體4-1BB配位體(71-248)-CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE

SEQ ID NO:	描述	序列
		GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS C
41	二聚4-1BB配位體(71-254)-CL* Fc 杵鏈	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSP DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPPEIPAGLPSR SEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
42	單體4-1BB配位體(71-254)-CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEK VEPKSC
43	二聚4-1BB配位體(71-254)-CL Fc 杵鏈	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV

SEQ ID NO:	描述	序列
		HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSP DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPR SEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
44	單體4-1BB配位體(71-254)-CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSC
45	抗Her2 (PER) Fc臼鏈	參見表1
46	抗Her2 (PER)輕鏈	參見表1
47	抗Her2 (TRAS) Fc臼鏈	參見表2
48	抗Her2 (TRAS)輕鏈	參見表2
49	抗Her2 (aff-PER) Fc臼鏈	參見表3
50	抗Her2 (aff-PER)輕鏈	參見表3
51	人 類4-1BB ECD , aa 24-186 Q07011	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSF SSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTS NAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGG ELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTN CSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSP GASSVTPPAPAREPGHSPQ
52	Fc臼鏈	參見表5
53	人類4-1BB抗原Fc杵鏈	參見表5
54	人 類Her2 , UniProt寄 存 編 號 P04626-1	MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKLRLPASPE THLDMLRHL Y QGCQVVQGNL

SEQ ID NO:	描述	序列
		ELTYLPTNAS LSFLQDIQEV QGYVLIAHNQ VRQVPLQRLR IVRGTQLFED NYALAVLDNG DPLNNTTPVT GASPGLREL QLRSLTEILK GGVLIQRNPQ LCYQDTILWK DIFHKNNQLA LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK GSRCWGESSE DCQSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCCHEQC AAGCTGPKHS DCLACLHFNH SGICELHCPA LVTYNTDTFE SMPNPEGRYT FGASCVTACP YNYLSTDVGS CTLVCPLHNQ EVTAEDGTQR CEKCSKPCAR VCYGLGMEHL REVRAVTSAN IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGDPASNTA ETLEEITGYL YISAWPDSLP DLSVFQNLQV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI SWLGLRSLRE LGSGLALHH NTHLCFVHTV PWDQLFRNPH QALLHTANRP EDECVGEGLA CHQLCARGHC WPGPTQCVN CSQFLRGQEC VEECRVLQGL PREYVNARHC LPCHPECQPQ NGSVTCFGPE ADQCVACAHY KDPPFCVARC PSGVKPDLSY MPIWKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAEQRASP LTSIISAVVG ILLVVVLGVV FGILIKRRQQ KIRKYTMRRL LQETELVEPL TPSGAMPNQA QMRILKETEL RKVKVLGSGA FGTVYKGIWI PDGENVKIPV AIKVLRENTS PKANKEILDE AYVMAGVGSP YVSRLLGICL TSTVQLVTQL MPYGCLLDHV RENRGRLGSQ DLLNWCQMIA KGMSYLEDVR LVHRDLAARN VLVKSPNHVK ITDFGLARLL DIDETEHAD GGKVPIKWMA LESILRRRFT HQSDVWSYGV TVWELMTFGA KPYDGIPARE IPDLLEKGER LPQPPICTID VYMIMVKCWM IDSECRPRFR ELVSEFSRMA RDPQRFVVIQ NEDLGPASPL DSTFYRSLE DDDMGDLVDA EEYLVPQQGF FCPDAPGAG GMVHHRHRSS STRSGGGDLT LGLEPSEEEA PRSPLAPSEG

SEQ ID NO:	描述	序列	
		AGSDVFDGDL LPTHDPSP LQ PSETDGYVAP NQPDVRPQPP RPAGATLERP VKDVFAFGGA GGAAPQPHPP YYWDQDPPER PTAENPEYLG LDVPV	GMGAAKGLQS RYSEDPTVPL LTCSPQPEYV SPREGPLPAA KTLSPGKNGV VENPEYLTPQ PAFSPAFDNL GAPPSTFKGT
55	4-1BB抗體20H4.9 IgG4，重鏈	MKHLWFFLLL VQLQQWGAGL CAVYGGSFSG EKGLEWIGEI SLESRVTISV LSSVTAADTA GNYDWYFDLW ASTKGPSVFP STAALGCLVK WNSGALTSGV GLYSLSSVVT YTCNVDPKPS KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT PEVQFNWYVD PREEQFNSTY DWLNGKEYKC IEKTISKAKG PPSQEEMTKN FYPSDIAVEW KTTTPVLDS VDKSRWQEGN LHNHYTQKSL SLSL	VAAPRWVLSQ LKPSETLSLT YYWSWIRQSP NHGGYVTYNP DTSKNQFSLK VYYCARDYGP GRGTLTVSS LAPCSRSTSE DYFPEPVTVS HTFPAVLQSS VPSSSLGTKT NTKVDRVES CVVVDVSQED GVEVHNAKTK RWSVLTVLHQ KVSNGKLPSS QPREPQVYTL QVSLTCLVKG ESNGQPENNY GSFFLYSRLT VFSCSVMHEA
56	4-1BB抗體20H4.9 IgG4，輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ CGGTKVEIKR PPSDEQLKSG FYPREAKVQW SQESVTEQDS LTLSKADYEK QGLSSPVTKS FNRGEC	GQAPRLLIYD RSNWPPALTF TVAAPSVFIF TASVVCLLNN KVDNALQSGN KDSTYLSST HKVYACEVTH
57	4-1BB抗體MOR7480 IgG2，重鏈	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSF STYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDS YTNYSFSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMY YCARGYGIFDYWGQGT LTVT SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVD	

SEQ ID NO:	描述	序列
		HKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVA GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVSFLTVDHQLDNLGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYT QKSLSLSP
58	4-1BB抗體MOR7480 IgG2，輕鏈	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQ YAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIPE RFGSNGSGNTATLTISGTQAMDEADYYCA TYTGFGSLAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFPPSSEELQANKATLYCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAA SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
59	Her2 (TRAS)-抗運載蛋白-4-1BB 人類IgG4重鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGY TRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSFLTVDHQLDNLG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSVMSVHEAL HNHYTQKSLSLGLKGGGGSGGGGSGGGG GSQDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFH GKWYVVGQAGNIRLREDKDPIKMMATIY ELKEDKSYDVTMVKFDDKKCMYDIWTF VPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLRVVST NYNQHAMVFFKFVFQNREEFYITLYGRK ELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPID QCIDG
60	Her2 (TRAS)-抗運載蛋白-4-1BB 人類IgG4輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDV NTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGV PSRFGSRSRGTDFLTISLQPEDFATYYCQ QHYYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
61	DP47 Fc白鏈	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF

SEQ ID NO:	描述	序列
		SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKGS GFDYW GQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
62	DP47輕鏈	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
63	DP47-抗 運 載 蛋 白-4-1BB人 類 IgG4重鏈	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKGS GFDYW GQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGKGGGGSGGGGSGGGGSGDSTS DLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYV VGQAGNIRLREDKDPIKMMATIYELKEDK SYDVTMVKFDDKKCMYDIWTFVPGSQPG EFTLGKIKSFPGHTSSLVRVYSTNYNQHA MVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELTSELK ENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
64	DP47-抗 運 載 蛋 白-4-1BB人 類 IgG4輕鏈	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP

SEQ ID NO:	描述	序列
		SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SLTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
65	Her2 (TRAS) 人 類IgG1 P329G LALA，重鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGY TRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSP
66	Her2 (PER) 人 類IgG1 P329G LALA，重鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF TDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSG GSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGGQT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP
67	DP47 人類IgG1 P329G LALA，重鏈	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKGS GFDYWGGQGLTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA

SEQ ID NO:	描述	序列
		VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
68	(G4S)2肽連接子	GGGGS
69	人類4-1BBL (UniProt編號P41273)	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE
70	人類4-1BBL(50-254)	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSP DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPR SE
71	肽連接子G4S	GGGGS
72	肽連接子(SG4) ₂	SGGGGS
73	肽連接子(G ₄ S) ₃	GGGGS
74	肽連接子G4(SG4) ₂	GGGGS
75	肽連接子(G ₄ S) ₄	GGGGS
76	肽連接子	GSPGSSSSGS
77	肽連接子	GSGSGSGS
78	肽連接子	GSGSGNGS
79	肽連接子	GGSGSGSG
80	肽連接子	GGSGSG
81	肽連接子	GGSG
82	肽連接子	GGSGNGSG
83	肽連接子	GGNGSGSG
84	肽連接子	GGNGSG
85	人類CD3ε	UniProt編號P07766
86	食蟹獼猴CD3ε	NCBI GenBank編號BAB71849.1 Uniprot Q05LI5
87	VHCH1(EE) (MU137-1) Fc-KK (mu4-1BB-Her2)	參見表4A
88	VLCH1 (2C4) VHCH1(EE) (MU137-1) Fc-DD (mu4-1BB-	參見表4A

SEQ ID NO:	描述	序列
	Her2)	
89	VLCL(RK)-輕鏈(MU137-1) (mu4-1BB-Her2)	參見表4A
90	VHCL-輕鏈(2C4)	參見表4A
91	重鏈CDR-H1，CD3	NYYIH
92	重鏈CDR-H2，CD3	WIYPGDGNTK YNEKFKG
93	重鏈CDR-H3，CD3	DSYSNYYFDY
94	輕鏈CDR-L1，CD3	KSSQSLLNSR TRKNYLA
95	輕鏈CDR-L2，CD3	WASTRES
96	輕鏈CDR-L3，CD3	TQSFILRT
97	重鏈可變域VH，CD3	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIHWVRQA PGQGLEWIGW IYPGDGNTKY NEKFKGRATL TADTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARD YSNYYFDYWG QGTLTVSS
98	輕鏈可變域VL，CD3	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL NSRTRKNYLA WYQQKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCTQSFIL RTFGQGKVE IK
99	重鏈CDR-H1，Her2 (7C2)	GYWMN
100	重鏈CDR-H2，Her2 (7C2)	MIHPDSEIR ANQKFRD
101	重鏈CDR-H3，Her2 (7C2)	GTYDGGFEY
102	輕鏈CDR-L1，Her2 (7C2)	RASQSVSGSR FTYMH
103	輕鏈CDR-L2，Her2 (7C2)	YASILES
104	輕鏈CDR-L3，Her2 (7C2)	QHSWEIPPWT
105	重鏈可變域VH，Her2 (7C2)	QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYSFT GYWMNWLKQR PGQGLEWIGM IHPDSEIRA NQKFRDKATL TVDKSSTAY MQLSSPTSED SAVYYCARGT YDGGFEYWGQ GTTLTVSS
106	輕鏈可變域VL，Her2 (7C2)	DIVLTQSPAS LVS LGQRAT ISCRASQSVS GSRFTYMHY QKPGQPPKL LIK YASILES GVPARFSGGG SGTDFTLNH PVEEDDTATY YCQHSWEIPP WTFGGGKLE IK

【0254】 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, 美國公眾衛生服務署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991)中。抗體鏈之胺基酸係根據EU編號系統編號及提及, 該等EU

編號系統根據如上文所定義之Kabat (Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, 美國公眾衛生服務署, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991))。

【0255】

實例

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。

【0256】

重組DNA技術

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之總體資訊在Kabat, E.A.等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, NIH公開號91-3242中給出。

【0257】

DNA定序

藉由雙股定序法測定DNA序列。

【0258】

基因合成

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。在確切基因序列無法獲得的情況下，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。

【0259】

細胞培養技術

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。

【0260】

蛋白質純化

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，接著立即中和樣品。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。單體抗體級分經彙集、使用例如MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO)離心濃縮器濃縮(必要時)、冷凍且在-20°C或-80°C下儲存。提供部分樣品用於例如藉由SDS-PAGE、尺寸排阻層析法(SEC)或質譜分析進行後續蛋白質分析及分析型表徵。

【0261】**SDS-PAGE**

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4-12% 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。

【0262】**分析型尺寸排阻層析**

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。

【0263】**實例1****產生及生產Her2靶向4-1BB促效抗原結合分子****1.1. 產生及生產含有Her2靶向4-1BB配位三聚體之Fc融合物抗原結合分子**

用於靶向三聚4-1BB配位體之Her2結合子為帕妥珠單抗(在下文中稱
為PER)、曲妥珠單抗(TRAS)及親和力成熟帕妥珠單抗(aff-PER)，如WO
2015/091738中所述。

【0264】 編碼特異性針對Her2之結合子之重鏈及輕鏈DNA序列的可

變區係用白之恆定重鏈或人類IgG1之恆定輕鏈進行框內次選殖。

【0265】 根據Uniprot資料庫之P41273序列合成人類4-1BB配位體之胞外域之DNA序列編碼部分(胺基酸71-248)。

【0266】 如圖1A中所描繪地選殖含有4-1BB配位體之兩個胞外域(由(G4S)₂連接子分離)且與人類IgG1-CL域融合之多肽：人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類CL。

【0267】 如圖1B中所述地選殖含有4-1BB配位體之一個胞外域且與人類IgG1-CH域融合之多肽：人類4-1BB配位體、(G4S)₂連接子、人類CH。

【0268】 為改良正確配對，在交叉CH-CL中引入以下突變。在與人類CL融合之二聚4-1BB配位體中，引入突變E123R及Q124K。如國際專利申請公開案第WO 2015/150447號中所述，在與人類CH1融合之單體4-1BB配位體中，將突變K147E及K213E選殖至人類CH1域中。

【0269】 編碼特異性針對Her2之結合子(PER、TRAS及aff-PER)之重鏈及輕鏈DNA序列之可變區係用白之恆定重鏈或人類IgG1之恆定輕鏈進行框內次選殖。

【0270】 在Fc域中，根據國際專利申請公開案第WO 2012/130831號中所述之方法在杵及白重鏈之恆定區中引入P329G、L234A及L235A突變以消除與Fcγ受體之結合。含有S354C/T366W突變之二聚配位體-Fc杵鏈、單體CH1融合物、含有Y349C/T366S/L368A/Y407V突變之靶向抗Her2-Fc白鏈及抗Her2輕鏈之組合允許產生雜二聚體，其包括組裝之三聚4-1BB配位體及Her2結合Fab(圖2A)。

【0271】 表1顯示單價抗Her2 (PER)之胺基酸序列分離含有CH1-CL

交換及帶電殘基之三聚4-1BB配位體Fc (kih)融合抗原結合分子。分子稱作Her2 (PER)-4-1BBL。

【0272】 表2顯示含有CH1-CL交換及帶電殘基之單價抗Her2 (TRAS)裂解型三聚4-1BB配位體Fc (kih)融合抗原結合分子之胺基酸序列。分子稱作Her2 (TRAS)-4-1BBL。

【0273】 表3顯示含有CH1-CL交換及帶電殘基之單價抗Her2 (aff-PER)裂解型三聚4-1BB配位體Fc (kih)融合抗原結合分子之胺基酸序列。分子稱作Her2 (aff-PER)-4-1BBL。

表1：含有CH1-CL交換及帶電殘基(*表示帶電殘基)之Her2 (PER)-4-1BBL的胺基酸序列

SEQ ID NO:	描述	序列
37	二聚hu 4-1BBL (71-248)- CL* Fc 杵鏈	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGG GGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGG GSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSP
38	單體hu 4-1BBL (71-248) - CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGG GGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTGPS

		SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
45	抗Her2 (PER) Fc 白鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDW VRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSV DRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
46	抗Her2 (PER)輕 鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

表2：含有CH1-CL交換及帶電殘基(*表示帶電殘基)之Her2 (TRAS)-4-1BBL的胺基酸序列

SEQ ID NO:	描述	序列
37	二聚hu 4-1BBL (71-248)- CL* Fc 杵鏈	參見表1
38	單體hu 4-1BBL (71-248) - CH1*	參見表1
47	抗Her2 (TRAS) Fc白鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
48	抗Her2 (TRAS) 輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

表3：含有CH1-CL交換及帶電殘基(*表示帶電殘基)之Her2 (aff-PER)-4-1BBL的胺基酸序列

SEQ ID NO:	描述	序列
37	二聚hu 4-1BBL (71-248)- CL* Fc 杵鏈	參見表1
38	單體hu 4-1BBL (71-248) - CH1*	參見表1
49	抗Her2 (aff-PER) Fc白鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIIVNRRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
50	抗Her2 (aff-PER) 輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFRTYTGVPSTRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0274】藉由使用聚伸乙亞胺共轉染HEK293-EBNA細胞與哺乳動物表現載體來產生雙特異性構築體。細胞經1:1:1:1之對應表現載體(「載體4-1BBL Fc-杵鏈」：「載體4-1BBL輕鏈」：「載體Fc-白鏈」：「載體輕鏈」)轉染。

【0275】生產係使用HEK293 EBNA細胞在搖瓶中進行。為進行轉染，細胞經離心且培養基經預溫熱在CD CHO培養基置換。在CD CHO培養基中混合表現載體，添加PEI，渦旋溶液且在室溫下培育10分鐘。隨後，將細胞與DNA/PEI溶液混合，轉移至搖瓶中且在具有5% CO₂氛圍的培育箱中在37°C下培育3小時。培育後，添加具有補充劑之Excell培養

基。在轉染之後一天，添加12%進料。在培養7天之後，藉由離心收集細胞上清液。溶液經無菌過濾，用疊氮化鈉補充至0.01% (w/v)之最終濃度，且保持於4℃下。

【0276】 藉由使用蛋白質A之親和層析，隨後藉由尺寸排阻層析，自細胞培養物上清液純化所分泌之蛋白質。對於親和層析，將上清液裝載於使用20 mM磷酸鈉、20 mM檸檬酸鈉pH 7.5平衡之蛋白A MabSelect Sure管柱(GE Healthcare)上。藉由用平衡緩衝液洗滌移除未結合蛋白質。結合蛋白質使用以20 mM檸檬酸鈉、100 mM氯化鈉、100 mM甘胺酸，pH 3.0產生之分步溶離來溶離。藉由添加1/10 (v/v) 0.5 M磷酸鈉，pH 8.0來調節所收集之溶離份的pH。將蛋白質進行濃縮且過濾，隨後裝載至經20 mM組胺酸、140 mM氯化鈉，pH 6.0平衡之HiLoad Superdex 200管柱(GE Healthcare)上。

【0277】 藉由使用基於胺基酸序列計算之莫耳消光係數量測280nm下的OD來測定經純化之雙特異性構築體的蛋白質濃度。使用LabChipGXII (Caliper)在有及無還原劑(Invitrogen, USA)存在下藉由CE-SDS分析雙特異性構築體之純度及分子量。在25℃下，使用在25 mM K₂HPO₄、125 mM NaCl、200 mM L-精胺酸單鹽酸鹽、0.02% (w/v) NaN₃，pH 6.7操作緩衝液中平衡之TSKgel G3000 SW XL分析型尺寸排阻管柱(Tosoh)分析雙特異性構築體之聚集物含量。

【0278】 表4概括含有HER2靶向及非靶向4-1BB配位三聚體之Fc (kih)融合抗原結合分子及對照分子之產率及最終單體含量。

表4：含有Her2靶向4-1BB配位三聚體之Fc (kih)融合抗原結合分子之生物化學分析

分子	單體[%]	產量[mg/l]	CE-SDS
----	-------	----------	--------

	(SEC)		(非紅色)
Her2 (PER) 4-1-BBL	98	3.5	89
Her2 (TRAS) 4-1BBL	100	2.8	97
Her2 (aff-PER) 4-1BBL	98	16.4	93

【0279】

1.2. 產生及生產Her2靶向4-1BB促效抗原結合分子作為小鼠替代物(mu4-1BB-Her2)

由於mu 4-1BBL天然地形成二聚體(A. Brita 等人 2018)且不像在人體中那樣形成三聚體，已如圖2B中所示地製備對於小鼠4-1BB具有二價結合且對於Her2具有單價結合之雙特異性促效4-1BB抗體，亦稱為2+1。

