



(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 I870335 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 01 月 21 日

(21)申請案號：105118272

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 06 月 08 日

(51)Int. Cl. : A61K39/00 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/06/12 美國

62/175,039

2015/08/28 美國

62/211,109

2015/10/16 美國

62/242,640

(71)申請人：美商宏觀基因股份有限公司(美國) MACROGENICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：微吉頓 強瑪克 WIGGINTON, JON MARC (US)；潘耶 內米希巴赫 PANDYA,

NAIMISH BHARAT (US)；利希烈德 羅伯喬瑟夫 LECHLEIDER, ROBERT

JOSEPH (US)；寇尼格 史考特 KOENIG, SCOTT (US)；波維尼 愛利歐

BONVINI, EZIO (US)

(74)代理人：李文賢

(56)參考文獻：

US 2011097323A1

期刊 Savas P et al. "Investigating the positive relationship between tumor-infiltrating lymphocytes and trastuzumab therapy"

Immunotherapy vol.6 no.7 Future Medicine Ltd 2014/10/07 p.803-805

期刊 Philips GK et al "Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies" International Immunology vol.27 no.1 Oxford University Press 2014/10/16 p.39-46

審查人員：官速貞

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：15 共 216 頁

(54)名稱

變異的嵌合 4D5 抗體及其與抗 PD-1 抗體聯合用於治療癌症的應用

(57)摘要

本發明涉及藥物組合物，其包括特異性結合 HER2/neu 的第一分子和參與調節免疫檢查點(或其配體)的、特異性結合細胞表面受體(或其配體)的第二分子。本發明尤其涉及其中第二分子結合 PD-1 的實施方式。本發明也涉及這類藥物組合物治療癌症和其他疾病的用途。

This invention relates to a pharmaceutical composition that comprises a first molecule that specifically binds HER2/neu and a second molecule that specifically binds a cell-surface receptor (or its ligand) that is involved in regulating an immune checkpoint (or the ligand thereof). The invention particularly relates to the embodiment wherein the second molecule binds to PD-1. The invention also relates to the use of such pharmaceutical compositions to treat cancer and other diseases.

指定代表圖：

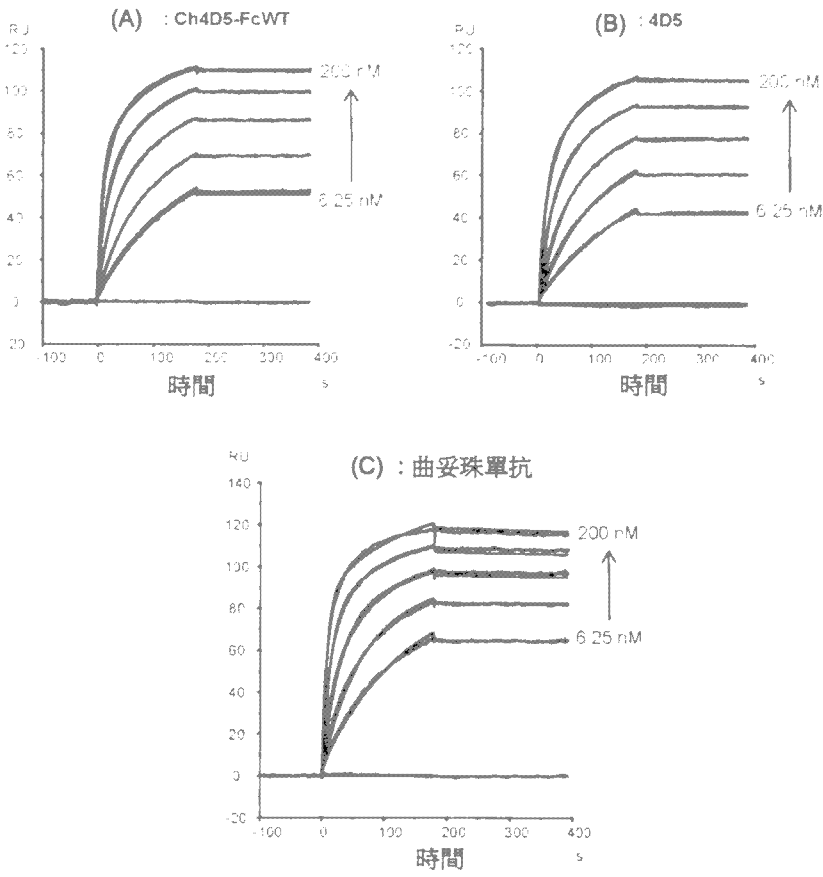


圖 3



I870335

【發明摘要】

【中文發明名稱】 變異的嵌合4D5抗體及其與抗PD-1抗體聯合用於治療癌症的應用

【英文發明名稱】 Variant Chimeric 4D5 Antibodies and Uses thereof in Combination with anti-PD-1 Antibodies for the Treatment of Cancer

【中文】

本發明涉及藥物組合物，其包括特異性結合HER2/neu的第一分子和參與調節免疫檢查點(或其配體)的、特異性結合細胞表面受體(或其配體)的第二分子。本發明尤其涉及其中第二分子結合PD-1的實施方式。本發明也涉及這類藥物組合物治療癌症和其他疾病的用途。

【英文】

This invention relates to a pharmaceutical composition that comprises a first molecule that specifically binds HER2/neu and a second molecule that specifically binds a cell-surface receptor (or its ligand) that is involved in regulating an immune checkpoint (or the ligand thereof). The invention particularly relates to the embodiment wherein the second molecule binds to PD-1. The invention also relates to the use of such pharmaceutical compositions to treat cancer and other diseases.

【指定代表圖】 圖3

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 變異的嵌合4D5抗體及其與抗PD-1抗體聯合用於治療癌症的應用

【英文發明名稱】 Variant Chimeric 4D5 Antibodies and Uses thereof in Combination with anti-PD-1 Antibodies for the Treatment of Cancer

【技術領域】

【0001】 本發明涉及藥物組合物，其包括特異性結合 HER2/neu 的第一分子和特異性結合細胞表面受體的、參與調節免疫檢查點(或其配體)的第二分子。本發明尤其涉及其中第二分子結合 PD-1 的實施方式。本發明也涉及這類藥物組合物治療癌症和其他疾病的用途。

【先前技術】

【0002】 I. HER2/neu 和 HER2/neu 受體

細胞生長和分化過程涉及通過特異性受體比如酪氨酸激酶發揮它們作用的生長因數。配體與酪氨酸激酶受體的結合引發一系列事件，其最終導致細胞增殖和分化 (Carpenter, G. 等(1979) “Epidermal Growth Factor,” Annu Rev Biochem. 48:193-216 ; Sachs 等(1987) “Cell Differentiation And Bypassing Of Genetic Defects In The Suppression Of Malignancy,” Cancer Res. 47:1981-1986)。基於序列相似性和不同的特徵，酪氨酸激酶受體可歸類為若干組。一種這樣的家族是 ErbB 或表皮生長因數受體家族，其包括稱為 HER-1 (也稱為 erbB-1 或 EGFR)、HER2/neu (也稱為 HER-2、erbB-2、c-neu 或 p185)、HER-3 (也稱為 erbB-3)，和 HER-4 (也稱為 erbB-4)的多個受體(見，例如，Carpenter, G.等(1979) “Epidermal Growth Factor,” Annu. Rev. Biochem. 48:193-216 ; Semba, K. 等(1985) “A v-erbB-Related Protooncogene, c-erbB-2, Is Distinct From The c-erbB-1/Epidermal

第 1 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

Growth Factor-Receptor Gene And Is Amplified In A Human Salivary Gland Adenocarcinoma,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82:6497-6501 ; Coussens, L.等(1985) “Tyrosine Kinase Receptor With Extensive Homology To EGF Receptor Shares Chromosomal Location With neu Oncogene,” Science 230:1132-1139 ; Bargmann, C.I.等(1986) “Multiple Independent Activations Of The Neu Oncogene By A Point Mutation Altering The Transmembrane Domain Of p185,” Cell 45:649-657 ; Kraus, M.H.等(1989) “Isolation And Characterization Of ERBB3, A Third Member Of The ERBB/Epidermal Growth Factor Receptor Family: Evidence For Overexpression In A Subset Of Human Mammary Tumors,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:9193-9197 ; Carraway, K.L.等(1994) “The erbB3 Gene Product Is A Receptor For Heregulin,” J. Biol. Chem. 269:14303-14306 ; Plowman, G.D.等(1993) “Heregulin Induces Tyrosine Phosphorylation Of HER4/p180erbB4,” Nature 366: 473-475 ; 和 Tzahar, E.等(1994) “ErbB-3 and ErbB-4 Function As The Respective Low And High Affinity Receptors Of All neu Differentiation Factor/Heregulin Isoforms,” Biol. Chem. 269: 25226-25233)。

【0003】 在正常的發育過程和人腫瘤發生過程中，ErbB 受體在傳播調節細胞增殖、分化、運動和細胞凋亡的信號中起到重要的作用(Slamon, D.J.等(1989) “Studies Of The HER-2/neu Proto-Oncogene In Human Breast And Ovarian Cancer,” Science 244:707-712)。例如，erbB 受體的啟動與以下相關並且刺激它們：下游 MAPK-Erk1/2 和磷酸肌醇-3-激酶(PI3K)/AKT 生長和生存途徑。已經將癌症中這些途徑的失調與疾病進展和難以治療相關聯(Fukazawa, T. 等(1996) “Tyrosine Phosphorylation Of Cbl Upon Epidermal Growth Factor (EGF) Stimulation And Its Association With EGF Receptor And Downstream Signaling Proteins,” J. Biol. Chem. 271:14554-14559 ; Tzahar, E.等(1996) “A Hierarchical

Network Of Interreceptor Interactions Determines Signal Transduction By neu Differentiation Factor/Neuregulin And Epidermal Growth Factor,” Mol. Cell. Biol. 16:5276-5287 ; Lange, C.A. 等 (1998) “Convergence Of Progesterone And Epidermal Growth Factor Signaling In Breast Cancer. Potentiation Of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways,” J. Biol. Chem. 273:31308-31316 ; Olayioye, M.A. 等 (1998) “ErbB-1 And ErbB-2 Acquire Distinct Signaling Properties Dependent Upon Their Dimerization Partner,” Mol. Cell. Biol. 18:5042-5051 ; Hackel, P.O.等(1999) “Epidermal Growth Factor Receptors: Critical Mediators Of Multiple Receptor Pathways,” Curr. Opin. Cell Biol. 11:184-189) 。

PI3K/AKT 的啟動促進了細胞生存並且增強了腫瘤侵略性，並且報導了 AKT2 在過表達 HER2/neu 的乳腺癌中被啟動和過表達(Shak, S. (1999) “Overview Of The Trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 Monoclonal Antibody Clinical Program In HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer,” Semin. Oncol. Suppl 12:71-77 ; Huang, S.M.等(2000) “Modulation Of Radiation Response After Epidermal Growth Factor Receptor Blockade In Squamous Cell Carcinomas: Inhibition Of Damage Repair, Cell Cycle Kinetics, And Tumor Angiogenesis,” Clinical Cancer Res. 7:2166-2174 ; Bacus, S.S. 等 (2002) “AKT2 Is Frequently Upregulated In HER-2/neu-Positive Breast Cancers And May Contribute To Tumor Aggressiveness By Enhancing Cell Survival,” Oncogene 21:3532-3540) 。

【0004】 通過受體的 ErbB 家族的信號傳導由配體結合啟動，這引發同受體二聚化或異受體二聚化、細胞質尾部的交互的酪氨酸磷酸化和細胞內信號轉導途徑的啟動(Citri, A.等(2003) “The Deaf And The Dumb: The Biology Of ErbB-2 And ErbB-3,” Exp. Cell Res. 284:54-65) 。結合和啟動 ErbB 受體的配體的可用性由各種金屬蛋白酶，比如鋅依賴性金屬蛋白酶的 ADAM (a disintegrin and

第 3 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

metalloprotease，解鏈蛋白和金屬蛋白酶)家族介導，該家族催化特異性蛋白質的細胞表面胞外域脫落(見 Chang, C.和 Werb, Z. (2001) “The Many Faces Of Metalloproteases: Cell Growth, Invasion, Angiogenesis And Metastasis,” Trends in Cell Biology 11:S37-S43 ; Moss, M.L.等(2002) “Shedding Of Membrane Proteins By ADAM Family Proteases,” Essays in Biochemistry 38:141-153 ; Seals, D.F.等(2003) “The ADAMs Family Of Metalloproteases: Multidomain Proteins With Multiple Functions,” Genes and Development 17:7-30)。具體地，已經證明 ADAM 家族切割負責啟動 ErbB 受體的配體，比如 APP 和 Notch (Blobel, C.P. (2005) “ADAMs: Key Components In EGFR Signalling And Development,” Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6:32-43)。

【0005】 HER2/neu 是 ErbB 家族的重要成員。它是 185 kDa 受體蛋白，初始被鑒定為來自化學處理的大鼠的成神經細胞瘤的 ERBB2 轉化基因的產物。因為其在若干人類癌症和哺乳動物發育中的作用，HER2/neu 得到了廣泛研究 (Hynes, N.E.等(1994) “The Biology Of erbB-2/neu/HER-2 And Its Role In Cancer,” Biochim. et Biophys. Acta 1198:165-184 ; Dougall, W.C. 等 (1994) “The neu-Oncogene: Signal Transduction Pathways, Transformation Mechanisms And Evolving Therapies,” Oncogene 9:2109-2123 ; Lee, K.F.等(1995) “Requirement For Neuregulin Receptor erbB2 In Neural And Cardiac Development,” Nature 378:394-398)。人 HER2/neu 基因和 HER2/neu 蛋白質描述在下述文獻中：Semba, K.等(1985) “A v-erbB-Related Protooncogene, c-erbB-2, Is Distinct From The c-erbB-1/Epidermal Growth Factor-Receptor Gene And Is Amplified In A Human Salivary Gland Adenocarcinoma,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82: 6497-6501 和 Yamamoto, T.等(1986) “Similarity Of Protein Encoded By The Human c-erb-B-2 Gene To Epidermal Growth Factor Receptor,” Nature 319:230-234，並且可在

第 4 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

GenBank 中以登錄號 X03363 獲得序列。HER2/neu 包括四個結構域：配體結合的細胞外結構域；親脂性跨膜結構域；保守的細胞內酪氨酸激酶結構域；和具有若干可被磷酸化的酪氨酸殘基的羧基-末端信號傳導結構域(Plowman, G.D.等(1993) “Ligand-Specific Activation Of HER4/p180erbB4, A Fourth Member Of The Epidermal Growth Factor Receptor Family,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:1746-1750)。Franklin, M.C.等(2004) “Insights Into ErbB Signaling From The Structure Of The ErbB2-Pertuzumab Complex,” Cancer Cell. 5(4):317-328 描述了 HER2/neu 細胞外結構域(ECD)的序列，其可獲得自 Protein DataBank Record 1S78 (2004)。

【0006】 HER2/neu 用作生長因數受體並且通常由乳腺癌、卵巢癌或肺癌的細胞表達。HER2/neu 在 25-30%的人乳腺癌和卵巢癌中過表達，並且其過表達與受影響的患者中快的臨床進程和差的預後相關(Slamon, D.J.等(1987) “Human Breast Cancer: Correlation Of Relapse And Survival With Amplification Of The HER-2/neu Oncogene,” Science 235:177-182；Slamon, D.J.等(1989) “Studies Of The HER-2/neu Proto-Oncogene In Human Breast And Ovarian Cancer,” Science 244:707-712)。也已經在其他癌的癌細胞中觀察到了 HER2/neu 的過表達，所述癌包括胃癌、子宮內膜癌、唾液腺癌、肺癌、腎癌、結腸癌、甲狀腺癌、胰腺癌和膀胱癌(見，例如 King, C.R.等(1985) “Amplification Of A Novel v-erbB-Related Gene In A Human Mammary Carcinoma,” Science 229:974；McCann, A. 等(1990) “c-erbB-2 Oncoprotein Expression In Primary Human Tumors,” Cancer 65:88-92；Yonemura, Y. 等(1991) “Evaluation Of Immunoreactivity For erbB-2 Protein As A Marker Of Poor Short Term Prognosis In Gastric Cancer” Cancer Research 51:1034)。

【0007】 已經將 HER2/neu 的啟動與乳腺癌患者中對激素療法降低的臨床反應性相關聯(Wright, C. et. al. (1989) “Expression Of c-erbB-2 Oncoprotein: A Prognostic Indicator In Human Breast Cancer,” Cancer Res. 49:2087-2090 ; Kurokawa, H.等(2001) “Inhibition Of erbB Receptor (HER) Tyrosine Kinases As A Strategy To Abrogate Antiestrogen Resistance In Human Breast Cancer,” Clin. Cancer Res. 7:4436s-42s, 4411s-4412s)。事實上，HER2/neu 表達足以傳輸抗雌激素抗性 (Benz, C.C. 等 (1993) “Estrogen-Dependent, Tamoxifen-Resistant Tumorigenic Growth Of MCF-7 Cells Transfected With HER2/neu,” Breast Cancer Res. Treat. 24:85-95)。HER2/neu 以及 HER-3 似乎牽涉前列腺癌患者中激素抗性的發作。約三分之一的前列腺癌患者接收激素療法治療，目標是破壞睪丸和腎上腺雄激素的功能。就乳腺癌而言，抗性是不可避免的。最近的資料提示，源自 HER2/neu 和 HER-3 的信號誘導了“激素難治性”的狀態(Mellinghoff, I.K. 等 (2004) “HER2/neu Kinase-Dependent Modulation Of Androgen Receptor Function Through Effects On DNA Binding And Stability,” Cancer Cell 6:517-527)。

【0008】 若干截短和剪接形式的 HER2/neu 是已知的。例如，通過使用內含子中的多腺苷酸化信號產生的可選的轉錄體產生了位於一些胃癌細胞的細胞核周圍的細胞質中的截短 ECD (Yamamoto, T.等(1986) “Similarity Of Protein Encoded By The Human c-erb-B-2 Gene To Epidermal Growth Factor Receptor,” Nature 319:230-234；和 Scott, G.K.等(1993) “A Truncated Intracellular HER2/neu Receptor Produced By Alternative RNA Processing Affects Growth Of Human Carcinoma Cells,” Mol. Cell. Biol. 13:2247-2257)。HER2/neu 的 ECD 也可在培養中從乳腺癌細胞蛋白水解脫落，其在一些癌症患者的血清中被發現，因此可以作為轉移性乳腺癌和總體差的預後的血清標記物(Petch, L.A.等(1990) “A

Truncated, Secreted Form Of The Epidermal Growth Factor Receptor Is Encoded By An Alternatively Spliced Transcript In Normal Rat Tissue,” Mol. Cell. Biol. 10:2973-2982 ; Leitzel, K.等(1992) “Elevated Soluble c-erbB-2 Antigen Levels In The Serum And Effusions Of A Proportion Of Breast Cancer Patients,” J. Clin. Oncol. 10:1436-1443 ; Scott, G.K.等(1993) “A Truncated Intracellular HER2/neu Receptor Produced By Alternative RNA Processing Affects Growth Of Human Carcinoma Cells,” Mol. Cell. Biol. 13:2247-2257 ; 和 Lee, H.等(1998) “Isolation And Characterization Of Four Alternate c-erbB3 Transcripts Expressed In Ovarian Carcinoma-Derived Cell Lines And Normal Human Tissues,” Oncogene 16:3243-3252)。在一些過表達 HER2/neu 的癌細胞中，熟知的金屬蛋白酶啟動劑，乙酸 4-氨基苯汞(APMA)啟動金屬蛋白酶比如 ADAM10 和 ADAM15，將 HER2/neu 受體切割成兩個部分：稱為 p95 的截短的膜相關受體，和稱為 p105 或 ECD105 的可溶性 ECD(見，例如 Molina, M.A.等(2001) “Trastuzumab (Herceptin), A Humanized anti-Her2 Receptor Monoclonal Antibody, Inhibits Basal And Activated Her2 Ectodomain Cleavage In Breast Cancer Cells,” Cancer Res. 61:4744-4749;美國專利公開號 2004/0247602)。ECD 的損失致使 p95 受體成為組成型活性酪氨酸激酶，其可遞送生長和生存信號至癌細胞(見，例如，美國專利號 6,541,214)。

【0009】 研究已經顯示在過表達 HER2/neu 的乳腺癌細胞中，用對 HER2/neu 特異性的抗體組合化療劑(例如，順鉑、阿黴素(doxoubicin)、紫杉醇)進行治療引起比單獨用化療進行治療更高的細胞毒性應答(Hancock, M.C.等(1991) “A Monoclonal Antibody Against The c-erbB-2 Protein Enhances The Cytotoxicity Of Cis-Diamminedichloroplatinum Against Human Breast And Ovarian Tumor Cell Lines,” Cancer Res. 51:4575-4580 ; Arteaga, C.L. 等 (1994)

第 7 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

“p185c-erbB-2 Signal Enhances Cisplatin-Induced Cytotoxicity In Human Breast Carcinoma Cells: Association Between An Oncogenic Receptor Tyrosine Kinase And Drug-Induced DNA Repair,” Cancer 54:3758-3765 ; Pietras, R.J.等(1994)

“Antibody to HER-2/neu receptor Blocks DNA Repair After Cisplatin In Human Breast And Ovarian Cancer Cells,” Oncogene 9:1829-1838) 。HER2/neu 抗體可能增強對化療劑應答的可能的機制是通過調節 HER2/neu 蛋白質表達或通過干擾 DNA 修復(Stancovski, I.等(1991) “Mechanistic Aspects Of The Opposing Effects Of Monoclonal Antibodies To The ERBB2 Receptor On Tumor Growth,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:8691-8695 ; Bacus, S.S.等(1992) “A Ligand For The erbB-2 Oncogene Product (gp30) Induces Differentiation Of Human Breast Cancer Cells,” Cell Growth & Diff. 3:401-411 ; Bacus, S.S.等(1993) “Neu Differentiation Factor (Heregulin) Induces Expression Of Intercellular Adhesion Molecule 1: Implications For Mammary Tumors,” Cancer Res. 53:5251-5261 ; Klapper, L.N. 等 (1997) “ A Subclass Of Tumor-Inhibitory Monoclonal Antibodies To ErbB-2/HER2 Blocks Crosstalk With Growth Factor Receptors,” Oncogene 14:2099-2109 ; Klapper, L.N. 等 (2000) “ Tumor-Inhibitory Antibodies To HER-2/ErbB-2 May Act By Recruiting c-Cbl And Enhancing Ubiquitination Of HER-2,” Cancer Res. 60:3384-3388 ; Arteaga, C.L.等(2001) “The Epidermal Growth Factor Receptor: From Mutant Oncogene In Nonhuman Cancers To Therapeutic Target In Human Neoplasia,” J Clinical Oncology 19(18s):32s-40s) 。

【0010】 已經開發了靶向HER-1或HER2/neu的許多單克隆抗體和小分子酪氨酸激酶抑制劑。例如，稱為鼠科抗體“4D5”的鼠科單克隆抗體識別位置非常靠近跨膜區的HER2/neu的富含半胱氨酸的II結構域中的細胞外表位元(氨基酸 529 至 627)。用鼠科 4D5 和人源化 4D5 治療乳腺癌細胞部分阻斷了

HER2/neu-HER-3 複合物的 NDF/調蛋白啟動，如通過受體磷酸化試驗測量的 (Carter, P.等(1992) “Humanization Of An anti-p185HER2 Antibody For Human Cancer Therapy,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289 ; Sliwkowski, M.X. 等 (1999) “ Nonclinical Studies Addressing The Mechanism Of Action Of Trastuzumab (Herceptin), ” Sem. in Oncol. 26:60-70 ; Ye, D. 等 (1999) “Augmentation Of A Humanized anti-HER2 mAb 4D5 Induced Growth Inhibition By A Human-Mouse Chimeric anti-EGF Receptor mAb C225,” Oncogene 18:731-738 ; Vogel, C.L.等(2001) “First-Line Herceptin Monotherapy In Metastatic Breast Cancer,” Oncology 61(suppl 2):37-42 ; Vogel, C.L 等(2002) “Efficacy And Safety Of Trastuzumab As A Single Agent In First-Line Treatment Of HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer,” J. Clin. Oncol. 20(3):719-726 ; Fujimoto-Ouchi, K.等(2002) “Antitumor Activity Of Combinations Of anti-HER-2 Antibody Trastuzumab And Oral Fluoropyrimidines Capecitabine/5'-Dfurd In Human Breast Cancer Models,” Cancer Chemother. Pharmacol. 49:211-216)。但是，向人施用鼠科 4D5 臨床上失敗了，因為患者迅速發展了人抗鼠抗體(HAMA)應答，從而開發了人源化形式的鼠科 4D5。人源化 4D5 抗體的序列和晶體結構已經描述在下述文獻中：美國專利號 6,054,297 ; Carter, P.等(1992) “Humanization Of An anti-p185HER2 Antibody For Human Cancer Therapy,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289 ; 和 Eigenbrot, C.等(1993) “X-ray Structures Of The Antigen-Binding Domains From Three Variants Of Humanized anti-p185HER2 Antibody 4D5 And Comparison With Molecular Modeling,” J. Mol. Biol. 229:969-995。

【0011】 開發了稱為“曲妥珠單抗(trastuzumab)”的人源化形式的鼠科 4D5 抗體(作為赫賽汀®(Herceptin®)由 Genentech, Inc.出售)，並且已經批准用

第 9 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

於治療涉及 HER2/neu 的過表達或基因擴增的癌症，包括乳腺癌((Cobleigh, M.A. 等(1999) “Multinational Study Of The Efficacy And Safety Of Humanized anti-HER2 Monoclonal Antibody In Women Who Have HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer That Has Progressed After Chemotherapy For Metastatic Disease,” J. Clin. Oncol. 17:2639-2648)。曲妥珠單抗在體外抑制 APMA-介導的 HER2/neu 切割成 ECD 和 p95 部分，並且認為在體外通過不同的機制起作用，包括可能的抑制 HER2/neu 脫落(Pegram, M.D.等(1998) “Phase II Study Of Receptor-Enhanced Chemosensitivity Using Recombinant Humanized anti-p185HER2/neu Monoclonal Antibody Plus Cisplatin In Patients With HER2/neu-Overexpressing Metastatic Breast Cancer Refractory To Chemotherapy Treatment,” J. Clin. Oncology 16(8):2659-2671；Baselga, J.等(2001) “Mechanism Of Action Of Trastuzumab And Scientific Update,” Seminars in Oncology 28(5)(suppl. 16):4-11；Baselga, J.等(2001) “Mechanism Of Action Of anti-HER2 Monoclonal Antibodies,” Ann. Oncol. 12 (suppl. 1):S35-S41)。但是，曲妥珠單抗療法具有各種缺點，比如心臟毒性和在一些患者中人抗人源化抗體(HAHA)應答的發展。

【0012】 本文提供了用於癌症療法的新的和改進形式的抗 HER2/neu 抗體，例如工程化的嵌合 4D5 抗體，其具有增加的親和力或特異性、降低的 HAMA 或 HAHA 應答的可能性、增強的效應子功能等，並且已經在 PCT 公開 WO 2009/123894 中描述。在臨床前研究中，已經顯示這類工程化的 4D5 抗體展示了針對 HER2/neu 陽性腫瘤，包括低 HER2/neu 表達子，的增強的 ADCC 活性，與效應細胞的 Fc γ R 變體無關(Nordstrom, J.L.等(2011) “Anti-tumor Activity And Toxicokinetics Analysis Of MGAH22, An anti-HER2 Monoclonal Antibody With Enhanced Fc γ Receptor Binding Properties,” Breast Cancer Research

第 10 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

13(6):R123)。另外，I 期研究表明，在患有乳腺癌和胃食管癌的、在 HER-2/neu 療法之前失敗的患者中，和在患有表達 HER2/neu 的腫瘤的並且認為曲妥珠單抗對該腫瘤無效的患者中，這類抗體耐受良好並且具有有希望的活性(Burris, H.A.. (2013) “Phase I Study Of margetuximab (MGAH22), An FC-Modified Chimeric Monoclonal Antibody (MAb), in Patients (pts) With Advanced Solid Tumors Expressing The HER2 Oncoprotein,” J. Clin. Oncol. Suppl: abstr. 3004)。

因此，這類改進的抗 HER2/neu 抗體為腫瘤表達低水準的 HER2/neu 的患者或其他 HER2/neu 療法無效的患者提供了新的治療選擇。

【0013】 II.細胞介導的免疫應答

人和其他哺乳動物的免疫系統負責提供抗感染和疾病的保護。這類保護通過體液免疫應答和細胞介導的免疫應答提供。體液應答導致產生抗體和能夠識別和中和外源靶(抗原)的其他生物分子。相比之下，細胞介導的免疫應答涉及通過 T 細胞啟動巨噬細胞、天然殺傷細胞(NK)和抗原特異性細胞毒性 T-淋巴細胞，和回應抗原的識別釋放各種細胞因數(Dong, C.等(2003) “Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,” Immunolog. Res. 28(1): 39-48)。

【0014】 T 細胞最佳介導針對抗原的免疫應答的能力需要兩種不同的信號傳導相互作用(Viglietta, V. 等(2007) “Modulating Co-Stimulation,” Neurotherapeutics 4: 666-675；Korman, A.J.等(2007) “Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,” Adv. Immunol. 90: 297-339)。首先，已經排列在抗原呈遞細胞(APC)的表面的抗原必須被呈遞至抗原特異性幼稚(naïve) CD4+ T 細胞。這類呈遞經 T 細胞受體(TCR)遞送信號，所述 T 細胞受體引導 T 細胞啟動對呈遞的抗原特異性的免疫應答。第二，通過 APC 和不同的 T 細胞表面分子之間的相互作用介導的一系列共刺激和抑制信號，首先引發 T 細胞的啟動和

增殖，並最終引發它們的抑制。因此，第一信號為免疫應答提供特異性，而第二信號用於確定應答的性質、量級(magnitude)和持續時間。

【0015】 免疫系統受共刺激和共抑制配體和受體的嚴格控制。這些分子為 T 細胞啟動提供第二信號，並且提供正信號和負信號的平衡網路，以使針對感染的免疫應答最大化，同時限制對自身的免疫性(Wang, L.等(2011) “VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses,” J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16 ; Lepenies, B.等(2008) “The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections,” Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288)。對於保持自身耐受性和調節免疫應答的持續時間和幅度(amplitude)關鍵的抑制途徑統稱為免疫檢查點(immune checkpoint)。尤其重要的是抗原呈遞細胞的 B7.1 (CD80)和 B7.2 (CD86)配體和 CD4+ T-淋巴細胞的 CD28 和 CTLA-4 受體之間的結合(Sharpe, A.H.等(2002) “The B7-CD28 Superfamily,” Nature Rev. Immunol. 2: 116-126 ; Dong, C.等(2003) “Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,” Immunolog. Res. 28(1): 39-48 ; Lindley, P.S.等(2009) “The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,” Immunol. Rev. 229: 307-321)。B7.1 或 B7.2 與 CD28 的結合刺激 T 細胞啟動；B7.1 或 B7.2 與 CTLA-4 的結合抑制這類啟動(Dong, C.等(2003) “Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,” Immunolog. Res. 28(1): 39-48 ; Lindley, P.S.等(2009) “The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,” Immunol. Rev. 229: 307-321 ; Greenwald, R.J.等(2005) “The B7 Family Revisited,” Ann. Rev. Immunol. 23: 515-548)。CD28 在 T 細胞的表面上組成型表達(Gross, J.,等(1992) “Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse,” J. Immunol. 149: 380 - 388)，而 CTLA-4 表達在 T 細胞啟動之後快速上調(Linsley, P.等(1996)

第 12 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

“Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement,” *Immunity* 4: 535 – 543)。因為 CTLA-4 是較高親和力的受體 (Sharpe, A.H.等(2002) “The B7-CD28 Superfamily,” *Nature Rev. Immunol.* 2: 116-126)，結合首先啟動 T 細胞增殖(經 CD28)，然後抑制它(經 CTLA-4 的初期表達)，從而當不再需要增殖時，抑制該作用。

【0016】 對 CD28 受體的配體的進一步研究已經導致鑒定和表徵了一組相關的 B7 分子(“B7 超家族”) (Sharpe, A.H.等(2002) “The B7-CD28 Superfamily,” *Nature Rev. Immunol.* 2: 116-126；Greenwald, R.J.等(2005) “The B7 Family Revisited,” *Ann. Rev. Immunol.* 23: 515-548；Collins, M.等(2005) “The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,” *Genome Biol.* 6: 223.1-223.7；Loke, P.等(2004) “Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T-Cells.” *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214；Korman, A.J.等(2007) “Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,” *Adv. Immunol.* 90: 297-339；Flies, D.B. 等(2007) “The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,” *J. Immunother.* 30(3): 251-260；Agarwal, A.等(2008) “The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance,” *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372；Wang, S.等(2004) “Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses,” *Microbes Infect.* 6: 759-766)。目前存在若干已知的家族成員：B7.1 (CD80)、B7.2 (CD86)、可誘導的共刺激物配體(ICOS-L)、程式化死亡-1 配體(PD-L1；B7-H1)、程式化死亡-2 配體(PD-L2；B7-DC)、B7-H3、B7-H4 和 B7-H6 (Collins, M.等(2005) “The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,” *Genome Biol.* 6: 223.1-223.7；Flajnik, M.F.等(2012) “Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And

Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC," Immunogenetics 64(8): 571-90)。

【0017】 III. PD-1

程式化死亡-1 (“PD-1”)是廣泛負調節免疫應答的擴展的 T 細胞調節子的 CD28/CTLA-4 家族的約 31 kD I 型膜蛋白成員(Ishida, Y.等(1992) “Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death,” EMBO J. 11:3887-3895；美國專利申請公開號 2007/0202100、2008/0311117、2009/00110667；美國專利號 6,808,710、7,101,550、7,488,802、7,635,757、7,722,868；PCT 公開號 WO 01/14557)。

【0018】 PD-1 在啟動的 T 細胞、B 細胞和單核細胞上表達(Agata, Y.等(1996) “Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes,” Int. Immunol. 8(5):765-772；Yamazaki, T. 等(2002) “Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC,” J. Immunol. 169:5538-5545)，並且以低水準在天然殺傷細胞(NK) T 細胞中表達(Nishimura, H.等(2000) “Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice,” J. Exp. Med. 191:891-898；Martin-Orozco, N. 等(2007) “Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,” Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298)。

【0019】 PD-1 的細胞外區域由與 CTLA-4 中的等同結構域有 23%同一性的單免疫球蛋白(Ig)V 結構域組成(Martin-Orozco, N.等(2007) “Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,” Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298)。細胞外 IgV 結構域之後是跨膜區和細胞內尾部。細胞內尾部包含位於免疫受體酪氨酸基抑制基序和免疫受體酪氨酸基轉換基序中的兩個磷酸化位點，這表明 PD-1 負調節 TCR 信號(Ishida, Y.等(1992) “Induced Expression Of PD-1, A Novel

第 14 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death,” EMBO J. 11:3887-3895 ; Blank, C.等(2006) “Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer,” Immunol. Immunother. 56(5):739-745)。

【0020】 通過結合 B7-H1 和 B7-DC, PD-1 介導其對免疫系統的抑制(Flies, D.B.等(2007) “The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,” J. Immunother. 30(3):251-260 ; 美國專利號 6,803,192、7,794,710 ; 美國專利申請公開號 2005/0059051、2009/0055944、2009/0274666、2009/0313687 ; PCT 申請號 WO 01/39722、WO 02/086083)。

【0021】 B7-H1 和 B7-DC 廣泛地在人和鼠組織的表面上表達,比如心臟、胎盤、肌肉、胎肝、脾、淋巴結和胸腺以及鼠肝臟、肺、腎、胰腺的胰島細胞和小腸(Martin-Orozco, N.等(2007) “Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,” Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298)。在人中,已經在人內皮細胞(Chen, Y.等(2005) “Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells,” Nephron. Exp. Nephrol. 102:e81-e92 ; de Haij, S.等(2005) “Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1” Kidney Int. 68:2091-2102 ; Mazanet, M.M. 等 (2002) “B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis,” J. Immunol. 169:3581-3588)、心肌(Brown, J.A.等(2003) “Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production,” J. Immunol. 170:1257-1266)、合胞滋養層(syncytiotrophoblast) (Petroff, M.G.等(2002) “B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface,” Placenta 23:S95-S101)中發現 B7-H1 蛋白質表達。分子也由一些組織的駐留型巨噬細胞、已經通過干擾素(IFN)- γ 或腫瘤壞死因數(TNF)- α 啟動

第 15 頁, 共 121 頁(發明申請專利範圍)

的巨噬細胞表達(Latchman, Y.等(2001) “PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation,” Nat. Immunol 2:261-268), 並且中腫瘤中被表達(Dong, H. (2003) “B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity,” J. Mol. Med. 81:281-287)。

【0022】 已經發現 B7-H1 和 PD-1 之間的相互作用為 T-細胞和 B 細胞提供了重要的負共刺激信號(Martin-Orozco, N.等(2007) “Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,” Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298)並作為細胞死亡誘導物發揮作用(Ishida, Y.等(1992) “Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death,” EMBO J. 11:3887-3895 ; Subudhi, S.K. 等(2005) “The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition,” J. Molec. Med. 83:193-202)。更具體而言，已經發現低濃度的 PD-1 受體和 B7-H1 配體之間的相互作用導致抑制信號的傳遞，所述抑制信號強烈抑制抗原特異性 CD8+ T 細胞的增殖；在較高濃度下，與 PD-1 的相互作用不抑制 T 細胞增殖，但是明顯減少多種細胞因數的產生(Sharpe, A.H. 等(2002) “The B7-CD28 Superfamily,” Nature Rev. Immunol. 2:116-126)。已經發現，通過靜息和先前啟動的 CD4 和 CD8 T 細胞，和甚至來自臍帶血的幼稚 T 細胞的 T 細胞增殖和細胞因數產生受可溶性 B7-H1-Fc 融合蛋白的抑制(Freeman, G.J.等(2000) “Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation,” J. Exp. Med. 192:1-9 ; Latchman, Y.等(2001) “PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation,” Nature Immunol. 2:261-268 ; Carter, L.等(2002) “PD-1:PD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells And Is Overcome By IL-2,” Eur. J.