【0280】 在此實例中，構築體之HC1由以下組分構成：抗小鼠4-1BB (純系MU137-1)之VHCH1繼之以CH2及CH3。HC2由以下各者構成：抗Her2 (純系2C4，Adams CW等人, Cancer Immunol Immunother, 55(6), 2006, 第717-727頁，交換Fab)之VLCH1繼之以抗小鼠4-1BB (純系MU137-1) 之VHCH1及CH2及CH3。分別在HC1及HC2中引入由Gunasekaran等人, J. Biol. Chem. 2010,19637-19646描述之促進雜二聚之突變，亦即E356K及D399K (稱為KK)以及K392D及K409D (稱為DD)。

【0281】 此外，根據例如Baudino等人 J. Immunol. (2008), 181, 6664-6669或WO 2016/030350 A1中所描述之方法在重鏈之恆定區中引入DAPG突變以消除與小鼠Fcγ受體之結合。簡言之，已在Fc-DD及Fc-KK重鏈之恆定區中引入D265A及P329G突變以消除與Fcγ受體之結合(根據Kabat EU索引編號；亦即D265A，P329G)。

【0282】 Fc-DD與Fc-KK鏈之組合允許產生雜二聚體，其包括一個Her2結合Fab及兩個4-1BB結合Fab。為改良正確配對，在抗-4-1BB Fab之CH-CL中引入以下突變：CL中之E123R及Q124K以及CH1中之K147E

及K213E。

【0283】 2+1抗4-1BB (MU137-1)、抗Her2 (2C4)抗體之胺基酸序列可見於表4A中。

表4A：2+1抗mu 4-1BB抗Her2 (2C4)抗 體DAPG DDKK(mu4-1BB-Her2)之胺基酸序列

SEQ ID NO:	描述	序列
87	VHCH1(EE) (MU137-1) Fc-KK	DVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFIFSYFDMAWV RQAPTKGLEWVASISPSGDIPYYRDSVKGRFTVSRENA KSSLYLQMDSLRSEDATATYYCARRSYGGYSELDYWG QGVMVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCL LVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS SSVTVPSSWTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDEKIVPRDCG CKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVAI SKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTFRSV SELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAGAPIEKTISKTK GRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDIT VEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKLVNQ KSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSP
88	VLCH1 (2C4) VHCH1(EE) (MU137-1) Fc-DD	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITCKASQDVSIGVAWYQ QRPQGSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFITIS SVQAEDLAVYYCQYYIYPYTFGGGKLEIKSSAKTT PPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQT VTCNVAHPASSTKVDEKIVPRDCGGGGSGGGGSDVQ LVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFIFSYFDMAWVRQA PTKGLEWVASISPSGDIPYYRDSVKGRFTVSRENAKSS LYLQMDSLRSEDATATYYCARRSYGGYSELDYWGQGV MVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVEG YFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVT VPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDEKIVPRDCGCKP CICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVAISKD DPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTFRSVSELP IMHQDWLNGKEFKCRVNSAAGAPIEKTISKTKGRPK APQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQ WNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNW EAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSP
89	VLCL(RK)-輕 鏈 (MU137-1)	DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNWLAWYHQ KPGKSPQLLIYGTSSLADGVPSRFSGSSSGSQYSLKISR LQVEDIGIYYCLQAYGAPWTFGGGKLELKRADAAPT VSIFPPSSRKLTSGGASVVCFLNFPKDIVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERH NSYTCEATHKTTSTSPIVKSFNRNEC
90	VHCL-輕 鏈 (2C4)	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGFTFTDYTMDWV KQSHGKSLEWIGDVNPNSGGSIYNQRFKGKASLTVDR

		SSRIVYMELRSLTFEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQ GTTLTVSSASDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYS MSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRN EC
--	--	---

表4B：2+1抗mu 4-1BB抗Her2 (2C4)抗體之生物化學分析

分子	單 體[%] (SEC)	產量[mg/l]	CE-SDS (非紅色)
2+1 H2H抗mu 4-1BB抗Her2 (2C4) muIgG1 DAPG DDKK (mu4-1BB-Her2)	100	2.5	100

【0284】

實例2

Her2靶向裂解型三聚4-1BB配位體Fc融合物抗原結合分子藉由表面電漿子共振之功能表征

製備4-1BB Fc (kih)融合物分子

【0285】 編碼人類4-1BB之胞外域的DNA序列(根據Q07011之人類4-1BB之胺基酸24至186，SEQ ID NO:51)係用杵上之人類IgG1重鏈CH2及CH3域進行框內次選殖。在抗原胞外域與人類IgG1之Fc之間引入AcTEV蛋白酶裂解位點。在抗原-Fc杵之C端引入用於定向生物素標記之Avi標 籤 。 含 有S354C/T366W突 變 之 抗 原-Fc杵 鏈 與 含 有Y349C/T366S/L368A/Y407V突變之Fc白鏈之組合允許產生雜二聚體，其包括含有4-1BB胞外域之鏈之單一複本，因此產生Fc連接之抗原之單體形式。表5展示抗原Fc-融合構築體之胺基酸序列。

表5：單體人類4-1BB Fc (kih)融合分子之胺基酸序列

SEQ ID NO:	抗原	序列
52	Fc白鏈	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSL SP

53	人類 4-1BB 抗原 Fc 杵鏈	LQDPCSNCPAGTFCDNRRNQICSPCPPNSFSSAGGQRT CDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAG CSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICR PWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASS VTPPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGG LNDIFEAQKIEWHE
----	----------------------	--

【0286】 將所有4-1BB-Fc-融合物分子編碼序列選殖入質體載體，其驅動插入物自MPSV啟動子之表現且含有位於CDS之3'端處的合成polyA信號序列。此外，載體含有用於質體之游離型維護之EBV OriP序列。

【0287】 關於經生物素標記之單體抗原/Fc融合分子之製備，用三個編碼融合蛋白之兩個組分(杵及臼鏈)的載體以及BirA (生物素標記反應所需之酶)共轉染以指數方式生長之懸浮液HEK293 EBNA細胞。以2:1:0.05之比率(「抗原ECD-AcTEV-Fc杵」:「Fc臼」:「BirA」)使用相應載體。

【0288】 關於在500 ml搖瓶中製造蛋白質，在轉染之前24小時接種4億個HEK293 EBNA細胞。關於轉染，使細胞在210 g下離心5分鐘，且用預溫熱之CD CHO培養基置換上清液。使表現載體再懸浮於20 mL含有200 µg載體DNA之CD CHO培養基中。在添加540 µL聚乙烯亞胺(PEI)之後，將溶液渦旋15秒且在室溫下培育10分鐘。隨後，將細胞與DNA/PEI溶液混合，轉移至500 mL搖瓶中且在具有5% CO₂氛圍之培育箱中在37℃下培育3小時。在培育之後，添加160 mL F17培養基且培養細胞24小時。在轉染之後一天，將1 mM丙戊酸及7% Feed 1與補充劑一起添加至培養物中。培養7天之後，藉由使細胞在210 g下短暫離心15分鐘收集細胞上清液。將溶液無菌過濾(0.22 µm過濾器)，補充疊氮化鈉至最終濃度為0.01%

(w/v)，且保持在4°C下。

【0289】藉由使用蛋白質A之親和層析，隨後藉由尺寸排阻層析，自細胞培養物上清液純化所分泌之蛋白質。對於親和層析，將上清液裝載於用40 mL 20 mM磷酸鈉、20 mM檸檬酸鈉(pH 7.5)平衡之HiTrap ProteinA HP管柱(CV=5 mL，GE Healthcare)上。藉由用至少10倍管柱體積之含有20 mM磷酸鈉、20 mM檸檬酸鈉、0.5 M氯化鈉之緩衝液(pH 7.5)洗滌來移除未結合蛋白質。使用經20管柱體積之20 mM檸檬酸鈉、0.01% (v/v) Tween-20 (pH 3.0)產生的線性pH梯度之氯化鈉(0至500 mM)來溶離結合蛋白質。接著用10管柱體積之20 mM檸檬酸鈉、500 mM氯化鈉、0.01% (v/v) Tween-20 (pH 3.0)洗滌管柱。

【0290】藉由添加1/40 (v/v) 2 M Tris，pH 8.0來調節所收集之溶離份之pH。蛋白質經濃縮且過濾，隨後裝載於用2 mM MOPS、150 mM氯化鈉、0.02% (w/v)疊氮化鈉溶液(pH 7.4)平衡之HiLoad Superdex 200管柱(GE Healthcare)上。

【0291】重組人類Her2 (ErbB2蛋白質之ECD，SEQ ID NO:54之胺基酸23至652，UniProt寄存編號P04626-1)為市售的(例如獲自abcam，目錄號ab168896)且用於測定與Her2之結合。

【0292】

測定Her2靶向裂解型三聚4-1BB配位體Fc融合物抗原結合分子之同時結合

藉由表面電漿子共振(SPR)評估同時結合人類4-1BB Fc (kih)及人類Her2之能力。所有SPR實驗均在Biacore T200上在25°C下以HBS-EP作為操作緩衝液(0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、

0.005%界面活性劑P20，Biacore, Freiburg/Germany)來進行。生物素標記之人類4-1BB Fc (kih)與抗生蛋白鏈菌素(SA)感測器晶片之流動細胞直接偶合。使用至多450個共振單位(RU)之固定水準。

【0293】 Her2靶向裂解型三聚4-1BB配位體Fc融合物構築體在30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 之流量下以200 nM的濃度範圍在90秒內穿過流動細胞且將解離設定為零秒。人類Her2作為第二分析物在30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 之流量下穿過流動細胞在90秒內以500 nM之濃度注射(圖3A)。監測解離120秒。藉由減去在參考流動細胞(其中未固定蛋白質)中獲得之反應來校正整體折射率差異。

【0294】 如在圖3B及3C之圖式中可見，雙特異性構築體可同時結合人類4-1BB及人類Her2。

【0295】

實例3

Her2靶向裂解型三聚4-1BB配位體Fc融合物抗原結合分子之功能表征

對於功能分析，吾人測試上述單價Her2靶向裂解型三聚4-1BB配位體Fc融合物抗原結合分子，亦即Her2 (PER)-4-1BBL、Her2 (aff-PER)-4-1BBL及Her2 (TRAS)-4-1BBL，相對於兩種前述促效抗人類4-1BB抗體，亦即抗人類4-1BB純系20H4.9 人類IgG4 (專利EP1670828B1及US7659384(B2)中所述，具有重鏈SEQ ID NO:55及輕鏈SEQ ID NO:56之抗體)及抗人類4-1BB純系MOR7480 人類IgG2 (專利申請案WO2012/032433中所述，具有重鏈SEQ ID NO:57及輕鏈SEQ ID NO:58之抗體)，及前述融合多肽Her2 (TRAS)-抗運載蛋白-4-1BB 人類IgG4 (如專利申請案WO2016/177802中所述之SEQ ID NO 59及60之融合多肽)。

【0296】 此外，使用不同對照分子，如非靶向DP47-4-1BBL (包含

胺基酸序列SEQ ID NO:37、28、61及62且在WO 2016/075278 A1中描述為不結合至抗原之對照D (稱為DP47之生殖系對照)之分子用於置換抗原結合域)、DP47-抗運載蛋白-4-1BB 人類IgG4(SEQ ID NO:63及64之融合多肽, 與WO2016/17780中所述之分子類似地製備)、Her2 (TRAS)人類IgG1 P329G LALA (具有重鏈SEQ ID NO:65及輕鏈SEQ ID NO:48之抗體)、Her2 (PER)人類IgG1 P329G LALA (具有重鏈SEQ ID NO:66及輕鏈SEQ ID NO:46之抗體)及非靶向DP47 人類IgG1 P329G LALA (具有重鏈SEQ ID NO:67及輕鏈SEQ ID NO:62之抗體)。此等IgG1抗體包含Pro329Gly、Leu234Ala及Leu235Ala突變以消除與Fc γ 受體之結合。

【0297】

3.1. 與Her2表現腫瘤細胞之結合

為了測試與細胞表面表現之Her2之結合, 使用不同人類Her2表現腫瘤細胞: 人類乳癌細胞株SK-Br3 (ATCC HTB-30)、人類乳癌細胞株KPL-4 (Kawasaki Medical School)及人類胃癌細胞株NCI-N87 (ATCC CRL-5822)。

【0298】將再懸浮於DPBS (Gibco, Life Technologies, 目錄號14190-326)中之 0.2×10^6 個腫瘤細胞添加至圓底懸浮細胞96孔盤(greiner bio-one, cellstar, 目錄號650185)之各孔中。細胞用200 μ L DPBS洗滌一次且使集結粒再懸浮。添加含有1:5000稀釋之Fixable Viability Dye eFluor 450 (eBioscience, 目錄號65-0863-18)之100微升/孔之4°C冷DPBS緩衝液且將盤在4°C下培育30分鐘。細胞用200 μ L 4°C冷DPBS緩衝液洗滌一次且再懸浮於50微升/孔之4°C冷FACS緩衝液(供有2% FBS、5 mM EDTA pH 8 (Amresco, 目錄號E177)及7.5 mM疊氮化鈉(Sigma-Aldrich

S2002)之DPBS，含有滴定濃度之人類裂解型4-1BB配位體分子，稱作Her2 (PER)-4-1BBL或Her2 (aff-PER)-4-1BBL或Her2 (TRAS)-4-1BBL，以及對照分子，亦即非靶向DP47-4-1BBL，或抗人類4-1BB抗體，稱作抗人類4-1BB純系20H4.9 huIgG4或抗人類4-1BB純系MOR-7480 huIgG2或融合蛋白Her2 (TRAS)-抗運載蛋白-4-1BB huIgG4或其非靶向對照DP47-抗運載蛋白-4-1BB huIgG4或Her2 (TRAS) huIgG1 P329G LALA或Her2 (PER) huIgG1 P329G LALA或DP47 huIgG1 P329G LALA中。將細胞在4℃下培育1小時且隨後用冷FACS緩衝液洗滌若干次以移除未結合抗體。細胞另外在4℃下用50微升/孔之4℃冷FACS緩衝液5 µg/mL PE結合之AffiniPure抗人類IgG F(ab')₂片段特異性山羊F(ab')₂片段(Jackson ImmunoResearch，目錄號109 116 097)染色30分鐘。細胞用200 µL 4℃ FACS緩衝液洗滌兩次且將細胞固定於含有1%甲醛的50微升/孔DPBS (Sigma，HT501320-9.5L)中至少10 min。隨後將細胞再懸浮於100 µL 4℃ FACS緩衝液中且使用與Cytomat (ThermoFisher)耦接之MACS Quant Analyzer 10流式細胞儀(Miltenyi Biotech)獲取。使用FlowJo版本10 (FlowJo LLC)、Microsoft Excel及Graph Pad Prism版本6 (Graph Pad Software Inc.)分析資料。

【0299】如圖4A至4D中所示，Her2 (PER)-4-1BBL及Her2 (aff-PER)-4-1BBL顯示與由人類腫瘤細胞SK-BR3或NCI-N87表現之人類Her2類似的結合，藉此Her2 (aff-PER)-4-1BBL分子顯示如表6中所列之略微較高EC₅₀值。與Her2 (PER)-4-1BBL不同，抗體Her2 (PER) huIgG P329G LALA結合二價而非單價。此由如圖4中所示之略微較低MFI (較少抗體/細胞表面，因為抗體可佔據兩個而非一個Her2分子)及如表6中所列之略微

較低的反映親合力效應之EC₅₀值所反映。二價曲妥珠單抗結合融合蛋白 Her2 (TRAS)-抗 運 載 蛋 白-4-1BB huIgG4反映低於二價結合Her2 (PER)huIgG P329G LALA之MFI及較高EC₅₀值(圖4及表6中所示)。此反映曲妥珠單抗(TRAS)結合子相比於帕妥珠單抗(PER)結合子較低之親和力及親合力。

表6：圖4中所示之Her2⁺腫瘤細胞株之結合曲線的EC₅₀值

	Her2 (aff-PER)-4-1BBL	Her2 (PER)-4-1BBL	Her2 (PER) huIgG1 PGLALA	Her2 (TRAS)-抗運載蛋白4-1BB huIgG4
EC ₅₀ [nM] on SK-Br3細胞	7.3	2.4	1.3	4.1
EC ₅₀ [nM] on NCI-N87細胞	4.3	2.9	2.1	5.3

【0300】如圖5A及5B中所示，Her2 (PER)-4-1BBL及Her2 (aff-PER)-4-1BBL顯示與由人類乳癌細胞株KPL-4表現之人類Her2類似的結合。相比於Her2 (PER)-4-1BBL及Her2 (aff-PER)-4-1BBL，Her2 (Tras)-4-1BBL具有較低MFI (圖5A)及略微較高EC₅₀值(表7)，反映曲妥珠單抗(TRAS)相比於帕妥珠單抗(PER)在較低親和力。此僅針對單價Her2結合構築體顯示，因為二價Her2結合Her2 (TRAS) huIgG1 PG LALA及Her2 (PER) huIgG1 PG LALA分子(顯示親合力)結合類似(圖5B及表7)。相比於Her2 (Tras)-4-1BBL，二價Her2結合分子Her2 (TRAS)-抗運載蛋白-4-1BB huIgG4顯示較低MFI (圖5A)，但EC₅₀較低(表6)-此反映兩種Her2 (TRAS)靶向分子之親和力(單價結合)及親合力(二價結合)之間的差異。

表7：圖5中所示之Her2⁺腫瘤細胞株KPL-4之結合曲線的EC₅₀值

	KPL-4細胞之EC ₅₀ [nM]
Her2 (PER)-4-1BBL	0.23
Her2 (aff-PER)-4-1BBL	0.35
Her2 (TRAS)-4-1BBL	0.54
Her2 (TRAS)-抗運載蛋白4-1BB huIgG4	0.34
Her2 (PER) huIgG1 PGLALA	0.12
Her2 (TRAS) huIgG1 PGLALA	0.16

【0301】

3.2 生物活性分析

3.2.1 表現人類4-1BB及NF κ B-luc報導子卡匣之Jurkat細胞中之NF κ B活化

Jurkat-hu4-1BB-NF κ B-luc2報導子細胞株係訂購及接收自Promega (CS196004)且在RPMI 1640 (GIBCO, Life Technologies, 目錄號42401-042)中培養, RPMI 1640供有10% FCS (GIBCO, Life Technologies, 目錄號16000-044)、2 mM GlutaMAX-I (GIBCO, Life Technologies, 目錄號35050-038)、1 mM丙酮酸鈉(SIGMA-Aldrich, 目錄號S8636)、0.1 mM MEM-非必需胺基酸溶液(SIGMA-Aldrich, 目錄號M7145)、25 mM HEPES(Sigma Life Science, 目錄號H0887)、600 μ g/ml G-418 (Roche, 目錄號04727894001)及400 μ g/ml潮黴素B(Roche, 目錄號10843555001)。為了建立活化分析, 將Jurkat-hu4-1BB-NF κ B-luc2再懸浮於供有10% FCS及2 mM GlutaMAX-I之RPMI 1640 (另外稱為分析培養基)中且將含20`000個細胞之100  $\mu$ L接種於組織培養物處理之平底白色96孔盤(Huber lab, greiner bio-one目錄號655083)中或將含2`000個細胞之10 μ L接種於組織培養物處理之平底白色384孔盤(Corning, 目錄號3826)之各孔中。隨後, 添加50 μ L (96孔盤)或10 μ L (384孔盤)分析培養基或Her2表現腫瘤細胞(SK-BR3、KLP-4或NCI-N87, 96孔盤之每孔100`000個細胞或384孔盤之每孔10`000個細胞)。最後, 添加50 μ L (96孔盤)或10 μ L (384孔盤)分析培養基, 其含有不同滴定濃度之單價Her2靶向裂解型三聚4-1BB配位體Fc融合物抗原結合分子(稱作Her2 (PER)-4-1BBL、Her2 (aff-PER)-4-1BBL或Her2 (TRAS)-4-1BBL)或非靶向對照DP47-4-1BBL

或抗人類4-1BB抗體20H4.9 huIgG4或MOR-7480 huIgG2或融合蛋白Her2 (TRAS)-抗運載蛋白-4-1BB huIgG4或其非靶向對照DP47-抗運載蛋白-4-1BB huIgG4或對照抗體Her2 (TRAS) huIgG1 P329G LALA或Her2 (PER) huIgG1 P329G LALA或DP47 huIgG1 P329G LALA。將盤在37°C及5% CO₂下在細胞培養培育箱中培育6 h。

【0302】為了使用96孔盤偵測螢光素酶活性，將盤用200微升/孔DPBS洗滌兩次。將40 µl新近製備之報導子溶解緩衝劑(Promega，目錄號：E3971)添加至各孔中且將盤儲存於-20°C下隔夜。第二天，將冷凍盤及偵測緩衝液(Luciferase 1000分析系統，Promega，目錄號E4550)解凍至室溫。將100 µL偵測緩衝液添加至各孔且使用Tecan微量盤讀取器(Tecan)在500 ms積分時間下儘可能快地量測盤，不過濾，收集所有波長及頂部讀數。

【0303】為了使用384孔盤偵測螢光素酶活性，向新近解凍至室溫之各孔中添加6 µL One-Glo螢光素酶(Promega，目錄號E6110)且使用Tecan微量盤讀取器(Tecan)在500 ms積分時間下儘可能快地量測盤，不過濾，收集所有波長及頂部讀數。由於螢光素酶介導之螢光素氧化而發射之光發射偵測為釋放光單位(URL)。資料係使用Microsoft Excel及Graph Pad Prism版本6 (Graph Pad Software Inc.)分析。

【0304】在圖6中，說明Jurkat-hu4-1BB-NFκB-luc2活化分析之設定。如圖7A至7F中所示，Her2 (PER)-4-1BBL及Her2 (aff-PER)-4-1BBL在Her2表現腫瘤細胞存在下顯示類似活性(圖7B及7C)，而融合蛋白Her2 (TRAS)-抗運載蛋白4-1BB huIgG1顯示較低活性潛能-顯示於表8中所列之較小曲線下面積以及較高EC₅₀值中。所有三種Her2靶向4-1BB促效分子在

不存在Her2表現細胞的情況下不誘導報導體細胞株Jurkat-hu4-1BB-NFκB-luc2之任何活化(圖7A)。僅促效抗人類4-1BB純系20H4.9 huIgG4能夠誘導Jurkat-hu4-1BB-NFκB-luc2活化-與Her2表現腫瘤細胞之存在或不存在無關(圖7D、7E及7F)。

表8：圖7中所示之NFκB活化誘導之螢光素酶活性曲線之EC₅₀值

	Her2(PER)-4-1BBL	Her2 (aff-PER)-4-1BBL	Her2 (TRAS)-抗 運載蛋白-4-1BB huIgG4	抗hu 4-1BB純 系20H4.9 huIgG4
無Her2 ⁺ 細胞之 EC ₅₀ [nM]	n.d.	n.d.	n.d.	0.16
SK-BR3細胞之 EC ₅₀ [nM]	0.02	0.03	0.23	0.20
NCI-N87細胞 之EC ₅₀ [nM]	0.03	0.05	0.32	0.14

【0305】在圖8A至8D中，將Her2 (PER)-4-1BBL相比於Her2 (TRAS)-4-1BBL。由於較低親和力結合子曲妥珠單抗(TRAS)，相比於Her2 (PER)-4-1BBL，Her2 (TRAS)-4-1BBL顯示較低活性(圖8B、8C及8D)。此顯示於較低曲線下面積及較高EC₅₀值(如表9中所示)中。在不存在Her2⁺腫瘤細胞的情況下，兩種分子均不活化報導子細胞株Jurkat-hu4-1BB-NFκB-luc2 (圖8A)。同樣，融合蛋白Her2 (TRAS)-抗運載蛋白4-1BB huIgG1顯示低於Her2 (PER)-4-1BBL或Her2 (TRAS)-4-1BBL之活性，其由較低曲線下面積、較低平線區值及較高EC₅₀顯示(顯示於圖8B-8D及表9中)。與圖7中類似，同樣，在此實驗中，僅促效抗人類4-1BB純系20H4.9 huIgG4能夠與存在或不存在Her2表現腫瘤細胞無關地誘導Jurkat-hu4-1BB-NFκB-luc2活化(圖8E-8H)。

表9：圖8中所示之NFκB活化誘導之螢光素酶活性曲線之EC₅₀值

EC ₅₀ [nM]	Her2(PER)-4-1BBL	Her2 (TRAS)-4-1BBL	Her2 (TRAS)-抗 運載蛋白-4-1BB huIgG4	抗hu 4-1BB純系 20H4.9 huIgG4
無Her-2+細胞	n.d.	0.02	0.02	0.07
SK-Br3	0.01	0.07	0.28	0.01
KPL-4	0.01	0.13	0.62	0.02
NCI-N87	0.02	0.16	0.43	0.02

【0306】

3.2.2 在Her2表現腫瘤細胞株NCI-N87存在下之人類PBMC之活化分析

對於Her2結合介導之交聯，使用表現Her2之黏附人類胃癌細胞株NCI-N87。NCI-N87細胞用DPBS (Gibco，Life Technologies，目錄號14190 326)洗滌且在37℃下用無酶之基於PBS之細胞解離緩衝液(Gibco，Life Technologies，目錄號13151-014)處理15分鐘。收集細胞且再懸浮於T細胞培養基中，該T細胞培養基由供應有10% FCS、2 mM GlutaMAX-I、1 mM丙酮酸鈉(SIGMA-Aldrich，目錄號S8636)、1% MEM非必需胺基酸溶液(SIGMA-Aldrich，目錄號M7145)及50 μM β-巰基乙醇(Sigma-Aldrich，目錄號M3148)之RPMI 1640組成，且用50 Gy (X射線輻照器RS 2000，Rad源)輻照。

【0307】 將含 2×10^4 個NCI-N87細胞之50 μL T細胞培養基接種至圓底組織培養96孔盤(TTP，目錄號92697)之各孔。添加50 μL T細胞培養基，其含有不同滴定濃度之人類單價Her2靶向裂解型三聚4-1BB配位體Fc融合物抗原結合分子Her2 (PER)-4-1BBL、Her2 (aff-PER)-4-1BBL或Her2 (TRAS)-4-1BBL或非靶向對照分子DP47-4-1BBL或促效抗人類4-1BB抗體抗人類4-1BB純系20H4.9 huIgG4或抗人類4-1BB純系MOR-7480 huIgG2或融合蛋白Her2 (TRAS)-抗運載蛋白-4-1BB huIgG4或其非靶向對照DP47-抗運載蛋白-4-1BB huIgG4或對照抗體Her2 (TRAS) huIgG1 P329G LALA、Her2 (PER) huIgG1 P329G LALA或DP47 huIgG1 P329G

LALA。自健康供體之白血球層分離之人類PBMC在37°C下在含有40 nM CFDA-SE (SIGMA-Aldrich，目錄號21888-25MG-F)之37°C溫熱DPBS中標記15分鐘。藉由添加胎牛血清(FBS)停止CFSE標記，將PBMC洗滌兩次且再懸浮於T細胞培養基中直至 1.5×10^6 個細胞/毫升之最終濃度。將50 μ L此PBMC細胞溶液接種至各孔以充分添加 7.5×10^4 個CFSE標記之PBMC。最終，製備含有8 nM促效性抗人類CD3人類IgG1純系V9之T細胞培養基之儲備溶液且以50微升/孔添加至各孔中，達到2 nM抗人類CD3人類IgG1純系V9之最終濃度。

【0308】將盤在37°C及5% CO₂下在細胞培育箱中培育4天。細胞用DPBS洗滌且在4°C下用含有以1:1000稀釋之LIVE/DEAD Fixable Aqua死細胞染色套組(Molecular Probes，Life Technology，目錄號L34957)的100微升/孔之DPBS染色30分鐘。細胞用200微升/孔之DPBS洗滌一次且在4°C下用50 μ L含有0.1 μ g/mL之PerCP-Cy5.5結合之抗人類CD137小鼠IgG1 κ (純系4B4-1，BioLegend，目錄號309814)、0.1 μ g/mL之PE/Cy7結合之抗人類PD-1小鼠IgG1 κ (純系EH12.2H7，BioLegend，目錄號329918)、0.03 μ g/mL之APC結合之抗人類CD25小鼠IgG1 κ (純系BC96，BioLegend，目錄號302610)、0.06 μ g/mL之APC/Cy7結合之抗人類CD8小鼠IgG1 κ (純系RPA-T8，BioLegend，目錄號3301016)、BV421結合之抗人類CD4小鼠IgG1 κ (純系RPA-T4，BioLegend，目錄號300532)之FACS緩衝液(具有2% FBS、5 mM EDTA pH 8 (Amresco，目錄號E177)及7.5 mM疊氮化鈉(Sigma-Aldrich S2002)之DPBS)染色30分鐘。細胞用200微升/孔之DPBS洗滌兩次且在4°C下與50微升/孔之新近製備之FoxP3 Perm/Fix緩衝液(eBioscience，目錄號00-5123)一起培育30分鐘。細胞用

200微升/孔之DPBS洗滌兩次，再懸浮於50微升/孔之供應有PE結合之以1:250稀釋之抗人類顆粒酶B小鼠IgG1κ (純系GB11，批號4269803，BD Pharmingen，目錄號561142)的新近製備之Perm緩衝液(eBioscience，目錄號00-8333)中，且在4℃下培育1小時。盤用200微升/孔之DPBS洗滌兩次且細胞用含有1%甲醛(Sigma，HT501320-9.5L)之DPBS固定15分鐘。使細胞再懸浮於100微升/孔之FACS緩衝液中且使用MACS Quant Analyzer X (Miltenyi Biotech)獲取。使用FlowJo V10 (FlowJo, LLC)、Microsoft Excel及GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc)分析資料。

【0309】在圖9中，說明PBMC活化分析之設定。如圖10A至10F及圖11A至11F中所示，Her2 (PER)-4-1BBL誘導CD8及CD4 T細胞之最強活化，其由IL-2Rα (CD25)之上調(圖10A及11A)、顆粒酶B之細胞內增加(圖10B及11B)及增加之增殖(圖10C及11C)所指示。Her2 (TRAS)-4-1BBL亦誘導CD8 (圖10A-10C)及CD4 T細胞(圖11A-11C)之強活化，然而具有較高EC₅₀值。融合多肽Her2 (TRAS)-抗運載蛋白4-1BB huIgG4介導較少T細胞活化，其主要顯示於頻率低得多的CD25⁺、顆粒酶B^高及增殖CD8 (圖10A-10C)及CD4 T細胞(圖11A-11C)中。促效抗人類4-1BB純系20H4.9 huIgG4抗體再次顯示一些活化潛能，然而不如靶向Her2之4-1BB促效劑多肽強力(圖10D-10F及圖11D-11F)。EC₅₀值及高於背景之曲線下面積值列於表10及表11中。

表10：圖10及11中所示之CD8及CD4T細胞活化曲線之EC₅₀值

EC ₅₀ [nM] PBMC活化分析	Her2(PER)- 4-1BBL	Her2 (TRAS)- 4-1BBL	Her2 (TRAS)- 抗運載蛋白-4- 1BB huIgG4	抗hu 4-1BB純 系20H4.9 huIgG4	抗hu 4-1BB純 系MOR-7480 hu IgG2
% CD25 ⁺ CD8	0.01	0.06	n.d.	n.d.	n.d.
% GnzB ^高 CD8	0.02	0.19	0.19	n.d.	n.d.

%增殖CD8	0.01	0.04	0.05	~0.03	n.d.
% CD25 ⁺ CD4	0.02	0.08	n.d.	n.d.	n.d.
% GnzB ^高 CD4	0.01	0.19	0.21	n.d.	n.d.
%增殖CD4	0.02	0.04	0.05	0.01	0.13

表11：圖10及11中所示之CD8及CD4T細胞活化曲線之高於背景值之曲線下面積

高於背景之AUC	Her2(PER)- 4-1BBL	Her2 (TRAS)- 4-1BBL	Her2 (TRAS)- 抗運載蛋白-4- 1BB huIgG4	抗hu 4-1BB純 系20H4.9 huIgG4	抗hu 4-1BB純 系MOR-7480 hu IgG2
% CD25 ⁺ CD8	10	8	4	n.d.	n.d.
% GnzB ^高 CD8	122	63	58	n.d.	n.d.
%增殖CD8	38	27	13	16	0.1
% CD25 ⁺ CD4	81	64	15	n.d.	n.d.
% GnzB ^高 CD4	55	27	23	n.d.	n.d.
%增殖CD4	25	20	12	10	12

【0310】

3.2.3 在Her2表現腫瘤細胞株KPL-4存在下之小鼠脾細胞之活化分析

對於Her2結合介導之交聯，使用Her2表現黏附人類乳癌細胞株KPL-4。KPL-4細胞用DPBS (Gibco，Life Technologies，目錄號14190 326)洗滌且在37℃下用無酶之基於PBS之細胞解離緩衝液(Gibco，Life Technologies，目錄號13151-014)處理15分鐘。收集細胞且再懸浮於T細胞培養基中，該T細胞培養基由供應有10% FCS、2 mM GlutaMAX-I、1 mM丙酮酸鈉(SIGMA-Aldrich，目錄號S8636)、1% MEM非必需胺基酸溶液(SIGMA-Aldrich，目錄號M7145)及50 μM β-巯基乙醇(Sigma-Aldrich，目錄號M3148)之RPMI 1640組成，且用50 Gy (X射線輻照器RS 2000，Rad源)輻照。

【0311】 將含2×10⁴個經輻照之KPL-4細胞之50 μL T細胞培養基接種至圓底組織培養96孔盤(TTP，目錄號92697)之各孔。添加50 μL含有不同滴定濃度之小鼠替代物mu4-1BB-Her2或非靶向對照mu4-1BB muIgG1

DAPG之T細胞培養基。自新近收集之C57BL/6小鼠脾分離小鼠脾細胞(Octo Dissociator, Miltenyi Biotech, 遵循製造商之方案)。隨後,藉由在室溫下在ACK溶解緩衝液(0.15 M NH_4CL , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA於ddH₂O中, pH 7.2)中培育10分鐘來溶解紅血球。藉由添加T細胞培養基停止溶解且用DPBS洗滌細胞。藉由在37°C下在含有0.5 μM CellTrace紫色增殖染料(Molecular Probes, Life Technologies, 目錄號C34557)之37°C溫熱DPBS中培育15分鐘來標記小鼠脾細胞。藉由添加胎牛血清(FBS)停止標記,將小鼠脾細胞洗滌兩次且再懸浮於T細胞培養基中直至 3×10^6 個細胞/毫升之最終濃度。將50 μL 之此小鼠脾細胞細胞溶液接種至各孔以向每孔添加 15×10^4 個紫色增殖染料標記之小鼠脾細胞。最後,製備含有2 $\mu\text{g/mL}$ 促效抗小鼠CD3 ϵ 亞美尼亞倉鼠IgG1純系1452C11(BioLegend目錄號100331)之T細胞培養基之儲備溶液且將50微升/孔添加至各孔,得到0.5 $\mu\text{g/mL}$ 促效抗小鼠CD3 ϵ 亞美尼亞倉鼠IgG1純系1452C11之最終濃度。

【0312】將盤在37°C及5% CO_2 下在細胞培育箱中培育3天。細胞用DPBS洗滌且在4°C下用含有以1:1000稀釋之LIVE/DEAD Fixable Aqua死細胞染色套組(Molecular Probes, Life Technology, 目錄號L34957)的100微升/孔之DPBS染色30分鐘。將細胞用200微升/孔之DPBS洗滌一次且在4°C下用50 μL 含有0.67 $\mu\text{g/mL}$ 抗小鼠CD8a-APC-Cy7 (BioLegend, 目錄號100714, 純系53-6.7, 大鼠IgG2 $\alpha\kappa$)、0.67 $\mu\text{g/mL}$ 抗小鼠CD4-APC(BioLegend, 目錄號100412純系GK1.5, 大鼠IgG2b, κ)、0.67 $\mu\text{g/mL}$ 抗小鼠CD137-PE (BioLegend, 目錄號106106, 純系17B5, 敘利亞倉鼠IgG)、0.67 $\mu\text{g/mL}$ 抗小鼠CD25-PerCP-Cy5.5 (BioLegend, 目錄號

101912，純系3C7，大鼠IgG2b，κ)之FACS緩衝液(供應有2% FBS、5 mM EDTA pH8 (Amresco，目錄號E177)及7.5 mM疊氮化鈉(Sigma-Aldrich S2002)之DPBS)染色30分鐘。細胞用200微升/孔之DPBS洗滌兩次且在4℃下與50微升/孔之新近製備之FoxP3 Perm/Fix緩衝液(eBioscience，目錄號00-5123)一起培育30分鐘。細胞用200微升/孔在DPBS洗滌兩次，再懸浮於50微升/孔之供應有10 µg/mL抗小鼠Eomes-AlexaFluor 488 (eBioscience，目錄號53-4875-82，純系Dan11mag，ratIgG2a)之新近製備之Perm緩衝液(eBioscience目錄號00-8333)中且在4℃下培育1小時。盤用200微升/孔之DPBS洗滌兩次且細胞用含有1%甲醛(Sigma，HT501320-9.5L)之DPBS固定15分鐘。使細胞再懸浮於100微升/孔之FACS緩衝液中且使用MACS Quant Analyzer X (Miltenyi Biotech)獲取。使用FlowJo V10 (FlowJo, LLC)、Microsoft Excel及GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc)分析資料。

【0313】在圖12中，說明小鼠脾細胞活化之設定。如圖13A至13D中所示，小鼠替代物mu4-1BB-Her2誘導CD8及CD4 T細胞之活化，其由IL-2Rα (CD25)之上調(圖13A及13C)及增加之增殖(圖13B及13D)指示。相比之下，非靶向促效mu4-1BB muIgG1 DAPG不誘導此類活化。因此，此協同性協同刺激效應很大程度上取決於Her2交聯。EC₅₀值及高於背景之曲線下面積值列於表12及表13中。

表12：圖13中所示之小鼠CD8及CD4T細胞活化曲線之EC₅₀值

EC ₅₀ [nM] 小鼠脾細胞活化分析	mu4-1BB-Her2
% CD25 ⁺ CD8	0.35
%增殖CD8	~0.03
% CD25 ⁺ CD4	0.36
% 增殖CD4	~0.1

表13：圖14中所示之小鼠CD8及CD4T細胞活化曲線之曲線下面積

AUC 小鼠脾細胞活化分析	mu4-1BB muIgG1 DAPG	mu4-1BB-Her2
% CD25 ⁺ CD8	53	64
%增殖CD8	354	380
% CD25 ⁺ CD4	70	80
%增殖CD4	208	279

【0314】

實例4

Her2 (PER)-4-1BBL及Her2/CD3雙特異性抗體之組合的活體外測試

為了測試Her2 (PER)-4-1BBL及Her2/CD3雙特異性抗體(Her2 TDB，Junttila等人, 2014)之組合，吾人使用帕妥珠單抗(2C4)衍生之Fab產生結合至Her2之4-1BBL雙特異性分子(圖2A)。基於曲妥珠單抗之Her2/CD3雙特異性抗體(Her2-TDB)結合至Her2之域IV (Cho等人, 2003)，而Her2 (PER)-4-1BBL非競爭性地結合至HER2之域II (Franklin等人, 2004)。Her2 TDB係如WO 2015/095392 A1中所述地產生。小鼠替代物為muIgG2a HER2 TDB，其中「杵」臂為鼠類抗HER2(hu4D5)且「臼」臂為嵌合抗鼠類CD3(2C11) (Leo等人 Proc Natl Acad Sci USA. 84: 1374-1378, 1987)。