Immunol. 32(3):634-643 ; Sharpe, A.H.等(2002) "The B7-CD28 Superfamily," Nature Rev. Immunol. 2:116-126)。

【0023】 B7-H1 和 PD-1 抑制 T 細胞啟動和增殖的作用已經提示，這些生物分子可用作治療炎症和癌症的治療性靶標。因此，已經建議了使用抗 PD-1 抗體治療感染和腫瘤和上調適應性免疫應答(見，美國專利申請公開號 2010/0040614、2010/0028330、2004/0241745、2008/0311117、2009/0217401；美國專利號 7,521,051、7,563,869、7,595,048；PCT 公開號 WO 2004/056875、WO 2008/083174)。Agata, T.等(1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes," Int. Immunol. 8(5):765-772；和 Berger, R.等(2008) "Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies," Clin. Cancer Res. 14(10):3044-3051 已經報導了能夠特異性結合 PD-1 的抗體(也見，美國專利號 8,008,449 和 8,552,154；美國專利公開號 2007/0166281、2012/0114648、2012/0114649、2013/0017199、2013/0230514 和 2014/0044738；和 PCT 專利公開號 WO 2003/099196、WO 2004/004771、WO 2004/056875、WO 2004/072286、WO 2006/121168、WO 2007/005874、WO 2008/083174、WO 2009/014708、WO 2009/073533、WO 2012/135408、WO 2012/145549、和 WO 2013/014668)。

【0024】 IV.表達 HER2/neu 的癌症

HER2/neu 的擴增或過表達發生在約 25-30%的乳腺癌中(Mitri, Z.等(2012). "The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy," Chemother Res Pract 2012:742193；Burstein, H.J. (2005) "The Distinctive Nature of HER2-Positive Breast Cancers," N. Engl. J. Med. 353 (16): 1652 - 4)。也已知過表達發生在卵巢、胃和浸潤形式的子宮癌中(見例如，

第 17 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

Yonemura, Y.等(1991) “Evaluation Of Immunoreactivity For erbB-2 Protein As A Marker Of Poor Short Term Prognosis In Gastric Cancer” *Cancer Research* 51:1034 ; Lanitis, E. (2012) “Primary Human Ovarian Epithelial Cancer Cells Broadly Express HER2 At Immunologically-Detectable Levels,” *PloS One* 7(11):e49829;和 Tan, M.等(2007). "Molecular Mechanisms Of erbB2-Mediated Breast Cancer Chemoresistance," *Adv. Exp. Med. Biol.* 608: 119 – 29)。如上所述，HER2/neu 的過表達與增加的疾病復發和差的預後密切相關。但是，HER2/neu 也是抗 HER2/neu 藥物，包括靶向受體的細胞外結構域的單克隆抗體比如曲妥珠單抗和瑪格妥昔單抗(margetuximab)，和小分子腺苷三磷酸(ATP)競爭劑的重要的靶標，所述小分子腺苷三磷酸(ATP)競爭劑能夠阻斷 HER2 靶特異性劑諸如拉帕替尼(lapatinib)的細胞內結構域中酪氨酸激酶(TK)活性((Gandhi, M.D. 等(2014) “Targeted Treatment Of Head And Neck Squamous-Cell Carcinoma: Potential Of Lapatinib,” *Onco. Targets Ther.* 7:245-251 ; Opdam, F.L.等(2012) “Lapatinib For Advanced Or Metastatic Breast Cancer,” *Oncologist* 17(4):536-542 ; Liao, J.等(2010) “Lapatinib: New Opportunities For Management Of Breast Cancer,” *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2:79-91)。

【0025】 儘管有效靶向過表達 HER2/neu 的癌症已經改善了無進展生存(PFS)和總體生存(OS)率，但是表達 HER2/neu 的轉移性乳腺癌仍是不可治癒的疾病。事實上，許多乳腺癌患者在用 HER2/neu 靶向劑，比如曲妥珠單抗和拉帕替尼治療之後復發，表明存在從頭開始的(de novo)或獲得的抗性(Tan, M.等(2007). “Molecular Mechanisms Of erbB2-Mediated Breast Cancer Chemoresistance,” *Adv. Exp. Med. Biol.* 608: 119 – 29 ; Singh 等(2014) “HER2-Positive Advanced Breast Cancer: Optimizing Patient Outcomes And Opportunities For Drug Development,” *British Journal of Cancer* 111:1888 – 1898 ;

第 18 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

Formisano, L.等(2014) “Epidermal Growth Factor-Receptor Activation Modulates Src-Dependent Resistance To Lapatinib In Breast Cancer Models,” *Breast Cancer Research* 16:R45)。此外，低 HER2/neu 表達也可能與差的預後相關(Gilcrease M.Z. 等(2009) “Even Low-Level HER2 Expression May Be Associated With Worse Outcome In Node-Positive Breast Cancer,” *Am J Surg Pathol.* 2009 33(5):759-67)。

但是，還沒有 HER2/neu 靶向治療療法被批准用於患表達低水準的 HER2/neu 的癌症的患者。這些發現突出了開發用於表達 HER2/neu 的癌症的改進療法的重要性。

【0026】 因此，儘管之前的進步，但是仍需要改進的組合物和方法，用於治療表達 HER2/neu 的癌症，尤其是轉移乳腺癌和表達低水準的 HER2/neu 的癌症。本發明涉及這類組合物和將它們用於治療 HER2/neu 陽性乳腺癌和表達 HER2/neu 的其他癌症的方法。

【發明內容】

【0027】 本發明涉及藥物組合物，其包括特異性結合 HER2/neu 的第一分子和特異性結合細胞表面受體的、參與調節免疫檢查點(或其配體)的第二分子。本發明尤其涉及其中第二分子結合 PD-1 的實施方式。本發明也涉及這類藥物組合物治療癌症和其他疾病的用途。

【0028】 具體地，本發明提供了治療癌症的方法，其包括向需要其的受試者施用特異性結合 HER2/neu 的抗體和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子。

【0029】 本發明尤其涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體是“變異的嵌合 4D5 抗體”，其包括具有 SEQ ID NO: 4 的氨

基酸序列的輕鏈可變結構域和具有選自 **SEQ ID NO: 9**、**SEQ ID NO: 11** 和 **SEQ ID NO: 13** 的氨基酸序列的重鏈。

【0030】 本發明尤其涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子是抗 PD-1 抗體或其抗原結合片段。

【0031】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中抗 PD-1 抗體或其抗原結合片段：

(a)與下述抗體競爭 PD-1 結合：尼魯單抗、派姆單抗、皮地珠單抗、抗體 EH12.2H7、抗體 hPD-1 mAb 2、抗體 hPD-1 mAb 7、抗體 hPD-1 mAb 9、抗體 hPD-1 mAb 15 或選自表 1 的另外的抗 PD-1 抗體；或

(b)具有下述抗體的三個重鏈 CDR 和三個輕鏈 CDR：尼魯單抗、派姆單抗、皮地珠單抗、抗體 EH12.2H7、抗體 hPD-1 mAb 2、抗體 hPD-1 mAb 7、抗體 hPD-1 mAb 9、抗體 hPD-1 mAb 15 或選自表 1 的另外的抗 PD-1 抗體；或

(c)具有下述抗體的重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域：尼魯單抗、派姆單抗、皮地珠單抗、抗體 EH12.2H7、抗體 hPD-1 mAb 2、抗體 hPD-1 mAb 7、抗體 hPD-1 mAb 9、抗體 hPD-1 mAb 15 或選自表 1 的另外的抗 PD-1 抗體。

【0032】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中抗 PD-1 抗體或其抗原結合片段包括 Fc 區。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中 Fc 區包括減少變異的 Fc 區對 FcγRIIIa (CD16A)的親和力和/或減少 ADCC 活性的一個或多個氨基酸修飾。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中修飾包括下述取代：L234A；L235A；或 L234A 和 L235A。

【0033】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中抗 PD-1 抗體是尼魯單抗、派姆單抗、皮地珠單抗、抗體 EH12.2H7、抗體 hPD-1 mAb 2、抗體 hPD-1 mAb 7、抗體 hPD-1 mAb 9、抗體 hPD-1 mAb 15 或選自表 1 的另外的抗 PD-1 抗體。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中抗 PD-1 抗體的抗原結合

片段是下述抗體的抗原結合片段：尼魯單抗、派姆單抗、皮地珠單抗、抗體 EH12.2H7、抗體 hPD-1 mAb 2、抗體 hPD-1 mAb 7、抗體 hPD-1 mAb 9、抗體 hPD-1 mAb 15 或選自表 1 的另外的抗 PD-1 抗體。

【0034】 本發明另外涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體(尤其是變異的嵌合 4D5 抗體)以約 6-18 mg/kg 體重/三周的劑量施用，和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子(尤其是抗 PD-1 抗體)以約 200 mg/三周的固定劑量施用。本發明也涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體(尤其是變異的嵌合 4D5 抗體)以約 6-18 mg/kg 體重/三周的劑量施用，和特異性結合細胞表面受體或其配體的分子、調節免疫檢查點的(尤其是抗 PD-1 抗體)以約 1-10 mg/kg 體重/三周的劑量施用。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體(尤其變異的嵌合 4D5 抗體)以每三周約 6 mg/kg 體重、約 10 mg/kg 體重、約 15 mg/kg 體重，或約 18 mg/kg 體重的劑量施用。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子(尤其抗 PD-1 抗體)以約 1 mg/kg 體重、約 2 mg/kg 體重、約 3 mg/kg 體重，或約 10 mg/kg 體重的劑量施用。

【0035】 本發明另外涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體(尤其變異的嵌合 4D5 抗體)和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子(尤其抗 PD-1 抗體)在單藥物組合物中被同時施用至受試者。

【0036】 本發明另外涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體(尤其變異的嵌合 4D5 抗體)和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子(尤其抗 PD-1 抗體)在分開的組合物中同時被施用，使得在 24 小時時間段內兩種組合物均被施用。

【0037】 本發明另外涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體(尤其變異的嵌合 4D5 抗體)和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子(尤其抗 PD-1 抗體)在分開的藥物組合物中順序施用至受試者，尤其地，其中第二施用的組合物在施用第一施用的組合物之後至少 24 小時或更長時間後施用。

【0038】 本發明尤其涉及這類方法的實施方式，其中癌症是表達 HER2/neu 的癌症。本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中癌症是乳腺癌、胃癌，前列腺癌、子宮癌、卵巢癌、結腸癌、子宮內膜癌、腎上腺癌、非小細胞肺癌、頭頸癌、喉癌、肝癌、腎癌、惡性膠質瘤或胰腺癌。

【0039】 本發明另外涉及這類方法的實施方式，其進一步包括施用第三治療劑的步驟，尤其地，其中第三治療劑是抗血管生成劑、抗腫瘤劑、化療劑或細胞毒性劑。

【0040】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中第三治療劑與特異性結合 HER2/neu 的抗體(尤其變異的嵌合 4D5 抗體)和/或特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子(尤其抗 PD-1 抗體)同時施用或分開施用。

【0041】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體是瑪格妥昔單抗和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子是抗 PD-1 抗體派姆單抗。

【0042】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體是瑪格妥昔單抗和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子是抗 PD-1 抗體尼魯單抗。

【0043】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體是瑪格妥昔單抗和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子是抗 PD-1 抗體皮地珠單抗。

【0044】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體是瑪格妥昔單抗和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子是抗 PD-1 抗體 EH12.2H7。

【0045】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體是瑪格妥昔單抗和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子是抗 PD-1 抗體 hPD-1 mAb 2。

【0046】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體是瑪格妥昔單抗和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子是抗 PD-1 抗體 hPD-1 mAb 7。

【0047】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體是瑪格妥昔單抗和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子是抗 PD-1 抗體 hPD-1 mAb 9。

【0048】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體是瑪格妥昔單抗和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子是抗 PD-1 抗體 hPD-1 mAb 15。

【0049】 本發明進一步涉及這類方法的實施方式，其中特異性結合 HER2/neu 的抗體是瑪格妥昔單抗和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子是選自表 1 的抗 PD-1 抗體。

【0050】 本發明另外的優勢和特徵將通過下面的詳細說明、附圖和實施例而變得明顯，所述詳細說明、附圖和實施例闡釋了本發明的優選實施方式。

【圖式簡單說明】**【0051】**

圖 1 描繪了比較“嵌合 4D5 抗體”的輕鏈可變結構域 (SEQ ID NO: 4)與“鼠科 4D5 抗體”的輕鏈可變結構域(SEQ ID NO: 3)和“人源化 4D5 抗體”的輕鏈可變結構域(SEQ ID NO: 5)的序列的序列比對。

圖 2 描繪了具有野生型(“WT”) Fc 區的“嵌合 4D5 抗體”的重鏈(SEQ ID NO: 7)、具有第一變異的 Fc 區(“MT1”)的“變異的嵌合 4D5 抗體 MT1”的重鏈 (SEQ ID NO: 9)、具有第二變異的 Fc 區(“MT2”)的“變異的嵌合 4D5 抗體 MT2”的重鏈(SEQ ID NO: 11)和具有第三變異的 Fc 區(“MT3”)的“變異的嵌合 4D5 抗體 MT3”的重鏈(SEQ ID NO: 13)的序列之間的比較。CDR 的殘基由這類殘基下方顯示的黑條表示。

圖 3 (圖 A-C)描繪了具有野生型 Fc 的嵌合 4D5 抗體(“ch4D5-野生型 Fc”) (圖 A)、4D5 (圖 B)和曲妥珠單抗(圖 C)結合的 BIACore®分析。

圖 4 (圖 A-D)描繪了 ch4D5-Ag (圖 A 和 B)和 Ch4D-FcMT1 (圖 B 和 D)在體外對 CD16-158F+ (圖 A 和 C)或 CD16-158V+ (圖 B 和 D) SKBR3 細胞增殖的作用。

圖 5 描繪了本發明的各種抗體在非轉基因小鼠中的增強的抗腫瘤活性。

圖 6 描繪了本發明的各種抗體在 hCD16A 轉基因小鼠中的增強的抗腫瘤活性。

圖 7 (A-B)描繪了在非轉基因和轉基因小鼠中 mFcRIV 和 hCD16A 通過本發明的各種抗體對腫瘤生長抑制的作用。

圖 8 描繪了本發明的各種抗體在 hCD16A 轉基因小鼠中增強的抗腫瘤活性。

圖 9 (A-M)圖解了來自各種癌細胞系的細胞針對 HER2/neu 的代表性免疫組織化學染色。圖 A-L 表示不同的細胞系，即，圖 A：MDA-MB-435、圖 B：MDA-MB-231、圖 C：A549、圖 D：OVCAR-8、圖 E：MCF-7、圖 F：BT-20、圖 G：HT-29、圖 H：ZR75-1、圖 I：JIMT-1、圖 J：MDA-MB-453、圖 K：BT-474、圖 L：SKBR-3、和圖 M：mSKOV-3。

圖 10 (A-B)描繪了 ADCC 試驗的結果，進行 ADCC 試驗以測試本發明的嵌合 4D5 抗體變體在具有非常低或沒有 HER2/neu 表達水準的癌細胞系(圖 A 中 MDA-MB-435、圖 B 中 MDA-MB-231)仲介導 ADCC 的能力(DAKO 分數為 0)。

圖 11 (A-E)描繪了 ADCC 試驗的結果，進行 ADCC 試驗以測試本發明的變異的嵌合 4D5 抗體在具有低 HER2/neu 表達水準的癌細胞系(圖 A 中 A549、圖 B 中 OVCAR-8、圖 C 中 MCF-7、圖 D 中 BT-20、圖 E 中 HT-29)仲介導 ADCC 的能力(DAKO 分數為 1+)。

圖 12 (A-B)描繪了 ADCC 試驗的結果，進行 ADCC 試驗以測試本發明的變異的嵌合 4D5 抗體在具有中等 HER2/neu 表達水準的癌細胞系(圖 A 中 ZR75-1、圖 B 中 JIMT-1)仲介導 ADCC 的能力(DAKO 分數為 2+)。

圖 13 (A-C)描繪了 ADCC 試驗的結果，進行 ADCC 試驗以測試本發明的變異的嵌合 4D5 抗體在具有高 HER2/neu 表達水準的癌細胞系(圖 A 中 MDA-MB-453、圖 B 中 BT-474、圖 C 中 SKBR-3、圖 D 中 mSKOV-3)仲介導 ADCC 的能力(DAKO 分數為 3+)。

圖 14顯示了用於評估抗 PD-1 抗體增強 T 細胞增殖的能力的方案圖。

圖 15顯示，與 IgG1 同種型對照抗體相比，在 allo-MLR 試驗開始時添加 PD-1 mAb 1 (5C4；BMS-936558；Bristol-Myers Squibb，尼魯單抗)、PD-1 mAb 2 (MK-3475；Merck，派姆單抗(之前為蘭羅利珠單抗(lambrolizumab)))和 PD-1 mAb 3 (EH12.2H7；Dana Farber)誘導強的 T 細胞增殖應答。也顯示用 PD-1 mAb

4 (CT-011 ; CureTech , 皮地珠單抗)、抗 CTLA mAb 和 LAG-3 mAb 獲得的增生性應答。應答者(R)細胞是泛 T 細胞；刺激劑(S)細胞是成熟樹突細胞(mDCs)。

【實施方式】

【0052】 本發明涉及藥物組合物，其包括特異性結合 HER2/neu 的第一分子和特異性結合細胞表面受體的、參與調節免疫檢查點(或其配體)的第二分子。本發明尤其涉及其中第二分子結合 PD-1 的實施方式。本發明也涉及這類藥物組合物治療癌症和其他疾病的用途。

【0053】 尤其地，本發明提供了藥物組合物，其包括：

(I)特異性結合 HER2/neu 的第一抗體，以便可以用作針對過表達 HER2/neu 的細胞的選擇性細胞毒性劑(例如，針對 HER2/neu 的變異的嵌合 4D5 抗體，其與已知的 4D5 抗體相比，具有減少的糖基化和改變的效應子功能)，和
(II)特異性結合 PD-1 的第二抗體，以便通過防止向 T 細胞遞送負信號用於對抗或阻斷 PD-1/PD-L1 接合(engagement)並且從而維持 T-細胞應答。

【0054】 本發明也提供了在疾病比如癌症的診斷、預後和治療中使用這類組合物的方法。

【0055】 不限於任何具體的理論，聯合有效靶向抗 HER2/neu 抗體與抗 PD-1 抗體的本發明的方法和組合物能夠通過結合癌細胞上的 HER2/neu 而直接靶向腫瘤，從而減少/阻斷 HER2/neu-HER-3 複合物的 NDF/調蛋白啟動和/或增強抗 HER2/neu 陽性腫瘤的 ADCC 活性，和直接增強內源抗腫瘤免疫應答，例如通過結合衰竭的(exhausted)和耐受腫瘤-浸潤淋巴細胞的表面上存在的細胞表面 PD-1 分子，並且從而削弱這類細胞表面分子結合它們的受體配體的能力並且從而促進免疫系統的啟動。這些性質允許這類治療和組合物用於治療癌症。

【0056】 現將詳細參考本發明目前優選的實施方式，其與附圖和下述實施例一起用於闡釋本發明的原理。足夠詳細地描述這些實施方式，以確保本領域技術人員能夠實施本發明，並且應當理解，可使用其他實施方式，並且在不背離本發明的精神和範圍的情況下可進行結構、生物和化學變化。除非另外定義，否則本文使用的所有的技術和科學術語具有如本發明所屬領域的普通技術人員通常理解的相同含義。

【0057】 除非另外指出，否則本發明的實施將採用屬於本領域技能的常規分子生物學技術(包括重組技術)、微生物學技術、細胞生物學技術、生物化學和免疫學技術。這類技術充分闡釋在文獻中，比如：MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Fourth Edition (Sambrook 等編輯, 2012) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY；CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel, F.M.等編輯, 1987) Greene Pub. Associates, New York, NY；OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: METHODS AND APPLICATIONS (Methods in Molecular Biology), IMMUNOBIOLOGY 7 (Janeway, C.A.等 2007) Garland Science, London, UK；MONOCLONAL ANTIBODIES: A PRACTICAL APPROACH (Shepherd, P.等編輯, 2000) Oxford University Press, USA, New York NY；USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Harlow, E.等編輯, 1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY；和 DEVITA, HELLMAN, AND ROSENBERG'S CANCER: PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY, EIGHTH EDITION, DeVita, V.等編輯 2008, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA。美國臨時專利申請號 60/781,564、60/945,523、61/015,106、和 61/019,051、和 US 20040185045、US 20040197347、US 20040197866、US 20050037000、US 20050064514、US 20050215767、US 20060134709、US 20060177439、US 20070004909、US

20070036799、US 20070037216、US 20070077246、US 20070244303、US 20080044429、US 20080050371、11/869,410、11/952,568、美國專利號 7,112,439、WO 04/063351、WO 06/088494、WO 07/024249、WO 06/113665、WO 07/021841、WO 07/106707 和 WO/2008/140603 中討論了抗體工程化。

【0058】 V.定義

【0059】 本發明涉及藥物組合物治療疾病比如癌症的用途，所述藥物組合物包括特異性結合 HER2/neu 的第一分子和特異性結合細胞表面受體的、參與調節免疫檢查點(或其配體)的第二分子。本發明尤其涉及其中第二分子結合 PD-1 的實施方式。

【0060】 如本文所使用，術語“ADCC”指抗體-依賴性細胞毒性，其是體外細胞介導的反應，其中表達 Fc γ Rs 的非特異性細胞毒性細胞(例如，單核細胞，比如天然殺傷(NK)細胞和巨噬細胞)識別靶細胞上結合的抗體並且隨後引起靶細胞的裂解。

【0061】 如本文所使用，術語“抗體”指免疫球蛋白分子，由於在多肽或蛋白質或非蛋白質分子上存在特定的結構域或部分或構象(“表位”)，其能夠特異性結合這類分子。包含表位的分子可具有免疫原活性，使得其在動物中引起抗體產生應答；這類分子稱為“抗原”。包含表位的分子不一定是免疫原性的。

【0062】 如本文所使用，術語“抗體”包括單克隆抗體、多特異性抗體、人抗體、人源化抗體、合成抗體、嵌合抗體、多克隆抗體、駱駝源化(camelized)抗體、單鏈 Fvs(scFv)、單鏈抗體、特異性結合抗原等的免疫活性抗體片段(例如，能夠結合表位的抗體片段，例如，Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、包含 VL 和/或 VH 結構域或包含這樣的 VL 結構域的 1、2 或 3 個互補決定區(CDR)(即，CDRL1、CDRL2 和/或 CDRL3)或 VH 結構域的 1、2 或 3 個互補決

定區(CDR) (即，CDRH1、CDRH2 和/或 CDRH3))的片段)、雙功能或多功能抗體、二硫鍵連接的雙特異性 Fvs (sdFv)、胞內抗體和雙抗體和任何上述的表位結合片段。尤其地，術語“抗體”旨在包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段，即，包含抗原-結合位點的分子。免疫球蛋白分子可以是任何類型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)，類別(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亞類別(見，例如，美國專利公開號: 20040185045、20050037000、20050064514、20050215767、20070004909、20070036799、20070077246 和 20070244303)。最近數十年已經看到對抗體的治療潛能的興趣的復興，並且抗體已經成為一種主要類型的生物技術衍生的藥物(Chan, C.E.等(2009) “The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases,” Singapore Med. J. 50(7): 663-666)。超過 200 種基於抗體的藥物已經被批准使用或正在開發。

【0063】 術語“嵌合抗體”指這樣的抗體：其中重鏈和/或輕鏈的一部分與來自一個物種(例如，小鼠)的抗體或抗體類別或亞類別一致或同源，而剩餘部分與另一物種(例如，人)的抗體或抗體類別或亞類別一致或同源，只要它們展示期望的生物活性。本文感興趣的嵌合抗體包括“靈長類源化(primatized)”抗體，其包括源自非人靈長類(例如，舊大陸猴(Old World Monkey)、猿等)的可變結構域抗原結合序列和人恒定區序列。

【0064】 如本文使用的術語“單克隆抗體”指基本上同質型(homogeneous)抗體群的抗體，即，構成該群體的單個抗體是相同的，除了具有可能以較少量出現的天然產生的突變的可能抗體之外，並且如本文使用的術語“多克隆抗體”指獲得自異質型(heterogeneous)抗體群的抗體。術語“單克隆”指示抗體的特徵是基本上同質型的抗體群，並且不應該被解釋為需要通過特定方法產生抗體(例如，通過雜交瘤、噬菌體選擇、重組表達、轉基因動物等)。

術語包括完整的免疫球蛋白以及上面根據“抗體”的定義描述的片段等。製備單克隆抗體的方法是本領域已知的。一種可採用的方法是 Kohler, G.等(1975) “Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity,” Nature 256: 495-497 的方法或其改良。典型地，在小鼠、大鼠或兔子中開發單克隆抗體。通過用免疫原性量的包含期望表位的細胞、細胞提取物或蛋白質製品免疫動物產生抗體。免疫原可以是但不限於原代細胞、培養的細胞系、癌細胞、蛋白質、肽、核酸或組織。在用作免疫原之前，用於免疫的細胞可被培養一段時間(例如，至少 24 小時)。細胞它們本身或與非變性佐劑，比如 Ribi 組合，可用作免疫原(見，例如，Jennings, V.M. (1995) “Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production,” ILAR J. 37(3): 119-125)。一般而言，當用作免疫原時，細胞應保持完整和優選地能存活。相比於破裂的細胞，完整的細胞可允許抗原被免疫動物更好地檢測。使用變性或烈性(harsh)佐劑例如弗氏佐劑可破壞細胞，因此，其應用受阻。免疫原可以週期性間隔被多次施用，諸如兩週一次或一週一次，或者可以維持在動物中的生存力這樣的方式被施用(例如，在組織重組體中)。可選地，可通過本領域已知的任何方式對現有單克隆抗體和對期望的病原性表位特異性的任何其他等價抗體測序並且重組產生它們。在一個實施方式中，對這類抗體測序，然後將多核苷酸序列克隆至載體中用於表達或增殖。編碼感興趣的抗體的序列可以在宿主細胞中被維持在載體中，並且，宿主細胞然後可被擴張和冷凍，用於將來應用。這類抗體的多核苷酸序列可用於遺傳操作，以產生單特異性或多特異性(例如，雙特異性、三特異性和四特異性)的本發明的分子以及親和力優化的、嵌合抗體、人源化抗體和/或犬源化的抗體，以改善抗體的親和力或其他特徵。

【0065】 術語“人源化抗體”指一般使用重組體技術產生的嵌合分子，其具有來自非人物種的免疫球蛋白的抗原結合位點和基於人免疫球蛋白的結構

和/或序列的分子的剩餘免疫球蛋白結構。抗原結合位元點可包括融合在恒定結構域上的完整可變結構域或僅僅包括移植在可變結構域中適當的框架區上的 CDRs。抗原結合位點可以是野生型的或通過一個或多個氨基酸取代被修飾。這消除了人個體中作為免疫原的恒定結構域，但是仍保留對外源可變區的免疫應答的可能性(LoBuglio, A.F.等(1989) “Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 4220-4224)。另一方法不僅僅關注提供源自人的恒定區，而且也修飾可變區，以便重塑它們使其盡可能地與人形式接近。已知重鏈和輕鏈的可變區都包含三個 CDR，側翼是四個框架區(FR)，所述 CDR 對所討論的抗原回應不同並且決定結合能力，所述框架區(FR)在給定物種中相對保守並且推定其為 CDR 提供支架。當針對特定抗原製備非人抗體時，可通過將源自非人抗體的 CDR 移植在待修飾的人抗體中存在的 FR 上“重塑”或“人源化”可變區。已經報導了該方法應用於各種抗體：Sato, K. (1993)等“Reshaping A Human Antibody To Inhibit The Interleukin 6-Dependent Tumor Cell Growth,” Cancer Res 53: 851-856。Riechmann, L.等(1988) “Reshaping Human Antibodies for Therapy,” Nature 332:323-327；Verhoeyen, M.等(1988) “Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity,” Science 239:1534-1536；Kettleborough, C. A.等(1991) “Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation,” Protein Engineering 4:773-3783；Maeda, H.等(1991) “Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity,” Human Antibodies Hybridoma 2:124-134；Gorman, S. D.等(1991) “Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185；Tempest, P.R.等(1991) “Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in

vivo,” Bio/Technology 9:266-271 ; Co, M. S.等(1991) “Humanized Antibodies For Antiviral Therapy,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873 ; Carter, P.等(1992) “Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289 ; 和 Co, M.S.等(1992) “Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen,” J. Immunol. 148:1149-1154。在一些實施方式中，人源化抗體保存所有的 CDR 序列(例如，人源化的小鼠抗體，其包含來自小鼠抗體的所有六個 CDR)。在其他實施方式中，人源化抗體具有其氨基酸序列相對於初始抗體被改變的一個或多個 CDR (一個、兩個、三個、四個、五個或六個)，其也稱為“源自”初始抗體的一個或多個 CDR 的一個或多個 CDR(即，源自這類 CDR，源自這類 CDR 氨基酸序列的認知等)。編碼抗體的可變結構域的多核苷酸序列可用於產生這類衍生物，並且改善這類抗體的親和力或其他特徵。使抗體人源化的一般原則涉及保留抗體的抗原結合位點的基本序列，同時用人抗體序列替換抗體非人剩餘部分。使單克隆抗體人源化有四個大體的步驟。這些是：(1)確定起始抗體輕鏈和重鏈可變結構域的核苷酸和預測的氨基酸序列(2)設計人源化抗體或犬源化的抗體，即，在人源化或犬源化過程期間，決定使用哪個抗體框架區(3)實際人源化或犬源化方法/技術和(4)人源化抗體的轉染和表達。見，例如，美國專利號 4,816,567、5,807,715、5,866,692 和 6,331,415。

【0066】 天然抗體(比如 IgG 抗體)包括與兩條重鏈複合的兩條輕鏈。每條輕鏈包含可變結構域(VL)和恒定結構域(CL)。每條重鏈包含可變結構域(VH)，三個恒定結構域(CH1、CH2 和 CH3)，和位於 CH1 和 CH2 結構域之間的“鉸鏈”結構域(“H”)。天然產生的免疫球蛋白(例如，IgG)的基本結構單元因此是具有兩條輕鏈和兩條重鏈的四聚體，通常作為約 150,000 Da 的糖蛋白被表達。每條鏈的氨基端(“N-末端”)部分包括主要負責抗原識別的約 100 至 110 或更多氨

基酸的可變結構域。每條鏈的羧基端(“C-末端”)部分限定了恒定區，其中輕鏈具有單個恒定結構域而重鏈通常具有三個恒定結構域和鉸鏈結構域。因此，IgG 分子的輕鏈的結構是 n-VL-CL-c 並且 IgG 重鏈的結構是 n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (其中 n 和 c 分別表示多肽的 N-末端和 C-末端)。抗體結合抗原的表位的能力取決於抗體的 VL 和 VH 結構域的存在和氨基酸序列。抗體輕鏈和抗體重鏈的相互作用，尤其地，其 VL 和 VH 結構域的相互作用形成天然抗體的兩個抗原結合位點之一。天然抗體能夠結合僅僅一個表位種類(即，它們是單特異性的)，儘管它們可結合該種類的多個拷貝(即，展示二價或多價)。IgG 分子的可變結構域由互補決定區(CDR)和稱為框架區段(FR)的非 CDR 區段組成，所述互補決定區(CDR)包含與表位接觸的殘基，所述框架區段一般維持結構和決定 CDR 環的定位，以便允許這類接觸(儘管某些框架殘基也可接觸抗原)。因此，VL 和 VH 結構域具有結構 n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c。是(或可用作)抗體輕鏈的第一、第二和第三 CDR 的多肽在本文分別命名為 CDRL1 結構域、CDRL2 結構域和 CDRL3 結構域。類似地，是(或可用作)抗體重鏈的第一、第二和第三 CDR 的多肽在本文分別命名為 CDRH1 結構域、CDRH2 結構域和 CDRH3 結構域。因此，術語 CDRL1 結構域、CDRL2 結構域、CDRL3 結構域、CDRH1 結構域、CDRH2 結構域和 CDRH3 結構域指當併入到蛋白質中時使得該蛋白質能夠結合特異性表位的多肽，無論這樣的蛋白質是否是具有輕鏈和重鏈的抗體或雙抗體或單鏈結合分子(例如，scFv、BiTe 等)或是另一類型的蛋白質。因此，如本文所使用，術語“抗原結合結構域”指負責這樣的分子特異性結合抗原表位的能力的抗原結合分子的部分。抗原結合片段可包含這樣的抗體的 1、2、3、4、5 或所有 6 個 CDR 結構域，並且，儘管能夠免異性結合這樣的表位，但可展示對與這樣的抗體的表位不同的這樣的表位的特異性、親和力或選擇性。然而，優選地，抗原結合片段包含這樣的抗體的所有

6 個 CDR 結構域。抗體的抗原結合片段可以是單多肽鏈(例如，scFv)或可包括兩條或更多條多肽鏈，每條具有氨基末端和羧基末端(例如，雙抗體、Fab 片段、F(ab')₂ 片段等)。

【0067】 如本文所使用，術語“雙抗體”指兩條或更多條多肽鏈或蛋白質的複合物，每條多肽鏈或蛋白質包括至少一個 VL 和一個 VH 結構域或其片段，其中兩個結構域包括在單多肽鏈中，但是通過很短的間插連接體分開，以使它們締合形成表位結合位點；因此，需要至少兩條多肽鏈或蛋白質，以便形成雙抗體。在某些實施方式中，“雙抗體分子”包括包含抗體的“Fc”或“鉸鏈-Fc 區”的分子。複合物中的多肽鏈可以相同或不同，例如，雙抗體分子可以是同源多聚體或異源多聚體。在具體的方面中，“雙抗體分子”包括二聚體或四聚體或包含 VL 和 VH 結構域的所述多肽鏈(例如，同源二聚體雙抗體分子、異源二聚體雙抗體分子等)。包括多聚體蛋白質的單多肽鏈可通過鏈間二硫鍵共價連接至多聚體的至少一個其他肽。

【0068】 如本文所使用，術語“癌症”指特徵在於存在由細胞的異常的不受控制的生長(這類細胞是“癌細胞”)引起的贅生物或腫瘤的疾病。如本文所使用，術語癌症明確地包括，白血病和淋巴瘤。在一些實施方式中，術語癌症指特徵在於存在仍是局部性的良性腫瘤的疾病。但是，在優選的實施方式中，術語癌症指特徵在於存在已經侵入相鄰身體結構的惡性腫瘤的疾病。這類腫瘤可另外具有擴散至遠端部位的能力。在一些實施方式中，癌症與表達特異性癌症抗原的癌細胞相關。在一些方面中，如本文使用的術語癌症具體指表達 HER2/neu 的癌症。因此，如本文所使用，術語“表達 HER2/neu 的癌症”指特徵在於存在表達可檢測水準的 HER2/neu 的癌細胞的癌症。這類表達 HER2/neu 的癌症的癌細胞可表達高水準的 HER2/neu 或低水準的 HER2/neu。如本文使用的“高水準的 HER2/neu”指特徵在於存在當使用 HercepTest® (Dako

Cytomation California Inc., Carpinteria, CA)分類時展示 2+或更大分數的癌細胞的癌症，或具有通過例如螢光原位雜交(FISH) 已經鑒定為過表達 Her2/neu 的癌細胞的受試者或患者。如本文所使用，“低水準的 HER2”指特徵在於在 HercepTest® (Dako Cytomation California Inc., Carpinteria, CA)分類中展示小於 2+ (例如，1+)分數的癌細胞的癌症。可用各種診斷/預後測定來確定通過腫瘤的癌細胞表達的 HER2 的水準。在一個方面中，可通過免疫組織化學(IHC)，例如，通過使用 HercepTest® (Dako) 分析 HER2 過表達。因此，來自腫瘤活組織檢查的石蠟包埋的組織切片可進行 IHC 試驗並且被給與 HER2 蛋白質染色強度標準。可選地，或另外，FISH 試驗比如 INFORM™ (由 Ventana, Ariz.出售)或 PATHVISION™ (Vysis, Ill.)可在福馬林固定的、石蠟包埋的腫瘤組織上進行，以確定腫瘤中 HER2 過表達的程度(如果存在的話)。

【0069】 如本文所使用，術語“病症(disorder)”和“疾病(disease)”可互換使用，指受試者中的病況。尤其地，術語“自身免疫性疾病”與術語“自身免疫病症”可互換使用，指受試者中特徵在於由受試者對自身的細胞、組織和/或器官的免疫反應造成的細胞、組織和/或器官損傷的病況。術語“炎症疾病”與術語“炎症病症”可互換使用，指受試者中特徵在於炎症，優選慢性炎症的病況。自身免疫病症可伴隨炎症或不伴隨驗證。而且，炎症可由或不由自身免疫病症造成。因此，某些病症的特徵可在於自身免疫病症和炎症病症二者，而其他病症特徵可在於僅僅自身免疫病症或僅僅炎症病症。癌症是“增生性病症”的例子(即，與一定程度的不正常細胞增殖相關的病症)。

【0070】 如本文所使用，“有效量”的藥物組合物是足夠實現有益的期望的結果的量，所述結果包括但不限於臨床結果，比如縮小腫瘤(在癌症背景，例如，乳腺、胃或前列腺癌的腫瘤)尺寸、阻礙癌細胞生長、延遲轉移發展、減少源自疾病的症狀、提高遭受疾病的患者的生命品質、降低治療疾病需要的其他