【0315】

人類周邊血液單核細胞(PBMC)及CD8⁺ T細胞分離：

使用Lymphoprep培養基(STEMCELL Technologies)自健康志願者之血液分離人類PBMC。使用獲自Miltenyi Biotec (#130-094-156)之人類CD8⁺分離套組藉由陰性選擇自PBMC提取CD8⁺細胞。

【0316】

活體外T細胞活化：

所有用於流式細胞測量術細胞染色之抗體均獲自BD Biosciences(San Jose, CA)。將人類CD8⁺細胞及人類乳癌細胞株SKBR3細胞(3:1比率)在測試物存在下在平底96孔盤(BD)中培育24小時。在培育之後，將細胞轉移至新的V底96孔盤。細胞用抗CD8-FITC、抗CD69-PE及抗CD25-APC染色。藉由流式細胞測量術對CD8⁺ T細胞偵測CD69及CD25表面表現。將CD8⁺CD69⁺CD25⁺在百分比報導為T細胞活化。

【0317】

活體外靶細胞殺死：

將效應細胞(人類CD8⁺細胞)及靶細胞(SKBR3，以20,000個細胞/孔之密度)在測試物存在下在黑色透明底部96孔盤中以3:1比率培育48小時。在培育結束時，丟棄細胞上清液且將盤用PBS洗滌2×。添加100 μL Cell Titer-Glow Luminescent Cell Viability試劑(Promega目錄號G7570)且如說明書中所述地在光度計上讀盤。

【0318】

活體外T細胞增殖及存活：

CD8⁺ T細胞增殖反應係藉由量測羧基螢光素丁二醯亞胺酯(CFSE)螢光強度稀釋來偵測。簡言之，將人類CD8⁺ T細胞用CFSE標記且與SKBR3靶細胞及測試物共培養。HER2 TDB係以100 ng/ml使用且4-1BB促效劑係以1000 ng/ml使用。藉由流式細胞測量術分析獲自第0天(新近分離及標記之CD8⁺)、第3天及第7天之細胞等分試樣的CFSE螢光強度。CD8⁺ T細胞之存活率係藉由第0天、第3天及第7天之活CD8⁺ T細胞數目來量測。

【0319】 如所預期，單一藥劑Her2 (PER)-4-1BBL不誘導活體外T細胞活化或靶細胞殺死(分別為圖14A及14B)。抗HER2/CD3-TDB誘導穩

定T細胞活化及腫瘤細胞殺死，但此基本上不由與Her2 (PER)-4-1BBL共處理增強。相比之下，添加Her2 (PER)-4-1BBL顯著增強抗HER2/CD3-TDB誘導之活體外T細胞增殖/存活(圖15A及15B)。

【0320】

實例5

小鼠替代物Her2 (2C4)-4-1BB及Her2/CD3雙特異性抗體之組合之活體內抗腫瘤功效

鼠類4-1BB促效劑之抗腫瘤活性係在植入有表現人類HER2之Fo5腫瘤同種異體移植之免疫勝任型小鼠中測試(Lewis Phillips等人, 2008)。單一藥劑HER2 TDB治療通常在此模型之治療中產生瞬時反應且完全反應即使在高劑量水準下亦為稀有的(Li等人, 2018)。TDB與mu4-1BB Her2之共治療未導致反應之顯著改良，但用Her2 TDB及mu4-1BB-Her2之組合治療之七隻小鼠中之四隻(57%)在研究結束時在無可偵測腫瘤之情況下展示完全反應(圖16D)。

【0321】

抗腫瘤功效-Fo5腫瘤同種異體移植模型：

在雌性FVB WT小鼠之第三乳腺脂肪墊之恰好吻側之皮膚中切出1 cm切口。在No. 2/3乳腺脂肪墊中製得用於腫瘤之囊袋且將2×2 mm MMTV-Her2-轉殖基因Founder #5 (Fo5)腫瘤切片(Lewis Phillips等人, 2008)置於囊袋中。使用創緣夾使皮膚閉合。在手術後7-10天移除創緣夾且對於小鼠監測可觸知腫瘤之出現。當腫瘤體積生長至平均約190 mm³時，將其置於具有等效腫瘤體積平均尺寸之治療群體中。

【0322】 將攜帶之腫瘤小鼠分成7隻動物/組之組(N=7)。一個組在

第0、7及14天用0.5 mg/kg靜脈內劑量之HER2 TDB治療，每週兩次(qwx2)。另一組用10 mg/kg劑量之mu4-1-BB-Her (2C4)(小鼠替代物)治療，每週兩次(qwx2)，在第0天靜脈內注射且在第7天腹膜內注射，且另一組在第0、7及14天用0.5 mg/kg靜脈內劑量之Her2 TDB治療，每週兩次(qwx2)，且用10 mg/kg劑量之mu4-1-BB Her2 (2C4)(小鼠替代物)治療，每週兩次(qwx2)，在第0天靜脈內注射且在第7天腹膜內注射。對照組僅用媒劑治療。

引用文獻：

Ascierto, P. A., E. Simeone, M. Sznol, Y. X. Fu, and I. Melero (2010), Clinical experiences with anti-CD137 and anti-HER2 therapeutic antibodies. *Semin Oncol* 37:508-516.

Aggarwal B.B. (2003), Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3(9),745-56.

Banner D. et al (1993), Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445.

Bodmer J., Schneider P. and Tschopp, J. (2002), The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences* 27(1), 19-26.

Broll, K., Richter, G., Pauly, S., Hofstaedter, F., and Schwarz, H. (2001). CD137 expression in tumor vessel walls. High correlation with malignant tumors. *Am J Clin Pathol* 115, 543-549.

Buechele, C., Baessler, T., Schmiedel, B.J., Schumacher, C.E., Grosse-Hovest, L., Rittig, K., and Salih, H.R. (2012). 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Immunol* 42, 737-748.

Chen S., Lee L., Fisher T., Jessen B., Elliott M., Evering W., Logronio K., Tu K.H., Tsaparikos K., Li X., Wang H., Ying C., Xiong M., Van Arsdale T., and Lin J.C. (2015), Combination of 4-1BB Agonist and PD-1 Antagonist Promotes Antitumor Effector/Memory CD8 T Cells in a Poorly Immunogenic Tumor Model. *Cancer Immunology Research* 3(2), 149-160. Published online 11 November 2014.

Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr., and Leahy, D. J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421, 756-760

Choi, B.K., Kim, Y.H., Kwon, P.M., Lee, S.C., Kang, S.W., Kim, M.S., Lee, M.J., and Kwon, B.S. (2009). 4-1BB functions as a survival factor in dendritic cells. *J Immunol* 182, 4107-4115.

Cuadros, C., Dominguez, A.L., Lollini, P.L., Croft, M., Mittler, R.S., Borgstrom, P., and Lustgarten, J. (2005). Vaccination with dendritic cells pulsed with apoptotic tumors in combination with anti-OX40 and anti-4-1BB monoclonal antibodies induces T cell-mediated protective immunity in Her-2/neu transgenic mice. *Int J Cancer* 116, 934-943.

Curran, M.A., Kim, M., Montalvo, W., Al-Shamkhani, A., and Allison, J.P. (2011). Combination CTLA-4 blockade and 4-1BB activation enhances tumor rejection by increasing T-cell infiltration, proliferation, and cytokine production. *PLoS One* 6, e19499.

Diehl, L., van Mierlo, G.J., den Boer, A.T., van der Voort, E., Fransen, M., van Bostelen, L., Krimpenfort, P., Melief, C.J., Mittler, R., Toes, R.E., and Offringa, R. (2002). In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway. *J Immunol* 168, 3755-3762.

Dubrot, J., Milheiro, F., Alfaro, C., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Perez-Gracia, J.L., Morales-Kastresana, A., Romero-Trevejo, J.L., Ochoa, M.C., Hervas-Stubbs, S., et al. (2010). Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1223-1233.

Franklin, M. C., Carey, K. D., Vajdos, F. F., Leahy, D. J., de Vos, A. M., and Sliwkowski, M. X. (2004). Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 5, 317-328.

Futagawa, T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int Immunol* 14, 275-286.

Guo, Z., Cheng, D., Xia, Z., Luan, M., Wu, L., Wang, G., and Zhang, S. (2013). Combined TIM-3 blockade and CD137 activation

affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *J Transl Med* 11, 215.

Heinisch, I.V., Daigle, I., Knopfli, B., and Simon, H.U. (2000). CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. *Eur J Immunol* 30, 3441-3446.

Hornig, N., Kermer, V., Frey, K., Diebolder, P., Kontermann, R.E., Mueller, D. (2012), Combination of a bispecific antibody and costimulatory antibody-ligand fusion proteins for targeted cancer immunotherapy. *J. Immunother.* 35, 418-429.

Ju, S.A., Cheon, S.H., Park, S.M., Tam, N.Q., Kim, Y.M., An, W.G., and Kim, B.S. (2008). Eradication of established renal cell carcinoma by a combination of 5-fluorouracil and anti-4-1BB monoclonal antibody in mice. *Int J Cancer* 122, 2784-2790.

Junttila, T. T., Li, J., Johnston, J., Hristopoulos, M., Clark, R., Ellerman, D., Wang, B. E., Li, Y., Mathieu, M., Li, G., et al. (2014). Antitumor efficacy of a bispecific antibody that targets HER2 and activates T cells. *Cancer Res* 74, 5561-5571.

Kienzle, G., and von Kempis, J. (2000). CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol* 12, 73-82.

Kim, D.H., Chang, W.S., Lee, Y.S., Lee, K.A., Kim, Y.K., Kwon, B.S., and Kang, C.Y. (2008). 4-1BB engagement costimulates NKT cell

activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Immunol* 180, 2062-2068.

Kim, Y.H., Choi, B.K., Oh, H.S., Kang, W.J., Mittler, R.S., and Kwon, B.S. (2009). Mechanisms involved in synergistic anticancer effects of anti-4-1BB and cyclophosphamide therapy. *Mol Cancer Ther* 8, 469-478.

Kwon, B.S., and Weissman, S.M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1963-1967.

Lee, H., Park, H.J., Sohn, H.J., Kim, J.M., and Kim, S.J. (2011). Combinatorial therapy for liver metastatic colon cancer: dendritic cell vaccine and low-dose agonistic anti-4-1BB antibody co-stimulatory signal. *J Surg Res* 169, e43-50.

Levitsky, V., de Campos-Lima, P.O., Frisan, T., and Masucci, M.G. (1998). The clonal composition of a peptide-specific oligoclonal CTL repertoire selected in response to persistent EBV infection is stable over time. *J Immunol* 161, 594-601.

Lewis Phillips, G. D., Li, G., Dugger, D. L., Crocker, L. M., Parsons, K. L., Mai, E., Blattler, W. A., Lambert, J. M., Chari, R. V., Lutz, R. J., et al. (2008). Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res* 68, 9280-9290.

Li, F., and Ravetch, J.V. (2011). Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40

antibodies. *Science* 333, 1030-1034.

Li, J., Ybarra, R., Mak, J., Herault, A., De Almeida, P., Arrazate, A., Ziai, J., Totpal, K., Junttila, M. R., Walsh, K. B., and Junttila, T. T. (2018). IFN γ -induced Chemokines Are Required for CXCR3-mediated T-Cell Recruitment and Antitumor Efficacy of Anti-HER2/CD3 Bispecific Antibody. *Clinical Cancer Research* 24, 6447-6458.

Lin, W., Voskens, C.J., Zhang, X., Schindler, D.G., Wood, A., Burch, E., Wei, Y., Chen, L., Tian, G., Tamada, K., et al. (2008). Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies. *Blood* 112, 699-707.

Melero, I., Johnston, J.V., Shufford, W.W., Mittler, R.S., and Chen, L. (1998). NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol* 190, 167-172.

Melero, I., Shuford, W.W., Newby, S.A., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Hellstrom, K.E., Mittler, R.S., and Chen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 3, 682-685.

Merchant, A.M., Zhu, Z., Yuan, J.Q., Goddard, A., Adams, C.W., Presta, L.G., and Carter, P. (1998). An efficient route to human bispecific IgG. *Nat Biotechnol* 16, 677-681.

Morales-Kastresana, A., Sanmamed, M.F., Rodriguez, I., Palazon,

A., Martinez-Forero, I., Labiano, S., Hervas-Stubbs, S., Sangro, B., Ochoa, C., Rouzaut, A., et al. (2013). Combined immunostimulatory monoclonal antibodies extend survival in an aggressive transgenic hepatocellular carcinoma mouse model. *Clin Cancer Res* 19, 6151-6162.

Mueller, D., Frey, K., Kontermann, R.E. (2008), A novel antibody-4-1BB1 fusion protein for targeted costimulation in cancer immunotherapy, *J. Immunother.* 31, 714-722.

Murillo, O., Dubrot, J., Palazon, A., Arina, A., Azpilikueta, A., Alfaro, C., Solano, S., Ochoa, M.C., Berasain, C., Gabari, I., et al. (2009). In vivo depletion of DC impairs the anti-tumor effect of agonistic anti-CD137 mAb. *Eur J Immunol* 39, 2424-2436.

Narazaki, H., Zhu, Y., Luo, L., Zhu, G., and Chen, L. (2010). CD137 agonist antibody prevents cancer recurrence: contribution of CD137 on both hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Blood* 115, 1941-1948.

Nishimoto, H., Lee, S.W., Hong, H., Potter, K.G., Maeda-Yamamoto, M., Kinoshita, T., Kawakami, Y., Mittler, R.S., Kwon, B.S., Ware, C.F., et al. (2005). Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor. *Blood* 106, 4241-4248.

Olofsson, P.S., Soderstrom, L.A., Wagsater, D., Sheikine, Y., Ocaya, P., Lang, F., Rabu, C., Chen, L., Rudling, M., Aukrust, P., et al. (2008). CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes

development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117, 1292-1301.

Palazon, A., Teijeira, A., Martinez-Forero, I., Hervas-Stubbs, S., Roncal, C., Penuelas, I., Dubrot, J., Morales-Kastresana, A., Perez-Gracia, J.L., Ochoa, M.C., et al. (2011). Agonist anti-CD137 mAb act on tumor endothelial cells to enhance recruitment of activated T lymphocytes. *Cancer Res* 71, 801-811.

Taraban, V. Y., Rowley, T. F., O'Brien, L., Chan, H. T., Haswell, L. E., Green, M. H., Tutt, A. L., Glennie, M. J., and Al-Shamkhani, A. (2002). Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *Eur J Immunol* 32, 3617-3627.

Schwarz, H., Valbracht, J., Tuckwell, J., von Kempis, J., and Lotz, M. (1995). ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood* 85, 1043-1052.

Shao, Z., and Schwarz, H. (2011). CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. *J Leukoc Biol* 89, 21-29.

Shi, W., and Siemann, D.W. (2006). Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment. *Anticancer Res* 26, 3445-3453.

Shindo Y., Yoshimura K., Kuramasu A., Watanabe Y., Ito H.; Kondo

T., et al. (2015). Combination Immunotherapy with 4-1BB activation and PD-1 blockade enhances antitumor efficacy in a mouse model of subcutaneous tumor. *Anticancer Res.* 35(1), 129-136.

Simeone, E., and Ascierto, P.A. (2012). Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, and anti-HER2. *J Immunotoxicol* 9, 241-247.

Snell, L.M., Lin, G.H., McPherson, A.J., Moraes, T.J., and Watts, T.H. (2011). T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 244, 197-217.

Stagg, J., Loi, S., Divisekera, U., Ngiew, S.F., Duret, H., Yagita, H., Teng, M.W., and Smyth, M.J. (2011). Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7142-7147.

Teng, M.W., Sharkey, J., McLaughlin, N.M., Exley, M.A., and Smyth, M.J. (2009). CD1d-based combination therapy eradicates established tumors in mice. *J Immunol* 183, 1911-1920.

von Kempis, J., Schwarz, H., and Lotz, M. (1997). Differentiation-dependent and stimulus-specific expression of ILA, the human 4-1BB-homologue, in cells of mesenchymal origin. *Osteoarthritis Cartilage* 5, 394-406.

Wei, H., Zhao, L., Li, W., Fan, K., Qian, W., Hou, S., Wang, H., Dai, M., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., and Guo, Y. (2013). Combinatorial PD-1 blockade and CD137 activation has therapeutic

efficacy in murine cancer models and synergizes with cisplatin. PLoS One 8, e84927.

Wei H., Zhao L., Hellstrom I., Hellstrom K.E. and Guo Y. (2014). Dual targeting of CD137 co-stimulatory and PD-1 co-inhibitory molecules for ovarian cancer immunotherapy, OncoImmunology, 3:4, e28248, DOI: 10.4161/onci.28248.

Wilcox, R.A., Chapoval, A.I., Gorski, K.S., Otsuji, M., Shin, T., Flies, D.B., Tamada, K., Mittler, R.S., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., and Chen, L. (2002). Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. J Immunol 168, 4262-4267.

Wilcox, R.A., Tamada, K., Flies, D.B., Zhu, G., Chapoval, A.I., Blazar, B.R., Kast, W.M., and Chen, L. (2004). Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8⁺ cytolytic T lymphocytes in vivo. Blood 103, 177-184.

Zhang, N., Sadun, R.E., Arias, R.S., Flanagan, M.L., Sachsman, S.M., Nien, Y, Khawli, L.A., Hu, P., Epstein, A.L. (2007). Targeted and untargeted CD137L fusion proteins for the immunotherapy of experimental solid tumors. Clin. Cancer Res. 13, 2758-2767.

Zhang, X., Voskens, C.J., Sallin, M., Maniar, A., Montes, C.L., Zhang, Y., Lin, W., Li, G., Burch, E., Tan, M., et al. (2010). CD137 promotes proliferation and survival of human B cells. J Immunol 184, 787-795.