藥物治療的劑量、比如經靶向和/或內化增強另一藥物的作用、延遲疾病的進展、和/或延長個體的生存。可在一次或多次施用中施加有效量。為了本發明的目的，有效量的藥物、化合物或藥物組合物是足以直接或間接減少(或破壞)癌細胞的增殖或減少和/或延遲癌細胞的發展或生長或轉移的量。在一些實施方式中，藥物、化合物或藥物組合物的有效量可聯合或不聯合另一藥物、化合物或藥物組合物實現。因此，“有效量”可在施用一種或多種化療劑的背景下考慮，並且如聯合一種或多種其他劑，可實現或實現期望的結果，則單劑可視為以有效量施用。儘管個體的需要不同，但是測定每種組分的有效量的最佳範圍是本領域技術人員已知的。下面討論典型劑量。

【0071】 術語“效應子活性”指歸於抗體Fc區與Fc受體或配體的相互作用的生物活性。抗體可具有一個或多個效應子功能。抗體效應子功能的非限制性例子包括ADCC、C1q結合、補體依賴性細胞毒性(CDC)、細胞表面受體(例如，B細胞受體；BCR)的下調、調理、調理吞噬、細胞結合和玫瑰花結(rosetting)。效應子功能包括抗原的結合之後起作用的那些和不依賴於抗原結合起作用的那些。

【0072】 如本文使用的，術語“效應細胞”指表達一種或多種Fc受體並介導一種或多種效應子功能的免疫系統的細胞。效應細胞包括但不限於單核細胞、巨噬細胞、嗜中性粒細胞、樹突細胞、嗜伊紅粒細胞、肥大細胞、血小板、B細胞、大顆粒淋巴細胞、朗格漢斯細胞、天然殺傷細胞(NK)，並且可來自任何生物體，包括但不限於人、小鼠、大鼠、兔子和猴子。

【0073】 術語“Fc受體”或“FcR”在本文用於描述結合抗體的Fc區的受體。示例性FcR是天然序列人FcR。FcR可以是結合IgG抗體的FcR(γ 受體，“Fc γ R”)，並且包括Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)、Fc γ RIII(CD16)和Fc γ RIV亞類的受體，包括這些受體的等位基因變體和可選剪接形式，例如，存在至少

兩種已知的Fc γ RII受體，Fc γ RIIA和Fc γ RIIB。術語FcR也包括新生兒受體，FcRn，其負責將母體的IgG轉移給胎兒。

【0074】 術語“糖基化位點”指被哺乳動物細胞識別為用於附接寡糖(即，包含兩個或更多個連接在一起的單糖的碳水化合物)的位置的氨基酸殘基。附接碳水化合物，比如寡糖的氨基酸殘基通常是天冬醯胺(N-連接)、絲氨酸(O-連接)和蘇氨酸(O-連接)殘基。N-連接的糖基化指寡糖部分附接至天冬醯胺殘基的側鏈。O-連接的糖基化指寡糖部分附接至羥基氨基酸，例如，絲氨酸或蘇氨酸。本發明的分子可包括一個或多個糖基化位點，包括 N-連接的和 O-連接的糖基化位點。本領域已知的用於 N-連接的或 O-連接的糖基化的任何糖基化位元點可根據本發明使用。附接的特定位元點通常具有特徵性的氨基酸序列，稱為“糖基化位點序列”。用於 N-連接的糖基化的糖基化位點序列是：N-X-S 或 N-X-T，其中 N 指示天冬醯胺，X 可以是脯氨酸之外的常規氨基酸的任何氨基酸，S 指示絲氨酸和 T 指示蘇氨酸。天然人 IgG 的 Fc 區具有兩個 N-連接的糖基化位點，在每個 CH2 結構域中各有一個，在 297 位的天冬醯胺 (Asn 297)處。糖基化位點可使用本發明所屬領域熟知的方法引入到本發明的分子中(見例如，IN VITRO MUTAGENESIS, RECOMBINANT DNA: A SHORT COURSE, J. D. Watson,等 W.H. Freeman and Company, New York, 1983,第 8 章, pp. 106-116，其通過引用以其整體併入本文。將糖基化位點引入本發明分子中的示例性方法可包括：修飾或突變分子的氨基酸序列，從而獲得期望的 N-X-S 或 N-X-T 序列。同樣地，例如，可通過修飾或突變現有糖基化位點的氨基酸序列，去除糖基化位點，以改變現有的 N-X-S 或 N-X-T 序列。

【0075】 如本文所使用，術語“人抗小鼠抗體(“HAMA”)反應”指當人免疫系統將鼠科抗體視為外源分子並且產生針對其的炎症反應時而發生的有害的免疫原性反應。HAMA 反應可造成中毒性休克或死亡。嵌合和人源化抗體

通過減少施用抗體的非人部分而降低了 HAMA 反應的可能性，但是仍存在對這類抗體的人抗人抗體反應(“HAHA 反應”)免疫反應的可能性。

【0076】 如本文所使用，術語“異源”核酸表示引入到宿主細胞中的 DNA、RNA 等。核酸可源自任何各種來源，包括基因組 DNA、mRNA、cDNA、合成 DNA 和這些的融合物或組合。核酸可包括來自與宿主或接受者細胞相同的細胞或細胞類型的多核苷酸或來自不同細胞類型的多核苷酸，例如，來自哺乳動物或植物，並且可任選地包括標記基因或選擇基因，例如，抗生素抗性基因、溫度抗性基因等。

【0077】 如本文所使用，術語“免疫調節劑”和其變型指調節宿主的免疫系統的試劑。在某些實施方式中，免疫調節劑是免疫抑制劑。在某些其他實施方式中，免疫調節劑是免疫刺激劑。免疫調節劑包括但不限於小分子、肽、多肽、融合蛋白、抗體、無機分子、模擬劑和有機分子。

【0078】 如本文所使用，如果分子(例如抗體)相對於分子的可選區域或可選分子與該分子的區域(即，表位元)更經常、更快速、以更長的持久性和/或以更大的親和力反應或締合，則認為分子“特異性”結合該分子的區域。例如，特異性結合 HER2/neu 表位的抗體是與其結合其他 HER2/neu 表位或結合非 HER2/neu 表位相比，以更大的親和力、親合力、更容易和/或以更長的持久性結合這類 HER2/neu 表位的抗體。同樣地，特異性結合 PD-1 的表位的抗體與其結合其他 PD-1 表位或結合非 PD-1 表位相比，以更大的親和力、親合力、更容易和/或以更長的持久性結合這類表位。通過閱讀該定義，應理解，例如，特異性結合第一靶的抗體(或部分或表位元)可特異性或非特異性或優選或非優選結合第二靶。因此，“特異性結合”不必要求(儘管其可包括)排他性結合。一般而言，觸發上下文相反指出，否則提及“結合”意思是“特異性結合”。抗體特異性結合抗原表位的能力可通過例如，免疫試驗測定。

【0079】 如本文所使用，術語“核酸分子”包括 DNA 分子(例如，cDNA 或基因組 DNA)、RNA 分子(例如，mRNA)、DNA 和 RNA 分子的組合或雜交的 DNA/RNA 分子，以及 DNA 或 RNA 分子的類似物。可使用例如，核苷酸類似物產生這類類似物，所述核苷酸類似物包括但不限於肌苷或三苯甲基化碱基。這類類似物也可包括 DNA 或 RNA 分子，其包括修飾的骨架，所述修飾的骨架賦予分子有益的性質，比如，例如，核酸酶抗性或增加的跨細胞膜的能力。核酸或核苷酸序列可以是單鏈的、雙鏈的，可包含單鏈和雙鏈部分二者，並且可包含三鏈部分，但是優選地是雙鏈 DNA。

【0080】 如本文所使用，術語“基本的序列同一性”指當為了最大對應性進行比較和比對時，具有至少約 80%氨基酸殘基同一性，優選地至少約 90%或至少約 95%同一性的兩條或更多條序列或亞序列(例如，結構域)。可通過比如下述演算法測量兩條類似序列(例如，抗體可變結構域)之間的序列同一性：Smith, T.F. & Waterman, M.S. (1981) “Comparison Of Biosequences,” Adv. Appl. Math. 2:482 [local homology algorithm (局部同源性演算法)]；Needleman, S.B. & Wunsch, C.D. (1970) “A General Method Applicable To The Search For Similarities In The Amino Acid Sequence Of Two Proteins,” J. Mol. Biol. 48:443 [homology alignment algorithm (同源性比對演算法)]，Pearson, W.R. & Lipman, D.J. (1988) “Improved Tools For Biological Sequence Comparison,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 [search for similarity method (相似性方法的搜索)]；或 Altschul, S.F.等, (1990) “Basic Local Alignment Search Tool,” J. Mol. Biol. 215:403-10 [BLAST algorithm (BLAST 演算法)]。當使用任何上述演算法時，使用預設參數(對於視窗長度(Window length)、空隙罰分等)。當序列同一性的程度是至少約 70%一致，優選地至少約 80%一致或至少約 90%一致，或甚至至少約 95%一致時，則認為第一氨基酸序列與第二氨基酸序列“基本上類似”。

當(1)序列同一性的程度是至少約 70%一致，優選地至少約 80%一致或至少約 90%一致，或甚至至少約 95%一致，或(2)包括核酸序列的核酸分子編碼多肽，所述多肽與由包括第二序列的核酸分子編碼的多肽是至少約 70%一致，優選地至少約 80%一致或至少約 90%一致，或甚至至少約 95%一致時，則認為核酸序列與第二序列“基本上類似”。基本上一致的序列也基本上類似。

【0081】 當提及抗體時，為每個結構域的氨基酸的分配是根據 Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. (National Institutes of Health, Bethesda, MD., (1991) (“Kabat 等”)，其明確通過引用併入本文。遍及本說明書，IgG 重鏈中“根據 Kabat”的恒定殘基的編號指如 Kabat 等中描述的人 IgG1 EU 抗體的編號。

【0082】 術語“鼠科 4D5 抗體”指美國專利號 5,677,171 中以 ATCC CRL 10463 公開的鼠科 IgG1 抗體。鼠科 4D5 抗體結合 Her2/neu 並且具有輕鏈可變結構域和重鏈可變結構域，所述輕鏈可變結構域具有 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列，並且所述重鏈可變結構域具有 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列。術語“人源化 4D5 抗體”指 Carter, P.等(1992) (“Humanization Of An Anti-P185her2 Antibody For Human Cancer Therapy,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289)中公開的 IgG 抗體。據報導，人源化 4D5 抗體能夠結合 Her2/neu；其輕鏈可變區具有 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列，並且重鏈可變區具有 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列。

【0083】 鼠科 4D5 抗體的輕鏈可變結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO: 3) (CDR_L 殘基以底線顯示)：

【0084】 DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP
GHSPKLLIYS ASFRYTGVDP RFTGNRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ
HYTTPPTFGG GTKLEIK

第 40 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

【0085】 鼠科 4D5 抗體的重鏈可變結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO: 47) (CDR_H殘基以底線顯示)：

【0086】 QVQLQQSGPE LVKPGASLKL SCTASGFNIK DTYIHWVKQR
PEQGLEWIGR IYPTNGYTRY DPKFQDKATI TADTSSNTAY LQVSRLTSED
TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGASVTVSS

【0087】 人源化 4D5 抗體的氨基酸輕鏈可變結構域的序列是(SEQ ID NO: 5) (CDR_L殘基以底線顯示)：

【0088】 DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP
GKAPKLLIYS ASFLESGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ
HYTTPPTFGQ GTKVEIK

【0089】 人源化 4D5 抗體的重鏈可變結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO: 48) (CDR_H殘基以底線顯示)：

【0090】 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA
PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED
TAVYYCSRWG GDGFYAMDVW GQGTLVTVSS

【0091】 術語“嵌合 4D5 抗體”指結合人 Her2/neu 的 IgG 抗體，其具有輕鏈和重鏈，所述輕鏈具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列以及所述重鏈具有野生型 Fc 區；嵌合 4D5 抗體的重鏈的氨基酸序列顯示在 SEQ ID NO: 7 中。“變異的嵌合 4D5 抗體”是結合 Her2/neu 的 IgG 抗體，其具有輕鏈和/或重鏈，所述輕鏈和/或重鏈的氨基酸序列與嵌合 4D5 抗體的氨基酸序列不同(例如，這樣的 IgG 抗體：其包括輕鏈和重鏈，所述輕鏈具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列，並且所述重鏈具有 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列)。

【0092】 VI.結合分子

【0093】 A.特異性結合 HER2/neu 的分子

【0094】 本發明包括的特異性結合 HER2/neu 的分子包括能夠特異性結合人 HER2/neu 連續的或不連續的(例如，構象)表位的抗 HER2/neu 抗體。本發明的方法中使用的 HER2/neu 抗體優選地也展示結合一個或多個非人物種，尤其地，鼠科、齧齒動物、犬類和靈長類物種(尤其是食蟹猴)的 HER2/neu 分子的能力。

【0095】 下面提供了針對 HER2/neu 的抗體。可通過突變編碼這類抗體的多肽鏈的核酸分子，然後通過分離使用 HER2/neu 或其肽片段引起的新的分泌抗體的雜交瘤篩選展示特異性結合 Her2/neu 的能力的表達的抗體或通過其他方式製備其他期望的抗體。人 HER/2 序列已經描述在 Y Yamamoto, T.等(1986) “*Similarity Of Protein Encoded By The Human c-erb-B-2 Gene To Epidermal Growth Factor Receptor*,” Nature 319:230-234 中，並且序列在 GenBank 中可以登錄號 X03363 得到。

【0096】 本發明尤其包括嵌合 4D5 抗體的變體，更尤其涉及特異性結合 HER2/neu，優選地人 HER2/neu 的這類嵌合 4D5 抗體的變體，其由於輕鏈的可變結構域中去除了糖基化位點而相對於鼠科 4D5 抗體展示減少的糖基化。尤其地，本發明優選的嵌合抗體在鼠科 4D5 抗體的輕鏈的可變結構域中缺少糖基化位點，其在鼠科 4D5 抗體的輕鏈中在 65、66 和 67 位包括 N-R-S 序列。優選地，抗體對於 HER2/neu 具有增強的結合親和力，並且更優選地，與鼠科 4D5 抗體相比，本發明的變異的嵌合 4D5 抗體具有增強的效應子功能，或具有對於 HER2/neu 的增強的結合親和力和增強的效應子功能。

【0097】 在優選的實施方式中，嵌合 4D5 抗體的優選變體包括輕鏈(嵌合 4D5 輕鏈)，其具有或包括 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。

【0098】 嵌合 4D5 抗體輕鏈的氨基酸序列(**SEQ ID NO: 2**) (CDR_L 殘基以底線顯示)：

DIVMTQSHKF	MSTSVGDRVS	ITC <u>KASQDVN</u>	<u>TAVA</u> WYQQKP	GHSPKLLIY <u>S</u>
<u>ASFRYT</u> GVPD	RFTGSRSGTD	FTFTISSVQA	EDLAVYYC <u>QQ</u>	<u>HYTTPPT</u> FGG
GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNIFY	PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSTLT	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN	RGEC			

【0099】 編碼優選的變異的嵌合 4D5 抗體的輕鏈的示例性核酸分子是 **SEQ ID NO: 1**：

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga
tagggtcagc atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag
cctgggtatca gcagaaacca ggacattctc ccaaactgct gatttactcc
gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat cgcttctactg gcagcagatc
tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct gaagacctgg
cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg
ggtaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat
cttcccgcc tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttggtg
gcctgctgaa taacttctat ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg
gataacgcc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga
cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag
cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag

【0100】 具有這樣的輕鏈氨基酸序列的抗體在 VL 區的 65 位具有修飾，因此缺少在鼠科 4D5 抗體中發現的 N-連接的糖基化位點(見圖 1，其描繪了具有 N65S 修飾的嵌合 4D5 抗體(**SEQ ID NO: 4**) 和鼠科 4D5 抗體(**SEQ ID NO: 3**)和人源化 4D5 抗體(**SEQ ID NO: 5**)的 VL 區氨基酸序列之間的示例性比較)。在另一優選的實施方式中，本發明的變異的嵌合 4D5 抗體具有 **SEQ ID NO: 4** 的 VL 區氨基酸序列。

【0101】 嵌合 4D5 V_L區的氨基酸序列(**SEQ ID NO: 4**) (CDR_L殘基以底線顯示)：

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAWAWYQQKP GHSPKLLIYS
ASFRYTGVPD RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG
GTKVEIK

【0102】 嵌合 4D5 抗體包括具有野生型 Fc 區的重鏈(“嵌合 4D5 重鏈”) (SEQ ID NO: 7)，其可由 SEQ ID NO: 6 的核酸序列編碼。這些序列顯示在下面：具有野生型 Fc 區的嵌合 4D5 重鏈的氨基酸序列(**SEQ ID NO: 7**) (CDR_H殘基以底線顯示)：

QVQLQQSGPE	LVKPGASLKL	SCTASGFNIK	<u>DTYIH</u> WVKQR	PEQGLEWIG <u>R</u>
<u>IYPTNGYTRY</u>	<u>DPKFQD</u> KATI	TADTSSNTAY	LQVSRLTSED	TAVYYCSR <u>WG</u>
<u>GDGFYAMDY</u> W	GQGASVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSVVT	VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP
KDTLMISRTP	EVTCTVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
VYTLPPSRDE	LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV
LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK

【0103】 編碼具有野生型 Fc 區的嵌合 4D5 重鏈的示例性核酸分子(**SEQ ID NO: 6**)：

caggttcagc tgcagcagtc tggccctgag ctggtgaagc caggggcctc
actcaagttg tcctgtacag cttctggctt caacatcaaa gacacctata
tccactgggt gaaacagagg cctgaacagg gcctggaatg gattggaagg
atztatccta ccaatggcta tactagatat gacccaaagt tccaggacaa
ggccactatc acagcagaca catcctccaa cacagcctac ctgcaagtca
gccgcctgac atctgaggac actgccgtct attactgctc ccggtgggga
ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcaggag cctccgtgac
cgtgagctcc gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct

cctccaagag cacctctggg ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag
gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg tggaaactcag gcgccctgac
cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca ggactctact
ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag
agttgagccc aaatcttgtg acaaaactca cacatgcca ccgtgcccag
cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtggtggt
ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg
gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc gcgaggagga gcagtacaac
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct
gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc
ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag
cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt
gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa
gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg
ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
tga

【0104】 在其他實施方式中，本發明考慮採用其重鏈包括變異的 Fc 區，並且更優選地，“FcMT1”、“FcMT2”或“FcMT3”變異的 Fc 區的變異的嵌合 4D5 抗體。這些序列顯示在下面：

具有 FcMT1 變異的 Fc 區的變異的嵌合 4D5 抗體的重鏈的氨基酸序列(SEQ ID NO: 9) (CDR_H殘基以底線顯示)：

QVQLQQSGPE	LVKPGASLKL	SCTASGFNIK	<u>DTYIHWVKQR</u>	PEQGLEWIG <u>R</u>
<u>IYPTNGYTRY</u>	<u>DPKFQD</u> KATI	TADTSSNTAY	LQVSRLTSED	TAVYYCSR <u>WG</u>
<u>GDGFYAMDYW</u>	GQGASVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	PSVFLLPKP
KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPPEEQYN

STLRVVSILT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPLV
LDSDGSSFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

【0105】 編碼具有 FcMT1 變異的 Fc 區的變異的嵌合 4D5 抗體的重鏈的

示例性核酸分子(SEQ ID NO: 8)：

caggttcagc tgcagcagtc tggccctgag ctggtgaagc caggggcctc
actcaagttg tcctgtacag cttctggcct caacatcaaa gacacctata
tccactgggt gaaacagagg cctgaacagg gcctggaatg gattggaagg
atztatccta ccaatggcta tactagatat gacccaaagt tccaggacaa
ggccactatc acagcagaca catcctccaa cacagcctac ctgcaagtca
gccgcctgac atctgaggac actgccgtct attactgctc ccggtgggga
ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcaggagg cctccgtgac
cgtgagctcc gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct
cctccaagag cacctctggg ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag
gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg tggaaactcag gcgccctgac
cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca ggactctact
ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag
agttgagccc aaatcttggtg acaaaactca cacatgcca ccgtgcccag
cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttacc cccaaaacc
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtggtggt
ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg tacgtggacg
gcgtggagggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac
agcacgctcc gtgtgggtcag catcctcacc gtcctgcacc aggactggct
gaatggcaag gagtacaagt gcaagggtctc caacaaagcc ctcccagccc
ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accagggtcag
cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt
gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctctcgtg
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa
gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg
ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa

tga

【0106】 具有 FcMT2 變異的 Fc 區的變異的嵌合 4D5 抗體的重鏈的氨基

酸序列(SEQ ID NO: 11) (CDR_H殘基以底線顯示)：

QVQLQQSGPE	LVKPGASLKL	SCTASGFNIK	<u>DTYIHWVKQR</u>	PEQGLEWIG <u>R</u>
<u>IYPTNGYTRY</u>	<u>DPKFQD</u> KATI	TADTSSNTAY	LQVSRLTSED	TAVYYCSR <u>WG</u>
<u>GDGFYAMDY</u> W	GQGASVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELVGG	PSVFLLPKP
KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPPEEQYN
STLRVVSFLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
VYTLPPSRDE	LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPLV
LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK

【0107】 編碼具有 FcMT2 變異的 Fc 區的變異的嵌合 4D5 抗體的重鏈的

示例性核酸分子(SEQ ID NO: 10)：

caggttcagc tgcagcagtc tggccctgag ctggtgaagc caggggcctc
actcaagttg tcctgtacag cttctggctt caacatcaaa gacacctata
tccactgggt gaaacagagg cctgaacagg gcctggaatg gattggaagg
at ttatccta ccaatggcta tactagatat gacccaaagt tccaggacaa
ggccactatc acagcagaca catcctccaa cacagcctac ctgcaagtca
gccgcctgac atctgaggac actgccgtct attactgctc ccggtgggga
ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcaggag cctccgtgac
cgtgagctcc gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct
cctccaagag cacctctggg ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag
gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg tggaactcag gcgccctgac
cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca ggactctact
ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag
agttgagccc aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag
cacctgaact cgtgggggga ccgtcagtct tcctcttacc cccaaaacc
aaggacacc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtggtggt
ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg

gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac
agcacgctcc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct
gaatggcaag gagtacaagt gcaagggtctc caacaaagcc ctcccagccc
ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accagggtcag
cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt
gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctctcgtg
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa
gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg
ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
tga

【0108】 具有 FcMT3 變異的 Fc 區的變異的嵌合 4D5 抗體的重鏈的氨基

酸序列(SEQ ID NO: 13) (CDR_H 殘基以底線顯示)：

QVQLQQSGPE	LVKPGASLKL	SCTASGFNIK	<u>DTYIHWVKQR</u>	PEQGLEWIG <u>R</u>
<u>IYPTNGYTRY</u>	<u>DPKFQD</u> KATI	TADTSSNTAY	LQVSRLTSED	TAVYYCSR <u>WG</u>
<u>GDGFYAMDYW</u>	GQGASVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	PSVFLLPKP
KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPPEEQYN
STLRVVSFLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
VYTLPPSRDE	LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV
LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK

【0109】 編碼具有 FcMT3 變異的 Fc 區的變異的嵌合 4D5 抗體的重鏈的

示例性核酸分子(SEQ ID NO: 12)：

caggttcagc tgcagcagtc tggccctgag ctggtgaagc caggggcctc
actcaagttg tcctgtacag cttctggctt caacatcaaa gacacctata
tccactgggt gaaacagagg cctgaacagg gcctggaatg gattggaagg
atztatccta ccaatggcta tactagatat gacccaaagt tccaggacaa
ggccactatc acagcagaca catcctccaa cacagcctac ctgcaagtca
gccgcctgac atctgaggac actgccgtct attactgctc ccggtgggga
ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcaggagg cctccgtgac

cgtgagctcc gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct
cctccaagag cacctctggg ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag
gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg tggaactcag gcgccctgac
cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca ggactctact
ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag
agttgagccc aaatcttgtg acaaaactca cacatgccc cctgcccag
cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttacc cccaaaaccc
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtggtggt
ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg
gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac
agcacgctcc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct
gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc
ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag
cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt
gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa
gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg
ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
tga

【0110】 在一個實施方式中，本發明涉及變異的嵌合 4D5 抗體的用途，所述變異的嵌合 4D5 抗體具有在 Fc 區中具有修飾的重鏈，並且所述重鏈由 **SEQ ID NO: 8** 的核酸序列編碼或包括 **SEQ ID NO: 9** 的氨基酸序列或由 **SEQ ID NO: 10** 的核酸序列編碼或包括 **SEQ ID NO: 11** 的氨基酸序列或由 **SEQ ID NO: 12** 的核酸序列編碼或包括 **SEQ ID NO: 13** 的氨基酸序列。

【0111】 在一個實施方式中，本發明涉及抗 HER2/neu 抗體的用途，所述抗 HER2/neu 抗體包括在 VL 結構域中具有 N65S 修飾的免疫球蛋白輕鏈和具有修飾的 Fc 區的免疫球蛋白重鏈。優選地，這類抗 HER2/neu 抗體是嵌合 4D5 抗

體或變異的嵌合 4D5 抗體，所述變異的嵌合 4D5 抗體包括具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的輕鏈和具有選自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列的重鏈。在一些實施方式中，本發明的抗 HER2/neu 抗體進一步包括輕鏈恒定結構域，所述輕鏈恒定結構域與在一些實施方式中包括至少 SEQ ID NO: 4 的輕鏈可變結構域融合。在其他實施方式中，抗體是修飾的、是片段或是修飾片段。

【0112】 根據本發明的各個實施方式構建嵌合 4D5 抗體，以增強與啟動性低親和力 Fc 受體的結合，和不改變或僅僅最小程度地增加與低親和力抑制劑受體 CD32B (FcγRIIb)的結合。抗體包括下述野生型和 Fc 優化的抗體：

- ch4D5-野生型 Fc，其具有含 **SEQ ID NO: 2** 的氨基酸序列的輕鏈，和含 **SEQ ID NO: 7** 的氨基酸序列的重鏈。ch4D5-野生型 Fc 在輕鏈上具有 N65S 取代，這產生去糖基化的輕鏈。
- ch4D5-FcMT1，其具有含 **SEQ ID NO: 2** 的氨基酸序列的輕鏈，和含 **SEQ ID NO: 9** 的氨基酸序列的重鏈。ch4D5-FcMT1 在輕鏈上具有 N65S 取代，這產生去糖基化的輕鏈，以及在重鏈上具有 F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L 取代(均根據 Kabat 編號)。ch4D5-FcMT1 在與人 CD16A (FcγRIII-A) 結合方面表現出 10 倍增加，並且與 CD16-158^{Val} 的結合相比，與 CD16-158^{Phe} 的結合以成比例更大的方式增強。
- ch4D5-FcMT2 (“瑪格妥昔單抗,” CAS 註冊號：1350624-75-7)，其具有含 **SEQ ID NO: 2** 的氨基酸序列的輕鏈，和含 **SEQ ID NO: 11** 的氨基酸序列的重鏈。瑪格妥昔單抗在輕鏈上具有 N65S 取代，這產生去糖基化的輕鏈，和在重量上具有 L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L 取代(均根據 Kabat 編號)。該抗體是 ch4D5-FcMT1 抗體的進一步改良形式，並且具有類似的 CD16A 結合特性，而且也具有更有利的與 CD32B

(FcγRII-B) 結合的降低。

- ch4D5-FcMT3，其具有含 **SEQ ID NO: 2** 的氨基酸序列的輕鏈，和含 **SEQ ID NO: 13** 的氨基酸序列的重鏈。ch4D5-FcMT3 在輕鏈上具有 N65S 取代，這產生去糖基化的輕鏈，和在重鏈上具有 F243L、R292P 和 Y300L 取代(均根據 Kabat 編號)。該抗體是 ch4D5-FcMT1 抗體的進一步改良形式，並且具有類似的 CD16A 結合特性，但是也具有更有利的與 CD32B (FcγRIIB)結合的降低。
- ch4D5-N297Q (本文也稱為“ch4D5-Ag”)，其具有含 **SEQ ID NO: 2** 的氨基酸序列的輕鏈，和具有 N297Q 取代的重鏈(根據 Kabat 編號)。

【0113】 在圖2中顯示ch4D5-野生型Fc和Fc優化的變體ch4D5-FcMT1、ch4D5-FcMT2 和 ch4D5-FcMT3 的重鏈序列的比較。CDR 由在相關殘基下面所顯示的黑線表示。

【0114】 B.特異性結合 PD-1 的分子

【0115】 本發明包括的特異性結合 PD-1 的分子包括能夠結合人 PD-1 的連續的或不連續的(例如，構象)部分(表位元)的抗 PD-1 抗體。本發明的方法中使用的 PD-1 抗體優選地也展示結合一個或多個非人物種，尤其地，鼠科、齧齒動物、犬科和靈長類物種的 PD-1 分子的能力。

【0116】 對 PD-1 特異性的抗體是已知的(見，例如，美國專利申請號 62/198,867、美國專利號 5,952,136、7,488,802、7,521,051、8,008,449、8,088,905、8,354,509、8,552,154、8,779,105、8,900,587、9,084,776、PCT 專利公開 WO 2004/056875、WO 2006/121168、WO 2008/156712、WO 2012/135408、WO 2012/145493、WO 2013/014668、WO 2014/179664、WO 2014/194302 和 WO 2015/112800)。另外期望的抗體可通過分離使用 PD-1 或其肽片段產生的分泌抗

體的雜交瘤製備。人 PD-1 (包括 20 個氨基酸殘基信號序列(以底線顯示)和 268 個氨基酸殘基成熟蛋白質)具有氨基酸序列(SEQ ID NO: 14)：

<u>MQIPQAPWPV</u>	<u>VWAVLQLGWR</u>	PGWFLDSPDR	PWNPPTFSPA	LLVVTEGDNA
TFTCSFSNTS	ESFVLNWYRM	SPSNQTDKLA	AFPEDRSQPG	QDCRFRVTQL
PNGRDFHMSV	VRARRNDSGT	YLCGAISLAP	KAQIKESLRA	ELRVTERRAE
VPTAHPSPSP	RPAGQFQTLV	VGVVGGLLGS	LVLLVWVLAV	ICSRAARGTI
GARRTGQPLK	EDPSAVPVFS	VDYGELDFQW	REKTPEPPVP	CVPEQTEYAT
IVFPSGMGTS	SPARRGSADG	PRSAQPLRPE	DGHCSWPL	

【0117】 優選的抗 PD-1 抗體具有下述抗體的 VL 和/或 VH 結構域：抗人 PD-1 單克隆抗體“PD-1 mAb 1”(尼魯單抗，CAS 註冊號：946414-94-4，也稱為 5C4、BMS-936558、ONO-4538、MDX-1106，並且作為 OPDIVO®由 Bristol-Myers Squibb 出售)、“PD-1 mAb 2”(派姆單抗，(之前稱為蘭羅利珠單抗)，CAS 註冊號：1374853-91-4，也稱為 MK-3475，SCH-900475，並且作為 KEYTRUDA®由 Merck 出售)、“PD-1 mAb 3”(EH12.2H7；Dana Farber)、“PD-1 mAb 4”(皮地珠單抗，CAS 註冊號：1036730-42-3 也稱為 CT-011，CureTech)；或表 1 中提供的任何抗 PD-1 抗體；並且更優選的抗 PD-1 抗體具有這類抗 PD-1 單克隆抗體的 VL 區的 1、2 或所有 3 個 CDR 和/或 VH 結構域的 1、2 或所有 3 個 CDR。最近已經鑒定了可用于本發明的方法和組合物的具有獨特的結合特徵的另外的抗 PD-1 抗體(見，美國專利申請號 62/198,867)。尤其地，優選的是具有抗 PD-1 抗體“PD-1 mAb 5”(hPD-1 mAb 2，MacroGenics)；“PD-1 mAb 6”(hPD-1 mAb 7，MacroGenics)；“PD-1 mAb 7”(hPD-1 mAb 9，MacroGenics)；“PD-1 mAb 8”(hPD-1 mAb 15，MacroGenics)的人源化的 VH 和/或 VL 結構域的 PD-1 結合分子；和更優選是具有這類抗 PD-1 單克隆抗體的 VL 區的 1，2 或所有 3 個 CDR 和/或 VH 結構域的 1，2 或所有 3 個 CDR 的 PD-1 結合分子。這類優選的抗 PD-1 抗體包括具有變異

的 Fc 區的抗體、雙特異性(或多特異性)抗體、嵌合抗體或人源化抗體、BiTes、雙抗體等。

【0118】 PD-1 mAb 1 的重鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 15)
(CDRH 殘基以底線顯示)：

QVQLVESGGG	VVQPGRSLRL	DCKASGITFS	<u>NSGMH</u> WVRQA	PGKGLEWVAV
<u>IWYDGSKRYY</u>	<u>ADSVKG</u> RFTI	SRDNSKNTLF	LQMNSLRAED	TAVYYCAT <u>ND</u>
<u>DY</u> WGQGT	LVTVSS			

【0119】 PD-1 mAb 1 的 CDRH1 (SEQ ID NO: 16) NSGMH

【0120】 PD-1 mAb 1 的 CDRH2 (SEQ ID NO: 17)

VIWYDGSKRYYADSVKG

【0121】 PD-1 mAb 1 的 CDRH3 (SEQ ID NO: 18) NDDY

【0122】 PD-1 mAb 1 的輕鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 19)
(CDRL 殘基以底線顯示)：

【0123】 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP
GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ
SSNWPRTFGQ GTKVEIK

【0124】 PD-1 mAb 1 的 CDRL1(SEQ ID NO: 20) RASQSVSSYLA

【0125】 PD-1 mAb 1 的 CDRL2(SEQ ID NO: 21) DASNRAT

【0126】 PD-1 mAb 1 的 CDRL3(SEQ ID NO: 22) QQSSNWPRT

【0127】 PD-1 mAb 2 的重鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 23)
(CDRH 殘基以底線顯示)：

QVQLVQSGVE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>NYMY</u> WVRQA	PGQGLEWMG <u>G</u>
<u>INPSNGGTNE</u>	<u>NEKFKN</u> RVTL	TTDSSTTTAY	MELKSLQFDD	TAVYYCAR <u>RD</u>
<u>YRFDMGF</u> DY	W GQGTTVT	TVSS		

【0128】 PD-1 mAb 2 的 CDRH1 (SEQ ID NO: 24) NYMY

【0129】 PD-1 mAb 2 的 CDRH2 (SEQ ID NO: 25)

GINPSNGGTNFNEKFKN

【0130】 PD-1 mAb 2 的 CDRH3 (SEQ ID NO: 26) RDYRFDMGFDY

【0131】 PD-1 mAb 2 的輕鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 27)

(CDRL 殘基以底線顯示)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL
LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL
TFGGGTKVEIK

【0132】 PD-1 mAb 2 的 CDRL1 (SEQ ID NO: 28) RASKGVSTSGYSYLH

【0133】 PD-1 mAb 2 的 CDRL2 (SEQ ID NO: 29) LASYLES

【0134】 PD-1 mAb 2 的 CDRL3 (SEQ ID NO: 30) QHSRDLPLT

【0135】 PD-1 mAb 3 的重鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 31)

(CDRH 殘基以底線顯示)：

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKASGYSFT SSWIHWVKQR PGQGLEWIGY
IYPSTGFTEY NQKFDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARRWR
DSSGYHAMDY WGQGTSTVTSS

【0136】 PD-1 mAb 3 的 CDRH1 (SEQ ID NO: 32) SSWIH

【0137】 PD-1 mAb 3 的 CDRH2 (SEQ ID NO: 33)

YIYPSTGFTEYNQKF

【0138】 PD-1 mAb 3 的 CDRH3 (SEQ ID NO: 34) RWRDSSGYHAMDY

【0139】 PD-1 mAb 3 的輕鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 35)

(CDRL 殘基以底線顯示)：

DIVLTQSPAS LTVSLGQRAT ISCRASQSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL
LIKFGSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQHSWEIPY
TFGGGTKLEI K

【0140】 PD-1 mAb 3 的 CDRL1 (SEQ ID NO: 36) RASQSVSTSGYSYMH

- 【0141】 PD-1 mAb 3 的 CDRL2 (SEQ ID NO: 37) FGSNLES
- 【0142】 PD-1 mAb 3 的 CDRL3 (SEQ ID NO: 38) QHSWEIPYT
- 【0143】 PD-1 mAb 4 的重鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 39)

(CDRH 殘基以底線顯示)：

QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLQWMGW
INTDSGESTY AEEFKGRFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGMVFCVRVG
YDALDYWGQG TLVTVSS

- 【0144】 PD-1 mAb 4 的 CDRH1 (SEQ ID NO: 40) NYGMN
- 【0145】 PD-1 mAb 4 的 CDRH2 (SEQ ID NO: 41)

WINTDSGESTYAEEFKG

- 【0146】 PD-1 mAb 4 的 CDRH3 (SEQ ID NO: 42) VGYDALDY
- 【0147】 PD-1 mAb 4 的輕鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 43)

(CDRL 殘基以底線顯示)：

EIVLTQSPSS LSASVGDRV T ITCSARSSVS YMHWFQQKPG KAPKLWIYRT
SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSLQPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG TKLEIK

- 【0148】 PD-1 mAb 4 的 CDRL1 (SEQ ID NO: 44) SARSSVSYMH
- 【0149】 PD-1 mAb 4 的 CDRL2 (SEQ ID NO: 45) RTSNLAS
- 【0150】 PD-1 mAb 4 的 CDRL3 (SEQ ID NO: 46) QQRSSFPLT
- 【0151】 PD-1 mAb 5 的重鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 53)

(CDRH 殘基以底線顯示)：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSGSMSISY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTE D TALYYCASLS
DYFDYWGQGT TVTVSS

- 【0152】 PD-1 mAb 5 的 CDRH1 (SEQ ID NO: 54) SFGMH
- 【0153】 PD-1 mAb 5 的 CDRH2 (SEQ ID NO: 55) YISSGSMSISYADTVKG
- 【0154】 PD-1 mAb 5 的 CDRH3 (SEQ ID NO: 56) LSDYFDY

【0155】 PD-1 mAb 5 的輕鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 57)

(CDRL 殘基以底線顯示)：

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS I SCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPQ
LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQTTHVP
WTFGQGTKLE IK

【0156】 PD-1 mAb 5 的 CDRL1 (SEQ ID NO: 58) RSSQSLVHSTGNTYLH

【0157】 PD-1 mAb 5 的 CDRL2 (SEQ ID NO: 59) RVSNRFS

【0158】 PD-1 mAb 5 的 CDRL3 (SEQ ID NO: 60) SQTTHVPWT

【0159】 PD-1 mAb 6 的重鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 61)

(CDRH 殘基以底線顯示)：

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWXGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREEH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

其中 X 是 I 或 A。

【0160】 PD-1 mAb 6 的 CDRH1 (SEQ ID NO: 62) SYWMN

【0161】 PD-1 mAb 6 的 CDRH2 (SEQ ID NO: 63)

VIHPDSETWLDQKFKD

【0162】 PD-1 mAb 6 的 CDRH3 (SEQ ID NO: 64) EHYGTSPFAY

【0163】 PD-1 mAb 6 的輕鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 65)

(CDRL 殘基以底線顯示)：

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRAX₁ESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNX₂GS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI K

其中 X₁ 是 N 或 S 和 X₂ 是 Q 或 R；或 X₁ 是 N 和 X₂ 是 Q；或 X₁ 是 S 和 X₂ 是 Q；或 X₁ 是 S 和 X₂ 是 R。

【0164】 PD-1 mAb 6 的 CDRL1 (SEQ ID NO: 66)

RAX1ESVDNYGMSFMN

其中 X1 是如上所指示。

【0165】 PD-1 mAb 6 的 CDRL2 (SEQ ID NO: 67) AASN_{X2}GS

其中 X2 是如上所指示。

【0166】 PD-1 mAb 6 的 CDRL3 (SEQ ID NO: 68) QQSKEVPYT

【0167】 在具體的實施方式中，PD-1 mAb 6 包括：

- (a) SEQ ID NO: 61，其中 X 是 I；和 SEQ ID NO: 65，其中 X1 是 N 和 X2 是 Q；或
- (b) SEQ ID NO: 61，其中 X 是 I；和 SEQ ID NO: 65，其中 X1 是 S 和 X2 是 Q。

【0168】 PD-1 mAb 7 的重鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 69)

(CDRH 殘基以底線顯示)：

EVQLVESGGG LX₁RPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVX₂WVRQA PGKGLEWX₃AT
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSX₄RAED TATYYCARYYG
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

其中 X₁ 是 V 或 A；X₂ 是 S 或 G；X₃ 是 V 或 T；X₄ 是 L 或 A；X₁ 是 V，X₂ 是 S，X₃ 是 V，和 X₄ 是 L；或 X₁ 是 A，X₂ 是 G，X₃ 是 T，和 X₄ 是 A

【0169】 PD-1 mAb 7 的 CDRH1 (SEQ ID NO: 70) SYLVX₂

其中 X2 是如上所指示。

【0170】 PD-1 mAb 7 的 CDRH2 (SEQ ID NO: 71)

TISGGGGNTYYSDSVKG

【0171】 PD-1 mAb 7 的 CDRH3 (SEQ ID NO: 72) YGFDGAWFAY

【0172】 PD-1 mAb 7 的輕鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 73)

(CDRL 殘基以底線顯示)：

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY X₁YLAWYQQKP GKAPKLLIYX₂
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ GTKLEIK

其中 X₁ 是 N 或 S 和 X₂ 是 N 或 D；X₁ 是 S 和 X₂ 是 N；或 X₁ 是 N 和 X₂ 是 D

【0173】 PD-1 mAb 7 的 CDRL1 (SEQ ID NO: 74) RASENIYX1YLA

其中 X1 是如上所指示。

【0174】 PD-1 mAb 7 的 CDRL2 (SEQ ID NO: 75) X2AKTLAA

其中 X2 是如上所指示。

【0175】 PD-1 mAb 7 的 CDRL3 (SEQ ID NO: 76) QHHYAVPWT

【0176】 在具體的實施方式中，PD-1 mAb 7 包括：

(a) SEQ ID NO: 69，其中 X1 是 V，X2 是 S，X3 是 V，和 X4 是 L；和 SEQ ID NO: 73，其中 X1 是 S 和 X2 是 N；或

(b) SEQ ID NO: 69，其中 X1 是 A，X2 是 G，X3 是 T，和 X4 是 A；和 SEQ ID NO: 73，其中 X1 是 N 和 X2 是 D。

【0177】 PD-1 mAb 8 的重鏈可變結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 77)

(CDRH 殘基以底線顯示)：

EVQLVESGGG	LVRPGGSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYLIS</u> WVRQA	PGKGLEWVAA <u>A</u>
<u>ISGGGADTTY</u>	<u>ADSVKGR</u> FTI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	TATYYCAR <u>RG</u>
<u>TYAMDY</u> WGQG	TLVTVSS			

【0178】 PD-1 mAb 8 的 CDRH1 (SEQ ID NO: 78) SYLIS

【0179】 PD-1 mAb 8 的 CDRH2 (SEQ ID NO: 79)

AISGGGADTTYADSVKG

【0180】 PD-1 mAb 8 的 CDRH3 (SEQ ID NO: 80) RGTYAMDY

【0181】 PD-1 mAb 8 的輕鏈可變結構域的氨基酸序(SEQ ID NO: 81)

(CDRL 殘基以底線顯示)：

【0182】 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY NYLAWYQQKP
GKAPKLLIYD AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH
HYAVPWTFGQ GTKLEIK

- 【0183】 PD-1 mAb 8 的 CDRL1 (SEQ ID NO: 82) RASENIYNYLA
- 【0184】 PD-1 mAb 8 的 CDRL2 (SEQ ID NO: 83) DAKTLAA
- 【0185】 PD-1 mAb 8 的 CDRL3 (SEQ ID NO: 84) QHHYAVPWT

表 1：另外的抗 PD-1 抗體	
PD-1 抗體	參考文獻
PD1-17；PD1-28；PD1-33；PD1-35；和 PD1-F2	美國專利號 7,488,802、7,521,051 8,088,905 和 PCT 專利公開 WO 2004/056875
17D8；2D3；4H1；5C4；4A11；7D3；和 5F4	美國專利號 8,008,449、8,779,105、9,084,776 和 PCT 專利公開 WO 2006/121168
hPD-1.08A；hPD-1.09A；109A；K09A；409A；h409A11；h409A16；h409A17；密碼子優化的 109A；和密碼子優化的 409A	美國專利號 8,354,509；8,900,587；5,952,136；和 PCT 專利公開 WO 2008/156712
1E3；1E8；和 1H3	美國專利公開 2014/0044738；和 PCT 專利公開 WO 2012/145493
9A2；10B11；6E9；APE1922；APE1923；APE1924；APE1950；APE1963；和 APE2058	PCT 專利公開 WO 2014/179664
GA1；GA2；GB1；GB6；GH1；A2；C7；H7；SH-A4；SH-A9；RG1H10；RG1H11；RG2H7；RG2H10；RG3E12；RG4A6；RG5D9；RG1H10-H2A-22-1S；RG1H10-H2A-27-2S；RG1H10-3C；RG1H10-16C；RG1H10-17C；RG1H10-19C；RG1H10-21C；和 RG1H10-23C2	美國專利公開 2014/0356363；和 PCT 專利公開 WO 2014/194302
H1M7789N；H1M7799N；H1M7800N；H2M7780N；H2M7788N；H2M7790N；H2M7791N；H2M7794N；H2M7795N；H2M7796N；H2M7798N；H4H9019P；H4xH9034P2；H4xH9035P2；H4xH9037P2；H4xH9045P2；H4xH9048P2；H4H9057P2；H4H9068P2；H4xH9119P2；H4xH9120P2；H4Xh9128p2；H4Xh9135p2；H4Xh9145p2；H4Xh8992p；H4Xh8999p；和 H4Xh9008p；	美國專利公開 2015/0203579；和 PCT 專利公開 WO 2015/112800

表 1：另外的抗 PD-1 抗體	
PD-1 抗體	參考文獻
PD-1 mAb 1；PD-1 mAb 2；hPD-1 mAb 2；PD-1 mAb 3；PD-1 mAb 4；PD-1 mAb 5；PD-1 mAb 6；PD-1 mAb 7；hPD-1 mAb 7；PD-1 mAb 8；PD-1 mAb 9；hPD-1 mAb 9；PD-1 mAb 10；PD-1 mAb 11；PD-1 mAb 12；PD-1 mAb 13；PD-1 mAb 14；PD-1 mAb 15；和 hPD-1 mAb 15	美國專利申請號 62/198,867

【0186】 在某些實施方式中，可用于本發明的方法和組合物的 PD-1 抗體包括上面提供的任何抗體(例如，PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、PD-1 mAb 4、PD-1 mAb 5、PD-1 mAb 6、PD-1 mAb 7、PD-1 mAb 8 或表 1 中的任何抗 PD-1 抗體)的 VL 和 VH 結構域、κ CL 結構域和 IgG4 Fc 結構域，任選地缺少 C-末端賴氨酸殘基。這類抗體優選地包括 IgG4 CH1 結構域和鉸鏈，並且更優選地包括穩定化的、包括 S228P 取代的 IgG4 鉸鏈(其中編號是根據如 Kabat 中的 EU 索引)。

【0187】 κ CL 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 85)是：

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

【0188】 IgG4 CH1 結構域和穩定化的鉸鏈的氨基酸序列(SEQ ID NO: 86)是：

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPPCP

【0189】 下面提供了 IgG4 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列(SEQ ID NO: 52)。

【0190】 命名為“PD-1 mAb 6-ISQ”的示例性抗 PD-1 抗體包括：具有 PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 65)的 VL 結構域，其中 X1 是 S 和 X2 是 Q，和 κ CL (SEQ ID NO: 85)的輕鏈；和具有 PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 61)的 VH 結構域，其中 X1 是

I，IgG4 CH1 結構域、穩定化的 IgG 4 鉸鏈(SEQ ID NO: 86)和 IgG4 CH2-CH3 結構域(SEQ ID NO: 52)的重鏈。

【0191】 PD-1 mAb 6-ISQ 的完整輕鏈的氨基酸序列(SEQ ID NO: 87)顯示在下面(CDRL 殘基以底線顯示)：

EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSC <u>RASESVD</u>	<u>NYGMSFMNWF</u>	QQKPGQPPKL
LIH <u>AASNQGS</u>	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFAVY	FC <u>QQSKEVPY</u>
<u>T</u> FGGGTKVEI	KRTVAAPSVF	IFPPSDEQLK	SGTASVVCLL	NNFYPREAKV
QWKVDNALQS	GNSQESVTEQ	DSKDSTYSL	STLTLSKADY	EKKHVKYACEV
THQGLSSPVT	KSFNRGEC			

【0192】 PD-1 mAb 6-ISQ 的完整重鏈的氨基酸序列(SEQ ID NO: 88)顯示在下面(CDRH 殘基以底線顯示)：

QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYSFT	<u>SYWMN</u> WVRQA	PGQGLEWIG <u>V</u>
<u>IHPSDSETWL</u>	<u>DQKFKD</u> RVTI	TVDKSTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARE <u>EH</u>
<u>YGTS</u> PFAYWG	QGTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APCSRSTSES	TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV	PSSSLGTKTY
TCNVDHKPSN	TKVDKRVESK	YGPPCPPCPA	PEFLGGPSVF	LFPPKPKDTL
MISRTPEVTC	VVVDVSQEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTYR
VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPSS	IEKTISKAKG	QPREPQVYTL
PPSQEEMTKN	QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTTPVLDSD
GSFFLYSRLT	VDKSRWQEGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSLG

【0193】 另一示例性抗 PD-1 抗體是 PD-1 mAb 1 (尼魯單抗)，其是人抗體，包括具有 VL 結構域(SEQ ID NO: 19)和 κ CL 結構域(見例如，SEQ ID NO: 85)的輕鏈；和具有 VH 結構域(SEQ ID NO: 15)、IgG4 CH1 結構域和穩定化的鉸鏈(見例如，SEQ ID NO: 86)、和 IgG4 CH2-CH3 結構域(見例如，SEQ ID NO: 54)的重鏈。

【0194】 另一示例性抗 PD-1 抗體是 PD-1 mAb 2 (派姆單抗)，其是人源化抗體，包括具有 VL 結構域(SEQ ID NO: 27)和 κ CL 結構域(見例如，SEQ ID NO:

85)的輕鏈；和具有 VH 結構域(SEQ ID NO: 23)、IgG4 CH1 和穩定化的 IgG4 鉸鏈(見例如，SEQ ID NO: 86)、和 IgG4 CH2-CH3 結構域(見例如，SEQ ID NO: 52)的重鏈。

【0195】 C.抗體變體

【0196】 也考慮可製備抗體變體。變體可在它們的氨基酸序列中相對於天然氨基酸序列在期望位置具有序列修飾(例如，取代、缺失和/或插入)。本領域技術人員應該瞭解，氨基酸改變可改變抗體的翻譯後過程，比如改變糖基化位元點的數目或位置或改變膜錨定特徵。在優選的實施方式中，抗體和變體是 Fc 區變體。

【0197】 與天然抗體相比，變體可具有相同的或改變的活性。例如，可期望變體具有相同的活性，但是以使得其更穩定或具有更長的體內半衰期的方式被修飾，例如，通過將抗體與白蛋白或補救受體(salvage receptor)結合表位軛合，如在例如美國專利第 5,739,277 中描述的。或者，例如，可能期望的是抗體對抗原具有增加的結合親和力，但是具有與天然抗體相同的效應子功能，或者可能期望的是抗體對抗原具有相同的結合親和力，但是具有降低的效應子功能。可以通過例如使用體外測定如 ELISA 測定、表面等離子體共振測定、放射性標記的蛋白結合測定(RIA)或免疫沉澱測定來測試活性。

【0198】 在功能或免疫同一性上的實質修飾可以通過選擇在維持下列方面的作用方面顯著不同的修飾來完成：(a) 修飾區域的多肽骨架的結構，例如，為片層或螺旋構象；(b) 在靶位點的分子的電荷或疏水性；或(c) 側鏈的體積(bulk)。還可以採用掃描氨基酸分析來沿著連續序列鑒定一個或多個氨基酸，例如 Cunningham 和 Wells (1989) Science 244:1081-1085 所述的。優選的掃描氨基酸是相對較小的中性氨基酸，例如丙氨酸、甘氨酸、絲氨酸和半胱氨酸。丙氨酸在這個組中通常是優選的掃描氨基酸，因為它是最常見的氨基酸，並且常見於隱

藏的和暴露的位置二者中，並且因為它消除了 β -碳以外的側鏈並且不太可能改變變體的主鏈構象。如果丙氨酸取代沒有產生足夠量的變體，則可以使用同分異構(isoteric)氨基酸。此外，不參與維持抗體或多肽的正確構象的任何半胱氨酸殘基可以被取代，一般用絲氨酸進行取代，以改善分子的氧化穩定性並阻止異常的交聯。然而，在某些情況下，尤其在抗體是諸如 Fv 片段等抗體片段時，可以添加半胱氨酸鏈至抗體或多肽以改善其穩定性。

【0199】 CDR 殘基的單氨基酸改變可導致功能性結合喪失的事實 (Rudikoff, S. etc. (1982) “Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity,” Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6):1979-1983) 提供了系統性鑒定可選的功能 CDR 序列的手段。在用於獲得這類變異的 CDR 的一個優選的方法中，對編碼 CDR 的多核苷酸進行誘變(例如經隨機誘變或通過位點定向方法(例如，用編碼突變的基因座的引物進行聚合酶鏈介導的擴增))，以產生具有取代的氨基酸殘基的 CDR。通過比較原始(功能) CDR 序列的相關殘基的同一性與取代的(非功能)變異的 CDR 序列的同一性，可鑒定該取代的 BLOSUM62.iiij 取代分數。BLOSUM 系統提供了通過分析用於可信比對的序列的資料庫而產生的氨基酸取代的矩陣(Eddy, S.R. (2004) “Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?,” Nature Biotech. 22(8):1035-1036；Henikoff, J.G. (1992) “Amino acid substitution matrices from protein blocks,” Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:10915-10919；Karlin, S.等(1990) “Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes,” Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:2264-2268；Altschul, S.F. (1991) “Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective,” J. Mol. Biol. 219, 555-565。目前，最高級 BLOSUM 資料庫是 BLOSUM62 資料庫(BLOSUM62.iiij)。下面表 2 顯示了 BLOSUM62.iiij 取代分數(分數越高取代越保守，因此取代越可

能不影響功能)。例如，如果包括所得 CDR 的抗原結合片段不能結合 ROR1，那麼 BLOSUM62.ijj 取代分數視為不足夠保守，並且選擇和產生具有更高取代分數的新的候選取代。因此，例如，如果原始殘基是谷氨酸(E)，和非功能取代殘基是組氨酸(H)，那麼 BLOSUM62.ijj 取代分數是 0，並且更高保守的改變(比如對天冬氨酸、天冬醯胺、穀氨醯胺或賴氨酸的改變)是優選的。

表 2：BLOSUM62.ijj 取代分數																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

【0200】 本發明因此考慮使用引導的或隨機誘變，以鑒定改善的 CDR。

【0201】 D.Fc 區變體

【0202】 在傳統的免疫功能中，抗體-抗原複合物與免疫系統的細胞的相互作用產生各種各樣的應答，範圍從效應子功能，比如 ADCC、肥大細胞脫粒和吞噬至免疫調節信號，比如調節淋巴細胞增殖和抗體分泌。所有這些相互作用

用均通過抗體的 Fc 區或免疫複合物與造血細胞上的專用細胞表面受體的結合而啟動。由抗體和免疫複合物引發的多種細胞應答源自三個 Fc 受體：FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32)和 FcγRIII (CD16)的結構異質性。FcγRI (CD64)、FcγRIIA (CD32A)和 FcγRIII (CD16)是啟動性(即，免疫系統增強)受體；FcγRIIB (CD32B)是抑制性(即，免疫系統抑制)受體。

【0203】 IgG1 Fc 區的氨基酸序列顯示在下面(如 SEQ ID NO: 49，根據

Kabat 編號)：

231	240	250	260	270	280
APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	
	290	300	310	320	330
GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	
	340	350	360	370	380
PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	
	390	400	410	420	430
WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	
	440	447			
ALHNHYTQKS	LSLSPG	X			

如通過根據 Kabat 的 EU 索引編號，其中，X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0204】 示例性人 IgG2 的 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:

50)：

231	240	250	260	270	280
APPVA-GPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFNWYVD	
	290	300	310	320	330
GVEVHNAKTK	PREEQFNSTF	RVVSVLTVVH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPA	
	340	350	360	370	380
PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDISVE	
	390	400	410	420	430
WESNGQPENN	YKTTTPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	
	440	447			
ALHNHYTQKS	LSLSPG	X			

如通過根據 Kabat 的 EU 索引編號，其中，X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0205】 示例性人 IgG3 的 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO: 51) :

231	240	250	260	270	280
APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVVDVSHED	PEVQFKWYVD	
	290	300	310	320	330
GVEVHNAKTK	PREEQYNSTF	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	
	340	350	360	370	380
PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	
	390	400	410	420	430
WESSGQPENN	YNTTPPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NIFSCSVMHE	
	440	447			
ALHNRFTQKS	LSLSPGX				

如通過根據 Kabat 的 EU 索引編號，其中，X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0206】 示例性人 IgG4 的 CH2-CH3 結構域的氨基酸序列是(SEQ ID NO: 52) :

231	240	250	260	270	280
APEFLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVVDVSQED	PEVQFNWYVD	
	290	300	310	320	330
GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	
	340	350	360	370	380
SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	
	390	400	410	420	430
WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	NVFSCSVMHE	
	440	447			
ALHNHYTQKS	LSLSLGX				

如通過根據 Kabat 的 EU 索引編號，其中，X 是賴氨酸(K)或不存在。

【0207】 在抗體恒定區中的許多不同位置(例如，Fc 位置，包括但不限於如通過根據 Kabat 的 EU 索引編號的 270、272、312、315、356 和 358 位)處已經觀察到了多態性，因此本發明的序列和現有技術的序列之間可能存在稍微的區別。已經充分表徵了人免疫球蛋白的多態性形式。目前，已知 18 個 Gm 同種異型：G1m (1、2、3、17)或 G1m (a、x、f、z)、G2m (23)或 G2m (n)、G3m (5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28)或 G3m (b1、c3、b3、b0、b3、

b4、s、t、g1、c5、u、v、g5) (Lefranc, *et al.*, “*The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation.*” Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990) ; Lefranc, G.等, 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211)。具體考慮本發明的抗體可併入任何免疫球蛋白基因的任何同種異型(allotype)、異同種異型(isoallotype)或單倍型(haplotype)，並且不限於本文提供的序列的同種異型、異同種異型或單倍型。此外，在一些表達系統中，CH3 結構域的 C-末端氨基酸殘基(上面 **SEQ ID NOs : 49-52** 粗體和底線顯示的)可在翻譯後去除。因此，CH3 結構域的 C-末端殘基(上面粗體和加底線顯示的)是本發明的方法中使用的抗體中的任選氨基酸殘基。

【0208】 本發明的分子可具有變異的 Fc 區。Fc 區的修飾通常導致改變的表型，例如改變的血清半衰期、改變的穩定性、改變的對細胞酶的易感性或改變的效應子功能。就效應子功能而言，可期望修飾本發明的抗體，例如，以便增強抗體在治療癌中的有效性。在某些情況下，期望降低或消除效應子功能，例如在抗體的作用機制涉及阻斷或對抗但不是殺傷攜帶靶抗原的細胞的情況下。當被引導至不期望的細胞諸如其中 FcγR 以低水準表達的腫瘤和外源細胞時，例如具有低水準 FcγRIIB 的腫瘤-特異性 B 細胞(例如，非霍奇金淋巴瘤、CLL 和伯基特淋巴瘤)，提高的效應子功能通常是期望的。在所述實施方式中，具有賦予的或增強的效應子功能活性的本發明的分子可用于治療和/或預防疾病、病症或感染，其中增強的效應子功能活性的功效是期望的。

【0209】 在某些實施方式中，本發明的分子包括 Fc 區氨基酸的一個或多個修飾，所述修飾降低了 Fc 區對一個或多個 FcγR 受體的親和力和親合力，因此降低了本發明的分子對一個或多個 FcγR 受體的親和力和親合力。在其他實施方式中，本發明的分子包括 Fc 區氨基酸的一個或多個修飾，所述修飾增加了 Fc 區對一個或多個 FcγR 受體的親和力和親合力，因此增加了本發明的分子對一個或多個 FcγR 受體的親和力和親合力。在其他實施方式中，相對於不包括 Fc 區

或包括野生型 Fc 區分子，分子包括變異的 Fc 區，其中所述變體賦予或介導增加的 ADCC 活性和/或對 FcγRIIA 增加的結合。在可選的實施方式中，相對於不包括 Fc 區或包括野生型 Fc 區分子，分子包括變異的 Fc 區，其中所述變體賦予或介導降低的 ADCC 活性(或其他效應子功能)和/或對 FcγRIIB 增加的結合。

【0210】 在一些實施方式中，本發明包括分子，所述分子包括變異的 Fc 區，所述變異的 Fc 區相對於包括野生型 Fc 區的相當分子不顯示對任何 FcγR 的可檢測的結合。在其他實施方式中，本發明包括分子，所述分子包括變異的 Fc 區，所述變異的 Fc 區僅僅結合單個 FcγR，優選地 FcγRIIA、FcγRIIB 或 FcγRIIA 之一。

【0211】 本發明的分子可包括對於啟動性和/或抑制性 Fcγ 受體改變的親和力。在一個實施方式中，抗體或分子包括變異的 Fc 區，其相對於具有野生型 Fc 區的相當分子，具有對於 FcγRIIB 增加的親和力和對於 FcγRIIA 和/或 FcγRIIA 降低的親和力。在另一實施方式中，本發明的分子包括變異的 Fc 區，其相對於具有野生型 Fc 區的相當分子，具有對於 FcγRIIB 降低的親和力和對於 FcγRIIA 和/或 FcγRIIA 增加親和力。在仍另一實施方式中，本發明的分子包括變異的 Fc 區，其相對於具有野生型 Fc 區的相當分子，具有對於 FcγRIIB 降低的親和力和對於 FcγRIIA 和/或 FcγRIIA 降低的親和力。在仍另一實施方式中，本發明的分子包括變異的 Fc 區，其相對於具有野生型 Fc 區的相當分子，具有對於 FcγRIIB 不變的親和力和對於 FcγRIIA 和/或 FcγRIIA 降低的(或增加的)親和力。

【0212】 在某些實施方式中，本發明包括免疫球蛋白，其包括對於 FcγRIIA 和/或 FcγRIIA 具有改變的親和力的變異的 Fc 區，使得免疫球蛋白具有增強的效應子功能，例如，ADCC。效應細胞功能的非限制性例子包括 ADCC、

抗體依賴性細胞吞噬(ADCP)、吞噬、調理、調理吞噬、細胞結合、玫瑰花結、C1q 結合和 CDC。

【0213】 在尤其優選的實施方式中，本發明包括嵌合抗 HER2/neu 抗體，其包括變異的 Fc 區，其中所述變體賦予或具有增加的 ADCC 活性和/或對 FcγRIIIA (CD16A)增加的結合，如使用本領域技術人員已知的和本文列舉的方法測量的。根據本發明的方法使用的 ADCC 試驗可以是 NK 依賴性或巨噬細胞依賴性的。

【0214】 在尤其優選的實施方式中，本發明包括特異性結合 PD-1 的分子，其包括變異的 Fc 區，其中所述變體賦予或具有降低的 ADCC 活性和/或對 FcγRIIIA (CD16A)降低的結合，如使用本領域技術人員已知和本文列舉的方法測量的。根據本發明的方法使用的 ADCC 試驗可以是 NK 依賴性或巨噬細胞依賴性的。在另外優選的實施方式中，本發明包括特異性結合 PD-1 的分子，其包括變異的 Fc 區，其中所述變體賦予或具有降低的 CDC 活性和/或對 C1q 降低的結合，如使用本領域技術人員已知和本文列舉的方法測量的。

【0215】 在優選的實施方式中，親和力或效應子功能的改變相對於包括野生型 Fc 區的相當的分子是至少 2 倍，優選地至少 4 倍、至少 5 倍、至少 6 倍、至少 7 倍、至少 8 倍、至少 9 倍、至少 10 倍、至少 50 倍或至少 100 倍。在本發明的其他實施方式中，變異的 Fc 區特異性結合一個或多個 FcR，相對於包括野生型 Fc 區的分子，親和力是至少 65%，優選地至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 100%、至少 125%、至少 150%、至少 175%、至少 200%、至少 225%或至少 250%更大。這類測量可以是體內或體外測試，並且在優選的實施方式中是體外測試比如 ELISA 或表面等離子共振測試。

【0216】 在不同的實施方式中，分子包括變異的 Fc 區，其中所述變體激動(agonize)FcγR 受體的至少一種活性或對抗 FcγR 受體的至少一種活性。在優選

的實施方式中，分子包括這樣的變體：其激動(或對抗) $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 的一種或多種活性，例如，B 細胞受體-介導的信號傳導、B 細胞的啟動、B 細胞增殖、抗體產生、B 細胞的細胞內鈣流入、細胞週期進程、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ -介導的對 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 信號傳導的抑制、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 的磷酸化、SHIP 募集、SHIP 磷酸化和與 Shc 的締合或在 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 信號轉導途徑中一個或多個下游分子(例如，MAP 激酶、JNK、p38 或 Akt)的活性。在另一實施方式中，分子包括變體，所述變體激動(或對抗) $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 的一種或多種活性，例如，肥大細胞啟動、鈣動員、脫粒、細胞因數產生或 5-羥色胺釋放。

【0217】 在某些實施方式中，分子包括包含結構域的 Fc 區或來自兩個或更多個 IgG 同種型(例如，IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4)的區域。由於它們的鉸鏈和/或 Fc 區中氨基酸序列的差異，各種 IgG 同種型展示不同的物理和功能特性，包括血清半衰期、補體結合、 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ 結合親和力和效應子功能活性(例如 ADCC、CDC 等)，例如如下面文獻所描述：Flesch, B.K. and Neppert, J. (1999) “Functions Of The Fc Receptors For Immunoglobulin G,” J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156；Chappel, M.S.等(1993) “Identification Of A Secondary Fc Gamma RI Binding Site Within A Genetically Engineered Human IgG Antibody,” J. Biol. Chem. 33:25124-25131；Chappel, M.S.等(1991) “Identification Of The Fc Gamma Receptor Class I Binding Site In Human IgG Through The Use Of Recombinant IgG1/IgG2 Hybrid And Point-Mutated Antibodies,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9036-9040；Brüggemann, M.等(1987) “Comparison Of The Effector Functions Of Human Immunoglobulins Using A Matched Set Of Chimeric Antibodies,” J. Exp. Med 166:1351-1361。該類型的變異的 Fc 區可單獨使用或組合氨基酸修飾使用，以實現 Fc-介導的效應子功能和/或結合活性。相對於包括野生型 Fc 區的本發明的分子，在組合時，氨基酸修飾和 IgG 鉸鏈/Fc 區可展示類似的功能(例如，對 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$

第 70 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

增加的親和力)並且可疊加作用，或更優選地，協同作用，以修飾本發明分子的效應子功能。在其他實施方式中，氨基酸修飾和 IgG Fc 區可展示相反的功能(例如，對於 FcγRIIA 分別增加的和降低的親和力)，並且相對於不包括 Fc 區或包括相同同種型的野生型 Fc 區的本發明分子，可用于選擇性減輕或降低本發明分子的特定功能。

【0218】 在優選的具體實施方式中，分子包括變異的 Fc 區，其中所述變異的 Fc 區相對於野生型 Fc 區包括至少一個氨基酸的修飾，以便所述分子具有對 FcR 改變的親和力，條件是基於諸如由 Sondermann, P.等(2000) “The 3.2-A Crystal Structure Of The Human IgG1 Fc Fragment-Fc GammaRIII Complex,” Nature 406:267-273 公開的 Fc-FcR 相互作用的晶體學和結構分析，所述變異 Fc 區在直接接觸 FcγR 的位置不具有取代。Fc 區中直接接觸 FcγR 的位置的實例是氨基酸殘基 234-239 (鉸鏈區)、氨基酸殘基 265-269 (B/C 環)、氨基酸殘基 297-299 (C'/E 環)和氨基酸殘基 327-332 (F/G 環)。在一些實施方式中，本發明的分子包括變異的 Fc 區，其包括至少一個殘基的修飾，所述殘基基於結構和晶體學分析不直接接觸 FcγR，例如不在 Fc-FcγR 結合位點內。

【0219】 變異的 Fc 區是本領域熟知的，並且任何已知的 Fc 變體可用于本發明，以賦予或改變包括 Fc 區的本發明的分子(或其部分)展示的效應子功能，如在例如 NK 依賴性或巨噬細胞依賴性測定中功能測定的。例如，Antibody Engineering Technology Art (抗體工程化技術工藝)公開了鑒定為改變效應子功能的 Fc 區變體，並且其中公開的任何適當的均變體可用于本發明的分子。

【0220】 在某些實施方式中，分子包括變異的 Fc 區，其在一個或多個區中具有一個或多個氨基酸修飾，所述修飾(一個或多個)(相對於野生型 Fc 區)改變了變異的 Fc 區對啟動性 FcγR (比如 FcγRIIA 或 FcγRIIIA)相對於對抑制性 FcγR (比如 FcγRIIB)的親和力比例：

第 71 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

親和力比 =
$$\frac{\text{在對Fc}\gamma\text{R}_{\text{激活}}\text{的親和力中野生型至變體改變}}{\text{在對Fc}\gamma\text{R}_{\text{抑制}}\text{的親和力中野生型至變體改變}}$$

【0221】 當 Fc 變體的親和力比大於 1 時，本發明的方法在為期望增強 FcγR 介導的效應細胞功能(例如，ADCC)的效力的疾病、病症或感染——例如，癌症或感染疾病——提供治療性或預防性治療或改善其症狀方面尤其有用。在 Fc 變體的親和力的比小於 1 的情況下，本發明的方法在為期望降低 FcγR 介導的效應細胞功能的效力的疾病或病症——例如，自身免疫或炎症病症——提供治療性或預防性治療或改善其症狀方面尤其有用。表 3 根據它們的親和力比是否大於或小於 1 列舉了示例性的單、雙、三、四和五突變，並且與這些突變相關的更多資訊可見於 Antibody Engineering Technology Art(抗體工程化技術工藝)中。

表 3				
根據親和力比列舉的示例性單突變和多突變				
單	雙	三	四	五
親和力比> 1				
F243L	F243L & R292P	F243L、P247L & N421K	L234F、F243L、R292P & Y300L	L235V、F243L、R292P、Y300L & P396L
D270 E	F243L & Y300L	F243L、R292P & Y300L	L235I、F243L、R292P & Y300L	L235P、F243L、R292P、Y300L & P396L
R292 G	F243L & P396L	F243L、R292P & V305I	L235Q、F243L、R292P & Y300L	F243L、R292P、V305I、Y300L & P396L
R292P	D270E & P396L	F243L、R292P & P396L	F243L、P247L、D270E & N421K	

表 3				
根據親和力比列舉的示例性單突變和多突變				
單	雙	三	四	五
	R292P & Y300L	F243L、Y300L & P396L	F243L、R255L、D270E & P396L	
	R292P & V305I	P247L、D270E & N421K	F243L、D270E、G316D & R416G	
	R292P & P396L	R255L、D270E & P396L	F243L、D270E、K392T & P396L	
	Y300L & P396L	D270E、G316D & R416G	F243L、D270E、P396L & Q419H	
	P396L & Q419H	D270E、K392T & P396L	F243L、R292P、Y300L、& P396L	
		D270E、P396L & Q419H	F243L、R292P、V305I & P396L	
		V284M、R292L & K370N	P247L、D270E、Y300L & N421K	
		R292P、Y300L & P396L	R255L、D270E、R292G & P396L	
			R255L、D270E、Y300L & P396L	
			D270E、G316D、P396L & R416G	
親和力比< 1				
Y300 L	F243L & P396L	F243L、R292P & V305I		
P396L	P247L & N421K			
	R255L &			

表 3				
根據親和力比列舉的示例性單突變和多突變				
單	雙	三	四	五
	P396L			
	R292P & V305I			
	K392T & P396L			
	P396L & Q419H			

【0222】 在具體的實施方式中，在變異的Fc區中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：235、240、241、243、244、247、262、263、269、298、328 或 330，和優選地，下述殘基的一個或多個：A240、I240、L241、L243、H244、N298、I328 或 V330。在不同的具體實施方式中，在變異的 Fc 區中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：268、269、270、272、276、278、283、285、286、289、292、293、301、303、305、307、309、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438 或 439，和優選地，下述殘基的一個或多個：H280、Q280、Y280、G290、S290、T290、Y290、N294、K295、P296、D298、N298、P298、V298、I300 或 L300。

【0223】 在優選的實施方式中，在以改變的親和力結合 FcγR 的變異的 Fc 區中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：255、256、258、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、300、301、303、305、307、309、312、320、322、326、329、330、332、331、333、334、335、337、338、339、340、359、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438 或 439。優選地，變異的 Fc 區具有任何下述殘基：A256、N268、Q272、D286、Q286、S286、A290、S290、A298、M301、A312、E320、M320、Q320、R320、E322、A326、D326、E326、N326、S326、

K330、T339、A333、A334、E334、H334、L334、M334、Q334、V334、K335、Q335、A359、A360 或 A430。

【0224】 在不同的實施方式中，在以降低的親和力結合 FcγR(經其 Fc 區)的變異的 Fc 區中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：252、254、265、268、269、270、278、289、292、293、294、295、296、298、300、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438 或 439。

【0225】 在不同的實施方式中，在以增強的親和力結合 FcγR(經其 Fc 區)的變異的 Fc 區中，任何氨基酸修飾(例如，取代)在下述任何位置：280、283、285、286、290、294、295、298、300、301、305、307、309、312、315、331、333、334、337、340、360、378、398 或 430。在不同的實施方式中、在以增強的親和力結合 FcγRIIA 的變異的 Fc 區中，任何下述殘基：A255、A256、A258、A267、A268、N268、A272、Q272、A276、A280、A283、A285、A286、D286、Q286、S286、A290、S290、M301、E320、M320、Q320、R320、E322、A326、D326、E326、S326、K330、A331、Q335、A337 或 A430。

【0226】 優選的變體包括在任何下述位置的一個或多個修飾：228、230、231、232、233、234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、271、273、275、281、284、291、296、297、298、299、302、304、305、313、323、325、326、328、330 或 332。