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司(F. HOFFMANN-LA ROCHE AG)
<120> 包含4-1BBL之靶向HER2的抗原結合分子
<130> P34738-WO
<150> EP18167147.0
<151> 2018-04-13
<160> 106
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 184
<212> PRT
<213> 智人
<400> 1
Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15
Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30
Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45
Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60
Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80
Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95
Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110
Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125
Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140
His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160
Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175
Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu

180

<210> 2
<211> 170
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2
Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
20 25 30

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
35 40 45

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
50 55 60

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
65 70 75 80

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
85 90 95

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
100 105 110

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
115 120 125

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
130 135 140

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
145 150 155 160

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
165 170

<210> 3
<211> 175
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3
Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
50 55 60

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
165 170 175

<210> 4
<211> 203
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190

Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
195 200

<210> 5
<211> 178
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu

<210> 6
<211> 164
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
20 25 30

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
35 40 45

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
50 55 60

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
65 70 75 80

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
85 90 95

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
100 105 110

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
115 120 125

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
130 135 140

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
145 150 155 160

Pro Ala Gly Leu

<210> 7
<211> 169
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7
Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15
Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30
Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45
Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
50 55 60
Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80
Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95
Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110
Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125
Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140
His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160
Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
165

<210> 8
<211> 197
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8
Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15
Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190

Ile Pro Ala Gly Leu
195

<210> 9
<211> 378
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 藉由(G4S)2連接了連接之二聚hu 4-IBBL (71-254)

<400> 9

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
355 360 365

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
370 375

<210> 10
<211> 366
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 藉由(G4S)2連接子連接之二聚hu 4-1BBL (71-248)

<400> 10

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
180 185 190

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
195 200 205

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
210 215 220

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
225 230 235 240

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
245 250 255

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
260 265 270

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
275 280 285

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
290 295 300

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
305 310 315 320

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
325 330 335

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
340 345 350

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
355 360 365

<210> 11
<211> 360
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 藉由(G4S)2連接子連接之二聚hu 4-1BBL (80-254)

<400> 11

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser

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

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
290 295 300

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
305 310 315 320

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
325 330 335

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
340 345 350

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
355 360

<210> 12
<211> 416
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 藉由(G4S)2連接子連接之二聚hu 4-IBBL (52-254)

<400> 12

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg

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

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H1，帕妥珠單抗

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asp
1 5 10

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H2，帕妥珠單抗

<400> 14

Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H3，帕妥珠單抗

<400> 15

Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L1，帕妥珠單抗

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L2，帕妥珠單抗

<400> 17
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L3，帕妥珠單抗

<400> 18
Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 19
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變域VH，帕妥珠單抗

<400> 19
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 Thr Asp Tyr
20 25 30
Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg 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 Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變域VL，帕妥珠單抗

<400> 20
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 Gln Asp Val Ser Ile Gly
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 Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H1，曲妥珠單抗

<400> 21
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H2，曲妥珠單抗

<400> 22
Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H3，曲妥珠單抗

<400> 23

Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L1，曲妥珠單抗

<400> 24

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L2，曲妥珠單抗

<400> 25

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L3，曲妥珠單抗

<400> 26

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 27
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變域VH，曲妥珠單抗

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變域VL，曲妥珠单抗

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H1，aff.帕妥珠單抗

<400> 29

Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Thr Met Asp
1 5 10

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H2，aff.帕妥珠單抗

<400> 30

Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Val Asn Arg Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H3，aff.帕妥珠單抗

<400> 31

Asn Leu Gly Pro Phe Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L1，aff.帕妥珠單抗

<400> 32

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR-L2，aff.帕妥珠單抗

<400> 33

Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR-L3，aff.帕妥珠單抗

<400> 34

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 35

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變域VH，aff.帕妥珠單抗

<400> 35

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 Asn Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 輕鏈可變域VL，aff.帕妥珠單抗
<400> 36
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 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 Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 708
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 三聚4-1BB配位體(71-248) - CL* Fc杵鏈
<400> 37
Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15
Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30
Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45
Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60
Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80
Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
180 185 190

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
195 200 205

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
210 215 220

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
225 230 235 240

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
245 250 255

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
260 265 270

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
275 280 285

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
290 295 300

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
305 310 315 320

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
325 330 335

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
340 345 350

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly

355										360										365									
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val														
	370						375				380																		
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Lys	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser														
385					390					395					400														
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln														
				405					410						415														
Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val														
			420					425					430																
Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu														
		435					440					445																	
Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu														
	450					455					460																		
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg														
465					470					475					480														
Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu														
				485					490					495															
Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp														
			500					505					510																
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp														
		515					520					525																	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly														
	530					535					540																		
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn														
545					550					555				560															
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp														
				565					570					575															
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly														
			580					585					590																
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu														
		595					600					605																	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn														
	610					615					620																		

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
625 630 635 640

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
645 650 655

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
660 665 670

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
675 680 685

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
690 695 700

Ser Leu Ser Pro
705

<210> 38
<211> 291
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 單體4-1BB配位體(71-248)-CH1*

<400> 38

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val

130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys
180 185 190

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
195 200 205

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
210 215 220

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
225 230 235 240

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
245 250 255

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
260 265 270

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro
275 280 285

Lys Ser Cys
290

<210> 39
<211> 708
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 二聚4-IBB配位體(71-248) - CL Fc杵鏈

<400> 39

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
180 185 190

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
195 200 205

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
210 215 220

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
225 230 235 240

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
245 250 255

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
260 265 270

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
275 280 285

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
290 295 300

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
305 310 315 320

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr

325															330															335														
Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	His	Ala	Trp	Gln	Leu	Thr	Gln	Gly	Ala	Thr	Val																													
340								345							350																													
Leu	Gly	Leu	Phe	Arg	Val	Thr	Pro	Glu	Ile	Pro	Ala	Gly	Leu	Gly	Gly																													
355								360							365																													
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val																													
370								375							380																													
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser																													
385								390							395										400																			
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln																													
405								410							415																													
Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val																													
420								425							430																													
Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu																													
435								440							445																													
Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu																													
450								455							460																													
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg																													
465								470							475										480																			
Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu																													
485								490							495																													
Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp																													
500								505							510																													
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp																													
515								520							525																													
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly																													
530								535							540																													
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn																													
545								550							555										560																			
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp																													
565								570							575																													
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly																													
580								585							590																													

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
595 600 605

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
610 615 620

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
625 630 635 640

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
645 650 655

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
660 665 670

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
675 680 685

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
690 695 700

Ser Leu Ser Pro
705

<210> 40
<211> 291
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 單體4-IBB配位體(71-248)-CHI

<400> 40

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr

100

105

110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly

115120125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val

130135140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln

145150155160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala

165170175

Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys

180185190

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly

195200205

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

210215220

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

225230235240

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

245250255

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

260265270

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro

275280285

Lys Ser Cys

290

<210> 41

<211> 720

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 三聚4-IBB配位體(71-254) - CL*Fc杵鏈

<400> 41

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp

151015

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu

202530

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala

290	295	300
Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala		
305	310	315 320
Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu		
	325	330 335
Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu		
	340	345 350
Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile		
	355	360 365
Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
	370	375 380
Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro		
385	390	395 400
Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu		
	405	410 415
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp		
	420	425 430
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp		
	435	440 445
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys		
	450	455 460
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln		
465	470	475 480
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp		
	485	490 495
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly		
	500	505 510
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
	515	520 525
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
	530	535 540
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
545	550	555 560

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
565 570 575

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
580 585 590

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
595 600 605

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
610 615 620

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
625 630 635 640

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
645 650 655

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
660 665 670

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
675 680 685

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
690 695 700

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
705 710 715 720

<210> 42
<211> 297
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 單體4-IBB配位體(71-254)-CH1*

<400> 42

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg

[illegible]

<210>	43
<211>	720
<212>	PRT
<213>	人工序列
<220>	
<223>	二聚4-1BB配位體(71-254) - CL Fc和鏈

<400> 43
Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15
Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30
Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45
Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
50 55 60
Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80
Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95
Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110
Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125
Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140
His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160
Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175
Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190
Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205
Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220
Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240
Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255
Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu

260					265					270					
Leu	Arg	Arg	Val	Val	Ala	Gly	Glu	Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Leu	Ala
		275					280					285			
Leu	His	Leu	Gln	Pro	Leu	Arg	Ser	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala
	290					295					300				
Leu	Thr	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser	Ser	Glu	Ala	Arg	Asn	Ser	Ala
305					310					315					320
Phe	Gly	Phe	Gln	Gly	Arg	Leu	Leu	His	Leu	Ser	Ala	Gly	Gln	Arg	Leu
				325					330					335	
Gly	Val	His	Leu	His	Thr	Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	His	Ala	Trp	Gln	Leu
			340					345					350		
Thr	Gln	Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Arg	Val	Thr	Pro	Glu	Ile
		355					360					365			
Pro	Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	Pro	Arg	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	370					375					380				
Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro
385					390					395					400
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
				405					410					415	
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp
			420					425					430		
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp
		435					440					445			
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys
	450					455					460				
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln
465					470					475					480
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Asp
				485					490					495	
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly
			500					505					510		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
		515					520					525			

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
530 535 540

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
545 550 555 560

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
565 570 575

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
580 585 590

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
595 600 605

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
610 615 620

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
625 630 635 640

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
645 650 655

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
660 665 670

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
675 680 685

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
690 695 700

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
705 710 715 720

<210> 44
<211> 297
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 單體4-IBB配位體(71-254) -CH1

<400> 44

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

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

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

<210> 45
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗Her2 (PER) Fc融合鏈

<400> 45
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 Thr Asp Tyr
20 25 30
Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg 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 Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro

225 230 235 240

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

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

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

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

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

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
 355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 46
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗Her2 (PER)輕鏈

<400> 46

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 Gln Asp Val Ser Ile Gly
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 Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr 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> 47
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗Her2 (TRAS) Fc融合鏈

<400> 47

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 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 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 48
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗Her2 (TRAS)輕鏈

<400> 48

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

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

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

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

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

<210> 49
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗Her2 (aff-PER) Fc白鍵

<400> 49

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
20 25 30
Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Val Asn Arg Arg Phe
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

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

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

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

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

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 50
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗Her2 (aff-PER)輕鏈

<400> 50

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 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 Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 51
<211> 163
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 52
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fc白鏈

<400> 52

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

180					185					190					
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		195					200					205			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	210					215					220				
Pro															
225															
<210> 53															
<211> 422															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 人類4-1BB抗原Fc栓鏈															
<400> 53															
Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn
1				5					10					15	
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser															
20 25 30															
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val															
35 40 45															
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp															
50 55 60															
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu															
65 70 75 80															
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp															
85 90 95															
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro															
100 105 110															
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr															
115 120 125															
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro															
130 135 140															
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His															
145 150 155 160															
Ser Pro Gln Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys															
165 170 175															

Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
180 185 190

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
195 200 205

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
210 215 220

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
225 230 235 240

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
245 250 255

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
260 265 270

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
275 280 285

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
290 295 300

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
305 310 315 320

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
325 330 335

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
340 345 350

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
355 360 365

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
370 375 380

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
385 390 395 400

Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
405 410 415

Lys Ile Glu Trp His Glu
420

<210> 54

<211> 1245
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
210 215 220

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

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu

245										250										255																																				
His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val																																									
			260											265											270																															
Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg																																									
			275											280											285																															
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu																																									
			290											295											300																															
Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln																																									
			305											310											315											320																				
Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys																																									
													325											330											335																					
Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu																																									
													340											345											350																					
Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys																																									
													355											360											365																					
Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp																																									
													370											375											380																					
Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu																																									
													385											390											395											400										
Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro	Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln																																									
													405											410											415																					
Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg	Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser																																									
													420											425											430																					
Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu																																									
													435											440											445																					
Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu																																									
													450											455											460																					
Cys	Phe	Val	His	Thr	Val	Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His																																									
													465											470											475											480										
Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr	Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly																																									
													485											490											495																					
Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His	Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly																																									
													500											505											510																					

Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln
515 520 525

Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr
530 535 540

Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln
545 550 555 560

Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala
565 570 575

Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser
580 585 590

Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp
595 600 605

Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys
610 615 620

Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro
625 630 635 640

Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val
645 650 655

Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile
660 665 670

Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu
675 680 685

Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile
690 695 700

Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala
705 710 715 720

Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val
725 730 735

Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys
740 745 750

Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly
755 760 765

Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val
770 775 780

Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val
 785 790 795 800
 Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys
 805 810 815
 Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val
 820 825 830
 His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His
 835 840 845
 Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu
 850 855 860
 Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala
 865 870 875 880
 Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp
 885 890 895
 Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro
 900 905 910
 Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly
 915 920 925
 Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile
 930 935 940
 Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg
 945 950 955 960
 Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe
 965 970 975
 Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser
 980 985 990
 Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val
 995 1000 1005
 Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro
 1010 1015 1020
 Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg
 1025 1030 1035
 Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu
 1040 1045 1050

Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser
1055 1060 1065

Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly
1070 1075 1080

Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro
1085 1090 1095

Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu
1100 1105 1110

Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu
1115 1120 1125

Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg
1130 1135 1140

Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu
1145 1150 1155

Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp
1160 1165 1170

Val Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr
1175 1180 1185

Pro Gln Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe
1190 1195 1200

Ser Pro Ala Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro
1205 1210 1215

Glu Arg Gly Ala Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala
1220 1225 1230

Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
1235 1240 1245

<210> 55
<211> 464
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-IBB抗體20H4.9 IgG4，重鏈

<400> 55

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp
115 120 125

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145 150 155 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
225 230 235 240

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Trp Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
450 455 460

<210> 56
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB抗體20H4.9 IgG4，輕鏈

<400> 56

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 Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Cys Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 57
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB抗體MOR7480 IgG2，重鏈

<400> 57

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 58
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB抗體MOR7480 IgG2，輕鏈

<400> 58

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Tyr Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 59
<211> 640
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Her2 (TRAS)-抗運載蛋白-4-1BB人類IgG4重鏈

<400> 59

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly
435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asp
450 455 460

Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val Pro Leu
465 470 475 480

Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr Val Val
485 490 495

Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro Ile Lys
500 505 510

Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val
515 520 525

Thr Met Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys Cys Met Tyr Asp Ile Trp Thr
530 535 540

Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys Ile Lys
545 550 555 560

Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn
565 570 575

Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg
580 585 590

Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser
595 600 605

Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro
610 615 620

Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
625 630 635 640

<210> 60
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Her2 (TRAS)-抗運載蛋白-4-IBB人類IgG4輕鏈

<400> 60
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 61
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47 Fc融合鏈

<400> 61
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 Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

225		230		235		240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
			245	Thr	Leu	Met
					250	Ile
				Ser	Arg	Thr
					255	Pro
						Glu
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
		260	Val	Val	Val	Asp
				Val	Ser	His
					265	Glu
				Asp	Pro	Glu
					270	Val
						Lys
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
		275				280
				Val	Glu	Val
						His
				Asn	Ala	Lys
					285	Thr
						Lys
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
	290					295
				Ser	Thr	Tyr
					Arg	Val
					300	Val
				Ser	Val	Leu
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
305				310	Leu	Asn
					Gly	Lys
					315	Glu
						Tyr
						Lys
						Cys
						320
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly
			325			Ala
				Pro	Ile	Glu
					330	Lys
						Thr
						Ile
						Ser
						335
						Lys
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
		340				Pro
				Gln	Val	Cys
					345	Thr
						Leu
						Pro
						350
						Ser
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn
	355					360
				Val	Ser	Leu
					Ser	Cys
						365
						Ala
						Val
						Lys
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
	370					375
				Ala	Val	Glu
					Trp	Glu
						380
					Ser	Asn
						Gly
						Gln
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
385					390	Thr
						Pro
						Pro
						Val
						395
					Leu	Asp
						Ser
						Asp
						Gly
						400
Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys
			405			Leu
				Thr	Val	Asp
					410	Lys
						Ser
						Arg
						Trp
						415
						Gln
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
		420				Ser
						Val
						425
					Met	His
						Glu
						Ala
						Leu
						430
						His
						Asn
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
		435				440
						Ser
						Leu
						Ser
						Pro
<210>	62					
<211>	215					
<212>	PRT					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	DP47輕鏈					
<400>	62					
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser
1			5			Pro
						Gly
						Thr
						10
						Leu
						Ser
						Leu
						Ser
						Pro
						15
						Gly

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 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> 63
<211> 635
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47-抗運載蛋白-4-1BB人類IgG4重鏈

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

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

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

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

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly
435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu
450 455 460

Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln
465 470 475 480

Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Gln Ala Gly Asn
485 490 495

Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro Ile Lys Met Met Ala Thr Ile
500 505 510

Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Met Val Lys Phe
515 520 525

Asp Asp Lys Lys Cys Met Tyr Asp Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser
530 535 540

Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys Ile Lys Ser Phe Pro Gly His

545 550 555 560

Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala
565 570 575

Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile
580 585 590

Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn
595 600 605

Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val
610 615 620

Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
625 630 635

<210> 64
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47-抗運載蛋白-4-1BB人類IgG4輕鏈

<400> 64

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 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> 65
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Her2 (TRAS)人類IgG1 P329G LALA，重鏈

<400> 65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu 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 Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 66
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hcr2 (PER)人類IgG1 P329G LALA , 重鏈

<400> 66

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 Thr Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

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

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

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

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

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 67
<211> 443

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47人類IgG1 P329G LALA，重鏈

<400> 67
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 Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

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

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

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

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

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

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (G4S)2肽连接子

<400> 68

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 69
<211> 254
<212> PRT
<213> 智人

<400> 69
Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
100 105 110

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

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
145 150 155 160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
225 230 235 240

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 70
<211> 205
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70

Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala
35 40 45

Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro
50 55 60

Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp
65 70 75 80

Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
85 90 95

Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val
100 105 110

Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala
115 120 125

Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg
130 135 140

Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly
145 150 155 160

Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala
165 170 175

Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr
180 185 190

Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
195 200 205

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子-G4S

<400> 71

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子(SG4)2

<400> 72

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 73
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子(G4S)3

<400> 73

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 74
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子G4(SG4)2

<400> 74

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 75
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子(G4S)4

<400> 75

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子GSPGSSSSGS

<400> 76
Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子GSGSGSGS

<400> 77
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5

<210> 78
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子GSGSGNGS

<400> 78
Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser
1 5

<210> 79
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子GGSGSGSG

<400> 79
Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子GGSGSG

<400> 80
Gly Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 81
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子GGSG

<400> 81
Gly Gly Ser Gly
1

<210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GGSGNGSG

<400> 82
Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子GGNGSGSG

<400> 83
Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 84
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽連接子GGNGSG

<400> 84
Gly Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 85
<211> 207
<212> PRT
<213> 智人

<400> 85
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 Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160
Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly 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> 86
<211> 198
<212> PRT
<213> 食蟹獼猴

<400> 86
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 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> 87
<211> 442
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VHCH1(EE) (MU137-1) Fc-KK (mu4-1BB-Her2)

<400> 87

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Tyr Phe
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Glu Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Ser Tyr Gly Gly Tyr Ser Glu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
130 135 140

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

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

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

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
195 200 205

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

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
245 250 255

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

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
290 295 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
305 310 315 320

Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
340 345 350

Lys Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn
355 360 365

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser
385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
435 440

<210> 88
<211> 663
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VLCH1 (2C4) VHCH1(EE) (MUI37-1) Fc-DD (mu4-1BB-Her2)

<400> 88

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Ser Ala Lys Thr
100 105 110

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr
115 120 125

Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
130 135 140

Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
165 170 175

Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn
180 185 190

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro
195 200 205

Arg Asp Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln
210 215 220

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys
225 230 235 240

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Tyr Phe Asp Met Ala
245 250 255

Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile
260 265 270

Ser Pro Ser Gly Asp Ile Pro Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg
275 280 285

Phe Thr Val Ser Arg Glu Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met
290 295 300

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

Ser Tyr Gly Gly Tyr Ser Glu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met
325 330 335

Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
340 345 350

Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
355 360 365

Leu Val Glu Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
370 375 380

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
385 390 395 400

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
405 410 415

Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
420 425 430

Lys Val Asp Glu Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
435 440 445

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
450 455 460

Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
465 470 475 480

Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe
485 490 495

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu
500 505 510

Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His
515 520 525

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
530 535 540

Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg
545 550 555 560

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met
565 570 575

Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro
580 585 590

Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn
595 600 605

Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val
610 615 620

Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr

625 630 635 640

Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
645 650 655

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
660

<210> 89
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VLCL(RK)-輕鏈(MU137-1) (mu4-1BB-Her2)

<400> 89

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

Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp
20 25 30

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

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

Ser Ser Ser Gly Ser Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Arg Leu Gln Val
65 70 75 80

Glu Asp Ile Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Gly Ala Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Arg Lys Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 90
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VHCL-輕鏈(2C4)
<400> 90

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

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

Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
115 120 125

Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val
130 135 140

Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp
145 150 155 160

Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr
165 170 175

Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr
180 185 190

Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala
195 200 205

Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn
210 215 220

Glu Cys
225

<210> 91
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H1，CD3

<400> 91

Asn Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 92
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H2，CD3

<400> 92

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H3，CD3

<400> 93

Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 94
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L1，CD3

<400> 94

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L2，CD3

<400> 95

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 96
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L3，CD3

<400> 96

Thr Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr
1 5

<210> 97
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變域VH，CD3

<400> 97

Glu 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 Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 98
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變域VL，CD3

<400> 98

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Ser Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 99
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H1，Hcr2 (7C2)

<400> 99

Gly Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 100
<211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H2，Her2 (7C2)

<400> 100
Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Ile Arg Ala Asn Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15

Asp

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR-H3，Her2 (7C2)

<400> 101
Gly Thr Tyr Asp Gly Gly Phe Glu Tyr
1 5

<210> 102
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L1，Her2 (7C2)

<400> 102
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Gly Ser Arg Phe Thr Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L2，Her2 (7C2)

<400> 103
Tyr Ala Ser Ile Leu Glu Ser
1 5

<210> 104
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈CDR-L3，Her2 (7C2)