【0227】 尤其優選的變體包括選自組 A-AI 的一個或多個修飾：

A	228E、228K、228Y 或 228G；
B	230A、230E、230Y 或 230G；
C	231E、231K、231Y、231P 或 231G；
D	232E、232K、232Y、232G；
E	233D；

F	234I 或 234F ；
G	235D 、 235Q 、 235P 、 235I 或 235V ；
H	239D 、 239E 、 239N 或 239Q ；
I	240A 、 240I 、 240M 或 240T ；
J	243R 、 243 、 243Y 、 243L 、 243Q 、 243W 、 243H 或 243I ；
K	244H ；
L	245A ；
M	247G 、 247V 或 247L ；
N	262A 、 262E 、 262I 、 262T 、 262E 或 262F ；
O	263A 、 263I 、 263M 或 263T ；
P	264F 、 264E 、 264R 、 264I 、 264A 、 264T 或 264W ；
Q	265F 、 265Y 、 265H 、 265I 、 265L 、 265T 、 265V 、 265N 或 265Q ；
R	266A 、 266I 、 266M 或 266T ；
S	271D 、 271E 、 271N 、 271Q 、 271K 、 271R 、 271S 、 271T 、 271H 、 271A 、 271V 、 271L 、 271I 、 271F 、 271M 、 271Y 、 271W 或 271G ；
T	273I ；
U	275L 或 275W ；
V	281D 、 281K 、 281Y 或 281P ；
W	284E 、 284N 、 284T 、 284L 、 284Y 或 284M ；
X	291D 、 291E 、 291Q 、 291T 、 291H 、 291I 或 291G ；
Y	299A 、 299D 、 299E 、 299F 、 299G 、 299H 、 299I 、 299K 、 299L 、 299M 、 299N 、 299P 、 299Q 、 299R 、 299S 、 299V 、 299W 或 299Y ；
Z	302I ；
AA	304D 、 304N 、 304T 、 304H 或 304L
AB	305I ；
AC	313F ；
AD	323I ；
AE	325A 、 325D 、 325E 、 325G 、 325H 、 325I 、 325L 、 325K 、 325R 、 325S 、 325F 、 325M 、 325T 、 325V 、 325Y 、 325W 或 325P ；
AF	328D 、 328Q 、 328K 、 328R 、 328S 、 328T 、 328V 、 328I 、 328Y 、 328W 、 328P 、 328G 、 328A 、 328E 、 328F 、 328H 、 328M 或 328N ；
AG	330L 、 330Y 、 330I 或 330V ；
AH	332A 、 332D 、 332E 、 332H 、 332N 、 332Q 、 332T 、 332K 、 332R 、 332S 、 332V 、 332L 、 332F 、 332M 、 332W 、 332P 、 332G 或 332Y ；和
AI	336E 、 336K 或 336Y

【0228】 尤其優選的變體包括選自組 1-105 的一個或多個修飾：

組	變體	組	變體
1	A330L / I332E	54	S239D / D265L / N297D / I332E
2	D265F / N297E / I332E	55	S239D / D265T / N297D / I332E
3	D265Y / N297D / I332E	56	S239D / D265V / N297D / I332E
4	D265Y / N297D / T299L / I332E	57	S239D / D265Y / N297D / I332E
5	F241E / F243Q / V262T / V264F	58	S239D / I332D
6	F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E	59	S239D / I332E
7	F241E / F243R / V262E / V264R	60	S239D / I332E / A330I
8	F241E / F243R / V262E / V264R / I332E	61	S239D / I332N
9	F241E / F243Y / V262T / V264R	62	S239D / I332Q
10	F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E	63	S239D / N297D / I332E
11	F241L / F243L / V262I / V264I	64	S239D / N297D / I332E / A330Y
12	F241L / V262I	65	S239D / N297D / I332E / A330Y / F241S / F243H / V262T / V264T
13	F241R / F243Q / V262T / V264R	66	S239D / N297D / I332E / K326E
14	F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E	67	S239D / N297D / I332E / L235D
15	F241W / F243W / V262A / V264A	68	S239D / S298A / I332E
16	F241Y / F243Y / V262T / V264T	69	S239D / V264I / A330L / I332E
17	F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E	70	S239D / V264I / I332E
18	F243L / V262I / V264W	71	S239D / V264I / S298A / I332E
19	P243L / V264I	72	S239E / D265N
20	L328D / I332E	73	S239E / D265Q
21	L328E / I332E	74	S239E / I332D
22	L328H / I332E	75	S239E / I332E
23	L328I / I332E	76	S239E / I332N
24	L328M / I332E	77	S239E / I332Q
25	L328N / I332E	78	S239E / N297D / I332E
26	L328Q / I332E	79	S239E / V264I / A330Y / I332 E
27	L328T / I332E	80	S239E / V264I / I332 E
28	L328V / I332E	81	S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E
29	N297D / A330Y / I332E	82	S239N / A330L / I332E
30	N297D / I332E	83	S239N / A330Y / I332E
31	N297D / I332E / S239D / A330L	84	S239N / I332D
32	N297D / S298A / A330Y / I 332E	85	S239N / I332E
33	N297D / T299L / I332E	86	S239N / I332N
34	N297D / T299F / I332E / N297D / T299H / I332E	87	S239N / I332Q
35	N297D / T299I / I332E	88	S239N1S298A / I332E
36	N297D / T299L / I332E	89	S239Q / I332D

組	變體	組	變體
37	N297D / T299V / I332E	90	S239Q / I332E
38	N297E / I332E	91	S239Q / I332N
39	N297S / I332E	92	S239Q / I332Q
40	P230A / E233D / I332E	93	S239Q / V264I / I332E
41	P244H / P245A / P247V	94	S298A / I332E
42	S239D / A330L / I332E	95	V264E / N297D / I332E
43	S239D / A330Y / I332E	96	V264I / A330L / I332E
44	S239D / A330Y / I332E / K326E	97	V264I / A330Y / I332E
45	S239D / A330Y / I332E / K326T	98	V264I / I332E
46	S239D / A330Y / I332E / L234I	99	V264I / S298A / I332E
47	S239D / A330Y / I332E / L235D	100	Y296D / N297D / I332E
48	S239D / A330Y / I332E / V240I	101	Y296E / N297D / I332 E
49	S239D / A330Y / I332E / V264T	102	Y296H / N297D / I332E
50	S239D / A330Y / I332E / V266I	103	Y296N / N297D / I332E
51	S239D / D265F / N297D / I332E	104	Y296Q / N297I / I332E
52	S239D / D265H / N297D / I332E	105	Y296T / N297D / I332E
53	S239D / D265I / N297D / I332E		

【0229】 在一個實施方式中，特異性結合 HER2/neu 的分子(例如，抗 HER2/neu 抗體)，和/或特異性結合 PD-1 的分子(例如，抗 PD-1 抗體)包括在 Fc 區中具有至少一個修飾的變異的 Fc 區。在一個實施方式中，特異性結合 HER2/neu 的分子(例如，抗 HER2/neu 抗體)包括變異的 Fc 區，所述變異的 Fc 區具有至少一個修飾，相對於包括野生型 Fc 區的相同抗體，所述修飾增強了與 FcγRIIA 的結合和/或增強了 ADCC 活性。在某些實施方式中，變異的 Fc 區包括選自下述的至少一個取代：L235V、F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L，其中所述編號是如 Kabat 中 EU 索引的編號。

【0230】 在具體的實施方式中，變異的 Fc 區包括：

- (A)選自 F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L 的至少一個取代；
- (B)選自下述的至少兩個取代：
 - (1) F243L 和 P396L；
 - (2) F243L 和 R292P；和
 - (3) R292P 和 V305I；

(C)選自下述的至少三個取代：

(1) F243L、R292P 和 Y300L；

(2) F243L、R292P 和 V305I；

(3) F243L、R292P 和 P396L；和

(4) R292P、V305I 和 P396L；

(D)選自下述的至少四個取代：

(1) F243L、R292P、Y300L 和 P396L；和

(2) F243L、R292P、V305I 和 P396L；或

(E)選自下述的至少五個取代：

(1) F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L；和

(2) L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L。

【0231】 在另一具體的實施方式中，變異的 Fc 區包括下述取代：

(A) F243L、R292P 和 Y300L；

(B) L235V、F243L、R292P、Y300L 和 P396L；或

(C) F243L、R292P、Y300L、V305I 和 P396L。

【0232】 在一個實施方式中，特異性結合 PD-1 的分子(例如，抗 PD-1 抗體)，包括變異的 Fc 區，其相對於包括野生型 Fc 區的相同抗體具有降低與 FcγRIIIA (CD16A)的結合和/或降低 ADCC 活性的至少一個修飾。在某些實施方式中，變異的 Fc 區包括選自 L234A、L235A、D265A、N297Q 和 N297G 的至少一個取代，其中所述編號是如 Kabat 中 EU 索引的編號。在具體的實施方式中，變異的 Fc 區包括下述取代：L234A 和 L235A。

【0233】 可選地，使用固有地展示與 FcγRIIIA (CD16A)降低的(或基本上沒有)結合和/或降低的效應子功能(相對於野生型 IgG1 Fc 區展示的結合(SEQ ID NO: 1))的 Fc 區。在具體的實施方式中，特異性結合 HER2/neu 的分子(例如，抗

HER2/neu 抗體), 和/或特異性結合 PD-1 的分子(例如, 抗 PD-1 抗體), 包括 IgG2 Fc 區(SEQ ID NO: 50)或 IgG4 Fc 區(SEQ ID NO: 52), 任選地缺少 C-末端氨基酸殘基。在使用 IgG4 Fc 區的情況下, 本發明也包括引入穩定化突變, 比如 S228P, 如通 Kabat 中闡釋的 EU 索引編號(Lu 等, (2008) “The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of Igg4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation,” J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969), 以減少鏈交換的發生率。本領域已知的其他穩定化突變可引入 IgG4 Fc 區中(Peters, P 等, (2012) “Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability,” J. Biol. Chem. 287:24525-24533 ; PCT 專利公開號 WO 2008/145142)。在具體的實施方式中, 特異性結合 PD-1 的分子(例如, 抗 PD-1 抗體), 包括 IgG4 Fc 區和 S228P 突變。

【0234】 在其他實施方式中, 本發明包括本領域已知的任何 Fc 變體, 如下述文獻中公開的那些 Fc 變體, 的用途: Jefferis, R.等(2002) “Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcγR: Current Models,” Immunol. Lett. 82:57-65 ; Presta, L.G.等(2002) “Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function,” Biochem. Soc. Trans. 30:487-90 ; Idusogie, E.E.等(2001) “Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement,” J. Immunol. 166:2571-75 ; Shields, R.L.等(2001) “High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc γRI, Fc γRII, Fc γRIII, And FcγRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc γR,” J. Biol. Chem. 276:6591-6604 ; Idusogie, E.E.等(2000) “Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc,” J. Immunol. 164:4178-84 ; Reddy, M.P.等(2000) “Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4,” J. Immunol. 164:1925-1933 ; Xu, D.等(2000)

“In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies,” Cell. Immunol. 200:16-26 ; Armour, K.L.等(1999) “Recombinant human IgG Molecules Lacking Fcγ Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities,” Eur. J. Immunol. 29:2613-24 ; Jefferis, R.等(1996) “Modulation Of Fc(γ)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions,” Immunol. Lett. 54:101-04 ; Lund, J.等(1996) “Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc γ Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains,” J. Immunol. 157:4963-4969 ; Hutchins 等(1995) “Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A γ 4 Variant Of Campath-1H,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84 ; Jefferis, R.等(1995) “Recognition Sites On Human IgG For Fc γ Receptors: The Role Of Glycosylation,” Immunol. Lett. 44:111-17 ; Lund, J.等(1995) “Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc γ Receptors,” FASEB J. 9:115-19 ; Alegre, M.L.等(1994) “A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo,” Transplantation 57:1537-1543 ; Lund 等(1992) “Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc γ R11,” Mol. Immunol. 29:53-59 ; Lund 等(1991) “Human Fc γ RI And Fc γ RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG,” J. Immunol. 147:2657-2662 ; Duncan, A.R.等(1988) “Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG,” Nature 332:563-564 ; 美國專利號 5,624,821、5,885,573、6,194,551、7,276,586 和 7,317,091 和 PCT 專利公開號 WO 00/42072 和 WO 99/58572。在一些實施方式中，本發明的分子進一步包括一個或多個糖基化位點，以便一個或

多個碳水化合物部分被共價連接至分子。優選地，與未修飾的分子相比，Fc 區中具有一個或多個糖基化位點和/或一個或多個修飾的本發明的分子賦予或具有增強的抗體介導的效應子功能，例如，增強的 ADCC 活性。在一些實施方式中，本發明進一步包括這樣的分子：所述分子包括已知直接或間接與 Fc 區的碳水化合物部分相互作用的氨基酸的一個或多個修飾，所述氨基酸包括但不限於在下述位置的氨基酸：241、243、244、245、245、249、256、258、260、262、264、265、296、299 和 301。直接或間接與 Fc 區的碳水化合物部分相互作用的氨基酸是本領域已知的，見，例如，Jefferis, R.等(1995)“Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation,” Immunol. Lett. 44:111-17。

【0235】 在另一實施方式中，本發明包括這樣的分子：所述分子已經通過在分子的一個或多個位點中引入一個或多個糖基化位點被修飾，優選不改變分子的功能，例如，與靶抗原或 FcγR 的結合活性。糖基化位點可被引入到本發明分子的可變結構域和/或恒定結構域中。

【0236】 因此，在一些實施方式中，本發明包括通過添加或刪除糖基化位點修飾本發明分子的碳水化合物含量的方法。修飾抗體(和包括抗體結構域，例如，Fc 區的分子)的碳水化合物含量的方法是本領域熟知的並且包括在本發明中，見，例如，美國專利號 6,218,149、EP 0 359 096 B1、美國專利公開號 US 2002/0028486、WO 03/035835、美國專利公開號 2003/0115614、美國專利號 6,218,149、美國專利號 6,472,511，其所有均通過引用以其整體併入本文。在其他實施方式中，本發明包括通過刪除分子的一個或多個內源碳水化合物部分，修飾本發明分子的碳水化合物含量的方法。在具體的實施方式中，本發明包括通過修飾與 297 相鄰的位置而改變抗體 Fc 區的糖基化位點。在具體的實施方式中，本發明包括修飾 296 位，從而 296 位而不是 297 位被糖基化。

【0237】 可通過技術，比如在 Antibody Engineering Technology Art(抗體工程化技術工藝)中描述的那些技術，或通過其他方式，修飾效應子功能。例如，可在 Fc 區中引入半胱氨酸殘基，從而允許在該區域中形成鏈間二硫鍵，導致產生可具有改善的內化能力和/或提高的補體-介導的細胞殺傷和 ADCC 的同源二聚化抗體。見 Caron, P.C.等(1992) “Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies,” J. Exp. Med. 176:1191-1195；Shopes, B. (1992) “A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity,” J. Immunol. 148(9):2918-2922。也可使用如在 Wolff, E.A.等(1993) “Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice,” Cancer Research 53:2560-2565 中描述的異源雙功能交聯劑製備具有增強的抗腫瘤活性的同源二聚化抗體。可選地，抗體可被工程化，其具有雙 Fc 區並且從而可具有增強的補體分解和 ADCC 能力(Stevenson, G.T.等(1989) “A Chimeric Antibody With Dual Fc Regions (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge,” Anti-Cancer Drug Design 3:219-230。

【0238】 E.多肽綴合物(Conjugates)

【0239】 本發明的分子可與異源多肽或其部分經重組融合或化學上綴合(包括共價和非共價綴合)以產生融合蛋白。優選地，本發明的分子(尤其是抗體)與異源多肽的至少 10、至少 15、至少 20、至少 25、至少 30、至少 40、至少 50、至少 60、至少 70、至少 80、至少 90 或至少 100 個氨基酸融合，以產生期望的融合蛋白。融合不必是直接的，也可通過連接體序列發生。分子(例如，抗體和多肽)可與治療劑綴合，以便修飾給定的生物學應答，影響(例如，延長)治療劑的血清半衰期或使治療劑靶向至細胞的特定的亞類。它們也可與標記序列(例如，六組氨酸肽或 “flag” 標籤)融合，以利於純化。用於將這類治療性部分與抗體綴合的技術是熟知的；見，例如，Hellstrom 等, “Antibodies For Drug Delivery”, in

第 83 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

Controlled Drug Delivery (第 2 版, Robinson 等(編輯), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.)。

【0240】 另外的融合蛋白可通過基因改組、基序改組、外顯子改組和/或密碼子改組(統稱為“DNA 改組”)的技術產生。DNA 改組可用于改變本發明分子的活性(例如，具有更高親和力和較低解離速率的抗體)。本發明的分子或它們的編碼核酸在重組之前，可通過易錯 PCR、隨機核苷酸插入或其他方法進行隨機誘變而被進一步改變。編碼本發明分子的多核苷酸的一個或多個部分，可與一個或多個異源分子的一個或多個組分、基序、區段、部分、結構域、片段等重組。

【0241】 F.雙抗體和 DART®雙抗體

【0242】 本發明也提供了雙抗體和雙親和力重靶向試劑(尤其是 DART®雙抗體(MacroGenics, Inc.))。因此，本發明另外包括雙抗體(尤其地，DART®雙抗體)分子，其包括形成至少兩個表位結合位點的至少兩個共價結合的多肽鏈，其中一個表位結合位點特異性結合 HER2/neu 和其中第二個表位結合位點結合細胞表面受體(或其配體)，其調節免疫檢查點。優選地，這類雙抗體結合 HER2/neu 和 PD-1。尤其地，包括雙抗體和 DART，其包括來自本發明的抗 HER2/neu 抗體和抗 PD-1 抗體的抗原結合結構域。

【0243】 下面描述了同源二聚化雙抗體和穩定的、共價結合的異源二聚化非單-特異性雙抗體的設計和構建，例如，美國專利公開號 2013-0295121、2010-0174053 和 2009-0060910、歐洲專利公開號 EP 2714079、EP 2601216、EP 2376109、EP 2158221 和 PCT 公開號 WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538、WO 2008/157379、WO 2006/113665 和 Sloan, D.D.等(2015) “Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells,” PLoS

Pathog. 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233 ; Al Hussaini, M.等(2015) “Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform,” Blood 127(1):122-131 ; Chichili, G.R.等(2015) “A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates,” Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82 ; Moore, P.A.等(2011) “Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,” Blood 117(17):4542-4551 ; Veri, M.C.等(2010) “Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,” Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943 ; Johnson, S.等(2010) “Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion,” J. Mol. Biol. 399(3):436-449 ; Marvin, J.S.等(2005) “Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies,” Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658 ; Olafsen, T.等(2004) “Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,” Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27 ; Holliger, P.等(1993) “‘Diabodies’: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448。雙抗體分子的每條多肽鏈均包括來自相同或不同抗體的 VL 區和 VH 區，其被共價連接，以便結構域被限制自組裝。多肽鏈中的兩條的相互作用將產生兩個 VL-VH 配對，形成兩個表位結合位點，即，二價分子。結構域可通過肽連接體分開並且多肽鏈可被工程化，以在每條鏈上包括至少一個半胱氨酸殘基，從而可形成鏈間二硫鍵來穩定雙抗體。

【0244】 在優選的實施方式中，雙抗體的第一多肽鏈包括：

第 85 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

(i)結構域(A)，其包括對 HER2/neu 的表位特異性的第一免疫球蛋白的輕鏈可變結構域的結合區(VL1)；

(ii)結構域(B)，其包括對 PD-1 的表位特異性的第二免疫球蛋白的重鏈可變結構域的結合區(VH2)；和

(iii)任選地，結構域(C)。

這類雙抗體的第二多肽鏈包括：

(i)結構域(D)，其包括對這類 PD-1 的表位特異性的第二免疫球蛋白的輕鏈可變結構域的結合區(VL2)；

(ii)結構域(E)，包括對這類 HER2/neu 的表位特異性的第一免疫球蛋白的重鏈可變結構域的結合區(VH1)；和

(iii)任選地，結構域(F)。

【0245】 雙抗體結構域(A)和(B)不彼此締合形成表位結合位點。類似地，雙抗體結構域(D)和(E)不彼此締合形成表位結合位點。相反地，雙抗體結構域(A)和(E)締合形成結合 HER2/neu 表位的結合位點，並且雙抗體結構域(B)和(D)締合形成結合 PD-1 表位的結合位點。

【0246】 第一和第二多肽鏈的可變結構域可以可選地顛倒，以便雙抗體的第一多肽鏈包括：

(i)結構域(A)，其包括對於 PD-1 的表位特異性的第二免疫球蛋白的輕鏈可變結構域的結合區(VL2)；

(ii)結構域(B)，其包括對於 HER2/neu 的表位特異性的第一免疫球蛋白的重鏈可變結構域的結合區(VH1)；和

(iii)任選地，結構域(C)；

並且這類雙抗體的第二多肽鏈包括：

(i)結構域(D)，其包括對於這類 HER2/neu 的表位特異性的第一免疫球蛋白的輕鏈可變結構域的結合區(VL1)；

(ii)結構域(E)，其包括對於這類 PD-1 的表位特異性的第二免疫球蛋白的重鏈可變結構域的結合區(VH2)；和

(iii)任選地，結構域(F)。

【0247】 在顛倒的構造中，雙抗體結構域(A)和(E)締合形成結合 PD-1 表位的結合位點，並且雙抗體結構域(B)和(D)締合形成結合 HER2/neu 表位的結合位點。

【0248】 當存在時，結構域(C)和(F)共價締合在一起。結構域(C)和(F)可以是異源二聚體促進結構域，其利於第一和第二多肽鏈的相互作用。異源二聚化結構域可用於產生雙抗體，如下述文獻中描述的：例如，PCT 公佈號：WO 2012/162068、WO 2012/018687、WO 2010/080538、WO 2008/157379；和 WO 2006/113665，其每一篇通過引用併入本文。結構域(C)和/或(F)可包括 Fc 結構域或其部分(例如 CH2 結構域或 CH3 結構域)。Fc 結構域或其部分可源自任何免疫球蛋白同種型或同種異型，包括但不限於，IgA、IgD、IgG、IgE 和 IgM。在優選的實施方式中，Fc 結構域(或其部分)源自 IgG。在具體的實施方式中，IgG 同種型是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其同種異型。在一個實施方式中，雙抗體分子包括 Fc 結構域，所述 Fc 結構域包括獨立地選自任何免疫球蛋白同種型的 CH2 結構域和 CH3 結構域(即，Fc 結構域包括源自 IgG 的 CH2 結構域和源自 IgE 的 CH3 結構域或源自 IgG1 的 CH2 結構域和源自 IgG2 的 CH3 結構域等)。Fc 結構域可被工程化到組成本發明的雙抗體分子的多肽鏈中相對於所述多肽鏈的其他結構域或部分的任何位置中(例如，Fc 結構域或其部分，可以在多肽鏈的 VL 和 VH 結構域的 C-末端；或其可以在 VL 和 VH 結構域的 N-末端；或其可以在一個結構域的 N-末端和另一個的 C-末端(即，在多肽鏈的兩個結構域之間)等)。

【0249】 雙抗體分子的多肽鏈中的 Fc 結構域優選地二聚化，從而導致形成展示免疫球蛋白樣特性，例如，Fc-FcγR，相互作用的雙抗體分子。包括 Fc 的雙抗體可以是例如包括兩條多肽鏈的二聚體，每條多肽鏈各包括 VH 結構域、VL 結構域和 Fc 結構域。所述多肽鏈的二聚化產生包括 Fc 結構域的二價雙抗體，但是結構與未修飾的二價抗體不同。這類雙抗體分子相對於野生型免疫球蛋白展示改變的表型，例如，改變的血清半衰期、結合特性等。在其他實施方式中，包括 Fc 結構域的雙抗體分子可以是四聚體。這類四聚體包括兩條‘較重的’多肽鏈，即，包括 VL、VH 和 Fc 結構域的多肽鏈，和兩條‘較輕的’多肽鏈，即，包括 VL 和 VH 的多肽鏈。較輕的鏈和較重的鏈相互作用以形成單體，並且所述單體經它們的未配對的 Fc 結構域相互作用，以形成 Ig 樣分子。這類 Ig 樣雙抗體是四價的。

【0250】 如上描述形成四特異性的雙抗體分子需要四條不同多肽鏈的相互作用。這類相互作用難以在單細胞重組生產體系中有效率地實現，原因是許多潛在的鏈的變體錯配。降低錯配概率的一個方案是將“杵入臼(knobs-into-holes)”型突變工程化到期望的多肽鏈對中。這類突變相對於同源二聚化有利於異源二聚化。例如，就 Fc-Fc-相互作用而言，氨基酸取代(優選地用包括形成“杵”的大側基的氨基酸，例如，色氨酸進行取代)可被引入到 CH2 或 CH3 結構域中，以便空間干擾會防止與類似突變的結構域的相互作用，並且會迫使突變的結構域與這樣的結構域配對：在所述結構域中，已經工程化進了互補或適應性突變，即‘臼(hole)’，(例如用甘氨酸進行取代)。這組突變可被工程化到任何組成雙抗體分子的多肽對中，並且進一步地，可被工程化到所述多肽鏈對的任何部分中。相比同二聚化而利於異源二聚化的蛋白質工程的方法是本領域熟知的，尤其就免疫球蛋白樣分子的工程化而言，並且包括在本文中(見例如，Ridgway 等(1996) “Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For

Heavy Chain Heterodimerization,” Protein Engr. 9:617-621 ; Atwell 等(1997) “Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,” J. Mol. Biol. 270: 26-35 ; 和 Xie 等(2005) “A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,” J. Immunol. Methods 296:95-101 ; 其每一篇通過引用以其整體併入本文。

【0251】 本發明也包括雙抗體分子，其包括變異的 Fc 或變異的鉸鏈-Fc 結構域(或其部分)，相對於相當的野生型 Fc 結構域或鉸鏈-Fc 結構域(或其部分)，所述變異的 Fc 結構域包括至少一種氨基酸修飾(例如取代，插入缺失)。包括變異的 Fc 結構域或鉸鏈-Fc 結構域(或其部分)的分子(例如，抗體)，相對於包括野生型 Fc 結構域或鉸鏈-Fc 結構域或其部分的分子，通常具有改變的表型。變體表型可表達為改變的血清半衰期、改變的穩定性、改變的對細胞酶的易感性或在 NK 依賴性或巨噬細胞依賴性試驗中測定的改變的效應子功能。上面公開了被鑒定為改變效應子功能的 Fc 結構域修飾。

【0252】 本發明也包括這樣的分子，其包括鉸鏈結構域。鉸鏈結構域源自任何免疫球蛋白同種型或包括 IgA、IgD、IgG、IgE 和 IgM 的同種異型。在優選的實施方式中，鉸鏈結構域源自 IgG，其中 IgG 同種型是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其同種異型。所述鉸鏈結構域可與 Fc 結構域一起被工程化到組成雙抗體分子的多肽鏈中，以便雙抗體分子包括鉸鏈-Fc 結構域。在某些實施方式中，鉸鏈和 Fc 結構域獨立地選自本領域已知的或本文列舉的任何免疫球蛋白同種型。在其他實施方式中，鉸鏈和 Fc 結構域由多肽鏈的至少一個其他結構域，例如 VL 結構域，分開。鉸鏈結構域，或任選地鉸鏈-Fc 結構域，可被工程化到本發明的多肽鏈中相對於所述多肽鏈的其他結構域或部分的任何位置中。在某些實施方式中，本發明的多肽鏈包括鉸鏈結構域，該鉸鏈結構域在多肽鏈的 C-末端，其

中所述多肽鏈不包括 Fc 結構域。在仍其他實施方式中，本發明的多肽鏈包括鉸鏈-Fc 結構域，該鉸鏈-Fc 結構域在多肽鏈的 C-末端。在進一步實施方式中，本發明的多肽鏈包括鉸鏈-Fc 結構域，該鉸鏈-Fc 結構域在多肽鏈的 N-末端。

【0253】 儘管不意圖受具體作用機制的限制，相對於本領域已知的治療抗體，本發明的雙抗體分子展示增強的治療效力，部分是由於雙抗體特異性結合以降低水準表達特定抗原(例如，Her2/neu 或 PD-1)的靶細胞的能力所致，例如，憑藉雙抗體由於雙抗體-表位相互作用的改善的親合力而較長時間保留在靶細胞上的能力。因此，本發明的雙抗體在治療、預防或管控其中靶抗原在靶細胞群中低水準表達的亞群體的疾病或病症如癌症中具有特別效用。

【0254】 雙抗體分子可使用各種方法產生，包括從頭蛋白質合成和編碼結合蛋白質的核酸的重組表達。可通過重組方法(例如，較早製備的期望多核苷酸的變體的 PCR 誘變)或通過固相 DNA 合成產生期望的核酸序列。優選地使用重組表達方法。因為遺傳密碼的簡並性，多種核酸序列編碼每種免疫球蛋白氨基酸序列，並且本發明包括編碼本文所述的結合蛋白質的所有核酸。

【0255】 G.抗體的生產

【0256】 可以以任何各種方式產生或獲得本發明優選實施方式的抗體。例如，這類抗體可從血漿獲得、經合成獲得、經重組獲得或經轉基因獲得、經細胞(例如，雜交瘤培養)獲得等。合成蛋白質的生產已經描述在，例如，Dawson, P.E. 等(2000) “Synthesis Of Native Proteins By Chemical Ligation,” Annu. Rev Biochem. 69:923-960；Wilken, J.等(1998) “Chemical Protein Synthesis,” Curr. Opin. Biotechnol. 9(4):412-426；和 Kochendoerfer, G.G.等(1999) “Chemical Protein Synthesis,” Curr. Opin. Chem. Biol. 3(6):665-671 中。

【0257】 可通過如下重組製備抗體：首先從宿主動物分離製備的抗體，獲得基因序列，和使用基因序列在宿主細胞(例如，CHO 細胞)中重組表達抗體。

包含感興趣的多核苷酸的載體可通過許多適當方式中的任何方式被引入到宿主細胞中，所述適當方式包括電穿孔、採用氯化鈣、銣氯化物、磷酸鈣、DEAE-葡聚糖或其他物質的轉染；微彈轟擊(microprojectile bombardment)；脂轉染；和感染(例如，在載體是感染劑諸如痘苗病毒的情況下)。引入載體或多核苷酸的選擇將通常取決於宿主細胞的特徵。

【0258】 能夠過表達異源 DNA 的任何宿主細胞均可被使用，用於分離編碼感興趣的抗體、多肽或蛋白質的基因的目的。合適的哺乳動物宿主細胞的非的限制性實例包括但不限於 COS、HeLa 和 CHO 細胞。優選地，相比於宿主細胞中相應的感興趣的內源抗體或蛋白質（如果存在），宿主細胞以約 5-倍，更優選 10-倍，甚至更優選 20-倍的水準表達 cDNA。通過免疫試驗或 FACS 實現篩選特异性結合 HER2/neu 或 PD-1 的宿主細胞。經細胞(例如，雜交瘤)培養生產抗體已經描述在下述文獻中：例如，Laffly, E.等(2005) “Monoclonal And Recombinant Antibodies, 30 Years After...,” Hum. Antibodies. 14(1-2):33-55；Aldington, S.等(2007) “Scale-Up Of Monoclonal Antibody Purification Processes,” J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 848(1):64-78；S.S. Farid (2006) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 848(1):8-18；Birch, J.R.等(2006) “Antibody Production,” Adv. Drug Deliv. Rev. 58(5-6):671-685；Even, M.S.等(2006) “Serum-Free Hybridoma Culture: Ethical, Scientific And Safety Considerations,” Trends Biotechnol. 24(3):105-108；Graumann, K.等(2006) “Manufacturing Of Recombinant Therapeutic Proteins In Microbial Systems,” Biotechnol. J. 1(2):164-86、美國專利號 7,112,439；和美國專利公開號 20070037216 和 20040197866。

【0259】 可應用的另一方法是在植物(例如，煙草)或轉基因奶中表達抗體序列。用於在植物或奶中重組表達抗體的適當的方法已經被公開了(見，例如，Peeters, K.等(2001) “Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants,”

Vaccine 19:2756 ; Lonberg, N.等(1995) “Human Antibodies From Transgenic Mice,” Int. Rev. Immunol 13:65-93 ; 和 Pollock 等(1999) “Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies,” J. Immunol Methods 231:147-157)。

【0260】 製備抗體衍生物，例如，人源化的抗體、優化的抗體、單鏈抗體等的合適的方法是本領域已知的。可經噬菌體展示方法產生具有例如對於其抗原增加的親和力的抗體的衍生物。稱為親和力成熟的技術採用誘變或 CDR 步移 (walking) 和使用關聯抗原 (cognate antigen) 的再選擇，來鑒定與初始抗體或親本抗體相比以更高的親和力結合抗原的抗體(見，例如，Glaser, S.M.等(1992) “Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System,” J. Immunology 149:3903 ; Wu, H.等(1998) “Stepwise in vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An AlphaV Beta3-mAb,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 95:6037-6042 ; Yelton, D.E.等(1995) “Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis,” J. Immunology 155:1994-2004 ; Schier, R 等(1996) “Isolation Of Picomolar Affinity anti-c-erbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site,” J. Mol. Bio. 263:551-567)。

【0261】 可使用轉基因小鼠產生全人抗體(也稱為完全人抗體)，所述小鼠不能表達內源免疫球蛋白重鏈和輕鏈基因，但是可表達人重鏈和輕鏈基因。用於產生人抗體的該技術的概述描述在以下文獻中：例如，Lonberg, N.等(1995) “Human Antibodies From Transgenic Mice,” Int. Rev. Immunol. 13:65-93，和美國專利號 5,633,425。也可使用本領域已知的其他技術，包括噬菌體展示文庫(如 Hoogenboom, H.R.等(1991) “By-Passing Immunisation. Human Antibodies From Synthetic Repertoires Of Germline VH Gene Segments Rearranged In Vitro,” J. Mol. Biol. 227:381 和 Marks, J.D.等(1991) “By-Passing Immunization. Human Antibodies

第 92 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

From V-Gene Libraries Displayed On Phage,” J. Mol. Biol. 222:581 描述的)或 “導向選擇(guided selection)” (如例如 Jespers, L.S.等(1994) “Guiding The Selection Of Human Antibodies From Phage Display Repertoires To A Single Epitope Of An Antigen,” Biotechnology 12:899-903 中描述的)產生全人抗體。被設計為產生更期望的(例如，全人抗體)或更強免疫應答的轉基因動物也可用於產生人源化抗體或人抗體。這類技術的例子是 Xenomouse™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA)和 HuMAb-Mouse®和 TC Mouse™ (都來自 Medarex, Inc., Princeton, NJ)。

【0262】 本發明包括對本文所述抗體(即，抗 HER2/neu 抗體和抗 PD-1 抗體)的修飾，包括功能上等同的抗體和不明顯影響這類分子性質的融合多肽以及具有增強的降低的活性的變體。多肽的修飾在本領域中是常規實操作，因而不需要在本文詳細描述。修飾的多肽的實例包括這樣的多肽：其具有氨基酸殘基的保守取代、未明顯有害改變功能活性的氨基酸的一個或多個缺失或添加，或使用化學類似物。可彼此保守取代的氨基酸殘基包括但不限於：甘氨酸/丙氨酸；絲氨酸/蘇氨酸；纈氨酸/異亮氨酸/亮氨酸；天冬醯胺/穀氨醯胺；天冬氨酸/谷氨酸；賴氨酸/精氨酸；和苯基丙氨酸/酪氨酸。這些多肽還包括糖基化和非糖基化多肽以及具有其它翻譯後修飾的多肽，所述其它翻譯後修飾，諸如例如，用不同糖進行糖基化、乙醯化和磷酸化。優選地，氨基酸取代應該是保守的，即，取代的氨基酸會具有與原始氨基酸類似的化學性質。這樣的保守取代在本領域中是已知的，並且已經在上文提供實例。氨基酸修飾範圍可從改變或修飾一個或多個氨基酸到區域諸如可變區的完全重新設計(redesign)。可變結構域中的變化可改變結合親和力和/或特異性。修飾的其它方法包括利用本領域中已知的偶合技術，包括但不限於酶促手段、氧化取代和螯合。修飾可用於例如，連接標籤用於免疫分析，諸如連接放射性部分用於放射免疫分析。修飾的多肽利用本領域中確定的方法製備，並且可利用本領域中已知的標準測定來篩選。

【0263】 H.結合分子的表徵

【0264】 可以各種方式表徵結合分子，比如抗體。尤其地，可測試抗體特異性結合抗原，例如，HER2/neu、PD-1 的能力，或當分子包括 Fc 區(或其部分)時，測試展示 Fc-FcγR 相互作用，即，Fc 區(或其部分)特異性結合 FcγR 的能力。

【0265】 可用於分析特異性結合、交叉反應性和 Fc-FcγR 相互作用的免疫試驗包括但不限於使用下述技術的競爭和非競爭試驗系統：比如蛋白質印跡、放射免疫試驗、ELISA(酶聯免疫吸附試驗)、“夾心”免疫試驗、免疫沉澱試驗、沉澱(precipitin)反應、凝膠擴散沉澱(precipitin)反應、免疫層析試驗、免疫擴散試驗、凝集試驗、補體結合試驗、免疫放射測定試驗、螢光免疫試驗和蛋白質 A 免疫試驗等。(見，例如，Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M.等編輯, 1987) Greene Pub. Associates, New York, NY)。

【0266】 通常通過標準抗體-抗原試驗，比如 BIAcore 競爭試驗、飽和試驗或免疫試驗比如 ELISA 或 RIA，測量或測定對於靶抗原的結合親和力。使用本領域技術人員已知的任何技術的螢光啟動細胞分選(FACS)可用於基於免疫學或功能的試驗，以表徵本發明的分子。基於表面等離子共振的試驗可用於表徵抗原結合結構域或 Fc-FcγR 結合的動力學參數。

【0267】 包括Fc區(或其部分)和/或包括對FcγR 特異性的表位元結合結構域分子與 FcγR 結合的表徵可根據 Antibody Engineering Technology Art(抗體工程化技術工藝)中描述的方法進行。用於效應細胞功能的試驗是本領域悉知的，例如如下述文獻中所描述的：Perussia, B.等(2000) “Assays for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC (Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells,” Methods Mol. Biol. 121:179-192；Lehmann, A.K.等(2000) “Phagocytosis: Measurement By Flow Cytometry,” J. Immunol. Methods 243(1-2):229-242；Baggiolini, M.等(1998) “Cellular Models For The Detection And

第 94 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

Evaluation Of Drugs That Modulate Human Phagocyte Activity,” *Experientia* 44(10):841-848 ; Brown, E.J. (1994) “In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction,” *Methods Cell Biol.* 45:147-164 ; 和 Munn, D.H.等(1990) “Phagocytosis Of Tumor Cells By Human Monocytes Cultured In Recombinant Macrophage Colony-Stimulating Factor,” *J. Exp. Med.* 172:231-237 。

【0268】 VII.治療方法

【0269】 特異性結合 HER2/neu 的分子和特異性結合細胞表面受體(或其配體)的、參與調節免疫檢查點的分子(尤其是 PD-1)可用於在患癌症或其他疾病的個體中的治療性目的。在一個實施方式中，同時施用具有這類結合特異性的分子。如本文所使用，這樣的“同時(concurrent)”施用旨在表示：

(A)施用包含特異性結合 HER2/neu 的分子和特異性結合細胞表面受體(或其配體)的、參與調節免疫檢查點的分子(尤其是 PD-1)的單藥物組合物。這類分子可以是相同的分子(例如，雙抗體)或可以是不同的分子(例如，抗 HER2/neu 抗體或其抗原結合片段，和抗 PD-1-抗體或其抗原結合片段)。

或；

(B)分開施用兩種或更多種藥物組合物，其中一種組合物包含特異性結合 HER2/neu 的分子，而其中另一種組合物包含特異性結合細胞表面受體(或其配體)的、參與調節免疫檢查點的分子(尤其是 PD-1)，其中組合物在在 24 小時時間內施用。

【0270】 在第二個實施方式中，採用兩種不同的分子，並且“相繼(sequentially)”施用分子(例如，施用抗 HER2/neu 抗體，稍後提供抗 PD-1 抗體，或反之亦然)。在這類相繼施用中，第二施用的組合物最優選地在施用第一施用的組合物之後至少 24 小時或更長時間施用。

【0271】 提供療法(therapy)或“治療(treating)”是指在損傷、病理或病況的治療或改善方面的任何成功跡象，包括任何客觀參數或主觀參數，例如症狀的減輕、減緩、減少；或使患者對損傷、病理或病況更加耐受；減緩退化或衰弱的速率；使退化的終點不太衰弱；或改善患者的身體或精神健康。症狀的治療或改善可以基於客觀參數或主觀參數，包括身體檢查、神經精神檢測和/或精神病學評定的結果。

【0272】 用於治療的優選受試者包括經受疾病和其他病理狀態的動物，最優選地是哺乳動物物種，比如人或其他靈長類，以及馴養動物，比如狗、貓等。“患者”指受試者，優選哺乳(包括人)。

【0273】 在一個實施方式中，單克隆抗 HER2/neu 抗體和單克隆抗 PD-1 抗體可用於免疫療法，所述免疫療法針對表達 HER2/neu 的不同組織的癌細胞，尤其是癌細胞，比如乳腺癌、惡性膠質瘤、宮頸癌、轉移結直腸癌、胃癌、肝細胞癌、白血病、肺癌、轉移黑素瘤、血管化胰腺癌和轉移性前列腺癌。這類免疫療法可例如足以減少癌症細胞的細胞分裂、延遲轉移的發展(例如，發作和程度)和/或促進免疫系統對癌細胞的活性。

【0274】 應理解，分子以促進在生理學(例如，體內)條件下結合的濃度被施用。分子(例如，抗體或雙抗體)可與增強或引導個體自身免疫應答的另外的試劑，比如增強 ADCC 的試劑一起施用。

【0275】 在仍另一實施方式中，一種或多種這類分子(例如，抗體或雙抗體)可與放射性分子、毒素(例如，加利車黴素)、化療分子、脂質體或包含化療化合物的其他小泡綴合或結合，並且被施用至需要這種治療的個體，以使這些化合物靶向包含被抗體識別的抗原的癌症細胞，因此消除癌症或患病的細胞。不限於任何具體的理論，抗體(例如，抗 HER2/neu 抗體)通過在其表面攜帶 HER2/neu 的細胞被內化，因此將綴合部分遞送至細胞，以誘導治療作用，並且

特異性結合細胞表面受體(或其配體)的、參與調節免疫檢查點的分子(尤其是PD-1)促進免疫系統的啟動。

【0276】 在仍另一實施方式中，這類分子(例如，抗體或雙抗體)可在外科去除腫瘤時用作輔助療法，以便延遲、抑制或預防轉移的發展。也可在外科手術之前施用分子(新輔助療法)，以便減小腫瘤的尺寸，因此確保外科手術能夠進行或簡化外科手術、在外科手術期間節約組織，和/或減少任何產生的缺陷。

【0277】 本發明的抗 HER2/neu 抗體尤其可用於治療和/或預防期望 FcγR 介導的效應細胞功能(例如，ADCC)的疾病或病症(例如，癌症)。例如，本發明的抗 HER2/neu 抗體可結合細胞表面抗原和免疫效應細胞(例如，NK 細胞)上的 FcγR (例如，FcγRIIIA)，刺激針對所述細胞的效應子功能(例如，ADCC、CDC、吞噬、調理等)。在一些實施方式中，本發明的抗 HER2/neu 抗體尤其適於治療癌症。標準單克隆抗體療法的效力取決於受試者的 FcγR 多態性。Cartron, G.等(2002) “Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor FcγRIIIa Gene,” Blood 99:754-758；Weng, W.K.等(2003) “Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma,” J Clin Oncol. 21(21):3940-3947。這些受體在效應細胞的表面上表達並且介導 ADCC。高親和力等位基因提高效應細胞介導 ADCC 的能力。尤其地，本發明的抗 HER2/neu 抗體包括變異的 Fc 區，其展示對於效應細胞上的 FcγR 增強的親和力(相對於野生型 Fc 區)，因此為患者提供了更好的免疫治療試劑，無論他們的 FcγR 多態性如何。

【0278】 VIII. 可治療的病症

【0279】 可由本發明的各個實施方式治療的示例性病症包括但不限於增生性病症，尤其是癌症(和更尤其地，表達 HER2/neu 的癌症)。在各個實施方式

中，本發明包括用於治療、預防或管理受試者中疾病或病症的方法和組合物，包括向受試者施用治療有效量的特異性結合 HER2/neu 的分子和特異性結合細胞表面受體(或其配體)的、參與調節免疫檢查點的分子(例如，PD-1)。例如，本發明的分子尤其用於預防、抑制、減少原發性腫瘤的生長或復原(regression)，以及癌細胞的轉移。儘管不意圖受具體作用機制的限制，但是本發明的分子可介導針對癌細胞的效應子功能、促進免疫系統針對癌細胞的啟動、交聯細胞表面抗原和/或癌細胞上的受體和增強細胞凋亡或負生長調節信號傳導，或其組合，導致腫瘤清除和/或腫瘤減小。

【0280】 對於 FcγRIIB 具有降低的親和力和對於 FcγRIIIA 和/或 FcγRIIA 具有增加的親和力的抗體在 FcγR 結合時，可導致增強的啟動應答，因此對於治療和/或預防癌症具有增強的治療效力。可通過本文的方法治療的癌症的非限制性例子包括急性骨髓淋巴瘤、腎上腺癌、腺癌、基底細胞癌症(basal cancer)、膀胱癌、骨癌、骨和結締組織肉瘤、腦癌、乳腺癌、支氣管癌、宮頸癌、絨毛膜癌、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、結腸癌、結直腸癌、子宮內膜癌、食管癌、眼癌、輸卵管癌、膽囊癌、胃腸癌、神經膠質瘤、毛細胞白血病、肝細胞癌、霍奇金疾病、肝內膽管癌症、關節癌、卡波西氏肉瘤、腎癌、喉癌、肝癌、白血病、肺癌、成淋巴細胞性白血病、淋巴瘤、惡性間皮瘤、成神經管細胞瘤、黑素瘤、間皮瘤、中耳癌、多發性骨髓瘤、骨髓瘤、粘液肉瘤、鼻腔癌、鼻咽癌、成神經細胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小細胞肺癌、鼻癌、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、陽莖癌症 (penal cancer)、腹膜癌、咽癌、腦垂體癌、前列腺癌、直腸癌、腎癌、唾液腺癌、皮膚癌、軟組織肉瘤、鱗狀細胞癌、胃癌、睪丸癌、甲狀腺癌、尿道癌、子宮癌、陰道癌、睪丸癌、外陰癌和腎胚細胞腫瘤。

【0281】 在一些實施方式中，癌症是造血癌症或血液相關的癌症，比如淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、淋巴惡性腫瘤、脾的癌症和淋巴結的癌症。在優選的實施方式中，癌症是 B 細胞相關的癌症，比如，例如，高、中或低級淋巴瘤(包括 B 細胞淋巴瘤比如，例如，伯基特淋巴瘤、彌散性大細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、邊緣區淋巴瘤、粘膜相關的淋巴組織 B 細胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、小淋巴細胞淋巴瘤和 T 細胞淋巴瘤)和白血病(包括慢性淋巴細胞性白血病，比如 B 細胞白血病(CD5+ B 淋巴細胞)、慢性骨髓白血病、淋巴白血病，比如急性成淋巴細胞白血病、骨髓發育不良、骨髓白血病，比如急性髓細胞樣白血病，和繼發性白血病)、多發性骨髓瘤，比如漿細胞惡性腫瘤，和其他血液學和/或 B 細胞或 T-細胞相關的癌症。其他示例性癌症是另外的造血細胞的癌症，包括多形核白細胞，比如嗜鹼性粒細胞、嗜伊紅粒細胞、嗜中性粒細胞和單核細胞、樹突細胞、血小板，紅細胞和天然殺傷細胞。

【0282】 在一些實施方式中，癌症是其中表達 HER2/neu 的癌症。在一些實施方式中，癌症是其中表達 HER2/neu 的乳腺癌、胃癌，前列腺癌、子宮癌、卵巢癌、結腸癌、子宮內膜癌、腎上腺癌、非小細胞肺癌、頭頸癌、喉癌、肝癌、腎癌、惡性膠質瘤或胰腺癌。

【0283】 IX.藥物組合物

【0284】 本發明分子(例如，抗體或雙抗體)的各種製劑可用于作為藥物組合物的“活性成分”施用。在一些實施方式中，可純(neat)施用這類分子。除了藥理學活性試劑，本發明的組合物可包含本領域熟知的適當的藥學上可接受的載體，包括賦形劑和助劑，其是相對惰性的物質，利於施用藥理學有效的物質，或利於將活性化合物加工成可藥學上用於遞送至作用位點的製劑。例如，賦形劑可給予形狀或一致性或用作稀釋劑。適當的賦形劑包括但不限於穩定劑、濕潤劑和乳化劑、改變滲透性的鹽、封裝劑、緩衝劑，和皮膚滲透增強劑。組合

物可為任何合適的形式，例如片劑、丸劑、粉劑、錠劑、囊劑、扁囊劑、酏劑、懸液、乳液、溶液、糖漿、氣霧劑(作為固體或在液體介質中)、包含，例如，多達按重量計 10%的活性化合物的軟膏、軟明膠和硬明膠膠囊、栓劑、無菌可注射溶液和無菌包裝的粉末等等，僅列出了幾種非限制性的可選項。這類組合物可通任何已知的方法製備，例如通過在無菌條件下混合活性成分與載體或賦形劑。

【0285】 適合腸胃外施用的製劑包括水溶性形式的活性化合物的水溶液，例如，水溶性鹽。另外，可施用適於油性注射懸液的活性化合物的懸液。適當的親脂溶劑或媒介包括脂肪油，例如，芝麻油或合成脂肪酸酯，例如，油酸乙酯或甘油三酯。水性注射懸液可包含增加懸浮粘度的物質，其包括，例如，羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇和/或葡聚糖。任選地，懸液也可包含穩定劑。脂質體也可用于封裝用於遞送至細胞的試劑。

【0286】 用於根據本發明全身性施用的藥物製劑可被配製為用於腸施用、腸胃外施用或局部施用。事實上，所有三種類型的製劑可同時使用以實現活性成分的全身性施用。用於腸胃外和非腸胃外藥物遞送的賦形劑以及製劑闡釋在 Remington: The Science And Practice Of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishing (2005)中。用於口服施用的適當的製劑包括硬明膠膠囊或軟明膠膠囊、藥丸、片劑，包括包衣片劑、酏劑、懸液、糖漿或吸入劑和其控釋形式。一般而言，這些試劑被配製為通過注射施用(例如，腹膜內、靜脈內、皮下、肌內等)，但是也可使用其他施用形式(例如，口服、粘膜施用等)。因此，本發明的分子(例如，抗 HER2/neu 抗體、抗 PD-1 抗體)優選地與藥學上可接受的媒介比如鹽水、林格溶液、右旋糖溶液等組合。

【0287】 也可配製藥物組合物以便在通過採用本領域已知的程式施用至患者之後，提供活性成分的快速遲釋、持續遲釋或延遲釋放。本發明組合物的

物理特徵和化學特徵可以依據施用方式和待治療的具體疾病或病症，根據本領域的技術被改良或優化。組合物可以以單位劑量的形式、在密封容器中或作為試劑盒的一部分被提供，所述試劑盒可以包含使用說明書和/或多個單位劑型。

【0288】 在具體的實施方式中，治療劑可通過以下方式被摻入到組合物中：例如，封裝在脂質體、微粒、微膠囊中、能夠表達抗體或融合蛋白的重組細胞、受體-介導內吞作用(見，例如，Wu G.Y. and Wu C.H. (1987) “Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System,” J. Biol. Chem. 262:4429-4432)、構建作為反轉錄病毒或其他載體的一部分的核酸等。在另一具體的實施方式中，治療劑作為乾燥滅菌冷凍乾燥粉末或無水濃縮物提供在密封容器中並且可用例如水或鹽水重構至適當的濃度，用於施用至受試者。

【0289】 優選地，治療劑作為乾燥的無菌冷凍乾燥粉末提供在密封容器中，單位劑量為至少 5 mg、更優選地至少 10 mg、至少 15 mg、至少 25 mg、至少 35 mg、至少 45 mg、至少 50 mg 或至少 75 mg。冷凍乾燥粉末應在其初始容器中儲存在 2°C 和 8°C 之間並且分子應在重構之後的 12 小時，優選地 6 小時、5 小時、3 小時或 1 小時內腸胃外施用。在可選的實施方式中，治療劑在指示治療劑的量和濃度的密封容器中以液體形式被提供。優選地，以至少 1 mg/ml、更優選地至少 2.5 mg/ml、至少 5 mg/ml、至少 8 mg/ml、至少 10 mg/ml、至少 15 mg/kg、至少 25 mg/ml、至少 50 mg/ml、至少 100 mg/ml、至少 150 mg/ml、至少 200 mg/ml 的分子將液體形式提供在密封容器中。

【0290】 當施用大於一種治療劑時，試劑可在相同的製劑中被配製在一起，或可被配製成單獨的組合物。因此，在一些實施方式中，特異性結合 HER2/neu 的分子和特異性結合細胞表面受體(或其配體)的、參與調節免疫檢查點的分子(例如，PD-1)在相同的藥物組合物中被配製在一起。在可選的實施方式中，分子被配製在分開的藥物組合物中。

【0291】 X.試劑盒

【0292】 組合物也可包括在試劑盒中。在非限制性方面中，試劑盒可包括包含治療劑的藥物組合物、用於施用的說明書和/或其他組分。在優選的實施方式中，試劑盒可包括即用型組合物。試劑盒的容器可包括瓶、分配器、包裝、室或其中可放置組分的其他類型的容器。容器在其表面上可包括標記。例如，標記可以是詞語、短語、縮寫、圖片或符號。容器可分配預定量的組分(例如本發明的組合物)。組合物可以以噴霧、氣溶膠或以液體形式或半固體形式分配。容器可以具有噴霧、泵和擠壓機構。在某些方面，試劑盒可以包含用於施用本發明組合物的注射器。

【0293】 在試劑盒中具有大於一種組分的情況下，它們可包裝在一起，或者，試劑盒一般還包含其中可分別放置另外組分的第二、第三或其他另外的容器。本發明的試劑盒也可包括嚴密容納組分的容器，用於商業出售。這類容器可以包括注塑成型或吹塑成型的塑膠容器，在該塑膠容器中保存期望的瓶、分配器或包裝。試劑盒還可以包括應用試劑盒元件以及使用任何其他組合物、化合物、藥劑、活性成分或試劑盒中未包含的物品的說明書。說明書可包括可實施的變型。說明書可包括例如如何施用、使用和保存產品或組合物的說明。

【0294】 XI.施用和劑量

【0295】 本發明組合物的多種施用途徑是可用的。所選的具體方式當然將取決於所選的具體治療劑、施用是用於疾病的預防、診斷還是治療、被治療的醫學病症的嚴重程度以及治療功效所需的劑量。可以使用醫學上可接受的並且產生有效水準的活性化合物而不引起臨床上不可接受的不利影響的任何施用方式來實踐本發明的方法。這樣的施用方式包括但不限於：口服、含服、舌下、吸入、經粘膜、直腸、鼻內、局部、眼部、眼周、眼內、經皮、皮下、動脈內、靜脈內、肌內、腸胃外或輸注方法。在具體的實施方案中，可能期望的是將本

發明的藥物組合物局部施用於需要治療的區域；這可以通過例如但絕不限於通過注射或借助於植入物的局部輸注實現，所述植入物是多孔的、非多孔的或凝膠狀的材料，包括膜，如矽橡膠(silastic)膜或纖維。

【0296】 如本文所用的術語“治療有效量”意指藥物組合物或方法足以顯示出有意義的患者有益效果的各活性組分的總量，所述有益效果即，慢性病況的治癒或改善、症狀的減少、這種病況治癒速率的增加或在治療組織或周圍組織中某種物質水準的可檢測的改變。當應用于單獨施用的單活性成分時，該術語是指該單獨的成分。當組合應用時，該術語是指產生治療效果的活性成分的組合量，無論其組合施用、連續施用或同時施用。

【0297】 本發明的製劑中採用的精確劑量將取決於施用的路徑和病況的嚴重性，並且應根據從業者的判斷和每個患者的情況決定，並且可通過標準臨床技術確定。有效的劑量(即，足以有效治療、預防或改善一個或多個與病症相關的症狀的劑量)可從源自體外或動物模型檢測系統的劑量回應曲線外推。因此，具體的劑量方案，即，劑量、時機和重複取決於具體的個體以及該個體的病史，以及施用的路徑。本發明分子的施用的劑量和頻率可通過增強它們的攝入和/或組織滲透，比如例如，通過脂質化，而被減少或改變。

【0298】 在優選的實施方式中，發明的治療劑以節律性(metronomic)給藥方案通過連續輸注或頻繁施用而不延長休息期(rest period)施用。這種節律性施用可以包括以恒定間隔而沒有休息期的給藥。通常，以較低的劑量使用治療劑，尤其是細胞毒性劑。這種給藥方案涵蓋在延長的時間期內相對較低劑量的長期每日施用，這種施用可以最小化毒副作用並消除休息期。在某些實施方式中，治療劑通過在下列範圍內的長期低劑量或連續輸注被遞送：約24小時至約2天、至約1周、至約2周、至約3周至約1個月至約個2月、至約3個月、至約4個

月、至約 5 個月、至約 6 個月。這類給藥方案的安排可以通過熟練的腫瘤學家優化。

【0299】 優選地，使用包括一個或多個劑量的治療方案施用本發明的分子，其中所述治療方案在 2 天內、3 天內、4 天內、5 天內、6 天內或 7 天內施用。在某些實施方式中，治療方案包括間歇地施用有效量的這類分子的劑量(例如，在給定周的第 1 天、第 2 天、第 3 天和第 4 天施用劑量並且在該周的其他天不施用分子的劑量。尤其考慮在同一周的第 5 天、第 6 天和第 7 天施用這類分子。典型地，存在 1、2、3、4、5 或更多個治療療程。每個療程可以是相同的方案或不同的方案。

【0300】 在另一實施方式中，施用劑量在方案的前四分之一、前一半或前三分之二或四分之三(例如，在 4 個療程治療的第一、第二或第個三方案中)中上升，直到實現日預防或治療有效量的分子。

【0301】 可計算施用至患者的這類分子的劑量，以用作單劑療法。可選地，分子可與其他治療性組合物聯合使用，並且向患者施用的劑量比當所述分子用作單劑療法時更低。施用至患者的這類分子(或這類分子的組合)的劑量通常是至少約 1.0 mg/kg 體重、至少約 3 mg/kg 體重、至少約 5 mg/kg 體重、至少約 10 mg/kg 體重或至少約 20 mg/kg 體重。對於本發明包括的抗體，向患者施用的劑量通常是 1.0 mg/kg 至 100 mg/kg 患者的體重。優選地，向患者施用的劑量在 1.0 mg/kg 體重和 20 mg/kg 體重之間、1.0 mg/kg 體重和 10 mg/kg 體重之間、1.0 mg/kg 體重和 5 mg/kg 體重之間、2.0 mg/kg 體重和 20 mg/kg 體重之間、或 5 mg/kg 體重和 20 mg/kg 患者的體重之間。在一個實施方式中，向患者施用的劑量在 6 mg/kg 體重和 18 mg/kg 體重之間。在另一實施方式中，向患者施用的劑量是 6 mg/kg 體重、10 mg/kg 體重、15 mg/kg 體重或 18 mg/kg 體重。基於患者在基線時的體

重施用計算的劑量。體重由基線或確定的穩定狀態(plateau)重量的顯著($\geq 10\%$)改變將提示重新計算劑量。

【0302】 可選地，向患者施用固定劑量的這類分子(或這類分子的組合)，無論體重如何。對於本發明包括的抗體，向患者施用的固定劑量通常在 50 mg 至 500 mg 之間。優選地，向患者施用的固定劑量在 50 mg 和 300 mg 之間、100 mg 和 300 mg 之間或 100 mg 和 200 mg 之間。在一個實施方式中，向患者施用的固定劑量是 200 mg。

【0303】 經驗上的考慮，比如半衰期，一般有助於確定劑量。與人免疫系統相容的抗體，比如人源化抗體或全人抗體，可用于延長抗體的半衰期並且防止抗體受到宿主免疫系統的攻擊。可確定施用的頻率並且在療法的療程內進行調整，並且是基於減少癌細胞的數量、保持癌細胞的減少、減少癌細胞的增殖，或延遲轉移的發展。可選地，持續釋放抗 HER2/neu 抗體的製劑可能是適當的。用於實現持續釋放的各種製劑和設備是本領域已知的。

【0304】 XII.聯合療法

【0305】 本發明進一步包括進一步聯合本領域技術人員已知的其他療法施用特異性結合 HER2/neu 的分子和特異性結合細胞表面受體(或其配體)的、參與調節免疫檢查點的分子(例如，PD-1)，用於治療或預防癌症、自身免疫性疾病、炎症或感染疾病，所述其他療法包括但不限於目前標準的和實驗化學療法、激素療法、生物療法、免疫療法、輻射療法或外科手術。在一些實施方式中，本發明的分子(例如本發明的抗 HER2/neu 和抗 PD-1 抗體)聯合本領域技術人員已知的治療或預防有效量的一種或多種治療劑施用，用於治療和/或預防癌症，尤其是表達 HER2/neu 的癌症。

【0306】 如本文所使用，術語“聯合(combination)”指使用大於一種治療劑。術語“聯合”的使用並不限制治療劑施用給患病症的受試者的順序，也不

是意指藥劑準確地在同一時間施用，而是意指本發明的抗體或多肽與其他試劑以某一順序並且在某一時間間隔內施用給哺乳動物，以便使本發明的抗體或多肽可以與其他試劑一起作用從而提供比它們以其他方式施用增加的有益效果。例如，各治療劑（例如，化療、放射療法、激素療法或生物療法）可以在同一時間施用或者在不同的時間點以任何順序順序地施用；然而，如果不在同一時間施用，則他們應在足夠接近的時間施用，以便提供期望的治療或預防效果。各治療劑可以以任何適當的形式並且通過任何合適的途徑單獨施用，例如一種通過口服途徑施用，另一種通過腸胃外途徑施用。

【0307】 在各個實施方式中，第一治療劑可以在將第二（或隨後）治療劑施用給患病症的受試者之前(例如，5 分鐘之前、15 分鐘之前、30 分鐘之前、45 分鐘之前、1 小時之前、2 小時之前、4 小時之前、6 小時之前、12 小時之前、24 小時之前、48 小時之前、72 小時之前、96 小時之前、1 周之前、2 周之前、3 周之前、4 周之前、5 周之前、6 周之前、8 周之前或 12 周之前)，同時或之後(例如，5 分鐘之後、15 分鐘之後、30 分鐘之後、45 分鐘之後、1 小時之後、2 小時之後、4 小時之後、6 小時之後、12 小時之後、24 小時之後、48 小時之後、72 小時之後、96 小時之後、1 周之後、2 周之後、3 周之後、4 周之後、5 周之後、6 周之後、8 周之後或 12 周之後)施用。在優選的實施方式中，兩種或更多種試劑在同一患者隨訪中施用，或在不超過 12 小時的間隔、不超過 24 小時的間隔或不超過 48 小時的間隔內施用。

【0308】 儘管，如上所討論，可採用各種給藥和施用路徑，以便根據本發明向需要其的接受受試者提供特異性結合 HER2/neu 的分子和特異性結合細胞表面受體或其配體的、調節免疫檢查點的分子的組合，但是某些組合、給藥和施用路徑尤其優選用於這類治療。在這樣的給藥和施用中，應用本發明的變異

的嵌合 4D5 抗體(例如，瑪格妥昔單抗)和本發明的抗 PD-1 抗體(例如，派姆單抗)的組合是尤其優選的。

【0309】 變異的嵌合 4D5 抗體的劑量和抗 PD-1 抗體的劑量的組合可施用一次或多次(其中這樣的聯合治療方案的每次施用在本文稱為“迴圈”)，每次包括施用 6 至 18 mg，優選地 6 mg、10 mg、15 mg 或 18 mg 的變異的嵌合 4D5 抗體/kg 患者體重，和 1 至 10 mg，優選地 1 mg、2 mg、3 mg 或 10 mg 的抗 PD-1 抗體/kg 患者體重，或固定的 200 mg 劑量的抗 PD-1 抗體。最優選地，一個迴圈將每三周($\pm$ 3 天)發生一次，直到觀察到疾病或難處理毒性的緩解。

【0310】 在尤其優選的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體(例如，瑪格妥昔單抗)和抗 PD-1 抗體(例如，派姆單抗)通過 IV 輸注施用至受試者，約每三周($\pm$ 3 天)一次，持續至少 1 個月或更長、至少 3 個月或更長或至少 6 個月或更長或至少 12 個月或更長。至少 6 個月或更長或至少 12 個月或更長或直到觀察到疾病或難處理的毒性緩解的治療持續時間是尤其優選的。在這樣的 IV 施用中，變異的嵌合 4D5 抗體和抗 PD-1 抗體可被一起或相繼施用。在尤其優選的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體和抗 PD-1 抗體通過 IV 輸注以不大於 24 小時的間隔相繼施用至受試者。在這樣的相繼施用中，變異的嵌合 4D5 抗體可在施用抗 PD-1 抗體之前或之後施用。

【0311】 尤其優選地，為受試者提供多劑量的變異的嵌合 4D5 抗體和抗 PD-1 抗體的組合。治療方案可因此包括 1 個迴圈、至少 2 個迴圈或大於 2 個迴圈、至少 3 個迴圈或大於 3 個迴圈、至少 4 個迴圈或大於 4 個迴圈、至少 5 個迴圈或大於 5 個迴圈或至少 6 個迴圈或大於 6 個迴圈。每個這樣的迴圈中的每種抗體的劑量可以相同或可與之前施用的劑量不同。因此，例如，療法可包括施用“第一”(或“載入(loading)”)劑量的變異的嵌合 4D5 抗體，隨後降低的“第二”劑量的變異的嵌合 4D5 抗體。

【0312】 在一些實施方式中，以約 6、10、15 或 18 mg/kg 的第一劑量施用變異的嵌合 4D5 抗體，隨後施用第二較低劑量，其中在施用第一劑量之後約三周 (± 3 天)施用第二劑量。例如，在變異的嵌合 4D5 抗體的第一劑量是約 18 mg/kg 體重時，第二劑量將小於 18 mg/kg 體重，(例如，約 3 mg/kg 體重、約 6 mg/kg 體重、約 8 mg/kg 體重、約 10 mg/kg 體重或約 15 mg/kg 體重)。在一些實施方式中，施用另外的隨後劑量的變異的嵌合 4D5 抗體，其中在施用第二劑量或之前的隨後劑量之後三周(± 3 天)施用隨後劑量。在一些實施方式中，以與第二較低劑量相同濃度施用隨後劑量。在優選的實施方式中，在整個治療療程中施用相同劑量的變異的嵌合 4D5 抗體。

【0313】 優選地，不以 IV 推注或 IV 團注施用抗體，但是這樣的施用通過 IV 輸注實現。因此，抗體優選地被稀釋至包括適當的稀釋劑，例如，0.9%氯化鈉的輸注袋中。因為可能發生輸注或過敏反應，所以推薦用於預防這類輸注反應的術前用藥並且應在抗體施用期間觀察防範過敏。尤其優選地，在 30 分鐘和 24 小時之間的時期內向受試者施用 IV 輸注。在某些實施方式中，如果受試者不展示不利的輸注反應的徵兆或症狀，IV 輸注優選地在 30-180 分鐘或 30-120 分鐘或 30-90 分鐘內或 60 分鐘或更短的時間段內遞送。

【0314】 因此，提供了優選的治療癌症的方法，該方法包括向需要其的受試者以約 6 至 18 mg/kg 體重的劑量施用變異的嵌合 4D5 抗體和以約 200 mg 的固定劑量施用抗 PD-1 抗體，其中每種抗體/三周(± 3 天)施用一次。在一個實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 6、10、15 或 18 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 6 mg/kg 體重和抗 PD-1 抗體以固定劑量 200 mg 施用。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 10 mg/kg 體重和抗 PD-1 抗體以固定劑量約 200 mg 施用。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 15 mg/kg 體重和抗 PD-1

抗體以固定劑量約 200 mg 施用。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 18 mg/kg 體重和抗 PD-1 抗體以固定劑量約 200 mg 施用。在任何上述實施方式中，通過 IV 輸注，在 24-小時時間段內施用變異的嵌合 4D5 抗體和抗 PD-1 抗體。在任何上述實施方式中，癌症是表達 HER2/neu 的癌症。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是派姆單抗。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是尼魯單抗。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是皮地珠單抗。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是 EH12.2H7。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是 hPD-1 mAb 2。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是 hPD-1 mAb 7。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是 hPD-1 mAb 9。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是 hPD-1 mAb 15。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體選自表 1 中提供的抗體。

【0315】 提供了另一優選的治療癌症的方法，該方法包括向需要其的受試者施用變異的嵌合 4D5 抗體，劑量為約 6 至 18 mg/kg 體重，和抗 PD-1 抗體，劑量為約 1 至 10 mg/kg，其中每種抗體每三周($\pm$ 3 天)施用一次。在一個實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 6、10、15 或 18 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，抗 PD-1 抗體施用的劑量是約 1、2、3 或 10 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 6 mg/kg 體重和抗 PD-1 抗體施用的劑量是約 1 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 6 mg/kg 體重和抗 PD-1 抗體施用的劑量是約 2 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 6 mg/kg 體

重和抗 PD-1 抗體施用的劑量是約 10 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 10 mg/kg 體重和抗 PD-1 抗體施用的劑量是約 1 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 10 mg/kg 體重和抗 PD-1 抗體施用的劑量是約 2 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 10 mg/kg 體重和抗 PD-1 抗體施用的劑量是約 10 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 15 mg/kg 體重和抗 PD-1 抗體施用的劑量是約 1 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 16 mg/kg 體重和抗 PD-1 抗體施用的劑量是約 2 mg/kg 體重。在進一步的實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體施用的劑量是約 15 mg/kg 體重和抗 PD-1 抗體施用的劑量是約 10 mg/kg 體重。在任何上述實施方式中，通過 IV 輸注在 24-小時時間段內施用變異的嵌合 4D5 抗體和抗 PD-1 抗體。在任何上述實施方式中，癌症是表達 HER2/neu 的癌症。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是派姆單抗。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是尼魯單抗。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是皮地珠單抗。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是 EH12.2H7。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是 hPD-1 mAb 2。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是 hPD-1 mAb 7。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是 hPD-1 mAb 9。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體是 hPD-1 mAb 15。在任何上述實施方式中，變異的嵌合 4D5 抗體是瑪格妥昔單抗和抗 PD-1 抗體選自表 1 提供的抗體。

【0316】 在某些實施方式中，治療劑迴圈施用至受試者。這類迴圈療法涉及施用第一試劑一段時間，隨後施用第二試劑和/或第三試劑一段時間，並且重複這種順序施用。迴圈療法可減少發展對一種或多種療法的抗性，避免或減少一種療法的副作用，和/或改善治療的效力。示例性迴圈是約每週一次，約每 10 天一次，約每兩週一次，和約每三週一次。每個迴圈可包括至少 1 周的休息、至少 2 周的休息、至少 3 周的休息。施用的迴圈的數量是約 1 至約 12 個迴圈，更通常約 2 至約 10 個迴圈，和更通常約 2 至約 8 個迴圈。

【0317】 在治療細胞增生性病症的實施方式中，本發明的分子(例如，抗 HER2/neu 抗體、抗 PD-1 抗體)與另一治療劑綴合，或進一步聯合另一治療劑施用，所述另一治療劑比如，但不限於烷基化劑(例如，氮芥或順鉑)、血管生成抑制劑、蔥環類抗生素(例如，柔紅黴素/道諾黴素或多柔比星)、抗生素(例如，放線菌素 D、博來黴素或安黴黴素)、抗體(例如，抗 VEGF 抗體比如貝伐單抗(由 Genentech, Inc. 以 AVASTIN® 出售)、抗 EGFR 抗體比如帕尼單抗(由 Amgen, Inc. 以 VECTIBIX™ 出售)或抗整聯蛋白抗體，比如那他珠單抗(由 Biogen Idec and Elan Pharmaceuticals, Inc. 以 TYSABRI® 出售))、抗代謝物(例如，氨甲喋呤或 5-氟尿嘧啶)、抗有絲分裂劑(例如，長春新城或紫杉醇)、細胞毒素(例如，細胞抑制劑或殺細胞劑)、激素治療劑(例如，選擇性雌激素受體調節劑(例如，他莫昔芬或雷洛昔芬)、芳香酶抑制劑、促黃體激素-釋放激素類似物、促孕劑、腎上腺皮質固醇、雌激素、雄激素、抗雌激素試劑、雄激素受體阻斷劑、5- α 還原酶抑制劑、腎上腺產生抑制劑等)、基質金屬蛋白酶抑制劑、放射性元素(例如， α -發射體、 γ -發射體等)或任何其他化療劑。

【0318】 適當的血管生成抑制劑的非限制性例子包括 ABT-627、血管生長抑制素(血纖維蛋白溶酶原片段)；抗血管生成 RNA 構成酶(angiozyme)；抗血管生成抗凝血酶 III；Bay 12-9566；氟草胺；貝伐單抗；BMS-275291；雙膦酸

鹽；軟骨衍生的抑制劑(CDI)；CAI；CD59 補體片段；CEP-7055；Col 3；考布他汀 A-4；內皮抑制素(膠原蛋白 XVIII 片段)；法呢基轉移酶抑制劑(FTI)；纖維蛋白片段；gro- β ；鹵夫酮；肝素酶；肝素多聚己糖片段；HMOV833；人絨膜促性腺素(hCG)；IM-862；干擾素 $\alpha/\beta/\gamma$ ；干擾素可誘導的蛋白質(IP-10)；白介素-12；絞鏈區 5 (kringle 5) (血纖維蛋白溶酶原片段)；馬立馬司他；金屬蛋白酶抑制劑(TIMPs)；2-甲氧雌二醇；MMI 270 (CGS 27023A)；MoAb IMC-1C11；新伐司他；NM-3；panzem；PI-88；胎盤核糖核酸酶抑制劑；血纖維蛋白溶酶原啟動抑制劑；血小板因數-4 (PF4)；普馬司他；催乳素 16kDa 片段；增殖蛋白相關的蛋白質(PRP)；PTK 787/ZK 222594；類視黃醇；索利司他；角鯊胺；SS 3304；SU 5416；SU6668；SU11248；四氫皮質醇-S；四硫鉬酸鹽；沙利度胺；血小板反應蛋白-1 (TSP-1)；TNP-470；轉化生長因數 β (TGF- β)；血管抑制素 (vasculostatin)；血管形成抑制素(鈣網蛋白片段)；ZD6126 和 ZD 6474。

【0319】 用於治療細胞增生性病徵的另外的抗體的非限制性例子包括針對下述的抗體：17-1A、 $\alpha v \beta 3$ 、AFP、CD3、CD18、CD20、CD22、CD33、CD44、CD52、CEA、CTLA-4、DNA 相關的蛋白質、EGF 受體、Ep-CAM、GD2-神經節苷脂、gp IIIb/IIIa、gp72、HLA-DR 10 β 、HLA-DR 抗原、IgE、神經節苷脂 GD3、MUC-1、nuC242、PEM 抗原、SK-1 抗原、腫瘤抗原 CA125、腫瘤抗原 MUC1、VEGF 和 VEGF-受體。

【0320】 XIII.實施例

【0321】 現在已經大體上描述了本發明，通過參考下述實施例，本發明將被更容易理解，通過示例的方式提供實施例而不旨在限制本發明，除非另外指出。

【0322】 實施例 1

【0323】 BIACore 親和力測定

第 112 頁，共 121 頁(發明申請專利範圍)