<400> 104

Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Pro Trp Thr
1 5 10

<210> 105
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變域VH，Her2 (7C2)

<400> 105

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Ile Arg Ala Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 106
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變域VL，Her2 (7C2)

<400> 106

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Gly Ser
20 25 30

Arg Phe Thr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95

Glu Ile Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其包含

(a)能夠特異性結合於Her2之Fab分子，該Fab分子包含

包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的VL域，或

包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的VL域，或

包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的VH域及包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的VL域，

(b)第一及第二多肽，其藉由雙硫鍵彼此連接，

其中該抗原結合分子之特徵在於分別地該第一多肽含有CH1或CL域及該第二多肽含有CL或CH1域，其中該第二多肽藉由該CH1與CL域之間的雙硫鍵連接至該第一多肽，且其中該第一多肽包含4-1BBL之兩個胞外域，該等胞外域包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO:8，該等胞外域藉由肽連接子彼此連接且連接至該CH1或CL域，且其中該第二多肽包含該4-1BBL之一個胞外域，該胞外域包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO:8，該胞外域經由肽連接子連接至該多肽之該CL或CH1域，及

(c) Fc域，其由能夠穩定締合之第一及第二次單位構成，其中該Fc域

為包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G (根據Kabat EU索引編號)之IgG1 Fc域。

【第2項】

如請求項1之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中該4-1BBL之胞外域或其片段包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5之胺基酸序列。

【第3項】

如請求項1或2之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中該Fc域包含杵-臼修飾，其促進該Fc域之該第一及該第二次單位的締合。

【第4項】

如請求項1或2之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結合分子包含

(i)第一重鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:19之VH域，及第一輕鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:20之VL域，或

第一重鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:27之VH域，及第一輕鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:28之VL域，或

第一重鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:35之VH域，及第一輕鏈，其包含有包含胺基酸序列SEQ ID NO:36之VL域，

(ii)第二重鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41及SEQ ID NO:43，及

(iii)第二輕鏈，其包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:44。

【第5項】

如請求項1或2之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其中該抗原結

合分子包含

(a)包含胺基酸序列SEQ ID NO:45之第一重鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:46之第一輕鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:37之第二重鏈及包含胺基酸序列SEQ ID NO:38之第二輕鏈，或

(b)包含胺基酸序列SEQ ID NO:47之第一重鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:48之第一輕鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:37之第二重鏈及包含胺基酸序列SEQ ID NO:38之第二輕鏈，或

(c)包含胺基酸序列SEQ ID NO:49之第一重鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:50之第一輕鏈、包含胺基酸序列SEQ ID NO:37之第二重鏈及包含胺基酸序列SEQ ID NO:38之第二輕鏈。

【第6項】

一種經分離核酸分子，其編碼如請求項1至5中任一項之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子。

【第7項】

一種表現載體，其包含如請求項6之經分離核酸分子。

【第8項】

一種宿主細胞，其包含如請求項6之核酸或如請求項7之表現載體。

【第9項】

一種產生如請求項1至5中任一項之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之方法，其包含在適合於表現該含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之條件下培養如請求項8之宿主細胞。

【第10項】

如請求項9之方法，其進一步包含自該宿主細胞回收該抗體。

【第11項】

一種含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，其由如請求項10之方法產生。

【第12項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至5或11中任一項之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。

【第13項】

如請求項12之醫藥組合物，其進一步包含額外治療劑。

【第14項】

如請求項12或13之醫藥組合物，其進一步包含T細胞活化抗CD3雙特異性抗體。

【第15項】

如請求項14之醫藥組合物，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體為抗Her2/抗CD3雙特異性抗體。

【第16項】

一種如請求項1至5中任一項之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，或如請求項12至15中任一項之醫藥組合物之用途，其用於製造用以治療癌症之藥劑。

【第17項】

一種如請求項1至5中任一項之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子之用途，其用於製造用以治療癌症之藥劑，其中該含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子與T細胞活化抗CD3雙特異性抗體組合使用。

【第18項】

如請求項17之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體為抗Her2/抗CD3抗體。

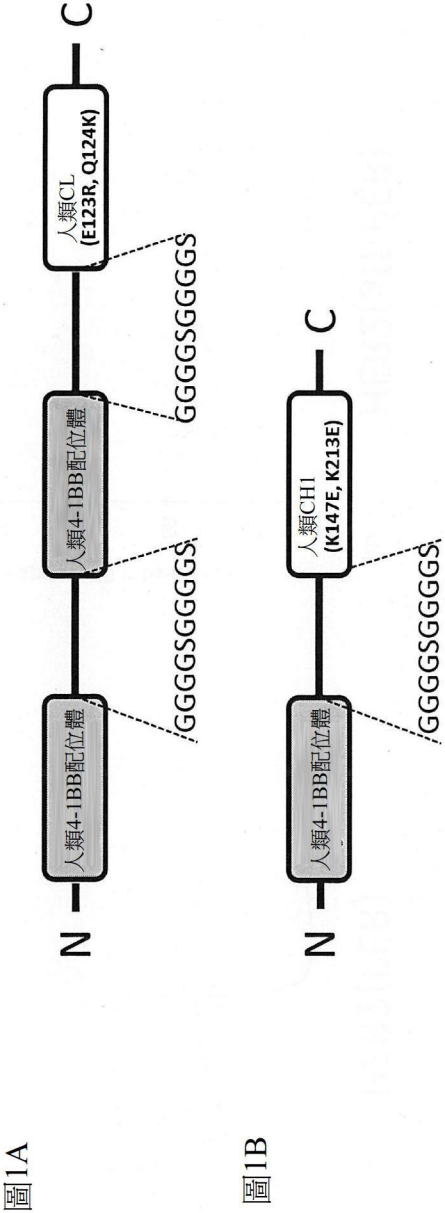
【第19項】

如請求項17之用途，其中該T細胞活化抗CD3雙特異性抗體係與該含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子同時、在其之前或在其之後投與。

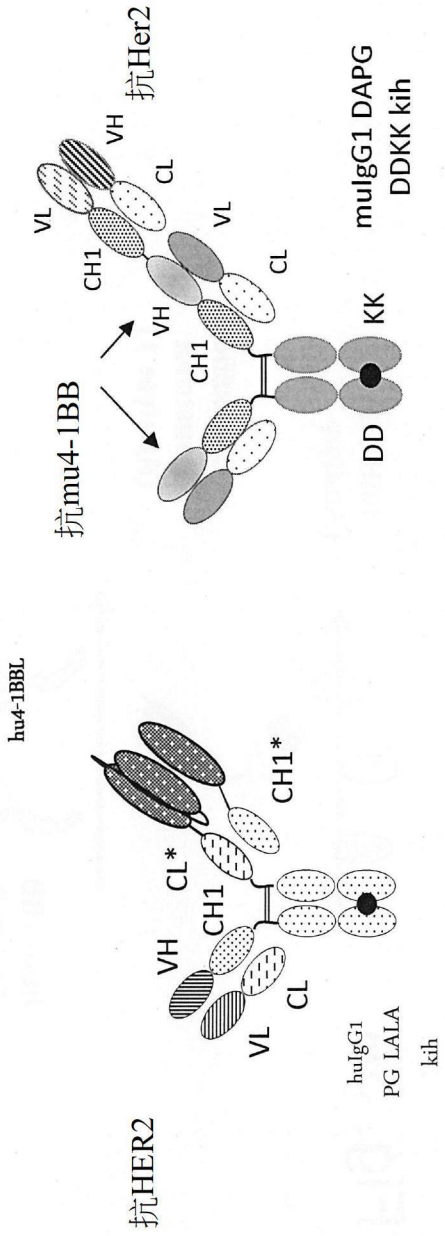
【第20項】

一種如請求項1至5中任一項之含有4-1BBL三聚體之抗原結合分子，或如請求項12至15中任一項之醫藥組合物之用途，其用於製造用以上調或延長患有癌症之個體之細胞毒性T細胞活性之藥劑。

【發明圖式】

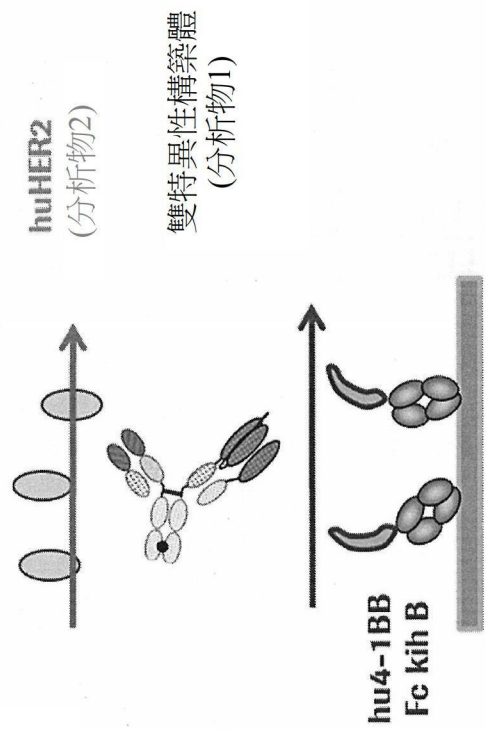


【圖1】

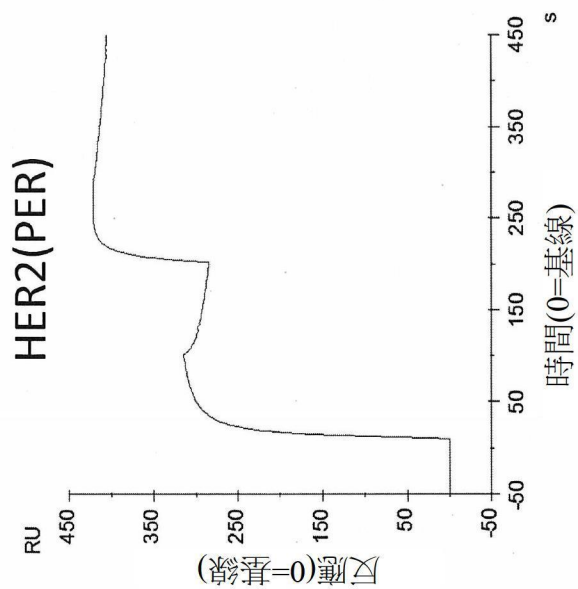


【圖2A】

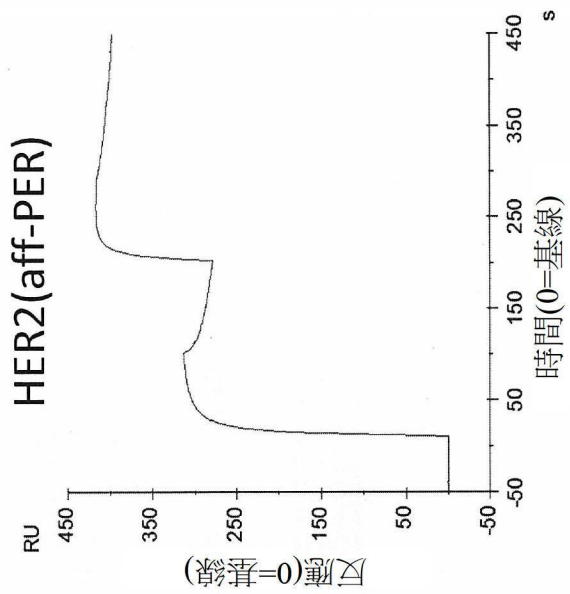
【圖2B】



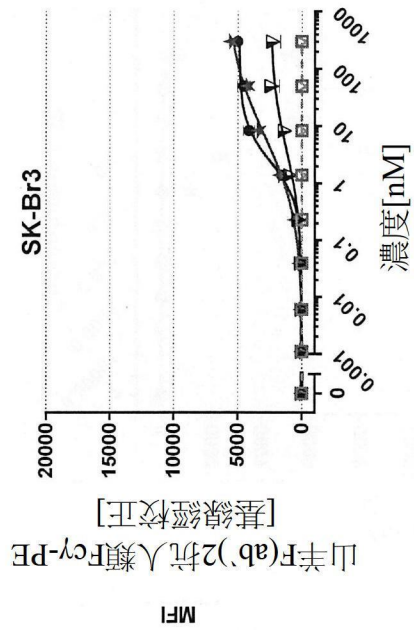
【圖3A】



【圖3B】

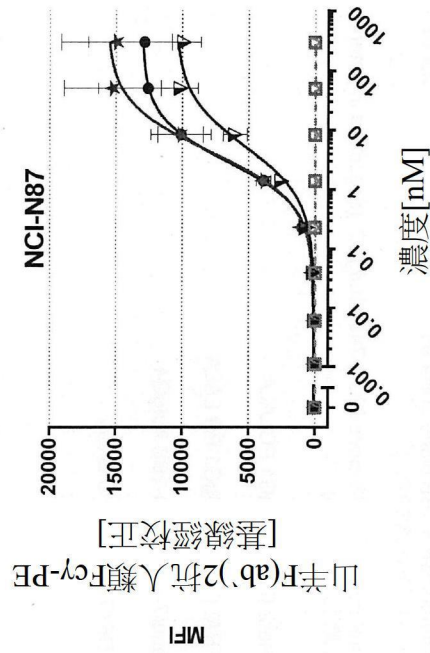


【圖3C】

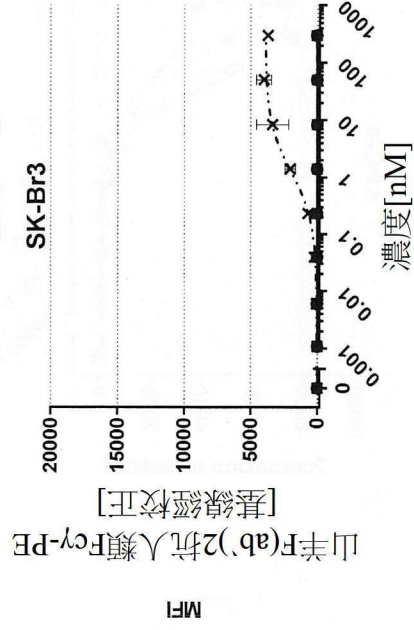


● Her2 (PER)-4-1BBL ★ Her2 (TRAS)-抗運載蛋白4-1BB hulG4
★ Her2 (aff-PER)-4-1BBL (專利WO2016177802中所述之SEQ ID NO 9及10之融合多肽)
□ DP47-4-BBL ▽ DP47-抗運載蛋白4-1BB hulG4

【圖4A】

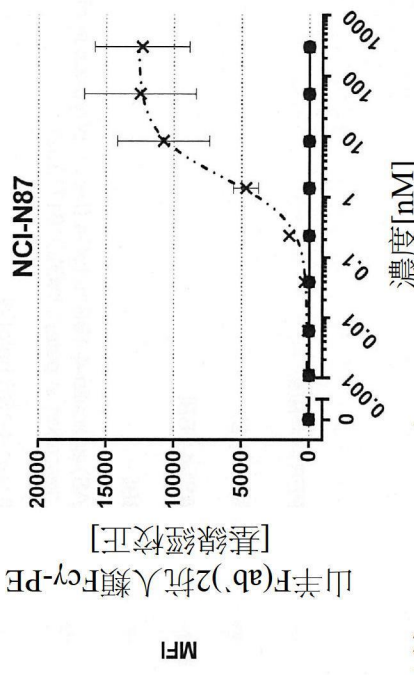


【圖4B】

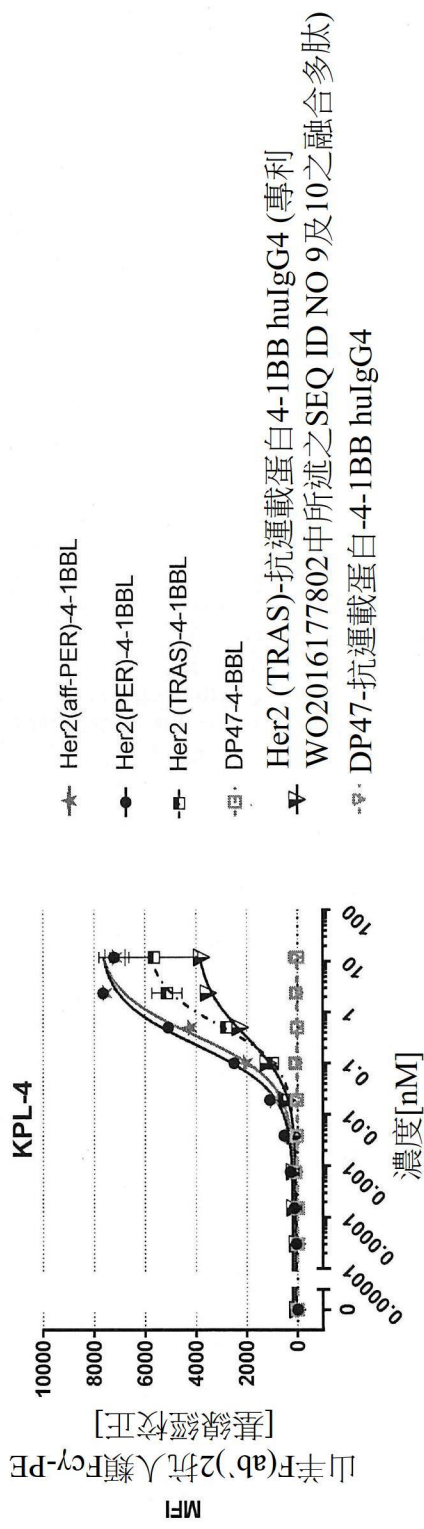


■ 抗人類4-1BB純系20H4.9 hulG4 (描述於專利EP1670828B1及US7659384(B2)中)
◆ 抗人類4-1BB純系MOR-7480 hulG2 (描述於專利WO2012032433中)

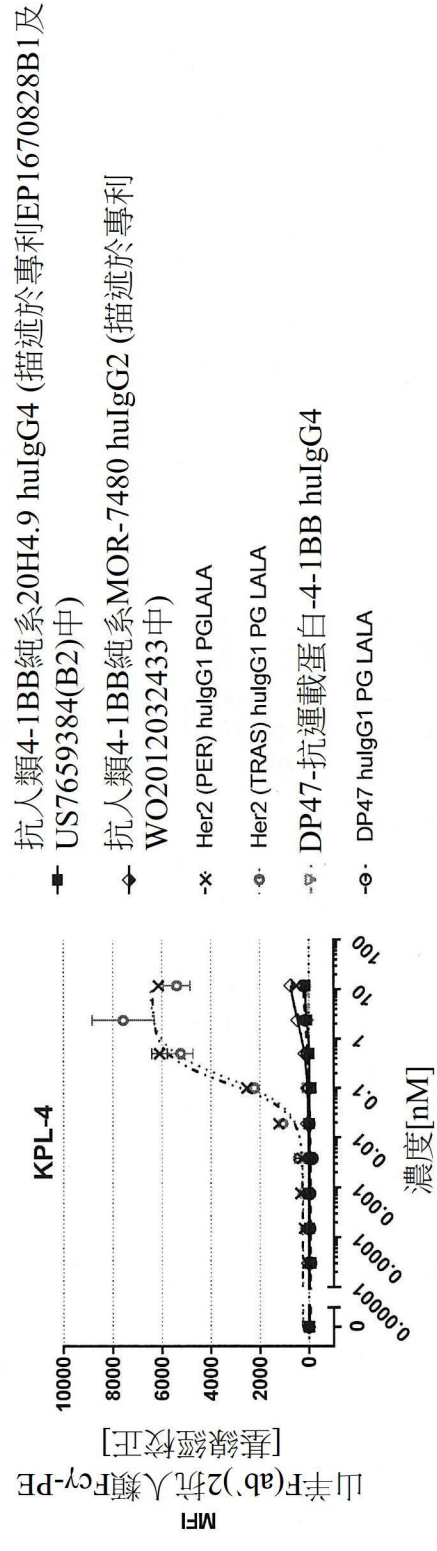
【圖4C】



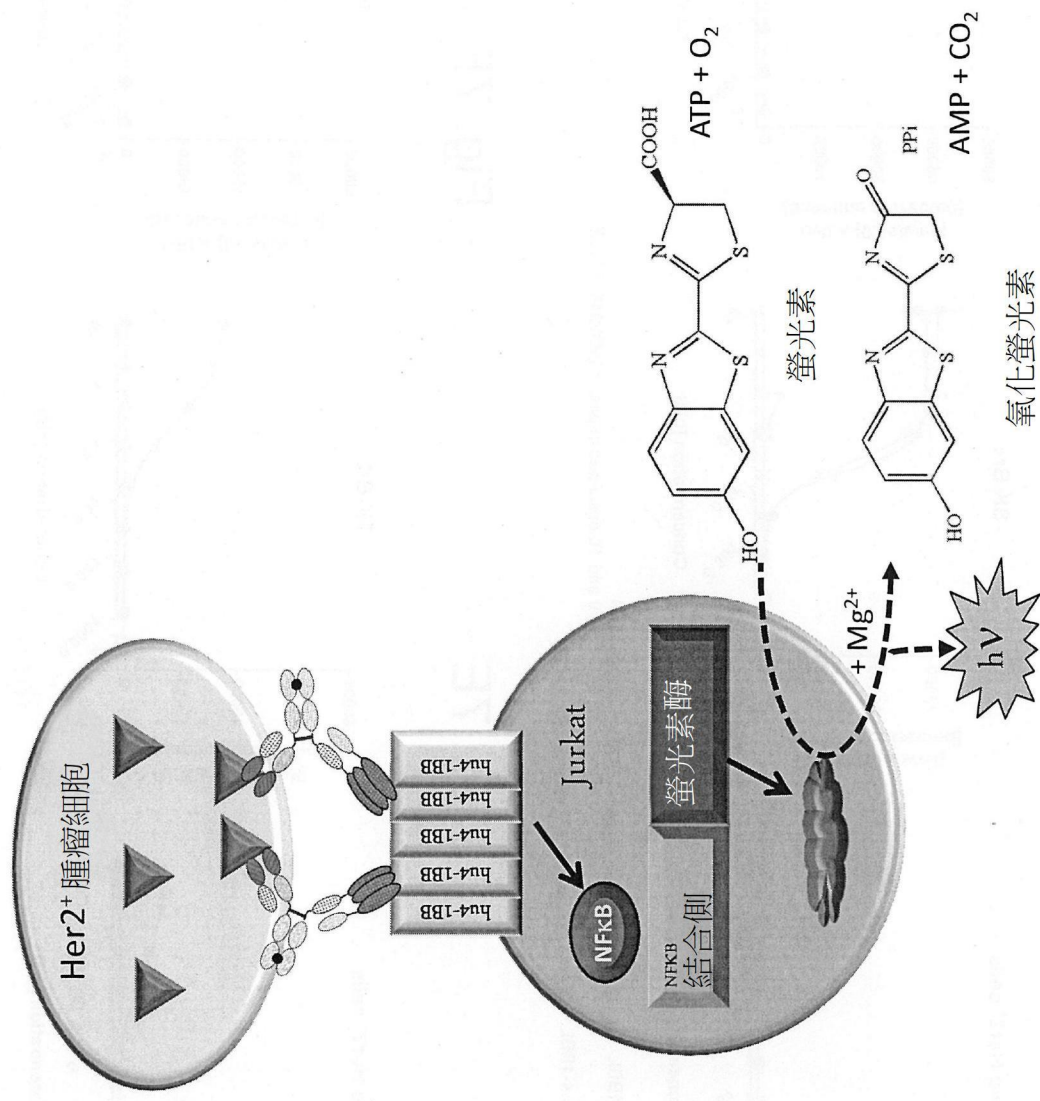
【圖4D】



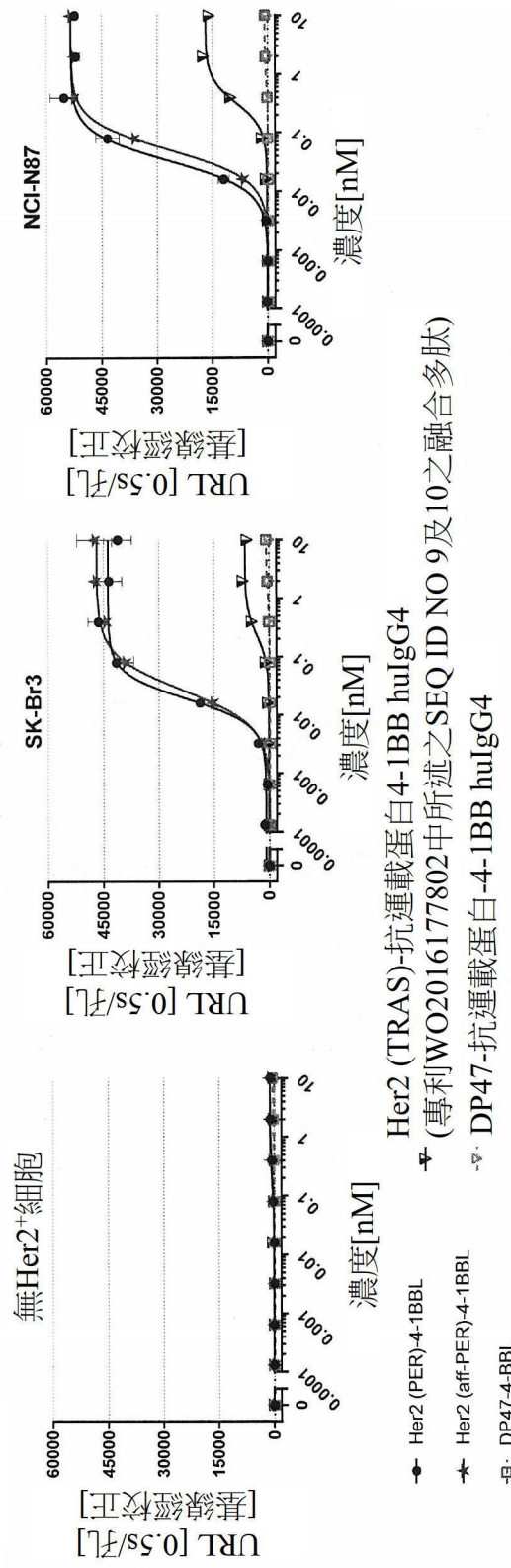
【圖5A】



【圖5B】



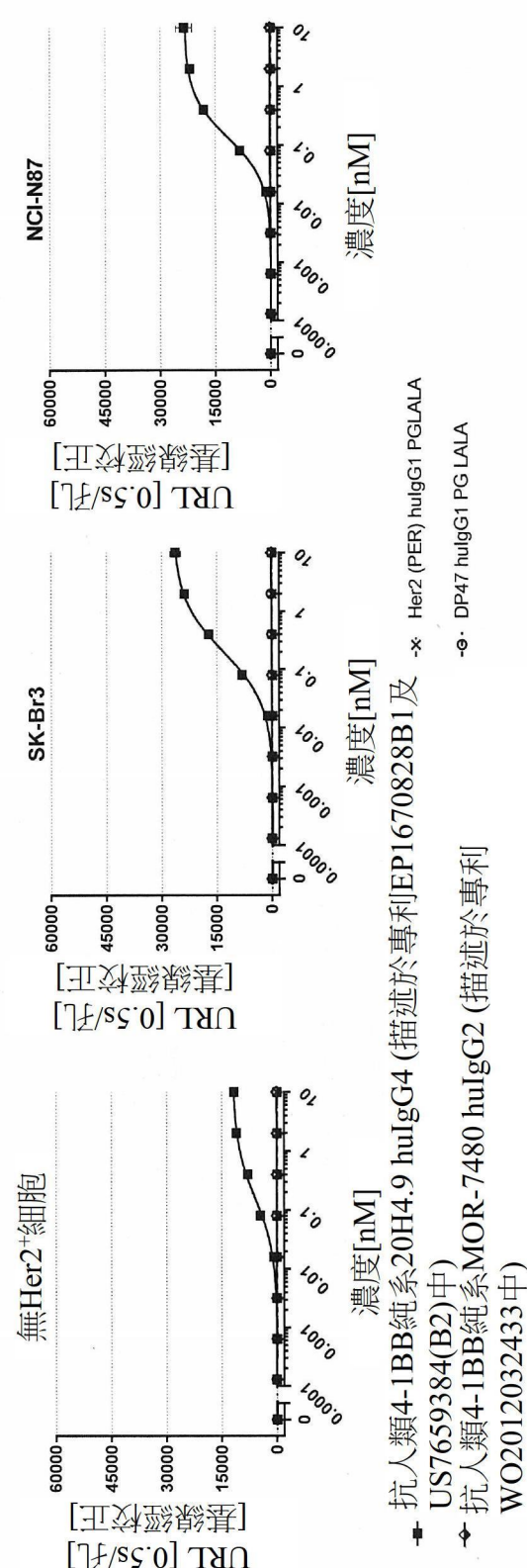
【圖6】



【圖7A】

【圖7B】

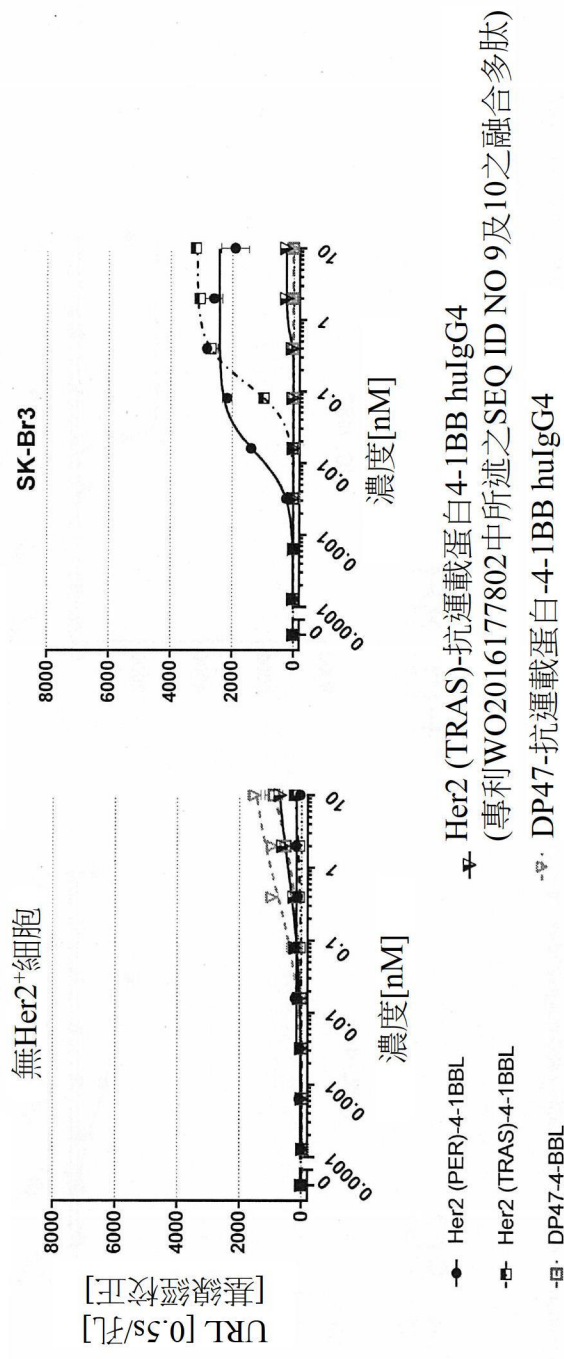
【圖7C】



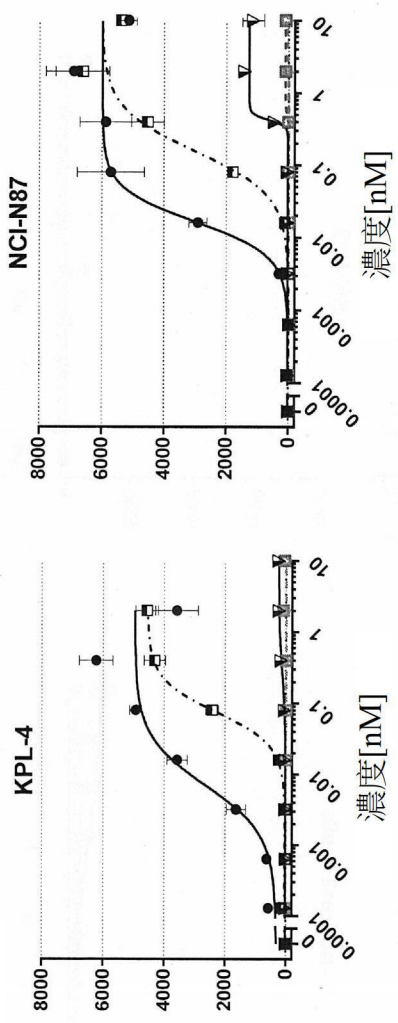
【圖7B】

【圖7C】

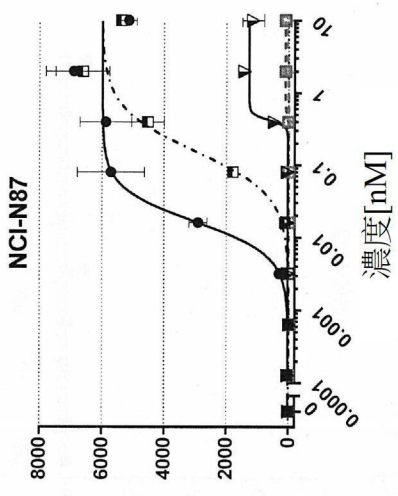
【圖7D】



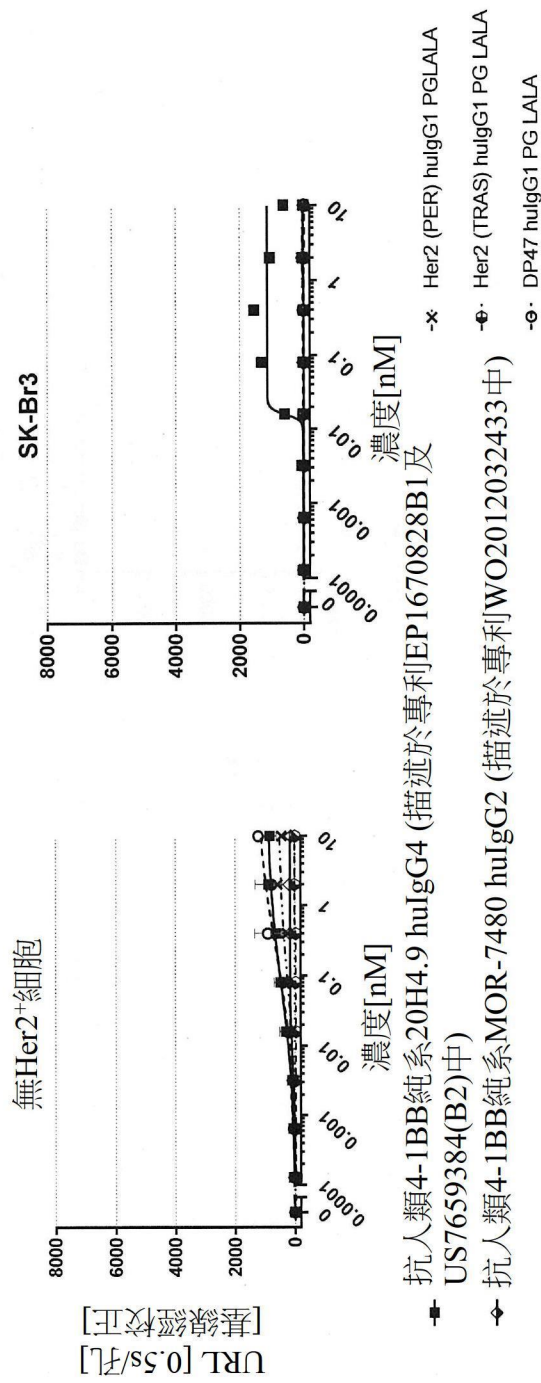
【圖8A】



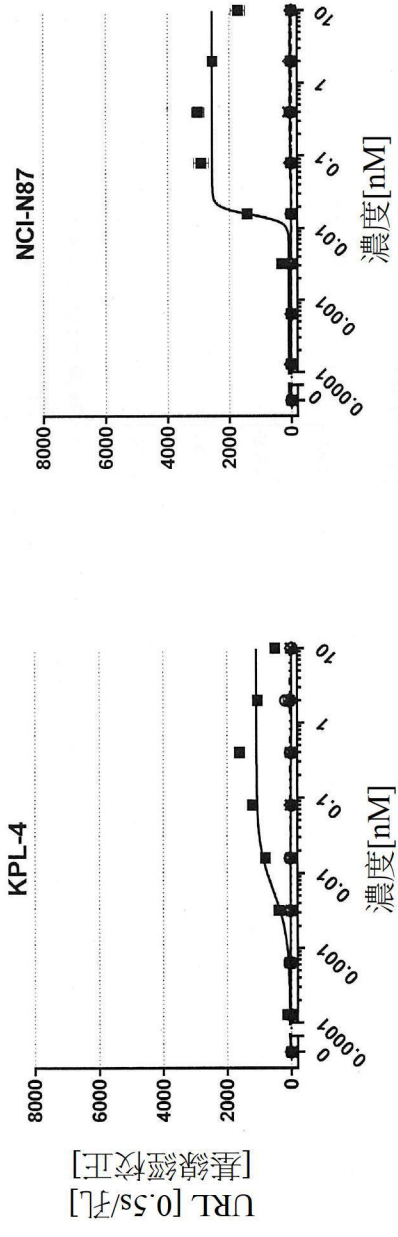
【圖8B】



【圖8C】



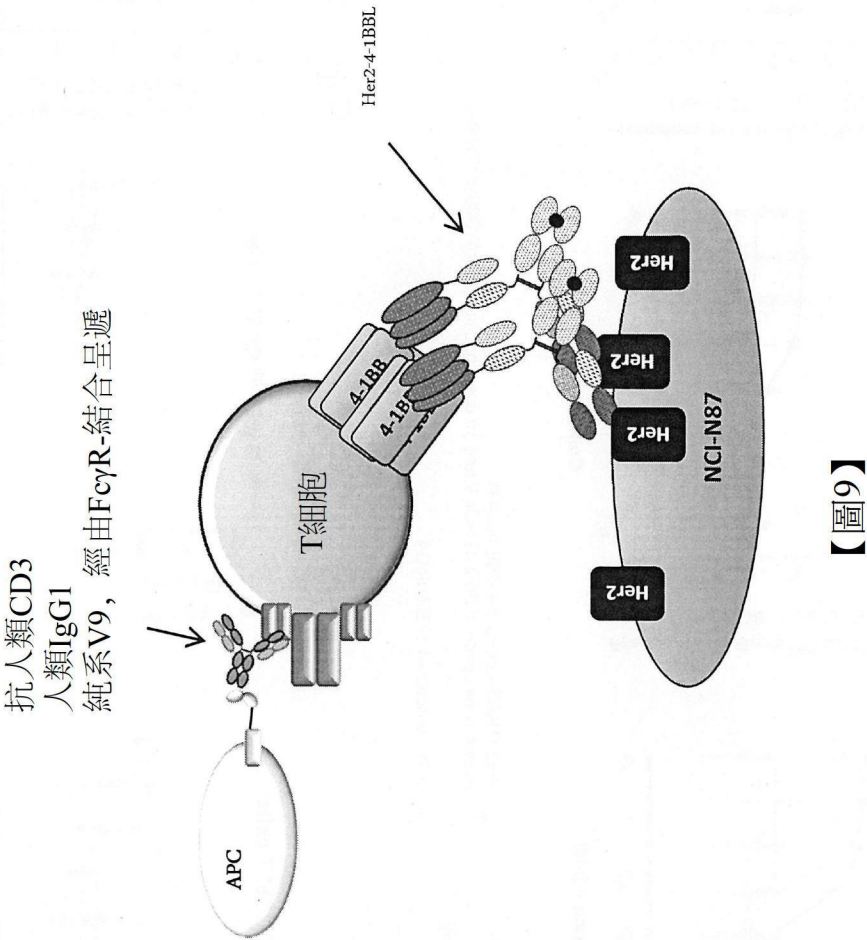
【圖8E】

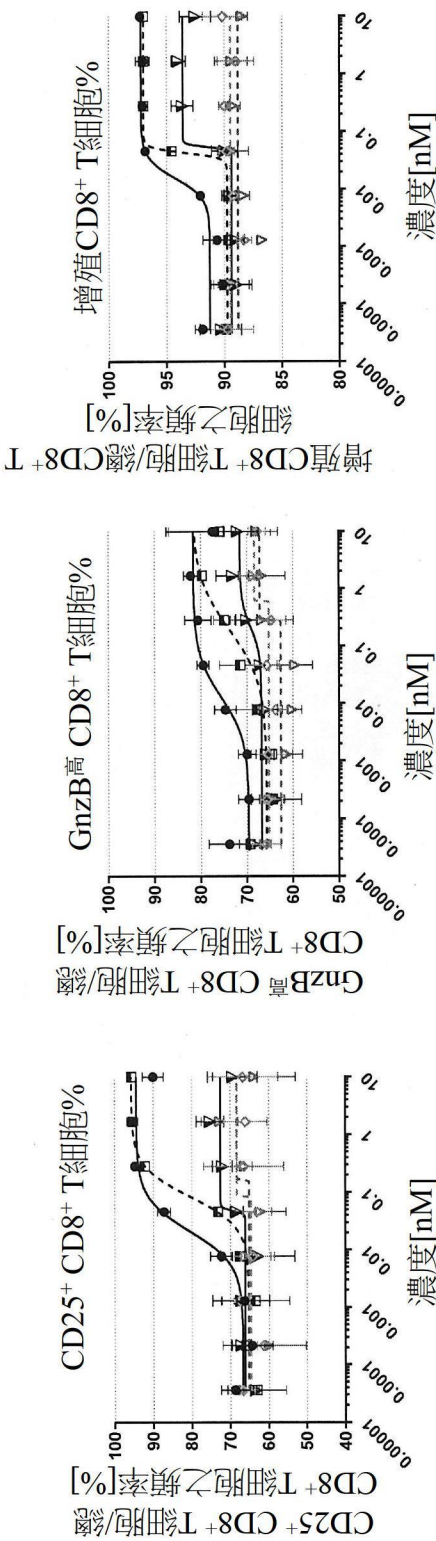


【圖8F】

【圖8G】

【圖8H】



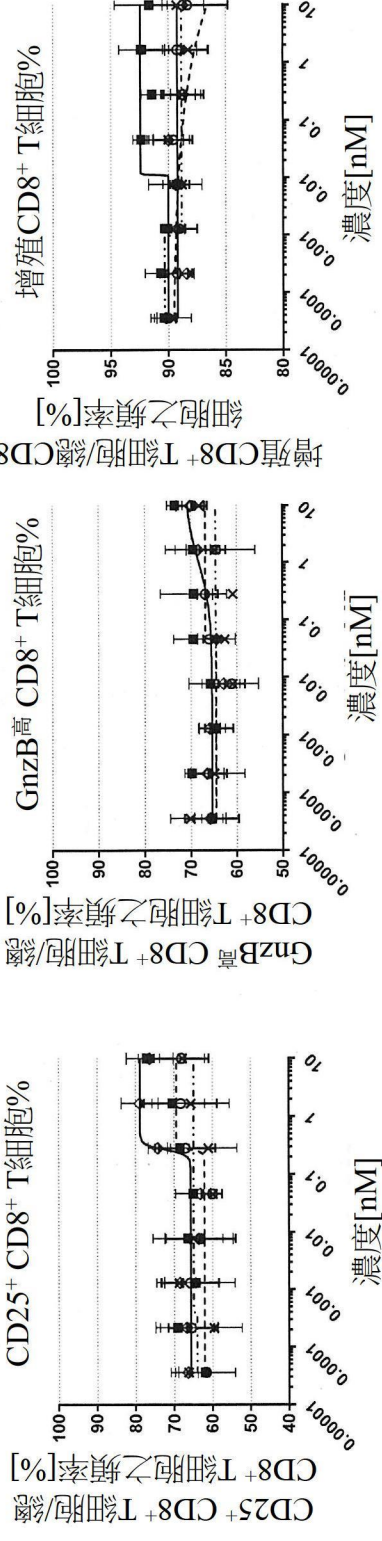


Her2 (TRAS)-抗運載蛋白4-1BB hulgG4
(專利WO2016177802中所述之SEQ ID NO 9及10之融合多肽)
DP47-抗運載蛋白4-1BB hulgG4

【圖10A】

【圖10B】

【圖10C】

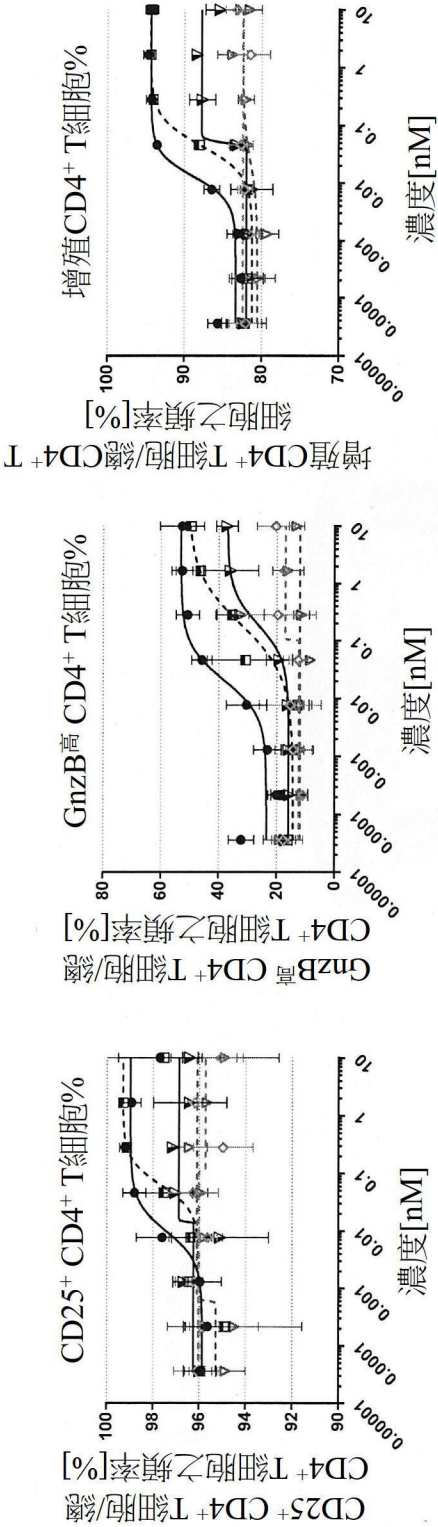


抗人類4-1BB純系20H4.9 hulgG4 (描述於專利EP1670828B1
及US7659384(B2)中)
抗人類4-1BB純系MOR-7480 hulgG2 (描述於專利
WO2012032433中)

【圖10D】

【圖10E】

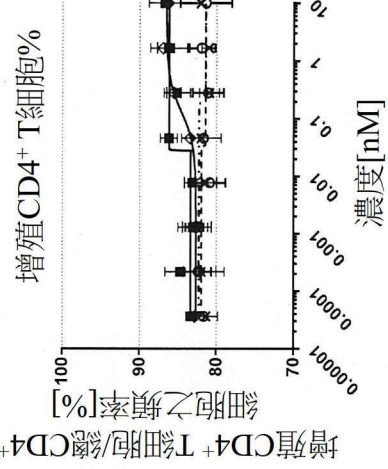