【0324】 使用 BIAcore 試驗(BIAcore® instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, N.J.)和相關的軟體分析洗脫的和純化抗體的結合的動力學參數。通過胺偶聯化學法(通過用 NHS/EDC 的混合物修飾羧甲基基團)，將 HER-2 固定在感測器晶片表面的四個流動室(流動室 2)之一上，使約 1000 回應單位 (RU) 的受體固定於表面上。此後，通過注射 1M Et-NH2 使未反應的活性酯“脫帽(capped off)”。當準備好適當的表面後，以 70 mL/min 的流速將 ch4D5-FcWT (野生型 Fc)、ch4D5 和曲妥珠單抗(對照)以 6.25 – 200 nM 的濃度注射在表面上，達 180 秒。

【0325】 收集到整個資料組後，整體擬合所得的結合曲線，並且使用製造商提供的電腦演算法計算速率常數和表觀平衡結合常數，如在可獲得自 BIAcore, Inc 的 BIAevaluation Software Handbook (BIAevaluation 軟體手冊) 描述的。圖 3 顯示了 SPR 分析的圖表結果，並且計算的常數提供在表 4 中。

表 4：由 BIAcore 資料計算的動力學和平衡常數			
分析物	Ka1 (1/摩爾*s)	Kd1 (1/s)	K _D (nm)
ch4D5-野生型 Fc	1.7 x 10 ⁵	~3.2 x 10 ⁻⁷ (est.)	--
ch4D5	1.1 x 10 ⁵	~6.3 x 10 ⁻⁶ (est.)	--
曲妥珠單抗	1.6 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁻⁴	0.8

【0326】 實施例 2

【0327】 凋亡

【0328】 孵育各種細胞系與 ch4D5 和 ch4D5-FcMT1 過夜。通過 FACS 分析測試凋亡，結果顯示在表 5 中。

表 5				
細胞系	實驗 1		實驗 2	
	ch4D5	ch4D5 FcMT1	ch4D5	ch4D5 FcMT1
SKBR3	35%	30%	15%	10%
JIMT	10%	10%	12-30%	10-30%
BT474	0	0	0	0

MCF-7	0	0	0	0
MDA MB 435	0	0	0	0
MDA MB 468	10%	10%	5%	0
MDA MB 361	0	0	12%	10%
MDA MB 453	20%	20%	20%	20%
MDA MB 231	0	0	0	0
ZR-75-1	0	0	0	0
A549	0	0	0	0
SKOV3	0	0	0	0
HT-29	0	0	0	0
OVCAR-3	10%	14%	5%	19%
OVCAR-8	0	0	0	0
BT-20	12%	10%	20%	15%

【0329】 實施例 3

【0330】 增殖

【0331】 併入到 DNA 中的[3H]胸苷([3H]TdR)用作 SKBR3 細胞增殖的生物化學指標，以比較本發明的各種嵌合 4D5 抗體的作用。研究 ch4D5-Ag、ch4D5 和 Ch4D-FcMT1 對 CD16-158F+和 CD16-158V+細胞的作用並且與對照相比較。結果描繪在圖 4 中。

【0332】 實施例 4

【0333】 在小鼠(乳腺癌模型)中的抗腫瘤活性

【0334】 在使用非轉基因和轉基因(hCD16A)小鼠的乳腺癌模型中研究各種抗體的抗腫瘤活性。在第 0 天，50 只 Balb/c RAG2-/-非轉基因小鼠被皮下(s.c.)注射 JMT-1 乳腺癌細胞。將小鼠分成 5 組，每組 10 只小鼠，並且每週用 ch4D5 N297Q、ch4D5-野生型 Fc、ch4D5-FcMT1、ch4D5-FcMT2 或 PBS (陰性對照)腹膜內(intraperitoneously)(IP)處理一次，持續 8 周。使用測徑器每週兩次監測腫瘤發展，並且通過下述公式評估腫瘤重量：腫瘤重量= (長度 x 寬度 2)/2。結果顯

示在圖 5 中。23 只 Balb/c RAG2^{-/-} mCD16^{-/-} hCD16A⁺轉基因小鼠在第 0 天被皮下注射 JIMT-1 乳腺癌細胞。將小鼠分成 3 組，並且每週用 ch4D5-野生型 Fc (n=8)、ch4D5-FcMT1 (n=8)或 PBS (陰性對照；n=7)腹膜內(IP)處理一次，持續 8 周。使用測徑器每週兩次監測腫瘤發展，並且通過下述公式評估腫瘤重量：腫瘤重量=(長度 x 寬度²)/2。結果顯示在圖 6。

【0335】 實施例 5

【0336】 小鼠(卵巢癌模型)中的抗腫瘤活性

【0337】 使用非轉基因和轉基因(hCD16A)小鼠，研究卵巢癌模型中各種抗體的抗腫瘤活性。來自 MacroGenics 繁殖群體的 22 只 R3^{-/-} N/N 非轉基因小鼠在第 0 天被皮下注射 SKOV-3 卵巢癌細胞。將小鼠分成 4 組，並且每週用 ch4D5 N297Q (n=5)、ch4D5-野生型 Fc (n=6)、ch4D5-FcMT1 (n=6)或 PBS (陰性對照；n=5)腹膜內(IP)處理一次，持續 8 周。使用測徑器每週兩次監測腫瘤發展，並且通過下述公式評估腫瘤重量：腫瘤重量=(長度 x 寬度²)/2。這樣的處理對生存的作用顯示在圖 7 的圖 A 中。來自 MacroGenics 繁殖群體的 32 只 R3^{-/-} N/N hCD16A⁺轉基因小鼠在第 0 天被皮下注射 SKOV-3 卵巢癌細胞。將小鼠分成 4 組，並且每週用 ch4D5 N297Q (n=8)、ch4D5-野生型 Fc (n=8)、ch4D5-FcMT1 (n=8)或 PBS (陰性對照；n=8)腹膜內(IP)處理一次，持續 8 周。使用測徑器每週兩次監測腫瘤發展，並且通過下述公式評估腫瘤重量：腫瘤重量=(長度 x 寬度²)/2。這樣的處理對生存的作用顯示在圖 7 的圖 B 中。來自 MacroGenics 繁殖群體的 96 只 mCD16^{-/-} huCD16A FoxN1^{-/-} (nu/nu)轉基因小鼠在第 0 天被皮下注射 SKOV-3 卵巢癌細胞。將小鼠分成 6 組，每組 16 只小鼠，並且每週用 ch4D5-FcMT3、ch4D5-FcMT1、ch4D5-FcMT4、ch4D5、ch4D5Ag 或 PBS (陰性對照)腹膜內(IP)處理一次，持續 8 周。使用測徑器每週兩次監測腫瘤發展，並且通過下述公式

評估腫瘤重量：腫瘤重量= (長度 x 寬度 2)/2。這樣的處理對生存的作用顯示在圖 8 中。

【0338】 實施例 6

【0339】 在各種癌細胞系中的 ADCC 試驗

【0340】 圖 9 圖解對於 HER2/neu 的各種癌細胞系的代表性免疫組織化學染色。根據它們的 HER2/neu 染色強度對細胞系進行分級，如在作為 DAKO HerceptTest™ (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)出售的 HER2/neu 測試試劑盒中說明的：缺乏 HER2/neu 染色(DAKO 分數 0)；弱 HER2/neu 染色(DAKO 分數 1+)；中度 HER2/neu 染色(DAKO 分數 2+)；和強 HER2/neu 染色(DAKO 分數 3+)。圖 A-M 示出各種細胞系，如表 6 中顯示。

表 6：圖 9 中各種癌細胞系的 DAKO 染色				
圖	細胞系	描述	位點/細胞	分數
A	MDA-MB-435	乳腺癌	4.7 x 10 ³	0
B	MDA-MB-231	乳腺癌	1.6 x 10 ⁴	0
C	A549	肺腺癌	3.4 x 10 ⁴	1+
D	OVCAR-8	卵巢癌	4.4 x 10 ⁴	1+
E	MCF-7	乳腺癌	4.5 x 10 ⁴	1+
F	BT-20	導管癌	6.9 x 10 ⁴	1+
G	HT-29	結腸癌/結直腸癌	9.4 x 10 ⁴	1+
H	ZR75-1	導管癌	1.4 x 10 ⁵	2+
I	JIMT-1	乳腺癌	2.0 x 10 ⁵	2+
J	MDA-MB-453	乳腺癌	2.8 x 10 ⁵	3+
K	BT-474	導管癌	2.0 x 10 ⁶	3+
L	SKBR-3	乳腺癌	3.0 x 10 ⁶	3+
M	mSKOV-3	卵巢癌	4.0 x 10 ⁶	3+

【0341】 測試若干 ch4D5 抗體，包括具有 Fc 變體結構域的 ch4D5 抗體，在癌細胞系中介導 ADCC 的能力，所述抗體包括 ch4D5-FcMT1、ch4D5-FcMT2、ch4D5-FcMT3、ch4D5-FcWT (野生型 Fc)、ch4D5 N297Q 和曲妥珠單抗(作為對照)。來自驗證試驗的資料(SR ≤ 20% MR，AICC ≤ 50% MR)報告在表 7 中，其

中只有當模型符合>20%的最大裂解時，EC50 評估才視為是有效的。通過詢問針對 Fc 優化的抗體獲得的最佳擬合值與針對 Fc 野生型 ch4D5 抗體獲得的最佳擬合值經平方和 F 檢驗是否是統計學上有差異的，進行 EC50 和最大裂解參數的比較。也將資料與 S 形(sigmoidal)劑量回應模型擬合，如圖 10-13 中所顯示。

表 7：各種細胞系中的 ADCC 試驗						
細胞系	抗體	EC50 (ng/mL)	p	最大裂解 (%)	p	圖 (圖)
MDA-MB-435	ch4D5-FcMT1	ND	-	5	NS	10 (A)
	ch4D5-FcMT2	ND	-	13	NS	
	ch4D5-FcMT3	ND	-	7	NS	
	ch4D5-FcWT	ND	-	7	-	
	曲妥珠單抗	ND	-	7	NS	
MDA-MB-231	ch4D5-FcMT1	4	NS	27	NS	10 (B)
	ch4D5-FcMT2	12	NS	29	NS	
	ch4D5-FcMT3	?	?	24	NS	
	ch4D5-FcWT	9	-	27	-	
	曲妥珠單抗	7	NS	22	NS	
A549	ch4D5-FcMT1	14	-	34	<0.01	11 (A)
	ch4D5-FcMT2	21	-	24	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	> 100	-	23	<0.01	
	ch4D5-FcWT	ND	-	6	-	
	曲妥珠單抗	ND	-	5	NS	
OVCAR-8	ch4D5-FcMT1	14	<0.01	43	<0.01	11 (B)
	ch4D5-FcMT2	21	<0.05	40	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	26	NS	36	<0.01	
	ch4D5-FcWT	57	-	16	-	
	曲妥珠單抗	37	NS	13	NS	
MCF-7	ch4D5-FcMT1	4	<0.05	55	<0.01	11 (C)
	ch4D5-FcMT2	9	NS	51	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	8	NS	48	<0.01	
	ch4D5-FcWT	23	NS	32	-	
	曲妥珠單抗	9	-	21	NS	
BT-20	ch4D5-FcMT1	42	<0.01	66	<0.01	11 (D)
	ch4D5-FcMT2	78	<0.01	62	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	67	<0.01	55	<0.01	
	ch4D5-FcWT	>100	-	33	-	
	曲妥珠單抗	>100	NS	25	NS	
HT-29	ch4D5-FcMT1	0.4	-	43	<0.01	11 (E)

表 7：各種細胞系中的 ADCC 試驗						
細胞系	抗體	EC50 (ng/mL)	p	最大裂 解 (%)	p	圖 (圖)
	ch4D5-FcMT2	0.5	-	44	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	1	-	38	<0.01	
	ch4D5-FcWT	ND	-	13	-	
ZR75-1	ch4D5-FcMT1	14	<0.01	78	<0.01	12 (A)
	ch4D5-FcMT2	20	NS	67	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	26	<0.01	63	<0.01	
	ch4D5-FcWT	38	-	38	-	
	曲妥珠單抗	ND	-	23	<0.01	
JIMT-1	ch4D5-FcMT1	8	NS	73	<0.01	12 (B)
	ch4D5-FcMT2	7	<0.05	70	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	10	NS	65	<0.01	
	ch4D5-FcWT	22	-	43	-	
	曲妥珠單抗	10	NS	34	NS	
MDA-MB-453	ch4D5-FcMT1	3	<0.05	59	<0.01	13 (A)
	ch4D5-FcMT2	4	<0.05	58	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	6	NS	57	<0.01	
	ch4D5-FcWT	11	-	45	-	
	曲妥珠單抗	3	<0.05	31	<0.01	
BT-474	ch4D5-FcMT1	3	<0.01	73	<0.01	13 (B)
	ch4D5-FcMT2	3	<0.05	58	NS	
	ch4D5-FcMT3	4	<0.05	71	NS	
	ch4D5-FcWT	11	-	64	-	
	曲妥珠單抗	7	NS	60	NS	
SKBR-3	ch4D5-FcMT1	0.4	<0.01	64	NS	13 (C)
	ch4D5-FcMT3	0.8	<0.01	61	NS	
	ch4D5-FcWT	6	-	62	-	
mSKOV-3	ch4D5-FcMT1	1.2	NS	71	<0.01	13 (D)
	ch4D5-FcMT2	7	<0.05	43	<0.05	
	ch4D5-FcMT3	0.9	<0.05	56	NS	
	ch4D5-FcWT	3	-	58	-	

【0342】 實施例 7

【0343】 針對共刺激或檢查點靶的單克隆抗體對 T 細胞增殖的活性

【0344】 在 allo-MLR 試驗的背景下，誘導 T 細胞回應 HLA-錯配

(Latchman, Y.E.等(2004) “PD-L1-Deficient Mice Show That PD-L1 On T-Cells,

Antigen-Presenting Cells, And Host Tissues Negatively Regulates T-Cells.” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(29):10691-10696 ; Wang, W.等(2008) “PD-L1/PD-1 Signal Deficiency Promotes Allogeneic Immune Responses And Accelerates Heart Allograft Rejection,” Transplantation 86(6):836-44)或促有絲分裂/藥理學刺激而增殖。已知靶向共刺激分子的激動劑抗體通過強化 T 細胞信號傳導和穩定促進或驅動 T 細胞效應子功能的轉錄因數而誘導增生性應答(Melero, I.等(2013) “Agonist Antibodies to TNFR Molecules That Costimulate T and NK Cells,” Clin. Cancer Res. 19(5):1044-1053)。類似地，靶向負調節 T-細胞應答的關鍵檢查點分子的拮抗抗體(檢查點抑制劑)可通過保持 T 細胞信號傳導和效應子功能而誘導增生性應答，從而改善抗腫瘤免疫性(Capece, D.等(2012) “Targeting Costimulatory Molecules to Improve Antitumor Immunity,” J. Biomed. Biotech. 2012:926321)。針對共刺激或檢查點靶的單克隆抗體回應同種異體抗原對增殖的作用可容易在短期混合淋巴細胞(allo-MLR)反應中通過併入 3H-胸苷而測量。為了解決針對檢查點抑制劑的抗體增強增殖的能力，產生抗 PD-1 或抗 LAG-3 mAb，將其純化，並且在啟動 allo-MLR 試驗時，以 20、10、5、2.5 和 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 外源添加(圖 14)。在 5-6 天結束時，平鋪的 96 孔用 3H-胸苷進行脈衝，並且培養 18 小時，以測量增殖。評估針對人 PD-1、LAG-3 和 CTLA-4 的若干基準抗體它們回應同種異體抗原刺激而增強 T 細胞增殖的能力。如圖 15 中顯示，與 IgG1 同種型對照抗體或包含應答物和刺激劑的對照孔相比，在 allo-MLR 試驗開始時添加 PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558)、PD-1 mAb 2 (MK-3475 ; Merck, 蘭羅利珠單抗)或 PD-1 mAb 3 (EH12.2H7 ; Dana Farber)誘導強的 T 細胞增殖。僅包含輻射的刺激劑細胞的孔顯示沒有增殖。儘管觀察到了劑量依賴性增生性應答，但是與 PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558)、PD-1 mAb 2 (MK-3475 ; Merck, 蘭羅利珠單抗)或 PD-1 mAb 3 (EH12.2H7 ; Dana Farber)相比，PD-1 mAb 4 (CT-011 ; CureTech, BAT-1)顯示最

小的增殖。用 LAG-3 mAb 1 (25F7；BMS-986016，Medarex/BMS)也觀察到了輕微的劑量依賴性增生性應答，其與 Yervoy®伊匹單抗、抗 CTLA-4 mAb (Bristol-Myers Squibb)比較類似。

【0345】 實施例 8

【0346】 瑪格妥昔單抗和派姆單抗的劑量遞增研究

【0347】 進行劑量遞增研究，以確定與約 200 mg 固定劑量的派姆單抗聯合施用的瑪格妥昔單抗的遞增劑量的最大耐受劑量(MTD)或最大施用劑量(MAD) (如果沒有定義MTD)。這隨後可以是組擴展階段(cohort expansion phase)，以進一步定義與在劑量遞增研究中確定的瑪格妥昔單抗劑量的組合的安全性和初始效力。每 3 周施用瑪格妥昔單抗和派姆單抗一次。在同一天施用兩種試劑，首先施用派姆單抗，隨後施用瑪格妥昔單抗。療法的每個迴圈限定為 3 周，其中瑪格妥昔單抗和派姆單抗在第 1 天施用。可在研究期間進行腫瘤評估，首選地，在每兩個迴圈的治療結束時進行腫瘤評估(即，每 6 週一次[迴圈 2、4、6 等結束時])。

【0348】 可在組患者中，以與 200 mg 派姆單抗聯合的兩個相繼升高的劑量，約 10 mg/kg 體重和約 15 mg/kg 體重，評估瑪格妥昔單抗。如果測定在第一劑量組中超過了 MTD，則可使用劑量遞降組，以評估與 200 mg 派姆單抗聯合的瑪格妥昔單抗(6 mg/kg)的較低劑量。可在研究的劑量遞增部分期間探究瑪格妥昔單抗的較高劑量(例如，18 mg/kg)。

【0349】 對於組擴展階段，招募另外的患者，並且使其以從研究的劑量遞增階段確定的 MTD (或 MAD)接收瑪格妥昔單抗聯合 200 mg 派姆單抗。

【0350】 本說明書提到的所有出版物和專利通過參考併入本文，達到如同具體和單獨指出每個單個出版物或專利申請通過參考以其整體併入的相同程度。儘管已經結合其具體實施方式描述了本發明，但是應當理解，其能夠被進一步

修改，並且本申請旨在覆蓋大體上根據本發明原理並且包括與本公開的偏離的本發明的任何變型、用途或改變，只要在本發明所屬領域的已知或習慣實踐內並且如可應用至本文之前所闡釋的本質特徵。

【符號說明】

【0351】 無

【序列表】

<110> 宏觀基因有限公司
Wigginton, Jon Marc
Pandya, Naimish Bharat
Lechleider, Robert Joseph
Koenig, Scott
Bonvini, Ezio

<120> 治療癌症的聯合療法

<130> PCT/US2016/036608

<150> US 62/175,039
<151> 2015-06-12

<150> US 62/211,109
<151> 2015-08-28

<150> US62/242,640
<151> 2015-10-16

<160> 88

<170> PatentIn 3.5 版本

<210> 1
<211> 645
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼優選的變異嵌合 4D5 抗體的輕鏈的多核苷酸

<400> 1
gacatcgtga tgaccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc 60

atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca 120

ggacattctc ccaaactget gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat 180

cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac ctteggaggg300

ggtaccaagg tggagatcaa acgtacgggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgccca360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taactttetat420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag645

- <210> 2
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 優選的變異嵌合 4D5 抗體的輕鏈
- <400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly 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> 3
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> 小家鼠(Mus musculus)

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> 鼠科 4D5 抗體的輕鏈可變結構域

<400> 3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Asn Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合 4D5 VL 區

<400> 4

1093267820-0

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 Glu 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> 6
- <211> 1353
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 編碼具有野生型 Fc 區的嵌合 4D5 重鏈的多核苷酸
- <400> 6

caggttcagc tgcagcagtc tggcctgag ctggtgaagc caggggcctc actcaagttg	60
tctgttacag cttctggctt caacatcaaa gacacctata tccactgggt gaaacagagg	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggaagg atttatecta ccaatggcta tactagatat	180
gacccaaagt tccaggacaa ggccactatc acagcagaca catcctcaa cacagcctac	240
ctgcaagtca gccgcctgac atctgaggac actgccgtct attactgctc ccggtgggga	300
ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcaggag cctccgtgac cgtgagctcc	360
gcctccacca agggeccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	420

ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtectca	540
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc	660
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cactgaact cctgggggga	720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggtt gaatggcaag	960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag	1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccg	1200
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1260
cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1320
cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa tga	1353

- <210> 7
- <211> 450
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 具有野生型 Fc 區的嵌合 4D5 重鏈
- <400> 7

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

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

第 9 頁，共 76 頁(序列表)

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
Gly Lys		
450		

- <210> 8
- <211> 1353
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 編碼具有 FcMT1 變異 Fc 區的變異嵌合 4D5 抗體的重鏈的多核苷酸

<400> 8	
caggttcagc tgcagcagtc tggccctgag ctggtgaagc caggggcctc actcaagttg	60
tcctgtacag cttctggett caacatcaaa gacacctata tccactgggt gaaacagagg	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggaagg atttatecta ccaatggeta tactagatat	180
gacccaaagt tccaggacaa ggccactatc acagcagaca catcctccaa cacagcctac	240

ctgcaagtca gccgcctgac atctgaggac actgccgtct attactgctc ccggtgggga	300
ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcagggag cctccgtgac cgtgagctcc	360
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggccaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	480
tggaaactcag gcgcctgac cageggcgctg cacaccttcc cggtgttcct acagtcctca	540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc	600
tacatctgca acgtgaatca caagccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc	660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	720
ccgtcagtct tctcttacc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccgaccct	780
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac	900
agcacgctcc gtgtggtcag catctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacce tgccccatc ccgggatgag	1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggccaag gcttctatcc cagcgacatc	1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctctcgtg	1200
ctggactccg acggctcctt cttctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga	1353

- <210> 9
- <211> 450
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>
<223> 具有 FcMT1 變異 Fc 區的變異嵌合 4D5 抗體的重鏈

<400> 9

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

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

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser 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 Ala Ser 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	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
210					215					220					
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
225	230					235					240				
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Leu	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	Pro	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg
290					295					300					
Val	Val	Ser	Ile	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	Pro	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 Leu 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

Gly Lys
450

- <210> 10
- <211> 1353
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 編碼具有 FcMT2 變異 Fc 區的變異嵌合 4D5 抗體的重鏈的多核苷酸
- <400> 10
- caggttcagc tgcagcagtc tggccctgag ctggtgaagc caggggcctc actcaagttg 60

tccgtgtacag cttcttggett caacatcaaa gacacctata tccactgggt gaaacagagg	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggaagg atttatecta ccaatggcta tactagatat	180
gacccaaagt tccaggacaa ggccactatc acagcagaca catcctccaa cacagcctac	240
ctgcaagtca gccgcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtct ccggtgggga	300
ggggacggct tctatgtctat ggactactgg ggtcaggag cctccgtgac cgtgagctcc	360
gcctccacca agggeccatc ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg	420
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg	480
tggaaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgttcct acagtcctca	540
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	600
tacatctgca acgtgaatca caagcccage aacaccaagg tggacaagag agttgagccc	660
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cgtgggggga	720
ccgtcagtct tectcttacc cccaaaaccc aaggacacce tcatgatctc ccggaccct	780
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac	900
agcacgctcc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggtt gaatggcaag	960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc	1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacce tgccccatc ccgggatgag	1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctctcgtg	1200
ctggactccg acggtctctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1260
cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag	1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga	1353

<210> 11
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有 FcMT2 變異 Fc 區的變異嵌合 4D5 抗體的重鏈

<400> 11

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

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

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser 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 Ala Ser 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					180				
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro				
180					185					190					195				
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys				
195					200					205					210				
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp				
210					215					220					225				
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Val	Gly	Gly				
225					230					235					240				
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Leu	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile				
245					250					255					260				
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu				
260					265					270					275				
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His				
275					280					285					290				
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Pro	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg				
290					295					300					305				
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	Pro	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	Leu	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				
Gly	Lys															
	450															

- <210> 12
- <211> 1353
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>

<223> 編碼具有 FcMT3 變異 Fc 區的變異嵌合 4D5 抗體的多核苷酸

<400> 12

caggttcagc tgcagcagtc tggccctgag ctggtgaagc caggggcctc actcaagttg	60
tctgttacag cttcttgctt caacatcaaa gacacctata tccactgggt gaaacagagg	120
cctgaacagg gcctggaatg gattggaagg atttatecta ccaatggeta tactagatat	180
gacccaaagt tccaggacaa ggccactatc acagcagaca catcctccaa cacagcctac	240
ctgcaagtca gccgcctgac atctgaggac actgccgtct attactgctc ccggtgggga	300
ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcagggag cctccgtgac cgtgagctcc	360
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	420
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	480
tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtcctca	540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc	660
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccc cctgcccag cacctgaact cctgggggga	720
ccgtcagtct tcctcttacc cccaaaaccc aaggacacc tcattgatct ccggaccct	780
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac	900
agcacgctcc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgeccccatc ccgggatgag	1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga1353

- <210>13

<211>450

<212>PRT

<213>人工序列
- <220>

<223>具有FcMT3變異Fc區的變異嵌合4D5抗體

- <220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(1)..(450)

<223>具有FcMT3變異Fc區的變異嵌合4D5抗體

<400>13

GlnValGlnLeuGlnGlnSerGlyProGluLeuValLysProGlyAla

151015

SerLeuLysLeuSerCysThrAlaSerGlyPheAsnIleLysAspThr

202530

TyrIleHisTrpValLysGlnArgProGluGlnGlyLeuGluTrpIle

354045

GlyArgIleTyrProThrAsnGlyTyrThrArgTyrAspProLysPhe

505560

GlnAspLysAlaThrIleThrAlaAspThrSerSerAsnThrAlaTyr

65707580

LeuGlnValSerArgLeuThrSerGluAspThrAlaValTyrTyrCys

					85						90						95	
Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln			
					100						105						110	
Gly	Ala	Ser	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						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	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp			
					210						215						220	
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly			
					225						230						235	240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Leu	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			

第 22 頁，共 76 頁(序列表)

	435	440	445
Gly Lys			
450			
<210>	14		
<211>	288		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(1).. (288)		
<223>	人 PD-1		
<400>	14		
Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln			
1	5	10	15
Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp			
	20	25	30
Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp			
	35	40	45
Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val			
	50	55	60
Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala			
65	70	75	80
Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg			
	85	90	95

Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg
100				105				110							
Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu
115				120				125							
Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val
130				135				140							
Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro
145				150				155				160			
Arg	Pro	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly
165				170				175							
Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys
180				185				190							
Ser	Arg	Ala	Ala	Arg	Gly	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro
195				200				205							
Leu	Lys	Glu	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Tyr	Gly
210				215				220							
Glu	Leu	Asp	Phe	Gln	Trp	Arg	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Val	Pro
225				230				235				240			
Cys	Val	Pro	Glu	Gln	Thr	Glu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Val	Phe	Pro	Ser	Gly
245				250				255							
Met	Gly	Thr	Ser	Ser	Pro	Ala	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Pro	Arg
260				265				270							

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 15
<211> 113
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (113)
<223> PD-1 mAb 1 的重鏈可變結構域

<400> 15

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (5)
<223> PD-1 mAb 1 的 CDRH1

<400> 16

Asn Ser Gly Met His
1 5

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (17)
<223> PD-1 mAb 1 的 CDRH2

<400> 17

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

Gly

<210> 18

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

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

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> PD-1 mAb 1 的 CDRL1

<400> 20

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

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 1 的 CDRL2

<400> 21

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

15

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (9)
<223> PD-1 mAb 1 的 CDRL3

<400> 22

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
15

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (120)
<223> PD-1 mAb 2 的重鏈可變結構域

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
151015

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
202530

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
354045

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (5)
<223> PD-1 mAb 2 的重鏈可變結構域 CDR1

<400> 24

Asn Tyr Tyr Met Tyr
1 5

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (7)
<223> PD-1 mAb 2 的輕鏈可變結構域 CDR2

<400> 29

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (9)
<223> PD-1 mAb 2 的輕鏈可變結構域 CDR3

<400> 30

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 31
<211> 121
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1).. (121)
<223> PD-1 mAb 3 的重鏈可變結構域

<400> 31

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

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

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

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (5)
<223> PD-1 mAb 3 的重鏈可變結構域 CDR1

<400> 32

Ser Ser Trp Ile His
1 5

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (17)
<223> PD-1 mAb 3 的重鏈可變結構域 CDR2

<400> 33

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

Asp

<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (13)
<223> PD-1 mAb 3 的重鏈可變結構域 CDR3

<400> 34

<223> PD-1 mAb 3 的輕鏈可變結構域 CDR3

<400> 38

Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 39

<211> 117

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(117)

<223> PD-1 mAb 4 的重鏈可變結構域

<400> 39

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

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (5)
<223> PD-1 mAb 4 的重鏈可變結構域 CDR1

<400> 40

Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (16)
<223> PD-1 mAb 4 的重鏈可變結構域 CDR2

<400> 41

Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15

<210> 42

<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (8)
<223> PD-1 mAb 4 的重鏈可變結構域 CDR3

<400> 42

Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 43
<211> 106
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (106)
<223> PD-1 mAb 4 的輕鏈可變結構域

<400> 43

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(10)
<223> PD-1 mAb 4 的輕鏈可變結構域 CDR1

<400> 44

Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 4 的輕鏈可變結構域 CDR2

<400> 45

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser

15

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> PD-1 mAb 4 的輕鏈可變結構域 CDR3

<400> 46

Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
15

<210> 47
<211> 120
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> 鼠科 4D5 抗體的重鏈可變結構域

<400> 47

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
15105

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
202530

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
354045

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser 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 Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

- <210> 48
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 人源化的 4D5 抗體的重鏈可變結構域

<400> 48

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	Val	Trp	Gly	Gln								
			100					105					110										
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser																
		115					120																
<210> 49																							
<211> 217																							
<212> PRT																							
<213> 智人																							
<220>																							
<221> MISC_FEATURE																							
<222> (1).. (217)																							
<223> IgG1 Fc 區																							
<220>																							
<221> MISC_FEATURE																							
<222> (217).. (217)																							
<223> Xaa 是 Lys 或不存在																							
<400> 49																							
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys								
1				5					10					15									
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val								
			20					25					30										

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

- <210> 50
- <211> 216
- <212> PRT
- <213> 智人

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1).. (216)
- <223> 示例性人 IgG2 的 CH2-CH3 結構域

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (216).. (216)
- <223> Xaa 是 Lys 或不存在

- <400> 50

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly

<220>	
<221>	MISC_FEATURE
<222>	(1).. (217)

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

- <210> 52
- <211> 217
- <212> PRT
- <213> 智人

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1).. (217)
- <223> 示例性人 IgG4 的 CH2-CH3 結構域

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (217).. (217)
- <223> Xaa 是 Lys 或不存在

- <400> 52

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

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

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

	195	200	205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa			
210	215		
<210>	53		
<211>	116		
<212>	PRT		
<213>	小家鼠		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(1)..(116)		
<223>	PD-1 mAb 5的重鏈可變結構域		
<400>	53		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe			
	20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
	85	90	95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (5)
<223> PD-1 mAb 5的重鏈可變結構域 CDR1

<400> 54

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (17)
<223> PD-1 mAb 5的重鏈可變結構域 CDR2

<400> 55

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

Gly

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (7)
<223> PD-1 mAb 5 的重鏈可變結構域 CDR3

<400> 56

Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (112)
<223> PD-1 mAb 5 的輕鏈可變結構域

<400> 57

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 58
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> PD-1 mAb 5的輕鏈可變結構域 CDR1

<400> 58

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> PD-1 mAb 5的輕鏈可變結構域 CDR2

<400> 59

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1).. (9)

<223> PD-1 mAb 5 的輕鏈可變結構域 CDR3

<400> 60

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 61

<211> 119

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1).. (119)

<223> PD-1 mAb 6 的重鏈可變結構域

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (48).. (48)

<223> Xaa 是 Ile 或 Ala

<400> 61

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Xaa
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (5)
<223> PD-1 mAb 6 的重鏈可變結構域 CDR1

<400> 62

Ser Tyr Trp Met Asn
1 5

<400> 65

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

110

Ala Ala Ser Asn Xaa Gly Ser

15

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (9)
<223> PD-1 mAb 6 的輕鏈可變結構域 CDR3

<400> 68

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr
15

<210> 69
<211> 119
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (119)
<223> PD-1 mAb 7 的重鏈可變結構域

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12).. (12)
<223> Xaa 是 Val 或 Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35).. (35)
<223> Xaa 是 Ser 或 Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (48).. (48)
<223> Xaa 是 Val 或 Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (86).. (86)
<223> Xaa 是 Leu 或 Ala

<400> 69

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 70

<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (5)
<223> PD-1 mAb 7 的重鏈可變結構域 CDR1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> Xaa 是 Gln 或 Arg

<400> 70

Ser Tyr Leu Val Xaa
1 5

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (17)
<223> PD-1 mAb 7 的重鏈可變結構域 CDR2

<400> 71

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

Gly

<210> 72
<211> 10

<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (10)
<223> PD-1 mAb 7 的重鏈可變結構域 CDR3

<400> 72

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

<210> 73
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (107)
<223> PD-1 mAb 7 的輕鏈可變結構域

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31).. (31)
<223> Xaa 是 Asn 或 Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50).. (50)
<223> Xaa 是 Asn 或 Asp

<400> 73

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 Glu Asn Ile Tyr Xaa Tyr
20 25 30

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

Tyr Xaa Ala Lys Thr Leu Ala Ala 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 His His Tyr Ala Val Pro Trp
85 90 95

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

- <210> 74
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> 小家鼠

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1).. (11)
- <223> PD-1 mAb 7 CDRL1

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (8).. (8)
- <223> Xaa 是 Asn 或 Ser

- <400> 74

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Xaa Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (7)
<223> PD-1 mAb 7 CDRL2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> Xaa 是 Asn 或 Asp

<400> 75

Xaa Ala Lys Thr Leu Ala Ala
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (9)
<223> PD-1 mAb 7 CDRL3

<400> 76

Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 77
<211> 117
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(117)
<223> PD-1 mAb 8的重鏈可變結構域

<400> 77

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg 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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 78
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (5)
<223> PD-1 mAb 8 CDRH1

<400> 78

Ser Tyr Leu Ile Ser
1 5

<210> 79
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (17)
<223> PD-1 mAb 8 CDRH2

<400> 79

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

Gly

<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (8)
<223> PD-1 mAb 8 CDRH3

<400> 80

Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 81
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> PD-1 mAb 8的輕鏈可變結構域

<400> 81

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 Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala 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 His His Tyr Ala Val Pro Trp
85 90 95

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

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (11)
<223> PD-1 mAb 8 CDRL1

<400> 82

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (7)
<223> PD-1 mAb 8 CDRL2

<400> 83

Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (9)
<223> PD-1 mAb 8 CDRL3

<400> 84

Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 85
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> kappa CL 結構域

<400> 85

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

- <210> 86
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> 智人

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1)..(110)
- <223> IgG4 CH1 結構域和穩定化的鉸鏈

- <400> 86

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110

<210> 87
<211> 218
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (218)
<223> PD-1 mAb 6-ISQ 的完整輕鏈

<400> 87

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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115					120					125						
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	
130					135					140						
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	
145					150					155					160	
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	
165					170					175						
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	
180					185					190						
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	
195					200					205						
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
210					215											

<210> 88
<211> 445
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (445)
<223> PD-1 mAb 6-ISQ 的完整重鏈

<400> 88

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

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
		20					25					30			
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45			
Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Phe	Ala	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	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	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	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro
	210					215					220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
225					230					235					240
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
				245					250					255	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
			260					265					270		
Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
		275					280					285			
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
	290					295					300				
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
305					310					315					320
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				325					330					335	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
			340					345					350		
Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
		355					360					365			

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種變異的嵌合4D5抗體和特異性結合PD-1的分子的組合之用途，其係用於製備治療需要其的受試者中的表達HER2/neu的胃癌或胃腸癌之藥物，其中：

(a)所述變異的嵌合4D5抗體包括：包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的輕鏈可變結構域和包含變異的Fc區的重鏈，該變異的Fc區相對於包括野生型IgG1 Fc區的相當的抗體呈現增強的ADCC活性，其中所述重鏈包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列；和

(b)特異性結合PD-1的所述分子是選自由尼魯單抗、派姆單抗或抗體PD-1 mAb 6-ISQ組成的組的抗PD-1抗體或是其PD-1結合片段，該PD-1結合片段包含變異的Fc區，所述變異的Fc區包括L234A、L235A、D265A、N297Q或N297G的至少一個修飾，其中所述編號是如Kabat中EU索引的編號。

【第2項】如請求項1所述的用途，其中所述抗PD-1抗體或其抗原結合片段包含IgG4 Fc區。

【第3項】如請求項2所述的用途，其中所述抗PD-1抗體或其抗原結合片段包括包含穩定化的取代的變異的IgG4鉸鏈。

【第4項】如請求項3所述的用途，其中所述抗PD-1抗體或其抗原結合片段包括包含根據Kabat編號的S228P取代的變異的IgG4鉸鏈。

【第5項】如請求項1所述的用途，其中特異性結合PD-1的所述分子是抗PD-1抗體尼魯單抗或其抗原結合片段。

【第6項】如請求項1所述的用途，其中特異性結合PD-1的所述分子是抗PD-1抗體派姆單抗或其抗原結合片段。

【第7項】如請求項1所述的用途，其中特異性結合PD-1的所述分子是抗PD-1抗體PD-1 mAb 6-ISQ或其抗原結合片段。

【第8項】如請求項1-7中任一項所述的用途，其中：

(a)所述變異的嵌合4D5抗體用於以每三周約6-18 mg/kg的劑量施用，並且特異性結合PD-1的所述分子用於以每三周約50-500 mg的固定劑量施用；或者

(b)所述變異的嵌合4D5抗體用於以每三周約6-18 mg/kg的劑量施用，並且特異性結合PD-1的所述分子用於以每三周約1-10 mg/kg的劑量施用。

【第9項】如請求項1所述的用途，其中所述變異的嵌合4D5抗體用於以每三周選自6 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg和18 mg/kg的劑量施用。