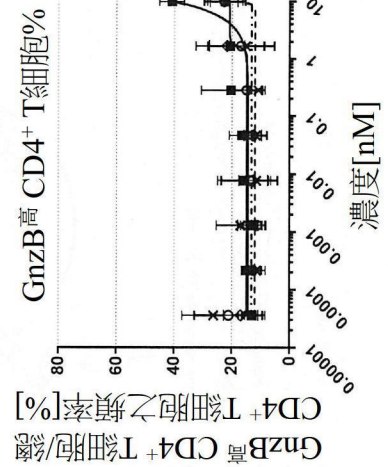
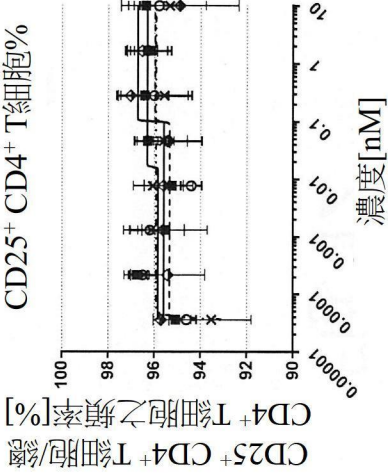
【圖10F】



【圖11A】

【圖11B】

【圖11C】

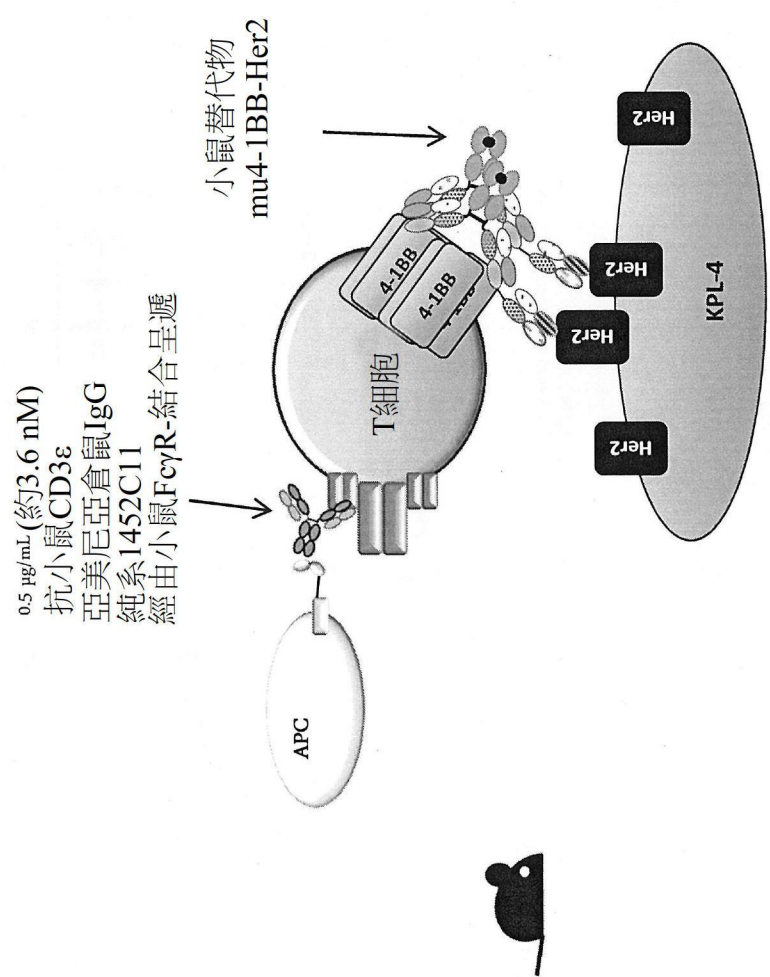


抗人類4-1BB純系20H4.9 hulgG4 (描述於專利EP1670828B1及
US7659384(B2)中)
抗人類4-1BB純系MOR-7480 hulgG2 (描述於專利
WO2012032433中)

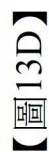
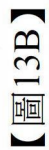
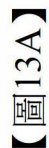
【圖11D】

【圖11E】

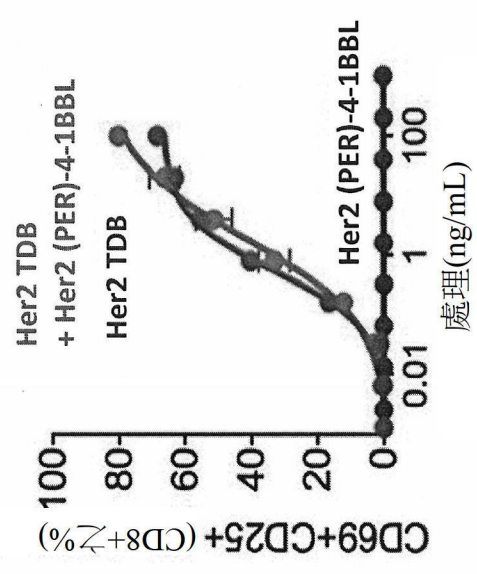
【圖11F】



【圖12】

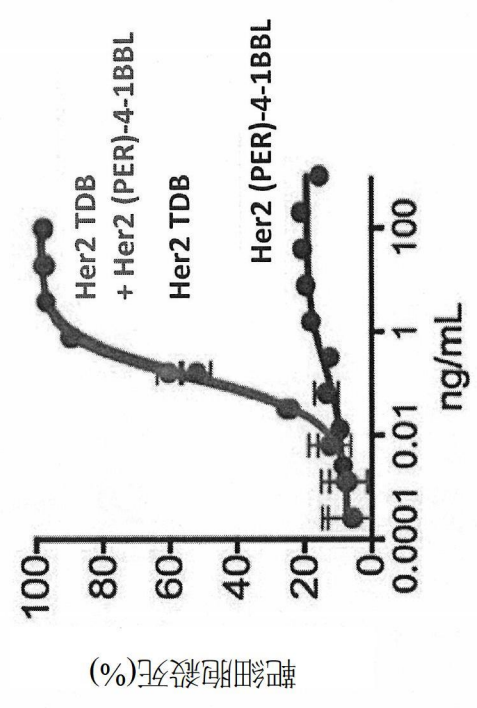


T細胞活化



【圖14A】

細胞殺死

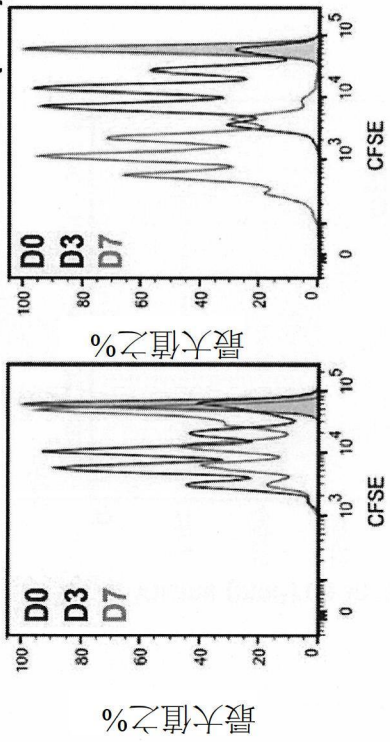


【圖14B】

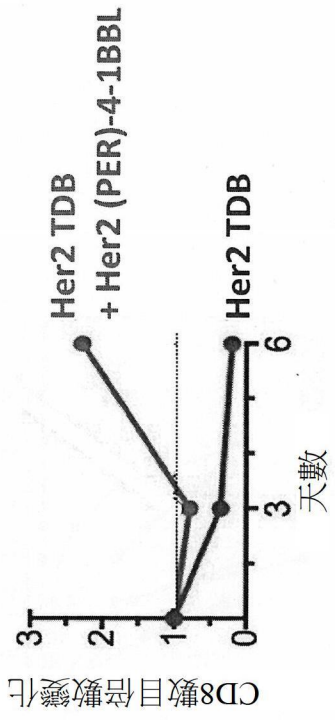
Her2(PER)-4-1BBL促進CD8+ T細胞增殖

Her2(PER)-4-1BBL支持更大CD8+ T細胞數目

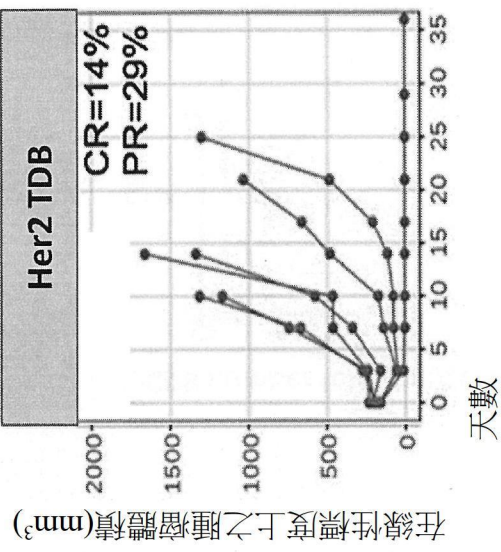
Her2 TDB Her2 TDB + Her2 (PER)-4-1BBL



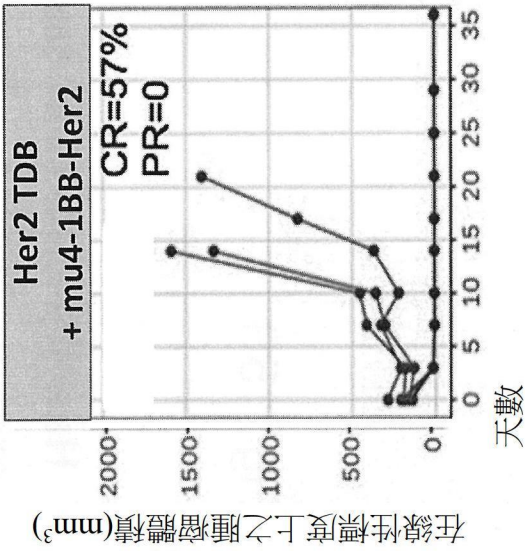
【圖15A】



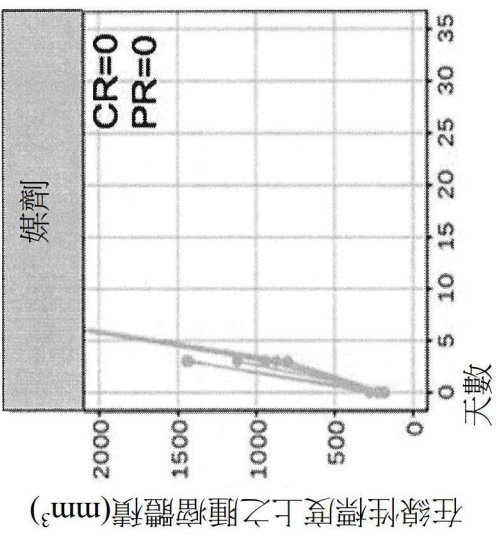
【圖15B】



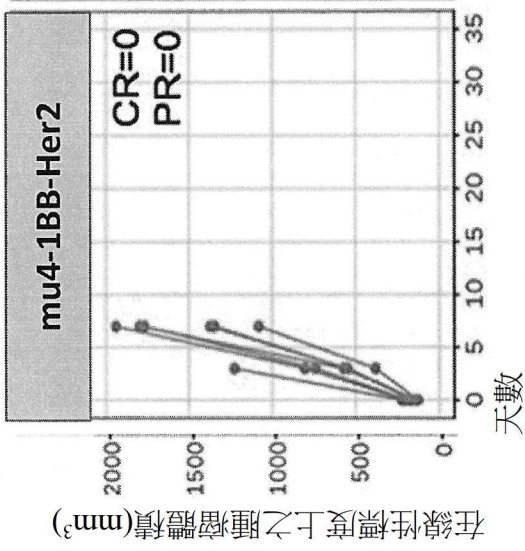
【圖16B】



【圖16D】



【圖16A】



【圖16C】