【第10項】如請求項1所述的用途，其中特異性結合PD-1的所述分子用於以選自1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg和約200 mg的固定劑量的劑量施用。

【第11項】如請求項9所述的用途，其中特異性結合PD-1的所述分子用於以選自1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg和約200 mg的固定劑量的劑量施用。

【第12項】如請求項1-7或9-11中任一項所述的用途，其中所述變異的嵌合4D5抗體和特異性結合PD-1的所述分子用於在單藥物組合物中同時施用。

【第13項】如請求項8所述的用途，其中所述變異的嵌合4D5抗體和特異性結合PD-1的所述分子用於在單藥物組合物中同時施用。

【第14項】如請求項1-7或9-11中任一項所述的用途，其中所述變異的嵌合4D5抗體和所述抗PD-1抗體或其抗原結合片段用於在分開的藥物組合物中在彼此的24小時時間內施用。

【第15項】如請求項8所述的用途，其中所述變異的嵌合4D5抗體和特異性結合PD-1的所述分子用於在分開的藥物組合物中在彼此的24小時時間內施用。

【第16項】如請求項1-7或9-11中任一項所述的用途，其中所述變異的嵌合4D5抗體和所述抗PD-1抗體或其抗原結合片段中的一者用於在施用所述變異的嵌合4D5抗體和所述抗PD-1抗體或其抗原結合片段中的另一者之後至少24小時或更長時間施用。

【第17項】如請求項10所述的用途，其中所述變異的嵌合4D5抗體和所述抗PD-1抗體或其抗原結合片段中的一者用於在施用所述變異的嵌合4D5抗體和所述抗PD-1抗體或其抗原結合片段中的另一者之後至少24小時或更長時間施用。

【第18項】如請求項1所述的用途，其中所述組合進一步包括第三治療劑，其中所述第三治療劑是抗血管生成劑、抗腫瘤劑、化療劑或細胞毒性劑。

【第19項】如請求項18所述的用途，其中所述第三治療劑與所述變異的嵌合4D5抗體和/或所述抗PD-1抗體或其抗原結合片段同時施用。

【第20項】如請求項18所述的用途，其中所述第三治療劑與所述變異的嵌合4D5抗體和/或所述抗PD-1抗體或其抗原結合片段分開施用。

【發明圖式】

		10		20		30
鼠科	DIVMTQSHKF	MSTSVGDRVS	ITCKASQDVN			
嵌合	DIVMTQSHKF	MSTSVGDRVS	ITCKASQDVN			
人源化	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQDVN			
		40		50		60
鼠科	TAVAWYQQKP	GHSPKLLIYS	ASFRYTGVDP			
嵌合	TAVAWYQQKP	GHSPKLLIYS	ASFRYTGVDP			
人源化	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS	ASFLESGVPS			
		70		80		90
鼠科	RFTG N RSSTD	FTFTISSVQA	EDLAVYYCQQ			
嵌合	RFTG S RSSTD	FTFTISSVQA	EDLAVYYCQQ			
人源化	RFSG S RSSTD	FTLTISLQP	EDFATYYCQQ			
		100		109		
鼠科	HYTTPPTFGG	GTKLEIKRA	SEQ ID NO:3			
嵌合	HYTTPPTFGG	GTKVEIKRT	SEQ ID NO:4			
人源化	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRT	SEQ ID NO:5			

圖 1

MT1	QVQLQQSGFELVKPGASLKLSTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRY	60
MT2	QVQLQQSGFELVKPGASLKLSTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRY	60
MT3	QVQLQQSGFELVKPGASLKLSTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRY	60
WT	QVQLQQSGFELVKPGASLKLSTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRY	60
MT1	DPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDVAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGASVTVSS	120
MT2	DPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDVAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGASVTVSS	120
MT3	DPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDVAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGASVTVSS	120
WT	DPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSEDVAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGASVTVSS	120
MT1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	180
MT2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	180
MT3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	180
WT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	180
MT1	GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG	240
MT2	GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG	240
MT3	GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG	240
WT	GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG	240
MT1	PSVFL L PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP P EEQYN	300
MT2	PSVFL L PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP P EEQYN	300
MT3	PSVFL L PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP P EEQYN	300
WT	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN	300
MT1	ST L RVVSVLT I TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE	360
MT2	ST L RVVSVLT I TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE	360
MT3	ST L RVVSVLT I TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE	360
WT	STYRVVSVLT I TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE	360
MT1	LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	420
MT2	LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	420
MT3	LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	420
WT	LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	420
MT1	QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	450
MT2	QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	450
MT3	QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	450
WT	QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	450

SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 7

圖 2

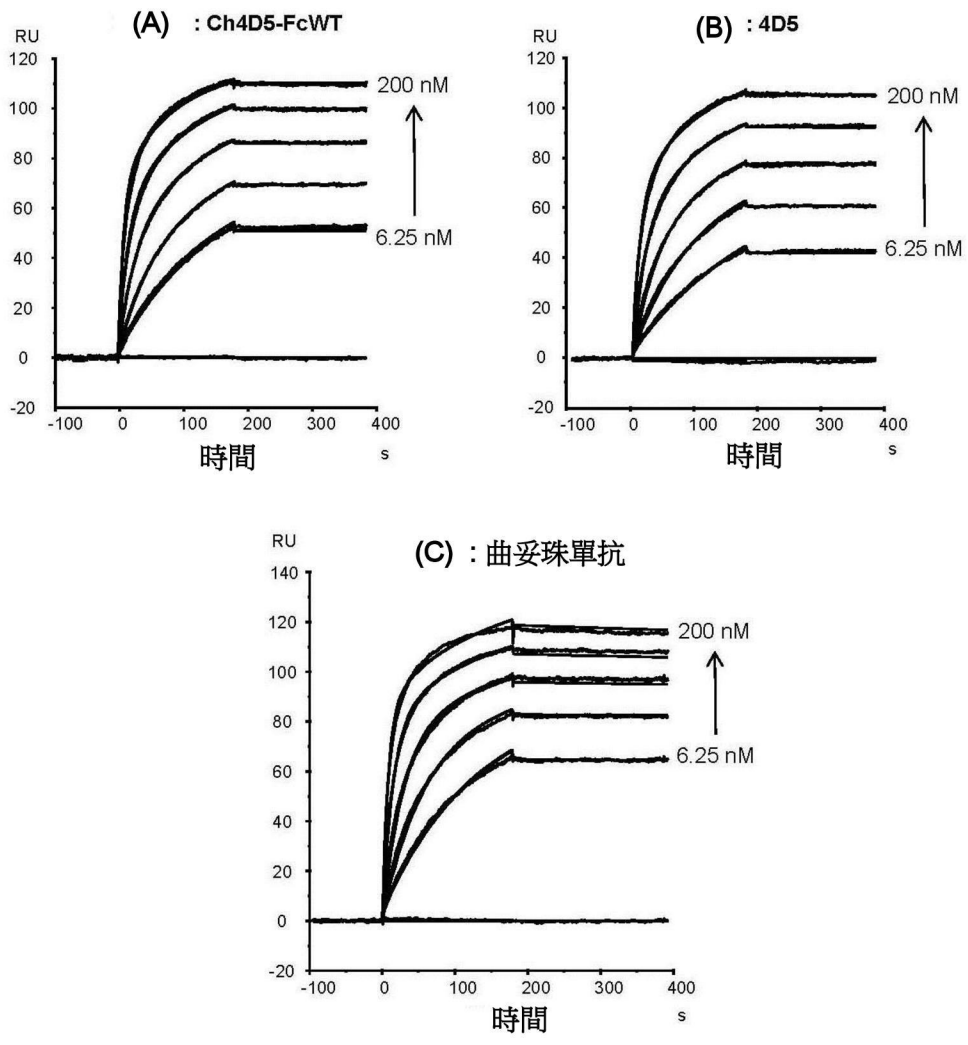


圖 3

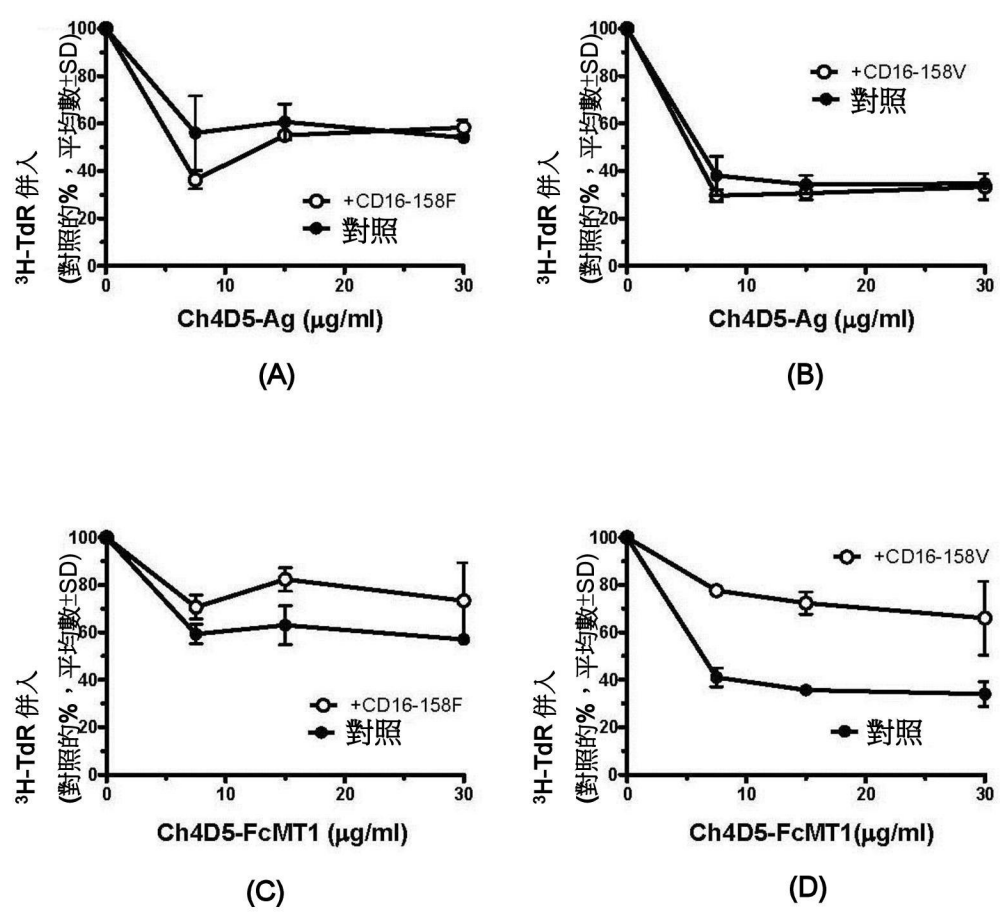


圖 4

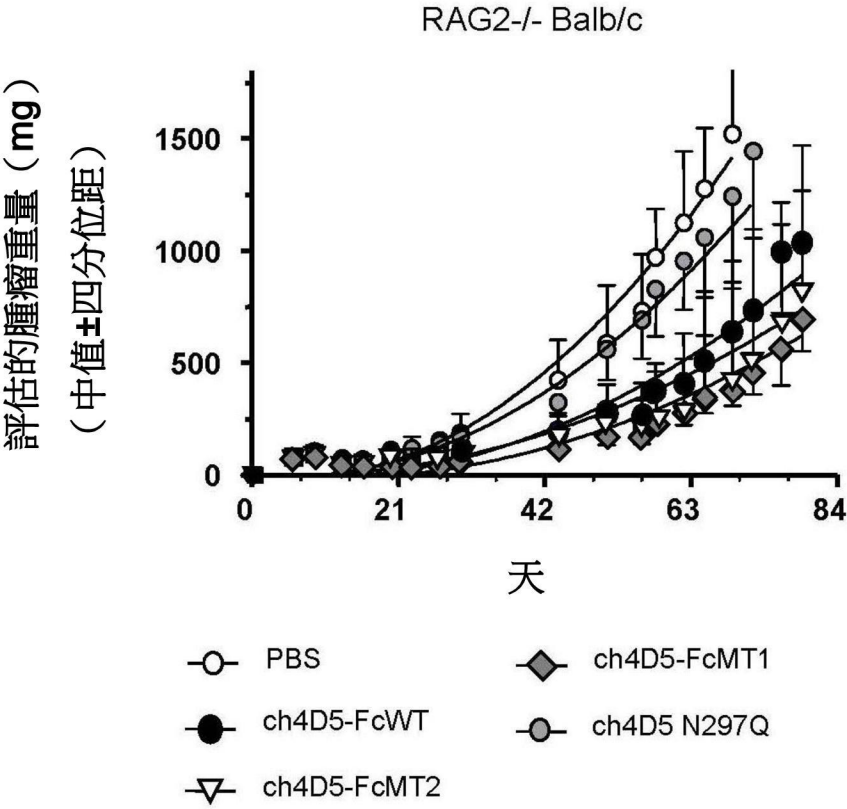


圖 5

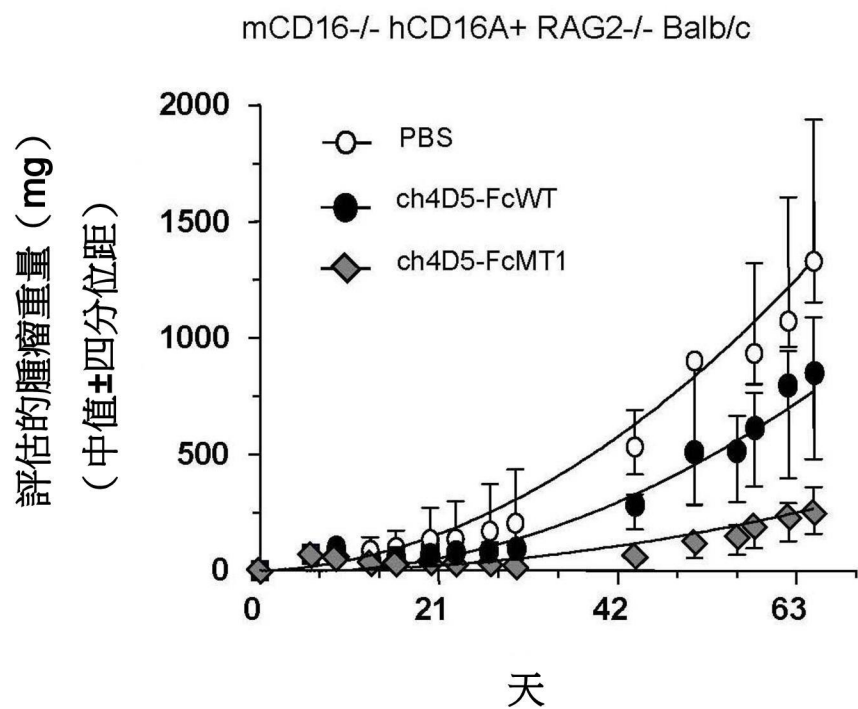


圖 6

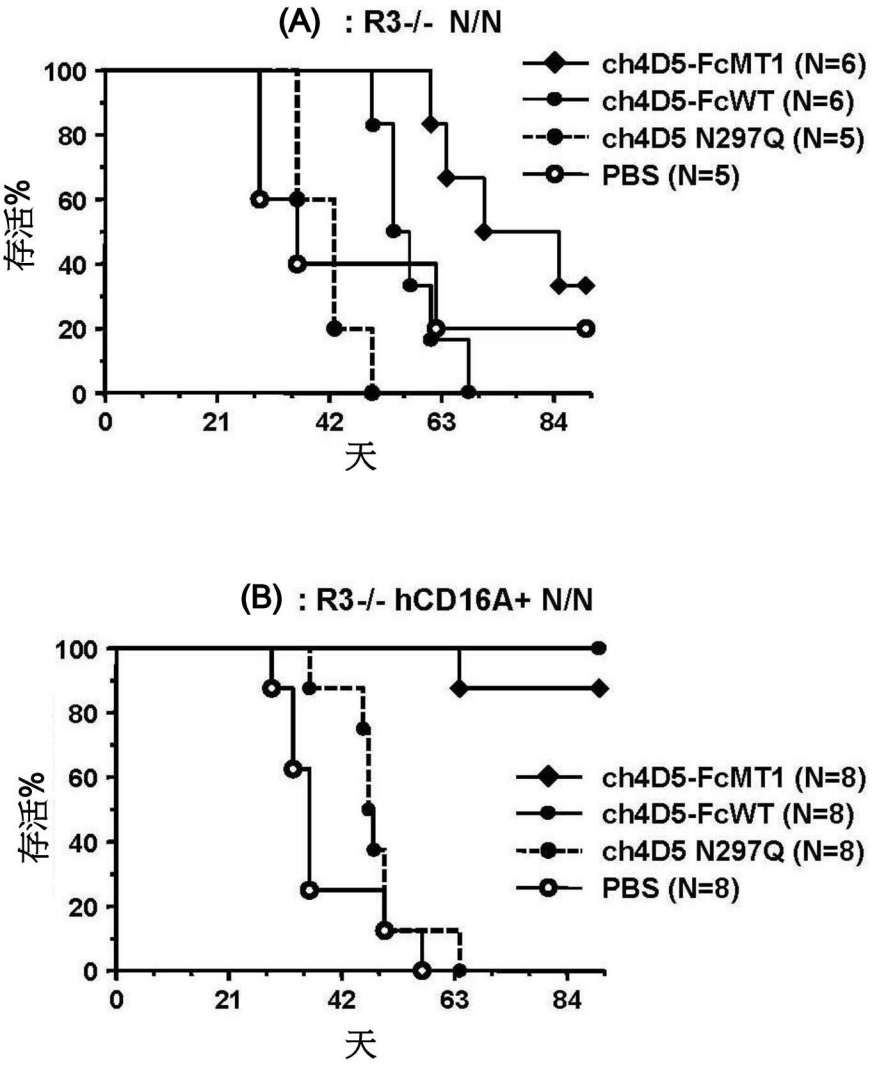


圖 7

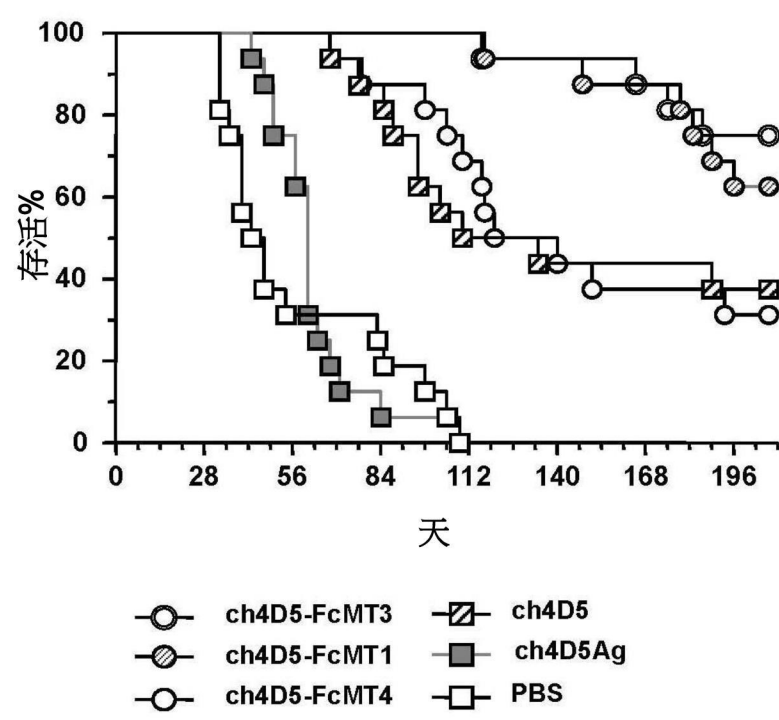


圖 8

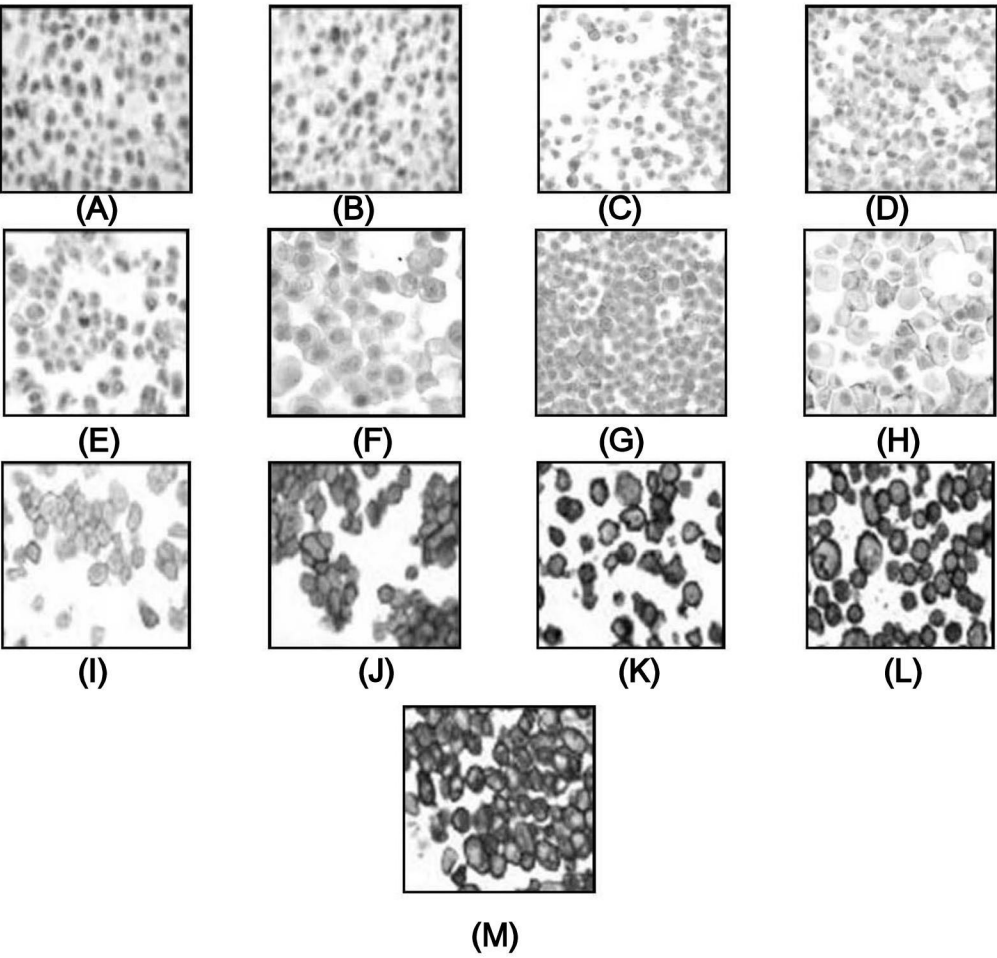


圖 9

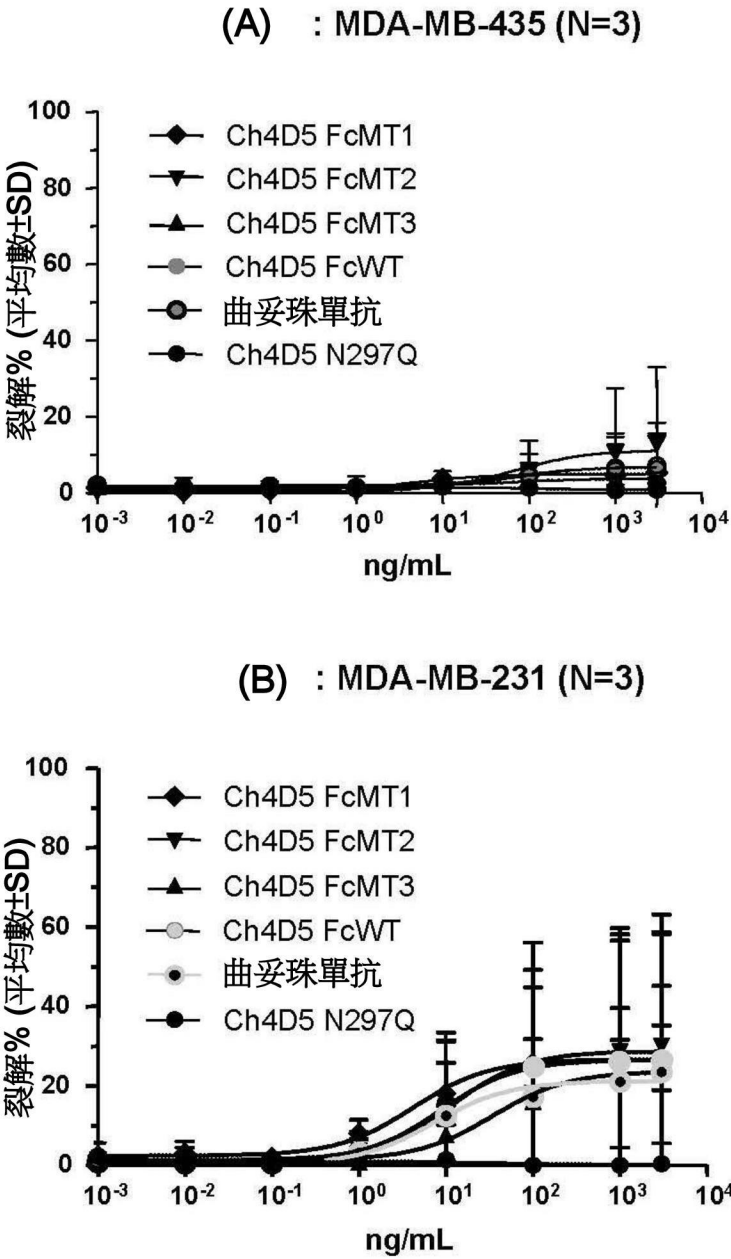


圖 10

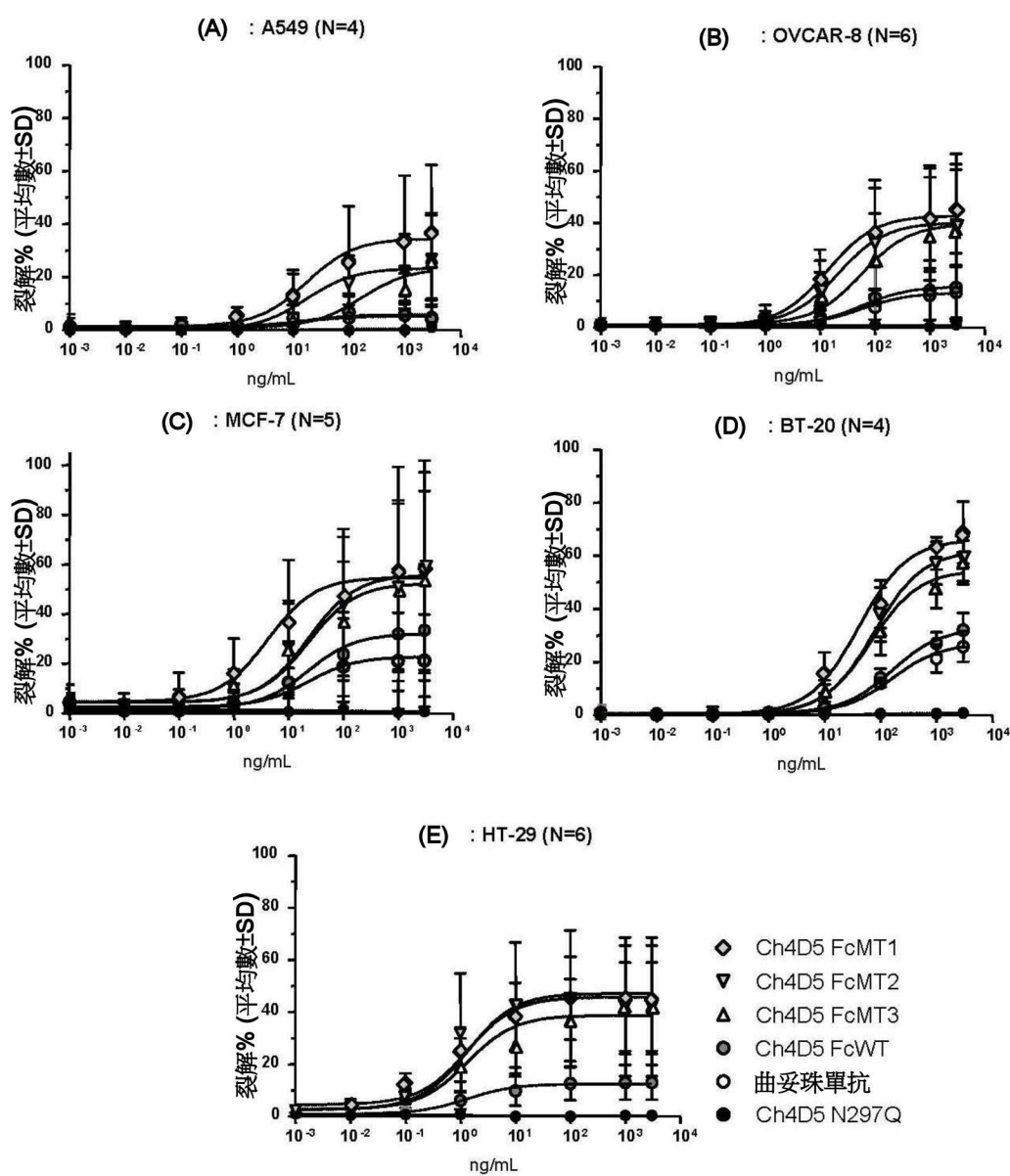


圖 11

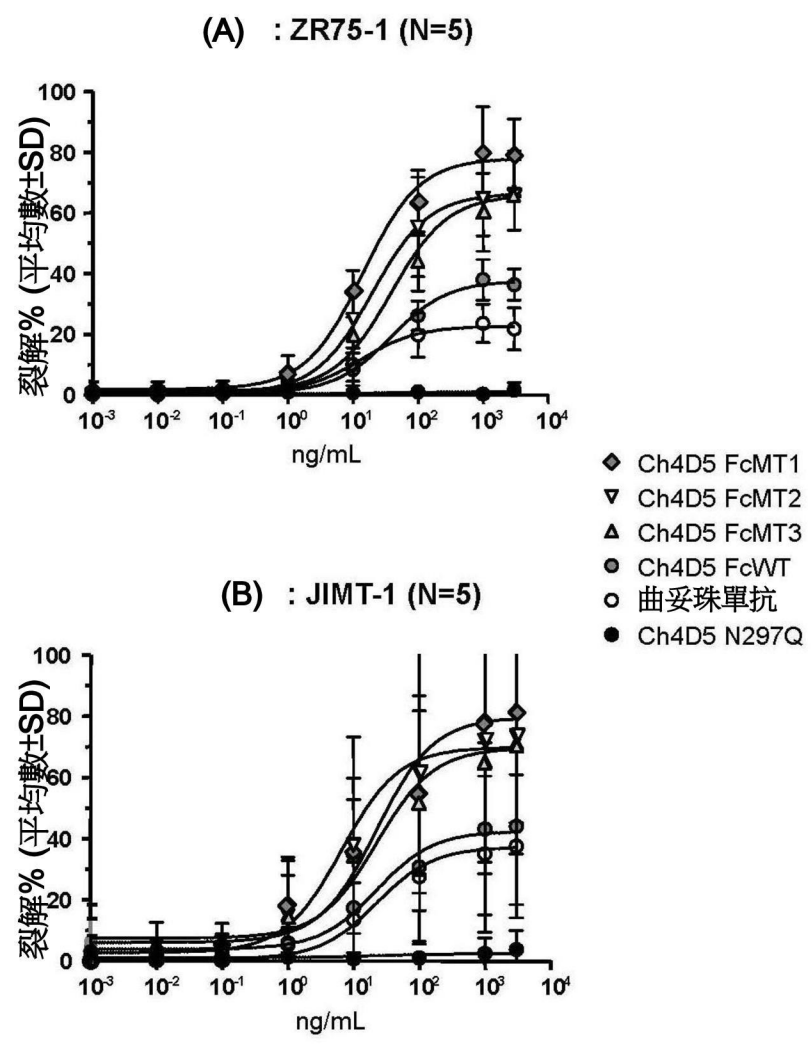


圖 12

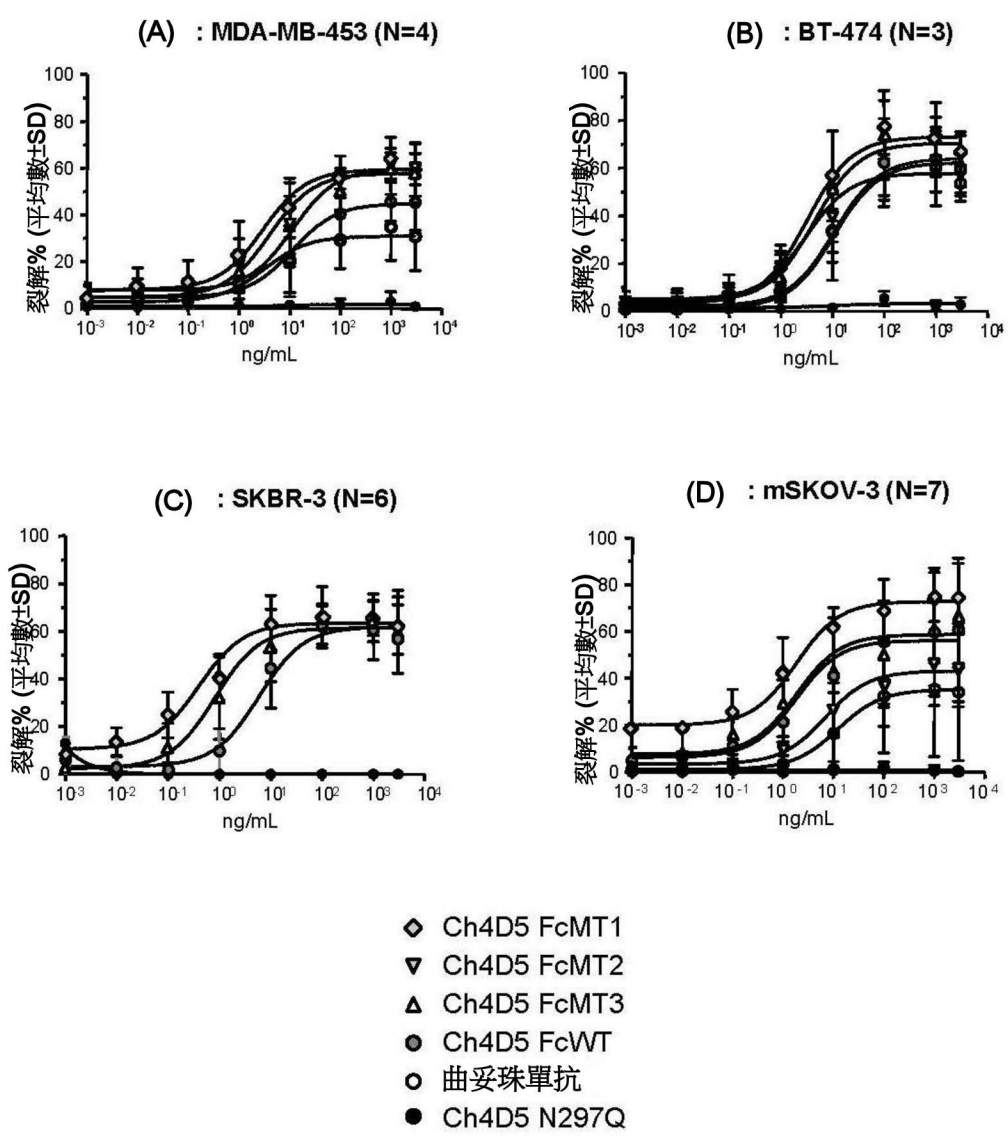
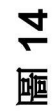


圖 13



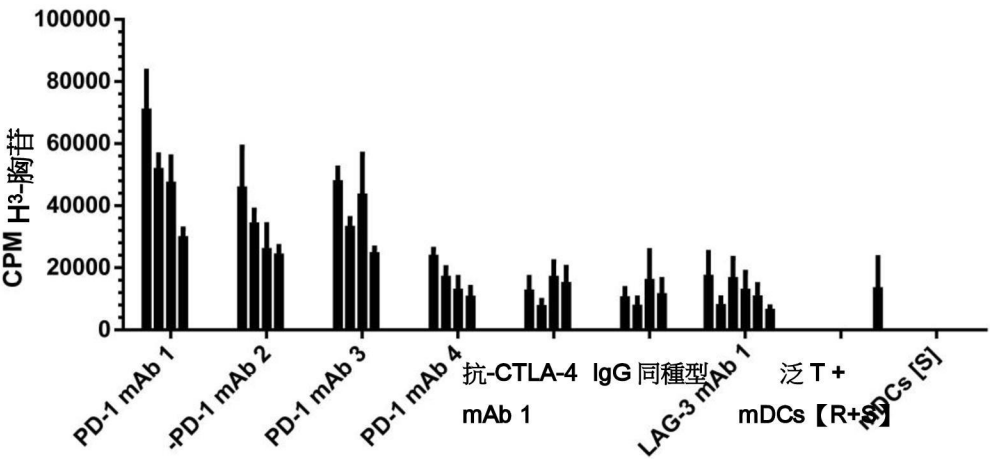


圖 15